

原著論文

# クロマグロ種苗生産におけるウイルス性神経壊死症防除のためのハマフエフキ受精卵の大量消毒法

樋口健太郎\*・江場岳史\*・田中庸介\*・久門一紀\*・西 明文\*・  
二階堂英城\*・塩澤 聡\*

## Large-scale Disinfection of Eggs of Spangled Emperor *Lethrinus nebulosus* to Prevent Viral Nervous Necrosis in Seed Production of Pacific Bluefin Tuna *Thunnus orientalis*

Kentaro HIGUCHI, Takeshi EBA, Yosuke TANAKA, Kazunori KUMON, Akefumi NISHI, Hideki NIKAIDO and Satoshi SHIOZAWA

Large amounts of yolk-sac larvae are indispensable feed materials in the seed production of Pacific bluefin tuna. Before yolk-sac larvae are used as feed, the fertilized eggs need to be disinfected to prevent viral nervous necrosis in the tuna seed. Electrolyzed seawater containing residual chlorine is a potential disinfectant for use in large-scale production of Spangled emperor eggs for Pacific bluefin tuna. However, the residual chlorine concentration declines rapidly because of the adherence of organic suspended matter to the surface of the eggs. To prevent this decline, we conducted experiments in which we varied two factors, namely the egg-rinse time before disinfection and the flow of electrolyzed seawater into the disinfection tanks. No decline in residual chlorine concentration was observed in disinfection with a 7.0-kℓ/h electrolyzed seawater flow (2 million eggs per 0.5-kℓ tank) after a 2-h egg-rinse (8 million eggs per 0.5-kℓ tank, 1.0-kℓ/h fresh seawater flow) using a total of 2.0 kℓ of fresh seawater (four times the tank volume). Effective large-scale disinfection of eggs is possible with the use of sufficient egg-rinse and electrolyzed seawater flow.

2011年5月2日受付, 2011年9月7日受理

ウイルス性神経壊死症 (Viral Nervous Necrosis 以下, VNN)<sup>1)</sup>の発生は, 種苗生産に甚大な被害を及ぼすため<sup>2,3)</sup>, その防疫体制の構築が必須となっている。このため, クロマグロ *Thunnus orientalis*<sup>4)</sup> やアカアマダイ *Branchiostegus japonicus*<sup>5)</sup> 等の種苗生産現場では, VNN 防疫対策として, 電気分解処理した海水 (以下, 電解海水) を用いた卵消毒が行われている。電解海水は, 海水

を電気分解することで主に生成される次亜塩素酸によって強い消毒効果を有する<sup>6-10)</sup>。実際に, 残留塩素濃度を 0.07 ~ 0.58 mg / ℓ に調製した電解海水を用いて, 多くの魚類病原細菌やウイルスを殺菌あるいは不活化することが可能であると報告されている<sup>6)</sup>。

独立行政法人水産総合研究センター西海区水産研究所 奄美庁舎 (旧奄美栽培漁業センター: 以下, 当センタ

\* 独立行政法人水産総合研究センター 西海区水産研究所 まぐろ増養殖研究センター

〒894-2414 鹿児島県大島郡瀬戸内町俣崎山原 955-5

Research Center for Tuna Aquaculture, Seikai National Fisheries Research Institute, FRA, 955-5 Hyousakiyamahara, Setouchi, Ohshima, Kagoshima 894-2414, Japan.

higuken@affrc.go.jp

一) では、クロマグロ種苗生産の餌料にハマフエフキ *Lethrinus nebulosus* のふ化仔魚を用いている<sup>11)</sup>。ハマフエフキ成魚は飼育環境下で VNN 原因ウイルス (Nervous Necrosis Virus 以下, NNV) を保有することが知られており<sup>11)</sup>, NNV を保有するハマフエフキ親魚から得られたふ化仔魚を餌料に使用することで、クロマグロ仔稚魚への NNV の水平感染を引き起こすおそれがある。したがって、クロマグロ種苗生産における VNN 防疫体制を構築するためには、餌料生物であるハマフエフキふ化仔魚に由来する NNV の水平感染を防止する必要がある。

クロマグロ種苗生産で餌料として供給するハマフエフキふ化仔魚は一日当たり 1,000 万個体以上となることから、これに応じた量のハマフエフキ受精卵を消毒する必要がある。シマアジ *Pseudocaranx dentex* の種苗生産現場では、500 l 消毒水槽に対して受精卵を 10 万粒ずつ収容して卵消毒を行っているが<sup>12)</sup>, クロマグロ仔稚魚の餌料として供給する場合、作業効率を考慮すれば、500 l 消毒水槽に対して少なくとも 100 万粒以上の受精卵を収容して卵消毒を行わなければならない。しかし、大量の受精卵を一度に消毒すると、消毒水槽内の残留塩素濃度が急激に低下し、残留塩素濃度を維持することができない。これは、採卵時に海水とともに混入した、あるいは、卵表面に付着した有機物が大量の受精卵とともに消毒水槽内へ持ち込まれ、残留塩素濃度の低下を引き起こすためであると考えられる<sup>13)</sup>。残留塩素濃度の低下への対策として、卵消毒前に清浄な海水をかけ流した水槽内で受精卵を管理し、有機物を洗い流すこと、すなわち、卵洗浄を行うことが有効であると考えられる<sup>14,15)</sup>。また、卵消毒中に所定の残留塩素濃度を維持するためには、電解海水を消毒水槽内へ注水し、常に新たな次亜塩素酸を消毒水槽内に供給することが必要となる。そこで本研究では、大量のハマフエフキ受精卵に対する電解海水を用いた消毒法の開発を目的として、卵洗浄時間および電解海水の注水量の検討を行った。

## 材料と方法

**供試卵** 当センターの陸上水槽 (150 kl 角型コンクリート水槽 1 面および 50 kl 角型コンクリート水槽 3 面) で養成した天然由来ハマフエフキ親魚 156 尾 (雌 104 尾, 雄 52 尾, 平均尾叉長 54.7 cm, 平均体重 2.7 kg) から自然産卵によって得られた卵を用いた。

**卵洗浄および卵消毒用の海水の調製** 卵洗浄用の海水として、砂ろ過海水を電解殺菌装置 (ESF-045, 荏原実業) により残留塩素濃度 0.5 mg/l で処理した後、活性炭で次亜塩素酸を除去した海水 (以下, 殺菌海水) を用いた。卵消毒用の海水として、砂ろ過海水を海水電解装置 (HSE-100, 東和電機製作所) により残留塩素濃度 0.5 mg/l に調製した電解海水を用いた。残留塩素濃度は、0-

トリジン溶液 (SIGMA 社) で発色させた試水の吸光値 (波長 440 nm) を分光光度計 (DR/2400, HACK 社) により測定し、以下の方法で算出した<sup>16)</sup>。

$$\text{残留塩素濃度 (mg/l)} = \text{吸光値} \times 0.419$$

**試験 1: 卵洗浄時間の検討** 2009 年 10 月 20, 21, 22 日に採卵し、1 日 1 回ずつ合計 3 回の試験を行った。10 月 20, 21, 22 日の親魚飼育水槽の水温はそれぞれ 26.4, 26.4, 26.3°C であった。採卵した卵は、直ちに殺菌海水を満たした 100 l 水槽に収容した。3 分間静置した後、表面に浮上した卵をナイロン製ネットで採集した。得られた卵の受精率は 100% であった。各採卵日において、採卵直後の受精卵の卵径およびふ化率を測定した。卵径は、顕微鏡用デジタルカメラ (DP70, オリンパス社) によって撮影した受精卵の画像から画像解析ソフトウェア (WinROOF, 三谷商事) を用いて各回 30 粒ずつ測定した。ふ化率は、殺菌海水を満たした 500 ml ガラスビーカーに受精卵を約 100 粒ずつ収容し、恒温室内 (26.0°C) で 24 時間管理した後、ふ化仔魚を計数し、以下の方法で算出した。ふ化管理期間は、エアーストーンによる通気で海水を攪拌した。

$$\text{ふ化率 (\%)} = (\text{ふ化仔魚数} / \text{収容卵数}) \times 100$$

得られた受精卵を殺菌海水で満たした 500 l アルテミアふ化水槽 3 面に重量法 (350 g 当たり 100 万粒) で 800 万粒ずつ収容した後、流量 1.0 kl/h の殺菌海水で換水し、卵洗浄を行った。卵洗浄時間を 0, 0.5 および 2 時間とする 3 試験区を設定した。

所定時間の卵洗浄を行った後、電解海水で満たした 500 l 水槽内に設置したナイロン製ネット (縦 70 cm, 横 70 cm, 深さ 95 cm) に供試卵 200 万粒を収容し、残留塩素濃度 0.5 mg/l, 1 分間の卵消毒を行った<sup>11)</sup>。供試卵を一定濃度の電解海水に接触させるため、卵消毒中は、ビニールホース (内径 40 mm) を用いてネット内に残留塩素濃度 0.5 mg/l の電解海水を注水し (流量 7.0 kl/h), 常時ネット内を湯かき棒で攪拌した。1 分間の卵消毒後、電解海水の注水を直ちに停止し、チオ硫酸ナトリウム溶液を終濃度 5 mg/l となるように加えて次亜塩素酸を中和し、卵消毒を終了した (図 1)。各試験区において、卵洗浄後に卵消毒を行った消毒区に対して、次亜塩素酸を含まない殺菌海水を用いて同じ操作を行う対照区を設けた。すなわち、卵洗浄 2 時間消毒区、卵洗浄 2 時間対照区、卵洗浄 0.5 時間消毒区、卵洗浄 0.5 時間対照区、卵洗浄 0 時間消毒区および卵洗浄 0 時間対照区の合計 6 試験区とした。なお、卵消毒中の残留塩素濃度を卵消毒開始直後から 10 秒ごとに測定した。卵消毒に供試した時点の受精卵の発生段階は、卵洗浄 0 および 0.5 時間区で原腸胚後期、卵洗浄 2 時間区で胚体形成初期であった。10 月 20, 21, 22 日の消毒水槽内の水温はそれぞれ 26.4, 26.3, 26.4°C であった。

卵消毒後、試験区ごとに上述と同様の方法でふ化率を

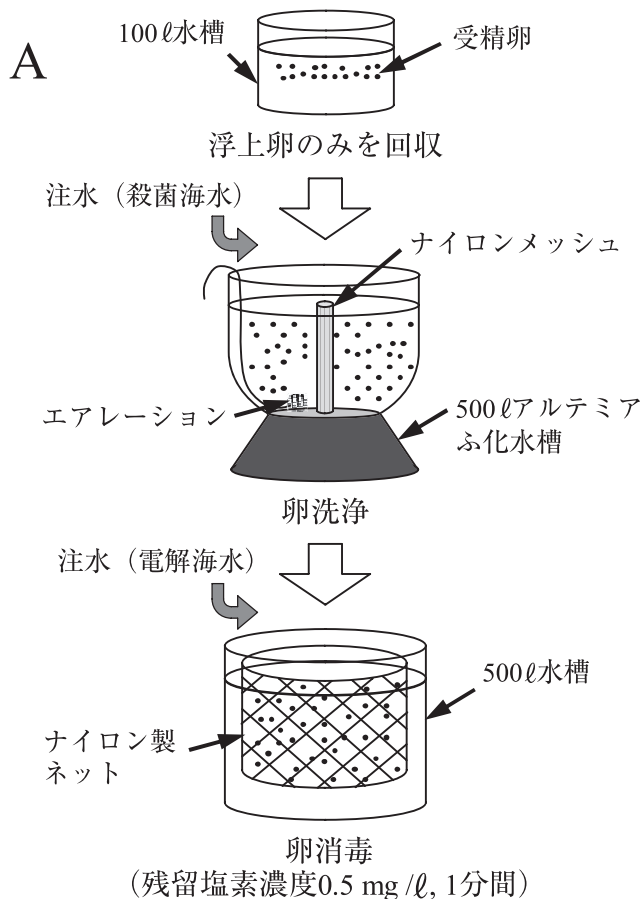


図1. ハマフエフキ受精卵の大量卵洗浄および卵消毒方法  
A: 卵洗浄および卵消毒の手順 B: 卵洗浄に使用したアルテミアふ化水槽 C: 卵消毒風景

算出した。また、未ふ化生残卵（胚は生存しているがふ化できない卵）<sup>17-20)</sup>を計数し、以下の方法で未ふ化生残卵出現率を算出した。

未ふ化生残卵出現率 (%) = (未ふ化生残卵数 / 収容卵数) × 100

**試験2：電解海水の注水量の検討** 2009年11月10, 11, 12日に採卵し、1日1回ずつ合計3回の試験を行った。10月20, 21, 22日の親魚飼育水槽の水温はそれぞれ25.4, 25.3, 25.1℃であった。採卵した卵は、直ちに殺菌海水を満たした100ℓ水槽に収容した。3分間静置した後、表面に浮上した卵をナイロン製ネットで採集した。得られた卵の受精率は100%であった。受精卵800万粒を殺菌海水で満たした500ℓアルテミアふ化水槽へ収容した後、流量1.0 kℓ/hで殺菌海水を用いて換水し、2時間の卵洗浄を行った。試験1と同様の方法で残留塩素濃度0.5 mg / ℓ, 1分間の卵消毒を行った。卵消毒中に注水する電解海水の量を0.0, 3.0および7.0 kℓ/hとする3試験区を設定した。卵消毒中の残留塩素濃度を卵消毒開始直後から10秒ごとに測定した。11月10, 11,

12日の消毒水槽内の水温はそれぞれ25.3, 25.4, 25.2℃であった。なお、卵消毒に供試した時点の受精卵の発生段階は、胚体形成初期であった。

**統計処理** 試験1に供試した受精卵の卵径を一元配置分散分析、ふ化率を $\chi^2$ 検定に処した。また、試験1において、ふ化率および未ふ化生残卵出現率を逆正弦変換し、卵消毒の有無および卵洗浄時間を要因とした二元配置分散分析を行った。

## 結 果

**試験1：卵洗浄時間の検討** 10月20, 21, 22日に採卵した受精卵の卵径は、それぞれ $0.81 \pm 0.02$  (平均値 ± 標準偏差),  $0.80 \pm 0.02$ ,  $0.80 \pm 0.02$  mmであり、有意差は認められなかった ( $F = 2.28$ ,  $P = 0.11$ )。卵洗浄および卵消毒を行わない採卵直後の受精卵のふ化率は、それぞれ96.3, 95.1, 96.2%であり、有意差は認められなかった ( $\chi^2 = 0.69$ ,  $P = 0.71$ )。

卵消毒開始直後から10秒経過毎の残留塩素濃度は、

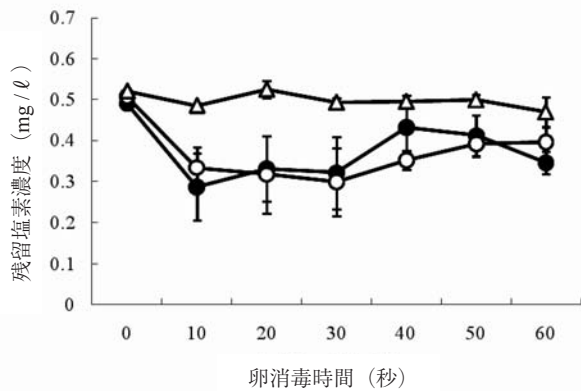


図2. 試験1における卵消毒中の残留塩素濃度の変化  
●：卵洗浄0時間区 ○：卵洗浄0.5時間区  
△：卵洗浄2時間区  
値は平均値，バーは標準誤差を示す (n=3)

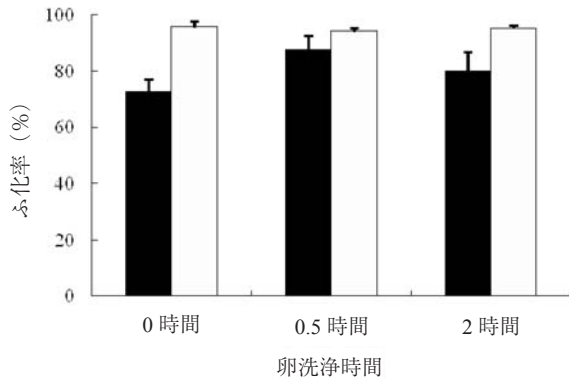


図3. 試験1の各試験区における卵消毒後のふ化率  
■：消毒区 □：対照区  
値は平均値，バーは標準誤差を示す (n=3)

卵洗浄0時間区で0.49, 0.29, 0.33, 0.32, 0.43, 0.41, 0.35 mg/l, 卵洗浄0.5時間区で0.51, 0.33, 0.32, 0.30, 0.35, 0.39, 0.40 mg/l, 卵洗浄2時間区で0.52, 0.49, 0.53, 0.49, 0.50, 0.50, 0.47 mg/lであった(図2)。卵洗浄2時間区のみにおいて、卵消毒中の残留塩素濃度の低下は認められなかった。

ふ化率は、消毒区の卵洗浄0時間区, 0.5時間区, 2時間区でそれぞれ72.9 ± 7.2 (平均値 ± 標準誤差), 87.8 ± 8.3, 80.2 ± 11.3%, 対照区の卵洗浄0時間区, 0.5時間区, 2時間区でそれぞれ95.8 ± 3.7, 94.3 ± 1.9, 95.4 ± 1.8%であり、消毒区で低い傾向が認められた(図3)。未ふ化生残卵出現率は、消毒区の卵洗浄0時間区, 0.5時間区, 2時間区でそれぞれ23.6 ± 7.3 (平均値 ± 標準誤差), 10.0 ± 6.2, 17.6 ± 11.3%, 対照区の卵洗浄0時間区, 0.5時間区, 2時間区でそれぞれ0.3 ± 0.5, 1.3 ± 2.2, 0.6 ± 1.0%であり、消毒区で高い傾向が認められた(図4)。二元配置分散分析の結果、ふ化

率および未ふ化生残卵出現率ともに卵消毒の有無に有意差が認められたが、卵洗浄時間に有意差は認められなかった(表1および表2)。

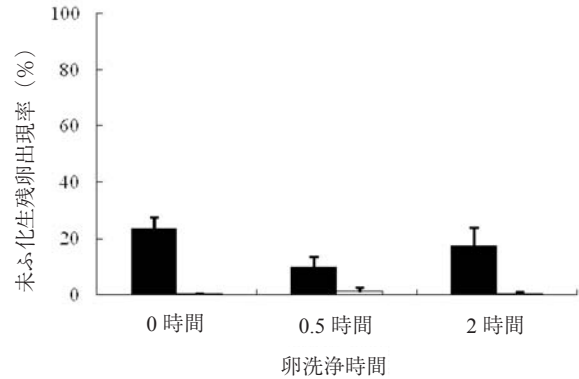


図4. 試験1の各試験区における卵消毒後の未ふ化生残卵出現率  
■：消毒区 □：対照区  
値は平均値，バーは標準誤差を示す (n=3)

表1. 二元配置分散分析によるふ化率の検定結果

	偏差平方和	自由度	F値	P値
卵消毒	827.44	1	20.08	< 0.01
卵洗浄時間	48.12	2	0.58	0.57
卵消毒 × 卵洗浄時間	189	2	2.29	0.14
誤差変動	494.5	12		
総変動	1559.05	17		

表2. 二元配置分散分析による未ふ化生残卵出現率の検定結果

	偏差平方和	自由度	F値	P値
卵消毒	1947.70	1	51.34	< 0.01
卵洗浄時間	63.27	2	0.83	0.46
卵消毒 × 卵洗浄時間	134.39	2	1.77	0.21
誤差変動	455.22	12		
総変動	2600.59	17		

試験2：電解海水の注水量の検討 卵消毒開始直後から10秒経過毎の残留塩素濃度は、注水量0.0kl/h区で0.51, 0.29, 0.40, 0.40, 0.32, 0.35, 0.37 mg/l, 注水量3.0kl/h区で0.53, 0.40, 0.45, 0.40, 0.38, 0.36, 0.43 mg/l, 注水量7.0kl/h区で0.55, 0.50, 0.54, 0.53, 0.47, 0.58, 0.54 mg/lであった(図5)。注水量7.0kl/h区においてのみ、卵消毒中の残留塩素濃度の低下は認められなかった。



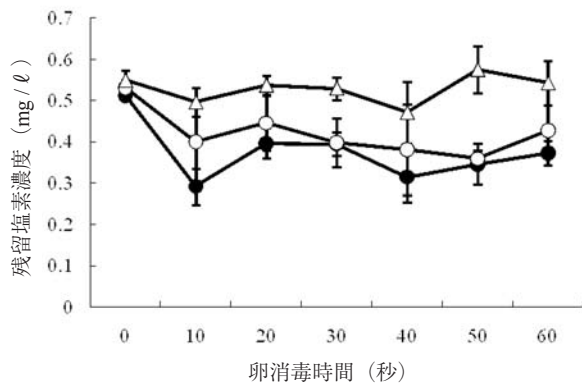


図5. 試験2における卵消毒中の残留塩素濃度の変化  
 ●：注水量 0.0 kl/h ○：注水量 3.0 kl/h △：注水量 7.0 kl/h  
 値は平均値，バーは標準誤差を示す (n=3)

## 考 察

電解海水を用いた受精卵の大量消毒時における残留塩素濃度の低下の防止を試みたところ、卵洗浄を2時間、合計4倍量の殺菌海水を用いて行った場合のみ残留塩素濃度の低下が生じなかった。このことは、大量の受精卵を消毒する場合において、十分に卵洗浄を行うことが卵消毒中の残留塩素濃度の低下の防止に有効な手段であることを示している。一般に、採卵時に海水とともに混入した、あるいは、卵表面に付着した有機物が残留オキシダントや有効ヨウ素などの消毒成分の濃度低下を引き起こすことが知られている<sup>13)</sup>。また、卵消毒前にろ過海水で受精卵の洗浄を繰り返すことで、洗浄後の海水の化学的酸素要求量が順次低下することが報告されており、卵洗浄により卵表面に存在する有機物が除去されることが明らかにされている<sup>21)</sup>。ヒラメ *Paralichthys olivaceus* の例では、卵消毒前に受精卵の洗浄が行われているが、一度に消毒する受精卵数が少ないため(10～30万粒)、3分間の卵洗浄を行えば消毒成分の濃度低下を防ぐことが可能である<sup>13)</sup>。本研究の結果が示すように、クロマグロ仔稚魚の餌料供給に用いられるような100万粒単位の受精卵を電解海水を用いて一度に消毒する場合、卵を収容した海水の4倍量の新鮮な海水を用いて十分な卵洗浄を行うことが卵消毒中の残留塩素濃度の急激な低下の防止に必要なことが明らかとなった。

卵洗浄を2時間行った場合、卵洗浄を0および0.5時間行った場合と比較してふ化率の低下は見られなかった。本試験では採卵日の異なる受精卵を供試したが、各採卵日の卵径および採卵直後の受精卵のふ化率に有意差はなかった。また、卵消毒に供試した受精卵の発生ステージは原腸胚後期および胚体形成初期であったが、ハマフエフキ受精卵に対して残留塩素濃度 0.5 mg/l、1分

間の卵消毒を行った場合、桑実胚初期からふ化直前までのいずれのステージにおいても同様のふ化率を示すことが報告されている<sup>11)</sup>。したがって、本試験条件下において消毒後のふ化率に影響を及ぼす要因は卵洗浄時間のみであったと想定され、2時間の卵洗浄はハマフエフキ受精卵のふ化に対して影響を及ぼさないことを示している。

試験1において、対照区のふ化率と比較して消毒区のふ化率が有意に低下した。また、消毒区では未ふ化生残卵出現率の増加が認められた。電解海水を用いた卵消毒を行った場合、未ふ化生残卵出現率の増加がアカアマダイ<sup>5)</sup>やコチの一種 *Platycephalus* sp.<sup>22)</sup> 等で知られている。したがって、消毒区のふ化率の低下は受精卵が電解海水に暴露されたことによって引き起こされたと考えられる。三村ら<sup>20)</sup>は、海水のオゾン処理によって発生した残留オキシダントを含む海水に受精卵を暴露した場合、残留オキシダントの作用により卵膜の変性および卵膜の膨張過程の欠如が発生し、未ふ化生残卵が生じると推察している。受精卵を電解海水に暴露した場合においても次亜塩素酸あるいは電解海水に含まれるその他の残留オキシダントによって同様の現象が発生し、未ふ化生残卵出現率が増加した可能性が考えられる。しかし、本研究におけるいずれの試験区の消毒区においても、得られたふ化率は80%前後と高く、本研究で見られたふ化率の低下は実用可能な範囲内であると考えられる。

試験2において、電解海水を7.0 kl/hで注水した場合のみ残留塩素濃度の低下が起らなかった。したがって、200万粒のハマフエフキ受精卵を一度に消毒する場合、消毒水槽500 lに対して7.0 kl/hの電解海水を消毒水槽内に注水することで、残留塩素濃度が維持され、安定した消毒効果が期待できる。

本研究の結果から、受精卵を収容した海水の4倍量の新鮮な海水を用いて十分な卵洗浄を行うこと、消毒水槽500 lに対して7.0 kl/hの電解海水を消毒水槽内に注水することにより、大量のハマフエフキ受精卵に対する電解海水を用いた効果的な消毒が可能となった。今後、本研究の方法により、ハマフエフキふ化仔魚に由来するクロマグロ仔稚魚へのNNVの水平感染の防除が可能となり、クロマグロ種苗生産におけるVNN防疫体制の強化が期待される。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、ハマフエフキ親魚管理および採卵にご協力いただきました独立行政法人水産総合研究センター西海区水産研究所奄美庁舎の契約職員の皆様に感謝いたします。

## 文 献

- 1) YOSHIKOSHI, K., and K. INOUE (1990) Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel). *J. Fish Dis.*, **13**, 69-77.
- 2) MUNDAY, B. L., J. KWANG, and N. MOODY (2002) Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *J. Fish Dis.*, **25**, 127-142.
- 3) 西岡豊弘・古澤 徹・水田洋之助 (1997) 種苗生産過程の海産魚介類における疾病発生状況. 水産増殖, **45**, 285-290.
- 4) 手塚信弘・升間主計・武部孝行・二階堂英城・井手健太郎 (2004) クロマグロ種苗生産におけるオキシダント処理海水のウイルス性神経壊死症 (VNN) への防除効果. 栽培漁業センター技報, **1**, 76-79.
- 5) 竹内宏行・升間主計・渡辺 税・中川 亨・町田雅春 (2008) オキシダント海水がアカアマダイ卵に及ぼす影響. 栽培漁業センター技報, **8**, 5-8.
- 6) 笠井久会・石川麻美・堀 友花・渡辺研一・吉水 守 (2000) 流水式電解装置の魚類病原細菌およびウイルスに対する殺菌効果. 日水誌, **66**, 1020-1025.
- 7) 笠井久会・渡辺研一・吉水 守 (2001) バッチ式海水電解装置の魚類病原細菌およびウイルスに対する殺菌効果. 水産増殖, **49**, 237-241.
- 8) 渡辺研一・吉水 守 (2001) 電解海水による飼育器具の消毒. 日水誌, **67**, 304-305.
- 9) JORQUERA, M. A., G. VALENCIA, M. EGUCHI, M. KATAYOSE, and C. RIQUELME (2002) Disinfection of seawater for hatchery aquaculture systems using electrolytic water treatment. *Aquaculture*, **207**, 213-224.
- 10) KATAYOSE, M., K. YOSHIDA, N. ACHIWA, and M. EGUCHI (2007) Safety of electrolyzed seawater for use in aquaculture. *Aquaculture*, **264**, 119-129.
- 11) 井手健太郎・手塚信弘・二階堂英城・武部孝行・升間主計 (2004) オキシダント海水がハマフエフキ卵のふ化に及ぼす影響. 栽培漁業センター技報, **2**, 100-103.
- 12) 塩澤 聡 (1998) オゾン殺菌システムの種苗生産現場への導入事例. 「栽培漁業技術研修事業基礎理論コーステキスト集XI」, 社団法人日本栽培漁業協会, 東京, 11-18pp.
- 13) 山田徹生 (2008) 宮古栽培漁業センターにおけるヒラメのVNN防除対策. 「栽培漁業技術シリーズ13 ヒラメVNN防除に関するこれまでの取り組み」(森広一郎編), 独立行政法人水産総合研究センター, 神奈川, 32-49pp.
- 14) CHAPMAN, P. F., and R. W. ROGERS (1992) Decline in iodine concentration of iodophore during water hardening of salmonid eggs and methods to reduce this effect. *Prog. Fish-Cult.*, **54**, 81-87.
- 15) 太田健吾・有瀧真人・渡辺研一 (2008) オキシダント海水およびポビドンヨード剤がヒラメ *Paralichthys olivaceus* 卵のふ化率に及ぼす影響. 日水誌, **74**, 653-659.
- 16) 三村 元・長光貴子・片山泰人・長瀬俊哉 (1999) 海水中の残留オキシダントの $\alpha$ -トリジン法による簡易測定. 水産増殖, **47**, 103-110.
- 17) HALL, L. W. Jr., D. T. BURTON, and L. B. RICHARDSON (1981) Comparison of ozone and chlorine toxicity to the developmental stages of striped bass, *Morone saxatilis*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **38**, 752-757.
- 18) 磯野良介・伊藤康男・木下秀明・城戸勝利 (1993) シロギス卵・稚魚の生残に及ぼす海水オゾン処理の影響. 日水誌, **59**, 1527-1533.
- 19) 三村 元・長瀬俊哉・片山泰人・長光貴子・難波憲二 (1998) オゾン処理海水のヒラメ *Paralichthys olivaceus* 卵に対する影響. 水産増殖, **46**, 101-110.
- 20) 三村 元・長瀬俊哉・片山泰人・難波憲二 (1999) 未ふ化生残卵の生理学的小および組織学的考察. 日水誌, **65**, 448-456.
- 21) 有元 操 (1996) シマアジのウイルス性神経壊死症に関する研究. 「特別研究報告10号」, 社団法人日本栽培漁業協会, 東京, 33-37pp.
- 22) 石黒宏昭 (2006) 残留オキシダント海水によるマゴチ卵の消毒における適正な卵発生段階 (短報). 千葉水総研報, **1**, 111-113.