

人工孵化マハタの形態異常低減に関する研究*1

辻 将治*2

Study on the malformation in artificially hatched seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* (Thunberg)

MASAHARU TSUJI

Abstract : In recent years, the emphasis has been given on the seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* (Thunberg) in Mie prefecture as an alternative cultured fish species to a red sea bream *Pagrus major*. The Mie Prefecture Fisheries Research Institute has been studying techniques for seedling production of the seven-band grouper to develop a viable aquaculture system for this species since 1996. As a result of this effort, the improved rearing techniques have recently increased larval survival ratio, and at the present time the Mie Prefectural Fish Farming Center can produce approximately 200,000 to 300,000 seedlings in a season. However, the occurrence of skeletal malformations at larval (from hatch out to 3.0 cm TL) and juvenile (3.0-15.0 cm TL) stages has a major negative impact on the commercial aquaculture of this species, as they reduce the quality of seedlings and decrease production efficiency. In the present study, the particular kinds of skeletal malformations and their induction factors were identified in the seven-band grouper. In addition, the preventive measures were developed.

In chapter I, types of skeletal malformations and their incidences were investigated in the mass seedling production of seven-band grouper, and their reduction procedure was identified. In chapter II, the effect of water temperature on the occurrence, types and frequencies of malformations was examined in cultured larvae and juveniles, and the optimum rearing temperature to minimize those malformations was identified. In chapter III, the relationship between swim bladder inflation failure and malformations in later developmental stages was examined. It was demonstrated that the inflation failure at early stage is the main reason of the spinal curvature observed at the later stages in the seven-band grouper seedlings. Moreover, promotion or inhibition conditions for initial swim bladder inflation were investigated. In chapter IV, the effects of food amount and water current condition on spinal curvature (lordosis and kyphosis) induction were investigated during juvenile stage.

Chapter I : Type of skeletal deformities and their incidence

Types of skeletal malformations, their incidences and prevention methods were investigated to improve the mass seedling production of seven-band grouper (10-15 cm in total length: TL) in the Mie prefecture during 2004-2010. Skeletal malformations in specimens were classified into the following four categories: spinal curvature (lordosis or kyphosis), fusion or defects of the centra, deformation of the centra and saddleback syndrome. The most frequently observed skeletal malformation was spinal curvature throughout the studies, although the frequency fluctuated widely which ranged from 2.5 to 22.2%. Additionally, the

*1 近畿大学学位審査論文 (2015年3月)

*2 三重県津農林水産事務所水産室漁政課

frequency fluctuation ranges of fusion or defects of the centra, and the deformation of centra and saddleback syndrome were 0.9 to 21.1%, 0 to 18.2%, and 0 to 4.1%, respectively. Consequently, it is necessary to prevent spinal curvature as much as possible to improve the efficiency in seven-band grouper seedling production.

Chapter II : The effect of water temperature on the frequency and types of malformations

Information on the causes of malformations in cultured seven-band grouper is scarce except for the possibility of unsuitable rearing temperature. In the present study, the effects of rearing temperature (23-29°C) at larval and juvenile stages on skeletal malformations were investigated, and the optimum culture temperature was identified. Growth was accelerated at higher temperatures, and the survival rate of juveniles 30-40 mm TL was higher at 25 and 26°C. Incidence of deformation of the centra was higher at higher temperatures, while the incidence of bifurcated neural spine was significantly higher at 23°C than at other temperatures. On the other hand, incidences of spinal curvature and fusion or defects of centra in juveniles were not related to rearing temperature. Comprehensively, the frequency of malformed individuals was lower at 25-27°C. The results of this study suggest that the optimum culture temperature range for seven-band grouper is 25-26°C.

Chapter III : The relationship between swim bladder inflation and malformations

In this chapter, the promotion of initial swim bladder inflation was effective in preventing spinal curvature. In many percomorph species, as a method to promote initial swim bladder inflation, a surface skimmer has been shown to be effective in removing the oily surface film from the rearing water surface during the larval stage. Since the oily film at the water surface forms a barrier at the air-water interface, its removal would provide a better gulping atmosphere for larvae. In contrast, since the water surface tension-related larval death frequently occurs at the prelarval stage in commercial seedling production of this species, it is recommended that oil should be poured on the water surface to prevent this mortality. In this species, removal of the oily surface film to promote larval swim bladder inflation is methodologically antagonistic to the prevention of water surface mortality. As the first priority for seedling production is to secure seedling survival, the presence of oil film at the water surface is a general practice in seedling culture. Therefore, this study was aimed to establish a new rearing method which strikes a balance between the prevention of water surface mortality and the promotion of initial swim bladder inflation to get more benefits.

The developmental stage of swim bladder inflation was assessed by histological observation, which confirmed that the start-time of initial swim bladder inflation is the pre-flexion stage. Therefore, removal of the oily surface film and/or autogenous surface substances should be conducted at the pelagic larval stage prior to the pre-flexion stage.

To confirm whether the gulping of atmospheric air by larvae is involved in initial swim bladder inflation, frequencies of swim bladder inflation was compared under following three types of water surface rearing conditions: (i) removal of the oily surface film and/or autogenous surface substances (ROF), (ii) without removal of the oily surface film (covering of water surface with oil film; COF group), and (iii) sealing of water surface with liquid paraffin (SLP group). From 0 to 10 days after hatching (DAH), plant oil was poured on the surface of each rearing tank in the ROF group to prevent water surface death, and removal of the oily surface film and/or autogenous surface substances (overflow method; water exchange rate of 6-23% of tank volume per day) was conducted from 11 or 12 DAH when larvae were mostly at the pelagic

developmental stage. In the COF group, oil was poured on the surface of each rearing tank and removal of the oily surface film was not carried out. In the SLP group, liquid paraffin (7-mm-thick layer) was poured on the surface to inhibit the gulping of atmospheric air by larvae. Initial swim bladder inflation was confirmed in the ROF to start on 14 DAH. The maximum frequency of swim bladder inflation (40%) was found in ROF group, which was significantly higher than that of 2.3-19.0% and 0.8-5.8% in COF and SLP groups, respectively. Therefore, the larval swim bladder inflation rate was promoted by gulping air at water surface, which was facilitated by removal of the oily surface film. Additionally, no significant difference existed in survival rate among the groups. Thus, it can strike a balance between the prevention of water surface mortality and the promotion of initial swim bladder inflation by removal and addition of oil film at appropriate time.

In this study, the frequency of swim bladder inflation was found to be generally low compared with other species. There is the possibility that water current created by aeration affects larval behavior in gulping atmospheric air. Therefore, frequency of swim bladder inflation was compared under following four types of aeration rate in 500-L polyethylene tanks: 0.01, 0.05, 0.10 and 0.50 l/min. The frequency of swim bladder inflation in 0.50 l/min group was significantly lower than that in the other groups. Current velocity at 5 cm below the water surface in 0.50 l/min group was 1-3 cm/sec. Since larvae could not stay at near the water surface due to strong water current, there is possibility that it inhibits larval behavior in gulping atmospheric air. Therefore, it was concluded that the weak ventilation (0.01-0.10 l/min) during the oil removal period is effective in promoting of initial swim bladder inflation.

Chapter IV : The effects of food amount and water current condition on spinal curvature

In other species, juvenile lordosis occurred by the unsuitable rearing condition, regardless of the individuals with or without inflated swim bladders. Thus, this study examined the effect of food amount and water current condition on spinal curvature (lordosis and kyphosis) induction in juveniles. An experiment was conducted with the following four different rearing conditions: small amount feeding/low current velocity (Experimental group A), large amount feeding/low current velocity (Experimental group B), large amount feeding/middle current velocity (Experimental group C) and large amount feeding/high current velocity (Experimental group D). One hundred randomly selected seedlings (7.2 ± 1.0 cm TL, 6.2 ± 2.6 g in body weight, 98DAH) were transferred into each 500-l polyethylene tank. Rearing trial was carried out in duplicate per group and was conducted from 98 DAH until 136 DAH. In group A and B, to prevent strong water current by aeration, one hemispherical aerator (aeration; 0.5 l/min) was placed on the bottom sidewall of each rearing tank. In group C and D, to generate more strongly horizontal rotary current, 2 small gutters equipped with aerator (airlift, group C; 1.5 l/min/place, group D; 5.0 l/min/place) at the bottom which were fixed along the either sidewall. Current velocity of rearing water at each group was determined using the electromagnetic current meter. Daily feeding rate was 2%BW/day (group A) and 6%BW/day (group B to D). The frequency of feeding per day was once in group A (2% daily feeding rate/time) and five times in group B (1.2% daily feeding rate/time). The anesthetized samples were used to assess skeletal malformations (lordosis and kyphosis) and frequency of swim bladder inflation by soft X-ray examination at the end of the experiment. The frequency of swim bladder inflation was 44.2% at the start of experiment, and at the end of the experiment it was significantly higher in group A to D (72.3-88.7%) compared with the start of experiment. It has been confirmed that fish with an uninflated swim bladder at the early larval stage can inflate it later (so-called secondary inflation) in all groups.

The frequency of kyphosis was not significantly different. Thus, it was shown that lordosis is induced by large amount of feeding (6%) during the juvenile period. In group B, the intensive swimming was confirmed at every feeding, and the visual observation suggested that juveniles expanded the abdomen by filling the stomach with diet. Thus, lordosis might develop due to an excessive load on vertebral column or swim bladder by an intense swimming behaviour and the cumulative filling stomach with diet at every feeding. On the contrary, the frequency of kyphosis was significant higher in group D than that of the start of the experiment and in other groups, and it was shown that kyphosis is induced by strong water current due to strong aeration. Continuous swimming time was increased with the increase of aeration rate (current velocity). Therefore, kyphosis might develop due to an excessive load on vertebral column by continuous intense swimming. Additionally, large amount feeding and high current velocity caused the bending angles to be acute up to 40 degrees. Therefore the spinal curvature develops depending on environmental factors (e.g., large amount feeding and strong water current) while secondary swim bladder inflation had been steadily developed. It is possible to prevent the spinal curvature induction under the rearing conditions corresponds to the group A, i.e., daily feeding rate and water velocity of less than 2% and 0.09 m/ sec, respectively.

Conclusion

In the present study, the most frequently observed skeletal malformation was identified as spinal curvature (lordosis and kyphosis) in the seedling production of the seven-band grouper, and their induction factors were identified as the failure of swim bladder inflation at the larval stage and unsuitable rearing condition (food amount and current condition) at juvenile stage. In addition, the removal of oily surface film until 10 DAH and the addition of oil film from 11 DAH to prevent water surface death will provide a balance between the prevention of water surface mortality and the promotion of initial swim bladder inflation. The results also suggest that the optimum range of culture temperature for seven-band grouper is 25-26° C. Furthermore, in juvenile period, the spinal curvature developed due to the large amount feeding and strong water current, which suggests that the spinal curvature can be reduced by controlling the environmental factors (e.g., small amount feeding and weak water current condition). However, the secondary swim bladder inflation had been steadily developed.

Although these series of studies have preliminary pointed out some causes and remedies of malformations, a detail clarification of the mechanisms involved is necessary to further improve the efficiency of seven-band grouper seedling production to ensure sustainable aquaculture system.

目 次

序 論	7
本 論	
第 I 章 形態異常の発生状況	
I -1. 緒言	8
I -2. 材料および方法	8
I -3. 結果	9
I -4. 考察	9
第 II 章 飼育水温と形態異常	
II -1. 緒言	11
II -2. 材料および方法	12
II -3. 結果	15
II -4. 考察	17
第 III 章 鰾の開腔と形態異常	
緒 言	21
第 1 節 飼育水面の性状と鰾の開腔	22
III-1-1. 材料および方法	22
III-1-2. 結果	26
III-1-3. 考察	28
第 2 節 通気量と鰾の開腔	31
III-2-1. 材料および方法	31
III-2-2. 結果	34
III-2-3. 考察	36
第 3 節 鰾の開腔と形態異常	39
III-3-1. 材料および方法	39
III-3-2. 結果	41
III-3-3. 考察	41

第IV章 給餌量および流速と稚魚の形態異常

IV-1. 緒言	44
IV-2. 材料および方法	44
IV-3. 結果	52
IV-4. 考察	55
和文要旨	58
謝 辞	60
文 献	61

序 論

近年、ハタ科魚類は、天然資源の希少性および高い市場価値、さらに早い成長等により、熱帯から亜熱帯域における新しい養殖対象魚として注目されている (Fukuhara 1989 ; Tucker 1999 ; Pierre et al. 2008)。日本においても、幾つかの研究機関が、ハタ科魚類の一種であるマハタ *Hyporthodus septemfasciatus* (Craig and Hastings 2007) 養殖に関する技術を開発するため、親魚の成熟、産卵および人工種苗生産技術に関する様々な研究 (北島ら 1991 ; 土橋ら 2002 ; 塩谷ら 2003 ; 土橋ら 2003a, 2003b ; Shein et al. 2004 ; Shiotani et al. 2005 ; 田中ら 2005 ; Sakakura et al. 2006 ; Nagano et al. 2007 ; Sakakura et al. 2007a, 2007b ; 土橋ら 2007 ; Ruttanapornvareesa kul et al. 2007 ; 照屋ら 2008 ; Kline et al. 2008 ; 平田ら 2009a ; Sabate et al. 2009 ; Koh et al. 2010 ; Ruttanapornvareesakul et al. 2010 ; Wu et al. 2011 ; Wullur et al. 2011 ; Koh et al. 2013) を実施している。その結果、一事業所で10万尾単位のマハタの種苗生産が可能なまでに技術は進歩し (Nagano et al. 2007 ; 照屋 2009, 2010)、三重県水産研究所尾鷲水産研究室および (公財) 三重県水産振興事業団尾鷲栽培漁業センターも、2001年、2004年、2006年および2008~2014年にかけて、年間約10万尾から30万尾の種苗生産に成功している。現在、三重県では、初期飼育期 (受精卵孵化から全長約3 cmまで) の終了後、引き続き陸上水槽で稚魚の中間育成を行い、ウイルス性神経壊死症 (VNN) 対策としてワクチン (オーシャンテクトVNN, 日生研, 東京) を接種後、全長約13 cmで海面生簀に收容して継続飼育を行い、受精卵から約6ヵ月後に全長約15 cmの人工種苗を養殖業者に出荷している。しかし、ハタ科魚類の人工種苗では外部形態や骨の異常が発生することが知られ (Song et al. 2005 ; Russo et al. 2011)、マハタの人工種苗においても、上下顎異常および脊椎骨前彎症 (Nagano et al. 2007) が確認されるほか、脊椎骨後彎症、背鰭陥没、脊椎骨の癒合・椎体欠損、骨梁異常、鰓蓋欠損などの形態異常が発生して種苗の価値や生産効率を低下させる大きな問題となり、その防除策の開発が急務になっている。

人工種苗での形態異常発生については、これまでに多くの魚種で、様々な要因が報告されている (Divanach et al. 1996 ; Gavaia et al. 2002 ; Cahu et al. 2003 ; Koumoundouros 2010 ; Cobcroft and Battaglène 2013)。しかし、

マハタでは、Uji et al. (2013, 2014) が胚の体節形成期に発生する体節の分節異常が脊椎骨の異常 (脊椎骨椎体の欠損) を引き起こす可能性に言及し、体節分節異常の原因として体節形成期の低酸素濃度を指摘しているほか、Nagano et al. (2007) が、骨変形 (特に上下顎の変形) の発生に飼育水温が関与する可能性を示したのみであり、人工種苗に形態異常が出現する原因については不明な点が多い。三重県は、先述のとおり年間約10万尾以上の種苗生産が可能で生産技術を保有するが、受精卵を飼育水槽に收容してから約6ヵ月後の全長約13~15 cmに成長する間に、高率で形態異常が出現することがあり、形態異常防除の観点からは、正常な発育および成長に必要な飼育環境が長期に渡り継続されていないと考えられる。

マダイ *Pagrus major* では、仔魚期における鰾の開腔不全が脊椎骨屈曲の原因とされ (北島ら 1981 ; Kitajima et al. 1994)、多くの魚種で鰾の開腔不全の原因となる飼育水面の油膜と鰾の開腔の関係 (Chatain and Ounais-Guschemann 1990 ; Battaglène et al. 1994 ; Trotter et al. 2005 ; 川辺・木村 2008 ; 今井ら 2001 ; Kurata et al. 2012 ; Summerfelt 2013 ; Kurata et al. 2014) が調査されているが、マハタではその関係性が検討されていない。また、他魚種では、稚魚期の不適切な飼育条件で前彎症が増加することが知られる (Divanach et al. 1997 ; Kihara et al. 2002 ; Sfakianakis et al. 2006 ; Helland et al. 2009)。

本研究では、現在のマハタ人工種苗生産で形態異常が出現する要因が飼育環境にあると仮定し、その究明および防除策の確立を目的とした。第I章では、三重県における形態異常の出現傾向 (種類、出現率) を調査し、最も生産効率を低下させる形態異常のタイプを明らかにして防除策を構築する対象を特定した。第II章では、Nagano et al. (2007) が形態異常出現への関与を指摘している種苗生産期 (仔稚魚期) の飼育水温について、仔稚魚の成長、生残も考慮したうえで、形態異常防除に最適な飼育水温を求めた。第III章では、仔魚期における鰾の開腔不全とマハタにおいて最も高頻度で発生する脊椎骨屈曲の発生との関係および鰾の開腔促進条件および開腔阻害条件について考察した。第IV章では、稚魚期の給餌量と飼育水の流速が人工種苗の形態異常 (特に脊椎骨の屈曲) の出現に及ぼす影響を飼育試験によって明らかにしようとした。

第 I 章 形態異常の発生状況

I-1. 緒言

マハタ *Hyporthodus septemfasciatus* の人工種苗生産では様々な形態異常が出現する。そこで本章では、三重県における形態異常の発生傾向（種類および出現率）について調査し、マハタ人工種苗において防除策を開発する形態異常の種類の特定を行った。

I-2. 材料および方法

2004～2007年に三重県水産研究所および2008～2010年に尾鷲栽培漁業センターが生産した人工種苗の形態異常について調査した。2004～2007年は、全長約10 cmまで

陸上水槽で飼育した後、海面生簀で継続飼育した全長約12～15 cmの人工種苗を、2008～2010年は、全長約12～13 cmまで陸上水槽で飼育した人工種苗を使用した (Table I-1)。

標本は、軟X線装置 (OM-80CTRS, オーミック, 東京) を用いて撮影し、尾鰭椎前第2および尾部棒状骨を除く脊柱の骨構造を観察した (第1腹椎から尾鰭椎前第3まで)。形態異常は、(a) : 脊椎骨屈曲, (b) : 椎体の癒合または欠損, (c) : 椎体変形, (d) : 背鰭陥没の4区分とした (Fig. I-1)。脊椎骨の前彎症または後彎症は区別せず、脊椎骨屈曲とした。

Table I-1. The seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* juveniles were used to assess for skeletal malformations (2004-2010)

	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
<i>n</i>	43	111	356	213	200	200	265
Total length(mm)	138.0±8.5	145.0±6.2	124.0±22.0	139.8±10.9	131.5±11.4	117.9±9.3	131.9±14.3

Total length values are represented as the mean ± standard deviation.

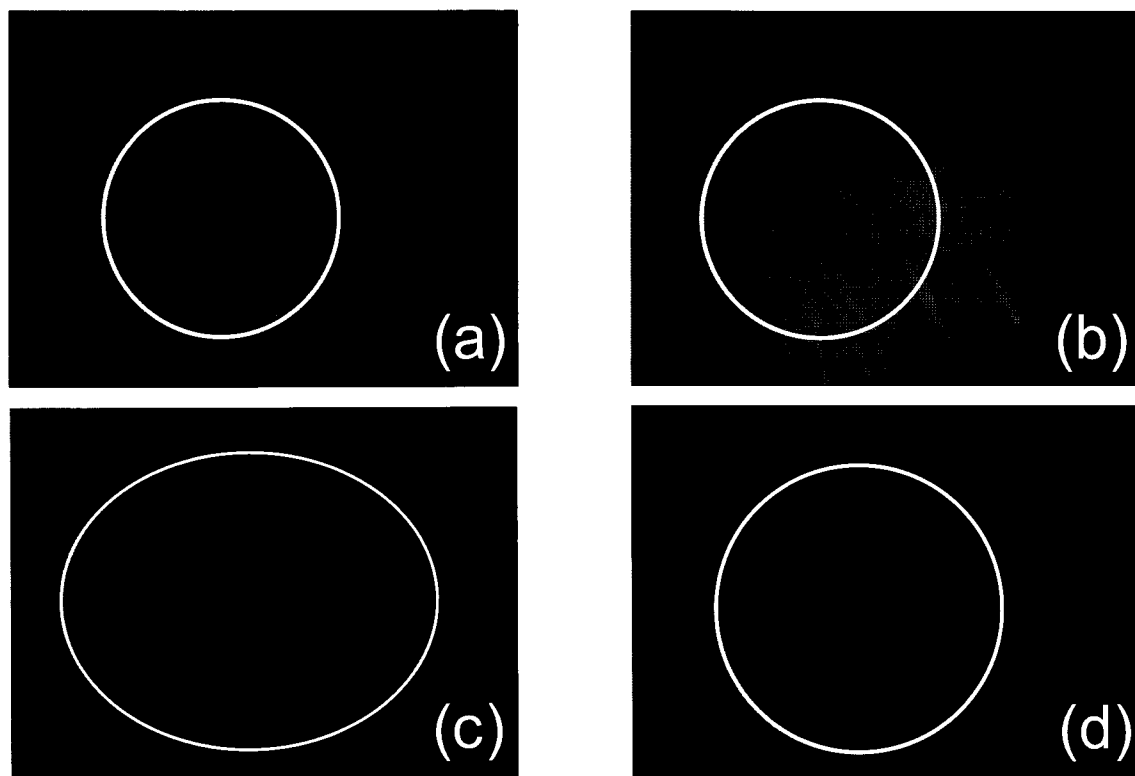


Fig. I-1. Types of vertebral malformation morphology in the seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus*. The white circles indicate the abnormalities. (a) Spinal curvature, (b) fusion or defect of the centra, (c) deformation of centra, and (d) saddleback syndrome.

椎体の癒合は、複数の椎体が癒合し、複数の神経棘および血管棘が存在する場合を含めた(松里 1986)。一方、Hattori et al. (2003) は、マダイの外観上癒合した椎体の内部に不連続の表面がなく、靭帯が存在しないことを観察しており、癒合ではなく椎体欠損であると考察した。しかし、この現象は、骨組織学によってのみ観察が可能であり、本研究では考慮しなかった。こうしたことから、本研究では、癒合と椎体欠損の両者を一つのパターンとした。椎体変形は、脊椎骨の歪み、窪み、圧縮と診断した。背鰭陥没は、背鰭の一部が腹側へ陥没しているものとした。

I-3. 結果

調査期間における脊椎骨屈曲の発生率は2.5~22.2%の範囲で、屈曲は2008および2009年を除いて高率に発生した(Fig. I-2)。椎体の癒合または欠損は0.9~21.1%の範囲で出現し、2008年が最も高かった。椎体変形は、0~18.2%の範囲で出現し、2009年が最も高率で発生した。背鰭陥没は発生が確認されない年もあり、発生率は最高で4.1%(2007年)であった。

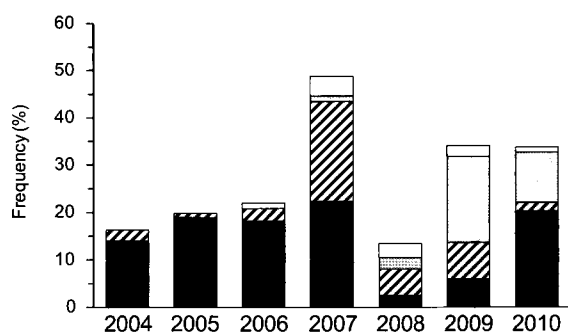


Fig. I-2. Incidence of abnormalities in cultured juveniles in Mie Prefecture from 2004 to 2010. Black indicates spinal curvature. Diagonal pattern indicates fusion or defect of the centra. Grey indicates deformation of centra. White indicates saddleback syndrome.

I-4. 考察

三重県が生産するマハタの人工種苗では、脊椎骨屈曲が最も高頻度に発生したことから、生産効率の向上のため脊椎骨屈曲を防止することが最も効果的であることが分かった。それ以外の形態異常は、椎体の癒合または欠損および椎体の変形であったが、2007年を除いてその発生率は0.9~7.6%と低かった。一方、背鰭陥没は、マハタの近縁種であるクエ *Epinephelus bruneus* で多発することが知られるが(中田ら 2011)、本研究で確認され

た背鰭陥没の出現率は低い。したがって現時点におけるマハタの人工種苗生産では、脊椎骨屈曲以外の形態異常は大きな問題にならないレベルであると考えられる。

脊椎骨あるいは脊索の屈曲が発生する原因として、不適切なふ化水温や、あるいは種苗生産期(仔稚魚期)の飼育水温管理(Sfakianakis et al. 2006; Santerre and May 1977; Wiegand et al. 1989; 萱野・尾田 1991; Polo et al. 1991; Graham and Hop 1995; Wang and Tsai 2000; 川辺 2005; Georgakopoulou et al. 2010)が報告されているが、飼育水温と関係ないとする報告もあり(Ottesen and Bolla 1998; Abdel et al. 2004; Cook et al. 2005; Okamura et al. 2007; Kurokawa et al. 2008)、水温との関連性は魚種によって異なると考えられる。しかし、Nagano et al. (2007) は、マハタの上下顎の変形が飼育水温と関連する可能性を指摘したことから、本研究では第2章において、仔稚魚期の飼育水温が脊椎骨屈曲の発生に及ぼす影響を検討した。

さらに、マダイでは、仔魚期初期(全長3.5~4.5 mm)における鰾の開腔不全と前彎症との関係が知られている(北島ら 1981; Kitajima et al. 1994)。仔魚期初期に鰾の中に空気が充たされる、いわゆる一次開腔が起こらなければ、前彎症が増加することは良く知られた事実である(北島ら 1981; Kitajima et al. 1994)。しかし、マハタでは仔魚期初期の鰾の開腔と脊椎骨屈曲の関係については不明である。マハタ仔魚期における開腔は、ふ化後15日(15日令)で確認された事例があるが(土橋ら 2003a)、鰾の一次開腔条件は全く不明である。また、鰾が未開腔のマダイ稚魚は、強制的遊泳状態で前彎症出現率が上昇し(Chatain 1994)、さらに、ヨーロッパバス *Dicentrarchus labrax* L. やマダイ、タイセイヨウダラ *Gadus morhua* では、鰾の開腔が確認された個体でも、稚魚期の飼育環境(飼育水の流動)が形態異常の出現要因になることも報告されている(Divanach et al. 1997; Kihara et al. 2002; Sfakianakis et al. 2006; Helland et al. 2009)。マハタにおいても、仔魚期の飼育水温、鰾の開腔、稚魚期の飼育環境が脊椎骨屈曲の発生に影響を及ぼす可能性は高く、本研究では第3および4章でこれらの関係性を検討した。

脊椎骨屈曲以外に発生する形態異常として、椎体の癒合または欠損および椎体の変形が2007年には脊椎骨屈曲に次いで多く発生した。また、幾つかの魚種では、いわゆる短軀症の原因となる椎体の癒合または欠損が発生し、

人工種苗の生産効率を低下させることから問題となっている（服部 2004 ; Hattori et al. 2004 ; 澤山・高木 2012）。マダイなどでは、体節形成期の酸素不足が椎体の欠損の原因の一つであり（服部 2004 ; Hattori et al. 2004 ; Sawada et al. 2006）、近親交配が椎体の癒合に関係（澤山・高木 2012）することから、環境要因と遺伝的要因が相互に異常形質を発現する可能性（Lijalad and Powell 2009 ; Bardon et al. 2009）や、餌料の栄養強化剤に含まれる過剰なビタミンAが椎体の癒合の原因であることも報告されている（Dedi et al. 1995 ; Fernandez et al. 2008）。近年、Uji et al. (2013, 2014) は、人工飼育下のマハタ胚の体節形成期に発生する体節分節異常が、脊椎骨の異常（脊椎骨椎体の欠損）を引き起こす可能性に言及し、体節分節異常の原因として、体節形成期の低酸素濃度を指摘した。本研究においても、2008年に椎体の癒合または欠損が最も高率に発生したことから、人工飼育下におけるマハタ受精卵の管理方法、遺伝的特性あるいは餌料組成には注意する必要がある、今後の研究課題と考えられる。

第II章 飼育水温と形態異常

II-1. 緒言

第I章では、マハタの人工種苗に発生する形態異常は脊椎骨屈曲が最も多く、生産効率を向上させるには、脊椎骨屈曲の防除策を開発することが効果的であることが示された。本研究では、脊椎骨屈曲の原因としては、仔魚期の飼育水温、鰾の開腔不全、稚魚期（中間育成）における餌料や飼育環境が予想されるが、本章では、まず仔魚期の飼育水温が、脊椎骨屈曲を含む形態異常の発生に及ぼす影響について検討した。

マハタ仔魚期における飼育水温と形態異常の関係については、Nagano et al. (2007) が、骨変形（特に上下顎の変形）の発生に飼育水温が関与する可能性を指摘しているが、水温が形態異常の発生に及ぼす詳細な研究は実施されていない。ふ化に至るまでの受精卵の培養水温や仔稚魚期の飼育水温は、数魚種で仔稚魚の形態異常発生との関連が指摘されている (Sfakianakis et al. 2006 ; Santerre and May 1977 ; Wiegand et al. 1989 ; 萱野・尾田 1991 ; Polo et al. 1991 ; Graham and Hop 1995 ; Wang and Tsai 2000 ; 川辺 2005 ; Georgakopoulou et al. 2010 ; Ottesen and Bolla 1998 ;

Abdel et al. 2004 ; Cook et al. 2005 ; Okamura et al. 2007 ; Kurokawa et al. 2008 ; Komada 1982 ; Bolla and Holmefjord 1988 ; 睦谷 1988 ; Wiegand et al. 1988 ; Pittman et al. 1989 ; Pittman et al. 1990 ; 有瀧ら 1996 ; Lein et al. 1997 ; Mihelakakis and Yoshimatsu 1998 ; Chang et al. 2004 ; 有瀧ら 2004 ; Aritaki and Seikai 2004 ; Sfakianakis et al. 2004) 重要な環境因子のひとつである。そこで、仔稚魚期の飼育水温が骨異常に及ぼす影響について検討した。

なお、受精卵のふ化時点あるいは仔稚魚期の飼育水温は、仔稚魚のふ化率、成長、発育および生残に大きく影響し (土橋ら 2003a ; Sfakianakis et al. 2006 ; Santerre and May 1977 ; Wiegand et al. 1989 ; 萱野・尾田 1991 ; Polo et al. 1991 ; Graham and Hop 1995 ; Wang and Tsai 2000 ; 川辺 2005 ; Georgakopoulou et al. 2010 ; Ottesen and Bolla 1998 ; Cook et al. 2005 ; Okamura et al. 2007 ; Kurokawa et al. 2008 ; Bolla and Holmefjord 1988 ; 睦谷 1988 ; Pittman et al. 1989 ; 有瀧ら 1996 ; Lein et al. 1997 ; Mihelakakis and Yoshimatsu 1998 ; Chang et al.

Table II-1. Rearing conditions of the seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* larvae and juveniles reared at six different temperatures ranging from 23 to 29°C

Target temperature (°C)	Water temperature (°C)	Salinity (ppt)	DO (mg/l)	Light intensity (lx)
Experiment 1				
23	23.13 ± 0.03	33.78 ± 0.51	7.39 ± 0.75	1,198 ± 4
25	25.04 ± 0.06	33.86 ± 0.32	6.74 ± 0.17	1,190 ± 20
27	26.98 ± 0.02	34.00 ± 0.11	6.79 ± 0.16	1,262 ± 13
29	28.99 ± 0.03	34.42 ± 0.09	6.21 ± 0.55	1,248 ± 11
Experiment 2				
25	25.08 ± 0.02	33.80 ± 0.06	6.65 ± 0.49	1,178 ± 28
26	26.06 ± 0.04	33.97 ± 0.11	6.05 ± 0.14	1,300 ± 11
28	28.00 ± 0.07	34.89 ± 0.19	6.04 ± 0.18	1,219 ± 30

All values are represented as the mean ± standard deviation in each experimental group. The mean values were calculated using the values measured from at the target temperature which was maintained up to 1-4 days before the end of the experiment. Means followed by different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

2004 ; 有瀧ら 2004 ; Aritaki and Seikai 2004 ; Sfakianakis et al. 2004 ; Seikai et al. 1986 ; Trotter et al. 2003a ; Sugama et al. 2004 ; Dou et al. 2005 ; Fielder et al. 2005 ; 照屋・與世田2006 ; Yoseda et al. 2006a ; 與世田ら 2006 ; 平田ら 2009b), さらに, 10日令のマハタ仔魚では自然水温 (19.5~20.5°C) より25.0°Cで生残率が高くなる (土橋ら 2003a) ことなどが報告される。しかし, マハタでは仔稚魚の成長や形態異常の出現に対する飼育水温の影響について詳細に検討されていない。

本章では, 仔稚魚期の飼育水温が, 人工飼育下のマハタ仔稚魚の成長, 生残に及ぼす影響および稚魚の形態異常に及ぼす影響について調査し, 成長, 生残も考慮したうえで, 形態異常防除に最適な飼育水温について考察した。

II-2. 材料および方法

試験は, 2007年秋季 (試験1) および2008年春季 (試験2) に三重県水産研究所で行った。

a) 親魚と人工授精

試験1 1992年に天然海域で採取したマハタ稚魚を室内水槽 (50 kl) で飼育し, 親魚とした (15歳, 体重9.4~16.0 kg)。親魚には, 土橋ら (2007) の方法に従い, 水温と光周期操作による成熟促進を施した。

2007年10月18日に, 親魚に胎盤性性腺刺激ホルモン (ゴナトロピン5000, あすか製薬, 東京) (以下hCG) を, 魚体重1 kgあたり500 IUで筋肉内に投与した。ホルモン投与42~54時間後の10月20日に, 2尾の雌から搾出した卵と2尾の雄から採取した精液を人工授精した。受精24~26時間後に, VNNの発症防止を目的として, 土橋ら (2002) の方法でオキシダント海水による受精卵消毒 (オキシダント濃度: 0.5ppm, 60秒暴露) を行い, 浮上している受精卵を等分して試験に使用した。

試験2 天然海域で捕獲した親魚と1999年に人工孵化して飼育した親魚 (体重3.8~18.8 kg) を室内水槽 (75 kl) で飼育した。2008年5月19日にhCGを親魚の筋肉内に投与した。ホルモン投与42~54時間後の5月21日に, 1尾の雌から搾出した卵を5尾の雄から採取した精液で人工授精し, 試験1と同様に受精卵消毒後の浮上卵を試験に使用した。

b) 仔稚魚の飼育方法

最も適した水温帯を明らかにするために試験1では, 4段階の異なる水温条件を設定した。試験1の結果に基づき, 試験2では試験1と同じ25°Cを対照区とし, より狭い水温帯の25°C, 26°Cおよび28°Cの影響を調査した (Table II-1)。水温, 塩分, 溶存酸素濃度および飼育水表面の照度は毎日1回あるいは2回測定した。試験1および2に関する飼育環境条件をTable II-1に示した。

試験1 500-lポリエチレン水槽 (直径100 cm, 水深65 cm) を用いて23°C, 25°C, 27°Cおよび29°Cの飼育水温を設け, 23°Cおよび25°Cの飼育試験は4反復で, 27°Cおよび29°Cでは3反復で実施した。2007年10月21日に受精卵25,952粒を各試験水槽に收容し, 0日令は受精卵を各実験水槽に收容した日と定義した。試験は, 仔稚魚が全長約30~40 mmに到達した23°C区で81日令, 25°C区で76日令, 27°C区で69日令および29°C区で67日令まで継続した。飼育水温はウォーターバス方式で調整した。受精卵收容時の水温は21.9~22.2°Cであり, その後, 23°C区では4日令までに, 25°C区では6日令までに, 27°C区では8日令および29°C区では10日令までに緩やかに上昇させた。設定水温は飼試験終了4日前まで維持し, その後は自然水温まで徐々に低下させた。急激な飼育水温の変動を防止するため, 23°C区では64日令, 25°C区では52日令, 27°C区では40日令および29°C区では36日令まで飼育水の交換を行わなかった。その後, 海水を水槽容量の12%/日の換水率で供給し, 換水率を試験終了までに101%/日まで徐々に増加させた。*Nannochloropsis* sp.を一日に2回, 233,000 個体/mlの密度で飼育水に添加した。“貝化石” (フィッシュグリーン, グリーン・カルチャア, 富山) を一日に2回, 0.01 g/lの濃度で水質安定のため添加した。0日令から10日令まで, 水面張力と関連したハタ科仔魚の浮上死 (Yamaoka et al. 2000) を防止するため, 熱湯と混合した植物油 (MT被膜オイル, マリンテック, 愛知) (土橋ら 2003a ; 田中ら 2005 ; Sakakura et al. 2006 ; Nagano et al. 2007 ; Sakakura et al. 2007a ; Yamaoka et al. 2000) を一日に2回, 0.1 ml/m²で各飼育水槽に添加した。

飼育水への通気のため, 2個 (通気および酸素) の半球状のエアストーン (25φ, 田中三次郎商店, 福岡) を各水槽の底部中央に設置した。蛍光灯による照明は, 10日令から試験終了までの5:00から19:00 まで行った (14時間明期/10時間暗期)。マハタ仔魚の初期生活期の生



Fig. II-1. Soft X-ray image of a wild seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* (23.8 cm Total length). Wild seven-band groupers were collected in Gokasyo Bay (Mie Prefecture) in March 2009 and reared in tanks where they were fed commercial artificial artificial diets, The rearing experiment was continued until they reached a total length of 24.8 ± 2.2 cm.

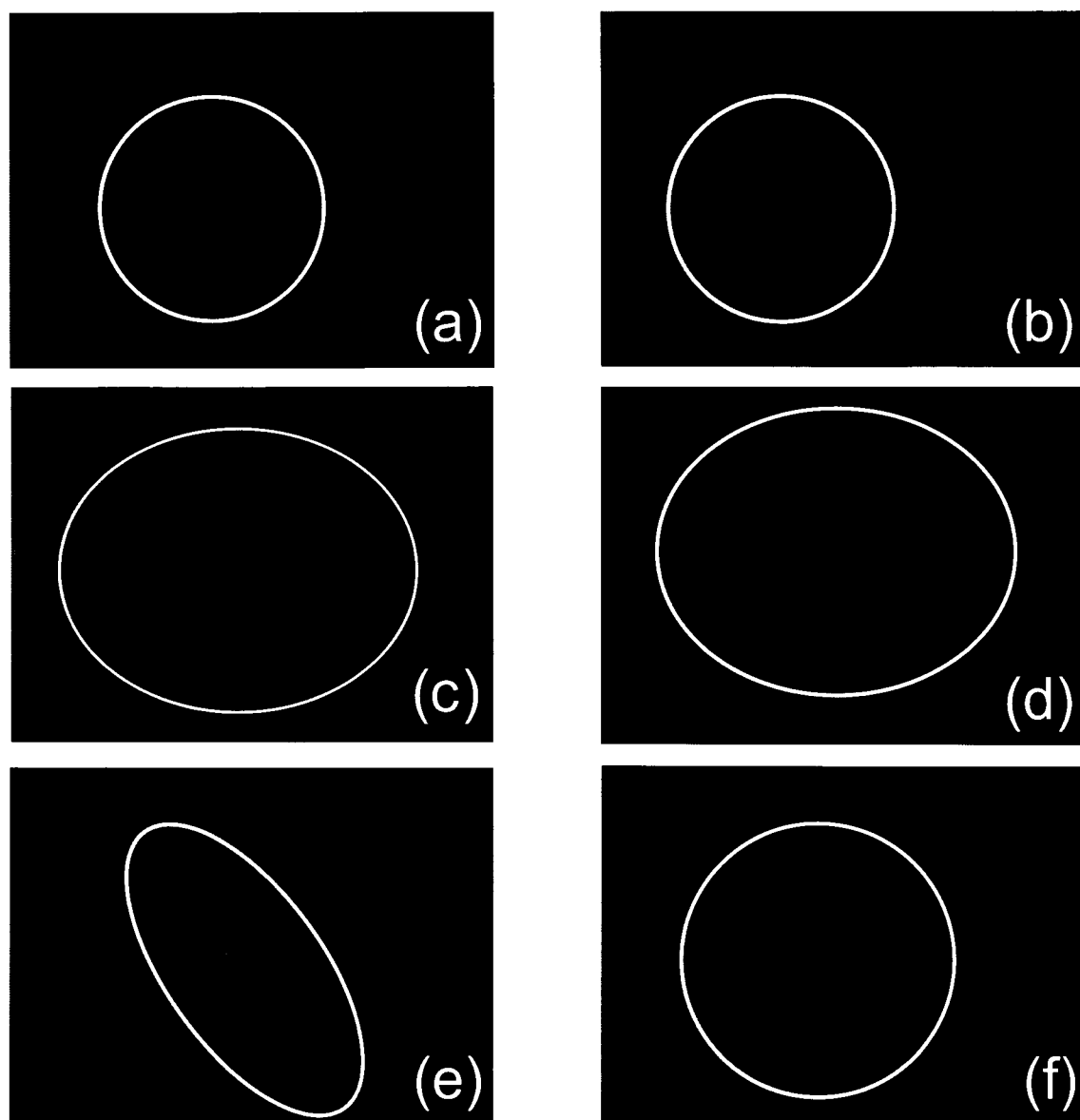


Fig. II-2. Types of malformation morphology in the seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus*. The white circles indicate the abnormalities. (a) spinal curvature, (b) fusion or defect of the centra, (c) deformation of centra, (d) bifurcated neural spine, (e) bifurcated or trifurcated hemal spine, and (f) saddleback syndrome.

残に効果がある連続照明（24時間明期/0時間暗期（土橋ら 2003a；照屋ら2008）は、2日令から10日令まで適用した。

仔稚魚には、栄養強化したS型ワムシ *Brachionus plicatilis* sp. 混合種、アルテミア幼生 *Artemia salina* nauplii（ブラインシュリンプ卵、マリンテック、愛知）および市販の人工飼料（ラブラアバ NO.2およびNO.3、林兼産業、山口）を仔稚魚の成長に応じて給餌した。生物餌料の栄養強化法として、ワムシは高度不飽和脂肪酸（HUFA）を高めた淡水クロレラ *Clorella vulgaris*（スーパー生クロレラ V-12、クロレラ工業、東京）で培養し、孵化したアルテミア幼生は、市販のHUFA強化剤（DC DHA SELCO, Inve (Thailand), Phichit）で培養した。S型ワムシは2日令から58日令に15 cells/mlの密度になるよう毎日2回給餌した。アルテミア幼生の給餌は、仔魚が平均全長6 mm（23℃で36あるいは40日令、25℃で31あるいは36日令、27℃で28日令、29℃で28あるいは31日令）に到達してから開始し、試験終了時まで継続した。市販の人工飼料は、23℃飼育で70日令から、25℃で64日令から、27℃で54日令から、29℃で51日令から試験終了時まで給餌した。

試験2 試験2の飼育方法は以下の相違点を除いて試験1と基本的に同じである。飼育水温は25℃、26℃および28℃とし、4反復で実施した。2008年5月22日に受精卵11,648粒を各試験水槽に収容し、試験は25℃区で68日令、26℃および28℃区で66日令まで継続した。受精卵収容時の水温は19.8～20.0℃で、その後、6日令で25℃、8日令で26℃、10日令で28℃に到達するように水温を徐々に上昇させた。飼育水温は試験終了4日前まで維持し、その後は自然水温まで徐々に低下させた。

飼育海水は、25℃で39日令まで、26℃および28℃では37日令まで交換しなかった。その後、海水を水槽容量の12%/日の換水率で供給し、換水率を試験終了までに、飼育水中の溶存酸素濃度の減少により、試験1より高い317%/日まで徐々に増加させた。連続照明（24時間明期/0時間暗期）は、試験1より開始時の水温が2℃低く、仔魚発育の遅延により、3日令から10日令まで適用した。アルテミア幼生の給餌は25℃で27あるいは31日令、26℃で27日令、28℃で31日令から開始し、試験終了時まで継続した。市販の人工飼料は、25℃で44日令から、26℃および28℃で42日令から試験終了時まで給餌した。ワムシは、

高度不飽和脂肪酸（HUFA）を高めた淡水クロレラおよび市販のHUFA強化剤（バイオクロミス パウダー、クロレラ工業、東京）で培養した。孵化したアルテミア幼生は、市販のHUFA強化剤（バイオクロミス パウダー、クロレラ工業、東京、DC DHA SELCOあるいはA1 DHA SELCO, Inve (Thailand), Phichit）で培養した。

c) 飼育環境

期間中の塩分および溶存酸素濃度は望ましいレベルに維持され、水面上の照度は1,200～1,300 lxに維持されていた（Table II-1）。

d) 標本採集

10日令の夜間に仔魚数を容積法で推定した。仔魚の採集は採水器（ポリ塩化ビニル製：長さ111 cm×直径4.8 cm）を用いて各水槽の2または3ヶ所で行い、仔魚数を計数した。また、試験終了時に全ての生残魚を計数した。仔稚魚の全長は、試験1および2の10、15、20、25、30、35および40日令に測定し、その後、試験1の45日令（23℃区のみ）、試験2の51日令および両試験の終了時に測定した。各試験区の標本採集は、10～51日令に1水槽（28℃区のみ）の35、40、51日令のみから4水槽で5～27尾ずつ、試験終了時に1水槽（28℃区のみ）あるいは2水槽から39～60尾ずつ行い、0.1～0.3 ml/lのエチレングリコールモノフェニルエーテル（和光純薬工業、大阪）で2分間の麻酔後に全長を測定した。

試験終了時では、全長の測定後、Koumoundouros et al. (2000) の方法に従い、標本を直ちに-21℃から-20℃で冷凍保存し、後日軟X線調査で骨異常および鰾の開腔率を評価した。なお、鰾の容量は、麻酔標本ではガスの放出で減少する可能性があり（Woolley and Qin 2010）、加えて、麻酔後の標本は、凍結時に鰾のサイズが減少する可能性がある（Koumoundouros et al. 2000）。しかし、これは、本研究で評価する鰾の開腔頻度の結果と関係なく、たとえサイズの減少があったとしても、鰾のX線撮影映像が完全に消失しないことから、問題とはならなかった。

e) 形態観察

試験終了時の標本は、軟X線装置（OM-80CTRS、オーミック、東京）を用いて撮影し、尾鰭椎前第2および尾

部棒状骨を除く脊柱の骨構造を観察した（第1腹椎から尾鰭椎前第3まで）。16尾の天然標本（全長約25 cm）を形態正常魚の基準とした（Fig. II-1）。標本の形態異常は、(a) 脊椎骨屈曲、(b) 癒合または椎体欠損、(c) 椎体の変形、(d) 神経棘の2又、(e) 血管棘の2又あるいは3又、(f) 背鰭陥没の6区分とした（Fig. II-2）。神経棘および血管棘の2又あるいは3又は、椎体から伸長した棘の分枝（Matsuoka 1987；澤山・高木2011）とした。なお、脊椎骨屈曲、椎体の癒合または欠損、椎体の変形および背鰭陥没は、第1章に記した定義で診断した。骨構造と同様に機能的な鰓の存在の有無の観察を行うため、軟X線撮影を行い、開腔した鰓を持つ標本数を求めた。

f) 統計分析

全長の正規性（Shapiro-Wilk test）および等分散性（Bartlett test）が確認された場合は、Tukey-kramer testで有意差を検定し、確認されなかった場合は検定しなかった（Table II-2）。生残率および形態異常率は、最少二乗法を用いた回帰分析で傾向を評価した（Figs. II-3, II-4, II-5）。試験1および2において、飼育水温に関係なく鰓が開腔した標本の出現差を確認するためStudent's *t* test を使用した（Fig. II-6）。試験2において、飼育水温の影響を考慮せずに、全ての形態異常と様々な形態異常に関して、鰓が開腔した標本と未開腔の標本の出現率を比較した（Fig. II-7）。また、試験2では、飼育水温の影響を考慮せずに、正常魚と異常魚で鰓の開腔率を比較した（Fig. II-8）。これらの統計的有意性はカイ二乗検定で求めた。生残率、形態異常率および鰓の開腔率は、データの正規性（Shapiro-Wilk test）が確認されず、データの範囲が20%未満、あるいは80%より大きい場合は、角変換後に統計処理した。カイ二乗検定を除いた全ての統計分析は、JMP7統計ソフトウェア（SAS Institute Japan, 東京）を用いて実施し、 $P < 0.05$ の場合を差が有意とした。

II-3. 結果

a) 生残と成長

試験1で用いた受精卵の孵化率は96.9%および94.5%、試験2で用いた受精卵の孵化率は89.2%であった。

試験1および2の10日令の生残率（Fig. II-3）は、23℃区で $54.3 \pm 1.0\%$ 、25℃区で $44.8 \pm 16.0\%$ および $40.8 \pm$

3.0% 、26℃区で $40.6 \pm 14.8\%$ 、27℃区で $47.0 \pm 17.9\%$ 、28℃区で $22.7 \pm 18.3\%$ および29℃区で $41.8 \pm 8.2\%$ を示し、高水温で有意に低下した（ $P < 0.05$ ）。試験終了時の生残率（Fig. II-4）は、23℃区で $0.2 \pm 0.1\%$ 、25℃区で $0.8 \pm 0.4\%$ および $0.3 \pm 0.1\%$ 、26℃区で $0.8 \pm 0.5\%$ 、27℃区で $0.4 \pm 0.1\%$ 、28℃区で $0.5 \pm 0.7\%$ および29℃区で $0.3 \pm 0.3\%$ を示し、25および26℃で有意に高く、23℃および27~29℃で低下した（ $P < 0.05$ ）。

全長の統計分析を実施することが可能であったのは10、15、20、40、51日令および試験終了時（68~81日令）であり、全長は10および51日令および試験終了時に試験区間で有意差はみられなかった（Table II-2）。しかし、15、20および40日令の全長は有意差がみられ（ $P < 0.05$ ）、高水温で大きくなる傾向がみられた。平均全長30.2

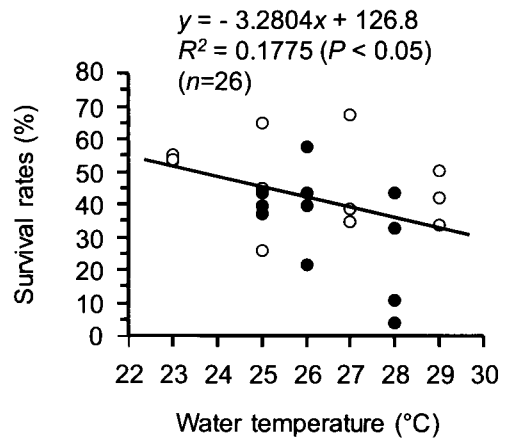


Fig. II-3. Relationship between rearing temperature and survival rate at 10 days after hatching. Open circles: survival rates in Experiment 1; closed circles: survival rates in Experiment 2.

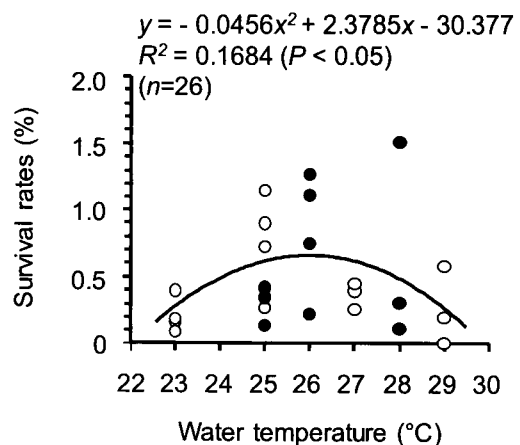


Fig. II-4. Relationship between rearing temperature and survival rate at the end of the experiments. Open circles: Survival rates in Experiment 1; closed circles survival rates in Experiment 2.

～36.9 mm (試験終了時) に到達するのに要した期間は、試験1の23℃区で81日令、25℃区で76日令、27℃区で69日令、29℃区で67日令、試験2の25℃区で68日令、26℃および28℃区で66日令であり、その期間は高水温で

短縮された。

b) 形態異常の発生

正常魚率は23.1～64.0%であり、飼育水温25-27℃で高く、23℃および28、29℃で低下した ($P < 0.05$, Fig.

Table II-2. Total length (mm) of the seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* larvae and juveniles reared at six different temperatures from 23 to 29°C

Target temperature (°C)	Days after hatching									
	10	15	20	25	30	35	40	45	51	66-81
Experiment 1										
23	3.05 ± 0.16 ^a	3.58 ± 0.12 ^c	4.32 ± 0.18 ^b	4.85 ± 0.28	5.41 ± 0.24	6.06 ± 0.33	7.18 ± 0.09 ^c	8.68 ± 0.13	No data	35.21 ± 3.76 ^a
25	3.26 ± 0.09 ^a	3.90 ± 0.19 ^{bc}	4.88 ± 0.34 ^{ab}	5.76 ± 0.14	6.21 ± 0.35	7.06 ± 0.68	8.81 ± 0.38 ^b	No data	No data	33.30 ± 1.19 ^a
27	3.27 ± 0.11 ^a	4.57 ± 0.11 ^a	5.56 ± 0.37 ^a	6.30 ± 0.15	7.18 ± 0.14	8.67 ± 0.36	9.60 ± 0.29 ^{ab}	No data	No data	32.97 ± 3.46 ^a
29	3.20 ± 0.29 ^a	4.42 ± 0.56 ^{ab}	5.23 ± 0.89 ^{ab}	5.79 ± 0.74	7.55 ± 1.26	8.88 ± 1.47	10.74 ± 0.71 ^a	No data	No data	33.05 ± 1.02 ^a
Experiment 2										
25	3.07 ± 0.07 ^a	No data	4.87 ± 0.43 ^{ab}	5.96 ± 0.18	7.14 ± 0.30	8.72 ± 0.71	8.86 ± 0.21 ^b	No data	19.32 ± 0.78 ^a	36.90 ± 4.08 ^a
26	3.19 ± 0.09 ^a	No data	4.96 ± 0.36 ^{ab}	6.30 ± 0.59	7.31 ± 0.03	8.94 ± 0.04	10.67 ± 0.17 ^a	No data	18.21 ± 0.09 ^a	33.17 ± 1.09 ^a
28	3.24 ± 0.10 ^a	No data	5.17 ± 0.18 ^{ab}	5.79 ± 0.01	7.67 ± 0.04	8.95	10.76 ^a	No data	17.86 ^a	30.2 ^a

All values are presented as the mean ± standard deviation in each experimental group (except at 28° C). Means followed by different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

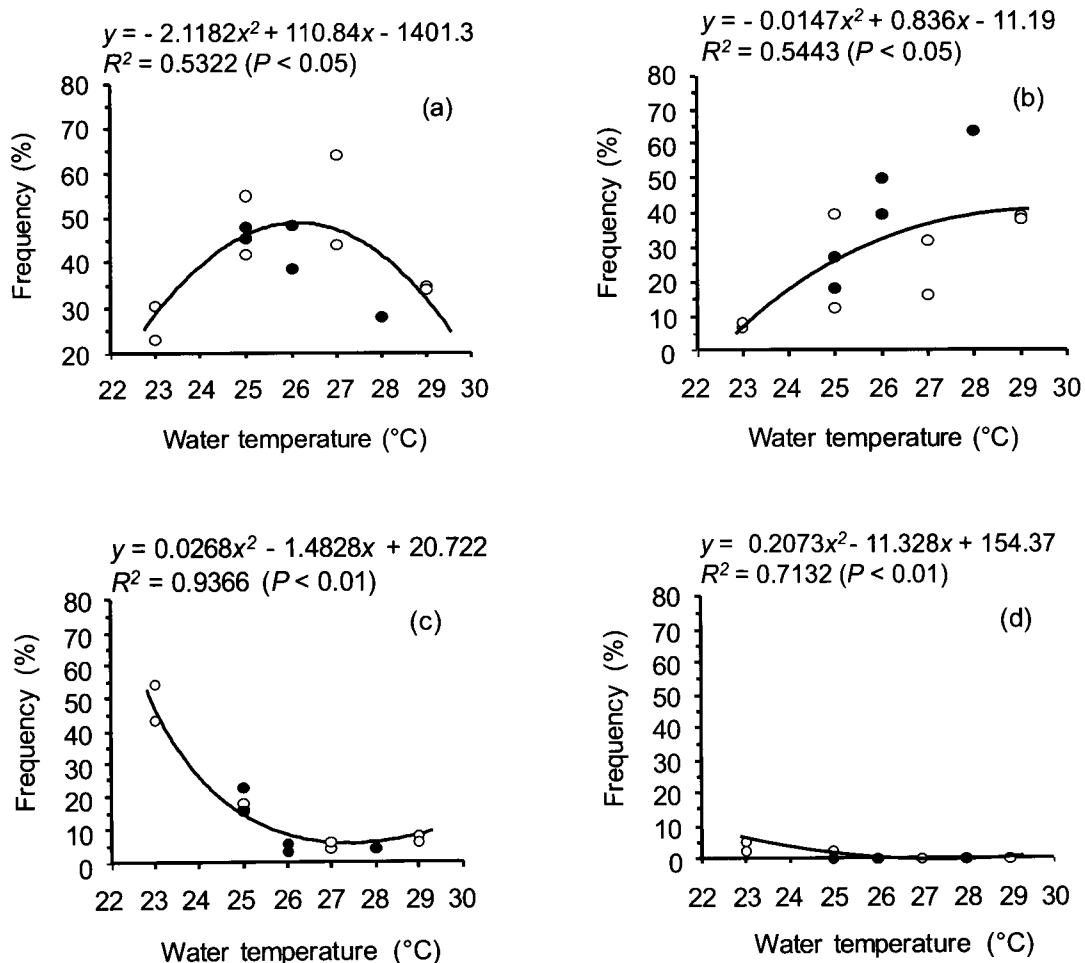


Fig. II-5. Relationship between rearing temperature and the various morphological types at the end of the experiments. (a) normal fish, (b) deformation of centra, (c) bifurcated neural spine, and (d) saddleback syndrome. Open circles: results from Experiment 1; closed circles: results from Experiment 2.

II-5a)。脊椎骨屈曲率は2.0～26.0%であり、飼育水温と有意な関係がなかった。癒合または椎体欠損率は、試験1で20.0～35.9%、試験2で1.9～6.7%を示し、飼育水温と有意な関係がなかった ($P < 0.05$, Fig. II-5b)。神経棘の2叉率は、26℃から29℃で低く (3.3～8.2%)、25℃で少々高くなり (15.9-22.7%)、23℃ (43.6～54.4%) で他の水温より有意に高かった ($P < 0.01$, Fig. II-5c)。血管棘の2叉または3叉率は0～15.0%と低く、飼育水温と有意な関係はなかった。背鰭陥没率は、26℃から29℃で0%であり、25℃で少々高くなり (0～2.0%)、さらに23℃ (2.2～5.1%) で他の水温より有意に高かった ($P < 0.01$, Fig. II-5d)。

c) 鰾が開腔した稚魚の頻度および形態異常との関係

鰾が開腔した稚魚の出現率は試験1で0%であったが、試験2では40.4～65.9%であり (Fig. II-6)、試験1と2でその差は有意であった ($P < 0.01$)。試験2で鰾が開腔した最小標本の全長は21.48 mmであった。一方、試験1では、最大標本 (全長48.74 mm) で鰾の開腔が確認されなかった。全ての骨異常の出現率は鰾の開腔個体で33.1%、鰾の未開腔個体で82.2%であり、鰾の未開腔個体で有意に高かった ($P < 0.01$, Fig. II-7)。脊椎骨屈曲は鰾の開腔個体で0%、鰾の未開腔個体で23.3%であり、鰾の未開腔個体で有意に高かった ($P < 0.01$, Fig. II-7)。また、椎体の変形は鰾の開腔個体で9.9%、鰾の未開腔個体で68.2%であり、鰾の未開腔個体で有意に高

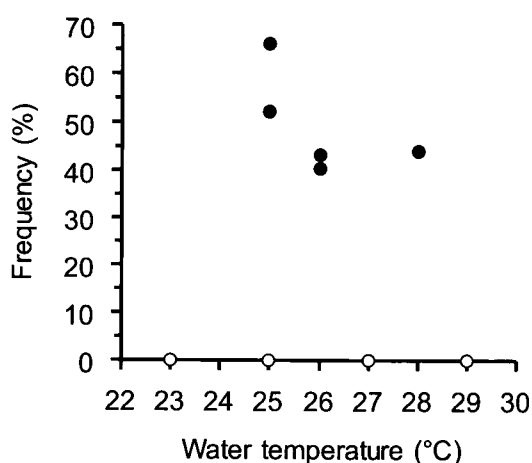


Fig. II-6. Relationship between rearing temperature and rates of swim bladder inflation. Open circles: Rates of swim bladder inflation in Experiment 1; closed circles: rates of swim bladder inflation in Experiment 2. A Student's t test was used to establish differences in the occurrence of specimens with inflated swim bladders, regardless of rearing temperature, in Experiment 1 and 2.

かった ($P < 0.01$, Fig. II-7)。椎体の癒合または欠損は、鰾の開腔個体で4.1%、鰾の未開腔個体で5.4%であり、有意差はなかった (Fig. II-7)。また、血管棘の2叉ま

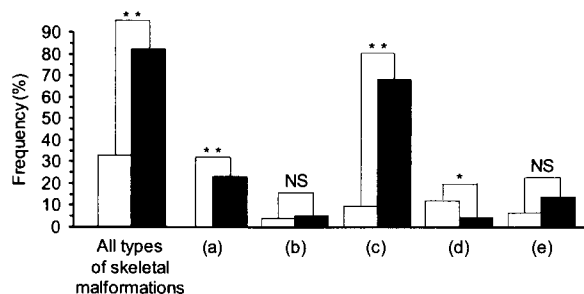


Fig. II-7. Incidence of all the skeletal malformations and the various abnormalities for specimens with an inflated and uninflated swim bladder specimens in Experiment 2, regardless of the rearing temperature. Open columns: Inflated swim bladder; closed columns: uninflated swim bladder. (a) spinal curvature, (b) fusion or defect of the centra, (c) deformation of the centra, (d) bifurcated neural spine, and (e) bifurcated or trifurcated hemal spine. Double asterisk: Significant difference between fish with inflated and uninflated swim bladders at $P < 0.01$. Single asterisk: Significant difference between fish with inflated and uninflated swim bladders at $P < 0.05$. NS: Not significant.

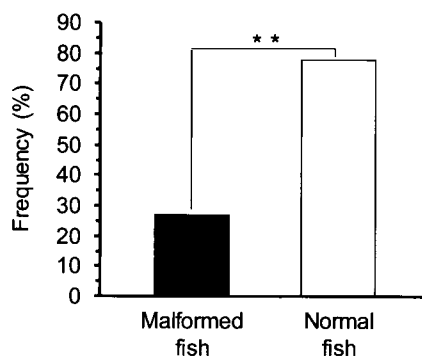


Fig. II-8. Frequency of swim bladder inflation in normal and malformed fish in Experiment 2, regardless of the rearing temperature. Double asterisk: Significant difference between normal and malformed fish at $P < 0.01$.

たは3叉率は鰾の開腔個体で6.6%、鰾の未開腔個体で14.0%であり、有意差はなかった (Fig. II-7)。一方、神経棘の2叉は鰾の開腔個体で12.4%、鰾の未開腔個体で4.7%であり、鰾の未開腔個体より開腔個体で有意に高かった ($P < 0.01$, Fig. II-7)。鰾の開腔率は正常魚で77.9%であり、形態異常魚の27.4%と比較して有意に高かった ($P < 0.01$, Fig. II-8)。

II-4. 考察

人工飼育マハタ仔稚魚期における飼育水温が、仔稚魚

の成長、生残および形態異常の出現に及ぼす影響について調査した結果、水温25℃で人工種苗の生産効率が向上し、鰾の開腔で形態異常率が低減した。マハタの最適な生産効率および生産性に関する要求の全てを満たす飼育水温を見出すことは困難であったが、本研究で得られた知見は、種苗生産の改善に寄与するであろう。

本研究では、10日令の生残率は高水温で低下し、試験終了時の生残率は23℃および27～29℃より25℃および26℃で高かった。原因として、不適切な飼育水温が、仔稚魚の内部栄養吸収と発育に影響を及ぼした可能性が考えられた。

ヤイトハタ *Epinephelus malabaricus* およびスジアラ *Plectropomus leopardus* における研究では、給餌開始から内部栄養の吸収までの時間が高水温で促進される (Yoseda et al. 2006a; 與世田ら 2006)。その結果、内部栄養から外部栄養への転換期間は短くなり、仔魚の初期生残にとって好ましくない可能性が指摘されている (Yoseda et al. 2006a; 與世田ら 2006)。Dou et al. (2005) は、ヒラメ *Paralichthys olivaceus* において、高水温で代謝コストが増加すると共に内部栄養がより早く消耗し、これにより飢餓状態の仔魚が摂餌する能力を失い、あるいは採餌効率が減少する可能性を示している。本研究では、内部栄養の消費のような仔魚の形態学的な変化について調査していないが、土橋ら (2003a) は、マハタでは高水温でそのような栄養源の消耗が促進されることを報告している。それ故、高水温で引き起こされる内部栄養から外部栄養への転換期間の短縮化は、本研究においても高水温で飼育された仔魚の10日令における低い生残を引き起こしたと考えられる。土橋ら (2003a) は、10日令に19.5から20.5℃の自然水温、22.5℃および25℃でマハタの生残率を比較し、他の飼育水温より25℃で生残率が高くなることを報告している。これは、23℃より25℃で生残が良くなることを示しており、本研究の結果と異なる。マハタの種苗生産では、表面張力と関連した仔魚の浮上死 (Yamaoka et al. 2000) が多発するが、本研究では、0日令から10日令まで油を添加したことから浮上死は観察されず、10日令の平均生残率は22.7～54.3%であった。一方、土橋ら (2003a) の研究では油を添加しておらず、それ故、10日令の生残率が0.06%から9.2%であった。こうしたことから、土橋ら (2003a) の研究の10日令における生残は、飼育水温だけでなく、仔魚の浮上死による影響を大きく受けたもの

と推定され、それにより生残率に本研究との違いがあった可能性がある。

他魚種では、孵化時期の飼育水温が、受精卵の孵化率に影響を及ぼすことも証明されている (Santerre and May 1977; Polo et al. 1991; Kurokawa et al. 2008)。こうしたことから、適正な範囲を外れた高水温での飼育が孵化率に不利な影響を及ぼすことは明らかである。

また、他魚種では、深刻な形態異常で生残率が低下する可能性が指摘されており (Kurokawa et al. 2008; Lein et al. 1997; Barahona-Fernandes 1982; Koumoundouros et al. 2002)、マハタにおいても、不適切な飼育水温で形態異常が出現し、生残に影響を及ぼす可能性が考えられた。大西洋オヒョウ *Hippoglossus hippoglossus*、ニホンウナギ *Anguilla japonica* およびヨーロッパシーバスでは、異常な顎が発生した仔魚は餌できず、生残できない (Kurokawa et al. 2008; Lein et al. 1997; Barahona-Fernandes 1982)。数魚種で不適切な飼育水温が、異常顎の発生の原因因子であることが実験的に証明されており (Polo et al. 1991; Okamura et al. 2007; Kurokawa et al. 2008; Lein et al. 1997)、同様の可能性がNagano et al. (2007) によってマハタでも示されている。また、顎部の異常に加えて深刻な脊椎の異常 (Barahona-Fernandes 1982)、あるいは後彎症 (Koumoundouros et al. 2002) で仔魚は死に至ることが知られる。本研究では、顎の異常発生について調査していないが、脊椎骨屈曲および癒合または椎体欠損は、飼育水温による有意な影響を受けず、飼育水温に関係なく一定の割合で発生した。しかし、深刻な脊椎形態異常の出現は飼育期間を通して大きく変化することが知られ (Barahona-Fernandes 1982)、本研究では、そのような異常の出現の変遷を調査していないが、不適切な水温による深刻な形態異常で生残率が低下する可能性がある。したがって、生残率のさらなる向上には、飼育期間を通して形態異常の出現傾向を把握し、死亡と関連する深刻な形態異常の防除技術開発に取り組む必要がある。

試験1および2の異なる飼育水温における、正常魚およびそれぞれの骨異常を伴う個体の出現傾向は、癒合または椎体欠損を除き、概ね同じであった。また、試験1および2の対照区 (25℃) では、正常魚およびそれぞれの骨異常個体の出現率は、癒合または椎体欠損を除いて同程度であることから、これらの出現傾向および頻度は、

両試験および同一試験区で類似性があることを確認した。したがって、本研究の飼育実験の結果には再現性が高いと考えられる。

癒合または椎体欠損は飼育水温と有意な関係はなく、これらの異常の出現傾向は、概ね両試験で同じであったが、その頻度は、試験1, 2および対照区 (25℃) と比較して同等ではなく、試験2で低い傾向がみられた。近親交配が椎体の癒合に関係し (澤山・高木2012)、環境要因と遺伝的要因の相互作用が異常形質の発現を誘導する可能性 (Lijalad and Powell 2009 ; Bardon et al. 2009) や、過剰なビタミンAの使用が椎体の癒合の原因であるとする可能性も示唆されている (Dedi et al. 1995 ; Fernandez et al. 2008)。試験1および2では、試験に使用した受精卵が異なり、また、初期餌料の栄養強化剤の成分も異なる。したがって、癒合または椎体欠損の防除に関する研究では、遺伝的な差異および餌の栄養価を検討し、更なる研究対象にするべきである。体節形成期の熱刺激がゼブラフィッシュの胚における体節異常を引き起こすことが報告されている (Roy and Ho 1999)。一方、服部 (2004) は、マダイでは、体節形成期の熱刺激は、体節異常を発生させないと報告しており、その因果関係は魚種間で異なるようである。Hattori et al. (2004) は、酸素不足が椎体の欠損の原因の一つであると結論付けている。したがって、癒合または椎体の欠損の出現を減少させるには、遺伝および栄養の要因と合わせて体節形成期の培養水温および酸素濃度の影響について更なる研究が必要であろう。近年、Uji et al. (2013, 2014) は、人工飼育下のマハタ体節形成期に発生する体節分節異常が、脊椎骨の異常を引き起こす可能性に言及し、体節分節異常の原因として、体節形成期の低酸素濃度を指摘している。こうしたことから、人工飼育下におけるマハタ受精卵の管理方法には注意する必要がある。

椎体変形の出現率は高水温で高く、このことは、仔稚魚期の飼育水温が、この異常の主要な原因の一つ、あるいは主要な原因の効果を助長する因子であることを示唆している。Sfakianakis et al. (2006) は、椎体の変形がヨーロッパシーバスにおける前彎症の最初の兆候であり、その出現率が15℃より20℃で高くなることを指摘している。マハタにおける椎体変形の出現を、初期の段階でその外観に基づいて判断することは困難であるが、椎体変形は、水温および水流のような、ある一定の飼育条件下で前彎症に発展する可能性がある (Sfakianakis et

al. 2006)。したがって、飼育水温管理や後述に示すように鰾の開腔促進で、可能な限りこの異常の発生を防止する必要がある。

血管棘の2又または3又の頻度は概ね低かった。対照的に、神経棘の2又は23℃で頻発し、神経棘の形態は、飼育水温に対する感受性が強いことが確認された。ヒラメでは、神経棘の形態異常は、血管棘よりも広範囲に渡ると報告され (澤山・高木2011)、神経棘の2又は人工飼育された仔稚魚における共通の問題かもしれない。

背鰭陥没は23~25℃で出現したが、非常に低い頻度であり、飼育水温は、背鰭陥没の出現に僅かに影響を及ぼすことが確認された。幾つかの背鰭陥没の事例では、脊椎骨の屈曲、癒合または椎体欠損および椎体の変形で複雑な様相を呈していたので、背鰭構成物の欠如、あるいは背鰭担鰭骨と神経棘の癒合を明確に確認することはできなかった。

マダイでは、後期仔魚期に鰾が適切に開腔しないことで、前彎症の発生が誘導される (北島ら 1981 ; Kitajima et al. 1994)。数魚種で水面のスキマー (油膜回収装置) が水面の油膜を除去するのに効果的であり、仔魚期の初期に鰾の一次開腔を促進するには、この操作が必要であることが示されている (Chatain and Ounais-Guschemann 1990 ; Trotter et al. 2005 ; Kurata et al. 2012)。本研究では、水面の油膜除去をいずれの試験でも実施せず、こうしたことが原因で鰾が開腔した稚魚の頻度は、試験1の全ての水槽で0%であり、試験2の水槽も低かった (40.4~65.9%) ことが考えられる。

マハタ仔魚の鰾開腔に関して、Nagano et al. (2007) は、鰾が開腔した個体が60日令 (体長 30.1 mm, 北島ら (1991) あるいはSabate et al. (2009) の相対成長式から計算した全長は36.95 mmあるいは39.60 mm) で初めて出現したと報告している。平田ら (2009a) は、61日令 (全長31.0 mm) でも開腔個体が認められなかったと報告した。これらの研究では、いずれも水面の油膜を除去しない環境条件下で、仔魚期の初期に鰾が開腔することがなかったことを示している。しかし、魚種によっては、仔魚期の初期に鰾が開腔しなかった魚がその後開腔する、いわゆる二次開腔が確認されている (北島ら 1981 ; Chatain 1994 ; Jacquemond 2004b)。本研究では、鰾が開腔した時期の調査を行っていないが、試験2で鰾が開腔した最も小さい標本は全長21.48 mmであつ

た。これは、マハタで二次開腔を示した標本が初めて確認された大きさ (Nagano et al. 2007) より小さい。試験1および平田ら (2009a) の研究結果では、31.0~48.74 mmの全長で鰾の二次開腔が確認されなかったことを考慮すると、試験2における鰾の開腔は、仔魚期初期における一次開腔であると考えられる。

鰾の開腔率について、両試験区間で有意差がみられた原因については、以下のことが考えられる。まず、癒合または椎体欠損に対する遺伝的特性、または生物餌料の栄養の影響が原因である可能性がある。Angelfish *Pterophyllum scalare* (Cichlidae) およびヨーロッパシーバスでは、遺伝的特性が、鰾の開腔に影響を及ぼす可能性について指摘されており (Zilberg et al. 2004 ; Peruzzi et al. 2007), 本研究でも両試験で使用した受精卵が異なることから、遺伝的な差異を考慮すべき可能性があり、これについては更なる研究の必要がある。また、Koven et al. (1990) は、ヨーロッパヘダイ *Sparus aurata* L. において、ワムシの高度不飽和脂肪酸の量と仔魚の鰾の開腔に、有意ではないが、弱い相関関係がみられることを報告している。餌料生物の栄養価は、仔魚の空気飲み込みに必要な仔魚の活力に関係する原因因子であることも示唆されることから (北島ら1981 ; 牧野ら 1995 ; Matsunari et al. 2013), 本研究でも両試験区間における鰾の開腔率の差の原因となった可能性がある。

試験2では、飼育水温に関係なく、鰾が開腔した個体と未開腔個体で骨異常率を比較した。脊椎骨屈曲および椎体の変形の出現率は、鰾が開腔した個体で0%および9.9%であり、未開腔個体の23.3%および68.2%と比較して有意に低かった。さらに、鰾の開腔率は、形態正常魚で77.9%を示し、異常魚の27.4%と比較して有意に高かった。したがって、鰾の一次開腔の促進は、形態異常、特に脊椎骨屈曲および椎体の変形の防止に効果的であると考えられた。

本研究では、仔稚魚の成長は高水温で促進されたが、稚魚の生残率は、23℃または27~29℃より25℃および26℃で高かった、一方で形態異常個体の頻度は、23℃、28℃または29℃より25~27℃で低下した。この結果を基に、仔稚魚期における飼育水温が成長、生残および形態異常に及ぼす影響を総合的に考慮すると、マハタ仔稚魚の最適な飼育水温は、25~26℃であると結論できる。天然マハタの産卵時の水温および仔魚の成長に関する水温は不

明であるが、人工飼育下の産卵に関しては、約20℃の水温が用いられることから (土橋ら2003a ; Shein et al. 2004 ; 土橋ら2007), 天然海域における仔魚期初期も同程度の水温かもしれない。したがって、本研究で用いた飼育水温は、著しく高いと考えられる。人工飼育下の異体類稚魚における形態異常の発生は水温に依存しており、成長と変態時期の正しい均衡が形態異常の防止に重要であることが知られる (有瀧ら2004 ; Aritaki and Seikai 2004)。マハタ仔稚魚の成長、生残および形態異常の出現を考慮すると、人工飼育下における成長と変態時期の最適な均衡は、25~26℃にあると結論できる。また、本研究では、鰾の一次開腔促進が、脊椎骨屈曲および椎体の変形の防止に有効であると結論できた。