

で供給した。なお、両試験区ともに、通気で発生する飼育水の流場が脊椎骨屈曲の出現に及ぼす影響を極力排除し、給餌量の影響を明確に把握するため、注水および通気による強水流の発生防止を目的に海水は各飼育水槽の側壁に沿って落水させ、2個の半球状の通気装置（通気および酸素）を側壁沿いの底層に設置した（Fig. IV-1a）。通気と酸素は、それぞれ0.5 l/分および0.2~0.3 l/分以下で維持した。水温は自然水温とした（23.3~26.2℃）。蛍光照明は7:00から18:00までとし（13時間明期/11時間暗期）、水面上の照度は200 luxに維持した。市販飼料（ノヴァ Jr.AおよびJr.1, 林兼産業, 山口）は、8月28日（99日令）から10月3日（135日令）まで給餌した。日間給餌率（%体重/日=給餌量/（平均体重×生残尾数）×100）は、2%体重/日（A試験区）および6%体重/日（B試験区）とした。一日の給餌頻度は、A試験区（日間給餌率2%/回）で1回（08:30）、B試験区（日間給餌率1.2%/回）で5回（08:30, 10:30, 12:30, 14:30および16:30）とした。

試験2：飼育水の水流（通気量）の影響

飼育水の通気方法で異なる流動が、稚魚期における脊椎骨屈曲の出現に及ぼす影響を検討するため、試験2では、3種類の異なる条件、第1に低速水流（B試験区；流速8.9 cm/秒）、第2に中速水流（C試験区；流速23.4 cm

/秒）、第3に高速水流（D試験区；流速45.6 cm/秒）で稚魚の飼育を行った。一般的な飼育方法は試験1と同様であり、異なる点を以下に記す。試験2のB試験区は、試験1のB試験区と同一である。C試験区およびD試験区では、より強い水平方向の回転流を発生させるため、注水口に hidrojet（噴射）方式を採用した（Fig. IV-1b）。注水口を水面上に設置し、水面に対して斜めに注水するように方向付けた。さらに、底部に通気装置を取り付けた2個の小型樋（長さ80 cm, 幅3.0 cm, 深さ2.5 cm；エアリフト）を両側の側壁の対角線上に設置した（Fig. IV-1b）。通気は、C試験区およびD試験区でそれぞれ一か所につき1.5 l/分および5.0 l/分に維持し、酸素は、0.2~0.3 l/分に維持した。これらの飼育方法で水平方向の強い回転流を発生させた。各試験区の日間給餌率は6%で、一日の給餌頻度は5回とした（日間給餌率1.2%/回）。

c) 飼育環境

試験1および2の飼育環境をTable IV-1に示す。飼育水温および塩分は、概ね24.7℃および32.9 g/lに維持された。また、溶存酸素濃度は、試験期間を通して平均7.5 mg/l以上に維持されており、試験期間中の飼育条件は適切であった。

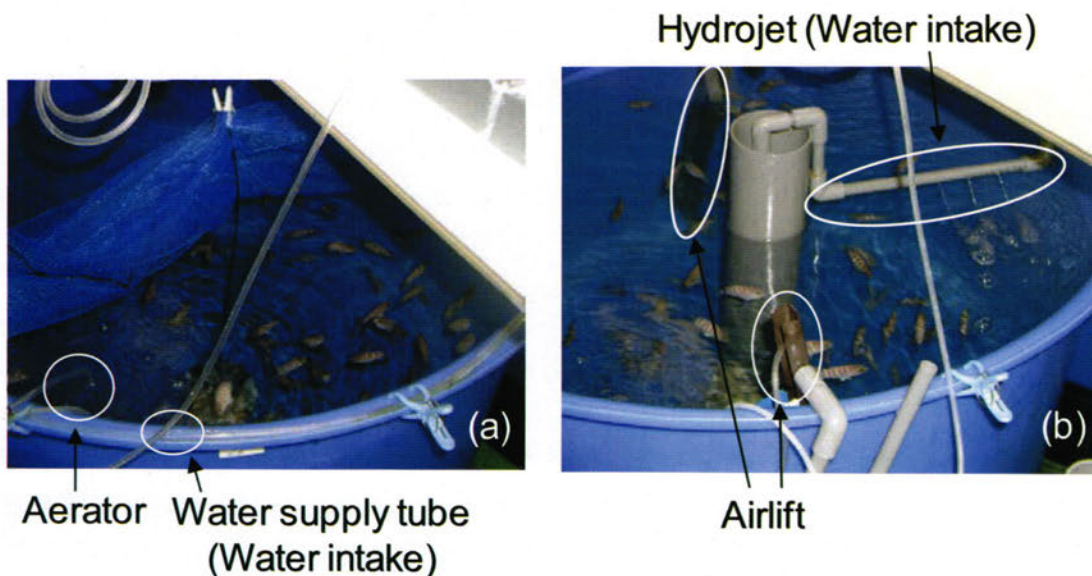


Fig.IV-1. Rearing tank used in the experiment. (a) Experimental group A and B, and (b) Experimental group C and D.

Table IV-1. Culture conditions for the seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* juveniles reared in Experiment 1 and 2

Treatment (Experimental group)	Water temperature (°C)	Salinity (g L ⁻¹)	DO (mg L ⁻¹)
Experiment 1			
Small amount feeding (A)	24.67 ± 0.75	32.93 ± 0.16	9.03 ± 1.70
Large amount feeding (B)	24.67 ± 0.75	32.93 ± 0.18	8.15 ± 2.44
Experiment 2			
Low current velocity (B)	24.67 ± 0.75	32.93 ± 0.18	8.15 ± 2.44
Middle current velocity (C)	24.67 ± 0.76	32.92 ± 0.17	7.62 ± 1.59
High current velocity (D)	24.65 ± 0.74	32.90 ± 0.21	7.52 ± 1.30

All values are presented as the mean ± standard deviation in each experimental group. The mean values were calculated by measurements values from 98 to 135 days after hatching in Experiment 1 and 2.

d) 標本採集と鰾の開腔の観察および骨異常の評価

試験開始時に無作為に取り上げた稚魚は、エチレンジリコールモノフェニルエーテル（和光純薬工業，大阪）を用いて0.3~0.4 ml/lの濃度で3分間の麻酔を行い，全長，体長および体重を測定した（Tables IV-2, IV-3）。その後，これらの標本は直ちに鰾の開腔率の調査および軟X線写真調査による骨異常の評価に使用した。日間給餌率を調査するため，中間測定時（120日令）に各水槽から無作為に抽出した5尾の稚魚を採集し，麻酔した標本は直ちに体重の測定に使用した（Tables IV-2, IV-3）。採集した魚は，測定後に各水槽に戻し，測定に関連した死亡魚は確認されなかった。また，試験終了時に全ての水槽で生残した稚魚数を計数して生残率を求めた。一水槽につき52~54尾を採集し，全長，体長および体重を測

定後，これら全ての標本は，Koumoundouros et al. (2000) の方法に従い，-21°Cから-20°Cで直ちに凍結保存し，後日軟X線調査による骨異常および鰾の開腔率の評価に使用した。肥満度（体重/体長³ × 10³）は，これらの測定値を用いて計算した。

標本の形態異常は，脊椎骨屈曲の前彎症および後彎症の2種類に分類した（第III章第3節）。脊椎骨屈曲の程度は，既報（Chatain 1994）を参考に，屈曲点と隣接する前方の椎体（あるいは一つ隣の椎体）の中心を繋げた第1直線および屈曲点と隣接する後方の椎体（あるいは一つ隣の椎体）の中心を繋げた第2直線の間の角度（α ≤ 180°）で示した（Fig. IV-2）。角度は，フリーソフトウェア "Image J"（Rasband 1997-2011）を用いて軟X線デジタル画像上で測定した。本研究では，16尾の天然

Table IV-2. Total length, body length, body weight, survival rates, frequency of swim bladder inflation, condition factor and daily feeding rate at the commencement (at 98 days after hatching), at intermediate measurement (120 days after hatching) and at the end (at 136 days after hatching) of the experiment 1

Timing (Days after hatching)	Treatment (Experimental group)	n	Total length (mm)	Body length (mm)	Body weight (g)	Survival rate (%)	Frequency of swim bladder inflation (%)	Condition factor	Daily feeding rate (%)
At the commencement of the experiment (98)	—	52	71.52±9.86 ^c	60.15±8.29 ^c	6.20±2.61 ^c	—	44.2 ^c	26.77±1.59 ^c	—
At the intermediate measurement (120)	Small amount feeding (A)	10	—	—	8.95±2.13 ^c	96.0 ^b	—	—	1.40±0.08 ^b
	Large amount feeding (B)	10	—	—	13.51±2.94 ^b	99.5 ^a	—	—	2.75±0.01 ^a
At the end of the experiment (136)	Small amount feeding (A)	106	93.08±8.29 ^b	78.28±6.97 ^b	13.93±4.15 ^b	87.0 ^b	88.7 ^a	28.27±1.70 ^b	1.45±0.11 ^b
	Large amount feeding (B)	105	107.43±9.82 ^a	90.35±8.26 ^a	25.75±8.42 ^a	98.0 ^a	72.4 ^b	33.62±3.13 ^a	3.19±0.09 ^a

Total length, body length, body weight, condition factor and daily feeding rate are presented as the mean ± standard deviation in each experimental group. When the data were measured at the commencement of experiment in each measurement item, statistical test was performed to establish differences in the data obtained on each sampling day. On the other hand, when the data were not measured at the commencement of experiment, statistical test was performed to establish differences in the data obtained in the both experimental groups on each sampling day. Different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

Table IV-3. Total length, body length, body weight, survival rates, frequency of swim bladder inflation, condition factor and daily feeding rate at the commencement (at 98 days after hatching), at intermediate measurement (120 days after hatching) and at the end (at 136 days after hatching) of the experiment 2

Timing (Days after hatching)	Treatment (Experimental group)	n	Total length (mm)	Body length (mm)	Body weight (g)	Survival rate (%)	Frequency of swim bladder inflation (%)	Condition factor	Daily feeding rate (%)
At the commencement of the experiment (98)	—	52	71.52±9.86 ^b	60.15±8.29 ^b	6.20±2.61 ^c	—	44.2 ^c	26.77±1.59 ^b	—
At the intermediate measurement (120)	Low current velocity (B)	10	—	—	13.51±2.94 ^b	99.5	—	—	2.75±0.01 ^a
	Middle current velocity (C)	10	—	—	14.37±4.73 ^b	100.0	—	—	2.58±0.16 ^a
	High current velocity (D)	10	—	—	17.75±5.38 ^b	99.0	—	—	2.11±0.07 ^b
At the end of the experiment (136)	Low current velocity (B)	105	107.43±9.82 ^a	90.35±8.26 ^a	25.75±8.42 ^a	98.0	72.4 ^b	33.62±3.13 ^a	3.19±0.09 ^b
	Middle current velocity (C)	104	106.34±7.90 ^a	89.43±6.64 ^a	24.48±6.77 ^a	100.0	87.5 ^a	33.41±2.96 ^a	3.28±0.25 ^b
	High current velocity (D)	104	106.67±7.51 ^a	89.71±6.32 ^a	25.29±6.46 ^a	98.5	86.5 ^a	34.25±2.44 ^a	4.24±0.09 ^a

Total length, body length, body weight, condition factor and daily feeding rate are presented as the mean ± standard deviation in each experimental group. When the data were measured at the commencement of experiment in each measurement item, statistical test was performed to establish differences in the data obtained on each sampling day. On the other hand, when the data were not measured at the commencement of experiment, statistical test was performed to establish differences in the data obtained in the three experimental groups on each sampling day. Different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

標本(全長約25 cm)を標準標本とし(Fig. IV-3),人工種苗における脊椎骨屈曲の基準は,天然標本における脊椎骨の最大屈曲角度に従い設定した。天然標本では,第1~4椎体はほぼ直線状に分布し,これらの屈曲角度は $177.1 \pm 1.4^\circ$ (16尾平均)であり, 175° 以下の最大屈曲角度を伴う個体は確認されなかった。一方,第5~24椎体は緩やかに湾曲しており,これらの屈曲角度は $172.7 \pm 1.6^\circ$ であり(16尾平均), 170° 以下の最大屈曲角度を伴う個体は確認されなかった。したがって,第1~4椎体およ

びその他椎体では,それぞれ 175° 以下および 170° 以下の最大屈曲角度を脊椎骨屈曲と定義した。前彎症(Fig. IV-4a)および後彎症(Fig. IV-4b)の頻度は,各試験区の試験開始時および試験終了時に比較した。試験開始時および試験終了時における標本の最大屈曲角度は, 135° から 180° まで 5° 間隔で9段階に分類した。各角度帯での標本の脊椎骨屈曲の頻度(%)は,全標本数(試験開始時:n=52,試験終了時:n=104~106)に対する当該標本数の割合で計算した(Tables IV-4, IV-5, IV-6, IV-7)。

鰈が開腔あるいは未開腔の標本において、前彎症あるいは後彎症の脊椎骨の頻度分布を各試験区の試験開始時および試験終了時に比較した (Fig. IV-5)。前彎症と後

彎症を伴う脊椎骨を特定し、各形態異常の椎体を数えた。頻度(%)は、各試験区の各形態異常の椎体の総数を標本数で除算して計算した。

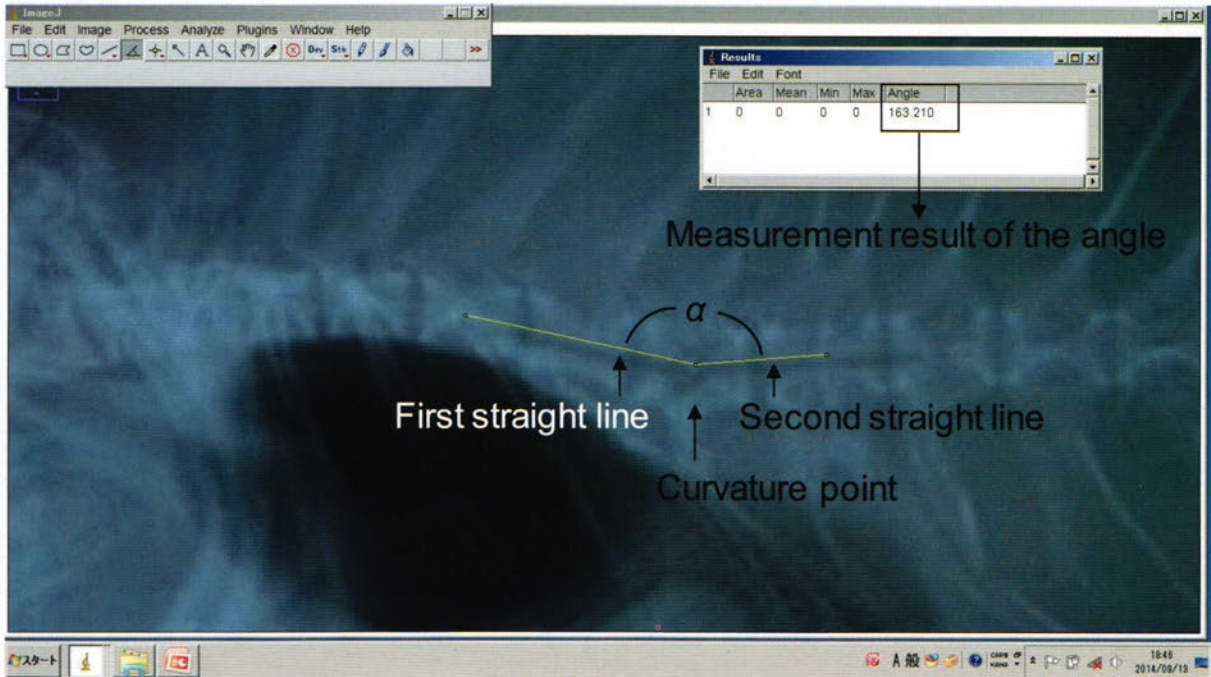


Fig.IV-2. Measurement of the bending vertebral angle in seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* juveniles using free software "ImageJ".

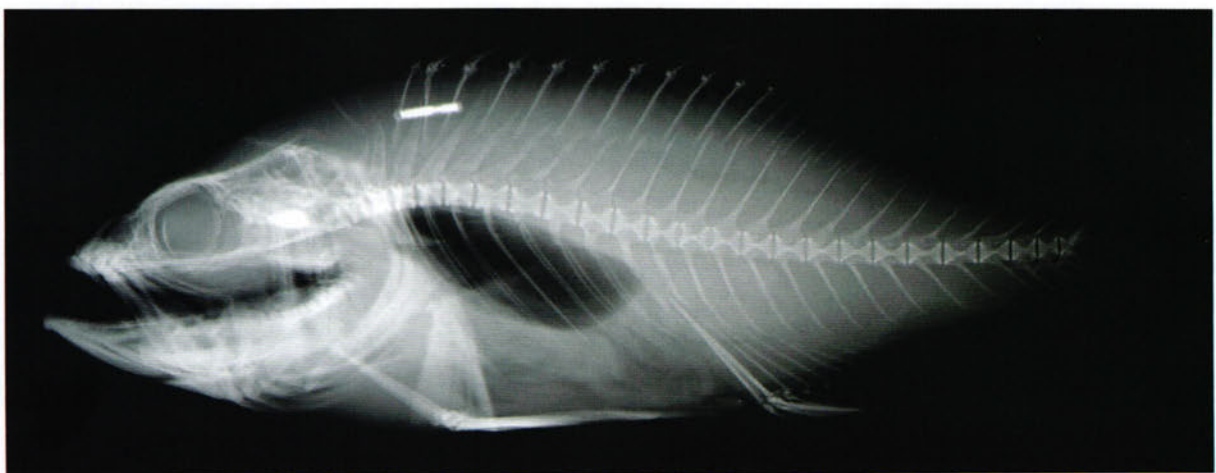


Fig.IV-3. Soft X-ray image of a wild seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* (23.8 cm Total length). Wild seven-band groupers were collected in Gokasyo Bay (Mie Prefecture) in March 2009 and reared in tanks where they were fed commercial artificial artificial diets, The rearing experiment was continued until they reached a total length of 24.8 ± 2.2 cm.

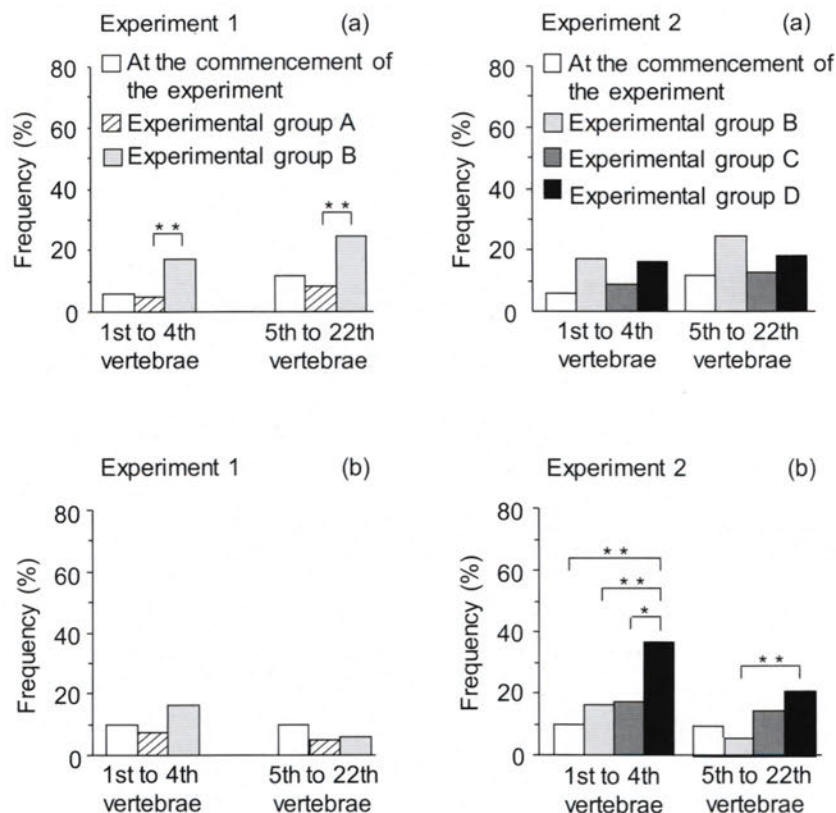


Fig.IV-4. Frequency of lordosis and kyphosis at the commencement (on 98 days after hatching) and at the end (on 136 days after hatching) of the experiment in Experiment 1 and 2. (a) Lordosis. (b) Kyphosis. Double asterisk: Significant difference between the two groups at $P < 0.01$. Single asterisk: Significant difference between the two groups at $P < 0.05$.

Table IV-4. Maximum bending angle from the 1st to 4th caudad numbered vertebra at the commencement (at 98 days after hatching) and at the end (at 136 days after hatching) of the experiment 1

Timing (Days after hatching)	Treatment (Experimental group)	Angle								Total % (n)	
		180-175° % (n)	175-170° % (n)	170-165° % (n)	165-160° % (n)	160-155°* % (n)	155-150° % (n)	150-145° % (n)	145-140° % (n)		140-135° % (n)
At the commencement of the experiment (98)	—	84.6 (44) ^{ab}	3.8 (2)	9.6 (5)	1.9 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (52)
At the end of the experiment (136)	Small amount feeding (A)	87.7 (93) ^a	2.8 (3)	5.7 (6)	2.8 (3)	0 (0)	0.9 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (106)
	Large amount feeding (B)	71.4 (75) ^b	9.5 (10)	9.5 (10)	3.8 (4)	3.8 (4)	1.9 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (105)

*Indicates that, at 160-155 degrees, the main effect of amount of feeding formula feed (difference in amount of feeding formula feed) on the maximum bending angle statistically significant by the G-test ($P < 0.05$), but not statistically significant different by the Ryan's multiple range test among experimental groups. Different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

Table IV-5. Maximum bending angle from the 5th to 22th caudad numbered vertebra at the commencement (at 98 days after hatching) and at the end (at 136 days after hatching) of the experiment 1

Timing (Days after hatching)	Treatment (Experimental group)	Angle									
		180-175° % (n)	175-170° % (n)	170-165° % (n)	165-160° % (n)	160-155° % (n)	155-150° % (n)	150-145° % (n)	145-140° % (n)	140-135° % (n)	Total % (n)
At the commencement of the experiment (98)	—	63.5 (33) ^{ab}	26.9 (14)	1.9 (1) ^b	5.8 (3)	1.9 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (52)
At the end of the experiment (136)	Small amount feeding (A)	65.1 (69) ^a	25.5 (27)	3.8 (4) ^b	2.8 (3)	1.9 (2)	0.9 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (106)
	Large amount feeding (B)	46.7 (49) ^b	27.6 (29)	16.2 (17) ^a	3.8 (4)	1.9 (2)	1.9 (2)	1.0 (1)	0 (0)	1.0 (1)	100 (105)

Different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

Table IV-6. Maximum bending angle from the 1st to 4th caudad numbered vertebra at the commencement (at 98 days after hatching) and at the end (at 136 days after hatching) of the experiment 2

Timing (Days after hatching)	Treatment (Experimental group)	Angle									
		180-175° % (n)	175-170° % (n)	170-165° % (n)	165-160° % (n)	160-155° % (n)	155-150° % (n)	150-145° % (n)	145-140° % (n)	140-135° % (n)	Total % (n)
At the commencement of the experiment (98)	—	84.6 (44) ^a	3.8 (2)	9.6 (5) ^b	1.9 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (52)
At the end of the experiment (136)	Low current velocity (B)	71.4 (75) ^a	9.5 (10)	9.5 (10) ^b	3.8 (4)	3.8 (4)	1.9 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (105)
	Middle current velocity (C)	77.9 (81) ^a	5.8 (6)	8.7 (9) ^b	5.8 (6)	1.0 (1)	1.0 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (104)
	High current velocity (D)	51.0 (53) ^b	14.4 (15)	25.0 (26) ^a	6.7 (7)	2.9 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (104)

Different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

Table IV-7. Maximum bending angle from the 5th to 22th caudad numbered vertebra at the commencement (at 98 days after hatching) and at the end (at 136 days after hatching) of the experiment 2

Timing (Days after hatching)	Treatment (Experimental group)	Angle									
		180-175° % (n)	175-170° % (n)	170-165° % (n)	165-160° % (n)	160-155° % (n)	155-150° % (n)	150-145° % (n)	145-140° % (n)	140-135° % (n)	Total % (n)
At the commencement of the experiment (98)	—	63.5 (33) ^{ab}	26.9 (14) ^{ab}	1.9 (1) ^b	5.8 (3)	1.9 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (52)
At the end of the experiment (136)	Low current velocity (B)	46.7 (49) ^{ab}	27.6 (29) ^{ab}	16.2 (17) ^a	3.8 (4)	1.9 (2)	1.9 (2)	1.0 (1)	0 (0)	1.0 (1)	100 (105)
	Middle current velocity (C)	46.2 (48) ^b	37.5 (39) ^a	5.8 (6) ^b	5.8 (6)	1.9 (2)	1.9 (2)	1.0 (1)	0 (0)	0 (0)	100 (104)
	High current velocity (D)	65.4 (68) ^a	18.3 (19) ^b	5.8 (6) ^b	3.8 (4)	4.8 (5)	0 (0)	1.0 (1)	0 (0)	1.0 (1)	100 (104)

Different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).