

クエ、マハタ種苗量産技術確立事業（種苗生産技術開発）

土橋靖史・栗山 功・黒宮香美*

目 的

東紀州地域はマダイ養殖が盛んであるが、近年、全国的な過剰生産により価格が低迷し、養殖経営を著しく圧迫している。このため、マダイにかわる新しい養殖魚種の要望がおこっている。そのなかでマハタは高級魚として、単価が高く、成長も良いことから、期待されている魚種である。しかし、その種苗は、国内ではごく少量採捕されるのみで、ほとんどは韓国、香港等からの輸入に頼っており、種苗の価格は高価で不安定である。クエはマハタ以上の高級魚であるが、養殖用種苗を入手することは現時点ではほとんど不可能な魚種であり、天然魚についてもまれにしか漁獲されないため、クエ鍋等の郷土料理の材料として安定生産が望まれている。

そこで、マハタ、クエの種苗量産化技術を開発して種苗の安定供給をめざし、これらの魚種を東紀州地域の特産種として定着させ、地域の活性化を図る。

1. 親魚養成試験

方 法

1) 親魚の確保

表1のとおりマハタ76尾（全長40～84cm、体重0.9～13.0kg）、クエ68尾（全長59～115cm、体重3.3～26.0kg）を確保し、個体識別をおこなうため、IDタグを装着している。親魚の正確な年齢は不明であるが、南島町、志摩町産のマハタ、クエで7～8歳以上とみられる。このうち、今年度新たに購入したのは、マハタ43尾（全長40～79cm、体重0.9～10.2kg）である。なお、これ以外に試験用親魚として、韓国産マハタ120尾（全長52～64cm、体重2.7～4.5kg）を飼育している。

表1 確保したマハタおよびクエ親魚

魚 種	尾 数	全 長 (cm)	体 重 (kg)
マハタ (県内産)	76尾	40.1～83.6cm	0.9～13.0kg
クエ (県内産)	68尾	59.0～115.0cm	3.3～26.0kg
マハタ (韓国産)	120尾	51.4～64.1cm	2.7～4.5kg

2) 海面生簀による飼育試験

マハタ、クエ親魚は尾鷲栽培漁業センターの海面生簀（5×5×5m、目合6節）3面にマハタ、クエの大型魚、クエ中型魚、マハタ、クエの小型魚の3群に分けて収容し、飼育をおこなった。餌料は生餌（スルメイカ、サバ等）を原則として週2回給餌した。なお栄養強化のため、ビタミン強化剤（ハマチエードフォルテ、フィッシュエードC、ユベラフード100）を5:2:1の割合で混合したものを給餌量の1%添加し、投餌した。

試験用親魚の韓国産マハタは、海面生簀（5×5×5m、目合6節）1面に収容し、飼育をおこなった。餌料はマダイ用のMP（生餌1:マッシュ1）を原則として週2回給餌した。

3) 陸上水槽による飼育試験

マハタ、クエ親魚のうちマハタ12尾、クエ10尾を平成10年11月26日に尾鷲栽培漁業センターの陸上水槽（75t、半循環濾過）に収容し、飼育を開始した。水温は自然水温としているが、冬期は15℃以下にならないよう加温した。またろ過海水を1時間当たり7t注水し、寄生虫等の疾病発症防止のため、銅イオン発生装置により、飼育水中の銅イオン濃度を50ppb前後とした。なおウイルス性疾病対策としてオゾン海水殺菌装置が整備された2月以降は、ろ過海水にかえてオゾン殺菌海水を同量注水した。日中は水銀灯を点灯し、照度を50ルクス前後とした。飼育密度は1.5kg/m³であった。餌料は海上生簀の餌と同様に生餌（スルメイカ、サバ等）を原則として週2回給餌し、ビタミン強化剤を添加した。給餌量は魚体重の2.0～3.0%とした。

結果および考察

1) 海面生簀による飼育試験

マハタについては、冬期も摂餌は良好であったが、水温が26℃を越えた8月中旬以降は少し餌喰いが悪くなった。

クエについては、夏期は特に活発に摂餌し、冬期も今

*三重県尾鷲栽培漁業センター

年度は水温が高かったためか、餌喰いが落ちたものの一昨年のように全く摂餌しなくなるようなことはなかった。また韓国産マハタの摂餌状態は周年良好であった。

魚病の発生は特に認められなかったが、クエ親魚2尾が採卵後にへい死した。また試験用親魚の韓国産マハタが、夏期の高水温期に2尾がへい死した。

飼育密度は、3月上旬の魚体測定および親魚入れ替えの時点で、マハタ、クエ大型群は $2.7\text{kg}/\text{m}^3$ 、クエ中型群は $2.1\text{kg}/\text{m}^3$ 、マハタ、クエ小型群は $1.8\text{kg}/\text{m}^3$ となった。また韓国産マハタ群は $4.8\text{kg}/\text{m}^3$ となった。

地先の2m層の水温は図1のとおり、4月上旬には18℃台で、5月中旬には20℃台になり、25℃を越えたのは7月末で最高水温は8月24日の27.6℃であった。その後降温して10月中旬には25℃以下、12月上旬には20℃以下、2月中旬には15℃台となり、最低水温は2月15日の15.4℃であった。その後昇温して3月末には17℃台となった。

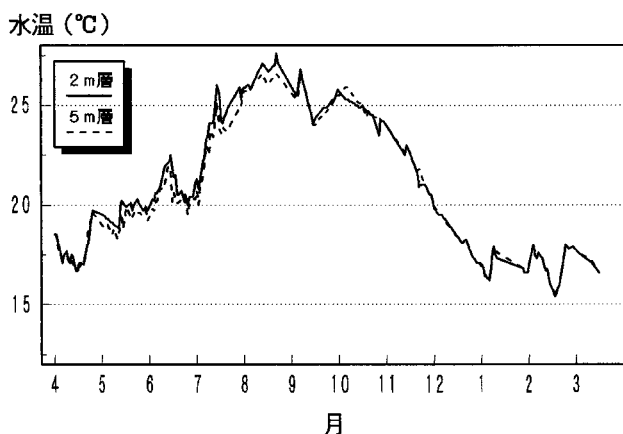


図1 海面生簀の水温

2) 陸上水槽による飼育試験

魚病の発生等は特に認められなかったが、雌親魚1尾が採卵直前の5月上旬にへい死した。解剖したところ卵巣内に昨年の退行吸収されなかった卵塊がコブ状になっており、これが内蔵を圧迫してへい死したとみられる。この卵塊は採卵時の支障にもなり、今後何らかの対策が必要である。

給餌後、残餌を回収して計量し、摂餌量を算定したところ、魚体重の0.0~3.0%、平均1.6%であった。

なお、親魚の入替えをおこない、親魚の中から、PCRによるVNNウイルスの検出で陰性と確認されたマハタ親魚25尾、クエ親魚10尾を陸上水槽に収容した(表2)。親魚の移動は麻酔をかけた後、タンカにて運搬した。飼育密度は $2.7\text{kg}/\text{m}^3$ となった。

陸上水槽内の水温は図2のとおり、4月上旬には18℃台で、6月中旬には20℃台になり、25℃を越えたのは8月上旬で最高水温は8月11日の26.0℃であった。その後降温して10月中旬には25℃以下、12月上旬には20℃以下、2月中旬には15℃以下となり、最低水温は2月23日の14.6℃であった。その後昇温して3月末には17℃台となった。

表2 陸上水槽に収容したマハタ、クエ親魚

魚種	尾数	全長 (cm)	体重 (kg)
マハタ (県内産)	25尾	47.4~83.6 cm	2.1~13.0 kg
クエ (県内産)	20尾	58.6~67.8 cm	3.3~5.3 kg

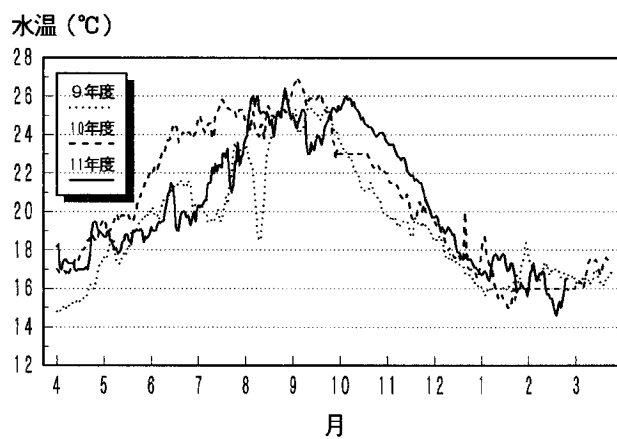


図2 陸上水槽の水温

2. 雄性化、成熟促進試験

性ホルモンの投与による雄性化、成熟促進試験については、水産庁養殖研究所繁殖部の田中主任研究官と共同で試験をおこなった。

目的

1) メチルテストステロン (MT) インプラントおよびLHRHaコレステロールペレット埋め込みによる韓国産マハタの雄性化および排精量増加試験

昨年度までの試験から、4歳以上の未熟な雌のマハタは3月に体重1kg当たり2mgのメチルテストステロン (MT) を医療用シリコンチューブ (サイラスティックチューブまたはシラスコンチューブ) に封入したインプラントを腹腔内に埋め込むことによって雄へ性転換し、一部の個体は5~6月の成熟期には排精することが明らかにされた。このホルモン処理により、全ての個体で性転換と精子形成が確認されているが、精巣が小さいために精液の量が少なく、必ずしも全個体で排精が確認できないという問題が残された。そこで本年度は、MTによって性転換を誘起した後に生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (LHRHa) を投与することによって、脳下垂体中の

生殖腺刺激ホルモン (GTH) を放出させ、精子形成を促進して精液量を増加させることを目的として実験をおこなった。

2) エストラジオール 17 β (E2), テストステロン(T) インプラントおよびLHRHaコレステロールペレット埋め込みによる韓国産マハタの成熟促進試験

昨年度までの試験から、未熟な雌のマハタの成熟を誘起することを目的として生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (LHRHa) を800 μ g/kg BWという高濃度で投与しても、卵巣の成熟は進まないことが明らかになった。その原因の1つとして、未熟なマハタは脳下垂体中に生殖腺刺激ホルモン(GTH)を蓄積していないために、LHRHaを投与してもGTHの分泌が起こらず、その結果成熟誘起効果がないことが考えられた。ヨーロッパウナギではエストラジオール 17 β (E2)およびテストステロン(T)を投与するとポジティブフィードバックによって脳下垂体におけるGTHIIの α および β サブユニットのmRNAが顕著に増加することが報告されている (Querat *et al.* 1991)。そこで本年度は、E2とTを単独または同時に投与して脳下垂体のGTH産生を促進した上でLHRHaを投与し、未熟な雌の成熟を図ることを目的として実験をおこなった。

方 法

1) メチルテストステロン (MT) インプラントおよびLHRHaコレステロールペレット埋め込みによる韓国産マハタの雄性化および排精量増加試験

MTインプラントの作製：25mgのMTを200 μ l の95%エタノールに溶解し、これに800 μ l のcastor oil (ひまし油) を添加して混和した。シラスコンチューブ (外径3mm, 内径2mm) を3cmの長さに切断し、チューブの一端をシリコン接着剤で塞ぎ、注射筒を用いてMT溶液(コントロールはエタノール+ひまし油)を80 μ l 注入した後、チューブの他端を接着剤で塞いで2mgのMTを含むインプラントを作製した。

LHRHaコレステロールペレットの作製：8mgのLHRHa (des Gly10 [D Ala6] LHRH Ethylamide) を0.4 0.6ml の50%エタノールに溶解したもの(コントロールはエタノールのみ) を、ガラス製の乳鉢内で380mgのコレステロールに添加し良く混合してから、37°Cで1時間乾燥させた後、20mgのココアバターを添加してフレーク状になるまで冷やしながらか完全に混ぜ合わせた。これを20mg (400 μ g のLHRHaを含む) ずつ秤量し、ペレットモールドの漏斗の部分に添加し、針などで穴に

詰め込み、型で押してペレットにした。

ホルモン投与およびサンプリング：6歳(以上)の韓国産マハタ30尾(全長(平均 \pm 標準誤差) 56.0 \pm 0.42cm, 体重3.13 \pm 0.08kg) を供試魚とし、平成11年3月12日に5尾取り上げ、採血、魚体測定したあと生殖腺を摘出し重量測定後固定するとともに脳下垂体を摘出し固定した(実験開始時対照区)。同時に、残り25尾の腹壁をメスで切開し、MTインプラントを3個ずつ(1.95 \pm 0.05mg MT/kg BW) 腹腔内に挿入した後生け簀に戻し、飼育を継続した。4月23日には同様に5尾をサンプリングし、残りのうち10尾にLHRHaを含まないコレステロールペレットを3個、他の10尾には400 μ gのLHRHaを含むコレステロールペレットを3個(367 \pm 58 μ g/kg BW) 背部筋肉中に埋め込んだ。5月25日と6月23日には残りの全個体の腹部を圧迫して排精の有無を確認した後、各区それぞれ5尾ずつサンプリングした。また、同じ群のマハタを供試魚とした実験2でステロイドを含まないインプラントと、LHRHaを含まないペレットを投与した群から4月23日、5月20日、6月24日に取り上げたサンプルを実験1の同時期の対照区とした。

2) エストラジオール 17 β (E2), テストステロン(T) インプラントおよびLHRHaコレステロールペレット埋め込みによる韓国産マハタの成熟促進試験

E2およびTインプラントの作製：実験1と同様に2mgのE2またはTを含むインプラントを作製した。

LHRHaコレステロールペレットの作製：実験1と同様に400 μ gのLHRHaを含むペレットを作製した。

ホルモン投与およびサンプリング：6歳(以上)の韓国産マハタ55尾(全長(平均 \pm 標準誤差) 58.1 \pm 0.27cm, 体重3.47 \pm 0.05kg) を供試魚とし、平成11年4月23日に5尾取り上げ、採血、魚体測定したあと生殖腺を摘出し重量測定後固定するとともに脳下垂体を摘出し固定した(実験開始時対照区)。同時に、残り50尾の腹壁をメスで切開し、E2またはTを含むインプラントをいずれか3個ずつ(E20mg T2mg区：10尾, E22mg T0mg区：10尾)、両方3個ずつ(E22mg T2mg区：15尾)、ステロイドを含まないインプラントを3個ずつ(E20mg T0mg区：15尾)腹腔内に挿入した後生け簀に戻し、飼育を継続した。ステロイドを投与したものの体重当たり投与量は1.75 \pm 0.02mg/kg BWとなった。5月20日に各区よりそれぞれ5尾をサンプリングし、残りのうちE20mg T0mg区とE22mg T2mg区の各5尾にLHRHaを含まないコレステロールペレットを3個、他の20尾には400 μ gのLHRHaを含むコレステロールペレットを3個、

各区5尾ずつ背部筋肉中に埋め込んで飼育を継続した(表4)。6月24日には各区それぞれ5尾ずつ全てサンプリングした。

結果および考察

1) メチルテストステロン (MT) インプラントおよびLHRHaコレストロールペレット埋め込みによる韓国産マハタの雄性化および排精量増加試験

ホルモンを投与しなかった対照区は全期間を通じて全個体雌であり、6月24日には5個体中3個体が第2次～第3次卵黄球期の卵を持ち生殖腺指数も1～5に達し、雌として初めて成熟しているのが確認された。MTを投与した区は、投与から6週間後の4月23日には全個体雄に性転換しており、活発な精子形成が始まっていたが、生殖腺指数(GSI)は0.075となり未熟な雌より低かった(表3)。LHRHa投与1カ月後の5月下旬には、LHRHa投与区では10個体中8個体が排精し、GSIも0.138に増加していたのに対し、非投与区は10個体中4個体が排精したのみで、GSIも0.090と低かった(表3)。しかし、組織学的観察では両区とも全個体で精子が形成されているのが確認された。さらに1カ月後の6月24日にも同様な傾向が見られ、LHRHa投与区では全個体が排精し、GSIも非投与区に比べて高かったが、個体数が少なかつたために統計的有意差は得られなかった(表3)。

表3 MTとLH-RHaを投与した韓国産マハタの生殖腺指数(mean±SE, n=5)および性別と排精率

試験区	3月12日	4月23日	5月25日	6月23日
Control	0.126±0.032	0.122±0.022	0.165±0.017* ¹	1.591±0.812* ²
(性別、成熟率)	雌	雌	雌	雌、3/5
MT2mg+LHRHa 0μg		0.075±0.006	0.090±0.014	0.092±0.014* ³
(性別、排精率)		雌	雌、4/10	雌、3/5
MT2mg+LHRHa400μg			0.138±0.018	0.134±0.016
(性別、排精率)			雌、8/10	雌、5/5

*1 実験2のE2 0mg+T 0mg処理区(5/20取り上げ)の値

*2 実験2のE2 0mg+T 0mg, +LHRHa 0μg 処理区(6/24取り上げ)の値

*3 p<0.05でControlより有意に小さい。他は全て有意差無し

以上の結果より、MT投与に加えてLHRHaを投与すると、MT単独の場合に比べて精子形成を活発化し、精巢重量および精液量を増加させ、その結果排精率を高める傾向が見られたが、その効果は統計的有意差が得られるほど顕著ではなかった。種苗生産用の精液確保のためのホルモン処理としては、LHRHaが高価であることを考慮に入れて適切な方法を選択することが必要であろう。なお、脳下垂体の組織像および血中ステロイドホルモンレベルに関しては今後解析をおこなう予定である。

2) エストラジオール 17β(E2), テストステロン(T)

インプラントおよびLHRHaコレストロールペレット埋め込みによる韓国産マハタの成熟促進試験

実験開始時(4月24日)には全て周辺仁期の卵を持つ未熟な雌であった。ホルモンを投与しなかった試験区(E20mg T0mg LHRHa0μg区)では6月24日に5個体中3個体が第2次～第3次卵黄球期の卵を持っており、飼育下でマハタは6歳(以上)、全長60cm、体重4kg前後で初めて自然に雌として成熟することが明らかになった。しかし、ホルモン投与区ではどの組み合わせでも生殖腺指数の増大はみられず(表4)、組織学的にも成熟は進んでいなかった。ただし、5月20日のE22mg T2mg区と6月24日のE22mg T2mg LHRHa400μg区で各1個体、生殖腺が部分的に雄性化しているものがあった。

以上の結果より、ステロイド投与に加えてLHRHaを投与しても、未熟な雌のマハタを人工的に成熟させることはできなかった。投与したステロイドが体内に十分放出されているかどうか、またポジティブフィードバックが起こって脳下垂体中のGTH含量が増加しているかどうかを明らかにするためには、今後血中ステロイドホルモン量の測定および脳下垂体の組織像の観察を必要がある。E22mg T2mgを投与した区で部分的に精巢組織が発達している個体が見られたことは、雄において精原細胞の増殖にエストラジオール 17βが関与しているという最近の知見に関連して興味深い。次年度以降、雄の成熟促進に応用できるかどうか検討してみる価値がある。

本実験でホルモン処理しなかった個体が成熟し、飼育下でマハタは6歳(以上)、全長60cm、体重4kg前後で初めて自然に雌として成熟することが明らかになったことから、種苗生産用の雌親魚確保のためには、雄の場合のようにホルモン処理にたよらずとも、長期的な視野に立って計画的な親魚養成をおこなえば十分対応可能であると考えられる。

表4 E2, TとLHRHaを投与した韓国産マハタの生殖腺指数(mean±SE, n=5)

試験区	4月23日	5月20日	6月24日
Initial	0.122±0.022		
E:0mg T0mg		0.165±0.017	
LHRHa 0μg			1.591±0.812
LHRHa400μg			0.148±0.032
E:0mg T2mg		0.123±0.012	
LHRHa400μg			0.080±0.024
E:2mg T0mg		0.146±0.043	
LHRHa400μg			0.147±0.041
E:2mg T2mg		0.131±0.037	
LHRHa 0μg			0.130±0.027
LHRHa400μg			0.096±0.018

3. 採精, 採卵および人工受精試験

方 法

1) カニキュレーションによる成熟度調査

マハタ, クエ親魚についてカニキュレーション (内径1 mm×外径2 mmのポリエチレンチューブを生殖腔に注入し, 卵巣卵, 精子を採取) による成熟度調査をおこなった。

2) HCG (胎盤性性腺刺激ホルモン) 投与による人工受精試験

カニキュレーションによる成熟度調査の結果, 卵黄形成が確認 (卵径450 μ 以上) できた雌および排精が確認できた雄にHCGを魚体重1 kg当たり500IU背筋部に注射した。採卵および採精は陸上水槽で, 40時間以降朝夕の2回腹部圧搾によりおこなった。採精は採卵直前に1 m ℓ の注射器を用いて行い, 得られた精子はリングル液で約50倍に希釈した。受精は採卵直後に乾導法で行い, 媒精後, 30 ℓ パンライト水槽に収容してろ過海水を注水し, 浮上卵と沈下卵を分離した。卵数は2,200粒/m ℓ および2,000粒/gで換算した。

なお, 浮上卵はゴース製ネットを張った500 ℓ ポリエチレン水槽内に収容し, 自然水温, 微通気, 微流水で管理をおこなった。

3) PCRによるVNNウイルスの検出

ウイルス性神経壊死症 (VNN) 発症防止のため, マハタ, クエ親魚の精液, 卵巣卵および受精卵からのVNNウイルスの検出をPCRによりおこなった。検体は成熟度調査時に採取した精液と卵巣卵および人工受精試験時に採取した精液と受精卵を用いた。また韓国産マハタの生殖線および血液も用いた。検体からのRNAの抽出にはISOGENもしくはISOGEN LSを用い, PCRにはTakara RNAPCR Kit Ver. 2を試薬に用いた。PCRのサイクルは30サイクルでおこなった。

結果および考察

1) カニキュレーションによる成熟度調査

①マハタ親魚

陸上水槽群の5月10日の調査では, 一昨年度性転換させた雄4尾で排精が確認された。また自然に性転換した雄2尾が確認された。

雌は9尾中6尾で卵黄形成 (卵径350~781 μ) が確認されたが, 残りの3尾は周辺仁期の卵で未成熟な雌であった。

海面生簀群の5月10日の調査では, 雌は21尾中2尾で卵黄形成が確認された。5月24日の調査では, 新たに1

尾で卵黄形成が確認された。残りの18尾は周辺仁期の卵で, 未成熟な雌または不明魚であった。なお今年度成熟が確認された雌は9尾, 排精が確認された雄は6尾であった (表5)。

なお6月24日に試験用の韓国産マハタ (推定6歳以上) の一部で成熟した雌の個体 (全長55~63cm, 体重2.9~3.9kg) が初めて確認された。

表5 カニキュレーションによる成熟度調査結果

魚種	性別	尾数	全長 (cm)	体重 (kg)
マハタ	雄	6尾	73.2~80.4 cm	7.4~9.7 kg
	雌	9尾	60.2~82.6 cm	4.2~13.0 kg
クエ	雄	1尾	81.0 cm	8.9 kg
	雌	41尾	61.0~91.5 cm	4.5~15.1 kg

②クエ親魚

陸上水槽群の5月10日の調査では, 雌は5尾中5尾で卵黄形成 (卵径465~530 μ) が確認された。雄は昨年度自然に性転換した2尾とも排精が確認されず, うち1尾は卵黄形成が確認され, 雄から雌に性転換していた。残りの1尾はLHRHaの投与により, 5月24日の調査で少量の排精が確認された。

海面生簀群の5月11日の調査では, 卵黄形成が確認された雌は36尾 (卵径151~497 μ) であった。成熟した雌は大半が10kg以下の個体で, 大型魚は性別が不明のものが多かった。また雄は1尾も確認されず, 昨年度に性転換させた雄9尾は不明魚もしくは雄から雌に性転換していた。なお今年度成熟が確認された雌は41尾, 排精が確認された雄は1尾のみであった (表5)。

これまで一度性転換した雄は翌年以降も雄として機能するといわれていたが, 今年度の結果から飼育環境によっては再び雌に性転換することが明らかになった。今後は飼育環境の制御や雄化ホルモンの定期的な投与, 凍結精子の作成について検討し, 雄と精子の安定した確保を図る必要がある。

2) HCG 投与による人工受精試験

①マハタ人工受精試験

5月24日に陸上水槽の雄2尾, 雌6尾, 海面生簀の雌2尾にHCGを注射した。2日後に雄より精液を採取するとともに, 1尾毎の精子運動を確認した。

そして雌8尾中6尾より675.6万粒を採卵, 人工受精をおこなった。浮上卵は550.0万粒, 浮上卵率は81.4%であり, 卵管理水槽に収容した (水温19.1 $^{\circ}$ C)。翌日, 卵管理中の沈下卵を取り除き, 卵質の良い3尾からの浮上卵合計384.3万粒を50 t 水槽3面に収容した。ふ化は

翌日の午後3時には確認され、ふ化時間は約45時間であった。ふ化率は93.1%、93.9%、91.6%であった(表6)。

②クエ人工受精試験

5月31日に陸上水槽の雄1尾、雌5尾、海面生簀の雌5尾にHCGを注射した。2日後に雄より精液を採取するとともに、精子運動を確認した。

そして雌10尾全個体より350.0万粒を採卵、人工受精をおこなった。過熟卵および沈下卵の割合が多く浮上卵は150.0万粒、浮上卵率は42.0%であり、卵管理水槽に収容した(水温19.2℃)。翌日、卵管理中の沈下卵を取り除き、卵質の良い4尾からの浮上卵合計118.8万粒を50t水槽1面に収容した。ふ化は翌日の午後3時には確認され、ふ化時間は約45時間であった。ふ化率は84.0%であった(表6)。

表6 マハタ、クエ人工受精結果

魚種	人工受精日	雌	雄	総採卵数(万粒)	浮上卵数(万粒)
マハタ	5月25~28日	9尾	1尾	675.6	550.0
クエ	6月1~5日	9尾	1尾	350.0	150.0

3) PCRによるVNNウイルスの検出

ウイルス検査の結果を表7に示す。マハタ親魚では雄6尾中4尾、雌16尾中6尾が、クエ親魚では雄1尾中1尾、雌42尾中5尾がVNN陽性であった。受精卵についてはクエでは陽性の雄の精子を用いたために5検体中2検体が陽性であった。マハタでは雄、雌ともに陰性の親魚を用いて人工受精をおこなったにもかかわらず5検体中1検体が陽性であった。これは採卵作業時のハンドリングによるストレスにより、元々体内に存在し、検出限界以下であったウイルスが増殖して検出されたと推測される。今後は親魚になるべくストレスを与えず、体内のウイルスを増殖させないように採卵する必要がある。

また韓国産マハタの生殖線と血液からのVNNウイルスの検出をおこなった結果、全個体で生殖線と血液の両方からウイルスが検出された。この結果から血液を検体

表7 PCRによるVNNウイルス検査結果

魚種	検体	検査数	陽性数	陽性率
マハタ	親魚 精液	6	4	66.7%
	卵巣卵	16	6	37.5%
	受精卵 消毒前	5	1	20.0%
	消毒後	5	0	0.0%
クエ	親魚 精液	1	1	100.0%
	卵巣卵	41	5	12.2%
	受精卵 消毒前	5	2	40.0%
	消毒後	5	1	20.0%

としたウイルスの検出が可能であると考えられたので、来年度の親魚候補のマハタ、クエ親魚について血液を採取し、PCRをおこなった結果、全個体が陰性であった。

4. 種苗生産試験

方法

1) オキシダント海水による受精卵消毒試験

ウイルス性神経壊死症(VNN)発症防止のため、オゾンによる海水殺菌装置を作成し、残留オキシダント海水による受精卵消毒をおこなった。残留オキシダント濃度の測定はOトリジン法により、分光光度計でおこなった。

消毒方法は胚体形成期(受精後20~24時間)の受精卵を0.5ppmのオキシダント海水で60秒または45秒で2回消毒し、飼育水槽へ収容した。

2) マハタ、クエ無給餌生残試験(SAI)

卵質およびふ化仔魚の活力を把握するため、500mlピーカーによる無給餌生残試験をおこない、無給餌生残指数(SAI)を求めた。

3) マハタ仔魚飼育試験

人工受精試験の結果、受精卵が得られたため、仔魚飼育試験を3回実施した。収容は受精卵で尾鰭栽培漁業センターの50t水槽におこない、収容前にウイルス性疾病対策として、受精卵消毒(オキシダント海水0.5ppm, 60秒)をおこなった。飼育海水は、当初は止水で日齢3からUV海水を底面から注水した。飼育水温は熱交換器により25.0℃に加温した。通気は水槽内にエアストーンを6カ所設置して、水槽内に循環流がおきるようにし、流量計により通気量を受精卵収容からふ化および開口まで強通気、開口から弱通気とした。

餌料系列は、日齢3から9までの7日間はタイ国産SSワムシを給餌した。日齢10以降40までS型ワムシを給餌した。日齢24からはアルテミア、日齢33からは配合餌料を給餌した。ワムシおよびアルテミアは市販の栄養強化剤で二次強化をおこなった。

ナンノクロロプシス(以下ナンノと略す)の飼育水への添加は毎日50万cells/mlとなるように添加した。なお飼育環境の急変を避けるため、ナンノの添加は時間をかけておこなった。3槽のうち1槽にはナンノに替えて濃縮淡水クロレラ(100億cells/ml)を毎日1l添加した。また飼育水の水質安定をはかるため、貝化石をトン当たり10g、ナンノ海水に添加して散布した。底掃除は日齢50までおこなわなかった。

さらに飼育初期におこる浮上へい死を防止するため、

日齢0～30まで飼育水槽3槽中2槽にフィードオイル(以下オイルと略す)を1日2回4mℓずつ添加した。

4) クエ仔魚飼育試験

人工受精試験の結果、受精卵が得られたため、仔魚飼育試験を1回次実施した。収容は受精卵で尾鷲栽培漁業センターの50t水槽におこない、収容前にウイルス性疾病対策として、受精卵消毒(オキシダント海水0.5ppm, 45秒×2回)をおこなった。

飼育海水は、当初は止水で日齢3からUV海水を底面から注水した。飼育水温は熱交換器により26.0℃に加熱した。通気は水槽内にエアストーンを6カ所設置し水槽内に循環流がおきるようにし、流量計により通気量を受精卵収容からふ化および開口まで強通気、開口から弱通気とした。

餌料系列は、日齢3から6までの4日間はタイ国産SSワムシを給餌した。日齢7以降28までS型ワムシを給餌した。日齢19からはアルテミア、日齢25からは配合飼料を給餌した。ワムシおよびアルテミアは市販の栄養強化剤で二次強化をおこなった。

ナンノクロロプシス(以下ナンノと略す)の飼育水への添加は毎日50万cells/mℓとなるように添加した。なお飼育環境の急変を避けるため、ナンノの添加は時間をかけておこなった。また飼育水の水質安定をはかるため、貝化石をトン当たり10g, ナンノ海水に添加して散布した。底掃除は日齢45までおこなわなかった。

さらに飼育初期におこる浮上へい死を防止するため、日齢0～24まで飼育水槽にフィードオイルを1日2回4mℓずつ添加した。

5) 軟X線写真撮影

生産したマハタ, クエ稚魚の開鰓および奇形を確認するため、日齢60の取り上げ時にマハタ3槽, クエ1槽から50尾ずつサンプリングし、ソフトテックスによる撮影をおこない、開鰓および奇形の有無を観察した。

6) マハタ稚魚二次飼育試験

仔魚飼育試験の結果、取り上げた約36,000尾の稚魚(平均全長4.5cm, 平均体重2.0g)は選別後、50t水槽4面で二次飼育をおこなった。飼育海水はUV海水を使用し、注水量は4～7回転/日とした。底掃除は自動底掃除機で1日2回おこなった。餌料は配合飼料のみを使用し、マダイ用EPを給餌した。

7) クエ稚魚二次飼育試験

仔魚飼育試験の結果、取り上げた約47,000尾の稚魚(平均全長4.0cm, 平均体重1.0g)は選別後、50t水槽2面, 3t水槽1面で二次飼育をおこなった。飼育海水は

50t水槽はUV海水, 3t水槽はろ過海水を使用し、注水量は4～5回転/日とした。底掃除は50t水槽は自動底掃除機で1日2回, 3t水槽は手動で1日1回おこなった。餌料は配合飼料(マダイ用EP), マダイ凍結卵, 冷凍イカナゴを給餌した。

結果および考察

1) オキシダント海水による受精卵消毒試験

卵消毒とふ化率, 未ふ化率, SAIの関係について、表8に示した。消毒の影響により、卵膜が硬く変成し、発生が進んでいるにもかかわらずふ化できない未ふ化卵の出現率は、生産に使用した卵では、マハタでは3.1～3.8%, クエでは13.9～24.0%であった。未ふ化卵の発生率はふ化率やSAIが低いほど高い傾向がみられ、卵質の影響が示唆された。

表8 オキシダント海水による受精卵消毒試験

魚種	オキシダント濃度		消毒時間 (秒)	ふ化率 (%)	未ふ化率 (%)	SAI	備考
	初発(mg/L)	最終(mg/L)					
マハタ	0.57	0.53	60	93.9	3.1	41.7	生産に使用
"	0.51	0.48	60	93.9	3.4	44.6	"
"	0.55	0.49	60	91.6	3.8	12.2	"
"	0.55	0.49	60	97.1	1.4	47.9	試験用配布
"	0.55	0.50	60	52.4	11.6	5.6	"
"	0.55	0.50	60	45.0	7.7	24.4	廃棄
"	0.55	0.50	60	9.0	44.4	4.4	"
"	0.55	0.50	60	21.5	51.3	3.6	"
クエ	0.56	0.51	90	76.0	24.0	20.0	生産に使用
"	0.56	0.51	90	85.3	14.2	13.8	"
"	0.52	0.51	90	71.7	18.0	13.6	"
"	0.52	0.51	90	78.6	13.9	19.4	"

2) マハタ仔魚飼育試験

① 1回次(ナンノ添加+オイル無添加区)

ふ化は受精卵収容翌日の午後であった。ふ化仔魚の全長は1.5～1.6mmであった。日齢2では開口が確認できず、日齢3で開口が確認できた。日齢3の午後からSSワムシを10個/mℓとなるように給餌し、日齢5でのワムシ摂餌率は95.0%であった。そして日齢10で3.3mmとなり、開鰓率85.7%, 生残率23.0%となった。日齢15で4.0mmとなり、棘の伸長が確認された。日齢24からアルテミアを給餌し、日齢25での摂餌率は66.7%であった。日齢30で8.3mmに成長した。配合飼料の摂餌が確認されたのは日齢38であった。そして日齢40以降(全長17.5mm～)大型魚が小型魚を攻撃し、共喰いが認められるようになった。日齢45で変態が完了した個体のみられ、配合飼料を活発に摂餌するようになった。

そして日齢60で約1.4万尾の稚魚を取り上げ、飼育試験を終了した。ふ化仔魚からの生残率は0.94%, 日齢10

からの生残率は4.1%であった。

② 2回次（ナンノ添加+オイル添加区）

ふ化は受精卵収容翌日の夜であった。ふ化仔魚の全長は1.5~1.6mmであった。日齢2では開口が確認できず、日齢3で開口が確認できた。日齢3の午後からSSワムシを10個/mℓとなるように給餌し、日齢5でのワムシ摂餌率は80.0%であった。そして日齢10で3.5mmとなり、開鰓率77.0%、生残率56.9%となった。日齢15で4.0mmとなり、棘の伸長が確認された。日齢24からアルテミアを給餌し、25での摂餌率は91.7%であった。この頃から表層にパッチを形成するようになった。日齢30で7.0mmに成長した。配合飼料の摂餌が確認されたのは日齢38であった。そして日齢40以降（全長13.3mm~）大型魚が小型魚を攻撃し、共喰いが認められるようになった。日齢45で変態が完了した個体がみられ、配合飼料を活発に摂餌するようになった。この頃から小型魚が水面で立ち泳ぎするのが多くみられるようになった。PCRでウイルス検査したところ陰性であり、また立ち泳ぎ個体を小型水槽に移して飼育したところこの現象がおさまったため、餌料不足または大型魚の干渉が原因と考えられる。今後は飼育中期以降の飼育密度および餌料密度について検討する必要がある。

そして日齢60で約1.9万尾の稚魚を取り上げ、飼育試験を終了した。ふ化仔魚からの生残率は1.36%、日齢10からの生残率は2.4%であった。

③ 3回次（淡水クロレラ+オイル添加区）

ふ化は受精卵収容翌日の午後であった。ふ化仔魚の全長は1.5~1.6mmであった。日齢2では開口が確認できず、日齢3で開口が確認できた。日齢3の午後からSSワムシを10個/mℓとなるように給餌し、日齢5でのワムシ摂餌率は90.9%であった。そして日齢10で3.4mmとなり、開鰓率86.4%、生残率20.9%となった。日齢15で3.9mmとなり、棘の伸長が確認された。日齢26からアルテミアを給餌した。この頃から表層にパッチを形成するようになった。日齢30で8.9mmに成長した。配合飼料の摂餌が確認されたのは日齢40であった。そして日齢40以降（全長13.6mm~）大型魚が小型魚を攻撃し、共喰いが認められるようになった。日齢45で変態が完了した個体がみられ、配合飼料を活発に摂餌するようになった。この頃から2回次と同様小型魚が水面で立ち泳ぎするのが多くみられるようになった。

そして日齢60で約0.3万尾の稚魚を取り上げ、飼育試験を終了した。ふ化仔魚からの生残率は0.43%、日齢10からの生残率は2.1%であった。

7月末に1回次から3回次の合計で約36,000尾の稚魚（日齢60、平均全長45mm）を取り上げることができた（図3、表9、写真1）。

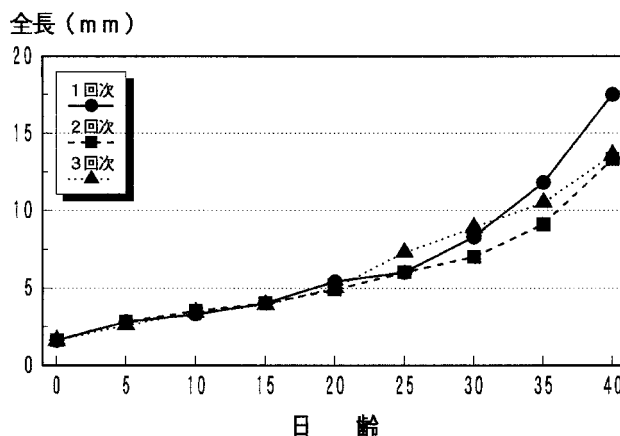


図3 マハタ仔稚魚の成長

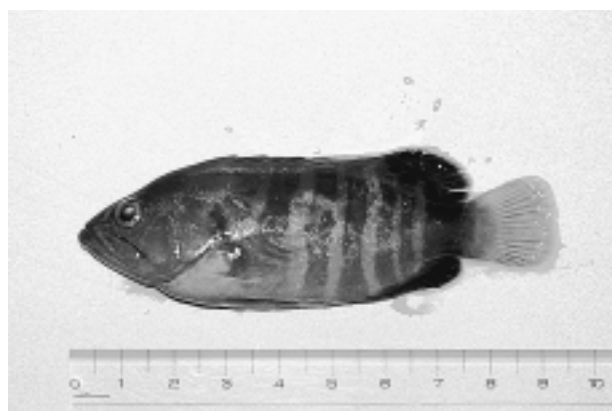


写真1 マハタ稚魚、日令80、全長90mm

表9 クエ、マハタ種苗生産結果(日齢60での取りあげ時)

試験区	人工受精日	受精卵収容数	ふ化率	全長	生残尾数	生残率	
クエ	6月3日	1,188,000粒	84.0%	3.5cm	4万7千尾	4.71%	
マハタ	ナンノ	5月26日	1,598,000粒	93.1%	5.0cm	1万4千尾	0.94%
	オイル+ナンノ	5月26日	1,483,000粒	93.9%	4.5cm	1万9千尾	1.36%
	オイル+クロレラ	5月29日	762,000粒	91.6%	4.0cm	3千尾	0.43%
合計					3万6千尾	0.91%	

3) クエ仔魚飼育試験

ふ化は受精卵収容翌日の午前であった。ふ化仔魚の全長は1.9~2.2mmであった。日齢3で開口が確認できた。日齢3の午後からSSワムシを10個/mℓとなるように給餌し、日齢5でのワムシ摂餌率は100%であった。そして日齢10で4.6mmとなり、棘の伸長が確認された。日齢20で8.0mmとなり、アルテミアの摂餌が確認され

た。日齢30で14.2mmに成長した。配合飼料の摂餌が確認されたのは日齢35であった。日齢37からサイフォンにより、分槽をおこなったが遊泳力が強く、9日間で約1/4しか分槽することができなかった。今後は早期の分槽を検討する必要がある。日齢42で変態が完了した個体がみられ、配合飼料を摂餌する個体が増加した。日齢45以降共喰いによる減耗が大きくなった。

そして日齢60で2水槽で計約4.7万尾の稚魚を取り上げ、飼育試験を終了した。ふ化仔魚からの生残率は4.71%、日齢10からの生残率は15.9%であった(図4、表9、写真2)。

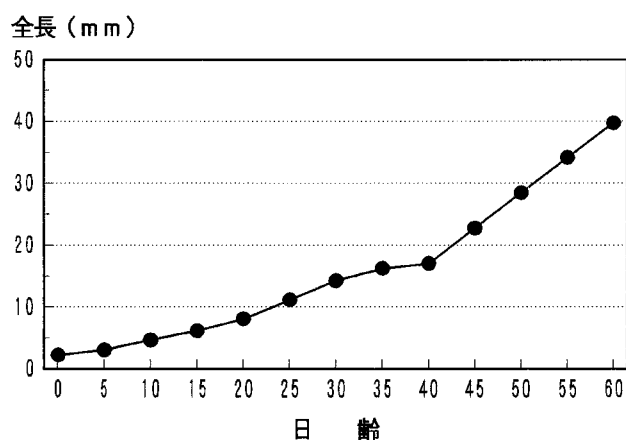


図4 クエ仔稚魚の成長



写真2 クエ稚魚、日令65、全長65mm

4) マハタ、クエ無給餌生残試験 (SAI)

試験結果は、表10に示した。マハタ仔魚のSAIは3.6~44.6で、生産に使用した仔魚のSAIはこれまでで最も高い値であった。またクエ仔魚のSAIも13.6~20.0で、昨年度のような10以下の値はみられなかった。これは今年度から採卵用の親魚を小型水槽に収容して、排卵状態

を観察し、過熟にならない時点で採卵をおこなったこと、採卵を全て屋内でおこない、卵のハンドリングに注意したためと考えられる。

表10 マハタ、クエふ化仔魚のSAI

魚種	標本数	最小	最大	平均	標準偏差
マハタ	16	3.6	44.6	23.1	18.0
クエ	8	13.6	20.0	16.7	3.0

5) 軟X線写真撮影

マハタは各試験区とも開鰓率は100.0%であり、オイル添加の影響は認められなかった。また脊椎骨異常は5.0%以下であった。クエは外観上の奇形は認められなかったが、開鰓率は48.0%と低かった。オイルを添加しなかった昨年度は奇形が多かったものの、開鰓率が87.7%であった。クエの開鰓率の低さはオイルを添加した他の種苗生産機関でも確認されており、クエについてはオイルの添加量および添加時期について検討する必要がある。

6) マハタ稚魚二次飼育試験

飼育期間は7月末から10月下旬の約90日間であった。選別直後にも共喰いによる減耗がみられたが、クエほど激しくはなかった。9月20日に分槽した1槽で横転魚がみられるようになり、PCRの結果、VNNと診断されたので処分した(へい死率 156尾/3,150尾=4.95%)。また10月5日にもう1槽で横転魚がみられるようになり、PCRの結果、VNNと診断されたので処分した(へい死率20尾/10,273尾=0.19%)。残りの2槽の魚についてもPCRをおこなったが、検査個体全てが陰性であり、試験終了時まで横転魚やへい死魚は1尾も認められなかった。

試験終了時には約17,000尾(日齢140、全長8.8~13.4cm、体重25~84g)の稚魚を取り上げるに留まった。全体の生残率は47.2%、VNNによる処分を除いた生残率は87.1%であった。

来年度以降は、二次飼育期のウイルス性疾病の発症防止をはかるため、今年度整備したオゾン殺菌海水を飼育海水に使用するとともに、飼育環境や餌料の栄養強化について検討する必要がある。

7) クエ稚魚二次飼育試験

飼育期間は8月上旬から9月初めの約30日間であった。選別直後にも共喰いによる減耗が多くみられた。8月26日に1槽から約18,000尾を近畿大学との共同研究用に分配した。配布までの生残率は78.1%であった。8月30日に残りの1槽で横転魚がみられるようになり、PCRの

結果、VNNと診断されたので9月1日に処分した（へい死率98尾/15,300尾=0.64%）。VNNによる処分を除いた生残率は71.1%であった。

クエについてもマハタ同様、二次飼育期のウイルス性疾病の発症防止策をとるとともに、共喰いによる減耗防止をはかる必要がある。

5. 餌料生物培養試験

方法

1) タイ国産SSワムシ培養試験

開口後約10日までのマハタ、クエ仔魚の初期餌料として、タイ国原産ワムシ（以下SSワムシとする）の培養をおこなった。培養はバッチ方式（3日バッチ）でおこない、移植は500個体/mlとなるようにおこなった。培養条件は80%海水、設定水温30℃とした。SSワムシの餌料は濃縮淡水クロレラを用い、毎日午前、午後の2回給餌をおこなった。給餌量はワムシ1億個体に対し、午前は200ml、午後は250mlとした。なお、給餌前には水温の測定およびワムシ密度の計数をおこなった。種苗生産期外の種の保持には100ℓアルテミアふ化水槽3槽を用いて培養し、種苗生産期には500ℓアルテミアふ化水槽8槽に拡大して培養をおこなった。

2) DHA強化濃縮淡水クロレラによるSSワムシ培養試験

種苗生産試験時のワムシ二次培養省力化のため、DHA強化された濃縮淡水クロレラによる培養試験をおこない、対照区（無強化濃縮淡水クロレラ）との比較をおこなった。

3) オゾン殺菌海水によるSSワムシ培養試験

ウイルス性疾病対策の一環として、今年度整備されたオゾン殺菌海水による培養試験をおこない、対照区（ろ過海水）との比較をおこなった。

結果および考察

1) タイ国産SSワムシ培養試験

生産期の培養結果について表11に示した。1日の平均収穫数は35.3億、収穫率は45.5%であり、今年度のSSワムシの需要量は十分に生産することができた。また二次培養中の減耗率は平均で128.5%と減耗はみられず、ワムシ1億当たりの餌料費は397.1円とS型ワムシの632.6円と比較して安価に生産することができた。

SSワムシの培養を8槽でおこなうと、1日に2水槽からの収穫が可能であり、午前、午後の1回の給餌分として、1水槽から出すことができ収穫しやすい。しか

し水槽数が多いことにより、計数等の作業量も多くなった。また今後、マハタおよびクエ仔魚のSSワムシ給餌期が重なった場合には、SSワムシの需要も増加する。よって、今後作業量を増やさずに生産量を増やすため、さらに培養方法を改善していく必要がある。

表11 SSワムシ培養結果

	総数(億)	収穫数(億)	収穫率(%)	給餌量(L)	餌料費	餌料費/億	二次減耗率
最小	67.5	24.0	34.7	18.1	¥15,221	¥400.2	81.0%
最大	98.4	43.6	54.8	26.9	¥22,630	¥770.0	165.0%
平均	77.5	35.3	45.5	20.9	¥17,595	¥510.3	128.5%

2) DHA強化濃縮淡水クロレラによるSSワムシ培養試験

試験区および対照区の培養日数毎の密度と抱卵率について表12に示した。試験区で3日目の抱卵率がやや低下する傾向がみられるものの大きな差は認められず、強化クロレラでSSワムシが充分培養できることが明らかになった。今後は強化クロレラで培養したSSワムシの分析をおこない、必要量の栄養強化がされているかどうか把握する必要がある。

表12 DHA強化濃縮淡水クロレラによるSSワムシ培養結果

	DHA強化濃縮淡水クロレラ区						濃縮淡水クロレラ区					
	密度(cells/ml)			抱卵率(%)			密度(cells/ml)			抱卵率(%)		
	1日	2日	3日	1日	2日	3日	1日	2日	3日	1日	2日	3日
最小	960	940	1,570	8.7	21.1	14.8	820	1,100	1,370	9.4	8.8	40.6
最大	1,580	2,950	3,170	34.4	56.4	53.0	1,710	2,770	3,550	32.0	55.0	67.2
平均	1,245	1,740	2,410	19.8	34.8	30.9	1,258	1,891	2,410	21.1	32.8	50.7

3) オゾン殺菌海水によるSSワムシ培養試験

試験区および対照区の培養日数毎の密度と抱卵率について表13に示した。試験区と対照区では差は認められず、オゾン殺菌海水でSSワムシが充分培養できることが明らかになった。今後はSSワムシの培養はオゾン殺菌海水のみを使用し、生物餌料からのウイルス性病原ウイルスの混入を防止したい。

表13 オゾン殺菌海水によるSSワムシ培養結果

	オゾン殺菌海水区						ろ過海水区					
	密度(cells/ml)			抱卵率(%)			密度(cells/ml)			抱卵率(%)		
	1日	2日	3日	1日	2日	3日	1日	2日	3日	1日	2日	3日
最小	570	1,200	1,560	11.0	18.3	30.3	490	860	1,560	11.1	17.5	27.2
最大	1,610	2,560	3,710	64.9	76.6	52.7	1,900	3,410	3,930	50.8	54.8	93.6
平均	1,122	1,784	2,543	26.9	37.0	40.9	1,018	1,868	2,892	29.9	34.5	45.1