

マダイおよびシマアジの種苗量産技術に関する研究\*1

高岡 治

Study on mass seedling production of red sea bream *Pagrus major*  
and striped jack *Pseudocaranx dentex*

Osamu Takaoka\*2

目次

序論	4
第1章 初期発育期間における生化学的変化	7
1-1) マダイ	7
1-1-1) 材料および方法	7
1-1-2) 結果	8
1-1-3) 考察	16
1-2) シマアジ	18
1-2-1) 材料および方法	18
1-2-2) 結果	18
1-2-3) 考察	24

---

\*1 本論文は近畿大学審査学位論文である。

\*2 近畿大学水産養殖種苗センター浦神事業場 (Uragami Hatchery, Aquaculture Technology and Production Center, kindai University, Nachi-katsuura, Higashi-muro, Wakayama, 649-5145, Japan)

第2章	ハーブの抗菌作用とワムシへの応用	27
2-1)	ハーブエキスの抗菌作用	27
2-1-1)	材料および方法	27
2-1-2)	結果	28
2-1-3)	考察	28
2-2)	ワムシに対するハーブ添加効果	29
2-2-1)	材料および方法	29
2-2-2)	結果	30
2-2-3)	考察	32
第3章	仔魚に対するハーブ添加ワムシの効果	34
3-1)	マダイ	34
3-1-1)	材料および方法	34
3-1-2)	結果	35
3-1-3)	考察	36
3-2)	シマアジ	37
3-2-1)	材料および方法	37
3-2-2)	結果	38
3-2-3)	考察	38
第4章	沖出しおよび種苗サイズ稚魚に対するハーブ添加飼料の効果	41
4-1)	マダイ	41
4-1-1)	沖出しサイズ稚魚	41
4-1-1-1)	材料および方法	41
4-1-1-2)	結果	43
4-1-1-3)	考察	46
4-1-2)	種苗サイズ稚魚	47
4-1-2-1)	材料および方法	47
4-1-2-2)	結果	51
4-1-2-3)	考察	56
4-2)	シマアジ	57
4-2-1)	沖出しサイズ稚魚	57
4-2-1-1)	材料および方法	57
4-2-1-2)	結果	59
4-2-1-3)	考察	61
4-2-2)	種苗サイズ稚魚	62

高岡：マダイおよびシマアジの種苗量産技術に関する研究

4-2-2-1) 材料および方法	62
4-2-2-2) 結果	64
4-2-2-3) 考察	68
第 5 章 総括	71
和文要旨	76
英文要旨 (Summary)	79
文献	83
謝辞	92

## 序論

我が国の主要な養殖魚種であるマダイ *Pagrus major* およびシマアジ *Pseudocaranx dentex* の生産量は、1970年にはそれぞれ460および36tと僅かであったが、種苗生産技術の発達も後押しして、1999年にはマダイが87,232t、2001年にはシマアジが3,396t生産されるに至った。その後は、日本経済の停滞とともに魚価が低迷し生産量はほぼ一定か減少して、近年のマダイおよびシマアジ生産量は、それぞれ60,000tおよび3,000t前後で推移している（農林水産省 漁業・養殖生産統計 2014）。さらに最近になって、養殖資材、燃料費、飼料などが高騰して養殖経営を逼迫させており、今後とも養殖産業を維持・発展させるには、いかに優れた形質の種苗を低価格で購入し、効率的かつ計画的に生産・販売できるかが最大のポイントになる。

これまで、優れた形質の種苗を作出するための研究が精力的に行われてきた（Murata 1996；家戸 2002；家戸・村田 2010；谷口 2011）。また、マダイおよびシマアジ仔稚魚の飼育、栄養要求、疾病、親魚の成熟・採卵などに関する数多くの知見が蓄積されている（田中 1969, 1972；福原 1976；北島ら 1980；Mathuoka 1984, 1985；原田ら 1984ab；Fukuhara 1985；荒川ら 1987, 1993；村井ら 1987, 1991；虫明 1989；海野 1990；川辺ら 1992；Mushiake 1992；Tanaka 1999；虫明・有本 2000；Muroga 2001；陳ら 2004；宮下・瀬岡 2005；渡邊 2009；竹内 2009）。しかし、優良種苗を低価格で供給できる種苗量産技術の確立が遅れており、今後の技術改良・改革を目指した精力的な取り組みが望まれている。近畿大学水産養殖種苗センターにおいても種苗生産技術の確立に向けた応用的研究を進め、マダイおよびシマアジでは受精卵の約30~60%を養殖用種苗にまで生産できるレベルに達したが、遺伝的形質や飼育環境の違いを踏まえて安定かつ計画的に生産する段階にまで至っていない。

これまでの種苗生産では主に形態変化を指標に飼育技術が開発されてきた。しかし、この変化に伴う各器官や細胞の分化・発達に関する理解が充分でないことが、多くの減耗要因をカバーする種苗量産技術の確立を阻んでいる原因の一つと考えられる。そこで本研究では、まず、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な変化を明らかにし、形態的变化を生化学的に理解して種苗量産技術に必要な基礎的知見の集積を試みた。マダイおよびシマアジ種苗生産において、変態期にあたるふ化10~20日後（dah）付近に大量へい死が発生し、一般的にクリティカルポイントとして認識されている。おそらくこの期間には骨格系、神経系、消化器系、運動系の各器官が分化・機能化することから、環境が僅かに悪化しても遺伝子の発現やタンパク質の合成が乱されて、生理機能に致命的な影響の出現することが予想できる。特に、免疫機能の低下や発現の遅延は大量へい死につながる。マダイ仔魚の

造血組織である腎臓、脾臓および胸腺が発達するのは15 dah以降であることや、脊索屈曲期には各器官形成の進行とともに酸素消費量が増大し、ストレス耐性が弱まることが知られ

ている (Tanaka et al. 1999 ; 石橋 2003, Ishibashi 2005)。

一方、種苗生産施設では生産コストを考慮して仔稚魚は一般的に高密度下で飼育されている。したがって、飼育条件がわずかに変化しても仔稚魚のストレスが上昇して、代表的な疾病の原因微生物のみならず、弱毒性細菌による日和見的な感染が拡大し易い。マダイでは1990年以降にイリドウイルス症が蔓延して、養殖産業を大きく揺るがす被害が発生し、対策としてイリドウイルス症が集中する高水温期までに大型の種苗を導入する案が提唱された (井上ら 1992 ; 田中ら 1996)。しかし、マダイの種苗生産が秋～早春に実施されるようになると、新たな問題として、適水温以下での飼育がピブリオ病や滑走細菌症の蔓延と大量への死を招来させた。これまで、細菌性疾病の治療には抗生物質による浸漬や経口投与を行ってきたが (安永 1972 ; 畑井 2006)、仔魚や低水温期の稚魚では確実に安定した治療効果は得られ難い。さらに、抗生物質による治療は耐性菌の出現、環境汚染、食品への残留なども懸念され、生産コストとともに種苗価格の高騰にもつながっている。マダイやシマアジだけでなく海産養殖魚類の種苗生産において、抗生物質に代わりうる疾病対策・治療方法を確立することが喫緊の課題になっている。

そこで本研究では、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に次いで、古来より多くの疾病で予防・治療効果が認められている薬用ハーブ (ハーブ) の利用効果を明らかにしようとした。ハーブはもともと人類の長い歴史の中で生薬として活用されてきたもので、原料そのものあるいは抽出したエキスがストレスの緩和、病気の治療や健康増進に有効であり、経済的で安全性が高く消費者のニーズに即応している。これまで、魚類やエビ類でも飼料へハーブを添加すると飼育成績が改善し、免疫能の向上することが報告されている (Kim et al. 1999 ; Citarasu et al. 2002 ; Kim et al. 2003 ; Jian and Wu 2003, 2004 ; Immanuel et al. 2004 ; Sivaram et al. 2004 ; Shalaby et al. 2006 ; Yin et al. 2006 ; Ji et al. 2007 ; Ardo et al. 2008 ; Xie et al. 2008 ; Zheng et al. 2009)。なお、本研究では多くのハーブの中から、Ji et al. (2007) がヒラメ *Paralichthys olivaceus* 稚魚の抗病性と飼育成績を改善させることを報告している、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) の4種を研究対象とした。Mmは小豆, 杏仁, 蒼茸, 野蓼, 青蒿などに小麦粉あるいは米を混合し、発酵させて調製したもので、ヒトでは消化不良, 食欲不振, 下痢などの症状に処方される (Lee and Seo 2003 ; 奥津ら 2011)。Cfはキレバサンザシ (オオミサンザシ) *Crataegi pinnatifida* の果実を乾燥させたもので、下痢, 瘀血による腹痛, 疝痛, 高血脂肪症などに効果がある。Acはカワラヨモギの帯花枝葉 (茵陳蒿) を乾燥させたもので、肝炎, 黄疸, 蕁麻疹, むくみなどに、Coはセンキュウの根茎を乾燥したもので、貧血症, 月経不順, 冷え性, 生理痛などにそれぞれ処方される (岡田 2002)。また、これらハーブには有効成分として抗酸化や抗菌作用を持つフェノール類やペクチンなどが含まれている (Kim et al. 1993 ; 萬 1994 ; 西村 1999 ; Zhang et al. 2001 ; 大嶋ら 2002 ; 桑原ら 2003 ; Seo et al. 2003 ; 杉本 2007 ; Jeong et al. 2009 ; 奥津ら 2011 ; Zhu et al. 2013 ; Wen

et al. 2015)。

本研究が、これからの魚類の種苗量産技術と養殖産業の発展に、多少とも貢献できれば幸いである。

## 第1章 初期発育期間における生化学的变化

マダイおよびシマアジは雌一尾が数百万粒の分離浮性卵を産出する。仔魚は極めて未熟な状態でふ化し、前・後仔魚期を経て稚魚期へと移行するが、ふ化してから稚魚に達するまでの減耗率が最も高い。人工種苗生産では仔魚から稚魚への初期発育期間を陸上水槽で管理し、好適な環境下で栄養価の高い餌飼料を充分に与えて飼育する。しかし、飼育条件のわずかな悪化でも生残率が著しく低下することが知られている。

これまで、マダイおよびシマアジの初期発育に関する研究は主に形態的な変化が注目され、生理・生化学的なアプローチはほとんど行われていない。生化学成分の変化を明らかにすることは、形態変化に隠されている器官の分化・発達に関する深い理解につながり、最終的には健全で優良な種苗の安定供給につながる。

そこで本章では、初期発育期間におけるマダイおよびシマアジの一般成分、核酸および各種酵素活性の変化について調べ、仔魚から稚魚期の成長を生化学的に把握しようとした。

### 1-1) マダイ

#### 1-1-1) 材料および方法

##### a) 供試魚および飼育方法

近畿大学水産研究所浦神実験場で、養成親魚から自然産卵により産卵日が異なる Lot 1~5 の5群の受精卵を得た。これらの卵群を15, 40または90 m<sup>3</sup>屋内飼育水槽へ収容して35 dahまで飼育した。その後、地先の海面生簀(8×8×3 m)へ沖出しして49 dahまで飼育した。この間、各 Lot からふ化直後、3, 7, 14, 21, 28, 35, 42および49 dahにそれぞれ必要数の仔稚魚を採取し分析した。仔稚魚には3 dahよりイカ乳化油で栄養強化したシオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* sp. Complex, アルテミア幼生 *Artemia* sp. および市販の仔稚魚用配合飼料(アルテック, 日清丸紅飼料, 東京)を順次与えた。飼育水にはろ過海水を用い3 dahより流水で飼育した。飼育期間中の水温は18.2~25.4℃であった。

##### b) 分析方法

採取した仔稚魚は氷冷下で5分間(min)静置し、氷冷生理食塩水で水洗して体表の付着物を取り除いた。次に、ろ紙(No.2)に包んで4℃の冷蔵庫内で約10 min静置して表面の水分を除き、液体窒素で凍結して分析に供すまで-20℃のフリーザに保存した。また、50~100尾を用いて平均全長および体重を、大型マクロ写真装置(日本光学社, 東京)および電子天秤(Shimadzu EB-330H, 島津製作所, 京都)を用いて測定した。

全魚体の水分, 粗タンパク質, 粗脂質および粗灰分含量などの一般成分はAOAC法

(1984)で分析した。全魚体のRNAおよびDNA含量はSchmidt-Thanhouser-Schneider法を一部改変した中野(1988)の方法で測定した。すなわち、試料を0.25 M sucrose, 1 mM EDTAを含む20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 緩衝液とともにPotter-Elvehjem型ホモジナイザーで均一に磨砕した。次いで、このホモジネートに、5 %TCA, 95 %ethyl alcohol-diethyl ether (3:1, v/v)を順に加え室温および氷冷下で20 min 放置した後、3000 rpmで10 min 遠心分離した。得られた沈殿物に1 N KOHを加えて37°Cで16時間(h)インキュベートした後、5 %TCA・6N HCl溶液で中和してから3000 rpmで10 min 遠心分離して得られた上澄部をRNA画分とした。DNA画分は残った沈殿部に5 %PCAを加えて90°Cに加熱した後、遠心分離して得られた上澄部とした。RNAおよびDNA含量は260 nmにおける吸光度を測定し、あらかじめ作成した検量線より求めた。

酵素分析に用いた粗酵素液は、仔稚魚を氷冷下で脱イオン水とともにPotter-Elvehjem型ホモジナイザーで磨砕した後、10000 × gで10 min 遠心分離し得られた上澄部を用いた。アルカリ性フォスファターゼ(ALP; EC 3.1.3.1)の測定は、Lowry and Brockの方法(北村元仕 1966)によった。すなわち、0.1 M Glycine buffer (pH 10.5), 0.1 M p-nitro phenyl phosphate および0.05 M MgCl<sub>2</sub>からなる基質混合液0.45 mLに、粗酵素液0.05 mLを加えて30°C, 15 min 反応させた後、0.02 N NaOH 5 mLを加えて反応を停止し、遊離したp-nitro phenol量を410 nmにおける吸光度から求めた。

グルコース-6-フォスフェートデヒドロゲナーゼ(G6PDH; EC 1.1.1.49)活性はGlock et al.の方法(示野貞夫 1974)によった。すなわち、2.5 mM glucose-6-phosphate, 0.125 mM NADP, 25 mM MgCl<sub>2</sub>を含む12.5 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 2 mLに、酵素液0.5 mlを加えて30°Cで5 min 反応させた。この反応の1 minにおけるNADPHの増加量を340 nmにおける吸光度から求め活性とした。

酸性プロテアーゼ(Acid-Pase; EC 3.3.4.1)および塩基性プロテアーゼ(Base-Pase; EC 3.4.4.4)の測定はcasein-Folin法(萩原丈二 1955)によった。すなわち、Acid-Pase活性の測定には50 mM HCl-lactic acid buffer (pH 3.0)を、またBase-Pase活性の測定には50 mM NaOH-boric acid buffer (pH 9.5)をそれぞれ用いて、caseinを2 %含む基質混液を調製した。各基質混液2.5 mLに粗酵素液0.5 mLを加えて30°Cで15 min 反応させた後、10 %トリクロロ酢酸2.5 mLを加えて反応を停止させ、3000 rpmで10 min 遠心分離して得た上澄液1 mLに、0.55 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2.5 mLと1 N Folin 試薬0.5 mLの順に加え、基質より遊離したtyrosine量を660 nmにおける吸光度から求めた。これらの酵素活性は、各反応条件下において基質あるいは反応生成物が1 minに1 μmol分解および合成される速度を1 unitと定義し、体重1 gあたりの活性に換算して表示した。

#### 1-1-2) 結果

飼育期間中における各ロットの全長の推移をFig. 1-1に示した。



飼育期間中において Lot 2, 3 および 4 では沖出し後に白点病が発生し, Lot 4 では 42 dah 以後にはすべてへい死した。そのため Lot 5 では沖出しをせずに 49 dah まで陸上水槽で飼育した。このように飼育状態の違いによって平均全長の推移に区間差が認められたが, いずれの Lot でも 14 dah (全長 7 mm) 前後に全長の屈曲点が認められ, それ以後の成長はそれ以前に比べて速かった。

ふ化後における仔稚魚の一般成分の変化を Fig.1-2~5 に示した。各成分の全体的な傾向を把握するために, 各 Lot の平均値をプロットした。

水分含量は摂餌を開始する 3 dah から低下し, 42 dah 以降ほぼ 80 % の値を示した。粗タンパク含量はふ化直後から摂餌開始直前にかけて低下した後, 21 dah まで速やかに上昇した。粗脂質含量はふ化から 7 dah まで低下し, その後緩やかに上昇した。粗灰分含量は試験終了時まで僅かずつ増加し続けた。

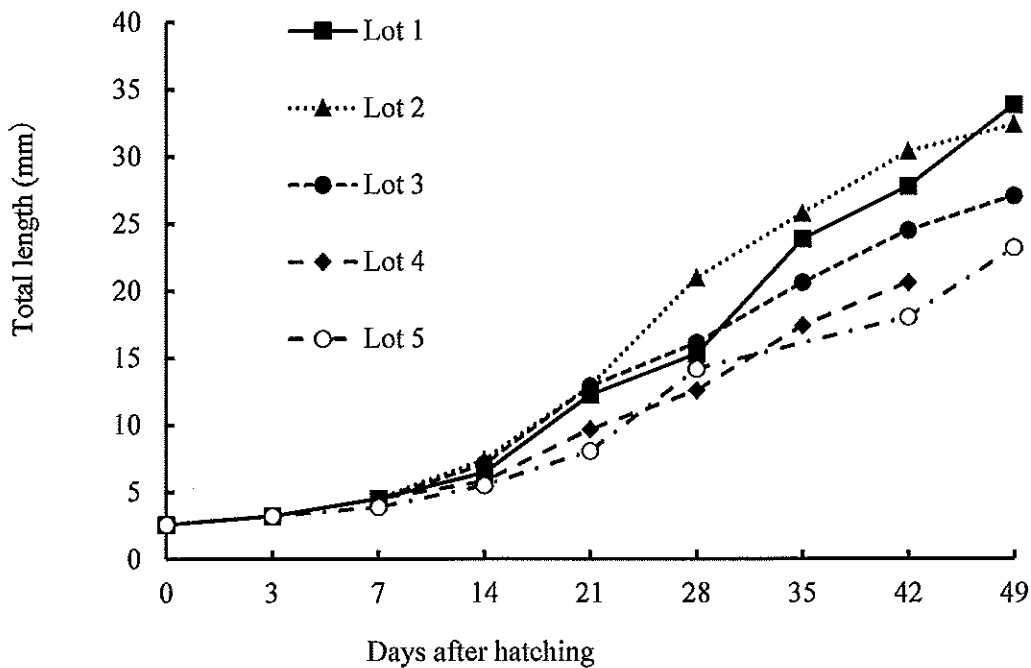


Fig. 1-1 Changes in total length of red sea beam from larvae just after hatching to 49 days old juveniles.

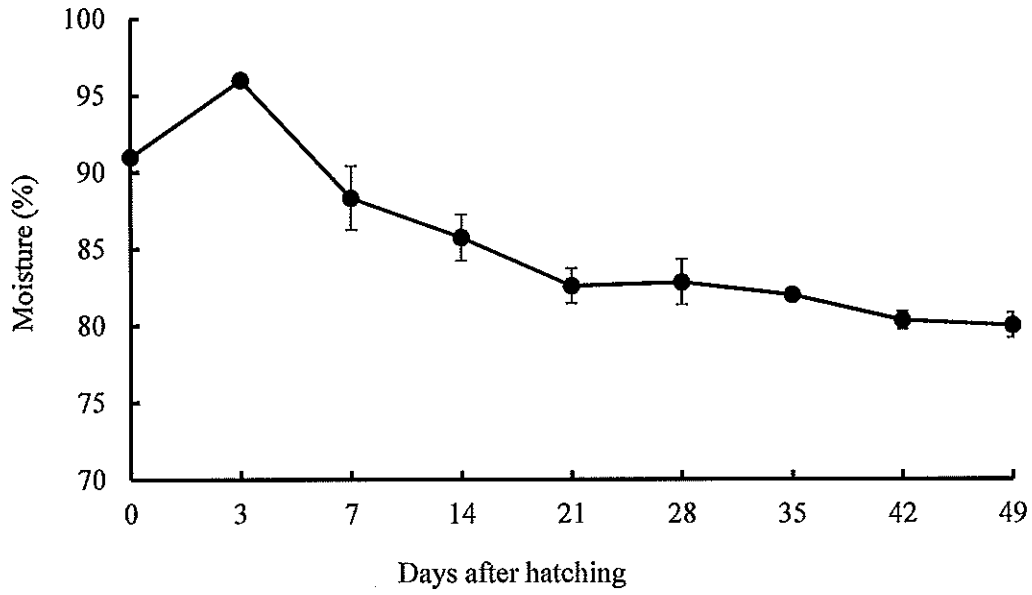


Fig.1-2 Changes in moisture content of red sea beam from larvae just after hatching to 49 days old juveniles.

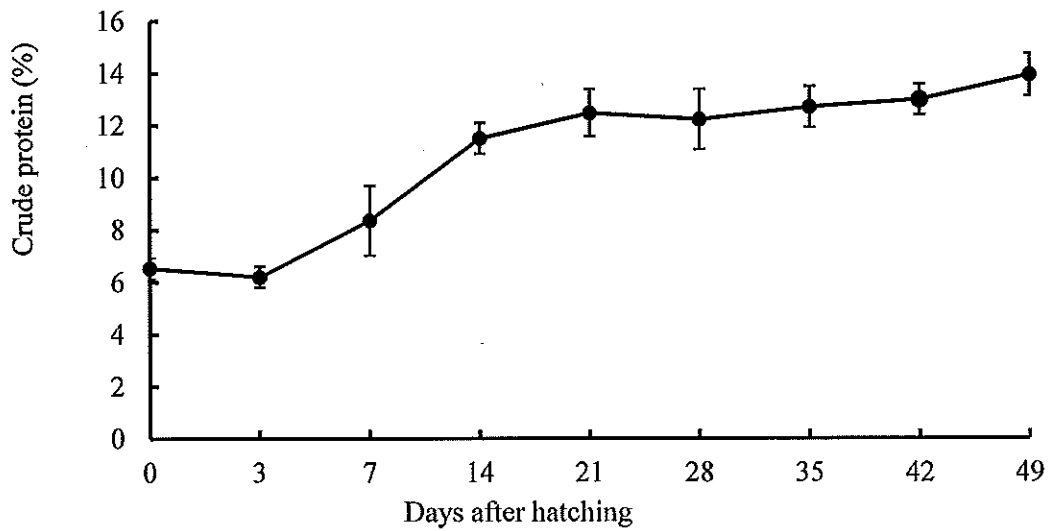


Fig. 1-3 Changes in crude protein content of red sea beam from larvae just after hatching to 49 days old juveniles. Values are expressed on a wet-weight basis.

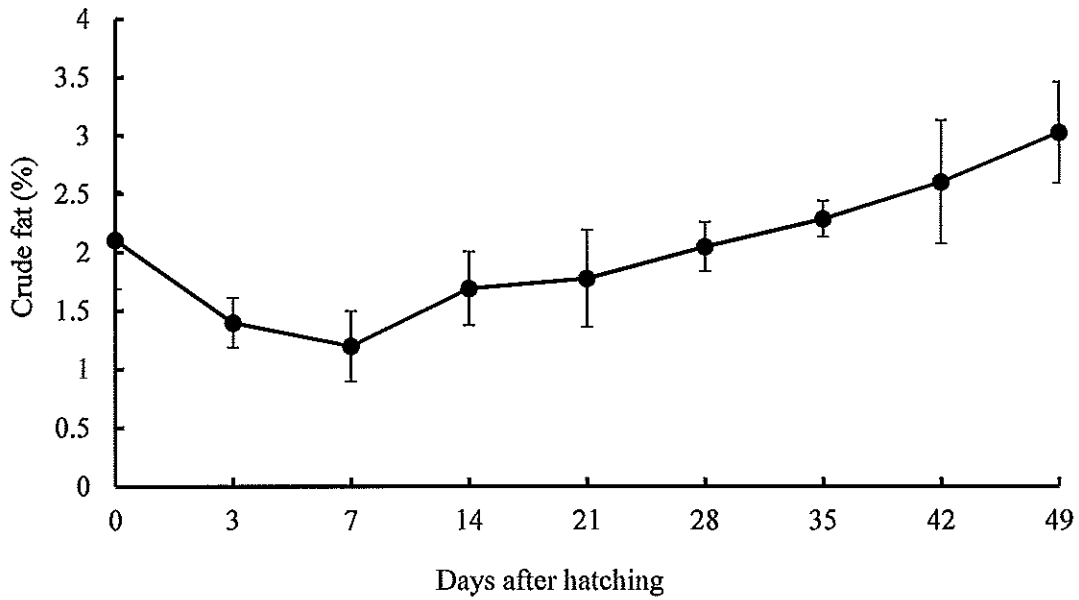


Fig. 1-4 Changes in crude lipid content of red sea beam from larvae just after hatching to 49 days old juveniles. Values are expressed on a wet-weight basis.

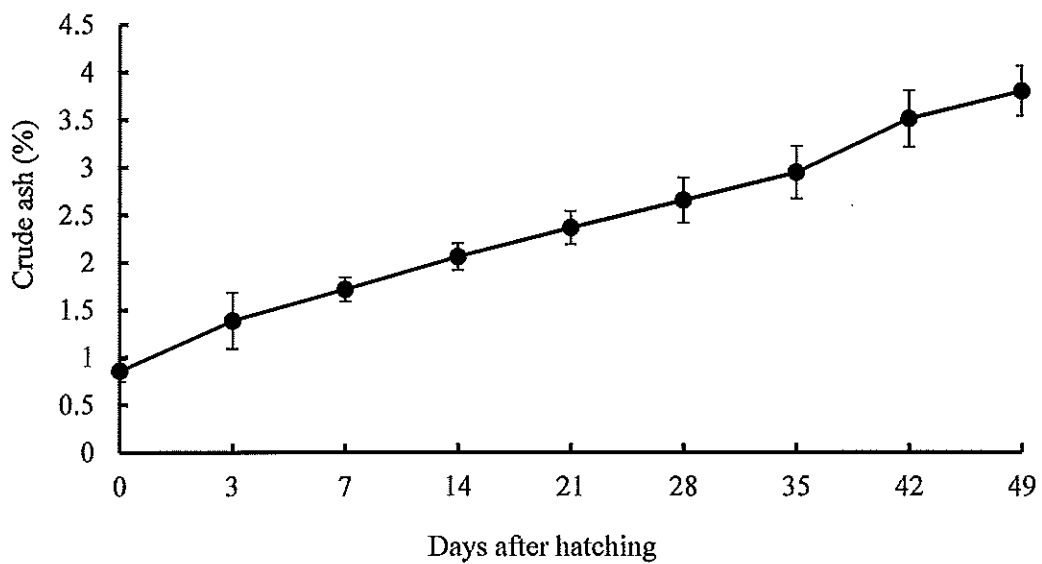


Fig. 1-5 Changes in crude ash content of red sea beam from larvae just after hatching to 49 days old juveniles. Values are expressed on a wet-weight basis.

RNA および DNA 含量, RNA/DNA 比およびタンパク質/DNA 比を Fig. 1-6~1-8 に示した。体重 1 g 当たりの RNA および DNA 含量は 14 dah まで急激に上昇し, 21 dah からは減少に転じた。RNA/DNA 比およびタンパク質/DNA 比は, ふ化直後から 3~7 dah まで激減したがその後は増加した。また, 成長が劣った Lot 5 の 14 dah 以降の両値は低く推移した。

体重 1g 当たりの ALP 活性を Fig.1-9 に示した。本酵素活性はふ化直後から 3 dah まで上昇した後 7 dah に低下する傾向にあった。その後 14~21 dah まで急上昇してピークに達した後再び低下した。一方, Lot 5 の ALP 活性は期間を通して低値を維持した。

体重 1 g 当たりの G6PDH の活性を Fig.1-10 に示した。ふ化直後から 3 dah まで上昇した後 7 dah に低下した。その後 28 dah まで急上昇して再び低下し, 摂餌開始時期と 28~35dah 付近に 2 つのピークが得られた。Lot 5 では 42 ~49 dah に急激に上昇し, 他の区と異なる変化を示した。

体重 1 g 当たりの Acid-Pase および Base-Pase の活性をそれぞれ Fig.1-11 および 12 に示し, Acid-Pase は 14~21 dah まで低く推移したが, その後は急激に増大した。Base-Pase は Lot によるバラツキが大きく一定の傾向は得られなかったが, Lot 5 では 42 dah まで低い値を維持した。

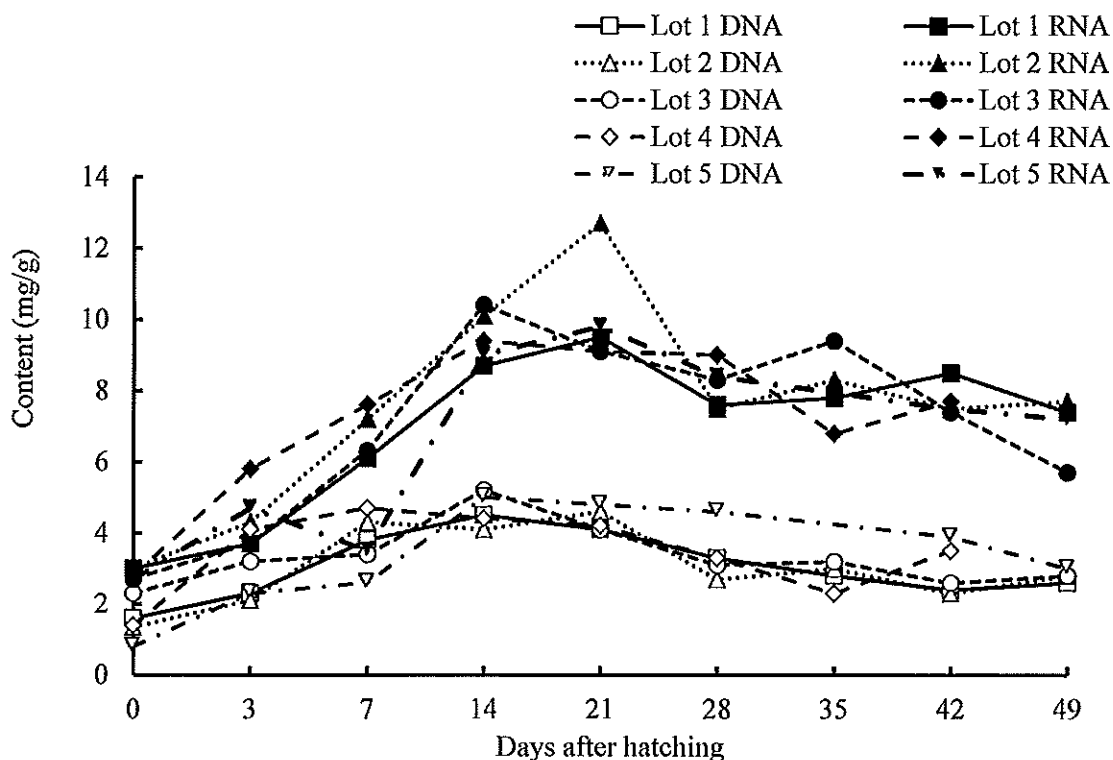


Fig. 1-6 Changes in DNA and RNA contents of red sea beam from larvae just after hatching to 49 days old juveniles. Values are expressed on a wet-weight basis.

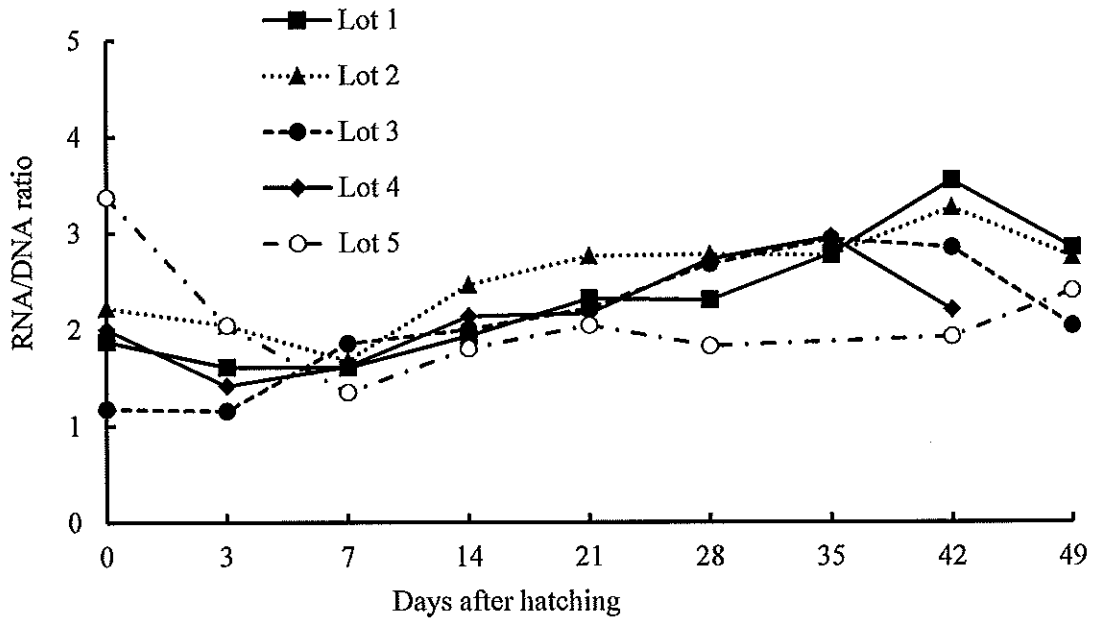


Fig. 1-7 Changes in RNA/DNA ratio of red sea beam from larvae just after hatching to 49 days old juveniles.

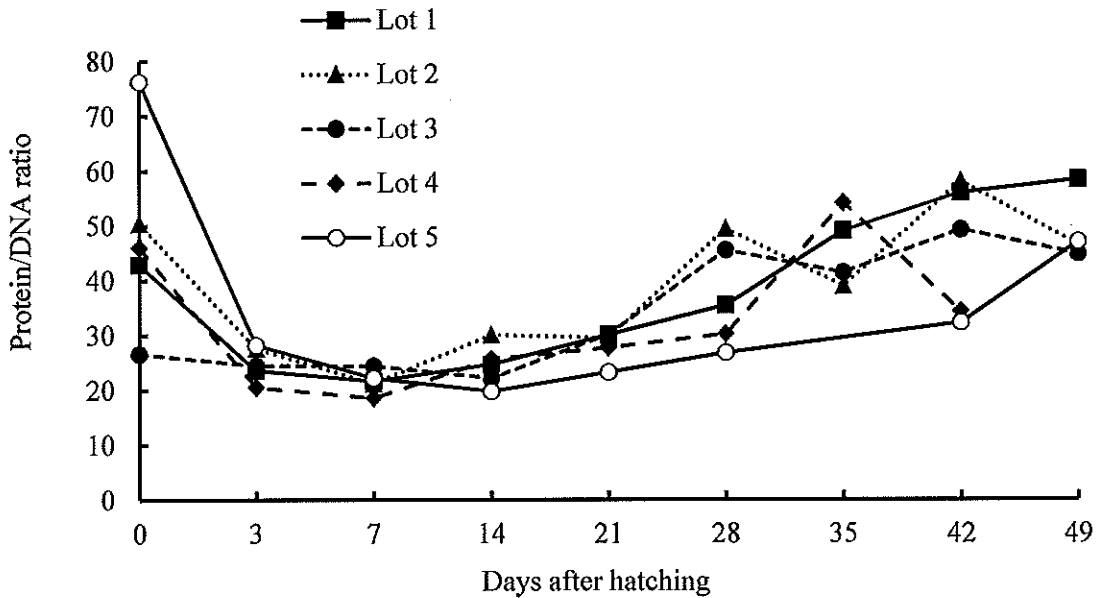


Fig. 1-8 Changes in protein/DNA ratio of red sea beam from larvae just after hatching to 49 days old juveniles.

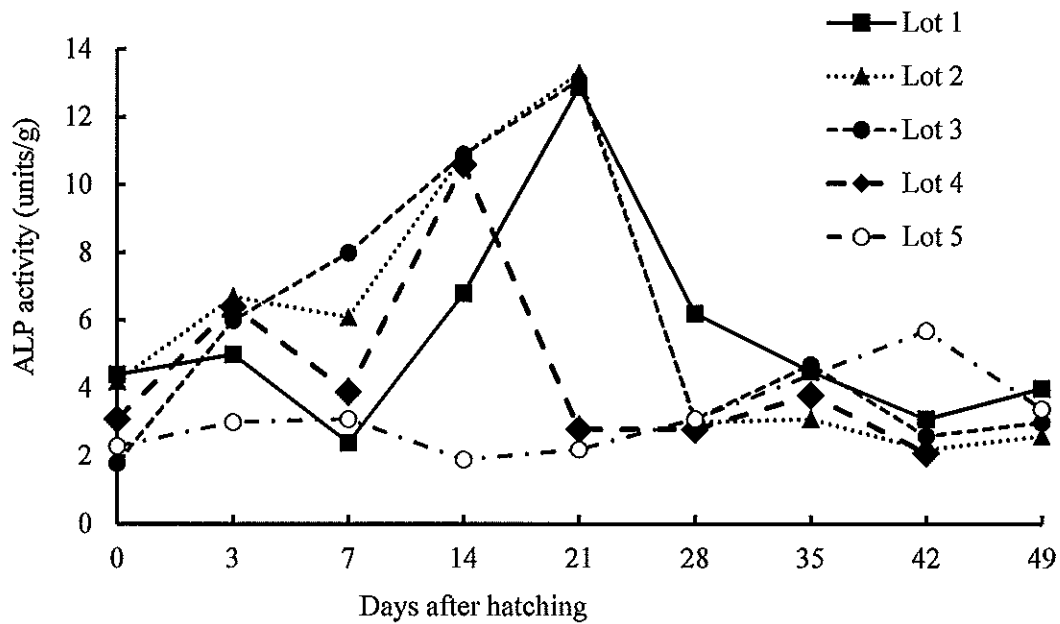


Fig. 1-9 Changes in alkaline phosphatase activity of red sea beam from larvae just after hatching to 49 days old juveniles. The activity is expressed in g wet body weight.

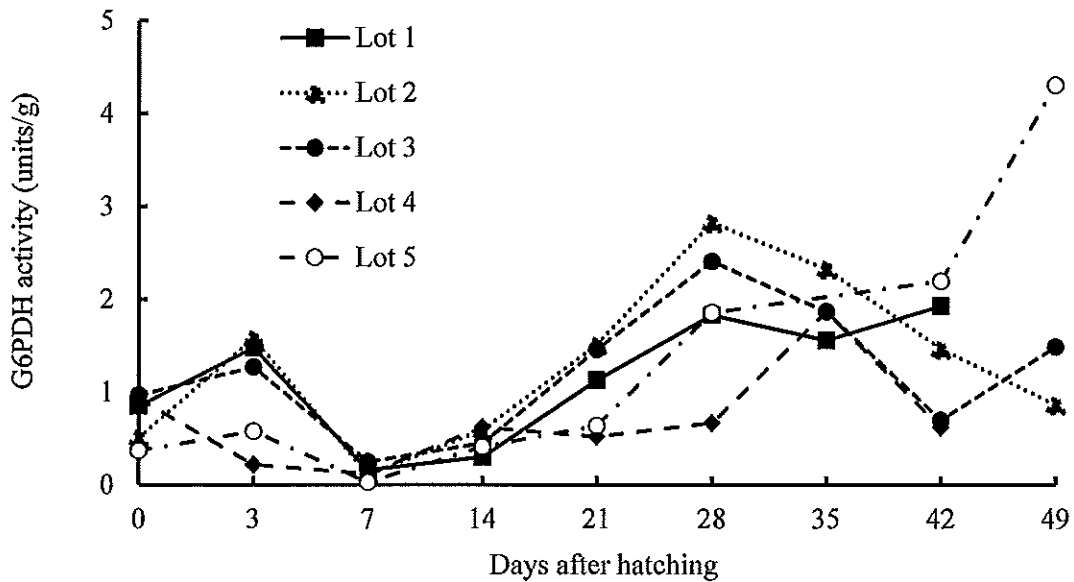


Fig. 1-10 Changes in G6PDH activity of red sea beam from larvae just after hatching to 49 days old juveniles. The activity is expressed per g wet body weight.

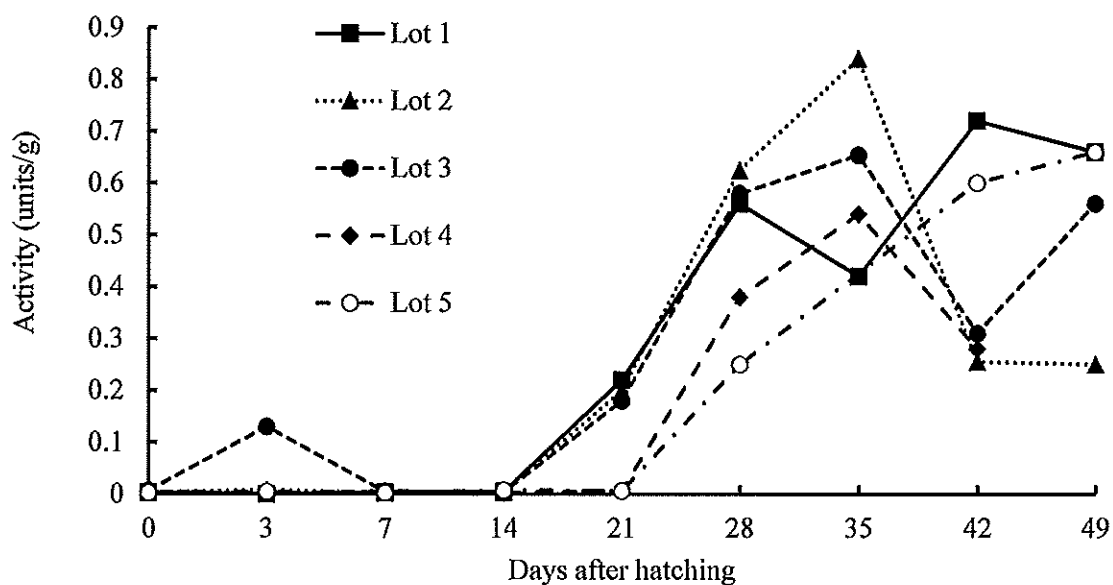


Fig. 1-11 Changes in acidic protease activity of red sea beam from larvae just after hatching to 49 days old juveniles. The activity is expressed per g wet body weight.

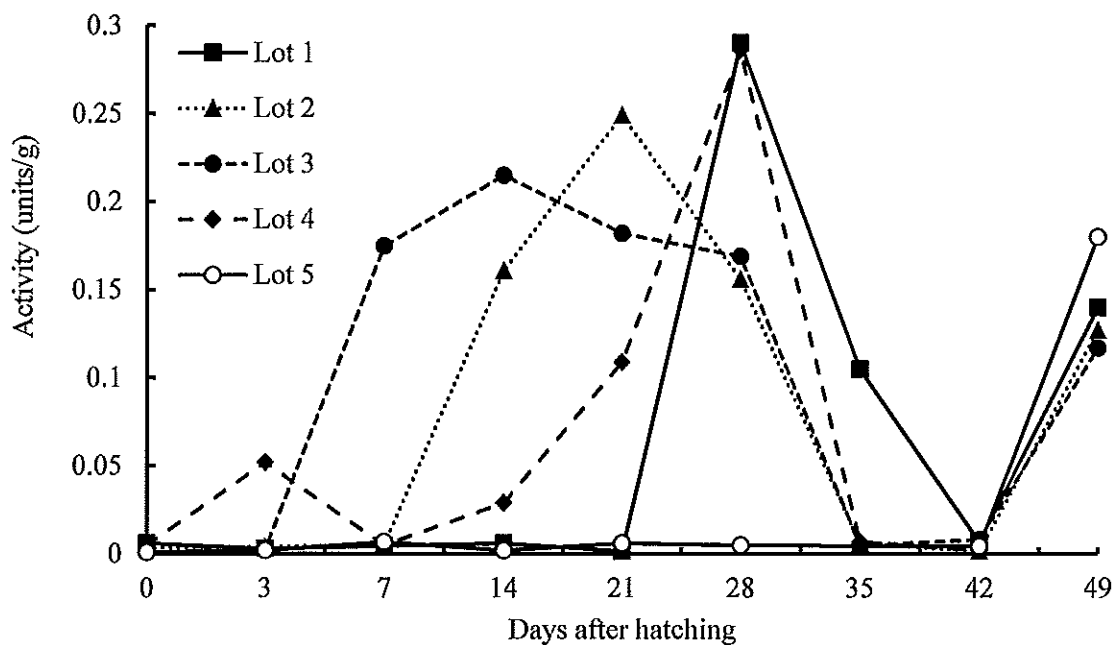


Fig. 1-12 Changes in basic protease activity of red sea beam from larvae just after hatching to 49 days old juveniles. The activity is expressed in g wet body weight.

### 1-1-3) 考察

人工飼育下のマダイ仔魚は全長 10 mm 前後で各鱗, 消化管, 鱗などが完成して稚魚期に移行する (Fukuhara 1985)。骨組織の形成は摂餌開始期の 2~3 dah から急激に始まり, 全長 6.5 ~7 mm の 14 dah 前後に最も顕しい変化が起こり, 稚魚に移行する全長 10mm 付近で骨格系の 90%が形成される (Mathuoka 1985)。本節のマダイは 14 ~21 dah に全長 7~10 mm に達し, この期間に仔魚から稚魚に移行した。

仔稚魚の成長にともなう一般成分の変化についてみると, ふ化から摂餌開始期にかけて粗タンパク質および粗脂質含量が低下した。しかし, 粗タンパク質含量は摂餌後から 21 dah まで上昇したのに対して, 粗脂質含量は 7 dah から上昇しその増加率は粗タンパク質より低かった。

Seoka et al. (1997) は, マダイでは卵割初期から摂餌開始期まで一定のリン脂質 (PL) 含量を維持するが, トリアシルグリセリド (TG) 含量は大きく低下したことから, TG をエネルギー源として消費していることを示唆した。本節でも, マダイ仔稚魚期の TG 含量は PL 含量より著しく低い値で推移したことから, TG が主なエネルギー源として利用されていることを確認した。ニジマス *Oncorhynchus mykiss* においてはふ化から浮上するまでの期間に, 全窒素量および脂質含量が減少すること (須山・萩野 1958), サヨリ *Hemiramphus sajori* でも孵化前後にタンパク質や脂質がエネルギー源として利用されていることが報告されている (木俣 1982)。おそらく, 他の魚種でも初期発育期間にはタンパク質 (アミノ酸) や脂質 (脂肪酸) がエネルギー源として, 選択的に利用されているのであろう。

粗灰分含量はふ化から継続的に僅かずつ増加し続けた。マダイの基本的な骨格は全長 70 mm 付近で完成することが報告されている (Matsuoka 1985)。また, 初生鱗の完成は体長 10~15 mm にみられるが, 成魚と同一の形状になるのは体長 30 mm 以上であることも知られている (福原 1976)。本節で粗灰分含量が増加し続けたことは, 初期発育期間は骨格や鱗形成にミネラル要求が高まっている可能性が推察される。特に, 14~21 dah からの稚魚期には全長の伸びが促進されることから, この時期からのミネラル要求量について留意する必要がある。いずれにしても, 仔稚魚用配合飼料の粗灰分含量について詳細に検討しなければならない。

細胞当たりの DNA 含量はほぼ一定であることから, 単位重量当たりの DNA 含量は細胞数を (大沢 1958), RNA / DNA 比は細胞あたりのタンパク質合成能を (里見 1969 ; Buckley 1984), タンパク質/DNA 比は細胞の大きさを示す指標 (中川 1982) であることが知られている。本節においてマダイ仔稚魚の DNA および RNA 含量は摂餌開始から 14 dah 付近にかけて急上昇したので, 細胞数とタンパク質合成が促進されていたことがうかがえる。一方, RNA/DNA 比はふ化から摂餌開始まで大きく低下した後上昇しつづけた。また, タンパク質/DNA 比も同様の変化を示した。これら DNA 含量と RNA 含量の変化から, 21 dah までの



仔魚期の成長は細胞数とそのタンパク質合成の増加，そして各器官の分化や機能化が併行して進むこと，21 dah からの稚魚期の成長は細胞数の増加だけでなく細胞の肥大も加わって，成長速度がさらに上昇することが分かった。ニシンにおいても（福田 1986），稚魚に移行した後に RNA/DNA 比とともにタンパク質/DNA 比が増加し，タンパク質合成および細胞肥大の両者が，稚魚期の速い成長を支えていることが示されている。Matsuoka（1984）はマダイ仔魚期には白筋および血合筋の筋繊維数は急激に増加するが筋繊維断面積に変化はなく，稚魚期に入って筋繊維数の増加は緩やかになり筋繊維断面積が著しく広がることを報告した。サケでは降海前に RNA/DNA 比・タンパク質/DNA 比の増加と筋細胞の肥大の起こることが報告されている（中野 1991）。マダイでは稚魚期に入るとこれまでの浮遊生活から底生生活に移行する（三村ら 1984）。中野（1991）がサケで推察したように，マダイでも生態変化に対応して筋細胞は肥大し，体力的な発達・改善がなされているのであろう。

仔稚魚の成長に伴う酵素活性の変化についてみると，ALP 活性のピークは 3 dah と 14～21 dah に認められた。ALP は骨，腸，肝臓および腎臓に局在し，ヒトでは乳幼児や成長期に活性が高くなることが知られている（細谷・森内 1980）。3 dah のピークは摂餌開始前から神経頭蓋，口蓋，舌弓などと鰓弓を含む頭部骨格と，消化吸収に係わる肝臓や腸が形成・機能化されるためであろう。一方，14～21 dah にみられたピークは稚魚への移行に向けて，骨格と鰭の分化・形成が進むことに対応していると考えられる。

G6PDH 活性のピークは 3 dah および 28～35 dah に認められた。G6PDH はペントースリン酸側路に位置し，脂肪酸合成に必要な NADPH と核酸の構成成分であるペントースを合成する（Cowey and Walton 1989）。ブリ *Seriola quinqueradiata* やコイ *Cyprinus carpio* で G6PDH は主に肝臓や腎臓に局在し，腸管でも僅かな活性が認められる（示野 1974）。田中（1969）はマダイの摂餌開始時期には肝臓，膵臓および腸管がすでに機能化していることを報告した。また，海野ら（1990）はマダイ仔稚魚の消化管の組織学的観察を行い，全長 8.0～12.7 mm の間に腸組織内の脂肪滴とタンパク質の蓄積はみられなかったことから，この時期に飲作用による消化吸収機構から胃の機能化が加わる成魚の機構に移行することを示唆している。このように，マダイにおける G6PDH の活性変化は，仔魚期および稚魚における消化器官の分化・機能化とよく符合していた。

Kawai and Ikeda（1973）はクロダイ *Acanthopagrus schlegelii* 仔稚魚の消化酵素活性の変化について調べ，ペプシン様酵素活性は稚魚に移行する 20 dah（全長 10 mm）頃から上昇し，胃腺の形成時期と一致することを示した。初期発育期間の Acid-Pase 活性は 14～21 dah から著しく上昇した。Acid-Pase として胃のペプシンと細胞リソゾームのカテプシンが考えられるが，本節では pH 3.0 の条件下で活性を測定していることから，主に胃のペプシン活性を反映するものと考えられる。おそらく，マダイでは 14 dah から胃腺の分化・形成が始まり，35 dah 頃に胃が完全に機能すると推察される。

一方，42 dah 以降に全てがへい死した Lot 4 と成長が顕著に劣った Lot 5 では他の Lot に

比べて核酸含量や各種酵素活性の変化に違いがみられた。Lot 4 および 5 では初期発育期間での骨格や消化管などの分化・形成が円滑に進まず、消化能や運動能力が低下して遅い成長と低い生残率につながったものと推察される。これらの諸点を考慮すると RNA/DNA 比、ALP 活性および G6PDH 活性は、種苗の健全性を表す良い指標になる可能性がある。しかし、いずれの Lot でも 42 dah における各酵素活性は低下した。これは、沖出しによる飼育環境の変化とストレス負荷に基づくものと考えられる。種苗量産に当たっても十分に留意する必要がある。

## 1-2) シマアジ

### 1-2-1) 材料及び方法

#### a) 供試魚および飼育方法

近畿大学水産研究所大島実験場の親魚群が産卵した受精卵を、浦神実験場の飼育棟に輸送し、屋内 7 m<sup>3</sup> FRP 製円形水槽に収容して 42 dah まで飼育した。この間、1 dah からほぼ 2 日毎に 42 dah まで、早朝の給餌前に必要数の仔稚魚を飼育水槽より採取して分析に供した。飼育水槽にはろ過海水を注水し、給餌は 3 dah よりシオミズツボウムシ、アルテミア幼生および市販の初期配合飼料を順に与えた。シオミズツボウムシおよびアルテミア幼生の栄養強化は前節 1-1-1), a) に記した方法で実施した。飼育期間中の水温は 22.0~24.3 °C であった。

#### b) 分析方法

仔稚魚のサンプリングと全長、全魚体の一般成分、RNA および DNA 含量 および ALP 活性の測定は 1-1-1), b) に記した方法で実施した。魚体の TG および PL 含量は市販のキット（リン脂質 C-テストワコー・トリグリセライド E-テストワコー、和光純薬工業株式会社、大阪）を用いて分析した。

### 1-2-2) 結果

全長の変化を Fig.1-13 に示した。ふ化直後の平均全長は 2.8 mm であり 16 dah の 7 mm に達するまで緩やかに成長した。16 dah からの成長速度は上昇し 30 dah に約 20 mm に達した。30 dah からはさらに成長速度が増加して 42 dah には 35 mm に達した。このように、シマアジ仔稚魚の成長には 16 dah および 30 dah に屈曲点がみられた。また、18 dah 全長 12 mm でほとんどの仔魚が稚魚に移行した。

ふ化後における仔稚魚の一般成分と TG および PL 含量の変化を Fig.1-14~18 に示した。水分含量は摂餌開始から 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、その後はほぼ一定値を維持した。

一方、粗脂質、TG および PL は 32 dah まで類似した変化を示した。すなわち、ふ化から 3 dah まで低下した後 12 dah まで著しく増加し、その後は 32 dah まで 7~12  $\mu\text{g}/\text{mg}$  の範囲で推移した。一方、32 dah から TG が著増したのに対して、PL はほぼ一定値を維持した。粗灰分含量はふ化から 16 dah まで徐々に上昇し、その後は一定値を維持した。

RNA および DNA 含量を Fig.1-19 に RNA/DNA 比およびタンパク質/DNA 比を Fig. 1-20, 21 示した。RNA および DNA 含量は 4~8 dah にかけて上昇し、それ以降は 18 まで比較的高い値を維持してから低下した。しかし、38 dah からは RNA が上昇したのに対して DNA 含量は低下し続けた。したがって、RNA/DNA 比は 3 dah~8 dah まで上昇して 38 dah まで一定値を維持し、その後は 42 dah まで急激に上昇した。期間中におけるタンパク質/DNA 比に多少の増減がみられたが全体的には増加し続けた。特に、34 dah からの上昇は顕著であった。

体重 1 g あたりの ALP 活性を Fig. 1-22 に示した。ALP 活性は 3 dah~6 dah にかけて急上昇し、その後は 14 dah まで高い値を維持した。16~21 dah には急激に低下し、その後は低値で推移した。

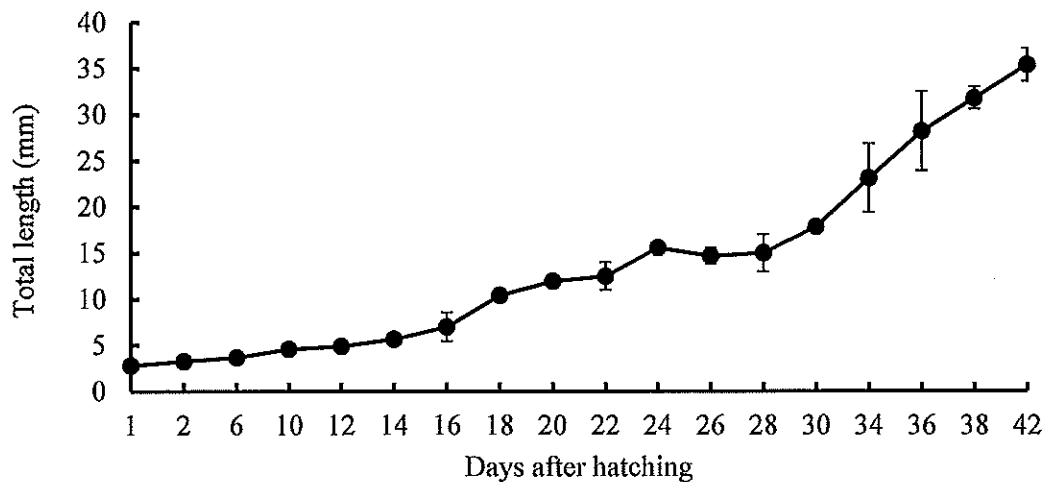


Fig. 1-13 Changes in total length of striped jack from larvae just after hatching to 42 days old juveniles.

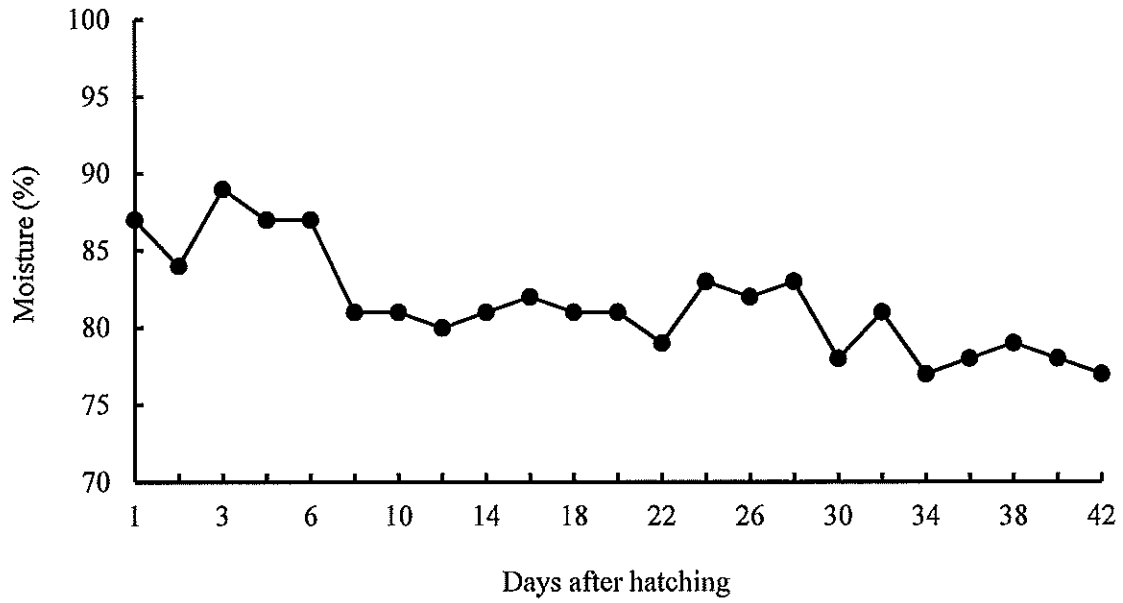


Fig. 1-14 Changes in moisture of striped jack from larvae just after hatching to 42 days old juveniles.

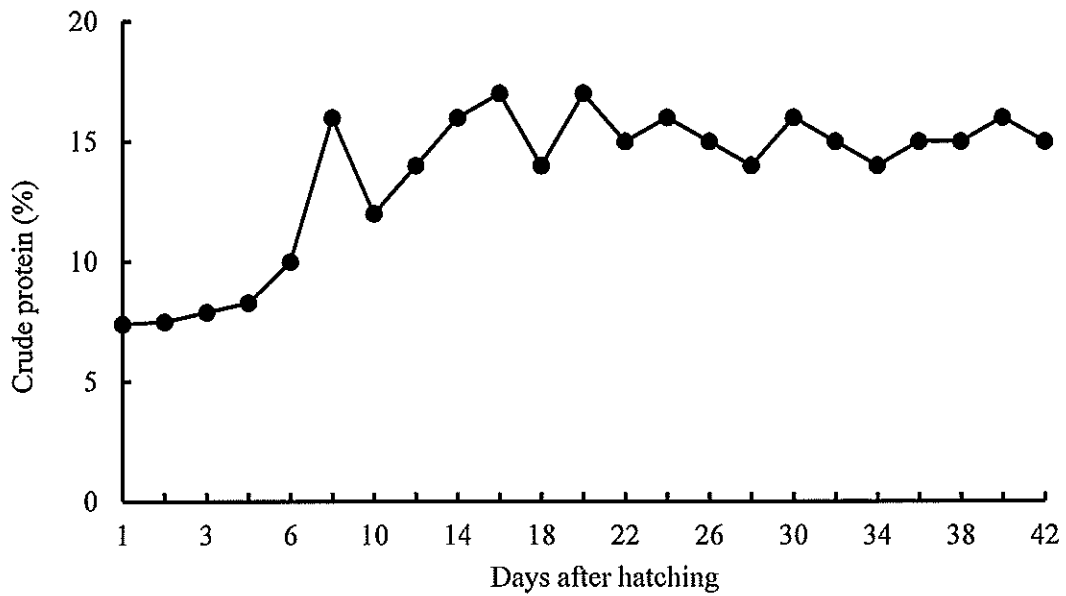


Fig. 1-15 Changes in crude protein of striped jack from larvae just after hatching to 42 days old juveniles. Values are expressed on a wet-weight basis.

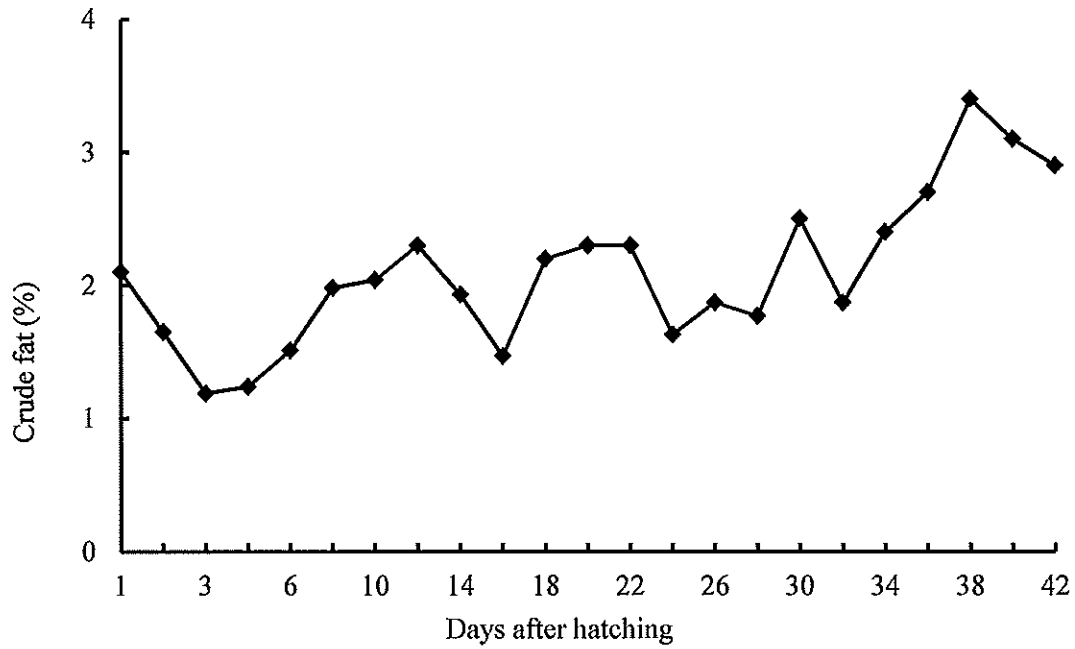


Fig. 1-16 Changes in crude fat of striped jack from larvae just after hatching to 42 days old juveniles. Values are expressed on a wet-weight basis.

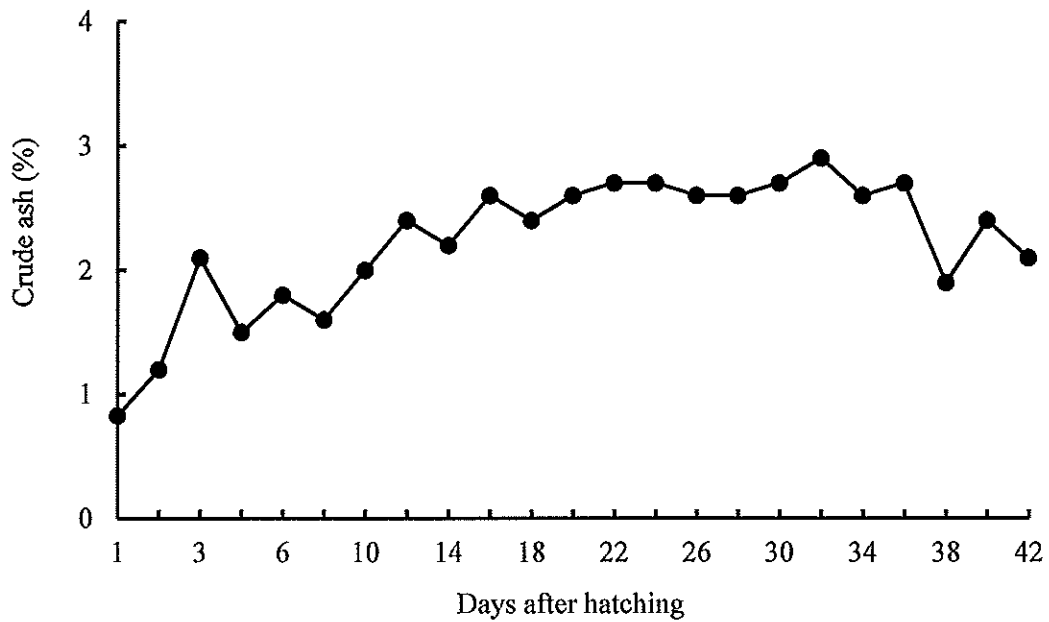


Fig. 1-17 Changes in crude ash of striped jack from larvae just after hatching to 42 days old juveniles. Values are expressed on a wet-weight basis.

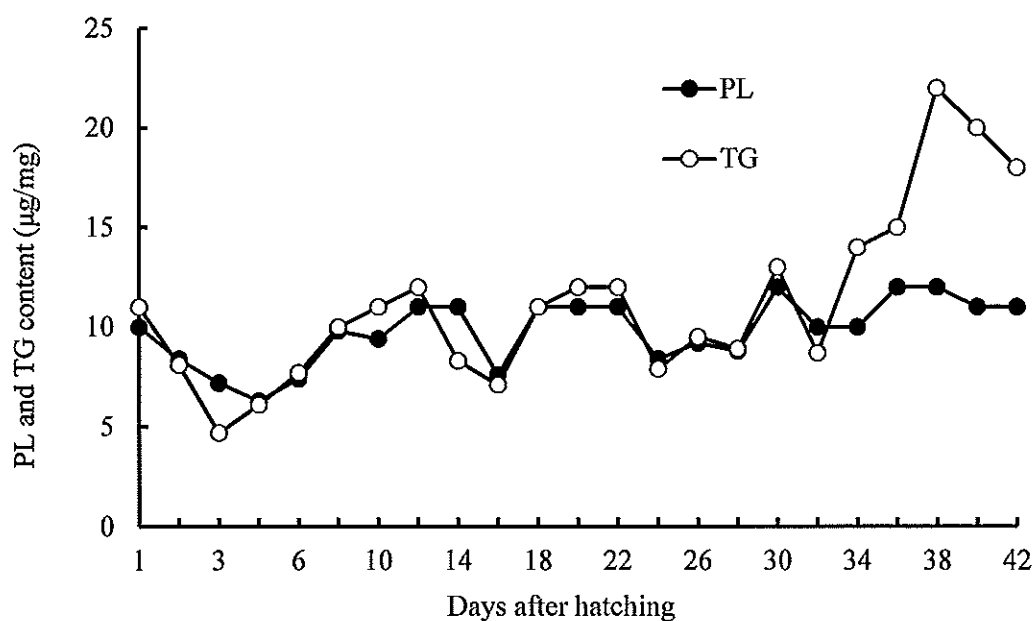


Fig. 1-18 Changes in PL and TG contents of striped jack from larvae just after hatching to 42 days old juveniles. Values are expressed on a wet-weight basis.

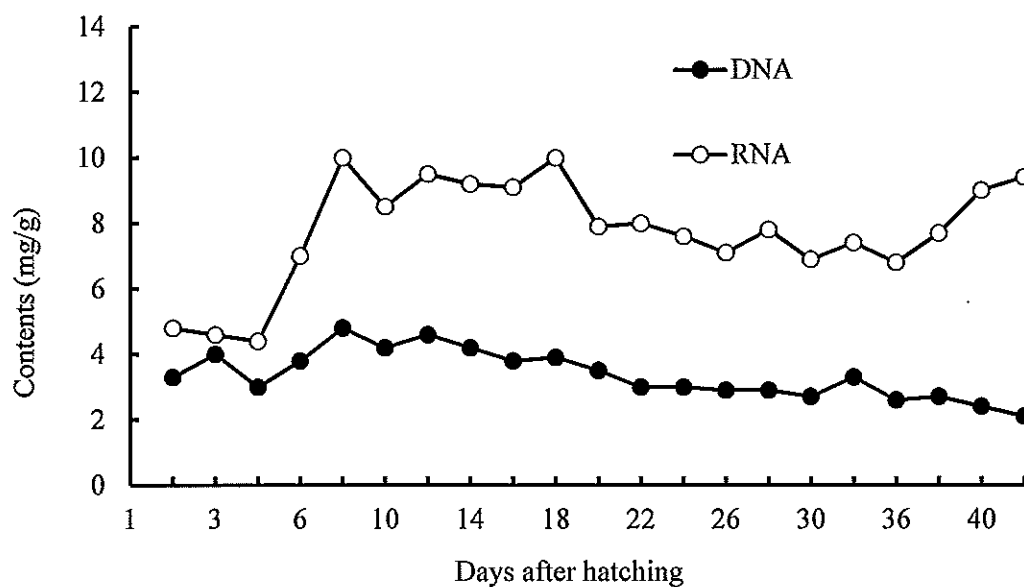


Fig. 1-19 Changes in DNA and RNA contents of striped jack from larvae just after hatching to 42 days old juveniles. Values are expressed on a wet-weight basis.

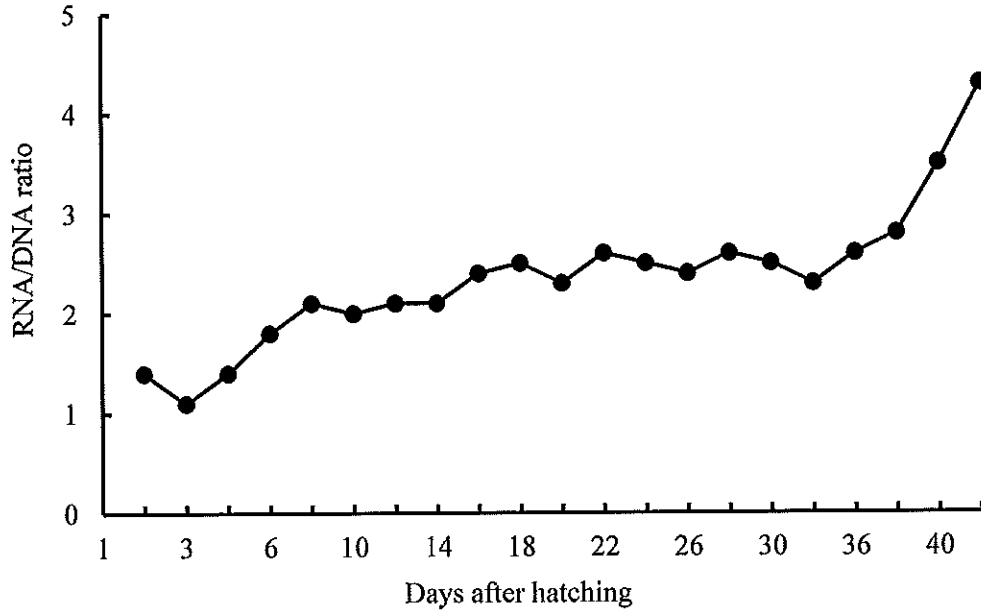


Fig.1-20 Changes in RNA/DNA ratio of striped jack from larvae just hatching to 42 days old juveniles.

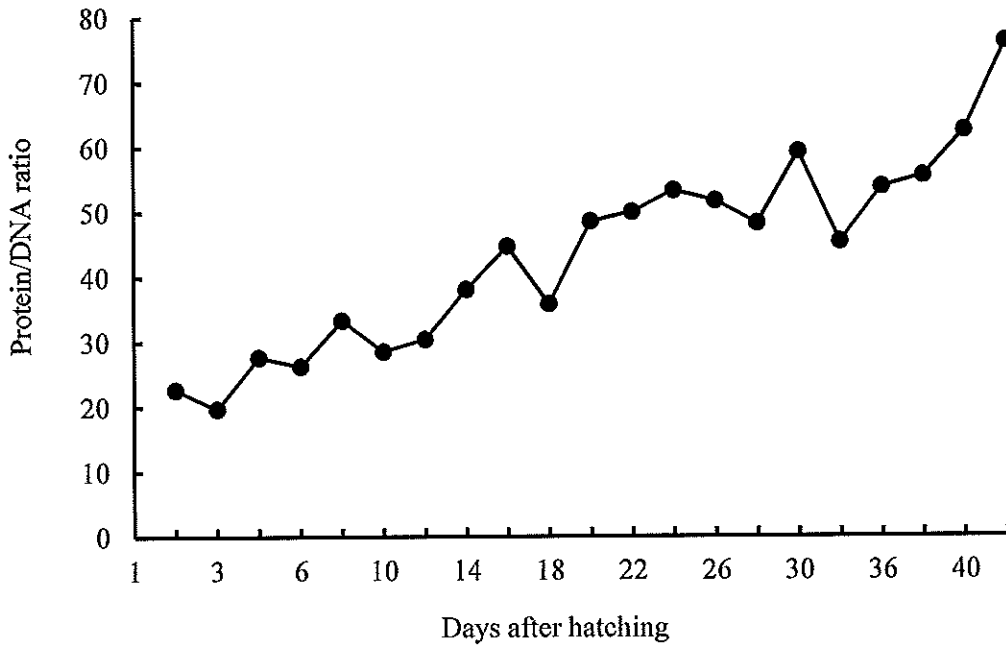


Fig.1-21 Changes in Protein/DNA ratio of striped jack from larvae just after hatching to 42 days old juveniles.

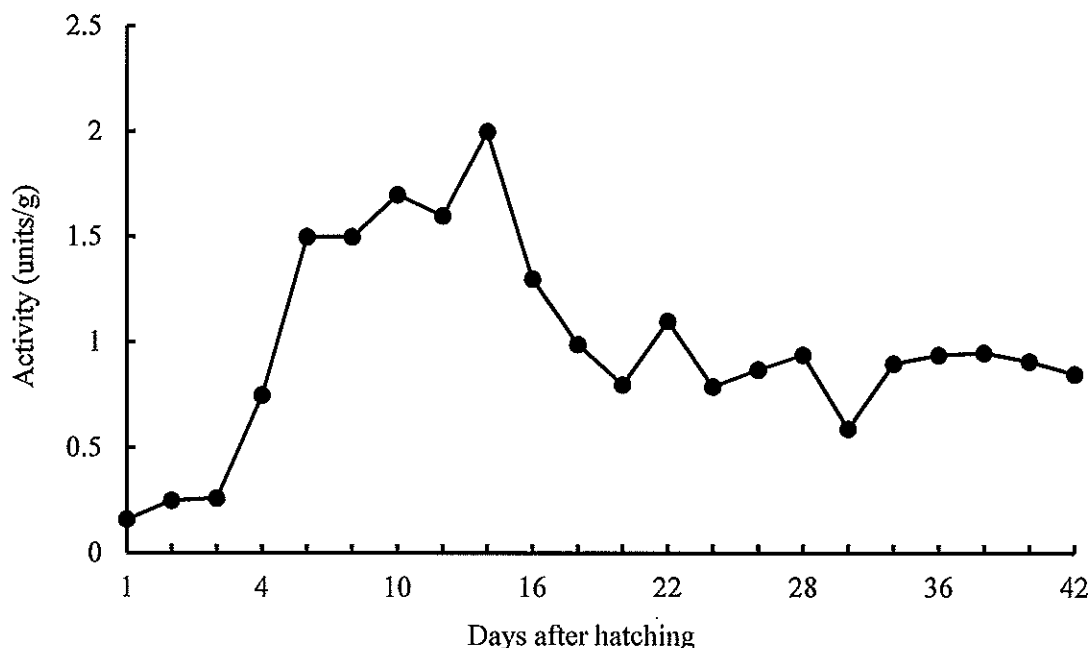


Fig.1-22 Changes in alkaline phosphatase activity of striped jack from larvae just after hatching to 42 days old juveniles. The activity is expressed per g of wet body weight.

### 1-2-3) 考察

我が国沿岸域に生息するシマアジは、脊椎骨数が 25 および 24 の A および B タイプに分けられる (Yamaoka et al. 1992)。小笠原近海に生息する B タイプの初期発育期間の形態変化では、外部形態の体長比は体長 6 mm と 10 mm 前後で屈曲点がみられ、各鰭が独立して鰭条が定数化する体長 10 mm で、仔魚から稚魚に移行することが明らかにされた (村井ら 1987, 1991; 川辺ら 1992)。本節で供試したシマアジ仔稚魚は一般に養殖に用いられている A タイプであるが、B タイプと同様に体長 10 mm (全長 12 mm) に達する 18 dah 前後に仔魚から稚魚に移行した。

本節におけるシマアジ仔稚魚の成長についてみると、全体的には前節のマダイに類似する成長速度を示したが、全長 10 mm と 18 mm 前後に達する 16 dah と 30 dah の 2 点で屈曲点がみられた。また、屈曲点以後の成長は以前より著しく速まった。なお、益田 (1995) によるとシマアジ稚魚は 28 dah から群泳をはじめるので、このころから生息域を大きく拡大させるものと推察される。したがって、16 dah の屈曲点は仔魚から稚魚への移行に、30 dah の屈曲点は群雄に伴う生息範囲の拡大に対応していることがうかがえる。

仔稚魚の成長に伴う魚体の一般成分の変化に注目すると、全長の屈曲点に対応した変化が



認められた。そこで、ふ化直後から 16 dah, 16~30 dah および 30 dah 以降の 1~3 期に分けて各成分について注目した。1 期では水分含量は低下したが、粗タンパク質と粗灰分含量は上昇した。2 期では水分、粗タンパク質および粗灰分は僅かに上下するがほぼ一定の値を維持し、3 期では粗タンパク質含量のみが 2 期と同レベルで推移したのに対して、水分と粗灰分は減少した。一方、粗脂質、TG および PL 含量の変化は他の一般成分と若干異なり、1 期では 3・4 dah および 16 dah, 2 期では 24~28 dah にそれぞれ著減し、3 期では粗脂質および TG 含量は 32 dah で減少した後増加したが、PL 含量はほぼ一定値を維持した。シマアジ仔稚魚も前節のマダイと同様に、全長の屈曲点付近で粗脂質および TG 含量が大きく低下したことから、仔魚から稚魚への移行や速い成長・生息域の拡大などを支えるエネルギー源として、脂質および TG を選択的に利用していることが示唆された。ニシン（福田ら 1986）や 1-1-3) に記したマダイでも仔魚から稚魚への移行期に、PL より TG が選択的に消費されることが明らかになっている。シマアジではフォスファチジルコリンを飼料に添加すると生残率および成長の向上が認められることから、シマアジ仔稚魚期においても後述するように細胞分裂が盛んに行われているため、細胞膜の構成成分である PL の要求性は高くなることが推察される（竹内 2009）。

DNA 含量は摂餌開始から 8 dah まで急激に上昇し 16 dah まで高く推移した後、42 dah にかけてほぼ直線的に減少したことから、シマアジ仔魚の成長もマダイ仔魚と同様に細胞数の増加によることが示唆された。一方、RNA/DNA 比についてみると、摂餌開始から 16 dah まで上昇し、30 dah まで一定値を維持し、その後は 42 dah まで増加したことから、細胞のタンパク質合成能は仔魚期より、群泳し生息域が拡大する 30 dah 以降に促進されることが分かった。また、タンパク質/DNA 比も期間中に増加し続けたが、34 dah からの上昇が顕著であったことから、30 dah からの速い成長は細胞数の増加と細胞肥大の両者に基づくことが示された。

シマアジ仔稚魚の ALPase 活性は 6~14 dah の期間で顕著に高く、3 dah と 14~21 dah にピークが得られたマダイとは異なっていた。シマアジ仔魚は外部形態・骨格の形成、神経系・内臓器官の分化・機能化などを、この短い期間に集中して行っていることが推察される。おそらく、この期間における栄養素の摂取や飼育環境が、その後の成育に大きな影響を及ぼすものと推察される。魚種だけでなく生態的な違いに対応して、初期発育期間の生理・生化学的な発達も異なるのは当然であろう。今後に残された興味ある研究課題の一つである。

本章において、マダイおよびシマアジの初期発育期間において大量へい死が多発する時期と、成長の変曲点および化学・生化学的成分の変化が重なることが示された。先述したように、その時点あるいは前後で粗脂質含量が大きく低下したことから、エネルギー源として脂質の要求性が増加していたことが容易に推察できる。しかし、変態期以後の成長が加速していたことを踏まえると、筋肉を含めた各器官の形成・機能化にタンパク質の要求性も増大していることがうかがえる。また、石橋ら（2003）および Ishibashi et al.（2005）は、各器官の形成・機能化に伴って酸素消費量が増大し、ストレス耐性が低下することを報告している。

海産仔稚魚はn-3高度不飽和脂肪酸(HUFA)の要求性が高く、エイコサペンタエン酸(C20:5n-3; EPA)やドコサヘキサエン酸(C22:6n-3; DHA)などを栄養強化した生物餌料を与える必要がある。また、DHAはマダイおよびシマアジ仔稚魚の活力を向上させる効果が認められている(竹内2009)。そこで、種苗生産施設ではHUFAを豊富に含有した栄養強化剤を用いるが、脂質の過剰な強化は生物餌料におけるタンパク質含量を低下させることから、脂質だけでなくタンパク質含量にも注意を払った強化方法を確立する必要がある。近畿大学水産養殖種苗センターでは本章の成果を実用化し、マダイおよびシマアジ卵から沖出し稚魚までの生存率を50~60%にまで高めることに貢献した。しかし、陸上の仔稚魚飼育や海上での種苗飼育において、疾病の発生が避けられず種苗の量産技術を確立する上でのボトルネックになっている。これまで、抗生物質やワクチン開発で魚類の初期発育期間の疾病と再発防止に関する研究が行われてきたが、仔稚魚期における免疫能は低くそれらによる有効かつ優れた治療効果は得られていない。特に、抗生物質の使用については厳しい制限や、耐性菌の出現、食品の安心・安全などから十分に留意する必要がある。そこで次章では、古来より抗菌活性や人に対して健康増進作用のあるハーブに注目し、マダイ・シマアジの初期発育期間における疾病予防や健康維持・ストレス耐性などに及ぼす効果について検討した。

## 第2章 ハーブの抗菌作用とワムシへの応用

マダイおよびシマアジの種苗量産技術の向上を目指して、本章ではまず、魚病細菌の増殖に対するハーブの抑制効果について検討し、次いで、ワムシの培養水に Cf および HM のメタノール抽出エキスを添加して、ワムシに由来するビブリオ菌に対する増殖抑制効果について調べた。なおハーブにはシンキク；Mm, サンザシ；Cf, カワラヨモギ；Ac, センキュウ；Co の4種を、魚病細菌には *Vibrio anguillarum* (SD040506), *V. alginolyticus* (rM-8402), *Aeromonas salmonicida* (ATCC14174), *Pseudomonas anguilliseptica* (NCIMB1949), *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (SP-91142), *Aeromonas hydrophila* (ET-79059), *Edwardsiella tarda* (NUF251) の7種をそれぞれ供試した。

### 2-1) ハーブエキスの抗菌作用

#### 2-1-1) 材料および方法

##### a) ハーブエキスの抽出

Mm, Cf, Ac および Co の乾燥品を韓国麗水市内で購入し、全南大学校水産学部で微粒子に細粉し運送業者を介して入手した。ハーブ混合物 HM は Mm, Cf, Ac および Co を 2 : 2 : 1 : 1 の割合で混合して調製した (Ji et al. 2007)。

薬用ハーブエキスは Sivaram ら (2004) の方法を改変してメタノールで抽出した。すなわち、これら4種ハーブと HM の粉末を室温下で 98 %メタノールに 48 h 浸漬し、次いで、15 min, 20 °C, 1500×g で遠心分離して得られた上澄部をエバポレーターで蒸発乾固させた。この方法で 100 g の Mm, Cf, Ac および Co からそれぞれ 3.9, 23.1, 2.5, 7.8 および 11.1 g の抽出物を得た。これら抽出物は試験に供すまで 4 °C の冷蔵庫に保存した。

##### b) 薬用ハーブの抗菌活性

薬用ハーブの抗菌活性を、魚病細菌の培地上でハーブ抽出物を吸着させたろ紙が形成する阻止円の直径とした。すなわち、ハーブ 800 μg 相当量の抽出物を吸着させた直径 7.5 mm のろ紙を、前培養した各魚病細菌株の菌液を前面に塗布した平板寒天培地上に置き、25 °C, 24 h インキュベートにより生じた阻止円を計測した。なお、ろ紙へのハーブ抽出物の吸着は、そのエタノール溶液を添加し 65 °C で乾燥して供試した。

##### c) 統計処理

一元配置分散分析法で処理による有意差 ( $P < 0.05$ ) を確認した後、Turkey's multiple range test に基づいて各区における平均値の有意差判定を行った ( $P < 0.05$ )。

2-1-2) 結果

7種の病原細菌に対する4種ハーブとHMの抗菌活性をTable 2-1に示した。CfおよびHMは供試した全ての病原細菌に対して阻止円を形成した。一方、Mmは*P. damsela* subsp. *piscicida*と*A. hydrophila*の2種細菌に阻止円を形成し、逆に、AcとCoでは*V. alginolyticus*のみに阻止円を形成しなかった。次いで、各ハーブにおける抗菌活性についてみると、Cfは*V. anguillarum*、*V. alginolyticus*および*A. salmonicida*に対して高い活性が、また、AcおよびCoはそれぞれ*P. damsela* subsp. *piscicida*および*E. tarda*に高い活性がみられた。4種ハーブを混合したHMの抗菌活性はCfに類似する傾向にあった。

Table 2-1. Antibacterial activity of four medicinal herbs and their mixture

Bacterial species	Zone of inhibition (mm)				
	Mm	Cf	Ac	Co	HM
<i>V. anguillarum</i>	0 <sup>a</sup>	17.29±0.91 <sup>b</sup>	13.05±0.92 <sup>c</sup>	13.67±1.21 <sup>c</sup>	14.63±1.05 <sup>c</sup>
<i>V. alginolyticus</i>	0 <sup>a</sup>	23.24±2.15 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	23.33±2.00 <sup>b</sup>
<i>Aeromonas salmonicida</i>	0 <sup>a</sup>	19.42±3.73 <sup>b</sup>	15.03±1.07 <sup>bc</sup>	15.57±1.17 <sup>bc</sup>	13.74±0.83 <sup>c</sup>
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	0 <sup>a</sup>	13.12±1.34 <sup>b</sup>	13.94±0.77 <sup>b</sup>	13.57±0.78 <sup>b</sup>	13.58±1.20 <sup>b</sup>
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	15.53±0.52 <sup>a</sup>	23.97±1.27 <sup>bd</sup>	26.48±0.41 <sup>c</sup>	25.06±0.90 <sup>bc</sup>	22.27±0.28 <sup>d</sup>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	14.23±2.14 <sup>a</sup>	29.43±1.14 <sup>d</sup>	16.68±1.05 <sup>ab</sup>	18.84±1.46 <sup>bc</sup>	22.13±1.16 <sup>c</sup>
<i>Edwardsiella tarda</i>	0 <sup>a</sup>	19.49±1.31 <sup>b</sup>	15.56±0.65 <sup>c</sup>	21.48±0.88 <sup>b</sup>	16.79±1.18 <sup>c</sup>

Values are mean ± SD (n=3).

Values in a row with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

2-1-3) 考察

本節から、Cfがすべての魚病細菌に対し強い抗菌活性を示した。また、AcおよびCoは*V. alginolyticus*を除く細菌に抗菌活性を示したが、Mmの抗菌活性は低かった。Cfにはカフェ酸、プロトカテク酸、フロログルシノールおよびピロガロールなどのポリフェノールが多く含まれている(Kim et al. 1993)。堂ヶ崎ら(2002)はカフェ酸やプロトカテク酸は肺炎を食中毒の原因菌である*Salmonella typhimurium*、*Staphylococcus aureus*および*Aspergillus niger*の増殖を抑制すると報告されている(Bae 2003, 大嶋ら 2002)。一方、Coにはプチル引き起こす*Legionella pneumophila*に対して抗菌活性を示すことを明らかにした。また、Acニライド、リグフチライド、セダノン酸が含まれ、天然の抗菌剤として一般的に使用される(西村

1999)。抗菌活性が最も低かった Mm は主に食欲不振や消化不良の改善に用いられるが、カフェ酸などを含むことが報告されている（奥津 2011）。このように抗菌活性に多少の差はみられるが、本節で供試したハーブは魚類の病原細菌の増殖を抑制する効果のあることが示された。ちなみに、*P. anguilliseptica*, *E. tarda*, *P. damsela* subsp. *piscicida* および *V. algaliticus* は、それぞれシマアジのシュードモナス症、マダイのエドワジェラ症、マダイおよびシマアジの類結節症およびマダイの腹部膨満症の原因菌である（Kusuda et al. 1995 ; 畑井ら 1998 ; 安永ら 1983 ; Nakai et al. 1992 ; 岩田ら 1978）。

Direkbusarakom et al. (1996) は、*V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *A. hydrophila* および *Streptococcus* sp. などに対して抗菌活性を示すハーブが、サケ類ウイルス病の原因となる伝染性造血器壊死症ウイルス IHNV, 伝染性脾臓壊死症ウイルス IPNV およびヘルペス症ウイルス OMV に対して抗ウイルス活性を示すことを報告した。海産魚の種苗生産において多大な被害をもたらすウイルス性神経壊死症, ウイルス性表皮増生症, ウイルス性腹水症, リンホシスチス症, イリドウイルス症などの原因ウイルスに対して, 本節のハーブが抗ウイルス活性を持つ可能性も考えられる。今後, 精査する必要がある。

HM の抗菌活性は各ハーブエキス混合による付加効果や相乗効果はみられず, Cf に類似していたことから, その効果の大部分は Cf によるものであると推察された。HM 中の Cf 含量は Cf の 3 分の 1 であることから, Cf の最小阻止濃度 (MIC) はそれ以下であると考えられ, 今後 Cf の MIC についても検討する必要がある。

## 2-2) ワムシに対するハーブ添加効果

ハーブエキスのうち Cf および HM エキスに優れた抗菌活性のあることが前節で示された。そこで, 本節ではワムシの栄養強化剤に Cf および HM エキスを添加し, ワムシに由来する *Vibrio* 属細菌数に及ぼす効果について検討した。ワムシに残存する病原細菌数が減少すれば, 仔魚期における疾病に伴うへい死は激減するものと期待できる。

### 2-2-1) 材料および方法

#### a) ワムシへのハーブ強化

ワムシの栄養強化剤は以下の手順で調製した。すなわち, 魚油 (カツオインターオイル, 植田製油, 神戸) に大豆レシチン (SLP ペースト, 辻製油, 松阪) を外割で 0.5 % 混合した 1.25 mL のカツオ乳化油に, Cf あるいは HM 抽出物 12.5 g を加えて 100 ml の水道水とともに混和して調製した。対照には 1.25 mL のカツオ乳化オイルのみを用いた。なお, ワムシの培養は, ナノクロロプシス *Nannochloropsis* sp. を  $3 \times 10^7$  cell/mL に調整した 30 L 容円形水槽 (水量 25 L) に, 先の栄養強化剤を投入して良く混合した後, ワムシを 600 ind./mL になるよ

うに接種して 12 h , 22 °C で培養した。なお、供試したワムシはあらかじめ市販の濃縮淡水円形水槽 (水量 25 L) に、先の栄養強化剤を投入して良く混合した後、ワムシを 600 ind./mL になるように接種して 12 h , 22 °C で培養した。

なお、供試したワムシはあらかじめ市販の濃縮淡水クロレラ (クロレラ濃縮液, ヤクルト薬品工業株式会社, 東京) とパン酵母 (ロティフル, オリエンタル酵母工業株式会社, 東京) で一次培養し、培養後は 60  $\mu$ m プランクトンネットで採集し殺菌海水で洗浄した。

#### b) ワムシの細菌数

Cf および HM による栄養強化試験をそれぞれ Exp. 1 および Exp. 2 として実施した。Exp. 1 では Cf 栄養強化剤をワムシ培養水に添加してから、開始 0, 2, 4, 6 および 12 時間後に、Exp. 2 では HM 栄養強化剤をワムシ培養水に添加し、開始 0, 6 および 12 h 後にそれぞれワムシを採取して計数した。なお、対照も同様にして培養し、採取後に計数した。なお、いずれの Exp. でもエキス添加および対照は 3 重区とし、ワムシの採取は 2-2-1) a) に記した方法で行った。採取したワムシは滅菌海水とともにガラスホモジナイザーにより氷冷下でホモジナイズした。このホモジネートと滅菌海水を用いて  $10^2$ ,  $10^3$  および  $10^4$  倍のワムシ抽出液とし、TCBS 培地に 1 mL ずつ接種して、24 h, 25 °C で培養し出現したコロニーを細菌数 (CFU) とした。

#### 2-2-2) 結果

Exp. 1 における細菌数の推移を Fig.2-1 に示した。Cf 区および対照区とも開始、6 h 後まで有意な区間差はなくほぼ一定値を維持したが、12 h 後の Cf 強化区でわずかに減少したのに対して、対照区は増加して有意な区間差がみられた。Exp. 2 における細菌数は 12 h 後まで HM 区と対照区との間に有意な区間差はなかったが、HM 区が対照区より僅かに低く推移し、経時的には両区とも増加する傾向にあった (Fig.2-2)。

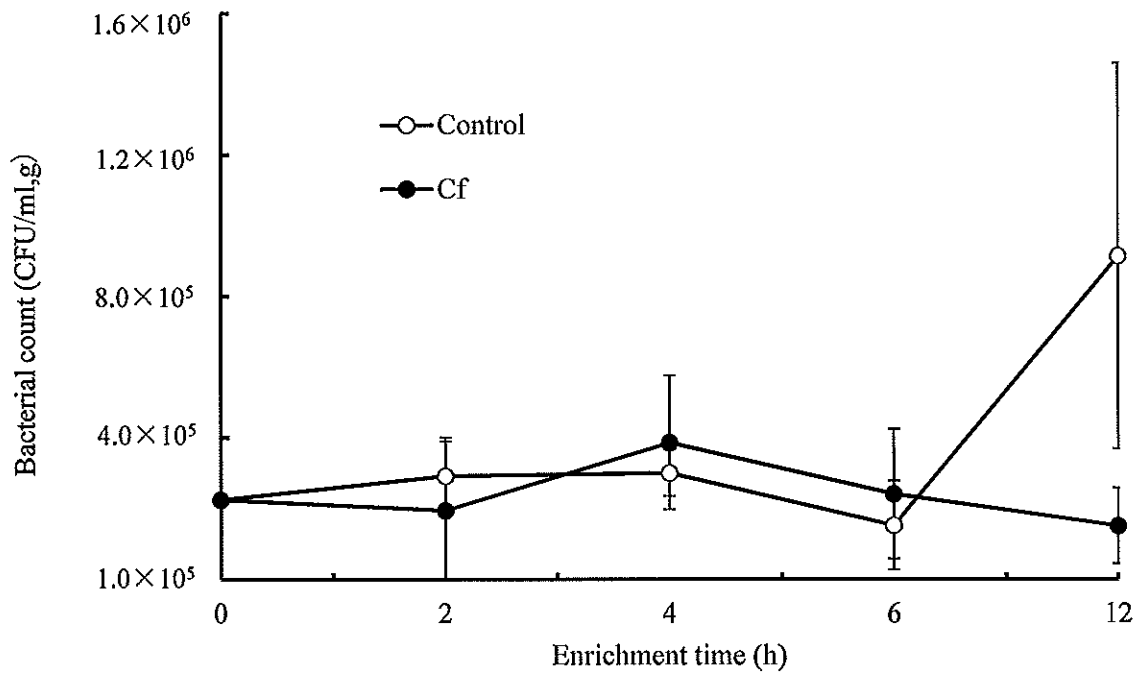


Fig. 2-1 Effect of enrichment of rotifer by Cf on the bacterial count. Values are mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

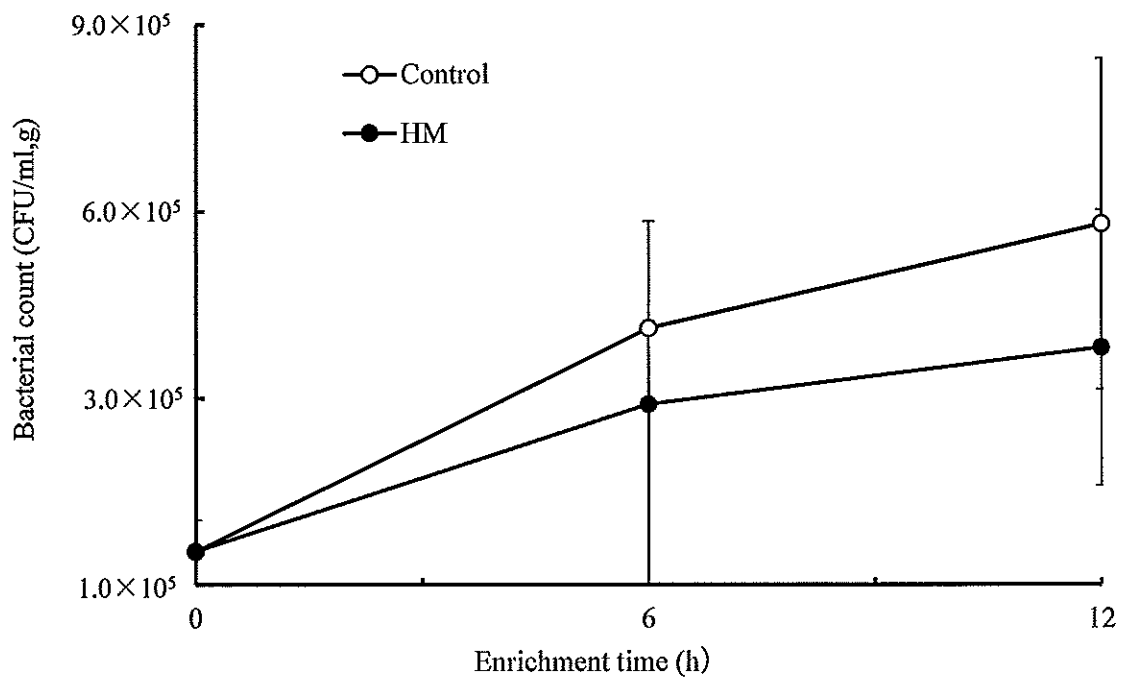


Fig. 2-2 Effect of enrichment of rotifer by HM on the bacterial count. Values are mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

### 2-2-3) 考察

海産魚の種苗生産ではふ化仔魚の生物餌料としてシオミズツボワムシが主に給与される。これまで、ワムシに代わる初期配合飼料の開発が試みられたが、成長や飼育成績そして生残率を十分に満たすものはいまだに開発されていない。

ワムシの効率的な培養方法と栄養強化方法は種々検討され、低塩分海水での培養が増殖を促進するだけでなく、コストの低減につながること(小磯・日野 2001)、植継ぎ培養は対数増殖期を過ぎて定常期に収穫されることからワムシの生理活性や餌料としての質が低下すること(小磯・日野 2002; 友田ら 2005)などが明らかにされている。さらに、ワムシを短時間でも飢餓状態に置くと生残率が低下し小型化が生じること(小磯ら 2005)、対数増殖期以降のワムシ給与はヒラメの形態異常を誘起すること(友田ら 2006)なども知られている。一方、渡辺ら(2005)は種苗生産現場で発生する仔魚疾病の感染源は主にワムシであり、その培養に使用する用水、水槽、器具、餌料およびワムシ元種の消毒が必要であると示し、単性生殖卵をグルタルアルデヒド 1.25 mg/L を含む 60%人工海水での 30 min 処理が有効であると述べている。しかし、実際のワムシ培養は開放条件で行われているので、病原菌の混入を完全に避けるのは不可能に近い。また、培養施設で特定の病原細菌の混入を避けるため、合成薬品や抗生物質を安易に使用するのも、耐性菌の発生や食の安全・安心からも推奨できない。そこで、本節では病原細菌に対して高い抗菌活性がみられた薬用ハーブ Cf および HM が、ワムシに由来する細菌数を減少させる効果を持つか否か検討した。なお、薬用ハーブが魚類養殖分野において防疫機能の改善や健康維持に効果のあることが報告されている(Kim et al. 1999; Jian and Wu 2003, 2004; Immanuel et al. 2004; Sivaram et al. 2004; Yin et al. 2006; Ji et al. 2007; Ardo et al. 2008; Xie et al. 2008; Zheng et al. 2009)。

Cf 区のワムシに由来するビブリオ属の細菌数は、対照区とともに 6 h 後まで低く推移したが、12 h 後では対照区が Cf 区より有意に増加し、HM 区でも対照区より細菌数は減少したが有意な区間差でなかった。前節で Cf および HM の *V. anguillarum* および *V. alginolyticus* に対する抗菌活性に差異のないことを明らかにした。本節でハーブによってワムシに由来する *Vibrio* 属細菌数に違いが認められたのは、これら病原細菌以外の *Vibrio* 属細菌に対する増殖抑制活性の差異に基づくのであろう。このように、Cf および HM にワムシに由来する *Vibrio* 属細菌数を減少させる効果がうかがえたことから、今後は添加濃度を高めるなどして、さらに詳細に検討する必要がある。

我が国の種苗生産過程に発生する海産仔稚魚の疾病は、*Vibrio* 属の病原細菌に基づくことが一般的に知られている。特に、クロダイ *Acanthopagrus schlegelii*, トラフグ *Takifugu rubripes*, マダイ, ヒラメ, アユ *Plecoglossus altivelis* などの仔稚魚で多く発症している(楠田ら 1986; 室賀・田谷 1982; 室賀ら 1987, 岩田ら 1978, 増村ら 1989, 安永・山元 1977; 田谷ら 1985)。岩田ら(1978)は腹部膨満症のマダイ稚魚から *V. alginolyticus* を、また、田谷ら(1985)はビ



ブリオ病のアユ仔稚魚から *V. anguillarum* を原因菌としてそれぞれ分離し、これらの疾病はワムシを介して伝播・感染することを示唆した。山野井ら（1998）は、栄養強化中のワムシをニフルスチレン酸で 3～5 h 薬浴することで、TCBS 寒天培地の細菌数が薬浴前の  $10^7 \times \text{CFU/g}$  から 2 桁減少すること、ワムシのニフルスチレン酸による薬浴はアユ仔魚の大量死の発生率を減少させることを明らかにした。Battaglione et al. (2006) は striped trumpeter *Latris lineata* の仔魚をオキシテトラサイクリン（OTC）で薬浴して飼育し、ワムシの脂肪酸組成を栄養強化で改善するより仔魚体内の TCBS 細菌数を OTC で減少させるほうが、歩留まりと成長を向上させることを報告した。初期飼育過程でワムシを介したビブリオ病の伝播を阻止することが、種苗の安定生産・低廉化にとって不可欠な課題になっているが、仔稚魚に対する抗菌剤や抗生物質による予防・治療効果は十分に得られていない。

次章では、ハーブ強化ワムシでマダイおよびシマアジ仔魚を飼育し、成長や体内の生菌数そして病原細菌による攻撃試験耐性に及ぼす効果について詳細に検討した。

### 第3章 仔魚に対するハーブワムシの効果

薬用ハーブエキス Cf および HM が病原細菌の増殖抑制効果を持つことを明らかにしたが、ワムシ培養の栄養強化剤に添加しても、ワムシ由来の *Vibrio* 属細菌数を顕著に減少させる効果はみられなかった。そこで、本章では前章に続いてハーブ添加ワムシでマダイおよびシマアジ仔魚を実際に飼育し、成長や仔魚の生菌数そして病原菌による攻撃試験耐性について調べた。

#### 3-1) マダイ

##### 3-1-1) 材料および方法

###### a) ワムシへのハーブ添加と飼育方法

ワムシ栄養強化方法の詳細は 2-2-1) a) に記した。

本学水産養殖種苗センター大島事業場のマダイ親魚群が自然産卵した受精卵を、同浦神事業場の屋内 400 L 容角型水槽へ 2,000 粒ずつ収容して対照区、Cf および HM 区を設けた。ふ化後 (3 dah) より各試験区にはそれぞれの栄養強化ワムシを、5~10 ind./mL の密度を維持するよう 1 日数回に分けて与え、3~20 dah まで 18 日間飼育した。試験区には 3 dah の給餌開始よりろ過海水を 1 L/min の割合で注水し、飼育水には濃縮淡水クロレラ (クロレラ濃縮液, ヤクルト薬品工業, 東京) を毎日 5 mL ずつ添加した。試験期間中の水温および DO はそれぞれ  $20.7 \pm 0.3$  °C および  $8.2 \pm 0.3$  mg/L であった。飼育試験は各処理につき 3 反復区を設けて実施した。

###### b) 測定項目・魚体の生菌数

試験終了時には全長と体重を測定するとともに、魚体の生菌数および *V. anguillarum* (SD040506) を用いた攻撃試験を行った。魚体の生菌数は魚体を殺菌海水で洗浄した後、滅菌海水とともにガラスホモジナイザーを用いて氷冷下でホモジナイズし、2-2-1) b) に記した方法で測定した。

###### c) 攻撃試験

飼育試験を終了した各水槽から 100 尾ずつ取り上げて 30 L 容円形水槽 (水量 20 L) に収容して攻撃試験区とした。供試した *V. anguillarum* はマダイ仔稚魚を通過させて病原性を確認したもので、各試験水槽に  $10^6$  CFU/mL になるように調整した。攻撃試験の期間中は各栄養強化ワムシ 60,000 ind. を 1 日 1 回給与し、常時通気しながら 7 日間飼育した。また、期間中は 1 日 2 回 (午前・午後) に底面掃除を行い、へい死魚を計数した。さらに、試験水槽の 1/3 容

量を 21 °C に加温した紫外線滅菌海水で毎日換水した。

#### d) 統計処理

一元配置分散分析法で処理による有意差 ( $P < 0.05$ ) を確認した後, Dunnett's new multiple range test に基づいて各試験区における平均値の有意差判定を行った ( $P < 0.05$ )。

#### 3-1-2) 結果

飼育成績を Table 3-1 に示した。終了時の全長と体重は, Cf ワムシ区, HM ワムシ区および対照区の順に低下し, 全長は Cf ワムシ区が対照区より有意に大きかった。また, 魚体重も Cf ワムシ区が対照区より 20 % 重かったが有意な差ではなかった。生残率に有意な差は認められずハーブワムシ区が僅かに低かった。また, 終了時における魚体のビブリオ菌数にも有意な区間差は認められなかった。

攻撃試験の結果を Fig. 3-1 に示した。Cf および HM ワムシ区の生残率は 5 日後まで徐々に低下したが, 対照区では大きく減少し, 1 日後より対照区が有意に低下した。さらに, 6 日から 7 日にかけて全区の生残率が急激に減少し, その減少は対照区で顕著であった。終了時の生残率は Cf および HM 区が 85% になり, 対照区では 60% 以下と有意に低かった。

**Table 3-1.** Growth , survival rate and bacterial count of larval red sea bream fed on rotifer treated with medicinal herb extracts for 18 days

Treatment	Control	Cf	HM
Initial total length (mm) <sup>1</sup>	2.92 ± 0.16	2.92 ± 0.16	2.92 ± 0.16
Final total length (mm) <sup>2</sup>	7.03 ± 0.19	7.64 ± 0.16*	7.26 ± 0.07
Final body weight (mg) <sup>3</sup>	3.12 ± 0.55	3.82 ± 0.27	3.51 ± 0.20
Survival rate (%)	46.83 ± 7.35	43.72 ± 12.54	45.43 ± 7.23
Bacterial count (×10 <sup>5</sup> CFU/g) <sup>4</sup>	3.09 ± 3.44	5.99 ± 2.95	4.73 ± 2.33

<sup>1</sup> Mean of 10 fish.

<sup>2</sup> Mean of three groups, each 30 fish.

<sup>3</sup> Total weight / number of the larvae ( $n = 3$ ).

<sup>4</sup> Bacterial count on TCBS agar.

Values in a row with asterisk indicates the significant difference compared with the control group ( $P < 0.05$ ).

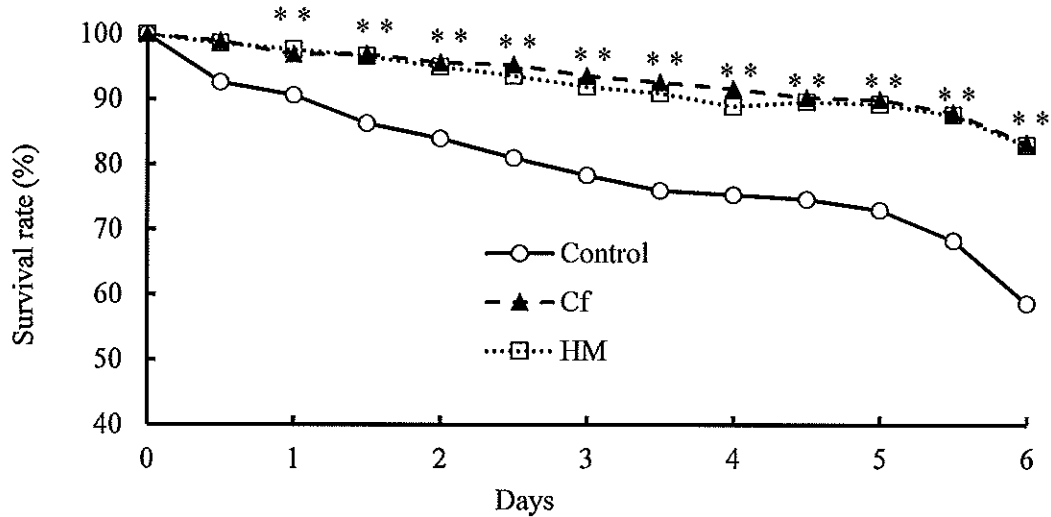


Fig. 3-1 Change in survival rate of larval red sea bream fed on rotifer treated with medicinal herb extracts and subsequently exposed into *V. anguillarum* bath. Asterisks indicate the significant difference compared with the control group ( $P < 0.05$ ).

### 3-1-3) 考察

本章では、ワムシを Cf および HM エキスのバイオカプセルとして利用し、マダイ仔魚の飼育成績や体内の生菌数および *V. anguillarum* 攻撃試験の生残率に及ぼす効果について検討した。

緒論で述べたように、Cfには主にポリフェノールとペクチンが含まれている (Kim 1993 ; 桑原ら 2003 ; Zhu et al. 2013 ; Wen et al. 2015)。HMは Cf, Ac, Co および Mm の混合物で、Acには抗酸化作用を持つポリフェノールや酵母 *Sacchamycetes cerevisiae* とカビ *Aspergillus niger* に抗菌活性を持つカピリンとカピレンが (Seo et al. 2003 ; 杉本ら 2007)、Coにはヒトにおいて血管平滑筋弛緩作用や皮膚血流増加作用を持つフタライド系化合物が (萬ら 1994)、Mmは小豆、杏仁、蒼茸、野蓼、青蒿などに小麦粉あるいは米を混合し、発酵させて調製したもので、ヒトでは消化不良、食欲不振、下痢などの症状に処方され、ポリフェノール、アミラーゼ、配糖体など多種多様なものがそれぞれ含まれている。(Lee and Seo 2003 ; 奥津ら 2011)。

終了時における Cf および HM ワムシ区の全長および体重は、有意な区間差でなかったが対照ワムシ区に比べて優れていた。しかし、魚体の *Vibrio* 属細菌数に区間差はなかった。一方、*V. anguillarum* 攻撃試験による生残率は、Cf および HM ワムシ区が対照区より有意に高かった。ハーブ添加ワムシ区で認められた多少とも速い成長は、Cfに含まれるポリフェノールやペクチンの作用によるかも知れない。第1章で示したように、ふ化から稚魚に移行するま

での仔魚期には胃は分化・機能化せず、門番として pH の低下や酸性プロテアーゼの分泌は認められない。したがって、仔魚期では飼育水に含まれる微生物がそのまま腸に侵入し腸管フローラを形成することになる。おそらく、Cfのポリフェノールやペクチンが害を持つ微生物の増殖を抑制し腸上皮粘膜を保護して（海老原 2008）、仔魚の消化吸収能を高く保っていた可能性が考えられる。さらに、吸収されたポリフェノールが体内の酸化を抑制して健康状態を高く維持していたことも推察できる。体内の *Vibrio* 属細菌数に区間差がみられなかったのは、第 2 章で示したようにすべての *Vibrio* 属細菌に対して Cf エキスは抗菌活性を示さないことに基づくのであろう。さらに、*V. anguillalum* 攻撃試験によるへい死魚が Cf および HM ワムシ区で減少したのは、Cf の *V. anguillalum* に対する増殖阻害・抗菌効果によることが示唆され、ワムシがバイオカプセルとして十分に利用できることが示された。北島ら（1980）および陳ら（2004）もワムシはバイオカプセルとして、仔魚への必須脂肪酸強化やタウリン投与に有効なことをすでに報告している。一方、魚類の免疫にも自然免疫と獲得性免疫機能の存在することが知られているが（三宅 2014）、仔魚期のマダイでは 2・3 dah に母親由来の抗体は一時的に消失し、造血器官の腎臓、脾臓および胸腺が発達する 15 dah 頃より抗体価は上昇する（Tanaka et al. 1999）。本節において、マダイ仔魚期にワムシをバイオカプセルとしてハーブエキスを投与できることが示され、飼育成績だけでなく健康維持や疾病の発生を抑制できる可能性が示されたことは意義深い。

### 3-2) シマアジ

#### 3-2-1) 材料および方法

##### a) ワムシへのハーブ添加と仔魚の飼育方法

ワムシへのハーブエキス添加とその培養方法の詳細は 3-1-1) a) に記した。

近畿大学水産養殖種苗センター白浜事業場のシマアジ親魚群から自然産卵で得た受精卵を、浦神事業場の屋内 500 L 容円形水槽に収容してふ化させた。次いで、それらふ化仔魚を屋内 400 L 容円形水槽に 4000 尾ずつ収容して、Cf および HM ワムシ添加区とハーブ無添加ワムシの対照区を設けた。各区には 3 dah より所定のワムシを 5 個体/mL の密度を維持するよう 1 日数回に分けて与え、3~20 dah までの 18 日間飼育した。飼育水にはろ過海水を 1 L/min で給水し、照明は水面上 50 cm に設けた 25W 電球型蛍光灯で 12L:12D とし、飼育水のナノクロプシス濃度を  $5\sim 8 \times 10^5$  cell/mL 維持した。飼育試験は各処理につき 3 反復区を設けて実施した。試験期間中の水温および DO はそれぞれ  $25.0 \pm 0.6$  °C および  $8.4 \pm 0.3$  mg/L であった。

b) 測定項目および干出試験

試験開始および終了時には全長と体重を測定した。前節のマダイ仔魚では魚体の生菌数について調べたが、有意な区間差が認められなかったことから、本節のシマアジ仔魚では以下の手順で干出試験を実施した。すなわち、飼育試験終了後に各水槽から仔魚を 100 尾ずつ取り上げて網籠に収容し、気温 15 °C の空气中に 30 sec 干出したのち新鮮ろ過海水を満たした 30 L 容円形水槽（水量 20 L）へ収容し、通気しながら 24 h 飼育して生残率を求めた。

c) 攻撃試験

攻撃試験の詳細は 3-1-1, c) に記した。なお、*V. anguillarum* の浸漬濃度は  $10^7$  CFU/mL に調整した。

c) 統計処理

一元配置分散分析法で処理による有意差 ( $P < 0.05$ ) を確認した後、Dunnett's new multiple range test に基づいて各試験区における平均値の有意差判定を行った ( $P < 0.05$ )。

3-2-2) 結果

飼育成績を Table 3-2 に示した。終了時における全長、体重および生残率に有意な区間差はなかった。

干出試験における生残率を Fig.3-2 に示した。24 h 後の生残率は Cf および HM ワムシ区で 70 % 前後と高く、対照区の 50 % より優れていたが標準偏差にばらつきがあり有意な区間差を得られなかった。

*V. anguillarum* 攻撃試験後における生残率の経日変化を Fig. 3-3 に示した。いずれの区も 6 日後まで大きく低下して区間差はみられなかったが、7 日後には Cf および HM ワムシ区 30 % 前後を維持したが、対照区では全てがへい死し前 2 者との間に有意差がみられた。

3-2-3) 考察

飼育成績には Cf および HM ワムシ区と対照区との間に有意差はなかった。シマアジの胃は体長 7~13 mm で分化することが報告されており (川辺ら 1992)、マダイと同様に稚魚に移行してから胃が機能化すると推察される。しかし、マダイ仔魚とは違って Cf および HM エキスはシマアジ仔魚の成長を改善しないことが示された。一方、飼育試験が終了した 20 dah の生残率はいずれの区も 60 % に近く、前節のマダイや川辺ら (1996) が報告したシマアジの仔魚の生残率より優れていた。おそらく、本節では飼育条件が微生物の関与を含めて好ましい条件であったことがうかがえる。干出試験では Cf および HM ワムシ区が生残率が対照

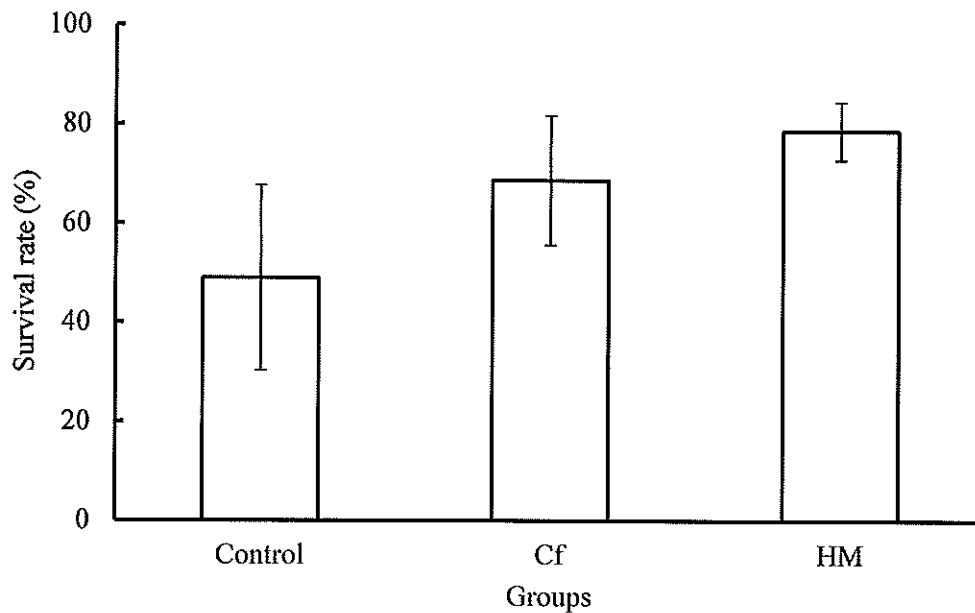
**Table 3-2.** Growth and survival rate of larval striped jack fed on rotifer treated with medicinal herb extracts for 18 days

	Control	Cf	HM
Initial total length (mm) <sup>1</sup>	3.80±0.08	3.80±0.08	3.80±0.08
Final total length (mm) <sup>2</sup>	6.60±0.12	6.48±0.04	6.57±0.10
Final body weight (mg) <sup>3</sup>	4.06±0.56	4.03±0.39	4.31±0.40
Survival rate (%)	57.67±5.09	57.43±3.13	57.17±4.39

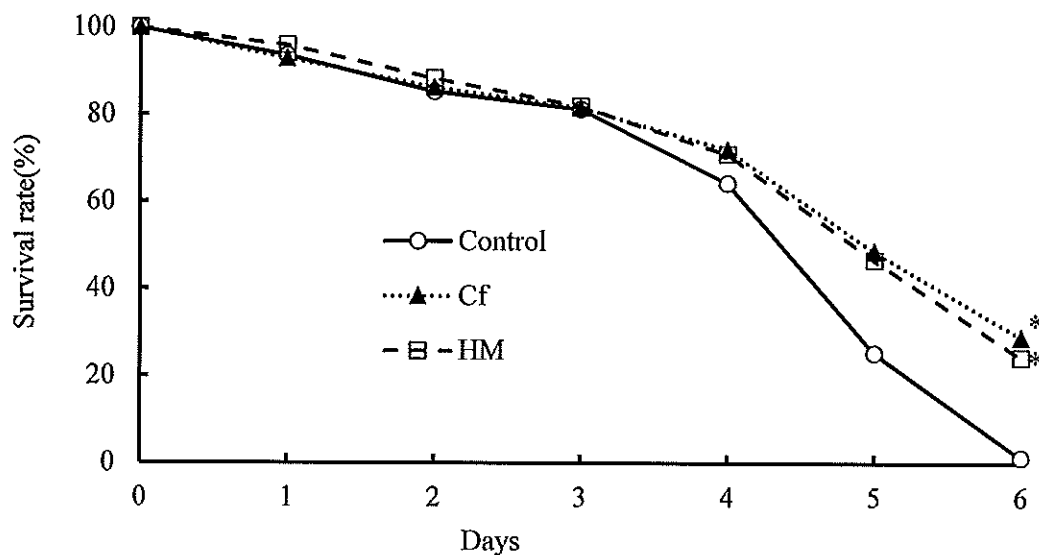
<sup>1</sup> Mean of 30 fish.

<sup>2</sup> Mean of three groups, each 30 fish.

<sup>3</sup> About 0.2-0.3 g larvae employed 3 times at random from all samples were counted.



**Fig. 3 -2** Survival rate of larval striped jack fed on rotifer treated with medicinal herb extracts for 18 days and subsequently the air exposure for 30 seconds. Values are mean ± SD ( $n = 3$ ).



**Fig. 3-3** Change in survival rate of larval striped jack fed on rotifer treated with medical herb extracts for 18 days and subsequently exposed into *V. anguillarum* bath. Asterisks indicate the significant different compared with the control group ( $P < 0.05$ ).

区より優れていたが有意差はなかった。北島ら (1993) は干出試験が仔稚魚の健苗性や健康状態を評価する良い指標であることを示した。中野ら (1989) も干出試験がサケ放流魚の健苗性を判断する有用な指標であると報告した。CfおよびHMワムシ区と対照区の飼育成績に有意差はみられなかったが、Cfエキスに含まれるポリフェノールやペクチンが、シマアジ仔魚の健苗性を高めていた可能性も考えられる。

本節の *V. anguillarum* 攻撃試験でも、CfおよびHMワムシ区のシマアジ仔魚に対照区より高い生残率が得られ、前節のマダイ仔魚の効果を再確認できた。おそらくシマアジ仔魚でもCfエキスが *V. anguillarum* の体内での増殖を阻害し、腸上皮からの侵入を抑制したと考えられる。このように、シマアジ仔魚に対してもワムシをハーブエキスのバイオカプセルとして利用できることが示された。



## 第4章 沖出しおよび種苗サイズ稚魚に対するハーブ添加飼料の効果

マダイおよびシマアジ種苗はふ化から 40 dah までは陸上水槽で、その後は海上の網生簀に沖出し 60~180 日飼育して養殖業者に配布される。沖出しや種苗配布の前後に輸送や選別作業などハンドリングの機会が増加し、それによるストレス負荷で健康度や免疫能が低下してへい死や疾病が多発する。特に、低水温期にはビブリオ病や滑走細菌症によるへい死が頻発して、種苗量産を行ううえでボトルネックになっている。細菌性疾病の治療は抗生物質の投与を主体に行うが、低水温期には効果が表れにくく、それ以前にいかにも健康な種苗を生産できるかが重要なポイントになる。

本章では前章の仔魚につづいて、ハーブがマダイ・シマアジの沖出しおよび種苗サイズ稚魚の成長やストレス耐性に及ぼす効果を検証した。

### 4-1) マダイ

#### 4-1-1) 沖出しサイズ稚魚

##### 4-1-1-1) 材料および方法

###### a) 試験飼料

Table 4-1 に基本飼料 D1 および D2 の配合組成を示した。タンパク質源として D1 には沿岸魚粉とオキアミミールを、D2 には沿岸魚粉、チリ産酵素処理魚粉 (EFM) およびオキアミミールを配合した。魚油、 $\alpha$ -デンプン、Halver 処方方のビタミン・ミネラル混合物などは共通して配合し、D2 には大豆レシチンとセルロースの配合割合を減じ、代わりにビタミン C とタウリンを加えた。これら D1 および D2 100g に Cf および HM 粉末 0.5 g をそれぞれ添加し、均質になるまで混合してから水道水を加えて練り合わせ、直径 0.5 ~ 1.0 mm ペレットに成型した後凍結乾燥した。なお、基本飼料 D1 および D2 に Cf と HM を添加した試験飼料を、それぞれ D1-Cf と D1-HM および D2-Cf と D2-HM とした。また、ハーブ無添加の対照飼料を D1-C および D2-C とした。いずれの飼料も調製後は 4 °C の冷蔵庫に給餌するまで保存した。

###### b) 供試魚および飼育方法

D1 飼料区では、屋内 400 L 容円形水槽に収容したマダイ稚魚 (平均体重  $0.09 \pm 0.02$  g  $n = 50$ , 35 dah) 200 尾に、D1-C, D1-Cf および D1-HM を 1 日 3 回 (7:00, 13:00, 17:00) 飽食給与して 20 日間飼育した。屋内の照明は蛍光灯で 12L : 12D とし、各水槽にはろ過海水を 2.5 L/min で注水した。期間中の水温および DO は  $21.1 \pm 0.7$  °C および  $8.6 \pm 0.3$  mg/L であった。

**Table 4-1.** Formulation and proximate composition of basal diet (% of dry matter) for red seabream juvenile

Ingredients (%)	Diets	
	D1	D2
Brown fish meal	65	35
EFM <sup>1</sup>		30
Krill meal	10	10
Cod liver oil	5	5
$\alpha$ -Potato starch	3	3
Vitamin mixture <sup>2</sup>	5	5
Vitamin C		0.1
Mineral mixture <sup>2</sup>	5	5
Soybean lecithin	5	3
Taurine		2
$\alpha$ -Cellulose	2	1.9
<i>Proximate composition (% of dry matter basis)</i>		
Crude protein	54.1	54.7
Crude lipid	18.4	15.8
Crude ash	12.2	10.6
Crude sugar	7.8	11.2

<sup>1</sup> Enzyme treated Chilean fish meal, Profish S.A, Santiago, Chile.

<sup>2</sup> Halver (1957).

D2 飼料区では、屋内 250 L 容角型水槽に収容したマダイ稚魚（平均体重  $0.11 \pm 0.02$  g  $n = 100$ , 35 dah）に、D1 飼料区と同様に D2-C、D2-Cf および D2-HM を飽食給与して 20 日間飼育した。期間中の水温は  $19.6 \pm 0.6$  °C であった。一方、DO は一部純酸素を混入させて通気し飽和量を維持した。なお、飼育試験は各飼料に 3 反復区を設けて実施した。

#### c) 測定項目

飼育開始および終了時には体重を測定し、成長率 (SGR)、日間摂餌率 (DFR) および飼料効率 (FE) を次式より算出した。

$$\text{SGR} = (\ln W_{mf} - \ln W_{mi}) / D$$

$$\text{日間給餌率 (DFR, \%)} = \frac{F}{\frac{N_i + N_f}{2} \times \frac{W_{mi} + W_{mf}}{2} \times D} \times 100$$

$$\text{飼料効率 (FE, \%)} = \frac{W_f + W_d - W_i}{F} \times 100$$

$W_{mi}$  : 開始時平均魚体重 (g)       $W_{mf}$  : 終了時平均魚体重 (g)  
 $W_i$  : 開始時総魚体重 (g)         $W_f$  : 終了時総魚体重 (g)  
 $D$  : 飼育日数                         $W_d$  : 死魚の総魚体重 (g)  
 $N_i$  : 開始時尾数                     $N_f$  : 終了時尾数  
 $F$  : 総乾物給餌量 (g)

#### d) 干出試験・麻酔回復試験・攻撃試験

飼育試験終了後に D1 飼料区の各水槽から供試魚 20 尾をプラスチック製籠に取り上げ、7 min 空中に干出した後に新鮮海水を満たした水槽に収容して生残率を求める干出試験、各水槽より 20 尾を取り上げて 300 ppm フェノキシエタノール液で 1 min 麻酔した後、新鮮海水を満たした水槽に収容して覚醒までの時間を計測する麻酔回復試験、そして、各水槽より 50 尾を取り上げて *V. anguillarum* を  $10^8$  CFU/mL に調整した溶液に浸漬した後、22 °C 海水による流水下で 10 日間飼育して生残率を測定する攻撃試験を実施した。

#### d) 統計処理

一元配置分散分析法で処理による有意差 ( $P < 0.05$ ) を確認した後、Dunnett's new multiple range test (SPSS) に基づいて各試験区における平均値の有意差判定を行った ( $P < 0.05$ )。

### 4-1-1-2) 結果

#### a) 飼育成績

Table 4-2 に飼育成績を示した。終了時における D1-C, D1-Cf および D1-HM 区間の平均体重と SGR に有意差はみられなかったが、D1-Cf・D1-HM 区は D1-C 区より重く高い傾向が

みられた。一方、終了時における D2-Cf および D2-HM の平均体重と SGR は D2-C 区より有意に優れていた。また、DFR は D1-Cf・D1-HM および D2-Cf・D2-HM 区が D1-C および D2-C 区より低く、FE は D1-Cf・D1-HM および D2-Cf・D2-HM 区が D1-C および D2-C 区より優れていた。

**Table 4-2.** Growth performance of red sea bream juvenile fed on different basal diets with medicinal herb for 20 days

	D1			D2		
	Control	Cf	HM	Control	Cf	HM
Initial body weight (g)	0.09±0.02	0.09±0.02	0.09±0.02	0.11±0.02	0.11±0.02	0.11±0.02
Final body weight (g)	1.26±0.05	1.39±0.06	1.36±0.06	1.22±0.02	1.37±0.02*	1.41±0.05*
SGR (%)	13.1±0.2	13.6±0.2	13.5±0.2	12.1±0.1	12.6±0.1*	12.8±0.2*
DFR (%)	6.92±0.30	6.20±0.24*	6.36±0.29	4.83±0.16	4.20±0.24*	4.30±0.19*
FE (%)	124.5±6.4	141.2±6.2*	137.2±7.1	172.4±5.46	202.8±12.0*	199.1±9.4*
Survival rate (%)	95.0±0.9	98.2±1.5*	96.8±1.5	96.3±0.6	97.3±3.1	99.0±1.0

Values in a row with asterisks indicates the significant difference compared with the control group ( $P < 0.05$ ).

**b) 干出試験・麻酔回復試験・攻撃試験**

干出試験の生残率を Fig. 4-1 に示した。D1-C の標準偏差が大きく有意な区間差はなかったが、D1-Cf および D1-HM 区が生残率が D1-C 区より高い傾向にあった。

麻酔後の覚醒時間を Fig. 4-2 に示した。D1-Cf および D1-HM 区の覚醒時間は D1-C 区より有意に短縮された。

攻撃試験終了後の生残率を Fig. 4-3 に示した。D1-Cf および D1-HM 区が生残率は 97 % 以上を維持したが、D1-C 区では 3 日後より 80 % 以下になり、6 日後より生残率は有意に低下した。

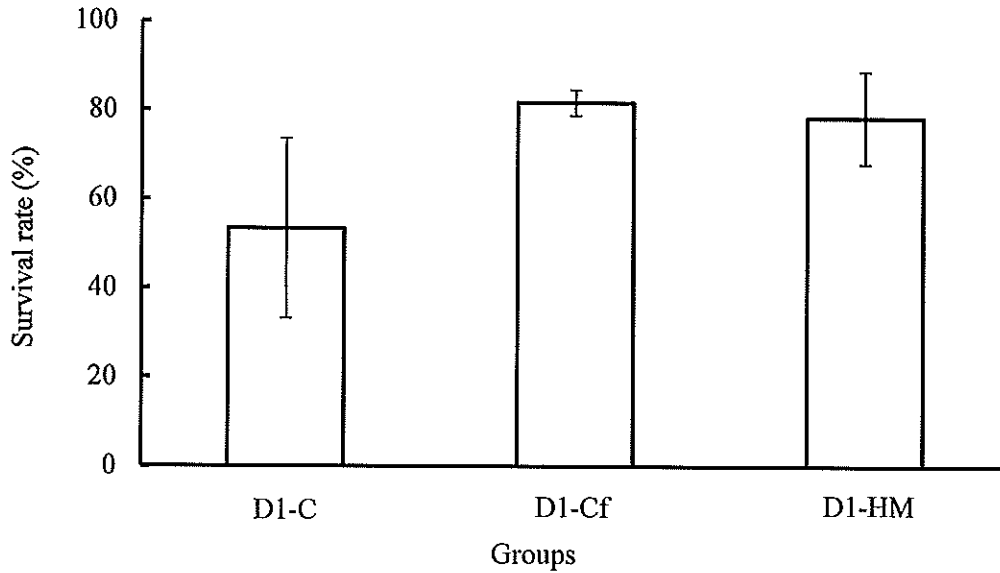


Fig. 4-1 Survival rates of red sea bream juvenile fed on D1 diets from Table 4-2 with medicinal herb for 20 days and subsequently the air exposure for 7 minutes. Values are mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

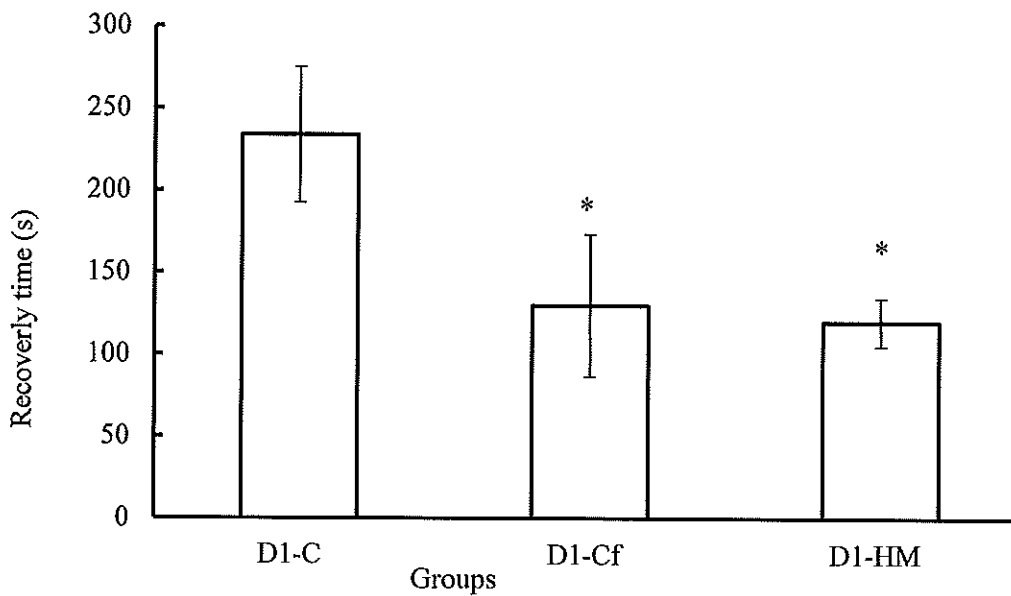


Fig. 4-2 Recovery time of red sea bream juvenile fed on D1 diets from Table 4-2 with medicinal herb for 20 days and subsequently anesthetization with 300 ppm for one minute. Bars with asterisks indicate the significant difference compared with control group ( $P < 0.05$ ).

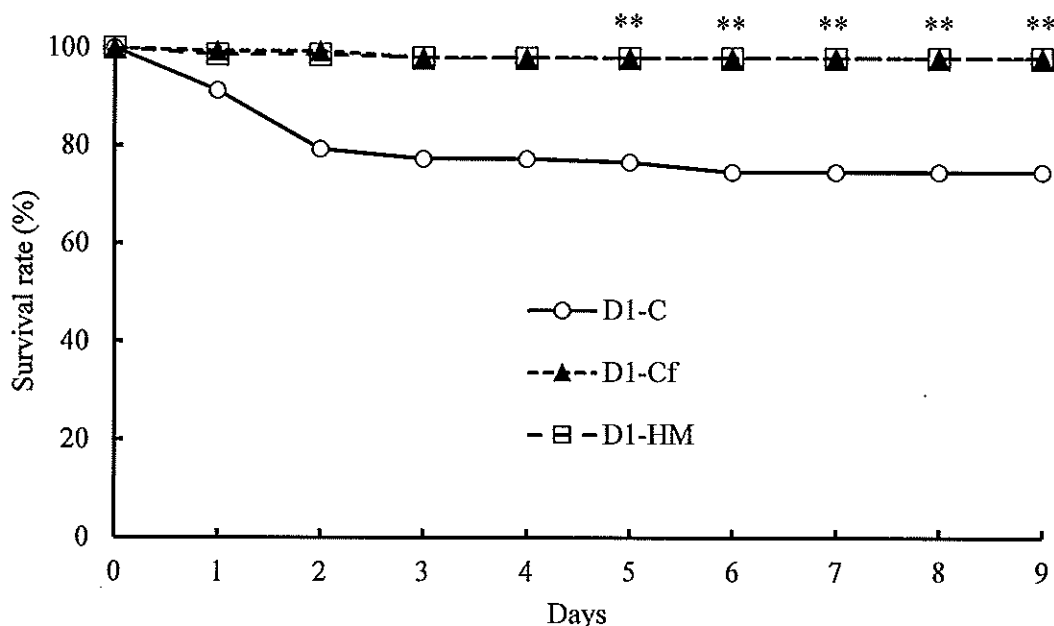


Fig. 4-3 Change in survival rate of red sea bream juvenile fed on D1 diets from Table 4-2 with medicinal herb for 20 days and subsequently exposed into *V. anguillarum* bath. Lines with asterisks indicate the significant different compared with the control group ( $P < 0.05$ ).

#### 4-1-1-3) 考察

D1-Cf 区の飼育成績は D1-C 区に比較して有意に優れていた。また、D1-HM 区では D1-C 区より優れていたが有意差はなかった。一方、D2-Cf および D2-HM 区の飼育成績は D2-C 区より有意に優れていた。これらの結果から、Cf および HM 粉末の飼料への添加はマダイ稚魚の成長を促進することが示唆された。

D1-Cf および D1-HM 区では D1-C 区より干出・麻酔耐性および病原細菌に対する抗病性が高いことも確認できた。Hilton and Dixon (1982) は肝臓機能が低下したニジマス *Oncorhynchus mykiss* では、フェノキシエタノール麻酔からの覚醒時間が長くなることを報告した。D1-Cf および D1-HM 区では肝機能も向上していた可能性が推察される。

また、*V. anguillarum* による攻撃試験の生残率が D1-Cf および D1-HM 区で高かったのは、第 2 章で示したように、それらエキスによる増殖阻害作用に基づくことが考えられる。

一方、Xie, et al. (2008) は大黄 *Rheum officinale* エキスに含まれるアントラキノンが、コイ *Cyprinus carpio* の疾病感染予防、過密飼育ストレスの緩和、飼育成績の改善に有効であることを報告し、アントラキノンの抗酸化作用が免疫機能の改善とストレス耐性の向上につながることを示唆した。また、Jian and Wu (2003, 2004) は、コイおよびフウセイ *Pseudosciana crocea* にキバナオウギ *Astragalus membranaceus* およびトウキ *Angelica sinensis* を飼料に添加

すると、白血球の呼吸バーストと血漿リゾチーム活性が上昇することを報告している。Cfおよび HM には抗酸化物質や抗酸化酵素の発現を誘導することが報告されている (Kim et al. 1993 ; Zhang et al. 2001 ; Seo et al. 2003 ; Jeong et al. 2009)。おそらく、第3章のマダイ仔魚の場合と同様にこれらハーブに含まれる化合物が、腸内フローラの制御や代謝機能を改善したことに加え、強力な抗酸化作用などを介して免疫機能やストレス耐性を向上させて健康を増進するのであろう。

本節では、各 D2 飼料区の FE が D1 飼料区に比べて顕著に優れていたことが注目される。基本飼料 D2 には EFM, ビタミン C およびタウリンが配合・強化されていた。各 D1 および D2 飼料区の生残率に大きな違いはなく、特徴的なビタミン C 欠乏症も観察できなかった。また、魚粉主体の配合飼料でマダイ稚魚・成魚を飼育すると、タウリン欠乏による低成長は認められないことが知られている。これらの諸点を考慮すると、各 D2 飼料区で認められた FE の改善は EFM の配合に基づく確率が高い。この EFM はアジ類をミンチにしたのち微生物起源の酵素でタンパク質を加水分解し、乾燥させたのち微粒子に粉碎したもので、通常の魚粉に比べて約3倍の価格で流通している。マダイでも稚魚期から胃の分化・形成がはじまり、その後の速い成長を支えることになるが、55 dah までの稚魚の消化吸収能は、通常の魚粉を十分に利用できるレベルに達していないことが推察された。Kotzamanis et al. (2007) もヨーロッパスズキ *Dicentrarchus labrax* の仔魚に魚肉タンパク質の加水分解物を給与すると、成長や生残率だけでなく腸の発達が促進されることを報告した。また、摂餌開始 56~60 日後のタイセイヨウオヒョウ *Hippoglossus hippoglossus* 仔魚の消化吸収と同化代謝は遊離アミノ酸>ペプチド>タンパク飼料の順に高いことが報告されている (Rojas-Garcia et al. 2003)。Ji et al. (2008) は、25 dah 以降のタイヘイヨウクロマグロ *Thunnus orientalis* 稚魚の速い成長を通常の魚粉配合飼料で支えられないが、EFM に代替することで優れた飼育成績の得られることを報告した。また、EFM に含まれる遊離のアミノ酸や小分子のペプチドが、消化吸収に重要な働きを持つ消化管ホルモンの合成・分泌を促進していた可能性もある (Liddle 1997, 2000)。Olsson et al. (1999) は魚類におけるコレシストキニン (CCK) の機能について報告し、ニジマスでは胃から腸への食塊移動の遅延と胆嚢収縮を、タイセイヨウサケ *Salmo salar* では膵臓酵素の合成・分泌を亢進するなど、陸上ほ乳類と同様に重要な働きを持つことを示した。酵素処理魚粉の利用については価格が大きな障壁となるが、稚魚配合飼料の開発にあたって有望なタンパク質源の一つであらう。

#### 4-1-2) 種苗サイズ稚魚

##### 4-1-2-1) 材料および方法

###### a) 試験飼料

Table 4-3 に Cf および HM を添加する基本飼料の組成を示した。タンパク源には沿岸魚粉，大豆タンパク質および小麦グルテンを，脂質源には魚油を，糖質源には  $\alpha$ -スターチを，さらにハーバー処方ビタミン・ミネラル混合物と  $\alpha$ -セルロースを配合した。基本飼料の一般成分は粗タンパク質が 47 % で，前節の D1 および D2 基本飼料の 54 % より低く設計した。この基本飼料 100 g に Cf と HM 粉末 0.5 g をそれぞれ添加してよく混合した後，4-1-1-1) a) に記した方法で各試験飼料を調製した。ただし，凍結乾燥は行わず 30 % の水道水を加えてから直径 5 mm のモイストペレットに成型した。Cf および HM 飼料はハーブ無添加の対照 C 飼料とともに，給餌するまで  $-20^{\circ}\text{C}$  の冷凍庫で保存した。

**Table 4-3.** Formulation and proximate composition of basal diet (% of dry matter)

Ingredients	Basal diet
Brown fish meal	55
Soybean meal	10
Wheat gluten	10
Fish oil	10
$\alpha$ -Potato starch	5
Vitamin mixture <sup>1</sup>	3
Mineral mixture <sup>1</sup>	3
$\alpha$ -Cellulose	4
<i>Proximate composition (% of dry matter basis)</i>	
Crude protein	47
Crude lipid	14.7
Crude ash	12.2
Crude sugar	17.9

<sup>1</sup> Halver (1957).

#### b) 供試魚および飼育方法

屋内 300 L 容塩ビ製角形水槽にマダイ稚魚 (平均体重  $24 \pm 0.2$  g , 125 dah) を 25 尾ずつ収容した各試験区に，所定の飼料を 1 日 2 回 (10:00, 15:00) 飽食給与して 84 日間飼育した。屋内の照明は蛍光灯を用いて 12L : 12D に調節し，各試験水槽にはろ過海水を 3 L/min で給水した。飼育期間中の水温および溶存酸素量は，それぞれ  $22.0 \pm 4.6^{\circ}\text{C}$  および  $7.5 \pm 0.3$  mg/L であった。



c) 測定項目および分析方法

飼育開始および終了時には体重を測定し、飼育成績として SGR, DFR, FE を前節 4-2-1-2) c) に基づいて算出した。タンパク質効率 (PER), 見かけのタンパク蓄積率 (APR), 見かけの脂質蓄積率 (ALR), 比内臓脂肪率 (AFR), 比肝臓重値 (HSI), 比内臓重値 (VSI) および肥満度 (CF) を下式より算出した。

飼料および魚体や肝臓の一般成分は AOAC 法によった。また、採取した肝臓を  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した後、Folch et al. (1957) の方法で脂質を抽出して、10 % TritonX-100 含有イソプロピルアルコールに溶解し、TG, PL および TCHO 含量を先に記した市販のキット (和光純薬工業株式会社, 大阪) を用いて測定した。

また、終了時には各試験区から 6 尾をランダムに取り上げ、ヘパリン処理したシリンジを用いて尾部動脈より採血し、ヘモグロビン濃度 (Hb) とヘマトクリット値 (Ht) をそれぞれシアンメトヘモグロビン法と遠心法で測定した。さらに、全血を遠心分離 (3,000 rpm, 20 min) して得られた血漿のアスパルテートアミノトランスフェラーゼ (GOT), アラニンアミノトランスフェラーゼ (GPT), 遊離脂肪酸 (NEFA), 高密度リポ蛋白質-コレステロール (HDL-CHO), 総コレステロール (TCHO), PL および TG の活性および含量を市販のキット (トランスアミナーゼ C11-テストワコー・NEFA C-テストワコー・HDL-コレステロール E-テストワコー・コレステロール E-テストワコー・リン脂質 C-テストワコー・トリグリセライド E-テストワコー 和光純薬工業株式会社, 大阪) を用いて測定した。

また、血漿のリゾチーム活性はポンドサイドキットマニュアル (日本水産資源保護協会 1998) で、血漿溶血補体価 (ACH50) はウサギの赤血球を用いる矢野ら (1988) の方法でそれぞれ測定した。すなわち、リゾチーム活性は *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma, St. Louis, IL, USA) を基質として、血漿とともに  $37^{\circ}\text{C}$  で 0, 15, 30, 45 および 60 min 反応させ、反応混液における 540 nm の吸光度の変化から求め、ACH50 は血漿に 10 mM エチレンジアミン四酢酸 (EGTA) と 10 mM  $\text{MgCl}_2$  を含む 0.1 %ゼラチンペロナル緩衝液を加えて  $20^{\circ}\text{C}$  で 2 h 反応させ、反応混液における 414 nm の吸光度の変化を測定した。ACH50 は  $4 \times 10^7$  個のウサギ赤血球を 50 %溶血させる活性を 1 ACH50 と定義した。

$$\text{タンパク質効率 (PER, \%)} = \frac{W_f + W_d - W_i}{F \times P} \times 100$$

$$\text{見かけのタンパク質蓄積率 (APR, \%)} = \frac{(W_f + W_d) \times P_f - W_i \times P_i}{F \times P} \times 100$$

$$\text{見かけの脂質蓄積率 (ALR, \%)} = \frac{(W_f + W_d) \times L_f - W_i \times L_i}{F \times P} \times 100$$

$$\text{内臓脂肪率 (AFR, \%)} = \frac{\text{内臓脂肪重量 (g)}}{\text{魚体重 (g)}} \times 100$$

$$\text{比肝重値 (HSI, \%)} = \frac{\text{肝臓重量 (g)}}{\text{魚体重 (g)}} \times 100$$

$$\text{比内臓重値 (VSI, \%)} = \frac{\text{内臓重量 (g)}}{\text{魚体重 (g)}} \times 100$$

$$\text{肥満度 (CF)} = \frac{\text{体重 (g)}}{\text{全長}^3 \text{ (cm)}}$$

Wi : 開始時総魚体重 (g)

Wf : 終了時総魚体重 (g)

Wd : 死魚の総魚体重 (g)

Pi : 開始時の魚体の  
タンパク質含量 (g)

Pf : 終了時の魚体の  
タンパク質含量 (g)

Li : 開始時の魚体の脂質含量 (g)

Lf : 終了時の魚体の脂質含量 (g)

F : 総乾物給餌量 (g)

P : 飼料のタンパク質含量 (g)

#### d) 干出試験・麻酔回復試験・攻撃試験

干出試験では各試験区からランダムに10尾を取り上げて5 min および10 min 空中に干出した。干出後は速やかに飽和 DO 海水を満たした30 L 容円形水槽へ収容して、6 h 後における生残率を測定した。また、5 min の干出0, 1, 2, 4 および6 h 後に回復した個体3尾ずつをランダムに取り上げ、ヘパリン処理した注射器で採血してグルコースおよびコルチゾール値を測定した。血液を4 °C, 20 min, 20,000 × g で遠心分離して得られた血漿を用いて、グルコースおよびコルチゾール含量をそれぞれ市販のキット (和光純薬工業株式会社, 大阪および Oxford Biochemical Research, Oxford, MI) で分析した。

麻酔試験は各試験区からランダムに10尾ずつ取り上げて、200, 400 および800 ppm のフェノキシエタノール海水へ2 min 浸漬し、新鮮海水に戻してから正常な遊泳を行うまでの時間を測定した。

## 高岡：マダイおよびシマアジの種苗量産技術に関する研究

攻撃試験は各試験区からランダムに10尾ずつを取り上げて、マダイを生体通過させた *V. anguillarum* (SD040506) を懸濁させた  $10^{11}$  CFU/mL リン酸緩衝生理食塩水を、1尾あたり0.1 mL ずつ腹腔内へ打注してから300 L 容塩ビ製角型水槽へ収容し、1日2回所定の試験飼料を給餌して15日間飼育しへい死尾数を計数した。水槽にはろ過海水を飼育試験と同様に注水し、へい死尾数の計数は各飼料区とも2反復で実施した。

### e) 統計処理

一元配置分散分析法で処理による有意差 ( $P < 0.05$ ) を確認した後、Turkey's multiple range test に基づいて各試験区における平均値の有意差判定を行った ( $P < 0.05$ )。

### 4-1-2-2) 結果

#### a) 飼育成績、血液性状、血漿化学成分、全魚体の一般成分、肝臓の脂質組成

Table 4-4 に飼育成績を示した。終了時における Cf および HM 区の平均体重、SGR および生残率は対照区より有意に優れていた。また、Cf 区と対照区の FE、APR および CF に区間差はみられなかったが、HM 区は両区より有意に高かった。しかし、PER、HSI、VSI などに区間差はなかった。

**Table 4-4.** Growth performance of young red sea bream fed on basal diets with medicinal herb for 12 weeks

	Control	Cf	HM
Initial body weight	24.1±0.2	24.2±0.1	24.9±0.2
Final body weight	60.4±2.2 <sup>a</sup>	70.9±2.8 <sup>b</sup>	81.4±4.7 <sup>c</sup>
SGR (%)	1.09±0.05 <sup>a</sup>	1.28±0.05 <sup>b</sup>	1.46±0.07 <sup>c</sup>
DFR (%)	2.46±0.07	2.70±0.06	2.65±0.21
FE (%)	58.7±3.2 <sup>a</sup>	60.5±3.3 <sup>a</sup>	74.4±2.9 <sup>b</sup>
PER	1.23±0.1 <sup>a</sup>	1.28±0.1 <sup>a</sup>	1.57±0.1 <sup>b</sup>
HSI (%) <sup>1</sup>	1.60±0.15	1.33±0.23	1.49±0.24
VSI (%) <sup>1</sup>	5.99±0.98	5.87±0.55	6.60±1.01
CF	1.77±0.19 <sup>a</sup>	1.78±0.14 <sup>a</sup>	2.38±0.09 <sup>b</sup>
Survival rate (%)	84.0±5.3 <sup>a</sup>	96.0±2.7 <sup>b</sup>	97.3±3.6 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> Values are mean ± SD of three groups, each 2 fish per tank.

Values in a row with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

Table 4-5 に終了時の血液性状と血漿化学成分を示した。Ht に区間差はみられなかったが、Hb は HM 区が高く Cf 区および対照区の順に低下し、HM 区と対照区の間には有意差がみられた。一方、血漿 GOT および GPT 活性は、Cf および HM 区が対照区より有意に低かった。TG, HDL-CHO および NEFA 含量には Cf 区と対照区の間には差はなかったが、HM 区の TG および NEFA 含量は他区に比べて低く、逆に HDL-CHO 含量は高かった。しかし、TCHO および PL 含量に有意な区間差はなかった。

血漿リゾチームおよび ACH50 活性は HM 区が最も高く、Cf 区および対照区の順に低下し HM 区と対照区の間には有意差がみられた。

**Table 4-5.** Hematological and plasma constituents of young red sea bream fed on basal diets with medicinal herb for 12 weeks

	Control	Cf	HM
<b>Hematological</b>			
Hematocrit (%)	32.8 ± 3.4	34.2 ± 2.8	33.7 ± 1.3
Hemoglobin (mg/dL)	5.50 ± 0.9 <sup>a</sup>	6.54 ± 0.58 <sup>ab</sup>	7.35 ± 0.83 <sup>b</sup>
<b>Plasma constituents</b>			
GOT (Karmen/mL)	25.7 ± 10.1 <sup>b</sup>	9.2 ± 2.6 <sup>a</sup>	8.6 ± 0.3 <sup>a</sup>
GPT (Karmen/mL)	19.5 ± 8.4 <sup>b</sup>	10.2 ± 1.2 <sup>a</sup>	6.5 ± 2.4 <sup>a</sup>
NEFA (mg/dL)	215.3 ± 28.5	275.3 ± 52.1	152.7 ± 28.0
HDL-CHO (mg/dL)	143.0 ± 28.7 <sup>a</sup>	158.2 ± 3.7 <sup>a</sup>	218.0 ± 12.8 <sup>b</sup>
TCHO (mg/dL)	250.9 ± 49.8	298.8 ± 40.1	259.4 ± 69.3
TG (mg/dL)	321.1 ± 32.7 <sup>b</sup>	367.3 ± 76.8 <sup>b</sup>	194.2 ± 48.0 <sup>a</sup>
PL (mg/dL)	841.5 ± 96.2	858.2 ± 59.0	954.1 ± 53.6
Lysozyme (units/mL)	29.4 ± 8.2 <sup>a</sup>	53.8 ± 16.4 <sup>ab</sup>	78.0 ± 12.3 <sup>b</sup>
ACH50 (units/mL)	156.3 ± 12.0 <sup>a</sup>	169.4 ± 9.2 <sup>ab</sup>	181.3 ± 5.4 <sup>b</sup>

Values are mean ± SD of three groups, each 2 fish per tank.

Values in a row with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

全魚体の一般成分、肝臓の粗脂質と脂質クラスを Table 4-6 に示した。全魚体の一般成分に区間差は認められなかった。また、見かけの脂質蓄積率にも区間差はなかったが、見かけのタンパク質蓄積率は HM 区が Cf 区および対照区より優れていた。肝臓の粗脂質含量は Cf および HM 区が対照区より僅かに低かったが、PL 含量は Cf および HM 区が対照区より有意に高かった。しかし、Cf および HM 区に区間差はなかった。また、TCHO 含量にも区間差はなかった。

**Table 4-6.** Proximate composition of whole body and lipid and lipid class content of liver of young red sea bream fed on basal diet with medicinal herbs for 12 weeks

	Control	Cf	HM
Whole carcass (% wet matter basis)			
Moisture	67.61±1.23	68.65±2.50	69.08±2.08
Crude protein	18.71±1.37	18.15±0.25	18.56±0.33
Crude lipid	10.02±1.41	9.26±3.00	8.53±1.07
Crude ash	5.95±0.30	5.69±0.10	5.36±0.32
APR	25.6±2.4 <sup>a</sup>	24.7±1.3 <sup>a</sup>	30.8±2.1 <sup>b</sup>
ALR	52.1±9.6	53.5±11.9	46.6±5.5
Liver			
Crude lipid (% dry matter basis)	19.6±3.8	15.6±1.6	15.1±3.3
Lipid class (mg/g tissue)			
TG	54.3±11.7 <sup>ab</sup>	55.1±1.6 <sup>b</sup>	42.9±1.5 <sup>a</sup>
PL	8.2±0.5 <sup>a</sup>	10.4±0.3 <sup>b</sup>	10.2±0.3 <sup>b</sup>
TCHO	3.8±0.2	4.3±0.3	3.5±0.3

Values are mean ± SD of three groups, each 2 fish per tank.

Values in a row with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

#### b) 干出試験・麻酔回復試験・攻撃試験

干出試験における生残率を Fig. 4-4 に示した。5 min の干出では 6 h 後の生残率に有意な区間差はみられなかったが、10 min の干出では Cf および HM 区が生残率が対照区より有意に向上した。

5 min の干出後における血漿コルチゾールおよびグルコース含量の経時変化を、それぞれ Fig. 4-5 および 4-6 に示した。血漿コルチゾール含量はいずれの区でも干出 1 h 後でピークに達したが、対照区が Cf および HM 区より有意に高かった。血漿グルコース含量は干出後に急激に上昇し、いずれも 1 および 2 h 後にピークに達したが、Cf および HM 区ではピーク後に速やかに低下し、4 h 後のグルコース含量は対照区より有意に低下した。

麻酔試験の覚醒時間を Fig. 4-7 に示した。フェノキシエタノール 200 ppm および 400 ppm 溶液に浸漬後の覚醒時間に有意な区間差はなかったが、Cf および HM 区における 800 ppm の覚醒時間は対照区より有意に短縮した。

攻撃試験後の生残率の経日変化を Fig. 4-8 に示した、対照区では攻撃 10 日後まで急激に低下したが、Cf および HM 区では攻撃 6 日後まで僅かに低下し、その後は 80 % を維持して 10 日後から対照区との間に有意差がみられた。

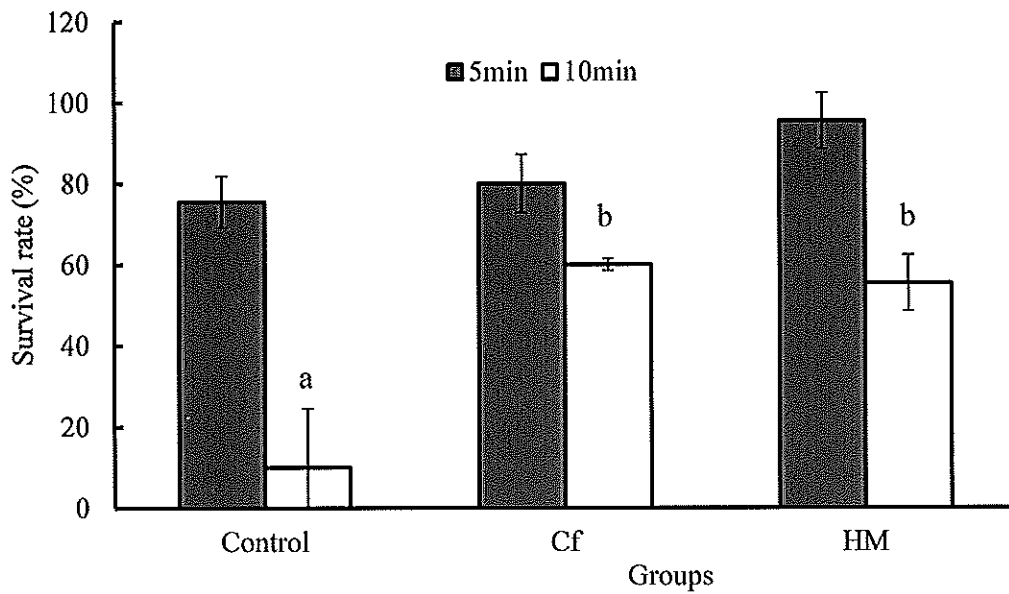


Fig. 4-4 Survival rate of young red sea bream fed on basal diets with medicinal herb for 12 weeks and subsequently the air exposure for 5 and 10 minutes. Bars with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

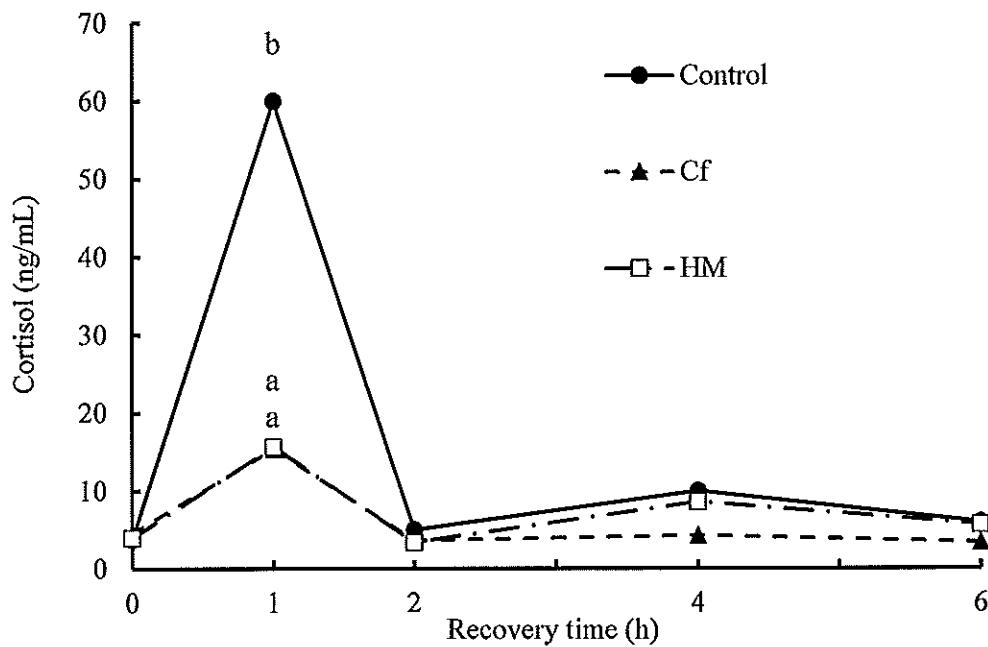


Fig. 4-5 Changes in plasma cortisol level of young red sea bream fed on basal diets with medicinal herb for 12 weeks and subsequently the air exposure for 5 minutes. Lines with different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

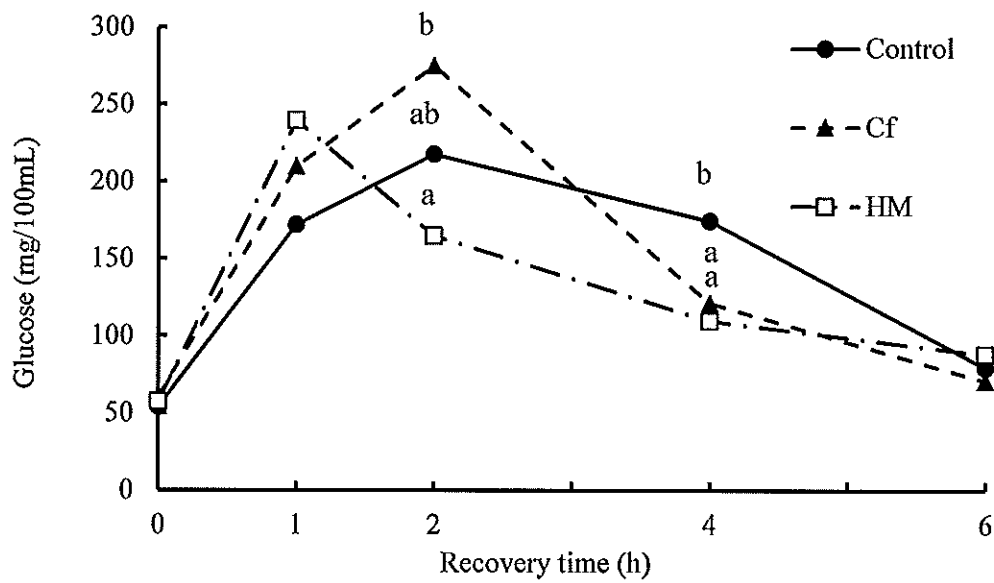


Fig. 4-6 Changes in plasma glucose level of young red sea bream fed on basal diets with medicinal herb for 12 weeks and subsequently the air exposure for 5 minutes. Lines with different letter indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

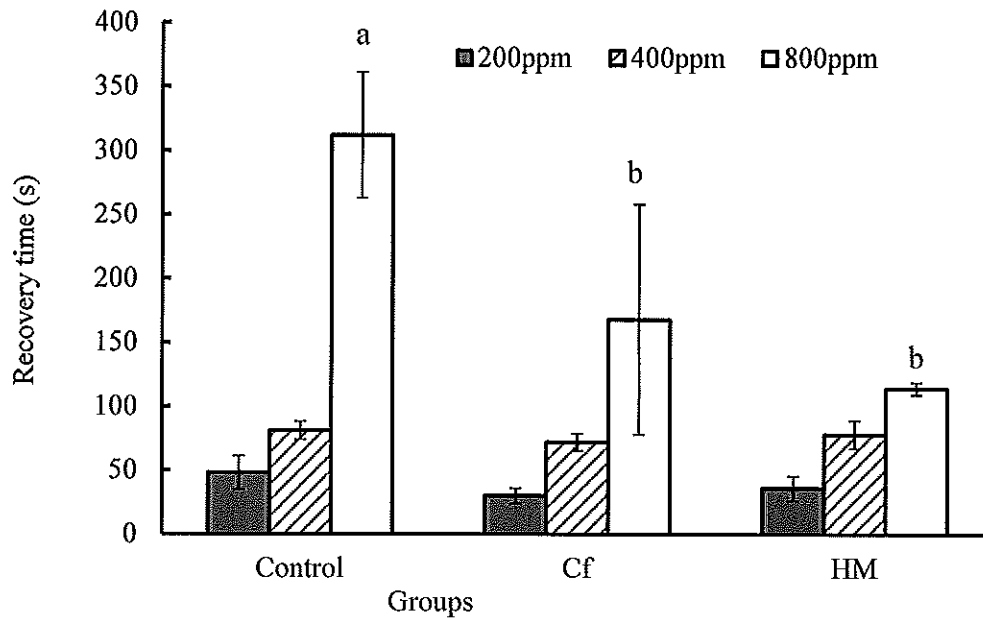


Fig. 4-7 Recovery time of young red sea bream fed on basal diet with medicinal herbs powder for 9 weeks and subsequently anesthetization with 200, 400 and 800 ppm 2-phenoxyethanol for two minutes. Means with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

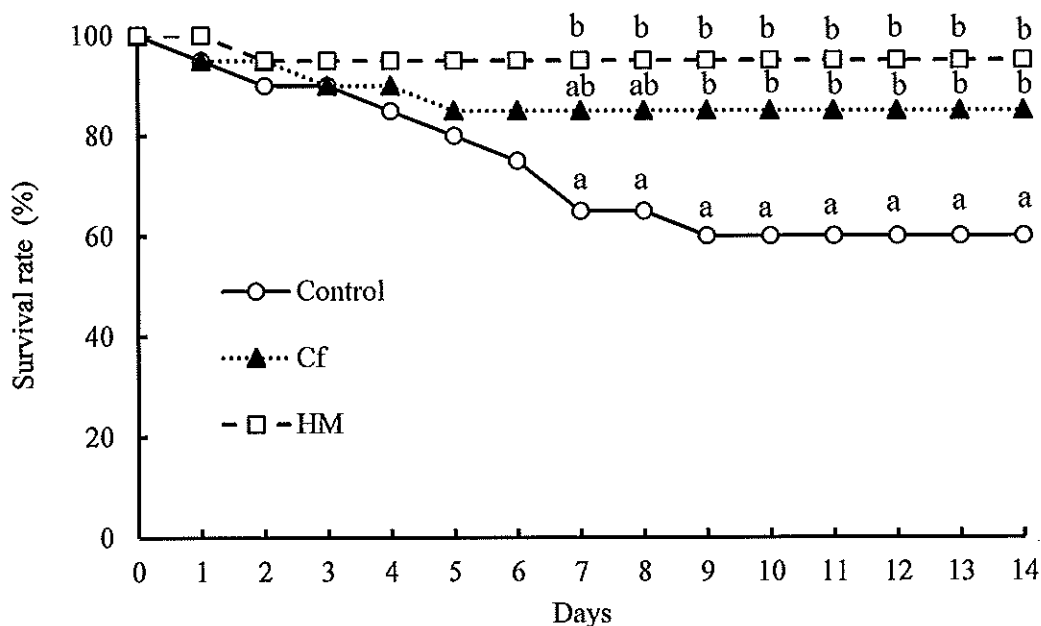


Fig. 4-8 Change in survival rate of young red sea bream fed on basal diets with medicinal herb for 12 weeks and subsequently challenged intraperitoneally with *V. anguillarum*. Lines with different letter indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

#### 4-1-2-3) 考察

マダイの種苗サイズ稚魚に対しても Cf および HM 飼料を給与すると、無添加対照飼料に比べて成長や飼育成績とともに、各種ストレス耐性や *V. anguillarum* 攻撃試験での生残率を高めるなど、優れた効果を持つことが本節で明らかになった。したがって、マダイの仔魚、沖出しおよび種苗サイズ稚魚において、薬用ハーブ Cf および HM の優れた効果を確認することができた。

マダイの養殖種苗サイズ稚魚でのこれらハーブの効果の一因を明らかにするため、終了時における各飼料区の血漿化学成分、体成分、肝臓の脂質画分、ストレス負荷後の血漿コルチゾール・グルコース含量について調べた。成長や飼育成績が優れていた Cf および HM 区では血漿の GOT・GPT 活性が低く、肝臓の PL 含量は高かった。さらに、HM 区は血漿の HDL-CHO 含量は他の区より高かった。これらの結果は、Cf および HM を添加した飼料を給与すると肝臓機能が健全に保たれていたことを示唆している。

一方、HM 区では Cf および対照区に比べて見かけのタンパク質蓄積率は高く、見かけの脂質蓄積率は低かった。また、HM 区では血漿 TG および PL 含量と肝臓 TG 含量は低かった。すなわち、HM 区では摂取したタンパク質をできるだけ多く蓄積し、脂質を優先的にエネルギー源として利用する方向に代謝調節していることが示唆された。しかし、Cf 区では HM 区よりエネルギー源としてタンパク質を多く利用していることが分かった。この差異は HM に含まれる Cf 以外の薬用ハーブに起因するかもしれない。今後、詳細な検討が必要である。



5 min の干出試験では Cf および HM の添加効果はみられなかったが、干出後の血漿コルチゾールおよびグルコース含量は対照区より低かった。Bandeen and Leatherland (1997) は、魚類でも輸送時やハンドリングによって血漿コルチゾール含量が増加することを報告している。Davis et al. (1985) は、血漿コルチゾール含量の増加は各細胞でのエネルギー消費を促進し、肝臓でのアミノ基転移酵素と糖新生系酵素の活性を高めることを示した。Cf および HM 区では対照区よりストレス耐性が高く、10 min の干出や 800 ppm フェノキシエタノール麻酔後の高い生残率や短い覚醒時間につながったものと推察される。

本節のマダイ種苗においても、*V. anguillarum* による攻撃試験で Cf および HM の高い生残率が得られた。なお、対照区では試験開始 7 週間後まで滑走細菌 *Tenacibaculum maritimum* によって生残率が低下したが、Cf および HM 区では滑走細菌症や異常な行動はみられなかった。終了時の血漿リゾチームと ACH50 活性は Cf および HM 区が対照区より高かったことから、これらハーブ区では自然免疫系が賦活されていたことを示唆している。また、第 1 章の Cf メタノールエキスによる *V. anguillarum* の増殖阻止効果が、Cf および HM 区における攻撃試験後の高い生残率に基づくのであろう。他のハーブの免疫賦活活性はウシエビ *Panaeus monodon*、クロソイ *Sebastes schlegeli*、フウセイ、ヒトミハタ *Epinephelus tauvina* などですでに報告されている (Citarasu et al. 2002 ; Kim et al. 1999 ; Jian and Wu 2003 ; Sivaram et al. 2004)。多くのハーブには抗酸化作用のあるカロテノイド、フラボノイド、桂皮酸、安息香酸、葉酸、アスコルビン酸、トコフェロール、トコトリエノールなどが含まれている (Hollmam 2001)。おそらく、体内で生成された活性酸素が機能障害を引き起こし、免疫能を低下させることで種々の疾病が発生するのであろう (Kapahi et al. 1999)。

ちなみに、顕著な区間差でなかったが飼育成績や耐性・攻撃試験では HM の効果が Cf より高かった。ナイルティラピア *Oreochromis niloticus*、ヒラメ、クロソイなどで複数のハーブによる相加・相乗効果が報告されている (Jian and Wu 2003 ; Kim et al. 2003)。

## 4-2) シマアジ

### 4-2-1) 沖出しサイズ稚魚

#### 4-2-1-1) 材料および方法

##### a) 試験飼料

Table 4-7 に Cf および HM を添加する基本試料の組成を示した。荒川ら (1987) および Takeuchi et al. (1992) の報告に準じて、沿岸魚粉およびオキアミミールをタンパク質源とし、脂質源および糖質源としてタラ肝油および  $\alpha$ -スターチを、さらにハーブ処方のビタミンおよびミネラル混合物、そして大豆レシチンと  $\alpha$ -セルロースを配合した。この基本飼料 100

gに薬用ハーブ Cfと HM を 0.5 g 添加した。なお、試験飼料の調製方法は 4-1-1-1) a) に記した。基本飼料の一般成分 (Table 4-7) は前節のマダイ稚魚のそれら (Table 4-1) に比べてに比べて、粗脂質含量が僅かに高かったことを除いて顕著な差異はなかった。

**b) 供試魚および飼育方法**

屋内 400 L 容円型水槽へシマアジ稚魚 (平均体重  $0.4 \pm 0.1$ g, 36 dah) を 200 尾ずつ収容して設けた各試験区に、所定の試験飼料を 1 日 3 回 (7:00, 13:00, 17:00) 飽食給与して 20 日間飼育した。屋内照明は蛍光灯を用いて 12L:12D とし、各試験水槽にはろ過海水を 3 L/min で給水した。試験期間中の水温および溶存酸素量は、それぞれ  $19.2 \pm 2.7$  °C および  $8.9 \pm 0.3$  mg/L であった。

**c) 測定項目**

飼育開始および終了時には体重測定を実施し、SGR, FE, 生残率などを 4-1-1-1) c) に記した式より算出した。

Table 4-7. Formulation and proximate composition of basal diet (% of dry matter) for striped jack juvenile

Ingredients (%)	Basal diet
Brown fish meal	65
Krill meal	10
Cod liver oil	5
$\alpha$ -Ptato starch	3
Vitamin mixture <sup>1</sup>	5
Mineral mixture <sup>1</sup>	5
Soybean lecithin	5
$\alpha$ -Cellulose	2
<i>Proximate composition (% of dry matter basis)</i>	
Crude protein	54.64
Crude lipid	15.81
Crude ash	13.91
Crude sugar	7.34

<sup>1</sup> Halver (1957).

#### d) 干出試験・麻酔回復試験

試験終了時には各試験区から必要尾数を取り上げて前節 4-1-1-1), d)に記した方法に準じ干出試験および麻酔回復試験を実施した。

干出試験では、各水槽からランダムに 20 尾を取り上げて 7 および 10 min 空中に干出した後、新鮮海水を満たした水槽に収容して 24 h 後における回復尾数を計数した。

麻酔試験も終了時に各水槽から 20 尾取り上げて、400 ppm のフェノキシエタノール海水に 1 min 浸漬して麻酔した後、新鮮海水を満たした水槽へ移して覚醒するまでの時間を測定した。

#### e) 統計処理

一元配置分散分析法で処理による有意差 ( $P < 0.05$ ) を確認した後、Dunett's new multiple range test に基づいて各試験区における平均値の有意差判定を行った ( $P < 0.05$ )。

#### 4-2-1-2) 結果

a) 飼育成績

Table 4-8 に飼育成績を示した。終了時における体重は Cf 区が他の区より有意に高かったが他の項目に有意な区間差はなかった。また、生残率は全ての飼料区で優れていた。

**Table 4-8.** Growth and survival rate of striped jack juvenile fed on basal diets with medical herb for 20 days

	Control	Cf	HM
Initial body weight (g) <sup>1</sup>	0.4±0.1	0.4±0.1	0.4±0.1
Final body weight (g)	2.1±0.5	2.3±0.5*	2.1±0.5
SGR (%)	8.9±0.2	9.3±0.2	8.9±0.3
DFR (%)	5.7±0.2	5.3±0.2	5.6±0.2
FE (%)	125.4±6.4	137.9±6.2	126.4±8.3
Survival rate (%)	99.3±0.3	99.3±0.3	99.7±0.6

<sup>1</sup> Mean of 50 fish.

Values in a row with asterisk indicates the significant difference compared with the control group ( $P < 0.05$ ).

b) 干出試験・麻酔試験

干出試験における 24 h 後の生残率を Fig. 4-9 に示した。干出時間が 7 min および 10 min とともに Cf 区および HM 区が対照区より僅かに高かったが、有意な区間差でなかった。

麻酔試験における覚醒時間を Fig. 4-10 に示した。覚醒時間は対照区に比べて HM 区が有意に短縮したが、Cf 区と対照区との間に有意差はなかった。

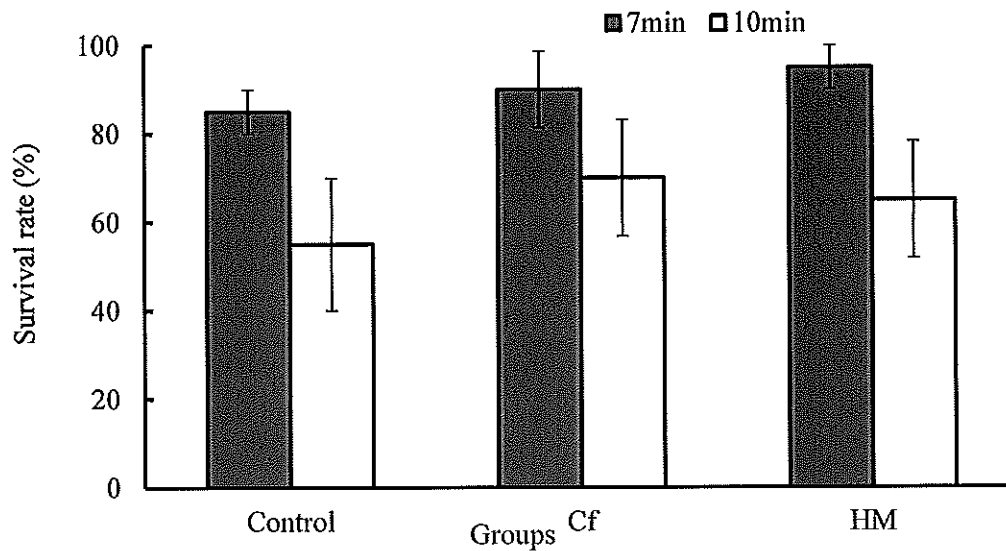


Fig. 4-9 Survival rate of striped jack juvenile fed on basal diets with medicinal herb for 20 days and subsequently the air exposure for 7 and 10 minutes. Values are mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

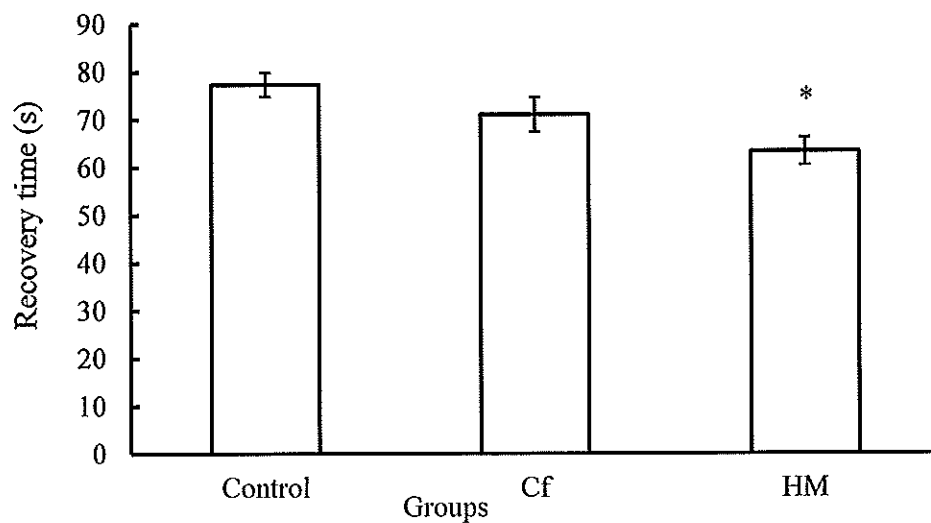


Fig. 4-10 Recovery time of striped jack juvenile fed on basal diets with medicinal herb for 20 days and subsequently anesthetization with 400ppm 2-phenoxyethanol for one minute. Bar with asterisk indicates the significant difference compared with the control group ( $P < 0.05$ ).

#### 4-2-1-3) 考察

4-1-1) に記したマダイ稚魚の飼育成績 (Table 4-1) に比べてシマアジ稚魚では、ハーブ添加に基づくと考えられる顕著な区間差はなく、終了時における Cf 飼料区の魚体重のみが他区より有意に重かった。おそらく、シマアジ稚魚に対して Cf および HM は成長や栄養素の利

用性を高める効果はないか、あっても小さいことを示唆するのであろう。落合 (1965) によると体長 3 cm 未満のマダイ稚魚は、エビ・カニの幼生やヨコエビ類やワレカラ類を摂餌する。モズク養殖場に出現する全長 10 cm 内外のシマアジ稚魚も、ワレカラ類やヨコエビ類を摂取することが示されている (金城・海老沢 1993)。これらの知見と本研究における飼育成績から、全長 3 cm 前後のマダイ稚魚およびシマアジ稚魚の栄養要求や栄養素代謝能は極めて類似しているものと推察される。近年になって海産稚魚の配合飼料化が急速に進み、共通した市販の稚魚用配合飼料で両種の稚魚を問題なく飼育できている。しかし、飼育成績に及ぼすハーブの効果に違いが認められたのは、両種の消化吸收機構の違いに基づくのかもしれない。

一方、本節では病原細菌による攻撃試験を行わなかったが、干出試験および麻酔回復試験における生残率や覚醒時間は、有意な区間差でなかったが Cf および HM 区が僅かに優れていたことから、シマアジ稚魚においても各種ストレス耐性を改善する効果があるのかもしれない。今後、詳細な検討が必要である。

#### 4-2-2) 種苗サイズ稚魚

##### 4-2-2-1) 材料および方法

###### a) 試験飼料

Table 4-9 に Cf および HM を添加する基本飼料の組成を示した。タンパク質源に沿岸魚粉を、脂質源に魚油を、糖質源に  $\alpha$ -スターチを、さらにハーブ処方のビタミン・ミネラル混合物をそれぞれ配合した。この基本飼料 100 g に Cf と HM 粉末 0.5 g をそれぞれ添加した。試験飼料は前節 4-1-1-1) a) に記した方法で調製した。但し、30 % の水道水を加えてから直径 3 mm のモイストペレットに成型し、凍結乾燥は行わなかった。各試験飼料は給与するまで  $-20^{\circ}\text{C}$  の冷凍庫で保存した。基本飼料の一般成分についてみると、粗タンパク質、粗脂質、糖質および粗灰分は、それぞれ 50, 15, 19 および 14% であり、4-2-1-1) a) の基本飼料 (Table 4-7) に比べて、粗タンパク質がわずかに減少し糖質含量が増加した。

###### b) 供試魚および飼育方法

屋内 500 L 容 FRP 角型水槽へ、シマアジ種苗サイズ稚魚 (平均体重  $16.0 \pm 0.0$  g, 128 dah) を 60 尾ずつ収容して設けた各試験区に、所定の飼料を 1 日 2 回 (10:00, 15:00) 飽食給与して 63 日間飼育した。屋内の照明は蛍光灯を用いて 12L : 12D とし、各試験水槽にはろ過海水を 7 L/min で給水した。飼育期間中の水温および溶存酸素量はそれぞれ  $20.7 \pm 1.4^{\circ}\text{C}$  および  $8.6 \pm 1.4$  mg/L であった。なお、飼育試験は各飼料につき 3 反復区で実施した。

**Table 4-9.** Formulation and proximate composition of basal diet (% of dry matter) for young striped jack

Ingredients (%)	Basal diet
Brown fish meal <sup>1</sup>	68
Fish oil <sup>2</sup>	7
$\alpha$ -Potato starch	15
Vitamin mixture <sup>3</sup>	5
Mineral mixture <sup>3</sup>	5
<i>Proximate composition (% of dry matter basis)</i>	
Crude protein	50.3
Crude lipid	15.0
Crude ash	14.2
Crude Sugar	18.5

<sup>1</sup> Peruvian anchovy meal, Marubeni Nisshin Feed Co. Ltd., Osaka, Japan.

<sup>2</sup> Ueda Oils & Fats Mfg. Co., Ltd., Kobe, Japan.

<sup>3</sup> Halver (1957).

#### c) 測定項目および分析方法

飼育開始および終了時には体重を測定し、飼育成績として SGR, FE, DFR などを 4-1-1-1) c) および 4-1-2-1) c) に記した式により算出した。飼料および魚体や肝臓の一般成分は AOAC 法 (1984) によった。

終了時には各水槽区から 3 尾を取り上げてヘパリン処理したシリンジで尾部動脈より採血し、Hb および Ht をそれぞれシアンメトヘモグロビン法および遠心法で測定した。また、血漿を用いて TG, TCHO, HDL-CHO などを生化学自動分析装置 (富士ドライケム 7000V, Fuji Film, 東京) で、NEFA および PL 含量を 4-1-1-2) c) に記した方法で分析した。肝臓の PL, TG および TCHO 含量も 4-1-2-1), c) に記した方法で測定した。

#### d) 干出試験・麻酔回復試験・攻撃試験

試験終了後に各飼料区から必要尾数を取り上げて 4-1-1-1) d) に記した方法に準じて干出試験、麻酔回復試験および病原細菌 *V. anguillarum* による攻撃試験を実施した。

干出試験は機器類の不備で回復時間を測定できず、干出後における血漿グルコース含量の変化についてのみ検討した。すなわち、各試験区からランダムに 16 尾を取り上げて 5 min 空中に干出してから、新鮮海水を満たした 150 L 容角型水槽へ速やかに收容し、1, 2, 4 および 6 h 後に各区より 3 尾ずつ取り上げてヘパリン処理したシリンジで尾動脈から採血した。血

漿グルコース含量は生化学自動分析装置（富士ドライケム 7000V, Fuji Film, 東京）を用いて測定した。

麻酔回復試験は各試験区から 30 尾ずつ取り上げ、800 ppm フェノキシエタノール海水へ 2 min 麻酔してから、新鮮海水を満たした 150 L 容角型水槽に収容し、水槽底での横臥状態から起位して正常な遊泳を行うまでの覚醒時間を測定した。試験は 3 反復で実施した。

攻撃試験は各試験区から 20 尾ずつ取り上げて、シマアジ稚魚を生体通過させた *V. anguillarum* (SD040506) を、 $2 \times 10^8$  CFU/mL 滅菌生理食塩水の濃度に調整し、0.1 mL/尾を腹腔内に注意深く打注した。なお、当該菌の打注は、全試験区で翌日も活発に摂餌したことから、全区でへい死が認められるまで隔日に 5 回に分けて行った。打注後は 300 L 容角型水槽へ収容して 1 日 2 回給餌し 20 日間のへい死尾数を毎日計数した。試験は 2 反復で実施した。なお、毎日取り上げたへい死魚はこれまでと同様に腎臓より釣菌して *V. anguillarum* を確認した。

#### c) 統計処理

一元配置分散分析法で処理による有意差 ( $P < 0.05$ ) を確認した後、Dunnett's new multiple range test に基づいて各試験区における平均値の有意差判定を行った ( $P < 0.05$ )。

### 4-2-2-2) 結果

#### a) 飼育成績，血液性状，血漿化学成分，全魚体の一般成分，肝臓の脂質組成

Table 4-10 に飼育成績を示した。終了時の体重や生残率に有意な区間差はなく、いずれも優れていた。一方、DFR は Cf および HM 区が対照区より低かったことから、FE や PER は Cf 区が他の区より有意に優れていたが、それらの区間差は小さかった。

血液性状および血漿の脂質クラスを Table 4-11 に示した。Ht および Hb に有意な区間差はなかった。血漿 TG, TCHO, NEFA および PL 含量にも有意な区間差はなかった。HDL-CHO 含量は Cf および HM 区が高い傾向にあり、対照区と HM 区の間で有意差が認められた。

全魚体の一般成分および肝臓の脂質含量と脂質クラスを Table 4-12 に示した。全魚体の一般成分に区間差は認められなかった。また、HSI と VSI, APR および ALR にも区間差はなかった。しかし、肝臓の脂質, PL, TG および TCHO 含量はいずれも対照区が低く、Cf 区および HM 区の順に上昇し、HM 区の脂質および TG 含量は対照区より有意に高かった。



**Table 4-10.** Growth performance of young striped jack fed on basal diets with medicinal herb for 9 weeks

	Control	Cf	HM
Initial body weight (g)	16.0 ± 0.0	16.0 ± 0.0	16.0 ± 0.0
Final body weight (g)	62.0 ± 0.6	63.6 ± 1.9	62.1 ± 1.3
SGR (%)	2.2 ± 0.0	2.2 ± 0.1	2.2 ± 0.0
DFR (%)	2.8 ± 0.0	2.7 ± 0.1*	2.7 ± 0.1*
FE (%)	65.8 ± 0.5	70.8 ± 2.4*	68.2 ± 2.2
PER	1.27 ± 0.01	1.38 ± 0.05	1.33 ± 0.03
Survival rate (%)	98.9 ± 1.9	99.4 ± 1.0	98.9 ± 1.0
HSI <sup>1</sup>	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1
VSI <sup>1</sup>	4.3 ± 0.3	4.2 ± 0.1	4.3 ± 0.5

<sup>1</sup> Values are mean ± SD of three groups, each 3 fish per tank.

Values in a row with asterisks indicate the significant difference compared with the control group ( $P < 0.05$ ).

**Table 4-11.** Hematological and plasma constituents of young striped jack fed on basal diets with medicinal herbs powder for 9 weeks

	Control	Cf	HM
Hematological			
Hematocrit (%)	41.66 ± 2.84	44.16 ± 2.55	42.52 ± 5.31
Hemoglobin (mg/dL)	13.02 ± 1.00	14.36 ± 1.14	14.46 ± 2.01
Plasma constituents			
NEFA (mg/L)	101.58 ± 4.99	134.42 ± 24.81	104.58 ± 2.66
HDL-C (mg/dL)	207.67 ± 2.03	225.56 ± 15.41	236.89 ± 14.87*
TCHO (mg/dL)	287.67 ± 11.55	321.56 ± 23.76	301.56 ± 5.67
TG (mg/dL)	143.67 ± 15.63	166.22 ± 19.67	152.56 ± 5.50
PL (mg/dL)	832.19 ± 59.32	935.35 ± 53.14	772.4 ± 24.5

Values are mean ± SD of three groups, each 3 fish per tank.

Values in a row with asterisk indicates the significant difference compared with the control group ( $P < 0.05$ ).

**Table 4-12.** Proximate composition of whole body and lipid class content of liver of young striped jack fed on basal diets with medicinal herb for 9 weeks

	Control	Cf	HM
Whole carcass			
Moisture (%)	66.80 ± 1.32	67.58 ± 0.58	67.00 ± 0.37
Crude protein (%)	19.37 ± 0.48	19.23 ± 0.14	19.40 ± 0.30
Lipid (%)	9.50 ± 0.97	9.34 ± 0.76	9.53 ± 0.35
Ash (%)	3.46 ± 0.07	3.55 ± 0.28	3.55 ± 0.17
APR	25.61 ± 0.76	27.39 ± 0.73	26.88 ± 1.11
ALR	47.66 ± 5.78	50.21 ± 3.51	50.03 ± 2.26
Liver			
Crude lipid (% wet matter basis)	9.76 ± 2.77	12.10 ± 2.51	17.84 ± 2.21*
Lipid (mg/g tissue)			
PL	9.22 ± 1.35	11.94 ± 4.42	16.19 ± 2.37
TCHO	2.86 ± 1.36	3.09 ± 0.96	4.34 ± 1.03
TG	82.5 ± 23.77	102.79 ± 23.60	147.13 ± 22.27*

Values are mean ± SD of three groups, each 3 fish per tank.

Values in a row with asterisk indicate the significant difference compared with the control group ( $P < 0.05$ ).

#### b) 干出試験・麻酔試験・攻撃試験

干出試験における血漿グルコース含量の変化を Fig. 4-11 に示した。なお、0 h の血漿グルコース含量は干出前の供試魚の値とした。血漿グルコース含量の経時変化に有意な区間差は認められなかったが、干出 1~4 h 後までは対照区が高く Cf および HM 区は低く推移した。6 h 後には各区ともほぼ等しいレベルに達した。

麻酔試験における各飼料区の覚醒時間を Fig. 4-12 に示した。覚醒時間は対照区より Cf 区および HM 区が有意に短かった。

攻撃試験後における生残率の変化を Fig. 4-13 に示した。対照区では 8 日後からへい死魚が認められ 12 日後までに増加し、生残率は 60% 以下に達した。Cf および HM 区も 8 日および 9 日後からへい死が認められたが、10 日後の生残率は 85% を維持していた。

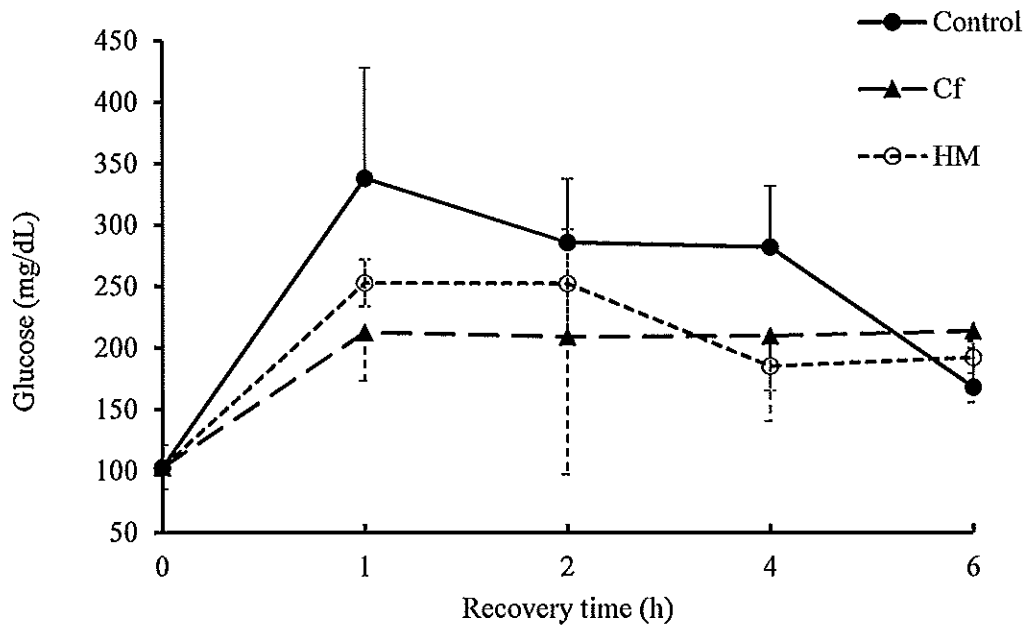


Fig. 4-11 Changes in plasma glucose level of young striped jack fed on basal diets with medicinal herb for 9 weeks and subsequently air exposure for 5 minutes. Values are mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

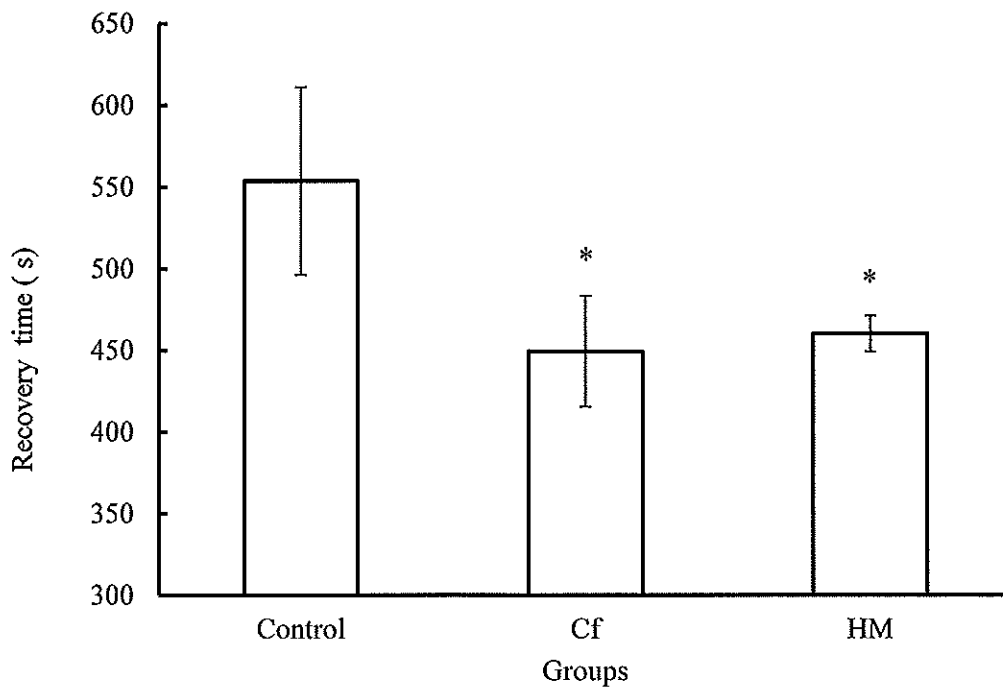


Fig. 4-12 Recovery time of young striped jack juvenile fed on basal diets with medicinal herb for 9 weeks and subsequently anesthetization with 800 ppm 2-phenoxyethanol for two minutes. Bars with asterisks indicate the significant difference compared with the control group ( $P < 0.05$ ).

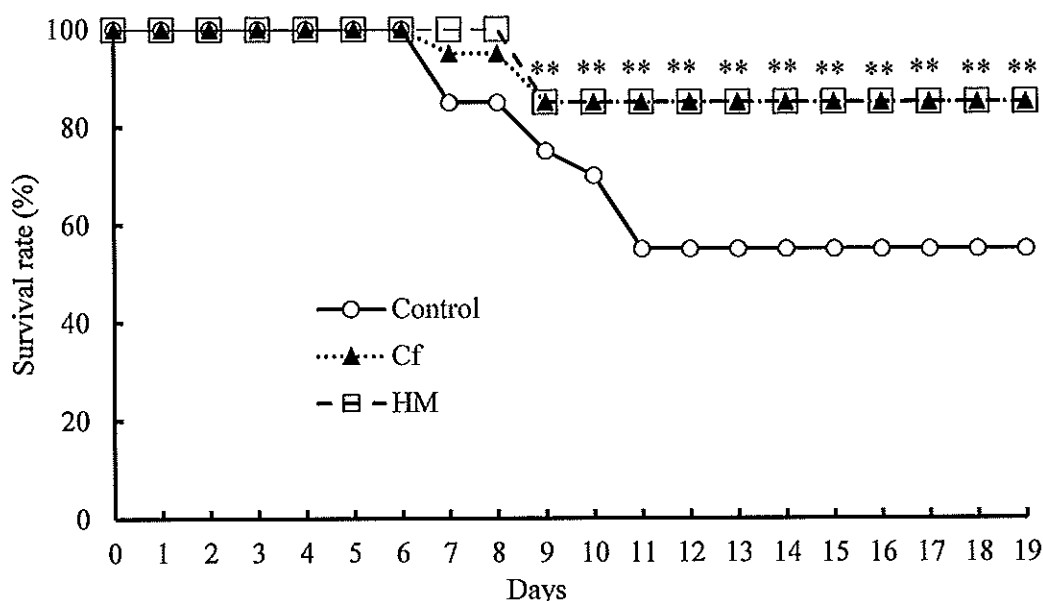


Fig. 4-13 Change in survival rate of striped jack juvenile fed on basal diets with medicinal herb for 9 weeks and subsequently challenged intraperitoneally with *V. anguillarum*. Lines with asterisks indicate the significant difference compared with the control ( $P < 0.05$ ).

#### 4-2-2-3) 考察

本節におけるシマアジ種苗サイズ稚魚のSGRは4-1-2)のマダイ種苗サイズ稚魚より高く、FEや生残率に種間差は認められなかったことから、種苗サイズ稚魚でもマダイおよびシマアジの栄養要求に顕著な違いのないことを確認した。

CfおよびHMを基本飼料に添加してシマアジ種苗サイズ稚魚を飼育しても飼育成績は改善せず、添加効果が認められた4-1-2)マダイ種苗サイズ稚魚と異なる結果が得られた。シマアジもマダイと同じく仔魚から稚魚への移行ステージから胃や胃腺の分化がはじまる。また、その移行と並行して幽門部付近に腸より分化幽門垂がするしたあ現れるマアジ幽門垂は細長い多数の盲嚢が塊集した器官であり、マダイ幽門垂は4本程度の小さな袋状の器官である(Fig. 4-14)。また、全消化管長に対する腸長比はマダイがシマアジより高いが、腸管径に著しい種間差はみられない。これら消化器官の形態の違いから、両種の栄養要求は類似するが消化吸收過程に差異のあることがうかがえる。すなわち、マダイ稚魚では摂取した餌飼料は胃に蓄えられ部分的に消化された後、腸での消化吸收が効率よく行われる量の食塊が胃から腸に移行する。そこで腸前部で分泌された胆汁液や膵液が混合され、徐々に後腸・直腸に移行する間に消化吸收が進み、完了する。これに対して、シマアジ稚魚では摂取した餌飼料は胃でマダイと同様な消化を受けた後に腸へ移行し、食塊の多くが幽門垂に侵入して胆汁液と膵液に

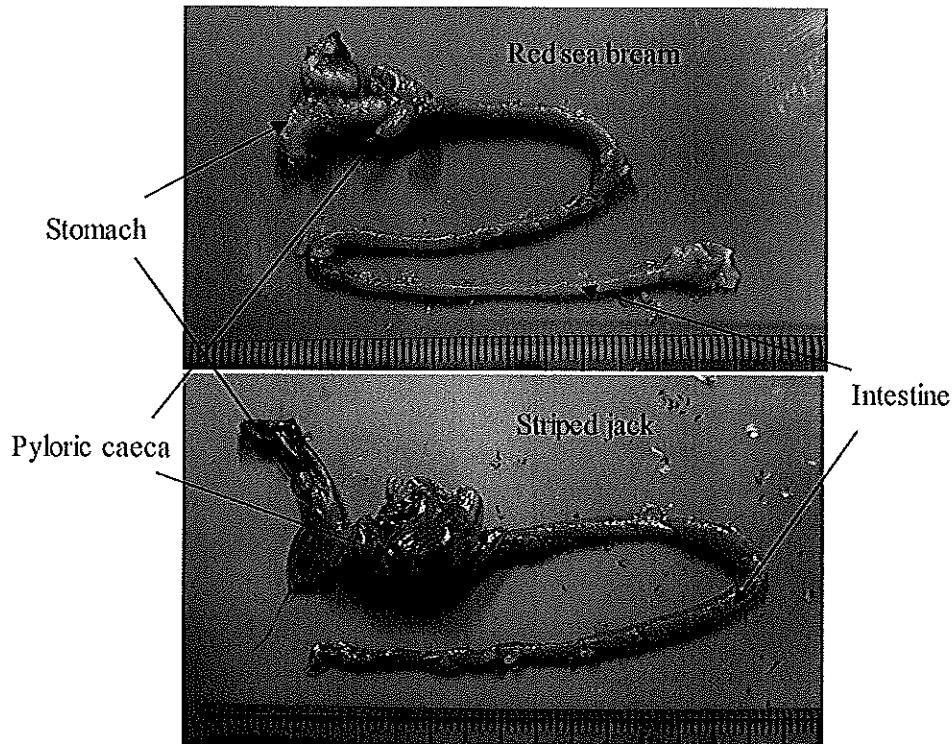


Fig. 4-14 Digestive tract of young red sea bream (13.5 mm TL) and striped jack (17.5 mm TL).

による消化・吸収が早い時間から効率よく行われる。しかし、幽門垂を経由しない食塊は幽門垂の残渣とともに徐々に後腸・直腸に移行し、その間に消化吸収が進み完了するものと推察される。おそらく、CfおよびHMの添加効果がみられたマダイでは、それらに含まれる有効物質が腸上皮細胞の吸収機能を亢進し、腸管フローラの改善を介して体内の栄養素代謝を活性化していた可能性が考えられる。一方、添加効果がみられなかったシマアジではこれらハーブが幽門垂に侵入し難く、その上皮細胞や細菌叢に及ぼす効果が得られなかったことに基づくのかもしれない。今後に残された興味ある検討課題であろう。

干出試験後の血漿グルコース含量に有意な区間差はなかったが、CfおよびHM区は低く推移する傾向にあった。また、麻酔後の覚醒時間はCfおよびHM区が対照区より有意に短縮した。これらの結果は、ハーブに含まれるポリフェノールなどの有効成分が、シマアジ種苗サイズ稚魚の健苗性を高く維持する方向に機能したものと考えられる。なお、シマアジ種苗サイズ稚魚の覚醒時間は前節のマダイ種苗に比べて長かった。おそらく、血漿TGおよびNEFA含量がシマアジで著しく低かったことに関連しているのかもしれない。

シマアジ種苗サイズ稚魚に対する *V. anguillarum* の攻撃試験では、CfおよびHM区の生残率が対照区より有意に高く維持され、シマアジ稚魚とともにCfおよびHMの添加効果を確

認した。これまで述べたように、ハーブエキスの *V. anguillarum* に対する増殖阻止と健苗性の向上効果に基づくのであろう。シマアジの産卵および種苗生産は初冬からはじまる。ふ化から 40 dah までは陸上施設で飼育されるが、その後は海上の生簀に沖出しされて種苗にまで養成される。この養成期間においては数日間に水温が大幅に低下してストレスが頻繁に負荷される。特に、低温期には *V. anguillarum* を原因菌とするビブリオ症が頻発し、本種の種苗生産に大打撃を与える。ハーブでビブリオ症の蔓延を抑制できることを明らかにした本章の結果は、今後のマダイおよびシマアジの種苗量産技術の確立に大いに貢献するものと確信する。

## 第5章 総括

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、ハーブの抗菌作用とワムシへの応用、仔稚魚および種苗に対するハーブの投与効果について検討し、両魚種の種苗量産技術の確立に資する数多くの有為な知見を得た。以下にその概要を記す。

### 初期発育期間における生化学的変化

マダイおよびシマアジのふ化から摂餌開始 3 dah まで、粗タンパク質および粗脂質含量が低下し、DNA 含量が増加した。この時期の仔魚は骨格や消化器官などを構築するため、タンパク質と脂質をエネルギー源として利用することが示唆された。エネルギーが得られないこの期間は、活動エネルギーを極めて低いレベルに維持することが、生き残り戦略の一つであることが推測された。

また、摂餌開始より仔魚から稚魚への移行期には、粗タンパク質、RNA 含量、DNA 含量および ALP 活性が急増し、各組織・器官が急速に分化・機能化することが生化学的にも確認された。この期間は主な体構成成分であるタンパク質の要求性が極めて高いと考えられた。しかし、マダイにおける魚体の粗脂質含量の増加は、粗タンパク質に比較して緩やかであったが、シマアジでは全長の屈曲点、すなわち、16 dah および 28 dah 付近で大きく低下したことから、いずれの魚種でも脂質がエネルギー源として選択的に消費されていることが示唆された。

マダイ種苗生産における餌料系列と仔稚魚の消化管の発達を Fig. 5-1 に示した(田中 1969, 1972 ; Fukuhara 1985)。摂餌開始からワムシ、そしてアルテミア幼生の順に給与するが、これら生物餌料には海産魚の必須脂肪酸である EPA や DHA を豊富に含む餌料で培養する。これまで、生物餌料における EPA や DHA 含量が特に注目され、その強化に力点が置かれてきたが、仔魚期におけるタンパク質要求の高いことが本研究で示されたことから、生物餌料の培養にあたっては脂質とともにタンパク質含量に留意する必要がある。本研究で示さなかったがワムシのタンパク質と脂質含量は相補的に変化する。近畿大学水産養殖種苗センター浦神事業場ではワムシのタンパク質含量にも留意したワムシ培養法を考案し、マダイおよびシマアジ仔魚の生残率を高めることを可能にしている。

マダイでは 14 dah から Acid-Pase 活性が上昇して胃腺の分化・形成が始まり、ピークに達する 35 dah に胃が完成・機能すると示唆された。シマアジでは体長 7~13 mm (16~24 dah) に胃・幽門垂が分化・機能すると報告されている。渡辺 (1985) は仔魚期におけるタンパク質の消化は飲細胞作用によるもので、複雑な高次構造を持つタンパク質の消化分解は稚魚期から行われることを報告した。加熱乾燥した魚粉を主原料とする配合飼料の給与は仔魚には不适当であり、Fig. 5-1 に示すように 20 dah から生物餌料と併用しながら配合飼料に転換するのが望ましい。

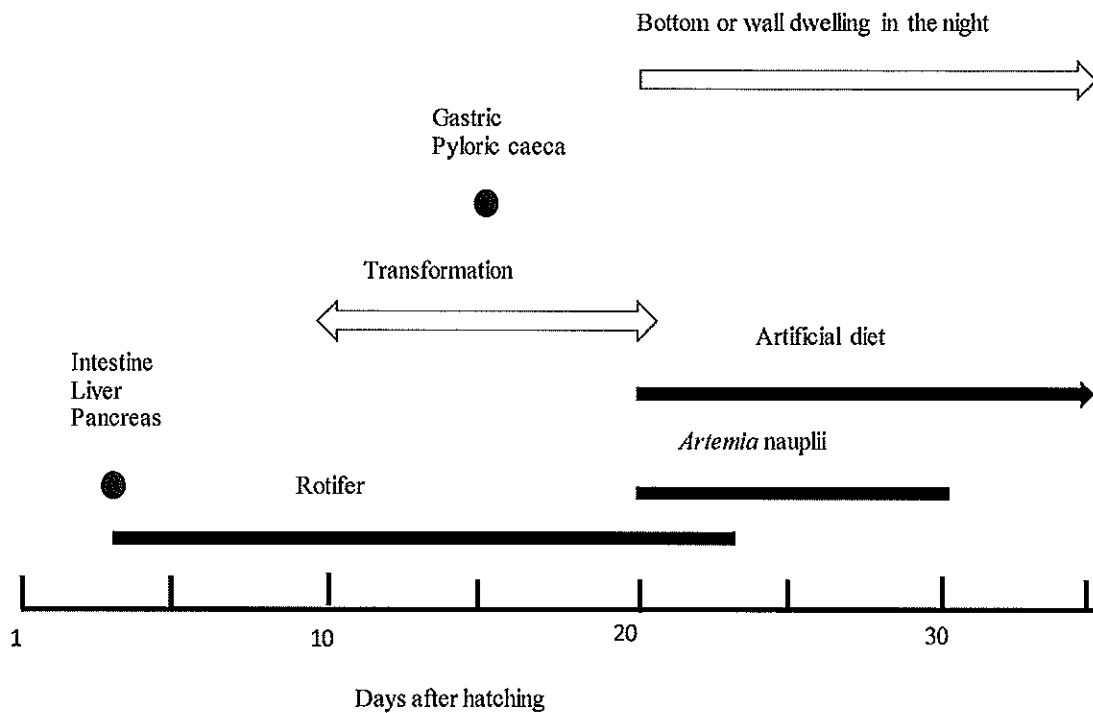


Fig. 5-1 Feeding schedule and development of digestive organ of larval and juvenile red sea bream and striped jack.

マダイおよびシマアジの種苗生産では10~20 dah にしばしば多大な減耗が発生する。石橋(2003) および Ishibashi et al. (2005) はこの期間に酸素消費量が増大し、ストレス耐性が低下することを報告した。本研究でも20 dah 前後で粗脂質含量が低下する傾向が認められたことから、組織・器官形成や機能化のためにエネルギー消費が著増することで、ストレス耐性が低下するのかもしれない。マダイ、シマアジともに40 dah 前後で脂質含量が上昇したが、この頃になると組織・器官の形成・機能化が一段落して、摂取した脂質をエネルギーとして蓄積することが可能となりストレス耐性が改善されるのかもしれない。種苗生産施設では陸上水槽から海上生簀へ沖出しする前に魚体の大小を選別するが、その前に実施される絶食やハンドリングによるストレスを考慮すると、マダイでは全長20 mm 以上の稚魚で沖出しすることが望まれる。加えて、シマアジでは初生鱗の形成などを考慮して全長30 mm 以上からが望ましい。

#### ハーブの抗菌作用とワムシへの応用

4種薬用ハーブ、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) とその混合物 (HM) では, Cf および HM メタノール抽出エキスに7種の魚病細菌 (*V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *A. salmonicida*, *P. anguilliseptica*, *P. damsela* subsp. *piscicida*, *A. hydrophila*, *E. tarda*) に



対する増殖抑制効果が認められ、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 細菌数を減少させる効果のあることが示された。

種苗生産施設で仔魚に発生する疾病の多くはワムシを介して伝播することが知られており、これまで培養水への合成抗菌剤や抗生物質の添加や、病原菌の混入を避けた閉鎖循環式培養法などが検討されている。しかし、種苗生産施設でのワムシ培養は開放条件で行われており、抗菌剤等の使用は食の安心・安全面からも推奨できないとともに、確実な治癒効果も得られないのがほとんどである。本章で Cf および HM エキスが、ワムシ体内の *Vibrio* 属細菌数を減少させる効果を持つことが示され、種苗の安定生産・低廉化に大きく貢献できる可能性が示唆された。

### 仔稚魚に対するハーブの投与効果

マダイおよびシマアジ仔稚魚に Cf および HM ワムシ、Cf および HM 粉末の添加飼料などを給与して、成長や飼育成績、ストレス耐性、*V. anguillarum* に対する抗病性などに及ぼす効果について検討した。

Table 5-1 に Cf および HM の効果についてまとめた。Cf および HM エキスと粉末をそれぞれワムシと基本配合飼料に添加したところ、マダイの成長と飼育成績はいずれの發育段階においても改善されたが、シマアジでの効果はないかあっても僅かであった。この原因として、消化管の形態が大きく異なることが考えられる。すなわち、両魚種は仔魚から稚魚へ移行する時期に胃・胃腺の分化・機能化が始まるが、マダイでは幽門部に 4 本の円錐型の単純な幽門垂を形成し比較的長い腸を持つのに対して、シマアジでは多数の細い盲嚢状の幽門垂が形成され短い腸を持つ (Fig. 4-14)。おそらく、これらハーブに含まれるポリフェノールなどの有効物質が、長い腸管を持つマダイでは腸管フローラを巧妙に調節して消化吸收能を改善するが、大きな幽門垂と短い腸を持つシマアジでは腸内フローラの調節がうまく行われないのであろう。今後詳細に検討すべき興味ある検討課題である。シマアジ種苗サイズ稚魚の干出試験で Cf および HM の添加効果はみられなかったが、マダイの沖出しおよび種苗サイズ稚魚およびシマアジ仔魚では、干出後の生残率が添加区で高い傾向を示した。一方、麻酔試験ではマダイおよびシマアジの沖出しおよび種苗サイズ稚魚で、無添加の対照区より Cf および HM 区に有意に短い覚醒時間が得られた。干出試験後にマダイおよびシマアジの血漿コルチゾールおよびグルコース含量の変化を調べたところ、対照区より Cf および HM 区が早い時間から低く、ハーブ添加区では干出および麻酔ストレス耐性が高いことが示された。これも、ハーブに含まれる有効物質がマダイおよびシマアジ種苗の健康度を高めていたことに基づくのであろう。Goda (2008) はチョウセンニンジンに含まれるサポニンがナイルティラピアの腸内細菌叢を調整し、栄養素の吸収や健康度を向上させることを報告している。Cf に多く含まれるペクチン類には腸内フローラの改善効果や腸粘膜増殖作用のあることが報告されており (Suzuki et al. 2004 ; 佐々木ら 2005)、ポリフェノール類による病原菌の増殖抑制や

免疫機能の活性化に加えて、ペクチンなどを栄養源とする腸内フローラにも注目する必要がある。

*V. anguillarum* (SD040506) による攻撃試験では、マダイおよびシマアジの仔稚魚のいずれにも生残率を高める有意な効果が得られた。これらハーブエキスに当該菌に対する増殖抑制効果が認められたので、ハーブに含まれる物質が直接的に腸内における当該菌の増殖と、体内への侵入を阻害していたものと推察される。杉田 (2012) は魚類の腸内細菌の魚病細菌に対する抗菌活性を調べ、1~11 %の細菌が抗菌活性を持つこと明らかにしているので、ここでも Cf および HM による腸管フローラの調節が免疫能を高めていた可能性も残されている。

シマアジ種苗生産期の大きな減耗原因に神経ウイルス症 (VNN) がある。この対策としてウイルスキャリアー親魚の除去、受精卵および飼育水や資材の消毒が推奨されている (虫明・有本 2000)。2-1-3) にも記したように薬用ハーブには抗ウイルス活性を示すものもあることから、海産魚類へのハーブ利用については将来にわたってさらに広がることも考えられる。

本研究のマダイおよびシマアジ初期発育期間における生化学的研究から、多数のへい死がみられるクリティカルピリオッドでは、組織・器官の分化・機能化やそれに伴う代謝機能、各栄養素の必要性と要求量などの変化が示されるなど、仔稚魚飼育に資する知見が得られた。また、薬用ハーブ Cf および HM にはマダイおよびシマアジの仔魚、稚魚および養殖種苗のストレス耐性や魚病細菌に対する免疫能を高める効果のあることも明らかにした。本研究成果がこれからの種苗量産技術の確立に多少とも貢献できれば望外の喜びである。

Table 5-1. Summary of the results of chapter 3-4

		Red sea bream		Striped jack		
		Cf	HM	Cf	HM	
Larvae	Growth performance and survival rate	TL (↑)				
	Air exposure test	NP	NP	(+)	(+)	
	Pathogen challenge test	(++)	(++)	(++)	(++)	
Juveniles	Growth performance and survival rate	SGR (↑) DFR (↓) FE (↑) SR (↑)	DFR (↓)	Bwt (↑)		
	Air exposure test	NP	NP	NP	NP	
	Anesthetization test	(++)	(++)	(++)	(++)	
	Pathogen challenge test	(++)	(++)	NP	NP	
	Growth performance and survival rate		Bwt (↑) SGR (↑) SR (↑)	SGR (↑) FE (↑) PER (↑) APR (↑) CF (↑) SR (↑)	FE (↑) DFR (↓) PER (↑) HSI (↑)	DFR (↓)
		Fingerlings Haematological and plasma constituents		GOT (↓) GPT (↓)	Hg (↑) GOT (↓) GPT (↓) HDL-C (↑) TG (↓) Lysozyme (↑) ACH50 (↑)	HDL-C (↑)
Liver lipid			PL (↑)	TG (↓) PL (↑)	TG (↑)	
Air exposure test			(++)	(++)	(+)	(+)
Anesthetization test			(++)	(++)	(++)	(++)
Pathogen challenge test	(++)		(++)	(++)	(++)	

(↑), (↓) and (++) indicate to significant difference compared with control group ( $P < 0.05$ ).

NP = not performed

TL, total length; SGR, specific growth rate; DFR, daily feeding rate; FE, feed efficiency; SR, survival rate; Bwt, body weight; PER, protein efficiency ratio; APR, apparent protein ratio; CF, condition factor; HSI, hepatosomatic index; Hg, hemoglobin; GOT, aspartate aminotransferase; GPT, alanine aminotransferase; HDL-C, high density lipoprotein-cholesterol; TG, triglyceride; PL, phospholipid; ACH50, alternative complement pathway activity.

## 和文要旨

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, 原因不明の大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、ワムシに由来する 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、ワムシに由来する 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24h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 沖出しおよび種苗サイズ稚魚に対するハーブ添加飼料の効果

マダイ沖出しサイズ稚魚 体重0.1g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。

マダイ種苗サイズ稚魚 体重24gの稚魚に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。

シマアジ沖出しサイズ稚魚 体重0.4g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。

シマアジ種苗サイズ稚魚 体重16gの稚魚に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が明らかになり、多数のへい死がみられるクリティカルピリオッドでは、組織・器官の分化・機能化とそれに伴う代謝機能、各栄養素の必要性と要求性の変化が示されるなど、仔稚魚飼育に資する知見が得られた。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。

英文要旨 (Summary)

The aquaculture management of red sea bream and striped jack became very difficult in recent years because of the soaring production cost inspite of decreasing fish price. Therefore, it has become the most important point for the development of aquaculture industry on how to produce and supply sufficient number of excellent trait of seedlings with low price.

The production technologies of both fish have been continuously progressed by utilizing the outputs of research activities, and mass seedling supply system to aquaculture industry is improving. However, the stability and planned production of artificial fingerlings are yet to be achieved due to the lack of integration of basic knowledge on the development at larval and juvenile stages. Particularly, the duration from 10 to 20 day after hatching (dah) is generally recognized as a critical period, and mass mortality from unknown origin is often occurred during this period. On the other hand, even a small change in rearing conditions at the seedling production facility with high stocking density may increase stress susceptibility, which often causes disease and resulted in mass mortality. To date, the treatment by antibiotic has been performed but the results are not stable. Moreover, the application of antibiotic cannot be recommended to think about the food safety.

In this study, the changes in biochemical components of red sea bream and striped jack were clarified from hatching to juvenile stages. Subsequently, the research activities were carried out to determine the effects of herbs administration, which have been used since ancient times in place of the antibiotic, on pathogenic bacteria proliferation, growth performance, and tolerance against stress and disease. Those activities were aimed to achieve valuable knowledge in order to contribute to the establishment of mass seedling production technology and the development of aquaculture industry.

**Chapter 1: Changes in biochemical components at early developmental stages**

The fertilized eggs of red sea bream and striped jack were allowed to hatch after obtaining from the Fisheries Laboratory, Kindai University, and the changes in body proximate composition, nucleic acid content and various enzymes activities were investigated until 49 and 42 dah, respectively.

**Red sea bream** Moisture content was decreased from 3 dah, but crude protein and lipid contents were decreased until 3 and 7 dah, respectively, but increased thereafter. In particular, a remarkable increase was observed in crude protein content until 21 dah. Ash content was increased gradually from hatching to 49 dah. On the other hand, DNA and RNA contents were increased remarkably until 14 dah but gradually decreased from 21 dah. RNA/DNA ratio and protein/DNA ratio were rapidly decreased from hatching to 3-7 dah and increased thereafter. While the peak of alkaline phosphatase (ALP) and, glucose 6-phosphate dehydrogenase and acid protease activities were observed at 14~21 and 28~35 dah, respectively, no specific trend was found in basic protease activity.

**Striped jack** Moisture content declines gradually from the feeding start to 12 dah, in contrast, crude protein and ash contents were increased until 16 dah. On the other hand, body triglyceride (TG) and phospholipid (PL) contents were significantly increased from 3 to 12 dah. DNA and RNA contents were increased from 4 to 8 dah, later it was gradually decreased until 36 dah. RNA/DNA ratio increased from 3 to 8 dah, later remained constant until 36 dah but showed a rapid increase thereafter. ALP activity showed rapid increase at 3 and 6 dah, and maintained high value until 14 dah.

From the results of this chapter, it has shown that the growth inflexion point and changes in biochemical components of both species are coincided with the critical period observed at the early developmental stage. Also, it was assumed that the formation and functioning of different organs caused increased requirement of lipid and protein.

## Chapter 2: Application of antibacterial action of herb in rotifer

The beneficial effects were verified of some medicinal herbs such as *Massa medicata* (Mm, shinkiku in Japanese), *Crataegi fructus* (Cf, sanzashi in Japanese), *Artemisia capillaris* (Ac, kawarayomogi in Japanese) and *Cnidium officinale* (Co, senkyu in Japanese) in rotifer.

**Antibacterial effects of herb extract** The methanol extract of herbs mixture (HM) containing Mm, Cf, Ac and Co at 2:2:1:1 was impregnated in circular filter paper, and the inhibitor effect was examined using the paper-disk method against the pathogenic bacteria such as *Vibrio anguillarum*, *V. alginolyticus*, *Aeromonas salmonicida*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda*. Here, Cf and HM showed inhibitory effects against all pathogenic bacteria.

**Herbs supplementation effect in rotifer (herb-rotifer)** Extracts of Cf and HM were added in the rearing water of rotifer and it was examined the effect of suppressing TCBS bacteria number in the rotifer body. While Cf was added in water, bacteria number remained constant until 12 h, but the bacteria number in control (without herb) group was significantly increased from 6 to 12 h. The bacteria number remained lower than the control group from 6 to 12 h after adding HM in rearing water.

The results from this chapter suggested that the herbal extracts have growth inhibitory effect against pathogenic bacteria, and the suppressing effect of TCBS bacteria number was observed when Cf and HM were added in the rearing water.

## Chapter 3: Effect of herb-rotifer in larvae

The larvae of red sea bream and striped jack were fed with herb-rotifer fortified by Cf and HM. After rearing until 20 dah, the usefulness of herbs was determined from the growth performance and challenge test against pathogenic bacteria, *V. anguillarum*.

**Red sea bream** At the end of rearing trial, total length was higher in larvae fed with Cf-enriched



rotifer (Cf-rotifer) followed by HM-rotifer and control, with significant difference between Cf-rotifer and control group. However, there was no significant difference in TCBS bacteria number in larval body among the treatments. On the other hand, the survival rate after 6 days challenge test against *V. anguillarum* in larvae fed with herbs-enriched rotifer was significantly higher than that of control group.

**Striped jack** There was no significant difference in final total length among the treatments. On the other hand, about 24 h after air exposure test, the survival rate in larvae fed with herbs-enriched rotifer became higher than the control group. When the larvae were subjected to challenge test, the survival rate after 6 days in herb-enriched rotifer groups was significantly higher than that of control group.

From the result of this chapter, the increased survival rate in larvae fed with herbs-enriched rotifer was due to the activation of immune function but not by the suppression of TCBS bacteria. On the other hand, since there was very little effect on the growth promotion of larvae, herbs may not be so effective to enhance the digestion and absorption functions.

#### **Chapter 4: Effect of herbs supplemented feed on juveniles and fingerlings for aquaculture**

**Red sea bream juveniles** Red sea bream juveniles of mean weight 0.09 g and 0.11 g were fed with FM based diet supplemented with powdered Cf and HM for 20 days. The final mean body weight, specific growth rate (SGR) and feed efficiency (FE) were significantly higher in fish fed with herbs mixed diets compared to those of control diet. In contrast, the daily feeding rate (DFR) was significantly lower in herbs supplemented diets. In air exposure test and recovery after challenge test, fish fed herbs (Cf and HM) supplemented diets indicated higher survival rate and short recovery time, respectively. Also, the survival rate in challenge test was significantly higher in Cf and HM supplemented groups than the control group.

**Red sea bream fingerlings for aquaculture** Aquaculture fingerlings with mean body weight 24 g were fed with fish meal (FM) based formulated diets supplemented with Cf and HM for 84 days. The survival rate, SGR and FE were higher in fish fed herbs supplemented diets than the control diet. In addition, hemolytic complement and plasma lysozyme activity of herbs supplemented diets fed groups were tended to be higher. On the other hand, herbs supplemented groups showed short recovery time after anesthesia and high survival rate after air exposure and challenge test against pathogenic bacteria *V. anguillarum*.

**Striped jack juveniles** Juveniles with mean body weight 0.4 g were cultured for 20 days feeding with formulated diets including Cf and HM. The final mean body weight was higher in fish fed Cf followed by HM and control group, the value of Cf fed group being significantly higher than control. In addition, the survival rate after air exposure test was higher and recovery time after anesthesia was short in fish fed herbs mixed diets than control diet. There was significant difference in recovery time between fish fed with diets HM and control.

**Striped jack fingerlings for aquaculture** The fingerlings for aquaculture with mean body weight 16 g were fed with diets supplemented with Cf and HM for 63 days. The FE, protein and energy retention efficiencies showed decreasing trend in order of Cf, HM and control, and the values for those parameters were significantly higher in Cf than those of control group. Conversely, the DFR in fish fed herbs mixed diets was significantly lower than control diet. On the other hand, fish fed with herbs mixed diets showed short recovery time after air exposure and anesthesia tests, longer time of 50% mortality against water with low specific gravity, and higher survival rate against pathogenic test compared to the control group.

From the results of this chapter, the supplementation of medicinal herbs in FM based formulated diets not only improved the growth performance of red sea bream and striped jack juveniles and fingerlings for aquaculture, but also showed an effect of improving resistance against various stresses.

From these series of experiments, the biochemical changes at early developmental stages of red sea bream and striped jack become clear. Important knowledge has also achieved and found that the metabolism, essentiality and requirement of nutrients are changed depending on the differentiation and functioning of organs at the critical period when mass mortality occurs. In addition, medicinal herbs can inhibit the proliferation of pathogenic bacteria, improve the growth performance and disease resistance against various stresses, and resulted in the improvement in survival rate to facilitate mass seedlings production of red sea bream and striped jack.

文献

- 荒川敏久・竹内俊郎・渡邊 武 (1993) : シマアジ稚魚用飼料の適正デンプン含量. 日本水産学会誌, **59**, 1945-1949.
- 荒川敏久・高屋雅生・北島 力・吉田範秋・山下金義・山本博敬・I. M. Soledad・渡邊 武 (1987) : シマアジの種苗生産における 2, 3 の問題点について. 長崎県水産試験場研究報告, **13**, 31-37.
- Ardo I., G. Yin, P. Xu, L. Varadi, G. Szigeti, Z. Jeney and G. Jeney (2008): Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Ionicera japonica*) and boron enhance the non-specific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, **275**, 26-33.
- Association of Official Analytical Chemists (1984): Official methods of analysis of the association of official analytical chemists, 14 th edition. Arlington, 1141.
- Bae J.H. (2003): Effect of *Artemisia capillaris* extract on the growth food-borne pathogens. *Korean Journal of Nutrition*, **36**, 147-153.
- Bandeem J. and J. F. Leatherland (1997): Transportation and handling stress of white suckers raised in cages. *Aquacult. Int.*, **5**, 385-396.
- Battaglione S.C., D.T. Morehead, J. M. Cobcroft, P. D. Nichols, M. R. Brown and J. Carson (2006): Combined effect of feeding enriched rotifers and antibiotic addition on performance of striped trumpeter (*Latris lineata*) larvae. *Aquaculture*, **253**, 447-460.
- Buckley (1984): RNA-DNA ratio: an index of larval fish growth in the sea. *Marine Biology*, **80**, 291-298.
- 陳 昭能・竹内俊郎・高橋隆之・友田 努・小磯雅彦・桑田 宏 (2004) : マダイ仔魚の成長および飢餓耐性に及ぼすタウリン強化ワムシの効果. 日本水産学会誌, **70**, 542-547.
- Citarasu T. M. M. Babu, R. R. J. Sekar and M. P. Marian (2002): Developing *Artemia* enriched herbal diet for producing quality larvae in *Penaeus monodon* Fabricus. *Asian Fish, Sci.*, **15**, 21-32.
- Cowey, C. B. and M. J. Walton (1989): Intermediary metabolism. in "Fish nutrition, 2<sup>nd</sup> ed.", (ed. by J. E. Halver), Academic Press. San Diego, pp. 259-329.
- Davis K. B., P. Torrance, N. C. Parker and M.A. Suttle (1985): Growth, body composition and hepatic tyrosine aminotransferase activity in cortisol fed channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *J. Fish. Biol.*, **27**, 177-184.
- Direkbusarakom, S., A. Herunsalee and M. Yoshimizu (1996): Antiviral activity of several Thai traditional herb extracts against fish pathogenic viruses. *Fish Pathology*, **31**, 209-213.
- 堂ヶ崎知格・新藤哲也・古畑勝則・福山正文 (2002) : *Legionella pneumophila* に抗菌活性を示すコーヒー成分の化学構造について. 薬学雑誌, **122**, 487-494.

- 海老原 清 (2008) : 食物繊維の栄養・生理機能に関する研究. 日本栄養・食糧学会誌, **61**, 3-9.
- Folch J., M. Lee, G. H. Sloane Stanley (1957): A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509.
- 福田雅明・中野 広・山本和久 (1986) : ニシン発育初期における体成分の変化. 北大水産彙報, **37**, 30-37.
- 福原 修 (1976) : マダイ稚仔魚の形態学的研究－Ⅱ. 初生鱗の発生と成長. 南西海区水産研究所業績, **56**, 13-18.
- Fukuhara O. (1985): Functional morphology and behavior of early life stage of red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **51**, 731-743.
- Goda A. M. A. -S. (2008): Effect of dietary ginseng herb (Ginsana G115) supplementation on growth, feed utilization, and hematological indices of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), fingerlings. *Journal of the world aquaculture society*, **39**, 205-214.
- Hollman P.C. H. (2001): Evidence health benefits of plant phenols: local or systemic effects. *J. Sci. Food Agric.*, **81**, 842-852.
- Halver, J. E. (1957): Nutrition of salmonid fishes III. Water soluble vitamin requirements of chinook salmon. *J. Nutr.*, **62**, 225-243.
- Hilton, J. W. and D. G. Dixon (1982): Effect of increased liver glycogen and liver weight on liver function in rainbow trout, *Salmo gairdneri Richardson*: recovery from anesthesia and plasma <sup>35</sup>S-sulphobromophthalein clearance. *J. Fish Diseases*, **5**, 185-195.
- 萩原文二 (1955) : Proteolytic enzyme. 酵素研究法 2 (赤堀四郎編), 朝倉書店, 東京, pp. 37-244.
- 原田輝雄・村田 修・宮下 盛 (1984a) : 養成シマアジの成熟と採卵. 近畿大学水産研究所報告, **2**, 143-149.
- 原田輝雄・村田 修・宮下 盛 (1984b) : シマアジの人工ふ化飼育. 近畿大学水産研究所報告, **2**, 151-160.
- 畑井喜司雄・小川七朗・安永統男 (1982) : 養殖マダイから分離された *Edwardsiella tarda* の病原性について. 長崎県水産試験場研究報告, **8**, 67-73.
- 畑井喜司雄 (2006) : マダイ (ビブリオ病・滑走細菌症). 畑井喜司雄, 小川和夫監修, 緑書房, 東京, pp 175-176.
- 細谷憲政・森内幸子 (1980) : 栄養生理学. 朝倉書店, 東京, pp. 2-17.
- Immanuel, G., V.C. Vincybai, V. Sivaram, A. Palavesam and M.P. Marian (2004): Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. *Aquaculture*, **236**, 53-65.
- 井上 潔・山野恵祐・前野幸男・中島員洋・松岡 学・和田有二・反町 稔 (1992) : 養殖マ

高岡：マダイおよびシマアジの種苗量産技術に関する研究

- ダイのイリドウイルス感染症. 魚病研究, 27, 19-27.
- 石橋泰典・小澤 勝・平田八郎・熊井英水 (2003) : マダイ *Pagrus major* 仔稚魚の発育に伴う各種環境ストレス耐性の変化. 日本水産学会誌, 69, 36-43.
- Ishibashi Y. K. Inoue, H. Nakatsukasa, Y. Ishitani, S. Miyashita, O. Murata (2005): Ontogeny of tolerance to hypoxia and oxygen consumption of larval and juvenile red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture*, 244, 331-340.
- 岩田一夫・矢野原良民・石橋 制 (1978) : マダイの種苗生産過程におけるへい死要因に関する研究. 魚病研究, 13, 97-102.
- Jeong J. B., J. H. Park., H. K. Lee, S. Y. Ju, S. Y. Hong, J. R. Lee, G. Y. Chung, J. H. Lim and H. J. Jeong (2009): Protective effect of the extracts from *Cnidium officinale* against oxidative damage induced by hydrogen peroxide via antioxidant effect. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 525-529.
- Jian, J. and Z. Wu, (2003): Effects of traditional Chinese medicine on nonspecific immunity and disease resistance of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* (Richardson). *Aquaculture*, 218, 1-9.
- Jian, J. and Z. Wu (2004): Influences of traditional Chinese medicine on non-specific immunity of Jian Carp (*Cyprinus carpio* Var. Jian) *Fish and Shellfish immunology*, 16, 185-191.
- Ji, S. - C., G. -S. Jeong, G. -S. Im, S.- W. Lee, J.- H. Yoo and K. Takii (2007): Dietary medicinal herbs improve growth performance, fatty acid utilization, and stress recovery of Japanese flounder. *Fisheries Science*, 73, 70-76.
- Ji S.-C., O. Takaoka, A. K. Biswas, M. Seoka, K. Ozaki, J. Kohbara, M. Ukawa, S. Shimeno, H. Hosokawa and K. Takii (2008): Dietary utility of enzyme-treated fish meal for juvenile Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. *Aquaculture Science*, 74, 54-61.
- Kapahi P., M. E. Boulton and T. B. Kirkwood (1999): Positive correlation between mammalian life span and cellular resistance to stress. *Free Rad Biol. Med.*, 26, 495-500.
- 家戸敬太郎 (2002) : マダイの品種改良に関する研究. 近畿大学水産研究所報告, 8, 173-259.
- 家戸敬太郎・村田 修 (2010) : マダイの品種改良の現状と今後の展望. 養殖, 47, 34-35.
- 川辺勝俊・中野 卓・村井 衛・隆島史夫 (1992) : 人口採苗シマアジ仔稚魚の相対成長. 水産増殖, 40, 253-259 .
- Kawai S. and S. Ikeda (1973): Studies on digestive enzymes of fishes- IV development of the digestive enzymes of carp and black sea bream after hatching. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 39, 877-881.
- 木俣 誠 (1982) : サヨリ *Hemiramphus sajori* (Temmnck et Schlegel) 卵の発生に伴う構成有機成分の変化. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 48, 1663-1671.
- Kim J.S., Lee G.D., Kwon J.H. and Yoon H.S. (1993): Identification of phenolic antioxidative components in *Crataegus pinnatifida* Bunge. *Journal of the Korean Agricultural Chemical Society*, 36, 154-157.
- Kim, K. H., Y. J. Hwang and S. C. Bai (1999): Resistance to *Vibrio alginolyticus* in juvenile rockfish

- (*Sebastes schlegeli*) fed diets containing different doses of aloe. *Aquaculture*, **180**, 13-21.
- Kim K.S., S.C. Ji, Y.S. Joo and G.S. Jeong (2003): Effect of dietary herbs mixture on growth and body composition of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* and rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Bull. Fish. Sci. Inst. Yeosu Nat'l Univ.* **12**, 40-48.
- 金城清昭・海老沢明彦 (1993): 沖縄島産シマアジの漁獲生態からみた生態的知見. 水産増殖, **41**, 105-112.
- 北島 力・荒川敏久・大和史人・藤田矢郎・今田 克・渡辺 武・米 康夫 (1980): マダイ仔魚に対する油脂酵母ワムシの餌料効果. 日本水産学会誌, **46**, 43-46.
- 北島 力 (1993): 放流魚の健苗性と育成技術. 北島 力編, 厚生社恒星閣, 東京, pp.31-40.
- 北村元仕 (1966): アルカリ性フォスファターゼ. 臨床酵素学 (赤堀四郎・沖中重雄監修), 朝倉書店, 東京, pp.278-595.
- 小磯雅彦・日野明德 (2001): 培養水の塩分がシオミズツボワムシの増殖, 培養コスト, 栄養強化に及ぼす影響. 水産増殖, **49**, 41-46.
- 小磯雅彦・日野明德 (2002): シオミズツボワムシの大量培養における増殖停滞機構に関する研究. 水産増殖, **50**, 197-204.
- 小磯雅彦・桑田 博・日野明德 (2005): 短時間の飢餓がシオミズツボワムシの生残, 発達, 生物学的最小形および卵の大きさに及ぼす影響. 水産増殖, **53**, 1-5.
- Kotzamanis, Y.P., E. Gisbert, F. J. Gatesoupe, Z. J. Infante and C. Cahu (2007): Effect of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to *Vibrio anguillarum* in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comp. Biochem. Physiol.*, **A147**, 205-214.
- 楠田理一・横山 淳・河合研児 (1986): クロダイ仔稚魚のいわゆる腹部膨満症に関する細菌学的研究. 日本水産学会誌, **52**, 1745-1751.
- Kusuda R., N. Dohata, Y. Fukuda and K. Kawai (1995): *Pseudomonas anguilliseptica* infection of striped jack. *Fish Pathology*, **30**, 121-122.
- 桑原秀明・栗林 剛・大澤克己・高波修一 (2003): 県内産サンザシの成分特性. 長野県食品工業試験場研究報告, **31**, 29-32.
- Lee E. -S. and B. -I. Seo (2003): The property of Bacillus Sp. B-222 isolated from *Massa medicata fermentata*. *The Journal of Applied Oriental Medicine*, **3**, 43-47.
- Liddle R. A. (1997): Cholecystokinin cell. *Annu. Rev. Physiol.*, **59**, 221-242.
- Liddle R. A. (2000): Regulation of cholecystokinin secretion in humans. *J. Gastroenterol.*, **35**, 181-187.
- 益田玲爾: シマアジの群れ行動の個体発生に関する研究. 東京大学学位論文, pp.99-115
- 増村和彦・安信秀樹・岡田直子・室賀清邦 (1989): ヒラメ仔魚の腸管白濁症原因菌としての *Vibrio sp.* の分離. 魚病研究, **24**, 135-141.
- Mathuoka M. (1984): Morphometry of the myotomal muscle fibers in larvae and juveniles of red sea

高岡：マダイおよびシマアジの種苗量産技術に関する研究

- bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **50**, 1811-1816.
- Matsuoka, M. (1985): Osteological development in the red sea bream, *Pagrus major*. *Japan. J. Ichthyol.*, **30**, 35-51.
- 三村 元・吉本 悟・斎藤新一・林 知夫・高橋正雄 (1984) : 粗放的育成池におけるマダイ仔稚魚の生態観測. 広島大学生物生産学部紀要, **23**, 95-119.
- 宮下 盛・瀬岡 学 (2005) : マダイ・マチダイ. 海水魚, 熊井英水編, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 45-81.
- 三宅幸子 (2014) : 腸内細菌と自己免疫. 日本臨床免疫学会誌, **37**, 398-402.
- 村井 衛・加藤憲司・中野 卓・隆島史夫 (1987) : シマアジの卵発生と仔魚の形態学的変化. 水産増殖, **34**, 217-226.
- 村井 衛・川辺勝俊・加藤憲司・隆島史夫 (1991) : シマアジ仔稚魚の鰭と鱗の発育. 水産増殖, **39**, 201-210.
- Murata O., T. Harada, S. Miyashita, K. Izumi, S. Maeda, K. Kato and H. Kumai (1996): Selective breeding for growth in red sea bream. *Fisheries Science*, **62**, 845-849.
- 室賀清邦・田谷全康 (1982) : マダイ稚魚からの *Vibrio anguillarum* の分離. 魚病研究, **16**, 211-214.
- 室賀清邦・V. Tanasomwang・桃山和夫 (1987) : トラフグ稚魚に発生した *Vibrio anguillarum* 感染症. 魚病研究, **22**, 29-30.
- Muroga K. (2001): Viral and bacterial diseases of marine fish and shellfish in Japanese hatcheries. *Aquaculture*, **202**, 23-44.
- 虫明敬一・河野一利・長谷川 泉 (1989) : シマアジの採卵について - II. 栽培技研, **18**, 15-24.
- Mushiake K., M. Arimoto, T. Furusawa, I. Furusawa, T. Nakai (1992): Detection of antibodies against striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) from brood stocks of striped jack. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 2351-2356.
- 虫明敬一・有本 操 (2000) : シマアジのウイルス性神経壊死症 (VNN) に関する防除対策. 栽培技研, **28**, 47-55.
- 中川一郎 (1982) : 妊娠期および授乳期栄養が (仔) の発育, 発達および生存日数に及ぼす影響. 栄養と食料, **35**, 323-331.
- Nakai T., N. Fujiie, K. Muroga, M. Arimoto, Y. Mizuta and S. Matsuoka (1992): *Pasteurella piscicida* infection in hatchery-reared juvenile striped jack. *Fish Pathology*, **27**, 103-108.
- 中野 広 (1988) : 稚仔魚研究のための核酸の定量法, 海洋と生物, **54**, 23-26.
- 中野 広・小野木博一・大橋誠之・丸山敬悟 (1989) : マダイの空中乾出時の生化学的変化に関する研究 粗放的生産魚と集約的生産魚との比較 - I. 栽培技研, **17**, 107-113.
- 中野 広 (1991) : 生体成分の生化学的分析. 魚類の初期発育, 田中 克編, 恒星社厚生閣,

東京, pp. 60-70.

日本水産資源保護協会 (1998) :平成9年度バイオディフェンス機能活用健康魚づくり技術開発研究成果報告書. 日本水産資源保護協会, 東京, pp. 4-12.

西村民男 (1999) :抗菌作用を示す漢方用薬, 誰でもわかる抗菌の基礎知識, 西村民男 監修), 株式会社テクノシステム, 東京, pp. 175-176.

Olsson C., G. Aldman, A. Larsson and S. Holmgren (1999): Cholecystokinin affects gastric emptying and stomach motility in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.*, **202**, 161-170.

大沢省三 (1958) :細胞核. 岩波書店, 東京, pp. 1-74.

大嶋悟士・宮本敦之・山田 武・釈迦堂誠 (2002) :カワラヨモギの抗微生物作用と化粧品抗菌剤への応用. フレグランスジャーナル, **30**, 67-71.

岡田 稔 (2002) :新訂原色牧野和漢薬草大図鑑. 北隆館, 東京, pp. 722-734.

奥津果優・吉崎由美子・高峯和則・鮫島吉廣 (2011) :漢方生薬「神麴」の製造過程における成分変化. 日本薬学会年会要旨集, **131**, 217.

落合 明 (1965) :マダイ. 魚類学 (下), 松原喜代松・落合 明著, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 704-709.

Rojas-Garcia C. R. and I. Ronnestad (2003): Assimilation of dietary free amino acids, peptides and protein in post-larval Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Marine Biology*, **142**, 801-808.

佐々木雅也・荒木克夫・辻川知之・安藤 朗・藤山佳秀 (2005) :腸管内細胞増殖と腸管フローラ. 腸管細菌学雑誌, **19**, 1-8.

里見至弘 (1969) :コイ稚魚の体成分 (核酸, 燐脂質, 全窒素, 全燐, 水分) におよぼす飽食と絶食の影響. 淡水研報, **19**, 47-72.

Seoka M., K. Takii, O. Takaoka, M. Nakamura and H. Kumai (1997): Biochemical phases in embryonic red sea bream development. *Fisheries science*, **63**, 122-127.

Seo H.-C., M. Suzuki, M. O. Kameyama, M.-J. Oh, H.-R. Kim and T. Nagata (2003): Extraction and identification of antioxidant components from *Artemisia capillaries herba*. *Plant Foods for Human Nutrition*, **58**, 1-12.

Shalaby A. M., Y. A. Khattab, A. M. Abdel Rahman (2006) Effect of Garlic (*Alliumsativum*) and chloramphenicol on growth performance, physiological parameters and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, **12**, 172-201.

示野貞夫 (1974) :魚類の炭水化物代謝に関する研究. 高知大水実研報, **2**, 1-107.

Sivaram V., M. M. Babu, G. Immanuel, S. Murugadass, T. Citarasu and M. P. Marian (2004): Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections. *Aquaculture* **237**, 9-20.



高岡：マダイおよびシマアジの種苗量産技術に関する研究

- 杉田治男 (2012) : 魚類の腸内細菌叢. 日本水産学会誌, 78, 782.
- 杉本直樹・多田敦子・山崎 壮・棚本憲一 (2007) : 天然保存料カラヨモギ抽出物の抗菌活性成分. 食品衛生学雑誌, 48, 106-111.
- 須山三千三・荻野珍吉 (1958) : ニジマス発生中の一般成分の変化. 日本水産学会誌, 23, 785-788.
- Suzuki Y., K. Tanaka, T. Amano, T. Asakura and N. Muramatsu (2004): Utilization by intestinal bacteria and digestibility arabino-oligosaccharides in vitro. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 73, 574-579.
- 竹内俊郎 (2009) : 仔稚魚の栄養. 改訂魚類の栄養と飼料, 渡邊 武編, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 204-228.
- Takeuchi T., T. Arakawa, Y. Shiina, S. Satoh, K. Imaizumi, S. Sekiya and T. Watanabe (1992): Effect of dietary  $\alpha$ - and  $\beta$ -starch growth of juvenile striped jack and yellowtail. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58, 701-705.
- 田中真二・青木秀夫・清水康弘・今西禎雄・岡本 至 (1996) : 養殖マダイのイリドウイルス感染症の発生条件と対策について. 三重水技研報, 6, 55-61.
- 田中 克 (1969) : 仔魚の消化系の構造と機能に関する研究—II. 摂餌開始時の仔魚の消化系の特徴. 魚類学雑誌, 16, 41-49.
- 田中 克 (1972) : 仔魚の消化系の構造と機能に関する研究—IV. 摂餌にともなう腸前部および中部上皮層の変化と脂肪の吸収. 魚類学雑誌, 19, 15-25.
- Tanaka T., K. Furukawa, Y. Suzuki and K. Aida (1999) : Transfer of maternal antibody from mother to egg may have no protective meaning for larvae of red sea bream *Pagrus major*, a marine teleost. *Fisheries Science*, 65, 240-243.
- 谷口順彦 (2011) : 魚介類養殖育種の現状と展望. 動物育種研究, 39, 16-25.
- 田谷全康・室賀清邦・杉山瑛之・平本義春 (1985) : 種苗生産過程の稚アユからの *Vibrio anguillarum* の検出. 水産増殖, 33, 59-66.
- 友田 努・小磯雅彦・桑田 博・陳 昭能・竹内俊郎 (2005) : 増殖ステージが異なるシオミズツボウムシのヒラメ仔魚に対する餌料価値. 日本水産学会誌, 71, 555-562.
- 友田 努・小磯雅彦・陳 昭能・竹内俊郎 (2006) : 増殖ステージが異なるワムシを摂餌したヒラメ仔魚の発育と形態異常の出現. 日本水産学会誌, 72, 725-733.
- 海野徹也・高場 稔・中川平介 (1990) : マダイ仔稚魚の脂質蓄積に関する研究. 広島大学生物生産学部紀要, 29, 117-125.
- 渡辺研一・篠崎大祐・小磯雅彦・桑田 博・吉水 守 (2005) : シオミズツボウムシ複相単性生殖卵の消毒. 日本水産学会誌, 71, 294-298.
- 渡邊 武 (2009) : 親魚の栄養. 改訂魚類の栄養と飼料, 渡邊 武編, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 229-250.

- 渡辺良郎 (1984) : 海産魚類の初期生活史-2-仔稚魚の消化吸收機構, 海洋と生物, 6, 191-197.
- Wen L., X. Guo, R. H. Liu, L. You, A. M. Abbasi, X. Fu (2015): Phenolic contents and cellular antioxidant activity of Chinese hawthorn "*Crataegus pinnatifida*". *Food Chemistry*, 186, 54-62.
- Xie, J., B. Liu, Q. Zhou, Y. Su, Y. He, L. Pan, X. Ge and P. Xu (2008): Effects of anthraquinone extract from rhubarb *Rheum officinale* Bail on the crowding stress response and growth of common carp *Cyprinus carpio* var. *Jian*. *Aquaculture*, 281, 5-11.
- Yamaoka K. H.-S. Han, and N. Taniguchi (1992): Genetic Dimorphism in *Pseudocaranx dentex* from Tosa Bay, Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58, 39-44.
- 山野井英夫・惣明睦枝・室賀清邦 (1998) : ワムシのニフルスチレン酸ナトリウム浴の効果持続時間と栄養強化剤の影響. 水産増殖, 46, 141-144.
- 矢野友紀・畑山幸宏・松山博子・中尾実樹 : 主要養殖魚の補体代替経路活性の測定法について. 日本水産学会誌, 54, 1049-1054.
- 安永統男 (1972) : スレに起因する種苗用マダいの細菌性疾病の一原因菌と薬浴の効果. 魚病研究, 7, 67-71.
- 安永統男・山元宣征 (1977) : 1977 年冬期養殖マダいのいわゆるビブリオ病から分離された菌株の性状. 魚病研究, 12, 209-214.
- 安永統男・畑井喜司雄・塚原淳一郎 (1983) : 養殖マダイから分離された *Pasteurella piscicida* について. 魚病研究, 18, 107-110.
- Yin, G., G. Jeney, T. Racz, P. Xu, X. Jun and Z. Jeney (2006): Effect of two Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Scutellaria radix*) non-specific immune response of tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 253, 39-47.
- 萬 秀憲・佐藤広隆・古元嘉昭 (1994) : センキュウ由来のフタリドの効果. 日本温泉気候物理医学会雑誌, 57, 123-128.
- 吉水 守・絵面良男 (1999) : 抗ウイルス物質産生細菌による魚類ウイルス病の制御. 日本微生物生態学会, 14, 269-275.
- Zhang Z., Q. Chang, M. Zhu M., Y. Huang Y., W. K. Ho and Z.-Y. Chen (2001): Characterization of antioxidants present in hawthorn fruits. *J. Nutr. Biochem.* 12, 144-152.
- Zheng, Z. L., J. Y. W. Tan, H. Y. Liu, X. H. Zhou, X. Xiang and K. Y. Wang (2009): Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 292, 214-218.
- Zhu R., T. Li, Y. Dong, Y. Liu, S. Li, G. Chen, Z. Zhao, Y. Jia (2013): Pectin pentasaccharide from hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bunge. Var. *major*) ameliorates disorders of cholesterol metabolism in high-fat diet fed mice. *Food Research International*, 54, 262-268.

論文目録

主論文

1. 滝井 健二・中村 元二・高岡 治・古田 晋一・熊井 英水 (1992) : ふ化後におけるマダイ稚仔魚の核酸および一般成分の変化. 水産増殖, **40**, 285-290.
2. 滝井 健二・中村 元二・高岡 治・古田 晋一・熊井 英水 (1992) : ふ化後におけるマダイ稚仔魚の各種酵素活性の変化. 水産増殖, **40**, 291-296.
3. Takii K., M. Seoka, O. Takaoka, S. Furuta, M. Nakamura and H. Kumai (1994): Chemical composition, RNA and DNA contents, and alkaline phosphatase activity with growth of striped jack larvae through juveniles. *Fisheries science*, **60**, 73-76.
4. Ji S.-C., O. Takaoka, G.-S. Jeong, K. Ishimaru, A. K. Biswas, M. Seoka and K. Takii (2007): Dietary medicinal herbs improve growth and non-specific immune response of red sea bream, *Pagrus major*. *Fisheries science*, **73**, 63-69.
5. Ji S.-C., O. Takaoka, S.-W. Lee, J.-H. Hwang, Y.-S. Kim, K. Ishimaru, M. Seoka, G.-S. Jeong and K. Takii (2009): Effect of dietary medicinal herbs on lipid metabolism and stress recovery in red sea bream, *Pagrus major*. *Fisheries science*, **75**, 665-672.
6. Takaoka O., S.-C. Ji, K. Ishimaru, S.-W. Lee, G.-S. Jeong, J. Ito, A. Biswas and K. Takii (2011): Effect of rotifer enrichment with herbal extracts on growth and resistance of red sea bream, *Pagrus major* (Temminck & Schlegel) larvae against *Vibrio anguillarum*. *Aquaculture Research*, **42**, 1824-1829.
7. 高岡 治・池 承哲・石丸克也・李 鍵雨・鄭 寛植・Amal BISWAS・滝井健二 (2012) : シマアジ稚仔魚の各種ストレス耐性に及ぼす薬用ハーブの効果. 水産増殖, **60**, 199-205.
8. Takaoka O., S.-C. Ji, K. I., S.-W. Lee, G.-S. Jeong, A. Biswas and K. Takii (2016): Dietary medicinal herbs and enzyme treated fish meal improve stress resistances and growth performance at early juvenile stage of red sea bream *Pagrus major*. *Aquaculture Research*, **47**, 390-397.

## 謝辞

本研究をまとめるにあたり終始懇切なる激励とご指導を賜りました近畿大学農学部教授滝井健二博士には心より感謝申し上げます。また、本論文のご校閲を頂き、貴重なご意見を賜った近畿大学農学部教授 江口 充博士ならびに石橋泰典博士に厚くお礼申し上げます。

近畿大学理事教授 熊井英水博士には長年にわたりご懇篤なご指導、ご鞭撻を賜りました。衷心よりお礼申し上げます。また、元近畿大学理事・水産研究所長 原田輝雄博士、元近畿大学水産研究所長 村田 修博士（現 顧問）、前近畿大学水産研究所長 宮下 盛博士ならびに元近畿大学水産研究所教授 小野征一郎博士には多くのご助言と、ご指導、叱咤激励を賜ったことを深く感謝申し上げます。水産養殖種苗センター長 升間主計博士ならびに那須敏朗事業本部長には多くのご支援とご助言を賜ったことを心より感謝申し上げます。さらに、元近畿大学水産研究所新宮実験場長補佐 中村元二氏、元水産研究所講師 瀬岡 学博士（現 スクレッティング株）には本研究を進めるのにあたり多くのご尽力とご助言を賜りましたことを深く感謝申し上げます。

近畿大学水産研究所講師 ビッシヤシュ博士には、本稿をまとめるにあたり英文の校閲をはじめ多くのご指導とご助言を賜った、韓国国立水産科学院 池 承哲博士には薬用ハーブの添加効果に関する研究を共に進めて頂き、終始貴重なご助言とご指導を賜った、また、韓国全南大学校 鄭 寛殖教授には多大なご指導と労力を賜ったここに記して深謝いたします。近畿大学水産研究所白浜実験場 石丸克也講師、同水産養殖種苗センター白浜事業場 石谷浩江成育員には実験用細菌の準備をはじめ多くのご協力とご助言を頂いた。また、本研究を実施するに際して、近畿大学水産養殖種苗センター 古田晋一氏、合田満樹氏、井土孝志氏、鳥居加奈氏、飯塚泰助氏、大川有紀氏、小出昌平氏、近畿大学水産研究所浦神実験場・水産養殖種苗センター浦神事業場の職員、卒論生各位ならびに近畿大学水産研究所・水産養殖種苗センターの教職員の皆様に多大なご協力とご援助を頂いた。これらの方々に深く感謝申し上げます。

なお、本研究の一部は、文部科学省グローバル COE プログラム「クロマグロ等の養殖科学の国際教育研究拠点」の支援を頂きました。ここに記して感謝の意を表します。