

第三章 鰾の開腔と形態異常

諸言

第II章では、マハタ仔稚魚飼育における不適切な飼育水温が、骨異常（椎体の変形および神経棘の2叉）の原因であるとともに、脊椎骨屈曲および椎体の変形の出現防止には、鰾の一次開腔促進が効果的であることを明らかにした。同様の効果はマダイでも観察されており（北島ら 1981 ; Kitajima et al. 1994）、幾つかのスズキ目の魚種では、鰾の一次開腔の促進には、仔魚期に飼育水面から油膜または自原性表面物質（生物餌料あるいは魚由来の油あるいは粒子状有機物および細菌など（Kurata et al. 2012 ; Summerfelt 2013））を除去する、油膜除去器の設置が効果的である（Chatain and Ounais-Guschemann 1990 ; Battaglene 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）。スズキ目の無気管鰾魚である wall eye *Stizostedion vitreum* では、仔魚が空気を飲み込むため空気と水の境界面を貫通し、これにより鰾の一次開腔が誘導されることが顕微鏡ビデオ撮影による観察で証明されている（Rieger and Summerfelt 1998）。それ故、水面の油膜などの障害物を除去することで、仔魚の空気飲み込み行動が促進されると推察される。

一方で、マハタの種苗生産では、前期仔魚期に水の表面張力と関連した仔魚の浮上死（Yamaoka et al. 2000）が多発することから、浮上死を防止するため、飼育水槽に油を添加することが推奨されている（土橋ら 2003a）。マハタの近縁種であるキジハタ *Epinephelus akaara* では、仔魚の浮上死のメカニズムは、体表の粘液細胞の発達と退化、照度と仔魚の走行性および水面張力と関係することが示唆されている（Yamaoka et al. 2000）。仔魚が水面に蟻集し、仔魚の表皮にある粘液細胞が物理的な刺激で粘液を分泌し、水面に接着するとともに粘液で互いに接着し、その結果、死亡した個体の集団が水面に集積し、仔魚の浮上死と呼ばれる（Yamaoka et al. 2000）。本研究の第II章を含むマハタの種苗生産では、仔魚期初期の生残が向上することから（土橋ら 2003a）、フィードオイルまたは植物油を用いた浮上死の防除法がよく用いられる（田中ら 2005 ; Sakakura et al. 2006 ; Nagano et al. 2007 ; Sakaku

ra et al. 2007a)。したがって、本種では、仔魚の鰾の開腔を促進する油膜除去は、方法論的に浮上死の防止と拮抗するため、両立できない。実際には、種苗生産における最優先課題は、種苗の生残を確保することであるため、それ故、油膜の非除去が現在の一般的な飼育方法となっている（平田ら 2009a）。こうした背景から、マハタでは、鰾の一次開腔に関する促進条件が研究されないまま今日に至っている。しかし、上述の通り、骨異常は鰾の一次開腔の促進で減少することから、浮上死を可能な限り抑えつつ、油膜の除去で鰾の一次開腔を促進する、特にその時期と方法に関する促進条件を研究することは重要である。

本研究の第II章でも確認されたが、マハタでは、油膜を除去しない環境条件下で、幾つかの標本が15日令で鰾の一次開腔を示す（土橋ら 2003a）。それ故、鰾の一次開腔不全は、油膜以外の要因に原因がある可能性も考えられる（第II章）。しかし、本研究の第II章を含む多くの研究が、油膜を除去しない場合は鰾が一次開腔しないことを報告するとともに（Nagano et al. 2007 ; 平田ら 2009a）、それ以降の成長段階で鰾が開腔する事例もあると報告される（鰾の二次開腔（北島ら 1981 ; Chatain 1994 ; Jacquemond 2004b)）。本研究の第II章を含む著者らの以前の研究（土橋ら 2003a）では、油を水面に添加したが油膜除去は行っておらず、その場合飼育水は流動パラフィンで水面を密封した場合（北島ら 1981 ; Chatain and Ounais-Guschemann 1990 ; 今井ら 2001 ; Kurata et al. 2012 ; 林田ら 1984）のように空気から完全に隔離されていない。それ故、仔魚が空気を飲み込むため油膜を貫通し、あるいは、油膜の隙間から空気を飲み込む機会が存在したと考えられ、結果として、鰾が一次開腔したのかもしれない。いずれにせよ、人工飼育下におけるマハタ鰾の開腔に関する知見が不足しており、鰾の一次開腔が起こる時期を明らかにすることと、仔魚による空気の飲み込みが鰾の一次開腔に関係しているかを確認することが重要であると考えられる。

このような背景から、本章の第1節では、人工飼育下におけるマハタ鰾の開腔について、まず鰾の開腔開始時期および開腔開始後の仔魚の発育ステージを特定するため、予備的な最初の飼育試験（試験1）を実施した。試

験2および3では、試験1の結果に基づき、次の3種類の水面飼育条件下で鰾の開腔率を比較し、仔魚の空気の飲み込み行動が鰾の開腔に必要なか確認した。(i) 油膜および、または自原性表面物質の除去、(ii) 油膜除去なしおよび (iii) 流動パラフィンでの水面の密封。また、仔稚魚の骨異常に対する鰾の一次開腔の影響を調査した。特に、第II章で確認された、鰾が一次開腔していない標本で最も高頻度に出現する脊椎骨屈曲（前彎症および後彎症）および椎体の変形の出現頻度と場所について調査した。さらに、飼育したマハタ仔稚魚の生残と成長に対する油膜除去の影響について確認した。

第III章第1節では、油膜除去期間中の飼育水の流動を発生させる油膜除去期間中の通気量が、仔魚の空気飲み込み行動（鰾の開腔）に影響を及ぼす可能性が示唆された。そこで、本章の第2節では、油膜除去期間中の通気量が異なる試験区を設定し、鰾の開腔および仔稚魚の生残、成長に及ぼす影響について把握した。

また、本研究の第II章では、脊椎骨屈曲および椎体の変形の出現防止には、鰾の一次開腔促進が効果的であることを示したが、本章の第3節では、第1節で実施した鰾の開腔条件を検討する試験において、人工飼育下における飼育環境調整で鰾の一次開腔が促進された個体について、これら形態異常が低減されているかを確認した。

第1節 飼育水面の性状と鰾の開腔

Ⅲ-1-1. 材料および方法

a) 卵

試験1は、2009年に（独法）水産総合研究センター増養殖研究所で実施した。受精卵は、照屋ら（2008）の方法に従い、6月10日に人工授精で採取した。

試験2および3の人工授精は、次に示す点を修正して第II章の手順に基づき実施した。試験2では、天然海域で採取した親魚および1999年および2001年に人工孵化して飼育した親魚（7.0～18.0 kg）を屋内水槽（75 kl）で飼育した。2012年5月14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）を筋肉内に投与した。5月16日に、1尾の雌から搾出した卵と6尾の雄から採取した精液を人工授精した。1尾の雌から採取した浮上している受精卵を試験に使用した。試験3では、天然海域で採取した親魚および1999年から2004年に人工孵化して飼育した親魚（5.9～13.5 kg）を飼育し、試験2で使用した親魚と異なる個体を人

工授精に使用した。2013年5月29日にhCGを筋肉内投与し、5月31日に、5尾の雌から搾出した卵と7尾の雄から採取した精液を人工授精した。5尾の雌から採取した浮上している受精卵を等分して試験に使用した。

b) 試験1:鰾の開腔開始時期および開腔の仔魚の発育ステージの特定

鰾の開腔と仔魚の発育ステージをふ化後14日（14日令）に観察した。飼育試験は、25-l ポリエチレン製水槽（長径50 cm, 短径32 cm, 水深25 cm）の2反復で実施した。2009年6月11日に250粒の受精卵を各試験水槽に収容した。飼育期間を通して飼育水温は23℃に維持し、飼育海水の交換は行わなかった。Nannochloropsis sp.を一日に2回、500,000 個体/mlの密度で飼育水に添加した。水質を安定させるため、“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、0.02 g/l/回の濃度で添加した。水面に植物油（MT被膜オイル、マリンテック、愛知）は添加せず、油膜は除去しなかった。1個（通気）の半球状の通気装置（25 φ, いぶき、愛知）を各飼育水槽の底部中央に設置した。蛍光照明は、12時間明期/12時間暗期とした。マハタ飼育の仔魚期初期に生残を改善する効果があることが証明されている連続照明（24時間明期/0時間暗期（土橋ら 2003a；照屋ら 2008）を、3日令から4日令まで適用した。仔魚には、高度不飽和脂肪酸（HUFA）を高めた淡水クロレラ（スーパー生クロレラ V-12, クロレラ工業、東京）で培養し、栄養強化したS型ワムシ混合種を給餌した。ワムシは、20～30 個体/mlの密度で維持した。飼育試験は14日令まで継続した。

c) 試験2:油膜除去

試験2では、次に示す3種類の処理を行った。3種類の処理は、マハタ仔稚魚の飼育における、油膜および、または自原性表面物質の除去（ROFグループ）、油膜での水面の被覆（COFグループ）および流動パラフィンでの水面の密封（SLPグループ）である。ROFグループは、鰾の一次開腔に対する飼育水からの油膜および、または自原性表面物質の除去の促進効果を証明するために計画した。COFグループは、浮上死を防止するために用いる本種の現行飼育法の典型として設定した（土橋ら 2003a；田中ら 2005；Sakakura et al. 2006；Nagano et al. 2007；Sakakura et al. 2007a）。本グループは、

仔魚の空気飲み込みを阻害することで、鰾の一次開腔に対する油膜の抑制効果を証明するとともに、浮上死に關して、ROFグループと生残率を比較するために計画した。SLPグループは、仔魚が空気と接触するのを完全に阻止することで鰾の一次開腔に対する完全な流動パラフィンの抑制効果を証明するために計画した。

ROFグループの飼育試験は500-lポリエチレン水槽で9反復実施し、COFグループの試験は5反復、SLPグループの試験は7反復実施した。全部で15,000粒の受精卵を各試験水槽に収容し、ふ化が確認された日を0日令とした。飼育水温は、ウォーターバスで調整した。受精卵収容時の水温は18.9～19.3℃であり、その後、各試験区共に7日令までに26℃まで徐々に昇温し、その後、試験終了4日前から自然水温まで徐々に低下させた。急激な環境条件の変化を防止するため、8日令まで飼育海水を交換しなかった。その後、海水を水槽容量の6%/日の換水率で供給し、換水率を試験終了までに84～92%/日まで徐々に増加させた。

Nannochloropsis sp.あるいは高度不飽和脂肪酸(HUFA)を高めた淡水クロレラを一日に2回、233,000個体/mlあるいは58,300個体/mlの密度で飼育水に添加した。水質を安定させるため、貝化石を一日に2回、0.01g/l/回の濃度で添加した。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、COFグループでは、熱湯と混合した植物油(MT被膜オイル、マリンテック、愛知)を、推奨されている通りに(土橋ら2003a)、一日につき2回、0.1 ml/m²の濃度で各飼育水槽の水面に添加した。SLPグループでは、COFグループと同様に0日令から3日令まで水面に油を添加し、その後、3日令から30日令まで、厚さ約7 mmのパラフィン層を形成するため、流動パラフィン(流動パラフィン、和光純薬工業、大阪)を水面に注いだ(北島ら 1981; Chatain and Ounais-Guschemann 1990; 今井ら 2001; Kurata et al. 2012; 林田ら 1984)。一方、ROFグループでは水面に油を添加せず、12日令から30日令まで、次の方法を用いて自原性表面物質の除去を行った。排水口(直径13 mm)を飼育水槽の側壁面の水位線上に開口した(Fig. III-1-1)。油膜除去期間中は、海水を日中(06:00～17:00)に水槽容量の10～23%/日の換水率で供給し、飼育水を自原性表面物質と共に排水口から流出させた。自原性表面物質の除去効果を向上させるため、水面油膜除去器を排水口

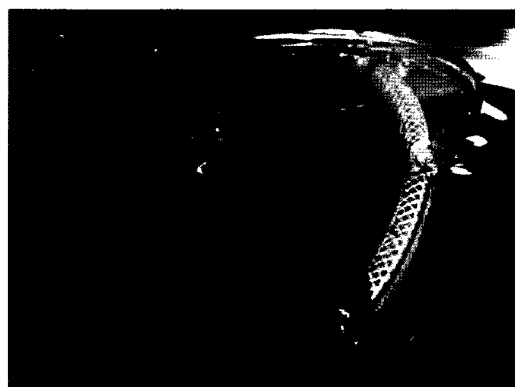


Fig. III-1-1. Exhaust port and surface skimmer. The surface skimmer is equipped with an air jet system to force the oily surface film and/or autogenous surface substances to the exhaust port.

に取り付けた(Fig. III-1-1)。

2個(通気および酸素)の半球状の通気装置(25 φ, 田中三次郎商店, 福岡)を各飼育水槽の底部中央に設置した。通気量は、飼育期間を通して0.2 l/分で維持し、酸素は、0日令から52日令まで0.1 l/分以下で維持し、52日令から試験終了まで0.2～0.5 l/分で維持した。蛍光照明は、6:00から20:00まで用いた(14時間明期/10時間暗期)。連続照明(24時間明期/0時間暗期)は3日令から10日令まで適用した。

水温、塩分、溶存酸素濃度および水面上の照度は毎日1回あるいは2回測定した。

仔稚魚には、栄養強化したS型ワムシ混合種、ベトナム産アルテミア幼生 *Artemia franciscana* nauplii (ベトナム産ブラインシュリンプエッグ, 北村, 京都), 北米産アルテミア幼生(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(ラブラァバ 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。S型ワムシを3日令から40日令に15 cells/mlの密度で毎日2回給餌した。ベトナム産アルテミア幼生の給餌は20日令から開始し、24日令まで継続した。北米産アルテミア幼生の給餌は、仔魚が6 mmの平均全長に到達した25日令に開始し、試験終了まで継続した。市販の人工飼料は、37日令から試験終了まで給餌した。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、孵化した北米産アルテミア幼生は、バイオクロミス パウダーで培養した。飼育実験は、魚の全長が23～36 mmに到達するまで継続した。

d) 試験3:油膜除去

概略の飼育方法は試験2と同様であり、異なる点を以下に記す。試験3では、試験2の再現性を確認するため、試験2と同様に3種類の水面処理 (ROF, COF, SLPグループ) を設定した。ただし、試験3で用いた受精卵の卵質は、試験2で用いた受精卵の品質より劣ったため、試験3のROFグループでは、COFグループと同様に油を水面に添加し、たとえ浮上死を防止する油を水面に添加した場合でも、その後の油膜除去で鰾が開腔するか確認するために計画した。

ROFグループの飼育試験は5反復で実施し、COFグループの試験は3反復、SLPグループの試験は1水槽で実施した。6月1日に、15,238粒の受精卵を各試験水槽に収容した。受精卵収容時の水温は21.4~21.8℃であり、その後、各試験区共に7日令までに26℃まで徐々に昇温した。水温は、飼育期間を通して26℃に維持し、試験終了1日前

から自然水温まで低下させた。

試験1より飼育開始時の水温が高いため、試験2より1日早く油あるいは流動パラフィンを添加した。ROFグループでは、油膜除去期間中は、海水を日中 (06:00~17:00) に水槽容量の6%/日の換水率で供給し、試験2と同様に、飼育水を流出させた。飼育水面の油膜および、または自原性表面物質の除去は、ROFグループで11日令から20日令まで油膜除去器 (スキマー) なしで実施した。さらに、油膜除去工程では通気を停止し、酸素のみを供給した。通気量は、飼育期間中 (油膜除去期間中を除く) に0.2 l/分を維持し、酸素は、0から54日令まで0.1 l/分以下で維持し、54日令から試験終了まで0.1~0.5 l/分で維持した。連続照明 (24時間明期/0時間暗期) は、試験2より1日早く適用した。

仔稚魚には、2日令から39日令に成長に応じて、栄養強化したS型ワムシを15 cells/mlの密度で毎日2回、ま

Table III-1-1. Culture conditions for the seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* larvae and juveniles reared at three different rearing treatments in Experiment 2 and 3

| Group | Water temperature (°C) | Salinity (g L ⁻¹) | DO (mg L ⁻¹) | Light intensity (lux) |
|---|------------------------|-------------------------------|--------------------------|-----------------------|
| Experiment 2 | | | | |
| Removal of the oily surface film and/or autogenous surface substances (ROF) | 26.00 ± 0.20 | 35.91 ± 0.37 | 7.30 ± 0.85 | 1,494 ± 176 |
| Covering of water surface with oil film (COF) | 26.02 ± 0.19 | 35.82 ± 0.35 | 7.12 ± 0.98 | 1,387 ± 161 |
| Sealing of water surface with liquid paraffin (SLP) | 26.09 ± 0.20 | 35.57 ± 0.44 | 7.63 ± 1.03 | 1,349 ± 153 |
| Experiment 3 | | | | |
| Removal of the oily surface film and/or autogenous surface substances (ROF) | 26.02 ± 0.54 | 36.30 ± 0.42 | 7.87 ± 1.97 | 1,298 ± 213 |
| Covering of water surface with oil film (COF) | 26.06 ± 0.57 | 36.33 ± 0.41 | 7.33 ± 1.44 | 1,201 ± 116 |
| Sealing of water surface with liquid paraffin (SLP) | 26.21 ± 0.49 | 35.87 ± 0.43 | 7.95 ± 1.45 | 1,331 ± 196 |

All values are presented as the mean ± standard deviation in each experimental group. The mean values were calculated by measurements values from 7 to 55-62 days after hatching (DAH) and from 7 to 55-59 DAH in Experiment 2 and 3, respectively.

たベトナム産アルテミア幼生を給餌した。さらに、25日令からはベトナム産アルテミア幼生に代えて、北米産アルテミア幼生（56日令まで）を、37日令からは市販の人工飼料（試験終了まで）を仔稚魚の成長に応じて給餌した。飼育実験は、魚の全長が19~35 mmに到達するまで継続した。

e) 飼育環境

試験2および3の飼育状態をTable III-1-1に示す。飼育水温は概ね26℃に維持されていた。塩分および溶存酸素濃度は試験期間を通して望ましいレベルに維持されていた。水面上の照度は、1,200~1,500 luxに維持されていた（Table III-1-1）。

f) 標本採集

試験1では14日令に全ての生残魚を採集し、鰾が開腔する発育ステージを特定するため、鰾の開腔頻度および組織像を評価した。試験2および3では、10日令の夜間に、各飼育水槽で生残している仔魚数を容積法（第二章）で推定するとともに、試験終了時（全長19~36 mm）に、生残している全ての仔稚魚数を計数した。試験2では、3, 5, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 31, 40および49日令に各試験区の2~9水槽から10~22尾ずつ、試験終了時（60~67日令）は全ての水槽から53あるいは54尾を採取して仔稚魚の全長を測定した。試験3では、10, 12, 15, 20, 30, 40および51日令に各試験区の1~5水槽から10~30尾ずつ、試験終了時（57~61日令）に全ての水槽から52あるいは53尾を採取して全長を測定した。飼育期間中に採取した全ての標本は、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）0.1~0.3 ml/lの濃度で2分間の麻酔を行った。試験2および3では、10日令から40日令に全長の測定を行ったあと、全ての麻酔標本を直ちに鰾の開腔頻度調査に使用した。Koumoundouros et al. (2000) の方法に従い、49日令、51日令および試験終了時に全ての麻酔標本を-21℃から-20℃で直ちに凍結保存し、後日軟X線調査で鰾の開腔率を評価した。

g) 組織像

試験1では、麻酔した標本は、Davidson'sあるいはBouin's固定液で24時間固定し、それぞれ70%あるいは80%エタノールに移管した。標本をエタノール系列で脱水し、パラフィン型に包埋した。3 μmの厚さで連続切片をスライドガラス上で標本にし、Mayer's hematoxylinおよびeosinで染色した。

h) 浮上死、仔魚の発育段階、鰾の開腔の観察

試験2および3では、生残に対する水面状態の影響を調査するため、浮上死を目視調査した。全ての試験では、仔魚の発育段階を顕微鏡観察で既存の報告（Sabate et al. 2009）に従い表現した。仔魚の鰾の開腔は、仔魚の成長に伴い腹腔の周囲に黒色素胞が発達するため（北島ら 1991）、通常の光学顕微鏡観察で確認することは困難であった。したがって標本を一滴の海水と共にスライドガラスの上に置き、鰾の開腔を、全ての試験でカバーガラスを用いた押し潰し法（Fig. III-1-2）でガスの泡（気泡）を確認し、試験1では、組織学的観察でも確認した（Fig. III-1-3）。鰾内にガスの泡（気泡）が存在する

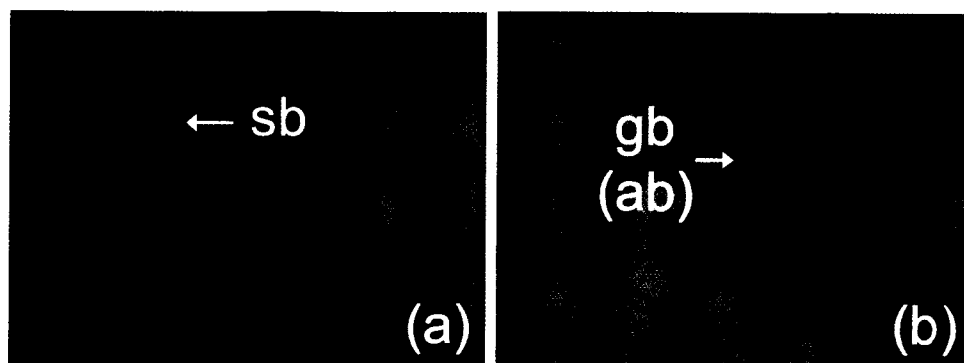


Fig. III-1-2. Photomicrographs of 18 days after hatching seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* larvae (5.22 mm TL, pre-flexion stage). (a) Specimen with inflated swim bladder, and (b) squash preparation of specimen with inflated swim bladder. sb: gas bubble (air bubble) in the swim bladder, gb (ab): gas bubble (air bubble) in sea water between the cover slip and glass slide.

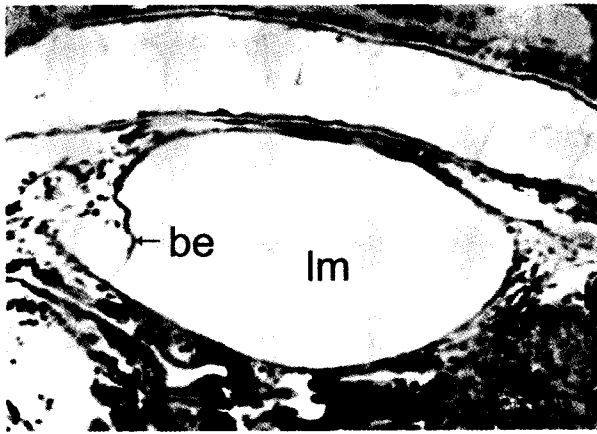


Fig. III-1-3. Longitudinal section of the inflated swim bladder of a seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* larva at 14 days after hatching. lm: swim bladder lumen, be: bladder epithelium (epithelium forming the wall of the swim bladder).

場合、海水へのガスの放出が、押し潰し法で明確に観察することができた。また、機能的な鰾を持つ仔稚魚数を計数するため、試験2および3では、49、51日令および試験終了時に軟X線写真を使用した。

i) 統計分析

データの正規性 (Shapiro-Wilk test) および等分散性 (Bartlett test) が確認された場合は、生残率および全長における差異を確認するため Tukey-kramer test を使用した (Tables III-1-2, III-1-3, III-1-4)。生残率は、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、角変換後に用いた (Table III-1-2)。全長に関

しては、データの正規性が確認されなかった場合は、Steel-Dwass test を使用した (Tables III-1-3, III-1-4)。また、鰾の開腔率 (Tables III-1-5, III-1-6) における差異を確認するため、William's の補正を伴う G-test (Sokal and Rohlf 1983) および事後検定として Ryan's multiple range test を使用した。Tukey-kramer test, Shapiro-Wilk test および Bartlett test は、JMP7 統計ソフトウェア (SAS Institute Japan, 東京) を用いて実施し、 $P < 0.05$ の場合に差が有意とした。

III-1-2. 結果

a) 試験1: 鰾の開腔開始時期の特定および開腔の仔魚の発育ステージ

2つの飼育水槽における試験終了時 (14日令) の生残率は、それぞれ25.6%および18.4%であった。全ての生残仔魚の発育ステージの構成は、Mouth-opening ステージ, Pelagic larvae ステージおよび Pre-flexion ステージの3種類に分類された。鰾の開腔後、内腔は気体で充満されていた (Figs. III-1-2, III-1-3)。鰾の開腔の頻度は、2つの水槽で10.9%および4.4%であり、鰾が開腔した全ての仔魚の発育ステージは Pre-flexion であり、Mouth-opening または Pelagic larvae ステージではなかった。

b) 試験2および3: 油膜除去

生残および成長

試験2で用いた受精卵のふ化率は95.2%、試験3では

Table III-1-2. Mean survival rates at 10 days after hatching and at the end of the experiments 2 and 3

| Group | Survival rates (%) | | | |
|---|---------------------------|---|---------------------------|---|
| | Experiment 2 | | Experiment 3 | |
| | At 10 days after hatching | At the end of the experiment (At 60-67 days after hatching) | At 10 days after hatching | At the end of the experiment (At 57-61 days after hatching) |
| Removal of the oily surface film and/or autogenous surface substances (ROF) | 53.0 ± 19.3 | 3.7 ± 1.1 | 39.5 ± 18.6 | 2.3 ± 1.4 |
| Covering of water surface with oil film (COF) | 71.1 ± 16.3 | 5.4 ± 2.5 | 19.4 ± 7.3 | 2.1 ± 1.8 |
| Sealing of water surface with liquid paraffin (SLP) | 74.0 ± 17.4 | 4.0 ± 1.7 | 37.9 | 1.1 |

All values are presented as the mean ± standard deviation in each experimental group (except where water surface was sealed with liquid paraffin (SLP) group) in Experiment 3).

72.9～92.3%であった。試験2では、COFまたはSLPグループで浮上死は確認されず、ROFグループでは、2日令から29日令にかけて浮上死が確認された。一方、試験3で

は、浮上死は、10日令までいずれのグループでも観察されなかったが、ROFグループでは、浮上死は11日令から、油膜および、または自原性表面物質の除去を開始後

Table III-1-3. Mean total length of the seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* larvae and juveniles reared at three different rearing treatments in Experiment 2

| Days after hatching | Removal of the oily surface film and/or autogenous surface substances (ROF) | | Covering of water surface with oil film (COF) | | Sealing of water surface with liquid paraffin (SLP) | |
|---------------------|---|-------------------------|---|--------------------------|---|-------------------------|
| | <i>n</i> | Total length (mm) | <i>n</i> | Total length (mm) | <i>n</i> | Total length (mm) |
| 3 | 20 | 2.57±0.15 | 20 | 2.65±0.10 | 20 | 2.66±0.10 |
| 5 | 20 | 2.76±0.09 | 20 | 2.73±0.12 | 20 | 2.70±0.10 |
| 10 | 150 | 3.27±0.34 | 69 | 3.30±0.32 | 109 | 3.34±0.29 |
| 12 | 137 | 3.87±0.28 | 30 | 3.81±0.32 | 31 | 3.90±0.20 |
| 13 | 31 | 4.24±0.29 ^a | 30 | 3.95±0.29 ^c | 31 | 4.06±0.27 ^{ab} |
| 14 | 135 | 4.22±0.27 | 30 | 4.31±0.47 | 31 | 4.21±0.50 |
| 15 | 136 | 4.52±0.43 ^b | 75 | 4.65±0.36 ^b | 105 | 4.81±0.47 ^a |
| 16 | 136 | 4.60±0.54 | 30 | 4.65±0.38 | 31 | 4.75±0.43 |
| 17 | 135 | 4.89±0.55 | 30 | 4.72±0.37 | 30 | 4.79±0.33 |
| 18 | 135 | 5.13±0.59 | 30 | 5.03±0.60 | 30 | 5.29±0.57 |
| 19 | 135 | 5.47±0.82 | 30 | 5.10±0.52 | 30 | 5.41±0.46 |
| 20 | 135 | 6.09±0.72 ^a | 75 | 5.54±0.57 ^b | 105 | 5.69±0.56 ^b |
| 25 | 136 | 7.10±0.92 | 75 | 6.84±0.88 | 105 | 6.84±0.81 |
| 31 | 135 | 9.28±1.64 ^a | 75 | 6.63±1.65 ^c | 105 | 7.89±1.67 ^b |
| 40 | 135 | 13.25±1.36 ^a | 75 | 11.76±2.81 ^b | 105 | 12.69±1.83 ^b |
| 49 | 135 | 18.39±3.33 ^a | 75 | 17.59±2.81 ^{ab} | 105 | 16.59±2.96 ^b |
| 60-67 | 478 | 31.49±4.75 ^a | 265 | 28.84±4.83 ^b | 371 | 27.62±4.89 ^c |

All values are presented as the mean ± standard deviation in each experimental group (except where water surface was sealed with liquid paraffin (SLP group) in Experiment 3).

Table III-1-4. Mean total length of the seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* larvae and juveniles reared at three different rearing treatments in Experiment 3

| Days after hatching | Removal of the oily surface film and/or autogenous surface substances (ROF) | | Covering of water surface with oil film (COF) | | Sealing of water surface with liquid paraffin (SLP) | |
|---------------------|---|-------------------------|---|-------------------------|---|-------------------------|
| | <i>n</i> | Total length (mm) | <i>n</i> | Total length (mm) | <i>n</i> | Total length (mm) |
| 10 | 75 | 3.21±0.29 | 45 | 3.30±0.20 | 30 | 3.14±0.38 |
| 12 | 22 | 3.77±0.16 ^b | 23 | 3.76±0.13 ^b | 22 | 3.91±0.16 ^a |
| 15 | 51 | 4.21±0.45 | 20 | 4.05±0.54 | 20 | 4.17±0.47 |
| 20 | 75 | 5.46±0.51 ^a | 30 | 5.40±0.93 ^a | 30 | 5.06±0.60 ^b |
| 30 | 50 | 6.75±0.74 ^b | 20 | 7.33±0.84 ^a | 20 | 7.68±0.37 ^a |
| 40 | 50 | 13.02±2.81 | 20 | 12.25±2.18 | 20 | 14.08±0.75 |
| 51 | 105 | 21.44±3.42 ^a | 42 | 21.74±3.94 ^a | 21 | 19.17±3.04 ^b |
| 57-61 | 261 | 28.95±5.71 ^a | 157 | 24.14±5.43 ^b | 52 | 28.40±4.51 ^a |

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

に観察され、30日令まで継続した。他のグループでは、11日令からも浮上死は確認されなかった。

10日令の平均生残率は、試験2で53.0～74.0%、試験3で19.4～39.5%を示した。また、試験終了時の平均生残率は、試験2で3.7～5.4%、試験3で1.1～2.3%を示した。試験2および3ともに、平均生残率は、10日令だけでなく、試験終了時も試験区間で有意差はみられなかった (Table III-1-2)。

試験2での全長は、3, 15, 20, 31, 40, 49日令および試験終了時にグループ間で有意差がみられ、15日令を除いてCOFグループまたはSLPグループよりROFグループで大きかった ($P < 0.05$, Table III-1-3)。試験3での全長は、12, 20, 30, 51日令および試験終了時にグループ間で有意差がみられ、12および30日令を除いてCOFグループまたはSLPグループよりROFグループで大きかった ($P < 0.05$, Table III-1-4)。

鰾が開腔した仔稚魚の頻度

油膜および、または自原性表面物質の除去を開始した12日令前後では、仔魚の発育ステージは、ほとんどPela-

gic larvae ステージであった (試験2および3)。それらの除去を終了した30日令 (試験2) および20日令 (試験3) では、発育ステージは、主にPre-flexionからPost-flexionおよびPre-flexionとFlexionステージであった。鰾の開腔は、試験2および3で、それぞれ14日令および15日令にROFグループで最初に確認された (Tables. III-1-5, III-1-6)。鰾が開腔した最初の仔魚は、試験2および3で、それぞれ3.76～4.20 mmおよび4.15～4.72 mmであり、鰾が開腔した全ての標本はPre-flexion ステージであった。試験2の19日令および試験3の15, 20および30日令では、鰾の開腔率に対する水面状態の主効果は統計的に有意であったが ($P < 0.05$)、試験区間で統計的有意差はなかった。その後、ROFグループの鰾の開腔率は、COF (2.3%および4.5%) あるいはSLPグループ (0.8%および5.8%) より有意に高くなり、試験2および3の終了時では、それぞれ11.1%および38.7%であった ($P < 0.05$)。

III-1-3. 考察

本研究は、マハタにおいて仔魚による空気飲み込みが

Table III-1-5. frequency of seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* larvae and juveniles with inflated swim bladders in Experiment 2

| Days after hatching | Removal of the oily surface film and/or autogenous surface substances (ROF) | | | Covering of water surface with oil film (COF) | | | Sealing of water surface with liquid paraffin (SLP) | | |
|---------------------|---|------|-------------------|---|------|------------------|---|------|------------------|
| | n SI | n SU | % SI | n SI | n SU | % SI | n SI | n SU | % SI |
| 10 | 0 | 150 | 0 | 0 | 69 | 0 | 0 | 109 | 0 |
| 12 | 0 | 137 | 0 | 0 | 30 | 0 | 0 | 31 | 0 |
| 13 | 0 | 31 | 0 | 0 | 30 | 0 | 0 | 31 | 0 |
| 14 | 2 | 133 | 1.5 | 0 | 30 | 0 | 0 | 31 | 0 |
| 15 | 2 | 137 | 1.5 | 0 | 75 | 0 | 0 | 105 | 0 |
| 16 | 4 | 132 | 2.9 | 0 | 30 | 0 | 0 | 31 | 0 |
| 17 | 6 | 129 | 4.4 | 0 | 30 | 0 | 0 | 30 | 0 |
| 18 | 6 | 129 | 4.4 | 0 | 30 | 0 | 0 | 30 | 0 |
| 19* | 9 | 126 | 6.7 | 0 | 30 | 0 | 0 | 30 | 0 |
| 20 | 9 | 126 | 6.7 ^a | 0 | 75 | 0 ^b | 0 | 105 | 0 ^b |
| 25 | 6 | 130 | 4.4 ^a | 0 | 75 | 0 ^{ab} | 0 | 105 | 0 ^b |
| 31 | 12 | 123 | 8.9 ^a | 0 | 75 | 0 ^b | 0 | 105 | 0 ^b |
| 40 | 8 | 127 | 5.9 ^a | 0 | 75 | 0 ^b | 0 | 105 | 0 ^b |
| 49 | 18 | 117 | 13.3 ^a | 3 | 72 | 4.0 ^b | 0 | 105 | 0 ^b |
| 60-67 | 53 | 425 | 11.1 ^a | 6 | 259 | 2.3 ^b | 3 | 368 | 0.8 ^b |

*Indicates that, at 19 days after hatching, the main effect of water surface conditions (difference in accessibility of larvae to the water surface) to the frequency of swim bladder inflation is statistically significant by the G-test ($P < 0.05$), but not statistically significant different by the Ryan's multiple range test among experimental groups. Different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$). SI, swim bladder inflation; SU, swim bladder uninflation.

Table III-1-6. Frequency of seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* larvae and juveniles with inflated swim bladders in Experiment 3

| Days after hatching | Removal of the oily surface film and/or autogenous surface substances (ROF) | | | Covering of water surface with oil film (COF) | | | Sealing of water surface with liquid paraffin (SLP) | | |
|---------------------|---|-------------|-------------------|---|-------------|-------------------|---|-------------|------------------|
| | <i>n</i> SI | <i>n</i> SU | % SI | <i>n</i> SI | <i>n</i> SU | % SI | <i>n</i> SI | <i>n</i> SU | % SI |
| 10 | 0 | 75 | 0 | 0 | 45 | 0 | 0 | 30 | 0 |
| 12 | 0 | 22 | 0 | 0 | 23 | 0 | 0 | 22 | 0 |
| 15* | 6 | 45 | 11.8 | 0 | 20 | 0 | 0 | 20 | 0 |
| 20* | 6 | 69 | 8.0 | 0 | 30 | 0 | 0 | 30 | 0 |
| 30* | 8 | 42 | 16.0 | 0 | 20 | 0 | 0 | 20 | 0 |
| 40 | 12 | 38 | 24.0 ^a | 0 | 20 | 0 ^b | 0 | 20 | 0 ^b |
| 51 | 49 | 56 | 46.7 ^a | 8 | 34 | 19.0 ^b | 1 | 20 | 4.8 ^b |
| 57-61 | 101 | 160 | 38.7 ^a | 7 | 150 | 4.5 ^b | 3 | 49 | 5.8 ^b |

*Indicates that, at 15, 20, and 30 days after hatching, the main effect of water surface conditions (difference in accessibility of larvae to the water surface) to the frequency of swim bladder inflation is statistically significant by the G-test ($P < 0.05$), but not statistically significant different by the Ryan's multiple range test among experimental groups. Different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$). SI, swim bladder inflation; SU, swim bladder uninflation.

鰾の一次開腔と関係することを明確に証明するとともに、一次開腔はPre-flexion ステージで発生することを明らかにした。また、本研究は、油膜および、または自原性表面物質の除去が、鰾の一次開腔の促進に効果的であることも示した。

既報の多くは、マハタの仔魚期に鰾が開腔した仔魚を確認していないが (Nagano et al. 2007; 平田ら 2009 a), 本研究の試験1では、鰾が開腔した仔魚を明確に確認した。マハタでは、鰾の二次開腔が、少なくとも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) まで確認されない (Nagano et al. 2007) ことを考慮すると、試験1で開腔した個体については一次開腔に間違いはないと考えられる。このことは、試験1で、鰾の一次開腔を開始した仔魚の発育ステージを特定できることを意味している。鰾が開腔した全ての個体が、Mouth-opening ステージあるいはPelagic larvae ステージではなく、Pre-flexion ステージであることが確認されたことから、鰾の一次開腔を開始する仔魚の発育ステージは、Pre-flexion ステージと特定された。ハタ科魚類が属するスズキ目の多くの魚種は、無気管鰾魚 (一時的な有気管鰾魚) であることから (板沢 1991), マハタにおける鰾の一次開腔促進は、限られた発育ステージ、すなわち鰾が気管を通して消化管と一次的に接続する、発育初期段階 (特にPre-flexion ステージ) に行う

べきである。したがって、それ以前のMouth-openingの仔魚の発育ステージに油膜を除去することは、不必要な浮上死を誘発するのみと推測される。この結果に基づいて、試験2および3のROFグループでは、油膜および、または自原性表面物質の除去を、ほとんどの仔魚がPelagic-larvae ステージである12または11日令から開始した。

本研究は、飼育水面の油膜除去がマハタ仔魚の鰾の一次開腔促進に効果的であり、仔魚による空気の飲み込みが一次開腔に必要であることを明らかにした。試験2および3では、飼育水温、塩分濃度、溶存酸素濃度および照度などの環境要因は、第II章の値に近く、これらの飼育条件は適切であった。試験2および3のROFグループでは、鰾の開腔率は大きく変動したが、開腔個体は、14または15日令から試験終了時まで確認された。特に、試験3では、浮上死を防止するための油を添加した場合でさえ、油膜除去後に鰾の開腔が確認された。対照的に、他のグループで鰾の開腔はほとんど確認されず、ROFグループの鰾の開腔率は、20日令 (試験2) および40日令 (試験3) から試験終了まで有意に高かった。これらの結果は、他魚種 (北島ら 1981; Chatain and Ounais-Guschemann 1990; 今井ら 2001; Kurata et al. 2012; Summerfelt 2013; 林田ら 1984; Doroshev and Cornacchia 1979) で報告されているのと同様に、試験区間における鰾の開腔率の差異が、仔魚が空気を飲

み込む行動の容易さを左右する水面状態の違いで引き起こされていることを示唆している。特に、SLPグループでは、厚さ約7 mmの流動パラフィン層で水面を被膜していることから、仔魚が空気を飲み込むために空気と飼育水の界面を貫通する機会は、ほとんどあるいは全くなかったと考えられる。また、wall eyeでは、空気飲み込みの行動中に、仔魚が漂積物、細菌および真菌を吸引した結果、鰾内の炎症で開腔が抑制される可能性が指摘されている (Summerfelt 2013 ; Marty et al. 1995)。それ故に、油膜のような水面の障害物は、鰾の一次開腔を促進するため除去すべきである。

COFおよびSLPグループでは、数は少ないが試験終了時に仔稚魚の0.8~5.8%で鰾の開腔が観察されたが、SLPグループでは、流動パラフィン層の下で通気を行ったので、その気泡および、または酸素供給由来の気泡を仔魚が飲み込み、結果的に鰾が開腔したと推定される (今井ら 2001)。飼育水には、十分量の溶存酸素が存在したが、COFおよびSLPグループで鰾の開腔は非常に低率であったことから、マハタ仔魚の鰾は、ティラピア *Tilapia mossambica* (Doroshev and Cornacchia 1979) のように、呼吸循環器系を通じたガス分泌では開腔しないと考えられる。仔魚が油膜を貫通し、あるいは油膜の間隙から空気を飲み込んでいる可能性もあるが、仔魚による空気飲み込みで、マハタ鰾の開腔が促進されることは確実である。

本研究では、飼育下のマハタ鰾の開腔率は、一般的に他魚種 (Chatain and Ounais-Guschemann 1990 ; Trotter et al. 2005 ; 川辺・木村 2008 ; 今井ら 2001 ; Kurata et al. 2012 ; Kurata et al. 2014 ; Battaglione and Talbot 1990) より低い結果となった。マハタで鰾の開腔率を向上する方法としては、試験2より試験3の15日令で鰾の開腔頻度が僅かに高いことから、試験2および3における飼育方法における、通気の差異に注意すべきである。他魚種では、飼育水面の状態が鰾の開腔率に影響を及ぼすことが報告されている (北島ら 1981 ; Kitajima et al. 1994 ; Chatain and Ounais-Guschemann 1990 ; Summerfelt 2013 ; 林田ら 1984 ; Battaglione and Talbot 1990 ; 照屋ら 2009 ; 橋本ら 2012)。試験2では、油膜除去器による波が仔魚の空気飲み込み行動を阻害し、一方で、試験3では、通気の停止で静穏な状態になり、結果として、鰾の一次開腔が促進された可能性もある。しかし、試験3では、0.1 l/分以

下の酸素量でさえ空気の飲み込みを阻害する可能性があった。それ故、鰾の開腔率と空気飲み込みの関係を解明するために更なる研究が必要であろう。また、本研究の両試験で使用した受精卵が異なることから、先天的な中軸骨格の欠損から生じた前彎症、あるいは遺伝的特性が鰾の開腔に影響した可能性も考えられる (Zilberg et al. 2004, Peruzzi et al. 2007 ; Andrades et al. 1996)。これらの可能性のうち、本節で示された、通気による水面の動静が、仔魚の空気飲み込み行動および鰾の開腔に影響を及ぼす可能性について、本章の第2節で実験的な検証を行い、考察した。

マハタの場合、浮上死は、水面状態の違いがあっても、10日令および試験終了時の試験区間での生残率の差に反映されない可能性がある。試験2のROFグループでは、油添加なしで2日令から浮上死が発生し、10日令で生残率が低い傾向を示したが、試験区間で平均の生残率に統計的有意差はなかった。このことは、浮上死が10日令の生残率に対して及ぼす弊害が限定されることを示唆している。浮上死は、試験2および3のROFグループで多発したが、試験終了時に試験区間で生残率に有意差はなかった。

これに対して沈降死および鰾の未開腔による深刻な形態異常で10日令あるいは試験終了時に生残率が低下した可能性が考えられる。いくつかの魚種では、鰾が開腔した仔魚より未開腔の仔魚で生残率が低下することが報告されている (Trotter et al. 2005 ; Summerfelt 2013 ; Kurata et al. 2014 ; Chatain 1989 ; Goolish and Okutake 1999 ; Kurata et al. 2013)。Kurata et al. (2014) は、太平洋クロマグロ *Thunnus orientalis* において、鰾の未開腔による沈降死は、油膜および、または自原性表面物質の除去による浮上死より生残に及ぼす弊害が大きいことを明らかにした。マハタの沈降死に関する知見は少ないが、背鰭第2棘および腹鰭棘の伸長個体が出現する10~13日令 (全長3.5~3.9 mm) に体比重が大きく増加することから、鰾が未開腔の仔魚は、その期間の夜間に沈降する可能性があるかと推定される (平田ら 2009a)。この時期は、鰾が一次開腔する時期と一致することから、仔魚は、鰾を開腔させることで浮力を獲得し、体比重の増加に伴う沈降を軽減している可能性がある。

また、鰾の未開腔を原因とする深刻な形態異常を伴うマハタ仔魚は、死亡率が高く、これにより生残率が低下

する可能性も考えられる。試験3のROFグループで確認される20日令以降の鰾の開腔率の増加傾向は、鰾の未開腔魚が死亡し、開腔魚が生残することで発生する可能性も考えられるため、鰾の未開腔による形態異常と生残に関する考察は第3節で行った。

このほかに、他魚種では、鰾が未開腔の幼魚は、開腔した幼魚と比較して成長が劣ることが指摘されており (Jacquemond 2004b ; 橋本ら 2012 ; Chatain 1989 ; Kurata et al. 2013 ; Jacquemond 2004a), マハタでも鰾の一次開腔促進で成長が向上する可能性がある。本研究においても、ROFグループの平均全長は、COFまたはSLPグループより、大きくなる傾向がみられた。

第2節 通気量と鰾の開腔

Ⅲ-2-1. 材料および方法

第Ⅲ章第1節では、飼育水の水流を起こす油膜除去期間中の通気が、仔魚の空気飲み込み行動 (鰾の開腔) に影響を及ぼす可能性が示唆された。そこで、本章の第2節では、油膜除去期間中の通気量が異なる4試験区を設定し、鰾の開腔および仔稚魚の生残、成長に及ぼす影響について把握した。

a) 卵

人工授精は、次に示す点を修正して第Ⅱ章の手順に基づき実施した。天然海域で採取した親魚および1999年から2004年に人工孵化した稚魚を屋内水槽 (75 kl) で飼育し、マハタの親魚とした (体重6.9~12.6 kg)。

2014年5月12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) 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44~54時間後の5月14日に、8尾の雌から搾出した卵と5尾の雄から採取した精液を人工授精した。受精32時間後に受精卵消毒を行い、5尾の雌から採取した浮上卵を等分して試験に使用した。

b) 試験区の設定と仔稚魚の飼育方法

飼育環境をTable Ⅲ-2-1に示す。油膜除去期間中の通気量が異なる4試験区を設定した (0.01, 0.05, 0.10, 0.50 l/分)。

飼育試験は、500-lポリエチレン水槽を用いて行い、通気量0.01 l/分では5反復、通気量0.05 l/分および0.10 l/分では3反復ずつ、通気量0.50 l/分では2反復で実施した。15,715粒の受精卵を各試験水槽に収容し、ふ化が

確認された日を0日令とした。飼育水温はウォーターバスで調整した。受精卵収容時の水温は18.0~18.3℃であり、その後、各試験区共に8日令までに25℃まで徐々に升温した。急激な環境条件の変化を防止するため、6日令まで飼育海水を交換しなかった。その後、海水を水槽容量の9%/日の換水率で供給し、換水率を試験終了までに58%/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。水質を安定させるため、貝化石 (フィッシュグリーン, グリーン・カルチュア, 富山) を一日に2回、0.01 g/l/回の濃度で添加した。本章第1節の結果から、水面張力と関連したハタ科仔魚の死亡 (Yamaoka et al. 2000) を防止するため、0日令から10日令まで、全ての水槽で熱湯と混合した植物油 (MT被膜オイル, マリントック, 愛知) を、一日につき2回、0.1 ml/m²の濃度で各飼育水槽の水面に添加した (土橋ら2003a)。その後、仔魚の空気飲み込み行動による鰾の一次開腔を促進するため、油膜除去を仔魚の発育ステージがMouth-openingからPelagic-larvae ステージが主である11日令から開始し、20日令まで実施した。油膜除去期間中は、海水を日中 (06:00~17:00) に21%/日の換水率で供給し、本章第2節の試験3と同様に、飼育水槽の側壁面の水位線に開けた排水口 (Fig. Ⅲ-1-1) から飼育水を流出させ、飼育水面の油膜および、または自原性表面物質の除去を行った。なお、本章第2節の結果から、油膜除去器による波が仔魚の空気飲み込み行動を阻害する可能性が考えられたため、水面油膜除去器 (スキマー, Fig. Ⅲ-1-1) は設置しなかった。

2個の半球状の通気装置 (通気および酸素) を各飼育水槽の底部中央に設置した。通気量は、11日令から20日令の油膜除去期間 (06:00~17:00) を含む11日令から27日令を除き、各試験区ともに試験開始時から29日令まで0.2 l/分で維持し、30日令から試験終了まで0.2~0.5 l/分で維持した。酸素は、油膜除去期間中を除く4日令から10日令および21日令から試験終了まで0.1 l/分以下で維持した。油膜除去期間中を含む11日令から27日令は、各試験区で設定した通気量 (0.01, 0.05, 0.10, 0.50 l/分) を維持し、かつ、溶存酸素濃度を飼育に適した望ましいレベルに維持するため、微細流量計 (高精度流量計 RK1450-15-SS-1/4, コフロック, 京都) を使用し、通気および酸素量の合計値が各試験区の設定値 (0.01, 0.05, 0.10, 0.50 l/分) になるよう調整した。

蛍光照明は、6:00から20:00まで用いた（14時間明期/10時間暗期）。連続照明（24時間明期/0時間暗期（土橋ら2003a；照屋ら2008））は3日令から10日令まで適用した。

水温、塩分、溶存酸素濃度および水面上の照度は毎日1回あるいは2回測定した。

仔稚魚には、栄養強化したS型ワムシ混合種、ベトナム産アルテミア幼生（ベトナム産ブラインシュエリンプエッグ、北村、京都）、北米産アルテミア幼生（ブラインシュエリンプ卵、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。S型ワムシを3日令から40日令に15 cells/mlの密度で毎日2回給餌した。ベトナム産アルテミア幼生の給餌は、20日令から開始し、24日令まで継続した。北米産アルテミア幼生の給餌は、仔魚が6 mmの平均全長に到達した25日令に開始し、試験終了まで継続した。市販の人工飼料は、40日令から試験終了まで給餌した。ワムシは、高度不飽和脂肪酸（HUFA）を高めた淡水クロレラ（スーパー生クロレラ V-12、クロレラ工業、東京）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、孵化した北米産アルテミア幼生は、バイオクロミス パウダーで培養した。飼育実験は、魚の全長が26～29 mmに到達するまで継続した。

c) 飼育環境

飼育環境をTable III-2-1に示す。飼育水温は概ね25℃に維持されていた。塩分および溶存酸素濃度は試験期間を通して望ましいレベルに維持されていた。水面上の照度は、1,400～1,500 luxに維持されていた（Table III-2-1）。

d) 標本採集

10日令の夜間に、各飼育水槽で生残している仔魚数を容積法（第II章）で推定した。試験終了時（全長26～29 mm）には、生残している全ての仔稚魚数を計数した。仔稚魚の全長を10, 13, 14, 15, 20, 25, 31, 41 および49日令および試験終了時（54～60日令）に測定した。各採集日に各試験区の全水槽から一水槽につき5～30尾を採取した。また、全長の測定に関しては、試験終了時に全ての水槽から一水槽につき54～58尾を採取した。飼育期間中に採取した全ての標本は、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）0.1～0.3 ml/lの濃度で2分間の麻酔を行った。10日令から41日令に全長の測定を行ったあと、全ての麻酔標本を直ちに鰾の開腔頻度調査に使用した。Koumoundouros et al. (2000)の方法に従い、49日令および試験終了時に全ての麻酔標本を-21℃から-20℃で直ちに凍結保存し、後日軟X線調査で鰾の開腔率を評価した。

e) 浮上死、仔魚の発育段階、鰾の開腔の観察

Table III-2-1. Culture conditions for the seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* larvae and juveniles reared at four different flow rates

| Flow rate (L min ⁻¹) | Water temperature (°C) | Salinity (g L ⁻¹) | DO (mg L ⁻¹) | Light intensity (lux) |
|-------------------------------------|---------------------------|----------------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| 0.01 | 25.10 ± 0.29 | 35.98 ± 0.63 | 7.91 ± 1.37 | 1,440 ± 183 |
| 0.05 | 25.12 ± 0.32 | 36.02 ± 0.65 | 8.25 ± 1.94 | 1,455 ± 210 |
| 0.10 | 25.25 ± 0.85 | 35.92 ± 1.03 | 7.95 ± 2.07 | 1,416 ± 200 |
| 0.50 | 25.09 ± 0.23 | 36.00 ± 0.64 | 7.63 ± 1.34 | 1,419 ± 248 |

All values are presented as the mean ± standard deviation in each experimental group. The mean values were calculated by measurements values from 8 to 54-60 days after hatching.

各試験区における、浮上死および仔魚の魚の空気飲み込み行動を目視観察した。顕微鏡観察で確認した仔魚の発育段階は、既存の報告 (Sabate et al. 2009) に従い表現した。また、仔稚魚の鰓の開腔は、本章第1節に記載したカバーガラスを用いた押し潰し法および軟X線写真で確認した。

f) 飼育水の流向・流速の測定

通気量が異なる4試験区 (0.01, 0.05, 0.10, 0.50 l/分) の流場の測定は、飼育試験開始前の2014年4月29日から5月7日にかけて行った。通気による流場の測定に用いた水槽は、その後の飼育試験と同様に水温を25°Cに設定し、一日に水槽容量の21%の換水率で海水を供給し、側壁面の水面から排水した。飼育水槽の流場の測定はAcoustic Doppler velocimeter (MicroADV, SonTek/YSI, California) を用いて、水平方向の直交 (x, y軸) および垂直方向 (z軸) の3方向で定量化した。流向・流速計およびセンサー (Acoustic Doppler velocimeter) は、飼育水槽上に置いた移動架台の上に設置し、x軸に沿って水槽の中央部から側壁面まで、およびz軸に沿って水

面下5 cm以深において、5 cmあるいは2.5 cm間隔で移動し、合計130箇所です流場の測定を行った。また、音波の反射向上を目的に、流場の測定直前に貝化石100 gを水槽内に添加した (Ching et al. 2014)。流場の測定は水槽の半面のみで行い、各測点における流場は3分以上 (25 Hz) 測定し、流場が安定した測定開始2分後から1分間の平均値をデータとして用いた。本研究では、z軸 (垂直成分) 周りの円周方向の水平循環流は微小であると仮定し (塩谷ら 2003)、z軸およびx軸の流量データのみを用いて各測点における平均流速を求めた。

g) 統計分析

データの正規性 (Shapiro-Wilk test) および等分散性 (Bartlett test) が確認された場合は、生残率および全長における差異を確認するためTukey-kramer testを使用した (Tables III-2-2, III-2-3)。生残率は、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、角変換後に用いた (Table III-2-2)。全長に関しては、データの正規性および等分散性が確認されなかった場合は、

Table III-2-2. Culture conditions for the seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* larvae and juveniles reared at four different flow rates

| Flow rate (L min ⁻¹) | Survival rates (%) | |
|-------------------------------------|---------------------------|--|
| | At 10 days after hatching | At the end of the experiment (At 54–60 days after hatching) |
| 0.01 | 116.1 ± 19.3 | 3.7 ± 2.2 |
| 0.05 | 103.2 ± 24.4 | 3.6 ± 2.1 |
| 0.10 | 98.3 ± 26.8 | 9.1 ± 5.2 |
| 0.50 | 87.4 ± 46.9 | 10.2 ± 11.5 |

All values are presented as the mean ± standard deviation in each experimental group. The mean values were calculated by measurements values from 8 to 54-60 days after hatching.

Steel-Dwass test を使用した (Table III-2-3)。また、鰾の開腔率 (Table III-2-4) における差異を確認するため、William'sの補正を伴うG-test (Sokal and Rohlf 1983) および事後検定としてRyan's multiple range testを使用した。Tukey-kramer test, Shapiro-Wilk test およびBartlett testは、JMP7統計ソフトウェア (SAS Institute Japan, 東京) を用いて実施し、 $P < 0.05$ の場合に差が有意とした。

III-2-2. 結果

a) 生残および成長

試験で用いた受精卵のふ化率は67.1~91.7%であった。各試験区ともに、浮上死が、油膜および、または自原性表面物質の除去を開始した直後に観察され、30日令まで継続した。

10日令および試験終了時の平均生残率をTable III-2-2に示す。平均生残率は、10日令で87.4%から116.1%、試験終了時で3.6%から10.2%を示し、ともに試験区間で有意差はみられなかった。試験終了時における、各試験区

の生残率の範囲は、通気量0.01 l/分区で1.7~7.1%, 0.05

Table III-2-3. Mean total length of the seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* larvae and juveniles reared at four different flow rate

| Days after hatching | Flow rate (L min ⁻¹) | | | | | | | |
|---------------------|----------------------------------|-------------------------|----------|--------------------------|----------|-------------------------|----------|--------------------------|
| | 0.01 | | 0.05 | | 0.10 | | 0.50 | |
| | <i>n</i> | Total length (mm) | <i>n</i> | Total length (mm) | <i>n</i> | Total length (mm) | <i>n</i> | Total length (mm) |
| 3 | 27 | 2.55±0.04 | 16 | 2.55±0.04 | 15 | 2.56±0.03 | 10 | 2.57±0.03 |
| 5 | 26 | 2.71±0.08 | 16 | 2.68±0.08 | 15 | 2.67±0.08 | 10 | 2.68±0.08 |
| 10 | 50 | 3.26±0.34 ^a | 30 | 3.16±0.27 ^{ab} | 30 | 3.26±0.34 ^{ab} | 20 | 3.07±0.23 ^b |
| 13 | 25 | 3.89±0.38 ^{ab} | 17 | 3.89±0.29 ^a | 16 | 3.85±0.41 ^{ab} | 11 | 3.62±0.10 ^b |
| 14 | 26 | 4.40±0.49 ^a | 16 | 4.03±0.45 ^{ab} | 16 | 4.38±0.27 ^{ab} | 10 | 4.17±0.43 ^b |
| 15 | 78 | 4.70±0.32 ^{ab} | 46 | 4.46±0.50 ^c | 45 | 4.73±0.34 ^a | 31 | 4.38±0.61 ^{abc} |
| 20 | 75 | 5.97±0.69 ^a | 47 | 5.12±0.51 ^{bc} | 49 | 5.27±0.53 ^b | 31 | 4.90±0.51 ^c |
| 25 | 75 | 7.17±1.00 | 45 | 7.04±1.11 | 46 | 6.80±0.96 | 30 | 6.82±0.86 |
| 31 | 75 | 8.53±1.52 | 46 | 8.87±1.43 | 45 | 8.64±1.27 | 32 | 8.26±1.29 |
| 41 | 75 | 14.78±1.81 ^a | 55 | 13.73±1.29 ^b | 45 | 13.73±1.41 ^b | 30 | 13.48±0.98 ^b |
| 49 | 95 | 20.07±3.14 ^a | 55 | 19.03±2.75 ^{ab} | 60 | 17.37±2.95 ^c | 35 | 17.82±3.35 ^{bc} |
| 54-60 | 270 | 27.84±3.70 ^a | 164 | 27.82±3.93 ^a | 166 | 25.98±3.23 ^b | 110 | 26.22±4.53 ^b |

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

Table III-2-4. Frequency of seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* larvae and juveniles with inflated swim bladders

| Days after hatching | Flow rate (L min ⁻¹) | | | | | | | | | | | |
|---------------------|----------------------------------|-------------|-------------------|-------------|-------------|-------------------|-------------|-------------|--------------------|-------------|-------------|-------------------|
| | 0.01 | | | 0.05 | | | 0.10 | | | 0.50 | | |
| | <i>n</i> SI | <i>n</i> SU | % SI | <i>n</i> SI | <i>n</i> SU | % SI | <i>n</i> SI | <i>n</i> SU | % SI | <i>n</i> SI | <i>n</i> SU | % SI |
| 10 | 0 | 50 | 0 | 0 | 30 | 0 | 0 | 30 | 0 | 0 | 20 | 0 |
| 13 | 0 | 25 | 0 | 1 | 16 | 5.9 | 0 | 16 | 0 | 0 | 11 | 0 |
| 14 | 2 | 23 | 8.0 | 0 | 16 | 0 | 1 | 16 | 5.9 | 0 | 11 | 0 |
| 15 | 7 | 70 | 9.1 ^{ab} | 7 | 39 | 15.2 ^a | 0 | 45 | 0 ^b | 1 | 30 | 3.2 ^{ab} |
| 20 | 10 | 65 | 13.3 | 3 | 45 | 6.3 | 2 | 47 | 4.1 | 1 | 29 | 3.3 |
| 25 | 8 | 67 | 10.7 | 4 | 41 | 8.9 | 1 | 45 | 2.2 | 0 | 30 | 0 |
| 31 | 7 | 68 | 9.3 | 5 | 41 | 10.9 | 1 | 44 | 2.2 | 1 | 31 | 3.1 |
| 41 | 17 | 58 | 22.7 ^a | 14 | 41 | 25.5 ^a | 12 | 33 | 26.7 ^a | 0 | 30 | 0 ^b |
| 49 | 13 | 82 | 13.7 | 7 | 48 | 12.7 | 9 | 51 | 15.0 | 1 | 34 | 2.9 |
| 54-60 | 76 | 194 | 28.1 ^a | 53 | 111 | 32.3 ^a | 43 | 123 | 25.9 ^{ab} | 17 | 93 | 15.5 ^b |

SI, swim bladder inflation; SU, swim bladder uninflation. Different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

1/分区分で1.5~5.6%, 0.10 1/分区分で3.7~14.1%および0.50 1/分区分で2.0~18.3%であった。

全長は, 10, 13, 14, 15, 20, 41, 49日令および試験終了時に試験区間で統計的有意差がみられた ($P < 0.05$, Table III-2-3)。このうち, 10, 14, 20, 41, 49および試験終了時では, 全長は, 0.50 1/分区分より0.01 1/分区分で有意に大きい値を示した。

b) 鰾が開腔した仔稚魚の頻度

10日令での仔魚の発育ステージは, Mouth-opening またはPelagic larvaeであった。油膜および, または自原性表面物質の除去を終了した20日令では, 発育ステージは, 主にPre-flexionとFlexionステージであった。鰾の開腔は, 13日令に0.05 1/分区分で最初に確認された (Table III-2-4)。その後, 14日令に0.01および0.10 1/分区分で開腔が確認され, この間に鰾が開腔した仔魚は全長3.80~5.16 mmであり, 全てPre-flexion ステージであった。鰾の開腔率は, 15, 41日令および試験終了時に試験区間で統計的有意差がみられた ($P < 0.05$, Table

III-2-4)。特に, 0.50 L/分区分の鰾の開腔率は全体的に低く, 15日令から49日令まで0~3.3%で推移し, 41日令では他試験区より有意に低かった。また, 試験終了時の鰾の開腔率は, 0.01 1/分区分で28.1%, 0.05 1/分区分で32.3%, 0.10 1/分区分で25.9%および0.50 1/分区分で15.5%を示し, 0.50 1/分区分の鰾の開腔率は0.01 1/分および0.05 1/分区分より有意に低かった ($P < 0.05$)。

c) 飼育水の流向・流速の測定

Fig. III-2-1からIII-2-4に各試験区における水槽鉛直断面内の3次元の流向流速の測定結果を示した。水槽の中央部 (通気装置直上) の垂直方向 (z軸) の流速分布は, 各試験区ともに上向きの上昇流が確認された。水槽の中央部 (通気装置直上) の流速は, 0.01 1/分区分で0.01~13.13 cm/秒, 0.05 1/分区分で0.02~18.95 cm/秒, 0.10 1/分区分で0.11~16.51 cm/秒および0.50 1/分区分で0.17~16.10 cm/秒であった。水槽の中央部 (通気装置直上) の水面下5 cmの流速は, 0.01 1/分区分で6.28 cm/秒, 0.05 1/分区分で16.39 cm/秒, 0.10 1/分区分で14.40 cm/秒, 0.50

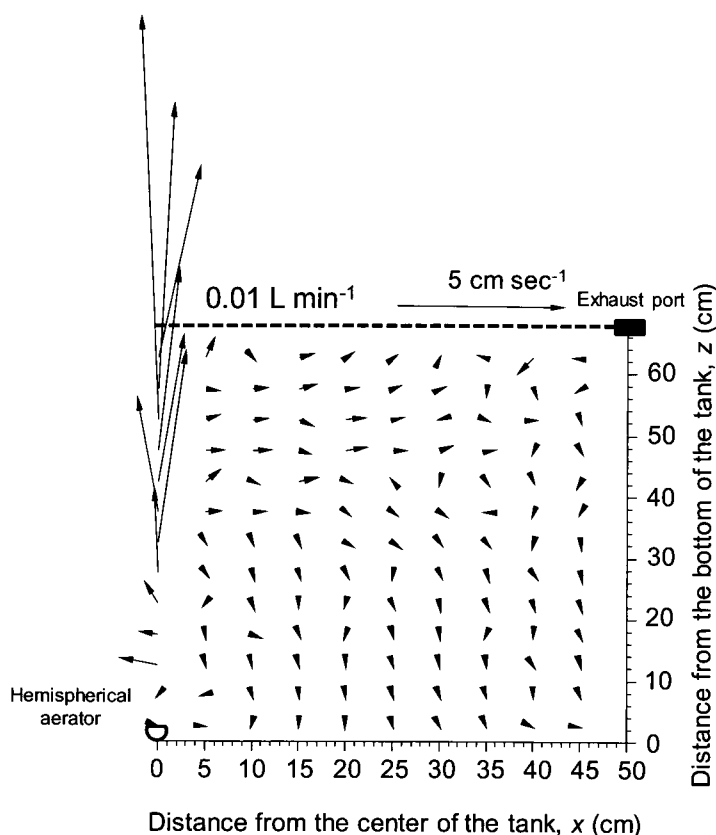


Fig. III-2-1. Current velocity distribution in a rearing tank at 0.01 L min⁻¹ aeration and oxygenation rate. Cross-section of a 500-L round tank is shown. Arrow indicates mean flow velocity at the observation point in a rearing tank. Broken line indicates water surface.

1/分区で16.10 cm/秒であった。流速の最大値が確認された水深は、0.01 1/分区は水面下15 cm、0.05 1/分区は水面下30 cm、0.10 1/分区は水面下20 cmおよび0.50 1/分区は水面下5 cmであり、いずれも水槽底部で遅かった。Fig. III-2-1からIII-2-4に示すとおり、水面付近では水平方向の流れも確認された。水平方向の流れは側壁面で沈降流となり、下降した。各試験区ともに、時計回りの鉛直循環流が形成されたが、その循環流は、強通気区でより大きくなった。水槽底面では、0.50 1/分区を除き、多くの測定箇所で沈降流が確認されたが、一部では水平方向の弱い流れも観測された。一方、0.50 1/分区の水槽底面では、沈降流はほとんど確認されず、水槽中央部に向かう水平方向の流れが観測された。また、0.01 1/分区では、水深の約半分より以深で底層に向かう沈降流が観測された。水面下5 cmの流速は、0.01 1/分区で0.06~0.67 cm/秒、0.05 1/分区で0.29~0.63 cm/秒、0.10 1/分区で0.08~1.28 cm/秒および0.50 1/分区で0.96

~2.73 cm/秒であった。

III-2-3. 考察

本章第1節では、通気による飼育水の流動が、仔魚の空気飲み込み行動および鰾の開腔に影響を及ぼす可能性が考えられた。そこで、本節では、同一の油膜除去条件下で通気量が異なる試験区を設定し、通気量がマハタ仔稚魚の鰾の開腔に及ぼす影響について検討した。また、油膜除去期間中の通気量が、マハタ仔稚魚の生残と成長に及ぼす影響についても確認した。

鰾の開腔率は、本試験で設定した最も高い通気量である0.50 1/分で有意に低下したことから、通気量が鰾の開腔に影響を及ぼすことが明らかとなった。Acoustic Doppler velocimeterで各試験水槽における飼育水の流場（流向・流速）を測定した結果、水面下5 cmの流速は、0.50 1/分区で0.96~2.73 cm/秒を示し、他試験区より速い傾向がみられた。また、0.50 1/分区では、目

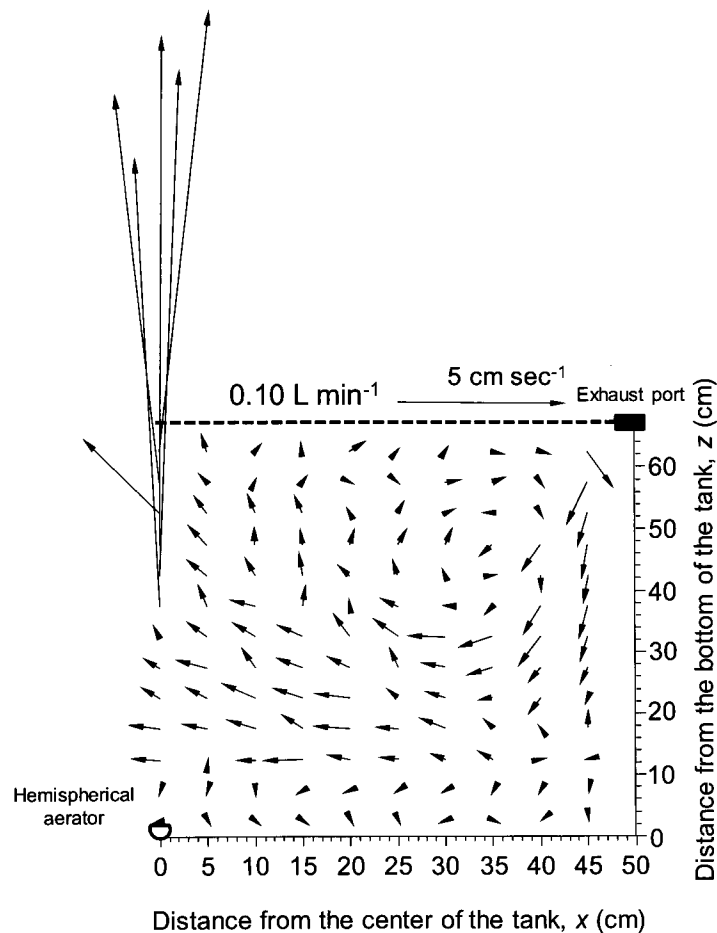


Fig. III-2-2. Current velocity distribution in a rearing tank at 0.05 L min⁻¹ aeration and oxygenation rate. Cross-section view of a 500-L round tank is shown. Arrow indicates mean flow velocity at the observation point in a rearing tank. Broken line indicates water surface.

視観察で、油膜除去期間中に仔魚が水面を突く行動が確認されたが、他試験区と比較して水流で流される仔魚が多かった。人工飼育下における人工飼育下におけるマハタ仔魚の遊泳速度は、孵化（0日令）から13日令（体長3.2 mm）および24日令（体長データなし、25日令で体長6.9 mm）まで、孵化時と変わらない 1.35 ± 0.60 cm/秒付近であり、仔魚の相対遊泳速度は、孵化時（ 7.9 ± 3.6 mm/体長/秒）より13日令および24日令（データなし、グラフからの読み取り値でおよそ3.0~3.5 mm/体長/秒）で有意に遅くなることが報告されている（Sabate et al. 2009）。油膜除去期間中の仔魚の遊泳速度および本研究の通気量0.50 L/分區における水面付近の流速（0.96~2.73 cm/秒）を考慮すると、同区の水面の一部あるいは大部分は、仔魚の遊泳速度を上回る流速であったと推定された。これらのことから、仔魚の遊泳速度を上回る水面付近の速い流速で仔魚は水面に定位で

きず、水面から離される機会が増加し、それに伴い仔魚の空気飲み込み行動が阻害され、鰾の開腔率が低下した可能性が高いと考えられた。

同様の現象は他魚種でも確認され、通気量あるいは注水による水面の動静が、仔魚の水面での空気飲み込みを阻害し、鰾の開腔に影響を及ぼすことが報告されており（北島ら 1981；Kitajima et al. 1994；Chatain and Ounais-Guschemann 1990；Summerfelt 2013；林田ら 1984；Battaglione and Talbot 1990；照屋ら 2009；橋本ら2012）、本研究の結果を支持すると考えられる。したがってマハタ仔魚で鰾の開腔を促進するには、Pre-flexion ステージにおける油膜除去だけでなく、その間の通気量（水面流速）にも注意を払うべきである。少なくとも、油膜除去期間中の飼育水面の流速を、通気量0.01および0.05 l/分區で測定された流速0.67 cm/秒以内に維持することで、鰾の開腔促進が期待できると言え

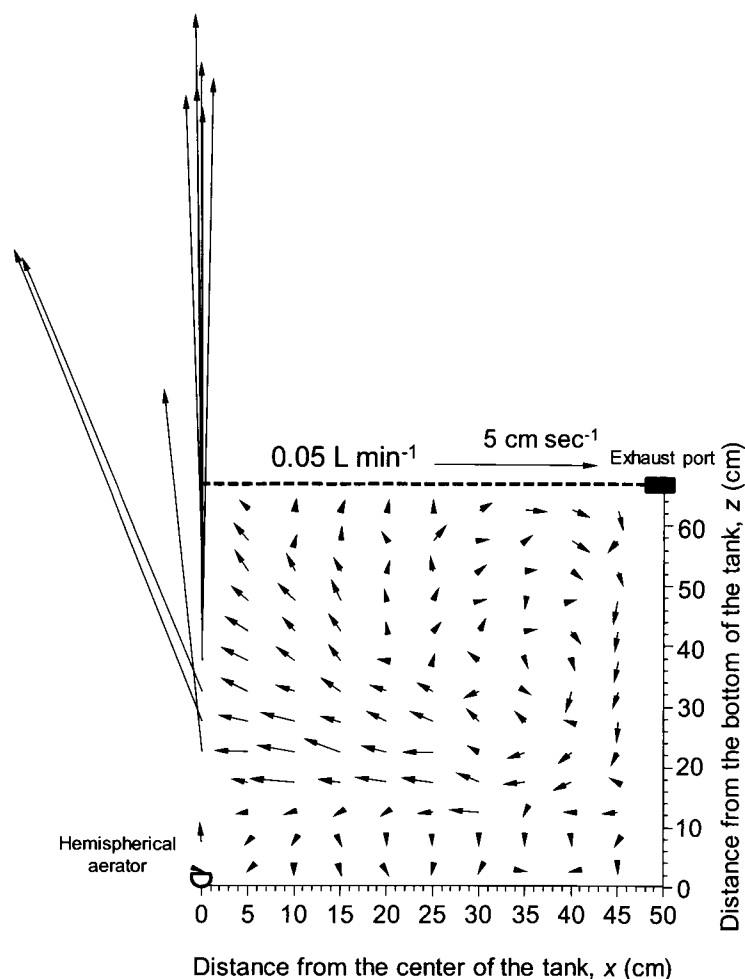


Fig.III-2-3. Mean flow velocity distribution in a rearing tank at 0.10 L min^{-1} aeration and oxygenation rate. Cross-section view of a 500-L round tank is shown. Arrow indicates mean flow velocity at the observation point in a rearing tank. Broken line indicates water surface.

る。同時に、油膜除去期間中の水面流速が、鰾の開腔が阻害される基準となる0.96~2.73 cm/秒 (0.50 l/分区) 以上にならないよう、注意すべきである。ただし、Sakakura et al. (2007a) は、孵化から仔魚期初期 (9日令) までの試験において、無通気による飼育で生残率が著しく低下することを示していることから、無通気飼育は避けるべき可能性がある。なお、本節では、500-lポリエチレン水槽を用いて異なる通気量がマハタ鰾の開腔に及ぼす影響を実験的に検証したが、通気で発生する水流の速さおよび流向は、飼育水槽の規模や水量、通気方法で異なる可能性がある。したがって、今後は実際にマハタの種苗生産を実施する飼育環境で通気量と流速の関係を把握することが必要である。

試験終了時の平均生残率は3.6%から10.2%を示し、試験区間で統計的有意差はみられなかった。しかし、各試験区の最高生残率は、通気量0.01 l/分区で7.1%、0.05 l

/分区で5.6%、0.10 l/分区で14.1%および0.50 l/分区で18.3%を示し、0.10 l/分区および0.50 l/分区で生残率が高くなる傾向がみられた。一方でマハタを含むハタ科魚類では、水槽内の通気量 (流速) が、孵化から6~14日令までの仔魚の生残に及ぼす影響について検討されており、過剰な通気で生残率あるいは成長率が低下することが報告される (塩谷ら 2003 ; Sakakura et al. 2007a ; Yamaoka et al. 2000 ; Ching et al. 2014 ; Toledo et al. 2002)。このうち、マハタでは、水槽内の通気量 (流速) が、孵化から仔魚期初期 (9日令) までの仔魚の生残に及ぼす影響について検討されており、1 klおよび100 kl円形水槽内の通気量を200 ml/分および630 ml/分に設定し、通気装置直上の流速を約8 cm/秒、水面付近で約6 cm/秒にすることで、生残率が向上する (Sakakura et al. 2007a)。また、Sabate et al. (2009) は、1 kl水槽を用いたマハタの人工飼育において、26日

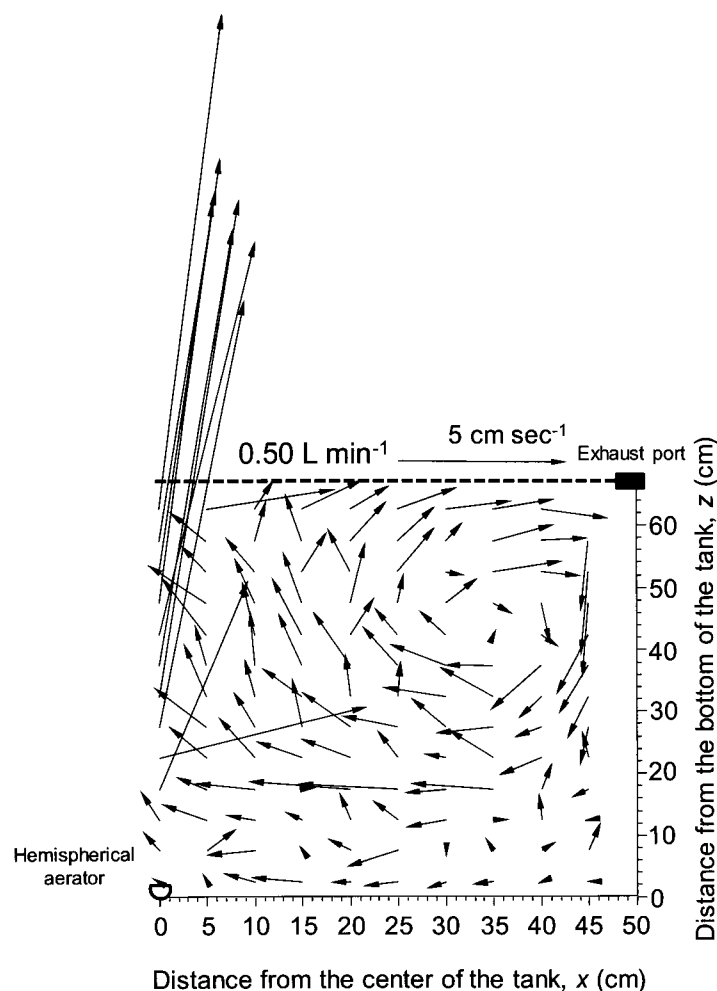


Fig. III-2-4. Mean flow velocity distribution in a rearing tank at 0.50 L min⁻¹ aeration and oxygenation rate. Cross-section point in a rearing tank. Arrow indicates mean flow velocity at the observation point in a rearing tank. Broken line indicates water surface.

令まで通気量200 ml/分で飼育し、27日令以降から65日令まで、仔魚の成長に応じて飼育水の通気量を段階的に600あるいは800 ml/分まで増加することで、生残率が向上する可能性を示唆している。一方、1 kl円形水槽で、通気量を1,000 ml/分に設定した試験区では浮上死が多発し、9日令までの生残率が低下する傾向が示されている (Sakakura et al. 2007a)。Sakakura et al. (2007a) は、この設定での流速を測定していないが、通気量を900 ml/分に設定した同型水槽では (塩谷ら 2003)、通気装置直上の流速が20 cm/秒と推定されることから (図からの読み取り値)、少なくとも20 cm/秒以上の流速であると推定される。これらの既報と本研究では、飼育水の通気量が仔魚の生残に及ぼす影響を検討した仔魚の日令および発育時期が異なることから、その関係性を単純に比較することはできない。しかし、Sakakura et al. (2007a) の試験では、通気量200 ml/分と1,000 ml/分の間の通気量を設定していないため、この間に仔魚の生残に適した通気量 (流速) が存在するかもしれない。本研究の0.10および0.50 l/分区では、通気装置直上で最大16.51および16.10 cm/秒の流速が確認されるとともに、水槽内のその他測点でも他試験区より強い水流が確認されることから、これら試験区の水槽全体の水流 (流速) 条件が、仔魚の生残に適している可能性も考えられる。

強通気で仔魚期初期 (6~9日令) の生残率が低下する要因として、他のハタ科魚類では、通気量の増加に伴う仔魚の摂餌効率の低下 (Toledo et al. 2002) あるいは強通気で特に通気装置上の鉛直方向周辺に強水流と気泡が発生し、これらに伴う物理的ストレスが仔魚の浮上死を引き起こす可能性が指摘される (Sakakura et al. 2007a)。その一方で、Yamaoka et al. (2000) は、水槽内の適切な通気量 (流速) は、浮上死に繋がる水面張力に捕らわれた仔魚を解放し、浮上死を防止すると推察している。このように、マハタの仔魚期における飼育水の通気量と浮上死は密接に関連していると考えられる。本研究では、日間の浮上死尾数を計数しておらず、11日令以降の異なる通気量が、浮上死に及ぼした影響は不明である。今後、10日令以降の浮上死に及ぼす通気量の影響を把握することで、通気量の調節で仔魚の生残率が向上する可能性がある。また、平田ら (2009a) は、鰾が未開腔のマハタ仔魚では、鰾棘伸長開始期 (水温26℃でおよそ13日令) 以降に体比重が著しく増大することを明

らかにしていることから、浮上死だけでなく、体比重の増加と関連した仔魚の沈降に通気量が影響する可能性も考えられる。これらのことから、今後、マハタの人工飼育下における最適な飼育水の通気量 (流速) を追求することで、さらなる生産効率の向上が見込まれる。

本研究では、通気量0.50 l/分区における仔魚の全長は、10, 14, 20, 41, 49日令および試験終了時では、0.01 l/分区と比較して有意に小さい値を示した。チャイロマルハタ *Epinephelus coioides* では、通気量の増加に伴う仔魚の摂餌効率の低下で成長が劣る可能性が指摘されるが (Toledo et al. 2002)、マハタの人工飼育下では、高い生残率と高密度のパッチに伴う、負の密度効果で成長が劣る可能性が示唆される (Sakakura et al. 2007b)。また、本章第1節で考察したが、他魚種では、鰾が未開腔の幼魚は、開腔した幼魚と比較して成長が劣ることが指摘されており (Jacquemond 2004b; 橋本ら 2012; Chatain 1989; Kurata et al. 2013; Jacquemond 2004a)、このことは、マハタでも鰾の一次開腔促進で成長が向上する可能性を示唆している。本研究においても、鰾の開腔率は、通気量0.01 l/分区と比較して0.50 l/分区で有意に低いことから、鰾の開腔率の差が成長差の原因になっている可能性がある。したがって、飼育水の通気量、摂餌効率、生残率、密度効果、鰾の開腔率および仔魚の成長は複雑に関連していると考えられた。

本研究では、油膜除去期間中 (11~20日令) を含む11日令から27日令の異なる通気量が、主にマハタ仔稚魚の鰾の一次開腔および生残に及ぼす影響を検討した。強通気飼育で鰾の一次開腔率が低下する一方、生残率が高くなる傾向があることから、通気量が両者に及ぼす影響はトレードオフの関係にある可能性が明らかになった。鰾が一次開腔していない個体で脊椎骨の屈曲率が高く (第2章および本章第3節)、このような形態異常魚は養殖用種苗として価値がないことから、マハタの人工種苗生産工程では、生残率より鰾の一次開腔率の向上を優先すべきであり、少なくとも油膜除去期間中は、生残に悪影響を及ぼさない範囲で可能な限り通気量を抑え、鰾の一次開腔を促進することが重要であると考えられた。

第3節 鰾の開腔と形態異常

III-3-1. 材料および方法

第3節では、第1節で実施した鰾の開腔条件を検討する試験 (試験2および3) において、人工飼育下における飼

育環境調整で鰻の一次開腔が促進された個体について、これら形態異常の低減効果に再現性がみられるか検討した。第3節の材料および方法は、第1節の内容に共通するため、新たな追加点のみを以下に記す。

a) 標本採集

第1節で実施した、鰻の開腔条件を検討する試験の終了時において、全長の測定終了後、標本を直ちに-21℃から-20℃で冷凍保存し、後日軟X線調査で骨異常を評価した。

b) 骨異常の評価

試験2および3では、標本は軟X線撮影装置を用いて写真撮影し、脊柱の骨の構造を第II章と同じ方法で観察した。標本の形態異常は、脊椎骨屈曲（前彎症または後彎

症）および椎体の変形に分類した。試験2および3の各試験区における、試験終了時の脊椎骨屈曲および椎体の変形率をFig. III-3-1およびIII-3-2に示した。また、試験区に関係なく、鰻の一次開腔個体および未開腔個体で脊椎骨屈曲および椎体の変形率を比較した（Fig. III-3-3）。鰻の一次開腔個体または未開腔個体の両方の標本について、屈曲が確認された脊椎骨の番号の頻度分布を試験区に関係なく形態異常の分類毎に比較した（Fig. III-3-4）。標本個体毎に脊椎骨を計数し、尾に向かって1から22番まで番号を付けた。形態異常の脊椎骨を特定し、各形態異常の椎体を数えた。頻度（%）は、試験2または3の各形態異常の椎体の総数を標本数（n=1114（試験2）およびn=470（試験3））で除算して計算した。

c) 統計分析

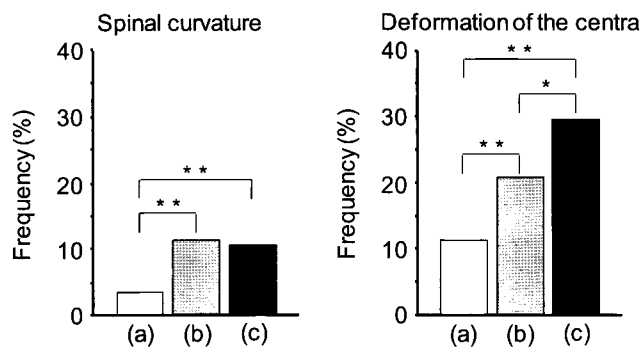


Fig.III-3-1. Frequency of spinal curvature and deformation of the centra at the end of the experiments in Experiment 2. (a) Removal of the oily surface film and/or autogenous surface substances (ROF group). (b) Covering of water surface with oil film (COF group). (c) Sealing of water surface with liquid paraffin (SLP group). Double asterisk: Significant difference between the two groups at $P < 0.01$. Single asterisk: Significant difference between the two groups at $P < 0.05$.

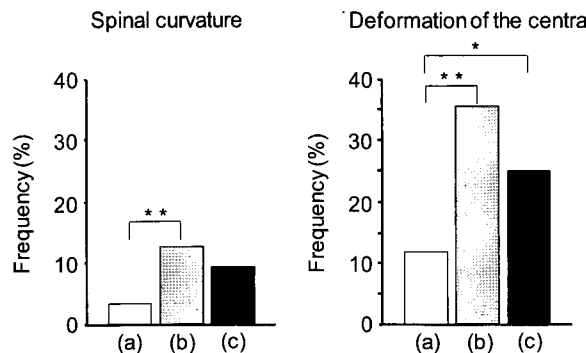


Fig.III-3-2. Frequency of spinal curvature and deformation of the centra at the end of the experiments in Experiment 3. (a) Removal of the oily surface film and/or autogenous surface substances (ROF group). (b) Covering of water surface with oil film (COF group). (c) Sealing of water surface with liquid paraffin (SLP group). Double asterisk: Significant difference between the two groups at $P < 0.01$. Single asterisk: Significant difference between the two groups at $P < 0.05$.

脊椎骨の屈曲および椎体の変形 (Figs. III-3-1, III-3-2) における差異を確認するため、William'sの補正を伴うG-test (Sokal and Rohlf 1983) および事後検定としてRyan's multiple range testを使用した。また、試験区に関係なく、脊椎骨の屈曲および椎体の変形について、鰾の開腔または未開腔の標本を比較し、統計的有意をG-testで確認した (Fig. III-3-3)。 $P < 0.05$ の場合に差が有意とした。

III-3-2. 結果

a) 鰾が開腔した仔稚魚の頻度および開腔率と骨異常との関係

試験2および3の脊椎骨屈曲率は、ROFグループで3.6%および3.4%であり、COFグループの11.3%および12.7%、およびSLPグループの10.8%および9.6%と比較して有意に低かった ($P < 0.01$, Figs. III-3-1, III-3-2)。試験2および3の椎体の変形率は、ROFグループで11.5%および11.9%であり、COFグループの20.8%および35.7%、およびSLPグループの29.6%および25.0%と比較して有意に低かった ($P < 0.05$, Figs. III-3-1, III-3-2)。

脊椎骨屈曲率は、試験2の鰾の開腔個体で1.6%、鰾の未開腔個体で8.5%、試験3の鰾の開腔個体で1.8%、鰾の未開腔個体で8.9%を示し、いずれも鰾の開腔個体で有意に低かった ($P < 0.05$, Fig. III-3-3)。また、椎体変形率は、試験2の鰾の開腔個体で1.6%、鰾の未開腔個体で20.8%、試験3の鰾の開腔個体で2.7%、鰾の未開腔個体で27.0%を示し、いずれも鰾の開腔個体で有意に低かった

($P < 0.05$, Fig. III-3-3)。また、椎体変形率は、試験2の鰾の開腔個体で1.6%、鰾の未開腔個体で20.8%、試験3の鰾の開腔個体で2.7%、鰾の未開腔個体で27.0%を示し、いずれも鰾の開腔個体で有意に低かった ($P < 0.05$, Fig. III-3-3)。

屈曲が確認された脊椎骨の番号の頻度分布をFig. III-3-4 に示す。鰾が一次開腔していない標本では、前彎症椎体の最頻値は、16番椎体の6.3% (試験2) および15番椎体の2.8% (試験3)。一方、鰾が一次開腔した標本では、前彎症は16番および22番椎体の間に位置しており、合計頻度は0.1% (試験2) および0.2% (試験3) であった。鰾が一次開腔していない標本では、後彎症椎体の最頻値は、7番椎体の0.5% (試験2) および5, 6番椎体で1.1%であった。鰾が一次開腔した標本の後彎症率は0% (試験1) および3番から5番椎体の間で0.2% (試験2) であった。試験3では、鰾が開腔した111個体のうち1個体において (0.9%)、後彎症は3番から5番椎体の間で鰾に接触していることが観察された。鰾が一次開腔していない標本では、変形した椎体の最頻値は、16番椎体の12.5% (試験2) および17番椎体で6.2% (試験3) であった。鰾が一次開腔した標本では、椎体の変形は、3番から18番椎体の間の幾つかの椎体で最高0.4%の頻度で観察された。

III-3-3. 考察

本研究では、試験終了時における脊椎骨屈曲および椎体変形の出現率は、油膜除去を実施したROFグループで有意に低かった。また、試験区に関係なく、脊椎骨屈

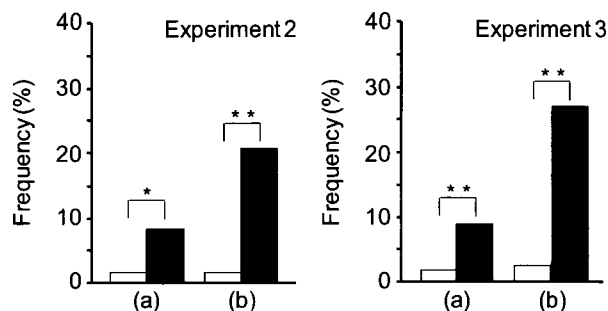


Fig. III-3-3. Comparison of frequencies between specimens with and without inflated swim bladders and those with spinal curvature and deformation of the centra in Experiments 2 and 3. Open columns: Inflated swim bladder; closed columns: uninflated swim bladder. (a) Spinal curvature and (b) deformation of the centra. 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 $P < 0.05$.

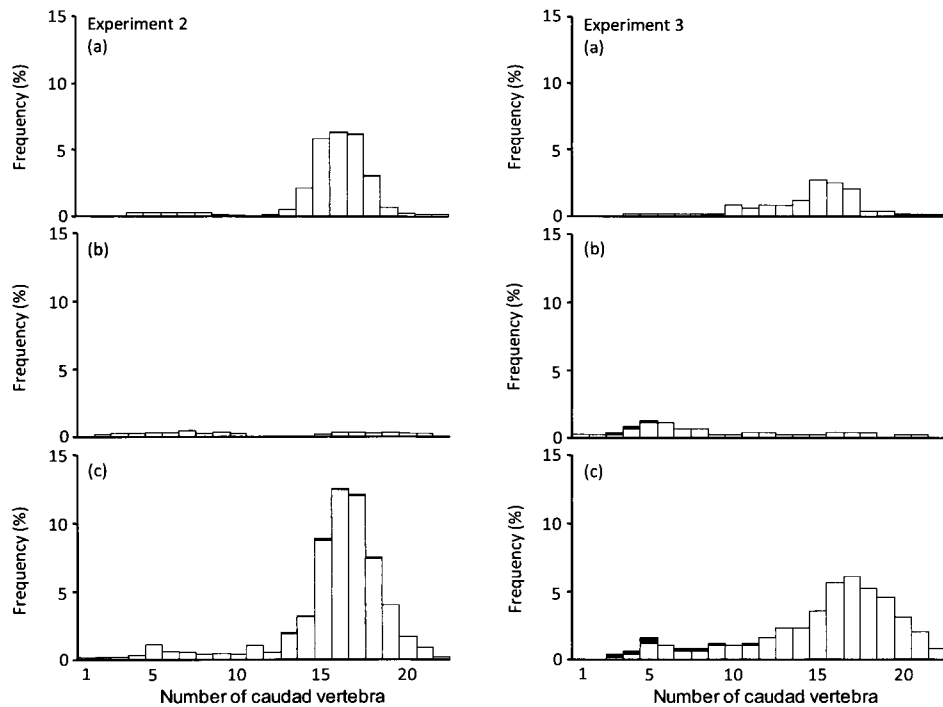


Fig.III-3-4. Frequency distribution of the caudad number of malformed vertebrae regardless of the experimental groups in Experiments 2 and 3. Open columns: Uninflated swim bladder; closed columns: inflated swim bladder. (a) Lordosis, (b) kyphosis and (C) deformation of the centra.

曲および椎体変形の出現率は、鰾の一次開腔個体で未開腔個体より有意に低かった。したがって、鰾の一次開腔促進で、脊椎骨屈曲および椎体の変形率が低減されることの再現性が確認された。本章の第1節では、油膜または自原性表面物質の除去が、鰾の一次開腔の促進に効果的であることを明らかにしたが、本節では、それらによる鰾の一次開腔促進で、仔稚魚期における脊椎骨屈曲および椎体の変形の出現防止が可能であることを明らかにした。

本章の第1節では、鰾が開腔しないことで起こる沈降死で生残率が低下する可能性を指摘したが、鰾が開腔しない場合、形態異常の出現率が高くなり、仔魚の選択的死亡率が高まって生残率が低下する可能性が考えられた。他魚種では、深刻な脊椎の形成異常 (Barahona-Fernandes 1982) あるいは後彎症 (Koumoundouros et al. 2002) は致命的であることが報告されている。本研究では、ROFグループにおける脊椎骨屈曲および椎体変形の出現頻度は、他のグループより有意に低かった。また、脊椎骨屈曲および椎体変形の出現頻度は、鰾が未開腔の個体で有意に高かった。したがって、COFおよびSLPグループで浮上死は発生しなかったが、これ

らのグループでは、鰾の未開腔による深刻な形態異常で仔魚の大量死が引き起こされ、結果として試験区間で生残率に差異がなくなった可能性が高い。このことは浮上斃死防止にまして沈降死防止がマハタ人工種苗の生産効率向上に有効であることを意味する。

また、試験3のROFグループでは、鰾の開腔率は20日令以降に増加傾向がみられた。この現象は、鰾の未開腔による仔魚の死亡で引き起こされた可能性がある。本研究では、鰾の一次開腔の開始時期における仔魚の発育ステージのみが特定されたが、鰾の一次開腔が可能な期間、いわゆる"window" (Summerfelt 2013) は特定しなかった。しかし、この"window"は、概ね無気管鰾魚ではPre-flexion ステージの前半に相当する (Koumoundouros 2010)。また、上述のとおり、マハタは無気管鰾魚であると考えられ、20日令での仔魚の発育ステージは、主にPre-flexion ステージの後半であると推察されることから、20日令まで鰾が未開腔の仔魚が、20日令から試験終了時まで一次開腔した可能性はほとんどない。一方でこの時点で鰾の二次開腔が確認されないことから、試験3における個体の開腔は仔魚期初期の一次開腔に違いない。他魚種では、鰾の開腔率が増加する現象は、機能的

な鰾を持たない仔魚の死亡率が高まる結果であると推察され（北島ら 1981 ; Battaglione and Talbot 1990）、我々の研究でも同様である可能性がある。

鰾が一次開腔していないマハタでは、前彎症および椎体の変形は15番から18番椎体の間（尾椎）で多発していた。反対に、後彎症はほぼ全ての脊椎骨で発生したが、頻度は低かった。一方、本種の鰾が一次開腔していない個体では、前彎症は概ね腹椎と尾椎の間（8～11番椎体）の位置で発生することが既に明らかとなっている（Nagano et al. 2007）。本研究で確認された前彎症椎体の位置が、既報で報告される位置と異なることは注目に値する。鰾が一次開腔していない魚において、ヨーロッパバスまたはヨーロッパヘダイ（Chatain 1994 ; Andrades et al. 1996）では、前彎症は、主に腹椎と尾椎の間の位置で発生する。対照的に、スズキ *Lateolabrax japonicus*（Kitajima et al. 1994 ; 林田ら 1984）およびクロダイ *Acanthopagrus schlegelii*（北島 1979）では、前彎症は主に腹椎で発生する。また、鰾が一次開腔あるいは飼育開始時に鰾の開腔が確認された個体でも、ヨーロッパバス、マダイ稚魚およびタイセイヨウダラでは、激しい遊泳行動あるいは高水温の飼育条件下で、尾椎で前彎症が現れる（Divanach et al. 1997 ; Kihara et al. 2002 ; Sfakianakis et al. 2006 ; Helland et al. 2009 ; Sfakianakis et al. 2013）。したがって、脊椎骨屈曲の位置は、その誘発要因や魚種により異なると推察される（末廣ら 2004）。鰾が一次開腔していないマハタ稚魚において、尾椎で前彎症が発生する機構は未だ不明である。しかし、鰾が開腔していない稚魚は、体の沈下に対応するため、沈下傾向に対して対応するため、体の後部で筋肉活動が増大することから（Divanach et al. 1997）、鰾が一次開腔していないマハタでの尾椎における前彎症の誘発は、そのような筋肉活動が原因である可能性がある。

本研究では、尾椎で前彎症が多発した椎体の位置が、椎体の変形が発生した位置とほぼ一致した。変形した尾椎の椎体が尾椎における前彎症の兆候であることが指摘されていることから（Sfakianakis et al. 2006）、椎体の変形は、飼育条件次第（例えば激しい遊泳行動）で前彎症が誘発される弱点になり得る。したがって、この異常の出現を防止するためのさらなる研究が必要であると考えられる。

脊椎骨の形態異常（脊椎骨屈曲および椎体の変形）の

頻度は、鰾が一次開腔しているマハタで非常に低かった。前彎症は尾椎で発生し、一方、後彎症は腹椎の前半で発生し、椎体の変形は幅広く発生した。飼育されたタイセイヨウダラでは、後彎症は、鰾のオーバーインフレーションによる脊索への圧迫で引き起こされる可能性が報告される（Grotmol et al. 2005）。本研究でも、後彎症は第3椎体～5椎体で鰾に接触していることが確認されている。しかし、試験3におけるそのような異常は僅か0.9%であり、試験2で確認されなかったことから、この時期のマハタでは後彎症はまれな異常であると考えられた。一方で腹椎の後彎症は死亡率が高く、深刻であることから（Koumoundouros et al. 2002）、初期飼育期間中（受精卵孵化から全長約3 cmまで）におけるこの異常の出現傾向を確認する必要がある。

本研究の結果から、鰾の一次開腔促進が、形態異常、特に脊椎骨屈曲および椎体の変形の防止に有効であることは間違いないと考えられた。

第IV章 給餌量および流速と稚魚の形態異常

IV-1. 諸言

ヨーロッパシーバス、マダイおよびタイセイヨウダラでは、稚魚期の不適切な飼育環境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)。本章では、マハタ稚魚期の給餌量と飼育水の通気方法で異なる流動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検討することを目的に飼育試験を行った。

現在、三重県では、初期飼育期 (受精卵～全長約3 cm) が終了後、大小選別を行い、引き続き陸上水槽で稚魚の中間育成を行い、VNN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で海面生簀に收容する。その後、全長約15 cmまで継続飼育を行い、受精卵から約6か月の飼育期間を経て人工種苗を養殖業者に出荷している。しかし、この間に人工種苗の骨異常が頻発し、このような形態異常は、本種の養殖における生産効率を低下させるとともに、市場での種苗の価値を損ねる大きな問題となっている。

鰾が未開腔のマダイ稚魚では、前彎症の出現率は、強制的遊泳状態で増加することが知られ (Chatain 1994)、一方、ヨーロッパシーバス、マダイおよびタイセイヨウダラでは、鰾の一次開腔あるいは飼育開始時に鰾の開腔が確認される稚魚でさえ、激しい遊泳行動で前彎症が発生する (Divanach et al. 1997 ; Kihara et al. 2002 ; Sfakianakis et al. 2006 ; Helland et al. 2009)。したがって、鰾の開腔率が低いマハタでは、不適切な飼育水の流場が脊椎骨屈曲を引き起こす可能性が高い。

タイセイヨウダラでは、椎骨の形成が開始する時期において、餌料の過食、あるいは便秘で消化管が過剰充填となり、これにより鰾と脊索の間の圧迫が増大し、脊索を上方へ持ち上げることで脊索の屈曲が引き起こされる可能性が指摘されている (Grotmol et al. 2005)。また、ブリ2歳魚では、餌料の飽食給餌、高い成長率あるいは性成熟が前彎症の出現と関連する可能性が指摘される (林 1990 ; 竹丸 2009)。これらの研究と魚の発育時期は異なるが、経験上、マハタ稚魚期においても、飽食給餌で消化管が充填され、腹部が膨張することを外観観察から確認している。したがって過剰量の餌料摂餌で消化管

が膨張し、鰾あるいは直接脊椎骨を圧迫することで脊椎骨の屈曲を引き起こした可能性がある。また、マダイやスズキでは、鰾の未開腔個体は浮力調節機能の欠如から体比重が増加し、遊泳行動が変化することで脊椎骨屈曲が発生する可能性が指摘される (北島ら 1981 ; 林田ら 1984)。

本研究では、マハタ種苗の形態異常を低減するため、稚魚の脊椎骨屈曲の出現に及ぼす配合飼料の給餌量および通気方法で異なる飼育水の流動の影響を検討した。さらに、成長と生残率に対する、これら飼育条件の影響を調査し、実験結果を基に、稚魚期における適切な飼育条件を検討した。

IV-2. 材料および方法

a) 供試魚

第II章の手順に基づき、7尾の天然雄親魚 (体重8.1～18.1 kg) と人工孵化した1尾の雌親魚 (4.5 kg) で人工授精を実施した。2010年5月17日に、親魚に胎盤性性腺刺激ホルモン (hCG ; ゴナトロピン5000, あすか製薬, 東京) を筋肉内に投与した。5月19日に、雌から搾出した卵と7尾の雄から採取した精液を人工授精した。浮上卵を等分して第III章第1節の飼育方法 (油膜および、または自原性表面物質の除去 : ROFグループ) に相当する飼育に使用した。種苗生産は、5月20日から7月21日 (61日令)、または7月22日 (62日令) まで行った。1,519尾の人工種苗を生産し、そのうちの800尾の人工種苗を本研究に用いた。

b) 試験区の設定と稚魚の飼育方法

試験1 : 給餌量の影響

稚魚期の給餌量の影響を検討するため、試験1は、次に示す2種類の異なる給餌量、体重の2% (A試験区 : 少量給餌) および体重の6% (B試験区 : 多量給餌) で稚魚に給餌を行った。飼育試験は、500-lポリエチレン水槽を用いて各試験区2反復で実施した。飼育試験は、8月27日 (98日令) から10月4日 (136日令) まで行った。各試験水槽に、100尾ずつ無作為に取上げた人工種苗 (全長71.52±9.86 mm, 体重6.20±2.61 g, n=52) を收容した。海水は、飼育期間中に水槽容量の432%/日の換水率