

博士学位論文

クロマグロ稚魚の飼育成績
向上に関する研究

令和3年11月15日

(指導: 石橋泰典教授)

岡田貴彦

クロマグロ稚魚の飼育成績向上に関する研究

岡田 貴彦

(指導:石橋泰典教授)

Study on improvement of growth performance in
(breeding of) juvenile Pacific bluefin tuna *Thunnus
orientalis*(*Temminck and Schlegel*)

Tokihiko Okada

November, 2021

(Advisor : Prof. Yasunori Ishibashi)

目次

序論	1
本論	
第I章 海上生簀におけるクロマグロ稚魚の死亡原因	6
I-1) 材料および方法	7
I-2) 結果	8
I-3) 考察	12
第II章 異物誤飲の防除法の検討	17
II-1) 材料および方法	17
II-2) 結果	20
II-3) 考察	28
第III章 沖出し前後の給餌方法の検討	32
III-1) 沖出し直前の無給餌時間の影響	33
III-1-1) 材料および方法	33
III-1-2) 結果	36
III-1-3) 考察	39
III-2) 沖出し前後の適正給餌方法の検討	41
III-2-1) 陸上水槽での給餌試験	42
III-2-1-1) 材料および方法	42
III-2-1-2) 結果	45

III-2-2 海上生簀での給餌試験	52
III-2-2-1) 材料および方法	52
III-2-2-2) 結果	54
III-2-2-3) 考察	60
第IV章 海上生簀への効果的な沖出しサイズ	64
IV-1)材料および方法	65
IV-2) 結果	68
IV-3) 考察	75
第V章 小型生簀の変則使用による生残率の向上	81
V-1) 材料および方法	81
V-2) 結果	85
V-3) 考察	90
第VI章 小型生簀における適性飼育密度	94
VI-1) 材料および方法	95
VI-2) 結果	98
VI-3) 考察	104
第VII章 稚魚の船舶輸送における活魚水槽の壁面色および模様の効果	108
VII-1) 材料および方法	109
VII-2) 結果	113
VII-3) 考察	119

第VIII章 総括 123

和文要旨 123

英文要旨 (Summary) 130

文献 139

謝辞

序論

クロマグロ類はスズキ目，サバ亜目，サバ科，マグロ属に属し，その中で最も大型で，個体の最大サイズとしては尾叉長 304 cm，体重 679 kg の記録がある（藤田 1998）。クロマグロ類には太平洋に分布する太平洋クロマグロ *Thunnus orientalis* (Temminck and Schelegel) と大西洋や地中海に分布する大西洋クロマグロ *Thunnus thynnus* (Linnaeus) の 2 種が存在する。両種は外見上に多くの共通点があることから長い間地理的亜種とされてきたが，近年に発達した分子遺伝学的研究から現在は別種とされている（Collete, 1999）。ここでは日本で行われているマグロ養殖の対象魚である太平洋クロマグロの種苗生産について，海上生簀への沖出し¹⁾過程からその後の中間育成時に発生する大量死の原因およびその防除対策について研究したので報告する。

太平洋クロマグロの生息域は，主に北太平洋の北緯 20～40 度の温帯域で，北西太平洋の台湾からアメリカ・メキシコ西岸まで広く東西を渡洋回遊する。野生個体の成熟開始年齢は 4 歳以上とされ，その産卵場所は台湾から南西諸島近海と日本海南西部に限られた海域であり，産卵回帰性の強いことが知られる（藤田 1998）。そのため，太平洋クロマグロは日本の栽培漁業対象魚としてマグロ類の中で最も有望と考えられる（宮下 2002）。クロマグロは延縄・引き縄釣り・定置網・巻き網などで漁獲されるが，その漁獲量はマグロ属の中でも極めて少なく，重要食用マグロ 6 種（太平洋クロマグロ，大西洋クロマグロ，ミナミマグロ，メバチ，キハダ，ビンナガ）の総漁獲量の 1% にも満たない（2017 年水産庁）。

食材としてのマグロ類を見ると，日本では縄文時代の貝塚からマグロ類の骨が発見されており，江戸時代後期にはヅケなどで生食されるなど（中野，岡 2010），日本人は古くからマグロ類を利用してきた。戦後，コールドチェ

ーンの整備とともに高級魚として刺身や寿司などで食されるようになり，現在では刺身食材として欠かすことのできない人気魚種である。クロマグロ類はマグロ類の中で最も美味とされ，刺身や寿司の食材として人気が高く，漁獲量の希少性と相まって高級食材として高値で取引される。かつて日本が世界中からマグロ類を輸入，消費した時代もあったが，2013年に和食がユネスコ無形世界遺産に登録されるなど世界中で和食がもてはやされ，クロマグロが注目されるようになった。今では世界中でクロマグロが消費されるようになり，以前にもまして天然クロマグロの乱獲による資源の枯渇問題が世界中で議論されるようになった。

クロマグロに関する資源保護政策として，CITES（絶滅のおそれのある野生動植物の国際取引に関する条約）の会議で1992年および2010年に大西洋クロマグロの付属書掲載が提案された（熊井ら2010）。これを皮切りに2011年にはICUNレッドリストの「絶滅危惧IB類」に同種が登録されたほか，2014年にはクロマグロが「絶滅危惧II類」に引き上げられた（山本2016）。また，マグロ類が広く沿岸国をまたいで分布・回遊する高度回遊性魚類であるため，マグロ類全体の資源管理に関しては，国際的な資源管理が必要になった。現在では全米熱帯まぐろ類委員会（IATTC），大西洋まぐろ類保存国際委員会（ICCAT），みなみまぐろ保存委員会（CCSBT），インド洋まぐろ類委員会（IOTC）および中西部太平洋まぐろ類委員会（WCPFC）の5つのマグロ類国際委員会で資源管理されており，太平洋クロマグロは，この内IATTCとWCPFCによって管理されている。特に日本では天然のクロマグロ未成魚を捕獲して養殖するため，その資源への負荷が大きいとされる。2014年には中西部太平洋まぐろ類委員会（WCPFC）がクロマグロの漁獲枠を2002～04年の平均から半減することを決め，日本におけるクロマグロ蓄養殖事業の存続が難しくなった。

一方、クロマグロの増養殖研究の取り組みをみると、日本では1970年に水産庁が企画した「マグロ類養殖技術開発試験」が3年間のプロジェクトとして開始された（宮下2002）。近畿大学水産研究所は他の6研究機関とともに、このプロジェクトに参画して、クロマグロの養殖技術開発に向けて研究をスタートさせた。近畿大学水産研究所は1970年から天然採捕されたクロマグロ幼魚（以下、ヨコワ）の活け込みⁱⁱ⁾試験を開始し、養成親魚からの自然産卵を目指した。1972年にプロジェクトは終了したが、その後も研究を続けた結果、1974年に活け込んだ天然ヨコワの人工飼育に成功し（原田1971）、1979年に養成クロマグロからの初めての採卵・人工孵化に成功した（原田1979）。その後、種苗生産技術の開発を目指し、1997年には人工種苗を民間養殖業者に販売するに至った。そして研究開始から32年後の2002年に、人工孵化から養成したクロマグロが自然産卵し、世界で初めて完全養殖を達成させた（熊井2003）。これによってクロマグロの天然資源に依存することのない、持続可能なクロマグロ養殖が可能になった。

近畿大学水産研究所のクロマグロ種苗生産では、海上生簀の親魚が自然産卵した受精卵を陸上水槽に収容し、30～40日齢まで飼育して、体長40～70mm程度に成長した時点で海上生簀に沖出しする。その後、60日齢に達する頃には天然種苗と同等の体長200～300mmに成長する（宮下2002）。しかし、クロマグロの種苗生産は他魚種に比べて非常に難しく、近畿大学水産研究所が2002年に完全養殖を達成したが、その当時の陸上水槽における（37～44日齢）生残率は1.3%であった。その後の海上生簀における30日間の間育成の生残率は35.4%であり、卵からの生残率を計算するとわずか0.5%であった（未発表）。その後、種苗の量産化を目指して、陸上飼育方法の改善や生産規模の拡大によって2009年以降は10万尾以上の沖出し稚魚を安

定して生産できるようになった。陸上施設における稚魚の量産化は生残率を向上させながら、生産規模や収容回数を増やすことによって可能になった。

一方、近畿大学水産研究所がクロマグロの沖出し稚魚の飼育に使用できる海上生簀は特定区画漁業権の制約により、増やすことが困難である。また、その生簀の使用期間は一年のうちに数か月と短く、漁場使用料を支払う側からすると無駄な出費となる。故に海上生簀においては沖出しされた稚魚の生残率を向上させることが最も重要である。

沖出し後の大量死の主な原因は衝突死とされ、何らかの刺激に対する驚愕反応による突進遊泳によって引き起こされると考えられた（宮下 2002）。そこで、その軽減対策として海上生簀を大型化し、突発遊泳した際に生簀網に衝突するまでの距離を稼ぐ方法を見出した。すなわち、飼育生簀を一辺 6 m (36 m^2) から直径 12 m の八角形 (120 m^2)、さらには直径 30 m (706.5 m^2) へと拡大することによって生残率は向上したが、突発的に大量死が発生するなど、まだまだ不安定な状況であった。その後、石橋ら（2005）の陸上水槽における研究によってクロマグロ稚魚の衝突・接触死は、クロマグロ稚魚の暗所視感度の低さが原因で、特に水槽のスペース等が変化する移動直後の夜間に大量死の起きやすいことが解明された。そして、夜間の照度を 150 lx 以上に保つことによって衝突・接触死の発生を防除できる効果が報告された。そこで、2006 年には、実際に海上生簀に夜間照明を設置することにより、完全養殖達成以来 4 年間の沖出し 50 日後の平均生残率を 16.8% から 35.2% へ 2 倍以上に向上させることができた。しかし、2009 年からクロマグロ人工種苗の量産化を目指し、10 万尾以上の稚魚を沖出しできるようになったが、成長の早いクロマグロ稚魚を期日内に沖出ししなければならず、飼育水槽からの取り上げ作業や輸送によると考えられるダメージによって、再び沖出し後の生残率が不安定になった。

クロマグロ天然資源は希少であるがために、クロマグロ養殖業が持続可能であるためには、種苗を野生個体に頼ってその天然資源に過度な負担を掛けなくてはならない。近畿大学水産研究所はクロマグロ養殖産業を持続可能なものにすべく、養殖原魚である種苗を人工種苗で担うための技術開発を行っており、沖出し後の生残率の向上が喫緊の課題となった。本研究は実際の生産現場でのこの課題解決に寄与すべく、養殖現場の環境や生産規模での実験を繰り返し行い、得られた成果である。

本論文は序論とそれに続く本論I～VIII章で構成されている。序論に続く本論の第I章では、改めて沖出し後の死亡原因の調査を詳細に行い、その対策を各章でそれぞれ検討した。まず第II章では、第I章で明らかになった死亡原因である異物の誤飲の防除策について検討した。また、第III章からは沖出し後の摂餌不良による成長不良の対策として、沖出し前後の給餌方法について、続けて第IV章では海上生簀への適切な沖出しサイズについて、第V章では小型生簀の変則使用による生残率の向上について、第VI章で小型生簀における適正飼育密度について検討を行うことで実用的な生産技術の確立に成功した。第VII章では、クロマグロ稚魚の輸送時の大量死対策として、稚魚の船舶輸送における活魚水槽の壁面色および模様の効果について検討を行った。最後に第VIII章では本研究を統括し、実際の生産現場で応用可能な沖出し稚魚の生残率の向上方法を提案した。

本研究がこれからのクロマグロ養殖の発展に、多少なりとも貢献できれば幸いである。

i) 沖出し：陸上水槽で飼育していた稚魚を海上生簀に輸送し、收容すること。

ii) 活け込み：ここでは漁師が引き縄釣り漁法で釣獲した天然ヨコワを飼育生簀に收容すること。

第 I 章 海上生簀におけるクロマグロ稚魚の死亡原因

近畿大学水産研究所では、1994年に12年振りに養成していたクロマグロが自然産卵し、クロマグロ人工種苗生産の研究が再スタートした。そしてその年、初めて1,872尾の稚魚(36~50日齢, 全長81.7 mm)を海上の正方形生簀(縦6 m×横6 m×深さ3 m, 容積108 m³)に沖出しするに至った(宮下2002)。しかし、沖出した翌日には、46.3%が死亡する大量死が発生した。解剖およびX線撮影による調査から、死亡原因は生簀網へ衝突したことによる頭蓋骨や脊椎骨の骨折ⁱⁱⁱ⁾であると判断された。以後、衝突死防除対策として沖出し生簀の形状と大きさを四角(36 m²)から八角形(120 m²)、さらに円形(706.5 m²)へと変更することによって沖出し1か月後の生残率は1995年に2.3%であったものが1998年には55.7%に改善された。また、2006年には、夜間に生簀中央に照明を設置し、点灯することが夜間の衝突死防除に有効であることが解明された(石橋2006; Ishibashi et al., 2009)。以後、全ての沖出し生簀で夜間照明を行い、2012年までの7年間の沖出し後10日目および30日目の平均生残率は、それぞれ69.2±13.2%(44.1~87.7)および46.1±11.2%(26.6~63.2)と改善されたが、マダイやシマアジに比べると未だに低く、非常に不安定である。

現在、クロマグロの種苗生産の技術開発に取り組んでいる機関は官民含めて数多くあるが、何れの機関も沖出し後の生残率は10~30%とされている。しかし、その死亡原因について詳しい報告はされていない。このような状況から、沖出し後の稚魚の死亡原因は、衝突以外にも存在すると考え、今回、改めて死亡原因の調査を行った。

- iii) 骨折：ここでは脊椎や頭部の骨格における明らかな後天的異常を骨折とした。

I-1) 材料および方法

a) 供試魚および飼育方法

近畿大学水産養殖種苗センター大島事業場で養成していたクロマグロ親魚から得た受精卵を同すさみ事業場に輸送し、50 m³容コンクリート製水槽（縦 5.5 m×横 5.5 m×深さ 1.8 m）で飼育した 32 日齢の稚魚（平均全長 65.1±8.8 mm，平均魚体重 2.3±0.8 g，n=20）9441 尾を供試魚とした。供試魚を 0.8 m³容 FRP 製円形水槽（直径 1.2 m，深さ 0.8 m）におよそ 2000 尾ずつ収容し，トラックと船舶でおよそ 36 km 離れた串本浅海漁場に約 1 時間掛けて輸送した。そして稚魚を直径 30 m 円形生簀（直径 30 m，深さ 6 m，目合い 5.8 mm，容積 4239 m³）に収容し，沖出しした翌日までの死亡魚を除いた 9093 尾を調査対象にした。生簀底部には網の形状を保つように直径 31 m の鋼管製底枠を設置し，生簀上面は鳥害を防ぐためにネットで覆った。また，夜間の生簀網への衝突を軽減するため，生簀中央の水面から 50 cm 上部に LED ライト（LEDs: Marintec. Co. Ltd., Fukuoka, Japan）を 4 基設置し，17:00～8:00 まで照射した（石橋 2006; Ishibashi et al., 2009; Honryo et al., 2013）。飼料は市販の配合飼料（鮪心，日清丸紅飼料株式会社，東京，日本）とし，できるだけ空腹状態にならないように 8:00～17:00 の間は適時，飽食量を給餌した。また，5:00～8:00 および 17:00～19:00 は自動給餌機（餌やり名人，福伸電気株式会社，兵庫，日本）で 15 分毎に給餌した。

試験期間は生簀へ移動後の 30 日間とし，毎朝，生簀に潜水して死亡魚を回収するとともに，生残率，日間死亡率の算出および死亡魚の状態を調査した。

b) 死亡原因の調査

死亡原因を調べるために、沖出し後 7 日目までは毎日、その後は 7 日毎に死亡魚の中から魚体の損傷がない個体 100 尾をランダム抽出し、胃内容物を調査して、異物を誤飲している魚の死亡原因を異物誤飲、そして Soft X 線撮影 (MA-60; Hitex, Osaka, Japan; NX-04H, RF, Nagano, Japan) によって骨格損傷が確認された魚の死亡原因を骨格損傷と判断した。

また、Smirnov-Grubbs の棄却検定を行い、生残魚の平均魚体重に比べて明らかに小さいと判断された魚を成長不良と判断した。上記いずれの死亡原因にも当てはまらないものは不明とした。それぞれの死亡原因別の発生率を下記の式から求めた。試験期間中の生残魚と死亡魚の成長を比較するために、試験開始後、0、3、5、7、14、21 および 28 日目に 20 尾ずつの体重および全長を測定した。

$$\text{原因別発生率(\%)} = 100 \times \text{原因別死亡尾数(尾)} / \text{調査尾数(尾)}$$

c) 統計処理

測定値は平均値±標準偏差で表した。生残魚と死亡魚の成長比較は、Student's t-test を行った。死亡魚の体重の変化は、ANOVA で有意差検定し、Tukey HSD で比較した。また、成長不良の定義として Smirnov-Grubbs の棄却検定を行い、生残魚の平均魚体重に比べて明らかに小さいと判断された個体を成長不良と判断した。

I-2) 結果

a) 生残率

生残率および日間死亡率の推移を Fig. I-1 に示した。 沖出し当日の死亡

魚を除いた 9093 尾の供試魚は 30 日間の試験期間中に 4449 尾が死亡し、生残率は 54.3% となった。試験期間中の平均日間死亡率は、 $1.2\% \cdot d^{-1}$ であったが、沖出し後 3 日間が顕著に高く、1 日目に $5.1\% \cdot d^{-1}$ 、2 日目に $11.6\% \cdot d^{-1}$ 、3 日目に $6.3\% \cdot d^{-1}$ と推移した。この 3 日間の死亡尾数は合計 1,943 尾となり、実に全試験期間中の死亡数の 43.7% に及んだ。4 日目以後の日間死亡率は、 $0.8 \sim 3.1\% \cdot d^{-1}$ の範囲で推移した。

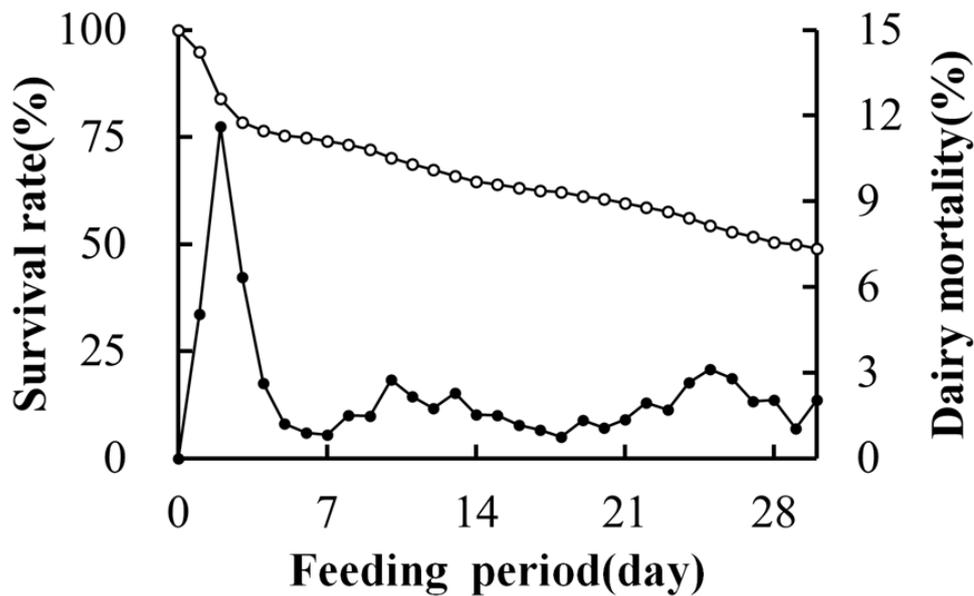


Fig. I-1. Changes in the survival rate of PBF juveniles after transport to sea net cage. ●, Dairy mortality; ○, Survival rate.

b) 成長

試験期間中の生残魚と死亡魚の平均魚体重の推移を Fig. I-2 に示した。平均体重において、死亡魚は生残魚より常に小さく、3, 5, 14, 21 および 28 日目において有意に小さい結果となった ($p < 0.01, n = 20$)。平均全長についても比較したところ、平均魚体重と同様に死亡魚は生残魚より小さい値を示し、試験開始後 3, 5 および 14 日目で有意差が得られた ($p < 0.05, n = 20$)。さらに、死亡魚の平均体重の変化を詳細に調べたところ、試験開始後、3, 5 および 7

日目の値に有意差はなく、体重の増加が見られなかった。また、死亡魚のサンプルについて Smirnov-Grubbs 検定 ($p<0.05$) を用いて成長不良個体を抽出したところ、試験開始後 3, 5 および 7 日の死亡魚の内、25~45%が成長不良と判断された。

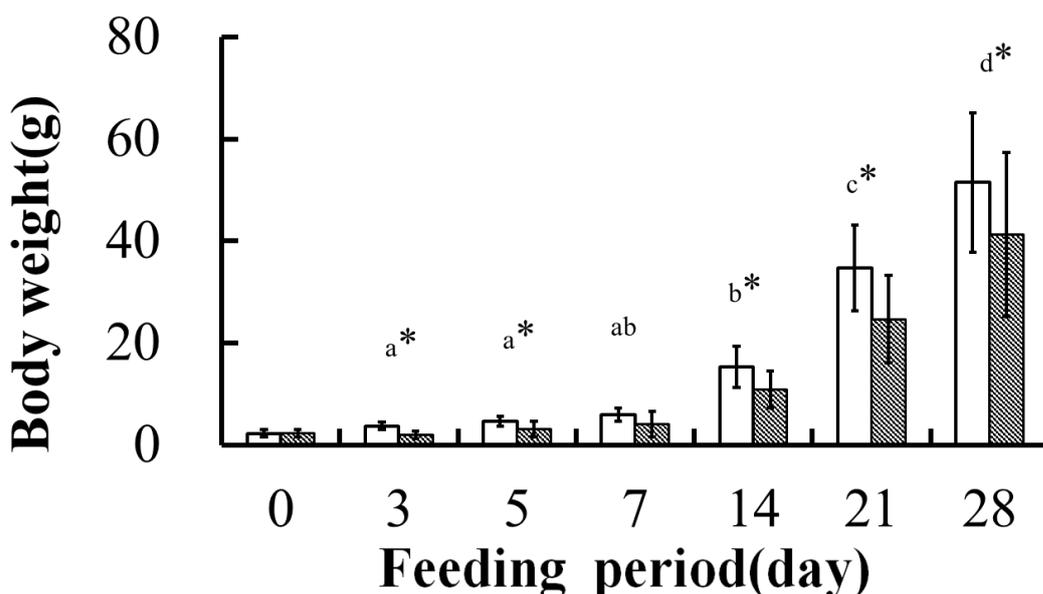


Fig. I-2. Body weight growth of PBF juveniles during the experimental period. □, Live fish; ■, Dead fish. ^{a-d} Values of different superscript letter represent significant differences among the dead fish ($p<0.01$, ANOVA with Tukey HSD test). * Asterisks indicate that the mean body weight in the dead fish was significantly lower than that in the live fish ($p<0.01$, $n=20$, t-test).

c) 死亡原因調査

死亡原因の調査結果を Fig. I-3 に示した。日々の死亡魚のサンプル 100 尾について X 線画像観察を行ったところ、1.0~15.2%に骨格損傷が確認された。骨格損傷の発生率は沖出し後 2 日目から増加し、5 日目に最大値 15.2%まで増加したが、7 日目に 12.5%に低下した後、明らかに減少した。

死亡原因の調査に用いた死亡魚サンプルの胃を解剖し、胃の内容物を調べた (Fig. I-4)。胃には、大きいものでは 20 mm に達する小枝、木片、発泡スチロール屑など浮遊性のものや養殖用鉄製生簀杵の錆と考えられる沈降性

のものが確認された。日々の死亡魚の中で，このように異物を誤飲していた死亡魚の発生率は，試験開始後6日目までに多く，最も高かった5日目には42.9%を示した。しかし，7日目以後は明らかに減少した。

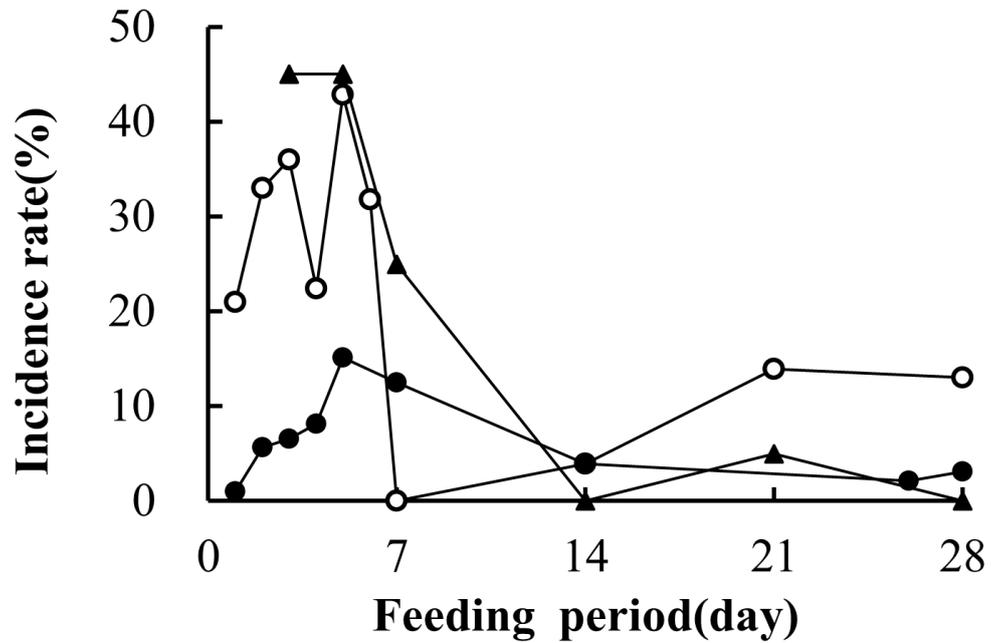


Fig. I-3. Main cause of death in the sea net cage of PBF juveniles.
○, Accidentally ingest ; ●, Vertebral fracture ; ▲, Poor growth.

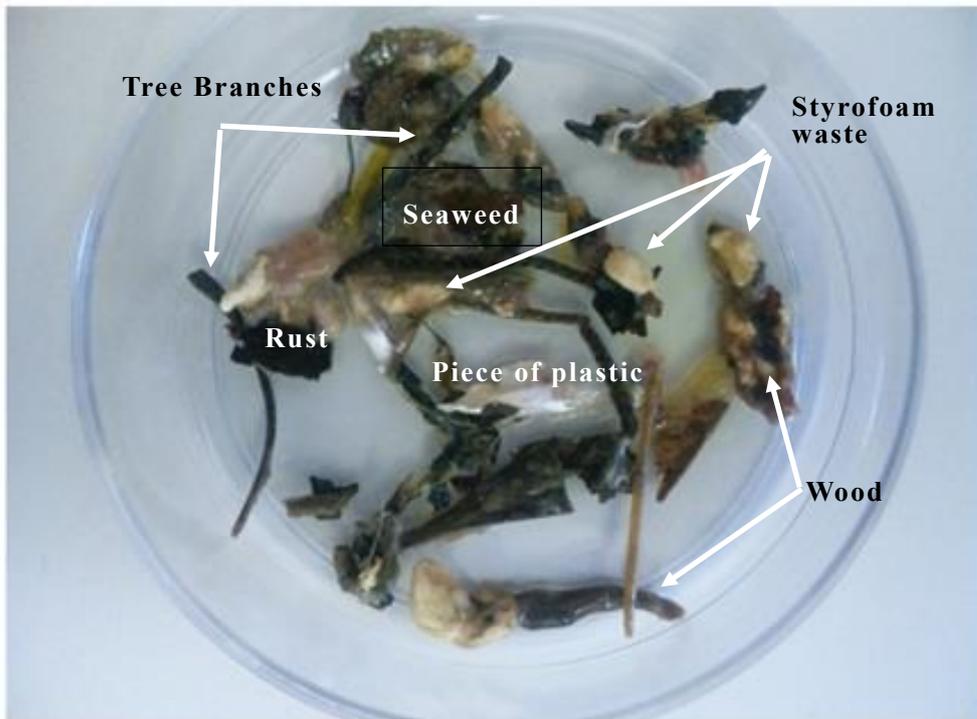


Fig. I-4. The stomach contents of PBF juveniles at 3 days after stocking in the sea net cage. The standard length and body weight of juvenile PBF were 58.2 ± 5.9 mm and 2.0 ± 0.7 g. The average length and width of object were 13.1 ± 6.7 mm and 3.2 ± 1.8 mm.

I-3) 考察

これまで我々は沖出し後の中間育成時の生残率を向上させるために様々な努力を行ってきた。沖出し前には生簀で給餌する配合飼料に完全に餌付けし、沖出し作業では稚魚にできるだけダメージを与えない取り上げ方法や海上生簀への輸送・収容方法の開発に取り組んできた。そして、生簀網へ収容後はこれまで主な死亡原因とされていた生簀網への衝突軽減対策（宮下 2002）や給餌方法などにも改善を重ねた。しかし、今回の調査においても海上生簀へ沖出し後 3 日間に死亡魚が多く発生し、その死亡魚数は

全試験期間中の死亡魚数の 43.7%に及んだ。この現象は近畿大学水産研究所における過去数年間の結果と同じであり、これまでの改善策だけでは不十分と言える。そこで、中間育成時の生残率を向上させる対策を検討するために改めて死亡魚の発生状況および死亡原因を調査した。その結果、死亡魚の発生は沖出し後の 3 日間に集中していた。そして死亡魚の成長は 7 日目まで停滞していることがわかった。死亡原因を骨格損傷、異物誤飲、成長不良、そしていずれにも当てはまらないものは原因不明と分類した。今回の調査結果から、これまで死亡の主原因と考えていた骨格損傷は少なく、異物誤飲や成長不良が新たな死亡原因として見出され、死亡原因が分からないものも多く確認された。

a) 摂餌と成長

沖出し後の生残魚と死亡魚の成長を比較すると、常に死亡魚の方が全長および体重ともに小さいことが明らかになった。さらに、死亡魚の成長の推移をみると、沖出し後 3, 5 および 7 日目の平均魚体重に有意差が認められなかった。すなわち、死亡に至った稚魚は、何らかの影響で摂餌不良に陥り、体重が増加しなかったと考えられる。陸上水槽では、孵化後 14 日頃から配合飼料への餌付が行われ、沖出しの数日前には、全ての稚魚が配合飼料単独給餌に対応できる状態になっている。本試験の供試魚が沖出し直前まで飼育されていた水槽は縦 5 m×横 5 m×深さ 1.8 m、水面面積 25 m²、実容量 45 m³、あるいは直径 6 m、深さ 2 m、水面面積 28.3 m²、実容量 50 m³のコンクリート製もしくは FRP 製水槽である。沖出し直前の稚魚の飼育密度は、36~283 尾/m³であった。ところが、本試験で沖出し後に使用した海上の飼育生簀は直径 30 m、深さ 6 m、水面面積 706.5 m²、実容量 4239 m³であり、今回の試験開始時の収容密度は、2.1 尾/m³である。つまり、海上生簀の面積は陸上水

槽の 23 倍、容積は 78.5 倍であり、飼育密度は陸上水槽の 6%以下である。稚魚を飼育管理する立場から考えると、陸上水槽では十分に稚魚の摂餌状況を確認しながら給餌できるが、海上生簀では飼育施設が広くて深いために、十分な観察が困難である。その結果、海上生簀では、稚魚と餌との遭遇率が極端に低くなる可能性がある。対策として沖出し生簀を小型化する方法が考えられるが、過去に小型生簀を使用したことによって生簀網への接触・衝突による大量死が発生したことがある（宮下 2002）。しかし、その当時は夜間照明を行っておらず、小型生簀に夜間照明を行うことで大量死を防ぐことが可能かもしれない（石橋 2006; Ishibashi et.al., 2009; Honryo et al., 2013）。

b) 骨格損傷

今回の試験でも、沖出し後の 3 日目までに大量の死亡が発生した。これまで、沖出し後の死亡原因は、沖出し作業によるダメージと海上生簀に輸送した後の生簀網への衝突と考えられていた（宮下 2002）。ところが、Fig.I-3 に示したように沖出し後の 3 および 5 日目の死亡原因の中で、骨格損傷の発生率は 6.5 および 15.2%に過ぎなかった。これは、骨格損傷が、沖出し作業のダメージ、生簀網に接触あるいは衝突した結果の一つの現象であることを示している。生簀網への接触あるいは衝突による体表のスレや判断できない損傷から死亡したものは、不明として処理されている可能性がある。不明として処理された死亡魚は試験開始 7 日目以後に急増し、試験開始後の 14 日目を以降には 80%を超えた。試験終了後の観察やこれまでの経験から、魚体重が 1 kg 以上に育ったヨコワが悪天候時や、生簀に侵入した小魚を追いかけて生簀網に衝突し、脊椎を損傷して死亡する症例が多くみられた。発生率が少ないものの、骨格損傷は、沖出し後の生残率を向上させるためには重要な死亡原因であると考えられるべきである。夜間照明によって夜間や薄明期の衝突防止

は軽減できた（石橋 2006; Ishibashi et. al., 2009）が、今後はさらに、日中の衝突防止対策を検討する必要がある。

c) 胃内容物

胃の内容物を調査したところ、稚魚は細かい枝、木片、発泡スチロール層などの浮遊性の異物を多く誤飲していた。また、僅かではあるが、鉄製生簀杵の錆と思われる沈降性の異物も誤飲していた。それらの大きさや成分から考えて、何れもマグロ稚魚の消化管で消化・排泄されるとは考えられない物体であり、摂餌促進物質を含んでいるとも考えられない。Hoss & Settle (1990) は野生で捕獲されたマグロの胃にプラスチックバッグのような海洋ゴミが入っていたと報告している。天然のヨコワ採捕の方法として疑似針を利用した引き縄釣りがよく知られている（宮下 2002）。この疑似針は、魚類が、動くものに敏感に反応するという運動視覚特性を利用したものである（Inoue, 1978）。また、魚類では不規則に光る刺激が捕食魚が噛みつくための信号になるとされている（Wickler, 1969）。さらに、流れのある水域に住む魚は捕食を急ぐため、餌の可能性のある物体は口に入れる（富永 1964）という摂餌生態が知られている。おそらく、今回の調査でクロマグロ稚魚の胃に確認された異物は、水中の挙動で稚魚の視覚を刺激し、摂餌意欲を誘導したものと考えられる。これらの異物を誤飲して死亡した稚魚は、沖出し翌日から 6 日目までに多く観察され、その発生率は 21~42.9%を示したが、7 日目以降に明らかに減少した。異物の生簀網への流入は潮流や風などの気象条件で変化するため、異物誤飲の発生率と経過日数との因果関係を求めるのは困難である。しかし、異物誤飲の対策として、生簀内部に稚魚が誤飲するような物体の流入を防ぎ、流入した場合は速やかに取り除く必要がある。

今回の試験結果から、中間育成時の死亡原因には、これまで考えられていた衝突死以外に成長不良や異物誤飲がより多く発生していることが明らかになった。今後、海上生簀における中間育成時の生残率を改善させるためには、できるだけ稚魚の空腹時間を短くし、餌との遭遇率を高める給餌方法とともに、異物が生簀網に流入しない飼育方法を開発することが必要と考えられる。

第II章 異物誤飲防除方法の検討

第I章で沖出し後のクロマグロ稚魚の死亡原因を調査した結果、多くの死亡魚の胃内容物に、稚魚が消化できない異物（プラスチック片や木片など様々な浮遊性ゴミおよび錆など）が含まれていることがわかった（Okada et al., 2014）。これらの生簀網に流入した異物を餌と間違えて誤飲したために消化できない上、本来の餌を十分に摂餌できなくなったことも重要な死亡原因になっていると推察された。また、死亡魚の推移を調査した結果、沖出し後3日目に36%、5日目に43%の死亡魚が異物を誤飲していた。これにより、異物の誤飲を防除することで沖出し後の生残率を向上させられる可能性が示唆された。そこで第II章では生簀内に異物が流入することを防除するためにゴミ除けネットを設置する生簀と設置しない生簀を設け、その有効性を検討した。

II-1) 材料および方法

a) 供試魚および試験区の設定

実験-1：2013年6月18, 19日に養成クロマグロ親魚から得られた受精卵を近畿大学水産養殖種苗センター大島事業場の50 m³容コンクリート製円形水槽（直径6 m, 深さ2 m）に収容し、種苗生産を行った。孵化後35～36日齢に成長したクロマグロ稚魚（平均体長62.8 mm, 平均体重1.9 g）を串本湾浅海漁場のポリエチレン製直径20 m生簀（深さ10 m, 目合い6 mm, 容積3140 m³）2基に沖出しして、供試魚とした。浮遊性ゴミの流入を防ぐために目合い1 mmのゴミ除けネット（農業用防虫ネット；サンサンネット R ソフ ライト SL2200：ニホンワイドクロス株式会社 大阪）を生簀網の外周に水

深 3 m まで設置した生簀に供試魚を 5977 尾収容し, 10 m-Covered 区とした。
そしてゴミ除けネットを設置しない生簀に供試魚を 5969 尾収容し, 10 m-Control 区とした。

実験-2: 2013 年 7 月 6 日に養成クロマグロ親魚から得られた受精卵を近畿大学水産養殖種苗センター大島事業場の 45 m³ 容コンクリート製水槽 (縦 5 m×横 5 m×深さ 1.8 m) に収容し, 稚魚を生産した。32 日齢のクロマグロ稚魚 (平均体長 63.4 mm, 平均体重 2.1 g) をポリエチレン製直径 20 m 生簀 (深さ 6 m, 目合い 6 mm, 容積 1884 m³) 2 基へそれぞれ 6000 尾ずつ沖出しし, 供試魚とした。実験 1 と同様にゴミ除けネットを設置した生簀を 6 m-Covered 区, ゴミ除けネットを設置しない生簀を 6 m-Control 区とした。

b) 飼育方法

試験期間は深さ 10 m の生簀を使用した実験-1 では 7 月 25 日から 30 日間, 深さ 6 m の生簀を使用した実験-2 では 8 月 8 日からの 30 日間とし, 配合飼料 (鮪心: 日清丸紅飼料株式会社, 東京) を給餌して飼育した。給餌は, 8:00~12:00 の間に 3 回, 13:00~17:00 までの間に 3 回, 手撒きで飽食量を与えた。これらの給餌作業に加え, 6:00~8:00 までと 17:00~19:00 までの間は自動給餌機 (餌やり名人, 福伸電気株式会社, 兵庫, 日本) で給餌した。

c) 日間死亡率, 生残率および成長

死亡魚は毎朝, 各生簀から潜水士が取り上げて計数し, 生残率および日間死亡率を算出した。試験開始から 3, 5, 7, 14, 21 および 28 日目の早朝給餌前の空腹時に生残魚を 20 尾ずつ取り上げ, 全長, 体長および体重を測定して, 次式により肥満度 (Condition Factor ; CF) を算出した。

$$CF (\text{肥満度}) = \text{魚体重 (g)} / \text{体長 (mm)}^3 \times 10^6$$

d) 死亡原因および原因別日間死亡率

試験開始から 3, 5, 7, 14 および 21 日目に死亡魚を取り上げ、魚体の損傷がない 200 尾を最大数としてランダムに抽出し、死亡原因を調査した。死亡魚のサンプルは個体ごとに全長、体長および体重を測定し、Soft X 線写真（工業用デジタル X 線センサー NAOMI NX, 株式会社アールエフ, 長野県）を撮影して、骨格損傷と胃内容物の有無を確認した。その後、解剖して胃内容物を調査した。

死亡魚サンプルの死亡原因を個体ごとに異物誤飲、骨格損傷および成長不良に分類し、いずれにも分類できない死亡魚は不明とした。死亡魚の魚体重と肥満度を個体別に Smirnov-Grubbs の棄却検定にかけ、同日に採取した生残魚と比較して有意に小さい個体を成長不良魚と定義した。死亡原因が重複している場合は原因別にそれぞれ表記した。そのため、死亡原因の発生割合が合計で 100%を超えることもあった。これらの死亡原因をゴミ除けネットの有無で比較、検討した。

異物誤飲、骨格損傷、成長不良および不明の 4 種類の死亡原因の発生率およびそれぞれの原因別の死亡率を推測するため、原因別日間死亡率を下記の式から求めた。

原因別死亡尾数 = 各種死亡原因の発生率 × 死亡尾数

原因別日間死亡率 (% · d⁻¹) = 100 × 原因別死亡尾数 / 前日の生残尾数

e) 統計処理

ゴミ除けネットを設置する Covered 区と設置しない Control 区における経過日数毎の生残魚の成長差を検定するため、Student の *t* 検定を用いて統計処理をした。

II-2) 結果

a) 日間死亡率および生残率

実験-1：試験期間中の日間死亡率および生残率の推移を Fig. II-1(A)に示した。沖出し後の1および2日目に10 m-Covered区の日間死亡率が16.4および16.8%・d⁻¹を示し、10 m-Control区でも17.6および14.9%・d⁻¹となつて、両試験区ともに大量死が確認された。3日目にはどちらの試験区の日間死亡率もおおよそ7%・d⁻¹まで低下し、9日目には2%・d⁻¹以下になった。10日目以後、試験終了までの日間死亡率は10 m-Covered区で0.8~4.0(平均1.9)%・d⁻¹、10 m-Control区で1.0~2.0(平均1.5)%・d⁻¹で推移した。試験終了時の生残率は、10m-Covered区で39.0%、10 m-Control区で41.7%となり、ゴミ除けネットの有無による差は認められなかった。

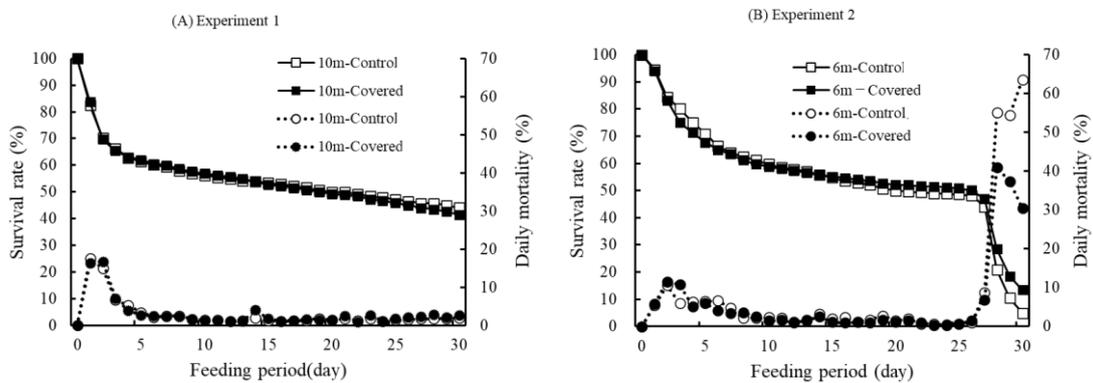


Fig. II-1. The effect of coverage with a fine mesh net for the cage on survival rate (○, Control; ●, Covered with solid line) and daily mortality rate (□, Control; ■, Covered with dotted line) on PBF juveniles in sea-cage for 30 days. (A) shows the result of experiment-1(10 m depth) and (B) shows the result of experiment-2(6 m depth).

実験-2：試験期間中の日間死亡率および生残率の推移を Fig. II-1(B)に示した。実験-2では細菌性疾病による大量死が発生する前までの26日間の結

果で比較した。沖出し後 2~3 日目に 6 m-Covered 区の日間死亡率が 11.6~10.8%・d⁻¹を示したが、4 日目には 5.1%・d⁻¹にまで低下した。10 日目には 2%・d⁻¹以下になり、その後は 0.3~2.5(平均 1.2) %・d⁻¹の間で推移した。同様に、6 m-Control 区の日間死亡率は沖出し後 2 日目に最大値 10.6%・d⁻¹を示したが、3 日目には 5.9%・d⁻¹に低下した。12 日目に漸く 2%・d⁻¹以下になり、その後は 0.3~3.3(平均 1.5) %・d⁻¹の間で推移した。試験終了時の生残率は、6 m-Covered 区で 50.2%、6 m-Control 区で 48.2%となり、ゴミ除けネットの有無による差は認められなかった。

b) 成長

実験-1: 試験期間中の魚体重、全長および肥満度の推移を Fig. II-2(A)に示した。ゴミ除けネットを設置した 10 m-Covered 区の平均体重は、試験終了時に 51.8 g を示し、10 m-Control 区の 46.5 g より、わずかに高くなる傾向を示した ($n=20, p>0.05$)。また、10 m-Covered 区の平均全長および肥満度も 160.1 mm および 18.6 で、10 m-Control 区の 155.1 mm および 18.0 より高い傾向があったものの有意差はなかった ($n=20, p>0.05$)。

実験-2: 試験期間中の魚体重、全長および肥満度の推移を Fig. II-2(B)に示した。26 日目以後に両試験区ともに大量死が発生したため、その影響のなかった 21 日目までの魚体重、全長および肥満度を比較した。その結果、最終測定時の 6 m-Covered 区の平均魚体重は 26.1 g で、6m-Control 区の 26.7 g と差が無く、ゴミ除けネットの設置による影響はなかった ($n=12$ for the Covered treatment and $n=20$ for the Control 区 treatment, $p>0.05$)。平均全長および肥満度も同様に区間差は確認されなかった ($n=12$ for the Covered treatment and $n=20$ for the Control 区 treatment, $p>0.05$)。

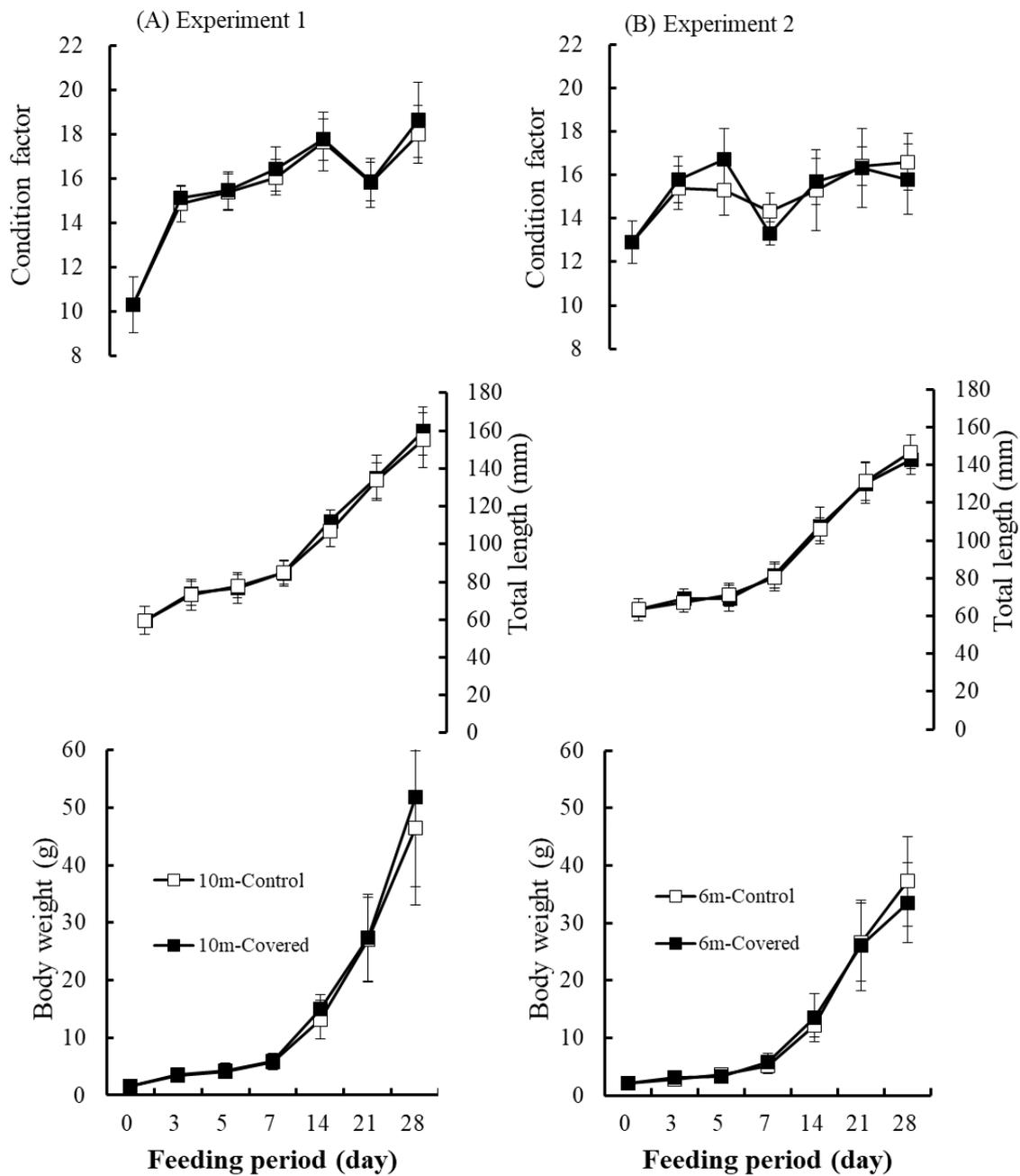


Fig. II-2. Change of body weight, total length and condition factor of survival PBF juveniles in each day. (A) shows Experiment-1 (□,Control; ■, Covered) and (B) shows Experiment-2 (□,Control; ■, Covered)

c) 死亡原因別の発生率および死亡率

死亡魚から判断した死亡原因を異物誤飲，骨格損傷，成長不良および不明の4つに分類し，それぞれの原因別に発生率および死亡率をまとめた。

c-1) 異物誤飲

死亡魚の胃から木片や発泡スチロール片など、明らかに消化できない異物が摘出された。異物のサイズや種類に一定の傾向はなかった。

実験-1: 全ての死亡魚中に占める異物誤飲の発生率と日間死亡率を Fig. II-3(A)に示した。ゴミ除けネットを設置しない 10 m-Control 区の異物誤飲の発生率は3日目に32.1%を示し、5日目に18.4%、7日目に7.5%と徐々に低下したが、その後再度増加して14日目は11.8%、21日目には15.0%となった。一方、ゴミ除けネットを設置した 10 m-Covered 区の異物誤飲の発生率は3日目に12.2%で 10 m-Control 区の 1/3 となり、5日目と7日目には2.0%と3.0%で低く、その後の14日目と21日目には発生しなかった。10 m-Control 区の異物誤飲による日間死亡率は3日目に $1.8\% \cdot d^{-1}$ を示し、5、7および14日目に0.4、0.1および $0.1\% \cdot d^{-1}$ となって、21日目に漸く $0.1\% \cdot d^{-1}$ 未満になった。これに対し、10 m-Covered 区の日間死亡率は3日目が $0.7\% \cdot d^{-1}$ で、その後は $0.1\% \cdot d^{-1}$ 未満であった。すなわち、異物誤飲の発生率および日間死亡率はゴミ除けネットを設置した生簀の方が低い値を示し、その設置効果が確認できた。

実験-2: 全ての死亡魚中に占める異物誤飲の発生率および日間死亡率を Fig. II-3(B)に示した。ゴミ除けネットを設置しない 6 m-Control 区の異物誤飲発生率は3日目に13.9%を示し、5、7および14日目に8.0、9.3および5.7%であったが、21日目には発生しなかった。一方、ゴミ除けネットを設置した 6 m-Covered 区では3日目に6.8%で、6 m-Control 区の 1/2 になり、5、7および14日目に5.1、7.1および12.0%で、21日目には発生しなかった。同様に 6 m-Control 区の異物誤飲による日間死亡率は3日目 $0.7\% \cdot d^{-1}$ を示し、その後は $0.4 \sim 0.0\% \cdot d^{-1}$ であったが、6 m-Covered 区のそれは3日目が $0.7\% \cdot d^{-1}$ で 6 m-Control 区と同じであり、その後は $0.3 \sim 0.0\% \cdot d^{-1}$ で 6 m-

Control 区よりも低くなる傾向を示した。実験-2 では、実験-1 より効果が低くなったものの 14 日目を除いて異物誤飲の発生率および死亡率がゴミ除けネットの設置によって低くなった。

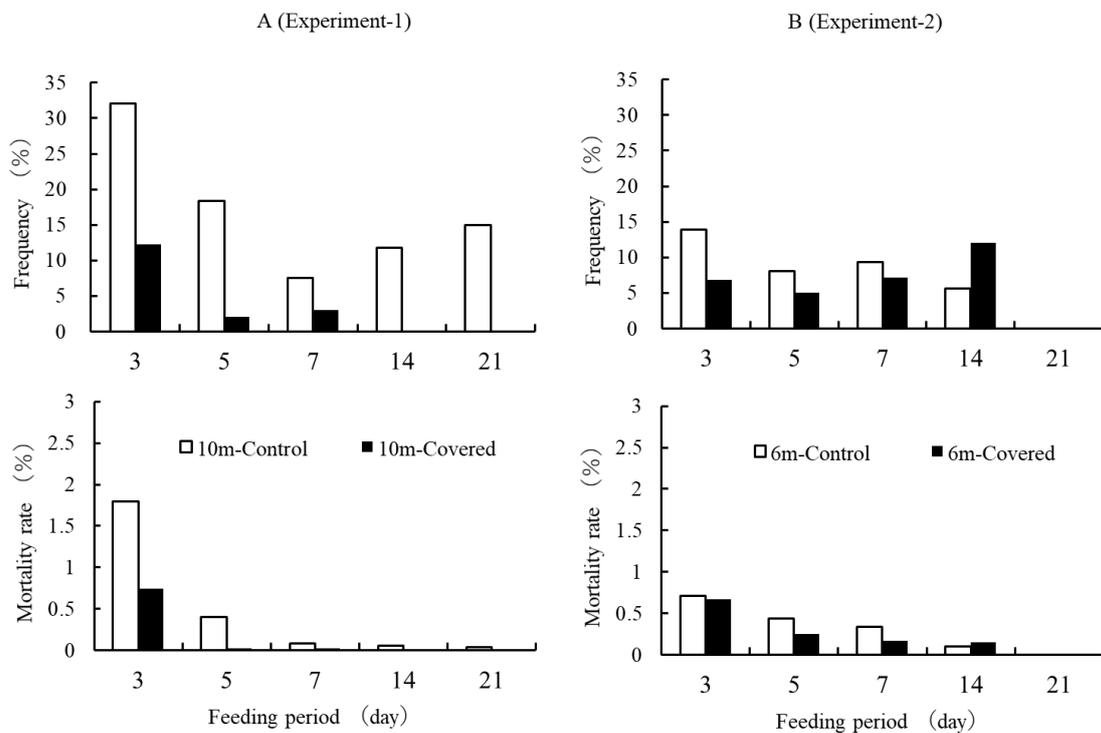


Fig. II-3. Estimated frequency (upper) and mortality rate (lower) of ingestion of foreign particles which caused death of PBF juveniles in each day. A show the result of Experiment-1(10 m depth) and B show the result of Experiment-2 (6 m depth) (□,Control; ■, Covered).

c-2) 成長不良

ゴミよけネットを設置しても、成長不良を原因とする死亡魚の発生率および日間死亡率には試験区による一定の傾向が見られなかった。

実験-1：全死亡魚に占める成長不良の発生率と死亡率を Fig. II-4(A)に示した。ゴミ除けネットを設置しない 10 m-Control 区の成長不良発生率は 3 日目に 0.9%と低いですが、5 日目以降は 11.8~40%まで高く、平均値は 24.9%になった。一方、ゴミ除けネットを設置した 10 m-Covered 区のそれは、3 日目に

58.0%の高値を示したものの、5日目以降は0.0~33.3%であった。また、10 m-Control区の日間死亡率は0~0.6%・d⁻¹と低い値で推移し、平均0.2%・d⁻¹であったが、10 m-Covered区のそれは0.0~3.6%・d⁻¹で推移し、平均0.9%・d⁻¹であった。

実験-2：全ての死亡魚に占める成長不良の発生率と死亡率を Fig. II-4(B)に示した。6 m-Control区における成長不良の発生率は2%以下の低い値で推移したが、6 m-Covered区のそれは7日目のみに28.6%と高い値を示し、平均5.8%であった。また、6 m-Control区の日間死亡率は0.0~2.5(平均1.1)%・d⁻¹で推移したが、6 m-Covered区のそれは0.0~0.7%(平均0.1%)・d⁻¹で推移し、常に6m-Control区より低かった。

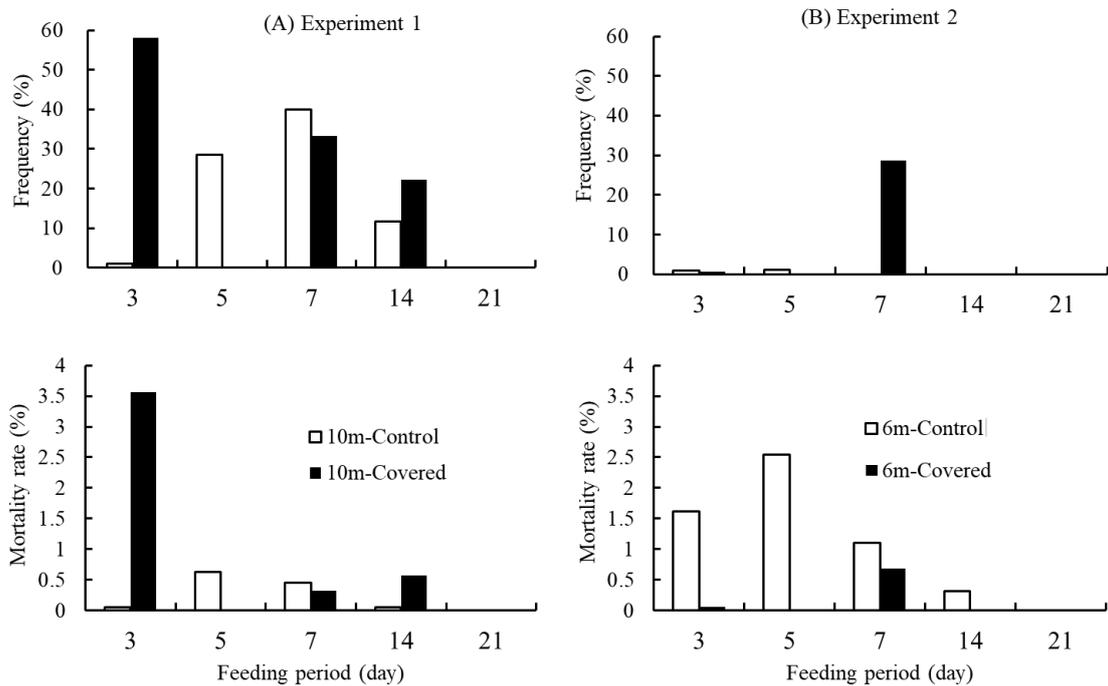


Fig. II-4. Estimated frequency (upper) and mortality rate (lower) of poor growth which caused death of PBF juveniles in each day. A show the result of Experiment-1(10 m depth) and B show the result of Experiment-2 (6 m depth) (□,Control; ■, Covered).

c-3) 骨格損傷

実験-1：全死亡魚の骨格損傷の発生率と死亡率を Fig. II-5(A)に示した。10 m-Control 区の骨折発生率は 5.0～28.6(平均 16.1) %で推移したが，10 m-Covered 区のそれは 9.9～21.2(平均 10.7) %で，10 m-Control 区より低くなる傾向を示した。また，10 m-Control 区の日間死亡率は 0.0～0.9(平均 0.4) %・d⁻¹であったが，10 m-Covered 区のそれも 0.1～0.6(平均 0.2) %・d⁻¹の低値で推移した。

両試験区とも骨格損傷の発生が 21 日目まで続いたが，一定の傾向が見られなかった。一方，日間死亡率は沖出し後に日が経過するにつれて減少する傾向を示した。

実験-2：全ての死亡魚に占める骨格損傷の発生率と死亡率を Fig. II-5(B)に示した。6 m-Control 区の発生率は 0.0～10.3(平均 0.3) %で，6 m-Covered 区の 0.0～25.4 (平均 13.9) %より低くなる傾向を示した。また，6 m-Control 区の日間死亡率は 0.0～0.6%・d⁻¹であったが，6 m-Covered 区のそれは 0.0～1.6%・d⁻¹であり，6 m-Control 区よりやや高い傾向を示した。実験 1 および 2 を通じて骨格損傷の発生率および日間死亡率にゴミ除けネットの設置による特定の傾向は見られなかった。

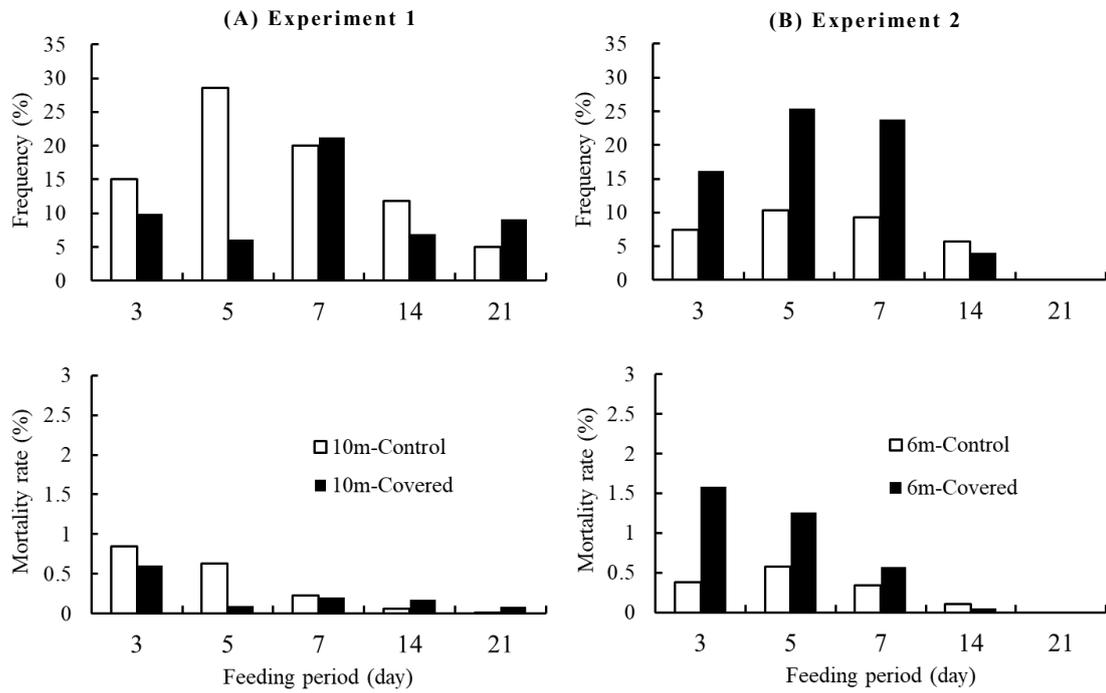


Fig. II-5. Estimated frequency (upper) and mortality rate (lower) of bone injuries which caused death of PBF juveniles in each day. A show the result of Experiment-1(10m depth) and B show the result of Experiment-2 (6 m depth) (□,Control; ■, Covered).

c-4) 不明

死亡原因が不明と判断された死亡魚の発生率および日間死亡率を Fig. II-6 に示した。実験-1, 2 いずれにおいても死亡原因を明らかにできなかった死亡魚が多く発生した。特に実験-2 のゴミ除けネットを設置した 6 m-Covered 区の日間死亡率が、沖出し後 3 および 5 日目に $3.4 \sim 7.5\% \cdot d^{-1}$ の高い値を示した。

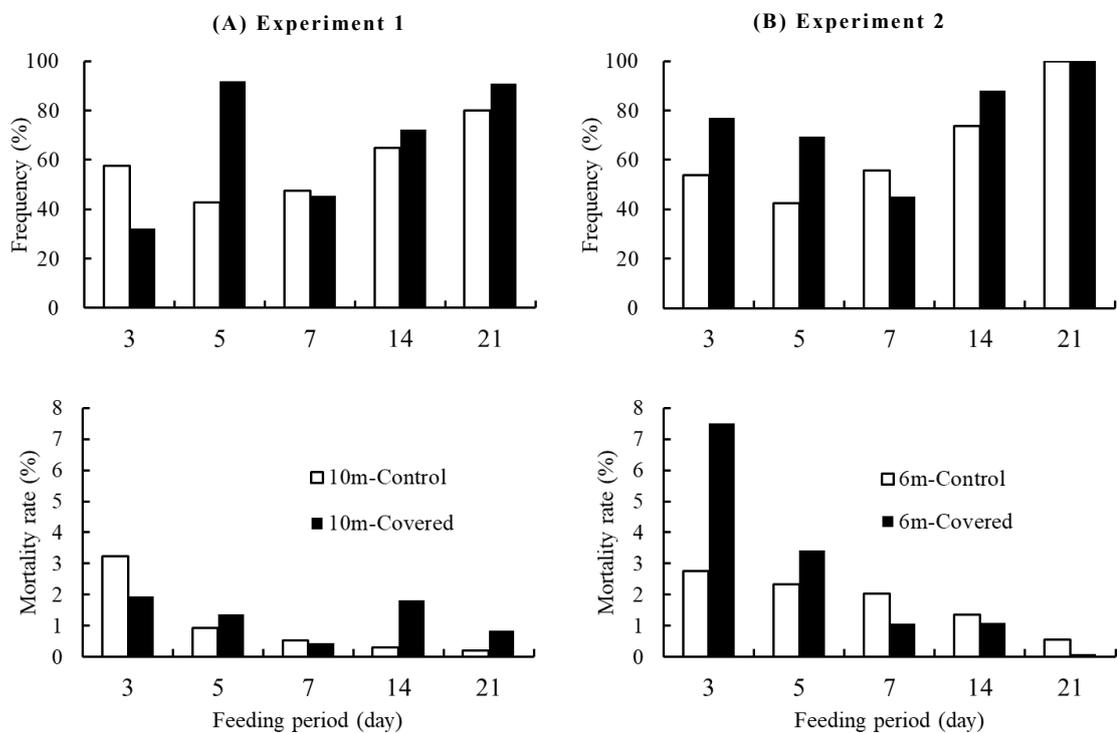


Fig. II-6. Estimated frequency (upper) and mortality rate (lower) of unknown which caused death of PBF juveniles in each day. A show the result of Experiment-1(10 m depth) and B show the result of Experiment-2 (6 m depth) (□,Control; ■, Covered).

II-3 考察

異物誤飲の対策としてゴミ除けネットを設置したところ、両試験区の生残率および日間死亡率に差はなく、成長にも有意な差がみられなかった。各試験区の死亡原因を調べた結果、両実験ともゴミ除けネットを設置した生簀の

死亡魚における異物誤飲の発生率が、設置しない生簀に比べて低くなる傾向を示した。異物誤飲の発生率から推定した日間死亡率もゴミ除けネットの設置で低くなった。すなわち、ゴミ除けネットの設置が異物誤飲を軽減する対策として有効であることが示唆された。

本実験では、異物誤飲の軽減によって生残率を向上させることができなかった。これは、第I章で死亡原因の調査をした年に比べ、本実験の実施年には除け実験海域へのゴミ流入量が少なかったためと考えられる。浮遊性ゴミの流入量は、潮流や風向あるいは時期により全く異なる。ゴミの量はその時によって変化するため、ゴミ除けネットの設置は今後も必要と考えられた。一方で、今回は海水面および海水中のゴミの除去を目的としたが、ゴミは空中からも落下してくることがある。ゴミ除けネットを設置することによって一旦流入したゴミが生簀の中に留まる可能性もある。これらを考慮すると異物流入防止のためのゴミ除けネットの設置と同時に流入したゴミを除去する必要があると考えられた。

2012年から実施したクロマグロ稚魚の死亡原因の調査では、死亡魚の胃内からプラスチック片を始めとする明らかに消化できない異物が確認され、その発生頻度は36～43%であった (Okada et al., 2014)。これら浮遊性の海洋ゴミ問題はこれまで海産哺乳類やミズウオ *Alepisaurus ferox* (Kubota, Uyeno, 1970; 久保田, 佐藤 2008)、遠洋延縄漁におけるキハダ *Thunnus albacares* でも報告されているが (Hoss, 1990)、養殖魚への被害はこれまでに報告されていなかった。このため、本研究では異物誤飲による養殖魚への影響を調べるとともに、対策を講じる実験を実施した。現状では、なぜクロマグロ稚魚が異物を誤飲してしまうのかについてはよくわかっていない。稚魚が配合飼料を十分に摂餌できていないために異物誤飲を行うのか、配合飼料を十分に摂餌しているにも拘らず異物を誤飲するのかが不明である。原因

が前者の場合、十分に摂餌できる環境や飼育方法で防ぐことができる可能性がある。しかし、原因が後者の場合、クロマグロ稚魚の本能による行動と考えられる。今回の実験でもわかったことであるが、いくら異物の流入防止のためにゴミ除けネットを設置しても海上生簀に流入するゴミの量をゼロにすることはできない。生簀網へ流入する異物には様々な物があり、本実験で設置した深さ 3 m までのゴミ除けネットでは流入を完全に防げなかった。

Colton et al. (1974) の報告によると水槽内でプラスチック片を撒き、その中でニシン科、タラ科、メダカ科、トゲウオ科およびカレイ科の稚魚を飼育してプラスチック片を誤飲しているかを調査した結果、どの魚種もプラスチック片を吐き出すか、飲み込んだとしても排出していた。このことから、実験した魚種は異物を誤飲しても死亡しないとされている。また、マダイ、シマアジ等の海面養殖においても異物を誤飲して死に至るという報告はない。つまり、異物を誤飲して死亡する問題はクロマグロ養殖における特異的な現象と考えられる。クロマグロは他魚種より早い成長を示すことが知られており、そのために摂餌量も多い。また強い魚食性を示すことから浮遊性ゴミを餌料生物と間違えて誤飲している可能性も考えられる。今後の課題としてクロマグロ稚魚が異物を誤飲する原因を究明する必要があると考える。

実験 2 においてゴミ除けネットを設置した生簀では無処理生簀に比べて 7 日目までの骨格損傷の発生率が 2 倍以上になり、日間死亡率では 1.7~4.2 倍（平均 2.7 倍）となった（Fig.II-5）。クロマグロは一般的な養殖魚と比べて高い推進力を持つと報告されている（Tamura and Takagi, 2009）。また、宮下（2002）はクロマグロ稚魚が高い遊泳能力を獲得するが、胸鰭や腹鰭などが未発達であるが故に推進力を制御できず衝突死すると報告している。海上生簀においても同様で、石橋（2006）によって海上での夜間照明の必要性が報告されるまでは衝突による大量死が発生していた。ゴミ除けネットの設置が

骨格損傷の増加に直接関係があるとは考えにくいですが、これは無視できない問題であり、今後さらに精査する必要がある。

第III章 沖出し前後の給餌方法の検討

第I章で、海上生簀に沖出しされたクロマグロ稚魚の死亡原因を調査したところ、死亡魚の体重が生残魚のそれと比べて有意に低いことがわかり (Smirnov-Grubbs 検定 ($p<0.05$)), 死亡原因を成長不良と定義した。成長不良個体は沖出し後の3, 5および7日目に見られる死亡魚の25~45%に発生しており (Okada et al., 2014), 沖出し後のクロマグロ稚魚の生残率を向上させるためには、第II章で取り上げた異物誤飲と同様に優先して解決すべき課題である。

近畿大学水産研究所で行っているクロマグロ種苗生産の餌料系列では、海上生簀に沖出しする4日前から配合飼料のみを給餌し、稚魚は完全に配合飼料に餌付いた状態で沖出しされる。クロマグロの沖出し作業では、拘束、ハンドリング、高密度、輸送などのストレスが負荷され、海上生簀収容後には光、音、生簀網などの視覚的な環境変化が負荷される。石橋 (2006) は、クロマグロが環境変化や視覚刺激に対して顕著なストレス反応を示し、稚魚期以降は沖出し時の輸送作業によってストレスホルモンのコルチゾルが顕著に増加すると報告している。また、Honryo et al. (2018) の報告によると、クロマグロ稚魚が陸上水槽から海上生簀への輸送作業や輸送後の環境変化によるストレスから回復するには少なくとも3日間が必要であり、その際に確認される遊離グルコース量、総コレステロール含量などのエネルギー源の減少は、輸送に伴うストレスによって引き起こされた摂餌不良に起因する可能性を指摘している。Pankhurst et al. (2008) はストレスを負荷された魚は一時的に摂餌不良になると報告しており、加えて田中 (2013) はクロマグロの飢餓耐性が低いことを指摘している。従って、成長不良による死亡防止対策として、沖出し作業、輸送および環境馴致によるストレスの軽減と、それ

らに伴うストレス応答や摂餌不良によるエネルギー不足を改善する必要がある。

そこで第Ⅲ章では、沖出し前後の給餌方法に着目し、Ⅲ-1では沖出し前の最終給餌時刻から沖出し作業開始までの無給餌時間の影響について検討した。また、Ⅲ-2-1では沖出し前の最終給餌時刻と沖出し後の給餌再開時刻の検討を陸上水槽での模擬沖出しにより行い、さらに、Ⅲ-2-2では実際に海上生簀に沖出ししてⅢ-2-1の結果を検証した。

Ⅲ-1) 沖出し直前の無給餌時間の影響

これまではクロマグロ稚魚を陸上水槽から海上生簀に沖出しする場合、沖出し作業を開始する3時間前の早朝5:00に最終給餌を行い、8:00から午前中を目途に沖出し作業を完了させてきた。そして、できるだけ無給餌時間を短くするために当日の13:00には給餌を再開させる方法を常法とした。しかし、その後の研究で、沖出し作業や輸送によるストレスから回復するには多くのエネルギーを消費し、さらにそれらのストレスが起因となって摂餌不良を引き起こす可能性があることが報告された (Honryo et al., 2018)。そこで沖出し直後に発生する成長不良を原因とする死亡率の軽減を目的に、沖出し作業開始前の最終給餌時刻の違いがクロマグロ稚魚の生残率、成長および生化学成分(全魚体コルチゾル含量および全魚体グルコース含量)に及ぼす影響について検討した。

Ⅲ-1-1) 材料および方法

a) 供試魚および試験区の設定

養成クロマグロ親魚から得た受精卵を近畿大学水産養殖種苗センター大

島事業場の 30 m³ 容 FRP 製円形水槽（直径 6 m，深さ 1.2 m）に収容し，種苗生産を行った。36 日齢まで陸上水槽で飼育したクロマグロ稚魚（平均全長 73.5±6.3 mm，平均魚体重 3.7±0.9 g）を供試魚とした。供試魚は和歌山県串本湾浅海漁場に設置したポリエチレン製正方形生簀（縦 6 m×横 6 m×深さ 4 m，目合い 6 mm，容積 144 m³）4 基に約 500 尾ずつ沖出しした。常法通り，沖出し作業開始の 3 時間前（5:00）に最終給餌を行う Control 区と沖出しの 3 時間前の給餌に加えて沖出し作業開始直前（8:00）にもう一度給餌する直前給餌（Feeding just before transportation : FJBT）区を二重複で設けた（ $n=2$ ）。

b) 飼育方法

供試魚は 500 尾ずつ試験生簀 4 基に本領ら（2018）の沖出し方法に準じて沖出しした。いずれの生簀も飛び出しと鳥害を防ぐために目合い 1.25 cm の天井網を生簀上面に敷設し，外周は生簀網と隙間が開かないように縫い付けた。生簀網の形状を適正に保つようにそれぞれの生簀網の底面の外郭に鋼管製底枠を設置した。また，夜間に稚魚が生簀網に衝突するのを防止するために生簀中央の水面から 50 cm 上部に LED ライト（LED マルチライト MDW-24，㈱マリンテック 福岡）を 1 灯ずつ設置し，16:30 から翌朝 8:30 まで点灯した（石橋 2006; Ishibashi et al., 2009 ; Honryo et al., 2013; 2014）。試験期間は 8 日間とし，試験期間中は配合飼料（鮪心 日清丸紅飼料株式会社，東京）を給餌した。沖出し輸送した日は常法通り，全生簀で 13:00 に給餌を再開した。それ以後は，毎日 8:00，11:00，13:00 および 16:00 に手撒きで飽食量を給餌した。さらに自動給餌器（餌やり名人，福伸電気株式会社，兵庫，日本）を用いて 4:30 と 18:30 に 30 分間ずつ給餌した。

c) 日間死亡率，生残率および成長

沖出し前の最終給餌時刻の違いによる死亡率および生残率への影響を調べるために，すべての死亡魚を，各生簀から潜水土が毎朝取り上げて計数し，日間死亡率および生残率を算出した。また，成長を比較するために，後述する d) 生化学的成分の評価に用いたサンプル魚について成長評価項目（全長，尾叉長，体長および体重）を測定した。

d) 生化学的成分（全魚体コルチゾル含量およびグルコース含量）

沖出し前の最終給餌時刻の違いによる生化学的成分の変化を比較するため，沖出し直前を開始時（initial）とし，海上生簀へ収容する直前（Before release : BR）と，生簀に収容後の 1，2，3，5 および 7 日目に供試魚を採取した。試料は 8:00 の給餌前に 30 尾程度をタモ網で掬い，氷殺後直ちに液体窒素で凍結して分析まで -80°C で保存した。ストレス反応の指標として，全魚体コルチゾル含量は，Cortisol EIA Kit（Oxford Biomedical Research Inc., MI, US）を，エネルギー源の指標としてグルコース含量は，グルコース CII テストキット（和光純薬工業株式会社，大阪）を用いてそれぞれ測定した。全魚体コルチゾル含量の測定は，冷凍保存した魚体と 4 倍量のリン酸緩衝生理食塩水を混合してミルミキサーでホモジナイズした。ホモジナイズ溶液にジエチルエーテルを加えて混合し，攪拌・冷却してジエチルエーテルにコルチゾルを溶解した後に四塩化炭素処理を施して測定試料を抽出した。グルコースはホモジナイズ溶液を遠心分離した上澄み液を用いて測定した。

e) 統計処理

測定値は平均±標準偏差で示した。沖出し直前に給餌した直前給餌区と沖出し 3 時間前に最終給餌した Control 区における生残率，成長および生化学

成分の差を検定するために有意水準 5%で Student の t 検定を用いた。試験区内サンプリング時間毎の各体成分を検定するために、同じく有意水準 5% ($n=6$) で Bonferroni 法による多重比較を行った。統計処理には SPSS 16.0j (IBM, Tokyo) を使用した。

III-1-2) 結果

a) 日間死亡率，生残率および成長

各試験区において沖出し作業や輸送の影響により死亡したと考えられる沖出し当日の死亡率は直前給餌区が $3.2\% \cdot d^{-1}$ ，Control 区が $1.4\% \cdot d^{-1}$ となり，直前給餌区が Control 区の 2.3 倍高い値になった。しかし，沖出し日を起点にして 3 日間の累積死亡率を比較したところ，Control 区が 12.4%，直前給餌区が 13.0%となり，差は見られなかった。直前給餌および沖出し前の 3 時間の無給餌時間が沖出し後のクロマグロ稚魚の生残率および成長に及ぼす影響を Table III-1 に示した。直前給餌区と Control 区における試験終了時の生残率は直前給餌区が 83.9%，Control 区が 87.1%と有意な差はなかったが ($n=2, p>0.05$)，わずかに Control 区が高くなる傾向を示した。試験終了時の成長評価項目には有意な区間差は認められなかった ($n=17, p>0.05$)。

Table III-1 The survival rate and growth performances of PBF juveniles reared under different feeding conditions

Index	Replicate	Treatment	
		Feeding just before transportation	Control
Survival rate (%)	n=2	83.9	87.1
Total length (mm)	n=17	99.0±8.5	103.4±9.2
Fork length (mm)	n=17	92.4±7.3	96.2±7.9
Standard length (mm)	n=17	87.3±6.9	92.0±7.6
Body weight (g)	n=17	10.0±2.9	11.5±3.4
Condition factor*	n=17	14.6±1.1	14.4±1.6

Growth values indicate mean ± standard deviation

*Condition factor=BW(g)/BL(mm)³ × 10⁶

b) 生化学的成分

試験期間中の全魚体コルチゾル含量の変化を Fig. III-1 示した。生簀へ収容直前の BR 時のコルチゾル含量は、直前給餌区が 244.2 ng/g となり、Control 区の 83.5 ng/g に比べて 3 倍近い値を示し、有意差が確認された ($n=6, p<0.05$)。さらに直前給餌区において BR 時が Initial 時と比較して約 40 倍のコルチゾル含量を示し、有意に高い値を示した ($n=6, p<0.05$)。一方、Control 区では BR 時の値が Initial 時より 3 倍高い結果となったが、偏差が大きく有意差は認められなかった。両試験区ともに生簀へ収容して 1 日後には Initial と同等の値を示し、その後試験終了まで上昇することはなかった。

試験期間中の全魚体グルコース含量の変化を Fig. III-2 に示した。直前給餌区的全魚体グルコース含量が BR 時に 0.82 mg/g を示し、Control 区の 1.11 mg/g より、有意に低くなった ($n=6, p<0.05$)。また、両試験区的全魚体グルコース含量は、いずれも生簀に収容して 1 日後に最も低い値を示し、その後

の経過日数とともに上昇する傾向を示して、生簀収容後の1日目と7日目の間に有意差が確認された。(n=6, p<0.05)。

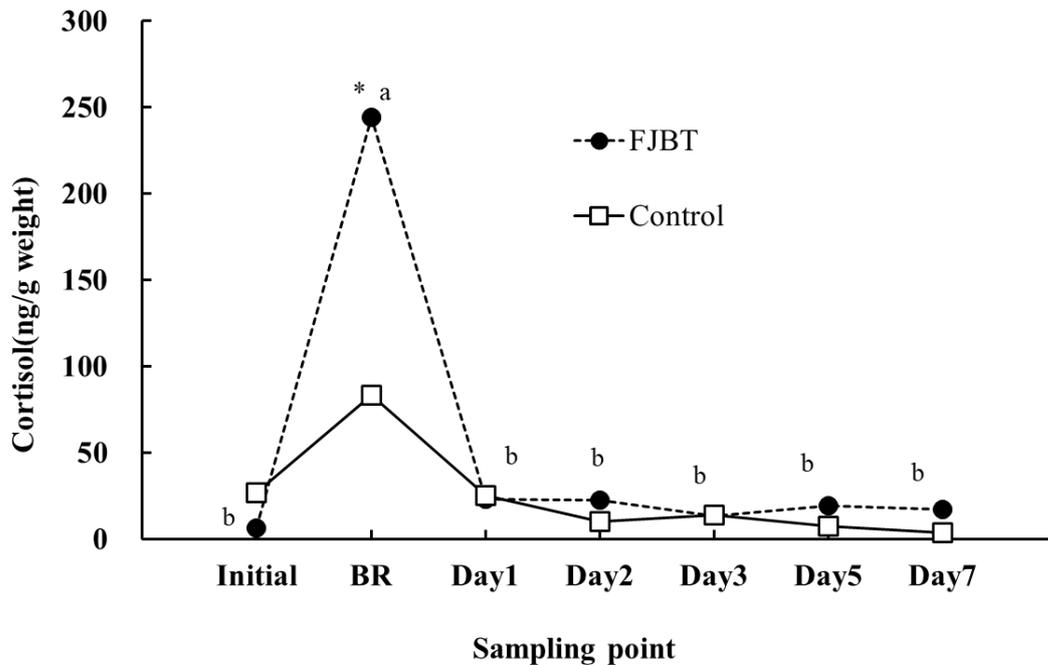


Fig. III-1. The changes of cortisol level of PBF juveniles reared under two different conditions; ●, feeding just before transportation from land-based tank and □, feeding 3 hours before transportation as Control. ^{a,b} Values of different superscript letters indicates significant differences among the sampling point (Bonferroni, n=6, p<0.05). * Asterisk indicates the significant differences among the treatment (Student's t-test, n=6, p<0.05). SD bars were not shown to simplify the figure.

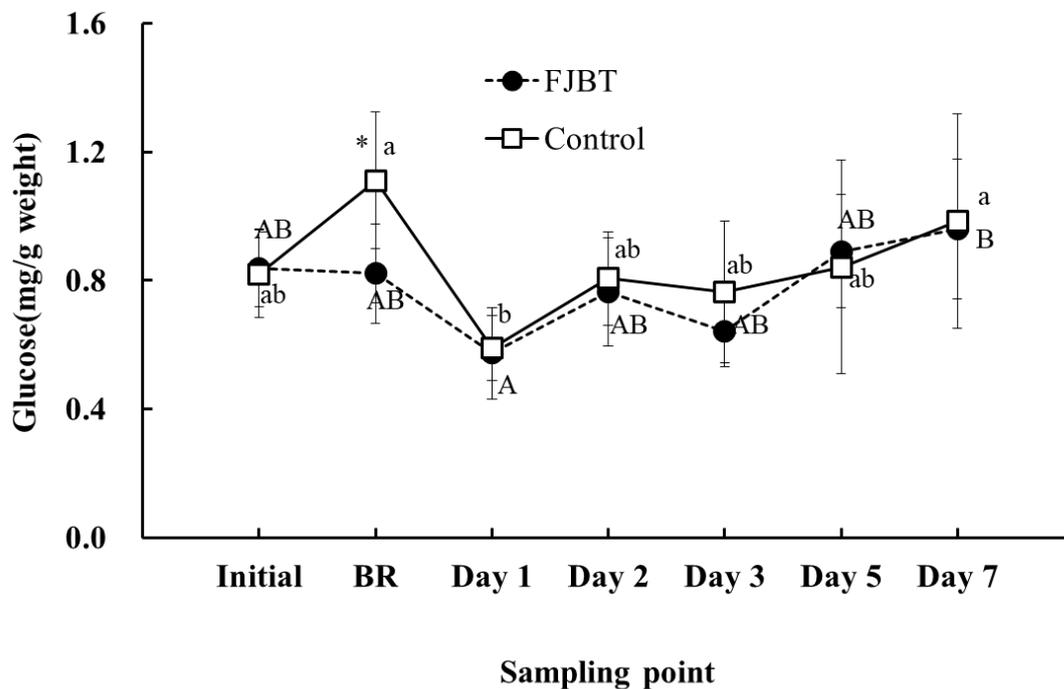


Fig. III-2. The changes of glucose level of PBF juveniles reared under two different conditions; ●, feeding just before transportation from land-based tank and □, feeding 3 hours before transportation as Control. ^{A-B, a-b} Values of different type of superscript letters indicates significant differences among the sampling point (Bonferroni, $n=6$, $p<0.05$). * Asterisk indicates the significant differences among the treatment (Student's t -test, $n=6$, $p<0.05$).

III-1-3) 考察

クロマグロ稚魚は沖出し作業や輸送のストレスから回復するために多くのエネルギーを消費する可能性がある (Honryo et al., 2018)。このため、沖出し前の最終給餌時刻を見直すことで、沖出し後に多く発生する成長不良を軽減できる可能性があると考えた。そこで、これまで行ってきた沖出し3時間前を最終給餌とする Control 区と沖出し作業直前にもう一度給餌を行う直前給餌区を設け、死亡率、生残率、成長および生化学的成分の変化を比較した。その結果、直前給餌区の沖出し当日の死亡率は、Control 区の 2.3 倍高くなった。また、試験終了時における直前給餌区の生残率は、Control 区よりわずかながら低くなる傾向を示した。さらに、ストレスの指標として全魚体

コルチゾル含量を比較したところ、最もストレスが負荷される生簀収容直前（BR）時において（Honryo et al., 2018）、直前給餌区が Control 区より 3 倍も有意に高くなった。以上の結果から、沖出し作業直前の給餌はクロマグロ稚魚のストレス負荷を増大させ、沖出し後の成長不良魚の発生を軽減する方法としては不適切であると考えられた。

本実験では、沖出し直前に給餌することで、沖出し作業や輸送のストレス、さらには、生簀への環境適応に必要なエネルギーを補い、摂餌不良による成長不良を軽減することを期待して実施した。一方、大西（2016）は、クロマグロの摂餌直後には、餌の消化に必要なエネルギーが増え、酸素消費量が増加することを報告している。今回の結果から、稚魚は沖出し作業の直前に摂餌した餌を消化するために多くのエネルギーが必要になり、その後に負荷される多くのストレスへの対応に十分なエネルギーを確保できなかった可能性があると考えられた。実際に直前給餌区の全魚体グルコース含量は BR 時に Control 区より有意に低くなった。魚類はストレスを受けると 1 次反応としてコルチゾルなどのホルモンが分泌され、続いて 2 次反応として血中グルコース濃度が上昇することが多くの魚種で報告されている（Ishibashi et al., 2002; Pratap and Bonga, 1990; Grutter and Pankhurst, 2000; Rotllant and Tort, 1997; 中野 2016）。グルコースは生物の主要なエネルギー源であり、ストレスの負荷で上昇した血中グルコースが、安静状態に回復するためのエネルギーとして使用される（会田 2013）。本実験で、コルチゾルの著しい上昇と同時に減少したグルコース含量は、餌の消化に使われた可能性もあり、その詳細については今後さらに検討が必要である。

他方、沖出し後 1 日目に両試験区のグルコース含量が減少し、既報の Ishibashi et al.（2009）や Honryo et al.（2018）の結果と一致した。彼らが報告しているように、沖出し後のクロマグロ稚魚で見られるグルコース含量の

減少はエネルギー源として消費された結果であると考えられた。Weber and Peter (1986) はマグロ類にとって糖質は他魚種よりも重要な栄養素の一つであると報告している。また、宮下 (2002) はクロマグロのエネルギー要求量が他魚種より高いことを報告し、大西 (2016) は早い成長を生き残り戦略とするクロマグロ稚魚では僅かな絶食でも消化吸収・代謝の生理に悪影響を及ぼすと報告している。さらに、Korsmeyer and Dewar (2001) は、マグロ類のエネルギー戦略はエネルギーの保存より、エネルギー摂取量の増加を優先させることを示唆している。つまり、クロマグロ稚魚の生存にとってわずかな時間でも絶食は避けるべきと考えられる。大西 (2016) はクロマグロ稚魚の摂餌後の酸素要求量は摂餌後 1 時間で最大値となり、2~4 時間後にかけて絶食時のレベルに戻ると報告している。魚をハンドリングや輸送する場合、酸素要求量の大きい時間は避けるべきであろう。これらの報告と今回の試験結果から、沖出し直前の摂餌はクロマグロ稚魚へのストレス負荷を増大させた可能性が考えられるので、沖出し等のストレス負荷が予想される作業の前の適正な無給餌時間についてさらに詳しい研究が必要である。

III-2) 沖出し前後の適正給餌方法の検討

III-1 の結果から、沖出し作業直前の給餌は沖出しに伴う摂餌不良に対応するエネルギーを補う効果がないばかりか、ストレス負荷を高めてしまうことから、沖出し作業直前には無給餌時間が必要であることが示唆された。一方、宮下 (2002) は、クロマグロ稚魚の消化・吸収能や絶食耐性が低いため、給餌量を制限すると成長率や生残率が大幅に減少すると報告している。また、大西 (2016) は、わずかな期間の絶食でもクロマグロ稚魚の生理機能に大きな悪影響を及ぼすと推察している。このため、我々はクロマグロの沖出し作業を午前中に終え、その後できるだけ早くにエネルギーを補うために、当日

の 13:00 に給餌を再開する方法を常法としてきた。しかし、クロマグロ稚魚の沖出し・輸送における適正な最終給餌時刻と輸送後の給餌再開時刻については詳しく調べられていない。そこでIII-2 では沖出し前の最終給餌時刻と沖出し後の給餌再開時刻の組み合わせを変えた試験区を設定し、クロマグロ稚魚の生残率、成長、ストレス反応および体成分の変化を比較し、沖出し作業前後の適正な給餌方法を調べた。まず、III-2-1 では天候や海況などの外部環境の変動が少ない陸上水槽で模擬的な試験を行い、その結果を基にIII-2-2 では海上生簀を用いて検証した。

III-2-1) 陸上水槽における給餌試験

III-2-1-1) 材料および方法

a) 供試魚および試験区設定

養成クロマグロ親魚から得た受精卵を近畿大学水産養殖種苗センター大島事業場の 30 m³ 容 FRP 製円形水槽（直径 6 m, 深さ 1.2 m）2 基に収容して種苗生産を行った。36 日齢まで飼育したクロマグロ稚魚（平均全長 66.0±8.0 mm, 平均体重 2.6±1.0 g）を供試魚とした。試験区の設定を Fig. III-3 に示した。尚、試験区の書式は下記の通りとした。

例：5-13（8 h）の場合、

5(5:00 最終給餌時刻)-13(13:00 給餌再開時刻) (8 h)（無給餌時間の合計）
実際の生産現場では 5:00 に沖出し作業前の最終給餌を行い、無給餌時間 3 時間を経て 8:00 から沖出し作業を開始した。作業は、午前中を目途に終了させ、当日の 13:00 に給餌を再開している。この給餌方法を Control 区：5-13(8 h)とした。試験区は最終給餌時刻を Control 区と同じとし、適正な給餌再開時刻を検討するため、最終給餌時刻から 12 時間後の 17:00 に給餌を再

開する試験区：5-17(12 h)および 24 時間後の翌日 5:00 に給餌を再開する試験区：5-5(24 h)を設けた。さらに無給餌時間を検討するため，沖出し前日の 17:00 に最終給餌を行い，無給餌時間 15 時間を経て沖出し作業を行った後，給餌再開が 20 時間後の 13:00 の試験区：17-13(20 h)，24 時間後の 17:00 の試験区 17-17(24 h)，36 時間後の翌日 5:00 の試験区 17-5(36 h)をそれぞれ設けた ($n=1$)。

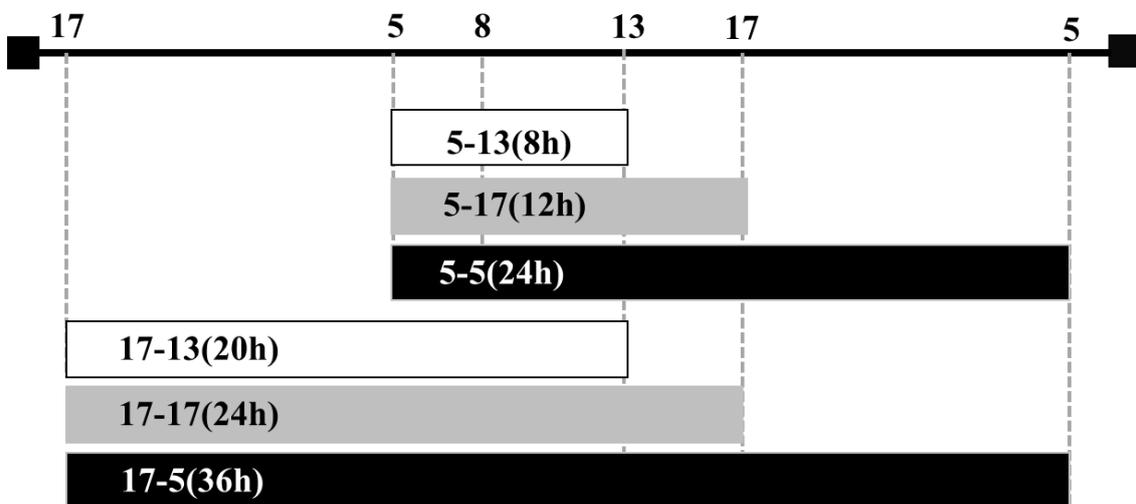


Fig. III-3. The treatment of PBF juveniles reared under six different feeding conditions. Horizontal boxes indicate non-feeding time.

b) 飼育方法

III-2-1 では模擬的な沖出し輸送を行うため，供試魚の沖出し工程は実際と同じ手順で行った。つまり 30 m³ 容円形 FRP 製水槽から供試魚を輸送用の 1 m³ 容 FRP 製水槽（直径 1.2 m，深さ 0.8 m）に 280 尾ずつ計数して収容し，実際の輸送時間と同じ 20 分を経過した後にそれぞれの試験水槽（30 m³ 容円形 FRP 製水槽）6 基に収容した。試験期間は，5 日間とし，試験期間中は配合飼料（鮪心，日清丸紅飼料株式会社，東京）を給餌して飼育した。各試験区の飼育環境を確認するため，水温（℃）および溶存酸素量（DO，%）を毎日測定した。試験期間中の水温は 27.4℃±0.3℃，DO は 117.4±5.5%の範囲で

推移し、各試験区の環境に差がなく、適正な飼育環境であったと判断した。また全試験水槽には衝突防止のため、毎日 16:30 から翌朝 8:30 まで夜間照明として水槽中央に蛍光灯を設置した (Honryo et al., 2013)。

c) 評価項目

クロマグロ稚魚の生残率の算出は試験水槽への収容日を 0 日目とし、1 日目以降の死亡魚を回収して算出した。成長の評価および体成分の経時的变化を調査するために模擬沖出し作業直前の水槽から開始時 (initial) として供試魚をサンプリングし、その後は試験水槽に収容直前 (Before release; BR), 各試験区における給餌再開時刻の 13:00, 17:00, 翌日 5:00, 9:00 および 2 日目に 30 尾程度ずつを各水槽からサンプリングした。各試料は、タモ網で掬って氷殺し、直ちに液体窒素で凍結して、分析まで -80°C で保存した。生化学分析の前に全長、尾叉長、体長および体重を測定した。生化学分析は III-2-1 と同様に全魚体のコルチゾル含量および全魚体グルコース含量に加え、全魚体グリコーゲン含量を測定した。さらに魚体の一般成分 (水分, 灰分, 粗タンパク質および粗脂質) を AOAC (1984) により測定した。ここでの熱量 (j/g weight) の算出は下記の係数を用いた (村井 2009)。

$$\text{熱量 (j/g weight)} = (\text{タンパク質} \times 5.65 + \text{脂質} \times 9.35) \times 4185.5$$

d) 統計処理

全試験区における生残率は有意水準 1% で Kaplan-Meier のログランクテストにより有意差を判定した。全魚体コルチゾル, グリコーゲンおよびグルコース含量 ($n=5$), 熱量を含む一般成分 ($n=3$) は有意水準 5% で Student の t 検定および Bonferroni 法により群間差の検定を行った (SPSS 16.0j IBM, Tokyo)。

III-2-1-2) 結果

a) 生残率および成長

沖出し前後の給餌方法がクロマグロ稚魚の生残率および成長に及ぼす影響を Table III-2 に示した。各試験区の沖出し当日に死亡した稚魚の割合は Control 区を含む最終給餌 5:00 の試験区群が 2.2%，最終給餌 17:00 の試験群が 1.9%となり，差はなかった。試験終了時の生残率は Control 区で 80.0%となり，これに比べて 5-17(12 h)，5-5(24 h)および 17-17(24 h)で僅かに高く，反対に 17-13(20 h)と 17-5(36 h)では僅かに低くなる傾向を示した。最も生残率が高かったのは 5-17(12 h)の 84.4%で，次いで 17-17(24 h)で 82.8%となり，17-5(36 h)の生残率 74.3%に対して有意差が確認された。最終給餌時刻に関わらず，給餌再開時刻が 17:00 の試験区の生残率が高くなる傾向を示した。各試験区における試験終了時の成長に差は認められなかった ($n=5$, $p>0.05$)。

Table III-2 The survival rate and growth performances of PBF juveniles reared under different feeding conditions

Index	Treatment					
	17-13(20h) n=2	17-17(24h) n=2	17-5(36h) n=2	5-13(8h) n=2	5-17(12h) n=2	5-5(24h) n=2
Survival rate (%)	79.3 ^{ab}	82.8 ^b	74.3 ^a	80.0 ^{ab}	84.4 ^b	80.4 ^{ab}
Total length (mm)	86.2±6.5	87.1±12.5	85.7±7.7	83.0±3.3	89.1±6.2	87.3±6.2
Fork length (mm)	81.2±6.0	81.7±11.6	81.4±7.4	78.4±2.9	85.0±5.7	81.6±5.6
Body length (mm)	78.3±5.5	77.6±10.8	78.4±7.6	74.5±3.2	82.8±5.7	79.1±5.4
Body weight (g)	6.7±1.3	7.5±3.1	6.9±2.1	6.2±0.8	7.9±1.8	6.8±1.7
Condition factor*	13.9±0.5	15.4±1.1	14.0±0.8	15.0±0.8	13.7±0.9	13.4±0.9

Growth values indicate mean ± standard deviation

^{a,b} : each letter indicates significant differences ($n=1, p<0.01$).

*Condition factor = $BW(g)/(BL(mm))^3 \times 10^6$

b) 生化学的成分（全魚体コルチゾル・グリコーゲン・グルコース含量）

試験期間中の全魚体コルチゾル含量の変化を Fig. III-4 に示した。試験区間で有意差は認められなかったが、いずれの試験区でも開始時と比較して収容直前（BR）に全魚体コルチゾル含量が上昇傾向を示した。

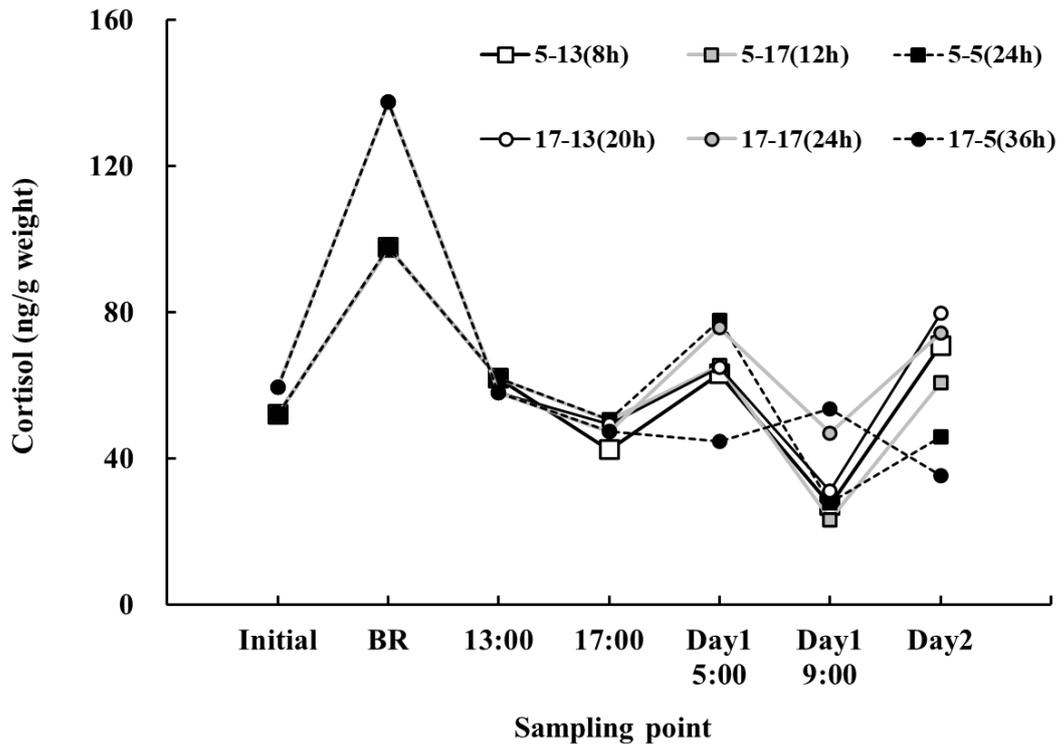


Fig. III-4. The changes of cortisol level of PBF juveniles reared under six different conditions; □,5-13(8 h) as Control; ■,5-17(12 h); ■,5-5(24 h); ○,17-13(20 h); ●,17-17(24 h) and ●,17-5(36 h).

試験期間中の全魚体グリコーゲン含量の変化を Fig. III-5 に示した。有意差はないものの各試験区の開始時から給餌再開時刻まで、最終給餌 17:00 の試験区群が最終給餌 5:00 の試験区群より低くなる傾向を示した。沖出し後 1 および 2 日目には試験区間で有意差が確認されたが、試験区の条件を反映した傾向は見出せなかった。

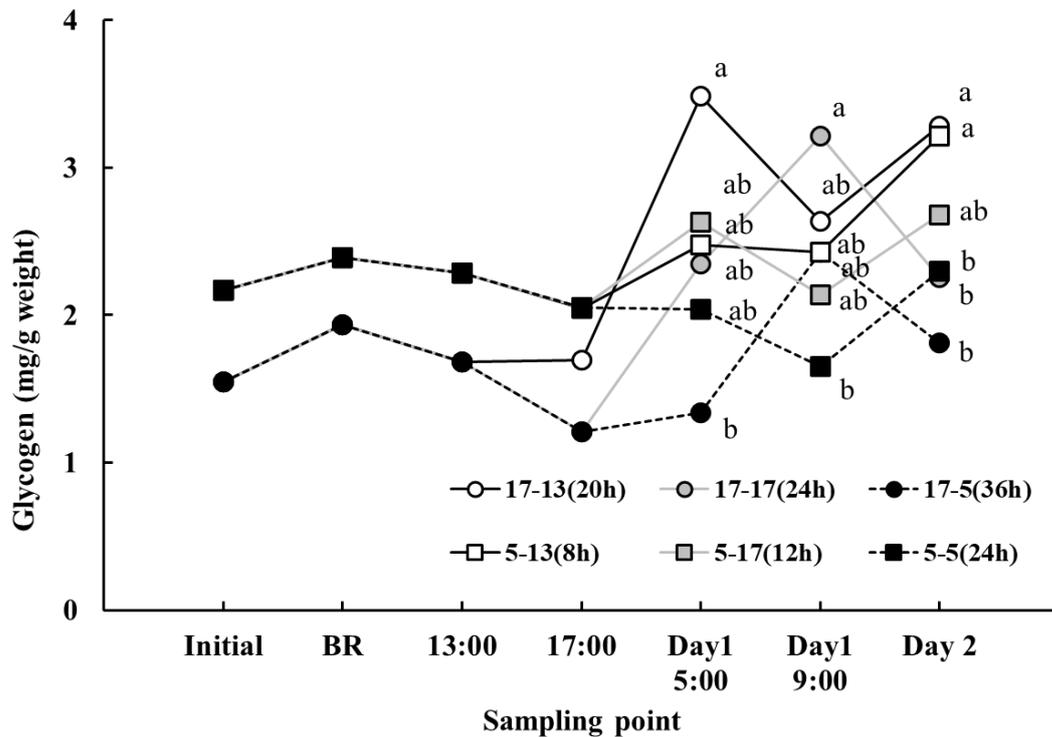


Fig. III-5. The changes of glycogen level of PBF juveniles reared under six different conditions; □,5-13(8 h) as Control; ■,5-17(12 h); ■,5-5(24 h); ○,17-13(20 h); ●,17-17(24 h) and ●,17-5(36 h).

^{a-c} Values of different superscript letters at the same hour indicate significant differences among treatment and between the group (Bonferroni, $n=5$, $p<0.05$).

試験期間中の全魚体グルコース含量の変化を Fig. III-6 に示した。グリコーゲン含量の経時変化と異なり，沖出し後の 13:00 まで最終給餌 17:00 の試験区群のグルコース含量が，最終給餌 5:00 の試験区群より高く推移し，生簀に収容後の 13:00 には有意な群間差が認められた。収容後 1 日目には試験区間で有意差が確認されたが，試験区の条件を反映した傾向は見出せなかった。

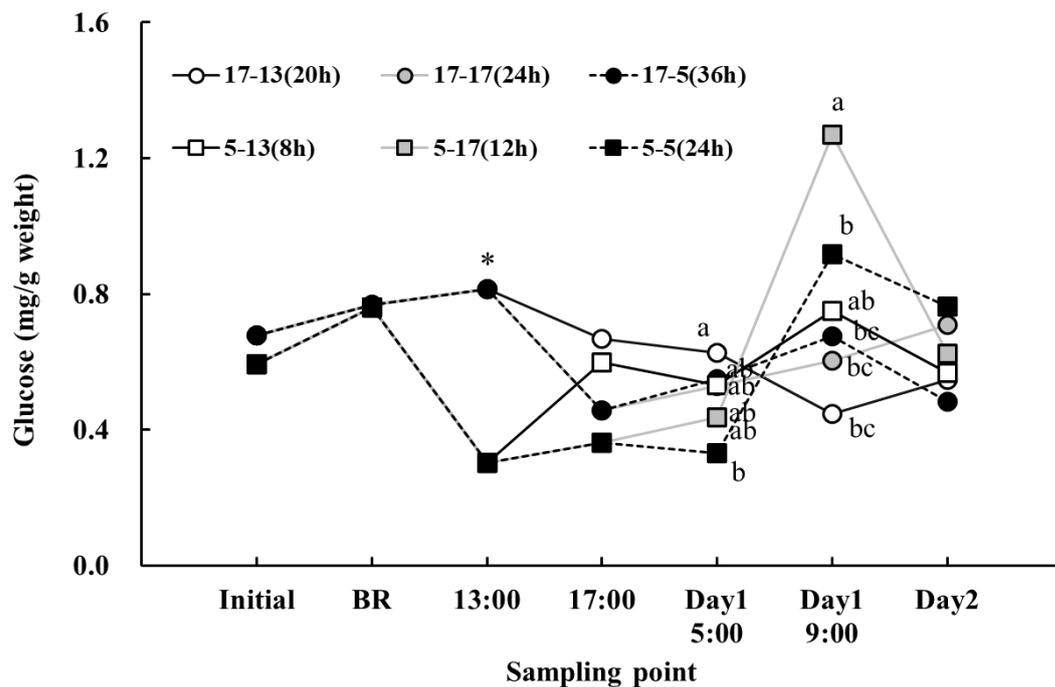


Fig. III-6. The changes of glucose level of PBF juveniles reared under six different conditions; □,5-13(8 h) as Control; ▣,5-17(12 h); ■,5-5(24 h); ○,17-13(20 h); ●,17-17(24 h) and ●,17-5(36 h).

^{a-c} Values of different letters at the same hour indicate significant differences among treatment (Bonferroni, $n=5$, $p<0.05$). * Asterisk indicate significant differences between the group (Student's t-test, $n=5$, $p<0.05$).

c) 一般成分および熱量

試験期間中の全魚体一般成分の変化を Fig. III-7~10 に、熱量の変化を Fig. III-11 にそれぞれ示した。水分含量は 2 日目からわずかに減少する傾向が見られた。一方、脂質含量と熱量は 2 日目から増加する傾向が見られた。いずれの成分においても試験区間に有意差が確認される時間帯があったが、一定の傾向は確認できなかった。

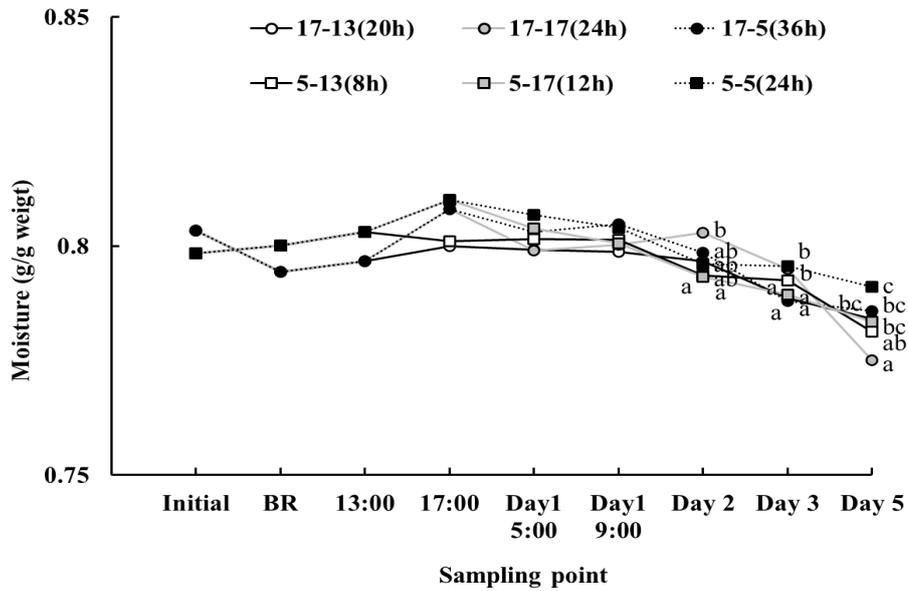


Fig. III-7. The changes of moisture level of PBF juveniles reared under six different conditions; □,5-13(8 h) as Control; ■,5-17(12 h); ■,5-5(24 h); ○,17-13(20 h); ●,17-17(24 h) and ●,17-5(36 h).

^{a-c} Values of different letters at the same hour indicate significant difference among treatment (Bonferroni, $n=3$, $p<0.05$).

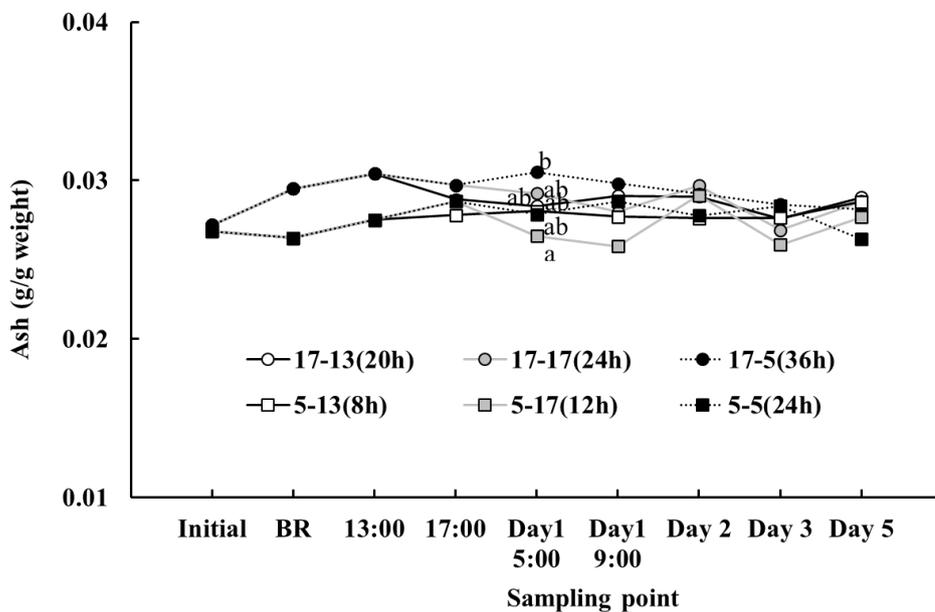


Fig. III-8. The changes of ash level of PBF juveniles reared under six different conditions; □,5-13(8 h) as Control; ■,5-17(12 h); ■,5-5(24 h); ○,17-13(20 h); ●,17-17(24 h) and ●,17-5(36 h).

^{a,b} Values of different letters at the same hour indicate significant difference among treatment (Bonferroni, $n=3$, $p<0.05$).

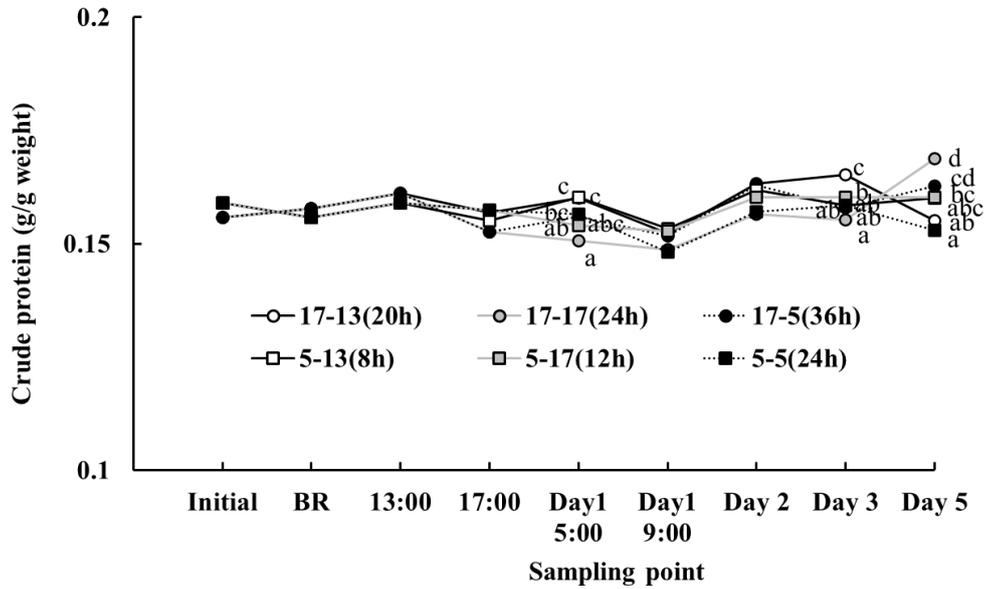


Fig. III-9. The changes of crude protein level of PBF juveniles reared under six different conditions; □,5-13(8 h) as Control; ■,5-17(12 h); ■,5-5(24 h); ○,17-13(20 h); ●,17-17(24 h) and ●,17-5(36 h).

^{a-c} Values of different letters at the same hour indicate significant difference among treatment (Bonferroni, $n=3$, $p<0.05$).

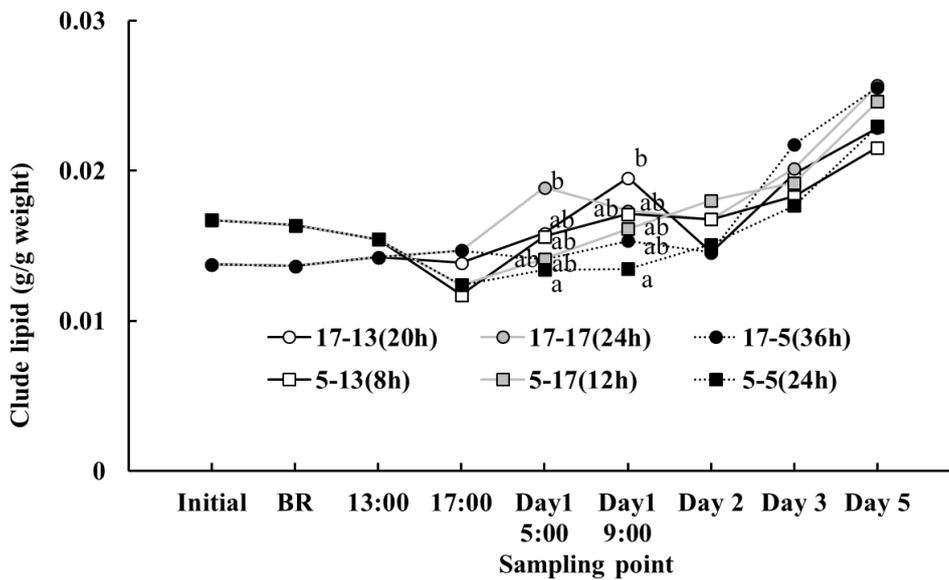


Fig. III-10. The changes of crude lipid level of PBF juveniles reared under six different conditions; □,5-13(8 h) as Control; ■,5-17(12 h); ■,5-5(24 h); ○,17-13(20 h); ●,17-17(24 h) and ●,17-5(36 h).

^{a,b} Values of different letters at the same hour indicate significant difference among treatment (Bonferroni, $n=3$, $p<0.05$).

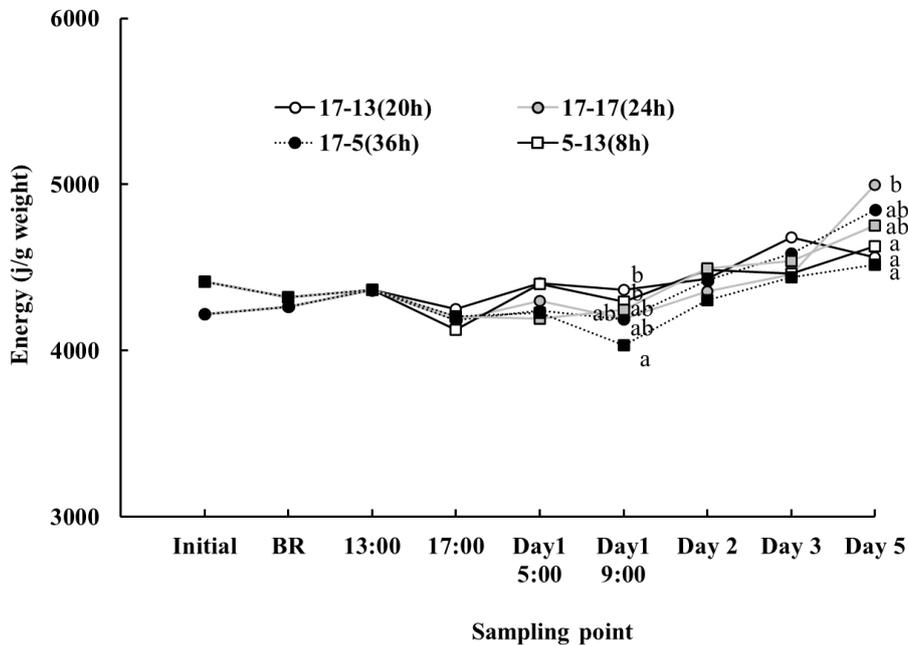


Fig. III-11. The changes of energy of PBF juveniles reared under six different conditions; □,5-13(8 h) as Control; ■,5-17(12 h); ■,5-5(24 h); ○,17-13(20 h); ●,17-17(24 h) and ●,17-5(36 h). ^{a,b} Values of different letters at the same hour indicate significant difference among treatment (Bonferroni, $n=3$, $p<0.05$).

III-2-2) 海上生簀における給餌試験

III-2-2 では、III-2-1 で生残率が改善された 5-17(12 h) および 17-17(24 h) を試験区とし、従来の 5-13(8 h) を対照として、実際の生簀に収容した時の影響を検討した。

III-2-2-1) 材料および方法

a) 供試魚および試験区設定

近畿大学水産養殖種苗センター大島事業場の 30 m³ 容 FRP 製円形水槽（直径 6 m，深さ 1.2 m）2 基で飼育されていた 34 日齢のクロマグロ稚魚（平均全長 63.2±6.8 mm，平均体重 2.1±0.7 g）を供試魚とした。これまでの沖出し

前後の給餌方法である沖出し当日の 5:00 に最終給餌をして、無給餌時間 3 時間を経た後に沖出し作業を開始し、当日 13:00 に給餌再開する 5-13(8 h) を Control 区とした。試験区は、最終給餌が Control 区と同じで、給餌再開が当日 17:00 の 5-17(12 h)および沖出し前日の 17:00 に最終給餌を行い、沖出し当日の 17:00 に給餌を再開する 17-17(24 h)を設けた。和歌山県串本湾浅海漁場に設置した 6 m×6 m×深さ 4 m の網生簀 6 基を用い、各試験区をそれぞれ 2 反復ずつ設けて比較した。

b) 飼育方法

供試魚は 300 尾ずつ試験生簀 6 基に本領ら (2018) の沖出し方法に準じて沖出しした。すべての生簀の飼育設備は III-1 に準じた。試験期間は沖出し日を 0 日目として 5 日間とし、試験期間中は配合飼料 (鮪心 日清丸紅飼料株式会社, 東京) を与えた。沖出し当日は試験区の設定に従って沖出し作業前と生簀収容後の給餌を行った。その後は、毎日 8:00, 11:00, 13:00 および 16:00 に手撒きで飽食量を給餌した。さらに自動給餌器 (餌やり名人, 福伸電気株式会社, 兵庫, 日本) を用いて 4:30 と 18:30 に 30 分間ずつ給餌した。

c) 評価項目

生残率, 成長, 生化学的成分 (全魚体コルチゾル含量, 全魚体グリコーゲン含量), 魚体の一般成分 (水分, 灰分, 粗タンパク質および粗脂質) および熱量の分析は III-2-1 と同様に実施した。

d) 統計処理

試験区における試験終了日の生残率は有意水準 5%で x^2 乗検定を行いス

レス指標となるコルチゾルを含む各体成分 ($n=5$) および熱量を含む一般成分 ($n=3$) の検定はIII-2-1と同様に行った。

III-2-2-2) 結果

a) 生残率および成長

各試験区の沖出し当日に死亡した稚魚の割合は、Control区 of 5-13(8 h)が6.0%であるのに対し、5-17(12 h)が7.5%、17-17(24 h)が5.0%となり、大きな差は見られなかった。次に、海上生簀における沖出し前後の給餌方法がクロマグロ稚魚の生残率と成長に及ぼす影響をTable III-3に示した。Control区 of 5-13(8 h)の生残率が86.4%で最も高い値を示したが、5-17(12h)のそれは

Table III-3 The survival rate and growth performances of PBF juveniles reared under different feeding conditions

Index	Treatment		
	5-13(8h) $n=2$	17-17(24h) $n=2$	5-17(12h) $n=2$
Survival rate (%)	86.4	79.6	85.6
Total length (mm)	67.4±9.5	66.5±8.3	68.7±3.5
Fork length (mm)	62.6±9.3	62.7±8.3	64.8±3.7
Body length (mm)	59.9±8.7	60.4±9.0	62.5±3.6
Body weight (g)	3.1±1.2	3.0±1.1	3.0±0.5
Condition factor*	13.9±1.7	13.2±2.3	12.0±0.8

Growth values indicate mean ± standard deviation

*Condition factor = $BW(g)/(BL(mm))^3 \times 10^6$

85.6%であり，差がなかった。17-17(24 h)の生残率は 79.6%で有意差はないものの最も低くなる傾向を示した。成長については試験区間に差はなかった ($n=2, p>0.05$)。

b) 生化学的成分 (全魚体コルチゾルおよびグリコーゲン含量)

試験期間中の全魚体コルチゾル含量の変化を Fig. III-12 に示した。どの経過時間においても有意な区間差は認められなかったが ($n=2, p>0.05$)，これまでの試験結果と同様に全試験区共通して BR 時が最も高く，開始時の約 2.5 倍の値を示した。

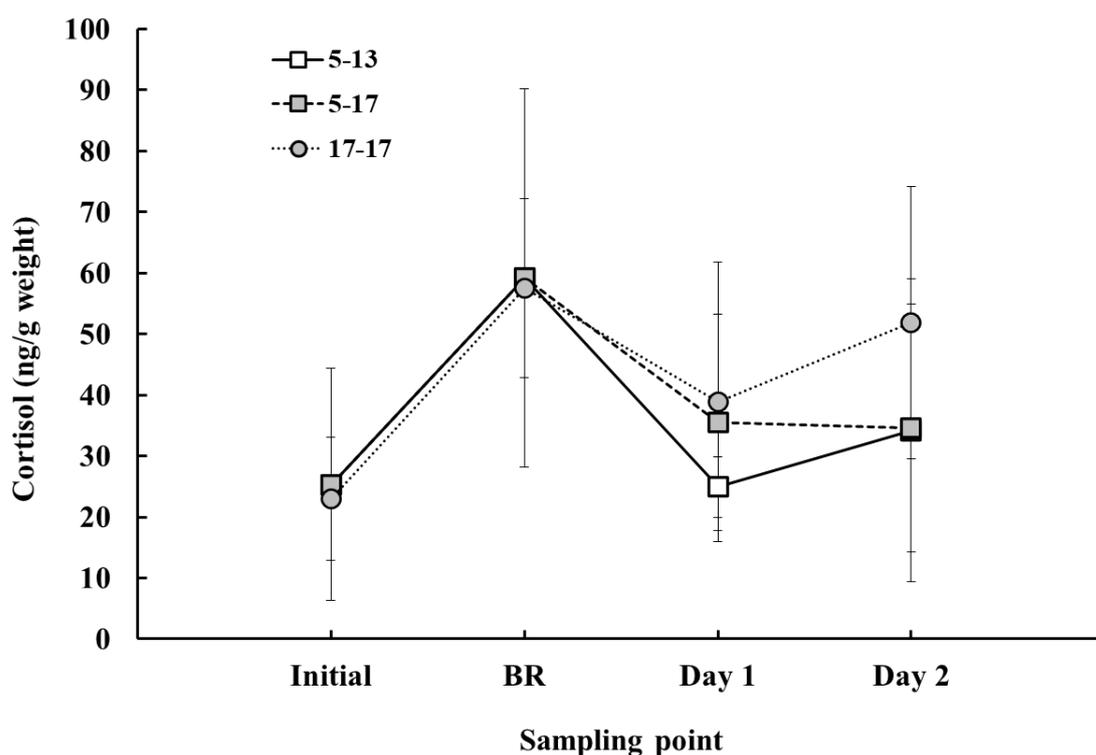


Fig. III-12. The changes of cortisol level of PBF juveniles reared under three different conditions; □, 5-13(8 h) as Control; ■, 5-17(12 h) and ●, 17-17(24 h).

試験期間中の全魚体グリコーゲン含量の変化を Fig. III-13 に示した。

III-2-2 の結果とは異なり，最も無給餌時間の長い 17-17(24 h)の試験区で高くなる傾向を示し，BR 時には 17-17(24 h)の試験区で 16.35 mg/g weight となり，最終給餌 5:00 の試験区群 5-17(12 h)，5-5(24 h)の 4.16 mg/g weight に対して有意に高くなった ($n=3, p>0.05$)。

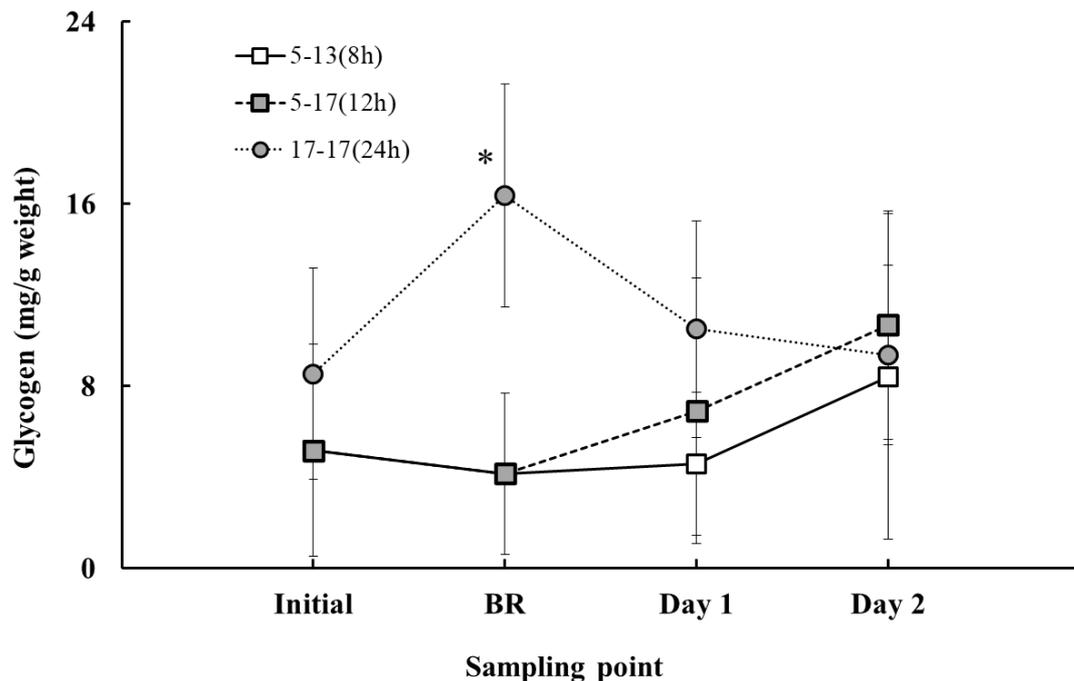


Fig. III-13 The changes of glycogen level of PBF juveniles reared under three different conditions; □, 5-13(8 h) as Control; ■, 5-17(12 h) and ●, 17-17(24 h). *Asterisk indicate significant differences between the group ($n=3, p<0.05$)

c) 一般成分および熱量

試験期間中の全魚体一般成分分析の結果を Fig. III-14~17 に，熱量の変化を Fig. III-18 に示した。沖出し前日の 17:00 に最終給餌を行った 17-17(24h)の試験区において BR まで水分含量は，沖出し当日の 5:00 に最終給餌を行った試験区に比べて有意に高い値を示し，灰分において BR で有意に低い値

を示した ($n=3, p<0.05$)。また, 17-17(24 h)のタンパク質含量, 脂質含量および熱量はすべての試験区が給餌を再開されるまで, 他の試験区に比べて低い傾向を示した。しかし, 2日目には他の試験区と同等もしくは高くなる傾向を示した。

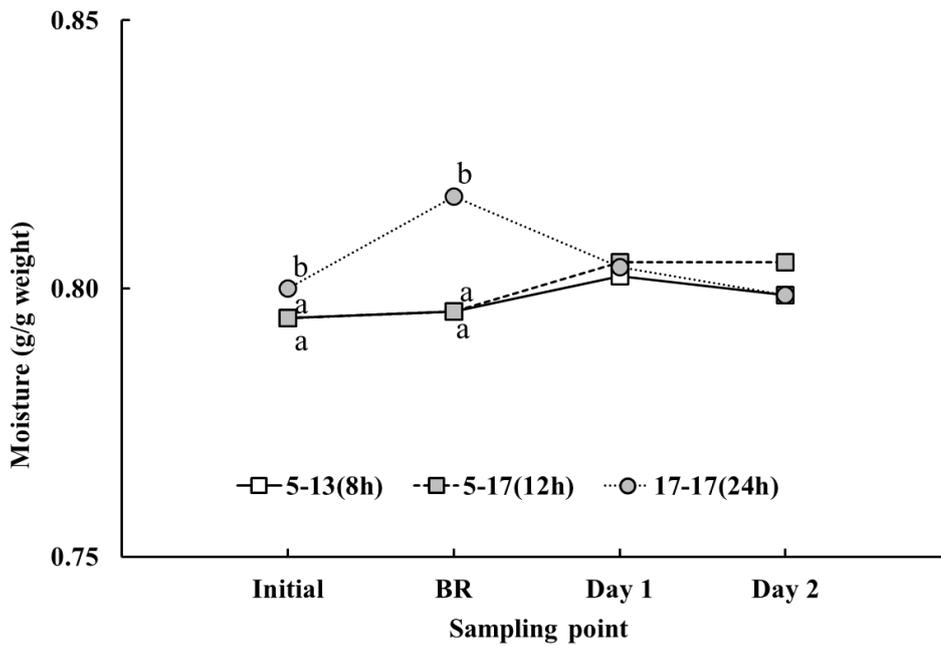


Fig. III-14. The changes of moisture level of PBF juveniles reared under three different conditions; □, 5-13(8 h) as Control; ■, 5-17(12 h) and ●, 17-17(24 h). ^{a,b} Values of different letters at the same hour indicate significant difference among treatment (Bonferroni, $n=3, p<0.05$).

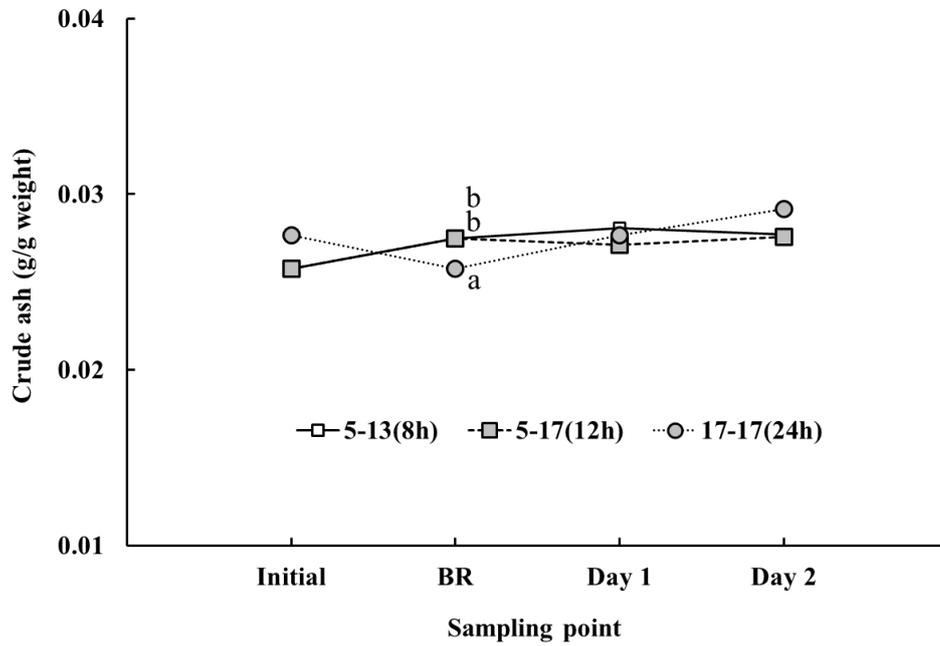


Fig. III-15. The changes of ash level of PBF juveniles reared under three different conditions; □, 5-13(8 h) as Control; ■, 5-17(12 h) and ●, 17-17(24 h). ^{a,b} Values of different letters at the same hour indicate significant difference among treatment (Bonferroni, $n=3$, $p<0.05$).

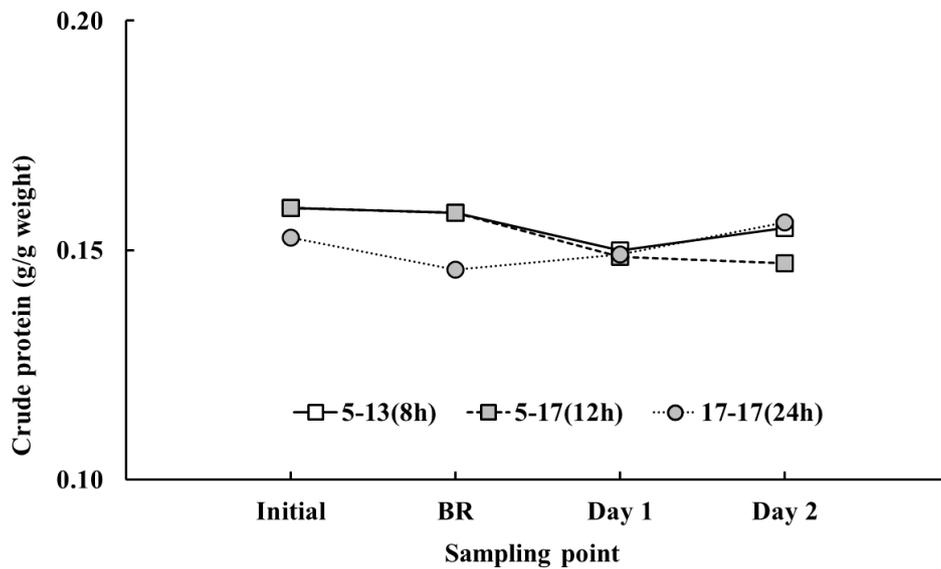


Fig. III-16. The changes of crude protein level of PBF juveniles reared under three different conditions; □, 5-13(8 h) as Control; ■, 5-17(12 h) and ●, 17-17(24h).

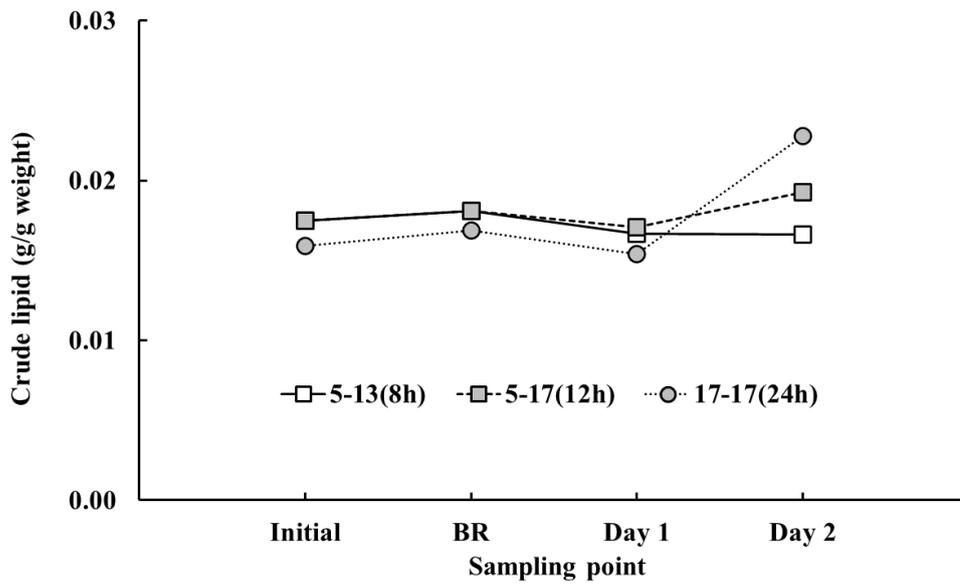


Fig. III-17. The changes of crude lipid level of PBF juveniles reared under three different conditions; □, 5-13(8 h) as Control; ■, 5-17(12 h) and ●, 17-17(24h).

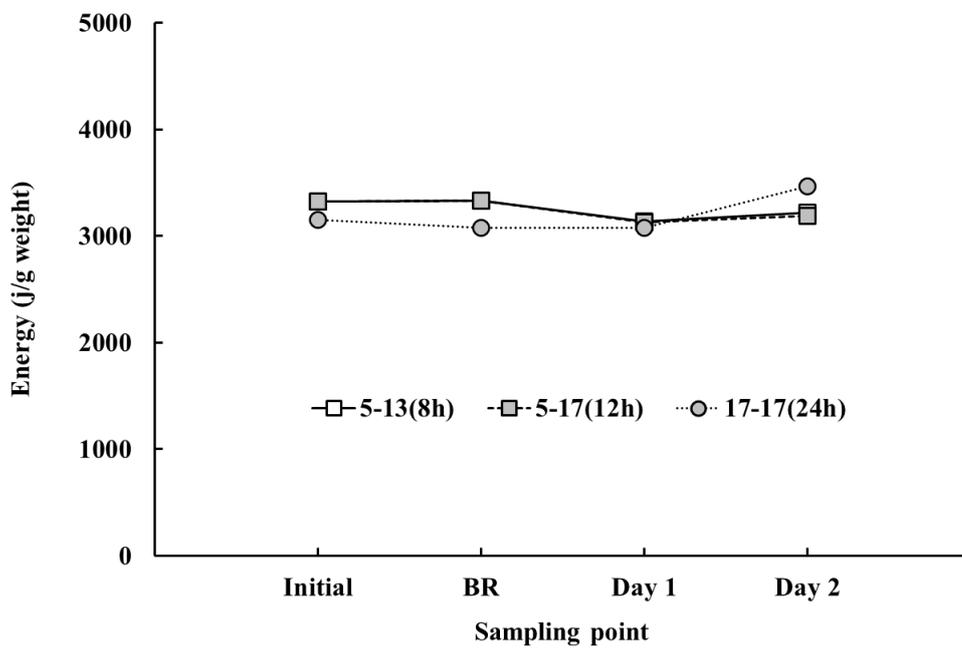


Fig. III-16. The changes of energy of PBF juveniles reared under three different conditions; □, 5-13(8 h) as Control; ■, 5-17(12 h) and ●, 17-17(24 h).

III-2-2-3) 考察

III-2-1 では、稚魚の沖出し前の最終給餌時刻と沖出し後の給餌再開時刻の組み合わせを変えて、生残率および体成分に及ぼす影響を陸上水槽の模擬沖出し実験で検討した。その結果、従来の給餌方法 5-13 (8 h) と比べ、最終給餌時刻に関わらず、沖出し当日の 17:00 に給餌を再開する試験区でわずかに生残率が向上した。そこで、III-2-2 では実際の海上生簀を用いて沖出し後の給餌再開時刻を 17:00 とし、最終給餌時刻を変更した試験区 17-17 (24 h) および 5-17 (12 h) を設定して従来の 5-13 (8 h) と飼育成績等を比較した。その結果、有意な差はないものの 5-13 (8 h) と 5-17 (12 h) の生残率は 17-17 (24 h) のそれより高くなった。特に沖出し作業の 3 時間前の 5:00 に最終給餌した場合、給餌再開時刻をこれまでの 13:00 から 17:00 に延長しても飼育成績に影響がないことがわかった。すなわち無給餌時間が 8 時間から 12 時間に延長されても生残率や成長に顕著な差がないことが明らかになった。この結果は III-2-1 の結果とも一致し、人工孵化クロマグロの稚魚を陸上水槽から海上生簀に沖出しする場合、沖出し当日の 5:00 に最終給餌を行い、沖出し作業を完了した後の給餌再開時刻は 13:00 以降 17:00 までに行うことが適切と判断された。

近畿大学水産養殖種苗センター大島事業場では、例年、人工孵化クロマグロ稚魚の生残率の向上や量産化を目的に様々な形状の生簀を数多く使用して技術開発を行っている。それらに供されるクロマグロ稚魚は毎年同時期に生産され、10 万尾以上の生産が可能になっている。クロマグロ稚魚を沖出しする場合、これまでの経験および沖出し作業で負荷されるストレスに対する応答や回復 (Honryo et al., 2018) さらに絶食耐性 (大西 2016) を考慮すると沖出し尾数は午前中で処理できる尾数あるいは水槽数に止め、午後からは沖出しされた稚魚の給餌や死亡魚回収などの飼育管理、沖出し作業の準備

および片付けを行わなければならない。そのため、本実験の結果は沖出し当日の給餌作業の合理化に繋がり、作業効率の向上に貢献できる結果であると言え、実際に本実験の結果を養殖現場で応用することになった。

III-2-1 では陸上水槽で模擬的な沖出しを行い、6種類の試験区を設けて成長、生残率、生化学成分等に及ぼす影響を調べた。その結果、最終給餌時刻に関わらず、17:00 に給餌を再開する試験区の生残率が、無給餌時間の最も長い 17-5 (36 h) より有意に高くなった。ストレス反応の指標となる全魚体コルチゾル含量に区間差は認められなかったが、いずれの試験区でも BR 時に上昇し、Honryo et al. (2018) の報告と一致した。模擬的な沖出しではあるが、実際の沖出しに近いストレス負荷を稚魚に掛けた状態で実験できたと考えられる。主に肝臓や筋肉に蓄えられたエネルギー源となるグリコーゲン含量は、開始時から 17:00 の間で区間差はなかった。しかし、最終給餌を前日の 17:00 に行った試験区群のグリコーゲン含量は、最終給餌を当日 5:00 に行った試験区群より低い傾向を示した。三坂ら (2004) は肉食魚では飢餓時にはグリコーゲンが分解されてエネルギー源となると推察し、また、ハマチでは絶食時に肝臓中のグリコーゲン含量が脂質やタンパク質含量より先に減少すると報告している (示野 1978)。今回の結果はこれらの報告と一致し、17:00 に最終給餌した試験区群では、無給餌時間が長くなったことでグリコーゲンが消費されたと推察された。試験 2 日目における区間差では最終給餌時刻に関わらず、無給餌時間が 20 時間までの試験区のグリコーゲン含量が Control 区と同等に高い値を示した。

一方、最終給餌時刻が 17:00 の試験区群のグルコース含量は、最終給餌時刻が 5:00 の試験区群より 13:00 まで高い傾向を示し、13:00 には有意差が確認された。それ以降の経過時間において区間差が確認される時間があったが、変動が大きく、試験区の設定条件による傾向は見出せなかった。

魚類はストレスを受けると 1 次反応としてコルチゾルやカテコールアミンが分泌され、2 次反応としてこれらのストレスホルモンの働きによって血中のグルコースレベルが上昇する。また、魚類はストレスを処理するために、肝臓から供給されるグルコースをエネルギーとして利用する（中野 2016）。今回の実験で、全魚体のグリコーゲンとグルコース含量の増減が逆になったのは、この生理反応の過程によるものかもしれない。

沖出し前後の給餌方法によって一般成分にどのような変化が生じるかを調べるために全魚体一般成分および熱量を分析した。その結果、いずれの成分においても試験区間に有意な差が見られる時間帯があったが、本試験で設定した沖出し前後の給餌方法の違いによる影響とは考えにくい結果であった。一般成分および熱量において、Biswajit et al. (2009) は、最も適した配合飼料を給餌した 35 日齢（平均体重 2.4 ± 0.3 g）のクロマグロ稚魚は、水分が $77.5 \pm 0.4\%$ 、灰分が $3.4 \pm 0.2\%$ 、粗タンパク質が $15.0 \pm 0.4\%$ 、粗脂質が $2.3 \pm 0.1\%$ 、熱量 (dry) が 20.5 ± 0.4 kJ/g であったと報告している。III-2-1 の結果では水分が $78.3 \pm 0.05\%$ 、灰分が $2.8 \pm 0.1\%$ 、粗タンパク質が $16.0 \pm 0.6\%$ 、粗脂質が $2.3 \pm 0.1\%$ 、熱量 (wet) が 4717.7 ± 183.4 j/g であり、両者を比較してもほぼ差がなかった。このことから、一般成分含量は各項目、各経過日数において全試験区で正常な範囲で推移していると考えられた。

III-2-1 の結果、生残率が従来 of 給餌方法である 5-13 (8 h) よりわずかに改善された 5-17 (12 h) および 17-17 (24 h) の給餌方法でも問題ないことが示された。そこで III-2-2 では III-2-1 で生残率が高かった 5-17 (12 h) および 17-17 (24 h) と従来法の 5-13 (8 h) を実際の海上生簀で検証した。その結果、生残率は 17-17 (24 h) が他の 2 試験区に比べてやや劣ったが、区間差は認められなかった。ストレス指標となるコルチゾルレベルに有意差は認められな

かったが、III-1 およびIII-2-1 の結果と同様にいずれの試験区でも BR が最も高い値を示した。

グリコーゲン含量は BR 時に最終給餌 17:00 の試験区が 5:00 の試験区群より有意に高くなった。最終給餌 17:00 の試験区が高く、15 時間前に摂餌された飼料が体内でグリコーゲンとして貯蔵されたためかもしれないが、その詳細は不明である。一方、全試験区の一般成分値は水分が $80.1\pm 0.4\%$ 、灰分が $2.8\pm 0.1\%$ 、粗タンパク質が $15.3\pm 0.5\%$ 、粗脂質が $2.0\pm 0.3\%$ 、熱量が 3291.6 ± 153.8 j/g であり、III-2-1 と同様に正常な範囲で推移したと考えられた。前日の 17:00 に最終給餌を行った試験区は、ほかの試験区に比べて BR までタンパク質、脂質含量および熱量が低くなる傾向を示したが、これは他の試験区より無給餌状態が 12 時間長かったためにエネルギーとして消費されたものと考えられる。

以上の第 III 章の結果、沖出し直前の給餌は体成分の減少を補正する効果はなく、沖出しのストレス負荷を増大させることから、沖出し前には無給餌時間が必要であることがわかった。そして沖出し前の最終給餌時刻はこれまでどおりの 5:00 で優れ、給餌再開時刻についても沖出し当日の 13:00 を 17:00 まで遅らせても沖出し後の生残率に影響しないことが示唆された。第 III 章の実験では、稚魚の沖出し後の生残率を直接的に改善しなかったが、沖出し前後の給餌方法を生産現場の都合に応じて合理的に調整できる根拠となった。すなわち、稚魚の飼育管理を充実させることで間接的に沖出し後の飼育成績を向上させる成果になると考えられた。今後、クロマグロの人工種苗の健苗性向上や量産化に向けて、特殊な生理生態を持つクロマグロの飢餓やストレス耐性を調べる必要がある。

第IV章 海上生簀への効果的な沖出しサイズ

第I章で海上生簀に沖出しした後に発生する大量死の原因を調査した結果、異物誤飲、成長不良および骨格損傷が主な原因であることを明らかにした (Okada et al., 2014)。そして成長不良は輸送に起因するストレスで引き起こされる可能性が高いと報告されている (Honryo et al., 2018)。また、クロマグロは皮膚が弱く、ハンドリングによる擦れが原因で死亡しやすいことが知られている (石橋 2010 ; Ishibashi, 2012 ; Buentello et al., 2016)。一方、石橋ら (未発表) の研究によるとクロマグロ稚魚の鱗は全長 100 mm に成長したころに完全に形成される。鱗が完全に形成されればハンドリングストレスを伴う輸送の影響を受けにくく、輸送後の大量死を防げるかもしれないが、急激な体重増加が皮膚へのダメージを増強する可能性もある。しかし、これまでに沖出しサイズの影響を検討した例はない。そこで第IV章ではクロマグロ稚魚の沖出しサイズに注目し、沖出し後の生産率に及ぼす影響を検討した。

実験-1 では確実に配合飼料に餌付け、より大きなサイズで沖出しすることで飼育成績にどのように影響するかを従来の沖出しサイズ (Honryo et al., 2018) で沖出しする Control 区-1 と比較した。一方、孵化後 1 ヶ月、全長 60 mm ほどに成長した稚魚は、遊泳力が高まり、頻繁に水槽壁に衝突し、スレや骨折によって死亡する稚魚が増える (宮下 2002 ; Fukuda et al., 2010)。そこで実験-2 では、配合飼料にできるだけ早く餌付けさせ、衝突死の発生が増加するサイズに至るまでの小さなサイズで沖出しし、従来のサイズで沖出しする Control 区-2 と生残率や成長を比較した。

IV-1) 材料および方法

a) 供試魚および試験区の設定

実験-1 大型サイズ (Large-size) の影響 :

大型サイズと従来サイズの供試魚は同じ陸上水槽で飼育した魚を用いた。すなわち、Large-size 区は養成親魚から得られた受精卵を陸上水槽で 42 日齢 (平均全長 104.7 ± 7.2 mm, 平均体重 $11.6 \text{ g} \pm 3.0$, $n=38$) まで飼育したクロマグロ稚魚を海上生簀に沖出した。生残率および成長を比較するため、Control 区-1 は Large-size 区より 9 日間早く、33 日齢 (平均全長 71.4 ± 6.5 mm, 平均体重 3.0 ± 0.9 g, $n=30$) で沖出しした。それぞれの試験区は和歌山県串本湾浅海漁場に設置したポリエチレン製方形生簀 (縦 6 m×横 6 m×深さ 4 m, 目合い 6 mm, 容積 144 m^3) に陸上水槽から 500 尾ずつ収容し、3 反復ずつ設けた。

実験-2 小型サイズ (Small-size) の影響 :

小型サイズと従来サイズの供試魚は同じ陸上水槽の魚を用いた。すなわち、Small-size 区は養成親魚から得られた受精卵を陸上水槽で 27 日齢 (平均全長 35.9 ± 6.0 mm, 平均魚体重 0.5 ± 0.3 g, $n=53$) まで飼育したクロマグロ稚魚を海上生簀に沖出しした。生残率と成長を比較するため、Control 区-2 は Small-size 区より 6 日間長く陸上水槽で飼育し、33 日齢 (平均全長 67.1 ± 7.0 mm, 平均魚体重 2.7 ± 0.8 g, $n=20$) で沖出しした。実験-1 と同様にポリエチレン製方形生簀 (縦 6 m×横 6 m×深さ 4 m, 目合い 6 mm, 容積 144 m^3) をそれぞれの試験区に 3 反復ずつ設けた。Small-size 区は各生簀に 700 尾ずつ収容した。生簀での飼育密度が生残率および成長などに及ぼす影響を避けるために Control 区-2 の沖出し尾数は 6 日前に沖出しした Small-size 区 3 生簀で

飼育中の供試魚の生存尾数と平均体重から算出した収容密度 8.7 g/m^3 に一致するように尾数調整し、450尾ずつ沖出しした。

b) 飼育方法

実験-1 大型サイズ (Large-size) の影響:

同じ採卵群から種苗生産した 3,800 尾のクロマグロ稚魚を容量 27 m^3 (直径 6 m, 深さ 1.2 m) の FRP 製水槽 2 基に収容し、イシダイ *Oplegnathun fasciatus* 孵化仔魚および配合飼料 (鮪心: 日清丸紅飼料株式会社, 東京) を給餌して飼育した。まず, Control 区-1 として 500 尾ずつの稚魚を試験生簀 3 基に本領ら (2018) の沖出し方法に準じて沖出しした。その後 9 日間陸上水槽で延長飼育した稚魚を Large-size 区として同様の方法で 3 生簀に 500 尾ずつ沖出しした。夜間に稚魚が生簀網へ衝突するのを防除するために生簀中央の水面から 50 cm 上部に LED ライト (LED マルチライト MDW-24(株)マリンテック 福岡) を 1 灯ずつ設置し, 試験期間中毎日 16:00 から翌朝 7:00 まで点灯した (石橋 2006; Ishibashi et al., 2009; Honryo et al., 2013, 2014)。水表面における光強度は $66.0 \mu\text{mol}$ であった。試験期間は 2015 年 8 月 26 日から同年 9 月 18 日までの 24 日間とした。いずれの生簀も生残率に影響しないように, 鳥害と飛び出しを防ぐために目合い 1.25 cm の天井網を生簀上面に敷設し, 外周は生簀網と隙間が開かないように縫い付けた。試験期間中は配合飼料 (鮪心: 日清丸紅飼料株式会社, 東京) を毎日午前・午後それぞれ 3 回ずつ手撒きで飽食量給餌した。さらに 6:00~8:00 および 17:00~19:00 の時間帯には自動給餌機 (餌やり名人, 福伸電気株式会社, 兵庫, 日本) を用いて給餌した。試験期間中のそれぞれの水質項目の平均値は水温 $26.8 \pm 0.7^\circ\text{C}$, 塩分 $31.9 \pm 0.8 \text{ psu}$, 溶存酸素量 $6.4 \pm 0.3 \text{ mg/l}$ および透明度 $5.7 \pm 1.3 \text{ m}$ であつ

た。なお、Large-size 区の陸上水槽における 9 日間の平均水温は $27.0 \pm 0.33^\circ\text{C}$ および溶存酸素量は $7.3 \pm 0.85 \text{ mg/l}$ であった。

実験-2 小型サイズ (Small-size) の影響:

同じ採卵群から種苗生産した 5600 尾のクロマグロ稚魚を容量 50 m^3 (直径 6 m, 深さ 2 m) の FRP 製水槽 2 基に収容し, 配合飼料 (鮪心: 日清丸紅飼料株式会社, 東京) を給餌して飼育した。まず, Small-size 区として 700 尾ずつの稚魚を試験生簀 3 基に沖出しした。その後, 6 日間陸上水槽で延長飼育した稚魚を Control 区-2 として先に海上生簀で飼育されている Small-size 区の収容密度と同じになるように 450 尾ずつ沖出しした。なお, 沖出し方法は実験-1 と同じ方法で行った。夜間照明についても実験-1 と同様の LED ライトを各生簀に 1 灯ずつ設置し, 試験期間中毎日 16:00 から翌朝 7:00 まで点灯した。いずれの試験生簀も生簀底に沈んだ死亡魚が生簀外部の生物に捕食されることによって死亡魚の計数誤差が起こらないように 1 辺 13 m, 深さ 6 m, 目合い 6 mm の生簀網の内部に設置した。

試験期間は 2018 年 8 月 10 日から同年 8 月 24 日までの 14 日間とし, 試験期間中の給餌方法は実験-1 に準じた。試験期間中のそれぞれの水質項目の平均値は水温 $27.7 \pm 0.9^\circ\text{C}$, 塩分 $31.3 \pm 0.4 \text{ psu}$ および溶存酸素量 $101.7 \pm 5.0 \%$ であった。どちらの実験においても, 試験期間中の飼育環境は比較的安定しており, クロマグロ稚魚の飼育に影響を及ぼすような変化はなかった。

c) 生残率および飼育成績

実験-1 では Large-size 区 ($n=3$) と Control 区-1 ($n=3$), 実験-2 では Small-size 区 ($n=2$) と Control 区-2 ($n=3$) について, 輸送による影響を比較するために沖出し後 3 日間の累積死亡率を調べた。実験-2 の Small-size 区の沖出しの際に

1 水槽について陸上水槽から取り上げる際のハンドリングを 2 回行ったことが原因と考えられる大きな減耗が発生したため、1 生簀分を棄却処理した。死亡魚は毎朝、各生簀から潜水土が取り上げて計数し、生残率および日間死亡率を求めた。また、定期的に生残魚を約 20 尾ずつサンプリングして、全長、尾叉長、体長および体重を測定した。サンプリングには稚魚を集めるために極少量の配合飼料を撒き、タモ網で無作為に掬い取り、氷温海水で即殺した。CF (肥満度), SGR (期間成長率) および FD (収容密度) を下記の計算式から求めた。

$$CF (\text{肥満度}) = BW (\text{g}) / BL (\text{mm})^3 * 10^6$$

$$SGR (\text{期間成長率}) = 100 \times (\ln W_f - \ln W_i) / \text{time} (\text{day})$$

W_f (経過日数毎の体重), W_i (試験開始時の体重)

$$FD (\text{収容密度}) = \text{生残尾数} (\text{尾}) \times \text{平均魚体重} (\text{g}) / \text{生簀容積} (144\text{m}^3)$$

d) 統計処理

実験-1 の Large-size 区と Control 区-1 および実験 2 の small-size 区と Control 区-2 における生残魚の成長および期間成長率を検定するために有意水準 5% で Student の t 検定を用いた。検定を行った各統計処理には SPSSv16.0j (IBM, Tokyo) を用いた。

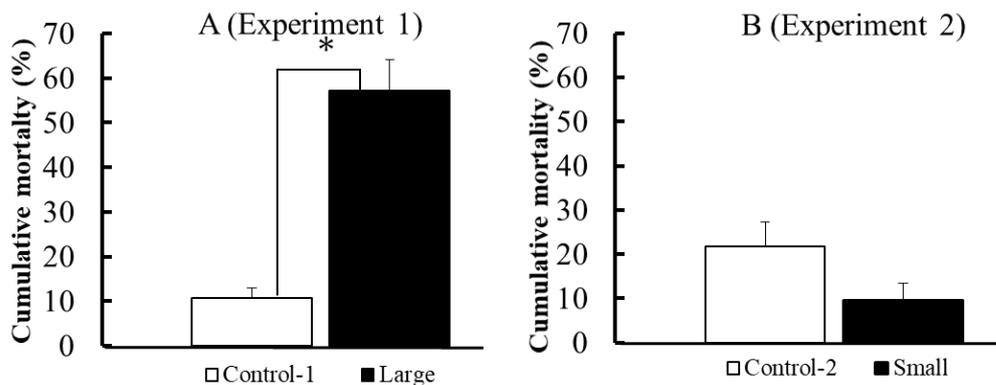
IV-2) 結果

a) 沖出し作業の影響による死亡率の比較

実験-1 大型サイズの影響: 沖出し作業のストレスに対する大型サイズの影響を調べるため、輸送開始時を起点にして 3 日間の累積死亡率を Fig.

IV-1A に示した。その結果, Large-size 区と Control 区-1 の累積死亡率は 57.2% および 10.8% であり, 有意な差がられた ($n=3, p<0.05$)。

実験-2 小型サイズの影響: 小型サイズの沖出しの影響を調べるため, 実験-1 と同様に輸送開始時を起点にして 3 日間の累積死亡率を Fig. IV-1B に示した。その結果, Small-size 区と Control 区-2 の累積死亡率に有意差はないものの, Small-size 区のそれは低く 9.6% であったのに対して Control 区-2 のそれは, およそ 2 倍の 21.9% であった ($n=2$ for the Small-size and $n=3$ for



the Control-2 group, $p>0.05$).

Fig. IV-1. Effect of fish size on cumulative mortality based on transportation operations. A shows Experiment 1 (□, Control -1; ■, Large-size) and B shows Experiment 2 (□, Control -2; ■, Small-size). *Asterisks indicate significant differences among the treatment ($n=3, p < 0.05$).

b) 飼育中の日間死亡率と生残率

実験-1 大型サイズの影響:

稚魚の沖出しサイズを大型化した時の試験期間中の日間死亡率および生残率を Fig. IV-2A に示した。Control 区-1 の沖出し後の日間死亡率は沖出し後 1 日目に $3.4\% \cdot d^{-1}$, 2 日目には試験期間中最大値である $4.0\% \cdot d^{-1}$ を示した。その後 3 日目には $2.9\% \cdot d^{-1}$ に減少し, 4 日目以後は平均 $1.0\% \cdot d^{-1}$ の範

囲に安定した。しかし、17日目から再び死亡が増加し、試験終了するまでの7日間の平均死亡率は $1.4\sim 3.7\% \cdot d^{-1}$ の範囲で推移した。一方、Large-size区の日間死亡率は、陸上水槽で9日間延長飼育中に平均 $2.9\% \cdot d^{-1}$ の範囲で推移し、この期間の生残率は76.9%であった。海上生簀に沖出ししてからの日間死亡率は1日目に $13.1\% \cdot d^{-1}$ 、2日目に $36.6\% \cdot d^{-1}$ の最大値を示した。沖出し時点を100%として沖出し後の生残率をみると試験終了時の生残率は43.9%にまで低下した。Control区-1の試験終了時の生残率は65.5%となった。一方、Large-size区の生残率は陸上水槽での延長飼育開始から海上生簀への沖出しを経て試験終了までの通算生残率は27.4%となった。試験終了時のLarge-size区の生残率はControl区-1に比べて38.1%低くなり、有意な差が確認された。 $(n=3, p<0.05)$ 。

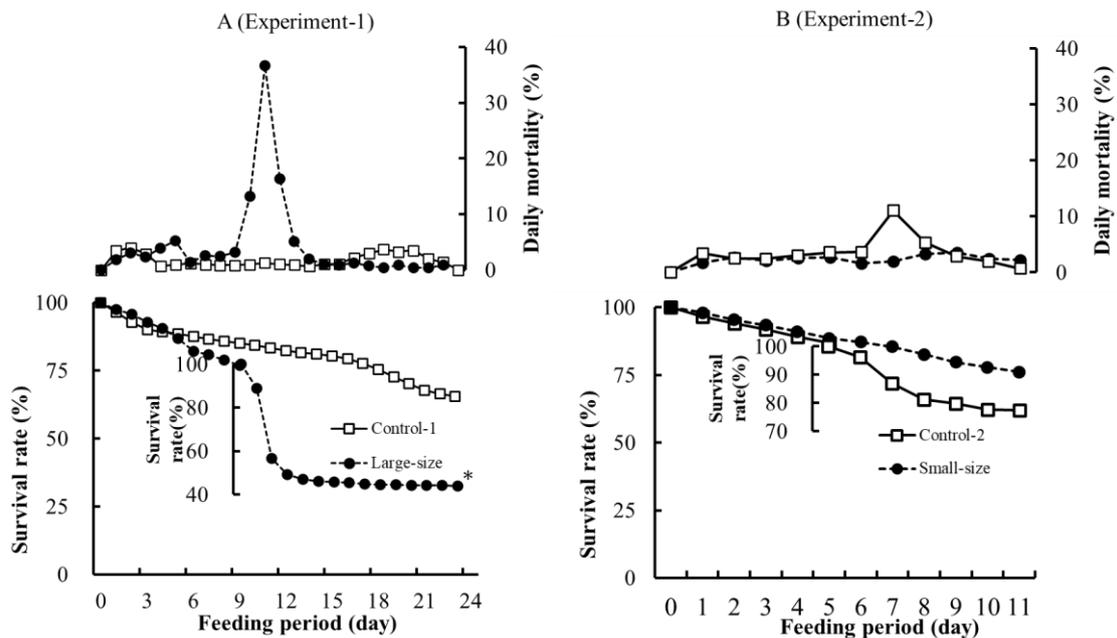


Fig. IV-2. The effect of transportation size on survival rate and daily mortality rate of PBF juveniles for the experimental period. A shows Experiment 1 (□, Control -1; ●, Large-size) and B shows Experiment 2 (□, Control -2; ●, Small-size). *Asterisks indicate significant differences among the treatment ($n=3, p < 0.05$).

実験-2 小型サイズの影響:

沖出し稚魚のサイズを小型化することによる沖出し後の日間死亡率および生残率を比較し Fig. IV-2B に示した。Small-size 区の試験期間中の日間死亡率は平均 $2.3\% \cdot d^{-1}$ で非常に低く安定して推移した。一方、Control 区-2 では5日間の陸上水槽飼育中の死亡率は平均 $2.9\% \cdot d^{-1}$ で安定していたが、沖出し2日目に $11.0\% \cdot d^{-1}$ に増加した。Small-size 区が沖出しされてから Control 区-2 が沖出しされるまでの5日間の生残率は Small-size 区で 91.1%、Control 区-2 は 89.1%となり、有意差はなかった ($n=2$ for the Small-size and $n=3$ for the Control 区-2 group, $p>0.05$)。その後も Small-size 区の生残率は試験期間中、大幅な低下は見られず、試験終了時の生残率は 76.1%になった。そして、Control 区-2 の全試験期間中の生残率を計算すると 68.5%であった。試験終了時の Small-size 区の生残率は有意差がないものの Control 区-2 に比べて 7.6%高くなった。 ($n=2$ for the Small-size and $n=3$ for the Control 区 group, $p>0.05$)。

c) 成長

実験-1 大型サイズの影響:

試験期間中の Large-size 区と Control 区-1 の魚体重、全長および肥満度の推移を Fig. IV-3A に示した。試験開始後9日目の魚体重を比較すると Control 区-1 の3生簀の平均魚体重は 9.5 ± 3.1 g であったのに対し、陸上水槽で9日間延長飼育した Large-size 区の平均魚体重は 11.6 ± 3.0 g であり、有意差はないものの 1.2 倍の成長差が生じた ($n=3$, $p>0.05$)。17日目の成長差は 1.07 倍に縮小したが、試験終了時には Control 区-1 の 38.8 ± 10.0 g に対して Large-size 区は 47.0 ± 12.5 g となり、再び 1.21 倍に拡大して有意差が確認された ($n=11$ for the Large-size treatment and $n=15$ for the Control 区-1 treatment, $p<0.05$)。

平均全長についても Large-size 区が Control 区-1 に比べて大きな値で推移し、試験終了時には Control 区-1 が 152.5 ± 10.7 mm であったのに対して Large-size 区のそれは 161.9 ± 11.5 mm となり、有意差が確認された ($n=11$ for the Large-size treatment and $n=15$ for the Control 区-1 treatment, $p < 0.05$)。肥満度については Large-size 区が僅かではあるが、全期間を通じて Control 区-1 より大きな値で推移したが、有意な差は認められなかった。

試験期間中の成長率の変化を Fig. IV-4A に示した。Large-size 区が陸上水槽で継続飼育されていた試験開始 0~9 日目では Large-size 区の成長率が Control 区-1 より有意に優れた ($n=56$ for the Large-size treatment and $n=38$ for the Control 区-1 treatment, $p < 0.05$)。しかし、9~17 日目は、反対に Control 区-1 の成長率が Large-size 区より有意に高くなった ($n=29$ for the Large-size treatment and $n=26$ for the Control 区 treatment, $p < 0.05$)。その後、17~23 日目には両試験区の間には差は見られなくなった。

実験-2 小型サイズの影響:

試験期間中の Small-size 区と Control 区-2 の魚体重、全長および肥満度の推移を Fig. IV-3B に示した。平均魚体重と平均全長については試験開始 5 日目に Control 区-2 が有意に大きな値を示した ($n=35$ for the Small-size and $n=20$ for the Control 区-2 group, $p < 0.05$)。しかし、試験終了時には Small-size 区の魚体重が 6.1 ± 1.4 g、全長は 86.0 ± 6.5 mm であったのに対して Control 区-2 の魚体重は 6.1 ± 1.7 g、全長は 84.7 ± 7.9 mm であり、有意な差は認められなかった ($n=92$ for the Small-size and $n=94$ for the Control 区-2 group, $p > 0.05$)。肥満度については試験開始から 8 日目まで大きな変化は見られなかったが、試験終了時に Control 区-2 が 12.5 ± 2.5 、Small-size 区が 12.0 ± 1.3 になり、有意に Control 区-2 が高い値を示した ($n=92$ for the Small-size and $n=94$ for the Control 区 group, $p < 0.05$)。試験期間中の成長率の変化を Fig. IV-4B に示

した。Small-size 区の成長率は、試験開始 0～5 日目で $19.6\% \cdot d^{-1}$ であり、Control 区-2 の $24.5\% \cdot d^{-1}$ より有意に低かった ($n=35$ for the Small-size and $n=20$ for the Control 区-2 group, $p < 0.05$)。反対に、5～8 日目では Small-size 区の成長率は $18.3\% \cdot d^{-1}$ であり、Control 区-2 の $7.8\% \cdot d^{-1}$ より有意に高い結果となった ($n=36$ for the Small-size and $n=32$ for the Control 区-2 group, $p < 0.05$)。しかし、8～11 日目には有意な差は見られなくなった ($n=92$ for the Small-size and $n=94$ for the Control -2 group, $p > 0.05$)。

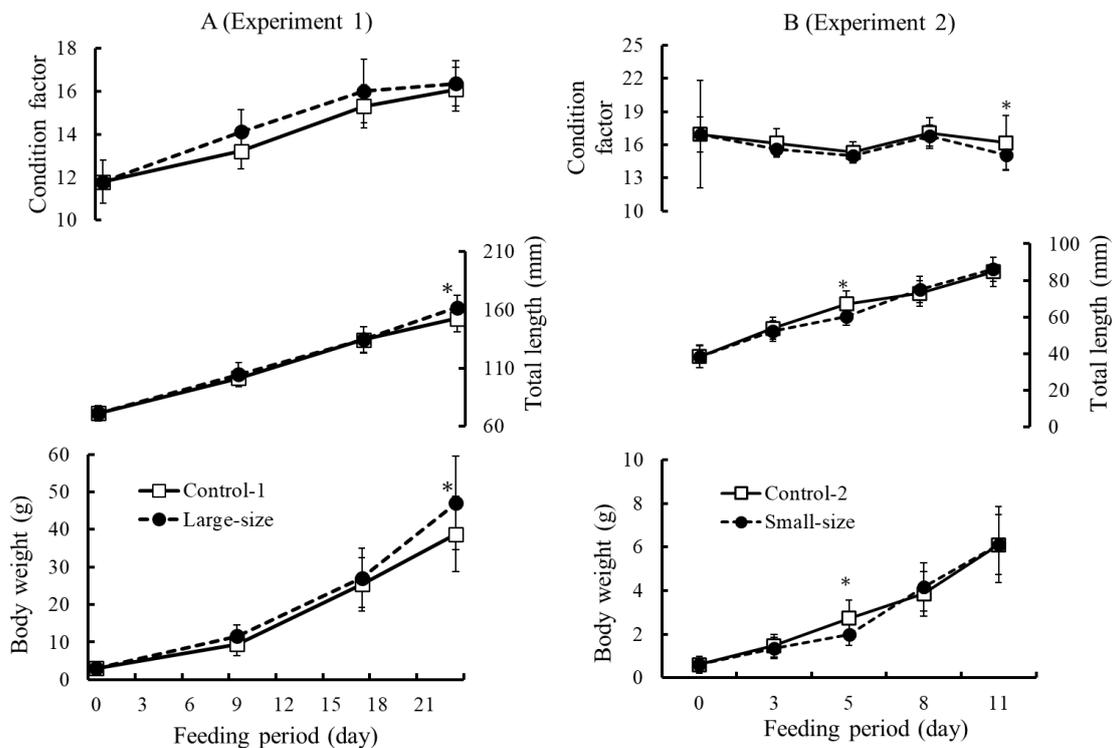


Fig. IV-3. Change of body weight, total length, and conditioning factor on the survival of PBF juveniles for each day. A shows Experiment 1 (□, Control -1; ●, Large-size) and B shows Experiment 2 (□, Control -2; ●, Small-size). *Asterisks indicate significant differences among the treatment ($p < 0.05$).

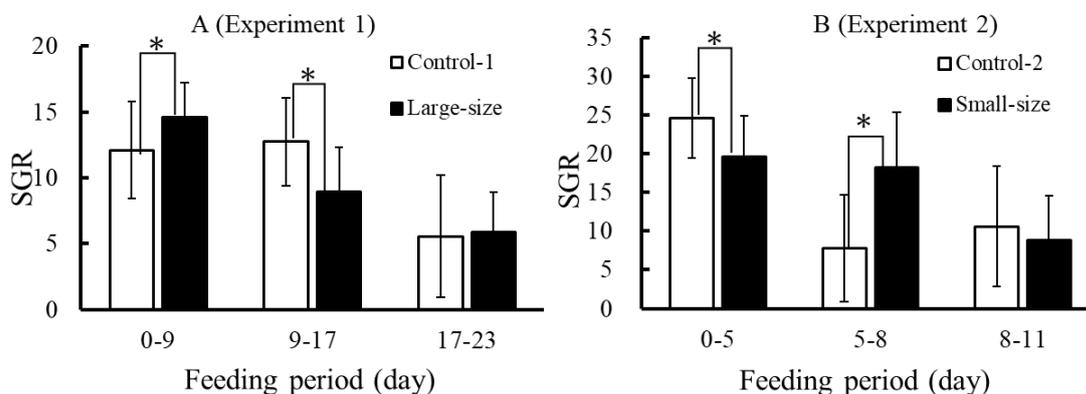


Fig. IV-4. The changes in the specific growth rate (SGR) of PBF juveniles during the experimental period. A shows Experiment 1 (□, Control; ■, Large-size) and B shows Experiment 2 (□, Control-2; ■, Small-size).

***Asterisks indicate significant differences among the treatment ($p < 0.05$).**

c) 収容密度

実験-1 大型サイズの影響:

試験期間中の収容密度の変化を Fig. IV-5A に示した。Large-size 区が海上飼育を開始した時点のそれぞれの収容密度は Large-size 区が 36.9 g/m^3 、Control 区-1 が 27.7 g/m^3 、であり、Large-size 区が有意に高かった ($n=3, p < 0.05$)。しかし、Large-size 区では試験期間中に大量死が発生したため、収容密度は増加しなかった。反対に Control 区-1 の収容密度は 87.6 g/m^3 まで増加した。その結果、試験終了時には Control 区-1 の収容密度が Large-size 区に比べて有意に高くなった ($n=3, p < 0.05$)。

実験-2 小型サイズの影響:

試験期間中の収容密度の変化を Fig. IV-5B に示した。Control 区-2 が海上飼育を開始した時点の収容密度を 8.7 g/m^3 に統一したにもかかわらず、試験終了時の収容密度は Small-size 区が $20.0 \pm 1.8 \text{ g/m}^3$ に対して Control 区-2 区で $13.7 \pm 1.8 \text{ g/m}^3$ となり、有意な差が確認された ($n=3, p < 0.05$)。

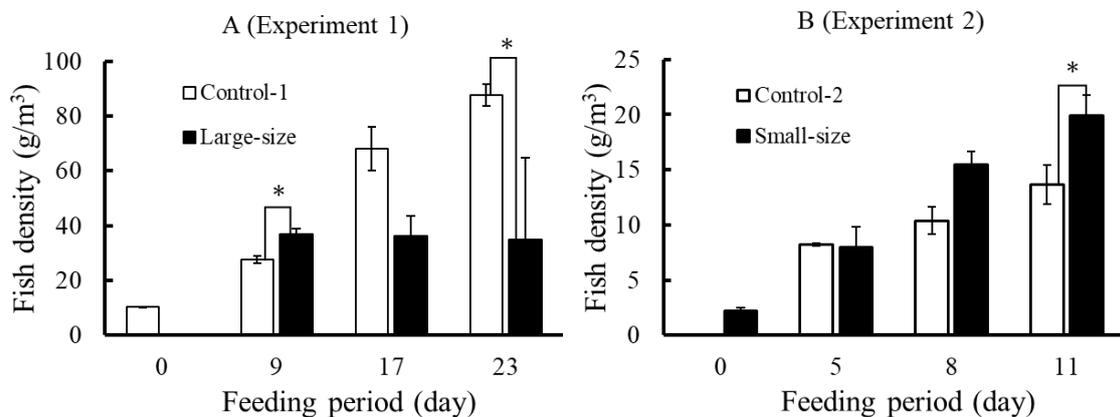


Figure IV-5. Change in fish density of PBF juveniles for each day. A shows Experiment 1 (□, Control; ■, large size) and B shows Experiment 2 (□, Control; ■, small size). *Asterisks indicate significant differences among the treatment ($n=3$, $p < 0.05$).

IV-3) 考察

本実験ではクロマグロ稚魚の沖出し後の生残率を向上させる目的で沖出しサイズに注目し、通常サイズより大きいサイズで沖出しする実験-1 と小さいサイズで沖出しする実験-2 を行い、適正な沖出しサイズについて検討した。その結果、実験-1 では稚魚を大型化するために陸上水槽の飼育期間を延長しなければならず、水槽での衝突などによる死亡魚が増加した (Ishibashi, 2012)。さらに沖出し時のハンドリングや輸送時のストレスによって海上飼育開始から3日間に多くの減耗が発生することがわかった。

一方、小型化する実験-2 では通常サイズの沖出しで発生するような沖出し後、数日間の日間死亡率の顕著な増加がみられず、結果として生残率は高く推移した。また、小さいサイズで沖出しした稚魚と通常サイズで沖出しした稚魚の成長を比較したところ、差は見られなかった。以上の結果から、早期に配合飼料に餌付けることができれば、これまで行われていた沖出しサイズ (全長 60~70 mm, 魚体重約 2 g) よりはるかに小さいサイズ

(全長約 35 mm, 魚体重約 0.5 g) で陸上水槽から沖出しすることが成長に影響なく, 生残率を向上させられることがわかった。そして, 陸上飼育期間が短縮できることからクロマグロの種苗生産において効率化が図られると考えられた。

a) 沖出し作業による死亡率の比較

クロマグロ稚魚は他魚種の場合に比べて沖出し後の生残率が非常に低い。我々はクロマグロ稚魚を海上生簀に沖出しした後 4 日目までに 40~70%が死亡することを明らかにした。その原因は, 暗所視能の低さや輸送ストレスに起因する衝突や接触による骨格損傷, 異物誤飲および成長不良などであることがわかった (Ishibashi, 2009; 2012; Okada et al. 2014)。そして, その対策として, 夜間照明の設置 (Ishibashi et al., 2009; Honryo et al., 2013), ゴミ除けネットの設置 (Okada et al., 2014) そして小型生簀による飼育 (Okada et al., 2020) を行うことによって生残率の向上を可能にした。しかし, 現在でも沖出し直後に 20~30%が死亡している状況であり, さらに生残率を改善させる対策を検討する必要があることを意味する。Honryo et al. (2018) は, 生化学的な指標から, 沖出しに伴うストレスから回復するためには 3 日を要すると報告している。そこで本実験では, 稚魚の沖出しサイズの違いによる沖出し作業の影響を検討するため, 稚魚の輸送作業から収容 3 日目までの累積死亡率について調査した。実験-1 の結果, 沖出しサイズを大型化することによって累積死亡率は明らかに高くなった。Ishibashi (2012) はクロマグロのストレス耐性が他の硬骨魚類より低く, さらにクロマグロ稚魚が全長 300 mm に成長するまでその耐性が低く推移すると報告している。加えて, その遊泳能力, 特に突進遊泳時のそれは稚魚期以降, 大幅に増大する。しかし, 対照的に尾鰭以外の方向転換やブレーキの役割を果たす鰭の発育は不完全

であるために光や音などの刺激に驚いて逃避行動を行った場合に壁や生簀網などの障害物を回避できずに激突して、致命傷を負うとしている (Higuchi et al., 2013; 宮下 2002)。その為、実験-1 で Large-size 区に発生した死亡率の増加は、沖出しに伴う取り上げや計数などタモを使ったハンドリングストレスおよび生簀網への接触・衝突によるダメージがより強く影響したものと考える。このことは、より小さいサイズで沖出しして影響を調べた実験-2 の結果からも裏付けられたと考える。全長およそ 40 mm の稚魚では皮膚を保護する役割の鱗が未形成あったとしても、小さい稚魚は魚体重が軽く、タモによる作業のストレスが軽い (石橋 2010; Ishibashi 2012)。魚体重や突進遊泳力が増大する前に沖出し・輸送できたことが前述のダメージを軽減できたものと考えられる。このことが実験-2 において Small-size 区の生残率を向上させたと考える。

実験-2 において、Small-size 区の 1 生簀において陸上水槽から取り上げる際のハンドリングを 2 回行ったことが原因と考えられる大きな減耗が発生した。これらの結果から、沖出し・輸送による死亡率を軽減するためには沖出しサイズを 40 mm 程度にすることが有効であるが、ハンドリングは慎重かつ迅速に行う必要がある。

b) 飼育中の日間死亡率および生残率

今回の 2 つの実験において実験-2 の Small-size 区を除くすべての試験区で死亡率の増加が見られた。実験-1 では沖出し後 2 日目に日間死亡率が最大になり、Control 区-1 で $4.0\% \cdot d^{-1}$ および Large-size 区で $36.6\% \cdot d^{-1}$ であった (Fig. IV- 2)。そして、試験終了時の生残率は実験-1 の Control 区-1 で 65.5%, Large-size 区で 27.4%となった。実験-2 では Small-size 区の 2 日目の日間死亡率は $2.7\% \cdot d^{-1}$ であり、試験期間中の最大値を見ても 9 日目の $3.6\% \cdot$

d¹であった。そして、試験終了時の生残率は Control 区-2 が 68.5%、Small-size 区では 76.1%になった。本実験の実験-1 と実験-2 は異なる年に実施され、飼育環境も異なるので単純に比較することは困難である。しかしながら、どちらの実験でも従来の沖出しサイズである Control 区-1 および Control 区-2 の生残率は 65.5 および 68.5%で同程度のレベルであった。実験-1 の Large-size 区が生残率は最も低かったのに対し、Small-size 区が生残率は最も高かったことから、全長 35.0 mm、魚体重 0.5 g が適正な沖出しサイズと考えられた。

c) 成長

実験-1 における平均魚体重と平均全長を比較すると沖出しサイズを大きくした Large-size 区が試験期間を通して Control 区-1 より大きな値で推移し、試験終了時には有意差が認められた (Fig. IV-3A)。成長率において試験開始 0~9 日目は Large-size 区が Control 区-1 より高かった (Fig. IV-4A) が、この期間は Large-size 区が陸上水槽で延長飼育していた期間であり、海上生簀より飼育管理しやすい陸上水槽で十分に摂餌できたためと考える。しかし、9~17 日目の期間には逆の傾向が見られた。実験-1 の成長率の結果から、沖出し直後におこる摂餌量の減少について検討が必要である。

実験-2 では Small-size 区の 5 日目の魚体重は Control 区-2 に比べて有意に小さかったが、終了時には差が見られなくなった (Fig. IV-3B)。成長率に関しては 0~5 日目において Control 区-2 が有意に高かった (Fig. IV-4B)。Small-size 区の稚魚は陸上水槽で完全に配合飼料に餌付けされており、沖出し作業によるダメージも小さいはずである。しかし、Small-size 区の成長率は Control 区-2 のそれに比べて低かった。その理由として実験-1 と同様に Control 区-2 の稚魚は 0~5 日間、飼育管理しやすい陸上水槽で十分に配合飼

料を摂餌していたためと考えられる。逆に 5~8 日間は Control 区-2 の稚魚は沖出し作業によるストレスを受け、そして摂餌活性が低下したため、Small-size 区の成長率が高くなった。実験-1 と同様に、いずれの試験区でも沖出し直後に成長率の低下が見られた。現在の輸送方法では、常に沖出しによるストレス反応によって沖出し後の成長に遅れが生じ、さらに飼育環境の変化が稚魚の摂餌活性を低下させる (Honryo et al., 2018)。そのため、より適正な沖出し方法の開発が必要と考える。

d) 収容密度

実験-1 において、稚魚の平均魚体重はいずれの試験区も実験の経過とともに増加した。Control 区-1 の収容密度はそれに伴って増大したが、Large-size 区では平均魚体重が常に Control 区-1 より高く推移したにも拘らず、試験期間中の収容密度は増加しなかった。これは Large-size 区で 2 日目に 36.6% の死亡率が発生したように、日々の死亡率が高かったためである (Fig. IV-2A)。

実験-2 では実験終了時に Small-size 区の収容密度が Control 区-2 より明らかに大きくなった。両区の平均魚体重に差が無かったが、生残尾数の差が影響したものである。

2 つの実験結果からクロマグロの稚魚を海上生簀で飼育する場合、最も収容密度が高くなった実験-1 の Control 区-1 の 87.6 g/m^3 までが適正な収容密度と推測でき、この数値はクロマグロ稚魚の海上飼育の効率化の指標となると考えられた。

以上の第IV章の結果より、クロマグロ稚魚の沖出しサイズを大型化させると、陸上水槽での飼育期間が長くなるとともに、沖出し時のハンドリングや輸送によるダメージで生残率が低下することがわかった。一方、小型化する

と、沖出し時のハンドリングや輸送によるダメージを軽減できることから、生残率が向上し、成長にも影響しないことがわかった。さらに、小型化することで陸上水槽での飼育期間が短縮でき、コストと安全面からクロマグロ種苗生産の効率化が図れると考えられた。

第V章 小型生簀の変則使用による生残率の向上

我々は、改めて死亡原因について詳細に調査し、沖出し後1ヶ月間の死亡尾数の50%以上が最初の7日間に発生していること、さらにその死亡原因として異物誤飲と成長不良がそれぞれ21.9~42.9%および25.0~45.0%の高率で発生していることを報告した (Okada et al., 2014)。成長不良による死亡は沖出し作業によるストレス反応に起因する摂餌不足が原因であり、給餌方法の改善が求められる (Honryo et al., 2018)。摂餌不良が起きる環境要因として、陸上水槽からその数十倍の容積の大きな生簀に放養することで餌と遭遇できない、あるいは餌として認識できていない可能性が高いと考えられた。

一方、小型生簀は衝突死が発生しやすいため、クロマグロの飼育には不向きとされていたが、夜間照明を行うことで、小型の生簀でも飼育可能であることが新たに分かってきた (Honryo et al., 2014)。小型生簀では、成長がすこぶる早いクロマグロの飼育には限界があるが、小型生簀の方が、稚魚は餌の視認がしやすく、摂餌不良を解消できる可能性が高いと考えられる。そこで本章では、クロマグロ稚魚が成長不良で大量死する沖出し後の初期に小型生簀で飼育を行い、その後、生簀環境に適応してから大型生簀に移すことで生残率の向上を図る新たな飼育方法について検討した。

V-1) 材料および方法

a) 供試魚および試験区の設定

養成中のクロマグロ6歳魚から得た受精卵を陸上水槽に収容し、種苗生産した32日齢のクロマグロ稚魚(平均全長63.4 mm, 平均魚体重2.08 g) 24000尾を供試魚とした。

Control 区は, 供試魚 12000 尾をポリエチレン製直径 30 m 生簀(深さ 6 m, 容積 4239 m³, 目合い 6 mm) に収容密度が 2.83 尾/m³, 5.89 g/m³ で直接収容した。試験区は, 一時的に 4 つの小型生簀で飼育した後に別に設けた直径 30 m 生簀に移動する Small-Large cage 区を設けた。Small-Large cage 区には, ポリエチレン製方形生簀(一辺 13 m, 深さ 6 m, 容積 1014 m³, 目合い 6 mm) 4 基を使用し, 供試魚 12000 尾をそれぞれの試験生簀に 3000 尾ずつ分散して収容した。その際の収容密度は 2.95 尾/m³, 6.15 g/m³ で, 12 日間飼育した後に生残魚のすべてを Control 区と同型の直径 30 m 生簀(深さ 6 m, 4239m³, 目合い 6 mm) に合併して収容した (Fig. V-1)。4 つの小型生簀は直径 30 m 生簀まで船舶で曳航した後, トンネル網で接続し, そのトンネル網を通して稚魚を直径 30 m 生簀に移動させた。この移動作業による衝突や骨折による死亡の増加はなかった。沖出し方法と海上生簀の設置方法は Honryo et al., (2018) の方法に準じた。

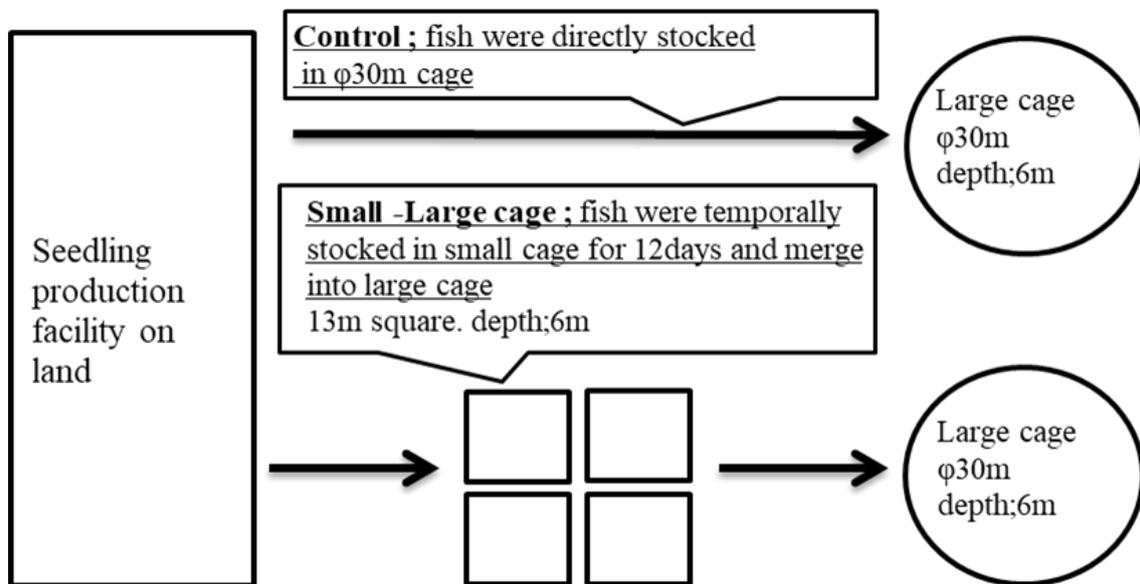


Fig. V-1 Schematic drawings of the experimental design.

b) 飼育方法

いずれの生簀にも外部からの異物侵入を防ぐために目合い 1 mm の農業用防虫ネット（サンサンネット R ソフライト SL2200：ニホンワイドクロス株式会社 大阪）を生簀網の外周に水深 3 m まで設置した。夜間の生簀網への衝突を軽減するため、生簀中央の水面から 50 cm 上部に LED ライト（LED マルチライト MDW-24(株)マリンテック 福岡）を直径 30 m 生簀には 4 灯、一辺 13 m 生簀には 1 灯ずつ設置し、16:00 から翌朝 7:00 まで点灯した（石橋 2006; Ishibashi et al., 2009; Honryo et al., 2013）。

試験期間は 21 日間とし、試験期間中は配合飼料（鮪心：日清丸紅飼料株式会社、東京）を午前・午後それぞれ 3 回ずつ手撒きで飽食量給餌した。さらに 6:00～8:00 と 17:00～19:00 の時間帯には自動給餌機（餌やり名人、福伸電気株式会社、兵庫、日本）を用いて給餌した。

c) 日間死亡率，生残率および成長

死亡魚はすべて、毎朝、各生簀から潜水土が取り上げて計数し、生残率および日間死亡率を求めた。また、沖出し後 3, 5, 7, 14 および 21 日目に生残魚を 20 尾ずつサンプリングして魚体測定し、CF（肥満度），SGR（期間成長率）および WG（増重率）を下記の計算式から求めた。

$$CF（肥満度）= 10^6 \times BW(g) / BL(mm)^3$$

$$SGR（期間成長率）= 100 \times (LnWf - LnWi) / time (days)$$

$$WG（増重率）= 100 \times (Wf - Wi) / ((Wi + Wf) / 2) / time (days)$$

BL（体長），Wf（経過日数毎の体重），Wi（試験開始時の体重）

d) 死亡原因および原因別日間死亡率

試験開始から 3, 5, 7, 14 および 21 日目の死亡魚を取り上げ、魚体損傷がない個体を最大で 200 尾としてランダム抽出し、サンプリングした。それらの魚体測定を行った後、死亡原因を調査するためにサンプルを個体ごとに軟 X 線写真撮影（工業用デジタル X 線センサー NAOMI NX04H, 株式会社アールエフ, 長野県）し、骨格損傷の有無を確認した。最後に解剖して消化管内容物を調べ、異物の有無を観察した（Okada et al., 2014）。

死亡原因は先に報告した成長不良、骨格損傷および異物誤飲の分類方法に準じたが（Okada et al., 2014）、成長不良については、魚体重と肥満度に基づいて判断した。また、いずれの死亡原因にも当てはまらないものについては不明とした。各死亡原因の発生率は下記の計算式¹⁾から算出した。

死亡原因が重複している場合も、原因別に表記した。そのため、死亡原因の発生割合は、合計が 100%を超える場合があった。死亡原因を特定するとともに、各種の死亡原因に基づいてどれだけの死亡魚が発生したかを推測するために、各死亡原因による死亡率（原因別死亡率）を下記の計算式²⁾から求め、試験区間で比較した。

1) 各種死亡原因の発生率 (%) = 調査日の各死亡原因（骨格損傷・異物誤飲・成長不良・不明）による死亡尾数/調査した死亡魚の総尾数×100

2) 原因別日間死亡率 (%) = 各種死亡原因の発生率×調査日の総死亡尾数/前日の生残尾数×100

e) 統計処理

測定値は平均値±標準偏差で表した。直径 30 m 生簀に直接沖出しした Control 区と Small-Large cage 区における生残魚の成長、期間成長率および増重率の差の検定は、有意水準 $p < 0.05$ で Student の t 検定を用いた。各死亡魚

の体重および肥満度と同日の生残魚のそれらとの間で Smirnov-Grubbs 棄却検定をかけ，有意に小さい個体は成長不良魚および低肥満度魚と定義した (Okada et al., 2014)。検定を行った各統計処理には SPSSv16.0j (IBM, Tokyo) を用いた。

V-2) 結果

a) 日間死亡率と生残率

生簀サイズの違いが稚魚の日間死亡率および生残率に及ぼす影響を Fig. V-2 に示したところ，大きな差が確認された。Small-Large cage 区の間死亡率は 1 日目に $6.4\% \cdot d^{-1}$ を示し，2 日目に試験期間中の最大値である $8.5\% \cdot d^{-1}$ になった。その後，3～7 日目にかけて $5.6 \sim 2.5\% \cdot d^{-1}$ に徐々に低下し，さらに 4 基の生簀を直径 30 m 生簀に合併する直前の 12 日目の $0.7\% \cdot d^{-1}$ まで低下した。

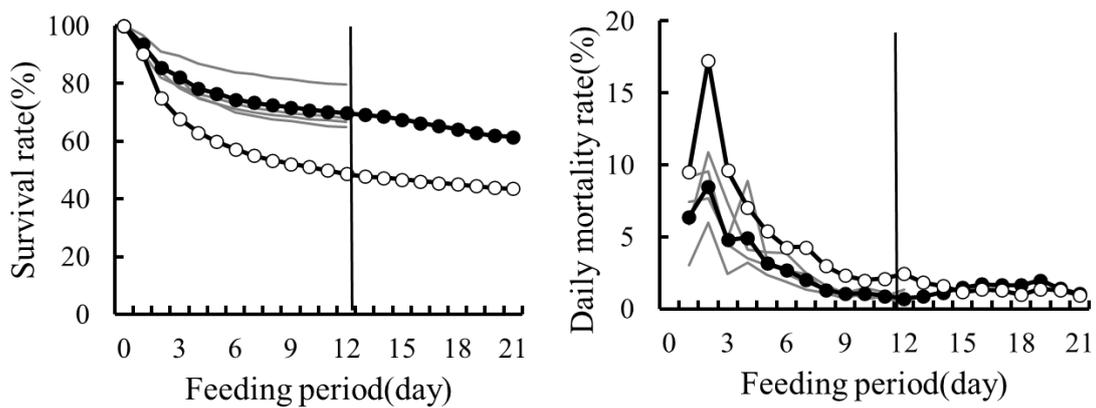


Fig. V-2 The effect of stocking cage size on survival rate (○, Control; ●, mean small-large cage) of PBF juveniles in sea-cages for 21 days. Grey lines represent each result of small cages before accumulated to Large cage. The vertical line represents the day when fish stocked in small-large cages were merged into another cage in which 30 diameter and 6 m depth.

しかし、直径 30m 生簀に合併してからは死亡率がわずかに上昇し、試験終了まで $0.9\sim 2.1\% \cdot d^{-1}$ に間で推移した。当初から直接直径 30 m 生簀に冲出しした Control 区は Small-Large cage 区と同様に 2 日目に試験期間中の最大値を示したが、その値は Small-Large cage 区より 8.8%高い $17.3\% \cdot day^{-1}$ になった。その後も Control 区の死亡率は Small-Large cage 区より高く推移し、3 日目に $9.9\% \cdot d^{-1}$ 、5 日目に $5.7\% \cdot d^{-1}$ 、7 日目に $4.6\% \cdot d^{-1}$ となった。その後、Small-Large cage 区の 4 生簀を直径 30m 生簀 1 基に合併されるまで、Control 区の日間死亡率は Small-Large cage 区のそれより $0.9\sim 1.7\% \cdot d^{-1}$ 高く推移した。両試験区の生残率は死亡率の変化を反映し、その差は 2 日目から拡大した。Control 区の 4 日目の生残率は冲出し直後の大量死によって 63.1% にまで低下したが、Small-Large cage 区のそれは 78.3%の高い値を示した。Small-Large cage 区の 4 生簀を直径 30 m 生簀に合併した直後の 13 日目の生残率は 69.2%であったが、Control 区のそれはわずか 47.9%となり、その後も 20%前後の差が開いたままで推移した。試験終了時の生残率は、Control 区の 43.6%に対し、Small-Large cage 区が 61.6%であり、18.0%の差が生じた。

b) 成長

生残魚の平均魚体重の変化を Fig. V-3 に示した。4 生簀を合併するまでの Small-Large cage 区の平均魚体重は、4 生簀の平均値を用いて算出した。Control 区の最終測定日における平均魚体重は 25.4 g で、Small-Large cage 区は 24.3 g と同等であり、顕著な成長差は見られなかった ($n=20, p>0.05$)。しかし、死亡が集中して発生した冲出し後 3 日目および 5 日目の平均魚体重は Small-Large cage 区が Control 区より有意に大きくなった (Fig. V-3 right)。また、Fig. V-4 に示したように、Small-Large cage 区の 3 日目と 5 日目における日間成長率 (SGR) および日間増重率 (WG) も、Control 区のそれより

有意に優れた ($n=20-25, p<0.05$)。7日目以後になると両試験区の間には差が認められなくなった。さらに、それぞれの試験区について生残魚と死亡魚の成長を比較するために平均魚体重の変化および肥満度の変化を Fig. V-5 に示した。その結果、試験期間中の魚体重と肥満度は常に生残魚が死亡魚に比べて高かった。

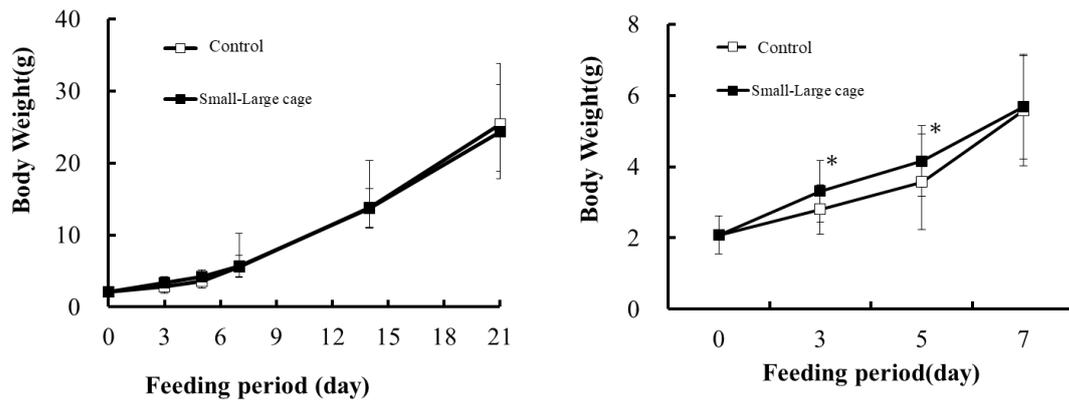


Fig. V-3 Change of body weight of survival PBF juveniles in each day. Left figure shows the result of during the whole experimental period and right one shows the result of 7 days. *Significant differences were detected on 3 ($n=25$ in Control, $n=86$ in small-large) and 5 ($n=21$ in Control, $n=87$ in small-large) days after stocking among the treatment ($p < 0.05$).

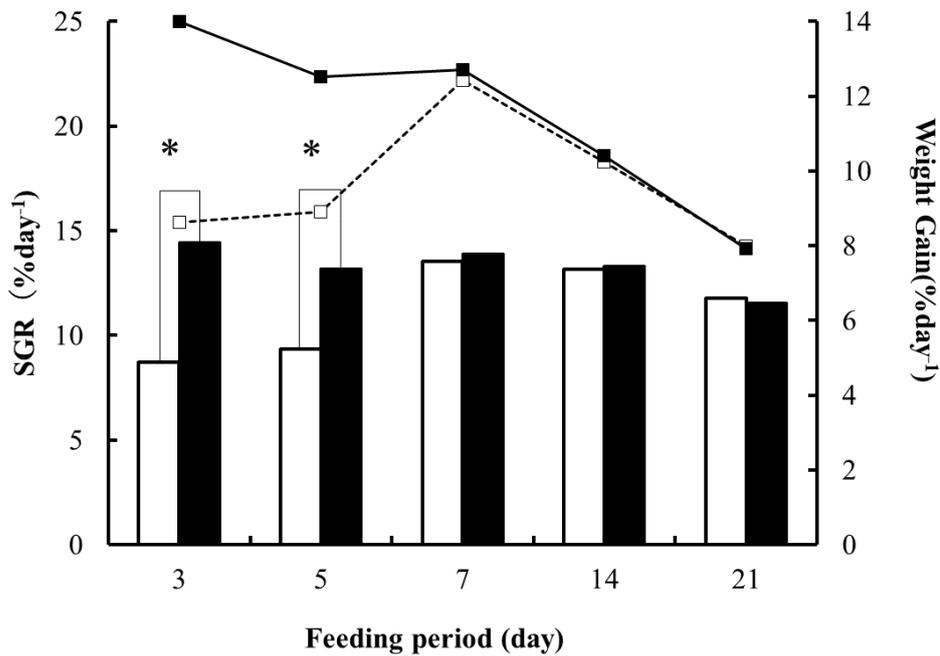


Fig. V-4 Change of SGR (white bar, Control; black bar, small-large cages) and weight gain of survival PBF juveniles in each day. (white square with dashed line, Control; black square with line, small-large cages) *Significant differences were detected on 3 ($n=25$ in Control, $n=86$ in small-large) and 5 ($n=21$ in Control, $n=87$ in small-large) days after stocking among the treatment ($p < 0.05$). Error bars are not shown to simplify the figure.

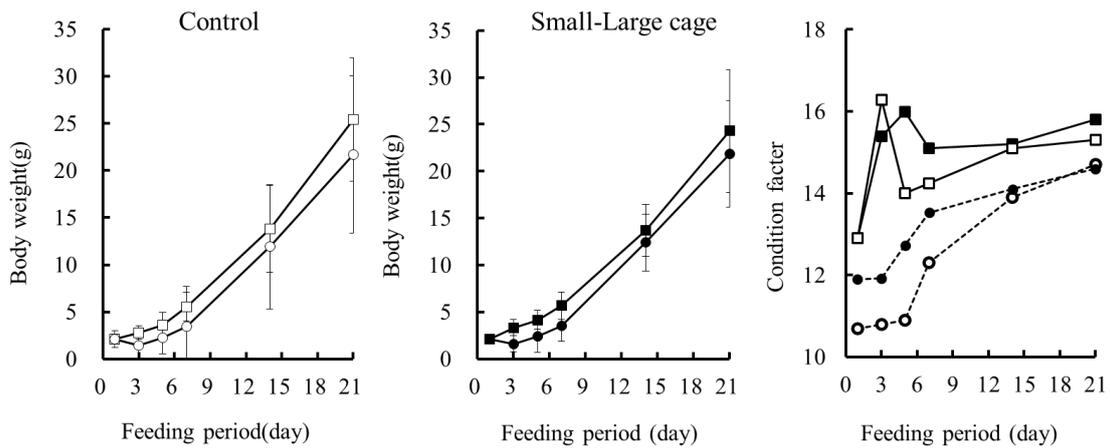


Fig. V-5 Change of body weight and condition factor of survival and dead PBF juveniles in each day. Left figure shows the result of Control, center one the result of small-large cages and right one shows the result of CF. (□,■, survival PBF juveniles; ○,●, dead PBF juveniles).

c) 各種死亡原因の発生率と死亡原因別の日間死亡率

死亡魚について死亡原因を調査し、その発生率を Fig.V-6 の上段に示したが、両試験区に顕著な差は無かった。Control 区の成長不良魚の発生率は、3 および 5 日目にそれぞれ 88.0 および 91.6% と高い値を示したが、7 日目以降に 31.7% に低下し、試験終了まで 25% を維持した。一方、Small-Large cage 区では 3 日目が最も高く 82.6% になったが、飼育日数の経過に伴って減少し、試験終了時の 21 日目には 4.2% になった。骨格損傷の発生率は、両試験区とも 3、5 および 7 日目に 15% 以上の高い値を示したが、14 日目には 10% 以下に低下し、21 日目には 5% 以下に減少した。今回の実験では異物誤飲の発生率が、両区とも試験期間を通して Okada et al. (2014) の報告より低く、Control 区では 0~9.6% の範囲となり、Small-Large cage 区でも同様に 2.2~8.3% の範囲で推移した。

次に、死亡原因別の日間死亡率を Fig. V-6 下段に示した。両試験区とも 3 および 5 日目に成長不良による死亡魚が高頻度で発生したが、成長不良による死亡率は Small-Large cage 区でわずか $2.3\sim 3.9\% \cdot d^{-1}$ となり、Control 区の $5.0\sim 8.5\% \cdot d^{-1}$ のおよそ 1/2 程度であった。また、骨格損傷、異物誤飲および不明それぞれの死亡率も同様に Small-Large cage 区で低くなる傾向を示した。

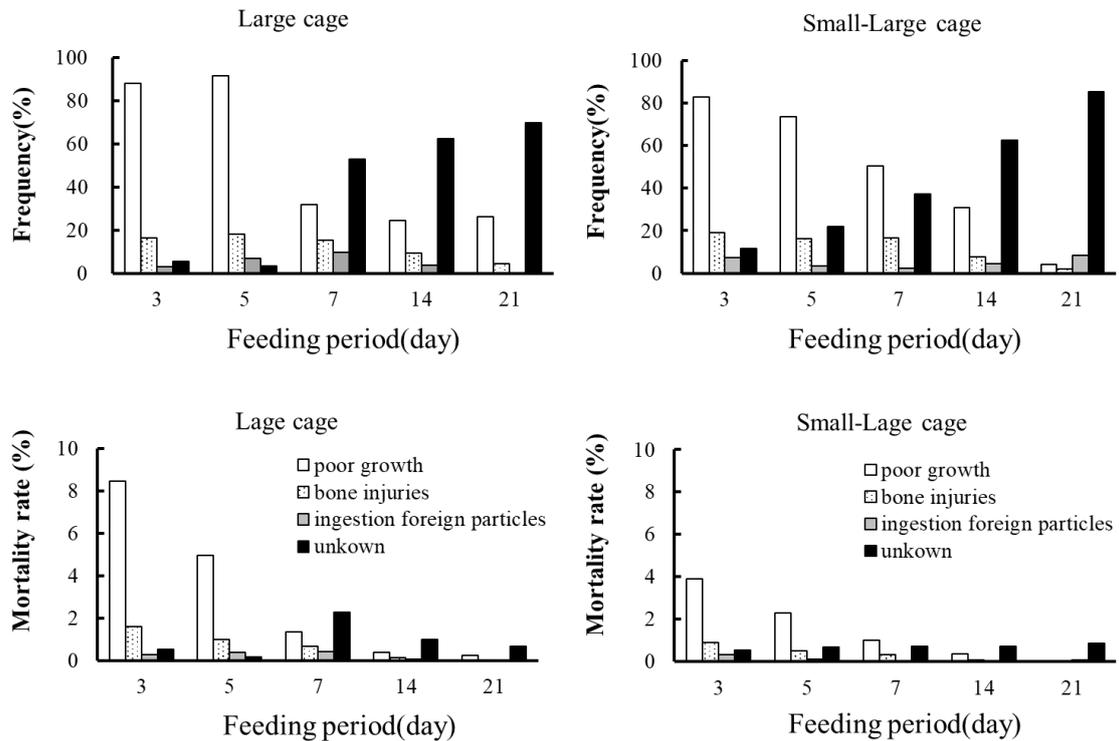


Fig. V-6. Estimated frequency (upper) and mortality rate of each factor (lower) which caused death of PBF juveniles in each day. Left Figures show the result of Control and right show the result of small–large cages. (white bar, poor growth; dot bar, bone injuries; grey bar, ingestion foreign particles; black bar, unknown).

V-3) 考察

第V章の結果，クロマグロ稚魚を海上生簀に沖出しした初期段階において，大型生簀ではなく，小型生簀を使用することで，稚魚の成長と生残率を向上させることができた。Fig. V-3 およびV-4 に示したように，沖出し後の短期間において Small-Large cage 区の成長率，増重率および平均魚体重は Control 区のそれらと比べて有意に高くなった ($p < 0.05$)。さらに，Small-Large cage 区の成長不良による死亡率が低くなったことから (Fig. V-6)，小型生簀の使用が適正であると判断できた。

その理由は，大型生簀で飼育するより，小型生簀で飼育することで稚魚が餌を認識しやすく，十分な量を摂餌することができたためであると考えられ

る。試験終了時の生残率は Control 区で 43.6%であったのに対し、Small-Large cage 区のそれは 61.6%であった (Fig. V-2)。これらの結果はクロマグロ種苗生産における海上飼育において、小型生簀の技術的な優位性を証明できたことになるであろう。クロマグロ稚魚の海上飼育において最も重要な技術開発のひとつであり、種苗生産業界においても有益な成果になると考えられる。

稚魚を 4 つの小型生簀に分散して沖出ししても、4 生簀間に生残率の差がほとんどなく、従来の大型生簀 (Control 区) に沖出しする方法より、生残率を約 20%向上させることができた (Fig. V-2)。そのため、クロマグロ人工種苗の量産化の技術開発に関して非常に効果的な方法が開発できたと考えられる。しかし、直径 30 m という大型生簀を使用する実験であるため、この実験は反復して行うことができなかった。クロマグロの種苗生産における小型生簀の有効性を再確認するためには、さらに実験を継続する必要がある。

我々は沖出し後のクロマグロ稚魚に見られる死亡の主原因が異物誤飲、成長不良、および骨格損傷によることをすでに報告した (Okada et al., 2014)。本実験における死亡原因の調査の結果では、成長不良の発生率とそれを原因とする死亡率が最も多くなった (Fig. V-6)。これは、先に報告した研究で考慮しなかった肥満度を、本実験の成長不良の指標に加えたためである。さらに本実験では生簀への異物の侵入を防ぐために農業用防虫ネットを設置したこと、あるいは生簀を設置した漁場に異物の流入が少なかったことによつて異物誤飲による死亡が減少したことも理由と考えられる。

これまで飼育中のクロマグロ稚魚の主な死亡原因は稚魚が生簀網に衝突し、身体的障害を受けることによる衝突死であると考えられてきた (宮下 2002)。また、生簀網への衝突あるいは接触が骨格損傷や皮膚の損傷の原因となると報告されている (石橋 2010 ; Ishibashi, 2012)。衝突や接触しても骨格損傷に至らない場合でも皮膚に損傷を受けることで、成長不良や原因不明

の死亡率が増加することに結び付くと考えられる。さらに、最近の研究では、身体的障害だけでなく、呼吸不全や酸塩基調整のアンバランスによる生理的損傷が衝突死に関与していることも報告されている (Honryo et al., 2019)。しかし、夜間照明を使用することで、今回の実験では、生簀の大型化とは反対に小型生簀での飼育の有効性が確認できるようになったと考えられる。

我々がこの実験を行うにあたり、懸念したのは、小型生簀で飼育することによる生簀網への接触または衝突、あるいは、小型生簀から大型生簀に合併する際の輸送や移動作業による死亡の増加であった。しかし、試験期間中の全死亡個体に対する骨格損傷の発生率に両試験区間の差がみられなかった (Fig.V-6)。また、小型生簀から大型生簀に合併する際にも死亡魚の増加はみられなかった。したがって、小型生簀から大型生簀に移送することによる弊害はないと考えられた。さらに、Small-Large cage 区の成長不良による推定死亡率は、沖出し後の 3~5 日目に Control 区の 1/2 であった (Fig. V-6)。また、Small-Large cage 区の骨格損傷による推定死亡率は、Control 区と比較して、懸念されたような死亡の増加はなく、反対に Small-Large cage 区の方が少ない結果となった。以前は、クロマグロの飼育には大型生簀を使用しないと高い死亡率がみられたが、夜間電照によって小型生簀でも網面が認識できるようになり、死亡率が軽減されたと考えられる (石橋 2006; Ishibashi, 2009 ; Honryo et al., 2013)。さらに、夜間の電照に集まるプランクトンを、クロマグロ稚魚が摂餌することで成長不良が軽減された可能性もあると考えられた。夜間にクロマグロ稚魚の餌となるような走光性の動物プランクトンが集まるため、クロマグロ稚魚の成長不良を防止する方法の一つとして夜間照明の有効性を詳しく調べる必要がある。

夜明け直後に生簀から採取した稚魚は空胃であったが、夜間照明を設置した生簀の稚魚は夜間であっても胃に内容物が見られた (近畿大学水産研究所,

未発表)。それぞれ 1 灯ずつ LED 照明を設置した 4 つの小型生簀は 4 つの LED 照明を設置した直径 30 m 生簀より多くの動物プランクトンを集めた可能性がある。したがって、夜間照明によって稚魚が配合飼料を十分に摂餌できない状況であっても生存率を高める可能性があると考えられる。

今回の実験と同様に先の実験でも、実験期間中に死亡原因が特定できない死亡が増加することを報告した (Okada et al., 2014)。原因不明と判断された尾数は調査した死亡魚の総数から成長不良、骨格損傷および異物誤飲と判断された尾数を差し引いた数字である。したがって、死亡魚に明確な死亡原因の痕跡が残っていない。今後、クロマグロ種苗生産の効率をさらに高めるためには、特定できていない死亡原因を解明する必要がある。

以上の本章の結果、稚魚を直接大型生簀に沖出しするのではなく、小型生簀に分散して沖出しする方法が成長を改善し、生残率を向上させることが示唆された。今回の実験では、沖出し後の 12 日間にわたり、稚魚を小型生簀で飼育した後に大型生簀に移動させたが、移動後に死亡魚が僅かながら増加した。小型生簀を使用する今回の方法では、クロマグロ人工種苗の量産化に多くの生簀が必要になり、多くの飼育担当者の労力も多くなる。クロマグロ人工種苗の量産化には、小型生簀の効率的な飼育密度の研究など、さらなる研究が必要である。

第VI章 小型生簀における適正飼育密度

クロマグロ稚魚の海上飼育において、生残率の向上を目的として第I章から第V章まで様々な角度から対策を検討してきた。限られた海上の飼育施設で如何に生残率を向上させるかが、技術開発の初期に最も重要な課題になるためである。しかし、いずれの魚種でも大量生産が求められるようになると生残率もさることながら、生産効率（単位容積当たりの生産量）が重要となる。クロマグロ種苗生産においても、その量産化は生産効率の向上と生産規模の拡大によって実現される。現在、近畿大学水産研究所の陸上生産施設を最大限に稼働すれば数十万尾の沖出し稚魚（30日齢，全長50 mm程度）が生産できる。しかし、漁業権などの問題から、我々が利用できる海上生簀の規模には限りがある。第V章では成長不良の軽減対策として大型生簀に直接沖出しして飼育するより、小型生簀に分散して沖出しする方法によって生残率が改善できることを確認した。今後、限られた海上施設においてクロマグロ人工種苗の量産化を進めるには生残率と飼育密度の向上による効率化が求められる。また、クロマグロ稚魚は個体間距離の接近によって突発遊泳を引き起こす可能性もあり、適切な飼育密度はその対策としても重要である。これまでの経験から我々は1辺13 mの正方形生簀（縦13 m×横13 m×深さ6 m，目合い6 mm，容積1014 m³）に沖出し稚魚3000尾を目安に沖出しして飼育してきた。しかし、クロマグロ人工種苗の量産化を目的として稚魚の飼育密度について研究された報告はない。

そこで第VI章では小型生簀を利用したクロマグロ人工種苗の量産化において効率の良い飼育密度について検討した。

VI-1) 材料および方法

a) 供試魚および試験区の設定

養成クロマグロの親魚から得た受精卵を近畿大学水産養殖種苗センター大島事業場の 30 m³ 容 FRP 製円形水槽（直径 6 m，深さ 1.2 m）に收容し，種苗生産を行った。34 日齢まで陸上水槽で飼育したクロマグロ稚魚（平均全長 62.8±5.8 mm，体重 1.9±0.5 g， $n=30$ ）を供試魚とした。沖出し生簀はポリエチレン製方形生簀（一辺 13 m，深さ 6 m，容籍 1014 m³，目合い 6 mm）を使用した。従来通り，1 生簀当たりの收容尾数が 3000 尾の生簀を Control 区（6 g/m³）とし，1500 尾を收容する 1/2 倍量区（3 g/m³）および 6000 尾を收容する 2 倍量区（12 g/m³）の 3 つの試験区をそれぞれ 3 反復ずつ設けて，生残率および成長を比較した。

b) 飼育方法

供試魚は，沖出し作業によるストレスの負荷状況が同じになるように，沖出しタンク（直径 1.2 m，深さ 0.8 m，容量 0.9 m³）1 基あたりの收容尾数を 1500 尾ずつとし，前章の方法に準じて沖出しした。いずれの生簀も飛び出しと鳥害を防ぐために目合い 1.25 cm の天井網を生簀上面に敷設し，外周は生簀網と隙間が開かないように縫い付けた。生簀網の形状を適正に保つようにそれぞれの生簀網の底面外郭に鋼管製底枠を設置した。夜間に稚魚が生簀網へ衝突するのを防除するために生簀中央の水面から 50 cm 上部に LED ライト（LED マルチライト MDW-24(株)マリンテック 福岡）を 1 灯ずつ設置し，試験期間中は毎日 16:00 から翌朝 7:00 まで点灯した（石橋 2006; Ishibashi et al., 2009; Honryo et al., 2013, 2014）。試験期間は 2013 年 7 月 24 日から同年 8 月 23 日までの 30 日間とし，配合飼料（鮪心：日清丸紅飼料株式会社，

東京)を毎日、午前と午後にそれぞれ3回ずつ手撒きで飽食給餌した。さらに6:00~8:00 および17:00~19:00の時間帯には自動給餌機(餌やり名人, 福伸電気株式会社, 兵庫, 日本)を用いて給餌した。試験期間中は, 水温が $27.1\pm 1.2^{\circ}\text{C}$, 塩分が 32.5 ± 0.3 psu および溶存酸素量が 6.9 ± 0.3 mg/lであった。試験期間中の飼育環境は比較的安定しており, クロマグロ稚魚の飼育に影響を及ぼすような環境変化はなかった。

c) 生残率および飼育成績

死亡魚は毎朝, 各生簀から潜水土が取り上げて計数し, 日間死亡率および生残率を求めた。実験開始より7, 14, 21 および28日目の午前6:00(給餌前)に各生簀から約10尾ずつの魚をタモ網でサンプリングした。その内, 5尾について成長を比較するために全長, 尾叉長, 体長および体重を測定した。CF(肥満度), SGR(期間成長率)およびFD(収容密度)は下記の計算式から求めた。

$$\text{CF (肥満度)} = \text{BW}(\text{g}) / \text{BL}(\text{mm})^3 \times 10^6$$

$$\text{SGR (期間成長率)} = 100 \times (\ln W_f - \ln W_i) / \text{time}(\text{day})$$

W_f (経過日数毎の体重), W_i (試験開始時の体重)

$$\text{FD (収容密度)} = \text{生残尾数(尾)} \times \text{平均魚体重(g)} / \text{生簀容積}(\text{m}^3)$$

d) 血液性状および血漿成分

魚体測定に使用した残りの5尾の尾部より内径0.65 mm, 長さ25 mmの注射針(テルモ注射針23 G*1", テルモ株式会社 東京)を用いて血液を採取した。採取した血液の一部を赤血球数(RBC, $\text{cell}/\text{mm}^3 \times 10^5$)およびヘマトクリット値(Ht, %)の測定にそれぞれ供した。残りの血液は, 直ちに遠心分離を行って血漿を分離し, 各種化学成分を測定した。赤血球数は血球計算盤(ト

ーマ血球計算盤, 富士理化工業株式会社 大阪)にマイクロピペットを用いて適量滴下し, 双眼実体顕微鏡にて測定した。ヘマトクリット値は外径 1.45~1.65 mm, 長さ 75 mm のガラス製毛細管(テルモヘマトクリット毛細管, テルモ株式会社 東京)に適量の血液を吸い上げ, 片側をパテで封じた。毛細管は, ヘマトクリット遠心機で 12000 rpm で 5 分間の遠心をした後, ヘマトクリット計測器(ヘマトクリットリーダー, 久保田製作所)で測定した(マイクロヘマトクリット法)。また, 平均赤血球容積(MCV: Mean Corpuscular Volume)は, $Ht/RBC \times 10$ の計算式で算出した。

分取した血漿成分からグルコース濃度をムタロターゼ・GOD 法 (Miwa et al. 1972 ; グルコース CII-テストワコー, 和光純薬工業株式会社 大阪) で測定した。また総コレステロール濃度はコレステロールオキシターゼ・DAOS 法 (Aliaine et al. 1974) ; コレステロール E-テストワコー, 和光純薬工業株式会社 大阪)で測定した。各種電解質濃度 (Na^+ , K^+ , Cl^- , H^+ , $CHCO_3^-$), 血液 pH は汎用血液ガス分析装置 (Cobas121, ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社 東京)を用いてそれぞれ測定した。

e) 統計処理

試験終了時の生残率, 並びに日間死亡率が最大となった沖出しから 2 日目の測定値は逆正弦変換の後, 一元配置分散分析 (ANOVA) により分散の検定を行い Bonferroni correction の多重比較を行った。成長の各測定値は一元配置分散分析 (ANOVA) により分散の検定を行い, 因子間で有意差が確認された場合は Tukey HSD テストにより多重比較を行った。経過日数に伴う各試験区の測定値は, 二次元配置分散分析 (UNIANOVA) で分散の検定を行い, 因子間で有意差が確認された場合は Bonferroni correction の多重比較で有意差を検定した (SPSS 16.0j, IBM, Tokyo)。

VI-2) 結果

a) 飼育中の日間死亡率および生残率

沖出し稚魚の飼育密度の違いによる試験期間中の日間死亡率および生残率を Fig. VI-1 に示した。Control 区の日間死亡率は、沖出し後 1 日目に $7.6\% \cdot d^{-1}$ 、2 日目には試験期間中最大値である $20.9\% \cdot d^{-1}$ を示した。7 日目までの平均日間死亡率は $6.9\% \cdot d^{-1}$ であった。8 日目以後、試験終了までの平均日間死亡率は $1.3(0.7 \sim 2.6)\% \cdot d^{-1}$ の範囲で安定した。1/2 倍量区の沖出し後の日間死亡率は沖出し後 1 日目に $7.1\% \cdot d^{-1}$ 、2 日目には試験期間中最大値である $10.8\% \cdot d^{-1}$ を示した。7 日目までの平均日間死亡率は $4.1\% \cdot d^{-1}$ であった。8 日目以後、試験終了までの平均日間死亡率は $1.1(0.5 \sim 2.2)\% \cdot d^{-1}$ の範囲に安定した。2 倍量区の日間死亡率は、沖出し後 1 日目に $8.3\% \cdot d^{-1}$ 、2 日目には試験期間中最大値である $21.9\% \cdot d^{-1}$ を示した。7 日目までの平均日間死亡率は $9.1\% \cdot d^{-1}$ であった。8~10 日目までも $4\% \cdot d^{-1}$ 以上の高い値を示した。11 日目から漸く他の試験区と同レベルに落ち着き、11 日目以後、試験終了までの平均日間死亡率は $1.3(0.8 \sim 2.8)\% \cdot d^{-1}$ の範囲に安定した。

試験終了時の Control 区が生残率は 45.9 ± 13.8 (3.4~61.1)% となった。これに対し、1/2 倍量区および 2 倍量区が生残率はそれぞれ 58.9 ± 15.7 (44.3~75.5)% および 35.9 ± 13.8 (22.4~50.0)% となり、1/2 倍量区が生残率が最も高い値を示した。しかし、日間死亡率および最終生残率は生簀間の偏差が大きく、有意差は、認められなかった。

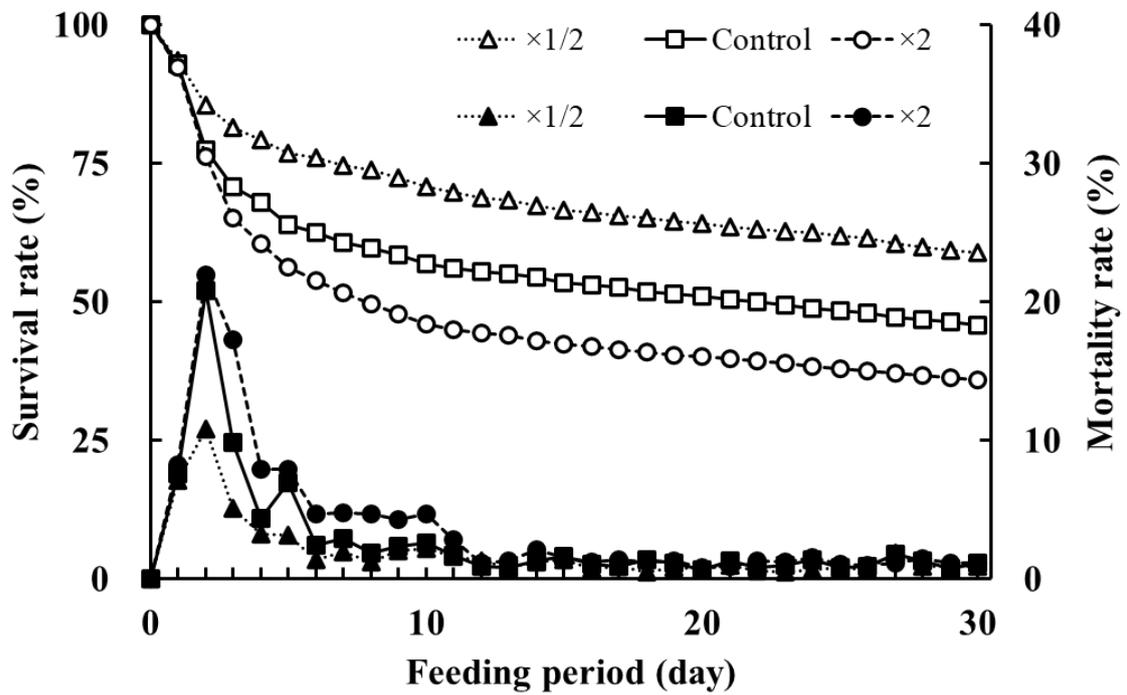


Fig. VI-1. The changes of daily mortality and survival rate of PBF juveniles reared under three different density (\square and \blacksquare , Control; \triangle and \blacktriangle , $\times 1/2$; \circ and \bullet , $\times 2$).

b) 成長

試験終了時の各試験区の魚体重，全長，体長，肥満度および期間成長率を Table VI-1 に示した。いずれの項目においても試験区間に差は見られなかった。

Table VI-1. Growth performances of PBF juveniles reared under different density.

Index	Treatment		
	×1/2 (1500) (n=11)	Control (3000) (n=15)	×2 (6000) (n=15)
Total length (mm)	159.6±18.1	160.9±11.5	157.7±15.9
Body length (mm)	134.9±13.9	135.7±9.8	133.3±13.2
Body weight (g)	51.1±18.0	52.3±13.5	48.1±13.6
Condition factor* ¹	19.9±1.9	20.6±1.5	19.7±1.6
SGR* ²	11.5±1.4	11.7±0.9	11.3±1.2

Growth values indicate mean ± standard deviation

*¹Condition factor = BW(g)/(BL(mm))³ × 10⁶

*² SGR = (ln(Final Body weight) - ln(Initial Body weight)) / time (days) × 100

c) 飼育密度

試験期間中の飼育密度の変化を Fig. VI-3 に示した。全ての試験区で，経過日数に伴う飼育密度の上昇が観察された。試験終了時の各試験区の平均飼育密度は Control 区で 66.2 g/m³，1/2 倍量区で 39.2 g/m³ そして 2 倍量区で 99.7 g/m³ となった。Control 区の飼育密度を基準とすると 1/2 倍量区はそれの 0.6 倍，2 倍量区はそれの 1.5 倍の飼育密度となった。

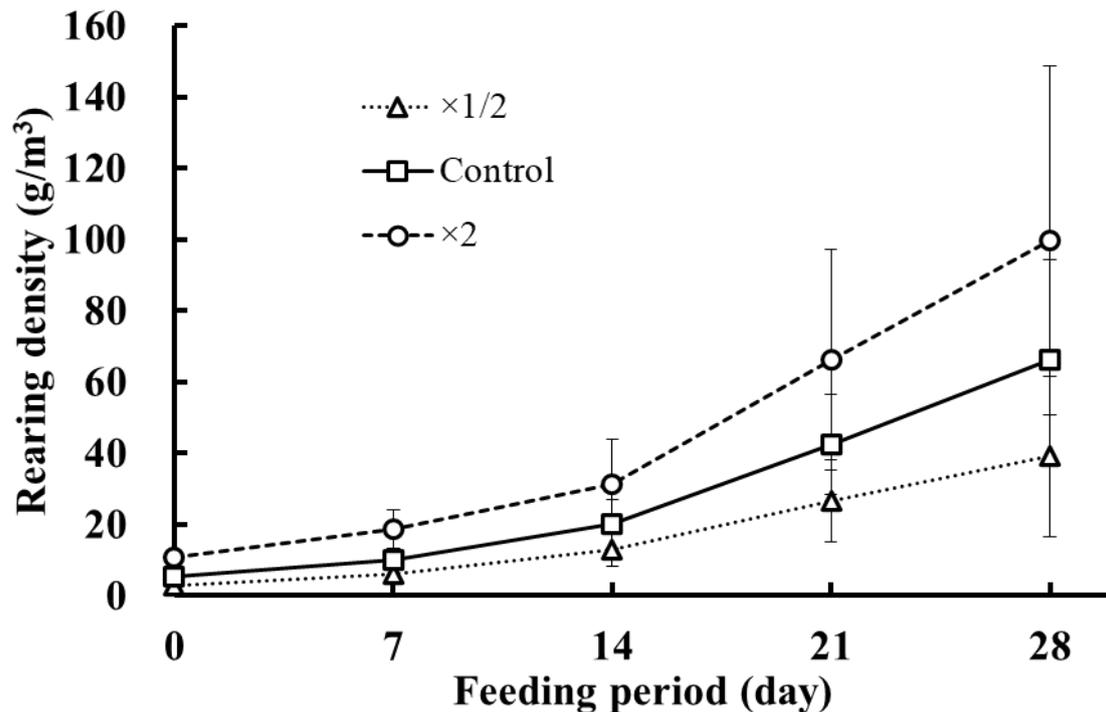


Fig. VI-2. The changes of rearing density of PBF juveniles reared under three different density(□, Control; △, ×1/2; ○, ×2)

d) 血液性状および血漿成分

試験期間中の各試験区における血液性状(Ht, RBC, MCV)の変化を Fig. VI-3 示した。各試験区における Ht 値を検定した結果、28 日目の 1/2 倍量区が Control 区および 2 倍量区より有意に低くなった。しかし、RBC および MCV については顕著な差が確認されなかった。

血漿のグルコースおよびコレステロールの濃度の変化を Fig. VI-4 に示した。1/2 倍量区の 7 日目の血漿グルコース濃度は 14 日目より有意に低くなったが、その後の経過日数に伴う差はみられず、試験区間による顕著な差は認められなかった。

各試験区の血漿コレステロール濃度についても、顕著な区間差は見られなかった。

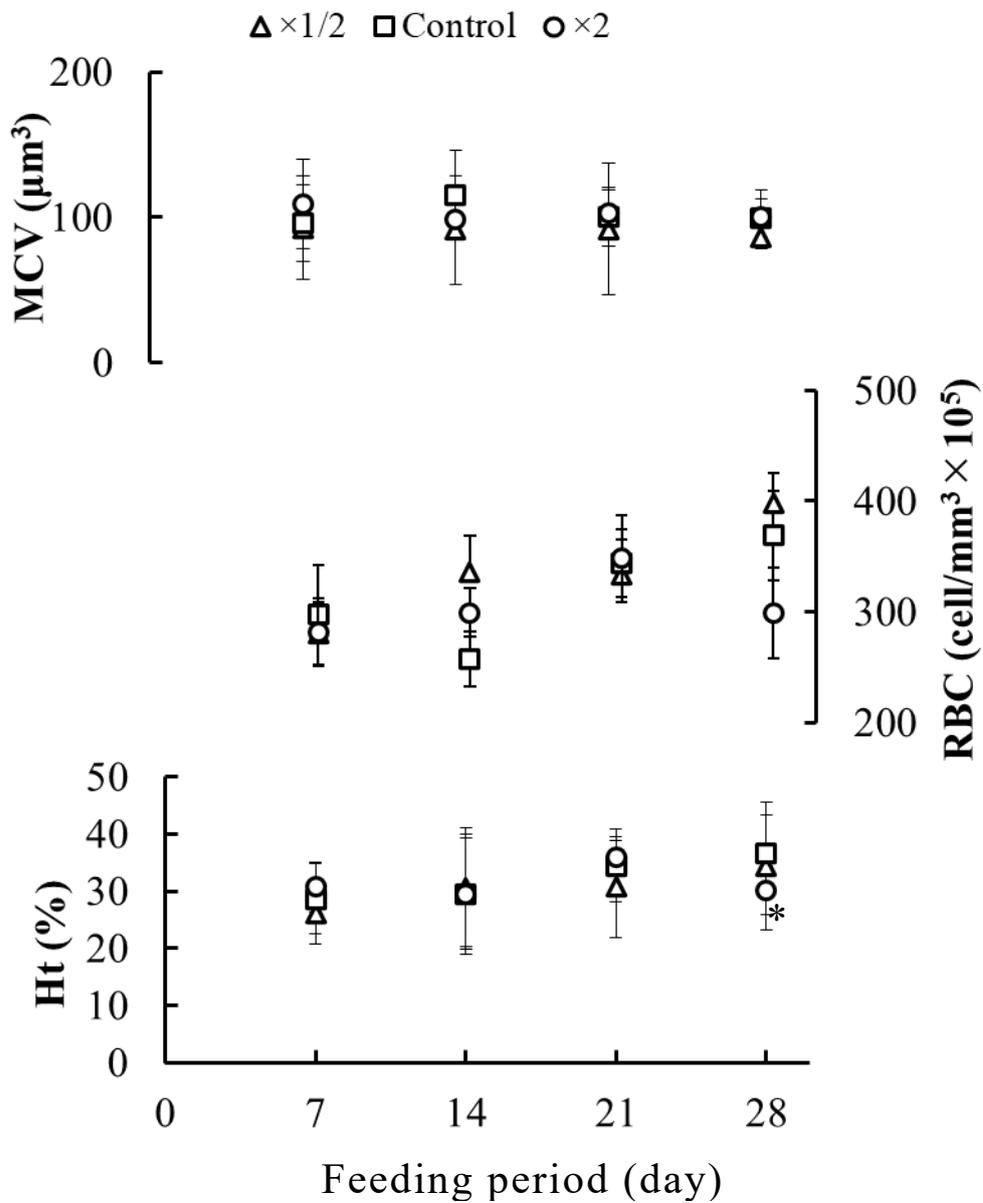


Fig.VI-3. Changes in blood properties of PBF juveniles reared at different densities(□, Control; △ ,×1/2; ○ ,×2). * Asterisk indicates a significant difference to the value of the Control group (UNIANOVA, Bonferroni correction, $p<0.05$).

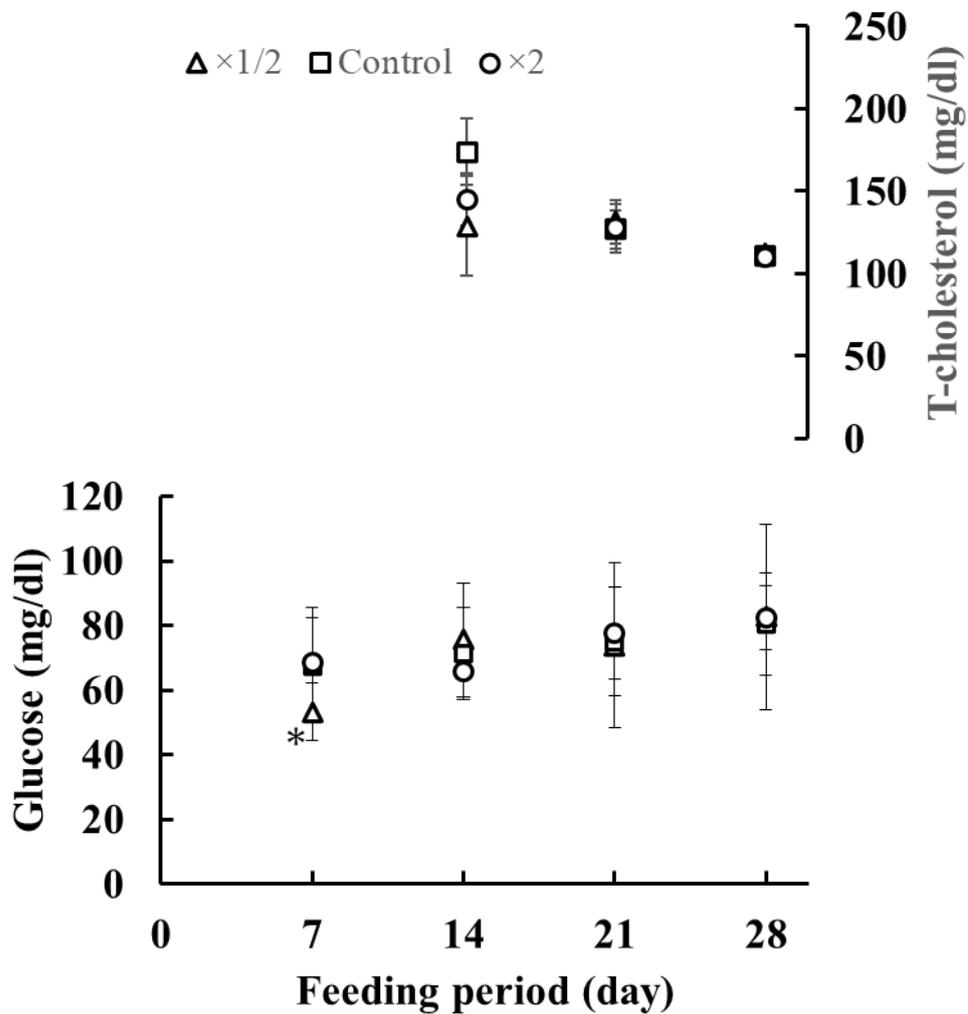


Fig.VI-4. The changes of plasma Glucose and plasma Total-cholesterol concentration on PBF juveniles under different rearing density(□, Control; △, ×1/2; ○, ×2). * Asterisk indicates a significant difference to the value of the Control group (UNIANOVA, Bonferroni correction, $p<0.05$).

Table VI-2 には 28 日後の各試験区における血漿中の電解質濃度の変化を示した。いずれの試験区も同等の値を示し、試験区間に顕著な差は見られなかった。

Table VI-2. The changes of electrolytes concentration on Pacific bluefin tuna juveniles cultured in sea-cage for 30days.

Treatment	Na	K	Cl	H ⁺	CHCO ₃	pHt
× 1/2 (n=4)	233.3±2.1	3.0±0.8	147.2±3.3	51.8±25.3	5.1±1.8	7.5±0.2
Control (n=6)	207.7±25.4	3.0±1.8	142.7±16.4	51.8±18.3	4.9±1.7	7.5±0.1
× 2 (n=5)	198.2±11.4	1.7±0.4	140.0±5.3	36.8±7.1	6.2±0.7	7.6±0.1

VI-3) 考察

a) 生残率の向上を目的とした検討

本実験ではクロマグロ稚魚の沖出し後の生残率の向上と効率的な生産方法を見出すことを目的に、生簀の飼育密度に注目した。すなわち、これまで行ってきた飼育密度である Control 区 (3000 尾/生簀, 6 g/m³) を基準として、その 1/2 倍量および 2 倍量の密度で飼育する試験区を設けて、限られた海上生簀で効率の良い飼育密度について検討した。その結果、1/2 倍量区の生残率が最も高く、続いて Control 区となり、2 倍量区は最も低くなった。しかし、試験終了時のそれぞれの試験区の総生残尾数は、その反対に 2 倍量区が最も多く、続いて Control 区となり、1/2 倍量区が最も少なくなった (Table-VI-3)。また、試験終了時の成長に差がなかったため、生簀の飼育密度は生残尾数を反映し、2 倍量区が最も高く、続いて Control 区となり、1/2 倍量区が最も低くなった。さらに、成長、血液性状、血漿成分および電解質濃度には、飼育密度による顕著な差が認められなかった。従って、本実験における飼育密度の範囲では、クロマグロ稚魚のストレスにならずに飼育できると考えられた。以上の結果から、生簀容積 1014 m³ (縦 13 m×横 13 m×深さ 6 m) におけ

る海上飼育において、生残率の向上を目的とした場合の沖出し時の飼育密度は 1500 尾/生簀, 3 g/m³ が適正であると考えられた。

本実験においても過去の海上飼育と同様に、沖出し後 2~3 日目に日間死亡率が最大値を示した。その後、ビブリオ病の発生により、死亡率が高く推移した。今回、各試験生簀への沖出し作業においてストレス負荷の影響をできるだけ小さくするために、沖出しタンクには 1500 尾を収容して輸送し、各試験生簀の所定の尾数になるまで輸送を繰り返した。つまり、1 生簀当たり、1/2 倍量区は 1 回、Control 区は 2 回そして 2 倍量区は 4 回を繰り返し輸送した。また、合計 31500 尾が必要であったため、陸上水槽 7 基の稚魚が必要となった。そのため、通常の沖出し作業に比べて多くのハンドリングと時間を要した。このような理由から、生簀ごとのストレス負荷に差が生じ、死亡率の偏差が大きくなったと考えられる。マダイでは飼育密度が 3 kg/m³ を超えるとビブリオ病が発生し、密度と死亡率との間に相関が確認されている(村田 2000)。本種においても飼育密度が高くなるほど、細菌性疾病が発生し、死亡のリスクが高くなると考えられる。本実験では飼育密度によるストレスの指標として、血液性状、血漿化学成分および電解質濃度を用いて評価を試みた。ヨーロピアンズズキ (*Dicentrarchus labrax*) では、標準飼育密度 (40 kg/m³) に比べて 2.5 倍高い高密度飼育 (100 kg/m³) でストレス反応が高まり、電解質濃度等が有意に高くなることが報告されている (Emmanuelle et al., 2010)。本実験では血液性状、電解質濃度および血漿グルコース濃度に有意な差が確認されなかった。このため、本実験での飼育密度では、クロマグロの各種指標に差を示すほどのストレスを受けていない可能性が高いと考えられる。

b) 生産効率の向上を目的とした検討

一方、限られた海上施設での生産効率から判断すると 6000 尾/生簀, 12 g/m³ の飼育密度が効率的である可能性が示唆された。

今回の実験では生簀ごとの死亡率の偏差が大きかったため、生残率の統計処理から適正な沖出し密度を明確にできなかった。しかし、沖出し方法をさらに改善できた場合、それぞれの試験区で最も良かった結果を期待できるはずである (Table VI-3)。つまり、1/2 倍量区では 72.9%, Control 区では 59.8% そして 2 倍量区で 49.4% の生残率が期待できる。そして、沖出し 30 日後 (魚体重 50 g/尾) の稚魚を試験生簀 1 基あたり, 1/2 倍量区で 1069 尾 (61.6 g/m³), Control 区で 1707 尾 (98.5 g/m³) そして 2 倍量区で 2777 尾 (149.7 g/m³) が飼育できる可能性がある。クロマグロの稚魚 6000 尾を 1 生簀に沖出しすることによって生残率は 50% になるが, 1 生簀当たり, 1/2 倍量区の 2.6 倍, Control 区の 1.6 倍の稚魚を生産することができることになる。すなわち, クロマグロ人工種苗の量産を目的にする場合, 今回使用した生簀には 6000 尾を収容することが効率的であると考えられる。しかし, クロマグロ稚魚の成長は早い。今後, さらにサイズ毎に飼育可能な最大飼育密度を調べ, 分養や大型生簀への移動, さらには人工種苗として出荷して飼育密度を下げるなどを検討し, クロマグロ人工種苗の量産化の技術開発を進める必要がある。

Table VI-3. Survival number of PBF juveniles and survival rate after 30days.

Treatment	Initial number of fish	Survival number of fish	Survival rate (%)
× 1/2-1	1,467	1,069	72.9
× 1/2-2	1,374	581	42.3
× 1/2-3	1,458	796	54.6
Average	1,433	815	56.6
Control-1	2,856	1,707	59.8
Control-2	2,779	921	33.1
Control-3	2,706	1,104	40.8
Average	2,780	1,244	44.6
× 2-1	5,626	2,777	49.4
× 2-2	5,624	1,954	34.7
× 2-3	5,656	1,237	21.9
Average	5,635	1,989	35.3

第VII章 稚魚の船舶輸送における活魚水槽の壁面色および模様の効果

海上生簀に馴致されたクロマグロの養殖用種苗は、水温が高く、早い成長が望めるため、国内養殖拠点の鹿児島県や長崎県の養殖漁場へ活魚船で輸送される事が多い。ところが、活魚船への積み込み作業や輸送中のストレス等によって、輸送中の1~3日間に全体の半数以上が死亡する場合がある。しかし、その原因については明らかにされておらず、その原因調査は船舶輸送中の死亡率軽減対策に必要である。クロマグロの人工種苗生産技術は長年研究され、その完全養殖にも成功した(Sawada et al., 2005)。近年、民間の種苗生産会社でも10000尾以上の沖出し稚魚の生産が可能になり、近畿大学水産研究所では2009年に100000尾の稚魚(全長60mm)を生産した。しかし、国内のクロマグロ養殖用種苗の必要量には達していない。衝突や接触による大量死は、人工孵化飼育された全長5cm程度の稚魚でも多数発生する(Miyashita et al., 2000; Masuma et al., 2001; Sawada et al., 2005; 石橋ら2005)。クロマグロは色覚を有するが(Miyazaki et al., 2008; Matsumoto et al., 2012; Tsutsumi et al., 2014)、暗所視能が非常に低いことが報告されている(石橋2006; Torisawa et al., 2007; Ishibashi et al., 2009; Matsumoto et al., 2009)。人工種苗の大量死は、この低い暗所視能や皮膚の薄さが原因の一つとされ(石橋2006, 2010)、対策としては夜間の電照飼育(石橋2006; Ishibashi, 2006; Ishibashi et al., 2009; Honryo et al., 2013)や壁面の水玉模様や格子模様のペイントが有効とされている(石橋2006; Ishibashi et al., 2013)。

そこで第VII章では、天然採捕されたクロマグロ稚魚の船舶輸送中の生残率におよぼす、活魚水槽壁面の色と模様について調査した。我々は一回目の実験において日光が稚魚の遊泳行動に影響することを見出したので、2回目の実験で遮光シートの効果についても調査した。

VII-1) 材料および方法

a) 供試魚および試験区の設定

3000～4000尾の天然クロマグロ稚魚を2003年および2004年の7月下旬から9月上旬にかけて熊野灘(33-34°N, 135-136°E)の曳き縄釣り漁法で採捕した。稚魚はできる限りダメージを与えないようにカエシがない釣り針で釣獲し、手で触れることなく漁船の活魚槽に収容した(原田ら 1971; Kumai, 1997)。その後、天然クロマグロ稚魚は2～3時間以内に近畿大学水産養殖種苗センター大島事業場の方形海上生簀(縦12m×横12m×深さ8m, 容積1,152m³)に輸送して収容した。平均魚体重は実験-1: 666g, 実験-2: 650gであった。輸送試験を開始するまで実験-1では27日間, 実験-2では65日間, 解凍イカナゴ Sand lance, *Ammodytes personatus* (Girard), を給餌して飼育した稚魚を供試魚とした。

実験-1では、活魚船の活魚水槽壁面を紺単色(N), 赤単色(R)および紺地に赤の格子模様(NRL)に塗装した3つの試験区を2重複で設けた(Fig.VII-1 upper)。

実験-2では、活魚船の活魚水槽壁面を紺単色(N), 紺地に赤の格子模様(NRL), NRLの水槽上面に遮光シートを設置した(NRL+S)および緑地に赤の格子模様の水槽上面に遮光シートを設置した(GRL+S)をそれぞれ2重複で設けた(Fig.VII-1 lower)。

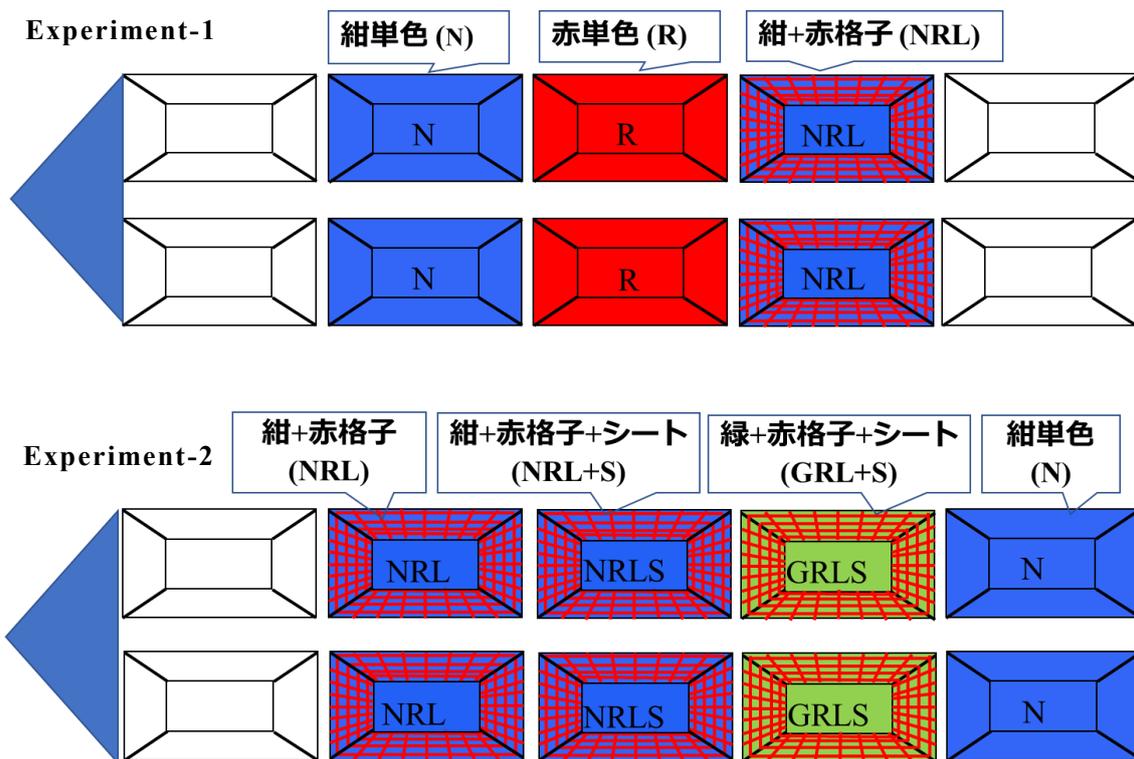


Fig. VII-1 Schematic drawings of the experimental design of Experiment-1 (upper) and Experiment-2 (lower).

b) 活魚船への積み込み方法

稚魚の輸送実験は2003年8月15日(実験-1)および2004年9月21日(実験-2)の2回実施した。生簀からの稚魚の取り上げは、魚体へのダメージをできるだけ軽減するため、カエシのないカツオ釣用疑似針(Fig.VII-2)を使った釣獲法、または、タモ網(Fig.VII-3)で掬い取る方法により行った。生簀から取り上げた稚魚は、海水の入った容量1.2 m³のビニール製円形水槽(Fig.VII-3)におよそ20尾ずつ収容し、その後に活魚船の角形活魚水槽(縦3.6 m×横5.0 m×深さ3.0 m 容量54 m³) 6および8基に積み込んだ。積み込みの際に、釣り針が鰓を傷つけるなどの致命的なダメージを受けて異常遊泳を示した魚や出発までに死亡した魚は全て除去した。すべての積み込み作業には5~6時間を要した。



Fig. VII-2 Barless jig of skipjack fishing.



Fig. VII-3 Circular vinyl vessel (1.2m³) and scoop net.

c) 輸送方法

実験-1 および 2 の供試魚は、147~250 尾ずつ 299 トン型の活魚船の角形活魚水槽に収容した。いずれも和歌山県串本の近畿大学水産養殖種苗センター大島事業場の養殖漁場から鹿児島県奄美大島の奄美事業場の養殖漁場までおよそ 850 km の距離を約 45 時間かけて輸送した。全ての活魚水槽には活魚水槽中央の水面上 50 cm の位置に 60 W の防水透明電球を設置した。夜間の水面位置の照度はおよそ 600 lx (Ishibashi, 2006; Ishibashi et al., 2009 ; Honryo et al., 2013) とし、24 時間点灯した。また、活魚水槽上部の蓋を約 50% (6.8 m²; 縦 1.8×横 3.8 m) 開放し、稚魚の観察および銜による死亡魚の回収ができるようにした。日中はこの開放部から太陽光が入射した。

d) 輸送中の環境

輸送中の活魚水槽内の水質は船外から海水を取り入れて交換するシステムで維持した。積み込み作業の開始から奄美事業場に到着するまでの各活魚水槽内の飼育水温、溶存酸素量および塩分を出航前、出航後そして黒潮流域に入った時点の 3 回および輸送中の毎日 7:00 と 17:00 にそれぞれ計測器 (YSI Model85; YSI Co., Ltd, Yellow Springs, OH, USA) を用いて測定した。活魚船で壁面模様や人工照明の設置されていない活魚水槽水面に光量子計測ロガー (MDS-MkV, JFE アドバンテック株式会社, 西宮, 兵庫, 日本) を取り付け、輸送中の活魚水槽における 24 時間の光量変化を調べた。

e) 統計処理

生残率の変化は、カプランマイヤー処理を行い、試験区間の生残率の比較はログランクテストを用いた (Altinok 2004)。

VII-2) 結果

a) 輸送中の環境変化

輸送中の活魚水槽の水温，溶存酸素量および塩分の変化を Fig. VII-4 に示した。水温は串本湾内で積み込み作業を行っている間は 22.8～23.2℃で安定していたが，出航後に黒潮流域に入ると 25℃以上に上昇した。溶存酸素量および塩分は，それぞれ 5.98～7.66 mg/l および 33.6～35.5 psu の範囲で推移した。光量は 6:00 から上昇し，太陽光が直接活魚槽に入射する 8:00～10:00 の間に最も大きく変動した (Fig. VII-5)。11:00 以降は活魚船が目的地に到着し，荷下ろし作業を始めたので光量の測定は行わなかった。

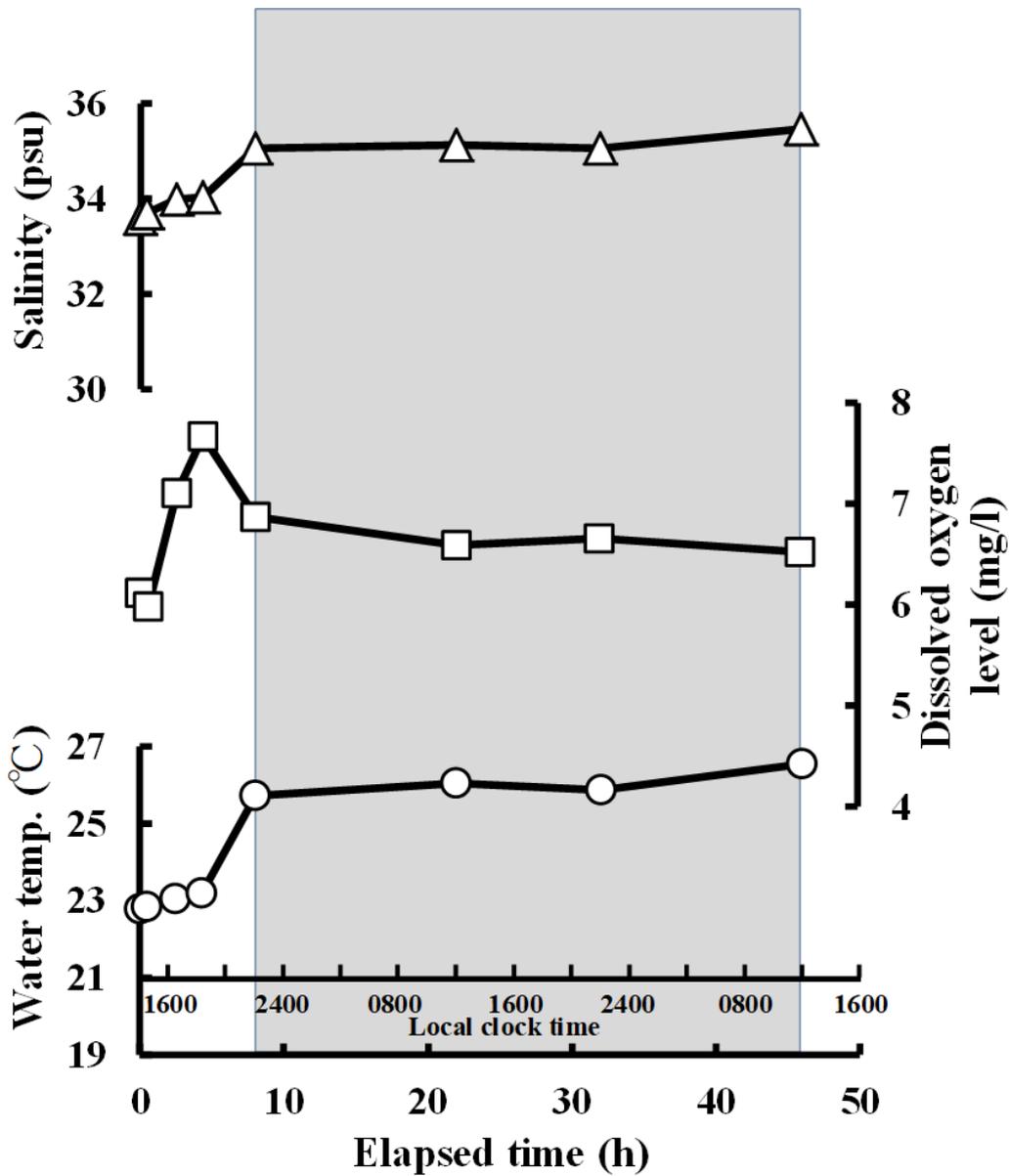


Fig. VII-4 Changes in water temperature (○), dissolved oxygen concentration (□), and salinity (△) in the live-fish tanks during ship transportation in Experiment 1. Dark grey area indicates the time during which the ship was cruising in the Kuroshio Current.

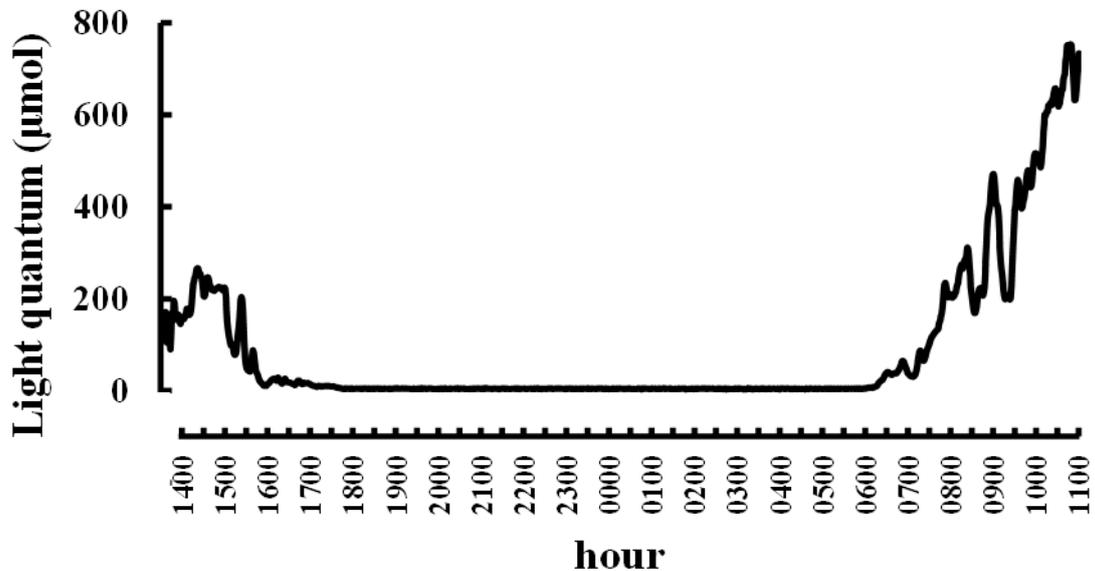


Fig. VII-5 Changes in light intensity at the water surface in the live-fish tanks during ship transportation in Experiment 1.

b) 生残率

実験-1： 活魚船の活魚水槽壁面の色と模様が稚魚の生残率に及ぼす影響を Fig. VII-6 に示した。出航後，輸送初日の日中に異常行動を示す魚や死亡魚は発生しなかった。また，目視観察では，どの試験区の魚も活魚水槽中央の照明を中心に円を描くように一定の速度で回遊し，昼夜ともに異常行動は観察されなかった。しかし，赤単色区の魚は，照明を中心にもっとも小さい半径で回遊した。また，格子模様の試験区の稚魚のみに体色の黒化が見られた。

2日目の朝 7:00 の生残率は，各区とも高い値を示した。しかし，8:00～10:00 の間に全ての活魚水槽において，何らかの刺激を受けて狂奔して突発遊泳する魚が増加した。特に紺および赤の単色の試験区では壁面に衝突して死亡する魚が増加した。しかし，格子模様の試験区では単色の試験区と同じように狂奔する魚が出現したものの，壁に衝突することはなかった。

10:00 以降はいずれの活魚水槽でも異常遊泳や死亡魚の増加が観察されなかった。3日目の8:00以降には、2日目と同様の異常行動がすべての活魚水槽で確認され、紺および赤の単色の試験区で死亡率が増加したが、格子模様の試験区に死亡魚はみられなかった。その結果、格子模様の試験区の生残率は単色の試験区に比べて有意に高くなった (log-rank test, $p < 0.001$, $n = 147$)。また、赤単色の試験区の生残率は紺単色の試験区のそれと比べて有意に高かった。奄美事業場に到着後、船舶側面のハッチと生簀網を連結して水中魚道を設けて稚魚を養殖生簀に移動させたが、その際に活魚水槽の壁に衝突して死亡する個体が観察された。

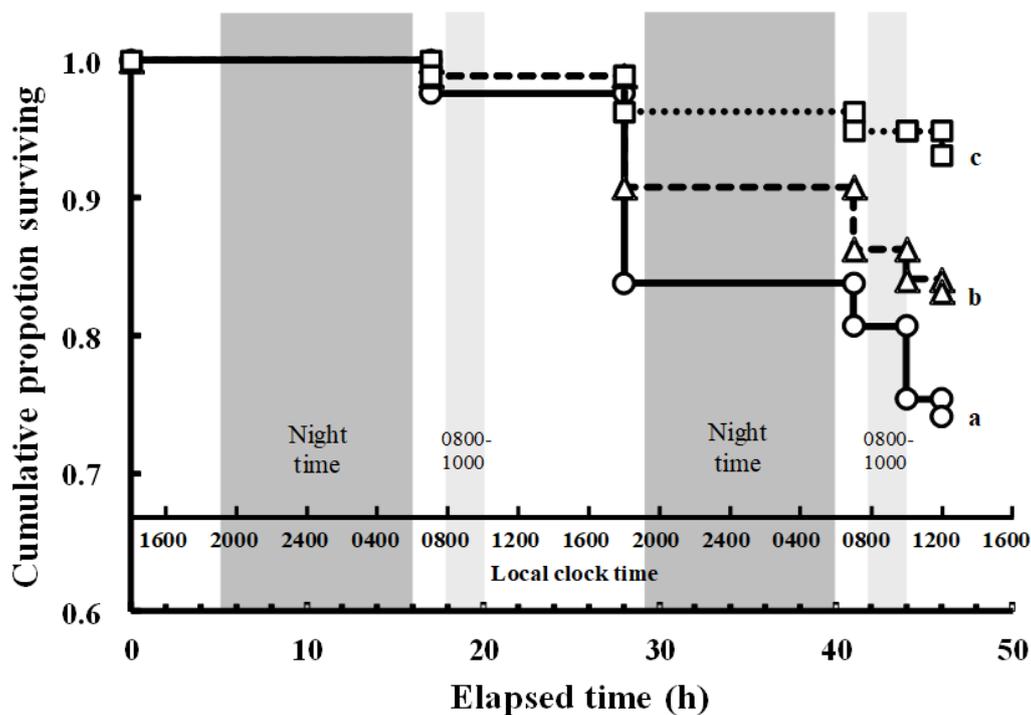


Fig. VII-6 Cumulative survival (Kaplan-Meier) of PBF juveniles during ship transportation in different coloured and patterned tanks. ○, Navy single-colour group; △, Red single-colour; □, Navy-red lattice pattern (red cross-stripes painted on a navy background). Dark grey area indicates night-time and light grey area indicates the time at which sunlight entered the tanks. ^{a-c} Values with different letters for the same time indicate significant differences (Kaplan Meier, log-rank test; $p < 0.001$, $n = 147$).

実験-2： 壁面格子模様の配色と遮光が稚魚の生残率に及ぼす影響を Fig. VII-7 に示した。活魚船への積み込みのダメージで 0.6%の死亡魚が発生したため、それらを取り上げて実験を開始した。全ての試験区で、輸送初日の日中や夜間に異常行動等を示す魚は観察されなかった。しかし、出航後 2 日目と 3 日目の 8:00～10:00 の時間帯には遮光シートを設置していない活魚水槽のすべてに異常行動が観察され、実験-1 と同様に紺単色の試験区に多数の死亡魚が発生した。2 日目の紺単色の試験区の死亡率は 25.8%になったが、格子模様の試験区の死亡率は 1%以下に留まり、格子模様の試験区の死亡率が有意に低くなった ($p<0.001$, $n=250$)。遮光シートを設置した試験区では格子模様の配色に関係なく、異常遊泳は確認されなかった。一方、格子模様の試験区においては、配色の違いや遮光シートの有無が生残率に影響することはなかった。奄美事業場に到着したときの最終的な各試験区の生残率は紺単色の試験区で 63.9%ともっとも低く、格子模様の試験区は 97.8～99.4%となり、明らかな差が確認された ($p<0.001$, $n=250$)。

Table VII-1 に、実験-1 および 2 の各試験区における生残率の違いを活魚水槽毎に示したが、配色に関係なく格子模様の試験区の生残率が、紺単色の試験区のそれよりも有意に高くなった。

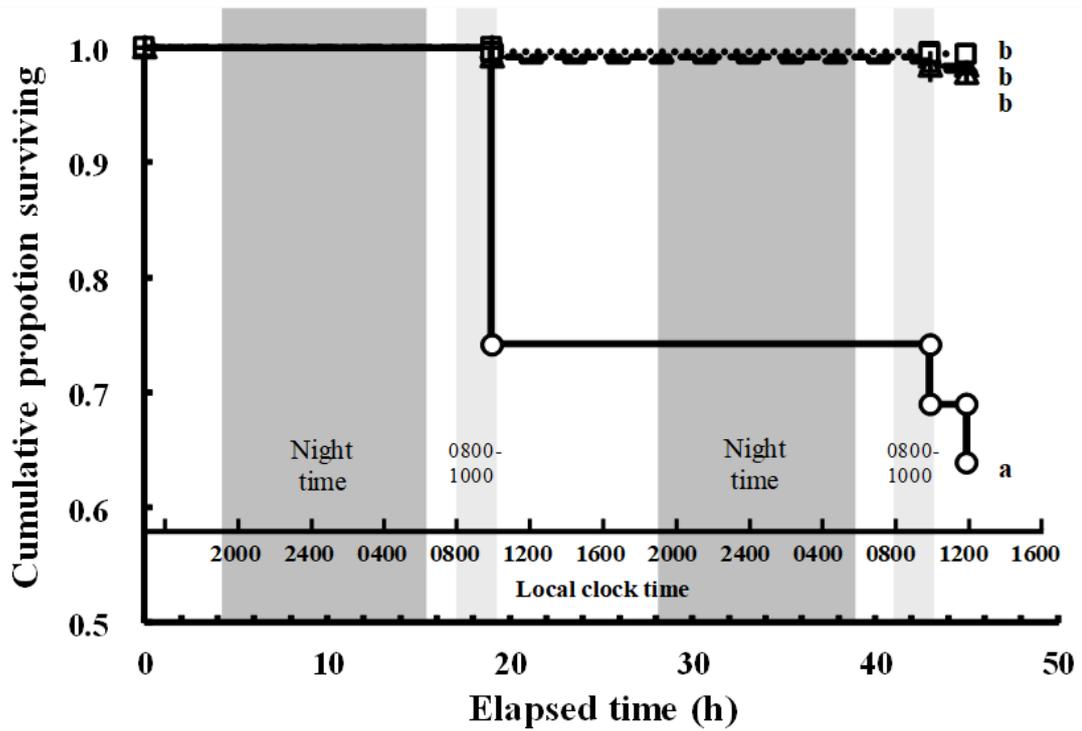


Fig. VII-7 Cumulative survival (Kaplan-Meier) of PBF juveniles during ship transportation in different patterned tanks and under different light conditions. ○, Navy single-colour; △, Navy-red lattice pattern; □, Navy-red lattice pattern with shade sheet; +, Green-red lattice pattern with shade sheet. Dark grey area indicates night-time and light grey area indicates the time at which sunlight entered the tanks. Values with different letters for the same time indicate significant differences (Kaplan Meier, log-rank test; $p < 0.001$, $n = 250$).

Table VII-1. Effect of the colour and pattern of the tank walls and bottom, and shading on cumulative survival rate during ship transportation.

Experiment setup	Tank no.	Survival rate (%)	
		Experiment 1	Experiment 2
Navy single-colour	1	69.4 ^a	69.3 ^a
	2	78.7 ^{ab}	58.8 ^a
Red single-colour	1	76.4 ^a	
	2	88.1 ^{bc}	
Navy-red lattice pattern	1	91.3 ^c	97.2 ^b
	2	94.5 ^c	98.4 ^b
Navy-red lattice pattern with shade sheet	1		99.2 ^b
	2		99.6 ^b
Green-red lattice pattern with shade sheet	1		98.8 ^b
	2		98.4 ^b

^{a,b,c} Values in the same column with different superscript letters are significantly different (Kaplan-Meier, log-rank test; $p < 0.01$, $n = 147-250$).

VII-3) 考察

a) 活魚水槽壁面の色と模様の影響

クロマグロ稚魚を活魚船に積み込む過程で、ハンドリングストレスによる死亡魚が発生した。しかし、2回の実験ともに輸送開始1日目の生残率が高かったことから、積み込み方法による生残率への影響はなかったと考えられる。実験-1では、活魚水槽の壁面が赤単色の試験区の生残率が、紺単色のそれより有意に高くなった (Fig. VII-6; Table VII-1)。この結果から、壁面の色が生残率に影響を及ぼすことが示唆された。我々はこれまでに天然採捕したクロマグロ稚魚を、串本から奄美大島まで14回輸送したが、到着時の生残率は52.1~99.7%と変動した (岡田ら未発表)。それらの輸送でも、紺単色よ

りも赤単色の壁面の活魚槽を備えた活魚船で輸送した場合に、生残率が高くなることが観察された。また、壁面が赤単色の試験区において稚魚の遊泳半径が他の試験区より小さかった。これはクロマグロにとって青緑色は視認性が高い一方、赤色の視認性が低いことに関係すると考えられた（石橋 2010; Ishibashi et al. 2012; Matsumoto et. al. 2012; Tsutsumi et al. 2014）。

今回の実験で、我々は壁面にハイコントラストの格子模様を塗布した活魚槽の生残率が明らかに高くなることを見出した。Ishibashi et al. (2012)は全長およそ 5 cm のクロマグロ稚魚を水玉模様や格子模様を設置した水槽で飼育すると、無処理の水槽より骨折頻度やストレス反応の程度が低くなって生残率が向上し、水槽の壁面模様が顕著な回避行動を導くと報告している。船舶輸送でも同様に、壁面模様によってクロマグロ稚魚の壁面の認識度が高まり、衝突が回避できたと考えられる。

今回の実験では、格子模様の試験区で稚魚の体色が黒化することも確認した。この反応はまだ生理学的に解明されていないが、魚類は高刺激環境に対応する場合に体色を変化させることが知られている（大島，杉本 2001）。今回の実験結果から、クロマグロ稚魚が壁面の格子模様などで視覚刺激を感じたため、通常なら衝突の引き金になるような環境変化が起きても衝突死が発生しない可能性が高くなると考えられた。今後はさらに、海上生簀内での衝突防除などに有効な研究を続ける必要がある。

b) 入射光の影響

実験-1 および 2 の結果から、輸送の 2 日目と 3 日目の 8:00～10:00 に異常行動を示して大量死することが観察された (Table VII-1; Fig. VII-6,7)。これより、輸送中の大量死は、環境変化、特に急激な光量変化によって異常遊泳が誘発され、壁面への衝突を引き起こすことが原因と考えられた。

稚魚は、600 lxの照明を施しておけば、夜間でも正常な遊泳を示したが、太陽光が活魚水槽の水面を照らすようになると Torisawa et al.(2007)が報告しているように突然早い速度で泳ぐ魚が出現した。さらに、1尾の異常遊泳が他の魚の遊泳方向や速度変化を誘導した。クロマグロは照度の急激な変化に反応し、生簀網や水槽壁に衝突することが知られている (Kumai, 1997; Masuma et al., 2001; Fukuda et al., 2010)。また、クロマグロの稚魚は暗所視能が低いことも知られている (石橋 2006; Torisawa et al., 2007; Ishibashi et al., 2009 ; Matsumoto et al., 2009 ; Matsumoto et al., 2011)。そのため、今回の輸送方法と同じように夜間、安定的に人工照明を使用することは生簀や陸上水槽の飼育においても大量死を防ぐことができると報告されている (石橋 2006 ; Ishibashi et al., 2009 ; Honryo et al., 2013)。今回の実験から、輸送中に周囲からの光を完全に遮断すれば、大量死を防げる可能性が示唆された。しかし、輸送中の死亡魚の除去作業では、水槽上面をある程度開放しなければならず、光環境の大きな変化が起きるため、大量死が発生しやすいと考えられる。また、クロマグロ稚魚の積み込みや荷下ろし時の光量の上昇は、死亡率を増加させる可能性がある。それゆえ、活魚輸送において光環境は熟慮すべき重要な問題と考えられる。

今回の実験結果から遮光シートの設置で異常行動の発生率を低減させることができたが、壁面模様の防御効果が大きく、遮光による生残率の向上は確認できなかった。輸送中の船舶は、天候や自走の影響で風波を受けるため、遮光シートの揺れや破損によって太陽光が入射する可能性がある。さらに、光量変化がなくても、活魚船のエンジンや波などの大きな音や揺れに加えて遮光シートの振動音がクロマグロ稚魚の突発的な泳ぎを引き起こす刺激になる可能性も考えられる。それゆえに、現状の活魚船を使用する場合には、

遮光シート設置の有無に関わらず、壁面模様の設置がクロマグロ稚魚の輸送中の死亡率を軽減する最も効果的な手段と考えられた。

第VII章の結果、クロマグロ稚魚の船舶輸送において、活魚水槽に壁面模様を塗布することでその生残率を99%にまで向上させられることが確認できた。さらに、我々は、過去の輸送において、大量死が発生した原因が積み込み時のハンドリングストレスと輸送中に太陽光が活魚槽に入射することによる光量の激しい変化であることを実証できた。活魚水槽の壁面にハイコントラストの格子模様を塗布することでクロマグロ稚魚が壁を認識しやすくなり、輸送中に環境が変化する場合にも衝突を回避することができたが、この発見は、今後のクロマグロ稚魚の輸送をより成功させる効果的な対策になる可能性がある。

第VIII章 総括

和訳要旨

クロマグロ, *Thunnus orientalis*, 天然資源の枯渇問題が世界中で議論される中, 近畿大学水産研究所は 2002 年に世界で初めてその完全養殖に成功した。クロマグロ養殖の種苗は天然資源に依存しており, 今後その養殖を持続的にするためには天然種苗に替わる人工種苗の量産が必要である。近畿大学水産研究所では 1997 年に初めて民間養殖業者に人工種苗を提供した。その後, 陸上飼育方法の改善や生産規模の拡大によって量産化を目指し, 2009 年から陸上施設で 10 万尾以上の稚魚を生産できるようになった。

しかし, 陸上施設から海上施設に沖出しされた稚魚は生簀網への衝突や環境変化によって多くが死亡し, 100 g を超える種苗サイズまでの生残率は一般養殖魚に比べて極めて低く不安定であった。一方, 近畿大学水産研究所がクロマグロの沖出し稚魚の飼育に使用できる海上生簀は, 特定区画漁業権の制約やコストの問題で増やすことが難しい。このため, 海上生簀では沖出しされた稚魚の生残率を向上させることが最重要課題となった。沖出し後の大量死の主な原因は衝突死とされ, 何らかの刺激に対する驚愕反応で突進遊泳が引き起こされると考えられていた(宮下 2002)。そこで, 軽減対策として海上生簀を大型化し, 突進遊泳した際に生簀網に衝突するまでの距離を稼ぐ方法で生残率を向上させたが, 突発的な大量死が発生するなど, 不安定な状況が続いた。その後, 石橋ら(2005)の研究によってクロマグロは稚魚期の初期に暗所視能が低く, 夜間に衝突または接触しやすいこと, 夜間の照度を 150 lx 以上に保つことで衝突死の発生を防除できることが報告された。2006 年には, 実際に海上生簀に夜間照明を設置し, 完全養殖達成以来 4 年間の沖出し 50 日後の平均生残率を 16.8%から 35.2%へ向上させることができた。しかし, 種苗の量産化に伴い, 成長が早いクロマグロ稚魚を大量に短期間で

沖出ししなければならず、飼育水槽からの取り上げ作業や輸送によると考えられるダメージなどによって、再び沖出し後の生残率が不安定になった。

クロマグロ養殖業が将来的に持続可能な産業であるためには、天然資源に過度な負担を掛けることができない。近畿大学水産研究所はその役割を果たすべく、養殖原魚である種苗を人工種苗で担うための技術開発を行っており、沖出し後の生残率の向上が喫緊の課題となった。本研究は実際の生産現場に多少なりとも参考になればという思いから、長年にわたって養殖現場の生産規模での実学研究を行った。

第I章 海上生簀におけるクロマグロ稚魚の死亡原因

クロマグロの稚魚を海上生簀に沖出しして 30 日後の生残率はおよそ 50% と低いが、大量死の原因は明らかにされていない。沖出し後 30 日間の死亡魚を回収して計数し、胃の内容物、成長および骨格損傷について調査した結果、沖出しした稚魚のおよそ半数（47.9%）が 4 日目までに死亡していた。その原因を調査すると、死亡魚のおよそ 1/3（21.9～42.9%）が木屑や発泡スチロールのような無機質な物体の飲み込みによるものであったが、8 日目以降には異物誤飲による死亡魚が顕著に減少した。また、沖出し 7 日目までの死亡魚の全長および魚体重は生残魚と比較して有意に小さく、死亡魚の 25～45%が輸送のストレスや摂餌不良に基づく成長不良と判断された。さらに、生簀網等に接触あるいは衝突したために骨格損傷となった死亡魚は 15%以下であったが、この現象は 7 日目以降も継続して発生することがわかった。これらの結果から、沖出し後の大量死の主な原因は、異物誤飲、成長不良および骨格損傷であり、それぞれの対策が稚魚の生残率を向上させると考えられた。

第II章 異物誤飲の防除法の検討

稚魚の海上飼育では、沖出し直後の7日間に大量死が発生する。前章では沖出し後の5日目までに80%の死亡魚が異物を誤飲しており、これを防除することで生残率が向上できると考えられた。そこで第II章では、異物の流入を防ぐためにゴミ除けネット（目合い1mmの農業用防虫ネット）を生簀網の外周に水面下3mまで設置した試験区を設け、生残率、成長および死亡原因を調べた。2回の実験で調べた結果、稚魚の生残率および成長にゴミ除けネットの有無による差はみられなかった。第I章の実験期間に比べ、今回は実験漁場にゴミの流入量が少なかった可能性が高い。しかし、死亡原因を調べると、ゴミ除けネットを設置した生簀の異物誤飲の発生率および日間死亡率はControl区よりも低くなった。これらの結果から、ゴミ除けネットを設置することで、ゴミの流入量が多い場合にも異物誤飲が軽減され、生残率を向上できる可能性の高いことが示唆された。

第III章 沖出し前後の給餌方法の検討

III-1 沖出し直前の無給餌時間の影響

輸送のストレスや摂餌不良に基づくと考えられる成長不良が大量死の主原因の一つであるため、この対策として沖出し前後の給餌方法を検討した。クロマグロ稚魚を海上生簀に沖出しする際に、従来通り、沖出し作業開始3時間前（当日5:00）に最終給餌を行うControl区と沖出し作業直前にも給餌する直前給餌区を設け、生残率、成長および体成分の変化を比較した。その結果、直前給餌区の成長および生残率が低くなる傾向を示し、ストレスホルモンのコルチゾル含量がControl区に比べて生簀収容直前に有意に高くなった。これより、輸送直前の摂餌が稚魚のストレス反応に影響し、沖出し後の摂餌や飼育成績に反映される可能性の高いことが示唆された。

III-2 沖出し前後の適正給餌方法の検討

沖出し作業に伴う無給餌時間（最終給餌から給餌再開までの時間）の影響を陸上水槽による模擬試験で検討した。沖出し当日，または前日から翌日までの無給餌時間を 12，20，24 および 36 時間とする試験区を設け，従来法の 8 時間無給餌の Control 区と比較した。その結果，前日 17:00～当日 17:00 までの 24 h 無給餌区および当日 5:00～17:00 までの 12 h 無給餌区の生残率が，Control 区の当日 5:00～13:00 の 8 h 無給餌区より高くなった。そこで，この 3 試験区の条件で実際に海上生簀を使って比較した結果，24 h 無給餌区の生残率がわずかに低く，体成分結果からも魚の負担が高い傾向が見られたが，8 および 12 h 無給餌区では差が無かった。作業の効率化から，稚魚の沖出し前の給餌は当日 5:00 を最終給餌とし，給餌再開は当日 17:00 とすることが適切と考えられた。

第IV章 海上生簀への効果的な沖出しサイズ

陸上水槽から海上生簀への沖出し直後に起きる大量死を軽減するため，稚魚の沖出しサイズの影響を検討した。従来法では，全長 6～7 cm，体重 2～3 g の稚魚が沖出しされていたが，実験-1 では平均体重 11.6 g の大型サイズ，実験-2 では平均体重 0.5 g の小型サイズの稚魚を沖出しし，従来法の平均体重 2～3 g（Control 区）とそれぞれ比較した。両実験ともに同じ水槽の魚を用い，設定したサイズになった段階で沖出しして，両者の飼育成績を比較した。その結果，実験-1 の大型サイズで沖出しした試験区の生残率は，Control 区のそれよりも有意に低くなった。また，大型サイズ区では，陸上水槽で飼育を延長したことによる衝突死が増加した。一方，実験-2 の小型サイズで沖出しした試験区の生残率は Control 区のそれよりも 8%向上し，成長にも差がないことから高い効果が確認できた。この原因として，沖出しサイズの稚

魚は皮膚が十分に発達しておらず、小型サイズの沖出しで体重当たりの皮膚損傷のダメージが少なくなるためと考えられた。本実験の結果から小型サイズの沖出しを行うことで、陸上水槽での飼育期間を短縮し、養殖効率を大きく改善できることが示唆された。

第V章 小型生簀の変則使用による生残率の向上

クロマグロ稚魚を大型生簀に沖出しすると摂餌不良に基づく成長不良が発生する。この原因の一つとして、大型生簀では沖出し直後の魚が餌を視認し難いためと考えられた。そこで本実験は、一辺 13 m の正方形小型生簀に沖出しして馴致した後に大型生簀に移動する方法を検討した。試験区は、4つの小型生簀に沖出しして 12 日間飼育した後に別の直径 30 m 生簀に合併する飼育方法とし、従来法の直径 30 m 生簀に直接沖出しする Control 区と生残率、成長および死亡原因を比較した。その結果、小型生簀を使用した試験区の生残率は、Control 区よりおよそ 20%高くなった。また、摂餌不足による成長不良は小型生簀でも発生したが、その発生率と日間死亡率は Control 区の 1/2 程度まで低下した。さらに、小型生簀の稚魚の日間成長率および増重率は、Control 区のそれより有意に高くなった。これらの結果から、沖出し直後に小型生簀を一時的に用いることが成長不良の対策として有効であり、海上生簀で発生する大量死を軽減できることが示唆された。

第VI章 小型生簀の適正な飼育密度

クロマグロ稚魚の接触や衝突による骨格損傷は、沖出し後から 7 日目以降も継続して発生する。また、海上生簀には区画漁業権の制約があるため、稚魚を量産するためには限られた生簀を効率的に使用しなければならない。そこで本章では、小型生簀（縦 13 m×横 13 m×深さ 6 m）における効率の良い収

容密度を検討した。試験区は、従来法の 1 生簀当たり 3000 尾を Control 区とし、1500 尾および 6000 尾の計 3 試験区を 3 重複ずつ設けて飼育成績を比較した。その結果、生残率は収容密度が低いほど高くなる傾向を示したが、1 生簀当たりの平均生残尾数は 6000 尾区で 1989 ± 771 尾、3000 尾区で 1244 ± 411 尾、1500 尾区で 815 ± 245 尾となった。成長、血液性状、血漿成分および血漿電解質濃度には差がなかったことから、海上生簀における生残率を優先する場合は 1500 尾/生簀が適切であるが、限られた海上施設での生産性から判断すると 6000 尾/生簀が効率的と考えられた。

第VII章 稚魚の船舶輸送における活魚水槽の壁面色および模様の効果

生簀で馴致したクロマグロ稚魚は活魚船で輸送することが多いが、その輸送中に半数以上の大量死が発生することが多い。陸上水槽による事前の実験で水槽壁面に模様を付けると接触や衝突死が軽減できることがわかったため、本実験では活魚船の水槽壁面の色や模様が生残率に及ぼす影響を調べた。実験-1 では、紺単色区、赤単色区および紺地に赤の格子模様を塗布した紺-赤格子区の計 3 試験区を 2 重複ずつ設けて 45 時間の船舶輸送の影響を調べた。輸送中の 8~10 時には活魚槽へ太陽光が入射し、試験区の稚魚に異常行動が観察された。また、紺および赤単色の試験区では稚魚が活魚槽の壁に衝突して死亡魚が増加し、単色区と格子区との生残率に 10%以上の差が見られた。実験-2 では活魚水槽の壁面を紺単色にしたものを Control 区とし、紺-赤格子区、その格子区に遮光シートを設置した紺-赤格子+シート区および緑-赤格子+シート区の 4 試験区を 2 重複ずつ設けた。その結果、太陽光が活魚槽に入射したときにすべての試験区の稚魚に異常行動が見られたが、格子区では衝突死が発生せずに生残率が 100%近くになり、単色区の 60%より有意に高くなった。これらの結果、コントラストの高い格子模様の壁面模様の設

置がクロマグロ稚魚の活魚輸送において大量死を劇的に防ぐことが示唆された。

以上の研究の結果、クロマグロ稚魚の海上中間育成における主要な死亡原因を明らかにし、その発生頻度から優先順位を付けて対策の開発を順次行った。すなわち、誤飲対策としてゴミ除けネットの設置、沖出し前後の適正な給餌方法、適切な沖出しサイズ、小型生簀の変則使用法、適正な飼育密度および稚魚の輸送方法などでそれぞれ効果的な方法を見出し、生残率を劇的に向上させる技術を開発した。これらの知見は今後のクロマグロ人工種苗の生産技術の確立に大きく貢献することが期待される。

英訳要旨(Summary)

Resource depletion in wild Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*; PBF) has been discussed worldwide. In such circumstances, the Aquaculture Research Institute, Kindai University, succeeded in closed-cycle cultivation of PBF for the first time in the world in 2002. However, PBF aquaculture still depends on wild-caught seedlings as a resource. To maintain sustainable development of PBF culture in the future, mass production of artificial seedlings will be required to replace wild-caught seedlings. The Aquaculture Research Institute, Kindai University, provided artificial seedlings to private aquaculture companies for the first time in 1997, and since then, more than 100000 juveniles have been produced at the hatchery by improving breeding protocols, in addition to expanding the production scale from 2009.

A continuing challenge is that many juveniles die owing to both collisions with the net cage and environmental changes after transport from the land-based hatchery to sea net cages; thus, the survival rate when seedlings grow up to 100 g (body weight) is extremely low or not constant compared to those of typical farmed fish in which rearing technology has been already established. In contrast, it is difficult to increase the number of sea net cages that the Aquaculture Research Institute, Kindai University can use for breeding PBF juveniles owing to legal regulation restrictions and/or economic limitations. Therefore, improving the production efficiency and survival rate of PBF juveniles in sea net cages is critical. Collision death was reported as one of the main causes of mass death in sea net cages, and it was caused by burst swimming as a startle response to external stimulus (Miyashita, 2002). As a countermeasure against this type of mortality, we enlarged the sea net cage for the purpose of increasing the distance

between PBF juvenile and the wall of the cage net when burst swimming occurred. As a result of this countermeasure, the survival rate has been improved; however, the survival rate remains unstable owing to sudden mass death without a concrete cause of death. Subsequently, Ishibashi et al. (2005) suggested that the collision death of early stage of PBF juveniles increases frequently during the nighttime owing to low ability of scotopic vision. In addition, Honryo et al. (2013) reported that providing nighttime lighting with intensity greater than 150 lx is an effective method for mitigating mass death of PBF juveniles. These developed strategies resulted in improved production efficiency. In 2006, we conducted a production-scale trial with night lighting installed on the sea net cages and the average survival rate (16.8%) was improved to 35.2% in the sea net cages over the past 4 years (since 2002). However, increasing the production amount has highlighted emerging issues such as transportation of large number of fast-growing PBF juveniles in a short period, and because of both the physical and physiological impact of transportation, the survival rate in sea net cages has decreased and became unstable again in recent years.

To develop industrial PBF aquaculture sustainably in the future, its natural resources must not be overfished. Therefore, the development of artificial seedling production technology for PBF juveniles is essential, and improving the survival rate in sea net cages is an urgent issue. This research was conducted with a focus on practical aquaculture of PBF using the actual scale of sea cages, and we hope that this study will help practical production sites.

Chapter I: Cause of death of juvenile Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) reared in sea net cages

Although the survival rate of juvenile Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* (PBF) during 30 days after stocking in sea net cages has been as low as approximately 50%, the reason for this high mortality is not clear. In Chapter 1, dead fish were collected and counted for 30 days after stocking in a sea net cage, and the stomach contents, growth performance, and bone injury were investigated. Nearly half (47.9%) of the fish died within the first 4 days. Approximately one-third of the dead fish (21.9%–42.9% per day) had ingested inorganic matter such as wood or Styrofoam waste during the first 7 days, but the daily ingestion rate of such inorganic matter decreased dramatically from the eighth day, when the daily mortality rate decreased. The total length and body weight of the dead fish were significantly smaller than those of the live fish, and the weight of the dead fish did not increase during the first 7 days. Furthermore, 25.0%–45.0% of the dead fish sampled per day showed poor growth owing to inadequate food intake induced by the impact of transportation. The percentage of dead fish with bone injuries due to collision or contact was low (less than 15%), even though this cause of death continued beyond the sea cage culture of PBF. These results suggest that the main causes of high mortality during several days after stocking in a sea cage were accidental ingestion of inorganic matter by juvenile PBF, poor growth, and bone injuries. Each countermeasure against the cause of death should be developed to increase the viability of PBF juveniles.

Chapter II: Investigation of countermeasures to prevent accidental ingestion of inorganic foreign matter

Mass mortality occurs within 7 days after transportation from land-based tanks to sea cages for practical fingerling production of PBF juveniles. As a result of investigating the cause of death in Chapter 1, of the total mortality that occurred during the first 7 days, 80% of dead fish ingested inorganic foreign matter. This implies that it is possible to improve the survival rate after transportation by preventing accidental ingestion of inorganic foreign matter. Therefore, in Chapter 2, we conducted experiments using a fine mesh net (agricultural insect net with a mesh size of 1 mm), which was installed up to a depth of 3 m below the water surface surrounding the sea net cages and examined survival, growth, and the cause of death. This trial was repeated twice. There were no differences in the survival rate and growth performance between the treatments at the end of the experiment. It is assumed that the amount of inorganic foreign matter inflow was lower in the experimental area than in the previous year (Chapter 1). However, among the causes of death, the incidence and mortality rate of accidental ingestion of inorganic foreign matter were lower in cages with fine mesh nets than in Control cages in which fine mesh nets were not installed. These results imply that the installation of a fine mesh net could potentially contribute to mitigating the death due to accidental ingestion of inorganic foreign matter, and this protocol is expected to improve the survival rate.

Chapter III: Examination of feeding strategy before and after transportation

III-1 Effect of fasting time immediately before transportation

Chapters I suggested that it is also important to develop countermeasures against poor growth caused by transportation stress and/or insufficient food intake. Thus, we examined the strategy before and after transport to the sea net cages. PBF juveniles were generally fed a diet 3 h prior to transportation; this feeding strategy served as a Control and treatment in which juveniles were fed again immediately before transportation (re-fed group), and the changes in survival rate, growth, and body composition were compared. The survival rate and growth were statistically similar between the treatment groups, although these were relatively lower in the re-fed group than in the Control group. The level of the stress-induced hormone, cortisol, was significantly higher in the fish from the re-fed group than that in the Control group at the point when fish were captured just before release to the cages. Hence, it can be said that feeding immediately before transportation increased the stress response of PBF juvenile.

III-2 Examination of appropriate feeding time before and after transportation

A preliminary test was conducted on land-based tanks to investigate the effect of fasting duration, from final feeding to re-feeding during transportation. Experimental combinations of fasting duration (8 (Control), 12, 20, 24, and 36 h) that varied the final and resumption of feeding times were examined. A slight improvement in the survival rate was confirmed after 12 and 24 h of fasting. Hence, the current method of 8 h of fasting, Control, 12 h of fasting, and 24 h of fasting were compared using practical sea net cages, and the changes in body

composition, growth, and survival rate were evaluated. Although there was no significant difference in survival rate, that of the 24 h fasting treatment was slightly lower than that of the other treatments. The results of body composition analysis showed that the physical impact on PBF juveniles tended to be higher in the 24 h fasting treatment than in the other treatments. Chapter 3 concludes that the suitable feeding strategy, which contributes to production efficiency, for PBF juveniles before and after transportation is as follows: fish are fed 3 h before transportation, and the resumption of feeding should be carried out within 12 h of fasting.

Chapter IV: Effect of transportation size to sea net cages of PBF juvenile

The effect of fish size was investigated to prevent mass death just after transportation. In practical fingerling production, PBF juveniles with a total length of approximately 6 cm and body weight of 2 g were transferred. In Experiment-1; large-size (mean body weight, 11.6 g) and in Experiment -2, small (mean body weight, 0.5 g) were transferred to sea cages and compared to the Control group (mean body weight of 2 g). Both experimental fish were placed in the same tank. The results of Experiment 1 that using large-sized PBF juvenile, showed a significantly lower survival rate than that of the Control group. Furthermore, increased mortality induced by collisions owing to a prolonged period in land-based tanks was observed. In contrast, Experiment 2, using small-sized PBF juvenile, demonstrated an 8% higher survival rate without high rates of mortality compared to the Control group, even just after transportation. In addition, there were no differences in growth between the treatments at the end of the experiment. Thus, this chapter suggests that

transportation of smaller PBF juveniles could improve production efficiency due to a higher survival rate and shortened duration of hatchery management.

Chapter V : Improving rearing performance in sea cage culture of PBF juveniles using small sea cages anomalistically

High levels of mortality occur in large net cages during practical fingerling production of PBF owing to poor growth induced by insufficient food intake. A hypothetical factor anticipating this mortality was that a large net cage, such as 30 m in diameter, is too spacious for PBF juveniles to recognize diet. Therefore, we conducted experimental transportation using small sea cages (square with 13-m sides) and moved fish to large net cages. PBF juveniles were directly transferred to a 30-m-diameter cage (Control) and compared to fish transferred to small sea cages for 12 days before being merged into another 30-m-diameter cage. The survival rate, growth performance, and causes of death were compared. The results showed that the survival rate in the small sea cages was approximately 20% higher than that of the Control group. Poor growth occurred even in the small sea cages; however, the frequency and daily mortality rate were almost half of those in the Control. These results suggest that using small sea cages could be an effective countermeasure for poor growth, which mitigates high mortality.

Chapter VI: Appropriate rearing density of sea net cages for culture of PBF juveniles

The bone injuries caused by collision and/or contact with the net cage were reportedly continued even a week after transportation. Moreover, the number of

sea cages that can be used for PBF culture is strictly regulated. Therefore, limited sea cages should be effectively used for the mass production of PBF juveniles. Therefore, in Chapter 6, we examined the appropriate stock density of PBF juveniles in small cages (length 13 m × width 13 m × depth 6 m, mesh size 6 mm, volume 1,014 m³). The experimental treatments were as follows: 1) 3,000 fish per cage served as Control, whose density was prescribed for practical fingerling production, 2) 1,500 fish per cage, and 3) 6,000 fish per cage. These treatments were performed in triplicate, and the survival rate, growth, and blood chemistry were compared. The survival rate tended to increase with decreasing stock density, but the number of surviving fish per cage was as follows: 1,989 ± 770 individuals in the 6,000 fish group, 1,244 ± 411 individuals in the Control group, and 815 fish ± 244 individuals in the 1,500 fish groups. There were no differences in growth, blood properties, plasma components, or electrolyte concentrations. These results suggest that if the survival rate is a priority index for production efficiency, a stocking density of 1,500 fish per cage is considered appropriate. However, it was also suggested that a stock density of 6,000 fish per cage may be efficient in a limited number of sea cages.

Chapter VII: Advantageous of tank wall color and pattern on the survival rate of PBF juvenile during ship transportation

PBF juvenile often experience high mortality during ship transportation. Preliminary experiments conducted in land-based tanks have elucidated that collision death can be prevented by painting tank walls with curtain patterns. Accordingly, in this chapter, we investigated whether the addition of colors or patterns to the walls of tanks affected the survival rate during ship transportation

by boat. In the first experiment, three colors and lattice patterns were tested: dark blue single-color, red single-color, and red–blue lattice patterns. Fish in all tanks exhibited abnormal behaviors when sunlight entered the tanks between 0800 and 1000 h, but mortality only increased in the single-colored tanks as a result of collision with the tank walls. In the second experiment, four colors and patterns were tested: dark blue single-color, red–blue lattice pattern, red–blue lattice pattern with shade sheet, and red–green lattice pattern with shade sheet. Again, we visually observed that fish in all treatment groups exhibited abnormal behavior when sunlight entered the tanks, but there were no collision deaths in the lattice-patterned tanks and survival in this group was significantly higher than in the single-colored tanks. Thus, the use of a high-contrast color pattern can prevent the mass death of PBF juvenile during ship transportation.

In conclusion, this study clarifies the main cause of death of PBF juveniles in sea cage culture and develops countermeasures against each cause of death. We propose technologies to improve the survival rate, such as installing a sea litter net against ingestion of inorganic foreign matter, appropriate feeding strategy before and after transport to sea net cages, appropriate size for transportation, effectiveness of applying small-sized sea cages, appropriate rearing density, and juvenile shipping method with tank wall painting. These findings are expected to contribute to the establishment of production technologies for artificial bluefin tuna.

文献

- Altinok I. (2004) Toxicity and therapeutic effects of chloramine-T for treating *Flavobacterium columnare* infection of goldfish. *Aquaculture* 239, 47-56.
- 会田勝美, 潮秀樹 (2013) 代謝. 増補改訂版魚類生理学の基礎 (会田勝美・金子豊二編) 恒星社厚生閣, 東京, pp.204-215.
- Biswajit, B. K., S. C. Ji. A. K. Biswas, M. Seoka, Y. S. Kim, K. Kawasaki and K. Takii (2009) Dietary protein and lipid requirements for the Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* juvenile. *Aquaculture*, 288, 114-119.
- Buentello, A., Seoka, M., Kato, K., & Partridge, G. J. (2015). Tuna Farming in Japan and Mexico (Chapter 8). In D. D. Benetti, G. J. Partridge, & A. Buentello (Eds.), *Advances in Tuna Aquaculture from Hatchery to Market* (pp. 189-212). Cambridge, MA: Academic Press.
- Collete, B. B. (1999) Mackerels, molecules and morphology. *Soc. Fr. Ichtol.*, 25, 149-164.
- Colton J.B. Knapp D.F.Jr. Bums R.B. (1974) Plastic particles in surface water of the northwestern Atlantic, *Science* 185, 491-497.
- Emmanuelle, R. D., Lemarie. G., Breuil. G., Petochi. T., Marino. G., Triplet. S., Dutto. G., Fivelstad.S., Coeurdacier. J.L. and J.P, Blancheton. (2010) Effects of rearing density on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) biological performance, blood parameters and disease resistance in a flow through system. *Aquat. Living Resour.*, **23**, 109-117.
- Fukuda H., Torisawa S., Sawada Y., Takagi T. (2010) Developmental changes in behavioral and retinomotor responses of Pacific bluefin tuna on exposure to sudden changes in illumination. *Aquaculture*, **305**, 73-78.

- Fukuda, H., Sawada, Y., & Takagi, T. (2011). Ontogenetic changes in behavior transmission among individuals in the schooling of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. *Aquatic Living Resources*, 24, 113-119.
<https://doi.org/10.1051/alr/2011136>
- 藤田 清 (1998) マグロの種類と生態. マグロの生産から消費まで (小野 征一郎編著) 成山堂, 東京, PP1-43
- Grutter A. S., and N. W. Pankhurst (2000) The effects of capture, handling, confinement, and ectoparasite load on plasma levels of cortisol, glucose and lactate in the coral reef fish *Hemigymnus melapterus*. *J. Fish Biol.*, 57 391-401
- 原田輝雄・熊井英水・水野兼八郎・村田修・中村元治・宮下盛・古谷秀樹(1971) クロマグロの飼育について. 近畿大学農学部紀要 第4号, 153-157.
- Higuchi, K., Tanaka, Y., Eba, T., Nishi, A., Kumon, K., Nikaido, H., & Shiozawa, S. (2013). High incidence of death due to collision of hatchery-reared Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* juveniles in sea cages, as revealed by head and spinal injuries. *Fisheries Science*, 79, 111-117.
<https://doi.org/10.1007/s12562-012-0568-3>
- Honryo, T., Kurata, M., Okada, T., & Ishibashi, Y. (2013). Effects of night-time light intensity on the survival rate and stress responses in juvenile Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* (Temminck and Schlegel). *Aquaculture Research*, 44, 1058-1065.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03109.x>
- Honryo, T., Okada, T., Kurata, M., Tamura, T., & Ishibashi, Y. (2014). Optimal periods of night-time lighting in the sea cage culture of Pacific bluefin tuna,

- Thunnus orientalis*, juvenile (Temminck and Schlegel). *Aquaculture Research*, 45, 1109-1115. <https://doi.org/10.1111/are.12059>
- Honryo, T., Okada, T., Kawahara, M., Kurata, M., Agawa, Y., Sawada, Y., Miyashita, S., Takii, K., & Ishibashi, Y. (2018). Estimated time for recovery from transportation stress and starvation in juvenile Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* (Temminck and Schlegel). *Aquaculture*, 484, 175-183. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.11.023>
- Hoss, D.E. and Settle, L.R. (1990) Ingestion of plastic by teleost fishes. In: Shomura R.S., Godrey M.L. (Eds.), Proceedings of the Second International Conference on Marine Debris. *Sci*, 185, pp. 694-709.
- ICCAT (2018). *Report for biennial period Part I* (English Version), 2016–17 (Vol. 2, pp. 91-126). Retrieved from https://www.iccat.int/Documents/BienRep/REP_EN_18-19_I-2.pdf
- Inoue, M., 1978. Fishing practices and fish behavior. Kouseisha kouseikaku, Tokyo, pp. 63-100.
- Ishibashi, Y., Hirata, H., Kumai, H. (2002) Effect of Hypoxic Stress on Energy Metabolism in Red Sea Bream, *Pagrus major*- I Stress Response and Energy Status in Various Tissues of Red Sea Bream, *Pagrus major*, Subjected to Hypoxic Exposure.
- Ishibashi, Y., Honryo, T., Saida, K., Hagiwara, A., Miyashita, S., Sawada, Y., Okada, T., & Kurata, M. (2009). Artificial lighting prevents high night-time mortality of juvenile Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*, caused by poor scotopic vision. *Aquaculture*, 293, 157-163. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.04.029>

Ishibashi, Y. (2012). Fingerling production-II Flexion larvae to juvenile. In H. Kumai, S. Miyashita, W. Sakamoto, & S. Ono (Eds.), *Full-life cycle aquaculture of the Pacific bluefin tuna* (pp.39-59). Tokyo, Japan: Agriculture and Forestry Statistics Publishing Inc.

Ishibashi, Y., Izumi, T, Kurata, M., Okada, T., (2013). Effects of tank wall pattern on survival, bone injury rate, and stress response of juvenile Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*. *Aquacultural Engineering* 56, 13-17.

doi: 10.1016/j.aquaeng.2013.03.004.

石橋泰典, 本領智記, 倉田道雄, 宮下盛, 澤田好史, 岡田貴彦 (2005)

<研究成果の概要> クロマグロにおける衝突死の発生原因について,
クロマグロ等の魚類養殖産業支援型研究拠点: 21 世紀 COE プログラム
ム 2003~2004(平成 15~16)年度 中間成果報告書, pp. 87-90.

石橋泰典 (2006) クロマグロの初期発育と種苗生産, 現状と展望: 種苗生産における衝突死. 日本水産学会誌, 72(5), 949-950.

石橋泰典 (2010) 中間育成 -稚魚期の生残率向上- 「近畿大学プロジェクト クロマグロ完全養殖」(熊井英水, 宮下盛, 小野征一郎編), 成山堂, 東京, pp.37-59.

石橋泰典 (2011) 種苗生産技術. クロマグロ養殖業-技術開発と事業展開 (熊井英水, 宮下盛, 小野征一郎編) 水産学シリーズ 168, 恒星社厚生閣, pp.53-69.

Korsmeyer and Dewar (2001). Tuna metabolism and energetics. *Fish Physiology* ,19, pp.35-78.

- Kubota, T. and Uyeno, T., (1970). Food habit of Lancetfish, *Alepisaurus ferox* (Order Myctophiformes) in Suruga Bay, Japan. *Japanese Journal of Ichthyology* 17, (1), 22-28. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(01\)19003-5](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(01)19003-5)
- 久保田正・佐藤武 (2008) 三保海岸 (駿河湾) に生存状態で打ちあがったミズウオの記録. 東海大学紀要海洋学部「海 - 自然と文化」第 6 巻 第 3 号, 11-17.
- Kumai H. (1997). Present state of bluefin tuna aquaculture in Japan. *Suisanzoshoku* 45, 293-297.
- 熊井英水・宮下盛 (2003) クロマグロ完全養殖の達成. 日水誌, 69, 124-127
- 熊井英水・宮下盛・小野征一郎 (2010) 「クロマグロ完全養殖」 成山堂, 東京. pp.1-21.
- Masuma S., Kawamura G., Tezuka N., Koiso M., Namba K. (2001) Retinomotor responses of juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus*. *Fisheries Science*, 67, 228-231.
- Matsumoto T., Ihara H., Ishida Y., Okada T., Kurata M., Sawada Y., Ishibashi Y. (2009) Electroretinographic Analysis of Night Vision in Juvenile Pacific Bluefin Tuna(*Thunnus orientalis*). *Biol Bull*, 217, 142-150.
- Matsumoto T., Okada T., Sawada Y., Ishibashi Y. (2011) Changes in the scotopic vision of juvenile Pacific bluefin tuna (<i>Thunnus orientalis</i>) with growth. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37, 693-700.

Matsumoto T., Okada T., Sawada Y. & Ishibashi Y. (2012) Visual spectral sensitivity of photopic juvenile Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *Fish Physiology and Biochemistry* 38, 911-917.

三坂尚行, 水野信也, 宮腰靖之, 竹内勝巳, 鷺見達也, 笠原昇 (2004) 飢餓中のサクラマス当歳魚の肝臓におけるトリグリセリドおよびグリコーゲン含量の変動. 日本水産学会 79(2), 168-174

Miwa, I., J. Okuda., K. Maeda . and G. Okuda. (1972) Mutarotase effect on colorimetric determination of blood glucose with β -d-glucose oxidase. *Clin. Chim. Acta*, 37, 538-540.

Miyazaki T., Kohbara J., Takii K., Ishibashi Y., Kumai H. (2008) Three cone opsin genes and cone cell arrangement in retina of juvenile Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. *Fisheries Science*, 74, 314-321.

Miyashita, S., Sawada, Y., Hattori, N., Nakatsukasa, N., Okada, T., Murata, O., & Kumai, H. (2000). Mortality of Northern bluefin tuna *Thunnus thynnus* due to trauma caused by collision during grow out culture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 31, 632-679. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2000.tb00913.x>

宮下 盛 (2002) クロマグロの種苗生産に関する研究. 近畿大学水産研究所報告, 8, 1-171.

村井武四 (2009) 魚類のエネルギー代謝. 改訂 魚類の栄養と飼料 (渡邊武 編) 恒星社厚生閣, 東京, pp.32-57

村田 修 (2000) マダイ. 「最新海産魚の養殖」(熊井英水編) 湊文社, 東京, pp.89-108.

- 中野俊樹 (2016) 魚類におけるストレスとその防御に関する研究. 日本水産学会誌, 82, 278-281
- 中野秀樹, 岡雅一 (2010) 「マグロの不思議がわかる本」 築地書館, 東京. pp.80-114.
- Okada, T., Honryo, T., Sawada, Y., Agawa, Y., Miyashita, S., & Ishibashi, Y. (2014). The cause of death of juvenile Pacific Bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) reared in sea net cages. *Aquaculture Engineering*, 59, 23-25. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2014.01.001>
- Okada, T., Sakurai, Y., Honryo, T., Kawahara, M., & Ishibashi, Y. (2020). Improving rearing performance in sea-cage culture of Pacific Bluefin tuna *Thunnus orientalis* (Temminck and Schlegel) using small sea cages. *Aquaculture Research*, 51, 3017-3024. <https://doi.org/10.1111/are.14641>
- 大島範子, 杉本雅純 (2001) 魚類における色素細胞反応と体色変化色素細胞. 色素細胞 (松本二郎・溝口昌子編), 慶応大学出版会, 東京. pp.161-176.
- 大西堯行 (2016) クロマグロ稚魚のエネルギー代謝に関する研究. 博士論文, 近畿大学, 大阪.
- Pankhurst, N. W., H. R. King and S. L. Ludke (2008) Relationship between stress, feeding and plasma ghrelin levels in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Mar. Fresh. Behav. Physiol.*, 41, 53-64.
- Pratap, H. B. and S. E. W. Bonga (1990) Effects of water-borne cadmium on plasma cortisol and glucose in the cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Comparative Pharmacology*, 95, 313-361.
- Rotllant, J. and L. Tort (1997) Cortisol and glucose responses after acute stress by net handling in the sparid red porgy previously subjected to crowding stress. *J. Fish Biol.*, 51(1), 21-28.

- Safina, C. (2001). Tuna conservation. In B. A. Block, & E. D. Stevens (Eds.), *Tuna: Physiology, Ecology, and Evolution* (pp. 413-459). San Diego, CA: Academic Press.
- 澤田好史, 熊井英水 (2000) クロマグロ. 「最新海産魚の養殖」(熊井英水編), 湊文社, 東京. pp.212-216.
- Sawada, Y., Okada, T., Miyashita, S., Murata, O., & Kumai, H. (2005). Completion of the Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* (Temminck et Schlegel) life cycle. *Aquaculture Research*, 36, 413-421. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01222.X>
- 示野貞夫 (1978) 魚類糖代謝の特性と適応性②代謝調節. 水産の研究 6 : 60-65.
- Tamura, Y. and Takagi, T. (2009) Morphological features and functions of bluefin tuna change with growth. *Fish Sci.*, 75, 567-575.
- 田中庸介 (2013) 海産多産性魚類の初期生残機構の解明とその増養殖への応用日本水産学会. 79(4), 623-626.
- 富永盛次朗 (1964) 魚の生活 角川新書, 東京, pp. 96-117.
- Torisawa S., Takagi T., Fukuda H., Ishibashi Y., Sawada Y., Okada T., Miyashita S., Suzuki K. & Yamane T. (2007) Schooling behavior and retinomotor response of juvenile Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* under different light intensities. *Journal of Fish Biology* 71, 411-420.
- Tsutsumi Y, Matsumoto T, Honryo T, Agawa Y, Sawada Y, & Ishibashi Y (2014) Effects of light wavelength on growth and survival rate in juvenile Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*. *Environmental Biology of Fishes* 97, 53-58.

- Weber, J., B. W. Richard and H. W. Peter (1986) Mammalian metabolite flux rates in a teleost: lactate and glucose and glucose turnover in tuna. *Amer. J. Physiol.*, 250 (Regulatory Integrative Comp. Physiol 19): 452-458.
- Wickler, W., 1969. *Mimicry*. Heibonsha, Tokyo, pp. 152-161.
- Williams, N. (2007). Tuna crisis looms. *Current Biology*, 17, R108-R109.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.01.066>
- 山本尚俊 (2016) 太平洋クロマグロ資源の管理強化と国内需給の変化
長崎大学水産学部研究報告 第 97 号, 1-10.
- Yoshikawa A. & Honma K. (1980) Canadian tuna *Thunnus thynnus* (Linnaeus) culture. *Teichi* 57/59, 1-12.

謝辞

クロマグロの完全養殖の研究を当初から立案され、指導された故原田輝雄先生、そして私に本研究の発端を与えてくださり、御懇篤な御指導、ご鞭撻を賜った故宮下 盛先生に本論文を捧げます。

本研究を進めるにあたり、終始丁寧にご指導、ご教授を賜りました本学農学部 石橋泰典教授には心より感謝申し上げます。また、本論文のご校閲を頂き、貴重なご意見を賜った江口 充教授、澤田好史教授に謹んで謝意を表します。

本学理事教授 熊井英水博士には長年にわたりご指導、ご鞭撻を賜りました。ここに心から厚く御礼申し上げます。

さらに、本研究を行うにあたり、村田 修博士、本学水産研究所長 升間主計教授、本学水産養殖種苗センター 高岡 治博士、そしてアーマリン近大 達 浩康社長ならびに那須敏郎取締役には多くのご支援と叱咤激励を賜ったこと深く感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、終始多大なご協力とご助言を頂いた本学水産研究所大島実験場の本領智記技術員、本学水産養殖種苗センター大島事業場の河原正人技術員に厚く御礼申し上げます。

また、本研究に関連する親魚養成、採卵、初期飼育および中間育成など一連の作業にあたり、惜しめない御協力を頂いた本学水産養殖種苗センター大島事業場、奄美事業場および浦神事業場の職員並びに大学院生および卒論生の皆様に深く感謝申し上げます。

なお、本研究は農林水産省の委託プロジェクト研究「天然資源に依存しない持続的な養殖生産技術の開発」-3「クロマグロの高品質稚魚の供給技術の開発」として遂行されました。本研究を進めるにあたり、水産研究・教育機

構の虫明敬一博士並びに岡 雅一博士に多大なる御協力を頂きました。ここに心から厚く御礼申し上げます。