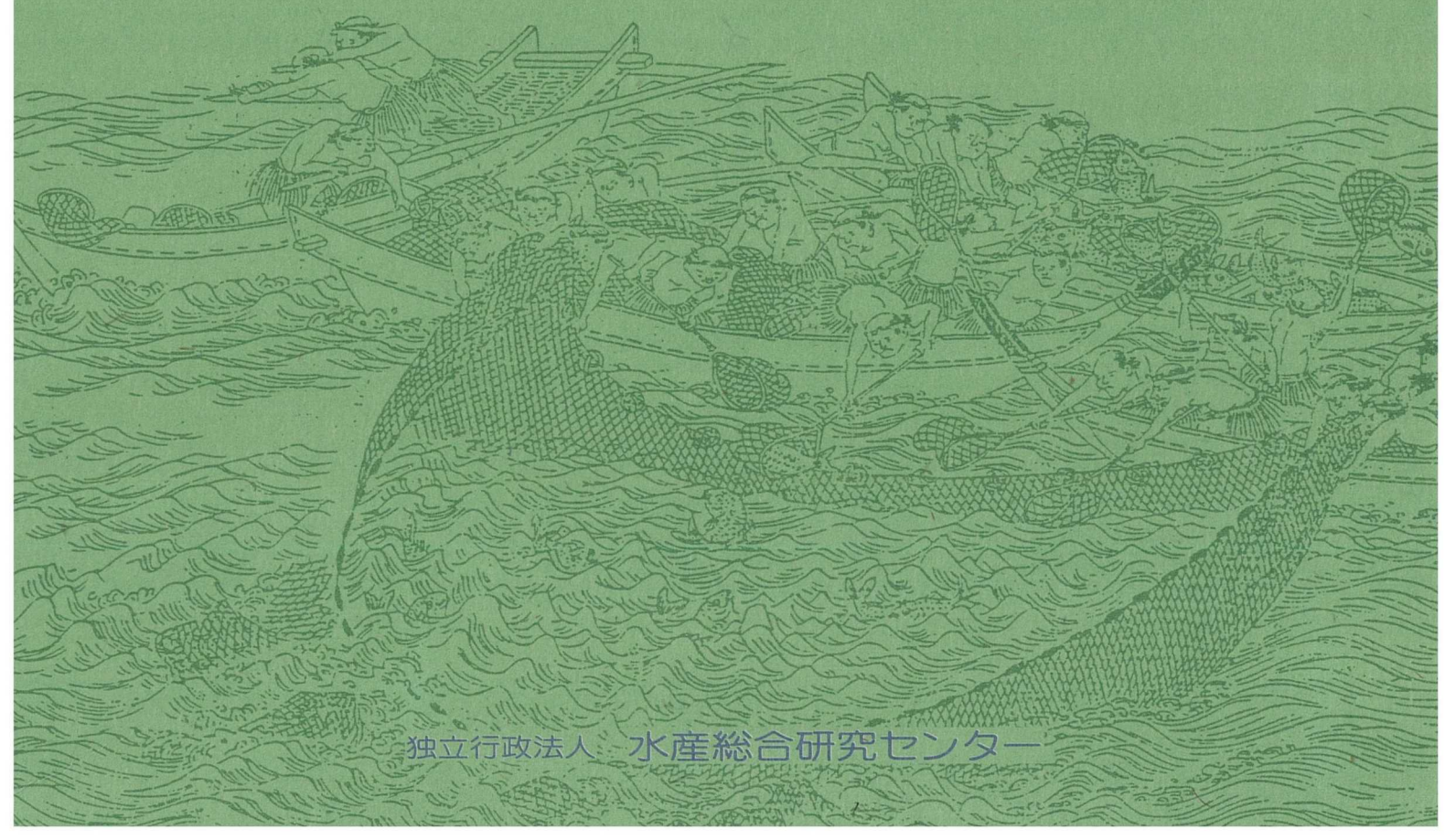


栽培漁業技術シリーズ

ヒラメの無眼側体色異常個体の 出現要因と防除技術



「ヒラメの無眼側体色異常個体の出現要因と防除技術」の刊行にあたって

独立行政法人水産総合研究センターは、同センター法の改正を行い、平成15年10月1日に認可法人海洋水産資源開発センターおよび（社）日本栽培漁業協会（日栽協）の事業を引き継いだ。これにより日栽協が実施してきた栽培漁業に関する業務等は、栽培漁業部門（栽培漁業部および栽培漁業センター）が引き続き担うこととなった。

日栽協では、水産庁からの委託を受け、栽培漁業技術の普及を目的として「栽培漁業技術シリーズ」を刊行してきた。本シリーズは、栽培漁業の技術開発の成果を体系的に整理し取り纏めることで、種苗生産・中間育成・放流等の栽培漁業の現場関係者にとって役に立つ実践的な技術マニュアルを目指したものである。平成5年度のシリーズNo.1「太平洋北区におけるヒラメ種苗生産技術集」に始まり、平成14年度にはシリーズNo.9として「クルマエビ種苗生産技術開発」を刊行している。今後、水研センター栽培漁業部においても、栽培漁業の実践をより一層促進するため、引き続き「栽培漁業技術シリーズ」を刊行することとしている。

今回は、「ヒラメの無眼側体色異常個体の出現要因と防除技術」を栽培漁業技術シリーズNo.10として刊行することになった。近年、全国37都道府県で毎年2,000万尾以上のヒラメ種苗が放流され、放流効果も顕在化するようになり、一部の県ではすでに事業化段階にきている。一方、平成6年度の栽培漁業技術開発推進事業全国協議会において、日栽協に対する都道府県からの技術開発の強い要望として、ヒラメの栽培漁業の事業化を図る上で、経済効果の算定上問題となっている「ヒラメの無眼側体色異常（黒化）個体の出現要因の把握と防除技術開発」が挙げられた。日栽協ではこれを受けて平成7年度に内部プロジェクトチームを立ち上げ、大学との共同研究も並行して取り組んできた。

本書は、無眼側体色異常個体の出現に関係あると思われる要因を抽出し、平成7年度から平成14年度に実施した試験結果を取り纏めたものである。本書がヒラメ栽培漁業の事業化に向けて、商品価値を損なわない体色の正常な放流種苗の生産に役立てれば幸いである。

終わりに、本書の取り纏めにあたり、熱心なご指導、ご助言をいただいた東京海洋大学海洋科学部竹内俊郎教授、福井県立大学生物資源学部 青海忠久教授、富永修助教授、広島大学生物生産学部 難波憲二教授、福山大学生命工学部 伏見浩教授に心より感謝を申し上げます。

平成16年3月

独立行政法人水産総合研究センター
理事長 川 口 恭 一

「ヒラメの無眼側体色異常個体の出現要因と防除技術」

執筆者	役 職	氏 名
(独) 水産総合研究センター		
宮古栽培漁業センター (旧日本栽培漁業協会 宮古事業場)	場 長	有 瀧 真 人
宮古栽培漁業センター (同上 宮古事業場)	技術開発員	藤 浪 祐一郎
小浜栽培漁業センター (同上 小浜事業場)	技術開発員	小 金 隆 之
宮津栽培漁業センター (同上 宮津事業場)	場 長	津 崎 龍 雄
宮津栽培漁業センター (同上 宮津事業場)	技術開発員	竹 内 宏 行
伯方島栽培漁業センター (同上 伯方島事業場)	技術開発員	太 田 健 吾
志布志栽培漁業センター (同上 志布志事業場)	主任技術開発官	加 治 俊 二
東京海洋大学海洋科学部 (旧東京水産大学)		村 山 靖 之
同上		福 田 庄 作
同上		樽 井 史 典
同上		芳 賀 穰
同上		長 谷 川 靖 之
広島大学生物生産学部		川 那 公 士
取り纏め		
(独) 水産総合研究センター 本部 (神田)	次 長	福 永 辰 廣
小浜栽培漁業センター	場 長	塩 澤 総
宮津栽培漁業センター	場 長	津 崎 龍 雄
指導・助言		
東京海洋大学海洋科学部 (旧東京水産大学)	教 授	竹 内 俊 郎
広島大学生物生産学部	教 授	難 波 憲 二
福井県立大学生物資源学部	教 授	青 海 忠 久
同上	助教授	富 永 修
福山大学生命工学部	教 授	伏 見 浩

ヒラメの無眼側体色異常個体の出現要因と防除技術

目次

まえがき	
I. 技術開発グループ発足の背景	1
II. 技術開発を進めるにあたっての考え方と 取組み課題	3
III. 技術開発試験結果の概要	6
III-1 飼育および観察方法に関する統一事項	6
III-2 浮遊期型体色異常 (全長3~12mm)	22
1. 飼育環境に関する試験	22
(1) 照度の影響	22
2. 餌料に関する試験	27
(1) 配合飼料の給餌開始サイズの影響	27
(2) 配合飼料のビタミンD添加の影響	35
3. 生物餌料の栄養強化に関する試験	44
(1) ワムシのDHA強化の影響	44
(2) アルテミアノープリウスのフェオダク チラム強化による防除効果	49
(3) ワムシのビタミンA・D強化の影響	53
III-3 着底期型異常	59
III-3-1 着底期前期 (全長13~20mm)	59
1. 飼育環境に関する試験	59
(1) ミクロスセラミック(MS)による防除効果	59
(2) 飼育密度の影響	62
2. 餌料に関する試験	64
(1) メーカーの違いによる配合飼料の影響	64
(2) アルテミアノープリウスと配合飼料の 給餌比率の影響	71
(3) 配合飼料の給餌量の影響	74
3. ストレスに関する試験	78
(1) 輸送ストレスの影響	78
III-3-2 着底期後期 (全長20~40mm)	87
1. 育成環境に関する試験	87
(1) 飼育密度の影響	87
(2) 照度・砂敷による抑制効果	88
(3) 砂敷による効果の実証	91
IV. 無眼側体色異常防除に関する共同研究	95
1. 東京水産大学 (現 東京海洋大学・海洋科学部)	95
(1) ヒラメの無眼側体色異常におよぼす脂溶性 ビタミン類の影響	95
(2) ヒラメの無眼側体色異常および脊椎骨異常 出現におよぼすビタミンDの影響	127
(3) ヒラメの無眼側体色異常におよぼす飼料中 の脂溶性ビタミン強化の影響	127
2. 広島大学	127
(1) ヒラメ種苗の接触刺激による無眼側体色 異常発現の抑制効果	127
V. ヒラメ種苗生産機関における無眼側体色 異常個体の出現状況および魚価等の調査	135
1. 魚市場での魚価等に関するアンケート調査	135
2. 太平洋北区の種苗生産機関における無眼側 体色異常個体の出現状況 (平成13年~15年度)	137
VI. 総合考察	140
(1) 飼育環境の影響	140
(2) 飼育密度の影響	142
(3) 飼餌料の影響	142
(4) 生物餌料の栄養強化の影響	144
(5) ストレスの影響	144
(6) 現状での有効な防除対策	144
(7) 今後の課題および問題点	144
VII. 参考文献	147

I. 技術開発グループ発足の背景

ヒラメの種苗生産は、原田等¹⁾が人工授精により得られたふ化仔魚を用いて幼魚までの一連の完全飼育に成功したことにはじまり、昭和45年以降、多くの試験研究機関で基礎的な種苗生産技術に関する研究開発がなされた。

昭和48年からは徐々に各県に栽培漁業センターが開設されるにつれ、栽培漁業対象種として本種の取り組みを始める県が増加した。放流用種苗としての全国のヒラメの総種苗生産数は昭和52年度では32万尾に過ぎなかったが、平成11年度の4,000万尾を最高に、ここ数年は3,000万尾前後で推移している。それとともに中間育成を経て放流されるヒラメ種苗の総数は、平成13年度で2,743万尾となっている^{2), 3)}。

一方、種苗生産、種苗放流量が増加する中で、人工種苗に多く見られる体表の有眼側体色異常（以下「白化」と称す）が放流用種苗としての健全性、経済性等の面で大きな問題となり、その原因究明と出現防除対策が求められてきた。

昭和58年度より3カ年間、水産庁研究課の下で「健苗育成技術開発委託事業」が実施され、大学、県水産試験場、栽培漁業センターが参加して、ヒラメの種苗生産における体色異常発生のメカニズムや特に白化個体の出現防除に関する基礎的な研究が実施された。その結果、白化個体の出現要因に関する初期餌料研究から白化の決定時期や水溶性・脂溶性ビタミンの影響等について、また飼育環境研究から飼育水温・光環境・飼育密度の影響等について、仔稚魚の生物学的特性研究から成長と形態変化、皮膚組織の特性、変態に関する内分泌器官の影響、色素胞運動の制御系等について重要な基礎的知見が得られている^{4)~14)}。

日裁協（現、水産総合研究センター栽培漁業部）では、昭和61年度から平成元年度までの4カ年間、内部プロジェクトチームを結成し種苗の量産現場における体色異常個体出現防除技術の開発に取り組んだ。その結果、白化の出現防除には生物餌料の栄養強化が必要であり、栄養強化の前提条件として、仔魚が健全で十分な摂餌や栄養素の取り込みが必要であること、浮遊期仔魚の生残率を高めることが重要であることを指摘した¹⁵⁾。

一方、これらの試験の中で無眼側体色異常（以下「黒化」と称す）の観察を行った結果、全長20mm前後の種苗で白化個体と黒化個体の出現状況に関連性は認められず、黒化の発現機構は白化とは異なることが示唆された¹⁵⁾。

黒化の発現については、青海が、ヒラメの両面有色には変態完了時にすでに無眼側の着色が起こっているもの

と、変態完了後に無眼側への着色が生じるものとの2型があり、変態完了後の着色には無眼側への光の照射が大きく影響すると報告している^{7), 16)}。高橋は、青海の報告から黒化を浮遊期型異常と着底期型異常に分け、浮遊期型異常個体を出現させる要因の1つに飼育密度と餌料（配合飼料、生物餌料）が影響をおよぼすことを指摘した¹⁷⁾。青森県栽培漁業振興協会は、着底期前後からの飼育で生物餌料の栄養強化剤が黒化の被覆面積の多少に影響し、黒化個体の出現率や被覆面積は使用した配合飼料の製造メーカーで異なると報告した。

近年、ヒラメの黒化の発現機構並びにその防除手法に関する研究は、増えつつあるが、前述した白化に関する研究に比べれば少ない。

一方、昭和55年度から始まった国のヒラメ放流技術開発事業において、有効な標識としてヒラメ種苗生産過程で高率に出現する黒化個体を用いて、放流後の市場調査等により放流効果算定を実施している機関が多い。各県の実施した魚市場等での混獲率調査では水揚げされたヒラメの数十%が放流魚で占められる地域も多々できており、また宮古事業場（現 宮古栽培漁業センター）が岩手県の宮古湾で行った放流試験では、満3歳までの回収率が20%に達する事例が得られている²⁰⁾。

このように、放流効果が顕在されるにもない商品サイズでの漁獲が増加しているが、ここに至って、経済効果を見る場合に水揚げされた黒化個体の魚価の下落が地域によっては大きな問題となっている²¹⁾。

平成5年度に水産庁が開催した栽培漁業ブロック会議において、日裁協に対する都道府県からの技術開発の要望課題の中に、ヒラメの種苗生産並びに種苗放流技術で問題となっている「体色異常個体出現要因の究明と防除技術開発」が上げられた。また、平成6年度の栽培漁業技術開発推進事業全国協議会において日裁協に対して技術開発の重要な課題の1つとして「ヒラメ黒化個体の出現要因の究明および防除技術開発」が求められた。

これを受けて、本種の種苗生産技術を行っている宮古・小浜・宮津・伯方島の4事業場（現栽培漁業センター）の担当者でプロジェクトチームを結成し、平成7年度からこの防除技術の確立を目的に、それぞれの役割分担を明確にして技術開発に取り組んできた。平成7～9年度までの3カ年間の技術開発成果については平成10年度の栽培漁業技術研究事業基礎理論コースで取りまとめて報告したが、本報告書では、その内容を補足するとともにそれ以降の平成14年度（一部平成15年度の技術開発試験を含む）までに取り組んだ5カ年間を取りまとめて

報告する。なお、この報告書では東京海洋大学海洋科学部（竹内俊郎教授）および広島大学生物生産学部（難波憲二教授）と伯方島事業場（現 伯方島栽培漁業センター）が行った共同研究の成果をそれぞれの大学が取りまとめ、併せて掲載した。また、マリノフォーラム21と伯方島事業場および広島大学（難波教授）で行った粒径選別型底清掃システムの関係試験の中から黒化発現防除に関する敷砂による効果の実証試験について、その成果をⅢ-3-2, (3)に掲載した。

II. 技術開発を進めるにあたっての考え方と取組み課題

黒化個体の出現要因の究明および防除技術開発の取組みに当たっては、青海⁵⁾のヒラメ体色異常に関する報告および南²²⁾のヒラメ仔稚魚の成長ステージ(図II-1)を参考に、体色異常の出現型を大きく浮遊期型異常(～全長12mm, A～Fステージ)、着底期型異常(全長13～40mm, G～Iステージ)に分け、さらに着底期型異常は、前期(全長13～18mm, G～Hステージ)と後期(全長18mm以上, Iステージ)に分けて技術開発を実施した。

黒化個体の出現に関する影響要因として、①配合飼料の種類(メーカーによる出現率が異なる)、②生物餌料と配合飼料の給餌バランス(給餌サイズ, 給餌期間等)、③仔稚魚期の飼育密度(高密度・低密度飼育の違い)、④育成環境(光および底質)、⑤ストレスに整理される。従って、このプロジェクトでは技術開発の取組み課題を「環境・密度・餌料・ストレス」の4課題に大分類し、

前述の成長段階別に黒化発現を誘引と思われる要因を細分し、技術開発フローに従って取組みを実施した(図II-2)。

技術開発を進めるに当たって、浮遊期型異常からの要因解析を進めると取組み項目が複雑なためヒラメ栽培漁業の事業化段階で最も関りの深い着底期後期段階で想定される要因をまず吟味し、結果を見ながら前のステージ段階の要因究明へと移行していく方法を採用した。平成7年度から平成14年度までの8カ年間の重点的取組み課題と役割分担を表II-1に示した。なお、宮古事業場では平成10年度からヒラメVNN防除対策が急務となり、プロジェクトチームでの試験は休止し、主に3事業場で実施した。なお、取りまとめについては各年度で実施した試験結果を浮遊期, 着底期前期, 後期とそれぞれの成長段階ごとに整理した。

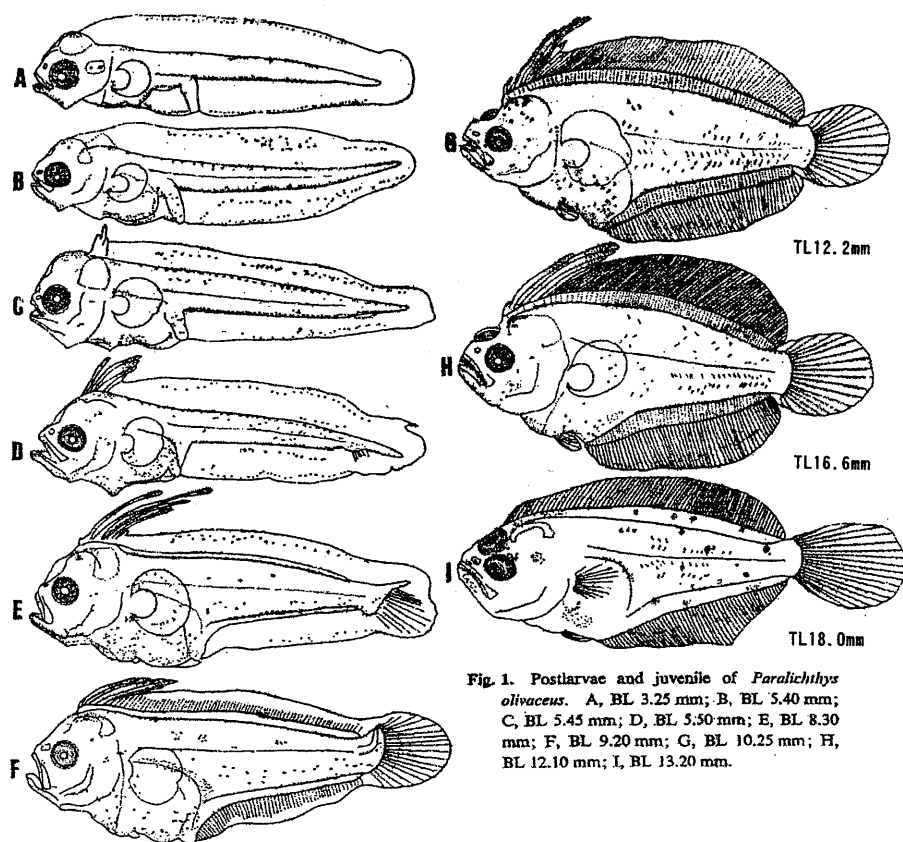
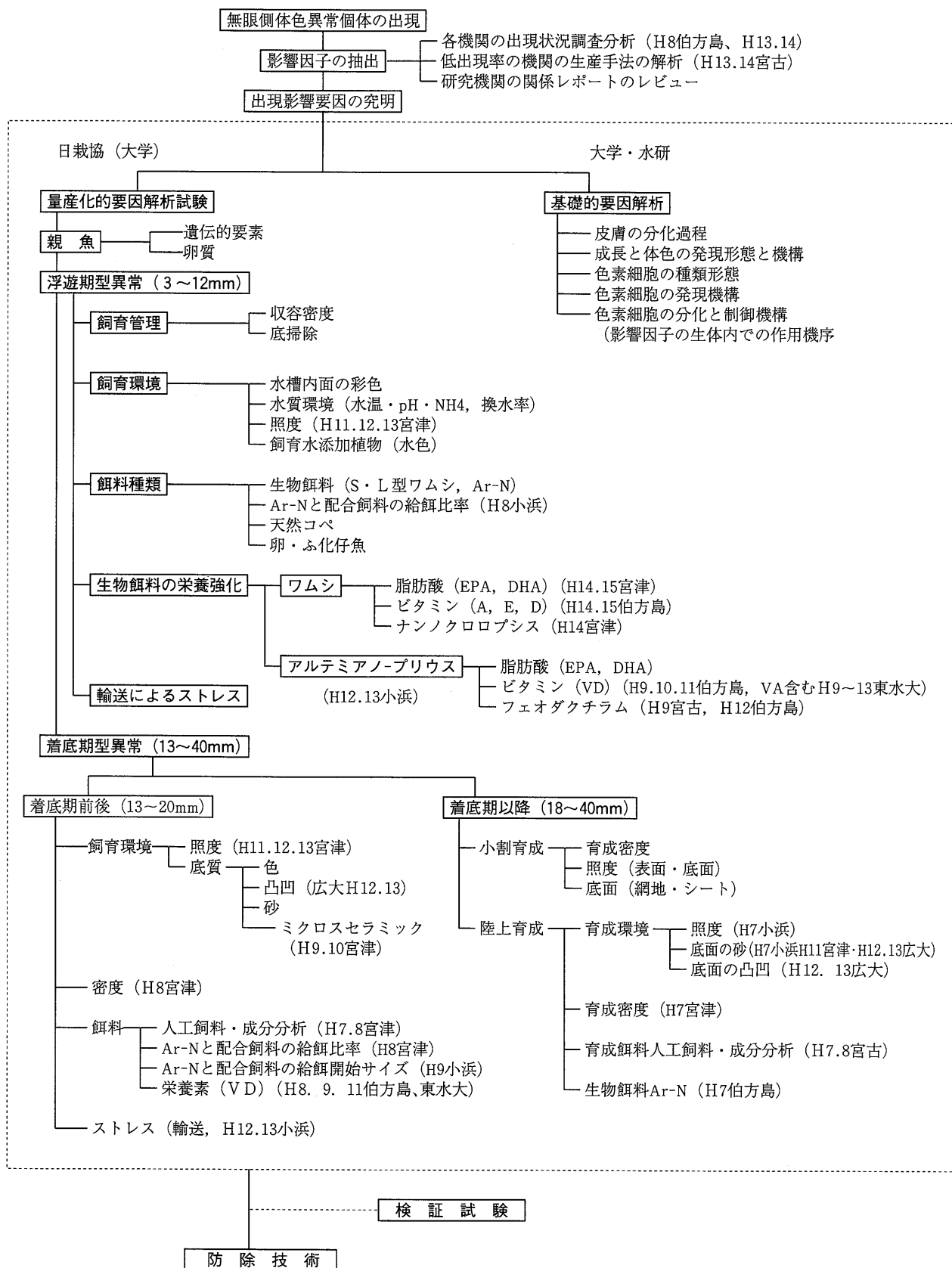


Fig. 1. Postlarvae and juvenile of *Paralichthys olivaceus*. A, BL 3.25 mm; B, BL 5.40 mm; C, BL 5.45 mm; D, BL 5.50 mm; E, BL 8.30 mm; F, BL 9.20 mm; G, BL 10.25 mm; H, BL 12.10 mm; I, BL 13.20 mm.

図II-1 ヒラメ仔稚魚の成長に伴う形態変化とステージ

原図：南 卓志 (1982), 日水誌48 (11), 1581～1588



図II-2 無限側体色異常防除技術開発における技術開発フロー

表Ⅱ-1 無眼側体色異常防除開発における各事業場の年度別取組み課題と役割分担

ステージ 全長 mm	A～F 3～12	G・H 13～14, 16～17	I 18～40
成長段階	浮遊期	着底期前期（移行期）	着底期後期
環境		宮津事業場（H8） ミクロスセラミックによる防除効果	小浜事業場（H7） 照度、砂敷による抑制効果
		宮津事業場（H11～12） 照度の影響	
		宮津事業場（H13） 照度の影響	
密度		宮津事業場（H8） 飼育密度の影響	宮津事業場（H7） 飼育密度の影響
飼料	宮古事業場（H9） 伯方島事業場（H12, 再試験） アルテミアノープリウスのフェオダクチラムによる 強化の防除効果	小浜事業場（H8） アルテミアと配合飼料の給餌比率の影響	伯方島事業場（H7） アルテミア併用給餌による 防除効果
		小浜事業場（H9～11） 配合飼料の給餌開始サイズの影響	
		宮古事業場（H7～8） メーカーの違いによる配合飼料の影響	
		伯方島事業場（H8～11） 配合飼料のビタミンD添加の影響	
		宮津事業場（H14～） ワムシのDHA強化の影響 伯方島事業場（H14） ワムシのビタミンA, D強化の影響	
ストレス		小浜事業場（H12） 輸送ストレスの影響	小浜事業場（H13） 輸送ストレスの影響

Ⅲ. 技術開発試験結果の概要

Ⅲ-1 飼育および観察方法に関する統一事項

試験方法は各事業場の試験結果が横並びで比較できるように飼育方法の条件設定および標本の観察方法について可能な限り統一した。

平成7～14年度における各事業場の試験設定並びに飼育方法の統一事項、標本の観察項目、さらに各事業場の試験を実施した担当者名等を年度ごとに表Ⅲ-1-1～表Ⅲ-1-8に示した。

平成7年度の供試サイズは、小浜・宮津・伯方島事業場では着底期後期のIステージ（全長約20mm）としたが、宮古事業場では配合飼料メーカーの違いが黒化の出現におよぼす影響調査を目的としたためにGステージ（全長約13mm）を使用した。

平成8年度の供試魚サイズは、4事業場とも着底期前期のGステージ（全長13mm）を使用した。

平成9年度の供試魚サイズは、宮古・小浜・伯方島事業場では浮遊期からの試験設定を計画したのでA～Fステージ（全長3～10mm）としたが、宮津事業場について

表Ⅲ-1-1 平成7年度ヒラメの無眼側体色異常防除技術開発における全体計画および試験方法の統一事項

	宮古事業場	小浜事業場	宮津事業場	伯方島事業場
課題	メーカーの違いによる配合飼料の影響	照度・敷砂による抑制効果	着底期後期の飼育密度の影響	アルテミアノープリウス（以下Ar-Nと称す）の延長給餌の影響
担当者	津崎 龍雄	野上 欣也	本藤 靖	加治 俊二
目的	着底期前期（全長13mmサイズ、Gステージ）からの配合飼料給餌において、飼料メーカーの違いが黒化個体の出現に影響があるかについて検討する。	着底後期（全長20mmサイズ、Iステージ）以降で、飼育時の照度および底質環境条件が黒化個体の出現におよぼす影響について検討する。	着底後期（全長20mmサイズ、Iステージ）以降において、飼育密度が黒化個体の出現におよぼす影響について検討する。	着底後期（全長20mmサイズ、Iステージ）において、Ar-N併用給餌（延長）が黒化個体の出現を抑制するかどうかについて検討する。
試験設定	区分 配合飼料 飼料メーカー名 1区 X社 2区 Y社 3区 Z社	区分 水槽 照度 底質 1区 透明 遮光 砂なし 2区 透明 遮光 砂敷き 3区 黒色 遮光 砂なし 4区 黒色 遮光 砂敷き 5区 透明 遮光無 砂なし	区分 飼育密度 1区 1,000尾/m ³ 2区 5,001尾/m ³ 3区 200尾/m ³ 4区 50尾/m ³	区分 Ar-N併用期間 1区 配合飼料単独 2区 併用 7日間 3区 併用 14日間 4区 併用 21日間 5区 併用 21日間 （5区は10mmからの予備試験）
供試魚	量産水槽から抽出 Gステージ（日齢25）	量産水槽から抽出、Iステージ（日齢40～50） 150径でサイズ選別し、大型群から抽出、ただし白化個体、トビ個体は除外。		
水槽	0.5m ³ 黒色円形水槽を各試験区にそれぞれ2面使用。ただし小浜事業場は試験目的から随意。			
水温	18℃に加温して飼育する。			
換水率	5回転/日=1.7ℓ/分（可能ならば10回転/日=3.5ℓ/分）			
水質	朝1回水温・pHを測定。照度は天候状況別に水面真上で1日数回測定。			
底面	水槽の材質のまま	底砂敷、底砂無	水槽の材質のまま	水槽の材質のまま
飼育密度	Gステージ～ 1,200尾/0.5m ³ 全長20mmサイズ～ 600尾/0.5m ³	全長20mmサイズ～ 500尾/0.5m ³	飼育密度は試験設定通り	全長20mmサイズ～ 500尾/0.5m ³
餌料	アルテミア：試験ではパワッシュA（75ml/m ³ ）を使用、量産段階ではこれ以外の強化剤の使用可 強化時間の開始から使用までの時間間統一（Ar-Nのふ化は28℃で24時間、種類は北米産にロット統一） 栄養強化後の脂肪酸分析を実施			
	配合飼料：X社・Y社・Z社 配合飼料（全長13mm～）	配合飼料：Y社配合飼料単独使用とする。		
観察項目	全長20mmサイズ：黒化・宮古事業場のみ白化（正常・≤1/2・>1/2・白化）を調べる。 全長30mmサイズ：黒化（中間調査） 全長40mmサイズ：黒化・脊椎骨異常、観察尾数は100尾とする。			
備考				Ar-Nの延長給餌の影響については、試験期間中疾病の発生により、順調な飼育を行うことができなかったため本報告書では割愛した。

注 Ar-N：アルテミアノープリウス

では底質に関する試験設定からGステージを使用した。

平成10年度の供試魚サイズは、小浜、伯方島事業場では試験計画によりFステージ（全長10mm）としたが、宮津事業場については平成9年度と同様にGステージを使用した。

平成11年度の供試魚サイズは小浜・伯方島事業場では試験計画によりFステージ（全長10mm）、宮津事業場では底質に関する試験がIステージ（全長20mm）、照度の予備試験がFステージ（全長10mm）を使用した。

平成12年度の供試魚サイズは、宮津事業場では浮遊期からの試験設定を計画したのでAステージ（全長3mm）、

小浜事業場では浮遊期のFステージ（全長9mm）からIステージ（全長20mm）までの各成長段階を、伯方島事業場ではDステージ（全長7mm）を使用した。

平成13年度の供試魚サイズは、宮津事業場では平成12年度と同様にAステージ（全長3mm）、伯方島事業場では浮遊期のDステージ（全長7mm）を使用した。

平成14年度の供試魚サイズは、宮津・伯方島事業場では浮遊期前期からの試験設定によりAステージ（全長3mm）を、小浜事業場ではDステージ（全長7mm）を使用した。

供試魚は、各事業場とも量産水槽から目的にあったサ

表Ⅲ-1-2 平成8年度ヒラメの無眼側体色異常防除技術開発における全体計画および試験方法の統一事項

	宮古事業場	小浜事業場	宮津事業場	伯方島事業場
課題	配合飼料メーカーの違いが黒化発現におよぼす影響について	Ar-Nと配合飼料の給餌比率の影響	着底期前期の飼育密度の影響	配合飼料のビタミンD添加の影響について
担当者	津崎 龍雄	野上 欣也	本藤 靖	加治 俊二
目的	着底期前期（全長13mm、Gステージ）からの配合飼料給餌において、飼料メーカーの違いが黒化個体の出現におよぼす影響について再検討する。	着底前期（全長13mmサイズ、Gステージ）からのAr-Nと配合飼料の給餌比率が黒化個体の出現におよぼす影響について検討する。	着底期前期（全長13mmサイズ、Gステージ）からの飼育において飼育密度が黒化個体の出現におよぼす影響について検討する。	着底期前期（全長13mmサイズ、Gステージ）から給餌する配合飼料中のビタミンD含有量の違いが黒化個体の出現要因となるかを検討する。
試験設定	サイズ：G→Iまで I→全長40mmまで 区分 配合飼料 1区 X社配合, X社配合 2区 X社配合, Y社配合 3区 Y社配合, X社配合 4区 Y社配合, Y社配合	サイズ：G→Iまで 区分 Ar-N 給餌量 配合給餌量 1区 50個体/尾 5% 2区 200個体/尾 5% 3区 200個体/尾 2.5% 4区 飽食量 0% 5区 200個体/尾 2.5% (魚体重)	サイズ：G→Iまで 区分 収容密度 1区 20,000尾/m ³ 2区 5,000尾/m ³ 3区 1,000尾/m ³	サイズ：G→Iまで 区分 ビタミンD含有量 1区 800 IU/100g 2区 5,000 IU/100g 3区 10,000 IU/100g 4区 40,000 IU/100g 5区 60,000 IU/100g
供試魚	量産水槽から抽出、Gステージ（日齢25前後）			
水槽	0.5m ³ 黒色円形水槽を各試験区にそれぞれ2面使用。			
水温	18℃に加温して飼育する。			
換水率	5回転/日=1.7ℓ/分（可能ならば10回転/日=3.5ℓ/分）			
水質	朝1回水温・pHを測定。照度は天候状況別に水面真上で1日数回測定。			
底面	水槽の材質のまま			
飼育密度	Gステージ～Hステージ：2,500尾/0.5m ³ 、Iステージ～：500尾/0.5m ³ ただし、宮津事業場は密度試験のために別枠とする。			
餌料	Ar-N：試験ではパワッシュA（75ml/m ³ ）を使用、量産段階ではこれ以外の強化剤の使用可 強化時間の開始から使用までの時間までの時間統一（Arのふ化は28℃で24時間種類は北米産にロット統一） 配合飼料：X社配合飼料単独とする。 ：給餌は魚体重の5%を目安とする。6回/日に分けて給餌する。 ：小浜・宮津事業場ではIステージ以降の配合飼料はY社を使用。			
観察項目	全長20mmサイズ：黒化・白化（正常・≤1/2・>1/2・白化）を調べる。 全長30mmサイズ：黒化（中間調査） 全長40mmサイズ：黒化・脊椎骨異常、観察尾数は100尾とする。			
備考				飼育試験中疾病の発生し、順調飼育できなかったため本報告書では割愛した。

表Ⅲ-1-3 平成9年度ヒラメの無眼側体色異常防除技術開発における全体計画および試験方法の統一事項

	宮古事業場	小浜事業場	宮津事業場	伯方島事業場
課題	フェオダクチラム等による生物餌料の栄養強化による抑制効果	配合飼料の給餌開始サイズの影響	ミクロスセラミック（以下MSと称す）による防除効果	配合飼料のビタミンD添加の影響
担当者	有滝 真人	三橋 直人	本藤 靖	板垣恵美子
目的	フェオダクチラム（以下フェオと称す）により2次強化した生物餌料の給餌が黒化個体の出現防除に効果があるかについて、他強化剤との比較の中で検証する。	浮遊期（全長8mmサイズ、Eステージ）～着底前期（全長13mmサイズ、Gステージ）の間で配合飼料の給餌時期が黒化個体の出現におよぼす影響について検討する。	着底前期（全長13mmサイズ、Gステージ）以降において、水槽底に敷くMSの黒化出現防除効果について検証し、またMSの適正な添加時期（サイズ）について検討する。	浮遊期（全長10mmサイズ、Fステージ）から給餌する配合飼料中のビタミンD含有量の違いが黒化個体の出現要因となるかをX社配合飼料をベースに再検討する。
試験設定	試験開始サイズ：ふ化仔魚～ 区分 ワムシ アルテミア 1区 アクアラン パワッシュュA 2区 フェオ パワッシュュA 3区 アクアラン フェオ 4区 フェオ フェオ 5区 無強化 無強化	試験開始サイズ：全長8, 10, 12mm 区分 配合飼料給餌サイズ 餌付け期間 1区 全長 8mm 10日間 2区 全長 10mm 10日間 3区 全長 12mm 12日間 4区 生物餌料給餌	試験開始サイズ：全長13, 20, 30mm 区分 MS添加サイズ 1区 MSなし 2区 13mmからMS添加 3区 20mmからMS添加 4区 30mmからMS添加	試験開始サイズ：全長10mm 区分 ビタミンD含有量 1区 0IU/100g試験飼料 2区 1,000IU/100g試験飼料 3区 20,000IU/100g試験飼料 4区 X社飼料 5区 Y社飼料
供試魚	ふ化仔魚	量産水槽から平均全長7.7mmで抽出後、随時各試験に供する。	量産水槽から平均全長13.3mmサイズで抽出	量産水槽から全長10mmサイズで抽出
水槽	0.5m ³ 黒色円形水槽を各試験区にそれぞれ2面使用。			
水温	18℃に加温して飼育する。			
換水率	着底まで50～100%/日、着底後は300%/日～とする。	500～1,000%/日	1,000～2000%/日	500～1,000%/日
水質	朝1回水温・pHを測定。照度は天候状況別に水面真上で1日数回測定。宮津事業場はこのほか試験内容から水質（態窒素等）を調査する。			
底面	特になし	特になし	MS(0.20～0.5mm粒径)を2cm敷きにする。試験設定通り	特になし
飼育密度	ふ化仔魚～ 5,000尾/0.5m ³ G～Hステージ 2,500尾/0.5m ³ 全長20mmサイズ～ 600尾/0.5m ³	E～Gステージ 5,500尾/0.5m ³ 全長20mmサイズ～ 500尾/0.5m ³	Gステージ 2,000尾/0.5m ³ 全長20mmサイズ～ 700尾/0.5m ³ 全長30mmサイズ～ 200尾/0.5m ³	Fステージ～ 2,500尾/0.5m ³ 全長20mmサイズ～ 600尾/0.5m ³
餌料	ワムシ・アルテミア強化：試験設定 ワムシ：開口～全長18mm Ar-N：全長8mm～取り揚げ（全長20mm）	ワムシ、アルテミア強化法：間引き水槽（量産水槽）と同様		
	配合飼料：Y社配合飼料（全長10mm～）	配合飼料：試験開始から全長20mmまではX社飼料 全長20mmからはY社飼料	Ar-N：マリングロス、スーパーカプセルA1 配合飼料：全長8～12mm Y社+X社 全長13mm～X社のみ	アルテミア：パワッシュュA（全長15mmサイズまで） 配合飼料：全長10mmまで使用せず 全長10mm以降から試験区通り
観察項目	全長20mmサイズ：黒化・白化（正常・≤1/2・>1/2・白化）。 全長30mmサイズ：黒化 全長40mmサイズ：黒化・脊椎骨異常、観察尾数は100尾とする。			
備考	飼育途中大量死亡が発生したために本報告書では割愛した。			

表Ⅲ-1-4 平成10年度ヒラメの無眼側体色異常防除技術開発における全体計画および試験方法の統一事項

	小浜事業場	宮津事業場	伯方島事業場
課題	配合飼料の給餌開始サイズの影響	MSによる防除効果	配合飼料のビタミンD添加の影響
担当者	小金 隆之	藤浪祐一郎	板垣恵美子
目的	浮遊期（全長10mm, Fサイズ）～着底前期（12mm, Gサイズ）の間で配合飼料の給餌時期が黒化個体の出現におよぼす影響について検討する。	着底前期（全長13mm, Gサイズ）以降において、水槽底に敷くMSの黒化出現防除効果について検証し、またMSの適正な添加時期（サイズ）について検討する。	浮遊期（全長10mm, Fサイズ）から給餌する配合飼料中のビタミンD含有量の違いが黒化個体の出現要因となるかをY社配合飼料をベースに再検討する。
試験設定	試験開始サイズ：全長10, 11, 12mm 区分 配合飼料給餌サイズ（餌付け含む） 1区 全長10mm配合飼料餌付け、以降配合のみ 2区 全長11mm配合飼料餌付け、以降配合のみ 3区 全長12mm配合飼料餌付け、以降配合のみ 4区 全長11mm配合飼料餌付け＋全長11～15mm Ar 併用 5区 全長11mm配合飼料餌付け＋全長11～20mm Ar 併用 6区 全長11mm配合飼料餌付け＋全長11～20mm Ar と養成 Ar 併用	試験開始サイズ：全長13, 20, 30mm 区分 MS添加サイズ 1区 MSなし 2区 全長13mmからMS添加 3区 全長20mmからMS添加	試験開始サイズ：全長10mm 区分 ビタミンD含有量 1区 Y社 2,000 IU/100g 2区 Y社20,000 IU/100g 3区 Y社市販配合飼料 4区 X社市販飼料
供試魚	量産水槽から全長10mmで抽出。	量産水槽から全長12mmで抽出。	量産水槽から全長10mmで抽出
水槽	0.5m ³ 黒色円形水槽を各試験区にそれぞれ2面使用。		
水温	18℃に加温して飼育する。		
換水率	500～1,000%/日	1,000%/日	当初500%/日 1,000%/日
水質	朝1回水温・pHを測定。照度は天候状況別に水面真上で1日数回測定。		
底面	全長20mmサイズ以降からMSを設置	試験設定通り。	全長20mm以降にMSを設置
飼育密度	E～Gステージ 5,500尾/0.5m ³ 20mmサイズで 500尾/0.5m ³	E～Gステージ 2,500尾/0.5m ³ 20mmサイズ～ 1,500尾/0.5m ³ 30mmサイズ～ 500尾/0.5m ³	Gステージ 2,500尾/0.5m ³ 20mmサイズ～ 600尾/0.5m ³
餌料	ワムシ, Ar強化：試験設定 ワムシ：開口～全長18mm Ar-N：全長8mm～取り揚げ（全長20mmサイズ）		Ar-N：マリンオメガ
	配合飼料：X, Y社配合飼料（全長10mm～）	配合飼料：試験開始X社飼料	配合飼料：試験設定通り
観察項目	全長20mmサイズ：黒化・白化（正常・ $\leq 1/2$ ・ $> 1/2$ ・白化）。 全長30mmサイズ：黒化（中間調査） 全長40mmサイズ：黒化・脊椎骨異常、観察尾数は100尾とする。		
備考	飼育途中大量死亡の発生し試験が成立しなかったため、本報告では割愛した。		

表Ⅲ-1-5 平成11年度ヒラメの無眼側体色異常防除技術開発における全体計画および試験方法の統一事項

	小浜事業場	宮津事業場		伯方島事業場
課題	配合飼料の給餌開始サイズの影響	MSによる防除効果	照度の影響	配合飼料のビタミンD添加の影響
担当者	小金 隆之	竹内 宏行		太田 健吾
目的	浮遊期（全長10mm, Fステージ）～着底前期（全長12mm, Gステージ）の間で配合飼料の給餌時期が黒化個体の出現におよぼす影響について検討する。	着底後期（全長20mm, Hステージ）において、水槽底に敷くMSの砂敷方法による黒化出現防除効果について検討する。	浮遊期（全長9mm, Fステージ）からの照度と黒化個体の出現におよぼす影響について検討する。	浮遊期（全長10mm, Fステージ）から給餌する配合飼料中のビタミンDの含有量の違いが黒化個体の出現要因となるかをX・Y社配合飼料をベースに再検討する。
試験設定	試験開始サイズ：全長10, 11, 12mm 区分 配合飼料給餌サイズ(餌付け含む) 1区 全長10mm配合飼料餌付け,以降配合のみ 2区 全長11mm配合飼料餌付け,以降配合のみ 3区 全長12mm配合飼料餌付け,以降配合のみ 4区 全長11mm配合飼料餌付け+ 全長11～15mm Ar-N併用 5区 全長11mm配合飼料餌付け+ 全長11～20mm Ar-N併用 6区 全長11mm配合飼料餌付け+ 全長11～20mm Ar-N養成 Ar併用	試験開始サイズ：全長20mm 区分 MS添加量 1区 MSを厚さ10mmに敷く区 2区 MSを3mm程度に敷く区 3区 MSを敷かない区	試験開始サイズ：全長9mm 区分 照度 1区 寒冷紗覆う区(暗区) 2区 自然光区(明区)	試験開始サイズ：全長10mm 区分 ビタミン含有量 1区 X社市販飼料 2区 X社VD20,000IU/100g試験飼料 3区 Y社市販飼料 4区 Y社VD20,000IU/100g試験飼料
供試魚	量産水槽から平均全長8.3mmで抽出。	小浜事業場の量産水槽から全長17mmサイズで抽出して、全長20mmサイズまで予備飼育後に収容。	伯方島事業場から搬入した平均全長8.2mmの種苗を使用。	量産水槽から平均全長9.46mmで抽出
水槽	0.5m ³ 黒色円形水槽を各試験区にそれぞれ2面使用。			
水温	18℃に加温して飼育する。			
換水率	着底まで50～100%/日、着底後は300～500%/日とする。	1,000%/日、飼育水が廻るよ うに水槽中央部より排水した。	着底期まで160～%/日 着底期以降は1,000%/日	当初500%/日 1,000%/日
水質	朝1回水温・pHを測定。照度は天候状況別に水面真上で1日数回測定。			
底面	全長20mmサイズ以降からMSを設置	試験設定通り。還元層発生を防止するために1回/2～3日間ごとに底掃除を行い、排出した量は新たにMSを追加する。また、砂の偏りは随時均した。	全長20mmサイズ以降からMSを設置	
飼育密度	I～Hステージ 5,500尾/0.5m ³ 20mmサイズ～ 570尾/0.5m ³	Hステージ～ 1,500尾/0.5m ³ 20mmサイズ～ 500尾/0.5m ³ 30mmサイズ～ 200尾/0.5m ³	Gステージ～ 1,500尾/0.5m ³ 20mmサイズ～ 500尾/0.5m ³ 30mmサイズ～ 300尾/0.5m ³	Gステージ～ 2,500尾/0.5m ³ 20mmサイズ～ 500尾/0.5m ³ 30mmサイズ～ 400尾/0.5m ³
餌料	ワムシ, Ar強化：試験設定 ワムシ：開口～全長18mm Ar-N：全長8mmサイズ～取り揚げ(全長20mm)	Ar-N:全長15mmまで スーパーカプセルA-1	ワムシ：生クロレラω3 Ar-N：DHAce	ワムシ：スーパー生クロレラV12 Ar-N：DHAce
	配合飼料：X社配合飼料(全長10mm～) ：Y社配合飼料(全長20mm～)	配合飼料：試験開始Y社飼料	配合飼料：試験開始Y社飼料	配合飼料：試験設定通り
観察項目	全長20mmサイズ：黒化・宮古事業場のみ白化（正常・≤1/2≤・>1/2・白化）を調べる。 全長30mmサイズ：黒化（中間調査） 全長40mmサイズ：黒化・脊椎骨異常、観察尾数は100尾とする。			
備考	全般的に黒化度合いが著しく試験が成立しなかったため本報告書では割愛した。		予備試験のために本報告書では割愛した。	

表Ⅲ-1-6 平成12年度ヒラメの無眼側体色異常防除技術開発における全体計画および試験方法の統一事項

	小浜事業場	宮津事業場	伯方島事業場
課題	ストレスが黒化個体の出現におよぼす影響について	浮遊期飼育照度が黒化個体の出現におよぼす影響	Ar-Nのフェオによる強化の防除効果
担当者	小金 隆之	竹内 宏行	太田 健吾
目的	浮遊期（全長9mm, Fステージ）～着底期（全長2017mm, Iステージ）の間で輸送ストレスによる黒化発現におよぼす影響について検討する。	ふ化仔魚から異なる照度で飼育した種苗の黒化出現状況の違いを検討する。	浮遊期（全長7mm, Dステージ）により, Ar-Nの栄養強化にフェオを使用して, その黒化発現におよぼす影響について検討する。
試験設定	試験サイズ：全長9・11・13・15・17・20mmに輸送ストレスを与える 区分 ストレス 1区 全長9mm 2区 全長11mm 3区 全長13mm 4区 全長15mm 5区 全長17mm 6区 全長20mm 7区 なし	試験開始サイズ：ふ化仔魚, 全長20mm 区分 照度 1区 暗条件 (200 lx 以下) 2区 通常条件 (1,000 lx 程度) 3区 明条件 (3,000 lx 以上) 4区 全長20mmまで暗条件→通常条件 5区 全長20mmまで明条件→暗条件	試験サイズ：全長6～7mmより開始 区分 Ar-Nの栄養強化 1区 フェオ強化 2区 DHAc 強化 3区 フェオ+DHAc 4区 無強化
供試魚	量産水槽から抽出して使用。	自場産の受精卵使用	大型水槽で予備飼育した日齢14の仔魚
水槽	一次飼育は0.1m ³ 黒色円形水槽2面使用。 2次飼育は0.5m ³ 黒色円形水槽使用	ふ化仔魚～全長20mmまで2m ³ 水槽 全長20～全長40mmまで0.5m ³ 黒色円形水槽	0.5m ³ 黒色円形水槽
水温	18℃に加温して飼育する。		
換水率	500～1,500%/日	1,000%/日, 飼育水が廻るように水槽中央部より排水する。	飼育当初20%/日, 徐々に漸増し1,000%/日
水質	朝1回水温・pHを測定。 照度は1000 lx 以下	朝1回水温・pHを測定。照度は試験設定通り。	
底面	全長20mmサイズ以降からMSを設置	MSなし	
飼育密度	全長9～： 1,000尾/0.1m ³ 全長20mm以降：500尾/0.5m ³	ふ化仔魚～ 5,000/0.5m ³ 全長20mmサイズ～ 500/0.5m ³ 全長30mmサイズ～ 300/0.5m ³	～Gステージ 1,500尾/0.5m ³ 全長20mmサイズ 2,500尾/0.5m ³ 全長20mm～サイズ 400尾/0.5m ³
餌料	ワムシ：プラスアクアラン Ar-N：DHAc 配合飼料：Y社配合飼料 (全長20mm～)	ワムシ：スーパー生クロレラV12, 脂溶性ビタミン Ar-N：試験設定通り	
観察項目	全長20mmサイズ：黒化・宮古事業場のみ白化（正常・≤1/2・>1/2・白化）を調べる。 全長40mmサイズ：黒化・脊椎骨異常, 観察尾数は100尾とする。		
備考			

表Ⅲ-1-7 平成13年度ヒラメの無眼側体色異常防除技術開発における全体計画および試験方法の統一事項

	小浜事業場	宮津事業場	伯方島事業場
課題	ストレスが黒化発現におよぼす影響について	浮遊期飼育照度が黒化発現におよぼす影響について	配合飼料の給餌量の違いで成長差が黒化発現におよぼす影響について
担当者	小金 隆之	竹内 宏行	太田 健吾
目的	着底後期（全長17mm, Hステージ）に異なるストレス強度により黒化発現におよぼす影響について検討する。	ふ化仔魚から着底期以降までの照度による黒化発現に違いがあるか検討する。	浮遊期（全長7mm, Dステージ）から配合飼料の給餌量を変えることで人為的に成長差を生じさせ、このことが黒化発現におよぼす影響について検討する。
試験設定	試験開始サイズ：全長17mm 区分 ストレス強度（密度+輸送時間） 1区 1,000尾/10ℓ+2h 2区 2,000尾/10ℓ+2h 3区 3,000尾/10ℓ+2h 4区 1,000尾/10ℓ+4h 5区 2,000尾/10ℓ+4h 6区 3,000尾/10ℓ+4h 7区 3,000尾/10ℓ+6h+水温刺激 8区 対照（700尾/10ℓ+0h） 9区 1,000尾/10ℓ, 6h 10区 2,000尾/10ℓ, 6h 11区 3,000尾/10ℓ, 6h 12区 対照区（700尾/10ℓ, 0h）	試験開始サイズ：ふ化仔魚より 区分 照度 1区 暗条件（70lx以下） 2区 明条件（3,000lx程度） 3区 全長20mmまで暗条件→明条件 4区 全長20mmサイズまで明条件→暗条件	試験サイズ：全長7mm 区分 配合飼料の給餌量 1区 基準量1/3量給餌 2区 基準量2/3量給餌 3区 基準量と同量給餌（対照区）
供試魚	1～8区は小浜事業場産 9～12区は伯方島事業場産	伯方島事業場の受精卵からふ化したふ化仔魚を使用。	量産水槽より全長7mmサイズの仔魚を抽出
水槽	0.5m ³ 黒色円形水槽を各試験区にそれぞれ2面使用。		
水温	18℃に加温して飼育する。		
換水率	0.3回転/日から最大8回転/日を目安。全長30mm以降は10回転/日		
水質	朝1回水温・pHを測定。照度は天候状況別に水面真上で1日数回測定。		
底面	MSの敷砂なし		
飼育密度	予備飼育：10,000尾/m ³ 700尾/0.5m ³	ふ化仔魚収容時：16,000/0.5m ³ 20mm～ 1,500/0.5m ³ 30mm～ 1,000/0.5m ³	7～15mmサイズ 5,000尾/0.5m ³ 15～20mmサイズ 2,500尾/0.5m ³ 20mmサイズ～ 500尾/0.5m ³
餌料	ワムシ：スーパー生クロレラV12+メガビットAD3E Ar-N：全長15mmまでDHAce 配合飼料：Y社配合飼料		
観察項目	全長20mmサイズ：黒化・宮古事業場のみ白化（正常・≤1/2・>1/2・白化）を調べる。 全長40mmサイズ：黒化・脊椎骨異常、観察尾数は100尾とする。		
備考			

表Ⅲ-1-8 平成14年度ヒラメの無眼側体色異常防除技術開発における全体計画および試験方法の統一事項

	小浜事業場	宮津事業場	伯方島事業場
課題	Ar-N の DHA 強化の影響	ワムシの DHA 強化の影響	ワムシ給餌期での VA, VD 強化の影響
担当者	小金 隆之	竹内 宏行	太田 健吾
目的	浮遊期に給餌する Ar-N の DHA 強化量の多寡が黒化個体の出現に及ぼす影響について検討する。	浮遊期のワムシ給餌期での DHA 強化量の多寡が黒化個体の出現に及ぼす影響について検討する。	浮遊期のワムシ単独給餌期間中に異なる VA, VD で強化したワムシを給餌して、黒化個体の出現に及ぼす影響について検討する。
試験設定	①試験サイズ：平均全長7.7mm (Dステージ) ~ 区分 Ar-N DHA 強化量 区分 配合飼料給餌サイズ 餌付け期間 区分 配合飼料給餌サイズ 餌付け期間 区分 配合飼料給餌サイズ 餌付け期間 区分 配合飼料給餌サイズ 餌付け期間	②試験サイズ：ふ化仔魚~ 区分 ワムシ DHA 強化量 区分 配合飼料給餌サイズ 餌付け期間 区分 配合飼料給餌サイズ 餌付け期間 区分 配合飼料給餌サイズ 餌付け期間 区分 配合飼料給餌サイズ 餌付け期間	③区分 配合飼料給餌サイズ 餌付け期間 区分 DHA 強化 V 強化 (IU/ℓ) 区分 配合飼料給餌サイズ 餌付け期間 区分 配合飼料給餌サイズ 餌付け期間 区分 配合飼料給餌サイズ 餌付け期間 区分 配合飼料給餌サイズ 餌付け期間
供試魚	予備飼育水槽から平均全長7.7mmで抽出。	ふ化仔魚	ふ化仔魚
水槽	0.5m ³ 黒色円形水槽を各試験区にそれぞれ2面使用。		
水温	18℃に加温して飼育する。		
換水率	予備飼育試験は30~300%/日 飼育試験は300~500%/日	0.3回転/日より開始し、徐々に漸増して、最終的に10回転/日とした。	0.6回転/日より開始し、徐々に漸増して、最終的に11回転/日とした。
水質	朝1回水温・pHを測定。照度は1,000 lx に調整し、1日2回測定する。		
底面	ミクロスセラミック (MS) は敷砂なし		
飼育密度	Eステージ~全長20mmサイズ 2,500尾/0.5m ³ 全長20~40mmサイズ 500尾/0.5m ³	ふ化仔魚 5,000尾/0.5m ³ 全長 9~20mmサイズ 2,500尾/0.5m ³ 全長20~40mmサイズ 500尾/0.5m ³	ふ化仔魚 5,000尾/0.5m ³ 全長9~20mmサイズ 3,000尾/0.5m ³ 全長20~40mmサイズ 500尾/0.5m ³
餌料	ワムシ, Ar 強化：試験設定 ワムシ：開口~全長18mmサイズ Ar-N：全長8mmサイズ~取り揚げ (全長20mmサイズ) 配合飼料：試験開始Y社飼料	ワムシ：各試験設定通り Ar-N：DHA 1% オイル使用	ワムシ：各試験設定通り Ar-N：DHA 1% オイル使用
観察項目	全長20mmサイズ：黒化・宮古事業場のみ白化 (正常・≤1/2・>1/2・白化) を調べる。 全長40mmサイズ：黒化・脊椎骨異常、観察尾数は100尾とする。		
備考	形態異常が多く試験が成立しなかったために本報告書では割愛した。		

イズの仔稚魚を間引いて使用した。給餌する生物餌料および配合飼料が試験設定に関与すると考えられた場合には、生物餌料の栄養強化方法や配合飼料のメーカー等について統一した。

飼育試験における水槽容量、容器の色、飼育水温、換水率、サイズ別の飼育密度、生物餌料、配合飼料および栄養強化方法については、各試験項目の条件設定に影響をおよぼさないと考えられる場合は統一した。

飼育試験は、供試サイズがGステージ以下の場合には全長20mmでいったん終了し、黒化個体の出現状況の違いをより明確にするため、さらに全長40mmまでの継続試験を行った。供試サイズがIステージの場合には全長40mmで終了した。

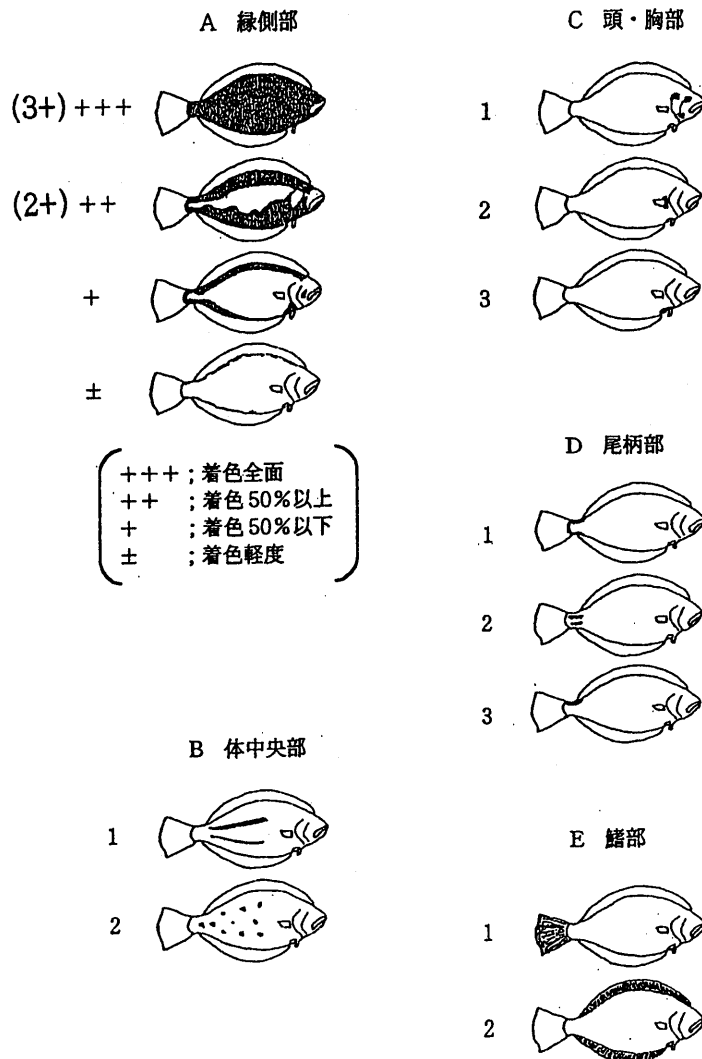
全長20, 30, 40mmサイズで各試験区から100尾のサンプリングを行い、10%濃度の中性ホルマリンで約1カ月間固定した後に体色異常個体の観察を行った。

黒化個体の出現状況は、正常個体、黒化面積割合が

1/2以下の個体（黒化 \leq 1/2）、黒化面積割合が1/2以上の個体（黒化 $>$ 1/2）、完全黒化個体の4段階で表示した。

黒化の出現パターンについては水産庁類型化マニュアル（図Ⅲ-1）を基準に、商品価値に影響を与えるという観点から図Ⅲ-2のように改変し、部位別に類型別表示した、なお、この分類ではBの体中央部の黒化パターンはAに含め、Eの鱗部のパターンは除外した（写真Ⅲ-1～写真Ⅲ-5参照）。

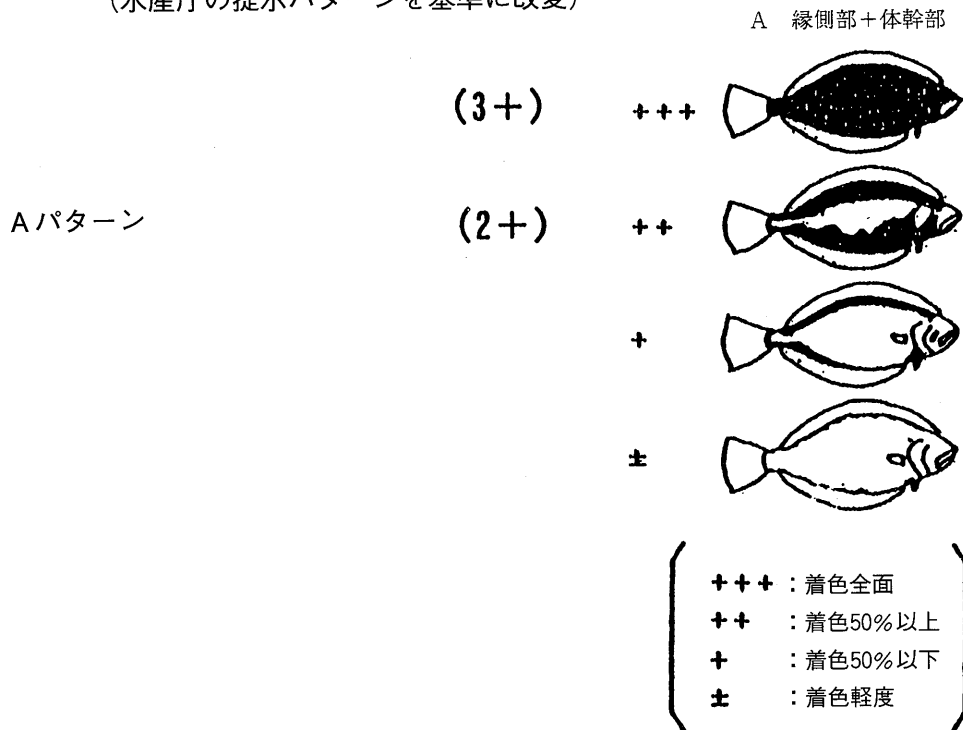
また、白化個体の出現状況についても調査し、正常個体、白化面積割合が1/2以下（白化 \leq 1/2）、白化面積割合が1/2以上（白化 $>$ 1/2）、完全白化個体の4段階で表示した。さらに、全長40mmサイズで軟X線撮影して脊椎骨異常個体の出現状況を調査した。また、伯方島事業場で行った東京水産大学（現 東京海洋大学）と広島大学との共同研究においても課題の試験設定に影響をおよぼさない限り飼育方法は統一事項に準じ、観察方法も同様とした。



図Ⅲ-1 黒化個体の類型化（水産庁基準）

D		A	C
類表示記号	内 容		
A	C, D以外の部位すべて (黒化の軽重で±~++++の4段階に分ける)		
C1	頭部 (鰓蓋及び鰓蓋上端と背鰓先端を結ぶ線から鰓蓋の部分)		
C2	胸鰭基底部周辺		
C3	腹鰭基底部周辺 (喉部~背鰭前端までを含む)		
D1±	尾柄部の縁側部分 軽度		
D1+	尾柄部の縁側部分 重度		
D2	尾柄部内部		
(D=尾柄部は背鰭後端と臀鰭後端を結ぶ後ろの部分)			

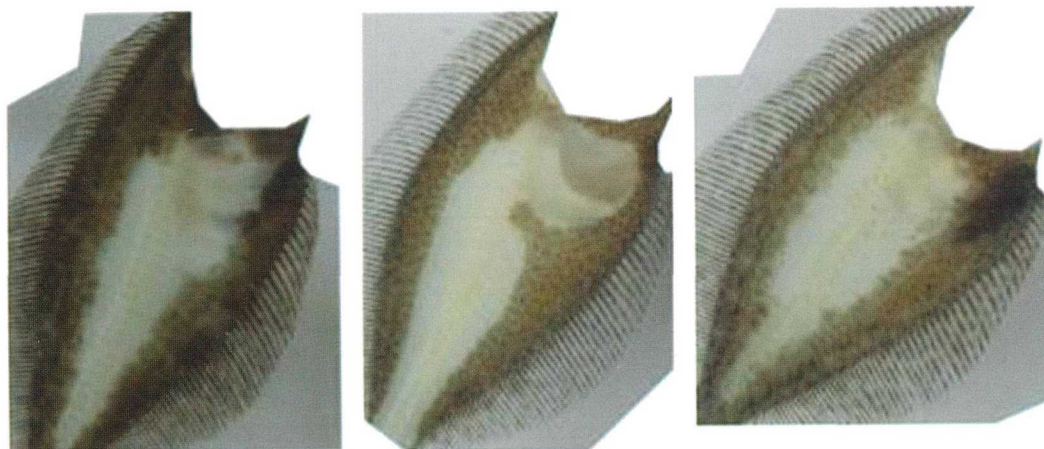
(水産庁の提示パターンを基準に改変)



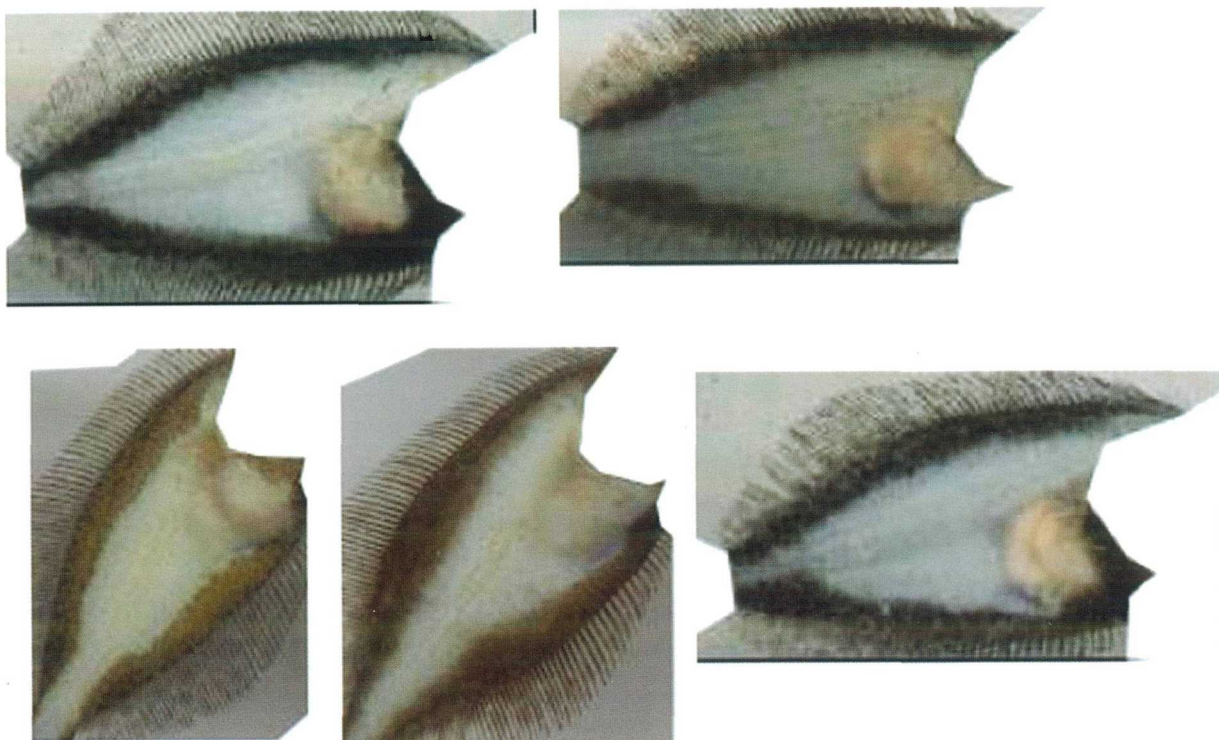
図Ⅲ-2 ヒラメ無眼側体色異常個体の出現状況の分類パターン

A + + + (A3+) は完全黒化のためサンプルなし

A + + (A2+) のサンプル

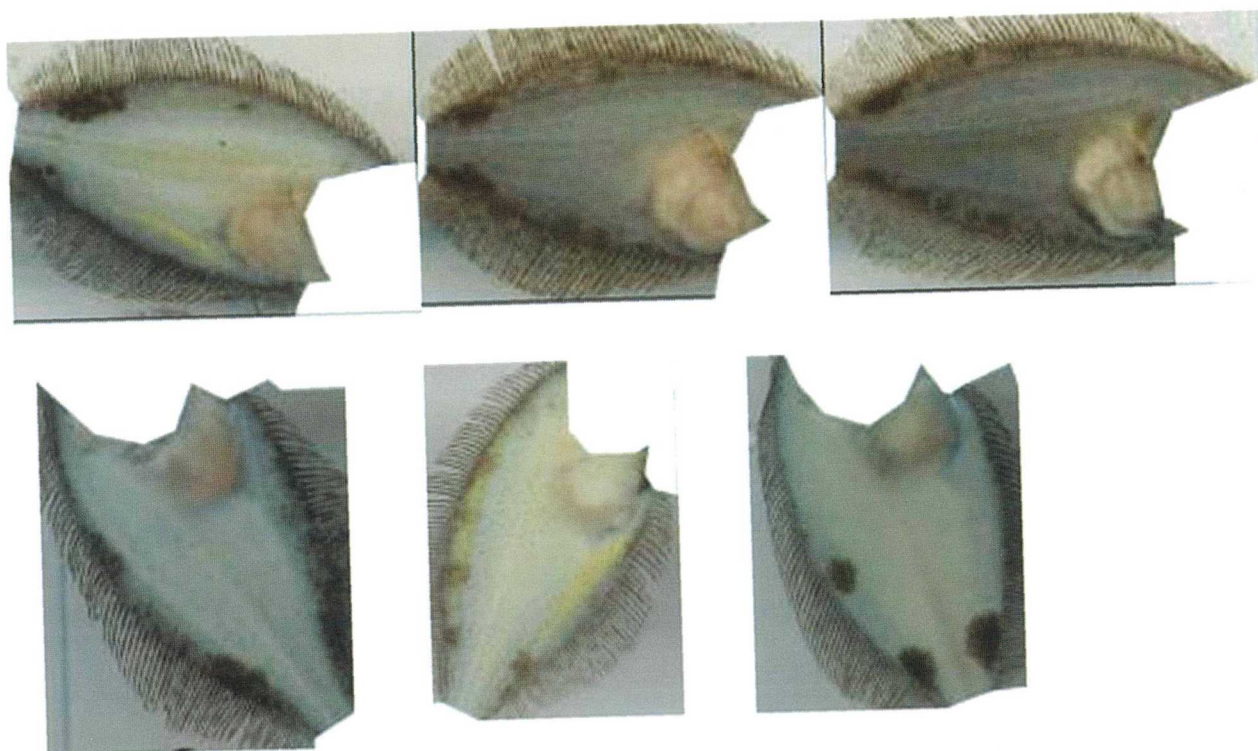


A + の上限界域サンプル

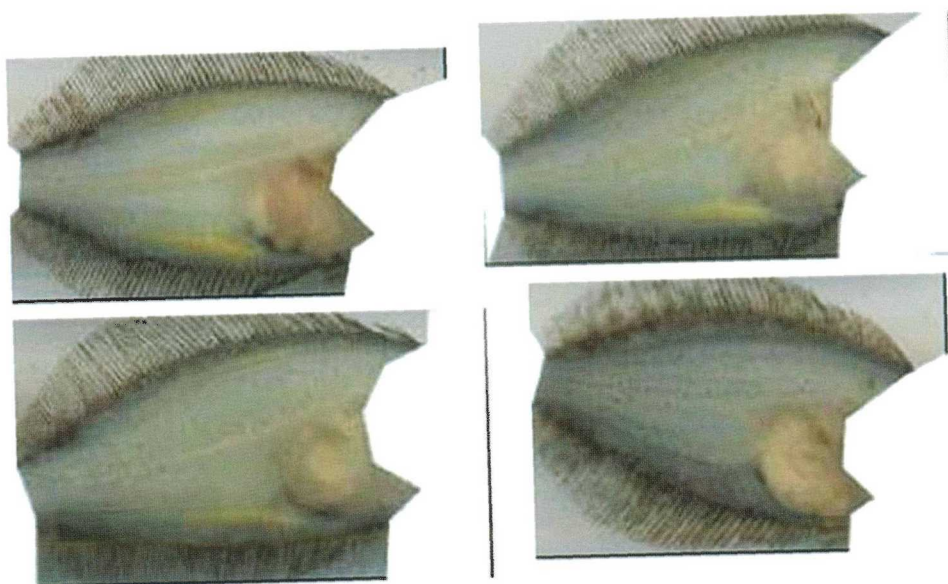


写真Ⅲ-1

A±の上限界域のサンプル

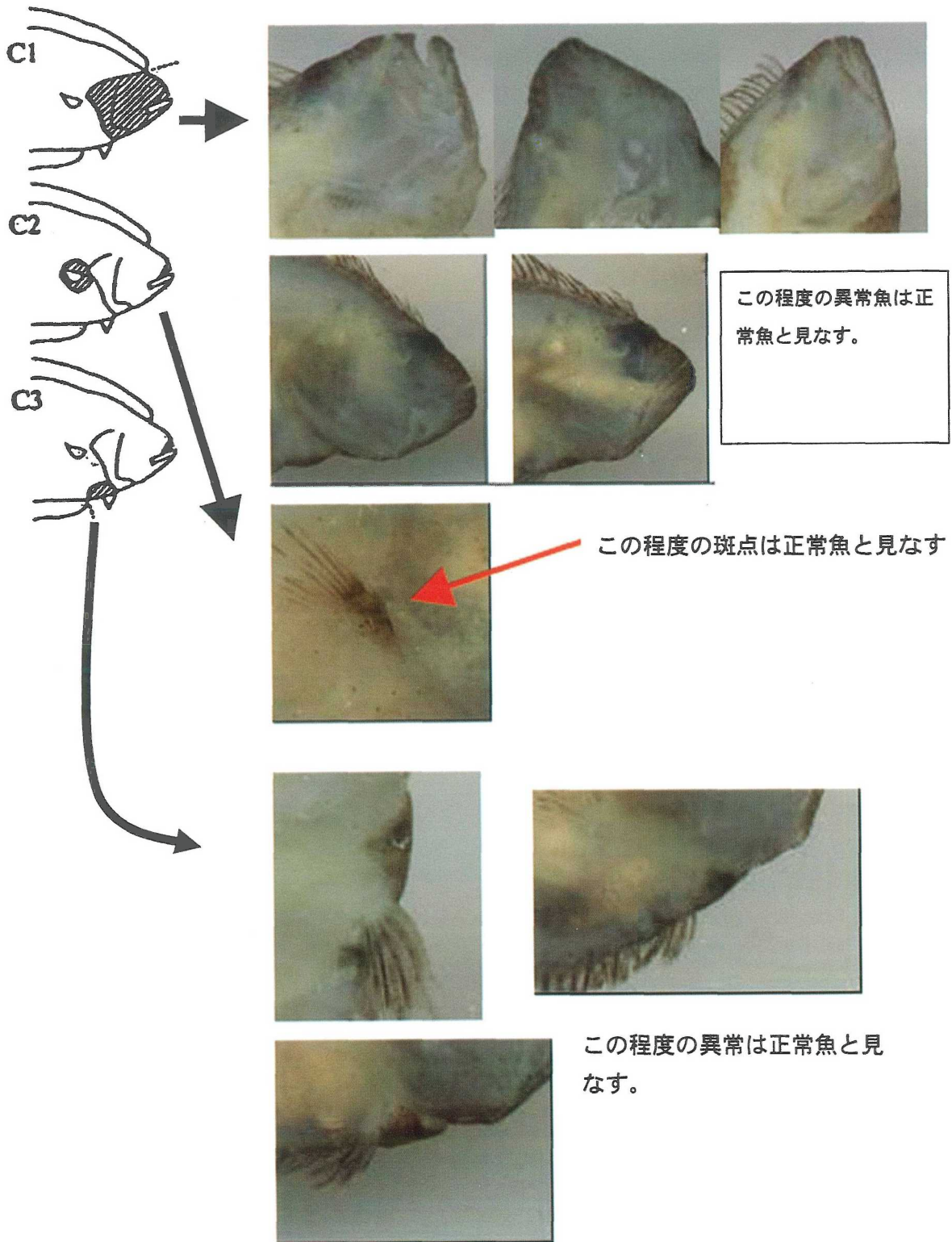


Aの正常魚の上限界域のサンプル



特にはっきりした体色異常がなければ正常魚と見なす。

Cパターン

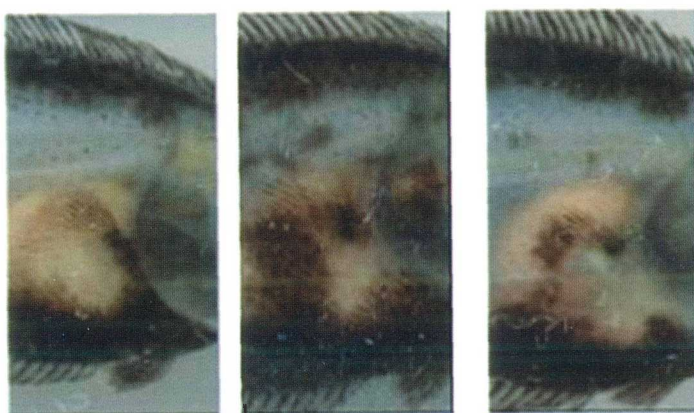


写真Ⅲ-3

C1の異常魚のサンプル



C2の異常魚のサンプル

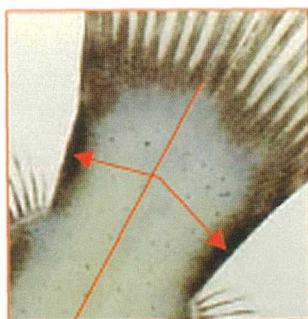
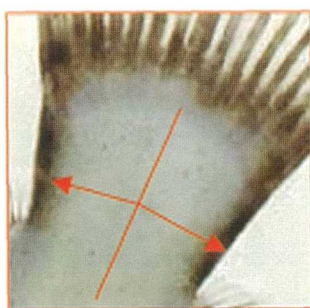


(鰓蓋骨上の体色異常は異常魚と見なす)

C3の異常魚のサンプル

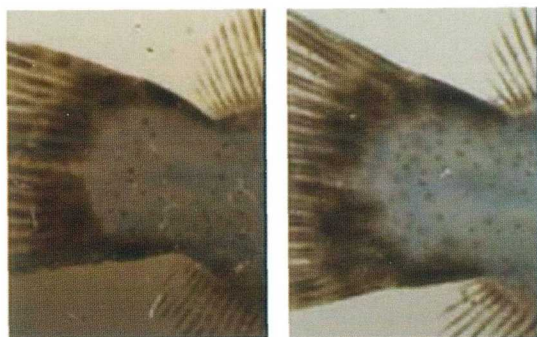


Dパターン



正中線より，1/4以下の黒
化の巻き込み程度までは
正常と見なす。

D1の異常魚のサンプル



D2の異常魚も含むサンプル



引用文献

- 1) 原田輝雄, 株田 晋, 村田 修, 熊井英水, 水野兼八郎: ヒラメの人工ふ化仔魚の飼育とその成長について. 近大水研報, 1, 49-54 (1966).
- 2) 水産庁・日裁協: 平成13年度栽培漁業種苗生産, 入手・放流実績 (全国). (2003).
- 3) 清水大介: 全国の種苗生産および放流の状況について. さいばい, 106, 59-68 (2003).
- 4) 金沢昭夫: 平成2年度健苗育成技術開発研究成果の概要, 異体類種苗の白化個体の出現防止のための超微粒子飼料の作成および白化個体出現機構の解明. 水産庁研究部研究課, 6-91 (1990).
- 5) 青海忠久: 異体類人工種苗における白化個体の出現機構に関する研究. 京都大学農学部学位論文, 193p (1989).
- 6) 青海忠久: ヒラメの種苗生産時にみられる体色異常. 平成3年度栽培漁業技術研修事業基礎理論コース 仔稚魚期の発育シリーズNo.2, 1-37 (1991).
- 7) 青海忠久: 異体類人工種苗の体色異常の発育に関する研究. 平成元年度健苗育成技術開発研究成果の概要, 水産庁研究部研究課, 1-12 (1990).
- 8) 青海忠久: 体色・形態異常と育成環境の関係解析. 平成8年度健苗育成技術開発委託事業年度末報告会実施機関報告書, (1996).
- 9) 青海忠久: 体色・形態異常と育成環境の関係解析. 平成9年度健苗育成技術開発委託事業年度末報告会実施機関報告書, (1997).
- 10) 藤井良三: 異体類白色化についての基礎研究. 健苗育成技術開発委託事業報告書 (昭和58. 59. 60年度), 1-36 (1986).
- 11) 青海忠久: ヒラメの生物学と資源培養, 5. 体色異常発現機構. 水産学シリーズ112, 恒星社厚生閣刊, 63-73 (1997).
- 12) 鈴木伸洋: 養殖ヒラメ無眼側皮膚の微細構造とその体色異常性の組織学的検討. 南西水研報, 27, 113-128 (1994).
- 13) 竹内俊郎: 魚類における栄養素の欠乏症と要求量, 平成3年度栽培漁業技術研修事業基礎理論コース 仔稚魚期の発育シリーズNo.4, 1-68 (1991).
- 14) 北部日本海ブロック種苗生産研究会: 北部日本海ブロックにおけるヒラメ種苗生産技術の現状. 日本水産資源保護協会, 水産増養殖叢書33, 1-110 (1984).
- 15) 高橋庸一: ヒラメの種苗生産における体色異常個体の出現と防除. 日裁協特別研究報告, 3, 1-50 (1992).
- 16) 青海忠久: ヒラメ幼魚の無眼側着色におよぼす光照射, 有眼側の体色, および供試魚の由来の影響. 水産増殖, 39, 173-180 (1990).
- 17) 高橋庸一: ヒラメ稚魚の無眼側の体色異常におよぼす飼育密度と飼餌料の影響. 日水誌, 60, 593-598 (1994).
- 18) 青森県栽培漁業振興協会: ヒラメ無眼側体色異常の出現防除対策への取り組みについて: 平成6年度太平洋北区栽培漁業協議会技術部会資料, 1-5 (1994).
- 19) 岩田伸弘・菊池弘太郎・吉田岳志: ヒラメ稚魚の無眼側黒化に対する飼育環境の影響. 電力中央研究所研究報告U95002, 1-19 (1995).
- 20) 岩本明雄・大河内裕之・津崎龍雄・福永辰廣・北田修一: 魚市場の全数調査に基づく宮古湾のヒラメ種苗放流効果の推定. 日水誌, 64, 830-840 (1998).
- 21) 加治俊二・福永辰廣: ヒラメ種苗生産の現状と体色異常の魚市場での価格に関するアンケート結果について. 栽培技研, 27(2), 67-101 (1999).
- 22) 南 卓志: ヒラメの初期生活史. 日水誌, 48(1), 1581-1588 (1982).

Ⅲ-2 浮遊期型体色異常（全長3～12mm）

1. 飼育環境に関する試験

(1) 照度の影響（宮津事業場）

【平成12年度】

1) 目的

飼育照度の違いが黒化個体出現におよぼす影響について、飼育初期から全長40mmサイズまでの間で浮遊期と着底期に分けて検討した。

2) 方法

① 供試魚

供試魚は、宮津事業場の天然親魚から得られた平均全長3.41mmのふ化仔魚を使用した。

② 試験区の設定

照度は、飼育棟内の自然光下で3,000 lx以上に保つ明条件、1,000 lx程度に保つ通常条件、水槽周囲を遮光幕で囲い、電球で200 lx以下に保つ暗条件を設定した。

試験は上記の暗条件で飼育する区（1区）、通常条件で飼育する区（2区）、明条件で飼育する区（3区）の計3区を設け、飼育初期から全長40mmサイズまでを同じ照度で一貫飼育した。一方、全長20mmサイズの段階でそれぞれの試験区から500尾ずつを抽出し、これまでの暗条件から通常条件で飼育する区（4区）、通常条件で飼育する区（5区）およびこれまでの明条件から通常条件で飼育する区（6区）の計3区を新たに設けた（表Ⅲ-2-1-1）。

③ 飼育方法

試験は2 m³FRP水槽（実水量1.5m³）3面（1区～3区）および0.5m³水槽3面（4区～6区）を使用した。飼育水温は18℃とし、海水温の上昇後は自然水温とした。ワムシ給餌期間中はナンノクロロプシスを50万セル/mlを維持するよう連続添加した。餌料はワムシを開口から全長13mm（日齢3～27）までナンノクロロプシス、プラスアクアランで強化したワムシを給餌し、全長10mmから全長20mm（日齢20～39）までDHAcで強化したアルテミアノープリウス（Ar-Nと称す）を給餌した。配合飼料は全長11mmから試験終了（日齢23～58）まで給餌した。

3) 結果

① 成長と生残

試験は5月11日から7月7日まで行った。1区～3区の全長20mmサイズまでの生残率は49.2～67.0％、全長30mmサイズまでの生残率は79.2～91.5％、全長40mmサイズの生残率は72.7～87.3％となり、全長20mmサイズまでの飼育では1区の生残率が低かった。一方、4区～6区の全長30mmサイズまでの生残率は89.0～97.8％、全長40mmサイズまでの生残率は85.7～91.7％と順調であった（表Ⅲ-2-1-2）。

飼育期間中の平均照度は、全長20mmサイズまでの飼育では1区123 lx（63～180）、2区601 lx（149～1,280）、3区4,408 lx（366～16,810）であった。全長20mm以降

表Ⅲ-2-1-1 平成12年度 照度の影響に関する試験の設定

試験区	照度条件*		備考
	全長20mmサイズ以前	全長20mmサイズ以降	
1	暗条件	暗条件	
2	通常条件	通常条件	
3	明条件	明条件	
4	暗条件	通常条件	全長20mmサイズで1区から抽出
5	通常条件	通常条件	全長20mmサイズで2区から抽出
6	明条件	通常条件	全長20mmサイズで3区から抽出

* 明条件：3,000 lx以上、通常条件：1,000 lx、暗条件：200 lx以下

表Ⅲ-2-1-2 平成12年度 照度の影響に関する試験の飼育結果

試験区	水槽 (m ³)	試験開始			試験開始～全長20mmサイズ			全長20mmサイズ～全長30mmサイズ			全長30mmサイズ～全長40mmサイズ				
		月日	収容尾数	平均全長 (mm)	月日	生残尾数	生残率 (%)	月日	収容尾数 ^{*1}	生残尾数	生残率 (%)	月日	収容尾数 ^{*2}	生残尾数	生残率 (%)
1	2.0	5.11	16,000	3.41	6.19	7,865	49.2	6.30	1,500	1,373	91.5	7.7	1,000	873	87.3
2	2.0	5.11	16,000	3.41	6.19	10,722	67.0	6.30	1,500	1,318	87.9	7.7	1,000	727	72.7
3	2.0	5.11	16,000	3.41	6.19	8,702	54.4	6.30	1,500	1,188	79.2	7.7	1,000	731	73.1
4	0.5							6.29	500	454	90.8	7.7	300	268	89.3
5	0.5							6.29	500	489	97.8	7.7	300	257	85.7
6	0.5							6.29	500	445	89.0	7.7	300	275	91.7

*1 全長20mmサイズで、1～3区では1,500尾/槽に、4～6区では500尾/槽に飼育密度を調整

*2 全長30mmサイズで、1～3区では1,000尾/槽に、4～6区では300尾/槽に飼育密度を調整

の飼育では、1区 142 lx (112~176), 2区 679 lx (81~1,205), 3区 4,608 lx (445~13,580), 4区 625 lx (109~1,420), 5区 594 lx (84~1,128) および 6区 566 lx (70~1,124) であった。

② 黒化個体の出現状況

全長20mmサイズでは、各区とも黒化は少なく、1区の体色正常個体の出現率は90.0%, 2区が88.0%で、3区が100%であった(表Ⅲ-2-1-3)。全長40mmサイズでは、一般的に黒化の度合いが高くなり、一貫飼育した区の体色正常個体の出現率は1区が18.0%, 2区が16.0%, 3区が10.0%, で暗い条件ほど正常率が高かった(表Ⅲ-2-1-4)。一方、照度条件を変更した区の正常率は6区が22.0%, 5区が8.0%, 4区が6.0%で浮遊期の照度が明るかった区ほど正常率が高かった。

③ 白化個体の出現状況

白化個体の出現率は、1区が25.0%, 2区が57.0%および3区が56.0%と高率に出現した(表Ⅲ-2-1-5)。

④ 脊椎骨異常個体の出現状況

外見上軽度なものがほとんどで、出現頻度は浮遊期に暗条件であった1区および4区でやや低かった(表Ⅲ-2-1-6)。

4) 考察

全長20mmサイズまでは明条件で飼育した3区が最も良好であった。全長40mmサイズでは、浮遊期から着底期を通して同じ照度条件で一貫飼育した区の中では、暗条件で飼育した1区が最も黒化の度合いは軽度で、明条件で飼育した3区が最も黒化の度合いが高かった。着底期以降通常の照度条件に変更飼育した中では、暗条件から通

表Ⅲ-2-1-3 平成12年度 照度の影響に関する試験の黒化個体の出現状況(全長20mmサイズ)

試験区	平均全長 (mm)	黒化個体の出現状況(%)				黒化パターン別の出現状況(%)									
		正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	A(縁側+体幹部)					C(頭・胸部)			D(尾柄部)	
						正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1	20.0	90.0	10.0	0	0	90.0	6.0	4.0	0	0	0	0	6.0	4.0	4.0
2	20.3	88.0	12.0	0	0	90.0	4.0	6.0	0	0	2.0	0	6.0	4.0	6.0
3	20.1	100	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表Ⅲ-2-1-4 平成12年度 照度の影響に関する試験の黒化個体の出現状況(全長40mmサイズ)

試験区	平均全長 (mm)	黒化個体の出現状況(%)				黒化パターン別の出現状況(%)									
		正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	A(縁側+体幹部)					C(頭・胸部)			D(尾柄部)	
						正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1	44.3	18.0	30.0	52.0	0	24.0	8.0	16.0	52.0	0	78.0	50.0	68.0	68.0	8.0
2	45.3	16.0	44.0	40.0	0	16.0	8.0	36.0	40.0	0	76.0	46.0	76.0	68.0	22.0
3	47.3	10.0	38.0	52.0	0	10.0	8.0	28.0	54.0	0	88.0	54.0	78.0	72.0	14.0
4	42.8	6.0	46.0	48.0	0	8.0	2.0	52.0	38.0	0	92.0	40.0	90.0	20.0	6.0
5	45.4	8.0	70.0	22.0	0	8.0	4.0	68.0	20.0	0	88.0	28.0	88.0	6.0	0
6	41.2	22.0	68.0	10.0	0	22.0	8.0	60.0	10.0	0	64.0	8.0	60.0	2.0	0

表Ⅲ-2-1-5 平成12年度 照度の影響に関する試験の白化個体の出現状況

試験区	異常個体率 (%)	白化個体の出現率(%)			
		正常	白≤1/2	白>1/2	白化
1	25.0	75.0	13.0	12.0	0
2	57.0	43.0	20.0	37.0	0
3	56.0	44.0	36.0	20.0	0

表Ⅲ-2-1-6 平成12年度 照度の影響に関する試験の脊椎骨異常の出現状況

試験区	異常個体率 (%)	脊椎骨異常の部位別出現状況(%)		
		癒合	屈曲	その他
1	9.0	7.0	2.0	0
2	17.0	16.0	1.0	0
3	12.0	12.0	0	0
4	10.0	9.0	1.0	0
5	17.0	16.0	1.0	0
6	15.0	15.0	0	0

常条件に変更した4区が最も黒化の割合が高くなり、暗条件で一貫飼育した1区より重度になった。逆に明条件から通常条件に変更した6区は最も黒化の割合は軽度で、明条件で一貫飼育した3区よりも軽度であった。このことから、全長20mmサイズまでは飼育照度が高いほど黒化発現に対する防除効果が高く、全長20mmサイズ以降では、照度が低いほど黒化発現に対する防除効果が高い傾向がうかがえた。

【平成13年度】

1) 目的

本年度は平成12年度の試験結果をもとに、飼育照度を暗条件と明条件に設定して、ふ化仔魚から全長40mmサイズまで同じ照度条件で一貫飼育する区と、着底以降に照度条件を変更する区を設けて黒化個体の出現と照度の関係について再検討した。

2) 方法

① 供試魚

供試魚には、伯方島事業場から輸送された受精卵から得られた平均全長3.53mmのふ化仔魚を使用した。

② 試験区の設定

試験区の設定のため飼育水槽を遮光幕で完全に囲い、各水槽の真上に1kWまたは40Wのリフレクター電球を設置して照度を調整し、水面照度で約3,000 lxに保つ明条件、約70 lxに保つ暗条件を設定した。

試験区は暗条件で飼育する区(1区)、明条件で飼育する区(2区)の2区を2面ずつ設け、ふ化仔魚から全長40mmサイズまで同じ照度条件で継続飼育した。また、

暗条件から明条件に変えて飼育する区(3区)、明条件から暗条件に変えて飼育する区(4区)の2区を2面ずつ設け、全長20mmサイズから照度条件を変更した(表Ⅲ-2-1-7)。

3) 飼育方法

試験は0.5㎡水槽8面を使用した。飼育水は50μmフィルターに通した生海水を20℃に冷却して注水し、ウォーターバス方式で冷却した。ワムシ給餌期間中は市販の濃縮淡水クロレラを50万セル/mlを維持するよう1日3回添加した。餌料は開口から全長10mm(日齢2~25)までスーパー生クロレラV12、メガビットAD₃Eで強化したワムシを給餌し、全長7mmから15mm(日齢14~35)までDHAcで強化したAr-Nを給餌した。配合飼料は全長9mmから試験終了(日齢22~71)まで給餌した。

3) 結果

① 成長と生残

試験期間は6月11日から8月20日までの70日間であった。全長20mmサイズでの生残率は30.9~51.9%、全長40mmサイズでの生残率は45.6~53.8%であった(表Ⅲ-2-1-8)。

照度による摂餌量の違いを確認するため、ワムシの単独給餌期とAr-Nの給餌初期の摂餌状況と成長について調査した。ワムシは摂餌開始時の摂餌個体率および摂餌量とも2区が高く推移し、成長も良好であった(図Ⅲ-2-1-1)。しかし、Ar-Nの給餌時期になると両区には顕著な差は認められなくなり、成長においても差は認められなくなった(図Ⅲ-2-1-2)。このように照度はワムシの

表Ⅲ-2-1-7 平成13年度 照度の影響に関する試験に設定

試験区	照度条件*		備考
	全長20mmサイズ以前	全長20mmサイズ以降	
1	暗条件	暗条件	
2	明条件	明条件	
3	暗条件	明条件	全長20mmサイズで1区から抽出
4	明条件	暗条件	全長20mmサイズで2区から抽出

* 明条件：3,000 lx, 暗条件：70 lx

表Ⅲ-2-1-8 平成13年度 照度の影響に関する試験の飼育結果

試験区	試験開始		試験開始~全長20mmサイズ			全長20mmサイズ~全長40mmサイズ				
	月日	収容尾数 (尾)	平均全長 (mm)	月日	生残尾数 (尾)	生残率 (%)	月日	収容尾数* (尾)	生残尾数 (尾)	生残率 (%)
1-1	6.11	5,000	3.53	7.26	1,543	30.9	8.20	500	228	45.6
1-2	6.11	5,000	3.53	7.26	2,536	50.7	8.20	500	250	50.0
2-1	6.11	5,000	3.53	7.26	2,156	43.1	8.20	500	243	48.6
2-2	6.11	5,000	3.53	7.26	2,594	51.9	8.20	500	267	53.4
3-1							8.20	500	244	48.8
3-2							8.20	500	269	53.8
4-1							8.20	500	229	45.8
4-2							8.20	500	234	46.8

* 全長20mmサイズで500尾/槽に飼育密度を調整

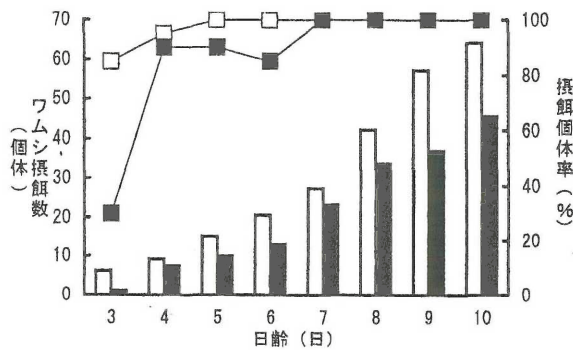
単独給餌期の摂餌状況に影響することが示唆された。

飼育期間中の平均照度は、全長20mmサイズまでは、1区が68~72 lx、2区が3,324~3,384 lxであった。全長20mm以降では、1区が75~81 lx、2区が3,199~3,447 lx、3区が3,107~3,606 lx、4区が69~76 lxであった。

② 黒化個体の出現状況

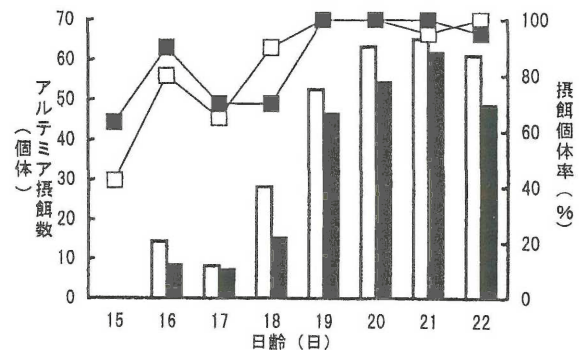
全長20mmサイズの体色正常個体の出現率は1区が

11.0%、2区が4.5%となった。正常率は全般的に低く、黒化面積割合1/2以上の重度な個体と完全黒化の個体も多かった(表Ⅲ-2-1-9, 写真Ⅲ-2-1-1)。また、A部でも同様の傾向がみられた。全長40mmサイズでは、すべての区で黒化の割合が高くなり、正常個体は認められなくなり、黒化面積割合1/2以下の出現率は2区が66.0%、4区が58.0%、3区32.5%および1区20.5%の順となった(表Ⅲ-2-1-10, 写真Ⅲ-2-1-2)。



図Ⅲ-2-1-1 照度の影響におけるワムシ摂取数と摂餌個体率

□明区摂餌数 ■暗区摂餌数 □明区摂餌個体率 ■暗区摂餌個体率



図Ⅲ-2-1-2 照度の影響におけるアルテミア摂取数と摂餌個体率

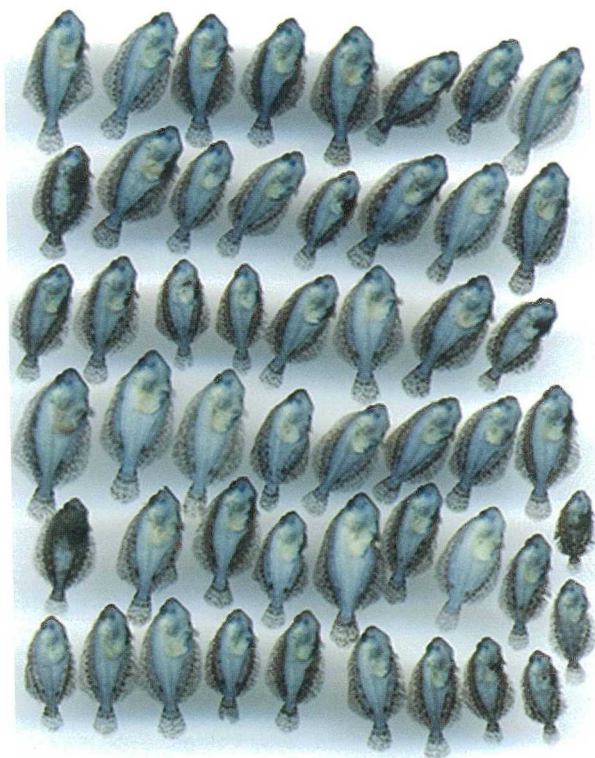
□明区摂餌数 ■暗区摂餌数 □明区摂餌個体率 ■暗区摂餌個体率

表Ⅲ-2-1-9 平成13年度 照度の影響に関する試験の黒化個体の出現状況 (全長20mmサイズ)

試験区	平均全長 (mm)	黒化個体の出現状況 (%)				黒化パターン別の出現状況 (%)									
		正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	A (鰓側+体幹部)					C (頭・胸部)			D (尾柄部)	
						正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1	21.8	11.0	67.5	19.0	2.5	11.5	23.5	41.0	15.5	8.5	43.5	39.5	71.0	53.5	35.0
2	22.5	4.5	87.0	8.0	0.5	4.5	27.5	57.5	10.0	0.5	43.5	18.5	69.0	51.5	22.0



1区 暗条件20mm



2区 明条件20mm

写真Ⅲ-2-1-1 照度の影響に関する試験の黒化個体の出現状況 (全長20mmサイズ)

③ 白化個体の出現状況

白化個体の出現率は全長20mmサイズ、40mmサイズの各試験区ともに0%であった。

④ 脊椎骨異常個体の出現状況

外見上軽度なものがほとんどであったが、出現頻度は浮遊期を明条件で飼育した2区と4区で高い傾向がみられた(表Ⅲ-2-1-11)。ビタミンAの過剰投与による化骨異常が知られていることから、浮遊期にワムシ摂餌量が多かった2区、4区で強化剤由来のビタミンA量が影響した可能性が考えられた。

4) 考察

全長20mmサイズでは、暗条件で飼育した1区の体色正常率が高かったが、重度な黒化も多く、明条件で飼育した2区の方が黒化の度合は低い傾向にあった。平成12年度の全長20mmサイズでも、黒化の度合は明条件で低かったことから、浮遊期飼育の照度条件として黒化発現

を軽減するためには高い照度の方がよいことが示唆された。

全長40mmサイズでは、浮遊期に暗条件で飼育した区では、着底期も暗条件で継続飼育した1区よりも暗条件から明条件に変更した3区の方が黒化発現の度合は軽度であり、着底後高い照度に変えた方が黒化の進行が抑えられた。一方、浮遊期に明条件で飼育した2区、4区では、区間の差がほとんどなく、着底後の照度による影響もみられなかった。平成12年度の試験結果では、着底後に低い照度で飼育すれば黒化が抑えられる可能性が示されたが、本年度は着底後の高照度で黒化が抑えられ、前年度と相反する結果となった。

この2年間の照度試験の結果、浮遊期の照度条件を高くすることで生物飼料の摂餌量の増加、良好な成長と合わせて、黒化発現が軽減されることが示唆された。しかし着底期以降は照度条件以外の他の要因に左右されると考えられた。(竹内 宏行)

表Ⅲ-2-1-10 平成13年度 照度の影響に関する試験の黒化個体の出現状況 (全長40mmサイズ)

試験区	平均全長 (mm)	黒化個体の出現状況 (%)				黒化パターン別の出現状況 (%)									
		正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	A (縁側+体幹部)					C (頭・胸部)			D (尾柄部)	
						正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1	50.1	0	20.5	59.0	20.5	0	3.5	23.5	51.0	22.0	95.0	88.5	98.0	91.5	52.0
2	47.8	0	66.0	34.0	0	0	3.0	69.0	28.0	0	88.0	38.0	92.0	87.0	20.5
3	50.2	0	32.5	58.5	9.0	0	3.5	36.0	51.5	9.0	94.0	72.5	98.0	94.0	48.5
4	49.1	0	58.0	42.0	0	1.0	6.0	59.0	33.5	0.5	93.5	57.5	94.0	85.0	19.5



1区 暗条件40mm



2区 明条件40mm

写真Ⅲ-2-1-2 照度の影響に関する試験の黒化個体の出現状況 (全長40mmサイズ)

表Ⅲ-2-1-11 平成13年度 照度の影響に関する試験の脊椎骨異常個体の出現状況

試験区	異常個体率 (%)	脊椎骨異常の部位別出現状況 (%)		
		癒合	屈曲	その他
1	21.5	21.0	0.5	0
2	28.0	27.5	0.5	0
3	21.5	21.0	0.5	0
4	31.5	31.0	0.5	0

2. 餌料に関する試験

(1) 配合飼料の給餌開始サイズの影響 (小浜事業場)

【平成9年度】

1) 目的

配合飼料の給餌により黒化個体の出現率が増加する傾向があり、配合飼料の適切な使用方法の把握が課題となっている¹⁾。本試験では全長8mmの仔魚（浮遊期，Eステージ）を用いて、配合飼料の給餌開始サイズが黒化個体の出現状況におよぼす影響について検討した。

2) 方法

① 供試魚

供試魚は小浜事業場において生物餌料のみの給餌で飼育している水槽から間引いた日齢16の浮遊期仔魚4.4万尾を使用した。仔魚の平均全長は7.7mmであった。

② 試験区の設定

試験区の設定条件を表Ⅲ-2-2-1に示した。飼育試験は、全長8mmから20mmまでとし、配合飼料の給餌開始時期を平均全長8mmとする区（1区）、全長10mmとする区（2区）、全長12mmとする区（3区）とし、対照区として全長20mmまでを生物餌料のみで飼育する区（4区）の合計4区を設けた。

試験終了後、黒化個体の出現状況を明確にするため全長20mmから40mmまで配合飼料のみで継続飼育した。

③ 飼育方法

飼育には、0.5m²水槽を1試験区に2面を用いた。1水槽に供試魚5,500尾を収容し、全長20mmまでの飼育試験を行った。また、試験終了後、白化個体を除いた種苗を同型的水槽に1水槽当り500尾を収容し、全長40mmまで継続飼育した。

水温は18℃を維持するように調温し、換水量は5～10

回転/日とした。

各試験区とも配合飼料を給餌するまでは、L型ワムシとアルテミアノープリウス（以下、Ar-Nと称す）を併用して給餌した。L型ワムシはナンノクロロブシスで、Ar-Nはマリンオメガ（クロレラ工業製；2.5l/m³）を用いて24時間の栄養強化を行った。

配合飼料の給餌開始時（試験開始時）から10～12日間は配合飼料の餌付け期間とし、Ar-Nと配合飼料を併用給餌した。餌付け期間が終了してから取り揚げるまでは配合飼料のみをほぼ飽食するまで給餌した。試験期間中はX社製配合飼料を使用し、全長20mmからはY社配合飼料を用い継続飼育した。

3) 結果

① 成長と生残

試験は平成9年5月11日から7月7日までの58日間行った。試験期間中の平均水温は20.1℃（17.9～22.5）であった。

試験結果を表Ⅲ-2-2-2に示した。試験区では、生物餌料のみの4区が最も成長が良かった。試験終了後の継続飼育では、各試験区ともほぼ同様の成長を示した。

飼育試験における生残率は4区が86.2%で良く、他の区では44.4～61.8%の範囲にあった。1-2区では、腸管白濁症が発生したため他の試験区よりも低くなった。

試験期間中に腸管白濁症が発生したので、全試験区でニフルスチレン酸ナトリウム（有効濃度5ppm，1時間）の薬浴を3回行った。

② 黒化個体の出現状況

黒化個体の出現状況を表Ⅲ-2-2-3に示した。飼育試験を終了した全長20mmサイズ時点での体色正常個体の出現率は4区（84.0%）>3区（32.5%）>2区（7.5%）>1区（0%）の順に高い値を示した。

配合飼料の給餌開始サイズを大きくすると体色正常個

表Ⅲ-2-2-1 平成9年度 配合飼料の給餌開始サイズの影響に関する試験に設定

試験区	配合飼料給餌開始サイズ	配合飼料への餌付け期間	備考
1	全長8mmサイズ	10日間	配合飼料給餌開始までは生物餌料のみを給餌
2	全長10mmサイズ	10日間	〃
3	全長12mmサイズ	12日間	〃
4	全長20mmサイズ	12日間	〃

表Ⅲ-2-2-2 平成9年度 配合飼料の給餌開始サイズの影響に関する試験の飼育結果

試験区	試験開始			試験開始～全長20mmサイズ			全長20mmサイズ～全長40mmサイズ					
	月日	収容尾数	平均全長 (mm)	月日	生残尾数	平均全長 (mm)	生残率 (%)	月日	収容尾数 ^{*1}	生残尾数	平均全長 (mm)	生残率 (%)
1	5.10	5,500	7.7	6.11	2,444	19.1	44.4	7.7	500	341	42.3	85.3
2	5.10	5,500	9.9	6.11	3,403	19.6	61.8	7.7	500	322	42.9	80.5
3	5.10	5,500	11.8	6.11	3,252	18.3	59.1	7.7	500	291	43.9	72.8
4	5.10	5,500	7.7	6.11	4,742	20.8	86.2	7.7	500	204	43.8	51.0

*1 全長20mmサイズで500尾/槽に飼育密度を調整

体の出現率が高くなった。全長20mmサイズ以降の継続飼育において、全長40mmサイズでの黒化個体出現率は各試験区とも大きな変化はみられず、全長20mmサイズ時点と同様の傾向で推移した。

全長20および全長40mmサイズの黒化パターン別の出現状況を表Ⅲ-2-2-4、Ⅲ-2-2-5に示した。各試験区の体色正常個体の出現率は継続飼育後も各サイズで大きな変化はみられなかったため、黒化パターン別の出現状況について全長40mmサイズで比較した。ヒラメの商品価値に関係が深いとされる縁側と体幹部(A)の平均出現率は1区が98.5%、2区が96.5%、3区が38.5%、4区が29.0%となり、配合飼料を全長10mmから給餌した2区と全長12mmから給餌した3区の間で出現率に大きな差がみられた。頭・胸部(C)および尾柄部(D)の黒化パターン別の出現状況もA部とほぼ同様の傾向が認められた。

③ 白化個体の出現状況

全長20mmサイズにおける白化個体の出現状況を表Ⅲ-2-2-6に示した。全長20mmサイズでの体色正常個体の

出現率では、1区(98.5%)>2区(91.5%)>3区(41.0%)>4区(21.5%)の順に高い値を示した。配合飼料の給餌開始サイズを大きくすると体色正常個体の出現率が低くなり、白化個体の出現率が増加した。黒化個体の出現状況と同様に、配合飼料を全長10mmから給餌した2区と全長12mmから給餌した3区の間で出現率に大きな差がみられた。

④ 脊椎骨異常個体の出現状況

全長40mmサイズにおける脊椎骨異常個体の出現状況を表Ⅲ-2-2-7に示した。全長40mmサイズでの脊椎骨異常個体の出現率は、1区(27.5%)>2区(10.5%)>3区(8.5%)>4区(7.8%)の順に高い値を示した。配合飼料を全長8mmから給餌した1区は腹椎骨の癒合の出現率が10.2%となり、他の区の0.4~1.5%に比べて高かった。

4) 考察

黒化個体出現率は、配合飼料を全長12mmから給餌した3区が全長8mmおよび全長10mmからの給餌に比べて

表Ⅲ-2-2-3 平成9年度 配合飼料の給餌開始サイズの影響に関する試験の黒化個体の出現状況

試験区	全長20mmサイズ (%)				全長40mmサイズ (%)			
	正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化
1-1	0	47.0	51.0	2.0	1.0	33.0	59.0	7.0
1-2	0	51.0	45.0	4.0	1.0	0	81.0	18.0
平均	0	49.0	48.0	3.0	1.0	16.5	70.0	12.5
2-1	3.0	46.0	49.0	2.0	5.0	17.0	65.0	13.0
2-2	12.0	26.0	57.0	5.0	2.0	20.0	65.0	13.0
平均	7.5	36.0	53.0	3.5	3.5	18.5	65.0	13.0
3-1	31.0	66.0	3.0	0	75.0	25.0	0	0
3-2	34.0	66.0	0	0	48.0	52.0	0	0
平均	32.5	66.0	1.5	0	61.5	38.5	0	0
4-1	85.0	15.0	0	0	78.0	22.0	0	0
4-2	83.0	17.0	0	0	64.0	35.0	1.0	0
平均	84.0	16.0	0	0	71.0	28.5	0.5	0

表Ⅲ-2-2-4 平成9年度 配合飼料の給餌開始サイズの影響に関する試験の黒化パターン別の出現状況

試験区	体色正常率 (%)	黒化パターン別の出現状況 (%)									
		A (縁側+体幹部)					C (頭・胸部)			D (尾柄部)	
		正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1-1	0	0	28.0	24.0	25.0	23.0	4.0	50.0	69.0	86.0	74.0
1-2	0	0	19.0	31.0	20.0	30.0	6.0	66.0	88.0	93.0	88.0
平均	0	0	23.5	27.5	22.5	26.5	5.0	58.0	78.5	89.5	81.0
2-1	3.0	0	23.0	25.0	22.0	27.0	7.0	58.0	89.0	84.0	66.0
2-2	12.0	3.0	12.0	21.0	17.0	38.0	8.0	60.0	86.0	78.0	74.0
平均	7.5	1.5	17.5	23.0	19.5	32.5	7.5	59.0	87.5	81.0	70.0
3-1	31.0	31.0	48.0	18.0	3.0	0	0	5.0	34.0	35.0	22.0
3-2	34.0	34.0	58.0	8.0	0	0	0	1.0	42.0	27.0	21.0
平均	32.5	32.5	53.0	13.0	1.5	0	0	3.0	38.0	31.0	21.5
4-1	85.0	85.0	9.0	6.0	0	0	0	0	8.0	8.0	3.0
4-2	83.0	83.0	12.0	5.0	0	0	0	0	11.0	6.0	4.0
平均	84.0	84.0	10.5	5.5	0	0	0	0	9.5	7.0	3.5

表Ⅲ-2-2-5 平成9年度 配合飼料の給餌開始サイズの影響に関する試験の黒化パターン別の出現状況 (全長40mmサイズ)

試験区	体色正常率 (%)	黒化パターン別の出現状況 (%)									
		A (縁側+体幹部)					C (頭・胸部)			D (尾柄部)	
		正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1-1	1.0	2.0	4.0	27.0	32.0	35.0	17.0	62.0	94.0	96.0	78.0
1-2	1.0	1.0	1.0	16.0	25.0	57.0	21.0	86.0	98.0	98.0	97.0
平均	1.0	1.5	2.5	21.5	28.5	46.0	19.0	74.0	96.0	97.0	87.5
2-1	5.0	5.0	6.0	23.0	25.0	41.0	19.0	77.0	88.0	87.0	61.0
2-2	2.0	2.0	14.0	19.0	28.0	37.0	27.0	72.0	93.0	76.0	65.0
平均	3.5	3.5	10.0	21.0	26.5	39.0	23.0	74.5	90.5	86.5	63.0
3-1	75.0	75.0	11.0	10.0	4.0	0	0	0	1.0	6.0	0
3-2	48.0	48.0	21.0	30.0	1.0	0	1.0	0	20.0	28.0	0
平均	61.5	61.5	16.0	20.0	2.5	0	0.5	0	10.5	17.0	0
4-1	78.0	78.0	17.0	5.0	0	0	1.0	0	4.0	9.0	0
4-2	64.0	64.0	11.0	23.0	2.0	0	3.0	0	11.0	10.0	0
平均	71.0	71.0	14.0	14.0	1.0	0	2.0	0	7.5	9.5	0

表Ⅲ-2-2-6 平成9年度 配合飼料の給餌開始サイズの影響に関する試験の白化個体の出現状況

試験区	異常個体率 (%)	白化個体の出現状況 (%)			
		正常	白≤1/2	白>1/2	白化
1-1	2.0	98.0	1.0	1.0	0
1-2	1.0	99.0	0	0	1.0
平均	1.5	98.5	0.5	0.5	0.5
2-1	13.0	87.0	2.0	6.0	5.0
2-2	4.0	96.0	1.0	1.0	2.0
平均	8.5	91.5	1.5	3.5	3.5
3-1	55.0	45.0	40.0	12.0	3.0
3-2	63.0	37.0	36.0	21.0	6.0
平均	59.0	41.0	38.0	16.5	4.5
4-1	78.0	22.0	39.0	36.0	3.0
4-2	79.0	21.0	33.0	34.0	12.0
平均	78.5	21.5	36.0	35.0	7.5

表Ⅲ-2-2-7 平成9年度 配合飼料の給餌開始サイズの影響に関する試験の脊椎骨異常個体の出現状況

試験区	異常個体率 (%)	脊椎骨異常の部位別出現状況 (%)					
		腹椎			尾椎		
		癒合	屈曲	複合	癒合	屈曲	複合
1-1	30.0	11.3	0	4.7	6.6	3.8	3.8
1-2	25.0	9.0	1.0	2.0	4.0	4.0	5.0
平均	27.5	10.2	0.5	3.4	5.3	3.9	4.4
2-1	9.0	0	0	3.0	3.0	3.0	0
2-2	12.0	2.0	0	2.0	7.0	1.0	0
平均	10.5	1.0	0	2.5	5.0	2.0	0
3-1	7.0	2.0	0	0	5.0	0	0
3-2	10.0	1.0	0	1.0	8.0	0	0
平均	8.5	1.5	0	0.5	6.5	0	0
4-1	5.6	0.8	0.4	0	4.4	0	0
4-2	10.0	0	0	2.0	5.0	0	3.0
平均	7.8	0.4	0.2	1.0	4.7	0	1.5

明らかに低い傾向が認められた。このことから配合飼料が黒化の発現を促すサイズは浮遊期であるFステージの全長10mmから12mmの間であり、配合飼料給餌を遅らすことにより黒化出現を軽減できる可能性が示唆された。しかし、これに相反して白化個体出現率は高くなる傾向が認められ、白化個体の出現に関与するサイズも同様にこの範囲にあることが推察された。また、配合飼料の給餌サイズにより白化におよぼす影響が異なる可能性が示唆されている²⁾。今後、全長10mmから全長12mmの間を細分化した試験を行い、黒化個体の出現防除に有効な配合飼料の給餌開始サイズを白化も含めて、より明確にするとともに発現を促す原因について発育面、栄養面等から究明していく必要がある。なお、配合飼料の早期給餌により、脊椎骨異常の出現率が高くなる傾向が認められ、問題となった。

【平成11年度】

1) 目的

平成9年度に配合飼料の給餌開始サイズが黒化個体の出現状況におよぼす影響を検討した結果、配合飼料の給餌が黒化の発現を促すサイズは全長10mmから12mmであると推察された。本試験では、給餌開始サイズをこの範囲でさらに細分化した試験を行い、黒化個体出現におよぼす影響について検討した。同時に配合給餌開始後の生物餌料の併用給餌効果についても併せて検討した。

2) 方法

① 供試魚

供試魚は、小浜事業場で生物餌料のみの給餌で飼育している量産飼育から間引いた日齢18、平均全長8.3mmの浮遊期仔魚を使用した。

2) 試験区の設定

試験区の設定条件を表Ⅲ-2-2-8に示した。飼育試験は全長8mmから全長20mmまでとし、配合飼料の給餌開始時期を平均全長10mmとする区(1区)、平均全長11mmとする区(2区)、平均全長12mmとする区(3区)とした。また生物餌料を併用給餌する区として、配合飼料給餌開始サイズが平均全長11mmでAr-Nを平均全長11mmから15mmまでの間併用給餌する区(4区)、平均全長11mmから20mmまで併用給餌する区(5区)、およびAr-Nを平均全長11mmから15mmまで併用し、その後

養成アルテミア(以下養成Arと称す)を全長20mmまで併用給餌する区(6区)の合計6区を設け、上記の2区を対照区とした。

試験終了後、黒化個体の出現状況を明確にするため全長20mmから全長40mmまで配合飼料のみで継続飼育した。

3) 飼育方法

飼育には、0.5m²水槽を1試験区に2面を用いた。1水槽に供試魚を比色法により5,500尾になるように収容し、全長20mmまで飼育した。また、試験終了後、白化個体を除いた種苗を同型的水槽に1水槽当たり570尾を収容し、全長40mmまで継続飼育した。

水温は平均全長20mmまでは18℃に調温し、その後は自然水温とした。換水量は3~15回転/日とした。全長20mm以降の飼育では底面に底質浄化材(ミクロスセラミック:以下MSと称す、ノーラ社)を1cmの厚さになるように敷いた。

各試験区とも配合飼料を給餌開始するまではAr-N単独給餌とした。配合飼料の給餌開始時から3日間は配合飼料の餌付け期間とし、Ar-Nと配合飼料を併用給餌した。Ar-N単独給餌期間中は1日1水槽当たり100万個体(約200個体/尾)、配合飼料との併用期間は50万個体(100~140個体/尾)を1日2回に分けて給餌した。養成Arは1水槽当たり1日に5万個体(約13個体/尾)を給餌した。配合飼料は全長20mmまでの試験期間中は1日当り魚体重の5~10%を目安に1~1.5時間ごとに手撒きで、全長20mm以降は魚体重の4%を目安に1.5~2.0時間ごとに自動給餌器を用いて給餌した。Ar-NはパワッシュA(理研ビタミン工業製、75ml/m²)を用いて17時間の栄養強化を行った。養成ArはマリンオメガA(日清サイエンス社、4時間強化2l/m²)で栄養強化後に冷凍保存した。全長20mmまでの試験期間中はX社製配合飼料を使用し、全長20mmからの継続飼育ではY社製配合飼料を使用した。

4) 結果

① 成長と生残

試験は平成11年5月21日から7月16日までの57日間であった。

配合飼料給餌開始時の平均全長と発育ステージを表Ⅲ-2-2-9に示した。平均全長は1区が9.7mm、2区、4

表Ⅲ-2-2-8 平成11年度 配合飼料の給餌開始サイズの影響に関する試験の設定

試験区	配合飼料 給餌開始サイズ	生物餌料の併用給餌期間		備考
		Ar-N	養成Ar	
1	全長10mmサイズ	-	-	配合飼料単独給餌
2	全長11mmサイズ	-	-	〃
3	全長12mmサイズ	-	-	〃
4	全長11mmサイズ	全長11~15mm	-	生物餌料併用
5	〃	全長11~20mm	-	〃
6	〃	全長11~15mm	全長15~20mm	〃

区, 5区および6区が10.3~10.7mm, 3区が11.5mmで, 主な発育ステージは1区がF, 2区, 4区, 5区, 6区がFとG, 3区がGとHであった。各区の平均水温は全長20mmまでは18.2~18.5℃, それ以降は21.1~21.5℃であった。水槽表面の照度は2,000~6,000 lxの範囲であった。

試験結果を表Ⅲ-2-2-10に示した。試験終了時の各区の平均全長は18.9~20.7mm, 継続飼育終了時の各区の平均全長は54.9~58.5mmとなり, 試験区間に大きい差はなかった。試験終了時の平均生残率は1区が56.0%, その他の区が72.0~79.0%となり, 1区は配合飼料の給餌開始直後の減耗が他の区に比べてやや大きかった。継続飼育では粘液状物質の発生により, 4区の1例で生残率が31.4%となり, 5区の1例では全滅した。他の水槽の生残率は76.0~95.3%の範囲にあり大きい減耗はなかった。

② 黒化個体の出現状況

配合飼料給餌時期の検討 黒化個体の出現状況を表Ⅲ-2-2-11に示した。全長20mmサイズでの体色正常個体の出現率は3区(29.5%)>2区(22.5%)>1区(1.9%)の順に高い値を示し, 配合飼料給餌開始サイズが大きい区ほど体色正常個体の出現率が高く, 1区と2区間で差が大きい傾向がみられた。全長40mmになると1区と2区間での差は少なくなった。一方, 重度の黒化(黒化>1/2)の出現率はいずれのサイズでも1区>2区>3区

の順に高くなった。

全長20mmおよび全長40mmサイズでの黒化パターン別の出現状況を表Ⅲ-2-2-12, 表Ⅲ-2-2-13に示した。

全長20mmサイズのA部の平均正常個体の出現率では3区(41.2%)>2区(35.2%)>1区(2.5%)の順に高くなった。同様にC1, C2, C3とDの出現状況も給餌開始サイズが大きいほど低くなった。その内C1とDではAと同様1区と2区の間に大きい差がみられた。全長40mmサイズでも全体に黒化の異常の度が増加したが, おおむね全長20mmサイズと同様の傾向が認められた。

生物餌料の併用効果の検討 全長20mmサイズでの正常率は, 4区(33%)>5区(29%)>2区(23%)>6区(22%)の順位となり, 4区と5区の体色正常個体の出現率がやや2区に比べて高かった。黒化面積割合1/2以上の個体の出現率は2区(24%)>6区(6%)>4区(5%)=5区(5%)の順に高い値となり, 生物餌料を併用給餌した区が配合給餌区に比べて低かった。全長40mmサイズでも同様に生物餌料併用給餌区の体色正常個体の出現率が高くなった。特に5区と6区は成長に伴い体色正常個体の出現率が低下する傾向がみられた。一方4区では低下の度合いが少なくなった。

黒化パターン別の出現状況でも生物餌料給餌区が全長20mmサイズではA2+とA3+, C1, C2, D1の出現率が配合給餌の1区から3区に比べて低かった。この傾向は成長しても同様であった。

表Ⅲ-2-2-9 平成11年度 配合飼料の給餌開始サイズの影響に関する試験の配合飼料給餌開始時の全長と発育ステージ

試験区	日齢 (日)	全長 (mm)		発育ステージ別出現個体の割合 (%)						平均ステージ ^{*2}	
		平均	(範囲)	D (4) ^{*1}	E (5)	F (6)	G (7)	H (8)	I (9)		
1-1	22	9.7	(8.2~11.1)		14	86					5.9
1-2	22	9.6	(7.6~10.8)		17	83					5.8
平均		9.7			15.5	84.5					5.8
2-1	30	10.5	(8.1~12.7)		2	48	50				6.5
2-2	30	10.1	(6.5~12.1)			53	47				6.5
平均		10.3			2.0	50.5	48.5				6.5
3-1	33	11.2	(8.5~13.1)			27	25	48			7.2
3-2	33	11.8	(9.5~14.0)			7	45	44	4		7.5
平均		11.5				17.0	35.0	46	4		7.3
4-1	30	10.5	(7.7~13.1)	1	2	57	40				6.4
4-2	30	10.9	(7.6~13.1)		1	29	70				6.7
平均		10.7		1.0	1.5	43.0	55.0				6.5
5-1	30	10.3	(8.3~12.0)			54	46				6.5
5-2	30	10.6	(8.5~13.0)			40	60				6.6
平均		10.5				47.0	53.0				6.5
6-1	30	10.4	(7.7~12.9)			52	48				6.5
6-2	30	10.2	(7.7~12.4)		1	51	48				6.5
平均		10.3			1	51.5	48.0				6.5

*1 () 内の数字は平均発育ステージを算出するために各ステージに便宜的に与えた数字

*2 発育ステージ毎の個体数組成により算出した上記数値の平均値

③ 白化個体の出現状況

全長20mmサイズにおける各試験区の体色正常個体の出現率は89.0～96.5%の範囲にあり、全体に正常率が高く、区間の差は少なかった(表Ⅲ-2-2-14)。配合飼料の給餌開始時期が最も早かった1区が96.5%と高く、全長20mmサイズまで Ar-N を併用給餌した5区が89.0%と

低かった。

④ 脊椎骨異常個体の出現状況

全長40mmサイズにおける脊椎骨異常個体の出現率を表Ⅲ-2-2-15に示した。1区(46.7%)>2区(31.0%)>3区(27.9%)の順に高い値を示し、全長10mm区で配合飼料の給餌を開始した1区の異常率が高くなる傾向

表Ⅲ-2-2-10 平成11年度 配合飼料の給餌開始サイズの影響に関する試験の飼育結果

試験区	試験開始			試験開始から全長20mmサイズ			全長20mmサイズ～全長40mmサイズ					
	月日	収容尾数 (尾)	平均全長 (mm)	月日	全長 (mm)		生残率 (%)	月日	収容尾数 ^{*1} (尾)	全長 (mm)		生残率 (%)
					平均	範囲				平均	範囲	
1-1	5.21	5,500	8.3	6.21	20.7	(13.1~28.6)	52.8	7.16	570	56.2	(40.0~73.0)	79.4
1-2	5.21	5,500	8.3	6.21	20.6	(15.8~31.3)	59.0	7.16	570	57.3	(42.0~73.0)	89.7
平均					20.7		55.9			56.8		84.6
2-1	5.21	5,500	8.3	6.21	20.5	(15.4~30.2)	71.1	7.16	570	53.1	(40.0~66.0)	76.0
2-2	5.21	5,500	8.3	6.21	19.7	(15.1~27.5)	73.3	7.16	570	56.7	(42.0~72.0)	88.6
平均					20.1		72.2			54.9		82.3
3-1	5.21	5,500	8.3	6.21	18.3	(15.1~27.0)	73.0	7.16	570	57.4	(44.0~71.0)	90.9
3-2	5.21	5,500	8.3	6.21	21.3	(15.1~30.4)	82.1	7.16	570	57.4	(39.0~72.0)	92.3
平均					19.8		77.6			57.4		91.6
4-1	5.21	5,500	8.3	6.21	20.0	(16.8~29.3)	70.3	7.16	570	59.0	(41.0~73.0)	31.4
4-2	5.21	5,500	8.3	6.21	20.7	(15.6~28.8)	83.3	7.16	570	58.0	(45.0~70.0)	95.3
平均					20.4		76.8			58.5		63.3
5-1	5.21	5,500	8.3	6.21	19.9	(16.5~25.7)	74.3		570			0
5-2	5.21	5,500	8.3	6.21	20.9	(15.3~29.7)	84.7	7.16	570	57.5	(44.0~79.0)	94.8
平均					20.4		79.5					
6-1	5.21	5,500	8.3	6.21	19.6	(15.6~26.9)	77.0	7.16	570	56.2	(43.0~71.0)	94.6
6-2	5.21	5,500	8.3	6.21	18.2	(13.0~26.1)	77.9	7.16	570	56.5	(41.0~70.0)	96.2
平均					18.9		77.5			56.4		95.4

*1 全長20mmサイズで570尾/槽に飼育密度を調整

表Ⅲ-2-2-11 平成11年度 配合飼料の給餌開始サイズの影響に関する試験の黒化個体の出現状況

試験区	全長20mmサイズ (%)				全長40mmサイズ (%)			
	正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化
1-1	1.0	69.0	30.0	0	2.0	60.0	36.0	2.0
1-2	3.0	67.0	30.0	0	1.0	52.0	41.0	6.0
平均	2.0	68.0	30.0	0	1.5	56.0	38.5	4.0
2-1	19.0	60.0	21.0	0	14.0	61.0	23.0	2.0
2-2	26.0	47.0	27.0	0	5.0	60.0	31.0	4.0
平均	22.5	53.5	24.0	0	9.5	60.5	27.0	3.0
3-1	26.0	56.0	18.0	0	8.0	83.0	9.0	0
3-2	33.0	53.0	14.0	0	7.0	66.0	27.0	0
平均	29.5	54.5	16.0	0	7.5	74.5	18.0	0
4-1	23.0	74.2	2.8	0	29.0	71.0	0.0	0
4-2	42.0	50.0	8.0	0	15.0	81.0	4.0	0
平均	32.5	62.1	5.4	0	22.0	76.0	2.0	0
5-1	32.0	62.0	6.0	0				
5-2	26.0	70.0	4.0	0	7.0	88.0	4.0	1.0
平均	29.0	66.0	5.0	0	7.0	88.0	4.0	1.0
6-1	27.0	68.0	5.0	0	10.0	80.0	10.0	0
6-2	16.0	77.0	7.0	0	4.0	80.0	15.0	1.0
平均	21.5	72.5	6.0	0	7.0	80.0	12.5	0.5

がみられた。生物餌料を併用給餌した区間の異常率には大きな差はみられなかった。全長10mmで配合飼料の給餌を開始した1区では他の区に比べて腹椎骨癒合の発生率が高くなった。

5) 考 察

配合飼料の給餌開始サイズは全長10mmサイズ、全長11mmサイズ、全長12mmサイズの中ではサイズが大きいほど黒化個体の出現率が低くなる傾向がみられ、全長

表Ⅲ-2-2-12 平成11年度 配合飼料の給餌開始サイズの影響に関する試験の黒化パターン別の出現状況(全長20mmサイズ)

試験区	黒化パターン別の出現状況 (%)									
	A (縁側+体幹部)					C (頭・胸部)			D (尾柄部)	
	正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1-1	1.0	25.0	41.0	29.0	4.0	27.0	46.0	86.0	76.0	0
1-2	4.0	29.0	31.0	32.0	4.0	24.0	45.0	93.0	68.0	0
平均	2.5	27.0	36.0	30.5	4.0	25.5	45.5	89.5	72.0	0
2-1	35.4	28.3	15.2	16.2	5.1	11.0	32.0	70.0	27.6	0
2-2	35.0	23.0	13.0	25.0	4.0	8.0	37.0	66.0	43.0	0
平均	35.2	25.6	14.1	20.6	4.5	9.5	34.5	68.0	35.3	0
3-1	44.4	23.2	13.1	17.2	2.0	6.0	34.0	72.0	27.3	0
3-2	38.0	24.0	19.0	16.0	3.0	6.0	23.0	53.0	28.0	0
平均	41.2	23.6	16.1	16.6	2.5	6.0	28.5	62.5	27.6	0
4-1	53.0	30.0	7.0	10.0	0.0	1.0	18.0	72.0	27.0	1.0
4-2	54.0	24.0	5.0	13.0	4.0	11.0	17.0	52.0	22.0	1.0
平均	53.5	27.0	6.0	11.5	2.0	6.0	17.5	62.0	24.5	1.0
5-1	57.0	23.0	12.0	8.0	0	2.0	14.0	75.0	19.0	3.0
5-2	34.0	42.0	14.0	10.0	0	2.0	9.0	60.0	16.0	3.0
平均	45.5	32.5	13.0	9.0	0	2.0	11.5	67.5	17.5	3.0
6-1	55.0	29.0	11.0	5.0	0	4.0	14.0	74.0	24.0	0
6-2	37.0	24.0	21.0	16.0	2.0	3.0	20.0	77.0	37.0	1.0
平均	46.0	26.5	16.0	10.5	1.0	3.5	17.0	75.5	30.5	0.5

表Ⅲ-2-2-13 平成11年度 配合飼料の給餌開始サイズの影響に関する試験の黒化パターン別の出現状況(全長40mmサイズ)

試験区	黒化パターン別の出現状況 (%)									
	A (縁側+体幹部)					C (頭・胸部)			D (尾柄部)	
	正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1-1	3.0	1.0	31.0	43.0	22.0	34.0	66.0	88.0	82.0	1.0
1-2	1.0	9.0	19.0	55.0	16.0	39.0	76.0	94.0	85.0	0
平均	2.0	5.0	25.0	49.0	19.0	36.5	71.0	91.0	83.5	0.5
2-1	14.0	23.0	28.0	25.0	10.0	19.0	44.0	76.0	34.0	1.0
2-2	6.0	12.0	35.0	37.0	10.0	35.0	68.0	86.0	51.0	0
平均	10.0	17.5	31.5	31.0	10.0	27.0	56.0	81.0	42.5	0.5
3-1	14.0	33.0	29.0	21.0	3.0	20.0	53.0	77.0	21.0	1.0
3-2	24.0	21.0	26.0	23.0	6.0	41.0	65.0	67.0	22.0	0.0
平均	19.0	27.0	27.5	22.0	4.5	30.5	59.0	72.0	21.5	0.5
4-1	29.0	36.0	26.0	6.0	3.0	18.0	38.0	55.0	14.0	2.0
4-2	27.0	39.0	24.0	10.0	0	20.0	39.0	66.0	16.0	0
平均	28.0	37.5	25.0	8.0	1.5	19.0	38.5	60.5	15.0	1.0
5-1										
5-2	13.0	40.0	31.0	15.0	1.0	24.0	55.0	82.0	23.0	0
平均										
6-1	26.0	26.0	30.0	17.0	1.0	29.0	47.0	77.0	19.0	0
6-2	13.0	33.0	29.0	23.0	2.0	26.0	56.0	74.0	34.0	0
平均	19.5	29.5	29.5	20.0	1.5	27.5	51.5	75.5	26.5	0

10mmサイズと全長11mmサイズでその差は大きく、全長11mmと全長12mmで小さかった。

各区の試験開始サイズの間隔が短いため、全長組成、発育ステージに重なりがみられたことから、福山大学伏見浩教授の指導・助言を受けて配合飼料の給餌開始時点の平均全長および平均発育ステージと黒化個体の出現率の関係について解析を試みた。

各水槽の配合飼料給餌開始サイズと全長20mmサイズでのAパターンの正常率について2次の回帰式を求めると、 $y = -2368.5 + 434.8x - 19.6x^2$ 、 $r = 0.921$ となり、平均全長11.1mmに変曲点がみられた(図Ⅲ-2-2-1)。この式ではピーク後に正常値が少し下がるが、その後のデータがないのでその傾きには意味はなく、その後はおそらく並行に推移すると考えられた。

表Ⅲ-2-2-14 平成11年度 配合飼料の給餌サイズに関する試験の白化個体の出現状況

試験区	異常個体率 (%)	白化個体の出現状況 (%)			
		正常	白 \leq 1/2	白 $>$ 1/2	白化
1-1	3.0	97.0	0	3.0	0
1-2	4.0	96.0	4.0	0.0	0
平均	3.5	96.5	2.0	1.5	0
2-1	7.0	93.0	0.0	7.0	0
2-2	9.0	91.0	3.0	6.0	0
平均	8.0	92.0	1.5	6.5	0
3-1	4.0	96.0	2.0	2.0	0
3-2	8.0	92.0	2.0	6.0	0
平均	6.0	94.0	2.0	4.0	0
4-1	6.0	94.0	0.0	6.0	0
4-2	8.0	92.0	0.0	8.0	0
平均	7.0	93.0	0.0	7.0	0
5-1	9.0	91.0	1.0	8.0	0
5-2	13.0	87.0	2.0	11.0	0
平均	11.0	89.0	1.5	9.5	0
6-1	2.0	98.0	2.0	0.0	0
6-2	7.0	93.0	1.0	6.0	0
平均	4.5	95.5	1.5	3.0	0

表Ⅲ-2-2-15 平成11年度 配合飼料の給餌サイズに関する試験の脊椎骨異常の出現状況

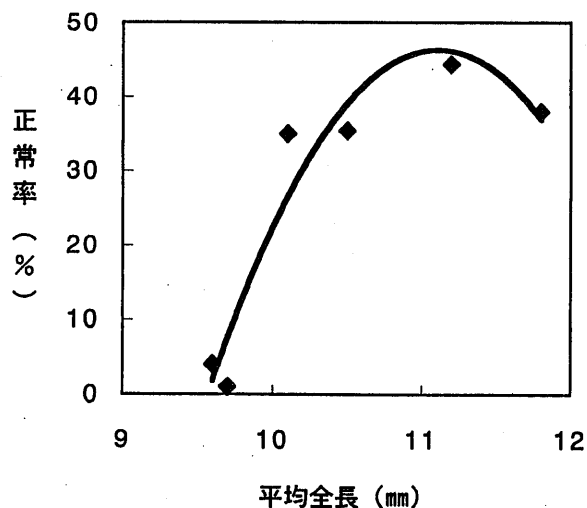
試験区	異常個体率 (%)	脊椎骨異常の部位別出現状況 (%)			
		腹椎		尾椎	
		癒合	屈曲	癒合	屈曲
1-1	43.4	21.2	6.1	27.3	3.0
1-2	50.0	27.0	6.0	25.0	8.0
平均	46.7	24.1	6.0	26.1	5.5
2-1	43.0	9.0	1.0	38.0	2.0
2-2	19.0	6.0	0	14.0	2.0
平均	31.0	7.5	0.5	26.0	2.0
3-1	27.0	2.0	0	27.0	0.0
3-2	28.9	4.1	0	22.7	3.1
平均	27.9	3.1	0	24.8	1.5
4-1	35.4	14.6	0	27.1	2.1
4-2	34.7	14.3	0	26.5	2.0
平均	35.1	14.4	0	26.8	2.1
5-1					
5-2	35.7	8.2	0	30.6	4.1
平均	35.7	8.2	0	30.6	4.1
6-1	32.0	9.0	0	28.0	1.0
6-2	34.3	9.1	1.0	31.3	2.0
平均	33.2	9.0	0.5	29.7	1.5

次に発育ステージと全長の関係を求めた。平均ステージは発育ステージA～Iに順にそれぞれ1～9の値を与え、飼育開始時のステージ毎の個体数組成から平均ステージを算出した。その結果、平均全長と平均ステージの関係は $y = 2.151 + 1.272x$, $r = 0.961$ となり (図Ⅲ-2-2-2), 発育ステージF, G, Hに対応する全長はそれぞれ9.8mm, 11.1mm, 12.5mmとなることが示された。これらの解析結果から黒化個体の出現率を下げるためには、配合飼料の給餌開始サイズを全長11mm, Gステージにすることが有効であると推測された。

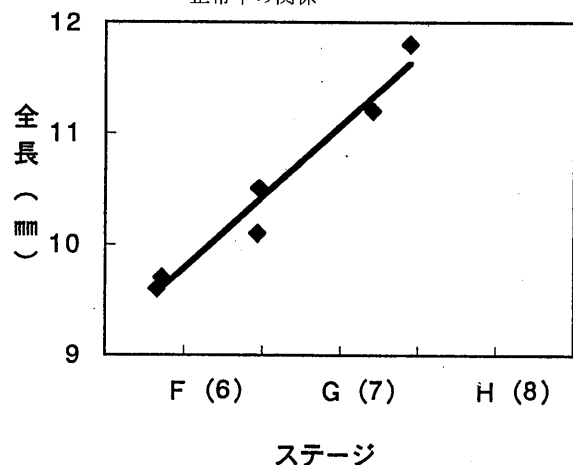
生物餌料の併用効果の検討では4区の体色正常率が最も高かったことから、生物餌料の併用期間は全長15mmまでと推測された。

白化については、平成9年度の全長12mm区 (給餌開始サイズ全長11.8mm) の白化個体率が59%と高かったのに対し、今年度の全長12mm区 (給餌開始サイズ全長11.5mm) の白化個体出現率は6.0%と低かった。この原因は不明であるが、両者のサイズの違い、配合飼料給餌開始までに使用した生物餌料の栄養条件の違い、全長と発育ステージの関係の違い等が関与した可能性が考えられた。

以上の結果から、配合飼料の給餌開始時期を平均全長



図Ⅲ-2-2-1 配合飼料給餌開始サイズとAパターン正常率の関係



図Ⅲ-2-2-2 全長と発育ステージの関係

11mm (発育ステージG) とし、さらに Ar-N を全長15mmまで併用することで、黒化個体の出現を防除する効果が高いと考えられた。

引用文献

- 1) 高橋庸一. ヒラメ稚魚の無眼側の体色異常におよぼす飼育密度と飼餌料の影響. 日本水産学会誌; 60 (5): 593-598 (1994).
- 2) 北島力, 林田豪介, 下崎真澄, 渡邊武. 人工採苗ヒラメの体色異常出現に対する微粒子飼料の抑制効果. 長崎県水産試験場研究報告; 11: 29-35 (1985).
(小金隆之)

(2) 配合飼料のビタミンD添加の影響 (伯方島事業場)

【平成9年度】

1) 目的

配合飼料に含まれるビタミンD (以下VDと略称) の多寡が黒化個体の出現におよぼす影響について検討した。

2) 方法

① 供試魚

供試魚は平均全長10.5mm (日齢25, Fステージ) まで50㎡水槽で生物餌料のみで飼育した仔魚を用いた。

② 試験区の設定

試験飼料はX社製飼料を基本に100g当りVD含有量を0IU, 1,000IUおよび20,000IU含有したものを製造し、試験に供した。試験区は、VD含有量を0IUとする区 (1区), VD含有量を1,000IUとする区 (2区) およびVD含有量を20,000IUとする区 (3区) とした。その他にX社製に市販飼料を給餌する区 (4区), Y社製市販飼料を給餌する区 (5区) の合計5区を設定した。水槽数は各試験区2面ずつとした (表Ⅲ-2-2-16)。

③ 飼育方法

試験水槽には0.5㎡水槽10面を用い、1面につき2,500尾ずつを収容した。平均全長20mmで一度取り上げて白化個体およびサイズの選別を行い、1水槽当り600尾に密度調整したのちに、全長40mmサイズまで飼育を継続した。全長20mmから取り揚げまでに給餌した配合飼料は全水槽とも1区の試験飼料を使用した。

飼育水は紫外線殺菌処理海水を用い、水温は17.0～18.0℃に加温した。換水量は5～10回転/日の流水飼育とした。また、通気はエアーストンを1個垂下して行った。試験飼料および市販飼料のVD含有量の分析は (財) 日本食品分析センターで行った。

3) 結果

① 成長と生残

5-1区では試験開始後から水槽中に粘液状物質の発生による死亡がみられ、平均全長20mmの生残率は31.4%まで低下した。しかし他の試験区では順調に推移し、生

残率は77.9~94.2%と試験区間で顕著な差は認められなかった。また全長20mm以降の飼育でも順調に推移して、全長40mmサイズの生残率は71.3~85.7%であった(表Ⅲ-2-2-17)。

② 黒化個体の出現状況

全長20mmサイズ 体色正常個体の出現率は1区で

42.0%, 2区で37.0%, 3区が41.0%, 4区が67.0%, 5区が95.0%であり, X社試験飼料を用いた1区~3区ではVDの含有量に関らず体色正常率はほぼ同じ程度で、4区はやや前者よりも良好であった。5区が最も体色正常個体の出現率が高く、その黒化出現度は他の区に比べて軽度であった(表Ⅲ-2-2-18)。

表Ⅲ-2-2-16 平成9年度 配合飼料のVD添加の影響に関する試験の設定

試験区	試験開始~全長20mmサイズ		全長20mmサイズ~全長40mmサイズ	
	配合飼料の種類	VD含有量 (IU/100g)	配合飼料の種類	VD含有量 (IU/100g)
1	X社試験配合飼料	0	X社試験配合飼料	0
2	X社試験配合飼料	1,000	X社試験配合飼料	0
3	X社試験配合飼料	20,000	X社試験配合飼料	0
4	X社市販配合飼料	-	X社試験配合飼料	0
5	Y社市販配合飼料	-	X社試験配合飼料	0

表Ⅲ-2-2-17 平成9年度 配合飼料のVD添加の影響に関する試験の飼育結果

試験区	試験開始		試験開始~全長20mmサイズ				全長20mmサイズ~全長40mmサイズ					
	月日	収容尾数 (尾)	平均全長 (mm)	月日	生残尾数 (尾)	平均全長 (mm)	生残率 (%)	月日	収容尾数* (尾)	生残尾数	平均全長 (mm)	生残率 (%)
1-1	4.24	2,500	10.5	5.21	2,255	22.5	90.2	6.10	600	496	44.7	82.6
1-2	4.24	2,500	10.5	5.21	2,308	22.7	92.3	6.10	600	488	44.7	81.3
2-1	4.24	2,500	10.5	5.21	2,168	22.8	86.7	6.10	600	476	46.0	79.4
2-2	4.24	2,500	10.5	5.21	2,205	22.1	88.2	6.10	600	467	45.8	77.8
3-1	4.24	2,500	10.5	5.21	2,175	21.6	87.0	6.10	600	514	43.7	85.7
3-2	4.24	2,500	10.5	5.21	2,230	22.1	89.2	6.10	600	475	45.0	79.2
4-1	4.24	2,500	10.5	5.21	2,355	23.3	94.2	6.10	600	475	43.3	79.1
4-2	4.24	2,500	10.5	5.21	2,168	22.3	86.7	6.10	600	445	44.4	74.2
5-1	4.24	2,500	10.5	5.21	785	20.6	31.4	6.10	600	442	46.4	73.6
5-2	4.24	2,500	10.5	5.21	1,948	20.7	77.9	6.10	600	428	46.2	71.4

* 全長20mmサイズで600尾/槽に飼育密度を調整

表Ⅲ-2-2-18 平成9年度 配合飼料のVD添加の影響に関する試験の黒化個体の出現状況 (全長20mmサイズ)

試験区	黒化個体の出現状況 (%)				黒化パターン別の出現状況 (%)									
	正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	A (縁側+体幹部)				C (頭・胸部)			D (尾柄部)		
					±	+	2+	3+	1	2	3	1	2	
1-1	47.0	46.0	7.0	0	20.0	19.0	6.0	2.0	10.0	9.0	31.0	29.0	14.0	
1-2	37.0	59.0	4.0	0	37.0	18.0	5.0	0	9.0	10.0	30.0	25.0	9.0	
平均	42.0	52.5	5.5	0	28.5	18.5	5.5	1.0	9.5	9.5	30.5	27.0	11.5	
2-1	31.0	58.0	10.0	1.0	21.0	22.0	12.0	4.0	16.0	28.0	48.0	41.0	21.0	
2-2	43.0	47.0	10.0	0	21.0	18.0	11.0	0	12.0	19.0	46.0	42.0	20.0	
平均	37.0	52.5	10.0	0.5	21.0	20.0	11.5	2.0	14.0	23.5	47.0	41.5	20.5	
3-1	36.0	56.0	8.0	0	36.0	16.0	7.0	2.0	6.0	11.0	34.0	23.0	12.0	
3-2	46.0	53.0	1.0	0	28.0	18.0	3.0	0	6.0	8.0	30.0	17.0	7.0	
平均	41.0	54.5	4.5	0	32.0	17.0	5.0	1.0	6.0	9.5	32.0	20.0	9.5	
4-1	66.0	29.0	5.0	0	19.0	7.0	6.0	0	1.0	5.0	15.0	15.0	8.0	
4-2	68.0	32.0	0	0	22.0	6.0	0	0	1.0	0	14.0	11.0	4.0	
平均	67.0	30.5	2.5	0	20.5	6.5	3.0	0	1.0	2.5	14.5	13.0	6.0	
5-1	97.0	3.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.0	0	
5-2	93.0	7.0	0	0	2.0	0	0	0	0	0	3.0	5.0	1.0	
平均	95.0	5.0	0	0	1.0	0	0	0	0	0	1.5	4.0	0.5	

全長30mmサイズ 体色正常個体の出現率は1区が5.0%，2区が2.5%，3区が0.5%，4区が3.5%および5区が13.5%と全般的に全長20mmサイズに比べ大幅に低下した。また，黒化パターン別の出現状況ではA部でA+，C部，D部の割合が高くなり，黒化出現度合が徐々に軽度な状態から拡大していく傾向が見られた。5区を除いて完全黒化個体が出現した（表Ⅲ-2-2-19）。

全長40mmサイズ 体色正常個体はほとんど見られず，黒化面積割合1/2以下の出現率が1区81.0%，2区67.5%，3区62.5%，4区と5区が90.0%で，黒化面積割合1/2以上の出現率は1区17.5%，2区32.0%，3区37.5%となり，

全体的に全長30mmサイズよりもさらに黒化面積の拡大が認められた。全長20mmまでの試験飼料を使用した1区から3区を比較すると黒化面積が2，3区に比べて1区がやや軽微な傾向が認められた（表Ⅲ-2-2-20）。

③ 白化個体の出現状況

白化個体の出現率は3~7%であり，いずれの試験区でも出現率は低く，試験区間で顕著な差は認められなかった。また，完全白化個体は観察されなかった（表Ⅲ-2-2-21）。

④ 脊椎骨異常個体の出現状況

脊椎骨異常個体の出現率は5区が48%と最も高かった

表Ⅲ-2-2-19 平成9年度 配合飼料のVD添加の影響に関する試験の黒化個体の出現状況（全長30mmサイズ）

試験区	黒化個体の出現状況 (%)				黒化パターン別の出現状況 (%)									
	正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	A (縁側+体幹部)					C (頭・胸部)			D (尾柄部)	
					正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1-1	6.0	85.0	9.0	0	10.0	39.0	42.0	7.0	2.0	20.0	21.0	75.0	73.0	16.0
1-2	4.0	84.0	11.0	1.0	11.0	41.0	35.0	12.0	1.0	24.0	18.0	79.0	81.0	14.0
平均	5.0	84.5	10.0	0.5	10.5	40.0	38.5	9.5	1.5	22.0	19.5	77.0	77.0	15.0
2-1	2.0	69.0	24.0	5.0	2.0	29.0	38.0	22.0	9.0	35.0	48.0	80.0	76.0	41.0
2-2	3.0	85.0	11.0	1.0	6.0	34.0	46.0	12.0	2.0	18.0	36.0	85.0	61.0	30.0
平均	2.5	77.0	17.5	3.0	4.0	31.5	42.0	17.0	5.5	26.5	42.0	82.5	68.5	35.5
3-1	0	76.0	19.0	5.0	1.0	24.0	48.0	16.0	11.0	23.0	40.0	85.0	59.0	22.0
3-2	1.0	81.0	17.0	1.0	1.0	28.0	49.0	19.0	3.0	34.0	37.0	87.0	84.0	29.0
平均	0.5	78.5	18.0	3.0	1.0	26.0	48.5	17.5	7.0	28.5	38.5	86.0	71.5	25.5
4-1	2.0	91.0	5.0	2.0	6.0	55.0	32.0	5.0	2.0	17.0	10.0	77.0	79.0	8.0
4-2	5.0	94.0	1.0	0	10.0	56.0	34.0	0	0	8.0	8.0	74.0	65.0	5.0
平均	3.5	92.5	3.0	1.0	8.0	55.5	33.0	2.5	1.0	12.5	9.0	75.5	72.0	6.5
5-1	15.0	85.0	0	0	25.0	56.0	19.0	0	0	13.0	2.0	44.0	43.0	3.0
5-2	12.0	85.0	3.0	0	20.0	47.0	31.0	2.0	0	21.0	11.0	57.0	40.0	4.0
平均	13.5	85.0	1.5	0	22.5	51.5	25.0	1.0	0	17.0	6.5	50.5	41.5	3.5

表Ⅲ-2-2-20 平成9年度 配合飼料のVD添加の影響に関する試験の黒化個体の出現状況（全長40mmサイズ）

試験区	黒化個体の出現状況 (%)				黒化パターン別の出現状況 (%)									
	正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	A (縁側+体幹部)					C (頭・胸部)			D (尾柄部)	
					正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1-1	2.0	77.0	19.0	2.0	9.0	26.0	47.0	16.0	2.0	45.0	45.0	81.0	93.0	19.0
1-2	1.0	85.0	13.0	1.0	10.0	33.0	39.0	17.0	1.0	47.0	30.0	83.0	97.0	21.0
平均	1.5	81.0	16.0	1.5	9.5	29.5	43.0	16.5	1.5	46.0	37.5	82.0	95.0	20.0
2-1	0	56.0	37.0	7.0	0	14.0	37.0	37.0	12.0	79.0	67.0	95.0	100	39.0
2-2	1.0	79.0	18.0	2.0	6.0	18.0	52.0	21.0	3.0	73.0	50.0	90.0	95.0	30.0
平均	0.5	67.5	27.5	4.5	3.0	16.0	44.5	29.0	7.5	76.0	58.5	92.5	97.5	34.5
3-1	0	59.0	35.0	6.0	3.0	12.0	36.0	41.0	8.0	77.0	56.0	97.0	100	38.0
3-2	0	66.0	30.0	4.0	1.0	13.0	48.0	34.0	4.0	80.0	58.0	89.0	98.0	34.0
平均	0.0	62.5	32.5	5.0	2.0	12.5	42.0	37.5	6.0	78.5	57.0	93.0	99.0	36.0
4-1	1.0	92.0	7.0	0	10.0	39.0	44.0	7.0	0	55.0	24.0	86.0	94.0	20.0
4-2	2.0	88.0	10.0	0	7.0	44.0	40.0	9.0	0	65.0	28.0	78.0	96.0	15.0
平均	1.5	90.0	8.5	0	8.5	41.5	42.0	8.0	0	60.0	26.0	82.0	95.0	17.5
5-1	3.0	90.0	7.0	0	10.0	41.0	43.0	6.0	0	63.0	25.0	70.0	94.0	6.0
5-2	2.0	89.0	9.0	0	12.0	27.0	51.0	10.0	0	68.0	24.0	80.0	92.0	10.0
平均	2.5	89.5	8.0	0	11.0	34.0	47.0	8.0	0	65.5	24.5	75.0	93.0	8.0

が、他の試験区のそれは33.5~36.0%であり、これらの試験区間では顕著な差は認められなかった（表Ⅲ-2-2-22）。

⑤ 飼料のVDの分析結果

各試験区の飼料の100g当りのVD含有量は1区が580IU、2区が1,010IU、3区が16,800IU、4区が1,520IU、5区が1,030IUであり、試験飼料には概ね想定した量のVDが含まれていたことが明らかとなった。また、Y社はX社に比べEPA含有量が1/10以下であるのに対してDHAは2倍程度含まれていた（表Ⅲ-2-2-23）。

4) 考察

全長20mmサイズで体色正常個体の割合が高かった5

区では全長30mmサイズ以降に急激に低くなった。また、全般的に黒化面積割合の拡大が認められた。試験飼料を用いた1区~3区を比較すると、VDの含有量が多いほど若干黒化個体の出現率および黒化面積割合が高い傾向が認められたが、大きな差ではなかった。また、VDの含有量がほぼ同じであった2区と5区を比較すると2区の方が黒化個体の出現率および黒化面積割合が有意に高かった。このことからVDは黒化発現を促す大きな要素ではなく、飼料中のビタミンA（VAと略称）とVDの比率や脂肪酸組成の違い等の栄養成分のバランスが黒化個体の出現に影響した可能性が推察された。

VDの含有量の違いによる脊椎骨異常個体の出現率に大きな差は認められず、X社とY社との間で出現率に差

表Ⅲ-2-2-21 平成9年度 配合飼料のVD添加の影響に関する試験の白化個体の出現状況

試験区	異常個体率 (%)	白化個体の出現状況 (%)			
		正常	白≤1/2	白>1/2	白化
1-1	4.0	96.0	3.0	1.0	0
1-2	5.0	95.0	2.0	3.0	0
平均	4.5	95.5	2.5	2.0	0
2-1	2.0	98.0	1.0	1.0	0
2-2	5.0	95.0	3.0	2.0	0
平均	3.5	96.5	2.0	1.5	0
3-1	4.0	96.0	2.0	2.0	0
3-2	2.0	98.0	1.0	1.0	0
平均	3.0	97.0	1.5	1.5	0
4-1	2.0	98.0	1.0	1.0	0
4-2	5.0	95.0	2.0	3.0	0
平均	3.5	96.5	1.5	2.0	0
5-1	8.0	92.0	4.0	4.0	0
5-2	6.0	94.0	3.0	3.0	0
平均	7.0	93.0	3.5	3.5	0

表Ⅲ-2-2-22 平成9年度 配合飼料のVD添加の影響に関する試験の流椎骨異常個体の出現状況

試験区	異常個体率 (%)	脊椎骨異常の部位別出現状況 (%)			脊椎骨異常の種類別出現状況 (%)		
		腹椎+尾椎	腹椎	尾椎	癒合+屈曲	癒合	屈曲
1-1	36.0	5.0	7.0	23.0	0	34.0	2.0
1-2	36.0	8.0	10.0	18.0	1.0	31.0	4.0
平均	36.0	6.5	8.5	20.5	0.5	32.5	3.0
2-1	35.0	8.0	11.0	16.0	1.0	34.0	0
2-2	34.0	7.0	15.0	12.0	0	34.0	0
平均	34.5	7.5	13.0	14.0	0.5	34.0	0
3-1	36.0	3.0	18.0	14.0	2.0	33.0	1.0
3-2	33.0	6.0	8.0	19.0	4.0	26.0	2.0
平均	34.5	4.5	13.0	16.5	3.0	29.5	1.5
4-1	31.0	5.0	13.0	13.0	2.0	28.0	1.0
4-2	36.0	6.0	11.0	19.0	1.0	30.0	4.0
平均	33.5	5.5	12.0	16.0	1.5	29.0	2.5
5-1	49.0	8.0	8.0	33.0	2.0	47.0	0
5-2	47.0	9.0	13.0	25.0	0	46.0	1.0
平均	48.0	8.5	10.5	29.0	1.0	46.5	0.5

が認められた。このことから脊椎骨異常個体の出現にはVDの影響よりもむしろVAの関連性が強いことが推察された。

【平成10年度】

1) 目的

平成9年度にX社製飼料を基本飼料としたVD含有量の違いによる黒化個体の出現状況を調査したところ大きな差は認められなかった。そこで、今回はY社製飼料を基本飼料としてVD含有量の多寡による黒化個体の出現におよぼす影響について検討した。

2) 方法

① 供試魚

供試魚は50㎡水槽の量産水槽で平均全長10.4mm（日齢22）まで生物餌料で飼育した仔魚を無作為に抽出して供した。

② 試験区の設定

試験飼料の製造にはY社製飼料を用い、試験区は飼料100g当りのVD含有量を2,000IUとする区（1区）、VD含有量を20,000IUとする区（2区）、Y社製市販飼料を給餌する区（3区）、X社製市販飼料を給餌する区（4区）の合計4区を設定した（表Ⅲ-2-2-24）。

③ 飼育方法

試験水槽は1試験区につき0.5㎡水槽2面ずつを用い、供試魚は1面につき2,500尾を収容した。供試魚は平均全長20mmで一度取り揚げて白化個体、サイズの選別を

行い、1水槽当り600尾に密度調整した後に全長40mmサイズまで飼育を継続した。全長20mmから取り揚げまでに給餌する配合飼料は全水槽でY社製市販飼料を使用し、砂敷き飼育を行った。飼育水は紫外線殺菌処理海水を使用し、飼育水温は17.0～18.0℃を維持した。換水量は5～10回転/日とした。試験飼料および市販飼料のVD含有量の分析は（財）日本食品分析センターで行った。

3) 結果

① 成長と生残

各試験区の全長20mmサイズの生残率は84.4～94.6%と順調であった。また、全長40mmの生残率は66.0～81.6%であり、1区から3区で若干低くなった（表Ⅲ-2-2-25）。

② 黒化個体の出現状況

全長20mmサイズ 黒化個体の出現率は1区が28.5%、2区が35.5%、3区が26.0%、4区が38.0%であった。VD含有量が異なる1、2区間では有意差が認められなかったが、メーカーの違う3区と4区の間には有意な差が認められた（表Ⅲ-2-2-26）。

全長30mmサイズ 黒化個体の出現率は1区が72.0%、2区が78.0%、3区が70.0%、4区が61.5%であり、全区とも全長20mmサイズ時に比べて体色正常率が低下した。黒化パターン別の出現状況をみると全長20mmサイズでA部の体色異常の出現割合が高かった4区よりも1区～3区の方が高い割合を示した。VDの含有量が高か

表Ⅲ-2-2-23 平成9年度 配合飼料のVD添加の影響に関する試験に使用した配合飼料の栄養分析結果

分析項目	単位	X社試験飼料 (VD含有量調整)			X社市販飼料	Y社市販飼料
		0	1,000	20,000		
VA	IU/100g	0.4	0.3	0.3	0.3	3.1
VC	mg/100g	280.0	417.0	378.0	378.0	1,270.0
VD	IU/100g	580.0	1010.0	16800.0	1520.0	1030.0
VE	mg/100g	93.1	77.6	112.0	115.0	149.0
EPA	%	8.5	6.7	5.9	8.5	0.4
DHA	%	9.8	9.7	8.5	9.8	17.0
Σn-3HUFA	%	19.6	17.8	15.7	19.6	32.0
水分	%	3.7	5.5	5.6	7.3	5.9
粗タンパク質	%	63.1	57.6	56.8	54.5	26.8
粗脂肪酸	%	14.9	19.2	20.5	20.5	13.5
粗灰分	%	8.9	9.4	9.2	8.6	14.1

表Ⅲ-2-2-24 平成10年度 配合飼料のVD添加の影響に関する試験の設定

試験区	Fステージから全長20mmサイズ		全長20mmサイズ～全長40mmサイズ	
	配合飼料の種類	VD含有量 (IU/100g)	配合飼料の種類	条件
1	Y社試験配合飼料	2,000	Y社市販配合飼料	砂敷 (MS2)
2	Y社試験配合飼料	20,000	Y社市販配合飼料	砂敷 (MS2)
3	Y社市販配合飼料	—	Y社市販配合飼料	砂敷 (MS2)
4	X社市販配合飼料	—	Y社市販配合飼料	砂敷 (MS2)

った2区では他の区に比べてA部, C3部の体色異常の出現割合が高い値を示した(表Ⅲ-2-2-27)。

全長40mmサイズ 黒化個体の出現率は1区が94.0%, 2区が95.5%, 3区が89.0%, 4区89.0%であり, VD含有量が異なる1区, 2区を含めて他の試験区間では有意な差は認められなかった。黒化パターン別の出現状況では, VDの含有量が高かった2区においてA部の黒化面積が広く, 特にC部やD部の出現割合が他の区よりも若干高い傾向が見られた(表Ⅲ-2-2-28)。

② 白化個体の出現状況

白化個体の出現率は1区が39.5%, 2区が39.5%, 3区が42.0%, 4区が41.0%となった。本年度は一般的に

白化個体の出現割合が高かった。

③ 脊椎骨異常個体の出現状況

脊椎骨異常個体の出現率は1区が56.5%, 2区が52.5%, 3区が52.0%, 4区が45.5%であり, Y社製飼料を与えた試験区の値が他の試験区に比べて高かった。飼料の分析結果からVAの含有量が高い傾向が認められた。脊椎骨の異常について調査したところ大半は癒合であった(表Ⅲ-2-2-29)。

④ 飼料のVDの分析結果

各試験区の飼料の100g当りのVD含有量は1区が2,580~2,670 IU, 2区が18,100~20,600 IU, 3区が

表Ⅲ-2-2-25 平成10年度 配合飼料のVD添加の影響に関する試験の飼育結果

試験区	試験開始			試験開始~全長20mmサイズ				全長20mmサイズ~40mmサイズ				
	月日	収容尾数(尾)	平均全長(mm)	月日	生残尾数(尾)	平均全長(mm)	生残率(%)	月日	収容尾数(尾)	生残尾数	平均全長(mm)	生残率(%)
1	4.10	2,500	10.4	5.6	2,180	20.0	87.2	5.28	600	418	44.3	69.6
2	4.10	2,500	10.4	5.6	2,140	20.3	85.6	5.28	600	396	44.3	66.0
3	4.10	2,500	10.4	5.6	2,110	19.9	84.4	5.28	600	446	44.4	74.4
4	4.10	2,500	10.4	5.6	2,148	20.1	85.9	5.28	600	482	43.7	80.3

* 全長20mmサイズで600尾/槽に飼育密度を調整

表Ⅲ-2-2-26 平成10年度 配合飼料のVD添加の影響に関する試験の黒化個体の出現状況(全長20mmサイズ)

試験区	黒化個体の出現状況(%)				黒化パターン別の出現状況(%)									
	正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	A(縁側+体幹部)					C(頭・胸部)			D(尾柄部)	
					正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1	71.5	27.5	1.0	0	80.0	18.5	1.0	1.5	0.5	0.5	1.0	2.0	19.0	2.0
2	64.5	34.5	0.5	0.5	73.5	20.0	5.0	1.0	0.5	0.5	1.5	8.0	20.0	3.0
3	75.0	26.0	0	0	78.0	19.0	2.5	0.5	0	0	0.5	5.0	12.0	1.5
4	62.0	38.0	0	0	65.0	31.5	3.5	0.0	0	1.0	1.0	1.5	12.5	0

表Ⅲ-2-2-27 平成10年度 配合飼料のVD添加の影響に関する試験の黒化個体の出現状況(全長30mmサイズ)

試験区	黒化個体の出現状況(%)				黒化パターン別の出現状況(%)									
	正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	A(縁側+体幹部)					C(頭・胸部)			D(尾柄部)	
					正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1	28.0	71.0	0	1.0	67.5	54.0	12.5	0	1.0	3.0	2.0	11.5	32.5	2.5
2	22.0	74.0	4.0	0	74.5	56.0	14.0	4.5	0	4.5	6.0	25.5	38.0	9.5
3	30.0	68.0	1.0	1.0	68.0	59.0	7.0	0.5	1.5	4.0	4.5	11.0	31.5	3.5
4	38.5	61.0	0	0.5	57.0	50.0	6.5	0	0.5	4.0	1.5	15.5	31.5	0.5

表Ⅲ-2-2-28 平成10年度 配合飼料のVD添加の影響に関する試験の黒化個体の出現状況(全長40mmサイズ)

試験区	黒化個体の出現状況(%)				黒化パターン別の出現状況(%)									
	正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	A(縁側+体幹部)					C(頭・胸部)			D(尾柄部)	
					正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1	6.0	92.5	1.5	0	92.5	71.5	19.5	1.5	0	12.0	5.0	36.5	68.0	3.5
2	4.5	91.0	3.0	1.5	93.5	65.5	23.0	3.5	1.5	15.5	6.5	46.0	72.5	6.5
3	11.0	86.0	3.0	0.5	87.0	67.5	16.0	3.0	0.5	13.0	4.5	36.0	63.5	4.5
4	11.0	87.5	1.0	0.5	86.0	72.0	13.0	0.5	0.5	9.5	5.0	32.0	64.5	3.5

1,020~1,250 IU, 4区が1,690~2,210 IUであり, 試験飼料には概ね想定した量のVDが含まれていたことが明らかとなった。Y社とX社について比較するとVAの含有量はY社がX社の約10倍量, ビタミンCではX社がY社の約18倍量, ビタミンEではY社がX社の1.5倍量であった(表Ⅲ-2-2-30)。

3) 考察

今回の試験結果からも昨年度と同様に, 飼料中のVD含有量の多寡と黒化個体の出現率に関係は見いだせず, 飼料メーカー間の比較でも体色異常個体の出現率には顕著な差は認められなかった。

以上のことから, 全長20mmサイズのヒラメにおいては飼料中のVD含有量は部分的な黒化出現に若干の関連性はみられたものの, 黒化個体の出現を促す大きな要素ではないことがうかがわれた。

【平成11年度】

1) 目的

平成9, 10年度に引き続き, メーカーの異なる2種類の市販飼料にVDを強化して試験飼料を製造し, 飼料中のVD含有量の多寡が黒化個体の出現におよぼす影響について, これまでの結果の検証を行った。

2) 方法

① 供試魚

供試魚は50m³RC水槽で平均全長9.49mm(日齢25)まで生物餌料で予備飼育した仔魚(ステージ組成D:4%, E:26%, F:70%, G:0%)を用いた。なお, これらの飼育に使用した生物餌料はワムシがスーパー生クロレ

ラV12((株)クロレラ工業製), Ar-NがDHAc((株)オリエンタル酵母工業製)を用いて栄養強化した。

② 試験区の設定

試験飼料はX社製およびY社製飼料を基本に製造し, 試験区はX社製市販飼料とする区(1区), X社製試験飼料100g当りのVD含有量を20,000IUとする区(2区), Y社製市販飼料とする区(3区), Y社製試験飼料100g当りのVD含有量を20,000IUとする区(4区)の合計4区を設定した(表Ⅲ-2-2-31)。

③ 飼育方法

試験水槽は1試験区につき0.5m³水槽2面ずつを用い, 供試魚は1面につき2,500尾を収容した。供試魚は平均全長20mmで一度取り揚げて90径の目合いのナイロンモジ網でサイズおよび白化個体の選別を行い, 1水槽当たり500尾に密度調整した後に, 全長40mmサイズまで継続飼育した。全長20mmから取り揚げまで給餌した飼料は1区と2区がX社製市販飼料を, 3区と4区がY社製市販飼料を使用した。また, この飼育期間は全水槽の底面に

表Ⅲ-2-2-31 平成11年度 配合飼料のVD添加の影響に関する試験の設定

試験区	配合飼料の種類	ビタミン強化量
		VD (IU/100g)
1	X社市販飼料	-
2	X社試験飼料	20,000
3	Y社試験飼料	-
4	Y社試験飼料	20,000

表Ⅲ-2-2-29 平成10年度 配合飼料のVD添加の影響に関する試験の脊椎骨異常個体の出現状況

試験区	異常個体率 (%)	脊椎骨異常の部位別出現状況 (%)		
		癒合	屈曲	癒合+屈曲
1	56.5	54.0	1.5	1.0
2	52.5	49.0	0.5	3.0
3	52.0	48.0	0.5	3.5
4	45.5	44.0	0.0	2.0

表Ⅲ-2-2-30 平成10年度 配合飼料のVD添加の影響に関する試験に使用した配合飼料の栄養分析結果

分析項目	単位	Y社試験飼料 (VD:2,000IU/100g)	Y社試験飼料 (VD:20,000IU/100g)	Y社市販飼料	X社市販飼料
		360~500μ	360~500μ	360~500μ	400μ
VA	IU/100g	10,800	10,900	11,200	1,200
VC	mg/100g	2	2	2	2,600
VD	10mg/100g	2,580	20,300	1,150	1,720
VE	IU/100g	149	152	150	94
EPA	%	12.4	12.3	12.5	6.0
DHA	%	15.5	15.5	15.6	9.9
Σn-3HUFA	%	29.2	29.1	29.4	17.0
水分	%	3.9	3.4	5.4	6.7
粗タンパク質	%	57.5	56.3	56.3	54.5
粗脂肪酸	%	10.8	11.4	11.5	20.4
粗灰分	%	13.2	13.3	13.0	8.3

MSを約1cmの厚さで設置した。

飼育水は紫外線殺菌処理海水を使用し、飼育水温は17.0~18.0℃を維持した。換水量は5~10回転/日とした。

供試した試験飼料および市販飼料のVD含有量の分析は(財)日本食品分析センターで、また、供試魚のVD含有量の分析は東京水産大学(現在、東京海洋大学)で実施した。

3) 結果

① 成長と生残

各試験区とも飼育は概ね順調に推移し、全長20mmサイズの生残率は88.0~96.7%であった。また、全長40mmサイズでも各試験区とも飼育は順調に推移し、平均全長は38.7~47.1mm、生残率は82.5~97.5%であった(表Ⅲ-2-2-32)。

② 黒化個体の出現状況

全長20mmサイズ 黒化個体の出現率は1区が19.5%、2区が19.3%、3区が15.9%、4区が17.5%であり、試験区間で有意差は認められなかった(表Ⅲ-2-2-33)。

全長30mmサイズ 黒化個体の出現率は1区が72.6%、2区が64.0%、3区が63.0%、4区が68.5%であり、試験区間で有意差は認められなかった。黒化パターン別の出現率ではC部のC2、C3、およびD部において4区が2

区よりも有意に高い値を示した(表Ⅲ-2-2-34)。

全長40mmサイズ 黒化個体の出現率は1区が81.0%、2区が84.5%、3区が78.5%、4区が88.0%であり、試験区間で有意差は認められなかった。黒化パターン別の出現率ではD部において4区が2区よりも有意に高い値を示した(表Ⅲ-2-2-35)。

③ 白化個体の出現状況

白化個体の出現率は1区が10.5%、2区が8.0%、3区が5.5%、4区が8.5%であり、試験区間で有意差は認められなかった(表Ⅲ-2-2-36)。

④ 脊椎骨異常個体の出現状況

脊椎骨異常個体の出現率は1区が30.5%、2区が42.5%、3区が44.0%、4区が44.5%であり、1区の出現率が他の試験区に比べて有意に低かった(表Ⅲ-2-2-37)。

⑤ 供試魚のVDの分析結果

市販飼料を用いた1区と3区の供試魚のVD含有量は550 IU/100g、520 IU/100gであった。そして、VD含有量を高めた試験飼料を与えた2区と4区はそれぞれ2,700 IU/100g、2,900 IU/100gであり、飼料中のVD含有量を高めた試験区では供試魚のVD含有量も高かった(表Ⅲ-2-2-38)。

表Ⅲ-2-2-32 平成11年度 配合飼料のVD添加の影響に関する試験の飼育結果

試験区	試験開始				試験開始~全長20mmサイズ				全長20mmサイズ~全長40mmサイズ				
	月日	収容尾数(尾)	平均全長	月日	平均全長	生残尾数(尾)	生残率(%)	月日	平均全長	収容尾数(尾)	生残尾数(尾)	生残率(%)	
1-1	4.13	2,500	9.5	5.6	19.4	2,201	88.0	6.10	40.3	400	390	97.5	
1-2	4.13	2,500	9.5	5.6	19.0	2,275	91.0	6.10	39.9	400	342	85.5	
2-1	4.13	2,500	9.5	5.6	18.9	2,239	89.6	6.10	40.0	400	330	82.5	
2-2	4.13	2,500	9.5	5.6	18.6	2,395	95.8	6.10	39.9	400	360	90.0	
3-1	4.13	2,500	9.5	5.6	19.4	2,218	88.7	6.10	39.1	400	358	89.5	
3-2	4.13	2,500	9.5	5.6	19.0	2,289	91.6	6.10	38.7	400	375	93.8	
4-1	4.13	2,500	9.5	5.6	19.1	2,215	88.6	6.10	39.4	400	362	90.5	
4-2	4.13	2,500	9.5	5.6	18.1	2,417	96.7	6.10	40.0	400	360	90.0	

*全長20mmサイズで400尾/槽に飼育密度を調整

表Ⅲ-2-2-33 平成11年度 配合飼料のVD添加の影響に関する試験の黒化個体の出現状況(全長20mmサイズ)

試験区	黒化個体の出現状況(%)				黒化パターン別の出現状況(%)									
	正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	A(縁側+体幹部)					C(頭・胸部)			D(尾柄部)	
					正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1-1	78.0	22.0	0	0	78.0	20.0	2.0	0	0	0	1.0	4.0	18.0	4.0
1-2	83.0	17.0	0	0	83.0	16.0	1.0	0	0	0	2.0	2.0	9.0	1.0
平均	80.5	19.5	0	0	80.5	18.0	1.5	0	0	0	1.5	3.0	13.5	2.5
2-1	82.5	16.5	1.0	0	82.5	12.7	2.4	2.4	0	0	3.1	3.1	15.5	2.1
2-2	79.0	19.0	2.0	0	79.0	17.0	1.0	3.0	0	0	3.0	4.0	9.0	1.0
平均	80.8	17.8	1.5	0	80.8	14.9	1.7	2.7	0	0	3.1	3.6	12.3	1.0
3-1	86.0	12.0	2.0	0	86.0	9.0	2.0	3.0	0	0	5.0	6.0	12.0	5.0
3-2	82.2	17.8	0	0	82.2	17.8	0	0	0	1.1	4.4	8.9	8.9	0
平均	84.1	14.9	1.0	0	84.1	13.4	1.0	1.5	0	0.6	4.7	7.5	10.5	2.5
4-1	85.0	15.0	0	0	85.0	11.0	4.0	0	0	0	4.0	4.0	7.0	4.0
4-2	80.0	18.0	2.0	0	80.0	16.0	0	4.0	0	1.0	7.0	9.0	14.0	5.0
平均	82.5	16.5	1.0	0	82.5	13.5	2.0	2.0	0	0.5	5.5	6.5	10.5	4.5

表Ⅲ-2-2-34 平成11年度 配合飼料のVD添加の影響に関する試験の黒化個体の出現状況 (全長30mmサイズ)

試験区	黒化個体の出現状況 (%)				黒化パターン別の出現状況 (%)									
	正常	黒 \leq 1/2	黒 $>$ 1/2	黒化	A (縁側+体幹部)					C (頭・胸部)			D (尾柄部)	
					正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1-1	28.9	63.9	7.2	0	28.9	47.0	16.4	7.7	0	4.0	7.0	21.0	40.0	16.0
1-2	25.8	73.2	1.0	0	25.8	52.2	17.4	4.6	0	0	1.0	15.0	52.0	11.0
平均	27.4	68.6	4.1	0	27.4	49.6	16.9	6.2	0	2.0	4.0	18.0	46.0	13.5
2-1	35.0	62.0	2.0	1.0	35.0	54.0	4.0	6.0	1.0	2.0	5.0	13.0	45.0	6.0
2-2	37.0	63.0	0	0	37.0	52.0	10.0	1.0	0	0.0	1.0	10.0	41.0	3.0
平均	36.0	62.5	1.0	0.5	36.0	53.0	7.0	3.5	0.5	1.0	3.0	11.5	43.0	4.5
3-1	42.0	56.0	1.0	1.0	42.0	45.0	7.0	5.0	1.0	5.0	5.0	21.0	33.0	8.0
3-2	32.0	66.0	2.0	0	32.0	52.0	12.0	4.0	0	1.0	4.0	19.0	52.0	14.0
平均	37.0	61.0	1.5	0.5	37.0	48.5	9.5	4.5	0.5	3.0	4.5	20.0	42.5	11.0
4-1	41.0	58.0	1.0	0	41.0	45.0	10.0	4.0	0	1.0	1.0	16.0	40.0	7.0
4-2	22.0	76.0	2.0	0	22.0	62.0	12.0	4.0	0	1.0	2.0	18.0	42.0	11.0
平均	31.5	67.0	1.5	0	31.5	53.5	11.0	4.0	0	1.0	1.5	17.0	41.0	9.0

表Ⅲ-2-2-35 平成11年度 配合飼料のVD添加の影響に関する試験の黒化個体の出現状況 (全長40mmサイズ)

試験区	黒化個体の出現状況 (%)				黒化パターン別の出現状況 (%)									
	正常	黒 \leq 1/2	黒 $>$ 1/2	黒化	A (縁側+体幹部)					C (頭・胸部)			D (尾柄部)	
					正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1-1	18.0	75.0	7.0	0	18.0	61.0	16.0	5.0	0	10.0	9.0	22.0	68.0	13.0
1-2	20.0	78.0	2.0	0	20.0	50.0	19.0	11.0	0	1.0	3.0	15.0	71.0	11.0
平均	19.0	76.5	4.5	0	19.0	55.5	17.5	8.0	0	5.5	6.0	18.5	69.5	12.0
2-1	16.0	83.0	1.0	0	16.0	59.0	17.0	8.0	0	5.0	2.0	20.0	75.0	4.0
2-2	15.0	85.0	0	0	15.0	67.0	9.0	9.0	0	1.0	3.0	13.0	75.0	4.0
平均	15.5	84.0	0.5	0	15.5	63.0	13.0	8.5	0	3.0	2.5	16.5	75.0	4.0
3-1	25.0	73.0	2.0	0	25.0	50.0	17.0	8.0	0	3.0	2.0	20.0	65.0	6.0
3-2	18.0	81.0	1.0	0	18.0	56.0	14.0	12.0	0	1.0	5.0	28.0	73.0	9.0
平均	21.5	77.0	1.5	0	21.5	53.0	15.5	10.0	0	2.0	3.5	24.0	69.0	7.5
4-1	13.0	87.0	0	0	13.0	53.0	21.0	13.0	0	4.0	1.0	20.0	76.0	4.0
4-2	11.0	85.0	3.0	1.0	11.0	40.0	27.0	21.0	1.0	4.0	10.0	44.0	76.0	17.0
平均	12.0	86.0	1.5	0.5	12.0	46.5	24.0	17.0	0.5	4.0	5.5	32.0	76.0	10.5

表Ⅲ-2-2-36 平成11年度 配合飼料のVD添加の影響に関する試験の白化個体の出現状況

試験区	異常個体率 (%)	白化個体の出現状況 (%)			
		正常	白 \leq 1/2	白 $>$ 1/2	白化
1-1	13.0	87.0	6.0	7.0	0
1-2	8.0	92.0	5.0	3.0	0
平均	10.5	89.5	5.5	5.0	0
2-1	9.0	91.0	5.0	4.0	0
2-2	7.0	93.0	5.0	2.0	0
平均	8.0	92.0	5.0	3.0	0
3-1	7.0	93.0	4.0	3.0	0
3-2	4.0	96.0	2.0	2.0	0
平均	5.5	94.5	3.0	2.5	0
4-1	9.0	91.0	7.0	2.0	0
4-2	8.0	92.0	3.0	5.0	0
平均	8.5	91.5	5.0	3.5	0

⑥ 配合飼料のVDの分析結果

各試験区の配合飼料の100g当りのVD含有量は1区が2,500~2,590 IU, 2区が21,300~22,800 IU, 3区が1,130~1,330 IU, 4区が19,200~21,900 IUであり, 試験飼料には概ね想定した量のVDが含まれていた(表Ⅲ-2-2-39)。

4) 考察

今回の試験結果からも前回, 前々回と同様に飼料のVD含有量の多寡と黒化個体の出現率に一定の関係は見いだせず, VDの要素解析を行うきっかけとなった飼料メーカーの違いによる黒化個体の出現状況にも顕著な差

は認められなかった。3年間の試験結果から配合飼料に含まれるVDの多寡は黒化個体の出現を促す大きな要因ではないと考えられた。(太田 健吾)

3. 生物餌料の栄養強化に関する試験

(1) ワムシのDHA強化の影響(宮津事業場)【平成14年度】

1) 目的

浮遊期仔魚におけるワムシのDHA強化量の多寡が黒化個体の出現におよぼす影響について検討した。

表Ⅲ-2-2-37 平成11年度 配合飼料のVD添加の影響に関する試験の脊椎骨異常の出現状況

試験区	異常個体率 (%)	脊椎骨異常の部位別出現状況 (%)			
		腹椎骨		尾椎骨	
		癒合	屈曲	癒合	屈曲
1-1	24.0	7.0	5.0	22.0	8.0
1-2	37.0	6.0	9.0	17.0	12.0
平均	30.5	6.5	7.0	19.5	10.0
2-1	43.0	5.0	4.0	26.0	16.0
2-2	42.0	8.0	10.0	29.0	13.0
平均	42.5	6.5	7.0	27.5	14.5
3-1	44.0	10.0	15.0	36.0	11.0
3-2	44.0	13.0	10.0	27.0	9.0
平均	44.0	11.5	12.5	31.5	10.0
4-1	43.0	17.0	13.0	34.0	7.0
4-2	46.0	12.0	8.0	29.0	10.0
平均	44.5	14.5	10.5	31.5	8.5

表Ⅲ-2-2-38 平成11年度 配合飼料のVD添加の影響に関する試験の供試魚のVD含有量(全長20mmサイズ)

試験区	配合飼料*1 (IU/100g)	供試魚*2 (IU/100g)
1	2,500	550
2	20,000	2,700
3	1,100	520
4	20,000	2,900

*1 配合飼料中のビタミン含有量

*2 乾燥重量当たりのビタミン含有量。平均値(N=2)

表Ⅲ-2-2-39 平成11年度 配合飼料のVD添加の影響に関する試験に使用した配合飼料の栄養分析結果

分析項目	単位	X社市販飼料			X社試験飼料 (VD: 20,000IU)			Y社市販飼料				Y社試験飼料 (VD: 20,000IU)		
		250μ	400μ	700μ	250μ	400μ	700μ	~300μ	360~500μ	500~800μ	1000μ	~300μ	360~500μ	500~800μ
VA	IU/100g	1,130	1,430	1,400		10,900		8,370	9,430	8,470	8,170			
VC	mg/100g		2			2			1,420					
VD	IU/100g	2,500	2,500	2,590	21,700	22,800	21,300	1,170	1,330	1,130	1,240	19,200	21,900	21,300
VE	mg/100g		100			152			131					
水分	%		8.4			3.4			6.0					
粗タンパク質	%		60.4			56			54.0					
粗脂肪	%		13.9			11			14.1					
粗灰分	%		9.0			13			12.6					
EPA	%		8.4			12			12.5					
DHA	%		11.6			16			12.3					
Σn-3HUFA	%		21.0			29			26.5					

2) 方法

① 供試魚

供試魚は、宮津事業場で天然親魚から得られた平均全長3.10mmのふ化仔魚を使用した。

② 試験区の設定

試験区は、ワムシをナンノクロロプシスで強化する区(1区)、DHA 極低減30%イカリン脂質で強化する区(2区)、DHA 低減30%イカリン脂質で強化する区(3区)およびDHA30%イカリン脂質で強化する区(4区)の計4区を設定し、それぞれ2面ずつ設けた(表Ⅲ-2-3-1)。強化後のワムシの乾燥重量当りDHA含有量は、1区が0.01%、2区が0.21%、3区が0.47%、4区が1.85%であった。

③ 飼育方法

試験には0.5³m³水槽8面を使用し、各区にふ化仔魚5,000尾を收容した。全長9mmサイズで2,500尾、全長20mmサイズで500尾に密度調整した。18℃の調温海水を注水してウォーターバス方式で保温した。ワムシ給餌期間中はナンノクロロプシスを100万セル/mlを維持するよう24時間連続添加した。照度は水面照度が約1,000lxになるように遮光幕を設置し、適宜開閉して調整した。

餌料は開口からGステージ(日齢3~29)までL型ワムシを給餌した。ワムシの1次強化はすべてナンノクロロプシスで行い、2次強化は試験区ごとに設定した条件

で行った。EステージからHステージ(日齢18~40)まで、DHA 低減30%イカリン脂質で強化したAr-Nを給餌した。Gステージから試験終了まで配合飼料を給餌した。

3) 結果

① 成長と生残

試験は4月5日から6月19日までの76日間行った。全長20mmサイズまでの生残率は、4-2区が日齢36頃に粘性物質が発生したため大量死亡を生じ、22.2%と低い値を示したが、その他の区では51.6~68.9%と順調であった(表Ⅲ-2-3-2)。全長20mmから40mmサイズまでの生残率は各区とも60.2~73.8%で順調に飼育できた。

② 黒化個体の出現状況

全長20mmサイズでは、体色正常率は18.5~21.0%を示し、各区間で差はほとんど認められなかった(表Ⅲ-2-3-3)。黒化面積割合1/2以上は4区が8.0%でやや高かったものの、全長20mmサイズでの黒化出現の度合は各試験区で差はなかった。全長40mmサイズでも、体色正常率は22.0~27.5%、黒化面積割合1/2以上の個体の出現率は6.0~9.5%で大きな差は認められなかった(表Ⅲ-2-3-4)。

③ 白化個体の出現状況

体色正常個体の出現率は4区が88.0%と他区の66.5~70.0%に比べて明らかに高かった(表Ⅲ-2-3-5)。

表Ⅲ-2-3-1 平成14年度 ワムシのDHA強化量の影響に関する試験の設定

試験区	ワムシの強化方法		ワムシのDHA含有量 (%)
	1次強化	2次強化	
1-1	ナンノクロロプシス	ナンノクロロプシス	0.01
1-2	ナンノクロロプシス	ナンノクロロプシス	0.01
2-1	ナンノクロロプシス	DHA極低減30%イカリン脂質	0.21
2-2	ナンノクロロプシス	DHA極低減30%イカリン脂質	0.21
3-1	ナンノクロロプシス	DHA低減30%イカリン脂質	0.47
3-2	ナンノクロロプシス	DHA低減30%イカリン脂質	0.47
4-1	ナンノクロロプシス	DHA30%イカリン脂質	1.85
4-2	ナンノクロロプシス	DHA30%イカリン脂質	1.85

表Ⅲ-2-3-2 平成14年度 ワムシのDHA強化量の影響に関する試験の飼育結果

試験区	試験開始			試験開始~全長9mmサイズ			全長9mmサイズ~全長20mmサイズ			全長20mmサイズ~全長40mmサイズ				
	月日	收容尾数 (尾)	平均全長 (mm)	月日	生残尾数 (尾)	生残率 (%)	月日	收容尾数*1 (尾)	生残尾数 (尾)	生残率 (%)	月日	收容尾数*2 (尾)	生残尾数 (尾)	生残率 (%)
1-1	4.5	5,000	3.1	4.26	4,540	90.8	5.29	2,500	1,568	62.7	6.19	500	328	65.6
1-2	4.5	5,000	3.1	4.26	5,190	103.8	5.29	2,500	1,532	61.3	6.19	600	327	65.4
2-1	4.5	5,000	3.1	4.26	3,490	69.8	5.29	2,500	1,722	68.9	6.19	500	359	71.8
2-2	4.5	5,000	3.1	4.26	4,430	88.6	5.29	2,500	1,289	51.6	6.19	500	346	69.2
3-1	4.5	5,000	3.1	4.26	5,400	108.0	5.29	2,500	1,561	62.4	6.19	500	334	66.8
3-2	4.5	5,000	3.1	4.26	5,330	106.6	5.29	2,500	1,392	55.7	6.19	500	369	73.8
4-1	4.5	5,000	3.1	4.26	5,060	101.2	5.29	2,500	1,694	67.8	6.19	500	301	60.2
4-2	4.5	5,000	3.1	4.26	4,570	91.4	5.29	2,500	556	22.2	6.19	400	287	71.8

*1 全長9mmサイズで2,500尾/槽に飼育密度を調整

*2 全長20mmサイズで500尾/槽に飼育密度を調整

④ 脊椎骨異常個体の出現状況

脊椎骨異常は外見上軽度なものがほとんどで、脊椎骨異常個体の出現率はワムシのDHA含有量の多い3区と4区が高かった(表Ⅲ-2-3-6)。

4) 考察

今回のワムシのDHA強化量の範囲では、全長20mmサイズおよび全長40mmサイズの黒化個体の出現状況に大きな差は見られなかった。ヒラメ仔稚魚期(Ar-N摂餌期)におけるDHA要求量が1.6%であると報告されている¹⁾。今回の試験で過剰量を想定した4区のワムシのDHA含有量は1.85%であり、仔稚魚の栄養要求に適した範囲にあったと思われる、試験の目的としたワムシのDHA強化量の多寡が黒化発現におよぼす影響についてはDHA含有量が全体的に低かったことから再検討が必要である。逆に、今回の結果から浮遊期前半のワムシのDHA強化量不足が全長20mm、40mmサイズの黒化発現におよぼす影響が低い可能性も考えられる。

【平成15年度】

1) 目的

前年度の試験で条件設定したワムシのDHA強化量がヒラメ仔稚魚のDHA要求量の範囲にあったことから、再度ワムシのDHA強化量の多寡が黒化個体の出現におよぼす影響について検討した。

2) 方法

① 供試魚

供試魚は、宮津事業場で天然親魚から得られた平均全長3.42mmのふ化仔魚を使用した。

② 試験区の設定

試験区は、ワムシをナンノクロロプシスで強化する区(1区)、DHA30%イカリン脂質で強化する区(2区)およびDHA増強30%イカリン脂質で強化する区(3区)の計3区を設定し、それぞれ3面ずつ設けた(表Ⅲ-2-3-7)。強化後のワムシ乾燥重量当りのDHA含有量は、1区が0%、2区が1.61%、3区が2.90%となった。

表Ⅲ-2-3-3 平成14年度 ワムシのDHA強化量の影響に関する試験の黒化個体の出現状況(全長20mmサイズ)

試験区	平均全長 (mm)	黒化個体の出現状況(%)				黒化パターン別の出現状況(%)									
		正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	A(縁側+体幹部)					C(頭・胸部)			D(尾柄部)	
						正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1	21.3	20.0	78.0	2.0	0	20.5	47.5	30.0	2.0	0	12.5	1.5	49.5	47.5	9.5
2	22.3	18.5	77.0	4.5	0	22.0	28.5	43.5	6.0	0	23.5	6.0	55.5	52.5	7.0
3	22.2	21.0	76.0	3.0	0	22.5	38.0	36.0	3.5	0	21.5	4.5	44.0	48.5	7.0
4	22.1	20.5	71.5	8.0	0	22.5	37.0	31.0	9.5	0	15.5	5.0	43.0	48.0	18.5

表Ⅲ-2-3-4 平成14年度 ワムシのDHA強化量の影響に関する試験の黒化個体の出現状況(全長40mmサイズ)

試験区	平均全長 (mm)	黒化個体の出現状況(%)				黒化パターン別の出現状況(%)									
		正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	A(縁側+体幹部)					C(頭・胸部)			D(尾柄部)	
						正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1	47.2	25.5	65.5	9.0	0	29.5	34.5	27.0	9.0	0	46.0	12.0	55.0	36.0	4.0
2	49.2	22.0	68.5	9.5	0	26.0	26.0	40.0	8.0	0	54.5	16.0	66.0	44.0	6.5
3	49.5	26.5	64.0	9.5	0	29.5	37.0	26.5	7.0	0	47.5	16.0	53.0	40.0	4.5
4	50.2	27.5	66.5	6.0	0	32.5	31.5	31.5	4.5	0	38.0	16.5	52.5	46.0	4.5

表Ⅲ-2-3-5 平成14年度 ワムシのDHA強化量の影響に関する試験の白化個体の出現状況

試験区	異常個体率 (%)	白化個体の出現状況(%)			
		正常	白≤1/2	白>1/2	白化
1	33.5	66.5	8.5	11.0	14.0
2	30.0	70.0	6.5	14.0	9.5
3	33.5	66.5	10.0	11.0	12.5
4	12.0	88.0	5.5	5.0	1.5

表Ⅲ-2-3-6 平成14年度 ワムシのDHA強化量の影響に関する試験の脊椎骨異常の出現状況

試験区	異常個体率 (%)	脊椎骨異常の部位別出現状況(%)		
		癒合	屈曲	その他
1	8.0	6.0	2.0	0
2	11.5	8.5	0	3.0
3	16.0	11.0	1.0	4.0
4	16.0	13.5	1.5	1.0

③ 飼育方法

試験には0.5㎡水槽9面を使用し、各区にふ化仔魚5,000尾を収容した。全長9mmサイズで2,500尾、全長20mmサイズで500尾に密度調整した。18℃の調温海水を注水してウォーターバス方式で保温した。ワムシ給餌期間中は培養ナンノクロロブシスを100万セル/mlを維持するよう24時間連続添加した。照度は水面照度が約1,000lxになるように調整した。

餌料は開口からGステージ(日齢4~32)までL型ワムシを給餌した。1次強化はすべてナンノクロロブシスで行い、2次強化は試験区ごとにそれぞれの強化剤を用いて強化した。DステージからHステージ(日齢19~44)までDHA低減30%イカリン脂質で強化したAr-Nを給餌した。Gステージから試験終了まで配合飼料を給餌した。

3) 結果

① 成長と生残

試験は3月13日から5月22日までの71日間行った。全

長20mmサイズまでの生残率は64.3~85.3%、全長20mmから40mmサイズまでの生残率は81.8~96.2%で順調に飼育できた(表Ⅲ-2-3-8)。

② 黒化個体の出現状況

全長20mmサイズでの体色正常率は2区(47.7%)>3区(40.0%)>1区(32.0%)の順に高くなった(表Ⅲ-2-3-9)。1区は黒化面積割合1/2以上の出現率も2.7%とやや高く、A部の黒化出現状況もA2+が7.7%を示し、他の0.7~1.3%に比べ高かった。全長40mmサイズでの体色正常率は24.3~34.0%で1区が34.0%と最も高かった。しかし黒化面積割合1/2以上の個体の出現率も13.3%とやや高かった(表Ⅲ-2-3-10)。2区と3区の黒化個体の出現率に差はほとんど認められなかった(写真Ⅲ-2-3-1)。

③ 白化個体の出現状況

体色正常個体の出現率は、3区(92.0%)>2区(86.7%)>1区(59.7%)の順に高くなった(表Ⅲ-2-3-11)。DHA強化量が多くなるほど白化の出現率が低下

表Ⅲ-2-3-7 平成15年度 ワムシのDHA強化の影響に関する試験の設定

試験区	ワムシの強化方法		ワムシのDHA含有量 (%)
	1次強化	2次強化	
1-1	ナンノクロロブシス	ナンノクロロブシス	0
1-2	ナンノクロロブシス	ナンノクロロブシス	0
1-3	ナンノクロロブシス	ナンノクロロブシス	0
2-1	ナンノクロロブシス	DHA30%イカリン脂質	1.61
2-2	ナンノクロロブシス	DHA30%イカリン脂質	1.61
2-3	ナンノクロロブシス	DHA30%イカリン脂質	1.61
3-1	ナンノクロロブシス	DHA増強30%イカリン脂質	2.90
3-2	ナンノクロロブシス	DHA増強30%イカリン脂質	2.90
3-3	ナンノクロロブシス	DHA増強30%イカリン脂質	2.90

表Ⅲ-2-3-8 平成15年度 ワムシのDHA強化の影響に関する試験の飼育結果

試験区	試験開始		試験開始~全長9mmサイズ				全長9mmサイズ~全長20mmサイズ			全長20mmサイズ~全長40mmサイズ				
	月日	収容尾数 (尾)	平均全長 (mm)	月日	生残尾数 (尾)	生残率 (%)	月日	収容尾数 ^{*1} (尾)	生残尾数 (尾)	生残率 (%)	月日	収容尾数 ^{*2} (尾)	生残尾数 (尾)	生残率 (%)
1-1	3.13	5,000	3.4	4.7	5,310	106.2	5.2	2,500	1,745	69.8	5.22	500	409	81.8
1-2	3.13	5,000	3.4	4.7	3,420	68.4	5.2	2,500	1,608	64.3	5.22	500	427	85.4
1-3	3.13	5,000	3.4	4.7	5,370	107.4	5.2	2,500	1,895	75.8	5.22	500	439	87.8
2-1	3.13	5,000	3.4	4.7	4,980	99.6	5.2	2,500	1,990	79.6	5.22	500	438	87.6
2-2	3.13	5,000	3.4	4.7	3,900	78.0	5.2	2,500	1,890	75.6	5.22	500	427	85.4
2-3	3.13	5,000	3.4	4.7	4,920	98.4	5.2	2,500	2,133	85.3	5.22	500	469	93.8
3-1	3.13	5,000	3.4	4.7	4,080	81.6	5.2	2,500	1,895	75.8	5.22	500	428	85.6
3-2	3.13	5,000	3.4	4.7	3,510	70.2	5.2	2,500	1,618	64.7	5.22	500	481	96.2
3-3	3.13	5,000	3.4	4.7	4,040	80.8	5.2	2,500	1,977	79.1	5.22	500	433	86.6

*1 全長9mmサイズで2,500尾/槽に飼育密度を調整

*2 全長20mmサイズで500尾/槽に飼育密度を調整

表Ⅲ-2-3-9 平成15年度 ワムシのDHA強化の影響に関する試験の黒化個体の出現状況(全長20mmサイズ)

試験区	平均全長 (mm)	黒化個体の出現状況(%)				黒化パターン別の出現状況(%)									
		正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	A(縁側+体幹部)					C(頭・胸部)			D(尾柄部)	
						正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1	21.8	32.0	65.3	2.7	0	33.0	32.0	27.3	7.7	0	0	0	29.7	40.7	10.0
2	22.1	47.7	52.0	0.3	0	49.0	33.3	16.3	1.3	0	1.0	0	25.3	28.0	3.0
3	23.3	40.0	60.0	0	0	40.3	37.7	21.3	0.7	0	1.3	0.3	29.3	33.3	1.7

した。

④ 脊椎骨異常個体の出現状況

脊椎骨異常は外見上軽度なものがほとんどで、各区の脊椎骨異常個体の出現率は18.7～24.3%であり、試験区間で大きな差は見られなかった（表Ⅲ-2-3-12）。

4) 考 察

全長20mmサイズの無眼側体色正常率は2区が高く、DHA 無強化の1区が低かった。しかし、全長40mmサイズになると体色正常率は1区が2区と3区に比べ高い値を示した。また、2区と3区の体色正常率および黒化パ

表Ⅲ-2-3-10 平成15年度 ワムシの DHA 強化の影響に関する試験の黒化個体の出現状況（全長40mmサイズ）

試験区	平均全長 (mm)	黒化個体の出現状況 (%)				黒化パターン別の出現状況 (%)									
		正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	A (縁側+体幹部)					C (頭・胸部)			D (尾柄部)	
						正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1	45.7	34.0	52.7	13.3	0	36.3	16.0	38.0	9.7	0	54.0	13.3	62.0	29.0	3.0
2	46.5	26.7	64.3	9.0	0	28.0	21.3	45.3	5.3	0	56.7	14.3	69.3	26.0	1.0
3	46.3	24.3	66.0	9.7	0	27.0	24.7	43.0	5.3	0	57.7	18.0	74.3	40.7	2.3



ナンノクロプシス強化（1区）

DHA オイル強化（2区）

DHA 増強オイル強化（3区）

写真Ⅲ-2-3-1 ワムシの DHA 強化の影響に関する試験の黒化個体の出現状況（全長40mmサイズ）

表Ⅲ-2-3-11 平成15年度 ワムシの DHA 強化の影響に関する試験の白化個体の出現状況

試験区	異常個体率 (%)	白化個体の出現状況 (%)			
		正常	白≤1/2	白>1/2	白化
1	40.3	59.7	11.7	14.0	14.7
2	13.3	86.7	6.7	4.3	2.3
3	8.0	92.0	2.0	4.0	2.0

表Ⅲ-2-3-12 平成15年度 ワムシの DHA 強化の影響に関する試験の脊椎骨異常の出現状況

試験区	異常個体率 (%)	脊椎骨異常の部位別出現状況 (%)		
		癒合	屈曲	その他
1	24.3	22.0	2.3	0
2	18.7	17.0	1.7	0
3	20.3	20.0	0.3	0

ターンA部の出現割合に差は見られず、DHA強化量が黒化発現におよぼす影響は認められなかった。

一方、白化個体の出現率は、DHA強化量の増加に伴って減少する傾向が明確に認められ、ワムシのDHA含有量が1.6%未満では白化個体の出現率が高くなる傾向が示唆された。

2カ年間にわたってワムシのDHA強化量が黒化におよぼす影響について、DHA無強化から過剰量まで段階的に検討したが、DHA強化量の増減に伴う黒化出現状況の違いに明確な差は認められず、ワムシのDHA強化量の多寡による黒化発現の影響は低いと考えられた。

一方、白化個体の出現防除のためには1.6%程度のDHAを含有するワムシを給餌することが望ましいと考えられた。

引用文献

- 1) 竹内俊郎, ヒラメ仔稚魚の栄養要求, 平成10年度栽培漁業技術研修事業基礎理論コース仔稚魚期の発育シリーズNo.11, 日本栽培漁業協会 東京.

(竹内 宏行)

(2) アルテミアノープリウスのフェオダクチラム強化による防除効果 (伯方島事業場)

1) 目的

フェオダクチラム *Phaeodactylum tricornutum* (以下フェオと称す) は、宮古事業場の量産規模の飼育試験において白化個体の出現防除に有効とされている。そこで本試験ではフェオが黒化個体の出現の防除にも効果があるか検討した。

2) 方法

① 供試魚

供試魚は20³RC水槽で平均全長7.4mm (日齢14) ま

で予備飼育を行った仔魚 (ステージ組成C:12%, D:87%, E:1%) を用いた。

② 試験区の設定

試験区はAr-Nの栄養強化剤に濃縮フェオ ((株) マクロガイア製) を使用する区 (1区), 乳化オイル (DHAce, (株) オリエンタル酵母製) を使用する区 (2区), これらを併用する区 (3区), および対照とする無強化区 (4区) の合計4区を設定した (表Ⅲ-2-3-13)。

③ 飼育方法

飼育水槽は1試験区につき2面を使用し、供試魚は1面に5,000尾ずつを収容した。餌料はワムシ, Ar-N, 配合飼料 (おとひめB1, B2, 1号, 2号, 日清飼料製) を用いた。なお、ワムシの栄養強化にはDHA含有濃縮淡水クロレラ (スーパー生クロレラV12, (株) クロレラ工業製) を用いた (表Ⅲ-2-3-14)。給餌期間はワムシが日齢14~20, Ar-Nが日齢14~32, 配合飼料が日齢23~58とした。飼育水は紫外線殺菌処理海水を使用し、飼育水温は17.7~18.0℃を維持した。換水率は試験開始時が20%, 以降は2日毎に1~2%ずつ増加させて、着底期以降は40%を維持した。

給餌したAr-Nは東京水産大学 (現 東京海洋大学) で脂肪酸分析を実施した。

3) 結果

① 成長と生残

各試験区とも飼育は順調に推移し、全長20mmサイズの取り揚げでは平均全長は19.8~21.5mm, 生残率は57.4~81.9%であった。また、全長20mm以降の飼育試験でも各試験区とも飼育は順調に推移し、平均全長は38.1~40.3mm, 生残率は96.8~99.8%であり、試験区間で顕著な差は認められなかった (表Ⅲ-2-3-15)。

② 黒化個体の出現状況

全長20mmサイズ 黒化個体の出現率は1区が44.0%,

表Ⅲ-2-3-13 平成12年度 Ar-Nのフェオダクチラムによる栄養強化に関する試験の設定

試験区	栄養強化剤の種類
1	市販濃縮フェオダクチラム
2	市販乳化オイル
3	市販濃縮フェオダクチラム+市販乳化オイル
4	無強化

表Ⅲ-2-3-14 平成12年度 Ar-Nのフェオダクチラムによる栄養強化に関する試験の生物餌料の栄養強化方法

栄養強化剤	強化量 (mg/m^3)	強化水温 ($^{\circ}C$)	強化時間 (時間)
ワムシ	市販濃縮淡水クロレラ*1 市販脂溶性ビタミン*2	200~500 20	20 6~16
Ar-N	市販乳化オイル 市販濃縮フェオダクチラム	80 1,500~2,000	23 16~23

*1 日本クロレラ工業 (商品名 スーパー生クロレラV12)

*2 フジタ製薬製 (商品名 メガビットAD3E)

2区が76.0%，3区が66.0%，4区が23.0%であり，2区が他の区に比べて高い傾向が認められた。黒化パターン別の出現状況ではC部，D部の出現率が2区で14.0% (C3)，16.0% (D1)，23.0% (D2) と他の試験区よりも高かった。なお，C1，C2の部位には黒化個体の出現はほとんど認められなかった (表Ⅲ-2-3-16)。

全長40mmサイズ 黒化個体の出現率は1区が58.0%，2区が78.0%，3区が52.0%，4区が53.0%であり，全長20mmサイズよりもさらに黒化出現率が高くなった。また黒化パターン別の出現状況では4区のC部，D部の出現率が高くなり，C3の部位で25.0%を示した。また，黒化個体出現率の高かった2区ではC部に加え，D部 (D1) で21.0%認められた。一方，他の区では0~7%と低率であった (表Ⅲ-2-3-17，写真Ⅲ-2-3-2)。

③ 白化個体の出現状況

白化個体の出現率では3区が8.0%と高く，次いで2区，4区，1区の順位で低下した。いずれの試験区でも出現率は全般的に低く，試験区間で有意差は認められなかった (表Ⅲ-2-3-18)。

④ 脊椎骨異常個体の出現状況

脊椎骨異常個体の出現率は3区の17.5%と最も高く，他の試験区でも13.5~17.5%で推移し，試験区間での有意差は認められなかった。出現部位ではすべての試験区で尾椎骨の癒合が多く認められた (表Ⅲ-2-3-19)。

⑤ Ar-Nの脂肪酸分析結果

$\Sigma n-3$ HUFAの含有率は乳化オイル単独強化区が18.3%，乳化オイルと濃縮フェオを併用した区が18.8%であり，濃縮フェオの単独強化区が3.5%，無強化区が2.5%であった。EPAの含有率では乳化オイル単独強化区が10.7%，乳化オイルと濃縮フェオを併用した区が11.0%，濃縮フェオの単独強化区が2.8%，無強化区が1.8%であった。DHAの含有率では乳化オイル単独強化区が5.7%，乳化オイルと濃縮フェオを併用した区が5.9%であり，濃縮フェオの単独強化区と無強化区はいずれも検出限界以下であった (表Ⅲ-2-3-20)。

4) 考察

今回の試験では対照区を含め，各試験区とも黒化個体の出現度合は軽度であり，フェオによるAr-Nの栄養強

表Ⅲ-2-3-15 平成12年度 Ar-Nのフェオダクチラムによる栄養強化に関する試験の飼育結果

試験区	試験開始			試験開始~全長20mmサイズ			全長20mmサイズ~全長40mmサイズ			
	月日	収容尾数	平均全長	月日	生残尾数	生残率	月日	収容尾数	生残尾数	生残率
		(尾)			(尾)	(%)		(尾)	(尾)	(%)
1-1	5.16	2,500	7.4	6.15	1,818	72.7	6.29	400	394	98.5
1-2	5.16	2,500	7.4	6.15	1,776	71.0	6.29	400	391	97.8
2-1	5.16	2,500	7.4	6.15	1,435	57.4	6.29	400	392	98.0
2-2	5.16	2,500	7.4	6.15	1,548	61.9	6.29	400	390	97.5
3-1	5.16	2,500	7.4	6.15	2,047	81.9	6.29	400	387	96.8
3-2	5.16	2,500	7.4	6.15	1,542	61.7	6.29	400	394	98.5
4-1	5.16	2,500	7.4	6.15	1,853	74.1	6.29	400	399	99.8
4-2	5.16	2,500	7.4	6.15	1,840	73.6	6.29	400	395	98.8

表Ⅲ-2-3-16 平成12年度 Ar-Nのフェオダクチラムによる栄養強化に関する試験の黒化個体の出現状況 (全長20mmサイズ)

試験区	黒化個体の出現状況 (%)				黒化パターン別の出現状況 (%)										
	正常	黒 \leq 1/2	黒 $>$ 1/2	黒化	A (縁側+体幹部)					C (頭・胸部)			D (尾柄部)		
					正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2	
1-1	58.0	42.0	0	0	58.0	40.0	2.0	0	0	0	0	0	2.0	0	2.0
1-2	54.0	46.0	0	0	54.0	46.0	0	0	0	0	0	0	4.0	2.0	4.0
平均	56.0	44.0	0	0	56.0	43.0	1.0	0	0	0	0	0	3.0	1.0	3.0
2-1	22.0	78.0	0	0	22.0	78.0	0	0	0	0	0	0	20.0	22.0	32.0
2-2	26.0	74.0	0	0	26.0	72.0	2.0	0	0	0	0	0	8.0	10.0	14.0
平均	24.0	76.0	0	0	24.0	75.0	1.0	0	0	0	0	0	14.0	16.0	23.0
3-1	38.0	62.0	0	0	38.0	62.0	0	0	0	0	0	0	2.0	2.0	2.0
3-2	30.0	70.0	0	0	30.0	70.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
平均	34.0	66.0	0	0	34.0	66.0	0	0	0	0	0	0	1.0	1.0	1.0
4-1	76.0	24.0	0	0	76.0	24.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4-2	78.0	22.0	0	0	78.0	22.0	0	0	0	0	0	0	4.0	0	2.0
平均	77.0	23.0	0	0	77.0	23.0	0	0	0	0	0	0	2.0	0	1.0

表Ⅲ-2-3-17 平成12年度 Ar-N のフェオダクチラムによる栄養強化に関する試験の黒化個体の出現状況 (全長40mmサイズ)

試験区	黒化個体の出現状況 (%)				黒化パターン別の出現状況 (%)									
	正常	黒 \leq 1/2	黒 $>$ 1/2	黒化	A (縁側+体幹部)					C (頭・胸部)			D (尾柄部)	
					正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1-1	44.0	56.0	0	0	44.0	54.0	2.0	0	0	2.0	0	6.0	0	0
1-2	40.0	60.0	0	0	40.0	50.0	10.0	0	0	2.0	0	8.0	6.0	0
平均	42.0	58.0	0	0	42.0	52.0	6.0	0	0	2.0	0	7.0	3.0	0
2-1	36.0	64.0	0	0	36.0	64.0	0	0	0	6.0	0	24.0	18.0	4.0
2-2	8.0	92.0	0	0	8.0	84.0	8.0	0	0	18.0	0	20.0	24.0	4.0
平均	22.0	78.0	0	0	22.0	74.0	4.0	0	0	12.0	0	22.0	21.0	4.0
3-1	66.0	34.0	0	0	66.0	34.0	0	0	0	2.0	0	8.0	6.0	0
3-2	30.0	70.0	0	0	30.0	70.0	0	0	0	6.0	0	28.0	8.0	0
平均	48.0	52.0	0	0	48.0	52.0	0	0	0	4.0	0	18.0	7.0	0
4-1	58.0	42.0	0	0	58.0	40.0	2.0	0	0	8.0	0	18.0	4.0	0
4-2	36.0	64.0	0	0	36.0	56.0	8.0	0	0	18.0	0	32.0	6.0	0
平均	47.0	53.0	0	0	47.0	48.0	5.0	0	0	13.0	0	25.0	5.0	0



フェオダクチラム強化 (1区)



乳化オイル強化 (2区)

写真Ⅲ-2-3-2 平成12年度 Ar-N のフェオダクチラムによる栄養強化に関する試験の黒化個体の出現状況 (全長40mmサイズ)

表Ⅲ-2-3-18 平成12年度 Ar-N のフェオダクチラムによる栄養強化に関する試験の白化個体の出現状況

試験区	異常個体率 (%)	白化個体の出現状況 (%)			
		正常	白 \leq 1/2	白 $>$ 1/2	白化
1-1	3.0	97.0	1.0	1.0	1.0
1-2	4.0	96.0	1.0	3.0	0
平均	3.5	96.5	1.0	2.0	0.5
2-1	7.0	93.0	2.0	3.0	2.0
2-2	6.0	94.0	3.0	1.0	2.0
平均	6.5	93.5	2.5	2.0	2.0
3-1	8.0	92.0	3.0	2.0	3.0
3-2	8.0	92.0	2.0	6.0	0
平均	8.0	92.0	2.5	4.0	1.5
4-1	8.0	92.0	1.0	5.0	2.0
4-2	4.0	96.0	2.0	1.0	1.0
平均	6.0	94.0	1.5	3.0	1.5

表Ⅲ-2-3-19 平成12年度 Ar-N のフェオダクチラムによる栄養強化に関する試験の脊椎骨異常個体の出現状況

試験区	異常個体率 (%)	脊椎骨異常の部位別出現状況 (%)			
		腰椎骨		尾椎骨	
		癒合	屈曲	癒合	屈曲
1-1	16.0	6.0	1.0	14.0	2.0
1-2	17.0	5.0	2.0	14.0	1.0
平均	16.5	5.5	1.5	14.0	1.5
2-1	16.0	5.0	6.0	13.0	4.0
2-2	11.0	4.0	2.0	5.0	2.0
平均	13.5	4.5	4.0	9.0	3.0
3-1	21.0	5.0	10.0	19.0	2.0
3-2	14.0	1.0	5.0	11.0	3.0
平均	17.5	3.0	7.5	15.0	2.5
4-1	17.0	6.0	6.0	8.0	9.0
4-2	17.0	1.0	8.0	8.0	9.0
平均	17.0	3.5	7.0	8.0	9.0

表Ⅲ-2-3-20 平成12年度 Ar-N のフェオダクチラムによる栄養強化に関する試験の Ar-N の脂肪酸分析結果

分析項目	栄養強化剤の種類 (%)			
	濃縮フェオ*1	乳化オイル*2	濃縮フェオ +乳化オイル	無強化
水分	78.4	79.0	81.7	85.3
粗脂肪酸	13.6	14.5	11.0	13.3
脂肪酸組成				
saturated	20.6	16.5	16.2	19.7
monoenes	37.7	29.9	30.1	33.8
$\Sigma n-3$	29.6	40.8	41.0	32.8
$\Sigma n-6$	9.0	8.0	7.9	9.0
$\Sigma n-3HUFA$	3.5	18.3	18.8	2.5
EPA	2.8	10.7	11.0	1.8
DHA	—	5.7	5.9	—
DHA/EPA	—	0.5	0.5	—

*1 市販濃縮フェオダクチラム

*2 市販乳化オイル

化と黒化個体の出現抑制効果との関連性は認められなかった。

(3) ワムシのビタミンA, D強化の影響 (伯方島事業場)

1) 目的

これまでヒラメの白化個体の出現にはワムシのビタミン含有量が関与するとされ、三木ら¹⁾はワムシ培養水1ml当りにVD₃を25,000IUの濃度で添加することにより白化個体の出現防除に効果があったと報告しているが、黒化個体の出現におよぼす影響については、まだ詳細な検討がなされていない。そこで、ワムシへの異なる濃度によるVAおよびVD強化が黒化個体の出現におよぼす影響について検討した。

2) 方法

① 供試魚

供試魚は人工生産親魚(8歳魚)から採卵して得られたふ化仔魚を用いた。

② 試験区の設定

試験区はビタミン類を添加せず、栄養強化後のワムシのDHA含有量が1%となるように調整したオイル(DHA低減30%イカリン脂質(株)太陽油脂:以下、DHAオイル)で栄養強化する区(1区)、DHAオイルに市販脂溶性ビタミン(メガビットAD₃E(株)フジタ製薬:以下、メガビット)のビタミン含有量と同量のVA、VD((株)和光純薬)を添加して栄養強化する区(2区)、2区と同様の方法でビタミン含有量を三木ら¹⁾の報告と同量に調整したDHAオイルで栄養強化する区(3区)、さらに従来の栄養強化剤と黒化個体の出現状況を比較する目的で、市販のDHA含有濃縮淡水クロレラ(スーパー生クロレラV12(株)クロレラ工業製:以下、スーパ

ー生クロレラV12)とメガビットで栄養強化したワムシを給餌する区(4区)の合計4試験区を設定した(表Ⅲ-2-3-21)。なお、これらの強化剤を使用する期間は2区と3区では開口直後からDステージまでとし、Eステージ以降Gステージまでの栄養強化には1区と同じビタミン無添加のDHAオイルを用いた。1区と3区はGステージまで設定通りの栄養強化を継続した。

③ 飼育方法

飼育水槽は各試験区とも0.5m²水槽2面ずつとし、延べ8面を使用した。供試魚は1面当たり5,000尾ずつ収容し、全長9mmサイズ(日齢23~25)で3,000尾/面、全長20mmサイズで500尾/面に再調整して飼育を継続した。

餌料にはワムシ、Ar-N、配合飼料(おとひめB1、B2、C1、C2:(株)日清飼料製)を用いた。ワムシは日齢3~日齢25、Ar-Nは日齢13~日齢35、配合飼料は日齢25から平均全長40mmの取り揚げまでとした。

生物餌料の1回当たりの給餌量はワムシが5~8個体/ml、Ar-Nが0.6個体/mlとし、摂餌状況に応じて日に1~4回の範囲で給餌した。また、ワムシを給餌する15~20分前には培養水中に市販濃縮淡水クロレラ(生クロレラV12:(株)クロレラ工業製)を5~10ml添加した。

配合飼料は日齢25(ステージ組成E:46%、F:52%、G:2%)から行い、日齢30までは2.2~4.0g/面/日を8~15回に分けて行った。特に餌付けの初期の段階では午前中に集中して30分から60分間隔で給餌を繰り返し、餌付けが完了した後は1日1面当たり平均全長20~25mmサイズで5.0~7.5g、同25~30mmサイズで7.5~10g、同30~40mmサイズで10~14gを給餌した。

④ 生物餌料の栄養強化方法

ワムシの栄養強化には70ℓ円型ポリエチレン製水槽4

表Ⅲ-2-3-21 平成14年度 ワムシのVA, VD強化の影響に関する試験の設定

試験区	ワムシの栄養強化剤の種類		ワムシの給餌期間 (強化ワムシの給餌期間)
	DHA強化	ビタミン強化	
1	DHA低減30%イカリン脂質*1	無添加	B~Gステージ
2	DHA低減30%イカリン脂質	VA: 2,000IU/ℓ*2 VD: 200IU/ℓ	B~Gステージ (B~D)
3	DHA低減30%イカリン脂質	VA 50,000IU/ℓ*3 VD 25,000IU/ℓ	B~Gステージ (B~D)
4	DHA含有濃縮淡水クロレラ*4	脂溶性ビタミン*5 (VA: 2,000IU/ℓ) (VD: 200IU/ℓ)	B~Gステージ

*1 (株)太陽油脂製(東京海洋大学竹内教授特注オイル)

*2 ワムシ栄養強化水1ℓ当りのビタミン含有量を市販脂溶性ビタミン(メガビットAD₃E)と同レベルに調整(東京海洋大学)

*3 ワムシ栄養強化水1ℓ当りのビタミン含有量を鳥取水試(三木ら1988)の報告と同レベルに調整(東京海洋大学)

*4 (株)クロレラ工業製(スーパー生クロレラV12)

*5 (株)フジタ製薬製(メガビットAD₃E)(原液1ml当たりのビタミン効力:VA 100,000IU, VD 10,000IU)。添加量はワムシ栄養強化水1ml当たり原液20ml(1ℓ当たりのビタミン効力:VA 2,000IU, VD 200IU)

面を用い、ウォーターバス方式で20℃に調温した。各水槽にろ過海水70ℓを入れ、直径50mmのエアストーン1個で通気を行った。市販濃縮淡水クロレラで培養したワムシを1面当たり0.5~0.6億個体ずつ収容し、1~3区に使用するワムシには1面当たりDHAオイルを5.6mlずつ添加し、4区に用いるワムシにはスーパー生クロレラV12を150~180ml添加した。強化時間は15~23時間とした。なお、DHAオイルは常温下では海水に溶解しないため、添加直前にDHAオイルの20%量(外割)の鶏卵の卵黄と20℃に加温した海水1ℓで乳化して使用した。

Ar-Nの栄養強化には100ℓアルテミアふ化槽2面を用い、それぞれにAr-N 2,000万個体を収容した。1~3区に使用するAr-NにはDHAオイルを、4区には乳化オイル(DHAce, (株)オリエンタル酵母製, 以下DHAce)を8.0mlずつ添加し、23℃で15~23時間強化した。

栄養強化したワムシ、Ar-Nの脂肪酸分析、ワムシのVA, VDの分析は東京水産大学(現 東京海洋大学)の竹内教授に依頼した。

3) 結果

① 成長・生残

試験開始当初は各試験区とも飼育は順調に推移したが、高濃度のVAとVDを添加した3区では日齢10を経過した頃から仔魚の成長が停滞し、水面直下に浮いて死亡する個体が増加した。3区と4区の仔魚は短軀症状を呈し、伸長鰭条の発達遅れと消化管の形成異常、腹水の貯留等が認められ、かつ、摂餌不良個体が増加したため日齢25で飼育を中止した。1-2区では日齢38でウイルス性表皮増生症が発生したため飼育を中止した。他の水槽では日齢25~40までの期間で一時的に成長が停滞する傾向が見られたが、死亡個体は認められなかった。全長20mmサイズまでは4-1区の成長が最もよく、生残率も70.6%と高かったが、他の試験区の生残率は50%前後であった。

全長20mmサイズ以降の飼育では各試験区とも成長の停滞は認められず、飼育は順調であった。試験を終了した平均全長40mmサイズでの生残率は93.4~96.8%であった(表Ⅲ-2-3-22)。

表Ⅲ-2-3-22 平成14年度 ワムシのVA, VD強化の影響に関する試験の飼育結果

試験区	試験開始		~全長9mmサイズ		全長9mmサイズ~全長20mmサイズ			全長20mmサイズ~全長40mmサイズ					
	月日	収容尾数 (尾)	平均全長 (mm)	生残尾数 (尾)	生残率 (%)	月日	収容尾数*1 (尾)	生残尾数 (尾)	生残率 (%)	月日	収容尾数*2 (尾)	生残尾数 (尾)	生残率 (%)
1-1	3.17	5,000	90	4,500	90.0	4.10	3,000	1,580	52.7	5.1	500	479	95.8
1-2	3.17	5,000	88	4,400	88.0	4.10	3,000	-	-	5.1	-	-	-
2-1	3.17	5,000	80	4,000	80.0	4.11	3,000	1,640	54.7	5.2	500	476	95.2
2-2	3.17	5,000	86	4,300	86.0	4.11	3,000	1,499	50.0	5.3	500	467	93.4
3-1*3	3.17	5,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3-2*3	3.17	5,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-1	3.17	5,000	90	4,500	90.0	4.9	3,000	2,118	70.6	4.29	500	484	96.8
4-2	3.17	5,000	96	4,800	96.0	4.9	3,000	1,489	49.6	5.4	500	483	96.6

*1 全長20mmサイズで500尾/槽に飼育密度を調整

*2 全長30mmサイズで200尾/槽に飼育密度を調整

*3 日齢25で飼育中止

表Ⅲ-2-3-23 平成14年度 ワムシのVA, VD強化の影響に関する試験の黒化個体の出現状況(全長20mmサイズ)

試験区	黒化個体の出現状況(%)				黒化パターン別の出現状況(%)									
	正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	A(縁側+体幹部)					C(頭・胸部)			D(尾柄部)	
					正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1-1	31.0	69.0	0	0	31.0	58.0	11.0	0	0	0	0	6.0	23.0	18.0
1-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
平均	31.0	69.0	0	0	31.0	58.0	11.0	0	0	0	0	6.0	23.0	18.0
2-1	40.0	60.0	0	0	40.0	48.0	12.0	0	0	0	0	0	48.0	20.0
2-2	4.0	69.0	27.0	0	4.0	45.0	26.0	25.0	0	2.0	0	30.0	81.0	62.0
平均	22.0	64.5	13.5	0	22.0	46.5	19.0	12.5	0	1.0	0	15.0	64.5	41.0
3-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
平均	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-1	34.0	66.0	0	0	34.0	58.0	8.0	0	0	0	0	3.0	28.0	20.0
4-2	2.0	77.0	21.0	0	2.0	0	67.0	31.0	2.0	4.0	0	41.0	77.0	62.0
平均	18.0	71.5	10.5	0	18.0	29.0	37.5	15.5	1.0	2.0	0	22.0	52.5	41.0

*1 試験区1-2, 3-1, 3-2は飼育中止

② 黒化個体の出現状況

全長20mmサイズ 体色正常個体の出現率は1区が31.0%で、2区の22.0%、4区の18.0%に比べ最も高かった。黒化面積割合1/2以上の個体の出現率も1区では見られず、2区で13.5%、4区で10.5%出現した。黒化パターンのA部（縁側+体幹部）ではA1+とA2+の出現率が4区>2区>1区の順で高く、特に1区ではA2+は出現しなかった。また、C部（頭・胸部）、D部（縁側と体幹部）の出現率も2区と4区が1区に比べて高い値を示した（表Ⅲ-2-3-23）。

全長40mmサイズ 体色正常個体の出現率は4区（22.0%）>1区（16.0%）>2区（1.5%）の順となり、特に2区の出現率が全長20mmサイズに比べ大幅に減少した。黒化面積割合1/2以上の個体の出現率も2区が1区と4区に比べ顕著に高かった。黒化パターンのA部（縁

側+体幹部）では黒化の程度が中度のA2+の出現率は2区（40%）>1区（11%） \geq （10%）2区の順となり、2区は全長20mmサイズに比べ大幅に増加した。また、2区ではD部（縁側と体幹部）の出現率が1区と4区に比べて顕著に高い値を示した（表Ⅲ-2-3-24）。

③ 白化個体の出現状況

体色正常個体の出現率は各試験区とも高く、95.7~97.0%であった（表Ⅲ-2-3-25）。

④ 脊椎骨異常個体の出現状況

脊椎骨異常個体の出現率は32.0~46.5%で全般的に高く、異常形態は脊椎骨の癒合が大半を占めた（表Ⅲ-2-3-26）。

⑤ 生物餌料の栄養分析結果

ワムシの脂肪酸分析 $\Sigma n-3$ HUFA の含有率は、無強化が0.3%、スーパー生クロレラ V12のみによる強化が

表Ⅲ-2-3-24 平成14年度 ワムシの VA, VD 強化の影響に関する試験の黒化個体の出現状況（全長40mmサイズ）

試験区	黒化個体の出現状況 (%)				黒化パターン別の出現状況 (%)									
	正常	黒 \leq 1/2	黒 $>$ 1/2	黒化	A (縁側+体幹部)					C (頭・胸部)			D (尾柄部)	
					正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1-1	16.0	79.0	5.0	0	16.0	18.0	55.0	11.0	0	34.0	0	7.0	23.0	3.0
1-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
平均	16.0	79.0	5.0	0	16.0	18.0	55.0	11.0	0	34.0	0	7.0	23.0	3.0
2-1	3.0	79.0	18.0	0	3.0	0	63.0	35.0	0	25.0	0	30.0	90.0	37.0
2-2	0	80.0	20.0	0	0	0	55.0	45.0	0	4.0	2.0	33.0	100	80.0
平均	1.5	79.5	19.0	0	1.5	0	59.0	40.0	0	14.5	1.0	31.5	95.0	58.5
3-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
平均	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-1	43.0	57.0	0	0	43.0	1.0	56.0	0	0	8.0	0	8.0	30.0	2.0
4-2	1.0	88.0	11.0	0	1.0	0	80.0	19.0	0	66.0	5.0	24.0	77.0	38.0
平均	22.0	72.5	5.5	0	22.0	0.5	68.0	9.5	0	37.0	2.5	16.0	53.5	20.0

*1 飼育中止

表Ⅲ-2-3-25 平成14年度 ワムシの VA, VD 強化の影響に関する試験の白化個体の出現状況

試験区	異常個体率 (%)	白化個体の出現状況 (%)			
		正常	白 \leq 1/2	白 $>$ 1/2	白化
1-1	3.0	97.0	0.8	2.3	0
1-2	-	-	-	-	-
平均	-	97.0	0.8	2.3	0
2-1	5.2	94.8	1.7	2.6	0.9
2-2	3.4	96.6	1.7	1.7	0
平均	4.3	95.7	1.7	2.2	0.4
3-1	-	-	-	-	-
3-2	-	-	-	-	-
平均	-	-	-	-	-
4-1	3.2	96.8	0	1.6	1.6
4-2	3.0	97.0	0.7	0.7	1.5
平均	3.1	96.9	0.4	1.2	1.5

9.3%, スーパー生クロレラ V12+メガビットによる強化が5.6%, DHA オイルのみの強化が5.5%, DHA オイル+メガビットと同濃度の VA, VD の強化が5.5%, DHA オイルに高濃度の VA, VD を加えた強化が4.5%であった。

EPA, DHA の含有率は, スーパー生クロレラ V12のみの強化が2.3%, 3.8%, スーパー生クロレラ V12+メガビットによる強化が1.6%, 2.5%, DHA オイルのみの強化が2.4%, 2.6%, DHA オイル+メガビットと同濃度の VA, VD の強化が2.0%, 2.9%, DHA オイルに高濃度の VA, VD を加えた強化が1.8%, 2.2%であった。無強化は, EPA が0.3%, DHA が検出限界以下であった(表Ⅲ-2-3-27)。

ワムシの VA, VD 分析 VA, VD の含有量は, DHA オイルに VA 2,000 IU/ℓ と VD 200 IU/ℓ (メガビットと同程度の添加量) の添加による強化 (2 区) が 259.8 IU/g, 94.4 IU/g, DHA オイルに VA 50,000 IU/ℓ, VD

25,000 IU/ℓ の添加による強化 (3 区) が3,485.7 IU/g, 830.8 IU/g となり, 添加量に比例して VA, VD を取り込んでいた。しかし, スーパー生クロレラ V12とメガビットの添加による強化では, VA が検出限界以下, VD が42.4 IU/g であり, VD については DHA オイルに VA 2,000 IU/ℓ と VD 200IU/ℓ (メガビットと同程度の添加量) の添加による強化の半分以下であった。一方, 無強化あるいは DHA オイルおよびスーパー生クロレラ V12のみの強化ではいずれも VA, VD 含有量は検出限界以下であった(表Ⅲ-2-3-28)。

Ar-N の脂肪酸分析 Σn-3HUFA の含有率は, 乳化オイル強化で14.8%と高く, DHA オイル強化が4.6%, 無強化が4.4%であった。また, EPA, DHA の含有率でも乳化オイル強化が10.8%, 3.5%であったのに対して, DHA オイル強化が4.0%, 0.5%, 無強化が4.3%, 検出限界以下となり, DHA オイル強化と無強化の両者に大差は認められなかった。(表Ⅲ-2-3-29)

表Ⅲ-2-3-26 平成14年度 ワムシの VA, VD 強化の影響に関する試験の脊椎骨異常の出現状況

試験区	異常個体率 (%)	脊椎骨異常の部位別出現状況 (%)		
		癒合	屈曲	癒合+屈曲
1-1	44.0	37.0	14.0	7.0
1-2	-	-	-	-
平均	-	-	-	-
2-1	59.0	55.0	15.0	11.0
2-2	34.0	32.0	7.0	5.0
平均	46.5	43.5	11.0	8.0
3-1	-	-	-	-
3-2	-	-	-	-
平均	-	-	-	-
4-1	29.0	29.0	2.0	2.0
4-2	35.0	31.0	9.0	5.0
平均	32.0	30.0	5.5	3.5

表Ⅲ-2-3-27 平成14年度 ワムシの VA, VD 強化の影響に関する試験のワムシの脂肪酸分析結果

測定項目	栄養強化剤の種類					
	無強化	DHAオイル ^{*1}	DHAオイル +VA 2,000 IU/ℓ +VD: 200 IU/ℓ	DHAオイル +VA 50,000 IU/ℓ +VD 25,000 IU/ℓ	DHA含有淡水クロレラ ^{*2} +脂溶性ビタミン ^{*3}	DHA含有淡水クロレラ
EPA	0.3	2.4	2.0	1.8	1.6	2.3
DHA	nd ^{*4}	2.6	2.9	2.2	2.5	3.8
Σn-3HUFA ^{*5}	0.3	5.5	5.5	4.5	5.6	9.3

*1 DHA低減30%イカリン脂質: (株) 太陽油脂製

*2 スーパー生クロレラV12: (株) クロレラ工業製

*3 メガビットAD3E: (株) フジタ製薬製

*4 検出限界値以下

*5 Σn-3HUFA=20:4+20:5+22:5+22:6

4) 考察

今回の試験結果から VA, VD を添加せず, DHA オイルのみで栄養強化したワムシを与えた 1 区と VA, VD をメガビットと同じ濃度に添加した DHA オイルで栄養強化したワムシを D ステージまで給餌した 2 区では体色正常個体の出現率, 黒化パターンの A 部・D 部の出現率に差が認められた。また, スーパー生クロレラ V12 とメガビットの添加により強化したワムシの VA の含有量は検出限界以下であり, VD の含有量は DHA オイルに VA 2,000 IU/ℓ と VD 200 IU/ℓ を添加し強化したワムシの半分以下であった。このワムシを G ステージまで給餌した 4 区の全長 20mm サイズでの体色正常個体の出現率, 黒化パターンの A 部・D 部の出現率とも 1 区よりも低かったが, 黒化面積割合 1/2 以上を占める個体の出現率は 1 区より明らかに高かった。今回, VA と VD を過剰に強化したワムシを給餌した 3 区では, 日齢 5 以降から仔魚の体幹部に萎縮が起こり, 伸長鰭条の形成も著しく阻害された。この現象は浮遊期に高濃度の VA を取り込ませることで脊椎骨の形成に異常をきたすとされるこれまでの報告と合致し, さらに, 水面直下に浮いて死亡する個体も多数出現した。このことから, 給餌したワムシの VA の含有量はかなり過剰な濃度であったことが推察された。しかし, 3 区と同じビタミン濃度で栄養強化したワムシを使用した三木ら¹⁾の報告では, ビタミンを取り込ませたワムシを給餌した試験区とビタミン無添加のワムシを給餌した対照区とでは成長と生残に顕著な

差が認められなかったと述べている。この相違は, 三木らがワムシにビタミンを取り込ませる際に市販の脂溶性ビタミン混合液を直接ワムシの栄養強化槽に添加する方法をとっているため, 前述した 4 区に給餌したワムシの栄養強化後の分析結果で述べたようにビタミンの取り込み量が期待値より少なくなったことに起因すると思われる。

生物餌料へのビタミン強化はヒラメの白化個体の出現防除に有効とされているが, 今回の試験結果から D ステージまでに給餌するワムシへの VA, VD 強化量が過剰になった場合には形態的な弊害を生じること, 黒化の発現を誘起することが示唆された。

一方, 給餌するワムシの VA と VD 強化の有無にかかわらず有眼側の体色正常率は全般的に高く, 白化個体の出現もほとんどなかった。給餌するワムシは全試験区で DHA オイルをベースに強化しており, 各試験区で使用したワムシの脂肪酸分析結果では EPA 含有量が 1.6~2.4%, DHA 含有量が 4.5~5.6% であった。金沢ら²⁾は白化個体の出現防除に DHA 強化が効果あると述べていることから, 今回の含有量が白化防除に有効に作用したと考えられる。一方, 黒化個体の出現防除には, 今回の試験結果から給餌するワムシの VA, VD の強化量を極端に軽減することが肝要と思われる。逆に, G ステージまで給餌するワムシへの DHA 強化が十分であれば, VA, VD の強化は不要の可能性もうかがえ, 今後再検討する必要がある。

表Ⅲ-2-3-28 平成14年度 ワムシの VA, VD 強化の影響に関する試験の Ar-N の脂肪酸分析結果

測定項目	栄養強化剤の種類		
	無強化	DHAオイル ^{*1}	乳化オイル ^{*2}
EPA	4.3	4.0	10.8
DHA	nd ^{*3}	0.5	3.5
Σn-3HUFA ^{*4}	4.4	4.6	14.8

*1 DHA低減30%イカリン脂質：(株)太陽油脂製

*2 DHAce：(株)オリエンタル酵母製

*3 検出限界値以下

*4 Σn-3HUFA=20：4+20：5+22：5+22：6

表Ⅲ-2-3-29 平成14年度 ワムシの VA, VD 強化の影響に関する試験のワムシの VA, VD の分析結果

測定項目	単位	栄養強化剤の種類					
		無強化	DHAオイル ^{*1}	DHAオイル +VA 2,000 IU/ℓ +VD 200 IU/ℓ	DHAオイル +VA 50,000 IU/ℓ +VD 25,000 IU/ℓ	DHA含有淡水クロレラ ^{*2} +脂溶性ビタミン ^{*3}	DHA含有淡水クロレラ
レチノール (乾燥重量当り)	μg/g	nd ^{*4}	nd	77.9	1045.8	nd	nd
VA効力 (レチノールより換算)	IU/g	nd	nd	259.8	3485.7	nd	nd
VD	IU/g	nd	nd	94.4	830.8	42.4	nd

*1 DHA低減30%イカリン脂質：(株)太陽油脂製

*2 スーパー生クロレラV12：(株)クロレラ工業製

*3 メガビットAD3E：(株)フジタ製薬製

*4 検出限界以下

引用文献

- 1) 三木教立, 谷口朝宏, 浜川秀夫: ヒラメの白化出現
におよぼす脂溶性ビタミン類投与ワムシの効果(予報),
水産増殖; 36(2): 91-96 (1988).
- 2) 金沢昭夫, 手島新一, 越塩俊介, 永松孝之, 尾田
正: ヒラメの白化個体出現に対する餌料性因子. 昭和
62年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, 645:
p.169 (1987).

(太田健吾)

Ⅲ-3 着底期型異常

Ⅲ-3-1 着底期前期（全長13~20mm）

1. 飼育環境に関する試験

(1) ミクロスセラミックによる防除効果

（宮津事業場）

【平成9年度】

1) 目的

底質浄化材ミクロスセラミック（以下、MSと称す）による黒化個体の出現防除効果およびその適切な砂敷きの開始時期（サイズ）について検討した。

2) 方法

① 供試魚

供試魚は、福井県栽培漁業センターの人工養成親魚から得られたふ化仔魚180万尾を用いて、宮津事業場の量産水槽で予備飼育した平均全長13.3mmの仔魚（日齢30）を使用した。

② 試験区の設定

試験区は、MSを敷かない対照区（1区）、全長13mmからMSを敷く区（2区）、全長20mmからMSを敷く区（3区）および全長30mmからMSを敷く区（4区）の計4区とし、それぞれ2面ずつ設けた（表Ⅲ-3-1-1）。

③ 飼育方法

試験には0.5m³水槽8面を用い、ウォーターバス方式で18℃に調温した。換水量は10~20回転/日とした。MSは水槽底に約2cmの厚さ（5kg/面）で一様に敷いた。底掃除は、対照区では毎日行い、試験区ではMSを敷くまでの期間に限り毎日行い、砂敷き後は行わなかった。全

表Ⅲ-3-1-1 平成9年度 MSによる防除効果に関する試験の設定

試験区	MS砂敷き飼育開始サイズ
1	-
2	全長13mmサイズ
3	全長20mmサイズ
4	全長30mmサイズ

長20mm以降は死亡魚を適宜取り除いた。餌料は、スーパーカプセルA-1とマリングロスで強化したAr-Nと配合飼料を給餌した。

3) 結果

① 成長と生残

試験は4月15日から5月23日までの39日間行った。予備飼育期間中に発生した疾病の影響を受けて、全長20mmサイズまでの生残率は39.2~56.0%と低かった（表Ⅲ-3-1-2）。全長30mmサイズまでの生残率は59.0~84.4%，全長40mmサイズまでの生残率は96.0~100%となり、順調に飼育できた。

2区で飼育開始7日目頃から底面に還元層が形成され、次第に底質が悪化した。13日目には飼育水に濁りがみられたため、換水量を20回転/日に増加した。同区の硫化水素濃度を測定したところ、収容後10~15日目に増加が認められた。

② 黒化個体の出現状況

全長20mmサイズの体色正常率は2区が79.5%で、他区の66.5~72.5%に比べ高い値を示した（表Ⅲ-3-1-3）。全長30mmサイズの体色正常率も2区が58.0%で、他区の31.5~48.5%に比べ高かった（表Ⅲ-3-1-4）。しかし、全長40mmサイズになると3区が47.5%で、他区の21.5~29.5%に比べ高かった（表Ⅲ-3-1-5）。黒化パターン別の出現状況では、全体的にC3部の異常率が高く、全長30mmサイズから40mmサイズにかけてさらに拡大した。A部の正常率は、全長30mmサイズでは2区が90.5%、全長40mmサイズでは3区が91.0%で最も高い値を示した。

③ 白化個体の出現状況

いずれの区も有眼側の体色は正常であり、白化個体の出現はみられなかった。

④ 脊椎骨異常個体の出現状況

脊椎骨異常個体の出現率は10.5~18.7%で、いずれも軽度であり、試験区間で大きな差は認められなかった（表Ⅲ-3-1-6）。

表Ⅲ-3-1-2 平成9年度 MSによる防除効果に関する試験の飼育結果

試験区	試験開始			試験開始~全長20mmサイズ		全長20mmサイズ~全長30mmサイズ			全長30mmサイズ~全長40mmサイズ					
	月日	収容尾数	平均全長 (mm)	月日	生残尾数 (尾)	生残率 (%)	月日	収容尾数 ^{*1} (尾)	生残尾数 (尾)	生残率 (%)	月日	収容尾数 ^{*2} (尾)	生残尾数 (尾)	生残率 (%)
1-1	4.15	2,000	13.3	4.30	783	39.2	5.13	700	574	82.0	5.23	200	195	97.5
1-2	4.15	2,000	13.3	4.30	826	41.3	5.13	700	591	84.4	5.23	200	192	96.0
2-1	4.15	2,000	13.3	4.30	964	48.2	5.13	700	542	77.4	5.23	200	194	97.0
2-2	4.15	2,000	13.3	4.30	1,119	56.0	5.13	700	442	63.1	5.23	200	200	100
3-1	4.15	2,000	13.3	4.30	989	49.5	5.13	700	491	70.1	5.23	200	200	100
3-2	4.15	2,000	13.3	4.30	1,035	51.8	5.13	700	540	77.1	5.23	200	200	100
4-1	4.15	2,000	13.3	4.30	1,031	51.6	5.13	700	555	79.3	5.23	200	200	100
4-2	4.15	2,000	13.3	4.30	881	44.1	5.13	700	413	59.0	5.23	200	193	96.5

*1 全長20mmサイズで700尾/槽に飼育密度を調整

*2 全長30mmサイズで200尾/槽に飼育密度を調整

表Ⅲ-3-1-3 平成9年度 MSによる防除効果に関する試験の黒化個体の出現状況 (全長20mmサイズ)

試験区	平均全長 (mm)	黒化個体の出現状況 (%)				黒化パターン別の出現状況 (%)									
		正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	A (縁側+体幹部)					C (頭・胸部)			D (尾柄部)	
						正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1	19.2	66.5	25.0	8.5	0	89.5	0	2.0	8.5	0	0	0	32.0	10.5	10.5
2	18.5	79.5	13.0	7.5	0	85.5	0	7.0	7.5	0	0	0	15.0	6.0	6.0
3	20.2	72.5	27.0	0.5	0	96.5	0	3.0	0.5	0	2.5	0	24.0	0.5	0.5
4	19.2	69.0	30.0	1.0	0	94.0	0	4.5	1.5	0	1.0	0	27.0	4.0	4.0

表Ⅲ-3-1-4 平成9年度 MSによる防除効果に関する試験の黒化個体の出現状況 (全長30mmサイズ)

試験区	平均全長 (mm)	黒化個体の出現状況 (%)				黒化パターン別の出現状況 (%)									
		正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	A (縁側+体幹部)					C (頭・胸部)			D (尾柄部)	
						正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1	33.0	48.5	51.5	0	0	78.5	13.0	8.0	0.5	0	1.0	0	48.5	1.0	1.0
2	31.2	58.0	42.0	0	0	90.5	6.0	2.0	1.5	0	0	0	41.0	7.0	7.0
3	31.5	36.0	64.0	0	0	72.5	19.0	7.0	1.5	0	0.5	0	63.0	5.5	5.5
4	33.4	31.5	67.0	1.5	0	63.0	30.0	4.5	1.0	1.5	1.0	0	66.0	4.5	4.0

表Ⅲ-3-1-5 平成9年度 MSによる防除効果に関する試験の黒化個体の出現状況 (全長40mmサイズ)

試験区	平均全長 (mm)	黒化個体の出現状況 (%)				黒化パターン別の出現状況 (%)									
		正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	A (縁側+体幹部)					C (頭・胸部)			D (尾柄部)	
						正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1	52.3	27.5	71.5	0	0	58.0	31.5	7.0	3.5	0	2.0	0	66.0	5.0	5.0
2	53.2	29.5	70.5	0	0	65.5	29.5	3.5	1.5	0	1.5	0	70.5	4.5	4.5
3	54.1	47.5	52.5	0	0	91.0	8.0	0.5	0.5	0	0.5	0	51.5	1.0	1.0
4	49.4	21.5	78.5	0	0	68.0	23.5	7.5	1.0	0	1.0	0	75.0	5.5	5.5

表Ⅲ-3-1-6 平成9年度 MSによる防除効果に関する試験の脊椎骨異常の出現状況

試験区	異常個体率 (%)	脊椎骨異常の部位別出現状況 (%)		
		腹椎	尾椎	腹椎+尾椎
1	10.5	0.5	10.0	0.5
2	14.0	2.0	12.0	0.0
3	18.7	2.6	16.1	1.1
4	15.0	0.0	15.0	1.0

4) 考察

本年度の黒化パターン別の出現状況では、全体的に体幹部と縁側部 (A部) では軽微な個体が多く、腹鱗基部 (C3) の部分的黒化が多いのが特徴であった。体色正常率は全長13mmからMSを敷いた2区が全長30mmサイズまでは最も高かったが、全長40mmサイズでは全長20mmからMSを敷いた3区の正常率が最も高い値を示した。2区の全長40mmサイズにおける体色正常率の低下は飼育期間中の底質悪化の影響が考えられた。これらのことから着底期に入る全長13mmのGステージからMSを敷くことで黒化発現防除に効果がありそうなこと、また全長30mmからのMS敷きは黒化個体の出現状況が砂敷きしない対照区と大きな差がないことから黒化発現の防除効果が期待できないことがうかがえた。全長13mmサイズからのMS敷きの効果については底質環境の悪化防止を考慮して再検討する必要がある。

【平成10年度】

1) 目的

前年度の試験結果から、全長13mmサイズからMSを敷くことにより黒化個体の出現防除に効果があることが推察されたが、全長13mmからMSを敷いた区で底質の悪化が起り、黒化個体の出現防除に適正な砂敷き時期を明確にすることができなかった。そこで本年度は供試魚の健全性、底質の悪化防止に留意し、MS敷きによる黒化個体の出現防除効果の検証と適切な砂敷き開始時期 (サイズ) について再検討した。

2) 方法

① 供試魚

供試魚は、宮津事業場で天然親魚から得られたふ化仔魚80万尾を用いて、量産水槽で予備飼育した平均全長12.3mmの仔魚 (日齢30) を使用した。

② 試験区の設定

試験区はMSを敷かない対照区 (1区)、全長13mmからMSを敷く区 (2区) および全長20mmからMSを敷く区 (3区) の計3区を設定し、それぞれ2面を設けた (表Ⅲ-3-1-7)。

表Ⅲ-3-1-7 平成10年度 MSによる防除効果に関する試験の設定

試験区	MS砂敷き飼育開始サイズ
1	-
2	全長13mmサイズ
3	全長20mmサイズ

③ 飼育方法

試験には0.5㎡水槽 6面を使用した。飼育水温は調温海水の注水により約18℃を維持させたが、海水温が18℃を超えてからは自然水温とした。換水量は10回転/日とした。

MSの使用量は、昨年度と同量にしたが、還元層の形成による底質悪化を防除するため毎日500gを新たに追加した。餌料は全長15mmまでスーパーカプセル A-1で栄養強化した Ar-N と配合飼料を併用給餌し、それ以降は配合飼料の単独給餌とした。

3) 結果

① 成長と生残

試験は4月13日から5月29日までの47日間行った。本年度は配合飼料に餌付いた仔魚を供試するとともに、過剰給餌を避け、毎日MSを追加する等の底質悪化防止対策をとった結果、還元層の形成はみられず、全長20mmサイズでの生残率は71.1~100%、全長30mmサイズでの生残率は82.2~96.2%と順調に飼育できた(表Ⅲ-3-1-8)。

しかし、全長30mmサイズから全長40mmサイズに達するまでに配合飼料の摂餌不良と共食いを生じたため全長40mmサイズでの生残率は21.0~68.0%と低く、特にMS砂敷き区の生残率が低かった。対照区は、飼育期間中、配合飼料給餌時に浮上して摂餌するのに対し、MS敷きの2区と3区の種苗は全長30mm以降ほぼ全個体が潜砂し、浮上して摂餌する個体はごくまれであった。

② 黒化個体の出現状況

全長30mmサイズでの体色正常率は3区が85.1%、2区が65.2%で、1区が57.7%となり、砂敷き区がともに高かった(表Ⅲ-3-1-9)。全長40mmサイズの体色正常率は3区が59.1%と高く、2区の35.1%、1区の22.4%の順となった(表Ⅲ-3-1-10)。黒化パターン別の出現状況では、A部とC部の出現率が1区に比べ2区、3区とも低い値を示し、黒化の度合も軽度な個体が多かった。

③ 白化個体の出現状況

白化個体の出現率はいずれの区も低く、試験区間で差はみられなかった(表Ⅲ-3-1-11)。

表Ⅲ-3-1-8 平成10年度 MSによる防除効果に関する試験の飼育結果

試験区	試験開始			試験開始~全長20mmサイズ			全長20mmサイズ~全長30mmサイズ			全長30mmサイズ~全長40mmサイズ				
	月日	収容尾数 (尾)	平均全長 (mm)	月日	生残尾数 (尾)	生残率 (%)	月日	収容尾数 ^{*1} (尾)	生残尾数 (尾)	生残率 (%)	月日	収容尾数 ^{*2} (尾)	生残尾数 (尾)	生残率 (%)
1-1	4.13	1,500	12.3	4.28	1,375	91.7	5.15	500	481	96.2	5.29	200	129	64.5
1-2	4.13	1,500	12.3	4.28	1,461	97.4	5.15	500	411	82.2	5.29	200	136	68.0
2-1	4.13	1,500	12.3	4.28	1,500	100	5.15	500	449	89.8	5.29	200	42	21.0
2-2	4.13	1,500	12.3	4.28	1,416	94.4	5.15	500	442	88.4	5.29	200	110	55.0
3-1	4.13	1,500	12.3	4.28	1,066	71.1	5.15	500	465	93.0	5.29	200	98	49.0
3-2	4.13	1,500	12.3	4.28	1,356	90.4	5.15	500	478	95.6	5.29	200	120	60.0

*1 全長20mmサイズで500尾/槽に飼育密度を調整

*2 全長30mmサイズで200尾/槽に飼育密度を調整

表Ⅲ-3-1-9 平成10年度 MSによる防除効果に関する試験の黒化個体の出現状況 (全長30mmサイズ)

試験区	平均全長 (mm)	黒化個体の出現状況 (%)				黒化パターン別の出現状況 (%)									
		正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	A (縁側+体幹部)					C (頭・胸部)			D (尾柄部)	
						正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1	32.5	57.7	40.3	1.5	0.5	53.2	26.9	18.4	1.0	0.5	4.0	2.0	27.4	3.0	1.0
2	31.8	65.2	34.8	0	0	67.2	30.8	2.0	0	0	1.5	0.5	9.1	1.0	0
3	32.2	85.1	14.9	0	0	86.1	10.9	3.0	0	0	1.0	1.0	6.5	0	0

表Ⅲ-3-1-10 平成10年度 MSによる防除効果に関する試験の黒化個体の出現状況 (全長40mmサイズ)

試験区	平均全長 (mm)	黒化個体の出現状況 (%)				黒化パターン別の出現状況 (%)									
		正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	A (縁側+体幹部)					C (頭・胸部)			D (尾柄部)	
						正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1	46.2	22.4	72.1	4.5	1.0	33.8	41.3	20.4	3.0	1.5	10.9	5.5	44.3	11.9	1.5
2	43.9	35.1	64.9	0	0	45.8	47.3	6.9	0	0	0	0	20.6	5.3	0
3	48.8	59.1	40.9	0	0	71.9	18.3	9.8	0	0	2.4	1.2	22.6	3.7	0

表Ⅲ-3-1-11 平成10年度 MSによる防除効果に関する試験の白化個体の出現状況

試験区	全長30mmサイズ				全長40mmサイズ			
	正常	白≤1/2	白>1/2	白化	正常	白≤1/2	白>1/2	白化
1	85.6	2.5	8.5	3.5	82.1	1.5	13.9	2.5
2	82.8	0	7.1	10.1	88.5	2.3	6.9	2.3
3	89.6	1.0	4.5	5.0	84.1	4.9	8.5	2.4

④ 脊椎骨異常個体の出現状況

脊椎骨異常個体の出現率は、1区が18.4%で、2区の10.9%、3区の11.0%に比べやや高かった(表Ⅲ-3-1-12)。

表Ⅲ-3-1-12 平成10年度 MSによる防除効果に関する試験の脊椎骨異常個体の出現状況

試験区	異常個体率 (%)	脊椎骨異常の部位別出現状況 (%)		
		癒合	屈曲	その他
1	18.4	14.4	1.5	2.5
2	10.9	7.0	3.9	0
3	11.0	7.9	0.6	2.4

4) 考察

本試験では黒化個体の出現状況は、全体的に体色正常率が高く、黒化の度も軽度のものが多かった。体色正常率は、MSを敷かない1区が最も低く、MS敷き区では、全長13mmからMSを敷いた2区に比べ、全長20mmからMSを敷いた3区の方が高い値を示した。

このことから、MSを敷くことにより黒化発現を防除する効果があること、黒化個体の出現防除には全長20mmサイズ(Iステージ)からMSを水槽底に敷くことが適正であると考えられた。

(竹内 宏行)

(2) 飼育密度の影響(宮津事業場)

1) 目的

飼育管理面から飼育密度の違いが黒化個体の出現におよぼす影響について、着底期前期(全長13mm, Gステージ)から検討した。

表Ⅲ-3-1-13 平成8年度 飼育密度による影響に関する試験の設定

試験区	Gステージでの収容		全長20mmサイズでの収容	
	密度(尾/㎡)	配合飼料	密度(尾/㎡)	配合飼料
1	20,000	X社	2,000	Y社
2	5,000	X社	2,000	Y社
3	1,000	X社	継続飼育*	Y社

*生残尾数での継続飼育

表Ⅲ-3-1-14 平成8年度 飼育密度による影響に関する試験の飼育結果

試験区	試験開始			試験開始～全長20mmサイズ				全長20mmサイズ～全長40mmサイズ					
	月日	収容尾数(尾)	平均全長(mm)	密度(尾/㎡)	月日	平均全長(mm)	生残尾数(尾)	生残率(%)	月日	収容尾数(尾)	生残尾数(尾)	平均全長(mm)	生残率(%)
1-1	6.21	10,000	13.3	20,000	7.8	24.0	8,397	84.0	7.29	1,000	329	43.9	32.9
1-2	6.21	10,000	13.3	20,000	7.8	22.7	8,692	86.9	7.29	1,000	488	46.2	48.8
2-1	6.21	2,500	13.3	5,000	7.8	23.7	2,199	88.0	7.29	1,000	274	44.8	27.4
2-2	6.21	2,500	13.3	5,000	7.8	24.1	2,232	89.3	7.29	1,000	421	50.0	42.1
3-1 ^{*1}	6.21	500	13.3	1,000	7.7	25.2	412	82.4	-	-	-	-	-
3-2	6.21	500	13.3	1,000	7.8	nd ^{*3}	464	92.8	7.23	464	356	45.2	76.7
3-3	6.21	500	13.3	1,000	7.8	nd ^{*3}	451	90.2	7.23	451	356	46.0	78.9
3-4 ^{*2}	6.21	500	13.3	1,000	7.8	nd ^{*3}	454	90.8	7.15	454	408	36.4	89.9

*1 全長20mmサイズで取り揚げ

*2 全長30mmサイズで取り揚げ

*3 継続飼育により未測定

2) 方法

① 供試魚

供試魚は宮古事業場でGステージ(平均全長13mm)まで飼育された仔魚を宮津事業場に輸送して供した。

② 試験区の設定

供試魚の収容尾数は20,000尾/㎡とする区(1区), 5,000尾/㎡とする区(2区)および1,000尾/㎡とする区(3区)の合計3区を設定した。各試験区に使用した水槽数は、1区と2区は2面, 3区は4面とした(表Ⅲ-3-1-13)。

③ 飼育方法

試験は0.5㎡水槽を使用し、自然水温のろ過海水で飼育した。注水量は1.7ℓ/分の流水飼育とし、エアーストン1個で通気した。餌料はAr-Nおよび配合飼料を用い、Ar-NはパワッシュAで栄養強化(75ml/㎡:6~12時間)して給餌した。配合飼料は全長13mmから全長20mmまではX社製飼料を、全長20mmから試験終了まではY社製飼料を給餌した。なお、X社製飼料は平成7年度に宮古事業場が使用した同じロットとした。

3) 結果

① 成長と生残

試験期間は6月21日から7月29日までの39日間であった。全長20mmサイズまでの飼育は順調に推移し、各試験区とも90.0%前後の高い生残率が得られた(表Ⅲ-3-1-14)。全長20mm以降から全長40mmサイズまでの生残率は1区が32.9%, 48.8%, 2区が27.4%, 42.1%, 3区が76.7~89.9%となり、1区および2区の生残率が低くなった。

② 黒化個体の出現状況

全長20mmサイズ 体色正常個体の出現率は1区が24.0%，2区が54.0%，3区が47.0%であった（表Ⅲ-3-1-15）。

全長30mmサイズ 体色正常個体の出現率は1区が56.0%，2区が47.0%，3区が87.0%で、黒化面積割合1/2以下の個体が1区で44.0%，2区で53.0%，3区で13.0%であった（表Ⅲ-3-1-16）。

全長40mmサイズ 体色正常個体の出現率は1区が38.5%，2区が61.0%，3区が77.0%であり、全長30mm

サイズと比較して1区が著しく減少した（表Ⅲ-3-1-17）。黒化面積割合1/2以下の個体は1区で51.0%，2区で33.5%，3区で16.0%となり、全長30mmサイズに比べ増加した。また、全長40mmサイズでは全長30mmサイズにはみられなかった黒化面積割合1/2以上の個体が1区で10.5%，2区で5.5%，3区で7.0%出現した。このように成長に伴い黒化個体の出現率が増加し、密度が高いほど黒化個体の出現率も高くなる傾向がみられた。

③ 白化個体の出現状況

体色正常個体の出現率は1区が82.9～83.2%，2区が

表Ⅲ-3-1-15 平成8年度 飼育密度による影響に関する試験の黒化個体の出現状況（全長20mmサイズ）

試験区	平均全長 (mm)	黒化個体の出現状況(%)				黒化パターン別の出現状況(%)									
		正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	A(縁側+体幹部)					C(頭・胸部)			D(尾柄部)	
						正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1	23.4	24.0	76.0	0	0	0	87.0	11.0	2.0	0	2.0	0	9.0	33.0	14.0
2	23.9	54.0	46.0	0	0	0	88.0	11.0	1.0	0	0	0	13.0	17.0	16.0
3	*	47.0	53.0	0	0	0	91.0	4.0	4.0	0	0	1.0	8.0	14.0	7.0

* 未測定

表Ⅲ-3-1-16 平成8年度 飼育密度による影響に関する試験の黒化個体の出現状況（全長30mmサイズ）

試験区	平均全長 (mm)	黒化個体の出現状況(%)				黒化パターン別の出現状況(%)									
		正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	A(縁側+体幹部)					C(頭・胸部)			D(尾柄部)	
						正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1	*	56.0	44.0	0	0	48.0	47.0	17.0	12.0	0	1.0	1.0	16.0	57.0	25.0
2	*	47.0	53.0	0	0	47.0	7.0	43.0	3.0	0	0	0	5.0	38.0	26.0
3	36.4	87.0	13.0	0	0	65.0	13.0	19.0	3.0	0	1.0	0	12.0	35.0	26.0

* 未測定

表Ⅲ-3-1-17 平成8年度 飼育密度による影響に関する試験の黒化個体の出現状況（全長40mmサイズ）

試験区	平均全長 (mm)	黒化個体の出現状況(%)				黒化パターン別の出現状況(%)									
		正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	A(縁側+体幹部)					C(頭・胸部)			D(尾柄部)	
						正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1	45.1	38.5	51.0	10.5	0	5.0	44.0	40.5	10.5	0	3.0	1.0	26.0	44.5	23.5
2	47.4	61.0	33.5	5.5	0	17.0	54.0	23.5	5.5	0	0	0	20.0	56.5	20.0
3	45.6	77.0	16.0	7.0	0	32.5	40.5	20.0	7.0	0	0	0	17.5	46.5	31.0

表Ⅲ-3-1-18 平成8年度 飼育密度による影響に関する試験の白化個体の出現状況

試験区	異常個体率 (%)	白化個体の出現状況(%)			
		正常	白≤1/2	白>1/2	白化
1	16.9	83.1	11.3	5.6	0
2	15.5	84.5	10.4	5.1	0
3	8.3	91.7	7.6	0.7	0

* 全長30mmサイズで調査

表Ⅲ-3-1-19 平成8年度 飼育密度による影響に関する試験の脊椎骨異常個体の出現状況

試験区	全長30mmサイズ(%)				全長40mmサイズ(%)			
	異常個体率	腹椎	尾椎	腹椎+尾椎	異常個体率	腹椎	尾椎	腹椎+尾椎
1	11.0	1.5	9.5	0	6.5	0.5	6.5	0.5
2	17.5	1.0	17.0	0.5	15.5	0.5	16.0	1.0
3	20.0	1.0	19.0	0	13.0	3.0	12.0	2.0

82.9～86.1%に比べ3区が90.2～93.2とやや高い傾向を示し、低密度飼育で白化頻度がやや低い結果となった(表Ⅲ-3-1-18)。

④ 脊椎骨異常個体の出現状況

脊椎骨異常の程度は軽度なものであった。全長30mmサイズでは試験区間の差はみられなかったが、全長40mmサイズでは1区がやや低い傾向がみられた(表Ⅲ-3-1-19)。

4) 考察

本年度の試験では、収容密度が高いほど黒化個体の出現率が高くなり、また成長に伴い黒化部位が拡大した。特に、高密度の20,000尾/m³試験区でその傾向が顕著に認められた。このことから、着底期前期(Gステージ)以降の飼育において飼育密度は黒化個体の出現におよぼす要因の一つである可能性が示唆された。この結果から、黒化個体の出現防除対策の一つとして着底期前期(Gステージ)段階での飼育密度を低く抑えることが肝要と考えられた。しかし、Gステージからの密度試験で黒化個体の出現に対して抑制効果がみられた低密度区においても、全長20mmから40mmまでの継続飼育で黒化個体の出現率が増加し、黒化部位の拡大がみられたことから密度以外の要因とも関連づけて検討する必要がある。

(竹内 宏行)

2. 餌料に関する試験

(1) メーカーの違いによる配合飼料の影響 (宮古事業場)

【平成7年度】

1) 目的

ヒラメの黒化個体の出現要因を究明するために、着底期前期(Gステージ)仔魚を用いて、配合飼料メーカーの違いが黒化個体の出現状況におよぼす影響について検討した。また、飼育試験終了後、各試験区で取り揚げた種苗を用いて全長90～100mmまでの継続飼育を行い、成長に伴う黒化個体の出現状況の変化を調査した。

2) 方法

① 供試魚

供試魚は種苗生産中の50m³水槽から平均全長13.1mm(日齢27, Gステージ)の仔魚を無作為に抽出した。試験開始以前ではワムシはナンノクロロプシスとアクアラン(100g/m³)で、Ar-Nはフェオ、パワッシュA(80ml/m³)と脂溶性ビタミン(40ml/m³)で栄養強化後に給餌した。

なお、供試魚は配合飼料に餌付いていない個体が多かった。

② 試験区の設定

試験には3社の配合飼料(以下、X社、Y社、Z社と称す)を用いた。3社単独使用の試験区を設定し、0.5m³黒色ポリエチレン水槽2面ずつの計6面を使用した。試験はX社の市販飼料を給餌する区(1区)、Y社の市販飼料を給餌する区(2区)、Z社の市販飼料を給餌する区(3区)の合計3区を設けた。なお、供試魚の成長に伴いそれぞれ各社の配合飼料の粒径を変えて使用した(表Ⅲ-3-1-20, 写真Ⅲ-3-1-1)。

③ 飼育方法

各試験区とも、水槽1面につき600尾(1,200尾/m³)を収容した。飼育水は18℃に加温したろ過海水を5ℓ/分の流水飼育とした。エアーストン1個で通気し、水槽上面は寒冷紗(遮光率90%)で覆った。

餌料には、ワムシ、Ar-Nおよび配合飼料の3種を用いた。ワムシの栄養強化にはナンノクロロプシスとアクアラン(100g/m³)を使用し、600～1,000個体/mlの密度で約20時間行った。Ar-Nの栄養強化は、ろ過海水にパワッシュA(75～80ml/m³)を懸濁させ、20～30個体/mlの密度で16～26時間行った。

ワムシは試験開始から日齢30まで1回/日、Ar-Nは日齢50まで2回/日に分けて給餌した。配合飼料は、餌付けのために当初は手撒きで適宜給餌したが、日齢38からは自動給餌器を用い6回/日に分けて給餌した。

底掃除は試験開始後6日目から毎日行い、各試験区の死亡個体を計数した。

全長が20mm, 30mmに達した時点、および試験終了時(全長40mm)で各水槽から100尾をサンプリングし、黒化および白化の体色異常出現状況の観察に供した。

④ 全長100mmサイズまでの継続飼育方法

試験終了後に各試験区の全長40mmの種苗を100尾ずつ無作為に抽出して、それぞれ0.5m³水槽1面ずつに収容して、全長100mmサイズまでの飼育を行った。飼料は全長40mmまでの飼育で給餌したX社、Y社およびZ社を引き続きそれぞれ給餌した。各社の配合飼料の粒径は1,000～2,000μmの2種類をそれぞれ用い、自動給餌で7回/日給餌した。飼育は18℃に加温したろ過海水を用い、10ℓ/分の流水飼育とした。

3) 結果

① 成長と生残

試験終了時の平均生残率は1区が39.4%、2区が

表Ⅲ-3-1-20 平成7年度 メーカーの違いによる配合飼料の影響に関する試験の設定

試験区	給餌する配合飼料のメーカー	
	G～Iステージ	Iステージ～全長40mmサイズ
1	X社	X社
2	Y社	Y社
3	Z社	Z社

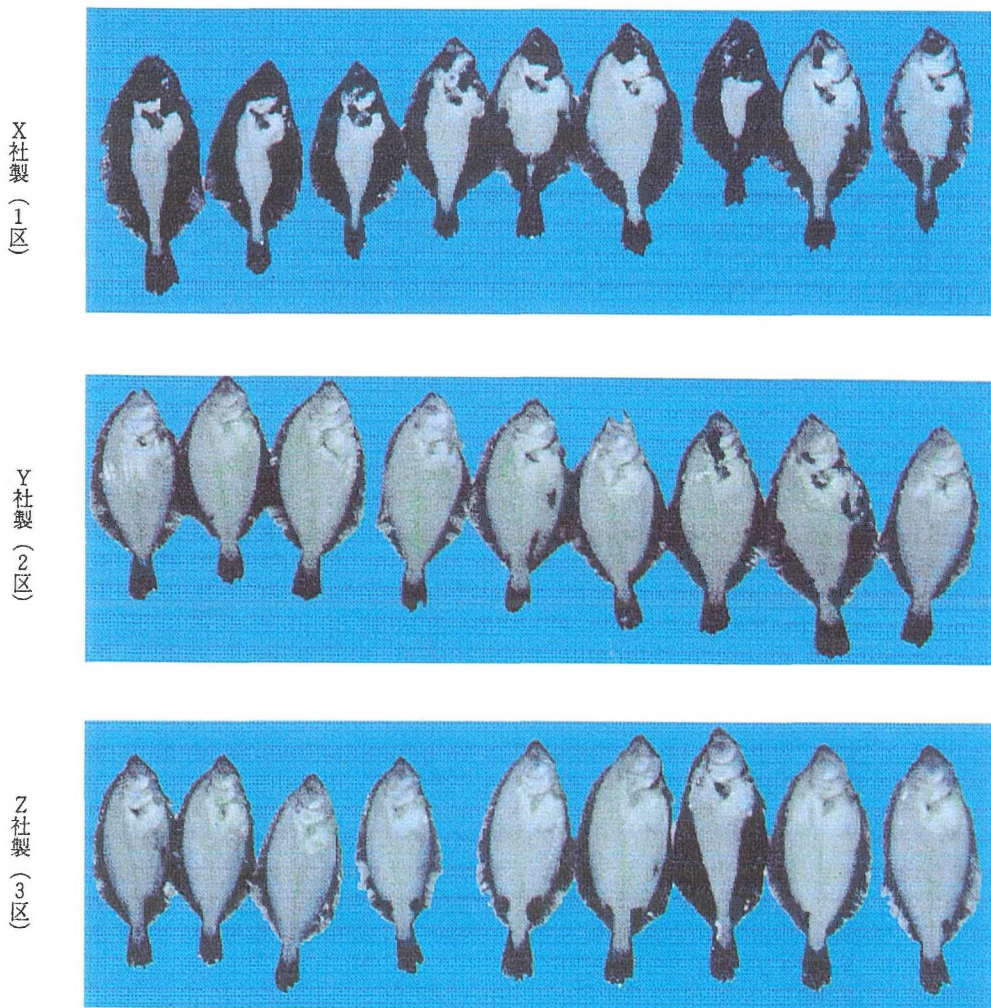
42.8%, 3区が52.1%であり, 平均全長は1区が50.3mm, 2区が46.8mm, 3区が46.0mmであった(表Ⅲ-3-1-21)。試験開始6日目に残餌が多くなり, 水槽底面に粘性の物質が発生し, それに絡まって死亡する個体が見られた。このため底掃除を徹底し, 粘液物質の除去に努めた結果, その後の死亡は治まった。

② 黒化個体の出現状況

全長20mmサイズ 各区の体色正常個体の出現率は, 1区が78.8% (75.5~82.0), 2区が83.0%, 3区が88.3%

(87.3~89.2) であり, 3区間で大きな差は認められなかった。

全長30mmサイズ 体色正常個体の出現率は1区が19.8% (17.0~22.5), 2区が74.7% (74.5~74.8), 3区が73.8% (69.9~77.7) であった。全長20mmサイズ時と比べて1区の体色正常個体の出現率は1/4程度に減少したのに対して, 黒化面積割合1/2以下の個体の出現率は増加した。また, 1区では黒化面積割合1/2以上の個体の出現率も4.5% (4.0~4.9) 認められた。2区お



写真Ⅲ-3-1-1 X, Y, Z社配合飼料の黒化個体出現状況 (全長100mm)

表Ⅲ-3-1-21 平成7年度 メーカーの違いによる配合飼料の影響に関する試験の飼育結果

試験区	試験開始			試験開始~全長40mmサイズ			
	月日	尾数 (尾)	平均全長 (mm)	月日	飼育日数 (日)	平均全長 (mm)	生残率* (%)
1-1	7.3	600	13.1	8.10	39	49.7	47.3
1-2	7.3	600	13.1	8.10	39	50.9	31.5
2-1	7.3	600	13.1	8.10	39	45.7	39.2
2-2	7.3	600	13.1	8.10	39	47.9	46.3
3-1	7.3	600	13.1	8.10	39	46.8	51.7
3-2	7.3	600	13.1	8.10	39	45.1	52.5

* 生残率は飼育途中の全長20mm及び30mmでサンプリングした尾数を除いて算出

よび3区における体色正常個体の出現率は全長20mmサイズ時に比べ10%程度低下した。黒化パターン別の出現状況では1区に黒化が上下縁辺部の一部あるいは大半を覆っている個体が多くみられ、頭部、胸鰭全体を覆っている個体もみられた。これに対して2区と3区では、黒化の出現が軽微であり、尾柄部およびその前方の上下縁側部に若干みられる程度であった。このように全長30mmサイズになって各試験区間で黒化個体の出現状況に差が認められた。

全長40mmサイズ 1区ではほとんどの個体に黒化部位が認められるようになり、全長30mmサイズ時と比べ黒化面積割合1/2以上の個体の出現率が13.0% (10.0~15.0) まで増加し、黒化個体の出現率および黒化部位の面積も増大した。2区および3区でも体色正常個体はみられず、黒化面積割合1/2以下の個体の出現率がそれぞれ100%となった。また、黒化個体の出現状況は全長30mmサイズ時と比べさらに増大したが、大半は尾柄部に若干見られる程度であった (表Ⅲ-3-1-22)。

黒化パターン別の出現状況は1区でA2+が12.5% (10.0~15.0), A+が27.0%, A±が46.5% (44.0~49.0) の出現率であった。これに対して2区と3区ではA±がそれぞれ31.5% (21.0~42.0), 30.5% (24.0~37.0) の出現率であった。C1, C2, C3部の出現率は1区でそれぞれ50.0% (48.0~52.0), 33.5% (32.0~35.0), および53.5% (53.0~54.0) で、2区と3区はいずれも数%と低く、際立って1区が高かった。D部でも1区は2区および3区の約2倍であった (表Ⅲ-3-1-23)。

全長100mmサイズ 1区の黒化面積割合1/2以上の出現

率が31.1%まで増加し、さらに黒化割合が増大した。一方、2区と3区は全長40mmサイズ時と同様に黒化面積割合1/2以下の出現率がほぼ100%であったが、黒化割合は大半が非常に軽度であった (写真Ⅲ-3-1-1)。黒化パターン別出現状況は1区でA2+が26.7%, A+が44.4%, A±が27.8%の出現率となり、全長40mmサイズ時に比べA2+, A3+が増大し、黒化が顕著となった。2区と3区は順にA+が3.2%, 2.2%, A±が67.7%, 71.0%の出現率で、全長40mmサイズ時に比べて大きな変化はみられなかった。C部では1区で87.8~95.6%まで増大した。2区と3区のC1部でそれぞれ19.4%, 10.8%, C2部で39.8%, 17.2%, C3部で8.6%, 15.1%の出現率で若干黒化が増大したが、1区に比べれば低い値であった。D部は1区で21.1%まで増大したが、2区と3区は全長40mmサイズとほぼ同様であった。

③ 白化個体の出現状況

各区の全長20mm, 30mm, 40mmサイズにおける白化個体の出現率は10~20%であり、顕著な差異は認められなかった (表Ⅲ-3-1-24)。

④ 脊椎骨異常個体の出現状況

全長100mmの時点での脊椎骨異常個体の出現率は1区が9.0% (8.0~10.1%), 2区が19.7% (19.0~20.4%), 3区が12.7% (12.2~15.2%) であり、2区が他の区に比べ高い値を示した。観察された異常は主に脊椎骨異常であり、異常部位は尾椎の32~38番目であった (表Ⅲ-3-1-25)。

4) 考 察

全長20mmサイズの段階では各社の配合飼料試験区と

表Ⅲ-3-1-22 平成7年度 メーカーの違いによる配合飼料の影響に関する試験のサイズ別黒化出現状況

試験区	全長20mmサイズ (%)					全長30mmサイズ (%)					全長40mmサイズ (%)					全長100mmサイズ (%)			
	正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	黒化	正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	黒化	正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	
1-1	82.0	22.5	72.5	4.9	0	0	90.0	10.0	0	0	0	68.9	31.1	0					
1-2	75.5	17.0	79.0	4.0	0	0	85.0	15.0	0										
2-1	83.0	74.8	25.2	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0						
2-2	83.0	74.5	25.5	0	0	0	100	0	0										
3-1	89.2	77.7	22.3	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0						
3-2	87.3	69.9	30.8	0	0	0	100	0	0										

表Ⅲ-3-1-23 平成7年度 メーカーの違いによる配合飼料の影響に関する試験の黒化パターン別出現状況 (全長40mm)

試験区	AC合計 (%)	黒化パターン別の出現状況 (%)										
		A (縁側+体幹部)					C (頭・胸部)			D (尾柄部)		
		正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2	
1-1	83.0	17.0	49.0	24.0	10.0	0	52.0	35.0	53.0	98.0	7.0	
1-2	90.0	11.0	44.0	30.0	15.0	0	48.0	32.0	54.0	94.0	10.0	
2-1	48.0	56.0	42.0	2.0	0	0	7.0	5.0	8.0	51.0	5.0	
2-2	30.0	79.0	21.0	0	0	0	1.0	2.0	0	41.0	4.0	
3-1	32.0	76.0	24.0	0	0	0	2.0	0	7.0	34.0	0	
3-2	41.0	61.0	37.0	3.0	0	0	2.0	1.0	3.0	44.0	2.0	

も黒化個体の出現状況に大差はみられなかったが、全長30mmサイズでは明らかな差がみられるようになった。また全長40mmから100mmまでの継続飼育結果からもX社の市販飼料を使用した場合、さらに黒化部位の増大が顕著に認められた。このことから、全長20~30mmの育成段階に使用する配合飼料の成分が黒化個体の出現と黒化面積の拡大に影響をおよぼす要因があることが推察された。白化個体の出現状況にはメーカー間の差異は見られなかったが、脊椎骨異常個体の出現率に関しては差が認められた。

試験に用いた3社の配合飼料の i) 一般成分, ii) ビタミン, iii) ミネラル, iv) 脂肪酸組成, v) 脂質組成, vi) アミノ酸組成の分析を行った結果、黒化の多かった

X社の市販飼料はVD含量がY社、Z社の市販飼料に比べて20~30倍高く、逆にVA含量はY社、Z社の市販飼料よりも低い値を示した(表Ⅲ-3-1-26)。このように、飼料中の栄養成分、特にビタミンが黒化個体の出現に何らかの影響を与えていることが示唆された。今後、これらの栄養素が黒化個体の出現に関連があるかどうか究明する必要がある。また、各栄養素が魚体内に取り込まれているかどうか重要な問題であり、配合飼料の物性(硬い、軟らかい)や消化吸収についても併せて検討する必要がある。

【平成8年度】

1) 目的

前年度使用した代表的な2社(X, Y社)の配合飼料

表Ⅲ-3-1-24 平成7年度 メーカーの違いによる配合飼料の影響に関する試験の白化個体の出現状況

試験区	全長20mmサイズ (%)				全長30mmサイズ (%)				全長40mmサイズ (%)	
	正常	白≤1/2	白>1/2	白化	正常	白≤1/2	白>1/2	白化	正常	白化
1-1	83.0	0	0	17.0	89.3	0	0	10.7	89.8	10.2
1-2	86.3	0	0	13.7	86.1	1.0	0	12.9	89.6	10.4
2-1	84.0	1.0	0	15.0	88.3	0	0	11.7	90.1	9.9
2-2	85.0	0	0	15.0	83.6	1.0	0	15.4	91.5	8.5
3-1	81.4	0	0	18.6	89.3	0	0	10.7	90.7	9.3
3-2	90.2	0	0	9.8	87.3	1.0	0	11.7	88.0	12.0

表Ⅲ-3-1-25 平成7年度 メーカーの違いによる配合飼料の影響に関する試験の脊椎骨異常個体の出現状況

試験区	異常個体率 (%)	脊椎骨及び棘の異常個体の出現状況 (%)		
		椎体異常	棘異常	椎体・棘異常
1-1	8.0	8.0	0	0
1-2	10.1	9.1	0	1.0
2-1	20.4	20.4	0	0
2-2	19.0	19.0	0	0
3-1	15.2	14.1	3.0	0
3-2	12.2	11.2	2.0	0

表Ⅲ-3-1-26 平成7年度 メーカーの違いによる配合飼料の影響に関する試験に用いた配合飼料の分析結果

項目	単位	X社配合飼料				Y社配合飼料		Z社配合飼料	
		250-400 μm	250-400 μm	400-700 μm	1,000 μm	-360 μm	360-620 μm	370-450 μm	450-850 μm
一般組成									
粗タンパク質	% ^{*1}	58.6	63.2	62.4	58.0	60.6	60.4	55.6	57.6
粗脂肪	% ^{*1}	21.6	16.8	17.2	14.6	14.2	12.1	10.4	9.4
粗灰分	% ^{*1}	8.8	9.7	9.9	14.6	15.0	14.2	14.1	13.3
ビタミン含量									
VA	IU/100g ^{*2}	530.0	1,830.0	23,000.0	4,730.0	87,000.0	9,230.0	7,600.0	7,930.0
VB1	mg/100g ^{*2}	7.1	6.4	6.2	6.1	7.5	8.0	2.6	2.9
VB2	mg/100g ^{*2}	21.6	18.3	17.0	13.4	15.4	18.2	2.8	2.9
VC	mg/100g ^{*2}	84.0	117.0	105.0	27.0	1,020.0	1,140.0	検出限界以下	検出限界以下
VD	IU/100g ^{*2}	56,600.0	32,300.0	2,610.0	1,690.0	1,140.0	1,120.0	490.0	420.0
VE	mg/100g ^{*2}	116.0	93.7	89.8	60.6	133.0	160.0	40.8	38.6
脂肪酸含量									
EPA	g/100g ^{*1}	1.3	1.5	1.6	1.6	2.1	1.5	1.3	1.2
DHA	g/100g ^{*1}	1.8	1.7	1.8	1.6	2.2	1.9	1.4	1.2
Σn-3HUFA	g/100g ^{*1}	4.7	4.6	4.8	4.7	5.7	4.7	4.2	3.8

*1: 乾物重量換算

*2: 湿物重量換算

を用い、平成7年度と同様の目的で着底期前期から全長40mmまでの飼育試験を行った。平成8年度は、全長20mm前後（Iステージ）から、それまで使用していた配合飼料を他のメーカーに切替えて給餌し、黒化個体の出現状況に差異があるかどうかについて検討した。

2) 方法

① 供試魚

種苗生産中の50m³水槽から平均全長（日齢27，Gステージ）の仔魚を無作為に抽出して試験に供した（以下，試験1と称す）。なお，試験1は後述する通り，飼育開始から死亡個体が増加したので，再試験（試験2と称す）を行った。試験2は試験1と同じく50m³水槽でそれぞれX社，Y社の市販飼料を使用して単一メーカーの市販飼料で飼育された日齢41のIステージの種苗をそれぞれ無作為に抽出した。

50m³水槽で用いた生物餌料の栄養強化は平成7年度と同様である。

② 試験区の設定

試験1 試験区にはGステージから全長40mmまでX社の市販飼料を給餌する区（1区），GステージからIステージまでX社，Iステージ以降にY社の市販飼料を給餌する区（2区），GステージからIステージまでY社，Iステージ以降にX社の市販飼料を給餌する区（3区），Gステージから全長40mmまでY社の市販飼料を給餌する区（4区）の合計4区を設けた。

試験2 試験区にはIステージから全長40mmまでX社の市販飼料を給餌する区（1区），Iステージから全長40mmまでY社の市販飼料を給餌する区（2区），Iステージから全長40mmまでX社の市販飼料を給餌する区（3区），Iステージから全長40mmまでY社の市販飼料を給餌する区（4区）の合計4区を設けた。なお，供試魚は1区，2区はIステージまでX社の市販飼料を使用して飼育された平均全長18.3mmの種苗，3区，4区はIステージまでY社の市販飼料を使用して飼育された平均全長18.6mmの種苗をそれぞれ使用した（表Ⅲ-3-1-27）。

本試験に使用した配合飼料は平成7年度の試験で使用

した同じロットで，開封せずに-40℃で冷凍保存したものである。

③ 飼育方法

各試験区とも0.5m³黒色ポリエチレン水槽を2面ずつ用いた。各試験区の収容密度は試験1で600尾（1,200尾/m³），試験2で500尾（1,000尾/m³）とした。なお，試験1ではIステージで生残尾数が少なくなったことから水槽2面を1面ずつにまとめて継続飼育した。

3) 結果

① 成長と生残

試験1の試験終了時の平均全長は43.9～47.5mm，生残率は37.9～43.8%であり，いずれも試験区間の差異は認められなかった。

試験2では試験終了時の平均全長は43.4～49.8mm，生残率は83.6～90.8%であり，いずれも試験区間の差異は認められなかった（表Ⅲ-3-1-28）。

② 黒化個体の出現状況

全長20mmサイズ 試験1における各区の平均体色正常個体の出現率は，80.9～89.0%，試験2では93.2～95.0%であり，黒化個体の出現状況に顕著な差は認められなかった。

全長30mmサイズ 試験1における各区の平均体色正常個体の出現率は3.3～13.8%に低下し，黒化面積割合1/2以下の個体が急増した。この傾向は試験2でも同様であった。

全長40mmサイズ 試験1・2ともに各試験区の体色正常個体の出現率はさらに低下し，黒化面積割合1/2以上の個体が増加した。いずれの試験でも，1区，3区の黒化面積割合1/2以上の個体の出現率が2区，4区の値に比べて高い値を示した（表Ⅲ-3-1-29）。

黒化パターン別の出現状況を見ると，A部，C部およびD部のいずれもIステージ以降にX社の市販飼料を給餌した1区，3区がY社の市販飼料を給餌した3区，4区よりも高い値を示した（表Ⅲ-3-1-30）。

③ 白化個体の出現状況

各区の全長20mm，30mm，40mmにおける白化個体の出現率は10%前後であり，顕著な差異は認められなかつ

表Ⅲ-3-1-27 平成8年度 メーカーの違いによる配合飼料の影響に関する試験の設定

区分	試験区	給餌する配合飼料メーカー	
		G～Iステージ	I～全長40mmサイズ
試験1	1	X	X
	2	X	Y
	3	Y	X
	4	Y	Y
試験2	1	X*	X
	2	X*	Y
	3	Y*	X
	4	Y*	Y

注：配合飼料は基本的には平成7年度購入分を使用しているが，*は各社配合飼料は平成8年度購入分を使用。

た(表Ⅲ-3-1-31)。

④ 脊椎骨異常個体の出現状況

全長40mmサイズで脊椎骨異常の出現状況を調べた結果、いずれの試験区においても脊椎骨の癒合が13~25%見られた。平成7年度の試験では給餌した配合飼料によって脊椎骨の異常率に差が見られたが、平成8年度の試験では各試験区の脊椎骨異常率に差は見られなかった(表Ⅲ-3-1-32)。

4) 考察

平成7年度の試験で黒化個体の出現率が高かったX社

の市販飼料と低かったY社の市販飼料をGステージから全長40mmまで給餌した結果、いずれの年度においても、X社製の市販飼料を給餌した区の黒化個体の出現率がY社に比べて高くなる傾向が認められ、配合飼料メーカーの違いが黒化個体の出現に影響することが再確認された。また、IステージでX社とY社の配合飼料を入れ替えて給餌した結果でもIステージ以降にX社の市販飼料を給餌した区の黒化個体の出現率が高く、浮遊期よりも着底期以降に与える飼料が黒化個体の出現に大きく関与していることが示唆された。(津崎 龍雄)

表Ⅲ-3-1-28 平成8年度 メーカーの違いによる配合飼料の影響に関する試験の飼育結果

区分	試験区	試験開始			試験開始~全長40mmサイズ			
		月日	尾数 (尾)	平均全長 (mm)	月日	飼育日数 (日)	平均全長 (mm)	生残率 (%)
試験1*	1-1	6.19	600	12.3	7.31	42	44.6	40.3
	1-2	6.19	600	12.3				
	2-1	6.19	600	12.3	7.31	42	43.9	43.8
	2-2	6.19	600	12.3				
	3-1	6.19	600	12.3	7.31	42	47.5	37.9
	3-2	6.19	600	12.3				
	4-1	6.19	600	12.3	7.31	42	45.9	42.0
	4-2	6.19	600	12.3				
試験2	1-1	7.4	500	18.3	7.31	27	43.9	89.2
	1-2	7.4	500	18.3	7.31		45.9	90.8
	2-1	7.4	500	18.3	7.31	27	44.8	83.6
	2-2	7.4	500	18.3	7.31		43.4	88.0
	3-1	7.4	500	18.6	7.31	27	49.8	85.6
	3-2	7.4	500	18.6	7.31		48.1	80.6
	4-1	7.4	500	18.6	7.31	27	45.3	85.6
	4-2	7.4	500	18.6	7.31		46.3	87.2

* 飼育途中で1水槽にまとめる。

表Ⅲ-3-1-29 平成8年度 メーカーの違いによる配合飼料の影響に関する試験のサイズ別黒化個体出現状況

区分	試験区	全長20mmサイズ (%)				全長30mmサイズ (%)			全長40mmサイズ (%)		
		正常	正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	
試験1*	1	84.0	3.3	93.3	3.3	0	2.8	85.5	11.7	0	
	2	80.9	9.1	88.2	1.8	0.9	7.2	89.9	2.9	0	
	3	89.0	4.8	89.4	4.8	1.0	2.9	68.6	27.2	1.3	
	4	83.9	13.8	75.2	9.2	1.8	5.5	89.4	5.1	0	
試験2	1-1	93.2	18.6	76.1	5.3	0	2.7	85.7	11.6	0	
	1-2	93.2	11.3	85.8	2.8	0	4.9	74.6	20.5	0	
	2-1	93.2	22.3	77.7	0	0	13.5	86.5	0	0	
	2-2	93.2	19.8	80.2	0	0	15.3	84.7	0	0	
	3-1	95.0	19.4	80.6	0	0	3.1	95.3	2.3	0	
	3-2	95.0	9.9	90.1	0	0	1.3	86.8	11.9	0	
	4-1	95.0	25.8	74.2	0	0	16.2	83.8	0	0	
	4-2	95.0	36.0	64.0	0	0	22.3	78.5	0.8	0	

*: 飼育途中で1水槽にまとめる。

表Ⅲ-3-1-30 平成8年度 メーカーの違いによる配合飼料の影響に関する試験の黒化パターン別の出現状況

区分	試験区	黒化パターン別の出現状況 (%)									
		A (縁側+体幹部)					C (頭・胸部)			D (尾柄部)	
		正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
試験*	1	29.6	38.8	26.6	5.0	0	12.9	1.4	65.5	57.6	3.6
	2	53.7	35.6	8.8	1.9	0	3.8	0.6	13.8	35.0	7.5
	3	31.2	31.2	21.3	14.2	2.1	29.8	13.5	74.5	73.0	15.6
	4	61.1	29.9	7.5	1.5	0	1.5	1.5	14.2	26.1	4.5
試験2	1-1	25.4	46.4	18.2	10.0	0	10.0	2.7	59.1	25.5	3.6
	1-2	26.2	32.8	25.4	15.6	0	23.8	9.0	47.5	63.1	4.1
	2-1	65.7	28.9	5.4	0	0	0	0	4.7	21.5	4.0
	2-2	59.9	35.2	4.9	0	0	0	0	4.2	17.6	4.9
	3-1	53.6	37.6	8.8	0	0	7.2	3.2	41.6	34.4	1.6
	3-2	30.3	46.7	15.1	7.9	0	17.8	5.9	65.1	46.7	0
	4-1	76.2	21.7	2.1	0	0	0	0	4.9	7.7	0
	4-2	76.5	22.7	0.8	0	0	0	0	2.3	20.5	0

* 飼育途中で1水槽に収槽

表Ⅲ-3-1-31 平成8年度 メーカーの違いによる配合飼料の影響に関する試験のサイズ別白化個体の出現状況

区分	試験区	全長20mmサイズ (%)				全長30mmサイズ (%)				全長40mmサイズ (%)			
		正常	白≤1/2	白>1/2	白化	正常	白≤1/2	白>1/2	白化	正常	白≤1/2	白>1/2	白化
		試験1	1	82.1	0.9	0.9	16.0	82.5	0	0.8	16.7	89.0	0
2	84.5		0	0	15.4	89.1	0	0	10.9	92.0	0	0	8.0
3	87.0		0	1.0	12.0	90.4	2.9	1.0	5.3	86.8	0	0	13.2
4	80.0		0.8	1.7	19.5	84.4	5.5	0.9	9.2	87.8	0	0	12.2
試験2	1-1	79.5	3.4	4.3	12.8	88.5	2.7	0	8.8	93.8	4.4	1.8	0
	1-2	79.5	3.4	4.3	12.8	88.7	1.9	0	9.4	91.0	1.6	4.1	3.3
	2-1	79.5	3.4	4.3	12.8	94.2	1.0	0	4.8	93.2	0.7	0	6.1
	2-2	79.5	3.4	4.3	12.8	86.1	0	0	13.9	88.9	2.1	0	9.0
	3-1	82.0	5.0	0	13.0	81.6	0	1.9	16.5	92.2	3.1	0	4.7
	3-2	82.0	5.0	0	13.0	86.1	0	0	13.9	84.8	2.0	4.6	8.6
	4-1	82.0	5.0	0	13.0	88.7	0	1.0	10.3	93.4	0	0	6.6
	4-2	82.0	5.0	0	13.0	88.0	1.0	0	11.0	92.3	0.8	0.8	6.1

表Ⅲ-3-1-32 平成8年度 メーカーの違いによる配合飼料の影響に関する試験の脊椎骨異常個体の出現状況

区分	試験区	脊椎骨及び棘異常個体の出現状況 (%)	
		椎体異常	棘異常
		試験1	1
2	19.0		2.0
3	24.0		6.0
4	24.0		6.0
試験2	1-1	25.0	3.0
	1-2	24.0	5.0
	2-1	22.0	4.0
	2-2	13.0	5.0
	3-1	15.0	7.0
	3-2	18.0	4.0
	4-1	19.0	4.0
	4-2	14.0	7.0

(2) アルテミアノープリウスと配合飼料の給餌比率の影響 (小浜事業場)

1) 目的

ヒラメの種苗生産では配合飼料は浮遊期後半頃からの主餌料として用いられ、量産には不可欠な飼料となっている。配合飼料の給餌が体色異常におよぼす影響については、白化個体の出現を抑制する半面¹⁾、黒化発現を促す傾向も明らかになっており、配合飼料の給餌方法の見直しが必要とされている²⁾。本試験では着底期前期の仔魚(全長13mm, Gステージ)を用いて、配合飼料と Ar-N の給餌比率、および Ar-N の栄養強化(EPA, DHA の強化)が黒化個体の出現状況におよぼす影響について検討した。

2) 方法

① 供試魚

供試魚は官津事業場で養成中のヒラメ親魚より得られた受精卵を用い、小浜事業場で生産された日齢33, 平均全長12.5mmの着底期前期の仔魚2.5万尾を用いた。試験開始前までの飼育はナンノクロロブシス(2,500~3,000万セル/ml)を用いて栄養強化したL型ワムシ(日齢0~24), 可消化処理クロレラ(マリンオメガ:日清ファインケミカル, 2.0~2.5 l/m³)と乳化オイル(パワッシュュA:75ml/m³, 理研ビタミン工業製)を用いて栄養強化した Ar-N(日齢21~33)を給餌した。配合飼料(日齢26~33)はX社とY社とZ社のものを混合して給餌した。

② 試験区の設定

試験区は配合飼料と Ar-N の給餌比率により、配合飼料の給餌量を魚体重当り5%, EPA と DHA で2次強化した Ar-N の給餌量を1尾当り50個体/日および200個体/日とする区(1, 2区), 配合飼料の給餌量を魚体重当り2.5%, EPA と DHA で2次強化した Ar-N の給餌量を1尾当り200個体/日とする区(3区), EPA と DHA

で2次強化した Ar-N のみを飽食量給餌(1尾当り1,000~3,000個体/日)する区(4区), 配合飼料の給餌量を魚体重当り2.5%, EPA のみで2次強化した Ar-N を1尾当り200個体/日とする区(5区), 合計5区とし、各2面を設けた(表Ⅲ-3-1-33)。

③ 飼育方法

試験には0.5m³水槽を10面用い、各水槽にGステージの仔魚を2,500尾(5,000尾/m³)収容した。水温を18℃に維持するように調温し、換水量を5~10回転/日とした。試験飼料にはX社の市販飼料を用いた。各種餌料の給餌時刻を表Ⅲ-3-1-34に示した。Ar-N の栄養強化はDHA と EPA の強化にはパワッシュュA(理研ビタミン工業製)を使用し、EPA のみの強化にはマリンオメガ(クロレラ工業製)を使用した。全長20mmサイズで各試験区の種苗を500尾(1,000尾/m³)ずつ選別(白化個体)して収容し、全長40mmサイズまで継続飼育した。飼料にはY社の市販飼料を使用した。

3) 結果

試験は、平成8年6月1日~7月8日までの38日間行った。全長20mmサイズまでの平均水温は18.5℃(17.5~19.7), pHは8.15(8.04~8.30)であり、全長20mmから全長40mmサイズまでの平均水温は19.8℃(19.7~21.5)であった。照度は2,000~6,000 lxであった。

① 成長と生残

全長20mmサイズ, 全長40mmサイズの飼育結果を表Ⅲ-3-1-35に示した。

全長20mmサイズの平均全長は、1区が24.6mm, 2区が22.9mm, 3区が20.9mm, 4区が18.0mm, 5区が23.1mmで、生物餌料を単独給餌した4区が他区に比べて成長が悪かった。全長40mmサイズの平均全長は、1~4区は44.3~45.7mmでほとんど差はなかったが、5区は50.2mmと最も良好であり、全長20mmサイズの生残

表Ⅲ-3-1-33 平成8年度 Ar-N と配合飼料の給餌比率に関する試験の設定

試験区	配合飼料* (%/日)	Ar-N給餌量 (個体/日/尾)	Ar-Nの強化剤の 種類	添加量と時間 (1m ³ 当たり)	備考
1	5.0	50	パワッシュュA	75ml・24時間	EPAとDHA強化
2	5.0	200	パワッシュュA	75ml・24時間	〃
3	2.5	200	パワッシュュA	75ml・24時間	〃
4	0	飽食量	パワッシュュA	75ml・24時間	〃
5	2.5	200	マリンオメガ	2.5 l・24時間	EPAのみの強化

* X社を使用

表Ⅲ-3-1-34 平成8年度 Ar-N と配合飼料の給餌比率に関する試験の餌料の給餌時刻の設定

試験区	7:00	9:00	11:00	13:00	15:00	16:30
1	配合飼料	配合飼料	配合飼料	配合飼料	配合飼料	配合飼料, Ar-N
2	配合飼料	配合飼料	Ar-N	配合飼料	配合飼料	Ar-N
3	配合飼料	配合飼料	配合飼料	Ar-N	-	Ar-N
4	Ar-N	Ar-N	Ar-N	Ar-N	-	Ar-N
5	配合飼料	配合飼料	配合飼料	Ar-N	-	Ar-N

率は、生物餌料単独の4区が94.2%で最も高く、他の試験区は78.4~85.5%であった。全長40mmサイズの生残率は各試験区とも60.9~66.5%で大きな差はなかった。

② 黒化個体の出現状況

黒化個体の出現状況を表Ⅲ-3-1-36に示した。

全長20mmサイズの体色正常個体の出現率は1区が19.0%、2区が36.5%、3区が46.5%、4区が94.0%、5区が46.0%であり、Ar-N単独給餌の4区が最も高かった。配合飼料の給餌率が高く、Ar-Nの給餌量が少ない区ほど体色正常個体の出現率が低下する傾向がみられた。

全長40mmサイズの体色正常個体の出現率は各区とも全長20mmサイズに比べて低下し、Ar-Nの給餌比率が他区に比べて少なかった1区では黒化面積割合1/2以上、および完全黒化の個体の出現率が増加し、黒化の度合は重度であった。

平均全長20mmサイズおよび全長40mmサイズでの黒化パターン別の出現状況を表Ⅲ-3-1-37、表Ⅲ-3-1-38に示した。全長20mmサイズのA部の正常率は1区が47.5%、2区が60.0%、3区が75.0%、4区が98.0%で、Ar-N単独給餌の4区が最も高く、Ar-N給餌量が最も少なく配合飼料の給餌率が高い1区が最も低い値を示した。また、

C部、D部の出現状況も1区が最も高く、4区が最も低かった。全長40mmサイズのA部でのA2+、A3+は増大し、その出現率はそれぞれ1区が32.0%、1.5%、2区が13.5%、0.5%、3区が4.0%、0.5%、4区が11.0%、0%、5区が12.5%、0%となり、1区と他の区で大きな差がみられた。このように黒化パターン別の出現率でもサイズが大きくなるとともに各区とも黒化の度合が増加する傾向がみられた。

Ar-NにEPAのみを強化した5区とEPAとDHAを強化した3区的全長20mmサイズでの体色正常個体の出現率はそれぞれ46.0%、46.5%、黒化面積割合1/2以下の個体の出現率は53.0%、52.0%となり、大きな差はなかった。

3) 白化個体の出現状況

全長20mmサイズにおける白化個体の出現率は1区が8.0%、2区が11.0%、3区が14.0%、4区が19.5%、5区が10.0%となり、Ar-N単独給餌の4区(対照区)が最も高く、Ar-Nの給餌率が多いほど、また配合飼料の給餌量が少ないほど白化個体の出現率が増加する傾向がみられた。3区と5区の白化個体の出現率はそれぞれ14.0%、10.0%であり、Ar-NをEPAとDHA強化した

表Ⅲ-3-1-35 平成8年度 Ar-Nと配合飼料の給餌比率に関する試験の飼育結果

試験区	試験開始			試験開始~全長20mmサイズ			全長20mmサイズ~全長40mmサイズ					
	月日	尾数	平均全長 (mm)	月日	生残尾数	平均全長 (mm)	生残率 (%)	月日	収容尾数*	生残尾数	平均全長 (mm)	生残率 (%)
1	6.1	2,500	12.5	6.18	2,139	24.6	85.5	7.8	500	266	45.7	65.4
2	6.1	2,500	12.5	6.18	1,981	22.9	79.2	7.8	500	262	45.7	65.5
3	6.1	2,500	12.5	6.18	1,959	20.9	78.4	7.8	500	266	44.3	66.5
4	6.1	2,500	12.5	6.18	2,355	18.0	94.2	7.8	500	256	44.8	64.0
5	6.1	2,500	12.5	6.18	2,021	23.1	80.8	7.8	500	244	50.2	60.9

* 全長20mmサイズで500尾/槽に密度調整

表Ⅲ-3-1-36 平成8年度 Ar-Nと配合飼料の給餌比率に関する試験のサイズ別黒化個体出現状況

試験区	全長20mmサイズ (%)				全長30mmサイズ (%)				全長40mmサイズ (%)			
	正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化
1-1	22.0	67.0	9.0	2.0	1.0	67.0	28.0	4.0	0	70.0	27.0	3.0
1-2	16.0	76.0	8.0	0	0	81.0	18.0	1.0	5.0	76.0	18.0	1.0
平均	19.0	71.5	8.5	1.0	0.5	74.0	23.0	2.5	2.5	73.0	22.5	2.0
2-1	33.0	64.0	3.0	0	3.0	90.0	7.0	0	0	93.0	7.0	0
2-2	40.0	59.0	1.0	0	3.0	92.0	5.0	0	0	91.0	8.0	1.0
平均	36.5	61.5	2.0	0	3.0	91.0	6.0	0	0	92.0	7.5	0.5
3-1	41.0	57.0	2.0	0	4.0	96.0	0	0	1.0	97.0	2.0	0
3-2	52.0	47.0	1.0	0	10.0	86.0	4.0	0	0	98.0	2.0	0
平均	46.5	52.0	1.5	0	7.0	91.0	2.0	0	0.5	97.5	2.0	0
4-1	93.0	7.0	0	0	欠	欠	欠	欠	19.0	81.0	0	0
4-2	95.0	5.0	0	0	6.0	83.0	11.0	0	0	89.0	11.0	0
平均	94.0	6.0	0	0	-	-	-	-	9.5	85.0	5.5	0
5-1	48.0	51.0	1.0	0	1.0	96.0	3.0	0	0	93.0	7.0	0
5-2	44.0	55.0	1.0	0	4.0	91.0	4.0	1.0	6.0	93.0	1.0	0
平均	46.0	53.0	1.0	0	2.5	93.5	3.5	0.5	3.0	93.0	4.0	0

3区がEPAのみで強化した5区に比べ、白化個体の出現率がやや高かった。

④ 脊椎骨異常個体の出現状況

全長40mmサイズでの脊椎骨異常個体の出現状況を表Ⅲ-3-1-39に示した。脊椎骨異常個体の出現率は32.9～39.5%であり、各試験区とも大きな差はみられなかった。腹椎の癒合個体の出現率は8.8～11.5%、尾椎の癒合個体の出現率は21.6～26.9%となり、部位別にも各試験区間に差はみられなかった。

4) 考察

今回の試験結果からGステージ（平均全長12.5mm）

の仔魚飼育では、配合飼料の給餌量を軽減し、Ar-Nの給餌量を多くすることによって全長20mmサイズでの黒化個体の出現率や黒化の度合いがともに軽減されることが推察された。一方、黒化個体の出現率の軽減にともない白化個体の出現率が若干増加する傾向がみられ、黒化個体の出現率を低下させる給餌条件が白化個体の出現率を増加させる傾向²⁾が本試験でもみられた。Ar-Nの栄養強化についてはEPAのみで強化した区（5区）とEPAおよびDHAの併用強化を行った区（3区）では、黒化個体の出現状況に大きな差がみられなかったことから、DHAが黒化個体の出現におよぼす影響については明ら

表Ⅲ-3-1-37 平成8年度 Ar-Nと配合飼料の給餌比率に関する試験の黒化パターン別の出現状況（全長20mmサイズ）

試験区	黒化パターン別の出現状況 (%)									
	A (縁側+体幹部)					C (頭・胸部)			D (尾柄部)	
	正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1-1	46.0	17.0	19.0	16.0	2.0	21.0	22.0	71.0	33.0	28.0
1-2	49.0	16.0	21.0	11.0	3.0	20.0	25.0	80.0	26.0	19.0
平均	47.5	16.5	20.0	13.5	2.5	20.5	23.5	75.5	29.5	23.5
2-1	56.0	19.0	17.0	6.0	2.0	7.0	12.0	63.0	28.0	21.0
2-2	64.0	19.0	12.0	5.0	0	5.0	8.0	58.0	15.0	11.0
平均	60.0	19.0	14.5	5.5	1.0	6.0	10.0	60.5	21.5	16.0
3-1	70.0	22.0	6.0	1.0	1.0	0.0	4.0	49.0	18.0	7.0
3-2	80.0	9.0	7.0	4.0	0	3.0	5.0	43.0	18.0	12.0
平均	75.0	15.5	6.5	2.5	0.5	1.5	4.5	46.0	18.0	9.5
4-1	96.0	2.0	2.0	0	0	0	0	15.0	1.0	7.0
4-2	100	0	0	0	0	0	0	6.0	0	1.0
平均	98.0	1.0	1.0	0	0	0	0	10.5	0.5	4.0
5-1	61.0	15.0	20.0	4.0	0	6.0	8.0	49.0	15.0	15.0
5-2	82.0	5.0	9.0	4.0	0	2.0	3.0	59.0	15.0	15.0
平均	71.5	10.0	14.5	4.0	0	4.0	5.5	54.0	15.0	15.0

表Ⅲ-3-1-38 平成8年度 Ar-Nと配合飼料の給餌比率に関する試験の黒化パターン別の出現状況（全長40mmサイズ）

試験区	黒化パターン別の出現状況 (%)									
	A (縁側+体幹部)					C (頭・胸部)			D (尾柄部)	
	正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1-1	10.0	26.0	22.0	39.0	3.0	49.0	46.0	96.0	96.0	47.0
1-2	22.0	13.0	40.0	25.0	0	44.0	29.0	93.0	95.0	30.0
平均	16.0	19.5	31.0	32.0	1.5	46.5	37.5	94.5	95.5	38.5
2-1	25.0	36.0	29.0	10.0	0	28.0	18.0	89.0	93.0	19.0
2-2	16.0	21.0	45.0	17.0	1.0	26.0	23.0	85.0	94.0	25.0
平均	20.5	28.5	37.0	13.5	0.5	27.0	20.5	87.0	93.5	22.0
3-1	35.0	42.0	20.0	3.0	0	15.0	8.0	80.0	91.0	5.0
3-2	28.0	44.0	22.0	5.0	1.0	8.0	4.0	81.0	86.0	6.0
平均	31.5	43.0	21.0	4.0	0.5	11.5	6.0	80.5	88.5	5.5
4-1	21.0	49.0	29.0	1.0	0	2.0	2.0	46.0	74.0	9.0
4-2	4.0	20.0	55.0	21.0	0	83.0	33.0	90.0	97.0	5.0
平均	12.5	34.5	42.0	11.0	0	42.5	17.5	68.0	85.5	7.0
5-1	27.0	33.0	24.0	16.0	0	18.0	16.0	80.0	95.0	11.0
5-2	22.0	29.0	40.0	9.0	0	13.0	19.0	88.0	91.0	21.0
平均	24.5	31.0	32.0	12.5	0	15.5	17.5	84.0	93.0	16.0

かにできなかった。また白化個体の出現におよぼすDHAの影響³⁾についても本試験では明らかにできなかった。

引用文献

- 1) 北島力, 林田豪介, 下崎真澄, 渡邊武. 人工採苗ヒラメの体色異常出現に対する微粒子飼料の抑制効果. 長崎県水産試験場研究報告; 11: 29-35 (1985).
- 2) 高橋庸一. ヒラメ稚魚の無眼側の体色異常におよぼす飼育密度と飼餌料の影響. 日本水産学会誌; 60(5): 593-598 (1994).
- 3) Alisia Estevez and Akio Kanazawa Fatty Acid Composition of Neural Tissues of Normally Pigmented and Unpigmented Juveniles of Japanese flounde Using Rotifer and *Artemia* Enriched in n-3 HUFA Fisheries science; 62(1): 88-93 (1996).

(小金 隆之)

(3) 配合飼料の給餌量の影響 (伯方島事業場)

1) 目的

人為的に供試魚に与える配合飼料の給餌量を変えることにより生じる成長差が黒化個体の出現におよぼす影響について検討した。

2) 方法

① 供試魚

供試魚は20m³RC水槽で平均全長6.9mm (日齢13) ま

で予備飼育を行った仔魚 (ステージ組成C: 5%, D: 31%, E: 64%) を用いた。

② 試験区の設定

試験区は平成12年度に伯方島事業場で実施した試験で使用した配合飼料の給餌量を基準として, その1/3量を給餌する区 (1区), 2/3量を給餌する区 (2区) および対照区として平成12年度と同量の配合飼料を給餌する区 (3区) の合計3区を設定した (表Ⅲ-3-1-40)。

③ 飼育方法

飼育水槽は1試験区につき0.5m³水槽2面ずつを使用し, 供試魚は1面につき5,000尾を収容した。そして日齢25で1槽当たり2,500尾に密度を調整し, 平均全長20mmの取り揚げまではこの密度を維持し, 全長20mmサイズから全長40mmまでの飼育期間は収容尾数を500尾/面とした。餌料はワムシ, Ar-N, 配合飼料 (おとひめB1, B2, 1号, 2号, (株)日清飼料製) を用いた。なお, ワムシの栄養強化にはDHA含有濃縮淡水クロレラ (スーパー生クロレラV12, (株)クロレラ工業製) を, Ar-Nの栄養強化には乳化オイル (DHAcce, (株)オリエンタル酵母製) 用いた。給餌期間はワムシが日齢13~20, Ar-Nが日齢15~30, 配合飼料が日齢22~取り揚げ前日までとした。なお, ワムシを給餌する15~20分前には飼育水中に淡水クロレラ (生クロレラV12, (株)クロレラ工業製) を5~10ml添加した。配合飼料の給餌は日齢22から試験開始前日の日齢32までは1.5~2.7g/面/日の

表Ⅲ-3-1-39 平成8年度 Ar-Nと配合飼料の給餌比率に関する試験の脊椎骨異常個体の出現状況

試験区	異常個体率 (%)	脊椎骨異常の部位別出現状況 (%)			
		腹椎		尾椎	
		癒合	屈曲	癒合	屈曲
1-1	33.0	11.3	0	20.7	0
1-2	36.0	6.3	0	24.3	0
平均	34.5	8.8	0	22.5	0
2-1	42.0	12.8	0	29.2	0
2-2	33.0	8.5	0	24.5	0
平均	37.5	10.7	0	26.9	0
3-1	41.0	12.5	0	25.0	0
3-2	38.0	10.4	0	25.0	0
平均	39.5	11.5	0	25.0	0
4-1	26.7	8.0	0	17.8	0
4-2	39.0	11.8	0	25.4	0
平均	32.9	9.9	0	21.6	0
5-1	37.0	10.2	0	25.0	0
5-2	39.0	12.2	0	22.8	0
平均	38.0	11.2	0	23.9	0

表Ⅲ-3-1-40 平成13年度 配合飼料の給餌量に関する試験の設定

試験区	配合飼料の給餌量	備考
1	平成12年度試験の1/3量を給餌	
2	平成12年度試験の2/3量を給餌	
3	平成12年度試験の3/3量を給餌	対照区

割合で1日に8～15回に分けて給餌を行った。日齢33以降の試験期間中は上述の平成12年度試験の供試魚の成長と給餌量のデータに基づいて算出した給餌量にしたがって給餌を行った(図Ⅲ-3-1-1)。なお、給餌作業は1日分の配合飼料を1区が午前7時から10時までの時間帯に2～4回、2区が午前7時から午後1時までの時間帯に4～8回、3区が午前7時から午後5時までの時間帯で6～12回に分けて行った。

3) 結果

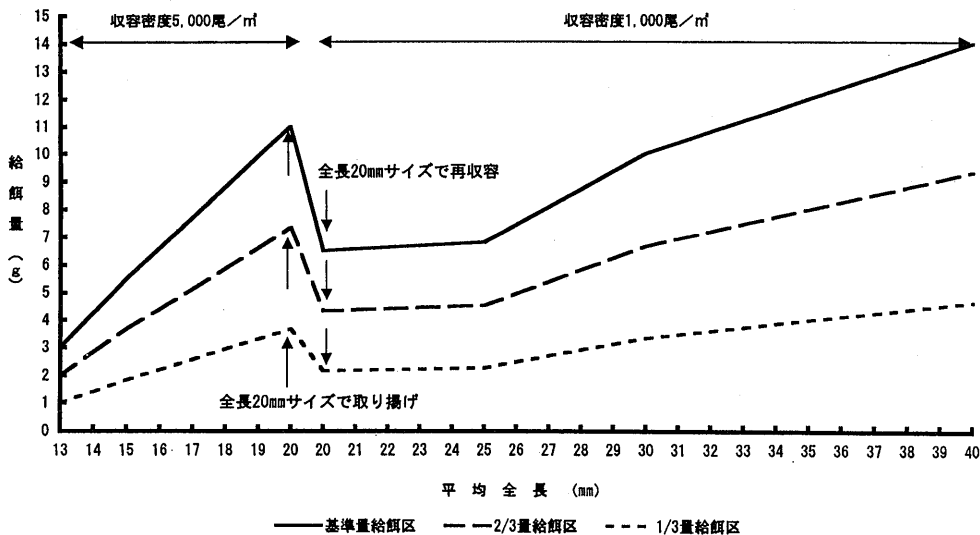
① 成長と生残

平均全長20mmまでの飼育は配合飼料の給餌量が最も多い3区が日齢48で平均全長19.3～19.4mm、生残率81.4～87.8%で取り揚げた。一方、給餌量を少なく設定した1区と2区では飼育が後半になるにつれて小型個体の死亡が認められるようになったため、平均全長が20mmに達する前に取り揚げた。それぞれの飼育結果は2区が日齢49で取り揚げて平均全長17.6～17.7mm、生残率64.0～66.8%で、1区が日齢50で取り揚げて平均全長が16.0～16.4mm、生残率が76.0～87.2%であった。その後は密度調整を行い、平均全長40mmまでの飼育を続けた。平均全長40mmまでの飼育でも3区の成長が最も早く、平均全長39.9～40.4mm、生残率93.8～94.2%で日齢65に飼育を終了した。一方、1区、2区では配合

飼料の給餌量が少ない区ほど成長が遅れ、飼育後半には大型個体の咬み合いと小型個体の死亡が認められるようになった。その結果1区が日齢90で平均全長39.7～41.2mmに達し、生残率56.4～70.8%で、2区が日齢80で平均全長40.5～41.6mmに達し、生残率74.0～92.2%であった。平均全長が40mmに達するまでの飼育日数差は1区で25日間、2区で15日間であった(表Ⅲ-3-1-41、図Ⅲ-3-1-2)。

② 黒化個体の出現状況

全長20mmサイズ 黒化個体の出現率が最も高かったのは1区で、黒化パターン別の出現状況はA部で2+と3+がそれぞれ29.5%、32.5%を占めた。次いで2区で32.0%と20.5%、3区で20.0%および13.0%であった。また、C部でも1区で特にC2が平均28.5%であった(表Ⅲ-3-1-42)。
全長40mmサイズ 全長20mmサイズで黒化個体の出現率が高かった1区に加えて、2区でも高くなり、A2+とA3+の合計で1区が98.0%、2区が92.0%で、3区は73.5%であった。一方、C部でもC1の平均は1区が100%、2区が94.0%、3区が89.5%であった。また、C3は各試験区で99.5～100%、D部でもD1で1区、2区とも平均で100%、3区が88.0%であった。また、D2で1区が平均68.0%、2区が56.5%、3区が42.0%であった(表Ⅲ-3-1-43、写真Ⅲ-3-1-2)。



図Ⅲ-3-1-1 平成13年度 配合飼料の給餌量の影響に関する試験の配合飼料の給餌量の設定

表Ⅲ-3-1-41 平成13年度 配合飼料の給餌量の影響に関する試験の飼育結果

試験区	試験開始		試験開始～全長20mmサイズ				全長20mmサイズ～全長40mmサイズ					
	月日	収容尾数 (尾)	平均全長 (mm)	月日	平均全長 (mm)	生残尾数 (尾)	生残率 (%)	月日	収容尾数* (尾)	平均全長 (mm)	生残尾数 (尾)	生残率 (%)
1-1	5.12	2,500	14.6	5.29	16.4	1,900	76.0	7.8	500	39.7	354	70.8
1-2	5.12	2,500	14.7	5.29	16.0	2,179	87.2	7.8	500	41.2	282	56.4
2-1	5.12	2,500	14.8	5.28	17.6	1,670	66.8	6.28	500	41.6	461	92.2
2-2	5.12	2,500	14.8	5.28	17.7	1,600	64.0	6.28	500	40.5	370	74.0
3-1	5.12	2,500	15.2	5.27	19.4	2,194	87.8	6.13	500	39.9	469	93.8
3-2	5.12	2,500	15.0	5.27	19.3	2,036	81.4	6.13	500	40.4	471	94.2

* 全長20mmサイズで500尾/槽に飼育密度を調整

③ 白化個体の出現状況

各試験区とも白化個体の出現率は全般に低く、出現率が最も高かったのは1-2区の5.3%であった。他の試験区の出現率は1.3~3.4%であり、試験区間では顕著な差は認められなかった(表Ⅲ-3-1-44)。

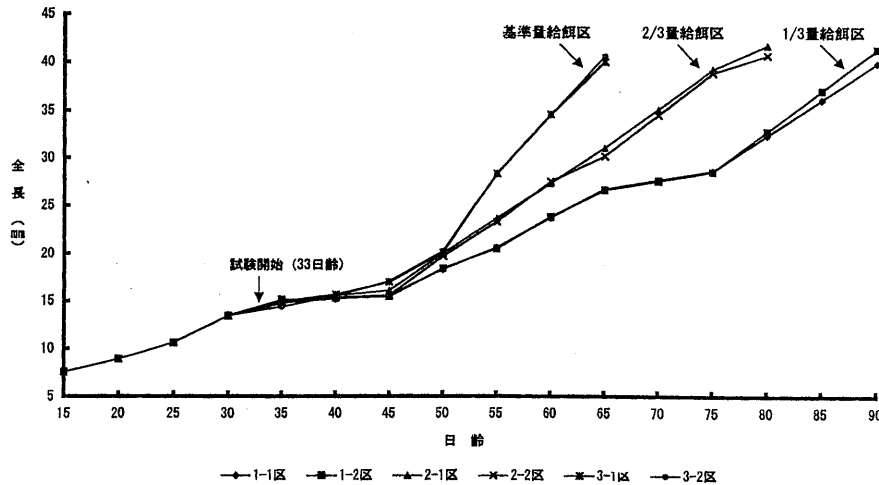
④ 脊椎骨異常個体の出現状況

脊椎骨異常個体の出現率が最も高かったのは1-2区の

65.0%であった。今年度の脊椎骨異常個体の出現率は全般に高く、平均で1区が49.5%、2区が46.0%、3区が34.5%であった(表Ⅲ-3-1-45)。

4) 考察

今回の試験では対照区を含め、試験区全般で黒化個体の出現率が高かった。特に平均全長20mmサイズでも黒化個体の出現率が高く、完全黒化に近い個体が多数認め



図Ⅲ-3-1-2 平成13年度 配合飼料の給餌量の影響に関する試験の各試験区の成長

表Ⅲ-3-1-42 平成13年度 配合飼料の給餌量の影響に関する試験の黒化個体の出現状況 (全長20mmサイズ)

試験区	黒化個体の出現状況 (%)				黒化パターン別の出現状況 (%)									
	正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	A (縁側+体幹部)					C (頭胸部)			D (尾柄部)	
					正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1-1	0	24.0	76.0	0	0	6.0	31.0	29.0	34.0	0	27.0	100	100	41.0
1-2	2.0	28.0	68.0	2.0	2.0	13.0	24.0	30.0	31.0	0	30.0	95.0	98.0	35.0
平均	1.0	26.0	72.0	1.0	1.0	9.5	27.5	29.5	32.5	0	28.5	97.5	99.0	38.0
2-1	0	44.0	52.0	4.0	0	25.0	30.0	26.0	19.0	0	20.0	90.0	100	25.0
2-2	4.0	68.0	28.0	0	4.0	15.0	21.0	38.0	22.0	0	10.0	95.0	96.0	28.0
平均	2.0	56.0	40.0	2.0	2.0	20.0	25.5	32.0	20.5	0	15.0	92.5	98.0	26.5
3-1	6.0	62.0	32.0	0	6.0	37.0	31.0	15.0	11.0	0	4.0	82.0	94.0	31.0
3-2	14.0	66.0	20.0	0	14.0	21.0	25.0	25.0	15.0	0	5.0	71.0	86.0	27.0
平均	10.0	64.0	26.0	0	10.0	29.0	28.0	20.0	13.0	0	4.5	76.5	90.0	29.0

表Ⅲ-3-1-43 平成13年度 配合飼料の給餌量の影響に関する試験の黒化個体の出現状況 (全長40mmサイズ)

試験区	黒化個体の出現状況 (%)				黒化パターン別の出現状況 (%)									
	正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	A (縁側+体幹部)					C (頭胸部)			D (尾柄部)	
					正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1-1	0	0	88.0	12.0	0	0	0	59.0	41.0	100	100	100	100	72.0
1-2	0	8.0	84.0	8.0	0	0	4.0	80.0	16.0	100	85.0	100	100	64.0
平均	0	4.0	86.0	10.0	0	0	2.0	69.5	28.5	100	92.5	100	100	68.0
2-1	0	15.0	74.0	11.0	0	0	8.0	64.0	28.0	92.0	72.0	99.0	100	36.0
2-2	0	8.0	68.0	24.0	0	0	8.0	32.0	60.0	96.0	88.0	100	100	77.0
平均	0	11.5	71.0	17.5	0	0	8.0	48.0	44.0	94.0	80.0	99.5	100	56.5
3-1	0	28.0	68.0	4.0	0	7.0	23.0	59.0	11.0	87.0	52.0	100	92.0	36.0
3-2	0	24.0	68.0	8.0	0	8.0	15.0	69.0	8.0	92.0	56.0	99.0	84.0	48.0
平均	0	26.0	68.0	6.0	0	7.5	19.0	64.0	9.5	89.5	54.0	99.5	88.0	42.0



写真Ⅲ-3-1-2 平成12年度 配合飼料の給餌量の影響に関する試験の黒化個体の出現状況（全長40mmサイズ）

表Ⅲ-3-1-44 平成13年度 配合飼料の給餌量の影響に関する試験の白化個体の出現状況

試験区	異常個体率 (%)	白化個体の出現状況 (%)			
		正常	白 \leq 1/2	白 $>$ 1/2	白化
1-1	2.2	97.8	2.2	0	0
1-2	5.3	94.7	4.4	0.9	0
平均	3.8	96.3	3.3	0.4	0
2-1	3.1	96.9	2.3	0.8	0
2-2	1.3	98.7	1.3	0	0
平均	2.2	97.8	1.8	0.4	0
3-1	3.4	96.6	3.4	0	0
3-2	3.1	96.9	2.3	0.8	0
平均	3.2	96.8	2.8	0.4	0

表Ⅲ-3-1-45 平成13年度 配合飼料の給餌量の影響に関する試験の脊椎骨異常個体の出現状況

試験区	異常個体率 (%)	脊椎骨異常の部位別出現状況 (%)		
		癒合	屈曲	癒合+屈曲
1-1	34.0	26.0	21.0	13.0
1-2	65.0	51.0	33.0	19.0
平均	49.5	38.5	27.0	16.0
2-1	52.0	46.0	19.0	13.0
2-2	40.0	32.0	17.0	9.0
平均	46.0	39.0	18.0	11.0
3-1	34.0	26.0	14.0	6.0
3-2	35.0	31.0	15.0	11.0
平均	34.5	28.5	14.5	8.5

られた。このことから、今年度は浮遊期の早い段階で黒化個体の出現要因があった可能性が考えられた。また、今年度の試験では黒化個体の出現率が高い以外に、平成12年度の試験と同量の配合飼料を給餌した対照区でも成長が遅かった。この原因は明らかでないが、今回の試験よりも配合飼料の給餌量が少なく、成長が遅かった平成11年度の試験例でも黒化個体の出現率が高かったことを考慮すると何らかの成長の遅れも黒化個体の出現要因となっている可能性が考えられた。つまり、供試魚が何らかの負荷で順調な発育上の成長が阻害された場合には、黒化個体の出現におよぼす影響があることが示唆された。
(太田 健吾)

3. ストレスに関する試験

(1) 輸送ストレスの影響 (小浜事業場)

【平成12年度】

1) 目的

平均全長17mmの種苗を小浜事業場から宮津事業場へ輸送(90km, 2.5時間)して飼育したところ、その後の成長に伴い、黒化個体の出現率が著しく増加した事例がみられたが、小浜事業場で飼育した同じロットの種苗では、全長30mmサイズで重度の黒化個体はまったく出現しなかった。そこで本試験では、輸送によるストレスが黒化個体の出現におよぼす影響についてヒラメの成長段階毎に検討した。

2) 方法

① 供試魚

供試魚は、福井県栽培漁業センターで養成中の親魚から自然産卵によって得られた卵を小浜事業場に搬入し、1m³ポリカーボネイト水槽1面で飼育した日齢19, 平均全長8.6mmの仔魚1.6万尾を使用した。供試するまでの餌料にはL型ワムシと Ar-N を使用した。

② 試験区の設定

試験区の設定条件を表Ⅲ-3-1-46に示した。飼育試験は全長9mmから全長20mmまでとした。ストレスを与えるサイズが全長9mmとする区(1区), 全長11mmとする区(2区), 全長13mmとする区(3区), 全長15mmとする区(4区), 全長17mmとする区(5区), 全長20mmとする区(6区), 対照区としてストレスを与えない区(7区)の合計7区を設定した。ストレスを与える際には、全個体(860~1,080尾)を試験飼育中の水槽から取り上げて10ℓの海水中に酸素封入し、乗用車で95km(約2時間)輸送した。輸送後に100ℓ水槽に再収容して試験飼育を行った。

飼育終了後は黒化個体の出現状況を把握するため、全長20mmから全長40mmまで継続飼育した。

③ 飼育方法

飼育は100ℓ円型黒色ポリエチレン水槽を試験区毎に2面ずつ用いた。各水槽に供試魚を1,000尾収容し、全長20mmまで飼育試験を行った。試験終了後に各区の2面から白化個体を除いた250尾, 計500尾を0.5m³水槽に収容し、全長40mmまで継続飼育をした。

飼育水温は試験飼育期間中18℃に調温し、継続飼育期間中は自然水温とした。換水量は5~15回転/日とした。試験期間を通じて照度が1,000lx以下になるように遮光した。

各試験ともL型ワムシは開口時から全長11mm, Ar-Nは全長8mmから全長20mm, 配合飼料は全長11mmから全長20mmまで給餌した。全長20mm以降は配合飼料のみを使用した。

ワムシの栄養強化にはプラスアクアラン(ビーエーエスエフジャパン製, 0.2ℓ/m³, 17時間)を, Ar-Nの栄養強化にはDH Ace(オリエンタル酵母製, 2.0ℓ/m³, 17時間)を用いた。これら生物餌料はニフルスチレン酸

表Ⅲ-3-1-46 平成12年度 輸送ストレスの影響に関する試験の設定

試験区	輸送サイズ	輸送月日	日齢	供試魚							輸送時間*1	輸送水温 (開始時~終了時) (℃)	密度*2 (万尾/m ³)	
				全長(mm)		発育ステージ別出現割合(%)								
				平均	範囲	D	E	F	G	H				I
1-1	全長9mmサイズ	5.18	20	8.8	(6.8~10.4)	16	64	20				2時間	-	10.7
1-2	"	"	"	8.8	(7.0~10.4)	17	67	16				"		10.8
2-1	全長11mmサイズ	5.26	28	11.0	(8.4~12.3)		4	2	94			2時間04分	18.9	9.8
2-2	"	"	"	11.1	(8.6~12.7)		6	0	88	6		"		9.9
3-1	全長13mmサイズ	6.2	35	13.1	(9.0~16.8)			2	12	54	32	2時間30分	18.9~19.0	10.0
3-2	"	"	"	13.8	(9.8~16.3)			4	10	58	28	"		9.8
4-1	全長15mmサイズ	6.5	38	15.5	(11.9~18.2)				2	12	86	2時間24分	19.0~20.0	9.5
4-2	"	"	"	15.5	(9.5~19.5)				8	4	88	"		9.9
5-1	全長17mmサイズ	6.7	40	17.8	(11.7~20.8)					2	98	2時間14分	19.1~20.3	9.5
5-2	"	"	"	17.7	(13.5~20.3)						100	"		9.4
6-1	全長20mmサイズ	6.10	43	19.1	(14.3~23.1)						100	2時間30分	18.6~19.2	8.6
6-2	"	"	"	19.2	(13.0~23.5)						100	"		9.6
7-1	輸送なし	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7-2	"	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*1 輸送距離95kmに要した時間

*2 収容尾数から輸送実施時までの死亡個体数を減じた値より算出

ナトリウム 2 ppm で 1 時間薬浴した後に給餌した。配合飼料は試験飼育期間中では X 社製市販飼料を、全長 20mm 以降では Y 社製市販飼料を給餌した。

3) 結果

① 成長と生残

試験は平成12年5月17日から7月2日までの47日間行った。試験期間中の平均水温は19.0℃ (17.2~22.9)，午前10時の平均照度は272 lx (17~3,090) であった。

各試験区の輸送時間は2時間~2時間30分，輸送時の水温は18.6~20.3℃の範囲にあった。輸送に伴う減耗は全試験区でみられなかった。

試験結果を表Ⅲ-3-1-47に示した。試験終了時の各区の平均全長は18.1~19.5mm，継続飼育終了時の各区の平均全長は38.2~40.0mmとなり，試験区間に有意な差はなかった。全長20mmサイズの各区の平均生残率は70~81%，全長40mmサイズでの生残率は71~87%となり，飼育中に特別な減耗はなく各試験区間に顕著な差はみられなかった。

② 黒化個体の出現状況

全長40mmサイズでの体色異常個体の出現状況を表Ⅲ-3-1-48に示した。全長20mmサイズでは幼体色素が多くみられ，また成体型黒色素の着色が不明瞭であったため，全長40mmサイズで評価した。各区の体色正常率は51~64%の範囲にあり，区間に大きい差はなかった。

全長20mmと全長40mmサイズの黒化パターン別の出現状況を表Ⅲ-3-1-49，表Ⅲ-3-1-50に示した。全長40mm

サイズにおけるA部の黒化パターン別の出現状況は7区(49%)>5区(48%)>4区(46%)>1区(40%)=6区(40%)>3区(36%)>2区(34%)の順に大きい値を示し，対照区が最も高い値を示したが，黒化の割合は軽度であった。またC部およびD部についても，対照区との大きな差はなかった。

③ 白化個体の出現状況

全長20mmサイズにおける正常率は98~100%となり，白化個体は殆ど出現しなかった(表Ⅲ-3-1-51)。

④ 脊椎骨異常個体の出現状況

脊椎骨異常個体の出現状況を表Ⅲ-3-1-52に示した。各試験区の異常個体出現率は40~55%で，各試験区には明瞭な差はみられなかった。

4) 考察

本試験結果から，平均全長9mmから平均全長20mm (E~Iステージ) の間に輸送によって与えたストレスと黒化出現率との関連性は認められなかった。また白化個体および脊椎骨の異常個体の出現との関連性も認められなかった。今後，さらにストレス強度を変えて黒化個体の出現におよぼす影響とストレス強度との関連性を把握する必要があると考えられた。

【平成13年度】

1) 目的

平成12年度で行った全長9~20mmサイズを用いた2時間の輸送ストレスが黒化個体の出現におよぼす影響は認められなかった。そこで，本試験ではさらに過酷な条件

表Ⅲ-3-1-47 平成12年度 輸送ストレスの影響に関する試験の飼育結果

試験区	試験開始			試験開始から全長20mmサイズ			全長20mmサイズ~全長40mmサイズ					
	月日	収容尾数 (尾)	平均全長 (mm)	月日	全長 (mm)		生残率 (%)	月日	全長 (mm)		生残率 (%)	
					平均	(範囲)			平均	(範囲)		
1-1	5.17	1,000	8.6	6.11	19.4	(15.2~22.8)	76.2	7.2	500	38.2	(28.3~48.8)	73.3
1-2	5.17	1,000	8.6	6.11	18.8	(15.2~21.9)	78.6					
平均					19.1		77.4			38.2		73.3
2-1	5.17	1,000	8.6	6.11	18.8	(12.9~22.0)	75.9	7.2	500	38.7	(30.4~49.5)	76.3
2-2	5.17	1,000	8.6	6.11	18.4	(15.2~23.7)	76.1					
平均					18.6		76.0			38.7		76.3
3-1	5.17	1,000	8.6	6.11	18.9	(14.5~23.6)	76.7	7.2	500	39.3	(31.3~49.2)	70.8
3-2	5.17	1,000	8.6	6.11	18.8	(14.4~23.0)	71.9					
平均					18.8		74.3			39.3		70.8
4-1	5.17	1,000	8.6	6.11	19.0	(14.0~23.5)	73.4	7.2	500	39.6	(29.3~50.3)	72.3
4-2	5.17	1,000	8.6	6.11	19.4	(13.1~22.9)	68.0					
平均					19.2		70.7			39.6		72.3
5-1	5.17	1,000	8.6	6.11	19.5	(16.3~22.9)	68.8	7.2	500	38.6	(29.8~49.2)	73.8
5-2	5.17	1,000	8.6	6.11	19.5	(16.0~22.8)	71.4					
平均					19.5		70.1			38.6		73.8
6-1	5.17	1,000	8.6	6.11	17.7	(14.0~20.7)	83.1	7.2	500	40.0	(31.2~51.2)	73.5
6-2	5.17	1,000	8.6	6.11	18.4	(14.4~21.5)	79.1					
平均					18.1		81.1			40.0		73.5
7-1	5.17	1,000	8.6	6.11	18.9	(14.1~23.3)	75.1	7.2	500	38.6	(30.1~55.3)	86.5
7-2	5.17	1,000	8.6	6.11	20.0	(17.7~22.9)	83.8					
平均					19.1		79.5			38.6		86.5

・試験開始~全長20mmサイズでは1試験区で100ℓ水槽2面を使用。全長20mmサイズ~全長40mmサイズでは0.5㎡水槽1面を使用

・全長20mmサイズで500尾/槽に飼育密度を調整

表Ⅲ-3-1-48 平成12年度 輸送ストレスの影響に関する試験のサイズ別黒化個体の出現状況

試験区	全長20mmサイズ (%)				全長40mmサイズ (%)			
	正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化
1-1	56.0	44.0	0	0	60.0	40.0	0	0
1-2	64.0	36.0	0	0	60.0	40.0	0	0
平均	60.0	40.0	0	0	60.0	40.0	0	0
2-1	64.0	36.0	0	0	64.0	36.0	0	0
2-2	74.0	26.0	0	0	64.0	36.0	0	0
平均	69.0	31.0	0	0	64.0	36.0	0	0
3-1	66.0	34.0	0	0	56.0	44.0	0	0
3-2	66.0	34.0	0	0	56.0	44.0	0	0
平均	66.0	34.0	0	0	56.0	44.0	0	0
4-1	70.0	30.0	0	0	58.0	42.0	0	0
4-2	82.0	18.0	0	0	58.0	42.0	0	0
平均	76.0	24.0	0	0	58.0	42.0	0	0
5-1	68.0	32.0	0	0	52.0	48.0	0	0
5-2	60.0	40.0	0	0	52.0	48.0	0	0
平均	64.0	36.0	0	0	52.0	48.0	0	0
6-1	66.0	34.0	0	0	60.0	40.0	0	0
6-2	66.0	34.0	0	0	60.0	40.0	0	0
平均	66.0	34.0	0	0	60.0	40.0	0	0
7-1	82.0	18.0	0	0	51.0	49.0	0	0
7-2	76.0	24.0	0	0	51.0	49.0	0	0
平均	60.0	40.0	0	0	51.0	49.0	0	0

表Ⅲ-3-1-49 平成12年度 輸送ストレスの影響に関する試験の黒化パターン別の出現状況 (全長20mm)

試験区	黒化パターン別の出現状況 (%)									
	A (縁側+体幹部)					C (頭・胸部)			D (尾柄部)	
	正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1-1	56.0	44.0	0	0	0	0	0	20.0	0	0
1-2	64.0	16.0	4.0	16.0	0	2.0	0	14.0	8.0	8.0
平均	48.0	42.0	2.0	8.0	0	1.0	0	17.0	4.0	4.0
2-1	64.0	36.0	0	0	0	0	0	14.0	0	0
2-2	74.0	26.0	0	0	0	0	0	12.0	0	0
平均	46.0	54.0	0	0	0	0	0	13.0	0	0
3-1	66.0	30.0	0	4.0	0	0	0	16.0	2.0	2.0
3-2	66.0	26.0	0	4.0	4.0	2.0	2.0	14.0	4.0	4.0
平均	50.0	44.0	0	4.0	2.0	1.0	1.0	15.0	3.0	3.0
4-1	70.0	30.0	0	0	0	0	0	20.0	0	0
4-2	82.0	14.0	4.0	0	0	0	0	20.0	0	0
平均	72.0	26.0	2.0	0	0	0	0	20.0	0	0
5-1	68.0	32.0	0	0	0	0	0	24.0	0	0
5-2	60.0	36.0	0	4.0	0	2.0	0	20.0	0	0
平均	58.0	40.0	0	2.0	0	1.0	0	22.0	0	0
6-1	66.0	34.0	0	0	0	0	0	18.0	0	0
6-2	66.0	26.0	0	8.0	0	0	0	14.0	0	0
平均	52.0	44.0	0	4.0	0	0	0	16.0	0	0
7-1	82.0	18.0	0	0	0	2.0	0	14.0	0	0
7-2	76.0	24.0	0	0	0	0	0	18.0	0	0
平均	76.0	24.0	0	0	0	1.0	0	16.0	0	0

表Ⅲ-3-1-50 平成12年度 輸送ストレスの影響に関する試験の黒化パターン別の出現状況 (全長40mm)

試験区	黒化パターン別の出現状況 (%)									
	A (縁側+体幹部)					C (頭・胸部)			D (尾柄部)	
	正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1	60.0	38.0	2.0	0	0	2.0	2.0	32.0	14.0	0
2	66.0	30.0	4.0	0	0	6.0	2.0	26.0	18.0	0
3	64.0	22.0	14.0	0	0	2.0	0.0	32.0	14.0	0
4	54.0	34.0	12.0	0	0	4.0	2.0	22.0	28.0	0
5	52.0	42.0	6.0	0	0	8.0	4.0	28.0	26.0	2.0
6	60.0	32.0	8.0	0	0	4.0	2.0	24.0	24.0	2.0
7	51.0	34.0	15.0	0	0	5.0	1.0	31.0	19.0	3.0

表Ⅲ-3-1-51 平成12年度 輸送ストレスの影響に関する試験の白化個体の出現状況

試験区	異常個体率 (%)	白化個体の出現状況 (%)			
		正常	白≤1/2	白>1/2	白化
1-1	1.0	99.0	0	1.0	0
1-2	0	100	0	0	0
平均	0.5	99.5	0	0.5	0
2-1	3.0	97.0	3.0	0	0
2-2	0	100	0	0	0
平均	1.5	98.5	1.5	0	0
3-1	0	100	0	0	0
3-2	0	100	0	0	0
平均	0	100	0	0	0
4-1	0	100	0	0	0
4-2	3.0	97.0	3.0	0	0
平均	1.5	98.5	1.5	0	0
5-1	3.0	97.0	3.0	0	0
5-2	0	100	0	0	0
平均	1.5	98.5	1.5	0	0
6-1	1.0	99.0	1.0	0	0
6-2	3.0	97.0	3.0	0	0
平均	2.0	98.0	2.0	0	0
7-1	2.0	98.0	2.0	0	0
7-2	1.0	99.0	0	1.0	0
平均	1.5	98.5	1.0	0.5	0

表Ⅲ-3-1-52 平成12年度 輸送ストレスの影響に関する試験の脊椎骨異常個体の出現状況

試験区	異常個体率 (%)	脊椎骨異常の部位別出現状況 (%)			
		腹椎		尾椎	
		癒合	屈曲	癒合	屈曲
1	53.0	14.0	4.0	40.0	13.0
2	41.0	7.0	3.0	33.0	6.0
3	55.0	15.0	9.0	35.0	11.0
4	47.0	18.0	2.0	30.0	3.0
5	43.0	14.0	2.0	35.0	2.0
6	40.0	15.0	2.0	25.0	2.0
7	48.0	18.0	4.0	38.0	4.0

下で輸送した場合のストレスが黒化個体の出現におよぼす影響について検討した。また、輸送によりヒラメ仔魚にどの程度のストレス強度が加わるかを調べるために、その指標として福井県立大学富永修助教授の指導を受けてコルチゾル濃度を測定した。輸送試験を行うサイズは、平成12年度小浜から宮津に種苗を輸送した際に黒化の問題が生じた全長17mmサイズに絞って試験を行った。

2) 飼育方法

全長17mmサイズの種苗に輸送ストレスを与えた後、全長40mmサイズまで継続飼育した。試験は異なる輸送方法で2回行った。

① 供試魚

試験1の供試魚は福井県栽培漁業センターで養成中の親魚から自然産卵によって得られた卵を小浜事業場に搬入して4m³角型FRP水槽で飼育した41日齢、平均全長16.2mmの種苗15,700尾を使用した。

試験2の供試魚は伯方島事業場の50m³角型RC水槽でほっとけ飼育により飼育中の種苗から抽出した日齢39、平均全長16.2mmの仔魚6,700尾を用いた。これらの種苗は供試するまでワムシ、Ar-N、配合飼料で飼育した。

ワムシの栄養強化は試験1のみスーパー生クロレラV12（日本クロレラ工業製、100ml/ワムシ1億個体、24時間）とメガビットAD₃E（フジタ製薬製、100ml/m³、6～16時間）を用いた。Ar-Nの栄養強化には両種苗ともDHAc（オリエンタル酵母製、80ml/m³、16～23時間）を用いた。配合飼料はY社製配合飼料を使用した。

② 試験区の設定

試験区の設定条件を表Ⅲ-3-1-53に示した。試験1では輸送密度と輸送時間がそれぞれ10万尾/m³と2時間とする区（1区）、20万尾/m³と2時間とする区（2区）、30万尾/m³と2時間とする区（3区）、10万尾/m³と4時間とする区（4区）、20万尾/m³と4時間とする区（5区）、

30万尾/m³と4時間とする区（6区）および30万尾/m³と4時間でさらに低水温による刺激を加える区（7区）、対照区とする区（8区）の合計8区を設定した。本試験の輸送は小浜事業場から往復95kmの道程を2～4時間かけて1～2往復した。試験2では輸送密度と輸送時間がそれぞれ10万尾/m³と6時間とする区（9区）、20万尾/m³と6時間とする区（10区）、30万尾/m³と6時間とする区（11区）、対照区とする区（12区）の4区を新たに設けた。本試験の輸送は伯方島事業場から小浜事業場までの422kmを6時間かけ行った。なお、試験1・2の輸送方法は海水10ℓを入れたナイロン袋に種苗を収容し、酸素封入後に水温の変動を少なくするために発泡スチロール箱に入れて乗用車で輸送した。

③ 飼育方法

飼育は0.5m³水槽を試験区毎に2面ずつ用いた。輸送直後の供試魚を1水槽当たり700尾収容した。

換水量は10回転/日とし、水温調節は行わなかった。照度は試験期間を通じて1,000lx以下になるように遮光した。

餌料にはY社製配合飼料を使用し、1日500尾あたり6.5～14gを自動給餌器で1日6回に分けて給餌した。

3) 結果

試験1の試験期間は6月15日から7月17日までの33日間、試験2の試験期間は6月29日から8月1日までの34日間であった。輸送終了時の各区の水温と水質およびコルチゾル濃度を表Ⅲ-3-1-54、Ⅲ-3-1-55に示した。

試験1の1～6区の輸送時の水温は20.4～20.6℃、低温処理した7区は15.2～17.1℃、試験2の9～10区の輸送時の水温は21.1～23.7℃となり、輸送中に異常な水温の変化はみられなかった。7区は低温処理時の飼育水の影響のため、やや低い値を示した。輸送終了時のpHは6.6から7.6の範囲にあり、輸送密度と輸送時間に比例し

表Ⅲ-3-1-53 平成13年度 輸送ストレスの影響に関する試験の設定

区分	試験区	供試魚		月日	輸送条件		
		平均全長 (mm)	尾数		水量 (ℓ)	時間 (時間)	密度 (万尾/m ³)
試験1	1	16.2	1,000	6.15	10	2.0	10
	2	16.2	2,000	〃	10	2.0	20
	3	16.2	3,000	〃	10	2.0	30
	4	16.2	1,000	〃	10	4.0	10
	5	16.2	2,000	〃	10	4.0	20
	6	16.2	3,000	〃	10	4.0	30
	7	16.2	3,000	6.16	10	4.0	30
	8	16.2	700	-	-	-	-
試験2	9	16.2	1,000	6.29	10	6.0	10
	10	16.2	2,000	〃	10	6.0	20
	11	16.2	3,000	〃	10	6.0	30
	12	16.2	700	-	-	-	-

* 試験1では小浜事業場産、試験2では伯方島事業場産の稚魚を使用

て低下する傾向にあった。アンモニア濃度は0から11.2mg/lの範囲にあり、輸送密度と輸送を開始してからの経過時間に比例して高い値を示した。

試験1ではどの区も輸送時間の経過に伴いコルチゾル濃度が上昇する傾向がみられた。収容密度が高い6区は他の4、5区に比べて輸送開始2時間後と輸送終了時の4時間後に高い値を示した。試験2の輸送終了時の値も輸送前より高い値を示し、輸送密度に比例して高くなる傾向がみられた。輸送終了後24時間目には全ての区が輸送前とほぼ同じ値に低下した。

試験1の輸送終了24時間後の死亡率は1.0~3.3%の範囲にあり、輸送に伴う減耗はほとんどみられなかった。試験2では、9区が2.3%、10区が18.4%、11区が35.4%となり、輸送密度が高い区ほど減耗が大きかった。

各試験区の飼育期間中の平均水温は22.7~25.0℃、平均照度は246~955 lxであった。

① 成長と生残

飼育結果の概要を表Ⅲ-3-1-56に示した。

試験1の試験終了時の各区の平均全長は33.9~38.7mmとなり区間に明瞭な差はなかった。生残率は飼育中に流失した8区の18.6%を除き44.4~61.0%の範囲にあり、区間に顕著な差はなかった。

試験2の試験終了時の平均全長は37.5~40.1mmとなり区間に明瞭な差はなかった。試験終了時の生残率は、12区(97.3%)>9区(42.7%)>10区(22.7%)>11区(12.7%)の順に高い値を示した。輸送した区が生残率が対照区より低く、輸送した区の中では輸送密度が高い区ほど生残率が低くなった。

② 黒化個体の出現状況

試験1では黒化個体の出現状況を表Ⅲ-3-1-57に示した。黒化面積割合1/2以下の個体の出現率は全長20mmサイズで12~21%、全長40mmサイズで1~12%を示した。成長に伴い黒化の度合いが進み、区間の差が大きくなる傾向がみられたが、いずれのサイズでも、ストレスを与えた試験区の黒化個体出現率が対照区より特に大きくなる傾向はなく、また輸送密度、輸送時間と黒化個体出現率との関連性もみられなかった。

全長20、および40mmサイズでの黒化パターン別の出現状況を表Ⅲ-3-1-58、Ⅲ-3-1-59に示した。どのサイズでも、試験区間に黒化出現パターンには明瞭な差はみられなかった。

試験2では全長20mmサイズでは、黒化面積割合1/2以下の個体の出現率は、9区が74.0%、10区が72.0%、11区が58.0%、対照区が46.0%となり、輸送密度が高い11

表Ⅲ-3-1-54 平成13年度 輸送ストレスの影響に関する試験の輸送終了時の水質環境と輸送翌日の生残状況

区分	試験区	輸送水質		輸送終了時の水質		輸送終了 24時間後の死亡率 (%)	
		(開始時~終了時) (°C)		pH	DO (mg/l)		アンモニア (mg/l)
試験1	1	20.4~20.6		7.61	26.0	0.0	1.6
	2	"		7.29	24.7	0.0	2.6
	3	"		7.03	20.8	0.3	3.3
	4	"		7.45	24.8	0.0	1.3
	5	"		7.32	26.0	0.8	2.4
	6	"		6.94	22.4	9.2	2.1
	7	15.2~17.1		6.86	26.3	3.8	1.0
	8	-		-	-	-	0.1
試験2	9	21.1~22.9		7.27	7.4	0.0	2.3
	10	21.1~23.1		6.85	12.3	7.3	18.4
	11	21.1~23.7		6.60	9.7	11.2	35.4
	12	-		-	-	-	-

表Ⅲ-3-1-55 平成13年度 輸送ストレスの影響に関する試験の各試験区のコルチゾル濃度の推移

区分	試験区	コルチゾル濃度の経時変化 (ng/g)					
		0時間後 (開始時)	1時間後 (輸送中)	2時間後 (輸送中)	4時間後 (終了時)	6時間後 (終了時)	輸送終了24時間後 (翌日)
試験1	4		7.4±2.6, n=5	6.5±1.4, n=5	12.4±6.6, n=4	-	2.2±1.1, n=4
	5	3.0±1.0, n=5	4.1±1.2, n=4	3.8±1.4, n=5	7.6±3.4, n=4	-	3.5±2.4, n=4
	6		7.5±2.4, n=5	12.2±3.0, n=4	18.6±4.0, n=5	-	1.3±0.5, n=5
試験2	9		-	-	-	2.4±1.4, n=4	0.4±0.2, n=4
	10	0.6±0.2, n=5	-	-	-	3.8±0.5, n=4	0.1±0.1, n=5
	11		-	-	-	5.4±1.3, n=4	0.6±0.4, n=4

コルチゾル濃度の測定は種苗が小さい場合(およそ0.06g以下)は1~4個体を合わせて行った

区の値が低かったが、輸送しなかった対照区はさらに低い値を示した。全長40mmサイズでは11区が76.2%、10区が65.0%、9区が59.0%、12区が29.0%となり、全長20mmサイズとは逆に、輸送密度が低い9区の値が低く、対照区はさらに低い値を示した。

全長20および40mmサイズの黒化パターン別の出現状況を表Ⅲ-3-1-58、表Ⅲ-3-1-59に示した。全長20mmおよび40mmサイズでのいずれの黒化パターン別の出現状況においても、対照区の黒化の割合が高かった。

③ 白化個体の出現状況

全長20mmサイズにおける白化個体の出現率は試験1が0~1%、試験2が1~4%となり、両試験とも白化個体の出現率は低く、試験区間の差もみられなかった。

④ 脊椎骨異常個体の出現状況

全長40mmサイズにおける脊椎骨異常個体の出現状況を表Ⅲ-3-1-60に示した。試験1では脊椎骨異常個体の出現率が96~100%と非常に高かった。尾椎の癒合が78~90%、尾部棒状骨異常が48~73%を示したが、区間に明瞭な差はみられなかった。試験2では試験区の異常個

体の出現率は66~72%の範囲にあった。尾椎の癒合個体の出現が58~63%であったが試験区間に差はみられなかった。

4) 考察

本試験では、ストレスの指標として、コルチゾルを測定したが、血中コルチゾル濃度は輸送時間の経過に伴い増加し、また輸送密度にも比例して大きくなる傾向がみられた。このことからヒラメ仔魚は輸送でのストレスを受けている可能性が示唆された。しかし、それぞれのストレスを加えた種苗の黒化個体の出現には差は認められず、今回の輸送によるストレス強度（密度、時間）では黒化個体の出現状況には影響しないことが考えられた。

本試験の輸送時のストレスには袋詰を行う際のハンドリングや急激な照度変化、輸送中の車の振動、個体間接触、アンモニアや魚の粘液の増加による水質悪化等が挙げられた。急性刺激を与えた場合、血中コルチゾル濃度は刺激を受けた直後に増加し、短時間の内（3時間程度）に低下する傾向がある（富永 未発表）が、試験1では輸送開始4時間目に血中コルチゾル濃度が最大に

表Ⅲ-3-1-56 平成13年度 輸送ストレスの影響に関する試験の飼育結果

区分	試験区	試験開始			試験開始~全長40mmサイズ			
		月日	収容尾数 (尾)	平均全長 (mm)	月日	平均全長 (mm)	生残尾数 (尾)	生残率 (%)
試験1	1	6.15	700	16.2	7.17	37.0	260	61.0
	2	"	"	16.2	"	37.3	214	49.8
	3	"	"	16.2	"	36.6	129	55.3
	4	"	"	16.2	"	37.6	205	48.0
	5	"	"	16.2	"	36.6	217	51.2
	6	"	"	16.2	"	33.9	254	59.2
	7	"	"	16.2	"	34.0	187	44.4
	8	6.16	"	16.2	"	38.7	80	18.6
試験2	9	6.29	"	16.2	7.27	40.1	188	42.7
	10	"	"	16.2	"	37.5	99	22.7
	11	"	"	16.2	"	37.7	65	12.7
	12	"	"	16.2	8.1	39.1	214	97.3

表Ⅲ-3-1-57 平成13年度 輸送ストレスの影響に関する試験のサイズ別黒化個体出現状況

区分	試験区	全長20mmサイズ (%)				全長40mmサイズ (%)			
		正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化
試験1	1	0	14.0	74.0	12.0	0	5.0	52.0	43.0
	2	0	13.0	72.0	15.0	0	4.0	61.0	35.0
	3	0	21.0	68.0	11.0	0	9.0	61.0	30.0
	4	0	13.0	63.0	24.0	0	6.0	63.0	31.0
	5	0	14.0	73.0	13.0	0	4.0	66.0	30.0
	6	0	12.0	78.0	10.0	0	8.0	51.0	41.0
	7	0	15.0	73.0	12.0	0	12.0	35.0	53.0
	8	0	13.0	64.0	23.0	0	1.3	55.1	43.6
試験2	9	0	74.0	23.0	3.0	0	59.0	39.0	2.0
	10	1.0	71.0	27.0	1.0	1.0	64.0	33.0	2.0
	11	1.0	58.0	37.0	4.0	0	76.2	23.8	0
	12	0	46.0	33.0	21.0	0	29.0	38.0	33.0

表Ⅲ-3-1-58 平成13年度 輸送ストレスの影響に関する試験の黒化パターン別の出現状況 (全長20mmサイズ)

区分	試験区	黒化パターン別の出現状況 (%)									
		A (縁側+体幹部)					C (頭・胸部)			D (尾柄部)	
		正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
試験1	1	0	0	10.0	56.0	34.0	60.0	98.0	99.0	99.0	98.0
	2	0	0	9.0	68.0	23.0	65.0	100	100	100	99.0
	3	0	1.0	14.0	65.0	20.0	46.0	98.0	99.0	99.0	99.0
	4	0	1.0	8.0	60.0	31.0	56.0	99.0	100	99.0	99.0
	5	0	1.0	6.0	71.0	22.0	56.0	99.0	99.0	99.0	99.0
	6	0	0	7.0	74.0	19.0	47.0	100	100	100	99.0
	7	0	1.0	10.0	62.0	27.0	61.0	98.0	99.0	99.0	99.0
	8	0	0	9.0	62.0	29.0	60.0	99.0	99.0	100	100
試験2	9	1.0	11.0	63.0	20.0	5.0	16.0	30.0	73.0	71.0	65.0
	10	3.0	3.0	64.0	24.0	6.0	23.0	38.0	71.0	74.0	71.0
	11	1.0	5.0	57.0	31.0	6.0	33.0	44.0	81.0	78.0	75.0
	12	1.0	3.0	41.0	29.0	26.0	49.0	55.0	90.0	83.0	77.0

表Ⅲ-3-1-59 平成13年度 輸送ストレスの影響に関する試験の黒化パターン別の出現状況 (全長40mmサイズ)

区分	試験区	黒化パターン別の出現状況 (%)									
		A (縁側+体幹部)					C (頭・胸部)			D (尾柄部)	
		正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
試験1	1	0	0	2.0	44.0	54.0	88.0	100	100	100	100
	2	0	0	2.0	58.0	40.0	83.0	99.0	100	100	100
	3	0	0	4.0	63.0	33.0	76.0	98.0	100	100	99.0
	4	0	1.0	2.0	54.0	43.0	84.0	100	100	100	99.0
	5	0	0	1.0	62.0	37.0	85.0	99.0	100	100	100
	6	0	0	3.0	52.0	45.0	79.0	100	100	100	100
	7	0	0	6.0	41.0	53.0	91.0	99.0	100	100	98.0
	8	0	0	0.0	53.8	46.2	93.6	100	100	100	100
試験2	9	0	6.0	39.0	53.0	2.0	37.0	48.0	93.0	92.0	81.0
	10	1.0	7.0	56.0	34.0	2.0	34.0	42.0	91.0	84.0	75.0
	11	0	9.5	55.6	33.3	1.6	36.5	41.3	93.7	90.5	81.0
	12	0	4.0	13.0	51.0	32.0	78.0	72.0	98.0	97.0	88.0

表Ⅲ-3-1-60 平成13年度 輸送ストレスの影響に関する試験の脊椎骨異常個体の出現状況

区分	試験区	異常個体率 (%)	脊椎骨異常の部位別出現状況 (%)				
			腹椎		尾椎		尾部棒状骨異常
			癒合	屈曲	癒合	屈曲	
試験1	1	99.0	17.0	30.0	83.0	21.0	73.0
	2	99.0	21.0	35.0	86.0	11.0	65.0
	3	96.0	26.0	24.0	84.0	6.0	48.0
	4	98.0	19.0	22.0	83.0	14.0	70.0
	5	98.0	24.0	24.0	88.0	3.0	65.0
	6	98.0	16.0	42.0	90.0	7.0	67.0
	7	0	18.0	30.0	78.0	15.0	60.0
	8	0	24.7	26.0	85.7	6.5	72.7
試験2	9	33.0	16.0	3.0	59.0	0	5.0
	10	34.0	11.0	6.0	58.0	1.0	5.0
	11	28.0	10.4	4.5	62.7	0	0
	12	-	-	-	-	-	-

なる傾向がみられた。この理由には、袋詰時の物理的衝撃の他に、水質悪化が輸送時間の経過とともに徐々に起こり、ストレスが輸送開始時から遅れて発生した可能性があると考えられた。また高密度区ほど血中コルチゾル濃度が高くなった原因にはアンモニア濃度や粘液量および個体間の接触頻度が密度の増加に比例したためと考えられた。

今回の試験では輸送によるストレス負荷がコルチゾルの測定によって明らかとなったが、輸送試験の結果では対照区を含めて全般的に黒化個体が出現し、黒化個体の出現状況とストレスの関係は判然としなかった。しかし、前年度の試験では輸送の影響はみられず、その異常は非常に軽微であった。このことから輸送によるストレスは黒化個体の出現に影響をおよぼすことは少ないと思われる。

(小金隆之)

Ⅲ-3-2 着底期後期（全長20~40mm）

1. 育成環境に関する試験

(1) 飼育密度の影響（宮津事業場）

1) 目的

飼育管理面から飼育密度の違いが黒化発現におよぼす影響について、着底期後期（Iステージ）から密度を変えた試験を実施した。

2) 方法

① 供試魚

供試魚は、小浜事業場で平均全長18mmまで飼育された仔魚を輸送して全長20.5mm（16.4~24.7）から使用した。

② 試験区の設定

供試魚の収容密度を5,000尾/m³とする区（1区）、1,000尾/m³とする区（2区）、200尾/m³とする区（3区）および50尾/m³とする区（4区）の計4区の試験区を設定した。各試験区に使用した水槽数は1区、2区および3区は2面、4区では6面であった（表Ⅲ-3-2-1）。

③ 飼育方法

試験水槽は0.5m³水槽を使用し、飼育水はろ過海水を用い、自然水温で飼育した。注水量は1.7ℓ/分の流水飼育とし、エアーストーン1個で通気を行った。餌料は全

長20mmから40mmまでY社製配合飼料のみを使用し、1、2区は自動給餌機で、3、4区は手撒きで給餌した。

3) 結果

① 成長と生残

試験期間は6月16日から7月7日までに22日間であった。試験終了時の平均生残率は1区が54.3%、2区が64.7%、3区が83.0%、4区が64.0%であった（表Ⅲ-3-2-2）。平均全長は1区が44.5mm、2区が46.3mm、3区が40.4mm、4区が47.4mmとなり、飼育密度の低い4区の成長が良く、生残率の高い3区が最も悪かった。

② 黒化個体の出現状況

試験開始時の体色正常個体の出現率はほぼ100%であり、成体型の黒色素胞はみられず、幼生型の黒色素胞が体表部全体に観察された。全長40mmサイズで取り揚げた種苗の黒化個体の出現状況は各試験区とも体色正常個

表Ⅲ-3-2-1 平成7年度 飼育密度の影響に関する試験の設定

試験区	Iステージでの収容	
	密度（尾/m ³ ）	配合飼料
1	5,000	Y社
2	1,000	Y社
3	200	Y社
4	50	Y社

表Ⅲ-3-2-2 平成7年度 飼育密度の影響に関する試験の飼育結果

試験区	試験開始				試験開始から全長40mmサイズ			
	月日	収容尾数 (尾)	平均全長 (mm)	密度 (尾/m ³)	月日	尾数 (尾)	平均全長 (mm)	生残率 (%)
1-1	6.16	2,500	20.5	5,000	7.7	1,396	45.6	55.8
1-2	6.16	2,500	20.5	5,000	7.7	1,321	43.3	52.8
2-1	6.16	500	20.5	1,000	7.7	370	46.2	74.0
2-2	6.16	500	20.5	1,000	7.7	277	46.5	55.4
3-1	6.16	100	20.5	200	7.7	80	40.3	80.0
3-2	6.16	100	20.5	200	7.7	86	40.6	86.0
4-1	6.16	25	20.5	50	7.7	19	45.7	76.0
4-2	6.16	25	20.5	50	7.7	17	44.0	68.0
4-3	6.16	25	20.5	50	7.7	16	50.5	64.0
4-4	6.16	25	20.5	50	7.7	15	49.9	60.0
4-5	6.16	25	20.5	50	7.7	13	47.5	52.0
4-6	6.16	25	20.5	50	7.7	19	47.0	76.0

表Ⅲ-3-2-3 平成7年度 飼育密度の影響に関する試験の黒化個体の出現状況

試験区	黒化個体の出現状況(%)				黒化パターン別の出現状況(%)										
	正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	A（縁側+体幹部）					C（頭・胸部）			D（尾柄部）		
					正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2	
1	0	100	0	0	96.5	3.5	0	0	0	0	0	0	28.0	0	4.5
2	0	100	0	0	98.5	1.5	0	0	0	0	0	0	26.5	0	0.5
3	0	100	0	0	95.9	4.1	0	0	0	0.5	0.5	14.5	0	1.0	
4	0	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	19.9	0	0.9	

体はみられず、黒化面積割合1/2以下の個体が大半を占めた(表Ⅲ-3-2-3)。

黒化パターン別の出現状況は、A部では各試験区とも軽微な異常であり、A±の出現率は1区が3.5%、2区が1.5%、3区が4.1%、4区が0%であった。C部はC3に特徴的に認められ、1区が28.0%、2区が26.5%、3区が14.5%、4区が19.9%であった。尾柄部も軽微な異常だけであった。このように各試験区間で黒化個体の出現状況に顕著な差は認められなかった。

③ 白化個体の出現状況

試験開始時の白化個体の出現率は13.0%で、例年と比較しても大差は認められなかった。

④ 脊椎骨異常個体の出現状況

脊椎骨の形態異常の出現率は1区が5.0%、2区が3.0%、3区が2.0%、4区が3.9%で、症状としては変形、屈曲、融合がみられた(表Ⅲ-3-2-4)。

表Ⅲ-3-2-4 平成7年度 飼育密度の影響に関する試験の脊椎骨異常個体の出現状況

試験区	異常個体率 (%)
1	5.0
2	3.0
3	2.0
4	3.9

4) 考察

全長20mmサイズ(Iステージ)以降での飼育密度の試験結果では、各試験区間の生残率のばらつきが大きかったが、試験の目的を評価する上では問題ないと思われた。各試験区間において黒化個体の出現率および黒化パターン別の出現状況に顕著な差が認められなかったことからIステージ以降の飼育において、飼育密度は黒化個体の出現におよぼす大きな要因ではないと考えられた。

(竹内 宏行)

(2) 照度・砂敷による抑制効果(小浜事業場)

1) 目的

底面の敷砂がヒラメの無眼側の色素異常の出現を抑制する効果については、これまでに4cmサイズのヒラメで確認されている^{1), 2)}。本試験では全長20mm(Iステージ)の着底期後期の種苗を用いて飼育時の照度および底質環境が黒化個体の出現におよぼす影響について検討した。

2) 方法

① 供試魚

供試魚は、量産水槽から有眼側の体色が正常な日齢50、平均全長19.5mm(15.2~25.1)の種苗5,000尾を抽出して試験に使用した。

② 試験区の設定

0.5m²透明円型水槽(ポリカーボネイト製)と同型黒

色円型水槽(ポリエチレン製)を用い屋内で試験を行った。試験設定は、遮光条件下で透明水槽を使用した区(1区)、遮光条件下で透明水槽に敷砂した区(2区)、遮光条件下で黒色水槽を使用した区(3区)、遮光条件下で黒色水槽に敷砂した区(4区)、遮光なしで透明水槽を使用した区(5区)の合計5区を設け、各試験区とも2面ずつを設けた。試験開始時の収容尾数は各水槽500尾とした。遮光には遮光率90%の寒冷紗を使用し、敷砂は平均粒径370μm(150~930)の海砂を使用した(表Ⅲ-3-2-5)。

表Ⅲ-3-2-5 平成7年度 照度・砂敷きによる抑制効果に関する試験の設定

試験区	試験条件		
	遮光の有無	水槽の色	砂敷きの有無
1-1	有	透明	砂無
1-2	有	透明	砂無
2-1	有	透明	砂敷
2-2	有	透明	砂敷
3-1	有	黒色	砂無
3-2	有	黒色	砂無
4-1	有	黒色	砂敷
4-2	有	黒色	砂敷
5-1	無	透明	砂無
5-2	無	透明	砂無

③ 飼育方法

試験は平成7年5月30日~6月28日までの30日間とした。飼育水には別途20m²水槽で18℃に加温処理したろ過海水を用いた。換水量は10回転/日とした。

餌料にはY社製市販飼料を使用し、魚体重の5%を目安に自動給餌器を用いて給餌した。毎日底掃除を行い、残餌、死亡魚を除去した。

3) 結果

① 飼育環境

飼育期間中の各水槽の平均水温は18.6(17.9~19.8)であり、pHは8.00~8.10の範囲であった。試験期間中、晴天時の平均照度は屋外で100,000 lx、屋内で22,000 lx、遮光下で1,000 lxであった。

② 成長と生残

試験区の設定条件と飼育結果を表Ⅲ-3-2-6に示した。各試験区とも疾病等の発生もなく順調に推移した。生残尾数は2区と5区で150前後と低かったが、他は232~280尾の範囲であった。取り揚げ時の各試験区の平均全長は46~56mmの範囲で、取り揚げ直前に共食いによる小型個体の減耗が生残数の少ない水槽で認められた。

③ 黒化個体の出現状況

全長20mmサイズ 供試魚の体色正常個体の出現率は90%で、残りは黒化面積割合1/2以下の個体であった。黒化パターン別の出現状況では、A部およびC部に4%

D部に2%と全体的に黒化の占める面積は小さく、ほぼ正常な個体が多かった(表Ⅲ-3-2-7, 表Ⅲ-3-2-8)。

全長30mmサイズ 体色正常個体の出現率は1区が20.0%, 2区が57.5%, 3区が15.5%, 4区が55.0%および5区が15.0%となり、成長に伴って全般的に減少した。特に、砂敷しない1区, 3区および5区でその傾向が著しかった。黒化パターン別の出現状況はA±の軽度な個体が大半で試験区間での差は認められなかった。C部ではC3に特異的に23.0%~46.0%の範囲で黒化個体の出現が認められた。(表Ⅲ-3-2-9)。

全長40mmサイズ 全長40mmサイズでは黒化面積割合1/2以下の個体が大半を占めた。体色正常個体の出現率は水槽が透明, 黒色に関らず敷砂した2区および4区が14.0, 11.5%であり, 砂敷しない1区, 3区および5区では体色正常個体はみられなかった。黒化パターン別の出現状況はA部で成長に伴い徐々に増加したが, 全体的に黒化割合はA±の軽度な個体が大半であり, A+, A2+は砂敷しない1区, 3区, 5区で出現し, 砂敷した2区,

4区ではみられなかった。また, 遮光しなかった5区では体幹中央部に黒化部位が認められた。C部では全長30mmサイズとほぼ同様傾向であった。D部は軽度であったが, 全長30mmサイズよりも増大し, D1±が敷砂しない区で100%, 敷砂した区で84~88.5%であった(表Ⅲ-3-2-10)。

④ 脊椎骨異常個体の出現状況

全長40mmサイズにおける脊椎骨異常個体の出現率を表Ⅲ-3-2-11に示した。正常個体出現率は22.5~32.0%と全体に低く, 試験区間による差は少なかった。

4) 考察

遮光下では, 水槽が透明あるいは黒色に関らず, 底面に敷砂した区で11.5~14.0%の体色正常個体が出現し, 砂敷しない1区, 3区, 5区では体色正常個体はみられなかった。また, 黒化個体の出現率は砂敷した区の方が砂敷しない区より低く, 黒化割合も軽度であった。

以上のことから遮光下では水槽色が透明であろうと黒色であろうと黒化個体の出現に対する影響は少ないと考

表Ⅲ-3-2-6 平成7年度 照度・砂敷きによる抑制効果に関する試験の飼育結果

試験区	試験開始			試験開始~全長40mmサイズ		
	月日	収容尾数 (尾)	平均全長 (mm)	月日	生残尾数 (尾)	平均全長 (mm)
1-1	5.30	500	19.4	6.28	233	52.1
1-2	5.30	500	19.4	6.28	235	50.7
2-1	5.30	500	19.4	6.28	233	52.5
2-2	5.30	500	19.4	6.28	141	55.4
3-1	5.30	500	19.4	6.28	232	48.5
3-2	5.30	500	19.4	6.28	280	49.6
4-1	5.30	500	19.4	6.28	245	51.0
4-2	5.30	500	19.4	6.28	262	49.8
5-1	5.30	500	19.4	6.28	231	52.7
5-2	5.30	500	19.4	6.28	151	56.3

表Ⅲ-3-2-7 平成7年度 照度・砂敷きによる抑制効果に関する試験の黒化個体の出現状況

試験区	黒化個体の出現状況 (%)				黒化パターン別の出現状況 (%)								
	正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	A (縁側+体幹部)				C (頭・胸部)			D (尾柄部)	
					正常	±	+	++	1	2	3	1	2
1~5 (開始時)	90.0	10.0	0	0	96.0	4.0	0	0	0	1.0	4.0	0	0

表Ⅲ-3-2-8 平成7年度 照度・砂敷きによる抑制効果に関する試験のサイズ別黒化個体出現状況

試験区	全長30mmサイズ				全長40mmサイズ			
	正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化
1	20.0	80.0	0	0	0	99.5	0.5	0
2	57.5	42.5	0	0	14.0	86.0	0	0
3	15.5	84.5	0	0	0	100	0	0
4	55.0	45.0	0	0	11.5	88.5	0	0
5	15.0	85.0	0	0	0	100	0	0

表Ⅲ-3-2-9 平成7年度 照度・砂敷きによる抑制効果に関する試験の黒化パターン別の出現状況 (全長30mmサイズ)

試験区	黒化パターン別の出現状況 (%)										
	AC合計	A (縁側+体幹部)					C (頭・胸部)			D (尾柄部)	
		正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1-1	55.0	85.0	12.0	3.0	0	0	1.0	0	47.0	0	0
1-2	47.0	81.0	9.0	3.0	0	0	0	0	45.0	0	0
平均	51.0	83.0	10.5	3.0	0	0	0.5	0	46.0	0	0
2-1	31.0	88.0	12.0	0.0	0	0	0	0	23.0	0	0
2-2	23.0	95.0	4.0	1.0	0	0	0	0	23.0	0	0
平均	27.0	91.5	8.0	1.5	0	0	0	0	23.0	0	0
3-1	52.0	87.0	11.0	2.0	0	0	0	0	51.0	0	0
3-2	42.0	82.0	13.0	5.0	0	0	0	0	39.0	0	0
平均	47.0	84.5	12.0	3.5	0	0	0	0	45.0	0	0
4-1	37.0	94.0	4.0	2.0	0	0	0	0	36.0	0	0
4-2	20.0	95.0	4.0	1.0	0	0	0	0	17.0	0	0
平均	28.5	94.5	4.0	1.5	0	0	0	0	26.5	0	0
5-1	52.0	81.0	9.0	10.0	0	0	0	0	49.0	0	0
5-2	45.0	84.0	11.0	5.0	0	0	0	0	42.0	0	0
平均	48.5	82.5	10.0	7.5	0	0	0	0	45.5	0	0

表Ⅲ-3-2-10 平成7年度 照度・砂敷きによる抑制効果に関する試験の黒化パターン別の出現状況 (全長40mmサイズ)

試験区	黒化パターン別の出現状況 (%)										
	AC合計	A (縁側+体幹部)					C (頭・胸部)			D (尾柄部)	
		正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
1-1	52.0	71.0	23.0	5.0	1.0	0	3.0	0	41.0	0	2.0
1-2	45.0	75.0	22.0	3.0	0	0	1.0	0	38.0	0	0
平均	48.5	73.0	22.5	4.0	0.5	0	2.0	0	39.5	0	1.0
2-1	37.0	84.0	15.0	1.0	0	0	1.0	0	26.0	0	1.0
2-2	33.0	92.0	7.0	1.0	0	0	0	0	28.0	0	0
平均	35.0	88.0	11.0	1.0	0	0	0.5	0	27.0	0	0.5
3-1	73.0	45.0	45.0	10.0	0	0	0	0	49.0	0	0
3-2	65.0	57.0	37.0	6.0	0	0	0	1.0	49.0	0	0
平均	69.0	51.0	41.0	8.0	0	0	0	0.5	49.0	0	0
4-1	37.0	80.0	20.0	0	0	0	0	0	25.0	0	0
4-2	32.0	82.0	18.0	0	0	0	0	0	24.0	0	0
平均	34.5	81.0	19.0	0	0	0	0	0	24.5	0	0
5-1	58.0	54.0	39.0	7.0	0	0	2.0	0	46.0	0	1.0
5-2	66.0	48.0	42.0	10.0	0	0	0	0	54.0	0	0
平均	62.0	51.0	40.5	8.5	0	0	1.0	0	50.0	0	0.5

表Ⅲ-3-2-11 平成7年度 照度・砂敷きによる抑制効果に関する試験の脊椎骨異常個体の出現状況

試験区	異常個体率 (%)	脊椎骨異常の出現状況 (%)					
		腹椎		尾椎		全体	
		癒合	屈曲	癒合	屈曲	癒合	屈曲
1	68.0	53.0	31.5	15.0	6.5	68.0	38.0
2	77.5	66.5	32.0	10.5	6.5	77.0	38.5
3	76.5	63.0	32.5	13.5	5.5	76.5	38.0
4	70.5	64.0	34.5	5.5	2.0	69.5	36.5
5	73.0	61.5	36.5	10.5	6.5	72.0	43.0

えられた。しかし、遮光なしの透明な水槽を用いた5区において、体幹部中央部に黒化部位が出現する個体が多くみられ、遮光下の1区との比較から、照度が高いと体幹部中央部に黒化が発現する可能性があると思われた。また、砂敷による黒化発現の抑制効果は認められたが、尾柄部の黒化の出現率は全長30mm以上になって急激に増加した。このことから着底期以降の段階で尾柄部の黒化発現を促す要因は異なると思われた。

引用文献

- 1) 青海忠久. ヒラメ幼魚の無眼側の着色におよぼす光照射, 有眼側の体色および供試魚の由来の影響. 水産増殖; 39(2): 173-180 (1991).
- 2) 青海忠久. ヒラメの無眼側黒化はなぜ出現するか. 養殖; 458: 92-95 (2000).

(小金 隆之)

(3) 砂敷による効果の実証 (伯方島事業場)

1) 目的

これまでの小規模な試験結果から、着底完了後のヒラメ種苗の黒化発現が、水槽の底面に砂を敷いた飼育(以下、砂敷き飼育)を行うことにより抑制されることが確認されている。そこでより大きな水槽を用いて砂敷きによる黒化発現の防除効果の実証試験を行った。

伯方島事業場では平成11, 12年度の2カ年にわたって(社)マリノフォーラム21との共同研究で、ヒラメの砂敷き飼育における底質環境保全および底掃除作業の省力化を目的とした粒径選別型底掃除システム開発試験を実施したが、ここで述べるのはその成果の一部である。

2) 方法

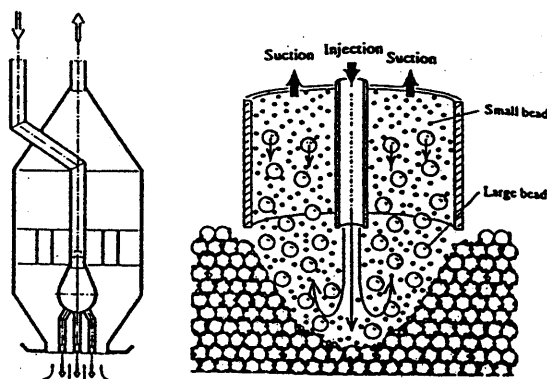
① 供試魚

供試魚は50m³RC水槽の量産飼育で生産した有眼側の体色が正常な着底個体1.8万尾(平均全長21~22mm)を用いた。

② 試験区の設定

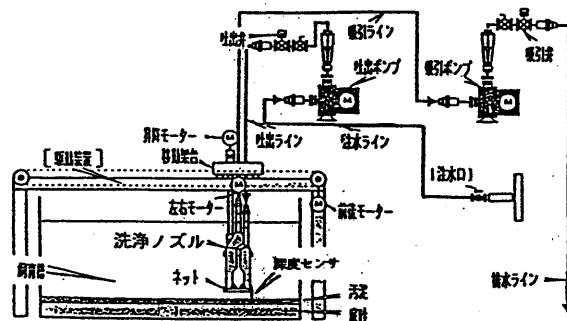
試験水槽にはFRP角型水槽(2.5×4.0×0.8m, 底面積10m²)3面を用い、上屋内(5.5×12.0×3.0m)に設置した。上屋の屋根は帆布仕様の材質で、側面は遮光率90%の寒冷紗を張った。

試験区は水槽の底面に平均粒径0.5mmの珪砂を約5cmの厚さで敷き、粒径選別型底掃除機(図Ⅲ-3-2-1)で底掃除を行う区(1区)、1区同様に水槽の底面に珪砂を設置し、底掃除を行わない区(2区)、水槽の底面には珪砂を敷かず、水槽の中央付近に唼集する糞、残餌等の汚物を口径25mmのビニールホースで吸い出す区(3区)の合計3区を設定した(表Ⅲ-3-2-12)。



洗浄ノズルの構造模型

基本原理の模式図



洗浄システムの構成

図Ⅲ-3-2-1 粒状選別型掃除システム装置

表Ⅲ-3-2-12 平成11・12年度 砂敷きによる効果の実証試験の設定

試験区	砂敷き	底掃除の有無	底掃除回数
1区	有り	MF21機種の底掃除機使用	飼育1~43(1回/2日間) 飼育44以降(毎日)
2区	有り	無し	無し
3区	なし	サイフォン方式により一部	飼育1~43(1/2日間) 飼育44以降(毎日)

③ 飼育方法

供試魚の収容尾数は0.6万尾/区（600尾/㎡）とした。注水は自然水温の砂ろ過海水を用い、換水量は試験開始当初は1～2回転/日とし、その後は飼育状況に応じて徐々に増加して、飼育後半は10～14回転/日を維持した。通気は水槽内の4カ所のコーナー部分に長さ70cm、直径13mmの塩ビ製パイプでエアブロックを設置して行った。餌料は市販飼料（おとひめ、(株)日清飼料製）を使用し、給餌量は魚体重の5%を目安に1日分を3回に分けて給餌した。1区と3区の底掃除の頻度は平成11年度が飼育1～43日目までが2日に1回、44日目以降は毎日行うこととし、平成12年度は飼育1～27日目までが2日に1回、28日目以降から毎日行った。

3) 結果

【平成11年度】

① 成長と生残

各試験区とも飼育は試験開始当初から順調に推移し、1区と3区では66日目の取り揚げ時の生残率は70.8%、61.8%であった。一方、2区では42～50日目に白点病による大量死亡が発生したため、生残率は0.4%まで低下した。取り揚げ時の平均全長は1区が100mm、2区が

78mm、3区が104mmであった（表Ⅲ-3-2-13）。

② 黒化個体の出現状況

供試魚の黒化個体の出現率は36%で、いずれの個体も黒化面積割合1/2以下であり、黒化の出現状況も軽微であった（表Ⅲ-3-2-14）。

全長40mmサイズ 黒化個体の出現率は1区と2区が63%であり、3区は82%と1区、2区よりも高かった。ただし、いずれも黒化面積割合1/2以下であった。

黒化パターン別の出現状況では、1区と2区はA部でA±が多く、黒化割合は軽度であったが、3区でA+が42%と高い値を示した。

全長60mmサイズ 黒化個体の出現率は1区が76%、2区が65%を示したのに対し、3区は98%まで急激に増加した。また、3区のみで黒化面積割合1/2以上を占める個体が19%出現した。黒化パターン別の出現状況では、1区と2区でA±が全長40mmサイズに比べ、若干高くなったもののA+はほぼ同値であった。しかし、3区はA+とA2+が増加した。

全長100mmサイズ 黒化個体の出現率は1区が78%と全長60mmサイズ以降から変化は認められなかったのに対し、3区では100%であった。また、3区のみで全長

表Ⅲ-3-2-13 平成11年度 砂敷きによる効果の実証試験の飼育結果

試験区	使用水槽		収容			取り揚げ					
	形状	底面積 (㎡)	月日	尾数 (尾)	全長 (mm)	月日	飼育日数	全長 (mm)	尾数 (尾)	密度 (尾/㎡)	生残率 (%)
1区	角形FRP	10	6.18	6,000	22.0 (19.0～25.0)	8.23	66	100.0	4,246 (71.0～118.0)	425	70.8
2区	角形FRP	10	6.18	6,000	22.0 (19.0～25.0)	8.23	66	78.0	24 (63.0～100.0)	2.4	0.4
3区	角形FRP	10	6.18	6,000	22.0 (19.0～25.0)	8.23	66	104.0	3,706 (89.0～122.0)	371	61.8

表Ⅲ-3-2-14 平成11年度 砂敷きによる効果の実証試験の黒化個体の出現状況

試験区	平均全長 (mm)	黒化個体の出現状況 (%)				黒化パターン別の出現状況 (%)									
		正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒化	A (縁側+体幹部)					C (頭・胸部)			D (尾柄部)	
						正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2
開始時	22.3	64.0	36.0	0	0	77.0	23	0	0	0	6.0	0	0	25.0	0
1	44.8	37.0	63.0	0	0	78.0	20.0	2.0	0	0	47.0	0	1.0	43.0	1.0
	73.6	24.0	76.0	0	0	58.0	38.0	4.0	0	0	66.0	1.0	0	40.0	0
	98.0	22.0	78.0	0	0	59.0	38.0	3.0	0	0	72.0	0	0	44.0	1.0
2	43.5	37.0	63.0	0	0	75.0	22.0	3.0	0	0	49.0	0	1	46.0	0
	60.7	35.0	65.0	0	0	64.0	33.0	3.0	0	0	49.0	0	2	33.0	0
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	45.7	18.0	82.0	0	0	29.0	29.0	42.0	0	0	50.0	0	3.0	76.0	2.0
	75.9	2.0	79.0	19.0	0	26.0	15.0	59.0	19	0	83.0	37.0	48.0	98.0	11.0
	102.0	0.0	79.0	21.0	0	2.0	14.0	63.0	21	0	95.0	53.0	64.0	99.0	6.0

60mmサイズ時と同様に黒化面積割合1/2以上を占める個体が21%出現した。黒化パターン別の出現状況では、3区でC2, C3の黒化が特徴的に出現し、1区と2区ではほとんど全長60mmサイズの黒化の出現状況と大差なかった。

【平成12年度】

① 成長と生残

各試験区とも飼育は10日目付近まで順調に推移したが、1区で15日目、3区で20日目頃から死亡が増加し、その後1区は飼育37日目から、3区では50日目頃に徐々に死亡個体が減少した。一方、2区では20日目付近で一時的に死亡が増加したが、その後終息した。66日目の取り揚げ時の生残率は1区が60.7%、2区が68.8%、3区が49.4%であり、平均全長は1区が98.6mm、2区が95.7mm、3区が94.0mmであった(表Ⅲ-3-2-15)。

② 黒化個体の出現状況

供試魚の黒化個体の出現率は54.3%で、いずれの個体も黒化面積割合1/2以下で、その出現率は軽微であった。
全長40mmサイズ 黒化個体の出現率は1区が41.6%、2区が38.6%、3区が64.0%であり、前年度と同様に3区の出現率が1区、2区よりも高かった。なお、いずれの個体も黒化面積割合1/2以下であった。黒化パターン別の出現状況は1区がA部のA±が8.9%と多く、2区はA+が7.9%と若干多くなったが、1・2区とも黒化割合は軽微であった。一方、3区はA+が23.4%と高くなった。

全長60mmサイズ 黒化個体の出現率は1区が39.0%、2区が40.0%と全長40mmサイズの時とほぼ同じであったが、3区では黒化個体の出現率が97.1%と急増した。黒化パターン別の出現では1・2区とも全長40mmサイズとほとんど同じ傾向を示したが、3区はA±が減少し、A+, A2+が増加した。

全長100mmサイズ 黒化個体の出現率は1区が39.0%、2区が53.0%、3区が97.0%と全長60mmサイズ以降からは出現率に大きな変化は認められなかった。また、3区のみが黒化面積割合1/2以上を占める個体が3%出現した。黒化パターン別の出現状況では、3区でC1, C2の部分に特徴的に黒化部位が認められた(表Ⅲ-3-2-16)。

4) 考察

2カ年にわたって実施した試験結果からヒラメ種苗の中間育成において水槽内での砂敷き飼育は縁側部と頭部および体幹部胸鰭基部の黒化出現防除を抑制する効果があることを確認できた。また、いずれの年度においても、全長60~70mmサイズと100mmサイズで黒化個体の出現状況を比較した場合、両サイズ間で差がないことが認められた。つまり、黒化出現は全長70mm前後を境に、それ以降は新しい部位での出現は少ないことが示唆された。このことは黒化を防除する上で、このサイズまでの防除対策が如何に重要であることを示している。

砂敷き飼育は黒化出現を抑制する効果があることを検証できたが、その理由については明らかでない。砂敷きによる接触刺激がヒラメ種苗のストレスを軽減し、それが

表Ⅲ-3-2-15 平成12年度 砂敷きによる効果の実証試験の飼育結果

試験区	形状	使用水槽		収容		取り揚げ					生残率 (%)
		底面積 (㎡)	月日	尾数 (尾)	全長 (mm)	月日	飼育日数	全長 (mm)	尾数 (尾)	密度 (尾/㎡)	
1区	角形	10	6.6	6,000	22.5 (18.8~26.4)	8.11	66	98.6 (69.5~110.6)	3,644 (69.5~110.6)	364	60.7
	FRP										
2区	角形	10	6.6	6,000	22.5 (18.8~26.4)	8.11	66	95.7 (75.6~109.6)	4,126 (75.6~109.6)	413	68.8
	FRP										
3区	角形	10	6.6	6,000	22.5 (18.8~26.4)	8.11	66	94.4 (78.3~114.1)	2,966 (78.3~114.1)	297	49.4
	FRP										

表Ⅲ-3-2-16 平成12年度 砂敷きによる効果の実証試験の黒化個体の出現状況

試験区	平均全長 (mm)	黒化個体の出現状況 (%)				黒化パターン別の出現状況 (%)										
		正常	黒≤1/2	黒>1/2	黒	A (縁側+体幹部)					C (頭・胸部)			D (尾柄部)		
						正常	±	+	2+	3+	1	2	3	1	2	
開始時	23	45.7	54.3	1.0	0	48.5	51.5	0	0	0	0	1.4	0	0	1.4	2.2
1	50	58.4	40.6	0	0	84.7	8.9	4.4	1.0	1.0	3.0	3.0	0	33.7	2.0	
	68	61.0	39.0	0	0	87.0	8.0	5.0	0	0	3.0	0	0	38.0	0	
	99	61.0	39.0	0	0	83.0	10.0	7.0	0	0	6.0	6.0	0	31.0	1.0	
2	49	61.4	38.6	0	0	89.1	3.0	7.9	0	0	0	0	0	34.7	1.0	
	65	60.0	40.0	0	0	86.0	8.0	5.0	1.0	0	3.0	0	0	36	0	
	96	47.0	53.0	0	0	85.0	4.0	11.0	0	0	10.0	11.0	0	51	0	
3	48	36.0	64.0	0	0	69.4	6.3	23.4	0.9	0	0.9	0	0	56.8	6.3	
	66	2.9	97.1	0	0	24.5	9.8	63.7	2.0	0	9.8	2.0	0	95.1	2.0	
	94	0	97.0	3	0	6.1	9.1	82.8	2.0	0	39.4	61.6	0	100.0	0	

色素形成に何らかの影響を与えることが予察されているが、さらにその機序の解明が必要である。また、今後砂敷き飼育による黒化出現の防除技術の実用化を図るためにも砂敷の厚さ、砂の形状等についても検討が必要と思われる。

(太田 健吾)

IV. 無眼側体色異常防除に関する共同研究

1. 東京水産大学 (現 東京海洋大学・海洋科学部)

(1) ヒラメの無眼側体色異常におよぼす脂溶性 ビタミン類の影響

1) ビタミンD強化飼料および底質の影響

村山 靖之・竹内 俊郎

① 材料と方法

【試験区の設定】

試験区の設定を表IV-1-1)-1に示す。試験区は全長(TL) 20mmまでは7区の2水槽試験(計14水槽)とし、TL20mm以降試験終了時(TL40mm)まではそれぞれの区に対しミクロスセラミック(MS, NORRA(株)製:粒径0.5~1.4mm)を敷いた区と敷かない区を設けた計14区とした。なお、MSは粒径が0.5~1.4mmのものを底面に2cm程度になるように敷いた。1~6区まではY社の市販配合飼料を用い、その飼料にVDを20,000IU/100gとなるように強化した区とVD無強化飼料の2種類とし、それぞれTL11, 13および17mmから両飼料をヒラメに与えた。また、7区は対照区としてX社の市販飼料を用い、TL11mmから与えた。TL20mm以降の配合飼料はY社の市販飼料を(VD無強化)を全区に与えた。

【供試魚】

供試魚は(社)日本栽培漁業協会伯方島事業場1R量産水槽(RC角型50m²)においてFステージ(TL10.43±0.83mm, 日齢21-22)まで生物餌料のみで飼育した仔魚を用い、各区2,000尾(収容密度20,000尾/m²)となるように実数計数により100Lポリカーボネイト水槽14面に収容した。その後TL20mmサイズで一度取り上げて選

別を行い、各水槽に300尾(収容密度3,000尾/m²)ずつ再収容した。なお、量産飼育期間における生物餌料への栄養強化はマリンオメガ(日清サイエンス(株)製)で行い、500ml/m²で6~15h強化した。

【飼育方法】

飼育には100ℓポリカーボネイト水槽14面を用いた。飼育には紫外線殺菌濾過海水を用い換水率は1,000%/日の割合で行った。水温は18℃前後維持するように加温した結果17.5~19.6℃の範囲で推移した。また、エアストーンを各水槽に1個垂下して通気を行い、底掃除は必要に応じて行った。TL20mmおよびTL40mmで取り揚げた魚について全長、生残率を調べるとともに、各100尾を10%海水ホルマリンで固定し、黒化の出現率と出現パターンを調べた。さらに、TL20mmサイズの魚については白化率を、TL40mmサイズの魚については脊椎骨異常率を調査した。また、TL20mmサイズの魚を成分分析用に-80℃で凍結保存し、試験中に用いた生物餌料も同様に凍結し分析に供した。

量産期間および飼育試験期間の仔稚魚の餌料系列を表IV-1-1)-2に示す。魚が配合飼料に餌付くまでは生物餌料と併用して給餌した。飼育試験期間中給餌したアルテミア幼生への栄養強化はオリエンタル酵母工業(株)製のDHAc(DHA含量40%以上)を用い、80ml/m²で16~24時間強化した。培養密度は100個体/mlを目安とした。

【黒化魚の分類方法】

黒化の分類に用いた魚はTL20mm取り揚げおよびTL40mm取り揚げ時に各水槽から100尾を無作為に抽出し、黒化の出現パターンを分類した。分類は後述する分類方法に従って目視によりで行い、不明瞭な部分はさら

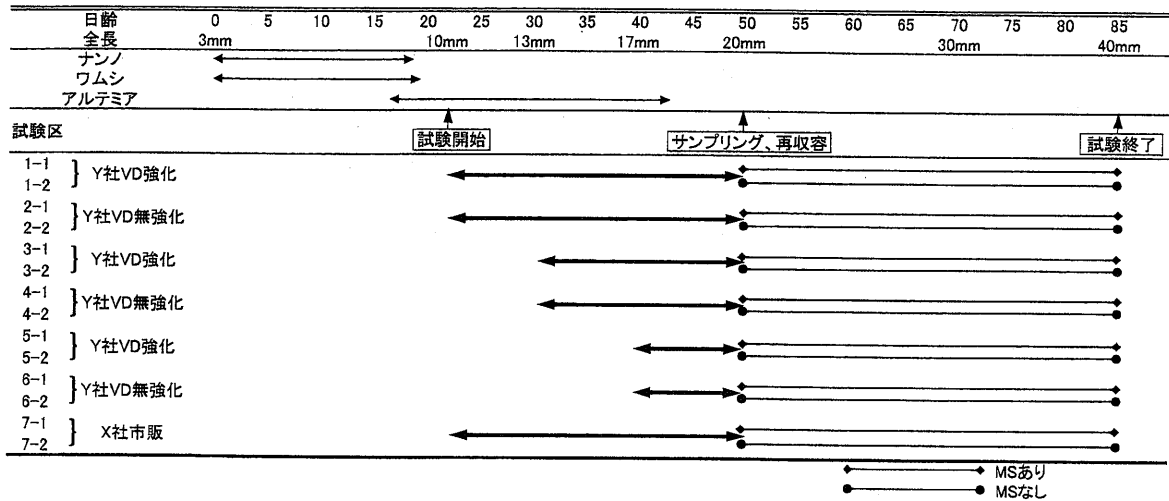
表IV-1-1)-1 試験区の設定

試験区	配合飼料の種類 ^{※1}	配合飼料を与え始めるサイズ	MSの有無 ^{※2}
1-1	Y社VD強化	TL11mm~	有
1-2	〃	〃	無
2-1	Y社VD無強化	〃	有
2-2	〃	〃	無
3-1	Y社VD強化	TL13mm~	有
3-2	〃	〃	無
4-1	Y社VD無強化	〃	有
4-2	〃	〃	無
5-1	Y社VD強化	TL17mm~	有
5-2	〃	〃	無
6-1	Y社VD無強化	〃	有
6-2	〃	〃	無
7-1	X社市販飼料	TL11mm~	有
7-2	〃	〃	無

※1 表中Y社VD強化飼料はVD=20,000IU/100g強化したものの、Y社VD無強化飼料はY社市販飼料を示す。

※2 MSは粒径0.5~1.4mmのものを厚さ2cmに敷く。また、ここではMSの影響を見るのでY社の市販飼料を全区に給餌する。

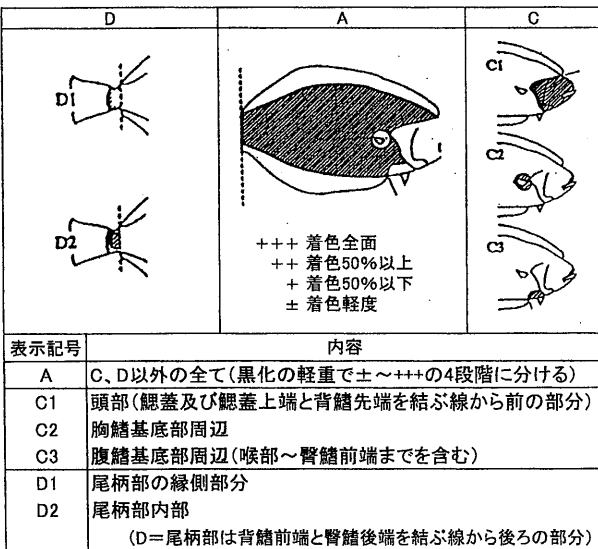
表IV-1-1)-2 試験区毎の餌料系列



に実体顕微鏡下で観察した。

分類は次の2通りの方法で行った。第1の方法はヒラメの鰭部分を除く無眼側全体の着色面積によって正常個体(W), 黒化面積割合が1/2以下の個体($B \leq 1/2$), 黒化面積が1/2以上の個体($B > 1/2$), 完全黒化個体(B)の4通りに分類し観察するもので、以降面積別出現状況と呼ぶ。

第2の方法はヒラメの無眼側を部位別に区切り、その部位における黒化の出現状況を観察するもので、以降パターン別出現状況と呼ぶ。黒化の分類方法を図IV-1-1)-1に示す。



図IV-1-1)-1 黒化の分類方法(水産庁の類型化を基準に改変)

【脊椎骨異常の観察方法】

脊椎骨異常はTL40mmサイズで取り上げ、10%海水ホルマリンで固定した個体100尾をSoftexにより撮影、観察した。撮影はmA=1.2, X線照射時間=30秒の設定で行った。観察は癒合、屈曲に分けて行った。なお、SoftexにはSoftex社製の軟X線検査装置CMB-2型を用いた。

【栄養分析】

配合飼料の一般組成、ビタミン類、脂肪酸等を(財)日本食品分析センターに分析を依頼した。

魚体中のVDの分析は小林らの方法で行った。試料を90%KOH溶液でケン化し、不ケン化物をベンゼンに溶解後、分取用第1段階HPLCに導入し、VD画分を分取した。得られたVD画分を分析用第2段階HPLCに導入し、クロマトグラム上に認められるピークの高さからVD含量を測定した。

【統計処理】

観察によって得られた結果を統計的に処理し、比較を行った。検定は二項検定とし、有意水準5%, 両側検定で行った。

② 結果

【配合飼料の分析結果】

今回使用した配合飼料の栄養分析結果を表IV-1-1)-3に示す。VD強化区は所期の目的通り約20,000 IU/100gであった。一方、Y社の無強化区におけるVD含量は1,150 IU/100gであったのに対し、本年のX社のVD含量は過去の値と異なり1,720 IU/100gと低く、両飼料の間にほとんど差がなかった。VA含量については、Y社のVA含量はX社の10倍程度と高い値を示していた。その他、YおよびX社の飼料の栄養分析値は、ビタミンC、ビタミンEおよび粗脂肪含量に違いが見られた。脂肪酸では飼料100gあたりに換算するとEPA, DHAおよびn-3HUFAに両社飼料間に差はなかった。

【成長と生残率】

飼育期間中のTLおよび生残率測定結果を表IV-1-1)-4に示す。TLでは20および40mmサイズにおいて各区の間に差はなかった。今回は水温が多少低かったことから、TL40mmに達するまでに84-85日を要した。TL20mmサイズにおける生残率を見ると、各区の間に有意差が認められたが、3-2区を除き平均値で77-91%と優れた値を示した。TL40mmサイズでの生残率は7区の

値が4区を除き有意に低く61.8%であったが、その他は71-78%の範囲であった。

【無眼側体色異常出現状況】

TL20および40mmサイズにおける黒化の出現状況を表IV-1-1)-5および表IV-1-1)-6に、TL20mmサイズにおけるパターン別黒化出現率を図IV-1-1)-2に、さらにTL40mmサイズにおける黒化出現率を図IV-1-1)-3にそれぞれ示す。TL20mmサイズにおける黒化出現状況をみると、各区の2水槽間でばらつきはあまり見られなかつ

た。パターン別黒化出現率を見ると、TL11mmからVD強化飼料を与えた区でA±が低く、A+, D1およびD2が高く、特にA+およびD1では他区と比較し有意差が認められた。すなわち、今回特に尾柄部の黒化出現に対し明確な差が見られた。しかし、VD強化飼料をTL13および17mmから与えた両区の間には有意差が認められなかった。一方、VD無強化飼料区ではTL11および17mmの間に有意差が認められるとともに、X社の飼料をTL11mmから与えると、TL13mm以降にY社の配合飼

表IV-1-1)-3 配合飼料の栄養分析結果

分析項目	単位	Y社VD強化	Y社VD無強化	X社市販飼料
ビタミンA	IU/100g	10,900	11,200	1,200
ビタミンC	mg/100g	1,500	1,530	26.0
ビタミンD	IU/100g	20,300	1,150	1,720
ビタミンE	mg/100g	152.0	150.0	94.3
水分	%	3.4	5.4	6.7
粗タンパク質	%	56.3	56.3	54.5
粗脂肪	%	11.4	11.5	20.4
粗灰分	%	13.3	13.0	8.3
脂肪酸組成				
20:5(EPA)	%	12.3 (1.4)*	12.5 (1.4)	6.0 (1.2)
22:6(DHA)	%	15.5 (1.8)	15.6 (1.8)	9.9 (2.0)
Σn-3HUFA	%	29.1 (3.3)	29.4 (3.4)	17.0 (3.5)

* 飼料100g当りの計算値。

表IV-1-1)-4 飼育試験結果 (全長と生残率)

試験区	試験開始時 (日齢21、22)	全長(mm)		生残率(%)	
		20mm取り揚げ時 (日齢47、48)	40mm取り揚げ時 (日齢84、85)	試験開始~TL20mm	TL20~40mm
1-1	10.4	21.0	43.6	86.3	76.3
1-2	10.4	19.8	45.2	94.9	71.3
平均	10.4	20.4	44.4	90.6 ^c	73.8 ^{b,c,d}
2-1	10.4	19.5	43.4	79.1	83.3
2-2	10.4	20.1	44.2	74.1	67.0
平均	10.4	19.8	43.8	76.6 ^b	75.2 ^{c,d}
3-1	10.4	20.3	44.4	85.2	76.7
3-2	10.4	20.8	43.8	48.8	79.0
平均	10.4	20.6	44.1	67.0 ^a	77.8 ^d
4-1	10.4	19.7	44.6	79.2	65.3
4-2	10.4	20.4	43.9	79.7	67.7
平均	10.4	20.1	44.3	79.5 ^b	66.5 ^{a,b}
5-1	10.4	20.3	43.8	79.3	70.3
5-2	10.4	20.5	45.6	93.6	71.3
平均	10.4	20.4	44.7	86.5 ^c	70.8 ^{b,c}
6-1	10.4	20.2	43.3	98.0	77.3
6-2	10.4	20.5	43.4	73.8	77.0
平均	10.4	20.4	43.4	85.9 ^c	77.2 ^{c,d}
7-1	10.4	19.9	44.9	74.6	56.0
7-2	10.4	20.2	44.4	79.5	67.7
平均	10.4	20.1	44.7	77.0 ^b	61.8 ^a

*有意差の検定は有意水準5%、両側検定で行った。

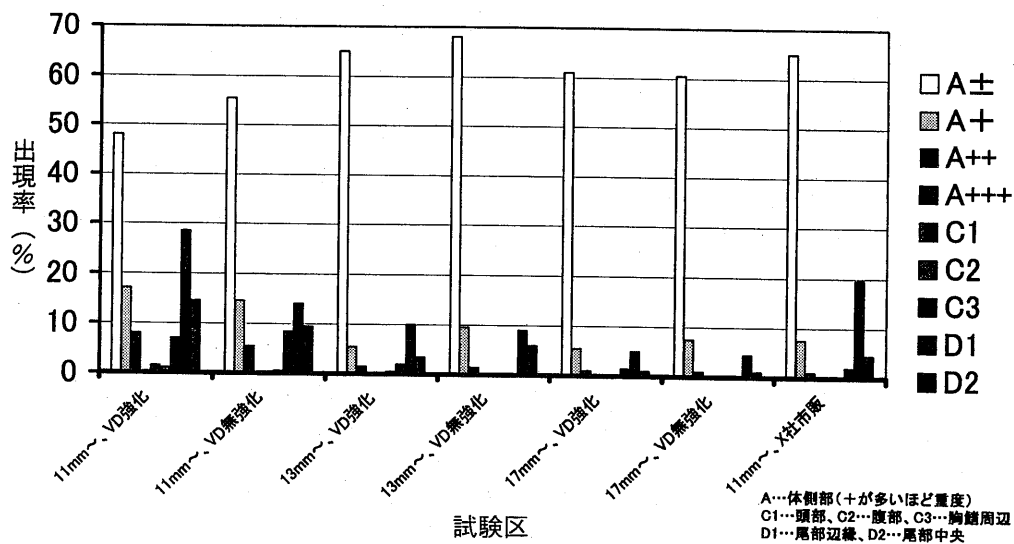
表IV-1-1)-5 全長20mmサイズにおける黒化出現状況

試験区	観察尾数 (尾)	正常率(%)				黒化									
		正常	黒≤1/2	黒≥1/2	黒	A		C			D				
						±	+	++	+++	1	2	3	1	2	
1	200	21.5	75	3.5	0	48	17 ^c	8 ^b	0	1.5	1	7	28.5 ^a	14.5	
2	200	23	75	2	0	55.5	14.5 ^{b,c}	5.5 ^b	0	0	0.5	8.5	14 ^{c,d}	9.5	
3	200	26.5	73	1	0	65	5.5 ^a	1.5 ^a	0	0	0.5	2	10 ^{b,c}	3.5	
4	200	18.5	79.5	2	0	68	9.5 ^{a,b}	1.5 ^a	0	0	0	0	9 ^{a,c}	6	
5	200	32	68	0	0	61	5.5 ^a	1 ^a	0	0	0	1.5	5 ^{a,b}	1	
6	200	30.5	69	1	0	60.5	7.5 ^a	1 ^a	0	0	0	0	4.5 ^a	1	
7	200	23	76.5	1	0	65	7.5 ^a	1 ^a	0	0	0	2	19.5 ^d	4.5	

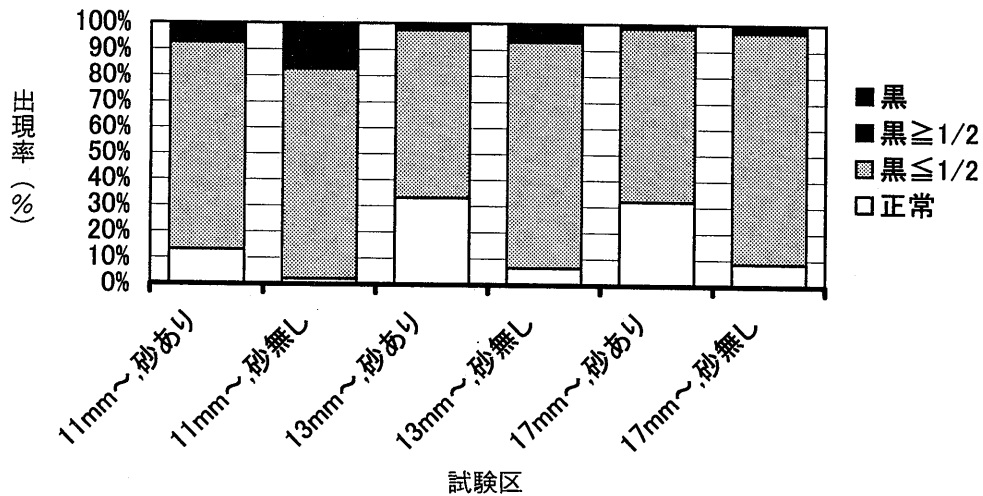
*有意差の検定は、有意水準5%、両側検定でおこなった。

表IV-1-1)-6 全長40mmサイズにおける黒化出現状況

試験区	観察尾数 (尾)	砂の有無	正常率(%)				A										C		D	
			正常	黒≤1/2	黒≥1/2	黒	A				C		D							
							±	+	++	+++	1	2	3	1	2					
1-1	100	有	12	81	7	0	31	35	5	0	22	6	44	67	11					
-2	100	無	2	85	13	0	12	64	18	0	44	3	54	94	20					
2-1	100	有	14	78	8	0	44	34	4	0	15	9	28	66	13					
-2	100	無	2	76	22	0	8	61	28	0	52	13	52	93	19					
3-1	100	有	35	61	3	1	36	15	3	1	6	5	14	39	2					
-2	100	無	3	86	11	0	20	57	16	0	33	3	35	86	2					
4-1	100	有	31	68	1	0	42	16	4	0	12	3	24	43	1					
-2	100	無	10	87	3	0	28	58	3	0	20	0	50	76	0					
5-1	100	有	32	65	3	0	45	12	2	0	11	3	28	49	2					
-2	100	無	7	92	1	0	33	55	2	0	22	2	47	68	1					
6-1	100	有	32	68	0	0	42	16	0	0	10	0	29	51	0					
-2	100	無	10	85	5	0	32	43	7	0	16	5	33	76	2					
7-1	100	有	9	89	2	0	32	45	3	0	22	4	43	68	5					
-2	100	無	8	88	4	0	26	58	4	0	35	2	52	76	2					



図IV-1-1)-2 20mmサイズにおけるパターン別黒化出現率



図IV-1-1)-3 40mmサイズにおけるパターン別黒化出現率

料を与えた区に比較しD1に有意差が認められた。

TL40mmサイズでの黒化出現状況を見ると、いずれの試験区とも TL20mmサイズに比較して黒化の進行がみられ、特に黒化の類型化においてA+, C1, C3およびD1の割合が増加した。TL11, 13および17mmから配合飼料を与えた区について、VD強化、無強化区をまとめ図にしたところ、TL20mmサイズ以降に飼育環境（MSのあるなし）の違いにより明らかに黒化出現率に差が見られた。すなわち、MSのありに比較しMSなし区で正常個体の割合が減少し、黒化 $\geq 1/2$ の割合が増加した。

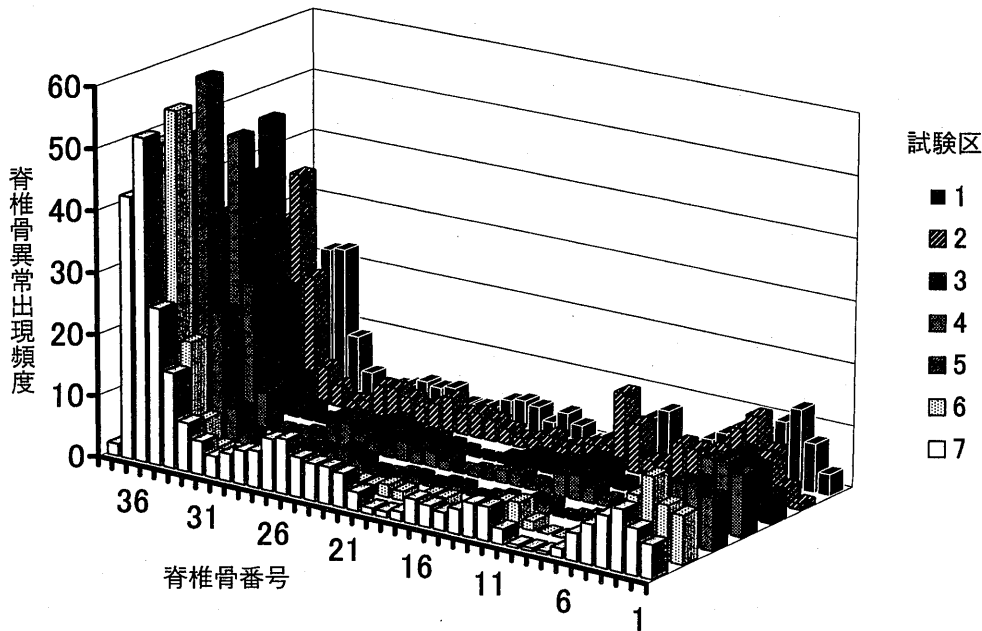
【脊椎骨異常出現状況】

TL40mmサイズにおける脊椎骨異常出現状況および出

現頻度を図IV-1-1)-4および表IV-1-1)-7に示す。各区とも異常出現率は55%以上を示し、その異常は腰椎および尾椎とも癒合が主であった。椎骨の35番前後が最も異常の出現頻度が高かったが、TL11mmから配合飼料を与えた区がその後に配合飼料を与えた区に比較し、出現頻度が有意に低くなる傾向を示した。特にVDを強化した1区で低かった。

【有眼側体色異常出現状況】

TL20mmサイズにおける白化率を表IV-1-1)-8に示す。TL11mmから配合飼料を与えた区では、TL17mmから与えた区に比較して白化率が有意に低下する傾向を示し、脊椎骨異常の出現状況と類似していた。



図IV-1-1)-4 40mmサイズにおける脊椎骨異常出現

表IV-1-1)-7 全長40mmサイズにおける脊椎骨異常出現状況

試験区	観察尾数 (尾)	異常出現率 (%)	脊椎骨異常出現頻度(%)					
			腰椎			尾椎		
			癒合	屈曲	複合	癒合	屈曲	複合
1-1	100	54	21	4	0	37	8	0
1-2	"	61	25	9	1	39	10	1
平均		57.5 ^a	23 ^b	6.5 ^c	0.5	38 ^a	9 ^a	0.5
2-1	"	66	21	3	1	51	12	0
2-2	"	66	13	11	2	47	15	4
平均		66 ^{a,b}	17 ^{a,b}	7 ^c	1.5	49 ^b	13.5 ^a	2
3-1	"	58	17	0	0	47	9	0
3-2	"	66	15	2	0	49	14	3
平均		62 ^{a,b}	16 ^{a,b}	1 ^{a,b}	0	48 ^b	11.5 ^a	1.5
4-1	"	61	16	1	1	50	9	1
4-2	"	59	20	1	0	47	8	1
平均		60 ^a	18 ^{a,b}	1 ^{a,b}	0.5	48.5 ^b	8.5 ^a	1
5-1	"	69	9	1	0	59	11	0
5-2	"	65	20	0	0	59	4	0
平均		67 ^{a,b}	14.5 ^a	0.5 ^a	0	59 ^c	7.5 ^a	0
6-1	"	65	19	1	0	51	8	1
6-2	"	66	17	0	1	59	7	0
平均		65.5 ^{a,b}	18 ^{a,b}	0.5 ^a	0.5	55 ^{b,c}	7.5 ^a	0.5
7-1	"	74	12	3	1	58	19	3
7-2	"	68	13	4	1	45	26	0
平均		71 ^b	12.5 ^a	3.5 ^{b,c}	1	51.5 ^{b,c}	22.5 ^b	1.5

※有意差の検定は有意水準5%、両側検定で行った。

表IV-1-1)-8 20mmサイズにおける白化出現状況

試験区	観察尾数(尾)	出現率(%)
1-1	100	49.0
1-2	100	46.0
平均		47.5 ^{a,b,c}
2-1	100	43.0
2-2	100	39.0
平均		41 ^a
3-1	100	62.0
3-2	100	47.0
平均		54.5 ^{b,c,d}
4-1	100	46.0
4-2	100	45.0
平均		45.5 ^{a,b}
5-1	100	62.0
5-2	100	49.0
平均		55.5 ^{c,d}
6-1	100	56.0
6-2	100	60.0
平均		58 ^d
7-1	100	50.0
7-2	100	53.0
平均		51.5 ^{b,c,d}

※有意差の検定は有意水準5%、両側検定で行った

③ 考察

今回の実験結果から、VDを20,000 IU/100 g強化した飼料をTL11mm (G~Hステージ) からヒラメに与えることにより、黒化出現率が高まることがわかった。さらにTL20mm以降底面にMSを敷かない環境で飼育すると、黒化はさらに進行することが明らかになった。しかし、VD無強化飼料区でも、TL11mmから与えた区のほうが、TL13mm以降に与えたVD強化区よりも黒化出現率が多少高く、さらに、X社の飼料はVD含量が低いにもかかわらず、黒化パターンのD1が高かったことから、VD以外の因子も関わっている可能性が示唆された。

脊椎骨異常出現率は今回いずれの区も高かったが、TL11mmサイズから配合飼料を与えた1、2および7区で違いが見られた。VA強化飼料をGステージであるTL10~11mmに与えることにより骨異常率が高まること知られているが、今回、VA含量が10,000 IU/100 g程度であっても、VDを同時に20,000 IU/100 g強化した区で尾部における異常の割合は低くなる傾向を示した。一方、X社の飼料はVDのみならずVA含量が低いにもかかわらず異常率が高い値を示し、これらのことから、脊椎骨異常はVAとVDのバランスあるいは、原料由来の何らかの因子がかかわっているものと推察された。また、今回白化率がいずれの試験区でも高く、浮遊期の餌料あるいは卵質の影響が想起され、それらの因子が、正常個体の減少や脊椎骨異常出現率の増加に影響をおよぼした可能性も考えられる。

以上の結果から、配合飼料中にVDを20,000 IU/100 g強化し、かつ、その強化飼料をTL11mmから給餌すると黒化の出現率が高くなり、また、着底期以降底面に砂を敷いた環境で飼育することが黒化の発現防止ならびに

進行の防除に有効であることがわかった。

VDには表皮細胞の分化とメラニン合成を促進する働きがある。しかし、これらの実験は哺乳類を用いて行われたもので、魚類におけるVDの皮膚組織への作用に関する報告例はなく、そのため、哺乳類の場合と異なる可能性もあるが、本試験や長谷川らの実験からVDがメラニン合成を促進する作用があることは推察される。一方、VAにはVDの生理作用を助ける働きがあり、また色素発現に対し促進的な作用がある。このように、VAとVDとの間には色素発現に対して相互作用があり、そのためVAとVDとのバランスも重要であると思われる。今後はVDの濃度およびVAとのバランスが黒化発現に関してどのような影響をおよぼすのかを検討していく必要がある。

2) 飼料中の脂溶性ビタミン強化バランスの影響

村山 靖之・竹内 俊郎

1) で行われた試験において、ヒラメ浮遊期 (TL11mm G~Hステージ) に、Y社の市販飼料にビタミンDを飼料100 g当り20,000 IU強化した飼料を給餌したところ、ビタミンDを強化しなかったY社市販飼料に比べTL20mmサイズにおいて黒化出現率が高く出現するという結果が得られた。この結果により、浮遊期型黒化発現要因の1つとしてビタミンDが関与していることが示唆された。

一方、ビタミンAの生理作用として、成長促進作用、視覚作用、皮膚における正常保持作用、制がん作用、細胞分化・発生能などが挙げられる。ヒラメにおけるビタミンAの生理作用としては、ビタミンAを生物餌料中に強化することによるヒラメの白化防除効果、ビタミンAの代謝活性体である9 cisRAの浸漬による黒化誘発など色素発現に関する報告もなされている。近年の分子生物学の研究の進展により、ビタミンAおよびビタミンDの核内レセプターのクローニングがなされ、さらにその動態調査によって、ビタミンAとビタミンDの相互作用の可能性が明らかになってきた。

そこで、ビタミンAとビタミンDの相互作用が黒化発現にどのような影響をおよぼすかを検討することとした。

① 材料と方法

【試験区の設定】

試験区の設定条件を表IV-1-2)-1に示す。試験区は6区を2反復で設け、ビタミンAとビタミンDの強化バランスを変えた飼料6種を作成した。それぞれの試験区の飼料には、I区がX社市販飼料、II区がビタミンDを飼料100 g当り20,000 IU、III区がビタミンDを60,000 IU、IV区がビタミンAを30,000 IU、V区がビタミンDを60,000 IUおよびビタミンAを30,000 IU、VI区がビタミンDを20,000 IUのビタミンを強化した。それらの試験飼料を試験開始からTL20mmまで給餌し、TL20mm

で取り揚げ、選別後、各水槽に砂（株）NORA 製マイクロセラミックMS-0：粒径0.1～0.5mm）を水槽底面に2～3cm程度になるように敷いた後、TL40mmまで飼育した。なお、TL20mm以降の飼育にはY社市販飼料を全区に給餌した。

【供試魚】

供試魚は1999年、（社）日本栽培漁業協会伯方島事業場で行われた種苗生産の過程で得られたもので、ヒラメの変態ステージF（25日齢、TL9.49±0.59mm）まで生物餌料のみで飼育された仔魚を用いた。なお、収容時のステージ組成はDステージ：4%、Eステージ：26%、Fステージ：70%であった。

【飼育方法】

飼育には黒色100ℓポリカーボネイト水槽12面（6区×2水槽）を用いた。水槽は遮光された屋内に設置し、水槽上部には照度調節用の照明器具を設置した。飼育水には紫外線殺菌ろ過海水を別の水槽で17～18℃に調温したものを使用し、それをポンプで各飼育水槽に注水した。なお、飼育水の加温は自然水温が18℃を超えた時点で中止した。1日の換水量は仔稚魚の成長に合わせ、5～10回転/日まで適宜増加させた。また、各水槽に1個エアーストーンを垂下し、通気を行った。底掃除は毎日行い、水槽底面の溜まった残餌、糞および斃死魚を取り除いた。飼育水の水温、溶存酸素、pHは毎日8時に計測し、水面上の照度は天候に応じて経時的に測定した。

試験開始時には供試魚が配合飼料に餌付いていないため、配合飼料に餌付くまではアルテミア幼生を併用給餌した。併用給餌は試験開始から30日齢まで7日間行い、配合飼料は8,9,10,11,14および15時に、アルテミア幼生は11時半および16時半に給餌した。併用給餌終了後TL20mmまでは1日6回、TL20mm以降は1日4回配合飼料を給餌した。なお、アルテミア幼生への栄養強化は、（株）オリエンタル酵母工業製のDHAceを用い、培養水100ℓに対し8mlの濃度で添加し、16～24時間強化した後給餌した。培養密度は100個体/mlを目安とした。

飼育期間中の飼育密度は、試験開始からTL20mmまでは5,000尾/m³で飼育し、TL20mmサイズで一旦全数を取り揚げ、生残率の測定および黒化判定用のサンプリン

グを行った。それを選別後、1,000尾/m³となるように密度調節を行いTL40mmまで飼育し、試験終了とした。

サンプリングはTL20mmサイズでは各水槽から100尾ずつ、TL40mmサイズでは生き残った全ての魚を取り揚げて10%海水ホルマリンで固定し、後日黒化個体の出現状況を調査した。さらに、TL20mmサイズの取り揚げ時には白化個体出現率を（n=100）、TL40mmサイズのサンプルでは軟X線写真を撮影し、脊椎骨形態異常の発生状況を調査した。

試験に用いた配合飼料は（財）日本食品分析センターに依頼し、一般組成、ビタミンA、C、D、E、脂肪酸等について分析を行った。

【無眼側体色異常個体の分類方法】

TL20mmおよびTL40mmサイズでサンプリングした供試魚は10%海水ホルマリンで固定後、黒化個体の分類を行った。観察は肉眼とさらに明確ではない部分は実体顕微鏡下で行った。

分類方法は1) で用いた方法に準じた。

【脊椎骨形態異常の観察方法】

脊椎骨形態異常はTL40mmサイズでサンプリングした個体を用い、軟X線写真を撮影して観察した。軟X線写真はSoftex社製の軟X線検査装置CMB-2型を使用し、撮影条件はmA=1.5、V=60、X線照射時間=20秒の設定で行った。観察は腹椎と尾椎おける癒合と屈曲の出現状況と、異常を起こしている脊椎骨番号を調べる方法とした。

【統計処理】

黒化出現状況および脊椎骨形態異常出現状況で得られた結果を統計学的検定により比較を行った。各試験区より得られた結果は平均値で示す事とし、検定は有意水準5%で母比率の差の検定を行った。

② 結果

【配合飼料の分析結果】

試験に用いた配合飼料の栄養分析結果を表IV-1-2)-2に示す。ビタミンAおよびビタミンDの強化量は各試験区とも想定量検出され、予定通りの強化を行うことができた。

その他の栄養素についてはX社に比べY社のビタミン

表IV-1-2)-1 試験区の設定

試験区	飼料種	ビタミンD	ビタミンA
		(IU/100g)	(IU/100g)
I	X社市販飼料	—	—
II	VD強化X社市販飼料	20,000	—
III	VD強化X社市販飼料	60,000	—
IV	ビタミンA強化X社市販飼料	—	30,000
V	ビタミンA・D強化X社市販飼料	60,000	30,000
VI	ビタミンD強化Y社市販飼料	20,000	—

Cが約120倍と極端な違いが見られた他はほぼ同様な含有量であった。

【飼育結果】

飼育試験は、4/13～6/10までの59日間行った。飼育結果を表IV-1-2)-3に示す。各試験区とも順調に成長し、成長、生残率において大きな差は認められなかった。なお、飼育期間中の水温、溶存酸素、pH、および照度はそれぞれ15.2～19.8℃、4.0～7.2 mg/l、7.97～8.23、66.4～339.0 lux であり、各試験区間に差は認められなかった。

【無眼側体色異常出現状況】

TL20mmおよび TL40mmサイズにおける黒化の出現状況を表IV-1-2)-4、表IV-1-2)-5、図IV-1-2)-1および図IV-1-2)-2に示す。

TL20mmサイズの黒化出現状況は、正常率が79.4～87.0%と全区とも高く、また、異常が出たものでも軽度の黒化個体のみで、各試験区間で出現率に有意差は認められなかった (P>0.05)。

TL40mmサイズの黒化出現状況は、全体的にV区の黒化率が高く、特にビタミン無強化飼料を給餌したI区と

表IV-1-2)-2 配合飼料の栄養分析結果

項目	計量単位	飼料の種類と粒径								
		X社市販飼料			X-D=20,000	X-D=60,000	X-A=30,000	X-A=30,000, D=60,000	Y社市販飼料	Y-D=20,000
		250	400	700	400	400	400	400	360～500	360～500
ビタミンA	IU/100g	1,130	1,430	1,400			30,000	30,200	9,430	
ビタミンC	mg/100g		12						1,420	
ビタミンD	IU/100g	2,500	2,500	2,590	22,800	53,300		62,800	1,330	21,900
ビタミンE	mg/100g		100						131	
水分	%		8.4						6.0	
粗タンパク質	%		60.2						54.0	
粗脂肪	%		13.9						14.1	
粗灰分	%		9.0						12.6	
脂肪酸含量										
20.5(EPA)	%		8.4						12.9	
22.6(DHA)	%		11.6						12.3	
Σn-3HUFA ^{*1}	%		21.0						26.5	

※ Σn-3HUFA=20.4+20.5+22.5+22.6

表IV-1-2)-3 取り揚げ結果

試験区	収容時	収容時～TL20mm		TL20mm～TL40mm	
	TL(mm)	TL(mm)	生残率(%)	TL(mm)	生残率(%)
I	9.5 ± 0.59 ^{*1}	19.6 ± 2.42 ^{*2}	85.0	39.9 ± 2.08 ^{*2}	95.5
II	9.5 ± 0.59	19.8 ± 1.84	86.6	39.6 ± 2.74	90.0
III	9.5 ± 0.59	19.1 ± 2.35	85.2	39.6 ± 2.26	91.5
IV	9.5 ± 0.59	19.6 ± 2.39	85.3	40.0 ± 2.10	89.0
V	9.5 ± 0.59	18.7 ± 2.18	85.2	39.7 ± 2.46	90.0
VI	9.5 ± 0.59	18.4 ± 1.73	88.2	39.5 ± 2.27	92.5

※1 N=50
※2 N=100

表IV-1-2)-4 TL20mmサイズにおける黒化出現状況

試験区	面積別黒化出現率(%)				パターン別黒化出現率(%)									
	W	B≤1/2	B>1/2	B	A				C			D		
					A±	A+	A++	A+++	C1	C2	C3	D1	D2	
I	82.0	17.0	1.0	0.0	9.0	0.0	1.0	0.0	0.0	2.5	6.5	10.5	1.5	
II	81.9	16.6	1.5	0.0	7.5	0.5	1.5	0.0	1.0	3.0	5.5	12.1	3.0	
III	85.5	14.0	0.5	0.0	7.0	1.0	0.5	0.0	0.0	1.0	5.5	6.5	1.0	
IV	82.5	16.5	1.0	0.0	7.0	0.5	1.5	0.0	0.5	2.5	4.0	8.0	3.0	
V	79.4	19.6	1.0	0.0	10.0	1.0	1.0	0.0	0.5	1.5	3.5	16.6	3.0	
VI	87.0	12.5	0.5	0.0	5.5	1.5	0.5	0.0	0.5	2.0	6.0	7.5	1.5	

比較し、面積別出現率の正常, B<1/2, パターン別出現率のA+, D1で有意に高く黒化が出現しているのが観察された (P<0.05)。

【脊椎骨異常出現状況】

TL40mmサイズにおける脊椎骨異常出現状況は各脊椎骨番号における異常出現頻度で図IV-1-2)-3に示した。出現率は30~47%程度で、異常症状別に見ると尾椎の癒合が主であった。また、異常出現率においてビタミン強化量が多いほど異常個体出現率が高くなる傾向が見られ、特に両ビタミンを強化したV区の異常出現率がビタミン無強化のI区に比べ有意に高く出現した (P<0.05)。

【有眼側体色異常個体出現状況】

TL20mmサイズにおける白化個体の出現率は4.0~11.0%と低く、特にビタミン両強化飼料を給餌したV区の白化率は4.0%と低かった。

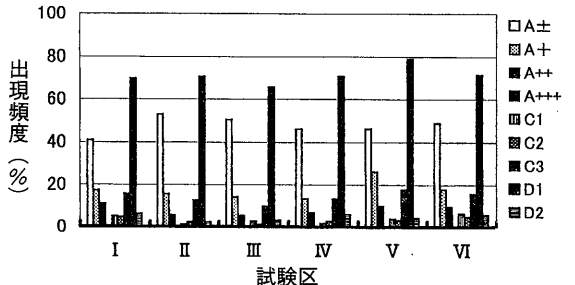
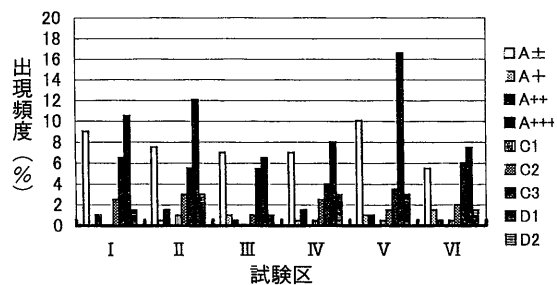
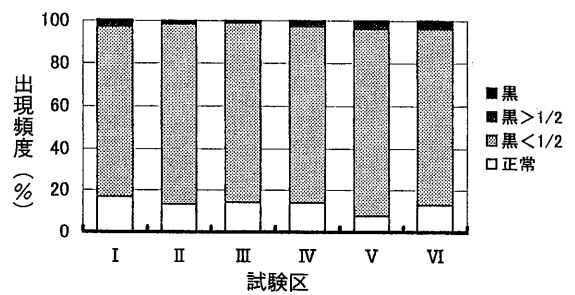
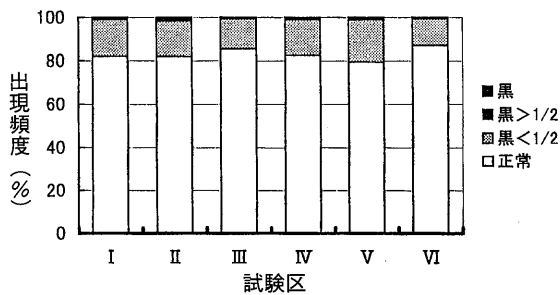
③ 考察

今回の実験では TL40mmサイズにおいて、ビタミンAおよびビタミンDをそれぞれ飼料100g当り 30,000 IU, 60,000 IU 強化した飼料を給餌したV区の黒化出現率が高い傾向が見られた。特にX社市販飼料 (飼料100g当り VA=1,400 IU, VD=2,500 IU) を給餌したI区とは有意差が認められる項目もあった。一方、TL20mmサイズの黒化出現率は全区とも黒化出現率が低く、各試験区間で差は認められなかった。このことから浮遊期にビタミンAとビタミンDを強化した配合飼料を給餌することにより着底期型の黒化発現を促進していることが示唆された。しかしながら、その差は大きなものではなく、このことが黒化発現に関する主要因であると断定することが出来なかった。

脊椎骨異常については、ビタミン無強化区に比べ強化した区の異常出現率が高まる傾向が見られ、これまでの

表IV-1-2)-5 TL40mmサイズにおける黒化出現状況

試験区	面積別黒化出現率(%)			パターン別黒化出現率(%)										
	W	B≤1/2	B>1/2	B	A				C			D		
					A±	A+	A++	A+++	C1	C2	C3	D1	D2	
I	16.8 ^{ab}	80.4 ^b	2.6	0.6	40.8	17.3	11.0	0.5	5.2	4.7	15.7	69.6	6.3	
II	13.3 ^{b,c}	85.0 ^{ab}	1.7	0.0	52.8	15.6	5.6	0.0	1.1	2.2	12.8	70.6	2.2	
III	14.2 ^b	84.7 ^{ab}	1.1	0.0	50.3	14.2	5.5	0.0	2.7	1.1	9.8	65.6	3.3	
IV	14.0 ^{b,c}	83.2 ^{ab}	2.8	0.0	46.1	13.5	6.7	0.0	1.7	2.8	13.5	70.8	6.2	
V	7.8 ^c	88.3 ^a	3.9	0.0	46.1	26.1	10.0	0.0	3.9	3.3	17.8	78.9	4.4	
VI	13.0 ^{b,c}	83.2 ^{ab}	3.8	0.0	48.6	17.8	9.7	0.0	6.5	4.9	15.7	71.3	5.9	



図IV-1-2)-1 TL20mmサイズにおける面積別(上)およびパターン別(下)黒化出現状況

図VI-1-2)-2 TL40mmサイズにおける面積別(上)およびパターン別(下)黒化出現状況

研究結果と同様の結果が得られた。特にビタミンAとビタミンDの両方を強化した区の出現率が他の区に比べると若干高かった。このことからビタミンAとビタミンDを両強化した飼料は黒化発現だけでなく、骨異常にも影響をおよぼしていることが考えられる。

今回、TL40mmサイズでの明確な違いが認められないという結果になり、黒化の要因を特定することが出来ないという結果になった。この要因として、TL20mm以降の飼育で用いたMSが考えられる。この飼育方法には着底期以降に出現する着底期型黒化の発現を大きく抑制する効果があることが数多く報告されている。現在、黒化は様々な要因が相互作用して発現していると考えられている。つまり、ビタミン過剰投与によって本来発現すべき黒化が、敷砂の効果により抑制されたとも言える。今回の実験からビタミンを強化した飼料を給餌する事は、着底期以降の黒化発現に影響している事が示唆された。よって、ビタミン過剰投与による黒化発現促進効果と、敷砂による黒化発現抑制効果の関連性を明らかにするために、着底期以降における敷砂の有無によってビタミン過剰投与の影響がどれだけ抑えられるかを確認する試験が必要であると考えられる。

3) ビタミン過剰投与と敷砂の関係

村山 靖之・竹内 俊郎

前述の実験において、浮遊期（G～Hステージ）にビ

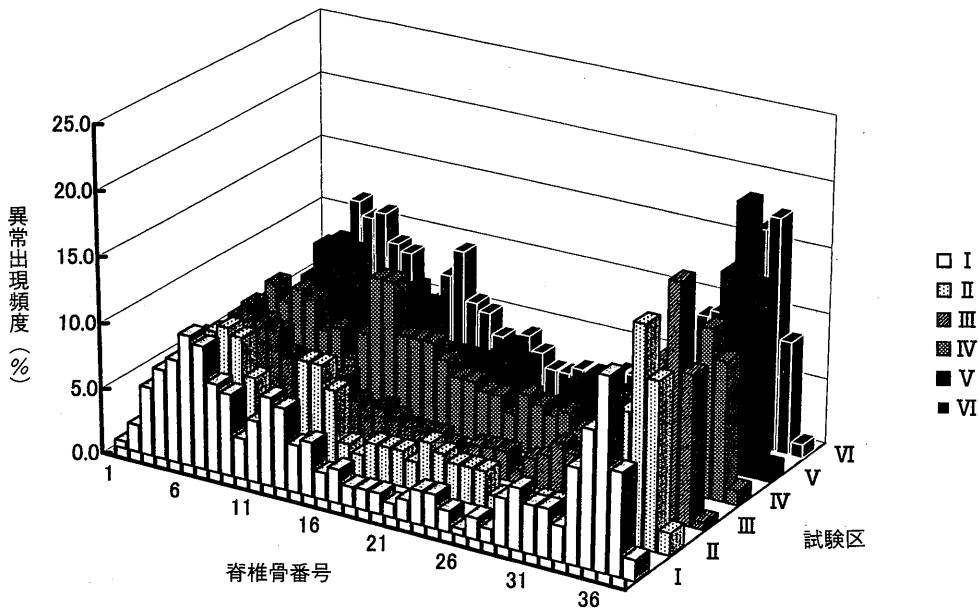
タミンAとビタミンDを強化した配合飼料を給餌することにより着底期型の黒化発現を促進していることが示唆された。しかしながら、その差は大きなものではなく、このことが黒化発現に関する主要因であると断定することが出来なかった。この要因として、TL20mm以降の飼育で用いた砂敷き飼育が考えられ、ビタミン過剰投与によって本来発現すべき黒化が、敷砂の効果が大きく、それによって抑制されたと推察された。

そこで、着底期以降の飼育水槽中への敷砂の有無によりビタミン過剰投与の影響がどれだけ抑えられるかの確認を行った。

① 材料と方法

【試験区の設定】

試験区の設定条件を表IV-1-3)-1に示す。試験区は4区を2反復で設けた。それぞれの試験区の飼料には、I区およびII区が前章で最も黒化出現率の低かったX社市販飼料、III区およびIV区が最も黒化出現率の高かった飼料100g当りビタミンDを60,000 IUおよびビタミンAを30,000 IU強化した配合飼料を用い、試験開始から全長(TL)20mmまで給餌した。さらに、TL20mm以降の飼育では、1区および3区には水槽底面に砂（株NORA製ミクロスセラミック MS-0：粒径0.1～0.5mm）を水槽底面に2～3cm程度になるように敷いた後、TL40mmまで飼育した。なお、試験区以外の設定は2)に準じた。



図VI-1-2)-3 各脊椎骨番号における異常出現状況

表IV-1-3)-1 試験区の設定条件

試験区	飼料種	ビタミンD (IU/100g)	ビタミンA (IU/100g)	砂敷きの有無
I	X社市販飼料	—	—	有
II	X社市販飼料	—	—	無
III	ビタミンA・D強化X社市販飼料	60,000	30,000	有
IV	ビタミンA・D強化X社市販飼料	60,000	30,000	無

【供試魚】

供試魚は2000年、(社)日本栽培漁業協会伯方島事業場で予備飼育されたものを用い、ヒラメの変態ステージF(22日齢, TL9.80±0.77mm)まで生物餌料のみで飼育された仔魚を試験に供した。なお、収容時のステージ組成はDステージ:13%, Eステージ:37%, Fステージ:50%であった。

【飼育方法】

飼育には黒色100ℓポリカーボネイト水槽8面(4区×2水槽)を用いた。なお、飼育方法、給餌回数、飼育密度、取り揚げおよび分析方法は2)に準じた。

【無眼側体色異常個体の分類方法】

TL20mmおよびTL40mmサイズでサンプリングした供試魚は10%海水ホルマリンで固定後、黒化個体の分類を行った。観察は肉眼とさらに明確ではない部分は実体顕微鏡下で行った。分類方法は1)で用いた方法に準じた。

【脊椎骨形態異常の観察方法】

脊椎骨形態異常はTL40mmサイズでサンプリングした個体を用い、軟X線写真を撮影して観察した。撮影条件および観察方法は1)で用いた方法に準じた。

【統計処理】

黒化出現状況および脊椎骨形態異常出現状況で得られた結果を統計学的検定により比較を行った。各試験区より得られた結果は平均値で示す事とし、検定は有意水準5%で母比率の差の検定を行った。

② 結果

【配合飼料の分析結果】

試験に用いた配合飼料の栄養分析結果を表IV-1-3)-2に示す。ビタミンAおよびビタミンDの強化量は各試験区とも想定量検出され、予定通りの強化を行うことが出来た。その他の栄養素についてはX社に比べY社のビタミンCが約10倍の違いが見られた他はほぼ同様な含有量であった。

【飼育結果】

飼育試験は、5/24~7/9までの49日間行った。本実験は前章の試験よりも遅い時期に開始したために水温の上昇が早く、成長も優れ飼育期間が短くなっている。飼育結果を表IV-1-3)-3に示す。各試験区とも順調に成長し、成長において大きな差は認められなかったが、生残率に関してはビタミンを強化した区でTL20mm取り揚げ時およびTL40mm取り揚げ時において市販飼料区に比べ

表IV-1-3)-2 配合飼料の栄養分析結果

項目	計量単位	飼料の種類と粒径		
		X社市販飼料	VA30,000-VD60,000X社市販飼料	Y社市販飼料
		400	400	360~500
ビタミンA	IU/100g	600	37,700	9,230
ビタミンC	mg/100g	150		1,410
ビタミンD	IU/100g	1,840	56,900	1,100
ビタミンE	mg/100g	99	56,900	1,100
水分	%	6.1		5.2
粗タンパク質	%	57.4		55.3
粗脂肪	%	19.0		15.4
粗灰分	%	8.4		11.8
脂肪酸含量				
20.5(EPA)	%	5.5		13.7
22.6(DHA)	%	8.5		12.3
Σn-3HUFA*	%	15.0		27.3

* Σn-3HUFA=20.4+20.5+22.5+22.6

表IV-1-3)-3 取り揚げ結果

試験区	収容時	収容時~TL20mm		TL20mm~TL40mm	
	TL(mm)	TL(mm)	生残率(%)	TL(mm)	生残率(%)
I	9.8 ± 0.77 ^{※1}	19.7 ± 2.80 ^{※2}	80.4 ^b	42.1 ± 2.49 ^{※2}	92.0 ^a
II	9.8 ± 0.77	19.2 ± 2.48	86.5 ^a	40.8 ± 2.21	93.0 ^a
III	9.8 ± 0.77	19.8 ± 4.06	57.7 ^d	41.1 ± 2.9	83.5 ^b
IV	9.8 ± 0.77	17.9 ± 2.87	69.5 ^c	40.6 ± 2.71	77.0 ^b

※1 N=50

※2 N=100

有意に低い結果が得られた。

飼育期間中の水温，溶存酸素，pH，および照度はそれぞれ17.3～22.1℃，5.5～7.3 mg/l，7.94～8.11，32.2～405.0 luxであり，各試験区間に差は認められなかった。

【無眼側体色異常出現状況】

TL20mmおよびTL40mmサイズにおける黒化の出現状況を表IV-1-3)-4，表IV-1-3)-5および図IV-1-3)-1，図IV-1-3)-2に示す。

TL20mmサイズの黒化出現状況は，面積別異常出現状況の正常率が47.0～56.3%であった。また，パターン別黒化出現状況では主にA±およびD1が異常の主で，異常の度合いも軽度の黒化個体のみであり，いずれの項目

も各試験区間で出現率に有意差は認められなかった (P<0.05)。

TL40mmサイズの黒化出現状況は，無強化区(試験区I，II)，ビタミン強化区(試験区III，IV)ともに敷砂の効果が認められ，面積別出現状況およびパターン別出現状況ともに有意差が認められる項目が多数出現した(P<0.05)。しかし，ビタミン強化の有無による黒化出現率の違いは(試験区IとIII，IIとIVの比較)，敷砂の有無に関わらずその出現率には差が認められなかった。

【脊椎骨異常出現状況】

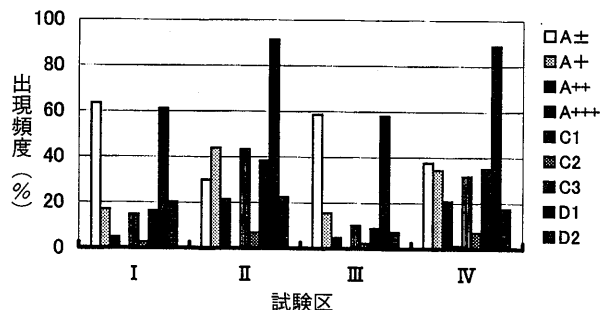
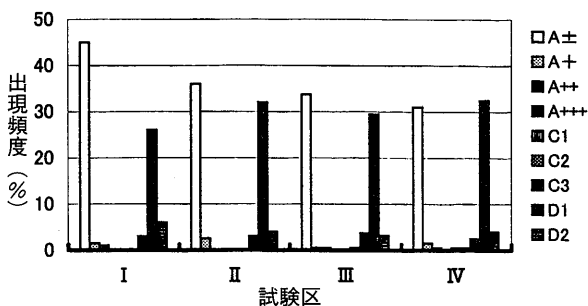
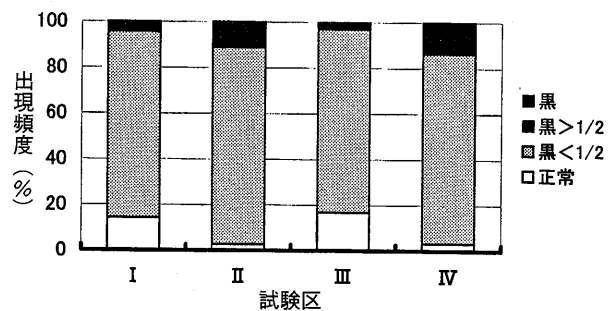
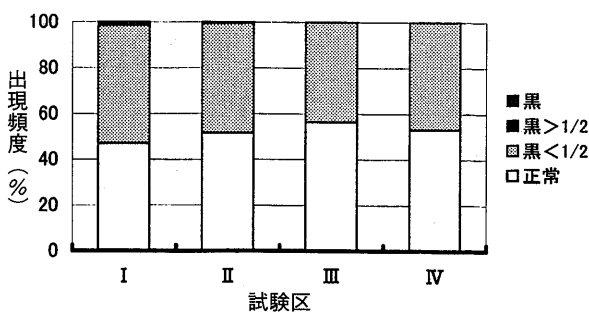
TL40mmサイズにおける脊椎骨異常出現状況および各脊椎骨番号における異常出現頻度を表IV-1-3)-6および図IV-1-3)-3に示す。出現率は41.7～56.5%で，異常

表IV-1-3)-4 TL20mmサイズにおける黒化出現状況

試験区	面積別黒化出現率(%)				パターン別黒化出現率(%)									
	W	B≤1/2	B>1/2	B	A				C			D		
					A±	A+	A++	A+++	C1	C2	C3	D1	D2	
I	47.0	51.5	1.5	0.0	45.0	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	26.0	6.0
II	51.5	48.0	0.5	0.0	36.0	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	32.0	4.0
III	56.3	43.7	0.0	0.0	33.7	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	3.7	29.5	3.2
IV	53.0	47.0	0.0	0.0	31.0	1.5	0.0	1.3	0.5	0.5	2.5	32.5	4.0	

表IV-1-3)-5 TL40mmサイズにおける黒化出現状況

試験区	面積別黒化出現率(%)				パターン別黒化出現率(%)									
	W	B≤1/2	B>1/2	B	A				C			D		
					A±	A+	A++	A+++	C1	C2	C3	D1	D2	
I	14.2 ^a	81.4	4.4 ^b	0.0	63.4 ^a	16.9 ^b	4.9 ^b	0.0	14.8	2.7	16.4	61.2 ^b	20.2	
II	2.7 ^b	86.1	11.2 ^a	0.0	29.9 ^b	43.9 ^a	21.4 ^a	0.0	43.3	7.0	38.5	91.4 ^a	22.5	
III	16.7 ^a	80.2	3.0 ^b	0.0	58.7 ^a	15.6 ^b	4.8 ^b	0.0	10.2	2.4	9.0	58.1 ^b	17.2	
IV	3.2 ^b	83.1	12.4 ^a	1.3	37.7 ^b	34.4 ^a	20.8 ^a	1.3	31.8	7.1	35.1	89.0 ^a	17.5	



図IV-1-3)-1 TL20mmサイズにおける面積別(上)およびパターン別(下)黒化出現状況

図IV-1-3)-2 TL40mmサイズにおける面積別(上)およびパターン別(下)黒化出現状況

症状別に見ると腹椎の屈曲が主であった。また、無強化区に比べ、ビタミン強化区の異常出現率が高い傾向が見られ、特に今回の主な異常である腹椎の屈曲では有意差が認められた ($P < 0.05$)。

【有眼側体色異常個体出現状況】

TL20mmサイズにおける白化率を表IV-1-3)-7に示す。出現率は1.5~5.0%と低かった。

③ 考察

ヒラメ変態完了以降の飼育において、水槽底面に砂を敷くことにより着底期型の黒化発現が抑えられることが数多く報告されているが、今回の実験結果においてもTL40mmサイズにおいてI区とII区およびIII区とIV区の比較から面積別、パターン別黒化出現状況において多くの項目でその出現率に有意差が認められ、その効果を確認することが出来た。

しかしながら、I区とIII区およびII区とIV区の比較、つまり飼料中のビタミンA、ビタミンDの過剰な含有量が黒化発現に影響をおよぼし、さらにその影響がTL20mm以降の敷砂によって抑制されているか否かの比較においては、ビタミン無強化飼料と強化飼料の間には敷砂の有無に関わらず黒化出現率には差が認められず、黒化発現における敷砂とビタミン過剰投与の関連性は見出すことは出来なかった。

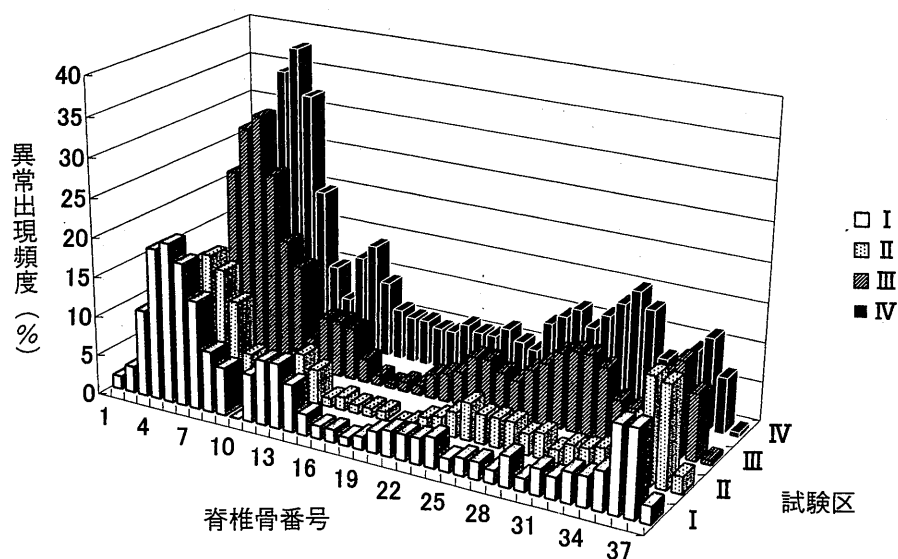
脊椎骨形態異常についてはビタミン無強化区に比べ、強化した区の異常出現率が高くなる傾向にあった。今回の実験では主な症状が腹椎の屈曲であり、形態異常の症状としては最も重度のものである。飼育開始ステージ、飼育条件などは2)と同様の方法で行ったにもかかわらずこのような結果になったのは、飼育開始時における供試魚のステージ組成が影響している事が考えられる。今回の試験開始時におけるヒラメ変態ステージ組成は、Dステージ：13%、Eステージ：37%、Fステージ：50%であり、2)のステージ組成(D：E：F = 7%：26%：70%)に比べステージ組成がばらついていた。ヒラメGステージにビタミンAの代謝活性物質であるレチノイン酸をヒラメに投与することにより形態異常が発症することが報告されており、Gステージは硬骨化が起こるステージで、硬骨化は頭部から尾部に向けて順次行われていく。そのため、供試魚が配合飼料に餌付く時期にD~Eステージの魚が形態異常発症の要因に敏感なF~Gステージとなり、高濃度に強化されたビタミンAが、硬骨化が始まっている腹椎に作用し、重度の形態異常を引き起こしてしまったことが考えられる。形態異常、特に屈曲を起こすと正常な摂餌行動がとれなくなるため、TL20mmの取り揚げ時およびTL40mmの試験終了時における生残率の違いが現れたこともこの形態異常がその主

表IV-1-3)-6 TL40mmサイズにおける脊椎骨異常出現状況

試験区	脊椎骨異常出現率 (%)	異常発生率 (%)			
		腹椎		尾椎	
		癒合	屈曲	癒合	屈曲
I	44.3	13.7	21.9 ^b	21.3	11.5
II	41.7	12.8	16.6 ^b	24.6	9.6
III	54.5	9.6	34.7 ^a	32.3	16.8
IV	56.5	4.5	39.0 ^a	30.5	19.5

表IV-1-3)-7 TL20mmサイズにおける白化出現状況

試験区	飼料種	異常出現率 (%)
I	X社市販飼料	3.0 ^{ab}
II	X社市販飼料	1.5 ^b
III	ビタミンA・D強化X社市販飼料	3.0 ^{ab}
IV	ビタミンA・D強化X社市販飼料	5.0 ^a



図IV-1-3)-3 各脊椎骨番号における異常出現状況

要因ではないかと考えられた。

2) においてビタミン無強化飼料とビタミンAおよびビタミンDを強化した飼料との間で黒化出現率に差が認められたが、ここでは2)と同様の設定で試験を行ったにも関わらず、黒化出現率に差は認められなかった。このように結果の再現性に乏しいことから、ビタミンAおよびビタミンDは黒化発現の主要因ではないことが推察される。本試験においても形態異常の発生状況から考えると、ビタミンA過剰投与の影響が現れていることからビタミンAは作用しているが、黒化には関与していないことが示唆された。一方、ビタミンDに関してはヒラメ体内で正常に利用されている様子は認められない。これまでにビタミンDの作用が顕著に表れなかった要因として体内でのビタミンDの代謝が正常に行われていないために、取り込まれたビタミンDが利用されていない可能性がある。そこで、実際に生理作用を現すビタミンD活性体が黒化発現に対してどのような影響があるかを調査する必要があると思われる。

4) 飼育方法の違いと無眼側体色異常との関係

福田 庄作・竹内 俊郎

ヒラメの人工種苗に発現する白化・黒化・体形異常などの発現原因は、これまでの多くの研究結果により明らかにされつつある。これまでに判明した異常発現の原因を踏まえ、異常が発現しやすい飼育、発現しにくい飼育を設定し、飼育方法によってどのように異常発現に違い

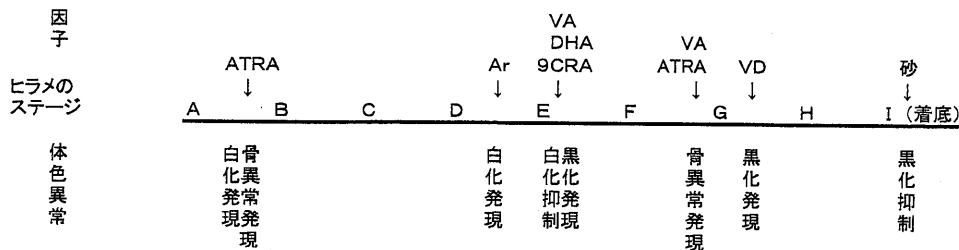
が出るのかについて確認した。

今回の試験では白化防除や脊椎骨異常に影響をおよぼすとされるアルテミア中のビタミンAの濃度（適正量1,000 IU/l, 過剰量10,000 IU/l）、黒化発現に影響をおよぼすとされるヒラメG～HステージのビタミンD濃度、配合飼料の給餌開始時期、黒化防除に効果があるとされる水槽内の砂敷きの有無に着目し、試験を行った。

① 材料と方法

【試験区の設定】

試験区はTL20mmまでは3区を2反復で設け、TL20mm以降は試験区を区ごとにさらに2区（砂敷き区、砂なし区）に分けたことから、1区につき4面、計12面を用いた。これまでに判明しているヒラメ各ステージにおける異常発現・抑制因子を図IV-1-4)-1に示す。I区を異常が発現しにくい飼育方法を用いた区、II区を異常が発現しやすい飼育方法を用いた区、III区を通常飼育区とした。また、試験区のステージ別の飼育条件、水槽環境を表IV-1-4)-1, 表IV-1-4)-2に示す。I区ではビタミンAを培養水1 l 当たり1,000 IU/l で強化したアルテミアをE～Fステージの仔魚に、II区では10,000 IU/l で強化したアルテミアをF～Gの仔魚に給餌した。I・II区のその他のステージとIII区ではビタミンAを強化していないアルテミアを給餌した。配合飼料は、I区はIステージ（TL13mm以降）、II・III区はG～Hステージ（TL11mm）で給餌を開始し、II区については配合飼料



図IV-1-4)-1 ヒラメ各ステージにおける形態異常発現・抑制因子

ATRA：オールトランスレチノイン酸，9cisRA：9-シス-レチノイン酸，T₄：チロキシン，Ar：ブラジル産アルテミア，VA：ビタミンA，DHA：ドコサヘキサエン酸，PL：リン脂質，VD：ビタミンD，砂：海砂やミクロスセラミック

表IV-1-4)-1 試験区の設定（TL20mmまで）

ステージ	試験区	
	I-I	I-II
A～B	通常飼育 ↓ ビタミンA強化アルテミア給餌	通常飼育 ↓ ビタミン無強化アルテミア給餌
B～C		
C～D		
D～E		
E～F	通常飼育	通常飼育
F～G	通常飼育	通常飼育
G～H	通常飼育	通常飼育
H～I	通常飼育	通常飼育

※アルテミアへのビタミンA強化量はI区のE～Fステージは適正添加量である0.1万IU/l(適正限度量0.2万IU以下)、II区のF～Gステージは異常出現量である1万IU/l(過剰量0.4万IU以上)とする。
 ※ビタミン無強化とは、リン脂質入りDHA乳化オイルをそのままアルテミアに強化し仔稚魚に与える。
 ※II区の配合飼料へのビタミンD強化量は黒化発現量とされる2万IU/100gとする。
 ※通常飼育とは種苗生産現場で行われている飼育方法を採用する。強化剤(DHAce)から配合飼料(おとひめ)まで同じものを使用する。

中にビタミンDを20,000 IU/100 gの濃度で強化したものを給餌した。砂敷き区の砂は、ヒラメが着底後、(株)NORA製マイクロセラミック(MS-0:粒径0.1~0.5mm)を底面に2~3cmになるように敷き、TL40mmまで飼育した。

試験の際、生物餌料を強化する強化剤はI・II区は太陽油脂(株)製の30%イカリン脂質オイルにビタミンAの濃度を調節して使用し、III区はオリエンタル酵母工業(株)製のDH Aceを使用した。配合飼料はI・III区はY社製の配合飼料を使用し、II区にはY社製の配合飼料にビタミンDを強化したものをG~Hステージの仔魚に使用し、以後はI・III区と同様にビタミンD無強化のものを使用した。

【供試魚】

供試魚は2001年、日本栽培漁業協会伯方島の種苗生産用産水水槽(RC角型50m³通常飼育)でDステージまで生物餌料のみで飼育された仔魚(日齢15, TL7.51±0.46mm, ステージ割合Cステージ12%, Dステージ88%)を用い、収容密度は10,000/m³とし、TL20mm以降は1,200尾/m³とした。

【飼育方法】

実施した飼育方法を表IV-1-4)-3に示す。飼育にはTL20mmまでは100Lポリカーボネイト水槽1区につき2面、計6面を、TL20mm以降は試験区ごとにさらに2区

(砂敷き区, 砂なし区)に分け、1区につき4面、計12面を用いた。水槽は屋内に設置し、周りを寒冷沙で覆い直接光が入らないようにした。飼育水にはろ過海水を用い、飼育水温は17~18℃に調温した。また、通気はエアストーン1個を垂下して行った。毎朝7時半に水温、pH、溶存酸素(DO)を測定するとともに、照度は定期的に測定した。試験開始時は供試魚が完全にアルテミアに餌付いていないため、開始から5日間はクロレラ工業(株)製のスーパー生クロレラV12で強化したシオミズツボワムシを併せて給餌した。アルテミアは試験開始2日目の日齢16から日齢36までの20日間給餌し、給餌量は供試魚の体長や摂餌状況を見て適宜決定した。アルテミア給餌開始から配合飼料給餌開始までは、供試魚のステージ組成により給餌するアルテミアの種類が異なるため、ステージ組成判定のためのサンプリングを各区1水槽につき50尾取り揚げ、判定を行った。ステージの決定は一番割合の大きいものをそのステージとした。サンプリングは計5回(1水槽当り計250尾)行った。配合飼料は供試魚の変態進行状況によりII区は日齢25、III区は日齢30、I区は日齢32から給餌を開始し、TL20mmまでは一日6回、TL20mm以降は一日4回給餌した。給餌開始から5日間はアルテミアを併せて給餌した。供試魚の平均全長がTL20mmとなった時点で、一旦全数を取り揚げ、平均TL、生残率の測定および、黒化判定用のサンプリ

表IV-1-4)-2 試験区の設定 (TL20mm以降)

ステージ	試験区											
	I-I		I-II		II-I		II-II		III-I		III-II	
1~	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
	砂敷きなし	砂敷きあり	砂敷きなし	砂敷きあり	砂敷きなし	砂敷きあり	砂敷きなし	砂敷きあり	砂敷きなし	砂敷きあり	砂敷きなし	砂敷きあり

表IV-1-4)-3 実施した飼育方法 (TL20mmまで)

日齢	ステージ	試験区			
		I-I	I-II	II-I	II-II
		通常飼育		通常飼育	
15	D	仔魚収容		仔魚収容	
16					
17					
18	E	ビタミンA強化アルテミア給餌開始		ビタミン無強化アルテミア給餌開始	
19					
20	F	ビタミン無強化アルテミア給餌		ビタミンA強化アルテミア給餌開始	E~F
21					
22					
23					
24	G			ビタミンD強化配合飼料給餌開始	G
25					
26	H			通常飼育	H
27					
28					
29					
30					配合飼料給餌開始
31	H~I				H
32		配合飼料給餌			
33					
34					
35					
36					
37					
38					
39		取り揚げ			
40					
41					
42					
43				取り揚げ	取り揚げ

ングを行い、選別後、各水槽に120尾ずつ再収容し、TL40mmまで飼育し試験終了とした。サンプリングはTL20mmでは目視でTL20mm以上である個体を100尾選別し、TL40mmサイズでは生き残った全数を10%海水ホルマリンで固定し、後日、黒化出現状況を調査した。またTL20mmサイズにおいては白化出現率 (n=100) を、TL40mmサイズにおいてはSoftexによる脊椎骨形態異常の出現状況 (n=100) を併せて行った。

試験に使用したアルテミアは水分、脂肪酸、ビタミンAについて分析した。また、配合飼料は(財)日本食品分析センターに依頼し、一般組成、ビタミンA、C、D、E、脂肪酸について分析した。

【無眼側体色異常個体の分類方法】

TL20mmサイズでは目視でTL20mm以上である個体を100尾、TL40mmサイズでは無作為に100尾サンプリングし、黒化出現状況を調査した。分類は肉眼で行った。各区の出現率は2水槽の平均値で表した。

分類方法は1) で用いた方法に準じた

【脊椎骨形態異常の観察方法】

脊椎骨異常はTL40mmサイズで取り上げ、10%海水

ホルマリンで固定した個体の軟X線写真を撮影し、形態異常の出現率を調査した。軟X線写真の撮影にはSoftex社製の軟X線検査装置CMB-2型を用い、mA=1.2、X線照射時間=30秒の設定で行った。調査は癒合、屈曲に分けて行った。各区の出現率は2水槽の平均値で表した。

【統計処理】

黒化出現状況および脊椎骨形態異常出現状況で得られた結果を統計学的検定により比較を行った。各試験区より得られた結果は平均値で示す事とし、検定は有意水準5%で母比率の差の検定を行った。

② 結果

【飼育結果】

飼育試験は、4/25~6/17までの54日間行った。各サイズでの取り揚げ結果を表IV-1-4)-4、表IV-1-4)-5に示す。各試験区間で成長、生残率に大きな差は認められなかった (p>0.05)。しかし、Ⅲ-1区についてはTL20mmで取り揚げた個体については、黒化判定用のサンプルが不足してしまった為、Ⅲ区のTL20mmにおける黒化出現状況のデータは、Ⅲ-2区の100尾のデータとした。試験期間中の水温、DO、pHはそれぞれ16.7~19.4℃、

表IV-1-4)-4 TL20mmにおける取り揚げ結果

試験区	収容時 ^{※1}		取り揚げ時 ^{※2}		TL20mm以降の試験に用いた供試魚 ^{※1}	
	TL(mm)	TL(mm)	TL(mm)	生残率(%)	TL(mm)	TL(mm)
I-I	7.5 ± 0.46	18.4 ± 2.17	18.4 ± 2.17	85.4	18.5 ± 1.63	18.5 ± 1.63
I-II	7.5 ± 0.46	18.9 ± 2.28	18.9 ± 2.28	90.2	18.6 ± 1.65	18.6 ± 1.65
II-I	7.5 ± 0.46	17.9 ± 1.68	17.9 ± 1.68	79.8	18.0 ± 1.22	18.0 ± 1.22
II-II	7.5 ± 0.46	18.0 ± 1.51	18.0 ± 1.51	82.6	18.2 ± 1.44	18.2 ± 1.44
III-I	7.5 ± 0.46	18.3 ± 2.11	18.3 ± 2.11	72.3	—	—
III-II	7.5 ± 0.46	18.4 ± 2.29	18.4 ± 2.29	86.4	18.5 ± 2.03	18.5 ± 2.03

※1 N=100

※2 N=50

表IV-1-4)-5 TL40mmにおける取り揚げ結果

試験区	TL(mm) ^{※1}	生残率(%)
I-I-a	38.3 ± 3.31	91.7
I-II-a	38.6 ± 3.85	89.2
II-I-a	36.9 ± 3.60	90.0
II-II-a	37.1 ± 3.44	91.7
III-I-a	38.1 ± 3.97	90.8
III-II-a	37.7 ± 3.96	90.0
I-I-b	37.8 ± 3.78	90.8
I-II-b	38.0 ± 3.60	90.0
II-I-b	37.4 ± 3.73	88.3
II-II-b	36.8 ± 4.15	85.8
III-I-b	38.1 ± 3.79	89.2
III-II-b	38.3 ± 4.04	87.5

※1 N=100

表IV-1-4)-6 試配合飼料の栄養分析結果

項目	計量単位	飼料の種類と粒径					
		Y社市販飼料				Y社市販飼料飼料 (VD2万IU/100g強化)	
		~300 μ	360~500 μ	500~840 μ	1,000 μ	~300 μ	360~500 μ
レチノール	mg/100g	3.52	3.42	3.44	3.14		
ビタミンA効力(レチノールより換算)	IU/100g	11,700	11,400	11,500	10,500		
総アスコルビン酸(ビタミンC)	%		1.15				
ビタミンD	IU/100g	1,290	890	1,190	940	21,800	21,600
総トコフェロール(ビタミンE)	mg/100g		152				
水分	%		8.0				
粗タンパク質	%		52.2				
粗脂肪	%		13.6				
粗灰分	%		12.9				
脂肪酸含量							
20:5(EPA)	%		15.0				
22:6(DHA)	%		15.7				
Σn-3HUFA ^{※1}	%		32.0				

※1 Σn-3HUFA=20:4+20:5+22:5+22:6

6.4~8.6 mg/l, 7.97~8.27, また照度は9.0~24.0 lux の間で推移し, どの項目も急激な変化は見られず, 各水槽間で差はなかった。

【配合飼料の分析結果】

試験に用いた配合飼料の分析結果を表IV-1-4)-6)に示す。ビタミンDを強化した区の配合飼料のビタミンDは設定量検出され, 予定通りの強化を行うことが出来た。その他の栄養素についてはほぼ同様な含有量であった。

【アルテミアの分析結果】

試験に用いたアルテミアの分析結果を表IV-1-4)-7)に示す。脂肪酸についてはどの強化区のアルテミアも差はなかった。ビタミンAについてはビタミンAを培養水に1,000 IU/l の濃度で強化した区は乾燥重量当り153.7 IU/g, 10,000 IU/l 強化した区は2380.5 IU/g 検出され, アルテミア中にビタミンAが取り込まれていること

が確認された。

【無眼側体色異常出現状況】

TL20mmおよびTL40mmにおける黒化の出現状況を表IV-1-4)-8, 表IV-1-4)-9および図IV-1-4)-2, 図IV-1-4)-3に示す。

TL20mmサイズの黒化出現状況はI区が他の区に比べ正常率が高かった。II区とIII区では黒化出現率に違いはなかったが, 面積別出現率では黒>1/2においてII区が有意に高かった。

TL40mmサイズの黒化出現状況は全体的にII-a, II-b区の黒化出現率が高く, 特にパターン別出現率のA+, C1, C2, C3, D1, D2において他の区より有意に高く出現した (P<0.05)。I-a, I-b区と区III-a, III-b区間では黒化出現率には差は見られなかったが, パターン別出現率のA+, C3においてIII-a, III-b区がI-a,

表IV-1-4)-7 アルテミアの栄養分析結果

項目	単位	サンプルの種類			
		1	2	3	4
レチノール(乾燥重量当たり)	μg/g	nd ^{※2}	721.4	46.6	nd
ビタミンA効力(レチノールより換算)	IU/g	nd	2380.5	153.7	nd
水分	%	88.9	88.0	88.6	88.9
粗脂肪含有量	%	2.4	2.6	2.2	2.2
粗脂肪含有量(乾燥重量当たり)	%	21.8	22.1	19.5	19.8
脂肪酸含有量					
20:5n-3(EPA)	%	7.4	6.7	7.4	10.5
22:6n-3(DHA)	%	3.5	3.7	3.3	3.1
Σn-3HUFA ^{※1}	%	11.5	10.9	11.3	14.6

※1 Σn-3HUFA=20:4+20:5+22:5+22:6

※2 ndは検出限界値以下

1:30%イカリン脂質オイルで強化したAr

2:30%イカリン脂質オイルとVAを10,000 IU/l で強化した Ar

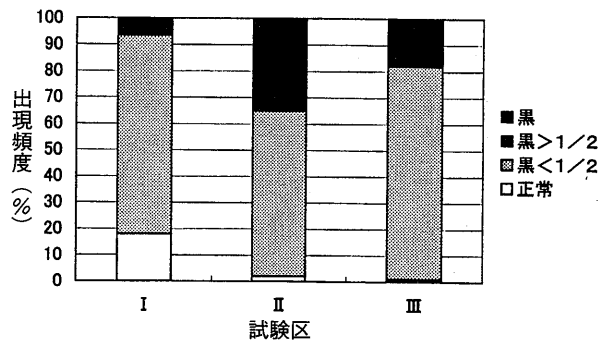
3:30%イカリン脂質オイルとVAを1,000 IU/l で強化した Ar

4:DHAceで強化したAr

表IV-1-4)-8 TL20mmサイズにおける体色異常出現状況

試験区	体色異常出現率 (%)				
	黒化面積別出現率				白化出現率 (%)
	正常	黒<1/2	黒>1/2	黒	
I	18.0	75.5 ^a	6.5 ^a	0.0	14.3
II	2.0	63.0 ^a	35.0 ^a	0.0	14.5
III	1.0	81.0 ^a	18.0 ^b	0.0	15.0

N=100



図IV-1-4)-2 TL20mmにおける面積別黒化出現状況

表IV-1-4)-9 TL40mmサイズにおける黒化出現状況

試験区	面積別出現率 (%)				パターン別出現率 (%)											
	正常	黒<1/2		黒	A(体幹部)				C			D(尾柄部)			A	A+C
		黒<1/2	黒>1/2		±	+	++	+++	1(頭部)	2(胸鳍)	3(腹部)	1(巻き返し)	2(中央)			
I-a	6.5	90.0 ^b	3.5	0.0	27.0	63.0 ^a	3.5	0.0	30.5 ^a	5.0 ^a	34.5 ^a	66.0 ^b	4.0 ^a	53.5 ^b	40.0 ^a	
I-b	11.5	88.0 ^b	0.5	0.0	31.0	63.0 ^a	0.5	0.0	22.0 ^a	5.0 ^a	33.0 ^a	38.0 ^a	2.0 ^a	53.0 ^b	35.5 ^a	
II-a	0.0	65.5 ^a	28.5	6.0	7.0	58.5 ^a	28.5	6.0	56.0 ^a	43.0 ^b	90.0 ^c	91.5 ^c	43.0 ^b	7.5 ^a	92.5 ^c	
II-b	0.0	61.0 ^a	32.0	7.0	3.5	57.5 ^a	32.0	7.0	62.0 ^a	53.0 ^b	92.0 ^c	89.0 ^c	60.0 ^b	5.0 ^a	95.0 ^c	
III-a	0.5	91.5 ^b	8.0	0.0	12.0	79.5 ^b	8.0	0.0	38.0 ^a	13.5 ^a	67.5 ^b	74.0 ^b	5.5 ^a	27.5 ^b	72.0 ^b	
III-b	1.0	92.0 ^b	7.0	0.0	13.5	77.5 ^b	7.0	0.0	22.0 ^a	12.5 ^a	65.0 ^b	61.0 ^b	5.5 ^a	33.5 ^{ab}	65.5 ^b	

N=100

I-b区に対し有意に高く出現していた (P<0.05)。また、今回 TL20mm以降の砂敷きの有無による黒化出現率に大きな差は認められなかった。

【有眼側体色異常個体出現状況】

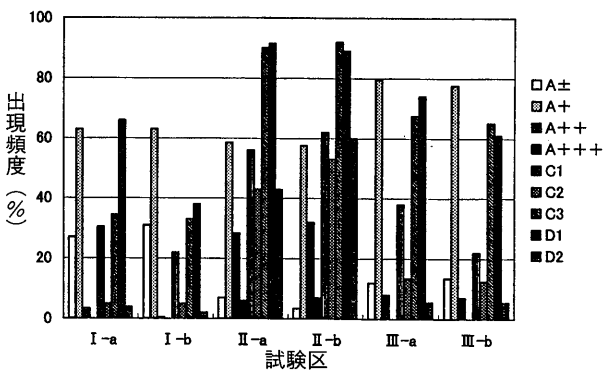
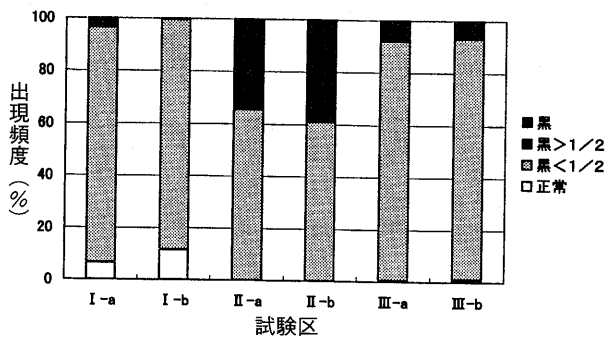
TL20mmサイズにおける白化率を表IV-1-4)-8)に示す。出現率は13.9~15.2%で、各試験区間で差はなかった。

【脊椎骨異常出現状況】

TL40mmサイズにおける脊椎骨異常出現状況を表IV-1-4)-10)に、各脊椎骨番号における異常出現状況を図IV-1-4)-4)に示す。F~Gステージに10,000 IU/ℓ ビタミンAで強化したアルテミアを与えたII-a、II-bが極めて高い異常出現率を示した。また、全区で25~40%程度、下顎に何らかの異常を持つ個体が出現したが、ビタミンAの影響ではなく、先天的なものと推測され、今回の試験には影響がないとして、それらのデータは表記しなかった。

③ 考察

今回の試験では TL20mm、TL40mm両サイズにおいて、



図IV-1-4)-3 TL40mmサイズにおける面積別(上)およびパターン別(下)黒化出現状況

表IV-1-4)-10 脊椎骨異常出現状況

試験区	脊椎骨異常出現率 (%)	異常発生率 (%)			
		腹椎		尾椎	
		癒合	屈曲	癒合	屈曲
I-a	1.5	0.0	0.0	1.5	0.0
I-b	1.5	0.5	0.0	1.0	0.0
II-a	95.5	79.0	6.5	82.0	3.0
II-b	98.5	74.5	7.0	83.0	2.0
III-a	1.5	0.5	0.0	1.0	0.0
III-b	1.5	0.0	0.0	1.5	0.0

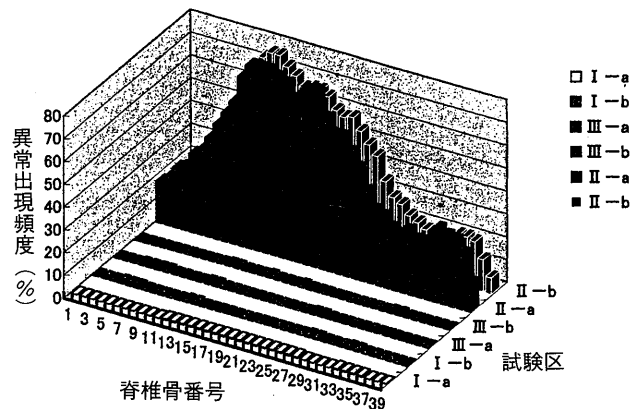
N=100

II区の黒化の面積別出現率が高い傾向が見られた。また全区で、TL20mmサイズとTL40mm両サイズ間において黒化出現率に大きな差は見られなかったことから、黒化発現の要因は浮遊期で発生していることが示唆された。黒化出現率の高かったII区では着底以前にF~GステージにビタミンAを10,000 IU/ℓで強化したアルテミアを与え、配合飼料給餌時期を早め、さらに、配合飼料に高濃度のビタミンDを強化した。すなわち、このような因子が異常発現を促進させたと推測されるが、それが今回の黒化発現に対して単一で影響をおよぼしたのか、また複数の相互作用が影響をおよぼしたのかは特定できなかった。しかし、これまでの数年間に至るビタミンAおよびビタミンD強化実験の結果とも考え合わせ、F~GステージにおけるビタミンA強化とその後のビタミンD強化により黒化が強く発現する可能性が示唆された。また、他の区も黒化の面積別出現率は低いながらも黒化は発現していることから、黒化発現にはII区に用いた因子以外にも黒化発現原因が存在する可能性が高い。

脊椎骨異常については、II区の異常出現率が極めて高く、これまでの研究結果と同様に、F~GステージにビタミンAを10,000 IU/ℓで強化したアルテミアを与えることによって、脊椎骨異常が高率で発生することが確認できた。また、脊椎骨異常の程度が重い個体の黒化面積別出現率が高くなる傾向が見られた。

白化出現については全区で出現率に差はなかった。白化防除にはビタミンAやDHAが有効とされているが、今回の試験では各試験区間でビタミンAの含有量に差はあったものの白化出現に違いがなかったことから、今回の白化発現には栄養的な要因以外に環境的な要因が発現原因であると考えられたが、主要因を特定することはできなかった。

また、今回の試験では TL20mmサイズ以降の飼育において水槽内の砂敷きの有無における仔魚の黒化発現には大きな差は見られなかった。その原因として、I、III区においては黒化面積別出現率が軽度だったこと、また、



図IV-1-4)-4 各脊椎番号における異常出現状況

Ⅱ区においては脊椎骨異常など重度の異常が重なり、砂敷きの効果が現れなかったことなどが考えられる。水槽内の砂は着底期以降に出現する着底期型黒化の発現を大きく抑制する効果が多く報告されていることから、今回の試験では着底期型黒化はある程度抑えられたと考えられる。そのため、黒化出現を抑制するためには、浮遊期における黒化発現をいかに抑えるかが重要であると考えられる。一方、F～GステージにビタミンA強化アルテミアを給餌した後、ビタミンDを与えることにより黒化が顕著に見られたことからビタミンAとビタミンDの連鎖も想起された。従って、今回の飼育方法を踏まえ、飼料中の脂溶性ビタミンがどのステージで黒化発現に影響をおよぼすのか調べる必要がある。

5) 無眼側体色異常におよぼす脂溶性ビタミン類と給餌時期の影響

福田 庄作・竹内 俊郎

4) において、F～Gステージのヒラメ仔魚に培養水当りビタミンAを10,000 IU/ℓで強化したアルテミアを給餌し、連続してG～Hステージの仔魚にビタミンDを20,000 IU/100gで強化した配合飼料を給餌したところ、ビタミンA・Dを強化しなかった区に比べ体形異常出現率と黒化出現率が共に高い確率で出現するという結果が得られた。このうち体形異常に関しては、F～Gステージのヒラメ仔魚に過剰量のビタミンAを与えることで、高率で体形異常を起こすという今までに報告されている結果を裏付けるものとなった。ビタミンDについては、2) の試験において、ビタミンDを配合飼料に強化することにより黒化出現率が高くなる結果が得られ、ビタミンDが黒化出現の原因の一つであると示唆された。またビタミンAとの相互作用により、黒化出現が促進されることが示唆された。しかしながら、3) の試験では同じ試験設定にもかかわらず、同じ結果は再現されなかった。このことから、過剰量のビタミンA・Dはヒラメ仔魚の体色異常出現の原因と考えられるが、これらのビタミンはヒラメ仔魚の成長過程において、影響が現れる時期と現れない時期があると考えられる。このことから、ビタミンAについては効果が最も作用すると推測されるF～Gステージを基本に、ビタミンDの投与時期を変えることにより、ビタミンA・Dの相互作用による体色異

常出現の違いを確認することとした。

① 材料と方法

【試験区の設定】

飼育にはポリカーボネイト水槽を10面（5区×2面）を用いた。ステージ別の飼育条件を表Ⅳ-1-5)-1に示す。Ⅱ・Ⅳ・Ⅴ区ではビタミンAを培養水1L当り10,000 IUで強化したアルテミアをE～Fステージの仔魚に、Ⅲ区ではビタミンAを10,000 IU/ℓ、ビタミンDを20,000 IU/ℓで強化したアルテミアをF～Gの仔魚に給餌した。Ⅰ区とⅡ・Ⅲ・Ⅳ・Ⅴのその他のステージではビタミンAを強化していないアルテミアを給餌した。配合飼料はⅠ区はⅠステージ、Ⅱ・Ⅲ・Ⅳ・Ⅴ区はG～Hステージで給餌を開始した。Ⅳ区については配合飼料中にビタミンDを20,000/100gの濃度で強化したものをG～Hステージの仔魚に、Ⅴ区については同様のものをH～Iステージの仔魚に給餌した。

試験の際、生物餌料を強化する強化剤は太陽油脂（株）製の30%イカリン脂質オイルを使用し、ビタミンを強化する区に関しては、ビタミンAおよびビタミンDをオイルに直接添加した。配合飼料はY社製を使用し、Ⅳ・Ⅴ区にはY社製の配合飼料にビタミンDを強化したものを使用し、以後はⅠ・Ⅱ・Ⅲ区と同様にビタミンD無強化のものを使用した。

【供試魚】

供試魚は2002年、日本栽協漁業協会伯方島の種苗生産用産水槽（RC角型20㎡通常飼育）でDステージまで生物餌料のみで飼育された仔魚（日齢14, TL6.13±0.39mm, ステージ割合Bステージ3%, Cステージ26%, Dステージ71%）を用い、収容密度は8,000/㎡とし、TL20mm以降は1,200尾/㎡とした。

【飼育方法】

実施した飼育方法を表Ⅳ-1-5)-2に示す。飼育にはTL20mmまでは100ℓポリカーボネイト水槽1区2面を、計10面を用いた。水槽は屋内に設置し、周りを寒冷沙で覆い直接光が入らないようにした。飼育水にはろ過海水を用い、飼育水温は17～18℃に調温した。また、通気はエアストーン1個を垂下して行った。毎朝7時半に水温、pH、溶存酸素（DO）を測定するとともに、照度は定期的に測定した。収容後2日間は2回追加収容し、3

表Ⅳ-1-5)-1 試験区の設定条件

ステージ	Ⅰ	Ⅱ	試験区 Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ
A～B	通常飼育	通常飼育	通常飼育	通常飼育	通常飼育
B～C					
C～D					
D～E					
E～F					
F～G		ビタミンA強化アルテミア給餌	ビタミンA・D強化アルテミア給餌	ビタミンA強化アルテミア給餌	ビタミンA強化アルテミア給餌
G～H		通常飼育	通常飼育	ビタミンDを強化した配合飼料給餌	通常飼育
H～I				通常飼育	ビタミンDを強化した配合飼料給餌

※アルテミアへのビタミンA強化量は異常出現量である10,000 IU/ℓ（過剰量4.0万IU以上）とし、ビタミンD強化量は20,000 IU/ℓとする。

※配合飼料へのビタミンD強化量は黒化発現量とされる20,000 IU/100gとする。

※通常飼育とは種苗生産現場で行われている飼育方法を採用する。強化剤に関しては全区で統一する為にリン脂質入りDHA乳化したオイル（ビタミン無強化）を使用する。

表IV-1-5)-2 実施した飼育方法 (TL20mmまで)

日齢	ステージ	通常飼育	ステージ II 通常飼育	試験区 III 通常飼育	ステージ IV 通常飼育	ステージ V 通常飼育
17	ステージ判別(1回目)	D~E	D~E	D~E	D~E	D~E
18		仔魚収容	仔魚収容	仔魚収容	仔魚収容	仔魚収容
19						
20			ビタミン無強化アルテミア給餌開始	ビタミン無強化アルテミア給餌開始	ビタミン無強化アルテミア給餌開始	ビタミン無強化アルテミア給餌開始
21						
22						
23	ステージ判別(2回目)	F	F	F	F	F
24			ビタミンA強化アルテミア給餌開始(1万IU/L)	ビタミンA・D強化アルテミア給餌開始(1万IU/L)	ビタミンA強化アルテミア給餌開始(1万IU/L)	ビタミンA強化アルテミア給餌開始(1万IU/L)
25						
26						
27	ステージ判別(3回目)	F~G	F~G	F~G	F~G	F~G
28		配合飼料給餌開始	通常飼育 配合飼料給餌開始	通常飼育 配合飼料給餌開始	ビタミンD強化配合飼料給餌開始	通常飼育 配合飼料給餌開始
29						
30						
31	ステージ判別(4回目)	G	G	G	G	G
32					通常飼育	ビタミンD強化配合飼料給餌開始
33						
34						
35						
36						
37	ステージ判別(5回目)	H~I	H~I	H~I	H~I	H~I
38						通常飼育
39						
40						
41						
42						
43						
44						
45						
46						
47						
48						
49						
50						
51						
52						

日後の日齢17から試験開始とした。試験開始時は供試魚が完全にアルテミアに餌付いていないため、開始から3日間はクロレラ工業(株)製のスーパー生クロレラV12で強化したシオミズツボムシを併せて給餌した。アルテミアは試験開始の日齢17から日齢31までの16日間給餌し、給餌量は供試魚の体長や摂餌状況を見て適宜決定した。アルテミア給餌開始から配合飼料給餌開始までは、供試魚のステージ組成により給餌するアルテミアの種類が異なるため、ステージ組成判定の為のサンプリングを各区1水槽につき50尾取り揚げ、判定を行った。ステージの決定は一番割合の大きいものをそのステージとした。サンプリングは計5回(1水槽当り計250尾)行った。日齢28から給餌を開始し、TL20mmまでは一日6回、TL20mm以降は一日4回給餌した。給餌開始から4日間はアルテミアを併せて給餌した。供試魚の平均全長がTL20mmとなった時点で、一旦全数を取り揚げ、平均TL、生残率の測定および、黒化判定用のサンプリングを行い、選別後、各水槽に120尾ずつ再収容し、TL40mmまで飼育し試験終了とした。サンプリングはTL20mmでは目視でTL20mm以上である個体を100尾選別し、TL40mmサイズでは生き残った全数を10%海水ホルマリンで固定し、後日黒化出現状況を調査した。また、白化出現率はTL20mmの取り揚げ全数から調査した。TL40mmサイズにおいてはSoftexによる脊椎骨形態異常の出現状況(n=100)を併せて行った。

試験に使用したアルテミアは水分、脂肪酸、ビタミンA、ビタミンDについて分析した。また、配合飼料は(財)日本食品分析センターに依頼し、一般組成、ビタミンA、C、D、E、脂肪酸について分析した。

【無眼側体色異常個体の分類方法】

TL20mmサイズでは目視でTL20mm以上である個体を100尾、TL40mmサイズでは無作為に100尾サンプリング

し、黒化出現状況を調査した。分類は肉眼で行った。分類方法は1)で用いた方法に準じた。

【脊椎骨形態異常の観察方法】

脊椎骨異常はTL40mmサイズで取り上げ、10%海水ホルマリンで固定した個体のX線写真を撮影し、形態異常の出現率を調査した。撮影条件および観察方法は4)で用いた方法に準じた。

【統計処理】

黒化出現状況および脊椎骨形態異常出現状況で得られた結果を統計学的検定により比較を行った。各試験区より得られた結果は平均値で示す事とし、検定は有意水準5%で母比率の差の検定を行った。

② 結果

【飼育結果】

飼育試験は、4/3~5/19までの47日間行った。各サイズでの取り揚げ結果を表IV-1-5)-3、表IV-1-5)-4に示す。

表IV-1-5)-3 TL20mm取り揚げ結果

試験区	収容時 ^{※1}	取り揚げ時 ^{※2}	生残率(%)
	TL(mm)	TL(mm)	
I	6.31 ± 0.39	21.13 ± 2.23	68.4
II	6.31 ± 0.39	20.04 ± 2.00	63.0
III	6.31 ± 0.39	20.22 ± 1.38	62.5
IV	6.31 ± 0.39	20.63 ± 1.45	59.8
V	6.31 ± 0.39	20.55 ± 1.44	63.6

※1 N=100

※2 N=50

表IV-1-5)-4 TL40mm取り揚げ結果

試験区	取り揚げ時 ^{※2}	生残率(%)
	TL(mm)	
I	39.95 ± 3.04	98.3
II	36.26 ± 3.42	93.8
III	34.50 ± 4.09	90.0
IV	38.12 ± 3.23	99.2
V	37.04 ± 3.36	97.5

※1 N=100

TL20mmサイズにおいては、取り揚げをI区は日齢50で、II～V区は日齢52で行った。通常飼育区であるI区が成長率において他の区より優れていた。これはF～Gステージに過剰量のビタミンAを強化したアルテミアを与えたII～V区の個体が、高率で体形異常を起こした結果、このような成長差が現れたものと考えられる。III-1区については原因不明の生残率悪化が起り、日齢45で試験を中止した。その為、III区の各データはIII-2区のデータを用いた。試験期間中の水温、DO、pHはそれぞれ117.0～18.2℃、6.3～8.4 mg/l、8.12～8.27、また照度は281～1060 luxの間で推移し、どの項目も急激な変化は見られず、各水槽間で差はなかった。

【配合飼料の分析結果】

試験に用いた配合飼料の分析結果を表IV-1-5)-5に示す。ビタミンDを強化した区の配合飼料のビタミンDは想定量より若干低く検出されたが、強化量としては問題ない程度であり、予定通りの強化を行うことが出来た。その他の栄養素についてはほぼ同様な含有量であった。

【アルテミアの分析結果】

試験に用いたアルテミアの分析結果を表IV-1-5)-6に示す。脂肪酸についてはIII区のDHAが他の区よりも多

く検出された。ビタミンについてはビタミンAを培養水に10,000 IU/lの濃度で強化したII区は2239.8 IU/g検出され、ビタミンAを培養水に10,000 IU/l、ビタミンDを20,000 IU/lの濃度で強化したIII区はビタミンAが2010.7 IU/g、ビタミンDが1216.1 IU/g検出され、アルテミア中にビタミンAおよびビタミンDが取り込まれていることが確認された。

【無眼側体色異常出現状況】

TL20mmおよびTL40mmにおける黒化の出現状況を表IV-1-5)-7、表IV-1-5)-8および図IV-1-5)-1、図IV-1-5)-2に示す。

TL20mmサイズの黒化出現状況は各試験区間で差はなかった。

TL40mmサイズの黒化出現状況はI区が他の区に比べ正常率が高かった。面積別出現率では黒>1/2においてはI区とIII区、I区とV区との間に有意差が見られた。また、パターン別出現率のA±、A+、C1、D1においてもI区とII～V区との間に有意差が見られた。より有意に高く出現した(P<0.05)。II区とV区間では黒化出現率には差は見られなかったが、パターン別出現率のA±においてII区がV区に対し有意に高く出現してい

表IV-1-5)-5 配合飼料の栄養分析結果

項目	計量単位	飼料の種類と粒径					
		Y社市販飼料				Y社市販飼料飼料(VD2万IU/100g強化)	
		～300μ	360～500μ	500～840μ	1,000μ	～300μ	360～500μ
レチノール	mg/100g	2.0	1.9	1.8	1.8		
ビタミンA効力(レチノールより換算)	IU/100g	6,600	6,230	6,000	6,130		
総アスコルビン酸(ビタミンC)	mg/100g		595				
ビタミンD	IU/100g	680	890	550	560	17,400	16,100
総トコフェロール(ビタミンE)	mg/100g		163				
水分	%		6.9				
粗タンパク質	%		57.0				
粗脂肪	%		15.1				
粗灰分	%		12.4				
脂肪酸含量							
20:5(EPA)	%		1.7				
22:6(DHA)	%		1.9				
Σn-3HUFA ^{※1}	%		4.1				

※1 Σn-3HUFA=20:4+20:5+22:5+22:6

表IV-1-5)-6 アルテミア分析結果

項目	単位	サンプルの種類		
		アルテミア		
		1	2	3
レチノール(乾燥重量当たり)	μg/g	nd ^{※1}	672.0	603.3
ビタミンA効力(レチノールより換算)	IU/g	nd	2239.8	2010.7
VD(乾燥重量当たり)	IU/g	nd	nd	1216.1
水分	%	86.6	85.2	85.6
粗脂肪含有量	%	2.7	3.1	3.4
粗脂肪含有量(乾燥重量当たり)	%	19.8	21.2	23.4
脂肪酸含有量				
20:5n-3(EPA)	%	6.7	7.4	6.6
22:6n-3(DHA)	%	1.2	1.1	2.6
Σn-3HUFA ^{※2}	%	8.0	8.6	9.5

※1 ndは検出限界値以下

※2 Σn-3HUFA=20:4+20:5+22:5+22:6

1: 30%イカリン脂質オイルで強化したAr

2: 30%イカリン脂質オイル+VA10000IU/Lで強化したAr

3: 30%イカリン脂質オイル+VA 10000IU/L+VD20000IU/Lで強化したAr

た (P<0.05)。

【有眼側体色異常個体出現状況】

TL20mmサイズにおける白化率を表IV-1-5)-7に示す。出現率は2.9~6.1%で各試験区間で差はなかった。

【脊椎骨異常出現状況】

TL40mmサイズにおける脊椎骨異常出現状況を表IV-1-5)-9に、各脊椎骨番号における異常出現頻度を図IV-1-5)-3に示す。F~Gステージに10,000 IU/l ビタミンAで強化したアルテミアを与えたII~V区がビタミン無強化のI区に比べ有意に高く出現した (P<0.05)。異常症状別に見ると腹椎および尾椎の癒合が主であった。

① 考察

今回の試験ではTL20mmサイズにおいては各試験区間で黒化出現率に差は見られなかったが、TL40mmサイズにおいて、I区に比べII~V区の黒化出現率に顕著な差が見られた。TL20mm以降の水槽環境には違いがないことから、今回出現した黒化は浮遊期型で、F~GステージにビタミンAを10,000 IU/l の濃度で強化したアルテミアを与えたことにより出現したと推測された。すなわち、今回の黒化発現の主要因はビタミンAであり、

特に腹部や尾柄部の黒化発現を促進させたと示唆された。

4)の結果とも考え合わせ、F~GステージにおけるビタミンA強化により重度の脊椎骨異常とともに黒化が強く発現する可能性が示唆された。しかし、I区においても黒化の面積別出現率は低いながらも黒化は発現していることから、黒化発現にはII~V区に用いた因子以外にも黒化発現原因が存在する可能性が高い。

脊椎骨異常については、II~V区の異常出現率が極めて高く、これまでの研究結果と同様に、F~GステージにビタミンAを10,000 IU/l で強化したアルテミアを与えることによって、脊椎骨異常が高率で発生することが確認できた。しかし、脊椎骨異常の程度と黒化面積別

表IV-1-5)-7 TL20mmサイズにおける体色異常出現状況

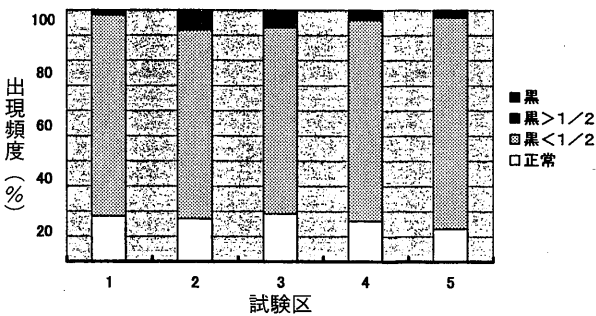
試験区	黒化面積別出現率(%) ^{※1}			白化出現率(%) ^{※2}
	正常	黒<1/2	黒>1/2	
I	9.0	40.0	1.0	5.9
II	8.5	37.5	4.0	6.1
III	9.5	37.0	3.5	4.4
IV	8.0	40.0	2.0	3.5
V	6.5	42.0	1.5	2.9

※1 N=100
※2 N=取り揚げ全数

表IV-1-5)-8 TL40mmサイズにおける黒化出現状況

試験区	面積別出現率(%)				パターン別出現率(%)									
	正常	黒<1/2	黒>1/2	黒	A(体幹部)				C				D(尾柄部)	
					±	+	++	+++	1(頭部)	2(胸鰭)	3(腹部)	1(巻き返し)	2(中央)	
I	13.0 ^a	86.0 ^a	1.0	0.0	35.0 ^a	51.0 ^a	1.0	0.0	1.5	2.0	24.0 ^a	49.5 ^a	14.5	
II	4.5 ^b	92.5 ^{ab}	3.0	0.0	10.5 ^c	82.0 ^b	3.0	0.0	6.0	4.0	51.5 ^b	78.5 ^b	21.5	
III	2.0 ^b	96.0 ^b	2.0	0.0	19.0 ^{bc}	77.0 ^b	2.0	0.0	5.0	4.0	48.0 ^b	70.0 ^b	22.0	
IV	4.0 ^b	94.0 ^{ab}	2.0	0.0	15.0 ^{bc}	79.0 ^b	2.0	0.0	2.0	4.5	50.5 ^b	72.5 ^b	21.5	
V	3.5 ^b	94.5 ^b	1.5	0.5	24.0 ^b	70.5 ^b	1.5	0.5	3.5	6.0	45.0 ^b	69.0 ^b	21.5	

N=100

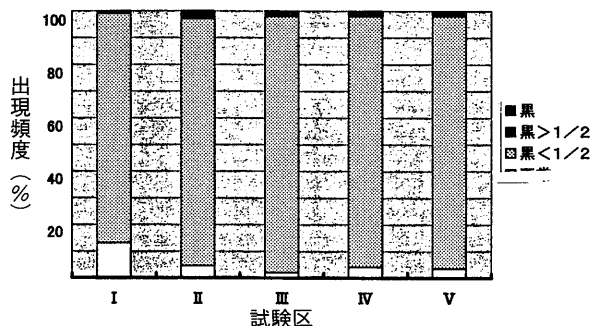


図IV-1-5)-1 TL20mmサイズにおける面積別黒化出現状況

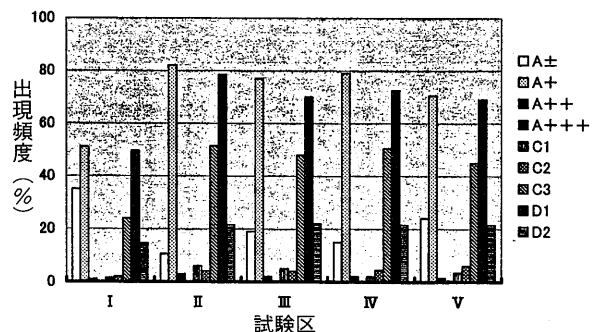
表IV-1-5)-9 脊椎骨異常異常出現状況

試験区	脊椎骨異常出現率(%)	症状別異常発生率(%)			
		腹椎		尾椎	
		癒合	屈曲	癒合	屈曲
I	44.5 ^a	21.5 ^a	5.0	34.0 ^a	4.0
II	97.0 ^b	68.5 ^b	5.0	94.5 ^b	4.0
III	96.0 ^b	64.0 ^b	5.0	93.0 ^b	7.0
IV	98.5 ^b	62.5 ^b	5.0	98.0 ^b	6.5
V	97.5 ^b	69.5 ^b	4.0	95.0 ^b	4.5

N=100



図IV-1-5)-2 TL40mmサイズにおける面積別(上)およびパターン別(下)黒化出現状況



出現率に相関性は見られなかった。また、I区でも脊椎骨番号の1～5, 36～39で癒合が出現したが、ビタミンAの影響ではなく、先天的なもの、あるいはビタミンA以外の栄養要因が原因であると推測されたが原因を特定することはできなかった。

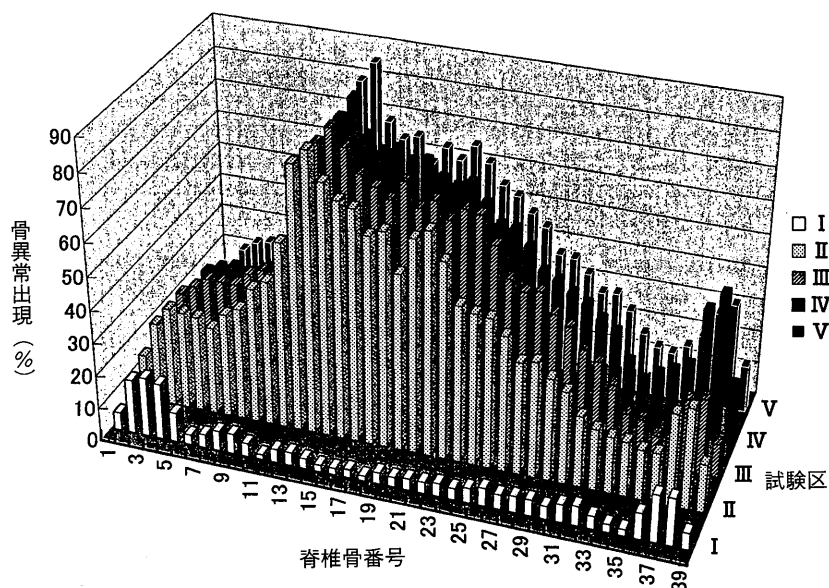
白化出現については全区で出現率に差はなかった。白化防除にはビタミンAやDHAが有効とされているが、今回の試験では各区間でビタミンAの含有量やアルテミア中のDHA含有量に差はあったものの白化出現に違いがなかったことから、今回の白化発現要因は栄養的な要因ではなく、環境的な要因が発現原因であると考えられた。

また、今回の試験ではビタミンDを強化したアルテミアや配合飼料を与えたⅢ～Ⅴ区と、ビタミンAのみを強化したアルテミアを与えたⅡ区との間で黒化発現状況には差は見られなかった。ビタミンAおよびビタミンDは体内で代謝活性化されることによりその生理作用を表す。配合飼料中のビタミンDはヒラメ稚魚の肝臓に比較的長期にわたり蓄積、保持され、摂取量に依存して蓄積量も増加することが明らかになっている。その為、これまでのビタミンDを使った黒化防除試験ではビタミンDがヒラメ仔魚体内で代謝が正常に行われていない可能性が推測されていた。今回の試験ではステージに関係なくビタミンDが黒化出現におよぼす影響は見られなかったことから、ビタミンAとビタミンDとの相乗効果が黒化出現を促進させる可能性は低いと推測された。また、ビタミンAによる黒化出現の影響が大きかった為、ビタミンDの影響が現れなかった可能性も考えられるが、今回、Ⅱ区～Ⅴ区で発現した黒化は主に腹部や尾柄部で、体幹部が重度に黒化した個体が少ないことから、ビタミンDは黒化出現要因であったとしても、その効果は強いもので

はないことが推測された。今回、4)の再現試験区もほぼ同じ結果を得ることができた。その結果を踏まえ、黒化出現を抑制するためには、浮遊期における黒化発現をいかに抑えるかが重要であると考えられる。従って、飼料中のビタミン、脂肪酸の濃度を考慮し、ヒラメステージ毎の適正な飼育方法を確立する必要がある。また、ビタミンDのみを強化した飼料をステージ毎に給餌し、ビタミンD単独の黒化への影響を調べる必要があるであろう。

引用文献 1)～5)

- 長谷川靖之・竹内俊郎・板垣恵美子・福永辰廣：ヒラメ無眼側体色異常出現におよぼす飼料中の脂溶性ビタミン強化の影響。水産増殖, 46(2), 279-286 (1998).
- 竹内俊郎・村山靖之・板垣恵美子・福永辰廣：ヒラメ無眼側体色異常出現におよぼすビタミンD強化飼料および底質の影響。平成11年度日本水産学会春季大会講演要旨集 (東京), 1999, p.198.
- 竹内俊郎・芳賀 穰・Jusadi Dedi・青海忠久：ヒラメ仔稚魚の体形異常におよぼすレチノイン酸の影響。平成9年度日本水産学会春季大会講演要旨集 (東京), p.138 (1997).
- 竹内俊郎：体色・形態異常と栄養生理の関係解明。平成10年度健苗育成技術開発研究中間報告会 (舞鶴).
- 竹内敦子：魚類を中心としたビタミンDの比較生物学, ビタミン, 68(2), 55-65 (1994).
- J. Dedi, T. Takeuchi, T. Seikai, and T. Watanabe : Hypervitaminosis and safe levels of vitamin A for larval flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed Artemia nauplii. Aquaculture, 133, 135-146 (1995).
- 高橋庸一：ヒラメ稚魚の無眼側の体色異常におよぼす飼育密度と飼餌料の影響。日水誌, 60, 593-598 (1994).



図IV-1-5)-3 各脊椎番号における異常出現状況

青海忠久・糟野忠夫：ヒラメ無眼側黒化要因と防除事例。
平成9年度日本水産学会春季大会講演要旨集（東京），
1997，p.107.

6) ヒラメ無眼側体色異常におよぼすビタミンA強化アルテミアの影響

樽井 史典・竹内 俊郎

ヒラメ種苗生産において，無眼側体色異常（以下黒化とする）個体が出現し，種苗価値の低下が問題になっている。これは異体類特有の変態過程で左右不相称化の始動期に何らかの異常が起こっていると考えられる。有眼側体色異常（以下白化とする）に関しては，ビタミンAによる抑制効果¹⁾が報告されており，D²⁾後半からEステージが白化に関し重要な時期であること³⁾が明らかになっている。一方，黒化に関してはビタミンAの活性体であるレチノイン酸をF～Gステージに浸漬すると黒化を誘起すること^{4), 5)}が報告されているが，経口投与によるビタミンAの黒化におよぼす影響は明らかにされていない。

平成14年度⁵⁾のヒラメ無眼側体色異常防除試験において，E～Fステージのヒラメ仔魚にビタミンAを1,000 IU/ℓで強化したアルテミアノープリウス（以下アルテミアとする）を給餌することで黒化出現率が抑えられた。しかし，F～GステージにビタミンAを10,000 IU/ℓで強化したアルテミアを給餌した場合は，黒化出現率が上昇した。このことからヒラメ仔魚に給餌するアルテミアへのビタミンA添加量が黒化の出現に濃度依存的に影響を与えることが推察された。本年度はF～Gステージヒラメ仔魚に給餌するアルテミアのビタミンA濃度をアルテミア培養水1ℓあたり0, 1,000, 2,000, 5,000および10,000 IUにすることにより，F～Gステージへの高濃度ビタミンA添加が黒化を促進させる要因

であるのか否かを調べた。

① 材料と方法

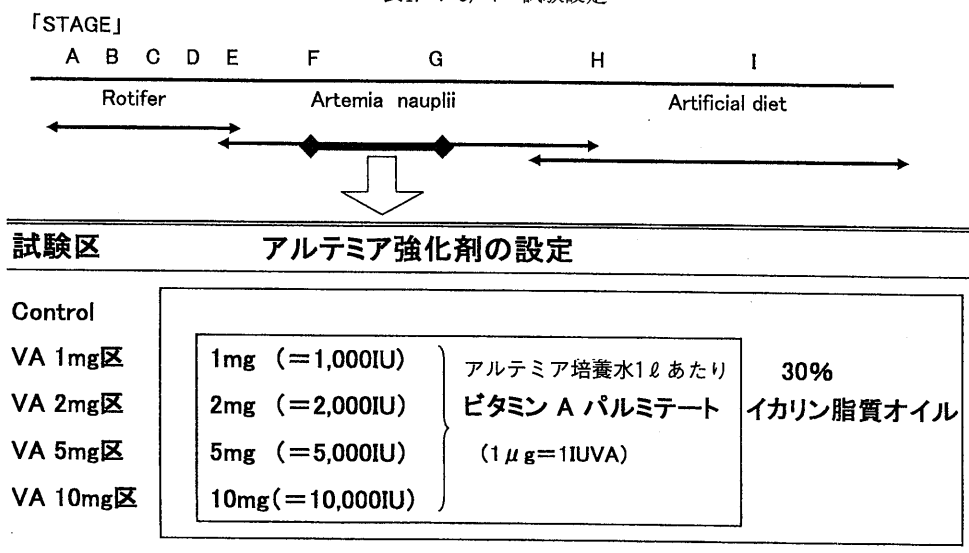
【供試魚】

供試魚は日本栽培漁業協会伯方島事業場（現 独立行政法人水産総合研究センター伯方島栽培漁業センター）の養成ヒラメ親魚より採卵した受精卵を20㎡角型コンクリート水槽で14日齢までスーパー生クロレラ V12強化ワムシで飼育した仔魚（TL5.52±0.48mm，ステージ割合：Bステージ17%，Cステージ70%，Dステージ13%）を用い，収容密度は1水槽あたり1000尾とし，TL20mmサイズ以降は1水槽あたり140尾とした。

【試験区】

各試験区における餌料設定を表IV-1-6)-1に示す。ビタミンAパルミテートを添加しないControl区，ビタミンAパルミテートを培養水1ℓあたり1, 2, 5および10 mg（1μg ビタミンAパルミテート=1 IUVA）区の計5試験区を設け，各区2水槽とした。収容直後はアルテミアに餌付いていないため全区においてワムシとアルテミアを7日間併用給餌した。22日齢からアルテミア単独給餌に切り替えた後，大部分の実験魚の変態がFステージに達してからGステージに至るまでの期間（27～31日齢）をF～Gステージとし，各々の強化設定のアルテミアを給餌した。配合飼料は全区においてHステージ（37日齢）から給餌開始し，餌付けが完了するまでアルテミアとの併用給餌を行った。ワムシの強化剤はスーパー生クロレラ V12（クロレラ工業（株）製）を使用し，アルテミアの強化剤はF～Gステージでは30%イカリン脂質オイル（太陽油脂（株）製）およびビタミンAパルミテート（ロシュビタミンジャパン（株）製），F～Gステージ以外は30%イカリン脂質オイルのみを使用した。配合飼料はY社製を使用した。

表IV-1-6)-1 試験設定



ビタミンAパルミテート：ロシュビタミンジャパン（株）製
30%イカリン脂質オイル：太陽油脂（株）製

【飼育方法】

飼育条件は100ℓ 黒色ポリエチレン水槽を屋内に設置し、照度を一定に保つため、遮光幕により外部からの光を遮断した。飼育水は砂ろ過海水を加温して使用した。飼育水温は17.1~19.5℃であった。エアストーン1個を垂下して通気を行い、溶存酸素を7.28~7.89 mg/ℓに維持した。pHは8.23~8.45で推移した。照度は実験開始時に1,059~1,870 luxであった。

飼育試験は4月30日から6月20日までの52日間行った。収容後に給餌したワムシは、スーパー生クロレラ V12を1~2ml/ℓ (培養水)の割合で添加し、水温20℃、密度1,000個体/mlで5~15時間強化したシオミズツボワムシを使用した。アルテミアは、北米産の耐久卵を水温28℃で約24時間かけて孵化させた幼生を、水温22℃、密度100~150個体/mlで栄養強化剤を0.08ml/ℓ (培養水)添加し、18時間以上栄養強化したものをを用いた。アルテミアは給餌前にニフルスチレン酸ナトリウム2 ppmで1時間の薬浴を行った。また、給餌量は飽食給餌とした。

ステージ組成の判定のためサンプリングは1水槽50尾とし、計5回行った。供試魚の平均全長が約20mmになった時点 (TL20mmサイズ)で、全数を取り揚げ、平均全長および生残率を測定した。次に各水槽140尾ずつ白化個体を除き再収容し、平均全長が約40mmになった時点 (TL40mmサイズ)で全数を取り揚げ、平均全長、生残率を測定した。なお、サンプルはすべて10%海水ホルマリンで保存した。

【有眼側体色異常の判定】

TL20mmサイズで取り揚げた全数より50尾をサンプリングした。各試験区の白化出現率は、完全白化および部分白化の個体を白化個体として肉眼で調査した。

【無眼側体色異常の判定】

TL20mmサイズでは白化個体を除いた50尾、TL40mmサイズでは100尾をサンプリングした。黒化出現状況の

調査方法は、黒化面積別と出現パターン別の2通りの評価方法で行い、すべて肉眼で調査した。

黒化面積で評価する方法はヒラメ無眼側全体の着色面積により正常個体 (正常)、着色面積50%以下の個体 (黒<1/2)、50%以上の個体 (黒>1/2) および完全黒化 (黒)の4通りに分類し、TL20mmおよびTL40mmサイズのサンプルで調査した。

次に、黒化出現パターン別の分類方法を図IV-1-1)-1に従い、ヒラメの無眼側を体幹部(A)、頭部(C1)・胸部(C2)・腹部(C3)、尾柄部(D)の4つの部位にわけ、体幹部においては黒化出現率により、正常個体(A±)、着色面積50%以下の個体(A+)、50%以上の個体(A++)および完全黒化(A+++)とし、尾柄部においては縁側部(D1)および内部(D2)に分類した。出現パターンによる判定はTL40mmサイズのサンプルで調査した。

【脊椎骨異常の判定】

TL40mmサイズのサンプル100尾の軟X線写真をSoftex社製の軟X線検査装置CMB-2型を用い、1.2 mA、X線照射時間30秒の設定で撮影した。脊椎骨異常出現状況は実体顕微鏡を用いて、部位を腹対および尾椎、症状を癒合および屈曲に分けて判定した。また、腹椎から尾椎までの脊椎骨に番号をつけ、各脊椎骨番号における異常出現状況も調査した。

【栄養分析】

アルテミアの栄養分析は、水分、粗脂肪、脂肪酸およびビタミンAについて分析した。水分は常圧加熱乾燥法、粗脂肪含量はFolch et al.⁶⁾の方法で測定した。ビタミンA含量は粗脂肪をSep-Pakカートリッジ(Waters Co.)で中性脂質と極性脂質に分画し、中性脂質をHPLC(表IV-1-6)-2)に付し、レチノール、レチナール、レチノイン酸およびビタミンAパルミテートを定量した。脂肪酸組成は粗脂肪を50%KOHでケン化し、三フッ化ホウ素-メタノールでメチルエステル化し、GLC(表IV-1-6)-3)

表IV-1-6)-2 HPLCの設定

Apparatus	High performance liquid chromatograph LC-10A (島津製作所)
Integrator	Chromatopac C-R6A (島津製作所)
Detector	UV-VIS Spectrophotometric detector SPD-10A (島津製作所)
Wave length	325nm
Column	Reversed-phase Shimpack CLC-ODS (5μ, 15cm×6mmφ)(島津製作所)
Mobile phase	98% methanol containing 0.5% ammonium acetate:chloroform(85:15)
Flow rate	1.5ml/min.

に付し測定した。

【統計処理】

TL20mm, TL40mmサイズの平均全長, 黒化出現率および脊椎骨異常出現率について, ダンカン多重比較検定を行った。

② 結果

【飼育結果】

平均全長の推移と餌料系列を図IV-1(6)-1, ステージ組成サンプリング結果を図IV-1(6)-2に示す。ステージ組成は飼育開始時にはB, CおよびDの3ステージに分けられたが, その後4~6ステージとばらつきが大きくなった。

各試験区の TL20および40mmサイズでの取り揚げ結果を表IV-1(6)-4および表IV-1(6)-5に示す。TL20mmサイズの取り揚げ段階では VA 10 mg 区の平均全長が

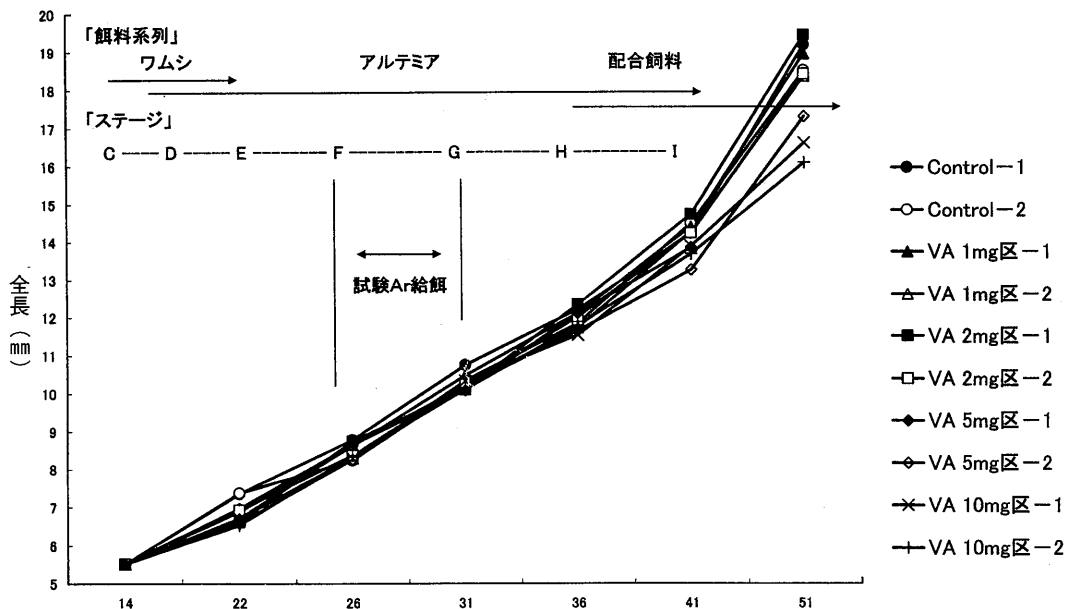
Control, VA 1 mg および VA 2 mg 区よりも有意に劣った ($P < 0.05$)。同様に TL40mmサイズでも VA 10 mg 区で平均全長が Control, VA 1 mg および VA 2 mg 区よりも有意に劣った ($P < 0.05$)。

【アルテミアの分析結果】

アルテミアの分析結果を表IV-1(6)-6および表IV-1(6)-7に示す。VA 1, 2, 5, 10 mg 区でビタミンAパルミテートそれぞれ乾燥重量あたり 0.2, 2.2, 2.2, 6.9 $\mu\text{g/g}$ 検出され, レチノールがそれぞれ乾燥重量あたり 1.0, 1.2, 7.5, 15.1 $\mu\text{g/g}$ 検出された。また, VA 5 mg および VA 10 mg 区において, レチノイン酸がそれぞれ乾燥重量あたり 7.2, 20.5 $\mu\text{g/g}$ 検出された。粗脂肪含量と各種ビタミンA含量の関係およびビタミンAパルミテート添加量と各種ビタミンAの関係を図IV-1(6)-3および図IV-1(6)-4に示した。各種ビタミンA関連物質は同列

表IV-1(6)-3 GCの設定

Apparatus	Gas chromatograph GC-14B (島津製作所)	
Integrator	Chromatopac C-R8A (島津製作所)	
Detector	Hydrogen flame ionization detector	
Column	Supelcowax TM -10 fused silica capillary column (30m × 0.32mm × 0.25 μm film thickness, Sigma Co.)	
Carrier gas	Helium	
Gas pressure	He	0.75kg/cm ²
	H ₂	0.50kg/cm ²
	Air	0.50kg/cm ³
Temperature	Detector	240°C
	Injection	240°C
	Column	205°C



図IV-1(6)-1 平均全長の推移と餌料系列

表IV-1-6)-4 TL20mmサイズでの取り揚げ結果

試験区	収容時 ^{※1}		TL20mmサイズ取り揚げ時 ^{※2}	
	全長 (mm)		全長 (mm)	生残率 ^{※3} (%)
Control-1	5.52 ± 0.48		19.16 ± 3.37 c	64.9
Control-2	5.52 ± 0.48		18.49 ± 3.37 bc	53.4
VA 1mg区-1	5.52 ± 0.48		18.93 ± 3.36 c	62.0
VA 1mg区-2	5.52 ± 0.48		18.34 ± 2.94 bc	64.1
VA 2mg区-1	5.52 ± 0.48		19.42 ± 4.13 c	59.4
VA 2mg区-2	5.52 ± 0.48		18.40 ± 2.89 bc	64.4
VA 5mg区-1	5.52 ± 0.48		— ^{※4}	47.2
VA 5mg区-2	5.52 ± 0.48		17.29 ± 2.74 ab	57.6
VA 10mg区-1	5.52 ± 0.48		16.59 ± 2.33 a	60.6
VA 10mg区-2	5.52 ± 0.48		16.08 ± 3.38 a	54.6

※1 n=100 日齢 14 収容密度 1000尾/100L

※2 n=50 日齢 51

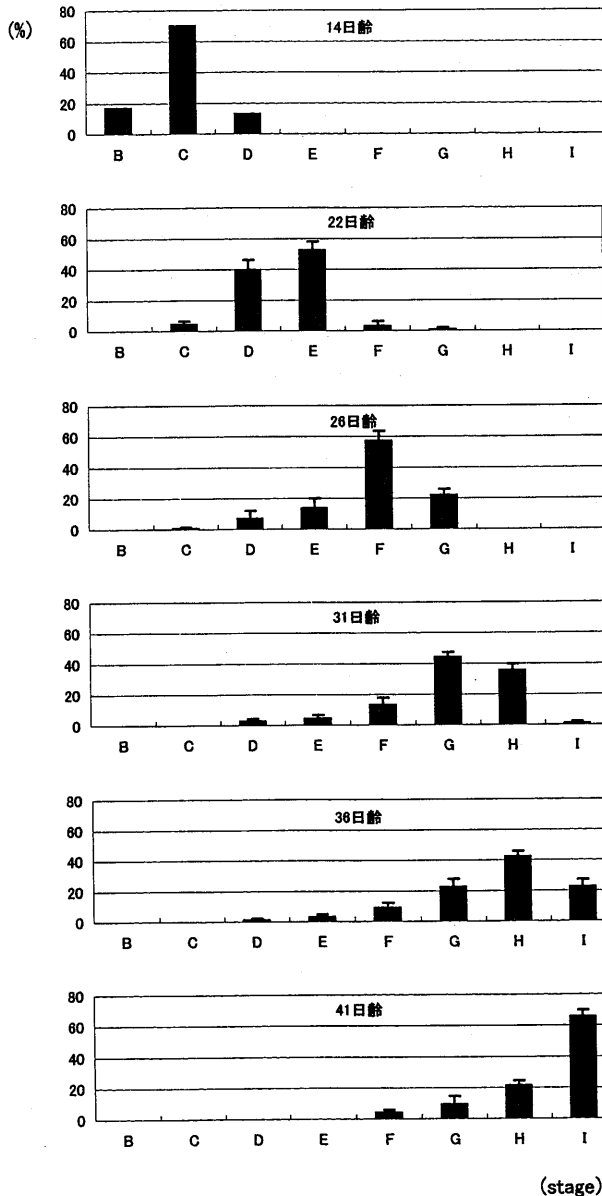
※3 途中サンプリングのため250尾を生残尾数に含める

※4 43日齢での糸状物質の発生による大量減耗のためサンプル不足

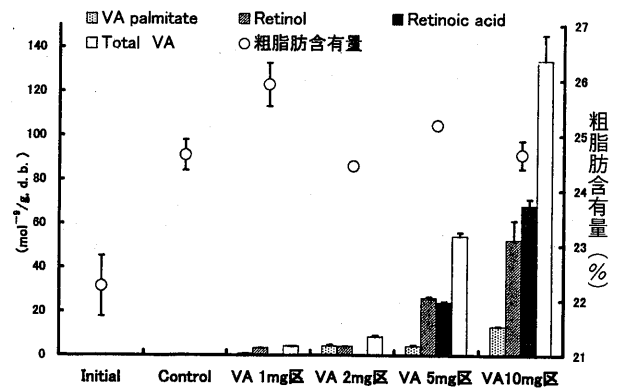
表IV-1-6)-5 TL40mmサイズでの取り揚げ結果

試験区	TL40mmサイズ取り揚げ時 [※]	
	全長 (mm)	生残率 (%)
Control-1	37.88 ± 6.57 cd	86.4
Control-2	38.46 ± 6.23 cd	89.3
VA 1mg区-1	37.77 ± 6.64 cd	90.7
VA 1mg区-2	37.18 ± 6.77 cd	88.6
VA 2mg区-1	37.73 ± 6.47 cd	95.0
VA 2mg区-2	39.21 ± 6.61 d	89.3
VA 5mg区-1	36.46 ± 7.64 bc	83.6
VA 5mg区-2	35.00 ± 6.43 ab	87.9
VA 10mg区-1	34.01 ± 6.85 a	81.4
VA 10mg区-2	33.71 ± 7.28 a	87.9

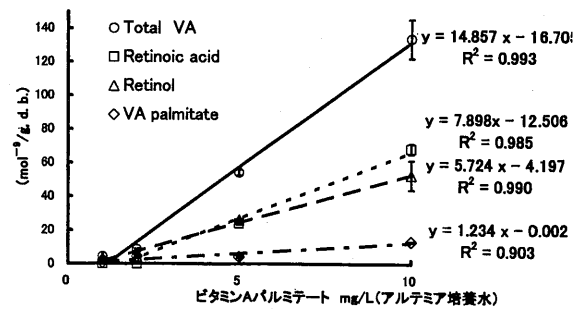
※ n=100 日齢 65



図IV-1-6)-2 ステージサンプリングの結果



図IV-1-6)-3 アルテミア中の粗脂肪およびビタミンA含量



図IV-1-6)-4 ビタミンA添加量とアルテミア
ビタミンA分析値の関係

に比較するため、モル換算で表示した。栄養強化剤を添加したアルテミアの粗脂肪含量は24.4~25.9%であったが、ビタミンAパルミテートを添加した区では添加濃度が高くなるにつれて全ビタミンA含量は増加した。また各種ビタミンA関連物質の含量は添加量と強い相関が見られた。

【無眼側体色異常出現状況】

TL20mmサイズの面積別黒化出現率を表IV-1-6)-8および図IV-1-6)-5に示す。全試験区で完全黒化個体は見られず、VA 2 mg区で正常個体が多く見られた。しかし、VA 5 mg区-1でTL20mmサイズのサンプルを取ること

ができず、統計処理をしていない。

TL40mmサイズの面積別黒化出現率を表IV-1-6)-9および図IV-1-6)-6に示す。正常はControlおよびVA 2 mg区に対しVA 10 mg区の出現率が有意に低く、ついでVA 5 mg区が低かった (P<0.05)。黒>1/2はVA 1 mgおよびVA 2 mg区に対しVA 10 mg区の出現率が有意に高かった (P<0.05)。

次に、TL40mmサイズでのパターン別黒化出現率を表IV-1-6)-9、図IV-1-6)-7、図IV-1-6)-8および図IV-1-6)-9に示す。体幹部 (A) において、A±はControlおよびVA 2 mg区に対しVA 5 mgおよびVA 10 mg区の出

表IV-1-6)-6 アルテミアの一般分析結果

項目	単位	アルテミア						
		Initial	無強化	Control	VA 1mg区	VA 2mg区	VA 5mg区	VA10mg区
レチノイン酸	μg/g, d. b.	nd ^{※1}	nd	nd	nd	nd	7.2	20.5
レチノール	μg/g, d. b.	nd	nd	nd	1.0	1.2	7.5	15.1
レチナール	μg/g, d. b.	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
VAパルミテート	μg/g, d. b.	nd	nd	nd	0.4	2.2	2.2	6.9
粗脂肪含有量	%	22.3	19.8	24.6	25.9	24.4	25.2	24.7
水分	%	86.7	91.1	89.4	88.9	88.8	88.7	88.7
脂肪酸含有量								
20:5n-3(EPA)	g/100g, d. b.	0.3	0.4	1.4	1.8	1.4	1.5	1.4
22:6n-3(DHA)	g/100g, d. b.	nd	nd	0.6	0.9	0.7	0.7	0.6
Σn-3HUFA ^{※2}	g/100g, d. b.	0.4	0.5	2.1	2.8	2.2	2.3	2.1

※1 検出限界値以下

※2 Σn-3HUFA=20:4+20:5+22:5+22:6

表IV-1-6)-7 アルテミアの脂肪酸組成 (area%)

脂肪酸	アルテミア						
	Initial	無強化	Control	VA 1mg区	VA 2mg区	VA 5mg区	VA10mg区
14:0	0.9	0.7	1.1	1.1	1.0	1.1	1.1
16:0	13.7	13.2	14.1	14.1	13.5	14.0	13.7
16:1	3.3	2.8	3.1	3.3	3.0	3.1	3.0
18:0	3.7	4.4	4.5	4.0	4.5	4.3	4.3
18:1	31.3	31.3	28.5	27.7	28.9	28.4	28.3
18:2n-6	5.2	4.9	4.3	4.1	4.2	4.3	4.5
18:3n-6	1.8	1.5	1.3	1.2	1.2	1.3	1.3
18:3n-3	22.2	20.8	19.4	18.4	18.0	18.4	19.3
18:4n-3	5.0	4.0	3.6	3.4	3.3	3.5	3.7
20:3n-6	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
20:4n-6	0.7	1.0	1.0	1.0	1.1	1.0	1.0
20:3n-3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
20:4n-3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
20:5n-3	1.5	2.0	5.7	6.8	5.8	5.9	5.7
22:4n-6	0.1	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.1
22:5n-6	tr ^{※1}	nd	tr	0.1	tr	0.1	tr
22:5n-3	nd ^{※2}	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
22:6n-3	nd	nd	2.3	3.3	2.7	2.7	2.4
Σ Monoenes	34.6	34.1	31.6	31.0	31.9	31.6	31.3
Σ Saturated	18.3	18.3	19.6	19.2	19.0	19.4	19.0
Σ n-3	29.5	27.7	31.9	32.9	30.7	31.4	32.1
Σ n-6	8.0	7.9	6.8	6.6	6.9	6.9	7.1
Σ n-3HUFA ^{※3}	2.0	2.5	8.5	10.8	9.2	9.2	8.7

※1 痕跡値

※2 検出限界値以下

※3 Σn-3HUFA=20:4+20:5+22:5+22:6

現率が有意に低かった ($P < 0.05$)。A+はControlおよびVA 2 mg区に対しVA 5 mg区の出現率が有意に高かった ($P < 0.05$)。A++はVA 10 mg区が最も高い出現率を示した ($P < 0.05$)。頭部 (C1) はVA 2 mg区に対しVA 5 mg区の出現率が有意に高かった ($P < 0.05$)。胸部 (C2) および腹部 (C3) においてはVA 5 mgおよびVA 10 mg区の出現率が高い傾向にあったが有意差は見られなかった ($P > 0.05$)。尾柄部 (D) では、縁側部 (D1) はControlに対しVA 1 mg, VA 5 mg, VA 10 mg区の出現率が高く ($P < 0.05$)、内部 (D2) ではVA 10 mg区が最も高い出現率であった ($P < 0.05$)。

【有眼側体色異常出現状況】

TL20mmサイズでの白化出現率を表IV-1-6)-8)に示す。各試験区に有意な差はなかった ($P > 0.05$)。

【脊椎骨異常出現状況】

TL40mm脊椎骨異常出現状況を表IV-1-6)-10)および図IV-1-6)-11)に示す。脊椎骨番号別異常出現率を図IV-1-6)-11)に示す。脊椎骨異常出現率においては、VA 10 mg区が他の試験区より有意に高い出現率を示した ($P < 0.05$)。脊椎骨番号別の異常出現率では、腹椎の前半、腹椎と尾椎の境目付近および尾対後半部に多く異常が見られた。VA 10 mg区ではほぼ全体的に異常が見られた。

② 考察

TL20mmおよびTL40mmサイズのVA 10 mg区の平均全長の低下は、高濃度のビタミンAパルミテート強化による脊椎骨の癒合および屈曲によるものと推察される。これは今回の試験と同様にアルテミアにビタミンAパルミテートを添加し、ヒラメ仔魚に与えたDedi et al⁷⁾ お

表IV-1-6)-8 TL20mmサイズにおける体色異常出現状況

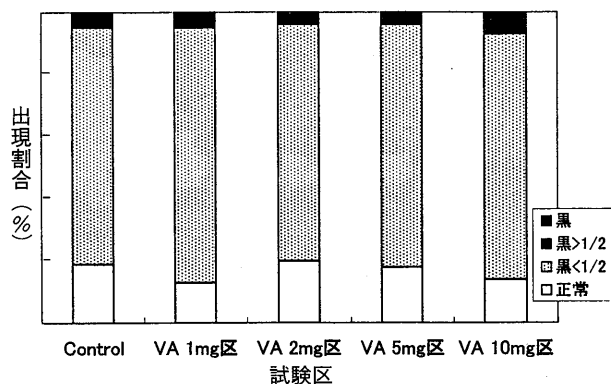
試験区	体色異常出現率(%)				
	黒化出現率				白化出現率
	正常	黒<1/2	黒>1/2	黒	
Control	19	76	5	0	17.0
VA 1mg区	13	82	5	0	13.0
VA 2mg区	20	76	4	0	17.0
VA 5mg区	18	78	4	0	20.0
VA 10mg区	14	79	7	0	19.0

n=50 日齢 51

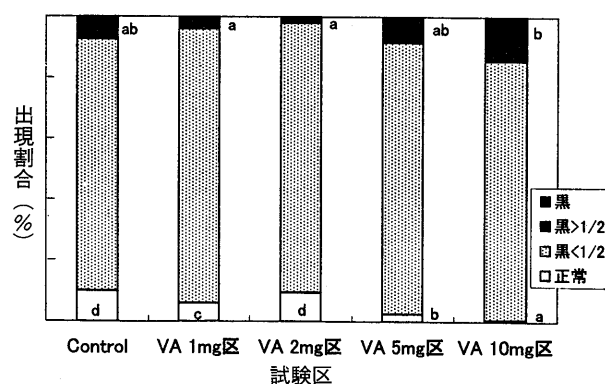
表IV-1-6)-9 TL40mmサイズにおける黒化出現状況

試験区	黒化出現率(%)				パターン別黒化出現率(%)								
	正常	黒<1/2	黒>1/2	黒	A(体幹部)				C			D(尾柄部)	
					±	+	++	+++	1(頭部)	2(胸部)	3(腹部)	1(縁側部)	2(内部)
Control	10.0 ^d	82.5	7.5 ^{ab}	0.0	39.5 ^b	53.0 ^a	7.5 ^b	0.0	40.0 ^{ab}	17.0	67.0	72.0 ^a	2.0 ^a
VA 1mg区	6.0 ^c	90.0	4 ^a	0.0	24.0 ^{ab}	71.5 ^{ab}	4.5 ^{ab}	0.0	55.5 ^{ab}	17.5	75.5	89.0 ^b	1.5 ^a
VA 2mg区	9.5 ^d	88.5	2 ^a	0.0	43.5 ^b	54.5 ^a	2.0 ^a	0.0	35.0 ^a	15.5	68.5	84.5 ^{ab}	1.5 ^a
VA 5mg区	2.5 ^b	89.0	8.5 ^{ab}	0.0	15.5 ^a	77.0 ^b	7.5 ^{ab}	0.0	74.0 ^b	24.0	84.5	91.5 ^b	4.5 ^a
VA 10mg区	0.5 ^a	85.0	14.5 ^b	0.0	10.0 ^a	75.0 ^{ab}	15.0 ^b	0.0	66.0 ^{ab}	27.0	87.5	97.0 ^b	20.5 ^b

n=100 日齢 65



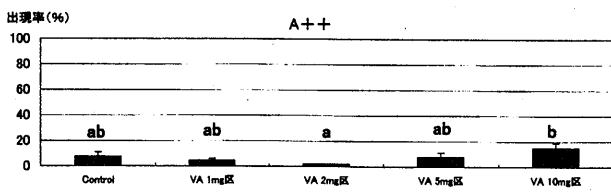
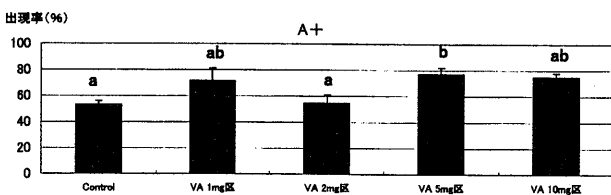
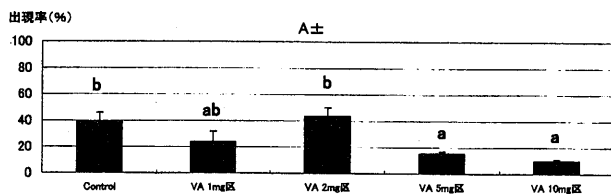
図IV-1-6)-5 TL20mmサイズでの面積別黒化出現率



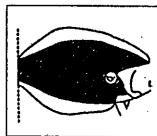
図IV-1-6)-6 TL40mmサイズでの面積別黒化出現率

よび Takeuchi et al⁸⁾ の結果と一致する。しかし、これらの試験のアルテミアのビタミンA分析方法は、ケン化後、その不ケン化物からレチノールを測定している。そのため、レチナールおよびレチノイン酸は含まれず、レチノールおよびビタミンAパルミテートが同じレチノールとして検出され、それぞれのビタミンA関連化合物の含量は反映されていない。Haga et al⁹⁾ の報告によると

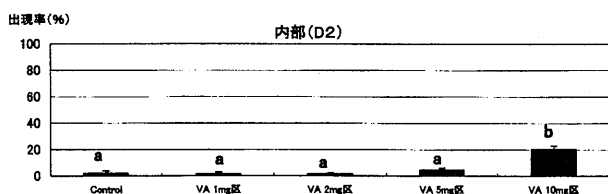
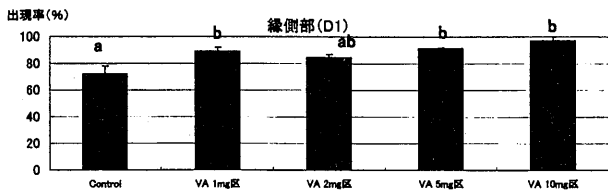
ビタミンAの活性体であるレチノイン酸をアルテミアに添加し、E~Hステージのヒラメに給餌すると脊椎骨異常の出現と平均全長の低下を示している。また、Takeuchi et al¹⁰⁾ よりレチノイン酸添加区に加え、ビタミンAパルミテート添加区でアルテミアにレチノイン酸が検出されており、どちらの区も非常に高い脊椎骨の異常が出現している。今回のアルテミア分析結果より、VA 10 mg 区のアルテミアからレチノールおよびビタミンAパルミテートに加え、レチノイン酸が検出されている。従って、10 mg 区の脊椎骨の異常はレチノイン酸によるものと推察される。しかし、VA 5 mg 区のアルテミアからもレチノイン酸が検出されているにもかかわらず、



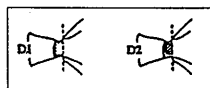
n=100 日齢 85
A±: 正常個体
A+: 着色面積50%以下の個体
A++: 着色面積50%以上の個体



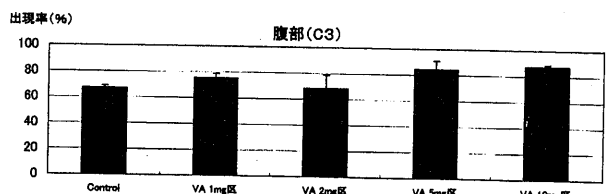
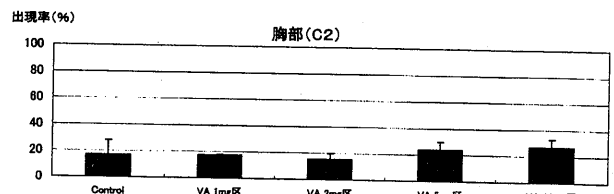
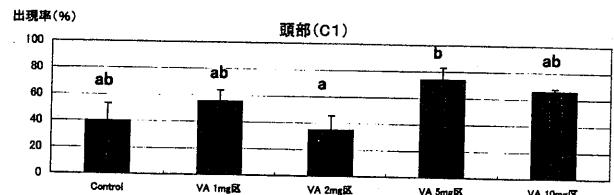
図IV-1-6)-7 体幹部における黒化出現率



n=100 日齢 85



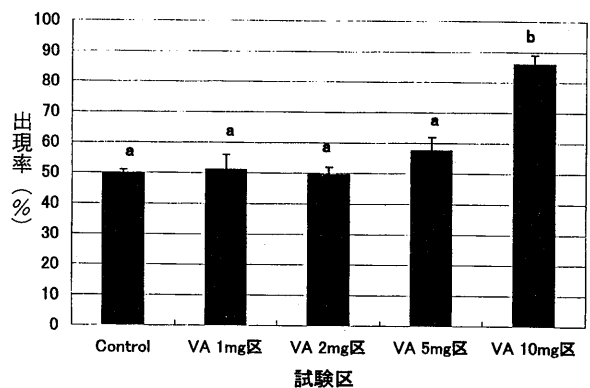
図IV-1-6)-9 尾柄部における黒化出現率



n=100 日齢 65



図IV-1-6)-8 頭部, 胸部, 腹部における黒化出現率



図IV-1-6)-10 脊椎骨異常出現状況

VA 5 mg 区の脊椎骨異常出現率は Control, VA 1 mg および VA 2 mg 区と有意な差は見られない ($P > 0.05$)。この原因として、レチノイン酸を含むアルテミアを給餌する時期の違いあるいはアルテミアに含まれるレチノイン酸の含量の違いが考えられる。今回のステージサンプリング結果 (図IV-1-6)-2) から、レチノイン酸を含むアルテミアを与える時期が26~31日齢であり、VA 10 mg 区と完全に同時期に給餌している。また、Dedi et al¹¹⁾ が脊椎骨異常の発現にかかわる時期と報告しているG期を十分に含んでいることから、給餌時期の違いがあるとは考えられない。次に、アルテミアに含まれるレチノイン酸含量に着目すると Haga et al⁹⁾ の分析結果では 32-1140 $\mu\text{g/g}$, Takeuchi et al¹⁰⁾ の分析結果では 217-666 $\mu\text{g/g}$ であり、今回の VA 5 mg 区のアルテミア分析結果の 7.2 $\mu\text{g/g}$ と比べると非常に高いレベルであることがわかる。そのため、F~G期という短期間において、VA 10 mg 区のアルテミアに含まれるレチノイン酸含量で脊椎骨異常を促進することが示唆された。

黒化出現に関して Miwa et al⁴⁾ はレチノイン酸を変態開始期 (premetamorphic phase) から10日間浸漬する実

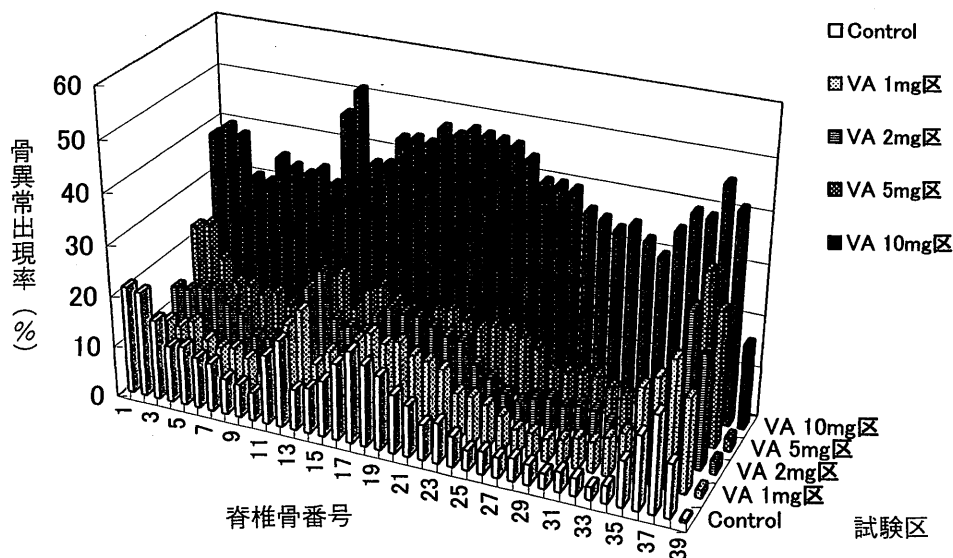
験で、無眼側の色素の着色を報告している。さらに、芳賀ら⁵⁾ も F~G期ヒラメ仔魚にレチノイン酸を浸漬すると88%の黒化個体が見られたと報告している。しかし、これらは直接飼育水にレチノイン酸を添加した結果であり、餌料に含まれるレチノイン酸の黒化に与える影響はこれまで調べられていない。今回の試験の黒化出現状況は、TL40mmサイズにおいて、A+では VA 5 mg 区、黒 > 1/2, A++, C1およびD2では VA 10 mg 区、D1では VA 5 mg と VA 10 mg 区で Control もしくは VA 2 mg 区に対し出現率が高くなっている ($P < 0.05$)。そして、アルテミアの栄養分析結果では VA 5 mg および 10 mg 区にレチノイン酸が検出されている。このことからレチノイン酸の経口投与による黒化発現が起こったものと考えられる。また、感受性があると思われるステージはEからGステージと考えられる (Miwa et al⁴⁾ の変態開始期から10日間はEステージから10日間と考えられる)。

ビタミンAパルミテートの添加量に関して、VA 5 mg 区に給餌したアルテミアに検出されたレチノイン酸含量以上で黒化が出現していることから、アルテミアへのビタミンAパルミテート添加量は2~5 mg を境に多くす

表IV-1-6)-10 脊椎骨異常出現状況

試験区	異常出現率 (%)	部位別異常出現率 (%)			
		腹椎		尾椎	
		癒合	屈曲	癒合	屈曲
Control	49.5 ^a	32.0 ^a	7.0 ^{ab}	36.0 ^a	15.0
VA 1mg区	51.0 ^a	26.5 ^a	4.5 ^a	46.5 ^a	11.0
VA 2mg区	49.5 ^a	24.5 ^a	6.5 ^a	46.0 ^a	9.5
VA 5mg区	57.5 ^a	35.0 ^a	8.0 ^{ab}	50.5 ^a	12.0
VA 10mg区	86.0 ^b	69.0 ^b	19.0 ^b	78.5 ^b	19.5

n=100 日齢 65



図IV-1-6)-11 各脊椎骨番号における異常出現状況

ると黒化につながることを示唆された。また、脊椎骨異常が出現するレチノイン酸含量よりも低い含量で黒化が出現することが示唆された。一方、Control, VA 1 mg および 2 mg 区でレチノイン酸が検出されず、その区間での黒化出現状況は、VA 1 mg 区の TL40mm サイズ面積別黒化出現率の正常率が Control および VA 2 mg 区よりも有意に低かった ($P < 0.05$) が、黒 $< 1/2$ および 黒 $> 1/2$ の項目では有意な差はなかった ($P > 0.05$)。また、D1 で Control 区に対し有意に出現率が高いが、VA 2 mg 区とは有意差は見られない。さらにそれ以外の項目では有意な差は見られなかった ($P > 0.05$)。これらのことよりビタミン A パルミテートを 1 mg および 2 mg 添加しても黒化出現率に影響を与えないことが示唆された。

ビタミン A パルミテートを強化したアルテミアからレチノイン酸が検出されたことについて、Takeuchi et al.⁸⁾ がレチノイン酸は、レチノール、レチニルパルミテート、レチノイン酸そのもののアルテミアによる主な代謝産物であると述べていること、図 IV-1-6)-12 に示されるエステル型のビタミン A パルミテートがレチノールを経てレチノイン酸に代謝される経路およびビタミン A パルミテートを単独で添加したアルテミアの栄養分析結果がビタミン A パルミテートのほかにレチノール、レチノイン酸が検出されていることを考慮するとアルテミアによりビタミン A パルミテートがレチノール、レチノイン酸へと代謝されていることが示唆された。一般に脂溶性であるビタミン A 自体はエステル型(ビタミン A パルミテート)やオイル中では安定度を増すが、空気、光、熱、酸および金属イオンに非常に不安定な物質¹²⁾ である。アルテミアに含まれる粗脂肪自体の含量は、Watanabe et al.¹³⁾ より、12 時間以上で安定していると考えられるが、そこに含まれるビタミン A 関連物質は強化時間や培養条件により変化すること予測される。よって、アルテミアとビタミン A パルミテートの関係を、光条件、代謝パターンおよび速度といった観点から、基礎的なデータを調べる

必要があると考えられる。

参考文献

- 1) 三木教立, 谷口朝宏, 浜川秀夫, 山田幸男, 桜井則広 (1990): ビタミン A 投与ワムシ給餌によるヒラメ白化防除. 水産増殖, 38 (2), 147-155.
- 2) 南 卓史 (1982): ヒラメの初期生活史. 日水誌, 48, 1581-1588.
- 3) Seikai T., Shimozaki M., Watanabe T. (1987): Estimation of Larval Stage Determining the Appearance of Albinism in Hatchery-reared Juvenile Flounder *Paralichthys olivaceus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53 (7), 1107-1114.
- 4) Miwa S., Yamano K. (1999): Retinoic Acid Stimulates Development of Adult-Type Chromatophores in the Flounder. *J. Exp. Zool.*, 284, 317-324.
- 5) 芳賀 穰, 竹内俊郎, 鈴木 徹 (2002): レチノイン酸により誘導されるヒラメ仔魚期のステージ特異的な影響. 平成14年度日本水産学会大会講演要旨集, p.104.
- 6) Folch J., Lee M., Stanley G.H.S., (1957): A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497-507.
- 7) Dedi J., Takeuchi T., Seikai T., and Watanabe T. (1995): Hypervitaminosis and safe levels of vitamin A for larval flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed *Artemia nauplii*. *Aquaculture*, 133, 135-146.
- 8) Takeuchi T., Dedi J., Ebisawa C., Watanabe T., Seikai T., Hosoya K., Nakazoe J. (1995): The Effect of β -Carotene and Vitamin A Enriched *Artemia Nauplii* on the Malformation and Color Abnormality of Larval Japanese Flounder. *Fisheries Science*, 61 (1), 141-148.
- 9) Haga Y., Takeuchi T., Seikai T. (1999): Effect of retinoic acid on larval Japanese flounder, *Paralichthys oli-*

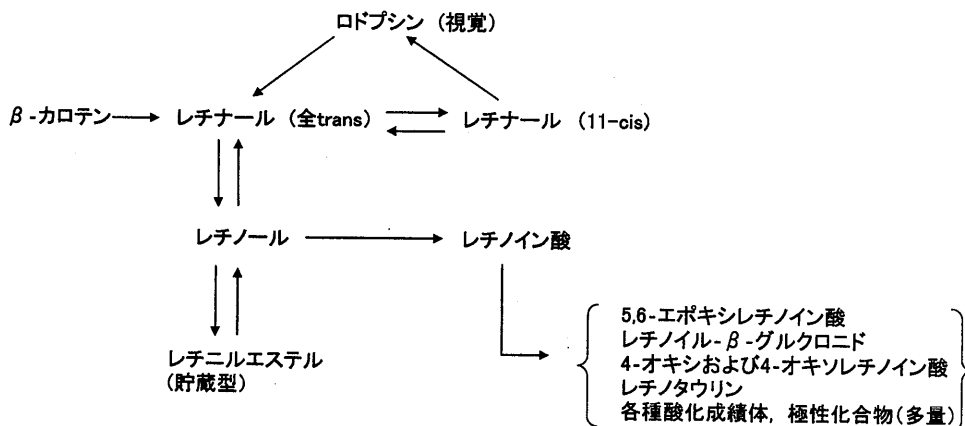


図 IV-1-6)-12 ビタミン A, プロビタミン A の存在形態とレチノイン酸の代謝
(ビタミンハンドブック 1 脂溶性ビタミン 日本ビタミン学会編 p.24 図 2-6)

vaceus, reared on *Artemia* nauplii. *Suisanzoshoku*, 47, 559-566.

- 10) Takeuchi T., Dedi J., Haga Y., Seikai T., Watanabe T. (1998) : Effect of vitamin A compounds on bone deformity in larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 169, 155-165.
- 11) Dedi J., Takeuchi T., Seikai T., Watanabe T., Hosoya K. (1997) : Hypervitaminosis A during Vertebral Morphogenesis in Larval Japanese Flounder. *Fisheries Science*, 63 (3), 466-473.
- 12) 日本ビタミン学会 (1989) : 2章 ビタミンA. ビタミンハンドブック1 脂溶性ビタミン. pp. 11-29.
- 13) Watanabe T., Tamiya T., Oka A., Hirata M., Kitajima C., Fujita S. (1983) : Improvement of dietary value of live food for fish larvae by feeding them on ω 3 highly unsaturated fatty acid and fat-soluble vitamins. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 49 (3), 471-479.

(2) ヒラメ稚魚の無眼側体色異常および脊椎骨異常出現におよぼすビタミンDの影響

芳賀 穰, 竹内俊郎, 村山靖之 (海洋大), 太田健吾, 福永辰廣 (日裁協)

ビタミンD₃および活性型ビタミンDを100g当り0.5mgまたは0.05mg添加した飼料を全長9.8±0.77mm(孵化後22日目)のヒラメ仔魚に28日間給餌した。その結果、孵化後70日目では活性型ビタミンD添加飼料区の魚の軀幹部に有意に黒化が出現した。また、全黒化は活性型ビタミンD区のみで見られた。さらに、ビタミンD₃区および活性型ビタミンD区において腹椎の湾曲率に有意差が見られた。これらの結果から、飼料中のビタミンD₃および活性型ビタミンDが黒化および脊椎骨異常を生じさせていると考えられた。

「Fisheries Science (2004) 70, 59-67.」から転載。

「末尾に本文を掲載してあるので参照」

(3) ヒラメ無眼側体色異常出現におよぼす飼料中の脂溶性ビタミン強化の影響

長谷川靖之, 竹内俊郎 (東水大), 板垣恵美子, 福永辰廣 (日裁協)

着定期以降の黒化発現におよぼすVAとVDの影響を検討することを目的に試験を行った。試験はVD含有量を同一にし、VA強化量を0, 1,500および9,000IU/100gとした3種類の試験飼料区、ならびに黒化発現に差異のある2社の市販飼料区を設け、20日令から給餌を開始し、全長20mm(ふ化後40日)および30mm(同, 50日)で黒化状況を観察した。その結果、VAを9,000IU/100g強化しても黒化発現を抑制できなかった。しかし、VD 20,000IU/100g強化区(試験飼料区)ではVD 6,640IU/100g以下区(市販飼料区)に比べて黒化

魚の出現率が高かった。また、市販飼料区の黒化魚の出現率を比較すると、VDをほとんど含まないY社の市販飼料区で正常個体出現率が高く、また成長に伴う黒化発現率の増加や着色部位の拡大は認められなかった。しかし、この市販飼料区では脊椎骨異常が高く、これはVAとVDのバランスあるいはVA以外の何らかの成分による可能性が示唆された。

「水産増殖 (1998) 46(2), 279-286.」から転載。

「末尾に本文を掲載してあるので参照」

2. 広島大学

(1) ヒラメ種苗の接触刺激による無眼側体色異常発現の抑制効果

川那 公士・難波 憲二

1) 底砂および接触刺激による無眼側体色異常発現の抑制効果 (平成12年度)

① 目的

ヒラメの黒化防除法の1つとして、着底完了後の種苗を育成する際に飼育水槽の底面に砂を敷いて飼育する砂敷き飼育が有効であることが知られている^{1)~5)}。しかし、砂敷き飼育が黒化を抑制する要因が無眼側への物理的刺激によるものか、潜砂することによるものかは解明されていない。砂に触れることのみで黒化が抑制されると仮定した場合、飼育水槽の環境維持が容易に行え、砂敷き飼育で発生する底質悪化などの問題点が解消されるのではないかと考えた。

そこで本試験では、砂との物理的な接触刺激のみによってヒラメの黒化が防除できるか否かを検証した。

② 方法

i) 供試魚

供試魚には、平成12年5月に(社)日本栽培漁業協会伯方島事業場で行われた種苗生産の過程で得られたもので、平均全長9.3mm(日齢21)までは生物餌料のみで飼育し、その後、アルテミア幼生と配合飼料を与えた平均全長12.4mm(日齢36)の仔魚を用いた。

ii) 試験区の設定

試験区の設定を表IV-2-1に示した。飼育試験には、内容積500ℓのFRP角型水槽を4個用いた。1区は水槽の底面と側面にFRP樹脂で砂(株式会社NORA, ミクロスセラミックMS0)を吹き付けたもの、2区は底面には通常の砂敷き飼育と同様に砂を敷き、側面にはFRP樹脂で砂を吹き付けたもの、3区は底面に砂を敷いただけのものとした。試験に用いた砂は全てふるいにかけ、粒径0.25~0.50mmの範囲で揃えた。砂を敷く場合の厚さは1~2cmとし、砂の吹き付けは0.36~0.49g/cm²の割合で行った。また、対照区として水槽の底面、側面ともに何も加工していないものを用意した。

iii) 飼育方法

飼育試験水槽は屋内に設置した。飼育水には濾過海水をあらかじめ別水槽で18℃に調温、曝気したものを使用した。1日の換水量は仔稚魚の成長に合わせ、9~15回転/日の範囲で適宜増加させた。飼育は自然日長下で行った。底掃除は毎日行い、その際に死亡個体も取り除いた。飼育水の温度、DO、pHは毎日測定し、水面上の照度は天候に応じて適宜測定した。

試験開始時には配合飼料（日清製粉株式会社、おとひめ）とアルテミア幼生（有限会社神戸物産、BIO-MARINE、北米産）を併用して与え、配合飼料に完全に餌付いた後は、配合飼料のみを与えた。なお、アルテミア幼生は高度不飽和脂肪酸強化用油（オリエンタル酵母工業株式会社、DHAce）で24時間強化した。

供試魚の収容密度は800尾/m³とし、放流サイズでもある平均全長60mmまで飼育した。試験終了時まで生残した全個体を取り揚げ、10%海水ホルマリンで固定した。後日、軟X線写真を撮影し、脊椎骨異常の発生状況を調査した。また、体形測定、黒化個体の出現状況の調査は固定1か月後に行った。

黒化個体の分類は水産庁基準の無眼側体色異常個体の類型化に準拠した。

その後、各試験区100尾ずつ無作為に抽出し、スキャ

ナでヒラメの無眼側を画像としてコンピュータに取り込み、画像解析ソフト NIH-Image を用いて鰭部分を除いた無眼側体表面全体の面積と黒化部位の面積をそれぞれ測定した。無眼側体表面全体の面積に対する黒化部位の面積の割合を「黒化率」とし、試験区間で比較した。黒化率(%) = [(黒化部位の面積)/(無眼側体表面全体の面積)] × 100

iv) 統計処理

体形測定、黒化出現状況、黒化面積測定、脊椎骨異常出現状況および生残率で得られた結果は、統計学的手法を用いて試験区間で比較した。解析には統計解析ソフト Stat View を用いた。体形測定結果の比較には ANOVA を用いた。黒化出現状況および脊椎骨異常出現状況の比較には Mann-Whitney's U-test を、黒化面積測定結果の比較には得られた黒化率の自然対数を取り ANOVA を用いて検定を行った。また、ANOVA により有意差が認められた場合は、Scheffe を用いて post-hoc test を行った。生残率の比較には chi-square test for independence を用いて検定を行った。

③ 結果

i) 成長、生残

飼育試験は、平成12年5月21日~7月8日までの49日間行った。全試験区とも順調に成長した。飼育期間中の

表IV-2-1 平成12年度 試験区の設定

試験区	底面	側面
1区	砂吹きつけ	砂吹きつけ
2郡	砂敷き	砂吹きつけ
3区	砂敷き	加工なし
対照区	加工なし	加工なし

使用した砂の粒径は全て0.25~0.50mm.

表IV-2-2 平成12年度 体形測定結果および生残率

試験区	全長 (mm)	体長 (mm)	体高 (mm)	体重 (g)	体高/体長	CF*	生残率 (%)
1区	59.8±6.0 ^a	50.0±5.1 ^a	18.8±1.8 ^a	1.55±0.44 ^a	0.38±0.01 ^a	12.2±1.1 ^a	52.5 ^{ab}
2郡	56.8±6.6 ^b	47.5±5.6 ^b	17.8±2.1 ^b	1.35±0.44 ^b	0.37±0.01 ^b	12.2±1.2 ^a	56.6 ^{ac}
3区	58.5±5.8 ^a	49.4±5.1 ^a	18.7±1.9 ^a	1.54±0.45 ^a	0.38±0.01 ^a	12.5±1.1 ^a	60.9 ^{ac}
対照区	64.1±5.1 ^c	54.0±4.3 ^c	20.9±1.7 ^c	2.04±0.46 ^c	0.39±0.01 ^c	12.8±0.9 ^b	45.5 ^{bd}

*CF=体重(g)/体長³(cm)×1000

値は全て平均値±標準偏差.

異なる上付き文字の付いた数値の間にはそれぞれ有意な差が認められた (p<0.01)

表IV-2-3 平成12年度 黒化パターン別出現状況

試験区	A (縁側部)					C (頭・胸部)			D (尾柄部)	
	正常*	±	+	++	+++	1	2	3	1	2
1区	50.2	42.8	7.0	0.0	0.0	58.5	0.0	93.4	100.0	0.0
2郡	45.4	46.5	6.7	1.4	0.0	89.4	0.0	97.5	100.0	0.0
3区	37.9	35.9	20.2	6.0	0.0	98.4	1.2	97.2	100.0	0.0
対照区	50.8	21.5	16.9	10.2	0.6	57.6	1.1	69.5	100.0	0.0

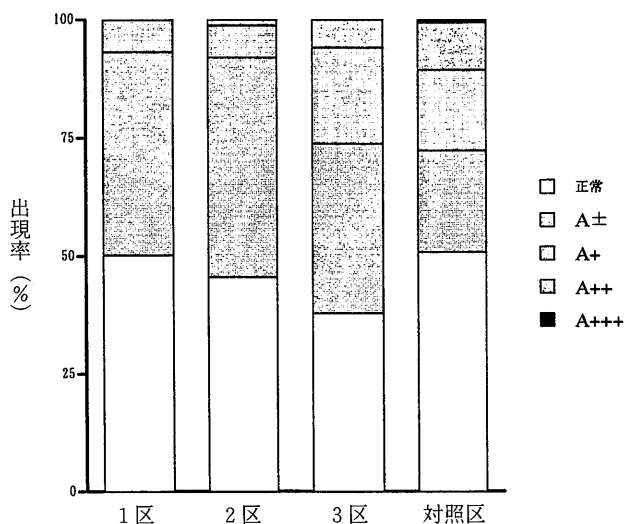
*正常は部位Aに黒化がないだけで、部位C、Dに黒化があるものも含む.

水温, DO, pH および照度はそれぞれ17.8~21.6℃, 6.5~7.4 mg/l, 8.00~8.10, 259~18940 lux であり, 各試験区ともほぼ同様の推移を示した。照度については日出時の値を示した。生残率は45.5~60.9%の範囲であった (表IV-2-2)。対照区は全試験区の中で最も低い生残率を示し, 統計的には2区および3区と対照区の間でそれぞれ有意な差がみられた ($p < 0.01$)。

体形測定結果を表IV-2-2に示した。対照区が他の試験区に比べ, 全長 (TL), 体長 (BL), 体高 (BH), 体重 (BW), 体高/体長 (BH/BL) 全ての項目において有意に大きい値を示した ($p < 0.01$)。肥満度 (CF) についても対照区が他の試験区よりも有意に大きい値を示した ($p < 0.01$)。

ii) 無眼側体色異常個体の出現状況

各試験区の黒化出現状況をパターン別に示した (表IV-2-3)。また, 黒化面積が大きく, 特に魚価への影響が大きいと思われる分類Aの黒化について試験区間で比較した (図IV-2-1)。1区は正常個体の出現率が50.2%とほぼ半数を占め, A±, A+の出現率がそれぞれ42.8%, 7.0%であり, A++以上の個体はみられなかった。2区は1区とほぼ同様の比率を示したが, 1区ではみられなかったA++の出現率が1.4%であった。3区は1区, 2区と比較し, 正常, A±の出現率がともに少なく, 代わりにA+, A++の割合がそれぞれ20.2%, 6.0%と多



図IV-2-1 平成12年度 部位Aにおける黒化個体出現状況

くみられた。対照区は更にA++の個体が多くみられ, 10%以上を占めるまでになった。また, 他の試験区では出現しなかったA++が0.6%ではあるがみられた。分類Aの黒化には1区と3区, 1区と対照区および2区と3区との間に有意な差がみられた ($p < 0.05$)。

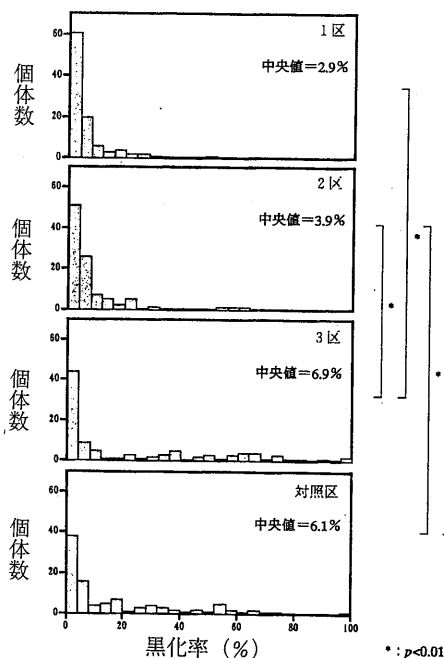
黒化率は全試験区とも0.0~4.0%のカラムにピークがみられた。しかし, 1区, 2区では, 黒化率が30%以上の個体がほとんどみられないのに対し, 3区および対照区では黒化率がさらに大きな個体が認められた (図IV-2-2)。黒化率には1区, 2区と3区, 対照区との間にそれぞれ有意な差がみられた ($p < 0.01$)。

iii) 形態異常個体の出現状況

各試験区の脊椎骨異常出現状況を表IV-2-4に示した。脊椎骨異常出現率は7.9~12.0%の範囲であり, 試験区による有意な違いはみられなかった。症状別にみると椎骨癒合が主であり, 異常個体出現率は腹椎よりも尾椎で高い値を示した。

④ 考察

本試験において, 底面や側面に砂を吹き付けた水槽で着底完了後のヒラメを飼育すると, 黒化の発現が抑制された。このことから砂敷き飼育の黒化を抑制する効果は



図IV-2-2 平成12年度 黒化率の頻度分布

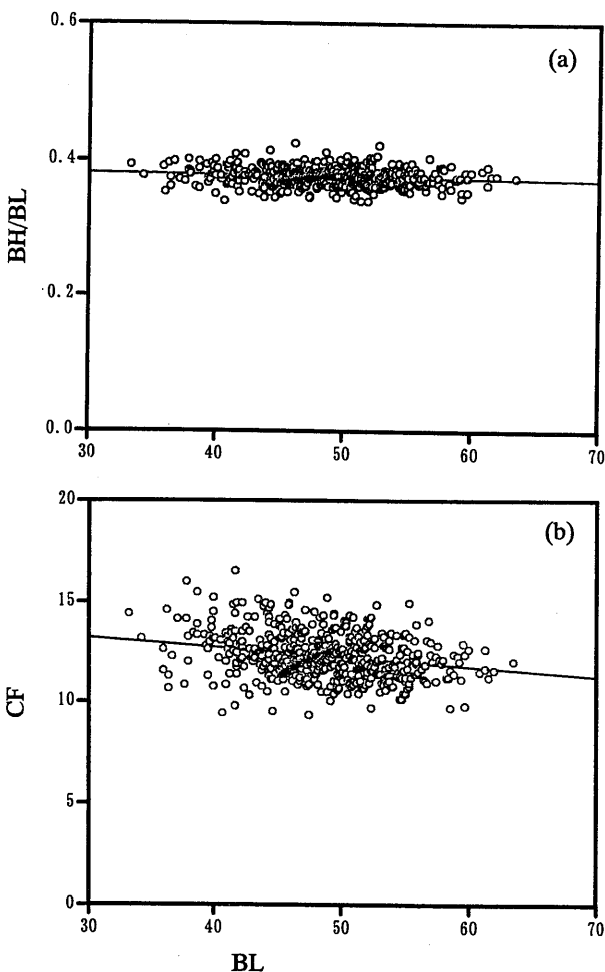
表IV-2-4 平成12年度 脊椎骨異常出現状況

試験区	個体数	正常 (%)	脊椎骨異常 (%)						
			合計	背側湾曲		腹側湾曲		癒合	
				腹椎	尾椎	腹椎	尾椎	腹椎	尾椎
1区	229	88.6	11.4	0.0	0.9	0.0	2.2	0.4	9.6
2区	284	88.0	12.0	0.0	0.0	0.0	1.4	0.0	11.6
3区	248	89.5	10.5	0.0	0.8	0.0	0.8	0.8	9.3
対照区	178	92.1	7.9	0.0	0.6	0.0	0.0	0.6	6.7

砂との物理的な接触刺激によるものであることが明らかになった。また、砂敷き飼育では、着底もしくは潜砂しているヒラメの黒化しか抑制できなかったのに対し、側面にも砂を吹き付けた水槽による飼育では、種苗生産のように高密度で飼育する際、水槽の側面につくヒラメの黒化も併せて抑制できる可能性が示唆された。

TL, BL, BH, BW および CF の全測定項目において対照区が最も大きな値を示した。その理由としては、対照区における生残率が全試験区の中で最も低かったことが挙げられる。今回の試験では、1日の給餌量を全試験区とも等量としているため、生残率の低い試験区では1尾あたりの餌の量が増加したことになる。対照区における生残率が最も低かった理由としては、他の試験区よりも大きな共食いの影響が考えられた。他の試験区と等量もしくは多量の給餌があったにもかかわらず、対照区の共食いが大きかったことから、ヒラメの共食い行動は砂の有無により大きな影響を受けていることが判明した。

BH/BL において1～3区の値は0.37～0.38であり、対照区の0.40と比べ、有意に低い値を示した。瀬戸内海区水産研究所より借用した平均全長43.0mmのヒラメ天然当歳魚のサンプルにおける BH/BL 値は0.38であった。



図IV-2-3 体長とBH/BL(a)および肥満度(b)の関係
 回帰直線： $y=0.426-0.001x$ (a)； $y=17.146-0.104x$ (b)

このことから砂との物理的な接触刺激によりヒラメの体形が細くなり、砂がない環境で飼育されたヒラメと比べて、天然魚の体形に近づくことが明らかとなった。

BH/BL と CF において1～3区と対照区の間のみられた有意差については飼育環境の違いによるものではなく、成長の違いによるものである可能性が考えられたので、取り揚げた時点でのヒラメのBLとBH/BLおよびCFとの関係を調べ、図IV-2-3に示した。その結果、BLが大きくなるに伴い、BH/BL、CFともに増加せず、逆にやや減少傾向にあった。このことからBH/BLとCFにおける1～3区と対照区との間の有意差は飼育環境の違いによるものであると考えられた。

また、脊椎骨異常の出現状況に試験区間で差異が認められなかったことから、砂との接触刺激により脊椎骨異常は抑制できないことが明らかとなった。

2) 形状およびサイズの異なる砂を用いた接触刺激による無眼側体色異常抑制効果 (平成13年度)

① 目的

平成12年度の試験において、砂との物理的な接触刺激により着底後のヒラメの黒化発現が抑制されることが確認された。一方で、水槽に設ける物理的刺激的形状やサイズを変化させることによってヒラメに与える刺激の大きさが変化し、それに伴い黒化抑制効果も変化することが予想される。

そこで本年度は、昨年度の再現性を確認するとともに、水槽に吹き付ける砂の形状およびサイズを変えることにより、黒化発現を抑制する効果がどのように変化するかを検証した。

② 方法

i) 供試魚

供試魚には、2001年4月に(社)日本栽培漁業協会伯方島事業場で昨年度と同様の飼育方法で行われた種苗生産の過程で得られた平均全長11.4mm(日齢28)の仔魚を用いた。

ii) 試験設定

試験区の設定を表IV-2-5に示した。飼育試験には、内容積500ℓの角型FRP水槽を5個用いた。水槽に吹き付ける砂はミクロスセラミックと珪砂の2種類を用い、粒径をそれぞれ0.25～0.50mm、1.00～1.40mmの2段階設定した(図IV-2-4)。1区をミクロスセラミック(粒径

試験区	砂の種類	粒径(mm)
1区	ミクロスセラミック	0.25～0.50
2区	ミクロスセラミック	1.00～1.40
3区	珪砂	0.25～0.50
4区	珪砂	1.00～1.40
対照区	加工なし	—

砂は水槽全面に吹き付けた。

0.25～0.50mm), 2区をミクロスセラミック(粒径1.00～1.40mm), 3区を珪砂(粒径0.25～0.50mm), 4区を珪砂(粒径1.00～1.40mm)とし, 各水槽の全面に吹き付けた。また, 対照区として昨年度と同様に水槽の底面, 側面ともに何も加工していないものを用意した。

iii) 飼育方法

飼育方法, 給餌方法, 取り揚げおよび各測定方法は基本的に昨年度に準じた。なお, 本試験においては光周期を明期12時間, 暗期12時間で行った。

黒化個体の分類方法および黒化面積の測定方法は昨年度の方法に準じた。

iv) 統計処理

体形測定, 黒化出現状況, 黒化面積測定, 脊椎骨異常出現状況および生残率で得られた結果は, 昨年度と同様に統計学的手法を用いて各試験区間で比較した。

③ 結果

i) 成長, 生残

飼育試験は, 平成13年5月7日～6月22日までの47日間行った。飼育1日目に対照区において33尾の死亡がみられた以外は各試験区とも順調に成長した。飼育期間中の水温, DO, pHおよび照度はそれぞれ17.6～19.8℃, 7.0～8.2 mg/l, 8.09～8.19, 170～340 luxであり, 各

試験区ともほぼ同様の推移を示した。照度については電照時の値を示した。先述した対照区における初期減耗は, 試験設定の違いによるものではなく, 収容時のハンドリングの影響だと考えられたので飼育3日目までの全試験区の死亡個体数は除外して生残率を計算した(表IV-2-6)。その結果, 62.8～82.4%の範囲で, 昨年度と同様に対照区が最も低い生残率を示した。統計的には2区と3区, 2区と対照区との間にそれぞれ有意差がみられた($p < 0.01$)。

体形測定結果を表IV-2-6に示した。TLの4区と対照区の間を除いてTL, BL, BH, BW, BH/BL, CFともに他の試験区と比べ, 有意に大きい値を示し($p < 0.01$), 昨年度と同様の結果を得た。

ii) 無眼側体色異常個体の出現状況

各試験区のパターン別黒化出現状況を表IV-2-7に示した。また, 黒化面積が大きく, 特に魚価への影響の強いと思われる分類Aの黒化について試験区間で比較した(図IV-2-5)。粒径の違うミクロスセラミックを吹き付けた1区と2区を比較すると, 粒径の大きい2区のほうがA±, A+の出現率が高くなり, 代わりにA++以上まで黒化が進行した個体が少なかった。同様に, 粒径の違う珪砂を吹き付けた3区と4区を比較した結果, 粒径

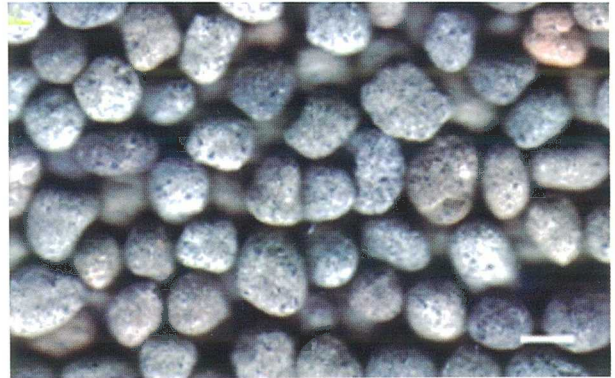
(a)



(c)



(b)



(d)



図IV-2-4 試験に用いた砂

(a)ミクロスセラミック(粒径; 0.25～0.50mm) (b)ミクロスセラミック(粒径; 1.00～1.40mm)
(c)珪砂(粒径; 0.25～0.50mm) (d)珪砂(粒径; 1.00～1.40mm) スケールバーは全て10mm

の大きい4区において黒化の進行度合が小さかった。また、同じ粒径のミクロスセラミックと珪砂を吹き付けた1区と3区、2区と4区を比較した結果、1区と3区ではほぼ同様の比率を示し、差異はみられなかったが、2区と4区では珪砂を吹き付けた4区において正常、A±の出現率が高く、代わりにA+以上の割合が低かった。対照区においては分類Aにおける正常、A±の出現率は1区と3区とほぼ同様の割合を示したものの、A++、A+++の出現率は全試験区の中で最も高い値を示した。統計的にも1～4区と対照区、1～3区と4区、1区と2区および2区と3区との間でそれぞれ有意な差がみられた ($p < 0.01$)。

次に黒化率について比較した。各試験区の黒化率のピークはそれぞれ1区が44～48%、2区が8～12%、3区が20～24%、4区が4～8%のカラムにみられた(図IV-2-6)。対照区においては出現率が全体にばらついており、明らかなピークはみられなかった。統計的には、対照区と1～4区の間で有意な差がみられた ($p < 0.01$)。また、1区と2区、1区と4区および3区と4区との間にも有意差がみられた ($p < 0.01$)。

iii) 有眼側体色異常個体の出現状況

白化個体の出現率は1.5～6.2%と全試験区とも10%未満で低い値を示した。統計的には1区と2区、1区と4区、3区と4区との間で有意な差がみられたが、最も高い白化率を示した4区においても6.2%と低い値を示しているので問題となる値ではないと考えられた。

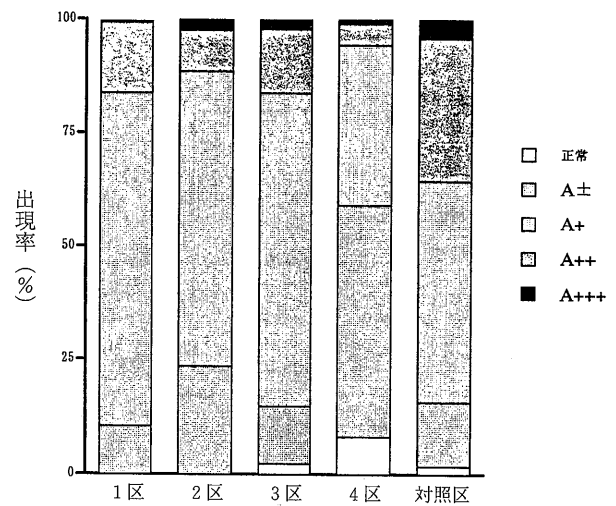
iv) 形態異常個体の出現状況

各試験区の脊椎骨異常出現状況を表IV-2-8に示した。

異常個体出現率は17.5～30.2%で、昨年度と比較すると、全体的に異常出現率が増加した。症状別にみると脊椎癒合が主であり、その出現率は腰椎よりも尾椎において高い傾向にあった。異常個体出現率は2区よりも3区、4区および対照区のほうが有意差に高い値を示した。また、両顎不整合という昨年度ではみられなかった症状がみられたが、本試験においては観察結果を併記するだけに留めた。

④ 考察

今回の試験においても、1～4区と対照区との間における黒化出現状況に違いがみられ、砂との物理的な接触刺激により着底完了後のヒラメの黒化発現を抑制することが再確認された。



図IV-2-5 平成13年度 部位Aにおける黒化個体出現状況

表IV-2-6 平成13年度 体形測定結果、生残率および白化率

試験区	全長 (mm)	体長 (mm)	体高 (mm)	体重 (g)	体高/体長	CF*	生残率 (%)	白化率 (%)
1区	55.7 ± 6.8 ^a	47.0 ± 5.7 ^a	17.9 ± 2.0 ^a	1.30 ± 0.40 ^a	0.38 ± 0.02 ^a	12.2 ± 1.2 ^a	76.2 ^{ab}	1.5 ^a
2区	54.9 ± 6.7 ^a	46.3 ± 5.7 ^a	17.6 ± 2.0 ^a	1.25 ± 0.39 ^a	0.38 ± 0.01 ^a	12.3 ± 1.3 ^a	82.4 ^{ac}	3.3 ^{bcd}
3区	55.2 ± 6.5 ^a	46.4 ± 5.5 ^a	17.7 ± 2.0 ^a	1.26 ± 0.38 ^a	0.38 ± 0.01 ^a	12.3 ± 1.2 ^a	73.6 ^{bd}	1.8 ^{ad}
4区	56.1 ± 6.1 ^{ab}	47.1 ± 5.2 ^a	18 ± 1.9 ^a	1.32 ± 0.38 ^a	0.38 ± 0.02 ^a	12.3 ± 1.3 ^a	75.9 ^{ab}	6.2 ^{ce}
対照区	57.7 ± 6.2 ^b	48.7 ± 5.2 ^b	19.3 ± 2.0 ^b	1.54 ± 0.42 ^b	0.4 ± 0.02 ^b	13.1 ± 1.3 ^b	62.8 ^{bd}	3.0 ^{abc}

*CF=体重 (g)/体長³(cm)×1000

値は全て平均値±標準偏差。

異なる上付き文字の付いた数値の間にはそれぞれ有意な差が認められた ($p < 0.01$)。

表IV-2-7 平成13年度 黒化パターン別出現率 (%)

試験区	A (縁側部)					C (頭・胸部)			D (尾柄部)	
	正常*	±	+	++	+++	1	2	3	1	2
1区	0.0	10.4	73.4	15.8	0.3	100.0	42.1	100.0	100.0	80.0
2区	0.0	23.8	64.8	9.2	2.3	100.0	33.2	100.0	99.7	61.3
3区	2.1	12.7	69.0	14.2	2.1	99.7	37.7	100.0	100.0	82.5
4区	8.2	51.1	35.1	4.9	0.7	99.0	19.3	100.0	100.0	46.9
対照区	1.6	14.0	49.0	31.5	3.9	99.2	81.7	100.0	100.0	52.9

*正常は部位Aに黒化がないだけで、部位C、Dに黒化があるものも含む。

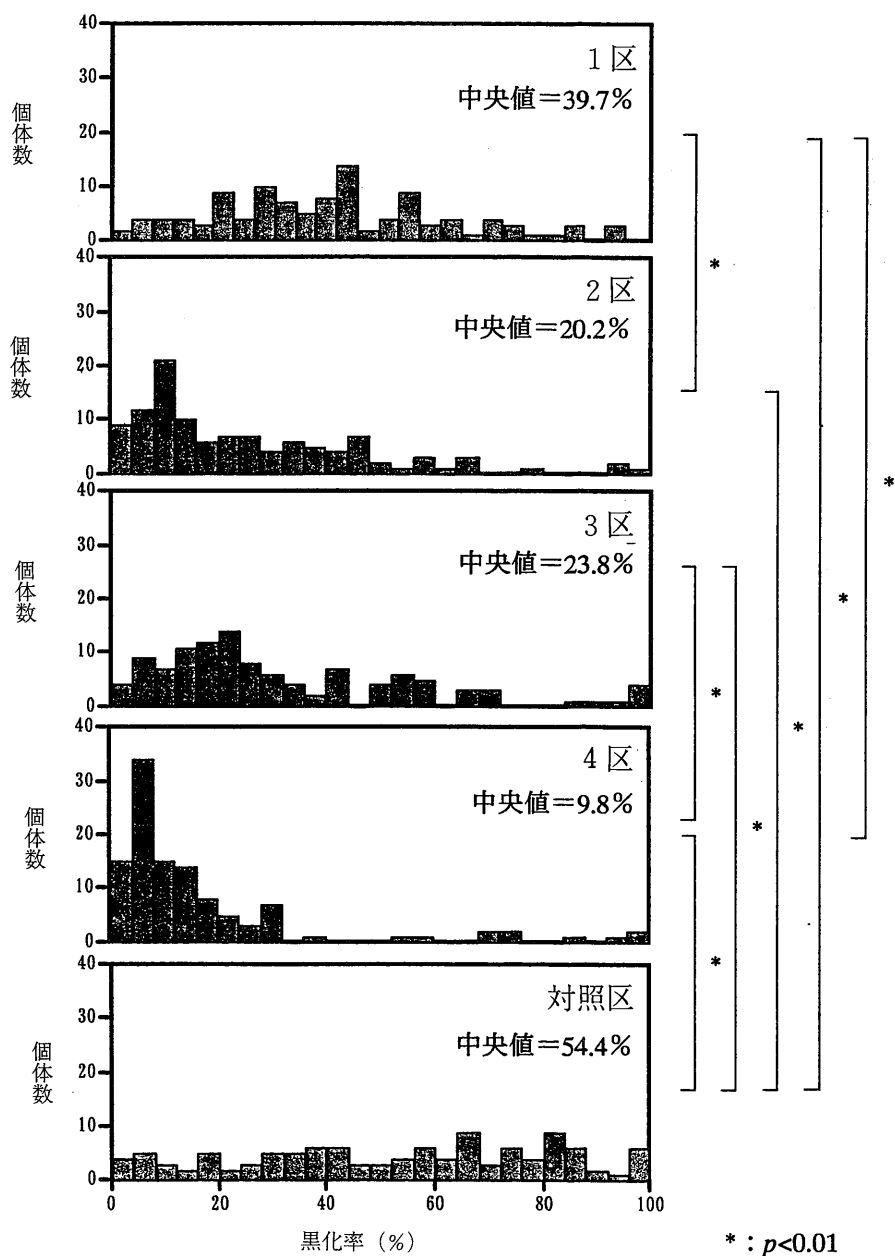
また、飼育水槽の吹き付けに使用した砂の種類については、ミクロスセラミックに比べ珪砂を吹き付けた区のほうが分類Aにおける黒化の進行度合、黒化率のいずれ

においても、有意に低い値を示した。これらのことからミクロスセラミックよりも珪砂のほうが高い黒化抑制効果を示すことが明らかとなった。粒径が0.25~0.50mm

表IV-2-8 平成13年度 脊椎骨異常出現率

試験区	個体数	正常 (%)	脊椎骨異常 (%)						両顎不整合 (%)	
			合計	背側湾曲		腹側湾曲		癒合		
				腹椎	尾椎	腹椎	尾椎	腹椎		尾椎
1区	340	79.1	20.9 ^{ab}	0.3	0.9	0.6	1.8	7.4	12.4	30.9
2郡	360	82.5	17.5 ^{ac}	0.3	2.5	0.6	0.8	1.7	12.8	36.1
3区	337	73.0	27.0 ^{bd}	1.2	0.3	0.9	0.3	11.3	18.1	37.1
4区	325	72.3	27.7 ^{bd}	0.0	0.3	0.9	0.9	11.7	18.8	36.6
対照区	262	69.8	30.2 ^{bd}	0.4	2.3	1.5	3.4	6.9	22.9	40.1

異なる上付き文字の付いた数値の間にはそれぞれ有意な差が認められた ($p < 0.01$)



図IV-2-6 平成13年度 黒化率の頻度分布

においてはミクロスセラミックと珪砂の間に差異がみられなかったことについては、形状の違いによる物理的な刺激の違いをみるには粒径が小さすぎたと考えられる。

飼育水槽の吹き付けに使用した砂の粒径については、ミクロスセラミック、珪砂のどちらにおいても粒径0.25～0.50mmを吹き付けた区よりも粒径1.00～1.40mmを吹き付けた区ほうが高い黒化防除効果を示すことが判明した。よって、今回行った試験の範囲においては、粒径1.00～1.40mmの珪砂のような角張った形状のもの（図IV-2-4）を吹き付けることで、最も高い黒化抑制効果を示すことが明らかになった。

また、体形測定した結果、昨年度と同様の結果が得られ、今回の試験においても対照区において生残率の低下に伴い全長、体重ともに大きな値を示すことおよび砂との物質的な刺激によりヒラメの体形がスリムになることの再現性が確認された。

引用文献

- 1) 岩田仲弘, 菊池弘太郎, 吉田岳志. ヒラメ稚魚の無眼側黒化に対する飼育環境の影響. 電力中央研究所研究報告 U95002 1995 ; 1-19.
- 2) 福永辰廣. ヒラメの無眼側体色異常防除技術開発の現状—日裁協プロジェクトチーム試験結果—. 平成10年度栽培漁業技術研修事業基礎理論コース 仔稚魚期の発育シリーズ No.12 1998 ; 1-46.
- 3) Cunningham T. An experimental concerning the absence of color from the lower sides of flat-fishes. Zoolog. Anzeiger 1891 ; 14 : 27-32.
- 4) Cunningham T. Reseaches on the coloration of the skins of flat-fishes. J. Mar. Biol. Assoc. 3 (N. S.) 1893 ; 111-118.
- 5) Conningham T. Additional evidence on the influence of light in producing pigments on the lower sides of flat fishes. J. Mar. Biol. Assoc. 4 (N. S.) 1895 ; 53-59.

V. ヒラメ種苗生産機関における黒化個体の出現状況および魚価等の調査

1. 魚市場での魚価等に関するアンケート調査

(1) 目的

ヒラメ黒化出現要因と防除技術開発を進める上で、全国の種苗生産機関のヒラメ種苗生産技術（中間育成を含む）の現状認識、魚市場におけるヒラメ体色異常個体（白化魚、黒化魚）の扱われ方や魚価等の現状認識が必要になったことから、アンケートによりその実態把握を目的に行った。

(2) 方法および結果

アンケートは平成7年12月に、全国の種苗生産機関でヒラメ種苗生産を実施している道府県の32機関に送付し、平成8年2月までに26機関からの回答があった。

ここでは回答のあった26機関に日裁協の4事業場を加えた30機関のアンケートを取りまとめた結果を報告する。

なお、この取りまとめ結果については、栽培技研1999:24(2)に掲載してあるので、ここでは黒化についてのみ取りあげる。

1) 天然魚の魚価

天然魚（正常魚）の魚価について、活魚・鮮魚に分けて、安値、高値、年平均値について設問した。回答のあった18機関のうち15機関に記載があり、その結果を表V-1-1に示した。

活魚では安値で600～4,000円/kg、高値で4,000～15,000円/kg、年平均値は2,000～9,000円/kgの範囲にあり、平均的には4,505円/kg（安値平均2,132円、高値平均8,187円）となる。

鮮魚では安値で300～4,000円/kg、高値で2,000～10,000円/kg、年平均値で1,152～4,300円/kgの範囲にあり、平均的には2,776円/kg（安値平均1,400円、高値

平均5,031円）となる。

このことから、漁獲サイズ・漁獲時期などの違いがあるにしても地域による価格の差が非常に大きいことが推察される。

2) 無眼側体色異常魚（黒化魚）の魚価

魚市場における黒化魚の扱いおよび重度・軽度の黒化魚の魚価について活魚と鮮魚に分けて設問した。

① 水揚げの有無

18機関で記載があり、その結果を表V-1-2に示した。「水揚げなし」という機関はない。「すべて水揚げする」が16機関、「黒化の程度によって水揚げする」が2機関である。ただし、「すべて水揚げする」と回答した機関でも漁協（市場）によっては「黒化の程度によって水揚げする」となっているところもある。

② 水揚げする場合の魚価

黒化の軽度・重度の基準については14機関で記載があり、その結果を表V-1-3に取りまとめて示した。12機関で軽度・重度を区別しており、概して、体幹周辺部の縁側などの目立たない部分に黒化がみられる場合を軽度、体幹部に黒化がみられる場合を重度と判断している。

活魚

15機関で記載があり、その結果の取りまとめを表V-1-2に、各県代表市場の平均単価を図V-1-1に、また正常魚に対する黒化魚の魚価割合を図V-1-2に示した。

軽度な黒化魚の魚価は、安値で500～4,000円/kg、高値で2,000～11,000円/kg、年平均値で1,000～9,000円/kgの範囲にある。

重度な黒化魚の魚価は、安値で400～4,000円/kg、高値で2,400～8,000円/kg、年平均値で1,766～7,000円/kgの範囲にある。

表V-1-1 県別の天然魚の単価

機関名	活魚 (円/kg)			鮮魚 (円/kg)		
	平均	安値	高値	平均	安値	高値
TO	2,000	1,000	4,000	1,400	800	2,000
IW	2,588	600	4,950			
TK	2,994	1,087	6,591	1,152	406	2,447
AO	3,467	1,600	10,000	2,509	400	5,522
EH	3,500	2,000	4,500	1,800	1,000	2,500
SI	3,500	2,000	7,000	2,500	1,000	3,500
NI*1	3,900	2,500	6,200	3,000	1,000	6,000
IS*2						
HY	4,615	1,300	15,000	3,547	300	10,000
IB	5,000	1,500	13,000	2,600	800	8,000
KC	6,000	4,000	10,000	3,000	2,000	5,000
HI	6,000	4,000	6,000	4,000	3,000	5,000
MI	6,000					
FU	9,000	4,000	11,000	4,300	4,000	4,500
OK				3,500	2,100	5,900
最安	2,000	600	4,000	1,152	300	2,000
最高	9,000	4,000	15,000	4,300	4,000	10,000
平均	4,505	2,132	8,187	2,776	1,400	5,031

*1, 30-40cmサイズの鮮魚では平均、安値、高値は2000円、1000円、3500円。

*2, H3-4年調査では30-40cmサイズで天然4200円。

黒化魚の扱いについては、「天然魚と同様に扱われる」が2機関（わずかに割安と記載）があるが、残りの機関の地域では価格差別がみられる。5機関では重度な黒化魚の場合のみ価格差別があり、天然魚（正常魚）の3～8割の価格で扱われている。2機関では黒化の軽重によって割り引く程度が異なり、軽度の場合は天然魚（正常魚）の6、7割、重度の場合は天然魚（正常魚）の5、6割の価格で扱われている。5機関では黒化の軽重に関係なく割り引かれ、天然魚（正常魚）の4～8割の価格で扱われている。残り1機関は軽度な黒化魚のみの記載で天然魚（正常魚）の5割の価格で扱われている。

このことから、軽度な黒化魚は15機関中8機関で価格差別を受け天然魚（正常魚）の4～8割の価格、重度な黒化魚は14機関中12機関で天然魚（正常魚）の3～8割の価格で買い叩かれているという現状にある。

鮮魚

13機関で記載があり、その結果の取りまとめを表V-1-2に、各県代表市場の平均単価を図V-1-3に、また正常魚に対する黒化魚の魚価割合を図V-1-4に示した。

軽度な黒化魚の魚価は、安値で200～4,000円/kg、高値で1,400～5,000円/kg、年平均値で700～4,300円/kgの範囲にある。

重度な黒化魚の魚価は、安値で406～3,500円/kg、高値で2,000～5,000円/kg、年平均値で1,152～4,000円/kgの範囲にある。

黒化魚の扱いについては、「天然魚と同様に扱われる」が活魚と同じ2機関（わずかに割安と記載）であるが、残りの機関の地域では価格差別がみられる。3機関では重度な黒化魚の場合のみ価格差別があり、天然魚（正常魚）の7～9割の価格で扱われている。5機関では黒化

の軽重に関係なく割り引かれ、天然魚（正常魚）の3～8割の価格で扱われている。残り3機関は軽度な黒化魚のみの記載で天然魚（正常魚）の4～8割の価格で扱われている。

このことから、軽度な黒化魚は13機関中8機関で価格差別を受け天然魚（正常魚）の3～8割の価格、重度な黒化魚は9機関中7機関で天然魚（正常魚）の3～9割の価格で買い叩かれているという現状にある。

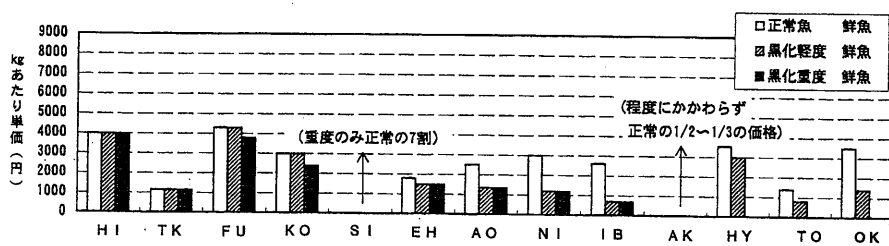
2. 太平洋北区のヒラメ種苗生産機関における黒化個体の出現状況（宮古事業場）

(1) 経緯

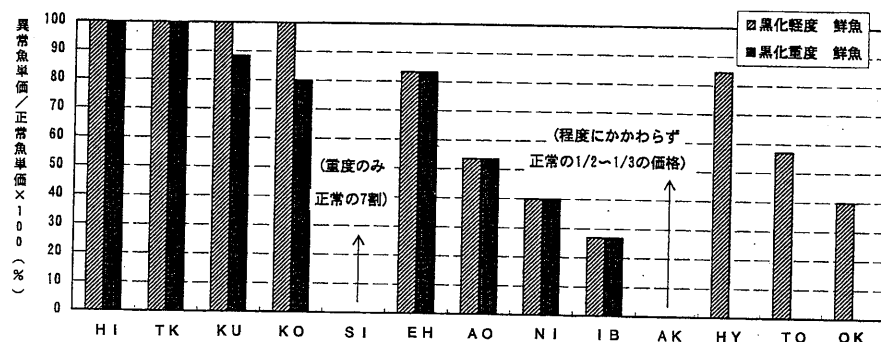
太平洋北区6道・県（北海道、青森県、岩手県、宮城県、福島県、茨城県）では漁獲された放流魚の黒化が魚価の低下などを引き起こしており、その対策が大きな課題となっていた。そこで、平成12年度太平洋北区栽培漁業協議会技術部会において、太平洋北区各機関におけるヒラメ黒化個体の出現状況およびその影響を検討した。また、日裁協宮古事業場（現 宮古栽培漁業センター）が黒化個体の出現防除の一環として、太平洋北区各機関からサンプルを収集し、観察することを提案し了承された。以下に平成13年～15年度の間に行われた観察結果について概要を記す。

(2) 目的

- 本観察の目的は以下の3点である。
- ・各生産機関においていつ、どのようなことが原因で黒化が生じているかを検討する。
 - ・種苗を一元的に、同一の基準で観察する。



図V-1-3 各県別の黒化魚の軽重度による平均単価の違い（鮮魚）



図V-1-4 各県別の黒化魚の正常魚に対する平均価格割合（鮮魚）

VI. 総合考察

ヒラメの無眼側体色異常（黒化）には大きく2型が存在し、すでに変態完了時に無眼側への着色が起こっている場合と、変態完了後に無眼側への着色が起こる場合がある。本チームでは、成長ステージに併せて、黒化試験の開始サイズを浮遊期（～Fステージ）、着底期前期（移行期）（G～Hステージ）、着底期後期（Iステージ、変態完了後）として黒化発現要因の把握および防除技術開発の試験を行ってきた。平成7～平成14年度の8カ年間の試験で得られた成果（表VI-1）について取組み課題ごとに考察した。

(1) 飼育環境の影響

青海¹⁶⁾は平均全長40mmの人工種苗（両面体色正常個体と白化個体）および天然稚魚を用いた光照射試験（水槽底面で1,500 lx）で、黒化の発現は、粒径0.5～1.0mmの砂（厚さ3 cm）敷きの有無に関らず人工種苗の白化個体>人工種苗の体色正常個体>天然魚の順に着色が容易に起こりやすく、砂敷きの有無では砂敷きの方が着色個体率および平均着色面積率の増加は穏やかであったと報告している。岩田ら¹⁹⁾は種苗生産されたヒラメ稚魚を材料に水槽底面が透明アクリルで砂敷き（粒径0.5～1.0mm）の有無と照度に明暗をつけた試験、飼育水槽底面の影響試験（底面黒色、物理刺激-黒色紙ヤスリ、透明砂、砂敷きの厚み等）を行い、供試魚によって黒化がしやすいあるいは出にくい、黒化の部分が異なる等の差異が見られたことから種苗の前歴（仔魚期の飼育方法）の影響があること、さらに潜砂できる条件であれば無眼側から光を照射しても黒化は生じなかったことから黒化に影響を与える環境要因は光ではなく、潜砂が可能か否かの方が重要であるとしている。

黒化発現の飼育環境要因の1つと考えられる照度について、浮遊期（Fステージ以前）から照度を3,000 lx以上に保つ明条件と200 lx以下の暗条件を設定して人工照明下で飼育を試みた。その結果明条件で飼育した方が、全長20mmでの黒化個体の出現状況は軽減される傾向にあり、さらに着底期以降も照度条件の変動によって黒化個体の出現状況が異なることがうかがえた。これは初期ワムシの摂餌量の調査から明条件の仔魚がワムシを多く摂餌しており、黒化発現には仔魚の順調な成長を促すことも重要であることを示し、浮遊期の飼育には仔魚の摂餌に影響をおよぼさない程度の照度（3,000 lx）は必要である。

Iステージからの照度および底砂敷きの試験結果では、遮光した場合（水槽表面照度平均1,000 lx）は、水槽色（透明および黒色）の影響はないが、遮光しなかった場合（水槽表面22,000 lx）では、Aパターンの体幹中央

部に黒化を発現させる可能性があること、水槽底面に砂（粒径0.2～0.9mm）を敷くことにより黒化個体の出現率の軽減および黒化部位拡大を抑制する効果のあることが示唆された。このことから着底期後期（Iステージ）以降の飼育は少なくとも明るいところでの飼育は避け、1,000 lx前後の遮光条件下で行うことが肝要と思われる。

青海⁸⁾は全長20～25mmのクローンヒラメを用いた飼育でセラミック粒子（MS：ミクロス菌を封入したセラミック粒子）を底に敷いた場合では硫化水素の発生が少なく、残餌量による底質悪化を招かないことから潜砂にも有効な素材であると述べている。このことからマイクロセラミック（MS）を使用して黒化防除に対する有効性を再確認するためより大きな規模で、MS敷きの開始時期、MSの利用方法を検討したところ、配合飼料に餌付いていない全長13mm（Gステージ）では、ミクロス菌の残餌の分解能を過大評価しすぎるあまりに残餌の滞留による還元層が発生し、潜砂できない個体が出現していることから黒化防除の効果は明らかにされなかった。全長20mmサイズ（Iステージ）からの使用では、水槽底に若干還元層が形成されたが、黒化防除効果が認められた。全長30mmから利用した場合、還元層の形成はなかったがほとんど防除効果は認められなかった。このことから少なくともMSを利用する場合は、配合飼料に十分に餌付いた全長20mmからの利用が望ましいと考えられた。しかし大型水槽でMSの有効性に関する試験を行ったが、前述したような還元層の形成により、底質が悪化し、黒化発現を助長する結果を招いた（未発表）。大規模に利用する場合には、十分にMSの底質浄化能力を勘案して、飼育水の注水、排水方法や給餌、残餌量を検討していく必要があるだろう。

変態完了後の黒化発現に砂敷き、MS敷きの防除効果が認められたが、水槽底の川砂使用の飼育では残餌や汚物で底質環境を悪化させ飼育管理が難しいとされている。岡村²³⁾は、光を遮光した巡流システム水槽に砂を敷くことにより、高密度で安定した中間育成と併せて黒化防除を可能にしている。マリノフォーラム21との共同研究で砂敷飼育での底質悪化を防止する粒径選別機底清掃システムの開発では生残率の向上と黒化発現の防除効果を検証でき、かつ砂敷きの状態であれば黒化発現は全長60～70mmを境に、それ以降新たな発現はないこともわかった。一方、広島大学との共同研究で飼育水槽の全面に砂を張り付けるだけでも黒化を抑制する効果が高いことが認められ、黒化防除効果は潜砂よりも砂との物理的な接触刺激であることを明らかにした。また、MSのような球型のものよりも角張った珪砂の方が高い黒化防除効果を示し、粒径が0.25～0.50mmの砂よりも1.00～

表VI-1 黒化防除技術開発試験の成果一覧

		全長 (mm)	10	15	20	25	30	35	40	(評価)
大課題		成長 (ステージ)	~F><		G><		H><		I~	
環境			20		30					(△)
		光：遮光下 (1,000lx) では黒化出現に対する光の影響は少ないが、照度が高いと体幹中央部に黒化出現。 底砂：底面の砂敷により黒化個体出現率を軽減できる。								
密度		光：ふ化仔魚から全長20mm (Iステージ) まで暗条件 (1,000 lx以下) より、明条件 (3,000lx以上) で飼育した方がより黒化個体の出現率を軽減できる。	10	20						(△)
		20mmサイズからのMS敷砂により黒化防除効果あり ：広大成果 (砂敷き、砂張り付け、体型の変化天然に近い) ：MF21成果砂敷き効果あり、黒化発現は全長60~70mmまでに決定される。	13	20						(◎)
配合飼料		飼育密度の黒化個体出現率に対する影響は少ない。	13	20						(×)
		低密度 (1,000尾/m ²) ほど黒化個体の出現率、部位の面積を軽減する。								(△)
配合飼料		メーカの違い：全長20mm以降でX社配合飼料の黒化個体出現率が高い (X, Y, Z社) (栄養分析結果ではX社配合飼料にはビタミンDの含有量が多いことが判明。	13	20						(◎)
		Ar-Nと配合飼料の給餌比率：仔魚1尾当りのAr-Nの給餌量を多く、配合飼料の給餌率を抑えることで黒化個体の出現率が軽減される。	13	20						(◎)
		給餌開始サイズ：給餌開始サイズを大きくするほど、黒化個体出現率が軽減される。黒化個体出現率は開始サイズの全長10mmと12mmの間で大きく変化する。全長11mm (Gステージ) からの配合給餌がよい。 給餌量と成長差：給餌量を少なくし、成長が順調でない場合、黒化発現が生じやすい (Gステージ~)。	8	10	12					(◎)
ビタミン		VA：F~GステージにおいてVAの過剰な取り込みは黒化と形態異常発現要因となる。	10	12	20					(◎)
		VD：全長11mmからVDを20,000IU/100g以上含有した配合飼料では黒化 (特に尾柄部) 発現がみられる。								(△)
		VD：商品価値を下げる体幹部の黒化発現に大きな影響はない。 VD ₃ ：活性型ビタミンDは黒化発現及び脊椎骨異常に影響を与える。								(△)
生物飼料		Ar-N：DHA強化、フェオダクテラムによる強化は黒化発現に関与しない。	13	20						(×)
		浮遊期のワムシのDHA栄養強化量は黒化発現に関与しない。	12						(×)	
ストレス		9	15	20						(×)
		輸送ストレスは輸送後の成長が順調であれば黒化発現に関与しない。								(×)

(評価) ◎：黒化防除への影響大きい △：多少影響する ×：影響要因ではない

1.40mmの砂を張り付けた方が黒化発現を抑制する効果が高いことが示唆された。さらに砂敷きや砂張りの水槽で飼育した場合、種苗の体型が天然魚に近いスマートな体型になることが明らかとなった。

以上のことから、変態完了後のヒラメの黒化発現防除対策として、水槽底面の砂敷きあるいは砂を水槽壁全面に張り付けることが有効であることが検証できた。今後は中間育成における黒化発現防除対策の1つとして実証化を図ることが重要と考える。

(2) 飼育密度の影響

近年のヒラメ種苗生産技術の向上とともに、飼育密度の高い生産が行われている²⁴⁾。飼育密度の違いと黒化発現状況の関係についての研究報告は少ない。本試験結果から、着底が完了したIステージ(全長20mm)以降の飼育密度の高低はその後の黒化発現に影響をおよぼす要因ではないことが示された。しかし、着底期前期にあたるGステージ(全長13mm)の仔魚を用いた試験では、収容密度の高い区ほど黒化個体の出現率が高く、黒化パターンの出現状況でも商品価値の低下につながる縁側および体幹部(A)が重度となる傾向がみられ、特に収容密度が20,000尾/m³と1,000尾/m³の間で黒化個体の出現状況に大きな違いが認められた。

青森県栽培漁業振興協会¹⁸⁾は、全長11mm(浮遊期)と全長15mm(着底期前期)の仔魚を供した試験の終了時の稚魚の黒化は、いずれも低密度(2,500尾/m³, 5,000尾/m³)ほど黒化面積が小さく、黒化も軽度であったと報告し、また高橋も全長11.5mmの仔魚を供した密度試験において着底完了個体の無眼側の体色正常率は低密度(1,000尾/m³)ほど高いことを指摘している。

このようにGステージ前後の成長段階の飼育密度は、黒化発現におよぼす重要な要因の1つであることが示唆され、黒化発現を抑制するためにはGステージの飼育密度は少なくとも5,000尾/m³以下に調整することが望ましい。ヒラメ仔稚魚はGステージを経て変態完了し、着底するが底面槽に対して、尾数が多いと着底期できない異常な飼育環境におかれ、かなりのストレスが加わっている可能性もある。青海ら²⁵⁾はストレス応答ホルモンの1つであるACTH分泌において昂進状態が持続すると無眼側黒化の進行に影響すると述べている。このことと関連しているのかもしれないとしているが、黒化発現を誘因する理由については今後明らかにする必要がある。

(3) 飼餌料の影響

1) 製造メーカーの違い

大量かつ安価なヒラメの種苗生産が可能となっているが、その理由の一つに人工配合飼料の利用技術の発展が上げられ、それとともに種苗生産における餌料種類がワムシ・Ar・N・配合飼料の3種と簡素化されて効率よい

生産が可能となっている。

しかし、冒頭で述べたように種苗放流において生産された種苗の黒化の発現が大きな問題となっているが、その要因として青森県栽培漁業振興協会¹⁸⁾が、使用する市販配合飼料の製造メーカーにより黒化個体の出現状況が異なることを指摘したのをはじめ、多くの機関でその影響が問題視されている。本試験では、それを明確にするために3社(X, Y, Z)の市販配合飼料を用いて検討した。着底期前期の仔魚(Gステージ)を供し、全長40mmまで一貫して同じメーカーの配合飼料を用いて飼育した場合、全長20mmでは黒化個体の出現率、黒化パターンの出現状況には差がなく、全体的に正常個体が多かったが、全長30mmではX社のみ黒化面積割合1/2以上の個体が出現し、その出現率も成長するにつれ増加し、縁側と体幹部(A)の黒化の割合も重度な個体が多かった。Y, Z社では黒化個体の出現率は増大したが、黒化面積割合1/2以下の個体であり、黒化の割合も軽度であった。また、Iステージ(全長20mm)からX社とY社を入れ替えて給餌した場合にも、X社の配合飼料は全長20mm以降において黒化発現を助長する可能性が示唆された。一方、全長20mmまではいずれの試験においても正常個体の出現率が高く、かつ黒化の割合も軽度であったが、浮遊期にX社の配合飼料を使用することにより、岩田ら¹⁹⁾のいう黒化になりやすい性質が着底完了した時点で形成されていた可能性もうかがわれる。以上のことから、配合飼料の使用に当ってはその栄養成分組成を可能な限り把握し、黒化個体の出現状況を比較した上で、使用する配合飼料メーカーを選択する必要がある。

3社の市販配合飼料の栄養分析結果(表VI-2)では、黒化個体の出現率の高かったX社ではVD含有量が他の2社に比べ20~30倍多く含まれ、VAとVCが少なかった。竹内¹³⁾は活性型VDが骨の石灰化に関係する機能があるが、魚類は水中のCaを直接鰓から吸収できるのでVDの要求量は低いとしている。一方、金沢⁴⁾は白化防除にはDHAを含むリン脂質および脂溶性のVA, VDが極めて有効であるとしている。体色異常の発現機構⁵⁾からVDが黒色素細胞の分化に関与している可能性があることを指摘している。これらのことから、配合飼料に含まれるVD量やVDの栄養強化の多寡は黒化発現に影響をおよぼすことが考えられた。

2) ビタミンD

前記の分析結果を受け、本試験では配合餌料に含まれるVDの影響について、Y社を基本飼料としてVDを過剰(20,000 IU/100g)に添加した試験飼料、およびX社を基本飼料としたVDの過剰試験飼料を用いて検討したが、その結果過剰区は対照区と大きな差はないものの、部分的な黒化発現が認められた。しかし、黒化発現を促すほど大きな要素ではないと思われた。同時に東京水産大学との共同研究でVDの黒化発現におよぼす影響につ

いて取り組み、配合飼料から摂取されたVDはヒラメ変態期の仔魚は代謝能力が低い可能性から、VDの代謝活性物質であるVD活性体(1, 25(OH)₂D₃)に着目して実験を行った。その結果VD活性体を強化した試験区で黒化個体の出現率が対照区より有意に高くなり、VD活性体が黒化発現に関与していることが示唆された。またF～Gステージで高濃度のVAを与えると形態異常だけでなく、黒化発現にも影響をおよぼすことを明らかにした。このように黒化個体の出現要因の1つとしてVAおよびVD活性体が影響していることが明らかとなったが、黒化発現に対するVAおよびVD活性体の作用機序の解明が今後の課題であろう。

X社の配合飼料の栄養分析結果では、当初黒化個体出現率の高かったX社の配合飼料中のVDの含有量が平成7年度よりもかなり少なくなり、メーカー側の配合飼料の開発の後がうかがえる。

配合飼料はいずれのメーカーについてもその年度、月毎の出荷ロットにより、栄養成分が異なると言われている。また、配合飼料にはそれぞれの製造メーカーにより栄養成分組成の特色がある。黒化発現や脊椎骨異常個体の出現防除の点から事前に配合飼料の成分組成を可能な限り把握して利用することが必要であろう。

3) Ar-Nと配合飼料の給餌比率と給餌開始サイズ

配合飼料製造の技術の進展に伴い、浮遊期からの使用が可能になった。高橋¹⁷⁾は、浮遊期型異常(着底期までの飼育で生じる黒化発現)の防除には飼育密度を極力下げ、かつ配合飼料の給餌を控えて生物餌料の給餌比率を増すことにより黒化個体の出現が軽減できるとした。後者の因果関係を検証するため、Gステージの仔魚を用いて、配合飼料とAr-Nの給餌比率に関する試験を行った。着底完了した全長20mmで評価した場合、体色正常個体の出現率はAr-Nのみで飼育した区が94%で最も高

く、配合飼料の給餌率が高く、かつAr-Nの個体当りの給餌量が少ない区が19%となり、両者間で明らかに差がみられた。このことから浮遊期における配合飼料の多寡が黒化発現に関係あることが明確になった。

配合飼料の給餌と黒化発現の因果関係が示唆されたことから、次に浮遊期段階のどのサイズが最も影響を受けやすいかについて調べ、配合飼料の給餌開始サイズが全長10mmと12mmを境に黒化個体の出現率、黒化パターンが大きく変化し、給餌開始が遅いほど黒化発現が抑制されることを明らかにした。青海⁶⁾は、色素細胞の分化過程および発現機構から白化発現の決定時期は変態初期の全長8～10mmの間にあると推定しているが、黒化発現についても決定時期がほぼ同様と仮定すれば、本試験結果の説明がつく。この時期に配合飼料を給餌することにより配合飼料に含まれるVDおよびVAの含有量が平行的に給餌する生物餌料の栄養強化と併せて過剰になり、無眼側の色素細胞の分化過程を阻害し、黒化発現を引き起こす要因となることが推察される。Ar-Nを単独使用した場合、無眼側の体色は正常個体が大半を占め、黒化個体の出現率は低い。生物餌料の利用が変態完了時の黒化発現を防除することは事実であり、この理由を明らかにすることも黒化個体の出現要因を究明する上で重要な課題である。

本試験では、一方、黒化個体の出現率が低かった年度の配合給餌量を基本に、人為的に成長に負荷をかけるために給餌量を減らした試験を行った結果、浮遊期(Dステージ)から成長の遅れた試験区ほど黒化発現の度合いが顕著となる傾向が認められた。このことは何らかの成長阻害にあい順調な成長がなされない場合には、黒化個体の発現の要因になりうることを示唆している。近年実施した太平洋北区の黒化個体の出現状況の調査では、茨城県の温水養魚協会が極めて高い無眼側の体色正常個体を

表VI-2 年度別のX・Y社配合飼料の栄養分析の結果

項目	単位	X社配合飼料				Y社配合飼料			
		7年度	9年度	10年度	11年度	7年度	9年度	10年度	11年度
一般組成									
粗タンパク質	% ^{*1}	63.2	54.5	54.5	60.4	60.4	26.8	56.3	54.0
粗脂肪	% ^{*1}	16.8	20.5	20.4	13.9	12.1	13.5	11.5	14.1
粗灰分	% ^{*1}	9.7	8.6	8.3	9.0	14.2	14.1	13.0	12.6
ビタミン含量									
ビタミンA	IU/100g ^{*2}	1,830	0.28	1,200	1,430	9,230	3.1	11,200	9,430
ビタミンC	mg/100g ^{*2}	117	378	2,600	2	1,140	1,270	1.53	1,420
ビタミンD	IU/100g ^{*2}	32,300	1,520	1,720	2,500	1,120	1,030	1150	1,330
ビタミンE	mg/100g ^{*2}	93.7	115	94.3	100	160	149	150	131
脂肪酸含量									
EPA	g/100g ^{*1}	1.5	1.7	1.2	1.2	1.5	0.5	1.4	1.8
DHA	g/100g ^{*1}	1.7	2	2.0	1.6	1.9	2.3	1.8	1.7
Σn-3HUFA	g/100g ^{*1}	4.6	4	3.5	2.9	4.7	4.3	3.4	3.7

*1: 乾物重量換算

*2: 湿物重量換算

生産している。ここでは他の機関よりも飼育水温を高くし、浮遊期において Ar-N 給餌量の増大および配合飼料の早期給餌を行っていることから他の機関に比べて成長が早いことが特徴である。つまり、飼育水温、給餌量、給餌方法により、ヒラメ仔魚の成長速度を適切に維持し、順調に成長させることが、変態過程を正しい機序で経過することとなり、強いては黒化個体の出現を防除することにつながっていると考えられる。

(4) 生物餌料の栄養強化

種苗生産する上で生物餌料の栄養強化は、順調な成長および生残率の向上のためには必要不可欠であると考えられている。A～Gステージの浮遊期の仔魚に給餌するワムシの DHA 強化および Ar-N の DHA およびフェオの栄養強化試験を行い、その結果、全長20mmサイズでは全般的に黒化個体の出現は低率であり、浮遊期の DHA による栄養強化およびフェオの栄養強化と黒化発現の関連性は少ないと思われた。VD と VA については前述したが、伯方島事業場の Dステージを用いた試験ではワムシへの VA、VD 強化量が過剰になった場合には形態的な弊害を生じること、黒化発現を誘引することが考えられた。これらのことから黒化個体の出現防除には、給餌するワムシの VA、VD の強化量を軽減することが肝要と思われ、また、Gステージまで給餌するワムシへの DHA 強化量が十分であれば VA、VD の強化は不要の可能性もあり、今後再検討する必要がある。

(5) ストレスの影響

小浜事業場と宮津事業場が同じロットの種苗を用いた試験で黒化個体の出現状況、黒化パターンの出現度合に相違がみられ、この要因として小浜から宮津までの輸送によるストレスが考えられた。このため輸送によるストレスを種苗に負荷し、黒化個体の出現状況の違いを検討した。その結果、輸送ストレスを加えても黒化個体の出現状況には違いは認められず、Fステージの仔魚は数時間程度の短期的な輸送ストレス等の負荷ではその後の黒化発現には影響しないことが示唆され、両場の黒化発現の相違については別の角度からの検討が必要とされた。

(6) 現状での有効な防除対策

これまでの知見および本試験結果から、黒化個体の出現防除対策として以下のことが考えられる。

1) 浮遊期型異常 (全長 3～12mm A～Fステージ) の防除対策

① Ar-N と配合飼料の給餌比率において、仔魚の 1尾当りの Ar-N の給餌量を多くして、配合飼料の給餌比率を抑えることが重要である。また、配合飼料の給餌開始サイズは全長10mmと12mmを境に黒化個体の出現率、黒化パターンが大きく変化することから、全長

11mm以降からの給餌が望ましい。

- ② 飼育水温、給餌量、給餌方法により、ヒラメ仔魚の成長速度を適切に維持し、順調に成長させ、変態過程を正しい機序で経過させることが肝要である。
- ③ 初期ワムシの摂餌量の調査から明条件の仔魚がワムシを多く摂餌しており、黒化発現には仔魚の順調な成長を促すことも重要であることを示し、浮遊期の飼育には仔魚の摂餌に影響をおよぼさない程度の照度 (3,000 lx) は必要であろう。
- ④ 給餌するワムシ、Ar-N の栄養強化で VA、VD の強化量は軽減することが肝要であり、Gステージまで給餌するワムシへの DHA 強化量が十分であれば VA、VD の強化は不要の可能性がうかがえる。

2) 着底期前期まで (全長13～20mm未満までの飼育、G～Iステージ) の防除対策

- ① Gステージ前後の成長段階の飼育密度は、黒化発現におよぼす重要な要因の1つであることが示唆され、黒化発現を抑制するためにはGステージの飼育密度は少なくとも5,000尾/㎡以下に調整することが望ましい。
- ② 配合飼料を使用するに当っては着底完了時の種苗が黒化になりやすい性質を持つ可能性があることから、着底完了後の黒化に影響をおよぼす配合飼料の使用を軽減する必要がある。

3) 着底期後期 (全長20mm～、Iステージ以降～) の防除対策

- ① 着底期後期 (Iステージ) 以降の飼育は少なくとも明るいところでの飼育は避け、1,000 lx 前後の遮光条件下で行うことが肝要である。
- ② 変態完了後のヒラメの黒化発現防除対策として、水槽底面の砂敷きあるいは砂を水槽壁全面に張り付けることが有効である。MS を利用する場合は、配合飼料に十分に餌付いた時点からの利用が望ましいと考えられるが、大規模に利用する場合には、十分に MS の底質浄化能力を勘案して、飼育水の注水、排水方法や給餌、残餌量を検討していく必要がある。
- ③ 配合飼料はいずれのメーカーについてもその年度、月毎の出荷ロットにより、栄養成分が異なると言われており、また、配合飼料にはそれぞれの製造メーカーにより栄養成分組成の特色がある。黒化発現や脊椎骨異常個体の出現防除の点から事前に配合飼料の成分組成を可能な限り把握して利用することが必要であろう。

(7) 今後の課題および問題点

- ① ヒラメについては放流効果の実証および事業化段階に来ており、これまでに得られた黒化防除技術の知見を種苗量産・中間育成の現場に応用し、防除技術の実証化を図ることが重要である。
- ② 水槽底面の砂敷きや水槽内面の砂の張り付けによる黒化発現防除効果が明確になり、無眼側の皮膚と砂の

接触刺激が黒化発現を抑えることに関係していると思われた。このことについて細胞学的な見地から究明する必要がある。飼育水槽の表面仕上げ（内面の砂の張り付け）は容易な方法であると思われるが、底面砂敷きの場合、砂敷き状態で長期育成を行うと底質環境の悪化による生残率の低下、防除効果を低減させる可能性がある。砂敷きによる環境悪化の防除手法（巡流式育成方法、粒径選別型底清掃装置の導入等）、あるいは底質環境の悪化を招かない素材の利用技術等を検討する必要がある。

- ③ Gステージの飼育密度を下げることによって黒化発現を抑制できることが分かったが、取り揚げ密度も踏まえその理由を明確にする必要がある。
- ④ 輸送以外のストレッサーと黒化発現との関連性の有無を明確にする必要がある。
- ⑤ 太平洋北区関係の近年の黒化個体の出現状況を調査し、種苗生産、中間育成段階において、体色の正常な個体が多く生産されるようになっている。体色異常個体の出現が少ない機関の優良事例を参考に、再現性試験を行うと共にこれまでの体色異常防除技術で得られた知見を合わせて体色異常防除技術を確立する必要がある。

要約

- ① 平成6年度の栽培漁業技術開発推進事業全国協議会において、技術開発の重要な課題の1つとして「ヒラメ黒化個体の出現要因の究明および防除技術開発」が求められ、これを受けて、平成7年度からこの防除技術の確立を目的に、日裁協の本種の種苗生産を行っている4事業場でプロジェクトチームを結成して、それぞれの役割分担を明確にして技術開発に取り組んだ。一方、黒化防除に関する基礎的な要因（要素）の究明にあたっては東京海洋大学および広島大学と共同研究を行った。
- ② 課題の取り組みに当り、体色異常出現型には浮遊期型異常、着底期型異常に分け、さらに着底期型異常を前期（G～Hステージ）と後期（Iステージ以降）に分けて技術開発を実施した。試験方法は各事業場の試験結果が横並びに比較できるように飼育方法の条件設定および標本の観察方法について可能な限り統一して行った。
- ③ 浮遊期（～Fステージ以前）からの照度3,000 lx以上に保つ明条件と200 lx以下の暗条件を設定して人工照明下で飼育を試みたところ、明条件で飼育した方が、全長20mm時点での黒化出現状況は軽減される傾向が認められ、さらに着底期以降も照度条件の変動によって黒化出現状況が異なり、黒化防除効果まで至らなかったものの、黒化出現状況とやや関連性があることがうかがえた。
- ④ 餌料に関する飼育試験で配合飼料の給餌サイズと黒化出現状況の調査では、全長10mmと12mmの間で黒化出現状況に大きな違い認められ、黒化防除には配合を全長11mm以降から給餌すると効果があり、また、Ar-Nの給餌は全長15mmまで併用給餌した方が黒化度合は軽度であった。また、配合飼料にVDの添加量を変えた試験で、VD含有量により部分的な黒化出現状況に若干の関連性が認められたが、黒化発現を促す程の大きな要因ではなく、栄養成分のバランスが黒化出現に影響した可能性を推察した。また、東水大との共同研究で黒化発現の要因として、VDの活性体が関与している可能性を示した。
- ⑤ 浮遊期における生物餌料の栄養強化でDHA強化量を過剰投与（増強30%イカリン脂質）に設定して試験を行ったが、黒化出現状況において、DHA無添加区と違いは認められなかったが、白化率の出現状況で大きな差が認められた。Ar-NのフェオおよびDHA強化の検討を行ったが、黒化出現状況には差は認められなかった。しかし、高濃度のVAを取り込ませると仔稚魚に形態的な弊害が生じた。
- ⑥ 底質浄化材のMSに黒化防除効果と適切な砂敷時期サイズについて検討したところ、配合飼料に餌付いた全長20mmサイズからその防除効果が高いことが認められた。しかし、なぜ砂敷飼育することで防除効果があるのか不明であった。このことについて、広島大学との共同研究により、砂敷飼育における潜砂でなく、接触刺激で防除効果があること、さらに砂敷きや砂の張りの水槽で飼育した場合、種苗の体型が砂を施さない飼育の種苗に比べ天然魚に近いスマートな体型になることが判明した。
- ⑦ 着底期前期の飼育密度と黒化出現状況の関連性を調査したところ全長13mm前後、Gステージから高密度（20,000尾/m²）試験区で黒化出現が顕著に認められ、Gステージ以降の飼育において飼育密度が黒化発現におよぼす要因の1つであることが示され、着底期前期での飼育密度を低く抑えることが肝要と考えられた。
- ⑧ 配合飼料の製造メーカーの違いによる黒化出現状況を調査したところ、X社製の配合飼料を給餌すると黒化出現が増大し、配合飼料メーカーが黒化発現に関与していることが示された。栄養分析を行い比較したところ、VDが他社より20～30倍多く、VAが少ないことが判明した。
- ⑨ 配合飼料の給餌量を変え人為的に成長差を生じさせたところ黒化出現状況の調査から成長の鈍化は黒化発現を高める要因になる可能性が示唆された。
- ⑩ 全長8mmから全長20mmの種苗に輸送ストレスをそれぞれ付加し、黒化発現状況との関連性を調べたところ、短期的な輸送ストレスは黒化発現に影響をおよぼさないことが示された。

- ⑪ 着底期後期の育成環境では、晴天時遮光しないと体幹中央に黒化が発現することが認められた。また、Iステージ以降では育成密度は黒化発現に大きな影響を与える要因でないことが示された。
- ⑫ これまでの黒化防除試験に考察を加えて、現状の有効な黒化防除対策と今後の問題点および課題について示した。

引用文献

- 1) 原田輝雄, 楳田 晋, 村田 修, 熊井英水, 水野兼八郎: ヒラメの人工ふ化仔魚の飼育とその成長について. 近大水研報, 1, 49-54 (1966).
- 2) 水産庁・日裁協: 平成13年度栽培漁業種苗生産, 入手・放流時実積 (全国). (2003).
- 3) 清水大介: 全国の種苗生産および放流の状況について. さいばい, 106, 59-68 (2003).
- 4) 金沢昭夫: 平成2年度健苗育成技術開発研究成果の概要, 異体類種苗の白化個体の出現防止のための超微粒子飼料の作成および白化個体出現機構の解明. 水産庁研究部研究課, 6-91 (1990).
- 5) 青海忠久: 異体類人工種苗における白化個体の出現機構に関する研究. 京都大学農学部学位論文, p.193 (1989).
- 6) 青海忠久: ヒラメの種苗生産時にみられる体色異常. 平成3年度栽培漁業技術研修事業基礎理論コース 仔稚魚期の発育シリーズNo.2, 1-37 (1991).
- 7) 青海忠久: 異体類人工種苗の体色異常の発育に関する研究. 平成元年度健苗育成技術開発研究成果の概要, 水産庁研究部研究課, 1-12 (1990).
- 8) 青海忠久: 体色・形態異常と育成環境の関係解析. 平成8年度健苗育成技術開発委託事業年度末報告会実施機関報告書, (1996).
- 9) 青海忠久: 体色・形態異常と育成環境の関係解析. 平成9年度健苗育成技術開発委託事業年度末報告会実施機関報告書, (1997).
- 10) 藤井良三: 異体類白色化についての基礎研究. 健苗育成技術開発委託事業報告書 (昭和58. 59. 60年度), 1-36 (1986).
- 11) 青海忠久: ヒラメの生物学と資源培養, 5. 体色異常発現機構. 水産学シリーズ112, 恒星社厚生閣刊, 63-73 (1997).
- 12) 鈴木伸洋: 養殖ヒラメ無眼側皮膚の微細構造とその体色異常性の組織学的検討. 南西水研報, 27, 113-128 (1994).
- 13) 竹内俊郎: 魚類における栄養素の欠乏症と要求量, 平成3年度栽培漁業技術研修事業基礎理論コース 仔稚魚期の発育シリーズNo.4, 1-68 (1991).
- 14) 北部日本海ブロック種苗生産研究会: 北部日本海ブロックにおけるヒラメ種苗生産技術の現状. 日本水産資源保護協会, 水産増養殖叢書33, 1-110 (1984).
- 15) 高橋庸一: ヒラメの種苗生産における体色異常個体の出現と防除. 日裁協特別研究報告, 3, 1-50 (1992).
- 16) 青海忠久: ヒラメ幼魚の無眼側着色におよぼす光照射, 有眼側の体色, および供試魚の由来の影響. 水産増殖, 39, 173-180 (1990).
- 17) 高橋庸一: ヒラメ稚魚の無眼側の体色異常におよぼす飼育密度と飼餌料の影響. 日水誌, 60, 593-598 (1994).
- 18) 青森県栽培漁業振興協会: ヒラメ無眼側体色異常の出現防除対策への取り組みについて: 平成6年度太平洋北区栽培漁業協議会技術部会資料, 1-5 (1994).
- 19) 岩田仲弘・菊池弘太郎・吉田岳志: ヒラメ稚魚の無眼側黒化に対する飼育環境の影響. 電力中央研究所研究報告U95002, 1-19 (1995).
- 20) 岩本明雄・大河内裕之・津崎龍雄・福永辰廣・北田修一: 魚市場の全数調査に基づく宮古湾のヒラメ種苗放流効果の推定. 日水誌, 64, 830-840 (1998).
- 21) 加治俊二・福永辰廣: ヒラメ種苗生産の現状と体色異常の魚市場での価格に関するアンケート結果について. 栽培技研, 27 (2), 67-101 (1999).
- 22) 南 卓志: ヒラメの初期生活史. 日水誌, 48 (11), 1581-1588 (1982).
- 23) 岡村正裕: ヒラメ種苗の敷砂と流速を用いた無眼側体色異常防除. 新潟県沿岸漁業振興協会日裁協 ヒラメ黒化防除に関する情報交換会資料, 1-2 (1997).
- 24) 福永辰廣: 総説 (特集ヒラメ) ヒラメ種苗生産の現状. 水産増殖, 34 (4), 391-394 (1990).
- 25) 青海忠久, 金子豊二, 田川正朋, ヒラメ幼魚の無眼側黒化に関する内分泌的検討, 日本水産学会秋季大会講演要旨集, 54 (429) (1999).

Ⅶ. 参考文献

ヒラメ無眼側体色異常（黒化）

1. 長谷川靖之, 竹内俊郎, 板垣恵美子, 福永辰廣. ヒラメ無眼側体色異常出現におよぼす飼料中の脂溶性ビタミン強化の影響. 水産増殖 1998; 46(2): 279-286
2. 青海忠久. ヒラメの無眼側黒化はなぜ出現するか. 養殖 2000; 458: 92-95
3. 青海忠久. ヒラメ幼魚の無眼側の着色におよぼす光照射, 有眼側の体色および供試魚の由来の影響. 水産増殖 1991; 39(2): 173-180
4. 鈴木伸洋. 養殖ヒラメ無眼側皮膚の微細構造とその体色異常性の組織学的検討. 南西海区水産研究所研究報告 1994; 27: 113
5. 高橋庸一. ヒラメ稚魚の無眼側の体色異常におよぼす飼育密度と飼餌料の影響. 日本水産学会誌 1994; 60(5): 593-598
6. 杉山元彦, 矢野豊. ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) 稚魚の両側体色発現におよぼすチオウレアの影響について (短報). 水産庁養殖研究所研究報告 1989; 16: 109-112
7. 福永辰廣. 底砂洗浄装置を使ったヒラメの中間育成と黒化防除. アクアネット 2000; 3(6): 48-53
8. 竹内俊郎. ヒラメ体色異常のメカニズムと防除法. アクアネット 1999; 2(10): 48-52
9. 高橋隆行. 海産仔稚魚の栄養管理ノート 5 海産魚類の変態とヒラメ体色異常. アクアネット 2000; 3(8): 58-64
10. Haga Y, Takeuchi T, Seikai T. Influence of all-trans retinoic acid on pigmentation and skeletal formation in larval Japanese flounder. *Fisheries science* 2002; 68(3): 560-570
11. Seikai T, Hirose E, Matsumoto J. Dual appearances of pigment cell from in vitro cultured embryonic cells of Japanese flounder: an implication for a differentiation-associated clock. *Pigment cell research* 1993; 6: 423-431
12. Seikai T, Matsumoto J, Shimozaki M, Oikawa A, Akiyama T. An association of melanophores appearing at metamorphosis as vehicles of asymmetric skin color formation with pigment anomalies developed under hatchery conditions in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Pigment cell research* 1987; 1: 143-151
13. 福永辰廣. ヒラメの無眼側体色異常個体の防除技術開発の現状. さいばい 1998; 86: 24-33
14. 加治俊二, 福永辰廣. ヒラメ種苗生産の現状と体色異常魚の魚市場での価格等に関するアンケート結果に

ついて. 栽培技研 1999; 24(2): 67-101

15. 福永辰廣. ヒラメの無眼側体色異常防除技術開発の現状-日栽協プロジェクトチーム試験結果-. 平成10年度栽培漁業技術研修事業基礎理論コース 仔稚魚の発育シリーズNo.12 日本栽培漁業協会 東京
16. 青海忠久, 金子豊二, 田川正朋, ヒラメ幼魚の無眼側黒化に関する内分泌的検討. 日本水産学会秋季大会講演要旨集 1999; 54

ヒラメ有眼側体色異常（白化）

1. 青海忠久. ヒラメ白化個体の出現機構と防除. 水産増殖 1990; 38(4): 394
2. Seikai T. Process of pigment cell differentiation in skin on the left and right sides of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, during metamorphosis. *Japanese journal of ichthyology* 1992; 39(1): 85-92
3. 福所邦彦, 山本剛史, 青海忠久. ヒラメの白化個体出現におよぼす飼育中の通気量の影響 (短報). 養殖研究所研究報告 1986; 10: 53
4. 青海忠久. 人工採苗ヒラメの体色異常に関連した初生鱗の発生様式. 魚類学雑誌 1980; 27(3): 249-255
5. 三木教立, 谷口朝宏, 浜川秀夫. ヒラメの白化出現におよぼす脂溶性ビタミン類投与ワムシの効果 (予報). 水産増殖 1988; 36(2): 91-96
6. 三木教立, 谷口朝宏, 浜川秀夫. 脂溶性ビタミン投与ワムシによるヒラメ白化防除と好適ビタミン量. 水産増殖 1989; 37(2): 109-114
7. 三木教立, 谷口朝宏, 浜川英夫, 山田幸男, 桜井則広. ビタミンA投与ワムシ給餌によるヒラメ白化防除. 水産増殖 1990; 38(2): 147-155
8. 田畑和男. ヒラメの白化現象の遺伝的要因の一考察. 水産増殖 1991; 39(1): 29-36
9. 中村弘二, 飯田遥. ヒラメの白化とリボフラビン含量との相関について. 日本水産学会誌 1986; 52(7): 275-1280
10. 山本剛史, 福所邦彦, 岡内正典, 田中秀樹, agata W D, 青海忠久, 渡邊武. ヒラメの白化個体出現におよぼす変態期の餌料の影響. 日本水産学会誌 1992; 58(3): 499-508
11. 福所邦彦, 難波秀博, 山本剛史, 山崎芳恵, 李明哲, 他. ヒラメ白化防除のためのマダイ卵の効果的給餌法. 水産庁養殖研究所研究報告 1987; 12: 1-8
12. 福所邦彦. 応用技術 人工採苗ヒラメの白化現象と防除法 (上). 水産の研究 1990; 9(2): 42-46
13. 福所邦彦. 応用技術 人工採苗ヒラメの白化現象と防除法 (中). 水産の研究 1990; 9(5): 62-69

14. 福所邦彦. 応用技術 人工採苗ヒラメの白化現象と防除法 (下). 水産の研究 1991; 10(1): 55-57
15. 青海忠久, 篠田正俊. アルテミア給餌期間を異にした人工採苗ヒラメの体色異常出現率の変異. 京都府立海洋センター研究報告 1981; 5: 29-38
16. 生田哲郎. ヒラメの人工種苗に発現する着色不完全個体の幼魚期における着色の進行. 京都府立海洋センター研究報告 1981; 5: 39-45
17. 中西雅幸, 藤田真吾. アルテミアと天然動物プランクトンの併用給餌および養成アルテミア給餌によるヒラメ稚魚の白化個体出現率の減少. 京都府立海洋センター研究報告 1986; 10: 25-34
18. 川村芳浩, 永山博敏, 吉岡力男, 武田雷介. ヒラメの白化防除に有効なシオミズツボムシの脂溶性ビタミン類による強化濃度の検討. 兵庫県立水産試験場研究報告 1990; 27: 33-38
19. 里森修, 堀江康浩. ヒラメ体色異常個体出現原因究明試験. 和歌山県水産増殖試験場報告 1984; 15: 10-16
20. 里森修. ヒラメ体色異常個体出現原因究明試験-II. 和歌山県水産増殖試験場報告 1985; 16: 30-40
21. 尾田正, 萱野泰久. 研究報告 ヒラメの白化個体出現におよぼす微粒子飼料の影響. 岡山県水産試験場報告 1986; 1: 80-84
22. 尾田正, 萱野泰久. 研究報告市販配合飼料がヒラメ仔稚魚の成長, 色素発現, 脊椎骨形成におよぼす影響. 岡山県水産試験場報告 1988; 3: 41-46
23. 山本章造, 尾田正. 研究報告 ヒラメ仔稚魚の生残, 成長および体色異常の出現におよぼす配合飼料の効果. 岡山県水産試験場報告 1991; 6: 100-108
24. 尾田正, 萱野泰久. 調査研究報告 ヒラメの白化個体出現におよぼす生物餌料の影響. 岡山県水産試験場事業報告書 1985; 59: 65-70
25. 武智昭彦, 森実庸男, 小泉喜嗣. 人工種苗ヒラメの白化個体出現におよぼす飼育密度の影響. 愛媛県水産試験場研究報告 1986; 4: 44-51
26. 中本幸一. 1990年度水産増殖地域研究集会講演要旨 ヒラメの産卵とふ化稚仔の白化におよぼす日周期の影響について. 水産増殖 1990; 38(4): 387
27. 杉山元彦, 中野広, 矢野豊, 福田雅明, 村上直人. 異体類の健苗育成に関する研究 1 白化等の異常個体出現率におよぼす注水量の影響について. 北海道区水産研究所研究報告 1985; 50: 63
28. 高橋庸一. ヒラメの種苗生産における体色異常個体の出現と防除 体色異常防除試験結果報告. 日本栽培漁業協会特別研究報告 3号 (1986~1989年)
29. Kanazawa A. Nutritional mechanisms involved in the occurrence of abnormal pigmentation in hatchery-reared flatfish. *Journal of the world aquaculture society* 1993; 24(2): 162-166
30. Estevez A, Kaneko T, Seikai T, Dores R M, Tagawa M, Tanaka M. Ontogeny of ACTH and MSH cells in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) in relation to albinism. *Aquaculture* 2001; 202(1-2): 131-143
31. Seikai T, Shimozaki M, Watanabe T. Estimation of larval stage determining the appearance of albinism in hatchery-reared juvenile flounder *Paralichthys olivaceus*. *Nippon suisan gakkaiishi* 1987; 53(7): 1107-1114
32. Seikai T, Watanabe T, Shimozaki M. Influence of three geographically different strains of *Artemia* nauplii on occurrence of albinism in hatchery-reared flounder *Paralichthys olivaceus*. *Nippon suisan gakkaiishi* 1987; 53(2): 195-200
33. Yoo J H, Takeuchi T, Tagawa M, Seikai T. Effect of thyroid hormones on the stage-specific pigmentation of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Zoological science* 2000; 17: 1101-1106
34. Takeuchi T, Dedi J, Ebisawa C, Watanabe T, Seikai T, Hosoya K, Nakazoe J. The effect of β -carotene and vitamin A enriched *Artemia* nauplii on the malformation and color abnormality of larval Japanese flounder. *Fisheries Science* 1995; 61(1): 141-148
35. 北島力, 林田豪介, 下崎真澄, 渡邊武. 人工採苗ヒラメの体色異常出現に対する微粒子飼料の抑制効果. 長崎県水産試験場研究報告 1985; 11: 29-35
36. Seikai T. Reduction in occurrence frequency of albinism in juvenile flounder *Paralichthys olivaceus* hatchery-reared on wild zooplankton. *Bulletin of the Japanese society of scientific fisheries* 1985; 51(8): 1261-1267
37. Seikai T. Influence of feeding periods on Brazilian *Artemia* during larval development of hatchery-reared flounder *Paralichthys olivaceus* on the appearance of albinism. *Bulletin of the Japanese society of scientific fisheries* 1985; 51(4): 521-527
38. 能勢健嗣. ヒラメ種苗生産における白化問題とりくみの現状—水産庁指定調査研究を中心に—. *さいばい* 1984; 32: 33-36
39. 青海忠久. ヒラメ種苗生産における白化問題のとりくみの現状. *さいばい* 1984; 32: 37-40
40. 青海忠久. 異体類体色異常出現の防除に関する研究 *日水誌* 2003; 69(5): 697-700
41. Esteves A, Ishikawa M, Kanazawa K. Effect of arachidonic acid on pigmentation and fatty acid composition of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)

(Temminck & Schlegel)). *Aquacult. Res* 1997 ; 28 : 279-289

42. Esteves A, Sameshima Ishikawa M, Kanazawa A. Effect of diets containing low levels of methionine and oxidized oil on body composition, retina structure and pigmentation success of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture nutrition* 1997 ; 3 : 201-216
43. Esteves A, Kanazawa A. Effect of (n-3) PUFA and vitamin A *Artemia* enrichment on pigmentation and success of turbot, *Scophthalmus maximus* (L). *Aquaculture nutrition* 1995 ; 1 : 159-168

ヒラメ骨格異常

1. Takeuchi T, Dedi J, Haga Y, Seikai T, Watanabe T. Effect of vitamin A compounds on bone deformity in larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 1998 ; 169(3-4) : 155-165
2. Dedi J, Takeuchi T, Seikai T, Watanabe T, Hosoya K. Hypervitaminosis A during vertebral morphogenesis in larval Japanese flounder. *Fisheries Science* 1997 ; 63(3) : 466-473
3. Dedi J, Takeuchi T, Hosoya K, Watanabe T, Seikai T. Effect of vitamin A levels in *Artemia* nauplii on the caudal skeleton formation of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science* 1998 64 (2) : 344-345
4. 鈴木徹. 骨格の発生と奇形の発症システム 遺伝子解析を通じて分かったこと. *養殖研ニュース* 2000 ; 46 : 24-29
5. Haga T, Takeuchi T, Seikai T. Effect of retinoic acid on larval Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, reared on *Artemia* nauplii. *Suisanzoushoku* 1999 ; 47 (4) : 559-566
6. Sawada Y, Hattori M, Suzuki R, Miyatake H, Kurata M, Okada T, Kumai H. Skeletal anomalies in cultured flounder *Paralichthys olivaceus*, with shortened upper jaw. *Suisanzousyoku* 2001 ; 49(4) : 451-460
7. Hosoya K, Kawamura K. Skeltal formation and abnormalities in the caudal complex of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel). *Bull. Natl. Res. Inst. Fish. Sci.* 1998 ; 12 : 97-110
3. Inui Y, Yamano K, Miwa S. The role of thyroid hormone in tissue development in metamorphosing flounder. *Aquaculture* 1995 ; 135(1-3) : 87-98
4. Estevez A, Kaneko T, Seikai T, Tagawa M, Tanaka M. ACTH and MSH production in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) larvae fed arachi-donic acid-enriched live prey. *Aquaculture* 2001 ; 192(2-4) : 309
5. Haga Y, Suzuki T, Takeuchi T. Retinoic acid isomers produce malformations in postembryonic development of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Zoological science* 2002 ; 19 : 1105-1112
6. 竹内俊郎, 芳賀 穰. ヒラメの体色・形態異常とビタミン 変態期に起こる異常の発現・抑制因子の解明. *化学と生物* 2000 ; 38(11) : 728-731
7. Yoo J H, Takeuchi T, Seikai T. Sensitivity of the metamorphic events and morphogenesis of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* during larval development to thyroxine. *Fisheries Science* 2000 ; 66 : 846-850
8. Balart E F. Development of median and paired fin skeleton of *Paralichthys olivaceus*. (Pleuronectiformes : paralichthyidae). *Japanese journal of ichthyology* 1985 ; 31(4) 398-410
9. Bolker J A, Hill C R. Pigmentation development in hatchery-reared flatfish. *Journal of Fish Biology* 2000 ; 56 : 1029-1052
10. 有瀧真人. カレイ類の変態と形態異常. *海洋* 1995 ; 27(12) : 732-739
11. 青海忠久. カレイ目魚類の体色異常と変態. *海洋* 1995 ; 27(12) : 727-726

ヒラメ以外の異体類無眼側, 有眼側の体色異常

異体類全般の変態に関する総説

1. 三輪理. ヒラメは何によって変態するのかーヒラメにおける甲状腺ホルモンの働きー. *水産の研究* 1990 ; 9(6) : 66-71
2. Venizelos A Benetti DD. Pigment abnormalities in flatfish. *Aquaculture* 1999 ; 176(1-2) : 181-188
1. 青海忠久. 人工採苗マコガレイの体色異常個体の出現におよぼす飼育密度および水槽の色の影響. *水産増殖* 1985 ; 33(3) : 119-128
2. 陸谷一馬. 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* 1998 ; 36 (1) : 27-32
3. 萱場隆昭. マコガレイ人工種苗の白化防止について. *北水試だより* 1996 ; 36 : 5-8
4. 有瀧真人, 青海忠久, 小林真人. マガレイ仔魚の高水温飼育とアルテミア幼生早期給餌による形態異常の出現防除. *日本水産学会誌* 1996 ; 62 (6) : 857-864
5. 早乙女浩一, 有瀧真人. マガレイ人工種苗の体色異常と形態異常. *栽培技研* 1988 ; 17(1) : 9-17
6. 有瀧真人, 長倉義智. マガレイ人工種苗の体色および形態異常に伴う有眼側無眼側の形質について. *栽培技研* 1991 ; 19(2) : 99-107
7. 北島力, 林田豪介, 安元進. 人工採苗メイトガレイの体色異常. *長崎県水産試験場研究報告* 1987 ; 13

- : 17-23
8. 沖山宗雄, 富和一. 側面逆位で両面有色のアカガレイ. 魚類学雑誌 1970; 17 (2): 84-85
 9. 南 卓忠. ヒラメの初期生活史 日水誌 1982; 48 (11): 1581-1588
 10. Hotta Y, Aritaki M, Tagawa M, Tanaka M. Changes in tissue thyroid hormone levels of metamorphosing spotted halibut *Verasper variegatus* reared at different temperatures. *Fisheries Science* 2001; 67 (6): 1119
 11. Denson MR, mith TIJ. Diet and light intensity effects on survivalgrowth and pigmentation of southern flounder *Paralichthys lethostigma*. *Journal of the world aquaculture society* 1997; 28(4): 366-373
 12. Specker JL, Schreiber AM, McArdle ME, Poholek A, Henderson J, Bengtson DA. Metamorphosis in summer flounder: effects of acclimation to low and high salinities. *Aquaculture* 1999; 176(1-2): 145-154
 13. Baker EP, Alves D, Bengtson DA. Effects of rotifer and Artemia fatty-acid enrichment on survivalgrowth and pigmentation of summer flounder *Paralichthys dentatus* larvae. *Journal of the world aquaculture society* 1998; 29(4): 494-498
 14. Chambers RC, Leggett WC. Size and age at metamorphosis in marine fishes: An analysis of laboratory-reared winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) with a review of variation in other species. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1987; 44: 1936-1947
 15. Copeman LA, Parrish CC, Brown JA, Harel M. Effects of docosahexaenoic and eicosapentaenoic and arachidonic acids on the early growthsurvival lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*): a live food enrichment experiment. *Aquaculture* 2002; 210(1-4): 285-304
 16. Stottrup JG, Attramadal Y. The influence of different rotifer and Artemia enrichment diets on growthsurvival and pigmentation in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) Larvae. *Journal of the world aquaculture society* 1992; 23(4): 307-316
 17. Estevez A, McEvoy LA, Bell JG, Sargent JR. Growthsurvival lipid composition and pigmentation of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae fed live-prey enriched in Arachidonic and Eicosapentaenoic acids. *Aquaculture* 1999; 180(3-4): 321-344
 18. McEvoy LA, Naess T, Bell JG, Lie O. Lipid and fatty acid composition of normal and malpigmented Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* fed enriched Artemia: a comparison with fry fed wild copepods. *Aquaculture* 1998; 163(3-4): 237-250
 19. Nass T, Lie O. A sensitive period during first feeding for the determination of pigmentatiuon pattern in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., juveniles: the role of diet. *Aquaculture Research* 1998; 29: 925-934
 20. Dickey-Collas M. The occurrence of juvenile pigmentation abnormalities in plaice (*Pleuronectes platessa*) larvae fed on enriched and unenriched *Artemia salina* nauplii. *Journal of fish biorygy* 1993; 42: 787-795
 21. Nakamura K, Iida H, Nakano H. Riboflavin in the skin of albinic flatfish *Liopsetta obscura*. *Bulletin of the Japanese society of scientific fisheries* 1987; 52(12): 2207

(藤浪祐一郎)

Vitamin D₃ compounds induce hypermelanosis on the blind side and vertebral deformity in juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*

YUTAKA HAGA,¹ TOSHIO TAKEUCHI,^{1*} YASUYUKI MURAYAMA,¹ KENGO OHTA²
AND TATSUHIRO FUKUNAGA²

¹Department of Marine Biosciences, Faculty of Marine Science, Tokyo University of Marine Science and Technology, Minato, Tokyo 108-8477 and ²Hakata-jima Station, Japan Sea-Farming Association, Ehime 794-2305, Japan

ABSTRACT: The purpose of the present study was to investigate the effect of vitamin D₃ compounds on the occurrence of hypermelanosis on the blind side and vertebral deformity in juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. To elucidate the mechanism by which vitamin D₃ causes hypermelanosis in Japanese flounder, larvae (total length (TL), 9.8 ± 0.77 mm; 22 days post-hatching (dph)) were fed an artificial diet without any vitamin D supplement (control group), a diet supplemented with 0.5 mg vitamin D₃/100 g (VD₃ group), or a diet supplemented with 0.05 mg 1,25-dihydroxyvitamin D₃/100 g (1,25(OH)₂D₃ group) until 49 dph. Fish were harvested at 49 dph and 70 dph for assessment of the TL, survival, pigmentation, and vertebral deformity. A high incidence of hypermelanosis on the blind side was observed on the head and caudal regions in all groups at both 49 dph and 70 dph. A significantly higher frequency of occurrence of severe hypermelanosis on the trunk region of the blind side was observed in the 1,25(OH)₂D₃ group ($P < 0.05$) compared with the control group at 70 dph. Moreover, completely hyperpigmented fish were observed only in the 1,25(OH)₂D₃ group. A higher frequency of the occurrence of winding of the abdominal vertebrae was also observed in the VD₃ and 1,25(OH)₂D₃ groups ($P < 0.05$).

KEY WORDS: 1, 25-dihydroxyvitamin D₃, deformity, flounder, pigmentation.

INTRODUCTION

A commonly encountered problem during cultivation of a novel species is occurrence of developmental deformities during larval rearing such as color abnormality and skeletal deformity. The Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* is one of the most successfully cultivated species in Japan.¹ This success is due, in part, to rearing techniques developed for sea bream *Pagrus major* (a pioneer species of mariculture in Japan), which can be applied to the Japanese flounder. Because it is mass seed produced, the problem of malpigmentation has been recognized. Malpigmentation can be classified into two groups: pseudoalbinism, which is characterized as full or part lack of pigmentation on the ocular side; and hypermelanosis, which is characterized as abnormal pigmentation on the blind side of fish.² Many studies have dem-

onstrated that several factors, including endocrine,³ nutritional^{4–11} and genetic factors,¹² during larval rearing were important for the determination of pseudoalbinism in juvenile flounder. Recently, the problem of pseudoalbinism in Japanese flounder has been gradually overcome possibly due to improvement of dietary nutrition for bloodstock and larval flounder, modification of environment during larval rearing, and the practical use of appropriate artificial diets for larval flounder.¹³ Although hypermelanosis on the blind side of recaptured flounder is widely used as a useful marker of released fish, this reduces the price of recaptured fish to half or more in the market.^{14,15} However, available information on hypermelanosis is limited. It was suggested that environmental factors such as lighting conditions, water quality and sandy substrate on the bottom of the rearing tank are important for the development of hypermelanosis on the blind side of fish.^{2,16–20} Recent studies suggested that nutritional factors were also important for determining the occurrence of hypermelanosis in Japanese flounder.

*Corresponding author: Tel: 81-3-5463-0545.

Fax: 81-3-5463-0545. Email: take@s.kaiyodai.ac.jp

Received 5 June 2003. Accepted 12 September 2003.

Takahashi observed that pseudoalbinism was prevented when fish were fed a commercially produced artificial diet from 27 days post-hatching (dph;²⁰ G stage²¹), while it induced hypermelanosis on the blind side. Fukunaga found that feeding a microdiet containing a 26-fold higher amount of vitamin D₃ and a lower amount of vitamin A, vitamin C and n-3 highly unsaturated fatty acids caused a higher frequency of hypermelanosis on the blind side of Japanese flounder compared to the control diet.²² In our previous study we investigated the effect of several diets containing different levels of vitamin D₃ and vitamin A on the occurrence of hypermelanosis on the blind side of Japanese flounder.²³ As a result, we concluded that a diet containing 20 000 IU (0.5 mg) vitamin D₃ or more per 100 g caused hypermelanosis on the blind side of Japanese flounder.

Vitamin D₃ plays a major role in calcium homeostasis and bone formation and is known to regulate cell proliferation and differentiation.^{24,25} Vitamin D₃ is metabolized and is functional in the form of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃).²⁶ 1,25(OH)₂D₃ is a biological active form of vitamin D₃ and activates the nuclear vitamin D receptor (VDR), which is a member of the steroid/thyroid receptor superfamily.²⁶ After binding with 1,25(OH)₂D₃, VDR acts as a transcription factor in the target cells.²⁶ 1,25(OH)₂D₃ has been confirmed to positively regulate calcium absorption in marine fish living in the calcium-rich environment and detected in the serum of several fishes including Japanese flounder.²⁷⁻²⁹ Lack of vitamin D was reported to cause rickets and abnormal bone formation in fish.³⁰ In flounder, vitamin D₃ is metabolized into 1,25(OH)₂D₃ in the liver and circulates in the serum.^{29,31} Concerning these results, dietary vitamin D₃ is assumed to affect the vertebral formation of larval flounder as a form of 1,25(OH)₂D₃. However, there are no reports on the effect of 1,25(OH)₂D₃ on skeletal formation in flounder. Therefore, we investigated the effect of 1,25(OH)₂D₃ on the occurrence of hypermelanosis on the blind side and vertebral deformity in juvenile Japanese flounder.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of experimental diet

Commercial diet X was purchased and used as a basal diet. Vitamin D₃ (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) or 1,25(OH)₂D₃ (Sigma, St Louis, USA) were dissolved in ethanol and sprayed onto the basal diet to make the final content approximately 0.5 mg and 0.05 mg/100 g, respec-

Table 1 Nutritional content and composition of the basal diet

Vitamin A (IU/100 g)	600
Vitamin C (mg/100 g)	159
Vitamin D (mg/100 g)	0.0046
Vitamin E (mg/100 g)	99.3
Moisture (%)	6.1
Crude protein (%)	57.4
Crude lipid (%)	19.0
Crude ash (%)	8.4
Fatty acid composition	
20 : 5 (EPA) (%)	5.5
22 : 6 (DHA) (%)	8.5
Σn-3 HUFA (%)	15.0

EPA, eicosapentaenoic acid; DHA, docosahexaenoic acid; HUFA, highly unsaturated fatty acids.

Table 2 Contents of vitamin D₃ in experimental diets

	Vitamin D ₃ (mg/100 g)
Basal diet (diet X)	0.0046
Basal diet + vitamin D ₃	0.5380
Basal diet + 1,25(OH) ₂ D ₃	0.0520

tively. Tables 1 and 2 show the proximate composition of the basal diet and vitamin D₃ content in experimental diets. After freeze-drying, the diets were preserved in a freezer (-20°C) until use.

Flounder larvae

Spontaneously spawned eggs of Japanese flounder *P. olivaceus* were collected and reared at the Hakata-jima Station of the Japan Sea-Farming Association, Ehime, Japan. Larvae were fed on rotifers *Branchionus rotundiformis* and San Francisco strains of *Artemia* nauplii and raised until 22 dph (F stage;²¹ total length (TL), 9.80 ± 0.77 mm). Three groups of larvae were then introduced into 100 L black cylindrical tanks (5000 ind./tank). Fish were fed on the basal diet X (control group), basal diet X supplemented with vitamin D₃ (VD₃ group), or basal diet X supplemented with 1,25(OH)₂D₃ (1,25(OH)₂D₃ group) until 49 dph; and for the first 7 days on *Artemia* nauplii enriched with 8 mL DHace (Oriental Yeast, Tokyo, Japan) in 100 L culture medium for more than 16 h. At 49 dph, the number of fish were counted for the calculation of survival rate and 100 fish were sampled for analysis of pigmentation on both the ocular and blind sides. The rest of the fish were reintroduced in 100 L black cylindrical tanks (1000 ind./tank), fed

on commercial diet Y and reared until 70 dph. At the end of the rearing experiment all fish were fixed in 10% formalin and 100 specimens were used for observation of pigmentation on the blind side and skeletal analysis. All procedures conducted in duplicate. During rearing, water temperature, amount of dissolved oxygen, pH, and light intensity at the surface of the tank were measured every day at 10.00 hours (15.2–19.8°C, 4.0–7.2 mg/L, 7.97–8.23 pH, 66.4–339.0 lux, respectively).

Biochemical analyses

Analyses of crude protein, crude lipid, crude ash and vitamin A content in diets were performed at the Japan Food Research Laboratories, Tokyo, Japan according to the standard methods.³² Vitamin D₃ content in the diet was analyzed at the Laboratory of Fish Culture, Tokyo University of Marine Science and Technology, Tokyo, Japan. According to the method of Takeuchi *et al.*, samples were saponified with 90% KOH in ethanol.³³ Unsaponifiable matter was extracted with benzene three times. The extracted matter was washed with water, pooled, and dried under nitrogen. The residue was redissolved in n-hexane and injected first in a preparative high performance liquid chromatography (HPLC) system with a reversed-phase column (Nucleosil 5C₁₈, 7.5 i.d. × 300 mm, GL Science, Tokyo, Japan) detected with UV-VIS detector (SPD-10A, Shimadzu, Kyoto, Japan) at 265 nm. Samples were eluted with 20% methanol-acetonitril mixture (1 : 1) solution. The vitamin D fraction was taken and injected into an analytical HPLC system with a normal phase column (Zorbax SIL, 4.6. i.d. × 250 mm, DuPont, USA) and detected with a UV-VIS detector (SPD-10A, Shimadzu) at 254 nm. Samples were eluted with 0.4% isopropanol in hexane. Unfortunately quantitative analysis of 1,25(OH)₂D₃ could not be conducted because of difficulty in separating contaminants from the 1,25(OH)₂D₃ fraction by HPLC.

Biological analyses

Total length, survival rate and pigmentation on the blind side at 49 dph and 70 dph were observed. Hypermelanosis on the blind side was classified into four types (normal pigmentation, pigmentation on less than half the body surface of the blind side, pigmentation on more than half the body surface of the blind side, and fully pigmented on the body surface of the blind side) according to Hasegawa *et al.* (Fig. 1).²³ Patterns of pigmentation on the blind side were also observed (head (C1),

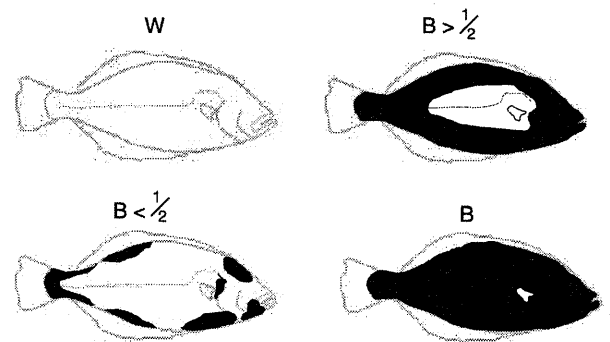


Fig. 1 Classification of the degree of hypermelanosis on the blind side of juvenile Japanese flounder. (W) Normal (without pigmentation); (B < 1/2) pigmented area is less than half of the body surface; (B > 1/2) pigmented area is more than half of the body surface; (B) pigmented in all areas.

	D	A	C
		+++ Completely pigmented ++ Pigmented area over 50% + Pigmented area less than 50% ± Slightly pigmented	
		Item	
A		Trunk	
C1		Head	
C2		Around of pectoral fin	
C3		Around of pelvic fin	
D1		Edge part of caudal peduncle	
D2		Inside part of caudal peduncle	

Fig. 2 Classification of patterns of hypermelanosis on the blind side of Japanese flounder modified from the guidelines of the Fisheries Agency of Japan.³⁴

pectoral (C2), pelvic fin (C3), caudal (D1 and 2), and trunk (A) regions) according to the guidelines of Fisheries Agency, Japan (Fig. 2).³⁴ In the trunk region we classified the degree of pigmentation according to the pigmented area (±, +, ++, and +++). Pigmentation on the ocular side of fish at 49 dph was classified as pigmented (normal) and unpigmented (albinism). The axial skeleton in fish at 70 dph was observed by soft X-ray exposure (CMB-2, Softex, Tokyo, Japan). The voltage, intensity and time of the exposure were set to 60 V, 1.5 mA, and 20 s. Vertebral deformity was classified into fusion and winding in both abdominal and caudal verte-

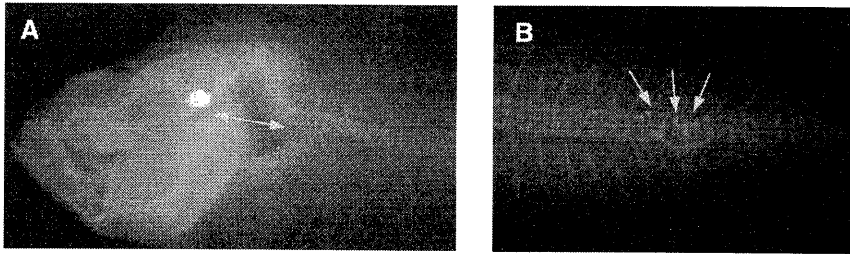


Fig. 3 Phenotypes of vertebral deformity in juvenile Japanese flounder at 70 days post-hatching (dph). (a) Winding observed in fish fed a diet supplemented with 1,25(OH)₂D₃. (Arrow) Winding region in the abdominal vertebrae. (b) Central fusions observed in fish fed a diet supplemented with 1,25(OH)₂D₃. (Arrows) Fused vertebrae.

Table 3 Growth and survival of juvenile Japanese flounder at 49 dph and 70 dph

Group	Initial (22 dph)	49 dph		70 dph	
	Total length (mm) [†]	Total length (mm) [†]	Survival rate (%) [§]	Total length (mm) [†]	Survival rate (%) [§]
Control	9.8 ± 0.77	19.2 ± 2.48	86.5	40.8 ± 2.21	93.0
Vitamin D ₃	9.8 ± 0.77	18.8 ± 3.05	66.7	40.6 ± 2.31	85.0
1,25(OH) ₂ D ₃	9.8 ± 0.77	18.7 ± 3.10	73.6	40.7 ± 2.94	76.0

dph, days post-hatching.

[†]Mean ± SD (*n* = 50); [‡]mean ± SD (*n* = 100); [§]mean value (*n* = 2); **P* < 0.05.

Table 4 Frequency (%) of occurrence of hypermelanosis and pigmented areas on the body surface on the blind side of juvenile flounder at 49 dph and 70 dph (*n* = 100)

Group	49 dph				70 dph			
	W	B ≤ 1/2	B > 1/2	B	W	B ≤ 1/2	B > 1/2	B
Control	51.5	48.0	0.5	0.0	2.7	86.1	11.2	0.0
Vitamin D ₃	44.0	56.0	0.0	0.0	1.2	78.8	20.0	0.0
1,25(OH) ₂ D ₃	47.4	51.6	1.1	0.0	1.3	68.6	29.4	0.7

W, normal (without pigmentation); B ≤ 1/2, pigmented area is less than half of the body surface; B > 1/2, pigmented area is more than half of the body surface; B, pigmented in all areas. dph, days post-hatching.

**P* < 0.05.

brae (Fig. 3). We also noted where vertebral deformity occurred. Data were tested by χ^2 test. Turkey's multiple test was then applied for detecting significant difference between groups (*P* < 0.05).³⁵

RESULTS

Growth and survival

In one tank of the VD₃ groups, all fish died at 5 days after starting the experiment due to unknown reasons. Therefore, data from one tank were shown in this group. There was no significant difference in the total length of fish in all groups at 49 dph (18.7–19.2 mm) and 70 dph (40.6–40.8 mm; *P* > 0.05; Table 3). Significant differences were recorded in the survival rate among all groups at both 49 dph and 70 dph. The survival rate at 49 dph and 70 dph was higher in the control group compared to that of the 1,25(OH)₂D₃ group (*P* < 0.05; Table 3).

Hypermelanosis on the blind side

We observed that approximately 50% of the fish had hypermelanosis on the blind side in all groups at 49 dph (Table 4). For these fish, less than half of the body surface on the blind side was pigmented in all groups (Table 4). Few fish had a pigmented area that covered more than half of the surface of the blind side in all groups at 49 dph (0.0–1.1%). No fish were observed that had complete pigmentation on the blind side in all groups at 49 dph.

At 70 dph, a high incidence of hypermelanosis (97.3–98.8%) was observed in all groups (Table 4). The incidence of hypermelanosis on less than half of the body surface of the blind side was 68.8–86.1% in all groups. A significantly higher incidence of hypermelanosis was observed in the control group compared to the 1,25(OH)₂D₃ group (*P* < 0.05). A low incidence of hypermelanosis on more than half of the body surface on the blind side occurred among all groups (11.2–

Table 5 Occurrence of each pattern of hypermelanosis on the body surface of the blind side of juvenile flounder at 70 dph (*n* = 100)

Group	A				C			D	
	A±	A+	A++	A+++	C1	C2	C3	D1	D2
Control	29.9	43.9	21.4	0.0	43.3	7.0	38.5	91.4	22.5
Vitamin D ₃	29.4	44.7*	24.7*	0.0	49.4*	14.1	43.5	91.8	25.9
1,25(OH) ₂ D ₃	24.8	28.8	42.5	0.7	60.1	13.7	47.7	94.8	32.0

±, Slightly pigmented; +, pigmented area is less than half of the body surface; ++, pigmented area is more than half of the body surface; +++, pigmented in all areas. dph, days post-hatching.
**P* < 0.05.

Table 6 Frequency of occurrence of vertebral deformity in flounder at 70 dph (*n* = 100)

Group	Frequency (%)	Abdominal vertebrae		Caudal vertebrae	
		Fusion	Winding	Fusion	Winding
Control	41.7	12.8	16.6	24.6	9.6
Vitamin D ₃	52.9	14.1	40.0*	12.9	25.9
1,25(OH) ₂ D ₃	51.6	8.5	42.5	19.6	16.3

dph, days post-hatching.
**P* < 0.05.

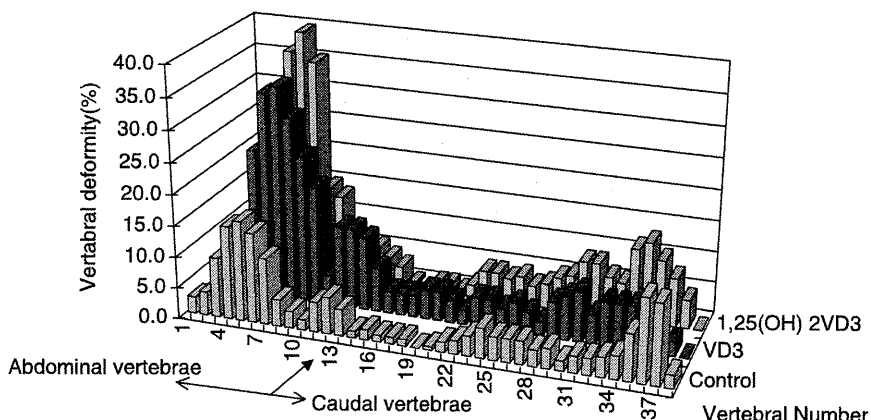


Fig. 4 Occurrence of vertebral deformity in juvenile flounder at 70 days post-hatching (dph; *n* = 100).

29.4%), but this was significantly higher in the 1,25(OH)₂D₃ group compared to the control group (*P* < 0.05). Moreover, completely pigmented fish were observed only in the 1,25(OH)₂D₃ group (0.7%).

Concerning the patterns of hypermelanosis in fish at 70 dph, different patterns of hypermelanosis were observed among the groups (Table 5). Significantly higher pigmentation occurred in the head and trunk regions in fish in the 1,25(OH)₂D₃ group compared to the control group (*P* < 0.05). Although no significant difference was detected, a higher incidence of hypermelanosis occurred in the pectoral and pelvic fin and caudal regions in fish of the VD₃ and 1,25(OH)₂D₃ groups compared to the control group.

Vertebral deformity

A total of 41–53% of vertebral deformity was recorded in all groups (Table 6). A high frequency of occurrence of vertebral deformity was observed especially in the middle part of the abdominal vertebrae (Fig. 4). In the abdominal vertebrae, a higher incidence of winding was observed compared to fusion. A higher frequency of winding in the abdominal vertebrae (Fig. 3A) was observed in the 1,25(OH)₂D₃ groups compared to the control group (*P* < 0.05; Table 6).

Pseudoalbinism

A low incidence of pseudoalbinism was observed in all groups (Fig 5; 1.0–11.0%) but this was sig-

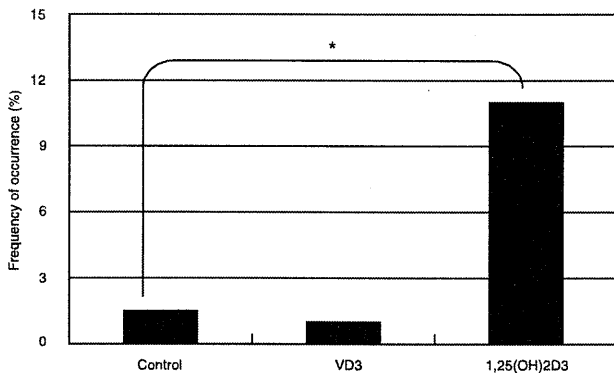


Fig. 5 Frequency of occurrence of pseudoalbinism in flounder at 49 days post-hatching (dph; $n = 100$).

nificantly higher in the 1,25(OH)₂D₃ group ($P < 0.05$).

DISCUSSION

In the previous studies we found that a high dietary intake of vitamin D₃ induces hypermelanosis in juvenile Japanese flounder.^{22,23} The present study demonstrates that feeding of a diet supplemented with 1,25(OH)₂D₃ induces hypermelanosis on the blind side of juvenile flounder. Although we used a diet containing 0.5 mg (20 000 IU) vitamin D₃ (the same amount used in Hasegawa *et al.*²³) we failed to observe hypermelanosis on the blind side of fish fed this diet. The contrasting results between the two studies are probably due to the differences in water temperature during rearing (Hasegawa *et al.*,²³ 20.2–25.0°C; present study, 15.2–19.8°C). The amount of food consumption usually increases as well as the rate of ingestion with elevation of water temperature.³⁶ Higher water temperature probably stimulates food consumption and production of 1,25(OH)₂D₃ in fish fed a diet containing vitamin D₃, resulting in occurrence of hypermelanosis on the blind side in the previous study. As far as we know, there are no reports on malpigmentation in fish fed vitamin D metabolites. This is the first report demonstrating an effect on skin pigmentation by dietary vitamin D₃ metabolites in flatfish.

It was well known that hypermelanosis on the blind side rarely occurs in the central region of the trunk in juvenile Japanese flounder, probably because pigmentation proceeds from the dorsal-anal fin ridge region to a more central region of the body surface on the blind side during prolonged rearing after settlement.^{23,37} We observed that a higher incidence of hypermelanosis on the central region of the trunk on the blind side occurred in fish fed a diet supplemented with 1,25(OH)₂D₃ compared with fish fed the control diet, suggesting

that the spread of pigmentation is accelerated by dietary intake of 1,25(OH)₂D₃ in juvenile flounder.

Japanese flounder larvae have only large larval-type melanophores.² They develop small adult-type melanophores at metamorphosis and larval-type melanophores gradually disappear during prolonged rearing.² In the present study, pigmentation on the blind side was not affected in fish at 49 dph (TL, 18.7–19.2 mm), but it was affected in fish at 70 dph (TL, 40.6–40.8 mm). Because diets supplemented with 1,25(OH)₂D₃ were fed to fish from TL 9.8 mm onwards, dietary 1,25(OH)₂D₃ probably affected development of precursor cells of the adult-type melanophore but not of the larval-type on the blind side, eventually leading to hypermelanosis on the blind side of fish at 70 dph.

Recent studies using animals with mutated VDR revealed that skin is a target organ of vitamin D.^{38,39} It was noted that vitamin D compounds are involved in stimulation of melanogenesis in melanoma cells and human melanocytes.^{40–43} Studies on the early development of melanophores reveal that endothelin has an important role in the development and maintenance of melanophores in teleosts.^{44,45} Knock-out mutation of endothelin B receptor has been demonstrated to inhibit development of melanophore in zebrafish *Danio rerio*.⁴⁶ Moreover, it was demonstrated that 1,25(OH)₂D₃ stimulated the differentiation of murine melanocyte precursor cells (NCC-/melb4 cell; trp-1, trp-2 and kit positive but tyrosinase, endothelin B receptor and dihydroxyphenylalanine (DOPA)-negative) to mature melanocyte with tyrosinase activity and endothelin B receptor expression and DOPA positive via increase in endothelin B receptor expression *in vitro*.⁴⁷ It was also shown that 1,25(OH)₂D₃ had no stimulating effect on melanogenesis in NCC-/melan5 cells (trp-1 and trp-2, tyrosinase, endothelin B receptor, DOPA positive).⁴⁷ Hypermelanosis in flounder is thought to be produced by differentiation of melanophores on the blind side, which is normally non-pigmented.^{18,48} It was suggested that propigment melanoblast resides on the blind side of flounder even after settlement, and the number of these cells is higher where the regions were readily pigmented.^{18,49} Concerning the above-mentioned evidence, we speculate that dietary 1,25(OH)₂D₃ induces hypermelanosis in Japanese flounder via the activation of endothelin B receptor pathways in immature melanophore precursors. It was also observed that a higher incidence of pseudoalbinism occurred in the 1,25(OH)₂D₃ group, suggesting that feeding of a diet containing 1,25(OH)₂D₃ impairs the pigmentation on the ocular side as well as that on the blind side in flounder.

In the present study we observed a higher incidence of winding of abdominal vertebrae in flounder fed on a diet supplemented with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Bone is the target organ of vitamin D_3 metabolites.²⁴ Yamakawa observed that the liver contained 28.3% of vitamin D_3 in the body of young yellowtail *Seriola quinqueradiata* but 93.6% of vitamin D_3 in the body of older fish, suggesting that vitamin D_3 was consumed for skeletal development in the younger yellowtail.⁵⁰ It is assumed that an excess intake of vitamin D_3 compounds in flounder larvae during vertebral morphogenesis caused skeletal deformity in flounder. In Japanese flounder, vertebral morphogenesis took place during the E–H stages and the sensitive stages for vitamin A intoxication was around the G stage.^{5,51,52} In the present study, fish were fed an experimental diet from the F stage to TL 20 mm. Feeding of a diet supplemented with excess vitamin D_3 compounds during vertebral morphogenesis in flounder probably induced the vertebral deformity. By contrast, no reports have described skeletal deformity and mortality as a result of excess vitamin D_3 in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Atlantic salmon *Salmo salar*, and brook trout *Salvelinus fontinalis*.^{52–55} These inconsistent results are probably due to differences in the size of fish used in the experiment; for instance, Atlantic salmon fry were at approximately 170 mg, rainbow trout at 8.3 g and Japanese flounder at around 5 mg. Vertebral deformity observed in the present study included central fusion and winding of the vertebrae. Central fusion is well described in flounder fed vitamin A or its metabolites.^{51,52,56} In contrast, winding of the vertebrae has rarely been observed in flounder affected by hypervitaminosis A. This suggests that vitamin A and vitamin D_3 compounds possibly induce vertebral deformity by different pathways. It was reported that an increase in calcium absorption occurs in American eel *Anguilla rostrata* and immature Atlantic cod *Gadus morhua* after $1,25$ -dihydroxyvitamin D_3 administration *in vivo*.^{57,58} It was assumed that excess vitamin D_3 compounds caused abnormal calcification and impairment of the rigidity of the vertebrae, which eventually causes winding of the vertebrae.

Concerning the frequency and degree of hypermelanosis and vertebral deformity, a similar tendency was observed; a lower incidence of abnormality was observed in fish fed a vitamin D_3 -supplemented diet compared to the fish fed a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -supplemented diet. It was reported that the dominant metabolite from vitamin D_3 and $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ is $24,25$ -dihydroxyvitamin D_3 in several marine teleost.²⁸ This suggests that dietary vitamin D_3 is not actively metabolized into $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in flounder. In fish fed on a diet sup-

plemented with vitamin D_3 , the serum concentration of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ is potentially lower than that of fish fed on a diet supplemented with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. This idea is supported by the fact that fish fed a diet supplemented with vitamin D_3 did not have severe hypermelanosis in the present study.

The survival rate was lower in fish fed the diet supplemented with vitamin D_3 or $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ compared to fish fed a control diet. The cause of the higher mortality in fish fed an excess of vitamin D_3 compounds is unclear. However, it seems that the dietary intake of an excess amount of vitamin D_3 compounds induces hypercalcemia in flounder. This status is probably a cause of stress in fish. It is assumed that flounder fed an excess amount of vitamin D_3 compounds suffered from hypercalcemia, resulting in the lower survival of fish in the present study.

The present study demonstrated that $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induced vertebral deformity and hypermelanosis on the blind side of Japanese flounder. Further study is needed to determine the serum concentration of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ that induces hypermelanosis in the flounder.

ACKNOWLEDGMENT

We wish to express thanks to all the staff of the Hakata-jima Station, Japan Sea-Farming Association.

REFERENCES

1. Takeuchi T. A review of feed development for early life stages of marine finfish in Japan. *Aquaculture* 2000; **200**: 203–222.
2. Matsumoto J, Seikai T. Asymmetric pigmentation and pigment disorders in pleuronectiformes (flounders). *Pigment Cell Res.* 1992; **S2**: 275–282.
3. Yoo JH, Takeuchi T, Tagawa M, Seikai T. Effect of thyroid hormones on the stage-specific pigmentation of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Zool. Sci.* 2000; **17**: 1101–1106.
4. Haga Y, Takeuchi T, Seikai T. Influence of all-*trans* retinoic acid on skeletal formation and pigmentation in larval Japanese flounder. *Fish. Sci.* 2001; **68**: 560–570.
5. Haga Y, Suzuki T, Takeuchi T. Retinoids as potent teratogens in larval development of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Fish. Sci.* 2002; **68** (Supp. 1): 789–792.
6. Seikai T, Watanabe T, Shimozaki M. Influence of three geographically different strains of *Artemia* nauplii on occurrence of albinism in hatchery-reared flounder *Paralichthys olivaceus*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1987; **53**: 195–200.
7. Oda T, Kayano Y. Effect of several commercial diets on growth, occurrence of color anomaly, and vertebral malformation in hatchery-reared flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Bull. Okayama Pref. Fish. Exp. Stn* 1988; **3**: 41–46.

8. Seikai T. Reduction in occurrence frequency of albinism in juvenile flounder *Paralichthys olivaceus* hatchery-reared on wild zooplankton. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1985; **51**: 1261–1267.
9. Fukusho K, Nanba H, Yamamoto T, Yamazaki Y, Lee ME, Seikai T, Watanabe T. Reduction of albinism in juvenile flounder *Paralichthys olivaceus* hatchery-reared on fertilized eggs of red sea bream *Pagrus major*, and its critical stage for the effective feeding. *Bull. Natl Res. Inst. Aquacult.* 1987; **12**: 1–7.
10. Kanazawa A. Nutritional mechanisms involved in the occurrence of abnormal pigmentation in hatchery-reared flatfish. *J. World Aquacult. Soc.* 1993; **25**: 162–166.
11. Yamamoto T, Fukusho K, Okauchi M, Tanaka H, Nagata WD, Seikai T, Watanabe T. Effect of various foods during metamorphosis on albinism in juvenile of flounder. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1992; **58**: 499–508.
12. Tabata K. Genetic factors on the albinism of hirame *Paralichthys olivaceus*. *Suisanzoshoku* 1991; **39**: 29–35.
13. Seikai T. Mechanism and practical prevention of albinism in hatchery-reared flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Suisanzoshoku* 1990; **38**: 394–395.
14. Nakamura T. Evaluation of recaptured flounder, *Paralichthys olivaceus*, in Tsukiji market. *Saibai* 1988; **88**: 11–15.
15. Kaji S, Fukunaga T. Results of a questionnaire on the recent status of seed production and market price of recaptured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* showing abnormal coloration. *Suisanzoshoku* 1999; **49**: 67–101.
16. Iwata N, Kikuchi K. Effect of sandy substrate and light on hypermelanosis of the blind side in cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Environ. Biol. Fish.* 1988; **52**: 20–22.
17. Kawana K, Nanba K, Ohta K, Fukunaga T. Effect of sandy substrate on hypermelanosis on the blind side of cultured Japanese flounder. In: *Abstract of the Meeting of the Japanese Society of Fisheries Science*. Japanese Society of Fisheries Science, Tokyo. 2001; 109.
18. Ottesen OH, Strand HK. Growth, development, and skin abnormalities of halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) juveniles kept on different bottom substrates. *Aquaculture* 1996; **146**: 17–25.
19. Seikai T. Influence of fluorescent light irradiation, ocular side pigmentation, and source of fishes on the blind side pigmentation in the young Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Suisanzoshoku* 1991; **39**: 173–180.
20. Takahashi Y. Influence of stocking density and food at late phase of larval period on hypermelanosis on the blind body side in juvenile Japanese flounder. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1994; **60**: 593–598.
21. Minami T. The early life history of flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1982; **48**: 1581–1588.
22. Fukunaga T. Development of prevention for color abnormality on blind side. In: *JASFA Annual Report*. JASFA, Tokyo. 1995; 147–151.
23. Hasegawa Y, Takeuchi T, Itagaki E, Fukunaga T. Relationship between fat soluble vitamins in diet and the occurrence of colour abnormality on the blind side of juvenile Japanese flounder. *Suisanzoshoku* 1998; **46**: 279–286.
24. Walters MR. Newly identified actions of the vitamin D endocrine system. *Endocr. Rev.* 1992; **13**: 719–764.
25. Bouillon R., Okamura WH, Norman AW. Structure–function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocr. Rev.* 1995; **16**: 200–257.
26. Haussler MR. Vitamin D receptors. Nature and function. *Ann. Rev. Nutr.* 1986; **6**: 527–562.
27. Avioli LV, Sonn Y, Jo D, Nahn TH, Haussler MR, Chandler JS. 1,25-dihydroxyvitamin D in male, non-spawning female, and spawning female trout. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1981; **166**: 291–293.
28. Graff IE, Lie Ø, Aksnes L. In vitro hydroxylation of vitamin D₃ and 25-hydroxy vitamin D₃ in tissues of Atlantic salmon *Salmo salar*, Atlantic mackerel *Scomber scombrus*, Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* and Atlantic cod *Gadus morhua*. *Aquacult. Nutr.* 1999; **5**: 23–32.
29. Takeuchi A, Okano T, Torii M, Hatanaka Y, Kobayashi T. Comparative studies on the contents of vitamin D₃, 25-hydroxy vitamin D₃ and 7-dehydrocholesterol in fish liver. *Comp. Biochem. Physiol.* 1987; **88B**: 569–573.
30. Halver JE. The vitamins. In: Halver JE (ed). *Fish Nutrition*. Academic Press, San Diego. 1989; 83–97.
31. Takeuchi A, Okano T, Kobayashi T. The existence of 25-hydroxyvitamin D₃-1 alpha-hydroxylase in the liver of carp and bastard halibut. *Life Sci.* 1991; **48**: 275–282.
32. Association of Official Analytical Chemists. *Official Method of Analysis*, 15th edn. Association of Official Analytical Chemists, Virginia, 1990.
33. Takeuchi A, Okano T, Teraoka S, Murakami Y, Kobayashi T. High-performance liquid chromatographic determination of vitamin D in foods, feeds and pharmaceuticals by successive use of reversed-phase and straight-phase columns. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 1984; **30**: 11–25.
34. Fukunaga T. Present status of technique to prevent occurrence of hypermelanosis on the blind side of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. In: *Farming Fisheries Technical Training Project. A Text for Basic Theory XII. Series of Development of Larval and Juvenile Stages*. Japan Sea-farming Association, Tokyo. 1999; 1–46.
35. Steel RGD, Torrie JH. *Principles and Procedures of Statistics. A Biometrical Approach*. McGraw-Hill, New York. 1980.
36. Brett JR. Environmental factors and growth. In: Hoar WS, Randall DJ, Brett JR (eds). *Fish Physiology, Volume VIII Bioenergetics and Growth*. Academic Press, New York. 1979; 599–675.
37. Maruyama K. Abnormal specimens of flatfishes collected in Iwate Prefecture. *Jpn. J. Ichthyol.* 1976; **23**: 118–120.
38. Sakai Y, Kishimoto J, Demay MB. Metabolic and cellular analysis of alopecia in vitamin D receptor knockout mice. *J. Clin. Invest.* 2001; **107**: 961–966.
39. Yagishita N, Yamamoto Y, Yoshizawa T, Sekine K, Uematsu Y, Murayama H, Nagai Y, Krezel W, Chambon P, Matsumoto T, Kato S. Aberrant growth plate development in VDR/RXRγ double null mutant mice. *Endocrinology* 2001; **142**: 5332–5341.
40. Abdel-Malek ZA, Ross R., Trinkle L, Swope V, Pike JW, Nordlund JJ. Hormonal effects of vitamin D₃ on epidermal melanocytes. *J. Cell. Physiol.* 1988; **136**: 273–280.
41. Hosoi J, Abe E, Suda T, Kuroki T. Regulation of melanin synthesis of B16 melanoma cells by 1,α,25-dihydroxyvitamin D₃ and retinoic acid. *Cancer Res.* 1985; **45**: 1474–1478.
42. Oikawa A, Nakayasu M. Stimulation of melanogenesis in cultured melanoma cells by calciferols. *FEBS Lett.* 1974; **42**: 32–35.
43. Tomita Y, Torinuki W, Tagami H. Stimulation of human mel-

- anocytes by vitamin D₃ possibly mediates skin pigmentation after sun exposure. *J. Invest. Dermatol.* 1988; **90**: 882–884.
44. Lister JA. Development of pigment cells in the zebrafish embryo. *Microsc. Res. Tech.* 2002; **58**: 435–441.
 45. Rawls JF, Mellgren EM, Johnson SL. How the zebrafish gets its stripes. *Dev. Biol.* 2001; **240**: 301–314.
 46. Parichy DM, Mellgren EM, Rawls JF, Lopes SS, Kelsh RN, Johnson SL. Mutational analysis of endothelin receptor b1 (rose) during neural crest and pigment pattern development in the zebrafish *Danio rerio*. *Dev. Biol.* 2000; **227**: 294–306.
 47. Watabe H, Soma Y, Kawa Y, Ito M, Ooka S, Ohsumi K, Baba T, Kawakami T, Hosaka E, Kimura S, Mizoguchi M. Differentiation of murine melanocyte precursors induced by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is associated with the stimulation of endothelin B receptor expression. *J. Invest. Dermatol.* 2002; **118**: 583–589.
 48. Suzuki N. Ultrastructure of the skin on reverse side of hatchery-reared Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* with reference to the pigmentation. *Bull. Nansei Reg. Fish. Res. Inst.* 1994; **27**: 113–128.
 49. Seikai T, Matsumoto J, Shimozaki M, Oikawa A, Akiyama T. An association of melanophores appearing at metamorphosis as vehicles of asymmetric skin color formation with pigment anomalies developed under hatchery conditions in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Pigment Cell Res.* 1987; **1**: 143–151.
 50. Yamakawa T. Studies on physicochemical determination of vitamin D and vitamin D in marine products. *Vitamins* 1964; **29**: 487–497.
 51. Dedi J, Takeuchi T, Seikai T, Watanabe T, Hosoya K. Hypervitaminosis A during vertebral morphogenesis in larval Japanese flounder. *Fish. Sci.* 1997; **63**: 466–473.
 52. Haga Y, Takeuchi T, Seikai T. Effect of retinoic acid on larval Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, reared on *Artemia* nauplii. *Suisanzoshoku* 1999; **47**: 559–566.
 53. Graff IE, Høie S, Totland GK, Lie Ø. Three different levels of dietary vitamin D₃ fed to first-feeding fry of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): effect on growth, mortality, calcium content and bone formation. *Aquacult. Nutr.* 2002; **8**: 103–111.
 54. Hilton JW, Ferguson HW. Effect of excess vitamin D₃ on calcium metabolism in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish. Biol.* 1982; **21**: 373–379.
 55. Poston HA. Effects of massive doses of vitamin D₃ on fingerling brook trout. *Fish. Res. Bull.* 1969; **32**: 48–50.
 56. Takeuchi T, Dedi J, Haga Y, Seikai T, Watanabe T. Effect of vitamin A compounds on bone deformity in larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 1998; **169**: 155–165.
 57. Fenwick JC, Smith K, Smith J, Flik G. Effect of various vitamin D analogs on plasma calcium and phosphorous and intestinal calcium absorption in fed and unfed American eels, *Anguilla rostrata*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1984; **55**: 398–404.
 58. Sundell K, Norman AW, Björnsson BT. 1,25(OH)₂D₃ increases ionized plasma calcium concentrations in the immature Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 1993; **91**: 344–351.

ヒラメ無眼側体色異常出現に及ぼす飼料中の 脂溶性ビタミン強化の影響

長谷川靖之・竹内俊郎・板垣恵美子・福永辰廣

(1998年5月10日受理)

Relationship between Fat Soluble Vitamins in Diet and the Occurrence of Colour Abnormality on the Blind Side of Juvenile Japanese Flounder

Yasuyuki HASEGAWA^{*1}, Toshio TAKEUCHI^{*1},
Emiko ITAGAKI^{*2}, and Tatsuhiro FUKUNAGA^{*2}

Abstract: This experiment was conducted to clarify the relationship between fat soluble vitamins (vitamins A and D) in diet and the occurrence of colour abnormality on the blind side of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Twenty days after hatching, fish were fed the experimental diets containing three different levels of vitamin A (0, 1,500, and 9,000 IU/100g) in addition to 20,000 IU vitamin D, apart from two others commercial diets (X and Y), the basal ingredients and compositions of the experimental diets and the commercial diet X are the same. When the fish reached 30 mm of total length, the occurrence of colour abnormality on ocular and blind sides and bone deformity were assessed. Vitamin A was not effective in preventing the colour abnormality on the blind side. However, fish fed experimental diet containing 20,000 IU vitamin D/100g diet showed a higher rate of colour abnormality on the blind side compared with the commercial diet X which contained 6,440 IU vitamin D/100g diet. Furthermore, the rate of normal blind side in the fish fed commercial diet Y containing trace amount of vitamin D was higher than that in the fish fed experimental diets. Although there was no expansion of black spot on the blind side during the experiment when fish were fed the commercial diet Y, the occurrence of bone deformity was high in the fish fed commercial diet Y. These results suggest that the balance of vitamins A and D or other basal ingredients is necessary to avert abnormal bone formation in Japanese flounder.

Key words: Japanese flounder; Colour abnormality; Vitamin D; Feed

近年、様々な水産有用魚類の種苗生産、養殖技術が確立されており、ヒラメ、*Paralichthys olivaceus*も養殖生産量の増加が著しい。しかし、ヒラメ種苗の大量生産に伴い疾病や種苗の質の問題が生じている。特に、白化や黒化と呼ばれる体色異常が多発している。白化(有眼側体色異常)とは、有眼側の黒褐色が発現せず白色を呈するものであるが、現在この白化については様々な防除研究¹⁻⁶⁾により実用面ではかなり防除できるようになりつつある。

ところが、近年もう一方の黒化(無眼側体色異常)が高い頻度で出現し、放流再捕したヒラメや養殖ヒラメの商品価値を低下させることから、その防除を望む声が高まっている。黒化防除は栄養、飼育環境、遺伝などの各分野から様々な研究が行われているが、その出現要因やメカニズムは未だ明らかにされていない。

平成7年度から(社)日本栽培漁業協会においても栄養と飼育環境の両面から、黒化出現要因解明のための飼育試験が行われている。その結果、市販配合飼料の

^{*1} 東京水産大学 (Department of Aquatic Biosciences, Tokyo University of Fisheries, Konan, Minato, Tokyo 108-8477, Japan).

^{*2} (社)日本栽培漁業協会 (Tamano Station, Japan Sea-Farming Association, Tamano, Okayama 706-0002, Japan).

間で黒化魚の出現率に明確な差が認められることが報告された*³。また、前述の試験に用いられた各社の市販飼料の成分を分析した結果、黒化魚の出現率が高かったX社の市販飼料には、Y社の市販飼料よりビタミンD（以下VD）が26倍以上含まれ、ビタミンA（以下VA）、ビタミンCおよびn-3高度不飽和酸（n-3HUFA）が少ないことが分かった*³。

本研究では、ヒラメの白化防除に有効とされているVAとVDの黒化発現に及ぼす影響について検討した。

材料および方法

供試魚 供試魚には、(社)日本栽培漁業協会伯方島事業場内の80t水槽で養成していたヒラメ親魚（人工6歳，雌：雄=21：26）より自然産卵にて得られた受精卵からフ化した全長3.09mm±0.18（n=30）の仔魚を用いた。

飼育水槽へは、全てのフ化が完了した段階で飼育密度が2000尾/100lとなるように収容した。

試験区の設定 試験区と餌料系列をFig. 1に示す。試験区は、VDを飼料100gあたり20,000IUと同一にし、VAの含量を0, 1,500および9,000IU/100gとした試験飼料の1～3区と、市販飼料の4および5区とした。試験飼料はX社に作製を依頼し、市販飼料にはX社とY社のものを用いた。なお、試験飼料の原料および組成はVAおよびVD以外はX社の市販飼料と同一である。

飼育方法 飼育には100l黒色ポリカーボネイト水槽10面（5区×2水槽）を用いた。水槽はビニールハウ

ス内に設置し、直接光が入る天井および側面は全て黒色ビニールで覆った。飼育水には砂ろ過海水をUV殺菌したものを用いた。換水は3回転/日から仔稚魚の成長にあわせて最高20回転/日まで増加させた。水温は飼育試験期間を通して自然水温とした結果、20.2～25.0℃の範囲で推移した。通気はエアストーン1個/水槽で行い、仔稚魚の成長に合わせて適宜増加させた。底掃除は配合飼料への餌付きが完了した25日令までは全く行わず、25日令から底に堆積した残餌等を吸出し、その後は毎日行った。

サンプリングは0, 10, 20, 30, 40および50日令で全長測定のために各水槽30尾ずつ行った。また、40日令で黒化の観察のために、各水槽から200尾ずつ取り揚げ、同時に尾数を調節し、着底期以降の黒化パターンの変動を明らかにすることを目的に各水槽に250尾ずつ再収容した。飼育試験終了時（50日令）に全ての魚を取り揚げ黒化の分類と観察に用いた。なお、取り揚げた魚は全て10%海水ホルマリンで固定した。

ワムシとアルテミア幼生への栄養強化は、オリエンタル酵母工業(株)製のパウッシュWおよびAを75mlの濃度で16～24時間行った。培養密度は、ワムシは500～1000個体/ml、アルテミア幼生は100個体/mlを目安とした。給餌は、ワムシだけを与えた3～12日令までは午前と午後の2回とし、ワムシとアルテミアを併用した13～20日令まではそれぞれ交互に計4回とした。アルテミアと配合飼料を併用した21～35日令には、11時と16時にアルテミアを与え、7, 8, 9, 10および15時に配合飼料を給餌した。36～40日令には配合飼料だ

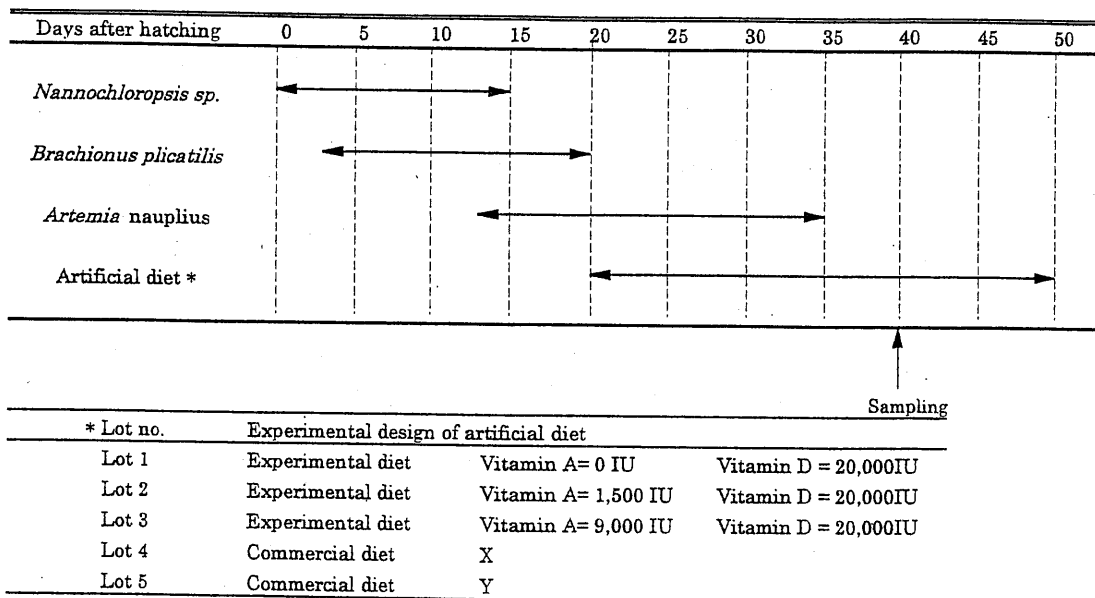


Fig. 1. Feeding schedule and experimental lots.

*³ 福永辰廣 (1995)：無眼側体色異常防除技術開発。平成7年度日本栽培漁業協会事業年報 p. 147-151.

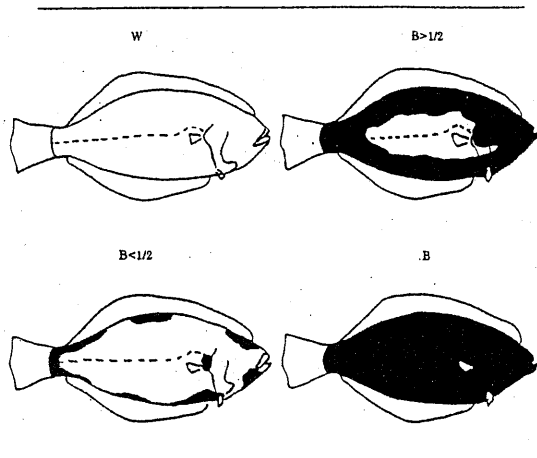


Fig. 2. Rate of the pigmented area.

けを1日6回与え、41~50日令には1日4回与えた。無眼側体色異常・脊椎骨形態異常の分類と観察 黒化の分類方法を Figs. 2 および 3 に示す。Fig. 2 は着色面積率により正常個体 (W), 着色面積50%以下の個体 ($B < 1/2$), 50%以上の個体 ($B > 1/2$), 完全黒化個体 (B) の4通りに分類したものであり、Fig. 3 は着色部位により分類したものである。分類は、40日令では200尾を、50日令では150尾をそれぞれ無作為に抽出したものをを用いた。脊椎骨の形態異常は Softex 撮影により、50日令で取り揚げた50個体を観察した。撮影は $mA = 1.5$, $V = 60$, X線照射時間 = 20秒の設定により行った。観察は、癒合・屈曲を起こしている脊椎骨の番号を調べる方法とした。なお、Softex には Softex 社製の軟X線検査装置 CMB-2 型を用いた。

分析方法 配合飼料については一般組成, VA, VD および脂肪酸組成を分析した。水分は常圧加熱乾燥法, 粗灰分は灰化法, 粗タンパク質はセミマイクロキエルダール法, 粗脂肪は Folch *et al.*の方法⁷⁾に準じて行った。

VA 含量は試料を50%KOH 溶液でケン化し, 不ケン化物をヘキサンに溶解後, 高速液体クロマトグラフ (HPLC) に導入し, クロマトグラム上に認められるピークの高さから測定した⁸⁾。

VD の分析では試料を90%KOH 溶液でケン化し, 不ケン化物をベンゼンに溶解後, 分取用第1段階 HPLC (逆相カラム) に導入し, VD 画分を分取した。得られた VD 画分を分析用第2段階 HPLC (順相カラム) に導入し, クロマトグラム上に認められるピークの高さから VD 含量を測定した。この分析は小林らの方法⁹⁾に準じた。

脂肪酸組成は, 粗脂肪を50%KOH でケン化し, 三フッ化ホウ素-メタノールでメチルエステル化し, ガスクロマトグラフ (GLC) に付し測定した¹⁰⁾。

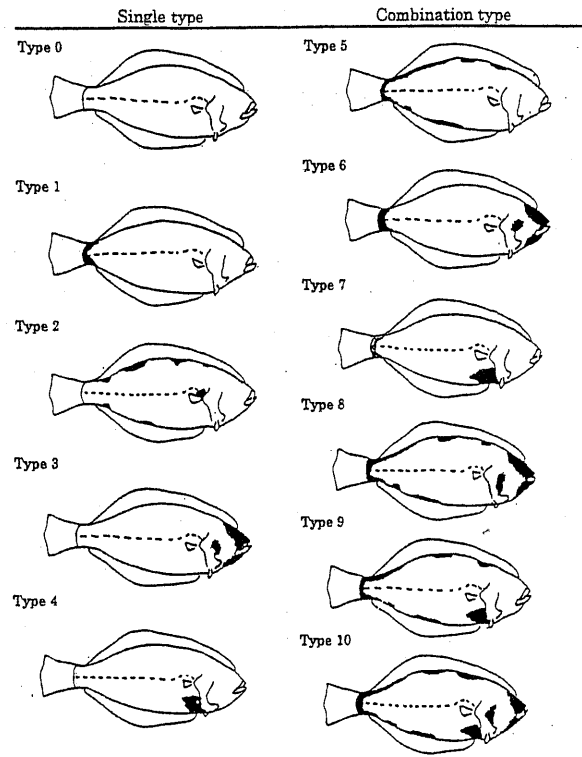


Fig. 3. The type of colour abnormality.

統計処理 無眼側体色異常の観察により得られた結果を統計学的に検定した。検定は二項検定とし, 有意水準 5%, 両側検定を行った。

結 果

飼料分析 飼育試験に用いた3種類の試験飼料ならびに2種類の市販飼料の分析結果を Table 1 に示す。一般組成は, 5区で用いた Y 社の市販配合飼料の粗脂肪含量が他の4種類の配合飼料のそれよりも低く, 逆に灰分含量が高い値を示した。VA 含量は1区を無強化試験飼料としたが, 640 IU/100g となった。これは, X 社の配合飼料原料に由来するものと考えられる。飼料2および3の VA 含量は強化濃度の約 2/3 であった。市販飼料の VA 含量は Y 社が X 社の約 4 倍であった。試験飼料1から3の強化量は 20,000 IU/100g と同一にしたが, 飼料2および3で若干低い値を示した。X 社の市販飼料の分析値は 6,440 IU/100g であり, Y 社の市販飼料には VD はほとんど含まれていなかった。

脂肪酸組成では, Y 社の市販配合飼料中に 20:5n-3 および 22:6n-3 を含む n-3HUFAs が多く含まれていた。成長と生残率 飼育試験の結果を Table 2 に, 各区の成長の推移を Fig. 4 に示す。全長は40日令で 18.9~23.8mm, 50日令で 29.1~33.7mm となり, 水温が高かったために, 18℃での標準的な飼育と比較して成長

Table 1. Analytical results of the experimental diets

	Lot no.				
	1	2	3	4	5
Moisture (%)	0.8	0.8	0.8	3.1	3.3
Crude protein (%)	59.9	61.1	58.0	60.6	56.8
Crude lipid (%)	19.1	18.7	19.0	18.0	15.9
Crude ash (%)	8.8	8.9	9.5	8.3	14.1
Vitamin A (IU/100g)	640	1,140	5,840	1,260	6,200
Vitamin D (IU/100g)	21,760	16,000	17,410	6,440	tr*
Fatty acid (area%)					
20:4n-6	1.1	1.1	1.0	1.1	0.9
20:5n-3	7.5	7.2	7.4	7.3	12.0
22:6n-3	8.1	8.0	7.4	8.5	12.8
Σn-3	18.9	18.4	18.0	19.0	30.0
Σn-6	11.9	11.6	11.6	13.5	3.3
Σn-3HUFA	16.5	16.1	15.6	16.7	26.0

* Less than 100 IU/100g.

Table 2. Results of the 40 days and 50 days rearing experiments

Tank no.	1-A	1-B	2-A	2-B	3-A	3-B	4-A	4-B	5-A	5-B
Water temperature (°C)	20.4-24.9	20.2-25.0	20.3-24.9	20.3-24.9	20.2-25.0	20.2-24.9	20.2-25.0	20.2-24.8	20.3-25.0	20.2-24.9
pH	7.64-8.02	7.64-8.01	7.62-8.02	7.59-8.02	7.61-8.02	7.63-8.01	7.60-8.01	7.62-8.02	7.58-8.02	7.62-8.02
Light intensity (lux)	23-183	8-105	21-177	16-169	20-160	14-145	11-136	8-114	9-142	8-108
Initial										
Number of fish	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
TL* (mm)	3.09	3.09	3.09	3.09	3.09	3.09	3.09	3.09	3.09	3.09
S. D.	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
40days after hatching										
Survival rate (%)	34.9	41.7	27.5	39.9	55.1	41.6	44.1	18.2	38.1	26.0
TL* (mm)	22.91	22.61	23.82	20.78	18.85	20.98	20.65	22.29	21.20	21.58
S. D.	2.83	3.23	3.91	3.43	2.31	4.57	3.15	5.78	2.61	2.55
50days after hatching										
Re-experimental number of fish	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Survival rate (%)	71.2	76.0	76.4	61.2	91.2	52.8	78.8	78.4	80.4	73.2
TL* (mm)	30.53	30.83	31.58	33.74	29.31	30.97	31.76	31.20	29.13	29.23
S. D.	3.75	4.27	4.40	3.73	4.02	4.30	5.89	6.57	4.73	3.79

* TL, total length.

が約10日程優れていた。生残率は40日令で18.2～55.1%，再収容後（40日令）から50日令では52.8～92.8%と区間差が見られた。

体色異常の出現状況 40日令および50日令におけるヒラメの体色異常出現状況ならびに着色部位によるタイプ分けの結果をそれぞれ Table 3 および Fig. 5 に示す。40日令における有眼側白化個体の出現率は13.5～42.0%と区間差が見られた。無眼側の正常個体の出現率を1区を対照として2および3区と比較すると有意差は認められなかった ($p > 0.05$)。ただし、2-B 水槽において黒化魚の出現率が高かった。これは餌料以外の何らかの要因によるものと考えられるが、その要因を特定することはできなかった。次に、50日目にお

る4区と5区の正常個体の出現率を比較すると (Table 3), X社の市販飼料を給餌した4区がY社の市販飼料を給餌した5区よりも有意に低かった ($p < 0.05$)。さらに、4区を対照として1～3区の正常個体の出現率を比較すると、4区よりも1～3区が有意に低かった ($p < 0.05$)。

部位別に黒化の出現状況を観察すると5区を除いて、40および50日令ともに体幹部 (type 2, 9) が最も着色しているのが観察された。

同一区間で40日令と50日令における正常個体出現率と部位別黒化出現率を比較すると (Fig. 5), 1～4区では50日令で正常個体出現率が低下し、体幹部と腹部の着色域 (type 9) が拡大していく傾向が見られた。

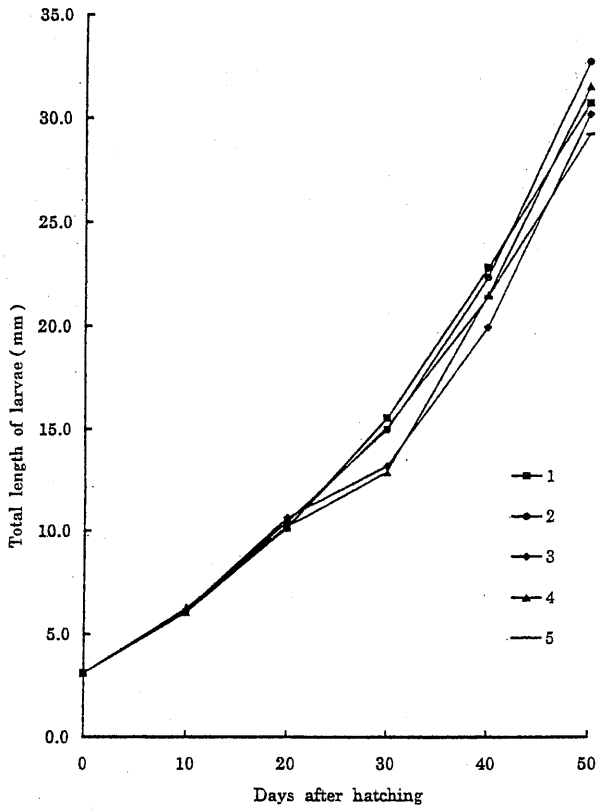


Fig. 4. Larvae growth of the fish fed each experimental lots.

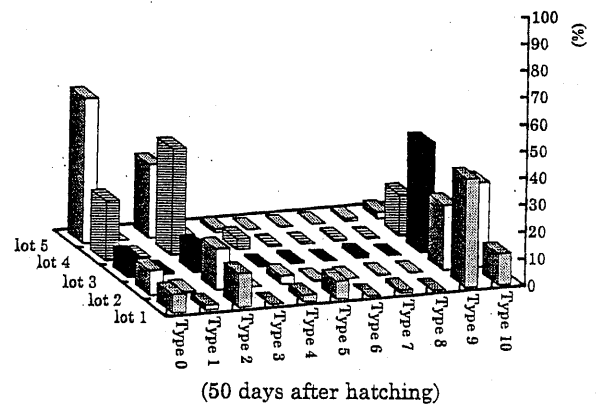
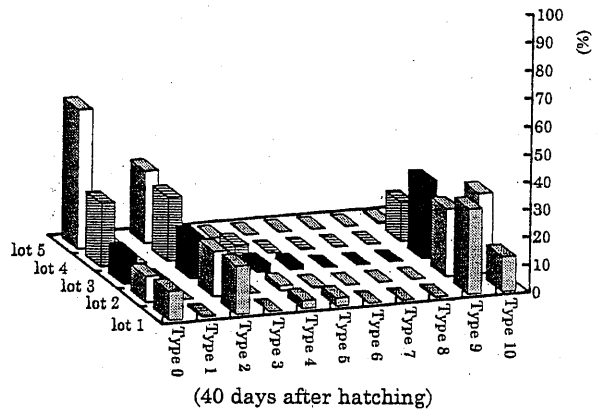


Fig. 5. Type of the colour abnormality.

Table 3. Analytical result of the colour abnormality (40 and 50 days after hatching) (%)

Tank no.		1-A	1-B	2-A	2-B	3-A	3-B	4-A	4-B	5-A	5-B
40 days after hatching* ¹											
Ocular side		26.0	20.0	24.5	13.5	36.5	22.0	42.0	29.5	23.0	22.5
Blind side	W	13.0	7.5	18.0	0.5	10.5	11.0	17.5	28.0	44.5	56.0
	B < 1/2	55.0	61.0	56.5	38.5	49.0	62.5	38.5	41.5	32.5	21.5
	B > 1/2	6.0	11.5	1.0	43.0	4.0	4.5	2.0	1.0	0.0	0.0
	B	0.0	0.0	0.0	4.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
50 days after hatching* ²											
Ocular side		26.0	20.0	24.5	13.5	36.5	22.0	42.0	29.5	23.0	22.5
Blind side	W	Control lot	3.5	13.5	0.0	4.0	6.5	11.5	21.5	36.5	42.5
		#	#	#	#	#	#	Control lot			
	B < 1/2	52.0	49.0	43.5	26.0	47.5	57.5	41.0	34.0	27.0	19.5
	B > 1/2	4.5	8.0	1.0	39.0	1.5	2.0	0.0	0.5	0.0	0.0
B	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Rate of the vertebral Deformity* ³		16.0	14.0	25.0	20.0	18.0	22.0	20.0	18.0	48.0	44.0

*¹ 200 fish were used for the observation experiment.

*² 150 fish were used for the observation experiment.

*³ 50 fish were used for the observation experiment.

Statistical comparison of normal coloration rate on the blind side of *P. olivaceus* juveniles. #: $p < 0.05$. NS: Not significant.

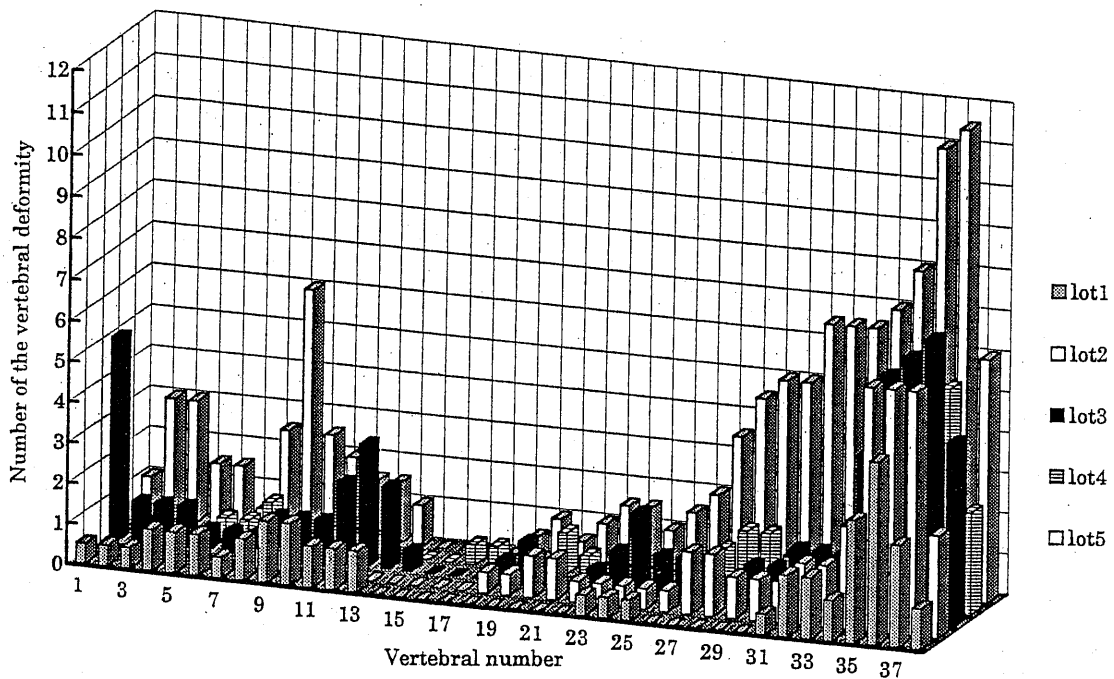


Fig. 6. Occurrence of the vertebral deformity in juvenile flounder 50 days after hatching.

一方、Y社の市販配合飼料を給餌した5区では、40および50日令で正常個体出現率の低下や着色域の拡大はあまり認められなかった。

脊椎骨形態異常 脊椎骨形態異常の観察結果を Table 3 および Fig. 6 に示す。形態異常、特に椎骨の癒合は脊椎骨の後部に多く見られた。また、Y社の市販飼料を用いた5区において異常魚の出現率が高かった。

考 察

本飼育試験は、ヒラメが配合飼料を摂餌し始める全長10mmから、VAの強化量だけを変えた3種類の試験飼料と、2種類の市販飼料を給餌し、全長20mmおよび30mmで無眼側黒化魚の出現状況を観察した。その結果、VAには黒化発現を抑制する効果は認められなかった。

市販飼料を与えた4区と5区の正常個体出現率を比較すると、4区の方が低かった。これら2種類の市販飼料の分析結果を比較するとVA、VDおよびn-3HUFAの含量に違いが認められた。VAには黒化の発現を抑制する効果は認められなかったことから、4区と5区の黒化魚の出現率の違いは2社の市販飼料中のVDかn-3HUFAの含量の違いが関与していることを想起させる。

さらに、X社の市販飼料を用いた4区では同飼料を基本とした試験飼料を用いた1～3区に比較し正常個体の出現率が高かった。これら2種類の配合飼料では

VAとVD含量以外の原材料、成分は統一されており、各区のVAやVDの分析結果から、正常個体出現率の差はVDの含有量の違いによるものと考えられる。特に、2区の試験飼料と4区の市販飼料ではVA含量は約1,200 IUとほぼ同じでありVD含量だけが16,000 IUと6,400 IUと異なっていた。

以上の結果から、VDを20,000 IU/100g強化した配合飼料を給餌すると黒化魚の出現率が高くなるものと推察された。

本試験ではVAと脊椎骨形態異常の関係についてSoftex撮影による解析を行った。その結果、Y社の市販飼料を給餌した5区の異常率が1～4区よりも高かった。この脊椎骨形態異常のパターンは、すでに報告したアルテミアを用いたVA過剰症の傾向^{11,12)}とは多少異なり、癒合は尾椎の27番以降に集中していた。そして、3区(5,840 IU/100g)と5区(6,440 IU/100g)のVA含量にはあまり差がないにもかかわらず、異常率に違いが認められたことから、Y社の市販飼料に含まれるVA以外の何らかの成分、あるいはVAとVDのバランスが脊椎骨異常を誘発している可能性が示唆された。

VDは、哺乳類の場合皮膚で紫外線照射により生合成されたものも経口的に取り込まれたものも、まず肝臓で25-OH-Dに、次いで腎臓で1,25(OH)₂Dに変換されることが知られており、20世紀の初めからくる病の治療薬としても広く用いられてきた¹³⁾。近年、皮膚組織はVDの産生器官としてだけではなく、VDの標

的器官として注目されている。その主な作用は表皮細胞の分化とメラニンの合成である¹⁴⁾。表皮細胞の基底層にはメラニン色素を合成するメラノサイトがある。細胞培養では、メラノサイトは表皮由来の基底細胞層に分散しているが、この培養液に1,25(OH)₂Dを添加するとメラノサイトが目立って観察されるようになる¹⁵⁾。また、Oikawa and Nakayasu¹⁶⁾はヒトに高濃度(10 μg/ml)のVD₂あるいはD₃を投与すると、メラニン合成のkey enzymeであるチロシナーゼ活性が有意に上昇することを報告している。また、新木ら¹⁷⁾もマウスのメラノサイト細胞(B16)を用いて1,25(OH)₂Dがメラニンの合成を促進し、チロシナーゼ活性を高めるとしている。しかし、魚類におけるVDの代謝は哺乳類のそれとは異なる部分が非常に多い。竹内¹⁸⁾によると、皮膚におけるVDの生合成は、日光中の有効紫外線が海水の表層付近で吸収されるため、ヒラメが棲息する海底までは殆ど到達せず、また魚の皮膚中の7-デヒドロコレステロール(DHC)含量はラットの1/100~1/2,000であるため、皮膚におけるVDの生合成は行われないとし、さらに哺乳類では腎臓で1,25(OH)₂Dに変換されるのに対し、魚類では、肝臓においてその代謝が行われると報告している。このように、魚類におけるVDの代謝過程については明らかにされているが、VDの皮膚組織への作用に関する報告例はなく、哺乳類の場合と異なる可能性があるが、本研究の結果から、魚類においてもVDがメラニン合成を促進する作用があるかもしれない。今後は、この仮説を証明するために、ヒラメのメラノサイトの純粋培養技術を確立し、メラニン生成と黒化発現の関係を明らかにする必要があるだろう。

要 約

着底期以降の黒化発現に及ぼすVAとVDの影響を検討することを目的に試験を行った。

試験はVD含有量を同一にし、VA強化量を0, 1,500および9,000 IU/100 gとした3種類の試験飼料区、ならびに黒化発現に差異のある2社の市販飼料区を設け、20日令から給餌を開始し、全長20 mm(ふ化後40日)および30 mm(同, 50日)で黒化の出現状況を観察した。

その結果、VAを9,000 IU/100 g強化しても黒化発現を抑制できなかった。しかし、VD 20,000 IU/100 g強化区(試験飼料区)ではVD 6,440 IU/100 g以下区(市販飼料区)に比べて黒化魚の出現率が高かった。また、市販飼料区の黒化魚の出現率を比較すると、VDをほとんど含まないY社の市販飼料区で正常個体出現率が高く、また成長に伴う黒化発現率の増加や着色部位の拡大は認められなかった。しかし、この市販飼料区

では脊椎骨異常率が高く、これはVAとVDのバランス、あるいはVA以外の何らかの成分による可能性が示唆された。

本研究の一部は水産庁健康育苗育成技術開発事業の一環として行った。ここに謝意を表す。

文 献

- 1) 青海忠久 (1986): ヒラメの白化個体出現に及ぼす飼育中の通気量の影響. 養殖研報, 10, 53-56.
- 2) 川村芳浩・永山博敏・吉岡力男・武田雷介 (1990): ヒラメの白化防除に有効なシオミズツボワムシの脂溶性ビタミン類による強化濃度の検討. 兵庫県水試報, 27, 33-38.
- 3) Seikai, T. (1985): Reduction in occurrence frequency of albinism in juvenile flounder *Paralichthys olivaceus* hatchery-reared on wild zooplankton. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 51(8), 1261-1267.
- 4) Seikai, T. (1985): Influence of feeding periods of Brazilian *Artemia* during larval development of hatchery-reared flounder *Paralichthys olivaceus* on the appearance of albinism. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 51(4), 521-527.
- 5) Seikai, T., T. Watanabe, and M. Shimozaki (1987): Influence of three geographically different strains of *Artemia* nauplii on occurrence of albinism in hatchery-reared flounder *Paralichthys olivaceus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53(2), 195-200.
- 6) Seikai, T., T. Watanabe, and M. Shimozaki (1987): Estimation of larval stage determination the appearance of albinism hatchery-reared juvenile flounder *Paralichthys olivaceus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53(7), 1107-1114.
- 7) Folch, J., M. Lees, and G. H. S. Stanley (1957): A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226(1), 497-506.
- 8) AOAC (1984): Official methods of analysis. 14th. ed. (ed. by S. Williams), AOAC Inc., Virginia, pp. 507-509.
- 9) Takeuchi, A., T. Okano, S. Teraoka, Y. Murakami, and T. Kobayasi (1984): High-performance liquid chromatographic determination of vitamin D in foods, feeds and pharmaceuticals by successive use of reversed-phase and straight-phase columns. *J. Nutri. Sci. Vitaminol.*, 30(1), 11-25.
- 10) Takeuchi, T., K. Watanabe, W.-Y. Yong, and T. Watanabe (1991): Essential fatty acids of grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57(3), 467-473.
- 11) Takeuchi, T., J. Dedi, C. Ebisawa, T. Watanabe, T. Seikai, K. Hosoya, and J. Nakazoe (1995): The effect of β -carotene and vitamin A enriched *Artemia* nauplii on the malformation and color abnormality of larval Japanese flounder. *Fisheries Sci.*, 61(1), 141-148.
- 12) Jusadi, D., T. Takeuchi, T. Seikai, and T. Watanabe (1995): Hypervitaminosis and safe levels of vitamin A for larval flounder *Paralichthys olivaceus* fed *Artemia* nauplii. *Aquaculture*, 133(2), 135-146.

- 13) 須田立雄 (1982) : ビタミンD-その新しい流れ. 講談社, 東京, p. 85.
- 14) Esvelt, R. P., H. F. Deluca, J. K. Wichman, S. Yoshizawa, J. Zurcher, N. Sar, and W. E. Stumpf (1980): 1,25-dihydroxyvitaminD stimulated increase of 7,8-dihydrocholesterol levels in rat skin. *Biochem.*, 19, 6158.
- 15) Suda, T., C. Miyaura, E. Abe, and T. Kuroki (1986): Modulation of cell differentiation, immune response and tumor promotion by vitamin D compound. *Bone and Mineral Research*, 4, p. 1.
- 16) Oikawa, A. and M. Nakayasu (1974): Stimulation of melanogenesis in cultured melanoma cells by calciferols. *FEBS Lett.*, 42, 32-35.
- 17) Hosoi, J., E. Abe, T. Suda, and T. Kuroki (1985): Regulation of synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1,25-dihydroxyvitamin D and retinoic acid. *Cancer Res.*, 45, 1475-1478.
- 18) 竹内敦子 (1994) : 魚類を中心としたビタミンDの比較生物学. *ビタミン*, 68(2), 55-65.

栽培漁業技術シリーズ No. 10

ヒラメの無眼側体色異常個体の出現要因と防除技術

平成16年3月30日発行

発行 独立行政法人 水産総合研究センター
〒101-0047 東京都千代田区内神田3-14-8
ニシザワビル5階
電話 (03) 5296-3181(代)

印刷所 日昇印刷株式会社
〒104-0043 東京都中央区湊1-14-14
電話 (03) 3553-3161(代)