

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 「魚類の完全養殖の高度化」

平成 26 年度～平成 28 年度 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 研究成果報告書

平成29年3月

学校法人名 学校法人 近畿大学

大学名 近畿大学

研究組織名 水産研究所・大学院農学研究科

研究代表者 升間主計

目 次

| | |
|------------------------------|-----|
| はじめに | 1 |
| テーマ1: 完全養殖システムの構築 | |
| 概 要 | 3 |
| (1) 難種苗生産種および新魚種からの採卵および初期発育 | 4 |
| (2) 病原体の生態および感染機構の解明と疾病防除 | 47 |
| (3) DNA マーカーを用いた親魚管理 | 70 |
| テーマ2: 環境低負荷システムの構築 | |
| 概 要 | 101 |
| (1) 環境低負荷・省エネ型種苗生産システムの構築 | 102 |
| (2) 環境低負荷配合飼料の開発 | 110 |
| (3) 物質循環の解析と制御 | 127 |
| (4) 有効物質の探索と回収技術 | 158 |
| 研究成果の公表 | 175 |

はしがき

本報告書は、近畿大学水産研究所と同農学研究科水産学専攻の研究グループが、文部科学省からの支援を受け、私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「魚類の完全養殖の高度化」をテーマとして平成 25 年から 3 年間にわたって取り組んだ研究の成果を取りまとめたものです。

地球の人口が世界的に見ると増加し続けており、漁場の拡大、資源の乱獲が海洋生態系をかく乱している状況にあります。その中で、海洋を利用した食料生産として「養殖事業」が世界的に広がり、生産量を伸ばしています。魚類の生産量では海面全体の約 40%を占めるまでになっています。しかし、養殖用の種苗や餌の原料、養殖漁場の利用など、天然に依存している中で養殖が行われています。そこで、「大学の特色を活かした研究」及び「地域に根差した研究」として、クロマグロを始め、長年にわたる多くの魚類の種苗生産、養殖技術の研究成果とその技術をもとに、真の「完全養殖」を目指して、親魚養成・種苗生産から育種技術の高度化と持続的な環境保全・改善技術による環境負荷低減技術の高度化に取り組みました。この 3 年間で雑誌論文 78 件、学会発表 121 件を公表しました。さらにこのような学術的な活動の他に、新聞・テレビによる 153 件の公表を行い、3 年という短い期間ではありましたがプロジェクトの研究成果を社会に対して数多く発信できました。プロジェクトメンバーの努力によるものと、研究代表者として感謝しています。

本件の評価にあたっては、京都大学名誉教授 坂本 亘先生、甲子園大学学長 川合眞一郎先生にお願いし、たいへん有意義で的確なご助言を頂きました。また、研究を進める上で近畿大学水産養殖種苗センター、(株)アーマリン近大の職員のみなさんや院生・卒研生諸君には多くの協力を頂いたことに感謝申し上げます。さらに、計画調書の作成から予算執行に関わる事務手続き等においてご協力いただき深くお礼を申し上げます。

研究代表者
升間 主計

研究テーマ 1： 完全養殖システムの構築

(グループリーダー 水産研究所・教授・升間 主計)

研究テーマの概要

本研究では、(1)難種苗生産魚種および新魚種からの採卵および初期飼育、(2)病原体の生態および感染機構の解明と疾病防除、(3)DNA マーカーを用いた親魚管理の3つをテーマとし、それぞれが連携して持続可能な完全養殖システムの構築を目指す。具体的には、(1)マアナゴやハタ科魚類などの難種苗生産魚種および新養殖魚種を対象とする。稚魚を天然海域から捕獲し、それを養成した親魚を用い、雄では精子形成と排精誘導、雌では卵黄形成と排卵誘導に有効な飼育環境とホルモン投与方法を検討する。また、良質な受精卵の確保手法を受精成績や採卵量に基づいて検討する。次に、適正な卵ふ化管理方法を開発するとともに、形態形成過程の生物学的知見を集積する。また、種苗量産技術開発の一環として、採卵施設から初期飼育施設への受精卵や仔魚の最適な輸送方法を検討するとともに、飼育に必要な適正餌料の探索、飼育方法の開発のために生態学的基礎知見の収集に努めて技術開発を牽引する。交雑に必要な優良形質を持つハタ科魚種の精子を採集・保存し、さまざまな組み合わせの交雑、仔稚魚飼育により養殖に適した優良品種を探索する。(2)持続的養殖の最も大きな阻害要因である感染症に対する新しい防除法を開発するため、養殖環境下における病原体の生態、環境条件と養殖魚の管理方法との相互関係を解明する。これにより感染症被害を軽減し、薬剤に頼らない実用的な養殖技術の確立を目指す。(3)クロマグロ雌雄性 DNA マーカーの解析を進め、また、同魚成長優良個体に特徴的な DNA マーカーを解析する。また養殖魚の形態異常防除を目的として、遺伝・環境要因排除と発生メカニズムについて解明する。

テーマ 1：完全養殖システムの構築

研究課題: (1) 難種苗生産種および新魚種からの採卵および初期発育

(1)-1 ハタ科魚類の新交雑種の開発

研究機関・研究室名：水産研究所・白浜実験場・奄美実験場

農学研究科・水産学専攻・水産増殖学研究室

担当者職名・氏名：水産研究所長・教授 升間 主計，白浜実験場長・教授 家戸 敬太郎，
農学研究科・水産学専攻・教授 太田 博巳

研究協力者：村田 修，中田 久，山本 眞司

(1)-1 目的

クエ (*Epinephelus bruneus*) の市場価値は高く、九州地方では鍋、刺身向けなどに 8 千円～1 万円/kg の高値でも取引される高級魚である。和歌山県では「紀州本クエ」としてブランド化が進んでいる。しかし、クエの海面養殖（自然水温）では低水温期（20℃ 以下）の成長停滞により出荷サイズ（体重：1 kg 以上）になるまで 3～4 年を要することから、このように生産サイクルの長い養殖事業では経営的に成立しないと言われている。一方、タマカイ (*E. lanceolatus*) はハタ類の中で最も大型となる種であり、体長は 2 m 以上、体重 400 kg にまで成長する。養殖魚類の生産効率を高めるために、より良い養殖特性を持つ品種改良手段の一つとして、交雑による品種改良が雑種強勢の発現を期待して古くから試みられてきている。そこで、本研究では成長の速いハタの作出を目的としてクエとタマカイの交雑を行った。

(1)-1 研究方法

1) マハタ属新交雑種の作出試験

高成長などの養殖に適した優良品種を探索するため、優良形質を持つマハタ属の精子を採集・保存し、クエ卵との様々な組み合わせの交雑試験を行った。

供試卵と精子

供試卵は、近畿大学水産研究所白浜実験場（以下、白浜実験場）地先生簀にて周年管理している 1998 年産または 2002 年産のクエ雌親魚 3 尾（体重 4～5kg）から得られた卵を使用した。雌親魚の排卵を誘導するために、2016 年 6 月 21 日に体重 1 kg あたり 500 IU のヒト絨毛性生殖腺刺激ホルモン（動物用ゴナトロピン 5000：あすか製薬株式会社；以下 hCG）を背筋部に注射投与し、2016 年 6 月 23 日（48 時間後）に排卵した卵を搾出した。

使用精子は、タマカイ *Epinephelus lanceolatus* (Giant grouper, 以下 GG), チャイロマルハタ *E. coioides* (Orange-spotted grouper, 以下 OG), ヤイトハタ *E. malabaricus* (Malabar grouper, 以下 MG), クエ *E. bruneus* (Longtooth grouper, 以下 LG) およびクエタマ *E. bruneus* × *E. lanceolatus* (以下 LG × GG) の雄親魚から得られたものを使用した。具体的には、タマカイ (GG) は 2016 年 6 月 11 日にマレーシアサバ大学ボルネオ海洋研究所で養成管理されている体重 80～90 kg の雄親魚（年齢不明）から採精し、冷蔵保存して飛行機で日本に持ち帰り、近畿大学水産養殖種苗センター白浜事業場（以下、種苗

センター）にて試験実施まで凍結保存しておいたものを使用した。OG と MG は 2015 年 7 月 17 日に近畿大学水産研究所奄美実験場（以下、奄美実験場）で養成管理している親魚を使用し、OG は 2007 年産の体重 6.5～12.5 kg の個体 7 尾から、MG は 2005 年産の体重 11.5～23.9 kg の個体 5 尾から採精し、白浜実験場にて試験実施まで凍結保存しておいたものを使用した。LG は 2016 年 6 月 23 日に種苗センターで養成管理している 2005 年産の体重 8.4 kg および 4.6 kg の個体 2 尾から採精し、当日の試験実施まで冷蔵保存しておいたものを使用した。そして、LG×GG は 2011 年に白浜実験場において新交雑種（以下、LG×GG）を作出し、その後養成管理している体重約 4 kg の個体を使用した。この LG×GG 4 歳魚 3 尾に対して、2016 年 2 月 22 日に雄化誘導のため、メチルテストステロン（以下、MT）コレステロールペレットを背筋部に埋め込み（MT 投与量：1 mg/kg）、その後 2016 年 6 月 23 日に排精を確認した。その結果、3 尾中 1 尾から排精が確認されたことから、直ちに採精・冷蔵保存し、本試験に使用した。

精子活性

2016 年 6 月 23 日に本試験で使用する GG, OG, MG, LG および LG×GG の合計 5 種類の精子について、運動時間と運動精子比を調べた。

各精液は 2.5 ml シリンジ内に収容した 1 滴分を 1.5 ml チューブに入れ、その上からろ過海水を 1 ml 加えた後、すぐにボルテックスミキサーにより攪拌した。希釈・攪拌した精液をピペットを用いてスライドガラス上に乗せた後、生物顕微鏡下で一視野あたりの精子の運動時間と運動精子比を観察した。運動精子比は次式で求めた。運動精子比（%）＝運動している精子数 / 全精子数×100

人工授精と卵管理

2016 年 6 月 23 日、LG 雌親魚への hCG 注射投与から 48 時間後に排卵した卵を用いて、各精子との人工授精を行った。供試卵は排卵個体のうち最も浮上卵率が高く卵質が良い 1 個体からの卵を使用した。その LG 卵を 6 穴マルチディッシュ 20 ヶ所に約 4,000 粒（2 ml 分）ずつ収容した後に、GG, OG, MG, LG および LG×GG の合計 5 種類の精子を 1 種類につき 4 ヶ所に媒精し、人工授精を行った。媒精後、紫外線殺菌海水（以下、UV 海水）を 1 穴につき 4 ml ずつ加えて攪拌し、水温 24℃で 2～3 分静置した。その後、300 ml 容プラスチック製ビーカーに媒精した卵を各々移し、さらに UV 海水 200 ml を加え 2～3 分静置し、浮上卵と沈下卵に分離した。受精率は人工授精から 3 時間後の 16 細胞期に浮上卵中の受精率を算出した。胚体形成率は人工授精から 26 時間後に浮上卵からの胚体形成率を算出した。正常ふ化率は人工授精から 48 時間後に浮上卵からの正常ふ化率を算出した。なお、受精率、胚体形成率および正常ふ化率を算出するまでの管理水温はいずれも 24℃とした。

2) 初期飼育試験

高成長などの優良形質を持つ GG の精子を採集・保存し、LG 卵との交雑により孵化した新交雑種（LG×GG）とクエ（LG×LG）の仔魚を用いて種苗生産試験を行い、両種の成長、生残等を比較した。

親魚と採卵

2015年6月12日、白浜実験場においてクエ雌親魚から採卵を行い、タマカイの凍結精子またはLGの新鮮精子による人工授精を行った。まず、LG1尾から得られた卵を等分し、その半分量に急速解凍した台湾産GGの凍結精子（6個体分）を加え、卵の2倍量のUV海水を注ぎ2～3分静置した。次に、残りの半分量の卵にLGの生鮮精子（2個体分）を加え、先と同様に人工授精した。人工授精を行ったLG×GGとLG×LGの卵は、UV海水で洗卵後、500l容ポリカーボネイト製（以下、PC）水槽各2面に収容し、翌日まで卵管理した。

卵収容と孵化

飼育水槽は7kl容FRP水槽を2面使用し、2015年6月13日（人工授精から24時間後）にクエの胚体形成卵169,000粒と新交雑種の胚体形成卵178,700粒をそれぞれ収容した。各水槽にはエアーストーン6個を設置し、通気量500ml/分、孵化管理水温は23.5℃で行った。6月14日には孵化を確認し、ふ化率は飼育水5l中の正常孵化仔魚数を計数し、各水槽の正常ふ化率を算出した。

仔稚魚の飼育

飼育水温は自然水温とし、飼育水はUV海水を用い、換水率は仔稚魚の成長に応じて増加させた。日長調節は3-5日齢に仔魚の摂餌率を向上させるため、蛍光灯の電照により明期を24時間とし、その後6日齢から取り揚げまでの期間は自然日長とした。飼餌料は1日齢からシオミズツボワムシ（*Brachionus plicatilis* sp. complex）を、20日齢からアルテミア（*Artemia* sp.）を、36日齢から市販の配合飼料（アルテックK3、日清丸紅飼料株式会社製）を仔稚魚の成長に応じて給餌した。ワムシとアルテミアは栄養強化剤（バイオクロミスパウダー、クロレラ工業株式会社製、以下、バイオクロミス）により栄養強化した後、給餌した。また、水中の照度を安定させ、ワムシの栄養価の低下を防ぐためにスーパークロレラV12（クロレラ工業株式会社製）を定量ポンプで毎日0.3lずつ飼育水中に24時間連続して添加した。飼育水槽内のワムシは毎日9:00と16:00に残餌の計数を行い、密度が15個体/mlになるように栄養強化したワムシを追加給餌した。ワムシとアルテミアの栄養強化方法は、バイオクロミス65gを水道水1lと混合・攪拌し、それをワムシ・アルテミアの二次強化水槽100lあたり100mlを添加した。バイオクロミスを添加する栄養強化時刻は、前日の17時、24時、そして当日の8時とした。ワムシ・アルテミアの二次強化水槽の水温は27℃に設定し、培養密度はワムシが1,000個体/ml、アルテミアが100個体/mlとした。

43日齢（7月27日）からは、水槽の底面掃除をサイフォンにより行った。また、44日齢（7月28日）頃には共食い行動が観察されたことから、共食いによる減耗を防ぐために、LG×GGでは47日齢（7月31日）、LG×LGでは50日齢（8月3日）に、飼育水槽から全ての生残魚を取り揚げて計数し、両種の生残率を算出した。

形態異常

2015年9月5日（83日齢）に種苗生産した新交雑種とクエ稚魚の形態異常の出現状況を調査した。調査尾数は新交雑種が33尾、クエが30尾とし、各個体の全長、体長、体重を

測定後、外観調査を行うとともに、ソフテックス（ソフテックス株式会社製）を用いて軟 X 線撮影を行い、形態異常の種類と出現率を算出した。形態異常の種類は前彎症と背鰭陥没を調査対象とし、軟 X 線撮影では鰓開腔率も併せて調査した。

3) 新交雑種クエタマの成長

作出された交雑種クエタマの養殖対象種としての評価を行うために、海上生簀網において出荷サイズである約 2 kg までの養成を行った。また、クエの成長と比較することで交雑種の成長特性を調べた。

田辺湾海上における養成試験

孵化後 182～337 日目までは FRP 製水槽（容量 1.7 m³）、それ以降は白浜実験場沖の海上生簀網（3.5×3.5×3.5 m、目合い 10 節）において飼育を行った。餌にはマダイ用配合飼料およびクエ EP20（日清丸紅製）を与えた。給餌は 2～3 日に 1 回、飽食するまで行った。

測定は月に 1 回実施した。無作為に 30 尾を取り揚げ、全長および体重を測定し、残りの全ての個体については数尾ずつまとめて測定した。

奄美漁場における養成試験

孵化後 175 日目に沖だしし、生簀網での養成を開始した。餌にはクエ太郎（ヒガシマル製）を用い、飽食まで与えた。給餌は摂餌の状態を観察しながら適宜行った。

測定は月末に 1 回実施した。群れから 20 尾を無作為に取り揚げ、全長および体重を測定した。また、10～2 尾ずつをまとめて 50～100 尾を測定し、総重量から 1 尾当たりの平均体重を求めた。

(1)-1 結果と考察

1) マハタ属新交雑種の作出試験

精子活性

交雑種の作出試験に使用したマハタ属各精子の運動率と運動時間を図 1 に示した。マレーシア産タマカイ（GG）凍結精子は運動率が 1%，運動時間が 10 分以上、チャイロマルハタ（OG）凍結精子は運動率が 20%，運動時間が 10 分以上、ヤイトハタ（MG）凍結精子は運動率が 5%，運動時間が 10 分以上、クエ（LG）新鮮精子は運動率が 90%以上、運動時間は 10 分以上、そして新交雑種（LG×GG）新鮮精子は運動率が 90%以上、運動時間が 10 分以上であった。

受精率・胚体形成率・正常ふ化率

マハタ属各精子とクエ同腹卵に対する人工授精結果を図 2 に示した。クエ×タマカイ（GG）、クエ×チャイロマルハタ（OG）、クエ×ヤイトハタ（MG）、クエ×クエ（LG）およびクエ×クエタマ（LG×GG）における受精率はそれぞれ 78.9%，79.2%，73.0%，87.8% および 86.7%，胚体形成率はそれぞれ 9.2%，0.9%，30.0%，80.1% および 71.9%，そして、正常ふ化率はそれぞれ 3.1%，0.0%，22.9%，72.0% および 53.8% であった。

チャイロマルハタ（OG）の凍結精子は、図1に示したように運動率が20%と高かったにも関わらず、受精から胚体形成期にかけて正常に発生せず、孵化もしなかった。一方、ヤイトハタ（MG）の凍結精子は、図1に示したように運動率が5%と低かったにもかかわらず、胚体形成率は30.0%、正常ふ化率は22.9%とチャイロマルハタ（OG）と比べて高かった。そして、タマカイ（GG）の凍結精子は、図1に示したように運動率が1%と低かったが、クエ卵との親和性はチャイロマルハタ（OG）よりも良く、ヤイトハタ（MG）よりも悪い結果となった。

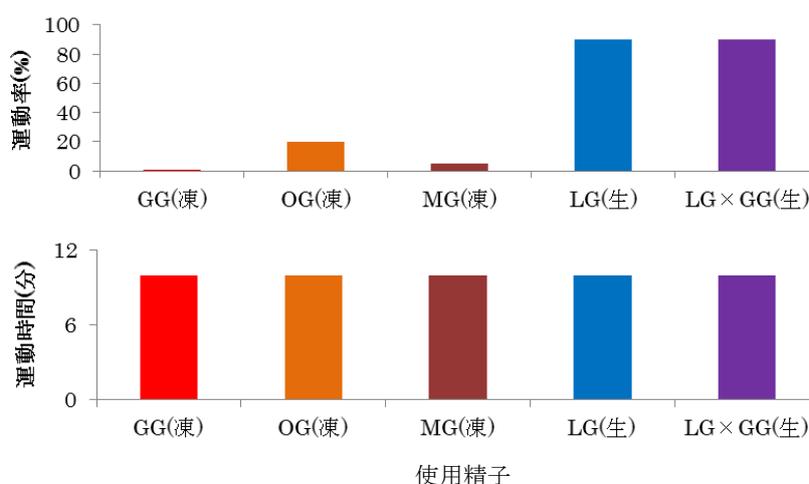


図1 交雑種の作出試験に使用したマハタ属各精子の運動率と運動時間
使用精子の GG はタマカイ、OG はチャイロマルハタ、MG はヤイトハタ、
LG はクエ、LG×GG はクエタマ（交雑種クエ×タマカイ）を表す。

また、交雑種クエタマ（LG×GG, MT 処理）の精子は、クエ（LG）には劣るが受精率、胚体形成率、正常ふ化率が 86.7%、71.9%、53.8%と非常に高い値を示したことから、今後のクエ（♀）×交雑種クエタマ（♂）による戻し交配試験により、優良品種のふ化率が改善される可能性が示唆された（図2）。

2) 初期飼育試験

仔稚魚の飼育

新交雑種（LG×GG）とクエ（LG×LG）の種苗生産試験結果を表1に、種苗生産試験における飼育水温、全長、生残率の推移を図3に示した。表1に示すように、7 kl 容 FRP 水槽で孵化した新交雑種仔魚は 6,250 尾（正常ふ化率 3.5%）であり、一方、クエ仔魚では 41,600 尾（正常ふ化率 24.6%）であった。その後、11 日齢での生残率は新交雑種で 20.8%、クエで 58.6%となり、種苗の取り揚げを行った 47 日齢での新交雑種の生残尾数は 383 尾（全長 35.7 mm, 生残率 6.1%）、50 日齢でのクエの生残尾数は 2,395 尾（全長 28.9 mm, 生残率 5.8%）となった。

完全養殖システムの構築
ハタ科魚類の新交雑種の開発（升間・家戸）

今回の種苗生産試験では、新交雑種（LG×GG）の仔魚はクエ（LG×LG）と同様の飼育方法によって、稚魚期まで正常に発育し、47日齢で383尾を生産することができた。新交雑種の正常ふ化率はクエの24.6%に比べ3.5%と低く、また、孵化から11日までの減耗が激しかったものの、取り揚げ時の生残率はクエの5.8%と同等の6.1%であった（図3）。新交雑種の47日齢での平均全長は 35.7 ± 3.8 mm, クエ（50日齢）では 28.9 ± 4.5 mm, そして、その後74日齢での新交雑種の平均全長は 85.0 ± 6.4 mm, クエでは 40.9 ± 5.0 mm となり、新交雑種がクエと比較して優れた成長を示した。

これらの結果から、新交雑種は良質な孵化仔魚さえ確保できれば、十分に種苗生産でき、その生残率はクエと同等、成長はクエよりも優れていることが明らかとなった。

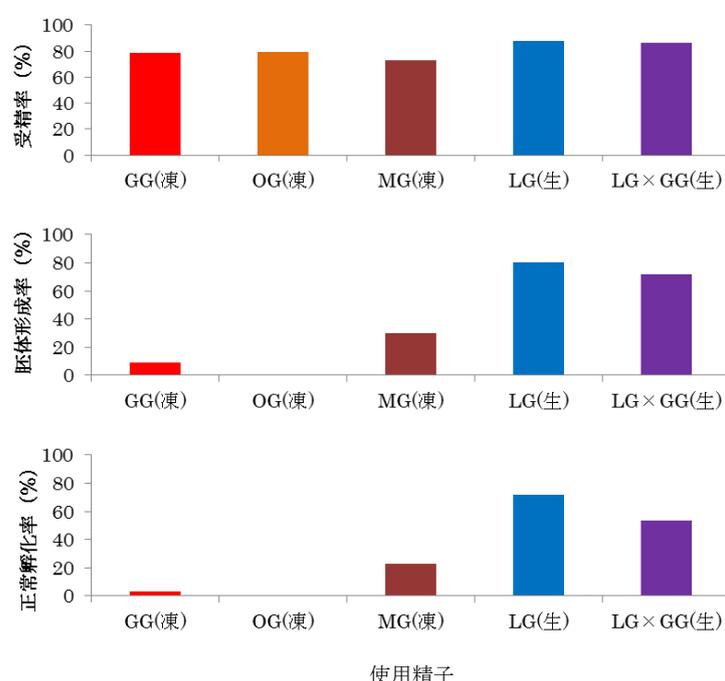


図2 マハタ属各精子とクエ同腹卵に対する人工授精結果
使用精子のGGはタマカイ、OGはチャイロマルハタ、MGはヤイトハタ、LGはクエ、LG×GGはクエタマ（交雑種クエ×タマカイ）を表す。

表1 新交雑種クエタマ（LG×GG）とクエ（LG×LG）の種苗生産試験結果

| 魚種 | 飼育水槽 容量(kl) | 収容卵数 (粒) | 孵化仔魚数 (尾) | 孵化率 (%) | 11日齢での 生残率(%) | 種苗の取り揚げ | | | |
|---------------------|----------------|-------------|--------------|------------|------------------|---------|-------|------------|------------|
| | | | | | | 日齢 | 尾数 | 全長 (mm) | 生残率 (%) |
| 新交雑種クエタマ (LG×GG) | 7 | 178,700 | 6,250 | 3.5 | 20.8 | 47 | 383 | 35.7 | 6.1 |
| クエ (LG×LG) | 7 | 169,000 | 41,600 | 58.6 | 58.6 | 50 | 2,395 | 28.9 | 5.8 |

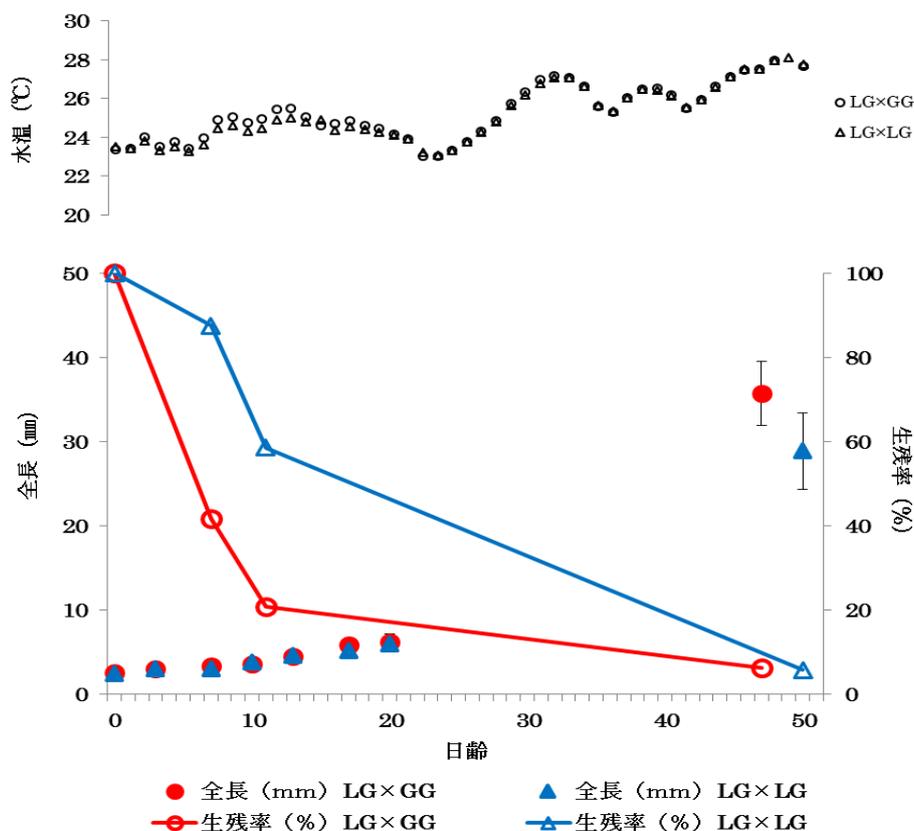


図3 新交雑種クエタマ (LG×GG) とクエ (LG×LG) の種苗生産試験における飼育水温, 全長, 生残率の推移

形態異常

新交雑種 (LG×GG) とクエ (LG×LG) 種苗の形態異常率の調査結果を表2に示した。調査サイズは, 新交雑種が83日齢, 全長97.9 mm, 体重16.4 gであり, クエが85日齢, 全長63.7 mm, 体重3.4 gであった。まず, 新交雑種の形態異常率は, 外観調査で0%, 軟X線撮影調査で背鰭陥没が3.0%であった。一方, クエでは外観調査で背鰭陥没が13.3%, 軟X線撮影調査で前彎症が26.7%, 背鰭陥没が10.0%, 前彎症と背鰭陥没の併発が3.3%であった。また, 鰓開腔率は, 新交雑種で100%, クエでは60%であった。

これらの結果から, 今回作出した新交雑種は, クエと比較して鰓開腔率が高く, 商品価値を低下させるような大きな形態異常も確認されず, 新たな養殖種として種苗の質としても問題ないと考えられた。

完全養殖システムの構築
ハタ科魚類の新交雑種の開発（升間・家戸）

表 2 新交雑種クエタマ (LG×GG) とクエ (LG×LG) 種苗の形態異常率

| 魚種 | 調査サイズ | | | | 調査尾数 | 確認方法 | 鱚開腔率 (%) | 形態異常率 (%) | | |
|------------------|-------|---------|---------|--------|------|--------|----------|-----------|------|-----|
| | 日齢 | 全長 (mm) | 体長 (mm) | 体重 (g) | | | | 前彎症 | 背鰭陥没 | 併発 |
| 新交雑種クエタマ (LG×GG) | 83 | 97.9 | 82.1 | 16.4 | 33 | 外観(目視) | - | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | | | | | | 軟X線撮影 | 100 | 0.0 | 3.0 | 0.0 |
| クエ (LG×LG) | 85 | 63.7 | 52.2 | 3.4 | 30 | 外観(目視) | - | 0.0 | 13.3 | 0.0 |
| | | | | | | 軟X線撮影 | 60 | 26.7 | 10.0 | 3.3 |

3) 新交雑種クエタマの成長

田辺湾海上における養成試験

田辺湾における平均水温は 1 月に最低となり、8 月に最高に達した (表 3)。平均最低水温は 7.7°C、平均最高水温は 31.3°C に達した (表 3)。

表 3 田辺湾と奄美漁場における月別平均・最低・最高水温

| 月 | 田辺湾 (白浜) | | | 奄美漁場 | | |
|-----|----------|------|------|------|------|------|
| | 平均 | 最低 | 最高 | 平均 | 最低 | 最高 |
| 1月 | 14.4 | 7.9 | 17.6 | 21.0 | 20.0 | 22.3 |
| 2月 | 13.2 | 7.7 | 16.5 | 20.5 | 19.7 | 21.4 |
| 3月 | 15.0 | 9.9 | 18.6 | 20.5 | 19.8 | 21.4 |
| 4月 | 18.3 | 15.4 | 22.2 | 22.3 | 20.5 | 25.0 |
| 5月 | 21.1 | 17.8 | 24.2 | 24.0 | 22.7 | 25.0 |
| 6月 | 24.3 | 21.6 | 26.5 | 24.6 | 23.5 | 27.2 |
| 7月 | 26.8 | 23.1 | 29.6 | 26.4 | 13.4 | 28.4 |
| 8月 | 28.5 | 25.1 | 30.2 | 28.0 | 13.8 | 29.0 |
| 9月 | 27.2 | 25.2 | 31.3 | 27.8 | 13.9 | 29.0 |
| 10月 | 24.1 | 18.2 | 27.3 | 26.5 | 25.4 | 28.0 |
| 11月 | 20.1 | 15.1 | 23.3 | 24.6 | 23.8 | 25.5 |
| 12月 | 15.8 | 10.3 | 21.7 | 22.5 | 21.0 | 24.0 |

クエタマは 12 月から 4 月の期間に成長が停滞し、5~6 月から成長し始め、10~11 月まで成長した (図 4)。この結果からクエタマの成長は、20°C を下回る水温では成長が期待できないことが明らかとなった。クエの成長と水温の関係と一致した。

出荷サイズの平均体重 2 kg (体重 2.03 kg, 全長 48.4 cm) に孵化後 3.1 年目 (孵化後 1116 日目) に達した。この時のクエは平均体重 0.62 kg (全長 34.7 cm) であったことから、クエタマはクエの 3.3 倍の体重を示した。クエが平均で 2 kg に達するのに 5 年を要することから、クエタマは約 2 年早く出荷サイズとなることが分かった。

完全養殖システムの構築
ハタ科魚類の新交雑種の開発（升間・家戸）

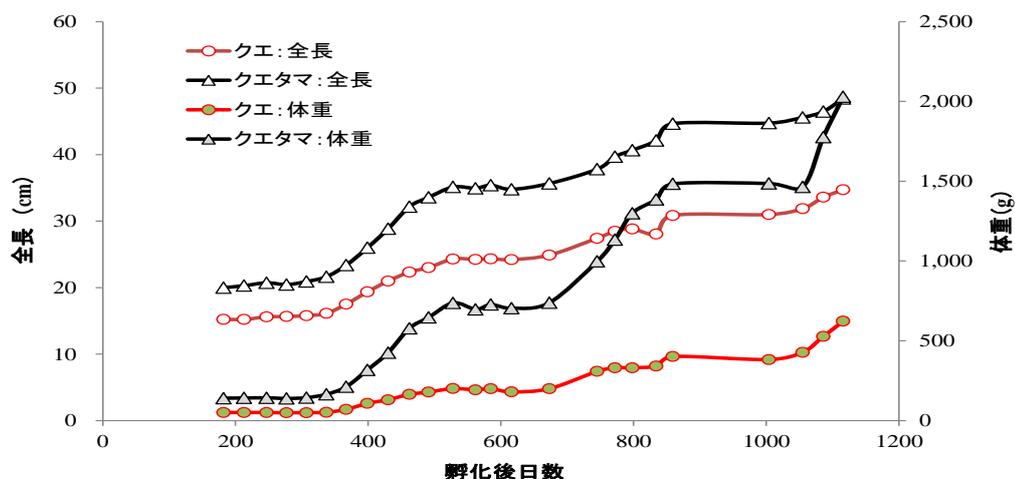


図4 田辺湾（白浜）におけるクエとクエタマの成長比較

奄美漁場における養成試験

奄美漁場での月別平均水温は 20°C を下回ることがなかった。平均最低水温では 2 月，3 月に 19°C 台に下がる日があった。8 月に 28.0°C に達し，年間で最も高くなった。平均最高水温は 8 月，9 月の 29.0°C であった。

クエタマの成長は 2 月，3 月の最低水温期に停滞が認められたが，その他の 10 ヶ月は成長が認められた。この結果は田辺湾での成長と水温の関係と一致した。

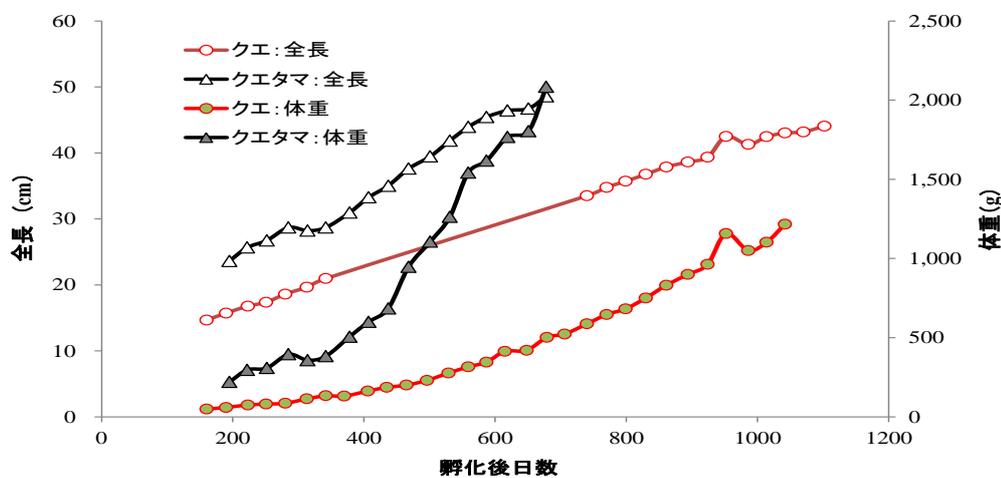


図5 奄美漁場におけるクエとクエタマの成長比較

出荷サイズの平均体重約 2 kg（体重 2.08 kg，全長 48.6 cm）に孵化後 1.9 年目（孵化後 678 日目）に達した。同年産（孵化後 679 日目）のクエでは平均体重 0.50 kg（全長 33.4 cm）であったことから，クエタマはクエの 4.1 倍の体重を示した（図 5）。また，奄美漁場では田辺湾のクエタマに比べて 1.65 倍の成長速度で成長することが分かった。

完全養殖システムの構築
ハタ科魚類の新交雑種の開発（升間・家戸）

以上の結果から、新交雑種クエタマは養殖魚として優れた成長形質を有しており、新養殖対象種として期待される。

(1)-1 成果の副次的効果、今後の計画等

クエ×クエタマ (LG×GG) の戻し交雑において、正常ふ化率が 53.8% と高かった。今後、戻し交配種の種苗生産を実施し、種苗の形態的な相違、成長の違いなどについて研究を進める。

テーマ1：完全養殖システムの構築

研究課題: (1) 難種苗生産種および新魚種からの採卵および初期発育

(1)-2 サクラマス・サツキマスの完全養殖

研究機関・研究室名：水産研究所・富山実験場・新宮実験場，農学研究科・水産学専攻・
水産増殖学研究室

担当者職名・氏名：富山実験場長・教授 家戸 敬太郎，農学研究科・水産学専攻・教授
太田 博巳

研究協力者：山本 慎一，山田 伸一，仲 和弘，岩間 達也

(1)-2 目的

近年，我が国においてサケマス類の海面養殖の取り組みが増加しており，青森県，静岡県，兵庫県，愛媛県，香川県，鳥取県などで，冬季の低水温期を中心にギンザケ，ニジマス，サクラマスなどの海面養殖が行われるようになった。

サケ科サケ属のサクラマス *Oncorhynchus masou masou* は，幼魚期を河川で過ごした後，海へ降って成長し，産卵期に再び遡上する降海型の生活様式をもち，同種ながら河川で一生を過ごす陸封型のもはヤマメと呼ばれている。ヤマメよりもサクラマスの方がサイズが大きいのが特徴の一つである。サクラマスは，富山名物「鱒寿司」の原料として用いられていたが，近年富山県内の漁獲量が年間1トン未満と大きく減少しており，現在は主として輸入された養殖サケ属が鱒寿司の原料に用いられるようになった。そこで近畿大学富山実験場では，平成23年よりサクラマスの海水陸上養殖に関する取り組みを開始した。

サクラマスの亜種であるサツキマス *Oncorhynchus masou ishikawae* も同様に降海型で陸封型をアマゴと呼ぶがサツキマスもアマゴよりも大型となる。近畿大学新宮実験場では，これまで陸封型のアマゴの完全養殖を行ってきたが，冬季に海水飼育可能な浦神実験場と協力してサツキマスの養殖研究を平成22年より行っている。

サクラマスおよびサツキマスはいずれも準絶滅危惧種に指定されている。近畿大学ではこれらの海水中で大きく成長するサクラマスおよびサツキマスの地域特産の新たな養殖魚種としての可能性に着目し，完全養殖を目指した研究を実施した。また，サケマス類の養殖では成熟の影響を大きく受けて成長停滞や肉質の低下が起こる。そこでサクラマスでは冬至から日長が長くなることで成熟が開始される特徴を考慮して冬至以降も短日条件を維持することによってサクラマスの成熟抑制効果について検討した。サツキマスについては，より確実な成熟制御の方法として，全雌三倍体の作出について検討した。

(1)-2 研究方法

1) サクラマス

長野県産種苗の海水飼育

サクラマスの種苗として，長野県で1年間淡水飼育されていた養殖用の銀毛系統を富山実験場に導入した。11月3日に平均体重200gの種苗473尾を，水道水を貯めて塩素を中和した30m³容コンクリート水槽に収容して3日間かけて海水馴致した。飼育水には富山湾の100m層から汲み上げて濾過した海水を使用した。マス用配合飼料を給餌して翌年の6

月 10 日まで飼育し、毎月体重測定を実施した。この結果を長野県産種苗の飼育データとした。

海水飼育群からの採卵と飼育（富山県産種苗）

上記と同様に長野県産種苗を導入して富山実験場の陸上水槽で海水飼育した平均体重 1,408g のサクラマス 339 尾の中から 2014 年 7 月に大型個体（平均体重約 2,000g）33 尾を選別し、そのうちの 28 尾を同年 8 月に射水市内の淡水飼育可能な大門漁協へ移動して淡水馴致した。輸送前の富山実験場における 100m 層海水の水温は 16～18℃、淡水飼育時の水温は 14～15℃であった。10 月 17 日に雌 7 尾より採卵、雄 6 尾より採精、23 日に雌 5 尾より採卵、雄 10 尾より採精して、それぞれ人工授精した。受精卵は大門漁協および富山実験場の両方で管理して生残率、発眼率およびふ化率を記録した。孵化した魚は大門漁協あるいは富山実験場で淡水飼育し、2015 年 6 月から 7 月にかけてスマルト化したものを富山実験場で海水馴致して飼育を続けた。

富山県産種苗からの採卵（完全養殖の達成）

富山県産種苗を大型個体を選別しながら飼育し、2016 年 7 月に 1,081 尾の中からさらに大型個体 32 尾を親魚として選別した。その中からさらに雌 11 尾および雄 9 尾を選んで 7 月 22 日に入善町の深層水利用施設（深層水パーク）に輸送した。この時の平均魚体重は 2,800g であった。深層水パークでは、海洋深層水に加えて地下水（淡水）も利用できるといったメリットがある。深層水パークに輸送した親魚 20 尾を淡水馴致して飼育し、9 月末から 10 月にかけて採卵した。その期間中、雌 10 個体から採卵、雄 9 個体から採精して、それぞれ人工授精した。受精卵は富山実験場および深層水パークの両方で管理して生残率、発眼率およびふ化率を記録した。

日長コントロールによるサクラマスの成熟制御

2015 年 12 月 15 日に、富山県産種苗を養成した平均体重 727g のサクラマス 135 尾を 20m³ 容コンクリート水槽に（短日処理区）、578 尾を 50 m³ 容 FRP 水槽に（対照区）それぞれ収容した。短日処理区の水槽は暗幕で覆って外部からの光を遮断し、40W の蛍光灯によって日長を 9L:15D（明期 9 時間、暗期 15 時間）とし、対照区は自然日長として 2016 年 9 月まで飼育した。3 月以降毎月サンプリングして、魚体重および生殖腺指数（％、GSI=100×生殖腺重量／魚体重）を測定した。

2) サツキマス

淡水飼育と海水飼育との比較

新宮実験場において継代飼育されていたアマゴの中からスマルトを選んで 12 月 7 日から 4 月 30 日までの間、新宮実験場の淡水陸上水槽で 1,140 尾（平均体重 119.2g）および浦神実験場の海面網生簀で 1,000 尾（平均体重 89.8g）を飼育して成長を比較した。

サツキマスの完全養殖

上記の海水飼育したサツキマスを 4 月 19 日に新宮実験場に輸送して淡水馴致した。11 月まで淡水飼育して、11 月 6 日に雌 9 尾、雄 6 尾より採卵・採精して人工授精した。この

サツキマス同士の交配により初めて得られた第一世代が翌年 1 月には孵化し、新宮実験場で飼育後に上記と同様に冬季の低水温期に浦神実験場の海面網生簀で飼育、春に新宮実験場に戻して淡水飼育することを繰り返して、2015 年 11 月 10 日に雌 26 個体、雄 12 個体より採卵・採精して人工授精した。

成熟制御のための全雌三倍体サツキマスの作出

全雌三倍体サツキマスの作出方法は以下の通りである。サツキマスは雌 XX、雄 XY 型の性決定と考えられている。まず、紫外線処理によって遺伝的に不活性化した精子を用いてサツキマス雌より得た未受精卵と人工授精し、温度処理によって第二極体の放出を阻止する。これによって雌の染色体のみをもった XX 型のサツキマスが作出される。この魚に雄化ホルモン処理をすることによって XX 型の機能的な雄である性転換雄が得られる。この性転換雄から得られる精子と通常二倍体の雌から得られる卵（ともに XX 型）を人工授精後、第二極体の放出を阻止すると XXX 型の全雌三倍体を得られる。本研究では、性転換雄および全雌三倍体の作出の両方において重要となる第二極体の放出を効率的に阻止する温度処理条件について検討した。授精後 5 分後から前処理として 23℃あるいは 25℃で 5 分間、本処理として 27℃あるいは 28℃で 20 分間、冷却処理として 10℃あるいは 15℃で 20 分間の処理をする全ての組み合わせについて三倍体化率および相対生残率を調べた。

(1)-2 結果と考察

1) サクラマス

長野県産種苗の成長

富山実験場で海水飼育した長野県産種苗の成長を図 6 に、飼育成績をまとめて表 4 にそれぞれ示した。平均魚体重が 200g であったものが約 7 ヶ月間の海水飼育で約 8 倍の 1,558g にまで成長した。期間中の生残率は 92.4%、飼料効率は 81.9%と比較的良好であった。海水飼育により長野県産種苗は順調に成長したが、水温が上昇して成熟の影響を受ける前の 6 月の段階では 1.5kg 程度までしか成長せず、鱒寿司用に要求される 2.5kg にするには改良が必要であると考えられた。また、大きさのバラツキが大きいことも問題と考えられた。

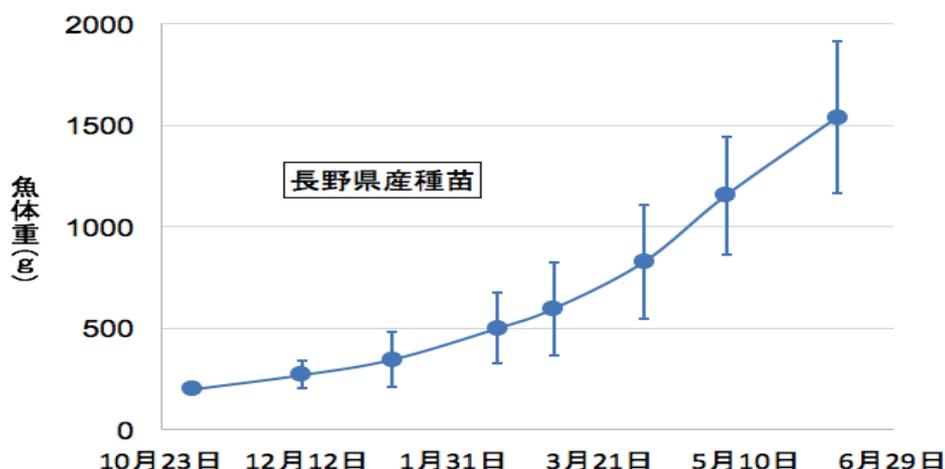


図 6. 富山実験場で海水飼育した長野県産種苗の成長

| 開始時 | 尾数 | 473 |
|-----------|-----------|-----------|
| | 平均魚体重 (g) | 200 |
| 終了時 | 尾数 | 437 |
| | 平均魚体重 (g) | 1,558±377 |
| 生残率 (%) | 92.4 | |
| 日間給餌率 (%) | 3.8 | |
| 飼料効率 (%) | 81.9 | |

海水飼育群からの採卵

10月17日に採精に用いた雄6尾の平均魚体重は1,783g、平均全長は52.2cm、10月23日の採精に用いた雄10尾の平均魚体重は1,623g、平均全長は54.0cmであった。10月17日の6尾からの採精量は約300mLであり23日分とともに十分量の精子を得ることができた。10月17日の雌7尾から、23日の雌5尾からの採卵量および採卵数を表5に示した。10月17日には雌1尾あたり2,325~3,344粒、10月23日には雌1尾あたり2,301~3,527粒の卵が得られた。卵質は雌の個体によって様々であったが、混合して管理した結果、10月17日採卵分からは11月から約2,500尾が、10月23日分からは12月から約2,400尾がそれぞれ孵化した。採卵した卵数からのふ化率は17日分が13.5%、23日分が16.5%と低い値であった。採卵のタイミングがベストでなかった可能性が考えられる。

| 採卵日 | 魚体重 (g) | 採卵量 (g) | 卵重量 (粒) | 卵数 (粒) |
|--------|---------|---------|---------|--------|
| 10月17日 | 1,830 | 397 | 0.144 | 2,762 |
| | 1,590 | 405 | 0.167 | 2,430 |
| | 1,660 | 494 | 0.154 | 3,211 |
| | 2,030 | 492 | 0.200 | 2,460 |
| | 1,850 | 439 | 0.159 | 2,759 |
| | 1,550 | 436 | 0.188 | 2,325 |
| | 1,780 | 528 | 0.158 | 3,344 |
| 10月23日 | 1,300 | 336 | 0.146 | 2,301 |
| | 1,820 | 529 | 0.150 | 3,527 |
| | 1,550 | 439 | 0.144 | 3,049 |
| | 1,890 | 487 | 0.166 | 2,934 |
| | 1,430 | 407 | 0.148 | 2,750 |

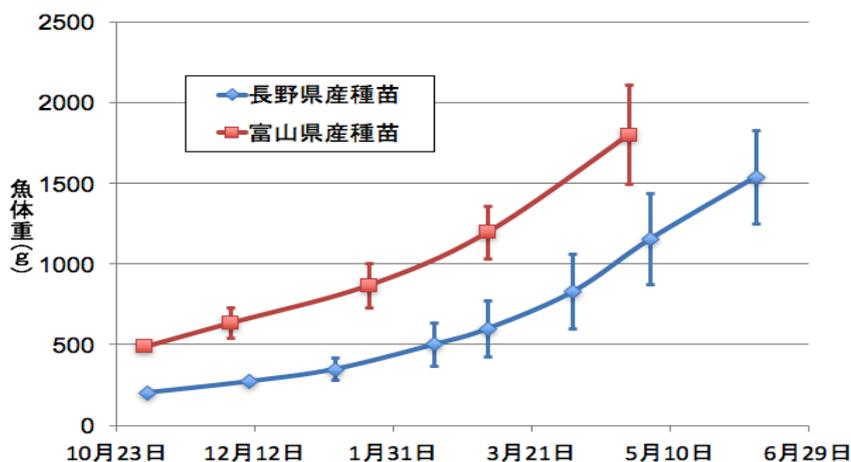


図7. 富山実験場で海水飼育した長野県産種苗と富山県産種苗の成長

富山県産種苗の成長

孵化した魚を淡水飼育したところ、5月頃からスモルト化が始まった。そこで長野県産種苗よりも5ヶ月程度早い6月～7月にかけて富山実験場において海水馴致し、海水飼育を開始した。海水馴致したときの魚体重は40g前後であった。この従来よりも早い海水飼育の開始が成長に大きく影響し、長野県産種苗を11月に導入したときの魚体重が200gであったのに対し、富山県産種苗では486gと二倍以上の大きさとなった。11月以降の富山県産種苗の成長を長野県産と比較して図7に示した。11月の時点で富山県産種苗と長野県産種苗との体重差はすでに300g弱もあったが、その後富山県産種苗は順調に成長し、翌年3月には約600gもの差ができた。成長が改善された理由については、海水中で早く成長した魚を親に用いたことによる効果も考えられるが、海水飼育の開始時期が5ヶ月も早くなったことによる効果が大きい。一方では大きさのバラツキも解消されず、バラツキを抑える方法が必要であると考えられた。

富山県産種苗養成親魚からの採卵

9月末から10月にかけて雄9尾(平均魚体重2,693g)から123mL採精することができた。11尾中10尾から採卵できた。採卵数は、340～3,707粒とばらついたが、発眼率が90%越える良質卵も得られた(表6)。10月13日以降に採卵した卵は11月後半には孵化した。これにより富山県内で海水飼育したサクラマスの完全養殖が達成できた。上記の長野県産種苗からの採卵に比べて良質な卵が得られる割合が高くなったようである。これは親魚の点検をより早期から実施してタイミングを逃さないようにしたためであると考えられる。

表6. 富山県産養成親魚雌からの採卵量と採卵数

| 採卵日 | 魚体重(g) | 採卵量(g) | 卵数(粒) | 発眼率 |
|--------|--------|--------|-------|------|
| 9月28日 | 2,459 | 539 | 3,208 | — |
| | 2,803 | 643 | 3,945 | — |
| 10月6日 | 2,723 | 511 | 3,097 | — |
| | 2,891 | 543 | 3,291 | — |
| 10月13日 | 2,419 | 519 | 3,707 | 64.8 |
| 10月18日 | 2,883 | 63 | 309 | 34.3 |
| | 2,460 | 480 | 2,840 | 89.8 |
| 10月22日 | 2,486 | 486 | 3,036 | 67.6 |
| | 2,591 | 371 | 2,182 | 77.9 |
| | 2,693 | 453 | 2,829 | 92.6 |
| | 2,400 | 0 | 0 | — |

日長コントロールによるサクラマスの成熟制御

雌雄の短日処理区 GSI の変動を対照区と比較して図8に示した。短日処理によって、雄の GSI は7月までは対照区との間に差はなかったが、8月には対照区よりも有意に高い値を示した。一方、雌の GSI は3月には短日処理区が対照区よりも高かったが、6月から8月にかけては有意に低くなり、成熟抑制効果が認められた。魚体重の変動を図9に示した。対照区では魚体重は4月頃から停滞する傾向がみられたが、短日処理区は7月頃まで成長して8月には対照区よりも有意に高い値を示した。従って、短日処理によって雄の成熟を

抑制するのは難しいが、雌の成熟抑制が可能であり、それによって春から夏にかけての成長が改善されることが分かった。

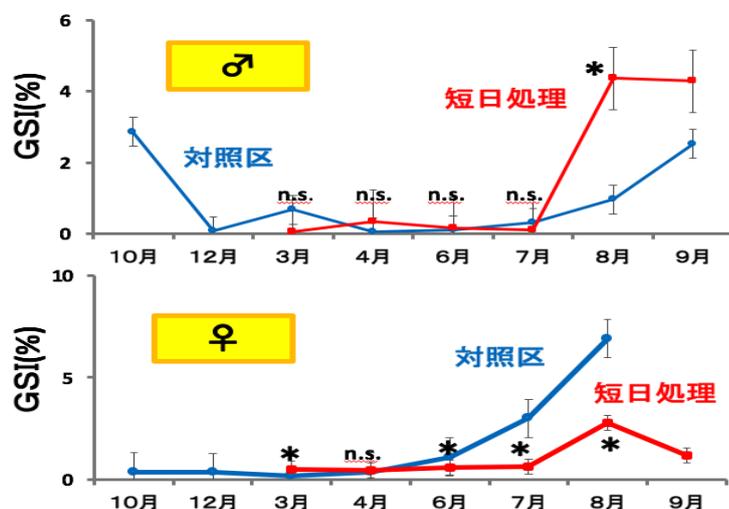


図8. 短日処理したサクラマスの GSI の変動

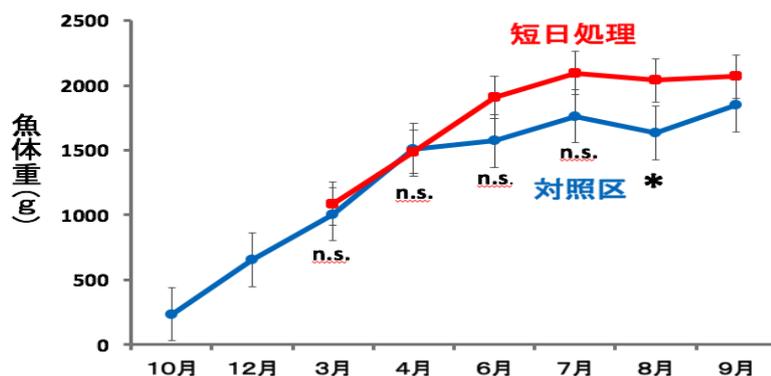


図9. 短日処理したサクラマスの成長

2) サツキマス

淡水飼育と海水飼育との比較

海水飼育と淡水飼育における成長を比較して図 10 に示した。海水飼育を終了した 4 月 19 日における平均体重は 719.6g であったが、淡水飼育では 4 月 30 日に 432.6 と海水飼育の方が成長がかなり優れていた。海水飼育したサツキマスの成長は、サクラマスよりも劣っていたが、これは天然魚のサイズでもサクラマスの方が大きいことと一致している。

サツキマスの完全養殖

上記の海水飼育サツキマスを新宮実験場へ輸送して淡水飼育し、11 月 6 日に雌 9 尾、雄 4 尾より採卵・採精し人工授精した。採卵数は 28,000 粒、発眼率は 42.9% であった。これらサツキマスから得られた第一世代を淡水→海水→淡水で飼育後、11 月 10 日に雌 26 尾、雄 12 尾より採卵・採精して人工授精した。採卵数は 93,000 粒、発眼率は 60.2% であった。

これらの卵は翌年 1 月に孵化した。これにより海水養殖したサツキマスの完全養殖が達成された。前述の通り、サツキマスはサクラマスよりは小型であるが、寄生虫の心配がないと考えられることから刺身商材としての利用の可能性があるなど、利用方法を工夫することで地域振興への貢献が期待できる。

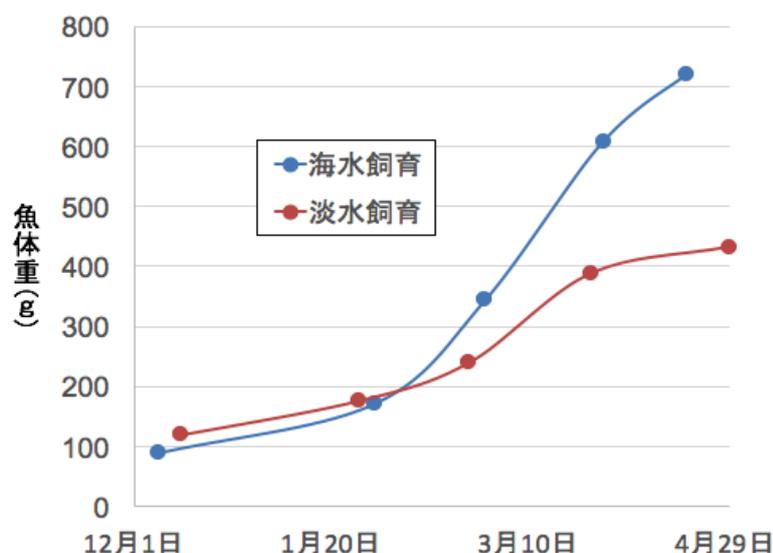


図 10. 浦神実験場の海面網生簀と新宮実験場の淡水飼育との成長の比較

成熟制御のための全雌三倍体サツキマスの作出

第二極体の放出阻止のために温度処理し、三倍体化率および相対生残率を調べた結果を図 11 に示した。授精後 5 分後からの 5 分間の前処理では 23℃と 25℃との間で三倍体化率には顕著な差はなかったが、相対生残率は 23℃の方が高い値を示す傾向がみられた。20 分間の本処理温度では 27℃よりも 28℃で三倍体化率は高くなったが相対生残率は低下した。28℃で本処理後、冷却処理として 10℃で 20 分間の処理をした場合よりも 15℃で処理した方が三倍体化率は高くなったが相対生残率は低下傾向にあった。以上の結果から、授精後 5 分後から前処理として 23℃で 5 分間、本処理として 28℃で 20 分間、冷却処理として 10℃で 20 分間の処理をした場合に三倍体化率は 100%となり、授精後 5 分後から前処理として 23℃で 5 分間、本処理として 27℃で 20 分間、冷却処理として 10℃で 20 分間の処理をすると相対生残率が最も高くなることが分かった。

性転換雄の精子を用いてサツキマスから得た受精卵に第二極体の放出阻止をして全雌三倍体サツキマスを作成した。2016 年 3 月の時点で、2014 年に採卵した全雌三倍体サツキマス 167 尾、2015 年に採卵した全雌三倍体サツキマス 1,200 尾を飼育している。2014 年採卵分については、同じ時期に採卵して飼育したアマゴの平均体重は 45g であるのに対し、全雌三倍体サツキマスは 250g とかなり大きく育っている。

(1)-2 成果の副次的効果、今後の計画等

本研究では、亜種関係にあるサクラマスおよびサツキマスの完全養殖を達成した。これらの成果は、サケマス類の海面養殖が全国的に広がることにつながった。海水飼育した結

完全養殖システムの構築
 サクラマス・サツキマスの完全養殖(家戸・太田)

果，サイズのバラツキが大きいことが問題であることがわかり，今後は，選抜育種による成長およびバラツキの改善，成熟制御技術のさらなる検討などを進めることが必要であると考えられる。全雌三倍体の成長などを評価し，越夏飼育可能となれば，より大型化させることができる。全雌三倍体サクラマスの作出にも取り組む予定である。

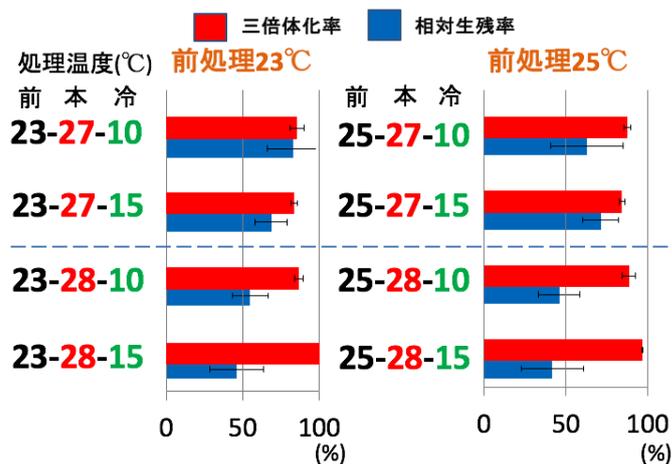


図 11. サツキマスの第二極体放出阻止のための温度処理の結果

テーマ1：完全養殖システムの構築

研究課題: (1) 難種苗生産種および新魚種からの採卵および初期発育

(1)-3 マアナゴの飼育と成熟促進

3-1) 雌雄の成長差

担当者職名・氏名：農学研究科・水産学専攻・教授 小林 徹，教授 太田博巳，
水産研究所・富山実験場長・教授 家戸敬太郎

研究協力者：山田伸一，猪熊 徹，瀬川 叡

(1)-3-1) 目的

マアナゴ *Conger myriaster* は日本のみならず東アジア各地の重要な食用魚であるが、国内の漁獲量は年々減少傾向にあり、養殖生産技術の確立が求められている。しかし、現在本種の養殖生産はわずかで、近畿大学水産研究所や瀬戸内海沿岸地域等数か所で行われているのみである。

本種は、サイズの大きい個体に雌が多いことが以前から知られており、雌が雄よりも大きく成長するものと考えられてきたが、それを科学的に明らかにした研究は行われていない。加えて本種は体サイズによって消費地域や価値が大きく異なっており、成長速度に違いのある魚群を出荷先ごとに管理することは、計画的で効率の良い生産のために有意義と考えられる。また、大きな雌が小さな雄を補食する共食いを防止するためにも早期に雌雄を隔離することが重要である。そこで本研究では、本種の体重と GSI の変化や生殖腺の変化をおよそ 5 ヶ月間にわたって調べ、得られた情報から本種の生殖腺発達と成長との関連を検討するとともに、体重を指標とした雌雄判別の可能性を模索した。

(1)-3-1) 研究方法

材料魚

本研究で使用した材料魚は 2014 年 4 月に淡路島周辺で採捕された後、近畿大学水産研究所富山実験場にて未選別状態・同飼育条件で飼育養成されたマアナゴを使用した。材料魚の年齢は調査開始時点で満 2 年弱であったと推測される。

飼育条件

材料魚の飼育条件は水槽の大きさが直径 600 cm×高さ 120 cm の円形水槽で、飼育密度は 29.4 尾/m³とした。この中に収容シェルター(塩ビパイプ製、直径 15 cm×長さ 75 cm)を 11 基設置した。水温は 16°C から 22°C で、7 月 29 日から 9 月 30 日まではほぼ横ばいだったがその後時期を追うごとに低下した。(表 7)

表 7. 各期間における飼育水の平均水温の遷移

| 期間 | 水温(°C) |
|----------------|------------|
| 7月29日 ~ 9月2日 | 21.8 ± 1.7 |
| 9月2日 ~ 9月30日 | 22.3 ± 0.9 |
| 9月30日 ~ 11月4日 | 19.8 ± 2.7 |
| 11月4日 ~ 12月12日 | 17.8 ± 1.8 |

サンプリング

2014年7月29日から12月8日までほぼ35日間隔でサンプリングを行った。サンプルとした個体はシェルター1本に入っている個体から任意に抽出した50尾とした。これらの各個体は2-フェノキシエタノールで麻酔し、各個体の全長・体長・体重をそれぞれ計測した。その後、頭部と尾部を切断し、躯幹部を開腹した上でブアン液に浸漬し2~3日間固定した。

生殖腺の摘出

固定を完了した躯幹部は、70%メタノール液に置換浸漬して-20℃で保存した。その後、保存した躯幹部から生殖腺のみを摘出し、重量測定を行なった。

組織切片標本の作製

摘出した生殖腺の頭部側先端部における長さ5 mm分の組織を組織切片標本の作製に供した。各個体の生殖腺組織は、エタノール・ブタノール系列を用いて脱水および透徹を行い、パラフィンに包埋した後、マイクロトームを用いて頭尾軸に垂直な厚さ6 μmの組織切片とした。その後、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色したのち封入して組織標本とし、光学顕微鏡下で観察した。

雌雄判別

全個体の性は、生殖腺の形状、すなわちラメラ構造の有無や胞囊の構造などを指標に判別した。

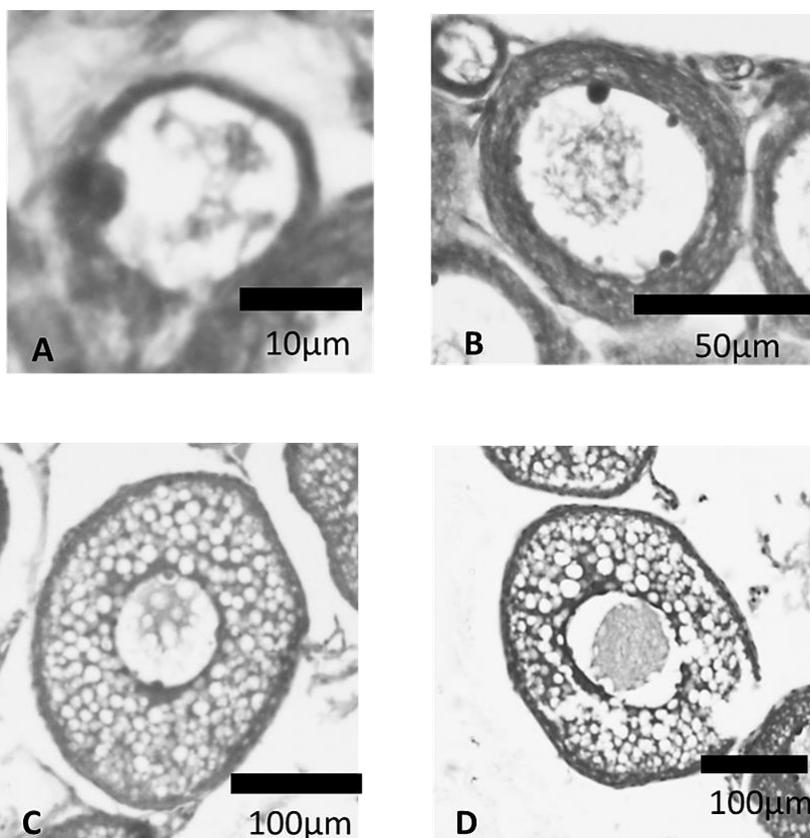


図 12. 卵細胞の発達段階. A: 染色仁期 B: 周辺仁期 C: 卵黄胞期 D: 油球期.

卵巣における生殖細胞の発達段階

各時期の雌個体のうち体重が最大値・最小値を示す 3 個体をそれぞれ抽出し、卵母生殖細胞それぞれの発達状況を調べた。卵母細胞は染色仁期、周辺仁期、卵黄胞期および油球期の 4 つの段階の細胞数を計数しその割合を算出し、細胞組成の変化と体重あるいは GSI との相関を調べた。卵母細胞の判定基準は以下の通りである。染色仁期：今回計数した卵細胞の中で最も小さく細胞質の大部分を占める核内に仁がひとつ存在している（図 12A）。周辺仁期：細胞質が増大し核内に複数の仁が確認される（図 12B）。卵黄胞期では細胞質の外縁部に透明な卵黄胞が多数分布している（図 12C）。そして油球期：外見は卵黄胞期とよく似ているが空胞状の油球が確認できる（図 12D）。

卵巣発達段階の算出

卵巣の発達状況を数値化するにあたっては、染色仁期の卵母細胞を 1、周辺仁期の卵母細胞を 2、卵黄胞期の卵母細胞を 3、油球期の卵母細胞を 4 として、これらの値をそれぞれの卵巣生殖細胞の割合値に乗じて合計し、100 分率で表した。すなわち、計算式は以下の通りである。

$$\{(染色仁期卵母細胞の割合 \times 1 + 周辺仁期卵母細胞の割合 \times 2 + 卵黄胞期卵母細胞の割合 \times 3 + 油球期卵母細胞の割合 \times 4) \times 100\}$$

この式から求められた値を本研究では便宜的に「発達段階指数」として、卵巣発達の進行状況を示す指標とした。

分析

体重、生殖腺指数 {GSI, (生殖腺重量/体重)×100}、および発達段階指数の各期間での変化の有無を調べた。統計検定には一元配置分散分析および Tukey-Kramer の多重比較を用いた。

(1)-3-1) 結果と考察

雌雄判別

7 月下旬では雌個体が 19 尾、雄個体が 31 尾で、判別できなかった個体が 1 尾であった。9 月上旬では雌個体 23 尾、雄個体 26 尾、雌雄が判別できなかった個体が 1 尾存在した。以降は全ての個体について判別ができ、9 月下旬では雌個体 15 尾、雄個体 35 尾、11 月上旬では雌個体 19 尾、雄個体 31 尾、そして 12 月上旬では雌個体 15 尾、雄個体 35 尾であった。

成長と GSI の変化

体重は調査開始時点では雌雄差はなかった（図 13A）。しかしその後雌の体重は、7 月下旬では 61.6 ± 21.9 g (平均体重 ± 標準偏差)、9 月上旬では 133.1 ± 31.0 g、9 月下旬では 183.5 ± 47.4 g、11 月上旬では 214.4 ± 78.1 g、そして 12 月上旬には 268.7 ± 66.0 g と著しく大きく増加した。一方、雄の体重は、7 月下旬では 59.2 ± 20.5 g、9 月上旬 90.0 ± 22.8 g と一時増加したが、9 月下旬では 102.9 ± 23.8 g、11 月上旬では 119.5 ± 29.2 g、そして 12 月上旬

でも 128.2 ± 29.6 g とその後伸び悩んだ。雌雄間の平均体重の差は時期が進むにつれ大きくなり、9月上旬では 43.1 g、9月下旬では 82.1 g、11月上旬で 94.9 g、12月上旬には 141.5 g となった。また、雌の最小体重 (196.1 g) が雄の最大体重 (180.9g) を上回るのは12月上旬になってからであった。

GSI (%) は体重と異なり調査開始時点で雌は平均 0.58%，雄は同 0.07%とすでに雌雄間で大きな差が生じていた(図 13B)。雌では7月下旬に 0.58%(平均値)、9月上旬に 0.75%，9月下旬に 1.11%，11月上旬に 1.45%，12月上旬には 2.05%と調査期間全体を通じて増加した。GSI は最終的に調査開始当初の 3.3 倍程度にまで増加した。特に 11月下旬から 12月上旬にかけておよそ 1.4 倍と調査期間中としては最も大きく増加した。雄も 7月下旬では 0.07%，9月上旬では 0.10%，9月下旬では 0.08%，11月上旬で 0.15%，12月上旬で 0.21% となった。調査期間全体で分析すると雄 GSI は調査開始時点から 3 倍にまで増加した。しかし調査開始時点で既に雌 GSI と比べ大きく小さかったことから、雌雄間での GSI の差は大きく広がった。

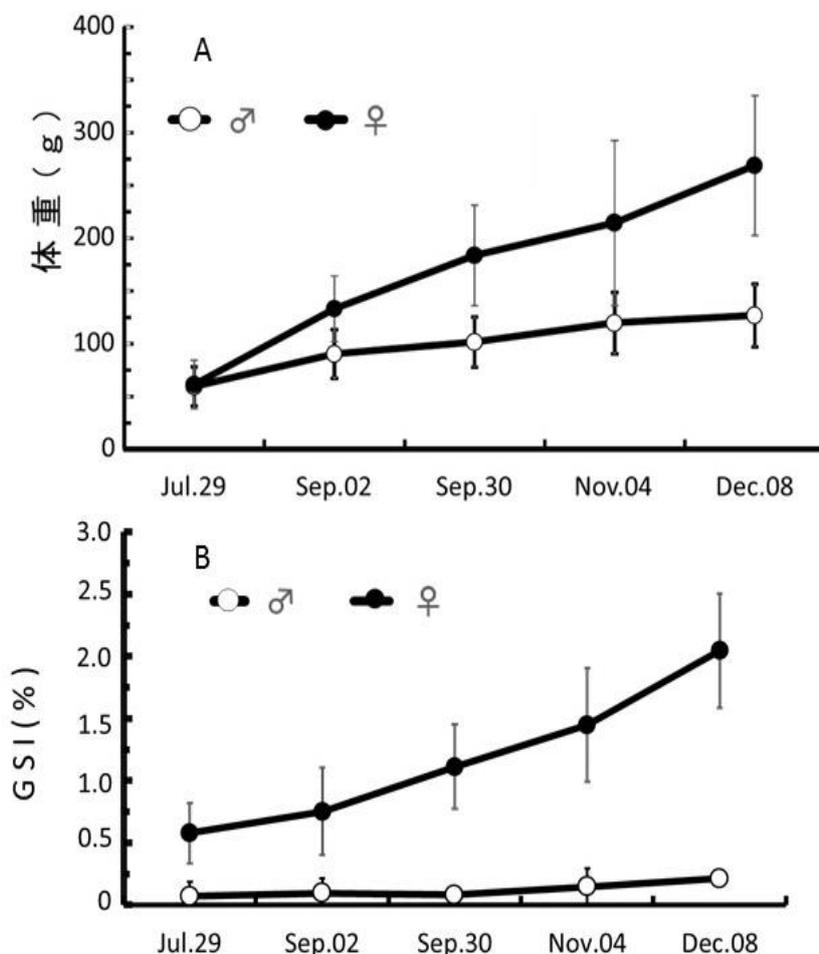


図 13. 同条件で飼育したマアナゴ雌雄の成長比較.

A : 平均体重 B : 平均 GSI.

*、雌雄間で有意差が存在する時期、縦線は標準偏差を表す。

雌雄それぞれで体重と GSI の関係を調べた結果、雌は相関係数 $R^2=0.5537$ と体重の増加にともなって GSI も増加していくことがわかった(図(3)-1-3A)。しかし、雄では $R^2=0.1201$ と体重が増加しても GSI が増加するわけではないことがわかった(図 14B)。

発達段階ごとの卵細胞数と水温

各時期から抽出した計 30 個体について 4 つの段階の卵細胞数を計数した。観察の結果、卵黄胞期は 9 月上旬から全体の 24.5%、油球期は 9 月上旬から 0.1%程度現れることがわかった。染色仁期と周辺仁期は時期を追うごとに減少し、対して卵黄胞期は 9 月上旬の 24.5% から 9 月下旬には 30.9%、11 月上旬には 54.6%、12 月上旬には 54.7%と時期を追うごとに増加する傾向がみられた。また油球期も 9 月上旬および同月下旬には 0.1%であったが 11 月上旬から急激に増加し 2.7%と、12 月上旬には 5.1%と増加していった。

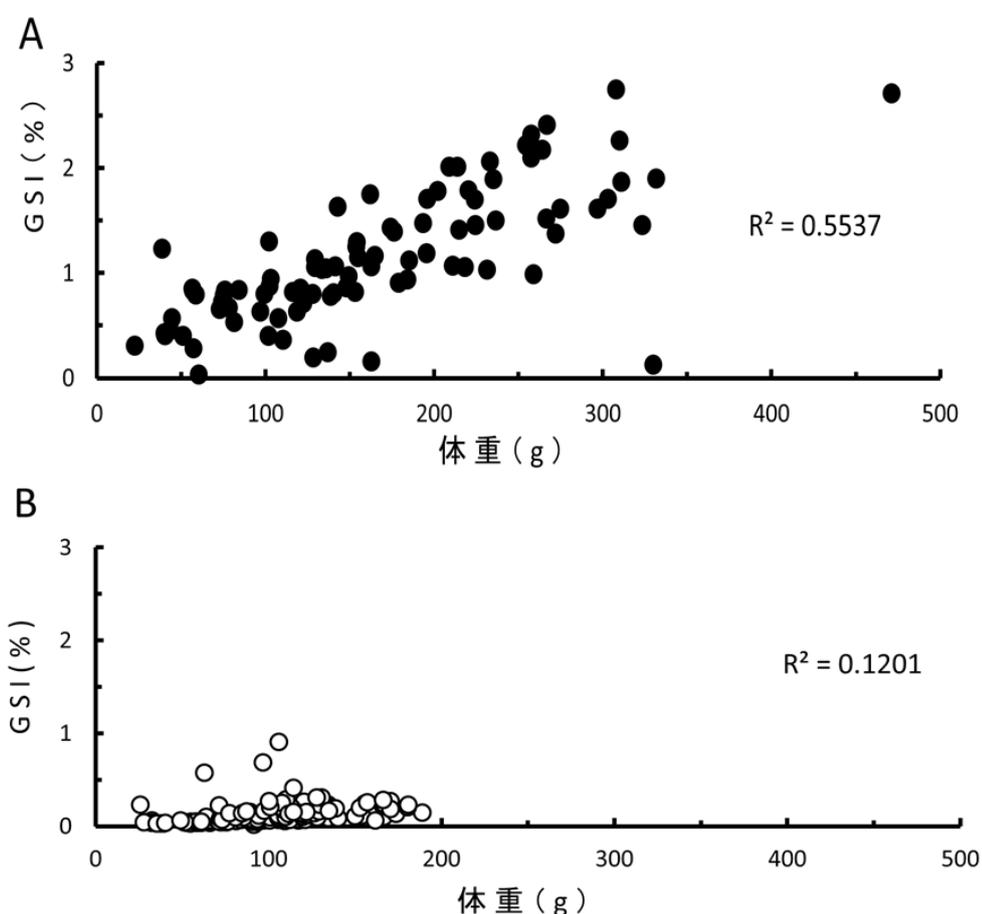


図 14. 雌雄別マアナゴの体重と GSI との関係

A:雌 B:雄

卵巣の発達状況

計数した卵細胞数から各個体の発達状況を算出し、体重と GSI それぞれとの関係を調べたところ、卵巣生殖細胞の発達段階と体重では体重が増加すると卵巣の発達も進行する傾向にあった ($R^2=0.4622$ 図 15A)。しかし発達段階と GSI では GSI が増加しても卵巣発達

が進行するという事はなかった ($R^2=0.2839$ 図 15B)。また卵巣の発達状況と体重および GSI の関係では個体差はあったものの、1つの時期内では体重や GSI の大小に関わらず発達の進行具合に大きな差は現れなかった。

成長と生殖腺の発達

マアナゴ雌個体は、体重では雄と比べ非常に大きく増加し、GSI ではそれ以前に雄よりも増加していたことがわかった。雄個体では体重の増加は一時のものでその後伸び悩み、GSI の増加も雌と比較して僅かなものだった。これらのことから本種の雌個体の成長が雄個体のそれよりも大きいということが実証された。同様の成長は他の魚種にも存在することが知られている。

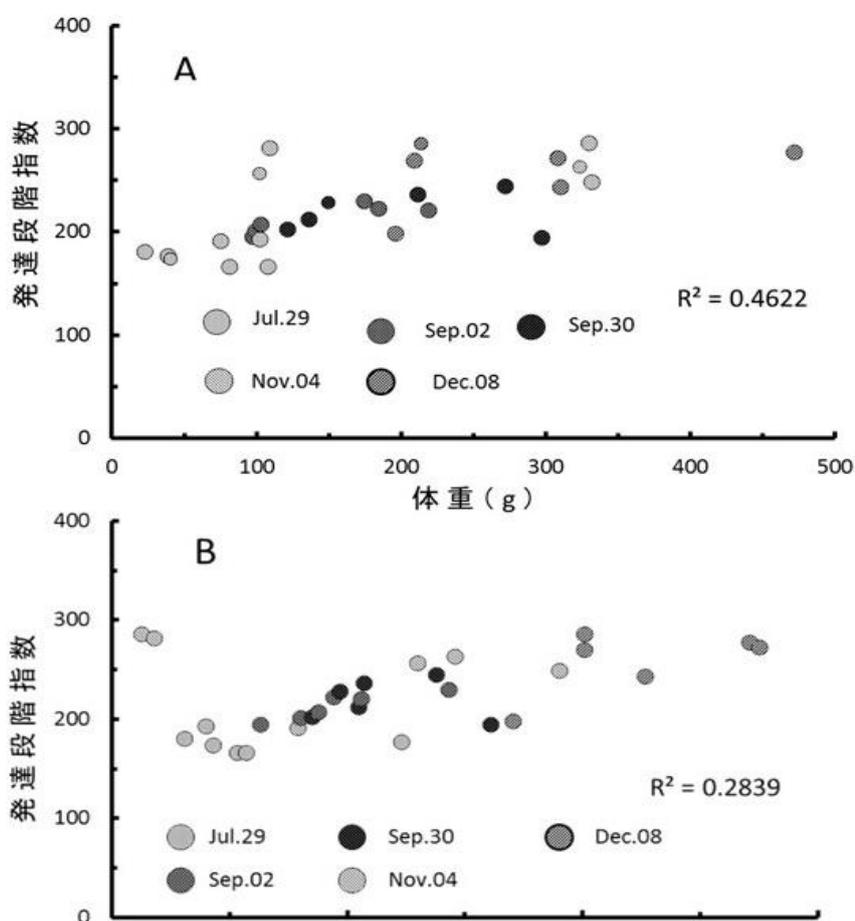


図 15. 体重または GSI と卵細胞発達段階との関係 (各時期最大最小 3 個体).

A : 体重 B : GSI.

また、1つの時期内では体重および GSI の大小が卵巣発達の進行具合に大きな影響を与えないことがわかった。すなわち卵巣の発達については体重や GSI の増加は重要な要因ではない可能性が示された。しかし平均水温と各発達段階の卵細胞数をあわせて検討したところ、平均水温の低下が始まる 11 月上旬から卵巣に油球期が確認され、卵細胞の卵黄胞期から油球期への進行には平均水温の低下が大きく関わっていることが示唆され、卵黄蓄積段階へ向かって進行する兆しであろうと推定された。

(1)-3-1) 成果の副次的効果, 今後の計画等

本項では, 各時期で雌雄間での成長の変化を分析した。稚アナゴの飼育を開始した後, 9月下旬から雌雄での平均体重に統計的差異が現れはじめたが, 雌雄の体サイズのばらつきは大きくオーバーラップしており, 11月以前においては, 各個体の性を体サイズに基づいて判別するのは困難であろうと考えられた。しかし, 12月上旬になると雌の最小体重(196.1g)が雄の最大体重(180.9g)を上回るようになることから, 体重を指標とした雌雄判別は12月以降に180~200gを基準として行うことが望ましいと考えられた。

本研究により, 養殖環境下での雌雄の分別を効率的に行うことが可能となり, 大きいサイズや良い脂つきといった出荷先の要求にも応えた養殖の助けとなる。さらに完全養殖にむけた, 高いストレス耐性や対病性をもった優良親魚の選別にも大きく貢献するだろう。しかし, 各個体の体サイズを確認してのちの選別は, それまでも起こる共食いを回避できないし, もっと早い時期に雌雄を分別できれば, 雌雄の特性に応じた養成を行うことにもつながり, さらなる効率的な養殖を行うことができる。そこで, 次項では, 本種の遺伝的雌雄判別のためのDNAマーカーの検索を行った。

テーマ 1：完全養殖システムの構築

研究課題: (1) 難種苗生産種および新魚種からの採卵および初期発育

(1)-3 マアナゴの飼育と成熟促進

3-2) DNA マーカーによる雌雄判別

担当者職名・氏名：農学研究科・水産学専攻・教授 小林 徹，教授 太田博巳，
水産研究所・大島実験場・助教 阿川泰夫，富山実験場長・教授 家戸
敬太郎

研究協力者：山田伸一，曾和愛理子，小池ひとみ

(1)-3-2) 目的

前項では、マアナゴの成長が雌雄で大きく異なり、雌は成長を続けて大型に、雄は小型のまま推移することを報告した。本種の体サイズへの需要には消費地により差があることから、この性による成長を利用することで効率化を図ることが検討されている。また、共食いによる減耗を防除する観点から、できるだけ早期に雌雄判別を行い、雌雄別に飼育を行うことが効率的であると考えられる。しかし、早期における外観からの雌雄判別はきわめて困難であり、成長差を指標にすると共食いを避けられず、生産効率が下がる。

DNA マーカーを指標にする雌雄判別法は、さまざまな魚種で検討され応用されている。特に AFLP 法 (Vos et al. 1995) は性判別で一般的に用いられてきた方法で、カラアカシタビラメ、パタゴニアアンペヘレイ等さまざまな魚種に用いられている。わが近畿大学でも AFLP 法によるクロマグロの雌雄に特異的な DNA 断片の特定の研究(阿川ら, 2011)が行われている。

そこで、この AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)法を用いて、マアナゴの養殖生産における計画調整や早期の親魚確保のため、種苗導入直後に性判別を可能にする、性を特定する遺伝子マーカーを探索した。

(1)-3-2) 研究方法

供試魚および供試試料

本研究に用いたマアナゴは、明石沖、瀬戸内海沿岸で捕獲されたのち、近畿大学水産研究所富山実験場で養成されたもので、雌雄 5 個体ずつ合計 10 個体を供試した (表 8)。それぞれをフェノキシエタノールで麻酔し、尾部血管からヘパリン処理を施した注射針 (テルモ注射針 23G) と注射筒 (1 mL) によって血液を採取し、使用するまで -30°C で凍結保存した。ただし、このうち雄として用意した 1 個体は、生殖腺の形から雌であることが考えられたため、本分析における性判別の対象からは除外した。したがって、雌 5 個体、雄 4 個体を分析の対象とした。

DNA 抽出

解凍した全血 10 μL を 1.5 mL チューブに移し、100 μL の PBS で希釈した後、ディスパーザブルホモジナイザー (バイオマッシャー II, Nippi) を用いて細胞膜と細胞質を粉碎したのち、沈殿を 5 μL 、吸い取り、新しい 1.5 mL チューブに移した。195 μL の PBS で希釈

した後、プロテナーゼ K 20 μ L を加えた。これ以降の操作は DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)を用いて行い、キットのプロトコルに従い DNA を抽出した。

アダプターの作成

Cut & Ligase 処理に使用する 100 pmol/ μ L のアダプター *EcoRI* adapter A と *EcoRI* adapter S それぞれ 100 μ L, 5 M NaCl 4 μ L を 0.2 mL チューブに調整し、サーマルサイクラーで 91°C 1 分の保温後、80 サイクルの 90°C 40 秒 (1 サイクル毎に温度を 0.5°C ずつ降下させた)その後 25 サイクル 50°C 40 秒 (1 サイクル毎に温度を 0.5°C ずつ降下させた)で徐々に温度を下げ二本鎖アダプターを形成させた。*MseI* アダプターも同様にして作製した。これらのアダプターは使用するまで -30°C で保存した。

Cut & Ligase 処理

以下の溶液を 0.2 mL チューブに調整した。10 \times T4 DNA ligase buffer 2.2 μ L, ゲノム DNA 110 ng, 500 mM NaCl 2.0 μ L, BSA 1.0 ng, *MseI* adaptor 10 pmol, *EcoRI* adaptor 1.0 pmol, 12 unit の *EcoRI* 及び 2 unit の *MseI* を含む溶液に滅菌蒸留水を加え 21 μ L とし、37°C 2 時間消化後、T4 DNA ligase 溶液 1.0 μ L を加えて 22 μ L としたのち、25°C 15 時間保温して Cut & ligase 反応を行った。この時加える T4 DNA ligase は、今回の実験では 3.5 unit/ μ L のものを用いた。保温後 TE buffer を 9 倍量加え混合し、10 倍希釈物として -30°C で凍結保存した。

一次増幅および二次増幅プライマーの作製

一次増幅のためのプライマーは *EcoRI*+A, および *MseI*+C を、また二次増幅プライマーには、*EcoRI*+ACT, *EcoRI*+ACG, *MseI*+CAA, *MseI*+CAT をそれぞれ用いた。プライマーの濃度は 100 pmol/ μ L に調整し、使用まで -30°C で凍結保存した。

一次増幅

10 \times Ex Taq buffer 2.0 μ L, 2.5 mM each dNTPs 1.6 μ L, *MseI* +C 5 pmol, *EcoRI* +A 5 pmol, ExTaq 0.5 unit, Cut & Ligase 反応産物 10 倍希釈 2.5 μ L をそれぞれ含む溶液を滅菌蒸留水で 20 μ L とし、72°C で 3 分間反応させた後、94°C で 20 秒変性、56°C で 30 秒のアニーリング、72°C で 1 分の伸長反応を 20 サイクル行った後、72°C で 10 分の伸長反応を行った。反応後 TE buffer を加えて混合し 10 倍希釈物とした。使用するまで -30°C で凍結保存した。

二次増幅

10 \times Ex Taq buffer 2.0 μ L, 2.5 mM dNTPs 1.6 μ L, 5 pmol *MseI*+C に 2 塩基加えた primer, 1 pmol *EcoRI*+A に 2 塩基加えた primer, ExTaq 0.5 unit, 一次増幅産物を TE buffer で 10 倍希釈した液または 50 倍希釈した液 1.5 μ l を混合し、滅菌蒸留水で 20 μ l とした。これらのプライマーには *MseI*+CAA, *MseI*+CAT および *EcoRI*+ACT, *EcoRI*+ACG を用い、*MseI*+CAA と *EcoRI*+ACT, *MseI*+CAA と *EcoRI*+ACG, *MseI*+CAT と *EcoRI*+ACT, *MseI*+CAT と *EcoRI*+ACG の 4 通りの組み合わせを用いた。PCR はス

テップダウン法を用い、94℃で1分間の反応の後、94℃で20秒の変性、30秒のアニーリング(温度は65℃1サイクル毎に0.7℃ずつ下げたステップダウン)、72℃1分の伸長反応を12サイクル行った。その後、56℃のアニーリング温度で18サイクル行い、ステップダウンとの合計30サイクルとした。最後に72℃5分の伸長反応を行った。反応産物は使用するまで-30℃で凍結保存した。

表8. 本実験に用いた供試魚の体サイズおよび生殖巣の形態から判別した性

| 個体No. | 全長(cm) | 体長(cm) | 体重(g) | 性 |
|-------|--------|--------|-------|---|
| 1 | 38.4 | 38.3 | 64.9 | ♂ |
| 2 | 38.5 | 38.3 | 79.8 | ♂ |
| 3 | 50.8 | 50.6 | 217.8 | ♀ |
| 4 | 54.3 | 54.1 | 241.9 | ♀ |
| 5 | 51.0 | 50.8 | 223.8 | ♀ |
| 6 | 35.5 | 35.3 | 59.1 | ♂ |
| 7 | 35.2 | 34.9 | 55.8 | ♂ |
| 8 | 37.3 | 37.2 | 53.6 | * |
| 9 | 49.8 | 49.5 | 221.3 | ♀ |
| 10 | 51.7 | 51.5 | 256.2 | ♀ |

シークエンサーによる AFLP 産物の確認

ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems, CA, USA)を用い、AFLP産物の増幅断片の確認を行った。

フラグメント解析

シークエンス産物を Peak Scanner ver. 1.0 (Applied Biosystems 社)を用いてフラグメント解析を行った。得られた波形のうち波形強度が100以上のものを増幅断片、それ未満をノイズと判断して、雌雄で特異的な増幅断片の有無の確認を行った。また、1個体のみが持つ増幅断片は、個体の特性である可能性が高く、ここではこれは特異的断片と判断せず、便宜的に同性の2個体以上が共有する場合とした。

(1)-3-2) 結果と考察

今回の解析の結果、雄特異的、または雌特異的な増幅断片が見られたプライマーの組み合わせについて表9、表10、表11にまとめて示した。

まず、雌5個体には検出されず雄4個体中2個体に検出された、もしくは雄4個体には見られず雌5個体中2個体に検出された増幅断片は、今回行ったすべての増幅産物中に23種確認された(表9)。その中で、このマーカーを保有していないものを確実に雄と判別することはできないが持っている個体が雌といえる増幅断片は16個、確実に雌と判別することはできないが持っている個体が雄であるといえる増幅断片は7個であった。

次に、雌には見られず雄4個体中3個体に見られる、もしくは雄には見られず雌5個体中3個体に見られる増幅断片は、すべての増幅産物中に5個確認された(表10)。こちらも上記と同様にこのマーカーを保有していないものを確実に雄と判別することはできないが、

表 9. メスには見られずオス 4 個体中 2 個体に見られる, もしくはオスには見られずメス 5 個体中 2 個体に見られる増幅断片.

| プライマー | M+CAA, E+ACT | | | | | M+CAA, E+ACG | | M+CAT, E+ACT | | | | | | | M+CAT, E+AGC | | | | | | | | | | |
|---------------|--------------|----|------|-----|-----|--------------|------|--------------|----|----|----|----|-----|-----|--------------|-----|------|----|----|----|-----|-----|-----|---|---|
| | 雌特異的 | | 雄特異的 | | | 雌特異的 | 雄特異的 | 雌特異的 | | | | | | | 雌特異的 | | 雄特異的 | | | | | | | | |
| 増幅断片長 (bp) | 38 | 70 | 83 | 140 | 373 | 49 | 192 | 41 | 58 | 76 | 86 | 98 | 122 | 128 | 221 | 295 | 335 | 43 | 80 | 90 | 116 | 106 | 212 | | |
| ♀ No. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| 4 | 0 | - | - | - | - | 0 | - | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | 0 | - | 0 | - | 0 | - | - | - | - | |
| 5 | 0 | - | - | - | - | 0 | - | - | - | 0 | - | 0 | 0 | - | - | - | - | 0 | - | 0 | - | - | - | - | |
| 9 | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 | - | 0 | - | - | - | - | 0 | 0 | - | 0 | - | 0 | - | - | - | |
| 10 | - | - | - | - | - | - | - | 0 | - | - | - | 0 | 0 | 0 | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 0 | - | - | - | |
| ♂ No. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | - | - | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| 2 | - | 0 | - | 0 | 0 | - | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 | 0 |
| 6 | - | 0 | - | - | 0 | - | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| 7 | - | - | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 | 0 |

持っている個体が雌といえる増幅断片は 3 個, 確実に雌と判別することはできないが持っている個体が雄であるといえる増幅断片は 2 個それぞれ見つかった。

さらに, プライマー Mse I+CAT と Eco RI+ACG の組み合わせにおいて, 雌のすべてに見られず, 雄の全個体に見られる, 166bp の増幅断片が 1 個確認された(表 11)。

今回の研究では, AFLP 法を用いた DNA 多型解析を行い, マアナゴの性特異的 DNA 断片の探索を行った。AFLP 法を用いた解析は様々な魚種で行われている。カラアカシタビラメ *Cynoglossus semilaevis* (Chen et al. 2007) では, 64 組のプライマーを用いて 28 個体を解析し, 4681 個の増幅断片が見つかった。その内, 雌に特異的な増幅断片が確認された。パタゴニアンペヘレイ *Odontesthes hatcheri* (Koshimizu et al. 2010) では 64 組のプライマーを用いて 46 個体を解析し, 153 個の増幅断片が見られた。その内, 雄に特異的な増幅断片が確認され, 配列が特定された。また, 今回参考にしたクロマグロでは 64 組のプライマーを用いて 8 個体を解析し, 1038 個の増幅断片が見つかっており, そのうち雄に特異的な増幅断片が確認された。本研究で得られた結果では, カラアカシタビラメやパタゴニアンペヘレイ等の研究と比較すると, 用いたプライマーの組み合わせ数が少ない。よって今の段階では, いくつかのプライマーによる増幅断片の保有パターンを判定すれば性が判定できるのではないかと考えられる。この考え方に基づき, 全体として 4 組のプライマーを用い, 計 247 個の増幅産物より, 雌雄で特異的な増幅断片の確認を行った。その結果, プライマー Mse I+CAT と Eco RI+ACG の組み合わせにおいて, 雌全個体に見られず, 雄の全個体に見られる, 雄に特異的といえる 166bp の増幅断片を確認することができた。このマーカーは, マアナゴの早期性判別に応用可能であろうと考えられた。

完全養殖システムの構築
マアナゴの飼育と成熟促進(小林・太田・阿川・家戸)

表 10. メスには見られずオス 4 個体中 3 個体に見られる, もしくはオスには見られずメス 5 個体中 3 個体に見られる増幅断片.

| No. | プライマー 増幅断片長 (bp) | M+CAA, E+ACT | | M+CAA, E+ACG | M+CAT, E+ACT | M+CAT, E+ACG | |
|-----|------------------------|--------------|-----|--------------|--------------|--------------|-----|
| | | 雄特異的 | 362 | 雌特異的 | 79 | 雌特異的 | 206 |
| ♀ | 3 | — | — | — | — | ○ | |
| | 4 | — | — | — | — | — | |
| | 5 | — | — | ○ | ○ | — | |
| | 9 | — | — | ○ | ○ | ○ | |
| | 10 | — | — | ○ | ○ | ○ | |
| ♂ | 1 | — | — | — | — | — | |
| | 2 | ○ | ○ | — | — | — | |
| | 6 | ○ | ○ | — | — | — | |
| | 7 | ○ | ○ | — | — | — | |

表 11. メスのすべてに見られず, オスの全個体に見られた増幅断片.

| No. | プライマー 増幅断片長 (bp) | M+CAT, E+ACG |
|-----|------------------------|--------------|
| | | 雄特異的 |
| ♀ | 3 | — |
| | 4 | — |
| | 5 | — |
| | 9 | — |
| | 10 | — |
| ♂ | 1 | ○ |
| | 2 | ○ |
| | 6 | ○ |
| | 7 | ○ |

(1)-3-2) 成果の副次的効果, 今後の計画等

上記にも述べたように, 本研究では用いたプライマー数が少なかったため, 今回用いたプライマーの組み合わせ以外でも, 雌雄に特異的な増幅断片が確認できる可能性は十分考えられる。今後, 今回確認された判別マーカー候補の増幅断片と, その隣接領域の塩基配列を解読して, プライマーを設計することで, 単純な PCR による簡易な雌雄判別が可能になると思われる。

テーマ1：完全養殖システムの構築

研究課題: (1) 難種苗生産種および新魚種からの採卵および初期発育

(1)-3 マアナゴの飼育と成熟促進

3-3) 飼育環境下でのマアナゴ雌雄の成熟度の周年変化

担当者職名・氏名：水産研究所・富山実験場長・教授 家戸 敬太郎，

農学研究科・水産学専攻・教授 太田 博巳

研究協力者：山田 伸一，瀬川 叡，笛田 えりか，尾賀 光輔

(1)-3-3) 目的

マアナゴ (*Conger myriaster*) の養殖や種苗生産に関する研究は未だ少なく，種苗生産の第一段階である採卵についても不明なことが多い。そこで本研究では，マアナゴの成熟制御技術を開発するための基礎的知見を得ることを目的として，飼育環境下でのマアナゴの生殖腺体指数 (GSI: 生殖腺重量/体重×100)，並びに卵巣卵の卵径組成の周年変化を調査した。

(1)-3-3) 研究方法

飼育は沿岸表層水と 100m 水深の低水温の両者を単独，あるいは混合して利用可能な近畿大学水産研究所富山実験場の陸上水槽で行った。養成2年目のマアナゴを供試魚として用いた。飼育水温は，年間的水温が約 10～25℃の範囲で特に7月から11月に 20～25℃で変化する夏季高水温区と，夏季に 100m海水を注水して 20℃以下を維持した夏季低水温区での成熟状態を比較した(図 16)。それぞれの条件で1年間，原則として毎月雌雄 5 尾をサンプリングし，全長，体重および生殖腺重量を測定した。さらに，雌については卵巣卵径の測定，雄については排精の有無を確認した。また，体重および生殖腺重量から GSI (生殖腺重量/体重×100) を算出した。卵巣卵径は無作為に選出した 100 個の卵径を測定し，卵径分布を各個体で作成した。

(1)-3-3) 結果と考察

雌の成熟周期

両区の水溫，雌の GSI および卵径の周年変化を図 16 に示した。夏季高水温区では水溫が高くなる7月に平均 GSI が最も高くなり，8月以降急激に低下した。9月以降は小さな個体差を維持しながら3月まで低い値で推移し，その後，わずかに増加傾向を示した。一方，夏季低水温区では8月に GSI が最大値となり，この値が9月でもほぼ維持され，10月以降に低下して3月まで小さい標準偏差の低い値を維持した。平均卵径は，夏季高水温区では GSI と同様に7月に平均値が最大となり，8月から9月にかけて低下したが7月から9月の個体差は大きく，10月から3月にかけては大きな個体差を示さずに増加傾向にあった(図 16)。夏季低水温区の平均卵径は9月に最大値を示し，10月以降は減少したが減少の程度は夏季高水温区よりも小さく，比較的標準偏差が大きかったものの3月まで高値を維持した。

本結果から，マアナゴ雌の生殖腺は両区ともに6月頃にかけて均質に成熟が進んでいき，それ以降 20℃を越える水溫が続くとばらつきが大きくなりながら GSI が小さくなると考

えられた。一方、6月以降に水温が20℃以下で維持されるとばらつきは同じように大きくなるもののGSIは9月まで高い値を維持することがわかった。今後、卵巢卵の組織学的な観察による成熟段階の詳細な解析をする必要があるが、マアナゴの人工的な成熟誘起は、成熟が均質に進んでいると考えられる6月頃に開始すると良いと考えられ、それ以降の成熟の維持には20℃以下の水温での飼育が有効であると推察された。

雄の成熟周期

雄のGSIは両実験区とも類似した変化を示した。両実験区とも飼育水温が最低値に近い10℃の3月頃からGSIが上昇を開始し、5月にピークを迎えた後、夏季高水温区では10月、夏季低水温区では1月に最低値となった。また5月から7月まではほとんどの個体で排精が確認されたが8月には個体数、排精量ともに少なくなったことから、退行開始期に当たると考えられた。その後GSIが最低値に近づく10月には組織学的に完全な退行像を示した。今回の研究結果から、雄のマアナゴの成熟サイクルは水温の影響を大きく受けると考えられ、特に10℃程度の低水温が精子形成の促進に有効であることが示唆された。

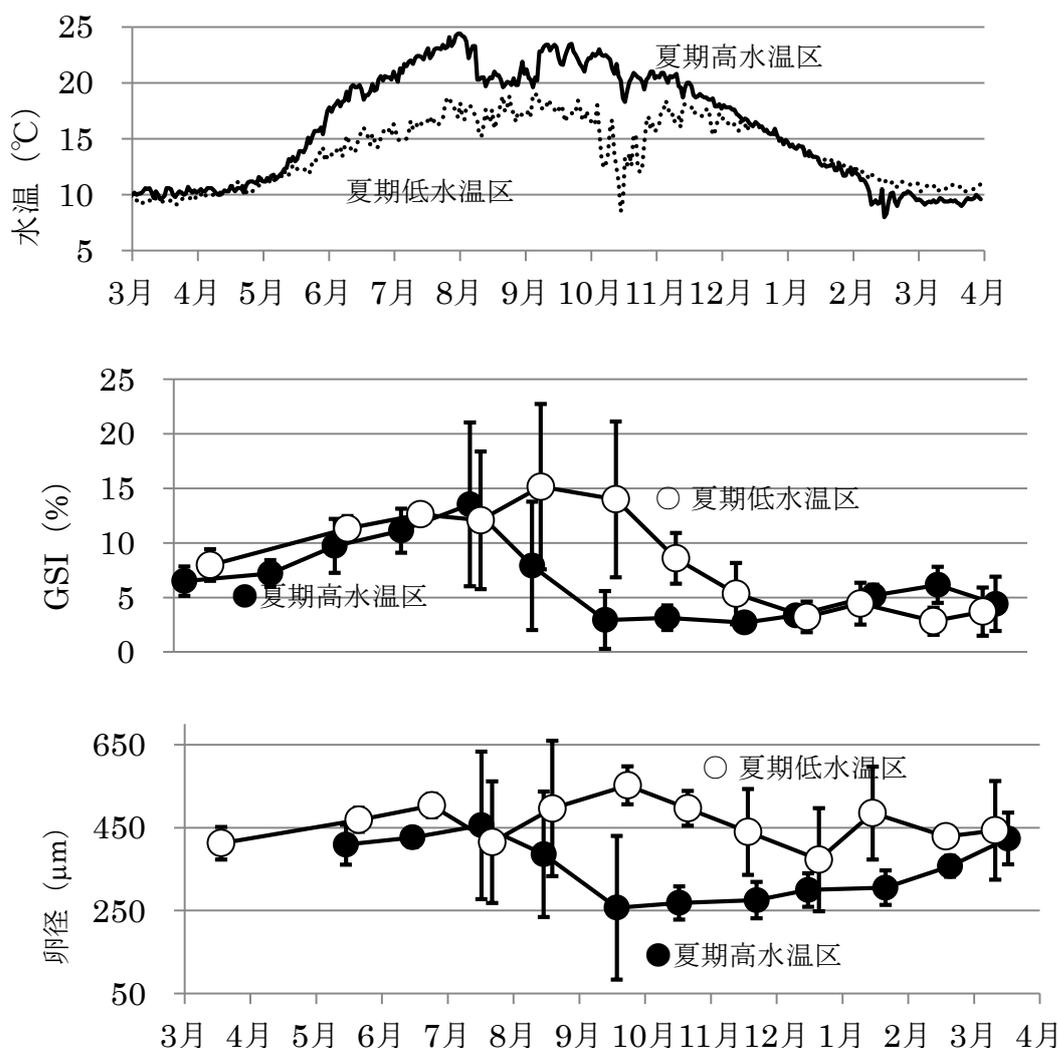


図 16. 富山実験場におけるマアナゴの飼育水温と雌のGSI,卵径の推移。

テーマ1：完全養殖システムの構築

研究課題: (1) 難種苗生産種および新魚種からの採卵および初期発育

(1)-3 マアナゴの飼育と成熟促進

3-4) 雄の成熟促進方法の開発

担当者職名・氏名：農学研究科・水産学専攻・教授 太田博巳，
水産研究所・富山実験場長・教授 家戸敬太郎，

研究協力者：村田 修，山本眞司，服部亘宏，山田伸一，笛田えりか，板倉壮太，瀬川 叡

マアナゴは重要な漁獲対象種であるが、資源量の減少が深刻化しており、種苗生産技術の開発が急務となっている。本種の成熟には水温が大きく影響を及ぼし、雌の人為催熟には 10℃以下の低水温維持が不可欠であることが報告されている。一方、雄成魚を飼育すると、ホルモン未投与でも春から初夏にかけて排精する。しかし、その採取可能な精液量は少ない。雌の採卵技術も確立されていないため、いつ精子が必要になるかということも不明である。そこで、マアナゴ雄の催熟に適した成熟誘起ホルモンの種類と投与方法について検討し、周年にわたり採精可能な雄を作出することを目標とした。

(1)-3-4)-a ヒト絨毛性性腺刺激ホルモンの投与濃度

(1)-3-4)-a 目的

本種の成熟には水温が大きく影響を及ぼし、雌の人為催熟には 10℃以下の低水温維持が不可欠であることが報告されている。一方、上述の実験結果から、雄成魚を飼育するとホルモン未投与でも春から初夏にかけて排精する。しかし、任意の時期に採精するためには、ホルモン投与による催熟が不可欠となる。本研究では魚類の成熟促進に使用され、入手も容易なヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) 投与によるマアナゴ雄の適切な催熟方法について検討した。

(1)-3-4)-a 方法

近畿大学富山実験場で稚アナゴから1年間飼育し、平均体重が 110.2 g となった雄を4月下旬に同・白浜実験場へ移送し、10.5～15.2℃の海水で飼育した。hCG の適切な投与濃度調べるため、稚アナゴから1年間飼育した雄に対し hCG を 0.1, 0.5, 2.5 IU/g 体重/wk の濃度で各4回投与する3群と、0.9%NaCl のみを投与する対照群を設け、その影響を比較検討した。投与開始時、および各投与の翌日に排精の有無、採精可能量、精子運動率を測定した。

(1)-3-4)-a 結果, 考察

実験開始時に全実験個体 48 尾中 6 尾の雄が排精していた。hCG の投与濃度が 0.5 IU 群で最も排精雄の比率が高くなった。採精量は、hCG の投与濃度が高いほど多くなる傾向を見せ、対照群と 0.1 IU 群では差が認められなかった (図 17)。また、精子運動率はいずれも高い値を示し、各群間に有意差は認められなかった。hCG を4週間に渡り投与した結果、hCG を投与した各群では2週目から斃死する個体が多く出現し始め、生理食塩水を投与した対照群では生残率が 80%以上を維持したが、2.5IU/g 体重群と 0.1IU/g 体重群では4回目投与

後までに生残率が 30%以下となった (図 18)。0.5IU/g 体重群でも対照群に比べて生残率は低い結果となった。

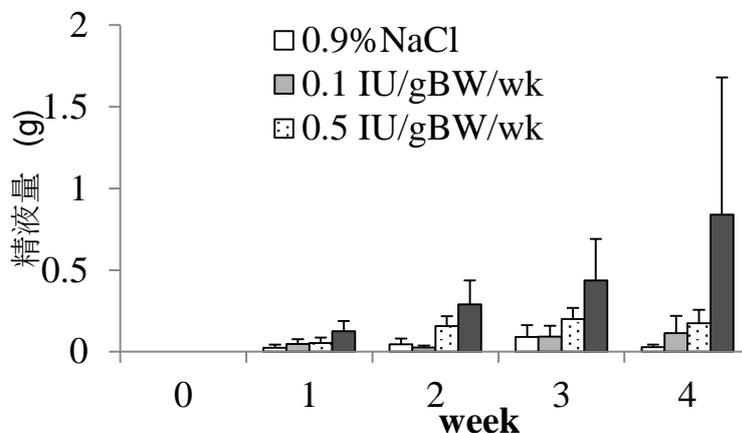


図 17. マアナゴ雄への hCG 投与に伴う採精可能量の変化。

以上の結果から、hCG は雄アナゴへの精子形成促進並びに排精誘起効果は認められるものの、投与に伴う斃死率がきわめて高く、その投与時期や投与頻度、投与濃度について、さらに詳細な検討が必要と考えられた。

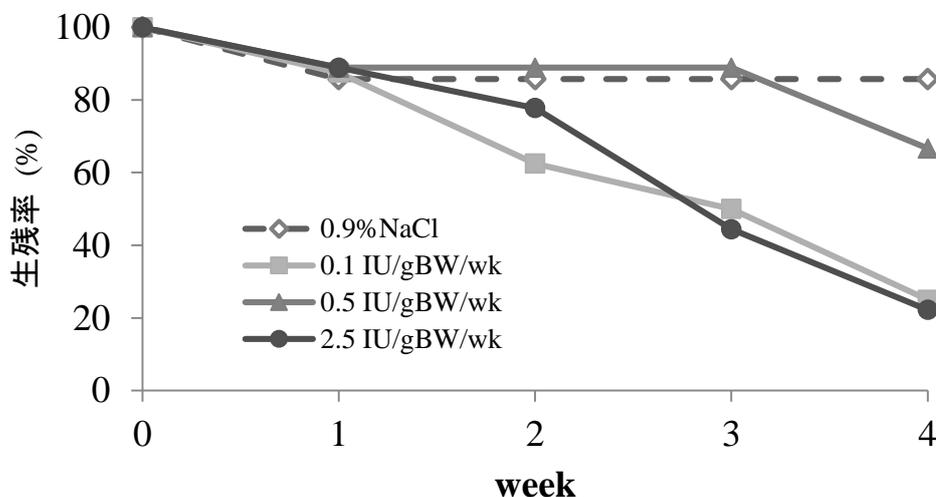


図 18. マアナゴ雄への hCG の毎週投与に伴う生残率の推移。

(1)-3-4)-b ヒト絨毛性性腺刺激ホルモンの投与間隔の検討

(1)-3-4)-b 目的

上述の実験結果から、本種はハンドリングストレスに弱く、成熟が進むとさらにその傾向が強くなり、hCG 投与後に斃死する個体が多く出現することが明らかとなった。そこで、

hCG の投与回数を可能な限り減らすとともに、適切な投与間隔を調べることを目的として、1 回の hCG 注射投与でどの程度ホルモンが体内に残存し、またそのホルモン機能が維持されるのかを検討した。

(1)-3-4)-b 方法

hCG(2.5IU/g 体重)を一回のみ投与後、2 ヶ月に渡り 1 週間に 1 回の採血を行って血中の残存 hCG 濃度と、hCG によって引き起こされる性ステロイドホルモン濃度の変化を調べる実験を行った。同じ個体から採血を繰り返すことから、体重が雄の数倍程度となる雌を用い、hCG の血中残存濃度と hCG によって卵濾胞からの分泌が促される雌性ホルモン (Estradiol-17 β : 以後 E₂) の血中濃度の測定を行った。試験魚は稚魚期から 2 年以上富山実験場で飼育した雌 10 尾 (体重 888 \pm 81 g) を用い、10 \square 一定の水温で飼育を行った。hCG 濃度の測定は hCG EIA test (Immunospec Corporation) , E₂ の濃度の測定は Estradiol EIA Kit(Cayman Chemical Company)を用いた。

(1)-3-4)-b 結果

血清中の hCG 濃度は投与 1 週後に最大値を示し、測定終了時の 9 週後まで徐々に減少していった(図 19)。一方 E₂ 濃度は 1 週後に開始時の 7 倍となり、3 週後まで高い濃度を維持し、その後濃度は低下したものの開始時の約 2 倍の値を維持し、8 週以降は開始時と同程度まで低下した(図 19)。

以上の結果から 1 回の hCG 投与で 1 ヶ月間は hCG の強い効果を維持し、2 ヶ月間はその効果が持続されることが示唆された。

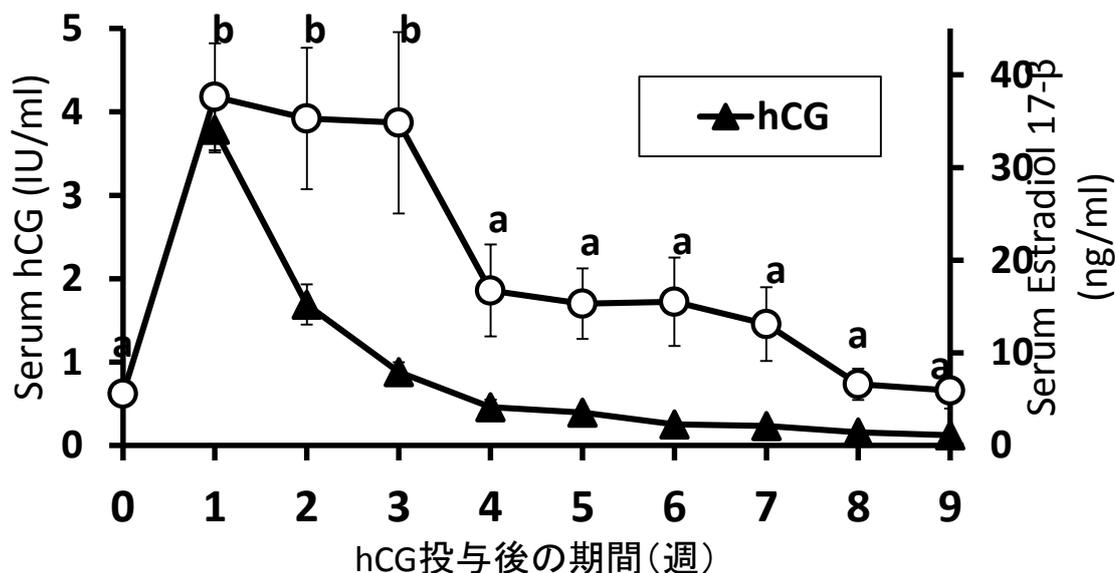


図 19. マアナゴ雌への hCG の 1 回のみ投与後の血中ホルモン濃度の推移。

(1)-3-4)-c 高濃度長間隔注射と体内徐放性分泌器（オスモティックポンプ）による投与
(1)-3-4)-c 目的

マアナゴ雄への hCG の反復注射は催熟効果は高いものの死亡個体が頻出する。前項の結果により、hCG の 2.5IU/g 体重を 1 回投与すると 1 ヶ月は高い持続効果が得られることが明らかとなった。そこで、この 1 ヶ月の投与間隔で 2.5IU/g 体重を注射投与した場合と、体内に埋め込むことで長期間一定濃度でのホルモン分泌が可能なオスモティックポンプ（OP：alzet 社）により、1 ヶ月間に 2.5IU/g 体重が分泌されるように投与した場合の両方で、血中ホルモン濃度の変化と成熟促進効果を比較検討した。

(1)-3-4)-c 方法

10ℓの飼育水温で雄 20 尾（体重 124.4±3.2 g）を飼育した。2.5 IU/g 体重の濃度で月に一回の注射で投与する群（10 尾）と、同じく同量（2.5 IU/g 体重/month）の hCG を分泌する OP により投与する群（10 尾）を設け、投与開始後の成熟度および血中の各種ホルモン濃度を比較検討した。

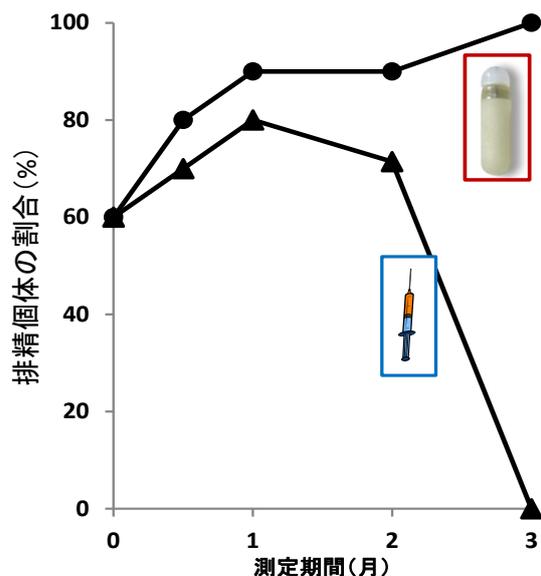


図 20. 排精誘起に及ぼす hCG の月 1 回注射投与とオスモティックポンプ投与の比較。

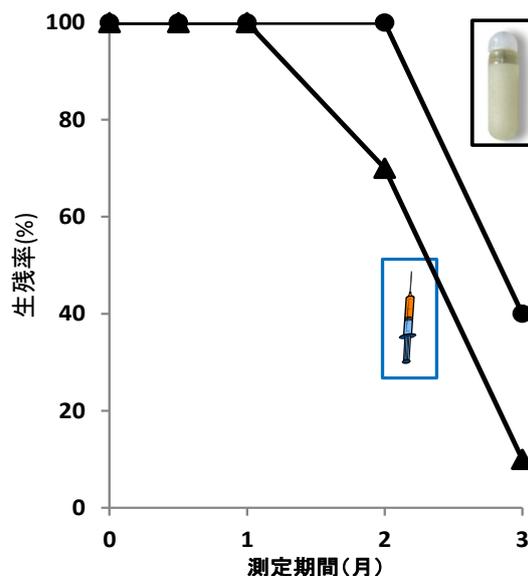


図 21. 投与方法の違いによる斃死率の比較

(1)-3-4)-c 結果と考察

月に一回の hCG 注射と OP による hCG 投与とを比較したところ、両者に成熟促進効果が認められたが（図 20）、成熟に伴い斃死する個体は OP より注射群で早い段階から出現した（図 21）。また、血中 hCG 濃度、11KT 濃度共に、注射より OP で投与した方が高い値を維持した（図 22）。以上の結果から、本種の催熟には OP による投与がより有効と考えられた。

完全養殖システムの構築
マアナゴの飼育と成熟促進(太田・家戸)

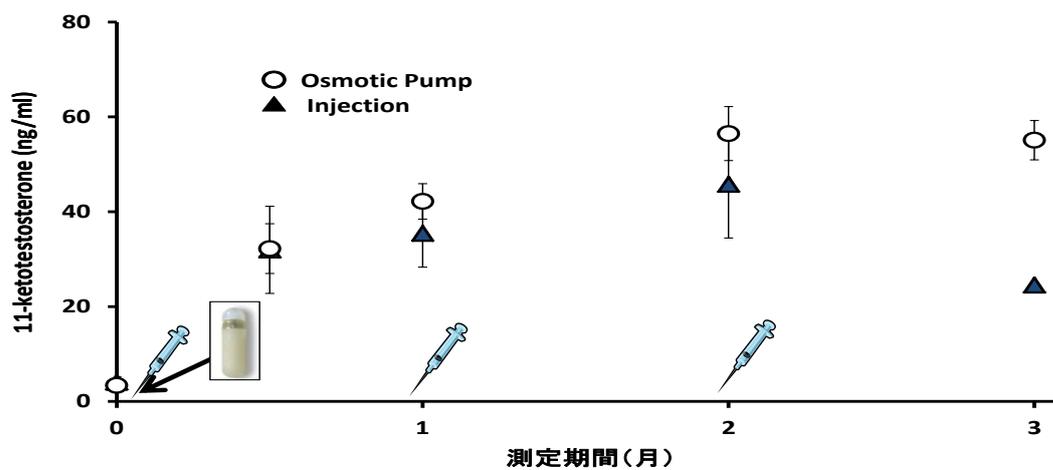


図 22. hCG の投与方法の違いによる血中雄性ホルモン濃度の比較.

テーマ1：完全養殖システムの構築

研究課題: (1) 難種苗生産種および新魚種からの採卵および初期発育

(1)-3 マアナゴの飼育と成熟促進

3-5) マアナゴ雌の成熟促進方法の開発

担当者職名・氏名：農学研究科・水産学専攻・教授 太田博巳，
水産研究所・富山実験場長・教授 家戸敬太郎，

研究協力者：村田 修，中田 久，山田伸一，尾賀光輔，瀬川 叡，笛田えりか

マアナゴの完全養殖を目指すに当たり，種苗を生産する第一段階として良質卵の確保が必要となる。3-3)の研究結果から明らかのように，飼育条件下のマアナゴは卵黄形成中期まで成熟が進行するものの産卵には至らずに成熟が停止，退行して未熟期に向かう。採卵して受精卵を得るためには，人為的なホルモン投与によって成熟誘導を行うことが必要である。そこで雌の成熟誘導方法について検討した。成熟誘導を行うに際し，成熟段階のどのタイミングでホルモン投与を開始するか，適したホルモンの種類と濃度をどうするか，どのように卵黄形成と排卵を導くか，ホルモン投与期間中の飼育環境をどうするか，という4つの検討が必要となる。後者の2つの条件については，近縁種のニホンウナギでの催熟方法，並びにマアナゴに関する先行研究の方法を踏襲し，本研究では前者の2つ，すなわち成熟誘導を開始するタイミングと投与するホルモン種と濃度について実験を行った。研究期間が限られていたことから，これらの問題は同時並行の形で実験計画を立て，実施した。

(1)-3-5)-a 卵黄形成期からの hCG，サケ下垂体投与

(1)-3-5)-a 目的

前述の(3)-3)の実験結果から，飼育環境下では春季の水温上昇に呼応して卵黄形成が起こり，GSIが最大値を示し，卵黄球期まで成熟が進むことが明らかとなった。飼育下ではその後の水温上昇に伴い卵成熟は退行期に向かう。そこで，この時期から水温を低下させるとともに生殖腺刺激ホルモンを投与し，その後の成熟を促進することが友好と考えられた。

(1)-3-5)-a 研究方法

卵巣卵が卵黄形成前期，または中期のステージにある6月から，水温を10℃まで徐々に低下させるとともに，ホルモン投与を開始した。隔週でホルモンの注射投与を行い，hCGを500IU/kg体重の濃度で隔週で注射投与したhCG 500IU区，およびhCGを100IU/kg体重で隔週投与したhCG 100IU区を設定した。

(1)-3-5)-a 結果と考察

hCG 500IU区において実験開始から短期間で死亡が急増し，7週目には全ての個体が死亡した(表12)。hCG 100IU区は死亡魚の出現が遅かったものの11週目には全個体が死亡した。増重率が130%を超えた個体はhCG 500IUの1個体および試験区3(hCG 100IU)の2個体しか得られなかった。また排卵誘発処理まで成熟が進んだ個体は試験区3(hCG 100IU)の1尾のみであり，排卵には至らなかった。

以上の結果から、飼育下で成熟状態がピークを迎える 6 月に hCG 注射を開始する催熟方法は困難であることが分かった。投与するホルモンの種類や投与時期について検討する必要があると考えられた。

表 12. hCG を隔週投与したマアナゴの生残期間と成熟促進結果.

| 試験区 | 尾数 | 生残期間 (週) | >130% | 排卵誘発 | 排卵 |
|--------------------------|----|-------------|-------|------|----|
| hCG 500 (IU/kgBW/2wk) | 20 | 7 | 1 | 0 | 0 |
| hCG 100 (IU/kgBW/2wk) | 10 | 11 | 2 | 1 | 0 |

※『>130』はホルモン投与開始時の体重から卵巢の発達により体重の相対比が 1.3 倍を超えた個体数を示す。

(1)-3-5)-b 未熟期からの hCG, ウナギリコンビナント LH 投与

(1)-3-5)-b 目的

前述の 5)-a の結果から、飼育下で成熟が進む時期から生殖腺刺激ホルモンを投与して最終成熟まで進行させるという手法は、アナゴの生理的負担が大きく、数回のホルモン投与で斃死する可能性の高いことが示唆された。そこで、卵巢が退行・未熟期に入る 11 月末から成熟を促進するホルモンを投与する実験を行った。また、a の実験では hCG (ヒト) 並びにサケ下垂体という、マアナゴとは類縁関係の遠いホルモンを投与した。そこで、最近市販されるようになった同じウナギ目のニホンウナギの遺伝子組換え体生殖腺刺激ホルモン (ウナギリコンビナント黄体形成ホルモン: rLH) を投与する群も設け、hCG との投与効果の比較を行った。

(1)-3-5)-b 研究方法

飼育水温は 10℃一定とした。隔週で魚体重 1kg あたり rLH 250µg, 100 µg および 40 µg をそれぞれ注射投与した区、並びに hCG 300 IU/kg 体重を注射投与した区を設定した。実験は卵巢が退行し、未熟状態にある 11 月に開始した。

(1)-3-5)-b 結果と考察

rLH 250µg 区, rLH100µg 区, および hCG 300IU 区は 20 週目までに全個体が死亡したが、rLH40µg 区では 27 週目まで生き残る個体が認められた (表 13)。

いずれの試験区でも半数以上の個体の増重率が 130%を超えた。排卵誘発まで成熟が進んだ個体は rLH 250µg 区では 5 尾でそのうち 2 尾が排卵し、rLH100µg 区では 2 尾中 1 尾が排卵したが、rLH40µg 区では排卵誘発した 6 尾とも排卵しなかった。hCG 300IU 区では 4 尾中 2 尾が排卵した。

以上の結果から、未熟期である冬期に、近縁種のタンパクホルモンである rLH の注射投与によって、排卵誘導まで成熟させることが可能であることが分かった。また、卵黄形成期では投与開始後短時間で斃死した hCG 投与でも、最終成熟期まで生存、並びに成熟が進行促進が可能ながことが明らかとなった。

表 13. 未熟期のアナゴ雌に対するウナギリコンビナント LH, hCG の投与結果.

| 試験区 | 尾数 | 生残期間 (週) | >130% | 排卵誘発 | 排卵 |
|---|----|-------------|-------|------|----|
| rLH 250 ($\mu\text{g}/\text{kgBW}/2\text{wk}$) | 8 | 20 | 6 | 5 | 2 |
| rLH 100 ($\mu\text{g}/\text{kgBW}/2\text{wk}$) | 8 | 19 | 5 | 2 | 1 |
| rLH 40 ($\mu\text{g}/\text{kgBW}/2\text{wk}$) | 8 | 27 | 7 | 6 | 0 |
| hCG 300 (IU/kgBW/2wk) | 11 | 19 | 7 | 4 | 2 |

(1)-3-5)-c 卵黄形成期からのウナギリコンビナント LH, FSH 投与

(1)-3-5)-c 目的

3-5)-b の結果から、未熟期のマアナゴ雌に近縁なウナギ由来のリコンビナント黄体形成ホルモン (r LH) の反復投与を行うと、生存性を維持し、最終成熟期までの成熟促進が可能であることが明らかとなった。そこで、この rLH に加え、もう一つの生殖腺刺激ホルモンであるウナギリコンビナント卵濾胞刺激ホルモン (r FSH) の投与効果についても検証することとした。また、5)-a の実験においてヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) の投与で短期間で斃死が続出した卵黄形成期の 6 月に投与を開始し、催熟に要する期間の短縮化を目指した。

(1)-3-5)-c 研究方法

隔週で rFSH 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重および rFSH 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重をそれぞれ投与した区、および rLH 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重および rLH 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重をそれぞれ投与した区を設定した。飼育水温は 10 $^{\circ}\text{C}$ 一定とし、実験は 6 月に開始した。

(1)-3-5)-c 結果と考察

rFSH 250 μg 区および rLH 250 μg 区は 10 週間までに全ての個体が死亡し、rFSH 50 μg 区は 11 週、rLH 50 μg 区は 15 週目に全ての個体が死亡し、rLH 50 μg 区が生残が他区よりもやや長かった (表 14)。魚体の増重率が 130%を超えた個体は各試験区とも供試魚のおよそ半数前後であった。排卵誘発を行った rLH 250 μg 区の 2 尾のうちの 1 尾が排卵したが、rFSH 250 μg 区および rLH 50 μg 区では排卵は起こらなかった。

以上述べたように、hCG に比べウナギのリコンビナント生殖腺刺激ホルモンは生残期間が著しく伸びたものの、最終成熟まで到達する個体はほとんど見られなかった。このことから、マアナゴが水温の上昇に伴い成熟が開始され、卵黄形成を始めた個体に外因性ホルモンを投与して成熟を継続させ、最終成熟と排卵まで誘導するという手法は、魚体へのストレスが大きく、困難であると考えられた。未熟な冬期からのホルモン投与が適していることが明らかとなった。これまでのところ、5)-b の実験結果で明らかとなった退行・未熟期である 11~12 月からの投与開始が適していると考えられる。また、催熟期間の短縮を目指すための方法として、5)-c の卵黄形成中期の 6 月より早い、卵黄形成の開始直後に当たる 3~4 月頃からの投与開始を検討する必要があると考えられた。

表 14. 卵黄形成期のマアナゴ雌への r FSH, r LH の投与効果.

| 試験区 | 尾数 | 生残期間 (週) | >130% | 排卵誘発 | 排卵 |
|--|----|-------------|-------|------|----|
| rFSH 250 ($\mu\text{g}/\text{kgBW}/2\text{wk}$) | 10 | 10 | 5 | 1 | 0 |
| rFSH 50 ($\mu\text{g}/\text{kgBW}/2\text{wk}$) | 10 | 11 | 5 | 0 | 0 |
| rLH 250 ($\mu\text{g}/\text{kgBW}/2\text{wk}$) | 10 | 10 | 4 | 2 | 1 |
| rLH 50 ($\mu\text{g}/\text{kgBW}/2\text{wk}$) | 10 | 15 | 6 | 1 | 0 |

最終成熟並びに排卵を誘起するファイナルショットの投与時期

これまでに実施した催熟実験では、生殖腺刺激ホルモン (hCG, r LH, r FSH) の反復投与で卵黄形成を促し、卵黄形成が終了したと判断された個体には、最終成熟誘起ステロイド (DHP) の前駆物質である $17\alpha\text{-OHP}$ を投与することにより、最終成熟と排卵を促す実験を行ってきた。その最終成熟の誘起方法は図 23 に示した。

この排卵に至る最終成熟の誘起が成功するか否かは、その個体が卵黄形成が終了し、最終成熟誘起ステロイドを投与することにより排卵誘発が可能、という成熟度の見極め方法が重要なポイントとなる。

そこで、この 3 年間の最終成熟誘起実験の実施結果について、特に排卵誘発を行うと決めた時点の卵巣卵径、並びに卵成熟の指標となる卵内の油球の融合度と、ステロイド投与によって排卵が起こったか否かについて整理を行った (図 24)。

排卵誘発処理によって最終成熟が誘起されて排卵した個体としなかった個体とを比較したところ、排卵誘発を行うと決定した時点での排卵個体の卵巣卵径は $882\sim 1,012\mu\text{m}$ 、成熟ステージは 5~9 であり、この条件内であれば排卵の条件として卵径とステージとの間に負の相関がみられた。

(1)-3 成果の副次的効果、今後の計画等

我が国では、飼育環境下では成熟しない養殖対象魚として、ニホンウナギの成熟促進技術の開発が50年以上に渡って行われてきた。ニホンウナギの場合は成熟の開始とともに淡水から海水に移行して産卵回遊を行うが、海水に移動する下りウナギの成熟度は著しく低い。しかし、これらの魚に生殖腺刺激ホルモンを投与することにより、比較的容易に雌雄の成熟が起こり、受精卵の確保、ふ化仔魚の飼育、そして成魚、親魚までの飼育にも成功している。



図 23. マアナゴ雌の最終成熟・排卵の誘起方法.

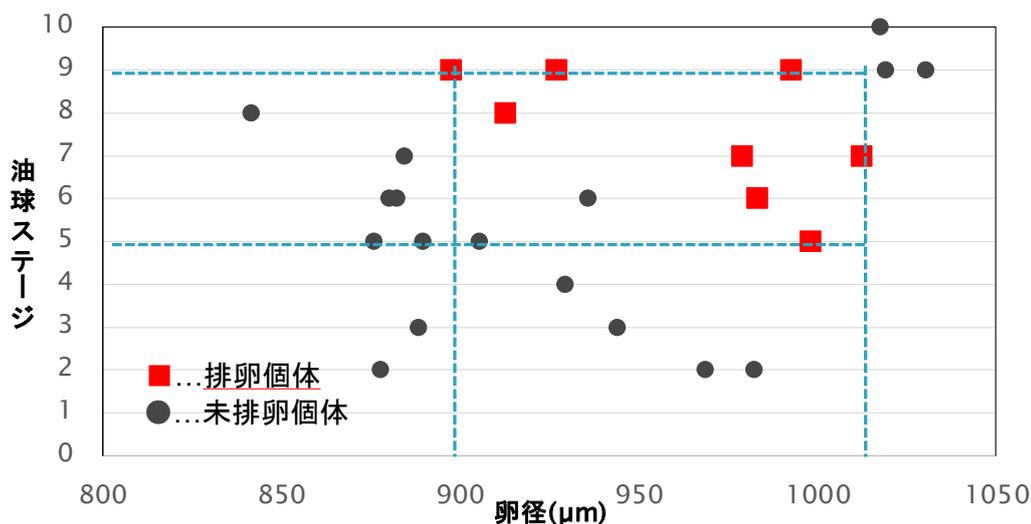


図 24. 排卵誘発開始時点の卵巣卵の最大卵径と卵の油球ステージ
排卵個体と未排卵個体の比較.

本研究で催熟を試みたマアナゴは、飼育環境下で雄は排精し、雌も卵黄形成の中期までの成熟が進行することが明らかとなった。しかし、それら成熟を開始した雌雄は、水温の

上昇とともに成熟を停止し，冬期までに成熟は退行現象を起こした。本研究では，このようなマアナゴ親魚に対し，外因性のホルモン投与による催熟を種々の成熟段階において試みた。その結果，ヒト由来の生殖腺刺激ホルモンである hCG の注射投与では急激な大量死が起こること，同じウナギ目のニホンウナギ由来の rLH の注射投与により排卵に至る個体を得ること，卵巢卵の卵径が 900～1,000 μm ，油球のステージが 5～9 の範囲にある時に排卵誘導を行えば良いことなどが明らかとなった。

今後は，排卵後の受精率や発生率を決定する卵質の改善を指標として，ホルモンの投与時期や投与方法についてさらに詳細な検討を行う必要がある。

テーマ1：完全養殖システムの構築

研究課題: (2) 病原体の生態および感染機構の解明と疾病防除

研究機関・研究室名：水産研究所・白浜実験場

感染症は持続的養殖の最も大きな阻害要因の一つである。ウイルス、細菌、寄生虫等による疾病は魚類養殖に付き纏う深刻な問題であり、これらの感染症対策については、それに要する費用が養殖経営の大きな負担となっているだけでなく、養殖魚という食品の安全かつ持続的生産に関わる重大な課題として挙げられる。現在、ウイルスや細菌性の疾病に対してはワクチン接種による予防や薬剤による治療が行われているが、新興・再興感染症に対して研究を進め、新たに水産用医薬品として承認されるまでには莫大なコストと時間を要する。国内の水産養殖では対象魚種は多岐に亘るが個々の生産量は比較的小さいため、多くの魚種や疾病に対しては開発コストの回収が見込めないことから、医薬品による対策を進められないという問題が起こっている。また、既知の重要疾病の対策が進んだ結果、弱病原性細菌による日和見感染症の被害が拡大しつつある。複数菌種の混合感染や他の疾病との併発がしばしば見られるうえ、多種多様な潜在的病原体が養殖環境中に常在しているため、現在主流となっているワクチンによる特異的な予防法の適用が困難であり、使用可能な抗菌剤に限られることもあって対応に苦慮している。一方、寄生虫疾病は多くの養殖場で慢性的な問題となっているにも関わらず、使用できる薬剤も少なく、有効な予防法も無い。そのため、養殖業者は限られた方法で何とか対応しているのが現状である。本研究ではこれらの感染症に対する新しい防除法の開発に向け、養殖環境下における病原体の生態、環境条件と養殖魚の管理方法との相互関係を解明することで感染症被害を軽減し、薬剤に頼らない実用的な養殖技術の確立を目的とした。

研究課題: (2) 病原体の生態および感染機構の解明と疾病防除

(2)-1 病原体の生態解明と疾病予防

研究機関・研究室名：水産研究所・白浜実験場

担当者職名・氏名：水産研究所・白浜実験場・准教授 白樫正

研究協力者：阿川泰夫，石谷浩江，坂本泰祐，平野千早，三浦真由子，山本修平

(2)-1 目的

寄生虫による感染症は全ての養殖場で見られる慢性的な疾病である。ウイルスや細菌と異なり、寄生虫に対するワクチン開発は極めて困難であるため、有効な予防策は無く、現状での対策は魚に寄生した虫体を薬剤で駆虫する対処療法的なものにほぼ限られている。寄生虫疾病の中でも魚の体表に寄生し、一般的に「ハダムシ」と呼ばれるカプサラ科単生類による感染症は海面魚類養殖の黎明期から現在に至るまで、養殖魚の生育や健康を害する疾病として問題となっている。現在のハダムシ対策は寄生された魚を過酸化水素水や淡水に浸けて体表上の虫体を駆虫する薬浴や淡水浴が主であるが、作業には多大な時間、労力、コストが掛かるだけでなく、魚体に対するストレスも大きく、魚の成長や生残にも悪影響を及ぼす。そのため、養殖場では新しい防除法の開発が強く求められている。ハダムシは魚を唯一の宿主とする単純な生活環を持ち、養殖環境で増殖し易い。駆虫しても魚は

すぐに再寄生されるため、増殖が盛んな時期には頻繁な駆虫作業が必要となる。ワクチンによる予防は実現困難であるため、ハダムシの生態を利用した生態的防除法の開発が期待される。しかし、ハダムシの生態については知見が少なく、特に近年問題となっている *Neobenedenia girellae* に関する生物学的情報は限られている。本種は 90 年代に輸入カンパチ稚魚と共に中国から侵入し、現在では西日本の養殖場に蔓延している。宿主特異性が低く、主要な海産養殖魚の多くに寄生する。増殖が早く、高水温期には爆発的に増えるため、養殖業者は駆虫作業に追われる。寄生を予防するためには、生活環を断ち切る必要があるが、そのためには生態を詳細に調べる必要がある。そこで本研究ではハダムシ、特に *N. girellae* について、その生態や養殖場における感染機構を調査し、得られた知見を基に新しい防除法を開発に向けた実験を行った。

(2)-1 研究方法

1) ハダムシ *Neobenedenia girellae* の産卵とふ化の日周リズムの解明

ハダムシ *N. girellae* に寄生されたカンパチ稚魚 1 尾を、透明もしくは黒色プラスチックコンテナに収容し、2 時間毎にコンテナ内の水から虫卵を回収して、室内自然光下と暗黒下における *N. girellae* 産卵数の経時変化を 76 時間調べた（水温 25~26°C）。実験は各光条件で、別の供試魚個体を用いて 3 反復行い、実験終了時に魚体に寄生していた成虫数から 1 虫体あたりの産卵数を推定した。また、成虫 1 個体が寄生した場合の産卵数を調べるため、カンパチに寄生していた *N. girellae* 成虫 1 個体をブラックモーリーに移植し、同様の方法で 2 時間毎の産卵数を調べた。さらに、ふ化の日周リズムを調べるため、6 穴ウェルプレートに *N. girellae* 虫卵を収容し、2 時間毎にふ化した幼生数を数えた。この実験は室内自然光下と明暗期を調節した LED 照明下（12L:2D, 24L:0D, 0L:24D）で行った。

2) 生簀網上におけるハダムシ *Neobenedenia girellae* 虫卵の蓄積と分布状況の把握

養殖生簀網上に付着するハダムシ虫卵の分布状況を把握するため、実際の養殖場で実験を行った。2014 年 9 月~10 月に *N. girellae* の寄生がみられたカンパチ養殖生簀内側の四方側面に縦 20 cm×横 30 cm、目合い約 2.5 mm のナイロン製モジ網を鉛直方向に約 60cm 間隔で取り付け、2 もしくは 3 日後に網上に付着蓄積した虫卵を数えた。虫卵計数の際には無作為に選んだ 5cm 四方の網を 6 ヶ所を切り出し、虫卵を網から外して実体顕微鏡下で数えた。この実験は 2 回繰り返した。

3) 海水中からのハダムシ *Neobenedenia girellae* ふ化幼生の定量検出系の確立

養殖場周辺の海水中に存在するハダムシふ化幼生を定量的に検出する方法として、ミトコンドリア Cytochrome b 遺伝子を対象として、*Neobenedenia* に特異的なリアルタイム PCR 系を作製した。特異性の確認には、日本国内で見られるハダムシ 4 種（*Benedenia seriola*, *B. epinepheli*, *B. hoshinai*, *B. sekii*）を用いた。既知数の *N. girellae* ふ化幼生から抽出した DNA を基に、対象遺伝子座のコピー数を算出し、定量検出系を作製した。海水中のふ化幼生定量検出のため、カンパチ養殖生簀（遮光生簀と非遮光生簀）内部 3 ヶ所から採取した表層海水 2L を 5µm のメンブレンフィルターで濾過し、抽出した DNA を新しく確立したリアルタイム PCR に供して *N. girellae* ふ化幼生密度を算出した。

4) 漁網防汚剤と銅合金網によるハダムシ虫卵への影響

2)の結果から、ハダムシの主な供給源は生簀網上に蓄積する虫卵であることが明らかになったため、虫卵の付着阻害とふ化抑制を目的に、漁網防汚剤と銅合金網による虫卵への影響を調べた。養殖生簀に使用されている化学繊維製の生簀網約 20×20cm に、水溶性銅系漁網防汚剤をドブ漬け処理した。対照区として無処理の網を用い、それぞれ 1 枚ずつをハダムシ *N. girellae* もしくは *B. seriolae* が寄生しているカンパチ飼育水槽に同時に 2 日間垂下し、虫卵を付着させた。その後、各網上の無作為に選んだ 10 ヶ所から網地 2cm 上の虫卵を採取し、実体顕微鏡下で写真撮影して PC 上で付着虫卵数とふ化した虫卵の割合を求めた。また、銅合金網における *N. girellae* 虫卵の付着とふ化についても、同様の方法で化繊網との比較試験を行った。

5) 銅合金網生簀によるハダムシ被害軽減効果の検証

銅合金製の生簀網を使用することで、ハダムシ被害を軽減できるかを調べるため、実際に約 5 ヶ月間のカンパチ飼育試験を実施した。試験では、新しく養殖生簀用に開発された銅合金製 2 基（銅 1 区、銅 2 区）、従来の銅合金である真鍮製生簀 1 基（真鍮区）、現在最も普及している金網生簀である亜鉛メッキ鋼線製生簀 1 基（亜鉛区）と化繊生簀 1 基（化繊区）を設置した。各生簀にカンパチ稚魚 250 尾を收容し、原則週 1 回各生簀から 10 尾ずつをサンプリングしてハダムシの寄生状況を調べた。また、各生簀における飼育成績（成長生残）および、生簀網への付着物蓄積状況についても調べた。

(2)-1 結果と考察

1) ハダムシ *Neobenedenia girellae* の産卵とふ化の日周リズムの解明

これまでブリ類に寄生するエラムシでは暗期に転じた直後に産卵が多いという報告がある。また、バラマンディに寄生したハダムシ *Neobenedenia* sp. では深夜に産卵のピークが有る等、明白な産卵の日周リズムが示されている単生類もある。しかし、本研究において、*N. girellae* は光条件に関わらず、常に虫卵を産出しており、明確な産卵の日周期は認められなかった（図 1）。これは虫体が複数寄生したカンパチでも、1 虫体を移植寄生させたブラックモーリーでも同様であった。このような日周リズムの無い、常時産卵する生殖生態はブリハダムシ *Benedenia seriolae* でも報告されており、これらのハダムシ種は魚体上で成熟した後はできるだけ多くの卵を産出するために、昼夜に関係なく、産卵をし続けていると思われる。今回の実験から、*N. girellae* の平均産卵数は 1 時間あたり 20 個程度であり、最多では約 1 分毎に虫卵を産する事が可能であることが明らかとなり、成虫 1 個体から 1 日 700 個以上の虫卵が放出されることも分かった。このため、*N. girellae* の寄生が多い高水温期には夥しい数の虫卵が養殖場海域に放出され、爆発的な増殖が起これると考えられる。

産卵とは異なり、*N. girellae* 卵のふ化には明白な日周リズムが見られた。ふ化は 1 日 1 回、午前中の比較的早い時間にピークがあった（図 2）。実験を実施した時期により、ふ化のピークには数時間の違いが見られたが、これは日照時間や照度が異なったためだと考え

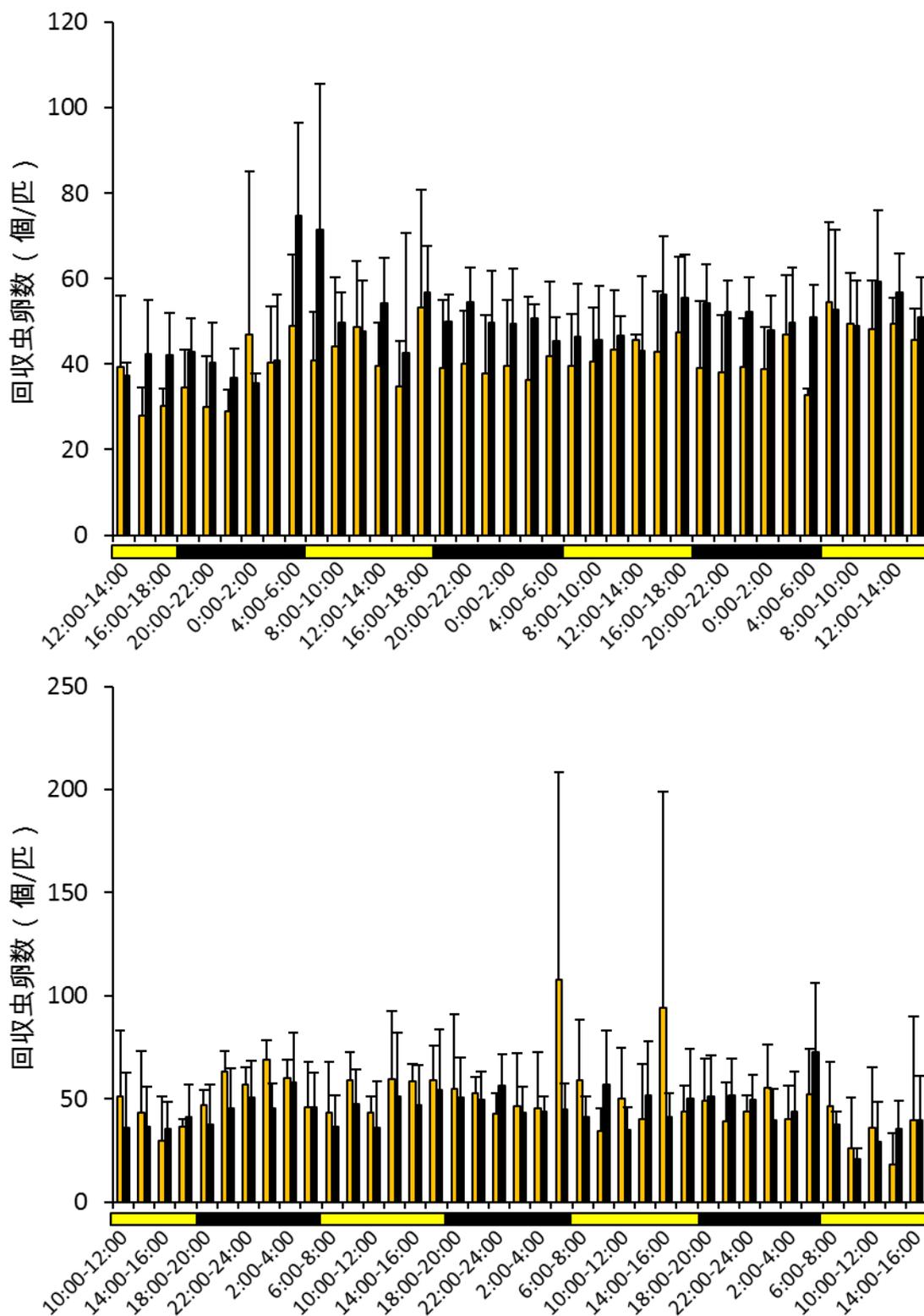


図 1. ハダムシ *Neobenedenia girellae* が複数寄生したカンパチ(上)と1虫体寄生のブラックモーリ(下)から2時間毎に回収した平均虫卵数(+SD)。オレンジの棒は室内自然光下, 黒棒は暗黒条件下を示す。図下部の横棒は明暗期を示す。

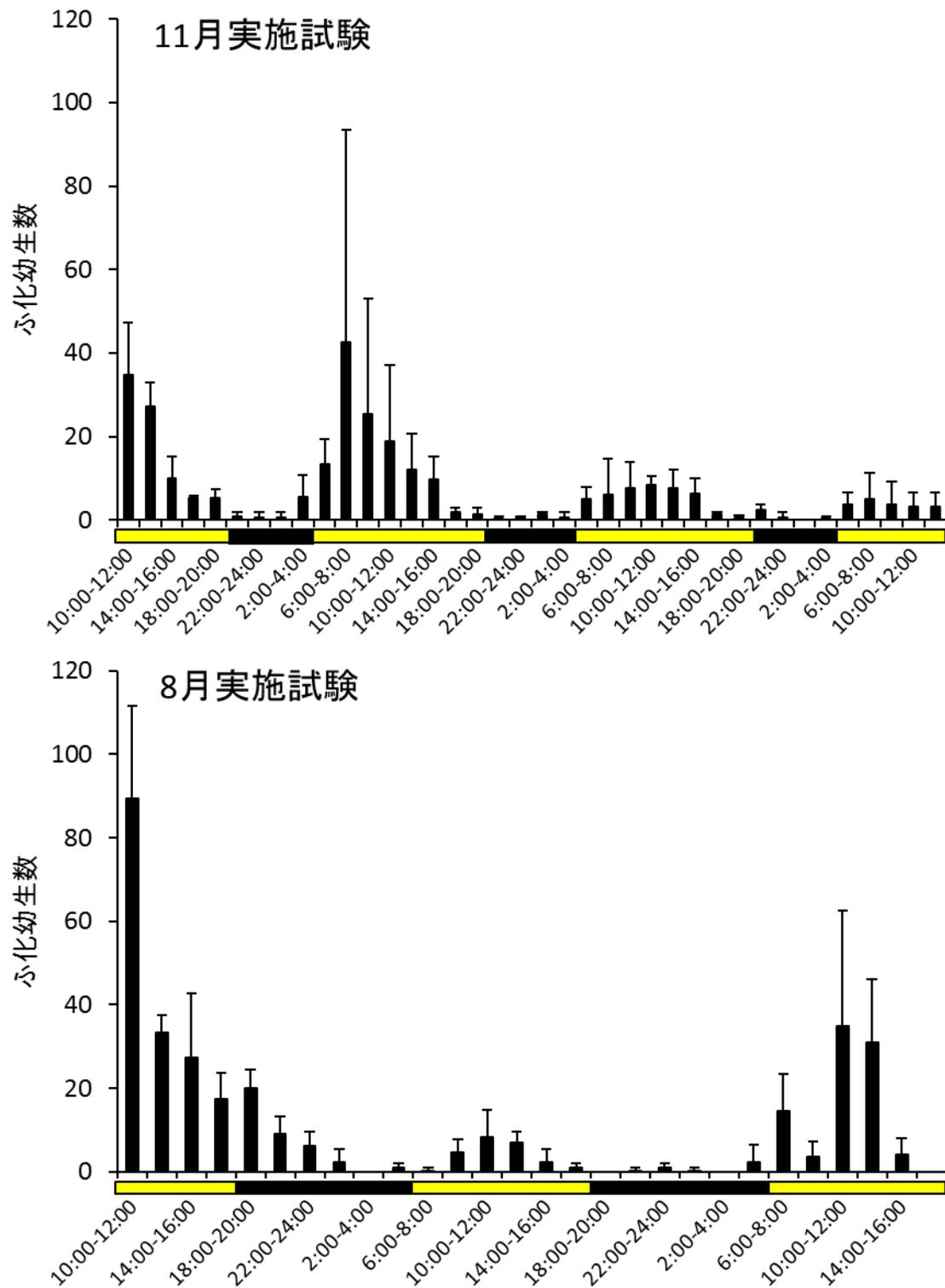


図 2. 自然光下における、時間帯別のハダムシ *Neobenedenia girellae* ふ化幼生平均回収数(+SD)。異なる時期に実施した 2 試験の結果を示し、図下部の横棒はそれぞれの時期における明暗期を示す。

られる。*Neobenedenia* sp.では光を当てて3時間以内にふ化が最も多いとの報告があり、今回の試験結果とほぼ一致する。また、夜間には殆どふ化が見られなかった。これは養殖場における魚への*N. girellae*寄生が午前中に最も多く、夜間の寄生は極めて少ないという過去の研究結果と合致する。一方、ブリハダムシのふ化は早朝と夕方に1日2回ピークが有ることが知られており、ハダムシは種によってふ化の日周リズムが異なることが判明した。ハダムシふ化幼生には眼点と呼ばれる光受容器官があるため、光刺激を受けてふ化するものと考えられる。一般的にハダムシふ化幼生の寿命は短く、ふ化後速やかに宿主である魚に寄生する必要がある。今回見られたような、ふ化の日周リズムは自然界で微小なふ化幼生が宿主である魚に遭遇する確率を高めるための適応だと考えられる。一方、LED照明下でのふ化は電照開始後に最も多い傾向が見られたが、明確なふ化リズムは認められなかった。自然光下と比べるとLED照明下でのふ化は少なく、ふ化には特定の光波長もしくは照度が重要なカギとなっている可能性も考えられた。

これら一連の試験により、*N. girellae*のふ化には光が重要であることが示されたため、例えば遮光や電照等によって養殖場の光環境を制御することで、ふ化の抑制やふ化のピークを潮通しが良く魚への寄生が困難な時間帯にずらすことでハダムシ被害軽減ができるかもしれない。一方、光環境の制御による産卵抑制は困難であることが明らかになったため、産出された虫卵を除去もしくは殺滅する方法の検討が必要であると考えられた。

2) 生簀網上におけるハダムシ *Neobenedenia girellae* 虫卵の蓄積と分布状況の把握

ハダムシが寄生したカンパチ養殖生簀網上には多数の虫卵が蓄積していた。試験に用いたモジ網5cm四方には1日で平均472.0±838.7個、最多で8058個の虫卵が付着した。この数を基に、生簀網全体（底面を覗いた4側面）の蓄積虫卵数を算出すると、平均で1日約3000万個、寄生が多い場合は5000万個以上になると推定された。これまでも生簀網に絡まる虫卵はハダムシの発生源として認識され、虫卵除去の重要性が提言されていたが、今回初めて具体的な虫卵蓄積量が明らかとなったことで、その重要性が再認識された。しかし、生簀網全体の清掃や交換には費用や労力を要するため、より効率的な虫卵除去法が求められる。そのため、本試験では虫卵が集中している場所（水深帯）についても調べた。

今回の試験では虫卵の鉛直分布には明白な偏りがみられた（図3）。虫卵蓄積率が最も高かったのは表層付近の水深0-20cmで、全体の約5割から8割程度の虫卵がこの水深帯に蓄積していた。それ以降は水深が増すごとに蓄積率は減少したが、生簀底面付近の水深帯240-260cmでは表層に次いで2番めに虫卵が多く、全体の1割~2割程度が蓄積していた。生簀網の上面部にハダムシ虫卵が多いという報告は過去にもあり、今回の試験結果はこれを支持した。虫卵は海水より比重が高いため通常では下に沈み、生簀下部に蓄積するはずである。おそらく摂餌等魚が水面付近で活発に行動する際に、虫体から虫卵の塊が脱落し生簀網に付着したと考えられる。また、魚の遊泳により起こった水流で虫卵が上面に巻き上がり、網に絡まった可能性もある。

虫卵の分布状況は生簀内で飼育している魚の行動生態と密接な関係があり、魚種によって異なると考えられるが、少なくともカンパチでは半数以上の虫卵が生簀上部に集中していることが示されたため、化繊生簀の場合は網の上部を一時的に空中に露出し、太陽光に当てて虫卵を乾燥死滅させることで、生簀網全体を交換せずとも、ある程度寄生を減らす

ことが可能であると考えられる。また、金網生簀の場合にも、上部を集中的に清掃することで、清掃に掛かる労力や、ハダムシ被害を軽減できると考えられる。

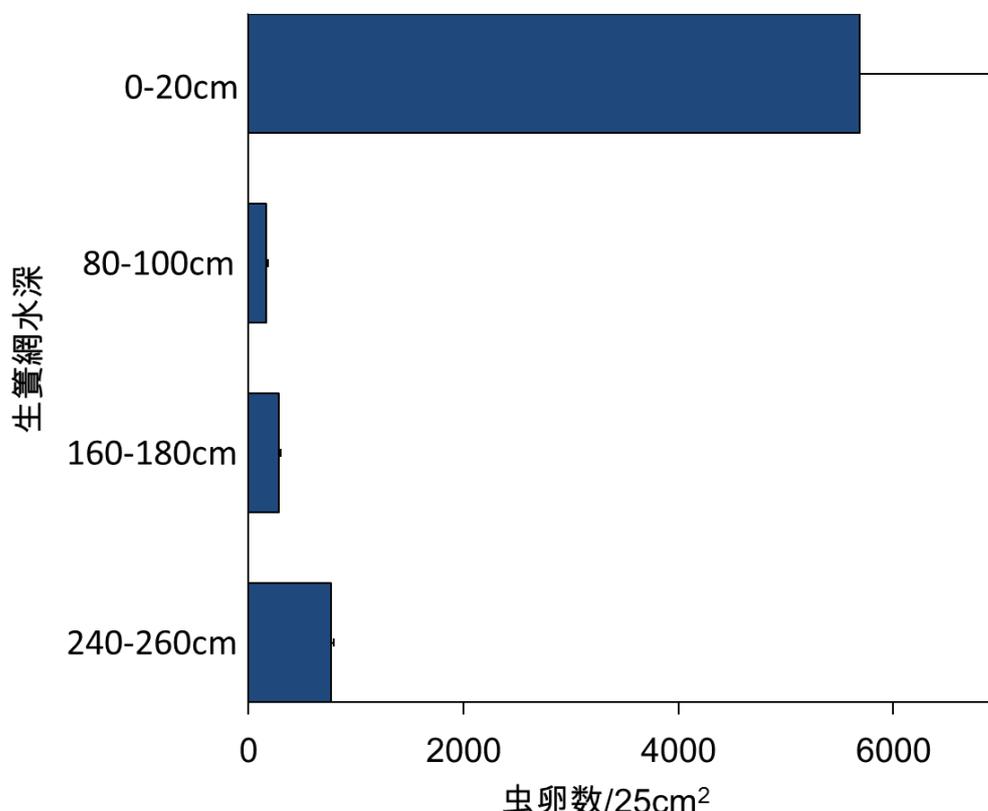


図 3. 養殖生簀網上 5cm 四方に蓄積した、水深別のハダムシ *Neobenedenia girellae* 平均虫卵数 (+SD)。

3) 海水中からのハダムシ *Neobenedenia girellae* ふ化幼生の定量検出系の確立

今回ミトコンドリア Cytochrome b 遺伝子を対象に作製したプライマーでは *N. girellae* 以外の日本の養殖場で見られる主要ハダムシ 4 種の遺伝子は増幅せず、本リアルタイム PCR の特異性が確認された。*B. seriola* に対しては鋳型 DNA 量が多い場合に限って僅かな非特異的増幅がみられたが、ポリアクリルアミド電気泳動又は melting point 解析によって、容易に識別可能であった。これにより、*Neobenedenia* を特異的に検出可能なリアルタイム PCR 系が確立された。しかし、*Neobenedenia* 属の分類については現在も混乱しており、日本や中国で見られる *N. girellae* と豪州や中南米等から報告のある *N. melleni* や *Neobenedenia* sp. が別種かどうかははっきりしていない。今回確立したリアルタイム PCR 系でも、*N. girellae* 以外の *Neobenedenia* 種の DNA 増幅が起こると考えられるが、少なくとも日本国内の養殖場では *N. girellae* 以外の *Neobenedenia* 種は確認されておらず、実用上の問題は少ないと考えられる。また、本リアルタイム PCR における検出感度は対象遺伝子座 500 コピー以上であることが示された。既知数のふ化幼生から算定した *N. girellae* ふ化幼生 1 匹あたりの対象 DNA は 220 万コピーと推定されたため、ふ化幼生 1 匹から抽出した鋳型を用いた場合にも十分検出可能である事が示された。

確立した定量 PCR 系を用いて、養殖生簀内海水中の *N. girellae* 遺伝子の定量検出を行った結果、遮光生簀、非遮光生簀両方において、それぞれ 2ヶ所から遺伝子が検出された（表

1)。定量 PCR の結果から算出した海水 1l 中のふ化幼生数は遮光生簀内の方が非遮光生簀に比べ半分程度と少なく、遮光によりふ化幼生の密度が低下することが示された。これまでの実験でも生簀を遮光し照度を下げることでハダムシ寄生が軽減できることは示されており、その理由としてふ化幼生の走光性により、より明るい生簀外に幼生が遊出すると考えられていた。本研究の結果はこれを支持するものであり、海水中のハダムシ幼生密度を定量的に検査できる系が整ったと言える。

今回確立した定量 PCR により、養殖場による *N. girellae* ふ化幼生の分布状況を迅速且つ簡便に定量検出できる事が示された。これにより、ハダムシの被害予測や魚を用いない寄生状況アッセイ系への応用が期待できる。しかし一方、海水中には PCR を阻害する物質が多く含まれており、その多寡は時期や環境によって大きく異なる。この定量 PCR 系についても、更に調査を実施し、精度を確認する必要がある。

表 1. 遮光生簀と非遮光生簀内の表層海水中におけるハダムシ *Neobenedenia girellae* 遺伝子量と推定ふ化幼生数。

| | 遮光生簀 | | | 非遮光生簀 | | | | |
|----|---------------------------|-------|------|-------------------------|---------------------------|--------|-------|-------------------------|
| | DNA ^a ng/ml | コピー数 | S.D. | 幼生数 ^b 匹/l | DNA ^a ng/ml | コピー数 | S.D. | 幼生数 ^b 匹/l |
| 北 | 28.1 | 254.9 | 40.1 | 0.22 | 40.4 | 1128.9 | 156.2 | 0.99 |
| 中央 | 27.3 | 462.5 | 82.7 | 0.41 | 29.3 | 687.6 | 35.0 | 0.60 |
| 南 | 44.6 | ND | | | 31.9 | ND | | |

ND: 非検出, コピー数: 算定コピー数, a フィルターからの抽出精製 DNA 濃度, b 海水 1l 中の算定幼生数

4) 漁網防汚剤と銅合金網によるハダムシ虫卵への影響

防汚塗料を塗布した化繊生簀網への *N. girellae* 虫卵付着数は平均 1263.5 ± 270.0 個/2cm であったのに対し、未処理網では約 30% 程度多い 1639.5 ± 223.5 個/2cm であり、防汚剤処理により虫卵の蓄積率が若干減少した。これはおそらく塗料によって網地の隙間が埋まり、虫卵が絡み難くなったためだと考えられる。また、*B. seriolae* 虫卵については、化繊網を防汚処理することで、ふ化率が平均 8% 程度低下した。一方、*N. girellae* 虫卵では防汚剤によるふ化への影響は認められなかった。これらの結果から、化繊網を銅系防汚剤で処理することで、虫卵の蓄積やふ化をある程度阻害できる可能性が示されたが、その影響は僅かであり、ハダムシ被害を軽減できる程の効果は無いと考えられた。通常化繊網では付着生物等による汚れが蓄積した場合には網交換を行うが、防汚剤処理によりその頻度が低下する。そのため、防汚処理した生簀網ではかえってハダムシ被害が増加する可能性もある。防汚処理はハダムシ虫卵への影響が少ないことを念頭に定期的な交換や乾燥による虫卵殺滅を実施することが重要だと考えられる。

化繊網と銅合金網における *N. girellae* 虫卵付着数はそれぞれ 390.5 ± 132.6 個と 358.6 ± 258.2 個/2cm であり、殆ど違いは無かった。しかし、化繊網では虫卵が網地全体に絡む様に密着していたのに対し、銅合金網では網目の間を跨ぐように緩く付着していた (図 4)。

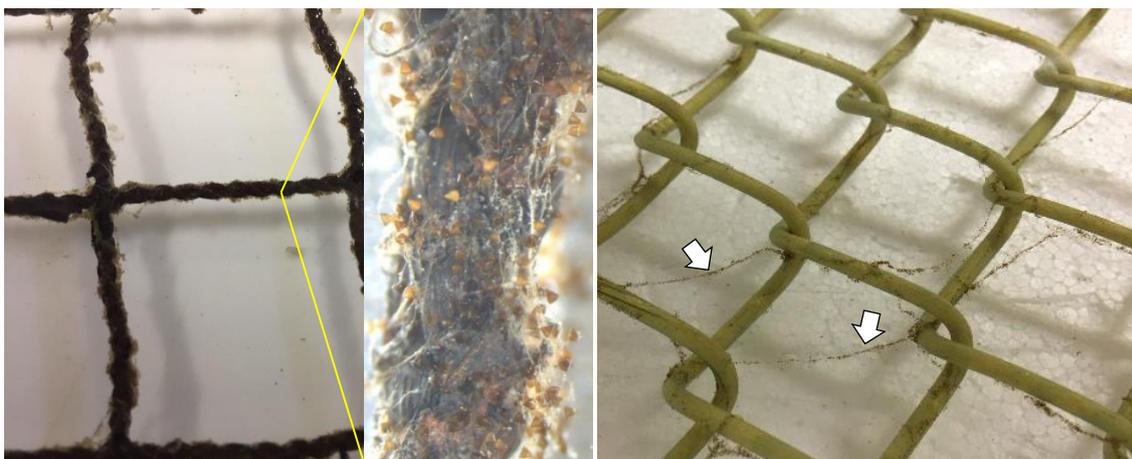


図 4. 化繊網(左)の網地に密着するように付着したハダムシ *Neobenedenia girellae* 虫卵と銅合金網の目を跨ぐように絡まっている虫卵(右, 矢印)。

このことから、海面では銅合金網に付着した虫卵は潮流等により除去され易いと考えられた。実際海面で行った実験では、銅合金網へのハダムシ虫卵付着数は化繊網に比べ著しく少ないとの報告もあり、銅合金を使用することで生簀内の虫卵蓄積を軽減できる可能性が示された。さらに、銅合金網に付着した虫卵では著しいふ化阻害が見られた。化繊網上の虫卵はほぼ全てがふ化していたのに対し（平均ふ化率 95.9%）、銅合金網上の虫卵ふ化率は1%程度と著しく低く、銅合金網による顕著なふ化抑制効果が認められた（図 5）。これはおそらく溶解した銅の毒性により虫卵が死滅したと考えられる。

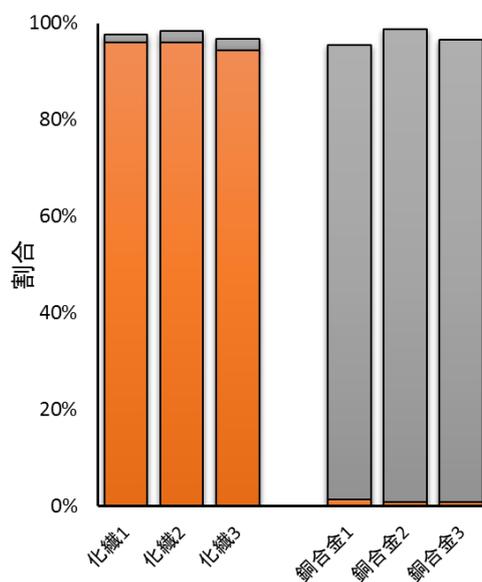


図 5. 化繊網と銅合金網上のハダムシ *Neobenedenia girellae* 虫卵におけるふ化(オレンジ)と未ふ化(グレー)卵の割合。

上記 2) の結果からも、養殖場では生簀網上に蓄積する膨大な数の虫卵がハダムシ発生源となっていると思われる。本研究の結果から、生簀に銅合金素材の網を用いる事で、生簀網への虫卵付着を軽減すると同時に、付着した虫卵のふ化も阻害し、ハダムシ被害の軽減に繋がると考えられる。実際 80 年代まで毒性の強い有機スズ系防汚剤を使用していた時期にはハダムシ被害が著しく減少した。現在金属生簀網には主に亜鉛メッキ鋼が用いられているが、これには銅の様な虫卵に対する毒性は期待できない。今後は生簀網素材を検討することで、ハダムシだけでなく類似の生活環を持つ他の寄生虫についても被害を軽減できる可能性がある。

5) 銅合金網生簀によるハダムシ被害軽減効果の検証

水槽実験において、銅合金網によるハダムシ虫卵への影響が認められたことから、実際に銅合金製生簀網を用いて、海面での飼育試験を行った。異なる素材の生簀網で約 5 ヶ月間カンパチ稚魚を飼育した結果、化繊網生簀では金網生簀に比べてハダムシ寄生が著しく多いことが示された（図 6）。また、金網生簀では銅を含む真鍮と銅合金での寄生数が比較的少ない傾向がみられたが、同じ銅合金生簀である銅 1 区と銅 2 区では結果が著しく異なっていた。供試魚の生存率もハダムシ寄生の多寡に準じ、寄生が多かった化繊、銅 2 区および亜鉛区では魚がほぼ全滅したのに対し、寄生が比較的少なかった銅 1 区と真鍮区では半数近くが生存した（図 7）。死亡魚の体表には擦過傷が多く見られており、ハダムシ寄生により、魚体を生簀網に擦りつけた事によるスレが原因で死亡したと考えられた。

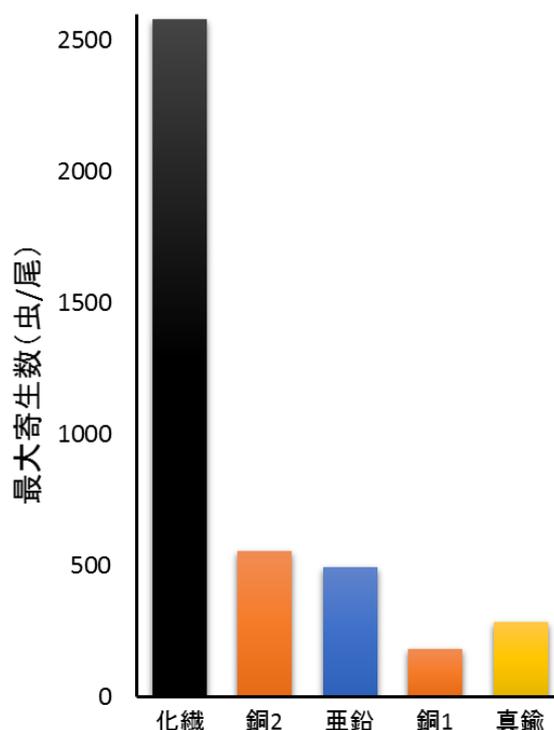


図 6. 各試験生簀で認められたハダムシ *Neobenedenia girellae* の最大寄生数。

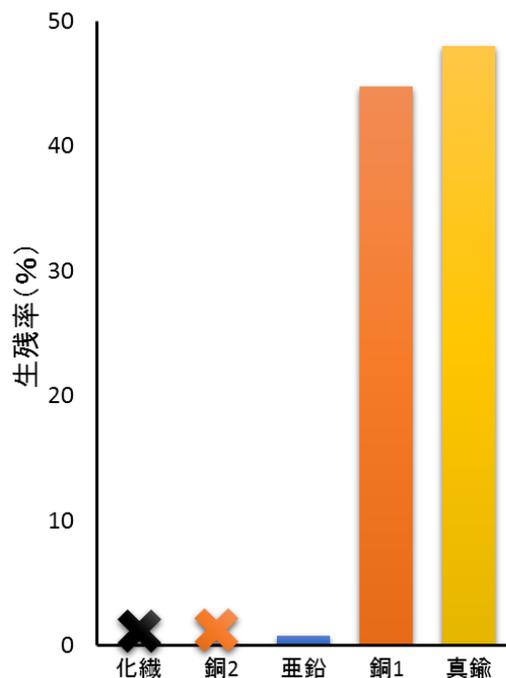


図 7. 各試験生簀における試験 5 ヶ月後のカンパチ生存率。×印は全滅を表す。

特に死亡が多かった生簀では、付着生物の蓄積が多くみられた。化繊区、銅 2 区、亜鉛区では試験開始後からカサネカンザシやフサコケムシの付着が目立ち、試験 50 日目の化繊区と銅 2 区は生簀網ほぼ全面を付着物が覆っていた（図 8）。亜鉛区でも同様に付着物の蓄積が見られたが、場所によってその度合は異なっていた。一方、真鍮区と銅 2 区では付着生物が殆ど無く、試験終了時においても、若干のフサコケムシ以外に汚れは見られなかった。おそらく銅の毒性によって付着生物が着生しなかったためだと考えられるが、同じ銅合金製の銅 2 区では付着生物の著しい蓄積がみられた。試験後の成分検査では両銅区に用いた素材に違いは認められなかったが、銅 2 区では線径が減少しておらず、何らかの理由により銅の溶解が起きず、防汚効果が発揮されなかったことが、両区の違いの原因と考えられた。

本試験の結果から、付着生物により生簀網が汚れることで、虫卵が絡まりやすくなると同時に潮通しが悪化してハダムシ寄生が増え、魚が体をカサネカンザシのような硬い付着物に擦りつけることにより死亡が増加する、といった、生簀の汚れ、ハダムシ寄生、魚の生残の 3 者の相互関係が明らかとなった。言い換えれば銅合金素材により付着生物やハダムシ虫卵の蓄積を軽減できれば、被害を大幅に軽減できる事が分かった。しかし、今回の試験では何らかの理由により銅の溶解が起きず、被害が大きいケースがあった。今後銅合金生簀の効果的な実用化には、この理由を解明することが重要であると思われる。

(2)-1 成果の副次的効果、今後の計画等

今回の一連の研究により、これまで詳細が不明であったハダムシ *Neobenedenia girellae* の産卵やふ化といった生物学的な特性が明らかになった。虫卵のふ化には光が重要な役割を示していることが分かり、今後光波長や照度といった光環境をコントロールすることで、

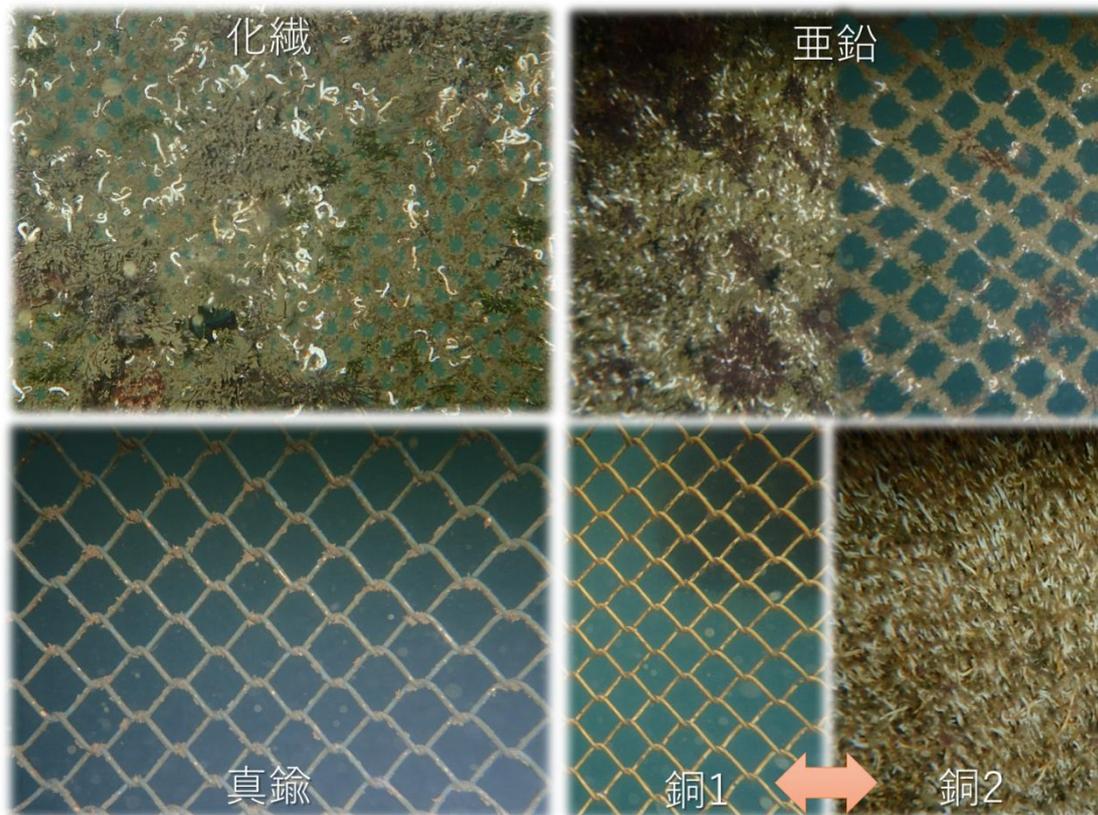


図 8. 試験 50 日目における各生簀の汚れ具合。化繊(左上), 亜鉛(右上), 銅 2 区(右下)では白いカサネカンザシの棲管や赤褐色のフサコケムシの蓄積が目立ち、網目が見えない程付着している箇所もあった。一方真鍮(左下)および銅 1 区(下中)では汚れが殆どなかった。

虫卵のふ化を制御する新しい防除法に繋がる知見を得ることができた。また、生簀網上で虫卵蓄積率や分布の偏りを明らかにすることで、養殖業者に対し虫卵除去の重要性を説く定量的なデータが得られるとともに、より効率良い虫卵除去法の開発に繋がる知見を集積した。今後はこれらの基礎データを基に実際に養殖場で実施可能な防除方法開発に向けて研究を継続する予定である。これまで、寄生虫の感染状況を知るためには魚を用いたバイオアッセイが主であったが、時間や手間が掛かるといった問題があった。今回定量 PCR 系を用いたハダムシ幼生定量検出系を開発したことにより、迅速且つ簡便に寄生状況を把握する新しい手段を手に入れた。同様の方法はハダムシ以外にも多くの寄生虫や病原体への応用も可能であり、今後広く用いられると思われる。実用的なハダムシ防除対策としては、銅合金製生簀による飼育法を提案する。本研究では室内試験によるメカニズムの解明（虫卵の付着とふ化阻害）と海面飼育試験による実用性評価を実施し、ある程度実用性があることを確認した。今後は他の寄生虫種に対する銅合金生簀の効果についても検証試験

完全養殖システムの構築
病原体の生態解明と疾病予防（白樫）

を行い、対費用効果からその実用性と普及の可能性を探りたいと考える。これらの一連の研究により、薬剤を用いた駆虫が主であったハダムシ対策について、寄生の予防という可能性を示し、養殖場における寄生虫疾病対策の新しい道を開いた。

テーマ1：完全養殖システムの構築

研究課題: (2) 病原体の生態および感染機構の解明と疾病防除

(2)－2 養殖魚の疾病発症機構の解明

研究機関・研究室名：水産研究所・白浜実験場

担当者職名・氏名：水産研究所・白浜実験場・講師 石丸克也

研究協力者：池上 祐馬

(2)-2 目的

従来進められてきた個別の疾病に対する対策、特に特異的な予防法であるワクチンでは、養殖環境に常在する多様かつ複数種の条件性病原体に起因する日和見感染への対処は困難である。適用可能な抗菌剤が存在しない事例も多く、あったとしても経口投与剤に限られるため摂餌活性が低下する発症魚群の治療には限界がある。そのため、魚類の日和見感染起因菌が持つ特性を把握し、共通する性状を探索して防除法を検討すると共に、対応する魚側の防御機構を向上させることで被害の軽減を目指すことが求められている。本小課題では、まず短期間で実用化が期待できる手法として、既に研究が進められつつある免疫賦活剤(飼料添加物)について検討した。予備的な検討の過程で、マンノクリーンβが海産魚の白点病による被害の軽減に有効であることが示唆されたため、以降はその点に集中して検討を進めた。海産魚の白点病は原虫の一種であるシオミズハクテンチュウ(*Cryptocaryon irritans*)の寄生によって起こる。当初の目的である日和見細菌感染症には該当しないが、時に数百億円に上る大きな被害を出し、その生態的特徴から有効な対策が困難な重要疾病である。

日和見感染症に関しては、現状を把握するとともに対策を進めるための起点とすることを目的として、海産養殖魚由来の原因菌株を多数収集し、生化学的性状や病原性について比較検討を行った。現状では実用的な細菌の病原性評価法は生体を用いた攻撃試験に限られているが、海水養殖対象魚種を供試魚とする場合、生産時期の季節性などのため条件を揃えた魚群の安定供給は事実上不可能である。さらに、スクリーニングのために多くの魚群を飼育するには大規模な設備が必要となる。そこで、規格化された個体群を常時供給可能、かつ簡易な小規模設備で大量飼育可能な魚種として海水馴致したクロメダカを選定し、海産魚由来細菌の病原性評価に使用可能かどうか評価した。また、種苗生産の初期飼育では、対象魚の免疫能が未発達であることから日和見感染による減耗が特に大きな問題となっている。その一方で、小規模かつ制御可能な環境で飼育されていることから、人為的に細菌相を制御することで減耗を軽減可能であると期待される。現状の初期飼育では、紫外線やオゾン等で殺菌処理した飼育水を中和・無害化したうえで供給することで外来細菌の侵入を阻止しているが、潜在的な病原細菌を飼育槽内から完全に排除することは極めて困難である。そこで、飼育槽内で低レベルの殺菌(静菌)環境を維持することで、細菌の増殖等の活動を抑制し、感染症の発生を防ぐことが可能であるかどうか、予備的な検討を行った。

(2)-2 研究方法

1) 酵素処理ヤシ粕経口投与によるシオミズハクテンチュウの寄生軽減効果の確認

マンノクリーンβ(酵素処理ヤシ粕・不二製油)のマダイ稚魚への経口投与により、自然感染時のシオミズハクテンチュウ寄生数が顕著に減少する事例(図9)が見られたため、その寄生軽減効果を確認するため以下の実験を行った。

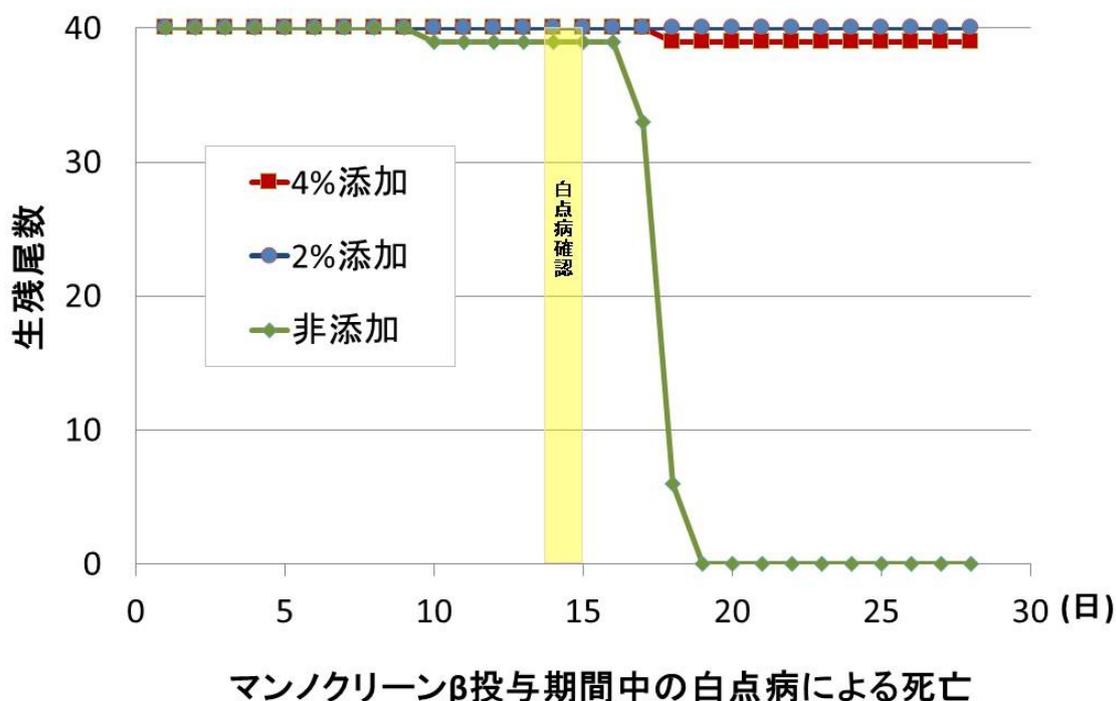


図9. マンノクリーンβ添加飼料を給餌したマダイ稚魚で自然発病した白点病による生残尾数の推移

投与区の試験飼料として、粉碎して60 mesh(網目250 μm)の篩を通過させたマンノクリーンβを市販配合飼料に対して重量比で4%展着したものを用意した。展着には飼料重量比で1%のカルボキシメチルセルロースと10%の蒸留水を用いた。対照区の飼料には、展着処理のみ施した。マダイ稚魚に対して、基礎飼料重量として毎日体重の3%を給餌した。15~26日間の継続投与後、投与区、対照区を各3水槽に分割収容し、シオミズハクテンチュウで浸漬攻撃を行った。近大水研白浜実験場で採取し冷蔵保存しておいたトモント(シスト)を常温に戻し、放出されたセロント(寄生期の仔虫)を3時間以内に攻撃に用いた。攻撃は200Lパンライト水槽内の海水75~100Lに約220虫/尾のセロントを投入して行い、2時間後に水量200Lまで注水して、以降は止水で管理した。1または2日毎に全水槽を交換したが、その際に底部に付着していたトモント全数をプラスチック製のヘラで剥離し、洗浄回収して計数した。試験は3回実施し、開始時魚体重、供試尾数、前投与期間、観察期間中の平均水温はそれぞれ、(1)6.8g、20尾*6水槽、21日、16.9℃、(2)11.6g、30尾*6水槽、15日、16.2℃、(3)14.5g、30尾*6水槽、26日、15.7℃であった。前投与期間が実験ごとに異なるのは、必要量のセロントを予定どおりに用意するのが困難であったためである。

2) 酵素処理ヤシ粕経口投与のマダイ稚魚体表粘液量に対する影響

マンノクリーンβ経口投与によるシオミズハクテンチュウ寄生軽減効果の主体が体表粘

液量の増加によるものと推察されたため、投与後のマダイ稚魚体表粘液量を直接定量して比較した。

投与区にはマンノクリーンβの4%添加飼料を、対照区には非添加飼料を14日間・毎日体重の3%給餌した後、体表粘液を採取した。採取前の粘液剥離を防ぐため、飼育水槽内に直接麻酔薬2-フェノキシエタノールを投与し、供試魚の遊泳が停止してから鰓蓋にフックをかけて引き上げた。空中に30秒間露出して体表に付着した海水の流失を待ったのち、台の上に横臥させた。五角形の穴を開けた食品用ラップフィルムとパラフィルムで構成した採取用具(図10)を用いて、左体側の軀幹部中央に面積10cm²の範囲を露出させ、該当範囲の体表粘液をセルスクレーパー(Ref 353085, BD Falcon。先端ゴム幅18mm)で掻き取った(図11)。スクレーパーの体表への押しつけ圧は90~110g重程度とした。採取した粘液は、水分の蒸発を避けるためウェットチャンバーに収容し、研究室に移送した。ラップフィルム上に集めた粘液は、採取時に用いたスクレーパーでパラフィルム小片上に全量に移してから電子天秤(NL-200, Shimadzu, 感量0.1mg)で秤量した。試験は各区20尾で3回実施した。3回目の試験では、塩化リゾチーム製剤(水産用ポトチーム, あすかアニマルヘルス)を規定量(日量3%給餌時, 飼料に対して1.33%)展着した飼料を給餌するポトチーム区を追加で設けた。供試魚の平均体重は103~138g, 期間中の平均水温は18.3~23.7°Cであった。

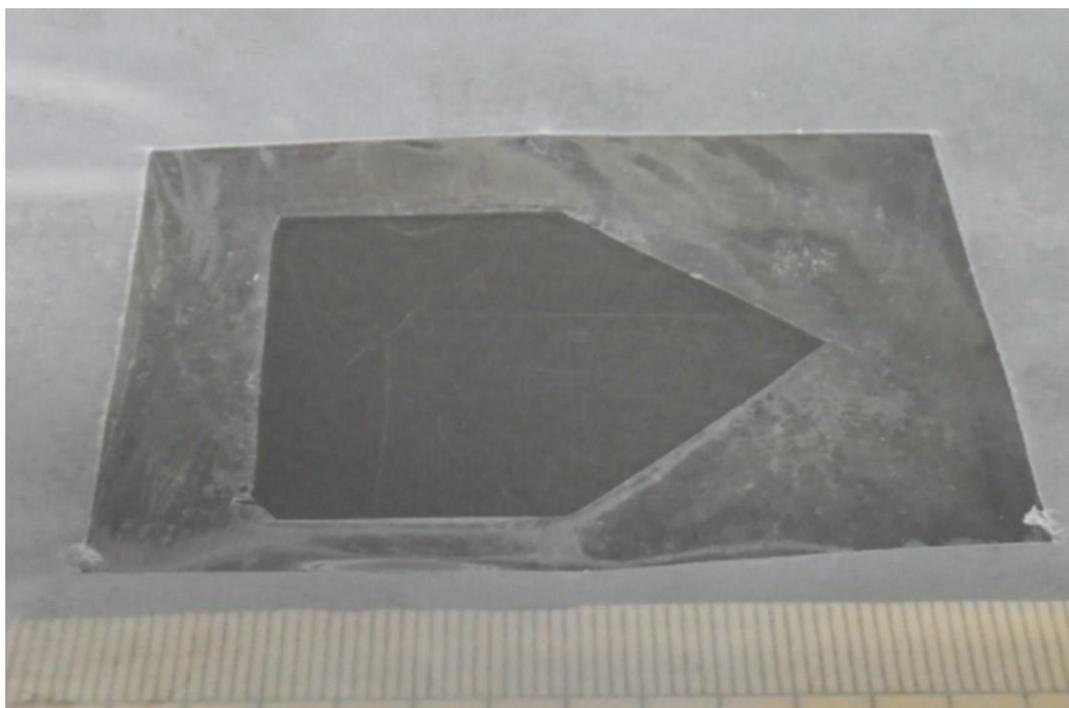


図10. 体表粘液採取用具

3) 海産魚の日和見感染起因菌株の収集と生化学的性状評価

水産研究所の各実験場・事業場および西日本各地の養殖場から様々な魚種の罹病魚を採取し、感染している菌株を分離・収集した。生化学的性状は BIOLOG GN プレートで検査

したが、供試菌体の懸濁液としては 4 倍希釈した滅菌人工海水を用いた。一部の菌株については 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を解析し、菌種の同定を行った。

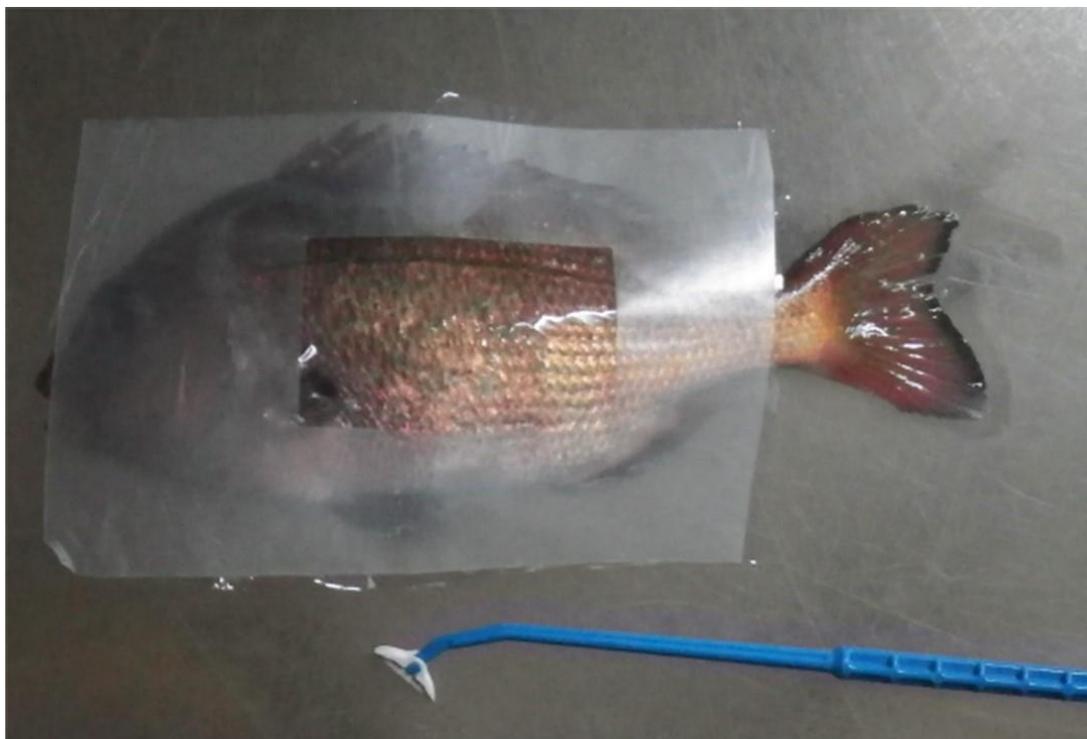


図 11. 体表粘液採取の様子

4) 海水馴致したクロメダカを用いた病原性評価法の検討

【試験 1】和歌山県田辺市産のクロメダカ（ミナミメダカ, *Oryzias latipes*）を淡水中で継代飼育しておき、海水に 1 週間以上馴致した成魚を用いた。比較対象として体重 20g 程度のマダイ稚魚も供試した。収集したマダイ稚魚分離菌株のうち、マダイ稚魚に対する浸漬感染で確認した病原株・非病原株各 6 株を選定し、海水馴致クロメダカおよびマダイ稚魚各 10 尾に対して菌濃度 10^7 cfu/mL、暴露時間 60 分の浸漬攻撃を行い、水温 22°C 前後で 1 週間経過観察して結果を比較した。

【試験 2】馴致したクロメダカは海水中で産卵・ふ化が可能であるため、海水中で発生した 2 日齢の仔魚についても浸漬攻撃による評価を行った。比較対象として、海水馴致クロメダカ成魚および体重約 12g のマダイ稚魚も供試した。供試菌株として、感染症が疑われるヒラメまたはアユの仔魚から分離した細菌 9 株を用意し、菌濃度 10^7 cfu/mL、暴露時間 60 分の浸漬攻撃を行い、水温 25°C で 1 週間経過観察して結果を比較した。メダカ成魚およびマダイ稚魚については、それぞれ 10^4 cfu/尾および 10^5 cfu/尾で腹腔内注射攻撃も行い、浸漬と同様に観察した。全ての試験には各 10 尾の魚を使用した。

5) 過酸化水素の連続添加がマダイ稚魚および飼育水中細菌へ及ぼす影響の評価

飼育槽内で殺菌活性を維持する手法として、水産用医薬品(外部駆虫薬)の主成分であり、

食品添加物としても使用される過酸化水素を選定し、飼育槽への給水に連続添加した。予備的な検討の結果、10ppmで4日間曝露してもマダイ稚魚に異常が見られなかったことから、濃度を5ppmに設定して2ヶ月間の試験を実施した。

試験には500L透明パンライト水槽を2基用いた。それぞれを対照区および過酸化水素添加区(試験区)とし換水率が1000%/日になるように設定した。試験区には、常時5ppmの過酸化水素が注入されるように注水口付近に薬剤注入用のホースを差し込み、ダイヤフラムポンプ(タクミナ製, パルス30)で送り込んだ。連続的に薬剤添加する機構は、天候の影響により注水が止まったり停電が起こった際に、薬剤が過剰注入されるような事故を軽減できるように考慮して、飼育水を送るためのタンク(200L水槽)や自動停止機能付きの投げ込みポンプを用いた。薬剤用のタンク(バケツ)は飼育水用のタンク内に浮かべることで、注水停止時に薬剤だけが注入されるのを防ぐような対策を取った。供試魚としてマダイ稚魚(全長9cm)を各水槽に22尾ずつ収容した。給餌は一日2回行い、一日あたり収容総魚体重に対して3%となる量を給餌した。給餌前に、水質計を用いて水温、pH、溶存酸素濃度の3項目について測定し、さらに水槽飼育水を50mLサンプリングし硫酸チタン試薬を用いて水槽内過酸化水素濃度を測定した。各水槽にはエアーレーションを施し、水槽掃除は適宜おこなった。給餌量を算出するために、試験開始から約2週間飼育したところで一度全個体の体測を行った。飼育開始から3週間後に、各水槽の水をサンプリングし0~1000倍程度まで希釈したものを培地上に0.1mL滴下し、滅菌コンラージ棒で塗抹して25°Cの恒温機内で1~2日間静置し各水槽の菌数を比較した。一般細菌の計数には普通寒天培地(蒸留水および2倍希釈海水で調製)、ビブリオ属細菌にはTCBS培地を用いた。

(2)-2 結果と考察

1) 酵素処理ヤシ粕経口投与によるシオミズハクテンチュウの寄生軽減効果の確認

各区3水槽のトモント産生数(平均±標準偏差)は、[実験1]では投与区39.0±5.20個、対照区61.3±13.3個で有意差は見られなかった(*t*検定, $p=0.054$)が、[実験2]では投与区5.7±2.5個、対照区10.3±0.6個、[実験3]では投与区20.2±4.5個、対照区38.3±8.5個となり、いずれも投与区で有意に少なかった(*t*検定, $p=0.035$ および 0.032)。この結果から、マンノクリーンβの経口投与によりマダイ稚魚でシオミズハクテンチュウ攻撃後の寄生数が減少することが確認された(表2)。

表2. マダイ稚魚に対するマンノクリーンβの経口投与が、人為攻撃後のシオミズハクテンチュウのトモント産生数に及ぼす影響

| | トモント産生数(平均±SD) | | | t検定 | 開始時 平均体重 | 攻撃前 投与期間 | 平均 水温 |
|---|----------------|-------------|-----|-----------|-------------|-------------|----------|
| | マンノクリーン(4%) | 非投与対照 | 比 | | | | |
| ① | 39.0±5.20 個 | 61.3±13.3 個 | 64% | $p=0.054$ | 6.8 g | 21日 | 16.9°C |
| ② | 5.7±2.5 個 | 10.3±0.6 個 | 55% | $p=0.035$ | 11.6 g | 15日 | 16.2°C |
| ③ | 20.2±4.5 個 | 38.3±8.5 個 | 53% | $p=0.032$ | 14.5 g | 26日 | 15.7°C |

本実験では1または2日毎にトモントを回収しているため、人為攻撃からトモント産生(宿主からの離脱)までの期間、すなわち寄生期間を算出可能である。各区3水槽ごとの値を平均±標準偏差で示すと(表3), [実験1]では投与区 10.9±0.1日, 対照区 11.2±0.7日, [実験2]では投与区 9.6±0.9日, 対照区 9.4±0.7日, [実験3]では投与区 10.2±0.6日, 対照区 10.2±0.2日となり, 3回の実験のいずれにも有意差は見られなかった(t検定, $p=0.440, 0.796, 0.902$)。シオミズハクテンチュウのトロホント(栄養体)は, 充分成長すると自発的に宿主から離脱し, 水底や生簀網に付着してトモントを形成する。この寄生期間に差が見られなかったことから, マダイ寄生後のシオミズハクテンチュウの成長速度やその他の生理的な状態に, 投与区と対照区の間で大きな差は無かったと考えられる。従って, マンノクリーンβの経口投与による寄生数の軽減は, 寄生確立後の脱落等では無く, 寄生時の定着阻害によるものであると推定できる。

表3. マダイ稚魚に対するマンノクリーンβの経口投与が, 人為攻撃後のシオミズハクテンチュウの寄生期間に及ぼす影響

| | 寄生期間(平均±SD) | | | t検定 | 開始時 平均体重 | 攻撃前 投与期間 | 平均 水温 |
|---|-------------|-----------|------|-----------|-------------|-------------|----------|
| | マンノクリーン(4%) | 非投与対照 | = 比 | | | | |
| ① | 10.9±0.1日 | 11.2±0.7日 | 97% | $p=0.440$ | 6.8g | 21日 | 16.9°C |
| ② | 9.6±0.9日 | 9.4±0.7日 | 102% | $p=0.796$ | 11.6g | 15日 | 16.2°C |
| ③ | 10.2±0.6日 | 10.2±0.2日 | 100% | $p=0.902$ | 14.5g | 26日 | 15.7°C |

2) 酵素処理ヤシ粕経口投与のマダイ稚魚体表粘液量に対する影響

体重200g程度のマダイ稚魚に対してマンノクリーンβを2週間投与した予備的検討において, 魚体表面の触感に明瞭な差が感じられたことから, 体表の粘液量に差が現れることが推定された。そこで体重100g超のマダイ稚魚を用いて躯幹中央部10cm²あたりの粘液量を厳密に比較したところ(表4), 対照区に対する投与区の平均粘液量の区間比は, 1.71, 1.21, 1.50となり, 21~71%の増加が見られた(t検定, $p<0.000, =0.055$ および <0.000)。また, ポトチーム区は対照区に対して46%増加していたがマンノクリーンβ投与区との間に有意差は無かった($p=0.737$)。

表4. マダイ稚魚に対するマンノクリーンβと水産用ポトチームの経口投与が, 体表粘液量に及ぼす影響

| | 粘液量(mg/10cm ²) 平均±標準偏差 | | | 比 | 開始時 平均体重 | 平均 水温 |
|---|------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------|-------------|----------|
| | マンノクリーン(4%) | 非投与対照 | ポトチーム(1.33%) | | | |
| ① | 40.9±8.8 ^a | 28.6±7.3 ^b | - | 171:100 | 103g | 23.7°C |
| ② | 29.4±8.9 ^a | 24.3±7.3 ^a | - | 121:100 | 138g | 18.3°C |
| ③ | 30.7±9.0 ^a | 20.5±6.7 ^b | 29.9±6.7 ^a | 150:100:146 | 135g | 19.1°C |

a,b: 同一文字間に有意差無し ($p>0.05$)

マンノクリーンβをマダイ稚魚に経口投与すると、シオミズハクテンチュウ人為攻撃時の寄生数が減少することを確認したが、これは体表への付着/定着阻害によるものと推定される。しかしマンノクリーンβの純水抽出液を海水に添加した簡易的な検討ではセロントの運動に影響が見られなかったことから、シオミズハクテンチュウに対して直接作用する生理活性物質が定着阻害に関係している可能性は小さいと考えられる。体表粘液は非特異的な免疫の最初のステップである物理的障壁として働いており、塩化リゾチーム製剤の経口投与により粘液量を増加させるとシオミズハクテンチュウの寄生が軽減することが知られている。一例のみの比較ではあるが、この効能で承認された医薬品である水産用ポトチームと同程度の粘液量増加が見られたことから、マンノクリーンβの経口投与においても本試験で確認した体表の粘液量増加により、シオミズハクテンチュウのセロントが魚体表面に付着することを妨げられたと考えられる。寄生数軽減の確認実験では、供試魚が小さいほど効果が小さい傾向が見られたが(表3)、通常時の体表粘液が少ない小型魚では、一定の比率で粘液量が増加しても、セロントの付着を阻害するのに必要な閾値に達しなかったと考えれば矛盾なく説明できる。

マンノクリーンβおよび水産用ポトチームは、いずれも体表粘液を増加させてシオミズハクテンチュウの寄生を軽減すると考えられる。しかし水産用ポトチームは医薬品であることと高価であることから、予防的に長期投与することは出来ない。抗炎症作用や殺菌作用を併せ持つことから、重篤寄生時の被害軽減を目的とした治療的な使用に限定される。その点、パーム油の絞りかすを発酵させたマンノクリーンβは安価に供給可能であり、予防的に常用することで養殖環境中での虫体蓄積を抑制し、大規模な発病を防止することが期待できる。すでに畜産・養鶏分野では飼料添加物として使用されており、ヒトに対する安全性についても問題ないことが確認されている。

3) 海産魚の日和見感染起因菌株の収集と生化学的性状評価

マダイ稚魚を主として計12魚種の海産養殖魚から800株を越える菌株を収集した。生化学的性状検査および遺伝学的な同定は現在も進行中であるが、過去の検討から想定されたとおり *Vibrio harveyi* およびその近縁種が高頻度に確認されている。また、マダイイリドウイルス病に罹病したクロマグロ魚群から、*Vibrio gigantes* またはその近縁種がしばしば分離されており、少なくともその被害の一部にこれらの細菌感染が関与していることが疑われる。海面養殖における日和見的な細菌感染症については、詳細な検討なしに「ビブリオ病」として処理される事例が少なからず見られるが、多様な菌種やそれらの混合感染による発症例も多数確認されており、対策を進める上ではさらに実態の解明を進める必要がある。

4) 海水馴致したクロメダカを用いた病原性評価法の検討

【試験1】病原性株6株については、マダイで6株、メダカで5株が40%以上の死亡率を示した。残るメダカの1株についても、死亡はしなかったものの腹部膨満や軽度の出血等の病徴が認められた。非病原性株6株は両魚種共に明瞭な異常は認められなかったが、メダカの1株で遊泳が不活発となり、攻撃1週間後の細菌学的検査により感染が確認された。病原細菌の宿主特異性は寄生虫などと比べて弱いものがほとんどであり、本試験において

も両魚種間で概ね一致した結果が見られたことから、病原性のスクリーニング程度であれば海水馴致クロメダカを海産養殖魚種の代替として使用しても大きな問題は無いと判断される。

【試験 2】メダカ成魚およびマダイ稚魚では供試 9 株の全てにおいて浸漬・注射いずれの攻撃でも異常は見られなかったが、メダカ仔魚では 3 株で 60%以上の高い死亡率が見られた。一般に仔魚は免疫能や常在細菌相が未完成であるため、病原性が極めて弱い細菌による感染が起こりうる。罹病状況から細菌感染が原因であると疑われる事例が頻発するが、分離した細菌の病原性を確認できないことが多い。本試験では海水メダカ仔魚を用いることで、一般的な方法では判別出来なかった極弱病原性株を検出可能であることを示すことが出来た。

クロメダカは省スペースで長期・大量の飼育が容易であり、遺伝的背景が明確な近交系が多数存在することから、実験動物として広く利用されている。特定のサイズを周年容易に入手可能であり、適応温度域が広い点でも養殖対象魚種より扱いやすい。また、二次性淡水魚であり、野外でも河口から海水域への進出が見られるほど海水適応力も高い。本研究で用いた系統は、10 時間程度の短期間でも淡水から海水へ問題なく馴致可能であることから、平時は淡水で飼育しておき、必要に応じて海水馴致して用いることが容易である。海水と淡水では常在する細菌相が異なり、淡水魚と海産魚でも消化管内細菌相が大きく異なることが知られているが、海水馴致クロメダカの場合、海産魚の病原菌となりうる菌種に汚染されている可能性が低いという利点がある。海産魚型の腸内細菌相のもとで評価したい場合には、一定期間海水で飼育した後に使用することで対応可能である。小型水槽内で維持継代できることから、必要に応じて SPF (Specific Pathogen Free) 魚も容易に準備できる。さらに、海水中での産卵・ふ化も可能であることから、希望する日齢の海水飼育されている仔魚を周年にわたり容易に供給可能である点は、他魚種では得られない大きな利点である。注射や採血、臓器の採材が困難ではあるが、病原性のスクリーニングにおいては特に問題とはならない。目的によっては特定魚種での病原性試験が必要な場合があり、海水馴致メダカも万能とは言えないが、海産魚類に対する病原性を多数の菌株でスクリーニングするには極めて優れた評価指標として使用可能である。

5) 過酸化水素製剤の連続添加がマダイ稚魚および飼育水中細菌へ及ぼす影響の評価

試験期間中の平均過酸化水素濃度は 5.85ppm であり、概ね設定通りに維持できた。過酸化水素添加区の溶存酸素濃度は、対照区と比べて期間平均で約 0.4mg/L 高かったが、pH(7.8~8.0)および水温(22.3~16.4℃)に差は無かった。2 ヶ月間の飼育では添加区に外観的な異常は認められず、両区間に成長の差も無かった。筋肉中の残留過酸化水素濃度は両区共に検出限界付近で差は見られなかった。ガス病の症状を示して死亡した個体が添加区で 2 尾、対照区で 4 尾見られたが、過酸化水素添加の影響では無いと判断された。その他には、対照区で 2 尾、滑走細菌症による死亡および数尾の発症魚が見られたが、添加区では発症魚も確認されなかった。この結果により、過酸化水素の 5ppm 常時添加により、滑走細菌症の発生を抑制可能であると考えられた。

試験開始 3 週間後の生菌数は、飼育施設内の水槽に供給されている海水(飼育原水)に比べて対照区の水槽内では一般細菌、ビブリオ属細菌ともに菌数が高くなる傾向がみられ

た。一方、試験区（過酸化水素添加区）では対照区に比べて一般細菌数が半減し、ビブリオ属細菌については検出限界未満にまで減少していた(図 12)。

また、目視による判定ではあるが、試験期間を通じて添加区の水槽は内壁や底面などの汚れが対象区と比較して明らかに少なかった。種苗生産の陸上水槽飼育では、藍藻やバイオフィーム・フロック形成菌による種々の悪影響が知られているが、過酸化水素の常時添加によりこれらの抑制が期待できる。

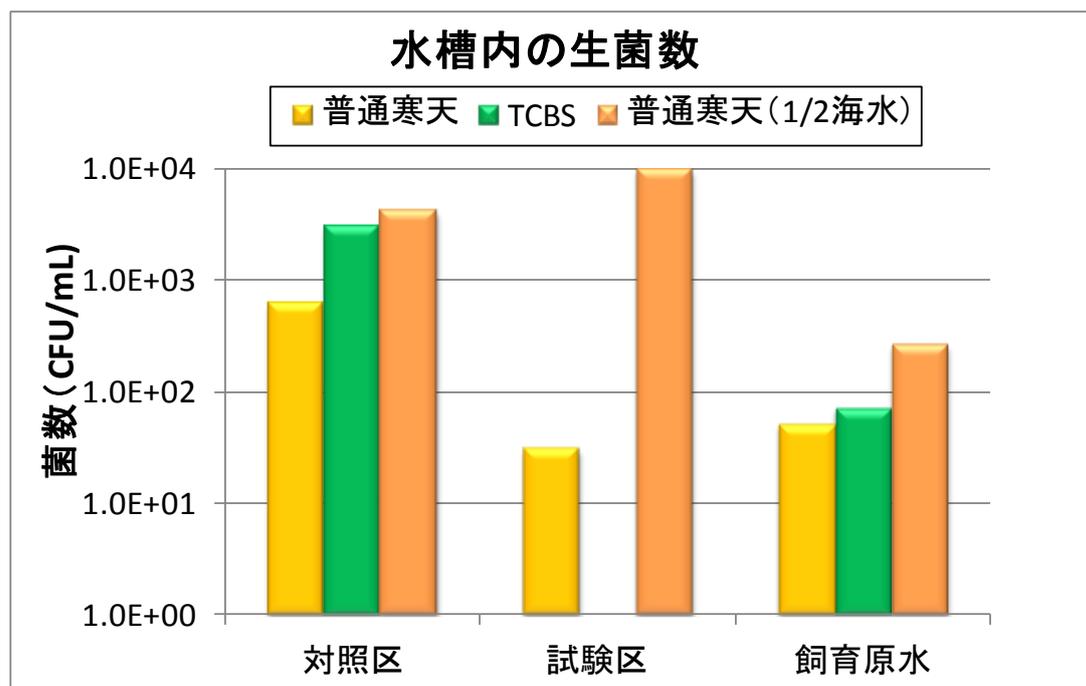


図 11. 対照水槽，過酸化水素 5ppm 添加水槽および水槽への供給水中の細菌密度(試験開始 3 週間後)

(2)-2 成果の副次的効果，今後の計画等

時に数百億円の被害をもたらし海面養殖で大きな問題となっている海産魚の白点病に対しては、未だに実用的な対策が無い。海底に沈んだトモント(シスト)の状態では生活環の大半を過ごし増殖も行っていることから、魚体寄生時の駆虫では根治療法とはならず、養殖環境中での虫体蓄積を抑制し、大規模な発病を防止することが必要となる。マンノクリーンβの経口投与はその一環として有効であると期待される。実用化を前提として特許を出願済であるが(特願 2016-054449)、魚病学会での発表後、飼料会社や養殖業者から多くの問い合わせがあり、大規模な野外試験の計画が進められている。

日和見細菌による感染症については、開放系での養殖では避けることが出来ず、個別の重要疾病の対策が全て確立された後も問題となり続けると予想される。人では既にその様な状況になりつつあるが、魚類養殖においても従来考えられている以上に大きな問題となっていることが本研究によって示唆された。実用的な対策確立のためにはさらに多くの研究が必要であるが、当面はマダイ稚魚のビブリオ病に焦点を当てて検討を継続する予定である。現在、マダイ稚魚の滑走細菌症浸漬ワクチンの実用化に向けて準備中であるが、関

完全養殖システムの構築
養殖魚の疾病発症機構の解明(石丸)

連して「ビブリオ病」が多発することが知られている。マダイの種苗生産における減耗を総合的に防除するためには、日和見感染症への対策が不可欠である。

海水馴致したクロメダカを用いた病原性評価法は、大規模な海水飼育設備や海産稚魚の供給源を持たない研究施設でも容易に導入可能であり、新たな治療薬や免疫賦活剤の開発に際してもモデル魚として広く使われることが期待される。

陸上水槽飼育時の細菌相制御による減耗抑制についてはその可能性を示すことが出来た。本研究では試験的に過酸化水素添加について検討したが、実用化に当たっては薬剤の使用では無く、特定の菌株の添加や増殖促進による方法が望ましい。生細菌添加による方法では、消化管内での消化・吸収促進やビタミン等有用物質の産生、水質改善など、多様な効果についても期待できることから、この方向で継続して検討を進めていく予定である。

テーマ 1 : 完全養殖システムの構築

研究課題 : (3) DNA マーカーを用いた親魚管理

水産物の世界的な需要の高まりや、あまり消費していなかった新興国の発展等の影響で、世界に流通する水産物の約半分は養殖されたものになっている。当研究所では多魚種の完全養殖技術を確立し、天然稚魚に頼らない人工ふ化させた養殖生産のための稚魚を多数販売するに至っている。マダイは当研究所で長期にわたり、選抜育種がおこなわれ、天然稚魚よりも 2 倍程度成長の早い系群が確立された。一方で、海産魚類の選抜育種の例はまだ少なく、当研究所完全養殖クロマグロ(通称近大マグロ)や他魚種においても実施されていない例が多数である。成長が良い、見た目が美しい等の養殖魚の経済形質に連鎖した DNA(DNA マーカー)は、成長優良魚の選抜や優良魚を得るための親魚群編成する際の目印となる。当研究所保有のクロマグロとシマアジを用いて、経済形質に連鎖する DNA マーカーの有無と詳細を調査した。なお、クロマグロ魚群編成は、今日までヨコワを死なせないハンドリング、タグ装着技術が確立していないので行わなかった。

また、カンパチ種苗を用いて、まずは形態異常が環境要因であるのか、遺伝的要因なのかを知る目的で、異なる水槽壁面色で飼育試験を行い環境要因が形態異常に及ぼす影響を調査した。さらに、マダイにおける形態異常要因を知る目的で低酸素、高二酸化炭素海水で受精卵を暴露しその影響を調査した。

研究課題 : (3) DNA マーカーを用いた親魚管理

(3)-1 シマアジまだら個体に特徴的な DNA 断片の探索

研究機関・研究室名 : 水産研究所・大島実験場, 農学研究科・水産学専攻・水産増殖学研究室

担当者職名・氏名 : 大島実験場長・教授 澤田好史, 同助教 阿川泰夫

研究協力者 : 岡田貴彦, 片山茂和, 川原正人, 深見笑可, 戸瀬憲一, 田村利博, 柴田善正

(3)-1 目的

シマアジ (*Pseudocaranx dentex*)はスズキ目アジ科に分類される魚で、西部、中部太平洋や大西洋の熱帯、亜熱帯の沿岸域に生息する。本種はアジ科の中で最も美味とされ、戦後間もないころ千葉県で蓄養が開始され、その後 1955 年より近畿大学や東京都、静岡県、千葉県、宮崎県、大分県、長崎県などの水産試験場や漁業協同組合でも養成試験が着手された。現在ではシマアジの種苗生産は当研究所が国内 8 割を出荷している。シマアジ稚魚では、体表模様がまだらになり、見た目に悪そうな魚と判断されるまだら模様個体が携帯異常と分類される魚の 5%程度出現し、該当魚は経済的価値が低く、正常魚と一緒に出荷されると正常魚の価値を下げってしまう。シマアジまだら個体に特徴的な DNA マーカーがわかれば、保因の親を排除することでまだらの頻度を低下できると期待できる。よってシマアジまだら個体に特徴的な DNA マーカーの有無を調査した。

(3)-1 研究方法

2012 年産シマアジ人工孵化稚魚 (平均全長約 8 cm) を用いた。このシマアジ種苗は、2011 年 12 月 21 日採卵および同 22 日採卵の受精卵を陸上水槽にて飼育したもので、2012 年 4 月 14 日 (孵化後 113 および 114 日齢) に海上生簀で捕獲し、水中で写真撮影後 DNA 抽出まで冷凍保存した。実験には正常 8 尾、体色異常 (まだら模様, 図 1) 8 尾, 計 16 尾を用いた。

2012 年にシマアジ親魚群の変更があったため、2012 年産のみならず 2015 年産シマアジでも同様に実験を行った。



図 1. (左)シマアジまだら個体と(右)正常個体。
体長およそ 6 cm.

AFLP 解析による正常個体, まだら個体に特徴的な DNA 断片の探索

AFLP 解析は Vos ら (1995) の方法を基本に実施したが、使用する酵素の製造会社やユニット数を若干変更した。DNA 抽出はシマアジ正常個体とまだら個体それぞれ 8 個体の筋肉を約 50 mg 摘出し、DNeasy Blood and Tissue kit (キアゲン) を用いてプロトコルに従い DNA を抽出、精製した。そののち以下の様に処理をした。10 x T4 DNA ligase buffer 2.2 μ l (タカラバイオ), シマアジゲノム DNA 110 ng, 500 mM NaCl 2.0 μ l, BSA 1.0 μ g (ニッポンジーン), *Mse*I adaptor 10 pmol, *Eco*RI adaptor 1.0 pmol (Vos ら 1995), 12 U *Eco*RI (タカラバイオ) 及び 2 U *Mse*I (New England Biolab) を含む溶液に滅菌蒸留水を加え 21 μ l とし, 37 \square 2 時間保温後, 3.5 U/ μ l T4 DNA ligase 溶液 1.0 μ l (タカラバイオ, 希釈には 100 ng/ μ l BSA を含む 1 x T4 ligase buffer を用いた) を加え 22 μ l とし, 25 \square 15 時間保温した。保温後 TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) 溶液を 9 倍量 (198 μ l) 加え混合し, 10 倍希釈物とし -30 \square で冷凍保存した。

一次増幅

10 x Ex taq buffer 2.0 μ l, 2.5 mM each dNTPs 1.6 μ l, 5 pmol *Mse*I+C primer 5'-CGATGAGTCCTG-AGTAAC, 5 pmol *Eco*RI+A primer 5'-AGACTGCGTACCAATTCA, 0.5 U *Takara* Ex Taq (タカラバイオ), cut&ligation 反応液 10 倍希釈物 2.5 μ l を含む溶液を滅菌蒸留

水で 20.0 μ l とし 72°C で 3 分保温の後、20 サイクルの 94°C で 20 秒の変性、56°C で 30 秒のアニーリング、72°C で 1 分の伸長反応を行った後、72°C で 10 分保温した。保温後 TE 溶液を 9 倍量 (180 μ l) 加え混合し、10 倍希釈物として使用するまで -30°C で冷凍保存した。

二次増幅

10 x Ex taq buffer 2.0 μ l, 2.5 mM each dNTPs 1.6 μ l, 5 pmol *Mse*I+3C, 1 pmol *Eco*RI+3A primer, 0.5 U *Takara* Ex taq Hot Start Version (タカラバイオ), 1 次増幅産物の 10 倍希釈液 2.5 μ l を含む溶液を滅菌蒸留水で 20.0 μ l とした。プライマーは *Eco*RI+3A, *Mse*I+3C 各 8 種類の総当たりで 64 種類の組み合わせで行った。なお、*Eco*RI+3A プライマーとは、*Eco*RI+A プライマーの 3' 末端にそれぞれ CT, CG, CA, CC, GC, GT, GG, GA の塩基を付加した 8 種。同様に、*Mse*I+3C プライマーとは *Mse*I+C プライマーの 3' 末端に AA, AT, AG, AC, TA, TT, TG, TC の塩基を付加した 8 種である。PCR はステップダウン法を用いて行い、94°C で 1 分保温の後、94°C で 20 秒の変性、30 秒のアニーリング (温度は 65°C から 1 サイクル毎に 0.7°C ずつ下げた)、72°C で 1 分の伸長反応を 12 サイクル行った。その後 56°C のアニーリング温度で 18 サイクル行い、ステップダウンとの合計 30 サイクルとした。その後 72°C で 5 分の伸長反応を 1 サイクル行い、電気泳動時まで -30°C で保存した。プライマーはライフテクノロジー社より購入した。サーマルサイクラーは PC818 (アステック) を用いた。

電気泳動による AFLP 二次増幅産物の確認

AFLP 二次増幅産物は、自動電気泳動装置 MCE-202 Multi-NA (島津製作所) を用いて解析した。電気泳動担体には DNA-1000 分離バッファー (島津製作所) を用いた。観察されたバンドが正常個体群、体色異常個体群に偏っているか否かは χ^2 検定を用いて *P* 値を算出した。

(3)-1 結果と考察

1) 2012 年産シマアジ

正常 8 個体、体色異常 8 個体、計 16 個体を 64 プライマーセットで AFLP 二次増幅し、産物を自動電気泳動装置で泳動分析して 1, 114 の断片を検出した。そのうち 206 (18.5%) 断片に個体間での多型が見られた。64 プライマー対のうち、*Mse*I+CTA, *Eco*RI+ACA プライマー対を用いて得られた PCR 産物では、520 bp 付近に観察されるバンドが正常 8 個体中 4 個体に認められたが、体色異常 8 個体にはそれが認められず有意に頻度が偏っていた (χ^2 検定, *P*<0.05)。 *Mse*I+CAG, *Eco*RI+ACC プライマー対の PCR 産物では、体色異常 8 個体中 3 個体に 800 bp 付近に観察されるバンドが認められ、正常魚には認められない傾向にあった (*P*>0.05)。 *Mse*I+CTA, *Eco*RI+ACC プライマー対の PCR 産物では、正常 8 個体中 4 個体に 520 bp の断片が検出され、体色異常では 8 個体中 1 個体に検出された (*P*>0.05)。

2) 2015 年産シマアジ

2012 年産の生産に使われた親魚群が事故で失われ、別の魚群が親魚群として用いられた。よって 2015 年産シマアジの正常魚と体色異常を同じ手法で分析した。しかし、2012 年産で得られた結果は魚群が異なるためか、全く再現できなかった。

本研究における AFLP スクリーニングでは、64 プライマー対を用いることで 1,114 の断片をとらえ、それらのうち 206 断片（18.5%）で個体間の多型（断片の有無）が示された。以前に当研究室で行った同じ 64 プライマー対でのクロマトグラム性状に関連した断片同定時のスクリーニング結果では 1,038 断片を検出し、内 183 断片（17.6%）が個体間多型を示した。検出した DNA 断片の数、このうち個体間で多型を示した比率が類似していたため、今回の AFLP 解析における DNA 断片の増幅は順調に行われたと考えられた。しかし、異なる親魚由来の種苗では、遺伝的な相違のせいも、2012 年産、2015 年産で異なる結果となり、2015 年産シマアジ正常、まだら個体間での特徴的な DNA 特定には至らなかった。今後 AFLP 解析に用いるプライマーセット増やせば、2015 年産でも正常、まだら個体に特徴的な断片を見つけられるかもしれない。

(3)-1 成果の副次的効果、今後の計画等

シマアジまだら個体を収集する過程で、まだら個体は、出荷時に大きさをそろえるために行われる大小選別の際、全長、体長の小さい個体に多く出現することを知った。また他魚種稚魚と比較して、シマアジは大小選別せねばならないほど個体の大きさが大きく異なる事を知った。今後の展開としては、小さいサイズに表れやすいまだらではなく、体の大小は特定の親から得られやすいのか否か、遺伝学的な分析が必要であると考えられた。親の影響がある場合は、その親を排除することで選抜育種が進むと期待できる。

テーマ 1 : 完全養殖システムの構築

研究課題 : (3) DNA マーカーを用いた親魚管理

(3)-2 クロマグロ雄に特徴的な DNA 多型の分析

研究機関・研究室名 : 水産研究所・大島実験場, 農学研究科・水産学専攻・水産増殖学研究室

担当者職名・氏名 : 大島実験場長・教授 澤田好史, 同助教 阿川泰夫

研究協力者 : 小林徹, 柳下直己, 谷口亮人, 岡田貴彦, 片山茂和, 川原正人, 深見笑可, 戸瀬憲一, 田村利博, 中谷正宏, 林正次, 濱口康信, 津路伸, 柴田善正, 佐竹弘基, 平松一徳, 東祥太郎, 岩城真結, 加賀俊生, 山根由行, 日下貴裕, 西田雄人, 岩尾咲也佳

(3)-2 目的

クロマグロ養殖の効率化を図るためには様々な観点から研究を行う必要がある。その内の一つは、種苗生産に用いる受精卵の安定供給に関する技術開発も必要である。クロマグロの産卵生態に関しては以下の特徴が知られている。産卵行動は、互いに性成熟したクロマグロ雌雄で、1尾の雌を複数の雄が追いかけることで行われる。雄に比べ雌は性成熟度が個体ごとに大きく異なり、生簀飼育下では成熟する個体の割合が低いことが報告されている。そのため、雌の多い親魚群を編成することで成熟産卵可能な雌が多くなり、より安定的な採卵に繋がると考えられる。

しかしながらクロマグロは、外部形態の特徴からの雌雄判別は困難である。現在のところ、発達した生殖腺の目視確認や、血清に含まれるピテロジェニンを検出することで性成熟雌を確認することができるが、これらの方法の適用は性成熟した雌に限られる。また、これらの方法では判別できるにしても成熟個体のハンドリングは困難を極める。よって、雌雄を判別して親魚群を編成するには、魚体への負荷が少なく、ハンドリングが比較的容易である稚魚期に雌雄を判別することが重要となる。このような観点から、雌雄の DNA の違いに基づいた DNA マーカーを用いた雌雄判別では、性成熟度合には関係なく、ハンドリング容易な稚魚期でも性判別が可能となり、雌の比率を高めた親魚群編成が可能となる。

我々のグループは以前、クロマグロ雄に特徴的な 6 塩基欠損 DNA 多型を同定した。本プロジェクトではこの多型を probe として、多型近傍 17 kbp の DNA 配列を解析し、本多型配列近傍のコーディングジーン配列取得を目指した。染色体上のコーディングジーンの並びは種を超えて保存されている場合が多く、クロマグロ性決定遺伝子の推定や、精度高い雌雄判別 DNA マーカーの同定につながると期待し本研究を行った。

(3)-2 研究方法

1) ゲノムウォーキング

大島実験場で飼育された 11 歳, F2 世代の雄クロマグロ血液からゲノム DNA を精製した。制限酵素による消化後、ファージアーム lambda fix II(アジレントテクノロジー)にクロマグロのゲノム DNA を結合、パッケージングし、ファージライブラリーを作成した。当研究室にはメンブレンのハイブリ、蛍光検出システムが無いので、ファージライセートに目的断片が含まれるか否かで試験した。研究開始時にはクロマグロ雄に特徴的な配列 *Md6*, 400 bp

を同定済であった。本配列を特異的に PCR 増幅させる事が出来るので、これを用いてファージゲノムライブラリーより本断片を含む配列をスクリーニ数千のファージをプレートに接種し、そのライセート DNA を精製、PCR で検査し、雄特徴的断片陽性であれば、数百ずつプレートに接種、さらに数十、数個と減数させ、最終的にファージを単離した。本方法で2つの *Md6* 近傍雄特徴的断片陽性クローンを単離した。

2) 連鎖地図マーカーとの相関解析

クロマグロ連鎖地図が2016年に内野らにより発表された。発表マーカーと、近大完全養殖クロマグロ性の連鎖を内野ら報告のマイクロサテライトを用いて調査した。マイクロサテライトは各連鎖群より2座抽出し、分析を行った。

(3)-2 結果と考察

1) ゲノムウォーキング

13万のファージからスクリーニングを開始し、2つの雄特徴的 DNA 多型マーカー(*Md6*)を含むファージクローン(#7, #9)を得た。当初、クローン#7と#9は *Md6* 配列近傍(スクリーニングに使ったプローブ部分)を含み、左右の取得配列の長さが違うのみと予想した。しかし予想に反して、2つのファージクローン(#7, #9)はどちらも雄特徴的配列(*Md6*)を含むものの、全く独立の配列である事、また互いに相同性がとても高いことが明らかとなった(図2)。クローン#7は17,195 bpの、クローン#9は17,297 bpのインサートを保有していた。

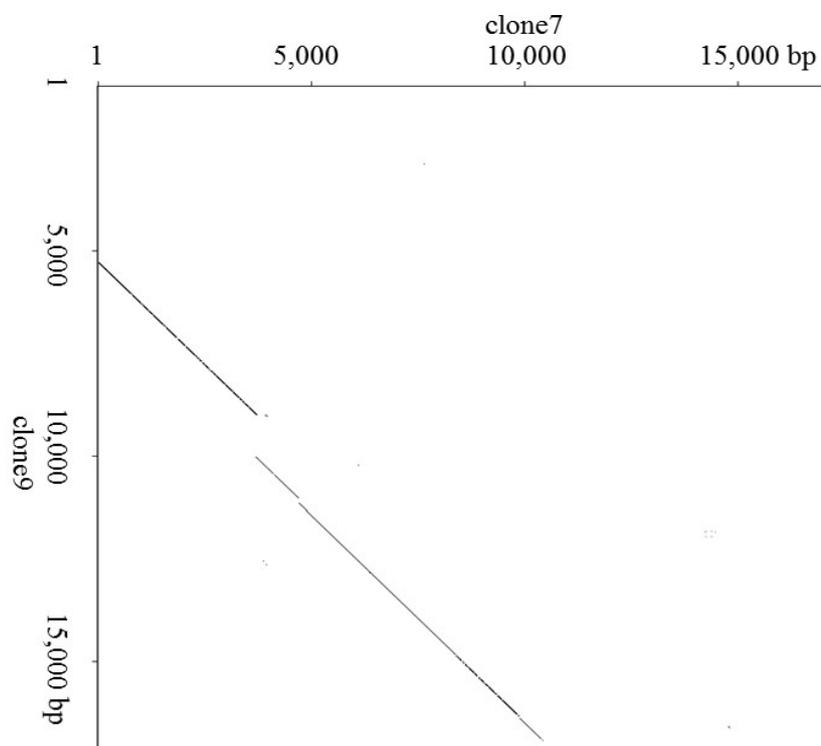


図2. クロマグロ雄特徴的 DNA 近傍ゲノム配列のドットプロット解析。独立のファージ2クローン、縦軸クローン9、横軸クローン7。相同性高い部分が点と線で示されている。

モデル生物ゲノム解析に用いる Ensemble browser や、DDBJ, NCBI データベースで解析を行い、この配列の特徴を調査した。この配列は TRIM14(tripartite motif containing 14)遺伝子に部分的に相同性が高かったが、ORF を保有していなかった。TRIM14 に相動性の高い場所はメダカゲノムに 13、海産魚でしばしば参照されるイトヨには 70 か所報告されており、このことからクロマグロにおいても TRIM14 のシュードジーンがゲノムに複数散在していると考えられた。我々の見つけた 6 塩基欠損多型(Md6)は Y 染色体上に少なくとも 2 か所あると結論した。なお、インサート計 34 kbp にコーディングジーンは無かった。コーディングジーンが見つければ、他生物の染色体上遺伝子座情報を参考に出来る可能性が高く、さらに精度良い性判別 DNA マーカーの取得につながる可能性が高い。

2) 連鎖地図マーカーとの相関解析

雌雄に偏った新規マーカーの同定には至らなかった。各連鎖群 2 か所を選んだが、調査したマーカーは性決定遺伝子座に遠いので性との相関が無かったと考える。今後クロマグロ連鎖地図の細密化を行ったのち、連鎖群上の場所を再度分析すれば、現有マーカー(93%)よりも判別率が高いものが得られると期待される。

(3)-2 成果の副次的効果、今後の計画等

ファージゲノムライブラリー作成については、実験書等にゲノム DNA を超遠心機で密度勾配分離し調整するなど、丁寧ではあるが、高額機と時間のかかる例が頻りに報告されている。本研究の課程で、低密度アガロースゲルによる電気泳動と、このゲルから目的断片およそ 17-20 kbp の切り出し精製した DNA でも何ら問題なくファージライブラリーを調整できることが分かった。本手法はとても簡単なライブラリー調整法である。

クロマグロ連鎖地図の作成は東京海洋大学グループが行った。このグループと技術協力しながら、クロマグロ形質に関連する遺伝子座の研究を進めることで意見一致したので、適宜相談協力しながら進める事となった。

テーマ 1 : 完全養殖システムの構築

研究課題 : (3) DNA マーカーを用いた親魚管理

(3)-3 クロマグロ成長に連鎖した DNA 多型の分析

研究機関・研究室名 : 水産研究所・大島実験場, 農学研究科・水産学専攻・水産増殖学研究室

担当者職名・氏名 : 大島実験場長・教授 澤田好史, 同助教 阿川泰夫

研究協力者 : 小林徹, 柳下直己, 谷口亮人, 岡田貴彦, 片山茂和, 川原正人, 深見笑可, 戸瀬憲一, 田村利博, 中谷正宏, 林正次, 濱口康信, 津路伸, 柴田善正, 佐竹弘基, 平松一徳, 東祥太郎, 岩城真結, 加賀俊生, 山根由行, 日下貴裕, 西田雄人, 岩尾咲也佳

(3)-3 目的

クロマグロ人工種苗は, クロマグロ養殖産業で 10%程度用いられ, 本魚漁獲圧の減少と天然資源保護に貢献している。本魚種苗量産化は様々なアプローチで改善が行われ, 達成されつつあるが, 他魚種に比べて生産効率は劣る。クロマグロ養殖の効率化を図るための一つは, 成長優良個体を選抜し, 親魚群へ編成する選抜育種が挙げられる。近畿大学完全養殖クロマグロ, 通称近大マグロはこれまで選抜されていない。本魚選抜が有効であるか否か知る目的で, 近大マグロ平成 19 年産を用いて成長分析を行った。その結果, 一部魚を成長優良, 平均的, 成長不良と分類し, 3 つの区分けで特徴的な DNA 多型があるか否かを調査した。

(3)-3 研究方法

1) 成長解析

2002 年に人工孵化され養成された, 同一の F2 親魚群から採卵され, 近畿大学水産養殖種苗センター大島事業場で養成された, 2007 年産人工孵化 F3 クロマグロを用いた。出荷対象となる年齢であり収穫時の体測データが多く得られる 730 日齢(2 歳)以上を解析対象とした。また, 雌雄別の解析に供することが可能なように雌雄が判別されている個体, さらに形態異常や外傷が無く, 明らかに衰弱した個体, 極端にやせているなど, 体測データに異常な値がない個体を用いた。その結果, 2007 年産では 2009 年 10 月 9 日に収穫された 818 日齢(2.2 歳)から 2012 年 12 月 28 日に収穫された 1994 日齢(5.5 歳)までの計 599 尾を対象とした。

雌雄別に, 体長, 体重およびそれらから計算される肥満度(BMI)について, 収穫時の測定値を用いて近似曲線を求めた。近似曲線よりも収穫時の体重, 肥満度指数が 0.6 以上のものを成長優良, 両指数が-0.25 から 0.25 の間のものを平均的, 両指数-0.6 以下のものを成長不良とグループ分けした(図 3)。

2) DNA 多型調査

上の手法でカテゴリー分けした, 成長優良, 平均的, 成長不良個体を選出した。内, 各グループ 8 尾計 24 尾を AFLP 解析し, 各成長群に特徴的な断片の有無をスクリーニングした。AFLP 解析の方法, 産物の検証はシマアジまだら個体の調査に同じ。ただし, クロマグ

口成長の試験では *MseI* サイト側 12 本, *EcoRI* 側 8 本, 計 96 セットのプライマー対を試験した。ハプロタイプペアの確認には, PCR 産物をプラスミド(pMD20)へクローニング後, 一頭体につき 6-12 クローンを解析した。

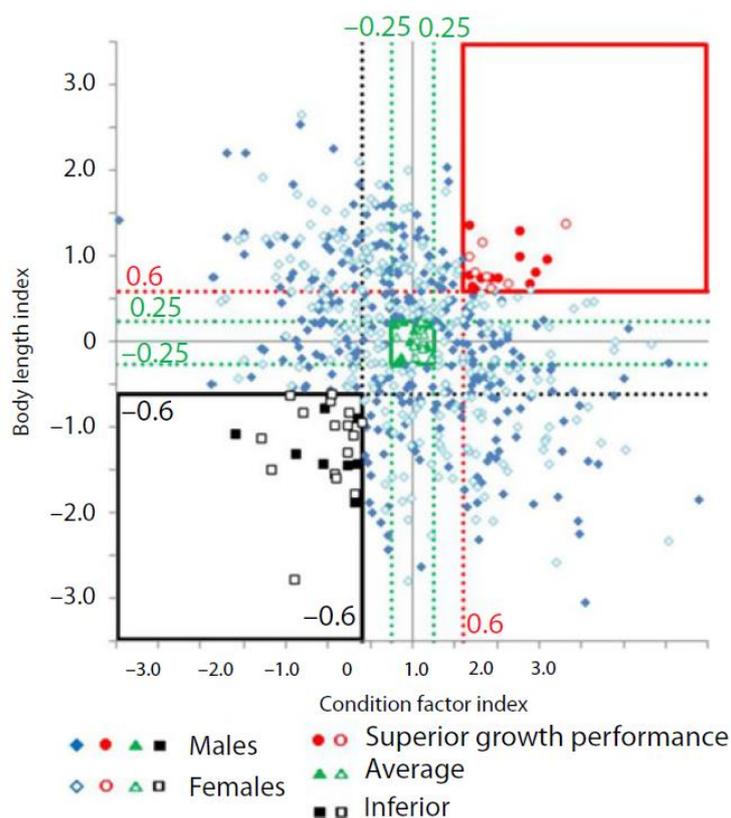


図 3. F3 完全養殖クロマグロ, 成長成績の体重, BMI 指数のプロット。
両指数が 0.6 以上のものを成長優良群, -0.25 から 0.5 の間を平均群,
-0.6 以下を成長不良群と区分けした。

(3)-3 結果と考察

1) 成長解析

2007 年産完全養殖 F3 クロマグロの成長解析を行った。AFLP 解析には, 標本使用可能であった成長優良個体 19 尾中 15 尾, 平均的個体 25 尾中 16 尾, 成長不良個体 25 尾中 15 尾をそれぞれ DNA 解析(AFLP 試験)に用いた。なお, 本魚群は同一産卵日である。成長曲線から推測されたこれらの推定平均体重(内臓込)は, 孵化後 1300 日齢で成長優良群 66.0 kg, 平均群 53.0 kg, 成長不良群 39.7 kg であった。

2) DNA 多型調査

AFLP 二次増幅を行った際、個体間で違いの見られた多型断片が 215 得られた(表 1)。この試験では *MseI* サイト側 12 本, *EcoRI* 側 8 本, 計 96 セットのプライマー対を試験した。その結果, 215 の多型断片を確認した(表 1)。これらの内, *MseI*+CCC, *EcoRI*+ACC プライ

表 1. 個体間で多型の観察された AFLP2 次増幅産物の DNA 断片の数.

| | EcoRI primers | | | | | | | | Total |
|---------------------|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|
| | ACT | ACG | ACA | ACC | AGC | AGT | AGG | AGA | |
| <i>MseI</i> primers | | | | | | | | | |
| CAA | 0 | 5 | 0 | 2 | | 0 | 1 | 0 | 8 |
| CAT | 0 | 2 | 1 | 1 | 2 | 0 | 11 | 0 | 7 |
| CAG | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 0 | 2 | 0 | 9 |
| CAC | 4 | 4 | 1 | 3 | 5 | 7 | 6 | 3 | 35 |
| CTA | 1 | 1 | 1 | 3 | 7 | 2 | 2 | 1 | 18 |
| CTT | 1 | 11 | 3 | 2 | 3 | 4 | 5 | 4 | 22 |
| CTG | 3 | 4 | 2 | 3 | 5 | 6 | 5 | 7 | 35 |
| CTC | 8 | 3 | 2 | 1 | 5 | 0 | 4 | 5 | 28 |
| CCA | 0 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| CCT | 4 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 2 | 1 | 12 |
| CCG | 3 | 0 | 5 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 17 |
| CCC | 4 | 2 | 1 | 7 | 4 | 1 | 1 | 0 | 20 |
| Total | 29 | 25 | 20 | 29 | 38 | 22 | 29 | 23 | 215 |

マーを用いた際に、高成長及び平均群に観察されやすいおよそ 630 bp の DNA 断片が見つかった(図 4)。この DNA 断片陽性のもの、陰性であっても該当領域に相当する遺伝子座を各成長計 46 尾について精査した(図 5, 表 2)。AFLP 解析は、制限酵素サイトとその近傍多型があった際に陽性、陰性となる。陰性であっても陽性断片に相当する領域を調査しなくてはならない。よって制限酵素サイト外側に、全個体の配列を増幅できるプライマーをデザインした(図 5 プライマー 719, 720)。全尾 PCR 産物をプラスミドへクローニング後、一個体につき 6-12 クローンを解析した。その結果、AFLP 陽性 630 bp 断片の配列は、コンセンサス配列(図 5)を多数派として、11 種のハプロタイプがある事が明らかとなった(表 2)。

AFLP 陽性、陰性の結果に一致して、ハプロタイプ 1, 2, 3, 10 は AFLP 陽性となる配列、それ以外は制限酵素サイトおよび近傍に変異があり、AFLP 陰性となることが明らかとなった。各個体の持つハプロタイプペアを調査した(表 3)。多くの個体がハプロタイプをヘテロで有しているものの、8 個体はハプロタイプ 5 のホモであった。ハプロタイプ 5 の出現頻度は $37/92 = 0.4$ である。ホモの個体数は $0.4 \times 0.4 \times 46 = 7.36$ 尾と推定でき、理論値に近い。すなわち今回調査した個体のハプロタイプ対の妥当性を支持する。さらに、成長とハプロタイプの偏りを調査したところ、ハプロタイプ 1 は優位に成長優良群、平均群に偏っていた(表 4, $P < 0.05$)。有意性はないものの、ハプロタイプ 7, 8, 9 は成長不良群に表れやすい傾向にあった。

(3)-3 成果の副次的効果、今後の計画等

クロマグロゲノムの連鎖地図上へ今回特定した配列のマッピングを考えている。究極的には近大マグロの成長を左右するのは何の遺伝子であるのかを明らかにしたい。このため

完全養殖システムの構築
DNA マーカーを用いた親魚管理 (阿川・澤田)

には、連鎖地図上のどこに今回の断片があるのか、近傍ゲノム領域のどちら側に進めばよいのかを先ず明らかにしたい。

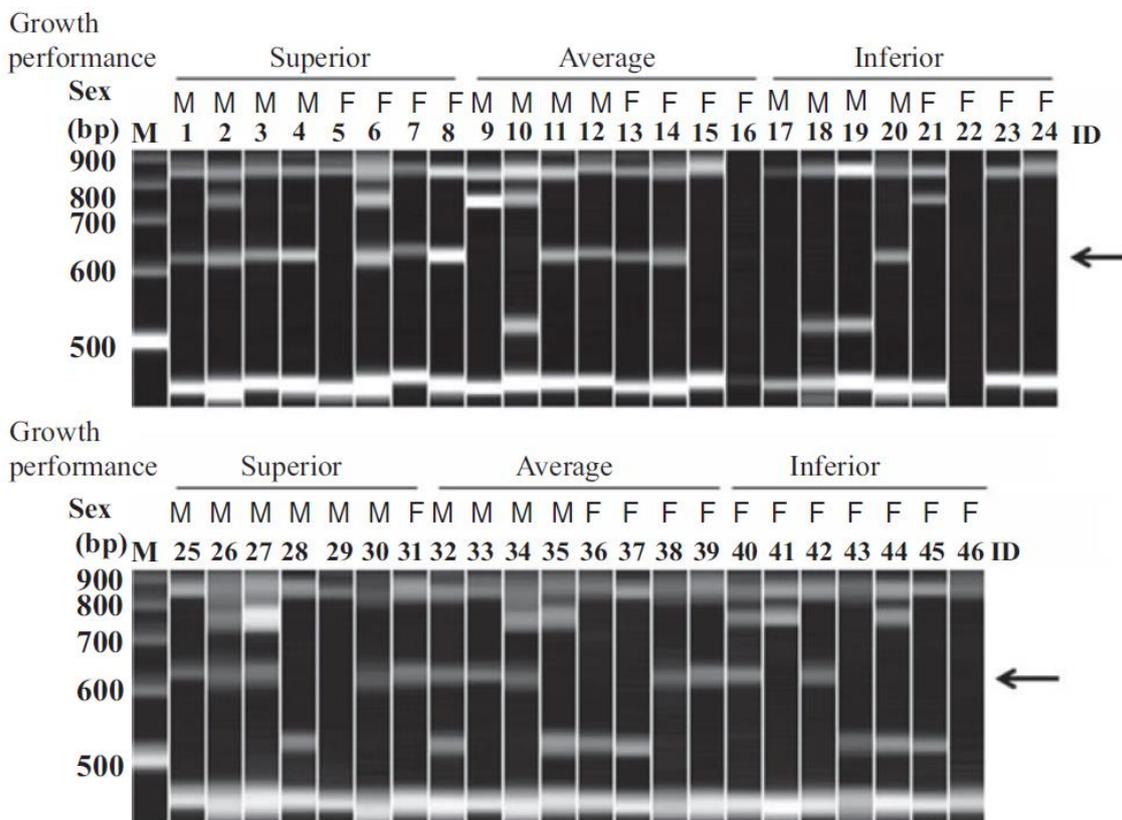


図 4. 自動電気泳動装置 Multi-NA で取得したゲルイメージ。EcoRI+ACC, MseI+CCC のプライマー対で PCR した際に、成長優良、平均群に表れやすい 630 bp の断片が認められた。

```

          Pri. 719
          →
GTTCTCTCAT CCCATGGTCT CAAGTTCAAT CCCTTTGATA GCTCACATGT 50
TGTGCAGAAG TGTCACTATG GTTTAAACCC CACAAAAGAG CAAAACACGA 100
                                MseI
CTCACTGTAA TCGCCAAATG TTCTGAAAAT GACATTTTCA CTCATCAGGT 150
GCTTTGGATG CTCCATGTTG GCAGTGATGC AGGTGCTGTC TGTGTTTCTG 200
CAGATGCTGC CGCCGGATGG ATCCCATTCG CAACACCGCA CTCACAGTGT 250
GGCTGTGGTG CTGCCTTCAC TGATGTAGTC ACATAAGCTG TTTTCACATA 300
TGAACTCCAG ACAATATCTG GAGAATCAGG TCAGGACATT ATCCGGAGTT 350
CCCCTTTCAC ATATGTAGCA CACAACAGGA GATTGTCCAT GTCGCATGTG 400
CTCTCACCTA CTGGAATAA TCTGTTTGGT TTAGGCAAGG GGTGGTGCTG 450
GGTAGAGTGT GTAGGTGGGA CATGATGCAA AAAGTACAGT ACATCAAAGA 500
TGGCGGACGA GACTACCAAC TCATCTGTAA TGATGACTGT TATTGTGCTG 550
ATATCAATAT TACATGTATT TGGATGTATC TGTGATATCA ATGAAAAGAGT 600
GAAAAGCAGA AAAGAGTACA AAACAGCTAC ACTACAGCGC CATTTCATC 650
ATAGAAACGC CATAAGCACT CGCTCACTGT GAATTCCTCTG TACAAATGAC 700
                                EcoRI
TGCTCTATTC ACACATGGGC TCAATCAGAC ATTACACAGA CTGTGTA 750
GGGAGCTGAC AGGGTAAAGT CCCTGATTCA GACATT 786
          ← Pri. 720
    
```

図 5. 図 4 で示した 630 bp 配列のコンセンサス配列。AFLP 陽性、陰性両方の配列を調査できるようにプライマーPri719, 720 をデザインした。

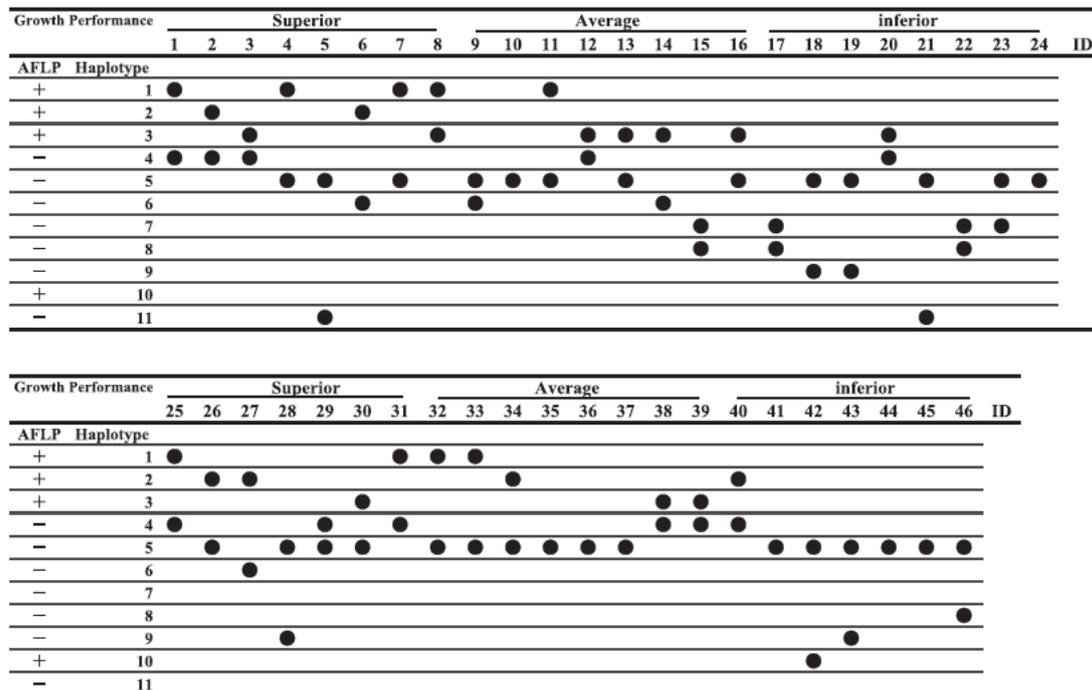
完全養殖システムの構築
DNA マーカーを用いた親魚管理 (阿川・澤田)

表 2. AFLP 陽性, 陰性該当領域で確認された DNA 多型。コンセンサスに対して異なる場合に場所(数字)の下に塩基(あるいは欠損, deletion)で示した。

| nucleotide position | 65 | 113 | 325 | 394 | 430 | 495-498 | 512 | 518 | 522 | 546 | 636 | 638 | 672 | 677 | 678 | 683 | 686 | 691 | 728 | 735 | 748 | |
|---------------------|----|-----|-----|-----|-----|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|
| <i>EcoRI</i> site | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| consensus | A | G | A | A | T | CAA | A | G | G | C | C | A | C | G | C | T | A | C | T | G | C | C |
| allele number | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | | | | | | | | | | | T | | | | G | | | | C | | | |
| 2 | | | | | | | | | | | T | | | | G | | | | C | A | | |
| 3 | | A | | G | | | | | | | | | A | T | G | | | | C | A | | |
| 4 | | | | G | C | | A | A | | | | | | | A | | | | C | | | |
| 5 | | | | | C | deletion | | | | | G | T | | | | T | | | | | | T |
| 6 | | C | | G | | | | | | | | | | | | | T | | | | | T |
| 7 | | | C | | C | | | | | | G | | | | | | T | | | | | T |
| 8 | G | | | G | C | | | | | | | | | | | | T | | | | | T |
| 9 | | | | | | deletion | | | | | G | | | | | T | | | | | | T |
| 10 | | | | G | | | | | | | | | A | T | G | | | | C | A | | |
| 11 | | | | | C | deletion | | | T | | G | T | | | | T | | | | | | T |

ハプロタイプ 1 を多くした魚群は成長優良魚群として期待できる。しかし、現在はハプロタイプの同定には PCR 産物のクローニングと塩基配列の解析で時間, 労力共に実用的ではない。実際の魚群編成には 1000 尾程度から魚を選ばなくてはならない。よって、次世代シーケンサーを用いたり, あるいは別の低コストハプロタイプ同定法を確立したい。次世代シーケンサーでは 300 bp 程度を解析する機器が主流であるので, 何等かの改良を加えて行ってみる余地があると考えられる。

表 3. 3 つの成長群における, 各個体の持つ DNA ハプロタイプの分布。



完全養殖システムの構築
DNA マーカーを用いた親魚管理 (阿川・澤田)

表 4. 3つの成長群での DNA ハプロタイプ分布のカイ 2 乗検定。

| Growth performance Haplotype | Superior | Average | Inferior | Superior | Average | Inferior | <i>P</i> | χ^2 |
|---------------------------------|-------------------------------|---------|----------|----------------|---------|----------|----------|----------|
| | Observed number of haplotypes | | | Expected value | | | | |
| 1 | 6 | 3 | 0 | 2.93 | 3.13 | 2.93 | 0.046 | 6.14 |
| 2 | 4 | 1 | 1 | 1.96 | 2.09 | 1.96 | 0.205 | 3.17 |
| 3 | 3 | 6 | 1 | 3.26 | 3.48 | 3.26 | 0.181 | 3.42 |
| 4 | 6 | 3 | 2 | 3.59 | 3.83 | 3.59 | 0.286 | 2.50 |
| 5 | 7 | 15 | 15 | 12.07 | 12.87 | 12.07 | 0.203 | 3.19 |
| 6 | 2 | 2 | 0 | 1.30 | 1.39 | 1.30 | 0.379 | 1.94 |
| 7 | 0 | 1 | 3 | 1.30 | 1.39 | 1.30 | 0.164 | 3.62 |
| 8 | 0 | 1 | 3 | 1.30 | 1.39 | 1.30 | 0.164 | 3.62 |
| 9 | 1 | 0 | 3 | 1.30 | 1.39 | 1.30 | 0.160 | 3.67 |
| 10 | 0 | 0 | 1 | 0.33 | 0.35 | 0.33 | 0.356 | 2.07 |
| 11 | 1 | 0 | 1 | 0.65 | 0.70 | 0.65 | 0.587 | 1.07 |

テーマ 1 : 完全養殖システムの構築

研究課題 : (3) DNA マーカーを用いた親魚管理

(3)-4 養殖魚の形態異常防除に向けた形態異常の原因解明と防除策の構築, カンパチ仔稚魚の顎形態異常の原因解明と防除策開発

研究機関・研究室名 : 水産研究所・大島実験場, 農学研究科・水産学専攻・水産増殖学研究室

担当者職名・氏名 : 大島実験場長・教授 澤田好史, 同助教 阿川泰夫

研究協力者 : 倉田道雄, 本領智記, 佐々木つかさ, 田口泰嗣, 西野貴之

(3)-4 目的

日本の海産養殖魚類のうち 14-15 万トンと最も生産量の多いブリ類 (ブリ, カンパチ, ヒラマサ) では, 現在養殖用種苗としてその 9 割以上が捕獲した野生の稚魚か, 野生の稚魚を捕獲し中間育成した幼魚が用いられている。しかしながら毎年のこれら種苗の捕獲量には大きな変動があるなど, 安定的・計画的な養殖生産を妨げる大きな要因となっている。さらに, 野生の稚魚の捕獲量が多くなれば天然資源への影響が懸念される他, 品種改良による養殖の効率改善も期待できない。

一方で, ブリ類の人工種苗生産, そしてそれを用いた完全養殖の技術開発は 1960 年代から試みられているものの, いまだ天然捕獲稚魚・幼魚に取って変わるところまで技術が確立されていない。ブリ類の人工種苗生産における最大の問題は, 形態異常の高い発生率である。なかでも顎部の形態異常は, ブリ類の人工種苗で特徴的なものであり, 変形した顎が原因で十分に摂餌できないことから, 生残率の大幅な低下も招いており, その原因の把握と防除策の構築は最優先の課題である。

本研究では, このような課題解決の需要に鑑みて, ブリ類のなかでブリに次いで養殖生産量が多いカンパチ (*Seriora dumerili*) を対象として, 顎形態異常の原因解明と防除策の開発を行った。人工種苗の顎形態異常の原因や防除策については, オーストラリアの養殖対象種であるストライプトランペッター (*Latris lineata*) において, 仔魚の走光性に起因する水槽壁面への衝突 (Walling behavior) が, 頭部への物理的な衝撃を与えることや, 変形した顎でうまく摂餌できないことによって栄養の摂取不良を起こすことで顎形態異常を引き起こすことが示唆されている。また我々の観察でも, カンパチの種苗生産においても, 仔魚が水槽壁に吻部を衝突させる 'Walling behavior' が頻繁に観察されると, 生簀での中間育成後の種苗の選別で, 顎形態異常の個体がより多く見つかることが判明している。

そこで本研究では, カンパチの顎形態異常の原因を, 仔魚の正の走光性による水槽壁面衝突であるとの仮説を立て, これを防ぐ手段として, 水槽壁面の明度や, 水槽壁面付近の飼育水の照度を下げることの仔魚の壁面衝突と顎形態異常発生削減効果の検証を行った。

(3)-4 研究方法

1) 水槽壁面色の明度がカンパチ仔稚魚の顎形態異常発生に及ぼす影響の検証

本研究に先立って実施した予備的研究では, 水槽壁面色が黒の水槽と白の水槽で生残率や顎形態異常の発生率に大きな差がみられ, これらの差には水槽壁面色の明度が関係していることが示唆された。そこで水槽壁面色の明度のどの程度の違いが飼育に影響するかを

調べるため、本実験では、1 m³容水槽内壁の全面の色を、明度のみが異なる黒、灰色、白に変えて飼育を行い、水槽壁面色ごとに顎形態異常発生率、Walling behavior、成長、生残を比較した。

供試魚および飼育方法

供試魚には、近畿大学水産研究所すさみ事業場で飼育された人工孵化カンパチ親魚から自然産卵で得られた受精卵を孵化させて用いた。得られた受精卵は室内の1 m³容円形水槽12面に8,000粒ずつ収容し、25日令まで近畿大学の飼育プロトコルに従って飼育した。

実験区の設定

水槽のマンセル明度は黒、灰色、白の塩化ビニル製カッティングシート（黒：791 ブラック；マンセル明度2.21，灰色：735 ミディアムグレー；マンセル明度5.85，白：711 ホワイト；マンセル明度9.52，中川ケミカル，東京）を水槽内壁に貼ることで変え、それぞれ4反復で行なった。水槽底部にはシートを張らず、底部は緑色に塗装されていた。

仔稚魚のサンプリングおよび全長測定方法

飼育中の全長の成長を調べるため、ふ化後4, 7, 10, 13, 19, 25日令に仔稚魚をランダムにサンプリングして氷殺した後、顕微鏡下でデジタル画像を取得し、画像から全長を測定した。サンプリング後の仔稚魚は5~10%のホルマリン溶液内に保存し、形態異常の観察に用いた。

顎形態異常の観察

顎形態異常の発生率は、25日令に生残稚魚全個体を取り上げ、実体顕微鏡下での観察によって異常を判別して算出した。顎の形態異常の症状の重篤さの判断ではCobcroft and Battaglione (2009)の基準を参考にした。顎形態異常は上下顎の長さや、口の開閉が可能かどうかを重要な判断基準とした。

Walling behavior の観察

Walling behavior という仔魚の行動は、仔魚や後期仔魚がよく見せる壁に向かっての活発な遊泳であり、仔魚頭部が水槽壁表面と接触して始まるとされ、頭部を壁に押し付けたまま泳ぎ、しばしばこの行動を何度も繰り返す。この行動はトラフグや、カンパチ仔魚と同様に外洋で仔魚期を過ごすストライプトランペッターでも観察されている。しかしながら、頭部を壁に押し付けたまま泳いだかどうかのみを計数することは困難であるため、本実験ではCobcroft and Battaglione (2009)に倣い、水槽壁に頭部が接触した時を1回のWalling behavior 行動として計数した。観察は、4日令から10日令の10:00~14:00の間、デジタルカメラで撮影した動画、または目視で行なった。観察範囲は水槽壁から3.5 cm以内で、水深0~30 cmとした。水槽壁から3.5 cm以内という範囲は、水槽壁面付近に形成される仔魚の集まり（パッチ）の広がりと同しいものであった。また、水槽壁より3.5 cm以上離れたところに形成されるパッチではWalling behavior が起こらなかった。観察範囲の設定は、3日令から10日令までのカンパチ仔魚は明期では水深0 cmから10 cm内に多く分布する傾向

があること (照屋, 2009), 筆者らが行った予備的観察の結果, 仔魚の分布が水槽壁から 3.5 cm 以内, 水深 0 cm から 30 cm までに確認できたことからこのようにした。観察は, 各実験区よりランダムに選んだ 1 水槽について行った。

観察した Walling behavior は, ①Walling behavior 割合, ②Walling behavior 頻度の 2 種類の指標でその頻度を数値化した。①Walling behavior 割合では, 水槽内の仔魚個体群の観点から行動を数値化した。すなわち, 測定範囲に分布する仔魚のうち, どの程度の割合が Walling behavior を行っているか調べた。②Walling behavior 頻度では, 仔魚個体の遊泳行動の観点から, Walling behavior を行っている仔魚 1 尾が, 30 秒間に何回水槽壁に衝突しているかを計数した。

水槽壁面輝度の測定

水槽壁面色の明度が水槽内の明るさに与える影響を比較するため, 水中で水槽壁を撮影しその画像から水槽内壁の輝度を測定した。飼育水には生クロレラを飼育時と同様に添加し, 塩ビパイプに固定したデジタルカメラを水槽壁に向け撮影した。撮影場所については図 1 と表 1 に示したように, ①照明と平行な測定場所 (図 6 の 1, 2, 3) と, ②照明と直角な測定場所 (図 6 の 4, 5, 6) の 2 か所で, 水平方向と垂直方向に撮影場所を設定した。水平方向は, 壁際 (水槽壁から 3.5 cm の距離, 図 6 の 1, 6), 中間 (水槽壁から 30 cm の距離, 図 6 の 2, 5), 水槽中央 (水槽壁から 60 cm の距離, 図 6 の 3, 4) の 3 地点, 垂直方向は, 水深 0, 10, 30, 50, 80 cm の 5 箇所とした。これらの照明の位置や水平方向, 垂直方向を組み合わせると, 1 水槽につき 30 箇所水槽内の写真を撮影しデジタル画像を取得した。なお水深 80 cm は底面であった。撮影は各実験区 1 水槽について行い, 取得した画像は画像解析フリーソフト (Image J, National Institutes of Health, Maryland) を用いて輝度を求めた。

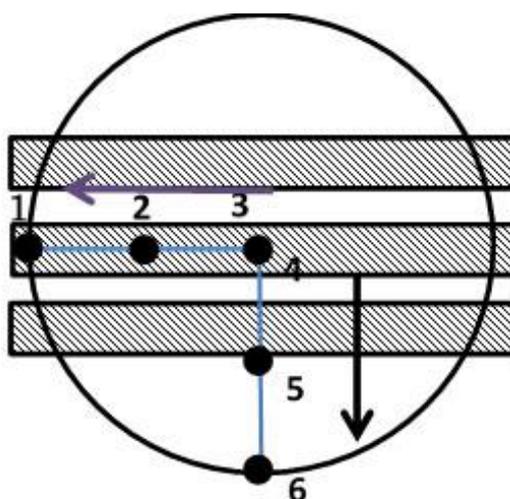


図 6. 水槽壁面明度の測定場所 (水平方向)。■は照明 (蛍光灯) の設置場所を示した。矢印は同じ色の数字の地点での, カメラのレンズ方向を示した。各地点では, 垂直方向 (水面から底面まで) の 5 箇所測定を行った。

撮影場所の設定において、壁際を水槽壁面から 3.5 cm 離れた場所としたのは、予備的実験にて、Walling behavior を行う仔魚が壁面から 3.5 cm 以内に分布することが観察されたためと、カメラにより壁にできる影の影響を抑えるためであった。

統計処理

統計処理は解析ソフトウェア (SPSS, IBM, New York) を用いて行い、実験区間の差を分散分析で検定した。有意水準は 5% に設定した。顎形態異常発生率と生残率は、有意水準を Bonferroni 法で補正し、全長は Tukey HSD でそれぞれ有意水準を補正した。

2) 水槽壁面の色, 材質, 照度がカンパチ仔稚魚の顎形態異常, 生残, 成長に及ぼす影響

1) における研究で、顎形態異常は、水槽壁面色を黒色にすると walling behavior と顎形態異常の発生を抑制できることが明らかとなった。これは、黒色の水槽壁面は他色より水槽から反射する光が弱く水槽壁面の反射光に反応する仔魚の walling behavior が抑制されるためと考えられる。また仔魚が walling behavior を行うのは水槽上部であり、水槽上部壁面のみ黒色にすれば効果があると考えられるが、その最適な深度は明らかではない。b では、カンパチ仔魚の顎形態異常発生率, 生残, 成長を、水槽壁面から反射する光の性質を変える、水槽壁面上部 50 cm のみを黒色にする、水槽壁面周辺の照度を低くするために底を用いることの影響を調べた。

飼育カンパチ親魚の自然産卵で得た受精卵を 1m³ 水槽に 8,000 粒収容して飼育した。各試験区の仔魚の標準体長, 4 日齢から 9 日齢までの Walling behavior, 20 日齢での生残率と顎形態異常発生率を比較した。水槽壁面の色と反射光の違いは異なるカットニングシートを、異なる深度範囲で貼ることで変えた。また底を用いて水槽壁面周辺の照度環境をかえた。試験は、全面ブラック (つや有り黒), 全面マットブラック (つや消し黒), マットブラック+グリーン, マットブラックグリーンに加え水槽壁面に飼育水面に 20 cm 張り出す底を設けた 4 試験区を 4 反復で行った (図 7)。

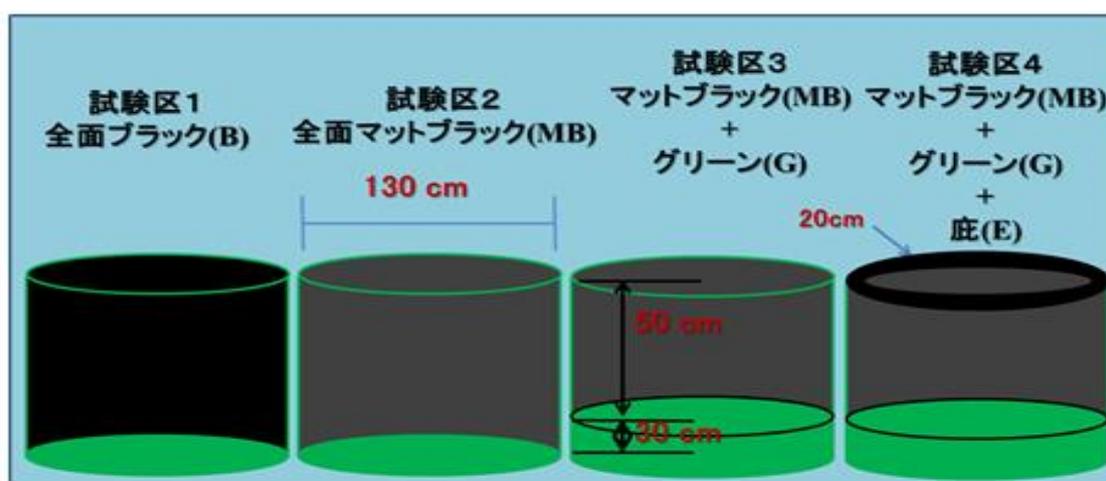


図 7 試験に用いた水槽壁面の色相, マンセル明度, 彩度。ブラック; 3.2PB, 2.2, 0.2, マットブラック; 3.6PB, 2.5, 0.2, グリーン; 2.9G, 3.4, 2.7。底面はグリーン。14L, 10D で実施。

(3)-4 結果と考察

1) 水槽壁面色の明度がカンパチ仔稚魚の顎形態異常発生に及ぼす影響の検証
25日令での顎形態異常には様々な種類と程度があった(図8)。発生率は、黒が最も低い5.8%, 灰色は 22.5%, そして白が最も高い26.8%で、黒と白, 黒と灰色の間に有意な差があった(表5)。

表5 水槽壁面色別 顎形態異常発生率 (25日令)

| 水槽色 | 標本数 (尾) (4 水槽合計) | 顎形態異常発生率 (%) | 重度顎形態異常発生率 (%) |
|-----|---------------------|------------------------|----------------|
| 黒 | 2179 | 5.8±1.2 ^a | 4.7±4.6 |
| 灰色 | 435 | 22.5±6.3 ^b | 8.0±9.4 |
| 白 | 278 | 26.8±10.6 ^b | 3.5±4.5 |

異なる文字間に有意差がある。p<0.05

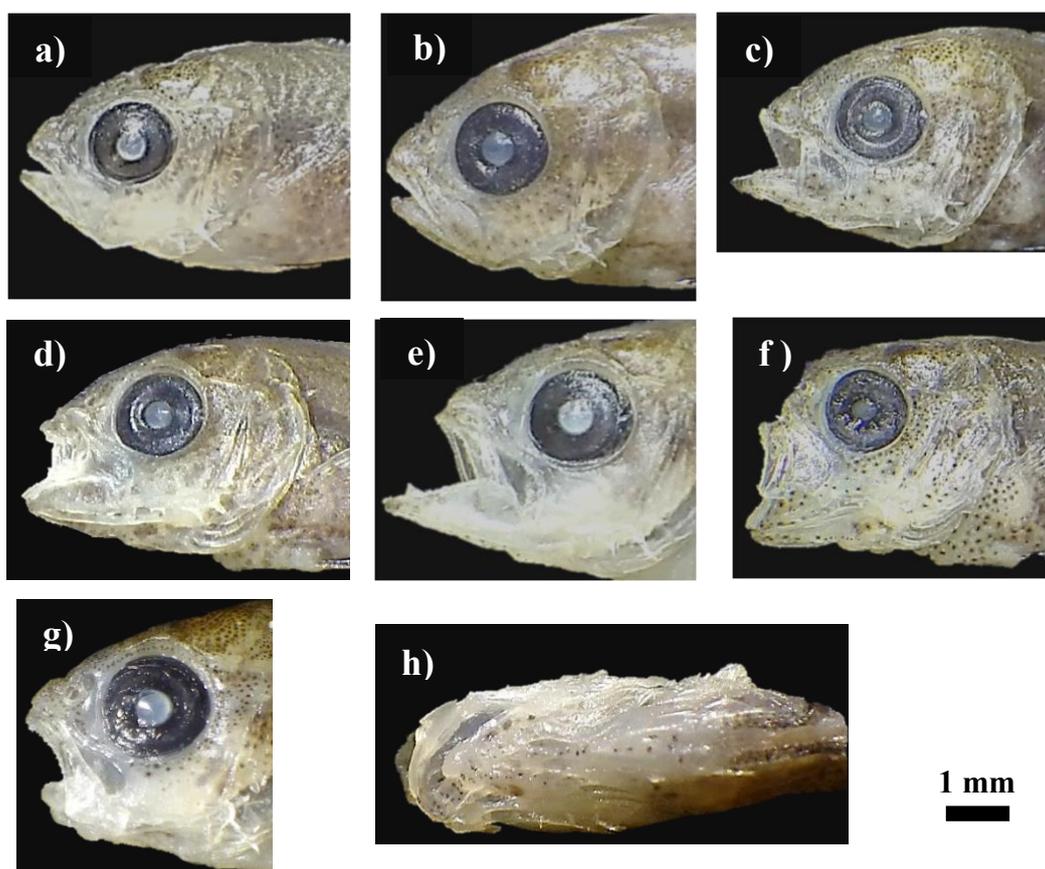


図 8. 観察された顎形態異常 (25日令)。本研究で観察された形態異常を示した。正常; b)下顎短縮; c)上顎縁部の異常 (上顎の縁部分が捲れ上がる); d)癒着 (上下顎の結合組織が癒着); e)下顎伸長 (下顎が長く見える); f)頭部形態異常; g) 重度下顎短縮。h)は g)を腹側から撮影したもので、下顎短縮。h)は g)を腹側から撮影したもので、下顎が左に湾曲している。

3実験区間で全長に違いは無かった。Walling behavior割合は、黒が日令とともに増加傾向を示すのに対し (図9), 灰色, 白は減少傾向を示した。Walling behavior頻度では4, 5, 6, 8日令で白が最も高く, 8日令までは黒が最も低く推移した (図10)。

25日令時の生残率は, 黒で最も高く平均12.2%, 次いで灰色の1.9%, 白が最も低い1.4%で, 黒と白, 黒と灰色の間に有意差があった (図11)。

水槽壁面輝度の測定結果を図 12a, b に示した。全ての測定位置において, 黒が最も低い輝度を示し, 白が最も高い輝度を示した。灰色は黒と白の間で推移したが, より白に近い輝度を示した。また, 水深が深くなると, 輝度も低くなる傾向が見られた。水槽壁面からの距離別の輝度 (輝度の水平分布) は, 黒と白, 黒と灰色の間に差異が見られ, 白と灰色では, 水槽中央での輝度が低かったが, 黒では, 水槽中央の輝度が, 黒の壁際や中間に比べ明らかに高かった。また, 照明に平行な測定場所 (図 12a) に比べ, 照明に直角な測定場所 (図 12b) では黒の輝度変化範囲が小さく, 壁際の水深 0 cm での輝度も小さかった。

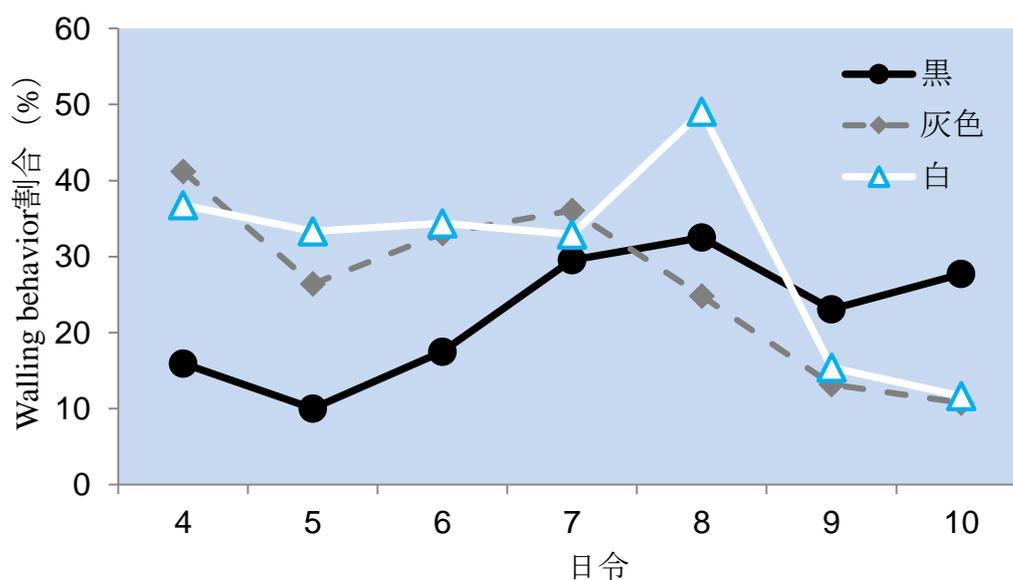


図 9. 水槽壁面色別 Walling behavior 割合.

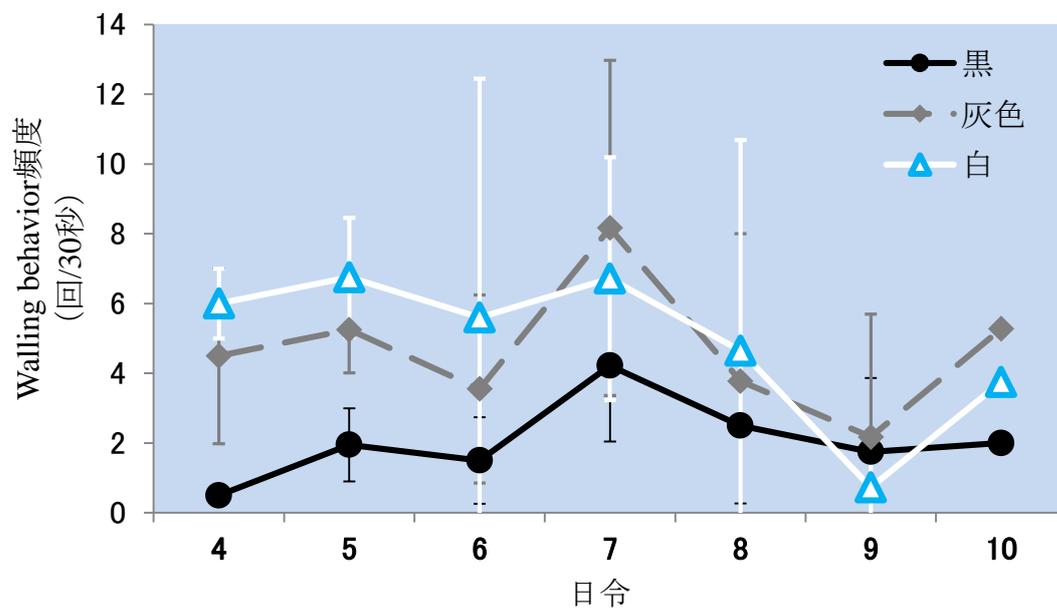


図 10. 水槽壁面色別 Walling behavior 頻度.

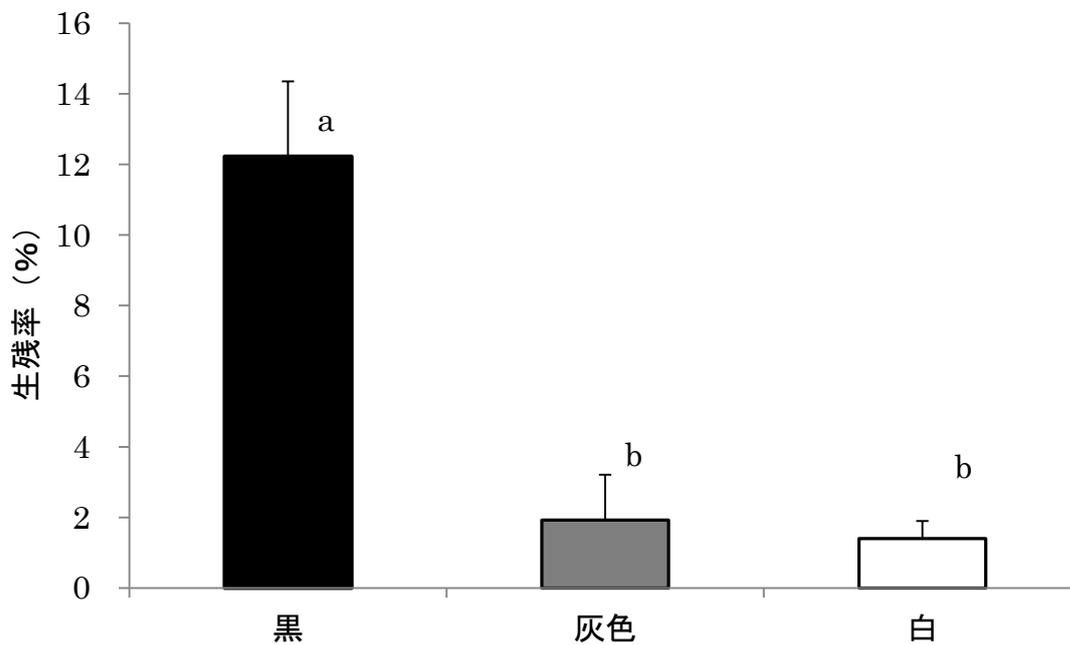


図 11. 水槽壁面色別 生残率 (25日令)。異なる文字間に有意差がある。 $p < 0.05$ 。

これらの結果から、水槽壁面色の明度は仔魚の顎形態異常の発生、生残に影響を与え、低い明度が有効であることが示された。また、顎形態異常の発生には、8日令までのWalling behaviorが関係していると考えられた。また、水槽壁面の明度はマンセル明度で5.85程度の

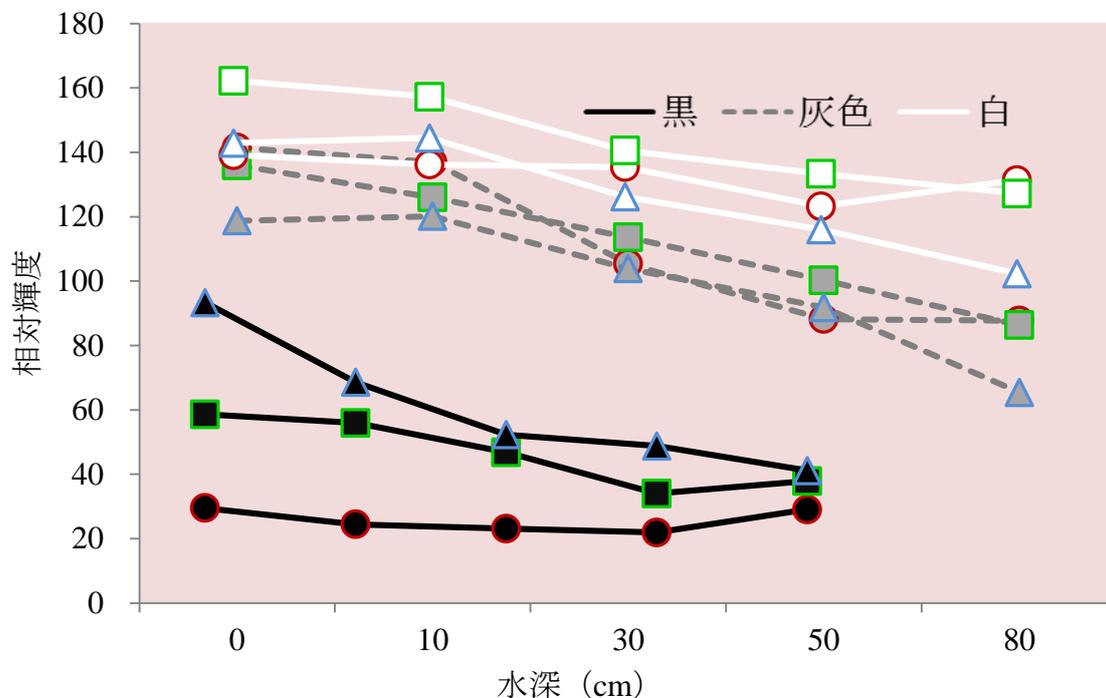


図 12a. 水槽壁面色別 照明に平行な測定場所での水槽壁面輝度。線の色は各試験区を示した。水平方向の測定場所は、○；壁際，□；中間，△；水槽中央で示した。

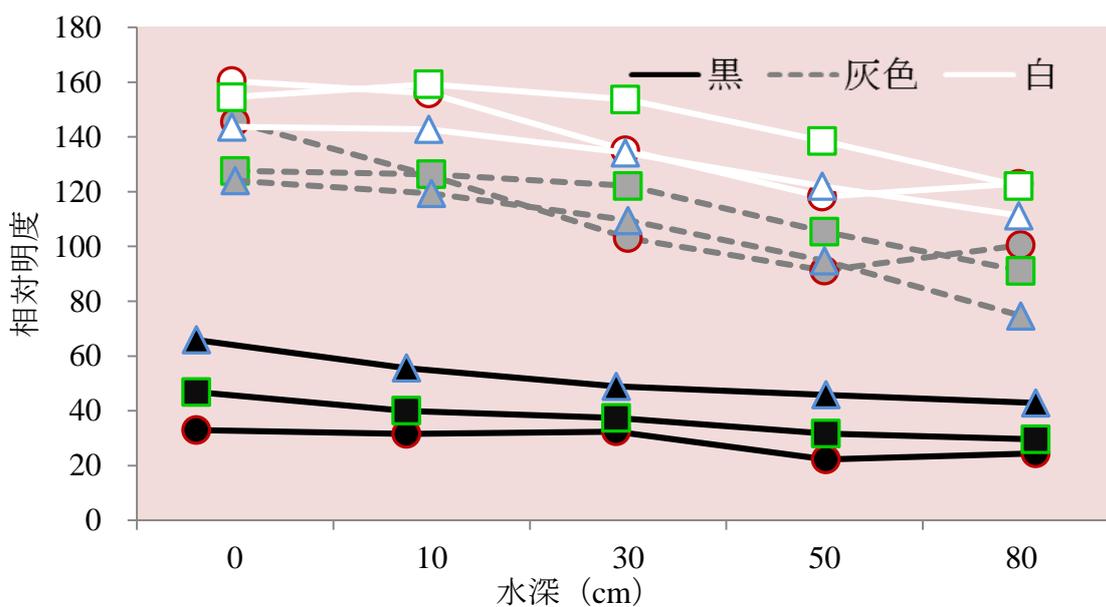


図 12b. 水槽壁面色別 照明に直角な測定場所での水槽壁面輝度。線の色は各試験区を示した。水平方向の測定場所は、○；壁際，□；中間，△；水槽中央で示した。

灰色では、仔魚の顎形態異常防止には不十分で、黒の 2.21 程度が必要であることが明らかとなった。

2) 水槽壁面の色, 材質, 照度がカンパチ仔稚魚の顎形態異常, 生残, 成長に及ぼす影響

顎形態異常の発生は各試験区で有意差は認められなかったものの全面ブラックで最も発生し 22%であった。次に高かったのがマットブラック+グリーンで 13%, 全面マットブラックで7%, マットブラック+グリーン+庇で2%となった (表 6)。

表 6. 試験区別の顎形態異常発生率

| 水槽色 | 標本数 (4 水槽合計検体数) | 顎形態異常発生率(%) Steel Dwass $P < 0.05$, $n=4$ |
|-----------------|--------------------|---|
| ブラック | 100 | 22.0±11.5 |
| マットブラック | 100 | 7.0±5.0 |
| マットブラック + | 100 | 13.0±8.8 |
| グリーン マットブラック | | |
| + | 100 | 2.0±2.3 |
| グリーン+庇 | | |

Walling behavior の割合は全面ブラックが一貫して高い割合となり 40.6%から 9.1%で推移した(図 13)。その他の試験区は低い割合で推移し, 全面マットブラックで 10.4%から 1.5%, マットブラック+グリーンで 10.6%から 5.3%, マットブラック+グリーン+庇で 4.2%から 0%となった。また 8 日令以降マットブラック+グリーン+庇では Walling behavior を行う仔魚はいなかった。

Walling behavior の頻度も割合同様, 全面ブラックが高い傾向となりその他の試験区では低い値で推移した (図 14)。

生残率は全体的に 3%以下と低い数字になった。各試験区間で有意な差はなかったが, 庇を用いた試験区が特に低い傾向がみられた(図 15)。

顎形態異常発生率が高く, 仔魚の成長が遅れた全面ブラックの試験区では, 仔魚が walling behavior を頻繁に行うことで顎形態異常が発生し, 摂餌量が減って最も成長が劣ったことが示唆された。また全面ブラックでは, 全面マットブラックに比べ walling behavior, 顎形態異常発生率が高かったことから, 水槽壁面からの鏡面反射を抑え極端に光が強い箇所を作らないことで walling behavior を抑制し, 顎形態異常の発生を軽減できる可能性が示唆された。一方顎形態異常の発生が最も低かったマットブラック+グリーン+庇の結果から, 水槽

壁面周辺の照度を低くすることで walling behavior, 顎形態異常の発生を抑制できる可能性があるが, 成長や生残率で他の試験区に比べ低い傾向にあったことから, 狭い照度範囲

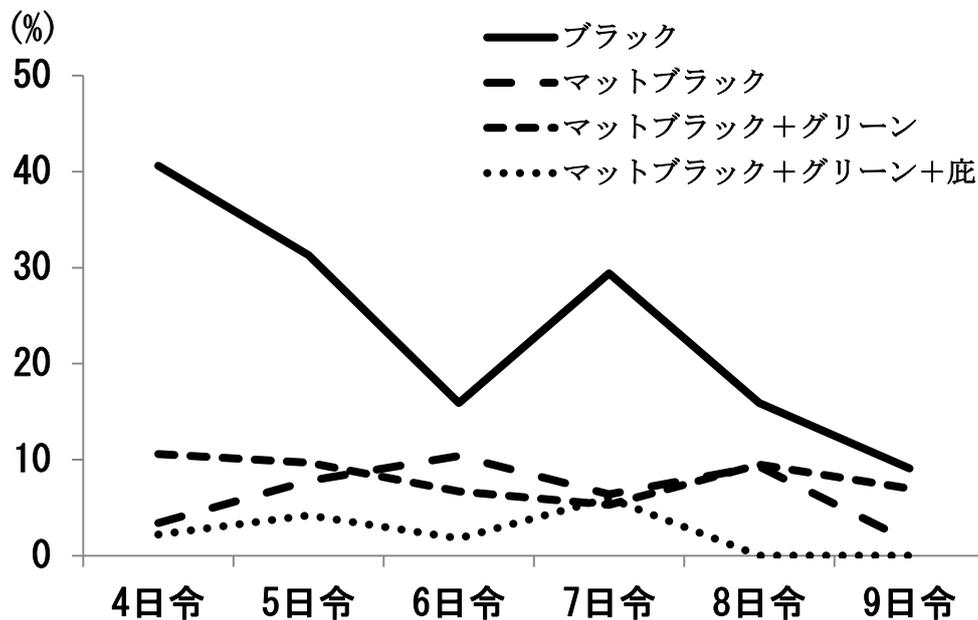


図 13. Walling behavior 割合 (%)

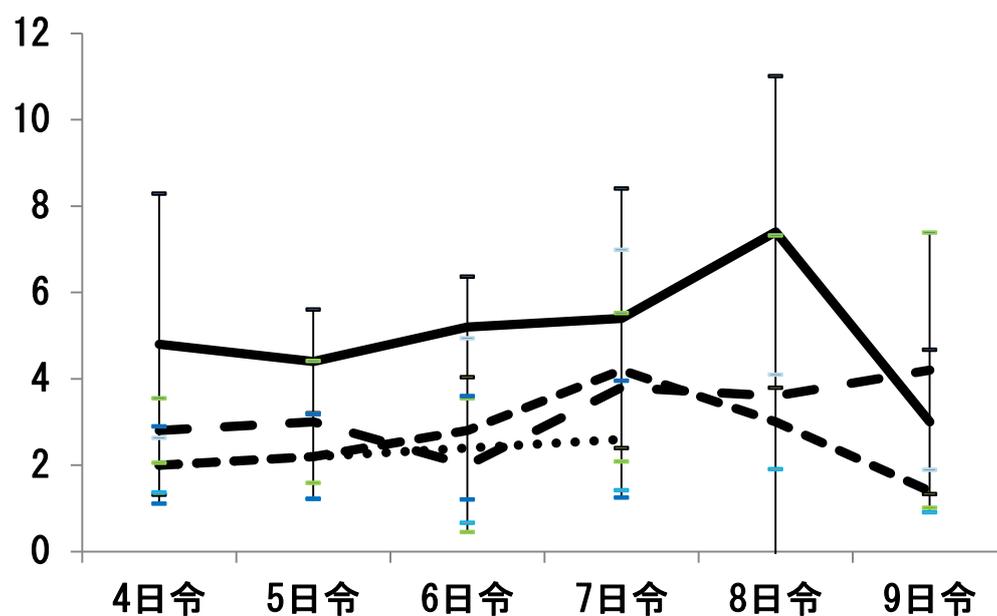


図 14. Walling behavior 頻度 (number of times/30 sec)

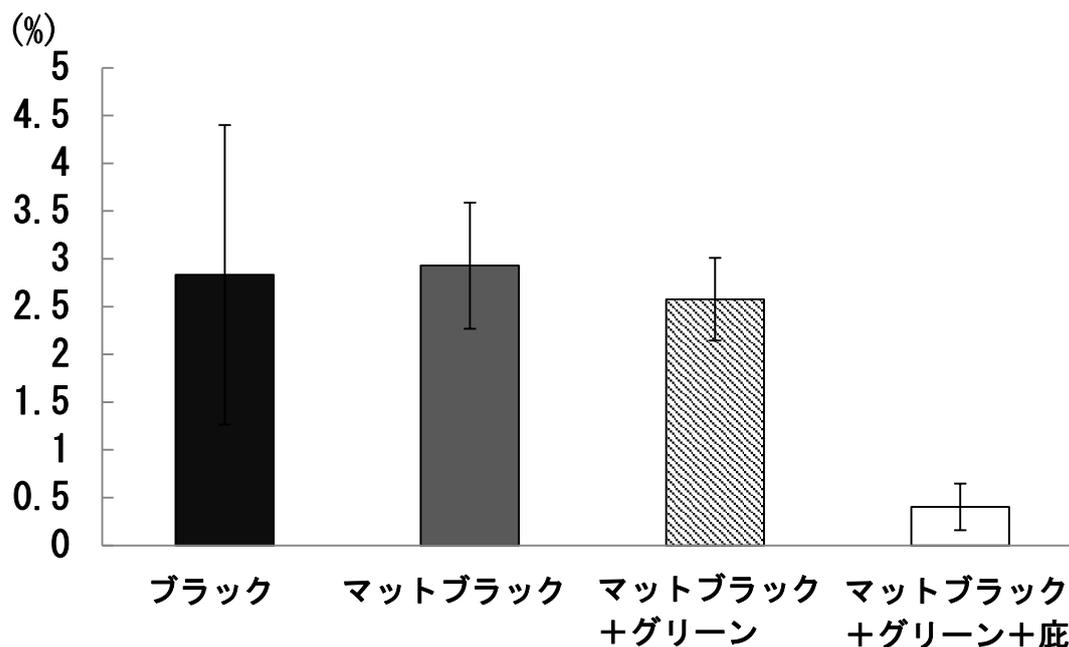


図 15. 各試験区における 20 日令での生残率.

の悪影響が示唆され、庇の覆う飼育水面の面積を今後検討する必要があると考えられる。また全面マットブラックに対し、水深 50 cm までマットブラックにすると顎形態異常率が高い傾向にあったことから、水深 50 cm まで黒色にすることは不十分であると考えられた。

(3)-4 成果の副次的効果、今後の計画等

カンパチを対象に行われた本研究の成果は、同様の顎形態異常の問題を有するブリ属魚類であるブリ、ヒラマサなどの人工種苗生産でも適用できる可能性が高い。今後これらの魚種でも同様の研究を実施し、顎形態異常防除に努めたい。

さらに、本研究は、これまで注意が払われてこなかった魚類の人工種苗生産における水槽壁面色や照度環境と、仔稚魚の行動の関係解明を通じて、ニーズは大きい人工種苗生産が難しい魚種の生産効率を大きく改善できる可能性を示している。

テーマ 1 : 完全養殖システムの構築

研究課題 : (3) DNA マーカーを用いた親魚管理

(3)-5 養殖魚の形態異常防除に向けた形態異常の原因解明と防除策の構築, 低酸素および高二酸化炭素環境がマダイ胚に及ぼす影響

低酸素および高二酸化炭素環境による体節分節異常

研究機関・研究室名 : 水産研究所・大島実験場, 農学研究科・水産学専攻・水産増殖学研究室

担当者職名・氏名 : 大島実験場長・教授 澤田好史, 同助教 阿川泰夫

研究協力者 : 倉田道雄, 本領智記, 佐々木つかさ, 田口泰嗣, 西野貴之

(3)-5 目的

マダイは我が国で最も多数人工種苗生産されている魚種であり, 養殖でも増殖でもその種苗が数千万尾の単位で用いられ, 種苗量産技術が最も進んでいる魚種である。しかしながら現在においても, その人工種苗生産では, 生産した種苗において形態異常個体や, 罹病している個体, 傷を負っている個体などを取り除く選別が不可欠な工程となっている。この選別作業には多くの労力が必要なうえに, 選別の過程でストレスがかかるために, 体調を崩し, その後の魚病発生などにつながることも多い。それゆえマダイにおいても人工種苗の形態異常防除は今なお重要な課題である。

マダイ養殖用種苗における形態異常は, これまで福原(1977), 北島(1978), 隆島(1978)や松里(1986)によって短軀症, 脊椎骨前湾症や側湾症が報告されている。特に短軀症は比較的高率に発生することが知られ, マダイ以外の養殖用種苗, イシダイ, クロダイ, ヒラメ, ニジマスおよびクロマグロなど数多くの魚種で報告されている。また, フナ, ウグイおよびヘダイなどでは天然魚においても報告されていることから, 養殖魚と天然魚の共通の課題として防除策開発が切望される症状の 1 つである。

魚類は多くの骨格を有し, 形態異常の多くは骨形態の異常に起因する。骨形成異常の原因としては, 遺伝的素質, ビタミンやミネラルなどの栄養疾患, 胚発生期および仔魚期の水温や化学物質の影響などさまざまな要因がこれまでに報告されている。しかしながら, 魚類の骨形成異常について, その原因を特定し, 発症のメカニズムを解明した例は少ない。さらに, これらの報告例のなかでも生産現場において実用的な対策を行い得るものは, 鰓の形成不全などによる脊椎骨の前湾症およびビタミン C 欠乏による脊椎の湾曲など数例しかない。例えば, 短軀症の骨症状の 1 つである椎体癒合の原因として, 仔魚期における生物餌料への過剰なビタミン A 添加, およびバクテリアの感染などが報告されている。しかしながら, これらの報告における症状の誘発条件は, 現状の種苗の飼育方法の範囲を大きく越えるものであり, 実際の生産現場においてそれらの知見を応用することは困難である, あるいは, かなり限られた条件でないと応用できないものと考えられる。

本研究では, マダイ優良種苗生産のための技術開発に資する目的で, マダイ脊椎骨異常の原因究明およびその防止策の確立を目指した研究を行った。胚発生期や仔魚期に, 現在の種苗生産現場で起こりえる環境要因である低酸素刺激への暴露などを与えて飼育実験を行い, これらが脊椎骨椎体欠損による短軀症の原因と成り得るかについて検討した。

(3)-5 研究方法

供試卵

近畿大学水産養殖種苗センター浦神事業場で飼育されたマダイ親魚 (雌雄計 23 尾) より自然産卵により得られた受精卵を供試した。産卵水温は約 19℃であった。胚の発生段階を揃えるために、その日最初に産卵された受精卵を親魚水槽より採卵し、卵 20~30 万粒を 20 L 海水とともにポリビニルバッグに入れ、発泡スチロールに収容して近畿大学水産研究所大島実験場に輸送した。輸送中、卵が水面に密集層を形成することを防ぐため、微弱なエアレーションで攪拌した。到着後、500 L ポリカーボネート水槽に設置したゴースネット内に収容し、微弱なエアレーションにより攪拌しながら、10 体節期まで培養した。10 体節期から実験開始とし、実験開始前には卵の分離作業を迅速に行い、浮上卵のみ実験に用いた。

低酸素・高二酸化炭素環境暴露

暴露前に卵 30 粒を採取しその卵径を測定した。海水約 10 L と共に 5~10 万粒をポリビニルバッグに収容した。海水は予め窒素ガスと二酸化炭素ガスを通気させ、6 段階の溶存酸素 (DO) 濃度 (0, 10, 25, 50, 75, 100%) および 3 段階の溶存二酸化炭素 (DC) 濃度 (0, 60, 120 mg/L) に調節した。暴露処理中は水温を維持するため、500 L ポリカーボネート水槽をウォーターバスとして使用し、ポリビニルバッグ内の水温を約 19℃に保った。供試卵が表層に密集するのを防ぐため、ポリビニルバッグは常に揺らした。処理時間は最大 180 分とし、30 分毎 (30, 60, 90, 120, 150, 180 分) に海水を入れたプラスチックボウルへ約 100 粒ずつ取り、孵化まで培養した。処理時間 0 分については暴露処理を行わないものと同様に培養した。処理中は 10 分毎に pH, DO 濃度, DC 濃度を測定した。

処理後培養した卵について、ふ化率を、正常孵化仔魚、異常孵化仔魚、死亡孵化仔魚、未孵化卵、死亡卵の 5 つに分類して求めた。また培養した卵から孵化した仔魚について、ボウルからランダムに取り出した約 100 個体のふ化率、さらに正常個体 20 以上、異常個体 10 以上の体節分節異常率を光学顕微鏡にて調査した。体節分節異常の基準としては、体節が等間隔で規則正しい山形を示している個体を正常とし、体節が等間隔ではない、あるいはその境界が不鮮明なこととした。

統計処理

DO 濃度, DC 濃度および処理時間の数値に対するふ化率および体節分節異常率の相関関係については Spearman's test を用いた。また、各暴露処理条件区による体節分節異常率の差の有意差検定には Student T test を用いた。

(3)-5 結果と考察

全ての DO および DC 濃度条件の実験区のふ化率を図 16 に示した。全ての DO および DC 濃度条件の処理時間 0 分(未処理)区の正常ふ化率は 76%以上、異常ふ化率は 17%以下であった。全ての DO および DC 濃度条件の正常ふ化率は処理時間増加に伴って減少する傾向が見られた。また、DC 濃度と正常ふ化率の間に有意な相関関係はみられなかった($r=0.16$, $p=0.34$)。同様に、DC 濃度と卵の死亡率との間にも有意な相関関係はみられなかった($r=0.32$, $p=0.15$)。

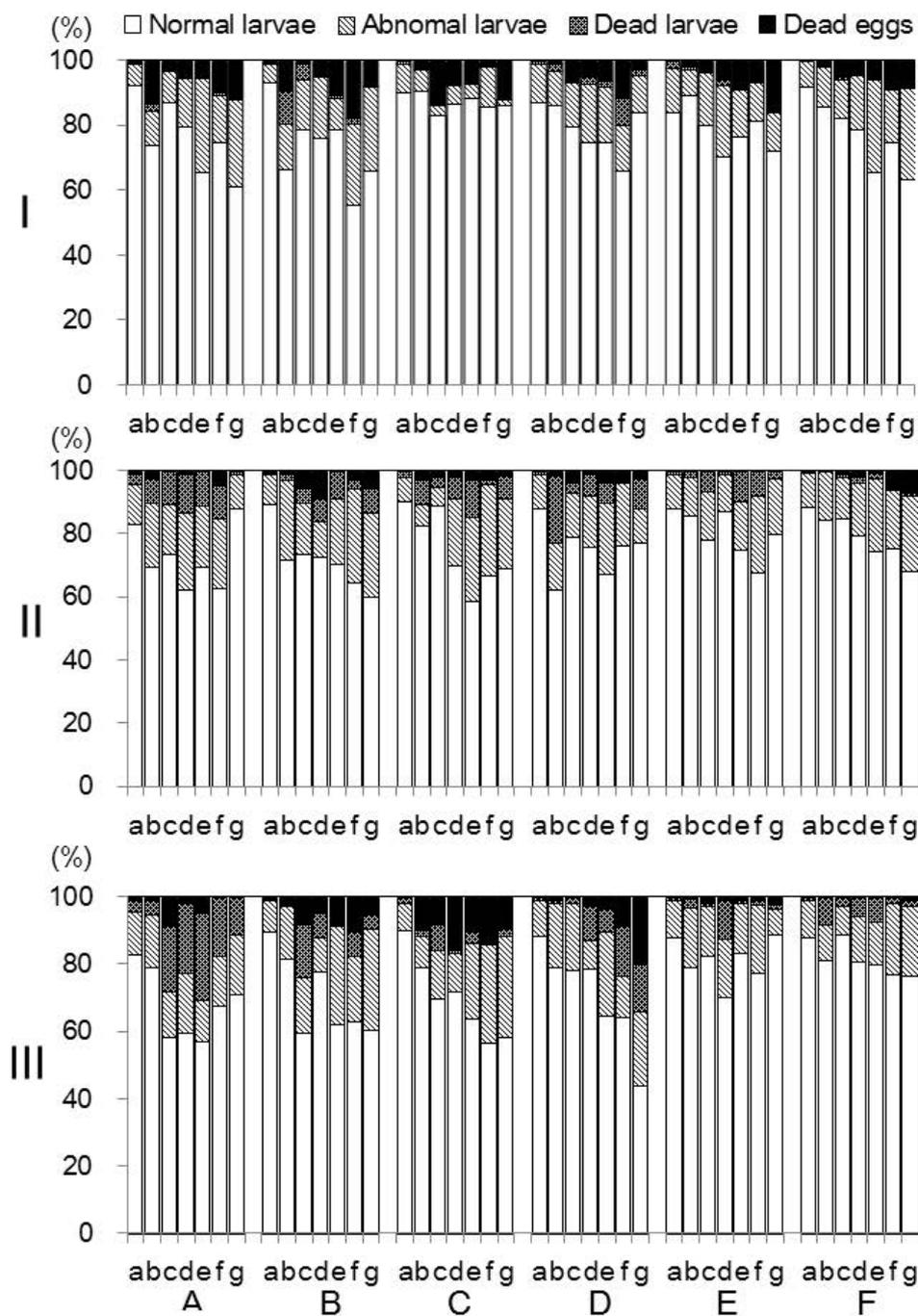


図16. 異なる溶存酸素溶存二酸化炭素濃度に暴露したマダイ受精卵のふ化率。用いた溶存二酸化炭素濃度は、0 (I), 60 (II), and 120 (III) mg/L. A, B, C, D, E および Fは、溶存酸素濃度 0, 10, 25, 50, 75, 100%を示す。横軸の a, b, c, d, e, f, gは 暴露時間0, 30, 60, 90, 120, 150, 180分を示す。

全ての DO および DC 濃度条件の実験区の体節分節異常率を図 17 に示した。これまでの報告と同様に、DC 濃度 0 mg/L の DO 濃度 10% と 0% の低酸素条件で体節分節異常が発生した。また DC 濃度 60 mg/L および 120 mg/L の DO 濃度 25% 以上の比較的 DO 濃度が高い暴露条件区群における体節分節異常率は、DC 濃度 0 mg/L のそれと比較して顕著に高かった ($p < 0.05$)。すなわち DC 濃度 60 および 120 mg/L の高二酸化炭素環境による体節分節異常が確認された。

本研究では、DC 濃度 60 および 120 mg/L の高二酸化炭素環境は、体節形成期胚に対して、体節分節異常を誘導することが明らかとなった。さらに、低酸素と高二酸化炭素環境の両方が有る場合の体節分節異常率相乗効果についても確認された。これまでにマダイでは、本研究で生じたような体節分節異常が椎体欠損に発展することが知られているので、高二酸化炭素環境は脊椎骨異常を誘導する可能性があるといえる。これについては暴露処理をした仔魚を骨格が完成する稚魚期まで飼育して確認した (結果については省略する)。

全条件区の正常ふ化率は処理時間増加に伴って減少する傾向が見られた。DO 濃度 100%、DC 濃度 0 mg/L の高酸素・低二酸化炭素環境においても正常ふ化率が処理時間増加に伴って減少していることを考えあわせれば、処理時間の増加と共に正常ふ化率が減少することの原因は、暴露処理時の物理的な刺激、例えば震盪や器壁との接触が正常ふ化率に影響していることが考えられる。

本実験では高二酸化炭素環境の設定のために、二酸化炭素ガス (分子状二酸化炭素) を用いた。このことについて、一般に海水は二酸化炭素 (全炭酸) の高い溶解力をもつ。また、二酸化炭素ガスが暴露された海水において、一旦分子状二酸化炭素は存在する。その後、分子状二酸化炭素は水と反応し、海水のもつ pH 緩衝作用 (特にアルカリ係数) に制御を受けながら、炭酸水素イオンおよび炭酸イオンとなる。通常の水の状態では、90% 以上が炭酸水素イオンとして存在している。ここで、胚体に対する炭酸水素イオンおよび炭酸イオンは、能動的な陽イオン交換体であるイオンチャンネルの機能を持つ魚類卵膜により、胚へ直接影響を与えていないと推測される。海水中の分子状二酸化炭素は酸素と同様に卵内へ拡散する。つまり、高二酸化炭素環境では、分子状二酸化炭素が胚に対して体節分節異常を誘導する効果を持つと推測される。

二酸化炭素分子は細胞区画内に拡散すると、偏在的な酵素である炭酸脱水素酵素の存在により速やかに炭酸を形成し、酸は即座に水素イオンおよび炭酸水素イオンに解離する。これにより引き起こされる細胞内アシドーシスは多くの生理学的プロセスに関与していると考えられる。しかしながら、低酸素環境により生じる胚の生理学的変化と高二酸化炭素により生じるそれとは同じかどうか不明であるので、両者の体節分節異常の発生機構が同じであるかどうかは不明である。しかし両者においてアシドーシスによる代謝の低下が共通して関連していると考えられる。これについては今後低酸素、高二酸化炭素環境における魚類胚の生理状態を調べることにより明らかにしてゆく必要がある。

これまでに報告されているマダイ、カンパチ、シマアジの低酸素環境による体節分節異常と、今回の高二酸化炭素環境による体節分節異常の種類は同じであった。しかしながら、体節分節異常を欠損、不等およびその他の異常の 3 種類に分類した報告では、低酸素による異常と比較して、高二酸化炭素による体節分節異常は不等の割合が高いという報告がな

されている。低酸素および高二酸化炭素環境暴露による魚類胚の体節分節異常の発生機構の違いは今後解明すべき課題である。

また、これまでに高 CO₂ 暴露 6 時間によるマダイ胚体期の半数致死濃度は 2%であるという報告がなされており、高二酸化炭素環境のマダイ胚に対する致死性および亜致死性の影響が確認されている。しかし、本実験においては処理時間が最大 180 分間という短時間であったため、顕著な致死性の影響はみられなかったものと考えられる。

本研究の結果は、養殖用人工種苗生産における受精卵培養水の溶存酸素、溶存二酸化炭素濃度の管理が重要であること、また循環養殖における再生産でもそれらが同様に重要であることを示している。

(3)-5 成果の副次的効果、今後の計画等

本研究で明らかになった、魚類の胚発生に有害な溶存酸素濃度、溶存二酸化炭素濃度は、天然海域では自然に発生する低酸素濃度海域あるいは水塊 (Oxygen minimum zone; OMZ) や、火山活動が盛んな海域での火山からの二酸化炭素噴出などで観察される濃度である。また一方で、人間活動による海洋への有機物負荷増加による貧酸素海域が増加や、空気中に排出された人間の活動に期限を持つ二酸化炭素が海水中に溶解した場合の濃度にも匹敵していることから、地球規模での環境変動が、魚類の初期発育の阻害を通じてその個体群動態に影響する可能性が示唆される。したがって本研究の成果は、今後天然海域の気候変動と魚類個体群変動の関係を明らかにするために用いることが可能な、大変重要な成果である。

今後は、低酸素、高二酸化炭素環境暴露により、魚類胚の体節分節異常が誘導される生化学的メカニズムを解明するとともに、他魚種でのこれらの環境の暴露の影響を明らかにする予定である。

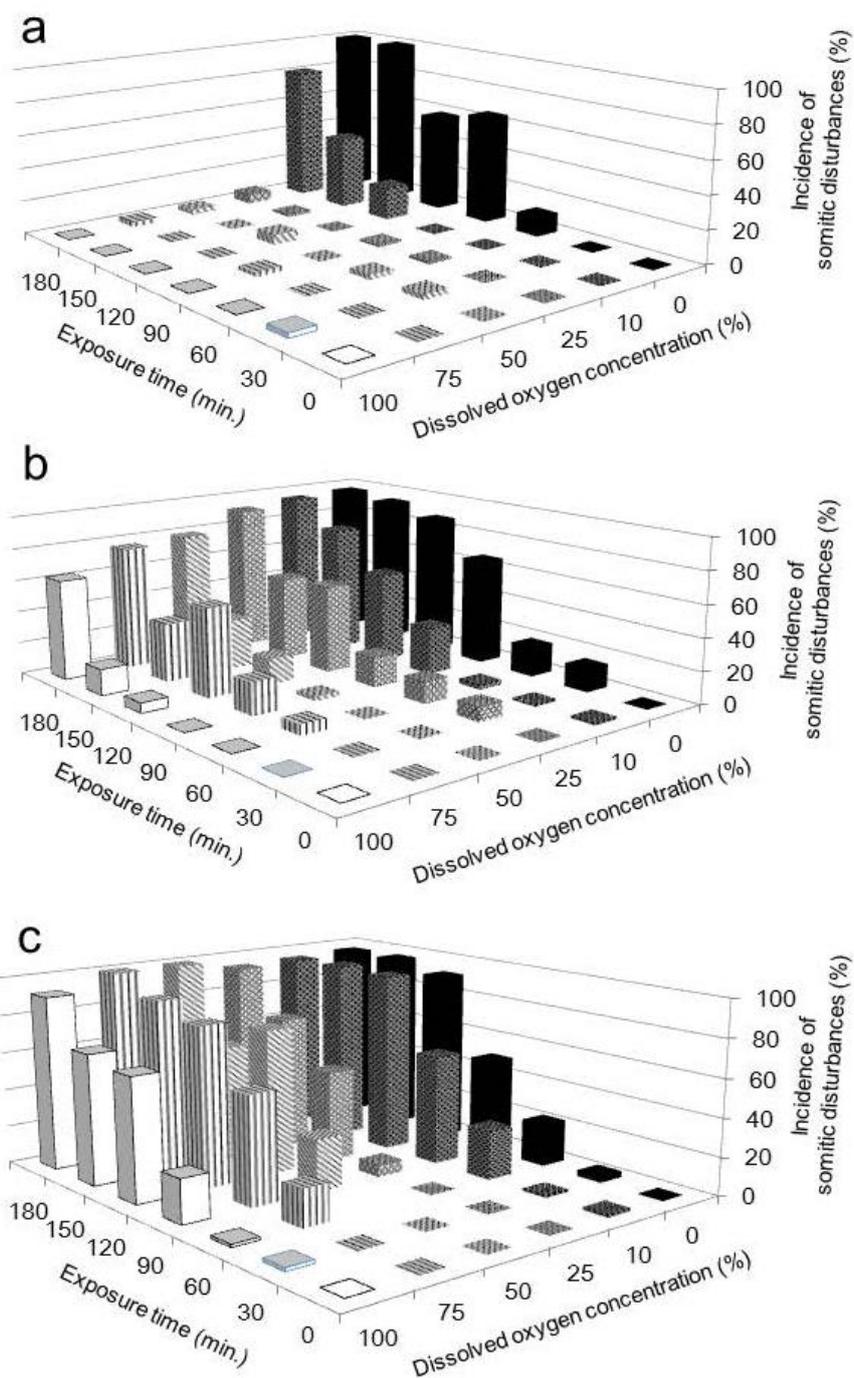


図 17. 10 体節期で通常二酸化炭素濃度(0 mg/L DCD; a), 高二酸化炭素濃度 (60 mg/L DCD; b, と 120 mg/L DCD; c)に暴露した受精卵に発生した体節分節異常の割合

研究テーマ 2：環境低負荷システムの構築

（グループリーダー 農学研究科・教授・江口 充）

研究テーマの概要

養殖という産業活動が自然に与える負荷には大きく 2 つある。ひとつは蓄養で問題になる天然資源の減少と生態系の攪乱である。もう一つは養殖漁場における残餌や養殖魚の排泄物に由来する有機物負荷である。天然資源に頼らず、養殖魚のライフサイクルを人為的に制御する完全養殖が確立されると、一つ目の問題の大半は解決される。しかし、二つ目の問題は解決されない。持続性の高い未来志向の養殖生産技術を確立するためには、環境にやさしい eco-friendly な養殖、すなわち「環境低負荷システムの構築」が必要になる。

本プロジェクトにおける「環境低負荷システムの構築」を目指した環境グループの研究テーマは大きく次の 4 つになる：「物質循環過程の解析と制御」、「有用微生物による養殖場底泥環境の改善」、「環境低負荷配合飼料の開発（Development of feed to reduce environmental load）」、「環境低負荷・省エネ型種苗生産システムの構築」。これら 4 つの研究テーマはすべて eco-friendly な養殖技術の確立に寄与する。

養殖漁場での環境問題の代表格は残餌や排泄などによる有機物負荷である。「物質循環過程の解析と制御」では、養殖に由来する有機物負荷が引き起こす環境問題（有機汚濁、底層の貧酸素化、水域の富栄養化など）の発生メカニズムを解明し、その制御の可能性を探った。「有用微生物による養殖場底泥環境の改善」では、養殖漁場の海底に堆積する硫化物を低減する方策について有用微生物である麹菌の利用法について検討し、養殖漁場の海底泥で検出した乳酸菌の分布を調べることで、硫化物の蓄積などの予測に役立てる可能性を探った。養殖漁場への有機物負荷は元を正せばすべて餌飼料である。したがって、環境低負荷型飼料の開発は eco-friendly な養殖に直結する。「環境低負荷配合飼料の開発」では、飼料に使用する魚粉に代るタンパク質源として豆乳から調製した新しいタイプの大豆タンパク質に注目した。飼育排水や光熱費を低減させることも環境低負荷型の養殖技術の確立に役立つ。「環境低負荷・省エネ型種苗生産システムの構築」では、種苗生産期で水槽に照射する光波長、水槽の形状と流動制御、超高密度飼育法の開発に取り組み、効率的な省エネ型種苗生産システムの開発を試みた。

地球は有限である。限りある資源を持続的かつ有効に利用するためには、養殖においても「環境低負荷システムの構築」が重要な使命となる。3 年間のプロジェクトで一定の成果を得ることは出来たが、養殖における「環境低負荷システムの構築」が完遂されたわけではない。今後も継続して研究・開発を行うことが、本プロジェクトに関わった研究者には求められる。

テーマ 2：環境低負荷システムの構築

研究課題：(1) 環境低負荷・省エネ型種苗生産システムの構築

研究機関・研究室名：農学研究科・水産学専攻・水産増殖学研究室

担当者職名・氏名：教授 石橋泰典

研究協力者：松本太郎，武田崇史，北村章博，酒井瑛介，今川貴之，谷口友希，三好映実，
小林桃子，辻 貴大，池田大起，山本紗耶加，長岡生真

クロマグロ、クエ等の難種苗生産種の完全養殖は10年以上前に成し遂げられたが、未だに生産効率が低く、大量の飼育排水やそれに関わる光熱費等の経費の高さが、大きな問題の一つになっている。また、マダイ等の一般的な養殖種苗でも感染症の発生等で生残率が不安定なことがあり、低コストで高効率な生産モデルの開発が望まれている。これらの対策の一つとしては、優れた飼育環境で生残率をできるだけ高め、減耗の多い時期に特定して、可能な範囲の高密度生産で飼育水量を削減することが重要になると考えられる。これらが実現できれば、陸上水槽の飼育排水に伴う環境負荷、かけ流し飼育に必要な光熱費、大型水槽の管理に要する労力が劇的に軽減され、環境低負荷・省エネ型種苗生産システムの構築が可能になると考えられる。

そこで本研究は、まず、様々な仔稚魚の飼育成績を高めるために光波長等の環境特性を調べた。また、仔稚魚の適切な飼育水塩分についても検討した。次に、対象種毎に適切な水槽形状、流動制御法を詳細に調べ、生残率を劇的に改善する水槽と飼育水流動条件を検討した。さらには、小型水槽による高密度生産方法の検討を行った。すなわち、小型水槽で飼育水の排出量を低減し、光熱費と労力を削減できる環境負荷の少ない省エネ型種苗生産システムの開発を目指し、下記のような実験を実施した。

(1)-1 数種仔稚魚の光波長特性

(1)-1 目的

摂餌開始期は視覚が十分に発達していないため、特定の波長光で仔魚の摂餌や行動を制御できる可能性がある。そこで、まずクエ稚魚を用い、視細胞オプシン遺伝子の同定と網膜電図を調べて視覚特性を検討した。次に、クロマグロおよびクエ仔魚の摂餌開始期および仔稚魚の発育に伴う視細胞オプシン遺伝子の発現解析を行った。さらに、光子量を合わせた白、UV、青、緑および黄色の LED 下で仔魚の摂餌活生、遊泳行動、飼育成績等を比較し、数種魚種の光波長特性を調べた。これによって仔魚の飼育に適切な光環境を明確にしようとした。

(1)-1 研究方法

a. クエ網膜の視物質オプシン遺伝子の同定

全長 27.6 ± 0.8 cm, 体重 273 ± 27.5 g のクエ 2 歳魚を 3 尾取り上げ、麻酔・即殺後に RNA later 溶液中で網膜を採取して、 -80° で保存した。また、全長 8.9 ± 0.5 mm の 40 日齢の魚を取り上げ、麻酔・即殺後に RNA later 溶液中で眼を採取して、 -20° で保存した。

DNA および RNA を抽出後, RNA を逆転写し, cDNA 合成した。それぞれから得られた DNA を PCR し, 電気泳動でバンドを検出した。目的のバンドから DNA 断片を抽出し, TA クローニングののち, シーケンシングを行った。得られた塩基配列を BLAST 検索にかけ, 既報の視物質オプシン遺伝子と相同性を確認した。

b. クエの網膜電図 (ERG) による分光応答および暗所視感度特性の解析

明順応, 暗順応, それぞれの条件下で網膜電図による分光応答を測定した (図 1)。すなわち, 10 ヶ月齢のクエ稚魚を麻酔・不動化し, 海水を口から還流して呼吸を確保し, 生きている状態を維持した。刺激光源としてキセノン灯 (150 W) と分光器によって得た単波長光 (340-640 nm) を用い, 光子量を ND フィルタで明順応の 1×10^{15} photons/cm²/s と暗順応の 6.3×10^{11} photons/cm²/s に統一して, クエの眼に 300 ms 照射した。

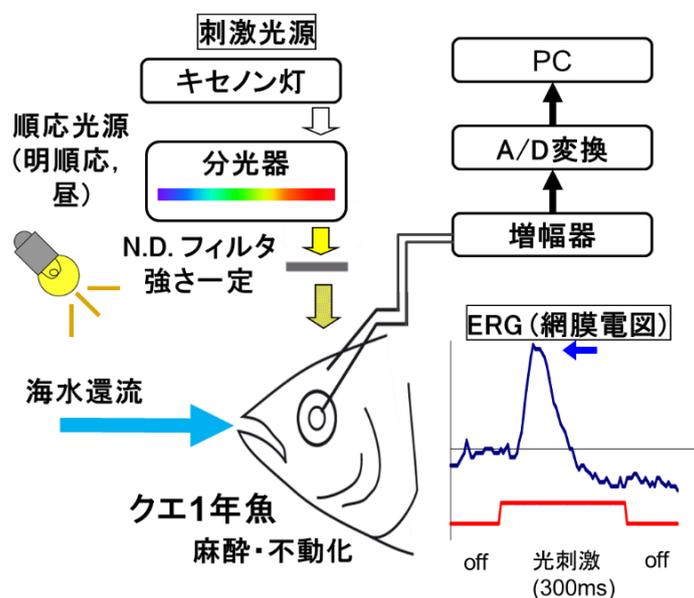


図1. 測定の機材, 概略図と測定された網膜電図 (ERG)

網膜で発生した電圧を銀線電極で拾い, 増幅器, AD 変換器を通してコンピュータに取り込んだ。網膜電図波形の一例を縦軸電圧, 横軸時間の図で示した (図 1)。光刺激で生じた電圧の高さを網膜活動の指標として解析した。この実験は昼間に明順応, 夜間に暗順応の条件で行った。明順応の測定には刺激光源とは別に網膜の明順応を維持するために電球を点灯した状態で行った。また, 網膜電図による暗所視感度を, 分光応答とほぼ同じ方法で測定した。すなわち, 分光応答と同じ実験装置 (図 1) を用い, 光源に 503 nm の緑色 LED による単色光を使って, 光の強度を段階的に強くした。光刺激で生じた電圧の高さを網膜活動の指標として解析した。

c. クロマグロおよびクエ仔魚の視物質オプシン遺伝子の発現解析

クロマグロについては中村らの報告した視物質オプシン遺伝子のプライマーを使い, 摂餌開始期における遺伝子の発現解析を行った。一方, クエについては, 上記で得られた視物質オプ

シン遺伝子の特異的プライマーとクロマグロ用のプライマーを用い、4日齢から10ヶ月齢の仔稚魚の発現解析を行った。

d. クロマグロ等の仔魚の摂餌、行動等に及ぼす光波長の影響

100 L水槽に3日齢仔魚を収容し、一定光子量のUV、青、緑、黄および白色LED光を照射して、腸管ワムシ数を計測した。また、2 Lビーカーに各種日齢の仔魚を収容し、一定光子量の上記LEDおよび暗黒下で、腸管ワムシ数を調べた。さらに、上記と同条件の2 L水槽に異なる日齢の仔魚を収容し、浮上死亡率等を比較した。

(1)-1 結果と考察

a. クエ網膜の視物質オプシン遺伝子の同定

2歳魚クエの網膜からは *Rh1* (rhodopsin), *SWS2A1*, *SWS2A2* (blue-sensitive), *Rh2A1-2* (green-sensitive), and *LWS* (yellow-red-sensitive) の5種類のオプシン遺伝子の発現が検出され、完全長を解析した。また、クロマグロ用のプライマーを用い、40日齢の魚で調べたところ、*Rh2A1-1*, *Rh2A2*, *g6738* および *g6740* の4つの *Rh2* 遺伝子と *SWS1* の発現が確認された。結果的に、クエから10種類の視物質オプシン遺伝子 [*Rh1*; *Rh2A1-1*, *Rh2A1-2*, *Rh2A2*, *g6738*, *g6740*; *SWS1*; *SWS2A1*, *SWS2A2*; *LWS*] が検出された。海産魚から5種類もの *Rh2* 関連遺伝子が見つかった例は大変少ない。2歳魚では *SWS1* オプシン遺伝子 (Violet-UV) はRT-PCRによって検出されなかったが、40日齢の魚からは検出された。

b. クエの網膜電図(ERG)による分光応答および暗所視感度特性の解析

明順応:クエ10ヶ月齢魚の昼間における明順応の分光応答曲線を示した(図2)。光強度を 10^{15} に統一した時の電圧を相対値で縦軸に示し、横軸には光の波長を示した。この図よりクエは見える光の波長が幅広く、最大感度が580 nm付近にあることがわかった。水中での減衰が大きい長波長の光を感じず *LWS* オプシンの発現と580 nm付近に最大感度があることは、沿岸の比較的浅い水深に多く生息するクエの生態と関連していると考えられた。400から580 nmの可視光の範囲では、RT-PCRで検出された3種類のオプシン遺伝子に対応するピークが観察された。すなわち、感度の高い順に、*LWS* = 580 nm, *Rh2* = 500 nm, *SWS2* = 400 nm 付近であることが示唆された。2歳魚では *SWS1* オプシン遺伝子 (Violet-UV) はRT-PCRによって検出されず、10ヶ月齢魚でも *SWS1* の発現量が低くなっていた。しかし、10ヶ月齢魚のERGでは360 nm付近に小さなピークが観察された。360 nm付近のUV感度ピークは、*SWS1* 以外の視物質が紫外部にもつ2番目の感度ピーク、すなわち、 β バンドによると考えられた。

暗順応:クエ10ヶ月齢魚の夜間暗順応時の分光応答曲線を示した(図3)。夜間には感度の高い桿体が主に働くため *Rh1* オプシンによる500 nm付近に感度のピークが見られるほか、昼間と同様に360 nm付近では β バンドによると考えられる2番目のピークが観察された。これより、クエの眼は緑色の光が多い沿岸の光環境に適応していること、 β バンドによるUV感度により、見える波長の範囲が広いことが推測された。

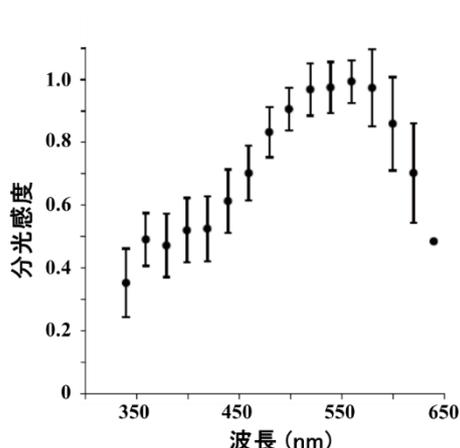


図2. クエ10ヶ月齢稚魚の明順応下での分光応答曲線

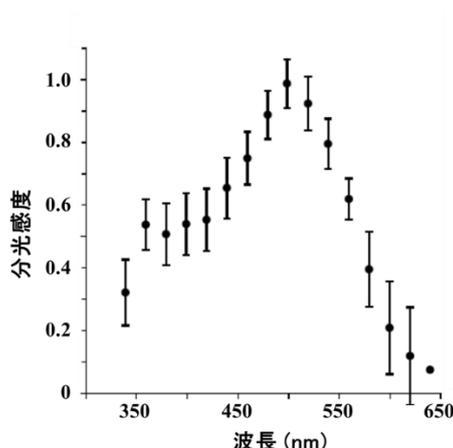


図3. クエ10ヶ月齢稚魚の暗順応下での分光応答曲線

暗所視感度: 図4には、暗所視感度曲線を示した。すなわち、縦軸に網膜電図の電圧を最大値1とした時の相対値を、横軸に光強度を光子量の対数で示し、図にプロットした。

暗所視感度では、光を感知できる閾値を求める必要がある。しかし、網膜電図で電圧が0になる閾値を求めることが非常に困難なため、網膜の反応が最大値の5%になる値、すなわち、相対値が0.05に達する光の強さの対数値を $\text{Log}(0.05 I)$ として閾値の代わりに用いた。その結果、クエは、既報のクロマグロやマサバより感度が高く、シマアジと同様に暗所視感度の高いことが示唆された。

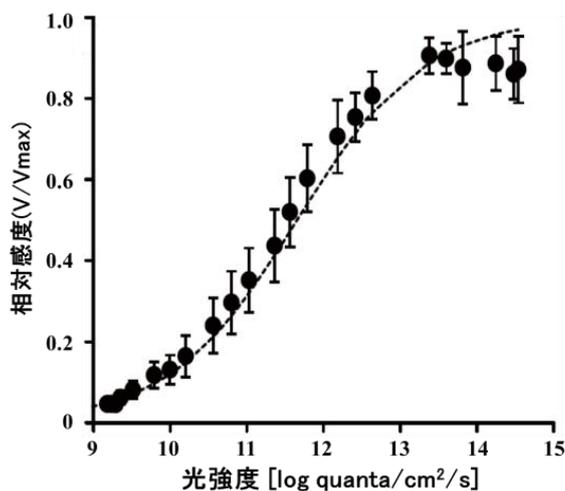


図4. クエ10ヶ月齢稚魚の503nm光に対する暗所視感度

c. クロマグロおよびクエ仔魚の視物質オプシン遺伝子の発現解析

クロマグロ仔魚では、摂餌開始期にはほとんどの視細胞オプシン遺伝子が発現しており、摂餌開始期から多くの波長光を認識できる可能性のあることが示唆された。一方、クエ仔

魚の各種オプシン遺伝子の発現解析を行った結果、14–40日齢の仔魚期に *LWS* の発現が見られなくなった（図5）。また、発育に伴って *SWS1* から *SWS2* へオプシン遺伝子が入り替わる傾向が観察され、発育初期に視感度特性の変化すること、特定の波長光が種苗生産に利用できる可能性の高いことがそれぞれ示唆された。

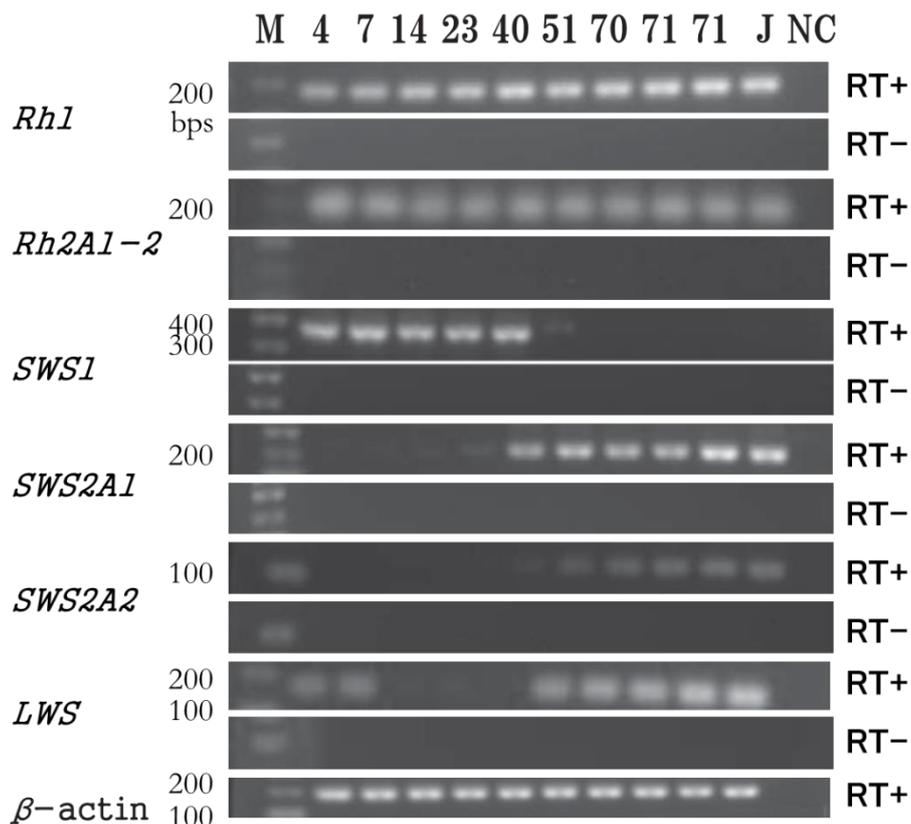


図5 クエ仔稚魚の発育に伴うオプシン遺伝子の発現変化。 bps, base pairs of DNA fragments; M, ladder marker; NC, negative control (without samples); Nos. 4–71日齢仔魚; J, 10ヶ月齢稚魚; RT+, reverse-transcribed samples; RT-, minus reverse transcriptase (“-RT”) controls. β -actin の発現は positive control として示した。

d. クロマグロ等の仔魚の摂餌，行動等に及ぼす光波長の影響

クロマグロ等の仔魚では、特定の波長光で摂餌活性，遊泳速度，浮遊率，浮上死発生率等の高まることがそれぞれ示された。すなわち、仔魚期の初期は各種波長光で摂餌，行動，飼育成績等を制御できる可能性の高いことが、それぞれ示唆された。

(1)-1 成果の副次的効果，今後の計画

今回の実験で、多くの学生に学会発表の機会を設けることができた。また、光波長で仔魚期の摂餌，行動，飼育成績等を制御できる可能性の高いことが示唆された。しかし、他

の多くの魚で明確になったわけではなく、詳細については不明瞭な部分がある。今後は、クロマグロ、クエ等を含む様々な仔稚魚を用いて、光波長制御の影響を詳細に検討していく必要があると考えられた。

(1)-2 数種仔魚の飼育水流動条件

(1)-2 目的

クロマグロおよびクエ仔魚で減耗の著しい10日齢までの生残率を高めるため、水槽形状および流動制御法が生残率等に及ぼす影響を調べた。

(1)-2 研究方法

水槽形状および水流発生法の異なる200L透明水槽にクロマグロ、クエ等の受精卵を収容し、10日齢まで飼育して、生残率等を比較した。試験区は、平底および丸底水槽に通気を設けた平底および丸底通気区、水槽の中央排水管内に下向き水中ポンプを設けた平底および丸底循環区の4試験区を設けた(図6)。続いて、適切な流動条件を検討するため、丸底水槽を用い、通気量が40~600ml/分、ポンプ流量が0.5~6.0L/分の試験区をそれぞれ設けて、生残率等を検討した。

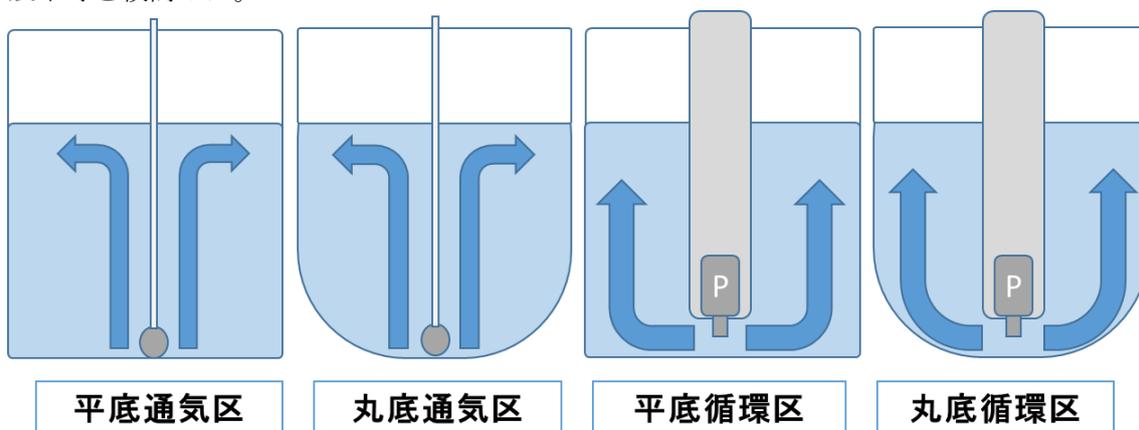


図6 水槽形状および水流発生法の異なる各種試験水槽の模式図

(1)-2 結果と考察

クロマグロの生残率および成長では、底面が半球状の水槽を用い、中央排水管内の水中ポンプで水槽底面に水を噴射する丸底循環区の飼育方式が最も優れていた。一方、クエでは、底面が半球状の水槽でエアレーションを施す丸底通気区の飼育方式で生残率および成長が著しく高くなった。どの魚種でも底面が半球状の水槽を用いることで優れた飼育成績が得られたが、クロマグロでは6.0L/分のポンプ流量で、クエでは200ml/分の通気で、それぞれ安定した高い生残率、摂餌量および成長の得られることが示唆された。

(1)-2 成果の副次的効果、今後の計画等

今回の実験で、多くの学生に学会発表の機会を設けることができた。また、多くの魚種に丸底水槽を使うことで優れた飼育成績が得られること、魚種によって適正な飼育水の流動条件が異なることがそれぞれ示唆された。しかし、詳細な部分ではさらに調べる必要があり、魚種を変えて今後、詳しく検討する必要があると考えられた。

(1)-3 数種仔魚の高密度飼育方法

(1)-3 目的

上記の優れた飼育条件下で、減耗の多い仔魚期初期をどの程度の高密度で飼育できるかについて検討した。また、大型水槽を使って期間限定の高密度飼育の可能性を調べ、環境低負荷・省エネ型種苗生産システムのモデル開発を試みた。

(1)-3 研究方法

上記で実施した飼育水流動環境等の優れた飼育条件下で、マダイおよびクロマグロの仔魚を0.3万～10万尾/m³で収容し、生残率等の飼育成績をそれぞれ比較した。続いて、高密度飼育の実用性を見るため、クロマグロ仔魚を複数の1 m³底面円錐水槽で高密度飼育し、通常の20 m³コンクリート水槽と飼育成績を比較した(図7)。

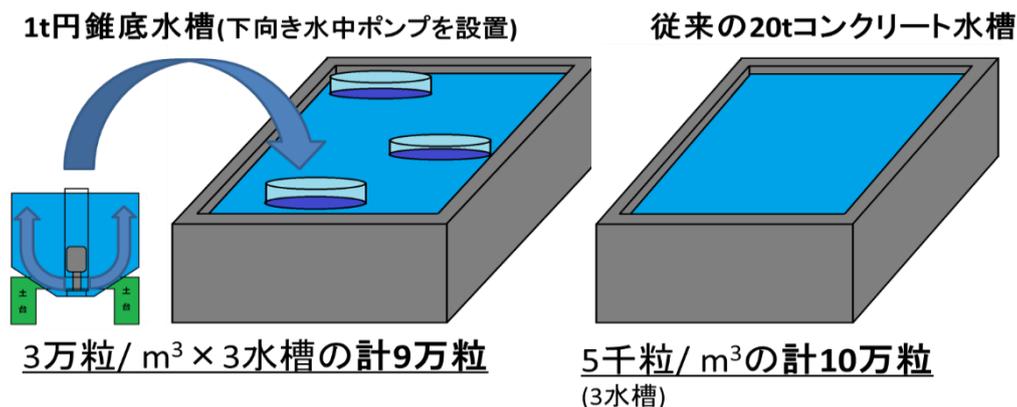


図7 実用レベルでの高密度飼育実験の模式図

(1)-3 結果と考察

マダイ仔魚では飼育密度を変えても成長、生残率等に顕著な差はなかった。一方、クロマグロでは、10日齢の生残率と成長が密度の増加に応じてわずかに低下したが、10万尾/m³の仔魚生産数は0.3万粒/m³のその数倍以上になり、高密度飼育が有効なことが示唆された。

そこで、高密度飼育の実用性を見るため、1 m³底面円錐水槽の高密度飼育と20 m³コンクリート水槽の通常飼育で飼育成績を比較した(図7)。その結果、両試験区に生残率の大きな差はなかった。すなわち、最適な水槽形状、流動条件下で、受精卵を3～10万粒/m³で収容しても高い生残率が得られるため、初期減耗の発生時期だけ複数の1～2 m³程度の小型水槽で高密度生産し、

環境低負荷システムの構築

環境低負荷・省エネ型種苗生産システムの構築（石橋）

全長 5mm 以降に状態の良い水槽群を選んで大型水槽へ広げる方法が最も効率的であることがわかり、低環境負荷、省エネ型飼育モデルの実用性が示唆された。

(1)-3 成果の副次的効果、今後の計画等

今回の実験から、環境低負荷・省エネ型種苗生産システムのモデルを開発できた。しかし、特定の魚種で検討したに過ぎず、詳細な部分ではさらに調べる必要がある。魚種や発育段階を変え、今後さらに、詳しく検討する必要があると考えられた。

テーマ 2：環境低負荷システムの構築

研究課題：(2) 環境低負荷配合飼料の開発

研究機関・研究室名：近畿大学水産研究所・浦神実験場

担当者職名・氏名：近畿大学水産研究所・講師・ビッシャシュ アマル

研究協力者：実験補助：滝井健二，大西堯行

魚類の完全養殖のさらなる高度化・効率化を推し進める技術開発を介して，海洋生物資源の維持と食糧タンパク質の確保に有効な解決法を提示し，世界的な魚類養殖の発展に貢献できる基礎・応用的知見の集積を目的とする。

本課題では，我が国の代表的な養殖魚種であるマダイを対象にして，豆乳から調製した新しいタイプの大豆タンパク質に注目し，まず，魚粉に代わるタンパク質源としての利用性と利用性の向上に有効な生理活性物質や機能促進物質について検討し，併せて，環境負荷・汚染の低減効果についても調べた。次いで，開発された低環境負荷飼料の効果的な給餌方法についても検索した。これまで，低環境負荷を目的にした無・低魚粉飼料が開発されているが，実用に当たっては嗜好性や飼育成績に多くの問題を抱えているだけでなく，効果的な給餌方法まで明らかにした報告はみられない。一方，クロマグロの完全養殖は 2002 年に達成されるとともに，稚魚用配合飼料の開発も 2005 年に行われたが，その生理生態機構の解明や養成技術の確立はいまだに進んでおらず，産業化の進展を妨げている。そこで，クロマグロの養成技術の確立に大きく貢献できるエネルギー分配についても検討し，その種特異性から養成の効率化に有効な給餌方法を提案しようとした。

(2)-1 大豆タンパク質・コーングルテンミールによるマダイ稚魚用低魚粉飼料の開発

(2)-1 目的

マダイは日本で最も重要な海産養殖魚種の 1 つである。マダイ用配合飼料にはタンパク質源として主に魚粉が用いられるが，世界的な人口の増加や原料魚の著しい資源減少，魚類養殖産業の拡大などで，魚粉の供給が滞って高騰が続いている。そこで，魚粉の代替タンパク質源に関する研究が不可欠かつ急務になっている。これまで，代替タンパク質源として安定な生産と比較的安価な大豆粕とその関連製品，例えば，脱皮脱脂大豆粕（SBM）や大豆濃縮タンパク質（SPC）などが注目されたが，マダイ消化器官の塩基性プロテアーゼ活性は，大豆トリプシンインヒビター（SBTI）に高い感受性を持つことから，魚粉に対する SPC 代替率は 20-30% で低いことが知られている。しかし，植物タンパク質源とチキンミールによって魚粉の 50-90% を代替できること，また，オキアミやイカミールなどを組み合わせた無魚粉配合飼料も開発されている。しかし，これらにはいくつかの問題点も残されている。例えば，我が国におけるチキンミールの生産量は少なく，ミートボーンミールの利用についても安全性や工場認定に制限があり，また，オキアミミールやイカミールの生産量は僅かで魚粉よりかなり高価であることから，実用に向かないのが現状である。そこで，本研究では脱脂大豆粕から調製した豆乳を原料とする新たな精製大豆タンパク質（SP）

の利用について検討した。なお、SSPのSBTI活性はSPCのそれよりかなり低いことが知られている。

(2)-1 研究方法

本研究にはSBTI活性（TI）が36, 21および13 TIU/mgの、SP-1, SP-2およびSP-3を用いた。なお、SPのTI活性は加熱温度と加熱時間を調整して低減した。また、SBMのTIは一般的に76 TIU/mg前後である。

表1 飼料組成および一般成分

| | FM | TI ₃₆ | TI ₂₁ | TI ₁₃ |
|----------------|------|------------------|------------------|------------------|
| 原料 (%) | | | | |
| 魚粉 | 67.0 | 13.5 | 13.5 | 13.5 |
| SP-1 | | 46.0 | | |
| SP-2 | | | 46.0 | |
| SP-3 | | | | 46.0 |
| コーングルテン | | 11.5 | 11.5 | 11.5 |
| 魚油 | 7.0 | 10.0 | 10.0 | 10.0 |
| α-スターチ | 10.0 | 3.0 | 3.0 | 3.0 |
| ビタミン混合物 | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 3.0 |
| ミネラル混合物 | 5.0 | 9.0 | 9.0 | 9.0 |
| 大豆レシチン | | 2.0 | 2.0 | 2.0 |
| セルロース | 8.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| タウリン | | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| フィターゼ (FTU/kg) | | 1000 | 1000 | 1000 |
| 一般成分 (%) | | | | |
| 相タンパク質 | 53.0 | 52.6 | 52.4 | 52.4 |
| 相脂質 | 13.0 | 15.1 | 14.4 | 14.4 |
| 相灰分 | 13.1 | 11.8 | 11.9 | 11.6 |
| 糖質 | 12.6 | 13.6 | 14.7 | 12.9 |
| エネルギー (kJ/g) | 20.5 | 21.3 | 21.8 | 21.8 |
| リン (g/kg) | 24.4 | 20.7 | 19.5 | 21.1 |

SP-1, SP-2 および SP-3 の TI 活性はそれぞれ 36, 21 および 13 TIU/mg

表1に示すように対照のFM飼料には魚粉、魚油、α-スターチ、ハーバー処方（ビタミンおよびミネラル混合物、セルロース）などを配合した。TI₃₆、TI₂₁およびTI₁₃飼料にはFMの魚粉の80%をSP-1、SP-2およびSP-3とCGMの混合物で代替した飼料を用いた。なお、TI₃₆、TI₂₁およびTI₁₃にはFMのセルロース含量を減量して、ミネラル混合物を増量し、新たに大豆レシチン、タウリンを加え、外割でフィターゼを添加した。飼料の一般成分についてみると、各飼料とも同窒素・エネルギー量に調整できたが、粗灰分およびリン含量は各TI飼料がFM飼料に比べて低くなった。

平均体重 19.2 g の稚魚を、屋内 300 L 容塩化ビニール製角型水槽に 20 尾ずつ収容して、各飼料につき 3 反復の試験区を設けた。各試験区には所定の飼料を週 6 日、1 日 2 回飽食給与して 10 週間飼育した。飼育期間中の平均水温および溶存酸素濃度はそれぞれ、 24.2 ± 0.8 °C および 8.3 ± 1.2 mg/L であった。飼育期間における各試験区の飼育成績やみかけの栄養素蓄積率、終了時には消化率や血漿化学成分を測定した。

(2)-1 結果と考察

終了時における FM 区、TI₂₁ 区および TI₁₃ 区の平均体重と飼料効率に有意差は認められなかったが、TI₃₆ 区は有意に劣っていた（図 1）。しかし、日間給餌率、肥満度および生残率に有意な区間差はなかった。

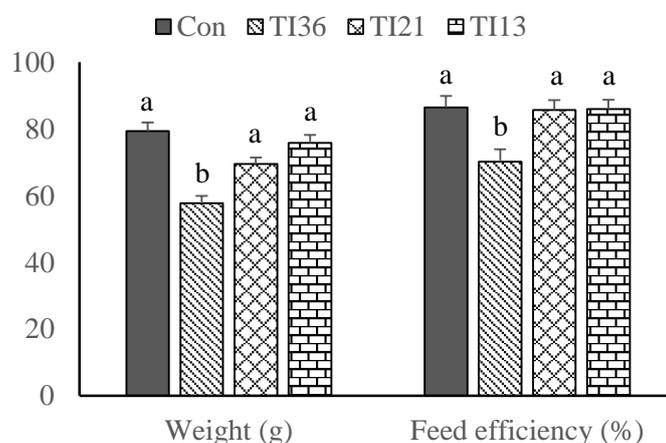


図1 終了時における各飼料区の平均体重および飼料効率
「 $100 \times \text{総増重量} / \text{総摂餌量}$ 」。同じ肩文字間に有意差はない ($P > 0.05$)

SP による魚粉の代替で飼料に対する嗜好性の低下が懸念されたが、本研究において、TI 活性 ≤ 21 TIU/mg の SP と CGM の混合物で魚粉の 80% を代替した飼料でも、マダイの嗜好性を低下させず飼育成績を FM 区と同様に高く維持できることが示された。これは、SP の TI 活性を低減させることで、マダイ稚魚の SP の利用性が改善され、優れた成長を維持できることを示した最初の知見である。本研究で用いた SP の必須アミノ酸指数は、FM を標準タンパク質として求めると 82.7 と比較的 low かった。一方、試験飼料のタンパク質含量はいずれも 52% 前後であったことから、TI₃₆ 区の成長や飼料効率の低下は飼料タンパク質含量に基づくのではなく、高い TI 活性に起因することが推察された。

次に、みかけの栄養素消化率および蓄積率を表 2 に示した。みかけのタンパク質およびエネルギー消化率に有意な区間差は認められなかったが、みかけの蓄積率は終了時の平均体重と飼料効率に類似した区間差が認められた。したがって、豆乳から精製した低 TI 活性の SP は、FM の有望な代替物であることが示唆された。しかし、TI₃₆ 区では消化率による TI 活性の影響は認められなかった。先にも示したように、TI₃₆ 区の日間給餌率に区間差は認められなかったが、終了時の体重は他区に比べて低かったことから、期間の総摂量も減少

環境低負荷システムの構築
環境低負荷配合飼料の開発（ビッシャシュ）

したことになる。おそらく、TI₃₆区ではTI阻害に対して塩基性のタンパク質消化酵素の合成・分泌を促進し、適応していたものと考えられる。そのために、消化吸収に係わるエネルギー消費が増加して飼料効率やみかけのエネルギー蓄積率が有意に低下したのであろう。いずれにしても、FMの代替源としてSP-2およびSP-3とCGMを併用したことが、マダイ稚魚の成長および健康へ悪影響を及ぼさないことが示された。

表2 終了時における各飼料区のみかけの栄養素消化率および蓄積率。

| | FM | TI ₃₆ | TI ₂₁ | TI ₁₃ |
|------------------|---------------|---------------------------|------------------|-----------------------|
| みかけの栄養素消化率 (%) | | | | |
| タンパク質 | 94.7 | 94.0 | 95.9 | 96.0 |
| エネルギー | 87.6 | 92.0 | 93.1 | 92.9 |
| みかけの栄養素蓄積率 (%) * | | | | |
| タンパク質 | 30.4±0.5 a | 23.4±2. 2 ^b | 31.2±0.2 a | 31.5±0.9 ^a |
| エネルギー | 42.1±1.1 a | 28.1±4. 1 ^b | 37.5±2.1 a | 38.9±0.9 ^a |

* 平均 ± 標準偏差 (n=3)

同じ肩文字間に有意差はない (P>0.05)

リンは環境負荷・汚染にかかわる元素であるため、漁場海域においてその負荷を低減することは、養殖産業にとっても重要な目標の一つである。図2に各飼料区におけるリン排出量を示した。FM区に比べてTI₂₁区およびTI₁₃区では漁場へのリン負荷量を半分程度まで低減できた。これは、TI₂₁およびTI₁₃飼料の低リン含量と優れたリン消化率・蓄積率に基づくのであろう。

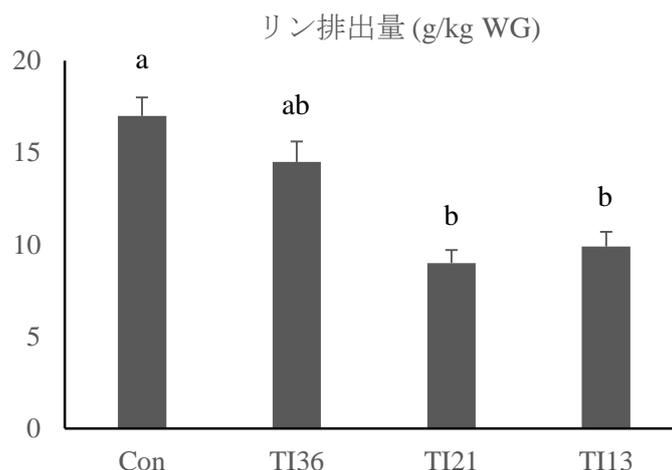


図2 終了時における各飼料区のリン排出量。同じ肩文字間に有意差はない (P>0.05)

本研究の結果から、マダイ稚魚に対するSPの利用性はそのSBTI活性に関係し、その低減が最も重要・有効であることが示された。また、SPのSBTI活性が21 TIU/mg以下であ

れば、消化機能は十分に適応でき優れた成長を維持できることが示唆された。さらに、血漿化学成分および比器官重値に有意な区間差が認められなかったことから、飼料の魚粉を SP-2 および CGM の混合物で 80% 代替した低魚粉飼料を実用できることも示された。すなわち、環境に優しい飼料を開発できたことになる。

(2)-1 成果の副次的効果、今後の計画等

SP と CGM の混合物による魚粉の 80% 代替は、タンパク質源としての魚粉の依存性を低減するとともに、養魚用配合飼料のタンパク質源利用の幅を拡大し持続可能な供給に貢献できる。また、低魚粉配合飼料の利用による低いリン排出は、環境保全や病気の発生・蔓延の軽減に有効である。本研究で当初の最も大きな目的を達成したことになる。

そこで、研究課題を「飼育成績の改善に有効な添加物の検索」から、「残渣魚粉（FRM）を用いる低魚粉エコフィードの開発」に変更した。なお、先の研究で用いた SP は食品として開発されたもので魚粉により高価であるが、需要が高まると企業努力で低廉化が可能性であるとの見解を得ている。しかし、養殖漁家の経営状況を考慮すると低魚粉飼料にかかわらず、飼料の低廉化に向けた検討が早急に必要である。そこで、食品加工残渣を原料とする残渣魚粉を利用したエコフィードを開発できれば、飼料コストを多少とも抑えることが可能になるとともに、近年危ぶまれている魚粉原料魚の急激な資源減少・枯渇の対応策の一つとして期待される。

(2)-2 食品残渣魚粉を用いたマダイ稚魚用低魚粉エコフィードの開発

(2)-2 目的

(1) において魚粉を低 SBTI 活性の SP と CGM で 80% 代替できること、また、この代替飼料で環境へのリン排出量を大幅に削減できることを明らかにした。しかし今後は、逼迫する我が国の養殖漁家経営を改善するため、生産コストの低減、なかでも、その 60% を占めている飼料コストの削減に向けた研究が必要になる。

魚粉原料魚の資源量・漁獲量が著しく減少する状況で、魚類養殖産業が世界的に拡大して生産量が格段に増加したことで、魚粉価格は 2000 年の 50,000 円/t から 2015 年の 300,000 円/t にまで価格はさらに上昇した。当然、魚粉主体の魚類配合飼料の価格も高騰し、低魚粉・無魚粉飼料の切り替えざるを得ない段階に達している。しかし、無魚粉飼料では嗜好性が低く飼育成績も劣ることから、少なくとも魚粉を配合する必要があることが知られている。

そこで本研究では、アンチョビやアジを原料とする魚粉を、食品加工残渣から調製した残渣魚粉（FRM）に代替し、低価格のマダイ稚魚用エコフィードの開発について検討した。食肉・魚市場やそれらの加工工場から生じる残渣は、世界各地でほとんどが未利用のまま廃棄されている。残渣の再利用はこれから本格的に取り組むべき課題であり、資源保護につながる効果的な方策の一つでもある。

(2)-2 研究方法

本研究で用いた FRM には、カタクチイワシ 65.3%とマアジ、サバおよびウルメイワシなどの残渣魚粉を 34.7%混合した。なお残渣魚粉の製造には脱骨工程が組み込み、粗タンパク質含量の増加および粗灰分含量の低減を図った。FRM の粗タンパク質、粗脂質および粗灰分含量は、乾物換算でそれぞれ 73.9, 8.28 および 16.4%であった。

表 3 に試験飼料組成および一般成分を示した。対照飼料には (1) の飼料 TI₂₁ を用いた。飼料 TI₂₁ の魚粉を FRM で代替して飼料 R20 とし、さらに FRM の割合を 28.5, 43 および 57.5% に増量し、逆に、TI₂₁ をそれぞれ 34, 22.5 および 11%に減量して配合した飼料 R40, R60 および R80 の計 5 飼料を調製した。飼料の一般成分では、FRM の割合が増加するに伴って粗タンパク質、粗脂質および粗灰分含量が増加し、糖質含量が低下した。各飼料のエネルギー含量は 22 kJ/g で近似していた。

表 3 飼料組成および一般成分.

| | TI ₂₁ | R20 | R40 | R60 | R80 |
|--------------------------------|------------------|------|------|------|------|
| 原料 (%) | | | | | |
| 魚粉 | 13.50 | | | | |
| FRM | | 13.5 | 28.5 | 43.0 | 57.5 |
| TI ₂₁ ^{□1} | 46.0 | 46.0 | 34.0 | 22.5 | 11.0 |
| コーングルテン | 11.5 | 11.5 | 8.5 | 5.5 | 2.5 |
| その他 ^{□2} | 29.0 | 29.0 | 29.0 | 29.0 | 29.0 |
| 一般成分 (%乾物) | | | | | |
| 相たんぱく質 | 48.6 | 48.1 | 49.5 | 50.7 | 52.2 |
| 相脂質 | 14.3 | 14.0 | 15.4 | 16.6 | 17.4 |
| 相灰分 | 11.6 | 11.7 | 13.0 | 14.1 | 15.8 |
| 糖質 | 14.0 | 13.8 | 10.8 | 8.57 | 5.96 |
| エネルギー (kJ/g) | 21.8 | 21.8 | 21.9 | 21.9 | 21.7 |

□1 大豆たんぱく質 TI 活性は 21 TIU/mg

□2 魚油, 10.0; α-スターチ, 3.0; ビタミン・ミネラル混合物, 12.0; 大豆レシチン, 2.0; セルロース, 1.0 およびタウリン, 1.0%.

屋内 300 L 塩化ビニール角型水槽に平均体重 19.2 g の稚魚を 20 尾ずつ収容し、各飼料につき 3 反復の試験区を設けた。各試験区には所定の飼料を 1 日 2 回、一週間に 6 日飽食給与して 8 週間飼育した。期間中の平均水温および溶存酸素濃度は、それぞれ 26.5 ± 1.04 °C および 8.83 ± 1.02 mg/L であった。終了時には各試験区の魚体重を測定して飼育成績を求めるとともに、みかけの栄養素消化率・蓄積率や血漿化学成分を測定した。

(2)-2 結果と考察

環境低負荷システムの構築
環境低負荷配合飼料の開発（ビッシャシュ）

表 4 に飼育成績を示した。終了時の平均体重，成長率，日間給餌率，飼料効率，肥満度および生残率に有意な区間差はなかったが，飼料 R20～80 区の体重が対照の TI₂₁ 区より僅かに重く，開始時の約 4 倍程度に達した。また，日間給餌率と飼料効率がいずれの飼料区でも高かったことは，マダイ稚魚が飼料 R20～80 を問題なく摂取し利用していたことを示している。

表 4 終了時における各試験区の飼育成績

| パラメーター | 開始時 | 終了時 | | | | |
|-----------|------|------------------|------------|-------------|-------------|------------|
| | | TI ₂₁ | R20 | R40 | R60 | R80 |
| 体重 (g) | 18.9 | 69.3 ± 3.6 | 72.1 ± 9.4 | 78.3 ± 4.68 | 71.2 ± 10.5 | 76.3 ± 6.6 |
| 成長率 (%/日) | | 2.4 ± 0.1 | 2.4 ± 0.2 | 2.6 ± 0.1 | 2.4 ± 0.2 | 2.5 ± 0.2 |
| 日間給餌率 (%) | | 2.7 ± 0.1 | 2.7 ± 0.1 | 2.8 ± 0.1 | 2.8 ± 0.3 | 2.7 ± 0.1 |
| 飼料効率 (%) | | 77.7 ± 3.2 | 78.6 ± 4.4 | 80.3 ± 2.1 | 74.8 ± 12.9 | 80.5 ± 2.5 |
| 肥満度 | | 3.6 ± 0.1 | 3.5 ± 0.2 | 3.4 ± 0.1 | 3.4 ± 0.3 | 3.6 ± 0.1 |
| 生残率 (%) | | 98.3 ± 2.8 | 96.7 ± 5.7 | 100 | 98.3 ± 2.8 | 98.3 ± 2.8 |

成長率 (%/日) = 100 × (ln 終了時の体重 - ln 開始時の体重) / 飼育期間

表 5 に終了時のヘマトクリット値と血漿化学成分を示した。ヘマトクリット値，血漿総タンパク質含量，GOT・GPT 活性，トリグリセリド含量および血糖値には有意な区間差は認められなかった。このことから，本研究の FRM，TI₂₁ およびコーングルテンの配合割合の範囲では，これらの併用によってマダイ稚魚の成長や健康に悪影響を及ぼさないことが確認された。

表 5 終了時における各試験区の血漿化学成分

| パラメーター | TI ₂₁ | R20 | R40 | R60 | R80 |
|-----------------|------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| ヘマトクリット (%) | 28.0 ± 7.1 | 30.2 ± 2.5 | 30.8 ± 1.4 | 30.1 ± 1.3 | 33.8 ± 2.4 |
| 総タンパク質 (g/dl) | 4.7 ± 0.4 | 4.8 ± 0.3 | 5.4 ± 0.1 | 5.1 ± 0.2 | 5.1 ± 0.4 |
| GOT (u/l) | 31.3 ± 12.6 | 30.3 ± 13.8 | 29.7 ± 14.3 | 16.2 ± 5.69 | 27.3 ± 20.5 |
| GPT (u/l) | 3.3 ± 0.2 | 3.0 ± 1.0 | 3.8 ± 1.8 | 2.1 ± 1.0 | 3.6 ± 2.0 |
| トリグリセリド (mg/dl) | 252 ± 44 | 259 ± 104 | 271 ± 42 | 299 ± 34 | 221 ± 32 |
| グルコース (mg/dl) | 65.3 ± 7.3 | 63.3 ± 2.8 | 64.7 ± 14.6 | 61.3 ± 2.4 | 65.3 ± 11.0 |

終了時のみかけの栄養素消化率および蓄積率を表 6 に示した。みかけのタンパク質，脂質およびエネルギー消化率に有意な区間差はなかった。また，みかけのタンパク質，脂質

環境低負荷システムの構築
環境低負荷配合飼料の開発（ビツシャシュ）

およびエネルギー蓄積率においても有意差は認められず、ここでも FRM 配合による悪影響はみられなかった。

表 6 終了時におけるみかけの栄養素消化率および蓄積率

| パラメーター | TI ₂₁ | R20 | R40 | R60 | R80 |
|----------------|------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| みかけの栄養素消化率 (%) | | | | | |
| タンパク質 | 93.5 | 93.4 | 93.2 | 93.2 | 93.6 |
| 脂質 | 92.7 | 95.2 | 96.1 | 96.9 | 97.8 |
| エネルギー | 90.2 | 91.3 | 91.0 | 91.3 | 92.3 |
| みかけの栄養素蓄積率 (%) | | | | | |
| タンパク質 | 28.4±0.50 | 28.0±1.57 | 26.9±1.81 | 25.4±4.21 | 26.0±2.47 |
| 脂質 | 84.4±5.36 | 93.6±14.4 | 82.9±5.00 | 81.9±12.5 | 76.7±6.98 |
| エネルギー | 35.4±0.99 | 39.2±5.48 | 35.4±4.69 | 34.6±11.2 | 37.4±8.40 |

残渣魚粉 FRM の飼料への配合（13.5～57.5%）は、飼育成績、ヘマトクリット値、血漿化学成分、比器官重値、みかけの栄養素消化率・蓄積率などに影響を及ぼさなかった。したがって、本研究から、FRM は魚粉 FM に代わるマダイ稚魚用配合飼料のタンパク質源として利用できるだけでなく、低魚粉飼料の FM に代替してもマダイ稚魚は問題なく成長することが示され、FRM, SP, コーングルテンからなるマダイ稚魚エコフィードの実用性が確認された。

(2)-2 成果の副次的効果、今後の計画等

FRM の利用による飼料コストの低廉は、マダイの生産コストの削減に貢献できる。さらに FRM の安定的な供給により魚粉の原料魚の資源回復にも貢献できる。

今後、FRM 中の残差割合を変化させた飼料を給与して、低水温下におけるエコフィードの利用性について検討する必要がある。

(2)-3 低水温下におけるマダイ稚魚用低魚粉エコフィードの利用性

(2)-3 目的

(2) では FRM, TI₂₁, CGM をタンパク質源とするマダイ稚魚用低魚粉エコフィードの高い利用性を確認できた。しかし、FRM の内訳は、鮮魚から調製した魚粉が 65% で、残渣魚粉は 35% であった。そこで、FRM の残渣魚粉の割合を段階的に増加させた低魚粉エコフィードを、夏期とともに冬期にマダイ稚魚に給与して飼育し、水温の違いによる利用性の差異を確認しようとした。

(2)-3 研究方法

FRM-1, FRM-2 および FRM-3 は、マアジ, サバ, ウルメイワシなどの残渣魚粉と魚粉を、それぞれ 35 : 65, 70 : 30 および 100 : 0 に混合して調製した。対照飼料には市販配合飼料を用いた。飼料 Z35, Z70 および Z100 にはそれぞれ 28.5%の FRM-1, FRM-2 および FRM-3 と、共通して TI₂₅ とコーングルテンを合わせて 42.5%配合した。これら試験飼料のタンパク質源の 40%が残渣魚粉, 60%が植物タンパク質源から成る（表 7）。飼料の一般成分では、粗タンパク質, 粗脂質, 粗灰分および糖質含量はそれぞれ 48, 17, 13 および 14%で大きな違いはなく, エネルギー含量も等しかった。

表 7 飼料組成および一般成分.

| | Con | Z35 | Z70 | Z100 |
|--------------------------------|------|------|------|------|
| 原料 (%) | | | | |
| FRM-1 | 市 | 28.5 | | |
| FRM-2 | 販 | | 28.5 | |
| FRM-3 | 配 | | | 28.5 |
| TI ₂₁ ^{□1} | 合 | 34.0 | 34.0 | 34.0 |
| コーングルテン | 飼 | 8.5 | 8.5 | 5.5 |
| その他 ^{□2} | 料 | 29.0 | 29.0 | 29.0 |
| 一般成分 (%) | | | | |
| 粗たんぱく質 | 48.6 | 49.1 | 48.8 | 48.2 |
| 粗脂質 | 17.3 | 17.7 | 16.4 | 16.6 |
| 粗灰分 | 13.6 | 13.8 | 13.1 | 13.5 |
| 糖質 | 13.0 | 13.7 | 13.8 | 14.2 |
| エネルギー (kJ/g) | 21.8 | 21.9 | 21.9 | 21.9 |

□1 大豆たんぱく質 TI 活性は 21 TIU/mg

□2 魚油, 10.0; α-スターチ, 3.0; ビタミン・ミネラル混合物, 12.0; 大豆
レシチン, 2.0; セルロース, 1.0 およびタウリン, 1.0%.

夏期および冬期における飼育水温は 30~18℃および 17~12℃であった。夏期：平均体重 28 g の稚魚を, 1.5 × 1.5 × 1.5 m³ の生簀に 50 尾ずつ収容して 3 反復区を設け, 所定の飼料を 1 日 2 回, 一週間に 6 日飽食給与して 8 週間飼育した。冬期：夏期と同一の生簀に平均体重 209 g の稚魚を 25 尾ずつ収容して 2 反復区を設け, 所定の飼料を 1 日 2 回, 一週間に 6 日飽食給与して 12 週間飼育した。

夏期および冬期における溶存酸素濃度は, それぞれ 7.1 ± 1.7 および 8.8 ± 1.5 mg/L であった。終了時には体重測定を行い, 各飼料区の飼育成績を求めた。

(2)-3 結果と考察

図 3 および 4 にそれぞれ夏期および冬期の平均体重を示した。夏期では終了時平均体重は、開始時平均体重の約 4 倍に達し、有意な区間差は認められなかった。冬期では、開始時体重が大きく、飼育 10 週間後の体重は開始時の約 1.3 倍程度であった。また、Z35 区の平均体重は他の区より僅かに重かったが、有意な区間差は認められなかった。冬期の低水温により飼育成績は劣ったが、いずれの飼育水温でも FRM に占める残渣魚粉の割合に関係なく、マダイにおける利用性に問題のないことが示された。

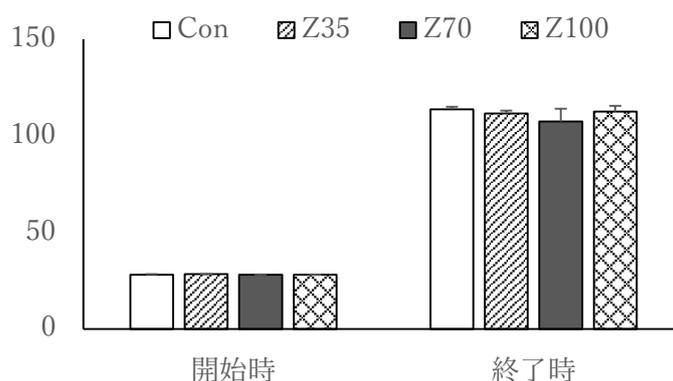


図3 夏期の各試験区の開始時および終了時の平均体重。

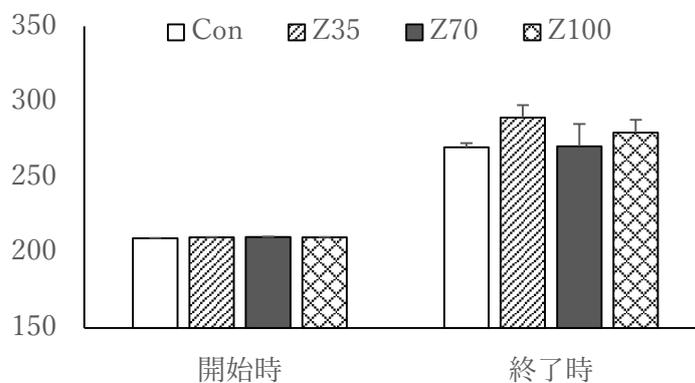


図4 冬期の各試験区の開始時および終了時の平均体重。

夏期および冬期における終了時の飼料効率をそれぞれ図 5 および 6 に示した。夏期の飼料効率に区間差はみられず、いずれの飼料区でも 70%前後と優れていた。一方、冬期の飼料効率は終了時の平均体重と同じく Z35 区が最も高く、Z70 および Z100・Con の順に低下したが、有意な区間差は認められなかった。ここでも、対照の市販飼料に劣らない効率が得られ、残渣魚粉のみからなる FRM-3 でも十分に利用できることが示された。

環境低負荷システムの構築
環境低負荷配合飼料の開発（ビッシャシュ）

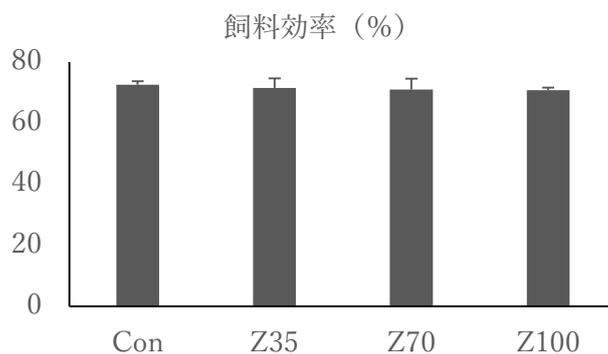


図5 夏期における飼料効率.

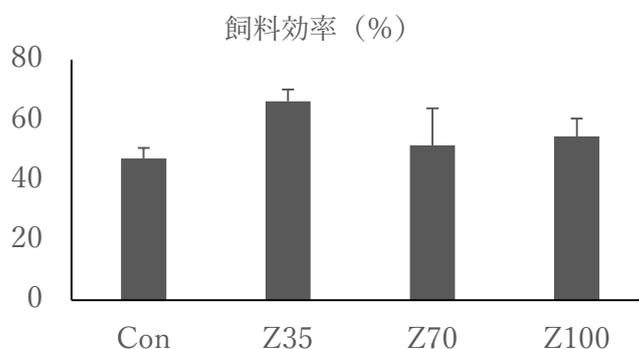


図6 冬期におけるの飼料効率.

ヘマトクリット値，血漿化学成分および比器官重値などにも有意な区間差が認められなかったので，飼育水温が 30℃～12℃の範囲で FMR-3 をマダイ用植物タンパク質配合飼料に問題なく利用できることを確認した。これからの，残渣魚粉を配合したマダイ稚魚エコフイードの速やかな普及が期待される。

(2)-3 成果の副次的効果，今後の計画等

本研究で用いた残渣魚粉の単価は検討中であり，飼料価格については明確にできないが，一般的に流通している魚粉に比べて安価に供給できるので，生産コストの削減につながり養殖業者にとって福音になる。さらに FRM の安定的な供給が可能になれば，魚粉原料魚の資源回復にも貢献できることが推察される。

(2)-4 クロマグロのエネルギー分配

(2)-4 目的

クロマグロ養殖の産業化に向けた研究は、現在のところ、産卵制御、仔稚魚飼育、種苗量産などの分野が主流になっている。しかし、産業として発展するためには成長や生産効率そして利潤などにも注目する必要があります。生産効率を高めるには飼育環境はもちろん、栄養要求や配合飼料の開発に関する研究が必要であり、クロマグロの特徴的なエネルギー分配についても把握することが必要になる。クロマグロは他の養殖魚に比べて成長が著しく速いため、それを支えるのに極めて多量の飼餌料を摂取する必要があります。さらに、それらを速やかに消化吸収・代謝しなければならない。また、クロマグロはラム還流呼吸を行うことから常時遊泳する必要があるとともに、代謝を促進するため環境水より体温を高める奇網を持つことから、血液循環を滞りなく行うため心臓を肥大させ血圧を高く維持している。このように特殊な生理・生態機構を持つことから、クロマグロは他の養殖魚とは全く異なるエネルギー分配を行っている可能性が推察される。

クロマグロのエネルギー分配を理解することは、単に、その種特異性を理解することにとどまらず、効率的な養殖を推進するための留意点の喚起につながるであろう。本研究では、まず、クロマグロ稚魚を用いてエネルギー分配を明らかにしようとした。

(2)-4 研究方法

本学水産養殖種苗センター白浜事業場でふ化・飼育した32日齢のクロマグロ稚魚（平均体重1.1g）を、2,500L容塩化ビニール製円型水槽2基に、それぞれ35および31尾ずつ収容して試験区1および2を設けた。試験区1ではヒトの基礎代謝エネルギーに当たる標準代謝エネルギーを求めるため、給餌から24時間の酸素消費量（ $\dot{M}O_2$ ）を測定した。なお、 $\dot{M}O_2$ の測定にあたっては水槽を透明な蓋で密閉し、止水下で飼育水の溶存酸素の減少量を測定した。また、試験飼料として本研究所浦神実験場で開発したクロマグロ稚魚用配合飼料（タンパク質52%、脂質19%および糖質14%）に、消化率測定の内部指標である酸化クロムを0.5%配合した。

給餌は1日5回（06:00, 09:00, 12:00, 15:00, 18:00）飽食給餌した。なお、夜間における稚魚の水槽壁面への接触・衝突防止のため、蛍光灯（60w×2）を水面から30cmの高さに設置して24L:0Dで照明した。試験区2ではエネルギー分配の測定を行い、試験区1と同一の条件下で10日間飼育した。飼育期間中の水温は $26.6 \pm 0.5^\circ$ であった。

エネルギー分配はNational Research Councilに準じて算出した。摂取エネルギー（GE）は試験飼料の燃焼熱と摂餌量から、糞エネルギー（FE）は飼料の燃焼熱と消化率から、尿エネルギー（UE + ZE）は吸収後に排泄されたNをすべて NH_3 として、標準代謝エネルギー（SME）は試験1区で求めた酸素消費量から、成長エネルギー（RE）は蓄積されたエネルギーとして求めた。また、標準代謝+活動エネルギー（ $HfE + HfJ$ ）はそれぞれを区別して測定するのは困難であるので、GEからFE, UE + ZE, SMEおよびREを差し引いた値とした（図7）。これらはkJ/kg体重/日に換算して表示した。

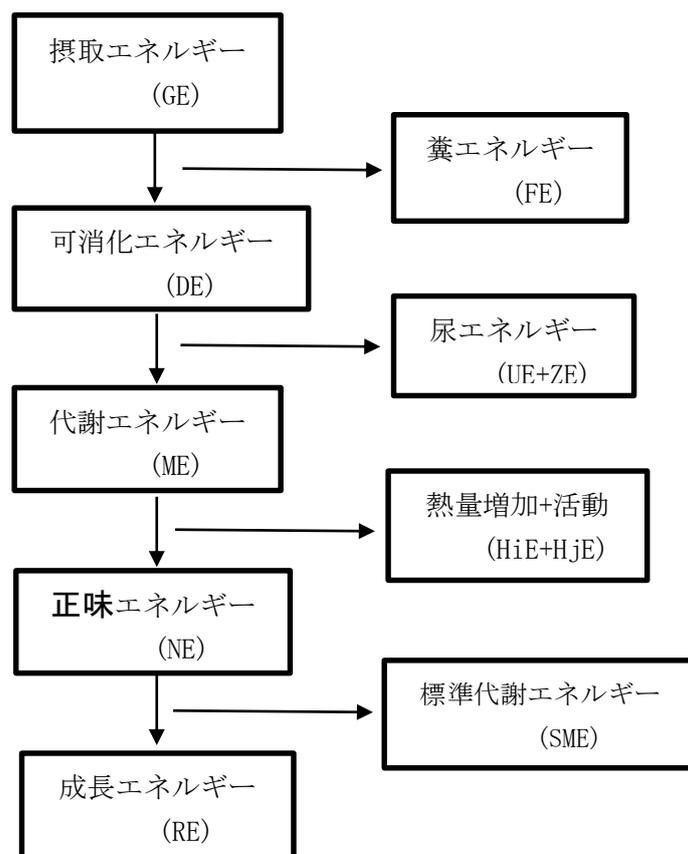


図 7. 魚類におけるエネルギー流の模式図

(2)-4 結果と考察

飼育成績を表 8 に示した。終了時の平均体重は開始時のその約 6 倍に達し、飼料効率は 107%と優れていた。その他にも異常な値はみられなかったことから、飼育条件や試験飼料に問題はなかったと判断できた。また、みかけのタンパク質および脂質消化率は高かったが、脂質蓄積率は 12.5%と他魚種に比べて低かった。おそらく、クロマグロ稚魚の速い成長を維持するため、脂質をエネルギー源として利用しタンパク質を蓄積する方向に代謝調節していたためと考えられる。

次に、エネルギー分配を図 8 に示した。なお、各項目を GE に占める%で表示した。GE の 1/4 が FE と UE + ZE に分配された。この値は、マダイやブリ稚魚で測定された 15~20% より大きかった。本研究では、消化性に優れた酵素処理魚粉を主体にする配合飼料を給与したにも係わらず、FE は 17%にも達した。これは、クロマグロ稚魚の消化吸収能が低く、また、速い成長を維持するため多量の配合飼料を摂取しなければならないことに因るのであろう。

表 8. 試験区 2 の飼育成績，みかけの栄養素消化率・蓄積率

| | |
|-------------|---------|
| 終了時平均体重 (g) | 6.4±2.1 |
| 日間摂餌率 (%) | 13.1 |
| 成長率 (%/日) | 17.6 |
| 飼料効率 (%) | 106.8 |
| 生残率 (%) | 54.8 |
| みかけの栄養素消化率 | |
| タンパク質 | 93.7 |
| 脂質 | 83.1 |
| みかけの栄養素蓄積率 | |
| タンパク質 | 34.5 |
| 脂質 | 12.5 |

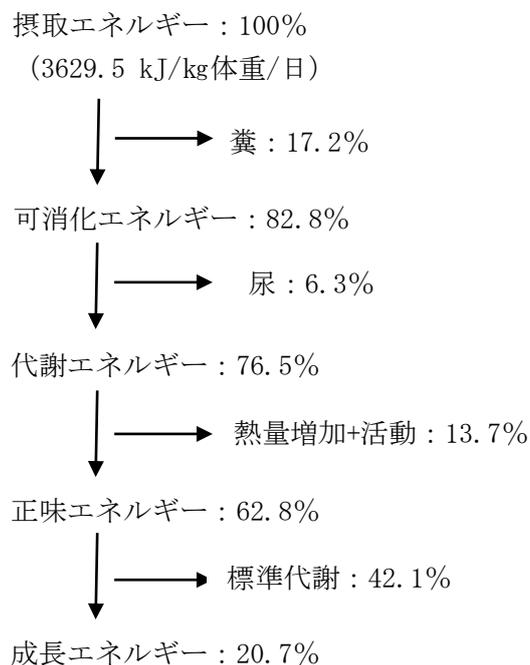


図 8 クロマグロ稚魚のエネルギー分配。

一方, SME として GE の 40%が消費されていたことも注目される。他魚種においては 20%前後が SME として利用されていることから, クロマグロのエネルギー分配における最大の特徴と考えられる。クロマグロは口や鰓蓋を開閉し呼吸するのではなく, 両器官を開けたまま遊泳に伴うラム換水によって呼吸する。したがって, 生存するにはクロマグロは遊泳し続ける必要があり, SME は鰓蓋運動で呼吸を行う魚種に比べて増加することになる。クロマグロの成長は極めて速いことを先に述べた。この速い成長も極めて高い代謝活性と酸素要求により支えられている。ラム換水による呼吸が鰓蓋運動による呼吸より, ガス交換効率が優れていることに関連しているのであろう。

クロマグロでは RE として GE の 20%しか配分されないことが示された。マサバやブリ, マダイなどでは GE の 30%前後が RE であることが知られている。したがって, クロマグロの速い成長はエネルギー分配で RE を高くして維持されるのではなく, 主に, GE を大きく増加させることで成し遂げられていることになる。

HiE + HjE が 14%と低かったことも, クロマグロにおけるエネルギー分配の特徴の一つとして数えられる。消化吸収に消費されるエネルギーは HiE + HjE に含まれることから, これが少ないと消化吸収能は低下することになる。これまで, クロマグロ稚魚は他の養殖魚が利用できる魚粉をうまく消化吸収できないことを報告した。本研究ではクロマグロに適した酵素処理魚粉を主体にする配合飼料を与えたにもかかわらず, 糞エネルギーは 17%と高かったことを併せて考えると, 消化し易い栄養素は速やかに吸収するのに対して, 消化し難い栄養素は摂餌後の速い時間から排泄して, 摂餌量をできるだけ多く確保する機構を持っているものと理解される。

以上の本研究から、クロマグロ養殖を効率的に行うには、RE を高く FE を低く維持するために、いかに SME による消費を低く抑えるかが重要なポイントであることが示唆された。

(2)-4 成果の副次的効果、今後の計画等

クロマグロ稚魚のエネルギー分配の特徴を明らかにすることで、極めて速い成長を支えている機構を明らかにすることができた。すなわち、栄養素バランスだけでなく消化吸収に優れた飼料を、できるだけ多く摂取させる飼育方法・環境が重要であることを明らかにできた。そこで、配合飼料の給餌量や給餌頻度など適正な給餌方法について次節で検討した。

(2)-5 クロマグロ稚魚のエネルギー分配と給餌回数

(2)-5 目的

前節のエネルギー分配からクロマグロ稚魚は速い成長を維持するため、消化吸収に要する時間をできるだけ短縮して摂餌量を増加させていることが示された。また、クロマグロの SME は他魚種よりも顕著に大きく、逆に、RE と $H_2E + H_3E$ は低く、FE は高かった。そこで本節では、クロマグロ稚魚の給餌回数が飼育成績やエネルギー分配に及ぼす効果について調べ、最適な飼育方法を求めるための応用的知見を得ようとした。

(2)-5 研究方法

試験飼料にはタンパク質源として酵素処理魚粉とアジ魚粉、脂質および糖質源としてそれぞれ魚油および α -デンプンを用い、相タンパク質、相脂質および糖質含量はそれぞれ 53, 18 および 12% の飼料を調製した。平均体重 1.8 g のクロマグロ稚魚を 40 m³ 容円形水槽 6 基に 160 尾ずつ収容して試験区を設けた。1 日の給餌回数を 0, 2, 3, 4, 5 回に設定する F, 2S, 3S, 4S, 5S 区と、1 日 5 回の給餌を 4 日間続けて 1 日を無給餌とする 4/5S 区に、それぞれ飽食給餌して 2 週間飼育した。なお、F 区では標準代謝エネルギーを測定した。また、明暗サイクルは球形の蛍光灯を用いて 24 L:0 D とした。エネルギー分配に関する詳細は(4)に示した。

(2)-5 結果と考察

飼育成績を表 9 に示した。期間中の増重倍率は 6~9 倍であり、これら飼育成績に異常な数値や特定の疾病によると考えられるへい死（すべては水槽壁への衝突死）も認められなかったことから、区間比較を実施するのに問題のないことが示された。成長率、日間摂餌率および飼料効率は 5S 区が最も高く、4S, 3S, 4/5S および 2S 区の順に低下した。しかし、5S, 4S および 3S 区の区間に大きな差異はなかった。生残率も成長率や日間摂餌率と同様に給餌回数の増加に伴って上昇したが、3S 以上の給餌回数区では 70%前後と比較的高い値が得られた。なお、4/5S 区比成長率、日間摂餌率、飼料効率、生残率などは、5 日間で同一回数の飽食給餌を行う 4S 区だけでなく、3S 区に比べて大きく劣っていた。極めて速い成長を生き残り戦略としてもつクロマグロ稚魚においては、5 日間に 1 日の絶食でも生理機構に悪

影響を及ぼすことが示唆され興味深い。おそらく、僅か 1 日間の絶食でも消化吸收・代謝機構は大きなダメージを受け、飽食を再開して 4 日間経てもこれらの機構が成長モードに戻らないことを示唆するのであろう。

表 9 終了時における各試験区の飼育成績

| | 2S | 3S | 4S | 5S | 4/5S |
|-----------|------|-------|-------|-------|------|
| 体重 (g) | 6.2 | 10.3 | 12.6 | 14.0 | 8.6 |
| 成長率 (%/日) | 8.9 | 12.5 | 13.9 | 14.6 | 11.2 |
| 日間摂餌率 (%) | 6.6 | 8.4 | 8.6 | 9.0 | 7.5 |
| 飼料効率 (%) | 76.7 | 107.1 | 111.6 | 112.8 | 94.0 |
| 肥満度 | 1.2 | 1.2 | 1.3 | 1.3 | 1.3 |
| 生残率 (%) | 43.8 | 61.3 | 64.4 | 72.5 | 45.0 |

表 10 に終了時におけるみかけのタンパク質、脂質およびエネルギー消化率および蓄積率を示した。みかけの各消化率に大きな区間差はなかった。しかし、みかけの蓄積率についてみると、タンパク質は 4S および 5S 区が高かったが、脂質およびエネルギーは 5S 区が最も高く、4S、3S、4/5S および 2S 区の順に低下した。

表 10 終了時におけるみかけの栄養素消化率・蓄積率

| | 2S | 3S | 4S | 5S | 4/5S |
|----------------|------|------|------|------|------|
| みかけの栄養素消化率 (%) | | | | | |
| タンパク質 | 96.0 | 95.4 | 95.6 | 94.9 | 95.4 |
| 脂質 | 95.1 | 91.2 | 93.1 | 91.5 | 90.2 |
| エネルギー | 90.8 | 88.7 | 88.6 | 88.6 | 88.4 |
| みかけの栄養素蓄積率 (%) | | | | | |
| タンパク質 | 21.1 | 31.4 | 34.0 | 34.0 | 27.2 |
| 脂質 | 5.0 | 11.5 | 13.3 | 19.4 | 8.5 |
| エネルギー | 12.1 | 22.1 | 23.8 | 24.4 | 18.0 |

飼育成績が大きく劣った 2S および 4/5S 区でも、消化率に大きな区間差がみられなかった。他の養殖魚では摂餌量が飽食あるいはそれ以上で消化率は減少する。前節 (4) でクロマグロ稚魚の FE は他の魚種より高く消化吸收能の劣ることを示唆した。本研究で比較的優れた各種消化率が得られたのは、成長に伴って幽門垂が発達することに関係すると考えられる。一方、みかけの蓄積率ではいずれも給餌回数が減少すると低下した。特に、脂質蓄積率がタンパク質やエネルギー蓄積率より減少が大きかった。成長が速いクロマグロ稚魚であることから、摂餌量が減少すると脂質を主にエネルギー源として消費して、生体内の代謝機構をなるべく高く維持する方向に調節していたものと考えられる。

図 9 に各試験区におけるエネルギー分配率を示した。GE は給餌回数の増加に伴って 1406 ~1917 kJ/kg BW/day まで増大した。各分配についてみると、2S 区の FE が他の区より僅か

に低下したが、 $H_iE + H_jE$ と $UE + ZE$ に著しい区間差はなかった。したがって、 SME と RE の合計は給餌回数に変化しても GE の 40% と一定であった。

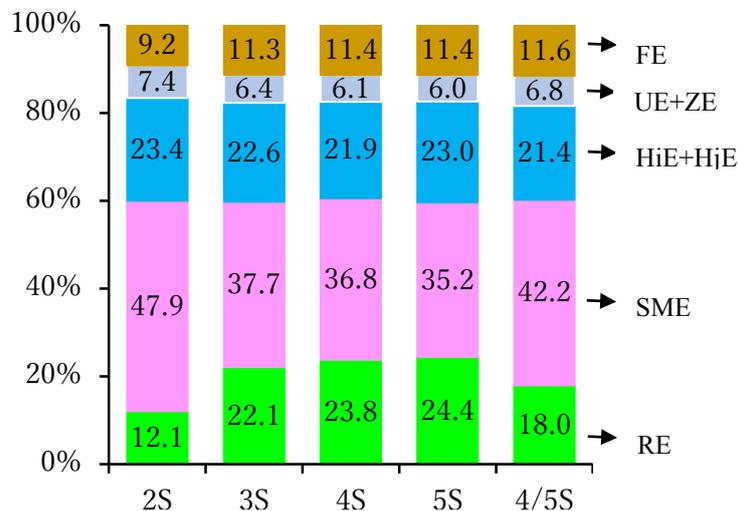


図9 各試験区におけるエネルギー分配率 (%)

また、F区における体エネルギーの減少から、体重 1.8~14.0 g のクロマグロ稚魚の SME は 670 kJ/kg BW/day で、体重維持には 1100 kJ/kg BW/day を要求することが示された。これらの値はマダイやブリ稚魚の約 2 倍、体重維持にかかるエネルギー量はマダイやブリの約 10 倍に達した。F区では絶食 6 日間ですべての供試魚がへい死した。ブリやマダイ稚魚では 2 週間程度の絶食ではへい死しないので、クロマグロ稚魚は速く成長することに特化している魚種であるか理解できる。おそらく、この機能はラム換水呼吸をベースにした著しく高い遊泳および捕食能力に、支えられているのであろう。

本研究結果から、体重 1~14 g のクロマグロ稚魚では 1 日の最適な給餌回数は 4・5 回であることが示された。また、無給餌日を設けると消化吸收・代謝機構に大きなダメージを受け、その後 4 日間給餌してもそれら機構の回復が難しいことも示された。

(2)-5 成果の副次的効果、今後の計画等

クロマグロ稚魚のエネルギー分配の特徴に関する本研究から得られた知識、また、最適な給餌回数は効率的な養殖形態の確立に貢献できると考えられる。

テーマ 2：環境低負荷システムの構築

研究課題：(3) 物質循環の解析と制御

研究機関・研究室名：水産研究所・白浜実験場，農学研究科・水産学専攻・水族環境学研究室

担当者職名・氏名：農学研究科・水産学専攻・教授 江口 充，水産研究所・講師 中瀬 玄德，農学研究科・水産学専攻・講師 谷口亮人

研究協力者：家戸敬太郎，永田恵里奈，向井良夫，宮野茂一，西田雄人，井口博紀，松井愛，山本竜二，井上太一，片桐流星，鈴木俊之，吉祥庵貴昭，樋口 温，沼田章人

完全養殖が達成されても環境を配慮しないシステムは，持続的な養殖生産を志向する上で不完全である。本研究テーマでは eco-friendly な養殖を具現化すること最終的な目標とし，それに繋がる第一歩となる養殖が影響する自然生態系での物質循環過程の把握を主な研究目的としている。

イケス養殖場水域における最大の有機物汚染は養殖魚からの排泄物や餌飼料からの栄養素のリーチングである。この養殖場で発生する有機汚濁の特徴は，“易分解性”有機物が多いという点である。通常，養殖魚に投与した餌の 5～20%が残餌となり，環境に直接負荷され，残りの約 80～95%を魚が食べる。しかし，魚が摂餌した有機物のうち，魚体の増加分になるの，例えばマダイの場合，約 1/4 であり，残りの約 3/4 は糞尿等の排泄物として環境に放出される。つまり，投餌量の大半が排泄物等として環境に負荷されるのである。

この環境に負荷された養殖由来の有機物がどのように分解・無機化され，無機栄養塩として水域に回帰するのか，或いは有機物負荷が水域の自浄能力を超えた場合，海底に堆積された有機物はどのように物質循環過程を経て，水域環境にどのような影響を及ぼすのかといったことが問題になる。

持続性の高い魚類養殖を具現化するためには，自然生態系が持つ自浄作用をできるだけ正確に把握することが求められる。養殖という人間活動が自然の生態系に関与することで起こる物質循環プロセスの変化を把握し，その変化を最小限に抑えることが求められるのである。本研究テーマでは養殖場水域の水質・底質の環境変動を把握するため，無機栄養塩濃度，有機物量，硫化物量といった化学分析項目，物質循環プロセスを推進する有機物の分解・無機化活性，またその分解・無機化プロセスを担う細菌群集構造について解析を行った。

(3)-1 完全養殖環境における物質循環過程の解析と制御

(3)-1 目的

養殖にはワカメやノリ養殖のような無給餌型養殖と魚類養殖のような給餌型養殖がある。海洋環境への負荷は，給餌型養殖（以下，単に養殖）が圧倒的に高い。この養殖に起因する環境問題が，自家汚染である。自家汚染とは，養殖による海域の有機汚濁とそれに伴う

養殖場の悪化（老化）、海域の生産性の低下といった現象を指す。この自家汚染の発生を防ぐためには、イクス養殖場水域における物質循環過程を把握することが重要になる。これが本小課題における最終的な研究目的である。

ここでは養殖場水域における高分子有機物を低分子化する細菌細胞外酵素活性、低分子化された有機物を無機物に変換する無機化活性、そして細菌群の無機化の結果生成される無機栄養塩の動態を解析した。この養殖場水域における物質循環過程の解析は、同水域の環境容量の推定に繋がり、同水域を環境容量という形で制御することを可能にする。

(3)-1 研究方法

野外調査は主に和歌山県白浜町近畿大学水産研究所白浜実験場の所有する養殖漁場内の養殖生簀の多く存在する St. 川久（水深約 15 m）と養殖生簀が設置されていない St. 畠島で実施した（図 1）。実験に使用した試料は水深 1 m（表層または上層）の海水、海底直上 1 m（底層または下層）の海水、堆積物試料（表層 0-1 cm）である。

栄養塩類の動態解析では長期変動と短期変動を調べた。長期変動解析のための定期観測（2 ヶ月に 1 回の頻度で実施）は、St. 川久と St. 畠島の試料について分析を行った。短期変動の観測は、より精度を上げるため試料の採取場所を増やして、毎週サンプリングを行った。試料は長期変動の観測時と同様に表層と底層の海水であるが、試料の採取場所は Sts. 大蛇前（川久）、馬見崎、古賀浦の 3 点である（図 1）。



図 1 和歌山県田辺湾養殖場水域での観測定点

a. 生簀養殖場水域における栄養塩類の分析

水深 1 m の海水（表層）、海底直上 1 m の海水（底層）については定法に従い、各種の栄養塩濃度（ $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{PO}_4\text{-P}$ 、 $\text{SiO}_2\text{-Si}$ ）を、本研究プロジェクトで導入した栄養塩自動分析装置のオートアナライザー（QuAAtro 2HR, BLTec）を用いて測定した。なお、長期変動解析のための観測（2 ヶ月に 1 回の頻度で実施）では、St. 川久（水深約 15 m）と養殖生簀が設置されていない St. 畠島の試料を用いた。

b. 細胞外酵素活性の測定

細胞外酵素活性は Obayashi and Suzuki (2005) を一部改変して測定した (図 2)。この方法は、蛍光色素で標識された有機基質を試料に添加し、微生物、特に細菌細胞に付着あるいは遊離して存在する細胞外酵素による加水分解により生産される蛍光物質の濃度を測定することで、細胞外酵素による加水分解速度を算出する方法である。

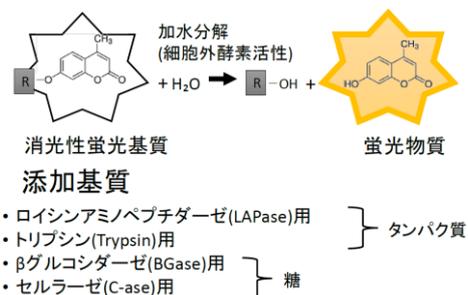


図 2 細胞外酵素活性の測定原理の概略

表層海水および底層海水については、各試料 900 μ L を 1.5 mL マイクロチューブに分注した。底泥堆積物試料については、堆積物表層 (0~1 cm) から約 0.1 g を 1.5 mL マイクロチューブに精秤し、オートクレーブ処理 (120 $^{\circ}$ C, 20 分) した底層海水 900 μ L を加えて堆積物の懸濁液試料を調製した。細胞外酵素の作用以外の非生物的作用により試料から生じる蛍光物質の蛍光強度を差し引くためのコントロールとして、オートクレーブ処理した海水および堆積物を同様に処理して用意した。

蛍光標識された有機基質として、 β -グルコシダーゼ活性測定用の 4-methylumbelliferyl β -D-glucopyranoside (BGase [#M3633, Sigma-Aldrich]) およびセルラーゼ活性測定用の 4-methylumbelliferyl β -D-cellobioside (Cellulase [#M6018, Sigma-Alrich]) はメトキシエタノール (特級, 和光純薬) に溶解し、1 mM の基質溶液を調製した。アミノペプチダーゼ活性測定用の L-leucine 4-methylcoumaryl-7-amide (LAPase [#3091-v, ペプチド研究所]) はジメチルスルホキシド (特級, 和光純薬) に溶解して 1 mM の基質溶液を調製した。これらの基質溶液を試料への添加後の最終濃度が 100 μ M になるように各試料及び各コントロールに 100 μ L ずつ加えた。試料およびコントロール自体の蛍光強度を差し引くために、基質溶液を添加しない未処理およびオートクレーブ処理した試料をブランクとして用意した。

蛍光強度の測定は培養開始後 1, 2, 3, 4 時間後の計 4 回行った。堆積物試料については、試料, コントロールおよびブランクを 930 \times g, 室温で 8 分間の遠心分離を行った後, その上清 200 μ L を 96 ウェルマイクロプレート (OptiPlate-96F, PerkinElmer) に入れ, 細胞外酵素の加水分解作用により生じた蛍光物質の蛍光強度を測定した。海水および間隙水試料についてはそれぞれの試料, コントロールおよびブランクを 200 μ L ずつ, そのまま 96 ウェルマイクロプレートに移し入れ, 蛍光物質の蛍光強度を測定した。蛍光強度の測定はマイクロプレートリーダー (Wallac 1420 ARV0sx, PerkinElmer) により, 励起光 355 nm, 蛍光 460 nm で測定した。

海水試料の蛍光強度の測定については、全て 3 本立てで行った。堆積物試料に関しては、1 サンプルにつき、懸濁液試料 12 本およびコントロール 4 本を用意した。測定 1 回につき試料 3 本およびコントロール 1 本を測定に使用し、一度測定に用いた試料はその後の測定には用いないようにした。

検量線を 4-methylumbelliferone (MUF [#A1381, Sigma-Aldrich]) および 7-amino-4-methylcoumarin (AMC [#A9891, Sigma-Aldrich]) を用いて作成した。MUF および AMC をジメチルスルホキシド (特級, 和光純薬) に溶解し、10 mM の溶液を調製した。これをミリ Q 水で 0.1, 1.0, 5.0, 10, 25 および 50 μM に希釈したものを用意し、試料と同様に、各希釈液 200 μL を 96 ウェルマイクロプレートに入れ、励起光 355 nm, 蛍光 460 nm で各希釈液の蛍光物質の濃度に対する蛍光強度を測定した。これらの蛍光物質の濃度とそれに対する蛍光強度から検量線を作成した。MUF の検量線から BGase, Cellulase を添加した試料における加水分解作用により生産された蛍光物質の蛍光強度を濃度に換算した。同様に、AMC の検量線から LAPase を添加した試料における加水分解作用により生産された蛍光物質の蛍光強度を濃度に換算することで、細胞外酵素による加水分解速度を算出した。

c. 無機化活性の測定

無機化活性の測定は、Nakase and Eguchi (2015, DOI: 10.1007/s12562-015-0927-y) を一部改変して行った。試料を入れる小さいガラス製のスクリーバイアル (以下、小バイアル, [#s-1, 日本電子硝子]) 内に付着する有機物をなくすために、あらかじめ小バイアルをアルミホイルで覆い、450 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間燃焼した。この小バイアルに海水または間隙水試料を 900 μL ずつ入れた。堆積物試料については、堆積物 0.1 g を燃焼済みの小バイアルに量り入れ、そこへステリベクス GP フィルターユニットでろ過除菌した海水を 900 μL を入れ、試料を調製した。微生物による無機化活性を完全に停止させたコントロールとして、全ての試料について最終濃度 110 mM になるように 6 M NaOH を入れた小バイアルも用意した。呼吸基質として、 ^{14}C 標識された、D-[U- ^{14}C]glucose (比放射活性 289.0 Ci mol $^{-1}$, PerkinElmer) と L-[U- ^{14}C]glutamic acid (比放射活性 260.0 Ci mol $^{-1}$, PerkinElmer) を用いた。 ^{14}C -基質を 1 \times PBS に加えて 2 $\mu\text{Ci mL}^{-1}$ に調製した溶液を用意し、これを最終濃度 0.2 $\mu\text{Ci mL}^{-1}$ になるよう、各試料およびコントロールに添加した。

液体シンチレーターは 100%メタノール (特級, 和光純薬) 4 mL, 6 M NaOH 1 mL およびクリアゾル I (液体シンチレーター用特製試薬, ナカライテスク) 50 mL を混合して調製した。液体シンチレーターにろ紙 (42 \times 80 mm, No. 2, ADVANTEC) を浸し、シリカゲルを入れて減圧したデシケーター内で乾燥させた後、シンチレーションバイアル (#1855SIV20, IWAKI) に入れて内壁を覆った。これに、各種 ^{14}C -基質を添加した試料入りの小バイアルを挿入し、液体シンチレーションカウンター (LSC-5100, Aloia) で 24 時間の連続測定を行い、無機化によって放出され $^{14}\text{CO}_2$ の放射線量を無機化量に換算した。放射線量の計測は全ての試料において 3 本立で行った。

(3)-1 結果と考察

a. 生簀養殖場水域における栄養塩類の動態

本プロジェクトで導入した栄養塩分析装置を用いて得られた2014年9月～2016年9月の2年間のデータをまとめた(図3～7)。調査したのはSt. 川久(生簀設置区)とそこから400mほど離れた生簀が設置されていないSt. 畠島の表層海水と底層海水である。

ケイ酸態ケイ素の2年間での最小値は76.8 $\mu\text{g/L}$ 、最大値は601.0 $\mu\text{g/L}$ 、平均値は280.0 $\mu\text{g/L}$ であった(図3)。ケイ酸態ケイ素についても、特に顕著な季節的な特徴や観測点による違いを見出すことが出来なかった。本プロジェクトの大きな目標のひとつは、継続的な栄養塩分析システムの確立である。試行錯誤の末、継続的な分析システムは確立したので、今後も引き続きデータを蓄積し、年間を通したケイ酸態ケイ素の変動のトレンドを把握したい。

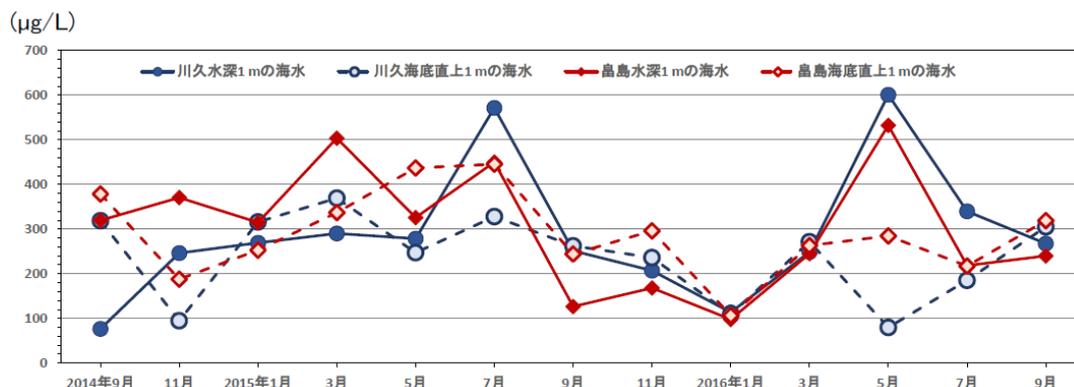


図3 田辺湾養殖場水域におけるケイ酸態ケイ素の長期変動(2014年9月～2016年9月)

観測を開始してからのリン酸態リンの年間の最小値は0.33 $\mu\text{g/L}$ 、最大値は32.6 $\mu\text{g/L}$ (平均10.1 $\mu\text{g/L}$)となり大きく変動した(図4)。2年間を通して観察された特徴的な季節変動はなかったが、例えば、2015年5月のSt. 川久の表層と底層では、表層が高く底層が一桁近く低くなり、同年11月では表層も底層も同程度のリン酸態リン濃度になるといったケースもあった。11月に表層と底層での濃度差が小さくなるのは、夏季の成層が崩壊し、鉛直混合が起こっているからかもしれない。因みに、一般的な外洋海水の有光層におけるリン酸態リン濃度は5～20 $\mu\text{g/L}$ であることを考慮すると、調査した養殖場環境のリン酸態リン濃度は外洋海水と同レベルといえる。

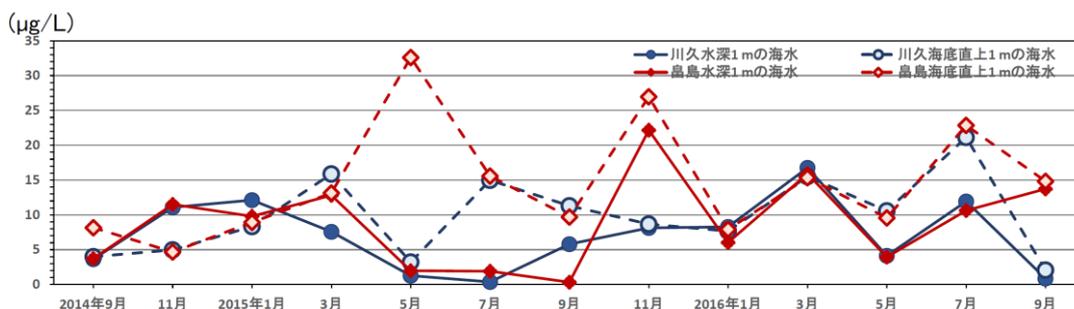


図4 田辺湾養殖場水域におけるリン酸態リンの長期変動(2014年9月～2016年9月)

亜硝酸態窒素(図6)と硝酸態窒素(図5)の年間の最小値はそれぞれ1.33 $\mu\text{g/L}$ と0.23 $\mu\text{g/L}$ 、最大値がそれぞれ12.6 $\mu\text{g/L}$ と61.5 $\mu\text{g/L}$ 、平均値がそれぞれ5.29 $\mu\text{g/L}$ と24.6 $\mu\text{g/L}$ であった。外洋域における硝酸態窒素は、有光層で表層から深くなるに従い10~180 $\mu\text{g/L}$ 程度で変化する。有光層以深になると、植物プランクトンによる取り込みがなくなり、有機物の分解が進むため200 $\mu\text{g/L}$ 前後となる。内湾域の硝酸態窒素濃度としては、極端に硝酸態窒素が減少している場合(例えば2015年と2016年の5月)もあり、その様な時期は一次生産の制限因子となっている可能性も考えられる。

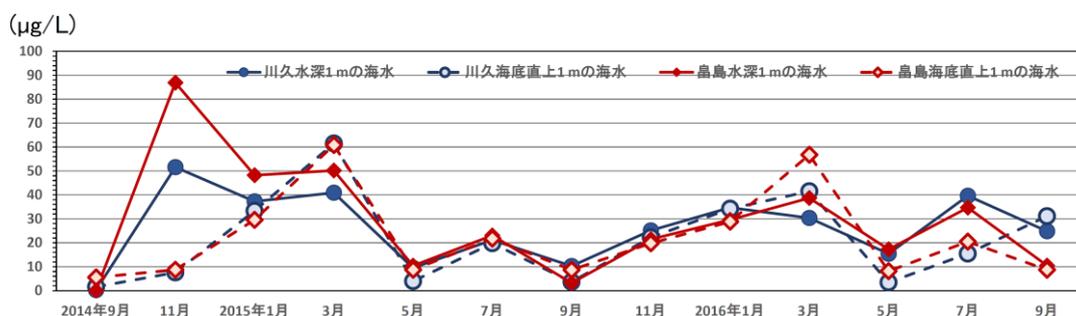


図5 田辺湾養殖場水域における硝酸態窒素の長期変動(2014年9月~2016年9月)

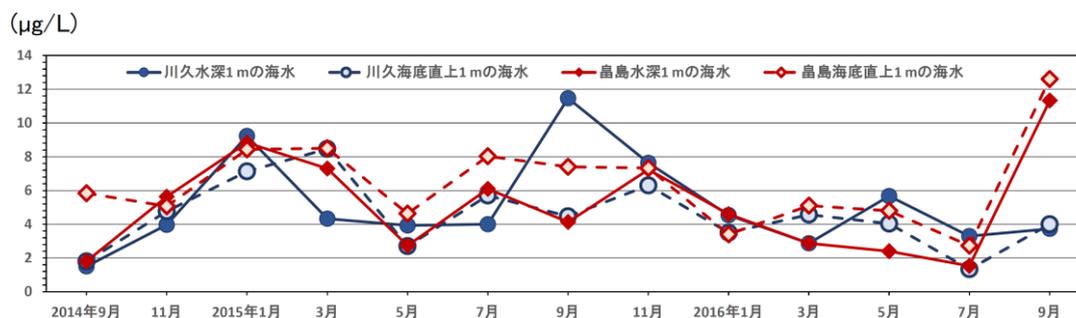


図6 田辺湾養殖場水域における亜硝酸態窒素の長期変動(2014年9月~2016年9月)

アンモニア態窒素の年間変動を図7にまとめた。年間の最小値, 最大値, 平均値は, それぞれ4.00 $\mu\text{g/L}$, 82.1 $\mu\text{g/L}$, 25.8 $\mu\text{g/L}$ となった。外洋域におけるアンモニア態窒素濃度は表層で高く, 底層へ行くに従い減少するのが一般的な傾向である。外洋域では表層の濃度が25 $\mu\text{g/L}$ 程度であり, そこから漸減して有光層以深では5 $\mu\text{g/L}$ 程度になる。今回, 調査を行った養殖場水域のアンモニア態窒素濃度は, 外洋の極表層部のそれと同程度の平均値であった。特徴的だったのは2015年7月であり, 両観測点とも底層の濃度が極端に高くなり, 表層がいずれも低くなった(図7)。これは, 夏季になって底泥堆積物表層の貧酸素化が進行し, 底泥堆積物の酸化還元電位が低下して, アンモニアが溶出していたのかも知れない。

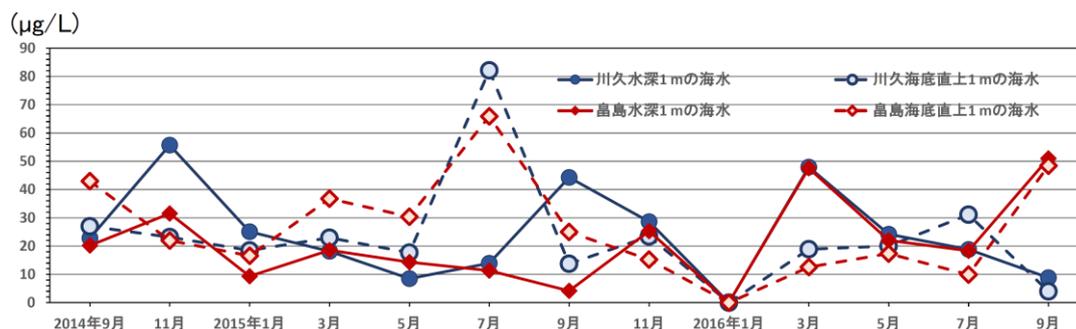


図7 田辺湾養殖場水域におけるアンモニア態窒素の長期変動
(2014年9月～2016年9月)

各種栄養塩類濃度の長期変動を明らかにするためには、更に観測を継続してデータを蓄積する必要がある。ただ、2ヵ月に1回の頻度での観測では、栄養塩類の短期変動の傾向を捉えることができない。そこで、2016年7月以降、更に観測点を増やし、観測頻度を上げて栄養塩の短期間の動態解析を行ってみた。その結果、同じ観測点であっても1週間程度間に大きく栄養塩濃度が変動し、比較的近接した観測点でも大きく異なることなどが明らかになった。すべての栄養塩について観測を行ったが、ここでは代表例としてアンモニア態窒素の短期変動のみを示す（図8）。

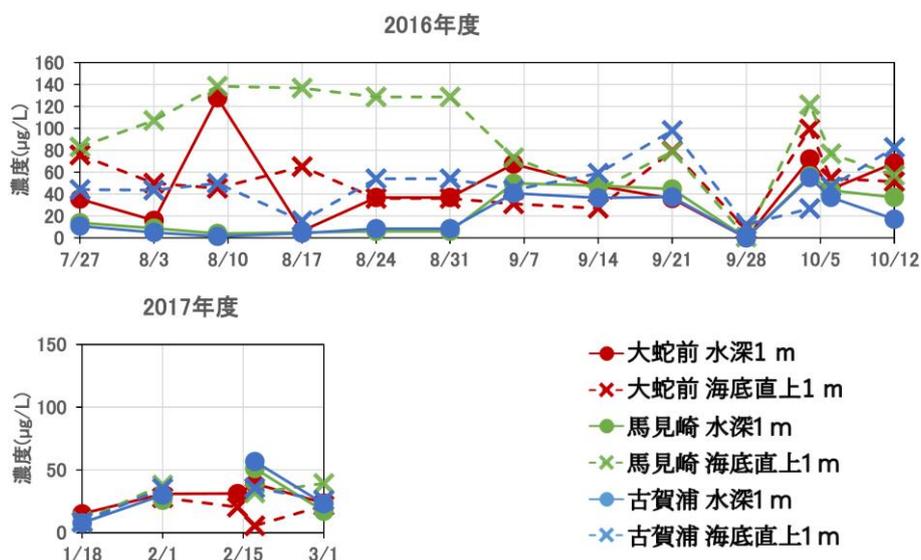


図8 田辺湾養殖場水域におけるアンモニア態窒素の短期変動

アンモニア態窒素の夏季2ヵ月間の短期変動では、8/10の大蛇前（川久）を除き、7/27から8/31までは全般的に表層よりも底層で高くなる傾向を示した（図8）。特に馬見崎の底層の値が7/27から8/31まで連続的に高い値を示したが、このときの溶存酸素（DO）の週変動を見ると、馬見崎の底層のDOが3 mg/L程度と一番低くなっていた（図9）。これは、成層する夏季において底層の低酸素化が進み、その結果、底層における硝化反応が停滞し、底泥堆積物からアンモニアが溶出してきたことを示す。9/7になると観測点や水深の違いに

関わらずアンモニア態窒素濃度は、均一な状態になった（図 8）。これは 9/5 に台風 12 号が近畿圏に上陸したため、海水が激しく攪拌されたことによると考えられる。台風等による自然攪乱が水質浄化を推進した可能性が高い。

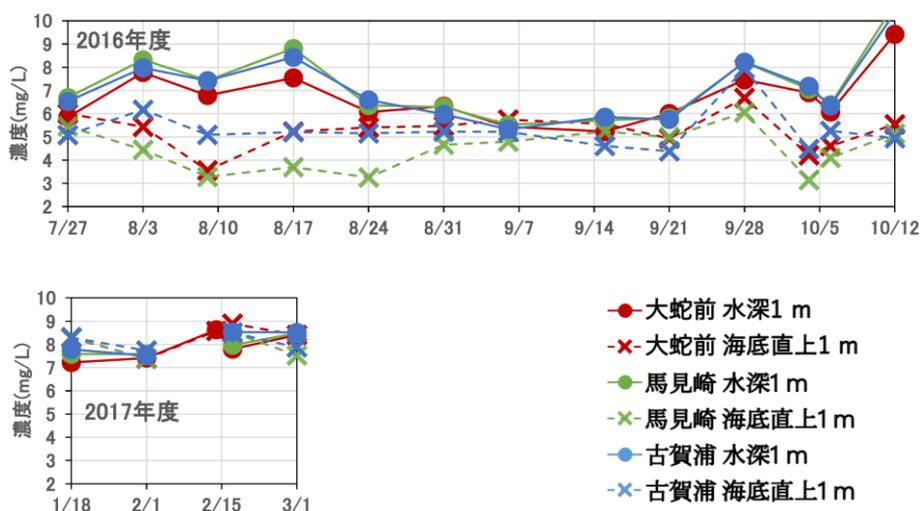


図 9 田辺湾養殖場水域における溶存酸素量 (DO) の短期変動

夏季の成層が崩壊する冬季になると、表層と底層の DO の差がなくなり（図 9）、アンモニア態窒素濃度も上から下まで均一に分布した。DO も底層まで十分に供給されるため、アンモニア態窒素濃度が低下したのであろう（図 8）。

b. 細胞外酵素活性

2015 年 1 月から 2017 年 3 月までの酵素活性の結果を図 10 に示した。単位体積当たりの活性で見ると、底泥堆積物の活性が海水の活性よりも 2 桁ほど高い。これは単位体積当たりに存在する底泥堆積物中の細菌量が、海水中の細菌量よりも 2 桁ほど高いことによる（Yoshikawa et al. 2011, doi:10.1111/j.1365-2109.2011.02978.x）。ロイシンアミノペプチダーゼ（LAPase）に注目すると、表層水では夏季に活性が上がる傾向があり、底層水や底泥堆積物では冬季に活性の上がる傾向があった。

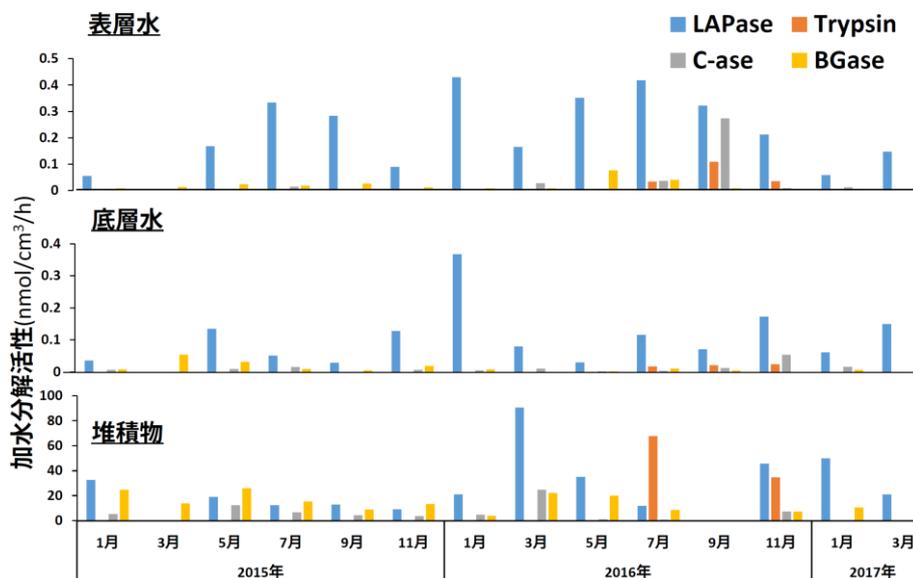


図 10 細胞外酵素活性（環境酵素）の季節変動

表層水と底層水の LAPase 活性について、水温 20℃以上の高水温期と 20℃未満の低水温期に分けて比較した（図 11）。5～9 月の高水温期では、表層水に比べて底層水の活性がかなり低くなったのに対し、11～3 月の低水温期では底層水の LAPase 活性が上がり、表層水と底層水に差がなくなった。

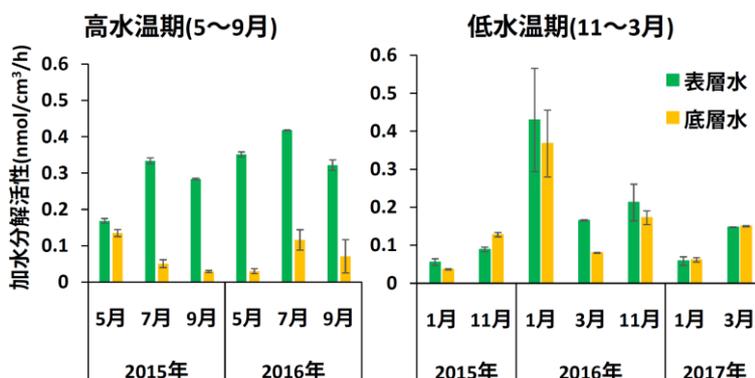


図 11 高水温期（5～9月）と低水温期（11～3月）の表層水と底層水のロイシンアミノペプチダーゼ活性の比較

どのような環境因子が夏季と冬季における LAPase 活性の変化に影響しているのかを調べるため、様々な環境要因と LAPase 活性との相関を調べてみた。その結果、表層水は水温と正の相関を示し、底層水は DO と正の相関を示した（図 12，有意水準 10%）。表層水は年間を通して DO が十分に供給されること、大気の影響を受けやすいことを考慮すると、DO よりも水温変化により強く依存し、水温が上がる夏季に酵素活性も上昇するのかもしれない。一方、底層水は表層水と異なり、水温の変動よりも DO の変動が激しいため、より DO への依存度が大きくなるのであろう。

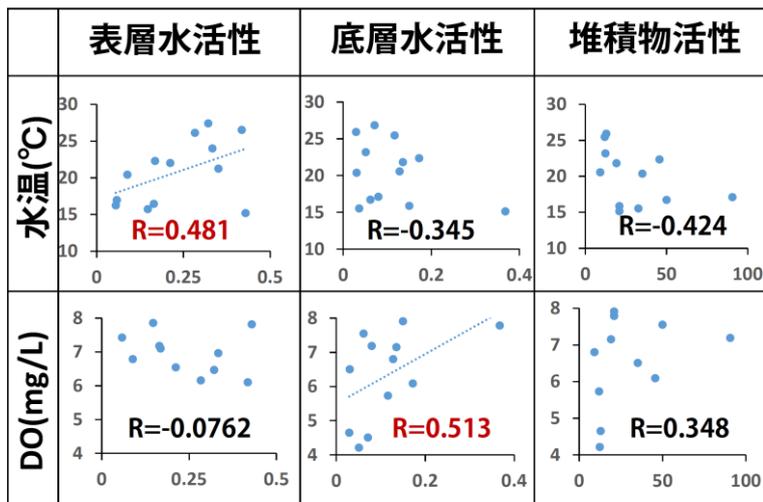


図 12 ロイシンアミノペプチダーゼと水温や溶存酸素（DO）との相関関係

底層水における水温と DO の関係を見ると、強い負の相関を示した（図 13）。水温低下と共に DO が上がる。これは夏季から冬季に向かうに従い、成層が崩壊して鉛直混合が起こっていることを示している。夏季の気温が 30℃以上あり、冬季の気温が 10℃以下になるような場合であっても、水深 15 m 程度の水深での温度は概ね 15℃以上ある。この比較的高い水温に十分な DO が供給されると、一気に LAPase 活性が上がるのであろう。

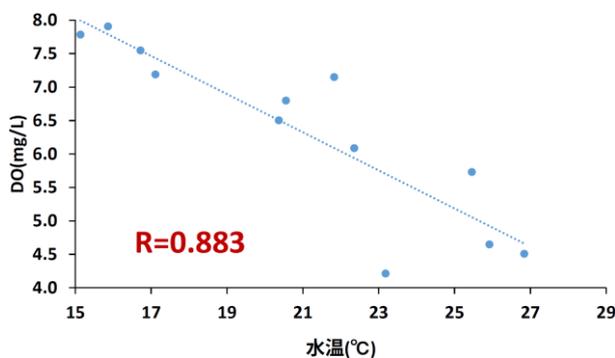


図 13 底層水における水温と溶存酸素（DO）との相関関係

養殖場水域の底泥堆積物についても、高水温期（5～9月）と低水温期（11～3月）に分けて比較した（図 14）。底泥堆積物でもやはり低水温期に LAPase 活性が高くなった。イケス養殖場水域の底泥に堆積したタンパク質成分は成層崩壊時に一気に進むのであろう。

環境低負荷システムの構築
物質循環の解析と制御（江口・中瀬・谷口）

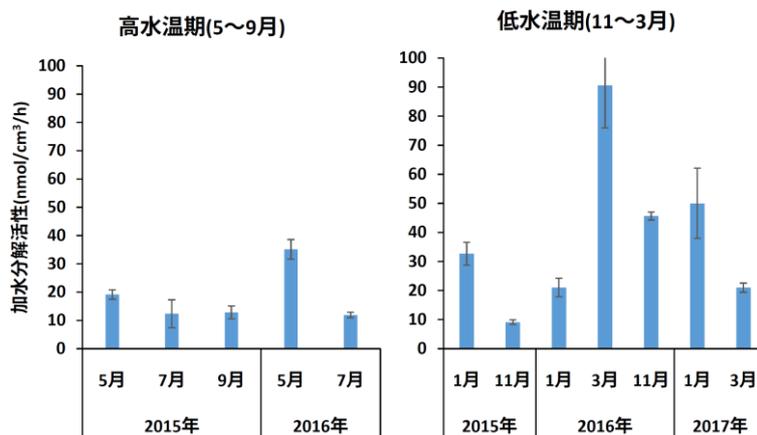


図 14 底泥堆積物の高水温期と低水温期におけるロイシンアミノペプチダーゼ活性の比較

c. 無機化活性

細胞外酵素活性の作用により低分子化された有機物は、最終的に海洋細菌に取り込まれ、無機化される。グルコースの無機化活性については 2015 年 3 月～2016 年 11 月に表層水、底層水、底泥堆積物について測定した（図 15 と 16）。グルタミン酸についてはエキソペプチダーゼであるロイシンアミノペプチダーゼ活性が夏季と冬季で大きく変化するという結果（図 11）をふまえ、2016 年 7 月から測定を開始した（図 17）。なお、図 15～17 で測定結果の数値がないものは、測定限界値以下を意味するのではなく、すべて測定を行っていない no data であることを意味する。

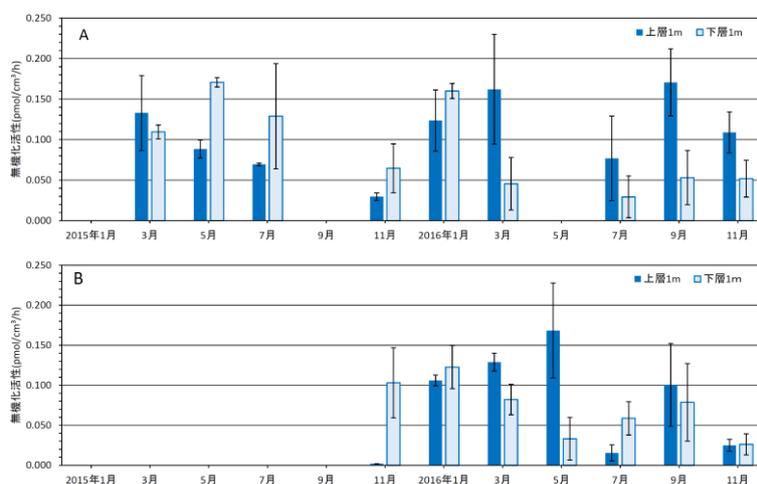


図 15 田辺湾養殖場水域の海水におけるグルコースの無機化活性

A : St. 川久, B : St. 島

環境低負荷システムの構築
物質循環の解析と制御（江口・中瀬・谷口）

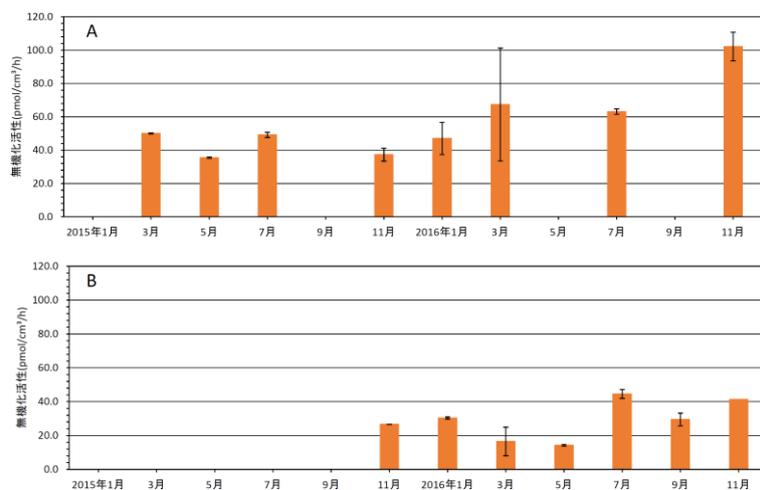


図 16 田辺湾養殖場水域の底泥堆積物におけるグルコースの無機化活性
A : St. 川久, B : St. 島島

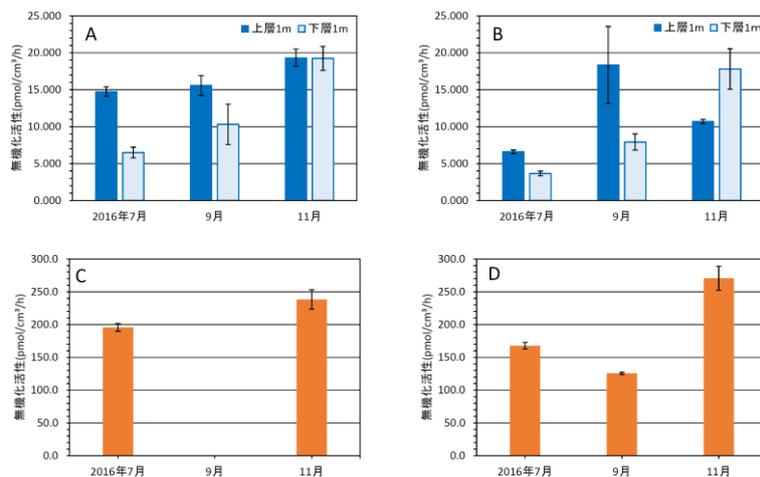


図 17.田辺湾養殖場水域におけるグルタミン酸の無機化活性

A : St. 川久 上 (表) 層と下 (底) 層海水, B : St. 島島 上 (表) 層と下 (底) 層海水,
C : St. 川久 底泥堆積物, D : St. 島島 底泥堆積物

海水と底泥堆積物の単位体積当たりの無機化活性は、細胞外酵素活性と同様に底泥堆積物が海水よりも 2 桁程度高くなった (図 15, 16, 17)。グルコースを呼吸基質とした場合、海水と底泥堆積物ともに、ある程度の季節変動が見られたが、成層しているであろう時期に必ずしも底層水や底泥堆積物の活性が低くなるということでもなかった。

グルタミン酸を基質とした場合、試料数が限られているために確定的なことは述べられないが、川久でも島島でも、底層水の無機化活性は 7 月、9 月、11 月と季節が移るに従い上昇する傾向を示した (図 17A と B)。一方、表層水は底層水ほど季節変化に伴う変化は確認できなかった (図 17A と B)。

グルタミン酸については、底泥堆積物でも底層水と同じように、夏季 (7 月) よりも冬季 (11 月) に活性が上昇した (図 17C と D)。この傾向はタンパク質を分解するロイシンアミ

ノペプチダーゼの場合とよく似ており、やはり冬季に底泥に堆積したタンパク質成分が活発に分解され、無機化されているのかもしれない。

(3)-1 成果の副次的効果、今後の計画等

内湾養魚場水域では冬季の底層と底泥堆積物で活発にタンパク質が分解・無機化されることが明らかになった。また、栄養塩のデータは台風などの自然攪乱がアンモニア濃度を低下させるという効果も確認した。これらの結果は、今まで全く研究されてこなかった、内湾養魚場水域における鉛直混合（自然攪乱）が、水質・底質浄化に有効に働くという新しいメカニズムの提案を可能にし、内湾養魚場浄水域における環境容量の推定を考える上で重要な要因となる。ただ、環境条件はサンプリングを行う場所や時期で極めて多様に変化することから、2～3年程度のデータの蓄積では全貌解明には至らない。今後も引き続き、野外調査を継続することが重要となる。

(3)-2 養魚場底質における有機物蓄積パターンの解析

(3)-2 目的

給餌養殖を行うと、残餌や糞に由来する有機物が漁場の底質に蓄積する。それら有機物の蓄積を放置すると底質の悪化が進行する。底質の状態を顧みずに利益のみを追い続けたツケは、いずれ疾病の蔓延や飼育成績の悪化という形で支払うことになる。また、一度底質の状態を著しく悪化させてしまうと、給餌養殖を続けたままその状態を回復させることは非常に難しい。海面を利用した給餌養殖の実施・継続には、底質など漁場の環境を良好な状態に維持し、環境の悪化を予防する取り組みが必須となる。

今日では、環境の収容力にみあった規模で養殖を行う必要があるという認識が広まってきたが、その一方で、どのように負荷と環境収容力のバランスをとるかという問いに対する具体的な回答・提案はほとんどない。仮に、漁場環境への負荷の削減を目指すとなれば、それは養殖生産者に投餌量（＝生産量）の削減という重荷を背負わせることを意味する。環境に配慮するあまり、短絡的にこれを実行することは養殖産業の発展と相反することになる。「持続可能（持続的）な養殖」には、環境への配慮と同時に産業としての養殖業を妨げない、という二つの目的が両立可能であることが求められる。

そこで新たな提案として考えていることが、漁場の計画的な運用と管理による更なる環境悪化の防止である。給餌養殖を続ける以上は環境への負荷が発生することは避けられない。まったく影響がない程の環境を求めるのではなく、養殖の持続に悪影響のない、周辺に新たな被害をおよぼさない、という水準で環境の維持・悪化防止に努めるという事を目標に漁場を運用する手法を検討・提案すべきではないかということである。その対応の一つとして、生簀の移動によって負荷を分散させることが考えられる。生簀の移動によって負荷を受ける面積を広げれば、投餌量を大幅に削減せずに、底質への面積あたりの負荷が減少するはずである。ただ、生簀は区画漁業権で定められた水面にしか設置できないため、生簀の移動は区画内に限られる（図 18）。この区画内での負荷の分散を実施するには、

底質をエクマンバージ式採泥器（採取範囲 15 cm × 15 cm，離合社，さいたま市）で採取し，採取した底質の表面（深さ 0～1 cm）部分を分析に供した。底質の分析は AVS（Acid Volatile Sulfide）および COD（Chemical Oxygen Demand）について行った。AVS を検知管法で，COD をアルカリ性過マンガン酸カリウム法でそれぞれ分析した。

採取した底質試料（複数回現場調査した月ではいずれか一回の調査の試料）を CHN 分析装置 JM10（ジェイ・サイエンス・ラボ，京都市）による有機炭素および窒素量の測定に供した。

定点を設定した生簀への投餌量を，現場作業担当者の記録を元に月ごとの積算値として集計した。集計は，「直上生簀」への餌料として定点を設定している生簀そのものへの投餌量を集計し，「直上・隣接生簀の合計投餌量」として，直上生簀への投餌と直上生簀に隣接設置されている生簀への投餌量を足し合わせたもの（直上生簀投餌量＋隣接生簀投餌量）をそれぞれ集計した。

b. 生簀直下の底質とその近傍の生簀非設置水面下の底質における有機物レベルの比較

2016 年 4 月から 10 月の調査・観測では，RS から 40 m 離れた出荷用の筏枠（飼育魚・投餌なし）にも定点 BL（平均水深 13.3 m）を設けた（図 20）。定点 BL および RS において底質試料の採取および現場観測を 2 週間に一度の頻度で実施した。底質試料の採取および分析は上述の方法（a. 養殖生簀直下の底質のモニタリング）で実施した。

底質試料の採取に加え，沈降粒子の捕集を 8 月および 9 月に 2 週間に一度の頻度で実施した。RS および BL において，樹脂製のセディメントトラップ（口径 9 cm，高さ 25 cm）を海底上 1 m に設置し，設置から 24 時間後にセディメントトラップを回収した。

採取した底質および沈降粒子の試料について有機炭素および窒素量を測定した。測定方法は上述（a. 養殖生簀直下の底質のモニタリング）の方法で行った。

底質採取時の海水の水温，DO（Dissolved Oxygen），塩分（以下 Sal）およびクロロフィル a 量（以下 Chl-a）を多項目水質計 AAQ-175（JFE アドバンテック，西宮市）を用いて測定した。

(3)-2 結果と考察

a. 養殖生簀直下の底質のモニタリング

AVS の値の推移を図 21 に示した。月ごとの平均値で表した AVS は，夏に高く冬に低いという季節的な変化を示した。これは調査した 2014 年，15 年および 16 年のいずれにおいても共通していた。年間の平均値を求めると，2014 年，15 年および 16 年においてそれぞれ，0.20，0.24 および 0.29 mg/g（dry sediment）となっており，2014 年の値が他の 2 年より低い傾向があった。

環境低負荷システムの構築
物質循環の解析と制御（江口・中瀬・谷口）

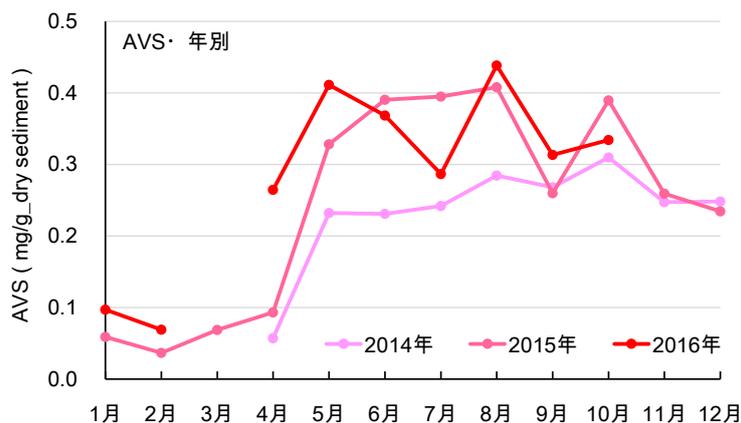


図 21 AVS の推移

2014年1月～3月，2016年3月，11月，および12月はデータなし。
測定値の月ごとの平均値を算出しプロットした。

COD の値の推移を図 22 に示した。月ごとの平均値で表した COD の推移は，AVS とは異なり，明瞭な季節性を示さなかった。年間の平均値を求めると，2014 年，15 年および 16 年においてそれぞれ，10.90，14.04 および 12.79 mg/g (dry sediment) となっており，AVS 同様 2014 年の値が他の 2 年より低くなる傾向があった。

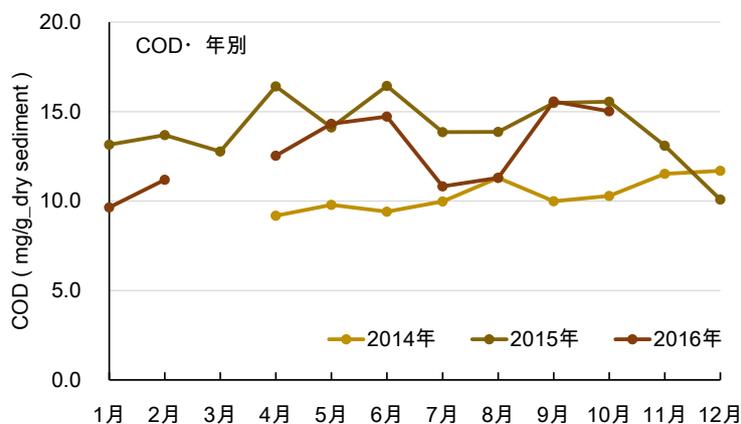


図 22 COD の推移

2014年1月～3月，2016年3月，11月，および12月はデータなし。
測定値の月ごとの平均値を算出しプロットした。

AVS と COD の相関係数を表 1 に示した。調査した 3 年の値をまとめて解析した場合には，相関係数は 0.31 であり，有意な相関ではなかった。年ごとに個別に解析した場合には，相関係数は 0.24～0.56 の範囲にあり，いずれも有意な相関ではなかった。

環境低負荷システムの構築
物質循環の解析と制御（江口・中瀬・谷口）

表1 底質と投餌量の相関係数一覧

下線は有意な相関を、太文字は底質と投餌量との相関係数を示す。a, 3年分のデータを全て解析; b, 2014年のデータのみの解析; c, 2015年のデータのみの解析; d, 2016年のデータのみの解析。

| a. 3年総合 | | | | | b. 2014年 | | | | |
|---------|--------------|--------------|-------------|---------|----------|--------------|--------------|-------|---------|
| | COD | AVS | 直上 | 直上・隣接合計 | | COD | AVS | 直上 | 直上・隣接合計 |
| COD | 1.00 | 0.31 | -0.07 | -0.12 | COD | 1.00 | 0.51 | -0.73 | -0.25 |
| AVS | 0.31 | 1.00 | -0.03 | 0.34 | AVS | 0.51 | 1.00 | -0.31 | 0.17 |
| 直上 | -0.07 | -0.03 | 1.00 | 0.63 | 直上 | -0.73 | -0.31 | 1.00 | 0.65 |
| 直上・隣接合計 | -0.12 | 0.34 | <u>0.63</u> | 1.00 | 直上・隣接合計 | -0.25 | 0.17 | 0.65 | 1.00 |

| c. 2015年 | | | | | d. 2016年 | | | | |
|----------|-------------|--------------|-------|---------|----------|--------------|-------------|-------------|---------|
| | COD | AVS | 直上 | 直上・隣接合計 | | COD | AVS | 直上 | 直上・隣接合計 |
| COD | 1.00 | 0.24 | 0.29 | 0.49 | COD | 1.00 | 0.56 | 0.21 | -0.07 |
| AVS | 0.24 | 1.00 | -0.36 | 0.67 | AVS | 0.56 | 1.00 | 0.41 | 0.39 |
| 直上 | 0.29 | -0.36 | 1.00 | -0.14 | 直上 | 0.21 | 0.41 | 1.00 | 0.94 |
| 直上・隣接合計 | 0.49 | 0.67 | -0.14 | 1.00 | 直上・隣接合計 | -0.07 | 0.39 | <u>0.94</u> | 1.00 |

定点直上生簀への投餌量の推移を図 23 に示した。直上生簀への投餌は、春季に増加し、夏季から冬季にかけて減少傾向を示していた。この傾向は調査した 3 年に共通していた。2015 年 9 月から 2016 年 3 月の期間は、生簀に飼育魚が不在となっていたため投餌は行われていなかった。2016 年 4 月および 5 月の投餌量が他より突出して多かった以外は、年ごとの投餌量に大きな違いはなかった。

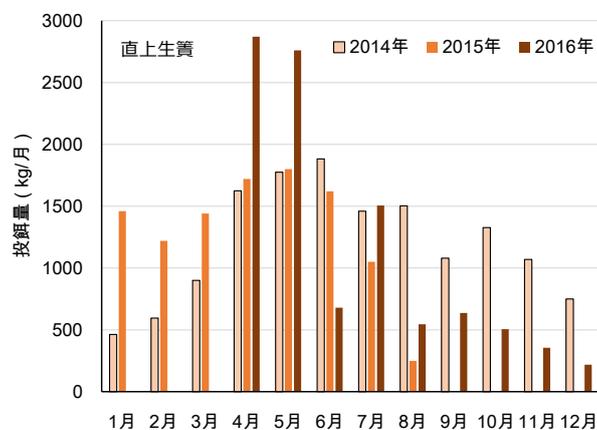


図 23 直上生簀への投餌量

2015 年 9 月～2016 年 3 月の期間は生簀に魚が収容されておらず投餌量 0。

直上・隣接生簀の合計の投餌量についても集計しその結果を図 24 に示した。春季に投餌量が増える傾向は直上生簀と同じであった。秋季の投餌量は、2014 年および 15 年では比較的高い値が記録されていた。2016 年は秋季、冬季には減少傾向であった。

環境低負荷システムの構築
物質循環の解析と制御（江口・中瀬・谷口）

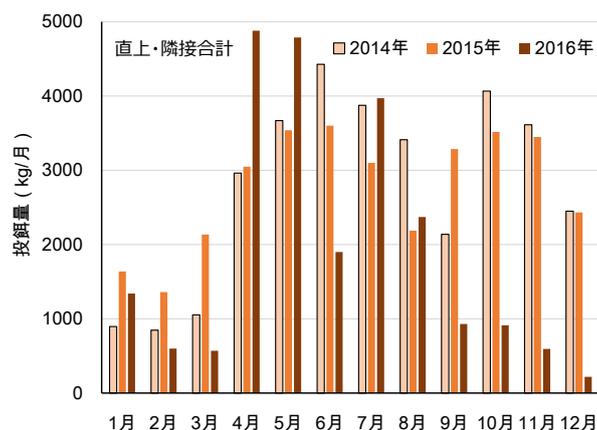


図 24 直上・隣接生簀の合計投餌量

底質と投餌量の相関係数を表 1 に示した。調査した 3 年の値をまとめて解析した場合は、相関係数は-0.12~0.34 の範囲にあり、底質と投餌量の間には有意な相関はみられなかった。年ごとに個別に解析した場合は、2015 年の AVS と直上・隣接合計の投餌量の間には有意な正の相関（相関係数 0.67, test of no correlation, $P < 0.05$ ）がみられた。

有機炭素量、窒素量および C/N 比の推移を図 25 に示した。底質の有機炭素量は夏季に高く冬季に低い傾向を示した。2014 年の値の水準は他の 2 年の値よりも低くなる傾向を示した。有機窒素量は有機炭素量と同様の変動をしていた。C/N 比はおおよそ 7 付近にあり、年間を通じて大きな変化を示さなかった。年ごとの値に顕著な違いもなかった。

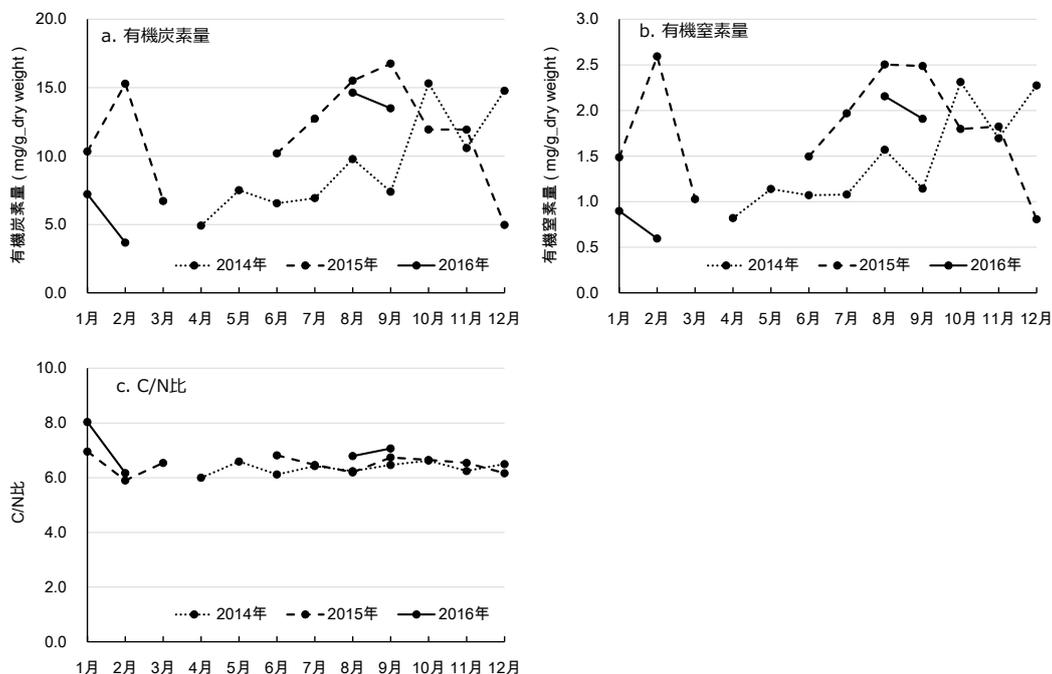


図 25 底質の有機炭素量, 有機窒素量および C/N 比
a, 有機炭素量; b, 有機窒素量; c, C/N 比

試料採取時の海水の水温および DO の変動を図 26 に示した。底層の DO は 6 月から 9 月まで低い値を示し、10 月以降回復していた。5 mg/L を下回るとはほとんどなかった。2015 年の底層の水温が他の 2 年より低い傾向があった以外、水温および DO の値に年ごとの顕著な違いはみられなかった。

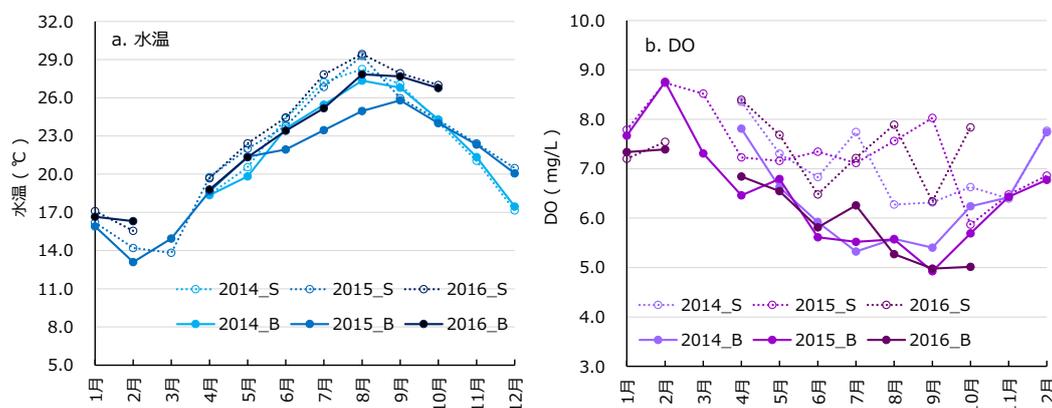


図 26 直上・隣接生簀の合計投餌量

観測値の月ごと平均値をプロット。a, 水温; b, DO。

AVS と COD はともに底質の有機汚濁の状態を表す指標と考えられているが、今回の研究では変動の様子が異なっていた。AVS が季節的な周期性を明瞭に示した（図 21）のに対して COD では季節レベルでの周期性を示さなかった（図 22）。ただ、年間レベルでの値の大小については、AVS および COD のどちらも 2014 年の値が他の 2 年よりも低くなるという点で一致していた（図 21 と 22）。AVS と COD の間には 0.5 程度の相関係数（2014 年および 16 年）があったが 2015 年には 0.25 と低かった（表 1）。これらの結果は、AVS と COD はどちらも底質における有機物負荷の状態を示す指標であることは間違いないが、AVS の方が COD よりもより細かい変化を測定値に反映させるという事を示唆している。底質の AVS は、投餌によって発生した有機物が分解される際、底質において局所的に嫌気状態となった部分で有機物の分解量に応じて硫化物が蓄積されることで、値が上昇する。この時に比較的分解の遅い有機物はその後も残留し続け COD として測定されているのではないかと推察される。AVS と投餌量との相関係数は、COD のそれよりも、高い値が得られる場合が多かった（表 1）。COD には比較的分解の遅い有機物が占める比率が高いのだとすれば、長期的（年レベル）での有機物量の増減には応答性を示すが、比較的分解の速い“新鮮な糞や残餌”の増減にはあまり感度が高くない、という事なのかもしれない。

底質の C/N 比は、調査した年の違い、季節や投餌量の変化に関わらずほぼ一定であった。上でも触れたが、投餌に起因する有機物の内、窒素を多く含む部分については速やかに分解されており、底質中にはあまり残留していないのかもしれない。そうであれば、今回調査した養魚場水域は、環境収容力にたいして比較的余裕のある状態で利用されていると、言えるのかもしれない。

b. 生簀直下の底質とその近傍の生簀非設置水面下の底質における有機物レベルの比較

各定点における底質 AVS および COD の推移を図 27 に示した。RS における AVS は、BL のそれよりも、高い水準で推移した。両定点における AVS の水準は有意に異なっていた (Friedman test, $P < 0.01$)。RS および BL における AVS の平均値はそれぞれ、0.34 および 0.45 mg/g (dry sediment) であった。一方、両定点における COD の水準には有意な違いはなかった (Friedman test, $P > 0.1$)。COD の平均値は RS および BL においてそれぞれ 13.5 および 14.4 mg/g (dry sediment) であった。

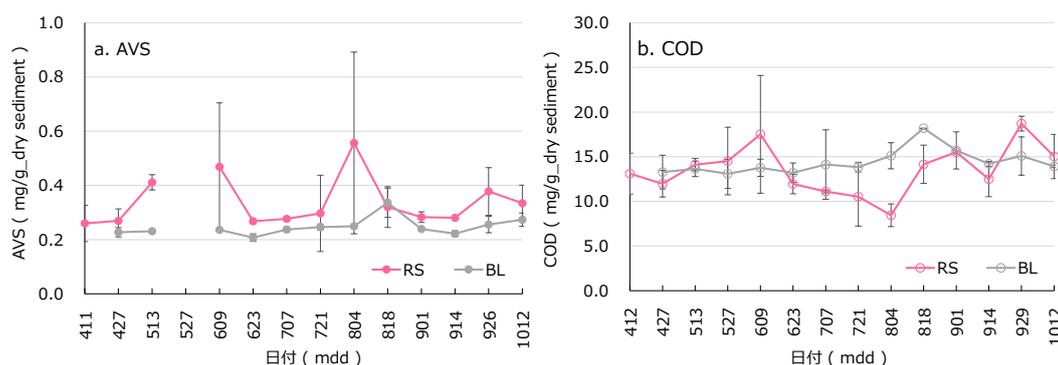


図 27 RS および BL における AVS・COD の推移 (2016 年)

a, AVS; b, COD

各定点における底質の有機炭素量および窒素量の変動を図 28 に示した。RS および BL における有機炭素量がそれぞれ 14.0 および 14.6 mg/g (dry sediment), 有機窒素量がそれぞれ 2.0 および 2.1 mg/g (dry sediment) であった。これらの値について定点間に有意な違いはなかった (いずれも Friedman test, $P > 0.1$)。

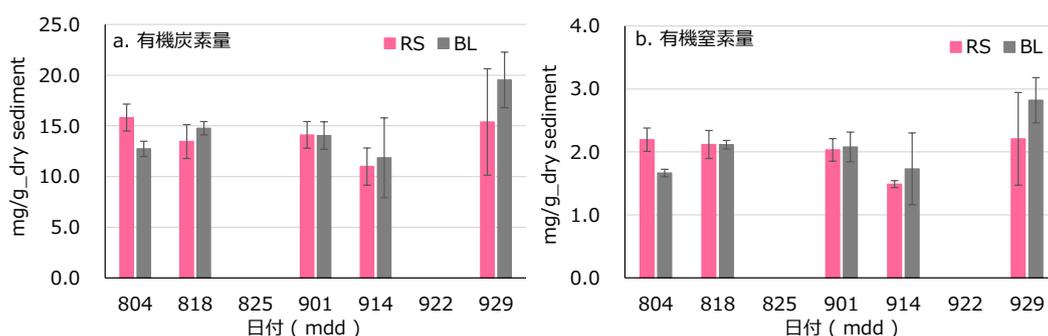


図 28 底質の有機炭素量および有機窒素量

a, 有機炭素量; b, 有機窒素量。8 月 25 日および 9 月 22 日は試料なし。

各定点で捕集された沈降粒子の有機炭素量および窒素量の変動を図 29 に示した。RS および BL において捕集された沈降粒子の有機炭素量の平均値がそれぞれ 79.7 および 59.8 mg/g (dry weight), 有機窒素量の平均値がそれぞれ 11.5 および 8.8 mg/g (dry weight) であった。

RS で捕集された沈降粒子において、同じ日に BL で捕集された沈降粒子よりも、有機炭素および窒素量が高くなる場合がみられた（サンプル数 n=2 のため検定せず）。

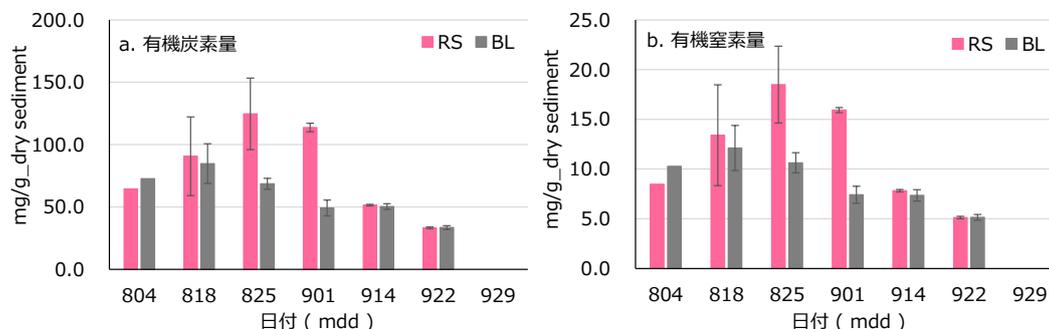


図 29 沈降粒子の有機炭素量および窒素量
a, 有機炭素量; b, 有機窒素量。9月29日は試料なし。

各定点における沈降粒子の捕集量を図 30 に示した。RS での捕集量は 0.024~0.208 mg (dry weight) /trap/day であり、同様に BL では 0.027~0.138 mg (dry weight) /trap/day であった。どちらの定点においても、捕集量の日ごとの変動が大きかった。捕集量の多かった日では、RS の捕集量が BL のそれよりも多くなる傾向があった。

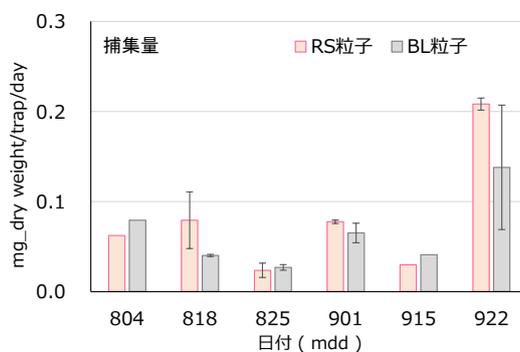


図 30 沈降粒子の捕集量

各定点における投餌量の推移を図 31 に示した。定点直上の生簀への投餌量の平均値は 1358 kg/月であった。投餌は春季に多く、以降減少していた。定点直上生簀の投餌量に隣接の生簀への投餌量を合計した場合の平均投餌量は、2822 kg/月であった。定点直上同様に、投餌は春季に多く夏以降は減少していた。セディメントトラップを設置した 8 月および 9 月の直上生簀への投餌量は、調査した 7 か月において、それぞれ 2 番目および 3 番目に少なかった。直上・隣接生簀の合計投餌量でも、8 月および 9 月の投餌量は調査期間内において、それぞれ 4 番目および 2 番目に少ない投餌量であった。

環境低負荷システムの構築
物質循環の解析と制御（江口・中瀬・谷口）

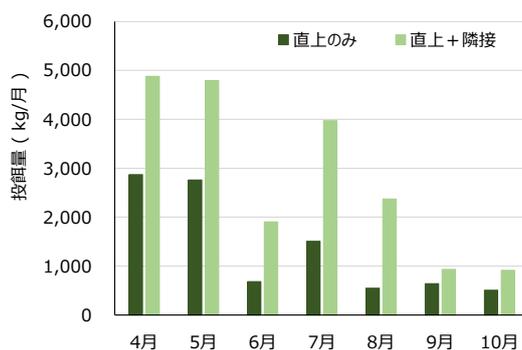


図 31 投餌量の推移

「直上のみ」は定点 RS を設定している生簀への投餌量を指し、「直上+隣接」は定点を設定した生簀の真横の生簀への投餌量を足し合わせた量（直上・隣接の合計）を指す。

海水の水質の推移を図 32 に示した。定点 RS と BL における水温，DO，クロロフィル a 量，濁度に大きな違いはなかった。調査期間中の水温は表層では 18.5~30.0 の範囲を，底層では 18.2~28.2 の範囲を推移した。同様に表層の DO が 5.7~9.4 mg/L の範囲，底層では 3.9~7.2 mg/L の範囲を推移した。クロロフィル a 量は表層で 0.1~16.3 μg/L であり，底層では 0.2~4.1 μg/L であった。濁度は表層で 0.2~1.0 FTU であり，底層では 0.6~10.4 FTU であった。定点間に大きな違いはなく，顕著な貧酸素化も観察されなかった。

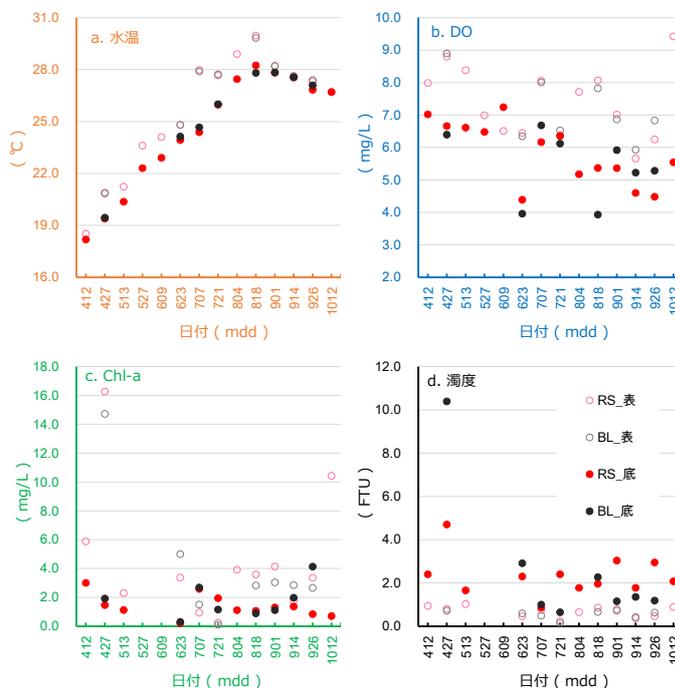


図 32 試料採取時の海水の水質

a, 水温; b, DO; c, Chl-a; d, 濁度。RS_表, RS の水深 1m; BL_表, BL の水深 1m; RS_底, RS の海底上 1m; BL_底, BL の海底上 1m を指す。

底質表面部分の AVS はほとんどの調査日において RS の値が、BL の値よりも、高い水準で変動しており、両定点における値の水準は有意に異なっていた（図 27）。また、捕集された沈降粒子の有機炭素および窒素量が RS で BL のものよりも高くなる場合がみられた（図 29）。これらの結果は、RS と BL において有機物負荷の程度が異なる可能性を示唆している。今回は投餌している点と投餌行われていない点の距離が 40 m であった。この距離は純粋に飼育担当者の作業場の都合であるが、40 m に限らずとも同程度の比較的近い距離で、投餌の顕著な影響が減少している可能性がある。まだ知見の量は十分ではないが、比較的近い距離で生簀を計画的に移動させて負荷を分散させる漁場の管理は、実現可能かもしれないと考えている。

調査定点 RS を設けた生簀で飼育されている魚には頻繁な投餌が不要であり、連日投餌されない。そのため糞や残餌の発生量が日によってかなり変動していた可能性が高い。加えて、トラップを設置した 8 月、9 月は投餌量が減少する時期に一致しており、投餌に起因して発生する沈降粒子の捕集がより難しい条件がそろっていた。捕集量が比較的多い場合には RS の粒子量も増える傾向があったことから、より活発に投餌・摂餌が行われる時期に調査することで明瞭な結果を得られると予想される。この点は今後の課題となった。

4) 成果の副次的効果、今後の計画等

本研究において、底質の AVS が毎年同程度の値の範囲で同じ変動を繰り返している事が分かった。調査対象とした漁場では更なる底質環境の悪化は発生しておらず適切な利用が行われていることが伺われた。漁場の管理において長期的にモニタリングを続けることの意義を改めて示したと言える。また、投餌している生簀から 40 m という比較的近距离の場所で、底質の AVS が有意に減少するデータを得た。沈降粒子の捕集量や有機炭素量も投餌している場所から 40 m 離れた点では減少することが示唆される結果も得た。これらは、生簀の設置場所の近傍を負荷の分散場所として利用できる可能性を示す。

今後、実際の生簀の移動を伴う実証研究などが実施できれば、よりデータの精度を高めていくことができるはずである。これにより、養殖生産量の大幅な削減をすることなしに、養魚場水域の底質環境を維持・改善する管理手法の確立につながると期待される。

(3)-3 養殖環境における物質循環過程の鍵を握る微生物の多様性と機能

(3)-3 目的

当該担当課題では、養殖場環境における物質循環を適切に把握するために第一義的に重要となる微生物の多様性および機能の季節変動性を明らかにすることを目的とした。将来的には、養殖環境における物質循環モデルの構築を目指す。

海洋生態系における生物活動による物質循環は、2 大経路による。すなわち、いわゆる古典的な生食物連鎖（植物プランクトンから動物プランクトン、そして魚類へと流れる経路）と微生物ループである。微生物ループは、生食物連鎖で利用できなくなった有機物を細菌が利用し、その細菌生産を原生生物が消費し、そして動物プランクトンへと流れ

る経路である。微生物ループの起点となる細菌群は、この中において有機物の無機化および高次栄養段階へのエネルギーおよび物質の転送という役割を果たしている。この細菌群は、植物プランクトンによる一次生産の 50%以上にも相当する有機物を消費していることも知られている。すなわち、細菌群は海洋における物質循環を駆動している生物群であるといえる。細菌群を無視して海洋の物質循環を語ることはできない。

魚類養殖環境においては、残餌や排せつ物などの有機物によって周辺環境に負荷がかかっている。その有機物負荷が過剰に進みすぎた場合、底質の悪化による貧酸素水塊の発生などによって養殖活動の継続が困難となる。どの程度の規模の養殖活動が可能なのかは、その環境の持つ自浄能力による。環境の自浄能力の範囲に収まる有機物負荷を伴う養殖活動を行うことが、環境を悪化させないことにつながる。そのためには、環境の自浄能力について正確に把握する必要がある。

環境の自浄能力のうち、生物活動によるものは主に微生物、とりわけ細菌群が担う。当該研究課題では、生物活動による自浄能力を正確に把握するために、細菌群の群集構造について解析することとした。とりわけ、本課題では活発に増殖している細菌群を対象とした。活発に増殖している細菌群は、その自らの増殖のために有機物や栄養塩を他の増殖していない細菌群よりも多く要求する。一方で、活発に増殖している細菌群は、原生生物による捕食やウイルスによる溶菌を他の増殖していない細菌よりも強く受ける。すなわち、海洋や養殖場環境の物質循環を駆動している細菌群のうち、活発に増殖している細菌群こそがその鍵を握る生物群ととらえることができる。将来的には、本課題で取得した細菌情報をを用いた養殖環境の物質循環モデルの構築を目指す。

活発に増殖している細菌群を解析するために、ブロモデオキシウリジン (BrdU) を用いた。BrdU は DNA 合成の前駆物質であるチミジンの類似体である。BrdU は、細菌が DNA を合成するとき、すなわち増殖するときに DNA に取り込まれる。DNA に取り込まれた BrdU は、特異的な抗体を用いて検出することができる。本研究課題では、磁気ビーズが標識された抗体を用いた。これにより、BrdU で標識された DNA だけを磁石を用いて取り分け、活発に増殖している細菌群だけを解析することができる。BrdU 標識 DNA を分取したのち、多様性解析手法の一種である ARISA (automated ribosomal intergenic spacer analysis) を用いて細菌群集構造の季節変動を解析し、さらに第 3 世代 PCR であるデジタル PCR で特徴的な細菌種の季節変動を推定した。

(3)-3 研究方法

a. 活発に増殖する細菌群の群集構造の季節変動

近畿大学水産研究所白浜実験場が所有する田辺湾養殖場において、養殖いけすが多い観測点 (St. 川久) および養殖いけすのない観測点 (St. 島島) の 2 観測点を対象とした (図 1)。表層 1 m および底上 1 m の海水試料を、2010 年 7 月から 11 月、2014 年 7 月から 2016 年 9 月までのそれぞれ 2 か月おきに、ニスキン採水器を用いて採取した。同時に、多項目水質計を用いて、水温、塩分、濁度、クロロフィル量および溶存酸素量を測定した。研究室に海水試料を持ち帰った後、BrdU (終濃度 1 μM) を添加し、現場水温付近で 3 時間培養した。培養後に、孔径 3 μm ポリカーボネートメンブレンフィルターおよび孔径 0.2 μm ステリベクスカートリッジフィルターを用いて連続ろ過した。細菌群集構造の解析には、ステリベク

スを用いた。ステリベクスから細菌 DNA を抽出し、ARISA に供した。ARISA ピークを OTU (operational taxonomic unit) とした。特徴的なピークの細菌種を推定するために、一部の試料をクローニング解析に供した。また、総ピーク高に対する各ピーク高の比を、各 OTU の相対現存量として、以下の解析に用いた。細菌群集構造データを用いて、多様度指数の算出および主成分分析を行った。細菌群集構造とともに、多項目水質計で得られた環境要因および同研究課題で得られた有機物および栄養塩データを合わせて、local similarity analysis (lsa) を行い、その解析結果を Cytoscape でビジュアル化し、細菌種の変動パターンについて解析した。

b. *Roseobacter* clade associated bacteria の季節変動

試料については、研究方法 a. と同じ DNA 抽出試料（ただし、2014 年 7 月から 2016 年 9 月）を用いた。*Roseobacter* clade associated (RCA) bacteria の 16S rRNA 遺伝子コピー数の定量を行った。定量には、第 3 世代 PCR システムである Quantstudio™ 3D デジタル PCR システムを用いた。デジタル PCR では、供した DNA 一つひとつに対して PCR 増幅を行い、その増幅の有無をもってコピー数の絶対定量を行う。プローブセットとして、RCA bacteria 用プローブセット (RCATQ830R: 5'-FAM-TGA CAC CAA CAA GTA TAC TTG CTG ACG T-MGB-3', RCA804f: 5'-TCC ACA CCG TAA ACG ATG AAT-3', RCA867r: 5'-CAG GCG GAA TGC TTA ATCC-3') および Bacteria 用プローブセット (TM1389F: 5'-VIC-CTT GTA CAC ACC GCC CGT A-MGB-3', BACT1369F: 5'-CGG TGA ATA CGT TCY CGG-3', PROK1492R: 5'-GGW TAC CTT GTT ACG ACT T-3') を用いた。BrdU 標識 DNA を分取する前後の DNA 試料を用いて、それぞれで RCA bacteria のコピー数を定量した。

(3)-3 結果と考察

a. 活発に増殖する細菌群の群集構造の季節変動

活発に増殖している細菌群の多様度指数は、年および月ごとに大きく変化していたが、規則的な季節変動パターンは見られなかった。観測期間を通じて、OTU 数 (S)、対数逆シン普森 (D')、シャノンウィーナー (H') および均衡度 (J') は、それぞれ 7~55 (25.4 ± 8.8 , 平均 \pm 標準偏差), 1.22~3.92 (2.44 ± 0.67), 1.70~4.28 (3.14 ± 0.63) そして 0.43~0.92 (0.68 ± 0.10) であった (図 33)。観測点および採水深度による違いには、有意な差が見られなかった ($p > 0.1$)。養殖いけすの St. 川久では、有機物や栄養塩負荷があるにもかかわらず、多様性に対する顕著な影響は見られなかった。

環境低負荷システムの構築
物質循環の解析と制御（江口・中瀬・谷口）

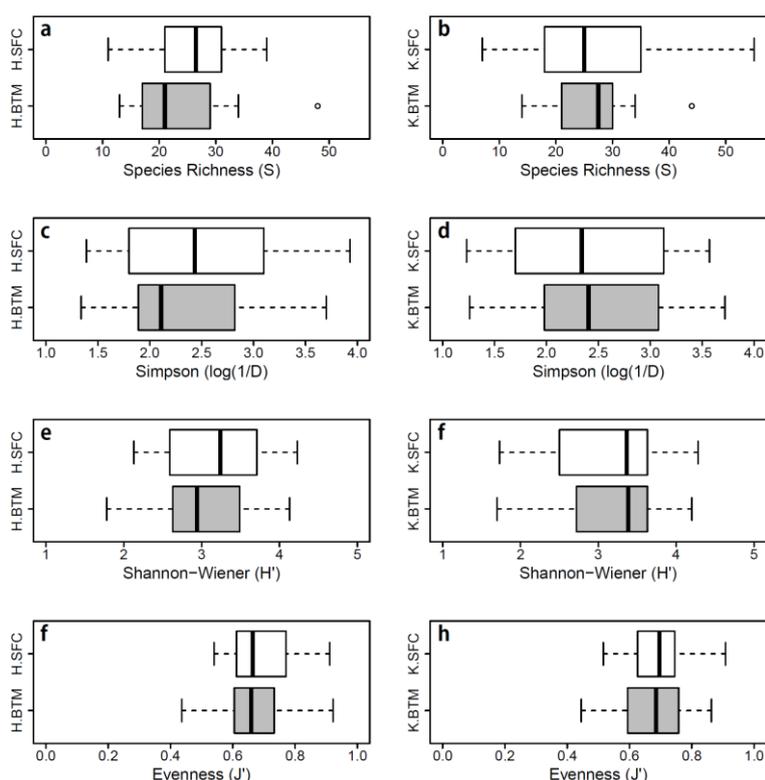


図 33 多様度指数

St. 島 (a, c, e, f), St. 川久 (b, d, f, h), 白箱は表層, 灰箱は底層

本研究で対象とした養殖場域は沿岸域であるため、大雨や台風などの影響を受けやすく、河川水や汽水などの流入もある。さらに、本養殖場域の特徴の一つとして、黒潮の差し込みもある。本研究では、このような影響について詳細に解析できなかったため、将来的に考慮に入れる必要がある。

一般的には、多様性が高い方が生態系機能も高い。細菌多様性の高さが、水域の水質浄化能力あるいは環境変化に対する対応力の高さにつながる。養殖活動によって細菌多様性が著しく低くなるという傾向は、本研究課題では見られなかった。多様性には様々な要因が影響を与えていると考えられるが、その要因の推定には至らなかった。今後の課題としては、河川水や汽水の流入、および黒潮の差し込みの影響に注目することである。それぞれの「水」には、存在している細菌種も異なる。それらの細菌種が混ざり合う本養殖場域では、どのような細菌間相互作用が生まれているのか、その結果どのような生態系機能が生じているのかについて調べる必要がある。

主成分分析の結果、活発に増殖している細菌群集構造には季節的な変動パターンが見られた (図 34)。基本的に、高温期 (夏季)、低温期 (冬季) および変温期 (春季と秋季) に分けられた。このことは、毎年のように同じ細菌種が出現していることを意味する。一方で、観測点および採水深度による違いを見出すことはできなかった。

環境低負荷システムの構築
物質循環の解析と制御（江口・中瀬・谷口）

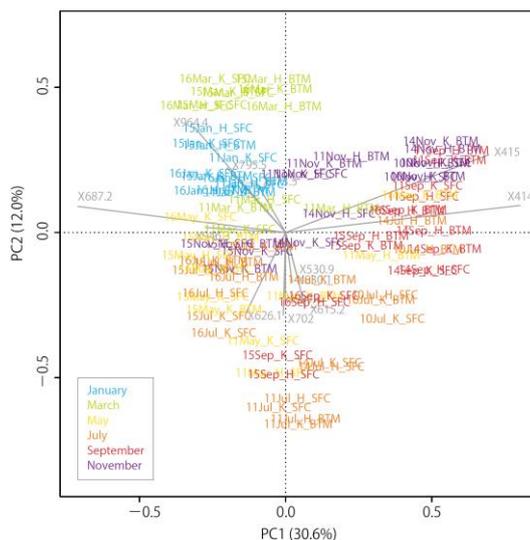


図 34 細菌群集構造の座標づけプロット

既報研究においても、細菌群集構造には季節周期性があることが示唆されている。本養殖場域においても同様のことがいえることが分かった。このことは、本養殖場の持つ細菌による潜在的な自浄能力については、毎年同じであることを示唆する。しかしながら、別研究課題で明らかになったように、細胞外酵素活性や無機化活性は同じ月でも年が異なると、その程度が異なる。これは、細菌群集がその能力を発揮するための制限要因の存在が示唆される。いわゆる細菌増殖の制限要因として挙げられる炭素、窒素およびリン酸については、別研究課題で明らかになったように、制限要因にはなっていないようである（細菌の C:N:P の比として、多くの報告があるが、一般的には 100:20:2 とされる）。細菌が利用できる有機物の化学構造も一因として考えられるが、C、N および P 以外に制限要因となっている栄養素の存在も示唆される。あるいは、細胞外酵素活性および無機化活性に関しては、活発に増殖していない細菌群、つまり増殖はしていないが生きている細菌群による貢献があるということも考えられる。今後の課題として、活発に増殖している細菌群だけでなく、生きている細菌群の解析も重要になる。生きている細菌群の解析には、RNA を対象とした解析が考えられる。

細菌群集構造全体としては季節周期性が見られたが、各細菌種に関する詳細な季節変動性に関する知見を得るために local similarity analysis で調べた。季節変動を水温の変動と読み替え、水温と相関のある OTU を調べた。観測期間を通じて検出された OTU 数は、St 川久の表層で 155 OTUs および底層で 151 OTUs、ならびに St. 島島の表層で 154 OTUs および底層で 137 OTUs であった。これらのうち、水温との相関がみられた OTU は、St 川久の表層で 70 OTUs (検出された OTU の 45.2%) および底層で 77 OTUs (51.0%)、ならびに St. 島島の表層で 75 OTUs (48.7%) および底層で 68 OTUs (49.6%) であった (図 35; $p < 0.05$, $q < 0.005$, lsa)。約半数の細菌が水温と何らかの関係があることが示された。

環境低負荷システムの構築
物質循環の解析と制御（江口・中瀬・谷口）

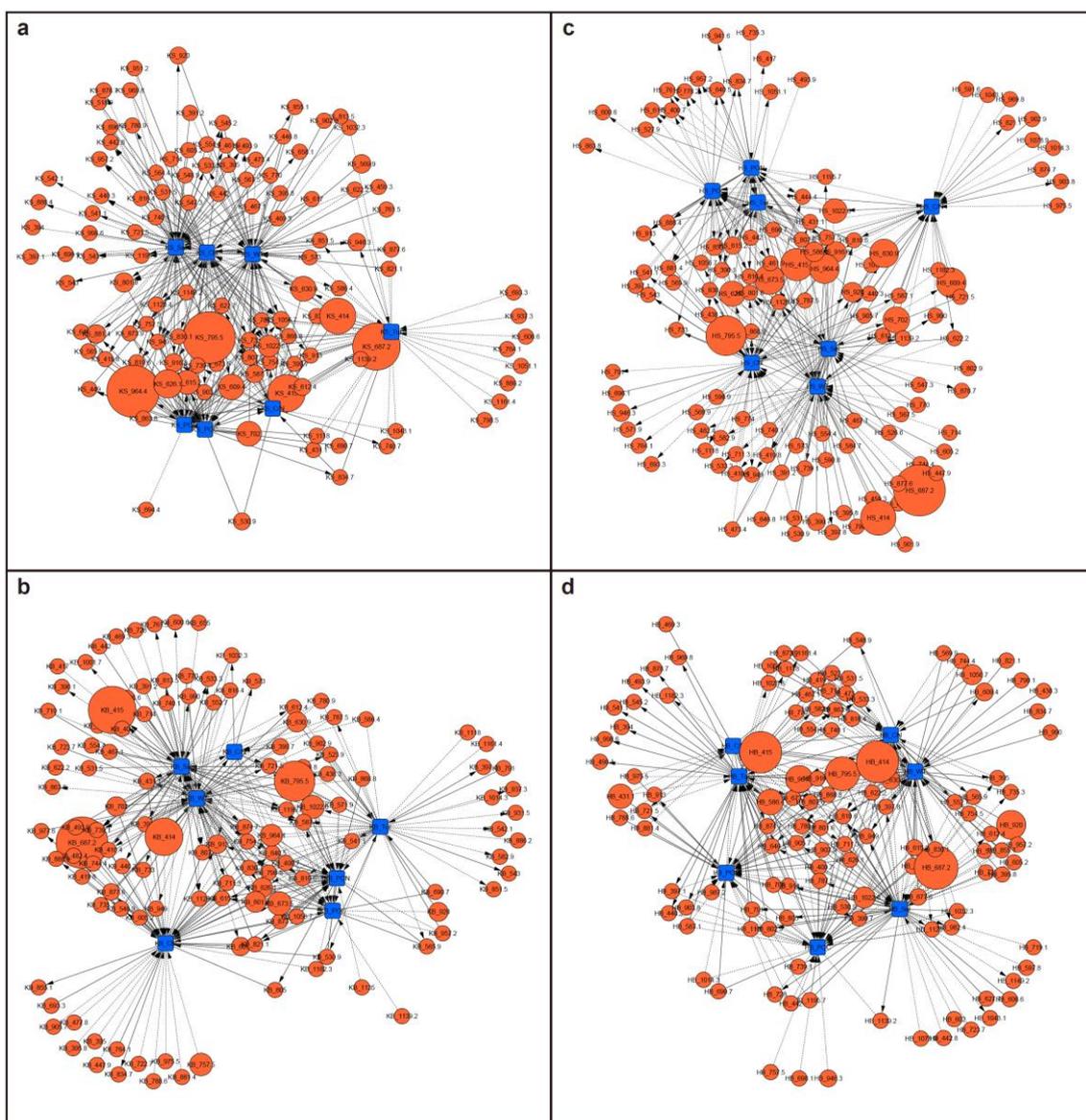


図 35 St. 川久 (a, b) および St. 島島 (c, d) における環境要因 (青) と細菌種 (橙) とのネットワーク
細菌種の円の大きさは現存量を反映している (大きいほど現存量も多い)。
上段 (a, c) が表層, 下段 (b, d) が底層

OTU795.5 が全観測点において検出されており、現存量も多い細菌種であった (図 35)。本細菌種は、local similarity analysis の結果で冬型の細菌種であることが示されている。クラusteringの結果、本細菌種は *Polaribacter* 属細菌に近縁な細菌種であった。*Polaribacter* 属細菌は極域において発見されており、低温環境を好適とする細菌種である。また、本細菌種は Bacteroidetes 門に属する細菌種である。本門は、難分解性の有機物を分解する細菌種を多く含む細菌門である。本種以外にも、Bacteroidetes 門に属する多くの細菌種が検出されていることから、本門の細菌種は難分解性有機物の分解・無機化などの鍵細菌種であることが示唆される。

他に興味深い細菌種が *Rhodobacteraceae* 科に属する細菌種である。本科に属する細菌は、例えば OTU1051.1 がある。本科に属する細菌群は、既報研究において、沿岸域に普遍的に存在し、かつ一年を通して活発に増殖している細菌群であることが示唆されている。さらに、本細菌群の興味深い点は、光従属栄養細菌も属している点である。光従属栄養細菌は非酸素発生型の光合成細菌であり、エネルギーおよび炭素源として有機物を利用するとともに、光をもエネルギー源として利用することができる細菌である。本細菌は、他の細菌群と異なり光を利用することができるため、これまでの物質循環とは異なる経路を生み出している可能性がある。養殖場域における物質循環を詳細に把握するためには、光従属栄養細菌の動態を把握する必要がある。

b. *Roseobacter* clade associated bacteria の季節変動

全細菌群（活発に増殖している細菌とそうでない細菌を含むすべての細菌）の 16S rRNA 遺伝子のコピー数は、St. 川久の表層で $101.6 \pm 76.6 \times 10^7$ copies/L（平均 ± 標準偏差）および底層で $65.5 \pm 35.1 \times 10^7$ copies/L ならびに St. 島島の表層で $103.7 \pm 76.7 \times 10^7$ copies/L および底層で $51.4 \pm 30.4 \times 10^7$ copies/L であった（図 36）。一方、活発に増殖している細菌群の 16S rRNA 遺伝子のコピー数は、St. 川久の表層で $6.2 \pm 3.3 \times 10^7$ copies/L および底層で $2.9 \pm 1.9 \times 10^7$ copies/L ならびに St. 島島の表層で $6.1 \pm 5.6 \times 10^7$ copies/L および底層で $1.9 \pm 2.0 \times 10^7$ copies/L であった。全細菌群に対する活発に増殖している細菌群の割合は、St. 川久の表層で $11.5 \pm 16.7\%$ および底層で $4.5 \pm 2.7\%$ ならびに St. 島島の表層で $5.2 \pm 2.0\%$ および底層で $4.3 \pm 4.3\%$ であった。

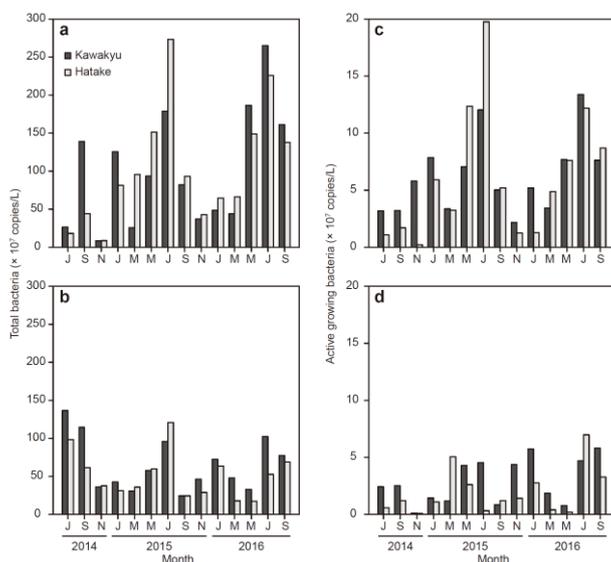


図 36 全細菌群 (a, b) と活発に増殖している細菌群 (c, d) の 16S rRNA 遺伝子コピー数
黒棒グラフが St. 川久、灰棒グラフが St. 島島、上段 (a, c) が表層、下段 (b, d) が底層

観測点間における違いはほとんど見られなかったが、表層と比較して底層のコピー数が低い傾向にあった。その傾向は全細菌群だけでなく活発に増殖している細菌群でも同じであった。この現象が何に起因するのかわからないが、興味深い知見である。活発に増殖

している細菌群が平均して 10%以下であった。既報研究においては、沿岸域においては培養 3 時間ではおよそ 15~30%が活発に増殖していることが報告されている。これは、本研究課題と同様に BrdU を用いているが、活発に増殖している細菌群を顕微鏡を用いて計数しているところに違いがある。細菌の 16S rRNA 遺伝子のコピー数は、細菌の種類によって 1~15 コピーの範囲で異なることが知られている。本研究課題における活発に増殖している細菌群の割合の低さは、細菌種の違いを反映しているのかもしれない。すなわち、活発に増殖している細菌群の多くは、16S rRNA 遺伝子コピー数が少ないということである。一般的に、16S rRNA 遺伝子が多いほどタンパク質合成などが活発に進むため、活発に増殖すると思われる。本研究課題で得られた知見は、とても興味深い。今後の課題として、活発に増殖している細菌群の 16S rRNA 遺伝子コピー数に注目した解析を行うと、海洋環境において活発に増殖している細菌群に関する新たな知見が得られるかもしれない。

全細菌群に対する全 *Roseobacter* clade associated (RCA) bacteria の 16S rRNA 遺伝子コピー数の割合は、St. 川久の表層で $3.4 \pm 7.1\%$ および底層で $1.9 \pm 4.1\%$ ならびに St. 島島の表層で $3.6 \pm 7.0\%$ および底層で $2.3 \pm 4.5\%$ であった (図 3-8)。一方、活発に増殖している細菌群に対する活発に増殖している RCA bacteria の 16S rRNA 遺伝子コピー数の割合は、St. 川久の表層で $4.8 \pm 11.1\%$ および底層で $4.0 \pm 7.5\%$ ならびに St. 島島の表層で $4.5 \pm 8.3\%$ および底層で $4.3 \pm 7.4\%$ であった。

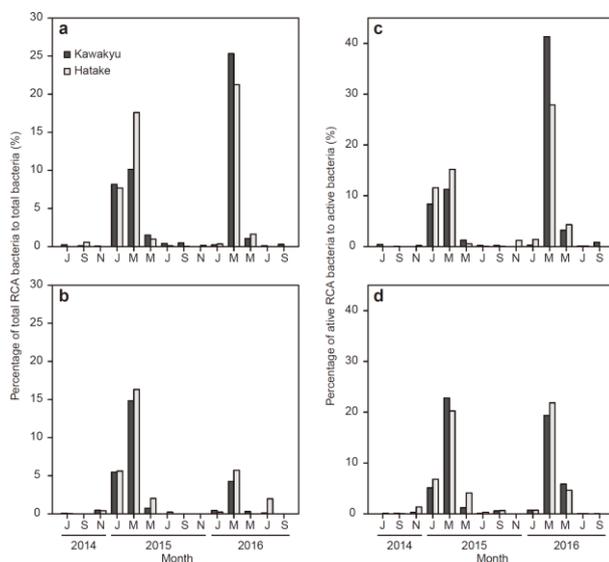


図 37 全細菌群に対する全 RCA bacteria の割合 (a, b) と活発に増殖している細菌群に対する活発に増殖している全 RCA bacteria の割合 (c, d) 黒棒グラフが St. 川久, 灰棒グラフが St. 島島, 上段 (a, c) が表層, 下段 (b, d) が底層

観測地点間における違いはほとんど見られなかったが、底層よりも表層の方がコピー数が高くなる傾向にあった。これは、光従属栄養細菌の特徴を反映しているのかもしれない。特に、活発に増殖している細菌群に対する活発に増殖している RCA bacteria の 16S rRNA 遺伝子コピー数の割合は、全体の細菌群に対するそれよりも高い割合を示している (最大 41.3%)。これは、活発に増殖している細菌群が果たす有機物循環に対する RCA bacteria の

貢献度の高さを示唆する。ただし、一年を通して RCA bacteria が活発に増殖しているわけではなく、きれいな季節変動性が見られた。すなわち、毎年1月～5月にかけて現存量および活性が高くなるということである。水温との相関を見てみたところ、非線形の相関が確認された（図38）。全 RCA bacteria および活発に増殖している RCA bacteria のいずれにおいても相関関係が見られた（それぞれ $R^2 = 0.511$ および $R^2 = 0.632$, MIC）。

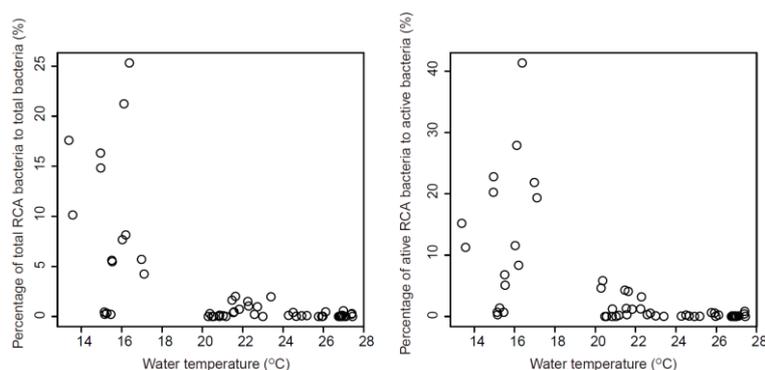


図38 RCA bacteria と水温の相関

RCA bacteria は 20°C 以下の低水温期において、活発に増殖し、かつ現存量が多くなることが示された。この時期に RCA bacteria が優占することを考えると、この細菌群の動態を把握することが低水温期における物質循環を理解することにつながると示唆される。すなわち、この RCA bacteria は低水温期における鍵細菌種の一つであると言える。一方で、既報研究において RCA bacteria も含まれる Rhodobacteraceae 科細菌の中には通年活発に増殖していたものもいた。今回対象として RCA bacteria にはこれらの細菌種が含まれていないことが考えられるため、他のプローブを設計するなどが課題として挙げられる。

(3)-3 成果の副次的効果、今後の計画等

本養殖場環境において、水質浄化や有機物循環にかかわる鍵細菌群のうち半分の動態は水温によって規定されていることが明らかとなった。また、それらの細菌群の群集構造には季節周期性があり、毎年のように同じような細菌が出現することも明らかにした。一方で、有機物との直接的な関連を示す細菌種は少なかった。これは、近年注目されている希少細菌種（現存量の少ないレアな細菌種）が貢献していることが考えられる。希少細菌種が有機物負荷という環境変化に機敏に応答している可能性がある。

海洋環境における物質循環は細菌群が駆動している。その細菌群の動態を解明することが、物質循環を理解することにもつながる。将来的には、特徴的な細菌種を対象とした養殖場環境における物質循環モデルの構築が期待される。ただし、細菌鍵種の動態の制限要因が不明な点も多く残されている。沿岸海水、河川水、汽水、黒潮由来の外洋水が複雑に関係してくる本養殖場環境における複雑な細菌群集構造の形成メカニズムおよびその生態系機能を明らかにすることが重要である。これからも、これらの点に着目しながら、継続的に調査を行い、有機物や栄養塩とともにデータを蓄積していくことが重要となる。

テーマ 2：環境低負荷システムの構築

研究課題：(4) 有効物質の探索と回収技術

研究機関・研究室名：農学研究科・水産学専攻・水産利用学研究室，水族環境学研究室

担当者職名・氏名：農学研究科・水産学専攻・教授 安藤正史，農学研究科・水産学専攻・
講師 永田恵里奈

研究協力者：塚正泰之，江口 充，伊藤智広，中瀬玄德，谷口亮人，岡田貴彦，藤田凌太，
佐藤修磨，岸本啓汰，伊藤尚弥，森内 新，山田真史，川口亮大，松岡真史，
若井 稜

魚類養殖場の海底には残餌や魚の排泄物が堆積する。それらは自然環境の浄化能力，すなわち水柱や底泥に存在する微生物，主に細菌，によりある程度は分解・無機化される。ところで，夏季の高水温時には海水の鉛直混合が十分に行われず，水塊が成層化し，底層水が停滞する。そこに有機物が大量に負荷されると，酸素の供給が不十分であるにもかかわらず底泥の微生物による分解・無機化の過程で酸素消費量が増えるため，底層では貧酸素状態が生じる。すると，底泥中の乳酸菌などの作用により乳酸・酢酸などの有機酸濃度が上がり始め，それらを電子供与体として嫌気性細菌である硫酸還元菌が有機物を分解する結果，有毒な硫化水素が発生し，そこに生物は住む事ができなくなる。持続的な養殖活動を目指す場合，この底質の劣化を改善・予防することは健全な養殖魚生産のためにも必要不可欠である。

そこで本研究では，有用微生物である麹菌を用い，硫化水素の底泥からの除去技術の開発をめざした。また，硫化水素の発生要因である硫酸還元細菌の増殖が乳酸濃度によって制御されている点に注目し，底泥中の乳酸菌数を硫化水素の発生予防診断の指標として有効か否かを検討するため，その基礎的知見を得ることも本研究の目的とした。

(4)-1 底泥と麹の混合による硫化物イオン量の変化：メチレンブルー法

(4)-1 目的

底泥を有用物質に変換することを念頭におき，底泥の成分を明らかにするとともに，有効物質への転換の一過程として，麹のもつ微生物活性による硫化水素の除去効果を検討した。

(4)-1 研究方法

底泥の成分分析

近畿大学農学部水産研究所大島実験場より提供されたヘドロを使用した。使用したヘドロは生餌で養殖されているクロマグロ養殖生簀直下のヘドロと，配合飼料で養殖されているマダイ養殖生簀直下のヘドロである。粗タンパク質はケルダール法，水分は加熱乾燥法，粗灰分は直接灰化法を用いた。

ヘドロはマグロとマダイ養殖生簀のものを用い、同時に入れる海水の代わりに 2% NaCl 水を用いた。麩はマルカワみその豆麩、井上麩店の米麩と麦麩、百川味噌の米麩、谷川醸造店の米麩、片山商店の米麩、大麦麩の 7 種類用いた。

麩と底泥の混合培養

麩とヘドロの混合培養における硫化物濃度の変化を 0~4 週間で測定した。麩とヘドロの比率を 1 : 101 : 1 の 2 パターンに分けてバイアル瓶に入れ、2% NaCl を麩の 10 倍量入れ、室温を 25℃ に保ち、暗所で 0~4 週間培養した。1 週間経過ごとにバイアル瓶を 2000 rpm × 20 分間遠心分離後、0.45 μm フィルターでろ過した。ろ液中の硫化物イオン濃度を定法にしたがいメチレンブルー法により測定した。

培養上清の元素分析

底泥と麩とを 2% NaCl 中で混合培養した後、遠心分離して得られた上清 5 μl を走査型電子顕微鏡 (SEM) 用試料台上に滴下し、さらに 1% 硫酸銅を 5 μl 加えて硫化物イオンを硫化銅として沈殿させた。試料台を 65℃ で 1 時間電気乾燥機に入れ乾燥させた後、SEM により元素分析を行った。

(4)-1 結果と考察

底泥の成分分析の結果、2 種類のヘドロはいずれも水分と灰分だけで 98% 以上を占め、有機物と思われる成分は 1% 弱にとどまった。灰分は大半が砂と思われるため、ヘドロそのものを肥料などの有用物質に転換させるには困難であり、それよりも砂そのものを清浄なものにすることが肝要であることが明らかとなった。

硫化物イオン濃度の変化においては、数値の上下が大きく安定した結果が得られなかったが、培養開始時 (0 週目) と終了時 (4 週目) で比較すると、開始時よりも硫化物イオン濃度が下がったものは、いずれの生け簀直下の底泥でも井上麩店と百川味噌の米麩 (混合比 1 : 1) であった。つまり、数ある麩の中でも特に米麩が比較的強い硫化物イオンの除去効果を有することが明らかとなった。

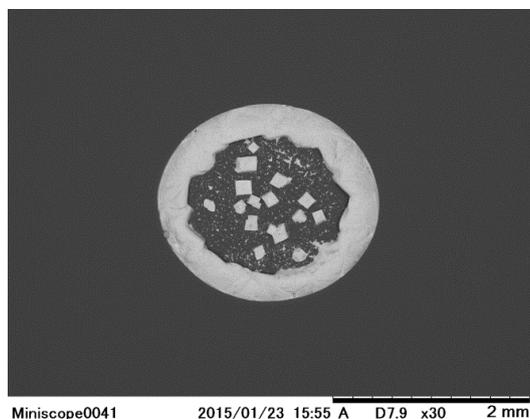


図 1 固形成分の SEM 像

SEMにより観察された培養上清固形成分を図1示す。2% NaClによる培養のため、観察される固形分は大部分がNaClであると思われた。次に、この試料表面全体に含まれる元素分析結果を図2に示す。図1からの予想通り、大量のNaとClが認められた。目標とする硫黄元素も認められた。硫化物イオンを沈殿させるために硫酸銅を使ったため、硫酸イオンに含まれる硫黄元素も含めて検出しており、これがすべて硫化物イオン由来であるとはいえないが、この方法により容易に水中の硫化物イオンが測定できることが明らかとなった。

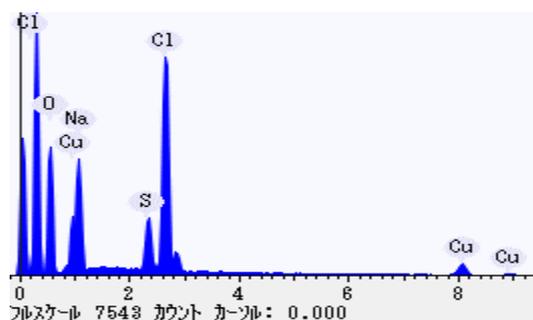


図2 元素分析結果の例

必要とするサンプル量が少ないこともあり、ここからは硫化物イオン濃度をこの方法により測定していくこととした。

(4)-2 麴の混合による硫化水素水中の硫化物イオン量の変化：SEMによる元素分析

(4)-2 目的

メチレンブルー法を用いた硫化水素の測定が非常に不安定なこと、およびSEMによる元素分析が簡便かつ安定していることから、SEMを用いての硫化水素除去効果の評価を行った。

(4)-2 研究方法

硫化水素水と麴の混合培養

底泥を用いると、水中の硫化水素濃度が徐々に低下していく現象が見られ、試験試料として不安定であることがこれまでに明らかとなっていた。そこで、安定した濃度の硫化水素水を得るため、人為的に作成した硫化水素水を実験に用いることとした。まず試験管に固形硫化水素を10gほど入れ、ガラス管をつけたゴム栓をする。さらに、必要量の蒸留水を三角フラスコにいれ、こちらもガラス管をつけたゴム栓をする。このときガラス管下口が蒸留水中に入るようにする。この二つのガラス管をゴム管でつないでから、試験管をガスバーナーで熱し、硫化水素を発生させ三角フラスコ内の蒸留水へ導入する。飽和の目安としては、どちらかのゴム栓が跳び抜けた時とした。このように作成した硫化水素水に米麴を加えて(1)と同様に培養した。

SEM による培養上清中の硫化物イオン量の測定

所定の培養期間経過後、バイアル瓶を 26□、3000 rpm・15 分間の条件で遠心分離し、麴や白濁を沈殿させ上澄みを 5 ml 採取し別のバイアル瓶に入れた。そこに 1%硝酸鉛 3 ml を加え硫化鉛を沈殿させた。(1) では硫酸銅を用いたため硫酸イオン由来の元素が共存し硫黄元素の由来が曖昧であった。そこで硫化鉛として沈殿させることでその不具合を解消した。硫化鉛を沈殿させたバイアル瓶を遠心分離し、上澄みを捨てた。硫化鉛のみとなったところに、蒸留水 5 ml を加え攪拌し再び遠心分離して上澄みを捨てた。この洗浄操作を行わないと過剰な硝酸鉛が硫化鉛を覆うため、硫黄元素の信号が検出できないことを予備実験において明らかにした。洗浄終了後、沈殿に蒸留水 2 ml を加えて攪拌して硫化鉛の懸濁液つくりを、濃度が偏らないようにバイアル瓶を振り混ぜながらマイクロシリンジで 2.5 μ l 採り、SEM 試料台のカーボンシート上に滴下した。これを乾燥させてから SEM で元素分析し、試料中の全元素量に対する硫黄元素の割合を測定した。観察倍率は 50 倍とし、試料全部が観察画面に入るような位置に調節した。

(4)-2 結果と考察

図 3 に 1 週間培養後の試験区バイアル瓶の外観を示す。右の対照区では硝酸鉛の添加により多くの硫化鉛が発生するため液体全体が黒く色づいているが、左側の米麴が共存する試験区では黒色ではなく白色の沈殿が生じている。またこの時点で硫化水素特有の腐卵臭はほとんど感じられず、逆に香ばしい匂いが感じられた。さらに培養期間が経過すると共に、上澄みの白濁も濃くなっていった。

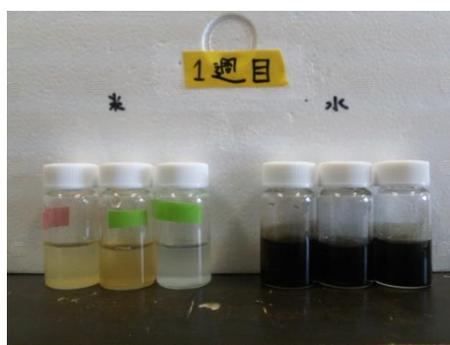


図 3 米麴による沈殿色の変化

図 4 に培養中の水中硫黄元素量の変化を示す。硫化水素水に米麴を加えた試験区では、培養 1 週間で硫黄元素が検出限界以下となった。つまりこのスケールであれば 1 週間以内に水中の硫化物イオンを除去できることが明らかとなった。

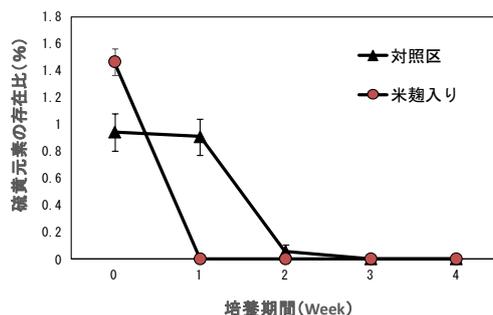


図4 米麩による硫化物イオンの減少（培養4週間）

一方、硫化水素水のみからなる対照区においても培養2週間で硫黄元素が大幅に減少し、3週間でやはり検出限界以下となった。この理由として、今回の実験系では密栓したバイアル瓶内の上部に10 ml 弱の空間が生じており（図3）、この空間に存在する酸素等により硫化物イオンが酸化されることで水中から失われたと考えられた。

この結果を受け、麩：水の比率を変えないようにしながらバイアル瓶をほぼ満たし、空間を少なくしたところ対照区における数値の減少はなくなった。よって、ここからは瓶内の空気を極力なくす条件下で実験を行った。

試験区の硫化物イオンが1週間以内に消失したので、同様の実験を毎日行ったところ、培養開始後4日目で対照区との間に有意差が生じた（図5）。この結果より、麩による硫化物イオンの除去速度はかなり遅いことが明らかとなった。この段階ではどのような機構で硫化物イオンが消失したのかは不明であるが、空気がほとんどなく酸素供与体がきわめて少ない環境であることを考慮すると、この機構は麩菌による取り込みか、麩表面への吸着が候補として挙げられる。いずれの場合も、麩菌が増殖することで取り込み量が増加、あるいは菌体の表面積が増加することにより硫化物イオン量を減少させたと考えられる。

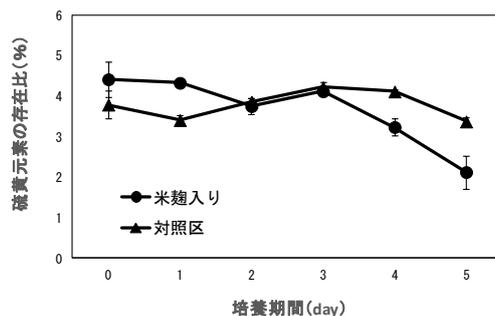


図5 米麩による硫化物イオンの減少（培養5日間）

以上の結果から、この実験系による硫化物イオン除去能評価のための培養期間は1週間とすることに決定した。

次に、米麩と麦麩の硫化物イオン除去能力を比較した（図6）。その結果、麦麩にも有意な硫化物イオンの除去能力が認められたが、それは米麩ほど強いものではなかった。

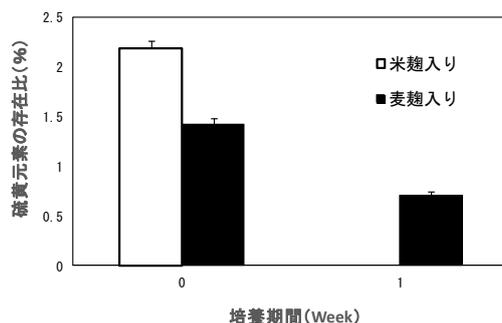


図6 米麴と麦麴による硫化物イオン除去能力の比較

そこで、麴の材料である米の特性による硫化物イオン除去の可能性を確かめるため、生米、炊飯米を用いて同様の試験を行った（図7）。その結果、生米と炊飯米には全く除去能力がないことが明らかとなった。米麴による硫化物イオンの除去能力は麦麴よりも優れることから、米自体の関与を完全には否定できないが、それはあくまでも麴菌との相乗効果によるものであると思われる。また、米麴と麦麴との間での菌種の違いも予想されるため、それぞれの菌を分離・培養し、菌体単独による硫化物イオンの除去能力の評価が今後の課題となった。この課題に明瞭な結果が得られれば、その菌体を用いたバイオフィルターなどの開発も可能になるとと思われる。

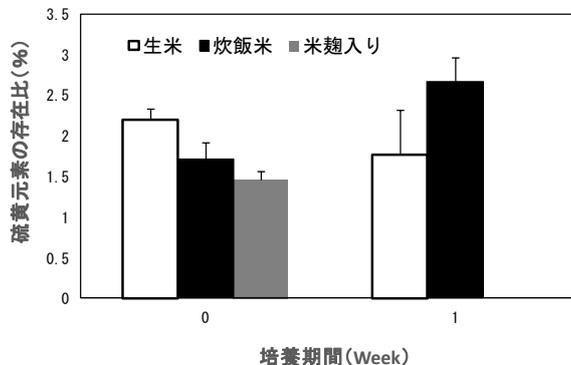


図7 米麴と米による硫化物イオン除去能力の比較

(4)-3 海水中での米麴による硫化物イオンの除去効果

(4)-3 目的

これまでの実験に用いた溶媒はすべて淡水を用いたが、その理由は実験系を可能なかぎりシンプルなものにするためであった。しかしながら、養殖場は海水面にも多くあるため、海底の硫化水素の除去能力についても検討する必要がある。そこで、これまでに実施した実験の淡水をすべて人工海水に置き換えて実施した。

(4)-3 研究方法

人工海水中での硫化物イオンの除去効果

これまでの実験に用いた溶媒はすべて淡水を用いたが、その理由は実験系を可能なかぎりシンプルなものにするためであった。しかしながら、養殖場は海水面にも多くあるため、海底の硫化水素の除去能力についても検討する必要がある。そこで、これまでに実施した実験の淡水をすべて人工海水に置き換えて実施した。人工海水は市販の粉末に指定された量の蒸留水を加えて溶解し作成した。

(4)-3 結果と考察

米麴による人工海水中の硫化物イオン除去の結果を図8に示した。淡水の場合と異なり、培養開始直後から効果が認められた。開始直後とは、具体的には操作内容を考慮すると麴と硫化物イオンとが接触した時間は約1時間となる。つまり、淡水の場合（図4）に比べてきわめて短時間のうちに硫化物イオンを吸着したことになる、淡水の場合とは全く異なる除去システムが作動したことを示した。

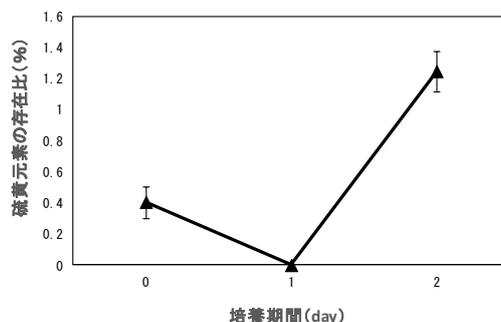


図8 米麴による人工海水中の硫化物イオンの除去効果

ところが、この状態は1日しか持続せず、培養2日目には水中硫黄濃度が急に上昇した。これは、一旦麴の表面に吸着した硫化物イオンが、何らかの理由で麴表面から遊離したことを示している。

これを確かめるため麴表面における硫黄元素濃度を測定したところ図9の結果となった。予想通り、水中硫黄元素と相反する結果となり、硫化物イオンが時間の経過とともに麴の表面から遊離していることが明確となった。

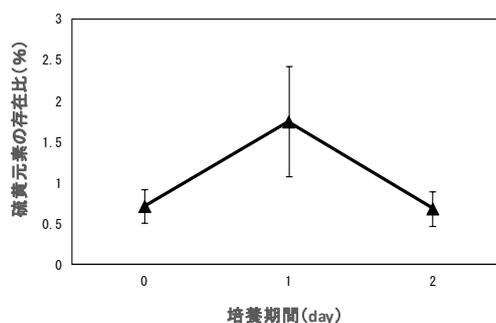


図9 米麴表面の硫黄元素濃度の変化

バクテリアの表面は一般には負に帯電しているとされるので、陰イオンである硫化物イオンが吸着するとは考えにくい。環境 pH が酸性に傾くと細胞表面のカルボキシ基の解離が生じ、陽イオン吸着サイトとして機能する可能性も示されているが、今回の実験中の pH は弱アルカリ性を示しており、上記の仮説は適用しにくい。よって、この吸着反応は電気的なものではなく、別の機構によるものと思われる。

淡水環境では吸着効果が持続するのに対して海水環境では効果を短時間しか維持できない理由については、麹菌の活性の低下が考えられるため、今後はミトコンドリア活性等を用いて検証する必要がある。

次に、実験系をスケールアップして必要最小限の麹量の決定を試みた。上記までは試験水 20 mL に対して麹 2 g を用いたので、その比率をベースとして、試験水 1 L に対して麹の量を 2 g から 50 g まで変化させて硫化物イオン量の変化を調べた（図 10）。その結果、麹 50 g 区は比率でいえば小スケールの実験よりも麹量が少ないが、培養 2 日目においても効果を維持することができた。麹 25 g 区では 2 日目に若干硫黄元素を遊離させたため、効果を維持させる際には最低でも麹 50 g 区ほどの麹量は必要と思われた。

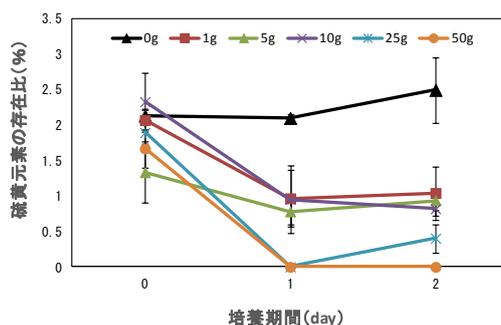


図 10 硫化物イオン除去に必要な麹量

ところで、自然環境の場合、汽水域が存在するほか、河川水や雨水の流入により塩分が海水と異なる場面がしばしば見られる。ここまでの結果より、淡水と海水とでは除去効果の動態に大きな違いが見られたため、塩分による影響が大きい効果であると思われる。

そこで最後に、人工海水を蒸留水で希釈し、塩分の違いによる除去効果への影響を検討した。その結果、0~20%海水では淡水の場合と同様の挙動を示した（図 11）。一方、50%海水では除去効果が 1 日しか維持できず、培養 2 日目にはほぼ除去効果が失われた。

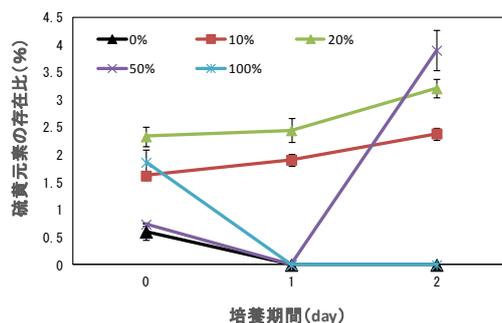


図 11 米麩の硫化物イオン除去効果における水中塩分の影響

(4)-3 成果の副次的効果，今後の計画等

本法を用いて現場海底の硫化水素の除去を試みる場合，環境条件を考慮しながら様々な工夫を取り入れる必要がある。麩を細かい網目のネット等に入れ，それを海底に沈めるのはいずれも同様であるが，海水環境であれば翌日を目途に引き上げる必要がある。一方，淡水環境であれば 1 週間ほど沈めておいてからその後は都合のよい時に引き上げればよいことになる。また，塩分変動の大きい場所であれば塩分を考慮に入れながら引き上げるタイミングを計る必要がある。さらに，麩自体が有機物の塊であるため，処理の期間を見誤ると海底の汚染を拡大することにもなりかねない。

以上のように，実用化をめざすには注意点多く，条件検討がまだまだ必要ではある。しかし，この方法は麩の再利用がおそらく可能であるため，省資源の観点からも将来の発展が期待される。

(4)-4 養殖に係る有用な発酵微生物の探索

(4)-4 目的

従来は，魚類養殖場の有機汚濁の程度を評価するために，底泥に蓄積した硫化物量や硫酸還元細菌数が用いられていた。しかし，これらの指標は，すでに養殖場の環境が悪化してしまった『結果』を調べているにすぎない。悪化を予防するためには，悪化が起きる予兆を知る指標の方が役にたつ。底泥の硫酸塩還元活性は硫酸還元細菌の現存量ではなく，有機酸（主に乳酸）濃度に依存し，有機酸量が硫化水素の生成に強く関わっているという報告がある。従って，底泥で乳酸の蓄積に貢献していると考えられる生理活性の高い乳酸菌数を指標とすれば悪化の進行を事前に察知できるのではないかと考えた。そこで，本研究では，養殖場底泥から乳酸菌を分離・培養し，分離した乳酸菌株の種を同定した。そして，「魚類養殖場の老化を早期発見する指標細菌」になりそうな乳酸菌がいるかどうかを調べた。

(4)-4 研究方法

a. 試料採取

和歌山県田辺湾に設置された本学水産研究所が所有する魚類養殖生簀下の海底泥を採取し、乳酸菌の分離・培養を試みた。本研究を始めるにあたり、海底にどのくらいの乳酸菌がいるかわからなかったため、第1次調査として、養殖域（養殖を年間を通して行っている海域）と非養殖域（筏のみ設置してある）を調査地点と定め、2015年7月、9月、11月と、2016年の1月、3月、5月に海底の泥を採取した（図12）。KK式柱状採泥器コアサンプラーを用いて海底の泥を採取し、実験室に持ち帰った後、0～1 cmの表層の泥を葉サジで採取した。第2次調査として、2016年6月から9月にかけては、養殖域のみを集中的に調査し、およそ2週間に1回泥を採取して、乳酸菌の分離を試みた。この調査では、養殖域の中でも生簀に養殖魚が入っている地点（養殖生簀1と2）と、そこから数10 mしか離れていない養殖魚が入っていない地点（空生簀）でサンプリングを実施した（図13）。海底の泥は、エックマン・バージ型採泥器にて採取し、船上で葉サジを用いて、表層0～1 cm層の泥を採取した。

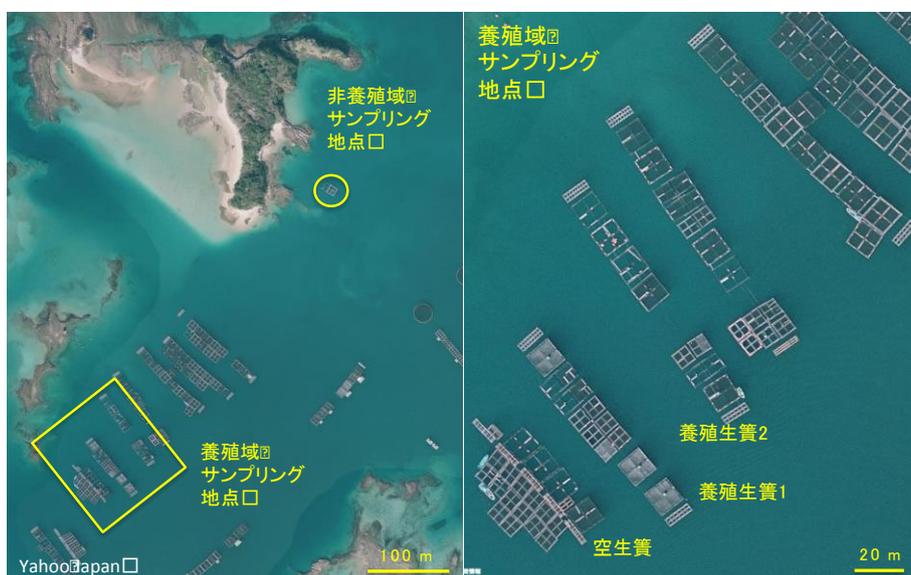


図12 第1次調査地点

図13 第2次調査地点

b. 乳酸菌の分離

採取した泥 0.5 g をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）4.5 mL に入れ、激しく攪拌して細菌を剥離させた。この細菌懸濁液を 1/10 ずつ PBS で段階的に希釈し、各希釈段階の細菌懸濁液 0.1 mL を、de Man, Rogosa, Sharpe（炭酸カルシウム 1% 添加）寒天培地（MRSA 培地）に塗抹した。20℃と 30℃の嫌気状態で 1 週間培養し、MRSA 培地上の白色で透明帯を持つコロニーを乳酸菌と判断した。乳酸菌コロニーを釣菌し、新しい MRSA 培地上に画線する作業を 3 回繰り返して、乳酸菌を純粋分離した。海底泥の乳酸菌の分離効率を上げるため、泥試料に栄養分（MRS 培地）を添加して室温（25℃）で一晩培養する増菌培養も行った。増菌培養を行った泥試料を PBS で段階希釈し、MRSA 培地に塗抹した。20℃と 30℃の嫌気状態で 1 週間培養し、MRSA 培地上の白色で透明帯を持つコロニーを乳酸菌と判断した。乳酸菌コロニーを釣菌し、新しい MRSA 培地上に画線して純粋分離した。

c. 細菌種の同定

マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計（MALDI-TOF MS）を用いた細菌種同定並びに、16S rRNA 遺伝子の塩基配列相同性解析による細菌種同定を行った。

c-1. MALDI-TOF MS

分離した乳酸菌コロニーをエタノール・ギ酸抽出法による前処理を行って菌体内タンパク質を抽出してから MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics 社) にてマスペクトルパターンを取得した。データベースに登録されているマスペクトルパターンと照合して分離株の属と種の同定を試みた。

c-2. 16S rRNA 遺伝子の塩基配列相同性解析

分離した乳酸菌を MRS 液体培地で培養し、得られた菌体ペレットから Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) を用いて DNA を抽出した。真正細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的としたプライマー (28F と 1500R) を用いて、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。増幅産物を精製し、20F, 648R そして 1500R プライマーを用いて、シーケンス反応を行った。Applied Biosystems 3130 ジェネティックアナライザー (life technologies) にて塩基配列を解読した。DNA データベース (BLAST) を用いて相同性の高い (99%以上) 細菌種の検索を行った。

(4)-4 結果と考察

a. 養殖域と非養殖域の底泥からの乳酸菌の分離（第1次調査）

通常培養の場合、乳酸菌を分離できたのは夏季だけであり、2016年5月は養殖域のみで、2015年7月は養殖域と非養殖域で分離することができた（図14）。20℃よりも30℃のほうが分離される乳酸菌数が多かった。2015年9月と11月、2016年1月と3月は乳酸菌を通常培養で分離することはできなかった。増菌培養すると、2016年1月と3月に養殖域の底泥から乳酸菌を分離することができたが、非養殖域では増菌培養しても乳酸菌を分離することができなかった（図15）。これらのことから、寒天培地で培養することができる生理活性の高い乳酸菌は、養殖を行っていない海域よりも養殖を行っている海域に多く存在しているということがわかった。また、春季、秋季や冬季には、海底泥の乳酸菌数が少なくなることがわかった。夏季の高水温時には海水が成層化し、底層水の貧酸素化が進行する。乳酸菌は通性嫌気性あるいは耐気性嫌気性の細菌なので、酸素が少ない環境では乳酸発酵によりエネルギーを獲得する。乳酸菌数の増減が、水温によるものなのか、それとも酸素濃度によるものなのか、今後調べる必要があった。

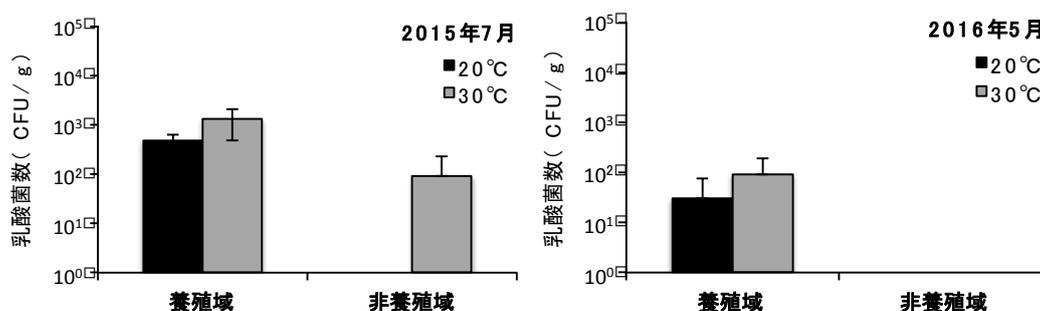


図14 魚類養殖域と非養殖域の底泥から通常培養により分離した乳酸菌数

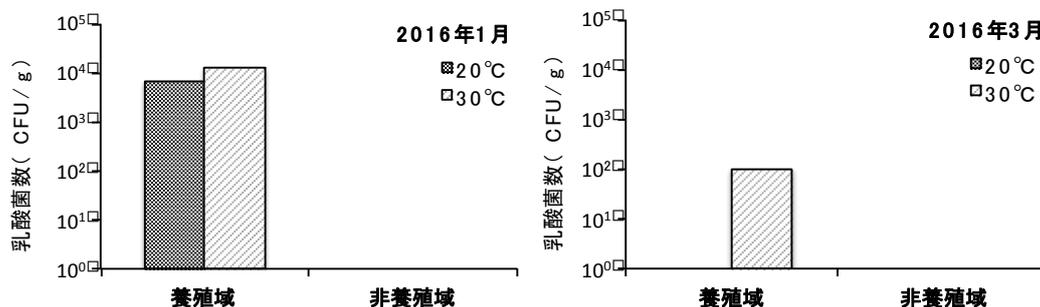


図 15 魚類養殖域と非養殖域の底泥から増菌培養により分離した乳酸菌数

b. 養殖域底泥からの乳酸菌の分離（第2次調査）

第1次調査を受けて、第2次調査では、養殖魚の入った生簀の下と、隣接する空生簀の下の乳酸菌を調べた。また水温と溶存酸素との関係も調べた。養殖生簀（1と2）と空生簀の下の海底に存在している乳酸菌数には違いが見られた。2016年6月から9月にかけて実施した調査によると、養殖生簀の下の泥の方が乳酸菌数が多いことがわかった（図16と17）。

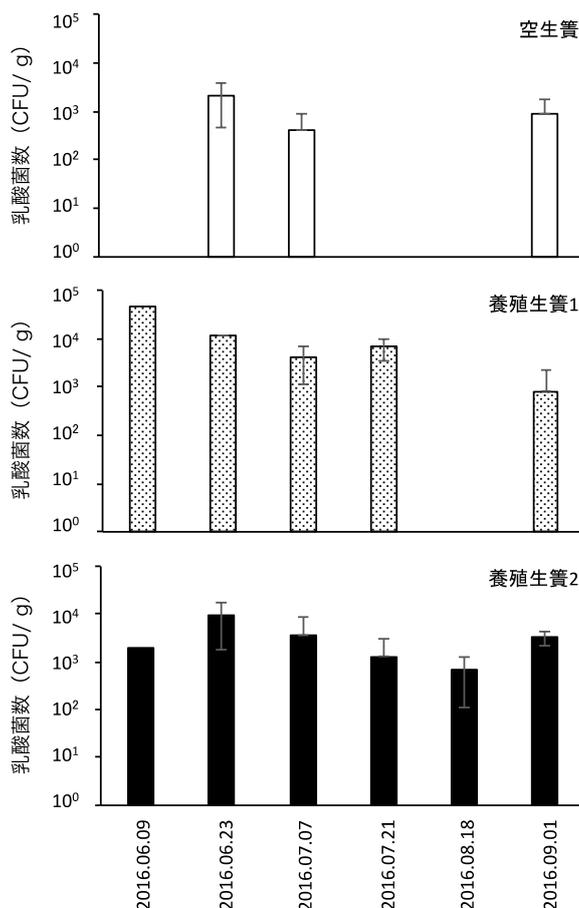


図 16 魚類養殖域において養殖生産量の違う生簀の下の底泥から通常培養（20°C）により分離した乳酸菌数

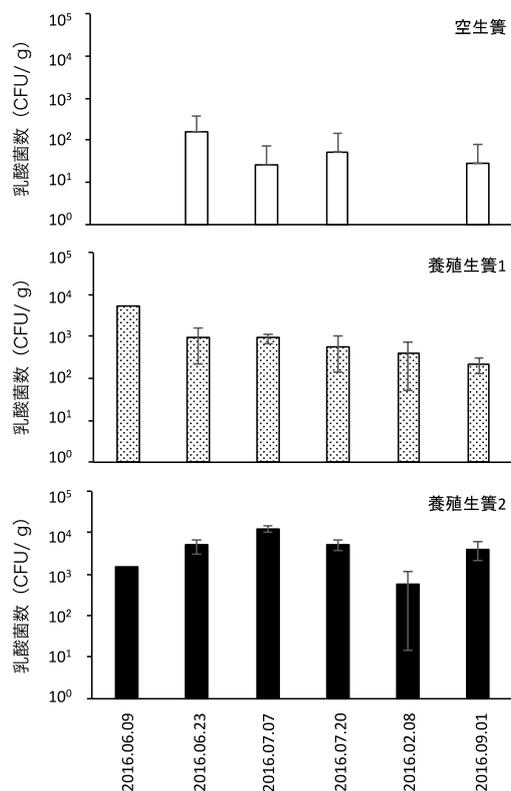


図 17 魚類養殖域において養殖生産量の違う生簀の下の底泥から通常培養（30℃）により分離した乳酸菌数

養殖生簀の下には、6月から9月にかけて、 $10^3 \sim 10^4$ CFU/g の乳酸菌が存在していた。生簀の中に魚がいるかどうかで底泥の乳酸菌の数に影響を与えていることがわかった。20℃と30℃の異なる培養温度によって乳酸菌数に大きな違いがでることはなかった。

6月から9月にかけて、空生簀、養殖生簀1と養殖生簀2の下の海底は、持続的養殖生産確保法で定められた溶存酸素濃度 5.7 mg/L を下回る状態になっていた（図 18a）。生簀の底（7 m 付近）の溶存酸素濃度が 5.7 mg/L をやや下回っていたのは、6月23日の養殖生簀1と9月1日の養殖生簀1と2であった（データは示さない）。海底水温は、6月の約 23℃から徐々に上昇し、9月には約 28℃になっていた（図 18b）。水温や溶存酸素濃度は、生簀の中に魚がいるかどうかに関わらず、3地点とも同様の傾向を示していた。乳酸菌は、生簀の中に魚がいるほうが多く分離されていたので、水温や溶存酸素よりも、養殖の影響の方が乳酸菌数の増減に多く貢献していると考えられる。今後は、有機物量や硫化物量などの環境データと照らし合わせていく必要がある。

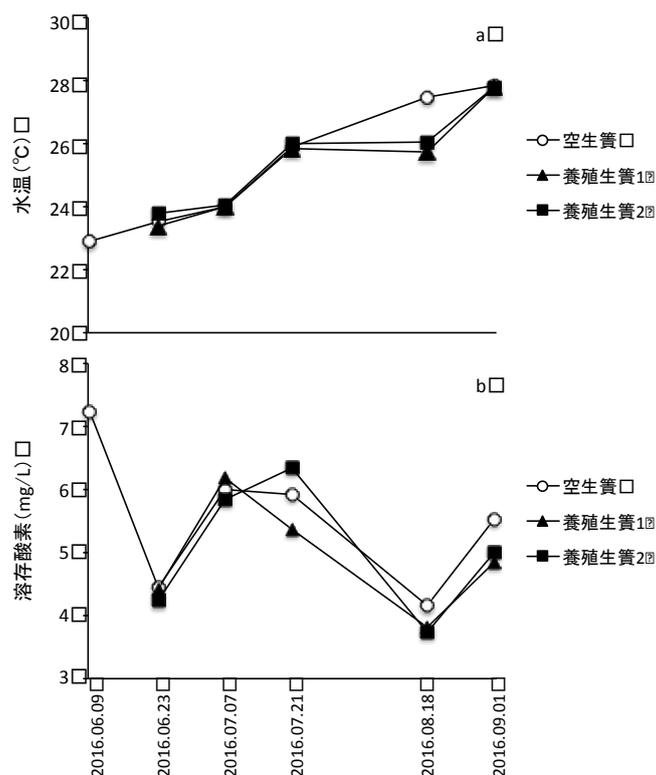


図 18 魚類養殖域において養殖生産量の違う生簀下底層の水温 (a) と溶存酸素 (b)

c. 乳酸菌分離株の同定

分離した乳酸菌は、2015年に18株で、2016年に283株であった。そのうち、2016年に分離した乳酸菌株91株を同定した(表1)。同定できた細菌種は、*Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus garvieae*, *Lactobacillus paracasei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus phoeniculicola*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus coagulans* の計14種であった。これらのうち培養温度20℃のみで分離されたのは *Ln. mesenteroides* と *Lb. garvieae* であり、培養温度30℃のみで分離されたのは *Lb. paracasei*, *Lb. farciminis*, *E. mundtii*, *B. coagulans* であった。空生簀の下からのみ分離された乳酸菌は *E. mundtii* であった。*Lc. lactis* は空生簀と養殖生簀の両方から分離されたが、6月以外の季節にはまったく分離されなかった。*P. pentosaceus* は5月から9月に、*E. faecalis* は6月から9月に高頻度で分離され、両細菌種とも空生簀の下よりも養殖生簀の下からよく分離された。*P. pentosaceus* と *E. faecalis* は、20℃と30℃と培養温度が異なっても寒天培地にコロニーを形成した。「養殖場の老化を早期発見する指標細菌」の候補として、この2菌種が有望ではないかと考えられる。

環境低負荷システムの構築
有効物質の探索と回収技術（安藤・永田）

表1 魚類養殖場の底泥から分離された乳酸菌種と分離株数

| 地点 | 年月日 | <i>Ln. mesenteroides</i> | <i>Lc. lactis</i> | <i>Lb. garvieae</i> | <i>Lb. paracasei</i> | <i>Lb. farciminis</i> | <i>Lb. plantarum</i> | <i>Lb. paraplantarum</i> | <i>P. pentosaceus</i> | <i>E. faecalis</i> | <i>E. phoenicicola</i> | <i>E. casseliflavus</i> | <i>E. mundtii</i> | <i>E. faecium</i> | <i>B. coagulans</i> |
|------------|------------|--------------------------|-------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------|------------------------|-------------------------|-------------------|-------------------|---------------------|
| 空生簀 | 2016.06.09 | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| | 2016.06.23 | | | | | | | | | | | | | | |
| | 2016.07.07 | | | | | | | | | | | | | | |
| | 2016.07.21 | | | | | | | | | | | | | | |
| | 2016.08.18 | | | | | | | | | | | | | | |
| | 2016.09.01 | | | | | | | | | 1 | | | | | |
| 20°C 養殖生簀1 | 2016.05.13 | 6 | 1 | | | | | | 2 | | | | | | |
| | 2016.06.09 | | 6 | | | | | | | 2 | 1 | | | | |
| | 2016.06.23 | | | | | | | 1 | 1 | 1 | | | | | |
| | 2016.07.07 | | | | | | 1 | | | | | | | 1 | |
| | 2016.07.21 | | | | | | | | | | | | | | |
| | 2016.08.18 | | | | | | | | | | | | | | |
| 2016.09.01 | | | 1 | | | | | | 1 | | | | | | |
| 養殖生簀2 | 2016.06.09 | | 1 | | | | | | 2 | | | | | | |
| | 2016.06.23 | | | | | | | | | 1 | | | | | |
| | 2016.07.07 | | | | | | | 1 | 1 | | | | | | |
| | 2016.07.21 | | | | | | | | | | | | | | |
| | 2016.08.18 | | | | | | | | | | | | | | |
| | 2016.09.01 | | | | | | | | 1 | | | 1 | | | |
| 空生簀 | 2016.06.09 | | | | | | | | | | | | | | |
| | 2016.06.23 | | | | | | | | 1 | | | | | | |
| | 2016.07.07 | | | | | | | | | | | | 1 | 1 | |
| | 2016.07.21 | | | | | | | | | | | | | | |
| | 2016.08.18 | | | | | | | | | | | | | | |
| | 2016.09.01 | | | | | | | | | | | | | | |
| 30°C 養殖生簀1 | 2016.05.13 | | 1 | | | | | | 10 | | | | | | |
| | 2016.06.09 | | 5 | | | | | | | 6 | 1 | | | | 1 |
| | 2016.06.23 | | | | 1 | | | | | | | | | | |
| | 2016.07.07 | | | | | | 3 | | 1 | 1 | | | | | |
| | 2016.07.21 | | | | | | | | | | | | | | |
| | 2016.08.18 | | | | | | | | 1 | | | | | | |
| 2016.09.01 | | | | | | 1 | | | 1 | | | | | | |
| 養殖生簀2 | 2016.06.09 | | 2 | | | 1 | | | 1 | 2 | | 1 | | | |
| | 2016.06.23 | | | | | | | | | 1 | | | | | |
| | 2016.07.07 | | | | | | 7 | 1 | 1 | | | | | | |
| | 2016.07.21 | | | | | | | | | | | | | | |
| | 2016.08.18 | | | | | | | | 1 | | | | | | |
| | 2016.09.01 | | | | | | | | | | 1 | | | 1 | |

Ln. = *Leuconostoc*; *Lc.* = *Lactococcus*; *Lb.* = *Lactobacillus*; *P.* = *Pediococcus*; *E.* = *Enterococcus*; *B.* = *Bacillus*

(4)-4 成果の副次的効果，今後の計画等

乳酸菌は，養殖をおこなっている海域に特徴的な細菌であることがあきらかになったことから，養殖場の有機汚濁の兆候を早期に把握するための手法として乳酸菌を活用できると考えられる。今後は，本研究で存在を確認した乳酸菌 2 種の増減を迅速・簡便に検出する DNA モニタリング手法を開発し，実際の養殖場での分布調査を実施する。

魚類の完全養殖の高度化
研究成果の公表

1. 雑誌・論文発表

1. Biswas A., Araki H., Sakata Y., Nakamori T., Kato K. and Takii K. Fish meal replacement by soy protein from soymilk in the diets of red sea bream (*Pagrus major*). *Aquacult. Nutr.*, (in press, 2017).
2. Koh I. C. C., Hamada D. Tsuji Y. Okuda D. Nomura K. Tanaka H. and Ohta H. Sperm cryopreservation of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, (in press, 2017).
3. Yoshikawa T. Kanemata K. Nakase G. and Eguchi M. Microbial decomposition process of organic matter in sinking particles, resuspendable particles, and bottom sediments at a coastal fish farming area. *Fish. Sci.*, (in press, 2017).
4. Kurata M. Tamura Y. Honryo T. Ishibashi Y. and Sawada Y. Effects of photoperiod and night-time aeration rate on swim bladder inflation and survival in Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis* (Temminck & Schlegel), larvae. *Aquacult. Res.*, (in press, 2017).
5. 升間主計 近畿大学水産研究所の完全養殖魚 主要9魚種の生産とブランド展開の可能性, 養殖ビジネス 54 (1) : 3-7 (2017).
6. 村田 修・板倉壮太・山本真司・服部亘宏・倉田道雄・太田博巳・升間主計. クエ *Epinephelus bruneus* × タマカイ *E. lanceolatus* の種間交雑と交雑仔稚魚の成長, 水産増殖, 65, 93-95 (2017).
7. 谷口亮人. クロマグロ養殖場水域の物質循環における細菌鍵種 クロマグロ養殖とサンゴと細菌, アグリバイオ, 1, 83-86 (2017).
8. Agawa Y. Tani K. Yamamoto S. Hirano C. and Shirakashi S. Development of a quantitative polymerase chain reaction assay for the detection of skin fluke *Neobenedeniagirellae* larvae from environmental water. *Fish. Sci.*, 82, 827-833. (2016).
9. Agawa Y. Kaga T. Katayama S. Okada T. and Sawada Y. Identification of growth-related nucleotide polymorphism in cultured Pacific Bluefin tuna, *Thunnus orientalis*. *Aquacult. Res.*, online published, DOI: 10.1111/are.13158 (2016).
10. Biswas A. Nakajima M. Takao T. Takaoka O. and Takii K. 2016. Determination of suitable protein and lipid levels in diets for Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis* at grow-out stage. *Aquacult. Sci.*, 64, 281-288 (2016)
11. Biswas A. and Takii K. Effects of light intensity on the growth performance and stress response in striped knifejaw, *Oplegnathus fasciatus*. *J. World Aquacult. Soc.*, 47, 806-811 (2016).
12. Biswas A. and Takii K. Optimum stocking density with the provision of self-feeder for striped knifejaw, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel, 1844). *J. World Aquacult. Soc.* DOI: 10.1111/jwas.12354 (2016).

13. Biswas A., Araki H. Sakata T. Nakamori T. Kato K. and Takii K. Fish meal replacement by soy protein from soymilk in the diets of red sea bream. *Aquacult. Nutr.* DOI: 10.1111/anu.12513 (2016)
14. Hamasaki K. Taniguchi A. Tada Y. Kaneko R. and Miki A. Active populations of rare microbes in oceanic environments as revealed by bromodeoxyuridine incorporation and 454 tag sequencing. *Gene* 576, 650-656 (2016).
15. Katagiri R., Sasaki T., Diaz A., Ando M., Margulies D., Scholey V. P. and Sawada Y. Effect of taurine enrichment in rotifer (*Brachionus* sp.) on growth of larvae of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* (Temminck & Schlegel) and yellowfin tuna *T. albacares* (Temminck & Schlegel). *Aquacult. Res.*, DOI:10.1111/are.13134 (2016).
16. 升間主計・村田 修・那須敏朗. 交雑種ブリヒラの養殖対象種としての可能性, 月刊ビジネス, 53(7), 19-21 (2016).
17. Matsumoto T. and Ishibashi Y. Sequence analysis and expression patterns of opsin genes in the longtooth grouper *Epinephelus bruneus*. *Fish. Sci.*, 82, 17-27 (2016).
18. Ogawa K. Shirakashi S. Tani K. Shin S.P. Ishimaru K. Honryo T. Sugihara Y. and Uchida H. Developmental stages of fish blood flukes, *Cardicola forsteri* and *Cardicola opisthorchis* (Trematoda: Aporocotylidae), in their polychaete intermediate hosts collected at Pacific bluefin tuna culture sites in Japan. *Parasitol. Int.*, 66, 972-977 (2016).
19. Ohnishi T. Biswas A. Kaminaka K. Nakao T. Nakajima M. Sakakibara N. and Takii K. Energy partitioning in cultured juvenile Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis* (Temminck & Schlegel, 1844). *Aquacult. Res.*, 47, 2040-2049 (2016).
20. Ohnishi T. Biswas A. Kaminaka K. Murata O. and Takii K. Energy partitioning in cultured juvenile chub mackerel (*Scomber japonicas*) fed with diet composed of enzyme treated fish meal. *Fish. Sci.*, 82, 473-480 (2016).
21. Pennacchi Y. Shirakashi S. Nowak B.F. and Bridle A.R. Immune reactivity in early life stages of sea-cage cultured Pacific bluefin tuna naturally infected with blood flukes from genus *Cardicola* (Trematoda: Aporocotylidae): Immune response in Pacific bluefin tuna infected by *Cardicola* spp. *Fish Shell. Immunol.*, 58, 490-499 (2016).
22. 澤田 好史. 海の生物の雌雄を決定する上での熱・温度の影響 Netsu Sokutei (熱測定) 43 (3), 113-117 (2016).
23. 澤田好史. パナマで人工ふ化期キハダ稚魚・幼魚の海面生簀での飼育に成功 クローズアップ クロマグロ養殖 資源管理と産地の戦略 月刊養殖ビジネス, 2月号, 33-36 (2016).
24. 澤田好史. クロマグロ完全養殖技術の開発 特集: 調査研究が拓くクロマグロ安定供給の未来 JATAFF ジャーナル, 4 (10), 1-6 (2016).
25. Shin S.P. Shirakashi S. Hamano S. Kato K. Lasso L.T. and Yokoyama H. Phylogenetic study of the genus *Kudoa* (Myxozoa: Multivalvulida) with a description of *Kudoa rayformis* sp. nov from the trunk muscle of Pacific sierra

- Scomberomorus sierra*, Mol. Phyl. Evol., 98, 337-345 (2016).
26. Shin S.P. and Shirakashi S. Investigation of *Kudoa yasunagai* (Hsieh & Chen, 1984) infection kinetics in *Seriola lalandi* (Valenciennes, 1833) by quantitative PCR. J. Fish Dis., 40, 287-291 (2016).
 27. Shin S.P. Ishitani H. and Shirakashi S. Development of a multiplex PCR to detect *Kudoa* spp. and to distinguish *Kudoa septempunctata* in olive flounder *Paralichthys olivaceus*, Aquaculture, 464, 37-41 (2016).
 28. Shin S.P. Nishimura T. Ogawa K. and Shirakashi S. Determination of effective dose of ultraviolet irradiation to influent water for prevention of *Kudoa yasunagai* infection. Fish Pathol., 51, 128-131 (2016).
 29. 白樫正・小川和夫. 海産養殖魚の住血吸虫症 魚病研究, 51, 92-98 (2016).
 30. 白樫正・小川和夫. 魚類住血吸虫症の現状と生態的防除の可能性 アクアネット, 19 (6), 44-49 (2016).
 31. Shirakashi, S. Tani K. Ishimaru K. Shin S.P. Honryo T. Uchida H. and Ogawa K. Discovery of intermediate hosts for two species of blood flukes *Cardicola orientalis* and *Cardicola forsteri* (Trematoda: Aporocotylidae) infecting Pacific bluefin tuna in Japan. Parasitol. Int., 65, 128-136 (2016).
 32. Taniguchi A., Aoki R. and Eguchi M. Microbial communities in various waters used for fish larval rearing. Aquacult. Res., 47, 370-378 (2016).
 33. Agawa Y. Iwaki M. Komiya T. Honryo T. Tamura K. Okada T. Yagishita N. Kobayashi T. and Sawada Y. Identification of male sex-linked DNA sequence of the cultured Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. Fish. Sci., 81, 113-121 (2015).
 34. Biswas A., Takaoka O., Kumai H. and Takii K. Combined effect of photoperiod and self-feeder on the growth performance of striped knifejaw, *Oplegnathus fasciatus*. Aquaculture, 452, 183-187 (2015).
 35. 平野千早・石丸克也・白樫正. ハダムシ *Neobenedenia girellae* の産卵とふ化の日周リズム 魚病研究, 50, 23-28 (2015).
 36. 石橋泰典. 海産魚の種苗生産における人工海水の利用と海水に含まれる各種元素の要求性. (特集 水産増養殖における人工海水の利用) 日本海水学会誌, 69 (4), 255-261 (2015).
 37. 家戸敬太郎. 第2章 海面養殖 マダイ. 養殖ビジネス臨時増刊号, よくわかる!日本の養殖業, 52 (4), 42-46 (2015).
 38. Kim Y.S. Biswas A. Ji S.C. Murata O. and Takii K. Phytase in soybean meal diet improves phosphorus availability of hybrid, female red sea bream *Pagrus major* x male black sea bream *Acanthopagrus schlegelii*. Aquacult. Sci., 63, 159-167 (2015).
 39. Kim Y.-S. Delgado D.I. Cano I.A. and Sawada Y. Effect of temperature and salinity on hatching and larval survival of yellowfin tuna *Thunnus albacares*. Fish. Sci., 81, 891-897 (2015).
 40. Kobayashi T. Honryo T. Agawa Y. Sawada Y. Tapia I. Macias K. Cano A. Scholey V. Margulies D. and Yagishita N. Gonadogenesis and slow proliferation of germ cells

- in juveniles of the cultivated yellowfin tuna *Thunnus albacares*. *Reprod. Biol.* 15, 106-112 (2015).
41. 升間主計. 新たな増養殖種の開発と可能性 世界で増産が進む交雑種 日本の研究動向と消費喚起の方法 養殖ビジネス, 52(7), 3-6 (2015).
 42. 升間主計. 将来のクロマグロ養殖産業を支える完全養殖技術 精密工学会誌 81(9), 828-831 (2015).
 43. 升間主計. クロマグロ～完全養殖の事業化が進む～ 養殖ビジネス 52(4), 47-51 (2015).
 44. Matsumoto T. Agawa Y. Okada T. Sawada Y. and Ishibashi Y. Opsin gene analysis in the cultured kawakawa *Euthynnus affinis*. *Aquacult. Sci.*, 63(2), 179-189 (2015).
 45. Matsumoto T. and Ishibashi Y. Electroretinographic evaluation and SWS1 opsin gene expression in vision of juvenile longtooth grouper *Epinephelus bruneus* (Bloch, 1793). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 48, 381-395 (2015).
 46. Nakase G. and Eguchi M. Influence of seasonal solar ultraviolet radiation on microbial mineralization activity in tidal flats in the Osaka Bay, Japan. *Fish. Sci.* 81, 1099-1104 (2015).
 47. Ohga H. Adachi H. Matsumori K. Kodama R. Nyuji M. Selvaraj S. Kato K. Yamamoto S. Yamaguchi A. and Matsuyama M. mRNA levels of kisspeptins, kisspeptin receptors, and GnRH1 in the brain of chub mackerel during puberty. *Comp. Biochem. Physiol., Part A*, 179, 104-112 (2015).
 48. 白樫正. ブリ類のべこ病(特集 魚介類の新興性・再興性疾病 : "目下の難敵"への対応) アクアネット, 18, 25-27 (2015).
 49. Shirakashi S. and Hirano C. Accumulation and distribution of skin fluke *Neobenedenia girellae* eggs on culture cage. *Aquaculture*, 443,1-4 (2015).
 50. Takaoka O. Ji S.C. Ishimaru K. Lee S.W. Jeong G.S. Biswas A. and Takii K. Dietary medicinal herbs and enzyme treated fish meal improve stress resistances and growth performance at early juvenile stage of red sea bream *Pagrus major*. *Aquacult. Res.*, 47, 390-397 (2015).
 51. Taniguchi A. Yoshida T. Hibino K. and Eguchi M. Community structures of actively growing bacteria stimulated by coral mucus. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 469, 105-112 (2015).
 52. Yamamoto M. Sugahara K. Endo M. Ishimaru K. and Kato K. Epidemiological studies of *Flavobacterium psychrophilum* in ayu *Plecoglossus altivelis* caught in Lake Biwa and the inflowing rivers from 1998 to 2011. *Fish Pathol.*, 50, 97-104 (2015).
 53. Yong A.S.K. Ooi Y.S.Y. Shapawi R. Biswas A. and Takii K. Effect of dietary lipid increments on the growth performance, feed utilization, and carcass proximate composition and intraperitoneal fat of marble goby. *Turkish J. Fish. Aquat. Sci.*, 15, 653-660 (2015).

54. Asdari R. Biswas A. Yamamoto S. Araki H. Kawashima K. Hashim R. and Takii K. Effect of dietary palm oil and medium chain tryglycerides on growth and fatty acid profiles of Japanese catfish *Silurus asotus* juveniles. *Aquacult. Sci.*, 62, 45-54 (2014).
55. Cano A. Kim Y.-S. Delgado D.I. Scholey V. and Sawada Y. Comparative efficacy of anesthetics among MS-222, 2-Phenoxyethanol, and clove oil in early juvenile Yellowfin tuna *Thunnus albacares*. *Aquacult. Sci.*, 62, 107-110 (2014).
56. Ching F.F. Miura A. Nakagawa Y. Kato K. Senoo S. Sakamoto W. Takii K. and Miyashita S. Flow field control via aeration adjustment for the enhancement of larval survival of the kelp grouper *Epinephelus bruneus* (Perciformes:Serranidae). *Aquacult. Res.*, 45, 874-881 (2014).
57. Guillen A. Honryo T. Ibarra J. Cano A. Margulies D. Scholey V. P. Wexler J.B. Stein M.S. Kobayashi T. and Sawada Y. Effect of water temperature on embryonic development of yellowfin tuna *Thunnus albacares* inhabiting the eastern Pacific Ocean. *Aquacult. Sci.*, 62, 319-322 (2014).
58. Hamasaki K. Sato-Takabe Y. Taniguchi A. and Tada Y. Photoheterotrophic process in surface seawater environments. *Western Pacific Air-Sea Interaction Study*, 199-202 (2014).
59. Honryo T. Kurata M. Okada T. Sawada Y. and Ishibashi Y. Effect of illuminance transition rate on survival of juvenile Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*. *J. World Aquacult. Soc.*, 45, 523-531 (2014).
60. Honryo T. Tanaka T. Guillen A. Wexler J. B. Cano A. Margulies D. Scholey V.P. Stein M. S. and Sawada Y. Effect of water surface condition on survival, growth and swim bladder inflation of yellowfin tuna, *Thunnus albacares* (Temminck and Schlegel), larvae. *Aquacult. Res.*, 47, 1832-1840 (2014).
61. Kato G. Kato K. Jirapongpaioj W. Kondo H. and Hirono I. Development of DNA vaccines against *Nocardia seriolae* infection in fish. *Fish Pathol.*, 49 (4), 165-172 (2014).
62. Kato K. Yamamoto M. Peerapon K. Fukuda H. Biswas A. Yamamoto S. Takii K. and Miyashita S. Effects of dietary taurine levels on epidermal thickness and scale loss in red sea bream, *Pagrus major*. *Aquacult. Res.*, 45, 1818-1824 (2014).
63. Kim Y.S. Ji S.C. Biswas A. Biswas B.K. Yong A.S.K. Takaoka O. Jeong G.S. Murata O. and Takii K. Suitable dietary protein/lipid ration for hybrid, female red sea bream *Pagrus major* and male black sea bream *Acanthopagrus schlegeli* in the juvenile stage, compared with red sea bream. *Fish. Aquatic Sci.* 17, 75-84 (2014).
64. Kim Y.-S. Sasaki T. Awa M. Inomata M. Honryo T. Agawa Y. Ando M. and Sawada Y. Effect of dietary taurine enhancement on growth and development in red sea bream *Pagrus major* larvae. *Aquacult. Res.*, 47, 1168-1179 (2014).
65. Nomura S. Kobayashi T. Agawa Y. Margulies D. Scholey V. Sawada Y. and Yagishita N. Genetic population structure of the Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* and

- the yellowfin tuna *Thunnus albacares* in the North Pacific Ocean. *Fish. Sci.*, 80, 1193-1204 (2014).
66. Nyuji M. Kodama R. Kato K. Yamamoto S. Yamaguchi A. and Matsuyama M. Gonadal development and gonadotropin gene expression during puberty in cultured chub mackerel (*Scomber japonicus*). *Zool. Sci.*, 31, 398-406 (2014).
67. Ogawa K. Shirakashi S. and Ishitani H. Insemination of the monogenean *Neobenedenia girellae* (Capsalidae, Benedeniinae). *Parasitol. Int.*, 63, 473-478 (2014).
68. Okada T. Honryo T. Sawada Y. Agawa Y. Miyashita S. and Ishibashi Y. The cause of death of juvenile Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) reared in sea net cages. *Aquacult. Engine.*, 59, 23-25 (2014).
69. Polinski M. Shirakashi S. Bridle A. and Nowak B. Transcriptional immune response of cage-cultured Pacific bluefin tuna during infection by two *Cardicola* blood fluke species. *Fish Shell. Immunol.*, 36, 61-67 (2014).
70. Rahmah S. Kato K. Yamamoto S. Takii K. Murata O. and Senoo S. Improved survival and growth performances with stocking density manipulation and shelter availability in bagrid catfish *Mystus nemurus* (Cuvier & Valenciennes 1840) larvae. *Aquacult. Res.*, 45, 2000-2009 (2014).
71. Shirakashi S. Yamane K. Ishitani H. Yanagida T. and Yokoyama H. First report of *Kudoa* species in the somatic muscle of the Japanese parrotfish *Calotomus japonicus* (Scaridae) and a description of *Kudoa igami* n. sp (Myxozoa: Multivalvulida). *Parasitol. Res.*, 113, 2515-2524 (2014).
72. Shirakashi S. Nishimura T. Kameshima N. Yamashita H. Ishitani H. Ishimaru K. and Yokoyama H. Effectiveness of ultraviolet irradiation for the prevention of *Kudoa yasunagai* and *Kudoa amamiensis* (Myxozoa: Multivalvulida) infections in *Seriola* fish. *Fish Pathol.*, 49, 141-144 (2014).
73. Tanaka T. Takahashi K. Adachi K. Ohta H. Yoshimura Y. Agawa Y. Sawada Y. Takaoka O. Biswas A. Takii K. Zaima N. Moriyama T. and Kawamura Y. Molecular cloning and expression profiling of procollagen $\alpha 1$ (I) of cultured Pacific bluefin tuna. *Fish. Sci.*, 80, 603-612 (2014).
74. Taniguchi A. Yoshida T. and Eguchi M. Bacterial production is enhanced by coral mucus in reef system. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 461, 331-336 (2014).
75. Tsuji M. Abe H. Hanyuu K. Kuriyama I. Tsuchihashi Y. Tsumoto K. Nigou T. Kasuya T. Katou T. Okada K. Uji S. and Sawada Y. Effect of temperature on survival, growth and malformation of cultured larvae and juveniles of the seven-band grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Fish. Sci.*, 80, 69-81 (2014).
76. Tsuji M. Uji S. Tsuchihashi Y. Okada K. Kawamura T. Katoh T. Kasuya T. Nigo T. Hamabe A. Miyamoto A. Nakamura S. Nakano A. and Sawada Y. Promotion of initial swim bladder inflation and effect of initial inflation failure on skeletal malformation in cultured seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus*

(Thunberg). *Aquacult. Res.*, 47, 1954-1971 (2014).

77. Yamamoto S. Fukushima A. Ishimaru K. and Shirakashi S. Shading of net cage is an effective control measure against skin fluke *Neobenedeniagirellae* infection in chub mackerel *Scomber japonicas*. *Fish. Sci.*, 80, 1021-1026 (2014).
78. Yokoyama H. Suzuki J. and Shirakashi S. *Kudoa hexapunctata* n. sp (Myxozoa: Multivalvulida) from the somatic muscle of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* and re-description of *K. neothunni* in yellowfin tuna *T. albacares*. *Parasitol. Int.*, 63, 571-579 (2014)

2. 図書

1. 澤田好史. マダイにおける脊椎骨の異常を胚発生環境から検討する, 魚の形は飼育環境で変わる～形態異常はなぜ起こるのか?～, 恒星社厚生閣, (印刷中, 2017年7月刊行予定).
2. 澤田好史・家戸敬太郎. 第IV章クロマグロ当歳魚の個体識別標識とハンドリング技術 クロマグロ親魚選抜のためのハンドリング技術, 国立研究開発法人水産総合研究センター, 18-23 (2016).
3. Balli J. Mladineo I. Shirakashi S. and Nowak B.F. “Diseases in Tuna Aquaculture” in “Advances in Tuna Aquaculture” ed. by Benetti DD. Partridge G.J. and Buentello A., pp. 253-272, Elsevier, AMSTERDAM, (2015).
4. Buentello A. Seoka M. Kato K. and Partridge G.J. “Tuna Farming in Japan and Mexico” in “Advances in Tuna Aquaculture from hatchery to Market” ed. by Benetti DD. Partridge G.J. and Buentello A., pp. 189-215, Elsevier, AMSTERDAM, (2015).
5. Sawada Y. and Agawa Y. “Genetics in tuna Aquaculture, Chapter 13”, in “Advances in Tuna Aquaculture from hatchery to Market” ed. by Benetti DD. Partridge G.J. and Buentello A., pp. 323-332 Elsevier, AMSTERDAM, (2015).
6. 微生物炭素ポンプ, 谷口亮人. 環境と微生物の事典 (日本微生物生態学会編), 朝倉書店, pp. 123-124 (2014).
7. 養殖場と微生物, 江口 充. 環境と微生物の事典 (日本微生物生態学会編), 朝倉書店, pp. 143-144 (2014).
8. 種苗生産と微生物, 江口 充. 環境と微生物の事典 (日本微生物生態学会編), 朝倉書店, pp. 145-146 (2014).

3. 学会発表

1. 阿川泰夫・谷和樹・山本修平・平野千早・澤田好史・白樫正. 海水中のハダムシ *Neobenedeniagirellae* 孵化幼生検出法開発, 平成29年度日本水産学会春季大会, 2017年3月29日.

魚類の完全養殖の高度化
研究成果の公表

2. 安藤正史・安藤真美・塚正泰之. 元素分析による食塩の浸透効果 医学生物学電子顕微鏡技術学会, 第 33 回学術講演会および総会, 2017 年 5 月 14 日 (予定) .
3. 安藤正史・伊藤智広・塚正泰之. 完全養殖クロマグロの水銀に関する研究-Xー野菜成分によるメチル水銀の吸収阻害効果ー 平成 29 年度日本水産学会春季大会, 2017 年 3 月 29 日.
4. 井口博紀・家戸敬太郎・中瀬玄德・山本竜次・井上太一・鈴木俊範・谷口亮人・江口 充, 田辺湾の養殖場水域における有機物の加水分解活性とその季節変動, 平成 29 年度日本水産学会春季大会, 2017 年 3 月 29 日.
5. 池田大起・石橋泰典. 飼育水の流動条件がクエ仔魚の成長, 生残率等に及ぼす影響 平成 29 年度日本水産学会春季大会, 2017 年 3 月 27 日.
6. 家戸敬太郎・尾賀光輔・竹内芳恵・森 喜代美・山田伸一・升間主計. マアナゴ天然魚と養殖魚との美味しさの比較, 平成 29 年度日本水産学会春季大会, 2017 年 3 月 29 日.
7. 岸本謙太・鷲尾洋平・安齋 賢・豊田 敦・吉浦康寿・家戸敬太郎・木下政人. ゲノム編集によるミオスタチン欠損マダイのオフターゲット変異の検討, 平成 29 年度日本水産学会春季大会, 2017 年 3 月 28 日.
8. 永田恵里奈・澤井里美・江口 充, スナヤツメがアユ型冷水病菌を長期保菌する可能性, 平成 29 年度日本水産学会春季大会, 2017 年 3 月 29 日.
9. 中瀬玄德・谷口亮人・江口 充, 生簀直下およびその近傍の底質と沈降粒子, 平成 29 年度日本水産学会春季大会, 東京海洋大学, 2017 年 3 月 28 日.
10. 澤田好史・田口恭嗣・本領智記・倉田道雄・阿川泰夫. 水槽壁面の色, 材質, 照度の変更によるカンパチ仔稚魚の顎形態異常防止, 平成 29 年度日本水産学会春季大会, 2017 年 3 月 28 日.
11. 白樫正. 単生類の生存戦略, 平成 29 年度日本水産学会春季大会ミニシンポジウム「寄生虫を宿主の視点から考える」, 2017 年 3 月 30 日.
12. 白樫正. 養殖種苗の寄生虫病対策に関する研究, 平成 29 年度日本魚病学会春季大会, 2017 年 3 月 12 日.
13. 白樫正・米加田徹・佐藤純・西岡豊弘・森広一郎・申相弼. 天然クサフグにみられた *Kudoa septempunctata* 寄生の報告, 平成 29 年度日本魚病学会春季大会, 2017 年 3 月 12 日.
14. 鷲尾洋平・岸本謙太・豊田 敦・田中 実・吉浦康寿・片山貴士・木下政人・家戸敬太郎. マイクロホモロジー媒介末端結合修復を利用したゲノム編集による foxl3 編集マダイ・トラフグの作成, 平成 29 年度日本水産学会春季大会, 2017 年 3 月 29 日.
15. Agawa Y., Kaga T., and Sawada Y. (2016) Identification of growth related DNA haplotype of cultured Pacific Bluefin tuna, *Thunnus orientalis*. Aquaculture Europe 2016. Scotland. Sept. 21.
16. 阿川泰夫・加賀俊生・澤田好史. 完全養殖クロマグロ成長に関連すると考えられる DNA 多型について, 平成 28 年度日本水産学会秋季大会, 2016 年 9 月 9 日.
17. 阿川泰夫・岩城真結・山根由行・高田義紘・小宮貴文・澤田好史 (2016) 完全養殖クロマグロ雄に特徴的な DNA 多型について, 平成 28 年度日本水産学会春季大会, 2016 年 3 月 28 日.
18. Agawa Y., Takada Y., Yamane Y. and Sawada Y. Identification of male and female

- characteristic DNA marker of Pacific bluefin tuna. *Aquaculture* 2016, USA. Las Vegas, 2016 Feb. 23.
19. 安藤正史・伊藤尚哉・伊藤智広・塚正泰之, 麴による水中硫化水素除去の試み, 医学生物学電子顕微鏡技術学会, 第32回学術講演会および総会, 2016年5月21日.
 20. 安藤正史・山田貴大・沖永洋一郎・伊藤智広・塚正泰之, 完全養殖クロマグロの水銀に関する研究-IY-野菜成分によるメチル水銀の吸収阻害効果-, 平成28年度日本水産学会春季大会, 2016年3月27日.
 21. Biswas A.・加藤歩実・滝井健二・高岡 治, クロマグロ稚魚用配合飼料の脂質源, 平成28年度日本水産学会春季大会, 2016年3月27日.
 22. Biswas A.・橋本晴賀・滝井健二・高岡 治, シマアジ稚魚稚魚のエネルギー収支, 平成28年度日本水産学会春季大会, 2016年3月27日.
 23. Biswas A.・高橋悠太・滝井健二・林 靖晃・成田清伴・岩本秀熙, 残渣魚粉を用いたマダイ稚魚用エコフィードの開発:大豆タンパクおよび残渣魚粉で飼料魚粉のすべてを代替, 平成28年度日本水産学会春季大会, 2016年3月27日.
 24. Biswas A., Ohnishi T., Nakao T., Nakajima M., Takii K. Energy partitioning in cultured juvenile Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*. *Aquaculture Europe* 2016, Edinburgh, Scotland, September 20 (2016).
 25. Biswas A., Tanaka T., Agawa Y., Sawada Y. and Takii K. Prediction of somatic growth pattern from changes in RNA, DNA and protein synthesis at early stages in yellowfin tuna, *Thunnus albacares*. *Aquaculture America* 2016, Las Vegas, USA, February 22, 2016.
 26. 浜野祥吾・白樫正・有元操・森広一郎. カンパチにおける種苗サイズによるべこ病発症率の違いとシスト数の長期変化傾向, 平成28年日本魚病学会秋季大会, 2016年9月7日.
 27. 井口博紀・清水沙理・谷口亮人・江口 充, 養殖場水域とそれに隣接する干潟域の栄養塩の動態, 平成28年度日本水産学会秋季大会, 2016年9月9日.
 28. 池田大起・武田崇史・石橋泰典, クロマグロ仔魚の生残率, 成長等に及ぼす水流発生法および高密度飼育の影響, 平成28年度日本水産増殖学会大会, 2016年11月3日.
 29. 池田大起・山本紗耶加・北村章博・石橋泰典, クエ仔魚の生残率, 摂餌, 成長等に及ぼす水槽形状および水流発生法の影響, 平成28年度日本水産学会秋季大会, 2016年9月9日.
 30. 石橋泰典, クロマグロ種苗生産の各種技術的課題と対策, 取り組み, 平成28年度日本水産学会秋季大会漁業懇話会, 2016年9月8日.
 31. Kato K. Kishimoto K. Washio Y. Toyoda A. Yoshiura Y. and Kinoshita M. Increment of skeletal muscle mass by CRISPR/Cas9 genome editing system in red sea bream (*Pagrus major*). 12th Japan-Korea Korea-Japan Joint Symposium on Aquaculture, Mie-prefecture, Tsu city, p. 36, 2016 Nov. 3.
 32. Kato K. Kishimoto K. Washio Y. Toyoda A. Yoshiura Y. and Kinoshita M. Increment of skeletal muscle mass by CRISPR/Cas9 genome editing system in red sea bream (*Pagrus major*). *Aquaculture Europe* 2016, Edinburgh, Scotland, pp. 507-508, 2016

Sept. 21.

33. 家戸敬太郎・鷺尾洋平・安齋 賢・豊田 敦・吉浦康寿・黒柳美和・片山貴士・今井 正・岸本謙太・村上 悠・木下政人. ゲノム編集による海水養殖魚の品種改良とその産業化に向けた課題, 平成 28 年度日本水産学会秋季大会, 2016 年 9 月 9 日.
34. 家戸敬太郎. アナゴ・サクラマス, 平成 28 年度日本水産学会秋季大会水産増殖懇話会第 2 回講演会「魚類養殖の新しいビジネスモデル」. 2016 年 9 月 8 日.
35. 木下政人・岸本謙太・鷺尾洋平・豊田 敦・吉浦康寿・家戸敬太郎. ゲノム編集技術の養殖業への応用—メダカからマダイ, トラフグへ—, 平成 28 年度日本水産学会秋季大会, 2016 年 9 月 9 日.
36. 岸本謙太・鷺尾洋平・豊田敦・吉浦康寿・家戸敬太郎・木下政人. ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 を用いた筋肉増量マダイ系統の作出, 平成 28 年度日本水産学会近畿支部後期例会, 2016 年 12 月 18 日.
37. 岸本謙太・鷺尾洋平・豊田 敦・吉浦康寿・家戸敬太郎・木下政人. ゲノム編集マダイの生殖細胞系列の変異, 平成 28 年度日本水産学会秋季大会, 2016 年 9 月 9 日.
38. 岸本謙太・鷺尾洋平・安齋 賢・村上 悠・豊田 敦・吉浦康寿・家戸敬太郎・木下政人. ゲノム編集処理世代マダイの変異スペクトラム解析, 平成 28 年度日本水産学会春季大会, 2016 年 3 月 29 日.
39. Kobayashi M. and Ishibashi Y. Effects of photoenvironmental control on the feeding, survival rate and behaviour of the larval long-tooth grouper, *epinephelus bruneus*. The Joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology & the 87th Meeting of the Zoological Society of Japan, November 17, 2016, Okinawa, Japan.
40. 小林桃子・石橋泰典, 各種波長光がクエ仔魚の飼育成績等に及ぼす影響, 平成 28 年度日本水産増殖学会大会, 2016 年 11 月 3 日.
41. 小林桃子・石橋泰典, クエ仔魚の摂餌, 浮上死亡率, 遊泳行動等に及ぼす各波長光の影響, 平成 28 年度日本水産学会秋季大会, 2016 年 9 月 9 日.
42. 小林 徹・猪熊 徹・瀬川 叡・山田伸一・家戸敬太郎・太田博巳. マアナゴ *Conger myriaster* における成長の雌雄差, 平成 28 年度日本水産学会春季大会, 2016 年 3 月 29 日.
43. 久保埜和成・石丸克也・白樫正・小川和夫・小田憲司, クロマグロの住血吸虫 (*Cardicola opisthorchis*) に対するプラジクアンテルの臨床試験, 平成 28 年度日本魚病学会春季大会, 2016 年 3 月 13 日.
44. 升間主計・村田 修・宮武弘文・中井彰治・山下 洋・森 大志・高橋範行・中田 久・太田博巳. 奄美におけるクエ (♀) ×タマカイ (♂) 交雑種の成長, 平成 28 年日本水産学会秋季大会, 2016 年 9 月 10 日.
45. 三浦真由子・石丸克也・石谷浩江・白樫正, ハダムシ *Benedenia epinepheli* ふ化幼生の光刺激に対する反応, 平成 28 年日本魚病学会秋季大会, 2016 年 9 月 7 日.
46. 長岡生真・三好映実・谷口友希・石橋泰典, クロマグロ仔魚の視物質オプシン遺伝子の発現様式と遊泳行動, 摂餌率, 浮上死亡率等に及ぼす各種波長光の影響, 平成 28 年度日本水産学会秋季大会, 2016 年 9 月 9 日.
47. 永田恵里奈・進藤有章・古谷あゆみ・山岡秀旭・江口 充, 分離起源の異なる冷水病菌の

- 水温に対する応答の違い, 平成 28 年度日本魚病学会秋季大会, 2016 年 9 月 7 日.
48. 中瀬玄德・谷口亮人・江口 充, 生簀への投餌と周辺底質の有機物量の関係, 平成 28 年度日本水産学会春季大会, 2016 年 3 月 29 日.
 49. 西田雄人・井上 勇・谷口亮人・江口 充, 養殖マダイの仔稚魚期における消化管内細菌叢の解析, 平成 28 年度日本水産学会春季大会, 2016 年 3 月 28 日.
 50. 西田雄人・井上 勇・青木隆一郎・谷口亮人・江口 充, 種苗生産期における養殖魚 4 種の消化管内細菌叢の変遷, 平成 28 年度日本水産学会秋季大会, 2016 年 9 月 9 日.
 51. 太田博巳・佐藤友太・今泉均・風藤行紀. ニホンウナギ雄へのリコンビナント LH 投与後の時間経過に伴う排精量と精液性状の変化, 平成 28 年度日本水産学会春季大会, 2016 年 3 月 28 日.
 52. 澤田好史. マダイにおける骨格異常と胚発生環境との関わり 平成 28 年度日本水産学会春季大会シンポジウム, 魚類人工種苗の形態異常: これまでとこれから平成 28 年度日本水産学会春季大会, 2016 年 3 月.
 53. Sawada Y., Kurata M., Sasaki T., Honryo T., Agawa Y., Kim Y.-S., Tamura Y., Katayama S. and Okada T. Prevention of jaw malformation in greater amberjack (*Seriola Dumerili*) by larval rearing with low brightness tank wall. Annual meeting of European Aquaculture Society. 2016 Sept. 21.
 54. Shirakashi S., Tani K., Ishimaru K., Honryo T., Uchida H. and Ogawa K. Temporal and spatial infection patterns of tuna blood flukes *Cardicola* spp. in polychaete intermediate hosts at a tuna farm in Japan, 91st Annual Meeting, American Society for Parasitologists, The Westin Edmonton, 2016 July 13.
 55. Shirakashi S. Preventing *Kudoa* infections in hatchery, Aquaculture Europe, Edinburgh, International Conference Centre, 2016 Sept. 20-23.
 56. 須崎 慶・石橋泰典, カワハギ稚魚の飼育成績, ストレス耐性等に及ぼす海水塩分の影響, 平成 28 年度日本水産学会秋季大会, 2016 年 9 月 9 日.
 57. Taniguchi A. and Eguchi M. Seasonal variation in community structures of actively growing bacteria in the aquaculture environment. The 8th Asian Symposium on Microbial Ecology, Invited lecture, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, 2016 October 1.
 58. 谷口亮人・畔柳裕樹・西田雄人・山口兼門・田中遥至・江口 充, クロマグロ養殖場海域における造礁サンゴが作り出す細菌群の多様性, 平成 28 年度日本水産学会春季大会, 2016 年 3 月 27 日.
 59. 辻 貴大・石橋泰典, クロマグロの卵および仔魚の飼育成績等に及ぼす紫外線の影響, 平成 28 年度日本水産増殖学会大会, 2016 年 11 月 3 日.
 60. 中田 久・須賀井貫太・音竹康太郎・山本眞司・中務 寛・服部亘宏・村田 修・升間主計, クエの鰓開腔時期と鰓の形状および前彎症出現率との関係, 平成 28 年日本水産学会秋季大会, 2016 年 9 月 10 日.
 61. 上田果奈・太田皓貴・石橋泰典, 種数種海産魚の卵および仔魚の生残率等に及ぼす海水塩濃度および元素組成の影響, 平成 28 年度日本水産学会秋季大会, 2016 年 9 月 9 日.
 62. 鷲尾洋平・大濱光希・岸本謙太・豊田 敦・吉浦康寿・木下政人・家戸敬太郎. ゲノム編

- 集マダイの F1 作出, 平成 28 年度日本水産学会秋季大会, 2016 年 9 月 9 日.
63. 鷺尾洋平・岸本謙太・安齋 賢・村上 悠・豊田 敦・田中 実・家戸敬太郎・木下政人. foxl3 遺伝子の破壊による早期精子形成マダイ作出の試み, 平成 28 年度日本水産学会春季大会, 2016 年 3 月 28 日.
64. 吉浦康寿・岸本謙太・鷺尾洋平・家戸敬太郎・上野智弘・木下政人. ゲノム編集技術を用いたダブルマッスルトラフグの作出, 平成 28 年度日本水産学会秋季大会, 2016 年 9 月 9 日.
65. 阿川泰夫・加賀俊生・岩城真結・岡田貴彦・澤田好史. 完全養殖クロマグロ成長に関連すると考えられるアレルについて, 平成 27 年度日本水産学会春季大会, 2015 年 3 月.
66. 安藤正史・漠 文潔・伊藤智広・塚正泰之, 完全養殖クロマグロの水銀に関する研究-YIIIーシステイン含有飼料による体水銀濃度の低減ー, 平成 27 年度日本水産学会春季大会, 2015 年 3 月 28 日.
67. Biswas A. Kato A. Hashimoto H. Hayashi Y. Narita K. Iwamoto S. and Takii K. Total replacement of fish meal by soy protein and fish market residue meal for red sea bream, *Pagrus major*. Fisheries and Aquaculture Conference 2015, Guilin, China, December 18, 2015.
68. Biswas A. Kato A. Hashimoto H. Hayashi Y. Narita K. Iwamoto S. and Takii K. Development of eco-feed for red sea bream *Pagrus major*: replacement of expensive fish meal by low cost residue fish meal and soy protein. Aquaculture Europe 2015, Rotterdam, Netherland, 2015 Oct. 20.
69. Biswas A. ・加藤あゆみ・橋本あやか・高橋悠太・滝井健二・岩本秀熙・食品残渣を利用したマダイ低魚粉エコフィードの開発, 平成 27 年度日本水産学会春季大会, 2015 年 3 月 26 日.
70. 笛田えりか・瀬川 叡・中村尚隆・山田伸一・家戸敬太郎・太田博巳. マアナゴへのホルモン投与方法の検討, 平成 27 年度日本水産学会春季大会, 2015 年 3 月 30 日.
71. 藤森猛志・升間主計・山本眞司・服部亘宏・中村竜哉・村田修・宮下盛, マダイの鰾開腔に及ぼす水温の影響, 平成 27 年度日本水産学会春季大会, 2015 年 3 月 30 日.
72. 服部亘宏・山本眞司・村田修・宮下盛・園田祥平・安原亜沙子・升間主計. クロマグロ仔稚魚の摂餌日周性と日間摂餌量の推定, 平成 27 年度日本水産増殖学会, 2015 年 11 月 13 日.
73. 浜野祥吾・石谷浩江・白樫正. ベコ病に罹患したカンパチ稚魚における体表のべこ症状とシストの関係, 平成 27 年度日本水産学会春期大会, 2015 年 3 月 29 日.
74. 平野千早・石丸克也・白樫 正. ハダムシ *Neobenedenia girellae* の産卵生態と養殖生簀網における虫卵分布, 平成 27 年度日本水産学会春期大会, 2015 年 3 月 29 日.
75. 家戸敬太郎・中村尚隆・瀬川 叡・安 孝珍・山田伸一・村田 修・宮下 盛. マアナゴ養成用飼料へのフィードオイルの添加効果, 平成 27 年度日本水産学会秋季大会, 2015 年 9 月 24 日.
76. 岸本謙太・鷺尾洋平・安齋 賢・村上 悠・黒柳美和・片山貴士・今井 正・豊田 敦・吉浦康寿・家戸敬太郎・木下政人. マダイ・トラフグにおける sgRNA の正確な評価法, 平成 27 年度日本水産学会秋季大会, 2015 年 9 月 24 日.

魚類の完全養殖の高度化
研究成果の公表

77. 岸本謙太・鷺尾洋平・安齋 賢・村上 悠・黒柳美和・片山貴士・今井 正・豊田 敦・吉浦康寿・家戸敬太郎・木下政人. マダイ・トラフグにおけるマイクロインジェクション法の最適化, 平成 27 年度日本水産学会秋季大会, 2015 年 9 月 24 日.
78. 岸本謙太・吉浦康寿・豊田 敦・家戸敬太郎・木下政人. CRISPR/Cas9 を用いた筋肉増量マダイの作製, 平成 27 年度日本水産学会春季大会, 2015 年 3 月 30 日.
79. 小西恭介・升間主計・中井彰治・高橋範行・村田修・宮下盛, 沖だし後のクロマグロ稚魚の生残・成長に及ぼす夜間の照明効果, 平成 27 年度日本水産増殖学会, 2015 年 11 月 13 日.
80. 升間主計・村田修・山本眞司・服部亘宏・滝井健二・ビシヤシユアマル・家戸敬太郎・宮下盛. クエ (♀) ×タマカイ (♂) 交雑種の味は?, 平成 27 年度日本水産学会秋季大会, 2015 年 9 月 23 日.
81. 升間主計・村田修・山本眞司・服部亘宏・太田博巳・島上侑馬・家戸敬太郎・宮下盛, クエ (♀) ×タマカイ (♂) 交雑種 3 歳魚の成長, 平成 27 年度日本水産学会春季大会, 2015 年 3 月 30 日.
82. 宮本富士子・松村圭祐・升間主計・山本眞司・服部亘宏・家戸敬太郎・宮下盛, ヒラメの体色異常に及ぼす変態期の栄養強化の影響, 平成 27 年度日本水産学会秋季大会, 2015 年 9 月 23 日.
83. 中瀬玄德・谷口亮人・江口 充, 隣り合う養殖筏直下の底質における有機物蓄積パターンの違い, 平成 27 年度日本水産学会春季大会, 2015 年 3 月 30 日.
84. 西田雄人・井上 勇・谷口亮人・江口 充, 養殖マダイの種苗生産期における消化管内細菌叢の解析, 平成 27 年度日本水産学会近畿支部後期例会, 2015 年 12 月 13 日.
85. 西田雄人・谷口亮人・江口 充, 養殖マダイとトラフグの仔稚魚期における消化管内細菌叢の解析, 第 5 回院生サミット, 2015 年 7 月 11 日.
86. 西田雄人・青木隆一郎・滝野雄斗・小原紘平・梶 暁登・井上 勇・谷口亮人・江口 充, 養殖マダイおよびトラフグの仔稚魚期における腸内細菌叢の解析, 平成 27 年度日本水産学会春季大会, 2015 年 3 月 28 日.
87. 西村知代・白樫正・中務寛・赤井茜. 飼育水処理による *Kudoa yasunagai* 防除法の検討および発症軽減に対する効果, 平成 27 年度日本魚病学会秋季大会, 2015 年 9 月 26 日.
88. 野村和晴・風藤行紀・田中秀樹・太田博巳. 大型ストロー容器によるニホンウナギ精子の凍結保存技術, 平成 27 年度日本水産学会春季大会, p 165, 東京都, 2015 年 3 月 28 日.
89. 大西堯行・Biswas A.・滝井健二, クロマグロ稚魚の給餌方法とエネルギー収支, 平成 27 年度日本水産学会春季大会, 2015 年 3 月 26 日.
90. 太田博巳・神谷祥代・和田龍成・野村和晴・風藤行紀・田中秀樹. ウナギ人工授精時の精子の質と量の測定方法, 平成 27 年度日本水産学会春季大会, 2015 年 3 月 28 日.
91. 澤田好史・佐々木つかさ・倉田道雄・本領智記・金 良珠・阿川泰夫・片山茂和・岡田貴彦. 水槽壁面の明度環境がカンパチ仔稚魚の顎形態異常, 行動, 成長, 生残に及ぼす影響, 平成 27 年度日本水産学会春季大会, 2015 年 3 月 28 日.
92. 瀬川 叡・家戸敬太郎・村田 修・山田伸一・尾賀光輔・太田博巳・笛田えりか・故宮下盛. 飼育条件下におけるマアナゴ生殖腺の周年変化, 平成 27 年度日本水産学会近畿

支部例会, 2015年12月13日.

93. Shirakashi S. Hirano C. and Ogawa K. Reproduction and inectious biology of Capsalid Monogenea *Neobenedenia gireallae*, 9th International Symposium of Fish Parasites, Valencia, Spain, 2015 Oct. 3.
94. 白樫正・谷和樹・石丸克也・本領智記・内田紘臣・小川和夫. 養殖クロマグロで見られる住血吸虫とその生活環, 平成27年度日本魚病学会秋季大会, 2015年9月26日.
95. 園田祥平・山本眞司・服部亘宏・宮下盛・村田修・升間主計, マサバ稚魚の長日飼育による飼育成績の改善, 平成27年度日本水産増殖学会, 2015年11月13日.
96. 高橋悠太・Biswas A.・滝井健二・坂田哲夫・中森俊宏・荒木秀雄, 豆乳由来の大豆タンパク質によるマダイ稚魚用低魚粉飼料の実用化, 平成27年度日本水産学会, 2015年3月26日.
97. 谷和樹・白樫正・石丸克也・本領智記・内田紘臣・小川和夫. マグロ住血吸虫の中間宿主フサゴカイの分布状況と寄生の季節変動, 平成27年度日本魚病学会秋季大会, 2015年9月26日.
98. 鷺尾洋平・岸本謙太・豊田敦・家戸敬太郎・木下政人. 成熟マダイ生殖腺の組織観察と性分化マーカー遺伝子の発現解析, 平成27年度日本水産学会春季大会, 2015年3月29日.
99. 吉浦康寿・岸本謙太・黒柳美和・片山貴士・今井 正・鷺尾洋平・安齋 賢・村上 悠・家戸敬太郎・木下政人. トラフグにおける CRISPR/Cas9 を用いた優良品種作出技術の開発, 平成27年度日本水産学会秋季大会, 2015年9月24日.
100. Agawa Y. Yamane Y. Iwaki M. Honryo T. Kurata M. Okada T. and Sawada Y. Identification of male and female characteristic DNA marker of aquacultured Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*. Aquaculture Europe, Spain, San Sebastian. 2014. Oct. 14.
101. Biswas A. Ahn H. Onishi T. Takahashi Y. Uemura S. Nakajima M. Nakao T. and Takii K. Growout feed development for Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*: utility of normal fish meal and squid meal. Aquaculture Europe 2014, San Sebastian, Spain, 2014 Oct. 14.
102. 笛田えりか・村田修・山本眞司・服部亘宏・山田伸一・板倉壮太・家戸敬太郎・太田博巳. マアナゴ雄の催熟方法, 平成26年度日本水産学会秋季大会, 2014年9月21日.
103. 加賀俊生・阿川泰夫・本領智記・岡田貴彦・澤田好史. 成長優良クロマグロに特徴的なDNAマーカーの探索, 平成26年度日本水産学会秋季大会, 2014年9月.
104. 家戸敬太郎. 海水魚の完全養殖とその産業化. 生物学若手研究者の集い, 夏のセミナー2014, 2014年7月12日.
105. 家戸敬太郎・山田伸一・村田 修・宮下 盛. 富山湾の水深100m層海水を利用した陸上養殖, 第16回マリンバイオテクノロジー学会シンポジウム「陸上養殖の現状と展望」, 2014年5月31日.
106. 岸本謙太・吉浦康寿・豊田 敦・家戸敬太郎・木下政人. ゲノム編集技術を用いたマダイ品種開発の試み, 平成26年度日本水産学会秋季大会, 2014年9月21日.
107. 岸本謙太・家戸敬太郎・吉浦康寿・木下政人. ゲノム編集技術を用いたトラフグ品種

魚類の完全養殖の高度化
研究成果の公表

開発の試み，平成 26 年度日本水産学会秋季大会， 2014 年 9 月 21 日．

108. 畔柳裕樹・西村翔太・西田雄人・滝野雄斗・谷口亮人・江口 充，サンゴ粘液によって活発に増殖する細菌群の群集構造解析，平成 26 年度日本水産学会近畿支部後期例会，2014 年 11 月 22 日．
109. 松浦大貴・家戸敬太郎・安 孝珍・石橋泰典・澤田好史・宮下 盛．キハダ消化酵素遺伝子のクローニングと仔稚魚における発現，平成 26 年度日本水産学会近畿支部後期例会， 2014 年 11 月 22 日．
110. 西村翔太・畔柳裕樹・谷口亮人・江口 充，養殖場水域における細菌の生産・被食速度の測定，平成 26 年度日本水産学会近畿支部後期例会， 2014 年 11 月 22 日．
111. 佐々木つかさ・倉田道雄・本領智記・金 良珠・阿川泰夫・片山茂和・澤田好史．水槽壁面色がカンパチ仔稚魚の成長，生残，顎形態異常に及ぼす影響，平成 26 年度日本水産学会秋季大会，2014 年 9 月．
112. 瀬川 叡・家戸敬太郎・山田伸一・村田 修・太田博巳・宮下 盛．飼育条件下におけるマアナゴ生殖腺の周年変化，平成 26 年度日本水産学会秋季大会，2014 年 9 月 21 日．

他 9 件。

4. 講演・シンポジウム・インターネット等での公開状況等

1. 升間主計，クロマグロの完全養殖について，ライオンズクラブ（今治地区）合同例会特別講演，今治国際ホテル，2017 年 3 月 18 日
2. 升間主計，近畿大学水産研究所の完全養殖の歴史と現状，第 14 回シーフードショー「陸上養殖勉強会セミナー」講演，2016 年 2 月 22 日．
3. 升間主計，これからの養殖，成熟社会における持続可能な水産業のあり方と其中長期戦略，日本学術会議主催公開シンポジウム，日本学術会議講堂，2016 年 11 月 18 日．
4. 升間主計，近大マグロの完全養殖と水産研究所の歩み，全国小学校理科研究大阪大会講演，全国小学校理科教育協議会，大阪市中央公会堂，2016 年 11 月 10 日．
5. 阿川泰夫，近大マグロ DNA のひみつ平成 28 年度 近畿大学水産研究所公開講座 和歌山県，新宮市商工会議所 2016 年 10 月 29 日．
6. 升間主計，クロマグロの完全養殖を支えた人々，国際問題研究会 OB 会講演，近畿大学 BLOSSOM CAFÉ ， 2016 年 10 月 9 日．
7. 升間主計，クロマグロの完全養殖研究について，第 68 回全国高等学校通信制教育研究会研究協議会和歌山大会記念講演，和歌山県高等学校 PTA 連合会，和歌山県民文化会館，2016 年 6 月 16 日．
8. 升間主計，クロマグロの完全養殖とその将来，海洋開発技術講演会，銀行倶楽部大ホール，2016 年 3 月 16 日．
9. 升間主計，近大マグロの完全養殖を支えた 32 年，第 30 回高槻市医師会勤務医総会，2016 年 2 月 4 日．
10. 升間主計，近畿大学水産研究所の魚類養殖研究とクロマグロ完全養殖，北区医師会新春講演会，名古屋市北医師会，2016 年 1 月 16 日．

魚類の完全養殖の高度化
研究成果の公表

11. 升間主計, 近大水研と完全養殖クロマグロ, パナソニック 2015 年度総合シンポジウム, 人材開発カンパニー, 2015 年 11 月 24 日.
12. 升間主計, 近畿大学水産研究所におけるクロマグロ完全養殖とマダイ人工種苗の標準化, 標準化と品質管理近畿地区大会 2015, メルパルク OSAKA, 2015 年 10 月 27 日.
13. 升間主計, 近畿大学水産研究所におけるクロマグロ完全養殖への挑戦!, 第 8 回 TEPIA 講演会, TEPIA ホール, 2015 年 10 月 18 日.
14. 升間主計, 今後のクロマグロ養殖事業について, 平成 27 年度中央区カレッジ, 近畿大学公開講座, 中央区立築地社会教育会館, 2015 年 10 月 17 日.
15. 升間主計, クロマグロ養殖から完全養殖へ, 出張講義, 上小阪小学校, 2015 年 9 月 17 日.
16. 升間主計, 近畿大学のクロマグロ完全養殖研究について, 和歌山県生活教養講座, 2015 年 7 月 8 日.
17. 升間主計, 近大マグロ等の現状とこれから, 近畿大学校友会東大阪支部総会講演, 2015 年 6 月 28 日.
18. 升間主計, 近大クロマグロと完全養殖, 恵庭商工会議所産業経済活性化委員会セミナー, 恵庭商工会議所, 2015 年 3 月 17 日.
19. 升間主計, クロマグロと完全養殖, 和歌山県生活教養講座, 和歌山県消費生活センター南紀支所, 2015 年 2 月 24 日.
20. 升間主計, 近畿大学におけるクロマグロ完全養殖について, 水産機械研究会講演会 in 稚内, 北海道立総合研究機構稚内水産試験場, 2014 年 12 月 16 日.
21. 升間主計, クロマグロと完全養殖の意義, 明石市高齢者大学, 大蔵ニコミュニティーセンター, 2014 年 11 月 19 日.
22. 升間主計, 近畿大学水産研究所のクロマグロ完全養殖への歩み, For the Better Forum 2014, 虎の門ヒルズフォーラム, PerkinElmer Japan, 2014 年 11 月 12 日.
23. 安藤正史. 養殖クロマグロの養殖クロマグロの水銀対策ー マグロから人へー 第 2 回 奈良まほろば産学官連携懇話会 奈良, 2014 年 9 月.

※プロジェクト・ホームページ

初年度において, <http://nara-kindai.univ.jp/02gakka/mext-gyorui/index.html> を開設し, この中で, プロジェクトの内容, メンバー, セミナーあるいはシンポジウムにおいて成果等の公表を行った

5. プロジェクト内セミナー・シンポジウム

※平成 26 年度第 1 回学内セミナー 開催日：2014 年 7 月 4 日

場所：近畿大学水産研究所白浜実験場 3F 講義室

1. キハダ消化酵素遺伝子のクローニングと発現解析 松浦大貴
2. 生態を利用した新しいハダムシ防除法の開発 平野千早
3. 成長優良クロマグロに特徴的な DNA マーカーの探索 加賀俊生
4. 水槽壁面色の明度が、カンパチ仔稚魚の顎形態異常、成長、生残に及ぼす影響
佐々木つかさ
5. クロマグロ養殖の効率化に向けた研究 大西堯行

※平成 26 年度第 2 回学内セミナー 開催日：2014 年 10 月 20 日

場所：近畿大学水産研究所白浜実験場 3F 講義室

1. ナマズにおける植物油の利用と脂肪酸代謝 上村秀太
2. マサバ仔稚魚の長日飼育および給餌方法の改善による成長促進 園田祥平
3. マダイ配合飼料における大豆タンパク質の利用性 高橋悠太
4. 養殖対象魚種の鰓形成に関する比較研究 藤森猛志
5. ヒラメ無眼側黒化の防除法に関する研究 宮本富士子
6. マアナゴの成熟および採卵に関する研究 瀬川 叡
7. 養殖クロマグロにおける住血吸虫の寄生時期と住血吸虫に対する抗体産生
谷 一樹

※平成 26 年度第 3 回学内セミナー開催報告 開催日：2014 年 11 月 29 日土曜日

場所：近畿大学農学部 218 教室

1. クロマグロ稚魚のエネルギー代謝に関する研究 大西堯行
2. クロマグロ仔魚の沈降死発生メカニズムに関する研究 伊奈佳晃
3. 人工孵化マハタの形態異常低減に関する研究 辻 将治

※平成 26 年度第 4 回学内セミナー開催報告 開催日：2014 年 12 月 8 日

場所：近畿大学水産研究所白浜実験場 3F 講義室

1. 光環境がクロマグロ仔魚の摂餌、成長、鰓開腔、生残に及ぼす影響 田村慶希
2. 水槽壁面色の明度が、カンパチ仔稚魚の顎形態異常、成長、生残に及ぼす影響 佐々木つかさ
3. キハダ消化酵素遺伝子のクローニングと仔稚魚における発現 松浦大貴
4. ハダムシの生態的特徴を利用した新しい防除法の開発 平野千早
5. 成長優良クロマグロに特徴的な DNA マーカーの探索 加賀俊生

※平成 27 年度第 5 回学内セミナー 開催日：2015 年 6 月 20 日

場所：近畿大学農学部 214 教室

1. マアナゴへのホルモン投与方法の検討 笛田えりか
2. 魚類精子の凍結保存耐性 飯尾良介
3. キハダの初期成長と成長関連遺伝子 葉山 卓

魚類の完全養殖の高度化
研究成果の公表

※平成 27 年度第 6 回学内セミナー 開催日: 2015 年 6 月 27 日

場所: 近畿大学農学部 214 教室

1. ホンモロコにおける第一卵割阻止条件の検討 藤井ひかる
2. ガンギエイの遺伝的集団構造 日下貴裕
3. 主要養殖魚の仔稚魚期における腸内細菌叢の解析 西田雄人
4. クロマグロ養殖場における海洋細菌の群集構造と代謝機能に及ぼすサンゴ粘液の影響 畔柳裕樹

※平成 27 年度第 7 回学内セミナー 開催日: 2015 年 7 月 27 日

場所: 近畿大学水産研究所白浜実験場 3F 講義室

1. クロマグロ稚魚のエネルギー代謝に関する研究 大西堯行
2. *Kudoa yasunagai* の感染防除および発症軽減に関する研究 西村知代
3. 養殖クロマグロにおける住血吸虫と粘液胞子虫の防除に向けた基礎的研究 谷 和樹
4. マダイ稚魚用エコフィードの開発 高橋悠太
5. 餌料の脂肪酸バランスがナマズの飼育成績と脂肪酸代謝に及ぼす影響 上村秀太
6. 光環境がクロマグロ仔魚に及ぼす影響 田村慶希

※平成 27 年度第 8 回学内セミナー 開催日: 2015 年 11 月 8 日

場所: 近畿大学水産研究所白浜実験場 3F 講義室

1. クロマグロ稚魚の沖出し直後の生残・成長に及ぼす夜間照明の効果 小西恭介
2. 養殖対象魚種の鰓形成に関する比較研究 藤森猛志
3. 長日飼育および配合飼料の給餌量の違いがマサバ種苗の成長と生残に及ぼす影響 園田祥平
4. ヒラメ無眼側黒化の防除法に関する研究 宮本富士子
5. 琵琶湖産アユ種苗における冷水病の実用的な防除技術 山本充孝
6. 飼育環境下におけるマアナゴ生殖腺の周年変化 瀬川 叡
7. カンパチベコ病対策法の開発 浜野祥吾
8. ホルモン投与によるメスのマアナゴの人為的な成熟 尾賀光輔

※平成 27 年度第 9 回学内セミナー 開催日: 2015 年 11 月 28 日

場所: 近畿大学農学部新教室棟 216 教室

1. クロマグロ稚魚のエネルギー代謝に関する研究 大西堯行
2. 琵琶湖産アユ種苗における冷水病の実用的な防除技術 山本充孝

※平成 28 年度第 10 回学内セミナー 開催日: 2016 年 10 月 8 日

場所: 近畿大学農学部新教室棟 213 教室

1. ガンギエイの遺伝的集団構造 日下貴裕
2. 2 回の高湿処理によるホンモロコ卵の第一卵割阻止条件 藤井ひかる
3. 養殖魚の種苗生産期における消化管内細菌叢の変遷 西田雄人

※平成 28 年度第 11 回学内セミナー 開催日: 2016 年 10 月 15 日

場所: 近畿大学農学部 214 教室

1. イケス養殖場及び隣接する干潟水域における物質循環過程の解明 井口博紀
2. クエ種苗生産の光波長制御に関する研究 小林桃子

魚類の完全養殖の高度化
研究成果の公表

3. クロマグロおよびカンパチの卵、仔魚の生残率等に及ぼす紫外線の影響 辻 貴大

※平成 28 年度第 12 回学内セミナー 開催日: 2017 年 1 月 14 日

場所: 近畿大学水産研究所白浜実験場 3F 講義室

1. ブリ類のペコ病対策に関する研究 浜野省吾
2. マアナゴ雌の成熟誘導に関する研究 尾賀光輔
3. クロマグロ卵・孵化仔魚の内部栄養に関する研究 加藤歩実
4. 飼料タンパク質源の差異がシマアジのエネルギー分配に及ぼす影響 橋本晴賀
5. クロマグロの中間育成期間における原溝防除対策 夜間給餌の影響と沖出し前後の給餌方法の検討 山雄沙希

※平成 28 年度私立大学戦略的研究基盤形成支援事業プロジェクト

「魚類の完全養殖の高度化」シンポジウム 開催日: 2017 年 2 月 23 日

場所: 近畿大学農学部新教室棟 211 教室

1. 13:00-13:05 開会挨拶・趣旨説明 升間主計
2. 「完全養殖システムの構築」グループ【座長: 升間主計】
3. 13:05-13:10 研究概要 升間主計
4. 13:10-13:20 DNA マーカーを用いた親魚管理 阿川泰夫
5. 13:20-13:35 病原体の生態および感染機構の解明と疾病防除 白樫 正
6. 13:35-13:50 難種苗生産魚種 I. ハタ科魚類の新交雑種の開発 中田 久
7. 13:50-14:05 難種苗生産魚種 II. サクラマス・サツキマスの完全養殖 家戸敬太郎
8. 14:05-14:20 難種苗生産魚種 III. マアナゴの完全養殖を目指して 太田博巳
9. 14:20-14:30 休憩
10. 「環境低負荷システムの構築」グループ【座長: 江口 充】
11. 14:30-14:35 研究概要 江口 充
12. 14:35-15:00 物質循環過程の解析と制御 中瀬玄德
13. 15:00-15:15 有用微生物による養殖場底泥環境の改善 安藤正史
14. 15:15-15:30 環境低負荷飼料の開発 アマル ビッシャシュ
15. 15:30-15:45 環境低負荷・省エネ型種苗生産システムの構築 石橋泰典
16. 15:45-16:15 総合討論【座長: 太田博巳】
17. 16:15-16:20 閉会挨拶 太田博巳

6. 受賞等

1. 白樫 正：2016 年度日本魚病学会研究奨励賞
2. 江口 充：平成 28 年度 水産学進歩賞，業績題目「魚類養殖に関わる環境微生物の生理生態学的研究」（公益社団法人 日本水産学会）
3. 西田雄人，井上 勇，谷口亮人，江口 充，（2015）優秀発表賞，発表題目「養殖マダイの種苗生産期における消化管内細菌叢の解析」（公益社団法人 日本水産学会近畿支部）
4. 小林桃子・石橋泰典：平成 28 年度日本水産増殖学会大会，ベストポスター賞「各種波長光がクエ仔魚の飼育成績等に及ぼす影響」（日本水産増殖学会）

7. 特許

1. 石丸克也，福井健介：魚類寄生虫症防除剤及び餌料，特願 2016-054449（出願日 2016/03/17）

8. 新聞報道

1. 近大が養殖サクラマス提供 関係 2 店で期間限定みなと新聞，2017/3/3
2. 紀州産クエを和歌山県から全国の食卓へ梅げんき Vol.40，2017/2/1
3. 高級魚「クエ」と「タマカイ」の良さを併せ持つハイブリッド「クエタマ」を直営店にて数量限定で初提供近畿大学プレスリリース，2016/12/16
4. 深層水で養殖 夏バテ防げ 近大と入善漁協サクラマスで試験北陸中日新聞，2016/11/26
5. 海洋深層水使いサクラマス養殖朝日新聞，2016/11/26
6. 養殖サクラマス飼育へ 全国初海洋深層水を活用北日本新聞，2016/11/26
7. 海洋深層水でサクラマス 入善町・漁協 近畿大と養殖試験読売新聞，2016/11/26
8. サクラマス深層水で増殖 近大，入善で 3 年計画富山新聞，2016/11/26
9. 海洋深層水でサクラマス養殖 近大など富山で日本経済新聞，2016/11/26
10. 目指せ 新宮名物 サツキマスの採卵作業熊野新聞，2016/11/2
11. 伊勢丹が近大とコラボ 19～25 日新宿で養アナゴなど提供みなと新聞，2016/10/13
12. 養殖魚の進化文芸春秋，10 月号，2016/10/1
13. タマカイの親魚養成試験を開始近畿大学プレスリリース，2016/8/1
14. 出張講義：マグロの完全養殖朝日小学生新聞，2016/7/23
15. 近大養殖クエが順調に日高新聞，2016/7/13
16. ナマズ養殖などに意見，新宮港埠頭の新事業報告で，熊野新聞，2016/6/17
17. 研究には大胆な発想の転換が大切，儀もんの味 ウナギ登り，読売新聞，2016/6/10
18. 近大の養殖技術を視察，サバ大学の学長ら一行，熊野新聞，2016/4/19
19. 最先端の研究に触れる，新宮，浦神実験場で実習，紀南新聞，2016/4/17
20. 産学連携（UHA 味覚糖），朝日新聞，2016/4/10
21. 命のありがたさを学ぶ，紀南新聞，2016/3/13
22. 近大，養殖技術で国際貢献，みなと新聞，2016/3/2
23. 養殖開発センター設立，朝日新聞，2016/3/1
24. 海の恵みで食をささえ，みなと新聞，2016/2/25

魚類の完全養殖の高度化
研究成果の公表

25. 魚をデザインする, 朝日新聞, 2016/2/14
26. 節分に近大恵方巻き, みなと新聞, 2016/2/2
27. 飼育技術向上の福音も, みなと新聞, 2016/2/1
28. 恵方巻き にぎわう商戦, 読売新聞, 2016/1/29
29. 新春シリーズ企画 ボーダーレス市場に立ち向かえ!! 漁業養殖, みなと新聞, 2016/1/26

他 93 件

9. テレビ報道

1. サクラマス養殖試験, ニュース, NHK富山, 2016/11/28
2. サクラマス養殖試験, ニュース富山人, NHK富山, 2016/11/28
3. サクラマス養殖試験, みんなのニュースニュース, 富山テレビ, 2016/11/25
4. サクラマス養殖試験, KNB news every, 北日本包装, 2016/11/25
5. サツキマスの採卵, ANNニュース, 朝日放送, 2016/11/3
6. 完全養殖について, 「高校講座 地理」, NHKE テレ, 2016/6/24
7. ゲノム編集について, ガリレオX, BSフジ, 2016/5/15
8. 受験者数全国一を誇る近畿大学の秘密に迫る, かんさい情報ネット ten, 読売テレビ, 2016/4/7
9. 泉南市のアナゴ養殖プロジェクト キックオフセレモニー, キャスト, 朝日放送, 2016/3/16
10. 泉南市のアナゴ養殖プロジェクト キックオフセレモニー, みんなのニュース, 関西テレビ, 2016/3/6
11. 白浜町のクエ, す・またん!, 読売テレビ, 2016/2/23
12. 店舗新メニュー, 関西情報ネット, 読売テレビ, 2016/1/21
13. 店舗新メニュー, ゆうがた LIVE ワンダー, 関西テレビ, 2016/1/21
14. 店舗新メニュー, す・またん!, 読売テレビ, 2016/1/21
15. クエ及びクロマグロ養殖について, ニュースシブ 5時, NHK 総合テレビ, 2015/12/24
16. クロマグロの養殖について, 中居正広のミになる図書館, テレビ朝日, 2015/10/20
17. クロマグロ養殖 新たな挑戦, KNB news every 金曜ジャーナル, 北日本放送, 2015/9/25
18. クロマグロ完全養殖, 所さんのニッポンの出番, TBS テレビ, 2015/9/8
19. 世界初クロマグロの完全養殖に尽力した男, for ~もう1人の主人公~, フジテレビ, 2015/8/30
20. クロマグロ完全養殖, ニュートンのリンゴ, 青森放送, 2015/8/9
21. ドラGO!, テレビ東京, 2015/8/3
22. 日本の養殖について, 未来広告ジャパン, NHKE テレ, 2015/7/8
23. キンダイについて, 朝生ワイドす・またん!, 読売テレビ, 2015/6/24
24. キンダイについて, キャスト, 朝日放送, 2015/6/23
25. キンダイ・ブリヒラ販売について, 「あさチャン」, 毎日放送, 2015/6/15
26. キンダイ・ブリヒラ販売について, 「グッド!モーニング」, テレビ朝日, 2015/6/15
27. 「アカデミックに食べまくれ! 全国選抜大学グルメ」, 山陽放送, 2015/6/14
28. クエ養殖を紹介, 遠くへ行きたい, 読売テレビ, 2015/4/26
29. 近大マダイ鯛めしの素の紹介, 和歌山経済 Biz Search, テレビ和歌山, 2015/4/25
30. 大島実験場のマグロ養殖の様子, 「JAPAN TUNA」, オーストラリア放送, 2015/4/8
31. マグロについて, Trails to Tsukiji, NHK, 2015/4/1

他 27 件