

養殖魚の形態異常防除に関する研究

服部 学, 澤田好史 *

(種苗生産・養殖グループ)

近畿大学水産研究所

* YoshifumiSawada@za.ztv.ne.jp

現在の海産魚類養殖は、近年の生産技術の向上により、量産化の追求から生産効率の向上や品質改良による優良種苗の開発にシフトさせてきた。しかしながら、少なからず形態異常が発生し、生産効率や販売価格の低下を招いている。近畿大学水産研究所にて生産されたマダイ種苗において、形態異常の発生率は毎年1割以上に達し、特に、脊椎骨癒合（椎体欠損）による短軀症は最も高率に発生している。²⁾椎体欠損とは、1つの椎体に複数の神経棘および血管棘が不随する異常な脊椎骨を有する症状であり、ヒラメおよびニジマスなどマダイ以外の養殖用種苗やウグイおよびフナなど天然環境下においても数多くの魚種で報告されている。^{3,4)}現在までにこの症状の原因として、仔魚期や稚魚期のビタミンA過剰や細菌感染などが報告されている。^{3,4)}しかしながら、これらの報告における誘発条件は、現状の種苗生産方法の範囲を大きく越えており、実際の生産現場において、それらの知見を応用することは困難である。そこで、従来から形態異常の原因の1つとして危惧されている環境要因、特に低酸素について着目した。

本研究では、種苗生産過程において発生する椎体欠損を防止することを目的とし、まず、マダイ卵を低酸素海水に暴露し、椎体欠損を誘導する胚発生段階やDOおよび暴露時間について検討した。また、マダイ卵の酸素消費量および浮上卵による密集層内の溶存酸素濃度（DO）を測定し、種苗生産過程で起こりえる低酸素状態を想定するとともに、その防除に向けた生産方法の検討を行った。さらに、上記の実験で得られた知見を元に、カンパチ卵における低酸素暴露の影響を検証し、他魚種での防除効果について検討した。

試料および方法

胚発育段階 椎体欠損を引き起こす胚発生段階を明らかにするため、マダイ受精卵を、DO 100%以上の海水にて培養し、異なる5つの発育段階（胞胚期、囊胚期、3体節形成期、11体節形成期および18体節形成期）に達した時点で、窒素ガスの通気によってDO約10%に調節した海水へ6時間暴露した。その後、再びDO 100%以上の海水で培養し、脊椎骨の骨化が完了する日令40まで、500L円形水槽で継続飼育した。

孵化仔魚において、各発育段階に低酸素暴露を行った実験区および対照区の孵化率を測定するとともに、体節の分節異常（分節異常）の発生率および発生部位を調査した。稚魚において、軟X線フィルム画像により、椎体欠損の発生率および発生部位を調査するとともに、脊椎骨外部形状および椎体内部構造をより詳細に観察するため、軟骨・硬骨二重染色を施した透明骨格標本およびHE染色による硬組織切片を作製した。

溶存酸素濃度と暴露時間 椎体欠損を誘導するDOと暴露時間を明らかにするため、自然産卵より得られたマダイ受精卵をDO 100%以上の海水で培養し、10体節が形成した時点で、窒素ガスを通気して6段階のDO(0, 10, 25, 50, 75, 100%)に調節した海水に7段階(5, 10, 30, 60, 120, 240, 360分)の時間、合計42通りの条件で暴露を行った。その後、再びDO100%以上の海水にて孵化まで培養し、孵化率、分節異常率および分節異常数を測定した。

胚発生期の酸素消費量 マダイ胚発生期における酸素消費量を明らかにするため、6-8体節形

成期で測定を行った。得られた結果は、水温と海水の酸素飽和量との関係表²⁾およびガス濃度諸単位間の換算表³⁾をもとに卵1粒または仔魚1尾あたりの酸素消費量($\mu\text{l}/\text{ind}/\text{min}$)を算出した。また、浮上卵による密集層内のDOの変化を明らかにするため、500 ml ビーカーに約16万粒(浮上卵の密集層が約1.8 cm)の体節形成期のマダイ受精卵を入れ30秒毎に測定した。

他魚種への応用 カンパチ卵における低酸素の骨形成への影響を明らかにするため、まず、DOおよび暴露時間の検討を行った。自然産卵より得られたカンパチ受精卵を7体節が形成した時点で、5段階のDO(0, 12.5, 25, 50, 100%)に調節した海水に6段階(0.5, 1, 2, 3, 4, 5時間)の時間、合計30通りの条件で暴露を行った。次いで、胚発生段階の検討では、自然産卵より得られたカンパチ受精卵を、異なる5つの発育段階(囊胚期, 1-2体節形成期, 10体節形成期, 15体節形成期および心臓拍動期)に達した時点で、DO約12.5%に調節した海水へ2時間暴露した。その後、脊椎骨の骨化が完了する日令35まで、500L円形水槽で飼育した。分析項目、測定方法および飼育方法は上記のマダイの方法に準じて行った。

結果および考察

胚発育段階 孵化仔魚において、体節形成期

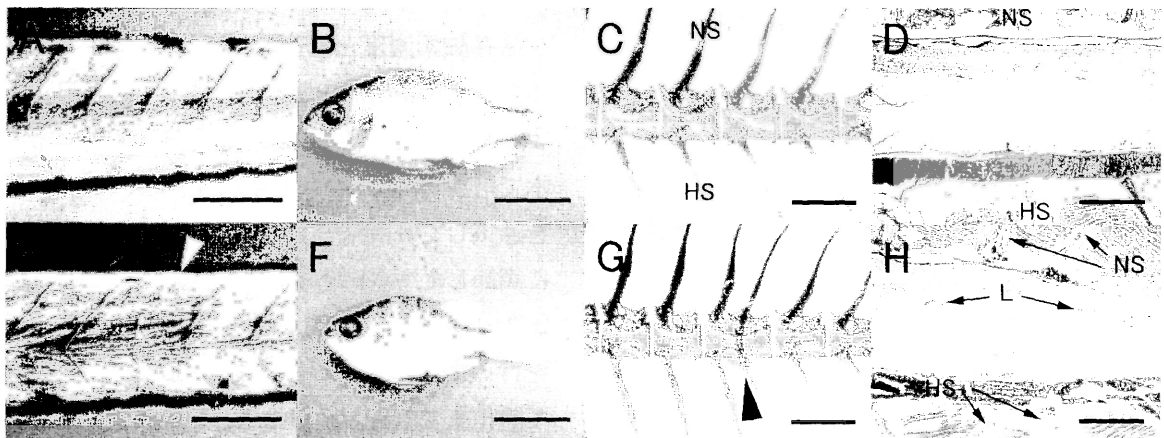


Fig. 1 Results of exposing to hypoxia in red sea bream, *Pagrus major*. A to D: Normal specimens, E to H: Abnormal specimens by exposing to hypoxia. E, F, G and H: Examples of somitic disturbance, external appearance of juvenile, Transparent skeletal specimen of vertebrae using double stain technique, and Sagittal section with HE stain. NS: neural spine, HS: heamal spine, L: ligament. Arrow head shows the abnormal somite and vertebrae. Bar in A and E, B and F, C and G, and D and H indicates 30 μ , 1 cm, 1 mm, and 0.5 mm respectively.

(3, 11および18体節形成期)に低酸素暴露を行った実験区のみで、高率に分節異常が見られ、その発生率は69.9~91.4%であった(Fig. 1E)。しかしながら、その他の実験区(胞胚期, 囊胚期)および対照区においては1.7%と低率であった。

40日間飼育した稚魚において、体節形成期に低酸素暴露を行った実験区の稚魚の外部形態は、その他の実験区および対照区に比べ体高が高く、躯間長が短いといった短軀症状を呈した(Fig. 1F)。これらの個体は異常な脊椎骨が高率に観察され、その発生率は58~100%であった(Fig. 1G)。これら誘導された異常な脊椎骨は、1つの椎体に複数対の神経棘と血管棘が付随しており、症状が重くなるほど椎体の数が減少したが、神経棘および血管棘の減少はみられなかった。また、外部形状は複雑であるが、これら異常椎体の内部構造は、正常椎体と同様に鼓型をしており、靭帯や骨組織の不連続面はみられず、基本的な構造には差はみられなかった(Fig. 1D, H)。

以上の結果は、これまでの種苗生産で発生している椎体欠損の特徴と一致しており、²⁾マダイにおける椎体欠損の原因の1つは、体節形成期の酸素不足であることが明らかとなった。また本実験において、仔魚における分節異常および稚魚における椎体欠損の発生部位には有意に相関がみられ($p < 0.05$)、分節異常は椎体欠損の前駆症状であると示唆された(Fig. 2)。

溶存酸素濃度と暴露時間 椎体欠損の原因は、体節形成期の酸素不足であることが明らかとなった。しかしながら、実際の種苗生産で椎体欠損を防止するためには、椎体欠損を誘導する条件を明確にする必要があり、その結果を Fig. 3 に示した。

DO 25%以上で暴露した区では、暴露時間に関わらず分節異常は生じなかったが、DO 0 および 10%で暴露した区では分節異常が生じた。暴露 DO が 0%の場合は、暴露時間 10 分から 60 分では分節異常が数%発生し、120 分以上の暴露時間では分節異常は急激に増加し 100%の発生率となった。処理 DO が 10%の場合は、処理時間 10 分から 60 分までは体節異常は発生せず、120 分以上で 100%発生した。この結果から、暴露 DO および暴露時間によって分節異常の発生状況は異なり、暴露 DO が 10%以下で分節異常が発生し、より低い DO であるほど短時間で分節異常が発生す

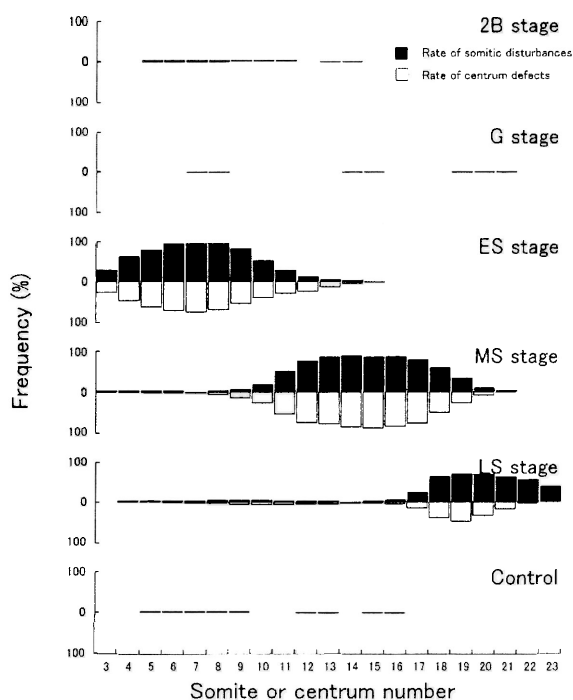


Fig. 2 The frequency distribution of somitic disturbances and centrum defects in red sea bream larvae and juveniles from 3rd to 23rd somite. 2B stage, G stage, ES stage, MS stage, and LS stage were the period exposed to hypoxia from the two cell stage to blastula stage, gastrula stage, three to three to 10 somites stage, 11 to 17 somites stage, and 18 to 24 somites stage, respectively. A significant correlation was found between the location of somitic disturbances in newly hatched larvae and that of centrum defects in juveniles (Spearman's rank correlation test, $p < 0.05$).

ることが明らかとなった。また分節異常は椎体欠損の前駆症状であることから、DO が 0%の場合、短時間で椎体欠損が発生することが示唆された。

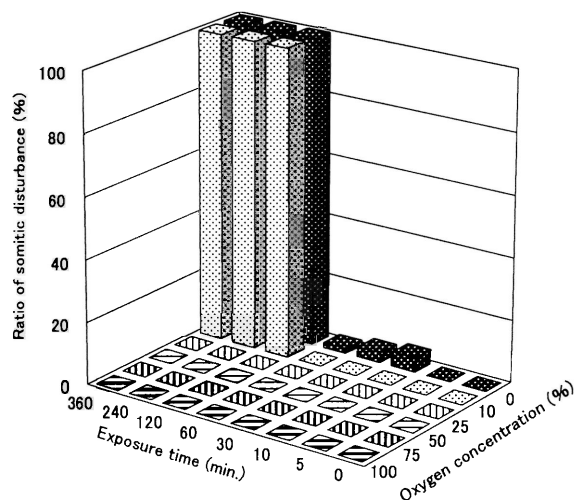


Fig. 3 Incidence rate of somitic disturbance induced by exposing to total of 42 conditions.

胚発生期の酸素消費量 卵培養環境が 0%の場合、短時間で分節異常が発生し、椎体欠損が発生することが示唆された。本実験では、実際の種苗生産で上記のような低酸素状態が起こりえるのか、まず、卵の密集時における DO の変化を調査した。その結果、測定開始後 60 秒後、一部の受精卵が浮上層を形成した。さらに 90 秒後ではその多くが浮上し、120 秒後には、そのほとんどが浮上して受精卵による密集層が形成された。密集層が形成すると同時に、DO は急激に低下し、測定開始後約 7 分では DO は約 3%となった。この結果から、マダイの受精卵はわずかな時間で密集層を形成し、密集層の酸素濃度は急激に低下することが明らかとなった(Fig. 4)。

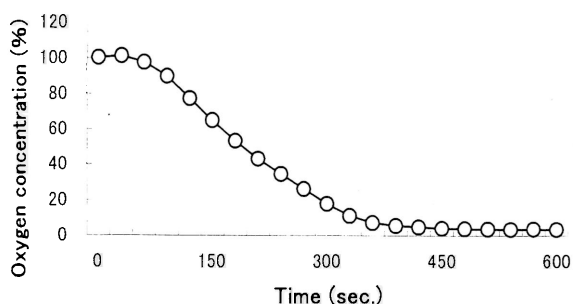


Fig. 4. Dissolved oxygen concentration in high density layer of floating eggs.

Table 1. The incidence of deformities in the red sea bream, *Pagrus major*, seedlings produced for 5 years from 1999 to 2003 at the Fisheries Laboratory Ohshima Experimental Station Kinki University.

The category of triage	1999	2000	2001	2002	2003
Normal	90.90	80.49	91.93	90.83	94.0
Shortened body condition	4.34	7.25	3.54	7.00	0.62
Deformity of frontal region	0.14	3.74	2.52	0.06	0.24
Deformity of dorsolateral region	0.02	0.68	0.46	0.30	0.14
Twist of jaw	0.23	0.57	0.14	0.13	0.24
Pagheadness	0.79	0.16	0.00	0.13	0.05
Scoliosis	0.05	0.30	0.23	0.56	0.05
Lordosis	0.75	0.00	0.00	0.18	0.00
Other morphological deformities	1.62	5.91	1.05	0.39	3.35
Abnormal coloration	0.54	0.48	0.00	0.06	0.08
Seedling with external injury	0.63	0.42	0.14	0.37	1.12
<i>n</i> (number of production lot)	5211 (3)	4353 (2)	3378 (2)	3260 (3)	3080

一方、6・8 体節形成期におけるマダイ卵 1 粒あたりの酸素消費量は、 3.7×10^{-4} $\mu\text{l}/\text{ind}/\text{min}$. であった。この数値をもとに、密集層内の DO の推移を試算すると、約 9 分で間隙水の DO は 0% となり、上記の結果とおよそ一致する。

これらの結果を考慮し、実生産において椎体欠損の原因が低酸素であるとする以下が推測される。受精卵の浮上卵と沈下卵の分離や輸送の際、受精卵は密集層を形成する。その密集層における溶存酸素濃度は 5~10 分間で急激に低下する。この低酸素濃度の状態が 10 分以上維持され椎体欠損が発生する。したがって、種苗生産において、以下のことについて提案することができる。

卵輸送においては、エアレーション等で攪拌し、浮上卵による密集層をつくらないこと。また、浮上卵と沈下卵の分離においては、分離時間を短くし、仮に必要な場合、卵輸送と同様に浮上卵による密集層をつくらないこと。

このような防止策を講ずることにより、効果的に椎体欠損による短軀症の発生を減らすことができ、生産効率の向上につながるものと考えられ、2003 年度のマダイ種苗生産においては、椎体欠損による短軀症の発生は劇的に減少した (Table 1)。

他魚種への応用 誘導条件試験において、12.5%の暴露区のみで分節異常が見られ、暴露時間に比例して分節異常率および数ともに増加し、その発生率は 2 時間以上の暴露条件でほぼ 100% となった。飼育試験において、分節異常は体節形成期に暴露した試験区のみで確認され、囊胚期暴露区では全く確認されず、心臓拍動期暴露区では

暴露後 10 分以内にすべての卵が死亡した。分節異常がみられた試験区では、仔魚における分節異常の部位と稚魚における椎体欠損の部位がほぼ一致し、その異常椎体の内部構造において不連続面や靭帯はみられなかった。これらの結果から、カンパチの胚発生期の酸素不足は椎体欠損を誘導することが明らかとなり、マダイ以外の魚種での防除効果も期待できることが示唆された。

文 献

- 1) 熊井英水, 澤田好史. 海産魚類養殖業の現状と課題. 「最新海産魚の養殖」(熊井英水編著) 湊文社, 東京. 2000 ; 1-16.
- 2) Hattori H, Sawada Y, Takagi R, Suzuki T, Okada T, Kumai H. Vertebral deformities in cultured red sea bream, *Pagrus major*; Temminck and Schlegel. *Aquaculture Res.* 2003; **34**: 1129-1137.
- 3) Haga, T, Takeuchi T and Seikai T. Influence of all-trans retinoic acid on pigmentation and skeletal formation in larval Japanese flounder. *Fish. Sci.* 2002; **68**: 560-570.
- 4) Madsen, L, Arnbjerg J and Dalsgaard I. Radiological examination of the spinal column in farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): experiments with *Flavobacterium psychrophilum* and oxytetracycline. *Aquaculture Res.* 2001; **32**: 235-241.
- 5) Komada, N. Vertebral anomalies in the cyprinid fish, *Tribolodon hakonensis*. *Japan. J. Ichthyol.* 1982; **29**: 185-192.
- 6) 土屋 実, 野村 博. 荒川下流域に出現した奇形魚について-II. 埼玉水試研報. 1973 ; **35** : 55-99.
- 7) Dejours P. Principle of comparative respiratory physiology. 2nd rev. ed., Elsevier/ North Holland Biomedical Press. Amsterdam. 1981; 265.
- 8) 板沢靖男. 呼吸. 「魚類生理学」(板沢靖男・羽生 功編) 厚生社厚生閣. 東京. 1991 ; 2.