

# クロマグロの卵質評価

太田博巳<sup>1\*</sup>, 瀬岡 学<sup>2</sup>, 村田 修<sup>3</sup>

(<sup>1,3</sup>種苗生産・養殖グループ, <sup>2</sup>飼料・食品安全・加工グループ)

<sup>1</sup>近畿大学大学院農学研究科, <sup>2,3</sup>近畿大学水産研究所

\* ohta@nara.kindai.ac.jp

成熟現象を人為的に制御し、安定した種苗生産を確保するための技術開発が多くの養殖魚を対象として行われている。そのためには、まず対象種が自然環境下、飼育環境下で成熟する過程を形態学的、生理・生化学的、分子生物学的に詳細に解析する必要がある。次に、それらのデータを基に、より良質な配偶子を生産できるように飼育環境を整え、そのみで成熟過程が完遂されない場合にはホルモン投与を行って排卵・産卵を導く、という方法が採られる。このプロセスの中で、飼育方法の変化やホルモン投与がどのように配偶子形成、並びに結果として産生される卵や精子の品質に影響を及ぼすかの判定が重要なポイントとなる。

クロマグロの成熟制御方法について検討する場合、親魚が極めて大型でハンドリングに弱く、またその飼育を大型の網生簀で行っていること等を考慮に入れると、飼育魚を捕捉して麻酔をかけ、ホルモン投与等の成熟促進因子を人為的に付与する方法よりも、より自然に成熟、産卵が行われるように飼育環境と飼育方法を改善する方法が適していると考えられる。換言すれば、これらの生体外環境がどのように成熟の進行、並びに産出される配偶子の品質に影響を及ぼすのかを解析し、それを基により良質な配偶子を多量に産出できるように飼育方法を調節していくことがクロマグロの成熟制御に相応しい手法と考えられる。

卵質を比較する手法は、大別すると受精率やふ化率等の稚仔魚の生残度合いや、奇形率や倍数性変異率に代表される健全度を数値化して卵、稚仔魚の品質を直接的に表す指標と、卵の比重や卵内成分等の経験的、あるいは実験的に上記直接指標と高い相関を示すことが明らかとなっている数値

で間接的に示す指標とがある。我々はクロマグロの卵質評価指標として、これまでに直接的指標に当たる倍数体変異の出現率や、間接的指標となる卵内に含まれる親魚由来のホルモンの影響等について技術開発を進めてきた。しかし、種苗生産・養殖の現場でこの卵質評価を行う場合には、可能な限り評価のための作業を省力化し、簡単な道具で正確に測定する必要がある。また、測定した結果が種苗の品質による生産効率を的確に反映する情報であることも重要な要素となる。

新聞と辻が堂<sup>1)</sup>は、カサゴ仔魚の無給餌での生残日数を数値化して、卵質の評価基準とする無給餌生残指数 (survival activity index:SAI) を考案した。彼らは1 Lビーカーに100尾の仔魚を収容し、全ての仔魚が斃死するまで毎日死亡した仔魚をその中から取り上げて計数してSAI値を求め、実際の給餌飼育における仔稚魚の生残率とが相関することを明らかにした。その後シマアジ<sup>2)</sup>やヒラメ<sup>3)</sup>、ウナギ<sup>4)</sup>を用い、ペトリ皿やマイクロプレートによる同様な生残率測定方法が開発されてきた。

クロマグロの種苗生産においては、大型網生簀内で雌雄親魚を確認後直ちにネットで受精卵を回収し、ふ化槽に収容する方法が行われている。<sup>5)</sup> この方法では、受精・発生能力の低い沈下卵<sup>6)</sup>が回収される可能性は低く、全ての産出卵を母数として卵質を評価を下すことは困難となる。従って、受精卵のみを回収し、その品質評価を行うことが残された方法となり、その手法としてこの無給餌生残率を、より簡便に、再現性の高い測定方法として実施するための技術開発を本研究の目的とした。

## 試料および方法

**供試卵と飼育海水** 2004年7月から8月にかけて、近畿大学水産研究所大島実験場並びに奄美実験場において自然産卵したクロマグロの受精卵を、奈良市にある農学部の実験室に陸送、又は空輸し、産卵の翌日までに実験に供した。

人工海水を  $0.2\mu\text{m}$  のフィルターで濾過し、ペニシリンGカリウム、ストレプトマイシン混合溶液を  $10\text{ ml/l}$ 、ポリエチレングリコール6000を  $1\mu\text{g/ml}$  の濃度で溶解し、飼育海水とした。

**マイクロプレートを用いた無給餌生残率の測定** 6穴から96穴の各種マイクロプレートのウェルに上記飼育海水をそれぞれ深さが  $2/3$  を目安として注水し、フタをした。すなわち、6穴プレートでは  $8\text{ ml}$ 、12穴プレートでは  $4\text{ ml}$ 、24穴プレートでは  $2\text{ ml}$ 、48穴プレートでは  $1\text{ ml}$ 、96穴プレートでは  $0.25\text{ ml}$  の海水ををそれぞれ注水した。受精卵はパスツールピペットを用い、各ウェルに1粒ずつ移した。プレート内の海水の蒸発を防ぐため、湿度  $100\%$  に保った  $24^\circ\text{C}$  のインキュベータに収容し、飼育を行った。1日1回実体顕微鏡下でプレート中の生残仔魚数を測定し、それぞれの生残率を算出した。

**ビーカーを用いた無給餌生残率の測定**  $200\text{ ml}$  ビーカーに  $100\text{ ml}$  の飼育海水を入れ、受精卵をパスツールピペットで受精卵を30粒移し、飼育を行った。海水の蒸発を防ぐために、ビーカーはサラップを用いて封をし、 $24^\circ\text{C}$  のインキュベータに収容した。1日1回死亡魚の除去を行い、飼育海水は  $1/3$  を交換した。

**PEG 濃度の検討** 浮上斃死の防除に有効とされるポリエチレングリコール<sup>3, 4)</sup>の添加濃度を検討するため、ペニシリンGカリウム、ストレプトマイシン混合溶液を加えた濾過滅菌海水にPEG6000を  $0\mu\text{g/ml}$ 、 $3.3\mu\text{g/ml}$ 、 $10\mu\text{g/ml}$ 、 $33\mu\text{g/ml}$  の濃度で溶解し、48穴プレートのウェルに  $1\text{ ml}$  ずつ入れ、それに受精卵各1粒を移し、生残日数を測定した。

**最適仔魚密度の検討** 48穴プレートのウェルに飼育海水を  $1\text{ ml}$  ずつ入れ、一つのウェルにそれぞれ1個、2個、4個、8個ずつ受精卵を移し、生残日数を測定した。

## 結果および考察

**マイクロプレートの大きさ と 生残率** 対照としたビーカーの集団飼育による平均生残率の推移をFig. 1に示した。ふ化後5日目までは高い生残率を維持したが、6日目になると著しい低下が認められ、7日目にはほぼ全ての仔魚の死亡が確認された。

種々の大きさのマイクロプレートで飼育した場合の生残率は、その傾向はやや異なるものの、ふ化後6日目の生残率は  $50\%$  を維持し、7日目でも  $45\%$  を示した(Fig. 1)。しかし、8日目には全てのプレートにおいて全尾が死亡した。プレート別にみると、1日目において6穴プレートで有意な生残率の低下が認められたが、この6穴プレートではその後の生残率の低下は他のプレートよりもむしろ緩やかに推移した。一方、ウェルの容量の小さい48穴と96穴では、2日目に急激な低下を示し、12穴、24穴に比べて有意に低い値となった。これらの結果から、クロマグロの無給餌生残率の測定には、生残が長く維持され、また急激な生残率の低下も起こらなかった12穴、24穴のマイクロプレートの使用が適していると思われた。

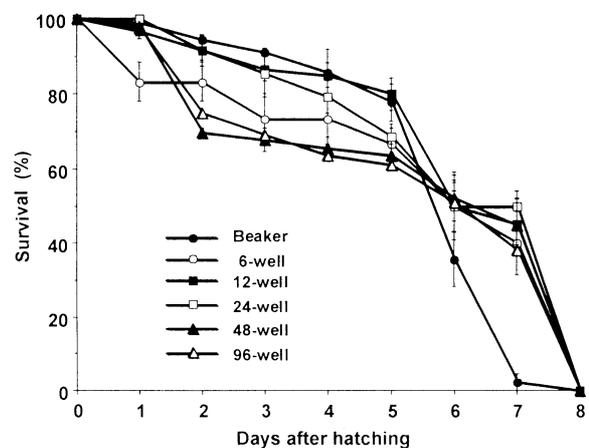


Fig. 1 Comparison of the survival profiles of tuna larvae in the beaker with those in the microplates.

**クロマグロの最適 PEG 濃度** 各PEG濃度の飼育海水のふ化後経過日数に伴う平均生残率の推移を Fig. 2 に示した。ふ化してから、全ての仔魚が死亡するふ化後 8 日目まで 0  $\mu$ g/ml の生残率が高い傾向を示し、全ての濃度において著しい生残率の差はみられなかった。

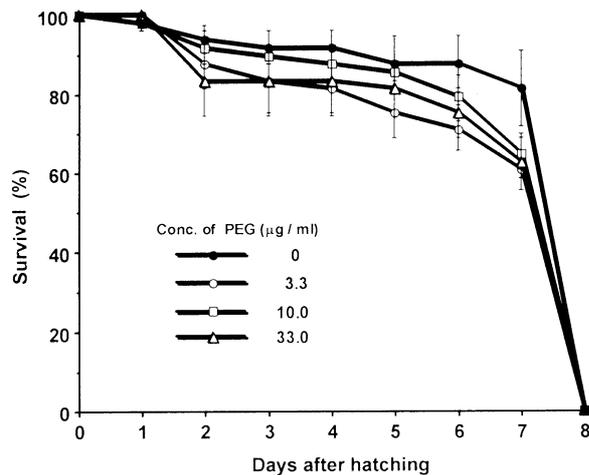


Fig. 2 Effects of addition of polyethylene glycol (PEG6,000) on survival rate of tuna larvae.

**プレート中の最適密度** プレートのウェル中の各密度で飼育した仔魚のふ化後経過日数に伴う平均生残率の推移は、Fig. 3 に示した。

ふ化後 2 日目の生残率は 1 尾/well, 2 尾/well に比べ、4 尾/well, 8 尾/well で有意に低下した。

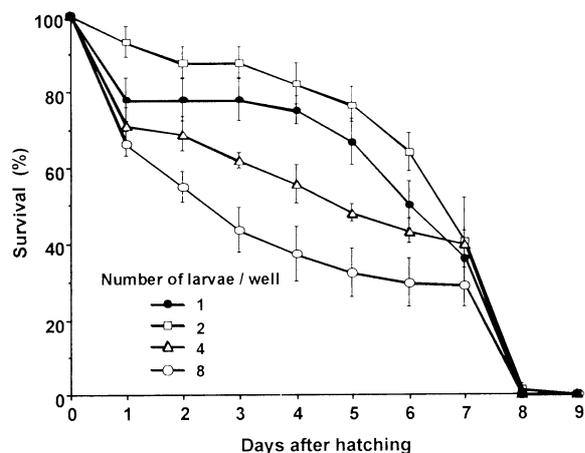


Fig. 3 Effects of the density in one microplate well (48-well) on the survival rate of tuna larvae.

よる個体別の飼育方法では、これまで無給餌生残率の測定方法として用いられてきたビーカーによる集団飼育方法に比べて、生残日数で 1-2 日長く、また死亡仔魚の取り上げや飼育水等の交換が不要であることなど、多くの利点を備えていることが明らかとなった。マイクロプレートに比べてビーカー内では生残日数が短くなる要因についてはさらに詳細な検討が必要であるが、Fig. 3 に示したように、マイクロプレートにおいてもウェル内の個体数を増やすことにより顕著に生残日数が低下することから、個体密度の増加に伴うストレスや運動活性の変化、水質の悪化等の影響や、飼育水の交換時の物理的ストレスがその原因の一つと考えられる。

クロマグロの発育初期の主要な減耗要因として、飼育水槽の水面にふ化仔魚がトラップされて死亡する浮上斃死が問題となっている。<sup>7)</sup>この現象は、これまでにキジハタ、<sup>8)</sup>ハガツオ、<sup>9)</sup>ヒラメ<sup>3)</sup>等、多くの海産魚の発育初期における減耗要因として指摘されてきた。この浮上斃死の防除方法として、飼育水槽へのオイルや卵白、タンパク質、そしてポリエチレングリコール等の表面活性物質の飼育海水への添加が有効であることが報告されている。<sup>3, 4, 8, 9)</sup>本研究では、このような観点から、ウェル中での生残率に及ぼす PEG6000 の影響を 3 段階の濃度によって検討したが、無添加を含め、浮上斃死を確認することができず、生残率にも顕著な差異は認められなかった。少なくとも、マイクロプレートによる無給餌生残率の測定時には、PEG の添加は必要のないことが明らかとなった。今回の実験では 48 穴のマイクロプレートを用い、大量飼育時に必要な飼育水への酸素供給を行っていない。今後さらに飼育容積の大きさや飼育密度、酸素供給量等と浮上斃死の出現率との相関を検討することにより、初期減耗の防除方法の開発にもつながるものと思われる。

## 文 献

以上のように、今回用いたマイクロプレートに

1) 新間脩子・辻ヶ堂 謙. カサゴ親魚の生化学的性状

- と仔魚の活力について. 養殖研報 1981; 2:11-20.
- 2) 虫明敬一・関谷幸生. シマアジふ化仔魚の活力判定の試み. 水産増殖 1993; 41:155-160.
- 3) Tagawa M, Kaji T, Kinoshita M, Tanaka M. Effect of stocking density and addition of proteins on larval survival in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture 2004; 230: 517-525.
- 4) Unuma T, Kondo S, Tanaka H, Kagawa H, Nomura K, Ohta H. Determination of the rates of fertilization, hatching and larval survival in the Japanese eel, *Anguilla japonica*, using tissue culture microplates. Aquaculture 2004; 241: 345-356.
- 5) 宮下 盛. 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 2002; 8:1-171.
- 6) Unuma T, Kondo S, Tanaka H, Kagawa H, Nomura K, Ohta H. Relationship between egg specific gravity and egg quality in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Aquaculture (in press).
- 7) 澤田好史. クロマグロの完全養殖. 海洋理工学会誌 (印刷中).
- 8) Yamaoka K, Nanbu T, Miyagawa M, Isshiki T, Kusaka. Water surface tension-related deaths in prelarval red-spotted grouper. Aquaculture 2000;189: 165-176.
- 9) Kaji T, Kodama M, Arai H, Tanaka M, Tagawa M. Prevention of surface death of marine fish larvae by the addition of egg white into rearing water. Aquaculture 2003 ; 224: 313-322.