

# 博士学位論文

人工孵化マハタの形態異常低減に関する研究  
(Study on the malformation in artificially  
hatched seven-band grouper *Hyporthodus  
septemfasciatus* (Thunberg))

近畿大学大学院

農学研究科水産学専攻

辻 将治

# 博士學位論文

人工孵化マハタの形態異常低減に関する研究  
(Study on the malformation in artificially  
hatched seven-band grouper *Hyporthodus*  
*septemfasciatus* (Thunberg))

平成 27 年 3 月 23 日

近畿大学大学院

農学研究科水産学専攻

辻 将治

## 目次

序論.....	3
本論	
第Ⅰ章 形態異常の発生状況	
I -1. 緒言.....	6
I -2. 材料および方法.....	6
I -3. 結果.....	9
I -4. 考察.....	9
第Ⅱ章 飼育水温と形態異常	
I -1. 緒言.....	13
I -2. 材料および方法.....	14
I -3. 結果.....	23
I -4. 考察.....	31
第Ⅲ章 鰾の開腔と形態異常	
緒言.....	39
第 1 節 飼育水面の性状と鰾の開腔..... 42	
Ⅲ-1-1. 材料および方法.....	42
Ⅲ-1-2. 結果.....	51
Ⅲ-1-3. 考察.....	60

第 2 節 通気量と鰾の開腔.....	64
III-2-1. 材料および方法.....	64
III-2-2. 結果.....	70
III-2-3. 考察.....	79
第 3 節 鰾の開腔と形態異常.....	84
III-3-1. 材料および方法.....	84
III-3-2. 結果.....	85
III-3-3. 考察.....	90
第IV章 給餌量および流速と稚魚の形態異常	
IV-1. 緒言.....	94
IV-2. 材料および方法.....	95
IV-3. 結果.....	114
IV-4. 考察.....	118
和文要旨.....	125
英文要旨 (Summary) .....	130
文献.....	138
謝辞.....	155

## 序 論

近年、ハタ科魚類は、天然資源の希少性および高い市場価値、さらに早い成長等により、熱帯から亜熱帯域における新しい養殖対象魚として注目されている (Fukuhara 1989 ; Tucker 1999 ; Pierre et al. 2008)。日本においても、幾つかの研究機関が、ハタ科魚類の一種であるマハタ *Hyporthodus septemfasciatus* (Craig and Hastings 2007) 養殖に関する技術を開発するため、親魚の成熟、産卵および人工種苗生産技術に関する様々な研究 (北島ら 1991 ; 土橋ら 2002 ; 塩谷ら 2003 ; 土橋ら 2003a, 2003b ; Shein et al. 2004 ; Shiotani et al. 2005 ; 田中ら 2005 ; Sakakura et al. 2006 ; Nagano et al. 2007 ; Sakakura et al. 2007a, 2007b ; 土橋ら 2007 ; Ruttanapornvareesakul et al. 2007 ; 照屋ら 2008 ; Kline et al. 2008 ; 平田ら 2009a ; Sabate et al. 2009 ; Koh et al. 2010 ; Ruttanapornvareesakul et al. 2010 ; Wu et al. 2011 ; Wullur et al. 2011 ; Koh et al. 2013) を実施している。その結果、一事業所で10万尾単位のマハタの種苗生産が可能なまでに技術は進歩し (Nagano et al. 2007 ; 照屋 2009, 2010), 三重県水産研究所尾鷲水産研究室および (公財) 三重県水産振興事業団尾鷲栽培漁業センターも、2001年、2004年、2006年および2008~2014年にかけて、年間約10万尾から30万尾の種苗生産に成功している。現在、三重県では、初期飼育期 (受精卵孵化から全長約3 cmまで) の終了後、引き続き陸上水槽で稚魚の中間育成を行い、ウイルス性神経壊死症 (VNN) 対策としてワクチン (オーシャンテクトVNN, 日生研, 東京) を接種後、全長約13 cmで海面生簀に収容して継続飼育を行い、受精卵から約6ヵ月後に全長約15 cmの人工種苗を養殖業者に出荷している。しかし、ハタ科魚類の人工種苗では外部形態や骨の異常が発生することが知られ (Song et al. 2005 ; Russo et al. 2011), マハタの人工種苗においても、上下顎異常および脊椎骨前彎症 (Nagano et al. 2007) が確認されるほか、脊椎骨後彎症、背鰭陥没、脊椎骨の癒合・椎体欠損、

骨梁異常，鰓蓋欠損などの形態異常が発生して種苗の価値や生産効率を低下させる大きな問題となり，その防除策の開発が急務になっている。

人工種苗での形態異常発生については，これまでに多くの魚種で，様々な要因が報告されている（Divanach et al. 1996 ; Gavaia et al. 2002 ; Cahu et al. 2003 ; Koumoundouros 2010 ; Cobcroft and Battaglione 2013）。しかし，マハタでは，Uji et al. (2013, 2014) が胚の体節形成期に発生する体節の分節異常が脊椎骨の異常（脊椎骨椎体の欠損）を引き起こす可能性に言及し，体節分節異常の原因として体節形成期の低酸素濃度を指摘しているほか，Nagano et al. (2007) が，骨変形（特に上下顎の変形）の発生に飼育水温が関与する可能性を示したのみであり，人工種苗に形態異常が出現する原因については不明な点が多い。三重県は，先述のとおり年間約10万尾以上の種苗生産が可能な生産技術を保有するが，受精卵を飼育水槽に収容してから約6ヵ月後の全長約13～15 cmに成長する間に，高率で形態異常が出現することがあり，形態異常防除の観点からは，正常な発育および成長に必要な飼育環境が長期に渡り継続されていないと考えられる。

マダイ *Pagrus major* では，仔魚期における鰓の開腔不全が脊椎骨屈曲の原因とされ（北島ら 1981 ; Kitajima et al. 1994），多くの魚種で鰓の開腔不全の原因となる飼育水面の油膜と鰓の開腔の関係（Chatain and Ounais-Guschemann 1990 ; Battaglione et al. 1994 ; Trotter et al. 2005 ; 川辺・木村 2008 ; 今井ら 2001 ; Kurata et al. 2012 ; Summerfelt 2013 ; Kurata et al. 2014）が調査されているが，マハタではその関係性が検討されていない。また，他魚種では，稚魚期の不適切な飼育条件で前彎症が増加することが知られる（Divanach et al. 1997 ; Kihara et al. 2002 ; Sfakianakis et al. 2006 ; Helland et al. 2009）。

本研究では，現在のマハタ人工種苗生産で形態異常が出現する要因が飼育環境にあると仮定し，その究明および防除策の確立を目的とした。第 I 章では，三重県における形態異常の出現傾向（種類，出現率）を調査し，最も生産効率

を低下させる形態異常のタイプを明らかにして防除策を構築する対象を特定した。第Ⅱ章では、Nagano et al. (2007) が形態異常出現への関与を指摘している種苗生産期（仔稚魚期）の飼育水温について、仔稚魚の成長、生残も考慮したうえで、形態異常防除に最適な飼育水温を求めた。第Ⅲ章では、仔魚期における鰾の開腔不全とマハタにおいて最も高頻度で発生する脊椎骨屈曲の発生との関係および鰾の開腔促進条件および開腔阻害条件について考察した。第Ⅳ章では、稚魚期の給餌量と飼育水の流速が人工種苗の形態異常（特に脊椎骨の屈曲）の出現に及ぼす影響を飼育試験によって明らかにしようとした。

## 第 I 章 形態異常の発生状況

### I -1. 緒言

マハタ *Hyporthodus septemfasciatus* の人工種苗生産では様々な形態異常が出現する。そこで本章では、三重県における形態異常の発生傾向（種類および出現率）について調査し、マハタ人工種苗において防除策を開発する形態異常の種類の特定を行った。

### I -2. 材料および方法

2004～2007年に三重県水産研究所および2008～2010年に尾鷲栽培漁業センターが生産した人工種苗の形態異常について調査した。2004～2007年は、全長約10 cmまで陸上水槽で飼育した後、海面生簀で継続飼育した全長約12～15 cmの人工種苗を、2008～2010年は、全長約12～13 cmまで陸上水槽で飼育した人工種苗を使用した（Table I -1）。

標本は、軟 X 線装置（OM-80CTRS, オーミック, 東京）を用いて撮影し、尾鰭椎前第2および尾部棒状骨を除く脊柱の骨構造を観察した（第1腹椎から尾鰭椎前第3まで）。形態異常は、(a) : 脊椎骨屈曲, (b) : 椎体の癒合または欠損, (c) : 椎体変形, (d) : 背鰭陥没の4区分とした（Fig. I -1）。脊椎骨の前彎症または後彎症は区別せず、脊椎骨屈曲とした。

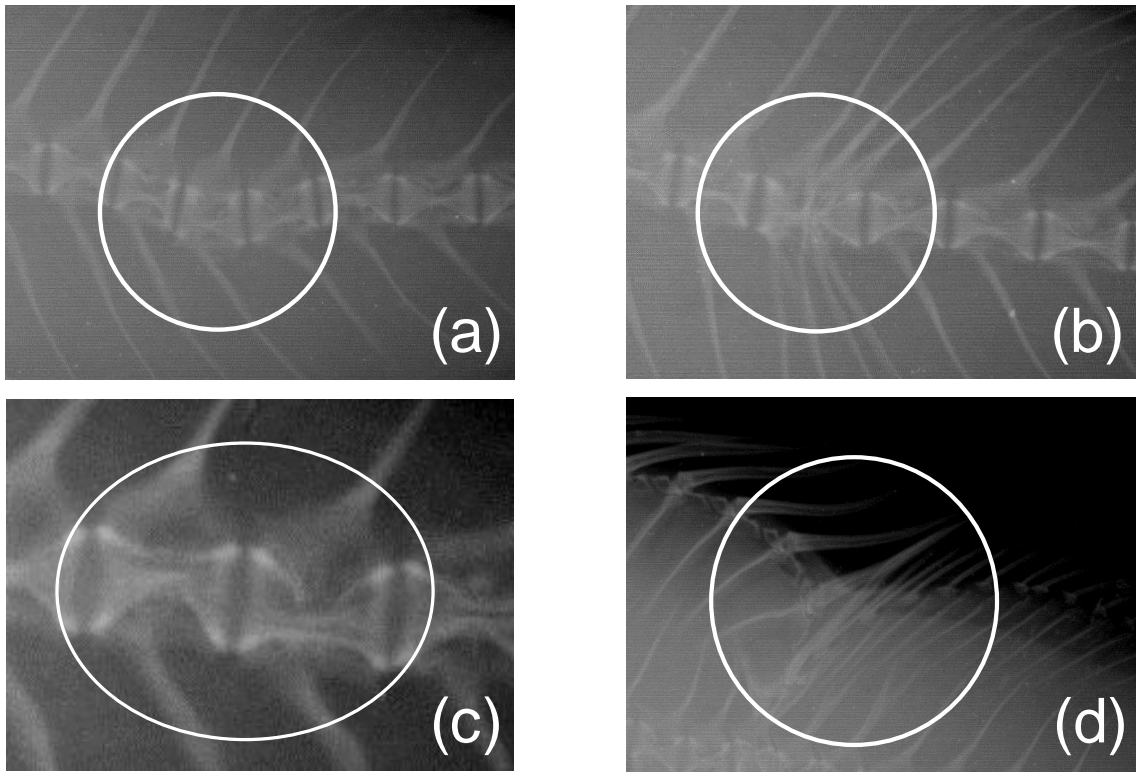
椎体の癒合は、複数の椎体が癒合し、複数の神経棘および血管棘が存在する場合を含めた（松里 1986）。一方、Hattori et al. (2003) は、マダイの外観上癒合した椎体の内部に不連続の表面がなく、靭帯が存在しないことを観察してお



**Table I -1.** The seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* juveniles were used to assess for skeletal malformations (2004-2010)

	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
<i>n</i>	43	111	356	213	200	200	265
Total length (mm)	138.0±8.5	145.0±6.2	124.0±22.0	139.8±10.9	131.5±11.4	117.9±9.3	131.9±14.3

Total length values are represented as the mean ± standard deviation.



**Fig. I -1.** Types of vertebral malformation morphology in the seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus*. The white circles indicate the abnormalities. (a) Spinal curvature, (b) fusion or defect of the centra, (c) deformation of centra, (d) saddleback syndrome.

り、癒合ではなく椎体欠損であると考察した。しかし、この現象は、骨組織学によってのみ観察が可能であり、本研究では考慮しなかった。こうしたことから、本研究では、癒合と椎体欠損の両者を一つのパターンとした。椎体変形は、脊椎骨の歪み、窪み、圧縮と診断した。背鰭陥没は、背鰭の一部が腹側へ陥没しているものとした。

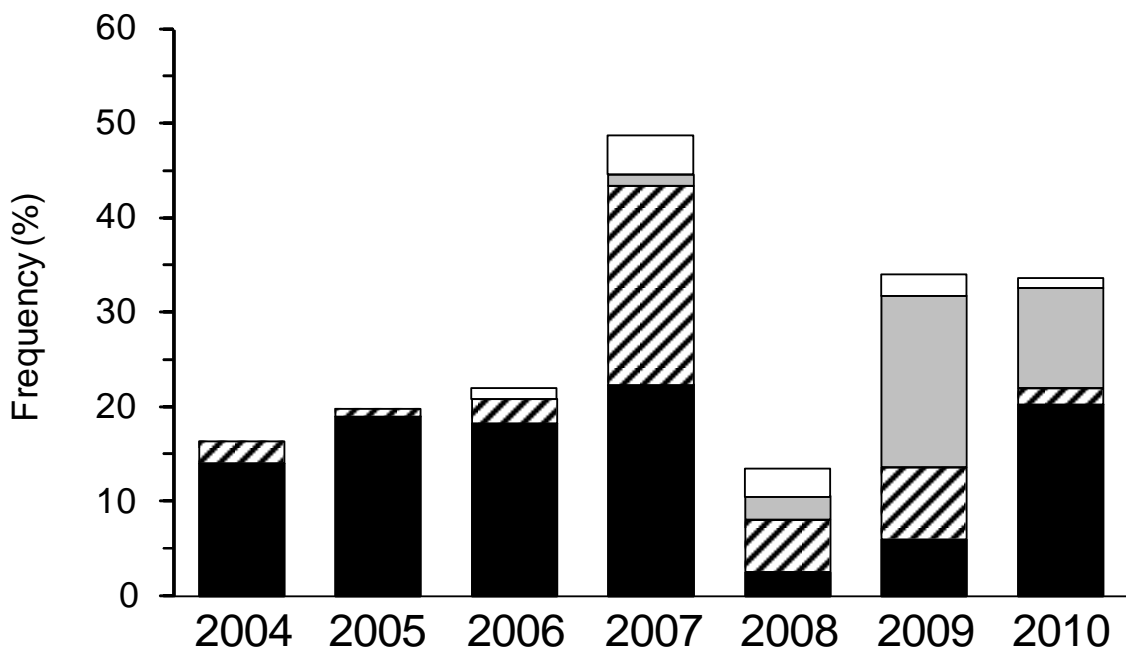
### I-3. 結果

調査期間における脊椎骨屈曲の発生率は2.5～22.2%の範囲で、屈曲は2008・2009年を除いて高率に発生した (Fig. I-2)。椎体の癒合または欠損は0.9～21.1%の範囲で出現し、2008年が最も高かった。椎体変形は、0～18.2%の範囲で出現し、2009年が最も高率で発生した。背鰭陥没は発生が確認されない年もあり、発生率は最高で4.1% (2007年) であった。

### I-4. 考察

三重県が生産するマハタの人工種苗では、脊椎骨屈曲が最も高頻度に発生したことから、生産効率の向上のため脊椎骨屈曲を防止することが最も効果的であることが分かった。それ以外の形態異常は、椎体の癒合または欠損および椎体の変形であったが、2007年を除いてその発生率は0.9～7.6%と低かった。一方、背鰭陥没は、マハタの近縁種であるクエ *Epinephelus bruneus* で多発することが知られるが (中田ら 2011)、本研究で確認された背鰭陥没の出現率は低い。したがって現時点におけるマハタの人工種苗生産では、脊椎骨屈曲以外の形態異常は大きな問題にならないレベルであると考えられる。

脊椎骨あるいは脊索の屈曲が発生する原因として、不適切なふ化水温や、あ



**Fig. I -2.** Incidence of abnormalities in cultured juveniles in Mie Prefecture from 2004 to 2010. Black indicates spinal curvature. Diagonal pattern indicates fusion or defect of the centra. Grey indicates deformation of centra. White indicates saddleback syndrome.

るいは種苗生産期（仔稚魚期）の飼育水温管理（Sfakianakis et al. 2006 ; Santerre and May 1977 ; Wiegand et al. 1989 ; 萱野・尾田 1991 ; Polo et al. 1991 ; Graham and Hop 1995 ; Wang and Tsai 2000 ; 川辺 2005 ; Georgakopoulou et al. 2010）が報告されているが、飼育水温と関係ないとする報告もあり（Ottesen and Bolla 1998 ; Abdel et al. 2004 ; Cook et al. 2005 ; Okamura et al. 2007 ; Kurokawa et al. 2008），水温との関連性は魚種によって異なると考えられる。しかし，Nagano et al. (2007) は，マハタの上下顎の変形が飼育水温と関連する可能性を指摘したことから，本研究では第 2 章において，仔稚魚期の飼育水温が脊椎骨屈曲の発生に及ぼす影響を検討した。

さらに，マダイでは，仔魚期初期（全長 3.5～4.5 mm）における鰾の開腔不全と前彎症との関係が知られている（北島ら 1981 ; Kitajima et al. 1994）。仔魚期初期に鰾の中に空気が充たされる，いわゆる一次開腔が起こらなければ，前彎症が増加することは良く知られた事実である（北島ら 1981 ; Kitajima et al. 1994）。しかし，マハタでは仔魚期初期の鰾の開腔と脊椎骨屈曲の関係については不明である。マハタ仔魚期における開腔は，ふ化後 15 日（15 日令）で確認された事例があるが（土橋ら 2003a），鰾の一次開腔条件は全く不明である。また，鰾が未開腔のマダイ稚魚は，強制的遊泳状態で前彎症出現率が上昇し（Chatain 1994），さらに，ヨーロッパシーバス *Dicentrarchus labrax* L.やマダイ，タイセイヨウダラ *Gadus morhua* では，鰾の開腔が確認された個体でも，稚魚期の飼育環境（飼育水の流動）が形態異常の出現要因になることも報告されている（Divanach et al. 1997 ; Kihara et al. 2002 ; Sfakianakis et al. 2006 ; Helland et al. 2009）。マハタにおいても，仔魚期の飼育水温，鰾の開腔，稚魚期の飼育環境が脊椎骨屈曲の発生に影響を及ぼす可能性は高く，本研究では第 3 および 4 章でこれらの関係性を検討した。

脊椎骨屈曲以外に発生する形態異常として，椎体の癒合または欠損および椎

体の変形が2007年には脊椎骨屈曲に次いで多く発生した。また、幾つかの魚種では、いわゆる短軀症の原因となる椎体の癒合または欠損が発生し、人工種苗の生産効率を低下させることから問題となっている（服部 2004 ; Hattori et al. 2004 ; 澤山・高木 2012）。マダイなどでは、体節形成期の酸素不足が椎体の欠損の原因の一つであり（服部 2004 ; Hattori et al. 2004 ; Sawada et al. 2006）、近親交配が椎体の癒合に関係（澤山・高木 2012）することから、環境要因と遺伝的要因が相互に異常形質を発現する可能性（Lijalad and Powell 2009 ; Bardon et al. 2009）や、餌料の栄養強化剤に含まれる過剰なビタミン A が椎体の癒合の原因であることも報告されている（Dedi et al. 1995 ; Fernandez et al. 2008）。近年、Uji et al. (2013, 2014) は、人工飼育下のマハタ胚の体節形成期に発生する体節分節異常が、脊椎骨の異常（脊椎骨椎体の欠損）を引き起こす可能性に言及し、体節分節異常の原因として、体節形成期の低酸素濃度を指摘した。本研究においても、2008年に椎体の癒合または欠損が最も高率に発生したことから、人工飼育下におけるマハタ受精卵の管理方法、遺伝的特性あるいは餌料組成には注意する必要がある、今後の研究課題と考えられる。

## 第Ⅱ章 飼育水温と形態異常

### Ⅱ-1. 緒言

第Ⅰ章では、マハタの人工種苗に発生する形態異常は脊椎骨屈曲が最も多く、生産効率を向上させるには、脊椎骨屈曲の防除策を開発することが効果的であることが示された。本研究では、脊椎骨屈曲の原因としては、仔魚期の飼育水温、鰾の開腔不全、稚魚期（中間育成）における餌料や飼育環境が予想されるが、本章では、まず仔魚期の飼育水温が、脊椎骨屈曲を含む形態異常の発生に及ぼす影響について検討した。

マハタ仔魚期における飼育水温と形態異常の関係については、Nagano et al. (2007) が、骨変形（特に上下顎の変形）の発生に飼育水温が関与する可能性を指摘しているが、水温が形態異常の発生に及ぼす詳細な研究は実施されていない。ふ化に至るまでの受精卵の培養水温や仔稚魚期の飼育水温は、数魚種で仔稚魚の形態異常発生との関連が指摘されている（Sfakianakis et al. 2006 ; Santerre and May 1977 ; Wiegand et al. 1989 ; 萱野・尾田 1991 ; Polo et al. 1991 ; Graham and Hop 1995 ; Wang and Tsai 2000 ; 川辺 2005 ; Georgakopoulou et al. 2010 ; Ottesen and Bolla 1998 ; Abdel et al. 2004 ; Cook et al. 2005 ; Okamura et al. 2007 ; Kurokawa et al. 2008 ; Komada 1982 ; Bolla and Holmefjord 1988 ; 睦谷 1988 ; Wiegand et al. 1988 ; Pittman et al. 1989 ; Pittman et al. 1990 ; 有瀧ら 1996 ; Lein et al. 1997 ; Mihelakakis and Yoshimatsu 1998 ; Chang et al. 2004 ; 有瀧ら 2004 ; Aritaki and Seikai 2004 ; Sfakianakis et al. 2004) 重要な環境因子のひとつである。そこで、仔稚魚期の飼育水温が骨異常に及ぼす影響について検討した。

なお、受精卵のふ化時点あるいは仔稚魚期の飼育水温は、仔稚魚のふ化率、

成長、発育および生残に大きく影響し（土橋ら 2003a ; Sfakianakis et al. 2006 ; Santerre and May 1977 ; Wiegand et al. 1989 ; 萱野・尾田 1991 ; Polo et al. 1991 ; Graham and Hop 1995 ; Wang and Tsai 2000 ; 川辺 2005 ; Georgakopoulou et al. 2010 ; Ottesen and Bolla 1998 ; Cook et al. 2005 ; Okamura et al. 2007 ; Kurokawa et al. 2008 ; Bolla and Holmefjord 1988 ; 睦谷 1988 ; Pittman et al. 1989 ; 有瀧ら 1996 ; Lein et al. 1997 ; Mihelakakis and Yoshimatsu 1998 ; Chang et al. 2004 ; 有瀧ら 2004 ; Aritaki and Seikai 2004 ; Sfakianakis et al. 2004 ; Seikai et al. 1986 ; Trotter et al. 2003a ; Sugama et al. 2004 ; Dou et al. 2005 ; Fielder et al. 2005 ; 照屋・與世田 2006 ; Yosedo et al. 2006a ; 與世田ら 2006 ; 平田ら 2009b), さらに, 10日令のマハタ仔魚では自然水温 (19.5~20.5°C) より 25.0°C で生残率が高くなる (土橋ら 2003a) ことなどが報告される。しかし, マハタでは仔稚魚の成長や形態異常の出現に対する飼育水温の影響について詳細に検討されていない。

本章では, 仔稚魚期の飼育水温が, 人工飼育下のマハタ仔稚魚の成長, 生残に及ぼす影響および稚魚の形態異常に及ぼす影響について調査し, 成長, 生残も考慮したうえで, 形態異常防除に最適な飼育水温について考察した。

## II-2. 材料および方法

試験は, 2007年秋季(試験1)および2008年春季(試験2)に三重県水産研究所で行った。

### a) 親魚と人工授精

**試験1** 1992年に天然海域で採取したマハタ稚魚を室内水槽(50kl)で飼育し, 親魚とした(15歳, 体重9.4~16.0kg)。親魚には, 土橋ら(2007)の方法に従い, 水温と光周期操作による成熟促進を施した。



2007年10月18日に、親魚に胎盤性性腺刺激ホルモン（ゴナトロピン 5000, あすか製薬, 東京）（以下 hCG）を、魚体重 1 kg あたり 500 IU で筋肉内に投与した。ホルモン投与 42～54 時間後の 10 月 20 日に、2 尾の雌から搾出した卵と 2 尾の雄から採取した精液を人工授精した。受精 24～26 時間後に、VNN の発症防止を目的として、土橋ら（2002）の方法でオキシダント海水による受精卵消毒（オキシダント濃度：0.5ppm, 60 秒暴露）を行い、浮上している受精卵を等分して試験に使用した。

**試験 2** 天然海域で捕獲した親魚と 1999 年に人工孵化して飼育した親魚（体重 3.8～18.8 kg）を室内水槽（75 kl）で飼育した。2008 年 5 月 19 日に hCG を親魚の筋肉内に投与した。ホルモン投与 42～54 時間後の 5 月 21 日に、1 尾の雌から搾出した卵を 5 尾の雄から採取した精液で人工授精し、試験 1 と同様に受精卵消毒後の浮上卵を試験に使用した。

#### b) 仔稚魚の飼育方法

最も適した水温帯を明らかにするために試験 1 では、4 段階の異なる水温条件を設定した。試験 1 の結果に基づき、試験 2 では試験 1 と同じ 25℃を対照区とし、より狭い水温帯の 25℃, 26℃および 28℃の影響を調査した (Table II-1)。水温, 塩分, 溶存酸素濃度および飼育水表面の照度は毎日 1 回あるいは 2 回測定した。試験 1 および 2 に関する飼育環境条件を Table II-1 に示した。

**試験 1** 500-l ポリエチレン水槽 (直径 100 cm, 水深 65 cm) を用いて 23℃, 25℃, 27℃および 29℃の飼育水温を設け、23℃および 25℃の飼育試験は 4 反復で、27℃および 29℃では 3 反復で実施した。2007 年 10 月 21 日に受精卵 25,952 粒を各試験水槽に収容し、0 日令は受精卵を各実験水槽に収容した日と定義した。試

験は、仔稚魚が全長約 30~40 mm に到達した 23°C区で 81 日令、25°C区で 76 日令、27°C区で 69 日令および 29°C区で 67 日令まで継続した。飼育水温はウォーターバス方式で調整した。受精卵収容時の水温は 21.9~22.2°Cであり、その後、23°C区では 4 日令までに、25°C区では 6 日令までに、27°C区では 8 日令および 29°C区では 10 日令までに緩やかに上昇させた。設定水温は飼試験終了 4 日前まで維持し、その後は自然水温まで徐々に低下させた。急激な飼育水温の変動を防止するため、23°C区では 64 日令、25°C区では 52 日令、27°C区では 40 日令および 29°C区では 36 日令まで飼育水の交換を行わなかった。その後、海水を水槽容量の 12%/日の換水率で供給し、換水率を試験終了までに 101%/日まで徐々に増加させた。*Nannochloropsis* sp.を一日に 2 回、233,000 個体/ml の密度で飼育水に添加した。“貝化石”（フィッシュグリーン、グリーン・カルチャア、富山）を一日に 2 回、0.01 g/l の濃度で水質安定のため添加した。0 日令から 10 日令まで、水面張力と関連したハタ科仔魚の浮上死（Yamaoka et al. 2000）を防止するため、熱湯と混合した植物油（MT 被膜オイル、マリンテック、愛知）（土橋ら 2003a；田中ら 2005；Sakakura et al. 2006；Nagano et al. 2007；Sakakura et al. 2007a；Yamaoka et al. 2000）を一日に 2 回、0.1 ml/m<sup>2</sup> で各飼育水槽に添加した。

飼育水への通気のため、2 個（通気および酸素）の半球状のエアストーン（25 φ、田中三次郎商店、福岡）を各水槽の底部中央に設置した。蛍光灯による照明は、10 日令から試験終了までの 5:00 から 19:00 まで行った（14 時間明期/10 時間暗期）。マハタ仔魚の初期生活期の生残に効果がある連続照明（24 時間明期/0 時間暗期（土橋ら 2003a；照屋ら 2008）は、2 日令から 10 日令まで適用した。

仔稚魚には、栄養強化した S 型ワムシ *Brachionus plicatilis* sp.混合種、アルテミア幼生 *Artemia salina* nauplii（ブラインシュリンプ卵、マリンテック、愛知）および市販の人工飼料（ラブラァバ NO.2 および NO.3、林兼産業、山口）を仔

**Table II -1.** Rearing conditions of the seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* larvae and juveniles reared at six different temperatures ranging from 23 to 29°C

Target temperature (°C)	Water temperature (°C)	Salinity (ppt)	DO (mg/l)	Light intensity (lx)
Experiment 1				
23	23.13 ± 0.03	33.78 ± 0.51	7.39 ± 0.75	1,198 ± 4
25	25.04 ± 0.06	33.86 ± 0.32	6.74 ± 0.17	1,190 ± 20
27	26.98 ± 0.02	34.00 ± 0.11	6.79 ± 0.16	1,262 ± 13
29	28.99 ± 0.03	34.42 ± 0.09	6.21 ± 0.55	1,248 ± 11
Experiment 2				
25	25.08 ± 0.02	33.80 ± 0.06	6.65 ± 0.49	1,178 ± 28
26	26.06 ± 0.04	33.97 ± 0.11	6.05 ± 0.14	1,300 ± 11
28	28.00 ± 0.07	34.89 ± 0.19	6.04 ± 0.18	1,219 ± 30

All values are represented as the mean ± standard deviation in each experimental group. The mean values were calculated using the values measured from at the target temperature which was maintained up to 1–4 days before the end of the experiment. Means followed by different superscript letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

稚魚の成長に応じて給餌した。生物餌料の栄養強化法として、ワムシは高度不飽和脂肪酸 (HUFA) を高めた淡水クロレラ *Clorella vulgaris* (スーパー生クロレラ V-12, クロレラ工業, 東京) で培養し, 孵化したアルテミア幼生は, 市販の HUFA 強化剤 (DC DHA SELCO, Inve (Thailand), Phichit) で培養した。S 型ワムシは 2 日令から 58 日令に 15 cells/ml の密度になるよう毎日 2 回給餌した。アルテミア幼生の給餌は, 仔魚が平均全長 6 mm (23°C で 36 あるいは 40 日令, 25°C で 31 あるいは 36 日令, 27°C で 28 日令, 29°C で 28 あるいは 31 日令) に到達してから開始し, 試験終了時まで継続した。市販の人工飼料は, 23°C 飼育で 70 日令から, 25°C で 64 日令から, 27°C で 54 日令から, 29°C で 51 日令から試験終了時まで給餌した。

**試験 2** 試験 2 の飼育方法は以下の相違点を除いて試験 1 と基本的に同じである。飼育水温は 25°C, 26°C および 28°C とし, 4 反復で実施した。2008 年 5 月 22 日に受精卵 11,648 粒を各試験水槽に収容し, 試験は 25°C 区で 68 日令, 26°C および 28°C 区で 66 日令まで継続した。受精卵収容時の水温は 19.8~20.0°C で, その後, 6 日令で 25°C, 8 日令で 26°C, 10 日令で 28°C に到達するように水温を徐々に上昇させた。飼育水温は試験終了 4 日前まで維持し, その後は自然水温まで徐々に低下させた。

飼育海水は, 25°C で 39 日令まで, 26°C および 28°C では 37 日令まで交換しなかった。その後, 海水を水槽容量の 12%/日の換水率で供給し, 換水率を試験終了までに, 飼育水中の溶存酸素濃度の減少により, 試験 1 より高い 317%/日まで徐々に増加させた。連続照明 (24 時間明期/0 時間暗期) は, 試験 1 より開始時の水温が 2°C 低く, 仔魚発育の遅延により, 3 日令から 10 日令まで適用した。アルテミア幼生の給餌は 25°C で 27 あるいは 31 日令, 26°C で 27 日令, 28°C で 31 日令から開始し, 試験終了時まで継続した。市販の人工飼料は, 25°C で 44

日令から、26°Cおよび28°Cで42日令から試験終了まで給餌した。ワムシは、高度不飽和脂肪酸（HUFA）を高めた淡水クロレラおよび市販のHUFA強化剤（バイオクロミス パウダー、クロレラ工業、東京）で培養した。孵化したアルテミア幼生は、市販のHUFA強化剤（バイオクロミス パウダー、クロレラ工業、東京、DC DHA SELCO あるいは A1 DHA SELCO, Inve (Thailand), Phichit）で培養した。

### c) 飼育環境

期間中の塩分および溶存酸素濃度は望ましいレベルに維持され、水面上の照度は1,200~1,300 lxに維持されていた（Table II-1）。

### d) 標本採集

10日令の夜間に仔魚数を容積法で推定した。仔魚の採集は採水器（ポリ塩化ビニル製：長さ111 cm×直径4.8 cm）を用いて各水槽の2または3ヶ所で行い、仔魚数を計数した。また、試験終了時に全ての生残魚を計数した。仔稚魚の全長は、試験1および2の10、15、20、25、30、35および40日令に測定し、その後、試験1の45日令（23°C区のみ）、試験2の51日令および両試験の終了時に測定した。各試験区の標本採集は、10~51日令に1水槽（28°C区の35、40、51日令のみ）から4水槽で5~27尾ずつ、試験終了時に1水槽（28°C区のみ）あるいは2水槽から39~60尾ずつ行い、0.1~0.3 ml/lのエチレングリコールモノフェニルエーテル（和光純薬工業、大阪）で2分間の麻酔後に全長を測定した。

試験終了時では、全長の測定後、Koumoundouros et al. (2000)の方法に従い、標本を直ちに-21°Cから-20°Cで冷凍保存し、後日軟X線調査で骨異常および鰾の開腔率を評価した。なお、鰾の容量は、麻酔標本ではガスの放出で減少す

る可能性があり (Woolley and Qin 2010), 加えて, 麻酔後の標本は, 凍結時に鰾のサイズが減少する可能性がある (Koumoundouros et al. 2000)。しかし, これは, 本研究で評価する鰾の開腔頻度の結果と関係なく, たとえサイズの減少があったとしても, 鰾の X 線撮影映像が完全に消失しないことから, 問題とはならなかった。

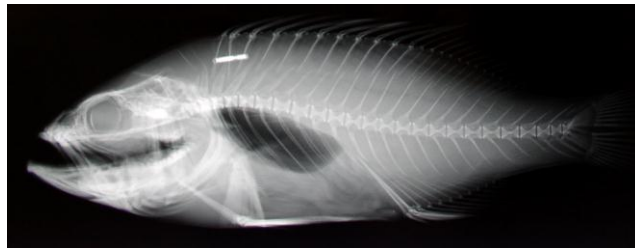
#### e) 形態観察

試験終了時の標本は, 軟 X 線装置 (OM-80CTRS, オーミック, 東京) を用いて撮影し, 尾鰭椎前第 2 および尾部棒状骨を除く脊柱の骨構造を観察した (第 1 腹椎から尾鰭椎前第 3 まで)。16 尾の天然標本 (全長約 25 cm) を形態正常魚の基準とした (Fig. II-1)。標本の形態異常は, (a) 脊椎骨屈曲, (b) 癒合または椎体欠損, (c) 椎体の変形, (d) 神経棘の 2 叉, (e) 血管棘の 2 叉あるいは 3 叉, (f) 背鰭陥没の 6 区分とした (Fig. II-2)。神経棘および血管棘の 2 叉あるいは 3 叉は, 椎体から伸長した棘の分枝 (Matsuoka 1987 ; 澤山・高木 2011) とした。なお, 脊椎骨屈曲, 椎体の癒合または欠損, 椎体の変形および背鰭陥没は, 第 1 章に記した定義で診断した。

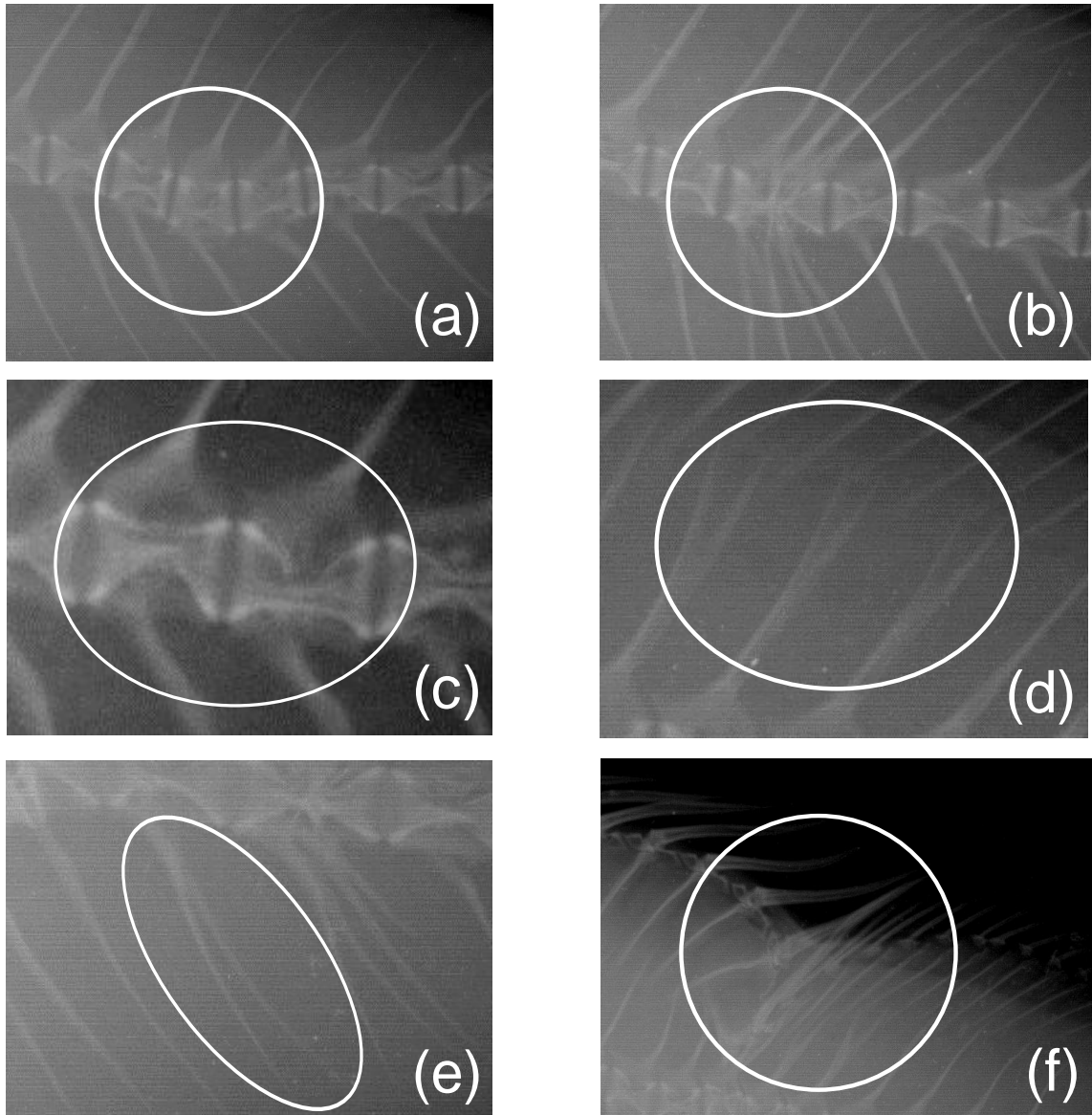
骨構造と同様に機能的な鰾の存在の有無の観察を行うため, 軟 X 線撮影を行い, 開腔した鰾を持つ標本数を求めた。

#### f) 統計分析

全長の正規性 (Shapiro-Wilk test) および等分散性 (Bartlett test) が確認された場合は, Tukey-kramer test で有意差を検定し, 確認されなかった場合は検定しなかった (Table II-2)。生残率および形態異常率は, 最少二乗法を用いた回帰分析で傾向を評価した (Figs. II-3, II-4, II-5)。試験 1 および 2 において, 飼育水温に関係なく鰾が開腔した標本の出現差を確認するため Student's *t* test を



**Fig. II -1.** Soft X-ray image of a wild seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* (23.8 cm Total length). Wild seven-band groupers were collected in Gokasyo Bay (Mie Prefecture) in March 2009 and reared in tanks where they were fed commercial artificial artificial diets, The rearing experiment was continued until they reached a total length of  $24.8 \pm 2.2$  cm.



**Fig. II-2.** Types of malformation morphology in the seven-band grouper. The white circles indicate the abnormalities. (a) spinal curvature, (b) fusion or defect of the centra, (c) deformation of centra, (d) bifurcated neural spine, (e) bifurcated or trifurcated hemal spine, and (f) saddleback syndrome.



使用した (Fig. II-6)。試験 2 において、飼育水温の影響を考慮せずに、全ての形態異常と様々な形態異常に関して、鰾が開腔した標本と未開腔の標本の出現率を比較した (Fig. II-7)。また、試験 2 では、飼育水温の影響を考慮せずに、正常魚と異常魚で鰾の開腔率を比較した (Fig. II-8)。これらの統計的有意性はカイ二乗検定で求めた。生残率、形態異常率および鰾の開腔率は、データの正規性 (Shapiro-Wilk test) が確認されず、データの範囲が 20%未満、あるいは 80%より大きい場合は、角変換後に統計処理した。カイ二乗検定を除いた全ての統計分析は、JMP7 統計ソフトウェア (SAS Institute Japan, 東京) を用いて実施し、 $P < 0.05$  の場合を差が有意とした。

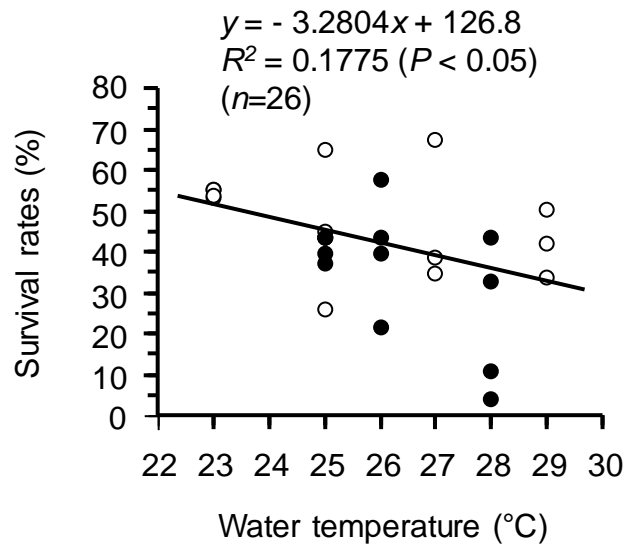
## II-2. 結果

### a) 生残と成長

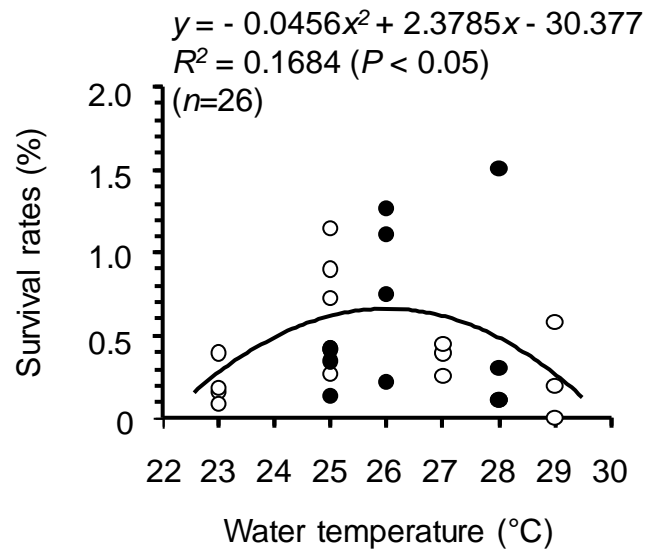
試験 1 で用いた受精卵の孵化率は 96.9%および 94.5%、試験 2 で用いた受精卵の孵化率は 89.2%であった。

試験 1 および 2 の 10 日令の生残率 (Fig. II-3) は、23°C区で  $54.3 \pm 1.0\%$ 、25°C区で  $44.8 \pm 16.0\%$  および  $40.8 \pm 3.0\%$ 、26°C区で  $40.6 \pm 14.8\%$ 、27°C区で  $47.0 \pm 17.9\%$ 、28°C区で  $22.7 \pm 18.3\%$  および 29°C区で  $41.8 \pm 8.2\%$  を示し、高水温で有意に低下した ( $P < 0.05$ )。試験終了時の生残率 (Fig. II-4) は、23°C区で  $0.2 \pm 0.1\%$ 、25°C区で  $0.8 \pm 0.4\%$  および  $0.3 \pm 0.1\%$ 、26°C区で  $0.8 \pm 0.5\%$ 、27°C区で  $0.4 \pm 0.1\%$ 、28°C区で  $0.5 \pm 0.7\%$  および 29°C区で  $0.3 \pm 0.3\%$  を示し、25 および 26°Cで有意に高く、23°Cおよび 27~29°Cで低下した ( $P < 0.05$ )。

全長の統計分析を実施することが可能であったのは 10, 15, 20, 40, 51 日令および試験終了時 (68~81 日令) であり、全長は 10 および 51 日令および試験終了時に試験区間で有意差はみられなかった (Table II-2)。しかし、15, 20 およ



**Fig. II-3.** Relationship between rearing temperature and survival rate at 10 days after hatching. Open circles: survival rates in Experiment 1; closed circles: survival rates in Experiment 2.



**Fig. II -4.** Relationship between rearing temperature and survival rate at the end of the experiments. Open circles: Survival rates in Experiment 1; closed circles survival rates in Experiment 2.

**Table 2-2.** Total length (mm) of the seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* larvae and juveniles reared at six different temperatures from 23 to 29°C

Target temperature (°C)	Days after hatching									
	10	15	20	25	30	35	40	45	51	66-81
Experiment 1										
23	3.05 ± 0.16 <sup>a</sup>	3.58 ± 0.12 <sup>c</sup>	4.32 ± 0.18 <sup>b</sup>	4.85 ± 0.28	5.41 ± 0.24	6.06 ± 0.33	7.18 ± 0.09 <sup>c</sup>	8.68 ± 0.13	No data	35.21 ± 3.76 <sup>a</sup>
25	3.26 ± 0.09 <sup>a</sup>	3.90 ± 0.19 <sup>bc</sup>	4.88 ± 0.34 <sup>ab</sup>	5.76 ± 0.14	6.21 ± 0.35	7.06 ± 0.68	8.81 ± 0.38 <sup>b</sup>	No data	No data	33.30 ± 1.19 <sup>a</sup>
27	3.27 ± 0.11 <sup>a</sup>	4.57 ± 0.11 <sup>a</sup>	5.56 ± 0.37 <sup>a</sup>	6.30 ± 0.15	7.18 ± 0.14	8.67 ± 0.36	9.60 ± 0.29 <sup>ab</sup>	No data	No data	32.97 ± 3.46 <sup>a</sup>
29	3.20 ± 0.29 <sup>a</sup>	4.42 ± 0.56 <sup>ab</sup>	5.23 ± 0.89 <sup>ab</sup>	5.79 ± 0.74	7.55 ± 1.26	8.88 ± 1.47	10.74 ± 0.71 <sup>a</sup>	No data	No data	33.05 ± 1.02 <sup>a</sup>
Experiment 2										
25	3.07 ± 0.07 <sup>a</sup>	No data	4.87 ± 0.43 <sup>ab</sup>	5.96 ± 0.18	7.14 ± 0.30	8.72 ± 0.71	8.86 ± 0.21 <sup>b</sup>	No data	19.32 ± 0.78 <sup>a</sup>	36.90 ± 4.08 <sup>a</sup>
26	3.19 ± 0.09 <sup>a</sup>	No data	4.96 ± 0.36 <sup>ab</sup>	6.30 ± 0.59	7.31 ± 0.03	8.94 ± 0.04	10.67 ± 0.17 <sup>a</sup>	No data	18.21 ± 0.09 <sup>a</sup>	33.17 ± 1.09 <sup>a</sup>
28	3.24 ± 0.10 <sup>a</sup>	No data	5.17 ± 0.18 <sup>ab</sup>	5.79 ± 0.01	7.67 ± 0.04	8.95	10.76 <sup>a</sup>	No data	17.86 <sup>a</sup>	30.2 <sup>a</sup>

All values are presented as the mean ± standard deviation in each experimental group (except at 28°C). Means followed by different superscript letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

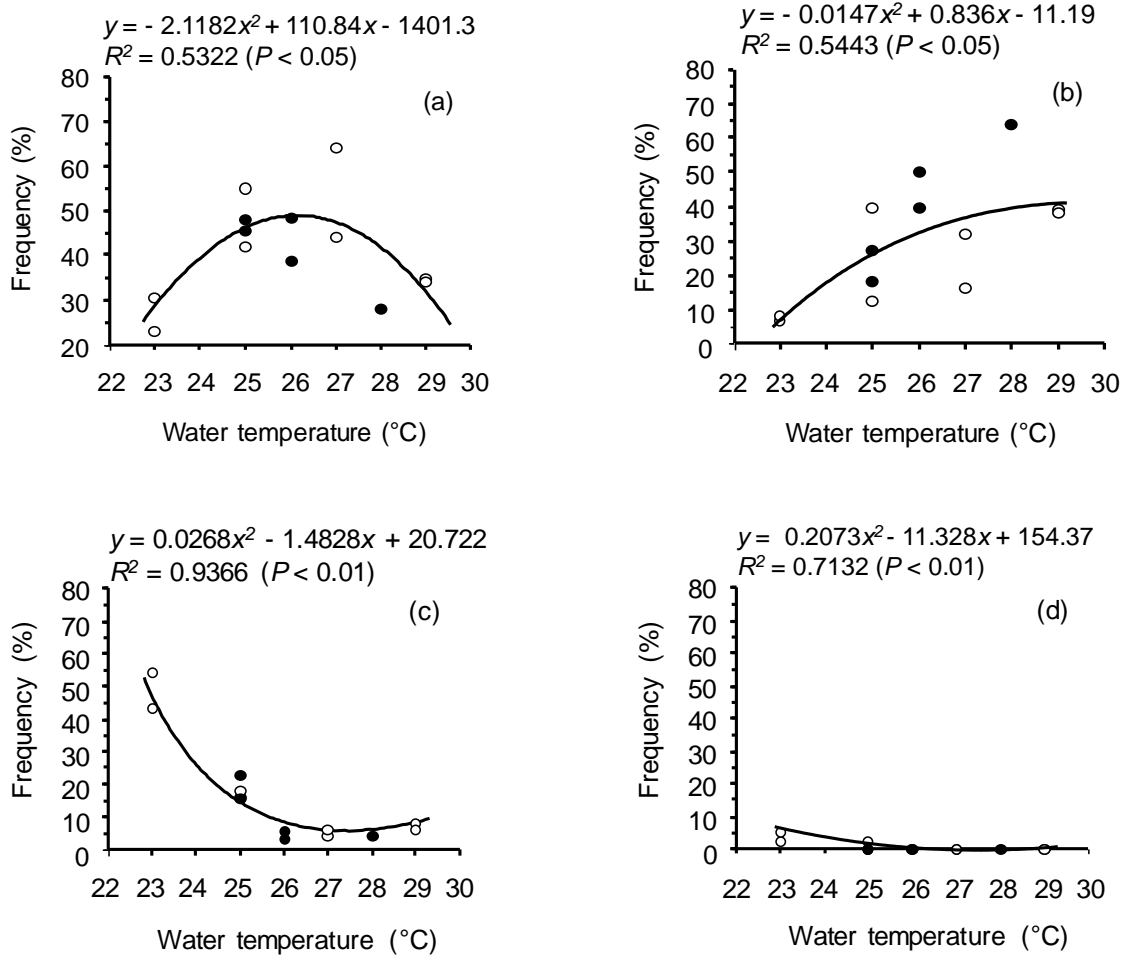
び40日令の全長は有意差がみられ ( $P < 0.05$ ), 高水温で大きくなる傾向がみられた。平均全長 30.2 ~ 36.9 mm (試験終了時) に到達するのに要した期間は, 試験1の23°C区で81日令, 25°C区で76日令, 27°C区で69日令, 29°C区で67日令, 試験2の25°C区で68日令, 26°Cおよび28°C区で66日令であり, その期間は高水温で短縮された。

#### b) 形態異常の発生

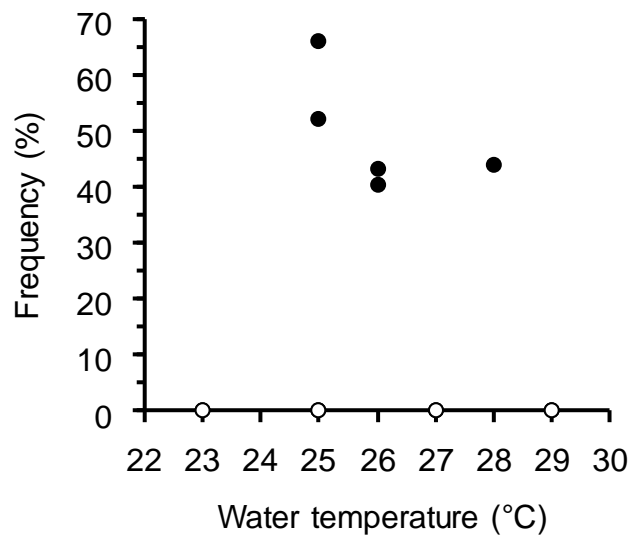
正常魚率は23.1~64.0%であり, 飼育水温25-27°Cで高く, 23°Cおよび28, 29°Cで低下した ( $P < 0.05$ , Fig. II-5a)。脊椎骨屈曲率は2.0~26.0%であり, 飼育水温と有意な関係がなかった。癒合または椎体欠損率は, 試験1で20.0~35.9%, 試験2で1.9~6.7%を示し, 飼育水温と有意な関係がなかった。椎体の変形率は6.5~64.0%で, 高水温で高かった ( $P < 0.05$ , Fig. II-5b)。神経棘の2叉率は, 26°Cから29°Cで低く(3.3~8.2%), 25°Cで少々高くなり(15.9-22.7%), 23°C(43.6~54.4%)で他の水温より有意に高かった ( $P < 0.01$ , Fig. II-5c)。血管棘の2叉または3叉率は0~15.0%と低く, 飼育水温と有意な関係はなかった。背鰭陥没率は, 26°Cから29°Cで0%であり, 25°Cで少々高くなり(0~2.0%), さらに23°C(2.2~5.1%)で他の水温より有意に高かった ( $P < 0.01$ , Fig. II-5d)。

#### c) 鰓が開腔した稚魚の頻度および形態異常との関係

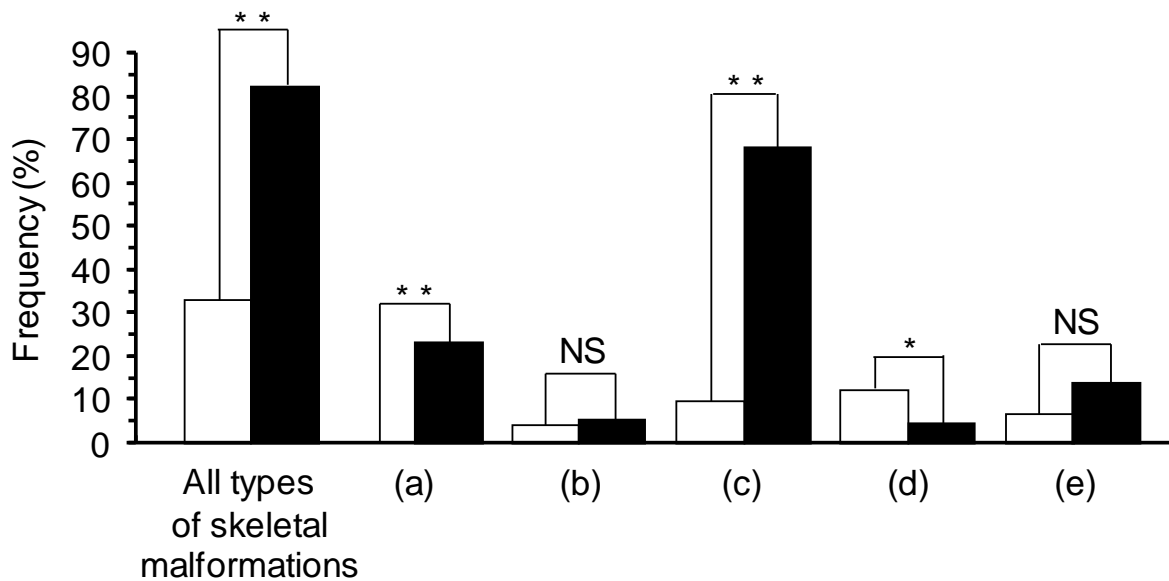
鰓が開腔した稚魚の出現率は試験1で0%であったが, 試験2では40.4~65.9%であり (Fig. II-6), 試験1と2でその差は有意であった ( $P < 0.01$ )。試験2で鰓が開腔した最小標本の全長は21.48 mmであった。一方, 試験1では, 最大標本(全長48.74 mm)で鰓の開腔が確認されなかった。全ての骨異常の出現率は鰓の開腔個体で33.1%, 鰓の未開腔個体で82.2%であり, 鰓の未開腔個体で有意に高かった ( $P < 0.01$ , Fig. II-7)。脊椎骨屈曲は鰓の開腔個体で0%, 鰓の未



**Fig. II -5.** Relationship between rearing temperature and the various morphological types at the end of the experiments. (a) normal fish, (b) deformation of centra, (c) bifurcated neural spine, (d) saddleback syndrome. Open circles: results from Experiment 1; closed circles: results from Experiment 2.



**Fig. II -6.** Relationship between rearing temperature and rates of swim bladder inflation. Open circles: Rates of swim bladder inflation in Experiment 1; closed circles: rates of swim bladder inflation in Experiment 2. A Student's t test was used to establish differences in the occurrence of specimens with inflated swim bladders, regardless of rearing temperature, in Experiment 1 and 2.



**Fig. II -7.** Incidence of all the skeletal malformations and the various abnormalities for specimens with an inflated and uninflated swim bladder specimens in Experiment 2, regardless of the rearing temperature. Open columns: Inflated swim bladder; closed columns: uninflated swim bladder. (a) spinal curvature, (b) fusion or defect of the centra, (c) deformation of the centra, (d) bifurcated neural spine, and (e) bifurcated or trifurcated hemal spine. Double asterisk: Significant difference between fish with inflated and uninflated swim bladders at  $P < 0.01$ . Single asterisk: Significant difference between fish with inflated and uninflated swim bladders at  $P < 0.05$ . NS: Not significant.



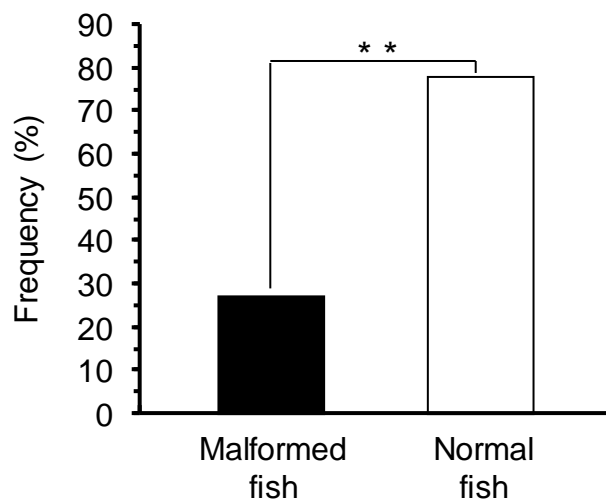
開腔個体で 23.3%であり、鰾の未開腔個体で有意に高かった ( $P < 0.01$ , Fig. II-7)。また、椎体の変形は鰾の開腔個体で 9.9%、鰾の未開腔個体で 68.2%であり、鰾の未開腔個体で有意に高かった ( $P < 0.01$ , Fig. II-7)。椎体の癒合または欠損は、鰾の開腔個体で 4.1%、鰾の未開腔個体で 5.4%であり、有意差はなかった (Fig. II-7)。また、血管棘の 2 又または 3 又率は鰾の開腔個体で 6.6%、鰾の未開腔個体で 14.0%であり、有意差はなかった (Fig. II-7)。一方、神経棘の 2 又は鰾の開腔個体で 12.4%、鰾の未開腔個体で 4.7%であり、鰾の未開腔個体より開腔個体で有意に高かった ( $P < 0.01$ , Fig. II-7)。鰾の開腔率は正常魚で 77.9%であり、形態異常魚の 27.4%と比較して有意に高かった ( $P < 0.01$ , Fig. II-8)。

### II-3. 考察

人工飼育マハタ仔稚魚期における飼育水温が、仔稚魚の成長、生残および形態異常の出現に及ぼす影響について調査した結果、水温 25°C で人工種苗の生産効率が向上し、鰾の開腔で形態異常率が低減した。マハタの最適な生産効率および生産性に関する要求の全てを満たす飼育水温を見出すことは困難であったが、本研究で得られた知見は、種苗生産の改善に寄与するであろう。

本研究では、10 日令の生残率は高水温で低下し、試験終了時の生残率は 23°C および 27~29°C より 25°C および 26°C で高かった。原因として、不適切な飼育水温が、仔稚魚の内部栄養吸収と発育に影響を及ぼした可能性が考えられた。

ヤイトハタ *Epinephelus malabaricus* およびスジアラ *Plectropomus leopardus* における研究では、給餌開始から内部栄養の吸収までの時間が高水温で促進される (Yoseda et al. 2006a ; 與世田ら 2006)。その結果、内部栄養から外部栄養への転換期間は短くなり、仔魚の初期生残にとって好ましくない可能性が指摘されている (Yoseda et al. 2006a ; 與世田ら 2006)。Dou et al. (2005) は、ヒ



**Fig. II-8.** Frequency of swim bladder inflation in normal and malformed fish in Experiment 2, regardless of the rearing temperature. Double asterisk: Significant difference between normal and malformed fish at  $P < 0.01$ .

ラメ *Paralichthys olivaceus* において、高水温で代謝コストが増加すると共に内部栄養がより早く消耗し、これにより飢餓状態の仔魚が摂餌する能力を失い、あるいは採餌効率が減少する可能性を示している。本研究では、内部栄養の消費のような仔魚の形態学的な変化について調査していないが、土橋ら (2003a) は、マハタでは高水温でそのような栄養源の消耗が促進されることを報告している。それ故、高水温で引き起こされる内部栄養から外部栄養への転換期間の短縮化は、本研究においても高水温で飼育された仔魚の 10 日令における低い生残を引き起こしたと考えられる。土橋ら (2003a) は、10 日令に 19.5 から 20.5°C の自然水温、22.5°C および 25°C でマハタの生残率を比較し、他の飼育水温より 25°C で生残率が高くなることを報告している。これは、23°C より 25°C で生残が良くなることを示しており、本研究の結果と異なる。マハタの種苗生産では、表面張力と関連した仔魚の浮上死 (Yamaoka et al. 2000) が多発するが、本研究では、0 日令から 10 日令まで油を添加したことから浮上死は観察されず、10 日令の平均生残率は 22.7~54.3% であった。一方、土橋ら (2003a) の研究では油を添加しておらず、それ故、10 日令の生残率が 0.06% から 9.2% であった。こうしたことから、土橋ら (2003a) の研究の 10 日令における生残は、飼育水温だけでなく、仔魚の浮上死による影響を大きく受けたものと推定され、それにより生残率に本研究との違いがあった可能性がある。

他魚種では、孵化時期の飼育水温が、受精卵の孵化率に影響を及ぼすことも証明されている (Santerre and May 1977 ; Polo et al. 1991 ; Kurokawa et al. 2008)。こうしたことから、適正な範囲を外れた高水温での飼育が孵化率に不利な影響を及ぼすことは明らかである。

また、他魚種では、深刻な形態異常で生残率が低下する可能性が指摘されており (Kurokawa et al. 2008 ; Lein et al. 1997 ; Barahona-Fernandes 1982 ; Koumoundouros et al. 2002), マハタにおいても、不適切な飼育水温で形態異常が

出現し、生残に影響を及ぼす可能性が考えられた。大西洋オヒョウ *Hippoglossus hippoglossus*, ニホンウナギ *Anguilla japonica* およびヨーロッパシーバスでは、異常な顎が発生した仔魚は餌できず、生残できない (Kurokawa et al. 2008 ; Lein et al. 1997 ; Barahona-Fernandes 1982)。数魚種で不適切な飼育水温が、異常顎の発生の原因因子であることが実験的に証明されており (Polo et al. 1991 ; Okamura et al. 2007 ; Kurokawa et al. 2008 ; Lein et al. 1997), 同様の可能性が Nagano et al. (2007) によってマハタでも示されている。また、顎部の異常に加えて深刻な脊椎の異常 (Barahona-Fernandes 1982), あるいは後彎症 (Koumoundouros et al. 2002) で仔魚は死に至ることが知られる。本研究では、顎の異常発生について調査していないが、脊椎骨屈曲および癒合または椎体欠損は、飼育水温による有意な影響を受けず、飼育水温に関係なく一定の割合で発生した。しかし、深刻な脊椎形態異常の出現は飼育期間を通して大きく変化することが知られる (Barahona-Fernandes 1982), 本研究では、そのような異常の出現の変遷を調査していないが、不適切な水温による深刻な形態異常で生残率が低下する可能性がある。したがって、生残率のさらなる向上には、飼育期間を通して形態異常の出現傾向を把握し、死亡と関連する深刻な形態異常の防除技術開発に取り組む必要がある。

試験 1 および 2 の異なる飼育水温における、正常魚およびそれぞれの骨異常を伴う個体の出現傾向は、癒合または椎体欠損を除き、概ね同じであった。また、試験 1 および 2 の対照区 (25℃) では、正常魚およびそれぞれの骨異常個体の出現率は、癒合または椎体欠損を除いて同程度であることから、これらの出現傾向および頻度は、両試験および同一試験区で類似性があることを確認した。したがって、本研究の飼育実験の結果には再現性が高いと考えられる。

癒合または椎体欠損は飼育水温と有意な関係はなく、これらの異常の出現傾向は、概ね両試験で同じであったが、その頻度は、試験 1, 2 および対照区 (25℃)

と比較して同等ではなく、試験 2 で低い傾向がみられた。近親交配が椎体の癒合に関係し（澤山・高木 2012）、環境要因と遺伝的要因の相互作用が異常形質の発現を誘導する可能性（Lijalad and Powell 2009 ; Bardon et al. 2009）や、過剰なビタミン A の使用が椎体の癒合の原因であるとする可能性も示唆されている（Dedi et al. 1995 ; Fernandez et al. 2008）。試験 1 および 2 では、試験に使用した受精卵が異なり、また、初期餌料の栄養強化剤の成分も異なる。したがって、癒合または椎体欠損の防除に関する研究では、遺伝的な差異および餌の栄養価を検討し、更なる研究対象にするべきである。体節形成期の熱刺激がゼブラフィッシュの胚における体節異常を引き起こすことが報告されている（Roy and Ho 1999）。一方、服部（2004）は、マダイでは、体節形成期の熱刺激は、体節異常を発生させないと報告しており、その因果関係は魚種間で異なるようである。Hattori et al.（2004）は、酸素不足が椎体の欠損の原因の一つであると結論付けている。したがって、癒合または椎体の欠損の出現を減少させるには、遺伝および栄養の要因と合わせて体節形成期の培養水温および酸素濃度の影響について更なる研究が必要であろう。近年、Uji et al.（2013, 2014）は、人工飼育下のマハタ体節形成期に発生する体節分節異常が、脊椎骨の異常を引き起こす可能性に言及し、体節分節異常の原因として、体節形成期の低酸素濃度を指摘している。こうしたことから、人工飼育下におけるマハタ受精卵の管理方法には注意する必要がある。

椎体変形の出現率は高水温で高く、このことは、仔稚魚期の飼育水温が、この異常の主要な原因の一つ、あるいは主要な原因の効果を助長する因子であることを示唆している。Sfakianakis et al.（2006）は、椎体の変形がヨーロッパシーバスにおける前彎症の最初の兆候であり、その出現率が 15°C より 20°C で高くなることを指摘している。マハタにおける椎体変形の出現を、初期の段階でその外観に基づいて判断することは困難であるが、椎体変形は、水温および水流

のような、ある一定の飼育条件下で前彎症に発展する可能性がある (Sfakianakis et al. 2006)。したがって、飼育水温管理や後述に示すように鰾の開腔促進で、可能な限りこの異常の発生を防止する必要がある。

血管棘の 2 叉または 3 叉の頻度は概ね低かった。対照的に、神経棘の 2 叉は 23°C で頻発し、神経棘の形態は、飼育水温に対する感受性が強いことが確認された。ヒラメでは、神経棘の形態異常は、血管棘よりも広範囲に渡ると報告され (澤山・高木 2011)、神経棘の 2 叉は人工飼育された仔稚魚における共通の問題かもしれない。

背鰭陥没は 23~25°C で出現したが、非常に低い頻度であり、飼育水温は、背鰭陥没の出現に僅かに影響を及ぼすことが確認された。幾つかの背鰭陥没の事例では、脊椎骨の屈曲、癒合または椎体欠損および椎体の変形で複雑な様相を呈していたので、背鰭構成物の欠如、あるいは背鰭担鰭骨と神経棘の癒合を明確に確認することはできなかった。

マダイでは、後期仔魚期に鰾が適切に開腔しないことで、前彎症の発生が誘導される (北島ら 1981 ; Kitajima et al. 1994)。数魚種で水面のスキマー (油膜回収装置) が水面の油膜を除去するのに効果的であり、仔魚期の初期に鰾の一次開腔を促進するには、この操作が必要であることが示されている (Chatain and Ounais-Guschemann 1990 ; Trotter et al. 2005 ; Kurata et al. 2012)。本研究では、水面の油膜除去をいずれの試験でも実施せず、こうしたことが原因で鰾が開腔した稚魚の頻度は、試験 1 の全ての水槽で 0% であり、試験 2 の水槽も低かった (40.4~65.9%) ことが考えられる。

マハタ仔魚の鰾開腔に関して、Nagano et al. (2007) は、鰾が開腔した個体が 60 日令 (体長 30.1 mm, 北島ら (1991) あるいは Sabate et al. (2009) の相対成長式から計算した全長は 36.95 mm あるいは 39.60 mm) で初めて出現したと報告している。平田ら (2009a) は、61 日令 (全長 31.0 mm) でも開腔個体が認め

られなかったと報告した。これらの研究では、いずれも水面の油膜を除去しない環境条件下で、仔魚期の初期に鰾が開腔することがなかったことを示している。しかし、魚種によっては、仔魚期の初期に鰾が開腔しなかった魚がその後開腔する、いわゆる二次開腔が確認されている（北島ら 1981 ; Chatain 1994 ; Jacquemond 2004b)。本研究では、鰾が開腔した時期の調査を行っていないが、試験 2 で鰾が開腔した最も小さい標本は全長 21.48 mm であった。これは、マハタで二次開腔を示した標本が初めて確認された大きさ (Nagano et al. 2007) より小さい。試験 1 および平田ら (2009a) の研究結果では、31.0~48.74 mm の全長で鰾の二次開腔が確認されなかったことを考慮すると、試験 2 における鰾の開腔は、仔魚期初期における一次開腔であると考えられる。

鰾の開腔率について、両試験区間で有意差がみられた原因については、以下のことが考えられる。まず、癒合または椎体欠損に対する遺伝的特性、または生物餌料の栄養の影響が原因である可能性がある。Angelfish *Pterophyllum scalare* (Cichlidae) およびヨーロッパシーバスでは、遺伝的特性が、鰾の開腔に影響を及ぼす可能性について指摘されており (Zilberg et al. 2004 ; Peruzzi et al. 2007), 本研究でも両試験で使用した受精卵が異なることから、遺伝的な差異を考慮すべき可能性があり、これについては更なる研究の必要がある。また、Koven et al. (1990) は、ヨーロッパヘダイ *Sparus aurata* L. において、ワムシの高度不飽和脂肪酸の量と仔魚の鰾の開腔に、有意ではないが、弱い相関関係がみられることを報告している。餌料生物の栄養価は、仔魚の空気呑み込みに必要な仔魚の活力に関係する原因因子であることも示唆されることから (北島ら 1981 ; 牧野ら 1995 ; Matsunari et al. 2013), 本研究でも両試験区間における鰾の開腔率の差の原因となった可能性がある。

試験2では、飼育水温に関係なく、鰾が開腔した個体と未開腔個体で骨異常率を比較した。脊椎骨屈曲および椎体の変形の出現率は、鰾が開腔した個体で0%

および9.9%であり、未開腔個体の23.3%および68.2%と比較して有意に低かった。さらに、鰓の開腔率は、形態正常魚で77.9%を示し、異常魚の27.4%と比較して有意に高かった。したがって、鰓の一次開腔の促進は、形態異常、特に脊椎骨屈曲および椎体の変形の防止に効果的であると考えられた。

本研究では、仔稚魚の成長は高水温で促進されたが、稚魚の生残率は、23℃または27～29℃より25℃および26℃で高かった、一方で形態異常個体の頻度は、23℃、28℃または29℃より25～27℃で低下した。この結果を基に、仔稚魚期における飼育水温が成長、生残および形態異常に及ぼす影響を総合的に考慮すると、マハタ仔稚魚の最適な飼育水温は、25～26℃であると結論できる。天然マハタの産卵時の水温および仔魚の成長に関する水温は不明であるが、人工飼育下の産卵に関しては、約20℃の水温が用いられることから(土橋ら2003a; Shein et al. 2004; 土橋ら2007)、天然海域における仔魚期初期も同程度の水温かもしれない。したがって、本研究で用いた飼育水温は、著しく高いと考えられる。人工飼育下の異体類稚魚における形態異常の発生は水温に依存しており、成長と変態時期の正しい均衡が形態異常の防止に重要であることが知られる(有瀧ら2004; Aritaki and Seikai 2004)。マハタ仔稚魚の成長、生残および形態異常の出現を考慮すると、人工飼育下における成長と変態時期の最適な均衡は、25～26℃にあると結論できる。また、本研究では、鰓の一次開腔促進が、脊椎骨屈曲および椎体の変形の防止に有効であると結論できた。



### 第三章 鰾の開腔と形態異常

#### 諸言

第II章では、マハタ仔稚魚飼育における不適切な飼育水温が、骨異常（椎体の変形および神経棘の2叉）の原因であるとともに、脊椎骨屈曲および椎体の変形の出現防止には、鰾の一次開腔促進が効果的であることを明らかにした。同様の効果はマダイでも観察されており（北島ら 1981 ; Kitajima et al. 1994）、幾つかのスズキ目の魚種では、鰾の一次開腔の促進には、仔魚期に飼育水面から油膜または自原性表面物質（生物餌料あるいは魚由来の油あるいは粒子状有機物および細菌など（Kurata et al. 2012 ; Summerfelt 2013））を除去する、油膜除去器の設置が効果的である（Chatain and Ounais-Guschemann 1990 ; Battaglene et al. 1994 ; Trotter et al. 2005 ; 川辺・木村 2008 ; 今井ら 2001 ; Kurata et al. 2012 ; Summerfelt 2013 ; Kurata et al. 2014）。スズキ目の無気管鰾魚である wall eye *Stizostedion vitreum* では、仔魚が空気を呑み込むため空気と水の境界面を貫通し、これにより鰾の一次開腔が誘導されることが顕微鏡ビデオ撮影による観察で証明されている（Rieger and Summerfelt 1998）。それ故、水面の油膜などの障害物を除去することで、仔魚の空気呑み込み行動が促進されると推察される。

一方で、マハタの種苗生産では、前期仔魚期に水の表面張力と関連した仔魚の浮上死（Yamaoka et al. 2000）が多発することから、浮上死を防止するため、飼育水槽に油を添加することが推奨されている（土橋ら 2003a）。マハタの近縁種であるキジハタ *Epinephelus akaara* では、仔魚の浮上死のメカニズムは、体表の粘液細胞の発達と退化、照度と仔魚の走行性および水面張力と関係することが示唆されている（Yamaoka et al. 2000）。仔魚が水面に蝟集し、仔魚の表皮

にある粘液細胞が物理的な刺激で粘液を分泌し、水面に接着するとともに粘液で互いに接着し、その結果、死亡した個体の集団が水面に集積し、仔魚の浮上死と呼ばれる (Yamaoka et al. 2000)。本研究の第Ⅱ章を含むマハタの種苗生産では、仔魚期初期の生残が向上することから (土橋ら 2003a)、フィードオイルまたは植物油を用いた浮上死の防除法がよく用いられる (田中ら 2005 ; Sakakura et al. 2006 ; Nagano et al. 2007 ; Sakakura et al. 2007a)。したがって、本種では、仔魚の鰾の開腔を促進する油膜除去は、方法論的に浮上死の防止と拮抗するため、両立できない。実際には、種苗生産における最優先課題は、種苗の生残を確保することであるため、それ故、油膜の非除去が現在の一般的な飼育方法となっている (平田ら 2009a)。こうした背景から、マハタでは、鰾の一次開腔に関する促進条件が研究されないまま今日に至っている。しかし、上述の通り、骨異常は鰾の一次開腔の促進で減少することから、浮上死を可能な限り抑えつつ、油膜の除去で鰾の一次開腔を促進する、特にその時期と方法に関する促進条件を研究することは重要である。

本研究の第Ⅱ章でも確認されたが、マハタでは、油膜を除去しない環境条件下で、幾つかの標本が15日令で鰾の一次開腔を示す (土橋ら 2003a)。それ故、鰾の一次開腔不全は、油膜以外の要因に原因がある可能性も考えられる (第Ⅱ章)。しかし、本研究の第Ⅱ章を含む多くの研究が、油膜を除去しない場合は鰾が一次開腔しないことを報告するとともに (Nagano et al. 2007 ; 平田ら 2009a)、それ以降の成長段階で鰾が開腔する事例もあると報告される (鰾の二次開腔 (北島ら 1981 ; Chatain 1994 ; Jacquemond 2004b))。本研究の第Ⅱ章を含む著者らの以前の研究 (土橋ら 2003a) では、油を水面に添加したが油膜除去は行っておらず、その場合飼育水は流動パラフィンで水面を密封した場合 (北島ら 1981 ; Chatain and Ounais-Guschemann 1990 ; 今井ら 2001 ; Kurata et al. 2012 ; 林田ら 1984) のように空気から完全に隔離されていない。それ故、仔魚が空気を呑み

込むため油膜を貫通し、あるいは、油膜の隙間から空気を呑み込む機会が存在したと考えられ、結果として、鰻が一次開腔したのかもしれない。いずれにせよ、人工飼育下におけるマハタ鰻の開腔に関する知見が不足しており、鰻の一次開腔が起こる時期を明らかにすることと、仔魚による空気の呑み込みが鰻の一次開腔に関係しているかを確認することが重要であると考えられる。

このような背景から、本章の第1節では、人工飼育下におけるマハタ鰻の開腔について、まず鰻の開腔開始時期および開腔開始後の仔魚の発育ステージを特定するため、予備的な最初の飼育試験（試験1）を実施した。試験2および3では、試験1の結果に基づき、次の3種類の水面飼育条件下で鰻の開腔率を比較し、仔魚の空気の飲み込み行動が鰻の開腔に必要なか確認した。(i) 油膜および、または自原性表面物質の除去、(ii) 油膜除去なしおよび (iii) 流動パラフィンでの水面の密封。また、仔稚魚の骨異常に対する鰻の一次開腔の影響を調査した。特に、第II章で確認された、鰻が一次開腔していない標本で最も高頻度に出現する脊椎骨屈曲（前彎症および後彎症）および椎体の変形の出現頻度と場所について調査した。さらに、飼育したマハタ仔稚魚の生残と成長に対する油膜除去の影響について確認した。

第III章第1節では、油膜除去期間中の飼育水の流動を発生させる油膜除去期間中の通気の量が、仔魚の空気呑み込み行動（鰻の開腔）に影響を及ぼす可能性が示唆された。そこで、本章の第2節では、油膜除去期間中の通気量が異なる試験区を設定し、鰻の開腔および仔稚魚の生残、成長に及ぼす影響について把握した。

また、本研究の第II章では、脊椎骨屈曲および椎体の変形の出現防止には、鰻の一次開腔促進が効果的であることを示したが、本章の第3節では、第1節で実施した鰻の開腔条件を検討する試験において、人工飼育下における飼育環境調整で鰻の一次開腔が促進された個体について、これら形態異常が低減され

ているかを確認した。

## 第 1 節 飼育水面の性状と鰾の開腔

### III-1-1. 材料および方法

#### a) 卵

試験 1 は、2009 年に（独法）水産総合研究センター増養殖研究所で実施した。受精卵は、照屋ら（2008）の方法に従い、6 月 10 日に人工授精で採取した。

試験 2 および 3 の人工授精は、次に示す点を修正して第 II 章の手順に基づき実施した。試験 2 では、天然海域で採取した親魚および 1999 年および 2001 年に人工孵化して飼育した親魚（7.0～18.0 kg）を屋内水槽（75 kl）で飼育した。2012 年 5 月 14 日に、親魚に胎盤性性腺刺激ホルモン（ゴナトロピン 5000，あすか製薬，東京）（以下 hCG）を筋肉内に投与した。5 月 16 日に、1 尾の雌から搾出した卵と 6 尾の雄から採取した精液を人工授精した。1 尾の雌から採取した浮上している受精卵を試験に使用した。試験 3 では、天然海域で採取した親魚および 1999 年から 2004 年に人工孵化して飼育した親魚（5.9～13.5 kg）を飼育し、試験 2 で使用した親魚と異なる個体を人工授精に使用した。2013 年 5 月 29 日に hCG を筋肉内投与し、5 月 31 日に、5 尾の雌から搾出した卵と 7 尾の雄から採取した精液を人工授精した。5 尾の雌から採取した浮上している受精卵を等分して試験に使用した。

#### b) 試験 1:鰾の開腔開始時期および開腔の仔魚の発育ステージの特定

鰾の開腔と仔魚の発育ステージをふ化後 14 日（14 日令）に観察した。飼育試験は、25-1 ポリエチレン製水槽（長径 50 cm，短径 32 cm，水深 25 cm）の 2

反復で実施した。2009年6月11日に250粒の受精卵を各試験水槽に收容した。飼育期間を通して飼育水温は23°Cに維持し、飼育海水の交換は行わなかった。*Nannochloropsis* sp.を一日に2回、500,000 個体/mlの密度で飼育水に添加した。水質を安定させるため、“貝化石”（フィッシュグリーン、グリーン・カルチャア、富山）を一日に2回、0.02 g/l/回の濃度で添加した。水面に植物油（MT被膜オイル、マリンテック、愛知）は添加せず、油膜は除去しなかった。1個（通気）の半球状の通気装置（25 φ、いぶき、愛知）を各飼育水槽の底部中央に設置した。蛍光照明は、12時間明期/12時間暗期とした。マハタ飼育の仔魚期初期に生残を改善する効果があることが証明されている連続照明（24時間明期/0時間暗期（土橋ら 2003a；照屋ら 2008）を、3日令から4日令まで適用した。仔魚には、高度不飽和脂肪酸（HUFA）を高めた淡水クロレラ（スーパー生クロレラ V-12、クロレラ工業、東京）で培養し、栄養強化したS型ワムシ混合種を給餌した。ワムシは、20~30 個体/mlの密度で維持した。飼育試験は14日令まで継続した。

### c) 試験 2:油膜除去

試験 2 では、次に示す 3 種類の処理を行った。3 種類の処理は、マハタ仔稚魚の飼育における、油膜および、または自原性表面物質の除去(ROF グループ)、油膜での水面の被覆 (COF グループ) および流動パラフィンでの水面の密封 (SLP グループ) である。ROF グループは、鰾の一次開腔に対する飼育水からの油膜および、または自原性表面物質の除去の促進効果を証明するために計画した。COF グループは、浮上死を防止するために用いる本種の現行飼育法の典型として設定した（土橋ら 2003a；田中ら 2005；Sakakura et al. 2006；Nagano et al. 2007；Sakakura et al. 2007a）。本グループは、仔魚の空気呑み込みを阻害することで、鰾の一次開腔に対する油膜の抑制効果を証明するとともに、浮上死に

関して、ROF グループと生残率を比較するために計画した。SLP グループは、仔魚が空気と接触するのを完全に阻止することで鰾の一次開腔に対する完全な流動パラフィンの抑制効果を証明するために計画した。

ROF グループの飼育試験は 500-l ポリエチレン水槽で 9 反復実施し、COF グループの試験は 5 反復、SLP グループの試験は 7 反復実施した。全部で 15,000 粒の受精卵を各試験水槽に収容し、ふ化が確認された日を 0 日令とした。飼育水温は、ウォーターバスで調整した。受精卵収容時の水温は 18.9~19.3℃であり、その後、各試験区共に 7 日令までに 26℃まで徐々に昇温し、その後、試験終了 4 日前から自然水温まで徐々に低下させた。急激な環境条件の変化を防止するため、8 日令まで飼育海水を交換しなかった。その後、海水を水槽容量の 6%/日の換水率で供給し、換水率を試験終了までに 84~92%/日まで徐々に増加させた。

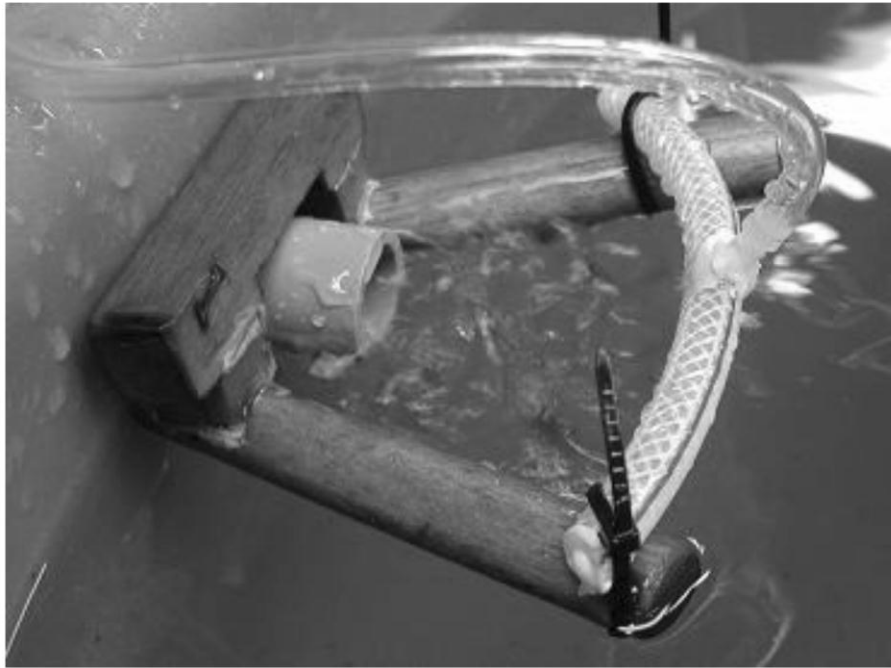
*Nannochloropsis* sp.あるいは高度不飽和脂肪酸 (HUFA) を高めた淡水クロレラを一日に 2 回、233,000 個体/ml あるいは 58,300 個体/ml の密度で飼育水に添加した。水質を安定させるため、貝化石を一日に 2 回、0.01 g/l/回の濃度で添加した。0 日令から 10 日令まで、水面張力と関連したハタ科仔魚の浮上死 (Yamaoka et al. 2000) を防止するため、COF グループでは、熱湯と混合した植物油 (MT 被膜オイル, マリンテック, 愛知) を、推奨されている通りに (土橋ら 2003a), 一日につき 2 回、0.1 ml/m<sup>2</sup> の濃度で各飼育水槽の水面に添加した。SLP グループでは、COF グループと同様に 0 日令から 3 日令まで水面に油を添加し、その後、3 日令から 30 日令まで、厚さ約 7 mm のパラフィン層を形成するため、流動パラフィン (流動パラフィン, 和光純薬工業, 大阪) を水面に注いだ (北島ら 1981 ; Chatain and Ounais-Guschemann 1990 ; 今井ら 2001 ; Kurata et al. 2012 ; 林田ら 1984)。一方、ROF グループでは水面に油を添加せず、12 日令から 30 日令まで、次の方法を用いて自原性表面物質の除去を行った。排水口 (直径 13

mm) を飼育水槽の側壁面の水位線上に開口した (Fig. III-1-1)。油膜除去期間中は、海水を日中 (06:00~17:00) に水槽容量の 10~23%/日の換水率で供給し、飼育水を自原性表面物質と共に排水口から流出させた。自原性表面物質の除去効果を向上させるため、水面油膜除去器を排水口に取り付けた (Fig. III-1-1)。

2 個 (通気および酸素) の半球状の通気装置 (25 φ, 田中三次郎商店, 福岡) を各飼育水槽の底部中央に設置した。通気量は、飼育期間を通して 0.2 l/分で維持し、酸素は、0 日令から 52 日令まで 0.1 l/分以下で維持し、52 日令から試験終了まで 0.2~0.5 l/分で維持した。蛍光照明は、6:00 から 20:00 まで用いた (14 時間明期/10 時間暗期)。連続照明 (24 時間明期/0 時間暗期) は 3 日令から 10 日令まで適用した。

水温、塩分、溶存酸素濃度および水面上の照度は毎日 1 回あるいは 2 回測定した。

仔稚魚には、栄養強化した S 型ワムシ混合種、ベトナム産アルテミア幼生 *Artemia franciscana nauplii* (ベトナム産ブラインシュリンプエッグ, 北村, 京都), 北米産アルテミア幼生 (ブラインシュリンプ卵, マリンテック, 愛知) および市販の人工飼料 (ラブラァバ NO.2 および NO.3, 林兼産業, 山口) を仔稚魚の成長に応じて給餌した。S 型ワムシを 3 日令から 40 日令に 15 cells/ml の密度で毎日 2 回給餌した。ベトナム産アルテミア幼生の給餌は 20 日令から開始し、24 日令まで継続した。北米産アルテミア幼生の給餌は、仔魚が 6 mm の平均全長に到達した 25 日令に開始し、試験終了まで継続した。市販の人工飼料は、37 日令から試験終了まで給餌した。ワムシは、高度不飽和脂肪酸 (HUFA) を高めた淡水クロレラおよび市販の HUFA 強化剤 (バイオクロミス パウダー, クロレラ工業, 東京) で培養し、孵化した北米産アルテミア幼生は、バイオクロミス パウダーで培養した。飼育実験は、魚の全長が 23~36 mm に到達するまで継続した。



**III-1-1.** Exhaust port and surface skimmer. The surface skimmer is equipped with an air jet system to force the oily surface film and/or autogenous surface substances to the exhaust port.



#### d) 試験 3:油膜除去

概略の飼育方法は試験 2 と同様であり、異なる点を以下に記す。試験 3 では、試験 2 の再現性を確認するため、試験 2 と同様に 3 種類の水面処理（ROF, COF, SLP グループ）を設定した。ただし、試験 3 で用いた受精卵の卵質は、試験 2 で用いた受精卵の品質より劣ったため、試験 3 の ROF グループでは、COF グループと同様に油を水面に添加し、たとえ浮上死を防止する油を水面に添加した場合でも、その後の油膜除去で鰾が開腔するか確認するために計画した。

ROF グループの飼育試験は 5 反復で実施し、COF グループの試験は 3 反復、SLP グループの試験は 1 水槽で実施した。6 月 1 日に、15,238 粒の受精卵を各試験水槽に収容した。受精卵収容時の水温は 21.4~21.8℃であり、その後、各試験区共に 7 日令までに 26℃まで徐々に昇温した。水温は、飼育期間を通して 26℃に維持し、試験終了 1 日前から自然水温まで低下させた。

試験 1 より飼育開始時の水温が高いため、試験 2 より 1 日早く油あるいは流動パラフィンを添加した。ROF グループでは、油膜除去期間中は、海水を日中（06:00~17:00）に水槽容量の 6%/日の換水率で供給し、試験 2 と同様に、飼育水を流出させた。飼育水面の油膜および、または自原性表面物質の除去は、ROF グループで 11 日令から 20 日令まで油膜除去器（スキマー）なしで実施した。さらに、油膜除去工程では通気を停止し、酸素のみを供給した。通気量は、飼育期間中（油膜除去期間中を除く）に 0.2 l/分を維持し、酸素は、0 から 54 日令まで 0.1 l/分以下で維持し、54 日令から試験終了まで 0.1~0.5 l/分で維持した。連続照明（24 時間明期/0 時間暗期）は、試験 2 より 1 日早く適用した。

仔稚魚には、2 日令から 39 日令に成長に応じて、栄養強化した S 型ワムシを 15 cells/ml の密度で毎日 2 回、またベトナム産アルテミア幼生を給餌した。さらに、25 日令からはベトナム産アルテミア幼生に代えて、北米産アルテミア幼

生（56日令まで）を、37日令からは市販の人工飼料（試験終了まで）を仔稚魚の成長に応じて給餌した。飼育実験は、魚の全長が19～35 mmに到達するまで継続した。

#### e) 飼育環境

試験2および3の飼育状態を表 Table III-1-1 に示す。飼育水温は概ね26°Cに維持されていた。塩分および溶存酸素濃度は試験期間を通して望ましいレベルに維持されていた。水面上の照度は、1,200～1,500 lux に維持されていた（Table III-1-1）。

#### f) 標本採集

試験1では14日令に全ての生残魚を採集し、鰾が開腔する発育ステージを特定するため、鰾の開腔頻度および組織像を評価した。試験2および3では、10日令の夜間に、各飼育水槽で生残している仔魚数を容積法（第II章）で推定するとともに、試験終了時（全長19～36 mm）に、生残している全ての仔稚魚数を計数した。試験2では、3, 5, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 31, 40 および49日令に各試験区の2～9水槽から10～22尾ずつ、試験終了時（60～67日令）は全ての水槽から53あるいは54尾を採取して仔稚魚の全長を測定した。試験3では、10, 12, 15, 20, 30, 40 および51日令に各試験区の1～5水槽から10～30尾ずつ、試験終了時（57～61日令）に全ての水槽から52あるいは53尾を採取して全長を測定した。飼育期間中に採取した全ての標本は、エチレングリコールモノフェニルエーテル（和光純薬工業、大阪）0.1～0.3 ml/l の濃度で2分間の麻酔を行った。試験2および3では、10日令から40日令に全長の測定を行ったあと、全ての麻酔標本を直ちに鰾の開腔頻度調査に使用した。Koumoundouros et al. (2000) の方法に従い、49日令、51日令および試験終了時

**Table III -1-1.** Culture conditions for the seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* larvae and juveniles reared at three different rearing treatments in Experiment 2 and 3

Group	Water temperature (°C)	Salinity (g L <sup>-1</sup> )	DO (mg L <sup>-1</sup> )	Light intensity (lux)
Experiment 2				
Removal of the oily surface film and/or autogenous surface substances (ROF)	26.00 ± 0.20	35.91 ± 0.37	7.30 ± 0.85	1,494 ± 176
Covering of water surface with oil film (COF)	26.02 ± 0.19	35.82 ± 0.35	7.12 ± 0.98	1,387 ± 161
Sealing of water surface with liquid paraffin (SLP)	26.09 ± 0.20	35.57 ± 0.44	7.63 ± 1.03	1,349 ± 153
Experiment 3				
Removal of the oily surface film and/or autogenous surface substances (ROF)	26.02 ± 0.54	36.30 ± 0.42	7.87 ± 1.97	1,298 ± 213
Covering of water surface with oil film (COF)	26.06 ± 0.57	36.33 ± 0.41	7.33 ± 1.44	1,201 ± 116
Sealing of water surface with liquid paraffin (SLP)	26.21 ± 0.49	35.87 ± 0.43	7.95 ± 1.45	1,331 ± 196

All values are presented as the mean ± standard deviation in each experimental group. The mean values were calculated by measurements values from 7 to 55–62 days after hatching (DAH) and from 7 to 55–59 DAH in Experiment 2 and 3, respectively.

に全ての麻酔標本を-21°Cから-20°Cで直ちに凍結保存し、後日軟 X 線調査で鰾の開腔率を評価した。

#### **g) 組織像**

試験 1 では、麻酔した標本は、Davidson's あるいは Bouin's 固定液で 24 時間固定し、それぞれ 70%あるいは 80%エタノールに移管した。標本をエタノール系列で脱水し、パラフィン型に包埋した。3  $\mu\text{m}$  の厚さで連続切片をスライドガラス上で標本にし、Mayer's hematoxylin および eosin で染色した。

#### **h) 浮上死, 仔魚の発育段階, 鰾の開腔の観察**

試験 2 および 3 では、生残に対する水面状態の影響を調査するため、浮上死を目視調査した。全ての試験では、仔魚の発育段階を顕微鏡観察で既存の報告 (Sabate et al. 2009) に従い表現した。仔魚の鰾の開腔は、仔魚の成長に伴い腹腔の周囲に黒色素胞が発達するため (北島ら 1991)、通常の光学顕微鏡観察で確認することは困難であった。したがって標本を一滴の海水と共にスライドガラスの上に置き、鰾の開腔を、全ての試験でカバーガラスを用いた押し潰し法 (Fig. III-1-2) でガスの泡 (気泡) を確認し、試験 1 では、組織学的観察でも確認した (Fig. III-1-3)。鰾内にガスの泡 (気泡) が存在する場合、海水へのガスの放出が、押し潰し法で明確に観察することができた。また、機能的な鰾を持つ仔稚魚数を計数するため、試験 2 および 3 では、49, 51 日令および試験終了時に軟 X 線写真を使用した。

#### **i) 統計分析**

データの正規性 (Shapiro-Wilk test) および等分散性 (Bartlett test) が確認された場合は、生残率および全長における差異を確認するため Tukey-kramer test

を使用した (Tables III-1-2, III-1-3, III-1-4)。生残率は、データの正規性 (Shapiro-Wilk test) が確認されず、データの範囲が 20%未満、あるいは 80%より大きい場合は、角変換後に用いた (Table III-1-2)。全長に関しては、データの正規性が確認されなかった場合は、Steel-Dwass test を使用した (Tables III-1-3, III-1-4)。また、鰾の開腔率 (Tables III-1-5, III-1-6) における差異を確認するため、William's の補正を伴う G-test (Sokal and Rohlf 1983) および事後検定として Ryan's multiple range test を使用した。Tukey-kramer test, Shapiro-Wilk test および Bartlett test は、JMP7 統計ソフトウェア (SAS Institute Japan, 東京) を用いて実施し、 $P < 0.05$  の場合に差が有意とした。

### III-1-2. 結果

#### a) 試験 1:鰾の開腔開始時期の特定および開腔の仔魚の発育ステージ

2 つの飼育水槽における試験終了時 (14 日令) の生残率は、それぞれ 25.6% および 18.4% であった。全ての生残仔魚の発育ステージの構成は、Mouth-opening ステージ, Pelagic larvae ステージおよび Pre-flexion ステージの 3 種類に分類された。鰾の開腔後、内腔は気体で充満されていた (Figs. III-1-2, III-1-3)。鰾の開腔の頻度は、2 つの水槽で 10.9% および 4.4% であり、鰾が開腔した全ての仔魚の発育ステージは Pre-flexion であり、Mouth-opening または Pelagic larvae ステージではなかった。

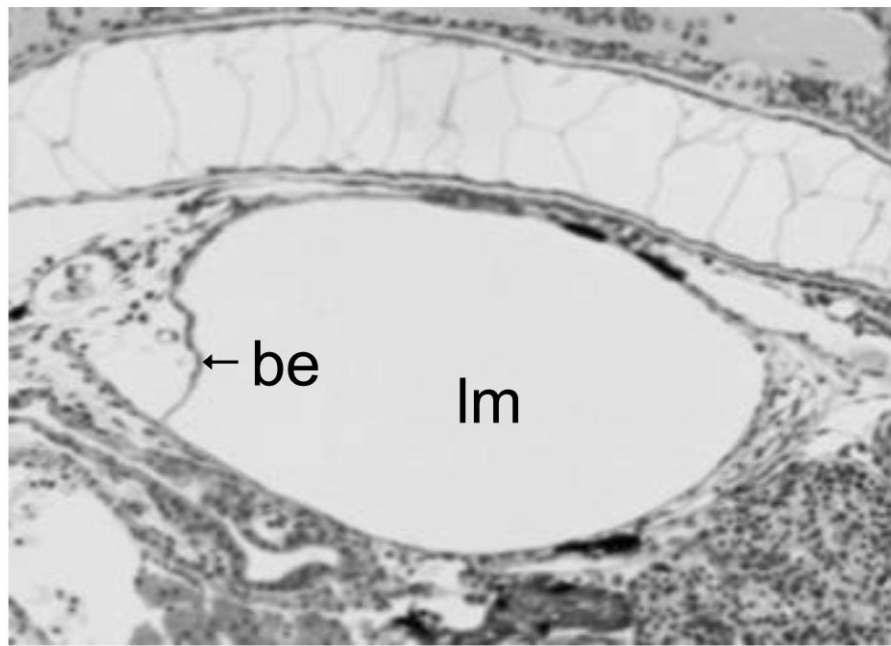
#### b) 試験 2 および 3:油膜除去

##### 生残および成長

試験2で用いた受精卵のふ化率は95.2%、試験3では72.9~92.3%であった。試験2では、COFまたはSLPグループで浮上死は確認されず、ROFグループでは、



**Fig. III -1-2.** Photomicrographs of 18 days after hatching seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* larvae (5.22 mm TL, pre-flexion stage). (a) Specimen with inflated swim bladder, and (b) squash preparation of specimen with inflated swim bladder. sb: gas bubble (air bubble) in the swim bladder, gb (ab): gas bubble (air bubble) in sea water between the cover slip and glass slide.



**Fig. III-1-3.** Longitudinal section of the inflated swim bladder of a seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* larva at 14 days after hatching. lm: swim bladder lumen, be: bladder epithelium (epithelium forming the wall of the swim bladder).

2 日令から 29 日令にかけて浮上死が確認された。一方、試験 3 では、浮上死は、10 日令までいずれのグループでも観察されなかったが、ROF グループでは、浮上死は 11 日令から、油膜および、または自原性表面物質の除去を開始後に観察され、30 日令まで継続した。他のグループでは、11 日令からも浮上死は確認されなかった。

10 日令の平均生残率は、試験 2 で 53.0~74.0%、試験 3 で 19.4~39.5%を示した。また、試験終了時の平均生残率は、試験 2 で 3.7~5.4%、試験 3 で 1.1~2.3%を示した。試験 2 および 3 とともに、平均生残率は、10 日令だけでなく、試験終了時も試験区間で有意差はみられなかった (Table III-1-2)。

試験 2 での全長は、3, 15, 20, 31, 40, 49 日令および試験終了時にグループ間で有意差がみられ、15 日令を除いて COF グループまたは SLP グループより ROF グループで大きかった ( $P < 0.05$ , Table III-1-3)。試験 3 での全長は、12, 20, 30, 51 日令および試験終了時にグループ間で有意差がみられ、12 および 30 日令を除いて COF グループまたは SLP グループより ROF グループで大きかった ( $P < 0.05$ , Table III-1-4)。

#### 鰾が開腔した仔稚魚の頻度

油膜および、または自原性表面物質の除去を開始した 12 日令前後では、仔魚の発育ステージは、ほとんど Pelagic larvae ステージであった(試験 2 および 3)。それらの除去を終了した 30 日令 (試験 2) および 20 日令 (試験 3) では、発育ステージは、主に Pre-flexion から Post-flexion および Pre-flexion と Flexion ステージであった。鰾の開腔は、試験 2 および 3 で、それぞれ 14 日令および 15 日令に ROF グループで最初に確認された (Tables. III-1-5, III-1-6)。鰾が開腔した最初の仔魚は、試験 2 および 3 で、それぞれ 3.76~4.20 mm および 4.15~4.72 mm であり、鰾が開腔した全ての標本は Pre-flexion ステージであった。試験 2 の 19



**Table III-1-2.** Mean survival rates at 10 days after hatching and at the end of the experiments 2 and 3

Group	Survival rates (%)			
	Experiment 2		Experiment 3	
	At 10 days after hatching	At the end of the experiment (At 60–67 days after hatching)	At 10 days after hatching	At the end of the experiment (At 57–61 days after hatching)
Removal of the oily surface film and/or autogenous surface substances (ROF)	53.0 ± 19.3	3.7 ± 1.1	39.5 ± 18.6	2.3 ± 1.4
Covering of water surface with oil film (COF)	71.1 ± 16.3	5.4 ± 2.5	19.4 ± 7.3	2.1 ± 1.8
Sealing of water surface with liquid paraffin (SLP)	74.0 ± 17.4	4.0 ± 1.7	37.9	1.1

All values are presented as the mean ± standard deviation in each experimental group (except where water surface was sealed with liquid paraffin (SLP group) in Experiment 3).

**Table III -1-3.** Mean total length of the seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* larvae and juveniles reared at three different rearing treatments in Experiment 2

Days after hatching	Removal of the oily surface film and/or autogenous surface substances (ROF)		Covering of water surface with oil film (COF)		Sealing of water surface with liquid paraffin (SLP)	
	<i>n</i>	Total length (mm)	<i>n</i>	Total length (mm)	<i>n</i>	Total length (mm)
3	20	2.57±0.15	20	2.65±0.10	20	2.66±0.10
5	20	2.76±0.09	20	2.73±0.12	20	2.70±0.10
10	150	3.27±0.34	69	3.30±0.32	109	3.34±0.29
12	137	3.87±0.28	30	3.81±0.32	31	3.90±0.20
13	31	4.24±0.29 <sup>a</sup>	30	3.95±0.29 <sup>c</sup>	31	4.06±0.27 <sup>ab</sup>
14	135	4.22±0.27	30	4.31±0.47	31	4.21±0.50
15	136	4.52±0.43 <sup>b</sup>	75	4.65±0.36 <sup>b</sup>	105	4.81±0.47 <sup>a</sup>
16	136	4.60±0.54	30	4.65±0.38	31	4.75±0.43
17	135	4.89±0.55	30	4.72±0.37	30	4.79±0.33
18	135	5.13±0.59	30	5.03±0.60	30	5.29±0.57
19	135	5.47±0.82	30	5.10±0.52	30	5.41±0.46
20	135	6.09±0.72 <sup>a</sup>	75	5.54±0.57 <sup>b</sup>	105	5.69±0.56 <sup>b</sup>
25	136	7.10±0.92	75	6.84±0.88	105	6.84±0.81
31	135	9.28±1.64 <sup>a</sup>	75	6.63±1.65 <sup>c</sup>	105	7.89±1.67 <sup>b</sup>
40	135	13.25±1.36 <sup>a</sup>	75	11.76±2.81 <sup>b</sup>	105	12.69±1.83 <sup>b</sup>
49	135	18.39±3.33 <sup>a</sup>	75	17.59±2.81 <sup>ab</sup>	105	16.59±2.96 <sup>b</sup>
60-67	478	31.49±4.75 <sup>a</sup>	265	28.84±4.83 <sup>b</sup>	371	27.62±4.89 <sup>c</sup>

All values are presented as the mean ± standard deviation in each experimental group. Means followed by different superscript letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

**Table III -1-4.** Mean total length of the seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* larvae and juveniles reared at three different rearing treatments in

Experiment 3

Days after hatching	Removal of the oily surface film and/or autogenous surface substances (ROF)		Covering of water surface with oil film (COF)		Sealing of water surface with liquid paraffin (SLP)	
	<i>n</i>	Total length (mm)	<i>n</i>	Total length (mm)	<i>n</i>	Total length (mm)
10	75	3.21±0.29	45	3.30±0.20	30	3.14±0.38
12	22	3.77±0.16 <sup>b</sup>	23	3.76±0.13 <sup>b</sup>	22	3.91±0.16 <sup>a</sup>
15	51	4.21±0.45	20	4.05±0.54	20	4.17±0.47
20	75	5.46±0.51 <sup>a</sup>	30	5.40±0.93 <sup>a</sup>	30	5.06±0.60 <sup>b</sup>
30	50	6.75±0.74 <sup>b</sup>	20	7.33±0.84 <sup>a</sup>	20	7.68±0.37 <sup>a</sup>
40	50	13.02±2.81	20	12.25±2.18	20	14.08±0.75
51	105	21.44±3.42 <sup>a</sup>	42	21.74±3.94 <sup>a</sup>	21	19.17±3.04 <sup>b</sup>
57-61	261	28.95±5.71 <sup>a</sup>	157	24.14±5.43 <sup>b</sup>	52	28.40±4.51 <sup>a</sup>

All values are presented as the mean ± standard deviation in each experimental group. Means followed by different superscript letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

**Table III -1-5.** Frequency of seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* larvae and juveniles with inflated swim bladders in Experiment 2

Days after hatching	Removal of the oily surface film and/or autogenous surface substances (ROF)			Covering of water surface with oil film (COF)			Sealing of water surface with liquid paraffin (SLP)		
	<i>n</i> SI	<i>n</i> SU	% SI	<i>n</i> SI	<i>n</i> SU	% SI	<i>n</i> SI	<i>n</i> SU	% SI
10	0	150	0	0	69	0	0	109	0
12	0	137	0	0	30	0	0	31	0
13	0	31	0	0	30	0	0	31	0
14	2	133	1.5	0	30	0	0	31	0
15	2	137	1.5	0	75	0	0	105	0
16	4	132	2.9	0	30	0	0	31	0
17	6	129	4.4	0	30	0	0	30	0
18	6	129	4.4	0	30	0	0	30	0
19*	9	126	6.7	0	30	0	0	30	0
20	9	126	6.7 <sup>a</sup>	0	75	0 <sup>b</sup>	0	105	0 <sup>b</sup>
25	6	130	4.4 <sup>a</sup>	0	75	0 <sup>ab</sup>	0	105	0 <sup>b</sup>
31	12	123	8.9 <sup>a</sup>	0	75	0 <sup>b</sup>	0	105	0 <sup>b</sup>
40	8	127	5.9 <sup>a</sup>	0	75	0 <sup>b</sup>	0	105	0 <sup>b</sup>
49	18	117	13.3 <sup>a</sup>	3	72	4.0 <sup>b</sup>	0	105	0 <sup>b</sup>
60-67	53	425	11.1 <sup>a</sup>	6	259	2.3 <sup>b</sup>	3	368	0.8 <sup>b</sup>

\*Indicates that, at 19 days after hatching, the main effect of water surface conditions (difference in accessibility of larvae to the water surface) to the frequency of swim bladder inflation is statistically significant by the G-test ( $P < 0.05$ ), but not statistically significant different by the Ryan's multiple range test among experimental groups. Different superscript letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). SI, swim bladder inflation; SU, swim bladder uninflation.

**Table III -1-6.** Frequency of seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* larvae and juveniles with inflated swim bladders in Experiment 3

Days after hatching	Removal of the oily surface film and/or autogenous surface substances (ROF)			Covering of water surface with oil film (COF)			Sealing of water surface with liquid paraffin (SLP)		
	<i>n</i> SI	<i>n</i> SU	% SI	<i>n</i> SI	<i>n</i> SU	% SI	<i>n</i> SI	<i>n</i> SU	% SI
10	0	75	0	0	45	0	0	30	0
12	0	22	0	0	23	0	0	22	0
15*	6	45	11.8	0	20	0	0	20	0
20*	6	69	8.0	0	30	0	0	30	0
30*	8	42	16.0	0	20	0	0	20	0
40	12	38	24.0 <sup>a</sup>	0	20	0 <sup>b</sup>	0	20	0 <sup>b</sup>
51	49	56	46.7 <sup>a</sup>	8	34	19.0 <sup>b</sup>	1	20	4.8 <sup>b</sup>
57-61	101	160	38.7 <sup>a</sup>	7	150	4.5 <sup>b</sup>	3	49	5.8 <sup>b</sup>

\*Indicates that, at 15, 20, and 30 days after hatching, the main effect of water surface conditions (difference in accessibility of larvae to the water surface) to the frequency of swim bladder inflation is statistically significant by the G-test ( $P < 0.05$ ), but not statistically significant different by the Ryan's multiple range test among experimental groups. Different superscript letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). SI, swim bladder inflation; SU, swim bladder uninflation.

日令および試験 3 の 15, 20 および 30 日令では、鰾の開腔率に対する水面状態の主効果は統計的に有意であったが ( $P < 0.05$ ), 試験区間で統計的有意差はなかった。その後, ROF グループの鰾の開腔率は, COF (2.3%および 4.5%) あるいは SLP グループ (0.8%および 5.8%) より有意に高くなり, 試験 2 および 3 の終了時では, それぞれ 11.1%および 38.7%であった ( $P < 0.05$ )。

### III-1-3. 考察

本研究は, マハタにおいて仔魚による空気呑み込みが鰾の一次開腔と関係することを明確に証明するとともに, 一次開腔は Pre-flexion ステージで発生することを明らかにした。また, 本研究は, 油膜および, または自原性表面物質の除去が, 鰾の一次開腔の促進に効果的であることも示した。

既報の多くは, マハタの仔魚期に鰾が開腔した仔魚を確認していないが (Nagano et al. 2007 ; 平田ら 2009a), 本研究の試験 1 では, 鰾が開腔した仔魚を明確に確認した。マハタでは, 鰾の二次開腔が, 少なくとも 60 日令 (体長 30.1 mm, 北島ら (1991) あるいは Sabate et al. (2009) の相対成長式から計算した全長は 36.95 mm あるいは 39.60 mm) まで確認されない (Nagano et al. 2007) ことを考慮すると, 試験 1 で開腔した個体については一次開腔に間違いないと考えられる。このことは, 試験 1 で, 鰾の一次開腔を開始した仔魚の発育ステージを特定できることを意味している。鰾が開腔した全ての個体が, Mouth-opening ステージあるいは Pelagic larvae ステージではなく, Pre-flexion ステージであることが確認されたことから, 鰾の一次開腔を開始する仔魚の発育ステージは, Pre-flexion ステージと特定された。ハタ科魚類が属するスズキ目の多くの魚種は, 無気管鰾魚 (一時的な有気管鰾魚) であることから (板沢 1991), マハタにおける鰾の一次開腔促進は, 限られた発育ステージ, すなわち

鰾が気管を通して消化管と一次的に接続する、発育初期段階(特にPre-flexion ステージ) に行うべきである。したがって、それ以前の Mouth-opening の仔魚の発育ステージに油膜を除去することは、不必要な浮上死を誘発するのみと推測される。この結果に基づいて、試験 2 および 3 の ROF グループでは、油膜および、または自原性表面物質の除去を、ほとんどの仔魚が Pelagic-larvae ステージである 12 または 11 日令から開始した。

本研究は、飼育水面の油膜除去がマハタ仔魚の鰾の一次開腔促進に効果的であり、仔魚による空気の呑み込みが一次開腔に必要であることを明らかにした。試験 2 および 3 では、飼育水温、塩分濃度、溶存酸素濃度および照度などの環境要因は、第 II 章の値に近く、これらの飼育条件は適切であった。試験 2 および 3 の ROF グループでは、鰾の開腔率は大きく変動したが、開腔個体は、14 または 15 日令から試験終了時まで確認された。特に、試験 3 では、浮上死を防止するための油を添加した場合でさえ、油膜除去後に鰾の開腔が確認された。対照的に、他のグループで鰾の開腔はほとんど確認されず、ROF グループの鰾の開腔率は、20 日令(試験 2) および 40 日令(試験 3) から試験終了まで有意に高かった。これらの結果は、他魚種(北島ら 1981; Chatain and Ounais-Guschemann 1990; 今井ら 2001; Kurata et al. 2012; Summerfelt 2013; 林田ら 1984; Doroshev and Cornacchia 1979) で報告されているのと同様に、試験区間における鰾の開腔率の差異が、仔魚が空気を呑み込む行動の容易さを左右する水面状態の違いで引き起こされていることを示唆している。特に、SLP グループでは、厚さ約 7 mm の流動パラフィン層で水面を被膜していることから、仔魚が空気を呑み込むために空気と飼育水の界面を貫通する機会は、ほとんどあるいは全くなかったと考えられる。また、wall eye では、空気呑み込みの行動中に、仔魚が漂積物、細菌および真菌を吸引した結果、鰾内の炎症で開腔が抑制される可能性が指摘されている(Summerfelt 2013; Marty et al. 1995)。それ故

に、油膜のような水面の障害物は、鰾の一次開腔を促進するため除去すべきである。

COFおよびSLPグループでは、数は少ないが試験終了時に仔稚魚の0.8～5.8%で鰾の開腔が観察されたが、SLPグループでは、流動パラフィン層の下で通気を行ったので、その気泡および、または酸素供給由来の気泡を仔魚が呑み込み、結果的に鰾が開腔したと推定される（今井ら 2001）。飼育水には、十分量の溶解酸素が存在したが、COFおよびSLPグループで鰾の開腔は非常に低率であったことから、マハタ仔魚の鰾は、ティラピア *Tilapia mossambica* (Doroshev and Cornacchia 1979) のように、呼吸循環器系を通したガス分泌では開腔しないと考えられる。仔魚が油膜を貫通し、あるいは油膜の間隙から空気を呑み込んでいる可能性もあるが、仔魚による空気呑み込みで、マハタ鰾の開腔が促進されることは確実である。

本研究では、飼育下のマハタ鰾の開腔率は、一般的に他魚種（Chatain and Ounais-Guschemann 1990 ; Trotter et al. 2005 ; 川辺・木村 2008 ; 今井ら 2001 ; Kurata et al. 2012 ; Kurata et al. 2014 ; Battaglone and Talbot 1990）より低い結果となった。マハタで鰾の開腔率を向上する方法としては、試験2より試験3の15日令で鰾の開腔頻度が僅かに高いことから、試験2および3における飼育方法における、通気の差異に注意すべきである。他魚種では、飼育水面の状態が鰾の開腔率に影響を及ぼすことが報告されている（北島ら 1981 ; Kitajima et al. 1994 ; Chatain and Ounais-Guschemann 1990 ; Summerfelt 2013 ; 林田ら 1984 ; Battaglone and Talbot 1990 ; 照屋ら 2009 ; 橋本ら 2012）。試験2では、油膜除去器による波が仔魚の空気呑み込み行動を阻害し、一方で、試験3では、通気の停止で静穏な状態になり、結果として、鰾の一次開腔が促進された可能性もある。しかし、試験3では、0.1 l/分以下の酸素量でさえ空気の呑み込みを阻害する可能性があった。それ故、鰾の開腔率と空気呑み込みの関係を解明するため



に更なる研究が必要であろう。また、本研究の両試験で使用した受精卵が異なることから、先天性な中軸骨格の欠損から生じた前彎症、あるいは遺伝的特性が鰾の開腔に影響した可能性も考えられる (Zilberg et al. 2004, Peruzzi et al. 2007 ; Andrades et al. 1996)。これらの可能性のうち、本節で示された、通気による水面の動静が、仔魚の空気呑み込み行動および鰾の開腔に影響を及ぼす可能性について、本章の第 2 節で実験的な検証を行い、考察した。

マハタの場合、浮上死は、水面状態に違いがあっても、10 日令および試験終了時の試験区間での生残率の差に反映されない可能性がある。試験 2 の ROF グループでは、油添加なしで 2 日令から浮上死が発生し、10 日令で生残率が低い傾向を示したが、試験区間で平均の生残率に統計的有意差はなかった。このことは、浮上死が 10 日令の生残率に対して及ぼす弊害が限定されることを示唆している。浮上死は、試験 2 および 3 の ROF グループで多発したが、試験終了時に試験区間で生残率に有意差はなかった。

これに対して沈降死および鰾の未開腔による深刻な形態異常で 10 日令あるいは試験終了時に生残率が低下した可能性が考えられる。いくつかの魚種では、鰾が開腔した仔魚より未開腔の仔魚で生残率が低下することが報告されている (Trotter et al. 2005 ; Summerfelt 2013 ; Kurata et al. 2014 ; Chatain 1989 ; Goolish and Okutake 1999 ; Kurata et al. 2013)。Kurata et al. (2014) は、太平洋クロマグロ *Thunnus orientalis* において、鰾の未開腔による沈降死は、油膜および、または自原性表面物質の除去による浮上死より生残に及ぼす弊害が大きいことを明らかにした。マハタの沈降死に関する知見は少ないが、背鰭第 2 棘および腹鰭棘の伸長個体が出現する 10~13 日令 (全長 3.5~3.9 mm) に体比重が大きく増加することから、鰾が未開腔の仔魚は、その期間の夜間に沈降する可能性がある と推定される (平田ら 2009a)。この時期は、鰾が一次開腔する時期と一致することから、仔魚は、鰾を開腔させることで浮力を獲得し、体比重の増加に伴う

沈降を軽減している可能性がある。

また、鰾の未開腔を原因とする深刻な形態異常を伴うマハタ仔魚は、死亡率が高く、これにより生残率が低下する可能性も考えられる。試験3のROFグループで確認される20日令以降の鰾の開腔率の増加傾向は、鰾の未開腔魚が死亡し、開腔魚が生残することで発生する可能性も考えられるため、鰾の未開腔による形態異常と生残に関する考察は第3節で行った。

このほかに、他魚種では、鰾が未開腔の幼魚は、開腔した幼魚と比較して成長が劣ることが指摘されており (Jacquemond 2004b; 橋本ら 2012; Chatain 1989; Kurata et al. 2013; Jacquemond 2004a), マハタでも鰾の一次開腔促進で成長が向上する可能性がある。本研究においても、ROFグループの平均全長は、COFまたはSLPグループより、大きくなる傾向がみられた。

## 第2節 通気量と鰾の開腔

### III-2-1. 材料および方法

第III章第1節では、飼育水の水流を起こす油膜除去期間中の通気が、仔魚の空気呑み込み行動（鰾の開腔）に影響を及ぼす可能性が示唆された。そこで、本章の第2節では、油膜除去期間中の通気量が異なる4試験区を設定し、鰾の開腔および仔稚魚の生残、成長に及ぼす影響について把握した。

#### a) 卵

人工授精は、次に示す点を修正して第II章の手順に基づき実施した。天然海域で採取した親魚および1999年から2004年に人工孵化した稚魚を屋内水槽(75

kl) で飼育し、マハタの親魚とした (体重 6.9~12.6 kg)。

2014 年 5 月 12 日に親魚に胎盤性性腺刺激ホルモン (ゴナトロピン 5000, あすか製薬, 東京) を, 魚体重 1 kg あたり 500 IU で筋肉内に投与した。ホルモン投与 44~54 時間後の 5 月 14 日に, 8 尾の雌から搾出した卵と 5 尾の雄から採取した精液を人工授精した。受精 32 時間後に受精卵消毒を行い, 5 尾の雌から採取した浮上卵を等分して試験に使用した。

#### b) 試験区の設定と仔稚魚の飼育方法

飼育環境を Table III-2-1 に示す。油膜除去期間中の通気量が異なる 4 試験区を設定した (0.01, 0.05, 0.10, 0.50 l/分)。

飼育試験は, 500-l ポリエチレン水槽を用いて行い, 通気量 0.01 l/分では 5 反復, 通気量 0.05 l/分および 0.10 l/分では 3 反復ずつ, 通気量 0.50 l/分では 2 反復で実施した。15,715 粒の受精卵を各試験水槽に収容し, ふ化が確認された日を 0 日令とした。飼育水温はウォーターバスで調整した。受精卵収容時の水温は 18.0~18.3°C であり, その後, 各試験区共に 8 日令までに 25°C まで徐々に昇温した。急激な環境条件の変化を防止するため, 6 日令まで飼育海水を交換しなかった。その後, 海水を水槽容量の 9%/日の換水率で供給し, 換水率を試験終了までに 58%/日まで徐々に増加させた。

*Nannochloropsis* sp. を一日に 2 回, 233,000 個体/ml の密度で飼育水に添加した。水質を安定させるため, 貝化石 (フィッシュグリーン, グリーン・カルチュア, 富山) を一日に 2 回, 0.01 g/l/回の濃度で添加した。本章第 1 節の結果から, 水面張力と関連したハタ科仔魚の死亡 (Yamaoka et al. 2000) を防止するため, 0 日令から 10 日令まで, 全ての水槽で熱湯と混合した植物油 (MT 被膜オイル, マリンテック, 愛知) を, 一日につき 2 回, 0.1 ml/m<sup>2</sup> の濃度で各飼育水槽の水面に添加した (土橋ら 2003a)。その後, 仔魚の空気呑み込み行動による

鰻の一次開腔を促進するため、油膜除去を仔魚の発育ステージが Mouth-opening から Pelagic-larvae ステージが主である 11 日令から開始し、20 日令まで実施した。油膜除去期間中は、海水を日中（06:00～17:00）に 21%/日の換水率で供給し、本章第 2 節の試験 3 と同様に、飼育水槽の側壁面の水位線上に開けた排水口（Fig. III-1-1）から飼育水を流出させ、飼育水面の油膜および、または自原性表面物質の除去を行った。なお、本章第 2 節の結果から、油膜除去器による波が仔魚の空気呑み込み行動を阻害する可能性が考えられたため、水面油膜除去器（スキマー、Fig. III-1-1）は設置しなかった。

2 個の半球状の通気装置（通気および酸素）を各飼育水槽の底部中央に設置した。通気量は、11 日令から 20 日令の油膜除去期間（06:00～17:00）を含む 11 日令から 27 日令を除き、各試験区ともに試験開始時から 29 日令まで 0.2 l/分で維持し、30 日令から試験終了まで 0.2～0.5 l/分で維持した。酸素は、油膜除去期間中を除く 4 日令から 10 日令および 21 日令から試験終了まで 0.1 l/分以下で維持した。油膜除去期間中を含む 11 日令から 27 日令は、各試験区で設定した通気量（0.01, 0.05, 0.10, 0.50 l/分）を維持し、かつ、溶存酸素濃度を飼育に適した望ましいレベルに維持するため、微細流量計（高精度流量計 RK1450-15-SS-1/4, コフロック, 京都）を使用し、通気および酸素量の合計値が各試験区の設定値（0.01, 0.05, 0.10, 0.50 l/分）になるよう調整した。

蛍光照明は、6:00 から 20:00 まで用いた（14 時間明期/10 時間暗期）。連続照明（24 時間明期/0 時間暗期（土橋ら 2003a ; 照屋ら 2008））は 3 日令から 10 日令まで適用した。

水温、塩分、溶存酸素濃度および水面上の照度は毎日 1 回あるいは 2 回測定した。

仔稚魚には、栄養強化した S 型ワムシ混合種、ベトナム産アルテミア幼生（ベトナム産ブラインシュリンプエッグ, 北村, 京都）、北米産アルテミア幼生（ブ

ラインシュリンプ卵，マリンテック，愛知）および市販の人工飼料（ラブリアバ NO.2 および NO.3，林兼産業，山口）を仔稚魚の成長に応じて給餌した。S型ワムシを3日令から40日令に15 cells/mlの密度で毎日2回給餌した。ベトナム産アルテミア幼生の給餌は，20日令から開始し，24日令まで継続した。北米産アルテミア幼生の給餌は，仔魚が6 mmの平均全長に到達した25日令に開始し，試験終了まで継続した。市販の人工飼料は，40日令から試験終了まで給餌した。ワムシは，高度不飽和脂肪酸（HUFA）を高めた淡水クロレラ（スーパー生クロレラ V-12，クロレラ工業，東京）および市販のHUFA強化剤（バイオクロミス パウダー，クロレラ工業，東京）で培養し，孵化した北米産アルテミア幼生は，バイオクロミス パウダーで培養した。飼育実験は，魚の全長が26～29 mmに到達するまで継続した。

#### c) 飼育環境

飼育環境を Table III-2-1 に示す。飼育水温は概ね25℃に維持されていた。塩分および溶存酸素濃度は試験期間を通して望ましいレベルに維持されていた。水面上の照度は，1,400～1,500 lux に維持されていた（Table III-2-1）。

#### d) 標本採集

10日令の夜間に，各飼育水槽で生残している仔魚数を容積法（第II章）で推定した。試験終了時（全長26～29 mm）には，生残している全ての仔稚魚数を計数した。仔稚魚の全長を10, 13, 14, 15, 20, 25, 31, 41 および49日令および試験終了時（54～60日令）に測定した。各採集日に各試験区の全水槽から一水槽につき5～30尾を採取した。また，全長の測定に関しては，試験終了時に全ての水槽から一水槽につき54～58尾を採取した。飼育期間中に採取した全ての標本は，エチレングリコールモノフェニルエーテル（和光純薬工業，大阪）0.1～

**Table III -2-1.** Culture conditions for the seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* larvae and juveniles reared at four different flow rates

Flow rate (L min <sup>-1</sup> )	Water temperature (°C)	Salinity (g L <sup>-1</sup> )	DO (mg L <sup>-1</sup> )	Light intensity (lux)
0.01	25.10 ± 0.29	35.98 ± 0.63	7.91 ± 1.37	1,440 ± 183
0.05	25.12 ± 0.32	36.02 ± 0.65	8.25 ± 1.94	1,455 ± 210
0.10	25.25 ± 0.85	35.92 ± 1.03	7.95 ± 2.07	1,416 ± 200
0.50	25.09 ± 0.23	36.00 ± 0.64	7.63 ± 1.34	1,419 ± 248

All values are presented as the mean ± standard deviation in each experimental group. The mean values were calculated by measurements values from 8 to 54–60 days after hatching.

0.3 ml/l の濃度で 2 分間の麻酔を行った。10 日令から 41 日令に全長の測定を行ったあと、全ての麻酔標本を直ちに鰾の開腔頻度調査に使用した。Koumoundouros et al. (2000) の方法に従い、49 日令および試験終了時に全ての麻酔標本を -21°C から -20°C で直ちに凍結保存し、後日軟 X 線調査で鰾の開腔率を評価した。

#### e) 浮上死、仔魚の発育段階、鰾の開腔の観察

各試験区における、浮上死および仔魚の魚の空気飲み込み行動を目視観察した。顕微鏡観察で確認した仔魚の発育段階は、既存の報告 (Sabate et al. 2009) に従い表現した。また、仔稚魚の鰾の開腔は、本章第 1 節に記したカバーガラスを用いた押し潰し法および軟 X 線写真で確認した。

#### f) 飼育水の流向・流速の測定

通気量が異なる 4 試験区 (0.01, 0.05, 0.10, 0.50 l/分) の流場の測定は、飼育試験開始前の 2014 年 4 月 29 日から 5 月 7 日にかけて行った。通気による流場の測定に用いた水槽は、その後の飼育試験と同様に水温を 25°C に設定し、一日に水槽容量の 21% の換水率で海水を供給し、側壁面の水面から排水した。飼育水槽の流場の測定は Acoustic Doppler velocimeter (MicroADV, SonTek/YSI, California) を用いて、水平方向の直交 (x, y 軸) および垂直方向 (z 軸) の 3 方向で定量化した。流向・流速計およびセンサー (Acoustic Doppler velocimeter) は、飼育水槽上に置いた移動架台の上に設置し、x 軸に沿って水槽の中央部から側壁面まで、および z 軸に沿って水面下 5 cm 以深において、5 cm あるいは 2.5 cm 間隔で移動し、合計 130 箇所で行った。また、音波の反射向上を目的に、流場の測定直前に貝化石 100 g を水槽内に添加した (Ching et al. 2014)。流場の測定は水槽の半面のみで行い、各測点における流場は 3 分間以

上 (25 Hz) 測定し、流場が安定した測定開始 2 分後から 1 分間の平均値をデータとして用いた。本研究では、z 軸 (垂直成分) 周りの円周方向の水平循環流は微小であると仮定し (塩谷ら 2003), z 軸および x 軸の流量データのみを用いて各測点における平均流速を求めた。

### g) 統計分析

データの正規性 (Shapiro-Wilk test) および等分散性 (Bartlett test) が確認された場合は、生残率および全長における差異を確認するため Tukey-kramer test を使用した (Tables III-2-2, III-2-3)。生残率は、データの正規性 (Shapiro-Wilk test) が確認されず、データの範囲が 20%未満,あるいは 80%より大きい場合は、角変換後に用いた (Table III-2-2)。全長に関しては、データの正規性および等分散性が確認されなかった場合は、Steel-Dwass test を使用した (Table III-2-3)。また、鰾の開腔率 (Table III-2-4) における差異を確認するため、William's の補正を伴う G-test (Sokal and Rohlf 1983) および事後検定として Ryan's multiple range test を使用した。Tukey-kramer test, Shapiro-Wilk test および Bartlett test は、JMP7 統計ソフトウェア (SAS Institute Japan, 東京) を用いて実施し、 $P < 0.05$  の場合に差が有意とした。

## III-2-2. 結果

### a) 生残および成長

試験で用いた受精卵のふ化率は 67.1~91.7%であった。各試験区ともに、浮上死が、油膜および、または自原性表面物質の除去を開始した直後に観察され、30 日令まで継続した。

10 日令および試験終了時の平均生残率を Table III-2-2 に示す。平均生残率は、



10 日令で 87.4% から 116.1%，試験終了時で 3.6% から 10.2% を示し，ともに試験区間で有意差はみられなかった。試験終了時における，各試験区の生残率の範囲は，通気量 0.01 l/分区で 1.7～7.1%，0.05 l/分区で 1.5～5.6%，0.10 l/分区で 3.7～14.1% および 0.50 l/分区で 2.0～18.3% であった。

全長は，10, 13, 14, 15, 20, 41, 49 日令および試験終了時に試験区間で統計的有意差がみられた ( $P < 0.05$ , Table III-2-3)。このうち，10, 14, 20, 41, 49 および試験終了時では，全長は，0.50 l/分区より 0.01 l/分区で有意に大きい値を示した。

#### b) 鰾が開腔した仔稚魚の頻度

10 日令での仔魚の発育ステージは，Mouth-opening または Pelagic larvae であった。油膜および，または自原性表面物質の除去を終了した 20 日令では，発育ステージは，主に Pre-flexion と Flexion ステージであった。鰾の開腔は，13 日令に 0.05 l/分区で最初に確認された (Table III-2-4)。その後，14 日令に 0.01 および 0.10 l/分区で開腔が確認され，この間に鰾が開腔した仔魚は全長 3.80～5.16 mm であり，全て Pre-flexion ステージであった。鰾の開腔率は，15, 41 日令および試験終了時に試験区間で統計的有意差がみられた ( $P < 0.05$ , Table III-2-4)。特に，0.50 L/分区の鰾の開腔率は全体的に低く，15 日令から 49 日令まで 0～3.3% で推移し，41 日令では他試験区より有意に低かった。また，試験終了時の鰾の開腔率は，0.01 l/分区で 28.1%，0.05 l/分区で 32.3%，0.10 l/分区で 25.9% および 0.50 l/分区で 15.5% を示し，0.50 l/分区の鰾の開腔率は 0.01 l/分および 0.05 l/分区より有意に低かった ( $P < 0.05$ )。

#### c) 飼育水の流向・流速の測定

Fig. III-2-1 から III-2-4 に各試験区における水槽鉛直断面内の 3 次元の流向流速の測定結果を示した。水槽の中央部 (通気装置直上) の垂直方向 (z 軸) の流

**Table III-2-2.** Mean survival rates at 10 days after hatching and at the end of the experiment

Flow rate (L min <sup>-1</sup> )	Survival rates (%)	
	At 10 days after hatching	At the end of the experiment (At 54–60 days after hatching)
0.01	116.1 ± 19.3	3.7 ± 2.2
0.05	103.2 ± 24.4	3.6 ± 2.1
0.10	98.3 ± 26.8	9.1 ± 5.2
0.50	87.4 ± 46.9	10.2 ± 11.5

All values are presented as the mean ± standard deviation in each experimental group.

**Table III -2-3.** Mean total length of the seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* larvae and juveniles reared at four different flow rate

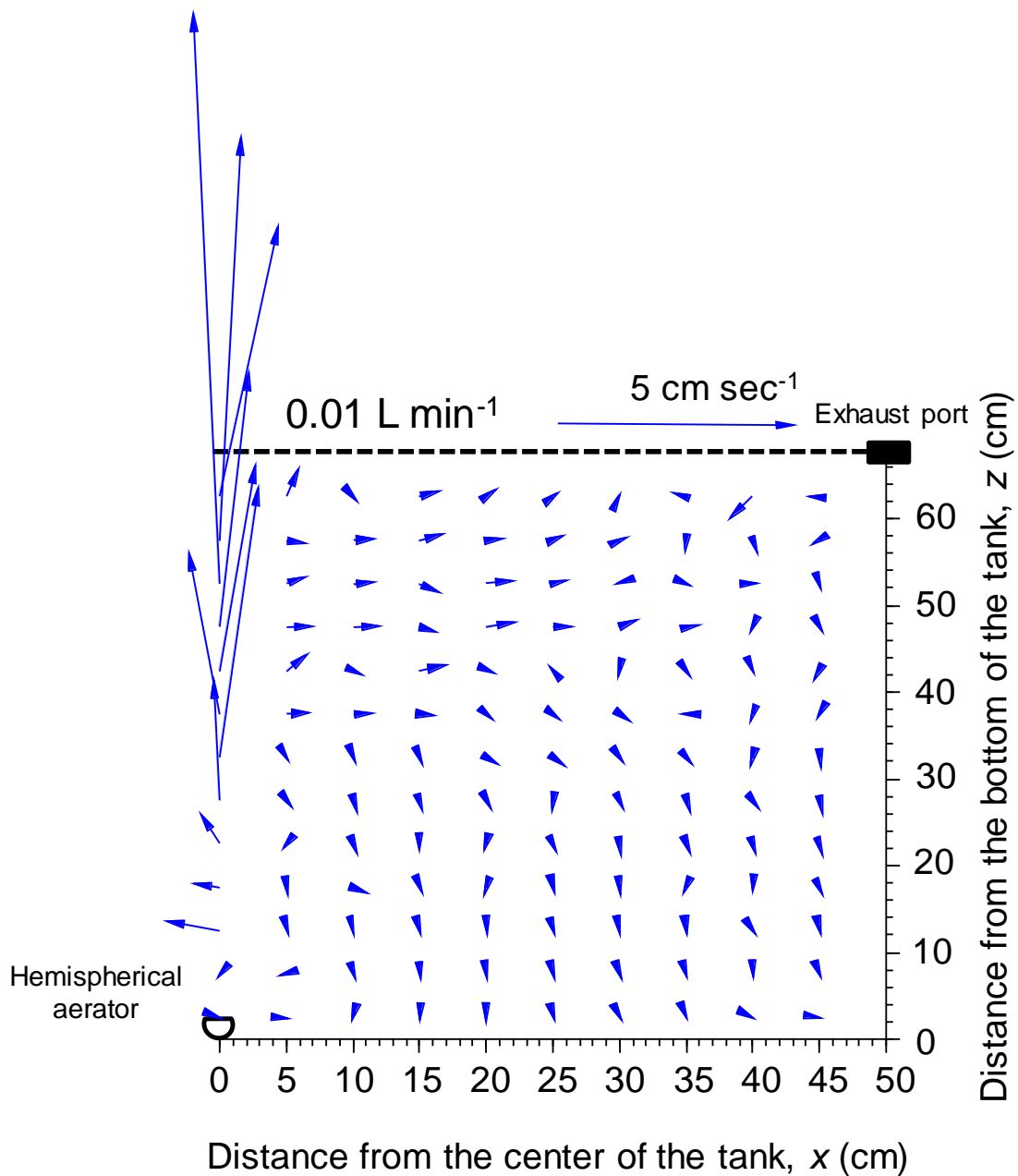
Days after hatching	Flow rate (L min <sup>-1</sup> )							
	0.01		0.05		0.10		0.50	
	<i>n</i>	Total length (mm)	<i>n</i>	Total length (mm)	<i>n</i>	Total length (mm)	<i>n</i>	Total length (mm)
3	27	2.55±0.04	16	2.55±0.04	15	2.56±0.03	10	2.57±0.03
5	26	2.71±0.08	16	2.68±0.08	15	2.67±0.08	10	2.68±0.08
10	50	3.26±0.34 <sup>a</sup>	30	3.16±0.27 <sup>ab</sup>	30	3.26±0.34 <sup>ab</sup>	20	3.07±0.23 <sup>b</sup>
13	25	3.89±0.38 <sup>ab</sup>	17	3.89±0.29 <sup>a</sup>	16	3.85±0.41 <sup>ab</sup>	11	3.62±0.10 <sup>b</sup>
14	26	4.40±0.49 <sup>a</sup>	16	4.03±0.45 <sup>ab</sup>	16	4.38±0.27 <sup>ab</sup>	10	4.17±0.43 <sup>b</sup>
15	78	4.70±0.32 <sup>ab</sup>	46	4.46±0.50 <sup>c</sup>	45	4.73±0.34 <sup>a</sup>	31	4.38±0.61 <sup>abc</sup>
20	75	5.97±0.69 <sup>a</sup>	47	5.12±0.51 <sup>bc</sup>	49	5.27±0.53 <sup>b</sup>	31	4.90±0.51 <sup>c</sup>
25	75	7.17±1.00	45	7.04±1.11	46	6.80±0.96	30	6.82±0.86
31	75	8.53±1.52	46	8.87±1.43	45	8.64±1.27	32	8.26±1.29
41	75	14.78±1.81 <sup>a</sup>	55	13.73±1.29 <sup>b</sup>	45	13.73±1.41 <sup>b</sup>	30	13.48±0.98 <sup>b</sup>
49	95	20.07±3.14 <sup>a</sup>	55	19.03±2.75 <sup>ab</sup>	60	17.37±2.95 <sup>c</sup>	35	17.82±3.35 <sup>bc</sup>
54-60	270	27.84±3.70 <sup>a</sup>	164	27.82±3.93 <sup>a</sup>	166	25.98±3.23 <sup>b</sup>	110	26.22±4.53 <sup>b</sup>

All values are presented as the mean ± standard deviation in each experimental group. Means followed by different superscript letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

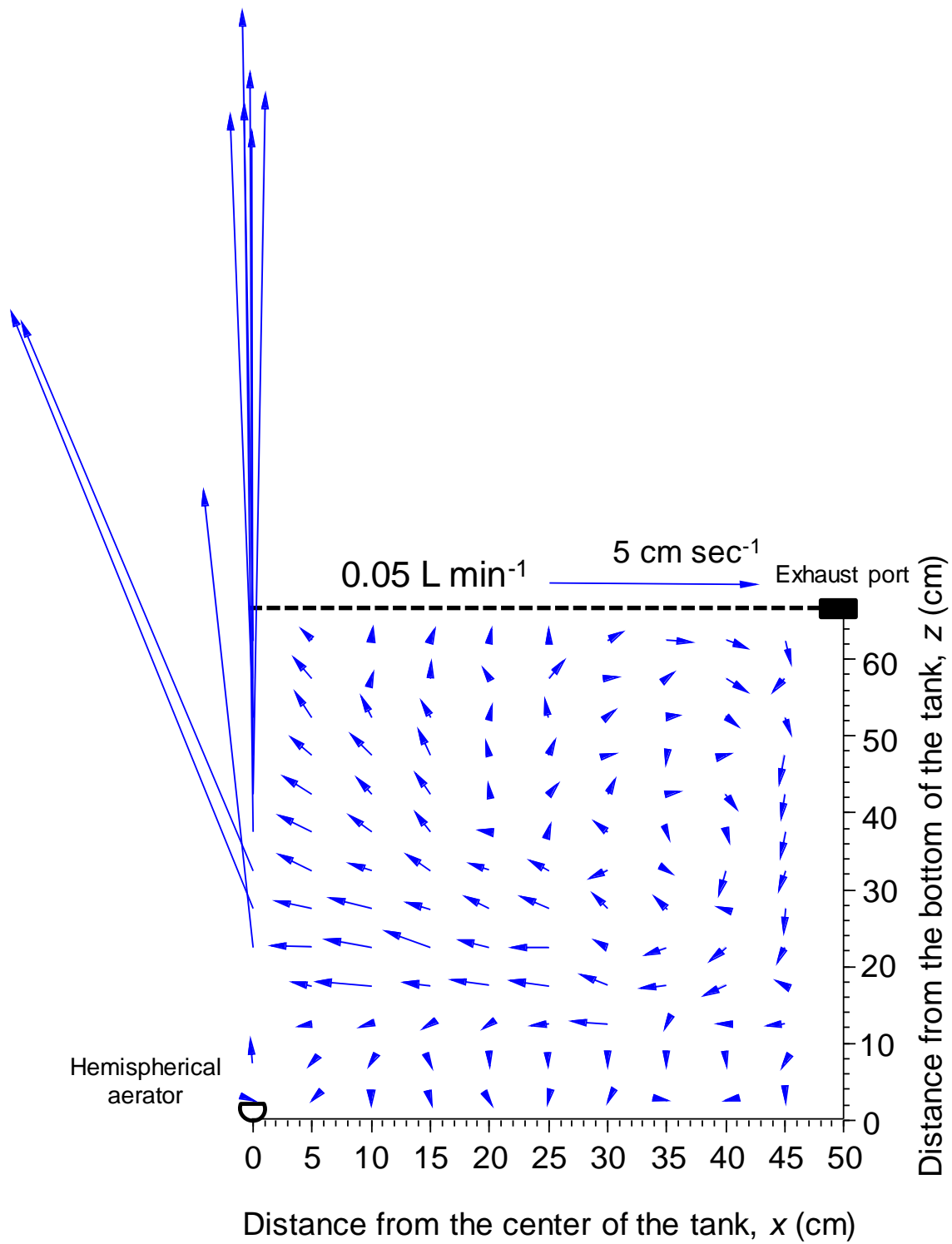
**Table III -2-4.** Frequency of seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* larvae and juveniles with inflated swim bladders

Days after hatching	Flow rate (L min <sup>-1</sup> )											
	0.01			0.05			0.10			0.50		
	<i>n</i> SI	<i>n</i> SU	% SI	<i>n</i> SI	<i>n</i> SU	% SI	<i>n</i> SI	<i>n</i> SU	% SI	<i>n</i> SI	<i>n</i> SU	% SI
10	0	50	0	0	30	0	0	30	0	0	20	0
13	0	25	0	1	16	5.9	0	16	0	0	11	0
14	2	23	8.0	0	16	0	1	16	5.9	0	11	0
15	7	70	9.1 <sup>ab</sup>	7	39	15.2 <sup>a</sup>	0	45	0 <sup>b</sup>	1	30	3.2 <sup>ab</sup>
20	10	65	13.3	3	45	6.3	2	47	4.1	1	29	3.3
25	8	67	10.7	4	41	8.9	1	45	2.2	0	30	0
31	7	68	9.3	5	41	10.9	1	44	2.2	1	31	3.1
41	17	58	22.7 <sup>a</sup>	14	41	25.5 <sup>a</sup>	12	33	26.7 <sup>a</sup>	0	30	0 <sup>b</sup>
49	13	82	13.7	7	48	12.7	9	51	15.0	1	34	2.9
54-60	76	194	28.1 <sup>a</sup>	53	111	32.3 <sup>a</sup>	43	123	25.9 <sup>ab</sup>	17	93	15.5 <sup>b</sup>

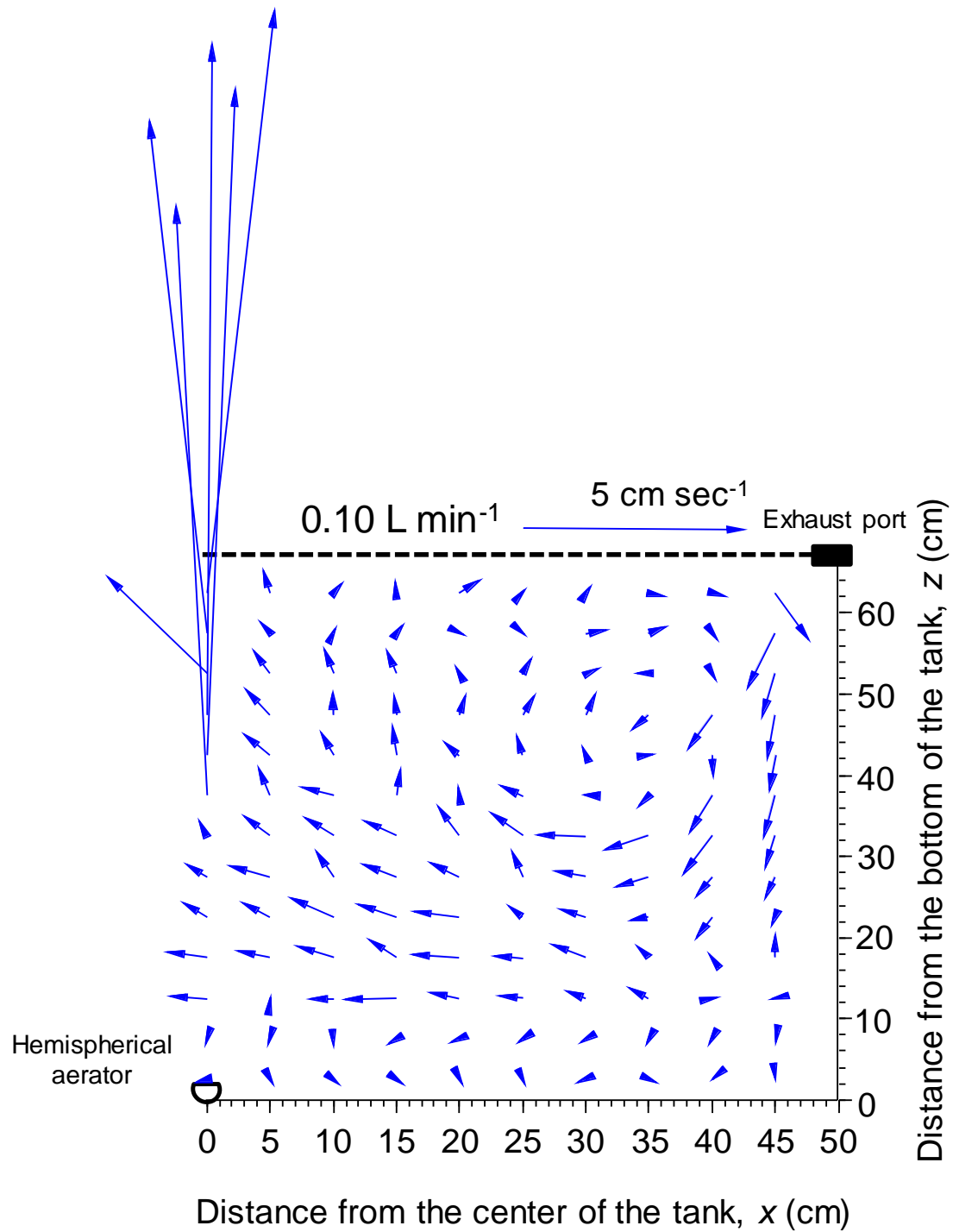
SI, swim bladder inflation; SU, swim bladder uninflation. Different superscript letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).



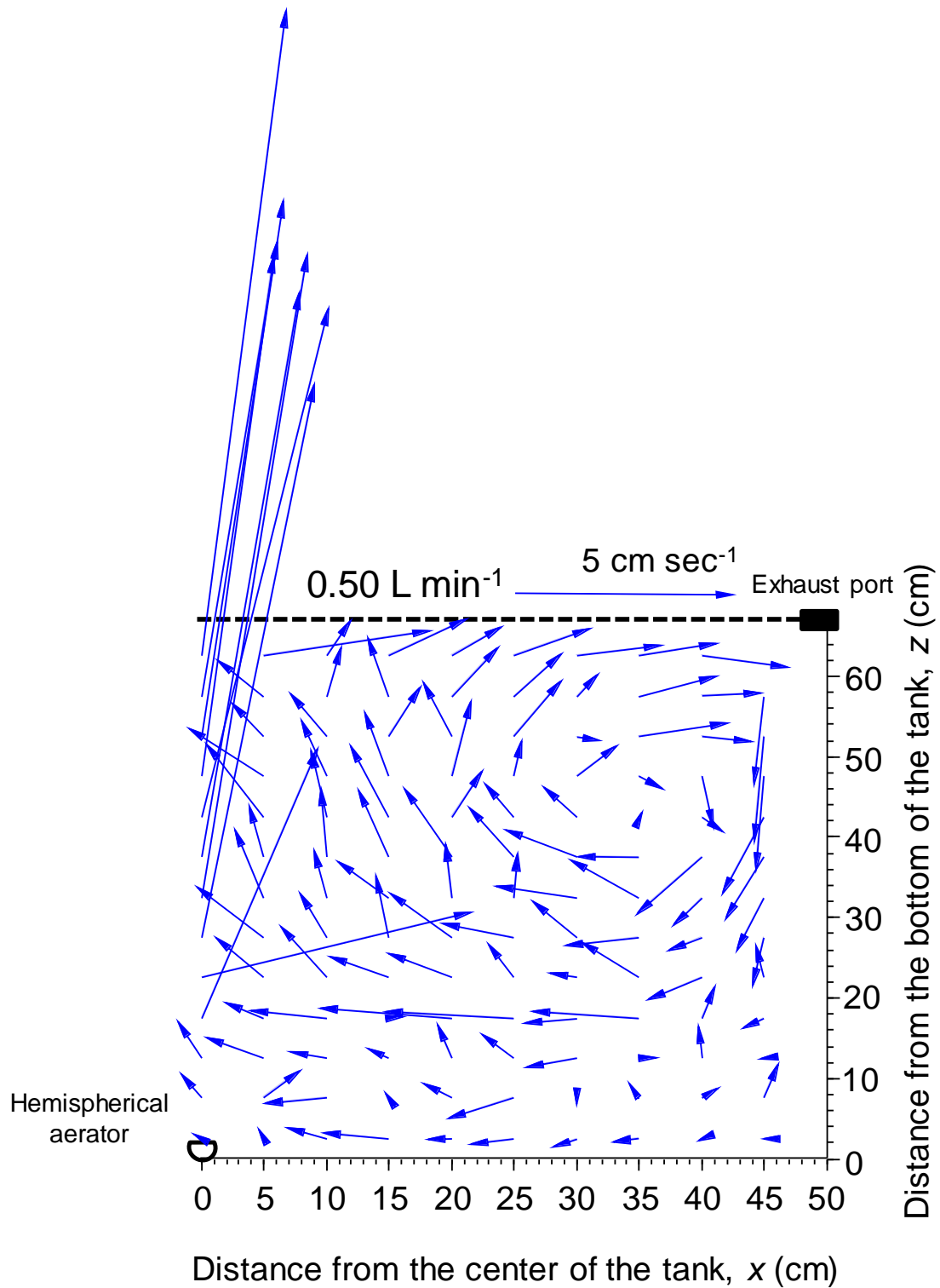
**Fig. III-2-1.** Current velocity distribution in a rearing tank at 0.01 L min<sup>-1</sup> aeration and oxygenation rate. Cross-section of a 500-L round tank is shown. Arrow indicates mean flow velocity at the observation point in a rearing tank. Broken line indicates water surface.



**Fig. III-2-2.** Current velocity distribution in a rearing tank at  $0.05 \text{ L min}^{-1}$  aeration and oxygenation rate. Cross-section view of a 500-L round tank is shown. Arrow indicates mean flow velocity at the observation point in a rearing tank. Broken line indicates water surface.



**Fig. III-2-3.** Mean flow velocity distribution in a rearing tank at 0.10 L min<sup>-1</sup> aeration and oxygenation rate. Cross-section view of a 500-L round tank is shown. Arrow indicates mean flow velocity at the observation point in a rearing tank. Broken line indicates water surface.



**Fig. III-2-4.** Mean flow velocity distribution in a rearing tank at 0.50 L min<sup>-1</sup> aeration and oxygenation rate. Cross-section view of a 500-L round tank is shown. Arrow indicates mean flow velocity at the observation point in a rearing tank. Broken line indicates water surface.



速分布は、各試験区ともに上向きの上昇流が確認された。水槽の中央部（通気装置直上）の流速は、0.01 l/分区で 0.01～13.13 cm/秒、0.05 l/分区で 0.02～18.95 cm/秒、0.10 l/分区で 0.11～16.51 cm/秒および 0.50 l/分区で 0.17～16.10 cm/秒であった。水槽の中央部（通気装置直上）の水面下 5 cm の流速は、0.01 l/分区で 6.28 cm/秒、0.05 l/分区で 16.39 cm/秒、0.10 l/分区で 14.40 cm/秒、0.50 l/分区で 16.10 cm/秒であった。流速の最大値が確認された水深は、0.01 l/分区は水面下 15 cm、0.05 l/分区は水面下 30 cm、0.10 l/分区は水面下 20 cm および 0.50 l/分区は水面下 5 cm であり、いずれも水槽底部で遅かった。Fig. III-2-1 から III-2-4 に示すとおり、水面付近では水平方向の流れも確認された。水平方向の流れは側壁面で沈降流となり、下降した。各試験区ともに、時計回りの鉛直循環流が形成されたが、その循環流は、強通気区でより大きくなった。水槽底面では、0.50 l/分区を除き、多くの測定箇所では沈降流が確認されたが、一部では水平方向の弱い流れも観測された。一方、0.50 l/分区の水槽底面では、沈降流はほとんど確認されず、水槽中央部に向かう水平方向の流れが観測された。また、0.01 l/分区では、水深の約半分より以深で底層に向かう沈降流が観測された。水面下 5 cm の流速は、0.01 l/分区で 0.06～0.67 cm/秒、0.05 l/分区で 0.29～0.63 cm/秒、0.10 l/分区で 0.08～1.28 cm/秒および 0.50 l/分区で 0.96～2.73 cm/秒であった。

### III-2-3. 考察

本章第 1 節では、通気による飼育水の流動が、仔魚の空気呑み込み行動および鰾の開腔に影響を及ぼす可能性が考えられた。そこで、本節では、同一の油膜除去条件下で通気量が異なる試験区を設定し、通気量がマハタ仔稚魚の鰾の開腔に及ぼす影響について検討した。また、油膜除去期間中の通気量が、マハタ仔稚魚の生残と成長に及ぼす影響についても確認した。

鰾の開腔率は、本試験で設定した最も高い通気量である 0.50 l/分で有意に低下したことから、通気量が鰾の開腔に影響を及ぼすことが明らかとなった。Acoustic Doppler velocimeter で各試験水槽における飼育水の流場（流向・流速）を測定した結果、水面下 5 cm の流速は、0.50 l/分区で 0.96～2.73 cm/秒を示し、他試験区より速い傾向がみられた。また、0.50 l/分区では、目視観察で、油膜除去期間中に仔魚が水面を突く行動が確認されたが、他試験区と比較して水流で流される仔魚が多かった。人工飼育下におけるマハタ仔魚の遊泳速度は、孵化（0 日令）から 13 日令（体長 3.2 mm）および 24 日令（体長データなし、25 日令で体長 6.9 mm）まで、孵化時と変わらない  $1.35 \pm 0.60$  cm/秒付近であり、仔魚の相対遊泳速度は、孵化時 ( $7.9 \pm 3.6$  mm/体長/秒) より 13 日令および 24 日令（データなし、グラフからの読み取り値でおよそ 3.0～3.5 mm/体長/秒）で有意に遅くなることが報告されている（Sabate et al. 2009）。油膜除去期間中の仔魚の遊泳速度および本研究の通気量 0.50 L/分区における水面付近の流速（0.96～2.73 cm/秒）を考慮すると、同区の水面の一部あるいは大部分は、仔魚の遊泳速度を上回る流速であったと推定された。これらのことから、仔魚の遊泳速度を上回る水面付近の速い流速で仔魚は水面に定位できず、水面から離される機会が増加し、それに伴い仔魚の空気呑み込み行動が阻害され、鰾の開腔率が低下した可能性が高いと考えられた。

同様の現象は他魚種でも確認され、通気量あるいは注水による水面の動静が、仔魚の水面での空気呑み込みを阻害し、鰾の開腔に影響を及ぼすことが報告されており（北島ら 1981；Kitajima et al. 1994；Chatain and Ounais-Guschemann 1990；Summerfelt 2013；林田ら 1984；Battaglione and Talbot 1990；照屋ら 2009；橋本ら 2012）、本研究の結果を支持すると考えられる。したがってマハタ仔魚で鰾の開腔を促進するには、Pre-flexion ステージにおける油膜除去だけでなく、その間の通気量（水面流速）にも注意を払うべきである。少なくとも、油膜除

去期間中の飼育水面の流速を、通気量 0.01 および 0.05 l/分区で測定された流速 0.67 cm/秒以内に維持することで、鰾の開腔促進が期待できると言える。同時に、油膜除去期間中の水面流速が、鰾の開腔が阻害される基準となる 0.96~2.73 cm/秒 (0.50 l/分区) 以上にならないよう、注意すべきである。ただし、Sakakura et al. (2007a) は、孵化から仔魚期初期 (9 日令) までの試験において、無通気による飼育で生残率が著しく低下することを示していることから、無通気飼育は避けるべき可能性がある。なお、本節では、500-l ポリエチレン水槽を用いて異なる通気量がマハタ鰾の開腔に及ぼす影響を実験的に検証したが、通気で発生する水流の速さおよび流向は、飼育水槽の規模や水量、通気方法で異なる可能性がある。したがって、今後は実際にマハタの種苗生産を実施する飼育環境で通気量と流速の関係を把握することが必要である。

試験終了時の平均生残率は 3.6% から 10.2% を示し、試験区間で統計的有意差はみられなかった。しかし、各試験区の最高生残率は、通気量 0.01 l/分区で 7.1%、0.05 l/分区で 5.6%、0.10 l/分区で 14.1% および 0.50 l/分区で 18.3% を示し、0.10 l/分区 および 0.50 l/分区 で生残率が高くなる傾向がみられた。一方でマハタを含むハタ科魚類では、水槽内の通気量 (流速) が、孵化から 6~14 日令までの仔魚の生残に及ぼす影響について検討されており、過剰な通気で生残率あるいは成長率が低下することが報告される (塩谷ら 2003 ; Sakakura et al. 2007a ; Yamaoka et al. 2000 ; Ching et al. 2014 ; Toledo et al. 2002)。このうち、マハタでは、水槽内の通気量 (流速) が、孵化から仔魚期初期 (9 日令) までの仔魚の生残に及ぼす影響について検討されており、1 kl および 100 kl 円形水槽内の通気量を 200 ml/分 および 630 ml/分に設定し、通気装置直上の流速を約 8 cm/秒、水面付近で約 6 cm/秒にすることで、生残率が向上する (Sakakura et al. 2007a)。また、Sabate et al. (2009) は、1 kl 水槽を用いたマハタの人工飼育において、26 日令まで通気量 200 ml/分で飼育し、27 日令以降から 65 日令まで、仔魚の成

長に応じて飼育水の通気量を段階的に 600 あるいは 800 ml/分まで増加することで、生残率が向上する可能性を示唆している。一方、1 kl 円形水槽で、通気量を 1,000 ml/分に設定した試験区では浮上死が多発し、9 日令までの生残率が低下する傾向が示されている (Sakakura et al. 2007a)。Sakakura et al. (2007a) は、この設定での流速を測定していないが、通気量を 900 ml/分に設定した同型水槽では (塩谷ら 2003)、通気装置直上の流速が 20 cm/秒と推定されることから (図からの読み取り値)、少なくとも 20 cm/秒以上の流速であると推定される。これらの既報と本研究では、飼育水の通気量が仔魚の生残に及ぼす影響を検討した仔魚の日令および発育時期が異なることから、その関係性を単純に比較することはできない。しかし、Sakakura et al. (2007a) の試験では、通気量 200 ml/分と 1,000 ml/分間の通気量を設定していないため、この間に仔魚の生残に適した通気量 (流速) が存在するかもしれない。本研究の 0.10 および 0.50 l/分区では、通気装置直上で最大 16.51 および 16.10 cm/秒の流速が確認されるとともに、水槽内のその他測点でも他試験区より強い水流が確認されることから、これら試験区の水槽全体の水流 (流速) 条件が、仔魚の生残に適している可能性も考えられる。

強通気で仔魚期初期 (6~9 日令) の生残率が低下する要因として、他のマハタ科魚類では、通気量の増加に伴う仔魚の摂餌効率の低下 (Toledo et al. 2002) あるいは強通気で特に通気装置上の鉛直方向周辺に強水流と気泡が発生し、これらに伴う物理的ストレスが仔魚の浮上死を引き起こす可能性が指摘される (Sakakura et al. 2007a)。その一方で、Yamaoka et al. (2000) は、水槽内の適切な通気量 (流速) は、浮上死に繋がる水面張力に捕らわれた仔魚を解放し、浮上死を防止すると推察している。このように、マハタの仔魚期における飼育水の通気量と浮上死は密接に関連していると考えられる。本研究では、日間の浮上死尾数を計数しておらず、11 日令以降の異なる通気量が、浮上死に及ぼした

影響は不明である。今後、10日令以降の浮上死に及ぼす通気量の影響を把握することで、通気量の調節で仔魚の生残率が向上する可能性がある。また、平田ら(2009a)は、鰾が未開腔のマハタ仔魚では、鰾伸長開始期(水温26°Cでおよそ13日令)以降に体比重が著しく増大することを明らかにしていることから、浮上死だけでなく、体比重の増加と関連した仔魚の沈降に通気量が影響する可能性も考えられる。これらのことから、今後、マハタの人工飼育下における最適な飼育水の通気量(流速)を追求することで、さらなる生産効率の向上が見込まれる。

本研究では、通気量0.50 l/分区における仔魚の全長は、10, 14, 20, 41, 49日令および試験終了時では、0.01 l/分区と比較して有意に小さい値を示した。チャイロマルハタ *Epinephelus coioides* では、通気量の増加に伴う仔魚の摂餌効率の低下で成長が劣る可能性が指摘されるが(Toledo et al. 2002)、マハタの人工飼育下では、高い生残率と高密度のパッチに伴う、負の密度効果で成長が劣る可能性が示唆される(Sakakura et al. 2007b)。また、本章第1節で考察したが、他魚種では、鰾が未開腔の幼魚は、開腔した幼魚と比較して成長が劣ることが指摘されており(Jacquemond 2004b; 橋本ら 2012; Chatain 1989; Kurata et al. 2013; Jacquemond 2004a)、このことは、マハタでも鰾の一次開腔促進で成長が向上する可能性を示唆している。本研究においても、鰾の開腔率は、通気量0.01 l/分区と比較して0.50 l/分区で有意に低いことから、鰾の開腔率の差が成長差の原因になっている可能性がある。したがって、飼育水の通気量、摂餌効率、生残率、密度効果、鰾の開腔率および仔魚の成長は複雑に関連していると考えられた。

本研究では、油膜除去期間中(11~20日令)を含む11日令から27日令の異なる通気量が、主にマハタ仔稚魚の鰾の一次開腔および生残に及ぼす影響を検討した。強通気飼育で鰾の一次開腔率が低下する一方、生残率が高くなる傾向

があることから、通気量が両者に及ぼす影響はトレードオフの関係にある可能性が明らかになった。鰾が一次開腔していない個体で脊椎骨の屈曲率が高く(第2章および本章第3節)、このような形態異常魚は養殖用種苗として価値がないことから、マハタの人工種苗生産工程では、生残率より鰾の一次開腔率の向上を優先すべきであり、少なくとも油膜除去期間中は、生残に悪影響を及ぼさない範囲で可能な限り通気量を抑え、鰾の一次開腔を促進することが重要であると考えられた。

### 第3節 鰾の開腔と形態異常

#### III-3-1. 材料および方法

第3節では、第1節で実施した鰾の開腔条件を検討する試験(試験2および3)において、人工飼育下における飼育環境調整で鰾の一次開腔が促進された個体について、これら形態異常の低減効果に再現性がみられるか検討した。第3節の材料および方法は、第1節の内容に共通するため、新たな追加点のみを以下に記す。

##### a) 標本採集

第1節で実施した、鰾の開腔条件を検討する試験の終了時において、全長の測定終了後、標本を直ちに $-21^{\circ}\text{C}$ から $-20^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存し、後日軟X線調査で骨異常を評価した。

##### b) 骨異常の評価

試験2および3では、標本は軟X線撮影装置を用いて写真撮影し、脊柱の骨の

構造を第Ⅱ章と同じ方法で観察した。標本の形態異常は、脊椎骨屈曲（前彎症または後彎症）および椎体の変形に分類した。試験 2 および 3 の各試験区における、試験終了時の脊椎骨屈曲および椎体の変形率を Fig. III-3-1 および III-3-2 に示した。また、試験区に関係なく、鰻の一次開腔個体および未開腔個体で脊椎骨屈曲および椎体の変形率を比較した (Fig. III-3-3)。鰻の一次開腔個体または未開腔個体の両方の標本について、屈曲が確認された脊椎骨の番号の頻度分布を試験区に関係なく形態異常の分類毎に比較した (Fig. III-3-4)。標本個体毎に脊椎骨を計数し、尾に向かって 1 から 22 番まで番号を付けた。形態異常の脊椎骨を特定し、各形態異常の椎体を数えた。頻度 (%) は、試験 2 または 3 の各形態異常の椎体の総数を標本数 ( $n=1114$  (試験 2) および  $n=470$  (試験 3)) で除算して計算した。

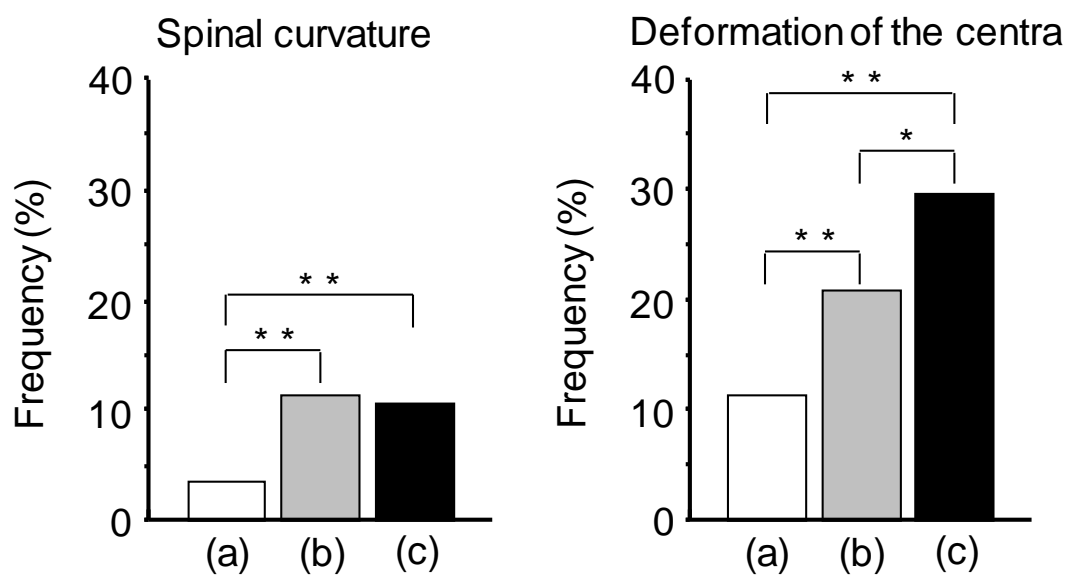
### c) 統計分析

脊椎骨の屈曲および椎体の変形 (Figs. III-3-1, III-3-2) における差異を確認するため、William's の補正を伴う G-test (Sokal and Rohlf 1983) および事後検定として Ryan's multiple range test を使用した。また、試験区に関係なく、脊椎骨の屈曲および椎体の変形について、鰻の開腔または未開腔の標本を比較し、統計的有意を G-test で確認した (Fig. III-3-3)。 $P < 0.05$  の場合に差が有意とした。

## III-3-2. 結果

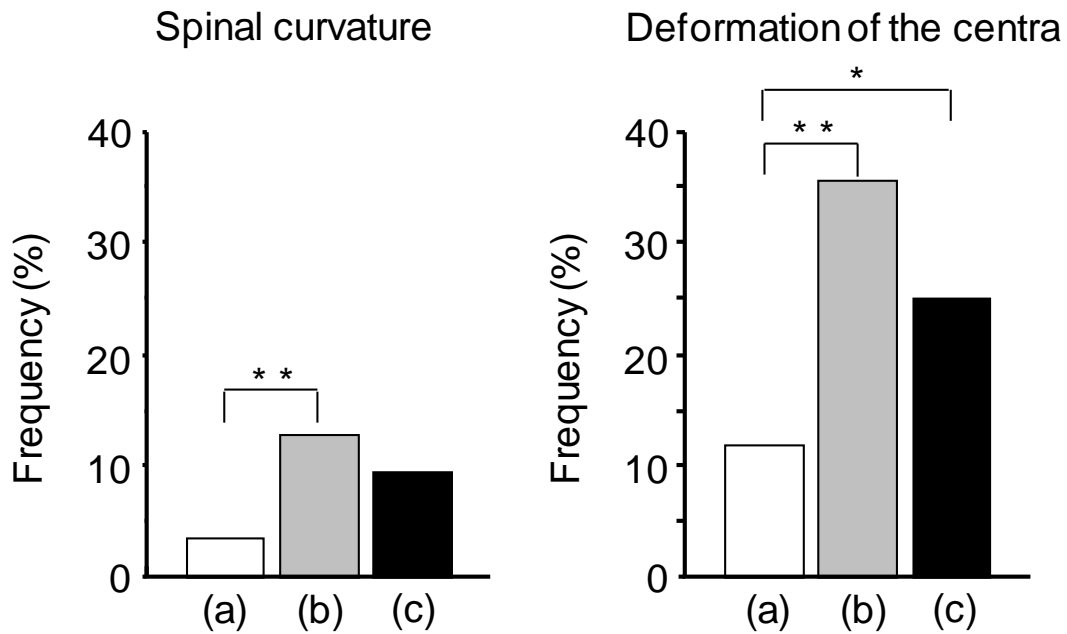
### a) 鰻が開腔した仔稚魚の頻度および開腔率と骨異常との関係

試験 2 および 3 の脊椎骨屈曲率は、ROF グループで 3.6% および 3.4% であり、COF グループの 11.3% および 12.7%，および SLP グループの 10.8% および 9.6% と比較して有意に低かった ( $P < 0.01$ , Figs. III-3-1, III-3-2)。試験 2 および 3 の

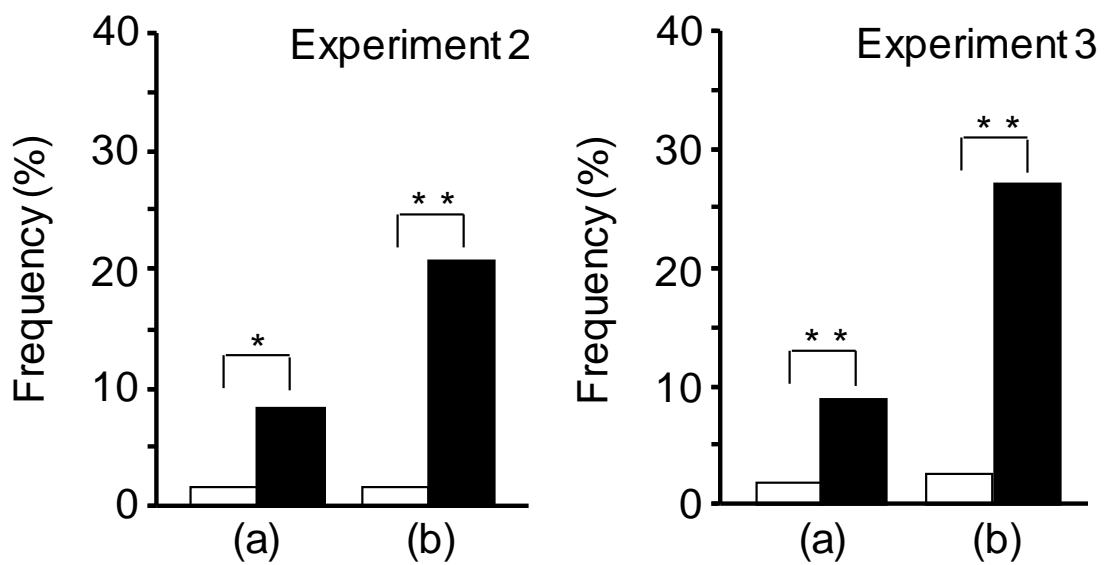


**Fig. III-3-1.** Frequency of spinal curvature and deformation of the centra at the end of the experiments in Experiment 2. (a) Removal of the oily surface film and/or autogenous surface substances (ROF group). (b) Covering of water surface with oil film (COF group). (c) Sealing of water surface with liquid paraffin (SLP group). Double asterisk: Significant difference between the two groups at  $P < 0.01$ . Single asterisk: Significant difference between the two groups at  $P < 0.05$ .





**Fig. III-3-2.** Frequency of spinal curvature and deformation of the centra at the end of the experiments in Experiment 3. (a) Removal of the oily surface film and/or autogenous surface substances (ROF group). (b) Covering of water surface with oil film (COF group). (c) Sealing of water surface with liquid paraffin (SLP group). Double asterisk: Significant difference between the two groups at  $P < 0.01$ . Single asterisk: Significant difference between the two groups at  $P < 0.05$ .



**Fig. III-3-3.** Comparison of frequencies between specimens with and without inflated swim bladders and those with spinal curvature and deformation of the centra in Experiments 2 and 3. Open columns: Inflated swim bladder; closed columns: uninflated swim bladder. (a) Spinal curvature and (b) deformation of the centra. Double asterisk: Significant difference between fish with inflated and uninflated swim bladders at  $P < 0.01$ . Single asterisk: Significant difference between fish with inflated and uninflated swim bladders at  $P < 0.05$ .



椎体の変形率は、ROF グループで 11.5%および 11.9%であり、COF グループの 20.8%および 35.7%、および SLP グループの 29.6%および 25.0%と比較して有意に低かった ( $P < 0.05$ , Figs. III-3-1, III-3-2)。

脊椎骨屈曲率は、試験 2 の鰐の開腔個体で 1.6%、鰐の未開腔個体で 8.5%、試験 3 の鰐の開腔個体で 1.8%、鰐の未開腔個体で 8.9%を示し、いずれも鰐の開腔個体で有意に低かった ( $P < 0.05$ , Fig. III-3-3)。また、椎体変形率は、試験 2 の鰐の開腔個体で 1.6%、鰐の未開腔個体で 20.8%、試験 3 の鰐の開腔個体で 2.7%、鰐の未開腔個体で 27.0%を示し、いずれも鰐の開腔個体で有意に低かった ( $P < 0.05$ , Fig. III-3-3)。

屈曲が確認された脊椎骨の番号の頻度分布を Fig. III-3-4 に示す。鰐が一次開腔していない標本では、前彎症椎体の最頻値は、16 番椎体の 6.3% (試験 2) および 15 番椎体の 2.8% (試験 3)。一方、鰐が一次開腔した標本では、前彎症は 16 番および 22 番椎体の間に位置しており、合計頻度は 0.1% (試験 2) および 0.2% (試験 3) であった。鰐が一次開腔していない標本では、後彎症椎体の最頻値は、7 番椎体の 0.5% (試験 2) および 5, 6 番椎体で 1.1% であった。鰐が一次開腔した標本の後彎症率は 0% (試験 1) および 3 番から 5 番椎体の間で 0.2% (試験 2) であった。試験 3 では、鰐が開腔した 111 個体のうち 1 個体において (0.9%)、後彎症は 3 番から 5 番椎体の間で鰐に接触していることが観察された。鰐が一次開腔していない標本では、変形した椎体の最頻値は、16 番椎体の 12.5% (試験 2) および 17 番椎体で 6.2% (試験 3) であった。鰐が一次開腔した標本では、椎体の変形は、3 番から 18 番椎体の間の幾つかの椎体で最高 0.4% の頻度で観察された。

### III-3-3. 考察

本研究では、試験終了時における脊椎骨屈曲および椎体変形の出現率は、油膜除去を実施した ROF グループで有意に低かった。また、試験区に関係なく、脊椎骨屈曲および椎体変形の出現率は、鰾の一次開腔個体で未開腔個体より有意に低かった。したがって、鰾の一次開腔促進で、脊椎骨屈曲および椎体の変形率が低減されることの再現性が確認された。本章の第 1 節では、油膜または自原性表面物質の除去が、鰾の一次開腔の促進に効果的であることを明らかにしたが、本節では、それらが鰾の一次開腔促進で、仔稚魚期における脊椎骨屈曲および椎体の変形の出現防止が可能であることを明らかにした。

本章の第 1 節では、鰾が開腔しないことで起こる沈降死で生残率が低下する可能性を指摘したが、鰾が開腔しない場合、形態異常の出現率が高くなり、仔魚の選択的死亡率が高まって生残率が低下する可能性が考えられた。他魚種では、深刻な脊髄の形成異常（Barahona-Fernandes 1982）あるいは後彎症（Koumoundouros et al. 2002）は致命的であることが報告されている。本研究では、ROF グループにおける脊椎骨屈曲および椎体変形の出現頻度は、他のグループより有意に低かった。また、脊椎骨屈曲および椎体変形の出現頻度は、鰾が未開腔の個体で有意に高かった。したがって、COF および SLP グループで浮上死は発生しなかったが、これらのグループでは、鰾の未開腔による深刻な形態異常で仔魚の大量死が引き起こされ、結果として試験区間で生残率に差異がなくなった可能性が高い。このことは浮上斃死防止にまして沈降死防止がマハタ人工種苗の生産効率向上に有効であることを意味する。

また、試験 3 の ROF グループでは、鰾の開腔率は 20 日令以降に増加傾向がみられた。この現象は、鰾の未開腔による仔魚の死亡で引き起こされた可能性がある。本研究では、鰾の一次開腔の開始時期における仔魚の発育ステージのみが特定されたが、鰾の一次開腔が可能な期間、いわゆる“window”（Summerfelt 2013）は特定しなかった。しかし、この“window”は、概ね無気管鰾魚では

Pre-flexion ステージの前半に相当する (Koumoundouros 2010)。また、上述のとおり、マハタは無気管鰾魚であると考えられ、20 日令での仔魚の発育ステージは、主に Pre-flexion ステージの後半であると推察されることから、20 日令まで鰾が未開腔の仔魚が、20 日令から試験終了時まで一次開腔した可能性はほとんどない。一方でこの時点で鰾の二次開腔が確認されないことから、試験 3 における個体の開腔は仔魚期初期の一次開腔に違いない。他魚種では、鰾の開腔率が増加する現象は、機能的な鰾を持たない仔魚の死亡率が高まる結果であると推察され (北島ら 1981 ; Battaglione and Talbot 1990)、我々の研究でも同様である可能性がある。

鰾が一次開腔していないマハタでは、前彎症および椎体の変形は 15 番から 18 番椎体の間 (尾椎) で多発していた。反対に、後彎症はほぼ全ての脊椎骨で発生したが、頻度は低かった。一方、本種の鰾が一次開腔していない個体では、前彎症は概ね腹椎と尾椎の間 (8~11 番椎体) の位置で発生することが既に明らかとなっている (Nagano et al. 2007)。本研究で確認された前彎症椎体の位置が、既報で報告される位置と異なることは注目に値する。鰾が一次開腔していない魚において、ヨーロッパシーバスまたはヨーロッパヘダイ (Chatain 1994 ; Andrades et al. 1996) では、前彎症は、主に腹椎と尾椎の間の位置で発生する。対照的に、スズキ *Lateolabrax japonicus* (Kitajima et al. 1994 ; 林田ら 1984) およびクロダイ *Acanthopagrus schlegeli* (北島 1979) では、前彎症は主に腹椎で発生する。また、鰾が一次開腔あるいは飼育開始時に鰾の開腔が確認された個体でも、ヨーロッパシーバス、マダイ稚魚およびタイセイヨウダラでは、激しい遊泳行動あるいは高水温の飼育条件下で、尾椎で前彎症が現れる (Divanach et al. 1997 ; Kihara et al. 2002 ; Sfakianakis et al. 2006 ; Helland et al. 2009 ; Sfakianakis et al. 2013)。したがって、脊椎骨屈曲の位置は、その誘発要因や魚種により異なると推察される (末廣ら 2004)。鰾が一次開腔していないマハタ稚魚におい

て、尾椎で前彎症が発生する機構は未だ不明である。しかし、鰻が開腔していない稚魚は、体の沈下に対応するため、沈下傾向に対して対応するため、体の後部で筋肉活動が増大することから (Divanach et al. 1997)、鰻が一次開腔していないマハタでの尾椎における前彎症の誘発は、そのような筋肉活動が原因である可能性がある。

本研究では、尾椎で前彎症が多発した椎体の位置が、椎体の変形が発生した位置とほぼ一致した。変形した尾椎の椎体が尾椎における前彎症の兆候であることが指摘されていることから (Sfakianakis et al. 2006)、椎体の変形は、飼育条件次第 (例えば激しい遊泳行動) で前彎症が誘発される弱点になり得る。したがって、この異常の出現を防止するためのさらなる研究が必要であると考えられる。

脊椎骨の形態異常 (脊椎骨屈曲および椎体の変形) の頻度は、鰻が一次開腔しているマハタで非常に低かった。前彎症は尾椎で発生し、一方、後彎症は腹椎の前半で発生し、椎体の変形は幅広く発生した。飼育されたタイセイヨウダラでは、後彎症は、鰻のオーバーインフレーションによる脊索への圧迫で引き起こされる可能性が報告される (Grotmol et al. 2005)。本研究でも、後彎症は第3椎体~5椎体で鰻に接触していることが確認されている。しかし、試験3におけるそのような異常は僅か0.9%であり、試験2で確認されなかったことから、この時期のマハタでは後彎症はまれな異常であると考えられた。一方で腹椎の後彎症は死亡率が高く、深刻であることから (Koumoundouros et al. 2002)、初期飼育期間中 (受精卵孵化から全長約3 cm まで) におけるこの異常の出現傾向を確認する必要がある。

本研究の結果から、鰻の一次開腔促進が、形態異常、特に脊椎骨屈曲および椎体の変形の防止に有効であることは間違いないと考えられた。

## 第IV章 給餌量および流速と稚魚の形態異常

### IV-1. 諸言

ヨーロッパシーバス、マダイおよびタイセイヨウダラでは、稚魚期の不適切な飼育環境で前彎症が増加することが知られる (Divanach et al. 1997 ; Kihara et al. 2002 ; Sfakianakis et al. 2006 ; Helland et al. 2009)。本章では、マハタ稚魚期の給餌量と飼育水の通気方法で異なる流動が人工種苗の形態異常（特に脊椎骨の屈曲）の出現に及ぼす影響を検討することを目的に飼育試験を行った。

現在、三重県では、初期飼育期（受精卵～全長約 3 cm）が終了後、大小選別を行い、引き続き陸上水槽で稚魚の中間育成を行い、VNN ワクチン（オーシャンテクト VNN, 日生研, 東京）を接種後、全長約 13 cm で海面生簀に収容する。その後、全長約 15 cm まで継続飼育を行い、受精卵から約 6 か月の飼育期間を経て人工種苗を養殖業者に出荷している。しかし、この間に人工種苗の骨異常が頻発し、このような形態異常は、本種の養殖における生産効率を低下させるとともに、市場での種苗の価値を損ねる大きな問題となっている。

鰮が未開腔のマダイ稚魚では、前彎症の出現率は、強制的遊泳状態で増加することが知られ (Chatain 1994)、一方、ヨーロッパシーバス、マダイおよびタイセイヨウダラでは、鰮の一次開腔あるいは飼育開始時に鰮の開腔が確認される稚魚でさえ、激しい遊泳行動で前彎症が発生する (Divanach et al. 1997 ; Kihara et al. 2002 ; Sfakianakis et al. 2006 ; Helland et al. 2009)。したがって、鰮の開腔率が低いマハタでは、不適切な飼育水の流場が脊椎骨屈曲を引き起こす可能性が高い。

タイセイヨウダラでは、椎骨の形成が開始する時期において、餌料の過食、



あるいは便秘で消化管が過剰充填となり、これにより鰾と脊索の間の圧迫が増大し、脊索を上方へ持ち上げることで脊索の屈曲が引き起こされる可能性が指摘されている (Grotmol et al. 2005)。また、ブリ 2 歳魚では、餌料の飽食給餌、高い成長率あるいは性成熟が前彎症の出現と関連する可能性が指摘される (林 1990 ; 竹丸 2009)。これらの研究と魚の発育時期は異なるが、経験上、マハタ稚魚期においても、飽食給餌で消化管が充満され、腹部が膨張することを外観観察から確認している。したがって過剰量の餌料摂餌で消化管が膨張し、鰾あるいは直接脊椎骨を圧迫することで脊椎骨の屈曲を引き起こした可能性がある。また、マダイやスズキでは、鰾の未開腔個体は浮力調節機能の欠如から体比重が増加し、遊泳行動が変化することで脊椎骨屈曲が発生する可能性が指摘される (北島ら 1981 ; 林田ら 1984)。

本研究では、マハタ種苗の形態異常を低減するため、稚魚の脊椎骨屈曲の出現に及ぼす配合飼料の給餌量および通気方法で異なる飼育水の流動の影響を検討した。さらに、成長と生残率に対する、これら飼育条件の影響を調査し、実験結果を基に、稚魚期における適切な飼育条件を検討した。

## IV-2. 材料および方法

### a) 供試魚

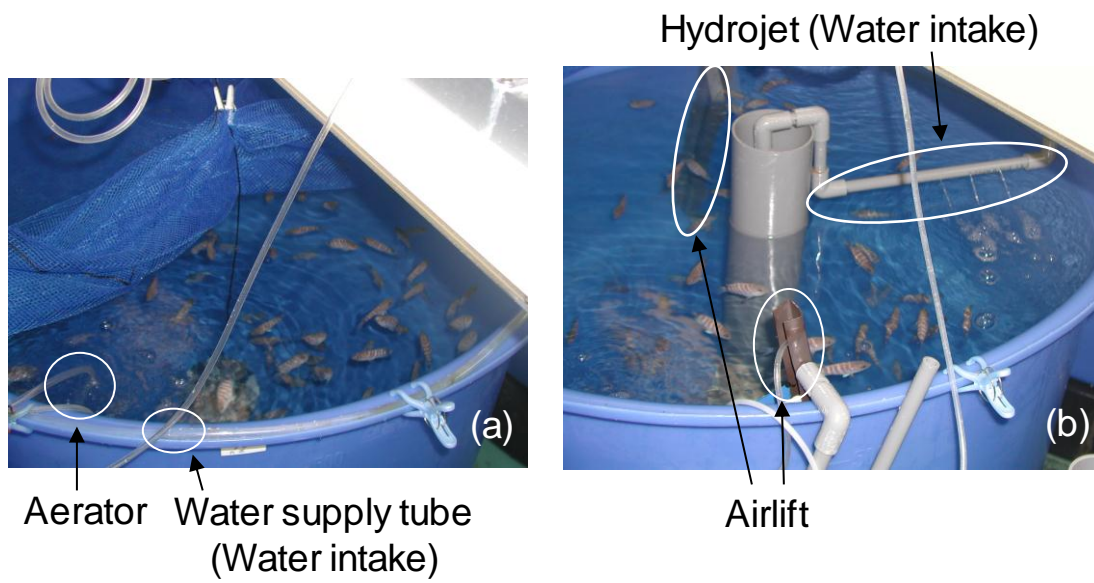
第 II 章の手順に基づき、7 尾の天然雄親魚 (体重 8.1~18.1 kg) と人工孵化した 1 尾の雌親魚 (4.5 kg) で人工授精を実施した。2010 年 5 月 17 日に、親魚に胎盤性性腺刺激ホルモン (hCG ; ゴナトロピン 5000, あすか製薬, 東京) を筋肉内に投与した。5 月 19 日に、雌から搾出した卵と 7 尾の雄から採取した精液を人工授精した。浮上卵を等分して第 III 章第 1 節の飼育方法 (油膜および、または自原性表面物質の除去 : ROF グループ) に相当する飼育に使用した。種苗

生産は、5月20日から7月21日（61日令）、または7月22日（62日令）まで行った。1,519尾の人工種苗を生産し、そのうちの800尾の人工種苗を本研究に用いた。

## b) 試験区の設定と稚魚の飼育方法

### 試験1：給餌量の影響

稚魚期の給餌量の影響を検討するため、試験1は、次に示す2種類の異なる給餌量、体重の2%（A試験区：少量給餌）および体重の6%（B試験区：多量給餌）で稚魚に給餌を行った。飼育試験は、500-lポリエチレン水槽を用いて各試験区2反復で実施した。飼育試験は、8月27日（98日令）から10月4日（136日令）まで行った。各試験水槽に、100尾ずつ無作為に取上げた人工種苗（全長 $71.52 \pm 9.86$  mm、体重 $6.20 \pm 2.61$  g、 $n=52$ ）を収容した。海水は、飼育期間中に水槽容量の432%/日の換水率で供給した。なお、両試験区ともに、通気で発生する飼育水の流場が脊椎骨屈曲の出現に及ぼす影響を極力排除し、給餌量の影響を明確に把握するため、注水および通気による強水流の発生防止を目的に海水は各飼育水槽の側壁に沿って落水させ、2個の半球状の通気装置（通気および酸素）を側壁沿いの底層に設置した（Fig. IV-1a）。通気と酸素は、それぞれ0.5 l/分および0.2~0.3 l/分以下で維持した。水温は自然水温とした（23.3~26.2°C）。蛍光照明は7:00から18:00までとし（13時間明期/11時間暗期）、水面上の照度は200 luxに維持した。市販飼料（ノヴァ Jr.A および Jr.1、林兼産業、山口）は、8月28日（99日令）から10月3日（135日令）まで給餌した。日間給餌率（%体重/日=給餌量/（平均体重×生残尾数）×100）は、2%体重/日（A試験区）および6%体重/日（B試験区）とした。一日の給餌頻度は、A試験区（日間給餌率2%/回）で1回（08:30）、B試験区（日間給餌率1.2%/回）で5回（08:30、10:30、12:30、14:30 および 16:30）とした。



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

## 試験2：飼育水の水流通気量の影響

飼育水の通気方法で異なる流動が、稚魚期における脊椎骨屈曲の出現に及ぼす影響を検討するため、試験2では、3種類の異なる条件、第1に低速水流（B試験区；流速8.9 cm/秒）、第2に中速水流（C試験区；流速23.4 cm/秒）、第3に高速水流（D試験区；流速45.6 cm/秒）で稚魚の飼育を行った。一般的な飼育方法は試験1と同様であり、異なる点を以下に記す。試験2のB試験区は、試験1のB試験区と同一である。C試験区およびD試験区では、より強い水平方向の回転流を発生させるため、注水口にハイドロジェット（噴射）方式を採用した（Fig. IV-1b）。注水口を水面上に設置し、水面に対して斜めに注水するように方向付けた。さらに、底部に通気装置を取り付けた2個の小型樋（長さ80 cm、幅3.0 cm、深さ2.5 cm；エアリフト）を両側の側壁の対角線上に設置した（Fig. IV-1b）。通気は、C試験区およびD試験区でそれぞれ一か所につき1.5 l/分および5.0 l/分に維持し、酸素は、0.2～0.3 l/分に維持した。これらの飼育方法で水平方向の強い回転流を発生させた。各試験区の日間給餌率は6%で、一日の給餌頻度は5回とした（日間給餌率1.2%/回）。

### c) 飼育環境

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

### d) 標本採集と鰓の開腔の観察および骨異常の評価

試験開始時に無作為に取り上げた稚魚は、エチレングリコールモノフェニルエーテル（和光純薬工業、大阪）を用いて0.3～0.4 ml/lの濃度で3分間の麻酔を行い、全長、体長および体重を測定した（Tables IV-2, IV-3）。その後、こ

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

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

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

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

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

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

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

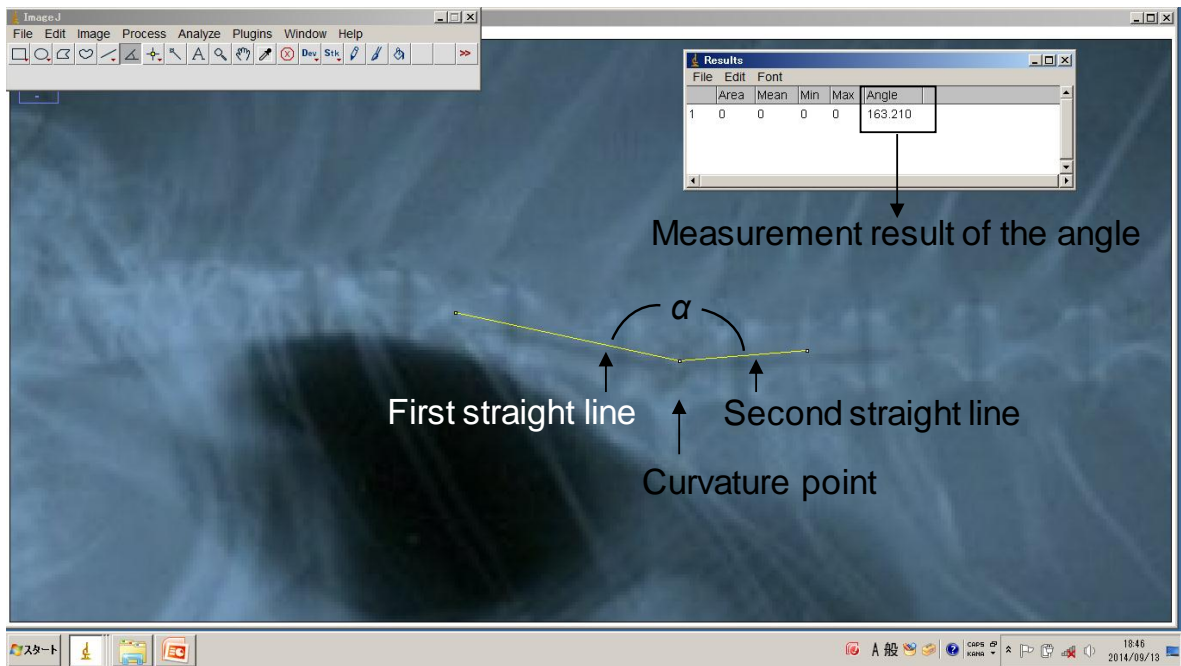
Timing (Days after hatching)	Treatment (Experimental group)	<i>n</i>	Total length (mm)	Body length (mm)	Body weight (g)	Survival rate (%)	Frequency of swim bladder inflation (%)	Condition factor	Daily feeding rate (%)
At the commencement of the experiment (98)	—	52	71.52±9.86 <sup>b</sup>	60.15±8.29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

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

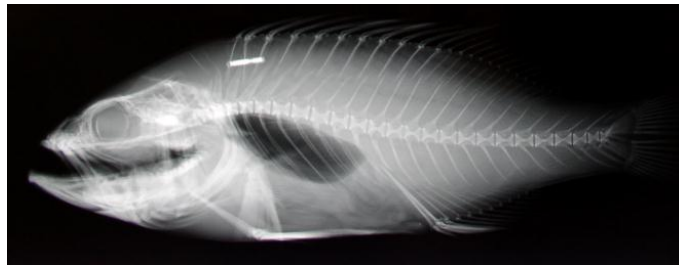
これらの標本は直ちに鰓の開腔率の調査および軟 X 線写真調査による骨異常の評価に使用した。日間給餌率を調査するため、中間測定時（120 日令）に各水槽から無作為に抽出した 5 尾の稚魚を採集し、麻酔した標本は直ちに体重の測定に使用した（Tables IV-2, IV-3）。採集した魚は、測定後に各水槽に戻し、測定に関連した死亡魚は確認されなかった。また、試験終了時に全ての水槽で生残した稚魚数を計数して生残率を求めた。一水槽につき 52～54 尾を採集し、全長、体長および体重を測定後、これら全ての標本は、Koumoundouros et al. (2000) の方法に従い、 $-21^{\circ}\text{C}$  から  $-20^{\circ}\text{C}$  で直ちに凍結保存し、後日軟 X 線調査による骨異常および鰓の開腔率の評価に使用した。肥満度（ $\text{体重}/\text{体長}^3 \times 10^3$ ）は、これらの測定値を用いて計算した。

標本の形態異常は、脊椎骨屈曲の前彎症および後彎症の 2 種類に分類した（第 III 章第 3 節）。脊椎骨屈曲の程度は、既報（Chatain 1994）を参考に、屈曲点と隣接する前方の椎体（あるいは一つ隣の椎体）の中心を繋げた第 1 直線および屈曲点と隣接する後方の椎体（あるいは一つ隣の椎体）の中心を繋げた第 2 直線との間の角度（ $\alpha \leq 180^{\circ}$ ）で示した（Fig. IV-2）。角度は、フリーソフトウェア“Image J”（Rasband 1997-2011）を用いて軟 X 線デジタル画像上で測定した。本研究では、16 尾の天然標本（全長約 25 cm）を標準標本とし（Fig. IV-3）、人工種苗における脊椎骨屈曲の基準は、天然標本における脊椎骨の最大屈曲角度に従い設定した。天然標本では、第 1～4 椎体はほぼ直線状に分布し、これらの屈曲角度は  $177.1 \pm 1.4^{\circ}$ （16 尾平均）であり、 $175^{\circ}$  以下の最大屈曲角度を伴う個体は確認されなかった。一方、第 5～24 椎体は緩やかに湾曲しており、これらの屈曲角度は  $172.7 \pm 1.6^{\circ}$  であり（16 尾平均）、 $170^{\circ}$  以下の最大屈曲角度を伴う個体は確認されなかった。したがって、第 1～4 椎体およびその他椎体では、それぞれ  $175^{\circ}$  以下および  $170^{\circ}$  以下の最大屈曲角度を脊椎骨屈曲と定義した。前彎症（Fig. IV-4a）および後彎症（Fig. IV-4b）の頻度は、各試験区の試験開始

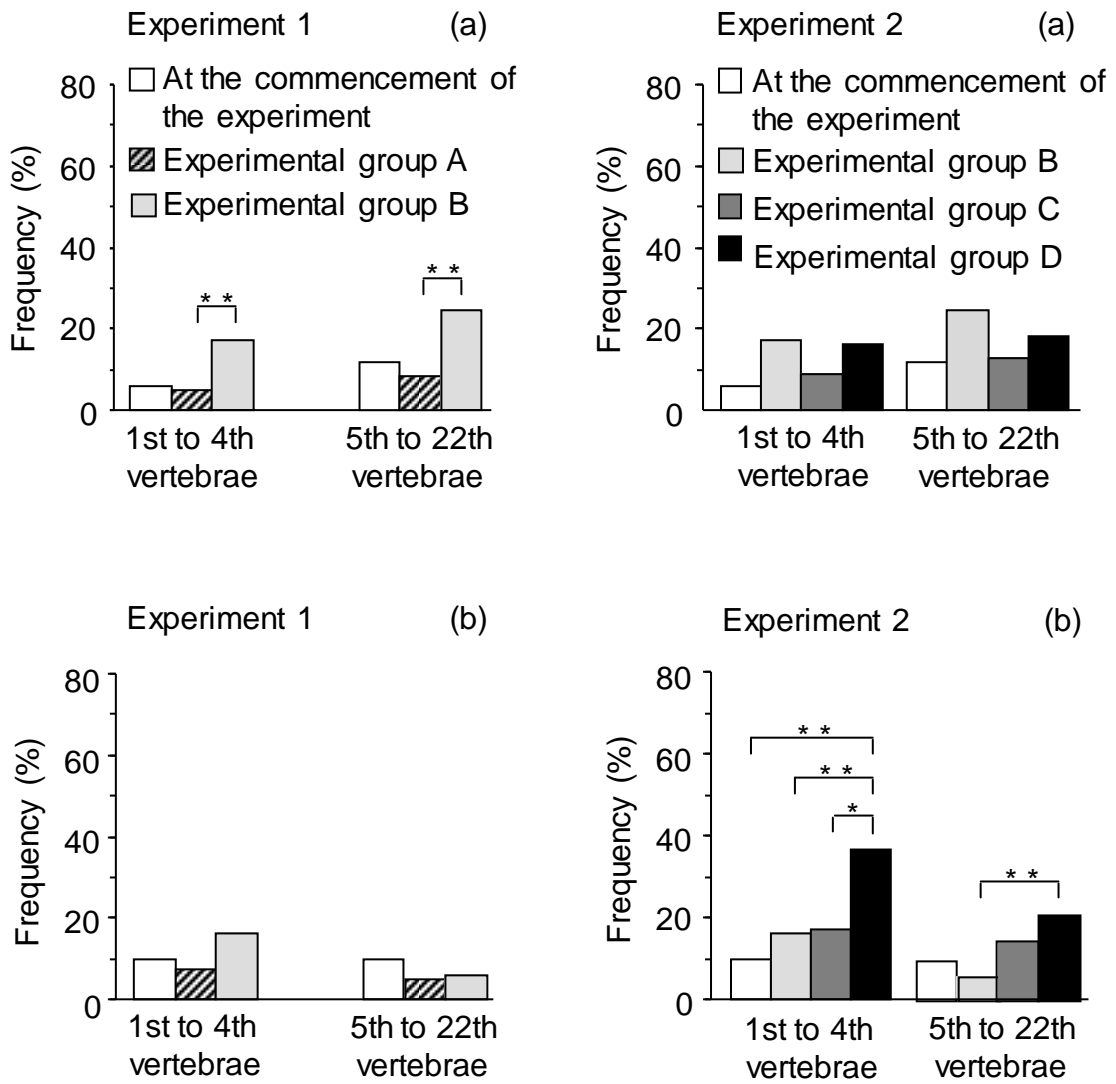




**Fig. IV-2.** Measurement of the bending vertebral angle in seven-band grouper juveniles using free software “ImageJ”.



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



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

時および試験終了時に比較した。試験開始時および試験終了時における標本の最大屈曲角度は、 $135^{\circ}$  から  $180^{\circ}$  まで  $5^{\circ}$  間隔で 9 段階に分類した。各角度帯での標本の脊椎骨屈曲の頻度 (%) は、全標本数 (試験開始時:  $n=52$ , 試験終了時:  $n=104\sim 106$ ) に対する当該標本数の割合で計算した (Tables IV-4, IV-5, IV-6, IV-7)。

鰓が開腔あるいは未開腔の標本において、前彎症あるいは後彎症の脊椎骨の頻度分布を各試験区の試験開始時および試験終了時に比較した (Fig. IV-5)。前彎症と後彎症を伴う脊椎骨を特定し、各形態異常の椎体を数えた。頻度 (%) は、各試験区の各形態異常の椎体の総数を標本数で除算して計算した。

#### e) 日間給餌率の推定と補正

中間測定時 (120 日令) および試験終了時 (136 日令) の平均体重および死亡尾数から算出した生残尾数の値を基に、これら測定時の各試験区における実際の日間給餌率を推定した。また、配合飼料の給餌量は、試験開始時 (98 日令) の稚魚の平均体重および各試験区で設定した日間給餌率 (2% または 6%) から算出したが、給餌量が一定のため、稚魚の成長とともに実際の日間給餌率が低下する。そこで、中間測定時の平均体重および生残尾数を基に、121 日令の給餌から各試験区の日間給餌率に補正した。

#### f) 飼育水の流速の測定

各試験区の飼育水の流速は、電磁流速計 (AEM-1D; JFE アドバンテック, 兵庫) を用いて測定した (Table IV-8)。流速は、A および B 試験区では、通気装置直上、通気装置反対側の側壁面および水槽中央部の水面と底層部で測定した (Fig. IV-6a)。また、C および D 試験区では、エアリフト前、エアリフトとエアリフトの間、中央排水パイプおよび注水口付近の水面と底層部に流速の観測

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

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

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

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

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

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

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

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

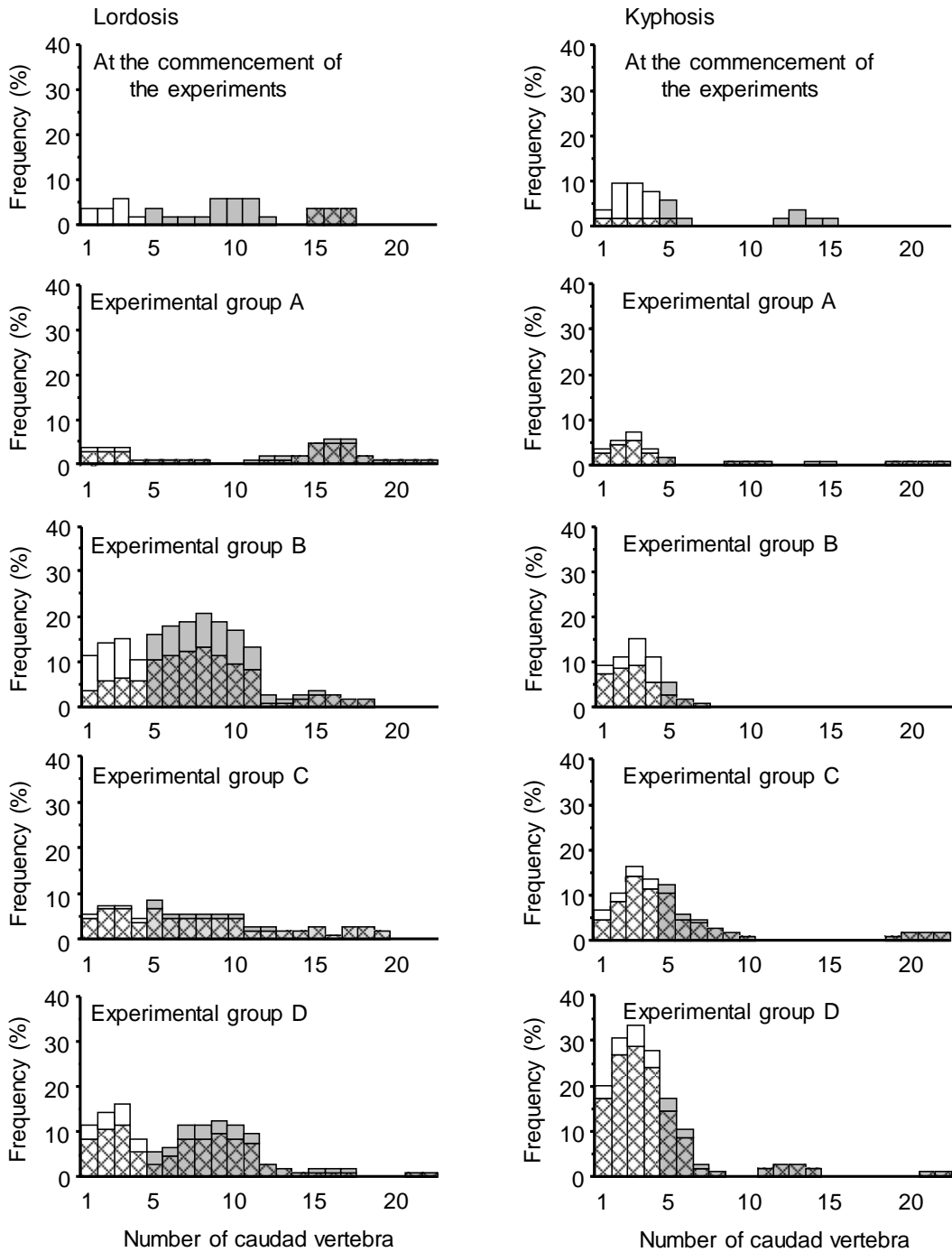
Different superscript letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

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

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

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



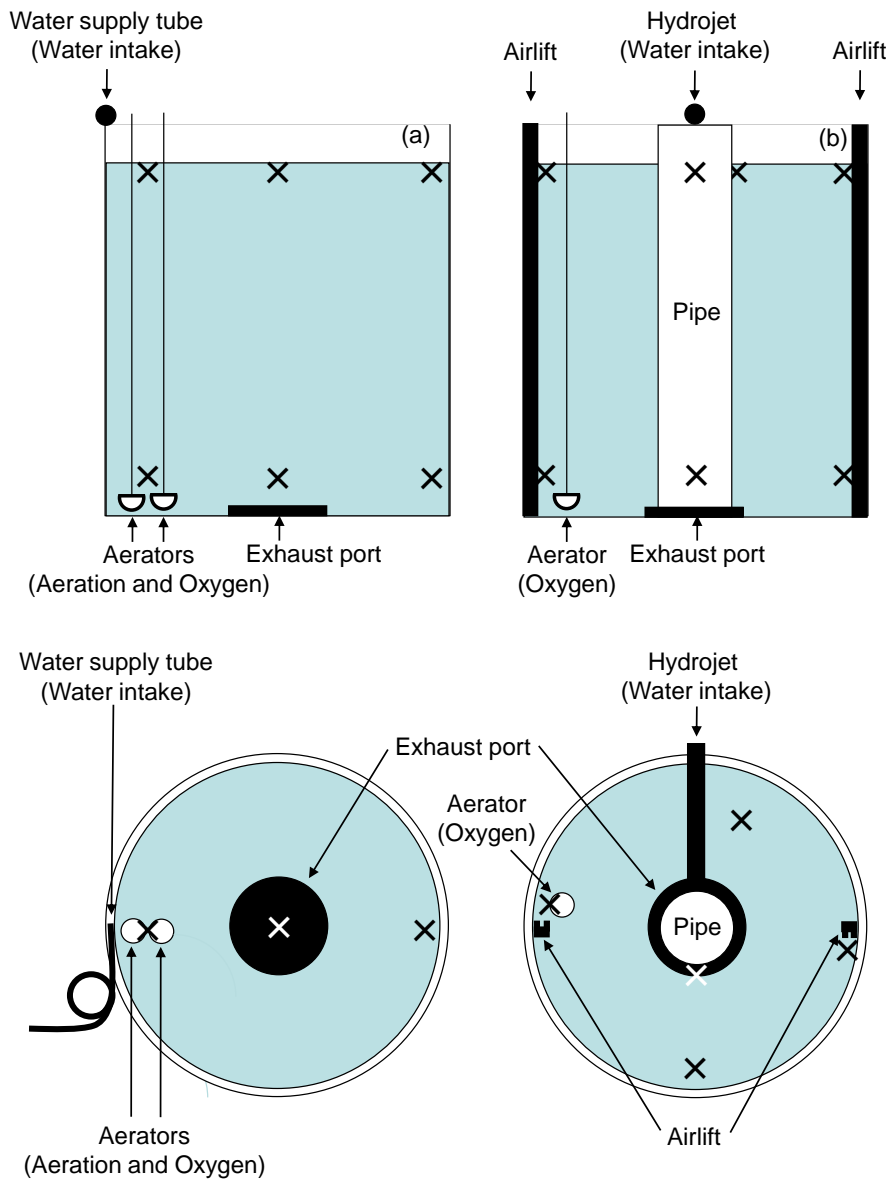


**Fig. IV-5.** Frequency distribution of the caudad number of lordotic and kyphotic vertebrae at the commencement (on 98 days after hatching) and at the end (on 136 days after hatching) of experiments in each Experimental group. Open columns: From the 1st to the 4th caudad numbered vertebra; grey columns: from the 5th to the 22th caudad numbered vertebra; lattice pattern: inflated swim bladder; non-lattice pattern: uninflated swim bladder.

**Table IV -8.** Continuous swimming time and maximum current at the commencement (at 98 days after hatching) of the experiments 1 and 2

	Experiment 1		Experiment 2		
	Small amount feeding (A)	Large amount feeding (B)	Low current velocity (B)	Middle current velocity (C)	High current velocity (D)
Continuous swimming time (sec)	6.43±11.37	5.11±4.64	5.11±4.64 <sup>c</sup>	35.31±34.47 <sup>b</sup>	87.08±73.72 <sup>a</sup>
Maximum current velocity (cm sec <sup>-1</sup> )	8.9	8.9	8.9	23.4	45.6

Continuous swimming time is presented as the mean ± standard deviation in each experimental group. Different superscript letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).



**Fig. IV-6.** Schematic drawing (top, side view; bottom, top view) of the experimental tanks and determination of water current velocity. (a) Experimental group A and B and (b) Experimental group C and D. In Experimental group A and B, current velocity was determined at the water surface and the bottom of right above aerators, the other side of aerators and the center of tank. In Experimental group C and D, the points of measurement were set at the water surface and the bottom in front of the airlift, between airlifts, around the center pipe and the water intake. Black or white crosses indicate the points of measurement. Measurement was conducted at the commencement of experiment, and the maximal value obtained was defined as the maximum current velocity.

点を設定した (Fig. IV-6b)。測定は試験開始時に行い、各試験区で測定された最大値を最大流速と定義した。

#### g) 連続遊泳時間の測定

各試験区での遊泳行動を評価するため、ある一定方向に対する稚魚の連続遊泳時間を測定した (Table IV-8)。連続遊泳時間は、無作為に抽出した標本が、一度方向転換してから再び方向転換するまでの時間と定義し、時間は、134 日令の 13:00 にストップウォッチで測定した ( $n=10$ /水槽)。

#### h) 統計分析

データの正規性 (Shapiro-Wilk test) および等分散性 (Bartlett test) が確認された場合は、全長、体長、体重、肥満度、日間給餌率および連続遊泳時間における差異を確認するため Tukey-kramer test を使用した (Tables IV-2, IV-3, IV-8)。これらのデータは、日間給餌率を除いてデータの正規性および等分散性が確認されなかった場合は、Steel-Dwass test を使用した (Tables IV-2, IV-3, IV-8)。生残率、鰓の開腔頻度 (Tables IV-2, IV-3)、各角度帯での標本の出現頻度 (Tables IV-4, IV-5, IV-6, IV-7) および脊椎骨屈曲の頻度 (Fig. IV-4) における差異を確認するため、William's の補正を伴う G-test (Sokal and Rohlf 1983) および事後検定として Ryan's multiple range test を使用した。Tukey-kramer test, Shapiro-Wilk test および Bartlett test は、JMP7 統計ソフトウェア (SAS Institute Japan, 東京) を用いて実施し、 $P < 0.05$  の場合に差が有意とした。

### IV-3. 結果

#### a) 生残および成長

試験 1 の開始時から終了までの全長、体長、体重、生残率、鰾の開腔頻度、肥満度および日間給餌率の結果を Table IV-2 に示す。A および B 試験区の全長および体長は、試験開始後に統計的に有意に増加し ( $P < 0.05$ )、試験終了時ではいずれも B 試験区で有意に大きかった ( $P < 0.05$ )。両試験区の体重は、試験開始後に統計的に有意に増加し ( $P < 0.05$ ; 中間測定時の A 試験区を除く)、中間測定時および試験終了時の体重はいずれも B 試験区で有意に大きかった ( $P < 0.05$ )。生残率は、中間測定時および試験終了時ともに B 試験区で有意に高かった ( $P < 0.05$ )。試験開始時の鰾の開腔率は 44.2%であり、A および B 試験区の試験終了時の鰾の開腔率は 88.7%および 72.4%を示し、両試験区共に試験開始時と比較して有意に高かった ( $P < 0.05$ )。試験終了時の肥満度は、試験開始時と比較して両試験区ともに有意に高く ( $P < 0.05$ )、A 試験区より B 試験区で有意に高かった ( $P < 0.05$ )。

試験 2 の開始時から終了までの全長、体長、体重、生残率、鰾の開腔頻度、肥満度および日間給餌率の結果を Table IV-3 に示す。試験終了時の全長および体長は、試験開始時と比較して全ての試験区で統計的に有意に増加し ( $P < 0.05$ )、試験区間で有意差はみられなかった。中間測定時および試験終了時の体重は、試験開始時と比較して全ての試験区で統計的に有意に増加し ( $P < 0.05$ )、試験区間で有意差はみられなかった。中間測定時および試験終了時の生残率に有意差はみられなかった。試験終了時の鰾の開腔率は、B 試験区で 72.4%、C 試験区で 87.5%および D 試験区で 86.5%を示し、試験開始時と比較して全ての試験区で有意に高かった ( $P < 0.05$ )。試験終了時の肥満度は、試験開始時と比較して全ての試験区で有意に高く ( $P < 0.05$ )、試験区間で有意差はなかった。

なお、試験 1, 2 ともに、全ての試験区で残餌は確認されなかった。

## b) 日間給餌率の推定

試験 1 の日間給餌率は、中間測定時および試験終了時ともに B 試験区で有意に高く ( $P < 0.05$ )、それぞれ A 試験区で  $1.40 \pm 0.08\%$  および  $2.75 \pm 0.01\%$ 、B 試験区で  $2.75 \pm 0.01\%$  および  $3.19 \pm 0.09\%$  であった。試験 2 の中間測定時および試験終了時の日間給餌率は、B 試験区で  $2.75 \pm 0.01\%$  および  $3.19 \pm 0.09\%$ 、C 試験区で  $2.58 \pm 0.16\%$  および  $3.28 \pm 0.25\%$ 、D 試験区で  $2.11 \pm 0.07\%$  および  $4.24 \pm 0.09\%$  を示し、他試験区と比較して中間測定時は D 試験区で有意に低かったが ( $P < 0.05$ )、試験終了時では D 試験区で有意に高かった ( $P < 0.05$ )。

#### c) 連続遊泳時間および最大流速

連続遊泳時間は、試験 1 の A 試験区で  $6.43 \pm 11.37$  秒、B 試験区で  $5.11 \pm 4.64$  秒を示し、試験区間で有意差はなかった (Table IV-8)。試験 2 では、B 試験区で  $5.11 \pm 4.64$  秒、C 試験区で  $35.31 \pm 34.47$  秒、D 試験区で  $87.08 \pm 73.72$  秒を示し、試験区間で有意差がみられた ( $P < 0.05$ , Table IV-8)。A および B 試験区では、飼育水は 0-8.9 cm/秒の速さで流れ、通気装置直上の底部で 8.9 cm/秒の最大流速が測定された (Fig. IV-6a)。C 試験区では、飼育水は 0.1-23.4 cm/秒の速さで流れ、エアリフト前の水面で 23.4 cm/秒の最大流速が測定された (Fig. IV-6b)。D 試験区では、飼育水は 0-45.6 cm/秒の速さで流れ、エアリフト前の水面で 45.6 cm/秒の最大流速が測定された (Fig. IV-6b)。

#### d) 脊椎骨屈曲の頻度

Fig. IV-4 は、それぞれ第 1~4 椎体および第 5~22 椎体での前彎症 (Fig. IV-4a) および後彎症 (Fig. IV-4b) の頻度を示す。試験開始時の前彎症の頻度は 5.8% (第 1~4 椎体) および 11.5% (第 5~22 椎体) であった。試験 1 では、前彎症の頻度は、試験開始時と A あるいは B 試験区間で有意差はなかったが、A 試験区より B 試験区で高かった ( $P < 0.01$ )。試験 2 では、前彎症の頻度に有意差は

なかった。試験開始時の後彎症の頻度は、どちらの脊椎骨の範囲（第1～4椎体および第5～22椎体）も9.6%であった。後彎症の頻度は、試験1では有意差はなかったが、試験2の試験開始時あるいは他試験区よりD試験区で有意に高かった（ $P < 0.05$  および  $P < 0.01$ ）。

Fig. IV-5 に、各試験の各試験区における鰾の開腔個体あるいは未開腔個体の前彎症あるいは後彎症を伴う脊椎骨番号の頻度分布を示す。試験開始時では、前彎症椎体の最頻値は第3および第5～11椎体の5.8%であり、後彎症椎体の最頻値は、第2および第3椎体の9.6%であった。鰾の開腔個体では、前彎症あるいは後彎症域は、それぞれ第15～17椎体（3.9%）、第1～5椎体（1.9%）のみに位置した。A試験区では、前彎症椎体の最頻値は第16および第17椎体での5.7%であり、後彎症椎体の最頻値は第3椎体での7.6%であった。B試験区では、前彎症の最頻度（21.0%）は第8椎体に位置し、後彎症の最頻度（15.2%）は第3椎体に位置した。C試験区では、前彎症は第1～19椎体で観察され、最頻度は第5椎体での8.7%であり、後彎症の最頻値は第3椎体での16.4%であった。D試験区では、前彎症の最頻値は、第3椎体での16.4%であり、後彎症の最頻値は第3椎体での33.7%であった。

試験開始時では、第1～4椎体での正常な最大屈曲角度（ $175^\circ$ 以上）の頻度は84.6%であり、 $160^\circ$ 以下の最大屈曲角度を伴う標本は確認されなかった（Table IV-4）。試験1では、試験終了時における第1～4椎体の正常な最大屈曲角度（ $175^\circ$ 以上）の頻度は、A試験区で87.7%、B試験区で71.4%を示し、A試験区よりB試験区で有意に低下した（ $P < 0.05$ ）。また、 $160^\circ \sim 155^\circ$ の頻度は、A試験区で0%、B試験区で3.8%を示し、試験区間で統計的有意差はなかったが、最大屈曲角度に対する給餌量の主効果は統計的に有意であった（ $P < 0.05$ ）。試験開始時の第5～22椎体での正常な最大屈曲角度（ $180^\circ \sim 175^\circ$ および $175^\circ \sim 170^\circ$ ）の頻度は63.5%および26.9%であり、 $155^\circ$ 以下の最大屈曲角度を伴う標本は確認さ

れなかった (Table IV-5)。試験 1 の第 5～第 22 椎体では、正常な最大屈曲角度 (175°以上) の頻度は、A 試験区で 65.1%、B 試験区で 46.7%を示し、A 試験区より B 試験区で有意に低下した ( $P < 0.05$ , Table IV-5)。一方、170～165°の頻度は、A 試験区で 3.8%、B 試験区で 16.2%を示し、試験開始時および A 試験区より B 試験区で有意に高かった ( $P < 0.05$ )。B 試験区の第 5～22 椎体で 150°以下の最大屈曲角度を伴う標本が確認されたが、A 試験区では、第 1～22 椎体まで 150°以下の最大屈曲角度を伴う標本は確認されなかった (Tables IV-4, IV-5)。

試験 2 の第 1～4 椎体では、180～175°の頻度は B 試験区で 71.4%、C 試験区で 77.9%、D 試験区で 51.0%を示し、試験開始時および他試験区より D 試験区で有意に低かった ( $P < 0.05$ , Table IV-6)。一方、170～165°の頻度は、B 試験区で 9.5%、C 試験区で 8.7%、D 試験区で 25.0%を示し、試験開始時および他試験区より D 試験区で有意に高かった。試験 2 の第 5～22 椎体では、正常な最大屈曲角度 (180～175°および 175～170°) の頻度は、B 試験区で 46.7%および 27.6%、C 試験区で 46.2%および 37.5%、D 試験区で 65.4%および 18.3%を示し、いずれも試験区間で有意差がみられたが ( $P < 0.05$ , Table IV-7)、試験開始時と比較して全ての試験区で有意差はみられなかった。また、170～165°の頻度は、B 試験区で 16.2%、C および D 試験区で 5.8%を示し、試験開始時および他試験区より B 試験区で高かった ( $P < 0.05$ )。

#### IV-4. 考察

本研究では、マハタの稚魚期 (全長 72～100 mm) における、不適切な配合飼料の給餌量および飼育水の流場が、脊椎骨屈曲 (前彎症および後彎症) を誘発することを明らかにした。本研究で得られた知見は、マハタの人工飼育期間に



おける脊椎骨屈曲の防止に大いに貢献するものである。

試験 1 では、日間給餌率は、飼育期間と通して A 試験区で 1.40~2.00% および B 試験区で 2.75~6.00% に維持されており、中間測定時および試験終了時に有意差がみられた。したがって、計画通り、試験 1 は、脊椎骨屈曲の出現に対する給餌量の差異の影響を確かめた試験となったと判断した。試験 2 では、日間給餌率は、飼育期間と通して B 試験区で 2.75~6.00%、C 試験区で 2.58~6.00% および D 試験区で 2.11~6.00% に維持された。試験終了時および中間測定時に一部の試験区間で統計的有意差が確認されたが、その差は僅かであることから、試験 2 では、脊椎骨屈曲の出現に対する水流の影響を確かめられたと判断できる。

試験 1 では、試験開始時と比較して、前彎症の頻度は多量給餌で主に腹椎および腹椎から尾椎の間（第 1~11 椎体）で増加し、後彎症の頻度は、統計的には有意でなかったものの、稚魚期に配合飼料の多量給餌を行った B 試験区の第 1~4 椎体の腹椎で多くなる傾向がみられた。このことから、稚魚期の多量給餌で主に前彎症が誘発されることが明らかになった。一方、試験 2 では、試験開始時と比較して、後彎症の頻度は通気量（流速）の増加に伴い主に腹椎（第 1~6 椎体）で増加し、前彎症の頻度は、試験区間で差はなかったものの、主に腹椎および腹椎から尾椎の間（第 1~11 椎体）で多くなる傾向がみられた。このことから、稚魚期の強通気飼育で主に後彎症が誘発されることが明らかになった。本研究では、鰾の開腔頻度は、試験開始時から終了時に統計的に有意に増加したことから、Pre-flexion ステージに鰾が開腔しなかった個体（第 III 章第 1 節、第 III 章第 2 節）が、その後の成長段階で開腔することが確認された (Nagano et al. 2007)。この現象は、鰾の二次開腔と呼ばれる (北島ら 1981 ; Chatain 1994 ; Jacquemond 2004b)。したがって、結論として鰾の二次開腔が進展する期間中の不適切な給餌量および飼育水の流場が、脊椎骨屈曲の出現に影響を及ぼすと考

えられる。

前彎症は、稚魚期に配合飼料の多量給餌を行った B 試験区で有意に増加したことから、稚魚の摂餌行動が前彎症の出現に関与する可能性が考えられた。B 試験区における稚魚の遊泳行動は、給餌時以外では底層に着底している個体、あるいは遊泳というより中層において主に胸鰭のみを使用した静止状態（ホバリング）で方向転換のみを行う個体が多く確認され、平均連続遊泳時間は 6.43 秒と短かったが、毎回の給餌時には激しい遊泳が確認された。また、外観観察で稚魚の腹部の膨張が確認され、同区で残餌が確認されなかったことから、消化管は餌料で充満されたと推定される。タイセイヨウダラでは、椎骨の形成が開始する時期において、最適でない給餌方法に関連した餌料の過食、あるいは便秘で消化管が過剰充填となり、これにより鰾と脊索の間の圧迫が増大し、脊索を上方へ持ち上げることで脊索の屈曲が引き起こされる可能性が指摘されている（Grotmol et al. 2005）。また、ブリの 2 歳魚では、垂直方向の異常遊泳、餌料の飽食給餌、高い成長率あるいは性成熟と成熟に伴う異常遊泳行動が前彎症の出現と関連する可能性が指摘される（林 1990；竹丸 2009）。したがって、マハタ稚魚期における新たな脊椎骨屈曲の出現は、これらの研究と魚の発育時期は異なるが、5 回/日の給餌に伴う激しい遊泳行動と餌料が完全に消化される前の連続的な摂餌による消化管の膨張が原因である可能性が高い。さらに、浮力調整機能が欠如する鰾の未開腔個体では、恒常的な餌料の過食に伴う腹部重量の増加で体比重が増加すると推察される。マダイの鰾の未開腔個体では、浮力を獲得するために体軸を斜上方に向けて遊泳することが知られていることから（北島ら 1981）、マハタにおいても、摂餌時の遊泳行動だけでなく、中層で浮力を獲得するためのホバリング時においても、体位を維持するうえで物理的な負荷が脊椎骨にかかり、屈曲が引き起こされる可能性が考えられる。これらのことから、過食で膨張した消化管が、鰾を介してあるいは直接脊椎骨を圧迫す

るとともに、摂餌に伴う度重なる急激な稚魚の遊泳行動および体比重の増加による浮力獲得に伴う恒常的なホバリングが相加的、あるいは相乗的に脊椎骨に負荷を加え、その結果、腹椎での前彎症を引き起こしたと推察される。

一方、後彎症でも、稚魚期に強通気飼育を行った D 試験区で有意に増加したことから、同区における飼育水の流場や稚魚の遊泳行動が後彎症の出現に関与する可能性が考えられた。C および D 試験区では、水平方向の遊泳行動が頻繁に確認され、連続遊泳時間は、通気量（流速）の増加とともに有意に長期化した。一般的に、回流水槽内に魚を収容し、一定の流速で回流水槽内に水を流した場合、魚はある一定の場所で遊泳を継続し、水流と同じ速さで遊泳することが知られる（塚本 1991）。特に、D 試験区では、マハタ稚魚は一定の場所に留まらず、幾つかの個体は、4 分以上の水流に対して激しい旋回遊泳を行うことが確認された。したがって、マハタ稚魚は、最大流速（45.6 cm/秒）あるいはそれ以上の速度で遊泳し、そのような連続性の遊泳の激しさが、稚魚期における新たな後彎症の出現要因である可能性が考えられた。魚の人工飼育下における飼育水の水流が形態異常の出現におよぼす影響は、ヨーロッパシーバス、マダイおよびタイセイヨウダラで実験的に検討されており、稚魚の激しい遊泳行動で前彎症個体が出現するが（Divanach et al. 1997 ; Kihara et al. 2002 ; Sfakianakis et al. 2006 ; Helland et al. 2009）、後彎症との関係は記されておらず、その影響は不明である。しかし、ヨーロッパシーバスの稚魚では、腹椎の後彎症は尾椎の前彎症と高い相関関係にあることが報告され（Boglione et al. 1995）、養殖ブリの 2 歳魚では、魚体の中央部または中央からやや後方で後彎症が出現する一方、同一個体の尾部で前彎症が出現し、両者は複合的に発生することから（竹丸ら 2009）、人工飼育下で発生する後彎症と前彎症は、脊椎骨の歪みを補正する補完的な関係にあると推察される。本研究の試験 2 では、試験開始時と比較して、後彎症の頻度は通気量（流速）の増加に伴い主に腹椎（第 1～6 椎体）で増加し、

一方、統計的に有意ではなかったが、前彎症の頻度は、主に腹椎および腹椎から尾椎の間（第 1～11 椎体）で増加傾向がみられた。したがって、先述の他魚種と同様に、マハタでも稚魚期の激しい遊泳行動で前彎症が出現し、脊椎骨の歪みを補正するため、後彎症が引き起こされた可能性も考えられる。

配合飼料の多量給餌を行った B、C および D 試験区では、最大屈曲角度が、試験開始時あるいは A 試験区で確認されなかった  $150^{\circ}$  以下になることが確認され、稚魚期における多量給餌および強水流で屈曲角度が鋭角化することが明らかとなった。そのような角度の鋭角化現象は、鰻の二次開腔が進展する間のヨーロッパヘダイにおいても、強制的遊泳条件下で報告されている（Chatain 1994）。マハタでは、顎と脊柱の化骨は 60 日令（体長 30.1 mm、北島ら（1991）あるいは Sabate et al.（2009）の相対成長式から計算した全長は 36.95 mm あるいは 39.60 mm）までに既に完了し（Nagano et al. 2007）、鰻の二次開腔は、少なくとも 60 日令以降に確認される（Nagano et al. 2007）。したがって、たとえ化骨の完了した稚魚でも、脊椎骨の屈曲は、鰻の二次開腔が進展する間の強水流で発生することから、そのような飼育水の流場には十分に注意すべきである。

一方、マダイでは、脊椎骨屈曲の出現は、鰻の二次開腔の開始とともに停止し、軽微な脊椎骨屈曲（ $20^{\circ}$  以下）は矯正される事例がある（北島 1978）。また、たとえ鰻が開腔し、化骨が完了した前彎症個体でさえ、環境要因あるいは形態異常の程度次第で矯正されることが報告される（末廣ら 2004）。そのような形態異常の矯正は本研究で確認されなかったが、マハタにおいても、飼育条件次第で形態異常が矯正される可能性がある。

本研究では、鰻が一次開腔した標本と未開腔の標本で脊椎骨屈曲の出現および頻度が異なるか把握していない。他魚種では、鰻が開腔した個体でさえ、速い流速に伴う遊泳の激しさと尾椎に前彎症が出現する（Divanach et al. 1997；Kihara et al. 2002）。したがって、鰻が一次開腔したマハタ稚魚も、飼育条件次

第で脊椎骨屈曲が誘発される可能性が高い。近年、マハタ仔魚期に油膜除去による鰾の一次開腔促進が試みられているが（第Ⅲ章第1節）、鰾の一次開腔率が改善された場合も、稚魚期における飼育条件には注意すべきである。ヨーロッパバスでは、前彎症を伴う椎体の位置は、鰾が開腔した魚より未開腔の魚で前方に位置し（Divanach et al. 1997 ; Chatain 1994）、腹椎の後彎症も、鰾が開腔していない稚魚（Boglione et al. 1995）だけでなく、鰾が開腔した仔魚（Koumoundouros et al. 2002）でも確認される。これらのことは、脊椎骨屈曲の出現は、仔魚あるいは稚魚の発育ステージ、機能的な鰾の存在または欠如および流速などの条件次第で変化することを示唆しており、マハタも例外ではないと考えられる。近年、脊椎骨屈曲は、脊柱に対する筋肉の機械的負荷で発生する可能性が指摘されており（Kihara et al. 2002 ; Kranenbarg et al. 2005）、複雑な脊椎骨屈曲の出現機構を解明するさらなる研究が必要である。一方で少なくとも、A試験区でマハタ稚魚の脊椎骨屈曲の頻度は増加しないことから、A試験区に相当する飼育条件下で、脊椎骨屈曲の発生を防止することが可能であると考えられる。

配合飼料の少量給餌および低速水流で飼育したA試験区で脊椎骨屈曲の頻度が増加しなかった原因としては、最大流速を 8.9 cm/秒、日間給餌率を 1.40～2.00%および肥満度を 27 から 28 に維持する飼育条件があると考えられる。A試験区では、激しい遊泳行動が毎回の給餌時に確認されたが、給餌時以外の平均の連続遊泳時間は 6.43 秒と短く、無作為に抽出した標本個体が一度方向転換から再び方向転換する間の行動は、遊泳というより静止状態であった。Sabate et al. (2009) は、変態が完了しつつあるマハタ仔魚は、59 日令（変態仔魚期の末期付近（体長 15.5～20.5 mm）に初めて着底することを報告しており、その時期の平均遊泳速度は 10 cm/秒弱であった。Sabate et al. (2009) は、着底（66 日令）後の稚魚の遊泳速度を報告していないが、マハタが属する天然ハタ類は、概ね

自然海域では遊泳するよりむしろ底層付近で静止していることが観察されることから (La Mesa et al. 2002), 同様の行動がマハタでも推察され, 稚魚が着底時より速い速度で長期間の連続遊泳を行う可能性は低いと考えられる。したがって, A 試験区で観測された最大流速 (8.9 cm/秒) は, マハタ稚魚の遊泳速度の範囲内であると考えられる。対照的に, 中速あるいは高速水流で飼育した C および D 試験区では, 稚魚は遊泳速度を上回る水平方向への遊泳行動を長期間継続させられたと推察される。A 試験区の飼育条件は, 流速に関して天然のマハタ稚魚が生息する海洋環境に類似し, また, 主に腹椎の前彎症を誘発する多量給餌でないことから, 脊椎骨屈曲は A 試験区で発生しなかったと考えられた。

本研究は, マハタ稚魚期 (全長 72~110 mm) における不適切な飼育条件 (給餌量および飼育水の流場) が, 脊椎骨屈曲を引き起こすことを明らかにした。さらに, 成長および生残率は, マハタ稚魚期における多量給餌で改善された。クエの稚魚 (全長 40~100 mm) において, 日間給餌率 1.0~6.0% の範囲内では, 生残率および日間成長率は高い日間給餌率で有意に高くなる (中川ら 2011)。したがって, マハタにおいても, 全長 40~110 mm の範囲内では, 少なくとも 6.0% の日間給餌率が成長および生残率の改善に効果的であると推察される。また, 強い水平方向への回転流で生じる速い水流には, 餌料および酸素の拡散, 排泄物の希釈および水槽の自浄といった飼育効率を改善する利点がある (Kihara et al. 2002 ; Helland et al. 2009)。一方, 多量給餌および, または飼育水の速い流速が脊椎骨屈曲の発生を引き起こした。さらに, 本研究の B, C および D 試験区間で成長に有意差がみられず, 速い流速は成長を改善しなかった。したがって, 2% 以上の日間給餌率および 8.9 cm/秒以上の流速は, マハタ稚魚の成長と生残率および飼育効率の改善に関しては魅力的であるが, 稚魚期における脊椎骨屈曲の誘発を防止するには, そのような飼育条件はできる限り避けるべきである。

# 博士學位論文

## 論文要旨

人工孵化マハタの形態異常低減に関する研究  
(Study on the malformation in artificially  
hatched seven-band grouper *Hyporthodus*  
*septemfasciatus* (Thunberg))

平成 27 年 1 月 9 日

近畿大学大学院

農学研究科水産学専攻

辻 将治

## 和文要旨

三重県では、マダイに続く新しい養殖対象魚としてマハタ (*Hyporthodus septemfasciatus*) を選定し、1996年から養殖用の人工種苗生産技術開発に取り組んでおり、これまでの研究開発で生産技術は進歩し、毎年20～30万尾程度と産業規模での種苗生産が可能になっている。しかしながら、三重県に限らず、日本国内で生産されるマハタ人工種苗においては、一般に初期飼育期（受精卵孵化から全長約3 cm）と稚魚期（全長約3～15 cm）に出現する形態異常が種苗の品質を低下させ、生産効率の低下を招く大きな課題となっている。そこで本研究では、マハタ人工孵化・飼育魚の形態異常の種類とその原因の特定、防止策の開発に取り組んだ。

第Ⅰ章では、三重県で生産したマハタ人工種苗に発生する形態異常の出現傾向を把握し、低減すべき形態異常の種類を特定した。第Ⅱ章では、仔魚期の異なる飼育水温が形態異常の出現に及ぼす影響について明らかにし、最適な飼育水温を検討した。第Ⅲ章では、仔魚期における鰓の開腔不全と形態異常の発生について検討し、マハタで最も高頻度に発生する脊椎骨屈曲の出現要因と鰓の開腔不全の関係を明らかにしたうえで、その発生率を低減するため、鰓の開腔促進および阻害条件を検討した。第Ⅳ章では、稚魚期の飼育方法として給餌量と通気量（流動）が前彎症および後彎症の脊椎骨屈曲出現に及ぼす影響について検討した。

### 第Ⅰ章 形態異常の発生状況

2004～2010年に三重県が生産したマハタ人工種苗（全長10～15 cm）の形態異常の出現傾向を把握し、低減すべき形態異常の種類を特定した。観察対象とした形態異常の種類は、脊椎骨屈曲、癒合または椎体欠損、椎体の変形、背鰭



陥没の 4 種類とした。毎年最も高頻度に確認された形態異常は脊椎骨屈曲であり、年変動は大きいですが、2.5～22.2%の範囲で推移した。また、癒合または椎体欠損は 0.9～21.1%，椎体の変形は 0～18.2%，背鰭陥没は 0～4.1%の範囲で推移した。この結果から、生産効率の向上には脊椎骨屈曲の出現率を低減することが必要不可欠であると考えられた。

## 第Ⅱ章 飼育水温と形態異常

本研究以前では、マハタの形態異常出現要因に関する報告はほとんどなく、わずかに仔魚期の不適切な飼育水温が、顎異常を引き起こす可能性が指摘されているのみであった。本研究では、仔稚魚期の異なる飼育水温（23～29℃）が、成長、生残および形態異常の出現に及ぼす影響について明らかにし、仔魚期の最適な飼育水温を検討した。仔稚魚の成長は高水温で促進され、全長 30～40 mm の稚魚の生残率は 25～26℃で高かった。形態異常のうち、椎体の変形出現率は高水温で高く、神経棘の 2 叉は 23℃で高かった。一方、脊椎骨屈曲、癒合または椎体欠損の出現と水温に関連はなく、総合的な形態異常魚の出現率は 25～27℃で低かった。仔稚魚の成長、生残、形態異常発生を統合して考慮すると、マハタ仔魚期の飼育適水温は 25～26℃であると考えられた。

## 第Ⅲ章 鰾の開腔と形態異常

第Ⅱ章では、脊椎骨屈曲の防除策として、鰾の一次開腔促進の有効性が推測された。多くの魚種で、飼育水面の油膜除去を行い、仔魚に水面で鰾内へ空気を供給するため空気呑み込み行動を妨げないことが鰾の一次開腔促進に有効であると報告されている。しかしながら、マハタ仔魚では飼育水面の表面張力に捕らわれて死亡する浮上死による大量減耗が発生し、飼育水面への油添加による浮上死防止が推奨されている。そのためマハタ種苗生産では、それに相反す

る油膜除去よりも浮上死対策を優先する油添加が標準的な生産方法とされている。そこで浮上死対策と鰾の一次開腔促進を両立させる新たな飼育方法確立のため、鰾の一次開腔時期の特定と、開腔促進条件を検討した。

マハタ仔魚の組織学的観察の結果、鰾の開腔開始時期は Pre-flexion ステージであることが明らかになり、油膜除去はそれ以前の Pelagic larvae ステージから実施するのが適切であると考えられた。次に、飼育水面での仔魚の空気呑み込み行動で鰾が一次開腔することを確認するため、油膜除去区、油膜非除去区（標準飼育法）および流動パラフィン添加区の3試験区を設定し、鰾の開腔率を比較した。油膜除去区では、10日令まで油を添加し、その後 Pelagic larvae ステージが主である11～12日令から油膜除去を実施した。油膜非除去区では、油を添加したうえで油膜除去を実施せず、流動パラフィン添加区では、仔魚の空気呑み込みを完全に阻害するため、流動パラフィンを厚さ約7 mmで水面に添加した。鰾の一次開腔は、油膜除去区で14日令以降に確認され、開腔率は最大平均40%であったが、油膜非除去区では2.3～19.0%、流動パラフィン区では0.8～5.8%であり、油膜除去区で有意に高い結果となった。このことから、マハタ仔魚は水面での空気呑み込みで鰾が一次開腔し、水面に存在する油膜などの障害物除去で鰾の開腔の促進が可能であると考えられた。また、試験区間で生残率に有意差が無く、10日令まで油を添加し、11日令以降に油膜除去を実施する飼育方法で、仔魚の生残確保と鰾の一次開腔促進の両立が可能であることが明らかとなった。

一方で本研究では、他魚種と比較したマハタ鰾の一次開腔率の低さが課題となった。要因として、飼育水の水流を起こす油膜除去期間中の通気量が、仔魚の空気呑み込み行動（鰾の開腔）に影響を及ぼす可能性が考えられた。そこで、0.5 t水槽を用いて通気量が異なる4試験区（0.01, 0.05, 0.10 および 0.50 l/分）を設定し、仔稚魚の鰾の開腔率を比較した結果、鰾の一次開腔率は0.50 l/分区

で有意に低下した。通気量 0.50 l/分区における水面下 5 cm の流速は 1~3 cm/秒であり、同区では仔魚が水面付近で定位できず、流される様子を観察したことから、水面での仔魚の空気呑み込み行動が強水流で阻害されたと考えられる。この結果から、マハタ鰾の一次開腔促進には、油膜除去期間中の弱通気 (0.01~0.10 l/分) 飼育が効果的と考えられた。

#### 第IV章 給餌量および流速と稚魚の形態異常

他魚種では、鰾の一次開腔に関わらず、稚魚期の不適切な飼育環境で前彎症が増加する。そこで、陸上水槽におけるマハタ稚魚期 (中間育成期) の給餌量および通気による水流が、脊椎骨屈曲 (前彎症・後彎症) の出現に及ぼす影響を検討した。試験区として、弱通気・給餌少量区 (A 区), 弱通気・給餌多量区 (B 区), 中通気・給餌多量区 (C 区) および強通気・給餌多量区 (D 区) を設定した。マハタ (全長  $7.2\pm 1.0$  cm, 体重  $6.2\pm 2.6$  g, 98 日令) を 0.5 t 水槽に 100 尾ずつ収容し、試験は各試験区 2 反復で 136 日令まで行った。A および B 区は、強い水流を発生させないため 1 個/槽のエアストーン (0.5 l/分) で通気し、C および D 区は、飼育水を水平方向に回転させるため、2 本/槽のエアリフト (C 区 : 1.5 l/分/本, D 区 : 5.0 l/分/本) で通気し、各試験区で流速を測定した。また、配合飼料の日間給餌率を A 区は 2%, B~D 区は 6% に設定した。試験開始および終了時に軟 X 線写真撮影で鰾の開腔率および脊椎骨の屈曲 (前彎症・後彎症) 率を求めた。A~D 区の終了時の鰾開腔率は 72.3~88.7% であり、試験開始時の 44.2% に対して有意に高く、鰾の二次開腔の進行が確認された。前彎症率は、A 区に対し B 区で有意に増加し、配合飼料の多量給餌 (6%) で前彎症が増加することが明らかとなった。B 区では、給餌時の稚魚の激しい遊泳や過食による体比重増加で上向き遊泳が増加するとともに、配合飼料の過食による腹部膨張で脊椎骨が圧迫されることで前彎症が増加したと考えられる。

また、後彎症は、試験開始時および他試験区と比較して D 区で有意に増加し、強通気による水流の後彎症の誘導が明らかとなった。通気量増加に伴い稚魚の連続遊泳時間が長くなる過剰な遊泳で脊椎骨の負担が増大し、後彎症が増加する可能性が考えられた。また、多量給餌および強通気飼育で脊椎骨の屈曲角度が鋭角化した（最大 40°）。これらの結果から、鰾の二次開腔が進行する間において、配合飼料の多量給餌および強通気飼育で新たな脊椎骨の屈曲が出現することが明らかとなり、少なくとも日間給餌率 2%、飼育水の最大流速 0.09 m/秒以内で新たな脊椎骨屈曲の出現防止が可能であると考えられた。

## 結論

本研究では、マハタ人工種苗で高頻度に出現する形態異常が前彎症および後彎症の脊椎骨屈曲であることを特定し、その出現要因は、仔魚期における鰾の一次開腔不全および稚魚期における過剰給餌と飼育水の流場であることを明らかにした。また、仔魚の浮上死防止で 10 日令までの油添加、11 日令以降の油膜除去で、仔魚の生残確保と鰾の一次開腔促進の両立が可能であることを明らかにした。また仔稚魚の成長、生残、形態異常発生を統合して考慮すると、マハタ仔魚期の飼育適水温は 25～26℃であることが明らかとなった。さらに、稚魚期以降の鰾の二次開腔期間で、配合飼料の多量給餌および強通気飼育で新たな脊椎骨屈曲の出現が明らかになった。これらの結果から、マハタでは、鰾の一次・二次開腔期間の飼育環境調整で、脊椎骨屈曲の出現を防止することが可能になると考えられる。

しかしながら、機能的な鰾の存在または欠如との関係を含めて、稚魚期の飼育環境が新たな脊椎骨屈曲を引き起こすメカニズムは解明できていない。マハタ人工種苗のさらなる生産効率向上には、その出現メカニズム解明が、その後の異常矯正の可能性を探るうえでも必要である。

# S U M M A R Y

Study on the malformation in artificially hatched seven-band grouper  
*Hyporthodus septemfasciatus* (Thunberg)

M A S A H A R U   T S U J I

## 英文要旨 (Summary)

In recent years, the emphasis has been given on the seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* (Thunberg) in Mie prefecture as an alternative cultured fish species to a red sea bream *Pagrus major*. The Mie Prefecture Fisheries Research Institute has been studying techniques for seedling production of the seven-band grouper to develop a viable aquaculture system for this species since 1996. As a result of this effort, the improved rearing techniques have recently increased larval survival ratio, and at the present time the Mie Prefectural Fish Farming Center can produce approximately 200,000 to 300,000 seedlings in a season. However, the occurrence of skeletal malformations at larval (from hatch out to 3.0 cm TL) and juvenile (3.0-15.0 cm TL) stages has a major negative impact on the commercial aquaculture of this species, as they reduce the quality of seedlings and decrease production efficiency. In the present study, the particular kinds of skeletal malformations and their induction factors were identified in the seven-band grouper. In addition, the preventive measures were developed.

In chapter I, types of skeletal malformations and their incidences were investigated in the mass seedling production of seven-band grouper, and their reduction procedure was identified. In chapter II, the effect of water temperature on the occurrence, types and frequencies of malformations was examined in cultured larvae and juveniles, and the optimum rearing temperature to minimize those malformations was identified. In chapter III, the relationship between swim bladder inflation failure and malformations in later developmental stages was examined. It was demonstrated that the inflation failure at early stage is the main reason of the spinal curvature observed at the later stages in the seven-band grouper seedlings. Moreover, promotion or inhibition

conditions for initial swim bladder inflation were investigated. In chapter IV, the effects of food amount and water current condition on spinal curvature (lordosis and kyphosis) induction were investigated during juvenile stage.

### **Chapter I: Type of skeletal deformities and their incidence**

Types of skeletal malformations, their incidences and prevention methods were investigated to improve the mass seedling production of seven-band grouper (10-15 cm in total length: TL) in the Mie prefecture during 2004-2010. Skeletal malformations in specimens were classified into the following four categories: spinal curvature (lordosis or kyphosis), fusion or defects of the centra, deformation of the centra and saddleback syndrome. The most frequently observed skeletal malformation was spinal curvature throughout the studies, although the frequency fluctuated widely which ranged from 2.5 to 22.2%. Additionally, the frequency fluctuation ranges of fusion or defects of the centra, and the deformation of centra and saddleback syndrome were 0.9 to 21.1%, 0 to 18.2%, and 0 to 4.1%, respectively. Consequently, it is necessary to prevent spinal curvature as much as possible to improve the efficiency in seven-band grouper seedling production.

### **Chapter II: The effect of water temperature on the frequency and types of malformations**

Information on the causes of malformations in cultured seven-band grouper is scarce except for the possibility of unsuitable rearing temperature. In the present study, the effects of rearing temperature (23–29°C) at larval and juvenile stages on skeletal malformations were investigated, and the optimum culture temperature was identified. Growth was accelerated at higher temperatures, and the survival rate of juveniles

30–40 mm TL was higher at 25 and 26°C. Incidence of deformation of the centra was higher at higher temperatures, while the incidence of bifurcated neural spine was significantly higher at 23°C than at other temperatures. On the other hand, incidences of spinal curvature and fusion or defects of centra in juveniles were not related to rearing temperature. Comprehensively, the frequency of malformed individuals was lower at 25–27°C. The results of this study suggest that the optimum culture temperature range for seven-band grouper is 25–26°C.

### **Chapter III: The relationship between swim bladder inflation and malformations**

In this chapter, the promotion of initial swim bladder inflation was effective in preventing spinal curvature. In many percomorph species, as a method to promote initial swim bladder inflation, a surface skimmer has been shown to be effective in removing the oily surface film from the rearing water surface during the larval stage. Since the oily film at the water surface forms a barrier at the air–water interface, its removal would provide a better gulping atmosphere for larvae. In contrast, since the water surface tension-related larval death frequently occurs at the prelarval stage in commercial seedling production of this species, it is recommended that oil should be poured on the water surface to prevent this mortality. In this species, removal of the oily surface film to promote larval swim bladder inflation is methodologically antagonistic to the prevention of water surface mortality. As the first priority for seedling production is to secure seedling survival, the presence of oil film at the water surface is a general practice in seedling culture. Therefore, this study was aimed to establish a new rearing method which strikes a balance between the prevention of water surface mortality and the promotion of initial swim bladder inflation to get more benefits.



The developmental stage of swim bladder inflation was assessed by histological observation, which confirmed that the start-time of initial swim bladder inflation is the pre-flexion stage. Therefore, removal of the oily surface film and/or autogenous surface substances should be conducted at the pelagic larval stage prior to the pre-flexion stage.

To confirm whether the gulping of atmospheric air by larvae is involved in initial swim bladder inflation, frequencies of swim bladder inflation was compared under following three types of water surface rearing conditions: (i) removal of the oily surface film and/or autogenous surface substances (ROF), (ii) without removal of the oily surface film (covering of water surface with oil film; COF group), and (iii) sealing of water surface with liquid paraffin (SLP group). From 0 to 10 days after hatching (DAH), plant oil was poured on the surface of each rearing tank in the ROF group to prevent water surface death, and removal of the oily surface film and/or autogenous surface substances (overflow method; water exchange rate of 6–23% of tank volume per day) was conducted from 11 or 12 DAH when larvae were mostly at the pelagic developmental stage. In the COF group, oil was poured on the surface of each rearing tank and removal of the oily surface film was not carried out. In the SLP group, liquid paraffin (7-mm-thick layer) was poured on the surface to inhibit the gulping of atmospheric air by larvae. Initial swim bladder inflation was confirmed in the ROF to start on 14 DAH. The maximum frequency of swim bladder inflation (40%) was found in ROF group, which was significantly higher than that of 2.3-19.0% and 0.8-5.8% in COF and SLP groups, respectively. Therefore, the larval swim bladder inflation rate was promoted by gulping air at water surface, which was facilitated by removal of the oily surface film. Additionally, no significant difference existed in survival rate among the groups. Thus, it can strike a balance between the prevention of water surface

mortality and the promotion of initial swim bladder inflation by removal and addition of oil film at appropriate time.

In this study, the frequency of swim bladder inflation was found to be generally low compared with other species. There is the possibility that water current created by aeration affects larval behavior in gulping atmospheric air. Therefore, frequency of swim bladder inflation was compared under following four types of aeration rate in 500-L polyethylene tanks: 0.01, 0.05, 0.10 and 0.50 l/min. The frequency of swim bladder inflation in 0.50 l/min group was significantly lower than that in the other groups. Current velocity at 5 cm below the water surface in 0.50 l/min group was 1-3 cm/sec. Since larvae could not stay at near the water surface due to strong water current, there is possibility that it inhibits larval behavior in gulping atmospheric air. Therefore, it was concluded that the weak ventilation (0.01-0.10 l/min) during the oil removal period is effective in promoting of initial swim bladder inflation.

#### **Chapter IV: The effects of food amount and water current condition on spinal curvature**

In other species, juvenile lordosis occurred by the unsuitable rearing condition, regardless of the individuals with or without inflated swim bladders. Thus, this study examined the effect of food amount and water current condition on spinal curvature (lordosis and kyphosis) induction in juveniles. An experiment was conducted with the following four different rearing conditions: small amount feeding/low current velocity (Experimental group A), large amount feeding/low current velocity (Experimental group B), large amount feeding/middle current velocity (Experimental group C) and large amount feeding/high current velocity (Experimental group D). One hundred randomly selected seedlings ( $7.2 \pm 1.0$  cm TL,  $6.2 \pm 2.6$  g in body weight, 98DAH)

were transferred into each 500-l polyethylene tank. Rearing trial was carried out in duplicate per group and was conducted from 98 DAH until 136 DAH. In group A and B, to prevent strong water current by aeration, one hemispherical aerator (aeration; 0.5 l/min) was placed on the bottom sidewall of each rearing tank. In group C and D, to generate more strongly horizontal rotary current, 2 small gutters equipped with aerator (airlift, group C; 1.5 l/min/place, group D; 5.0 l/min/place) at the bottom which were fixed along the either sidewall. Current velocity of rearing water at each group was determined using the electromagnetic current meter. Daily feeding rate was 2%BW/day (group A) and 6%BW/day (group B to D). The frequency of feeding per day was once in group A (2% daily feeding rate/time) and five times in group B (1.2% daily feeding rate/time). The anesthetized samples were used to assess skeletal malformations (lordosis and kyphosis) and frequency of swim bladder inflation by soft X-ray examination at the end of the experiment. The frequency of swim bladder inflation was 44.2% at the start of experiment, and at the end of the experiment it was significantly higher in group A to D (72.3-88.7%) compared with the start of experiment. It has been confirmed that fish with an uninflated swim bladder at the early larval stage can inflate it later (so-called secondary inflation) in all groups.

The frequency of kyphosis was not significantly different. Thus, it was shown that lordosis is induced by large amount of feeding (6%) during the juvenile period. In group B, the intensive swimming was confirmed at every feeding, and the visual observation suggested that juveniles expanded the abdomen by filling the stomach with diet. Thus, lordosis might develop due to an excessive load on vertebral column or swim bladder by an intense swimming behaviour and the cumulative filling stomach with diet at every feeding. On the contrary, the frequency of kyphosis was significant higher in group D than that of the start of the experiment and in other groups, and it

was shown that kypshosis is induced by strong water current due to strong aeration. Continuous swimming time was increased with the increase of aeration rate (current velocity). Therefore, kyphosis might develop due to an excessive load on vertebral column by continuous intense swimming. Additionally, large amount feeding and high current velocity caused the bending angles to be acute up to 40 degrees. Therefore the spinal curvature develops depending on environmental factors (e.g., large amount feeding and strong water current) while secondary swim bladder inflation had been steadily developed. It is possible to prevent the spinal curvature induction under the rearing conditions corresponds to the group A, i.e., daily feeding rate and water velocity of less than 2% and 0.09 m/ sec, respectively.

## **Conclusion**

In the present study, the most frequently observed skeletal malformation was identified as spinal curvature (lordosis and kyphosis) in the seedling production of the seven-band grouper, and their induction factors were identified as the failure of swim bladder inflation at the larval stage and unsuitable rearing condition (food amount and current condition) at juvenile stage. In addition, the removal of oily surface film until 10 DAH and the addition of oil film from 11 DAH to prevent water surface death will provide a balance between the prevention of water surface mortality and the promotion of initial swim bladder inflation. The results also suggest that the optimum range of culture temperature for seven-band grouper is 25–26°C. Furthermore, in juvenile period, the spinal curvature developed due to the large amount feeding and strong water current, which suggests that the spinal curvature can be reduced by controlling the environmental factors (e.g., small amount feeding and weak water current condition). However, the secondary swim bladder inflation had been steadily

developed.

Although these series of studies have preliminary pointed out some causes and remedies of malformations, a detail clarification of the mechanisms involved is necessary to further improve the efficiency of seven-band grouper seedling production to ensure sustainable aquaculture system.

# 博士學位論文

## 論文目錄

近畿大学大学院

農学研究科水産学専攻

辻 将治

## 文 献

- Abdel, I., E. Abellan, O. Lopez-Albors, P. Valdes, M. J. Nortes and A. Garcia-Alcazar (2004) Abnormalities in the juvenile stage of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) reared at different temperatures: types, prevalence and effect on growth. *Aquaculture International*, **12**, 523-538.
- Andrades, J. A., J. Becerra and P. Fernandez-Llebrez (1996) Skeletal deformities in larval, juvenile and adult stages of cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, **141**, 1-11.
- 有瀧真人・青海忠久・小林真人 (1996) マガレイ仔魚の高水温飼育とアルテミア幼生早期給餌による形態異常防除. 日本水産学会誌, **62**, 857-864.
- 有瀧真人・太田健吾・堀田又治・田川正朋・田中 克 (2004) 異なる飼育水温がホシガレイ仔魚の発育と変態に関連した形態異常の出現に及ぼす影響. 日本水産学会誌, **70**, 8-15.
- Aritaki, M. and T. Seikai (2004) Temperature effects on early development and occurrence of metamorphosis-related morphological abnormalities in hatchery-reared brown sole *Pseudopleuronectes herzensteini*. *Aquaculture*, **240**, 517-530.
- Barahona-Fernandes, M. H. (1982) Body deformation in hatchery reared european sea bass *Dicentrarchus labrax* (L). Types, prevalence and effect on fish survival. *Journal of Fish Biology*, **21**, 239-249.
- Bardon, A., M. Vandeputte, M. Dupont-Nivet, H. Chavanne, P. Haffray, A. Vergnet and B. Chatain (2009) What is heritable component of spinal deformities in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)? *Aquaculture*, **294**, 194-201.
- Battaglione, S. C. and R. B. Talbot (1990) Initial swim bladder inflation in intensively

- reared Australian bass larvae, *Macquaria novemaculeata* (Steindachner) (Perciformes: Percichthyidae). *Aquaculture*, **86**, 431-442.
- Battaglione, S. C., S. McBride and R. B. Talbot (1994) Swim bladder inflation in larvae of cultured sand whiting, *Sillago ciliata* Cuvier (Sillaginidae). *Aquaculture*, **128**, 177-192.
- Bolla, S. and I. Holmefjord (1988) Effect of temperature and light on development of Atlantic halibut larvae. *Aquaculture*, **74**, 355-358.
- Boglione, C., G. Marino, A. Fusari, F. Ferreri, M. G. Finioia and S. Cataudella (1995) Skeletal anomalies in *Dicentrarchus labrax* juveniles selected for functional swimbladder. ICES Mar. Sci. Symp **201**, 163–169.
- Cahu, C., J. Z. Infante and T. Takeuchi (2003) Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture*, **227**, 245-258.
- Chang, S. L., G. H. Kou and I. C. Liao (2004) Temperature adaptation of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) in its early stage. *Zoological Studies*, **43**, 571-579.
- Chatain, B. (1989) Problems related to the lack of functional swimbladder in intensive rearing of *Dicentrarchus labrax* and *Sparus auratus*. Advances In tropical Aquaculture AQUACOP IFREMER Actes de Colloque **9**, 699-709.
- Chatain, B. and N. Ounais-Guschemann (1990) Improved rate of initial swim bladder inflation in intensively reared *Sparus auratus*. *Aquaculture*, **84**: 345-353.
- Chatain, B. (1994) Abnormal swimbladder development and lordosis in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus auratus*). *Aquaculture*, **119**, 371-379.
- Ching, F. F., A. Miura, Y. Nakagawa, K. Kato, S. Senoo, W. Sakamoto, K. Takii and S. Miyashita (2014) Flow field control via aeration adjustment for the enhancement of larval survival of the kelp grouper *Epinephelus bruneus* (Perciformes: Serranidae).



- Aquaculture Research*, **45**, 874-881.
- 中田 久・築山陽介・濱崎将臣・宮木廉夫 (2011) I 形態異常の低減化技術開発 (クエ) 長崎県水産試験場事業報告, 51-52.
- Cobcroft, J. M. and S. C. Battaglene (2013) Skeletal malformations in Australian marine finfish hatcheries. *Aquaculture*, **396-399**, 51-58.
- Cook, M. A., K. M. Guthrie, M. B. Rust and P. D. Plesha (2005) Effects of salinity and temperature during incubation on hatching and development of lingcod *Ophiodon elongates* Girard, embryos. *Aquaculture Research*, **36**, 1298-1303.
- Craig, M. T. and P. A. Hastings (2007) A molecular phylogeny of the groupers of the subfamily Epinephelinae (Serranidae) with a revised classification of the Epinephelini. *Ichthyological Research*, **54**, 1-17.
- Dedi, J., T. Takeuchi, T. Seikai and T. Watanabe (1995) Hypervitaminosis and safe levels of vitamin A for larval flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed *Artemia* nauplii. *Aquaculture*, **133**, 135-146.
- Divanach, P., C. Boglione, B. Menu, G. Koumoundouros, M. Kentouri and S. Cataudella (1996) Abnormalities in finfish mariculture: an overview of the problem, causes and solutions. Seabass and seabream culture: problems and prospects. Handbook of contributions and short communications presented at the international workshop held in Verona, Italy Oct. 16-18. European Aquaculture Soc Ostende Belgium: 45-66.
- Divanach, P., N. Papandroulakis, P. Anastasiadis, G. Koumoundouros and M. Kentouri (1997) Effect of water currents on the development of skeletal deformities in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) with functional swimbladder during postlarval and nursery phase. *Aquaculture*, **156**, 145-155.
- Doroshev, S. I. and J. W. Cornacchia (1979) Initial swim bladder inflation in the larvae

- of *Tilapia mossambica* (Peters) and *Morone saxatilis* (Walbaum). *Aquaculture*, **16**, 57–66.
- Dou, S. Z., R. Masuda, M. Tanaka and K. Tsukamoto (2005) Effects of temperature and delayed initial feeding on the survival and growth of Japanese flounder larvae. *Journal of Fish Biology*, **66**, 362–377.
- Fernandez, I., F. Hontoria, J. B. Ortiz-Delgado, Y. Kotzamanis, A. Estevez, J. L. Zambonino-Infante and E. Gisbert (2008) Larval performance and skeletal deformities in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed with graded levels of vitamin A enriched rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture*, **283**, 102-115.
- Fielder, D. S., W. J. Bardsley, G. L. Allan and P. M. Pankhurst (2005) The effects of salinity and temperature on growth and survival of Australian snapper, *Pagrus auratus* larvae. *Aquaculture*, **250**, 201-214.
- Fukuhara, O. (1989) A review of the culture of grouper in Japan, *Bulletin of the Nansei Regional Fisheries Research Laboratory*, **22**, 47-57.
- Gavaia, P. J., M. T. Dinis and M. L. Cancela (2002) Osteological development and abnormalities of the vertebral column and caudal skeleton in larval and juvenile stage of hatchery-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, **211**, 305-323.
- Georgakopoulou, E., P. Katharios, P. Divanach and G. Koumoundouros (2010) Effect of temperature on the development of skeletal deformities in gilthead seabream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758). *Aquaculture*, **308**, 13-19.
- Goolish, E. M. and K. Okutake (1999) Lack of gas bladder inflation by the larvae of zebrafish in the absence of an air-water interface. *Journal of Fish Biology*, **55**, 1054–1063.
- Graham, M. and H. Hop (1995) Aspects of reproduction and larval biology of arctic

- cod (*Boreogadus saida*). *Arctic*, **48**, 130-135.
- Grotmol, S., H. Kryvi and G. K. Totland (2005) Deformation of the notochord by pressure from the swim bladder may cause malformation of the vertebral column in cultured Atlantic cod *Gadus morhua* larvae: a case study. *Diseases of Aquatic Organisms*, **65**, 121-128.
- 橋本 博・今井彰彦・岩崎隆志・浜崎活幸・照屋和久・岩田和久・虫明敬一 (2012) 鰾の開腔状態が異なるカンパチ仔魚の摂餌と成長. *水産増殖*, **60**, 99-106.
- Hattori, M., Y. Sawada, Y. Takagi, R. Suzuki, T. Okada and H. Kumai (2003) Vertebral deformities in cultured red sea bream, *Pagrus major*, Temminck and Schlegel. *Aquaculture Research*, **34**, 1129-137.
- 服部 学 (2004) 養殖マダイの脊椎骨異常に関する研究. *近大水研報*, **9**, 1-66.
- Hattori, M., Y. Sawada, M. Kurata, S. Yamamoto, K. Kato and H. Kumai (2004) Oxygen deficiency during somitogenesis causes centrum defects in red sea bream, *Pagrus major* (Temminck et Schlegel). *Aquaculture Research*, **35**, 850-858.
- 林 政博 (1990) 養殖ブリに発生した変形魚について. *三重水技研報*. **4**. 1-12.
- 林田豪介・塚島康生・松清恵一・北島 力 (1984) 人工採苗スズキの鰾異常と脊柱前彎症の関連. *長崎水試研報*, **10**, 35-40.
- Helland, S., S. Lein, K. Hjelde and G. Bæverfjord (2009) Effect of water speed on lordosis and heart ventricle weight in cod. In: Bæverfjord, G., Helle, S., Hough, C. (Eds.), *Control of Fish Malformations in Fish Aquaculture: Science and Practice*. Rapid Press, Bertrange, Luxembourg, pp.53-57.
- 平田喜郎・浜崎活幸・照屋和久・虫明敬一 (2009a) マハタおよびクエ仔稚魚の成長にともなう体密度の変化. *水産増殖*, **75**, 652-660.
- 平田喜郎・浜崎活幸・今井彰彦・照屋和久・岩崎隆志・浜田和久・虫明敬一 (2009b) カンパチ仔魚の生残, 成長, 摂餌および鰾の開腔に及ぼす光周期と水温の影響

- 響. 日本水産学会誌, **75**, 995-1003.
- 今井彰彦・岩崎隆志・橋本 博・平田喜郎・浜崎活幸・照屋和久・浜田和久・虫明敬一 (2001) 飼育試験と鰾の個体発生から考察したカンパチ仔魚の鰾開腔メカニズム. 日本水産学会誌, **77**, 845-852.
- 板沢靖男 (1991) 鰾: その浮力調節機能. 魚類生理学 (板沢靖男, 羽生功編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 151-165.
- Jacquemond, F. (2004a) Sorting Eurasian perch fingerlings (*Perca fluviatilis* L.) with and without functional swim bladder using tricaine methane sulfonate. *Aquaculture*, **231**, 249-262.
- Jacquemond, F. (2004b) Separated breeding of perch fingerlings (*Perca fluviatilis* L.) with and without initial inflated swim bladder: comparison of swim bladder development, skeleton conformation and growth performances. *Aquaculture*, **239**, 261-273.
- 川辺勝俊・木村ジョンソン (2008) 油膜回収装置によるアカハタ仔魚の鰾開腔率改善. 水産増殖, **56**, 613-617.
- 川辺勝俊 (2005) アカハタ卵の発生過程とふ化におよぼす水温の影響. 水産増殖, **53**, 333-342.
- 萱野泰久・尾田 正 (1991) キジハタ卵の発生に及ぼす水温の影響について. 水産増殖, **39**, 309-313.
- Kihara, M., S. Ogata, N. Kawano, I. Kubota and R. Yamaguchi (2002) Lordosis induction in juvenile red sea bream, *Pagrus major*, by high swimming activity. *Aquaculture*, **212**, 149-158.
- 北島 力 (1978) マダイの採卵と稚魚の量産に関する研究. 長崎県水産試験場論文集, **5**, 1-92.
- 北島 力 (1979) クロダイ人工種苗の鰾の異常および脊柱屈曲症について. 長

- 崎水試研報, **5**, 27-32.
- 北島 力・塚島康生・藤田矢郎・渡辺 武・米 康生 (1981) マダイ仔魚の空気呑み込みと鰾の開腔および脊柱前彎症との関連. 日本水産学会誌, **47**, 1289-1294.
- 北島 力・高屋雅生・塚島康生・荒川敏久 (1991) マハタの卵内発生および飼育による仔稚魚の形態変化. 魚類学雑誌, **38**, 47-55.
- Kitajima, C., T. Watanabe, Y. Tsukashima and S. Fujita (1994) Lordotic deformation and abnormal development of swim bladders in some hatchery-bred marine physoclistous fish in Japan. *Journal of the World Aquaculture Society*, **25**, 64-77.
- Kline, R. J., I. Khan, K. Soyano and M. Takushima (2008) Role of follicle-stimulating hormone and androgens on the sexual inversion of sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *North American Journal of Aquaculture*, **70**, 266-272.
- Koh, I. C. C., K. Yokoi, M. Tsuji, Y. Tsuchihashi and H. Ohta (2010) Cryopreservation of sperm from seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. *Cryobiology*, **61**, 263-267.
- Koh, I. C. C., D. Tanaka D, T. Itagane, M. Tsuji, Y. Tsuchihashi and H. Ohta (2013) Dry shipper cryopreservation of seven-band grouper (*Epinephelus septemfasciatus* Thunberg) spermatozoa. *Aquaculture Research*, **44**, 59-66.
- Komada, N. (1982) Vertebral anomalies in the cyprinid fish, *Tribolodon hakonensis*. *Japanese Journal of Ichthyology*, **29**, 185-192.
- Koumoundouros, G., P. Divanach, A. Savaki and M. Kentouri (2000) Effects of three preservation methods on the evolution of swimbladder radiographic appearance in sea bass and sea bream juveniles. *Aquaculture*, **182**, 17-25.
- Koumoundouros, G., E. Maingot, P. Divanach and M. Kentouri (2002) Kyphosis in reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): ontogeny and effects on mortality.

*Aquaculture*, **209**, 49-58.

Koumoundouros, G. (2010) Morpho-anatomical abnormalities in Mediterranean marine aquaculture. *Recent Advances in Aquaculture Research*, 125-148.

Koven, W. M., A. Tandler, G. Wm. Kissil, D. Sklan, O. Friezlander and M. Harel (1990) The effect of dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids on growth, survival and swim bladder development in *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture*, **91**, 131-141.

Kranenbarg, S., J. H. Waarsing, M. Muller, H. Weinans and J. L. Van Leeuwen (2005) Lordotic vertebrae in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) are adapted to increased loads. *Journal of Biomechanics*, **38**, 1239–1346.

Kurata, M., M. Seoka, Y. Nakagawa, Y. Ishibashi, H. Kumai and Y. Sawada (2012) Promotion of initial swimbladder inflation in Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis* (Temminck and Schlegel), larvae. *Aquaculture Research*, **43**, 1296-1305.

Kurata, M., Y. Ishibashi, M. Seoka, T. Honryo, S. Katayama, H. Fukuda, K. Takii, H. Kumai, S. Miyashita and Y. Sawada (2013) Influence of swimbladder inflation failure on mortality, growth and lordotic deformity in Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*, (Temminck & Schlegel) postflexion larvae and juveniles. *Aquaculture Research*, doi: 10.1111/are.12304.

Kurata, M., Y. Ishibashi, K. Takii, H. Kumai, S. Miyashita and Y. Sawada (2014) Influence of initial swimbladder inflation failure on survival of Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis* (Temminck and Schlegel), larvae. *Aquaculture Research*, **45**, 882–892.

Kurokawa, T., T. Okamoto, K. Gen, S. Uji, K. Murashita, T. Unuma, K. Nomura, H. Matsubara, S. K. Kim, H. Ohta and H. Tanaka (2008) Influence of water temperature on morphological deformities in cultured larvae of Japanese eel, *Anguilla japonica*, at completion of yolk resorption. *Journal of the World*

- Aquaculture Society*, **39**, 726-735.
- La Mesa, G., P. Louisy and M. Vacchi (2002) Assessment of microhabitat preferences in juvenile dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) by visual sampling. *Marine Biology*, **140**, 175–185.
- Lein, I., I. Holmefjord and M. Rye (1997) Effects of temperature on yolk sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture*, **157**, 123-135.
- Lijalad, M. and M. D. Powell (2009) Effects of lower jaw deformity on swimming performance and recovery from exhaustive exercise in triploid and diploid Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Aquaculture*, **290**, 145-154.
- 牧野 直・内山雅史・岩波重之・遠山忠次・田中 克 (1995) スズキの仔魚期における鰾の分化と発達. 日本水産学会誌, **61**, 143-150.
- Marty, G. D., D. E. Hinton and R. C. Summerfelt (1995) Histopathology of swimbladder noninflation in walleye (*Stizostedion vitreum*) larvae: role of development and inflammation. *Aquaculture*, **138**, 35-48.
- Matsuoka, M. (1987) Development of the skeletal tissues and skeletal muscles in the red sea bream. *Bulletin of the Seikai Regional Fisheries Research Laboratory*, **65**, 1-114.
- Matsunari, H., H. Hashimoto, K. Oda, Y. Masuda, H. Imaizumi, K. Teruya, H. Furuita, T. Yamamoto, K. Hamada and K. Mushiake (2013) Effects of docosaenoic acid on growth, survival and swim bladder inflation of larval amberjack (*Seriola dumerili*, Risso). *Aquaculture Research*, **44**, 1696–1705.
- 松里寿彦 (1986) 魚類の骨異常に関する研究. 養殖研報, **10**, 57-179.
- Mihelakakis, A. and T. Yoshimatsu (1998) Effects of salinity and temperature on incubation period, hatching rate and morphogenesis of the red sea bream. *Aquaculture International*, **6**, 171-177.

- 睦谷一馬 (1988) 人工飼育におけるマコガレイ仔稚魚の成長と変態について。  
水産増殖, **36**, 27-32.
- Nagano, N., A. Hozawa, W. Fujiki, T. Yamada, K. Miyaki, Y. Sakakura and A. Hagiwara (2007) Skeletal development and deformities in cultured larval and juvenile seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus* (Thunberg). *Aquaculture Research*, **38**, 121-130.
- 中川雅弘・堀田卓郎・吉田一範・服部圭太 (2011) 配合飼料の給餌量の違いがクエ *Epinephelus bruneus* 種苗の成長と生残に及ぼす影響。水産増殖, **59**, 579-584.
- Okamura, A., Y. Yamada, N. Horie, T. Utoh, N. Mikawa, S. Tanaka and K. Tsukamoto (2007) Effects of water temperature on early development of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fisheries Science*, **73**, 1241-1248.
- Ottesen, O. and S. Bolla (1998) Combined effects of temperature and salinity on development and survival of Atlantic halibut larvae. *Aquaculture International*, **6**, 103-120.
- Peruzzi, S., J. I. Westgaard and B. Chatain (2007) Genetic investigation of swimbladder inflation anomalies in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture*, **265**, 102-108.
- Pierre, S., S. Gaillard, N. Prevot-Dalvis, J. Aubert, O. Rostaing-Capaillon, D. Leung-Tack and G. Joel-P (2008) Grouper aquaculture: Asian success and Mediterranean trials, *Aquatic Conservation: Marine And Freshwater Ecosystems*. *Aquatic Conserv: Marine and Freshwater Ecosystems*, **18**, 297-308.
- Pittman, K., A. B. Skiftesvik and T. Harboe (1989) Effect of temperature on growth rates and organogenesis in the larvae of halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Rapp P-v Reun Cons Int Explor Mer* **191**, 421-430.



- Pittman, K., O. Bergh, I. Opstad and A. B. Skiftesvik (1990) Development of eggs and yolk sac larvae of halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Journal of Applied Ichthyology*, **6**, 142-160.
- Polo, A., M. Yufera and E. Pascual (1991) Effects of temperature on egg and larval development of *Sparus aurata* L. *Aquaculture*, **92**, 367-375.
- Rasband, W. S. (1997-2011) ImageJ. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, Available at <http://imagej.nih.gov/ij/> (accessed 27 April 2011).
- Rieger, P. W. and R. C. Summerfelt (1998) Microvideography of gas bladder inflation in larval walleye. *Journal of Fish Biology*, **53**, 93-99.
- Roy, M. N, V. E. Prince and R. K. Ho (1999) Heat shock produces periodic somitic disturbances in the zebrafish embryo. *Mechanism of Development*, **85**, 27-34.
- Russo, T., M. Scardi, C. Boglione and S. Cataudella (2011) Application of the self-organizing map to study of skeletal anomalies in aquaculture: the case of dusky grouper (*Epinephelus marginatus* Lowe, 1934) juveniles reared under different rearing conditions. *Aquaculture*, **315**, 69-77.
- Ruttanapornvareesakul, Y., Y. Sakakura and A. Hagiwara (2007) Effect of proportions on survival of seven-band grouper *Epinephelus septemfasciatus* (Thunberg) and devil stinger *Inimicus japonicus* (Cuvier) larvae. *Aquaculture Research*, **38**, 193-200.
- Ruttanapornvareesakul, Y., Y. Sakakura and A. Hagiwara (2010) Screening of enzyme activity for assessing the condition of larvae in the seven-band grouper *Epinephelus septemfasciatus* and devil stinger *Inimicus japonicus*. *Fisheries Science*, **76**, 295-304.
- Sabate, F. S., Y. Sakakura, M. Shiozaki and A. Hagiwara (2009) Onset and development of aggressive behavior in the early life stage of the seven-band

- grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Aquaculture*, **290**, 97-103.
- Sakakura, Y., S. Shiotani, H. Chuda and A. Hagiwara (2006) Improvement of the survival in the seven-band grouper *Epinephelus septemfasciatus* larvae by optimizing aeration and water inlet in the mass-scale rearing tank. *Fisheries Science*, **72**, 939-947.
- Sakakura, Y., S. Shiotani, H. Chuda and A. Hagiwara (2007a) Flow field control for larviculture of seven-band grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Aquaculture*, **268**, 209-215.
- Sakakura, Y., S. Shiotani, M. Shiozaki and A. Hagiwara (2007b) Larval rearing without aeration: a case study of the seven-band grouper *Epinephelus septemfasciatus* using a wave maker. *Fisheries Science*, **73**, 1199-1201.
- Santerre, M. T. and R. C. May (1977) Some effects of temperature and salinity on laboratory-reared eggs and larvae of *Polydactylus sexfilis* (pisces: polynemidae). *Aquaculture*, **10**: 341-351.
- Sawada, Y., M. Hattori, M. Iteya, Y. Takagi, K. Ura, M. Seoka, K. Kato, M. Kurata, H. Miyatake, S. Katayama and H. Kumai (2006) Induction of centrum defects in amberjack *Seriola dumerili* by exposure of embryos to hypoxia. *Fisheries Science*, **72**, 364-372.
- 澤山英太郎・高木基裕 (2011) 軀幹部の湾曲を示すヒラメ人工種苗の特徴と遺伝要因の推定. 水産増殖, **59**, 585-591.
- 澤山英太郎・高木基裕 (2012) ヒラメ人工種苗で見られた重度の脊椎骨癒合個体の遺伝解析. 日本水産学会誌, **78**, 429-438.
- Seikai, T., J. B. Tanangonan and M. Tanaka (1986) Temperature influence on larval growth and metamorphosis of the Japanese flounder *Palalichthys olivaceus* in the laboratory. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **52**, 977-982.

- Sfakianakis, D. G., G. Koumoundouros, P. Divanach and M. Kentouri (2004) Osteological development of the vertebral column and of the fins in *Pagellus erythrinus* (L. 1758). Temperature effect on the developmental plasticity and morpho-anatomical abnormalities. *Aquaculture*, **232**, 407-424.
- Sfakianakis, D. G., E. Geogakopoulou, I. E. Papadakis, P. Divanach, M. Kentouri and G. Koumoundouros (2006) Environmental determinants of haemal lordosis in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture*, **254**, 54-64.
- Sfakianakis, D. G., I. E. Papadakis, M. Papadaki, I. Sigelaki and C. C. Mylonas (2013) Influence of rearing temperature during early life on sex differentiation, haemal lordosis and subsequent growth during the whole production cycle in European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, **412–413**, 179–185.
- Shein, N. L., H. Chuda, T. Arakawa, K. Mizuno and K. Soyano (2004) Ovarian development and final oocyte maturation in cultured sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Fisheries Science*, **70**, 360-365.
- 塩谷茂明・赤澤敦司・阪倉良孝・中田久・荒川敏久・萩原篤志（2003）仔魚飼育水槽内の流場の計測：マハタ飼育水槽の検討例。水産工学, **39**, 205-212.
- Shiotani, S., A. Hagiwara, Y. Sakakura and H. Chuda (2005) Estimation of flow in a rearing tank of marine fish larvae by simplified numerical computation-a case of two-dimensional flow. *Aquaculture Engineering*, **32**, 465-481.
- Sokal, R. R. and F. J. Rohlf (1983) 頻度の分析. 生物統計学 (藤井宏一訳), 共立出版株式会社, 東京, pp. 349–378.
- Song, Y. B., S. R. Oh, J. P. Seo, B. G. Ji, B. S. Lim, Y. D. Lee and H. B. Kim (2005) Larval development and rearing of longtooth grouper *Epinephelus bruneus* in Jeju island, Korea. *Journal of the World Aquaculture Society*, **36**, 209-216.

- 末廣考伸・那須敏朗・谷口直樹・前田茂樹・澤田好史・宮下 盛・村田 修 (2004) 軟X線画像診断による骨格異常マダイの追跡試験. 近大水研報, **9**, 67-77.
- Sugama, K., T. S. Ismi and K. M. Setiawati (2004) Effect of water temperature on growth, survival and feeding rate of humpback grouper (*Cromileptes altivelis*) larvae. In “Advances in grouper Aquaculture” (ed by Rimmer MA, McBride S, Williams KC), ACIAR Monograph **110**, 61-66.
- Summerfelt, R.C. (2013) Gas bladder inflation in larval fish aquaculture. In “*Larval Fish Aquaculture*” (ed. By J.G. Qin), Nova Science Publishers, New York, pp. 125-142.
- 竹丸 巖・加塩信広・前野幸二 (2009) 鹿児島湾の養殖ブリおよびカンパチで発生した上湾症. 水産増殖, **57**, 255-264.
- 竹丸 巖 (2009) 養殖ブリ上湾症の発生と成熟との関係. 水産増殖, **57**, 301-306.
- 田中由香里・坂倉良孝・中田 久・萩原篤志・安元 進 (2005) マハタ仔魚のワムシサイズに対する摂餌選択性. 日本水産学会誌, **71**, 911-916.
- 照屋和久・與世田兼三 (2006) クエ仔魚の成長と生残に適した初期摂餌条件と大量種苗量産試験. 水産増殖, **54**, 187-194.
- 照屋和久・與世田兼三・岡 雅一・西岡豊弘・中野昌次・森 広一郎・菅谷琢磨・浜崎活幸 (2008) 光周期がマハタ仔魚の生残, 成長および摂餌に及ぼす影響. 日本水産学会誌, **74**, 645-652.
- 照屋和久 (2009) ハタ科魚類の人工繁殖と種苗放流に関する研究. 博士学位論文, 東京海洋大学, 東京.
- 照屋和久・浜崎活幸・橋本 博・片山俊之・平田喜郎・鶴岡廣哉・林 知宏・虫明敬一 (2009) カンパチ仔魚の成長にともなう体密度と水槽内鉛直分布の変化. 日本水産学会誌, **75**, 54-63.
- 照屋和久 (2010) ハタ科魚類の人工繁殖と種苗放流に関する技術開発研究. 日

- 本水産学会誌, **76**, 795-798.
- Toledo, J. D., N. B. Caberoy, G. F. Qunitio, C. H. Choresca and H. Nakagawa (2002) Effects of salinity, aeration and light intensity on oil globule absorption, feeding incidence, growth and survival of early-stage grouper *Epinephelus coioides* larvae. *Fisheries Science*, **68**, 478-483.
- Trotter, A. J., P. M. Pankhurst, D. T. Morehead and S. C. Battaglione (2003a) Effects of temperature on initial swim bladder inflation and related development in cultured striped trumpeter (*Latris lineata*) larvae. *Aquaculture*, **221**, 141-156.
- Trotter, A. J., P. M. Pankhurst and S. C. Battaglione (2005) A finite interval of initial swimbladder inflation in *Latris lineata* revealed by sequential removal of water-surface films. *Journal of Fish Biology*, **67**, 730-741.
- 土橋靖史・栗山 功・黒宮香美・柏木正章・吉岡基 (2002) マハタ種苗生産におけるウイルス性神経壊死症. 水産増殖, **50**, 355-361.
- 土橋靖史・栗山 功・黒宮香美・柏木正章・吉岡基 (2003a) マハタの種苗生産過程における仔魚の活力とその生残に及ぼす水温, 照明およびフィードオイルの影響. 水産増殖, **51**, 49-54.
- 土橋靖史・田中秀樹・黒宮香美・柏木正章・吉岡基 (2003b) マハタ雄性化のためのホルモン投与法の検討. 水産増殖, **51**, 189-196.
- 土橋靖史・高鳥暢子・栗山 功・羽生和宏・辻 将治・津本欣吾 (2007) 水温および日長調整によるマハタの9月採卵. 水産増殖, **55**, 395-402.
- 塚本勝巳 (1991) 遊泳生理. 魚類生理学 (板沢靖男, 羽生功編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 539-584.
- Tucker, J. W. (1999) Species profile grouper aquaculture. Southern Regional Aquaculture Center; SRAC Publication **721**.
- Uji, S., T. Suzuki, T. Iwasaki, K. Teruya, K. Hirasawa, M. Shirakashi, S. Onoue, Y.

- Yamashita and K. Okuzawa (2013) Development of the musculature and muscular abnormalities in larval seven-band grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Fisheries Science*, **79**, 277-284.
- Uji, S., T. Suzuki, T. Iwasaki, K. Teruya, K. Hirasawa, M. Shirakashi, S. Onoue, Y. Yamashita, M. Tsuji, Y. Tsuchihashi and K. Okuzawa (2014) Effect of temperature, hypoxia and disinfection with ozonated seawater during somitogenesis on muscular development of the trunk in larval sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* (Thunberg). *Aquaculture Research*, doi:10.1111/are.12425.
- Wang, L.H and C. L. Tsai (2000) Effects of temperature on the deformity and sex differentiation of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Experimental Zoology*, **286**, 534-537.
- Wiegand, M. D., L. G. Buchanan, J. M. Loewen and C. M. Hewitt (1988) Effects of rearing temperature on development and survival of embryonic and larval goldfish. *Aquaculture*, **71**, 209-222.
- Wiegand, M. D., J. M. Hataley, C. L. Kitchen and L. G. Buchanan (1989) Induction of developmental abnormalities in larval goldfish, *Carassius auratus* L., under cool incubation conditions. *Journal of Fish Biology*, **35**, 85-95.
- Woolley, L. D. and J. G. Qin (2010) Swimbladder inflation and its implication to the culture of marine finfish larvae. *Reviews in Aquaculture*, **2**, 181-190.
- Wu, X., Y. Washio, M. Aritaki, Y. Fujinami, D. Shimizu, H. Hashimoto, T. Iwasaki, S. Uji and T. Suzuki (2011) Staging of initial pepsinogen and chitinase expression and complete gastic gland development within the larval stomach of Japanese flounder, spotted halibut, seven-band grouper and greater amberjack. *Aquaculture*, **314**, 165-172.
- Wullur, S., Y. Sakakura and A. Hagiwara (2011) Application of the minute

- monogonont rotifer *Proales similis* de beauchamp in larval rearing of seven-band grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Aquaculture*, **315**, 355-360.
- Yamaoka, K., T. Nanbu, M. Miyagawa, T. Isshiki and A. Kusaka (2000) Water surface tension-related deaths in prelarval red-spotted grouper. *Aquaculture*, **189**, 165-176.
- Yoseda, K., S. Dan, T. Sugaya, K. Yokogi, M. Tanaka and S. Tawada (2006a) Effects of temperature and delayed initial feeding on the growth of malabar grouper (*Epinephelus malabaricus*) larvae. *Aquaculture*, **256**, 192-200.
- 與世田兼三・照屋和久・山本和久・浅見公雄（2006）異なる水温と初回摂餌の遅れがスジアラ仔魚の摂餌，成長，および生残に及ぼす影響．水産増殖，**54**，43-50.
- Zilberg, D., R. Ofir, T. Rabinski and A. Diamant (2004) Morphological and genetic characterization of swimbladder non-inflation in angelfish *Pterophyllum scalare* (Cichidae). *Aquaculture*, **230**, 13-27.

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始懇切なるご指導とご校閲を賜った近畿大学水産学研究所教授 澤田好史博士に深甚なる感謝の意を表します。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水産学研究所教授 滝井健二博士、近畿大学農学部教授 太田博巳博士ならびに近畿大学農学部教授 小林徹博士に厚くお礼申し上げます。また、太田博巳博士には、学生時代から今日に至るまで並々ならぬご高配を賜わり、未熟な私を水産研究分野へ導いて戴いたことについて、衷心よりお礼申し上げます。さらに、福山大学生命工学部海洋生物科学科教授 有瀧真人博士には、マハタ人工種苗の形態異常低減という課題に直面し、途方に暮れていた私に有益なご助言と激励を与えて戴きました。この場を借りて心から深謝の意を表します。

長期間にわたる研究の機会と種々の便宜を与えて戴くとともに御指導下さった三重県水産研究所 西村守央元所長，中島博司元所長，紀平正人元所長および遠藤晃平所長に心からお礼申し上げます。

独立行政法人水産総合研究センター増養殖研所主任研究員 宇治督博士には、飼育試験の協力をして戴くとともに、終始貴重な御助言と御指導を賜りました。ここに記して深謝いたします。

本研究は、三重県水産研究所尾鷲水産研究室で行われ、同室の職員および（公財）三重県水産振興事業団尾鷲栽培漁業センターの職員各位にはマハタ親魚および仔稚魚の飼育や管理，人工授精，餌料生物の管理について多大のご協力を賜りました。ここに厚くお礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、3次元流向流速計による飼育水の流場の測定および解析に関してご助言いただいた近畿大学水産研究所大島実験場場長補佐 倉田道雄博士および近畿大学大学院農学研究科水産学専攻 伊奈佳晃博士，英文要旨



のご高閲を賜りました近畿大学水産研究所浦神実験場講師 Biswas Amal博士に感謝の気持ちを表します。

さらに、研究の遂行にあたり、種々のご助言をいただいた三重大学生物資源学部教授 吉岡基博士および准教授 淀大我博士に謹んで感謝の意を表します。当時の三重大学生物資源学部4年生 小原大昇氏および仲野祥子氏には飼育試験で多大なるご協力を賜りました。ここに感謝の意を表します。

そして、学生時代から社会人に至るまで、自分の進路に対し温かく見守り支援して下さった両親に深い感謝の意を表します。さらに、博士課程入学を快く承諾し、どのような状況においても応援してくれた素晴らしい妻に心から感謝するとともに、研究の励みとなった長女と長男に感謝します。

本研究は三重県単独事業：平成16～18年度「三重のマハタ」高品質・早期安定種苗生産技術開発事業」、平成19～22年度「マハタ・クエの種苗生産・養殖高度化技術開発事業」および平成23～26年度「マハタの産地間競争力向上事業」によったことを記して、感謝の意を表します。また、本研究は、文部科学省グローバルCOEプログラムの支援を受けて行われた研究成果を数多く含んでおり、その支援には深く感謝致します。