

海水養殖魚のアスコルビン酸 要求に関する研究*

石 橋 泰 典**

Studies on the Ascorbic Acid Requirements of
Cultivated Marine Fish

Yasunori ISHIBASHI

目 次

緒 論	7
第 I 章 栄養要求試験用精製飼料の基本組成の設定	9
第 1 節 試験飼料におけるタンパク質の至適含有量	
1. 実験方法	
(1) 供試魚と飼育条件	
(2) 飼料組成と投餌法	
(3) 測定項目と方法	
2. 実験結果	10
(1) 増重率, 飼料効率およびタンパク質効率と 飼料タンパク質含量との関係	
(2) 体タンパク質蓄積率と飼料タンパク質含量との関係	
(3) 全魚体の一般成分組成と飼料タンパク質含量との関係	
3. 考察	12

* 本論文は近畿大学審査学位論文である。

** 近畿大学農学部水産学科 (Department of Fisheries, Faculty of
Agriculture, Kinki University, Nakamachi, Nara 631, Japan)

第2節	試験飼料における脂質の至適含有量	13
1.	実験方法	
2.	実験結果	13
	(1) 増重率と飼料脂質含量との関係	
	(2) 全魚体の一般成分組成と飼料脂質含量との関係	
	(3) 体脂質蓄積率と飼料脂質含量との関係	
3.	考察	14
第3節	試験飼料におけるミネラル混合物の至適含有量	15
1.	実験方法	
2.	実験結果および考察	15
	(1) 増重率, 飼料効率およびタンパク質効率と 飼料ミネラル混合物含量との関係	
	(2) 全魚体の一般成分組成と飼料ミネラル混合物含量との関係	
第4節	試験飼料におけるビタミン混合物の至適含有量	17
1.	実験方法	
2.	実験結果および考察	18
	(1) 増重率, 飼料効率およびタンパク質効率と 飼料ビタミン混合物含量との関係	
	(2) 全魚体の一般成分組成と飼料ビタミン混合物含量との関係	
第II章	インダイ稚魚における水溶性ビタミンの要求性	20
1.	実験方法	
	(1) 供試魚と飼育条件	
	(2) 飼料組成と投餌法	
	(3) 測定項目と方法	
2.	実験結果	21
	(1) 成長, へい死率および欠乏症に及ぼす各ビタミン欠乏の影響	
	(2) 相対増重率に及ぼす各ビタミン欠乏の影響	
	(3) 血液性状および比肝重に及ぼす各ビタミン欠乏の影響	
3.	考察	27

第Ⅲ章	イシダイ稚魚のアスコルビン酸要求量	30
第1節	環境変動の小さい飼育条件下におけるアスコルビン酸要求量	
1.	実験方法	
(1)	供試魚と飼育条件	
(2)	飼料組成と投餌法	
(3)	測定項目と方法	
2.	実験結果	31
(1)	増重率, 飼料効率, 欠乏症およびへい死率	
(2)	血液性状, 血漿化学成分含量および比肝重	
(3)	各組織のアスコルビン酸濃度	
3.	考察	33
第2節	環境変動の大きい飼育条件下におけるアスコルビン酸要求量	34
1.	実験方法	
(1)	供試魚と飼育条件	
(2)	測定項目と方法	
2.	実験結果	36
(1)	増重率, 欠乏症およびへい死率	
(2)	血液性状および比肝重	
(3)	肝臓のアスコルビン酸濃度	
3.	考察	37
第Ⅳ章	海水養殖魚の環境ストレス耐性に及ぼす飼料アスコルビン酸 投与の効果	39
第1節	急性低酸素ストレスの負荷に伴う呼吸数, 横転率, 血液性状等の変動	
1.	実験方法	
(1)	供試魚と飼育条件	
(2)	低酸素ストレス負荷の方法	
(3)	測定項目と方法	

2.	実験結果	42
	(1) 鰓蓋運動数および横転率	
	(2) 血液性状	
	(3) 血漿グルコース量	
	(4) 血液のアスコルビン酸濃度	
3.	考察	44
第2節	急性低酸素ストレス耐性に及ぼす飼料アスコルビン酸 投与の効果	45
1.	イシダイ1才魚を供試魚とした場合	
	(1) 実験方法	
	a. 供試魚と飼育条件	
	b. 低酸素ストレス負荷の方法	
	(2) 実験結果	46
2.	イシガキダイ1才魚を供試魚とした場合	47
	(1) 実験方法	
	(2) 実験結果	48
3.	イシダイ稚魚を供試魚とした場合	48
	(1) 実験方法	
	a. 供試魚と飼育条件	
	b. 低酸素ストレス負荷の方法	
	(2) 実験結果	49
	a. 累積横転率	
	b. 累積へい死率	
4.	考察	50
第3節	断続的低酸素ストレス耐性に及ぼす飼料アスコルビン酸 投与の効果	52
1.	実験方法	
	(1) 供試魚と飼育条件	
	(2) 飼料組成と投餌法	
	(3) 断続的低酸素ストレス負荷の方法	
	(4) 測定項目と方法	

2.	実験結果	54
	(1) 横転率	
	(2) 増重率, 飼料効率, 欠乏症, へい死率および肥満度	
	(3) 血液性状, 血漿化学成分含量および比肝重	
	(4) 血漿および各組織のアスコルビン酸濃度	
3.	考察	57
第4節	低酸素ストレス負荷に対する生理的変動パターン	59
1.	実験方法	
	(1) 供試魚と低酸素ストレス負荷の方法	
	(2) 測定項目と方法	
2.	実験結果および考察	60
	(1) 鰓蓋運動数および横転率	
	(2) 血液性状	
	(3) 血漿化学成分含量	
	(4) 各組織および血漿のアスコルビン酸濃度	
第5節	低酸素ストレス負荷時の代謝変動に及ぼす飼料アスコルビン酸 投与の影響	65
1.	実験方法	
2.	実験結果	
3.	考察	66
第V章	親魚の成熟, 産卵および卵質に及ぼす飼料アスコルビン酸 投与の効果	68
第1節	生殖腺成熟に及ぼす飼料アスコルビン酸投与の効果	
1.	実験方法	
	(1) 供試魚と飼育条件	
	(2) 測定項目と方法	
2.	実験結果	69
	(1) 増重率, 飼料効率, 欠乏症およびへい死率	
	(2) 生殖腺指数, 比肝重および内臓重量比率	
	(3) 生殖腺組織像	

(4) 各組織のアスコルビン酸濃度	
(5) 血漿化学成分含量	
3. 考察	72
第2節 産卵および卵質に及ぼす飼料アスコルビン酸投与の効果	74
1. 実験方法	
(1) 供試魚と飼育条件	
(2) 飼料組成と投餌法	
(3) 測定項目と方法	
2. 実験結果	75
(1) 産卵成績	
(2) 飼育水温別産卵成績	
(3) 卵の一般成分組成およびアスコルビン酸濃度	
3. 考察	78
第3節 孵化仔魚の生残率に及ぼす飼料アスコルビン酸投与の効果	78
1. 実験方法	
(1) 供試卵と飼育条件	
(2) 測定項目と方法	
2. 実験結果	79
(1) 卵および仔魚の生残率	
(2) 卵および仔魚の酸化型および還元型アスコルビン酸濃度	
3. 考察	80
要約	82
Summary	85
謝辞	88
文献	89

緒 論

近年、魚類の増養殖が盛んになるにつれて、健全な魚の養成を目的とした養殖魚のビタミン要求に関する研究が多く研究者によって行われるようになった。¹⁾

ビタミンC (アスコルビン酸, AsA) は結合組織コラーゲンの生合成に必須であるため,²⁾ ヒト, サル, モルモットなど AsA 生合成能をもたない動物では AsA 欠乏症として壊血病を発現することは古くからよく知られている。魚類もその多くは AsA を生合成できないので, 養魚飼料には AsA を添加しなければならない。³⁾

魚類における AsA 欠乏症としては食欲減退, 成長停止を始め, 脊椎前わん, 脊椎側わん, 骨折, 脱臼, 鰭や顎部の出血, 鰓蓋不全などの症状が報告されている。⁴⁻¹⁶⁾ しかし, このような欠乏症の発現を予防し得る AsA の要求量は魚種によって異なるばかりでなく,¹⁷⁾ たとえ同じ魚種においても成長段階¹⁸⁾ や魚の生理状態, 環境水の物理的, 化学的, および微生物学的条件によって異なることが¹⁹⁻²¹⁾ 魚類養殖の現場においては経験的によく知られている。

哺乳類では, 年令,²²⁾ 各種ストレス,²³⁻²⁶⁾ 生体異物の摂取,²⁷⁻³⁰⁾ 妊娠³¹⁾ など種々の条件によって AsA 要求量は変動することが報告されている。また, AsA は活性酸素の消去,^{32, 33)} 免疫能の増強,³⁴⁾ ヒスタミンの除去,³⁵⁾ コレステロールの代謝,²⁹⁾ カルニチンの合成,³⁶⁾ カテコラミンの合成³⁷⁾ など様々な生理作用を有することが知られている。一方, 魚類についても主としてニジマスなどの淡水魚を試料魚として, AsA の投与は傷の治癒を早める,^{18, 38)} 鉄の吸収を促進することによって, 貧血を防止する,⁶⁾ 重金属や農薬などによる障害を予防する,^{2, 39)} 病原菌に対する免疫能を増大する^{2, 40-42)} などの生理作用を有することが報告されている。しかし, 我が国における養殖対象魚の中で重要な位置を占める海水養殖魚の AsA 要求に関する研究はまだ著しく少ない。⁴³⁻⁴⁷⁾

海水養殖魚の大部分は, 親魚の産卵期および仔魚期を除いて, 海上の網いけすで飼育されるため環境を人為的に制御することが難しく, 病原菌も含め海水の溶存酸素量, 水温, 塩分など環境諸要因の変動を常にストレスとして受けている。これらの環境ストレスに対する養殖魚の耐性に飼料 AsA の投与がどのように影響するかを知ることは興味ある課題である。

また, AsA はステロイドホルモンの生合成に関与するので,^{48, 49)} 親魚における生殖腺の成熟に重要な役割を果たすものと考えられる。さらに, AsA はコラーゲンの生合成に必須であるから海水養殖魚の種苗生産における孵化仔魚の正常な発育に関与する可能性が大きい。

以上の観点から, 本研究では, 海水養殖魚の中で生殖期までの一世代サイクルが短いため各成長段階における試料魚が入手しやすいインダイを主として用い, 魚の飼育環境および生理状

態の異なる種々の条件下で飼育した場合における AsA の要求性を詳細に検討した。

第 I 章では、まず栄養要求試験用精製飼料の基本組成を設定するために、イシダイを試料魚として、タンパク質、脂質、ビタミン混合物およびミネラル混合物それぞれの至適含量に関する検討を行った。

第 II 章では、第 I 章の結果から得られた基本組成の精製試験飼料を用いて、イシダイ稚魚における各種水溶性ビタミンの要求性を検討して、成長および健康に必要な水溶性ビタミンを要求性の高いものから要求性の低いものまで順にグループ分けすることを試みた。

第 III 章では、イシダイ稚魚を試料魚として、AsA 要求量を、飼育環境の変動を人為的に調節して可能な限り小さくした場合と調節しなかった場合について比較し、AsA 要求量に及ぼす環境諸要因の変動の影響を検討した。

第 IV 章では、AsA 含量の異なる各区飼料で一定期間飼育したイシダイおよびイシガキダイを試料魚として、まず環境水溶存酸素濃度の急激な低下に対する魚の耐性に及ぼす AsA 投与の効果を調べた。さらに、養殖現場の実状を想定し、このような低酸素ストレスが16週間に亘って断続的に負荷されたときの AsA 要求量を対照魚のそれと比較するとともに、この低酸素ストレス負荷時の魚の生理的適応すなわちストレス反応の様相を調べ、AsA の作用機作を推論した。

第 V 章では、イシダイの 1 才魚および15才魚を試料魚として、海水養殖魚種苗生産の成否を左右する親魚の成熟、産卵および卵質に及ぼす飼料 AsA 投与の効果を調べた。

第 I 章 栄養要求試験用精製飼料の基本組成の設定

海水養殖魚の栄養要求試験用精製飼料の基本組成を設定するために、イシダイを試料魚として、カゼインをタンパク質源、スケソウダラ肝油を脂質源としたときの、それぞれの至適含量、並びに飼料に添加するビタミン混合物およびミネラル混合物それぞれの至適含量について検討した。

各至適含量の判定に当たっては、魚の成長に主眼をおいた増重率、飼料効率、およびタンパク質効率のほかに、タンパク質および脂質の体内蓄積率、並びに全魚体の一般成分組成を測定し、これらの指標から経済性や魚肉品質など実用的な観点をもふまえて考察することとした。

I - 1. 試験飼料におけるタンパク質の至適含有量⁵⁰⁾

I - 1 - 1. 実験方法

(1) 供試魚と飼育条件

本学水産研究所種苗センターで生産したふ化後約70日目のイシダイ稚魚35尾ずつをそれぞれ500 l 円形パンライト水槽（実容400l）に収容し、流水式（12l/min）で9月から10月にかけて各区実験飼料（Table I - 1）を40日間投与した。その間の水温は21～27℃，溶存酸素量（DO）は3.0～5.0ml/lであった。実験飼料投与開始時の各区の魚の平均体重は6.1～6.3gであったが、それまでにカゼイン飼料に対する馴致と各区の魚の大きさや健康状態を平均させるために供試魚数の約2倍の魚について2週間の予備飼育を行った。

(2) 飼料組成と投餌法

試験区とその飼料組成はTable 1 - 1に示した通りである。飼料No. 1～7はタンパク質源としてのビタミンフリーカゼインを30～70%含むように設定した。使用したカゼインの粗タンパク質含量はケールダール法⁵¹⁾で定量したところ94.4%であった。脂質源としては精製スケソウダラ肝油を、糖質源としてはデキストリンを用いた。ミネラル混合物の組成は、Coweyら⁵²⁾が plaice の試験飼料に用いたものを、ビタミン混合物の組成は Halver のマス用試験飼料H - 440¹⁾を、それぞれ基準としいくらか修正を加えたものとした。なお、カゼイン飼料に対する嗜好性の向上を主な目的としてアミノ酸混合物を添加した。その組成は米⁵³⁾がマダイ用のカゼイン試験飼料に添加したアミノ酸混合物のそれに準拠したが、試験飼料に対するイシダイの嗜好性は極めて良好であった。粘結剤としては金沢ら⁵⁴⁾のトラフグ用試験飼料を参考にして寒天を用いた。

飼料の pH はいずれも調餌のときに1～3%水酸化ナトリウム溶液を加え6.9となるように

Table I -1. Composition (%) of the test diets

Ingredient	Diet No.						
	1	2	3	4	5	6	7
Casein* ¹	30	40	45	50	55	60	70
Dextrin	43	33	28	23	18	13	3
Pollack liver oil	5	5	5	5	5	5	5
Minerals* ²	4	4	4	4	4	4	4
Vitamins* ³	3	3	3	3	3	3	3
Amino acids* ⁴	7	7	7	7	7	7	7
Cellulose	5	5	5	5	5	5	5
Agar	3	3	3	3	3	3	3

*¹ Vitamin free casein: crude protein 94.4%

*² Minerals (mg/100g dry diet): Ca(H₂PO₄)₂·H₂O, 533; Ca lactate, 1333; Fe citrate, 133; MgSO₄·7H₂O, 533; K₂HPO₄, 933; NaH₂PO₄·H₂O, 333; AlCl₃·6H₂O, 27; ZnCl₂, 80; CuSO₄·5H₂O, 40; KI, 27; MnSO₄·4H₂O, 27.

*³ Vitamins (mg/100g dry diet): thiamin·HCl, 10; riboflavin, 40; pyridoxine·HCl, 10; choline·HCl, 1500; nicotinic acid, 150; Ca pantothenate, 100; inositol, 518; biotin, 1.0; folic acid, 3.0; L-ascorbic acid, 500; cyanocobalamine, 0.02; menadione, 8; α-tocopherol acetate, 160.

*⁴ Amino acids (mg/100g dry diet): L-phenylalanine, 0.6; L-arginine·HCl, 1.3; L-cystine, 0.7; L-tryptophan, 0.2; L-histidine·HCl·H₂O, 0.2; DL-alanine, 1.3; Na L-aspartate, 1.0 L-lysine·HCl, 0.6; L-valine, 0.7; glycine, 0.4.

To 100g of the dry diet, 200ml of distilled water was added and the pH of diet was adjusted to 6.9 with NaOH solution.

調節した。飼料は実験魚体重の約7% (乾重) を基準とした1日分を2回に分けて投与した。

(3) 測定項目と方法

体重測定を10日目毎に行い、各飼料区の増重率 (weight gain, %) = 100 × 体重増加量 (g) / 試験開始時の体重 (g), 飼料効率 (feed conversion efficiency, %) = 100 × 体重増加量 (g) / 総摂取量 (g), およびタンパク質効率 (protein efficiency ratio, %) = 100 × 体重増加量 (g) / 飼料タンパク質摂取量 (g) を求めた。なお、飼育試験開始時および終了時に各飼料区から5尾ずつを取り上げ、全魚体の一般分析⁵⁾¹⁾を行った。すなわち、各区5尾の全魚体を細切磨碎して均一に混合した後、各測定項目ごとに3試料を分取して分析に供し、それぞれの平均値を求めた。実験開始時と終了時における全魚体の粗タンパク質含量から体タンパク質蓄積率 (protein retention rate, %) = 100 × 体タンパク質増加量 (g) / 飼料タンパク質摂取量 (g) をそれぞれ求めた。

I - 1 - 2. 実験結果

(1) 増重率, 飼料効率およびタンパク質効率と飼料タンパク質含量との関係

成長を増重率で比較してFig. I - 1に示した。生残率はタンパク質含量70%の区では80%,

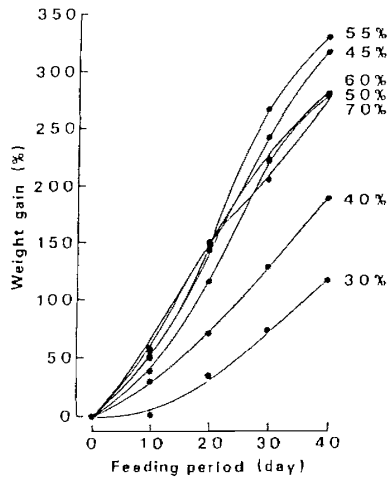


Fig. 1-1. Growth curves of the Japanese parrot fish. Percentage indicates the dietary protein (casein) levels.

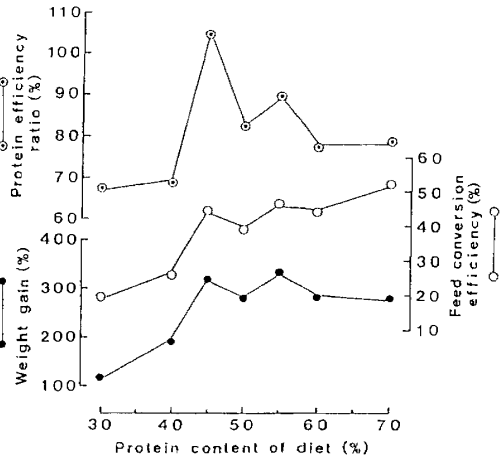


Fig. 1-2. Effect of dietary protein (casein) levels on the weight gain, feed conversion efficiency and protein efficiency ratio of the Japanese parrot fish after feeding for 40 days.

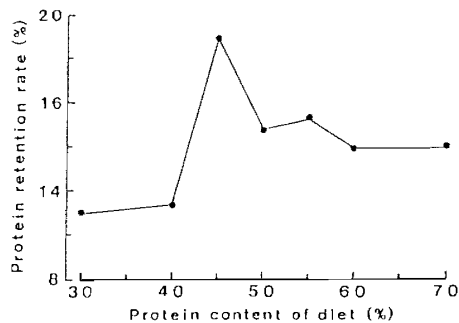


Fig. 1-3. Relationship between dietary protein (casein) levels and protein retention rate of the Japanese parrot fish after feeding for 40 days. Protein retention rate (%) was calculated as "100 × g gain of body protein/g protein ingested".

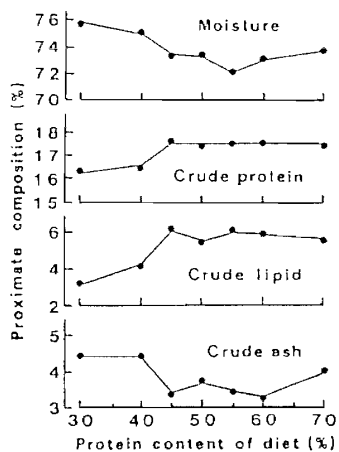


Fig. 1-4. Effect of dietary protein (casein) levels on the proximate compositions of whole bodies of the Japanese parrot fish after feeding for 40 days.

その他の区ではいずれも97%以上であった。

飼料のタンパク質含量と40日間飼育後の魚の増重率、飼料効率およびタンパク質効率との関係を求めてFig. 1-2に示した。増重率と飼料効率は飼料タンパク質含量が45%以上の区でほぼ一定となったが、タンパク質効率は45%区で最も高く、それ以上のタンパク質を含む区ではこれより低くなった。

(2) 体タンパク質蓄積率と飼料タンパク質含量との関係

摂取されたタンパク質のうち、どれだけが魚体のタンパク質として蓄積されたかを示す指標である体タンパク質蓄積率を求め、飼料タンパク質含量との関係をFig. 1-3に示した。本図から明らかなように、最大のタンパク質蓄積率は飼料タンパク質含量が45%の区において得られた。この関係はFig. 1-2に示したタンパク質効率を指標とした場合とほとんど同様であった。

(3) 全魚体の一般成分組成と飼料タンパク質含量との関係

各区の試験飼料を40日間投与した場合の魚体の一般分析を行った結果をFig. 1 - 4に示した。魚体の粗タンパク質および粗脂質の含量は、飼料のタンパク質含量が30および40%の区に比べ45%以上の区で増加し、ほぼ一定となった。一方、魚体の水分および粗灰分の含量は、飼料タンパク質45~60%の区で前二者とは逆に減少した。

I - 1 - 3. 考察

魚の成長に主眼をおいた増重率、飼料効率およびタンパク質効率を指標とした場合の飼料タンパク質の至適含量をFig. 1 - 2から求めると、それぞれ45~55%、45~60%および45%である。次に体タンパク質蓄積率を指標として、魚体内に蓄積されるタンパク質量が最大となる飼料のタンパク質含量を求めると (Fig. 1 - 3), それはタンパク質効率を指標とした場合と同様に45%である。体タンパク質蓄積率は、飼料原料の中で最も高価なタンパク質の含量をできるだけ節約したいという経済性を考慮した場合の良い指標となるが、Fig. 1 - 3の結果は、本実験条件下におけるイシダイ飼料の実用的な至適タンパク質含量は約45%であることを示している。

さらに、飼料組成と肉質との関係を知るために全魚体の一般分析を行った結果 (Fig. 1 - 4), 飼料のタンパク質含量が45%になると魚体の粗タンパク質および粗脂質の含量は増大し、水分および粗灰分の含量は減少することがわかった。これからの養魚においては、最大成長を得るための飼料と同時に、食料としての魚肉の品質との関係も考慮した飼料の組成をもっと詳細に研究する必要があると思われる。

以上の結果から、本実験で取り上げたいいくつかの指標との関係でみる限り、イシダイ用試験飼料の至適タンパク質含量はカゼインとして45%付近と判定された。これまでに報告されている主な海水養殖魚のカゼインをタンパク質源とした試験飼料の至適タンパク質含量は、マダイ⁵³⁾では約55%、オオニベ⁵⁵⁾では約55%、トラフグ⁵⁴⁾では約50%、メナダの稚魚⁵⁶⁾および1才魚⁵⁷⁾では40~45%および33~35%である。試料魚の成育段階、飼料組成、飼育条件などに加えて判定の指標も異なるので厳密な比較はできないが、イシダイ用試験飼料の至適タンパク質含量は、これら既報の海水魚のそれよりはやや低い部類に属するのではないかと考えられる。飼料の至適タンパク質含量の判定にはもっといろいろな要因を考慮する必要があるので、これがイシダイの特性であるかどうかについては、試験飼料のエネルギー・タンパク質比⁵⁸⁻⁶⁰⁾などとの関係も含めて、なお今後の検討が必要とされる。なお、熊井⁶¹⁾は北洋魚粉をタンパク質源とする飼料で平均体重23gのイシダイを8週間飼育した結果から、イシダイの成長に最も効率的な配合飼料のタンパク質含量は50%が適当であると報告している。

I - 2. 試験飼料における脂質の至適含有量⁵⁰⁾

I - 2 - 1. 実験方法

Table I-2. Composition (%) of the test diets used for determination of the optimal lipid level

Ingredient	Diet No.			
	1	2	3	4
Casein	50	50	50	50
Dextrin	25	23	19	13
Lipid* ¹	3	5	8	10
Minerals* ²	4	4	4	4
Vitamins* ³	3	3	3	3
Amino acids* ⁴	7	7	7	7
Cellulose	5	5	6	10
Agar	3	3	3	3

*¹ Pollack liver oil.

*²⁻⁴ Compositions are the same as in Table I-1.

試験魚および飼育方法は本章1節と同様とした。試験区およびその飼料組成はTable I-2に示した通りである。飼料は脂質源としての精製スケソウダラ肝油を3, 5, 8および10%含むように設定した。飼料成分, 調餌方法および測定項目と方法は本章1節に示した通りである。

なお, 飼育試験終了時に全魚体の一般分析を行い, 飼料の脂質含量と体成分組成との関係を考察した。さらに, 実験開始時と終了時における全魚体の粗脂質含量から, 体脂質蓄積率 (lipid retention rate, %) = 100 × 体脂質蓄積量 (g) / 飼料脂質摂取量 (g) を求めた。

I - 2 - 2. 実験結果

(1) 増重率と飼料脂質含量との関係

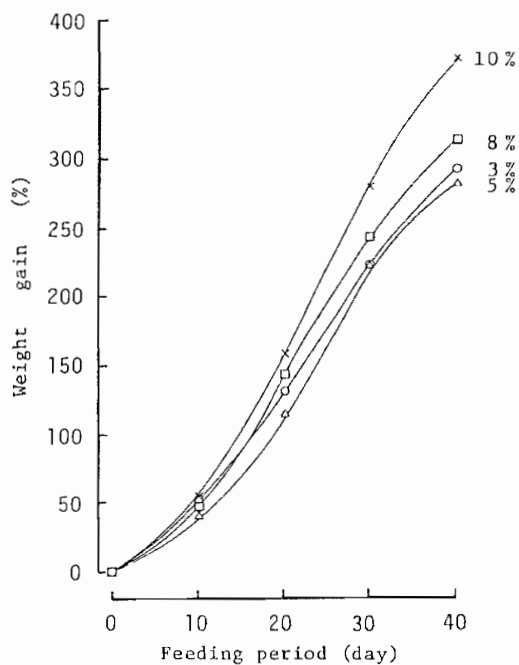


Fig. I-5. Growth curves. Percentage indicates the dietary lipid levels.

各飼料区の魚の成長を増重率で比較してFig. I-5に示した。飼育20日目より各区の成長曲線に差がみられ, 飼育40日目には脂質含量10%区の成長が最も優れていた。飼育期間中のへい死魚は脂質含量3%区で1尾みられたが, その他の区ではみられなかった。

(2) 全魚体の一般成分組成と飼料脂質含量との関係

試験終了時に全魚体を一般分析した結果をTable I-3に示した。魚体の粗脂質含量は飼料の脂質含量に比例して増加し, 水分含量は逆に減少した。一方, 魚体の粗タンパク質および粗灰分の含量には, 顕著な区間差は認められなかった。

Table I -3. Effect of dietary lipid levels on proximate compositions (%) of whole bodies after feeding for 40 days

Diet No.	Lipid in diet (%)	Moisture	Crude protein	Crude lipid	Crude ash
Initial fish		77.2	16.3	2.2	4.3
1	3	74.2	17.4	4.3	3.8
2	5	73.3	17.4	5.5	3.7
3	8	73.0	17.3	5.9	3.7
4	10	71.2	17.2	7.5	3.4

Values are means of 3 determinations of pooled sample from 5 fish.

(3) 体脂質蓄積率と飼料脂質含量との関係

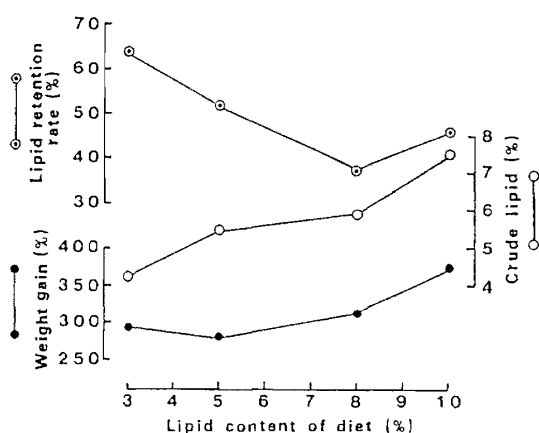


Fig. I -6. Effect of dietary lipid (pollack liver oil) levels on the weight gain, lipid retention rate and crude lipid content in the whole bodies of the Japanese parrot fish after feeding for 40 days. Lipid retention rate (%) was calculated as "100 × g gain of body lipid/g lipid ingested".

摂取された脂質のうち、どれだけが魚体の脂質として蓄積されたかを示す指標である体脂質蓄積率を求め、飼料脂質含量との関係を増重率および魚体の粗脂質含量とともにFig. I - 6に示した。その結果、増重率および魚体の粗脂質含量は先に述べたように飼料の脂質含量にほぼ比例して増加する傾向を示したが、体脂質蓄積率は、飼料の脂質含量が8%の場合に最小となった。

I - 2 - 3. 考察

スケソウダラ肝油を脂質源としたときの飼料の至適脂質含量は魚の体重増加を指標とした場合には10%あるいはそれ以上である (Fig.

I - 6, ●—●)。しかし、飼料の脂質含量が10%にもなれば8%以下の場合にくらべて魚体の粗脂質含量が著しく増加し (Fig. I - 6, ○—○), 脂肪ぶとりとなる恐れのあることがわかった。さらに、体脂質蓄積率は飼料の脂質含量が8%の場合に最小となることより (Fig. I - 6, ◎—◎), 本実験条件下では、8%の場合の方が10%の場合よりも摂取された脂質がエネルギー源として有効に利用され、タンパク質の節約にも寄与しているものと推察された。これらの結果から、脂質としてスケソウダラ肝油を添加したインダイ飼料の至適脂質含量は、本実験条件下で、成長以外の指標をも考慮した場合、約8%と判定された。

これまで報告されている主な海水養殖魚のタラ肝油を脂質源とした試験飼料の至適脂質含量は、飼料タンパク質含量がそれぞれの魚種の至適レベルである場合、マダイ⁵³⁾では約10%、トラフグ⁵⁴⁾では約6%、オオニベ⁶²⁾では約5%である。試験魚の成育段階、飼育条件および判定の指標が異なるので厳密な比較はできないが、インダイ用試験飼料の至適脂質含量は、およそマダイとトラフグの間であると考えられる。しかし、飼料の適正脂質含量は飼料脂質中の高度不飽和脂肪酸含量⁶³⁾、飼料のタンパク質含量、可消化エネルギー量などによって大きく変動することが知られているので、⁵⁸⁻⁶⁰⁾今後さらに詳細に検討する必要がある。

I - 3. 試験飼料におけるミネラル混合物の至適含有量

Table I -4. Composition (%) of the test diets used for determination of the optimal mineral mixture level

Ingredient	Diet No.			
	1	2	3	4
Casein	50	50	50	50
Dextrin	23	23	23	23
Lipid* ¹	5	5	5	5
Minerals* ²	2	4	6	8
Vitamins* ³	3	3	3	3
Amino acids* ⁴	7	7	7	7
Cellulose	7	5	3	1
Agar	3	3	3	3

*¹ Pollack liver oil.

*²⁻⁴ Compositions are the same as in Table I -1.

I - 3 - 1. 実験方法

試験魚および飼育方法は本章1節と同様とした。試験飼料の組成はTable I - 4に示した通りで、ミネラル混合物⁵²⁾を2, 4, 6および8%となるように配合した。測定項目および方法は本章1節に準じた。また、飼育試験終了時に全魚体の一般分析を行い、飼料のミネラル混合物含量と体成分組成との関係を考察した。

I - 3 - 2. 実験結果および考察

(1) 増重率、飼料効率およびタンパク質効率と飼料ミネラル混合物含量との関係

各飼料区インダイの成長を増重率で比較してFig. I - 7に示した。飼育実験期間中のへい死魚は認められなかった。

飼料ミネラル混合物含量と増重率およびタンパク質効率との関係をまとめてFig. I - 8 (●—●, ○—○)に示した。増重率およびタンパク質効率はいずれも飼料のミネラル混合物含量6%の区で最大値を示した。また、飼料効率もこれらとほぼ同じ関係を示し、魚の成長に主眼をおいた増重率、飼料効率およびタンパク質効率を指標とした場合の飼料ミネラル混合物の至適含量は6%付近と判定された。

(2) 全魚体の一般成分組成と飼料ミネラル混合物含量との関係

試験終了時に全魚体の一般分析を行った結果をTable I - 5に示した。各区試験飼料で40日間飼育したインダイ全魚体の水分、粗タンパク質および粗脂質の含量は飼料のミネラル混合

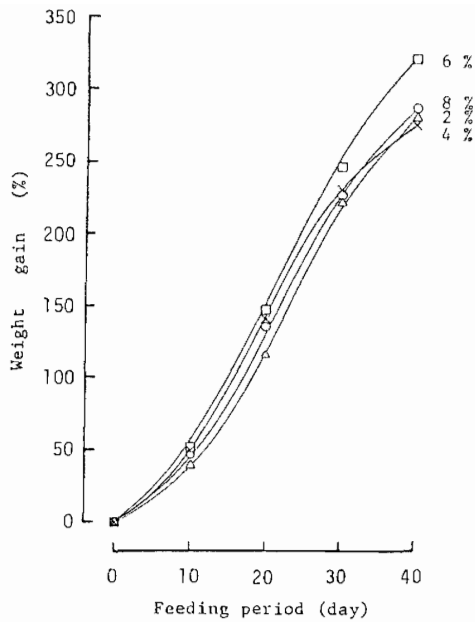


Fig. I-7. Growth curves. Percentage indicates the dietary mineral mixture levels.

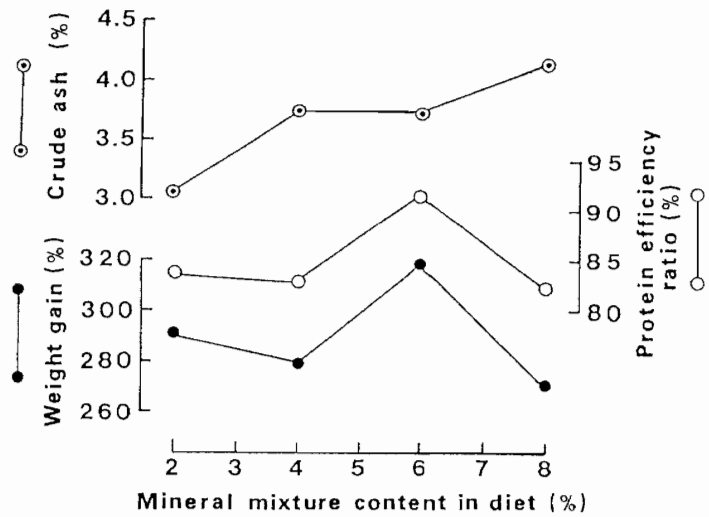


Fig. I-8. Effect of dietary mineral levels on the weight gain, protein efficiency ratio and crude ash content in the fish whole bodies.

物含量 4%以上の区でおおよそ一定の値を示した。しかし、ミネラル混合物含量 2%の飼料区の水分含量は 4%以上の区より低く、脂質含量は逆に増加する傾向を示した。また、粗灰分含量 (Fig. I-8, ◎—◎) は飼料のミネラル混合物含量が 4%および 6%の場合に比べて 8%区では高くなる傾向を示し、2%区では逆に減少した。

酒本⁶⁴⁾ はマダイにおける飼料無機質の必要性和その欠乏症について検討し、ミネラル混合物またはリンの欠乏は脂質および炭水化物の代謝異常を引き起こし、肝臓および脊椎骨の水分含量並びに脊椎骨の粗灰分含量が減少すること、および肝臓、脊椎骨および全魚体の粗脂質含量が増加することなどを報告している。同様に、ハマチ⁶⁵⁾ ではリンの欠乏によって脊椎骨の

Table I-5. Effect of dietary mineral mixture levels on proximate compositions (%) of whole bodies after feeding for 40 days

Diet No.	Minerals in diet (%)	Moisture	Crude protein	Crude lipid	Crude ash
Initial fish		77.2	16.3	2.2	4.3
1	2	72.1	18.1	6.6	3.1
2	4	73.3	17.4	5.5	3.7
3	6	73.1	17.6	5.0	3.7
4	8	73.6	17.5	5.0	4.1

Values are means of 3 determinations of pooled sample from 5 fish.

粗灰分含量が減少すること、並びに肝臓および全魚体の脂質含量が増加することが明らかにされている。イシダイの場合にも飼料のミネラル混合物含量が2%では生理的に必要なミネラルが欠乏しているものと推測された。

以上の結果から、本実験条件下で、イシダイの成長および健康に必要な飼料のミネラル混合物の至適含量は、約6%と判定した。カゼインをタンパク質源とする精製試験飼料を用いて検討されたコイおよびニジマスのミネラル混合物の至適含量は、McCollum 混合塩No. 185に微量元素を添加したミネラル混合物を用いた場合、いずれも約4%であった。⁶⁶⁾ また、Halver 処方⁶⁷⁾のミネラル混合物を用いた場合、ウナギ⁶⁷⁾ およびハマチ⁶⁸⁾ では約8%、マダイ⁶⁴⁾ では約4%と報告されている。

I-4. 試験飼料におけるビタミン混合物の至適含有量

I-4-1. 実験方法

供試魚および飼育方法は本章1節と同様である。ただし、実験期間は、9月から11月までの70日間とした。なお、飼育水温は20℃以下にならないように設定し、試験開始後47日目から調温海水を使用した。その結果、飼育期間中の水温は27~20℃であった。また、DOは3.0~5.0 ml/lの範囲であった。

試験区および飼料組成はTable I-6に示した通りで、ビタミン混合物の組成はHalver¹⁾の

Table I-6 Composition (%) of the test diets used for determination of optimal vitamin mixture level

Ingredient	Diet No.			
	1	2	3	4
Casein* ¹	50	50	50	50
Dextrin	23	23	23	23
Pollack liver oil	5	5	5	5
Minerals* ²	4	4	4	4
Vitamins* ³	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>
Amino acids* ⁴	7	7	7	7
Cellulose	7	6	5	4
Agar	3	3	3	3

*¹ Vitamin free casein.

*²⁻⁴ Compositions are the same as in Table I-1.

マス用試験飼料H-440を、一部修正して用いた。飼料No. 1~4には、ビタミン混合物をそれぞれ1, 2, 3および4%配合した。

また、他の飼料成分および調餌方法は本章1節に示した通りである。

試験開始日、飼育40日目および70日目に各飼料区の魚を5尾ずつ無作為抽出し、個体別に魚体重および尾叉長を測定した。また、10日目ごとに各飼料区の総魚体重測定を行った。これらの結果から、飼育40日目までと70日目までのそれぞれの増重率、飼料効率、タンパク質効率などを求めた。なお、飼育40日目には本章1節と同様に各区試料魚の全魚体の一般分析を行った。

I - 4 - 2. 実験結果および考察

(1) 増重率, 飼料効率およびタンパク質効率と飼料ビタミン混合物含量との関係

飼育40日目までの魚の成長を増重率で比較してFig. I - 9 に示した。飼育40日目の各飼料区の増重率, 飼料効率およびタンパク質効率をまとめてFig. I - 10 に示した。飼育期間中の

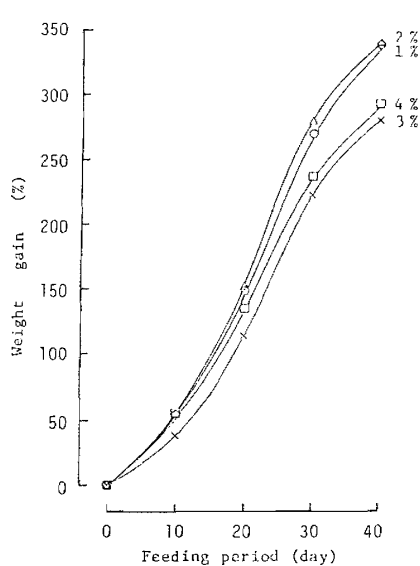


Fig. I - 9. Growth curves. Percentage indicates the dietary vitamin mixture levels.

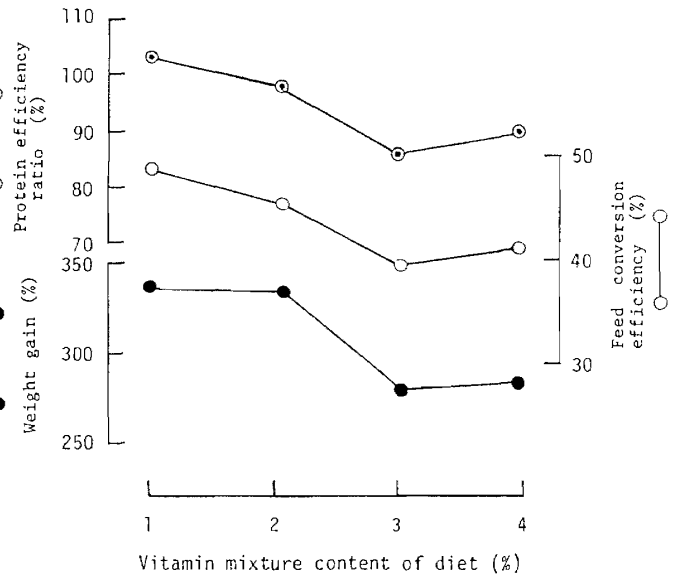


Fig. I - 10. Effect of dietary vitamin levels on the weight gain, feed conversion efficiency and protein efficiency ratio after feeding for 40 days.

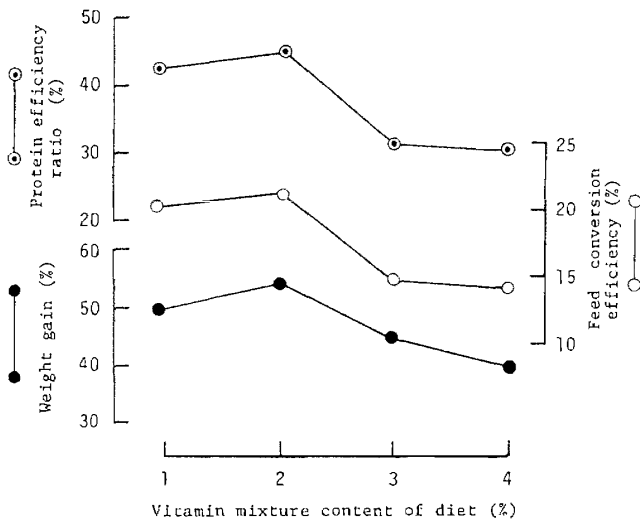


Fig. I - 11. Effect of dietary vitamin levels on the weight gain, feed conversion efficiency and protein efficiency ratio after feeding from 40th day to 70th day.

へい死魚はみられなかった。ビタミン混合物含量1および2%区の増重率, 飼料効率およびタンパク質効率はおおよそ一定の値を示したが, ビタミン混合物含量が3%以上になると各指標とも低下する傾向を示した。成長を指標とした飼料ビタミン混合物の至適含量は, 飼育40日目までの結果では1または2%と判定された。

しかし, ビタミン欠乏症の発症までの期間は魚種および各ビタミンによって異なることが知られている。¹⁵⁾そこで, さらに実験期間を延長し, 飼育40日目から70日目までの30日間飼育した結果をFig. I - 11にまとめて示した。その結果, ビタミン混合物含量1%区

の増重率，飼料効率およびタンパク質効率は2%区よりも低下する傾向を示した。また，ビタミン混合物3%および4%区におけるこれらの指標は飼育40日目までの結果と同様に2%区よりも低い値を示した。

(2) 全魚体の一般成分組成と飼料ビタミン混合物含量との関係

各区試験飼料で40日間飼育したイシダイの全魚体の一般成分組成をTable I-7に示した。各飼料区の一般成分組成に顕著な区間差はみられなかった。この結果から見る限り，飼料のビタミン混合物含量は全魚体の一般成分組成にほとんど影響しないと考えられた。

Table I-7. Effect of dietary vitamin mixture levels on proximate compositions (%) of fish whole bodies after feeding for 40 days

Diet No.	Vitamins in diet (%)	Moisture	Crude protein	Crude lipid	Crude ash
Initial fish		77.2	16.3	2.2	4.3
1	1	73.1	17.2	5.9	3.8
2	2	73.3	17.1	5.5	3.9
3	3	73.3	17.4	5.5	3.7
4	4	73.3	17.5	5.5	4.2

Values are means of 3 determinations of pooled sample from 5 fish.

以上の結果から魚の成長に主眼をおいた増重率，飼料効率およびタンパク質効率を指標とした場合の飼料のビタミン混合物の至適含量は2%前後と判定した。

これまで精製試験飼料を用いて検討された主な海水魚のHalver 処方を用いたビタミン混合物の至適含量は，ハマチ⁶⁹⁾では約2%，トラフグ⁵⁴⁾では約3%と報告されている。

第Ⅱ章 イシダイ稚魚における水溶性ビタミンの要求性⁷⁰⁾

魚類のビタミン要求に関する研究はこれまで主としてニジマスを始めとする淡水魚を中心に検討され、各ビタミンの要求量についてもそれぞれ明らかにされつつある。¹⁾しかし、我が国における養殖対象魚として重要な位置を占める海水養殖魚に関するその研究はまだ著しく少ない。^{14) 15)}そこで本章では第Ⅰ章の結果から得られた基本組成の栄養要求試験用精製飼料を用いて、イシダイ稚魚における水溶性ビタミンの要求性について検討し、成長および健康に必要な水溶性ビタミンをそれぞれの重要度によってグループ分けすることを試みた。

Ⅱ-1. 実験方法

(1) 供試魚と飼育条件

近畿大学水産研究所で生産された平均体重2.5gのイシダイ稚魚60尾ずつを、200lパンライト水槽に收容し、11種類の各水溶性ビタミンの欠乏したそれぞれの精製試験飼料を6月から10月にかけて8~16週間投与した。その間の水温は22~28℃であった。飼育水槽の注水量は8.5l/min、通気量は1.8l/minとした。なお、試料魚は実験開始前にカゼイン飼料に対する馴致と各区の魚の大きさや健康状態を平均させるために供試魚数の約2倍の魚について2週間の予備飼育を行った。

(2) 飼料組成と投餌法

試験飼料の組成はTable II-1に示した通りである。基本組成は、第Ⅰ章の実験で求めた

Table II-1. Composition of the water-soluble vitamin test diet

Ingredient (g/100g)		Vitamin mix. (mg)		Mineral mix. (mg)		Amino acid mix. (g)	
Vitamin-free casein	45	Thiamin·HCl	6.7	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·H ₂ O	800.0	L-Phe	0.6
Dextrin	24	Riboflavin	26.4	Ca-lactate	2000.0	L-Arg·HCl	1.3
Pollack liver oil	8	Pyridoxine·HCl	6.7	Fe-citrate	200.0	L-Cys	0.7
Vitamin mix.	2	Choline chloride	1000.0	MgSO ₄ ·7H ₂ O	800.0	L-Try	0.2
Mineral mix.	6	Nicotinic acid	100.0	K ₂ HPO ₄	1400.0	L-His·HCl·H ₂ O	0.2
Amino acid mix.	7	Calcium pantothenate	66.7	NaH ₂ PO ₄	500.0	DL-Ala	1.3
Cellulose	5	Inositol	345.3	AlCl ₃ ·6H ₂ O	40.0	L-Asp·Na	1.0
Agar	3	Biotin	0.67	ZnCl ₂	120.0	L-Lys·HCl	0.6
		Folic acid	2.0	CuSO ₄ ·5H ₂ O	60.0	L-Val	0.7
		L-Ascorbic acid	333.3	KI	40.0	Gly	0.4
		Vitamin B ₁₂	0.013	MnSO ₄ ·4H ₂ O	40.0		
		Menadione(K)	5.3				
		α-Tocopheryl acetate	106.7				

To 100g of the diet, 200 ml of distilled water was added and the pH of diet was adjusted to 6.9 with NaOH solution.

それぞれの成分の至適含量に基づいて決定した。すなわち、タンパク質源としてはカゼインを45%、脂質源としてはスケソウダラ肝油を8%、ミネラル混合物は6%、ビタミン混合物は2%とした。基本飼料に添加したビタミン混合物から各ビタミンをそれぞれ除去し、その分だけセルロースを補って各ビタミン欠乏飼料とした。調餌は第I章で述べた方法と同様に行った。なお、調製後の飼料は-70℃で貯蔵し、5~6日以内に投与した。飼料は実験魚体重の約7%（乾重）を一応の基準とした1日分を2回に分けて投与した。各飼料区の摂餌状況（食欲）をよく観察して投餌量を加減し、投餌量を以て摂餌量とみなした。

(3) 測定項目と方法

体重測定を2週間目毎に行い、各ビタミン欠乏区の増重率および飼料効率を求め対照区と比較した。各ビタミンの欠乏徴候とへい死魚数は毎日観察記録し、1週間毎に各区のへい死率(%)を算出した。成長低下やへい死などの欠乏徴候が明らかに発現したと判断されたビタミン欠乏区はその半数の魚に対照飼料を与えて回復試験を行った。試験終了時に各区3尾以上の試料魚を取り上げ、それぞれについて血液を腹大動脈から採取し、赤血球数をトーマの算定盤により、ヘマトクリット(Ht)値を毛細管法でそれぞれ測定した。⁷¹⁾ 比肝重(%) = 100 × 肝臓(g) / 体重(g) もそれぞれ測定した。赤血球数、Ht値および比肝重の測定結果についてはStudentのt検定を行い、対照区の測定値に対する有意差(P < 0.05または0.01)を判定した。

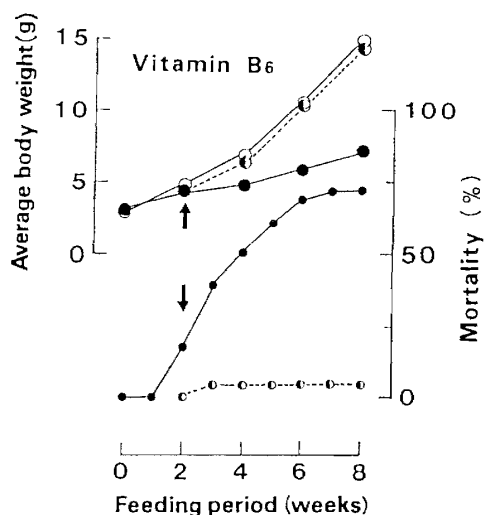


Fig. II-1. Growth and mortality of fish fed vitamin B₆ deficient diet. ○—○, growth of the control diet group; ●—● (●—●), growth (mortality) of the vitamin deficient group; ○···○ (○···○), growth (mortality) of the recovery test group. Arrow shows the start of recovery test.

II-2. 実験結果

(1) 成長、へい死率および欠乏症に及ぼす各ビタミン欠乏の影響

各ビタミン欠乏区の魚の成長およびへい死率、回復試験区の魚の成長およびへい死率を対照区の魚の成長と比較してFig. II-1~11に示した。図中の矢印は回復試験を開始した日を示す。

a. ビタミンB₆欠乏の影響 (Fig. II-1)

B₆欠乏区には飼育2週間頃から食欲減退、成長低下、神経過敏および遊泳異常魚がみられ、3週間までに旋回、狂奔および平衡感覚の喪失などの顕著な欠乏症状が確認された。また、へい死魚も2週間目頃から急激に

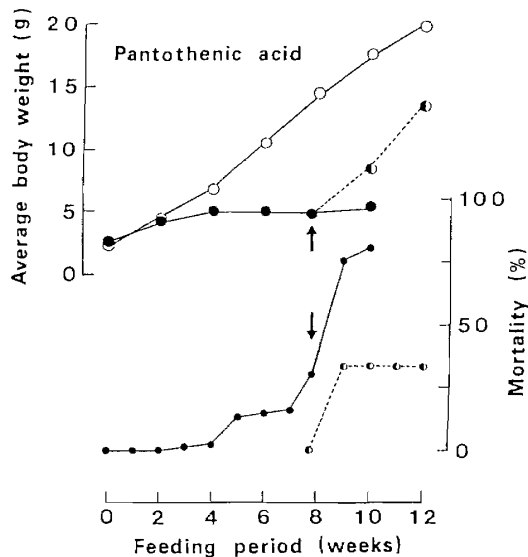


Fig. II-2. Growth and mortality of fish fed pantothenic acid deficient diet. Symbols are the same as in Fig. II-1.

増加し、8週目のへい死率は72%に達した。各ビタミン欠乏区の中で最も早く欠乏症状が現われた。へい死魚が18%になった2週目から回復試験区を設けB₆を含む対照飼料を投与したところ、数日以内に食欲が戻り、成長、へい死率ともに急速に回復した。

b. パントテン酸欠乏の影響 (Fig. II-2)

パントテン酸欠乏の影響はビタミンB₆欠乏に次いで早く現われ、食欲不振、けいれん、刺激に対する遅鈍、成長停滞などの症状が認められた。へい死魚は、5週目頃から増え始め、8週目頃から急激に多くなり、10週目には88%と

c. ビタミンB₁欠乏の影響 (Fig. II-3)

B₁欠乏の主な症状は食欲減退および神経過敏であり、6週目頃から成長が停滞した。へい死魚の数は9週目を過ぎてから増え始め、14週目のへい死率は60%であった。8週目から回復

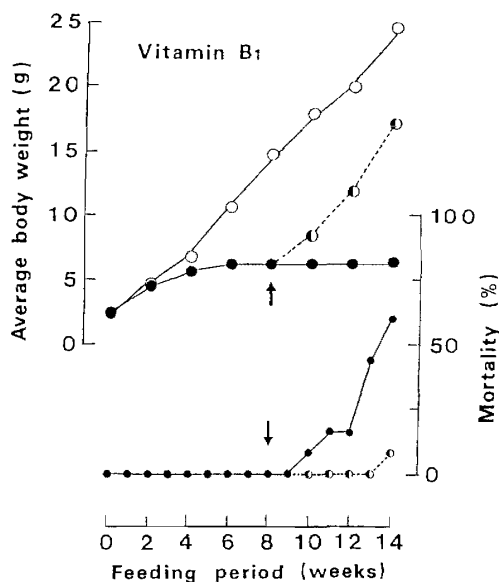


Fig. II-3. Growth and mortality of fish fed vitamin B₁ deficient diet. Symbols are the same as in Fig. II-1.

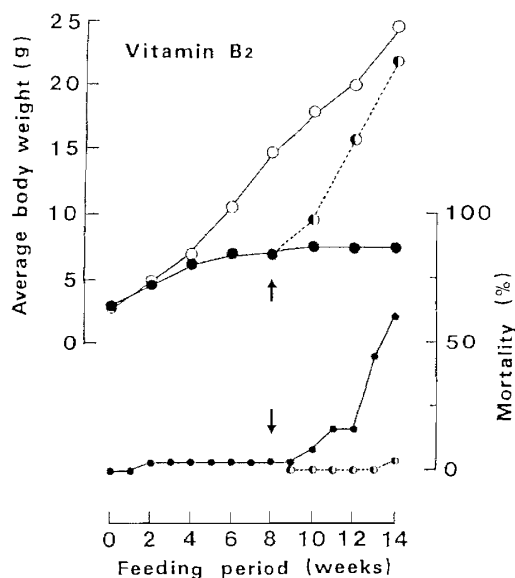


Fig. II-4. Growth and mortality of fish fed vitamin B₂ deficient diet. Symbols are the same as in Fig. II-1.

試験を始めたが、対照飼料投与後4日目にして食欲が回復し順調に成長した。

d. ビタミンB₂欠乏の影響 (Fig. II-4)

B₂欠乏区の成長およびへい死率はB₁欠乏の場合とよく似た経過を示した。すなわち、成長は6週目頃から停滞し、へい死魚は9週目を過ぎた頃から増え始め、14週目には60%となった。欠乏症状としては食欲減退の他に行動の緩慢な魚および刺激に対する反応の遅い魚が観察され、この点では神經過敏となるB₁欠乏魚と異なった。8週目から始めた回復試験区の魚の食欲および成長はB₁欠乏魚の場合と同様に急速に回復し、行動も機敏となった。

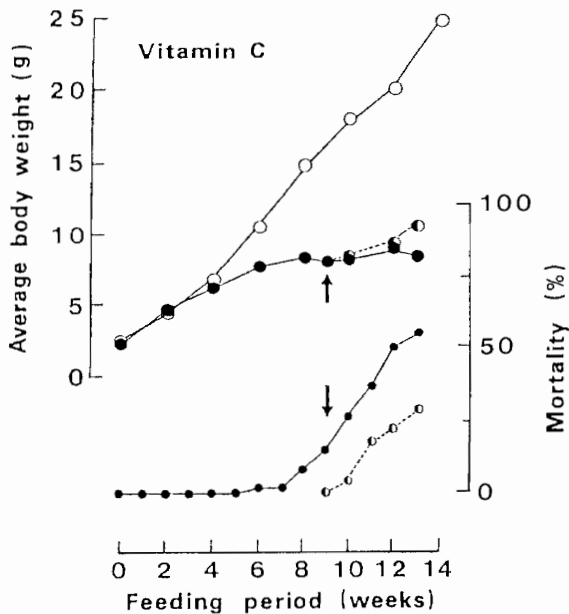


Fig. II-5. Growth and mortality of fish fed vitamin C deficient diet. Symbols are the same as in Fig. II-1.

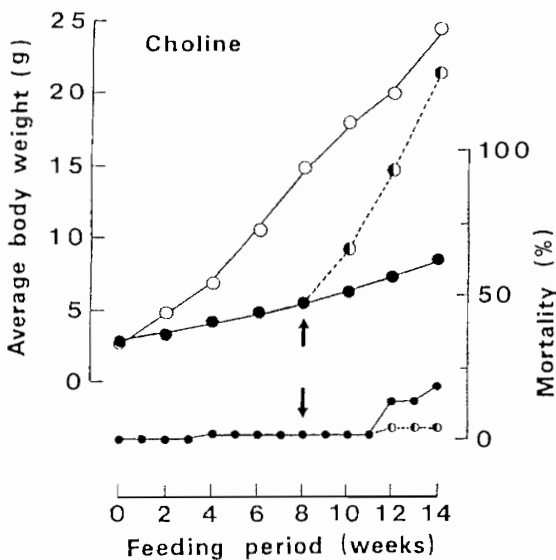


Fig. II-6. Growth and mortality of fish fed choline deficient diet. Symbols are the same as in Fig. II-1.

れ、この点では神經過敏となるB₁欠乏魚と異なった。8週目から始めた回復試験区の魚の食欲および成長はB₁欠乏魚の場合と同様に急速に回復し、行動も機敏となった。

e. ビタミンC欠乏の影響 (Fig. II-5)

イシダイ稚魚ではビタミンCの欠乏の症状が比較的早く出現した。すなわち食欲の減退による成長不良に加えて遊泳異常魚がすでに5週目頃から観察された。8週目には一部の魚に脊椎わん曲、腹部水腫および遅鈍などの症状を認めた。へい死率は8週目頃から増加し、13週目には54%に達した。回復試験を9週目から始めたが、この場合には、対照飼料投与後3週間を経てやっと回復の兆しが認められた。回復試験開始の時期が遅きに失したためと考えられる。

f. コリン欠乏の影響 (Fig. II-6)

コリン欠乏区では比較的早い時期から食欲の減退にともなう著しい成長不良がみられた。しかし、その他の症状は特に観察されなかった。一方、へい死魚は11週目までほとんどみられず、14週目でも18%に過ぎなかった。B₆、パントテン酸、B₁、B₂およびCの欠乏に比べると著しく低いへい死率であった。8週目頃から回復試験を行った結果、対照飼料投与後2日目にして早くも食欲が増大し、欠乏症が最も回復しやすいビタミンであった。

g. ニコチン酸欠乏の影響 (Fig. II-7)

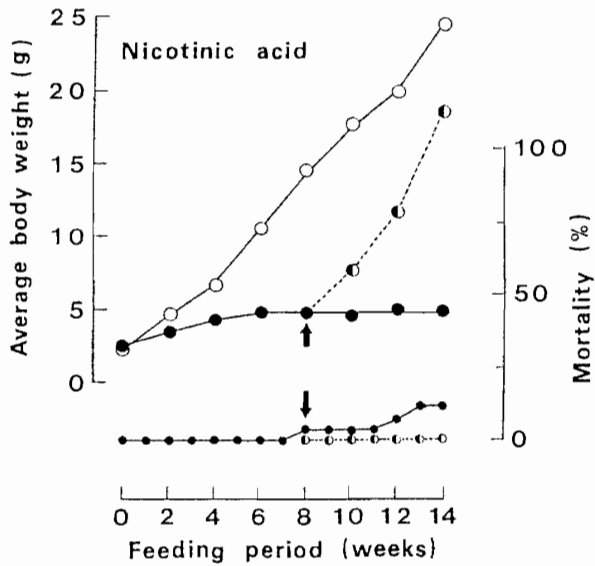


Fig. II-7. Growth and mortality of fish fed nicotinic acid deficient diet. Symbols are the same as in Fig. II-1.

ニコチン酸欠乏の主な症状は、早期からの食欲減退にともなう成長停滞であり、各ビタミン欠乏区の中で増重率に及ぼす影響が最も大きくなった。しかし、コリン欠乏区と同様に、その他の異常は特に認められず、へい死率は14週目で12%に過ぎなかった。8週目から始めた回復試験の結果も、コリン欠乏の場合によく似て食欲をいち早く回復し順調に成長した。

h. ビタミンB₁₂欠乏の影響 (Fig. II-8)

ビタミンB₁₂欠乏の影響はB₆、パントテン酸、B₁、B₂、C、コリンおよびニコチン酸の欠乏に比べると穏やかであり、食欲の減退にともなう成長低下はかなり遅れて認められた。へい死率も16週目で18%に過ぎなかった。

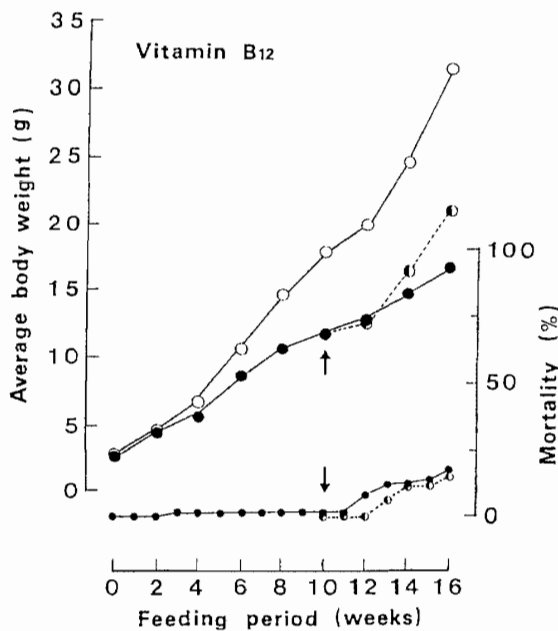


Fig. II-8. Growth and mortality of fish fed vitamin B₁₂ deficient diet. Symbols are the same as in Fig. II-1.

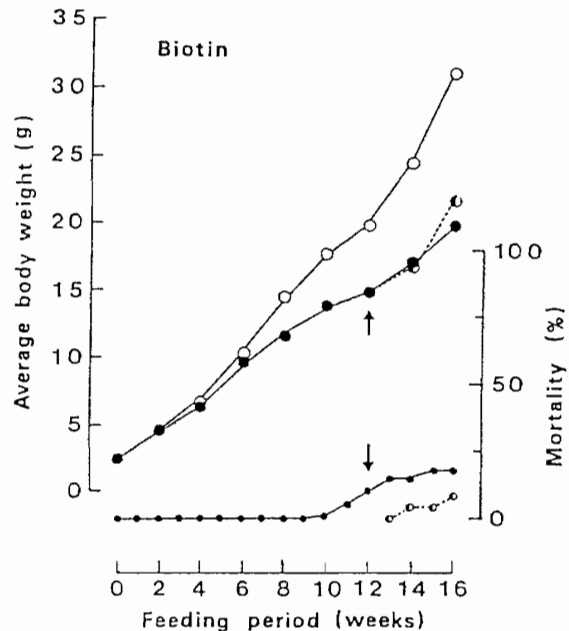


Fig. II-9. Growth and mortality of fish fed biotin deficient diet. Symbols are the same as in Fig. II-1.

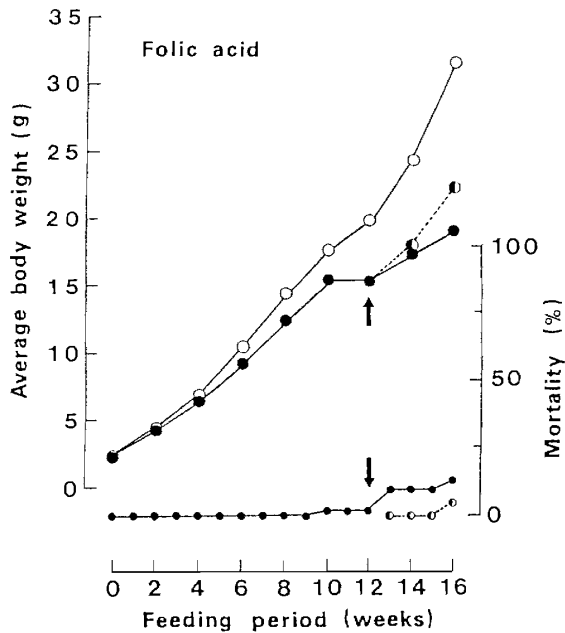


Fig. II-10. Growth and mortality of fish fed folic acid deficient diet. Symbols are the same as in Fig. II-1.

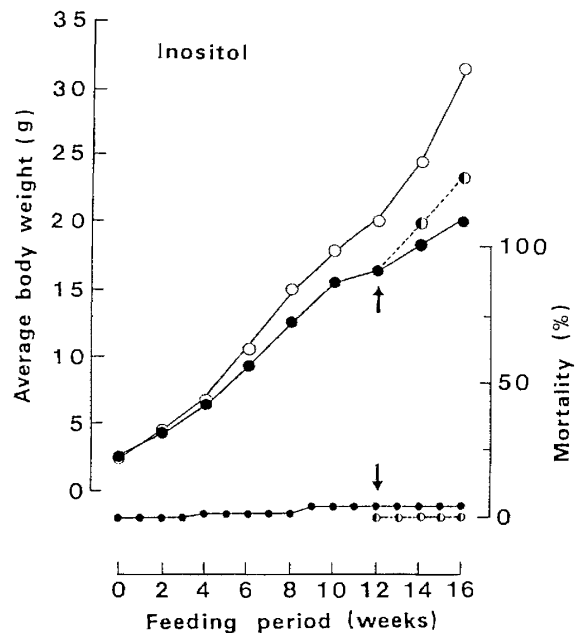


Fig. II-11. Growth and mortality of fish fed inositol deficient diet. Symbols are the same as in Fig. II-1.

ただし、10週目から始めた回復試験区の魚の食欲が対照区並みに回復するまでには4週間を要した。

i. ビオチン欠乏の影響 (Fig. II-9)

魚の成長に及ぼすビオチン欠乏の影響は B_{12} 欠乏よりも更にいくらか遅れて認められたが、16週目のへい死率は19%で B_{12} 欠乏の場合とほぼ等しかった。ビオチン欠乏の期間が長くなると軽度の神経過敏症が観察されるようになった。回復試験は12週目から始めたが、対照区なみの食欲を示すまでには、 B_{12} の場合と同様に4週間を要した。

j. 葉酸欠乏の影響 (Fig. II-10)

葉酸欠乏区の魚の成長は対照区に比べ10週目まではやや劣る程度であったが、12週目になると食欲減退にともなう成長の低下が目立つようになり、ビオチン欠乏と同様に軽度の神経過敏症も認められた。へい死率は11週目頃からわずかに増加し、16週目に14%であった。12週目から始めた回復試験区の魚は1~2週間で対照区なみの食欲を示した。

k. イノシトール欠乏の影響 (Fig. II-11)

試験したビタミンの中ではイノシトール欠乏の影響が最も軽微であり、へい死魚も16週目までほとんど認められなかった。しかし、このビタミンの欠乏においても飼育期間が長くなると食欲が減退し、対照区との体重差が目立つようになった。12週目から始めた回復試験区の魚は約10日間で対照区なみの食欲を示した。

(2) 相対増重率に及ぼす各ビタミン欠乏の影響

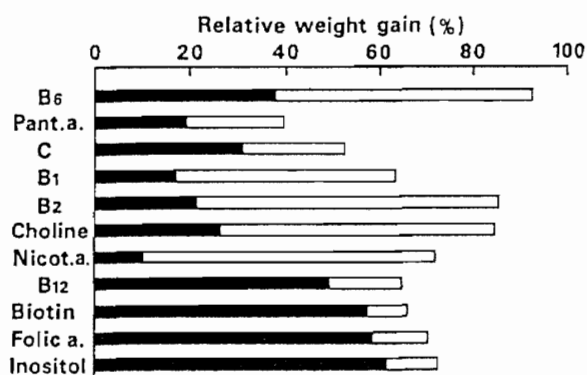


Fig. II-12. Relative weight gain of fish fed diets deficient in water-soluble vitamins. Relative weight gain was expressed as % against the weight gain obtained from the control fish for each vitamin deficient fish. ■, vitamin deficient group; □, recovery test group.

インダイ稚魚の成長に及ぼす各ビタミン欠乏の影響をわかり易く比較するために、各ビタミン欠乏区および回復区それぞれの飼育試験終了時における増重率を、その時点におけるそれぞれの対照区の値を100とした相対値（相対増重率、%）としてFig. II-12に示した。この図から明らかなように、魚の増重率に対する欠乏の影響の著しいビタミンはB₆、パントテン酸、C、B₁、B₂、コリンおよびニコチン酸であった。

一方、増重率に及ぼす欠乏の影響がそれほど大きくなかったビタミンはB₁₂、ビオチン、葉酸およびイノシトールであった。しかし、これ

ら後者のビタミン群といえども相対増重率は約50~60%であり、本研究の実験条件下では、これらのビタミンの要求性も決して低いものではなかった。

なお、同様にして求めた各ビタミン欠乏区の相対飼料効率も相対増重率の場合とほとんど同じ傾向を示した。

(3) 血液性状および比肝重に及ぼす各ビタミン欠乏の影響

各ビタミン欠乏魚の健康状態をチェックするために各区試験終了時の赤血球数、Ht値および比肝重を測定し、その時点におけるそれぞれの対照魚の数値と比較してTable II-2に示

Table II-2. Erythrocyte count, hematocrit and hepatosomatic index of fish fed the diets deficient in water-soluble vitamins

Deficient vitamins	Feeding period (weeks)	Control group			Deficient group		
		Erythrocyte (10 ⁴ /mm ³)	Hematocrit (%)	Hepatosomatic index(%)* ¹	Erythrocyte (10 ⁴ /mm ³)	Hematocrit (%)	Hepatosomatic index(%)
B ₆	8	202.0±23.2* ²	39.2±5.9	2.5±0.2	141.7±25.8 ^b	27.4±5.4 ^b	1.1±0.1 ^a
Panto. acid	10	273.3±33.3	38.8±3.7	2.4±0.6	196.7±17.5 ^b	22.8±3.1 ^b	0.7±0.2 ^a
C	13	319.1±14.2	36.6±1.6	2.1±0.7	125.1±13.5 ^a	19.7±6.1 ^a	1.1±0.1
B ₁	14	278.7±29.0	31.8±2.1	2.1±0.9	209.3±25.5 ^b	25.6±4.6	1.2±0.5
B ₂	14	278.7±29.0	31.8±2.1	2.1±0.9	202.1±20.1 ^b	21.4±0.8 ^a	1.1±0.1
Choline	14	278.7±29.0	31.8±2.1	2.1±0.9	216.0±2.0	25.7±1.1 ^b	1.4±0.5
Nicot. acid	14	278.7±29.0	31.8±2.1	2.1±0.9	216.5±22.9 ^b	26.2±0.8 ^b	1.1±0.2
B ₁₂	16	242.4±17.3	36.3±7.4	1.8±0.1	210.3±23.2	30.4±1.2	2.1±0.2
Biotin	16	242.4±17.3	36.3±7.4	1.8±0.1	224.9±50.3	34.5±2.3	1.4±0.4
Folic acid	16	242.4±17.3	36.3±7.4	1.8±0.1	128.5±22.4 ^a	24.1±10.5	1.7±0.1
Inositol	16	242.7±17.3	36.3±7.4	1.8±0.1	220.0±7.5	35.7±6.8	3.1±0.9

*1 Liver weight (g)×100/body weight (g).

*2 Means ±SD (n=3).

a, b Significantly different from the control group (respectively p<0.01, p<0.05).

した。イシダイの血液性状および比肝重に関する資料はまだそれほど多くない。本実験における対照区の魚の大部分は赤血球数 $200\sim 300 \times 10^4/\text{mm}^3$ 、Ht値30~40%、比肝重1.5~2.5%の範囲にあった。早期に欠乏の徴候が発現してへい死率も高かったビタミンB₆およびパントテン酸の欠乏した魚の赤血球数、Ht値および比肝重はいずれも対照区に比べて有意に低く ($p < 0.05$ または 0.01)、生理的な障害が大きいことを示している。また、B₆およびパントテン酸に次いで成長およびへい死率に及ぼす影響の著しかったC、B₁、B₂、コリンおよびニコチン酸の欠乏した魚では赤血球数およびHt値が一部の例外を除いて有意に低下し、比肝重も低くなる傾向を示した。一方、欠乏の影響がそれほど大きくなかったビタミン、すなわちB₁₂、ビオチン、葉酸およびイノシトールのうち、前二者の欠乏した魚では赤血球数、Ht値、比肝重のいずれにも有意差はみられなかった。しかし葉酸欠乏魚では赤血球数が著しく低下した ($p < 0.01$)。またイノシトール欠乏魚では比肝重が、個体差が大きくて有意差はなかったものの、各ビタミン欠乏魚の中で唯一増大するとともに、肝臓の色調が対照に比べかなり白っぽくなることを認めた。葉酸欠乏は貧血防止作用を、^{7,2)}イノシトールは抗脂肪肝作用を有することがそれぞれ知られている。イシダイ稚魚の場合もこれと同じ傾向を示すものと考えられた。なお、各ビタミンの回復区における各指標は、おおよそ対照区と同等の値を示した。

II-3. 考察

各ビタミン欠乏区の魚の欠乏徴候とその出現時期、成長、へい死率、血液性状、比肝重などによってイシダイ稚魚における水溶性ビタミンの要求性を大別すれば、Table II-3のようにまとめることができる。すなわち要求性の大きいと判断されるものから順に次のI~III群に分けられる。

Table II-3. Comparison of growth and mortality of fish fed the diets deficient in water-soluble vitamins

Group	Deficient vitamins	Feeding period (weeks)	Relative weight gain* (%)	Mortality (%)
I	B ₆	8	37.5	71.8
	Panto. acid	10	19.0	88.3
II	B ₁	14	17.0	60.0
	B ₂	14	21.4	59.8
	C	13	31.5	56.3
	Choline	14	26.2	18.2
	Nicot. acid	14	10.2	11.8
	B ₁₂	16	48.7	18.2
III	Biotin	16	57.2	18.8
	Folic acid	16	58.2	13.5
	Inositol	16	61.3	3.3

* See Fig. II-12.

まず第Ⅰ群は、欠乏によって最も早く食欲減退と成長低下をひき起こし、へい死率も70%以上に達したビタミンで、B₆およびパントテン酸がこの群に属する。

第Ⅱ群は、第Ⅰ群に次いで食欲減退と成長低下が早く現われ、へい死率が50%以上に達したビタミン、すなわちB₁、B₂およびC、並びにへい死率は20%以下であったが食欲の減退と成長不良の著しいビタミン、すなわちコリンおよびニコチン酸がこの群に属する。イシダイ稚魚におけるこれらのビタミンの要求性は、いずれも第Ⅰ群に次いでかなり高いことが分かった。なお、この第Ⅱ群は表中に破線で示したようにへい死率の高いB₁、B₂およびCのグループと、成長不良は著しいがへい死率の低いコリンおよびニコチン酸のグループに分けることができる。すなわちB₁、B₂およびCの欠乏した魚はいずれも飼育4週目頃から成長の低下が認められ、やがて死亡魚が増加したが、コリンおよびニコチン酸の欠乏では試験開始後間もない頃から早くも食欲減退に伴う成長不良を示したにもかかわらず、へい死魚は11週目頃までほとんど見られなかった。

第Ⅲ群は、ビタミンB₁₂、ビオチン、葉酸およびイノシトールであり、第Ⅰ群および第Ⅱ群に比べると欠乏による成長の低下は穏やかであり、へい死率も20%以下であった。しかし、それぞれの欠乏飼料を投与する時期が長くなるにつれて、いずれも成長の低下が目立つようになった。これより、イシダイ稚魚は、飼育条件によっては、これらのビタミンも必要とすることが分かった。

なお、本実験で観察された各ビタミン欠乏の外見的な徴候をTable II-4 にまとめて示した。

魚類のビタミン要求量は魚種、成長段階、飼（餌）料の組成と品質などによって異なるばかりでなく、魚の生理状態や飼育海水の物理的、化学的および細菌学的条件によっても異なるこ

Table II-4. Water-soluble vitamin deficiency symptoms

Deficient vitamins	Deficiency symptoms
B ₆	Poor appetite, abnormal swimming, erratic swimming, loss of equilibrium, anorexia, reduced growth, high mortality.
Panto. acid	Poor appetite, tetany, anorexia, lethargy, retarded growth, high mortality.
B ₁	Poor appetite, hyperirritability, anorexia, retarded growth, high mortality.
B ₂	Poor appetite, lethargy, retarded growth, high mortality.
C	Poor appetite, ascites, flexing of vertebra, anorexia, lethargy, abnormal swimming, retarded growth, high mortality.
Choline	Poor appetite, retarded growth.
Nicot. acid	Poor appetite, anorexia, retarded growth.
B ₁₂	Poor appetite, reduced growth.
Biotin	Poor appetite, hyperirritability, reduced growth.
Folic acid	Poor appetite, hyperirritability, reduced growth.
Inositol	Poor appetite, reduced growth.

とが知られている。¹⁷⁻²¹⁾また、これまで海水魚の水溶性ビタミンの要求に関する研究例はまだまだ著しく乏しい。

従って、平均体重2.4gのイシダイ稚魚を112日間飼育してビタミンの要求性を調べた本実験の結果だけから、直ちにイシダイのビタミン要求の特性を論ずることはできない。しかし、米ら¹⁵⁾が平均体重42gのマダイを用いて102日間飼育した実験では、欠乏症状の程度および出現の早さによって各ビタミンの要求性を次の4群すなわちB₆、コリンおよびパントテン酸；B₁₂、イノシトール、ニコチン酸およびB₂；B₁およびC；ビオチン、パラアミノ安息香酸および葉酸、の順に大別できたと報告している。

また、細川ら¹⁴⁾は平均体重28.7gのハマチを40日間飼育して水溶性ビタミンの必要性を調べ、パラアミノ安息香酸以外のビタミン欠乏区では1～5週間で食欲不振と成長停滞が現われたこと、特にコリン、パントテン酸およびB₆の欠乏では極めて短期間に成長が停滞したこと、パントテン酸、ビオチン、C、B₁、B₂、ニコチン酸およびB₁₂の欠乏では日数の経過とともにへい死率が高くなったこと、などを報告している。

このようなマダイおよびハマチの水溶性ビタミン要求の特性を、本研究により明らかになったイシダイのそれと比較してみると、B₆、パントテン酸およびコリンの欠乏により早期から著しい成長低下がみられ、特にB₆およびパントテン酸の欠乏により高いへい死率がみられたこと、一方、葉酸およびビオチンの欠乏による成長低下は遅く、僅かであったこと、など多くの点で共通性が認められる。したがって、イシダイの水溶性ビタミンの要求性は、基本的にはマダイやハマチのそれと差異がないように思われる。

なお、ビタミンC（アスコルビン酸、AsA）欠乏飼料を与えたイシダイ稚魚は比較的早い時期すなわち飼育約5週目頃から欠乏症状を示し、へい死率も顕著に増加したが、これは既報の淡水魚の場合と著しく異なっている。すなわち、魚の成長およびへい死率を指標とした淡水魚のAsA欠乏症の発現までの期間は、ニジマス、10～24週間；^{4-6, 73)}ギンザケ、16～24週間；⁵⁾カワマス、34週間；⁹⁾アメリカナマス、10～16週間^{7, 8, 72)}などの長期を要することが報告され、さらに欠乏症状を示した魚の肝臓には10μg/g以上のAsAが残存していた。^{2, 5-7)}これに対し、海水魚では、ハマチ、4～6週間；^{13, 14, 44)}マダイ、6～8週間；^{15, 45)}アカメ、4週間¹⁶⁾など、イシダイの場合と同様に短期間で成長不良などの欠乏症がみられ、しかも欠乏魚の肝臓AsA含量は痕跡程度である場合が多い。^{16, 43)}AsAの要求性は魚の大きさ¹⁸⁾や飼育水温²⁰⁾などの実験条件によっても異なるが、欠乏症発現までの期間でみる限り、AsA要求性は淡水魚より海水魚の方が高いものと推察される。

第Ⅲ章 イシダイ稚魚のアスコルビン酸要求量

第Ⅱ章において、イシダイ稚魚では AsA 欠乏の症状が比較的早く出現し、へい死率も高いことを認めた。しかし、養殖魚の AsA 要求量は成長段階によって異なるばかりでなく、種々の環境因子や生理的条件によっても異なることが魚類養殖の現場においては経験的によく知られている。そこで本章では、イシダイ稚魚の成長と健康に必要な AsA の要求量（飼料 AsA の至適添加量）を飼育環境の異なるそれぞれの条件下で検討した。

Ⅲ－１．環境変動の小さい飼育条件下におけるアスコルビン酸要求量⁷⁾⁵⁾

養殖魚の成長および健康に影響を及ぼす環境因子としては、飼育水温、溶存酸素量、塩分濃度などの変動、赤潮など有害プランクトンの発生、魚病細菌の発生などが主に挙げられる。本実験ではこれらの環境因子の影響を可能なかぎり除いた飼育条件下でイシダイ飼料の至適 AsA 添加量を検討した。

Ⅲ－１－１．実験方法

(1) 供試魚と飼育条件

本学水産研究所で生産された平均体重2.4gのイシダイ稚魚45尾ずつを200lパンライト水槽に収容し、9月から12月にかけて16週間の飼育試験を行った。飼育水は、魚に対する環境ストレスをできるだけ軽減するために、高架式砂じゃりろ過槽でろ過した海水を水温24～27℃、溶存酸素量4ml/l以上になるように調節し、紫外線殺菌して用いた。飼育水の注水量は8.5l/minとし、通気量12l/minでそれぞれ流水飼育した。飼育期間中の環境要因の変動をFig.Ⅲ－1に示した。

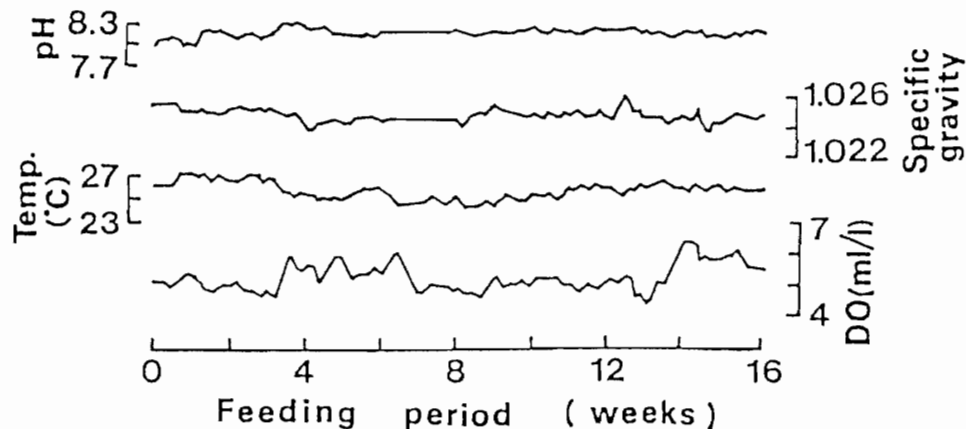


Fig.Ⅲ-1. Changes in temperature, pH, specific gravity and dissolved oxygen content of sea water during the feeding experiment.

(2) 飼料組成と投餌法

基本飼料の組成は、第Ⅱ章に記したビタミンフリーカゼインをタンパク質源とする精製試験飼料から AsA を抜いたものとした。但し、飼料の保形性をさらに高めるため、粘結剤としてはカルボキシメチルセルロースを用いた。AsA-ナトリウム塩を飼料乾重100 g 当たり AsA として0, 25, 50, 75, 100および300mgになるようにそれぞれ添加した6飼料区を設定した。飼料区による AsA 添加量の差はセルロース含量を増減することによって補った。給餌は1日2回とし、成長に応じて魚体重の2～4% (乾重) を投与した。飼料は水分含量35%となるように蒸留水を加え、さらに3%水酸化ナトリウム溶液を用いてpHを6.9に調整した後、造粒機で1.1～2.0mm径のモイストペレットに成型した。調製した飼料は直ちに1回当たりの投餌量に小分けしてポリビニール製小袋に詰め、真空包装して-20℃で保存した。保存期間は3～5日間とした。

(3) 測定項目と方法

体重測定を2週間目毎に行い、各区の増重率および飼料効率を求めた。AsA 欠乏徴候とへい死魚数は毎日記録し、2週間毎に各区のへい死率 (%) を算出した。成長低下やへい死などの欠乏徴候が明らかに発現した試験区では、その半数の魚に飼料乾重100 g 当たり AsA 300mg を添加した飼料を投与して、回復試験を行った。試験終了時に各区から5尾以上の試料魚を取り上げ、それぞれについて血液を脊椎尾部からヘパリン処理注射器で採取し、一部をヘマトクリット (Ht) 値およびヘモグロビン (Hb) 濃度の測定に供した。残りの血液は数分以内に氷冷、遠心分離して血漿を分取し化学成分の分析に供するまで-70℃で凍結保存した。採血後の試料魚は即殺し、直ちに脳、鰓、腎臓および肝臓を採取して秤量した。秤量後の臓器はドライアイスを用いて凍結し、AsA の定量に供するまで-70℃で保存した。一部の試料魚についてはX線写真を撮影した。組織 AsA 含量の測定は、ヒドラジン法で総 AsA のオサゾンを調製した後、酢酸エチルに転溶し、HPLC (島津LC-6型) を用いて測定した。⁷⁶⁾ Ht値は毛細管法で測定した。Hb濃度はアザイドメト法、グルコースは酵素法により京都第一科学社製 RaBAスーパーを用いてそれぞれ測定した。⁷⁷⁾ 血漿総タンパク質 (T-Pro) はビュウレット法、カルシウムは OCPC 法、アルカリ性ホスホターゼ (ALP) 活性はP-ニトロフェニール ホスフェート法により、京都第一科学社製SPOTCHEMを用いてそれぞれ測定した。比肝重 (%) = $100 \times \text{肝臓 (g)} / \text{体重 (g)}$ も測定した。

Ⅲ-1-2. 実験結果

(1) 増重率, 飼料効率, 欠乏症およびへい死率

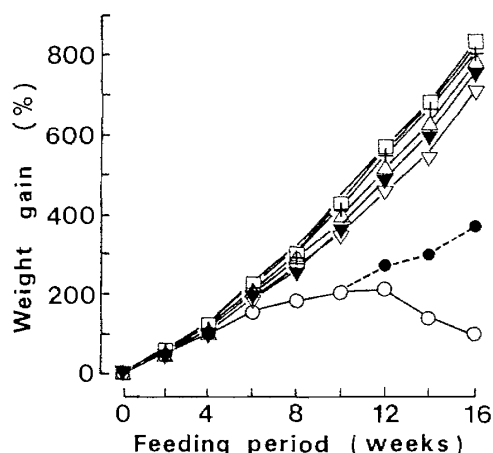


Fig. III-2. Effect of dietary ascorbic acid levels on the growth of the Japanese parrot fish. Dietary ascorbic acid levels (mg/100g): ○, 0; ▽, 25; ▼, 50; △, 75; +, 100; □, 300; ●, fed with AsA 300mg diet for recovery test.

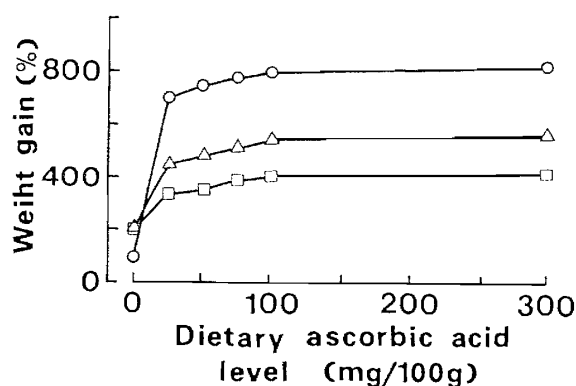


Fig. III-3. Relationship between dietary ascorbic acid levels and weight gains of the Japanese parrot fish, □, after feeding for 10 weeks; △, for 12 weeks; ○, for 16 weeks.

各飼料区インダイの成長を増重率で比較して Fig. III-2 に示した。AsA 添加量 0 mg の区では 8 週目頃から食欲減退、成長低下、遊泳異常、水槽底部に静止等の欠乏症状が認められた。しかし、図から明らかなように、飼料乾重 100 g 当たり AsA 25mg 以上を添加した各飼料区ではいずれも正常に成長して増重率に顕著な差はなく、食欲不振その他の症状もみられなかった。飼育 16 週目における各飼料区インダイの飼育結果を Table III-1 に示した。AsA 添加量 0 mg の区を増重率および飼料効率、AsA 添加量 25mg 以上の区に比べて著しく低く、へい死率は 28% に達した。また、明らかな骨格異常魚は観察されなかったが、X 線撮影の結果、外観的には正常な魚でも 6 尾中 4 尾に椎体異常が認められた。飼育 10 週目から行った回復試験では各指標に顕著な回復が認められた。一方、AsA 添加量 25mg 以上の区を増重率および飼料効率は AsA 添加量に比例してわずかに増加したものの顕著な差はみられなかった。なお、実験飼料投与後 10 週目、12 週目および 16 週目におけるインダイの増重率と飼料 AsA レベルとの関係を図示すれば Fig. III-3 のとおりである。本図から、いずれの飼育期間においても、イン

Table III-1. Results of feeding experiment of the Japanese parrot fish with diets containing different levels of ascorbic acid for 16 weeks

Diet No.	AsA level in diet (mg/100g)	Daily feed intake (%)	Weight gain (%)	Feed efficiency (%)	Mortality (%)
1	0	3.3	97.0	23.8	28.4
1-R*	300	3.1	364.5	30.8	23.6
2	25	3.8	706.8	49.6	6.7
3	50	4.0	753.3	47.5	8.9
4	75	3.8	782.1	50.4	13.3
5	100	3.7	803.0	52.8	8.9
6	300	3.6	825.6	53.9	4.4

* Recovery test on Diet No. 1 group at week 10.

ダイの成長は飼料100 g 当たり AsA 添加量25mg以上の区ではほぼ一定となることがわかった。AsA 添加量 100mgまではいくらか増大する傾向を示したが AsA 添加量25mg区との間に有意差はなかった。

(2) 血液性状, 血漿化学成分含量および比肝重

飼育16週目における各飼料区イシダイの健康診断指標として測定した血液の各種成分含量および比肝重をまとめてTable III-2 に示した。AsA 添加量 0 mg区のHb 濃度およびHt 値は AsA 添加量25mg以上の区に対していずれも著しく低く, 貧血であることを示した。また, 血糖値, T-Pro, ALP, カルシウムおよび比肝重も AsA 添加量25mg以上の区に比べ有意に低下した。飼育10週目から行った回復試験では, 各指標とも明らかに回復した。一方, AsA 添加量25mg以上の飼料区ではこれらの各指標にほとんど区間差はみられなかった。

Table III-2. Levels of hemoglobin, hematocrit, glucose, total protein, alkaline phosphatase and calcium, and the hepatosomatic index of the Japanese parrot fish fed with experimental diets for 16 weeks (Mean \pm SD, n=5)

Diet No.	AsA level in diet (mg/100g)	Hemoglobin (g/dl)	Hematocrit (%)	Glucose (mg/dl)	Total protein (g/dl)	Alkaline phosphatase (IU/l)	Calcium (mg/dl)	Hepatosomatic index (%)
1	0	2.6 \pm 1.6 ^b	9.9 \pm 5.7 ^b	25.8 \pm 6.3 ^b	2.0 ^b , * ¹	513 \pm 12 ^a	9.6 \pm 0.2 ^b	0.8 \pm 0.1 ^b
1-R* ²	300	6.8 \pm 1.8	25.1 \pm 6.0	73.6 \pm 16.1	3.3 \pm 0.7	936 \pm 191	11.5 \pm 0.6	2.1 \pm 0.4
2	25	7.4 \pm 0.6	29.1 \pm 3.9	62.8 \pm 5.4	3.8 \pm 0.6	842 \pm 253	12.7 \pm 0.7	2.8 \pm 0.5
3	50	7.9 \pm 1.1	30.9 \pm 3.5	60.1 \pm 4.4	4.0 \pm 0.4	924 \pm 299	12.6 \pm 0.6	2.6 \pm 0.2
4	75	7.6 \pm 1.4	29.7 \pm 4.7	76.5 \pm 14.2	3.8 \pm 0.5	1049 \pm 238	12.9 \pm 1.0	2.4 \pm 0.5
5	100	7.5 \pm 1.0	27.8 \pm 2.8	67.6 \pm 16.2	3.7 \pm 0.3	972 \pm 138	12.1 \pm 0.5	2.4 \pm 0.3
6	300	7.7 \pm 1.8	31.1 \pm 4.4	72.6 \pm 18.8	3.5 \pm 0.2	951 \pm 238	12.4 \pm 0.7	2.3 \pm 0.5

*¹ All values are less than 2.0g/dl (n=5).

*² Recovery test on Diet No. 1 group at week 10.

a, b Significantly different from the other groups ($p < 0.05$, $p < 0.01$ respectively).

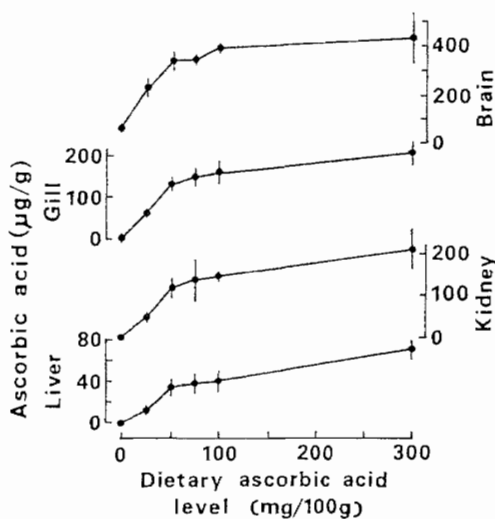


Fig. III-4. Effect of dietary ascorbic acid levels on the ascorbic acid contents in liver, kidney, gill and brain of the Japanese parrot fish.

(3) 各組織のアスコルビン酸濃度

飼育16週目における試料魚の脳, 鰓, 腎臓および肝臓の AsA 濃度と飼料 AsA レベルとの関係を Fig. III-4 に示した。これより脳, 鰓, 腎臓および肝臓の AsA 濃度は飼料 AsA 50mg以上の区ではほぼ飽和することが分かった。

III-1-3. 考察

まず魚の成長に主眼を置いて, イシダイ稚魚の増重率と飼料 AsA レベルとの関係を求

めた結果 (Fig. III - 3), 本実験条件下では, イシダイ稚魚は飼料100 g 当たり AsA 25mg を添加すれば正常な成長を示し, 16週間飼育しても食欲減退を始めとする骨格形成異常などの欠乏症状は発生しないことがわかった。また, 飼育16週目に測定した血液性状, 血漿成分含量および比肝重も (Table III - 2), AsA 添加量 0mg 区のみが AsA 添加量25mg 以上の区に対して有意に低下したが, AsA 添加量25mg 以上の区では, ここで測定した診断指標に関する限り, ほとんど区間差はみられなかった。以上の結果から, 本実験条件下で, イシダイ稚魚の正常な成長と健康状態に支障がみられない飼料 AsA の添加量としては25mg/100 g あれば十分であることが分かった。

一方, 飼育16週目におけるイシダイ稚魚各組織の AsA 濃度と飼料 AsA 添加量との関係を求めた結果 (Fig. III - 4) から, 組織 AsA の飽和濃度を指標とした場合に必要な飼料 AsA 添加量は少なくとも50mg/100 g であった。ここで測定した脳, 鰓, 腎臓および肝臓の AsA 濃度が魚体の AsA 貯留量を反映しているとすれば, 体内の AsA 量はこの飼料 AsA 添加量でほぼ飽和されると考えてよいであろう。従って, 前述の増重率および血液成分含量を指標とした飼料 AsA 添加量よりもかなり多いこの量は, ある程度の環境ストレス等にも対応できるいわゆる保健量²¹⁾とみなしてよいであろう。

魚類のアスコルビン酸要求量は魚種によって異なる¹⁷⁾ばかりでなく, 同じ魚種においても成長段階¹⁸⁾や飼育環境^{19-21, 78)}などによって異なることが知られている。今後さらに, 養殖現場の実状を或る程度考慮した各種条件下においても実験を行い, 飼育中におけるいろいろなストレスや細菌感染にも対応できる飼料アスコルビン酸添加量について検討する必要がある。²¹⁾

III - 2. 環境変動の大きい飼育条件下におけるアスコルビン酸要求量

前節で環境変動の小さい飼育条件下におけるイシダイの AsA 要求量を明らかにした。本実験では, マダイ, イシダイ, ハマチなど主な海水養殖魚の種苗生産シーズンであり, 溶存酸素量等の環境因子の変動が著しい春から秋にかけて, 養殖場近辺の自然海水をそのまま飼育水として用い, 環境因子の変動の大きい飼育条件下におけるイシダイの AsA 要求量を求めた。また, この結果を前節の結果と比較することによって養殖魚の AsA 要求量に及ぼす環境因子の影響について考察した。

III - 2 - 1. 実験方法

(1) 供試魚と飼育条件

近畿大学水産研究所で生産された平均体重2.4 g のイシダイ稚魚60尾ずつをそれぞれ200l パ

ンライト水槽に収容し、6月から10月までの18週間飼育した。養殖場近辺から汲み上げた海水を飼育水として用い、注水量8.5l/minで流水飼育した。飼育期間中の主な環境因子の変動をFig. III-5に示した。海水の水温は21~28℃、DOは1.5~5.5ml/l、pHは7.5~8.5、海水の塩分濃度（比重）は1.0225~1.0240の範囲内でそれぞれ大きく変動した。また、飼育期間中に赤潮（*Gymnodium nagasakiense*, et cetra）の流入が数回みられた。基本飼料の組成は第II章に示したのものからAsAを抜いたものを用い、飼料乾重100g当りAsA 0, 33, 100, 333 および999mgをそれぞれ添加した5飼料区を設けた。飼料の調製方法および投餌方法は第I章1節に示した通りである。

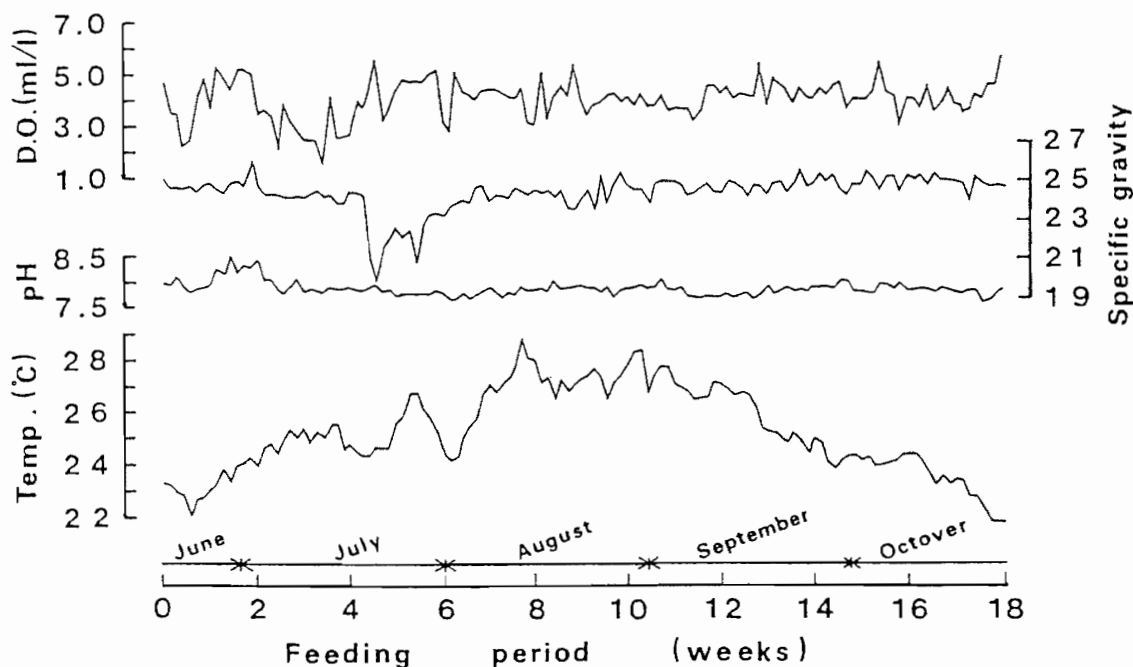


Fig. III-5. Changes in temperature, pH and dissolved oxygen content of sea water during the feeding experiment.

(2) 測定項目と方法

増重率、飼料効率およびへい死率は、前節と同様に求めた。成長低下やへい死などの欠乏徴候が明らかに発現した試験区では、その半数の魚に飼料100g当たりAsA 333mgを添加した飼料を投与して回復試験を行った。試験終了時には各区3尾以上の試験魚を取り上げ、それぞれについて血液を採取し、赤血球数およびHt値を測定した。また、前節に示した方法で各試験魚の肝臓を取り出し、AsA含量の測定に供した。赤血球数およびHt値は第II章に示した方法で、肝臓のAsA含量はヒドラジン法⁷⁹⁾でそれぞれ測定した。

Ⅲ-2-2. 実験結果

(1) 増重率, 欠乏症およびへい死率

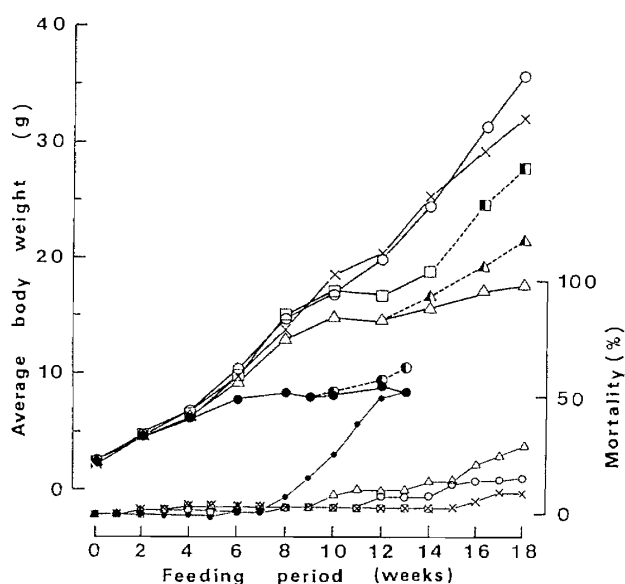


Fig. Ⅲ-6. Effect of dietary ascorbic acid levels on the growth and mortality of the Japanese parrot fish.

—●—, AsA 0mg; —△—, AsA 33mg; —□—, AsA 100mg; —○—, AsA 333mg; —×—, AsA 999mg per 100g dry diet. …●… , …▲… , …■… : fed with AsA 333mg diet for recovery test.

られなかったが、10週目頃から成長が低下した。AsA 添加量 0 mg 区では 9 週目, AsA 添加量 33 mg 区では 12 週目, AsA 添加量 100 mg 区では 14 週目からそれぞれ回復試験を行った結果, いずれの区とも成長等に明らかな回復が認められた。ただし, 回復までの期間は AsA 添加量が多い区程短かった。AsA 添加量 333 mg 以上の飼料区ではいずれも正常に成長し, 食欲不振およびその他の症状もみられなかった。

(2) 血液性状および比肝重

各飼料区の飼育終了時の赤血球数, Ht 値および比肝重を Table Ⅲ-3 に示した。AsA 添加量 0 mg および 33 mg 区の赤血球数および Ht 値は他区に比べて有意に低く, 貧血症状が認められた。また, 比肝重も AsA 添加量 33 mg 以下の区で低い値を示した。一方, AsA 100 mg 以上の飼料区では顕著な差はみられなかった。回復試験の結果, AsA 添加量 0 mg および 33 mg 区とも各指標に明らかな回復が認められた。

各飼料区の成長曲線およびへい死魚出現の状況を, Fig. Ⅲ-6 に示した。AsA 添加量 0 mg 区では 5 週目頃から成長が低下し始め前節と同様の欠乏症状を示した。また, 8 週目以降へい死魚が急激に増加した。AsA 添加量 33 mg 区では, AsA 0 mg 区よりやや遅く 8 週目頃から食欲減退および成長低下がみられ, 12 週目頃には欠乏区と同じような神経過敏, 遅鈍および遊泳異常を示し, 脊椎わん曲魚も 1 尾ではあるが認められた。またへい死魚は 12 週目頃から増えだし, 18 週目では約 30% となった。一方, AsA 添加量 100 mg 区では, 食欲減退およびへい死魚はほとんどみ

Table III-3. Effect of dietary ascorbic acid levels on erythrocyte count, hematocrit and hepatosomatic index of the Japanese parrot fish

AsA level in diet (mg/100g)	Feeding period (weeks)	Erythrocyte ($10^4/mm^3$)	Hematocrit (%)	Hepatosomatic index (%)*
0	13	125.1 ± 13.5 ^a	19.7 ± 6.1 ^a	1.1 ± 0.1
33	18	177.3 ± 16.3 ^a	25.4 ± 1.3 ^a	1.8 ± 0.5
100	18	232.0 ± 21.2	30.0 ± 4.4	3.3 ± 0.1
333	13	319.1 ± 14.2	36.6 ± 1.6	2.1 ± 0.7
	18	234.6 ± 20.5	35.6 ± 6.3	2.4 ± 0.5
999	18	216.4 ± 48.5	35.9 ± 4.4	2.6 ± 0.6

Results are expressed as mean ± SD of 3 fish.

* liver weight (g) × 100/body weight (g).

^a Significantly different from the control diet (AsA 333mg/100g) group ($p < 0.05$).

(3) 肝臓のアスコルビン酸濃度

AsA 含量の異なる各区飼料を摂取した魚の肝臓 AsA 含量を測定し、Table III-4 に示した。AsA 添加量 0 mg および 33 mg 区の肝臓の AsA 含量はいずれも痕跡程度であった。一方、

Table III-4. Effect of dietary ascorbic acid levels on the liver ascorbic acid content of the Japanese parrot fish

AsA level in diet (mg/100g)	Feeding period (weeks)	AsA content in liver ($\mu g/g$ wet weight)* ¹
0	13	trace
33	18	trace (80.2 ± 4.6)* ²
100	18	25.2 ± 4.7 ^a (82.0 ± 8.4)* ³
333	18	80.4 ± 17.8
999	18	100.4 ± 6.4

*¹ Results are expressed as mean ± SD of 3 fish.

*², *³ Figures in parentheses show the liver AsA content after recovery test with the control diet (AsA 333mg/100g) for 6 weeks and 4 weeks, respectively.

^a Significantly different from the control diet group ($p < 0.01$).

食欲減退およびへい死魚はほとんどみられなかったが、成長低下を示した AsA 添加量 100 mg 区の肝臓 AsA 含量は 25.2 $\mu g/g$ であった。また、AsA 333 mg 以上を添加した飼料区の肝臓 AsA 含量は 80~100 $\mu g/g$ を示した。

III-2-3. 考察

環境因子の変動の大きい本実験条件下で、魚の成長に主眼をおいた増重率を指標とした場合の飼料 AsA の至適添加量は、飼育 10 週目までは飼料乾重 100 g 当たり 100 mg、さらに飼育期間

がそれ以上延びた場合には約300mgと判定された。

一方、赤血球数、Ht値および比肝重を指標とした場合、いずれも AsA 添加量33mg以下の飼料区は AsA 添加量100mg以上の区に比べて顕著に低い値を示したが、AsA 添加量100mg以上の区ではここで測定した診断指標に関する限り、有意な区間差はみられなかった。以上の結果から、本実験条件下で、イシダイ稚魚の健康に必要な飼料 AsA の至適添加量は飼料乾重100g 当たり約100mgと考えられた。

前節において環境因子の変動の小さい飼育条件下でイシダイ稚魚の AsA 要求量を調べた場合、AsA 欠乏症が発現するのに要する期間はおおよそ 8 週間であり、さらに正常な成長と健康に支障がみられない飼料の AsA の至適添加量は25mg/100g またはそれ以下であった。これに対し、環境要因の変動の大きい本実験条件下で調べた場合、おおよそ 5 週間で AsA 0 mg 区の欠乏症が発現し、また、AsA 添加量33mg/100g 飼料区でも明らかな AsA 欠乏徴候が認められた。さらに、AsA 添加量100mg/100g 飼料を摂餌した魚でも血液性状および比肝重には顕著な支障はなかったものの、飼育10週目以上においては成長低下がみられた。

ニジマスでは正常なコラーゲン合成に必要な AsA 要求量は飼育水温の差によって異なることが知られている。²⁰⁾ また、高密度で飼育されたアメリカナマズでは AsA 欠乏症としての脊椎前わん症および側わん症が発現しやすいことが報告されている。⁷⁸⁾ 以上の実験結果から、海水養殖魚の AsA 要求量（飼料 AsA 添加量）は飼育水温、塩分濃度、溶存酸素分圧等の環境因子の変動、あるいは赤潮の発生、細菌の存在などによって著しく影響されることが明らかにされた。

第IV章 海水養殖魚の環境ストレス耐性に及ぼす 飼料アスコルビン酸投与の効果

養殖魚は常に多かれ少なかれ環境水の溶存酸素分圧、水温、塩分などの変動をストレスとして受けている。⁸⁰⁻⁸²⁾特に内湾に設置された網生簀に収容されている海水養殖魚は、潮流の変化等の影響で一時的な溶存酸素量の低下に基づく、いわゆるストレスをたびたび受けることが予想される。

海水魚のストレス反応については、環境ストレスによってホルモン（コルチゾール）の分泌が促され、そのストレスに対する生理的適応の起こることが知られている。⁸³⁾

しかし、魚類におけるこれらのいわゆるストレス反応にビタミンの欠乏あるいは摂取がどのように影響するかについてはまだほとんど研究されていない。第III章の結果より、イシダイのAsA 要求量は環境因子の変動によって左右されることが確かめられた。本章では、環境水の溶存酸素量の低下に対する海水養殖魚の耐性に及ぼす飼料 AsA 投与の効果を調べ、この低酸素ストレス負荷と AsA 要求量との関係を検討した。

IV-1. 急性低酸素ストレスの負荷に伴う呼吸数、横転率、血液性状等の変動

IV-1-1. 実験方法

(1) 供試魚と飼育条件

近畿大学水産研究所で生産したイシダイ 1 才魚35尾を500lパンライト水槽に収容し、100 g 乾飼料当たり AsA-カルシウム塩を AsA として100mg添加した飼料で40日間流水飼育した後実験に供した。予備飼育は、魚に可能な限りストレスを加えないことを前提に、飼育水の注水量 8.5l/min、通気量 2l/minとし、水温19.0~21.0℃、溶存酸素量 (DO) 4 ml/l以上にそれぞれ調節した。比重およびpH はそれぞれ1.0220~1.0240、7.8~8.2 の範囲であった。飼料の基本組成をTable IV-1に示した。すなわち、第I章で設定した精製試験飼料の組成を基に、タンパク質源として北洋魚粉を用いた飼料を調製し予備飼育に用いた。飼料の調製は第III章1節と同様の方法で行い、3.0 mm径のモイストペレットに成型した。調製した飼料は直ちに凍結し、-20℃で保存した。保存期間は長くとも6日間とした。なお、給餌は1日2回とし、飽食量を投与した。

(2) 低酸素ストレス負荷の方法

急性低酸素ストレスを各区試験魚に均一に負荷するために考案した流水循環方式実験水槽の模式図をFig. IV-1に示した。図中A、Cは500l容、Bは200l容のポリカーボネイト水槽で

Table IV-1. Composition of the test diets

Ingredient	%
White fishmeal	70
Pollack liver oil	5
α -Starch	10
Dextrin	9
Vitamin mixture* ¹	1
Mineral mixture* ²	1
CMC	3
AsA + α -Cellulose	1
AsA (mg/100g)* ³	100

*¹ Vitamins (mg/100g dry diet): thiamin HCl, 5; riboflavin, 20; pyridoxine HCl, 5; choline chloride, 500; nicotinic acid, 75; Ca pantothenate, 0.01; menadione, 4; α -tocopherol acetate, 40; α -cellulose, 98.99.

*² Minerals (mg/100g dry diet): Ca (H₂PO₄)₂·H₂O, 133; Ca lactate, 333; Fe citrate, 33; MgSO₄·7H₂O, 133; K₂HPO₄, 234; NaH₂PO₄·H₂O, 83; AlCl₃·6H₂O, 7; ZnCl₂, 20; CuSO₄·5H₂O, 10; KI, 7; MnSO₄·4H₂O, 7.

*³ Added as calcium ascorbate.

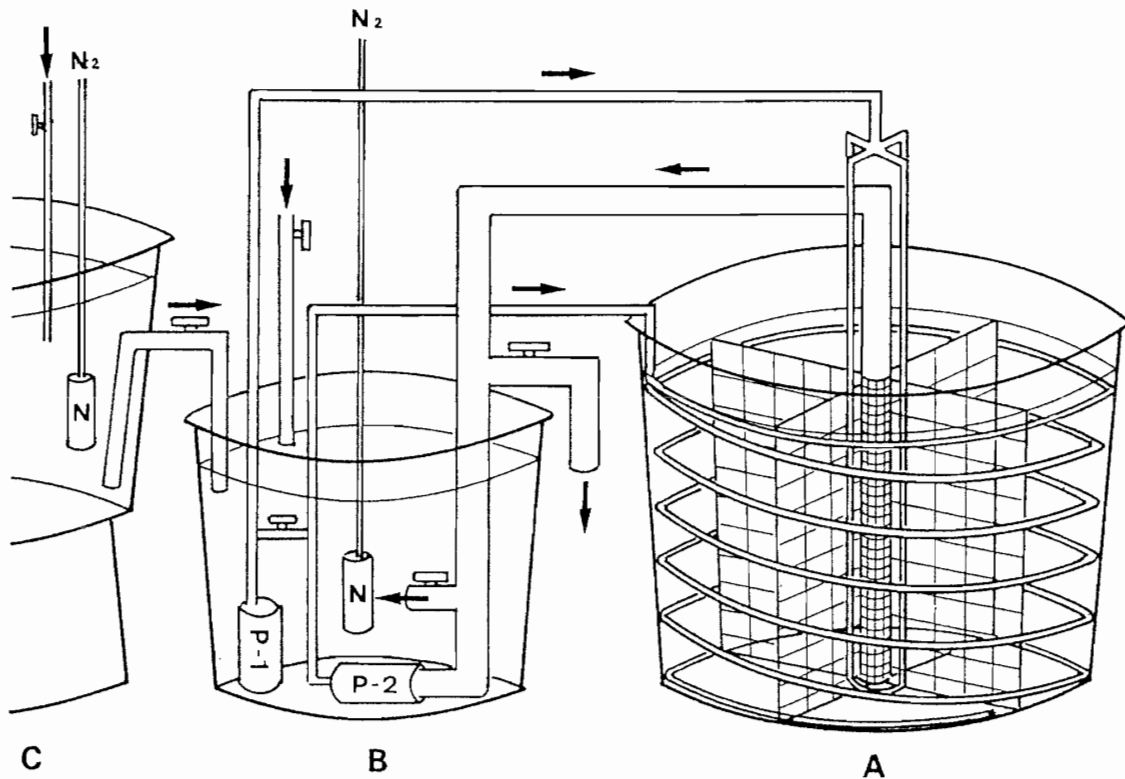


Fig. IV-1. Diagram of apparatus system used to study stress responses in the marine fish. A, Experimental tank ; B,C, Tank for preparing stressor sea water; P, Pump ; N, Instrument for dissolution of nitrogen ; \uparrow , Rout of sea water flow.

Aは実験用水槽，BはDO調節用水槽，Cは貯水槽である。実験開始後，数時間はBに一定量のろ過海水を注水しながら窒素ガスの送気量を調節し，徐々に酸素分圧を下げた。DO 2 ml/l程度からは，予め窒素ガスで調節したCの低酸素海水を，一定量注水しながら調節槽の窒素ガスで任意の酸素濃度にした。Bで任意の酸素濃度に調節した海水はポンプ1からA内の中心下部に設置した1 mm径スリットの円形パイプおよび数 μ m口径の多孔質ホースに送り，下層からの水流と側面からの拡散によってA内の酸素濃度を暫時均一にした。Aの海水は中心部ポールを通じて回収し，一部は排水，一部はC内に水流を起こして攪拌され，残りはポンプ2を通して再びA内に送水した。このような流水循環方式を用いることによって，A内のアンモニア濃度の上昇およびDOの急変を防いだ。なお，ストレス負荷中の水温，比重，pHおよびアンモニア濃度はそれぞれ20.2~21.0°C，1.0224~1.0234，7.9~8.1および0.1ppm以下であった。

調節槽および負荷槽に設置された2台の酸素メーターでDOをモニターしながら，約3時間かけて酸素量を0.9~0.8ml/l程度にまで下げ，約4時間その濃度を保った後，徐々に酸素濃度を上げ，3時間かけて正常にもどした。ストレス負荷中，負荷槽中央部に固定したサイホン管より15~30分毎に採水し，DOをウインクラ法で測定した。

なお，負荷槽は各区試料魚のストレス耐性を比較できるように硬質ビニール製のネットで4区画に分け，さらに魚が水面であばれないように水面下5 cmの位置に同様のネットでフタをした。

(3) 測定項目と方法

低酸素ストレスを負荷したときの魚の行動を観察しながら，血液のHt値，Hb濃度，赤血球数，血漿グルコース含量及びAsA含量の変動を測定した。魚の行動は常時，観察・記録し，試験魚の1分当たりの鰓蓋運動数を15~30分毎に数えた。また，魚が遊泳行動を停止し横転するまでの時間を測定して累積横転率（総尾数に対する横転魚の%）を求めた。血液採取のための試験魚の取り上げは，魚の状況に応じて平常時，鰓蓋運動数増加時（DO 3 ml/l以下），横転直前，横転時，横転からの回復直後，鰓蓋運動数減少の途中および鰓蓋運動数平常回復時の7段階に分けて行い，それぞれの状況下で魚を3尾ずつ静かに取り上げ，直ちに脊髓尾部から直接ヘパリン処理注射器で採血した。血液は第Ⅲ章1節に記した方法で各項目の測定用に分取し，血液AsA含量はヒドラジン法⁷⁹⁾により，赤血球数は日本光電工業社製CELLTAC⁸⁴⁾を用いてそれぞれ測定した。その他の項目は第Ⅲ章1節と同様の方法で測定した。

IV-1-2. 実験結果

(1) 鰓蓋運動数および横転率

DO低下に伴う試験魚の1分当たりの鰓蓋運動数および横転率の推移をFig. IV-2に示した。

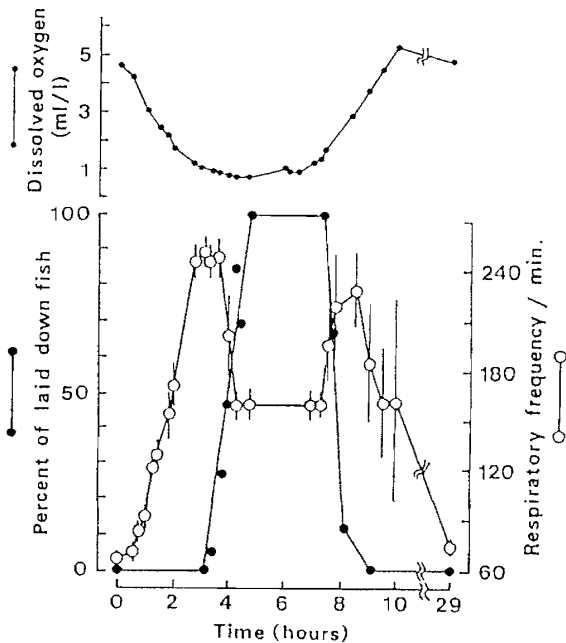


Fig. IV-2. Variations in respiratory frequency and laid down % of the Japanese parrot fish stressed by changing water oxygen level.

鰓蓋運動数は、DO 3 ml/l 以下になると増加し始め、実験開始後約3時間目にDOが1 ml/l 前後になると最大値を示した。その後、鰓蓋運動数は徐々に低下し始め、頭部および体が白色化し、水平感覚を喪失して横転するものが増加した。全部の魚が横転した後に鰓蓋運動数はやや安定したが、やがて硬直およびけいれん等の症状を示して狂奔、へい死する魚が増加した。次いで、DOを1~0.8 ml/l に約4時間保持した後、3時間かけてDOを通常レベルに戻したところ、酸素量の増加に伴い、鰓蓋運動数は再び増加し、横転魚は徐々に正常に遊泳し始め、全部の魚が回復したところから鰓蓋運動数は再び減少した。

(2) 血液性状

DO低下に伴う試験魚の血液のHt値、Hb濃度および赤血球数の変動をFig. IV-3に示した。各指標ともDO 2 ml/l 前後では平常時と差はみられなかったが、DOが1 ml/l 以下になって魚が横転する直前にはHt値がやや増加する傾向を示した。魚の横転時ではHt値、Hb濃度および赤血球数ともに増加した。酸素量が回復するとともにHt値、Hb濃度および赤血球数は減少する傾向を示した。

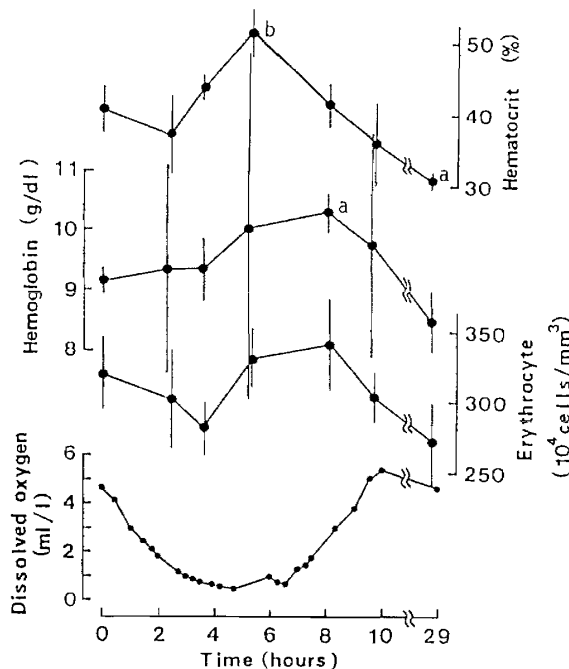


Fig. IV-3. Changes in blood characteristics of the Japanese parrot fish stressed by changing water oxygen level. a, b Significantly different from the values at 0 time (respectively $p < 0.01, p < 0.05$).

上記血液性状の測定結果から平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)および平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)を算出し、Fig. IV-4に示した。その結果、

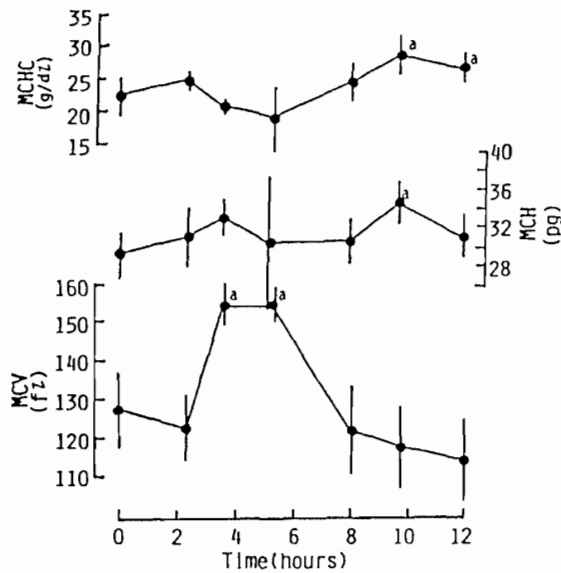


Fig. IV-4. Changes in mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin and mean corpuscular hemoglobin concentration of the Japanese parrot fish stressed by changing water oxygen level. ^a Significantly different from the values at 0 time ($p < 0.05$).

(4) 血液のアスコルビン酸濃度

Fig. IV-6 には、血液 AsA 含量の変動を示した。DO 2 ml/l 前後の AsA 含量には、平常時に比べ顕著な差はみられなかったが、DO が 1 ml/l 以下になる 4 時間後の横転直前時にはグルコースとは逆に、一時的に減少する傾向を示した。しかし、魚の横転時にはグルコースと

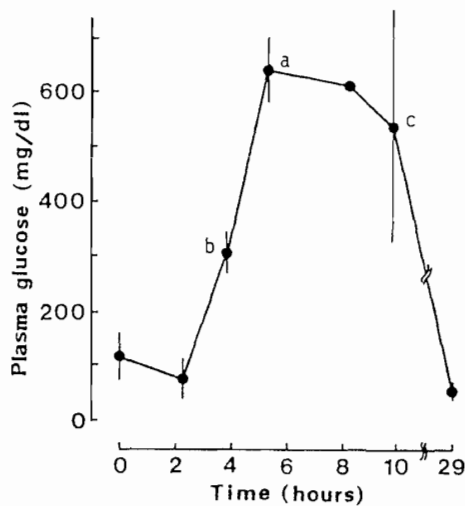


Fig. IV-5. Changes in plasma glucose levels of the Japanese parrot fish stressed by changing water oxygen level. ^{a, b, c} Significantly different from the value at 0 time (respectively $p < 0.001, p < 0.01, p < 0.05$).

MCHおよびMCHCはいずれも低酸素ストレスの負荷後に有意に増大したが、MCVは横転直前から横転時にかけて顕著に増大し、その後減少した。

(3) 血漿グルコース量

Fig. IV-5 には、DO低下に伴う血漿グルコース量の変動を示した。グルコース量はDO 2 ml/l 前後では顕著な変動を示さなかったが、DOが 1 ml/l 以下になる 4 時間後の横転直前時には急増し、さらに、魚の横転中には著し高くなり平常時の約 6 倍量に達した。DOの回復後もグルコース量は高い値を示していたが、実験開始29時間後には平常時にまで戻った。

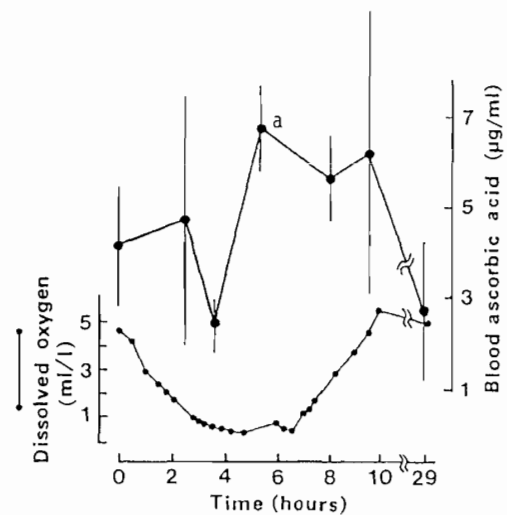


Fig. IV-6. Changes in blood ascorbic acid concentrations of the Japanese parrot fish stressed by changing water oxygen level. ^a Significantly different from the value at 0 time ($p < 0.05$).

同様に有意に高値を示し、その後、DOが回復してもしばらくは高い値を示した。29時間後にはAsA含量は低下したが開始時よりも低くなる傾向を示した。

IV-1-3. 考察

魚類の環境水DOの低下に対する生理学的研究はこれまでかなり多くなされ、低酸素における魚の酸素消費量、血液性状、血圧などに対する影響が詳細に調べられている。各測定指標の変動は低酸素に対する適応反応として複雑な様相を示すが、基本的に魚類は環境水の酸素欠乏によって動脈血の酸素分圧が低下すると呼吸頻度および呼吸振幅の増加にみられるように換水量を増やして対処しようとする。⁸⁵⁾ 本実験においても、イシダイは低酸素ストレスに対し、鰓蓋運動数を顕著に増加させたが、横転状態に入る直前にはどの魚にも鰓蓋運動数の減少が認められた。このような各指標の変動は同様の実験方法で調べたイシガキダイにおいても観察された。

魚類の低酸素ストレス負荷時の生理的適応反応の中で血液性状の変動については古くから多くの報告があり、ストレス条件や魚種による違いがみられるが、多くは赤血球数、Ht値およびHb濃度のいずれかの上昇を観察していることが多い。⁸³⁾ また、海水魚におけるこれらの研究はまだ少ないが、ハマチ、^{86, 87)} ウマズラハギ、カワハギ⁸⁷⁾ およびマダイ⁸²⁾ でも同様に低酸素による血液性状指標値の上昇が報告されている。これらの反応は環境水のDO低下に対して獲得酸素量を増大させるための適応反応と考えられ、DO低下時⁸⁶⁾ や激しい運動後⁸⁸⁾ には脾臓からの血球放出の起こることが知られている。同様に血漿水分が循環血液の外に出て血液濃縮の起こることもみられ、⁸⁸⁾ 特に海水魚では捕獲、輸送等のストレスによる利尿現象なども観察されている。⁸⁹⁾ 本実験に用いたイシダイでもDOの低下に伴って血液性状の各指標値が増加し、適応的に血球放出および血液濃縮の起こっていることが推測された。

一方、DO 1 ml/l 以下の横転直前から横転時にかけてはMCVが顕著に増加し、血球が膨潤していることが示された。赤血球の膨潤は、重炭酸イオンの増加によって浸透圧が高まり、水分が血球内に侵入することによって起こる。重炭酸イオン濃度は血漿中の二酸化炭素分圧、血漿イオン濃度差および非重炭酸緩衝物質によって増減し、魚類では特に血漿イオン濃度差に依存する場合が多い。⁹⁰⁾ これよりDOが顕著に低下したときには血漿イオン濃度の顕著な変動の起こることが間接的に示唆された。

血漿グルコース量の上昇はコルチゾールの分泌とともにストレスの負荷に対する指標として広く認められ、環境水の低酸素、水温、塩分濃度；飼育密度；麻酔および取り扱いなど種々のストレスで増加することが知られている。^{83, 91, 92)} また、グルコース量の増加はDOの低下速

度が大きい程、短時間内に起こることが報告されている。⁸²⁾ グルコースの生成はカテコラミン、コルチゾールなどに誘導されることが知られているが、^{83, 91-94)} 本実験では、横転直前からグルコース量の急激な増加がみられ、横転中には平常時の約6倍もの値を示した。このことは横転、へい死までの期間に、内分泌反応に基づく顕著なストレス反応が起こっていることを示している。

ストレス反応における AsA の変動については、哺乳類についてかなり古くから認められ、特に副腎における AsA の減少は副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) の放出と顕著な相関性を示すことが広く知られている。⁹⁵⁾ このような反応は近年、詳細に検討され、ラット、^{29, 34, 96)} モルモット、^{24)・25)} ニワトリ²⁶⁾ など種々の動物でストレスの種類または強度によって組織の AsA 含量が特異的に変動することが報告されている。一方、魚類におけるそれらの知見はまだ著しく少ないが、ボラ⁹⁷⁾ およびニジマス⁹⁸⁾ では、拘束、水温および塩分濃度の変動に応じて組織 AsA 含量が変動することが報告されている。しかし、魚類における低酸素ストレス負荷時の AsA の挙動についての報告はまだみられない。本実験の結果、低酸素ストレス負荷時の血液 AsA 含量は DO 低下時に一時的に減少する傾向を示すが、魚の横転中には顕著に増加することが分かった。ストレス反応における AsA の生理的役割については、まだ明らかにされていないが、⁹⁵⁾ 本実験の結果から魚類の低酸素ストレス耐性に対して AsA が何らかの役割を有する可能性が示唆される。

IV-2. 急性低酸素ストレス耐性に及ぼす飼料アスコルビン酸投与の効果⁹⁹⁾

上記の実験結果から、低酸素ストレス反応に AsA の関与する可能性が示唆された。そこで本実験では AsA 含量の異なる各区飼料でそれぞれ一定期間飼育したインダイおよびインガキダイに、前節と同様の低酸素ストレスを負荷し、そのストレス耐性に及ぼす飼料 AsA 投与の効果調べた。

IV-2-1. インダイ1才魚を供試魚とした場合

(1) 実験方法

a. 供試魚と飼育条件

AsA 添加量の異なる各区飼料で120日間飼育した平均体重約250gのインダイ1才魚各区12尾ずつに低酸素ストレスを負荷し、試験魚の累積横転率を指標として急性低酸素ストレス耐性に及ぼす飼料 AsA 投与の影響を調べた。予備飼育中の飼料は、前節に示した基本組成に AsA-カルシウム塩を AsA として乾飼料100g当たり0, 30, 100および300mgになるようそれぞれ添加し

た4飼料区とした。予備飼育および飼料調製は前節と同様に行った。

AsA 含量の異なる各区飼料で飼育したイシダイの平常時の肝臓および血液の AsA 含量ならびに血液性状を本章1節に記した方法で測定し、Table IV-2 に示した。肝臓および血液の AsA 含量は、飼料 AsA 含量の増加に伴って高くなり、肝臓では AsA 0 mg区から100mg区までの各区間に、血液では AsA 0 mg区と30mg以上の区との間にそれぞれ有意差がみられた。また、平常時の各区の血液性状には有意差はみられず、AsA 0 mg区に成長不良等の欠乏症はみられなかった。

Table IV-2. Effect of dietary ascorbic acid contents on the liver and blood ascorbic acid concentrations and blood characteristics in the Japanese parrot fish fed the diets*

Dietary AsA(mg/100g)	0	30	100	300
Liver AsA ($\mu\text{g/g}$)	1.8 ± 1.3^a	16.6 ± 2.7^b	40.9 ± 2.7^c	53.3 ± 11.1^c
Blood AsA ($\mu\text{g/ml}$)	1.0 ± 1.1^a	1.9 ± 1.0^c	4.1 ± 1.7^c	5.5 ± 1.0^c
Ht value (%)	43.6 ± 10.4	51.5 ± 5.6	40.7 ± 3.1	42.3 ± 6.9
RBC (10^4cells/mm^3)	336 ± 78	337 ± 26	319 ± 25	314 ± 83
Hb (g/dl)	9.1 ± 1.0	9.6 ± 0.7	9.1 ± 0.2	9.2 ± 1.6

* Data presented as mean \pm SD (n=3).

a, b, c Means within a row not followed by the same superscript letter are significantly different ($p < 0.05$).

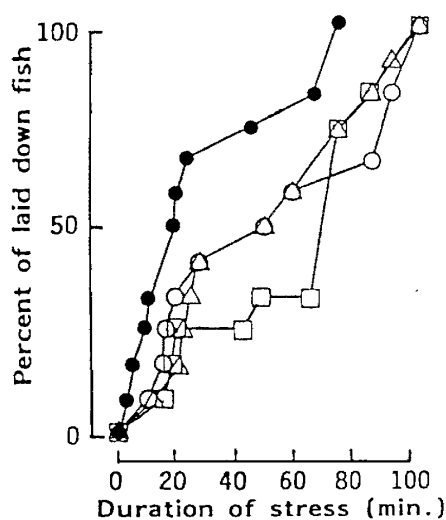


Fig. IV-7. Effect of dietary ascorbic acid contents on the laid down % of the Japanese parrot fish stressed by decreasing water oxygen level. Dietary ascorbic acid contents (mg/100g diet): ●, 0; ○, 30; △, 100; □, 300.

b. 低酸素ストレス負荷の方法

ストレス負荷装置および操作方法は本章1節に記した通りである。すなわち、DOを約4時間かけて4.6ml/lから0.8ml/l付近にまで下げ、そのDOを4時間保った後、除々にDOを上げ3時間かけて正常に戻した。

(2) 実験結果

DOが0.8 ml/l以下になった時点を0 timeとして、経過時間に伴う累積横転率の推移を比較しFig. IV-7に示した。その結果、DO 0.8 ml/l以下になってからおおよそ19分でAsA 0 mg区の累積横転率は50%を越え、73分後には100%に達した。これに対してAsA 30mg区およびAsA 100mg区と同横転率は、49分後に50

%に達した。一方、AsA 300mg区のそれは、他区に比べて低く、67分後も30%程度に過ぎなかった。これより、イシダイ1才魚に低酸素ストレスを負荷した場合の横転に要する時間は飼料AsA含量に応じて長くなることが分かった。

IV-2-2. イシガキダイ1才魚を供試魚とした場合

(1) 実験方法

近畿大学水産研究所で生産され、AsA添加量の異なる各区飼料で70日間飼育した平均体重約170gのイシガキダイ1才魚各区10尾ずつに、低酸素ストレスを負荷し、累積死亡率を指標としてストレス耐性を比較した。飼料区、飼料調製法、飼育方法ならびに測定項目および方法はそれぞれ前項と同様である。

ストレスの負荷は、へい死率を指標として比較するためにDOを約4時間かけて4.8ml/lから0.8ml/l付近にまで下げ、そのDOに2時間保った後、さらに1時間かけて0.6ml/lにまで下げ、その状態を1時間持続し、それからDOを除々に回復させるものとした。

AsA含量の異なる各区飼料で飼育したイシガキダイの平常時の肝臓および血液のAsA含量ならびに血液性状をTable IV-3に示した。各区供試魚の肝臓および血液のAsA含量は、イシダイ1才魚の場合と同様に飼料AsA含量の増加に伴って高くなり、いずれもAsA 0mg区から100mg区までの各区間に有意差がみられた。血液性状は、Ht値に有意差がみられたものの、赤血球数およびHb量には有意差がなく、AsA無添加区の欠乏症もみられなかった。

Table IV-3. Effect of dietary ascorbic acid contents on the liver and blood ascorbic acid concentrations and blood characteristics in the spotted parrot fish fed the diets*

Dietary AsA(mg/100g)	0	30	100	300
Liver AsA ($\mu\text{g/g}$)	7.0 \pm 1.8 ^a	25.9 \pm 7.3 ^b	64.3 \pm 5.7 ^c	79.3 \pm 5.5 ^c
Blood AsA ($\mu\text{g/ml}$)	0.3 \pm 0.3 ^a	1.7 \pm 0.5 ^b	8.0 \pm 2.8 ^c	12.9 \pm 4.3 ^c
Ht value (%)	32.2 \pm 4.1	34.2 \pm 2.6 ^c	24.3 \pm 2.9 ^c	26.2 \pm 5.3
RBC (10^4cells/mm^3)	264 \pm 21	248 \pm 19	240 \pm 13	234 \pm 46
Hb (g/dl)	7.0 \pm 1.1	6.4 \pm 0.7	6.6 \pm 0.5	6.9 \pm 0.6

* Data presented as mean \pm SD (n=3).

^{a, b, c} Means within a row not followed by the same superscript letter are significantly different ($p < 0.05$).

(2) 実験結果

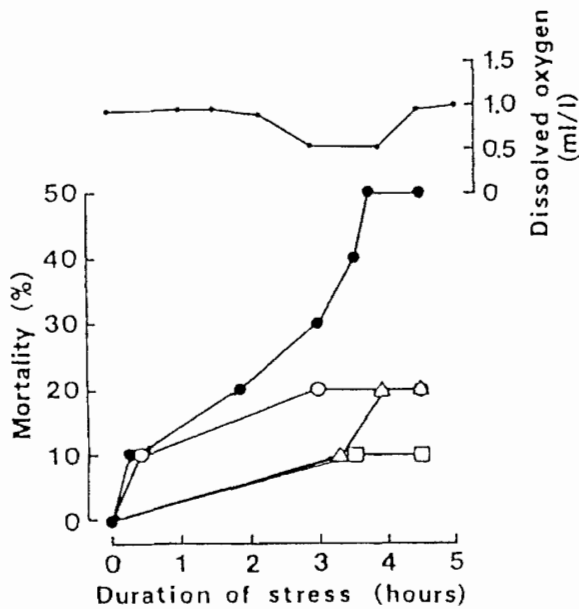


Fig. IV-8. Effect of dietary ascorbic acid contents on the mortality of the spotted parrot fish stressed by decreasing water oxygen level. Dietary ascorbic acid contents (mg/100g diet): ●, 0; ○, 30; △, 100; □, 300.

DOが0.8ml/l以下になった時点を0 timeとして、経過時間に伴う累積へい死率の推移を比較しFig. IV-8に示した。AsA 0 mg区は、DO 0.8ml/l以下になってから時間の経過とともに、へい死魚の数が増え、おおよそ4時間後の累積死亡率は50%に達した。AsA 30 mg区の累積死亡率は3時間後20%、AsA 100 mg区およびAsA 300mg区のそれは3時間後いずれも10%であった。本実験の結果から、イシガキダイを用い死亡率を指標とした場合にも低酸素ストレスに対する耐性は飼料AsA含量に比例して増大することが分かった。

IV-2-3. イシダイ稚魚を供試魚とした場合

(1) 実験方法

a. 供試魚と飼育条件

平均体重29.5gのイシダイ稚魚60尾ずつを500lパンライト水槽に収容し、AsA添加量の異なる各区飼料で9月から10月にかけて26日間予備飼育した後に実験に供した。予備飼育中の飼育水は、魚に対する環境ストレスを可能なかぎり軽減するために、ろ過海水を水温24.0~25.0℃、DO 4 ml/l以上になるように調節し、紫外線殺菌して用いた。注水量は6 l/min、通気量は1.8 l/minとし、比重およびpHはそれぞれ1.0220~1.0240、7.8~8.2の範囲であった。基本飼料としては第II章1節に記したカゼインをタンパク質源とする精製試験飼料を用い、AsA-ナトリウム塩を飼料乾重100g当り、AsAとして0、50および1000mgになるようにそれぞれ添加した3飼料区を設定した。飼料調製法および給餌方法は第III章1節に示した通りである。

各飼料区イシダイの実験開始時の肝臓AsA含量および血液性状をTable IV-4に示した。各飼料区の魚の肝臓AsA含量は、飼料AsA含量の増加に伴って高くなり、区間毎にそれぞれ有意差がみられた。また、正常時の各区の血液性状には有意差はみられず、AsA 0 mg区に成長不良等の欠乏症状も認められなかった。

Table IV-4. Effect of dietary ascorbic acid contents on the liver ascorbic acid concentration and blood characteristics in the Japanese parrot fish fed the diets*

Dietary AsA (mg/100g)	0	50	1000
Liver AsA ($\mu\text{g/g}$)	2.0 ± 1.1^a	19.6 ± 7.5^b	78.2 ± 24.7^c
Ht value (%)	31.0 ± 2.1	31.1 ± 1.8	34.0 ± 2.8
Hb (g/dl)	6.77 ± 0.5	6.92 ± 1.1	7.19 ± 0.7

* Data presented as mean \pm SD (n=6).

a, b, c Means within a row not followed by the same superscript letter are significantly different ($p < 0.001$).

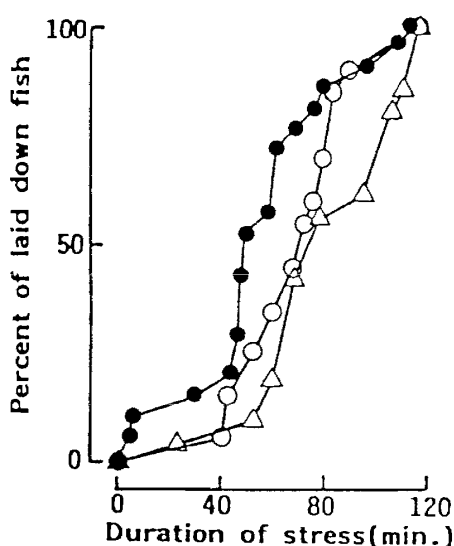
b. 低酸素ストレス負荷の方法

本実験では約4時間かけてDOを6ml/lから0.7ml/l付近にまで下げ、約4時間その濃度を保った後、除々にDOを上げ、3時間かけて正常に戻した。個々の試料魚の横転時間および死亡時間を測定し、累積横転率および累積死亡率をそれぞれ求めた。

(2) 実験結果

a. 累積横転率

DOが0.8ml/l以下になった時点をも0 timeとして、経過時間に伴う累積横転率の推移を比較



しFig. IV-9に示した。その結果、AsA 0 mg区は、DO 0.8ml/l以下になってから時間の経過とともに、横転する魚の数が増え、累積横転率は47分後には50%に達した。一方、AsA 50mg区および1000mg区の同横転率は、AsA 0 mg区のそれよりも約40分遅れて増加し始め、試料魚の50%が横転するのに要した時間はAsA 50mg区では70分、AsA 1000mg区では76分であった。

Fig. IV-9. Effect of dietary ascorbic acid contents on the laid down % of the Japanese parrot fish stressed by decreasing water oxygen level. Dietary ascorbic acid contents (mg/100g diet): ●, 0; ○, 50; △, 1000.

b. 累積へい死率

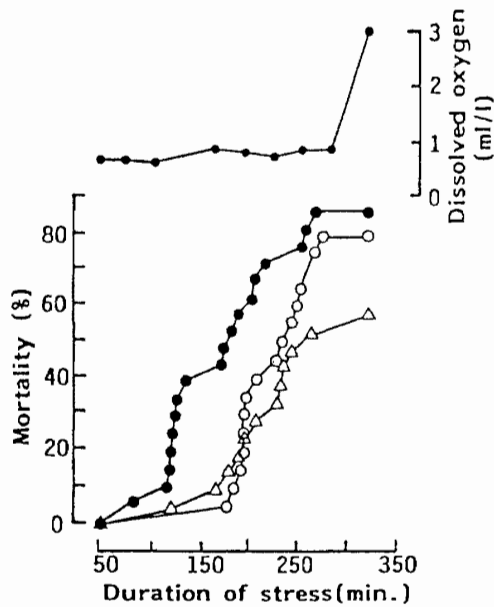


Fig. IV-10. Effect of dietary ascorbic acid contents on the mortality of the Japanese parrot fish stressed by decreasing water oxygen level. Dietary ascorbic acid contents (mg/100g diet) : ●, 0 ; ○, 50 ; △, 1000.

各飼料区イシダイのDO低下に伴うへい死率の推移をFig. IV-10に示した。AsA 0mg区の累積へい死率は、累積横転率の場合と同様に、経過時間とともに徐々に増大し、DO 0.8ml/l以下になってから178分後には50%に達した。一方、AsA 50mg区および1000mg区の累積へい死率は時間の経過に伴って指数関数的に増大し、AsA 50mg区の魚の50%がへい死するに要した時間はAsA 0mg区よりも約1時間遅くて234分、AsA 1000mg区ではさらに30分遅くて264分であった。また、実験終了時のへい死率はAsA 0mg区では86%、AsA 50mg区ではそれよりもやや低く80%、さらにAsA 1000mg区では57%にすぎなかった。

IV-2-4. 考察

本章における第1節から第3節までの実験結果をまとめてTable IV-5に示した。まず、イシダイ1才魚における“LD_{T50}”（環境水のDOが0.8ml/lにまで低下してから、この実験条件下で、各飼料区の供試魚の50%が横転するに要した時間）は、AsA 0mg区が最も早くて19分であったのに対し、AsA 30mg区および100mg区ではいずれも49分、さらにAsA 300mg区では73分であった。また、“LD_{TAVE}”（DOが0.8ml/lにまで低下してから、この実験条件下で、各飼料区の供試魚が横転するに要した平均時間）は、LD_{T50}と同じ傾向を示し、AsA 0mg区とAsA 300mg区との間には有意差が認められた。

次に、イシガキダイ1才魚における“FDT”（DOが0.8ml/lにまで低下してから、この実験条件下で、最初の死亡魚が観察されるのに要した時間）は、AsA 0mg区では11分、AsA 30mg区では18分であったが、AsA 100mg区および300mg区ではいずれも200分以上を要した。また、DOを0.8ml/l以下に4時間保ったときの“へい死率”は、AsA 0mg区では50%であったが、AsA 30mg区および100mg区ではいずれも20%、さらにAsA 300mg区では10%に過ぎなかった。

さらにイシダイ稚魚における“LD_{T50}”はAsA 0mg区では47分、AsA 50mg区では70

Table IV-5. Effect of dietary ascorbic acid levels on the tolerance of fish to the stress arose from water oxygen reduction

Dietary AsA(mg/100g)* ¹	0	30	100	300
Japanese parrot fish (Mean body wt. =239.1±39.4, n=48)				
Liver AsA (μg/g)* ²	1.8±1.3 ^a	16.6±2.7 ^b	40.9±2.7 ^c	53.3±11.1 ^c
LDT ₅₀ (min)* ³	19	49	49	73
LDT _{AVE.} (min)* ⁴	30.6±26.7 ^a	54.8±36.3 ^{a, b}	51.2±32.3 ^{a, b}	62.8±30.2 ^b
Spotted parrot fish (Mean body wt. =170.6±29.3, n=40)				
Liver AsA (μg/g)* ²	7.0±1.8 ^a	25.9±7.3 ^b	64.3±5.1 ^c	79.3±5.5 ^c
FDT (min)* ⁵	11	18	201	211
Mortality (%)* ⁶	50	20	20	10
Dietary AsA(mg/100g)* ¹	0	50	1000	
Japanese parrot fish (Mean body wt. =38.5±5.9, n=60)				
Liver AsA (μg/g)* ⁷	2.0±1.1 ^a	19.6±7.5 ^b		78.2±24.7 ^c
LDT ₅₀ (min)* ³	47	70		76
LDT _{AVE.} (min)* ⁴	54.5±26.9 ^a	69.5±21.4 ^{a, b}		81.3±26.3 ^b
FDT ₅₀ (min)* ⁸	178	234		264
FDT _{AVE.} (min)* ⁹	188±74 ^a	240±49 ^b		258±63 ^b

- *¹ Added as calcium ascorbate (equivalent to AsA mg per 100g diet on dry base).
 *² Data presented as mean ± SD (n=3).
 *³ Defined as the time needed to lay 50% of the sample fish down after water oxygen level reduced to 0.8 ml/l (n=12).
 *⁴ The average value (n=12) of the time needed to lay down the each fish after water oxygen level reduced to 0.8 ml/l.
 *⁵ Defined as the time needed to find the first dead fish after water oxygen level reduced to 0.8 ml/l(n=10).
 *⁶ During the water oxygen level has been maintained at ≤ 0.8 ml/l for 4 h (n=10).
 *⁷ Date presented as mean±SD (n=7).
 *⁸ Defined as the time needed to fall 50% of the sample fish dead after water oxygen level reduced to 0.8 ml/l (n=20).
 *⁹ The average value (n=20) of the time needed to fall the sample fish dead after water oxygen level reduced to 0.8 ml/l.
 Means within a row not followed by the same superscript letter are significantly different (p<0.05).

分, AsA 1000mg区では76分であり, また“LDT_{AVE}”にはAsA 0mg区と1000mg区との間に有意差が認められた。また“FDT₅₀”(DOが0.8ml/lにまで低下してから, この実験条件下で, 各飼料区の供試魚の50%がへい死するに要した時間)および“FDT_{AVE}”(DOが0.8ml/lにまで低下してから, この実験条件下で, 各飼料区の供試魚がへい死するに要した平均時間)は, “LDT₅₀”と同様に飼料AsA含量の増加にともなって長くなり, AsA 0mg区とAsA 50mg区および1000mg区の間にはそれぞれ有意差が認められた。

以上の結果から, 環境水溶存酸素量の低下をストレスとした場合の, いわゆる酸素ストレスに対する魚類の耐性は, 本実験条件下では, 飼料のAsA含量に比例して増大することが分かった。

これまで, ストレスに対するビタミンあるいは飼料添加物投与の影響について詳しく検討さ

れた例はまだ著しく少ないが、榎本ら⁸⁷⁾はハマチ、ウマズラハギおよびカワハギの低酸素分圧耐性に及ぼすビタミンE投与の影響を調べ、いずれの魚でもビタミンEの投与によってストレス耐性が向上することを報告している。また、高橋ら¹⁰⁰⁾はコイの水温耐性に及ぼすパントテン酸投与の効果を認めている。さらに中川ら¹⁰¹⁾はクロダイ飼料に対するアオサの添加は飼料のタンパク質効率を向上させるとともに低酸素ストレスに対する耐性を増強すると報告している。本章の実験結果から、飼料 AsA の投与もこれら既報のビタミンおよび飼料添加物の投与と同様に養殖魚の健全性を保つために極めて有効であることが明らかにされた。しかし、養殖現場においては第Ⅲ章に示したように急激な環境因子の変動をストレスとして断続的に長期に亘って受けることが多い。このようにストレスが慢性化された場合の魚の健全性および病気に対する抵抗力に及ぼすビタミン等の投与効果に関する研究の進展が養殖現場では切望されている。

IV-3. 断続的低酸素ストレス耐性に及ぼす飼料アスコルビン酸投与の効果¹⁰²⁾

養殖施設の多い内湾では赤潮の発生、人為的環境汚染、過密養殖、水変わり、潮通し不良、残餌や排泄物の分解などによる環境水のDO低下がたびたび引き起こされる。⁸⁵⁾ 特に夏期にはプランクトンによると考えられるDOの日周リズムが形成され、日の出前にたびたび起こるDOの一時的な低下は、養殖魚の成長および生残率等に大きく影響することが知られている。^{103, 104)} このようなDOの断続的な変動は第Ⅲ章2節における実験でもみられ、イシダイのAsA要求量は環境因子の変動ストレスによって増加した。本節では、養殖現場の状態を想定し、イシダイに長期間に亘って断続的に低酸素ストレスを負荷した場合に、それがAsA要求量にどのように影響するかを調べた。

IV-3-1. 実験方法

(1) 供試魚と飼育条件

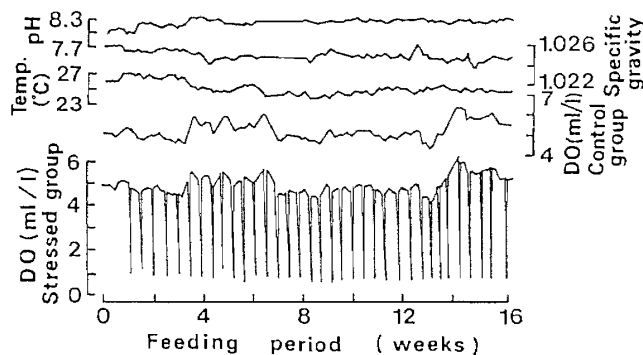


Fig. IV-11. Changes in ambient temperature, pH, specific gravity, and dissolved oxygen level during the experimental period.

近畿大学水産研究所で生産された平均体重2.4gのイシダイ稚魚45尾ずつを200lパンライト水槽に収容し、9月から12月にかけて16週間の飼育試験を行った。飼育期間中の環境因子の変動をFig. IV-11に示した。飼育水は魚に対する環境ストレスをできるだけ軽減するために、ろ過海水の水温を本実験に用いたサイズのイシダイ稚魚の

選好温度帯¹⁰⁴⁾である24~27℃に、DOを4 ml/l 以上になるように調節し、紫外線殺菌した後注水した。

(2) 飼料組成と投餌法

基本飼料の組成は、ビタミンフリーカゼインをタンパク質源とする精製試験飼料から AsA を抜いたものとした。AsA-ナトリウム塩を飼料乾重100 g 当たり AsA として0,75および300 mgになるように添加した飼料区をそれぞれ2区ずつ設け、一方を対照群とし、他方を断続的低酸素ストレス負荷群とした。飼料調製法およびその他の飼育方法は第Ⅲ章1節に示した通りである。

(3) 断続的低酸素ストレス負荷の方法

断続的低酸素ストレス負荷群には、実験開始7日目から終了時までの16週間に亘り、3~4日目毎に1回ずつ断続的に、低酸素ストレスを負荷した。ストレス負荷時には、ストレス負荷群水槽の注水および通気を止め、それぞれの水槽と100l 容量のDO調節用水槽1基とを連結し、各水槽の水が均一になるようにポンプ2基を用いて循環させた。DO調節用水槽には窒素ガスを送気し、時間経過に伴ない任意の酸素量になるように酸素メーターでモニターしながら随時調節した。毎回ストレス負荷時のDOは、約3時間かけて5 ml/l 前後から1~0.7 ml/l にまで下げた。ただし、低酸素状態の保持時間は30分間とし、その後飼育水を除々に注水して元の酸素濃度にまで戻した。飼育期間中に計35回の低酸素ストレスを負荷した。なお、ストレス負荷中は対照群も含め、すべて無給餌とした。

(4) 測定項目と方法

低酸素ストレス負荷時に各飼料区の魚の状態を観察し、横転した魚の尾数から横転率(%)を求めた。体重測定を2週間目毎に行い、各区の増重率および飼料効率を求めた。また、試験終了時に体長および体重を個体別に測定し、肥満度[Condition factor = 体重(g)/体長(cm)³ × 1000]を求めた。AsA 欠乏徴候とへい死魚は毎日観察し、2週間目毎にへい死率(%)を算出した。成長低下やへい死などストレス負荷の影響が明らかに発現したと判断された試験区では、その半数の魚にAsA 300 mg/100 g 飼料を投与して回復試験を行った。なお、負荷群の回復区にはAsA 300 mg 飼料を投与した後も、引き続き同様の低酸素ストレスを負荷した。

低酸素ストレスを35回目に負荷してから2日後の飼育16週目に、各区5尾以上の試料魚を取り上げ、それぞれについて血液を採取し、Ht値、Hb濃度、血漿グルコース量および血漿AsA含量の測定に供した。採血後の試料魚は即殺し、直ちに脳、鰓、腎臓および肝臓を採取して秤量し、AsAの定量に供した。一部の試料魚についてはX線写真を撮影した。各試料の採取方

法および測定方法は第Ⅲ章1節に示した通りである。

なお、各項目の測定結果については Student の t 検定を行い、対照区の測定値に対する有意差 ($p < 0.05$ または 0.01) を判定した。

IV-3-2. 実験結果

(1) 横転率

断続的低酸素ストレス負荷時の試料魚の横転率に及ぼす飼料 AsA 含量の影響を Fig. IV-12 に示した。図中の点は、酸素低下ストレスを 3~4 日目毎に 16 週間に亘って断続的に

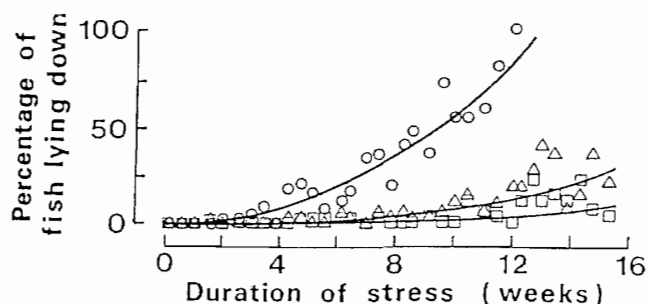


Fig. IV-12. Effects of dietary ascorbic acid levels on the percentage of fish lying down in Japanese parrot fish stressed by intermittently decreasing water oxygen levels. Dietary ascorbic acid levels (mg/100g): ○, 0; △, 75; □, 300.

負荷した時のそれぞれの時点における各区の魚の横転率をプロットしたものである。AsA 0 mg 区の DO 低下時における横転率は、低酸素ストレスを断続的に受ける期間が長くなるほど増加した。飼育 12 週目までの平均横転率 (%) は、 27.2 ± 27.0

(mean \pm SD) であり、AsA 75 および 300 mg 区の 3.6 ± 4.8 および 1.5 ± 2.5 よりも有意に高い値を示した ($p < 0.01$, $n = 27$)。

AsA 75 mg 区においてもストレス負荷期間が長くなるにつれて、増加する傾向を示し、飼育 16 週目までの平均横転率 (%) は 8.5 ± 11.3 となり AsA 300 mg 区の 4.1 ± 6.1 との間に有意差が認められた ($p < 0.05$, $n = 35$)。一方、AsA 300 mg 区ではストレスの影響はほとんどみられなかった。なお、飼育 9 週目から行った AsA 0 mg 区に対する回復区の平均横転率 (%) は、 8.5 ± 6.9 となり、その期間における AsA 0 mg 区の値 44.2 ± 26.2 よりも有意に低く ($p < 0.01$, $n = 15$)、AsA 投与による回復が認められた。

(2) 増重率, 飼料効率, 欠乏症, へい死率および肥満度

断続的に低酸素ストレスを負荷したイシダイの成長およびへい死率に及ぼす飼料 AsA 含量の影響をそれぞれの対照区と比較して Fig. IV-13 に示した。対照群の AsA 0 mg 区では、飼育 12 週目から体重の減少およびへい死率の増加がみられたが、負荷群の AsA 0 mg 区では早くも 6 週目から体重が減少し、死亡魚も急激に増えた。また 8 週目頃には脊椎側彎症がみられ、X 線撮影を行った結果 8 尾中 7 尾に椎体異常が認められた。一方、対照群の AsA 75 mg 区では、正常な成長がみられたが、負荷群の AsA 75 mg 区は飼育経過に伴って徐々に成長が低下し、へい死率もやや増加する傾向を示した。これに対し、AsA 300 mg 区の成長およびへい死率に

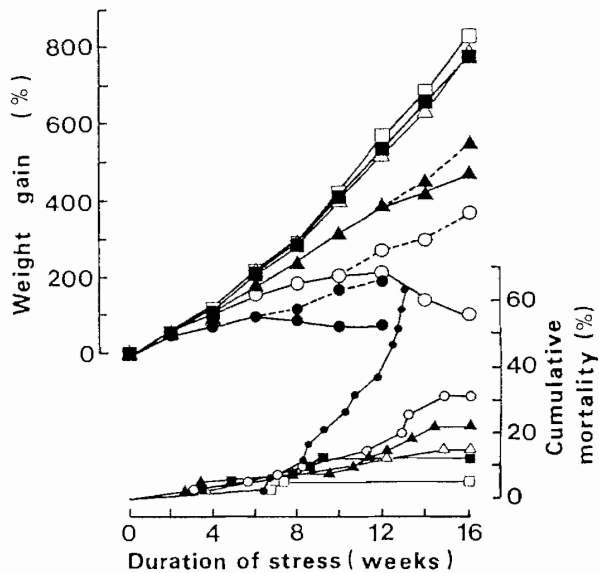


Fig. IV-13. Effects of dietary ascorbic acid levels on growth and mortality of Japanese parrot fish stressed by intermittently decreasing water oxygen levels. Dietary ascorbic acid levels (mg/100g). Control group: ○, △, 75, □, 300, …○… recovery. Stressed group: ●, ▲, 75, ■, 300, …●… recovery (0), …▲… recovery (300).

は低酸素ストレス負荷による影響がほとんどみられなかった。また、各飼料区の回復区はいずれも AsA 300 mg 飼料の投与によって回復が認められた。

AsA 添加量の異なる各飼料区の日間摂餌率、増重率、飼料効率、へい死率および肥満度に及ぼす低酸素ストレス負荷の影響をまとめて Table IV-6 に示した。各飼料区の対照群および負荷群の日間摂餌率には顕著な差はみられなかった。しかし、AsA 0 mg 区の負荷群の飼料効率は対照群のそれに比べて顕著に低く、肥満度もストレスによって低下する傾向を示した。また、AsA 75 mg 区においても、これらの各指標は、前図に示した増重率と同様に、低

酸素ストレス負荷による影響を受ける傾向を示した。一方、AsA 300 mg 区では、低酸素ストレスによる影響をほとんど示さなかった。

Table IV-6. Effects of 16-week exposure to intermittent hypoxic stress on growth, feed efficiency, mortality, and condition factor in Japanese parrot fish fed diets containing different levels of ascorbic acid

AsA level in diet (mg/100g)	Group	Daily feed intake (%)	Weight gain (%)	Feed efficiency (%) ^{*3}	Mortality (%)	Condition factor ^{*4}
0	Control ^{*1}	3.9	210.5	23.8	13.9	28.2 ± 6.0 ^{*2}
	Stressed ^{*1}	3.7	69.0	17.9	36.1	26.6 ± 3.0
75	Control	3.8	782.1	50.4	14.8	30.6 ± 4.6
	Stressed	3.7	467.6	41.7	21.9	28.5 ± 3.3
300	Control	3.6	825.6	53.9	4.7	30.2 ± 3.1
	Stressed	3.8	767.0	50.6	11.8	30.9 ± 2.7

*1 Results at week 12.

*2 Mean ± SD, at least 10 samples.

*3 G gain × 100/g feed.

*4 Body weight (g) × 1000 / 【body length (cm)]³.

(3) 血液性状および比肝重

AsA 添加量の異なる各飼料区の血液性状および比肝重に及ぼす断続的低酸素ストレス負荷の影響を Table IV-7 に示した。血漿グルコース濃度にはこのストレスの負荷による顕著な差はみられなかった。しかし、Ht 値および Hb 濃度は各飼料区ともに、断続的な低酸素ストレ

スの負荷によって低下する傾向を示した。また、AsA 0mg区および75mg区の比肝重もストレスによって低下する傾向を示したが、個体差が大きかったので、いずれも対照区との間に有意差はみられなかった。

Table IV-7. Effects of 16-week exposure to intermittent hypoxic stress on blood characteristics and hepatosomatic indices of Japanese parrot fish fed diets containing different levels of ascorbic acid (Mean \pm SD, n=5)

AsA level in diet (mg/100g)	Group	Hemoglobin (g/dl)	Hematocrit (%)	Glucose (mg/dl)	Hepatosomatic index (%) ^{*2}
0	Control ^{*1}	5.2 \pm 1.1	24.2 \pm 5.2	55.8 \pm 19.5	1.6 \pm 1.0
	Stressed ^{*1}	3.5	14.9 \pm 3.2	52.0	1.0 \pm 0.2
75	Control	7.6 \pm 1.4	29.7 \pm 4.7	76.5 \pm 14.2	2.4 \pm 0.5
	Stressed	5.9 \pm 2.0	22.4 \pm 6.0	70.6 \pm 29.5	1.5 \pm 0.6
300	Control	7.7 \pm 1.8	31.1 \pm 4.4	72.6 \pm 18.8	2.3 \pm 0.6
	Stressed	6.6 \pm 1.4	24.8 \pm 5.3	73.4 \pm 22.9	2.4 \pm 0.8

*1 Results at week 12.

*2 Liver weight (g) \times 100/body weight (g).

(4) 血漿および各組織のアスコルビン酸濃度

AsA 添加量の異なる各飼料区の血漿および各組織の AsA 含量に及ぼす断続的低酸素ストレス負荷の影響を Table IV-8 に示した。AsA 0 mg 区の血漿、鰓、肝臓および腎臓の AsA 含量はほとんど痕跡程度であった。AsA 0mg 区の脳のアスコルビン酸含量は他の飼料区に比べると著しく低い値であったがストレスの影響はほとんどみられなかった。AsA 75mg 区では、ストレスの負荷により血漿のアスコルビン酸含量が有意に低下した。腎臓および鰓のアスコルビン酸含量も低下したが有意差はなかった。脳および肝臓のアスコルビン酸含量は低酸素ストレスによる影響をほとんど受けなかった。一方、AsA 300mg 区における各組織のアスコルビン酸含量は、本表から明らかのように、低酸素ストレスの影響をほとんど受けなかった。

Table IV-8. Effects of 16-week exposure to intermittent hypoxic stress on ascorbic acid content in plasma, liver, kidneys, brain, and gills of Japanese parrot fish fed diets containing different levels of ascorbic acid (Mean \pm SD, n=5)

AsA level in diet (mg/100g)	Group	Plasma (μ g/ml)	Liver (μ g/g)	Kidney (μ g/g)	Brain (μ g/g)	Gill (μ g/g)
0	Control*	trace	trace	trace	52.9 \pm 11.6	3.0 \pm 0.8
	Stressed*	trace	trace	trace	47.4 \pm 11.8	1.7 \pm 0.3
75	Control	5.8 \pm 3.9	38.4 \pm 10.1	136.4 \pm 52.3	339.3 \pm 25.5	148.1 \pm 24.6
	Stressed	0.8 \pm 1.2 ^a	30.6 \pm 11.8	86.8 \pm 50.6	333.6 \pm 48.9	87.3 \pm 39.8
300	Control	18.1 \pm 7.5	73.2 \pm 9.3	211.8 \pm 46.5	436.2 \pm 106.8	209.7 \pm 30.6
	Stressed	16.9 \pm 9.5	76.5 \pm 19.8	226.1 \pm 59.6	385.6 \pm 26.0	222.7 \pm 56.6

* Results at week 12.

^a Significantly different from the control group ($p < 0.05$).

IV-3-3. 考察

本実験の結果、横転率を指標とした断続的低酸素ストレスに対する魚の耐性は飼料 AsA の投与によって増大することが明らかとなり、本章 2 節の結果とも一致した。また、AsA 0mg 区および 75mg 区の横転率はストレス負荷期間が長くなるにつれて指数関数的に増大した (AsA 0 mg 区, $y=0.00181X^{2.3832}$, $r=0.94$; AsA 75mg 区, $y=0.000037X^{2.8392}$, $r=0.85$) が、AsA 300mg 区の横転率は負荷期間が長くなってもそれほど増加しなかった。すなわち、ストレスに対する AsA の投与効果はストレスを受ける期間が長くなるほど顕著に現われることがわかった。Mazeaudら⁹¹⁾は魚類のストレス反応を内分泌ホルモンの放出にみられる一次反応とそれに基づく生理的諸成分の変動のような二次反応に分類することを提唱している。また、Wadmeyer⁹²⁾は、ストレスの負荷後にはその強度により生理的な障害の起こることを認め、Mazeaudら⁹¹⁾のいう一および二次反応の後に成長不良等を引き起こすような三次的な影響相の重要性を示した。一般的な養殖現場ではこのような三次的影響相の起こることがたびたび観察されており、¹⁰⁶⁾ ストレスは魚の恒常性を低下させること、¹⁰⁷⁾ さらに、あるストレスを受けると、新たに受けるストレスに対する抵抗力が低下することが報告されている。¹⁰⁸⁾ 本実験におけるストレスの断続的負荷に伴う AsA 0 mg 区および 75mg 区の横転率の指数関数的な増加は、急性的な低酸素ストレスによって受けた障害が蓄積し、その次に受ける低酸素ストレス耐性に影響すること、すなわち三次的な影響の起こることを示唆する。これに対し、300mg もの大量の AsA を投与した場合には低酸素ストレスの負荷に対して AsA が適応的に働いてストレス障害の発生を抑制したか、あるいはストレス後の障害を打ち消す作用を示したものと考えられる。すなわち、AsA は、本章 1, 2 節で示された急性的低酸素ストレスに対する適応反応に関与するのみならず、ストレス後の障害をも治癒する能力を有することが示唆された。

本実験の結果、AsA 欠乏区の魚の増重率および飼料効率もストレスの負荷によって対照群のそれよりも早くから減少し、へい死率も急増した。また、このストレスを負荷した AsA 欠乏魚には外観的にも明らかな脊椎側わん症が認められ、肥満度、比肝重および Ht 値も低下する傾向がみられた。

断続的低酸素ストレスの負荷と AsA 要求量との関係をさらに明白にするために、Fig. IV-13 に示した成長曲線を、AsA 0 mg 区、75mg 区および 300mg 区それぞれの対照区の増重率に対するそれぞれのストレス負荷区の増重率の相対比 (相対増重率, %) として Fig. IV-14 に示した。本図から明らかなように、AsA 0 mg 区では、実験開始 2 週間目で既に低酸素ストレス負荷による相対増重率の顕著な低下がみられ、その影響はストレス負荷期間が長くなるにつれ

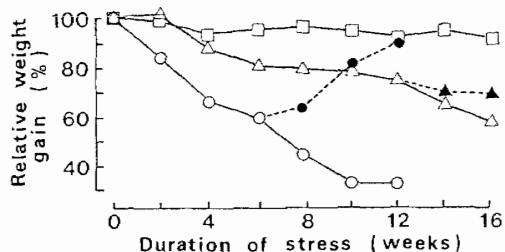


Fig. IV-14. Effects of dietary ascorbic acid levels on relative weight gain of Japanese parrot fish stressed by intermitently decreasing water oxygen levels. Dietary ascorbic acid levels (mg/100g): ○, 0; △, 75; □, 300; ●, ▲ recovery (300). Relative weight gain was calculated as the percentage of the weight gain of each lot of stress-exposed fish versus the weight gain of the control fish.

腎臓の AsA 含量および飼料効率には低下がみられ、肥満度および比肝重も低下する傾向を示した。普通の飼育条件下におけるイシダイの AsA 要求量は乾飼料100 g 当たり AsA 25mg またはそれ以下であることが報告されている。⁷⁵⁾ これより、断続的低酸素ストレスの負荷はいわゆる AsA 要求量を増大させることが分かった。

これに対し、AsA 300mg 飼料を投与した魚の相対増重率はほとんど90%以上の値を示し、組織 AsA 含量を始めとするその他の指標にも低酸素ストレス負荷の影響はほとんど認められなかった。これより、AsA の大量投与は断続的な低酸素ストレスに対する魚の耐性を明らかに向上させることが分かった。

哺乳類では種々のストレスを受けている間および高気温に順応する間は AsA の要求量が增大することが知られている。²⁶⁾ 本実験の結果、断続的な低酸素ストレスの負荷は魚類の AsA 要求量を増大することが認められた。環境水の DO は魚類の生活環境における最も重要な因子であり、自然環境下では断続的に増減することが観察されている。¹⁰³⁾ 従って、多くの養殖現場で、生簀内の養殖魚は低酸素ストレスに対し、常に何らかの適応を強いられていることが予想される。第Ⅲ章および本章の実験結果から、養殖現場における魚の AsA 要求量は飼育環境の様々な因子の変動によって左右されることが明らかにされた。

多くの動物で組織の AsA 濃度はストレスの種類や強度に応じて変動することが知られている。²⁶⁾ 本実験の結果、AsA 0 mg 区の脳を除く各組織の AsA 含量はいずれも低い値を示した。AsA 75mg 区の血漿 AsA 含量は低酸素ストレスの負荷によって著しく低下し、腎臓および鰓の AsA 含量もそれぞれ低下する傾向を示した。これより、血液、鰓および腎臓の AsA は断続的な低酸素ストレスによって消費されるか、または必要な組織へ動員されるものと考え

て直線的に大きくなることが分かった。これより、断続的な低酸素ストレスの負荷によって AsA 欠乏症はより早期に発現することが明らかとなった。

一方、AsA 75mg 区においても、4 週目頃から低酸素ストレス負荷による相対増重率の低下がみられた。しかし、その程度は AsA 0 mg 区に比べると小さく、その後の低下も緩やかではあった。また、このストレスを負荷した AsA 75mg 区の魚はその対照区の魚に比べてへい死亡率には顕著な差はみられなかったが、血漿、鰓、

られる。これに対し、AsA 300mg区における血漿および各組織の AsA 含量は、低酸素ストレスの影響をほとんど受けなかった。飼料乾重100 g 当たり300mgもの AsAを添加した場合には、低酸素ストレスによって消費または動員される組織中の AsA を十分に補給できるものと考えられる。一方、脳および肝臓の AsA 含量にはいずれの飼料区でもストレスによる影響がほとんどみられなかった。硬骨魚の脳の AsA 含量は短期間の物理的なストレスによっては影響されないことが報告されている。¹⁰⁹⁾ また、ボラに重油および拘束のストレスを負荷した場合にも同様の傾向がみられ、³⁹⁾ 本実験の結果と一致した。これらの結果は脳および肝臓の AsA がストレスに左右されない重要な役割を担っていることを示唆するとともに、鰓、腎臓および血液循環系は低酸素ストレスの適応機構につよく関与することを示唆する。しかし、Thomasら⁹⁷⁾ はボラに高水温ストレスを負荷した場合には、脳 AsA 含量が減少すると報告しており、ストレスの種類や負荷の方法によっては組織 AsA の変動の状況が異なる場合もあるようである。低酸素下における組織 AsA 含量の変動は AsA の作用機構を知る上で重要であり、今後詳細に検討する必要がある。

IV-4. 低酸素ストレス負荷に対する生理的変動パターン

本章2および3節において、飼料 AsA の投与は環境水溶存酸素量の低下に対するイシダイおよびイシガキダイの耐性を向上させることが明らかにされた。魚類のストレス反応については多くの報告がみられ、魚は環境因子の急激な変動に対してコルチゾールおよびカテコラミンを始めとする内分泌ホルモンの分泌を促し、血液性状及び血清化学成分の急激な変動から推察される生理的適応を起こすことが知られている。⁸³⁾ そこで本節では、イシダイ稚魚を用いて、低酸素ストレスを負荷した場合のイシダイの生理的適応すなわちストレス反応の様相を、血液の各種化学成分含量および酵素活性、並びに組織 AsA 含量の変動を中心にして調べた。

IV-4-1. 実験方法

(1) 供試魚と低酸素ストレス負荷の方法

平均体重約30 g のイシダイ稚魚60尾を500l パンライト水槽に収容し、飼料乾重100 g 当たり AsA 100mgを添加した精製試験飼料で24日間予備飼育した後に実験に供した。供試魚の平均体重および尾叉長はそれぞれ 39.0 ± 7.0 g, 12.2 ± 0.7 cmであった。予備飼育中の飼料および飼育方法は本章2節3項に示したとおりである。低酸素ストレスの負荷装置は本章1節に示した通りである。DOを約3時間かけて5 ml/l 前後から0.8~0.7ml/l 前後にまで下げ (DO低下期間), 約4時間その濃度を保ち (横転前後期間), その後、徐々にDOを上げ、3時間かけて正

常にもどした (DO回復期間)。

(2) 測定項目と方法

試料魚のサンプリングは、DOの変動に伴う魚の状況に応じて、Fig. IV-15の矢印で示したように、DO低下期間を平常時、鰓蓋運動数増加時、同最大時に、また横転前後期間を横転直前、横転時、同回復直後に、さらにDO回復後の0、4および14時間後をDO回復期間後とし、合計9段階に分けて行った。それぞれの状況下で魚を5尾ずつ静かに取り上げ、直ちに血液および組織を第Ⅲ章1節に記した方法で取り出し、各項目の測定に供した。血液のHb濃度、Ht値、血漿のALP活性、グルコース、T-Pro、カルシウム並びに血漿および組織AsA含有量は第Ⅲ章1節に記した方法により測定した。また、その他の血漿化学成分は京都第一科学社製SPOTCHEMを用い、総コレステロールは酵素法(CE-COD-POD法)、グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ(GOT)活性は酵素法(OAC-POP-POD法)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(GPT)活性は酵素法(POP-POD法)、 γ -グルタミルトランスペプチターゼ(GGT)活性は酵素法(γ -Glu-PNA法)、トリグリセリドは酵素法(LPL-GYOD-POD法)、総ビリルビンはDiazo法、クレアチンフォスフォキナーゼ(CPK)活性は酵素法(HK-G6PDH-DI法)、乳酸脱水素酵素(LDH)活性は(L-P)DI法でそれぞれ測定した。なお、各項目の測定値はStudentの*t*検定を行い、開始時の値に対する有意差($p < 0.05, 0.01, 0.001$)をそれぞれ判定した。

IV-4-2. 実験結果および考察

(1) 鰓蓋運動数および横転率

DO低下に伴う魚の鰓蓋運動数および横転率の推移をFig. IV-15に示した。鰓蓋運動数は、DOが3 ml/l以下になると増加し始め、実験開始後約3時間目にDOが0.9 ml/l前後になると最大値を示した。その後、鰓蓋運動数は徐々に低下し始め、魚は頭部が白化し、水平感覚を喪失して横転するものが増加した。これより、インダイはDO 0.9 ml/lまではDO低下に対し、鰓換水量を増加させ、酸素取得量を維持させて低酸素状態に適応するが、DO 0.9 ml/l以下になると体内のエネルギー産生量が、鰓を早く動かすためのエネルギー量を補えない状況になると考えられた。すなわち、鰓蓋運動数の増加から減少への屈曲点は魚の換水量を維持するにも不十分な好気性エネルギー代謝しか行われない状況に移る点であると思われる。そこで鰓蓋運動数の最大時を基準としてその前を“DO低下時(好氣的適応期)”，その後を“横転前後(嫌氣的適応期)”とし、さらにDOおよび鰓蓋運動数が平常に戻った後を“DO回復後”として区分けした。なお、本図には横転前後の期間を区別しやすいように斜線で表示し、以下、こ

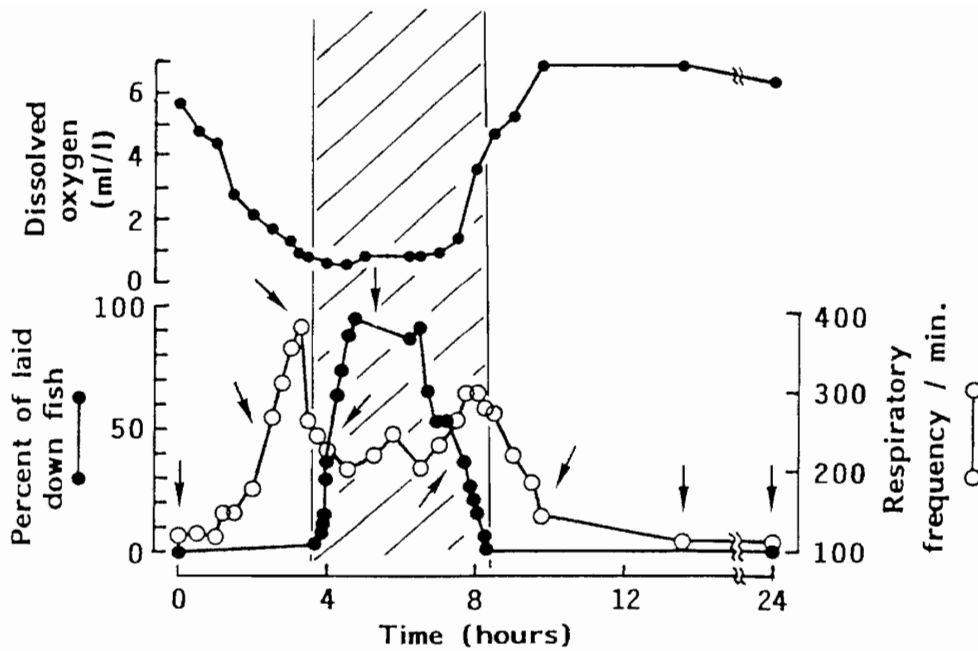


Fig. IV-15. Fluctuations in respiratory frequency and laid down % of the Japanese parrot fish stressed by changing water oxygen level.

の区分に従って適応反応の様相を推察した。

(2) 血液性状

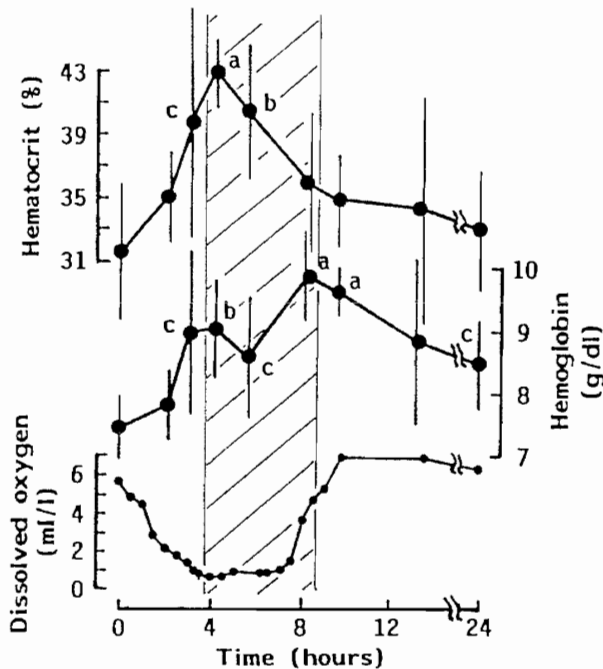


Fig. IV-16. Fluctuations in hematocrit values and hemoglobin concentrations of the Japanese parrot fish stressed by changing water oxygen level. *a, b, c* Significantly different from the values at 0 time (respectively $p < 0.001$, $p < 0.01$, $p < 0.05$).

低酸素ストレスの負荷に伴う血液の Ht 値および Hb 濃度の変動を Fig. IV-16 に示した。Ht 値および Hb 濃度は DO 低下時の鰓蓋運動数最大時に有意に増大した。本章 1 節の結果と同様に、DO 低下に伴い適応的に血球の脾臓からの放出および血液濃縮の起きていることが推測された。しかし、横転直前には Ht 値だけが増大し、横転時には両指標とも同じように減少する傾向を示した。本章 1 節の結果と同様に、横転前後には赤血球膨潤の起こることが予想された。低酸素時における赤血球膨潤はカテコラミンによって引き起こされることが知られている。¹¹²⁾ これより横転前後にはカテコラミンが顕著に分泌されるものと推察される。

(3) 血漿化学成分含量

血漿のグルコース量，総コレステロール含量，GOT，GPTおよびGGT活性の変動をFig. IV-17に示した。DO低下時には総コレステロール含量および各トランスアミナーゼ活性は顕著な変動を示さなかったが，グルコース量は鰓蓋運動数最大時に有意に増大した。横転前後にはコレステロール含量は減少する傾向を示し，グルコース量は著しく増加した。また，GOT，GPTおよびGGT活性も横転前後にはそれぞれ増加した。急激なDO低下はカテコラミンおよびコルチゾールの分泌を引き起こすことがマダイ，⁸²⁾ アメリカナマズ，¹¹⁰⁾ ニジマス^{94, 111, 112)} など種々の魚で知られている。石岡⁸³⁾ はストレス時に血液中に増加するエピネフリンおよびコルチゾールの物質代謝に及ぼす影響とストレス時の高血糖の影響を遊離組織標本を用いた *in vitro* 実験系により調べ，少なくともストレス時初期の血糖上昇は肝臓や筋肉におけるグリコーゲン分解によるグルコース生成，末梢組織におけるグルコース利用の抑制，肝臓における乳酸やアミノ酸からの糖新生等の複合的結果であると推測している。最近，Wrightら⁹⁴⁾ は環境水DOの低下時におけるニジマスの肝臓糖代謝系に及ぼすカテコラミンの

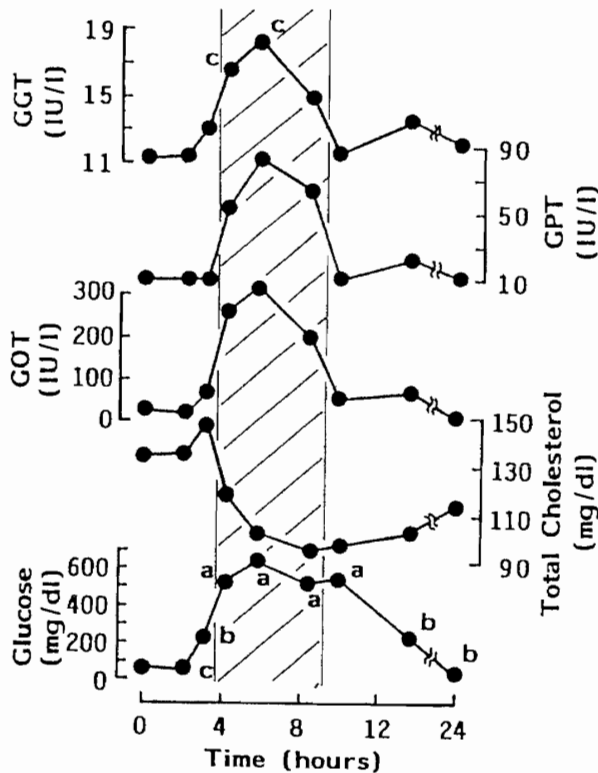


Fig. IV-17. Fluctuations in plasma glucose and total cholesterol concentrations, and transaminase activities of the Japanese parrot fish stressed by changing water oxygen level. a, b, c Significantly different from the values at 0 time (respectively $p < 0.001$, $p < 0.01$, $p < 0.05$).

影響を β -アドレナリンレセプターの拮抗剤を用いて調べ，カテコラミンによってピルビン酸キナーゼの活性が低下し，グリコーゲンフォスフォリラーゼ活性の上昇することをみている。すなわち，カテコラミンは肝細胞において糖新生を促進し，グリコーゲンからのグルコース生成，解糖系の阻害等を促進すると推測している。本実験においても，鰓蓋運動数の最大時から血糖値の上昇がみられ，また，横転前後にはコルチゾールの前駆物質になると考えられるコレステロールの減少，およびコルチゾールによって誘導されることが知られている3種のトランスアミナーゼ活性^{93, 113)}の上昇，さらに著しい高血糖がみられたことより，鰓蓋運動数の最大時から横転前後にかけてカテコラミンおよびコルチゾールによる糖新生作用，グリコーゲンからのグルコース遊離などが促進されるものと考えられる。

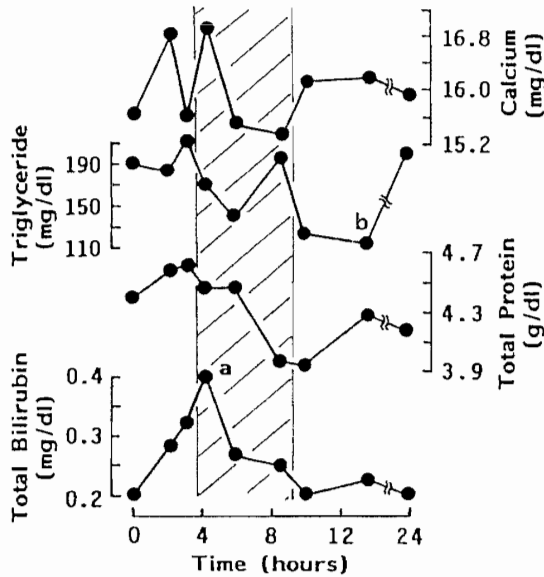


Fig. IV-18. Fluctuations in plasma chemical constituent contents of the Japanese parrot fish stressed by changing water oxygen level. ^{a, b} Significantly different from the values at 0 time (respectively $p < 0.01$, $p < 0.05$).

た。カエルの酸素欠乏時には、時間とともに脳、肝臓、肺および腎臓のATP量が減少すること、さらに脳のクレアチンリン酸が減少し、クレアチンおよび無機リン酸が増加することが報告されている。¹¹⁴⁾ CPKはクレアチンリン酸の高エネルギーリン酸基をADPに転移してATP

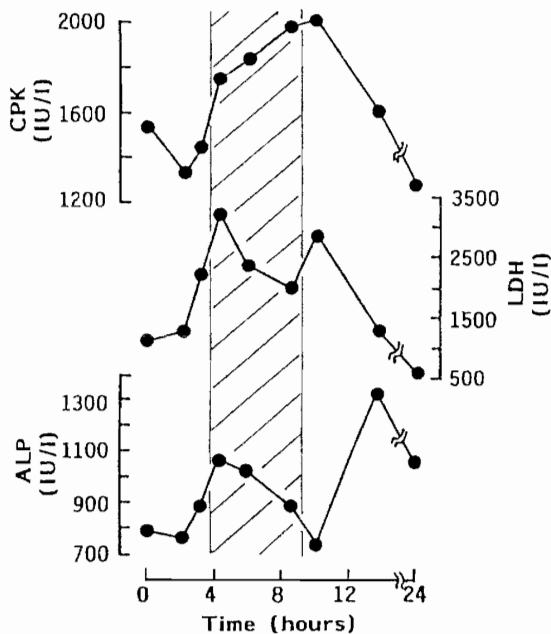


Fig. IV-19. Fluctuations in plasma enzyme activities of the Japanese parrot fish stressed by changing water oxygen level.

血漿のカルシウム、トリグリセリド、総タンパク質および総ビリルビン含有量の変動を Fig. IV-18に示した。いずれも横転前後を中心として変動を示したがカルシウムには一定の傾向がみられなかった。一方、トリグリセリドおよび総タンパク質含量にも一定の傾向はみられなかったが、これらはいずれもDO回復後に減少する傾向を示した。総ビリルビン含量は、DO低下に伴って増大し、その後減少した。

血漿のCPK、LDHおよびALP活性の変動を Fig. IV-19に示した。CPKはDO低下時には顕著な変動を示さなかったが、鰓蓋運動数が減少してから横転直前にかけて急激に増大し、その後横転時にはさらに増大する傾向を示し

を生成する反応を可逆的に触媒する。また、血漿CPK活性は激しい運動の後や急性循環不全などによって増大することが知られている。¹¹⁵⁾ 低酸素時における本酵素活性の増大はDO低下に応じてホスファゲンのエネルギーが緊急に利用されることを示しているのかもしれない。横転前後にはエネルギーの要求性が著しく高まっていることを間接的に推察させた。

一方、LDH活性は他の血漿酵素活性と異なり、DO低下に伴う鰓蓋運動数最大時に急激に増大し、その後横転直前まで増大し続けた。しかし、魚が横転する直前からは時間の経過とともに減少する傾向を示した。LDHは細胞可溶性画分の酵素とされているが、細胞膜と結合し

て存在する可能性があり、その活性は生理的要因によって変動することが知られている。¹¹⁶⁾ また、低酸素時に乳酸が生成することは広く知られている。^{117, 118)} 本実験におけるLDHはGOT, GPTおよびCPKなどの酵素活性に比べ、横転直前から早くも上昇し、その後減少する傾向を示した。環境水のDO低下に伴ってその初期から乳酸生成の起こることが推察される。

以上の結果から、血液のHb濃度およびHt値の上昇すなわち好氣的な適応機構はDO低下の比較的初期から鰓蓋運動数の最大時にかけてみられ、横転前後にかけては上述したようなホルモン分泌に伴う種々の代謝変動の起こっていることが推察された。

(4) 各組織および血漿のアスコルビン酸濃度

DO低下に対する適応反応の過程で脳、腎臓、鰓、肝臓および血漿のAsA濃度がどのように変動するかを調べ、Fig. IV-20に示した。まず、DO低下に伴い鰓蓋運動数が増加する期間ではいずれの組織のAsA濃度も有意に減少した。しかし、その程度は腎臓で最も顕著でありストレス負荷開始時の半分近くにまで低下した。これに対し、血漿AsAの減少率はわずかであった。これより、腎臓を始めとする各組織のAsAはDOが0.9ml/lまで低下する初期の適応期には消費または他の組織へ動員されるものと考えられた。次に、血漿化学成分に顕著な変動がみられる横転前後の期間では、いずれの組織でも鰓蓋運動数の減少に応じてAsA濃度は

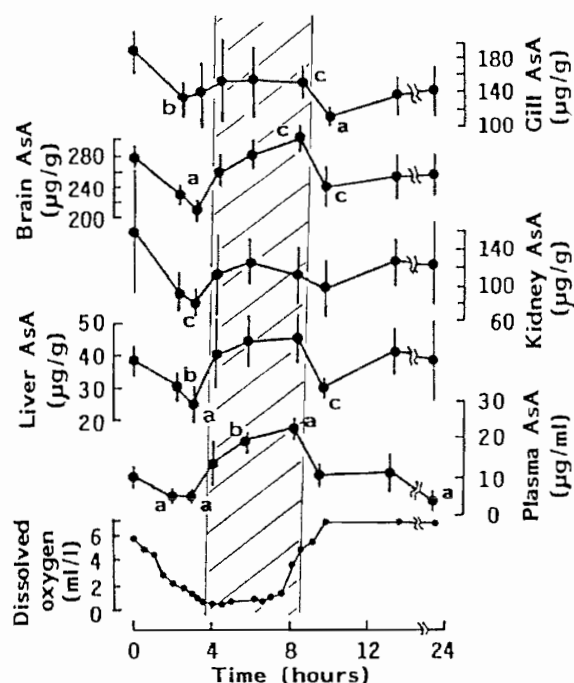


Fig. IV-20. Fluctuations in ascorbic acid concentrations of plasma, liver, kidney, brain and gill of the Japanese parrot fish stressed by changing water oxygen level. a, b, c Significantly different from the values at 0 time (respectively $p < 0.001$, $p < 0.01$, $p < 0.05$).

増大した。しかし、腎臓および鰓におけるその増加は他の組織よりも低く、開始時よりも低い値を示した。これに対し、肝臓および脳のAsAは開始時よりもわずかに高くなる傾向を示し、さらに血漿のそれは開始時の2倍以上の高い値を示した。横転前後の嫌氣的適応期には要求に応じてAsAが合成されるかまたは他の組織から動員されるものと考えられた。

さらに、DO回復後の期間では、DOの上昇に伴って各組織のAsAは再び一時的に減少したが、血漿以外の各組織のAsAはその後、徐々に回復した。しかし、実験開始24時間後の腎臓および鰓のAsA濃度は開始時よりも低くなり、さらに、血漿AsAは開始時の半分以下の値を示した。このような傾向は本章3節の実験で断続的ストレスを16週間に亘り負荷した場

合と同様であった。腎臓、鰓および血液におけるAsAが低酸素ストレス時にある重要な役割を有することが示唆される。

IV-5. 低酸素ストレス負荷時の代謝変動に及ぼす飼料アスコルビン酸投与の影響

本節では低酸素ストレス負荷に伴う代謝変換が起こると考えられる時期における筋肉の乳酸生成量に及ぼす飼料AsA投与の影響を調べるとともに、これまでに得られた種々の知見からAsAの作用機構を推察した。

IV-5-1. 実験方法

平均体重約80gのインダイ当歳魚に乾飼料100g当たりAsA 0および100mgを添加した精製試験飼料を60日間与え、本章4節とほぼ同じ条件下で低酸素ストレスを負荷した。実験開始時、鰓蓋運動数最大時および横転時の同一時間に、両区から5尾ずつの魚を静かに取り上げ、即殺してエタノールドライアイス法で凍結した。試料は-70℃で保存し数日以内に肝臓および筋肉のAsA含量ならびに筋肉の乳酸含量の測定に供した。AsA含量は第Ⅲ章1節に示した方法で、乳酸は酵素法¹¹⁹⁾によりそれぞれ測定した。

IV-5-2. 実験結果

低酸素ストレスに伴う肝臓、筋肉のAsA含量および筋肉乳酸含量の変動と飼料AsA含量との関係をTable IV-9に示した。AsA 100mg飼料区の肝臓AsA含量は、本章4節の場合と同

Table IV-9. Effect of dietary ascorbic acid levels on concentrations of liver and muscle ascorbic acid, and muscle lactate of the Japanese parrot fish stressed by changing water oxygen level

Dietary AsA (mg/100g)		Under low oxygen stress showing		
		Initial	Maximum respiratory frequency	Laid down
0	Liver AsA ($\mu\text{g/g}$)	4.0 \pm 2.2*	4.2 \pm 1.3	4.1 \pm 0.8
	Muscle AsA ($\mu\text{g/g}$)	trace	trace	trace
	Muscle lactate (mg/100g)	290 \pm 55	360 \pm 190	520 \pm 94 ^a
100	Liver AsA ($\mu\text{g/g}$)	57.0 \pm 7.1	53.4 \pm 3.2	60.7 \pm 8.3
	Muscle AsA ($\mu\text{g/g}$)	7.5 \pm 1.1	9.1 \pm 0.8 ^b	7.7 \pm 0.9
	Muscle lactate (mg/100g)	298 \pm 77	352 \pm 152	377 \pm 109

* Mean \pm SD, n=5.

^{a, b} Significantly different from the values at initial (respectively $p < 0.01$, $p < 0.05$).

様に、鰓蓋運動数最大時に減少し、横転時に増加する傾向を示した。一方、筋肉のAsA含量は逆に鰓蓋運動数最大時に増加し、横転時には減少した。これより、ストレス負荷に伴ってAsAが組織間で輸送される可能性が示唆された。これに対し、AsA 0 mg区の肝臓AsA含量は4 $\mu\text{g/g}$ と少なく、ストレス負荷中の変動もほとんどみられなかった。

筋肉の乳酸含量は両区ともストレスの負荷に伴い増大したが、AsA 0 mg区の横転時の乳酸含量はAsA 100mg区のそれよりも有意に高く、おおよそ1.4倍量に達した。

IV-5-3. 考察

以上の結果から、筋肉の乳酸生成量は低酸素ストレスの負荷により増加し、さらに横転中の乳酸蓄積量はAsA 0 mg区の方がAsA 100mg区のそれより著しく多くなることが分かった。

筋肉中の乳酸は激しい運動時や低酸素時などに嫌氣的解糖系の最終産物として生成し、その多くはCoriの回路に基づき血液中に放出されて肝臓で異化される。しかし、低酸素下における乳酸の血中への放出は血液pHを下げる主要な要因となり、赤血球ヘモグロビンの酸素結合能を低下させることが広く知られている。また、乳酸の顕著な蓄積は、Hochachka¹¹⁸⁾が言うように質量作用的にピルビン酸から乳酸への反応を触媒するLDH活性を阻害し、グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素とLDHとの酸化還元共役に失調を来たして、解糖系の代謝を抑制することが考えられる。本章1および4節の結果にみられたように、魚は低酸素時の横転およびへい死までの間、好氣的代謝と嫌氣的代謝が共存している状態であると考えられ、乳酸の過剰な生成、蓄積は両者を抑制する主要な因子となるであろう。

一方、低酸素に対し、極めて高い適応能を有することが知られている海洋性無脊椎動物では低酸素時に正常な酸素条件下におけるTCA回路の逆方向の反応を進め、コハク酸さらにはプロピオン酸、酢酸を生成することが知られている。さらに、これらの生物ではいずれも解糖系の最終産物である乳酸を生成しないかあるいは多量には蓄積せず、NADHとある種のアミノ酸の存在下でピルビン酸を還元して種特有のオピンを生成する。すなわち、ピルビン酸から補助的な嫌気メカニズムを介して、比較的無害な代謝産物あるいはアミノ酸等を生成し、細胞質における酸化還元平衡を調整するとともにTCA回路の代謝方向を調節して、無酸素的にATPを生成することが推測されている。^{117) 118)} また、魚類の中でも低酸素に対し極めて高い適応能を有するキンギョは特定の器官にエタノール脱水素酵素を保持し、低酸素状態で乳酸の酸化を行って酢酸、エタノールを生成する代謝経路を有するという。¹¹⁸⁾ 低酸素適応能を有する動物の共通の性質はいずれも乳酸の蓄積を防ぐ特異的な生理機能を保持し、無酸素的にエネルギー生産を行うことであろう。補助的な嫌気メカニズムをもたない一般的な脊椎動物が低酸素

に適應するために想定される重要な要因の一つは、過剰な乳酸の生成、蓄積を抑制するとともに、いかに代謝系を回轉させてATPを生産するかにあると考えられる。AsAの投与による組織AsA濃度の増加が魚類の低酸素ストレス耐性を向上し、さらに乳酸の蓄積を抑制するということは、AsAが低酸素下におけるエネルギー生産機構に関与することを予想させる。

池田(1960)¹²⁰⁾はAsA-酸化還元系の中間体フリーラジカルとしてモノデヒドロAsA(MDAsA)が存在することを分光学的に証明し、このMDAsAを介したAsAの酸化還元系が動植物の呼吸電子伝達系の一電子伝達すなわちATPの生成に関与するものと推論している。魚類ミトコンドリアにおいても同様の機構が起こるかどうかはまだ明らかではないが、今後の興味ある研究課題であろう。

ストレスの負荷によりカテコラミンおよびコルチゾールなどのホルモンが分泌され、いわゆるストレス反応(適應)を促がしていることは広く知られ、魚類の低酸素時にも両ホルモンが大量に放出されることは多くの研究報告によって明らかである。⁸³⁾ これら両ホルモンの合成にはいずれも水酸化反応が必要とされる。AsAはこれらの水酸化反応に対し、特にコルチゾール合成に対しては必ずしも特異的な因子ではなく、AsA投与量とホルモン生成量との正関係はみられない¹²¹⁾が、哺乳類副腎髄質のクローム親和性顆粒でドーパミンβ-ヒドロキシラーゼを介してドーパミンからカテコラミンが合成される反応では、AsAは補酵素的に水素(電子)供与体として要求されることが明らかにされている。¹²²⁾ また、コルチゾール合成時には腎臓静脈中において多量の酸化型AsAが放出されることが報告されている。⁹⁵⁾ すなわち、両ホルモンの合成に際しては特異性にかかわらず、AsAが水素供与体として水酸化反応に動員されるものと考えられる。

第V章 親魚の成熟，産卵および卵質に及ぼす 飼料アスコルビン酸投与の効果

哺乳類ではAsAは性腺ステロイドホルモンの生合成に関与し，生殖腺の成熟に重要な役割を果たすことが知られている。^{48, 49)}また，AsAはコラーゲンの生合成に必須であるから，養殖魚の人工種苗生産において，孵化後からAsAを含む飼料を摂取するまでの間は，産卵前の卵のAsA含量が生まれた仔魚の正常な発育を促す主要な因子となる。²¹⁾また，魚類卵巣のAsA含量は，特に成熟期において他の臓器に比べて著しく高いことより卵巣におけるAsAの役割が注目される。²¹⁾ニジマス¹²³⁾，ティラピア¹²⁴⁾等の淡水魚類では産卵，卵質に及ぼすAsA投与の効果が報告されている。しかし，海水養殖魚ではその種苗生産の鍵となる親魚に対するAsA投与の効果を調べた報告はまだほとんどない。そこで本章では，イシダイを試料魚として，生殖腺成熟，産卵および卵質に及ぼす飼料AsA投与の効果を調べた。

V-1. 生殖腺成熟に及ぼす飼料アスコルビン酸投与の効果¹²⁵⁾

親魚の生殖腺成熟に及ぼすAsA投与の影響についてはニジマス¹²⁶⁾およびアユ¹²⁷⁾等で検討されているが，AsAが生殖腺成熟を直接促進するという実証例はまだみられない。本実験では，生殖腺成熟に及ぼすAsA投与の影響を明確にするため，本来卵巣成熟を示さないイシダイの当歳魚から1才魚にかけて¹²⁸⁾，加温飼育によって成熟を誘発する環境を設定し，¹²⁹⁻¹³¹⁾卵黄形成がAsAの投与によって促進されるかどうかを検討した。

V-1-1. 実験方法

(1) 供試魚と飼育条件

近畿大学水産研究所で生産した平均体重98.1gのイシダイ35尾ずつを500lパンライト水槽に收容し，体重の増加に応じて分養しながら，12月から7月にかけて8ヶ月間の飼育試験を行った。水温は12月から4月までは20℃に調節し，5月以降は自然水温のままとしたので24℃まで徐々に上昇した。

試験飼料の基本組成およびAsA添加量は第IV章2節1項に示した通りとした。すなわち，タンパク質源としてホワイトフィッシュミールを用い，AsA-カルシウム塩をAsAとして乾飼料100g当たり，0，30，100および300mgになるようにそれぞれ添加した4飼料区を設けた。飼料の調製法および保存方法は第IV章1節に記した通りとした。

(2) 測定項目と方法

体重測定を1ヶ月目毎に行い、各区の増重率および飼料効率を求めた。また、AsA 欠乏徴候とへい死魚数は毎日記録し、1ヶ月毎に各区のへい死率(%)を算出した。成長低下やへい死などからAsA 欠乏症が発現したと判断された試験区では、その半数の魚にAsA 300mg/100g 飼料を投与して回復試験を行った。飼育8ヶ月目の7月に、各区10尾以上の試料魚を取り上げ、それぞれについて血液を第三章1節に記した方法で採取し、血漿総コレステロール、トリグリセリドおよびカルシウム含量の測定に供した。採血後の試料魚は即殺し、生殖腺、肝臓および内臓を採取して秤量し、生殖腺指数、比肝重および比内臓重量をそれぞれ求めた。生殖腺の一部をホルマリン固定し、組織像観察用に保存した。また、残りの生殖腺および肝臓は直ちにドライアイス凍結し、AsA の定量に供するまで-70°Cで保存した。

生殖腺組織切片の調製は、HE染色法¹³²⁾により行った。採血方法、血漿化学成分および組織AsA 含量の測定は、第三章1節および第四章4節に記した方法と同様に行った。なお、各項目の測定結果についてはStudentの*t*検定を行い、各飼料区の間で有意差($p < 0.05$ または 0.01)を判定した。

V-1-2. 実験結果

(1) 増重率、飼料効率、欠乏症およびへい死率

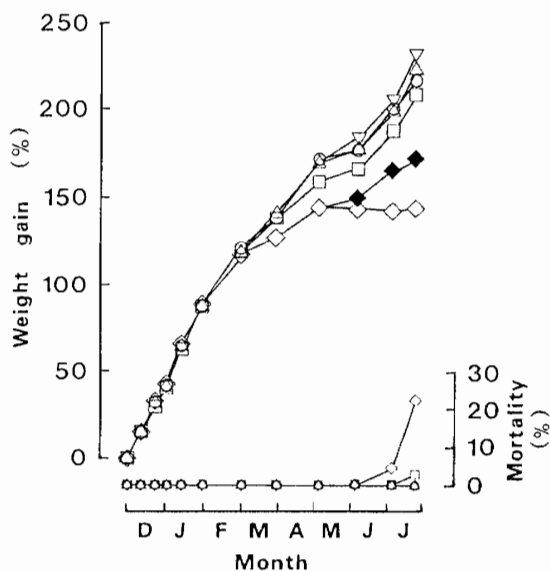


Fig. V-1. Effect of dietary ascorbic acid levels on the growth and mortality of the Japanese parrot fish. Dietary ascorbic acid levels (mg/100g): \diamond , 0; \square , 30; \triangle , 100; \circ , 300; \blacklozenge , fed AsA 100mg diet for recovery test; ∇ , fed AsA 0mg diet for deficiency test at month 5.

イシダイの成長に及ぼす飼料AsA 含量の影響をFig. V-1に示した。AsA 0mg区では飼育5ヶ月目、成熟期前の5月に食欲不振、成長不良が認められ、それは回復試験によって回復した。AsA 30mg以上の飼料区、および成熟期前の5月からAsA 100mg区の一部にAsA 0mg飼料を投与した区の成長曲線には相互間に顕著な差異はみられなかった。

イシダイを生殖期まで8ヶ月間飼育した結果をTable V-1に示した。AsA 0mg区の増重率、飼料効率は他区に比べて低く、へい死率は23%に達した。一方、AsA 30mg以上の区の各指標には顕著な差はみられなかった。飼育5ヶ月目より行ったAsA 0mg区の回復試験では各

Table V-1. Results of feeding experiment of the Japanese parrot fish with diets containing different levels of ascorbic acid for 8 months

Diet No.	AsA level in diet (mg/100g)	Daily feed intake (%)	Weight gain (%)	Feed efficiency (%)	Mortality (%)
1	0	1.2	144.8	28.3	22.5
2	30	1.3	208.1	33.2	2.5
3	100	1.3	223.3	32.8	0
4	300	1.3	216.5	32.7	0
1-R* ¹	100	1.2	171.1	32.2	0
3-D* ²	0	1.3	232.9	34.0	0

*¹ Recovery test on diet No.1 group at month 5.

*² Deficiency test on diet No.3 group at month 5.

指標とも明らかな回復が認められた。また、成熟期前の5月より、AsA 100mg飼料区の一部にAsA 0 mg飼料を投与したが、8ヶ月目までにはAsA 欠乏の徴候はみられなかった。

(2) 生殖腺指数，比肝重および内臓重量比率

生殖期のイシダイ各飼料区の内臓部位別重量比率をTable V-2に示した。AsA 300mg区の雄の生殖腺指数はAsA 0~100mg区のそれよりもやや高い値を示した。一方，雌の生殖腺指数は飼料AsA含量に比例して増大し，AsA欠乏区および30mg区とAsA 300mg区との間には有意差がみられた。また，各飼料区の生殖腺が未成熟であった5月より，AsA 100mg飼料区の一部にAsA 0 mg飼料を投与したところ，生殖腺指数は欠乏区と同様に著しく低い値を示した。これより，AsAの投与は卵巣の成熟を促進することが明らかになった。なお，生殖腺および肝臓を除く内臓の重量比率は飼料AsA含量の増加に伴い減少し，雌の比肝重値はAsA 30 mg

Table V-2. Effect of dietary ascorbic acid levels on the gonadosomatic index, hepatosomatic index and viscerosomatic index of the Japanese parrot fish fed the diets for 8 months (Mean \pm SD, n=1-11)

Diet No.	AsA level in diet (mg/100g)	Gonadosomatic index		Hepatosomatic index		Viscerosomatic index	
		Male	Female	Male	Female	Male	Female
1	0	0.4 \pm 0.2 ^{a b}	0.5 \pm 0.2 ^a	1.3 \pm 0.3 ^a	1.7 \pm 0.5 ^a	6.5 \pm 0.6 ^a	5.9 \pm 1.3 ^a
2	30	0.6 \pm 0.5 ^{a b}	0.9 \pm 0.5 ^a	1.6 \pm 0.4 ^{a b}	2.1 \pm 0.4 ^b	5.0 \pm 0.8 ^b	5.6 \pm 0.7 ^a
3	100	0.5 \pm 0.2 ^{a b}	1.4 \pm 1.3 ^{a b}	1.7 \pm 0.3 ^b	2.2 \pm 0.4 ^b	5.5	5.5 \pm 1.8 ^a
4	300	0.8 \pm 0.4 ^b	2.2 \pm 0.9 ^b	1.7 \pm 0.2 ^b	2.2 \pm 0.2 ^b	5.1 \pm 0.4 ^b	4.5 \pm 0.8 ^a
1-R* ¹	100	0.5 \pm 0.1 ^{a b}	0.6	1.5 \pm 0.1 ^{a b}	1.6	5.6	4.9
3-D* ²	0	0.3 \pm 0.2 ^a	0.5 \pm 0.5 ^a	1.6 \pm 0.3 ^{a b}	1.9 \pm 0.4 ^{a b}	5.8 \pm 0.5 ^{a b}	5.1 \pm 0.8 ^a

*¹ Recovery test on Diet No.1 group at month 5.

*² Deficiency test on Diet No.3 group at month 5.

^{a, b} Mean within a line not followed by the same superscript letter are significantly different ($p < 0.05$).

以上の区で増加した。

(3) 生殖腺組織像

各飼料区インダイの卵巣を5検体ずつ無作為抽出し、一般染色による組織像を検鏡して成熟度を調べた。Fig. V-2にAsA 0 mg区の未成熟卵巣と300mg区の成熟卵巣の卵巣組織像を比較して示した。すなわち、これら両飼料区の卵巣は、おおよそ周辺仁期までの未成熟期または卵黄球期前後の成熟期のいずれかの状態であった。AsA 欠乏区の卵巣はすべてが周辺仁期までの未成熟状態であったが、AsA 30mg区では20%が、AsA 100mg区では40%がいずれも成熟を示す卵黄球期に達していた。一方、AsA 300mg区では80%が卵黄球期に達しており、一部には核移動期に達したものもあった。これより、卵黄形成は飼料AsA 含量に比例して促進されることが分かった。なお、各飼料区の精巣には精子形成が認められ、ほとんどの雄試料魚で放精が確認された。

(4) 各組織のアスコルビン酸濃度

各飼料区インダイの肝臓、精巣および卵巣のAsA 含量をTable V-3に示した。肝臓および精巣のAsA 含量は飼料AsA 含量に比例して増大し、AsA 100mg以上の区でおおよそ飽和した。一方、他の臓器に比べてAsA 含量の著しく多い卵巣では、AsA 0~100mg区までの区の卵巣AsA 含量は、飼料AsA 含量の増加に伴って増大したが、生殖腺指数の最も高いAsA

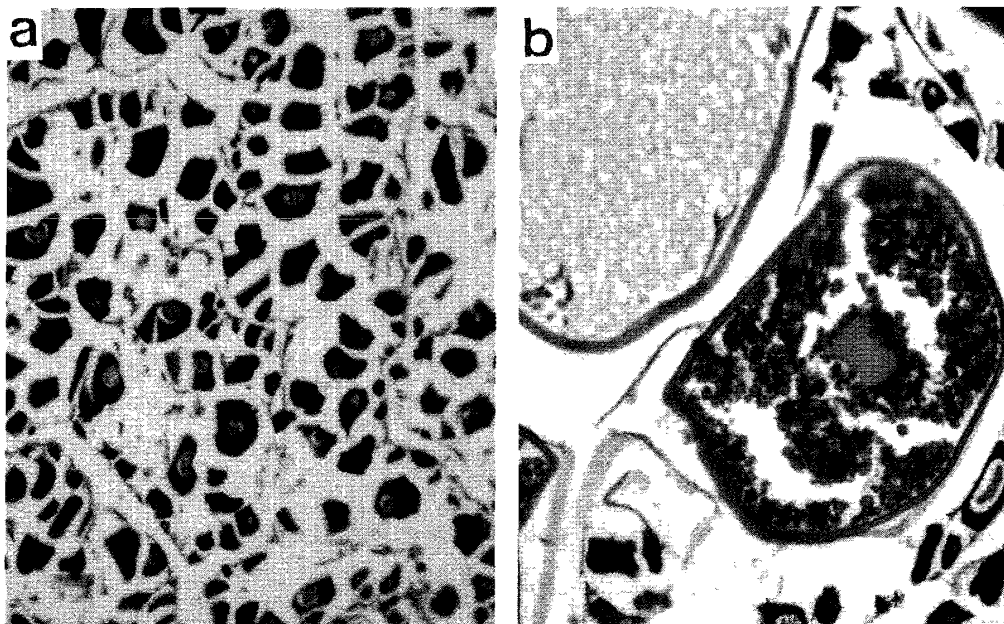


Fig. V-2. Effect of dietary ascorbic acid levels on ovarian egg maturation in the Japanese parrot fish fed the diets for 8 months. $\times 100$. a, immature phase; b, maturation phase.

Table V-3. Effect of dietary ascorbic acid levels on the total ascorbate concentration in liver, testes and ovaries of the Japanese parrot fish

Diet No.	AsA level in diet (mg/100g)	Liver ($\mu\text{g/g wet}$)	Testis ($\mu\text{g/g wet}$)	Ovary ($\mu\text{g/g wet}$)
1	0	trace	11.1 \pm 2.4 ^a	70.6 \pm 18.8 ^a
2	30	38.4 \pm 4.6 ^{*, a}	100.4 \pm 27.5 ^b	657.1
3	100	62.1 \pm 16.2 ^b	232.5	898.4 \pm 537.2 ^b
4	300	79.1 \pm 22.9 ^b	221.9 \pm 40.7 ^c	366.2 \pm 79.3 ^b

* Mean \pm SD, n=2-5.

a, b, c Means within a line not followed by the same superscript letter are significantly different ($p < 0.05$).

300mg区のそれは30および100mg飼料区のそれよりも低く、湿重g当たり平均366 μg であった。

(5) 血漿化学成分含量

生殖期イシダイの雌雄別の血漿化学成分含量をTable V-4に示した。総コレステロール含量は雌雄ともにAsA 300mg区で低い値を示した。雄の血漿トリグリセリド含量は飼料AsA含量に関係なくほぼ一定であったが、雌のそれは飼料AsA含量に比例して増加した。また、カルシウム含量は飼料AsA含量の増加に伴い雄では低下したが、雌ではむしろ増加する傾向を示した。

Table V-4. Effect of dietary ascorbic acid levels on the plasmic chemical components of the Japanese parrot fish fed the diets for 8 months

Diet No.	AsA level in diet (mg/100g)	Total cholesterol (mg/dl)		Triglyceride (mg/dl)		Calcium (mg/dl)	
		Male	Female	Male	Female	Male	Female
1	0	118 \pm 27 ^{*, a}	181 \pm 6 ^a	141 \pm 26 ^a	127 \pm 29 ^a	16.7 \pm 0.3 ^a	16.8 \pm 0.2 ^a
2	30	154 \pm 30 ^a	183 \pm 42 ^{a, b}	146 \pm 20 ^a	125 \pm 3 ^a	19.0 \pm 1.4 ^b	17.2 \pm 0.4 ^a
3	100	148	195 \pm 29 ^a	138	186 \pm 25 ^b	16.0	17.7 \pm 1.3 ^a
4	300	126 \pm 16 ^a	150 \pm 14 ^b	148 \pm 10 ^a	245 \pm 103 ^{a, b}	15.4 \pm 0.8 ^a	18.4 \pm 1.2 ^a

* Mean \pm SD, n=2-5.

a, b Means within a line not followed by the same superscript letter are significantly different ($p < 0.05$).

V-1-3. 考察

本実験の結果、イシダイ1才魚雌の生殖腺指数および卵黄形成期に達した卵巢を有する魚体の発生頻度は投与する飼料のAsA含量に比例して増大した。これよりAsAの投与はイシダイ卵巢の成熟を促進することが分かった。

卵黄は生殖腺刺激ホルモンによって誘導された性ホルモンが生殖腺より分泌され、肝臓で卵黄の前駆物質であるピテロジェニンが合成された後に卵巢内に到達して形成されることが認め

られている。^{48, 133)} 従って、卵黄形成期の雌の肝臓は雄に比べて大きく、細胞も肥大し、タンパク質合成能が高い。また、ビテロジェニン¹³³⁾は鉄、カルシウムとのリン酸複合体タンパク質であり、卵黄形成期には血漿の総タンパク質、カルシウムおよびリンが増加し、さらに油球成分であるトリグリセリドや遊離脂肪酸の増加することが報告されている。¹³³⁾ 本実験の結果、飼料AsA 含量の増加に伴い雌の比肝重は増大した。また、雌の血漿トリグリセリドおよびカルシウム含量は飼料AsA の投与量に比例して増加したが、ステロイドホルモン前駆物質になると考えられるコレステロールの含量はAsA を大量投与した場合には減少した。このことは、卵巢の組織検鏡像の結果と同様に、卵黄形成すなわちビテロジェニンの合成がAsA の投与によって促進されることを示した。一方、ビテロジェニンの合成は卵巢の莢膜細胞および顆粒膜細胞で水酸化反応を介して合成される性腺ステロイドホルモンであるエストロゲンによって調節されていることが知られている。^{48, 133)} さらに、飼料AsAの投与はニジマス¹²⁶⁾ およびアユ¹²⁷⁾ の血漿エストラジオール17 β を増加させることが報告されている。AsA はステロイド合成における水酸化反応に関与し、生殖腺成熟を促進するものと考えられる。

これまで魚類の生殖腺成熟とAsAとの関係については、特に成熟期に卵巢のAsA含量が著しく高くなることより注目され、様々な考察がなされている。^{21, 48, 72)} Seymour¹³⁴⁾ は卵黄の増加に伴って卵巢卵のAsA 含量が増加することを報告した。また、Sandnesら¹³⁵⁾ は成熟度の異なるタラの卵巢のAsA含量を測定し、未成熟期では生殖腺指数の増大に伴い卵巢AsAは増加し、成熟期に入ると生殖腺指数の増加に伴ってAsA 含量は減少することを報告している。一方、秋山¹³⁶⁾ はカタクチイワシ卵巢のAsA含量は黄体形成ホルモン放出ホルモンの投与によって減少するが、飼料AsAの大量投与はこれを防ぐことを報告している。本実験でも未成熟期の卵巢AsA 含量は飼料AsA 含量の増加に伴って増大したが、卵黄形成期に達した個体頻度が他区よりも高いAsA 300mg区の卵巢のAsA含量はAsA 100mg区のそれよりも低くなる傾向を示した。このことは卵黄形成期に達した卵巢の卵母細胞では卵黄および油球の主成分であるタンパク質および脂質の蓄積が多くなり、その結果、組織重量当たりのAsA 濃度が低下したのではないかと考えられる。

Solimanら¹²⁴⁾ はティラピアにAsA 125mg/100 g dry dietを投与すればAsA欠乏飼料を投与したものより、成熟の徴候が2週間早まるという。また、Waagboら¹²⁶⁾ はAsA欠乏飼料で21ヶ月間飼育したニジマスの血漿エストラジオール17 β およびビテロジェニンの含量、並びに比肝重はAsA投与区のそれよりも低かったと報告している。しかし、AsA の投与によって生殖腺成熟が促進されることを実証した報告はこれまでまだなされていない。本実験では、本来卵巢成熟を示さないイシダイの当歳魚から1才魚¹²⁸⁾を用いて、長期間の加温飼育によって

成熟を誘発する環境を設定し、¹²⁹⁻¹³¹⁾ 卵黄形成期に達した卵巢を有する魚体の発生頻度が AsA の投与量に比例して増大することより AsA の卵巢成熟促進作用を明らかにすることができた。この結果が養殖種苗生産の現場における親魚の成熟にどの程度反映されるかについては今後さらに検討する必要がある。

V-2. 産卵および卵質に及ぼす飼料アスコルビン酸投与の効果

前節における実験の結果、イシダイの生殖腺成熟が AsA の投与によって促進されることを明らかにした。本実験では、さらに実用的な観点から親魚に対する飼料 AsA 投与の効果を検証するため、産卵経歴の長いイシダイ15才親魚を用いて、産卵および卵質に及ぼす飼料 AsA 投与の効果を調べた。

V-2-1. 実験方法

(1) 供試魚と飼育条件

供試魚は近畿大学水産研究所において卵採取用親魚として飼育中の、産卵経歴の長いイシダイ15才魚（平均体重1.9 kg、尾叉長41.7cm）を用い、雄5尾、雌7尾ずつを円形3トン水槽にそれぞれ収容した。飼育期間は4月10日から8月20日までの約4ヶ月間とし、水温調整を行わない19~29℃のろ過海水を用いて、注水量40l/minで流水飼育した。日長時間は12時間に調節した。

Table V-5. Composition of test diets (%)

Diet No.	1	2
White fishmeal		68
Gluten		2
Pollack liver oil		5
α -Starch		15
Vitamin mixture* ¹		2
Mineral mixture* ²		3
CMC		3
AsA+ α -Cellulose		2
AsA(mg/100g)* ³	25	300

*¹ Vitamins (mg/100g dry diet): thiamin HCl, 10; riboflavin, 40; pyridoxine HCl, 10; choline chloride, 1000; nicotinic acid, 150; Ca pantothenate, 100; inositol, 400; biotin, 1; folic acid, 3; cyanocobalamin, 0.01; menadione, 1.6; α -tocopherol acetate, 40; α -cellulose, 229.9.

*² Minerals (mg/100g dry diet): Ca(H₂PO₄)₂·H₂O, 400; Ca lactate, 1000; Fe citrate, 100; MgSO₄·7H₂O, 400; K₂HPO₄, 700; NaH₂PO₄·H₂O, 250; AlCl₃·6H₂O, 20; ZnCl₂, 60; CuSO₄·5H₂O, 30; KI, 20; MnSO₄·4H₂O, 20.

*³ Added as calcium ascorbate.

(2) 飼料組成と投餌法

試験飼料の基本組成および AsA 添加量を Table V-5 に示した。すなわち、第 IV 章 1 節で用いた飼料組成を保形性などを考慮して親魚飼料用に一部修正し、造粒機で大型の10mm径モイストペレットに成型した。AsA 添加量は、本章 1 節の結果を基準とし、AsA-カルシウム塩を飼料乾重100g 当たり AsA として 25 および 300mg になるようにそれぞれ添加した 2 飼料区を設けた。なお、給餌は 1 日 1 回とし、毎日午後に飽食に近い量を両区等しくなるように投与した。

(3) 測定項目と方法

両区の卵を親魚用飼育水槽側面に設置した集卵槽から毎朝取り上げ、産卵数および浮上卵数を希釈法により計数し、雌親魚1尾当たりの平均総産卵数および浮上卵率を求めた。また、浮上卵100粒中の正常卵率（正常油球数を持つ卵数の割合）、卵重量および30粒の卵径もそれぞれ測定した。孵化率および総孵化仔魚数は浮上卵100粒を無作為抽出し、2l塩化ビニル容器に収容して、24時間後の孵化仔魚数からそれぞれ算出した。各項目は毎日測定し、それぞれの総数または平均値を求めた。

両区の胚体形成卵を一般成分およびAsA含量の測定に供するため5月18日から7月2日までの間、おおよそ7日目毎に採取し、卵表面の水分を拭き取った後に精秤し、 -70°C で凍結保存した。卵の一般成分およびAsA含量は第I章および第III章1節に示した方法でそれぞれ測定した。

V-2-2. 実験結果

(1) 産卵成績

全産卵期間中の産卵量および卵質と飼料AsA含量との関係をTable V-6に示した。産卵は実験開始約1ヶ月目の5月11日、水温 19.6°C から8月19日、水温 29.1°C までの約3ヶ月間に亘りほぼ毎日続いた。また、両飼料区の雌親魚の摂餌はいずれも活発であり、個々の魚には卵成熟に伴う腹部膨満状態が観察された。両区の産卵開始日および産卵期間には顕著な差はみられなかった。しかし、AsA 300mg飼料区のイシダイ親魚1尾当たりの平均総産卵数および浮上卵数は、それぞれ 1619×10^4 , 1411×10^4 粒であり、AsA 25 mg区のそれぞれ 1354×10^4 , 1187×10^4 粒よりいずれも多く、おおよそ1.2倍であった。一方、卵形、卵重量および正常卵率には両

Table V-6. Effect of dietary ascorbic acid levels on the spawning and egg quality of the Japanese parrot fish broodstock

AsA level in diet	25mg/100g	300mg/100g
Eggs produced/ fish ($\times 10^4$)	1354	1619
Buoyant eggs/ fish ($\times 10^4$)	1187	1411
Rate of buoyant egg (%)	$83.3 \pm 19.9^{*1}$	85.1 ± 14.2
Eggs diameter (mm)	0.86 ± 0.03	0.86 ± 0.03
Egg weight (mg)	0.38 ± 0.04	0.37 ± 0.04
Normal egg (%) ^{*2}	96.3 ± 5.7	96.7 ± 6.0
Hatching rate (%)	78.4 ± 17.9	80.9 ± 12.8

*¹ Mean \pm SD, n=62.

*² Eggs having 1 oil globule.

区間に顕著な差はみられなかったが、AsA 300mg区の平均孵化率および平均浮上卵率は、AsA 25 mg区よりわずかに高い傾向を示した。

(2) 飼育水温別産卵成績

産卵期間中の水温、産卵量および相対産卵量の変動をFig. V-3に示した。なお、産卵量は日変化が激しいためおおよそ10日目毎に日間平均産卵量を計算して図示した。また、相対産卵量は10日目毎のAsA 25mg飼料区の産卵量に対するAsA 300mg飼料区の産卵量の比率で示した。両区の産卵量は飼育水温の上昇とともに増加し、6月10日から7月20日の水温おおよそ21-25°Cの間で最大となり、7月20日以降の水温おおよそ25°C以上になると減少した。AsA 300mg区の産卵量はAsA 25mg区のそれより全期間を通じて多くなる傾向を示した。しかし、その程度は相対比に示したように産卵量の最も多い期間では顕著な差はなく、その前後でそれぞれ高くなった。

熊井¹²⁸⁾はインダイの生殖腺指数および産卵量と飼育水温との関係を調べ、その産卵盛期の

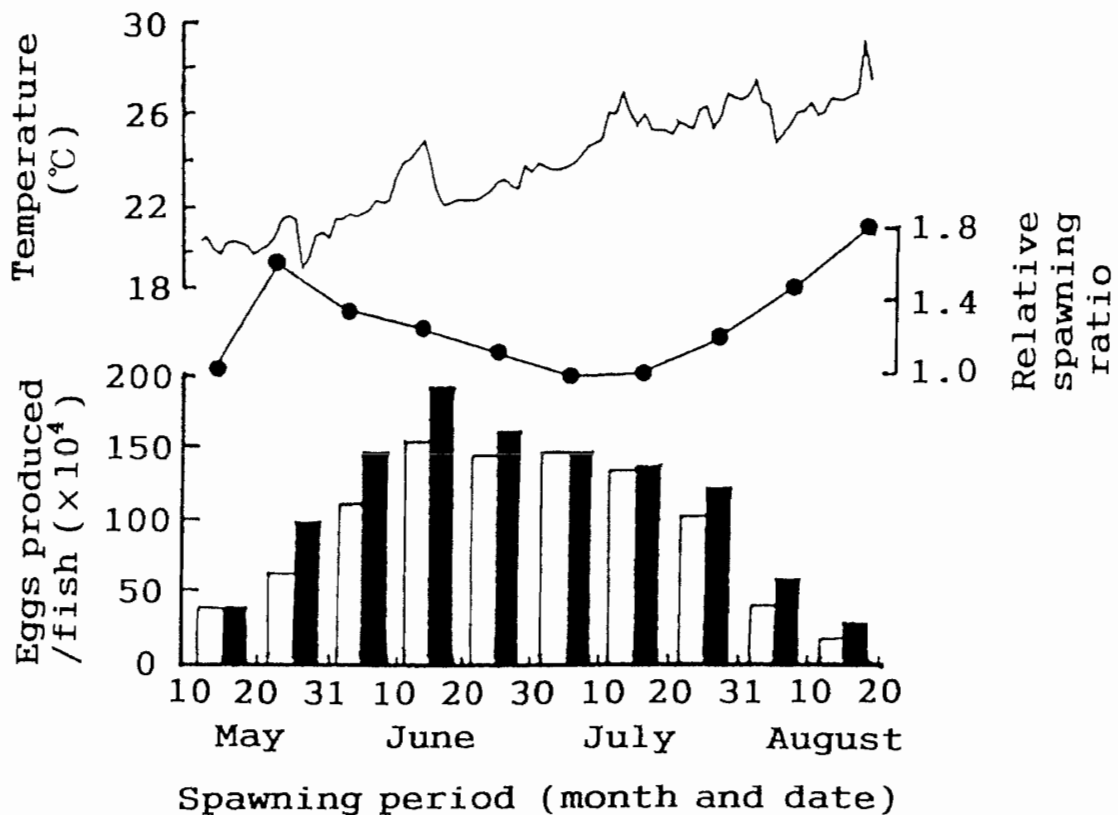


Fig. V-3. Effect of dietary ascorbic acid levels on the spawning of the Japanese parrot fish broodstock. Dietary ascorbic acid levels (mg/100g): □, 25; ■, 300. Relative spawning ratio was expressed as ratio against the amount of egg obtained from the fish fed AsA 25 mg diet for fish fed 300mg AsA diet.

水温は21–24℃であり、25℃以上になると産卵量が減少することを報告している。この結果は、本実験の結果とほぼ一致している。

そこで、6月10日から7月20日の間を産卵盛期とし、その前後を産卵盛期前および産卵盛期後に分け、各期間の産卵成績をTable V-7に示した。その結果、両区とも産卵盛期前の浮上卵率は産卵盛期以後に比べて低い値であったが、AsA 300mg区の浮上卵率はAsA 25mg区のそれよりも約10%高い値を示した。また、AsA 25mg区の孵化率は浮上卵率と同様に産卵盛期前に低い傾向を示したが、AsA 300mg区では全期間を通じて80%以上の値を示した。さらに、両区から得られた孵化仔魚の総数は産卵盛期には差はみられなかったが、その前後にはAsA 300mg区が高くAsA 25mg区のおおよそ1.4–1.6倍であった。

Table V-7. Effect of dietary ascorbic acid levels on the spawning and egg quality of the Japanese parrot fish broodstock at each spawning period

Spawning period*	Dietary AsA levels (mg/100g)	Egg produced /fish ($\times 10^4$)	Rate of buoyant egg (%)	Normal egg (%)	Hatching rate (%)	Total larvae /fish ($\times 10^4$)
Before best period (5/11-6/10)	25	304.1	63.2	93.6	72.3	169.5
	300	419.3	73.3	93.4	81.3	275.7
Best period (6/11-7/20)	25	820.5	93.5	98.2	81.5	653.9
	300	899.8	90.0	98.9	80.4	686.0
After best period (7/21-8/20)	25	229.8	88.5	96.2	79.7	168.7
	300	305.5	89.4	96.7	81.3	239.5

* See Fig.V-3.

(3) 卵の一般成分組成およびアスコルビン酸濃度

卵の一般成分およびAsA含量を測定した結果をTable V-8に示した。両区の一般成分組成には顕著な差はみられなかった。一方、卵の総AsA含量は、AsA 300mg区の方が25mg区のもの約5倍に達した。

Table V-8. Effect of dietary ascorbic acid levels on the proximate composition (dry base %) and ascorbic acid content in eggs

AsA level in diet	25mg/100g	300mg/100g
Crude protein	63.9 \pm 1.5*	62.6 \pm 1.1
Crude lipid	20.0 \pm 1.2	18.6 \pm 0.8
Crude ash	9.5 \pm 1.2	10.4 \pm 1.2
AsA content (μ g/g wet)	27.5 \pm 12.0	137.6 \pm 28.8 ^a

* Mean \pm SD, n=6.

^a Significantly different from the AsA 25mg diet group ($p < 0.001$).

V-2-3. 考察

マダイ、イシダイおよびクロダイなどのタイ類に関する種苗生産技術は近年、長足の進歩を遂げ、自然産卵の時期を日照時間および水温の調節によって制御できるようになっている。¹²⁹⁻¹³¹⁾ 海水養殖魚用種苗の需要の増大とともに、種苗の早期生産および安定供給が望まれている。しかし、これらの多回産卵魚は産卵期間の初期および後期に産卵量、浮上卵率および孵化率などの卵質の低下することが知られており、¹³⁷⁾ 良質卵をいかに安定供給するかが問題となっている。本章1節の結果から、生殖腺成熟は飼料AsAの投与によって促進されることが分かった。さらに、本実験の結果より、イシダイ親魚に対する飼料AsAの大量投与は産卵期間の初期および後期の産卵量を増加させ、産卵初期における卵質の低下を防止することが明らかにされた。すなわちAsAの投与は良質卵を安定供給するために有効な手段の一つであろう。

親魚の産卵および卵質に及ぼす飼料AsAの投与効果に関する報告はまだそれほど多くなされていないが、Sandnesら¹²³⁾はニジマスにおける飼料AsAの投与は卵のAsA含量を増加させ、孵化率の改善に役立つと報告している。また、Solimanら¹²⁴⁾はティラピアにおけるAsAの投与も卵の孵化率を増大させると報告している。本実験の結果、イシダイ親魚に対するAsAの投与は孵化率の改善には効果を示さなかったが、産卵初期における孵化率および浮上卵率はAsAの投与によって改善されることが明らかにされた。タイ類の産卵初期における卵質低下が何によって起こるかはまだ明確にされていないが、Hiraoら¹³⁸⁾はニジマス卵の鉄含量と孵化率には相関関係があると報告している。AsAは本章1節で述べたように性ステロイドホルモンの合成に関与することが知られ、さらに飼料AsAの投与は肝臓および脾臓の鉄含量に影響し、鉄の組織への貯留および利用を調節することが示唆されている。⁷²⁾

一方、本実験でAsAの大量投与は産卵の初期および後期の産卵量を増加させる傾向を示した。最近、秋山ら¹²⁷⁾は飼料AsAを投与したアユ成熟魚の大半は正常に放卵するが、AsA欠乏飼料を投与したアユではほとんど放卵しないことをみている。さらにAsA欠乏飼料を投与した未排卵状態のアユに黄体形成ホルモン埋め込み、生殖腺刺激ホルモンおよびAsAを注射した場合にはいずれも排卵個体が出現するという。本実験の結果すなわちAsAの大量投与による産卵初期および後期における産卵量および総孵化仔魚数の促進効果は、本章1節の場合と同様に、AsAが性ホルモン合成を促進したためと考えられる。

V-3. 孵化仔魚の生残率に及ぼす飼料アスコルビン酸投与の効果

上記実験の結果、卵のAsA含量は親魚用飼料のAsA含量が多いほど多くなることが分かっ

た。本実験ではそれらの卵を用い、卵および仔魚の生残率に及ぼす親魚に対するAsA投与の効果について検討した。

V-3-1. 実験方法

(1) 供試卵と飼育条件

本章2節に示した両飼料区から得られた胚体形成卵を、200l円形パンライト水槽に1万粒ずつ収容し、200W電気ヒーターで水温を調節して微流水飼育した。飼育期間は1lotにつき5日間とし、6月3日から7月10日の間に22lotsの飼育試験を行った。各lotにおける仔魚の生残尾数は毎日夜間に計数した。すなわち、各水槽の通気量をわずかに強め、仔魚が水槽内でおおよそ均一に分散していることを確かめた後、2l容器で飼育水の一部を数回採取して生残仔魚数を計数し、その平均値をそれぞれ算出した。なお、孵化後3日目以降の仔魚には両区とも海産クロレラで二次培養したシオミズツボウムシを与えた。

(2) 測定項目と方法

卵収容後24時間目毎に両区の仔魚および卵を3lotsずつサンプリングし、還元型および酸化型AsA含量を第III章1節に記した方法で測定した。仔魚および卵のAsA含量は測定したサンプル重量当たりの尾数から、1個体当たりのAsA含量として算出した。なお、測定結果はStudentのt検定を行い、卵収容時の測定値に対する有意差($p < 0.05$ または 0.01)を判定した。

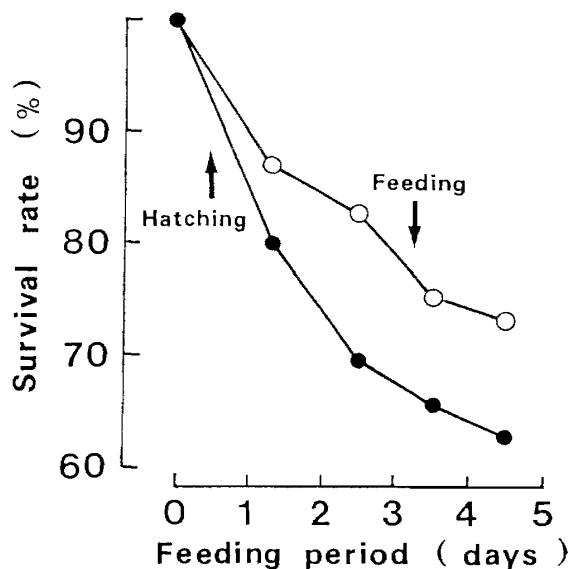


Fig. V-4. Effect of dietary ascorbic acid levels on survival rate of larvae. Dietary ascorbic acid levels (mg/100g): ●, 25; ○, 300.

V-3-2. 実験結果

(1) 卵および仔魚の生残率

仔魚の生残率に及ぼす親魚に対するAsA投与の影響をFig. V-4に示した。すなわち、22回の飼育試験を行い、生残率の平均値を求めて図に示した。その結果、AsA 300mg区の親魚から得られた孵化仔魚の平均生残率は、AsA 25mg区のそれより高く、実験開始2~3日目には有意差($p < 0.05$)が認められた。その後の生残率曲線は両区ともに同じ傾向を示した。このことよりイシダイ親魚に対するAsAの大量投与は孵化仔魚の生残率を向上させることが分かった。

(2) 卵および仔魚の酸化型および還元型アスコルビン酸濃度

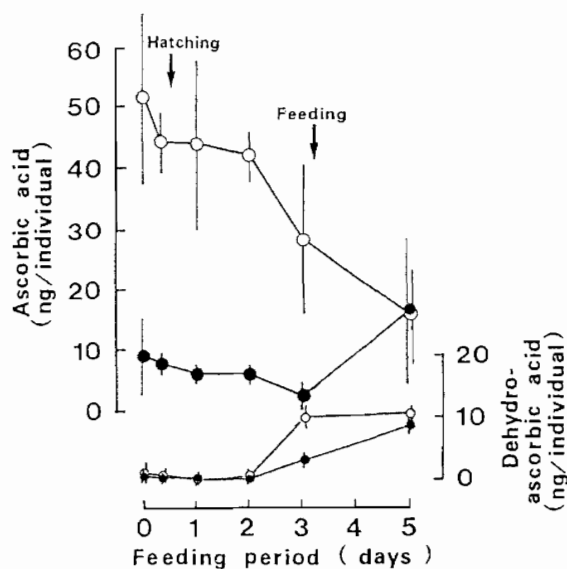


Fig. V-5. Changes in contents of ascorbic acid and dehydroascorbic acid of eggs and larvae produced by the Japanese parrot fish broodstock fed the diets having different ascorbic acid level.

a, b, c Significantly different from the values at 0 time (respectively $p < 0.001$, $p < 0.01$, $p < 0.05$). Dietary ascorbic acid levels (mg/100g): ●, 25; ○, 300.

両飼料区の親魚から得られた仔魚の飼育経過に伴う1個体当たりの還元型および酸化型AsA含量の変動を、Fig. V-5に示した。その結果、両区の還元型AsA含量は孵化直前および実験開始2～3日目にかけて著しく減少し、酸化型AsAは摂餌前の2日目から3日目にかけて有意に増加した。しかし、その程度はAsA 300mg区の方がいずれも顕著であった。

V-3-3. 考察

AsAはコラーゲンの生合成に必須であるから、養殖魚の人工種苗生産において、孵化後からAsAを含む飼料を摂取するまでの間は、産卵前の卵のAsA含有量が生まれた仔魚の正常な発育を促す主要な因子となる。²¹⁾ Solimanら¹²⁴⁾はAsA無添加飼料で21週間飼育したティラピア親魚から得られた卵のAsA含量および孵化率はAsA添加飼料を投与した親魚のそれよりも低く、さらに、卵のAsA含量は仔魚の成長等に影響することを指摘している。また、Komarovら¹³⁹⁾は、ニジマスにおける飼料AsAの投与は卵の生残率を向上すると報告している。一方、佐藤ら¹⁴⁰⁾はニジマス受精卵の孵化および発生過程でAsAが顕著に減少することを報告している。また、Golobら¹⁴¹⁾はウニの囊胚形成期にコラーゲン合成が始まり、浮遊幼生期に達する前からその後期にかけて何倍にも増加することを報告している。さらに、溝口ら¹⁴²⁾はウニ幼生の原腸形成はAsAおよび α -ケトグルタル酸によって増大し、コラーゲン合成における水酸化反応にAsAが関与したことを示唆している。イシダイと同じタイ類のマダイおよびクロダイでは孵化直後に心臓、眼球、体側筋組織、脳、脊髄および脊索などの原基が形成され、孵化後から餌付けまでの間には卵黄の吸収とともに内臓諸器官の形成が促進される。¹⁴³⁾ また、孵化直後のマダイ仔魚には骨組織が全く認められず、摂餌開始期前に摂餌のため最低限必要と考えられる骨格系が急激に形成される。¹⁴⁴⁾ 本実験の結果、親魚に投与したAsAは投与量に応じて卵にかなり

蓄積され、孵化直後および摂餌開始前に急激に減少することが分かった。蓄積されたAsAは組織形成に必要なコラーゲン合成に有効に利用され、これが孵化仔魚の生残率に反映するものと考えられる。

要 約

魚類の多くはビタミンC（アスコルビン酸，以下AsAと略記）を生合成できないので，養魚飼料には魚の成長と健康に必要な量のAsAを添加しなければならない。養殖魚のAsA要求に関する研究は，ニジマスやアメリカナマズなどの淡水魚についてはアメリカを始めとする各国でかなり古くからなされている。しかし，我が国における養殖魚介類の中で重要な位置を占める海水魚に関するその研究はまだ著しく少ない。また養殖魚のAsA要求量は，成長段階によって異なるばかりでなく，種々の環境因子や生理的条件によっても異なることが魚類養殖の現場においては経験的によく知られている。そこで，本研究では，海水魚養殖の現場において想定されるいくつかの条件下で，イシダイを主な試料魚として，AsA要求に関する飼育実験を行い，次の結果を得た。

I. まず，栄養要求試験用精製飼料の基本組成を設定するために，イシダイ稚魚を試料魚として，タンパク質（カゼイン）および脂質（スケソウダラ肝油）の含量の異なる飼料を40日間投与して，増重率，飼料効率，タンパク質効率，体タンパク質蓄積率，体脂質蓄積率および魚体の一般成分組成を測定した。これらの結果から，本実験条件下で，成長以外の指標も考慮した場合に，試験飼料の至適タンパク質含量は約45%，至適脂質含量は約8%と判定された。また，飼料に添加すべきミネラル混合物およびビタミン混合物についても，同様の試験を行った結果，本研究用として設定したそれぞれの組成を有する前者の至適含量は約6%，後者のそれは約2%と判定した。

II. 上記の栄養要求試験用精製飼料を用い，イシダイ稚魚を試料魚として，水溶性ビタミンの要求性を検討した。すなわち，平均体重2.5gのイシダイ稚魚に各水溶性ビタミンの欠乏した試験飼料を投与して8～16週間飼育し，欠乏症状，成長，へい死率，血液性状などを比較した。その結果，最も早く欠乏症状が発現して成長低下と高へい死率をもたらしたビタミンはB₆とパントテン酸であった。次いでB₁，B₂およびCの欠乏も成長とへい死率に大きく影響した。コリンおよびニコチン酸の欠乏では早くから食欲減退に伴う著しい成長低下がみられたが，へい死率は高くなかった。一方，B₁₂，ビオチン，葉酸およびイノシトールの欠乏ではいずれも成長がいくらか低下する程度であった。

III. 上記のように，イシダイ稚魚ではAsA欠乏の症状が比較的早く出現し，へい死率も高いことを認めた。そこで，イシダイの成長と健康に必要なAsAの要求量（飼料の至適AsA添加量）を，まず，水温，溶存酸素（DO）濃度などの環境因子の変動の比較的小さい飼育条件下で求めた。すなわち，この実験条件下で，AsA添加量が飼料100g当たり0～300mgの範囲

で異なる各区精製試験飼料をインダイ稚魚に投与して16週間飼育し、増重率、飼料効率、欠乏症、へい死率、血液性状、血漿成分含量および比肝重を比較した。その結果、この魚の正常な成長と健康に必要な飼料AsAの添加量としては25mg/100gあれば十分であることが分かった。さらに、肝臓などの組織AsA濃度と飼料AsA添加量との関係を求めた結果から、組織AsAの飽和濃度を指標とした場合に必要な飼料AsA添加量は少なくとも50mg/100gであることが分かった。

次いで、環境因子の変動の大きい飼育条件下で試験した結果、この条件下における飼料AsA添加量としては少なくとも100mg/100gを必要とし、海水養殖魚のAsA要求量は環境要因の変動によって著しく影響されることが明らかとなった。

IV. 養殖魚は常に環境水のDO濃度、水温、塩分などの変動をストレスとして受けている。そこで、まず環境水のDO濃度の低下に対する魚類の耐性に及ぼすAsA投与の効果を調べた。すなわち、飼料乾重100g当たり0, 30, 100および300mgのAsAを添加した各区飼料で飼育したインダイ（平均体重239g）およびイシガキダイ（同171g）を試料魚として、環境水DO濃度の低下に対する耐性を、一定条件下における“半数横転時間(min)”および“へい死率(%)”を指標としてそれぞれ比較した。その結果、DO低下ストレスに対する魚類の耐性は飼料のAsA添加量に比例して増大することが分かった。

次いで、飼料乾重100g当たり0, 75および300mgのAsAを添加した各区飼料をインダイ稚魚に与え、16週間に亘って断続的に環境水のDO濃度を低下させた場合の耐性を横転率、成長、死亡率、血液性状、組織AsA濃度などを指標として比較した。その結果、長期に亘る低酸素ストレスの断続的負荷は、AsA欠乏症の発現を促進し、AsA要求量を増大させること、およびAsAの大量投与はこのストレスに対する魚の耐性を向上させることが明らかとなった。

さらに、魚類の低酸素ストレス耐性に及ぼすAsAの作用機作を推論する目的で、このストレス負荷時の生理的適応すなわちストレス反応の様相について検討した。すなわちインダイ稚魚に低酸素ストレスを負荷して、呼吸数、血液性状、血漿の各種化学成分濃度および酵素活性、筋肉の乳酸濃度、並びに各組織のAsA濃度の変動を測定した。これらの結果から、AsAは環境水DO濃度の低下に伴って起こる魚の好氣的代謝から嫌氣的代謝への代謝適応によるエネルギー(ATP)生産に、生体酸化還元系の一員として関与することによって、低酸素ストレス耐性を向上させるものと推察した。

V. AsAはステロイドホルモンの生合成に関与するので生殖腺の成熟に関係することが知られている。またAsAはコラーゲンの生合成に必須のビタミンであるから、養殖魚の種苗生

産において、孵化仔魚の正常な発育を促す主要な因子となるものと考えられる。そこで、イシダイを試料魚として、その一才魚の成熟並びに15才親魚の産卵および卵質に及ぼすAsA投与の効果調べた。その結果、成魚の卵巣成熟は飼料のAsA添加量（0～300mg/100g）に比例して促進されること、および親魚に対するAsAの投与は産卵量を増加させるばかりでなく、卵の孵化率や孵化仔魚の生残率など卵質の向上にも効果を有することが明らかとなった。

Summary

Most fish are unable to synthesize ascorbic acid (AsA) and thus are dependent upon a dietary source of vitamin C. The lack of AsA in fish results in reduced growth, histopathological changes mostly related to malsynthesis of collagen, and impaired immune functions. The studies on the AsA requirements with fresh water fish have been carried out by many workers. With economically important marine fish in Japan, however, a few study has been reported so far. Moreover, experience at aquaculture farms has shown that the AsA requirement varies, not only with the stage of development of fish, but also with the environmental conditions and physiological status.

In the present study, using the Japanese parrot fish *Oplegnathus fasciatus* as primary test fish, the AsA requirements of marine fish were examined under differing conditions to be assumed at aquaculture farms.

I. First of all, to determine the composition of purified basal diet for nutritional experiments, the Japanese parrot fish were fed with purified test diets containing different levels of protein (casein), lipid (pollack liver oil), mineral mixture and vitamin mixture. After feeding for 40 days, weight gain, feed conversion efficiency, protein efficiency ratio, body protein (or lipid) retention ratio and the contents of moisture, crude protein, crude lipid and crude ash in the fish bodies were determined. Based upon the results of these experiments, the optimum protein level in the basal diet was estimated to be about 45% under the present experimental conditions. The optimum lipid level in the diet was about 8%. Also, the optimum levels of mineral mixture and vitamin mixture in the diet were about 6% and 2%, respectively.

II. The qualitative requirements and deficiency signs of water-soluble vitamins were studied in Japanese parrot fish having average weight of 2.5g with the purified test diet above mentioned. The fish were given the diets deficient in each one of 11 water-soluble vitamins. After feeding for 8-16 weeks, deficiency symptom, growth rate, mortality, and blood characteristics were examined. The fish fed the diets deficient in each vitamin B₆ or pantothenic acid showed most rapid stoppage growth with high mortality. The fish fed the diets deficient in each vitamin B₁, B₂ or C caused

the next most rapid decrease of growth with high mortality. Choline or nicotinic acid deficient fish caused very poor growth associated with loss of appetite but mortality was low. On the other hand, the fish fed the diets deficient in each vitamin B₁₂, biotin, folic acid or inositol showed only slightly poor growth than the control fish fed the complete diet.

III. In the above experiment Japanese parrot fish caused the rapid AsA – deficiency signs. At first, therefore, AsA requirement (optimal supplementary AsA level in diet) necessary for normal growth and good health in the juvenile Japanese parrot fish was examined under the mild fluctuations in environmental conditions such as temperature, dissolved oxygen concentration. The fish were fed purified test diets supplemented with 0, 25, 50, 75, 100 and 300mg of AsA per 100g of diet for 16 weeks and determined weight gain, feed efficiency, deficiency symptom, mortality, blood characteristics, plasma chemical components and hepatosomatic index. The results indicate that the sufficient supplementary AsA level to maintain a normal growth and health of the Japanese parrot fish was estimated to be 25mg of AsA per 100g of diet under this experimental condition. It was also estimated that 50mg of supplementary AsA per 100g of diet was needed to saturate the tissue AsA contents.

Subsequently, under the violent conditions of environmental fluctuations, AsA requirement of the same size fish as in the above experiment was also examined. The results indicate that the sufficient supplementary AsA level to maintain a good health of the fish was estimated to be at least 100mg of AsA per 100g of diet under this experimental condition. It was also estimated that about 300mg of supplementary AsA per 100g of diet is needed to a normal growth. Consequently, these results have shown that AsA requirement of cultivated marine fish must be affected by environmental fluctuation.

IV. Cultivated fish are inevitably subject to the stresses of environmental fluctuations, e. g. water temperature, dissolved oxygen levels, salt levels in seawater. Therefore, effect of dietary AsA on the tolerance for low oxygen stress in fish were examined. Japanese parrot fish and spotted parrot fish were fed the test diets supplemented with 0, 30, 100 and 300mg of AsA per 100g of diet before the start of stress experiments. The time (min.) needed to lay 50% of the sample fish down

and mortality (%) after reduced the water oxygen level were used as the parameters for tolerance. Results showed that the tolerance of fish against water oxygen reduction was increased in proportion to the dietary AsA levels.

Subsequently, control and stressed groups of the Japanese parrot fish, were fed diets supplemented with 0, 75, and 300mg of AsA per 100g diet. Fish in the stressed group were intermittently exposed to decreasing water oxygen levels every 3 or 4 days for 16 weeks and compared the percentage of fish laying down, growth, mortality, blood characteristics and AsA contents in plasma and tissues to the control group. The results indicate that, in the fish under these experimental conditions, exposure to intermittent hypoxic stress not only induced AsA-deficiency disease early, but also increased the AsA requirement. It was also shown that high doses of AsA increased the ability of these fish to resist the stressor.

Moreover, from the physiological adaptation behavior determined in the fish under low oxygen stress, AsA is assumed to play a role as a member of biological oxidation reduction system in maintenance of energy production even at the semi-anaerobic metabolism system.

V. AsA, which plays a part in the biosynthesis of gonad steroid hormones, is important to sexual maturation. And also, since AsA is essential for the biosynthesis of collagen in the connective tissue, AsA contents in the eggs before spawning is critical to the normal development of newly hatched larval fish in the seedling production of marine fish.

The effect of the dietary AsA levels on the sexual maturation was examined using one-year-old Japanese parrot fish. Moreover, the effects of AsA on the spawning and egg quality in 15-year-old broodstock of the fish were also examined. The results indicate that ovary maturation in adult fish was promoted in proportion to dietary AsA levels. And an increased dietary administration of AsA influenced not only increasing amount of eggs from the parental fish, but also improving hatching rate and survival rate of the larval fish.

謝 辞

近畿大学水産研究所前所長・教授^故原田輝雄先生には海水養殖魚の研究に着手する機会を与えられ、御懇篤なご指導、ご高配を賜わった。深く感謝の意を表します。

また、本研究の遂行に当たり終始御懇切なるご指導、ご鞭撻を賜り、取り纏めに際しては有益なご助言とご校閲の労をとって下さった近畿大学水産研究所 教授 池田静徳先生に心から厚く御礼申し上げます。

さらに、本論文を取り纏めるにあたり、格別のご高配およびご校閲を賜わり、本論文の掲載に対してご尽力を頂いた近畿大学水産研究所 所長・教授 熊井英水先生、並びに本稿のご校閲と貴重なご助言を賜った近畿大学農学部教授 小林 博先生に深甚なる謝意を表します。

近畿大学水産研究所助教授 村田 修先生、同助教授 宮下 盛先生、同助手 那須敏朗先生、並びに同教職員各位には多大なご協力と貴重なご助言、ご支援を賜わった。また、近畿大学農学部水産学科教員各位、近畿大学農学部助教授 重岡 成先生、鹿児島大学水産学部教授 佐藤 守先生および環境科学総合研究所 吉川弘正博士には貴重なご助言とご激励を賜った。これらの方々に対して深く感謝致します。

本研究は近畿大学水産研究所白浜実験場において行われ、その間、近畿大学水産研究所 家戸敬太郎助手を始め、水産増殖学専攻の卒業生諸氏には多大なご協力を頂いた。ここに記して感謝の意を表します。

文 献

- 1) J. E. Halver: The vitamins required for cultivated salmonids. *Comp. Biochem. Physiol.* **73 B**, 43–50 (1982).
- 2) 池田静徳, 佐藤 守, 吉中禮二: 魚類のコラーゲン合成におけるビタミンCの役割. *ビタミン*, **57**, 433–449 (1983).
- 3) Y. Yamamoto, M. Sato, and S. Ikeda: Existence of L-gulonolactone oxidase in some teleosts. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **44**, 775–779 (1978).
- 4) 北村佐三郎, 大原修平, 諏訪富雄, 中川憲一: ニジマスのビタミン要求に関する研究—I. アスコルビン酸について. *日水誌*, **31**, 818–826 (1965).
- 5) J. E. Halver, L. M. Ashley, and R. E. Smith: Ascorbic acid requirements of coho salmon and rainbow trout. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **98**, 762–771 (1969).
- 6) M. Sato, R. Yoshinaka, and S. Ikeda: Dietary ascorbic acid requirement of rainbow trout for growth and collagen formation. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **44**, 1029–1035 (1978).
- 7) R. I. Lovell: Essentiality of vitamin C in feeds for intensively fed caged channel catfish. *J. Nutr.*, **103**, 134–139 (1973).
- 8) J. W. Andrews and T. Murai: Studies on the vitamin C requirements of channel catfish. *J. Nutr.*, **105**, 557–561 (1975).
- 9) H. A. Poston: Effect of dietary L-ascorbic acid on immature brook trout. *New York State Cons. Dept. Fish Res. Bull.*, **30**, 46–51 (1967).
- 10) S. Arai, T. Nose, and Y. Hashimoto: Qualitative requirements of young eels for water-soluble vitamins and their deficiency symptoms. *Bull. Freshwater Fish. Res. Lab.*, **22**, 69–83 (1972).
- 11) S. P. Lall, G. Oliver, D. E. M. Weerakoon, and J. A. Hines: The effect of vitamin C deficiency and excess on immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Proc. Third Int. Symp. on Feeding and Nutr. in Fish*, Japan, 1989, pp. 427–441.
- 12) 森 政次, 池田静徳: アユの水溶性ビタミン欠乏症. 昭和53年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p. 83 (1978).
- 13) 坂口宏海, 竹田文弥, 丹下勝義: ハマチのビタミン要求に関する研究—I. ビタミン

- B₆およびビタミンCの欠乏症. 日水誌, **35**, 1201–1206 (1969).
- 14) 細川秀毅, 寺岡亮治, 斎藤 豊, 竹田正彦: ハマチに対する水溶性ビタミンの必要性, 昭和54年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p. 127 (1979).
 - 15) 米 康夫, 藤井正人: マダイの栄養に関する研究-X, 水溶性ビタミンの必要性について. 九州大学水産実験所報告, **2**, 25–32 (1974).
 - 16) M. Boonyaratpalin, N. Unprasert, and J. Buranapanidgit: Optimal supplementary vitamin C level in seabass fingerling diet. *Proc. Third Int. Symp. on Feeding and Nutr. in Fish*, Japan, 1989, pp. 149–157.
 - 17) M. Sato, R. Yoshinaka, Y. Yamamoto, and S. Ikeda: Nonessentiality of ascorbic acid in the diet of carp. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **44**, 1151–1156 (1978).
 - 18) M. Sato, R. Yoshinaka, and S. Ikeda: Dietary ascorbic acid requirement of rainbow trout for growth and collagen formation. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **44**, 1029–1035 (1978).
 - 19) 山本義和, 石井知幾, 佐藤 守, 池田静徳: コイの銅蓄積に及ぼすアスコルビン酸投与の効果. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **43**, 989–993 (1977).
 - 20) M. Sato, T. Kondo, R. Yoshinaka, and S. Ikeda: Effect of water temperature on the skeletal deformity in ascorbic acid deficient rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **49**, 443–446 (1983).
 - 21) 池田静徳: ビタミン. 「養魚飼料-基礎と応用」(米 康夫編), 恒星社厚生閣, 東京, 1985, pp. 43–53.
 - 22) D. J. Vanderjagt, P. J. Garry and H. N. Bhagavan: Ascorbic acid intake and plasma levels in healthy elderly people. *Am. J. Clin. Nutr.*, **46**, 290–294 (1987).
 - 23) M. E. Visagie, J. P. Duolelessis, G. Groothof, A. Alberts, and N. F. Laubacher: Change in vitamin A and C levels in black mine-workers. *S. Afr. Med. J.*, **48**, 2502–2506 (1974).
 - 24) 西川善之: ストレス性胃潰瘍に対するアスコルビン酸の効果. ビタミン, **62**, 155–157. (1988).
 - 25) R. E. Hughes, P. R. Jones, R. S. Williams, and P. F. Wright: Effect of prolonged swimming on the distribution of ascorbic acid and cholesterol in the

- tissues of the guinea-pig. *Life Sci.*, **10**, 661–668 (1971).
- 26) M. L. Scott : Environmental influences on ascorbic acid requirements in animals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **258**, 151–155 (1975).
 - 27) N. Kato, K. Kawai, and A. Yoshida : Effect of dietary level of ascorbic acid on the growth, hepatic lipid peroxidation, and serum lipids in guinea pigs fed polychlorinated biphenyls. *J. Nutr.*, **111**, 1727–1733 (1981).
 - 28) K. Kawai, Kobayashi, and A. Yoshida : Effect of dietary ascorbic acid and vitamin E on metabolic changes in rats and guinea pigs exposed to PCB. *J. Nutr.*, **116**, 98–106 (1986).
 - 29) 堀尾文彦, 吉田 昭 : ビタミンC栄養研究と遺伝的アスコルビン酸合成不能ラット. *ビタミン*, **62**, 317–333 (1988).
 - 30) F. Horio, K. Ozaki, H. Oda, S. Makino, Y. Hashiyuki, and A. Yoshida : Effect of dietary ascorbic acid, cholesterol, and PCB on cholesterol and bile acid metabolism in a rat mutant unable to synthesize ascorbic acid *J. Nutr.*, **119**, 409–415 (1989).
 - 31) 西川善之 : 妊娠中のビタミンCについて. *ビタミン*, **64**, 736–740 (1990).
 - 32) 重岡 成 : 動植物及び微生物における過酸化水素系の新しい存在様式. *ビタミン*, **63**, 103–104 (1989).
 - 33) 重岡 成 : アスコルビン酸の酸化還元系と活性酸素. *ビタミン*, **56**, 75–82 (1982).
 - 34) 盧 日煥, 岸川茂樹, 山田いずみ, 日高敏勝, 加藤富民雄, 村田 晃 : 2価鉄-アスコルビン酸錯体の殺菌作用. *ビタミン*, **66**, 109–116 (1992).
 - 35) K. Nakano and S. Suzuki : Stress-Induced change in tissue levels of ascorbic acid and histamine in Rats. *J. Nutr.*, **114**, 1602–1608 (1984).
 - 36) S. England and S. Seifter : The biochemical functions of ascorbic acid. *Annu. Rev. Nutr.*, **6**, 365–406 (1986).
 - 37) T. N. Thomas and J. W. Zemp: Inhibition of dopamine sensitive adenylate cyclase from rat brain striatal homogenates by ascorbic acid. *J. Neurochem.*, **28**, 663–665. (1977).
 - 38) C. Lim, and R. T. Lovell : Pathology of vitamin C deficiency syndrome in channel catfish. *J. Nutr.* **108**, 1137–1141 (1978).
 - 39) P. Thomas, M. Bally and J. M. Neff : Ascorbic acid status of mullet, *Mugil*

- cephalus* Linn., exposed to cadmium. *J. Fish Biol.*, **20**, 183–196 (1982).
- 40) L. E. Halver: The role of ascorbic acid in fish disease and tissue repair. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **38**, 79–92 (1972).
- 41) 鈴木雄策, 阿井敬雄: アスコルビン酸大量投与によるニジマス稚魚の IHN 抗病性. 静岡水試研報, **24**, 25–29 (1989).
- 42) L. J. Hardie, T. C. Fletcher, and C. J. Secombes: The effect of dietary vitamin C on the immune response of the Atlantic salmon (*salmo salar* L.). *Aquaculture*, **95**, 201–214 (1991).
- 43) 細川秀毅, 上野慎一, 平田伸治, 竹田正彦: ハマチの水溶性ビタミン要求量-IV. 昭和57年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p.102 (1982).
- 44) A. Kanazawa, S. Teshima, S. Koshio, M. Higashi, and S. Itoh: Effect of L-ascorbyl-2-phosphate-Mg on the yellowtail *Seriola Quinqueradiata* as a vitamin C source. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 337–342 (1992).
- 45) 古市政幸, 北島 力, 松井誠一, 吉松隆夫, 田辺智唯: マダイのビタミンC要求, 平成2年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p.39 (1990).
- 46) 矢野友紀, 中尾実樹, 古市正幸, 米 康夫: マダイの補体活性に及ぼす飼料中のコリン, パントテン酸およびビタミンCの影響. 日水誌, **54**, 141–144 (1988).
- 47) S. Teshima, A. Kanazawa, S. Koshio, and S. Ito: L-Ascorbyl-2-phosphate-Mg as a vitamin C source for the Japanese flounder (*paralichthys olivaceus*). Orally presented in the 4th Int. *Symp. on Feeding and Nutrition in Fish*, Biarritz, France, 1991.
- 48) K. Sandnes: Some aspects of ascorbic acid and reproduction in fish, in “Ascorbic acid in domestic animals” (ed. by I. Wegger, F. J. Tagwerker, and J. Moustgaard), *The royal danish agr. soc.*, Copenhagen, pp.206–212 (1984).
- 49) S. J. Pintauro and J. G. Bergan: Effects of ascorbic acid in vitro steroidogenesis in guinea pigs. *J. Nutr.*, **112**, 584–591 (1982).
- 50) 池田静徳, 石橋泰典, 村田 修, 那須敏朗, 原田輝雄: インダイ用精製試験飼料におけるタンパク質および脂質の至適含有量. 日水誌, **54**, 151–154 (1988).
- 51) 堤 忠一: 食品分析法 (日本食品工業学会編), 光琳, 東京, 1982, pp.4–246.
- 52) C. B. Cowey, J. A. Pope, J. W. Adron, and A. Blair: Studies on the nutrition of marine flatfish. The protein requirement of plaice. *Brit. J. Nutr.*, **28**, 447–456

(1972).

- 53) Y. Yone : Nutritional studies of red sea bream. *Rep Fish. Res. Lab., Kyushu Univ.*, No. 3, 87–101 (1976).
- 54) A. Kanazawa, S. Teshima, M. Sakamoto, and A. Shinomiya : Nutritional requirements of the puffer fish. purified test diet and the optimum protein level. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **46**, 1357–1361 (1980).
- 55) 黒木 陽, 袈裟丸倉基, 湯田 光, 武田 博 : オオニベの蛋白質要求量. 平成3年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p. 50 (1991).
- 56) 古市政幸, 吉松隆夫, 北島 力, 松井誠一 : メナダにおける至適飼料タンパク質と炭水化物レベル. 平成2年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p. 42 (1990).
- 57) 吉松隆夫, 古市政幸, 松井誠一, 北島 力 : メナダ1才魚における至適飼料タンパク質と炭水化物レベル. 平成3年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p. 40 (1991).
- 58) 竹田正彦, 示野貞夫, 細川秀毅, 梶山英俊, 会所建志 : ハマチの成長, 飼料効率および体成分に及ぼす飼料のカロリー・蛋白質比の影響. 日水誌, **41**, 443–447 (1975).
- 59) 示野貞夫, 細川秀毅, 竹田正彦, 梶山英俊 : 配合飼料のカロリー・タンパク質比がハマチの成長, 飼料効率および体成分に及ぼす影響. 日水誌, **46**, 1083–1087 (1987).
- 60) S. Shimeno, H. Hosokawa, M. Takeda, H. Kajiyama, and T. Kaisho : Effect of dietary lipid and carbohydrate on growth, feed conversion and body composition in young yellowtail. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **51**, 1893–1898 (1985).
- 61) 熊井英水 : イシダイの養殖生物学的研究. 近畿大学水産研究所報告, **2**, 98–105 (1984).
- 62) 黒木 陽, 袈裟丸倉基, 武田 博, 浦野泰介 : オオニベの成長におよぼす飼料脂質含量の影響. 平成3年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, p. 123 (1991).
- 63) T. Takeuchi, Y. Shiina, and T. Watanabe : Suitable protein and lipid levels in diet for fingerlings of red sea bream *pagrus major*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 293–300 (1991).
- 64) 酒本秀一 : マダイにおける飼料無機質の必要性和その欠乏症 : 九州大学水産実験所報告, **5**, 1–99 (1981).
- 65) 牧野弘靖, 飯田 新, 岩本俊樹, 細川秀毅, 示野貞夫 : ハマチのリン要求量. 平成3年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p. 44 (1991).
- 66) C. Ogino and M. Kamizono : Mineral requirements in Fish—I. Effects of diet-

- ary salt-mixture levels on growth, mortality, and body composition in rainbow trout and carp. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **41**, 429–434 (1975).
- 67) 山本義和：無機質。「魚介類の微量成分－その生化学と食品化学」（池田静徳編），恒星社厚生閣，東京，1981，pp.209–236.
- 68) 細川秀毅，竹田正彦，館 哲次，速見 均：ハマチ用基本飼料に関する研究－Ⅱ．ミネラル混合の添加について．昭和49年度日本水産学会秋季大会講演要旨集，p.16 (1974).
- 69) 細川秀毅，寺岡亮治，竹田正彦：ハマチ用基本飼料に関する研究－Ⅴ．ハルバー処方ビタミン混合物および鉄剤の添加量について．昭和53年度日本水産学会春季大会講演要旨集，p.81 (1978).
- 70) 池田静徳，石橋泰典，村田 修，那須敏朗，原田輝雄：イシダイにおける水溶性ビタミンの要求性，*日水誌*，**54**，2029–2035 (1988).
- 71) 日野志郎：臨床検査講座15，血液学．医試薬出版，東京，1977，pp.109–125.
- 72) 佐藤 守：ビタミン。「魚介類の微量成分－その生化学と食品化学」（池田静徳編），恒星社厚生閣，東京，1981，pp.143–208.
- 73) 佐藤 守，近藤隆雄，吉中禮二，池田静徳：ニジマスにおけるコラーゲン生合成に及ぼす飼料アスコルビン酸レベルの影響．*日水誌*，**48**，553–556 (1982).
- 74) C. Lim and R. T. Lovell：Pathology of the vitamin C deficiency syndrome in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Nutr.*，**108**，1137–1146 (1978).
- 75) 石橋泰典，池田静徳，村田 修，那須敏朗，原田輝雄：イシダイ飼料の至適アスコルビン酸添加量．*日水誌*，**58**，267–270 (1992).
- 76) 小高 要，稲垣節子，氏家 隆，上野順士，須田浩行：高速液体クロマトグラフィーによる食品中の総ビタミンCの定量．*ビタミン*，**59**，451–455 (1985).
- 77) 早山萬彦，池田静徳，池田弥生，尾崎久雄：魚類の血液酵素に関する診断学的研究－Ⅲ，昭和59年度日本水産学会春季大会講演要旨集，p.72 (1974).
- 78) R. T. Lovell：Ascorbic acid metabolism in Fish, in “Ascorbic Acid in Domestic Animals” (ed. by I. Wegger, F. J. Tagwerker, and J. Moustgaard), *The Royal Danish Agr. Soc.*, Copenhagen, 1984, pp.196–205.
- 79) 岡村正人，荒川信彦：ビタミンハンドブック 3，ビタミン分析法（日本ビタミン学会編），化学同人，京都，1989，pp.135–143.
- 80) 石岡宏子：海産魚のストレス反応に関する研究－1，温度変化による反応．*日水誌*，**46**，523–531 (1980).

- 81) 石岡宏子：急激な塩分変化がマダイの血液性状におよぼす影響. 日水誌, **46**, 1323–1331 (1980).
- 82) 石岡宏子：飼育水の酸素分圧低下によるマダイの血液性状変化. 日水誌, **48**, 165–170 (1982).
- 83) 石岡宏子：マダイのストレス反応に関する生理生化学的研究. 学位論文, 京都大学, 京都, 1984.
- 84) 楠田理一, 二宮 学：ビジョンシステムを用いた *Enterococcus seriolicida* ブリ実験感染魚の血液性状の変化の測定. 水産増殖, **40**, 323–328 (1992).
- 85) 板沢靖男：呼吸. 「魚類生理学概論」(田村 保編), 恒星社厚生閣, 東京, 1991, PP.1–30.
- 86) K. Yamamoto, Y. Itazawa and H. Kobayashi : Erythrocyte supply from the spleen and hemoconcentration in hypoxic yellowtail. *Marine Biology*, **73**, 221–226 (1983).
- 87) 榎本義正, 中村哲也：ハマチ等の低酸素分圧耐性におよぼすビタミンEの影響. 水産増殖, **17**, 167–175 (1970).
- 88) K. Yamamoto and N. Ootubo : Relationship of spleen to body weight before and after contraction in the carp cyprinus carpio. *Comp. Biochem. Physiol.* **99 A**, 381–382 (1991).
- 89) 小栗幹郎：腎臓. 「魚類生理学」(板沢靖男・羽生 功編), 恒星社厚生閣, 東京, 1992, pp.103–123 (1991).
- 90) 石松 惇：血液と循環. 「魚類生理学」(板沢靖男・羽生 功編), 恒星社厚生閣, 東京, 1992, pp.35–65 (1991).
- 91) M. M. Mazeaud, F. Mazeaud, and E. M. Donaldson : Primary and secondary effects of stress in fish. *Trans Am. Fish. Soc.*, **106**, 201–212 (1977) .
- 92) G. A. Wedemeyer and D. J. Mcleay : Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressor, in “Stress and Fish” (ed. by A. D. Pickering), Academic Press, London, 1981, pp. 247–275.
- 93) Y. Inui and M. Yokote : Gluconeogenesis in the Eel – IV. Gluconeogenesis in the hydrocortisone – administered Eel. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **41**, 973–981 (1975).
- 94) P. A. Wright, S. F. Perry and T. W. Moon : Regulation of hepatic gluconeogenes-

- is and glycogenolysis by catecholamines in rainbow trout during environmental hypoxia. *J. Exp. Biol.*, **147**, 169–188 (1989).
- 95) 西川喜之：副腎皮質ホルモンとビタミンCの関係. *ビタミン*, **62**, 684–687 (1988).
 - 96) 赤松明德, 黄 雅文, 山田和彦, 細谷憲政：ラットのビタミンC代謝に及ぼす高温ならびに運動負荷の影響. *ビタミン*, **60**, 199–204 (1986).
 - 97) P. Thomas : Influence of some environmental variables the ascorbic acid status of mullet, *Mugil cephalus* L, tissues. *J. Fish Biol.*, **25**, 711–720 (1984).
 - 98) B.W.Tucker, B.M.Tolbert, J.E.Halver, and M.Balaban : Brain ascorbate depletion as a response to stress. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, **57**, 289–295 (1987).
 - 99) 石橋泰典, 家戸敬太郎, 池田静徳, 村田 修, 那須敏朗, 熊井英水：魚類の低酸素ストレス耐性に及ぼす飼料アスコルビン酸投与の効果. *日水誌*, **58**, 1555 (1992).
 - 100) 高橋幸則, 藤野博文：コイの体表, 皮膚, 鰓ならびに腸管における飼育条件別の付着・増殖細菌数, *日水誌*, **50**, 735–742 (1983).
 - 101) 中川平介, 笠原正五郎, 杉山瑛之, 和田 功：クロダイに対するアオサ添加飼料の効果. *水産増殖*, **32**, 20–27 (1984).
 - 102) Y. Ishibashi, K. Kato, S. Ikeda, O. Murata, T. Nasu, and H. Kumai : Effects of dietary ascorbic acid on tolerance to intermittent hypoxic stress in Japanese parrot fish. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 2147–2152 (1992).
 - 103) 原田輝雄：ブリの養殖学的研究. 近畿大学水産研究所報告, **1**, 95–100 (1966).
 - 104) 平田八郎, 門脇秀策：酸素収支. 「海面養殖と養魚場環境」(渡辺競編), 恒星社厚生閣, 東京, 1990, pp. 28–38.
 - 105) 土田修二, 田端重夫：イシダイの成長に伴う選好温度の変化. 平成元年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, p. 32 (1989).
 - 106) E. M. Donaldson : The pituitary-interrenal axis as an indicator of stress in fish, in “Stress and Fish”(ed. by A. D. Pickering), Academic Press, London, 1981, pp. 11–47.
 - 107) C. B. Schreck : Stress and rearing of salmonids. *Aquaculture*, **28**, 241–249 (1982).
 - 108) J. L. Specker and C. B. Schreck : Stress responses to transportation and fitness for marine survival in coho salmon smolts. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **37**, 765–

- 769 (1980).
- 109) U. K. N. Patro and B. K. Patnaik : Change in ascorbic acid, glycogen and protein of muscle and brain of *Ophiocephalus punctatus* Bloch following short-term cold stress. *Indian J. Exp. Biol.*, **17**, 521–523 (1979).
 - 110) J. R. Tomasso, K. B. Davis and N. C. Parker : Plasma corticosteroid dynamics in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), during and after oxygen depletion. *J. Fish Biol.*, **18**, 519–526 (1981).
 - 111) B. A. Barton and C. B. Schreck : Metabolic cost of acute physical stress in juvenile steelhead, *Trans Am. Fish. Soc.*, **116**, 257–263 (1987).
 - 112) S. F. Perry and S. Thomas : The effects of endogenous or exogenous catecholamines on blood respiratory status during acute hypoxia in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Comp. physiol.*, **161 B**, 489–497 (1991).
 - 113) 野口知雄, 湊川洋介 : アミノ酸代謝「代謝マップ-経路と調節」(日本生化学会編), 東京化学同人, 東京, 1980, pp. 38–76.
 - 114) G. Wegener : 低酸素の分子生理学 (堀 均, 宮原正信, 中条信義, 寺田 弘), シュプリンガー・フェアラーク東京, 東京, 1991, 13–38.
 - 115) 三好和夫, 川井尚臣, 伊勢 浩, 足立克仁 : クレアチンキナーゼ. 「血清酵素の異常」(北村元仕編), 医学書院, 東京, 1985, pp. 88–129.
 - 116) 菅野剛史 : 乳酸脱水素酵素. 「血清酵素の異常」(北村元仕編), 医学書院, 東京, 1985, pp. 61–84.
 - 117) M. K. Grieshaber, U. Kreutzer, H. O. Pörtner : 低酸素の分子生理学 (堀 均, 宮原正信, 中条信義, 寺田 弘), シュプリンガー・フェアラーク東京, 東京, 1991, 39–52.
 - 118) P. W. Hochachka : 低酸素適応の生化学 (橋本周久, 阿部広喜, 渡辺終五), 恒星社厚生閣, 東京, 1984, pp. 113–129
 - 119) 吉中禮二, 佐藤 守 : 水産化学実験法, 恒星社厚生閣, 東京, 1989, pp. 126–131.
 - 120) S. Ikeda : Relation between oxidation-reduction system of L-ascorbic acid and biological hydrogen transfer systems, No. 12 ; On the free radical of L-ascorbic acid. *Mem. Resear. Inst. Food Sci., Kyoto Univ.*, No. **20**, 31–43 (1960).
 - 121) 香川靖雄 : アスコルビン酸の生合成と代謝. 「ビタミン学Ⅱ」(日本ビタミン学会編) 東京化学同人, 1980, pp. 578–585.

- 122) 永津俊治：アスコルビン酸要求性ドーパミン β -モノオキシゲナーゼの分泌機構。ビタミン, **59**, 482-484 (1985).
- 123) K. Sandnes, Y. Ulgenes, O. R. Braekkan and F. Utne : The effect of ascorbic acid supplementation in broodstock feed on reproduction of rainbow trout (*salmo gairdneri*). *Aquaculture*, **43**, 167-177 (1984).
- 124) A. K. Soliman, K. Jauncey, and R. J. Roberts : The effect of dietary ascorbic acid supplementation on hatchability, survival rate and fry performance in *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Aquaculture*, **59**, 197-208 (1986).
- 125) Y. Ishibashi, K. Kato, S. Ikeda, O. Murata, T. Nasu, and H. Kumai : Effect of dietary ascorbic acid supplementation on gonadal maturation in Japanese parrot fish. *Suisanzoshoku*, in press.
- 126) R. Waagbo, T. Thorsen and K. Sandnes : Role of dietary ascorbic acid in vitellogenesis in rainbow trout (*salmo gairdneri*). *Aquaculture*, **80**, 301-314 (1989).
- 127) 秋山敏男, 山本剛史, 白石 学, 香川浩行, 辻 勇 : アユの排卵におけるアスコルビン酸の役割. 平成4年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p. 204.
- 128) 熊井英水 : イシダイの養殖生物学的研究. 近畿大学水産研究所報告, **2**, 17-40(1984).
- 129) 福所邦彦, 藤村卓也, 山本剛史 : 加温循環水槽によるマダイの親魚養成と早期採卵. 水産増殖, **34** (2), 69-75 (1986).
- 130) 原田輝雄, 熊井英水, 水野兼八郎, 村田 修, 中村元二, 宮下 盛, 古谷秀樹 : ブリ, マダイ, イシダイ, イシガキダイからの加温による早期採卵. 昭和45年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, pp. 62-63 (1970).
- 131) 原田輝雄, 宮下 盛, 村田 修, 高井清美, 横山達雄, 米島久司 : イシダイの産卵制御について. 平成2年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p. 181 (1990).
- 132) 佐野 豊 : 組織学研究法, 南山堂, 東京, 1981, pp. 177-246.
- 133) 会田勝美 : 成熟, 産卵の内分泌支配. 「水族繁殖学」(隆島忠夫, 羽生 功編), 緑書房, 東京, pp. 65-88 (1989).
- 134) E. A. Seymour : Gonadal ascorbic acid and changes in level with ovarian development in the crucian carp, *Carassius carassius* (L.), *Comp. Biochem. Physiol.*, **70A**, 451-453 (1981).
- 135) K. Sandnes and O. R. Braekkan : Ascorbic acid and the reproductive cycle of

- ovaries in cod (*Gadus Morrhua*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **70 A**, 545-546 (1981).
- 136) 秋山敏男, 白石 学, 山本剛史, 広瀬慶二: マイワシの成熟・産卵時における投与アスコルビン酸の挙動. 平成2年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, p. 110.
- 137) 古賀文洋: 採卵 “マダイ種苗生産技術の現状と問題点” (九州・山口ブロック水産試験場マダイ種苗生産研究会), 日本水産資源保護協会, 東京, pp. 19-22 (1977).
- 138) S. Hirao, J. Yamada and R. Kikuchi: Relation between chemical constituents of rainbow trout eggs and the hatching rate. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **21**, 240-243 (1955).
- 139) I. P. Komarov and L. M. Knyazeva: Effects of vitamin C-enriched granulated feed on the physiological state of spawning rainbow trout. *Hydrobiol. J.*, **2**, 43-48 (1984).
- 140) 佐藤 守, 吉中禮二, 黒島良介, 森本晴之, 池田静徳: ニジマスの卵発生過程における水溶性ビタミン含有量およびトランスアミナーゼ活性の変化. 日水誌, **53**, 795-799 (1987).
- 141) R. Golob, C. J. Chetsanga, and P. Doty: The onset of collagen synthesis in sea urchin embryos. *Biochem. Biophys. Acta*, **349**, 135-141 (1974).
- 142) H. Mizoguchi and J. Yasumasu: Archenteron formation induced by ascorbate and α -ketoglutarate in sea urchin embryos kept in SO_4^{2-} -free artificial seawater. *Develop. Biol.*, **93**, 119-125 (1982).
- 143) 宮崎照雄・藤原和恵: マダイおよびクロダイ仔稚魚の卵黄吸収と消化管での栄養摂取に関する組織学的研究. 三重大大学生物資源紀要, **1**, 15-27 (1988).
- 144) 松岡正信: 運動器官「魚類の初期発育」(田中 克編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 21-35 (1991).