

学位論文審査結果の報告書

氏 名 高岡 治

生 年 月 日 (昭和)・平成34年 3月29日

本 籍 (国籍) 和歌山県

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 第 **214** 号

学位授与の条件 学位規程第5条2項該当
(博士の学位)

論 文 題 目

マダイおよびシマアジの種苗量産技術に関する研究

審 査 委 員

(主 査) 滝井 健二



(副主査) 江口 充



(副主査) 石橋 泰典



(副 査)



(副 査)



論文内容の要旨

マダイ, *Pagrus major* およびシマアジ, *Pseudicaranx dentex* 養殖では、魚価の低迷と生産コストの高騰で経営が逼迫しており、良質種苗を低価格かつ計画的に導入することが、今後の発展の重要な課題になっている。

これまでの研究開発で、両魚種の生産技術は進歩し種苗の量産体制も整備されつつあるが、安定的かつ計画的に行える段階には達していない。その原因として、仔稚魚期の発育に関する基礎的知見の集積が進んでいないことが挙げられる。特に、孵化後 10~20 日 (dah) 付近はクリティカルピリオッドとして一般的に認識され、原因不明の多量へい死がしばしば発生する。特に、高密度下で飼育される種苗生産施設では、飼育条件のわずかな悪化で仔稚魚のストレスが高まり、免疫機能が低下して疾病によるへい死が頻発する。これまでの抗生物質による治療では安定した効果はみられず、しかも、耐性菌の出現や食の安心・安全面から推奨されない。

そこで本研究では、ふ化後から稚魚期に至るマダイおよびシマアジ初期発育期間の生化学的成分の変化について明らかにするとともに、抗生物質に変えて古来より用いられてきたハーブの投与が、病原性バクテリアの繁殖、仔稚魚の飼育成績や抗ストレスおよび抗病性に及ぼす効果について調べた。

第1章 初期発育期間における生化学的変化

本学水産研究所で飼育したマダイおよびシマアジ親魚群から得た受精卵をふ化させ、それぞれ 49 および 42 日後 (dah) までの、魚体の一般成分、核酸含量、各種酵素活性の変化について調べた。

マダイ 全長の変化は 14 dah 付近に屈曲点がみられ、それ以後の成長は以前より速かった。また 21 dah 頃に 10 mm に達して稚魚に移行した。

水分含量は摂餌開始 3 dah から低下しつづけ、粗タンパク質は 3 dah まで粗脂質含量は 7 dah まで低下してから上昇した。特に、粗タンパク質含量の増加は 21 dah まで顕著であった。粗灰分含量はふ化から僅かずつ増加し続けた。

RNA および DNA 含量は 14 dah まで著しく上昇し、その後は 21 dah から徐々に減少した。RNA/DNA 比およびタンパク質/DNA 比はふ化から 3~7 dah まで激減してから上昇に転じた。また、アルカリ性フォスファターゼ (ALP) 活性は 14~21 dah, グルコース 6-リン酸脱水素酵素および酸性プロテアーゼ活性は 14 dah から上昇して 28~35 dah にピークに達したが、塩基性プロテアーゼはバラツキが大きく、一定の傾向はみられなかった。

シマアジ 全長の変化は 16 dah および 30 dah 付近に屈曲点がみられ、18 dah に全長 12 mm に達してほとんどが仔魚から稚魚に移行した。

水分含量は 3 dah~8 dah まで大きく減少し、その後は緩やかに低下した。粗タンパク質はふ化から 4 dah まで微増した後 16 dah まで急増し、粗脂質含量はふ化~3 dah まで低下した後 12 dah まで増加し、その後は増減を繰り返して 32 dah より上昇に転じた。粗灰分含量はふ化~16 dah まで徐々に上昇し、その後はほぼ一定値を維持した。

RNA および DNA 含量は 4~8 dah に上昇し、それ以降は 18 dah まで比較的高い値を維持してから低下した。しかし、RNA 含量は 38 dah より再び上昇した。RNA/DNA 比は 3~8 dah まで上昇して 38 dah まで高値を維持し、その後に再び急上昇したが、タンパク質/DNA 比はふ化後に上昇しつづけた。ALP 活性は 3 dah~6 dah にかけて急増して 14 dah まで高値を維持し、20 dah にかけて低下した。

本章から、マダイおよびシマアジの初期発育期間にみられるクリティカルピリオッドと、成長の変曲点や化学・生化学成分の変化が重なることが示された。また、各器官の形成・機能化とエネルギー源として脂質およびタンパク質などの要求が、初期発育期間に大きく変化することが示唆された。

第2章 ハーブの抗菌作用とワムシへの応用

ハーブエキスの抗菌作用 シンキク (*Massa medicata*, Mm), サンザシ (*Crataegi fructus*, Cf), カワラヨモギ (*Artemisia capillaris*, Ac), センキュウ (*Cnidium officinale*, Co) とそれらを 2:2:1:1 の割合で混合した HM のメタノール抽出エキス (エキス) を円形ろ紙に展着させ、ペーパーディスク法によって魚病細菌 *Vibrio anguillarum*, *V. alginolyticus*, *Aeromonas salmonicida*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda* に対する発育阻止効果を調べたところ、これら魚病細菌に対して Cf および HM が阻止効果をもつことが分かった。

ワムシに対するハーブ添加効果 Cf および HM エキスをワムシ, *Brachionus plicatilis* sp. complex 培養水へ添加し、ワムシ体内における TCBS 細菌数の低減効果について調べた。Cf ワムシでは、細菌数は 12 h 後までほぼ一定であったが、対照の無添加では 6~12 h 後に著しく上昇した。また、HM ワムシでは 6~12 h 後にかけて対照より低く推移した。

本章から、ハーブエキスに魚病細菌に対する発育阻止効果があることが示された。また、ワムシ培養水への Cf および HM エキスの添加は、ワムシ体内の TCBS 細菌数の増加を抑制することが示された。

第3章 仔魚に対するハーブワムシの効果

マダイおよびシマアジ仔魚に Cf および HM ワムシを給与して 20 dah まで飼育し、飼育成績、干出試験および病原細菌 *V. anguillarum* の攻撃試験から、種苗生産におけるハーブの実用性を明らかにしようとした。

マダイ 終了時の全長は Cf ワムシ, HM ワムシおよびエキス無添加の対照区の順に低下し、Cf ワムシ区と対照区の間には有意差が認められた。しかし、終了時における魚体の TCBS 細菌数には有意差はなかった。一方、*V. anguillarum* 液に浸漬した攻撃試験の 1~6 日後における仔魚の生残率は、Cf および HM ワムシ区が対照区より有意に高かった。

シマアジ 終了時の全長には有意な区間差は認められなかった。一方、干出試験 24 h 後の生残率は Cf および HM ワムシ区が対照区より高い傾向にあり、攻撃試験 6 日後における生残率は、Cf および HM ワムシ区が対照区より有意に高かった。

本章から、ハーブワムシは仔魚生残率を高める効果を持つことが示された。一方、仔魚に対する成長促進効果に魚種間差のあることも明らかになった。

第4章 稚魚および養殖種苗に対するハーブ添加配合飼料の効果

マダイ稚魚 体重0.1 gの稚魚に、CfおよびHM添加配合飼料を20日間与えて飼育した。終了時の体重、比成長率（SGR）および飼料効率（FE）はハーブ区が対照区より高かった。干出試験および麻酔後の回復試験では、CfおよびHM区に対照区より高い生残率と短い覚醒時間が得られた。また、攻撃試験ではハーブ区の生残率が対照区より有意に高かった。

マダイ養殖用種苗 体重24 gの種苗にCfおよびHM添加配合飼料を84日間与えて飼育した。生残率、SGR、FEなどはCfおよびHM区が対照区より高かった。また、CfおよびHM区の血漿リゾチーム活性と溶血補体価も高い傾向にあった。一方、CfおよびHM区では対照区より麻酔後の覚醒時間が短く、干出試験および攻撃試験後の生残率も高かった。

シマアジ稚魚 体重0.4 gの稚魚にCfおよびHM添加配合飼料を20日間与えて飼育した。終了時の体重はCf区と対照区との間に有意差がみられた。また、干出試験後における生残率はCfおよびHM区が対照区に比べて高く、麻酔後の覚醒時間はHM区が対照区より有意に短かった。

シマアジ養殖用種苗 体重16 gの種苗にCfおよびHM添加配合飼料を63日間与えて飼育した。FEおよびタンパク質効率はCf区、HM区および対照区の順に低下し、Cf区と対照区の間有意差がみられた。一方、麻酔後の覚醒時間はCfおよびHM区が対照区に比べて短く、攻撃試験後の生残率も高かった。

本章から、配合飼料へのハーブの添加は、マダイおよびシマアジ稚魚から養殖種苗に至るまで、の成長や飼育成績とともに、各種ストレス耐性を向上させる効果を持つことが示された。

本研究から、マダイおよびシマアジの初期発育期間における生化学的変化から、クリティカルピリオッドにおける組織・器官の分化・機能化とそれに伴う代謝機能、各栄養素の要求性の変化についての理解が可能になった。また、薬用ハーブは病原細菌の増殖を阻止し、成長や飼育成績、各種ストレス耐性を高めるなど、マダイおよびシマアジ仔稚魚の生残率を改善できる古くて新しい技術を提案することができた。これらの知見は、今後の種苗量産技術の確立に大きく貢献するものと期待される。

論文審査結果の要旨

マダイおよびシマアジ養殖においても、各形質のバラツキが小さく、効率よく速やかに成長する種苗の入手は欠かせない。これまでの研究開発で種苗量産技術は確立されつつあるが、安定した生産レベルには未だに達していない。そこで、本研究ではふ化から稚魚期に至る初期発育期間における生化学的成分の変化と、病原性微生物の繁殖、仔稚魚の飼育成績、各種抗ストレス、抗病性などに及ぼす薬用ハーブの効果について詳細に検討し、以下に示す有意な知見を得ている。

第1章 初期発育期間における生化学的变化

本学水産研究所で飼育したマダイおよびシマアジ親魚群から得た受精卵をふ化させ、それぞれ49および42日後(dah)までの、魚体の一般成分、核酸含量、各種酵素活性の変化について調べた。

マダイ 全長の変化は14 dah付近に屈曲点がみられ、それ以後の成長は以前より速かった。また21 dah頃に10 mmに達して稚魚に移行した。

水分含量は摂餌開始3 dahから低下しつづけ、粗タンパク質は3 dahまで粗脂質含量は7 dahまで低下してから上昇した。特に、粗タンパク質含量の増加は21 dahまで顕著であった。粗灰分含量はふ化から僅かずつ増加し続けた。

RNAおよびDNA含量は14 dahまで著しく上昇し、その後は21 dahから徐々に減少した。RNA/DNA比およびタンパク質/DNA比はふ化から3~7 dahまで激減してから上昇に転じた。また、アルカリ性フォスファターゼ(ALP)活性は14~21 dah、グルコース6-リン酸脱水素酵素および酸性プロテアーゼ活性は14 dahから上昇して28~35 dahにピークに達したが、塩基性プロテアーゼはバラツキが大きく、一定の傾向はみられなかった。

シマアジ 全長の変化は16 dahおよび30 dah付近に屈曲点がみられ、18 dahに全長12 mmに達してほとんどが仔魚から稚魚に移行した。

水分含量は3 dah~8 dahまで大きく減少し、その後は緩やかに低下した。粗タンパク質はふ化から4 dahまで微増した後16 dahまで急増し、粗脂質含量はふ化~3 dahまで低下した後12 dahまで増加し、その後は増減を繰り返して32 dahより上昇に転じた。粗灰分含量はふ化~16 dahまで徐々に上昇し、その後はほぼ一定値を維持した。

RNAおよびDNA含量は4~8 dahに上昇し、それ以降は18 dahまで比較的高い値を維持してから低下した。しかし、RNA含量は38 dahより再び上昇した。RNA/DNA比は3~8 dahまで上昇して38 dahまで高値を維持し、その後に再び急上昇したが、タンパク質/DNA比はふ化後に上昇しつづけた。ALP活性は3 dah~6 dahにかけて急増して14 dahまで高値を維持し、20 dahにかけて低下した。

本章から、マダイおよびシマアジの初期発育期間にみられるクリティカルピリオッドと、成長の変曲点や化学・生化学成分の変化が重なることが示された。また、各器官の形成・機能化とエネルギー源として脂質およびタンパク質などの要求が、初期発育期間に大きく変化することが示唆された。

第2章 ハーブの抗菌作用とワムシへの応用

ハーブエキスの抗菌作用 シンキク (*Massa medicata*, Mm), サンザシ (*Crataegi fructus*, Cf), カワラヨモギ (*Artemisia capillaris*, Ac), センキュウ (*Cnidium officinale*, Co) とそれらを2:2:1:1の割合で混合したHMのメタノール抽出エキス(エキス)を円形ろ紙に展着させ、ペーパーディスク法によって魚病細菌 *Vibrio anguillarum*, *V. alginolyticus*, *Aeromonas salmonicida*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda* に対する発育阻止効果を調べたところ、これら魚病細菌に対してCfおよびHMが阻止効果をもつことが分かった。

ワムシに対するハーブ添加効果 Cf および HM エキスをワムシ, *Brachionus plicatilis* sp. complex 培養水へ添加し、ワムシ体内におけるTCBS細菌数の低減効果について調べた。Cf ワムシでは、細菌数は12 h後までほぼ一定であったが、対照の無添加では6~12 h後に著しく上昇した。また、HMワムシでは6~12 h後にかけて対照より低く推移した。

本章から、ハーブエキスに魚病細菌に対する発育阻止効果があることが示された。また、ワムシ培養水へのCfおよびHMエキスの添加は、ワムシ体内のTCBS細菌数の増加を抑制することが示された。

第3章 仔魚に対するハーブワムシの効果

マダイおよびシマアジ仔魚にCfおよびHMワムシを給与して20 dahまで飼育し、飼育成績、干出試験および病原細菌 *V. anguillarum* の攻撃試験から、種苗生産におけるハーブの実用性を明らかにしようとした。

マダイ 終了時の全長はCfワムシ、HMワムシおよびエキス無添加の対照区の順に低下し、Cfワムシ区と対照区の間には有意差が認められた。しかし、終了時における魚体のTCBS細菌数には有意差はなかった。一方、*V. anguillarum* 液に浸漬した攻撃試験の1~6日後における仔魚の生残率は、CfおよびHMワムシ区が対照区より有意に高かった。

シマアジ 終了時の全長に有意な区間差は認められなかった。一方、干出試験24 h後の生残率はCfおよびHMワムシ区が対照区より高い傾向にあり、攻撃試験6日後における生残率は、CfおよびHMワムシ区が対照区より有意に高かった。

本章から、ハーブワムシは仔魚生残率を高める効果を持つことが示された。一方、仔魚に対する成長促進効果に魚種間差のあることも明らかになった。

第4章 稚魚および養殖種苗に対するハーブ添加配合飼料の効果

マダイ稚魚 体重0.1 gの稚魚に、CfおよびHM添加配合飼料を20日間与えて飼育した。終了時の体重、比成長率(SGR)および飼料効率(FE)はハーブ区が対照区より高かった。干出試験および麻酔後の回復試験では、CfおよびHM区に対照区より高い生残率と短い覚醒時間が得られた。また、攻撃試験ではハーブ区の生残率が対照区より有意に高かった。

マダイ養殖用種苗 体重24 gの種苗にCfおよびHM添加配合飼料を84日間与えて飼育した。生残率、SGR、FEなどはCfおよびHM区が対照区より高かった。また、CfおよびHM区の血漿リゾチーム活性と溶血補体価も高い傾向にあった。一方、CfおよびHM区では対照区より麻酔後の覚醒時間が短く、干出試験および攻撃試験後の生残率も高かった。

シマアジ稚魚 体重 0.4 g の稚魚に Cf および HM 添加配合飼料を 20 日間与えて飼育した。終了時の体重は Cf 区と対照区との間に有意差がみられた。また、干出試験後における生残率は Cf および HM 区が対照区に比べて高く、麻酔後の覚醒時間は HM 区が対照区より有意に短かった。

シマアジ養殖用種苗 体重 16 g の種苗に Cf および HM 添加配合飼料を 63 日間与えて飼育した。FE およびタンパク質効率率は Cf 区、HM 区および対照区の順に低下し、Cf 区と対照区との間に有意差がみられた。一方、麻酔後の覚醒時間は Cf および HM 区が対照区に比べて短く、攻撃試験後の生残率も高かった。

本章から、配合飼料へのハーブの添加は、マダイおよびシマアジ稚魚から養殖種苗に至るまで、の成長や飼育成績とともに、各種ストレス耐性を向上させる効果を持つことが示された。

本研究から、マダイおよびシマアジの初期発育期間における生化学的変化から、クリティカルピリオッドにおける組織・器官の分化・機能化とそれに伴う代謝機能、各栄養素の要求性の変化についての理解が可能になった。また、薬用ハーブは病原細菌の増殖を阻止し、成長や飼育成績、各種ストレス耐性を高めるなど、マダイおよびシマアジ仔稚魚の生残率を改善できる古くて新しい技術を提案した。よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、審査にあたっては、論文に関する専攻内審査および公聴会など所定の手続きを経たうえ、平成 28 年 2 月 5 日、農学研究科教授会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。