

栽培漁業センター技報

第3号

平成17年4月

目次

クルマエビの成熟と水温の関係 崎山一孝・清水大輔	1
富山県水産試験場で海洋深層水を用いて飼育したマダラ親魚の日長処理による採卵時期の早期化 渡辺研一・堀田和夫・桑田 博	4
海産魚における電気麻酔効果の検討 二階堂英城・尾花博幸・升間主計・武部孝行・井手健太郎・手塚信弘・難波憲二	9
同一ロットで異なったサイズのニシン種苗を水温制御により確保する方法の検討 福永恭平・鈴木重則	12
飼育したババガレイの変態異常と仔魚の成長および発育 有瀧真人・熊谷厚志	20
イセエビふ化フィロソーマの絶食耐性について 村上恵祐・西田航介	25
マダイを対象とした閉鎖系循環飼育-I 生物ろ過装置の機能向上について 山本義久・鴨志田正晃・岩本明雄	30
流速環境の変化がクエ仔魚の摂餌および生残に与える影響 本藤 靖・齋藤貴行・照屋和久・與世田兼三	37
クロマグロ仔魚の生残に及ぼす照度と水流の効果 手塚信弘・升間主計・小磯雅彦・武部孝行・二階堂英城・井手健太郎	41
低塩分海水および淡水によるワムシの細菌数の減少効果 小磯雅彦	45
アルテミアふ化幼生の生菌数を減少させる試み 森田哲男	49
若狭湾の天然ヒラメ当歳魚におけるネオヘテロボツリウムの感染状況 山田達哉・本藤 靖	51
ズワイガニ種苗生産試験における薬浴による飼育水の細菌数の動態 森田哲男・小金隆之	57
ポビドンヨード剤がオニオコゼ卵のふ化と生菌数に及ぼす影響 太田健吾・堀田卓朗・渡辺研一	61
ブリのウイルス性腹水症原因ウイルスの微量検出方法の開発 西岡豊弘	68
ブリの戻し交配家系を用いたイリドウイルス感染試験 長倉義智・西村卓哉・大原恵理子・佐藤 純・虫明敬一・岡本信明	72

クルマエビの成熟と水温の関係

崎山一孝・清水大輔
(百島栽培漁業センター)

クルマエビ *Penaeus japonicus* の種苗生産技術はほぼ完成し、全国の種苗生産施設での生残率は、疾病が発生した事例を除くと40~60%で安定している¹⁾。しかし、採卵用の親エビには未だ天然で漁獲された個体を使用されているため、採卵および種苗生産の開始時期は、天然海域の成熟個体の出現状況に左右され、計画的な種苗生産を行う上で特に問題となっている。そのため、天然海域における成熟個体の出現状況を把握し、その出現時期を推定する技術の開発が必要である。

しかし、天然では、同一群のクルマエビの成熟状況や生息海域の環境を連続して詳細に調査することは困難である。そこで、親クルマエビの養成技術の開発を行っている素掘池において、クルマエビの成熟度と池環境の時期的変化について周年調査し、両者の関係解明を試みた。

なお、成熟度については、外観から容易に測定可能で生殖腺指数との相関がある卵影比^{*1}を、池の環境では、成熟に大きく影響すると考えられる水温を測定し、これらの項目を用いて成熟個体の出現時期推定の可能性を検討した。

材料と方法

試験に供したクルマエビは、上浦栽培漁業センターで天然親エビから採卵して生産した種苗を、百島栽培漁業センターの素掘池で2002年7月から約2年間養成したものである。養成期間中、クルマエビの成長と成熟度を調査し、池の水温を測定した。成長の調査では毎月1~2回、体長と体重を測定した。成熟度の調査では、クルマエビの背部から卵巣の影(卵影)が確認された1歳エビと2歳エビについて、2003年3月から2004年7月まで毎月1回、卵影比(卵影最大幅/第1腹節幅×100)を測定した。なお、卵影比の増加が著しい4~6月は4~5回/月の頻度で測定した。池の水温調査では、マルチモニタリングシステム(HORIBA)を用いて、飼育期間中ほぼ毎日測定した。

結 果

素掘池の水温 2003年1月~2004年7月まで(1歳時~2歳時まで)の素掘池の水温変化を図1に示した。水温の季節変動を見ると、1歳時の1~2月は6~10℃と低いのが3月から徐々に上昇し、8~9月には約30℃に達した。9月以降は徐々に水温が低下し、2歳時の1月には10℃以下となった。その後、水温は3月から上昇したが、上昇傾向は1歳時と異なり、5月は18℃(1歳時では14℃)、7月は25℃(同22℃)となり、同時期の水温は1歳時より高い傾向が認められた。

成長 図2に素掘池で飼育したクルマエビの成長を示した。収容時の稚エビの平均体長は30mmであったが、当歳での成長が著しく、12月には136mmに達した。その後、12月から翌年3月まで成長は停滞するが、1歳エビでは4月以降再び増加し、8月には165mm、12月には175mmに達した。2歳エビの成長は当歳や1歳エビに比べ緩やかであり、取り揚げ直前の6月の平均体長は約180mmであった。

卵影比 クルマエビの背面から卵巣の影は、1歳時の4月以降から確認できた。図3に1歳~2歳エビの卵影比の時期的変化を示した。1歳エビでは4~7月と9~10月に、2歳エビでは3~5月に卵影比の増加が確認され、それぞれ6月下旬、4月下旬に卵影比が40%以上に達した。1歳エビの9~10月には卵影比の増加が確認されたが、卵影比40%以上を示す個体は確認されなかった。

続いて、卵巣の発達と水温との関係を見るために、卵影比の増加が認められた期間、すなわち1歳エビでは4月から7月まで、2歳エビでは3月から5月までの積算水温(℃・日)とその期間の卵影比との関係を図4に示した。両者の関係は次式で示せた。

$$1 \text{ 歳エビ} : CT = 51.2 \times RE - 558 \quad (R^2 = 0.8389)$$

$$2 \text{ 歳エビ} : CT = 23.3 \times RE - 152 \quad (R^2 = 0.9227)$$

CT: 積算水温(℃・日) RE: 卵影比(%)

この関係式から卵影比1%の増加に要する積算水温を求めると、1歳エビでは51.2℃・日であるのに対し、2歳エビでは23.3℃・日と1/2以下であった。また、卵影比が40%に達するまでの積算水温は、1歳エビで1,490℃・日、2歳エビで780℃・日となった。

^{*1} 崎山一孝・清水大輔・田原大輔(2004)卵影によるクルマエビの成熟度評価。平成16年度日本水産学会大会講演要旨集, pp. 156.

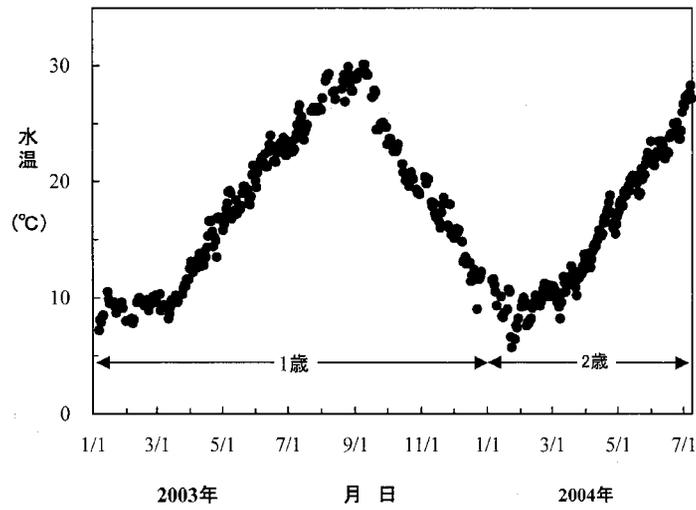


図1 クルマエビの養成試験を行った素掘池の水温変化

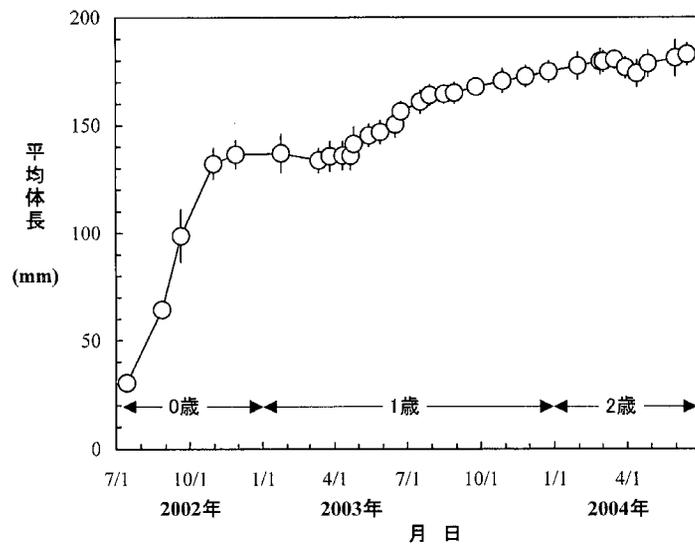


図2 素掘池で飼育したクルマエビの成長

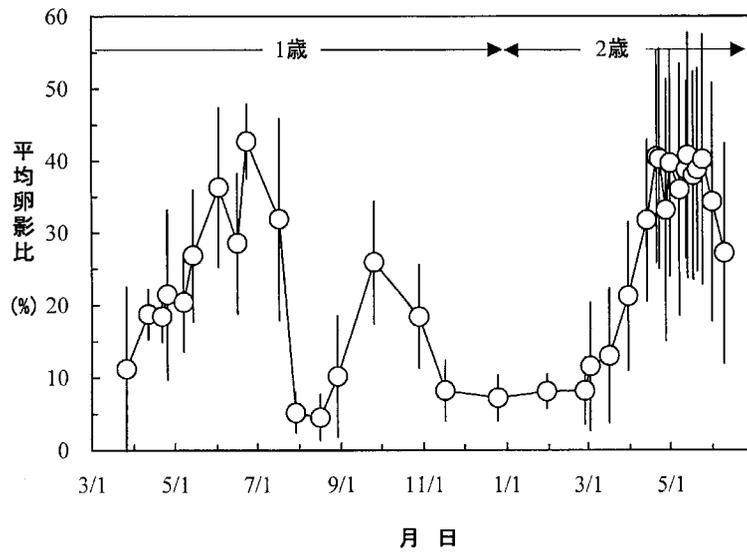


図3 素掘り池で飼育したクルマエビの卵影比の変化

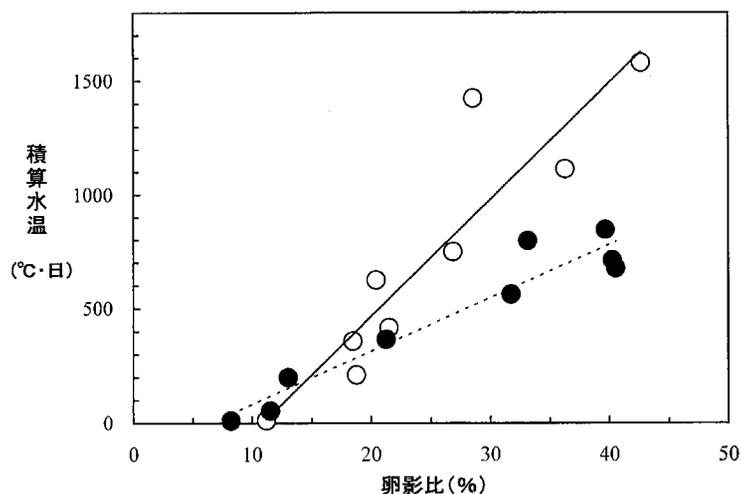


図4 クルマエビの卵影比と積算水温との関係
○:1歳エビ ●:2歳エビ

考 察

クルマエビの成熟度の指標として用いた卵影比は、生殖腺指数との相関があることを報告した^{*1}。そのため、素掘池での卵影比の変化はクルマエビの生殖腺指数の季節変化を表していると言える。一方、素掘池は外海水が直接流入するため、池の水温は地先の天然海と同様な変化を示し、池内では多種にわたるプランクトンやベントスが確認されている^{2, 3}。これらの生物は外海から流入、定着したものであり、クルマエビは与えた配合飼料だけではなくこれらの生物を天然餌料として摂餌していると考えられる。したがって、素掘池の水温と餌生物の組成は天然環境と近似しているため、池で飼育したクルマエビの成熟状況は天然エビとほぼ同様であると推察される。また、このことは素掘池での成熟エビの出現時期が天然と同時期（崎山 未発表）であることからうかがえる。

そこで、卵影比の変化からクルマエビの成熟状況をみると、1歳エビでは4月から、2歳エビでは、それよりも約1カ月早く3月から成熟が始まり、年齢により成熟の開始時期が異なることがわかった。成熟の進行に影響する要因として日長（長日化）と水温（昇温）の変化が挙げられるが、日長には年による違いはないことから、成熟開始時期が異なった要因とは考えられない。一方、素掘池の水温の上昇傾向は1歳時と2歳時では異なり、年による水温の違いが成熟開始時期を変動させる要因である可能性が高い。しかし、積算水温と卵影比との関係を見ると、1歳時と2歳時では卵影比1%増加に要する積算水温に顕著な差が認められ、同じ水温条件下では2歳エビの方が成熟の進行が早いことから、年による水温の違いは成熟開始時期を左右する主要因とは考えられない。2歳エビの成熟

個体の出現時期が1歳エビより早まる現象は、過去の飼育事例でも観察されており、これは成熟に関連する生理機構の年齢による差によるものであると考えられる。同様に、天然クルマエビにおいても2歳エビの成熟開始が1歳エビよりも早いため、成熟エビは漁期の初期ほど大きく¹⁾、後期は小型個体が多くなると推察される。

年齢により成熟状況が異なる原因は不明であるが、本試験により成熟と水温との関係が明らかとなり、成熟個体の出現時期を推定するための関係式を得ることができた。今回の試験では、クルマエビが成熟を開始する水温について情報を得ることはできなかったが、大型エビでは3月、小型エビでは4月の成熟状況とその後の積算水温から成熟個体の出現時期をある程度推定することが可能であると考えられる。今後、より正確に成熟個体の出現を推定するには、陸上水槽を用いた飼育試験を行い、成熟が開始する水温を把握するとともに、成熟に影響を及ぼす要因のひとつである日長（長日）の関与について調査を進める必要がある。

文 献

- 1) 水藤勝喜（1995）愛知県一色産クルマエビ種苗生産用親エビについて－I，漁獲と供給の現状。栽培技研，24，9-17.
- 2) 足立純一・高橋庸一（2002）模擬放流試験に用いる素掘池の環境－I，水底質と出現プランクトン。栽培技研，29，107-120.
- 3) 足立純一・河原郁恵・高橋庸一（2003）模擬放流試験に用いる素掘池の環境－II，ベントスの出現状況。栽培技研，30，111-119.

富山県水産試験場で海洋深層水を用いて飼育したマダラ親魚の 日長処理による採卵時期の早期化

渡辺 研一*1・堀田和夫*2・桑田 博*3

(*1 古満目栽培漁業センター, *2 富山県水産試験場, *3 栽培漁業部)

マダラ *Gadus macrocephalus* は、本邦では日本海北部および太平洋北部からオホーツク海に分布する大型の冷水性魚類である。日本海における本種の資源は減少傾向にあり、栽培漁業等による資源増大が望まれている。能登島栽培漁業センター（以下、当センター）では、前身の社団法人日本栽培漁業協会能登島事業場の開所当初から本種の親魚養成、種苗生産技術の開発を重要な課題として取り組んできた。

現在、当センターで種苗生産試験に使用するマダラの受精卵は、漁獲された産卵直前の天然親魚から得ている。したがって、受精卵を得る時期は天然親魚の漁獲時期に左右され、受精卵数も漁獲尾数あるいは入手尾数に左右される。また、マダラ仔稚魚を健全に飼育できる水温は12℃以下とされており¹⁾、当センターが位置する能登半島周辺では4月末までが飼育可能な時期となる。栽培漁業の推進に当たっては、放流魚の移動範囲を推定することが大きな課題の一つであり、そのために外部標識を付した種苗を放流し、再捕報告により明らかとする方法が広く用いられている。

しかし、今までの技術開発結果では、当海域で漁獲される親魚から得た受精卵を用いて種苗生産を行った場合、種苗のサイズは4月末で全長3cmが最大である。このため、当センターで生産するマダラ稚魚に外部標識を付すためには、天然における産卵期より早期

に採卵して飼育可能期間を長くし、大型の種苗を生産する必要がある。

早期採卵のためには、養成した親魚の成熟を促進させる必要がある。マダラの天然親魚は、産卵期以外は水深200m以深に分布すると推定され²⁾、その水温は3℃程度³⁾であることから、マダラ養成親魚の確保には低水温での養成が必要となる。富山県水産試験場（以下、富山水試）は海洋深層水（以下、深層水）の取水設備を有し、3℃の海水の取水が可能である。そこで、マダラの親魚養成と採卵技術の開発を目的に、当センターでは1998年から富山水試と共同研究を開始した。

現在、魚類の成熟コントロールには水温変動、日長処理、ホルモン処理などが利用されている。本稿では日長処理に着目して親魚養成を行い、マダラ親魚から通常よりも早期に受精卵を得ることに成功したので報告する。

材料と方法

親魚養成 親魚として、2001～2003年に氷見漁業協同組合魚市場に水揚げされた天然魚を、富山水試で1～3年間養成して採卵用親魚とした（表1）。親魚の養成には、14kℓ容量の円形および楕円形コンクリー

表1 深層水施設で養成し採卵試験に用いたマダラの親魚の概要

区分	供試尾数	飼育年数	供試魚の大きさ	
			平均全長 (cm)	平均体重 (kg)
2001～2002	雌 7	1～2	73.9 (71.0～77.5)	5.1 (4.3～5.6)
	雄 5	1～2	69.4 (66.5～72.0)	4.3 (3.4～4.9)
2002～2003	雌 5	1	75.5 (67.5～81.0)	4.7 (4.3～5.6)
	雄 4	2～3	76.5 (70.0～85.0)	4.8 (3.4～7.2)
2003～2004	雌 8	1～2	72.3 (55.0～91.0)	4.2 (1.9～7.9)
	雄 2	3	77.3 (71.5～83.0)	4.9 (3.8～6.0)

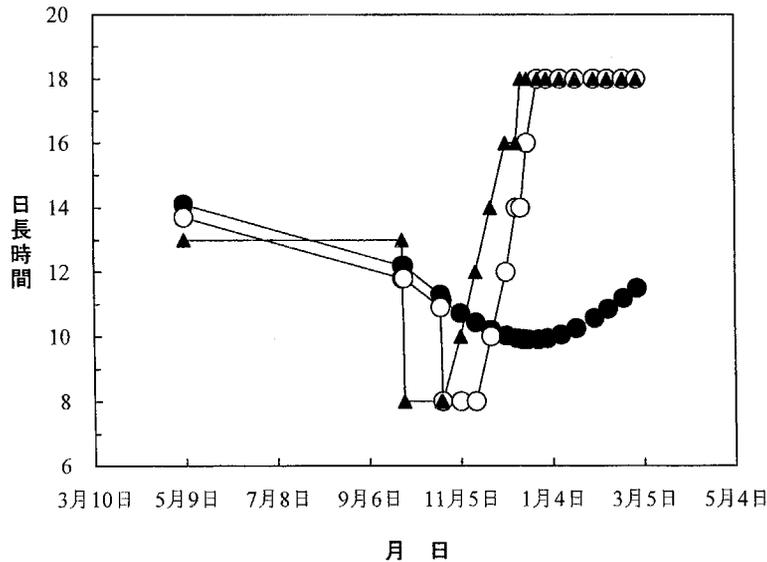


図1 深層水で養成したマダラ親魚の日長条件
 ● 2001-2002 ○ 2002-2003 ▲ 2003-2004

ト水槽をそれぞれ1面ずつ用いた。飼育海水は、採卵時期にはろ過した表層海水と深層水を混合して用いた(水温10℃)が、それ以外の時期は深層水のみ(3℃)を用いた。餌料には冷凍餌料(スルメイカ、ホタルイカ、オオナゴ=2:1:2)を与えた。

日長処理 2001~2002年の産卵期までは、自然日長条件下で親魚を養成した(図1)。自然日長時間は、<http://www.fb.u-tokai.ac.jp/WWW/hoshi/env/solar-j.html>に「金沢」を入力し、日の出から日没までの時間を示した。

2002~2003年の産卵期では、10月下旬まで自然日長とした。その後、水槽上面に遮光率100%のビニールを設置し、蛍光灯とタイマーを用いて日長調整を行った。蛍光灯は15Wを2台用い、楕円形水槽の長辺の1/3および2/3の位置の水面の直上約1mに設置した。日長処理の時間はブリの例⁴⁾を参考にした。ブリは通常4月に産卵するが、11月中旬から1カ月間に渡り明期8時間の短日処理(8L16D)、その後3~4日に1時間ずつ長日化して明期が18時間に達した後は長日処理(18L6D)を維持し、あわせて水温コントロールも施すことにより通常よりも2カ月間早い2月の採卵に成功している⁴⁾。そこで本試験では10月下旬から短日処理(8L16D)を行い、さらに11月下旬から1週間に2時間の割合で明期を延ばし、12月下旬に18時間に達した以降は、産卵終了まで長日処理(18L6D)を維持した(図1)。

2003~2004年の産卵期では、5月上旬にそれまでの長日処理方法を18L6Dから13L11Dへ改良して9月下旬まで継続し、その後は短日処理(8L16D)とした。

さらに11月上旬から10日に2時間の割合で明期を延ばし、12月中旬に再び長日処理(18L6D)を行い、以後産卵終了まで維持した(図1)。

魚体測定と成熟度調査 原則として春期に1回、秋期~産卵期までは1カ月に1回全長と体重を測定した。個体識別のためにピット・タグ(田中三次郎商店)を装着し、さらに外観から目視判定できるように背鰭基部に個体識別用の外部標識(背骨型標識とプラスチック製プレート)を装着した。秋期~産卵期までは測定にあわせて、雌雄不明の個体および雌からカニキュレを用いて生殖腺の一部を採取した。採取した生殖腺は生理食塩水に保存して実験室に持ち帰り、実体顕微鏡下で卵巣と精巣を判別した。卵巣卵については、万能投影機とノギスを用いて最大卵巣卵径を測定した。

採卵 採卵には、腹部が膨満し触圧すると排卵した透明卵を放出する雌親魚1尾と、同様の触圧で精液を放出する雄親魚1~2尾を用い、1kl容量の円形FRP水槽に収容した。飼育水には深層水との混合海水(約10℃)を用い、自発的に産卵させた(以下、自発的産卵)。

数日を経過しても産卵しない場合には、湿導法による人工授精を行った(以下、人工授精)。自発的産卵および人工授精によるいずれの採卵の場合も、受精直後の卵は粘着性を有することから取り扱いが難しいため、翌日まで水槽内に静置した。採卵翌日に羽箒を用いて卵を水槽底面および壁面から剥離し、サイホンにより回収してハッチングジャーで卵管理(水温8~10℃)した。

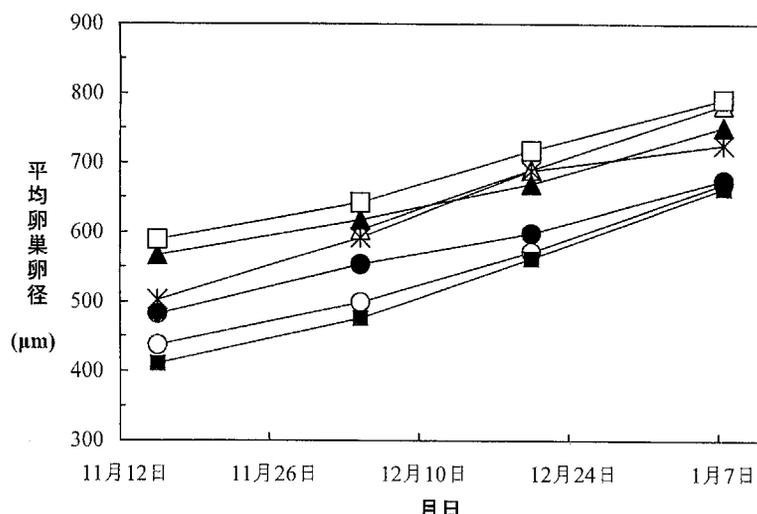


図2 深層水で養成したマダラ個体の卵巣卵径の変化 (2001~2002年)

○雌1 ●雌2 △雌3 ▲雌4 □雌5 ■雌6 *雌7

表2 深層水で養成したマダラ親魚からの採卵結果

2001~2002年				2002~2003年				2003~2004年			
採卵月日	採卵の状況	卵数 (万粒)	受精率 (%)	採卵月日	採卵の状況	卵数 (万粒)	受精率 (%)	採卵月日	採卵の状況	卵数 (万粒)	受精率 (%)
2月6日	人工授精	323.5	11.5	1月14日	人工授精	134.5	45.2	12月11日	人工授精	242.4	0
2月6日	自発的産卵	360.1	56.3	1月19日	人工授精	319.3	10.0	12月31日	人工授精	275.0	75.8
2月7日	自発的産卵	177.0	76.1	1月29日	自発的産卵	190.3	51.8	1月13日	自発的産卵	160.0	63.3
2月13日	自発的産卵	233.6	0	1月29日	自発的産卵	240.0	40.0				
2月14日	自発的産卵	132.4	0								
(計)		1,226.6				884.1				677.4	

結 果

2001~2002年の産卵期までの個体毎の卵巣卵径を図2に示した。平均卵巣卵径の増大傾向はほぼ直線的であり、11月中旬に400~600 μmであったものが、1月上旬には650~800 μmに達した。雌親魚からの採卵状況を表2に示した。7尾を採卵試験に供試し、2尾は採卵前に死亡したが、2月6日~14日にかけて5尾から計1,226.6万粒を採卵した。採卵できたのは、自発的産卵が4例、人工授精で1例であった。受精率は0~76%であり、2例で受精率が0%であった。

2002~2003年の産卵期までの個体毎の卵巣卵径を図3に示した。平均卵巣卵径の増大傾向は同様にほぼ直線的であり、10月下旬に400~500 μmであったものが、12月下旬には650~850 μmに達し、2001年の結果より、2週間程度早い時期に卵巣卵径の増大が認められた。雌親魚からの採卵状況を表2に示した。5尾を採卵試験に供試し、1尾は採卵前に死亡したが、1月14日~

29日に4尾から計884.1万粒を採卵し、受精率は10~52%であった。採卵は、自発的産卵で2例、人工授精は2例であった。採卵時期は、2001年の結果より2週間~1カ月早くなった。

2003~2004年の産卵期までの卵巣卵径を図4に示した。平均卵巣卵径の増大傾向は、11月上旬から中旬にかけてほとんどの個体で認められたが、以降は停滞する個体が半数を占めた。卵巣卵径は、11月上旬に550~850 μmと増大傾向は2001年の結果より1~2カ月、2002年の結果より1週間~1カ半月程度早かった。雌親魚からの採卵状況を表2に示した。8尾を採卵試験に供試し、5尾は採卵前に死亡したが、12月11日~1月13日に3尾から計686.4万粒を採卵し、受精率は0~76%であった。採卵できたのは、自発的産卵で1例、人工授精は2例であった。採卵時期は、2001年の結果より1~2カ月、2002年の結果より2週間~1カ月早かった。

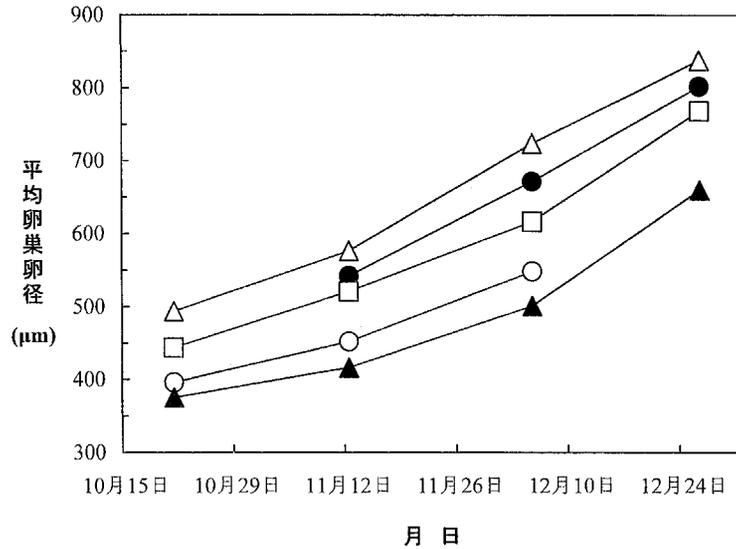


図3 深層水で養成したマダラ個体の卵巢卵径の変化 (2002~2003年)

○雌1 ●雌2 △雌3 ▲雌4 □雌5

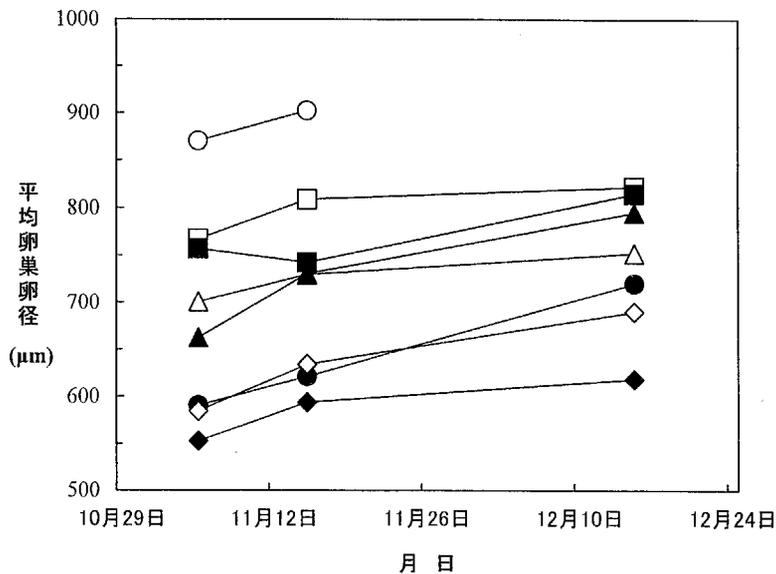


図4 深層水で養成したマダラ個体の卵巢卵径の変化 (2003~2004年)

○雌1 ●雌2 △雌3 ▲雌4 □雌5 ■雌6 ◇雌7 ◆雌8

考 察

深層水を用いて自然日長で養成したマダラ親魚では、天然での産卵期⁵⁾と同時期の2月上旬~中旬に採卵できることがわかった。一方、水温を同一として10月下旬から短日処理と長日処理を施すことにより、自然日長の場合と比較して2週間から1カ月の早期採卵が可能となった。このことから、マダラの親魚養成における採卵時期の早期化を図るためには、日長処理の

有効性が示唆された。

また、日長処理を9月下旬から開始したところ、自然日長の場合と比較して1~2カ月早い時期に採卵でき、12月上旬から1月中旬に採卵することに成功した。当センターにおけるろ過海水の水温は、通常12月上旬は13~15℃であり、ふ化すると考えられる中旬の水温は12℃程度である。マダラの種苗生産においては、ウイルス性神経壊死症防除の観点から10℃以下での飼育が望まれているが、量産規模では飼育用水の冷却はコ

スト面で困難である。当センターの取水温から判断すると、12月下旬に採卵し、1月上旬から種苗生産を開始することが、もっとも効率的に大型の種苗を生産できる方法であると考えられる。したがって今後は、12月下旬に採卵を開始できる手法の開発が必要である。

北海道栽培漁業総合センターでは、1月から1年間の日長周期を9カ月に短縮する段階的調整区と、1月末に自然日長から16L8Dの長日処理を7月末まで行い、その後8月から8L16Dの短日処理を産卵まで行う急変区を設けて光周期制御によるマダラ親魚の早期採卵試験を行い、自然日長の場合よりも3カ月早い11月初旬での採卵に成功している⁶⁾。日長処理の段階的調整区と急変区で共に2～3カ月の早期採卵に成功しており、短日処理が産卵の早期化に有効であったとしている⁶⁾。また、別種ながら同属の大西洋マダラ *Gadus morhua* では、周年24時間照明による長日条件下では成熟が抑制されて産卵しないこと、短日条件の設定時期によって周年いつでも成熟と産卵が可能ながことが報告されている⁷⁾。太平洋マダラでも、事例は少ないが、北海道栽培漁業総合センターと本試験の結果から、日長処理によって通常よりも約3カ月の早期産卵に成功し、大西洋マダラと同様に産卵時期をコントロールできる可能性が窺えた。したがって、太平洋マダラでも日長処理における短日および長日処理の条件とこれらの条件設定期間や水温条件を検討することにより、適正な種苗生産時期に産卵させる技術開発に取り組む必要がある。

謝 辞

本報告に当たり、サンプリング等にご協力頂いた能登島栽培漁業センター友田努技術開発員、荒井大介技術開発員および技術開発課久門一紀技術開発員に深謝の意を表す。

文 献

- 1) 森岡泰三・桑田 博 (2002) 七尾湾北湾とその沖におけるマダラ稚魚の生息上限水温と食性, 日水誌, **68**, 345-350.
- 2) 森岡泰三・山本和久・堀田和夫・大槻観三 (1998) 石川県能登島沖に放流されたマダラ人工種苗の成長と移動, 栽培技研, **27**, 11-26.
- 3) 社団法人マリノフォーラム21 (1992) 富山県日本海固有冷水を利用した水産実用化研究施設基本計画作成等調査業務報告書, p. 17.
- 4) Mushiake, K., K. Kawano, T. Kobayashi, and T. Yamasaki (1998) Advanced spawning in yellowtail, *Seriola quinquetadiata*, by manipulations of the photoperiod and water temperature. *Fisheries Sci.*, **64**, 727-731.
- 5) 與世田兼三・広川 潤・長倉義智・有瀧真人・小林真人 (1992) 石川県能登島周辺海域におけるマダラ成魚の成熟状況と卵・稚仔魚の分布, 栽培技研, **21**, 21-30.
- 6) 横山信一・高島信一 (1999) 特定海域親魚種定着促進技術開発事業 (マダラ), 平成10年度北海道立栽培漁業総合センター事業報告書, 110-123.
- 7) Hansen T., Ø. Karlsen, G. L. Taranger, G. Hemre, J. C. Holm and O. S. Kjesbu. (2001) Growth, gonadal development and spawning time of Atlantic cod (*Gadus morhua*) reared under different photoperiods. *Aquaculture*, **203**, 51-67.

海産魚における電気麻酔効果の検討

二階堂英城^{*1}・尾花博幸^{*2}・升間主計^{*1}・武部孝行^{*1}・井手健太郎^{*1}・手塚信弘^{*3}・難波憲二^{*4}
 (*1 奄美栽培漁業センター, *2 栽培漁業部, *3 能登島栽培漁業センター,
 *4 広島大学大学院生物圏科学研究科)

クロマグロ *Thunnus thynnus orientalis* は、成長が早く大型で擦れやストレスに弱いなどの理由で、ハンドリングが困難とされている。そのため、飼育下における生態、成熟について生きた個体を使用して調査することができず、技術開発の進捗を遅らせている¹⁾。

研究機関や種苗生産施設などで、魚類に麻酔をかける場合、各種薬剤に浸漬する方法が一般的である²⁾。しかし、クロマグロは、非常に大型の魚で、泳ぎが早く小回りのきかない遊泳生態を持つ。さらに、クロマグロは仔魚期を除き、呼吸のために遊泳する必要があるため、自力で麻酔から回復することが困難であるため、魚体の大きさに関わらず、一般的な薬剤に浸漬する方法で麻酔をかけることは著しく困難である。そこで、薬剤に代わるクロマグロに応用可能な麻酔方法の開発に取り組んだ。

麻酔効果を得る方法の一つとして電気麻酔法がある。これは、魚類の頭部を+極、尾部を-極として直流で通電し、脊髄での信号伝達を消失させて魚を麻痺させる方法である³⁾。竹田⁴⁾は、淡水魚では淡水中や空気中でも電気麻酔が可能であると述べている。また、魚における麻酔段階を第1期～第4期の4段階に分け、魚を扱う作業には第3期(麻酔期)が適するとした⁴⁾。第3期に入った魚は、横転して完全な麻酔状態となり、麻酔深度が高くなるに従い呼吸頻度と心拍数が減少し酸素消費量も減少するが、通電の終了とともに瞬時に回復する⁴⁾。信時⁵⁾は、コイ *Cyprinus carpio* を使用し、電極の位置を考慮すれば、通電中に鰓蓋運動の停止、心拍動の停止、心拍数の低下が起こらないことを報告している。

筆者らは、電気麻酔のクロマグロへの応用を目的として、まず他の海産魚で効果を検討したので報告する。

材料と方法

供試魚および電源装置 供試魚は、奄美栽培漁業センター地先で釣りにより採集した数種の海産魚を用いた(表1)。

通電に用いた電源にはバッテリー(12V, 28Ah: YUASA)2個を直列に繋いで24Vとしたものを用い、これを可変型直流定電流装置(広島ヤンマー商事)に連結し、目的とする直流電流値を得た。

表1 供試魚と麻酔効果が得られた電流値

魚種名	全長(cm)	電流値(mA)
キツネウオ <i>Pentapodus caninus</i>	19.5~24.0	15~30
ツバメウオ <i>Platax teira</i>	31.5	20~25
ハマフエフキ <i>Lathrinus nebulosus</i>	32.0~59.5	20
ヒトスジタマガシラ <i>Scolopsis monogramma</i>	32.0	18~20
ミナミクロダイ <i>Acanthopagrus sivicolus</i>	32.0~44.5	20~35

通電試験 通電試験は以下の方法で行った。まず、供試魚を淡水で湿らせたウレタンマットの上に置き、暴れないようにゴム手袋をした手で軽く押さえた。電極には幅30mmに切ったカーボン製ネット(炭素繊維W-3101, 東邦レーヨン)を用い、魚の頭部に+極、尾柄部に-極を当てた。電流値は0mAから徐々に上げ、魚の状態をデジタルビデオで撮影し、通電時間と通電後の回復状況を観察した。

麻酔効果の判定は竹田⁴⁾に従い、第1期(沈静期)、第2期(前麻酔期)、第3期(麻酔期)、第4期(麻痺期)に分け、第3期(麻酔期)になった時の電流値を麻酔効果の得られたものとした。また、第3期になったと判断した時点で、針による刺激を与え麻酔状態を確認した。

結 果

麻酔試験は2003年7月11日と24日、および9月3日に行った。供試魚には、キツネウオ *Pentapodus caninus*、ヒトスジタマガシラ *Scolopsis monogramma*、ミナミクロダイ *Acanthopagrus sivicolus*、ハマフエフキ *Lathrinus nebulosus* およびツバメウオ *Platax teira* を用いた。供試魚は、通電の有無に関わらずマット上で暴れることが少なく、静止している状態が長く続いたため、通電中は針により刺激を与えて麻酔状態を確認した。

無通電状態では、キツネウオはマット上に載せてから10~20秒で跳ねる行動がみられたが、15mAの通電により針による刺激に30秒以上無反応であった。

ツバメウオでは電流20~25mA, ハマフエフキでは20mA, ヒトスジタマガシラでは18~20mA, ミナミクロダイでは20~35mAで針による刺激に30秒以上の静止状態が観察された。電流値と魚体の様子は魚種、個体によって若干の違いは見られたが、概ね10~20mAで跳ねなくなり(第1期~第2期), 30mAまでに鰭に痙攣が観察され(表1), 第3期(麻醉期)の状態が認められた。

これらの供試魚は、いずれも麻醉後水槽に戻して180秒以内に正常に遊泳を開始し、実験後24時間以内に死亡する個体はなかった。

考 察

麻醉期に陥る電流値は魚種、個体によって若干の違いはみられるが、概ね10~20mAに達するまでに第1期から第2期に達して不動化し、25~35mAに達すると第3期になり完全な麻醉効果が得られた。竹田⁴⁾はコイについて12.5~15.5V, 24~32mAで通電すると5分間以上の麻醉が可能であることを報告している。信時⁵⁾は、同じくコイについて24V, 20~25mAで麻醉効果を得ている。今回、海産魚数種で得られた結果は、淡水魚であるコイとほぼ同様なものであった。

淡水と海水では、それ自体の導電性が異なり、海水の比抵抗値は淡水のそれと比べると著しく低い。すなわち、淡水魚のコイに通電する場合、魚体の比抵抗値は淡水よりも低いため水中で容易に魚体は通電することができるが、海産魚の場合、電極の両極が海水に触れていると、海水より比抵抗値の高い魚体には通電されず、電流は海水に流れてしまう⁶⁾。今回行った空気中の条件では、海水と魚体が十分に遮断されていたた

め、魚体に的確に通電できたことで麻醉効果が得られたと考えられる。

Cowx and Lamarqu³⁾は淡水中で魚に電気刺激を加える場合、同じ魚種でも魚体が大きくなると、体表面から脊髄までの距離が長くなり、魚体内での電位差が大きくなるため、小さな個体より電流の影響を受けやすいことを報告している。しかし、今回の試験ではその様な傾向は認められず、逆に魚体が大きい方が麻醉効果を得るための電流値が高くなる傾向がみられた(図1)。魚を電流によって不動化するためには、神経伝達を遮断するだけの十分量の電流を脊髄に流す必要がある。電気麻醉の場合、電極は魚体表面に置かれており、電流が魚体表面を流れやすい状態にある。また、魚体が大きくなるほど、魚体表面から魚体中心部にある脊髄までの距離が長くなり電気抵抗が大きくなる。したがって、脊髄の伝達信号を遮断するに足る電流を脊髄に流そうとすると、魚体全体に流す電流量は大きくなり、結果として多くの電流が流れたためCowx and Lamarqu³⁾と逆の結果が得られたと考えられる。

空気中での麻醉方法として、24V, 25~30mAの電流を魚体に流すことで十分な麻醉効果が得られることが判明した。この方法は、対象魚に電極を当て、かつ人間の力で保定することができるサイズの魚に限られるが、電極を改良することで現在の種苗生産対象魚種の多くで応用が可能である。例えばブリやカンパチ等の大型魚でも瞬時に不動化し、魚体各部の測定や採血等の作業を行うには最適な方法と考えられる。

しかし、本来の目的である大型クロマグロでは、電極を魚体に触れさせるために、釣りによって手元に引き寄せるまでに大きなストレスを与えてしまうなどの

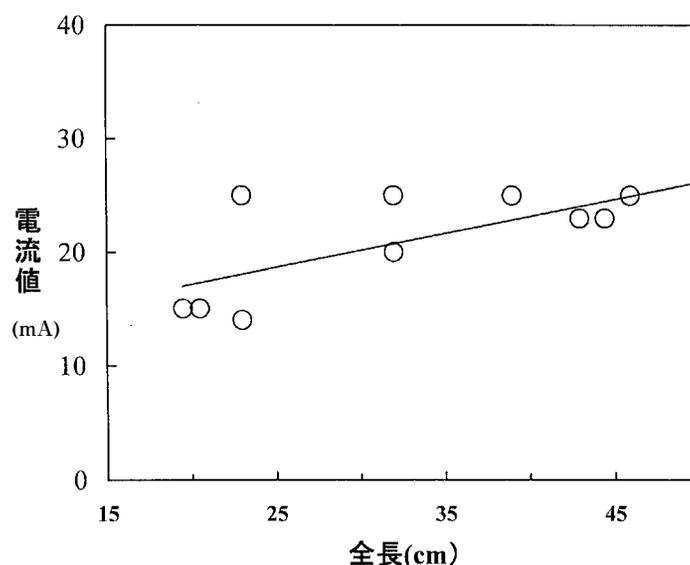


図1 供試魚の全長と麻醉効果が得られた電流値の関係

問題が残されている。今回明らかにされたデータを基に、今後、電極部の改良等をさらに検討し、大型魚を対象とした水中での電気麻酔技術を開発する必要がある。

文 献

- 1) 宮下 盛 (2001) クロマグロの種苗生産に関する研究. 近畿大学水産研究所博士学位論文.
- 2) 隆島史夫 (1998) 魚の麻酔Ⅱ 麻酔の実際①. 水産の研究, **41**, 緑書房, pp. 50-53.
- 3) Cowx, I.G. and P. Lamarque (1990) Electrophysiology of fish in electric fields. Fishing with Electricity, Fishing News Books, pp.4-33.
- 4) 竹田達右 (2002) 魚の麻酔に関する研究. アクアネット, **46**, 湊文社, pp. 36-40.
- 5) 信時和夫 (2002) 魚類に及ぼす電流の生理的影響. 広島大学大学院生物圏科学研究科修士論文.
- 6) 黒木敏郎 (1959) 電撃漁法. 技報堂, pp. 19-24.

同一ロットで異なったサイズのニシン種苗を水温制御により確保する方法の検討

福永恭平・鈴木重則
(厚岸栽培漁業センター)

厚岸栽培漁業センターでは、ニシンの放流試験においてサイズ別の回収状況を明らかにする目的で、2002～2004年の3年間、同じ採卵ロットのニシン種苗に平均全長で20～30mmの成長差を生じさせた試験を行った(鈴木, 未発表)。これらの試験に供する種苗を確保するため、卵管理から種苗の取り揚げまで水温を変えて飼育を行ったので、その概要を報告する。

材料と方法

種苗生産に用いたニシン卵は、2002年4月9日、10日、2003年4月22日、2004年4月13日、14日に、厚岸湾で漁獲された成熟ニシンから人工授精で得た。卵の付着基質にはマブシ(シュロの繊維を銅線に固定した人工産卵床:深貝ブラシ)を使用し、コンクリート製角形50kℓ水槽(4.8×7.8×1.7m)に垂下した。卵の管理は曝気した調温海水のかけ流しで行い、ふ化直前に飼育水槽へ移槽して止水でふ化させた。

試験区は、卵管理水温を10～12℃に上昇させるL区と10℃以下に抑えるS区を設定し、水温、ふ化日およびふ化仔魚数を観察した(表1)。

飼育は50kℓ水槽を使用し、ふ化が終了した時点で収容密度の調整を行った。L区の水温は13℃、S区は10～13℃を目安に設定し、それぞれ毎日測定した。換水はふ化終了時から開始し、日齢5で0.5～1回転/日、日齢20で1～2回転/日、日齢30で1.5回転/日、日齢40で2回転/日、日齢50以降は2.5回転/日以上で割合で行った。照度調節のため寒冷紗を周囲に取り付けた。通気は水槽の下辺隅4カ所に設置した1.4mの散気管と水槽中央部1カ所に設置した17cmのエア-

ストーンから行った。なお、エアストーンはワムシ給餌の終了時に撤去した。底掃除は日齢3から1日1回底掃除機(かす兵衛:ヤンマー)で行った。飼育水には、濃縮淡水クロレラ(生クロレラV12:クロレラ工業)を平均全長40mm前後まで、1水槽当り1～3ℓ添加した。

餌料にはシオミズツボワムシ(L型,以下ワムシ)、アルテミアノープリウス(北米産,以下アルテミア)、配合飼料を用いた。給餌期間はワムシが日齢2～20、アルテミアが日齢10～60、配合飼料が日齢20～取り揚げまでを目安とし、種苗の成長状態により期間を調整した。ワムシ、アルテミアの栄養強化剤にはアクアランプラス(BASF ジャパン)を用い、それぞれ150g/kℓ、150～200g/kℓの濃度で24～28時間強化した。給餌は、山本の示した給餌基準¹⁾を参考に、ワムシについては給餌密度一定で、その他は生残尾数から換算して行った。

全長測定は10日ごとに行った。試験期間中の生残率は、収容尾数から底掃除で回収された死亡魚数を除いて算出した。

種苗の取り揚げは、平均全長50～70mmで種苗移送ポンプ(ピンピン:松阪製作所)または巻き網で集めてタモ網ですくい取る方法で行った。取り揚げた稚魚は重量法で尾数を算出し、目視により外部形態異常の有無を判断した。さらに、軟X線を用いて脊椎骨異常の状態を調査した。脊椎骨異常の程度は癒合カ所数で表し、1カ所を「軽度」、2～5カ所を「中度」、6～10カ所を「重度」、10カ所以上を「極めて重度」とした。

表1 ニシン卵の収容およびふ化結果

年度	試験区	卵収容		ふ化				卵管理水温(℃)			積算水温(D°)
		収容日(月日)	卵数(万粒)	ふ化日(月日)	ふ化管理日数*	ふ化尾数(万尾)	ふ化率(%)	平均	最小	最大	
2002	L	4.9-10	295	4.25	16	42.1	14.3	7.8	2.7	11.1	124.8
	S	同上	295	5.6	27	34.6	11.7	5.3	3.3	8.1	143.5
2003	L	4.22	223	5.5	13	69.1	31.0	9.0	3.4	12.0	125.6
	S	同上	149	5.16	24	54.2	36.4	5.0	3.4	7.6	119.0
2004	L	4.13-14	384	4.27	14	37.0	9.6	8.4	2.7	11.9	116.9
	S	同上	256	5.11	28	13.5	5.3	4.6	2.7	10.0	127.8

*:ふ化日を0とし、収容が2日間に渡った事例では初日をふ化日とした。

結 果

卵管理とふ化 表1に卵収容およびふ化結果を、図1にふ化管理水温を示した。2002年は合計363尾の親魚（雄：雌=198：165尾）から590万粒を採卵し、L区とS区に二分して収容した。両試験区のふ化率はそれぞれ14.3%と11.7%、ふ化までの日数は16日と27日、平均水温は7.8℃と5.3℃および積算水温は124.8D°と143.5D°であった。平均2.5℃の卵管理水温の違いで、ふ化までの所要日数に11日の差がみられた。

2003年は、合計176尾の親魚（雄：雌=81：95尾）から372万粒を採卵し、L区に223万粒、S区に149万粒を収容した。両区のふ化率はそれぞれ31.0%と36.4%、ふ化までの日数は13日と24日、平均水温は9.0℃と5.0℃、および積算水温は125.6D°と119.0D°であった。平均4.0℃の卵管理水温の違いで、ふ化までの所要日数に11日の差がみられた。

2004年は、合計454尾の親魚（雄：雌=232：222尾）から合計640万粒を採卵し、L区に384万粒、S区に256万粒を収容した。両区のふ化率はそれぞれ9.6%と5.3%、ふ化までの日数は14日と28日、平均水温は8.4℃と4.6℃および積算水温は116.9D°と127.8D°であった。平均3.8℃の卵管理水温の違いで、ふ化までの所要日数に14日の差がみられた。

飼育試験 飼育試験結果を表2に、収容から取り揚げまでの成長を図2に、飼育水温を図3に、および生残率を図4に示した。

2002年は、L区は2002年4月25日に42.1万尾、S区は5月6日に34.6万尾のふ化仔魚を収容して飼育を開始し、L区では日齢90に平均全長75.2mmの種苗22.5万尾、S区では日齢79に58.8mmの種苗16.3万尾を取り揚げた。なお、生残率は、日齢76に取り揚げた7.7万尾を含めたL区で71.7%、S区で47.1%であった。L区の日間成長率は0.75mm/日、S区は0.64mm/日であった。

2003年は、L区は2003年5月5日に34.9万尾、S区は5月16日に34.0万尾のふ化仔魚を収容して飼育を開始し、L区では日齢86に平均全長73.8mmの種苗25.7万尾、S区では日齢75に54.1mmの種苗24.9万尾を取り揚げた。生残率はL区73.6%、S区73.2%であった。L区の日間成長率は0.77mm/日、S区は0.62mm/日であった。

2004年は、L区は2004年4月27日に37.0万尾、S区は5月11日に13.5万尾のふ化仔魚を収容して飼育を開始し、L区では日齢93に平均全長83.1mmの種苗22.2万尾、S区では日齢79に52.8mmの種苗7.4万尾を取り揚げた。生残率はL区60.0%、S区54.8%であった。L区の日間成長率は0.81mm/日、S区は0.57mm/日であった。

各年度におけるL区とS区の平均飼育水温は、2002年がそれぞれ13.1℃（10.1～13.6℃）と11.8℃（9.3～13.8℃）、2003年が13.0℃（11.1～13.5℃）と11.5℃（9.3～13.5℃）、および2004年が13.0℃（11.8～13.7℃）と10.8℃（9.8～14.4℃）であった。3年間ともにL区の成長は、これまでの試験で得られた平均的な成長¹⁾とほぼ同様であり、日齢65で平均全長50mmに達した。

異常個体の出現状況を表3に示した。2002年における外部形態異常の出現率はL区が1.0%、S区が0%で、異常箇所は鰓蓋部のみであった。脊椎骨癒合の出現率はL区6.0%、S区3.0%で、程度はそれぞれ軽および中度であった。2003年における外部形態異常の出現率は、L区が4.6%、S区が2.8%で、異常箇所は主に顎および前頭部であった。脊椎骨癒合の出現率はL区が11.7%、S区が13.2%で、それぞれ軽度、中度の個体が大部分を占めた。2004年における外部形態異常の出現率は、L区が1.4%、S区が6.4%、また、脊椎骨癒合魚の出現率は、それぞれ4.6%と31.8%であった。L区の癒合は、軽度および中度のみであったが、S区では重度以上の個体が8.1%出現した。

表2 ニシン飼育試験結果

年度	試験区	収容			取り揚げ										
		収容日 (月日)	尾数 (万尾)	平均全長 (mm)	取揚日 (月日)	日齢 (日)	尾数 (万尾)	全長 (mm)			日間成長量 (mm/日)	生残率 (%)	水温 (℃)		
							平均	最小	最大			平均	最小	最大	
2002	L	4.25	42.1	8.41	7.23	90	22.5	75.2	64.8	83.6	0.75	71.7*	13.1	10.1	13.6
	S	5.6	34.6	9.21	7.23	79	16.3	58.8	49.3	67.3	0.64	47.1	11.8	9.3	13.8
2003	L	5.5	34.9	8.39	7.30	86	25.7	73.8	54.5	83.9	0.77	73.6	13.0	11.1	13.5
	S	5.16	34.0	8.00	7.30	75	24.9	54.1	41.7	62.2	0.62	73.2	11.5	9.3	13.5
2004	L	4.27	37.0	8.39	7.28	93	22.2	83.1	71.1	92.7	0.81	60.0	13.0	11.8	13.7
	S	5.11	13.5	8.04	7.28	79	7.4	52.8	45.4	61.5	0.57	54.8	10.8	9.8	14.4

* 取り揚げ尾数は22.5万尾であったが、日齢76に取り揚げた7.7万尾を含めた生残率。

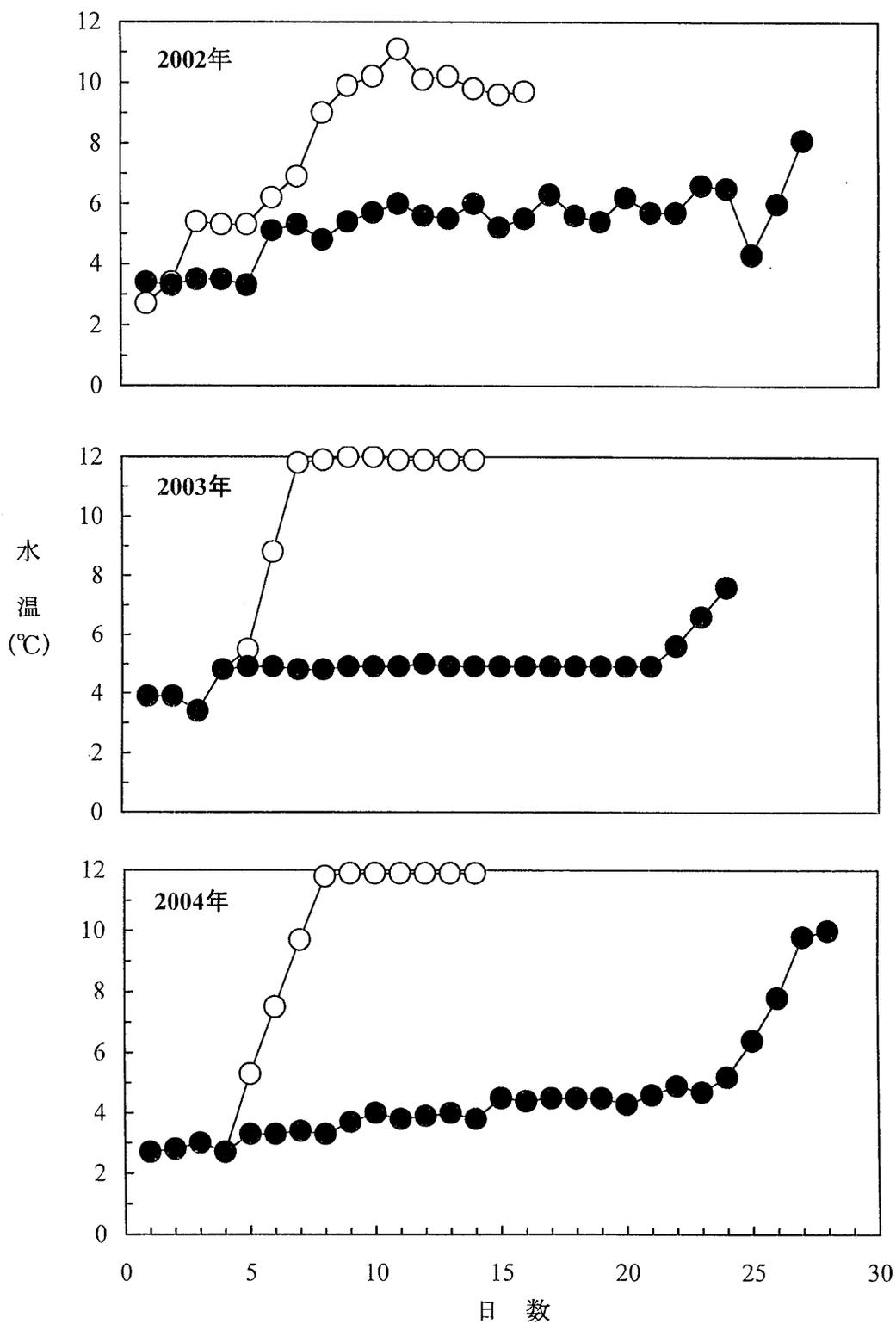


図1 ニシン卵のふ化管理水温の推移
○ : L区, ● : S区

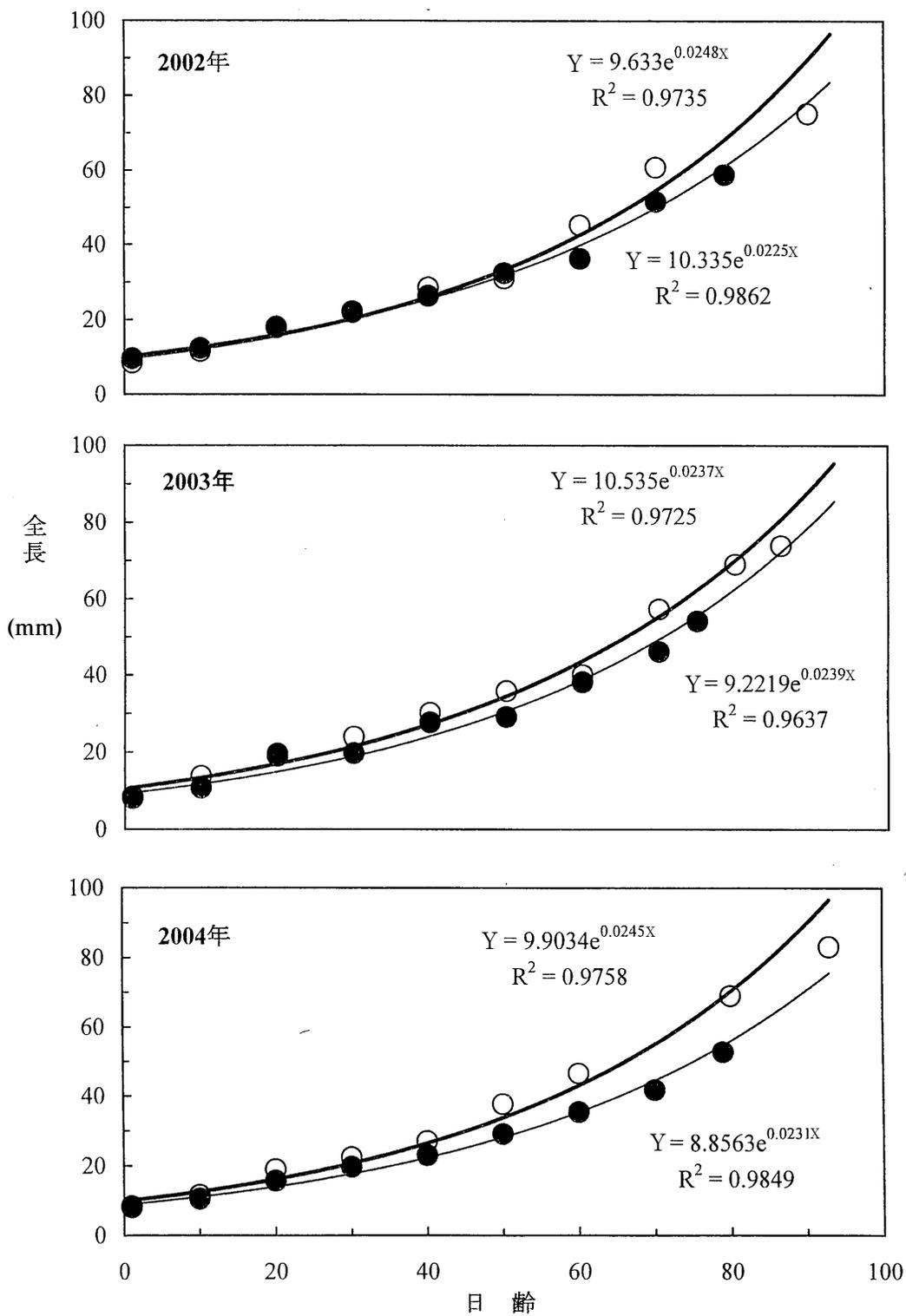


図2 ニシン種苗生産試験における仔稚魚の成長

○ : L区, ● : S区

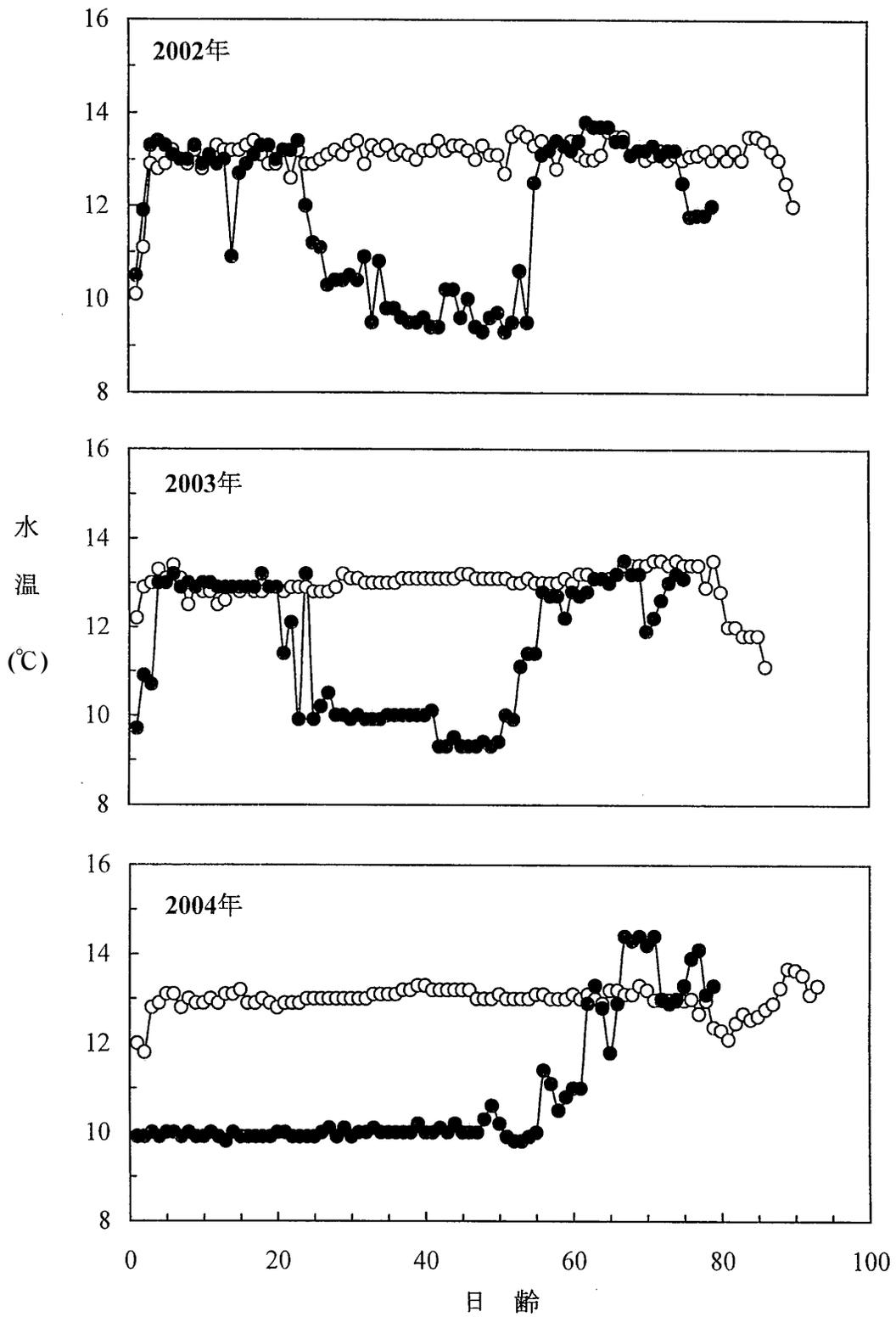


図3 ニシン種苗生産試験における飼育水温
○ : L区, ● : S区

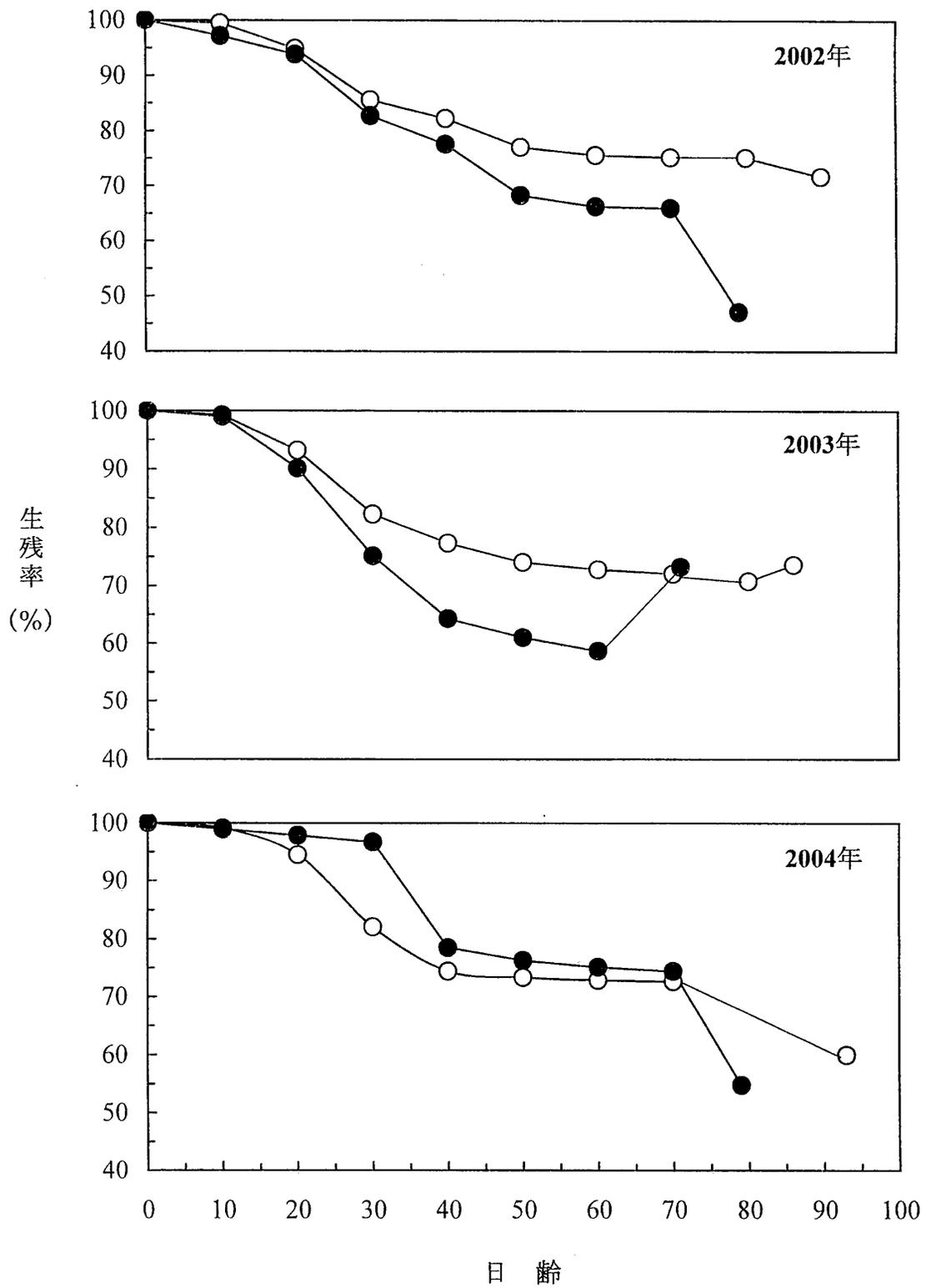


図4 ニシン種苗生産試験における生存率
○ : L区, ● : S区

表3 ニシンの形態異常個体出現状況

		試験区					
		2002		2003		2004	
		L区	S区	L区	S区	L区	S区
外部形態異常出現率 (%)		1.0	0.0	4.6	2.8	1.4	6.4
供試尾数		100	100	197	249	106	92
内訳	短軀						0.6
	鰓蓋欠損	1.0				0.7	1.2
	咽峡突出			0.5		0.7	1.7
	下顎変形				0.4		0.6
	上顎変形			4.1	0.8		2.3
	前頭部変形				1.6		
脊椎骨癒合出現率 (%)		6.0	3.0	11.7	13.2	4.6	31.8
供試尾数		100	100	197	249	153	173
内訳	軽度 (1) *	4.0	3.0	3.6	4.0	1.3	9.2
	中度 (2~5)	2.0		7.1	8.4	3.3	14.5
	重度 (6~10)			0.5	0.8		1.2
	極めて重度 (10~)			0.5			6.9

* () 内の数字は脊椎骨癒合数を示す。

考 察

今回の試験では、2~12℃の間で平均水温に2.5~4.0℃の差を付けた卵管理を行ったが、各年ともL区とS区でふ化率に顕著な差は認められなかった。ニシンのふ化適水温は0~17.5℃付近であることが指摘されており²⁾、今後は様々な水温帯でふ化状況を把握する必要がある。山本²⁾は、ニシンについて高橋ら³⁾、桑谷ら⁴⁾の結果を用い、ふ化管理中の平均水温とふ化時期の関係を報告している。今回の試験水温を山本²⁾の関係式 ($D=177.46T^{-1.147}$) に当てはめると、2002年はL区の推定ふ化日は16.8日 (試験結果:16日)、S区は26.2日 (27日)、2003年はL区14.8日 (13日)、S区28.0日 (24日)、2004年はL区15.4日 (14日)、S区は30.8日 (28日) といずれも実数値に良く近似し、ニシンのふ化日を概ね推定できることが実証された。また本試験の結果から、2℃~12℃の間で卵管理水温に2.5℃~4℃の差を付けるとふ化までの所要日数に11日~14日の違いが生じることが明らかとなった。一方、ふ化までの積算水温について、高橋ら³⁾は卵管理中の平均水温が7~10℃の場合は145D[°]、山本²⁾は10℃以下でおおよそ130D[°]としているが、今回5~8.7℃で113~143D[°]とばらつきが認められ、同様の水温条件でもふ化までの積算水温はロットによって異なることが示唆された。

山本¹⁾は、ニシンの種苗生産において、飼育水温14℃では11℃に比べ日間の成長率が約2倍高くなることを明らかにした。今回の試験でも、同一産卵ロットの魚を用いて平均水温に1.3~2.2℃の差を付けて飼育した結果、平均全長で16~30mmの差が生じた。ま

た、それぞれの各年とも、日間成長率はL区が0.75~0.81mm/日とS区の0.57~0.64mm/日より高く、水温制御によって成長を操作することが可能であった。本飼育では、取り揚げまでの日齢やサイズが異なるため、最終的な生残状況の比較は困難であるものの、S区の生残率が低い傾向が認められた。ニシンでは、水温別の発育、成長、生残に関するデータが把握されておらず、栽培漁業の技術を向上させるためにも今後これらの項目を明らかにする必要がある。

ニシンの放流試験で回収率低下の要因となる形態異常や脊椎骨の癒合は、種苗生産の技術開発の中で大きな問題となっている^{1,5)}。今回、各試験区で形態異常や脊椎骨の癒合が観察され、特に水温を下げた2004年のS区では形態異常の出現率が6.4%、脊椎骨の癒合が31.8%と他の試験区に比べ極めて高くなった。しかし、2002年と2003年のS区では、形態異常や脊椎骨の癒合はL区と同様かそれより低い発現率であり、水温を低下させたことがこれら異常の増加に直結したとは言い難い。2004年のS区では、日齢55に水温を上昇させた直後から異常遊泳や形態の異常な個体が増加したが、他のS区でも同時期に水温上昇を行っている。また、同区は他の試験区と異なり特に成長が遅く、水温上昇時に全長35mm以下の個体が大部分を占めていた。ニシンにおいてこのサイズは仔魚から稚魚への移行期であり、全身の化骨が急速に進行する時期でもある¹⁾。山本は本種の椎骨異常の発現要因の一つとして物理的な衝撃を挙げているが¹⁾、今後水温等の環境要因が形態異常や脊椎骨癒合の発現に与える影響を発育段階と関連させて検討する必要がある。

文 献

- 1) 山本義久 (2001) ニシンの種苗生産技術, 栽培漁業技術シリーズ No.7, 41-59.
- 2) 山本義久 (2001) ニシンの種苗生産技術, 栽培漁業技術シリーズ No.7, 27-30.
- 3) 高橋庸一・広川 潤・熊谷厚志 (1984) ニシンの採卵とふ化方法の検討. 水産増殖, **31**, 167-172.
- 4) 桑谷幸正・渋谷三五郎・和久井卓哉・中西 孝 (1978) ニシンの卵発生と稚魚の飼育に関する研究 - I 卵発生に及ぼす水温の影響. ニシン増養殖技術開発企業化試験報告, 昭和47~49年度, 11-29.
- 5) 鈴木重則・福永恭平・山本義久 (2004) ニシン人工種苗脊椎癒合の重篤度と回収結果との関係, 栽培漁業センター技報, **2**, 13-16.

飼育したババガレイの変態異常と仔魚の成長および発育

有瀧真人・熊谷厚志
(宮古栽培漁業センター)

カレイ科魚類の多くは、栽培漁業の対象種として取りあげられてきたが、どの種においても変態後に白化や両面有色等、形態異常が出現し、問題となってきた¹⁾。これら形態異常は、変態時の左右不相称性の異常(以下、変態異常)であることが様々な観察から確認されている¹⁾。変態異常を防除するには発生の機序を明らかにする必要があるものの、ホシガレイとマガレイをのぞいて検討されていない^{2,3)}。

ババガレイは厚岸栽培漁業センターで1983~1991年、宮古栽培漁業センターで1980~1994年の間、栽培漁業の技術開発が実施され、1999年には全長30mmサイズの種苗を6万尾(生残率34~49%)取り揚げるなど基礎的な飼育技術はほぼ確立されている。しかし、変態異常魚が半数以上出現するなど本種においても、その発現要因についての検討は充分になされていなかった。

本研究ではババガレイの仔魚を異なる水温で飼育し、変態異常の出現に及ぼす飼育水温の影響について検討した。また、変態異常の原因のひとつとして考えられる仔魚期の成長・発育^{2,3)}に着目し、その発現機序の一端を明らかにすることを目的とした。

材料と方法

試験設定および供試魚 飼育試験は能登島栽培漁業センターにおいて1996年3月21日から6月19日まで実施し、飼育水温9, 12, 15, 18および21℃の5段階の試験区を設けた(表1)。供試した受精卵は、漁獲後養成した天然魚から自然産卵で得たもので、採卵後直ちに9℃に調温したふ化用の水槽に収容し、ふ化まで13日間管理した。ふ化仔魚は、0.5klポリカーボネイト製円形水槽へ10,000尾/klの密度で収容した(表1)。

表1 飼育試験の概要

項目	設定
試験開始日	1996.3.21
採卵方法	自然産卵
1試験区あたりの水槽数(槽)	1
収容密度(尾/kl)	10,000
試験水温(℃)	9, 12, 15, 18, 21

飼育条件 仔稚魚の餌料には、L型シオミズツボワムシ(以下、ワムシ)および北米産アルテミア幼生(以下、アルテミア)を用いた。ワムシは仔魚の開口直後から全長13mmに達するまで、飼育水中の密度がおおよそ3個体/mlを維持するように給餌した。ワムシは、給餌16時間前にアクアラン(理研ビタミン)を200g/klの濃度で添加し、栄養強化を行った。

アルテミアは、ワムシの摂餌を確認してから10~60万個体を1日2回に分けて試験終了まで給餌した。アルテミアは給餌16時間前にパワッシュA(オリエンタル酵母)を50g/klの濃度で添加し、栄養強化を行った。

ワムシ給餌期間中、飼育水に1日1回、培養したナンクロロプシスを50万細胞/mlの密度で添加した。飼育水の調温には0.5kw, 1.0kw 投げ込み式ヒーターおよびサーモスタット(日東機材)と2.2kw 小型冷却機(TC-2200E, 山一製作所)を用いた。飼育水温は各設定値に達するまで飼育開始時の9℃から1℃/日の割合で上昇させた。飼育水槽には、飼育開始当初からごく微量の通気と注水を施し、通気量は期間中一定に保った。注水は砂濾過海水を使用し、換水率は飼育開始当初の50%/日から、アルテミア給餌開始以降は100%/日、仔魚の着底以降は300%/日を目安に順次増加させた。

成長と発育の観察 飼育魚は、ふ化から5日間隔で25尾を無作為に採集し、10%エチレングリコールモノフェニルエーテルで麻酔後に、万能投影機とノギスを用い全長を計測した。測定した仔稚魚は、5%中性ホルマリン溶液で2日間固定後、70%エタノール溶液に移して保存し、有瀧・田中⁴⁾に従って発育ステージを区分した。また、試験区間の発育速度を比較するメルクマールとして、変態期にあたるF~Hステージの平均出現日数を観察した。

稚魚の形態区分 全ての魚が着底を完了した時点で試験を終了し、全個体を10%中性ホルマリン溶液で保存した。標本は図1に従って正常魚(Type A)、白化魚(Type B, B'), 両面有色魚(Type C)に分類した後、各タイプの出現率(タイプの出現尾数/総尾数×100)を試験区ごとに算出した。

有眼側

無眼側

結 果

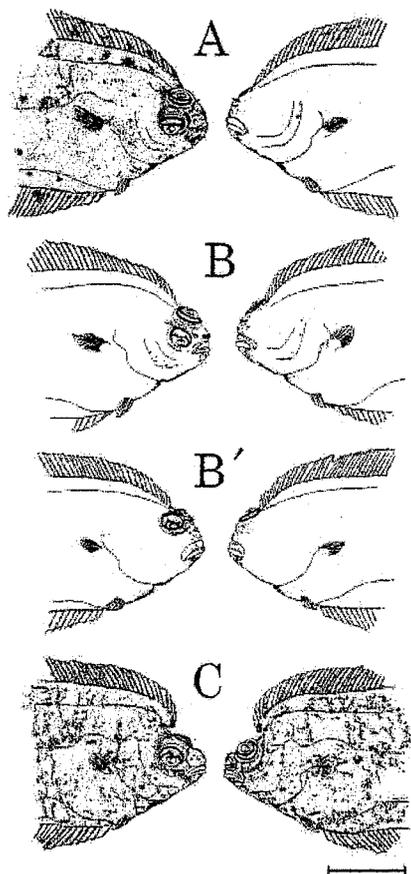


図1 飼育したババガレイの正常魚及び変態異常魚
A:正常魚, B,B' : 白化魚, C:両面有色魚

生残と成長 試験終了時の生残率は全般に低く、18℃区の10.6%が最も高く、21℃区の3.6%が最も低かった(図2)。成長は20日目まで水温が高いほど良かったが、それ以降は21℃区では遅滞し18℃区の値を下回った(図3)。全ての仔魚が変態を完了するまでに要した日数は、9℃区で91日、12℃区で78日、15℃区で74日、18℃区と21℃区で70日であった。

変態異常の出現状況 飼育水温と正常魚および変態異常魚出現率の関係を図4に示した。正常魚の出現率は、9℃区が60.5%と最も高く、12℃区、15℃区では50%前後を示したが、18℃区では10.2%、21℃区では0%と極めて低くなり、低い水温帯で高い傾向を示した。白化魚の出現率は全体的に低い傾向を示し、12℃区と15℃区では約20%、他の水温帯では5%以下であった。両面有色魚の出現率は、正常魚とは全く逆に水温が高くなると増加する傾向があり、9℃区でおよそ30%であったものが18℃区で89.7%、21℃区では100%になった。

発育段階の進行 ステージB(開口)までの発育段階の進行には、水温区間の差異は認められなかったが、ステージC以降では水温の高い試験区で早く、特に18℃区と21℃区で顕著であった(図5)。変態期にあたる各発育段階(ステージF~H)の平均出現日(図6)は、9℃区で59~83日、12℃区で49~73日、15℃区で39~72日、18℃区で33~59日、および21℃区で43~63日となり、全体的には水温の上昇とともに早期に変態する傾向があったものの、21℃区では18℃区の日数より遅れて変態が進行した。

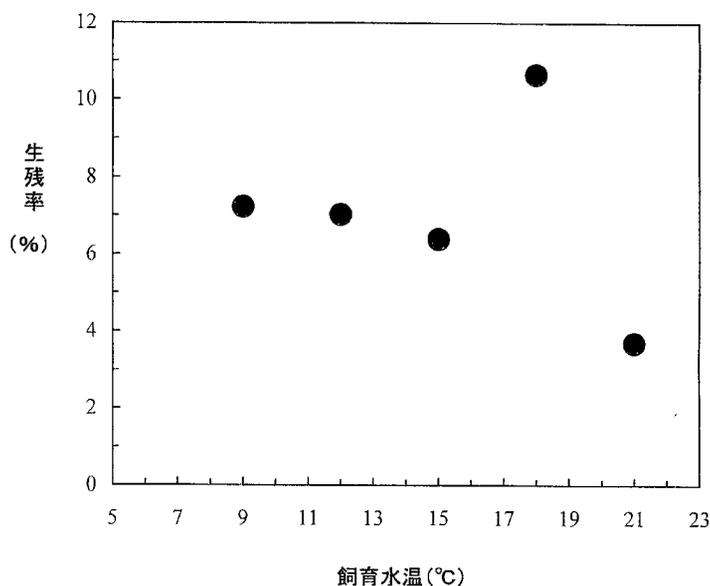


図2 異なる水温で飼育したババガレイ仔稚魚の生存率

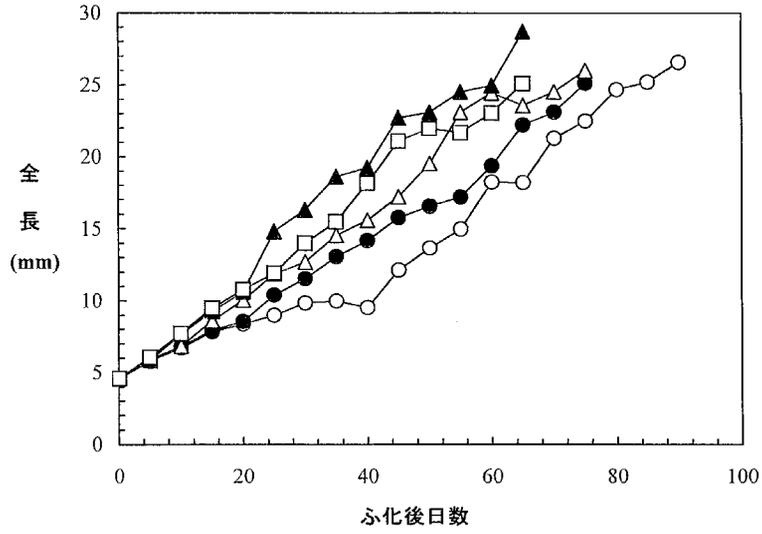


図3 異なる水温で飼育したババガレイ仔稚魚の成長

○-9°C ●-12°C △-15°C ▲-18°C □-21°C

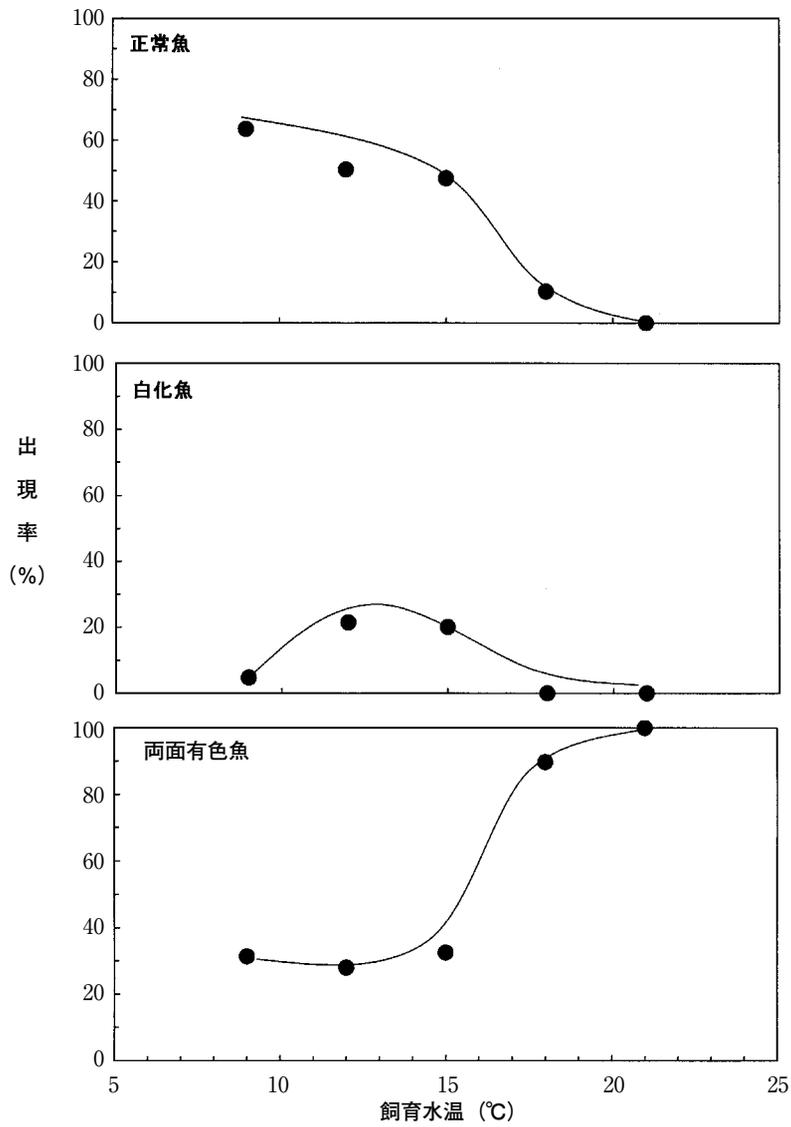


図4 飼育水温と正常魚および変態異常魚の出現状況

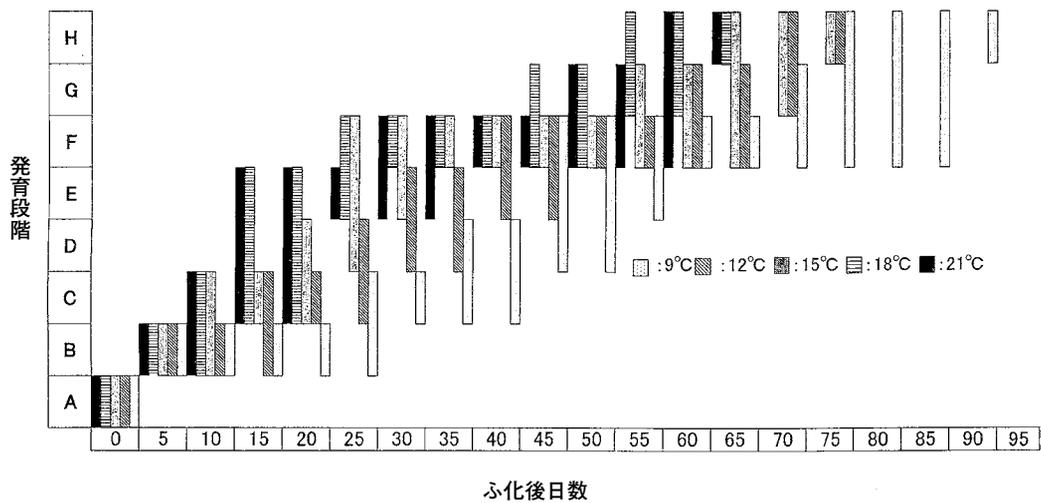


図5 飼育水温とババガレイ仔稚魚の発育状況

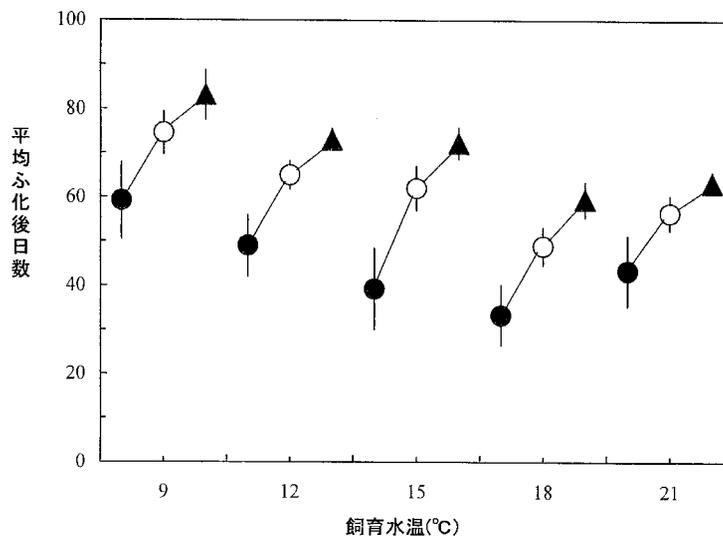


図6 ババガレイ稚魚が発育段階F～Hに達するまでの日数と飼育水温の関係

●:ステージF, ○:ステージG, ▲:ステージH

考 察

変温動物である異体類の成長および発育は、経験する水温に大きく影響されることがヒラメ⁵⁾やマコガレイ⁶⁾、ホシガレイ²⁾、マガレイ³⁾で明らかにされている。今回、ババガレイを用いて水温別の飼育試験を行った結果、本種においても成長および発育は概ね高水温で促進、低水温で遅滞することが確認された。しかし、最も高い21°Cの成長・発育は18°Cに比べて遅れ、生残率も最低値となった。これは、著者らがホシガレイやマガレイでも同様の傾向^{2,3)}を指摘したように、ババガレイにとって21°Cが生息限界を超えた水温環境であることを示唆している。

本研究では、ババガレイにおいて正常魚および白化

魚、両面有色魚の出現率と飼育水温との間に一定の傾向が認められた。すなわち、正常魚は9°C、白化魚は12°C、両面有色魚は21°C付近を最高値として出現することが確認された。水温と正常魚および変態異常魚の出現状況は、マコガレイ⁶⁾やホシガレイ²⁾、マガレイ³⁾でも強い関連性が報告されており、これらはカレイ科魚類に広く見られる現象である可能性が高い。

ホシガレイやマガレイでは、飼育水温を18～21°Cに加温し、発育・成長を促進させた場合に正常魚が増加すると報告されている^{2,3)}。今回ババガレイにおいては、これら2種とは異なり、発育・成長の速度が最も遅くなる9°Cで正常魚の出現頻度が高くなった。一方、飼育環境下のヒラメやタイ類⁷⁻⁹⁾では仔稚魚の発育・成長が天然海域のものに比べて大きく劣ることが明ら

かにされており、マガレイやホシガレイでも同様な報告がある^{2,3)}。ホシガレイやマガレイを18~21℃で飼育した場合、ほぼ天然魚と同様の発育・成長を示し、天然魚の発育・成長に近づける条件で飼育することが、仔稚魚の正常な発育を促し、形態の正常な魚の割合を増加させると推察されている^{2,3)}。ババガレイは、マガレイやホシガレイに比べると変態の開始サイズがきわめて大きく、長期の浮遊生活を送ることが明らかにされている⁴⁾。本研究でもババガレイの変態開始ステージ（ステージF）の平均全長は22.5mmと、マガレイの約9mm³⁾やホシガレイの約15mm²⁾に比べて著しく大きく、変態完了までに59~83日を要するなど浮遊期間も長かった。すなわち、天然海域でゆっくりとした初期発育を過ごすババガレイでは、マガレイやホシガレイとは逆に低い水温条件で飼育し、成長速度を抑えることが、形態異常を軽減する効果があると考えられる。過去の本種の種苗生産は、水温15℃前後と比較的高い水温帯で行われており、このことが形態異常の発現を増加させていたと推察される。

これまでの知見から、カレイ科魚類には魚種ごとに適切な変態のタイミングや発育速度が存在しており、飼育環境下でそれらが正常な範囲から逸脱するために形態異常が生じていると考えられる。今後、カレイ科魚類における変態異常発現の機序について飼育環境のみならず、生理・生態等複合的な面から検討し、防除対策を講じる必要がある。

文 献

- 1) 有瀧真人 (1995) カレイ類の変態と形態異常. 月刊海洋, 27, 732-739.
- 2) 有瀧真人, 太田健吾, 堀田又治, 田中 克 (2004) 異なる飼育水温がホシガレイ仔稚魚の発育と形態異常の出現に及ぼす影響. 日水誌, 70, 8-15.
- 3) Aritaki, M. and T.Seikai (2004) Temperature effects on early development and occurrence of metamorphosis-related morphological abnormalities in hatchery-reared brown sole *Pseudopleuronectes herzensteini*. *Aquaculture*, 240, 517-530.
- 4) 有瀧真人, 田中 克 (2003) ババガレイ飼育仔稚魚の形態発育および成長. 日水誌, 69, 602-610.
- 5) Seikai, T., J. B. Tanangonan, and M. Tanaka (1986) Temperature influence on larval growth and metamorphosis of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in the laboratory. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 52, 977-982.
- 6) 睦谷一馬 (1988) 人工飼育におけるマコガレイ仔稚魚の成長と変態について. 水産増殖, 36, 27-32.
- 7) 前田経雄 (2002) 若狭湾西部海域におけるヒラメ仔稚魚の加入機構. 博士論文, 京都大学, 京都.
- 8) 田中 克 (1975) 消化器官「稚魚の摂餌と発達」(日本水産学会編). 恒星社厚生閣, 東京, 7-23.
- 9) 木下 泉 (1993) 砂浜海岸碎波帯に出現するヘダイ亜科仔稚魚の生態学的研究. 高知大水研報, 13, 21-99.

イセエビふ化フィロソーマの絶食耐性について

村上恵祐*1・西田航介*2

(*1 南伊豆栽培漁業センター, *2 東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科)

イセエビ *Panulirus japonicus* フィロソーマの飼育試験では、幼生期間がふ化後300日以上と長く、飼育水温が24~27℃と高いことや個体干渉による胸脚の欠損が頻発することから、細菌性疾病に罹病しやすく、安定した飼育結果を得ることが非常に困難である。長い幼生期間が特徴である本種の飼育において、不安定要素を解明するためには、成長段階に応じたフィロソーマの活性評価手法を開発することが重要である。

そこで、ふ化フィロソーマの活性評価と、ふ化後30日までの初期飼育における飼育の不安定要素を探ることを目的として、ふ化フィロソーマの絶食期間と各脱皮齢までの生残、到達日数および成長の関係について明らかにするために絶食耐性試験を実施した。また、本試験の結果から、ふ化フィロソーマの脱皮齢で5齢（ふ化後30日）までの Point of No Return 50値（次の脱皮齢まで50%が生残可能な絶食日数 = PNR_{50} ）を推定した。

材料と方法

絶食耐性試験に用いたふ化フィロソーマは、2003年4月7~8日に静岡県南伊豆町下流地先で刺網により漁獲された親エビから得た。親エビは、自然光および

自然水温下で飼育した。なお、本試験ではフィロソーマの脱皮とともに齢数を加えていき、これを脱皮齢と称した。また、ふ化当日をふ化後0日とした。

試験は2回実施し、1回目の試験（試験-1）は2003年7月10日に、2回目の試験（試験-2）は8月24日にふ化したフィロソーマを供試した。試験-1では、ふ化フィロソーマの絶食期間を0, 2, 4, 6および8日間（以下、絶食0日区, 2日区, 4日区, 6日区および8日区）とし、これらに無給餌区を加えて6試験区を設定した（表1）。試験-2では、1回目の試験の結果から、絶食期間を0, 1, 2, 3および4日間とし、無給餌区と合わせて6試験区とした（表1）。試験-1の期間は2003年7月10日~8月14日（ふ化後35日目）、試験-2は8月24日~10月6日（同43日目）で、前者はすべての生残個体が脱皮5齢に、後者では6齢に到達するまでとした。

試験水槽は、容量500mlの亚克力製ボウル型水槽で各試験区に2槽使用し、供試したふ化フィロソーマは1水槽当たり10尾とした。飼育水温は26~27℃に設定した。アルテミアは各試験区で設定した絶食期間の後、給餌を開始し、フィロソーマの成長に合わせて大きさを調整した。ムラサキイガイ生殖腺の細片は、脱皮5齢の出現と同時に、アルテミアと併用給餌した。飼育

表1 イセエビふ化フィロソーマの絶食耐性試験における試験設定

試験区	ふ化後日数毎のアルテミア給餌の有無										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
< 試験-1 >											
無給餌区	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
絶食0日区	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
絶食2日区	×	×	○	○	○	○	○	○	○	○	○
絶食4日区	×	×	×	×	○	○	○	○	○	○	○
絶食6日区	×	×	×	×	×	×	○	○	○	○	○
絶食8日区	×	×	×	×	×	×	×	×	○	○	○
< 試験-2 >											
無給餌区	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
絶食0日区	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
絶食1日区	×	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
絶食2日区	×	×	○	○	○	○	○	○	○	○	○
絶食3日区	×	×	×	○	○	○	○	○	○	○	○
絶食4日区	×	×	×	×	○	○	○	○	○	○	○

各試験区とも500ml亚克力ボウル水槽の数は2個、収容尾数は10尾

水は0.2 μ mの中空糸フィルターでろ過処理した海水を使用し、水槽交換とアンピシリン20ppmの薬浴は毎日実施した。本試験では、毎日水槽交換する際に生残尾数と脱皮殻の個数を計数した。各脱皮齢における体長は、試験区すべての生残個体が脱皮した2~4日後にガラスシャーレに移し、万能投影機(V-12B, NIKON)により測定した。

試験-1の絶食0日区、2日区および4日区において、試験終了時に生残していたそれぞれ16尾、16尾および2尾の個体は、その後の生残および成長を確認するため、それぞれ5 ℓ ボウル水槽に収容し、ふ化後102日まで流水飼育(流量約57回転/日)による継続飼育を行った。この間、ムラサキイガイの生殖腺細片とアルテミアを給餌し、水槽交換とアンピシリン20ppm、15時間の薬浴は7日毎に行った。体長の測定は、生残した個体すべてについて、ふ化後102日に実施した。

結 果

各試験区における脱皮齢毎の生残率を図1、2に示した。無給餌区では、いずれもふ化後8日以降死亡個体が見られ、ふ化後10日までに2齢に脱皮することなくすべて死亡した。絶食0日区、1日区、2日区および3日区では2~6齢の平均生残率に差はなく、85%以上の値を示した(図2)。絶食4日区では2齢での平均生残率が40%であり、試験-1、2における生残率のばらつきが0~70%と大きく、2齢に達した個体はその後死亡することはなかった。絶食6日区、8日区ともに2齢に達する個体はなかったが、絶食6日区ではふ化後7~20日、8日区ではふ化後8~11日で死亡個体が見られ、6日区では全数死亡までの日数が無給餌区と比較して延長する傾向が認められた。

各脱皮齢における平均脱皮間隔は、1齢では絶食期間に応じて延長するものの、2齢以降ではほぼ同様の

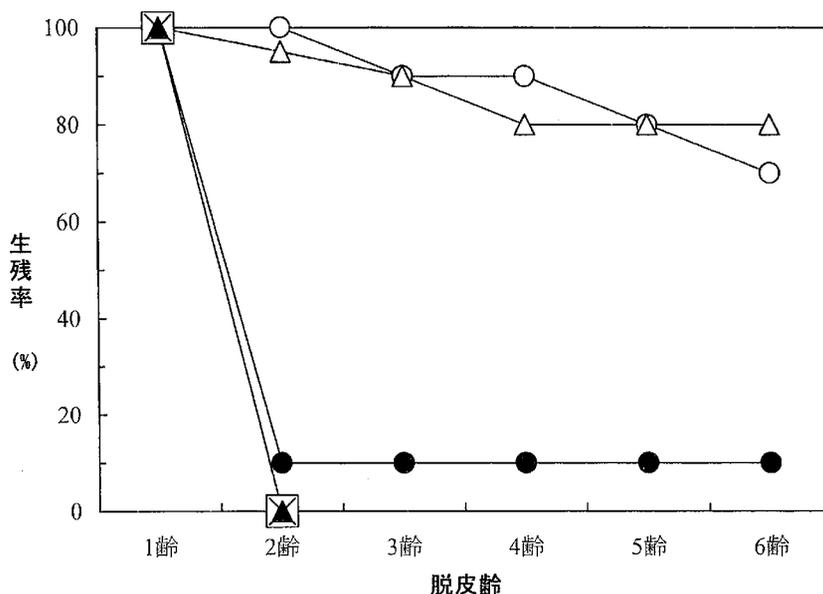


図1 イセエビふ化フィロソーマの絶食耐性試験における脱皮齢毎の平均生残率(試験-1)

□— 無給餌区 ○— 絶食0日区 △— 絶食2日区
 ●— 絶食4日区 ×— 絶食6日区 ▲— 絶食8日区

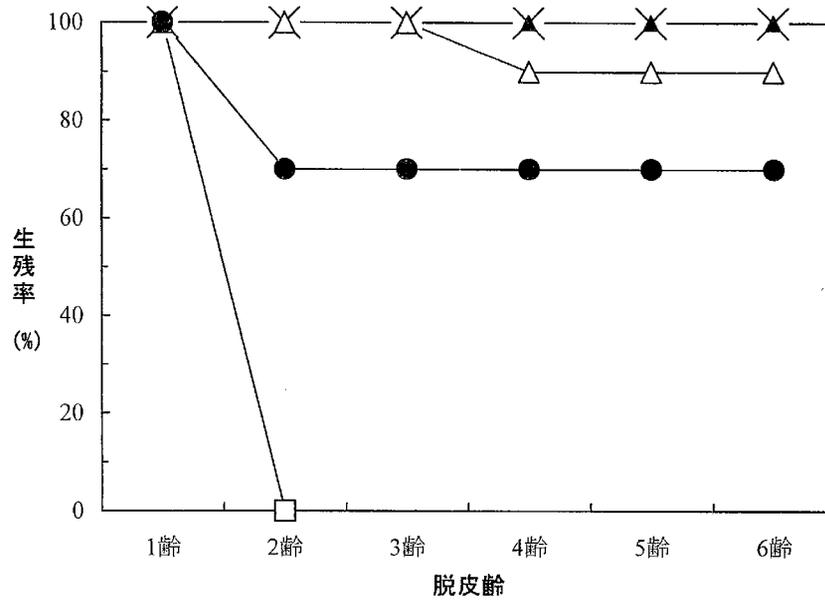


図2 イセエビふ化フィロソーマの絶食耐性試験における脱皮齡毎の平均生残率 (試験-2)

- 無給餌区 ○ 絶食0日区 × 絶食1日区
- ▲ 絶食2日区 △ 絶食3日区 ● 絶食4日区

間隔で推移する傾向が認められた (図3, 4)。また、5 齢までの成長については、絶食期間と各脱皮齡の体長との間に差が認められなかった (表2)。

試験-1における絶食0日区、2日区および4日区の継続飼育では、ふ化後102日での生残率がそれぞれ75.0%、80.0%および10%となり、死亡は絶食0日区

の1尾のみであった。また、ふ化後102日の脱皮齡は、絶食0日区が12~13齡、2日区が11~12齡、4日区が10齡であり、生残個体すべてが10齡に達したのは、絶食0日区がふ化後76日、2日区がふ化後84日、4日区がふ化後102日であった。

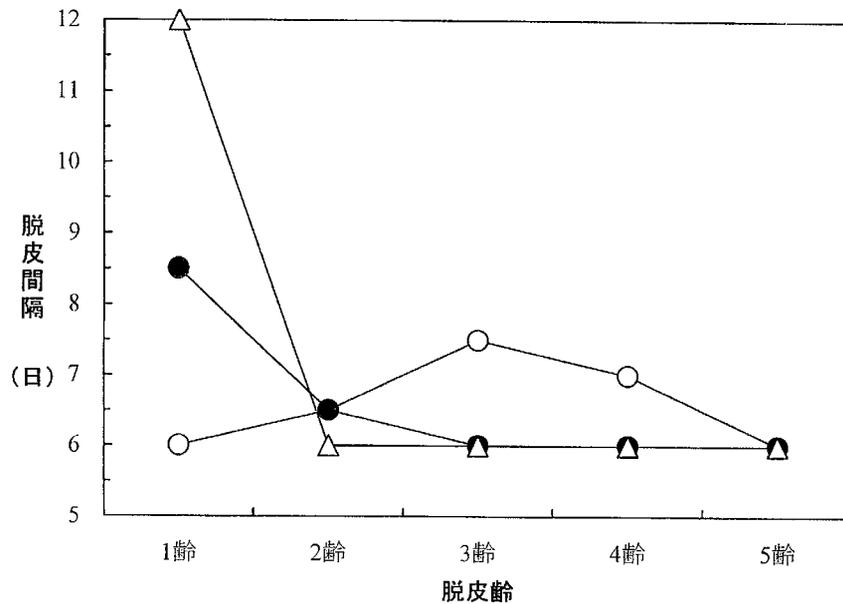


図3 イセエビふ化フィロソーマの絶食耐性試験における脱皮間隔 (試験-1)

- 絶食0日区 ● 絶食2日区 △ 絶食4日区

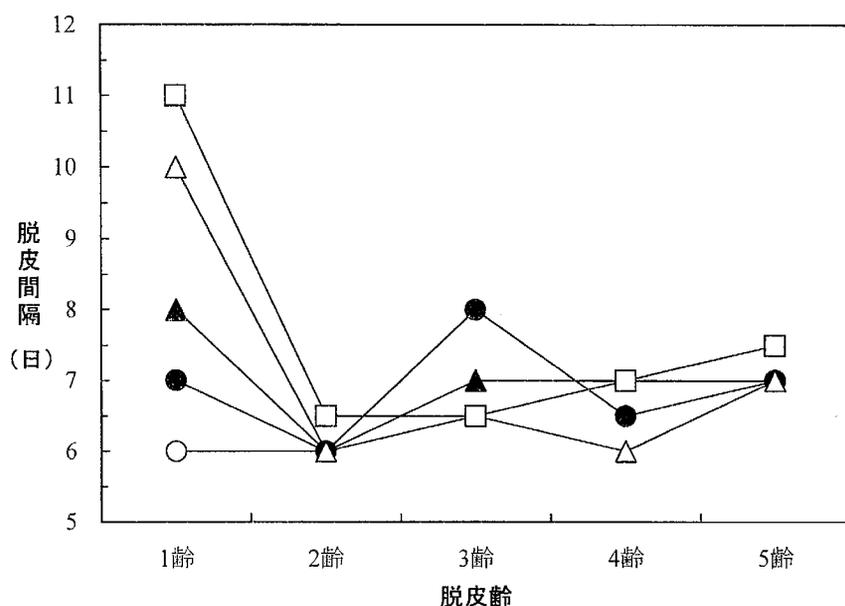


図4 イセエビふ化フィロソーマの絶食耐性試験における脱皮間隔（試験-2）

○—絶食0日区 ●—絶食1日区 ▲—絶食2日区 △—絶食3日区 □—絶食4日区

表2 イセエビふ化フィロソーマの絶食耐性試験結果

試験区	1 齢				5 齢				ふ化後102日				
	生残率	体長	±	SD	生残率	体長	±	SD	生残率	脱皮齢	体長	±	SD
絶食0日区					80.0	3.60	±	0.170	75.0	12-13	9.62	±	1.123
絶食2日区	100	1.64	±	0.026	80.0	3.66	±	0.192	80.0	11-12	8.82	±	0.964
絶食4日区					10.0	3.65	±	0.116	10.0	10	7.68	±	0.083

考 察

通常の飼育ではふ化後30日ではほぼ5齢に達することから、5齢の生残率でふ化フィロソーマの活性を評価すると、 PNR_{50} の値は3.8と推定された（図5）。したがって、ふ化フィロソーマは3日以内に摂餌しなければ、その後の生残に悪影響を及ぼすものと考えられた。本試験における PNR_{50} の値は、同様の試験を行った既往の報告¹⁻³⁾ ($PNR_{50}=3.4\sim 3.9$) とほぼ一致する値であった。50ℓボウル型水槽を使用した流水飼育では、脱皮齢が進行するに伴い、全個体が次の齢に脱皮するのに要する日数が増加する傾向があるが、これは今回の試験結果から2齢（ふ化後7日目）以降も摂餌しない個体が徐々に増加することが原因と推測された。

今回の試験期間内では、絶食3日以内であれば生残状況に、4日以内であれば2齢以降5齢までの脱皮間隔と体長に差がなかった。このことから、2齢まで

生残し十分餌料を摂餌した個体は、それ以降少なくとも5～6齢までは同様の発育・成長を示すものと考えられた。試験-1における絶食0日区、2日区および4日区で生残した個体の継続飼育の結果、5齢以降ふ化後102日まで各試験区とも死亡個体はほとんどないものの、ふ化後102日での体長は絶食0日区>2日区>4日区であり、脱皮2齢への進行の差は絶食0日区と2日区では2～3日、0日区と4日区では6日であったものが、10齢では前者が8日、後者が26日と著しく広がった。このことから、幼生期間の長い本種では脱皮に対する絶食の影響はふ化後の日数が進むにつれて、大きくなるものと推測され、フィロソーマがふ化後300日以上を要してプエルルスに変態する時点では、大幅な成長差となる可能性が高いと考えられた。今後、より安定した飼育技術を確認するための基礎的知見として、成長段階に応じた絶食耐性についても明らかにしておくことが重要であろう。

文 献

- 1) 山川 卓・松田浩一・西村守央 (1990) イセエビ幼生 (フィロゾーマ) の飼育に関する研究. 平成元年度三重県水産技術センター事業報告, 53-55.
- 2) Mikami, S., and F. Takashima (1993) Effect of starvation upon survival, growth and molting interval of the larvae of the spiny lobster *Panulirus japonicus* (Decapoda, Palinuridae). *CRUSTACEANA*, **64**, 137-142.
- 3) Mikami, S., J.G. Greenwood and N.C. Gillespie (1995) The effect of starvation and feeding regimes on survival, intermolt period and growth of cultured *Panulirus japonicus* and *Thenus* sp. phyllosomas (Decapoda, Palinuridae and Scyllaridae). *CRUSTACEANA*, **68**, 160-169.

マダイを対象とした閉鎖系循環飼育 - I ～生物ろ過装置の機能向上について～

山本義久*¹・鴨志田正晃*²・岩本明雄*¹

(*¹ 屋島栽培漁業センター, *² 栽培漁業部)

我が国では、養殖業からの排出物による環境負荷が周辺海域に悪影響を及ぼす問題が近年取りざたされ、環境保全の立場から陸上養殖による閉鎖系循環飼育が注目されつつある。あわせて、環境負荷の軽減と疾病等の外的リスクを回避可能なシステムの構築が検討されている。我が国の閉鎖系循環飼育システムに関する研究は1950～60年代にかけて主に水族館を中心に行われ、ろ過槽の機能¹⁻⁵⁾や浄化微生物の生理特性^{6,7)}等について多くの知見が集積された。また世界的にみれば1970年代に欧米における養殖分野で盛んに実証され、様々なシステム開発がなされている。しかし、欧米での閉鎖系循環飼育の概念では、10～20% / 日程度の換水率でも閉鎖系循環飼育の範疇に入るため、閉鎖度の高い飼育システムについては十分な検討がなされていない⁸⁾。疾病等の外的リスクを徹底して削減するためには極力新水を添加しない方法が必要であり、近年の魚類種苗生産や養殖分野でのウイルスを主体とした疾病の脅威から考えると、より徹底した管理の行えるシステムの構築が必要とされている。

屋島栽培漁業センター（以下、当センター）では、2000年よりマダイを対象とした閉鎖系循環飼育システムに関する技術開発を実施し、現在は5kℓ水槽規模で1日の換水率が1%以下で全長30mmサイズまでの種苗生産が可能となっている。しかし、今後閉鎖度が高く、かつ窒素負荷が高い高密度飼育等に対応可能な閉鎖系循環飼育システムを構築するためには、高い硝化能力機能が必要である。本技術開発では、マダイの閉鎖系循環飼育システムにおいて、生物ろ過装置の硝化能力の向上を目的に、ろ材の材質、ろ過水の回転率、水温、および酸素付加について検討した。

材料と方法

閉鎖系循環システムの構成 飼育水槽には5kℓ FRP水槽（実容量4kℓ）を使用した。当センターの閉鎖系循環飼育システムは、泡沫分離装置、生物ろ過装置、および紫外線殺菌装置からなる。泡沫分離装置では飼育水中の懸濁物の除去、生物ろ過装置ではアンモニア態窒素および亜硝酸態窒素の硝化、紫外線殺菌装置では細菌数の低下を目的としている（図1）。飼

育水は、飼育水槽からの排水を生物餌料の回収を行う受け水槽に貯水し、自吸式ポンプ（0.2kw：寺田ポンプ）を介して泡沫分離装置、生物ろ過装置および紫外線殺菌装置を経由して飼育水槽に戻る経路で循環させた。泡沫分離装置は、カーバスエアレーター（自吸式気液混合装置）を備えたKA式泡沫分離装置（容量250ℓ：TAS環境エンジニアリング）を用い、生物ろ過装置は400ℓのFRP水槽に200ℓ容量のろ材を収容し、上方向から下方へろ過水を環流させる浸漬ろ床方式とした。泡沫分離装置および生物ろ過装置内では、自吸式ポンプで飼育水を循環させた。紫外線殺菌装置はフロライザー 2DL（千代田工販）を使用した。

3 態窒素濃度の測定とアンモニア態窒素の硝化速度測定 アンモニア態窒素、亜硝酸態窒素および硝酸態窒素の濃度は、DR/2000（HACH）によりそれぞれサリチル酸法、ジアゾ化法、カドミウム還元法で測定した。

アンモニア態窒素の硝化速度の測定方法は、閉鎖系循環飼育システムに塩化アンモニウム20gを添加後、経時的にアンモニア態窒素濃度を測定した値から、アンモニア態窒素濃度（Y：mg/ℓ）と経過時間（X：時間）の関係を求め、硝化速度は回帰式の傾き（a）の絶対値とした。

ろ材の材質 ろ材はソフトセラミック（多孔質セラミック：フィルテック）、ファビオス（ポリエステル繊維担体：ユニチカ）、サランロック（塩化ビニレリン繊維：旭化成）およびライトホーム（ガラス製バイオフィルター：ライトウエーブ研究所）の4種類を使用した。ろ過槽にはFRP水槽（実水量400ℓ）を用い、各ろ材30ℓと硝化細菌の元種用に十分に熟成させたソフトセラミック10ℓを収容した。海水にはろ過海水250ℓを用い、小型水中ポンプを用いて100回転/日（20ℓ/分）の割合で循環させた。硝化細菌着床のための栄養源として、塩化アンモニウムを0.8～4g/日添加した。熟成1ヵ月後と3ヵ月後に元種用のろ材のみを除去し、硝化能力試験として塩化アンモニウム50～60gを添加後、3日目のアンモニア態窒素、亜硝酸態窒素および硝酸態窒素の濃度を測定し、ろ材の違いによる硝化能力を比較した。

ろ過水の回転率 ろ材（ソフトセラミック）を200

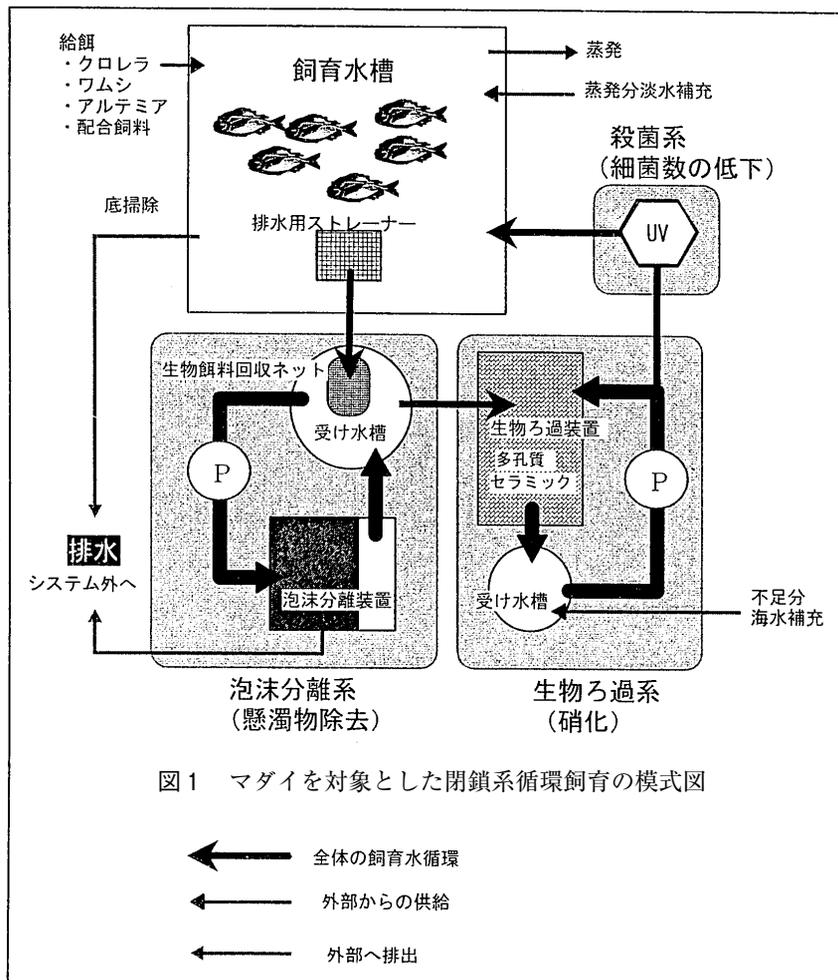


図1 マダイを対象とした閉鎖系循環飼育の模式図

ℓ 収容したろ過槽（実容量350 ℓ）を用い、循環ポンプの流量を調節することで回転率を10, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400回転/日に変えた試験を行った。試験は、ろ材の熟成度合いが異なる3水槽で実施し、塩化アンモニウム20gを添加して10～12時間後までのアンモニア態窒素の硝化速度を測定した。また、それぞれ回転率と硝化速度の関係の回帰式を求めた。

ろ過水の水温 サーモスタットと1kwヒーターを用いて、ろ過水の水温を14, 17, 20, 23, 26℃とする5段階を設定した。試験では、塩化アンモニウム20gを添加し、10～12時間後までのアンモニア態窒素の硝化速度を測定した。ろ過水の回転率は100回転/日とし、同一水槽で試験を実施した。その他の条件は、ろ過水の回転率の試験と同様とした。また、それぞれ回転率と硝化速度の関係の回帰式を求めた。

ろ過槽への酸素付加 ろ過槽への酸素付加方法は、純酸素を循環経路内のパイプに送り込み循環水と混合させることで、酸素飽和度が180～190%になるように調整した試験区と、酸素付加を行わない対照区の2試験区を設けた。試験では、塩化アンモニウム20gを

添加して開始し、10～12時間後までのアンモニア態窒素の硝化速度を測定した。ろ過槽の回転率は100回転/日、水温は20℃とし、同一水槽で試験を実施した。その他の条件設定はろ過水の回転率の試験と同様とした。

結 果

ろ材の材質 試験結果の概要を表1および表2に示した。アンモニア態窒素の硝化能力は、熟成1カ月後の試験ではソフトセラミックが8.0mg/ℓ/時と最も優れた硝化能力を示した。熟成3カ月後の試験では、ソフトセラミックとライトホームはそれぞれ9.0mg/ℓ/時、9.1mg/ℓ/時と差はなかった。一方、ファビオスとサランロックの硝化能力は前述の2種より劣り、それぞれ熟成1カ月後の試験では2.8mg/ℓ/時と4.2mg/ℓ/時、熟成3カ月後の試験では5.0mg/ℓ/時と5.4mg/ℓ/時であった。

試験開始3日目の亜硝酸態窒素濃度は、1カ月間熟成させたろ材ではソフトセラミックが39.0mg/ℓ、

表1 1カ月間熟成した各種ろ材の硝化能力に関する試験結果の概要

ろ材名	実水量 (ℓ)	ろ材容量 (ℓ)	アンモニア態窒素濃度(mg/ℓ)		アンモニア態窒素 の硝化能力* (mg/ℓ/h)	亜硝酸態窒素(mg/ℓ)	硝酸態窒素(mg/ℓ)
			試験開始時	試験開始3日後			
ソフトセラミック	250	30	70.0	1.0	8.0	39.0	41.6
ライトホーム	250	30	64.0	3.0	7.1	33.0	44.8
ファビオス	250	30	66.0	42.0	2.8	7.8	17.4
サランロック	250	28	68.0	34.0	4.2	9.6	17.4

* アンモニア態窒素の硝化能力 = 試験開始時と終了時のアンモニア態窒素濃度の差 / 経過時間 × 水量 / ろ材量

表2 3カ月間熟成した各種ろ材の硝化能力に関する試験結果の概要

ろ材名	実水量 (ℓ)	ろ材容量 (ℓ)	アンモニア態窒素濃度(mg/ℓ)		アンモニア態窒素 の硝化能力* (mg/ℓ/h)	亜硝酸態窒素(mg/ℓ)	硝酸態窒素(mg/ℓ)
			試験開始時	試験開始3日後			
ソフトセラミック	250	30	80.0	2.0	9.0	1.7	63.5
ライトホーム	250	30	80.0	1.3	9.1	3.3	64.0
ファビオス	250	30	79.8	36.2	5.0	5.3	27.5
サランロック	250	28	79.9	36.1	5.4	4.4	28.0

* アンモニア態窒素の硝化能力 = 試験開始時と終了時のアンモニア態窒素濃度の差 / 経過時間 × 水量 / ろ材量

ライトホームが33.0mg/ℓと高濃度に蓄積し、硝酸態窒素への移行が十分進んでいなかった。しかし、3カ月間熟成させたろ材ではソフトセラミックが1.7mg/ℓ/h、ライトホームが3.3mg/ℓとなった。また、アンモニア態窒素濃度もそれぞれ2.0mg/ℓ、1.3mg/ℓと低くなったが、硝酸態窒素は63.5mg/ℓ/時、64.0mg/ℓと高濃度であった。両ろ材とも添加したアンモニア態窒素はほぼ硝化されて硝酸に移行したことから、十分に熟成したと考えられた。ファビオスとサランロックでは、3カ月間の熟成でも試験開始3日目のアンモニア態窒素濃度はともに約36mg/ℓと高かった。今回の試験で、ソフトセラミックとライトホームはほぼ同等の硝化能力を示したが、同容量で重量的に軽いソフトセラミックがろ材として適正であると判断した。

ろ過水の回転率 ろ過水の回転率ごとのアンモニア

態窒素濃度と経過時間の関係を表3に示した。それぞれの相関係数は0.93以上と高く、直線回帰していると考えられた。上記の回帰式の傾き a の絶対値をアンモニア態窒素の硝化速度とし、ろ過水の回転率との関係から算出した関係式は以下のように対数関係を示した(図2)。

$$\text{水槽1} : Y = 0.314 \ln(X) - 0.272 \quad (R^2 = 0.936)$$

$$\text{水槽2} : Y = 0.233 \ln(X) - 0.272 \quad (R^2 = 0.970)$$

$$\text{水槽3} : Y = 0.196 \ln(X) - 0.030 \quad (R^2 = 0.937)$$

以上の様に、熟成度合いが異なる3水槽で、ろ過水の回転率の増加に伴いアンモニア態窒素の硝化速度は向上し、100回転/日以下では急激に硝化能力が低下する傾向が示された。

ろ過水の水温 ろ過水の水温ごとのアンモニア態窒素濃度と経過時間の関係を表4に示した。それぞれの相関係数は0.9以上と高く、直線回帰していると考え

表3 ろ過水の回転率とアンモニア態窒素の硝化速度の関係式

回転率 (回転/日)	水槽1			水槽2			水槽3		
	a	b	R ²	a	b	R ²	a	b	R ²
10	-0.50	19.35	0.970	-0.49	18.79	0.981	-0.52	18.74	0.934
25	-0.65	20.64	0.988	-0.77	20.11	0.953	-0.72	19.82	0.959
50	-0.58	19.16	0.936	-0.79	18.56	0.970	-0.75	17.53	0.965
75	-0.82	20.23	0.954	-0.92	19.01	0.963	-1.12	19.02	0.980
100	-0.78	21.00	0.983	-1.02	19.05	0.959	-1.32	20.10	0.960
200	-0.98	17.00	0.950	-1.18	19.06	0.991	-1.34	18.20	0.963
300	-1.15	16.98	0.992	-1.30	17.75	0.993	-1.55	16.41	0.978
400	-1.17	18.32	0.972	-1.40	16.70	0.998	-1.61	16.40	0.971

$$Y \text{ (アンモニア態窒素濃度)} = aX \text{ (経過時間)} + b, \quad (R^2: \text{相関係数})$$

られた。上記の回帰式の傾き a の絶対値をアンモニア態窒素の硝化速度とし、ろ過水の回転率との関係から算出した関係式は以下のように指数関係を示した (図 3)。

$$Y=0.2992e^{0.0528X} \quad (R^2=0.990)$$

ろ過水の水温が14~26℃の範囲では、水温が高いほどアンモニア態窒素の硝化能力は向上する傾向が示された。

ろ過水への酸素付加 ろ過槽への酸素付加の有無に

よるアンモニア態窒素濃度と経過時間の関係は、以下の関係式で示された (図 4)。

$$\text{酸素付加有り} : Y=-0.82X+21.49 \quad (R^2=0.992)$$

$$\text{酸素付加なし} : Y=-0.80X+20.50 \quad (R^2=0.999)$$

上記の回帰式の傾き a の絶対値をアンモニア態窒素の硝化速度として比較した結果、酸素付加の有無で硝化速度に差はなく、アンモニア態窒素の硝化能力にはほとんど影響は認められなかった。

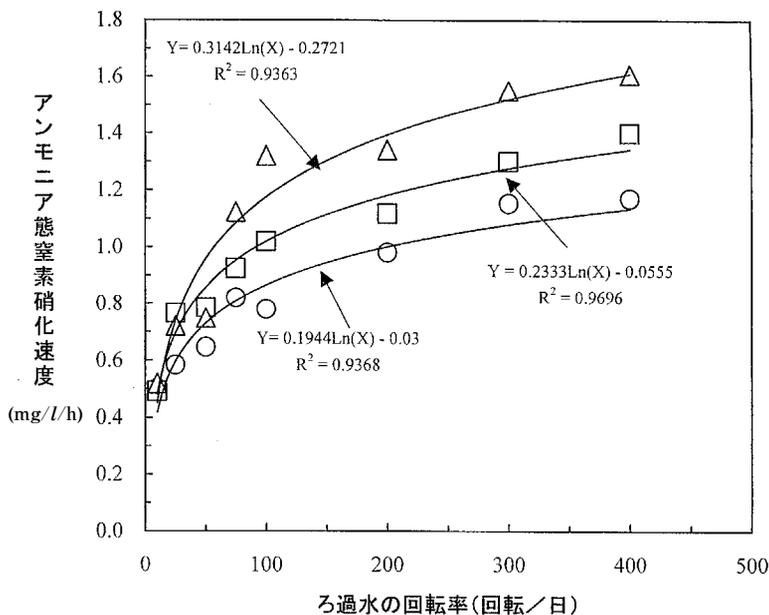


図 2 ろ過水の回転率とアンモニア態窒素の硝化速度の関係
○水槽1 □水槽2 △水槽3

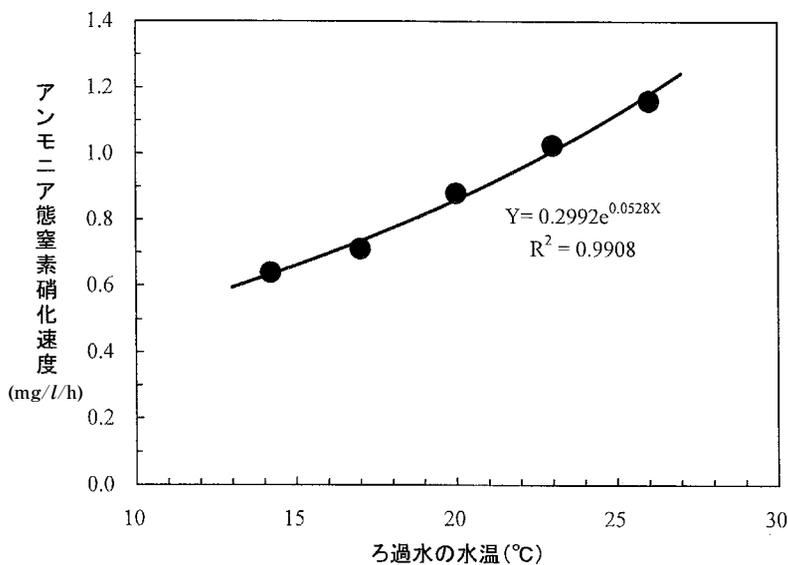


図 3 ろ過水の水温とアンモニア態窒素の硝化速度の関係

表4 ろ過水の水温とアンモニア態窒素の硝化速度の関係式一覧

ろ過水水温 (℃)	関係式係数		
	a	b	R ²
14	-0.64	19.69	0.980
17	-0.71	20.25	0.905
20	-0.80	20.50	0.999
23	-1.03	19.90	0.994
26	-1.16	19.30	0.956

Y (アンモニア態窒素濃度) = aX (経過時間) + b, (R²: 相関係数)

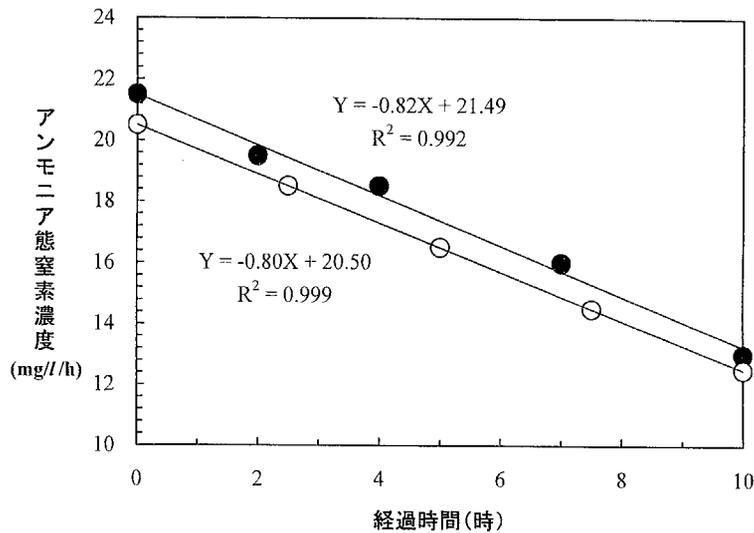


図3 ろ過槽への酸素付加の有無による硝化速度の比較

●酸素有り ○酸素なし

考 察

ろ材の材質 生物ろ過槽の機能は、毒性の強いアンモニア態窒素と亜硝酸態窒素を低濃度では毒性がない硝酸態窒素に硝化させることにある。硝化作用は、ろ材や装置の壁等に定着した独立栄養細菌である硝化細菌が行っており、硝化作用はアンモニアから亜硝酸への酸化と、亜硝酸から硝酸への酸化の2つの過程からなる。それぞれの酸化作用で主要となる細菌群は異なることが知られており⁹⁾、概ね前者の作用をする細菌が卓越した後に後者の作用をする細菌が増殖する。今回行ったろ材の材質選定の試験で、1カ月間熟成させたろ材の硝化能力では、アンモニアから亜硝酸への酸化作用は進んでいたが、亜硝酸から硝酸への酸化は進んでおらず、1カ月の熟成期間では後者の作用をする細菌群の増殖には短いと考えられた。しかし、ろ材を3カ月間熟成させることで亜硝酸態窒素の蓄積は少なくなり、亜硝酸から硝酸への酸化作用を持つ細菌群も増殖したと考えられた。ろ材の熟成期間は2～3カ月程度と報告¹⁰⁾されており、本試験でも同様の結果が得られた。

現在、当センターではろ材の熟成用の水槽を設けて、周年塩化アンモニウムを適宜添加し、常時熟成されたろ材を確保している。また、今回の試験では、ソフトセラミックが硝化能力、重量等の点からろ材として適していると判断したが、さらに、硝化細菌を早く効率的に定着させ、かつ安価であるろ材についての検討を進め、種苗生産に適したろ材の選定を行うことが必要である。

硝化細菌の着床方法としては、今回行った水界に存在する硝化細菌を利用する方法の他に、効率的な硝化作用がある細菌を培養し、これを積極的に添加してろ材に定着させる方法、および培養した硝化細菌を高分子の透過性のビーズ等に包括する微生物固定法等⁸⁾がある。微生物固定法として、植本ら¹¹⁾は、海洋性硝化細菌の固定化利用法で、通常生物膜法の約6倍の処理能力を持つ技術を開発している。本技術開発では、自然に定着・増殖した硝化細菌を利用したが、今後は効率的な硝化作用を持つ硝化細菌の分離、培養と固定化技術の応用が必要である。

ろ過水の水温と回転率 ろ過槽の機能向上の方法として、ろ過水の水温と回転率を上昇させることに効果

が認められた。水温に関する既存の知見¹²⁾と同様に、水温が高いほど硝化能力は向上した。海洋性硝化細菌の増殖好適水温は30～35℃とされ¹³⁾、今回の試験設定の最高水温(26℃)よりも高い。マダイの種苗生産では、飼育に適正な水温は16～23℃程度¹⁴⁾であるため、ろ過水槽の水温を30℃以上にすると飼育水槽の水温も上昇するため冷却装置が必要となり経費的に問題となる。このため、ろ過水槽の設定水温は25℃前後が適正と考えられた。

閉鎖系循環飼育システムの特徴は、ポンプで生物ろ過槽内の飼育水を高回転率で循環させ、その一部を紫外線殺菌装置に通してから飼育水槽に戻す方法を用いており、硝化作用を効率的に行い、生物ろ過槽の省スペース化を図ることを目的としている。この方法は、既存の閉鎖系循環飼育システムではほとんど導入されてはならず、一般的には飼育水の全体の循環率で生物ろ過槽内の水の出入りが行われている。ろ材の硝化能力と循環量について、平山³⁾と田中・青海¹⁵⁾が今回と同様の結果を報告している。一方、閉鎖系循環システムは種苗生産を目的としているため、飼育水全体の循環率を過度に上げると生物餌料が飼育水槽から流出し、仔稚魚の成長、生残に影響すると考えられる。ろ過槽内を再循環させる方法は、生物餌料の密度を維持ししつつ、ろ過槽の硝化能力を向上させる手法として有効である。さらに、今回の結果からろ過水の回転率を上げ、かつ経費の軽減を考える上では、ポンプ送水以外にエアリフトの併用も検討の価値がある。

閉鎖系循環飼育システムの機能向上の試算 今回の試験で、ろ材はソフトセラミックが優れ、最も硝化能力が高かったろ過水の条件は水温26℃、回転率400回転/日であった。それぞれの最適条件で試算した硝化能力は、現生物ろ過槽の種苗生産時の条件(水温20℃前後、回転率100回転/日)と比較して、水温では1.36倍、回転率では平均1.37倍となった。さらに、両条件を組み合わせた場合の硝化能力は、現状の設定条件の1.86倍となり、効率的に硝化能力の向上が図れることが示された。

硝化能力向上には、ろ材量の増加が最も効果的な方法と考えられる。当センターの閉鎖系循環飼育システムは、飼育水槽の容量4,000ℓに対してろ材量は5%程度の200ℓである。この値は既知の他のシステム¹⁶⁾と比較すると極めて少なく、ろ材量を拡充する余地は十分にある。当システムでろ材量を現在の2倍にした場合、上述したろ過水の最適水温と回転率の条件で試算すると、現生物ろ過槽の硝化能力は3.72倍まで向上すると考えられた。

当システムでは、生物ろ過の過程の前に懸濁物除去機能を有する泡沫分離装置を設置している。このた

め、懸濁物による生物ろ過槽の負担が軽減され、生物ろ過槽の容量が少なくても効果的に硝化作用が行われていると考えられる。泡沫分離装置の効果は、ヒラメ¹⁷⁾やウナギ¹⁸⁾の長期高密度飼育試験等で実証されているが、当センターのシステムでもろ材の閉塞原因となるクロレラの除去や細菌数の減少、アンモニア態窒素の物理的酸化作用などが明らかにされつつあり、多機能を有する泡沫分離装置と生物ろ過槽の組み合わせは効果的であると考えられる。一般的な種苗生産対象魚種では、生産期間は長くても3カ月程度であり、窒素負荷量も比較的少ないことから当システムによる種苗生産は十分可能である。今後は、高い収容密度での種苗生産や放流サイズまでの一貫飼育等の窒素負荷が高いと考えられる飼育への対応を目的に、今回の試験で得られた硝化能力向上の成果を組み入れた閉鎖系循環システムの再構築に取り組む。

文 献

- 1) 佐伯有常(1958)魚介類の循環濾過式飼育法の研究基礎理論と装置設計基準. 日水誌, 23, 684-695.
- 2) 平山和次(1965)海産動物飼育海水の循環濾過式浄化法に関する研究-I. 濾過による海水浄化量の指標としての溶存酸素の減少量. 日水誌, 31, 977-982.
- 3) 平山和次(1965)海産動物飼育海水の循環濾過式浄化法に関する研究-II. 濾過速度および砂層の厚さと海水浄化量との関係. 日水誌, 31, 983-990.
- 4) 平山和次(1966)海産動物飼育海水の循環濾過式浄化法に関する研究-III. 濾砂の粒径と海水浄化量(OCF)との関係. 日水誌, 32, 11-19.
- 5) 平山和次(1966)海産動物飼育海水の循環濾過式浄化法に関する研究-IV. 飼育魚による海水の汚濁, および循環濾過式飼育水量の安全収容量. 日水誌, 32, 20-27.
- 6) 河合 章・吉田陽一・木俣正夫(1964)循環濾過飼育水槽の微生物化学的研究-I. 魚の飼育に伴う水質ならびに微生物相の変化について. 日水誌, 30, 55-62.
- 7) 河合 章・吉田陽一・木俣正夫(1965)循環濾過飼育水槽の微生物化学的研究-II. 濾過砂の硝酸化成作用について. 日水誌, 31, 65-71.
- 8) 菊池弘太郎(1999)循環型養殖システムによる負荷低減. 水産養殖とゼロエミッション研究(日野明徳, 丸山俊朗, 黒倉 寿編). 恒星社厚生閣, 東京, 64-76.

- 9) 菊池弘太郎, 武田重信 (1999) 循環濾過養魚における水質変化と物質収支. 養殖, 4, 42-47.
- 10) 菊池弘太郎 (1998) 循環濾過養魚のための水処理技術. 日水誌, 64, 227-234.
- 11) 植本弘明, 渡辺良朗, 菊池弘太郎 (1994) 高能率魚類生産のための水質浄化技術の開発, 10. ヒラメ飼育への固定化微生物の適用. 電力中央研究所報告, U9304, p.22.
- 12) Brune, D. E. and D.C.Gunther (1981) The design of a new high rate nitrification filter for aquaculture reuse. *J. World Maricult. Soc.*, 12, 20-31.
- 13) 菊池弘太郎 (2000) 生物ろ過のメカニズムとろ材の活用法, 養魚家のためのろ材のやさしい基礎知識. 養殖, 9, 84-89.
- 14) 山口正男 (1978) タイ養殖の基礎と実際. 恒星社 恒星閣, 東京, 1-414.
- 15) 田中直幸, 青海忠久 (2003) 閉鎖循環飼育用濾材の硝化能力における枯草菌導入の効果と水温・pH など環境要因の硝化能力への影響. 日本水産増殖学会第2回大会講演要旨集, 水産増殖, 51, 477.
- 16) 鈴木祥広, 丸山俊朗 (2001) ゼロエミッション型養殖システムとは. 21世紀の養殖施設, 01年度養魚施設ガイド, 養殖臨時増刊号, 39, 48-53.
- 17) 丸山俊朗, 鈴木祥広, 佐藤大輔, 神田 猛, 道下 保 (1999) 泡沫分離・硝化システムによるヒラメの閉鎖循環式高密度飼育. 日水誌, 65, 818-825.
- 18) 鈴木祥広, 丸山俊朗, 竹本 進, 小田リサ (1999) 泡沫分離・硝化脱窒システムによるウナギの閉鎖循環式高密度飼育. 水環境学会誌, 22, 896-903.

流速環境の変化がクエ仔魚の摂餌および生残に与える影響

本藤 靖*¹・齋藤貴行*¹・照屋和久*²・與世田兼三*³

(*¹ 五島栽培漁業センター, *² 上浦栽培漁業センター,

*³ 八重山栽培漁業センター)

クエ *Epinephelus bruneus* はハタ類の中でも大型で、全長1 m以上、体重100kgに達し、非常に美味であることから高級魚として取り引きされている。近年、天然資源の減少が懸念され、栽培漁業による資源回復への期待が大きい魚種の一つである。五島栽培漁業センターでは2000年より種苗生産技術開発の取り組みを開始した。しかし、クエは他のハタ類と同様に、種苗生産過程の初期減耗が極めて大きく^{1,3)}、これが本種の種苗生産を困難にしている理由の一つである。この初期減耗は内部栄養吸収後の飼育環境、すなわち本来の棲息環境とは異なる水温や照度、あるいは水流等の物理的な環境が原因と考えられている。特に、飼育のごく初期(日齢1~4)に飼育水槽内の水流が弱いと仔魚が水槽底に沈降して、日齢3以降に急激に減耗する^{2,4)}。そこで、異なる流速環境におけるクエ仔魚の分布状況、摂餌状況および生残状況の差異を把握するための飼育試験を行った。

材料と方法

飼育試験 試験区は、通気量を0.1~2.0 l/分の段階的に増加させて流速環境を変化させた5区とし、各試験区に対して2水槽を設けた(表1)。各水槽は、水槽中央底に設置したエアーストーン(直径31mm×長さ51mm)で通気した。1分間当たりの通気量は100~250mlのメスシリンダーを用いた容積法で測定した。供試仔魚は、人工授精によって得られた受精卵を1kl FRP水槽で管理し、ふ化させた。ふ化管理時の水温は23℃で行った。温度管理はウォーターバス方式で行い、23℃で収容して、1日1℃の割合で昇温し、日齢3の開口日には25℃になるように調整した。

飼育水槽は、500 l 黒色円形ポリエチレン水槽を用い、1水槽当たりふ化仔魚2,000尾を実数計数して収容した。換水は試験終了まで行わなかった。飼育環境として、8:30と14:00に水温、pH、DOを測定した。日齢2より市販の淡水クロレラ濃縮液(生クロレラスーパーV12、クロレラ工業)を1日当たり10ml/槽を添加した。餌料は、日齢3よりシオミズツボワムシを8:00と14:00時に給餌した。

日齢3および日齢4の10:00に各区20尾の仔魚を採集し、ワムシ摂餌率(摂餌尾数/観察尾数×100)お

よび仔魚1尾当たりの平均ワムシ摂餌数を求めた。摂餌数は、スライドガラスに仔魚1尾を乗せ、カバーガラスで軽く押し潰し、消化管内のワムシの咀嚼器数を計数して求めた。日齢1~3の8:00、12:00および16:00に目視で仔魚の分布状況を観察し、仔魚が水中に見えず水槽底に沈んでいる状態を沈降とした。また、表層、中層、底層のそれぞれの範囲(各層域20cm帯)に存在する状態を分布とした。

試験期間は日齢4までとし、生残した仔魚を実数計数して生残率を算出した。

流速の測定 飼育試験と同一条件で、仔魚を収容しない状態で流速の測定を行った。測定には3次元電磁流速計(ACH300-A、アレック電子)を用いた。流速の測定ポイントとして、水槽中央部から水槽壁まで水平方向に10cm間隔で7ポイント、水面から水槽底まで垂直方向に10cm間隔で6ポイントの合計42ポイントを設定した。また、水槽底から20cmまでを底層(測定ポイント垂直3×水平6=18)、水槽底から20~40cmまでを中層(同)、水槽底から40cm~水面までを表層(同)として各層の垂直および水平の平均流速を求め、同時に目視により流れの状態を観察した。

結 果

飼育結果 試験終了時(日齢4)の生残率(表1)は1区で52.8, 81.2%, 2区で56.9, 61.7%, 3区で57.1, 57.3%, 4区で44.4, 52.4%および5区で40.1, 38.5%となり、各試験区とも、水槽間の生残率に有意差は認められなかった(クラスカル・ウォールス検定, $p>0.05$)。一方、ワムシ摂餌率は1区6.7%, 2区33.3%, 3区80.0%, 4区73.3%および5区60.0%、仔魚1尾当たりの平均摂餌数はそれぞれ1個、3個、2個、4.5個および2.6個となり、いずれも通気量の少ない1区で最も低い値となった(表1)。

各区の水温は24.3~24.4℃、pHは8.11~8.29、DOは5.14~6.22mg/lで、試験区間で大きな差は認められなかった。1区では、試験開始直後から日齢4まで仔魚は水槽底に沈降し、中層および表層ではほとんど観察できなかった。一方、2区では底層から中層に多くが分布し、3~5区では中層付近に多くの仔魚が分布した(表3)。

流速の測定結果 水槽内での流速として、3区の測定結果を図1に示した。流れの目視観察では、各区ともにエアーストーンからの気泡分布は上向きに開いた円錐形で、この気泡の動きに応じた水の上昇流が発生した。3～5区では、水面で水平方向の流れが、側壁面で沈降流となった。1区では、全体の流れは他よりも微小で、水面での乱流はほとんど認められなかった。平均水平流速は、1区では表層から底層まで0.3

～0.4cm/秒と層間で顕著な差は認められなかったが、2～5区では表層で流速が大きくなる傾向が認められた(表2)。また、平均垂直流速は、底層では試験区間で顕著な差は認められなかったが、表層と中層では1区が2.0cm/秒以下で最も低く、2区および3区が2.0～3.0cm/秒、4区および5区が2.6～4.3cm/秒であった(表2)。

表1 500ℓ水槽を用いたクエの初期飼育試験(日齢4まで)の結果概要

試験区	1区		2区		3区		4区		5区	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
通気量(ℓ/分)	0.1	0.1	0.25	0.25	0.5	0.5	1.0	1.0	2.0	2.0
収容尾数(尾)	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000
取り揚げ尾数(尾)	1,055	1,623	1,138	1,234	1,142	1,146	888	1,047	802	770
生残率(%)	52.8	81.2	56.9	61.7	57.1	57.3	44.4	52.4	40.1	38.5
平均摂餌率(%)*	6.7		33.3		80.0		73.3		60	
平均摂餌個体数(個)	1.0		3.0		2.0		4.5		2.6	

*: 摂餌尾数/観察尾数×100

表2 クエの飼育試験における各水深帯の水平および垂直流速

試験区	通気量(ℓ/分)	水平流速(cm/秒)			垂直流速(cm/秒)		
		表層	中層	底層	表層	中層	底層
1区	0.1	0.3	0.4	0.4	1.0	1.9	2.1
2区	0.25	0.6	0.4	0.3	2.2	3.0	3.4
3区	0.5	1.0	0.4	0.5	2.0	3.0	2.8
4区	1	1.3	0.9	0.9	3.5	3.7	2.0
5区	2	2.2	1.4	1.3	2.6	4.3	2.8

表層: 水面より20cmまで, 中層: 20～40cmまで, 底層: 水槽底より20cmまで。

流速は各層ともに18ポイントの平均

表3 500ℓ水槽を用いたクエの飼育試験における通気量と仔魚の分布域の関係

試験区	通気量(ℓ/秒)	表層	中層	底層
1区	0.1	+	+	+++
2区	0.25	+	++	+++
3区	0.5	++	+++	+
4区	1	++	+++	+
5区	2	++	+++	+

+++ : 多く見られる

++ : 見られる

+ : ほとんど見られない

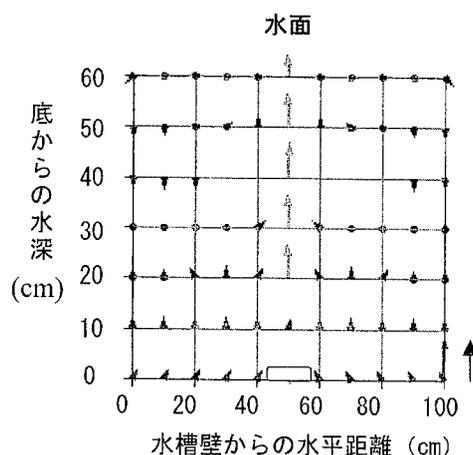


図1 通気量0.5 l / 分で通気を行った場合の流速図 (500 l 水槽)

→ 10cm/秒 □ エアーストーン

考 察

魚類仔魚の飼育では、発育に伴い比重が増加し水槽底へ沈降することが報告されているが^{5,6)}、クエふ化仔魚では水平方向の流速が0.3~0.4cm/秒、垂直方向が1.0~2.1cm/秒で、クロダイやアユよりさらに早い日齢1~3で水槽底に沈降することが明らかになり、このことが開口翌日の日齢4での摂餌率が著しく低い原因になったと考えられた。一方、水平方向1.3~2.2cm/秒、垂直方向2.6~4.3cm/秒の流速では、ふ化仔魚の沈降は見られなかったが通気による水流が強すぎたために魚体への物理的な影響が生じ、生残率が低下したと考えられた。仔魚の生残が最も良い流速は、水平方向0.4~1.0cm/秒、垂直方向2.0~3.5cm/秒であり、この流速では仔魚の水槽底への沈降は見られず、日齢4での生残率は50%以上であった。

様々な物理的、化学的飼育環境の中で、水流が飼育初期の生残に大きな影響を与えることがマハタ³⁾やキハダ⁷⁾でも報告されており、クエの種苗生産試験においても初期生残を安定させるためには、特に日齢1~3は仔魚に物理的な影響を与えず、また水槽内に水の動きが悪いいわゆる死水域ができない飼育環境を作り出すことが非常に重要であると考えられた。本試験では日齢4で試験を終了したため、その後の生残については言及できないが、試験期間中の仔魚の分布状況や摂餌状況から判断して、通気量が0.1 l / 秒以下や2.0 l / 秒以上ではその後の生残に大きく影響すると思われた。

今回の試験では、通気による魚体への損傷状況や

水槽底に沈降した仔魚が死亡に至る過程は解明できなかった。しかし、クエの初期飼育技術の向上に、流速条件の改善が効果的な役割を果たす可能性が示唆された。今後、小型水槽で得られた結果を基に、量産規模で好適な流速環境を把握し初期減耗防除技術の開発を進める必要がある。また、流速環境以外にも、水温や照度等の環境要因が初期減耗に与える影響についても同時に解明していく必要性が残されている。

文 献

- 1) 照屋和久 (2004) マハタの親魚養成におけるNNV抑制技術と健苗生産技術開発. 栽培漁業センター技報, 1, 67-70.
- 2) 照屋和久 (1999) 種苗生産技術の開発 (クエ), 日本栽培漁業協会事業年報 (平成11年度), 177.
- 3) 塩谷茂明, 赤澤敦司, 阪倉良孝, 中田 久, 荒川敏久, 荻原篤志 (2003) 仔魚飼育水槽内の流場の計測: マハタ飼育水槽の検討例. 水産工学, 39, 205-212.
- 4) 小金隆之 (1996) 種苗生産技術の開発 (クエ), 日本栽培漁業協会事業年報 (平成8年度), 176-177.
- 5) 北島 力, 山根康幸, 松井誠一 (1994) クロダイ仔魚の発育に伴う比重の変化. 日水誌, 60, 755-762.
- 6) 北島 力, 山根康幸, 松井誠一, 吉松隆夫 (1997) アユ仔魚の発育に伴う比重の変化. 日水誌,

64, 722-729.

7) 木村伸吾, 中田英昭, DANIEL MARGULIEES,
JENNY M.SUTER, SHARON L.HUNT (2004)

海洋乱流がキハダマグロ仔魚の生残に与える影
響. 日水誌, 70, 175-178.

クロマグロ仔魚の初期生残に及ぼす照度と水流の効果

手塚信弘*¹・升間主計*²・小磯雅彦*¹

武部孝行*²・二階堂英城*²・井手健太郎*²

(*¹ 能登島栽培漁業センター, *² 奄美栽培漁業センター)

クロマグロ *Thunnus thynnus orientalis* は大型で商品価値が極めて高いため、乱獲による天然資源の枯渇が懸念されており、資源管理への関心が高まるとともに、国内外で養殖が盛んに行われている¹⁾。このため、養殖あるいは放流用種苗の生産を目的とした仔稚魚の飼育試験が試みられており、陸上水槽を用いた仔稚魚の飼育に関する知見や技術が蓄積されつつある。奄美栽培漁業センターでは、1994年からクロマグロの種苗生産技術開発を開始し、1999年からは種苗の大量生産を目的として大型水槽（実容量50kl）を用いた飼育技術の開発に取り組んでいる。しかし、大型水槽を用いた飼育試験では、クロマグロ仔魚の生残率が日齢10までに1%以下まで低下する事例が多く²⁾、飼育初期における大きな問題であった。一方、奄美栽培漁業センターで飼育試験に供した受精卵の一部を八重山栽培漁業センターに輸送して飼育試験を行った場合、日齢10における生残率は10~15%と高かった²⁾。両センターの飼育方法を比較したところ、八重山栽培漁業センターにおける飼育水槽の水面照度（平均5,000lx）が、奄美栽培漁業センター（100~500lx）よりも高かった³⁾。このような背景から、1999年は中規模水槽を用いてクロマグロ仔魚の飼育初期における生残と照度の関係について調査した。さらに、2001年はこれらの結果に基づいて、大型水槽の上屋の一部を光透過性が高い素材に改良し、照度を高めた状況下で飼育試験を実施した。また、2000年の飼育試験で、夜間に仔魚が水槽底へ沈下して死亡する事例が発生したことから⁴⁾、2001年は、飼育水に水流を発生させて仔魚の沈下防止による生残率向上を検討した。これらの飼育技術の改良により、仔魚の飼育初期における生残が著しく向上したことから、その概要について報告する。

材料と方法

照度が仔魚の初期生残に与える影響 小型水槽を用いて、様々な段階の照度レベルがクロマグロ仔魚の初期生残に与える影響を検討した。試験には、屋内に設置した0.2klポリカーボネイト製水槽24面を用いた。これらを6グループに分け、4水槽を一組として遮光を行わないグループ、および水槽上面を寒冷紗とゴース網の組み合わせで覆って様々な照度条件を作り出

すグループを作った。ふ化仔魚の収容数は、約2,000尾/槽とした。

照度の測定には、照度計（Model LI-189, 盟和電工）を用い、毎日14時に水槽中央部の水面上で測定した。各水槽の平均照度は、飼育期間中の毎日の測定値を平均したものとした。調査は日齢8までとし、生残率は夜間の柱状サンプルによる容量法で推定した。

大型水槽で飼育水の攪拌が生残に与える影響 50klコンクリート製水槽を用いて、飼育水の攪拌が仔魚の初期生残に与える影響を検討した。試験区は、通常飼育区（対照区）を3例、水流を発生させた区（攪拌区）を6例設定した（表1）。ふ化仔魚の収容数は、23~59万尾/槽とした。

通気は、対照区では水槽全体に配置した7個のエアーストーンで、攪拌区の通気は中央部に設置した1個のエアーストーンで行った。さらに、攪拌区では、水槽の中央部から水中ポンプで吸引した飼育水を、水槽底の十字に組んだ塩ビパイプ（約7.5cm 間隔で直径1.5mmの穴）から吐出させることで流速約1~2m/分の左回りの水流を発生させた（図1）。照度は、水槽西側の水面上で上記と同様の方法で計測した。なお、照度調整は行わず、自然光とした。試験は日齢5までとし、生残率は夜間の柱状サンプルによる容量法で推定した。

大型水槽の遮光が生残に与える影響 上記の飼育水の攪拌試験に併設して、遮光が仔魚の生残に与える影響を検討した。試験区は、日齢6以降の上記攪拌区（6例）を2群に分け、日齢10まで自然光下で飼育を継続する区（以下、攪拌+自然光区）と遮光率70%の寒冷紗で遮光する区（以下、攪拌+遮光区）を設けた。試験期間は日齢6から5日間とした。

仔魚の飼育方法 飼育水温は自然水温とし、25.7~27.2℃の範囲にあった。換水率は日齢7までは0.3~1回転/日、日齢8以降は1~3回転/日とした。餌料には栄養強化したL型ワムシを使用し、日齢3から5個体/mlの密度で2~4回/日給餌した。栄養強化には、油源（キリンビール）または冷凍ナンノクロロプシス（メルシャン）を用いた。飼育水には冷蔵した濃縮ナンノクロロプシス（マリンフレッシュ, メルシャン）を50万細胞/mlの密度で2~3回/日添加した。

表1 大型水槽を用いた試験結果の概要

試験区	供試受精卵				ふ化仔魚の収容			生残率	
	採集		消毒		月日	尾数 (万尾)	密度 (万尾/kℓ)	日齢5 (%)	日齢10 (%)
	月日	場所	濃度*1 (mg/ℓ)	時間 (分)					
攪拌区 + 自然光区	6月21日	仕切網	25	1	6.23	44.1	1.0	100.0	65.0
	7月10日	仕切網	50	1	7.12	23.2	0.5	100.0	47.1
	7月18日	生糞	25	1	7.20	59.1	1.3	55.0	42.3
攪拌区 + 遮光区	6月13日	生糞	25	1	6.15	69.6	1.5	96.0	8.9
	6月17日	生糞	50	1	6.19	52.4	1.2	100.0	10.0
	7月17日	生糞	25	1	7.19	53.1	1.2	95.0	40.4
対照区	6月13日	生糞	50	1	6.15	40.5	0.9	13.0	*2
	6月15日	仕切網	50	1	6.17	47.4	1.1	0.7	*2
	6月21日	仕切網	25	1	6.23	43.5	1.0	0.5	*2

*1: 有効ヨウ素濃度

*2: 日齢5～6で飼育中止

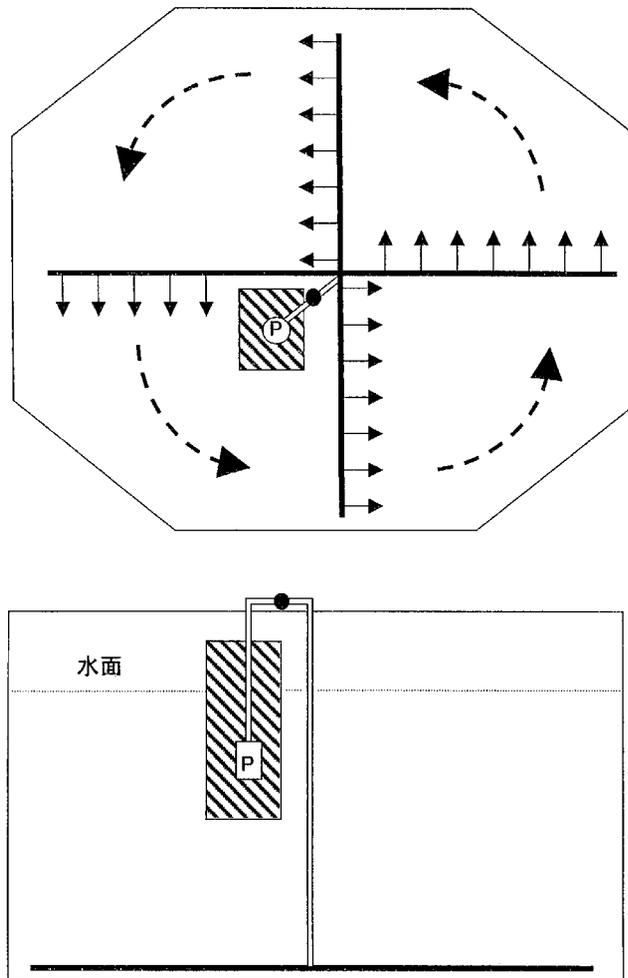


図1 大型水槽における飼育水の攪拌方法の模式図

(上: 上面図、下: 側面図)

太い実線は約7.5cm間隔で直径1.5mmの穴を開けた塩ビパイプ、Pは水中ポンプ、白抜き線は直径40mmのホース、黒丸は水量調整用のバルブ、細い実線の矢印は飼育水の噴き出す方向、点線の矢印は吹き出した飼育水によって生じた流れの方向を示す。

結果と考察

照度と生残の関係 小型水槽を用いた照度試験では、作り出した照度は0.5 (完全遮光)～4,400lx (遮光なし)の範囲にあった。水槽ごとの平均照度と日齢8での生残率の関係を図2に示した。水面照度が800lx以上の飼育では、6例中5例(83%)で生残率が30%以上であったが、800lx以下では全ての飼育で生残率が20%以下であり、さらに17例中13例(76%)では生残率が5%以下となり、照度が初期の生残率に与える影響が認められた。チャイロマルハタ⁵⁾では、照度500lx以上では日齢3の仔魚の摂餌率が高く、生残率が向上することが報告されている。仔魚の飼育に適した照度は魚種によって異なると考えられるが、クロマグロ仔魚でも同様な傾向を示したことから、照度が仔魚の摂餌に与える影響面からの検討が必要である。

飼育水の攪拌と生残状況 大型水槽を用いた飼育試験で、日齢5の平均生残率は、攪拌区が91.0% (55.0～100.0%)と対照区の4.7% (0.5～13.0%)より顕著に高くなった。塩澤ら⁶⁾はカンパチで、通気による飼育水の水平方向と垂直方向の攪拌が仔魚の沈降とそれによる死亡を防止し、生残率が向上することを報告しており、クロマグロ仔魚も同様の効果により生残率が向上したと考えられた。なお、日齢5以降の継続飼育では、対照区は日齢10までにほとんどの仔魚が死亡したが、攪拌区は6例とも照度試験に供することができた。

大型水槽の照度と生残状況 攪拌+自然光区の平均照度は4,800lx (4,700～4,900lx)で、攪拌+遮光区は

2,200lx (2,000～2,400lx)であった。平均生残率は、攪拌+自然光区が51.5% (42.3～56.0%)、水流+遮光区が19.8% (8.9～40.4%)と顕著な差が認められた(表1)。このことから、大型水槽においても飼育水の攪拌効果に加えて、照度を高く維持することにより安定した生残率を得られる可能性があると考えられた。

しかし、小型水槽での照度試験では、水面の照度が800lx以上で生残率向上に効果がある結果が得られたが、大型水槽での飼育試験では生残率の低い攪拌+遮光区でも2,000lx以上の照度であった。この原因として、飼育水槽の材質、形状や大きさ等の違いが飼育水の表面や水中の照度へ影響を与えており、水槽ごとに適正な照度が異なったためと考えられた。しかし、いずれの試験においても照度と生残の関係は認められており、今後は飼育水の攪拌と照度条件の把握により、クロマグロ仔魚の初期生残向上を目指したい。

文 献

- 1) 熊井英水 (1998) クロマグロの人口ふ化飼育とその再生産に関する研究. 日水誌, 64, 601-605.
- 2) 竹内宏行・手塚信弘 (1998) 種苗生産技術の開発, クロマグロ. 日本栽培漁業協会年報 (平成10年度), 204-214.
- 3) 手塚信弘 (1999) 種苗生産技術の開発, クロマグロ. 日本栽培漁業協会年報 (平成11年度), 185-191.
- 4) 手塚信弘 (2000) 種苗生産技術の開発, クロマグロ. 日本栽培漁業協会年報 (平成12年度),

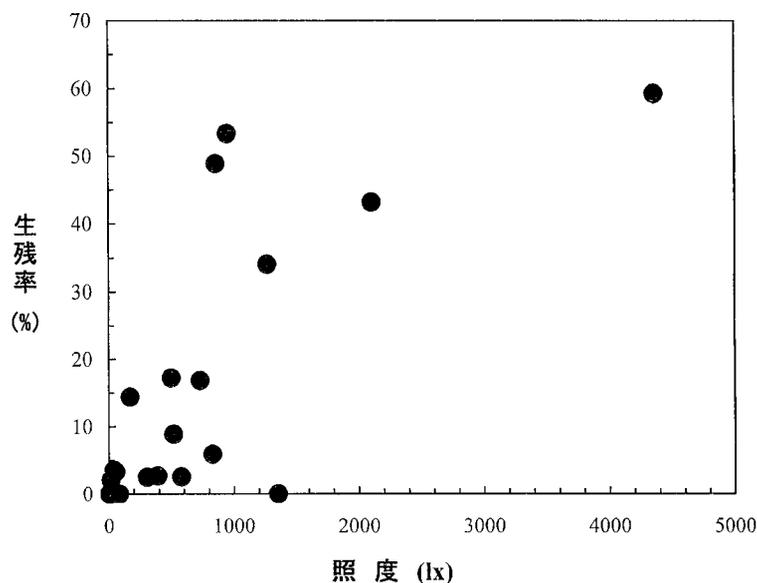


図2 クロマグロ種苗生産試験における平均照度と日齢8の生残率の関係

- 380-383.
- 5) Toledo, J.D., N.B. Caberroy, G.F. Qunitio, C.H. Choresca and H. Nakawa (2002) Effects of salinity, aeration and light intensity on oil globule absorption, feeding incidence, growth and survival of early-stage grouper *Epinephelus coioides* larvae. *Fisheries Sci.*, **68**, 478-483.
- 6) 塩澤 聡・竹内宏行・廣川 潤 (2003) カンパチ種苗生産方法の改良. *栽培技研*, **31**, 11-18.

低塩分海水および淡水によるワムシの細菌数の減少効果

小磯雅彦

(能登島栽培漁業センター)

海産ワムシ類(以下, ワムシ)は $10^6 \sim 10^8$ CFU/g¹⁻⁴⁾の細菌を保有し, また, *Vibrio*属細菌を短時間で体内に濃縮することが報告されている⁵⁾。そのため, ワムシは *Vibrio ichthyenteri*によるヒラメの細菌性腸管白濁症^{6,7)}, *V. alginolyticus*等によるタイ類の腹部膨満症⁸⁻¹⁰⁾ および *V. anguillarum*によるアユのピブリオ病^{11,12)}等の感染源として疑われている。これらの疾病を防除するためには, 仔稚魚の飼育環境への病原性細菌の侵入を防止することが重要である。その対策として, 種苗生産現場では, ワムシの細菌数を減少させるために, ニフルスチレン酸ナトリウム薬浴(以下, NFS薬浴)¹³⁻¹⁶⁾や冷凍保存処理¹³⁻¹⁴⁾が試みられた。

ワムシのNFS薬浴では, 5mg/ℓの濃度で3~5時間薬浴することで, $10^6 \sim 10^7$ CFU/gの*Vibrio*属細菌が $10^4 \sim 10^5$ CFU/gに減少することが認められているが¹⁶⁾, 使用頻度が高いと耐性菌が出現する可能性があることが問題点として指摘されている。また, 2003年に薬事法が一部改正されたため, 今後, NFSが使用できなくなると考えられる。冷凍保存処理では, ワムシを -15°C で50日以上冷凍するとNFS薬浴と同様に, 細菌数を減少させる効果が報告されているが, 冷凍ワムシを開口直後のアユ仔魚に投与した場合, その生残率が低いことが報告されている^{13,14)}。このため, ワムシの細菌数を減少させる新たな方法を早急に開発する必要がある。

そこで本研究では, 一般的に海水で生息している生物は淡水では死亡または衰弱するが, ワムシは比較的low saltに強いことに着目し, low salt海水ならびに淡水にワムシを浸漬することによる, 細菌数の減少効果について検討した。

材料と方法

供試ワムシ 実験には, 植え継ぎ式で培養した増殖期(培養5日目)のL型ワムシ *Brachionus plicatilis*(近大株, 携卵個体の背甲長: $271 \pm 14 \mu\text{m}$)を使用した。実験用ワムシの培養には, 三角フラスコ(3ℓ容)3個を用い, それぞれに滅菌処理した塩分34psu海水(以下, 海水)を3ℓ入れ, ワムシを約50個/mlの密度で収容した。培養水温は恒温器内で 25°C に設定した。餌料には, 濃縮淡水クロレラ(クロレラ工業, 細胞密度約 1.5×10^{10} 細胞/ml)を使用し, 毎日2~3mlを培養

水に添加した。通気は, エアーストン1個(MA-30)を用いて微通気で行った。

低塩分海水ならびに淡水に対するワムシの耐性 実験開始前に, 培養したワムシを水温 25°C の海水を3ℓ入れた三角フラスコに移し入れ, 通気下で5時間放置して飢餓状態とした。その後, 淡水(0psu)と塩分7, 14, 34psuの浸漬水を5mlずつ入れた6穴用マイクロプレートの1穴に飢餓ワムシを約100個体ずつ収容した。浸漬時間は1, 2, 5および10分間とし, 各塩分条件に浸漬したワムシを計画時間ごとに回収し, それぞれクロレラを500万細胞/mlの密度で添加した海水を5mlずつ入れたマイクロプレートの1穴に移送した。収容後0.5, 1, 2および3時間ごとに各試験区のワムシを生物顕微鏡で観察し, 消化管内に緑色部分がある個体を摂餌個体として計数した。各区の供試個体数に対する摂餌個体数から摂餌個体率(%)を求め, その値をワムシの耐性の指標とした

塩分7psu海水および淡水によるワムシの細菌数減少効果 low salt海水ならびに淡水へのワムシの耐性調査結果から, 塩分7psu海水と淡水に浸漬したワムシの細菌数を調査した。この試験では, 植え継ぎ式で培養したワムシを100個体/mlの密度で, 水温 25°C の塩分7psu海水と淡水を3ℓ入れた三角フラスコ(3ℓ容)に移し, 通気下で放置した。収容前および収容後1, 5, 10分ごとにワムシを採取し, 水分を取り除いて0.1g(湿重量)を秤量して0.9mlの滅菌海水を加え, ガラスホモジナイザーを用いてよく磨碎して原液とした。細菌数の計数は, 原液を滅菌海水で10倍ごとに希釈した後, 適当な希釈段階のものをZoBell寒天培地とTCBS寒天培地に塗布し, 25°C で48時間培養して発育したコロニーを計数した。なお, ZoBell培地から得られたCFU(Colony Forming Unit)値を一般細菌数, TCBS培地から得られたCFU値をTCBS細菌数とした。

結 果

低塩分海水ならびに淡水に対するワムシの耐性 各塩分海水および淡水に浸漬したワムシの摂餌個体率を表1に示した。塩分34psu海水への浸漬では3時間後まで摂餌個体率は80~100%であったが, 塩分濃度が低く浸漬時間が長いほど摂餌率が低下する傾向が認

表1 低塩分海水ならびに淡水に対するL型ワムシ近大株の耐性

塩分 (psu)	浸漬時間 (分)	摂餌個体率 (%) *			
		0.5時間	1時間	2時間	3時間
34	1	100.0	90.9	100.0	80.0
	2	94.1	92.0	88.9	96.2
	5	97.0	100.0	88.9	89.5
	10	90.9	100.0	94.4	100.0
14	1	92.9	96.4	80.0	94.4
	2	92.9	95.0	100.0	88.9
	5	96.8	100.0	95.2	100.0
	10	90.0	95.0	80.0	94.7
7	1	95.0	84.2	87.5	95.6
	2	81.5	84.6	83.8	80.9
	5	82.6	88.6	89.7	86.0
	10	13.5	62.5	77.5	81.8
0	1	73.7	80.0	88.6	84.6
	2	64.3	76.5	85.7	95.3
	5	3.7	18.9	80.6	89.2
	10	0.0	0.0	29.0	68.8

* : 摂餌個体率は、各塩分海水に浸漬後、クロレラを添加した塩分34psu海水に移送してワムシの消化管内に緑色部分がある個体を摂餌個体として、その割合を求めた。

められた。生残率80%以上を示した浸漬時間は、塩分14psu海水では1～10分、塩分7psu海水では1～5分であった。また、塩分7psu海水へ10分間、淡水へ5分間、または10分間浸漬したワムシの0.5時間後の摂餌個体率は、それぞれ13.5%、3.7%、0%と大幅に低下したが、3時間後には81.8%、89.2%、68.8%に回復した。淡水では、1分および2分間浸漬したワムシの0.5時間後の摂餌率はそれぞれ73.7%と64.3%であり、塩分7psu以上の試験区に比べ低かったが、2時間後にはともに80%以上となった。

塩分7psu海水および淡水によるワムシの細菌数減少効果 塩分7psu海水および淡水に浸漬したワムシの細菌数を図1と図2にそれぞれ示した。塩分7psu海水への浸漬では、浸漬前の一般細菌数 6.7×10^7 CFU/g、TCBS細菌数 3.1×10^7 CFU/gが、1～10分間の浸漬ではそれぞれ $5.4 \sim 7.9 \times 10^7$ CFU/gと $1.7 \sim 2.4 \times 10^7$ CFU/gとなり大きな減少は認められなかった。一方、淡水への1～10分間の浸漬で一般細菌数は $3.4 \sim 5.5 \times 10^7$ CFU/gと、処理前の 5.2×10^7 CFU/gからほとんど減少しなかったが、TCBS細菌数は処理前の 1.3×10^7 CFU/gから、1分間または5分間の浸漬でそれぞれ 0.9×10^7 、 1.0×10^7 CFU/gに、さらに10分間の浸漬で 0.3×10^7 CFU/gまで減少した。

考 察

本実験では、低塩分海水や淡水によるワムシの細菌

数減少効果を調べるために、先ずワムシの低塩分耐性を調査し、数分間であれば塩分0～34psuに浸漬してもワムシの活性は回復することが判った(表1)。そこで、塩分7psu海水または淡水に浸漬したワムシについて細菌数を調査したところ、塩分7psu海水処理は、一般細菌とTCBS培地で発育する*Vibrio*属細菌の細菌数を減少させる効果は期待できないと考えられた。一方、淡水処理では、一般細菌を減少させる効果は低かったが、10分間の浸漬処理により*Vibrio*属細菌を処理前の約1/5にまで減少できることがわかった(図1、2)。しかし、この効果は、*Vibrio*属細菌を1/100程度まで減少させるNFS薬浴¹⁶⁾に比べると非常に低いものであり、ワムシを淡水に10分間浸漬すると、活力が回復するまでに3時間以上を要すること(表1)から、餌料としての有効性が低下することが考えられた。これらのことから、塩分7psu海水および淡水による処理は、実用性が低いと考えられた。

大量培養したワムシの細菌数が高い理由としては、培養過程で発生する餌料の残餌やワムシの排泄物および死骸などの有機物が培養槽内に大量に蓄積し、これらが分解されることによって細菌の栄養素になることで細菌数が増加し、この細菌をワムシが短時間で高濃度に取り込む⁵⁾ためと推測される。この仮説が正しければ、ワムシの細菌数を減らすためには有機物を培養槽内にできる限り蓄積させない方法が考えられる。このためには、フィルターによる培養水中のフロック除去、過剰給餌の防止、培養期間の短縮に加えて、培養

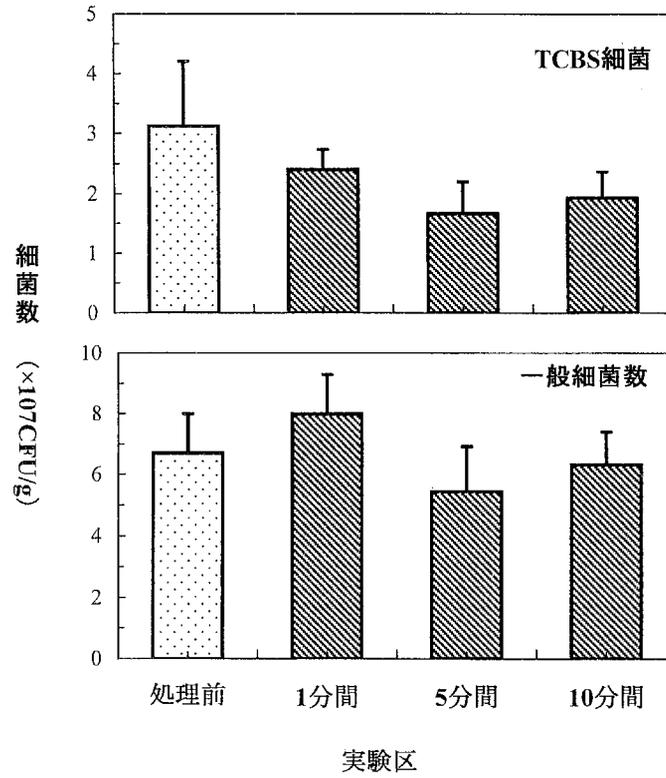


図1 塩分7 psu 海水に浸漬したL型ワムシ（近大株）の細菌数の経時変化

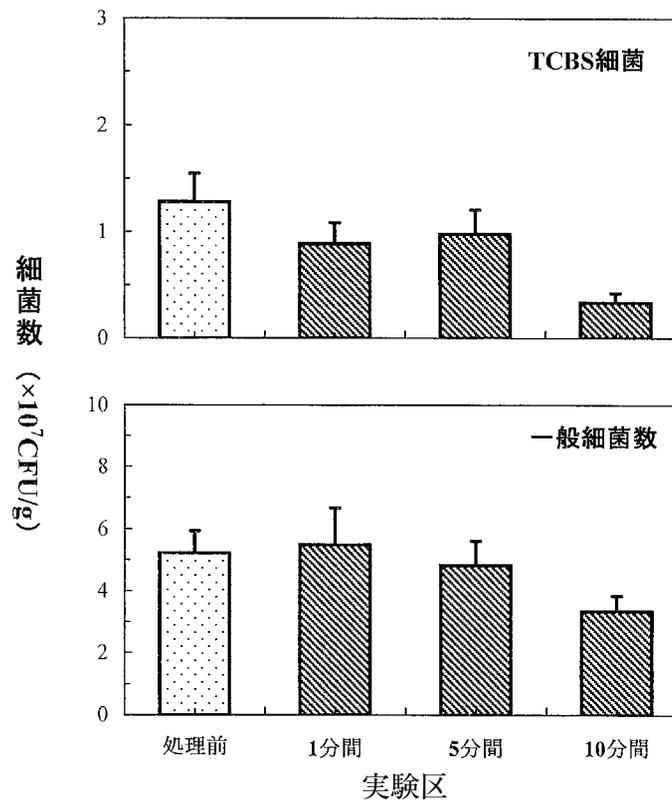


図2 淡水に浸漬したL型ワムシ（近大株）の細菌数の経時変化

水中の有機物を高率で希釈する高い収穫率での連続培養などが有効と考えられる。また、細菌の増殖速度は水温にも影響されるため、可能な範囲でワムシの培養水温を下げることも効果的と考えられる。なお、ワムシの滅菌海水による洗浄については、ワムシの細菌数は減少しない⁵⁾という報告があるが、培養水中のフロック混じりのワムシをヒラメ仔魚に投与すると、生残率が低下した¹⁷⁾ことから、培養水中のフロックを洗い流すことには意味があると考えられる。

ワムシの細菌数を減少させる処理を行わない場合、ワムシ給餌に伴って $10^6 \sim 10^7$ CFU/gの細菌を飼育水槽へ直接投与することになり、仔稚魚の細菌性疾病多発の原因になると考えられる。このため、ワムシの細菌数減少に効果があると考えられる培養法や、フロックを減少させる海水洗浄などは積極的に採用すべきである。さらに、ワムシの活性を低下させないで、効果的にワムシの細菌数を減少させる新たな手法の開発が必要である。

文 献

- 1) 林孝市郎・木村俊夫・菅原 庸 (1975) アユの人工種苗生産における微生物学的研究－Ⅲ、シオミズツボワムシ及びビタミンジンの細菌汚染. 三重大学水産学部研報, **2**, 81-91.
- 2) 宮川宗記・室賀清邦 (1988) シオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* の細菌叢. 水産増殖, **35**, 237-243.
- 3) 岡 彬 (1989) I 4・7 1) 細菌. 「初期餌料生物－シオミズツボワムシ」(福所邦彦・平山和次編). 恒星社厚生閣, 東京, 34-36.
- 4) 日野明德 (1989) IV 2・1 細菌による制御. 「初期餌料生物－シオミズツボワムシ」(福所邦彦・平山和次編). 恒星社厚生閣, 東京, 205-208.
- 5) Muroga, K. and H. Yasunobu (1987) Uptake of bacteria by rotifer. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **53**, 2091.
- 6) 増村和彦・安信秀樹・岡田直子・室賀清邦 (1989) ヒラメ仔魚の腸管白濁症原因菌としての *Vibrio* sp. の分離. 魚病研究, **24**, 135-141.
- 7) Ishimaru, K., M. A. Akagawa-Matsushita and K. Muroga (1996) *Vibrio ichthyoenteri* sp. Nov., a pathogen of Japanese flounder larvae. *Int. J. Syst. Bacteriol*, **46**, 155-159.
- 8) 岩田一夫・矢野原良民・石橋 制 (1978) マダイの種苗生産過程におけるへい死要因に関する研究. 魚病研究, **13**, 97-102.
- 9) 楠田理一・横山 淳・川合研児 (1986) クロダイ仔稚魚のいわゆる腹部膨満症に関する細菌学的研究. 日水誌, **52**, 1745-1751.
- 10) 安信秀樹・室賀清邦・丸山敬悟 (1988) マダイ仔魚の腸管膨満症に関する細菌学的検討. 水産増殖, **36**, 11-20.
- 11) 田端和男・柄多 哲・M. S. Ruiz (1982) 海水によるアユ種苗生産時の病害研究－Ⅱ, *Vibrio anguillarum* の動態. 魚病研究, **17**, 205-212.
- 12) 田谷全康・室賀清邦・杉山瑛之・平本義春 (1985) 種苗生産過程の仔稚アユからの *Vibrio anguillarum* の検出. 水産増殖, **33**, 59-66.
- 13) 山野井英夫・菅野泰久・尾田 正 (1990) クロダイ仔稚魚の消化管内細菌叢に及ぼす餌料生物のニフルスチレン酸ナトリウム浴と冷凍保存の影響. 水産増殖, **38**, 13-22.
- 14) 山野井英夫・尾田 正・浮田和夫 (1990) アユ仔稚魚の消化管内細菌叢に及ぼす餌料生物のニフルスチレン酸ナトリウム浴と冷凍保存の影響. 水産増殖, **38**, 327-332.
- 15) Tanosomwang, V. and K. Muroga (1992) Effect of sodium nifurstyrenate on the reduction of contamination of rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture*, **103**, 221-228.
- 16) 山野井英夫・惣明陸枝・室賀清邦 (1998) ワムシのニフルスチレン酸ナトリウム浴の効果持続時間と栄養強化剤の影響. 水産増殖, **46**, 141-144.
- 17) 増村和彦・伏見 徹 (1986) ヒラメの初期斃死機構に関する研究. 昭和60年度 魚病対策技術研究成果報告書, p.15.

アルテミアふ化幼生の細菌数を減少させる試み

森田哲男

(小浜栽培漁業センター)

ヒラメの種苗生産で発生する細菌性疾患は、その原因菌がビブリオ属細菌であることが多い¹⁾。このため、飼育水槽へ持ち込むビブリオ属細菌の数を減少させることができれば、細菌性疾患の発症率は低下する可能性がある。また、これらのビブリオ属細菌は、餌料生物の海産ワムシ類やアルテミアなどが伝搬源の1つと推定されている²⁾。これらのことから、本試験では餌料生物のアルテミアについて注目し、アルテミア耐久卵の塩素殺菌処理等がふ化幼生のビブリオ属細菌数に及ぼす影響について検討した。

材料と方法

試験は2000年2月に小浜栽培漁業センターで実施した。アルテミア耐久卵は2000年2月に入手した北米ユタ州産(インヴェジャパン)を用いた。ふ化水槽には滅菌した13ℓポリバケツを用い、紫外線殺菌処理(照射量: 30,000 μW・秒/cm²以上)海水(5ℓ)をヒーターで水温28℃に加熱し、1個のエアレーションで通気を行った。耐久卵はふ化水槽ごとに23gずつ(耐久卵収容密度: 4.6g/ℓ)用いた。

試験区の設定 試験は、耐久卵の処理方法により、無処理(1区)、有効塩素濃度100ppm(12%次亜塩素酸ナトリウム、アサヒラック、高杉製菓)で1時間処理(2区)、脱殻処理(3区)の3試験区と、脱殻処理した耐久卵に制菌効果のあるハッチコントローラー(インヴェジャパン)を0.1g/ℓ添加する区(4区)を設けた。各試験区とも2水槽を用いた。

2区では、13ℓポリバケツに紫外線殺菌処理海水10ℓと12%次亜塩素酸ナトリウム8.3mlを入れて有効塩素濃度100ppmとし、通気しながら1時間耐久卵を攪拌した。3区の脱殻処理は、吉松³⁾の方法に準じ以下の方法で行った。①脱殻用薬液として、吸水前の耐久卵100gに対して12%次亜塩素酸ナトリウム水溶液292ml、水酸化ナトリウム7gを淡水1,100mlに溶解する。②耐久卵を淡水中で通気により攪拌しながら1時間かけて吸水させる。③ネット(オープニング: 150 μm)で水分を除いた後、①の薬液に収容し強く攪拌する。④耐久卵が橙色に変色するのを確認後、耐久卵を取り揚げて淡水で洗浄する。

ふ化率は、収容24時間後のふ化が完了した時点で調査した。

細菌数の計数 細菌数の計数は、耐久卵収容22時間後のアルテミア幼生とふ化水で実施した。アルテミア幼生は、ネット(オープニング: 150 μm)を用いて海水を除いた後、滅菌した試験管に0.1g量を採用して10mlガラスホモジナイザーですり潰し、滅菌海水0.9mlと混ぜ合わせ10倍希釈原液とした。この原液をさらに10倍希釈を繰り返し、各段階の希釈液をZoBell 2216e 寒天培地およびTCBS 寒天培地(日水)にそれぞれ0.1mlずつ接種した。希釈液は細菌の出現個数が30~300個になる濃度を予測し、6~8段階の希釈倍率に植えつけた。培地は、ヒラメ種苗生産時の飼育水温である18℃に調温したインキュベータ内で1週間静置培養した。ZoBell 2216e 寒天培地に出現した細菌は一般細菌、TCBS培地に出現した細菌はビブリオ属細菌とした。細菌数は、細菌のコロニーが30~300個の範囲で出現した培地のコロニー数を計数した。ふ化水は、水槽表層の海水を滅菌したネット(オープニング: 63 μm)でろ過した後、滅菌した試験管に約1ml入れて原液とした。この原液をさらに滅菌海水で10倍希釈を繰り返し、アルテミア幼生と同じ手法で細菌数を計数した。

結果と考察

各試験区のふ化率を表1に示した。ふ化率は、1区、2区および4区では84.8~89.7%であったが、3区は66.6%と低下した。脱殻処理の3区のふ化率が低下した理由としては、他の試験区に比べてふ化水槽表面の壁面に多くの耐久卵が付着したことで、ふ化が阻害された可能性が考えられた。脱殻処理した耐久卵については、通気量や通気方法などのふ化方法を再検討する必要があると考えられた。なお、同様に脱殻処理した4区では、ふ化率が低下しなかったことからハッチコントローラーの利用によりふ化率が向上することが再確認された。

アルテミア幼生とふ化水の細菌数を表2に示した。1~3区では、一般細菌数は $2.0\sim 3.2\times 10^7$ CFU/g、ビブリオ属細菌数は $1.1\sim 7.9\times 10^6$ CFU/gとなり、試験区間で顕著な差は認められなかった。ハッチコントローラーを用いた4区では、アルテミア幼生の一般細菌数が 2.7×10^5 CFU/g、ビブリオ属細菌数が 3.4×10^3 CFU/gと、無処理区の細菌数に比べてそれぞれ

表1 耐久卵の処理方法とふ化率

試験区	処理方法			ふ化率 (%)
	塩素処理	脱殻処理	HC 添加*	
1区	×	×	×	89.7
2区	○	×	×	88.9
3区	×	○	×	66.6
4区	×	○	○	84.8

*：ハッチコントローラー

表2 アルテミア幼生およびふ化水の細菌数

試験区	アルテミア幼生の細菌数 (CFU/g)		ふ化水の細菌数 (CFU/ml)	
	一般細菌数	ビブリオ属細菌数	一般細菌数	ビブリオ属細菌数
1区	2.6×10^7	1.3×10^6	5.9×10^6	1.8×10^5
2区	3.2×10^7	1.1×10^6	5.5×10^6	2.7×10^5
3区	2.0×10^7	7.9×10^5	4.4×10^6	2.1×10^5
4区	2.7×10^5	3.4×10^3	5.6×10^3	5.9×10^1

1/100および1/1,000に減少し、ハッチコントローラーの細菌数を減少させる効果を再確認した。

また、ふ化水でも同様の結果が得られ、耐久卵の塩素処理や脱殻処理にはアルテミア幼生の細菌数を減少させる効果はないと考えられた。しかし、これらの処理により、耐久卵の表面に付着した細菌は消毒され、今回測定されたアルテミア幼生の細菌は、ふ化水に由来した細菌である可能性も考えられた。このため、今後、塩素処理や脱殻処理の効果を検討する場合には、細菌数だけでなく、細菌叢も含めて総合的に判断する

必要があると考えられた。

文 献

- 1) 畑井喜司雄・小川和夫・広瀬一美 (1989) 魚病図鑑. 緑書房, pp.263.
- 2) 森田哲男 (2000) ヒラメ種苗生産. 日裁協小浜事業場報告技術開発編 (平成12年度), 90-134.
- 3) 吉松隆夫 (1999) アルテミア耐久卵脱殻処理のすすめ方. 養殖, 2月号, 106-108.

若狭湾の天然ヒラメ当歳魚におけるネオヘテロボツリウムの感染状況

山田達哉*1・本藤 靖*2

(*1 小浜栽培漁業センター, *2 五島栽培漁業センター)

日本海西部海域では、近年ヒラメの漁獲量の減少が著しく、鳥取県では1995年に250トンの漁獲量がここ数年で50トン以下まで急激に落ち込んだ。この原因として、Anshary *et al.*¹⁾らは、ネオヘテロボツリウム *Neoheterobothrium hirame* の寄生が、漁獲加入前のヒラメ当歳魚の生残低下に深く関与していることを示唆した。本種は主にヒラメの上顎の口腔壁に寄生し、鰓弁より吸血する扁形動物である。ふ化した浮遊幼虫はまず鰓弁に寄生し、成長に従い鰓弓から上顎口腔壁へ移動後成熟し産卵する²⁾が、生涯を通じ鰓弁より吸血し、ヒラメを貧血症状に至らしめる。

虫明ら³⁾は、ヒラメ当歳魚における貧血の割合が他の年齢相に比べて高い値を示すことを報告しており、当歳魚の生残の低下との関連が深いと考えられる。これらのことから、当歳魚における *N.hirame* の寄生状況を調べることは、天然魚の漁獲加入量の変動を考察する上でも重要な知見になると考えられた。

本調査では、日本海西部海域に位置する若狭湾内において、*N.hirame* が天然0歳魚へ及ぼす影響を調べるため、寄生率およびその強度を月別に調べた。さら

に、湾内に3カ所の採集場所を設定して、*N.hirame* の寄生状況の違いを比較した。

材料と方法

調査場所と方法 調査は2001年5月から2002年3月まで行った。調査海域は、若狭湾中央部の福井県小浜市小浜湾と大飯郡高浜町和田浜、および西部の京都府宮津市由良浜の3カ所とした(図1)。小浜湾では、6月～翌年3月のエビ漕ぎ網漁(特別採捕を含む)で採集した。和田浜では、5～7月はソリネットにより、8月は定置網により採集した。由良浜では、5～7月はソリネット曳網で、8月はソリネットおよび定置網で、さらに9～12月は定置網で採集した。採集した標本は、個別別にビニール袋に入れて直ちに冷凍した。

寄生状態の把握 得られた標本は全長、体長、体重、消化管内容物重量を測定し、個別別に口腔内の虫数、鰓葉中の虫数を計数した。本種は上顎口腔壁へ移動後成熟し産卵することから、口腔内に寄生していたものを成虫、鰓に寄生していたものを幼虫とした。口腔内

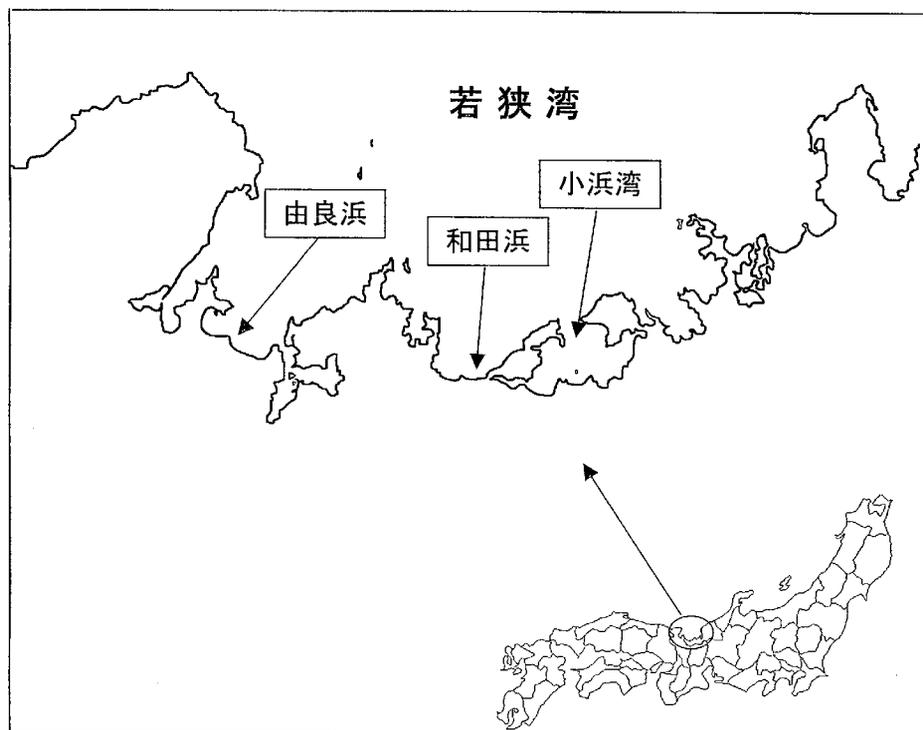


図1 若狭湾におけるヒラメ天然当歳魚の調査地点

に寄生する成虫は、肉眼で観察しピンセットを用いて1尾ずつ計数した。一方、鰓に寄生する幼虫は、鰓を切り出して10%ホルマリンに3日以上浸漬して固定した。固定標本は、水道水に置換した後1 cm程度の細片に切り分け、スターラーで攪拌(1,200rpm, 30分)して幼虫を鰓弁から脱落させ、実体顕微鏡下で計数した。幼虫および成虫の計数値をもとに、供試魚中に占める被寄生ヒラメの割合を寄生率(%), 被寄生ヒラメの1尾当りの寄生虫数を寄生強度(個体/尾)として月別に算出した。

供試魚中に占める摂餌個体の割合を摂餌個体率とし、摂餌個体の胃内容物の体重に対する割合を胃内容重量比として%で示した。また、肥満度は体重(g)÷体長(cm)³×10³で算出した。

水温測定 調査海域の特性として、各調査地点の水温を調査した。小浜湾では小浜栽培漁業センター地先の水深10m地点(2001年)、由良浜ではヒラメの主漁場である水深20m地点(1998年)、および和田浜では定置網漁場がある水深26m地点(2001年)を定点とした。

結 果

標本の採集 採集したヒラメ当歳魚の月別の平均全長、および採集尾数を表1に示した。小浜湾では、平均全長17.3cm(9.6~29.5cm)の個体を756尾、和田浜では、平均全長10.7cm(1.8~22.9cm)の個体を124尾、由良浜では、平均全長9.2cm(1.5~27.2cm)の個体を296尾採集した。

各調査地点の採集個体の大きさは、小浜湾では6月から12月まで徐々に大型化した。12月以降には停滞し

た。和田浜および由良浜では7月から8月にかけて急激に大型化した。

調査海域の水温 各調査地点の水温の年変化を図2に示した。周年測定した小浜湾と由良浜は、8~9月には最高値の25~27℃、2~3月には最低値の10~12℃と同様の変動傾向を示した。

N.hirame 成虫の寄生率と寄生強度 成虫の寄生率および寄生強度を図3に示した。調査した3地点とも7月までは寄生率および寄生強度ともに低い値を示したが、寄生率は8月には小浜湾で32.0%、和田浜で38.8%、由良浜で60%まで増加した。小浜湾と由良浜では、冬期に向けてさらに増加する傾向が認められ、小浜湾では翌年1月に91.3%、由良浜では12月に100%となった。寄生強度も8月以降に増加し、小浜湾では1月に8.3個体/尾、由良浜では11月に6.9個体/尾と冬期に高い値を示した。3地点間で寄生率および寄生強度に有意差は認められなかった(分散分析:P<0.05)。

N.hirame 幼虫の寄生率と寄生強度 幼虫の寄生率および寄生強度を図4に示した。幼虫の寄生が確認されたのは、小浜湾では7月、和田浜および由良浜では8月であった。小浜湾の寄生率は、9月以降から増加し翌年1月には82.6%となった。由良浜の寄生率も小浜湾と同様の傾向を示し、11月に60%となった。和田浜での調査は8月までであったため、幼虫の寄生は2.0%以下であった。寄生強度は、由良浜では12月までは小浜湾より低い傾向が見られた。9月以降の小浜湾と由良浜間で、幼虫の寄生率および寄生強度が増加したが、両地点間で有意差(P<0.05)は認められなかった。

表1 若狭湾の3調査地点で採集した当歳ヒラメの月別平均全長と尾数

月 日	小浜湾		和田浜		由良浜	
	平均全長 (cm)	尾数	平均全長 (cm)	尾数	平均全長 (cm)	尾数
2001. 5	-		2.6	10	4.6	63
6	10.6	7	4.9	10	5.4	74
7	11.8	121	7.7	55	8	69
8	14.4	244	17.5	49	17.5	45
9	18.1	49	-	-	20.9	23
10	19.9	110	-	-	21	10
11	21.7	159	-	-	26	10
12	23.2	13	-	-	22.5	2
2002. 1	22.2	23	-	-	-	-
2	-		-	-	-	-
3	24	30	-	-	-	-
		756		124		296

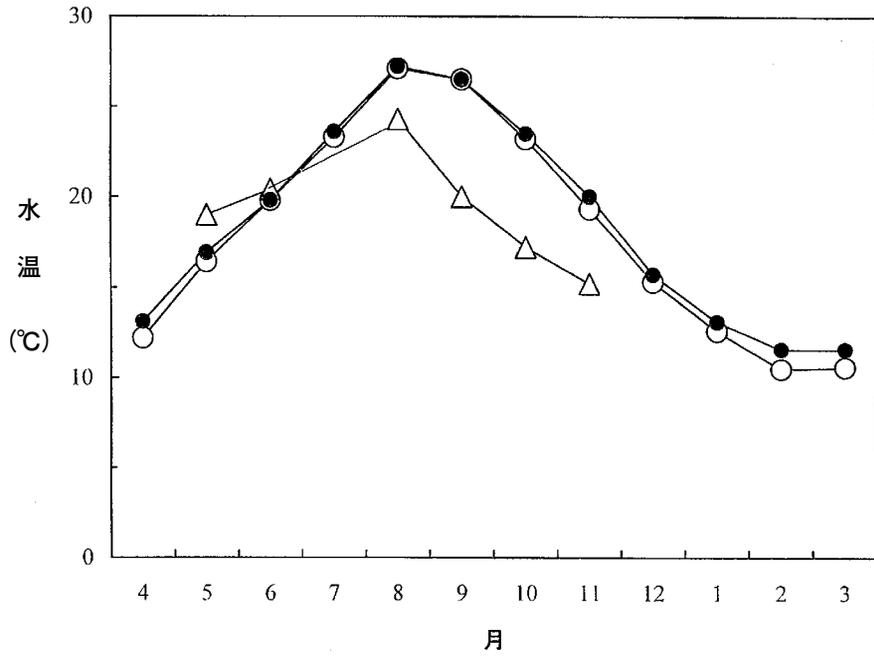


図2 若狭湾の調査地点における水温の年変化

○—小浜湾 △—和田浜 ●—由良浜

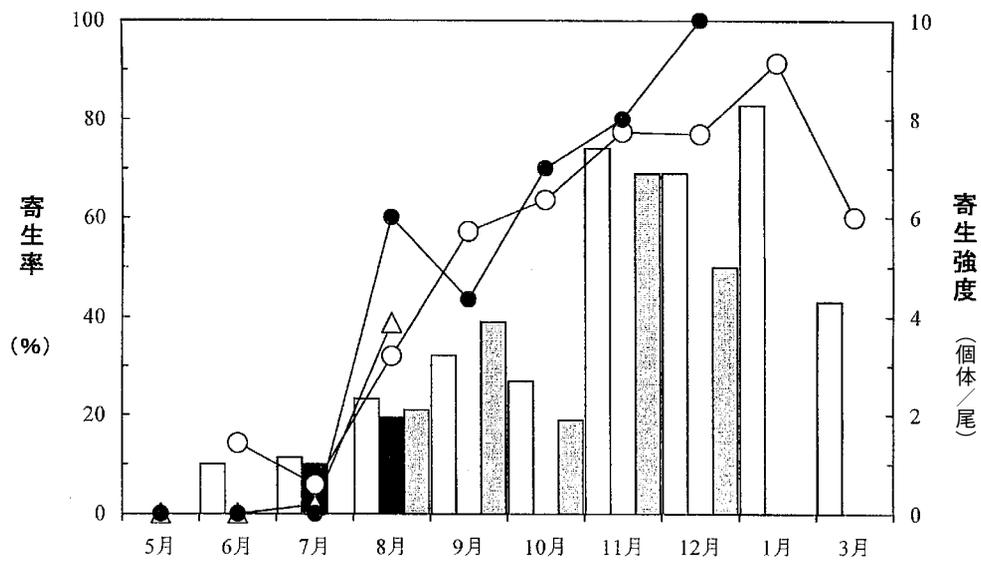


図3 若狭湾におけるネオヘテロボツリウム成虫の寄生率および寄生強度

寄生強度: □—小浜湾 ■—和田浜 ▨—由良浜
 寄生率: ○—小浜湾 △—和田浜 ●—由良浜

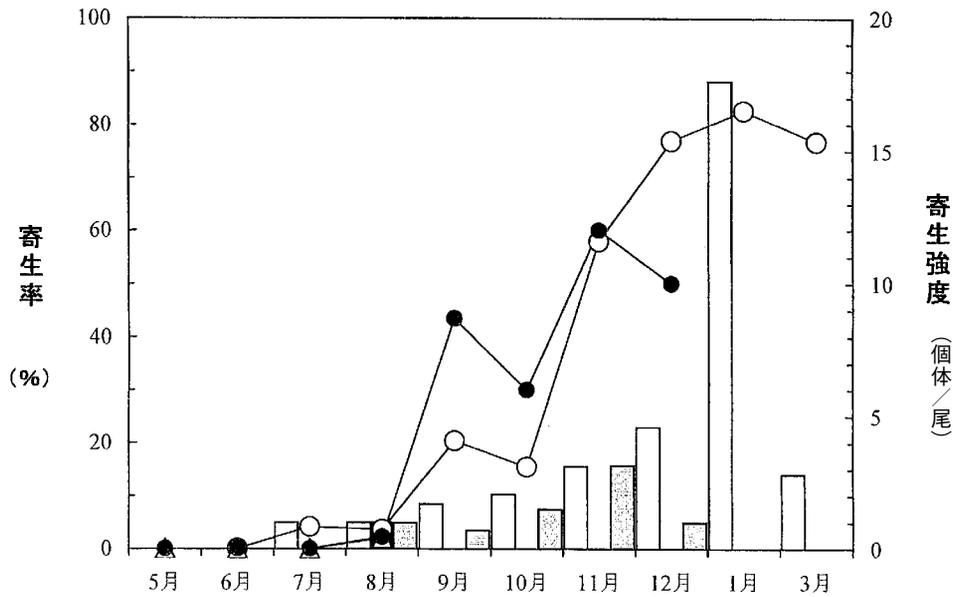


図4 若狭湾におけるネオヘテロボツリウム幼虫の寄生率および寄生強度

寄生強度: □ 小浜湾 ■ 和田浜 ▨ 由良浜
 寄生率: ○ 小浜湾 △ 和田浜 ● 由良浜

摂餌個体率, 胃内容重量比および肥満度 摂餌個体率 (図5) は, 小浜湾では6月の100%から8月の31.8%まで低下した。由良浜での摂餌個体率は, 5~9月の80%前後が10月に40%まで低下し, 12月には100%に増加した。小浜湾は由良浜に比べて7~9月の摂餌個体率が低く, この間のみでは有意差 (分散分析: $P > 0.05$) は認められたものの, 調査期間を通じては有意差 ($P < 0.05$) はなかった。

胃内容重量比 (図6) は, 小浜湾, 由良浜ともに6~12月にかけて低下する傾向が見られた。由良浜の胃内容重量比は小浜湾より高く, 両地点の間には有意差 (分散分析: $P > 0.05$) が認められた。

肥満度 (図6) は小浜湾と由良浜は8月以降に低下する傾向が見られた。由良浜の肥満度は小浜湾より高く, 両地点の間には有意差 (分散分析: $P > 0.05$) が認められた。

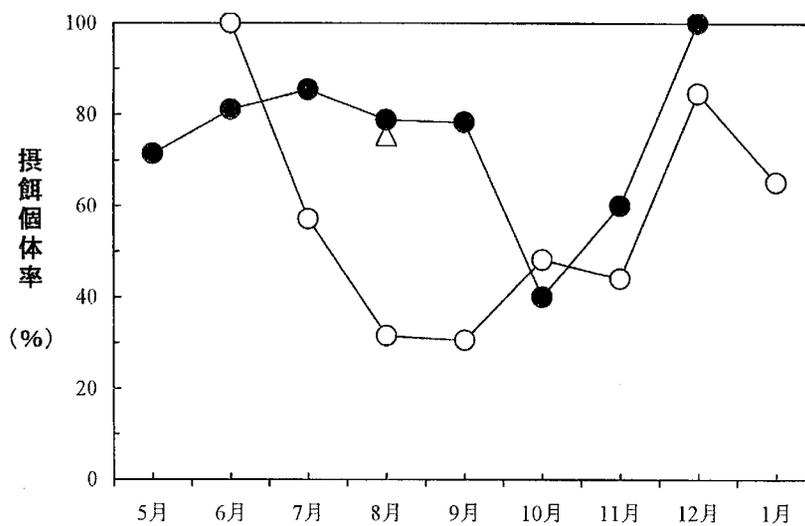


図5 若狭湾で採集した当歳ヒラメの摂餌個体率

○ 小浜湾 △ 和田浜 ● 由良浜

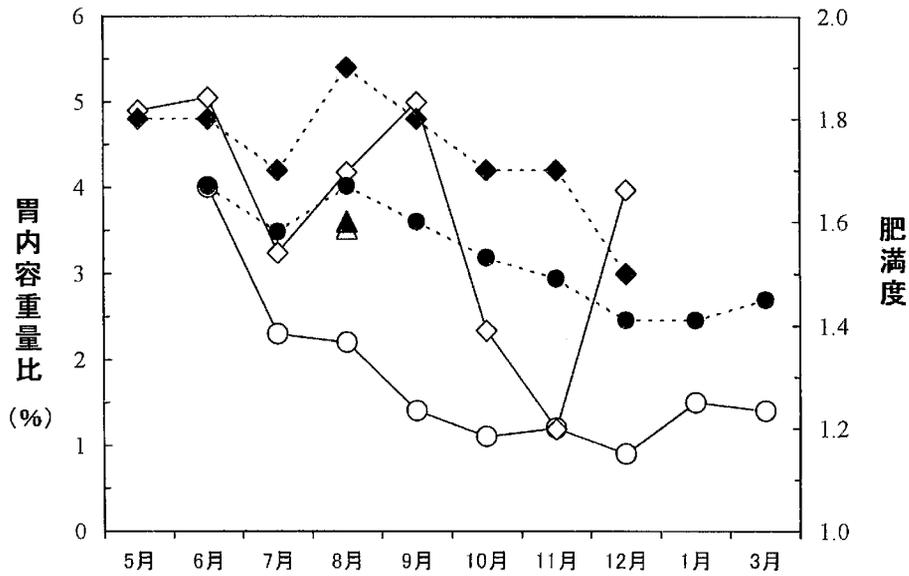


図6 若狭湾で採集した当歳ヒラメの胃内容重量比および肥満度

胃内容重量比: —○— 小浜湾 △ 和田浜 —◇— 由良浜
 肥満度: - - ● - - 小浜湾 ▲ 和田浜 - - ◆ - - 由良浜

考 察

N.hirame の成虫は由良浜および和田浜では8月から観察されたが、小浜湾では6月からと2カ月早く認められた(図3)。これは、由良浜および和田浜での採集が汀線近くのソリネットによるもので、得られた個体の平均全長が約5cmであったが、エビ漕ぎ網漁(水深5~10m)で採集した小浜湾では平均全長が10.6cmと大きく、着底後の生息期間がより長い個体で感染の機会が増えたと考えられた。また、小浜湾では*N.hirame*に感染した1歳魚も生息していることから、汀線近くに比べて感染の機会が多いと考えられた。

3調査地点間の比較で、7月までは漁獲の方法、水深および標本の大きさが異なるが、8月以降ではほぼ同サイズが漁獲されており、それらの成虫の寄生率や寄生強度が同程度であったことから、3地点ともこの時期までに同様の寄生を受けると考えられた。

若狭湾内のヒラメ当歳魚における*N.hirame*の成虫と幼虫の寄生率および寄生数は、8~12月にかけて急激に増加した。このことから、Anshary *et al.*¹⁾や虫明ら³⁾が示した冬季に寄生率および寄生強度が高くなる傾向が本海域についても示された。Anshary *et al.*¹⁾

によると、同所的に生息する1~2歳魚を感染源として当歳魚への寄生が始まり、当歳魚に寄生した虫体が産卵することで次世代の寄生虫の感染が起こり寄生レベルが増加する。若狭湾の成虫および幼虫の感染状況を見ると、次世代の寄生虫による感染拡大が8月以降に起こっていると考えられた。

摂餌個体率には3地点間で有意差は認められなかったが、胃内容重量比および肥満度では由良浜が有意に高く、小浜湾より餌料環境が良好であったと推察された。しかし、成虫および幼虫の寄生率や寄生強度には差が認められなかったことから、*N.hirame*の寄生はヒラメ当歳魚の摂餌に与える影響は低いと考えられた。

今回調査した若狭湾内の3つの地点では、*N.hirame*の寄生状況に違いが認められないことから、*N.hirame*の寄生は広い範囲にわたってほぼ同じ時期に出現していると考えられた。若狭湾内での*N.hirame*の寄生状況は、場所による顕著な差が見られないことから、今後は調査地点を絞った継続的な調査を行うとともに、*N.hirame*の寄生状況と魚市場に水揚げされたヒラメ漁獲量との関係の調査も重要であると考えられた。

文 献

- 1) Anshary, H., E. Yamamoto, T. Miyanaga, and K. Ogawa (2002) Infection dynamics of the monogenean *Neoheterobothrium hirame* among young wild Japanese flounder in the western sea of Japan. *Fish pathol.*, **37**, 131-140.
- 2) Anshary, H. and K. Ogawa (2001) Microhabitats and mode attachment of *Neoheterobothrium hirame*, a monogenean parasite of Japanese flounder. *Fish pathol.*, **36**, 21-26.
- 3) 虫明敬一・森 広一郎・有元 操 (2001) 天然ヒラメにおける貧血症の発生状況. 魚病研究, **36**, 125-132.

ズワイガニ種苗生産試験における薬浴による飼育水の細菌数の動態

森田哲男・小金隆之
(小浜栽培漁業センター)

ズワイガニ *Chionoecetes opilio* の種苗生産では、物理的な作用によると考えられる棘の破損¹⁾ が知られており、破損による傷口から細菌が進入して感染症を生じ大量減耗に至る事例がある。アミメノコギリガザミ *Scylla serrata* では、感染症による大量死亡を防ぐために、ニフルスチレン酸ナトリウム(以下、NFS-Na)による定期的な飼育水の薬浴に、生残率向上の効果が認められている²⁾。

ズワイガニの種苗生産においても、飼育水の NFS-Na 薬浴によりゾエア 2 齢期の生残率が高くなる結果が示されている^{3,4)}。しかし、薬浴による飼育水中の細菌数の動態を調査した事例はない。そこで、ふ化からメガロパ幼生までの飼育水における一般海洋細菌、および NFS-Na に感受性が高いビブリオ属細菌の細菌数の動態について調査した。なお、本試験は甲殻類種苗生産技術開発チームとの連携で実施した。

材料と方法

飼育試験 細菌数の動態調査は、2004年2月12日～4月12日に小浜栽培漁業センターで行った2回のズワイガニ種苗生産試験(試験1および2)の中で実施した。試験区は、定期的に薬浴する区(薬浴区)と薬浴を行わない区(対照区)を設けた。飼育はメガロパ幼生までとし、幼生への変態後に全個体を取り揚げて生残尾数を計測した。

飼育方法 試験1および2とも、角型20kℓコンクリート水槽2面ずつを用いた。ふ化幼生の収容尾数は、試験1では18.3万尾/槽、試験2では19.7万尾/槽とした。飼育は換水量を約1回転/日とした流水状態で行い、飼育水には紫外線照射海水を用いた。水温は13.5℃に調温した。各水槽には攪拌機(攪拌翼3.0×0.3m)を水槽底部から約20cmの位置に設置し、0.5回転/分で連続攪拌して幼生の沈下を防止した。

餌料は、試験1ではアルテミア *Artemia salina* 幼生のみを用い、飼育開始から1.0個体/mlの密度で給餌した。試験2では、L型ワムシ *Brachionus plicatilis* とアルテミア幼生を用いた。L型ワムシは、幼生の半数が第2齢期ゾエア幼生に変態するまで5個体/mlの密度で給餌した。アルテミア幼生は、L型ワムシとの併用期間中は0.5個体/ml、単独給餌期は1.0個体/mlの密度を維持した。餌料の栄養強化にはL型ワムシで

はマリンフレッシュ(5,000万細胞/ml, マリンバイオ), アルテミア幼生ではマリンオメガA(2.5ℓ/kℓ, クロレラ工業)とDHace(80ml/kℓ, オリエンタル酵母)を使用した。また、飼育期間中はナンノクロロプシス(マリンフレッシュ, マリンバイオ)を50万細胞/mlの密度で添加した。

薬浴 薬浴は、日齢7, 14, 21および28の16時に行い、水槽容量に対してNFS-Naの有効濃度5%で添加した。

細菌数の測定 サンプルの採取は、薬浴前日齢7, 14, 21および28と薬浴後日齢8, 15, 22および29に行った。さらに、飼育開始時(日齢1), 飼育途中(日齢35)および終了時(日齢40)に行った。サンプルの採取時刻は、日齢1, 7, 14, 21, 28および35では15時に、日齢7, 14, 21, 28および40では9時に実施し、滅菌した容器を用いて表層の同一場所より飼育水10mlずつ2回採取した。採取した2回のサンプルをそれぞれ原液とし、この原液を滅菌海水により10倍段階で希釈し、各段階の希釈液をZobell 2216e寒天培地およびTCBS寒天培地(日水)にそれぞれ100μℓずつ接種した。希釈液は細菌の出現個数が30~300個の範囲になる濃度を予測し、4~6段階の希釈倍率で培地に植え付けた。培地は飼育水温の14℃に調温したインキュベータ内で1週間静置培養した後、出現した細菌のコロニー数を計数した。Zobell 2216e寒天培地に出現した細菌を一般海洋細菌、TCBS寒天培地に出現した細菌をビブリオ属細菌とした。コロニー数の算出は30~300個の範囲で出現した培地の平均とした。その中に該当する培地が2つ以上ある場合は、コロニーの数の最も多い希釈率における培地の平均値を求めた。

ビブリオ属細菌の組成 TCBS寒天培地に出現した菌を目視観察により、コロニーの大きさと色調により3種類に分類した。分類に用いた培地は、30~100個程度のコロニーが出現しかつ観察しやすいものを選出し、優先的に出現したコロニーからA株(小さく黄色を呈する), B株(大きく薄い黄色を呈する), C株(小さく緑色を呈する)とした。

結 果

飼育試験 試験1の薬浴区では、アルテミア給餌の開始直後から水槽内に残ったアルテミア幼生が沈下し

て水槽底に堆積した。また、沈下したアルテミア幼生から粘液様の物質が発生し、これにゾエア幼生が絡まり大量死亡した。対照区でも、同様にアルテミア幼生の沈下と粘液様物質の発生が観察された。両試験区とも日齢10頃から生残個体の減少が顕著になったため、日齢20で全個体（第2齢期ゾエア幼生）を取り揚げて試験を終了した。生残率は、薬浴区が5.2% (9,550尾)、対照区が6.2% (11,270尾)であった。

試験2では、粘液様物質の発生は確認されなかったが、生残個体数は徐々に減少した。両試験区とも日齢40でメガロパ幼生となったため、全個体を取り揚げた。生残率は、薬浴区1.7% (3,300尾)、対照区0.04% (87尾)であった。

細菌数の動向 Zobell 2216e 寒天培地および TCBS 寒天培地に出現した細菌数を図1に示した。

試験1で出現した一般海洋細菌数は、薬浴区では日齢1の 9.9×10^4 CFU/mlが日齢7に 3.3×10^5 CFU/mlまで増加したが、薬浴により 5.6×10^4 CFU/mlまで減少した。しかし、2回目の薬浴（日齢14）では 1.2×10^5 CFU/mlとやや増加した。対照区でも、細菌数は飼育経過に伴い増加傾向が認められ、日齢15まで 1.9

$\sim 2.3 \times 10^5$ CFU/mlの範囲で推移した。ビブリオ属細菌数は、薬浴区では日齢1の 2.8×10^4 CFU/mlが日齢7に 2.2×10^5 CFU/mlに増加したが、薬浴により 7.1×10^3 CFU/mlまで減少した。しかし、2回目の薬浴では 9.0×10^3 CFU/mlと効果は得られなかった。対照区では、飼育経過に伴い細菌数の増加傾向が認められ、日齢15まで $7.1 \sim 9.2 \times 10^4$ CFU/mlの範囲で推移した。出現した全細菌数に対するビブリオ属細菌の割合は、飼育開始時は27.9%であったが、薬浴により7.4~12.8%まで減少した。対照区のビブリオ属細菌の出現割合は36.9~70.8%で、飼育期間を通して薬浴区より高くなった。

試験2の薬浴区における一般海洋細菌数は、日齢1の 4.3×10^4 CFU/mlが日齢7には 1.2×10^5 CFU/mlに増加したが、薬浴により 3.4×10^4 CFU/mlに減少した。3回目の薬浴（日齢21）では、 2.1×10^5 CFU/mlから 8.1×10^4 CFU/mlにまで減少したが、2回目（日齢14）と4回目（日齢28）の薬浴に効果は認められず、日齢14以降は $1.3 \sim 1.6 \times 10^4$ CFU/mlの範囲で推移した。対照区では、日齢1の 3.4×10^4 CFU/mlが日齢7には 9.2×10^5 CFU/mlまで増加し、以降は $8 \times$

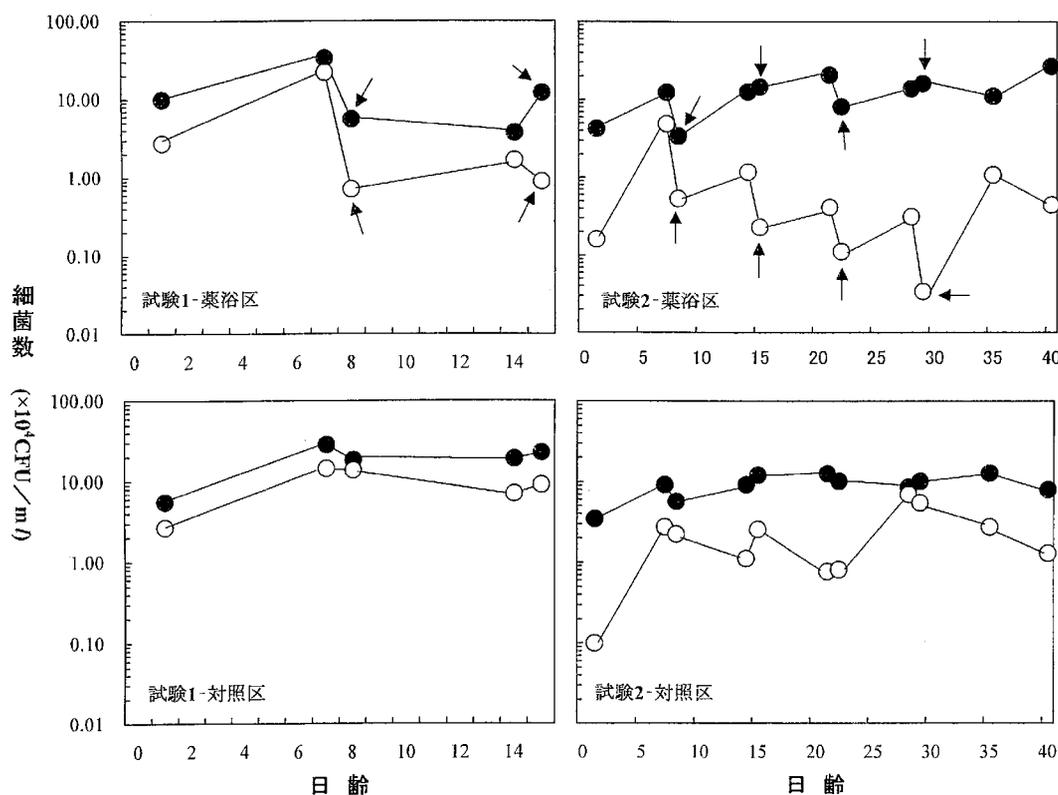


図1 ズワイガニ飼育試験における飼育水の細菌数

●：一般海洋細菌， ○：ビブリオ属細菌
↑は薬浴実施後のサンプルを採取

表1 ニフルスチレン酸ナトリウム薬浴によるズワイガニ種苗生産試験結果

試験区	収容尾数 (万尾)	飼育日数 (日)	取り揚げ			餌料	
			尾数	齢期*2	生残率 (%)		
試験1*1	薬浴区	18.3	20	9,550	Z2	5.2	アルテミア幼生
	対照区	18.3	20	11,270	Z2	6.2	〃
試験2	薬浴区	19.7	40	3,300	M	1.7	ワムシ, アルテミア幼生
	対照区	19.7	40	87	M	0.04	〃

*1 死亡個体が多かったため第2齢期ゾエア幼生(日齢20)で終了。

*2 Z2: 第2齢期ゾエア幼生, M: メガロバ幼生

$10^4 \sim 9.3 \times 10^5$ CFU/mlを維持した。ビブリオ属細菌数は、薬浴区では日齢1の 1.6×10^3 CFU/mlが日齢7に 4.9×10^4 CFU/mlまで増加したが、薬浴により 5.4×10^3 CFU/mlに減少した。その後の薬浴により細菌数は漸減したが、日齢35以降は増加傾向が認められた。対照区では、日齢1の 9.9×10^2 CFU/mlが日齢7に 2.8×10^4 CFU/mlまで増加したが、その後は $7.7 \times 10^3 \sim 7.0 \times 10^4$ CFU/mlで増減した。出現した全細菌数に対するビブリオ属細菌の割合は、薬浴区では、日齢1の3.7%から日齢7の39.7%まで増加したが、薬浴により15.8%まで減少し、その後も薬浴を行うことにより0.2~9.4%を維持した。対照区では、日齢1は2.9%であったが、その後は6.1%~81.9%と大きく変動し、飼育期間を通して薬浴区よりビブリオ属細菌出現の割合が高くなった。

ビブリオ属細菌の組成 TCBS寒天培地に出現したビブリオ属細菌3種の組成を図2に示した。試験1では、対照区、薬浴区とも日齢1はA株の出現が90~100%と優占した。日齢7と14の薬浴によりB株とC株が出現したが、A株の出現割合は80%以上と高く、細菌組成は薬浴により大きく変わることはなかった。また、対照区の組成も薬浴区と同様の傾向を示した。

試験2の薬浴区では、日齢1はA株の出現率が94.7%を占めたが、日齢7にはB株が17.0%まで増加した。日齢7と14の薬浴によりA株とB株は著しく減少し、変わってC株が急激に増加した。日齢21の薬浴によりC株の出現率は72.7%から38.1%まで減少したが、日齢28~40は19.8~72.4%の範囲で大きく変動した。対照区では、日齢1はA株のみであったが、その後はA株が7.3~52.8%、B株が1.5~66.7%、C株が20.6~

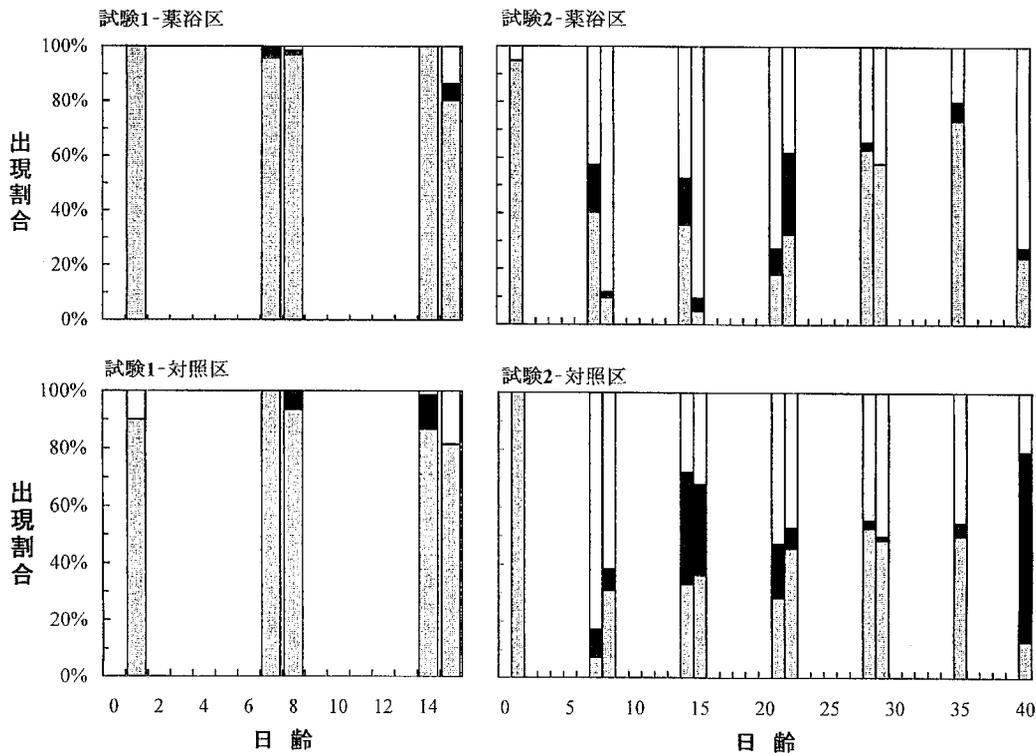


図2 ズワイガニ飼育試験における飼育水の細菌組成

■ : A, ■ : B, □ : C

82.9%の出現率であった。

考 察

ズワイガニの飼育は、1ℓ容器では管理が容易であり、毎日幼生の新しい容器への移し変えが可能なことから、稚ガニまでの飼育で30%前後の高い生残率が得られている。しかし、飼育管理が難しい大型水槽では、飼育環境の影響や細菌感染症の発生により生残率は大きく低下する。このような減耗はガザミ類等の他の甲殻類でも知られており、防止策としてNFS-Na薬浴を行うことで高い生残率が得られている^{2,5)}。また、ズワイガニでもNFS-Naの薬浴効果が認められている⁴⁾。

本試験のメガロバ期まで飼育を行った試験2では、全体的に生残率は低かったが生残率向上に薬浴の効果があつたと考えられた。飼育期間中のビブリオ属細菌数の推移を見ると、対照区では大きな変動はなく 10^5 CFU/ml前後で推移したのに対し、薬浴区では薬浴直後に細菌数の顕著な減少が認められた。特に日齢7に行つた1回目の薬浴に最も効果があり、日齢7以降も 10^2 ~ 10^4 CFU/mlを維持できた。しかし、試験2では、日齢28以降の薬浴を行わなかつたところ、ビブリオ属細菌数の増加が認められた。このように、1週間に1回の割合で薬浴を実施することによりNFS-Na感受性細菌が1オーダー減少することが確認された。

ビブリオ属細菌の簡易分類では、薬浴の有無により出現するビブリオ属細菌の種類に差は認められなかつた。しかし、試験1ではA株が優先したのに対し、試験2ではC株が飼育期間を通して優先種となつた。これらの細菌の由来が生物餌料から過海水かは今回の試

験では判断できなかった。また、A株がズワイガニ幼生にとって有害であるかは未検討であるが、A株が優占した試験1では薬浴の有無に関わらず生残率が低下したことから、A株がゾエアの生残に何らかの影響を与えている可能性が考えられた。

今後は、薬剤を使用せずに生残率を安定させる技術開発への応用を念頭に、ズワイガニ種苗生産過程における細菌性疾病の発生状況を詳細に把握するとともに、飼育水中の細菌数の動態を観察する必要がある。

文 献

- 1) 小金隆之 (2003) II - 1 各事業場において実施した技術開発, 5 小浜事業場, 3. ズワイガニ種苗生産の基礎技術の開発. 日本栽培漁業協会事業年報 (平成13年度), 126-128.
- 2) 浜崎活幸 (1999) アミメノコギリガザミ種苗生産における大量死亡の防除—幼生の声が聞こえるか?—。さいばい No. 91, 28-31.
- 3) 小金隆之 (2002) II - 1 各事業場において実施した技術開発, 5 小浜事業場, 3. ズワイガニ種苗生産の基礎技術の開発. 日本栽培漁業協会事業年報 (平成14年度), 133-135.
- 4) Morita, T., T. Kogane, and K. Hamazaki (2004) The experiments of early hatching of snow crab and its seed production. 第15回(日中韓)水産研究者協議会.
- 5) 浜崎活幸 (2003) II - 1 各事業場において実施した技術開発, 15 八重山事業場, 4. 亜熱帯性甲殻類の種苗生産技術の開発. 日本栽培漁業協会事業年報 (平成12年度), 362-366.

ポビドンヨード剤がオニオコゼ卵のふ化と生菌数に及ぼす影響

太田健吾*1・堀田卓朗*2・渡辺研一*2

(*1 伯方島栽培漁業センター, *2 古満目栽培漁業センター)

オニオコゼ *Inimicus japonicus* は本州各地, 東シナ海, 南シナ海に広く分布する高級魚であり, 定着性が強いことから栽培漁業の対象種として, 西日本を中心に多くの機関が種苗生産技術の開発に取り組んでいる。

近年では飼育技術の進展に伴い, 10万尾単位での生産が可能となり, 2002年の放流を目的とした種苗の生産尾数は86.6万尾に達している¹⁾。しかし, その一方で, 本種の種苗生産では依然として飼育初期および浮遊期に発生する大量減耗によって生残率が著しく低下する事例が多く, その防除対策の構築が急務となっている。今までにこれらの減耗の発生機序は明確になっておらず, 疾病, 餌料の栄養条件, 飼育環境などが原因として疑われている。

このため, 本報告ではヒラメなど多くの魚種で疾病防除対策の一環として実施されているポビドンヨード剤による受精卵の消毒を, 本種に適用する場合の条件を検討する目的で, ポビドンヨード剤の濃度と浸漬時間が受精卵のふ化と生菌数に及ぼす影響を検討した。

材料と方法

供試卵 試験には, 天然魚を購入し伯方島栽培漁業センターで養成した208尾(雌18尾, 雄190尾, 平均全長24.9cm)から自然産卵により得られた受精卵を用いた。供試卵には, 産卵を開始した6月中旬から産卵を終了した7月中旬までのうち, 6月24日, 7月5日および7月12日に採卵した受精卵を使用して3回の試験を実施した。供試卵の発生段階は6月24日採卵分が4~32細胞期(採集卵に占める割合:44%), 桑実期(同14%), 胚体形成期(同42%), 7月5日採卵分が桑実期, 7月12日採卵分が8細胞期(同1%), 32細胞期(同19%), 桑実期(同80%)であった。

採卵時には受精卵の他にシルト状の微細な粘性土などの夾雑物も混入して回収されるため, 試験開始前にこれらの除去を行った。夾雑物の除去は, 500ℓポリカーボネート製円形水槽に設置したゴース地製のネット(直径80cm×深さ65cm)に受精卵を收容し, 流水によって夾雑物のみをネットの外部に流出させる方法で行った。採卵時および試験時の水温は自然水温とし, 6月24日が22.3℃, 7月5日が23.3℃, 7月12日が24.1℃であった。

消毒液の調整 ポビドンヨード剤として市販品(水産用イソジン液10%, 明治製菓)を用い, 砂ろ過海水で希釈して計画濃度に調整した。試験液中の有効ヨウ素濃度の測定はヨウ素滴定法で行った。

試験区 有効ヨウ素濃度が0, 25, 50および100mg/ℓとなるように調整した4種類の濃度を設定し, 浸漬時間は各濃度とも5, 10, 15および20分間として, 合計16試験区を設けた。さらに, 有効ヨウ素濃度0mg/ℓについては, 浸漬しない区(浸漬時間0分間)を設けた。

試験方法 卵の消毒液への浸漬は, 所定濃度に調整した試験液30ℓを満たしたプラスチック製角形水槽に設置した観賞魚用ネット(縦7cm×深さ5cmのナイロン製)内で行った。供試卵数は約500粒(約1g)とし, ネットを所定時間までゆっくりと振盪させた。浸漬が終了した供試卵は, 直ちに砂ろ過海水を流水としたプラスチック製角形水槽にネットごと3分間浸漬し, 残留したヨード剤を洗浄した。その後, およそ200粒の供試卵をカナマイシン硫酸塩(和光純薬)5mgを含む1ℓの砂ろ過海水が入った蓋付きポリエチレン製容器に移し密栓した。容器は, 自然水温の砂ろ過海水を毎分4ℓの割合でかけ流した500ℓのウォーターバス水槽に浮かべ, エアーストーンによる強曝気で水槽内の海水を攪拌して容器を常時振盪させふ化管理を行った。対照区の卵がすべてふ化した時点で容器を回収し, 直ちに各容器にホルマリン原液を20mlずつ添加して試料を固定した。

試験結果の判定 固定した試料は実体顕微鏡(SMZ-U, ニコン)下で容器毎にふ化仔魚, 未ふ化生残卵(透明でふ化直前の状態であるが, ふ化していない卵), 死卵(白濁した卵)に区分して計数を行い, 以下のようにふ化率, 未ふ化生残卵発生率, 死亡率を算出した²⁾。

$$\text{ふ化率}(\%) = \frac{\text{ふ化仔魚数}}{\text{ふ化仔魚数} + \text{未ふ化生残卵数} + \text{死卵数}} \times 100$$

$$\text{未ふ化生残卵発生率}(\%) = \frac{\text{未ふ化生残卵数}}{\text{ふ化仔魚数} + \text{未ふ化生残卵数} + \text{死卵数}} \times 100$$

$$\text{死亡率}(\%) = \frac{\text{死卵数}}{\text{ふ化仔魚数} + \text{未ふ化生残卵数} + \text{死卵数}} \times 100$$

受精卵の生菌数の測定と消毒率の算出 受精卵の生菌数を測定するため, 消毒液への浸漬直後の卵約0.1~0.2g(約50~100粒)を滅菌した薬匙で取り, 予め

滅菌した2%ペプトン水(1.5% NaCl加) 1mlを入れて氷冷したストマッカーの袋(オルガノ) に入れてヨード剤の反応を止めた。これらに卵の9倍量(w/v)のHerbst人工海水を加えて磨砕し、これを原液として10, 100, 1000倍に同海水で希釈後、海水培地平板³⁾に塗抹した。培地は25℃で5日間好氣的に培養し、コロニー数を計数後、生菌数(CFU/g)および消毒率を算出した。なお、消毒率は以下のように定義した。

$$\text{消毒率}(\%) = (1 - \text{浸漬後の生菌数} / \text{浸漬前の生菌数}) \times 100$$

消毒率の値が負になる場合には、「効果なし」とした。

有効ヨウ素濃度の減衰状況の調査 前述の3回の試験時に、有効ヨウ素濃度の減衰状況を調べるため、有効ヨウ素濃度を25mg/lに調整した消毒液10lを水槽に入れ、消毒液1lに対して約84~89粒(136~154mg)の受精卵を収容する水槽、さらにこれを基準として2, 4, 8倍量の卵を収容する水槽、および卵を収容しない水槽の合計5槽を設けた。卵の収容前および収容後20分間が経過した時点の有効ヨウ素濃度をそれぞれ測定し、次式により減衰量と減衰率を算出した。なお、有効ヨウ素濃度の測定は前述した方法で行い、試験中は消毒液中での卵の密度に偏りができないように攪拌した。

$$\text{減衰量}(\text{mg}/\ell) = \text{卵収容前の有効ヨウ素濃度} - \text{卵収容後20分経過後の有効ヨウ素濃度}$$

$$\text{減衰率}(\%) = \text{減衰量} / \text{卵収容前の有効ヨウ素濃度}$$

×100

結 果

ふ化率 浸漬濃度および時間別のふ化率を表1に示した。有効ヨウ素濃度0mg/l区のふ化率は、いずれの試験でも浸漬時間に関わらず84.4~93.8%であった。一方、ヨード剤への浸漬では、いずれの濃度においても5分間の浸漬でふ化率が3.8~46.2%まで低下した。さらに、浸漬時間が10分以上に及ぶとふ化率は0.0~1.3%まで大きく低下した。また、ヨード剤を含む試験区では浸漬条件が同一であっても、使用した卵の産卵日が遅いほどふ化率が低下する傾向が認められた。

未ふ化生残卵の出現率 未ふ化生残卵の発生率を表2に示した。未ふ化生残卵の出現率は、ふ化率の観察結果と相反する傾向を示し、ヨード剤を含まない試験区での出現率は0.0~2.7%といずれの浸漬時間でも低率であった。ヨード剤を含む試験区では、未ふ化生残卵の出現率は46.2~88.5%であった。また、浸漬条件が同一であっても、5分間および10分間浸漬した区では使用した卵の産卵日が遅いほど出現率が高かった。一方、15分間および20分間浸漬した区では、逆に試験時期が遅くなるほど出現率が低下し、3回目の試験では有効ヨウ素濃度100mg/lに20分間浸漬した区の出現率は0.7%であった。

表1 ポビドンヨード剤がオニオコゼ卵のふ化率に及ぼす影響試験における浸漬濃度別、浸漬時間別のふ化率

試験区分	浸漬時間 (分)	有効ヨウ素濃度 (mg/l)			
		0	25	50	100
		単位: %			
1回目	0	85.6	-	-	-
	5	88.2	46.2	18.3	37.8
	10	89.2	0.0	0.0	0.0
	15	86.6	0.0	0.0	0.0
	20	84.1	0.0	0.0	0.0
2回目	0	90.7	-	-	-
	5	84.4	9.9	8.6	17.7
	10	87.7	0.0	0.0	1.3
	15	89.8	0.0	0.0	0.0
	20	89.8	0.0	0.0	0.0
3回目	0	91.7	-	-	-
	5	92.9	3.8	8.7	7.6
	10	89.2	0.0	0.7	0.6
	15	93.8	0.0	0.0	0.0
	20	86.2	0.0	0.0	0.0

表2 ポビドンヨード剤がオニオコゼ卵のふ化率に及ぼす影響試験における浸漬濃度別、浸漬時間別の未ふ化生残卵出現率

単位：%

試験区分	浸漬時間 (分)	有効ヨウ素濃度 (mg/ℓ)			
		0	25	50	100
1回目	0	1.1	—	—	—
	5	0.0	46.2	73.1	46.7
	10	2.7	93.2	92.9	93.8
	15	0.0	92.6	91.4	84.2
	20	0.0	92.8	90.3	74.5
2回目	0	0.0	—	—	—
	5	0.0	78.1	80.5	75.6
	10	0.0	80.4	91.5	90.9
	15	0.0	87.0	85.2	84.6
	20	0.0	86.2	88.7	68.3
3回目	0	0.0	—	—	—
	5	0.0	88.5	83.3	82.6
	10	0.6	91.4	93.9	90.4
	15	0.0	87.8	63.2	66.9
	20	1.7	81.1	6.7	0.7

表3 ポビドンヨード剤がオニオコゼ卵のふ化率に及ぼす影響試験における浸漬濃度別、浸漬時間別の死亡率

単位：%

試験区分	浸漬時間 (分)	有効ヨウ素濃度 (mg/ℓ)			
		0	25	50	100
1回目	0	13.3	—	—	—
	5	11.8	7.7	8.7	15.6
	10	8.1	6.8	7.1	6.2
	15	13.4	7.4	8.6	15.8
	20	15.9	7.2	9.7	25.5
2回目	0	9.3	—	—	—
	5	15.6	11.9	10.9	7.3
	10	12.3	19.6	8.5	7.8
	15	10.2	13.0	14.8	15.4
	20	10.2	13.8	11.3	31.7
3回目	0	8.3	—	—	—
	5	7.1	7.7	8.0	9.7
	10	10.2	8.6	5.4	9.0
	15	6.2	12.2	36.8	33.1
	20	12.2	18.9	93.3	99.3

死亡率 死亡率を表3に示した。死亡率は、いずれの試験でも浸漬時間が長く、有効ヨウ素濃度が高い試験区ほど高くなる傾向が認められた。最も死亡率が高かったのは、3回目の試験で有効ヨウ素濃度100mg/ℓに20分間浸漬した区であり、99.3%であった。

受精卵の生菌数と消毒率 受精卵の生菌数の測定結果および消毒率を、それぞれ表4および表5に示した。受精卵の生菌数は、1回目の試験ではヨード剤を含まない試験区が、浸漬時間に関わらず $10^2 \sim 10^4$ CFU/gの

オーダーの生菌数であった。これに対し、ヨード剤を含む試験区の生菌数は 10^3 CFU/gから測定限界以下で推移し、生菌数は有効ヨウ素濃度が高く浸漬時間が長いほど減少する傾向を示した。一方、2回目と3回目の試験では、ヨード剤を含まない試験区のほとんどが 10^4 のオーダーの生菌数であったが、ヨード剤を含む試験区ではいくつかの例外を除いて、生菌数は測定限界以下であった。

また、消毒効果を見ると(表5)、1回目の試験では、浸漬時間に係わらず有効ヨウ素濃度25mg/ℓ以下では

表4 ポビドンヨード剤がオニオコゼ卵のふ化率に及ぼす影響試験における浸漬濃度別、浸漬時間別の卵の生菌数

単位：CFU/g

試験区分	浸漬時間 (分)	有効ヨウ素濃度 (mg/ℓ)			
		0	25	50	100
1回目	0	3.9×10^2	—	—	—
	5	3.8×10^3	9.3×10^3	6.3×10^2	1.2×10^3
	10	3.3×10^4	8.0×10^3	2.3×10^2	nd*
	15	3.5×10^2	3.0×10^3	nd	3.5×10^1
	20	3.1×10^4	5.7×10^3	2.5×10^1	nd
2回目	0	5.2×10^4	—	—	—
	5	5.4×10^4	nd	1.4×10^3	nd
	10	5.2×10^4	nd	nd	nd
	15	2.9×10^4	nd	nd	nd
	20	2.8×10^4	nd	nd	nd
3回目	0	3.9×10^4	—	—	—
	5	5.4×10^4	5.0×10^1	1.0×10^2	nd
	10	3.3×10^3	2.0×10^2	nd	nd
	15	2.9×10^4	5.0×10^1	nd	nd
	20	2.8×10^4	nd	5.0×10^1	nd

* nd：検出限界以下

表5 ポビドンヨード剤がオニオコゼ卵のふ化率に及ぼす影響試験における浸漬濃度別、浸漬時間別の消毒率

単位：%

試験区分	浸漬時間 (分)	有効ヨウ素濃度 (mg/ℓ)			
		0	25	50	100
1回目	5	ne	ne	ne	ne
	10	ne	ne	41.0	>99
	15	10.3	ne	>99	91.0
	20	ne	ne	93.6	>99
2回目	5	ne	>99	97.3	>99
	10	0.0	>99	>99	>99
	15	44.2	>99	>99	>99
	20	46.2	>99	>99	>99
3回目	5	ne	99.9	99.7	>99
	10	91.5	99.5	>99	>99
	15	25.6	99.9	>99	>99
	20	28.2	>99	99.9	>99

消毒率 = (1 - 浸漬後の生菌数 / 浸漬前の生菌数) × 100

ne：効果なし

>99：消毒率99.9%以上

ほとんど消毒効果が得られなかった。しかし、2回目および3回目の試験では、ヨード剤への浸漬濃度および時間に係らず強い消毒効果が得られた。

有効ヨウ素濃度の減衰状況 有効ヨウ素濃度の減衰状況を表6に示した。3回の試験で、卵収容前の有効ヨウ素濃度は各々21.4、22.7および22.3mg/ℓであり、計画濃度の25mg/ℓを約10~15%下回った。ただし、卵を収容せずに20分が経過した場合の減衰量は、1回目の試験では1.0mg/ℓであったが、2回目

および3回目の試験ではそれぞれ5.1、4.6mg/ℓと増加した。同様に、減衰率も1回目の4.7%に対して2回目22.5%、3回目20.4%と高い値を示した。また、収容卵数別では、1回目および2回目の試験で8倍量の卵を収容した水槽の有効ヨウ素濃度が18.7、16.2mg/ℓと、他の水槽の20.4~20.7mg/ℓおよび17.1~18.0mg/ℓに比べて低かった。しかし、3回目の試験では、このような傾向は認められなかった。

表6 ポビドンヨード剤がオニオコゼ卵のふ化率に及ぼす影響試験における受精卵の消毒処理による有効ヨウ素濃度の減衰状況

試験区分	収容卵数	有効ヨウ素濃度 (mg/ℓ)		減衰量 (mg/ℓ)	減衰率 (%)
		収容前	20分経過後		
1回目	0	21.4	20.4	1.0	4.7
	基準量	21.4	20.7	0.7	3.3
	2倍量	21.4	20.6	0.8	3.7
	4倍量	21.4	20.4	1.0	4.7
	8倍量	21.4	18.7	2.7	12.6
2回目	0	22.7	17.6	5.1	22.5
	基準量	22.7	17.8	4.9	21.5
	2倍量	22.7	18.0	4.6	20.4
	4倍量	22.7	17.1	5.6	24.5
	8倍量	22.7	16.2	6.5	28.6
3回目	0	22.3	17.7	4.6	20.4
	基準量	22.3	18.0	4.3	19.3
	2倍量	22.3	18.0	4.2	19.0
	4倍量	22.3	16.9	5.4	24.2
	8倍量	22.3	18.0	4.2	19.0

*基準量 有効ヨウ素濃度25mg/ℓの消毒液 1ℓ当たり受精卵約84~95粒を収容

考 察

ふ化に及ぼす影響 今回の試験結果から、オニオコゼの桑実期の受精卵を有効ヨウ素濃度25mg/ℓ以上の消毒液に5分間浸漬すると、ふ化率が対照区の約半分まで低下することがわかった。さらに、浸漬時間が10分間以上に至ると、ふ化率は0%となり、全くふ化しないことも明らかとなった。

ポビドンヨード剤に対する受精卵の耐性は、これまでにヒラメ^{4,6)}、シマアジ⁷⁾、トラフグ⁸⁾、マダイおよびホシガレイ⁹⁾で報告されている。それによると、各魚種のふ化率に影響を及ぼさない最高濃度と最長浸漬時間は、ヒラメでは有効ヨウ素濃度50mg/ℓで10分間、10mg/ℓ以下で10分間、100mg/ℓで15分間、シマアジでは有効ヨウ素濃度80mg/ℓで15分間、トラフグでは桑実期の卵で有効ヨウ素濃度100mg/ℓ以下で5分間、マダイでは桑実期の卵で有効ヨウ素濃度200mg/ℓで5分間、ホシガレイでは心臓拍動開始時期の卵で75mg/ℓで15分間とされている。しかし、これらの報告では、ふ化率は卵の発生段階、産卵時期によっても変動するとされ、シマアジでは、発眼期の卵を有効ヨウ素濃度100mg/ℓ以上で15分間消毒すると64細胞期、胚環形成期に比べて、ふ化率が低下することがわかっている。また、マダイでは産卵初期の卵では、ふ化率の低下とともに、得られたふ化仔魚の飼育成績にも影響が及ぶとされている。そして、ホシガレイでは受精後1時間目、眼胞形成期、クッパー氏胞形成期に消毒を施すことにより、ふ化率の低下を招くと指摘されているほか、浮上卵率や発生率が低い卵を消毒した場

合も、ふ化率が低下すると報告されている。このため、マダイやホシガレイでは、消毒時の卵質もふ化率に影響を及ぼす要因のひとつとして考えられている。今回の試験でも浸漬濃度、浸漬時間などの消毒条件が同じであっても、ふ化率は産卵期が後半になるほど低下する傾向が窺われたことから、本種でも産卵時期の違いや消毒時の卵質が、ふ化率に影響を及ぼしていた可能性が考えられる。

未ふ化生残卵は、ヨード剤を含まない試験区の一部とヨード剤を含む試験区のすべてで観察された。ヨード剤を含む試験区の未ふ化生残卵出現率は、浸漬時間が10分間までであれば、浸漬濃度が高く浸漬時間が長いほど高くなる傾向を示した。さらに、浸漬時間が15分間以上の試験区では、浸漬濃度を25mg/ℓの試験区で最も高い値を示し、濃度50mg/ℓ以上の試験区では低下する傾向を示した。また、死亡卵はすべての試験区で観察され、特にヨード剤を含む試験区において、浸漬時間が15分間以上に及ぶ区で出現率が高かった。このことから、オニオコゼの受精卵をヨード剤を含む海水に浸漬すると、浸漬時間が10分間以内であれば未ふ化生残卵が出現する割合が高く、浸漬時間が15分以上に及ぶと死亡する卵の割合が増加すると考えられる。

受精卵の生菌数と消毒率 1回目の試験では、2回目、3回目の試験に比べてヨード剤を含む試験区の卵の生菌数が多く、消毒効果が低かった。供試卵を確保した親魚の産卵水槽には生海水を注水していたため、水槽内には卵以外にシルト状の粘性土をはじめ様々な有機物が混在していた。これに加えて、おそらく1回

目の試験では卵の前処理が不十分であったことから、卵の表面には有機物が多数残存していた可能性が考えられ、これが浸漬の際に有効ヨウ素の減衰を招き、消毒率を低下させたと考えられた。

有効ヨウ素濃度の減衰状況 今回の試験では、受精卵を収容しない場合でも有効ヨウ素濃度は約10~15%減衰した。さらに3回の試験間を比較すると、減衰量で5.1倍、減衰率で4.8倍の差が生じることが明らかとなった。このことから、試験の置かれる条件によっては、この程度のヨウ素の減衰は十分に起こる可能性があることが示唆された。

ポビドンヨード剤を用いた受精卵の消毒では、消毒効果を大きく左右する有効ヨウ素濃度の減衰は避けられない問題である。減衰の度合いにこのような差を生じさせる要因のひとつとして、海水中に含まれる有機物の量の差が指摘されている¹⁰⁻¹⁵。シマアジではCOD（化学的酸素消費量, Chemical Oxygen Demand）を指標として採卵ネット内の海水に含まれる有機物量を測定した結果、測定値は580ppmを示し、ろ過海水（0.21ppm）の約2,700倍であったと報告されている¹⁵。マスノスケやギンザケでは、消毒の際の卵量とポビドンヨード剤の使用量の比率によって、ヨウ素が減衰することが指摘されている¹²。それによると、マスノスケ卵ではポビドンヨード剤と卵の割合を2:1に、ギンザケ卵では同様に4:1にすることで、それぞれ1:1で消毒した場合よりも有効ヨウ素濃度の減衰が軽減できたと報告されている。

今回の試験では、収容卵数が基準量の4倍量（約336~380粒/ℓ）までであれば、海水のみで消毒剤を調整した場合と浸漬後の有効ヨウ素濃度に顕著な差が認められなかったことから、有効ヨウ素の減衰の影響は極めて少なかったと考えられる。しかし、マスノスケやギンザケの場合と比較すると、オニオコゼの卵量に対する試験液の量は約1:1600と非常に多くなっている。したがって、受精卵の消毒は、卵数とポビドンヨード剤の有効濃度との関係を魚種毎に把握して、効果が得られる条件で施す必要がある。

減衰の度合いを最小限にとどめるため、ギンザケ卵を用いて消毒前に卵を洗浄する工程を加えた試験¹²では、卵を洗浄しない区で消毒開始直後から急激な有効ヨウ素濃度の減衰が起こったのに対し、試験区の減衰は小規模で終息したと報告されている。同様のことが、CODを指標としてシマアジ¹⁵でも報告されている。今回の試験のように生海水で養成した親魚から採卵を行う場合は、特に海水および卵表面上に存在する微細な夾雑物によって消毒剤が減衰を受けやすく、十分な消毒効果が得られない可能性が高くなることが予想されるため、供試卵は消毒前に清浄海水で十分に洗

浄するなどの前処理を施すことが重要と考える。

以上の試験結果から、オニオコゼ受精卵のポビドンヨード剤に対する感受性は、ヒラメやマダイに比べて高いことが示唆され、通常、これらの魚種で実施されている有効ヨウ素濃度50mg/ℓ、浸漬時間10分間での消毒は不可能と考えられた。このため、今後は有効ヨウ素濃度を25mg/ℓ未満に調整し、浸漬時間を5分間以内にとどめた設定で再度試験を行い、ふ化率に影響せず、かつ消毒率が低下しない浸漬濃度と浸漬時間を推定する必要がある。また、今回の試験は桑実期の卵について行ったが、シマアジやホシガレイのように、卵の発生段階によりヨード剤に対する感受性が異なることも予想されるため、この点についても検討する必要がある。

文 献

- 1) 水産庁・独立行政法人水産総合研究センター（2004）平成14年度栽培漁業種苗生産、入手・放流実績（全国）～資料編～、25-26.
- 2) 三村 元・長瀬俊成・片山泰人・長光貴子・難波憲二（1998）オゾン処理海水のヒラメ、*Paralichthys olivaceus* 卵に対する影響、水産増殖、46、101-110.
- 3) Yamamoto, H., Y. Ezura, and T. Kimura（1982）Effects of antibacterial action of seawater on the viability of some bacterial species. *Fish. Sci.*, 48, 1427-1431.
- 4) 松田浩一・山川 卓・辻ヶ堂 諦・竹内敏博（1988）ヒラメ卵のポビドンヨード剤に対する耐性試験、昭和62年度三重県水産技術センター事業報告書、50-51.
- 5) 佐藤 修・村上啓士・水呉 浩・木村 淳・米司 隆・伏見 徹（1994）ポビドンヨード剤によるヒラメ卵の耐性、平成5年度広島県栽培漁業協会事業報告、83-87.
- 6) 中野平二・開 鉄生（1992）ヨード剤によるヒラメ卵の消毒、平成3年度魚類防疫技術基盤確立事業、海産魚の防疫事例集、社団法人日本水産資源保護協会、24-27.
- 7) 虫明敬一（1994）シマアジおよびブリの親魚養成技術の開発に関する研究、日本栽培漁業協会、特別研究報告、9、pp.62.
- 8) 堀田卓朗・藤本 宏・山崎英樹・渡辺研一（2004）トラフグ受精卵のヨード剤による消毒の効果、栽培漁業センター技報、2、92-95.
- 9) Hirazawa, N., T.Hara, T.Mitsuboshi, J. Okazaki, and K.Hata（1999）Idophore disinfection of

- eggs of spotted halibut *Verasper variegates* and red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Sci.*, **65**, 333-338.
- 10) 鈴木雄策 (1989) 卵の消毒. 平成元年度魚類防疫技術基盤確立事業さけます養殖における防疫事例集, 社団法人日本水産資源保護協会, 106-108.
 - 11) 佐古 浩・石田典子・前野幸男・反町 稔 (1988) *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* ならびに *V. ordalii*. に対する各種消毒薬の殺菌作用. 魚病研究, **23**, 219-229.
 - 12) Chapman, P.F. and R.W.Rogers (1992) Decline in iodine concentration of iodophore during water hardening of salmonid eggs and methods to reduce this effect. *Prog. Fish-Cult.*, **54**, 81-87.
 - 13) 野村哲一・笠井久会 (2003) さけ・ます増殖事業における防疫対策. 魚と卵, **169**, 1-12.
 - 14) 井上 潔・池谷文夫・山崎隆義・原 武史 (1990) IPN ウイルスに対する市販消毒剤の殺ウイルス効果. 魚病研究, **25**, 81-86.
 - 15) 有元 操 (1995) シマアジのウイルス性神経壊死症に関する研究. 日本栽培漁業協会, 特別研究報告, **10**, pp.52.

ブリのウイルス性腹水症原因ウイルスの微量検出方法の開発

西岡豊弘

(上浦栽培漁業センター)

ブリのウイルス性腹水症は、腹水の貯留による腹部の膨満や肝臓の出血を主徴とし、全長20~180mmのブリ稚魚に発生する¹⁾。原因ウイルスはビルナウイルス科のYAV²⁾(国際命名法によりYTAV: yellowtail ascites virus と呼称)であり、五島栽培漁業センターでは、本病が陸上水槽または海面小割生簀でのブリ種苗生産過程で、ほぼ毎年発生し、その発生時期および発生水温は主として5月上旬~7月下旬、20~26℃であった³⁻¹¹⁾。本病が陸上水槽で発生すると全滅することもあり⁶⁾、海面小割生簀でも高い時には40%以上の死亡率を示す場合がある¹¹⁾。本病の診断は、これまで培養細胞に病魚の磨砕ろ液を接種し、細胞が変性(細胞変性効果: CPE)するか否かを確認することにより行われているが(以下、培養細胞法)、近年は、短時間でウイルス遺伝子を検出できるPCR法も開発されている¹²⁾。また、本病はカンパチやヒラマサでも発生することから^{12,13)}、ブリ属の種苗生産過程や養殖においては、イリドウイルス病¹⁴⁾と同等に防除技術の開発が必要な疾病と考えられる。

種苗生産場における本病の感染経路としては、親魚からの垂直感染が強く示唆されている¹⁵⁾ものの、種苗生産過程における本病の伝播様式については明らかにされておらず、根本的な防除対策は実施されていない。本病の防除対策を講じるには、まず、疫学調査が必要であり、それには高感度にウイルスを検出する方法の開発が必須である。このため、本報では上記の培養細胞法とPCR法によるYTAVの検出感度について比較し、さらに検出感度を向上させるため、培養細胞法とPCR法を併用する検出方法について検討した。

材料と方法

ウイルスの検出に用いた病魚 供試魚には、2000年4月に五島栽培漁業センターで発生したウイルス性腹水症の飼育魚を用いた。この病魚は、養成親魚16尾(雌8尾、雄8尾)から3月下旬に採卵したものであり、この内ふ化仔魚37万尾を60kℓ水槽に収容し飼育したものである。本病の特徴である腹部が膨張した個体は、日齢52頃から多数観察され、日齢55には細胞培養法によりウイルス性腹水症を確認した。これらの中からウイルスの感染強度が異なると推定される3群を抽出した。すなわち、明らかな症状である腹部の膨満が認め

られる大型稚魚(A群: 7尾をプールして1検体とした)、症状が認められない大型稚魚(B群: 同じく5尾を1検体)および症状が認められない小型稚魚(C群: 同じく4尾を1検体)についてウイルス分離を行った。供試魚の平均尾又長は、大型個体で3.6cm、小型個体で2.1cmであった。

培養細胞によるウイルス感染価の測定 抽出した3群のブリ稚魚から肝臓を摘出し、9倍量のHBSS(ハンス液)を加えて磨砕し、磨砕液を1000×gで15分間遠心した。上清を0.45μmフィルターでろ過し、病魚磨砕ろ液原液とした。また、原液を10⁻⁸までHBSSで10段階希釈した希釈液を作製した。

ウイルスの分離にはサケ科魚類由来の株化細胞であるCHSE-214を用い、培養液にはウシ胎児血清を10%含むイーグルMEM(Minimum Essential Medium)培地を使用した。ウイルス感染価の測定には、予め細胞を培養した96穴マイクロプレートを用いた。マイクロプレート1穴当たり病魚磨砕ろ液原液および希釈液を50μℓずつ接種し、20℃で10日間培養後、CPEの発現を確認した。ウイルス感染価の測定には、10段階希釈液をそれぞれ4穴に接種し、50%感染終末点法(TCID₅₀)により測定した。なお、TCID₅₀/mℓはReed and Muench法により計算した¹⁶⁾。

PCR法によるウイルス遺伝子の検出 採取した病魚の肝臓からISOGEN(ニッポンジーン)を用いウイルスRNAを抽出した。YTAV遺伝子は、Suzuki *et al.*¹²⁾の方法に準じてnested PCRにより検出し、増幅サイクル数はPCRおよびnested PCRとも30サイクルとした。ただし、PCRの反応液量は50μℓ、nested-PCRの反応液量は25μℓとし、逆転写酵素にはSuper Script II(GIBCO BRL)、DNAポリメラーゼにはTaKaRa EX-Taq(宝酒造)を使用した。PCR反応終了後にアガロースゲルを用いた電気泳動法により、PCRでは359bp、nested PCRでは168bpのYTAVの増幅断片を確認した。

細胞培養法とPCR法によるウイルスの検出感度の比較 上記のウイルス検出方法による検出感度を比較するため、ウイルス感染価を測定した病魚磨砕ろ液原液を用いてPCRおよびnested PCRの検出限界を調査した。病魚磨砕ろ液原液からウイルスRNAを抽出し、DDW(ジエチルピロカーボネイト処理水)に溶解しRNA溶解原液を作製した。これをDDWで10倍

段階希釈し希釈 RNA 溶解液とした。各 RNA 溶解液を PCR に用い、それぞれの PCR 産物を nested PCR に供試し、電気泳動法により PCR 増幅産物を確認した。

親魚卵巣卵からのウイルスの検出 $10^{6.05}$ TCID₅₀/ml のウイルス液を 10^{-5} まで10段階希釈し、各希釈液 $10 \mu\text{l}$ をそれぞれプリの卵巣卵 $40 \mu\text{l}$ に添加後磨砕し、ウイルス検出用の材料とした。そして、培養細胞法、PCR 法および培養細胞法と PCR の併用によりウイルスの検出限界を測定した。

種苗生産に使用したプリ親魚生殖腺からのウイルスの検出 種苗生産に使用したプリ親魚群について、産卵終了から約3ヵ月後の2000年5月2日に生殖腺を採取し検査用材料とした。生殖腺 $50 \mu\text{l}$ を用い、細胞培養法と PCR 法および細胞培養法と PCR 法の併用によりウイルスの検出を行った。

結 果

YTAV 感染群からのウイルス分離 プリ稚魚からのウイルスの分離および検出結果を表1に示した。明らかな症状が認められる大型稚魚（A群）と症状が認められない大型稚魚（B群）からウイルスが分離された。

しかし、症状が認められない小型稚魚からウイルスは分離されなかった。なお、PCR および nested PCR 法による検出結果も細胞培養法と同様であった。

細胞培養法と PCR 法によるウイルスの検出感度の比較 YTAV 感染群のウイルス感染価、および PCR 法による検出限界のウイルス感染価を表2に示した。細胞培養法によりウイルスが分離された2群（A、B群）のウイルス感染価は、 $10^{4.30}$ と $10^{8.30}$ TCID₅₀/mlであった。ウイルスが分離されなかった小型個体では検出限界以下の $10^{1.30}$ TCID₅₀/ml未満であった。PCR 法では、 $10^{8.30}$ TCID₅₀/mlの1/10希釈 RNA 溶解液においてウイルス遺伝子が確認され、 $10^{4.30}$ TCID₅₀/mlの検体ではウイルス遺伝子は確認されなかった。nested PCR では、 $10^{4.30}$ TCID₅₀/mlの検体では原液の RNA 溶解液において PCR 産物が確認された。この結果からウイルス感染価に換算すると、PCR の検出限界は $10^{5.05}$ TCID₅₀/ml、nested PCR では $10^{4.30}$ TCID₅₀/mlであった。

親魚卵巣卵からのウイルス検出法の検討 プリの卵巣卵がウイルスの検出に及ぼす影響について表3に示した。PCR 法では、いずれの病魚磨砕液を添加した卵巣からもウイルス遺伝子は検出されなかった。しかし、nested PCR 法および細胞培養法と PCR 法を組み合わせた場合には、1/100に希釈した病魚磨砕液

表1 プリ稚魚からの YTAV の分離と PCR 法による YTAV 遺伝子の検出結果

生産場所	供試群	日齢 (日)	腹部膨満	供試尾数 (尾)	ウイルス検出			備考
					培養細胞	PCR	nested PCR	
五島栽培漁業センター	A	55	+	7	+	+	+	プリ大型稚魚
	B	55	-	5	+	+	+	プリ大型稚魚
	C	55	-	3	-	-	-	プリ小型稚魚

表2 感染魚の YTAV 感染価および PCR 法における YTAV 感染価の検出限界

No.	供試群	ウイルス感染価 \log_{10} TCID ₅₀ /ml	検出限界*		備考
			PCR	nested PCR	
1	A	8.30	7.30	4.30	腹部膨満大型プリ稚魚
3	B	4.30	ND	4.30	腹部未膨満大型プリ稚魚
4	C	<1.30	ND	ND	腹部未膨満小型プリ稚魚

*：核酸の希釈割合から、感染価に換算した。

ND：Not detected

表3 プリの卵巣卵が YTAV の検出に及ぼす影響

No.	病魚磨砕 ろ液量 (μl)	生殖腺量 (μl)	検出方法				
			細胞培養	PCR	nested PCR	細胞培養と PCR	細胞培養と nested PCR
1	1	40	CTE	-	+	+	+
2	0.1	40	+	-	+	+	+
3	0.01	40	+	-	+	+	+
4	0.00001	40	-	-	-	-	+

CTE：Cytotoxic effect

添加サンプルにおいて、細胞培養法と nested PCR 法を組み合わせた場合は1/100,000に希釈した病魚磨砕液添加サンプルにおいてウイルス遺伝子が検出された。

種苗生産に使用した親魚生殖腺からのウイルスの検出 上記の検出感度の比較結果に基づき、ブリ親魚の生殖腺からウイルスの検出を行ったが、細胞培養法と nested PCR 法を組み合わせた方法においてもウイルスは検出されなかった。

考 察

陸上水槽で飼育中のブリ仔稚魚におけるウイルス性腹水症は、突如発症が認められることから、ウイルス感染後に生体内でウイルスが増殖し、ブリ仔稚魚が死亡に至るまでの過程は急速に進行すると考えられる。また、発病魚から排出されたウイルスにより水槽内で水平感染が起こり、大量死亡すると考えられ、疾病を防除するには、早期に感染魚を発見するとともに、速やかに感染魚を取り除くことにより病気の拡大を阻止しなければならない。一方、本病の感染経路として親魚からの垂直伝播が推定されていることから¹⁵⁾、種苗生産にはウイルスを保持しない親魚を使用すべきである。従って、種苗生産過程における本病の迅速診断や親魚のウイルス保有状況調査のためには、微量なウイルスを検出する方法の開発が必要である。

本論文では、まず、飼育中の3群から細胞培養法、PCR法、nested PCR法によりウイルスを検出した結果、症状が認められない個体群からもウイルスが検出され、本病が発生した飼育群では、微量なウイルスを保有する個体が存在することが示された。これらの個体が、水槽内では次々と発症する可能性や水平感染の感染源となることが推定された。また、細胞培養法、PCR法および nested PCR法を用いて検出感度の比較を行った結果、細胞培養法と nested PCR法の検出感度に差はなかった。本病はこれまで主に培養細胞法により診断されており、CPEが発現するまでに数日は必要で、結果を判定するまでに時間を要した。一方、PCR法においても培養細胞法と同等の診断結果が得られたことから、細胞培養法に比べて比較的容易かつ迅速に診断ができることが確認された。このことから、種苗生産現場での診断法として有効であると考えられ、未発症魚や親魚組織から微量なウイルスを検出する方法として応用できる可能性が示唆された。

さらに、親魚からのウイルス検出方法を検討するために、雌親魚の生殖腺に一定量のウイルスを添加し、細胞培養法、PCR法および細胞培養法とPCR法の併用により、ウイルスの検出感度を比較した結果、細胞

培養法と nested PCR法を併用することにより、細胞培養法より1,000倍程度検出感度が高くなることが分かった。この微量検出方法を用いて、雌親魚の生殖腺からウイルスの検出を試みたがウイルスは検出されなかった。検査した親魚は、今回、ウイルス性腹水症が発生した種苗の親であり、ウイルスの微量感染が疑われる親魚群である。検出できなかった要因として、生殖腺の採取時期が適当でなく、親魚体内におけるウイルス量が検出限界以下に減少したことが疑われた。

親魚からの垂直感染により発病するシマアジ仔稚魚のウイルス性神経壊死症では、防除対策として親魚生殖腺をPCR法で検査しており、生殖腺からウイルスが検出される時期は、産卵前や産卵期間中であることから^{17,18)}、本病の防除対策として、親魚生殖腺を検査する場合には、産卵前および産卵直後におけるウイルス検査が必要と考えられる。また、今回は雌親魚の生殖腺についてのみウイルスの検出方法を検討したが、雄親魚についても同様に検討する必要がある。

今後は、開発した微量検出系を用いて、採卵用親魚や飼育している仔稚魚のウイルス保有状況および疾病の発生状況を調査し、感染経路の推定などを行い防除技術の確立につなげる必要がある。

文 献

- 1) 福田穎穂・室賀清邦(2004)ブリのウイルス性腹水症. 魚介類の感染症・寄生虫病(若林久嗣・室賀清邦編). 恒星社恒星閣, 東京, pp.70-75.
- 2) 反町 稔・原 武史(1985)腹水症を呈するブリ稚魚から分離されたウイルスについて. 魚病研究, 19, 231-238.
- 3) 勝山明里・小林 孝(1988:Ⅲ-3)種苗生産技術の開発, Cブリ, (3)五島事業場. 日本栽培漁業協会事業年報(昭和61年度), 184-189.
- 4) 勝山明里・小林 孝・有元 操(1989)Ⅲ-3種苗生産技術の開発, Cブリ, (3)五島事業場. 日本栽培漁業協会事業年報(昭和62年度), 166-168.
- 5) 勝山明里・小林 孝・有元 操(1990)Ⅲ-3種苗生産技術の開発, Cブリ, (3)五島事業場. 日本栽培漁業協会事業年報(昭和63年度), 172-181.
- 6) 塩澤 聡・小林 孝(1991)Ⅲ-3種苗生産技術の開発, Cブリ, (3)五島事業場. 日本栽培漁業協会事業年報(平成元年度), 145-147.
- 7) 塩澤 聡・小林 孝(1992)Ⅲ-3種苗生産技術の開発, Cブリ, (3)五島事業場. 日本栽培漁業

- 協会事業年報（平成2年度），178-180.
- 8) 塩澤 聡・小林 孝（1993）Ⅲ－3種苗生産技術の開発，Cブリ，(5)五島事業場．日本栽培漁業協会事業年報（平成3年度），155-157.
- 9) 塩澤 聡・小林 孝（1994）Ⅲ－3種苗生産技術の開発，Cブリ，(3)五島事業場．日本栽培漁業協会事業年報（平成4年度），178-180.
- 10) 塩澤 聡・小磯雅彦（1995）Ⅲ－3種苗生産技術の開発，Cブリ，(3)五島事業場．日本栽培漁業協会事業年報（平成5年度），145-147.
- 11) 塩澤 聡・中野昌次（1997）Ⅲ－3種苗生産技術の開発，Cブリ，(3)五島事業場．日本栽培漁業協会事業年報（平成7年度），157-159.
- 12) Suzuki, S., N. Hosono and R. Kusuda (1997) Detection of aquatic birnavirus genome from marine fish using a combination of reverse transcription and nested PCR. *J.Mar.Biotechnol.*, **5**, 205-209.
- 13) 一色 正・楠田理一（1987）各種海産魚のYAVに対する感受性．魚病研究，**22**，191-194.
- 14) 藤本 宏・白井重行（1996）Ⅲ－3種苗生産技術の開発，Cブリ，(1)屋島事業場．日本栽培漁業協会事業年報（平成6年度），128-132.
- 15) 一色 正・川合研児・楠田理一（1993）：採卵用ブリ親魚からのYAVと抗YAV中和抗体の検出．魚病研究，**28**，65-69.
- 16) Reed, L. J. and H. Muench (1938) A simple method of estimating fifty percent end points. *Am. J.Hyg.*, **27**, 493-497.
- 17) Nishizawa,T., K.Muroga and M.Arimoto (1996) Failure of polymerase chain reaction (PCR) method to detect striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in striped jack *Pseudocaranx dentex* selected as spawners. *J. Aquat. Anim. Health*, **8**, 332-334.
- 18) Mushiake,K., T. Nishizawa, T. Nakai, I. Furusawa and K. Muroga (1994) Control of VNN in striped jack : Selection of spawners based on the detection of SJNNV gene by polymerase chain reaction (PCR). *Fish Pathol.*, **29**, 171-182.

ブリの戻し交配家系を用いたイリドウイルス感染試験

長倉義智^{*1}・西村卓哉^{*2}・大原恵理子^{*2}・佐藤 純^{*1}

虫明敬一^{*3}・岡本信明^{*2}

(^{*1} 五島栽培漁業センター, ^{*2} 東京海洋大学, ^{*3} 栽培漁業部)

ブリ *Seriola quinqueradiata* は日本における最も重要な養殖対象魚種の一つであり, その年間生産量は約15万トンに達する。しかし, 本種では発生する病気の種類も多く¹⁾, より計画的な生産を行うためには, 耐病性を有する人工種苗が必要と考えられる。

これまで, 水産生物の耐病性の向上については, サケ・マス類を中心に多くの解析が行われ, 耐病性形質の遺伝支配様式が明らかにされてきた²⁾。特に, 最近ではそれらの魚種において QTL (Quantitative Trait Loci) 解析による耐病性関連遺伝子の特定が行われるようになり, 水産生物におけるゲノム育種の有効性が示唆されている³⁾。一方, ブリについては, すでにマイクロサテライト DNA マーカーによる遺伝子連鎖地図が作製されている⁴⁾ が, その耐病性に関する遺伝学的知見の蓄積は十分ではない。

このような中で, 近年, 海産養殖において広く問題となっているマダイイリドウイルス病⁵⁾ について, ブリとその近縁種であるヒラマサ *Seriola lalandi* とで感受性が異なっていることが明らかとなった^{6,7)}。このため, それらの交配実験がマダイイリドウイルス病に対する耐病性の遺伝学的解析に有効であると考えられる。

これらのことから, 本報では, ブリとヒラマサを用いた戻し交配 (Back cross, 以下 BC) 家系を作出して感染試験を行い, マダイイリドウイルス病に対する耐病性に遺伝的要因が関わっているかどうかを検討した。

材料と方法

BC 家系の作出 BC 家系の作出には, 親魚としてブリ雌とヒラマサ雄との雑種第1代 (F_1) 1尾と, その親世代のブリ雌1尾を用いた。これらの親魚は, 背部筋肉内に HCG を注射 (600IU/kg) し, 2日後に人工授精 (乾導法) による交配に供した。これにより得られたふ化仔魚を0.5klおよび7kl水槽において飼育した。飼育では, 餌料としてシオミズツボウムシ (L型), アルテミアノープリウスおよび配合飼料を成長に合わせて順次与えた。また, 地先の海水温が22℃を超えるまでは, 加温により飼育水温22℃を維持した。飼育魚は日齢35で取り揚げ, その後は50kl水槽で飼育

を継続した。

感染試験 供試魚には平均全長 114 ± 2 mm の稚魚400尾を用い, これらはあらかじめ0.5kl水槽で8日間飼育して設定水温の25℃に馴致した。

試験には100ℓ円形ポリエチレン水槽 (実容量60ℓ) を用いた。試験区は, ウイルス接種区7区とウイルス非接種区1区を設け, 各区に50尾ずつの供試魚を用いた。ウイルス接種区では, マダイイリドウイルス液 (イリドウイルス病に罹患したマダイの磨砕液を MEM で 10^{-4} に希釈) を, 腹腔内に1尾当たり100 μ ℓ接種し, ウイルス非接種区では MEM のみを接種した。接種時には供試魚を2-フェノキシエタノールで麻酔した。

各区とも餌料には配合飼料を与え, 試験期間は20日間とした。25℃に調温した海水を換水率100回転/日となるように注水するとともに, ウォーターバス方式により25℃を維持した。試験期間中の死亡魚は直ちに取り上げて脾臓を用いた蛍光抗体法を行い, 陽性と判定された個体をイリドウイルスの感染による死亡魚とした。

結果と考察

ブリとヒラマサの F_1 とブリとの人工授精を行った結果, 33.4万粒の受精卵が採取され (総採卵数41.3万粒), これらから22.4万尾のふ化仔魚が得られた。このうち15.4万尾を飼育に用いた結果, 日齢35で6,500尾 (生残率4.2%) の稚魚が得られ, ブリとヒラマサの BC 家系が作出できた。これらの個体を用いたマダイイリドウイルスの感染試験では, ウイルス非接種区では感染による死亡は認められなかったが, ウイルス接種区では接種後11~18日目に死亡がみられ累積死亡率は14.6~24.0%となった (図1)。

長倉は, ブリおよびヒラマサを用いて本報と同様の感染試験を行い, 累積死亡率はそれぞれ55.1~56.3%および4.0~8.0%と報告している^{6,7)}。本試験の累積死亡率をこれらと比較すると, ブリより有意に低くヒラマサより有意に高い値を示し (Mann-Whitney 検定, $p < 0.05$), BC 家系におけるマダイイリドウイルス病に対する感受性は両者の中間に位置する結果が示された。このことは, ブリおよびヒラマサのイリドウイルスに対する耐病性に遺伝的要因が関わっていることを

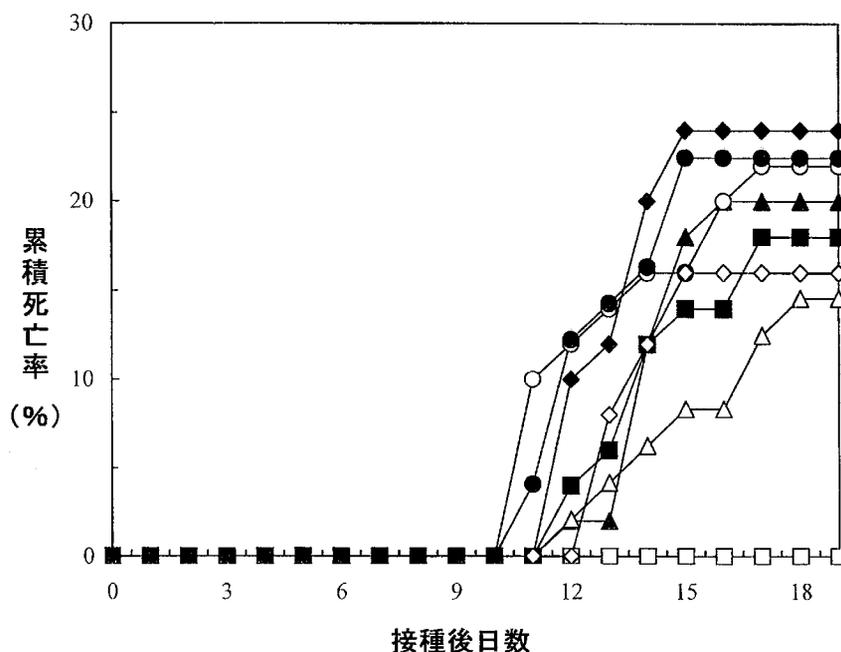


図1 戻し交配家系のイリドウイルス感染試験による死亡状況

ウイルス非接種: □(対照区)
 ウイルス接種: ▲, △, ■, ◇, ◆, ○, ●

示唆しているものと考えられる。

一方、BC家系およびDNAマーカーを用いた連鎖解析により、ニジマスのIPNおよびIHN耐病性関連遺伝子座や^{8,9)}、ヒラメのリンホシスチス病耐病性関連遺伝子座¹⁰⁾など、有用な耐病性関連遺伝子が特定されるようになった。このため、ブリにおいても、本報の結果にもとづいて連鎖解析を行うことで、耐病性に関連する遺伝子が特定できると考えられる。

文 献

- 1) 若林久嗣 (2004) 序論. 魚介類の感染症・寄生虫病 (若林久嗣・室賀清邦編). 恒星社厚生閣, 東京, pp. 1-27.
- 2) 山崎文雄 (1998) 耐病性. 水産育種に関わる形質の発現と評価 (藤尾芳久・谷口順彦編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 55-66.
- 3) 尾崎照遵・大原恵理子・藤 加菜子・原 拓矢・坂本 崇・岡本信明 (2004) 水産経済動物のゲノム研究およびQTL解析. 動物遺伝育種研究, **32**, 53-67.
- 4) Ohara, E., T.Nishimura, Y.Nagakura, T.Sakamoto, K.Mushiake, and N.Okamoto (2005) Genetic linkage maps of two yellowtails (*Seriola quinqueradiata* and *Seriola lalandi*). *Aquaculture*, **244**, 41-48.
- 5) 室賀清邦 (2004) マダイイリドウイルス病. 魚介類の感染症・寄生虫病 (若林久嗣・室賀清邦編). 恒星社厚生閣, 東京, pp. 75-79.
- 6) 長倉義智 (2003) II-1 各事業場において実施した技術開発, 14五島事業場, 6. (2)優良親魚育種技術開発. 日本栽培漁業協会事業年報 (平成14年度), 331-332.
- 7) 長倉義智 (2003) II-1 各事業場において実施した技術開発, 14五島事業場, 6. 優良親魚育種技術開発(ブリ). 日本栽培漁業協会事業年報 (平成15年度), 129-130.
- 8) Ozaki, A., T.Sakamoto, S.Khoo, K.Nakamura, M.R.M.Coimbra, T.Akutsu and N.Okamoto (2001) Quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance/susceptibility of infectious pancreatic necrosis (IPN) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol. Genet. Genomics*, **265**, 23-31.
- 9) Khoo, S.K., A.Ozaki, F.Nakamura, T.Arakawa, S.Ishimoto, R.Nickolov, T.Sakamoto, T.Akutsu, M.Mochizaki, I.Denda and N.Okamoto (2004) Identification of a novel chromosomal region

associated with infectious hematopoietic necrosis (IHN) resistance in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Pathol.*, **39**, 95-101.

10) 藤 加菜子・長谷川 理・小林一展・M. R. Coimbra・坂本 崇・岡本信明 (2002) 平成14年度日本魚病学会大会講演要旨集, pp. 36.

栽培漁業センター技報第3号

平成17年4月25日発行

編集人
発行

独立行政法人 水産総合研究センター

〒220-6115

神奈川県横浜市西区みなとみらい2-3-3

クイーンズタワー B 15F

電話 045 (227) 2715

印刷所

日昇印刷株式会社

東京都中央区湊1-14-14

電話 03 (3553) 3161 (代)