

# マツカワの種苗生産技術に関する研究\*1

萱場 隆昭\*2

## Studies on techniques for reliable production of seed of barfin flounder *Verasper moseri*\*1

Takaaki KAYABA\*2

Barfin flounder, *Verasper moseri*, are large flat fish inhabiting cold sea water basins in the northern Pacific off Japan. This species is suitable for aquaculture and resource enhancement in Hokkaido due to its high commercial value and growth rate at low temperatures. Recently, a developmental program for brood stock management of barfin flounder was proposed by the Hokkaido government ; one of the program objectives was to establish a reliable method for seed production of this species. At the Hokkaido Institute of Mariculture, technique for seed production of barfin flounder have been developed since 1990. However, the annual output of seedlings has been highly variable, and a consistent supply of seedlings could not be realized. This was primarily due to the very limited knowledge about reproduction, growth and habits of this species. Therefore, in the present study, the author firstly examined the mechanism of sexual maturation, spawning and larval development in cultured barfin flounder. This knowledge was subsequently applied to determine the most suitable system by which a large amount of seed can be consistently produced.

When barfin flounder were reared in culture from the larval stage, both male and female fish matured normally. However, there was an obvious difference in the timing during which eggs or sperm could be obtained, because testicular development progress faster than ovarian development. Therefore, the effects of water temperature on gonadal development, and the potential to synchronize maturation among sexes by water temperature manipulation were subsequently examined. In experiments conducted in 1997 and 1998, 50 cultured barfin flounder aged 3 years were reared from October to April under two water temperature regimes. As reflected by the gonadosomatic index (GSI) and by histological observation, males reared at ambient seawater temperature reached functional maturation of testes in February. For females in this group, both GSI and oocyte diameter linearly increased from October and first ovulation was observed in April. These results indicated that there was a 2-month difference in the timing of spawning between male and female flounders reared at ambient seawater temperature. However, in males reared at 18°C from October to December, functional maturation did not occur until April, because spermatogenesis was inhibited at 18°C. While in females vitellogenesis proceeded normally at 18°C and ovulation commenced in April, which is the same period as females reared at ambient seawater temperature. By maintaining the rearing temperature of barfin flounder at 18°C from October to December, and then gradually shifting to ambient seawater temperature over one month, it is thus possible to delay the maturation of males and thereby synchronize the spawning periods among sexes.

Obtaining eggs with good quality is very important for seed production of fish, because a deterioration of egg quality results in a decrease in fertilization rate or low vitality of larvae. Therefore, we examined the cause of a deterioration of egg quality in barfin flounder. Female barfin flounder has a regular ovulation rhythm that is 3.5

---

報文番号 A386 (2005年7月19日受理)

\*1 北海道大学審査学位論文 (掲載に際し投稿規定に従って一部修正した)

\*2 北海道立栽培漁業総合センター (Hokkaido Institute of Mariculture, Shikabe, Hokkaido 041-1404, Japan),  
e-mail ; kayabat@fishexp. pref. hokkaido. jp

days on average. However, under conditions of cultivation, spontaneous egg release is limited and deterioration of egg quality due to the retention of the eggs in the ovarian cavity for a prolonged period (over-ripening) is likely to occur. Firstly, in order to clarify the relationship between over-ripening of eggs and a decrease in fertilization rate, three morphos of artificially stripped eggs (transparent eggs, opaque eggs, over-ripening eggs) were incubated for 72 hours at 4°C. When only incubating transparent eggs that seemed to just have undergone ovulation, the fertilization rates remained high throughout the experimental period. In contrast, when mixing transparent eggs and over-ripening eggs and incubating them together, the fertilization rate sharply plunged and became zero even after 24 hours of incubation. These results indicated that over-ripening caused a rapid decrease in fertilization rate, but it also attributed to the deterioration of newly ovulated eggs by some means or another. Accordingly, to obtain good quality eggs, it is necessary to prevent the ovulated eggs from over-ripening either by periodic egg stripping or by the development of a method inducing spontaneous spawning.

In order to examine influencing larval vitality, the survival activity index (SAI) was calculated for 33 batches of larvae. Relating SAI with the morphological characters of brood stocks, eggs and larvae, a positive correlation with total length of larvae just after hatching was shown. Accordingly, the hatching larvae which are bigger size are thought to have superior vitality and the size of larvae was suggested to be a suitable indicator for identification of a good batch, one with the potential to survive at a high rate during seed production.

In this thesis, the effect of rearing environment of brood stocks such as water temperature or diets, on larval vitality was also examined, and yielded the following results ;<sup>1)</sup> rearing of brood stocks at an elevated temperature in winter could accelerate their growth as well as improving the larval vitality.<sup>2)</sup> both the content and composition of lipids in the eggs are strongly influenced by those in the diets which the brood stock were fed.<sup>3)</sup> it seemed possible to obtain larvae with superior vitality by feeding brood stocks diets containing higher concentrations of highly unsaturated fatty acids.

In general, egg acquisition by induced spontaneous spawning is extremely useful to obtain a sufficient quantity of good quality eggs in an efficient and consistent manner. Although female barfin flounder that started ovulation during spawning season, occasionally released eggs even in the aquarium, spawning behavior between male and female rarely occurred spontaneously. Especially from cultured fish, few fertilized eggs have ever been obtained from spawning in an aquarium. Therefore, the present study examined the potential to induce spontaneous spawning in cultured barfin flounder using increased temperature as a stimulus; that is, increasing the rearing temperature from 6 to 8 to 9°C over 6h in the morning and reducing it to 6°C the following morning. In 1997 and 1998, cultured barfin flounder, aged 3 years, were reared under two water temperature regimens. Among brood stock groups reared at fixed temperatures ( 6 or 8 - 9°C) during the spawning season, all females ovulated normally and released eggs into the aquarium; however, almost all eggs were unfertilized. In contrast, from groups reared with periodic stimulation with increased temperature, the number of eggs collected per day was greater than that from groups without stimulation. Furthermore, fertilization was achieved frequently throughout the experimental term and the number of fertilized eggs obtained was much greater. Estimation of fertilization time indicated that fertilization occurred largely within 24 h after the stimulation was conducted. Moreover, in 2000, the fertilization rate of fish reared with periodic stimulation was very much higher than that in fish without stimulation. These results demonstrate that performing periodic increased temperature stimulation during the spawning season is effective in accelerating egg release in females and also in inducing fertilization of cultured barfin flounder in rearing conditions. Furthermore, the environmental factors inhibiting spawning were experimentally deduced to be either the rearing of brood stock at excessively high densities or a low turnover rate of the rearing water. It thus became possible to obtain sufficient numbers of fertilized eggs from cultured barfin flounder by induced spontaneous spawning as well as by artificial fertilization techniques.

The occurrence of mass mortality in the larval phase was the most serious problem for seed production of barfin flounder. Therefore, a study was conducted to elucidate the cause of mass mortality, and to develop a new method to rear the larvae at high survival rates. Survival statistics and morphological observations of dead larvae during

ordinal larval rearing indicated that mass mortality tended to occur when larvae were either 18-20 days-old (preflexion larva, Stage D) or 25-28 days-old (flexion larva, Stage E). To clarify the cause of the former mortality, the effect of environmental factors on initial feeding of larvae was examined, because morphological observation revealed that almost all larvae that died at age 18-20 days had empty digestive tracts. The feeding activity of larvae during early development was closely related to<sup>1)</sup> the density of the unicellular alga *Nannochloropsis oculata* in rearing water,<sup>2)</sup> light intensity,<sup>3)</sup> the density (amount) of diet in the rearing water,<sup>4)</sup> water temperature. The density of *Nannochloropsis oculata* in the rearing water turned out to be the most important factor affecting feeding. Besides, larval rearing in water supplemented with *Nannochloropsis oculata* at higher densities is an effective means not only to accelerate initial feeding, but also to drastically increase survival.

Observations on swimming behavior of flexion larvae further showed that most of the larvae suddenly sank from the upper layer to the bottom of the tank at 25 days of age, and that mass mortality occurred just after sinking (flexion-stage mortality). Coinciding with the sinking of larvae was an obvious increase in body density, especially in larvae from 24 to 28 days-old. In order to investigate the effects of turbulence on sudden sinking and mortality, 10 day-old larvae were reared at various aeration levels, i.e., no aeration, gentle aeration and strong aeration. Larvae maintained under no or gentle aeration sank suddenly when 24-25 days-old and high mortality occurred. On the contrary, in the strong aeration groups, almost all larvae swam in the upper or middle layer throughout the experimental period. The survival rates by day 36 were 74.3-89.0%, clearly superior to those in other experimental groups. These results suggest that sudden sinking of flexion larvae is caused by a rapid increase in body density during a period of rapid ontogenetic change. It appears that manipulating aeration to establish vertical mixing is very successful to prevent flexion larvae from sinking, and hence, to avoid mass mortality. The larval rearing system was redesigned on the basis of this knowledge, resulting the prevention of early mass mortality and the production of large numbers of barfin flounder seed with high survival rates.

Among artificially reared barfin flounder, morphologically abnormal fish such as pseudoalbino fish and ambicolored fish (metamorphosis-related morphological abnormality), were frequently observed. Moreover, artificially reared barfin flounder frequently had a male-biased sex ratio. This could possibly cause a landing shortage or price fluctuations on markets, or serious fluctuations of genetic characteristics among wild fish, if these abnormal fish released into the wild. Therefore, the mechanisms responsible for metamorphosis-related abnormalities in morphology and sex determination were examined in a rearing experiment. It was found that<sup>1)</sup> the rearing temperature during larval development affect the incidence of morphological abnormality, i.e. larval rearing at suitable temperature, 14°C, could produce morphologically normal fish at high rates.<sup>2)</sup> Normal larval development up to Stage E (just before metamorphosis) is crucial to ensure that larvae can metamorphose into normal morphology.<sup>3)</sup> it is necessary to keep the larvae under 14°C during the temperature-sensitive period (ranging from 10 mm to 35mm in total length) to ensure that gonadal tissue will undergo sex differentiation according to genetic sex.

キーワード：マツカワ，種苗生産，親魚養成，採卵，仔稚魚飼育，健苗育成

## 第I章 緒言

四方を海で囲まれている我が国は世界有数の水産国である。水揚げされる様々な水産物は国民生活に不可欠なタンパク源として、また食文化を支える重要な食材として欠かせない。2002年の北海道における海面漁業生産量は140万トン、同生産額は2,600億円であり、これは全国の26.5%を占める（北海道水産現勢）。従って、日本の食料供給拠点として本道が担う役割は極めて大きい。また、北海道にとって水産業は、水産物の生産、加工、流通の

みならず、観光、運輸、飲食なども含めた幅広い関連産業にも波及し、経済を支える主要産業となっている。

一方、国際的な200海里体制が定着する中、公海漁業規制の強化や世界的な水産資源の減少によって本道の漁船漁業は低迷を続けている。そのため、沿岸・沖合資源の重要性が認識され、種苗放流や漁場造成などにより水産資源の増大を図る栽培漁業への関心が強くなった。サケ・マス類、ホタテガイ、コンブ類などの栽培漁業生産は、本道海面漁業生産の約50%を占めるまでに至った。近年、栽培漁業の対象は回遊性海産魚類へと広がりをみ

せ、1996年からは日本海海域を対象とし、ヒラメ、ニシン、クロソイの大量放流事業が行なわれている。しかし、こうした栽培漁業においても輸入水産物による魚価の低下や放流魚の回収率の低さ、経済効果の向上が求められるなど多くの問題を抱えている。そのため、今後、本道における栽培漁業をさらに推進するためには、各海域特性に応じたニーズが高い栽培対象種を選定すること、また種苗生産・放流技術の安定化と高度化をはかり経済性を高めることが必要である。

近年、本道では、太平洋およびオホーツク海域における新たな栽培漁業対象種として「マツカワ」の注目度が高まっている。マツカワは茨城県沖および若狭湾以北、北海道、千島列島、オホーツク海南部に生息する冷水性の大型カレイである(Fig.1)<sup>1,2)</sup>。暗褐色で硬い鱗を持ったその体表が松の木皮に似ることからこの名がついたといわれており<sup>3)</sup>、また、背鰭、臀鰭および尾鰭に鮮やかな黒い縞模様があることからタカノハガレイ、タンタカなどの地方名も持つ。本種が本道の栽培漁業対象種として選ばれた理由の一つとして、低水温環境下でも成長が非常に優れていることがあげられる。Fig.2に北海道立栽培漁業総合センター(以下、栽培センターと略)で飼育したマツカワ雌雄の成長を示した。ふ化後わずか18ヵ月で全長30cm、体重500gをこえ、雌においては48ヵ月で全長60cm、体重3kg~4kgに達する。他のカレイと比較してもその成長速度は群を抜いている。また、白身の割に脂ののった美味な肉質をもち、市場では高級な刺身魚として取り扱われている。そのため、単価は一時5,000~6,000

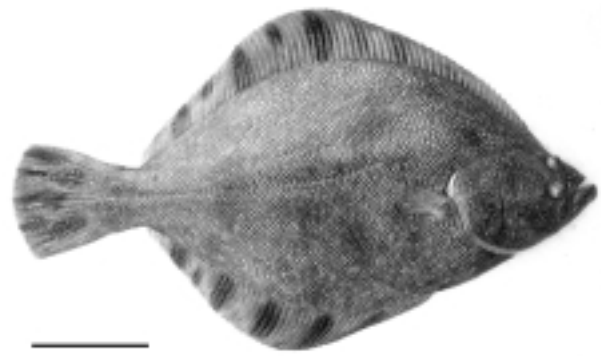


Fig.1 Photograph showing barfin flounder *Verasper moseri*. Bar: 10cm

円/kgまで上り、商業的価値が高いことも栽培対象種として優れている。

一方、マツカワの天然資源量は極めて低い水準にある。北海道日高管内浦河漁協での水揚げ記録によると、過去、最盛期には年間60tほどの漁獲があった。しかし、1975年頃から漁獲量が急減し、その後ほとんど漁獲されず、1992年以後はわずかに年間数10kg以下しか獲られていない<sup>4)</sup>。現在、全道的に調べても天然発生由来と推測されるマツカワの漁獲は年間わずか数尾程度である。従って、本道では、稀少種ともされるマツカワ資源の復興と漁業生産の向上を目的とし、現在、100万尾規模での人工種苗生産および放流事業の展開を計画している。そのため、大量の種苗を安定的に、且つ効率よく生産できる技術を早急に確立することが囑望されている。

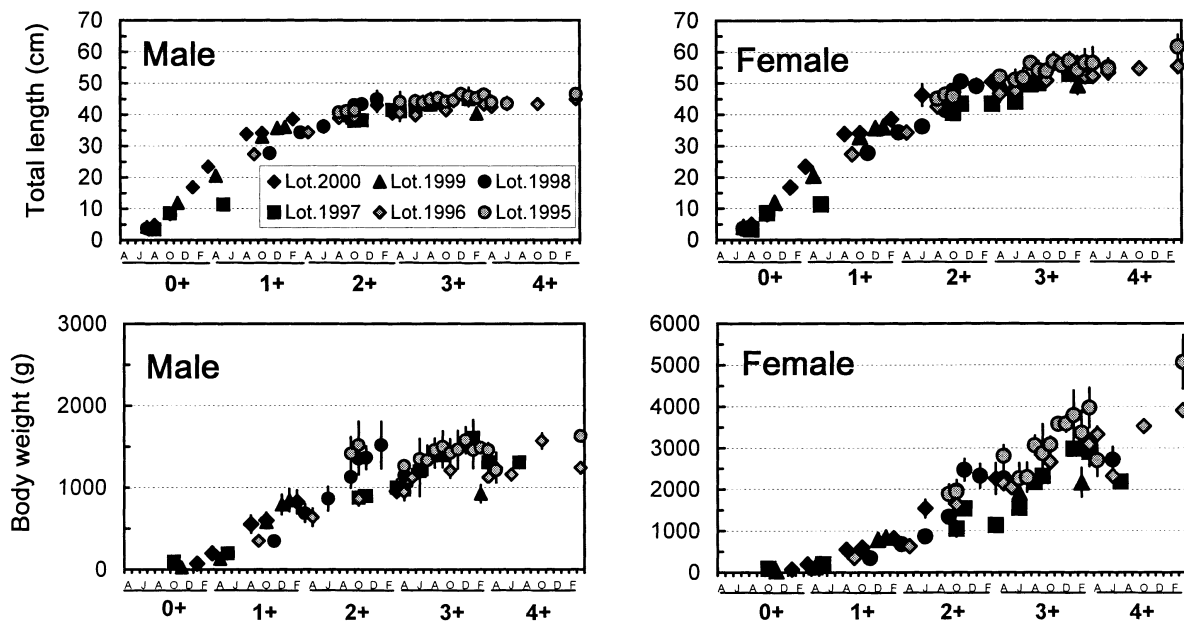


Fig.2 Changes in total length and body weight of barfin flounder reared in Hokkaido Institute of Mariculture.

マツカワの種苗生産研究は、1981年に旧（社）日本栽培漁業協会厚岸事業場（現独立行政法人水産総合研究センター厚岸栽培センター）において初めて取り組まれた。北海道では、1989年に初めてマツカワ成魚の飼育試験を実施し、1991年には日本栽培漁業協会から受精卵を導入して卵管理およびふ化試験を行った。また、1992年には天然由来の親魚から採卵し人工授精によって受精卵を得ることに成功した。さらにヒラメの仔稚魚飼育技術を模して種苗生産技術の開発に取り組んだ結果、生産数は最大数万尾程度まで増加をみせた。しかし、生産数や生産効率は年変動が激しく、生産年度によっては全く種苗を生産できなかったこともあった。種苗生産が不安定である主な原因は、親魚の成熟不良、採卵の不調、仔魚の初期大量減耗、ウイルス性疾病を懸念した廃棄等によるものである。また、形態異常魚の発生や種苗の性比が雄に偏るなど、放流種苗としての健苗性にも問題がみられた。従って、将来的に事業化規模でマツカワ種苗生産を進めるためには、先ず種苗生産過程の中で頻繁に発生する種々の問題を解決し、種苗生産の安定化を図ることが不可欠である。そのためには、マツカワ親魚の成熟や産卵機構を解明するとともに、仔稚魚の発育に関する知見を得、本種の繁殖特性にできる限り合致した種苗生産システムを開発する必要がある。

一般に、海産魚類の種苗生産過程は、「親魚養成または確保」「受精卵の確保（採卵）」「仔稚魚育成」といった工程から成っている。以下にマツカワ種苗生産の現状と解決すべき問題点を工程毎に概説する。

魚類の種苗生産において、成熟した親魚を安定確保できるかどうかは種苗生産の可否を決定する。しかし、前述のように、天然資源量が極めて少なく成魚の漁獲自体がまれであるマツカワにとって、成熟親魚を十分量、計画的に確保することはほぼ期待できない。そのため、水揚げされた成魚を人工飼育環境下で確実に成熟させる、または人工種苗を成魚となるまで養成し成熟を促す必要がある。栽培センターでは、1989年からマツカワの親魚養成を実施した。当時の飼育環境下においても、本種は雌雄ともに成熟し、卵と精子を得ることができた。しかし、性成熟の進捗は雌雄間で大きく異なり、採卵または採精が可能となる時期には約1ヵ月のずれがみられた。そのため、人工授精ができる期間は短く、受精卵を十分確保できないことが大きな問題となっていた。従って、本種の親魚養成において、雌雄の性成熟を同期化させることが最も重要な課題である。そのためには、まず、飼育環境下における生殖腺の発達過程や生殖周期等、性成熟機構に関する基礎的な知見を得ること、さらに環境要因が性成熟過程に及ぼす影響を明らかにし、それに基づ

いて適正な養成環境を整えることが必要と思われる。

良質の受精卵を大量に確保することは、魚類の種苗生産を進めるうえで欠くことができないステップであり、受精卵を安定的に確保できる技術を開発することは極めて重要な課題である。一般に、卵生硬骨魚類において実施されている採卵手法は人工授精法と自然産卵（自発的産卵）誘導法に大別できる。前者は成熟し排卵または排卵に達した雌雄の親魚から腹部の圧搾や切開によって卵と精液を人為的に採取し、媒精することにより受精卵を得る方法である<sup>9)</sup>。多少熟練は要するが成熟した親魚を確保できればほぼ確実に受精卵を得ることができる。親魚の飼育が困難な魚種（マダラなど）、沈性卵または粘着卵をもち水槽内で産卵しても回収が難しい魚種（ニシン、マコガレイ、ハタハタなど）、成熟までは達するが自発的な産卵が起こりにくい魚種（マツカワ、ホシガレイ、オヒョウなど）においては極めて有効である。一方、後者は親魚雌雄を同一の水槽内に収容し、適正な産卵環境を整えることによって自発的な放卵および放精（産卵行動）を促す方法である。排水口に集卵ネットを仕掛け排水を通して水槽内の受精卵を回収するのが一般的であり、分離浮性卵をもつ魚種に適している。作業労力が少なく良質卵を大量に確保できることからヒラメやマダイなどの種苗量産施設では広く用いられている。また、親魚の取り揚げや搾出（切開）作業も無いため親魚の補充が難しい稀少種（クエ、キジハタなど）にとっては有用性が高い。これらの採卵手法は、対象種の性成熟や産卵等の繁殖特性、人的作業能力、コストなどを考慮し使い分けられている。

マツカワの人工採卵は1985年に（社）日本栽培漁業協会厚岸事業場で初めて試みられ、地先で漁獲された天然魚から人工授精法によって受精卵を得ることに成功している<sup>9)</sup>。その後、北海道でも人工授精によってマツカワ受精卵の確保が可能となった。しかし、生産回次、または親魚個体間によって受精率の変動が大きく<sup>7,8)</sup>、受精率が高い良質卵を安定確保するにはさらなる技術改良が必要であった。一般に人工授精における受精率の低下には卵の熟度が大きく影響し、未熟であっても過熟であっても受精率は低下すると考えられている<sup>9,10)</sup>。Koya *et al.*<sup>11)</sup>はマツカワ雌の排卵周期を解明し、本種は水温6℃の場合、平均3.5日周期で排卵を繰り返すこと、また受精率の低下の原因は排卵した卵が長期間放出されずに体内で滞留し卵質が劣化したことによることを指摘した。一方、このような残留卵の卵質が変化する過程や新たに排卵された正常卵との相互作用については調べられていない。今後、採卵技術を改善するにはマツカワ卵の過熟現象について詳細な知見が必要である。

さらに、本種の場合、受精・ふ化は成功したが、ふ化後の仔魚の活力が弱く、飼育に供しても初期生残が著しく悪い卵質不良ロットが認められる。卵質不良ロットが多数出現すると、種苗生産における生産性が大幅に低下するばかりではなく、ふ化仔魚を充分量確保できるまで採卵を何度も繰り返さなければならない。そのため作業労力が大きくなるうえに親魚にも多大な負担をかける。従って、将来生き残りがよい良質ロットを早期的に判断できる指標を解明することが望まれている。さらに卵質には由来となった親魚の性状も重要と思われる。親魚養成条件が卵およびふ化仔魚の質に及ぼす影響を調べ、卵質が低下する原因を明らかにする必要がある。

前述のように、北海道ではマツカワ人工種苗の大量生産施設を建設し、事業規模で本種の栽培漁業を展開することを計画している。一方、マツカワ雌は一産卵期に少量の卵を数日間隔に分けて排卵するため<sup>11)</sup>、事業化の際、人工授精によって大量の受精卵を確保するには幾度も親魚を取り上げ・搾出を繰り返す必要がある。このことは作業労力が多大であることに併せて、親魚にハンドリングによるストレスを頻繁に与えてしまうことを示唆している。また、1993年には、日本栽培漁業協会でのマツカワ種苗生産においてウイルス性神経壊死症(VNN)による大量への死が発生し、放流種苗の供給停止や種苗生産技術開発の中断を余儀なくされるなど甚大な損害があった<sup>12)</sup>。VNNは親魚から仔稚魚へと水平感染することが確認されており<sup>13,14)</sup>、親魚へのストレスはVNNの発症、伝播の引き金となりうる。従って、今後、マツカワ種苗量産技術開発を進めるには大量の受精卵を効率よく確保でき、且つ、できる限り親魚への負担が掛からない自発的産卵誘導技術の開発が必要とされている。

魚類の仔稚魚飼育において、健康な種苗を生き残りよく育てることは最も重要な課題である。特に仔魚期は、内部栄養から外部栄養へのエネルギー転換、変態による形態構造の変化、遊泳生活から底棲生活への移行など様々な生理生態的变化が生じる。そのため、適正な仔魚飼育環境を整えるかどうかは、種苗生産の成否を決定するポイントといえる。飼育環境下におけるマツカワ仔稚魚の発育過程および相対成長は有瀧ら<sup>15)</sup>によって整理されている。飼育が順調に進んだ場合、Fig.3に示した過程を経て発育が進み、ふ化後約70日になると平均全長が30mmをこえる(種苗生産終了)。一方、本種の仔魚飼育条件は、ヒラメ等の他魚種の飼育例、実際の飼育による試行錯誤、飼育担当者の経験に基づいて設定された部分が多い。設定した環境条件や作業工程がマツカワ仔稚魚の発育や生残にどのような影響(効果)を与えるのかについては明らかでない。より安定的な飼育技術を確立するに

は、それぞれの飼育要因がもつ意義について理解し、整理することが必要と考えられる。

また、本種の仔稚魚飼育過程において、浮遊生活期に仔魚の大量減耗が頻繁に発生する<sup>7,8,16-19)</sup>。生産年度や生産ロットによって差があるが、この期間の仔魚の死亡率は30~99%と高く、初期減耗が著しい場合、全く種苗を生産できなかった事例もある。そのため、生産成績は仔魚期の減耗の度合いによって決定されるといっても過言ではなく、マツカワ栽培漁業を進める上で初期減耗は種苗の安定供給を揺るがす重要な問題となっている。従って、初期大量減耗がいつ(どの発育段階で)、どのような原因によって発生するのかを早急に解明し、その防除対策を確立する必要がある。

近年のグルメブームに代表されるように、消費者の食の質に対するニーズはこれまでにないほどに高まっている。また、環境を重視した社会への移行によって、人工種苗が天然海域に及ぼす影響も懸念されている。従って、放流後も生き残りがよく、且つ天然資源と隔たりのない形態および生理特性をもつ種苗を育成することが必要とされている。異体類の人工種苗の中には、体色、眼の位置、脊椎骨などの骨格系に著しい異常をもった個体が高い頻度で認められる。Norman<sup>12)</sup>は、種苗生産履歴がない天然カレイにおいてもこうした形態異常個体が現れることを報告しているが、その出現頻度は人工種苗のそれと比較できないほど低い。従って、人工飼育に起因する何らかの要因が形態異常の出現を強く促していることは疑いない。マツカワ人工種苗においても、白化、両面有色、逆位、脊椎骨異常など形態異常魚が高い頻度で出現する。こうした形態異常魚は、放流後の生残が懸念されるばかりでなく、その外観から価格低下の原因となりうる。また、マツカワにおいては、生産された種苗の性比が著しく雄に偏りやすいことが問題となっている。この現象は、雌の遺伝形質を有する個体が、生殖腺の性が未分化な時期に人工飼育の何らかの影響によって不可逆的に生理的雄へと分化したために生じると考えられる。性比が雄に偏った種苗群を継続的に放流すると、大型の雌魚の漁獲が減少するとともに、マツカワ天然集団の再生産機構にも悪影響を及ぼす可能性がある。形態異常と性比偏重のいずれもマツカワ栽培漁業を進める上での経済性に関わる問題であり、その発生要因を解明し、健苗育成技術を早急に確立する必要がある。

以上のことから、本研究では、マツカワ種苗生産技術の確立を目指し、飼育環境下における親魚の性成熟、産卵、仔稚魚の発育に関した基礎知見を得るとともに、種苗生産過程で障害となっている諸問題の発生原因と改善策の解明に取り組んだ。まず、第II章では、マツカワ雌

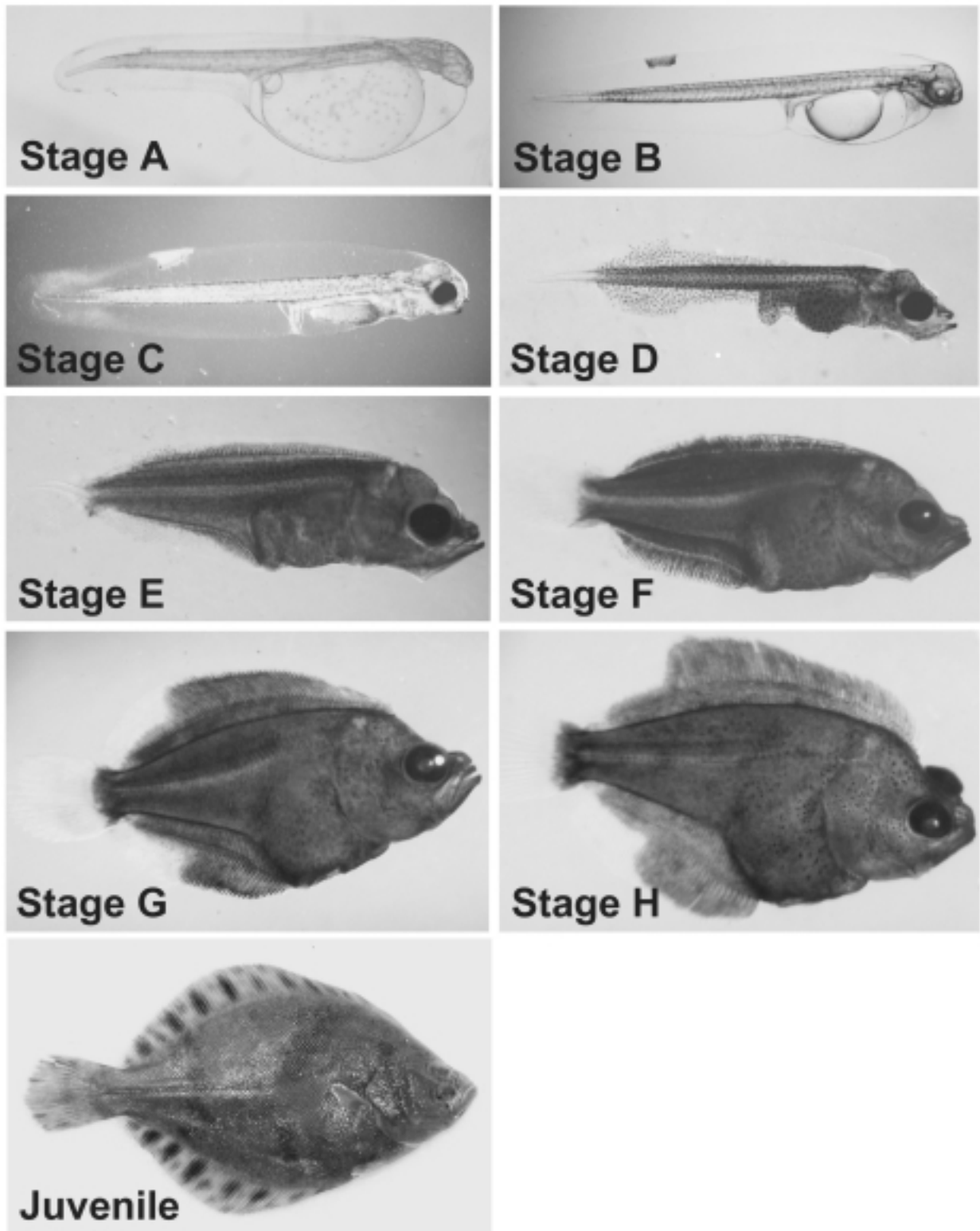


Fig.3 Development of barfin flounder reared in Hokkaido Institute of Mariculture.  
 Stage B: yolk-sac larva, Stage C: preflexion larva (mouth opened), Stage D: preflexion larva, Stage E: flexion larva,  
 Stage F: postflexion larva (onset of metamorphosis), Stage G: postflexion larva (early metamorphosis),  
 H: postflexion larva (late metamorphosis), Stage I: juvenile.

雄の生殖年周期について詳細に調べるとともに、飼育水温がそれぞれの性成熟過程に及ぼす影響について解析し、性成熟期を同期化できる飼育条件を明らかにした。次に

第三章では、受精率の低下やふ化仔魚の活力不良等、卵質が原因と推測される緒問題の解決を試みた。まず搾出した卵の培養実験を行い、卵が体内で過熟化する機構を

明らかにした。また、ふ化後の仔魚の生残ポテンシャルを反映する評価指標について調べ、良質ロットの早期判別基準を解明した。さらに、親魚の養成条件が卵質の良否に及ぼす影響を明らかにし、良質卵を安定確保できる親魚養成条件について提唱した。続いて第IV章では、大量の受精卵を効率よく確保し、且つ親魚に負担を与えない新採卵技術の開発を試みた。これまで困難とされていたマツカワ人工養成魚における水槽内産卵が昇温刺激によって誘導可能であることを初めて証明し、自発的産卵誘導法を確立した。また第V章では、マツカワ仔魚飼育における初期大量減耗の防除に取り組んだ。仔魚期における発育特性について詳細に調べるとともに大量減耗の発生要因を特定し、生残率を高めるうえで適正な飼育条件を明らかにした。併せて、第VI章では、マツカワ人工種苗の健苗化を目指し、形態異常や性比の偏りの発生要因および防除法について調べた。本種人工種苗にみられる形態異常のうち、白化および両面有色化現象の発生に及ぼす水温の影響を解明した。また、性決定メカニズムを明らかにするため、性決定に対する温度感受期を特定するとともに、着底時における底質条件が性決定に及ぼす影響を明らかにした。最後に第VII章では、以上の研究で得られた知見を総合し、マツカワの種苗生産において最適と考えられる親魚養成、採卵、仔稚魚飼育の各条件を提唱した。

## 第II章 飼育環境下におけるマツカワの性成熟過程および環境要因による制御

前章で述べたように、飼育環境下においてもマツカワは雌雄ともに性成熟が進む。しかし、その成熟進度には雌雄間で大きな差があり、採卵および採精適期がずれることが種苗生産を行う上での問題となっている。従って、雌雄の性成熟期を同調させ得る親魚養成条件を明らかにする必要があるが、そのためにはマツカワの性成熟機構に関する基礎的知見の収集が不可欠である。そこで本章第1節では飼育環境下におけるマツカワの性成熟過程について詳細に観察した。また、魚類を取り巻く外部環境は、性決定から生殖腺の形成、配偶子形成、産卵に至るまでの一連の生殖現象に大きな影響を及ぼしていると考えられる<sup>21)</sup>。しかし、マツカワの性成熟過程に水温や光条件などの環境要因が及ぼす影響については全く知られていない。そこで、第2節では飼育水温が性成熟に及ぼす影響について解析した。さらに得られた知見をもとに雌雄の性成熟期を同期化できる水温条件について検討した。

### 第1節 飼育環境下におけるマツカワの性成熟過程

親魚の養成条件を検討する上で、対象種の性成熟機構を詳細に把握することは極めて重要である。種苗の量産技術が確立され、事業規模で栽培漁業が推進されているマダイ<sup>22,23)</sup>やヒラメ<sup>24)</sup>においては、性成熟機構に関する多くの知見が得られており、その特性に適合した飼育条件が整えられている。また、天然海域における分布、移動、食性など対象種の生態学的な情報は、親魚の養成環境を設定する上での有用な基礎知見となる。しかし、1975年以後、天然資源が劇的に減少し、現在も極めて低い水準のままであるマツカワにおいて、生息水温や餌料などの生態学的特性は不明である。また、初回成熟年齢や産卵期など天然環境下での再生産に関わる知見もほとんど得られていない。

飼育環境下におけるマツカワ雌の性成熟過程については比較的多くの研究例がある。初期卵形成過程<sup>25)</sup>、卵黄形成期における血中雌特異タンパク量の変化<sup>26)</sup>、最終成熟から排卵における卵の生化学的性状変化<sup>27-30)</sup>、排卵周期<sup>31)</sup>など、それぞれの卵発達段階に焦点をあて詳細な生理変化が報告されている。しかし、これまで生殖腺体指数、卵径、卵巣組織の変化等、マツカワ雌の卵発達過程を総合的に、且つ周年を通して観察した例はない。また、雄の性成熟過程に関しては全く報告がない。そこで、本研究では飼育環境条件下におけるマツカワ雌雄の初回成熟年齢と性成熟過程を明らかにするため、人工養成1歳魚と2歳魚の卵巣発達および精巣発達過程を観察した。また、他魚種と同様に、本種の性成熟過程にも生息環境の水温が何らかの影響を及ぼすと推測される。そこで、自然海水温を基本として飼育した群と高水温のまま飼育した群との性成熟過程を比較した。

### 材料と方法

#### 1. 供試魚

実験には、栽培センターで種苗生産し成魚になるまで養成した1～3歳のマツカワ雌雄（これらを以下、人工養成魚と称す）を用いた。なお、本研究で人工養成魚の年齢を論ずる際、混乱を避けるため、便宜上、すべて4月1日を受精日とした。従って、毎年4月1日を経過すると年齢が1歳増すことになる。

#### 2. 飼育条件

自然海水の水温変動に近似した条件で飼育したマツカワ1歳魚群（自然水温群）と飼育期間を通して15℃以上となるように飼育した1歳魚群（高水温群）における性成熟過程について調べた。自然水温群においては同一の



群から毎月連続的にサンプリングすることができなかった。そのため、1998年産まれ、1999年産まれおよび2002年産まれ群のサンプリングデータをまとめ、自然水温群とした。また、高水温群は1990年産まれ群のサンプリングデータを用いた。いずれの実験群も栽培センターの屋内水槽（容量10 tの楕円形FRP水槽）内で養成した。Fig.4aに実験期間における各群の飼育水温を示した。高水温群では実験期間を通して水温15℃以上にするため、夏場の高水温期以外はヒーターで加温した海水をかけ流して飼育した。一方、自然水温群においては、水温が最も低下する12月から4月までの間、8℃程度までやや加温する以外は無調温の地先汲み上げ海水で飼育した。いずれの群も光周期条件は自然日長とした。給餌は週6日間毎日実施し、市販の配合飼料を一日一回飽食量与えた。

また、1996年産まれのマツカワ2歳魚の性成熟過程を調べた。飼育水温は自然海水の水温とした(Fig.4b)。実験期間中は配合飼料に併せてイカナゴやエビジャコなどの生鮮餌を週6日間で日替わりで給餌した。

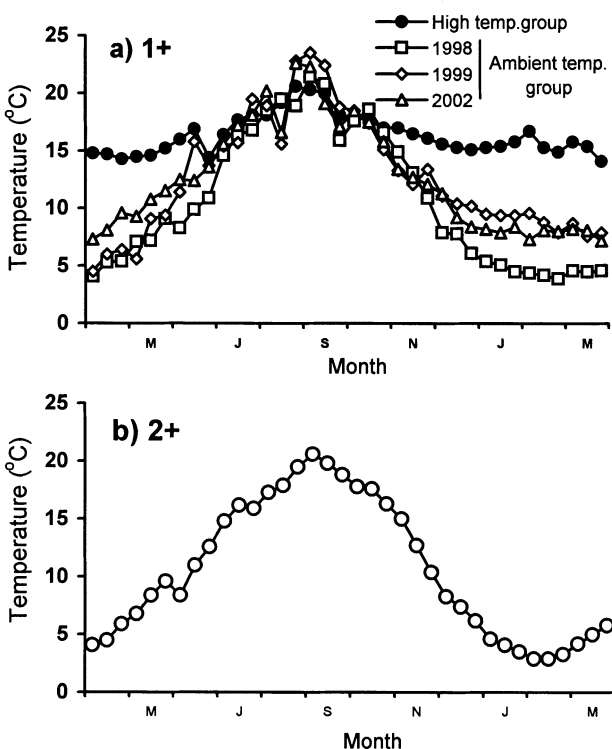


Fig.4 Changes in water temperature during experiments using 1+ barfin flounder (a) and using 2+ barfin flounder (b).

### 3. 実験方法

1歳魚高水温群では、4月から翌年3月まで毎月、雄を15~20個体および雌を0~3個体ずつサンプリングした。また、1歳魚自然水温群では、4月、9月、10月、

12月~3月にそれぞれ雌雄3~5尾ずつサンプリングした。さらに、2歳魚においては6月と7月を除いた各月、雌雄5尾ずつサンプリングした。

供試魚の全長および体重を測定した後、開腹して卵巣または精巣を摘出しそれらの重量を測定した。後日、測定データから生殖腺体指数 ( $GSI = \text{生殖腺重量} \times 100 / \text{体重}$ ) を求めた。生殖腺の一部はブアン氏液で固定し常法によりパラフィン切片を作成して組織観察を行った。精巣の発達過程を正確に把握するため、精巣中央部の横断組織を写真撮影し、拡大した印画紙上で生殖細胞の部位を発達段階別に切断した。それらの重量を計量し、画面全域に対する重量比から生殖細胞ごとの存在比率を求めた。一方、卵巣においては、組織観察によって発達段階を把握するとともに、実体顕微鏡下で卵母細胞、または排卵した卵の直径（以下、卵径）を測定し、最大卵群の平均卵径を求めた。全長、体重、GSIは平均値±標準偏差で現した。

### 4. 血中性ステロイドホルモン量

1歳魚高水温群においては開腹前に尾部静脈から採血し、性成熟に伴う血中ステロイドホルモン濃度の変化を調べた。血液は4℃で一晩静置した後、3000回転で15分間遠心して血清を分離した。血清はホルモン分析に用いるまで-20℃で凍結保存した。放射免疫測定法 (RIA) により雌血清中のEstradiol-17 $\beta$  ( $E_2$ ) および17 $\alpha$ 、20 $\beta$ -Dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP)量、雄血清中のTestosterone (T), 11-ketotestosterone (11-KT) 量およびDHP量を測定した。血清100 $\mu$ lを入れた試験管に1 mlのジエチルエーテルを加え、十分混和した後-30℃に冷却したメチルアルコールに浸して試料層を凍結し、ステロイドが抽出された上澄みのみを別の試験管に移した。この操作を2回繰り返した後エーテルを蒸発させ、抗体とトリチウム標識ステロイドを加え、暗所で24時間抗原抗体反応を起こさせた。その後、デキストランチャーコール法により遊離ステロイドを除去し、抗体と結合した標識ステロイドの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。ステロイド濃度は標準曲線より算出した。測定データは平均値±標準誤差で表した。

## 結 果

### 1. 雄の成長および性成熟過程

#### (1) 生殖腺体指数の変化および採精状況

1歳魚および2歳魚の成長を調べた。その結果、1歳魚の場合、高水温群は自然水温群に比べ実験期間を通して良好な成長を示し、3月には全長39.5cm、体重887gに達した。また、2歳魚の場合、水温が上昇する4月から

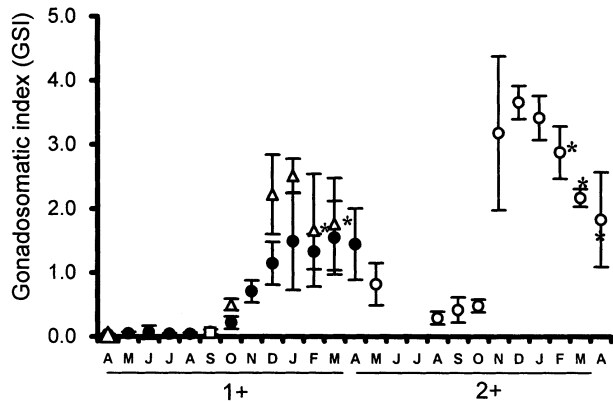


Fig.5 Changes in gonadosomatic index (GSI) of male barfin flounder aged 1+ and that aged 2+.

9月にかけて摂餌が活発となり全長、体重いずれも直線的に増加した。10月以降は水温の低下に伴って摂餌が徐々に減退し、成長は停滞した。

Fig.5に1歳魚および2歳魚雄のGSI変化を示した。1歳魚の場合、両群ともに9月までは精巣の発達は見られずGSIは低値のままであった。高水温群では10月からGSIが徐々に増加し、1月にピークとなった後、4月までその値のまま推移した。また、4月に腹部を圧搾したところ、少量であったものの精液を採取することができた。しかし、それらを海水で希釈しても精子は全く運動せず、受精能はないと判断された。自然水温群においても10月以降GSIの増加が認められ、12月にはGSIが2.22まで急増

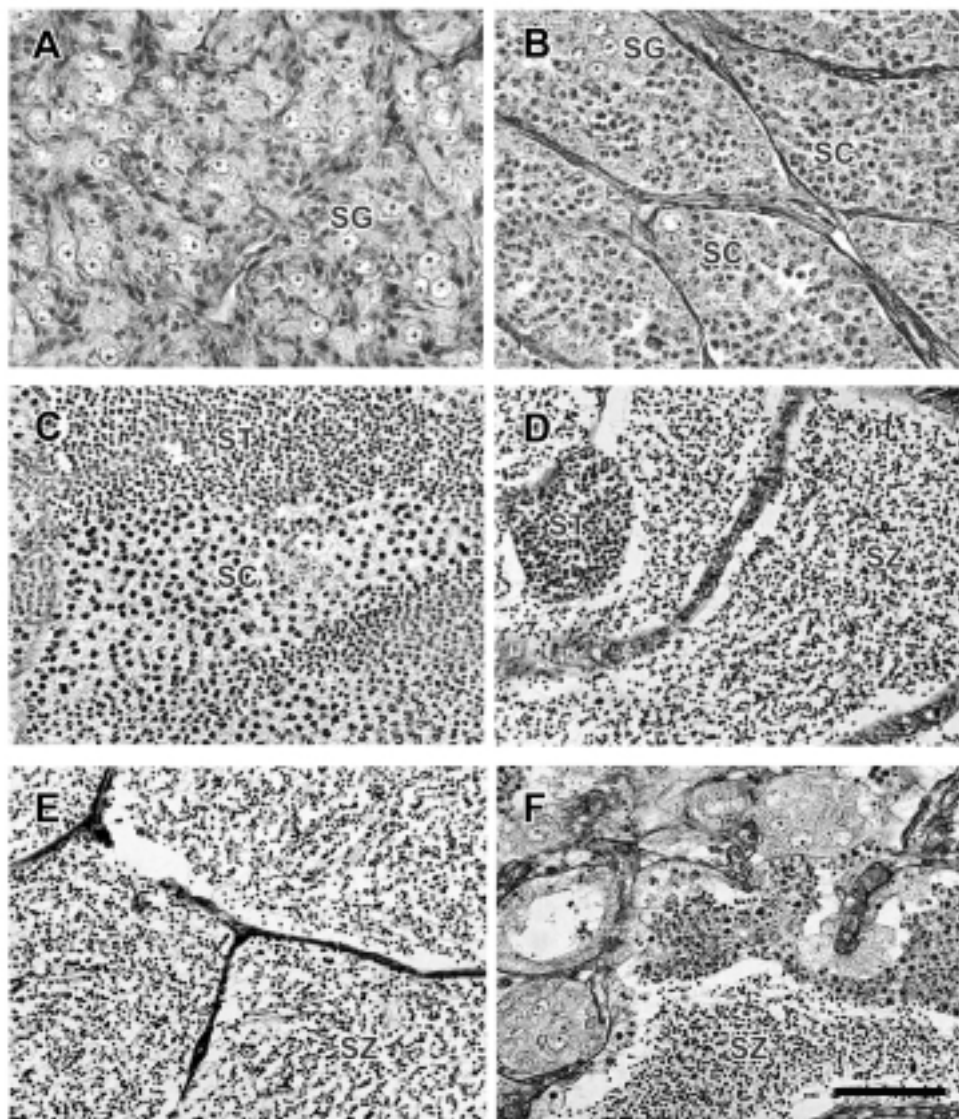


Fig.6 Histological observations of testis from male barfin flounder (2+) reared at ambient seawater.

All sections were stained with hematoxylin-eosin. Bar=50 $\mu$ m.

A: pre-spermatogenesis stage (This sample was obtained from 0+ male barfin flounder), B: early spermatogenesis stage, C: mid spermatogenesis stage, D: late spermatogenesis stage, E: functional maturation stage, F: post-spawn stage.

SG: spermatogonia, SC: spermatocytes, ST: spermatotids, SZ: spermatozoa.

し、1月に最高値を示した。自然水温群のGSIのピーク値は高水温群のそれを大きく上回っており、その後GSIは速やかに低下した。併せて、高水温群とは異なり、これらの群では2月以降、運動活性が高い精子を採取することができた。

2歳魚においても、10月までGSIの増加は緩やかであった。しかし、10月から11月にかけて急激に増加し12月に最高値(3.66)を示した。その後、GSIは速やかに低下し2月以降、精液を採取することができた。精子の運動活性は高く、また一回の搾出で得られる精液量は1歳時のそれに比べて多かった。

(2) 精巣の組織学的変化

マツカワの精巣を組織学的に観察し、生殖細胞の形態、局在状況からその発達段階を区分した。精原細胞(A型および初期B型)のみを有する時期を前精子形成期とした(Fig.6A)。また、B型精原細胞の活発な増殖が始まり、精原細胞包囊が形成される時期を精原細胞増殖期とした。さらに、後期B型精原細胞および精母細胞を有する包囊が主となる時期を精子形成初期(Fig.6B)、精原細胞、精

母細胞、精細胞の各包囊が存在する時期を精子形成中期(Fig.6C)、精小囊内のほとんどが精細胞と精子になり、包囊から精子の放出像が観察される時期を精子形成後期(Fig.6D)とした。精小囊内腔および輸精管内に充満した精子が観察され、成熟に達したと推察される時期を機能的成熟期(Fig.6E)とし、一方、精小囊の一部に精子が放出された後の間隙が目立ち、精巣間質の肥厚が進む時期を退行期(Fig.6F)とした。

精巣組織の観察結果と各生殖細胞の存在比率から実験期間中における精巣の発達過程を調べた。その結果、1歳魚の場合、高水温群では4月～9月まで精巣内にはA型精原細胞が主であり前精子形成期、または精原細胞増殖期であった(Fig.7a)。GSIが徐々に増加する10月～12月、精巣内には後期B型精原細胞および精母細胞がほぼ全域を占めて精子形成初期となり、GSIがピークとなる1月に比率は少ないものの精細胞および精子が観察されて精子形成中期となった。3月までは各生殖細胞の存在比に変化はみられず精子形成中期のままであったが、4月には精子が精小囊内に充満した像が観察されて精子形成後期となった。一方、自然海水水温群の場合、12月には精細胞が観察され、高水温群よりも精子形成が進んでいた(Fig.7b)。1月には精巣内に精子が充満し、精子形成後期となった。

2歳魚においては、8月にはすでに精母細胞が認められ、10月まで精子形成初期であった(Fig.8)。GSIが急上昇しピークとなる11月および12月には精細胞が出現しそれらは精巣内の38～45%を占めた(精子形成中期)。1月以降はほぼ全域に精子が観察され、2月以降は精小囊の一部に精子が放出された間隙が観察された。2月には搾

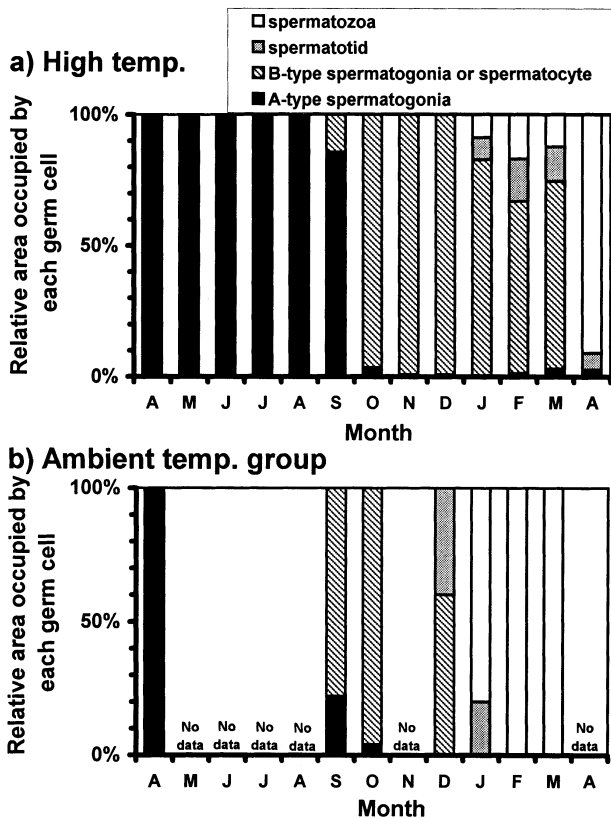


Fig.7 Testicular development of male barfin flounder aged 1+. Relative area occupied by each germ cell was calculated from the histological photographs. a) High temp. group (Lot.1990), b) Ambient temp. group (Lot.2002).

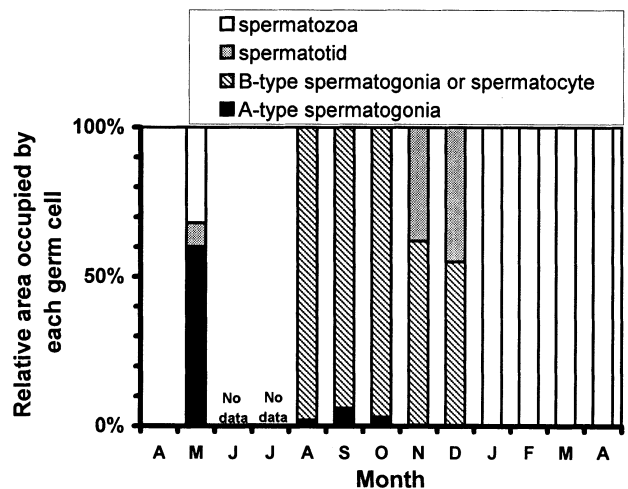


Fig.8 Testicular development of male barfin flounder aged 2+. Relative area occupied by each germ cell was calculated from the histological photographs.

出によって運動活性が高い精子を得ることができ、機能的成熟期になった。

(3) 血中ステロイドホルモン量の変化

高水温群雄における血中Tおよび11-KT量の変化をFig.9に示した。前精子形成期には、血中Tおよび11-KT量はそれぞれ1.0ng/mlおよび1.5ng/ml程度と低値のまま推移していたが、精子形成初期となる9月から10月にかけて急激に増加した。T量は11月に最高値(7.5ng/ml)に達した後、12月に4.0ng/mlまで急減したが1月以降再び増加した。11-KT量も11月から12月にかけて値が急減したが、再び上昇することは無く3月まで5.5ng/ml程度で推移した後、4月に6.4ng/mlとなった。DHPは実験期間を通して検出されなかった。

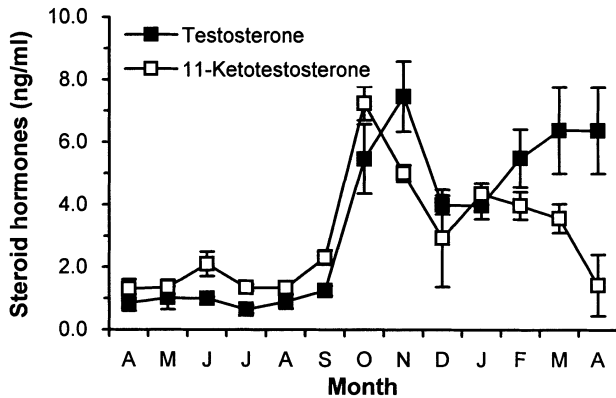


Fig.9 Changes in serum levels of testosterone and 11-ketotestosterone in male barfin flounder reared in high temperature. Values represent the means ± standard error (SE)

2. 雌の成長および性成熟過程

(1) 生殖腺体指数の変化

1歳魚と2歳魚における成長を調べたところ、雄の場合と同様に高水温群は実験期間を通して自然水温群を上回り、1歳の3月で全長約45cm体重1,500gに達した。2歳魚においても、水温の上昇期は摂餌が活発となり全長および体重のいずれも直線的に増加したが、11月以降は水温の低下に伴い成長が停滞した。

Fig.10に1歳魚と2歳魚の雌のGSI変化を示した。1歳魚の場合、養成水温の違いによってGSIの変動パターンに明確な違いが認められた。すなわち、自然海水温群においては実験期間を通してGSIは1.0以下と低値のままであり卵巣の発達は見られなかった。一方、高水温群では2月および3月にGSIが10.0~15.0まで急増した個体が認められた。しかし、高水温群において、卵成熟が誘起され排卵した個体はみられなかった。

2歳魚の場合、9月まではGSIは3.0以下と低値であったが、10月以降は直線的に上昇し、さらに2月から3月

にかけて値は急増し3歳になった4月には25.8となった。また、群内のほぼすべての雌個体で3月下旬から4月上旬に排卵が確認された。

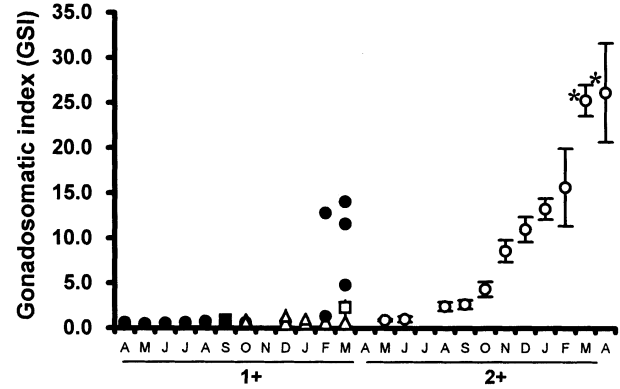


Fig.10 Changes in gonadosomatic index (GSI) of female barfin flounder aged 1+ and that aged 2+. Values represent the mean ± SD. Asterisk shows that ovulated egg could be obtained by stripping the abdomen.  
1+: ● High temp. group, □ Ambient temp. group (Lot.1998), ◇ Ambient temp. group (Lot.1999), △ Ambient temp. group (Lot.2002)  
2+: ○ Ambient temp. group (Lot.1996)

(2) 卵巣の組織学的変化

マツカワ1歳魚と2歳魚の卵巣を組織学的に観察し、卵母細胞の形態を観察した。その結果、以下のステージの卵母細胞が観察された。

1. 染色仁期：卵径約15~25μmで最小の卵母細胞。卵細胞質の大部分を大きな核が占める。ただし、今回の実験でこのステージの卵母細胞は観察されず、組織像は0歳魚(11月)の生殖腺である(Fig.11A)。
2. 周辺仁期：卵径約50~280μm (Fig.11B)。卵細胞質がヘマトキシリンに濃染し、染色仁が核周辺部に局在する。卵母細胞内に油球は観察されない。
3. 第一次卵黄球期：卵径約280~450μm (Fig.11C,D)。卵細胞質の周縁部にエオシンに濃染する卵黄球が出現する。卵発達に伴い卵黄球はその数と体積を増し、卵母細胞内に蓄積した。
4. 第二次卵黄球期：卵径約500~650μm (Fig.11E)。卵母細胞内の卵黄球は増加し続け、卵細胞質のほぼ全域を占める。また、卵膜の内側に卵黄球とはやや染色性を異とする表層胞が並んだ像が観察された。卵膜は厚くなり、層構造が観察される。
5. 第三次卵黄球期：卵径約700~900μm (Fig.11F)。卵母細胞内に卵黄球はさらに蓄積し、卵母細胞はその体積を増す。卵膜はさらに厚みを増した。
6. 核移動期：卵径約1,000~1,200μm (Fig.11G)。卵核胞

が動物極側の卵母細胞質周辺に移動する。

7. 最終成熟期：卵径約1,300~1,700 $\mu\text{m}$ 。卵核胞が崩壊して消失する。吸水も始まり卵黄タンパクの融合も進み、卵母細胞が透明化する。

1歳魚の場合、自然水温群においては実験期間を通して卵母細胞の発達段階は周辺仁期のままであった。一方、高水温群では2月と3月に第三次卵黄球期の卵母細胞をもつ個体が観察され、卵黄形成の進行が確認された。し

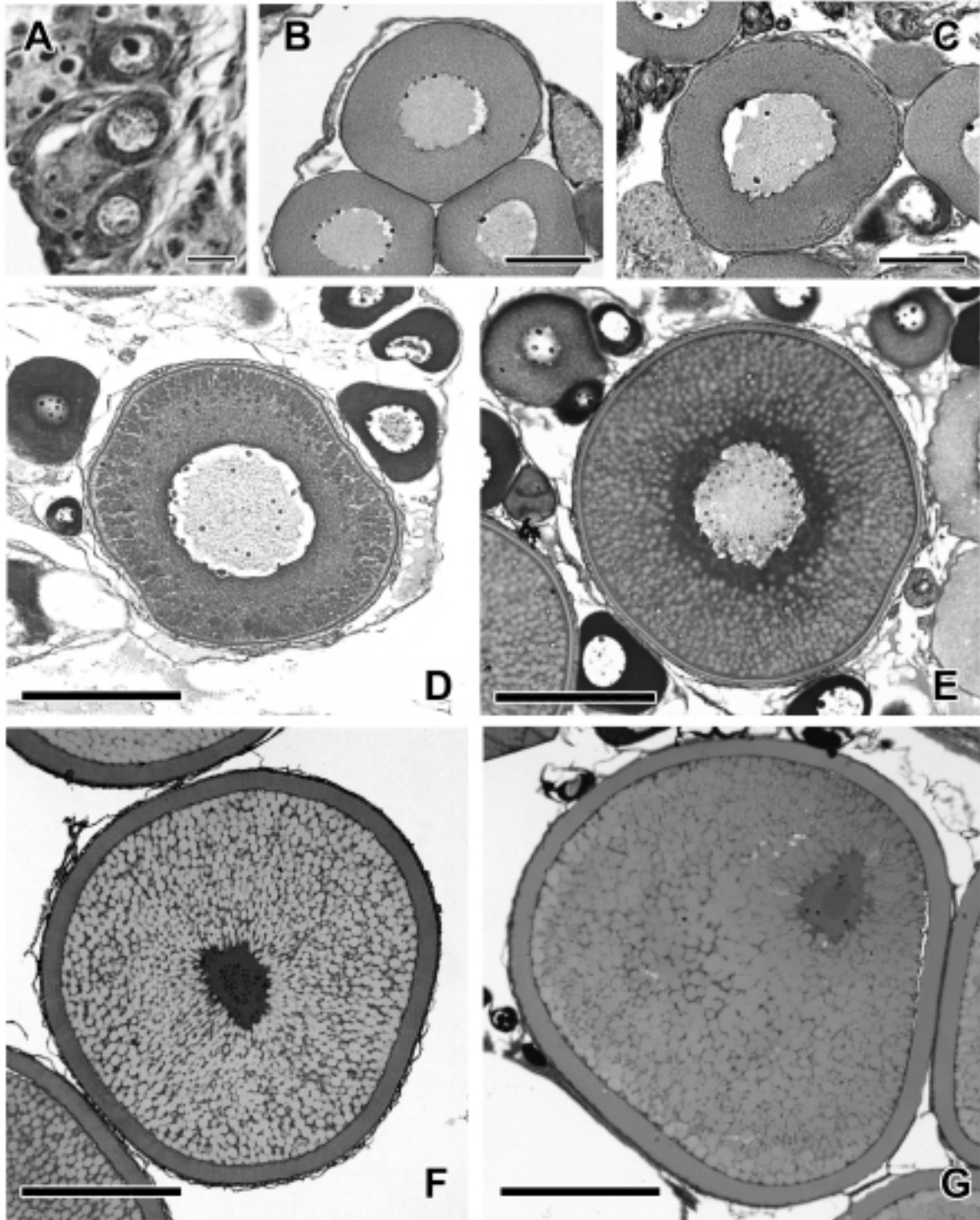


Fig.11 Histological observations of oocyte from female barfin flounder (2+) reared at ambient seawater temperature. All sections were stained with hematoxylin-eosin. A:chromatin nucleus stage (bar=50 $\mu\text{m}$ . This sample was obtained from 0+ barfin flounder), B:peri-nucleolus stage (bar=125 $\mu\text{m}$ ), C:primary yolk globule stage (bar=125 $\mu\text{m}$ ), D:primary yolk globule stage (bar=250 $\mu\text{m}$ ), E:secondary yolk globule stage (bar=250 $\mu\text{m}$ ), F:tertiary yolk globule stage (bar=250 $\mu\text{m}$ ), G:migratory nucleus stage (bar=500 $\mu\text{m}$ )

かし、卵成熟および排卵に至った個体は認められなかった。

2歳魚における卵発達過程を観察した結果、4月～8月は周辺仁期、9月～10月は第一次卵黄球期、11月は第二次卵黄球期、12月～2月は第三次卵黄球期であった。3月～4月には卵巣内に核移動期および最終成熟期の卵母細胞が混在した。3月下旬から4月にかけて排卵が始まった。

### (3) 血中ステロイドホルモン量の変化

高水温群雌における血中 $E_2$ 量の変化をFig.12に示した。10月まで血中 $E_2$ 量は $1.0\text{ng/ml}$ 以下と低値のままであったが、卵黄形成が活発となった12月には $6.3\text{ng/ml}$ まで増加した個体が認められ、第三次卵黄球期の個体が出現した2月および3月には最高値を示した。また、雄の場合と同様にDHPは実験期間を通して検出されなかった。

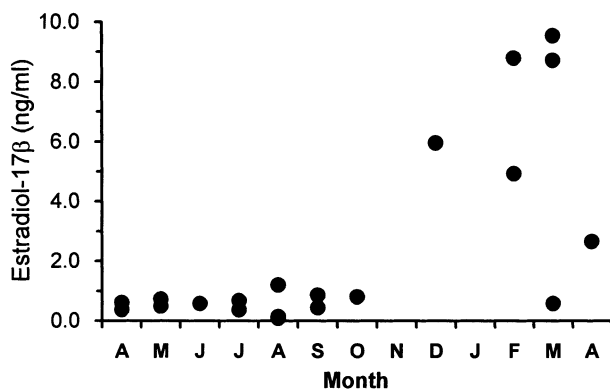


Fig.12 Changes in serum levels of estradiol-17 $\beta$  in female barfin flounder reared in high temperature.

## 考 察

自然海水の水温変動に近似した条件で飼育したマツカワ1歳および2歳魚と、周年高水温条件下で飼育した1歳魚の性成熟過程を比較した。その結果、自然海水温群の雄では1歳時の10月からGSIが増加し始め、精小囊には精母細胞が出現し精子形成が開始した。GSIが最高値を示す12月～1月にかけて精細胞と精子が出現し、その後、精小囊内に精子が充満するとともにGSIは徐々に低下した。また、2月以後、搾出すると運動活性が高い精子を得ることができた。2歳魚においても、1歳魚とほぼ同様の変動を示し、2月以降、全個体から機能的な精子を得ることができた。今回データは示さないが、本種雄において0歳時は前精子形成期の生殖腺を有することが分かっており、これまで0歳魚から精子が得られた例はない。従って、自然海水温条件下においてマツカワ雄が初回成熟に達する時期（年齢）は満1歳の2月である

と考えられる。一方、高水温群では同じ10月から精子形成が進行するものの、その進捗は自然水温群よりも遅れた。また4月に精子が得られたが、その粘性は高く運動能はみられなかった。これらの群において血中ステロイドホルモン量の変化を調べたところ、精子形成の進行と同時に血中Tおよび11-KT量が明らかに上昇した。しかし、DHPは実験期間を通して検出限界以下であった。数種の魚類において、11-KTは主に精子形成過程に、またDHPは精子の運動能の付与などの精子成熟過程に強く関与していることが明らかとなっている<sup>31,32)</sup>。以前、鈴木<sup>33)</sup>は、精子形成後期まで達したが最終成熟が誘起されないマツカワ雄群を用い、DHP投与による精巣の最終成熟誘起効果について検討した。その結果、生理的食塩水を投与した対照群では運動活性のある精子は得られなかったのに対し、DHP投与群では投与1週間後に全個体から運動活性が高い機能的な精子が得られている。現段階ではマツカワ雄の最終成熟誘起ステロイド(MIS)は未同定であり、また本研究では機能的な精子が得られた自然海水温群における血中DHP量を確認していなかったため、DHPが精子成熟に関与しているかどうかは不明である。しかし、高水温群の雄は何らかの影響によって、おそらくは高水温によってMISの分泌、または作用が起きず、最終成熟過程が正常に進まなかった可能性が高い。従って、水温が精子形成や精子成熟過程にどのような影響を及ぼすかについて実験的に確かめる必要がある。

雌の性成熟過程について調べた結果、1歳時の場合、自然海水温で飼育した全ての群では卵黄形成が誘起されず、卵巣内には周辺仁期の卵母細胞のみが観察された。2歳になると、9月以降卵黄形成が開始し、GSIおよび卵径は卵黄球の蓄積により直線的に増加した。3月以後最終成熟が誘起され、3月中旬から4月にかけてほぼ全個体が排卵した。以上の結果、マツカワ雌の場合、雄とは異なり1歳時には成熟できず、初回成熟に達する時期（年齢）は満2歳の3月（3歳になった4月）であると考えられる。一方、高水温群の雌では1歳時でも卵母細胞が第三次卵黄球期まで進行した個体も認められた。これらにおいては12月以降血中では $E_2$ 量が有意に増加し、3月にピークとなった。一般に、魚類の卵黄形成過程として、生殖腺刺激ホルモンの刺激によって卵濾胞細胞で合成、分泌された $E_2$ が血流を介して肝臓に達し、卵黄タンパク前駆物質であるビテロジェニン(VTG)の合成を促す。VTGは卵母細胞膜状の受容体を介して選択的に卵内へ取り込まれる<sup>34)</sup>。今回、血中VTG量は測定しなかったが、 $E_2$ 量の変化と卵巣の組織観察結果から少なくとも卵黄形成過程は概ね正常に進行したと考えられる。現在のところ、高水温で飼育したことが早期な卵黄形成誘起

の引き金となったかどうかは不明だが、他魚種では栄養条件が良好な環境下で育成した場合、早期的に卵発達が進行することが報告されている<sup>30)</sup>。高水温群の雌は冬季間も活発に摂餌していたため、同年齢の他群に比べ全長は約5 cm以上も大きく体重は約2倍であった。従って、マツカワでも卵黄形成の開始には親魚の栄養状態などが大きく関わっているのかもしれない。一方、高水温群の雌では卵黄形成は進んだものの、最終成熟は起こらなかった。またこれらでは多くの魚類雌でMISとして知られているDHPが実験期間を通して血中に認められなかった。この原因として、満1歳の雌では元来、卵成熟機能が備わっていない、または卵成熟が達成するには高水温条件下は不適であることが推測される。従って、雄と同様に、雌の性成熟過程と水温との関連性について詳細に調べる必要がある。

## 第2節 水温操作によるマツカワ雌雄の性成熟の同調

2歳以上のマツカワ雌雄を同一の水槽で飼育した場合、2月中旬にはほぼ全雄個体が成熟しており精子を得ることができる。一方、雌の初回排卵は3月下旬以後であり、雌雄間で成熟進度に1か月以上の違いがみられる。このため、採卵は5月下旬まで可能であるが、4月中、下旬になると精子の質が劣化するため、人工授精ができる期間は2～3週間内に限られる。また、雌は少量の卵を数日間隔で排卵する特性があるため<sup>31)</sup>、搾出によって一度に得られる採卵量は他のカレイ類に比べて少ない。これらのことから、大量の受精卵をより効率よく確保するためには、採卵および採精適期のずれを同一化し、長期にわたって人工授精が実施できるように親魚養成技術を改善する必要がある。

一般に多くの魚種において生息水温の年間変動パターンと生殖周期との間に密接な関連性が認められ、水温は魚類の性成熟を制御する重要な因子であると考えられている<sup>36)</sup>。前節において、自然水温で飼育した1歳魚と、周年を通して高水温のまま飼育した1歳魚との性成熟過程を比較した。その結果、高水温飼育群の雄では精子形成の遅れや精子成熟不全が観察され、また、雌においては卵黄形成の早期開始が認められた。従って、マツカワの精巣および卵巣発達進度も水温によって大きな影響を受けると推測される。しかし、これまで飼育水温とマツカワ性成熟との関連性を実験的に調べた例はない。

そこで、本研究では、マツカワ雌雄の性成熟に及ぼす飼育水温の影響を明らかにするため、水温別の飼育実験を実施した。さらに、その成果をもとに採卵および採精適期を同期化する水温条件について調べた。

## 材料と方法

### 1. 供試魚

1997年の実験には、1995年に栽培センターで種苗生産し、実験開始まで養成した満3歳の人工養成魚を用いた。また、1998年の実験においては、1996年に日本栽培漁業協会厚岸事業場で種苗生産して全長80mmまで飼育し、その後、栽培センターで養成した満3歳の人工養成魚を使用した。

いずれも種苗生産期間の飼育水温は14℃以下とし、また、実験開始までの養成期間は自然海水の水温とした。種苗生産終了後から1歳までは配合飼料のみを給餌し、2歳以降は配合飼料に併せて生餌4種を日替わりで給餌した。

### 2. 実験手法

1997年および1998年の2年間、水温別の飼育実験を行った。両年度ともに、9月下旬に供試魚を50尾（雌25、雄25）ずつ8 t水槽2基に収容し、2つの実験区を設けた。

1997年の実験においては、10月から2月まで自然海水の水温で飼育する自然水温区-97 (A.T.group-97) と、10月から2月まで18℃の加温海水で飼育し、その後、徐々に自然水温まで降温する高水温区-97 (H.T.group-90) を設定した (Fig.13a)。また、1998年の実験では、前年と同様、実験開始から2月まで自然海水水温で飼育する自然水温区-98 (A.T.group-98) にあわせて、10月から12月まで18℃で飼育して、その後、徐々に自然海水水温まで降温する高水温区-98 (H.T.group-98) を設けた (Fig.13b)。全ての実験区において、3月以降の水温は6℃とした。実験期間は生餌4種および配合飼料を週6日間で日替わりで給餌した。毎朝、前日の残餌量を計測し、飽食量を給餌した。

実験を開始した10月から2か月おきに雌雄5尾ずつサンプリングし、全長、体重および生殖腺重量を測定した。前節で示した式により各個体のGSIを算定した。精巣および卵巣をブアン氏液で固定して組織切片を作製し、光学顕微鏡により観察した。精巣の発達過程を正確に把握するため、前節と同様の手法によって精巣中の各生殖細胞の存在比率を求めた。一方、卵巣においては、組織観察によって発達段階を把握するとともに、実体顕微鏡下で卵母細胞、または排卵卵の直径（以下、卵径と略す）を測定し、最大卵群の平均卵径を求めた。さらに、排卵の開始時期を把握するため、2月以降定期的に腹部を搾し、排卵の有無を確認した。

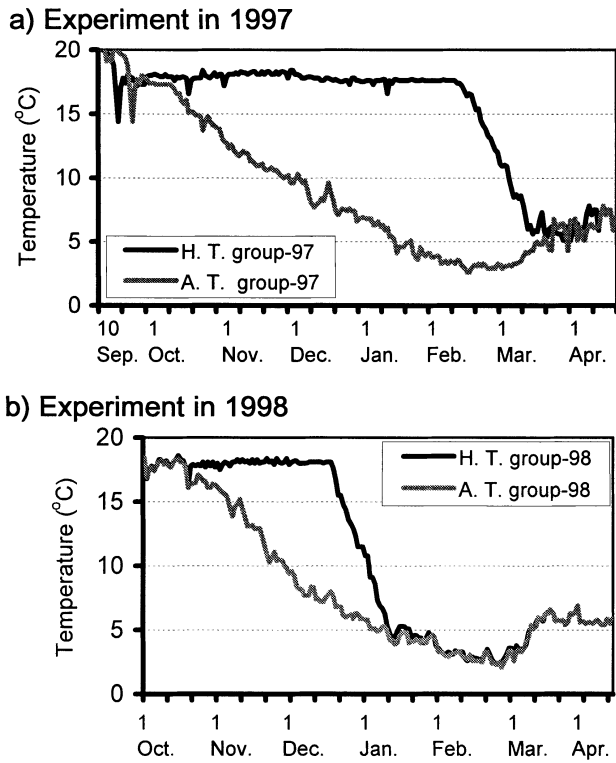


Fig.13 Changes in water temperature during the experiment from 1997 (a) and 1998 (b).  
A.T.group, Ambient seawater temperature group; H.T. group, High temperature group.

### 3. 統計学的解析

各データは平均値±標準偏差で表した。実験群間における統計的有意差の判定はt検定によって行った。

#### 結果

##### 1. 実験期間における供試魚の成長

1997年および1998年の実験期間における雌雄の全長お

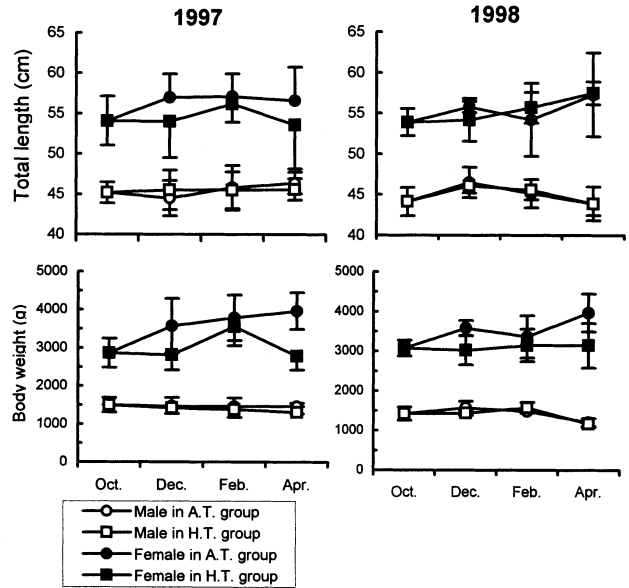


Fig.14 Changes in total length and body weight of barfin flounder from 1997 and 1998.  
Each bar indicates standard deviation (SD).  
A.T.group, Ambient seawater temperature group; H.T.group, High temperature group.

よび体重の変化をFig.14に示した。雌の全長および体重は、雄を大きく上回り、実験開始時においても全長で約8.9~9.7cm、体重で1.3~1.6gの差がみられた。両年ともに高水温区の雌は自然海水温区より体重がやや低かったが、実験期間を通して有意な成長差はみられなかった。

##### 2. 雄の性成熟に及ぼす飼育水温の影響

Fig.15に実験期間における雄のGSIの変化を示した。

1997年の実験において、自然海水温区-97のGSIは実験開始時0.44と低かったが、12月に急増して最大値(3.78)となり、その後、緩やかに下降した。これに対し、2月ま

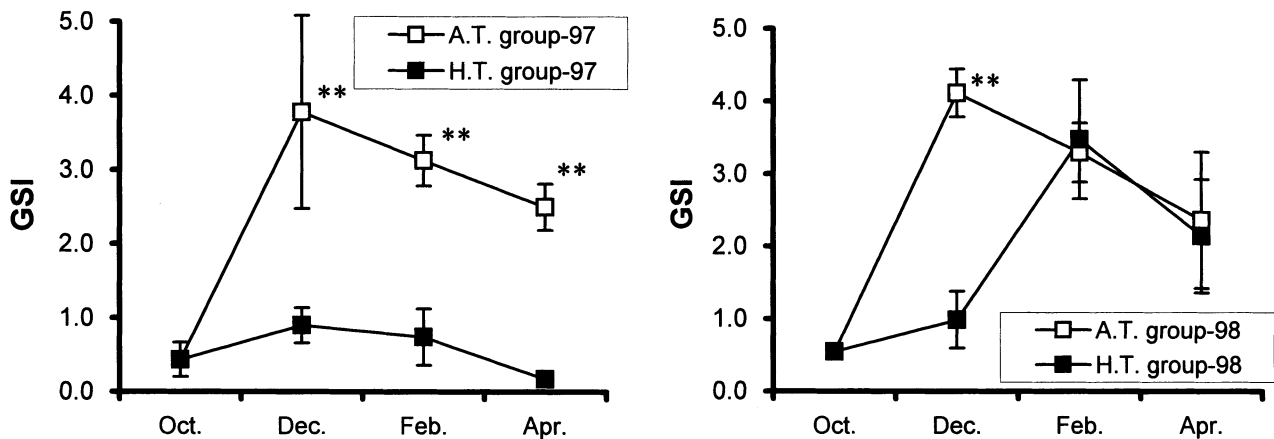


Fig.15 Gonadosomatic index (GSI) of male barfin flounder from 1997 and 1998.  
Each bar indicates SD. \*\* indicates significant difference (P<0.01 by t-test).  
A.T.group, Ambient seawater temperature group; H.T.group, High temperature group.



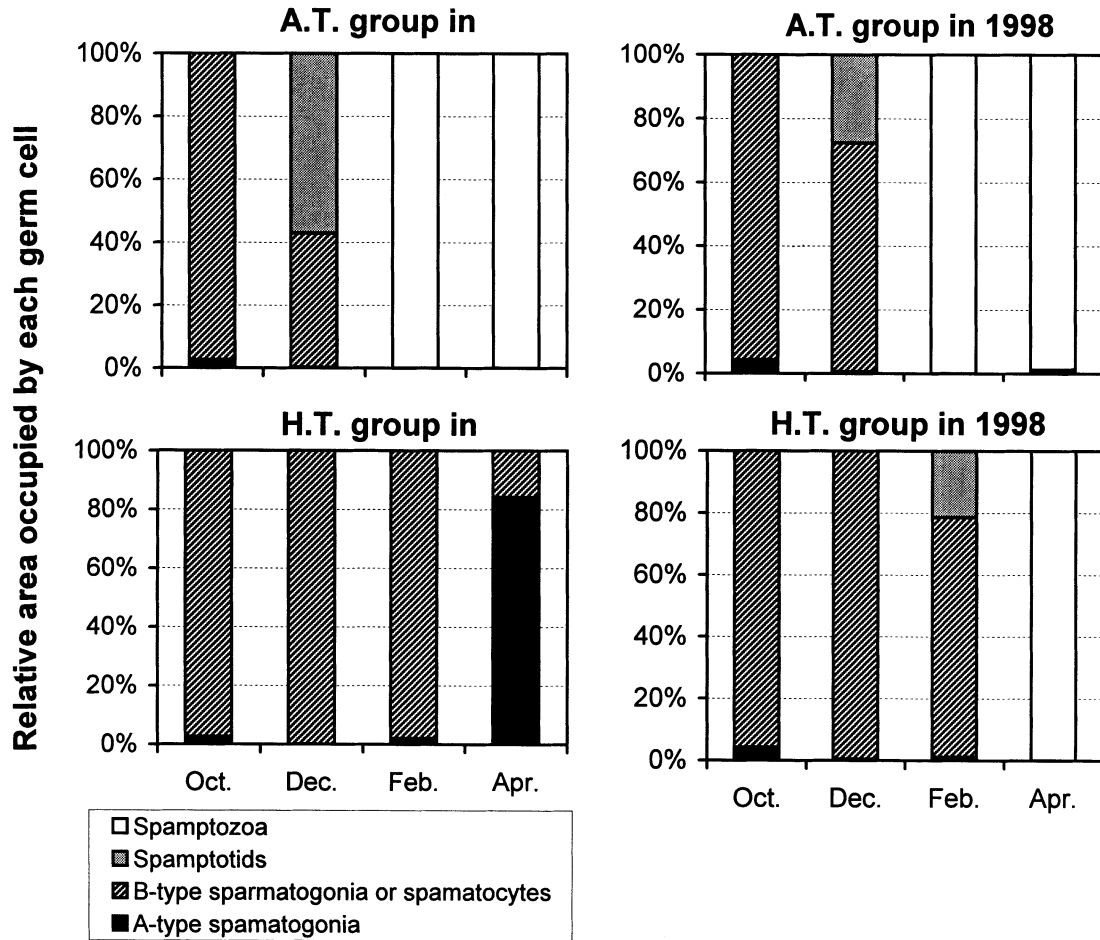


Fig.16 Testicular development of male barfin flounder from 1997 and 1998. Relative area occupied by each germ cell was calculated from the histological photographs. A.T.group, Ambient seawater temperature group; H.T.group, High temperature group.

で18℃で飼育した高水温区-97では、GSIが実験期間を通して1.0以下と低いままであり、自然海水温区-97のようなピークは認められなかった。

1998年の実験において、自然海水温区-98のGSIは、前年と同様に12月にピークとなって2月、4月にかけて緩やかに下降した。一方、高水温期間を12月までとした高水温区-98において、GSIは12月までは低値のみであった。しかし、その後、水温が低下するとGSIは急激に上昇し、自然海水温区-98より2か月遅れて2月にピークを示した。

Fig.16に1997年および1998年の水温別飼育実験における精巣内の各生殖細胞比率を、Fig.17に精巣の組織観察像を示した。いずれの年度の実験においても、実験を開始した10月の精巣組織内には、B型精原細胞および精母細胞を含む包囊がほぼ全域を占めており、精子形成初期であった (Fig.16およびFig.17a)。自然海水温区-97および-98において、12月には精巣組織内に精細胞を含む包囊が観察され、精子形成中期となった (Fig.16および

Fig.17b)。2月になると精小囊内に精子が充満し、さらに輸精管内にも精子が観察されて採精できる状態になった (Fig.16およびFig.17c)。4月においても精小囊内および輸精管内に精子が充満していたが精巣間質がやや肥厚し、また4月中旬になると精液の粘性が増して採精量も減少する傾向がみられた (Fig.16およびFig.17d)。これに対し、高水温区-97においては、2月になっても精子形成初期のみであり、精細胞および精子は全く観察されなかった (Fig.16およびFig.17f)。また、4月になると精母細胞は完全に消失し、厚い精巣間質の間に精原細胞のみが観察された (Fig.16およびFig.17g)。

一方、高水温区-98では、水温が高い12月までは実験開始時と同じ精子形成初期のみであった (Fig.16およびFig.17h)。しかし、その後、水温の低下に伴って精子形成が急速に進行し、2月には精細胞が観察された (Fig.16およびFig.17i)。さらに4月には精子が精小囊の全域を占め採精可能となった (Fig.16およびFig.17j)。また、高水温区-98の個体から得られた精子は正常に運動し、

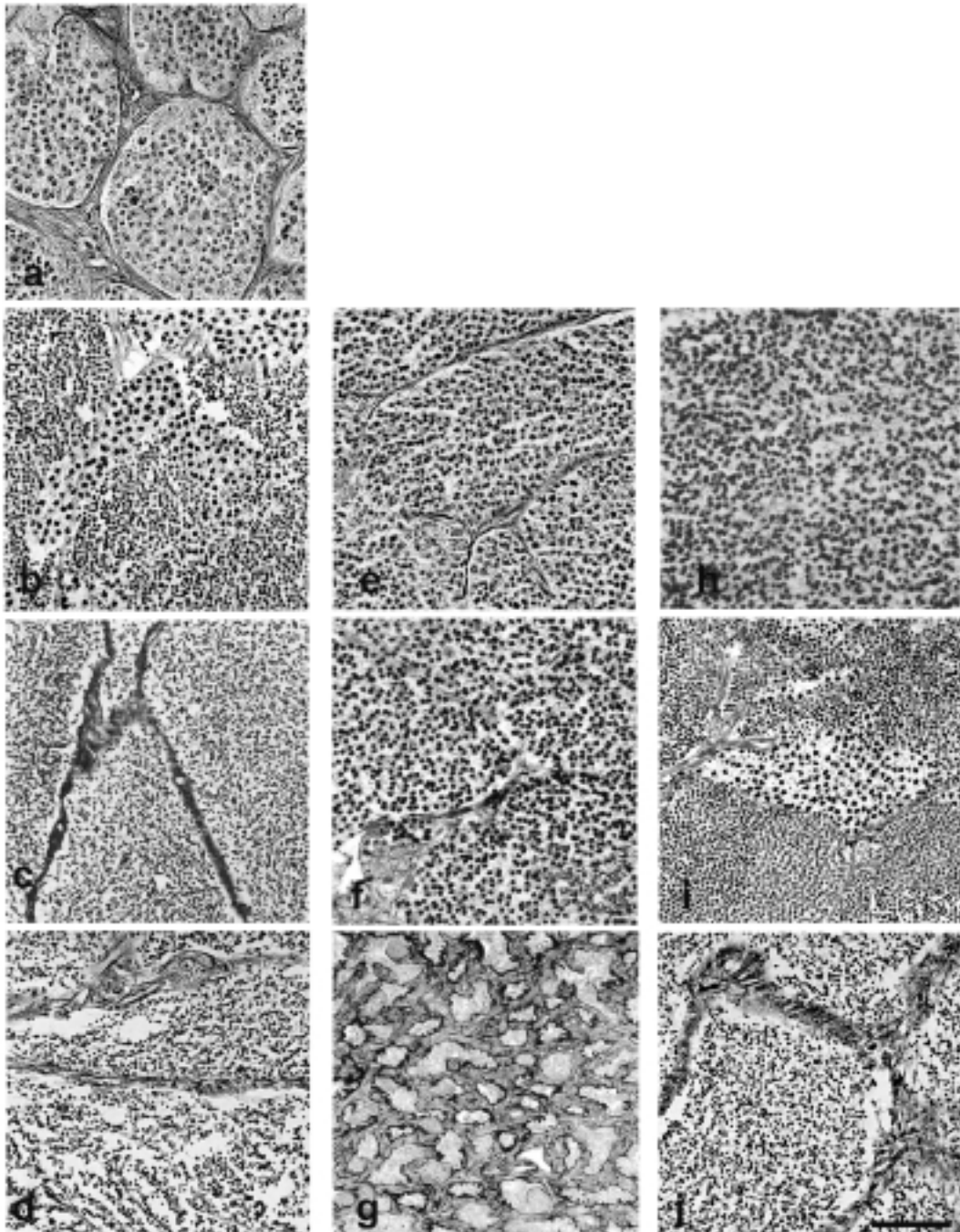


Fig.17 Changes in testicular development in male barfin flounder reared at different water temperature regime. a) Testis which obtained from A.T.group in 1997 on October (initial control), b) Testis which obtained from A.T.group in 1997 on December, c) Testis which obtained from A.T.group in 1997 on February, d) Testis which obtained from A.T.group in 1997 on April, e) Testis which obtained from H.T.group in 1997 on December, f) Testis which obtained from H.T.group in 1997 on February, g) Testis which obtained from H.T.group in 1997 on April, h) Testis which obtained from A.T.group in 1998 on December, i) Testis which obtained from H.T.group in 1998 on February, j) Testis which obtained from A.T.group in 1997 on April.

人工授精に使用しても受精能に影響はみられなかった。

### 3. 雌の性成熟に及ぼす飼育水温の影響

Fig.18および19に実験期間における雌のGSIおよび卵径の変化を示した。1997年の実験において、自然海水温区-97のGSIおよび卵径は、実験開始から直線的に増加し、

4月にそれぞれ27.3および1,753 $\mu$ mとなって最大値を示した。排卵は3月下旬から始まっており、4月にはサンプリングした全個体から採卵することができた。一方、高水温区-97のGSIおよび卵径は、自然海水温区-97をやや下回ったが、2月まではほぼ変わらずに増加した。しかし、4月にはGSIおよび卵径のいずれも減少し、さらに全て

の個体において排卵が誘起されず、採卵することはできなかった。これらの卵巣を組織観察したところ、第三次卵黄球期まで発達した卵母細胞は観察されたが透明化した成熟卵は全く存在せず、また、卵巣内には退行した卵母細胞が数多く観察された (Fig.20)。

1998年の実験において、自然海水温区-98のGSIおよび卵径は前年と同様に直線的に増加して、4月には全ての個体から採卵することができた。一方、高水温区-98では、前年の高水温区-97と異なり、GSIおよび卵径が4月まで増加し、実験期間を通して自然海水温区-98と有意な差はみられなかった。また、自然海水温区-98より排卵の開始時期がやや遅れる傾向はみられたが、4月には全個体で排卵が始まり、採卵が可能となった。

考 察

本実験において、自然海水で飼育したマツカワ雄では

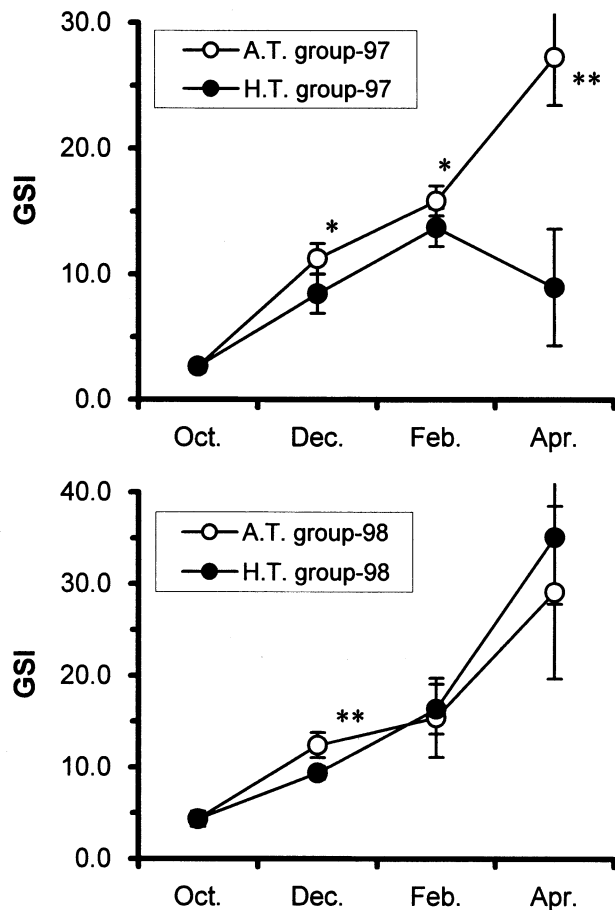


Fig.18 Gonadosomatic index (GSI) of female barfin flounder from 1997 and 1998. Each bar indicates SD. \*\* and \* indicates significant difference ( $P < 0.01$  by t-test) and ( $P < 0.05$ ), respectively. A.T. group, Ambient seawater temperature group; H.T. group, High temperature group.

10月以後、水温の低下に伴って精子形成が進行し、2月に機能的な精子が得られた。一方、水温を低下させず高

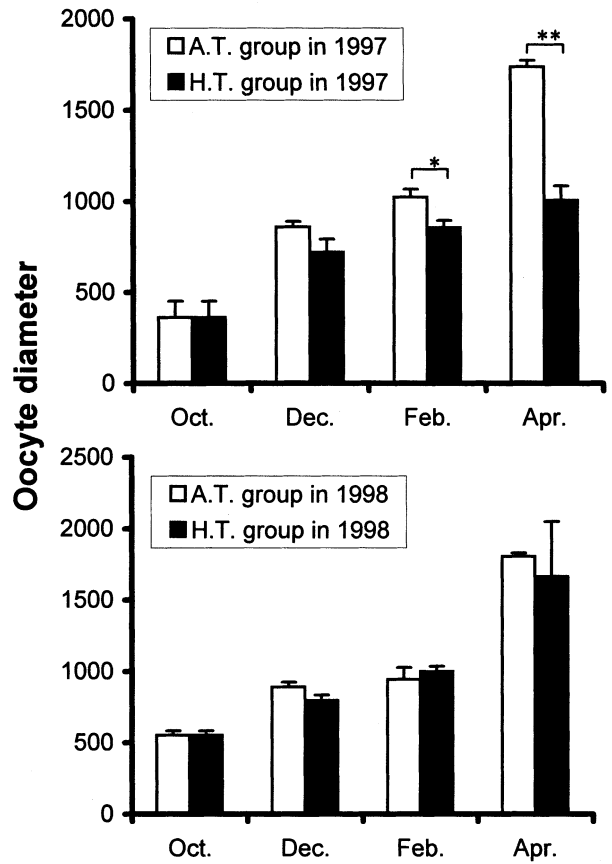


Fig.19 Changes in the oocytes diameter of female barfin flounder from 1997 and 1998. Each bar indicates SD. \*\* and \* indicates significant difference ( $P < 0.01$  by t-test) and ( $P < 0.05$ ), respectively. A.T. group, Ambient seawater temperature group; H.T. group, High temperature group.

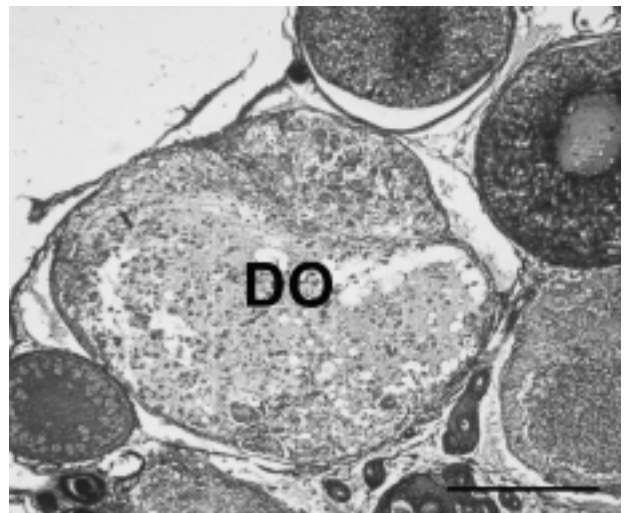


Fig.20 Histological photograph of ovary obtained from female of H.T.group in 1997 on April. DO:degenerated oocyte. Bar:500 $\mu$ m.

水温のままで飼育した場合、精子形成は全く進行せず、生殖細胞は10月に観察された状態のままその発達を停止していた。また、これらの水温を12月から徐々に低下させたところ、精子形成が再び進行して、4月に機能的な精子を得ることができた。これらの結果は、マツカワの雄において高水温環境下では精子形成の進行が著しく抑制されることを明確に示している。数種の硬骨魚類では、雄の性成熟過程に水温が深く関与すると考えられている。Matsuyama *et al.*<sup>37)</sup>は、マイワシ雄のGSI値と飼育水温の推移が高い負の相関を示したことから、精子形成の進行および終了が水温変動の影響を受けることを推測している。また、カラフトマスの雄においては、高水温条件下で飼育すると成熟まで達する個体の割合が有意に低下する<sup>38)</sup>。さらに北米産のハゼ科魚類であるlong-jaw gobyを用いた実験では、18℃以下の低水温が精子形成の促進および維持に、また、24℃以上の高水温は精原細胞から精母細胞への移行を阻害することを報告している<sup>39)</sup>。本実験を開始した10月には、マツカワの精巣内に精母細胞がすでに観察されたため、精子形成の開始を促した要因については明らかにできない。しかし、今回の結果から、精子形成が進行して成熟した精子に至るまでの過程には、少なくとも秋季から冬季にかけての水温低下が不可欠であることが示唆された。

また、本実験において、2月まで高水温（18℃）のまま飼育した場合、その後、降温しても精子形成は進まず、減数分裂が停止していた生殖細胞は退行した。このことから、長期にわたって高水温飼育を継続すると、精子形成の促進、または維持に関わる生理機構に何らかの障害が及ぼされることが考えられる。多くの海産魚類では、精子形成の進行にテストステロンや11-ケトテストステロン等のステロイドホルモンが作用すると考えられている<sup>40-42)</sup>。Miura *et al.*<sup>43)</sup>は、ニホンウナギ精巣の器官培養系によって、11-ケトテストステロンの存在下、精原細胞から精子に至る全過程を生体外で再現し、ウナギの精子形成が内分泌因子によって制御されていることを証明している。前節で、水温15℃で飼育したマツカワ1歳魚雄の血中ステロイドホルモン量の変化を調べたところ、精子形成の開始に先立ってテストステロンおよび11-ケトテストステロンの有意な増加が認められた。従って、本種でもこれらのホルモンが精子形成過程に関わっている可能性が高い。一方、これらの飼育群では精子形成は進んだものの、自然海水温で飼育した他の1歳魚群と比べて精巣の発達は不十分であり（GSIが低く）、また、機能的な精子は得られなかった。水温変化と血中ホルモン量の変動については確認が必要であるが、高水温条件下では精子形成および成熟を制御するホルモンの分泌や作用

が妨げられると推測される。

自然海水温で飼育したマツカワ雌において、GSIおよび卵径は、卵黄形成の進行によって、実験開始後、著しく増加し、4月に最高値となって排卵がみられた。また、2月、これらの卵巣内に成熟卵が観察されなかったことから、卵母細胞の最終成熟は、3月以後に誘起されたものと推測される。一方、10月以後、18℃のまま飼育した雌においても、GSIおよび卵径は2月まで直線的に増加し、卵母細胞の成長が認められた。従って、マツカワ雌では、高水温条件下でも卵黄形成は正常に進行することが示唆される。

タナゴやキンギョなど多くの淡水性魚類において、生息場の水温は、卵黄形成の開始、進行および終了を決定する重要な因子であることが知られている<sup>36)</sup>。また、マイワシを水温13℃、短日光周期の条件下で飼育した場合、水槽内でも卵黄形成が進行して、卵母細胞が成長するが、水温18℃、同光周期条件下では卵黄形成が著しく阻害されることも報告されている<sup>44)</sup>。現在のところ、マツカワの卵黄形成が妨げられる水温範囲については不明であるが、回の結果から18℃以下であれば、卵黄形成は阻害されないと考えられる。また、サケ科魚類<sup>36)</sup>やブリ<sup>45)</sup>など一部の海産魚類では、周期の変化が卵黄形成を促進する刺激となることも明らかにされている。そのため、マツカワでも水温以外の環境因子が卵黄形成の開始および進行に作用している可能性が示唆され、今後、詳細に検討する必要がある。

12月まで18℃で飼育し、その後、降温した雌では、自然海水温飼育と同様に卵発達が進み4月に排卵した。これに対し、2月まで高水温飼育を継続した場合、卵黄形成までは進行したものの、排卵は全く誘起されなかった。一般に、マダイ<sup>46)</sup>やマイワシ<sup>44)</sup>など春から初夏を産卵期とする魚種においては、春季の水温上昇によって卵母細胞の最終成熟および排卵が促されて、その結果、産卵が始まると考えられている。また、マツカワでも、3月上旬に飼育水温を4℃から6℃へ昇温すると、雌の排卵が誘起され、水槽内でも放卵することが確かめられている<sup>47)</sup>。以上のことから、マツカワの卵発達過程において、卵黄形成期は水温による影響が少なく適水温範囲は幅広いと考えられるが、一方、最終成熟の直前から排卵が誘起されるまでの時期においては、水温条件によって強い制御を受けることが示された。

栽培センターにおけるマツカワ親魚の養成水温は、8～9月および3～4月に若干、冷却および加温する以外は、北海道噴火湾の自然海水温を基本としている。しかし、この条件下では、雄の方が雌よりも早い時期に成熟するため、採精および採卵の適期にずれが生じる。

本研究でも、自然海水温で飼育した雌雄において、採精および採卵の開始時期はそれぞれ2月および4月であり、約2か月間の違いがあった。一方、10月から12月まで18℃のまま飼育し、水温が低下する時期を通常より2か月遅らせたところ、高水温によって、一定の間、雄の精子形成が抑制され、採精開始時期は4月となった。また、雌では、高水温条件下でも卵黄形成が進行し、採卵開始時期は4月のままであった。以上の結果から、10月から12月まで親魚雌雄を加温海水で飼育することによって、雄の成熟進度を雌に同調させ、雌雄ほぼ同時期に人工授精を開始できることが明らかとなった。また、高水温飼育を行っても卵および精子の受精能に悪影響はみられなかった。そのため、今後、本研究で明らかとなった水温条件に基づいて親魚を養成することにより、精子および卵の質がともに最良の時期に人工授精を実施できると考えられた。

この成果により、これまで問題となっていた雌雄の性成熟進度のずれを解消でき、今後、より効率よく受精卵を確保することが可能となると思われる。

### 第三章 マツカワの卵質に影響を及ぼす諸要因

天然環境下の場合、それぞれの魚種では適当な外部刺激の影響下、特有のリズムで成熟・産卵が行われている。しかし、飼育環境下においては、適切な外部環境情報の欠如やストレスなどにより成熟や産卵機構に異常が生じやすく、このことは体内で成長過程にある卵母細胞、または貯留されている排卵された卵の質的性状に悪影響を及ぼす<sup>10)</sup>。種苗生産現場において、受精率・ふ化率の低下、ふ化仔魚の活力不良、初期大量減耗等、安定生産を脅かす重大な問題が多々生じるが、これらのいずれにおいても由来となった卵質の影響が懸念される。そのため、対象種の卵質について詳細な知見を得ることは有意義であり、その知見に基づき卵質劣化が起こらない採卵技術や卵質を向上できる親魚養成条件について検討することが望まれる。

飼育環境下においてもマツカワは雌雄ともに正常に成熟するため、人工授精によって受精卵を得ることが可能である。しかし、生産年度や回次によって受精率が極めて低い事例もあり、受精率が変動することが問題となっている。足立<sup>10)</sup>は、飼育魚における卵質低下に関して整理し、特に受精率およびふ化率が低下する主要因については、未熟、濾胞内過熟、排卵後過熟といった受精時の卵の熟度が適切でないことを指摘している。本種は約1ヵ月間、排卵を繰り返す多回産卵魚であるが、連続的な

放卵がスムーズに行われず卵が体内に残留し過熟化したため受精率が低下した可能性がある。そこで第1節では、体内残留によるマツカワ卵の受精能および正常発生能の変化について解析した。

マツカワの仔稚魚飼育過程の中で、仔魚が変態および着底する前の遊泳生活期に大量減耗が生じやすい。Fig.21に1999年度に同一条件で飼育した6ロット分の仔魚の初期生残率を示した。いずれのロットも18~28日齢の発育段階で生残率が大きく低下しており、この時期に何らかの共通な要因によって大量へい死が引き起こされていると考えられる（へい死要因については第V章で述べる）。同時に、減耗率は15.6~98.5%と飼育ロットによって大きな差がみられる。このことは初期減耗の発生度合いに卵質の違いも影響していることを強く示唆している。従って、大量減耗を防ぎ種苗生産の生産性を向上するためには、ふ化後の生き残りが良いと推測されるロットを早期に選択して種苗生産に用いること、また適正な条件下で親魚を養成することにより得られる卵の質を高めることが重要である。そこで、本章第2節では、仔魚の初期生残能力と由来となった親魚および卵の性状との関連性について調べた。また、親魚の養成条件の違いが卵質の差異に及ぼす影響を明らかにするため、第3節では養成水温が卵質に及ぼす影響について、さらに第4節では餌料の栄養価の違いが卵質に及ぼす影響について検討した。併せて、人工養成親魚と天然海域で成育・成熟した親魚（天然魚および放流再捕魚）から得られた卵の性状について比較した。

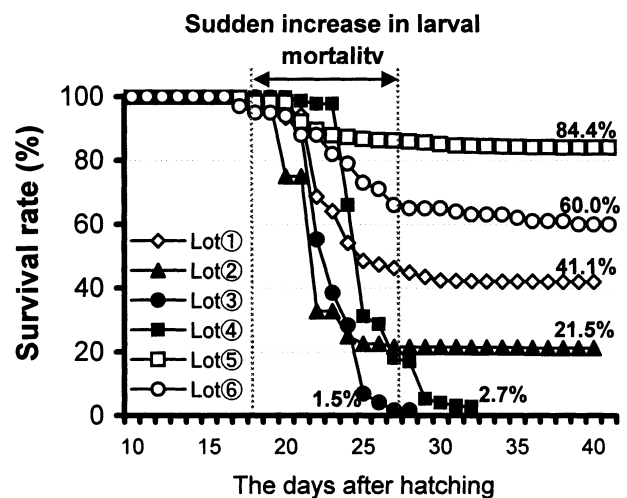


Fig.21 Changes in survival rate during larval rearing of barfin flounder in 1999.

## 第1節 マツカワの卵質劣化に及ぼす残留過熟卵の影響

マツカワ雌は産卵期になると、3～4日周期で約1ヵ月間、排卵を繰り返す<sup>11)</sup>。しかし、飼育環境下では放卵がスムーズに誘起されないため、連続的に排卵された卵は卵巣腔内で滞留し、その結果として“卵の過熟化”が生じる。そのため、卵を搾出して人工授精を行っても、受精率やふ化率が悪い場合が多く、種苗生産を行う上で問題となっている。従って、受精卵を安定的かつ効率良く確保するためには、先ず、マツカワの卵質劣化現象に関して詳細に調べ、その知見に基づいて適正な採卵システムを確立することが不可欠である。以前、Koya *et al.*<sup>11)</sup>はマツカワの連続採卵実験を行い、産卵盛期の場合、排卵から3日以上卵が体内で滞留すると受精率が低下することを報告した。しかし、マツカワの卵質が劣化する機構について、生体外の実験系を用いて詳細に調べた研究は無い。また、卵の体内での残留が胚発生過程に及ぼす影響を示した報告はみられない。そこで、本研究では、搾出したマツカワ卵を用いて培養実験を行い、本種の卵質劣化機構について解析した。

## 材料と方法

### 1. 供試魚

実験1および2のいずれにおいても、栽培センターで種苗生産し、親魚として養成した3歳の人工養成魚雌雄を用いた。満2歳の3月上旬までは自然海水温で飼育したが、3月中旬から下旬にかけて最終成熟および排卵を誘起するため6℃まで徐々に昇温し、排卵開始後は6℃のままとした。満1歳までは配合飼料のみを給餌し、2歳以降は配合飼料に併せて生餌4種を日替わりで給餌した。

### 2. 実験1における実験手法

1998年4月10日に排卵が確認された雌親魚10尾から卵を採取し、それぞれから得た卵の一部を実体顕微鏡下で観察した。その結果、完全に透明である正常な卵（Ⅰ卵）、肉眼観察では正常にみえるが、検鏡すると卵膜の破損や変色した部位がわずかに認められる卵（Ⅱ卵）、肉眼でも変形や白濁した部位が認められる卵（Ⅲ卵）が観察された（Fig.22）。10個体分の卵におけるⅠ～Ⅲ卵の各タイプの占める比率をTable 1に示した。その内、Ⅰ卵の比率が

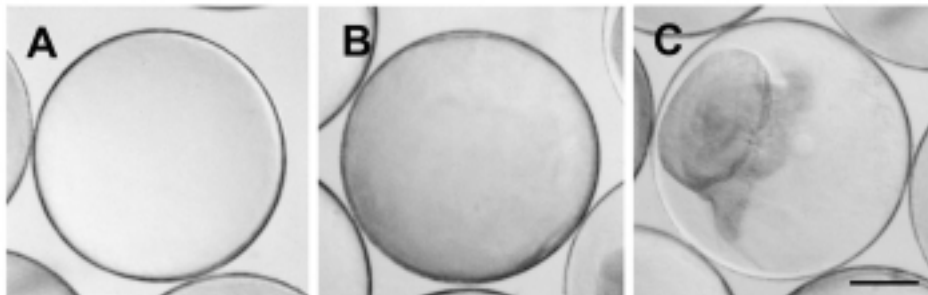


Fig.22 Photomicrograph of the eggs obtained from barfin flounder by pressing the abdomen.

A, type I; B, type II; C, type III. Bar = 500 $\mu$ m.

Table1 Ratio of each type (type I-III) of egg obtained from barfin flounder by pressing the abdomen.

Experiment 1				Experiment 2					
ID		Ratio of each egg type(%)			ID		Ratio of each egg type(%)		
		Type I	Type II	Type III			Type I	Type II	Type III
58A92	(Lot.A)	87.7	7.6	4.7	41902	(Lot.D)	80.1	12.9	7.0
8667C		84.9	4.4	10.7	A581C		77.2	8.3	14.5
D6A5A		79.2	4.8	16.0	E5314		68.1	7.6	24.7
C6E19		71.4	6.5	22.1	29017		62.8	15.2	22.0
72D72		68.0	12.9	19.1	371B29		51.2	13.8	35.0
91882	(Lot.B)	48.6	22.3	29.1	73350		45.2	11.0	43.8
03D31		43.8	4.5	51.7	662D9		40.5	10.4	49.1
24178		33.0	5.2	61.8	899B1	(Lot.E)	25.4	29.4	45.2
6B241		29.4	8.8	61.8	41902+899B1	(Lot.D+E)	52.1	19.8	29.1
41902	(Lot.C)	21.7	49.5	28.8					

最も高かった個体の卵（ロット A：I 卵率87.7%），約半数がI 卵であった個体の卵（ロット B：I 卵率48.6%），I 卵が最も少なく白濁化が進んでいた個体の卵（ロット C：I 卵率21.7%）を選抜し，これらを培養実験に供した。

培養実験は以下の手順で実施した。それぞれ卵を20g ずつ滅菌シャーレ4個に収容し，室温5℃，湿度100%に設定したモイスチャーチャンバー内で受精までインキュベートした。採卵から0（採卵直後），24，48および72時間後にシャーレ1つ分の卵をとりだし，乾導法によって人工授精を行った。なお，人工授精に用いた精液は，媒精の都度，5尾の雄から採取し，それらを混合したものである。人工授精後，卵を円筒形の小割式ふ化ネット内に収容し，水温8℃，微流水および微通気条件下でふ化まで管理した。媒精から24時間後に実体顕微鏡下で受精の有無を観察した。桑実胚期まで発生が進んだ卵を受精卵と判定し，受精率を求めた。さらに，媒精から7日後に発眼期まで正常に発生が進んだ卵の比率を求めた。

### 3. 実験2における実験手法

実験2では，I 卵率が高く排卵直後と推定される卵に，過熟化が進行している卵が接触した場合における受精率およびふ化率への影響について検討した。1999年4月14日に3歳魚8尾から採卵し，それぞれにおいてI～III卵の比率を調べた（Table 1）。I 卵率が最も高い個体の卵（ロット D：I 卵率80.1%）および最も低い個体の卵（ロット E：I 卵率25.4%）を選抜した。また，それらを同量ずつ混合した実験区を設けた（ロット D+E：混合後のI 卵率52.1%）。実験1と同様の手法と条件下で受精までインキュベートし，受精率および発眼率の変化を調べた。

### 結 果

Fig.23に実験1の培養実験における受精率および正常発生率の変化を示した。採卵直後における受精率は，ロット Aで81.2%，Bで51.0%，Cで20.4%であり，I 卵率が高いLot.ほど受精率が高かった（Fig.23a）。また，全てのロットにおいて，採卵直後の受精率はI 卵率とほぼ同じ値を示した。I 卵率が最も高かったロット Aでは，採卵72時間後においても82.5%と高い値を示し，時間が経過しても受精率はほとんど変動しなかった。これに対し，IIおよびIII卵が多く混在したロット BおよびCでは，採卵24時間後ですでに受精率が半減し，48時間後にいずれも10%以下まで低下した。一方，発眼率はすべてのロットにおいて採卵後の時間経過に伴い直線的に低下した（Fig.23b）。中でもロット Aでは，採卵72時間後，80%

以上の卵が受精していたが，発眼率は37.2%と受精率に比べて大幅に下回った。

Fig.24に実験2の培養実験における受精率および発眼率の変化を示した。I 卵率が高いロット Dのみで培養した場合，受精率は採卵72時間後まで70.9～82.7%と安定して高値を示した（Fig.24a）。また，IIおよびIII卵が多くを占めたロット Dでは培養開始後，受精率が急激に低下し，24時間後にはほぼ0%となり，実験1の結果を再現した。一方，これらを混合したロット D+Eにおいて，採卵直後の受精率は52.2%であったが，24時間後に受精率は20%以下まで急減し，その後も値は徐々に低下した。実験1と同様に発眼率はいずれのロットにおいても採卵後の時間経過に伴い直線的に低下した（Fig.24b）。

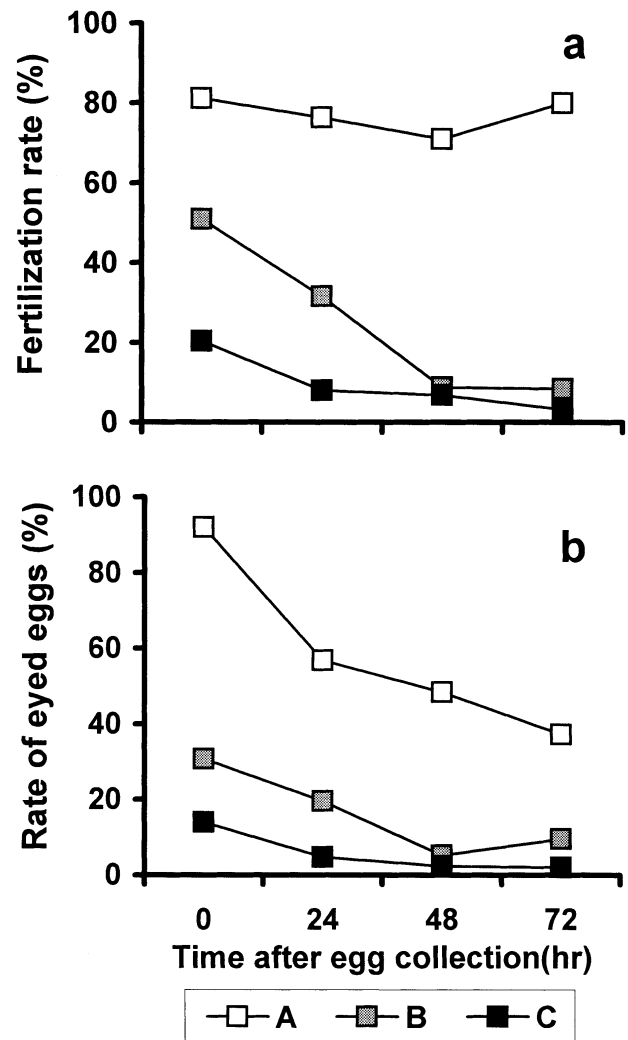


Fig.23 Changes of fertilization rate (a) and rate of eyed egg (b) after egg collection in Experiment 1. Open, gray and black squares show the value in Lot. A (type I egg rate 87.7%), B (48.6%) and C (21.7%), respectively.

## 考 察

サケ科魚類<sup>48)</sup>やキンギョ<sup>49)</sup>の卵では、排卵後、受精までに時間が経過すると、表層胞や油球等の微細構造が変質するため、卵は透明度を失い白濁化する。多回産卵魚である本種の場合、完全に透明であるI卵は排卵されて間もない卵であり、一方、白濁したIII卵は排卵後、長時間体内で残留し過熟化が進んだ卵であると推測される。実験1において、採卵直後における受精率はI卵率が高いロットほど高く、また、すべてのロットにおいて採卵直後の受精率はI卵率とほぼ同じ値を示した。このことから、搾出卵の内、正常に受精まで至った卵はI卵のみであり、外部観察上、異常が認められたII卵およびIII卵はすでに受精能を失っていると考えられる。また、I卵率が最も高かったロットAでは、採卵72時間後においても受精率は80%以上と高値を示したのに対し、IIおよびIII卵が多く混在したロットBとCでは、採卵24時間後ですでに受精率が半減し、48時間後においていずれも10%以下まで低下した。この結果は、本実験条件下において、I卵は少なくとも72時間受精能を保持できるが、過熟卵と混在した環境下では何らかの作用によって受精能が低下する可能性を示している。

そこで、実験2では、排卵直後と推定される卵に過熟化が進行した卵が接触した場合、その受精能にはどのような影響が及ぼされるかについて調べた。I卵率が高いロットDとII卵・III卵率が高いロットEを同量ずつ混合して培養したところ、採卵直後の受精率は52.2%であったが、24時間後には20%以下まで急減し、72時間後には3.4%まで低下した。この結果は、正常な受精能をもったI卵に過熟化が進行したII卵とIII卵が接触した影響によって、I卵の受精能が急速に劣化したことを明確に示している。従って、卵巣腔内においても、一度、残留卵の過熟化が進行すると、それ以後、新しく排卵される正常卵の卵質は加速的に劣化すると考えられる。

本実験からは、過熟卵がどのような過程を経て、正常卵の受精能の低下を促すのかは明らかにできない。キンギョでは、卵の過熟化が進むと卵膜構造が変質し、圧力や衝撃に対して弱くなることが示されている<sup>49)</sup>。本実験でも、特にIII卵においては、著しい卵膜の破損や変形が観察された。そのため、過熟卵から蛋白や脂質等の内容物質が流出し、それらが正常卵の表面、または卵門に付着した場合、酸素欠乏や精子の進入阻害等の弊害が生じると推測される。また、持田ら<sup>50)</sup>は、マツカワの排卵卵と接触した海水中では精子の運動活性が高まることを示し、卵側に精子運動を伸長させる因子が存在することを示唆した。そのため、過熟卵から流出した内容物質によって、pHなど卵をとりまく液性環境が大きく変化した場

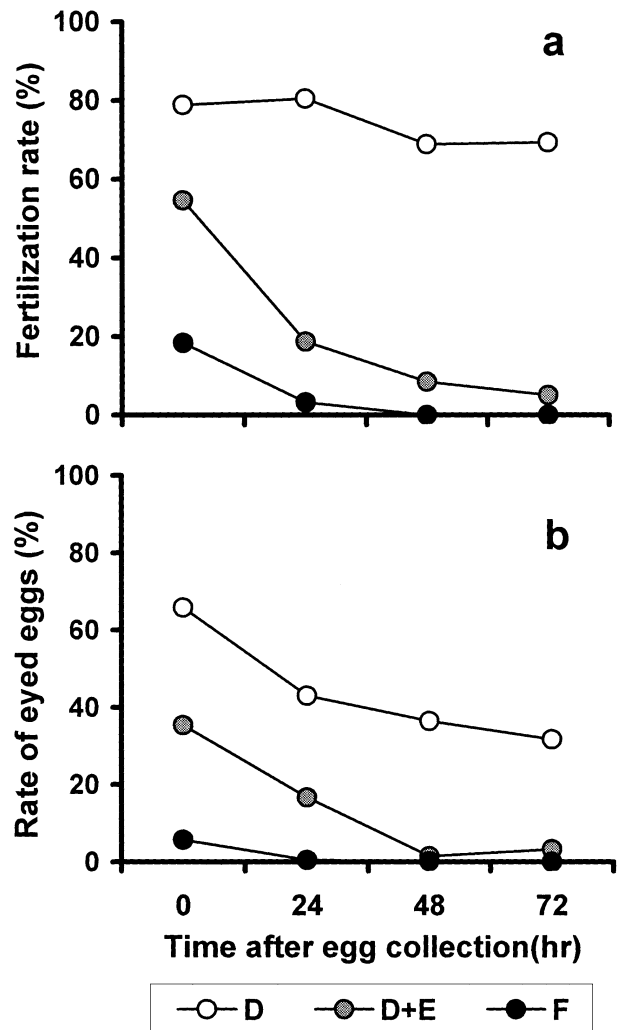


Fig.24 Changes of fertilization rate (a) and rate of eyed egg (b) after egg collection in Experiment 2. Open, gray and black circles show the value in Lot. D (type I egg rate 80.1%), D+E (52.1%) and E (25.4%), respectively.

合、媒精しても精子運動が活性化されないことも考えられる。従って、媒精前にリンガー液で洗卵した条件下で人工授精を行い、過熟卵から流出した内容物質が精子運動を介して受精に及ぼす影響についても詳細に検証する必要がある。

実験1と2のいずれにおいても、発眼率は、全ロットにおいて採卵後の時間経過に伴い直線的に低下した。ロットAおよびDでは、採卵72時間後、80%以上もの卵が受精しているにもかかわらず、発眼期まで正常に発生が進んだ卵はそれぞれ37.2%および32.6%と低かった。このことから、マツカワ卵においては、排卵後、時間が経過すると、受精までは至っても、胚発生に関わる生理機能に障害が生じ、正常にふ化できなくなることが考えられる。受精率が高くても正常発生率が低い現象は、他魚



種においても知られている<sup>51-53)</sup>。ブリ<sup>54)</sup>やマハタ<sup>55)</sup>の卵では、排卵から6時間以上経過すると、受精率、ふ化率ともに低下するが、ふ化率の低下は受精率のそれに比べてより顕著であることが報告されている。生息水温が低いマツカワでは、これらの魚種に比べて、発眼率の低下はやや緩慢であるが、おそらく同様の作用によって卵の胚発生機能の劣化が進行しているものと考えられる。

以上のように、マツカワの卵質が劣化する機構は、過熟化した残留卵または卵巣腔液の接触によって引き起こされる正常卵の受精能の低下と、排卵後の時間経過に伴う胚発生機能の劣化に大別できると考えられた。従って、マツカワ種苗生産において、良質な卵を安定的に確保するためには、排卵後、できる限り短時間で卵を採取し、過熟化の開始を抑止することが重要である。そのため、今後、人工授精を実施する場合、排卵周期に基づいて卵を搾出することが重要なポイントとなる。一方、連続的に搾出を繰り返すことは作業労力が多大であることに併せて、親魚に大きな負担をかける。従って、水槽内で自発的な排卵および受精行動を誘起できる自然産卵誘導法の開発もまた必要であろう。

## 第2節 マツカワ仔魚の初期生残能力に及ぼす卵質の影響

マダイ、ターボット、オヒョウなど多くの海産魚類の種苗生産において、卵質の良否は受精やふ化に影響するのみならず、仔魚の初期生残をも左右すると考えられている<sup>35)</sup>。前述したように、マツカワ種苗生産においても、同一条件下で飼育したにもかかわらず、由来の違い(ロットの違い)によって仔魚の初期生残率に大きな差が現れる例が多々みられる (Fig.21)<sup>56)</sup>。そのため、本種でも卵質の良否がふ化後の仔魚の生残能力に影響している可能性が高い。

サケ科魚類や多数の海産魚類において、仔魚の生残ポテンシャル(ふ化仔魚の質)を示す指標が検討されており、由来となった親魚の性状(年齢、栄養条件、遺伝的特性など)、卵サイズ、卵内容物質の生化学的成分、浮上卵率、受精率、ふ化率、ふ化仔魚の大きさ、形態異常率などが注目されている<sup>57)</sup>。魚種によってはこれらの因子と初期発育期における仔魚の活力との間に一定の関係がみだされているが、「良質ロット」と「不良ロット」とを区別できる基準についてはさらなる検討が必要である<sup>58,59)</sup>。また、マツカワの場合、どのような親魚からどのような質の卵が得られるのか、活力が高く生き残りが良い種苗を育てるにはどのような性状の卵(ふ化仔魚)を選択すべきかについては全く情報が無い。種苗生産に用

いる卵・ふ化仔魚のロットは飼育担当者の直感によって選択されているのが現状であり、このことが時として生産不調が生じる原因となる可能性がある。

そこで、本節では、年齢が異なるマツカワ親魚群から卵とふ化仔魚を採取し、その形態的性状について詳細に比較した。また、卵およびふ化仔魚の性状と初期生残能力との関連性を調べ、生残率が高い良質ロットを判別できる指標となるかどうかについて検討した。

## 材料と方法

### 1. 供試魚

実験には、栽培センターで種苗生産し、親魚として養成した満3歳~5歳の人工養成魚雌雄を用いた。いずれの年齢の親魚においても、3月上旬までは北海道噴火湾の自然海水の水温変動で飼育したが、3月中旬から下旬にかけて最終成熟と排卵を誘起するため6℃まで徐々に昇温し、排卵開始後は6℃のままとした。満1歳までは配合飼料のみを給餌し、2歳以降は配合飼料に併せて生餌4種を日替わりで給餌した。

### 2. 年齢が異なる親魚から得られた卵およびふ化仔魚の性状比較

親魚の年齢が産出される卵およびふ化仔魚の質的性状に及ぼす影響を調べるため、以下の手法により実験を行った。

#### (1) 卵、精子および受精卵の確保

1999年、2000年および2001年の3月下旬から4月上旬、3~5歳のマツカワ雌雄から卵と精子を得た。本実験では産卵期の初期から中期までに得られる卵、精子に限定しそれらを実験に供した。腹部が膨満し排卵が始まったと判断された雌親魚を取り上げ、全長と体重を測定した。その後、生殖腺隆起部を圧搾し、卵を採取した。今回は残留過熟卵による影響を排除するため、卵採取直後に卵の一部を瞬時に目視観察し、透明卵の割合が約50%以上と判断されたロットのみを実験に用いた。搾出した卵の総重量を測定した後、約5g分の卵をカレイ用リンガー液が入ったシャーレに移して冷蔵保管した。後に、これらの卵径を測定し、卵体積を算出した。残りの卵には同年齢の雄親魚から得た精液を媒精し、乾導法により人工授精を行った。受精卵を容量200lの円形水槽に移し、水温8℃、換水率300%/日、通気量500ml/分の条件下でふ化まで管理した。

#### (2) 卵体積

採取した卵の卵体積を求めるため、万能投影機上で卵径を測定した。一検体あたり50粒の卵を無作為に抽出した。本種の卵はやや楕円体であるため、それらの長軸(a)

と短軸(b)測定し、下記の計算式によって卵体積を求めた。

$$V = (4 \pi ab^2)/3$$

V : 卵体積, a : 卵の長軸, b : 卵の短軸

(3) 受精率およびふ化率

人工授精の24時間後、それぞれのロットにおいて受精率を調べた。受精率を算出する際、卵管理水槽の通気を強めて卵を水槽内で均一に分布させ、その状態において直径5cmの円筒棒を用い柱状サンプリングを行った。採取された卵を実体顕微鏡下で観察し、全卵中、受精卵が占める割合を(受精卵数×100) / 総卵数の式により求めた。また、3歳魚由来の受精卵に関してはふ化率も求めた。ふ化後、水槽内の通気を強めて仔魚を均一に分布させ、上述の円筒棒を用いて柱状サンプリングを行った。水槽内の総ふ化仔魚数を算出し、(総ふ化仔魚数×100) / 総受精卵数の式によってふ化率を求めた。

(4) ふ化仔魚の形態測定

ふ化直後における仔魚の全長および卵黄嚢体積を調べた。本種の場合、水温8℃で受精卵を管理すると、通常、受精240時間後からふ化が始まり、288時間後に全仔魚がふ化を完了する。本研究では、いずれのロットもふ化の開始を確認した24時間後に50尾ずつ無作為に抽出した。MS-222で仔魚を麻酔後、万能投影機下で全長と卵黄嚢の長径(a)・短径(b)を測定した。卵黄嚢の形状を回転楕円体

であるとして、下記の計算式によりふ化時における卵黄嚢の体積を求めた。

$$V = (4 \pi ab^2)/3$$

V : 卵黄嚢体積, a : 卵黄嚢の長軸, b : 卵黄嚢の短軸

(5) ふ化仔魚の無給餌生残指数 (Survival activity index: SAI)

それぞれのLotにおいてふ化直後の仔魚を200尾ずつ抽出した。それらを水温8℃に調温したろ過海水が入った15l水槽に収容し、無給餌飼育を行った。毎日一定時刻にへい死した仔魚をピペットで除去しながら計数し、次式により求めた。

$$SAI = \frac{\sum_{i=1}^k (N - h_i) \times i}{N}$$

N : 収容尾数, i : 飼育日数, h<sub>i</sub> : i日後の死亡数

(6) 実験データの解析

実験に使用した3歳~5歳魚雌の全長、体重、肥満度、またそれぞれの親魚群から得られた卵の卵体積と受精率、さらにふ化仔魚の全長、卵黄嚢体積、SAIについて、頻度分布によりロット間のばらつきを調べた。さらに親魚群間においてそれらの平均値の差を検定した。なお、有意差の判定には一元配置分散分析 (ANOVA) を用いた後、Tukey法により多重比較を実施した。

また、ふ化仔魚の活力指標であるSAIと、由来となっ

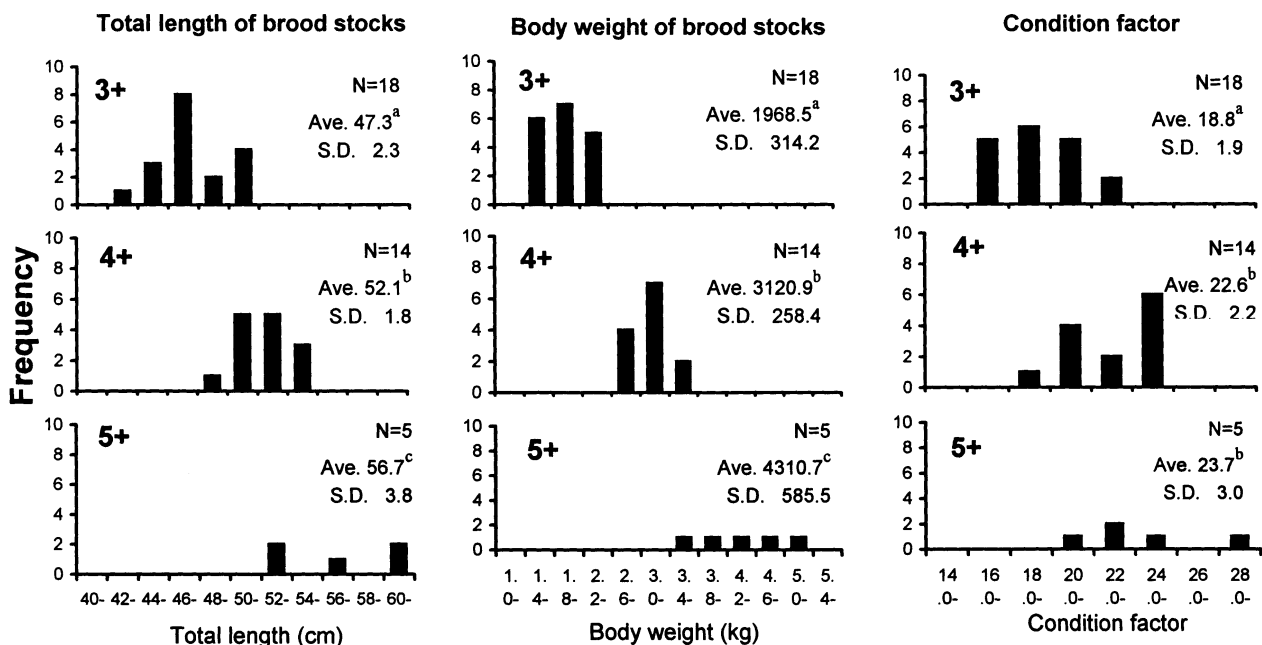


Fig25 Frequency distribution of total length (left), body weight (middle) and condition factor (right) from female barfin flounder aged 3-5 year old. Means with different letters are significantly different at the 0.05 level within each age of broodstock.

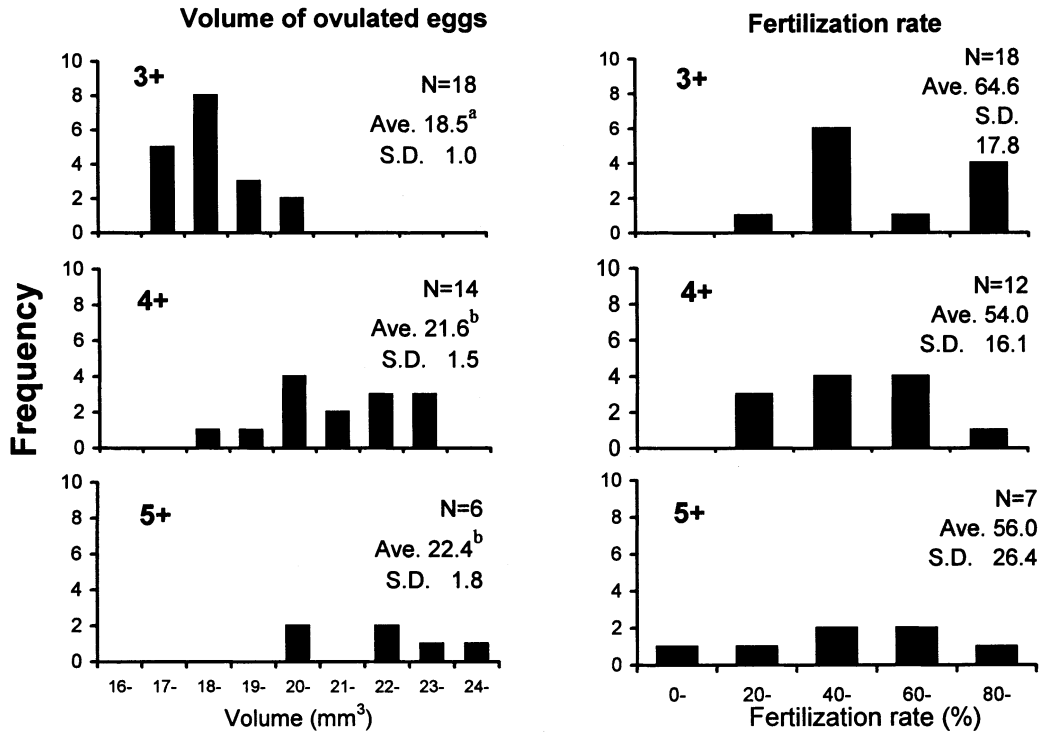


Fig.26 Frequency distribution of volume of ovulated eggs (left) and fertilization rate (right) from female barfin flounder aged 3-5 year old. Means with different letters are significantly different at the 0.05 level within each age of broodstock.

た親魚、卵およびふ化仔魚の性状との関係について、散布図および回帰分析により相互関係を調べた。さらに必要に応じて二元配置分散分析を行い、どの因子が最もSAIに影響を及ぼすかについて解析した。

結 果

1. 年齢が異なる親魚から得られた卵およびふ化仔魚の性状

Fig.25に3～5歳の人工養成魚における採卵時（4月）の全長と体重、肥満度を示した。各年齢における平均全長および体重は、3歳魚で47.3±2.3cmおよび1,968.5±314.2g、4歳魚で52.1±1.8cmおよび3,120.9±258.5g、5歳魚で56.7±3.8cmおよび4,310.7±585.5gであり、いずれも加齢に伴って有意に値が高くなった（P<0.01）。また、経産魚である4歳および5歳魚は、初回産卵である3歳魚に比べて肥満度が有意に上回った（P<0.05）。

Fig.26に3～5歳魚から得た排卵卵の卵体積および媒精後の受精率を示した。それぞれの平均卵体積は、18.5±1.0mm<sup>3</sup>（3歳）、21.6±1.5mm<sup>3</sup>（4歳）および22.4±1.8mm<sup>3</sup>（5歳）であり、3歳魚由来の卵は4歳および5歳魚由来に比べて卵体積が有意に小さかった（P<0.01）。また、3歳魚由来の卵は平均受精率がやや高い傾向がみられたが、親魚群間で明確な違いはみられなかった。さ

らに、3歳魚群において受精率およびふ化率と卵体積との関係を調べた。その結果、受精率およびふ化率は卵体積18.3～19.5mm<sup>3</sup>の範囲においてピークを示し、卵サイズがこの範囲より大きい、または小さいほど受精率が低下する傾向がみられた（Fig.27）。

Fig.28に3～5歳魚由来のふ化仔魚の全長、卵黄嚢体積およびSAIを示した。仔魚の平均全長は、3歳魚由来で5.58±0.17mm、4歳魚由来で6.08±0.17mm、5歳魚由来

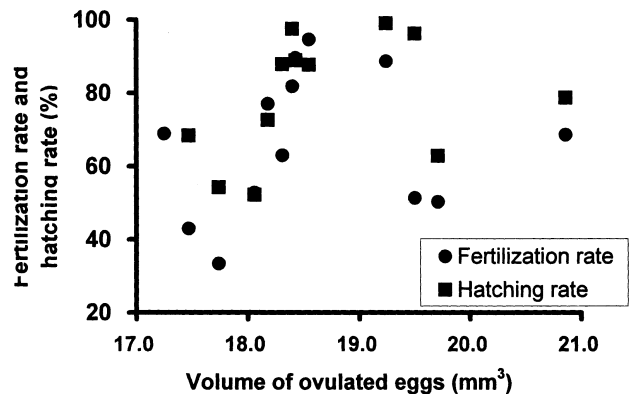


Fig.27 Relationship between volume of ovulated eggs and fertilization rate, hatching rate in 3+ broodstocks group.

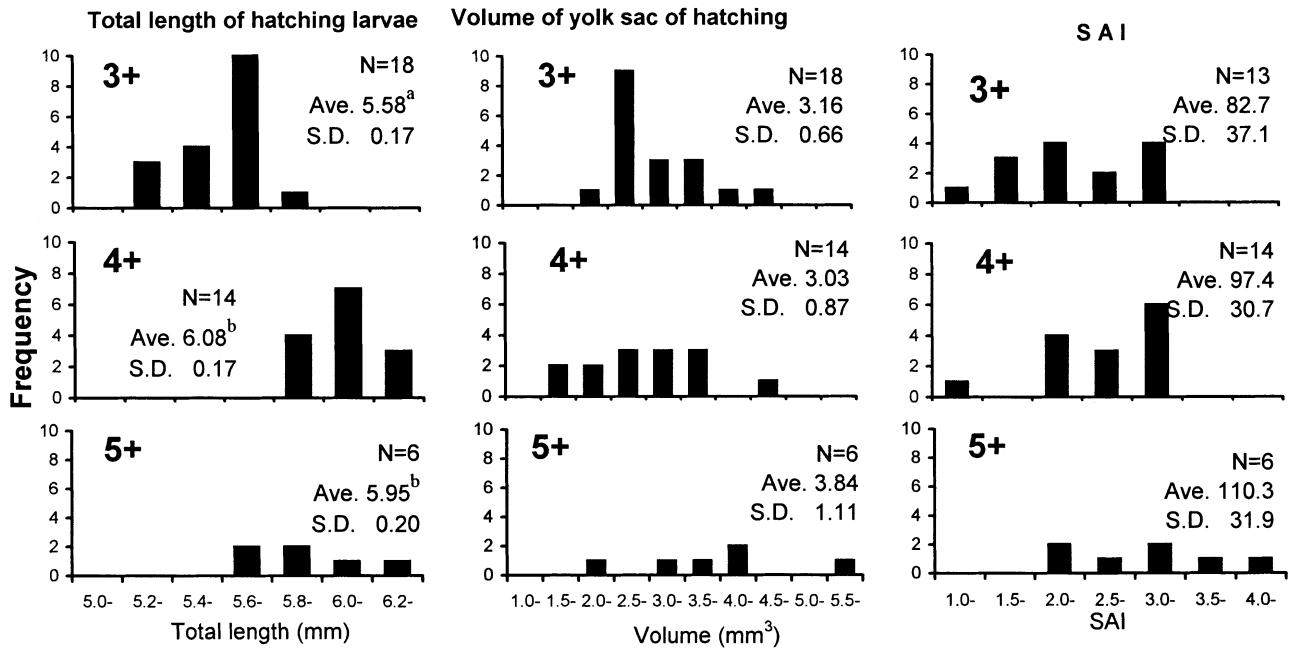


Fig.28 Frequency distribution of total length (left), volume of yolk sac (middle) and SAI (right) of hatching larvae obtained from female barfin flounder aged 3-5 year old. Means with different letters are significantly different at the 0.05 level within each age of broodstock.

で $5.95 \pm 0.20$ mmであった。4歳および5歳魚由来の仔魚間では全長に明確な差はみられなかったが、3歳魚由来の仔魚はそれらに比べて有意に値が小さかった ( $P < 0.01$ )。また、卵黄嚢の体積は、いずれの親魚群でも個体間で幅が大きく、親魚群間で平均値に有意な差はみられなかった。さらに各群のふ化仔魚のSAIを比較したところ、SAI値の範囲は3歳魚由来の仔魚で4.7~126.5、4歳魚由来の仔魚で29.4~138.2、5歳魚由来の仔魚で75.3~156.0であり、同一群内でも値にバラツキがみられた。そのため、統計学的に有意差はみられなかったが、親魚の年齢が高くなるほど仔魚の平均SAI値が高くなる傾向がみられた。

## 2. 仔魚のSAIと親魚、卵およびふ化仔魚の性状との相関

Fig.29にふ化仔魚のSAIと、由来となった親魚の全長、体重と肥満度、卵体積、受精率、ふ化直後の仔魚の全長と卵黄嚢体積との関係を示した。親魚の全長、体重および肥満度のいずれにおいてもその分布に一定の傾向は認められず、親魚の形態的特性から産まれてくる仔魚のSAIを推測することは難しいと考えられた (Fig.29A,29B,29C)。また、卵体積、受精率および卵黄嚢体積においても同様であり、SAI値との間に明確な関連性は認められなかった (Fig.29D,29E,29G)。一方、ふ化直後の仔魚の全長とSAI値を比較したところ、いずれの年齢においてもふ化直後の全長が大きい仔魚ほどSAI値が高い傾向が認められた (Fig.29F)。回帰直線における決定係数 $R^2$ と相関係

数 $r$ はそれぞれ0.38~0.68および0.62~0.83であり、ふ化仔魚全長とSAIとの間に有意な正の相関関係が認められた ( $P < 0.01$ )。

また、ふ化仔魚全長 (要因1) および卵体積 (要因2) を変動要因として2要因の分散分析を行い、それぞれがSAIに及ぼす影響、またはそれらの交互作用があるかどうかについて詳しく調べた。3歳および4歳魚群において、ふ化直後全長も卵体積も小さかったロット (Group A)、ふ化直後全長は大きかったが卵体積は小さかったロット (Group B)、ふ化直後全長は小さかったが卵体積は大きかったロット (Group C) およびふ化全長、卵体積ともに大きかったロット (Group D) を2ロットずつ抽出し、解析に供した (Fig.30, Table 2)。その結果、3歳および4歳魚由来のいずれにおいても、卵体積の大小と仔魚のSAIとの間に有意な関連性はみられなかったが、一方、ふ化直後の仔魚の全長はSAIに影響する因子であることが示された ( $P < 0.05$ , Table 3 a,b)。また、これらの2要因による交互作用はみられなかった。

## 3. ふ化仔魚全長に影響する要因の推定

ふ化仔魚サイズに関わる要因について調べるため、ふ化時の仔魚の全長と各性状データとを比較した。3~5歳魚由来の仔魚全体を通して関連性を調べたところ、ふ化仔魚の全長は親魚の肥満度との間に直線回帰を示し (相関係数 $r = 0.629$ )、肥満度が高い親魚ほどサイズが大きいふ化仔魚を産出するという正の相関が認められた ( $p < 0.01$ , Fig.31A)。また、相関係数がやや劣るが、ふ化

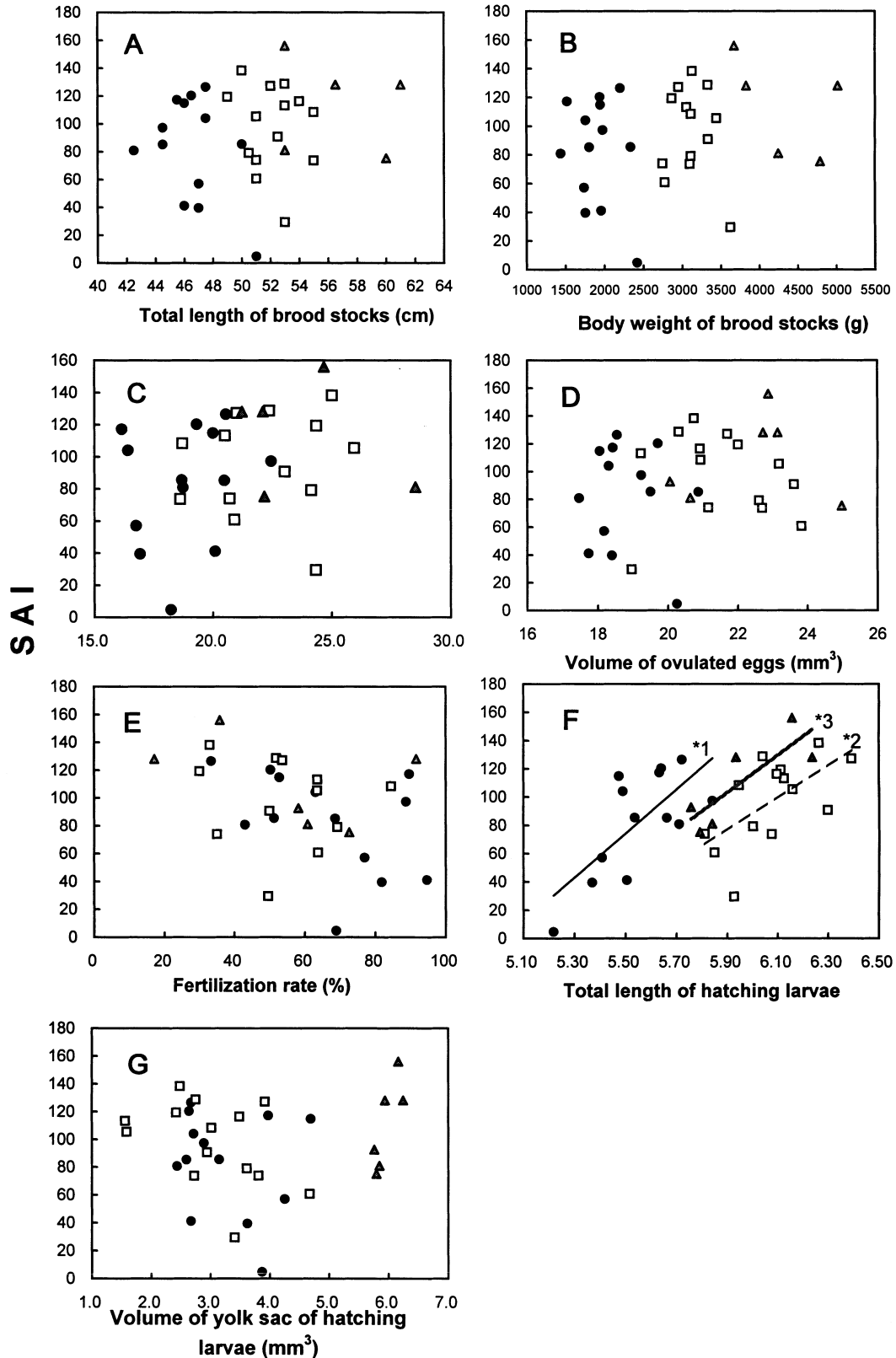


Fig.29 Relationship between SAI (vertical axis) and total length (A), body weight(B) and condition factor(C) of broodstocks, egg volume (D), fertilization rate(E), total length(F) and yolk sac volume(G) of hatching larvae. Closed circle, data from 3+ group; Open square, data from 4+ group; Hatched triangle, data from 5+ group. \*1: regression line from data of 3+ group.  $y = 155.77x - 782.53$ ,  $R^2$  (regression parameter) = 0.50,  $r$  (correlation coefficient)=0.71( $P < 0.01$ ). \*2: regression line from data of 4+ group.  $y = 115.03x - 601.85$ ,  $R^2 = 0.39$ ,  $r = 0.62$  ( $P < 0.01$ ). \*3: regression line from data of 5+ group.  $y = 132.37x - 677.84$ ,  $R^2 = 0.68$ ,  $r = 0.83$  ( $P < 0.01$ ).

仔魚全長は卵体積とも正の相関を示し、受精時の卵サイズが大きいほどふ化仔魚も大型化する傾向がみられた ( $p < 0.01$ , Fig.31B)。さらに、ふ化直後における卵黄嚢の体積と全長との関係を調べた (Fig.32)。その結果、いずれの年齢群においてもふ化時に全長が大きい仔魚ほど卵黄嚢体積が小さい傾向があり、これらの間に直線的な反比例関係が確認された (相関係数  $r = -0.663 \sim -0.440$ )。

考 察

本研究では、初回産卵を迎えるマツカワ3歳魚、2回目および3回目の産卵となる4歳魚および5歳魚において、その形態的特性や産出される卵、ふ化仔魚の性状の違いについて比較した。採卵時(4月)における親魚の全長、体重および肥満度を比べたところ、いずれの項目においても加齢するほど平均値が高くなり、中でも3歳魚は他に比べて体サイズが明らかに小さかった。また、排卵卵の

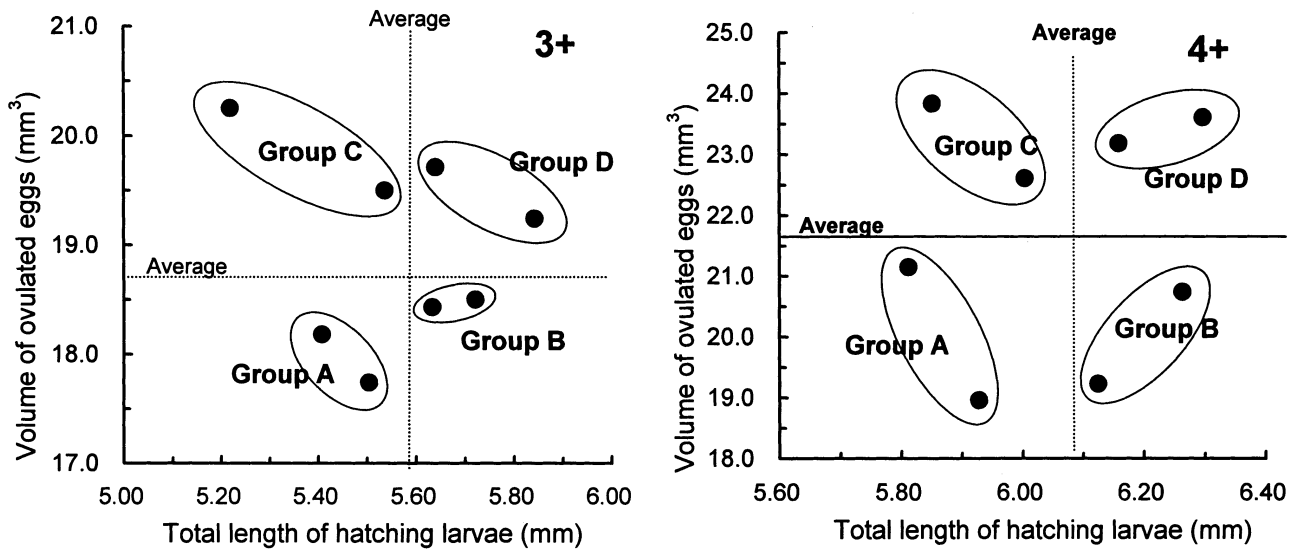


Fig.30 The lot. from 3+ and 4+ broodstock used for analysis of relation between SAI and total length of larvae or volume of ovulated eggs. In the lots selected as group A, both egg volume and total length of hatching larvae were lower than average value. In the lots selected as group B, their egg volume were lower, but, total length of hatching larvae were higher than average value. Oppositely, In the lots selected as group C, their egg volume were higher, but, total length of hatching larvae were lower than average value. In the lots selected as group D, both egg volume and total length of hatching larvae were higher than average value.

Table2 Data of the lots sampled for the analysis of the relation between SAI and total length of hatching larvae or egg volume.

Age	Group	Lot	SAI	Total length of larvae (Factor 1)		Volume of ovulated egg (Factor 2)	
				Mean (mm)	character	Mean (mm <sup>3</sup> )	character
3+	A	1	57.18	5.41	small	18.18	small
		2	41.18	5.50	small	17.74	small
	B	3	126.51	5.72	large	18.50	small
		4	117.25	5.63	large	18.43	small
	C	5	4.74	5.22	small	20.25	large
		6	85.54	5.54	small	19.50	large
	D	7	97.34	5.84	large	19.24	large
		8	120.29	5.64	large	19.71	large
4+	A	1	29.43	5.93	small	18.96	small
		2	73.99	5.81	small	21.15	small
	B	3	138.21	6.26	large	20.74	small
		4	113.19	6.13	large	19.23	small
	C	5	60.75	5.85	small	23.83	large
		6	79.12	6.00	small	22.61	large
	D	7	119.25	6.30	large	23.61	large
		8	105.37	6.16	large	23.18	large

Table3 Result of the two-way ANOVA for analysing the relation between SAI and total length of hatching larvae or egg volume in 3+ and 4+ broodstock groups.

Age	Source of variation	sum of squares	degrees of freedom	Mean squares	F value	level of significance
3+	Total length (1)	9298.39	1	9298.39	10.057	*0.05
	Volume of ovulated egg (2)	146.21	1	146.21	0.158	
	Interaction (1 x 2)	40.68	1	40.68	0.044	
	Error	3698.45	4	924.61		
	Total	13183.73	7			
4+	Total length (1)	6770.40	1	6770.40	17.240	*0.05
	Volume of ovulated egg (2)	11.69	1	11.69	0.029	
	Interaction (1 x 2)	499.75	1	499.75	1.272	
	Error	1570.85	4	392.71		
	Total	8852.70	7			

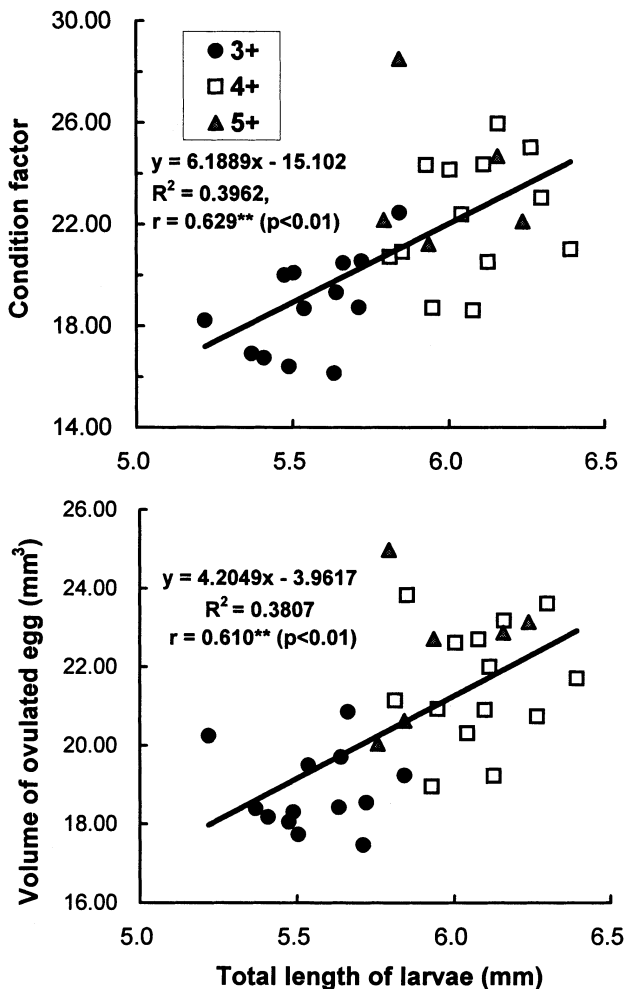


Fig.31 Relationship between larval total length just after hatching and (A) condition factor of female broodstock, (B) volume of ovulated egg.

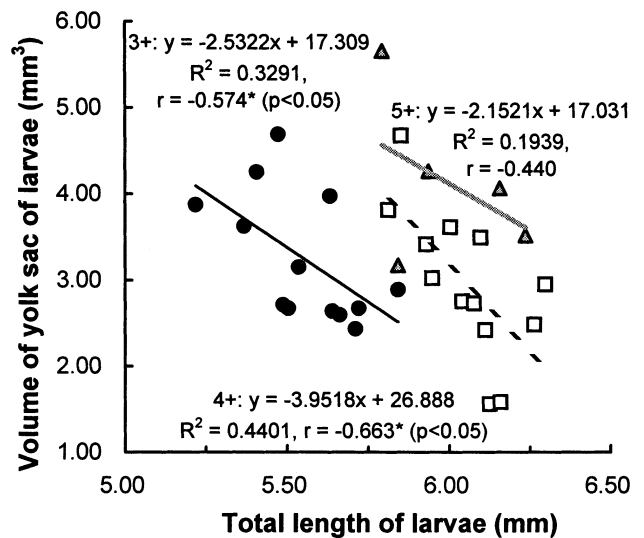


Fig.32 Relationship between larval total length just after hatching and volume of yolk sac just after hatching.

性状を比較した結果、卵体積は親魚の年齢が高いほど増加する傾向があり、3歳魚においては卵サイズが有意に小さかった。さらに、ふ化直後の仔魚サイズにも明らかな違いが認められ、4歳および5歳魚由来の仔魚は3歳魚由来の仔魚に比べて平均全長が有意に大きかった。従って、マツカワの場合、異なる年齢の親魚から産出される卵とふ化仔魚はその形態的性状に違いがあり、特に初回産卵である3歳魚は比較的小さい卵と仔魚を産むと考えられる。

一般に多くの魚類において、卵のサイズはその種ごとに定められた範囲内で多様に変異することが知られている<sup>57,60</sup>。その変動要因は魚種によって様々であり、系群など地理的な変異<sup>61</sup>、産卵時期<sup>62</sup>、親魚の栄養状態、成熟

産卵様式の違い、水温などの非生物的要因<sup>63-65</sup>などの影響が示唆されている。本研究では、水温、塩分、餌料環境がほぼ同一の条件下で養成した人工養成マツカワを用い、且つ産卵初期に限定して排卵卵を人為的に採取した。そのため、産卵時期や物理的環境因子が各年齢群間の卵サイズの差に影響したとは考えにくい。また、数種の魚類では、親魚の年齢と卵サイズとの間には一定の関係がみられている。本種と同様にプレイスでは高齢魚は若齢魚に比べ卵サイズが大きい<sup>66</sup>が、反対にキジハタでは加齢に伴って卵サイズが小型化することが報告されている<sup>67</sup>。これらには、魚種間における成熟や繁殖様式の違いが強く関わっていると思われる。本種の場合、サイズが大きい卵を産出した4歳および5歳魚群は、3歳魚群よりも肥満度が有意に高かった。肥満度は母体の栄養蓄積量を総合的に表す一つの指標であり、これらの親魚群間では栄養状態に明白な差があったと考えられる。カタクチワシ<sup>68</sup>やマダラ<sup>69</sup>では、親魚の餌料環境が良いほど卵サイズが大型化することが報告されており、母体の栄養状態が卵サイズに関わることが示唆されている。また、第II章1節において、周年高水温で飼育し成長を促進したマツカワ雌では、通常成熟しない1歳時の段階から卵黄形成が開始された。そのため、本種においても親魚の成育度合いや栄養学的な要因が卵黄形成や卵成熟といった卵サイズを決定するプロセスに強く関連している可能性がある。

また、本実験では統計学的有意差は認められなかったものの、親魚が加齢するほどSAIが高い仔魚が得られる傾向がみられた。親魚の加齢によってなぜ仔魚の活力が高まるのかは明らかではないが、おそらく卵体積やふ化時の仔魚サイズ等の違いが関連していることが推測される。この点については後段で改めて考察する。

一般に種苗生産施設において、卵またはふ化仔魚の飼育許容数や生産コストには限りがある。そのため、ふ化仔魚の活力が高く生残に優れた良質ロットのみを選択することが望ましい。本研究では、ふ化仔魚の活力を現す指標として仔魚のSAIに注目した。33ロット分のふ化仔魚について、SAI値と由来となった親魚と卵、さらにふ化直後における仔魚の形態測定データ（全7項目）を比較した。その結果、いずれの年齢群においてもSAIはふ化仔魚の全長と高い正の相関を示し、仔魚サイズが大きいほどSAIが優れていることがわかった。また、卵体積とふ化仔魚全長を変動要因として2要因分散分析を行った結果、3歳魚および4歳魚由来の仔魚いずれにおいても、ふ化仔魚全長はSAIに強く影響する要因であることが示されたが、卵体積とSAIとの間に有意な関係は認められなかった。これらの結果から、本種の場合、ふ化直

後における仔魚の全長はその後の生き残りを現す有効な指標であり、平均全長が大きいロットほど活力が高く生残能力に優れていると考えられる。

本研究と同様の現象は、大西洋ニシン<sup>61</sup>、テラピア<sup>70</sup>、大西洋マダラ<sup>63</sup>およびカタクチワシ<sup>71</sup>でも観察されており、大型仔魚ほど初期生残能力が優れていることが確認されている。一方、キジハタ<sup>72</sup>、ブリ<sup>73</sup>、カタクチワシ<sup>74</sup>においては、初期生残能力は卵サイズと正の相関を示すことが報告されている。これらの種は比較的卵黄量が少なく、ふ化後短期間の内に卵黄吸収を完了する。そのため卵黄の量や質に優れていることは生き残るうえで優位な形質と考えられる。他方、マツカワは卵黄量が多く、且つ生息水温も低いいため卵黄消費には長期を要する。摂餌を開始する12日齢にはわずかであるがまだ卵黄が残存している。そのため、SAIを活力指標とした場合、卵黄量の多少による影響は不明瞭なのかもしれない。併せて、今回、ふ化仔魚全長と卵黄囊体積との関係を調べたところ、負の相関関係が認められ、大型の仔魚は卵黄量が少なく、小型の仔魚は多くの卵黄を有していた。このことはマツカワ仔魚の初期生残には、摂餌を開始するまでの栄養源となる卵黄の残量よりも、より発育が進んだ形態で孵出することの方が重要であることを示唆している。水温8℃の場合では、通常、ふ化後0～9日間、仔魚は外部刺激には反応するものの活発な自発遊泳は認められず、水槽内の流れに任せて浮遊または飼育水の表層へ螺旋する<sup>15</sup>。体ができる限り発達した状態になって卵殻を出て外界で生活すること（ふ化時の体サイズが大きいこと）は、エアレーションや個体間同志の接触、水流などの物理的なショックに対して耐性が高く、このことが高SAIに繋がったのかもしれない。

ふ化直後における大型の仔魚は初期生残能力が高いことが示唆された。そこで、次にふ化仔魚のサイズを決定する要因について調べるため、由来となった親魚と卵の形態特性とふ化仔魚のサイズを比較した。その結果、ふ化仔魚の全長は、親魚の肥満度および卵体積と正の相関を示した。卵生硬骨魚類において、母体が保持する様々な栄養成分は卵形成過程を通して卵母細胞へと移行し、排卵・受精後、その一部は胚発生に、残りはふ化後の栄養源として利用される。そのため、卵内栄養成分の量または質は発生過程に強く影響することが想像される。また、本研究では、いずれの年齢群から産まれた仔魚でも、ふ化時の全長と卵黄囊の体積との間に負の相関が認められた。この結果から、大型の仔魚は胚発生過程において卵内栄養成分を活発に利用しスムーズに胚体成長へと繋げることができたが、一方、小型仔魚はその利用吸収能が劣り、成長が十分に至らなかった可能性も考えられる。



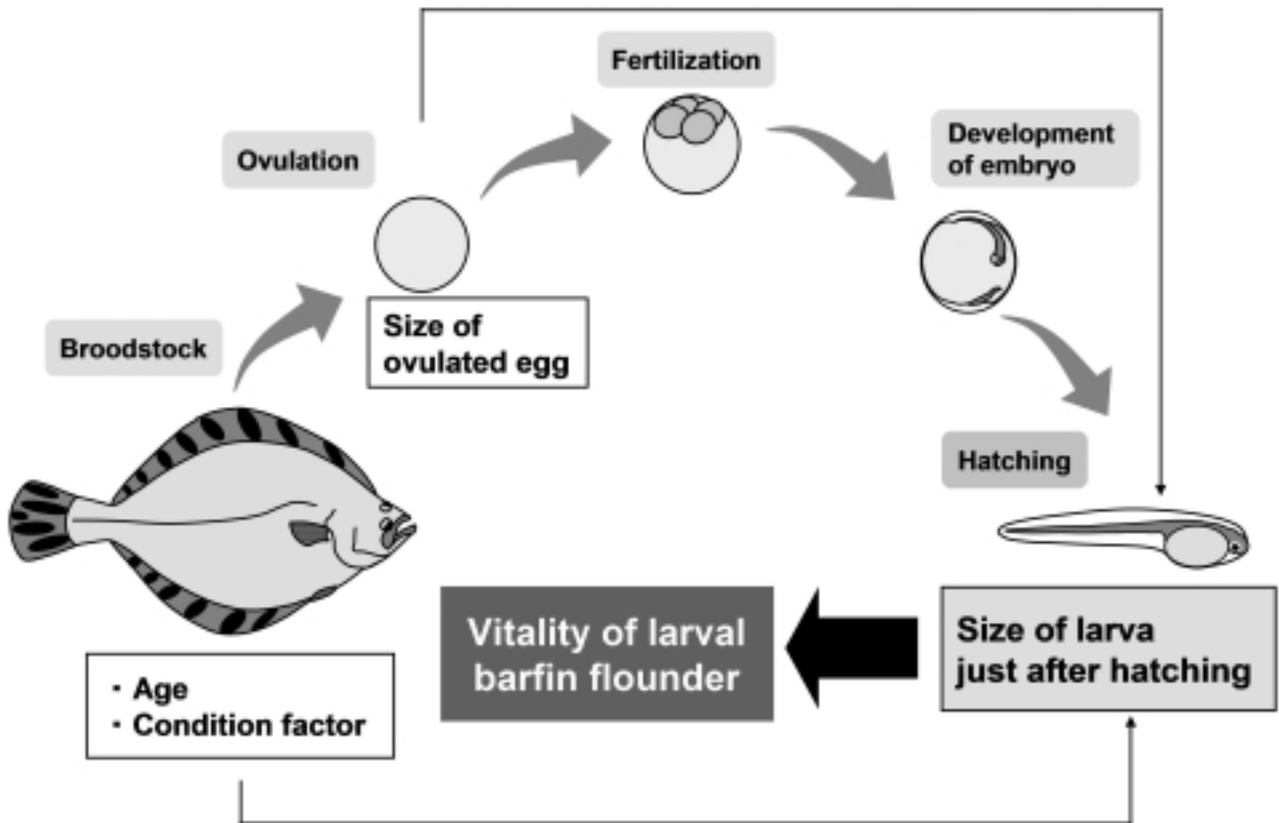


Fig.33 Schematic illustration of the relation between viability of larval barfin flounder and characteristics on broodstock, egg and larvae.

Ohkubo & Matsubara<sup>74)</sup>は、胚発生と卵黄吸収期におけるマツカワ卵および仔魚中のリポビテリン（本種の主要な卵黄タンパク）、脂質、遊離アミノ酸量の消長を解析した。その結果、本種の場合、受精からふ化までの間、リポビテリンと脂質含有量はほとんど変化しないが、遊離アミノ酸量は受精4日後から急速に低下し、ふ化した時点では受精時の13%程度となっていることが示された。このことは、遊離アミノ酸のみが胚発生の進行に積極的に利用されていることを明確に示している。卵内の遊離アミノ酸は、卵黄タンパクが最終成熟期において低分子化される際に発生する<sup>29)</sup>。従って、可能性の一つとして、親魚の栄養状態が優れていること（肥満度が高いこと）は卵黄形成の促進および卵成熟の正常化に繋がり、その結果、卵内の遊離アミノ酸量が増加してふ化仔魚の大型化をもたらすことが考えられる。親魚の栄養と卵およびふ化仔魚の質との関係については今後詳細に検討する必要がある。

以上の結果、ふ化直後のマツカワ仔魚の全長はSAIと強い正の相関があり、ふ化仔魚の活力を図る指標として有効であることが示された (Fig.33)。このことから、種苗生産現場において、初期減耗の発生を効果的に防ぐ方

法として、①比較的大きい仔魚を産出する産卵経験魚（4歳魚以上）から採卵すること、また②できるだけ多くの個体から卵を得、ふ化直後の仔魚サイズが大きいロットを選択して飼育に供することが有効と考えられる。また、今回、SAIと親魚の肥満度および卵体積との間に明瞭な関係は認められなかったが、これらは仔魚サイズを決定する要因であり、間接的に仔魚の初期生残に関わっている可能性が示された。従って、親魚の栄養条件の改善によってふ化仔魚の大型化、並びに活力向上を促すことができるかもしれない。本種の種苗生産の場合、産卵経験魚は活力が優れた仔魚を産出すると考えられるが、同個体から複数回、繰り返して採卵に用いると、親魚に対して多大なストレス与えることとなり、免疫力の低下からウイルス性疾病の発生も懸念される。従って、防疫上の観点からも、初回産卵魚でも活力が高い仔魚を得られるように技術開発を進める必要がある。この取り組みについては次節で述べる。

本研究では、他魚種の研究例に習い、仔魚の初期生残能力を現す指標としてSAIを採用した。マダイ<sup>75)</sup>やカタクチイワシ<sup>76)</sup>等、比較的卵サイズが小さく、卵黄吸収完了までの期間も短い種において、SAIは親魚や卵の形質

および栄養分組成をよく反映することから、仔魚の初期生残能力を現す指標として有効である。一方、マツカワは大型の卵を産み、且つ冷水性であるため卵黄吸収期が長いことから、SAIはこのような指標としては精度が悪いことも考えられる。今後、本種仔魚により適合した生残能力の判定指標についても検討を続けることが必要であろう。

### 第3節 低水温期間の加温養成による卵質改善

本章第2節において、初回産卵である3歳魚から得られる卵とふ化仔魚は、産卵経験魚（4歳以上）のそれと比べてサイズが小さく、また、ふ化後の初期生残能力が劣る傾向がみられた。従って、後者から得た受精卵を選択し種苗生産に用いる方が初期減耗が少なく生産効率が高いと考えられる。一方、本種雌は飼育環境下でも連続的に排卵するが、放卵が自発的に起りにくい。そのため、人為的に卵を搾出しない限り、体内で過熟化し卵質が著しく劣化する（本章1節）。特に経産個体においては、前年の産卵期に放出できなかった卵が消化、吸収されないまま卵巣腔内で残存している現象が認められ、これらは産卵不調の原因となりうる。一方、3歳魚においては上述のような難点はなく、人工受精における受精率も総じて高い。そのため、親魚養成条件の改良によって3歳魚からもふ化後の活力が高い良質卵を採取することが望まれる。

前節で親魚の肥満度とふ化仔魚サイズとの間には正の相関関係が認められ、母体の栄養状態はふ化仔魚の性状に何らかの影響を及ぼすことが示唆された。そこで本研

究では、成長が停滞する低水温期に加温養成を行い、通常よりも成長を促進させた親魚の卵・ふ化仔魚の性状について調べ、低水温期加温養成による卵質改善の可能性について検討した。

### 材料と方法

#### 1. 供試魚および養成条件設定

実験には、1996年、1997年および1998年に栽培センターで種苗生産した0歳の稚魚を用いた。各年ごとに異なる水温条件下で養成した。Fig.34に各飼育群における養成水温の変化を示した。いずれの群も、仔稚魚の性分化が完了する全長35mm（0歳8月）までは15℃以下に調温して養成した。その後、A群（1997年産）では採卵を行う3歳4月まで北海道噴火湾の自然海水の水温変動で飼育した。また、B群（1998年産）およびC群（1996年産）も自然海水温による飼育を基本としたが、これらの場合、水温が7℃以下となり摂餌が鈍化する低水温期（12月～4月）に約8～10℃まで昇温した。B群は0歳時の低水温期間のみ、またC群は0歳時および1歳時の低水温期間に加温飼育を行った。いずれの群も採卵の直前である2歳時の低水温期間には加温飼育を行わなかった。餌料として市販の配合飼料（ヒガシマル、鹿児島）を週6日間飽食量給餌した。

#### 2. 親魚、卵およびふ化仔魚の性状

親魚が満3歳になった4月、本章2節で示した手法により各群5～6尾の雌から卵を得、人工授精を行いふ化仔魚を得た。また、第2節と同様の方法によって雌親魚の全長、体重、肥満度、卵体積、ふ化仔魚全長、卵黄囊

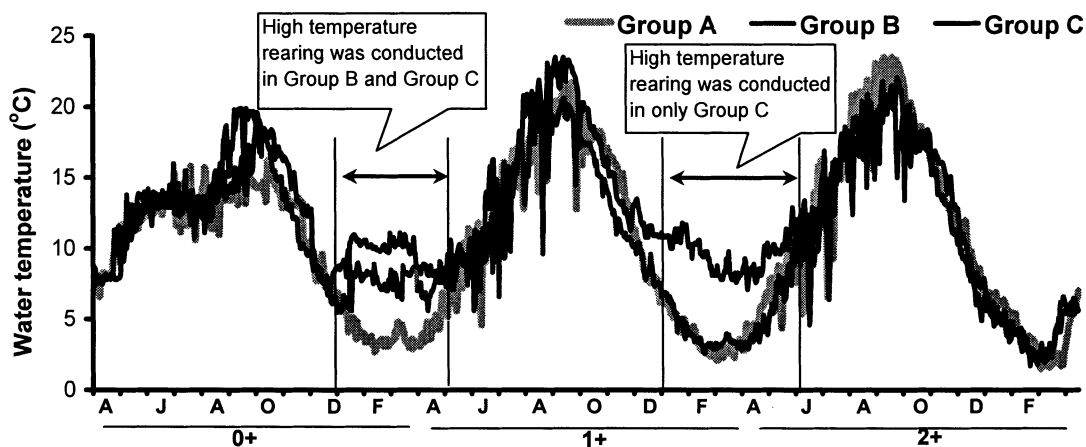


Fig.34 Seasonal changes in rearing temperature of each experimental group.

Group A, broodstocks were reared at ambient sea water temperature throughout experimental term;  
Group B, high temperature rearing was conducted in winter season when broodstocks were one year old;  
Group C, high temperature rearing was conducted in winter seasons when broodstocks were one and two year old.

の体積, SAIを求めた。

### 3. 統計学的解析

データは平均値±標準偏差で表した。実験区間におけ

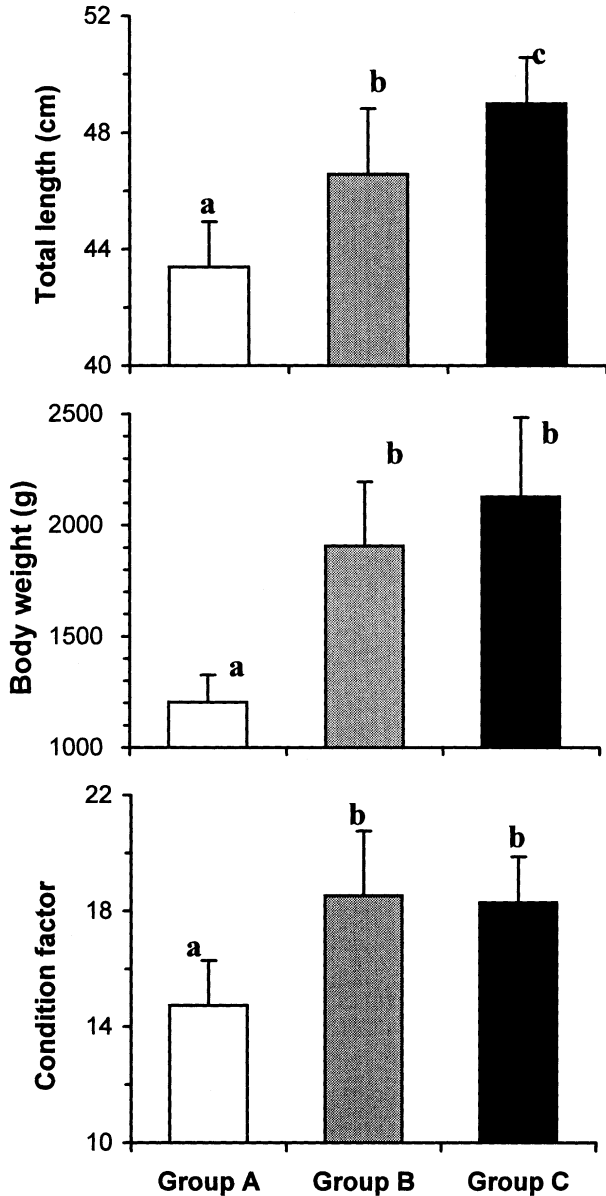


Fig.35 Total length, body weight and condition factor of female barfin flounder reared at 3 different temperature regime. Group A, broodstocks were reared at ambient sea water temperature throughout experimental term; Group B, high temperature rearing was conducted in winter season when broodstocks were one year old; Group C, high temperature rearing was conducted in winter seasons when broodstocks were one and two year old. Sampling was conducted when fish became 3 year old in April. Values represent the mesn ±SD of 5-6 female. Means with different letters were significantly different at the 0.05 level within each experimental group.

る統計学的有意差の有無は一要因の分散分析を行った後, Tukey法により多重比較を行った。また, 2群間のデータを比較する際にはt-test, またはMann-whitney testを用いた。

### 結 果

#### 1. 雌親魚の成長の比較

養成期間を通して加温飼育を行わなかったA群においては, 水温が低下する秋季から冬季にかけて摂餌が鈍化し, 7℃以下になると完全に摂餌が停止した。一方, 低水温期間, 8℃以上に加温飼育したB群とC群では, 摂餌量はやや少ないものの冬季間も摂餌を続けた。採卵時(満3歳4月)における雌親魚の全長, 体重および肥満度を比較した結果, それぞれA群では43.4±1.6cm, 1201.2±122.4gおよび14.7±1.1, B群では46.6±2.2cm, 1907.3±287.8gおよび18.5±1.6, C群では49.0±1.6cm, 1907.3±287.8gおよび18.3±4.0であり, いずれもA群はB群およびC群に比べて有意に値が小さかった (P<0.01, Fig.35)。また, B群とC群の雌親魚間において, 肥満度に明確な差はみられなかったが, C群はB群よりも平均全長 (P<0.05) と体重が上回った。

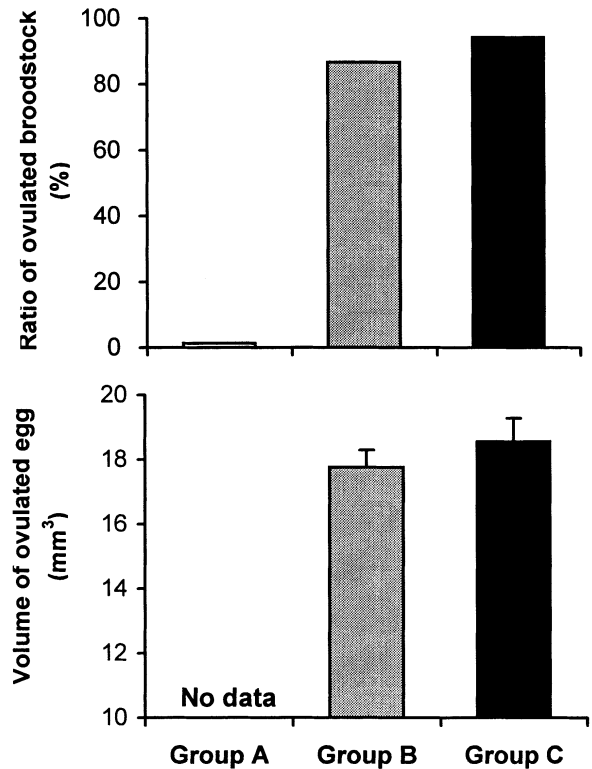


Fig.36 Ratio of ovulated broodstock and volume of ovulated egg of female barfin flounder reared at 3 different temperatures regime.

## 2. 雌の成熟個体率および卵体積の比較

満3歳になった4月に、いずれの群においても全ての雄は成熟し精子を得ることができた。B群およびC群において、雌の成熟個体率はそれぞれ86.7%および94.2%であり、ほぼ全ての雌が正常に成熟し排卵した (Fig.36)。一方、A群では成熟に達した個体は52尾中わずか2尾のみであり、それら成熟個体も排卵しなかったため採卵することができなかった。A群雌の卵巣の状態を組織観察したところ、卵母細胞はすべて周辺仁期であり、卵黄形成は開始していなかった。また、A群の雌をそのまま継続して飼育した結果、卵黄形成を経て卵成熟が進み、満4歳になった翌年4月に採卵することができた。

B群とC群から得られた排卵卵の体積を比較した結果、C群で平均卵体積がやや上回ったが、これらの間に有意な差は認められなかった (Fig.36)。

## 3. ふ化仔魚全長、卵黄嚢体積およびSAIの比較

ふ化開始から24時間後における仔魚の形態を比較したところ、C群の仔魚はB群よりもふ化時の全長が有意に上回った ( $P < 0.05$ , Fig.37)。卵黄嚢体積に関しては、2群間で有意差はみられなかったが、C群の仔魚はB群よりも値が下回る傾向がみられた (Fig.37)。

B群およびC群の仔魚においてSAIを調べた結果、B群では13.4~126.5 (平均 $82.7 \pm 37.2$ )、C群では65.9~143.2 (平均 $112.57 \pm 35.9$ )であった (Fig.38)。ロット間でバラツキが大きい有意とはいえないが、C群の方が総じてSAIが高い傾向がみられた。また、これらと前節で示した4歳魚および5歳魚由来のふ化仔魚のSAIを比較した。その結果、B群は4歳魚および5歳魚由来のそれより平均SAI値が劣る傾向がみられたが、一方、C群は両年齢群と同等か、またはそれを上回った。

## 考 察

自然海水の水温下でマツカワを飼育した場合、秋季以降の水温低下に伴って摂餌が徐々に減退し、7℃以下になると投じた餌料にも全く反応を示さなくなった。一方、摂餌限界水温となる冬季から初春の間、8~10℃まで加温して飼育すると親魚は周年を通して摂餌を続け、その結果、加温飼育群は自然海水温群に比べて優れた成長を示した。さらに2シーズンの低水温期を加温した群は1シーズンのみ加温した群よりも成長が良かった。従って、低水温期間のみ一時的に加温する養成方法は、マツカワ親魚の成長を促進する手法として効果的である。

B群およびC群では、満3歳になった4月にほぼ全ての雌個体が排卵した。これに対し、加温飼育を行わず成長が劣ったA群においては、卵黄形成が開始せず、排卵

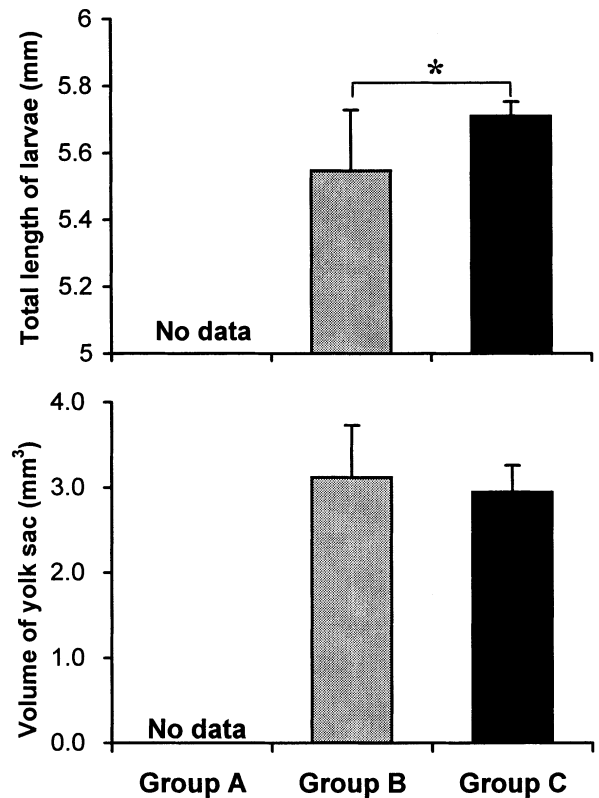


Fig.37 Total length and volume of yolk sac of hatching larvae obtained from female barfin flounder reared at 2 different temperatures regime.

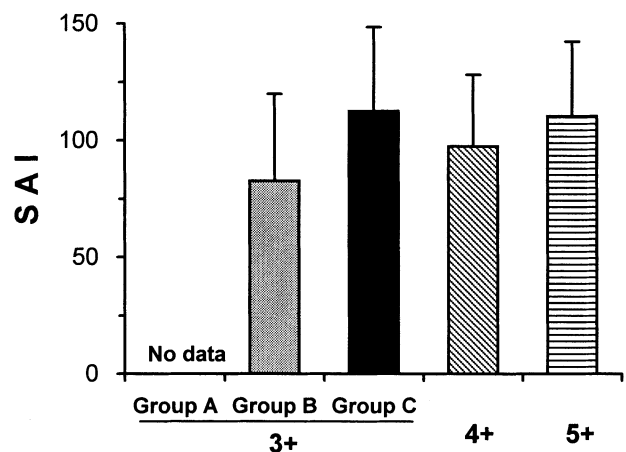


Fig.38 SAI of hatching larvae obtained from female barfin flounder reared at 2 different temperatures regime.

卵を得るには至らなかった。一般に、魚類の生殖腺の発達過程には親魚の成長度合いや栄養状態も深く関連することが知られている<sup>35)</sup>。サケ・マス類では、給餌頻度や給餌量を高めて成長を促進させると、通常よりも早い年齢から卵黄形成が開始し成熟、産卵に達する (早熟系サケマス)<sup>76)</sup>。また、多くの魚種において、特定の栄養素の欠乏等、不適切な栄養環境条件下では成熟不良が頻繁に生じることも報告されている<sup>77-79)</sup>。取り上げ時に、A群の

雌は正常に成熟した他群の雌に比べ全長が約3～6cm下回っていた。そのため、2歳時（本来卵黄形成が進む時期）までの栄養成分の蓄積が不十分であったことに併せて、性成熟に関連する諸器官の機能発達も極めて遅れていたと推察され、結果として初回成熟年齢が一年遅れたものと思われる。

B群およびC群から得られた卵およびふ化仔魚の性状を比較した結果、両群間で卵の体積には明確な違いはみられなかった。一方、C群由来の仔魚はふ化時の全長がB群由来の仔魚に比べて有意に大きく、さらにSAI値も上回る傾向がみられた。本章第2節において、親魚の肥満度とふ化仔魚の全長との間に正の相関が認められ、親魚の栄養状態の良否が産出されるふ化仔魚のサイズに影響することが示唆されている。さらにふ化仔魚全長とSAIとの間にも正の相関関係が存在し、より発達した形態でふ出した仔魚の方が初期生残能力に優れていることも示されている。本結果は前節で示唆された仮説を支持するものであり、加温飼育によって親魚の成育が促進されたことが卵黄形成と卵成熟過程にプラスの効果をもたらした、その結果ふ化仔魚の大型化が促されてSAI値も高くなったと推測される。

また、B群とC群のふ化仔魚を経産魚である4歳魚と5歳魚由来の仔魚と比較した。その結果、C群仔魚の平均SAI値は4歳魚と5歳魚のそれと同値か、またはわずかに上回った。この結果は、加温養成によって成長を高めることにより初回産卵である3歳魚からも経産魚と変わらない良質な仔魚を確保できることを明確に示している。一方、SAIは4歳魚および5歳魚由来の仔魚と同等であったが、C群仔魚のふ化時のサイズはそれらよりもやや小さかった（4歳魚由来6.0mm、5歳魚由来5.9mm）。このことは、C群でSAIが向上した理由として、仔魚が大型化したこと以外に加温飼育によって何か別の好適作用が起った可能性を示唆している。現在のところ、これらの要因については特定できないが、他魚種では卵黄中におけるタンパク質や脂質などの栄養成分の質（組成）が胚発生やふ化およびふ化後の仔魚の生残に影響すると考えられている<sup>80, 81)</sup>。本種の場合、卵黄中のタンパク質および脂質は主にふ化後、初回摂餌が始まるまでの期間の栄養源として利用される<sup>74)</sup>。加温養成によって摂餌量が増大化し、卵内へ移行する特定の栄養成分の量、または組成に変化が生じたことも想像される。この仮説を確かめるため、親魚に与える餌料が卵内栄養成分やふ化仔魚の初期生残に及ぼす影響について検討する必要がある。

#### 第4節 卵質に及ぼす親魚の餌料条件の影響

種苗生産や養殖を目的とした親魚養成において、給餌する餌料の質は対象魚の成長や肥育に関わるばかりではなく、性成熟に関連した様々な生理機構にも影響を及ぼす<sup>35)</sup>。数種の硬骨魚類では、得られる卵またはふ化仔魚の質的性状に餌料に含まれる種々の栄養素が影響していることが知られており<sup>82, 83)</sup>、近年は経済性や利便性のみならず、卵質の向上を重要視した養魚餌料の開発も進められている。

一方、マツカワの親魚養成において、餌料の質と性成熟または卵質との関連性を示した知見は全く無い。現在、数機関で種苗生産を目的とした親魚の飼育が行われているが、餌料は嗜好性、入手の可否、価格、飼育担当者の直感などにより決定されているのが現状である。いずれの機関でも地場で入手できる冷凍鮮魚、またはその加工品（モイストペレットなど）が主体であるが、これらは調餌などの作業労力やコストが過大であるのに併せて、種本来がもつ成育・成熟特性に合致しているかどうかは不明である。本章2節において、雌親魚の肥満度と得られるふ化仔魚のサイズとの間に一定の関係が認められ、母体の栄養状態が産出される卵とふ化仔魚の質に影響する可能性が示された。そのため、今後、良質卵を安定確保するためには、親魚に与える餌料が卵質に及ぼす影響を把握し、適正な給餌条件を確立する必要がある。そこで本節では、餌料別の飼育実験を行い、異なる餌料で養成した親魚から得た卵およびふ化仔魚の性状を比較した。さらに、天然海域で成育した天然魚および放流再捕魚の卵質を解析し、人工養成魚との差異について調べた。

#### 材料と方法

##### 1. 供試魚

餌料別飼育実験には、栽培センターで種苗生産した人工養成魚雌雄を用いた。満2歳になるまでの間は自然海水の水温変動を基本として飼育したが、12月～4月までの低水温期間は8～10℃となるように加温した。餌料は市販の配合飼料（ヒガシマル、鹿児島）とし、実験魚の成長や摂餌状況に併せて餌の粒径および投餌量を変化させた。実験開始時（満2歳4月）における平均全長および体重は34.3cmおよび637.8gであった。

天然成育個体の卵質調査においては、1997～1999年に北海道胆振および日高太平洋海域で漁獲されたマツカワ天然魚雌4尾および放流再捕魚雌3尾を用いた。Table 4に供試魚の形態測定データとそれぞれの漁獲状況を示した。漁獲海域は室蘭沖からえりも沖（庶野）までの太平洋岸であり、秋季から初冬にかけてサケ定置網、シシャ

モ桁網およびババガレイ刺し網によって漁獲された個体である。漁獲時の全長と体重は55.0~71.5cmおよび2,723~6,933gであり、生殖腺部位の膨らみ状態から第二次~第三次卵黄球期に達していると推測された。いずれも水揚げから栽培センターに輸送するまでの間は地先の漁業共同組合やウニ種苗生産施設内にて無給餌で蓄養されていた。500l活魚輸送タンクで当センターまで輸送し、体内標識を内殖した後、実験水槽である10 t FRP水槽に收容した。

## 2. 飼育実験条件

### (1) 餌料別飼育実験

1998年の4月に、容量8 tのキャンバス水槽3基に満2歳になった人工養成魚の雌を10尾、雄を20尾ずつ收容し実験区I~IIIとした。I区においては、従来、当センターで行ってきた生餌中心の給餌方法で養成した。すなわち、冷凍イカナゴ、チカ、アジ、エビジャコを週5日、日替わりで給餌した(イカナゴは2日/週給餌)。生餌を解冻後、餌料重量に対して1%のビタミンミックスと1%のガーリックパウダーを添着させて飽食量を投餌し

た(Table 5)。毎日残餌をサイフォンで除去するとともに残餌量を測定し、その値を参考にして翌日の給餌量を決定した。一方、4種の生餌の中で嗜好性が異なり摂食する餌料種に偏りがあることも推定された。そのため、II区においては、これらの生餌を均一に摂取できるようにモイストペレットを給餌した。冷凍イカナゴ：アジ：チカ：エビジャコ：魚粉マッシュを1：1：1：1：2の比率で粉碎、混合し、総重量の1%のビタミンミックスとガーリックパウダーを添加した後、ペレット作製用エクスクルーダーによってモイストペレットを作製した。給餌はI区と同様に週5日間行い、飽食量を与えた。またIII区では、市販のヒラメ用配合飼料を前2区と同様の方法で給餌した。いずれの区も北海道噴火湾の地先海水温のまま飼育したが、3月上旬からは最終成熟および排卵を誘起するため徐々に6℃まで昇温し、採卵期間は6℃のまままで飼育した。

### (2) 天然成育個体の卵質調査

栽培センターに移送した天然魚と放流再捕魚を10 t水槽に收容し、採卵まで全く餌料を与えずに飼育した。飼育水温は地先海水温としたが、3月上旬からは徐々に

Table 4 Details of the wild and recaptured barfin flounder used for the experiments.

Fish No.	Origin	Total length (cm)	Body weight (g)	Condition factor	Captive situation			
					Date	Site	Gear	Depth(m)
1	Wild fish	68.0	5023.0	16.0	99.10.29	Samani	Gill net	90
2	Wild fish	71.5	6933.0	19.0	99.12.3	Muroran	Set net	No data
3	Recaptured fish	60.0	3750.0	17.4	97.11.15	Sizunai	Set net	15
4	Recaptured fish	55.0	2723.0	16.4	99.10.27	Mukawa	Set net	12
5	Wild fish	63.0	4643.0	18.6	99.12.3	yufutsu		11
6	Wild fish	71.0	5407.0	15.1	98.11.20	Nikappu	Set net	20
7	Recaptured fish	62.0	3300.0	13.8	99.10.7	Syoya	Set net	30

Table 5 Food and initial data of female barfin flounder for feeding experiment.

Experimental group	I	II	III
<i>Diet</i>	Raw fish Japanese sand lance Japanese surfsmelt Yellowfin horse mackerel Shrimp ( <i>Crangon affinis</i> ) Vitamins	Moist pellet Japanese sand lance Japanese surfsmelt Yellowfin horse mackerel Shrimp ( <i>Crangon affinis</i> ) Fish meal mash Vitamins	Commercial dry pellet  HIGASHIMALU for Japanese flounder
<i>Initial data of experimental female fish</i>			
Total length (cm)	34.2±1.6	34.7±1.7	34.1±1.7
Body weight (g)	620.6±88.2	676.4±131.7	617.0±101.8
Condition factor*	15.5±1.1	16.1±1.2	15.5±1.0

\* : [Body weight(g) x 1000]/[Total length(cm)]<sup>3</sup>

6℃まで昇温した。

### 3. 親魚および卵、ふ化仔魚の性状

排卵が開始した雌親魚から本章2節で示した手法により卵を得、人工授精を行いふ化仔魚を得た。また、第2節と同様の方法によって雌親魚の全長、体重、肥満度、卵体積、受精率、ふ化率、ふ化仔魚全長、卵黄囊の体積、無給餌生残指数 (SAI) を求めた。

### 4. 餌料および卵中の脂質成分の分析

給餌した餌料と搾出した卵中の総脂質および脂肪酸の含有量、また脂肪酸組成を解析した。サンプル中の脂質はクロロホルム/メタノール混合液 (2 : 1 v/v) を用いる Folch *et al.*<sup>84)</sup> の方法によって抽出し、総脂質量を求めた。抽出した脂質は7%三フッ化ホウ素メタノールで脂肪酸メチルエステル化し、ガスクロマトグラフで脂肪酸組成を調べた。各脂肪酸量は容量既知である内部標準 (トリコサノエン酸) を基準として把握した。

### 5. 統計学的解析

データは平均値±標準偏差で表した。実験区間におけ

る統計的有意差の有無は一要因の分散分析を行った後、Tukey法により多重比較を行った。比率データに関しては、逆正弦変換を行い等分散性を確認した後、上法によって検定を行った<sup>85)</sup>。

## 結 果

### 1. 餌料別飼育実験

Table 6に給餌した餌料中の脂質含有量および脂肪酸組成を示した。餌料1gあたりの脂質含有量は配合飼料において最も高く、その値はモイストペレットの2倍以上であった。生餌の場合、種類によって脂肪酸組成に違いがみられ、n3系高度不飽和脂肪酸 (n3-HUFA) 含量はエイコサペンタエン酸 (EPA, 20:5n-3) を多く含むエビジャコにおいて最も値が高かった。エビジャコ以外の餌料ではドコサヘキサエン酸 (DHA, 22:6n-3) が主要であり、中でもチカ (生餌) と配合飼料はDHA含有比が顕著に高かった。

各実験区における摂餌状況を観察した結果、I区において摂餌が最も活発であり、エビジャコの嗜好性が特に強かった。採卵時における親魚の成長を比較した結果、III区において平均全長と体重が高かったが、実験区間で

Table6 Total lipid contents and fatty acid composition in lipid of each diets in feeding experiment.

	Diet I				Diet II	Diet III
	Japanese sand lance	Japanese surfsmelt	Yellowfin horse mackerel	Shrimp	Moist pellet	Dry pellet
<i>Total lipid (mg/g)</i>	No data	No data	No data	No data	38.1	91.7
<i>Fatty acid</i>						
14 :0	8.68	4.43	5.72	1.58	4.37	4.81
16 :0	12.31	14.96	20.66	14.37	21.28	18.33
16 :1 n-7	5.49	5.57	7.92	8.36	6.02	6.06
18 :0	1.44	3.50	5.61	2.96	4.64	4.93
18 :1 n-9	5.51	11.93	9.71	9.90	13.39	13.36
18 :1 n-7	1.20	3.04	2.82	8.05	3.66	3.01
18 :2 n-6	1.35	1.49	0.85	0.75	2.06	2.51
18 :3 n-3	1.18	0.92	0.58	0.15	0.73	0.63
18 :4 n-3	-	-	-	-	0.84	1.44
20 :1 n-9	8.83	4.62	1.87	1.01	0.63	1.90
20 :2 n-6	-	-	-	-	0.01	-
20 :3 n-6	-	0.09	0.09	0.09	0.06	0.11
20 :3 n-3	-	-	-	-	1.23	1.10
20 :4 n-6	0.34	1.63	1.07	2.38	0.60	0.07
20 :4 n-3	0.74	0.46	0.55	0.33	0.30	0.59
20 :5 n-3	8.34	10.50	11.42	22.64	10.71	10.38
21 :5 n-3	-	-	-	-	0.29	0.40
22 :5 n-6	-	-	-	-	0.20	0.42
22 :5 n-3	0.60	1.47	2.07	1.35	1.19	2.32
22 :6 n-3	10.74	16.93	13.38	10.43	11.44	15.06
n-3 HUFA	20.54	29.50	27.49	34.84	24.53	28.82
n-6 HUFA	0.51	2.35	1.58	3.11	1.50	1.63

Table 7 Results of analysing the quality of eggs and larvae obtained from the broodstocks fed 3 different diets in feeding experiment.

Experimental group	Diet I	Diet II	Diet III
<i>Broodstocks</i>			
Total length (cm)	44.5 ± 3.1	43.5 ± 1.9	47.5 ± 2.0
Body weight (g)	1989.8 ± 300.3	1764.2 ± #####	2003.8 ± 358.1
Conditon factor	19.4 ± 2.6	18.3 ± 1.5	18.9 ± 2.0
<i>Eggs</i>			
Volume (mm <sup>3</sup> )	19.7 ± 1.1	18.4 ± 0.8	18.6 ± 0.7
Fertilization rate (%)	72.3 ± 11.3	61.0 ± 17.3	67.2 ± 29.7
Hatching rate (%)	88.5 ± 10.2	70.7 ± 16.8	81.8 ± 18.7
Total lipid contents in 1g tissue (mg/g)	11.4 ± 4.2 a*	16.6 ± 7.8 ab	25.7 ± 5.5 b
Total fatty acid contents in 1g tissue (mg/g)	10.3 ± 2.1	13.2 ± 8.1	15.2 ± 4.3
Total fatty acid contents in 1g lipids (mg/g)	938.6 ± 141.3	771.2 ± #####	592.6 ± 107.4
n3HUFA contents in 1g tissue (mg/g)	3.6 ± 1.1	4.5 ± 2.9	4.8 ± 1.1
n6HUFA contents in 1g tissue (mg/g)	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.2	0.4 ± 0.1
<i>Larvae</i>			
Total length of larvae (mm)	5.5 ± 0.3	5.5 ± 0.1	5.6 ± 0.2
Volume of yolk sac (mm <sup>3</sup> )	3.0 ± 0.6	3.5 ± 1.0	3.1 ± 0.6
Survival activity index	72.9 ± 46.1	82.6 ± 35.2	92.6 ± 38.5

\* Mean with different letter are significantly different at 0.05 level within each group.

Table 8 Total lipids and fatty acids contents in 1g tissue of eggs obtained from the broodstocks fed 3 different diets in feeding experiment.

	Diet I	Diet II	Diet III
<i>Total lipids content in 1g tissue (mg/g)</i>	11.4 ± 4.2 a*	16.6 ± 7.8 ab	25.7 ± 5.5 b
<i>Total fatty acids content in 1g tissue (mg/g)</i>	10.3 ± 2.1	13.2 ± 8.1	15.2 ± 4.3
<i>Total fatty acids content in 1g lipids (mg/g)</i>	938.6 ± 141	771.2 ± 291	592.6 ± 107.4
<i>Fatty acids content in 1g tissue (mg/g)</i>			
14 :0	0.29 ± 0.07	0.31 ± 0.18	0.36 ± 0.15
16 :0	2.04 ± 0.35	2.72 ± 1.69	3.10 ± 1.08
16 :1 n-7	0.47 ± 0.09	0.53 ± 0.33	0.68 ± 0.22
18 :0	0.40 ± 0.04	0.58 ± 0.40	0.63 ± 0.18
18 :1 n-9	1.02 ± 0.14	1.43 ± 1.01	1.78 ± 0.56
18 :1 n-7	0.28 ± 0.04	0.43 ± 0.27	0.45 ± 0.14
18 :2 n-6	0.14 ± 0.03	0.23 ± 0.14	0.35 ± 0.10
18 :3 n-3	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.03	0.06 ± 0.02
18 :4 n-3	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.03	0.04 ± 0.04
20 :1 n-9	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.07	0.11 ± 0.04
20 :2 n-6	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
20 :3 n-6	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.02	0.08 ± 0.14
20 :3 n-3	0.15 ± 0.03	0.19 ± 0.13	0.24 ± 0.06
20 :4 n-6	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.00
20 :4 n-3	0.08 ± 0.08	0.05 ± 0.03	0.10 ± 0.13
20 :5 n-3	0.78 ± 0.15	1.17 ± 0.75	0.99 ± 0.25
21 :5 n-3	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
22 :5 n-6	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.06 ± 0.02
22 :5 n-3	0.28 ± 0.09	0.35 ± 0.22	0.37 ± 0.10
22 :6 n-3	2.47 ± 0.77	2.89 ± 1.86	3.30 ± 0.71
n-3 HUFA	3.63 ± 1.10	4.50 ± 2.87	4.79 ± 1.14
n-6 HUFA	0.18 ± 0.04	0.24 ± 0.16	0.39 ± 0.12
DHA/EPA	3.12 ± 0.36	2.44 ± #####	3.35 ± 0.14

\* Mean with different letter are significantly different at 0.05 level within each group.



Table 9 Fatty acids composition in lipids of eggs obtained from the broodstocks fed 3 different diets in feeding experiment.

Fatty acid	Diet I	Diet II	Diet III
14 :0	2.74 ± 0.34	2.34 ± 0.15	2.21 ± 0.35
16 :0	19.38 ± 0.70	19.78 ± 0.98	19.35 ± 1.62
16 :1 n-7	4.42 ± 0.32	3.97 ± 0.50	4.25 ± 0.57
18 :0	3.79 ± 0.38	4.08 ± 0.51	4.01 ± 0.15
18 :1 n-9	9.74 ± 0.89	9.98 ± 1.66	11.20 ± 0.65
18 :1 n-7	2.65 ± 0.16 a*	3.15 ± 0.23 b	2.81 ± 0.13 ab
18 :2 n-6	1.31 ± 0.13 a	1.70 ± 0.18 a	2.23 ± 0.28 b
18 :3 n-3	0.36 ± 0.01	0.38 ± 0.01	0.35 ± 0.04
18 :4 n-3	0.31 ± 0.03	0.19 ± 0.12	0.28 ± 0.29
20 :1 n-9	0.85 ± 0.05 a	0.70 ± 0.10 ab	0.68 ± 0.07 b
20 :2 n-6	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
20 :3 n-6	0.04 ± 0.01	0.10 ± 0.10	0.60 ± 1.03
20 :3 n-3	1.41 ± 0.03	1.37 ± 0.24	1.53 ± 0.20
20 :4 n-6	0.13 ± 0.03	0.12 ± 0.02	0.10 ± 0.01
20 :4 n-3	0.68 ± 0.52	0.38 ± 0.04	0.56 ± 0.63
20 :5 n-3	7.38 ± 0.14 ab	8.38 ± 0.77 a	6.35 ± 0.50 b
21 :5 n-3	0.11 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.15 ± 0.08
22 :5 n-6	0.24 ± 0.05 a	0.21 ± 0.03 ab	0.41 ± 0.04 c
22 :5 n-3	2.62 ± 0.27	2.55 ± 0.17	2.33 ± 0.11
22 :6 n-3	22.99 ± 2.26	20.47 ± 2.57	21.27 ± 2.23
n-3 HUFA	33.90 ± 2.96	32.06 ± 3.29	30.75 ± 2.60
n-6 HUFA	1.71 ± 0.04	1.69 ± 0.36	2.54 ± 0.90
DHA/EPA	3.12 ± 0.36	2.44 ± 0.22	3.35 ± 0.14

\* Mean with different letter are significantly different at 0.05 level within each group.

有意な成長差は認められなかった (Table 7, Fig. 39,  $P > 0.05$ )。卵体積, 受精率およびふ化率においては, いずれもⅡ区が他区よりも値が低い傾向がみられたが, これらにおいても有意差は無かった (Table 7, Fig. 40,  $P > 0.05$ )。さらに, ふ化直後の仔魚の全長および卵黄嚢体積においても実験区間で明確な違いは認められなかった (Table 7, Fig. 41,  $P > 0.05$ )。SAIは個体間で幅があり有意な差とはいえないが, Ⅲ区において平均SAIが92.6と最も高く, 続いてⅡ区の82.6, Ⅰ区の72.9の順となった。

また, 各実験区の親魚から得られた卵の脂質成分を調べた。Table 8に卵1g中に含有する総脂質量と総脂肪酸量, 各脂肪酸量を示し, またTable 9には脂質中における脂肪酸組成を示した。配合飼料を給餌したⅢ区の卵は組織1g中の総脂質含有量が25.7mg/gと最も高く, 生餌を給餌したⅠ区のそれよりも値が有意に上回った (Table 8, Fig. 42,  $P < 0.05$ )。また, Ⅲ区の卵は総脂質量が突出して多いため, 含有する各脂肪酸の絶対量も最も多かった。卵内脂質中の脂肪酸組成は実験区間で大きく異なり,

Ⅰ区の卵では脂質含有量は低いものの, 脂質に占める脂肪酸の割合が高かった (Table 9)。卵内の各脂肪酸の組成は給餌した餌料の組成とよく類似した傾向を示した (Table 6, Table 9)。

## 2. 天然成育個体の卵質調査

Table 10に天然魚および放流再捕魚7個体の採卵時における形態測定データ, 卵およびふ化仔魚の性状を示した。またFig. 43には3~5歳の人工養成魚と比較した結果を示した。天然成育魚の全長および体重は54.0~74.0cmおよび3,438.4~7,765.0g (未計測を含む)と個体によって幅が大きかった。全長および体重ともに人工養成魚より有意に高かったが, 肥満度は4歳魚および5歳魚よりも下回り, 3歳魚とほぼ同値であった。また, 卵体積は22.2~27.1mm<sup>3</sup>と人工養成魚に比べて有意に大きかった。ふ化仔魚全長は5.7~6.4mmであり, 人工3歳魚由来の仔魚よりは大きいものの4歳魚および5歳魚のそれとは明確な差は認められなかった。SAIは44.3~199.4であり,

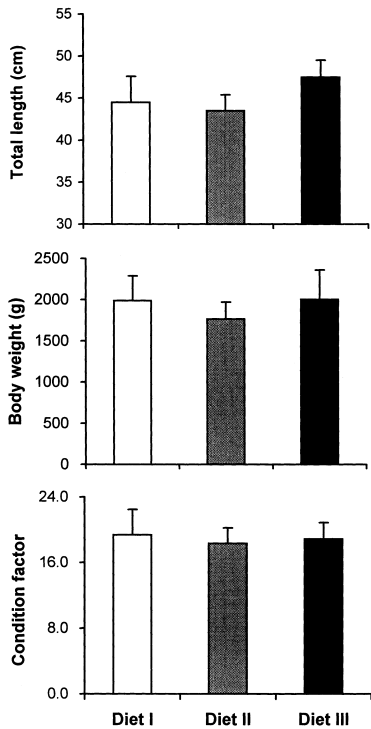


Fig.39 Total length, body weight and condition factor of female barfin flounder in feeding experiment. Each value represent mean  $\pm$  SD. Diet I, raw fish and shrimp; Diet II, moist pellet; Diet III, dry pellet.

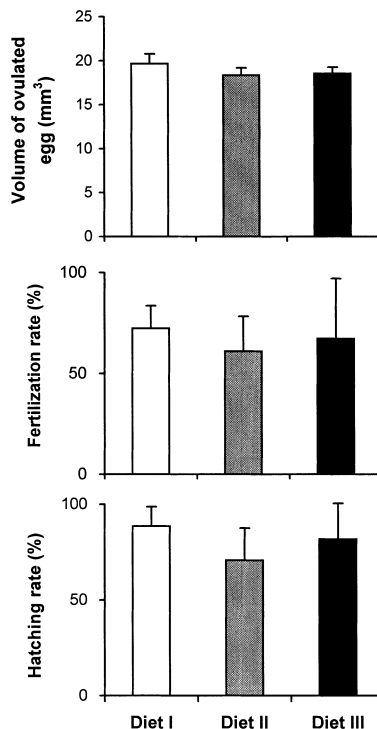


Fig.40 Volume of ovulated egg, fertilization rate and hatching rate in feeding experiment. Each value represent mean  $\pm$  SD. Diet I, raw fish and shrimp; Diet II, moist pellet; Diet III, dry pellet.

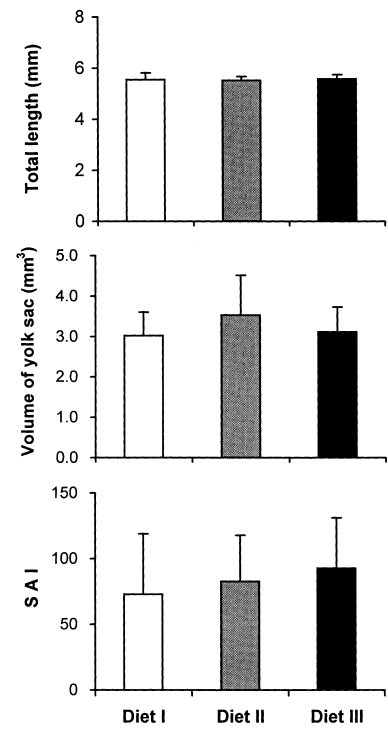


Fig.41 Total length, volume of yolk sac and SAI of larval barfin flounder just after hatching in feeding experiment. Each value represent mean  $\pm$  SD. Diet I, raw fish and shrimp; Diet II, moist pellet; Diet III, dry pellet.

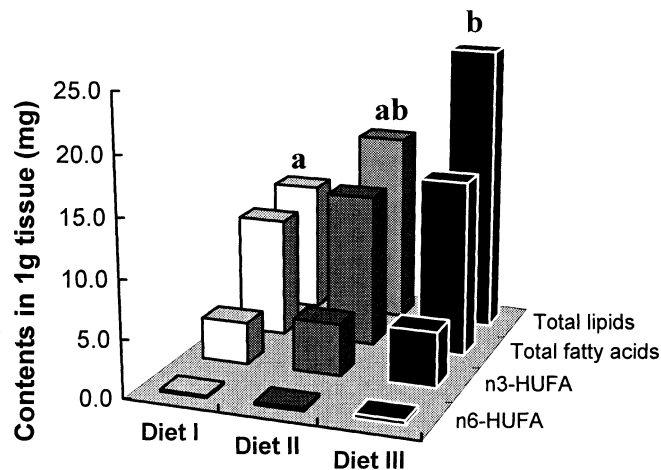


Fig.42 Total lipids and total fatty acids contents in 1g tissue of eggs obtained from the broodstocks fed 3 different diet in feeding experiment. Mean with different letter are significantly difference at the level within each group.

Fish No.2を除けば総じて値が高く、有意差はないものの人工養成魚のSAIを上回った。

Fish No.5 (天然魚) およびFish No.4 (放流再捕魚) から得られた卵の脂質成分を調べ、餌料別飼育実験で使用した人工養成魚の卵と比較した (Table 11)。卵 1 g 中にお

ける総脂質量および脂肪酸量はそれぞれ17.12, 16.98mg/g および16.71, 16.43mg/gであり、総脂質量は配合飼料で養成したⅢ区よりも明らかに低かった。一方、脂肪酸量はいずれの人工養成魚群のそれを上回っており、脂質に占める脂肪酸の割合が高いことが示された。また、

Fish No.4およびFish No.5の卵内脂肪酸組成は生餌を給餌して養成したI区のそれと類似した傾向を示し、DHAおよびEPAの含有量が顕著に高かった。

考 察

従来給餌している生餌4種と、その生餌を用いて作成し

たモイストペレット、市販のヒラメ用配合飼料を与えて養成した親魚の卵とふ化仔魚の性状を比較した。その結果、卵サイズやふ化仔魚サイズなど形態的性状、また受精率およびふ化率には実験区間でほとんど違いはみられなかった。ふ化仔魚のSAIにおいては、統計学的有意差はないものの、配合飼料区の仔魚がモイストペレット区

Table 10 Result of analysing the quality of egg and larva obtained from wild and captured barfin flounder.

Fish No.	Total length (cm)	Body weight (g)	Condition factor	Volume of ovulated egg (mm <sup>3</sup> )	Fertilization rate (%)	Total length of larvae (mm)	Volume of yolk sac (mm <sup>3</sup> )	SAI
1	68.0	6250.7	19.9	26.6	50.5	5.7	6.6	103.6
2	74.0	7765.0	19.2	26.7	85.4	6.4	4.5	44.3
3	66.0	5905.2	20.5	27.1	63.6	6.3	3.8	163.9
4	54.0	3438.4	21.8	22.2	41.4	6.3	3.1	199.4
5	65.0	Not measured		26.1	44.9	6.2	4.4	128.7
6	68.0	Not measured		22.2	43.7	6.3	3.6	123.0
7	64.0	Not measured		22.7	46.7	6.3	2.2	135.6

Table 11 Comparison between lipid contents of egg obtained from wild or recaptured fish and that of cultured fish.

	Wild fish	Recaptured fish	Cultured fish		
	Fish. 2	Fish. 3	Diet I	Diet II	Diet III
<i>Total lipids content in 1g tissue (mg/g)</i>	17.12	16.98	11.42	16.58	25.66
<i>Total fatty acids content in 1g tissue (mg/g)</i>	16.71	16.43	10.35	13.21	15.25
<i>Total fatty acid contents in 1g lipids (mg/g)</i>	976.05	967.76	938.59	771.18	592.57
<i>Fatty acids in 1g tissue (mg/g)</i>					
14 :0	0.27	0.28	0.29	0.31	0.36
16 :0	3.16	3.22	2.04	2.72	3.10
16 :1 n-7	0.79	0.84	0.47	0.53	0.68
18 :0	0.77	0.84	0.40	0.58	0.63
18 :1 n-9	2.61	2.41	1.02	1.43	1.78
18 :1 n-7	0.40	0.45	0.28	0.43	0.45
18 :2 n-6	0.12	0.08	0.14	0.23	0.35
18 :3 n-3	0.03	0.03	0.04	0.05	0.06
18 :4 n-3	0.01	0.02	0.03	0.02	0.04
20 :1 n-9	0.18	0.16	0.09	0.10	0.11
20 :2 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
20 :3 n-6	0.01	0.01	0.00	0.02	0.08
20 :3 n-3	0.38	0.33	0.15	0.19	0.24
20 :4 n-6	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01
20 :4 n-3	0.05	0.06	0.08	0.05	0.10
20 :5 n-3	1.54	1.24	0.78	1.17	0.99
21 :5 n-3	0.03	0.02	0.01	0.02	0.02
22 :5 n-6	0.03	0.03	0.03	0.03	0.06
22 :5 n-3	0.62	0.51	0.28	0.35	0.37
22 :6 n-3	3.88	3.62	2.47	2.89	3.30
n-3 HUFA	6.50	5.46	3.63	4.50	4.79
n-6 HUFA	0.05	0.36	0.18	0.24	0.39
DHA/EPA	2.52	2.92	3.12	2.44	3.35

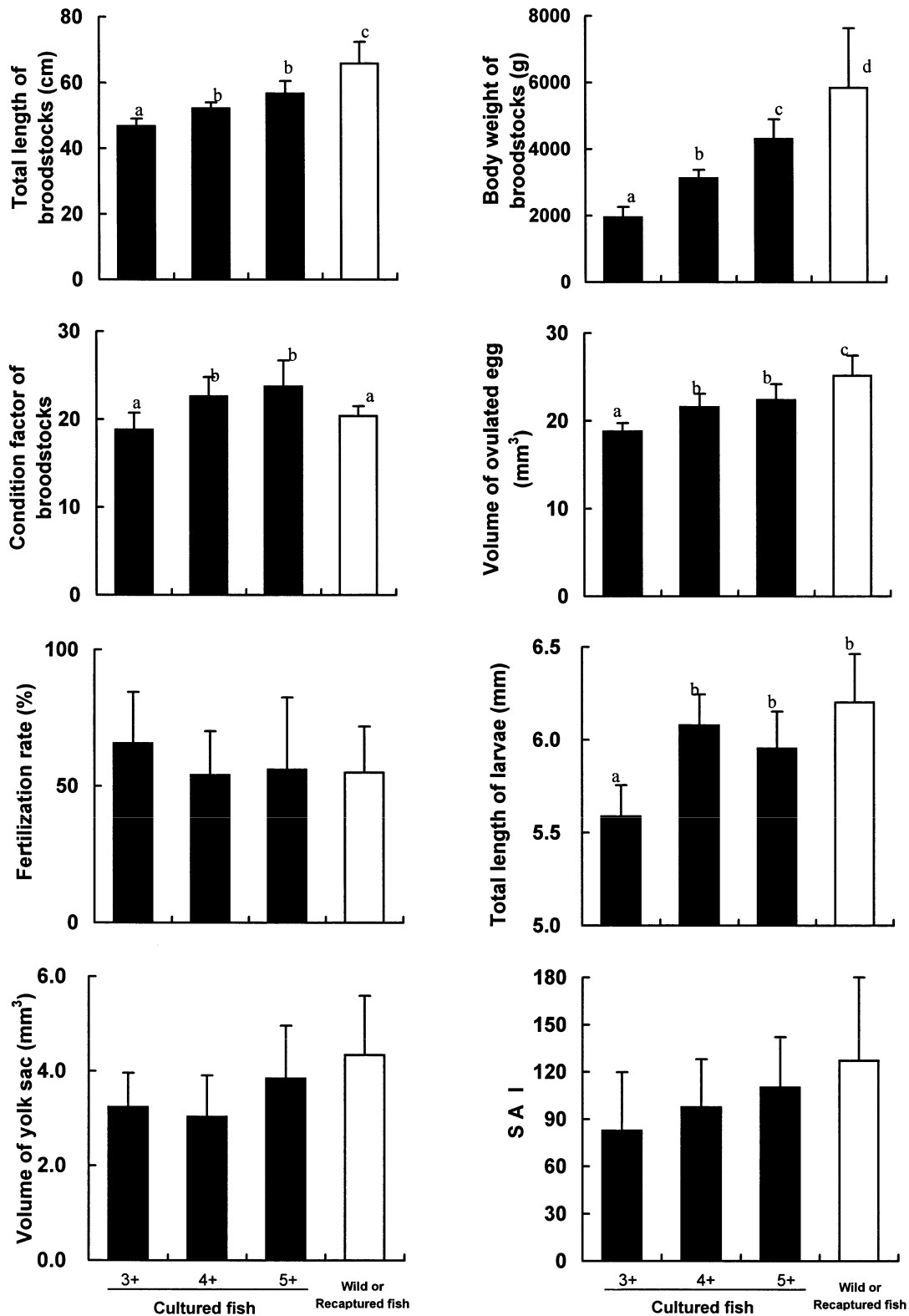


Fig.43 Comparison between the quality of egg and larvae obtained from wild or recaptured fish and that of cultured fish. Each value represents the mean  $\pm$ SD. Mean with different letter are significantly different at 0.05 level within each broodstocks group.

および生餌区のそれより高い傾向がみられた。本章第2節において、マツカワ仔魚のSAIはふ化直後の仔魚の全長と正の相関を示すことが明らかとなっており、より発

達した形態で卵殻からふ出する方が初期生残に有利であると考えられた。本実験では、親魚の餌料が異なってもふ化直後の仔魚サイズはほとんど差がなく、また摂餌開

始までの栄養源となる卵黄の絶対量（卵黄嚢体積）もほぼ等しかった。従って、わずかではあるが今回観察されたSAIの差は、ふ化仔魚の形態の違いによるものではなく、卵黄の質的性状の差に関連している可能性がある。

そこで、卵黄を構成する栄養素のうち脂質成分に着目し、餌料と得られた卵の総脂質量および脂肪酸組成を調べた。その結果、脂質含有量が高い配合飼料で養成した親魚からは脂質含有量が極めて高い卵が得られ、一方、生餌で養成した親魚からは低脂質の卵が産出された。また、いずれの実験区においても脂質中の脂肪酸組成は摂食した餌料の組成と極めて類似していた。このことからマツカワにおいて母体が摂食した餌料中の脂質成分は卵へほぼ忠実に受け継がれると考えられる。マダイ<sup>80)</sup>、シマアジ<sup>81)</sup>、マイワシ<sup>82)</sup>等の他の海産魚種においても、本研究と同様に、餌料の脂質組成は親魚の筋肉中や得られる卵中の脂質組成に反映することが確認されている。マツカワの卵黄蛋白前駆物質であるピテロジェニン（VTG）は約20%の脂質を含む複合蛋白である<sup>27)</sup>。以前、我々はマツカワ人工養成魚の血中および卵母細胞内のリン脂質濃度を継時的に測定した結果、いずれも第一次卵黄球期から徐々に上昇し始め、第二次から第三次卵黄球期にかけて急激に増加した。そのため、卵内の脂質成分はVTGの取り込み・蓄積によって増加すると考えられ、卵黄形成が始まる2歳以降の餌料の質は卵の生化学的性状に特に強く影響すると推察される。

近年、多くの海産魚類において卵中の脂肪酸、中でもn3-HUFAが卵とふ化仔魚の質的性状に関与することが示唆されている<sup>82,88)</sup>。その作用特性は魚種によって様々であり、マダイではDHA（22:6 n-3）またはDHAを含むリン脂質（フォスファチジルコリン）が胚発生の正常化と仔魚の活力向上に重要な役割を担っていると示唆されている<sup>75,89)</sup>。一方、ヒラメではDHAのみならず、EPAもふ化仔魚の初期生残に関わることを示唆されている<sup>90)</sup>。また、DHA/EPA比やアラキドン酸（AA 18:3 n-9）/EPA比などの各脂肪酸のバランスも重要であることが指摘されている<sup>39)</sup>。本実験で平均SAI値がやや高かった配合区は、卵中の総脂質含有量が極めて高く、またn3-HUFAの絶対量も3実験区中最大であった。このことから卵内に含まれるn3-HUFA含有量の差がSAIの違いとして現れたことも推察される。本実験では脂質クラス毎（極性脂質、中性脂質、遊離脂肪酸）に分けて脂肪酸組成を調べなかったため、n3-HUFAがどのような機能を果たしているかは類推できないが、マツカワにおいてもこれらは仔魚の初期生残能力に対してプラスの作用効果を持っている可能性があり、今後詳細に調べる必要がある。

天然環境と人工飼育環境との差が卵質に及ぼす影響を

把握するため、マツカワ天然魚と放流再捕魚（計7尾）の卵質について解析した。天然成育魚の卵内脂質成分を調べたところ、総脂質含有量は人工養成魚に比べて低かった。しかし、脂質中の脂肪酸含有比が極めて高く、n3-HUFAの含有量は人工養成魚のそれを上回った。また、各脂肪酸の組成は生餌のみで養成した人工養成魚の脂肪酸組成と酷似していた。天然環境下において、本種は1歳まではアミ類、ワラジムシ類、エビジャコ類、甲殻類を主な餌とするが、2歳以降になると甲殻類に加えてカタクチイワシやハタハタなどの魚類も摂食するようになる<sup>91)</sup>。従って、今回の分析結果は、天然海域での食性が卵内脂質へと反映したものと考えられる。

また、天然成育魚と人工養成魚（3～5歳）の外部形態と産出される卵、ふ化仔魚の性状について比較した。その結果、今回実験に用いた天然成育魚は人工養成魚（3～5歳）よりも全長および体重が有意に上回っていたが、肥満度は低かった。この原因として、天然成育魚は漁獲から採卵までの3～5ヵ月間無給餌で飼育されており、その影響で本来よりも肥満度が低下したと推測された。また、天然成育魚は人工養成魚よりもサイズが大きい卵を産んだ。併せて、ふ化仔魚のサイズも大きく、さらにSAI値は人工養成魚のそれを上回った。このSAIが高かった理由として、ふ化仔魚サイズが大きかったこと、また有効性が示唆されるn3-HUFAを多く含有していたことが推察される。年齢など個体ごとの情報をより詳しく精査する必要はあるが、これらの結果から成育環境は産出される卵とふ化仔魚の質的性状に大きな影響を及ぼすこと、また本知見をもとに親魚養成環境を改良することによって人工養成魚の卵質を天然魚に近いレベルまで向上できることが示唆された。

近年、マツカワ天然魚の資源量は極めて低水準となり、その漁獲は皆無に等しい。従って、採卵用の親魚は、人工種苗から養成することが不可欠である。親魚に与える餌料は卵質に大きな影響を及ぼす可能性があり慎重をきす必要がある。本結果から、親魚に与えた餌料の脂質成分はほぼ確実に卵内へと反映することが示された。さらに本種でもわずかではあるがDHAなどのn3-HUFAがふ化後の初期生残能力の向上に寄与している可能性が推測された。どのようなメカニズムによってn3-HUFAがマツカワ仔魚の初期発育過程に関わっているかは今後確認すべき点であるが、これらの結果から親魚餌料の改善（n3-HUFA強化）によって活力が高い仔魚を安定的に確保できると考えられる。また、本試験では市販のヒラメ用配合飼料と生餌との間に卵質へ対する差はほとんど認められず、かえって配合飼料はn3-HUFAが多いことから仔魚の初期生残には有利であることが示唆された。この

ことは、これまで試行錯誤的に行ってきた生餌中心の給餌法から配合飼料を利用した給餌法へと切り替えることにより、良質の仔魚が確保できるばかりではなく、餌料コストの低減や給餌作業の省力化を図れることを示している。さらに、先に述べた様に、本種では第二次卵黄球期から第三次卵黄球期にかけて脂質を含めた卵黄タンパクの取り込み活性が急激に高まることが明らかとなっている。従って、通常は配合飼料主体で養成し、卵母細胞への脂質取り込み活性が高まる時期に限定してn3-HUFA強化餌料へと切り替えると、より効果的に且つ経済的に卵質を向上できると思われる。

本研究では卵内の栄養素として脂質成分のみを分析対象とした。しかし、他魚種において、魚粉、イカミール、オキアミミールなどタンパク源が異なる飼料で飼育した場合、産卵量、浮上卵率、正常発生率、ふ化後の生残率に明確な差が生じ、タンパク質の生化学的性状も成熟・産卵過程や卵質に多大な影響を及ぼすことが報告されている<sup>78,92,93)</sup>。さらに、親魚餌料中のビタミンE等の微量元素は適正量から逸脱した場合、卵成長不全や浮上卵率の低下、異常卵発生率の増加が観察される<sup>94)</sup>。今回、いずれの餌料区でも卵サイズ、受精率、ふ化率に明確な差はなかったが、採卵可能量や採卵期間など餌料が産卵に関する特性に関しては十分に比較検討できなかった。従って、今後は、タンパク質、ビタミン、ミネラルなど他の栄養素の作用についても調べ、親魚の成長、性成熟、卵質といった面から最も優位性が高いマツカワ親魚餌料を明らかにする必要がある。

#### 第IV章 マツカワの自発的産卵誘導法の開発

良質の受精卵を大量に確保することは、魚類の種苗生産を進めるうえで欠くことができないファーストステップである。そのため、受精卵を確保する技術（採卵技術）の開発は極めて重要な課題である。

前述したように、マツカワの場合、人工授精法によってほぼ確実に受精卵を得ることができる。しかし、第III章1節で示したように、飼育環境下において本種の雌は排卵しても放卵がスムーズに起りにくいため、卵が体内で滞留し過熟化が生じやすい。一度卵巣内で過熟化が進むと、新たに排卵される卵の受精能も劣化するため、人工授精によって良質卵を確保するには定期的に搾出を繰り返さなければならない。しかし、これは作業労力が多大であることに併せて、親魚に大きなストレスを与えるためウイルス疾病の発症も懸念される。従って、良質卵を効率よく確保することができ、且つ親魚に負担を与え

ない自発的産卵誘導法の確立が不可欠である。

マツカワにおける自発的産卵誘導の試みは種苗生産研究の開始当初から取り組まれてきた。研究開始当時も産卵期である3月下旬～4月下旬になると、排卵を開始した雌は時として水槽内でも卵を放出した。しかしながら、雌雄の産卵行動はほとんど誘起されず、これまで自然産卵によって受精卵が得られた事例はほとんど無かった。近年、渡辺・鈴木<sup>95)</sup>は、北海道太平洋岸で漁獲された天然魚を大型水槽で飼育した結果、自発的な産卵が起り受精卵が得られたことを初めて報告した。しかし、これまで人工養成魚において水槽内産卵により受精卵が得られた報告は数少ない。現在、本種の天然資源量は著しく低水準にあり、採卵用の親魚として天然個体の漁獲・補充を期待するのは極めて困難である。従って、今後、種苗の大量生産を進めるためには、人工養成親魚から効率よく産卵を誘導できる技術の開発が不可欠である。

本研究では、飼育水温操作によってこれまで困難とされていたマツカワ人工養成魚の自発的産卵誘導に初めて成功した。本章第1節では昇温刺激による産卵誘起効果について述べる。また、第2節では、放卵、放精など本種の産卵行動に関する知見を得るため、搾出した卵、精子を水槽内へ滴下しする実験を実施した。さらに第3節では自発的産卵に関わる飼育環境条件の影響について調べた。

#### 第1節 昇温刺激によるマツカワ人工養成魚の自発的産卵誘導

先述のように、飼育環境下においても本種は雌雄ともに正常に成熟に達し、産卵期になると雌の放卵も認められる。しかし、回収された卵は白濁した過熟卵か、透明でも未受精であるものが大部分であり、これまで自発的産卵によって受精卵が得られた事例はほとんど無い。この原因として、飼育水槽内では本種の生殖特性に適合した環境を再現できていないため、放卵や放精といった雌雄の産卵行動がスムーズに誘起されないことが考えられる。

一般に、魚類の周年の性成熟や繁殖過程は、水温、光周期、潮汐など生息場をとりまく様々な環境要因の変化によって制御されている<sup>96)</sup>。中でも、水温は産卵行動に対して特に重要な作用をもつと考えられており、数種の高産卵魚では飼育水温制御によって産卵を誘導し受精卵を確保できることが報告されている<sup>96-100)</sup>。そこで、本研究では水温がマツカワの産卵誘起に及ぼす影響を調べるとともに、昇温刺激により人工養成親魚からも受精卵を確保できるかどうかについて検討した。

なお、他の研究報告の中で、「産卵 spawning」という言葉は広義に用いられており、「卵放出から受精までを含めた一連の産卵過程」を指す場合もあれば、他方、「雌の放卵」または「雄の放精」のみを産卵 spawning という言葉で表現している場合もある。本報では、マツカワの自発的産卵がうまくいかない原因を明確化するため、生殖過程を細分化して表した。すなわち、「雌による卵放出：放卵 egg release, oviposition」, 「雄による精液放出：放精 sperm release, ejaculation」, さらに「受精を伴う放卵および放精行為：産卵 spawning」と定義した。混乱を避けるために特記する。

## 材料と方法

### 1. 供試魚

実験には栽培センターにおいて種苗生産し、成魚となるまで養成した3歳の人工養成魚を使用した。実験を開始するまでは容量20 tの楕円形FRP水槽内で、地先汲み上げろ過海水をかけ流して飼育した（換水率5トン/時）。餌料として、冷凍生餌4種と市販のヒラメ用配合飼料（ヒガシマル、鹿児島）を週6日間で飽食量給餌した。実験開始時における親魚の体重は、雌で1.76～2.43kg、雄で1.25～1.33kgであった。

### 2. 1997年および1998年の産卵誘導実験の概要

1997年の実験においては、産卵期に一定の水温で飼育し自発的産卵を誘導できるかどうかについて検討した。1997年9月10日、容量8 tの実験水槽2基に雌3尾雄9尾ずつ収容し、2実験区（97No.1および97No.2）を設けた。飼育水槽の上層から2トン/時の流量で飼育海水をかけ流した。水温は2月まで北海道噴火湾の自然海水温としたが、3月1日以降、5日で1～2℃という割合で徐々に昇温した。3月11日から97No.1では6℃、また97No.2では8～9℃となるように調温し、以後、実験終了までその水温を保った。一方、1998年の実験では、産卵期における水温変動が本種の自発的産卵に及ぼす効果について検討した。1998年の9月18日、8 t水槽3基に人工養成3歳魚の雌を3尾、雄を9尾ずつ収容し、実験区98No.1～98No.3を設けた。2月までの水温条件は前年と同様とし、いずれの区も3月11日以降は6℃となるように調温した。その後、連続的に昇温刺激を行った。昇温刺激は10時に飼育水内に加温海水（18℃）を流入させて約6時間かけて6℃から8～9℃まで一気に上昇させる操作である。水温がピークとなった16時から翌日の10時までは8～9℃のまま保ち、その後、徐々に6℃まで降温して次の刺激まで6℃のまま飼育する。98No.1では3月20日から、98No.2では4月1日から、98No.3では4月10

日から昇温刺激を開始した。いずれも昇温刺激は3～4日間隔で連続的に実施したが、水温変動と産卵との関連を明らかにするために、4月14日から同月23日の間は一時昇温刺激を停止した。

### 3. 日間採卵数、受精卵数および受精率の計測

産卵誘導実験においては、一日あたりの総採卵数、受精卵数および受精率を調べた。毎朝9:00に、水槽上部排水口に設置した集卵ネット内の卵を回収し、それらをろ過海水が入った10lバケツ内に移した。10mlあたりの卵数を計数し、バケツ内水量分に引き延ばすことにより日間総採卵数を求めた。また、回収した卵の一部を実体顕微鏡下で観察し、卵割が認められる卵を受精卵として受精率を求めた。さらにその受精率と総採卵数から一日あたりの総受精卵数を算出した。併せて、受精卵が得られた場合には、9時における受精卵の発生ステージを記録した。既報のマツカワ卵の発生速度<sup>9)</sup>に基づいて水槽内で受精行動が誘起された時刻を推定した。

### 4. 雌一尾における産卵特性および受精率に及ぼす昇温刺激の影響

1999年および2000年の実験では、一尾の雌における放卵量および放卵間隔を明らかにするとともに、受精率に及ぼす昇温刺激の効果について検討した。いずれの年度も、3歳の人工養成魚の雌雄を実験に使用した。

1999年の10月20日、8 t円形FRP水槽3基（99No.1～3）に、一実験区当たり雌1尾および雄4尾ずつ収容した。全実験区とも飼育水温は1999年3月2日まで自然海水温（最低水温2.9℃）とし、その後、徐々に加温して3月12日には6℃になるように調温した。さらに4月5日から昇温刺激を行った。昇温刺激は基本的に4日周期で繰り返すこととしたが、刺激後4日以内に放卵および受精が確認された場合は一定の期間（13～16日間）、水温刺激を停止しそれによる放卵量や受精率への影響を調べた。

また、2000年の実験においては、10月19日、人工養成3歳魚の雌を1尾、雄を4尾ずつ8 t水槽2基に収容し、2実験区（昇温刺激区および対照区）を設けた。3月11日までは1999年と同様の水温設定で飼育した。対照区では3月26日に昇温刺激を一度行った以外は実験終了まで水温6℃のまま飼育した。これに対し、昇温刺激区においては3月28日に最初の昇温刺激を行った後、4月6日、12日、21日にも刺激を繰り返した。日間総採卵数、受精卵数および受精率は前述の方法によって求めた。

Table 12 Results of spontaneous spawning in barfin flounder during the experiments in 1997 and 1998.

Year	1997		1998		
	1	2	1	2	3
Test group No.	1	2	1	2	3
The days when eggs collected	12	23	44	33	36
Total eggs (x10 <sup>3</sup> )	257.6	503.8	3073.7	1696.2	2037.2
Total eggs/days when eggs collected (x10 <sup>3</sup> )	21.5	21.9	69.9	51.4	56.6
The days obtained fertilized eggs	2	0	15	10	12
Total fertilized eggs (x10 <sup>3</sup> )	37.4	0.0	266.4	287.0	140.6

結 果

1. 1997年および1998年における産卵結果

Fig.44およびTable 12に1997年の実験期間における飼育水温および採卵数の日変化を示した。97No.1および97No.2のいずれにおいても、飼育水温は数日変動がみられたが、実験期間を通して概ね設定した6℃および8～9℃のまま推移した。初回の放卵は97No.1で4月4日、97No.2で3月31日に観測され、両区ともその後も放卵が認められたが、採卵数はそれぞれ4.3～72.2×10<sup>3</sup>および3.0～68.3×10<sup>3</sup>粒/日と少なかった。得られた卵のほとんどは未受精卵であり、受精卵は97No.1で4月20日および27日に少量確認されたのみであった。また、97No.1において受精卵が得られた両日の水温条件を調べたところ、いずれの場合においても前日に水温が6℃から7.5℃または7.2℃へと偶発的に急上昇していたことがわかった。

1998年の実験期間における飼育水温採卵数の日変化を

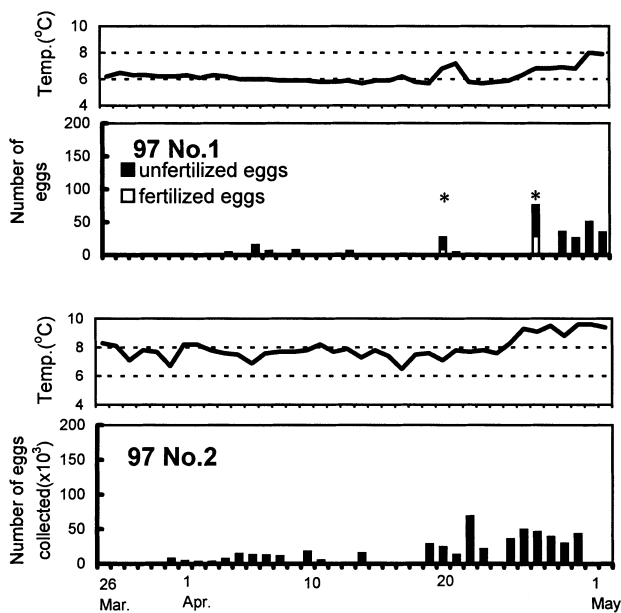


Fig.44 Changes in water temperature and the number of eggs collected in cultured barfin flounder during the experiments in 1997. Asterisks indicate the days when fertilized eggs were obtained.

Fig.45およびTable 12に示した。いずれも飼育水温はほぼ条件設定の範囲内で推移したが、5月に入ってから実験終了までは水温の急変が比較的頻繁に生じた。雌の放卵は98No.1では3月26日から、98No.2では3月27日から、98No.3では3月30日から始まり、5月8日までほぼ毎日続いた。いずれの実験区においても、100×10<sup>3</sup>粒以上の卵が得られた事例が頻繁に観察され、一日当たりの採卵数は1997年の実験よりも明らかに高かった。98No.1およ

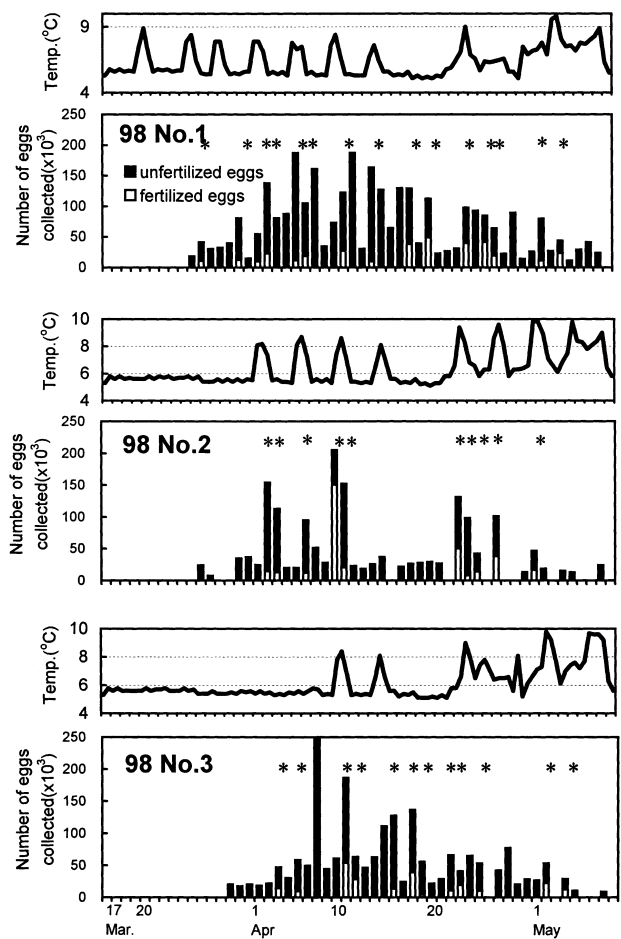


Fig.45 Changes in water temperature and the number of eggs collected in cultured barfin flounder during the experiments in 1998. Asterisks indicate the days when fertilized eggs were obtained.



び98No.3の雌は昇温刺激を停止した4月14日~23日の期間であっても連続的に放卵を続けた。これに対し、98No.2においては、日間採卵数と水温変化が極めて同調しており、昇温刺激を停止すると採卵数が急減し、刺激を再開すると採卵数は再び増加した。

1998年の実験において実験期間中、受精卵が得られた事例は一実験区当たり10~15日であり、1997年に比べて受精が誘起される頻度は極めて多かった。それぞれの実験区における総受精卵数は140.6~287.0×10<sup>3</sup>粒であり、98No.2では昇温刺激を行った翌日(4月10日)、全区中最大量の受精卵が得られた。

Fig.46に昇温刺激実施後の経過日数と受精卵が得られた事例数との関係を示した。98No.3において最初の昇温刺激を行う前に2例受精が誘起されたが、いずれの区においても昇温刺激を行った翌日に受精卵が得られた頻度

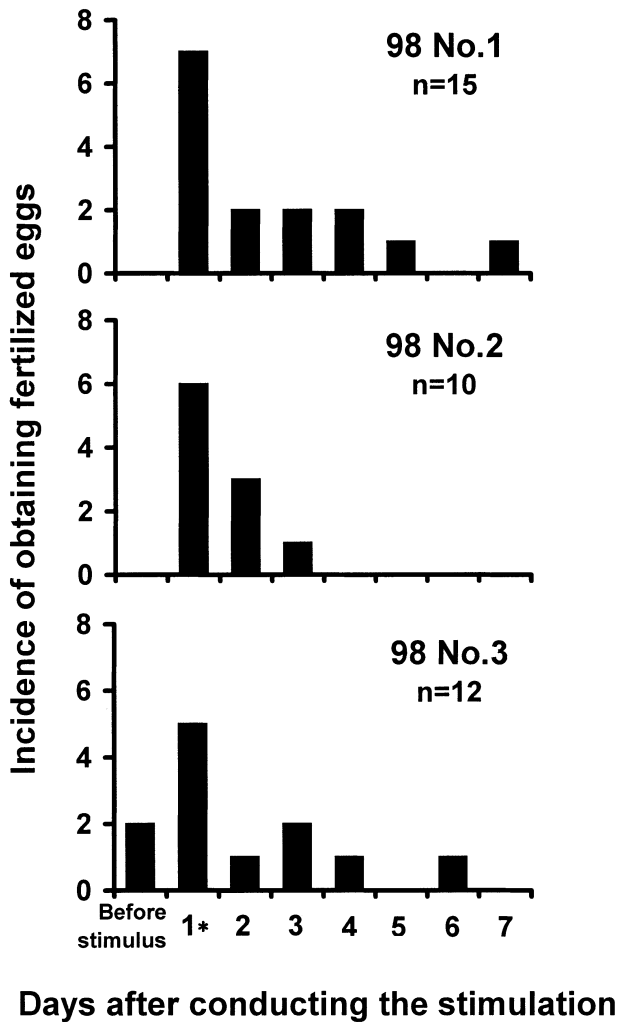


Fig.46 The relationship between the number of days after conducting the increased temperature stimulus and the incidence of obtaining fertilized eggs during the experiments in 1998. Asterisk indicates the day after the stimulation was conducted.

が最も多かった。

## 2. 雌一尾における産卵特性および受精率に及ぼす昇温刺激の影響

1999年の実験において、昇温刺激開始までにおける雌親魚の外部形態を観察したところ、水温を6℃まで上昇させた3月12日では、全実験区ともに腹部の膨満や総排泄孔の突出が不明瞭であり最終成熟および排卵はまだ始まっていないものと推察された。4月4日になると、99No.1と99No.2の雌親魚は腹部が著しく膨満し、さらに総排泄孔の突出が明瞭となって排卵直前か、既に初回の排卵が開始したと考えられた。一方、99No.3は4月4日においても腹部の膨満と総排泄孔の突出は不明瞭のままであった。

Fig.47に実験期間における飼育水温、総採卵数および受精卵数の変化を示した。実験開始から昇温刺激開始日

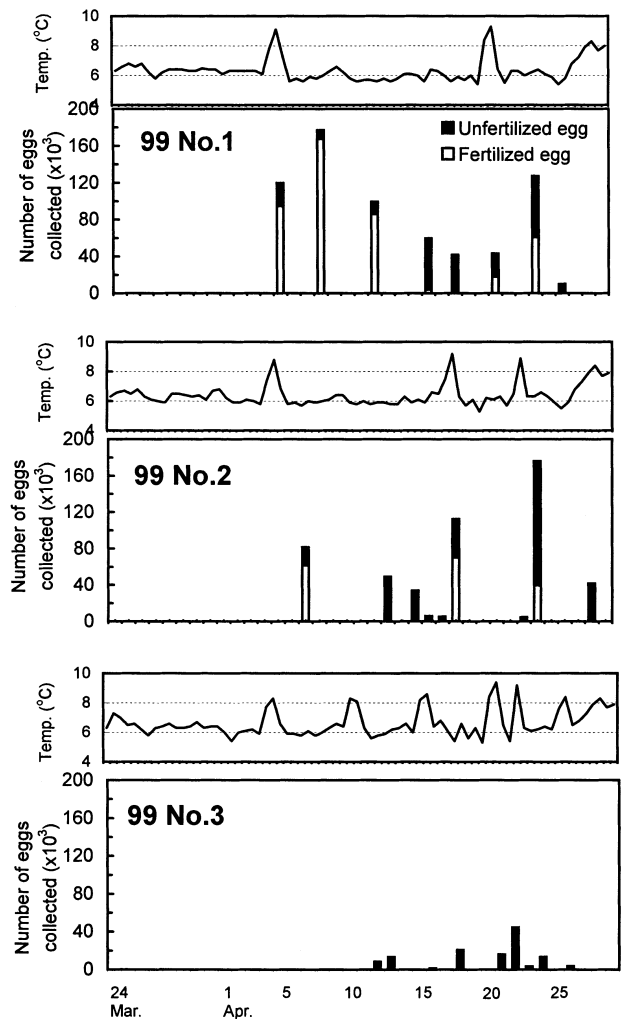


Fig.47 Changes in water temperature and number of eggs obtained from one female during the experiment in 1999.

までいずれの区でも放卵は全く確認されなかった。初回の昇温刺激後、99No.1においては、刺激をした日の深夜に放卵および受精が誘起され、受精卵 $95.0 \times 10^3$ 粒が得られた。また、昇温刺激を停止したところ、4月8日および12日に間隔をおいて放卵と受精が継続し、それぞれ $167 \times 10^3$ および $8.6 \times 10^3$ 粒の受精卵が得られた。しかし、その後は放卵量が急激に減少し、また放卵しても受精は起こらなくなった。さらに、4月21日から水温刺激を再開したところ、放卵量が $40 \sim 120 \times 10^3$ 粒に増加し、受精も再び誘起された。99No.2においても、初回の刺激の翌日に放卵と受精が誘起され、受精卵 $63 \times 10^3$ 粒が得られた。しかし、昇温刺激の停止後は放卵量が急減し受精は全く誘起されなくなった。4月18日に昇温刺激を再開すると99No.1と同様に放卵量が $110 \times 10^3$ 粒以上に急増し、さらに受精卵も得られるようになった。一方、実験区3においては、初回の昇温刺激を行っても放卵が起こらなかったため、その後4日周期で刺激を繰り返した。その結果、4月13日から放卵が確認されたが、放卵量が $42 \times 10^3$ 粒以下と実験期間を通して少なく、また受精が誘起された事例はわずかに一例のみであった。実験期間における受精率の変化について調べた結果、99No.1および99No.2では、昇温刺激を行うと受精率が79.1~94.6%へと向上したが、刺激を停止するといずれの区においても受精率は低下し、さらに再開すると受精率は50.5~70.1%および

34.8~44.0%まで高まった (Fig.48)。

Fig.49に2000年の実験における産卵結果および受精率の変化を示した。対照区では、放卵は3月26日から始ま

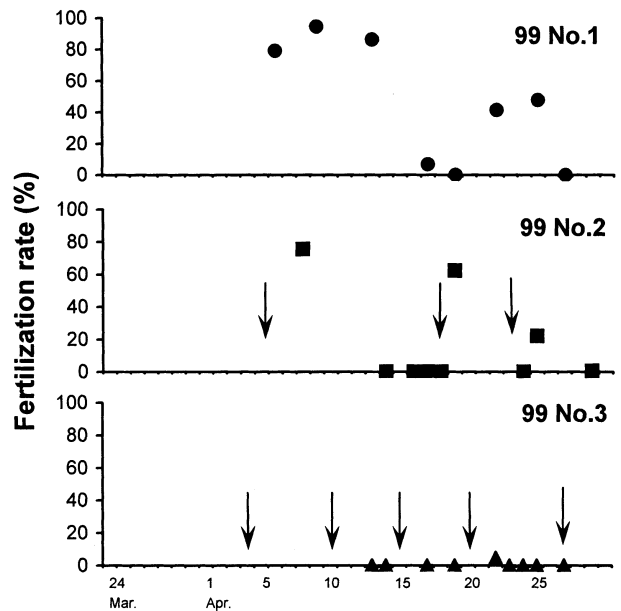


Fig.48 Changes in fertilization rate during the experiment in 1999. Arrows show the days when the increased temperature stimulation was conducted.

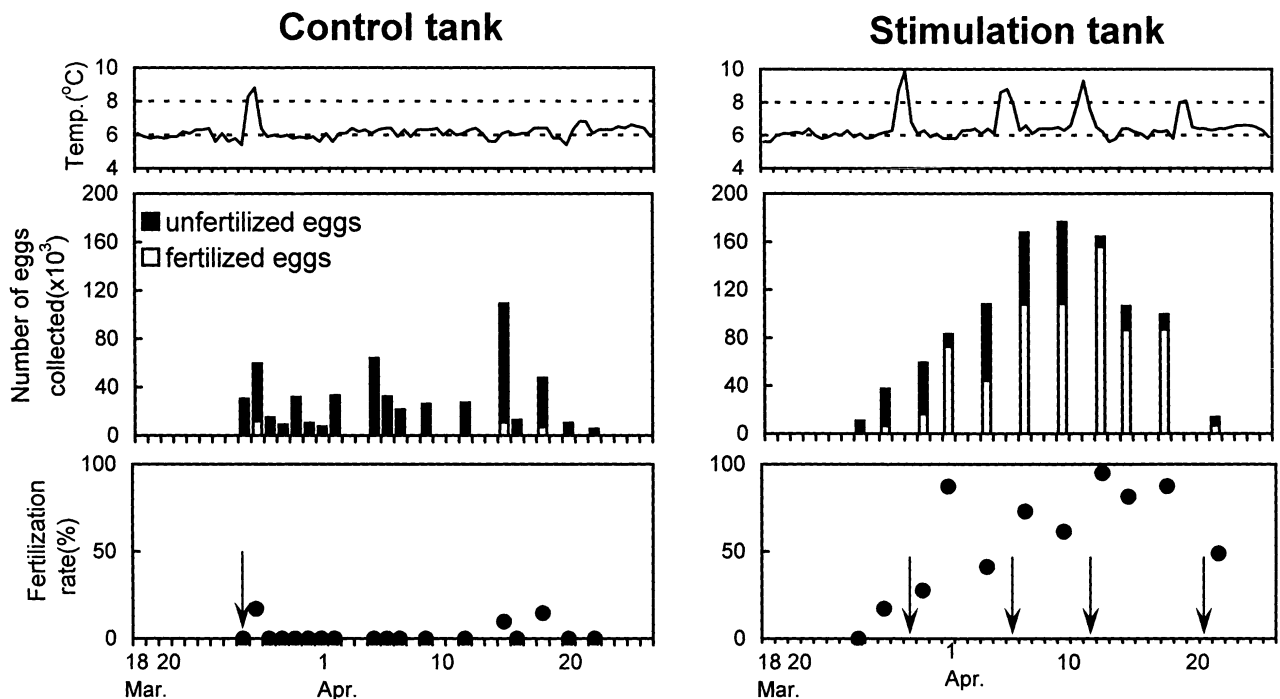


Fig.49 Changes in water temperature, number of eggs collected and fertilization rate in the control tank (left) and the stimulation tank (right) during the experiment in 2000. Arrows show the days when the increased temperature stimulation was conducted.

り実験期間を通してほぼ毎日続いた。昇温刺激の翌日である3月27日に受精卵が得られた。受精卵は水温を6℃のままとしていた4月15日および18日においても確認されたが、受精率はそれぞれ9.8%および14.6%といずれも極めて低かった。これに対し、昇温刺激区の雌は、実験終了まで2～4日間隔で定期的に放卵した。採卵量は初回の放卵後、徐々に増加し4月13日には最高値(176.30×10<sup>3</sup>粒)に達した。さらにほぼすべての放卵日で受精卵を確認することができ、受精が誘起される頻度は対照区に比べて明らかに高かった。実験期間における昇温刺激区の受精率は17.3%～94.9%であり、平均受精率は対照区のそれを明確に上回った。併せて、昇温刺激の翌日は受精率が高くなる傾向がみられた。

## 考 察

本研究では人工養成マツカワの自発的産卵誘導に対する昇温刺激の効果について検討するとともに、大量の受精卵を効果的に確保する技術について考察した。

1997年の実験においては、産卵期中、3歳の人工養成魚を6℃、または8～9℃に維持したままで飼育した。いずれの水水域においても全ての雌は正常に排卵したが、日間採卵数は極めて少なかった。さらに実験期間中、受精が誘起されたのはわずかに2例のみであり、受精卵はほとんど得ることができなかった。ブリ<sup>45)</sup>、トビヌメリ<sup>101)</sup>、カンパチ<sup>102)</sup>、クロマグロ<sup>103)</sup>など主に春季または初夏を産卵期とする海産魚種においては、飼育水温をそれぞれの種が持つ適正水水域まで昇温し、そのレベルのまま維持することによって放卵と自発的な産卵行動を促進できることが報告されている。マツカワも産卵期は春季から初夏であると考えられるが、これらの魚種とは異なり自発的産卵を誘起するためには、何か他の特別な刺激が必要とされるのかもしれない。

1997年の実験で受精が起こったいずれの日においても、偶然に飼育水温が約2℃ほど急激に上昇していた。この現象は水温の急激な変化がマツカワの産卵行動を誘起する引き金となった可能性を示している。そのため、1998年の実験では、昇温刺激がマツカワの自発的産卵に及ぼす効果について検証した。同年齢の人工養成マツカワに定期的に昇温刺激を行いながら飼育した。その結果、雌の放卵頻度および日間採卵数は明らかに増加した。さらに、98No.2区においては水温変動と放卵パターンとの間に顕著な相関関係が認められた。これらの結果は、飼育環境下においてマツカワ雌の放卵は昇温刺激と密接に関連していることを示唆している。

また、昇温刺激を行った1998年の実験においては水槽内受精が頻繁に誘起され、受精誘起回数および得られた

総受精卵数は水温を維持して飼育した1997年のそれらに比べて明確に上回った。さらに受精卵の発生段階から受精が誘起された時刻を推定した結果、すべての実験区において昇温刺激の実施から24時間以内に頻繁に受精が誘起されていることが示された。これらの結果から、マツカワ人工養成魚に連続的に昇温刺激を行うことにより雌の放卵を促進できるばかりではなく、雌雄の産卵行動を効果的に誘導できることが強く示唆される。

現在のところ、天然環境下でマツカワの産卵行動誘起に関わっている環境要因についてはほとんど知見がない。1965年から1998年までの北海道太平洋岸におけるマツカワ漁獲調査によると、主に卵黄形成中の個体は12月から1月、水深300～600mの海域で漁獲されているのに対し<sup>4)</sup>、一方、成熟卵または排卵卵をもっている個体は4月から6月に水深5～50mの場所で漁獲されている<sup>104)</sup>。これらの情報に基づいて推測すると、本種の雌は春季に深層域から浅海域へと産卵を目的として移動すると考えられる。北海道太平洋岸においてこれらの浅海部では例年、特に5月から6月にかけて水温が突発的に急変動することが極めて多い(北海道栽培漁業振興公社 海洋環境観測データ)。産卵場と推測される海域の環境情報と飼育実験から得た産卵特性を併せて考えると、本種において産卵期に水温が急上昇するという現象は産卵行動を強く誘起する刺激として作用していることが想像される。そのため、定期的に昇温刺激を行うという操作は産卵誘導法として有効性が高いと考えられる。

1998年の実験の中で、98No.3区の雌は他区とは異なり、昇温刺激開始前すなわち6℃のままで飼育した期間においても放卵が頻繁に認められた。他魚種における産卵実験では、総産卵量や産卵期間は環境要因ばかりではなく、年齢<sup>67)</sup>や大きさ<sup>105)</sup>、栄養状態<sup>106-108)</sup>など親魚の性状によっても変動することが示されている。そのため、本種においても産卵能力は個体間で幅が広いのかもしれない。今後、より効率良い採卵技術を確立するためには、この点について詳細に解析する必要がある。

本実験において、昇温刺激はいずれの場合も10時から開始した。従って、飼育水温はおよそ16時に最高値(8～9℃)となり、翌朝10時までそのレベルのまま維持されたこととなる。一方、渡辺・鈴木<sup>94)</sup>は、飼育水槽内においてマツカワの産卵は主に22時から4時の間に頻繁に誘起されることを報告した。そのため、1998年の実験で産卵成績が優れていた理由の一つとして、本来産卵行動が起りやすい時刻に水温が上昇したため産卵誘起効果が相乗的に高まったことも推察される。従って、水温上昇がもたらす効果をより鮮明にするためには、今後、今回と異なる時刻から昇温刺激を行い産卵結果を比較検討す

る必要がある。

1999年の実験で、最も多くの受精卵を得ることができた99No.1の雌は2～4日周期で放卵したのに対し、ほとんど受精が誘起されなかった99No.3の雌では放卵の周期性は認められず、一日あたりの放卵量も少なかった。同様の現象は2000年の実験においても認められ、昇温刺激を行わなかった実験区の雌は少量の卵をほぼ毎日放出したが、一方、昇温刺激区の雌は2～4日と規則的な間隔で放卵を繰り返した。さらに、昇温刺激区ではほぼすべての放卵日で受精卵が確認され、その上、受精率は無刺激区に比べて大幅に上回った。これらのことから、雌の放卵周期と受精の可否の間には一定の関係が存在することが推測される。一般に、多くの多回産卵魚種において、産卵周期は水温<sup>(109)</sup>や光周期<sup>(110,111)</sup>、月周期<sup>(112)</sup>といった環境要因による制御を受けていることがよく知られている。Koya *et al.*<sup>(11)</sup>はマツカワ雌を用いて連日卵搾出実験を行い、水温6℃の場合、本種は平均3.5日周期で規則的に排卵していることを示した。従って、99No.1と2000年の昇温刺激区の雌は、昇温刺激の作用によって排卵周期と同調して卵放出を繰り返すことができたと考えられる。また、Koya *et al.*(1994)は、自発的産卵による受精卵確保が成功しない原因の一つとして、排卵は連続的に起るが放卵がスムーズに誘起されないため、卵が長期間卵巣構内に貯留されて過熟化し、体外に放出されても既に受精能が低下していることも指摘している。さらに我々はマツカワ卵の培養実験を行い、卵巣腔内において過熟化した卵は新たに排卵された正常卵の受精能を急速に低下させることを明らかにした(第Ⅲ章第1節)。従って、受精率が高い良質卵を得るためには排卵後できるだけ速やかに卵放出を促すことが極めて重要である。昇温刺激は雌の排卵リズムにあわせた規則的な放卵を促す効果があり、その結果、排卵卵の過熟化と受精能の低下を防ぎ、受精率が高い卵が得られると考えられる。

1999年の実験で、親魚の外観から排卵直前または排卵が始まったと判断された時点で昇温刺激を開始した場合(99No.1および99No.2)、産卵誘導がほぼ成功したのに対し、まだ最終成熟が不完全なまま刺激を与えた99No.3においては刺激を繰り返しても受精卵はほとんど得られなままに終わった。本結果のみからこの原因を明らかにすることはできないが、産卵誘導の成否には昇温刺激を開始する時点の雌個体の成熟度が重要であり、不十分な成熟状態で刺激を与えるとかえって生殖リズムが乱れてしまう可能性も考えられる。昇温刺激の開始タイミングについては今後検討を要する。

1999年と2000年の実験において、昇温刺激を停止しても2、3回分は連続して受精率が高い卵が得られた事例

もみられた。このことは、産卵誘導には必ずしも昇温刺激を頻繁に繰り返す必要はなく、一度放卵および受精が成功するとその後も自発的に産卵が続く可能性を示唆している。従って、効率良く受精卵を確保するためには、初回の刺激によって産卵を誘導した後は一時刺激を停止して産卵状況を観察し、放卵数や受精率が低下した場合に再度刺激を行う方法が適切と考えられる。

また、1998年における実験では一水槽あたり雌を3尾収容していたにもかかわらず、得られた受精卵量は2000年の実験で一尾の雌から得られた受精卵量に比べて少なかった。渡辺・鈴木<sup>(9)</sup>は漁獲されたマツカワ天然魚を大型の水槽を用い低密度で飼育することによって約1ヵ月間受精卵が得られたことを報告しており、さらに収容密度が本種の産卵に重要であることを示唆している。そのため、高い収容密度環境下では正常な産卵行動が阻害されることも推測される。従って、今後は、収容密度など水温以外の環境要因の影響についても検証する必要がある(本章第3節)。

以上の結果、本研究では、昇温刺激により飼育環境下においてもマツカワの放卵および受精を効果的に誘導できることを明らかにした。これらの結果は、人工授精法よりも大量の受精卵をより効果的に、且つ簡便に確保できることを示唆している。今後、最適な昇温刺激の開始タイミングやより効果的な水温上昇幅について解析を進めることにより、良質卵の安定確保が実現するであろう。また、先述したように、1993年には日本栽培漁業協会におけるマツカワ種苗生産でVNNが発生し甚大な被害が生じた<sup>(113)</sup>。VNNの感染原因としては母体から種苗へと伝播する垂直感染が確認されている<sup>(114)</sup>。本手法は、親魚に対してハンドリングによるストレスを与えないため、VNN防除という観点からも有益な手法といえよう。さらに、我々は人工養成マツカワから自発的産卵を誘導することに成功した。マツカワ天然魚の捕獲が極めて困難である現在、本知見は種苗量産化を進める上で、親魚不足という問題を解決するといった面でも有用性が高い。

## 第2節 精液産生に及ぼす昇温刺激の影響及び自発的産卵における受精率低下の原因

前節において、産卵期、マツカワ人工養成魚に昇温刺激を連続的に実施することによって雌の放卵を促進できるとともに、高い頻度で雌雄の産卵行動を誘導し受精卵を確保できることが示された。この成果によって、本種においてこれまで困難とされてきた自発的産卵誘導による採卵が可能であることが明らかとなった。今後、本採卵技術の確実性を高め、種苗量産現場で応用することが期待される。

昇温刺激による自発的産卵誘導法を大量採卵技術として定着させる場合、実際に昇温刺激がどの過程にどのような効果を及ぼすのかを十分理解することは極めて重要である。前節で、昇温刺激後は採卵量が増加し、また排卵周期と同調した放卵が促されることから、雌の生殖機構に作用しているのは疑いが無いが、一方、雄に対する効果は不明である。そこで本節では、昇温刺激を行った場合における雄親魚の精液量を連続的に調べ、昇温刺激が雄の精液産成に及ぼす効果を調べた。

また、前節の1998年の産卵誘導実験では、透明であり外観から良質と思われた卵が大量に回収されてもそのほとんどが未受精であり、受精率はわずか数%であった事例も多々みられた。これらの原因の一つとして、雌は多くの卵を放出したが雄の放精が同時に伴わなかった、または近接した位置で放精できなかつたなど雌雄の産卵行動が不完全であったことが推察される。しかし、これまでマツカワ雌雄の産卵行動に関する情報は全くなく、また、放卵後、環境水中で卵がどのくらいの時間、受精能を保持しているかについても知られていない。飼育環境下において受精は主に深夜から早朝といった静穏な暗所時に誘起されるため<sup>9)</sup>、撮影や目視観察によって産卵行動を確認するのは難しい。そこで本研究では、搾出して得た排卵卵と精液を様々な状況下で水槽内に人為的に滴下し、その受精率を調べることによって飼育水中における卵と精子の受精能の変化を解析した。さらに、その結果からマツカワの産卵行動を類推し、受精率の低下が生じる原因について考察した。

## 材料と方法

### 1. 雄の精液生成に及ぼす昇温刺激の影響

実験には3歳の人工養成魚の雄を使用し、それらを5尾ずつ2 t水槽2基へ収容した。実験開始までいずれも水温6℃、無給餌で飼育した。4月10日の16時に全供試魚を取り上げて腹部を圧搾し精子を完全に搾出した(Fig.48A)。その後、一方の水槽は水温6℃のまま飼育した(対照群)が、他方は4月11日の9時から水温を8.9℃まで一気に上昇させ昇温刺激を行った(刺激群)。刺激群の水温が完全にピークに達した16時に全個体を取り上げて再度採精し、採精量とスパマトクリット値を調べた。刺激群においては4月12日の9時から降温を開始し、その日の16時以後は6℃のまま飼育した。4月12日の16時に再び両群ともに採精し、得られた精液の状態を比較した。

### 2. 搾出した卵および精液の水槽内滴下実験：卵・精液の滴下時間差と受精率との関係

2003年の3月27日、4歳の人工養成魚の雌1尾および雄15尾を取り上げて腹部を圧搾し、それぞれ排卵卵と精液を採取した。精液はすべて混合し実験に用いるまで冷蔵保存した。得られた卵を50gずつ8組に分け、その内7組を産卵水槽とはほぼ同じ環境条件(水温8℃、通気量150ml/分、換水率25%/時間)に設定した200l水槽7基に投入した。さらに卵投入の直後(0秒)、15秒後、30秒後、1分後、3分後、6分後、12分後に精液を4mlずつ卵を投入したポイントに滴下した。また、残りの1組の卵を用いて乾導法により人工授精を行った(対照区)。24時間後、各水槽間の受精率を比較し卵投入から精液滴下までの時間経過に伴う受精率の変化を調べた。また、4月12日にも実験魚を変えて同様の実験を繰り返した。この場合、精液滴下までの経過時間を0秒後、1分後、10分後、20分後、30分後、1時間後、2時間後に設定した。

### 3. 搾出した卵および精液の水槽内滴下実験：卵・精液の滴下地点の距離と受精率との関係

卵放出時および精液放出時における雌雄の距離が受精にどのように関わるかを明らかにするため、長さ350cm幅50cm高さ40cmの直方形水槽4基(容量450L)を用いて卵・精液滴下実験を行った。2と同様の方法で採取した卵と精液を同時に、同地点(0m)と、距離を1、2m、3m離して滴下した。いずれの地点も水まわりや通気条件ができるだけ均等となるように水槽底面に通水管および通気管を這わせた。換水率と通気量は2の実験と同様にした。24時間後に各条件下での受精率を求めた。なお、この実験も後日、親魚を変えて再度繰り返した。

## 結 果

### 1. 雄の精液生成に及ぼす昇温刺激の影響

Fig.50B, Cに連続採精実験における採精量とスパマトクリット値の変化を示した。実験開始前である4月10日に全実験魚の精子を搾出し、体内に保留された精液をできる限りゼロに近づけた。その時の採精量およびスパマトクリット値はそれぞれ0.8~4.0ml(平均3.93ml)および45.0~68.9%(平均64.9%)であり、個体によって幅がみられた。刺激群と対照群のいずれも24時間後に再度採精した結果、両群とも平均3ml程度精液が得られたが、スパマトクリット値が約90%と高かった。また、採精量およびスパマトクリット値に実験区間で有意な差は認められなかった(Mann-Whitney U検定,  $p>0.05$ )。さらにその翌日も採精したところ、両群ともにスパマトクリット値がやや低下したが精液量は2~3ml程度と少なかった。

た。また、実験区間ではこれらの値に明確な差はなく、昇温刺激の有無によって精液の産生状況に違いはみられなかった。

2. 搾出した卵および精液の水槽内滴下実験：卵・精液の滴下時間差と受精率との関係

1回目の試験において、卵投入から最大12分後に精液を滴下しても受精率は60%以上であり、対照区および精液を同時に滴下した区との間に明確な差はみられなかった (Fig.51A)。2回目の試験では精液滴下までの時間を

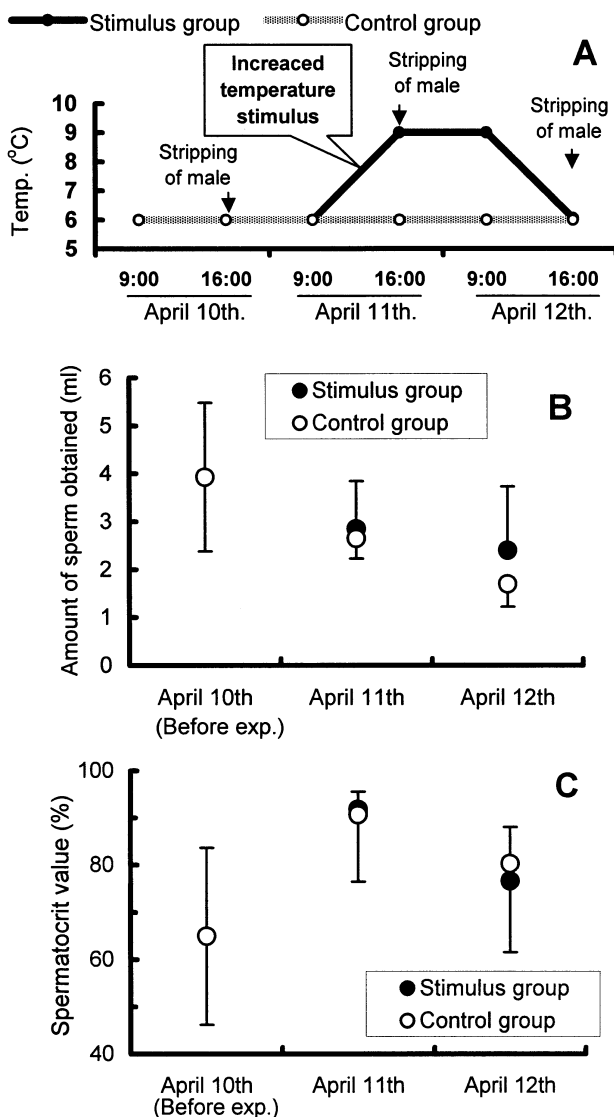


Fig.50 Effects of increase temperature stimulation on amount of sperm obtained by artificial stripping and spermatocrit value of sperm. A, experimental design; B, amount of sperm; C, spermatocrit value.

最大2時間まで延長した (Fig.51B)。その結果、受精率の低下は経過時間30分後まで緩やかであったが、それ以上精液滴下が遅れると受精率は急速に低下し、1時間後では18.2%、2時間後では4.6%となった。

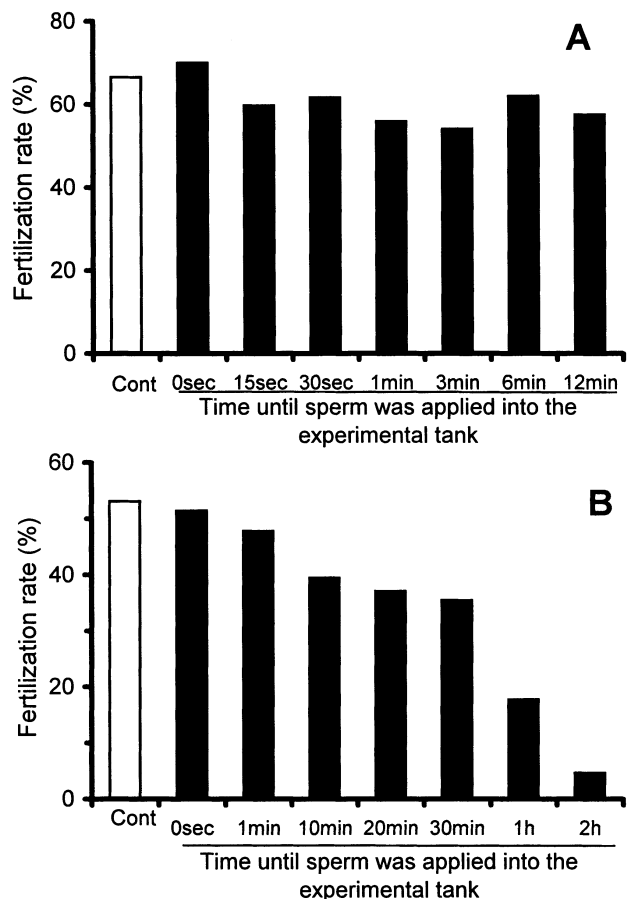


Fig.51 Relationship between fertilization rate and term from putting egg (egg release) to putting sperm (sperm release) into the spawning tank. A, trial 1; B, trial 2.

3. 搾出した卵および精液の水槽内滴下実験：卵・精液の滴下地点の距離と受精率との関係

試験1および試験2のいずれにおいても、卵と精子の添加距離が1m以内である場合、受精率は対照区と差がみられなかった (Fig.52)。一方、両者の添加地点が2m以上離れると、受精率は対照区の半分以下まで低下した。それぞれの区の平均受精率を統計学的に比較した結果、2mおよび3m離れて卵・精子を投入した場合、対照区 (乾導法)、その他の場合に比べて受精率が有意に低いことが示された (各データを逆正弦変換後、Tukey法により多重比較を実施,  $P < 0.05$ )。

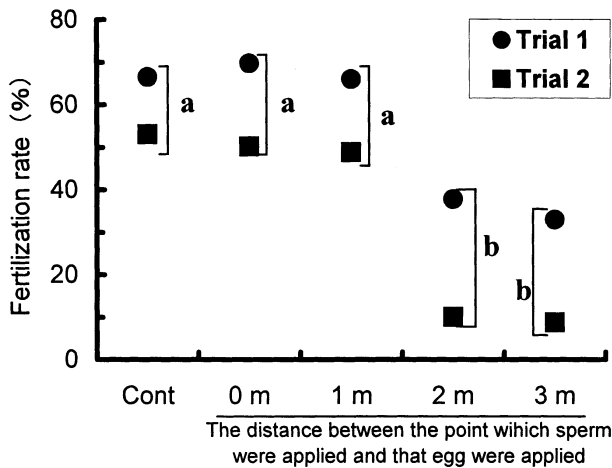


Fig.51 Relationship between fertilization rate and distance from the point putting egg (egg release) to the point putting sperm (sperm release) into the spawning tank. Different letter shows significant difference at the level of 0.05.

## 考 察

マツカワ雄に昇温刺激を行う場合と行わない場合における精液の産生を連続的に調べた結果、実験期間を通して昇温刺激の有無に関わらず採精量およびスパマトクリット値に明確な差は認められなかった。実験期間中に自発的な放精が起った可能性も否定できないため断定できないが、おそらく水温が急上昇しても雄の精液産生自体には影響がみられないと考えられる。一方、前節において昇温刺激を行うと、受精の誘起回数と受精率が上昇することが示されている。従って、昇温刺激は性行動の発現や放精に作用するのかもしれない。多くの魚種において、雄の性行動発現には11ケトテストステロンなどのアンドロゲン分泌が必須であることも報告されており<sup>115)</sup>、精子形成や精子成熟、性行動、放精といった一連の過程は内分泌因子の制御下にあることが疑いない。本種でも産卵期におけるアンドロゲンの挙動と水温変動など環境要因との関連性を調べることにより、昇温刺激が産卵期の雄の生理機能に及ぼす効果が明らかになるであろう。

また、本実験において前日に採精した場合、その24時間後は精子が得られてもスパマトクリット値が90%以上と高かった。スパマトクリット値が低下して粘性が低い精液となるには最低48時間以上かかることがわかった。一般にスパマトクリット値と精子の運動性は反比例し、スパマトクリット値が高い精液は受精には適さない<sup>116)</sup>。本種の雌は2～4日周期と間隔をあけて放卵するため、一度放精した雄も次回の放卵までに回復でき、理論上1ペアの雌雄から連続して受精卵が得られる。しかし、受精の成功率を高めるには雄の収容数が多い方が確実であ

ろう。

排卵された卵は、卵巣腔内では卵巣腔液に包まれた状態にある。この卵巣腔液は粘性を有する無色の液体であり、卵の物理的保護に加えて、受精能の保持や精子運動の活性化など様々な生理的機能を有すると考えられている<sup>117)</sup>。一方、卵が体外に放出されると時間経過に伴って受精能は低下し、また環境水に接触した刺激によっても卵は付活化するため、できるだけ早く精子にめぐり合い受精卵となる必要がある<sup>5)</sup>。山野目・平嶋<sup>118)</sup>は1Lビーカーを用い、止水条件下で海水接触後のマツカワ卵の受精能保持時間を観察している。それによると海水接触後30時間までは受精率が対照区(乾導法による人工授精)とほぼ差がなく、また海水接触2時間後でも受精率は約50%であることが報告されている。本実験ではできるだけ実際の産卵状況に近い環境を再現するため、容量200～500Lの水槽を用い産卵水槽と同じ割合で通水、通気を行いながら、卵・精液の滴下時間別実験を行った。その結果、卵と精子を同地点に投じた場合、卵投入の30分後に精液を滴下しても明確な受精率の低下は認められなかった。一方、精液投入までの時間を1時間以上に延長したところ、受精率は急速に低下し、2時間後ではほとんど受精しなかった。この結果は、水温6℃の場合、放卵しても最低30分までは卵の受精能は保たれたままであり、この時間内に放精が誘起されれば受精可能であることを示している。先述の山野目・平嶋<sup>118)</sup>の結果と本結果を比較しても、海水に接触30分後を境に受精率が急に低下するのはほぼ同じであり、再現性が高い現象と思われる。一方、海水接触2時間後の受精率は明確に差があり前者の方が卵の受精能が保たれていた。この違いの原因として、実験に供した卵の卵質に差があったこと、また本実験では通水・通気していたため卵が常に流動し卵の付活が早まったことが推測される。従って、実際の産卵水槽内では、卵放出後の受精能の低下は今回調べた現象よりも加速的に進行しているかもしれない。

さらに本実験では、放卵と放精が起きた地点間の距離が受精率に及ぼす影響を調べるため、卵・精液の滴下距離別の受精実験を行った。その結果、それぞれの滴下距離が1m以内である場合、受精率は対照区と差がみられなかった。これに対し、両者の滴下地点が2m以上離れたら受精率は急激に低下した。このことからマツカワの水槽内受精が成功するためには、雄が放出された卵の1m以内に接近して放精する必要があると考えられる。先に、環境水中で卵が受精能を保持できる時間は30分以上と比較的長いことが示された。そのため、受精率が低下する要因として、卵の付活ばかりではなく、水流などの物理作用により卵と精子が拡散し、希釈された影響が

大きいと推察された。

以上の結果、マツカワの自発的産卵における低受精率の原因としては、前節で述べた排卵後過熟による放卵前の卵質劣化と、雌雄のペアリングが伴わずに卵と精子が放出されたこと、すなわち放卵と放精の時間的・空間的なずれに大別できると考えられた。そのため、今後、受精率を向上させるためには、規則的な放卵を促し過熟化を防ぐこと、さらにペアリングが起りやすくなる（ペアリングを阻害しない）産卵環境を整えることが重要である。魚類の産卵行動が誘起されるメカニズムについては数種の淡水性魚類で報告があるのみで、未だ不明な点が多い。キンギョやドジョウでは排卵および放卵と同時にプロスタグランジン $F_2\alpha$  (PG  $F_2\alpha$ ) などフェロモン作用を持つ物質が環境水中に放出され、それは雄の嗅覚系に作用して雌に対する性行動を誘導すると考えられている<sup>119,120</sup>。もしマツカワでも同様の機構が存在すると仮定すると、排卵、放卵の正常化は雄の性行動誘起に繋がると考えられ、定期的に昇温刺激を行うことは極めて有効な飼育管理法だと思われる。また、収容密度や雌雄比等の環境要因はペアリングに直接的に関わる重要なファクターだと推測される。今後、これらの影響について実験的に検証する必要がある（本章次節）。

### 第3節 マツカワの自発的産卵に及ぼす親魚収容数および換水率の影響

これまでの研究で、産卵期の人工養成魚に昇温刺激を行うことにより効果的に放卵・受精を誘起でき、マツカワでも自発的産卵によって受精卵を確保できることが明らかになった。今後、種苗量産段階においてもこの産卵誘導技術を実用できるかどうかについて検討するとともに、技術改良を進めることが重要である。

ヒラメやマダイなど事業規模で種苗の大量生産を進めている施設では、飼育作業の効率化や生産コストの軽減という観点から多くの受精卵（またはふ化仔魚）を大型水槽にまとめて収容し集中的に飼育管理を行っている。これらの種は日間産卵量が数十～数百万粒と極めて多く、また産卵期間中はほぼ毎日産卵するため受精日が同一な受精卵を十分量確保することは比較的容易である。一方、マツカワの場合、一回の産卵量は8～10万粒程度と少なく、また一産卵期に3～4日置きと間隔をあけて排卵・放卵を繰り返す。そのため、短期間で同一日齢の受精卵を数多く得ることは難しく、この特性は種苗生産の事業化を展開する上で不利である。従って、自発的産卵誘導によって一度にできるだけ多くの受精卵を確保するためには、産卵水槽内に複数の雌親魚を収容して集中的に産

卵を誘導できる技術の開発が必要である。そこで本節では、雌親魚の収容数と産卵誘導効果との関連性について調べた。併せて、水温以外の飼育環境因子がマツカワの産卵に及ぼす影響を把握するため、飼育水の換水率と産卵との関わりについても解析した。

#### 材料と方法

##### 1. 自発的産卵に及ぼす雌親魚の収容数の影響

3歳の人工養成魚雌雄を用い、雌親魚の収容数別の産卵誘導実験を行った。2001年11月14日、8t水槽4基に雌親魚をそれぞれ1尾、2尾、3尾および5尾ずつ収容した（平均全長49.2cm）。併せて、全ての水槽に雄親魚を5尾ずつ収容し実験区No.1～4を設けた。いずれも飼育水温は、2002年3月5日まで地先自然海水温（最低水温1.8℃）とし、その後、徐々に加温して3月20日には6℃になるように調温した。また、4月1日から昇温刺激を連続的に行い、放卵および受精の誘起を試みた。毎朝、9時に排水口に設置した集卵ネット内の卵を回収し、採卵数および受精卵数を計測した。また、卵の回収時における受精卵の発生ステージを調べ、受精が起こった時刻と回数を推測した。例として、卵を回収した9時の時点で4細胞期と16細胞期の受精卵が観察された場合、その前日の22時と翌朝3時に合計2回は受精が起きたと考えた。

##### 2. 自発的産卵に及ぼすの換水率の影響：実験I

2002年と2003年に、容量8tの小型水槽を用いて換水率別の産卵誘導実験を行った。2002年では、8t円形水槽4基に3歳の人工養成魚（平均全長雌51.1cm、雄42.1cm）を一水槽あたり雌3尾雄6尾ずつ収容し4つの実験区を設けた。それぞれ通水量を調節して換水率を40%/時とする高換水率区（High turnover rate of rearing water group; HTR区と略）AおよびB、換水率を10%/時と設定する低換水率区（Low turnover rate of rearing water group; LTR区と略）AおよびBを設定した（Table 13）。飼育水温は、2002年3月4日まで自然海水温とし、その後、徐々に加温して3月10日には6℃になるように調温した。3月15日から昇温刺激を連続的に行い、放卵および受精の誘起を試みた。

また、2003年にも3歳の人工養成魚の雌雄（平均全長雌48.2cm、雄42.3cm）および8t円形水槽4基を用いて換水率別の産卵誘導実験を繰り返した。2003年は前年よりも雄親魚の収容数を増やし、一水槽当たり雌3尾雄9尾ずつ収容した。換水率を40%/時とするHTR-C区およびD区、10%/時とするLTR-C区およびD区を設けた。実験期間中における水温管理や昇温刺激は前年とほぼ同様



の手法で行った。また、いずれの年度も、上述の方法により採卵数、受精卵数、受精率および受精誘起回数を調べた。

Table13 Outline of the spawning experiment I using small sized tanks (8t) for barfin flounder reared under various turnover rates of sea water in 2002 and 2003.

Year	Experimental group	Number of fish (Male:Female)	Total length of female (cm)	Total length of male (cm)	Turnover rate of rearing water (%)
2002	HTR-A	9 (3:6)	50.9±2.7	42.4±1.7	40
	HTR-B	9 (3:6)	50.4±1.4	42.0±1.1	40
	LTR-A	9 (3:6)	51.3±1.8	41.2±2.0	10
	LTR-B	9 (3:6)	51.8±2.9	42.6±2.8	10
2003	HTR-C	12 (3:9)	48.8±0.6	42.4±0.7	40
	HTR-D	12 (3:9)	47.3±0.6	42.3±0.6	40
	LTR-C	12 (3:9)	48.0±1.3	42.7±0.6	10
	LTR-D	12 (3:9)	48.6±0.6	41.9±1.0	10

### 3. 自発的産卵に及ぼす飼育水の換水率の影響：実験Ⅱ

2002年と2003年に、容量30 tの大型水槽を用いて換水率別の産卵誘導実験を行った。2002年の実験では、30 t楕円形水槽2基に3歳の人工養成魚を一水槽あたり雌5尾雄20尾ずつ収容した。それぞれの換水率に差をつけるため通水量と水深を調整し、HTR-E区では換水率33%/時（水深1 m）、LTR-E区では11%/時（水深1.5m）とした（Table 14）。2003年の実験においても、同水槽に一水槽あたり雌5尾雄20尾ずつ収容し換水率別の産卵誘導実験を行ったが、この年は通水量の調節のみで換水率を決定した。従って、HTR-F区では換水率33%/時、水深1.5mおよびLTR-F区では換水率11%/時、水深1.5mであった。水温操作や卵回収の手法は実験Ⅰと同様とした。

### 4. 統計学的解析

換水率別産卵誘導実験Ⅰにおいては、2要因の分散分析（反復有り）によって総放卵数、受精卵数、受精誘起回数に及ぼす試験実施年度（要因1）と換水率の違い（要因2）の影響を統計学的に解析した。また、換水率別産

Table14 Outline of the spawning experiment II using large sized tanks (30t) for barfin flounder reared under various turnover rates of sea water in 2002 and 2003.

Year	Experimental tank	2002		2003	
		HTR-E	LTR-E	HTR-F	LTR-F
Number of fish (Female:Male)		25 (5:20)	25 (5:20)	25 (5:20)	25 (5:20)
Rearing condition					
Capacity	(t)	16	24	24	24
Depth	(m)	1	1.5	1.5	1.5
Bottom rea of tank	(m <sup>2</sup> )	16	16	16	16
Turnover rate of rearing water	(%/hour)	33	11	33	11
Total length ±SD					
female	(cm)	51.2±1.9	51.3±1.8	48.6±0.6	48.5±0.6
male	(cm)	41.5±2.5	41.2±2.3	42.3±0.8	42.6±0.6

卵誘導実験Ⅱでは、2要因の分散分析（反復無し）によって総放卵数、受精卵数、受精誘起回数に対し試験実施年度（要因1）と換水率の違い（要因2）が及ぼす影響を調べた。

## 結 果

### 1. 自発的産卵に及ぼす雌親魚の収容数の影響

Fig.53およびTable 15に実験期間における飼育水温、放卵数および受精卵数の変化を示した。雌を1尾だけ収容したNo.1においては、これまでの実験結果と同様に、2～4日間隔で放卵が確認された。また全ての放卵日で受精卵を得ることができ、受精率は23.7～100%と実験期間を通して高かった。雌を2尾収容したNo.2において、実験期間中ほぼ毎日放卵が確認された。受精卵の発生ステージから受精が起こった事例数を推測したところ合計21例であり、全区中、最も受精頻度が高かった。しかし、受精率は0.9～91.4%とNo.1に比べて低く、総受精卵数もNo.1を下回った。3尾の雌を収容したNo.3においては、推定受精誘起回数が18例とNo.2よりも少なかった。産卵の初期は受精率が高く、多くの受精卵を得ることができたが、産卵の中・後期になると受精は起こるものの受精率は10%程度に低下した。さらに、最も多くの雌を収容

Table15 Effect of the number of female broodstocks in spawning tank on spawning in barfin flounder.

Exp. Tank	No.1	No.2	No.3	No.4	
Number of fish	female	1	2	3	5
	male	5	5	5	5
-----					
Total number of eggs collected (x10 <sup>3</sup> )	446.3	690.9	770.8	1116.8	
Incidence of fertilization induced	7	21	18	9	
Total number of fertilized eggs (x10 <sup>3</sup> )	301.1	180.2	184.2	14.6	
Fertilization rate (%)	23.7 - 100.0	0.9 - 91.4	1.0 - 56.1	0.4 - 48.2	

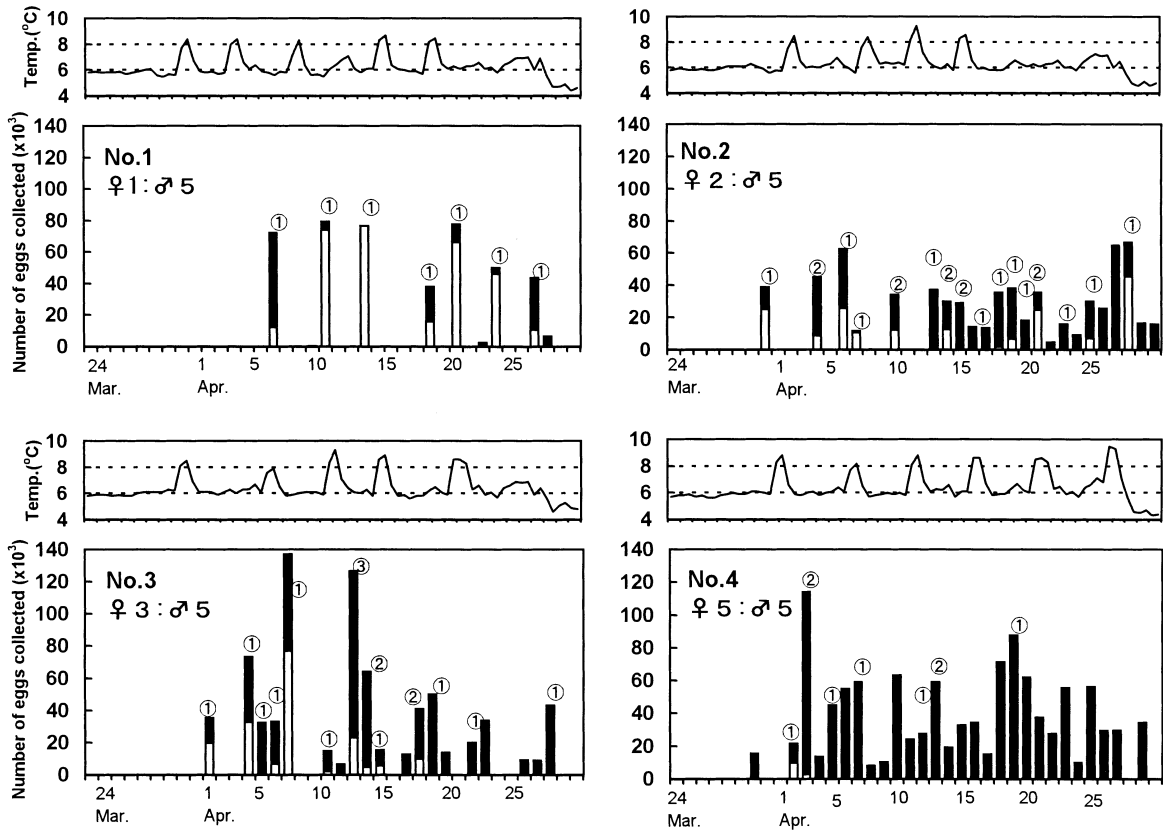


Fig.53 Changes in water temperature and the number of eggs collected in cultured barfin flounder during the experiments in 2001. Closed column, unfertilized egg; open column, fertilized egg. The number in the circles indicate the incidence of fertilization induced.

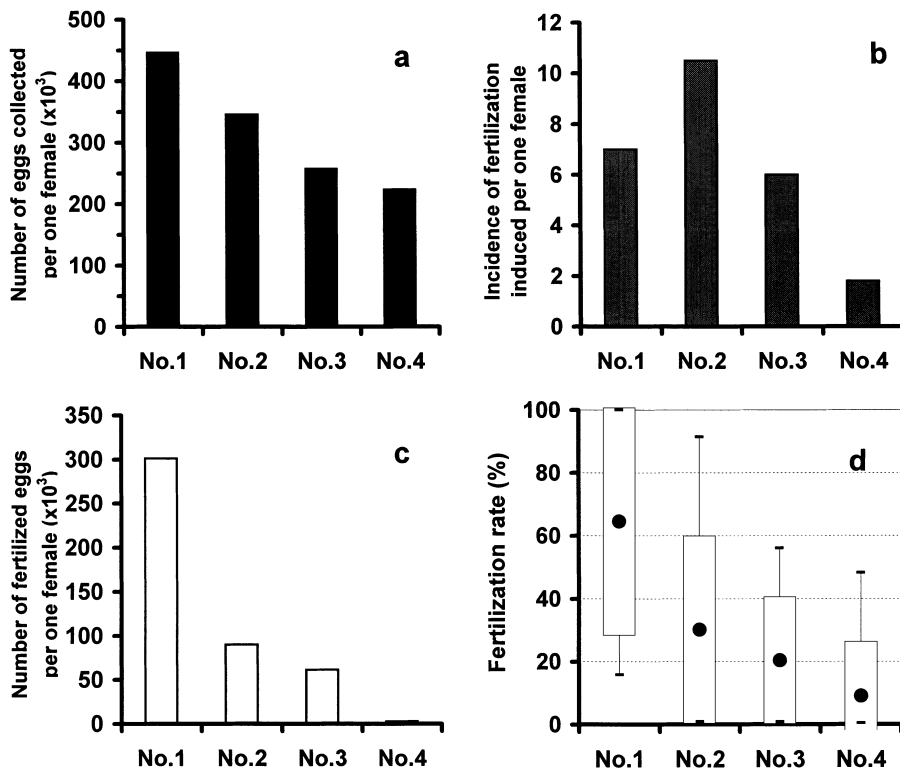


Fig.54 Effect of the number of female broodstocks in spawning tank on spawning in barfin flounder. (a) number of eggs collected per one female, (b) incidence of fertilization induced per one female, (c) number of fertilized eggs per one female, (d) fertilization rate; black point, mean value; column, SD; bar, minimum and maximum.

したNo.4では、昇温刺激の開始直後にやや受精卵が得られたが、その後、放卵は頻繁に起こるものの受精はほとんど誘起されなかった。

各実験区において雌一尾当たりで換算した放卵数、受精卵数、受精頻度および受精率の範囲について比較した。その結果、雌収容数が多くなるほど一尾当たりの放卵数は明確に低下した (Fig.54a)。また、雌一尾当たりの受精誘起例数はNo.2が10.5回/尾と最も多かったが、雌の収容数がさらに増加すると受精誘起例数が急減しNo.4ではわずか1.8回/尾であった (Fig.54b)。総受精卵数はNo.1で $308 \times 10^3$ 粒/尾と最も高く効率よく採卵することができたが、No.2~4はこれを遙かに下回り、雌収容数に反比例して受精卵数も低下した (Fig.54c)。中でも、No.2はNo.1より受精誘起例数が多かったにもかかわらず、得られた受精卵数はNo.1の1/4程度であった。受精率も雌の収容数との間に顕著な負の相関関係が認められた (Fig.54d)。

2. 自発的産卵に及ぼす飼育水の換水率の影響：実験 I

Fig.55およびTable 16に小型水槽を用いた実験 I における産卵結果を示した。2002年の実験において、ほぼ全ての実験区で例年よりも早い時期 (3月12~17日) から放卵が確認された。しかし、早期に得られた卵はほとんど未受精であり、いずれの区も受精卵が得られたのは4月以後であった。換水率が高いHTR-A区およびHTR-B区では、実験期間中、8例および22例受精が確認され、それぞれ $127.3 \times 10^3$ 粒および $301.0 \times 10^3$ 粒の受精卵が得られた。換水率を低く設定した実験区のうち、LTR-A区は高換水率の実験群とほぼ同数の受精卵を得ることができた ( $111.5 \times 10^3$ 粒)が、LTR-B区は受精例数が少なく、総受精卵数もわずかに $3.1 \times 10^3$ 粒と低かった。また、低換水率の実験区は高換水率群に比べて受精卵率が下回る傾向

がみられた。

2003年の実験においても3月上旬から放卵する個体が認められたが、前年と同様に受精卵が得られたのは4月以降であった。2003年は前年の実験に比べて総放卵量が下回る傾向がみられた。産卵状況は前年の結果とよく似ており、高換水率群は低換水率群に比べ受精卵数がやや上回り、また低換水率群の中には受精卵がほとんど得られない実験区 (LTR-D区) もみられた。

総採卵数、受精卵数、受精誘起例数に及ぼす試験実施年度 (要因1) および換水率の違い (要因2) の影響を2要因の分散分析により解析した。その結果、2002年の実験は2003年よりも総採卵数および総受精卵数が有意に多いことが示されたが ( $P < 0.05$ )、換水率の違いが産卵結果に及ぼす影響に関しては有意な差が認められなかった。

3. 自発的産卵に及ぼす飼育水の換水率の影響：実験 II

Fig.56およびTable 17に大型水槽を用いた実験 II における産卵結果を示した。実験 I と同様に、いずれの実験年度と実験区も例年より早い時期から放卵する雌個体が認められたが受精卵はほとんど得られず、受精頻度と受精卵率が増加したのは4月以後であった。2002年の実験期間における受精誘起例数および総受精卵数は、HTR-E区において20例および $246.1 \times 10^3$ 粒、LTR-E区において36例および $456.8 \times 10^3$ 粒であり、いずれも後者の方がやや値が上回った。一方、反対に2003年の実験においては、換水率が高いHTR-F区で計44例受精が確認され $537 \times 10^3$ 粒もの受精卵が得られたのに対し (受精卵率1.2~96.3%)、LTR-F区においては放卵は連続的に認められるものの受精誘起例数が14例と極めて少なく、HTR-F区に比べて総受精卵数が著しく劣った。総採卵数、受精卵数、受精誘起例数に対して試験実施年度 (要因1) および換水率の

Table 16 Results of spontaneous spawning in barfin flounder reared under various turnover rate of sea water during the experiment I in 2002 and 2003.

Year	Experimental group	Number of eggs collected ( $\times 10^3$ )	Number of fertilized eggs ( $\times 10^3$ )	Incidence of fertilization induced	Fertilization rate (%)
2002	HTR-A	1113.8	127.3	8	12.6-42.4
	HTR-B	1122.9	301	22	0.6-60.8
	LTR-A	1193.9	111.5	22	0.5-33.8
	LTR-B	934.5	3.1	7	0.7-5.0
2003	HTR-C	884.9	82.4	20	0.7-66.4
	HTR-D	685.7	65.2	12	0.5-50.3
	LTR-C	333	17.5	7	3.8-16.3
	LTR-D	662.4	68.8	12	1.1-49.2

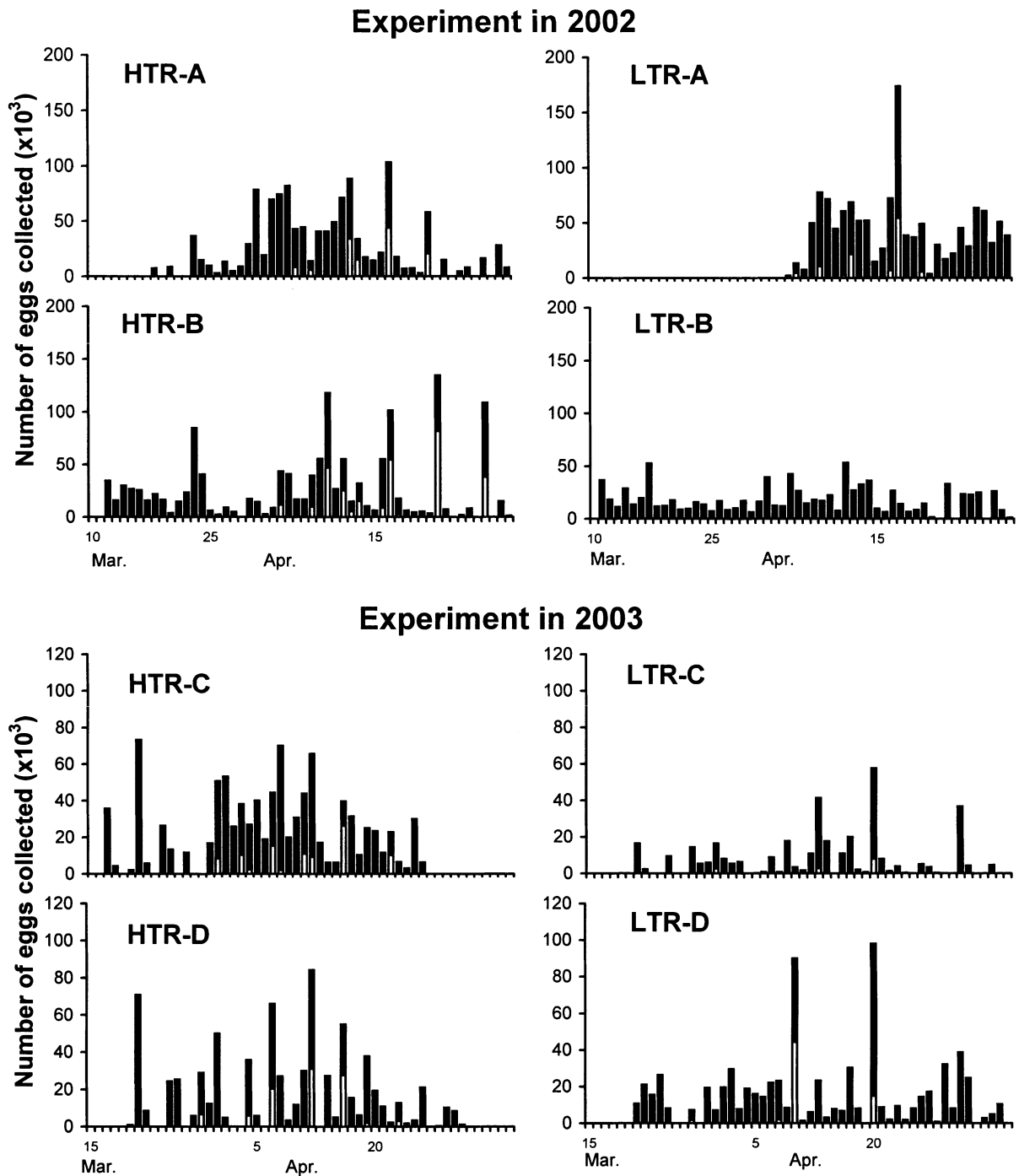


Fig.55 Changes in the number of eggs collected and fertilized eggs during the experiment I in 2002 and 2003.HTR, high turnover rate of rearing water; LTR, low turnover rate of rearing water. Closed column, unfertilized egg; open column, fertilized egg.

違い（要因 2）が及ぼす影響を 2 要因の分散分析（反復無し）により解析した結果，実験 I と同様に 2002 年の実験は 2003 年よりも総採卵数および総受精卵数が有意に多かったが（ $P < 0.05$ ），換水率の違いが産卵結果に及ぼす影響に関して有意差がみられなかった。

### 考 察

本節ではマツカワの自発的産卵誘起に産卵水槽中の雌の収容数が及ぼす影響について解析した。水槽内に雌 1 尾と雄 5 尾を収容した No.1 の場合，これまでの実験結果と同様に，雌はおよそ 3，4 日間隔で放卵を繰り返した。さらにすべての放卵日において受精が確認され，受精率が高い良質卵が大量に得られた。一方，雌収容数を 2 尾

(No.2), 3尾 (No.3) および5尾 (No.4) へと増やすと、卵はほぼ毎日得られたが受精誘起回数および受精卵率は減少し、雌を5尾収容した区ではほとんど受精卵が得ら

れなかった。反復実験がないため統計学的な有意差を示すことはできないが、本結果から雌の収容数を増加させると何らかの作用によってマツカワの自発的産卵が阻害

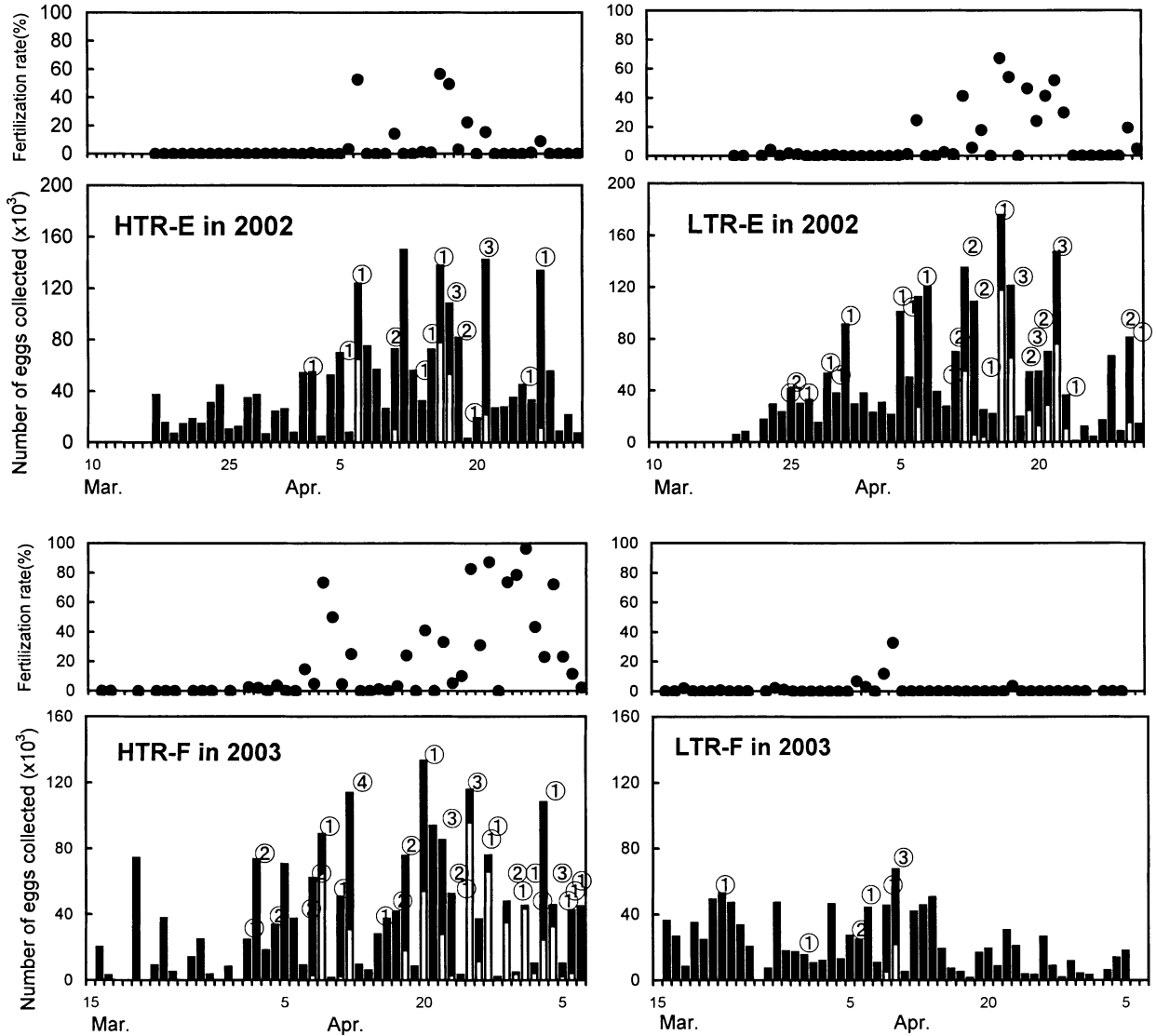


Fig.56 Changes in water temperature, the number of eggs collected and fertilization rate during the experiment II in 2002 and 2003. HTR, high turnover rate of rearing water; LTR, low turnover rate of rearing water. Closed column, unfertilized egg; open column, fertilized egg. The number in circles indicate the incidence of fertilization induced.

Table 17 Results of spontaneous spawning in barfin flounder reared under various turnover rate of sea water during the experiment II in 2002 and 2003.

Year	2002		2003	
	HTR-E	LTR-E	HTR-F	LTR-F
Number of eggs collected	(x10 <sup>3</sup> ) 1881.4	1775.8	1470	1073.7
Number of fertilized eggs	(x10 <sup>3</sup> ) 246.1	456.8	537	33.2
Incidence of fertilization induced	20	36	44	14
Fertilization rate	(%) 0.6-56.6	0.3-67.1	1.2-96.3	0.6-32.7

されることが強く示唆される。

一般に、産卵水槽内の親魚の密度や雌雄の比率は産卵に影響する因子として重要視されているが、それらの因子が具体的に産卵のどの過程に影響するのかは明らかにされていない。本研究では、雌の個体数が増加したことに注目して解析した。その結果、雌収容数が多くなるに従い、雌一尾当りに換算した総放卵数は明らかに減少した。複数の雌が存在する状況下では個体ごとの放卵状況を正確に把握できないが、雌収容数の増加によって排卵周期にあわせたスムーズな放卵が阻害された可能性が高い。

また、個体当たりの受精誘起例数（一個体の雌が実験期間中に受精に関与したと推測される事例数）を推定したところ、No.2が10.5回/尾と最も多かった。一方、雌収容数がさらに多くなった場合、受精誘起例数は減少しNo.4ではわずか1.8回/尾であった。さらにNo.1では、産卵期間を通して受精卵率が23.7~100%と高かったのに対し、No.2~4ではそれぞれ0.9~91.4%、1.0~56.1%および0.4~48.2%と雌収容数の増加に伴って低下した。中でも、No.2はNo.1の3倍もの受精が誘起されているにもかかわらず、得られた総受精卵量はNo.1を下回った。No.2~4では複数の雌が同時刻に産卵行動を起こした事も想定できるため、今回推定した受精誘起回数は過小評価されている可能性もある。しかし、これらの水槽では総受精卵数も、また受精率も低いことから、放卵、放精は起っていたとしても正常な状態で誘起されたとは考えにくい。このことから、雌収容数の増加は雌の放卵のみならず雌雄の産卵行動にも悪影響を及ぼすと推測される。

本結果から、雌収容数の増加がどのような機構によって受精卵率の低下に繋がったかは解明できないが、その原因として、①放卵不調による卵の過熟化の影響、②ペアリングを伴った産卵行動が阻害された影響が推察される。①に関して、第三章第1節で示したように、排卵後すぐに放卵されずに卵が長期間滞留すると受精能が低下し、さらに一度卵巣腔内で滞留卵の過熟化が生じるとその後排卵される正常卵の卵質も加速的に劣化する。No.3とNo.4で産卵期中・後半以降はほとんど受精しなかったことはこれに起因していると思われる。収容数の増加によるストレスが放卵周期の乱れとなり、過熟化を誘引したのかもしれない。また、②に関して、本章2節で示したように自発的産卵で受精が成功するには、雌雄が1m以内に近接した状況下で卵および精子を放出する必要がある。No.2~No.4は多量の卵が放出されても受精率は10%以下と低い事例が多く、放卵と放精が同調して行われていないことが伺える。他個体の存在によるストレスがペアリングを阻害するのかもしれない。また、前述し

たように数種の魚類において産卵期の雌は排卵とともに雄の性行動を誘引するフェロモン物質を放出することが示されている。仮にマツカワでも同様の機構が存在すると仮定すると、雌の数が多い場合、産卵開始期はフェロモンの刺激により産卵行動が効果的に誘起されるが、その後、多数の雌が一斉に排卵・放卵を続けるとフェロモン物質が常在している状態になり、雄のフェロモンに対する反応性は微弱となって受精が起こらなくなると推察される。一方、雌の数が少ない場合、3、4日周期で間隔をあけて排卵・放卵するため、雄はその都度放出されるフェロモンに反応でき、結果として継続的にペアリングを伴った産卵行動を起こすことができると考えられる。この仮説を確かめるためには、飼育水の換水率を高めることにより産卵行動を持続できるかどうかについて検討する必要がある。

そこで、マツカワの自発的産卵と飼育環境の換水率との関連を調べるため、2002年と2003年の2年間、雌親魚を複数収容した条件下で換水率別の産卵誘導実験を行った。小型水槽を用いた実験Iにおいて、2002年および2003年のいずれも換水率を40%に設定した高換水率群では換水率10%の低換水率群よりも多くの受精卵が得られ、受精卵率も高い傾向がみられた（ただし、産卵結果に統計学的な有意差はみられない）。また、高換水率群の場合、全実験水槽間で産卵結果にバラツキは小さく比較的安定的に受精卵が得られた。一方、低換水率群では放卵量および受精卵量がともに少ない産卵不調水槽が4水槽中2水槽（LTR-BおよびLTR-C）認められ、産卵結果に変動が大きかった。この傾向は大型水槽を用いた実験IIでも観察され、高換水率区の総受精卵数は $246.1 \times 10^3$ 粒（2002年）、 $537 \times 10^3$ 粒（2003年）であったのに対し、低換水率区では2002年は $456.8 \times 10^3$ 粒と多かったものの、2003年はわずかに $33.2 \times 10^3$ 粒であった。以上の結果、通水量が少なく飼育水が滞留した条件下では産卵不調が起りやすく、飼育水の換水率を高く保つことは自発的産卵を安定的に誘起する上で必要と考えられる。すなわち、飼育環境の換水率はマツカワの自発的産卵を促進する要因ではないが、制限要因となりうることが示唆される。

実験Iにおいて、収容尾数12尾（雌1：雄3）と設定した2003年の実験区は、収容尾数9尾（雌1：雄2）とした2002年の実験区に比べて放卵数および受精卵数が有意に下回った。また、実験IIで、換水率を高めるため水深を下げた2002年のHTR-E区はLTR-E区よりも受精回数および受精卵量が劣ったが、同じ水深とした2003年においてはHTR-F区の方がLTR-F区よりも良好な産卵結果を示した。これらの結果は密度や雌雄比といった親魚の収容状況にあわせて水深などの水槽形状が産卵に影響して

いることを示唆している。これまで渡辺・鈴木<sup>94)</sup>はマツカワの産卵には収容密度や水槽形状が関与し、大型の水槽内に0.24～0.26尾/haといった低密度で親魚を収容することが必要であると報告している。そのため、飼育密度の増加、雌雄比、水深等も重要な制限要因の一つと考えられ、今後、実験的に証明する必要がある。

また、2002年および2003年のいずれにおいても、例年より早い時期3月上旬から放卵する親魚がみられた。しかし、この時期に得られた卵はほとんど未受精であり、受精頻度および得られる受精卵数が増加するのは4月以後であった。この結果は、本実験で使用した3歳魚群内において雌の成熟進度にずれがあったこと、さらに3歳魚雄の場合、自発的な放精が可能となるのは4月以降であることを強く示唆している。今後、より効率良く受精卵を確保するには、使用する親魚雌雄の産卵行動の可能時期や期間について十分把握するとともに成熟進度が早い4歳以上の雄を混養することも検討する必要がある。

また、実験IおよびIIの産卵結果を調べると、多くの受精卵が得られた日は2～4日間隔で続いていた。このことは、水槽内での受精には特定の雌のみ、または特定のペアのみが関わっている可能性を示唆している。近年、魚類でもマイクロサテライトDNAを用いた親子判別技術が開発され、それによってヒラメ種苗生産現場での自然産卵による交配状況が解析されている。その結果、多数の雌個体の放出した卵に対し、一尾の雄だけが受精に加わっていた例もみられる(鈴木、私信)。現在、マツカワにおいてもマイクロサテライトDNAによる親子判別技術開発が進められており、今後、産卵状況を確認できるとともに産卵に適する優良個体の把握・選別が期待される。

種苗の大量生産を行う場合、受精日がほぼ同一な受精卵を大量に確保することは、飼育作業の効率化や生産コストの軽減という観点からも有用である。そのため、産卵水槽に多数の雌を収容し集中的に産卵誘導できれば理想的である。しかし本結果から、マツカワにおいて産卵水槽内における雌親魚数の増加は、正常な産卵行動に対し制限要因として働く可能性があり、親魚の過剰な収容は放卵量の低下や受精誘起回数、受精卵率の低下に繋がると考えられた。そのため、水槽規模とあわせて最適な収容数(限界数)を明らかにする必要がある。また、飼育水の換水率には産卵促進効果はないが産卵不調の原因となる可能性があるため、雌を多数収容する際には換水率を30%/h程度まで高く保つ必要がある。さらに、今後、親魚の成熟度や産卵行動の可能時期、個体差によるポテンシャルの差について詳細に解析することにより、採卵を念頭においた親魚群の管理や優良ロットの選択が可能となり、より効率的な受精卵確保が実現す

ると思われる。

## 第V章 マツカワ仔魚における初期減耗の原因解明および防除技術の開発

魚類の種苗生産において、健康な種苗を生き残り良く育成することは最も重要な課題である。ふ化してから目標サイズになるまでに生き残った仔稚魚の割合(生残率)はその魚種の飼育技術レベルを因る一指標であり、生残率の向上は仔稚魚飼育技術の開発における第一目標といえる。

一般に、多くの海産魚種では、飼育開始から初期、すなわち体型や各器官の機能が未発達である仔魚期に大量減耗が高頻度で発生する。マツカワ種苗生産においても同様であり、変態や着底する前の浮遊仔魚の段階で著しいへい死が生じやすい。Table 18に北海道におけるマツカワ種苗生産で発生した大量減耗をまとめた。発生日齢や原因にやや違いはあるが、いずれも浮遊仔魚期に集中して発生し、またその減耗率は最大90%以上と極めて大きいことが分かる。一方、大量減耗の発生は安定した種苗供給を脅かすとともに、生産コストといった経済面にも大きなデメリットをもたらす。従って、マツカワ栽培漁業を進める上で初期減耗の防除は極めて重要な課題である。

初期減耗の発生要因を探るうえで、仔魚がへい死に至る状況を正確に把握することは不可欠である。Fig. 57に1998～2000年のマツカワ仔魚飼育8例におけるへい死個体数の推移を示した。ロットが異なる以外、ほぼ同じ条件下で飼育した。それによると、いずれの飼育ロットにおいても共通して日間死亡数は18～20日齢にかけて顕著に増加し、その後、一時減少するものの、25～28日齢時の成

Table 18 Mass mortality of larval barfin flounder during seed production in Hokkaido Institute of Mariculture.

Year	Larval age (days after hatching)	Cause of mortality	Survival rate of each rearing tank (%)
1991	18-20, 25-35	early larval mortality, disease?	4.1
1992		No record	33.0
1993		No record	25.0
1994	17	early larval mortality	0.0-5.0
1995		No record	22.0
1996	10-20, 33-55		1.0
1997	18-20	early larval mortality	19.6-71.7
1998	19-20	early larval mortality	1.0-32.1
1999	26-28	early larval mortality	3.4-37.1
2000	26-28	early larval mortality	13.6-46.3

長段階において再び著しく増加した。1998年は前者の時期に、1999年と2000年においては後者の時期に死亡が集中的に発生した。いずれの年度およびLot.も、仔魚が30日齢をこえるとへい死はほとんど発生しなくなった。1999年のロット1において、へい死が発生した状況を詳しく調べた。その結果、最初にへい死が増加した18~20日齢時に仔魚の平均全長は $7.4 \pm 0.3$ mm(19日齢時測定)であり、またこの時期の死亡個体はほぼ全てが空胃であった(Table 19)。一方、2度目のへい死が観察された25~28日齢時では、仔魚の平均全長は $8.8 \pm 0.7$ mm(27日齢時測定)であり、先とは異なって、死亡個体の消化管内には餌料生物が多量に認められた。さらに、へい死が増加する前日に仔魚が底層へと一斉に沈降する現象も観察され

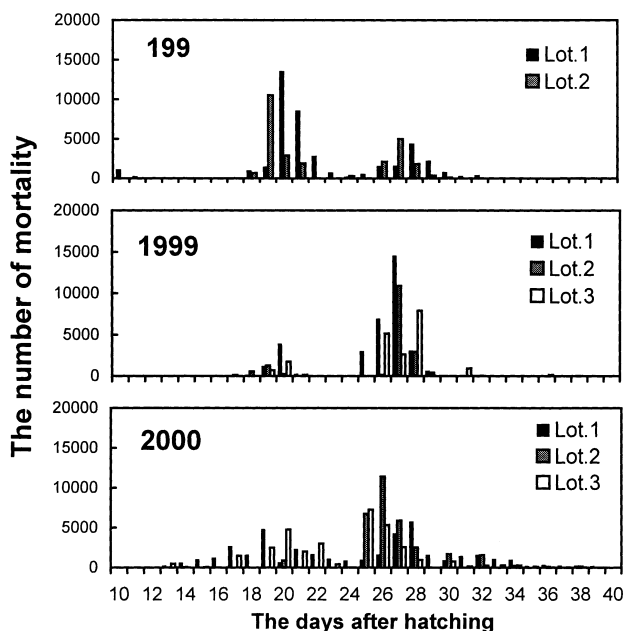


Fig.57 Changes in the number of larvae that died during early larval rearing in 1998, 1999 and 2000.

Table 19 Mean total length and feeding incidence of the larval barfin flounder died on 19 days after hatching and 27 days after hatching in 1999.

Age (days old)	Total length (mm $\pm$ SD* <sup>1</sup> )	Feeding incidence* <sup>2</sup> (%)
19* <sup>3</sup>	7.4 $\pm$ 0.3	4.3 (n = 208)
27* <sup>4</sup>	8.8 $\pm$ 0.5	84.3 (n = 115)

\*<sup>1</sup>: standard deviation

\*<sup>2</sup>: (Number of larvae with food in gut) x 100/ total larvae

\*<sup>3</sup>: larval age when first mass mortality was observed during seed production

\*<sup>4</sup>: larval age when second mass mortality was observed during seed production

た。以上のことから、マツカワ仔魚の初期減耗は18~20日齢の上屈前仔魚と呼ばれる時点と、26~28日齢時の上屈仔魚になった時点の2度において、それぞれ異なる要因によって生じていると考えられる。

そこで本章ではマツカワ仔魚の初期大量減耗を防ぎ種苗生産における生残率を向上させることを目的とした。第1節では18~20日齢時に発生する減耗要因とその防除対策について調べた。また、その中で仔魚の生残に初期発育段階における摂餌レベルが強く関連していることが示唆された。そこで第2節において、仔魚期におけるマツカワの摂餌特性と摂餌活性に及ぼす環境要因の影響について解析した。さらに第3節では26~28日齢時に発生する減耗要因とその防除対策について検討した。

### 第1節 マツカワ仔魚の初期摂餌および生残に及ぼすナンノクロロプシス *Nannochloropsis oculata* 添加の影響 (上屈前仔魚期に発生する減耗の防除)

先述のように本種の種苗生産過程の中では、ふ化後18日齢~20日齢(上屈前仔魚:ステージD)と26日齢~28日齢(上屈仔魚:ステージE)の発育段階において、仔魚の大量へい死が生じやすい。初期減耗は生産効率の低下、また時として種苗の供給不能に繋がるため、その発生要因を早急に解明し、適切な飼育システムを確立する必要がある。前述したように、最初の減耗期である18~20日齢時に生存個体は餌料を摂食していたが、死亡個体はほぼすべてが空胃であった。従って、この時期の減耗には初期発育過程における摂餌状態が関連している可能性がある。そこで先ず、マツカワ仔魚の摂餌に種々の飼育環境因子がどのような影響を及ぼしているのかを解明することが重要と思われる。

一般に、多くの魚種の種苗生産過程において、飼育海水中に単細胞緑藻類など<sup>121,129)</sup>の植物プランクトンを添加し仔魚を飼育する手法が用いられている。中でも、ナンノクロロプシス *Nannochloropsis oculata* (以下、ナンノと略)は、大量培養が可能であることから、仔魚の飼育水添加用プランクトンとして最も広く利用されている<sup>123)</sup>。ナンノ添加海水飼育の利点として、水質の安定化、初期餌料であるシオミズツボワムシ(以下、ワムシと略)の活力維持、水中照度の低下などが期待されているが、ナンノが仔魚の発育過程に対してどのような役割を果たしているかについては十分検討されていない。また、従来、マツカワの種苗生産においても、ナンノ添加海水による飼育を行ってきたが、マツカワ仔魚に対する有効性や適正な添加濃度についてはまったく知見がない。

そこで本研究では、ナンノ添加海水による飼育が、マ



ツカワ仔魚のワムシ摂餌と成長、初期生残に及ぼす影響を明らかにするため、通水条件別およびナンノ添加濃度別の飼育実験を実施した。さらに、その知見に基づき、マツカワ仔魚の初期減耗を抑制できる飼育条件について考察した。

## 材料と方法

### 1. 供試魚

栽培センターにおいて養成した3～5歳の雌雄から、卵・精子を搾出し、人工授精を行って受精卵を得た。受精卵を水温8℃、流水、強通気条件下でふ化まで管理し、得られた仔魚を実験に供した。通水条件別飼育実験においては、3歳魚から得られたふ化仔魚を用い、また、ナンノ添加濃度別飼育実験には、5歳魚由来（ロット1）および4歳魚由来（ロット2）のふ化仔魚を使用した。

### 2. 生物餌料の培養

飼育水に添加するナンノは、北海道栽培漁業振興公社瀬棚事業所から譲り受けた株と栽培センターで培養した株を元種とし、栄養塩を添加しながら拡大培養したものである。実験期間中、7tキャンバス水槽4基を用いて培養し、培養密度が2,000万cell/mlをこえた水槽から飼育水添加のため収穫した。

仔魚の初期餌料として給餌したワムシは、栽培センターで継代的に培養していたS型・L型混合ワムシである。また、25日齢から給餌したアルテミアは、市販の北米産アルテミア乾燥卵を水温28℃、強通気条件下でふ化させたものである。なお、ワムシおよびアルテミアには、給餌前にそれぞれアクアラン(BASF社)およびDHAc(オリエンタル酵母)・メガビット(フジタ薬品)で栄養強化を施した。

### 3. 通水条件別飼育実験

1999年4月に、1t水槽3基に5日齢の仔魚を2万尾ずつ収容し、実験区A～Cを設けた。10日齢からナンノを50万cell/mlの濃度になるように添加し、同時にワムシ給餌を開始した。いずれの区も、毎朝9時にナンノおよびワムシを添加した後は一時通水を停止した。また、通水環境の違いが仔魚のワムシ摂餌に及ぼす影響を比較するため、A区では給餌2時間後から、B区では4時間後から、またC区では8時間後から通水を再開した。ワムシ給餌は実験を終了する35日齢時まで実施し、また、25日齢以降はアルテミアを併用して給餌した。ワムシおよびアルテミアの給餌密度は、それぞれ10～20個体/mlおよび1～2個体/mlとした。仔魚を収容後、飼育水温を9℃から0.5℃/日の割合で徐々に上昇させ、16日齢以

降は13～14℃の範囲になるように調温した。実験期間における通水量および通気量は、それぞれ1,000～3,000l/日および0.6～0.8l/分とした。

仔魚が13日齢および20日齢になった時点で、ワムシ摂餌状況を調べた。給餌から2時間おきに仔魚をサンプリングし、それらを10%ホルマリン海水で固定した後、実体顕微鏡下で開腹して消化管内におけるワムシの個体数を計数した。また、給餌8時間後において、採集した全仔魚のうち消化管内にワムシが認められた仔魚の割合(群摂餌個体率)を求めた。併せて、35日齢時に全生存魚を計数し、生残率を求めた。

### 4. ナンノ添加濃度別飼育実験

2000年4月に、0.5t水槽4基に5日齢の仔魚を1万尾ずつ収容して、実験区①～④とした。10日齢から飼育水中にナンノを①区で320万cell/ml、②区で160万cell/ml、③区で40万cell/mlとなるように添加した。また、④区では実験期間を通してナンノを全く添加しなかった。全実験区ともに、10日齢からワムシ給餌を開始した。いずれの実験区も、ワムシ給餌後は8時間止水状態のまま飼育した。その他の基本的な飼育条件は前実験と同様に設定した。

10日齢から25日齢まで、3日おきに各実験区における仔魚の成長、給餌8時間後の群摂餌個体率、摂餌が認められた仔魚における消化管内ワムシ数を調べた。また、35日齢まで毎日底掃除を行い、日間死亡魚数を計数して生残率の経時変化を調べた。なお、実験結果の信頼性を高めるため、本実験はロット1と2のふ化仔魚を用いて2回繰り返した。

### 5. 統計学的解析

実験データは平均値±標準偏差で表した。実験区間における有意差は、一元配置分散分析を行った後、Tukey法により多重比較を実施し調べた。

## 結 果

### 1. 初期摂餌および生残に及ぼす通水条件の影響

実験区A～Cにおける飼育水中のナンノおよびワムシ密度の変化をFig.58に示した。ナンノおよびワムシ添加後、8時間通水を止めたC区において、ナンノ濃度は47.3～65.0万cell/mlと添加直後の値のまま推移した。一方、給餌2時間後および4時間後から通水したA区およびB区では、通水開始後、ナンノ濃度は直線的に低下し、8時間後にはそれぞれ8.0cell/mlおよび20.1万cell/mlとなった。飼育水中のワムシ密度は、どの区も添加後の時間経過に伴って徐々に低下した。また、ナンノとは異なる

り、飼育水上層および中層のいずれにおいても、実験区間でワムシ密度に明確な違いは認められなかった。

Fig.59に、給餌8時間後の群摂餌個体率を示した。摂餌を開始したばかりである13日齢時、C区では約80%以上の仔魚がワムシを摂餌していたのに対し、A区およびB区の摂餌個体率はそれぞれ18.5%および30.4%とC区に比べて明らかに低かった。また、摂餌がみられた個体において、消化管内ワムシ数の経時変化を調べたところ、

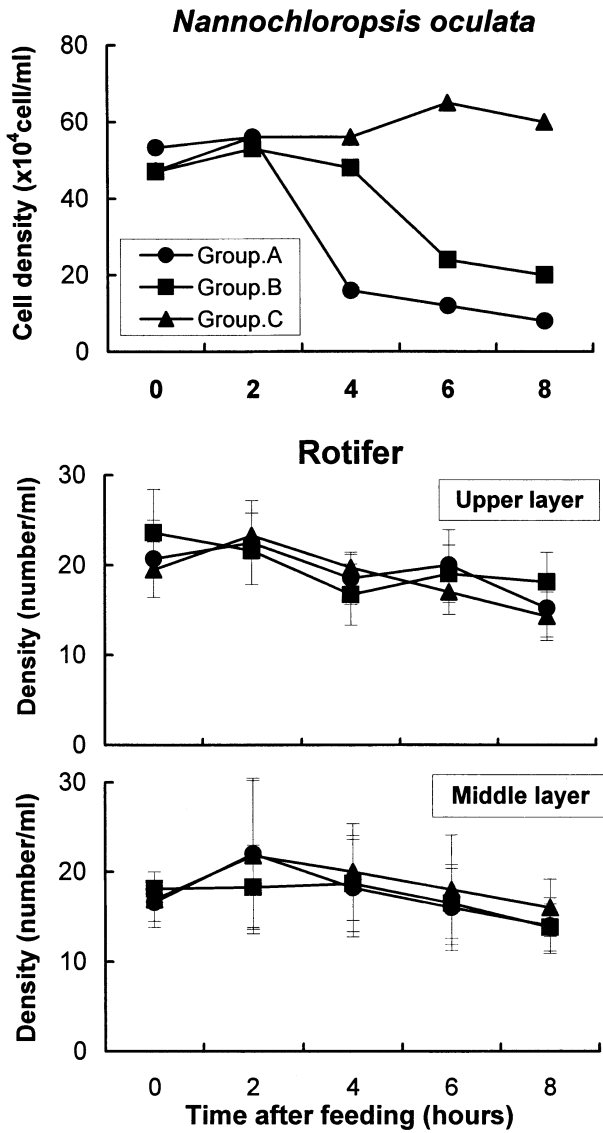


Fig.58 Changes in the density of Nannochloropsis and rotifer in the rearing water during experiment. Larval barfin flounder aged 10 day old were reared for 25 days under different conditions of inflow of fresh seawater. Each bar indicates SD. Group A, larvae were reared without inflow of fresh seawater for 2 hours after rotifer; Group B, larvae were reared without inflow of fresh seawater for 4 hours after rotifer; Group C, larvae were reared without inflow of fresh seawater for 8 hours after rotifer.

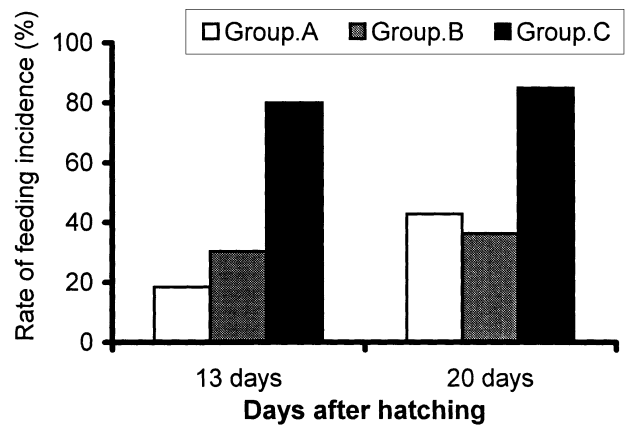


Fig.59 Rate of feeding incidence 8 hours after rotifer addition of 13 day- and 20 day-old larval barfin flounder. Larval barfin flounder aged 10 day old were reared for 25 days under different conditions of inflow of fresh seawater.

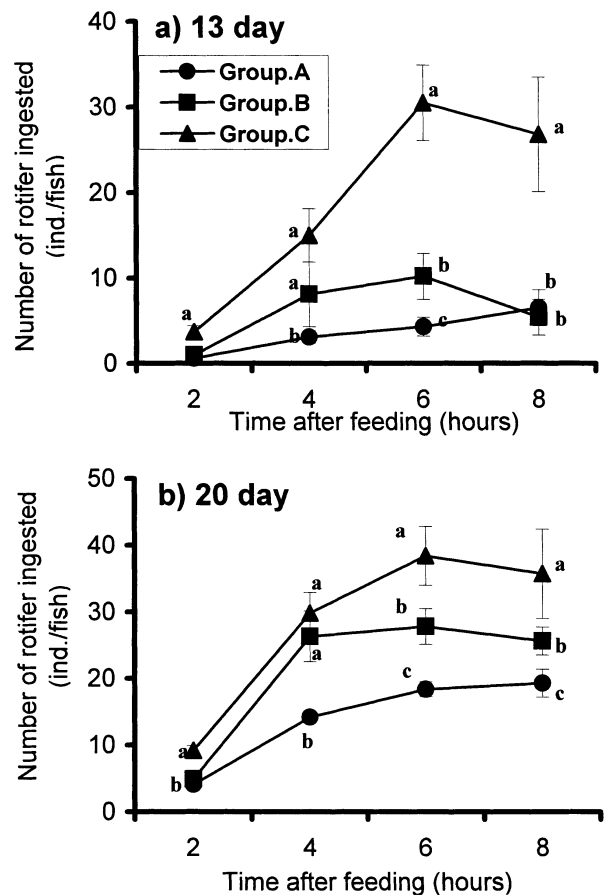


Fig.60 Changes in the number of rotifer ingested of larval barfin flounder under the different conditions of inflow of seawater. Symbols and vertical bars represent means and SD of number of rotifers eaten by one larva, respectively. Symbols with the different letters represent means that are statistically different at P < 0.05.

C区の子魚では、給餌後、消化管内ワムシ数が直線的に増加し、6時間後において最高値(30.5個体/尾)に達した(Fig.60a)。一方、B区の子魚においては、4時間後まで消化管内ワムシ数が増加したが、通水を開始すると子魚の摂餌が停滞し、6時間後にピークとなったものの、その値はC区を大きく下回った。さらに、最も早くから通水したA区の子魚においては、実験期間を通して消化管内ワムシ数が10個体/尾以下であり、摂餌活性が最も劣った。

20日齢の成長段階においても、群摂餌個体率および消化管内ワムシ数は13日齢時のそれとほぼ同様のパターンを示し、C区の子魚において最も活発な摂餌が認められた(Fig.60b)。

Table 20に35日齢時における各実験区の子魚の生残率

Table 20 Growth and survival rate of larval barfin flounder under different conditions of inflow of seawater.

Group	Total length (mm)		Survival rate (%)
	3 days (Initial)	25 days	
A	5.71 ± 0.09	6.63 ± 0.11	5.5
B	5.71 ± 0.09	6.50 ± 0.08	1.8
C	5.71 ± 0.09	6.61 ± 0.04	38.1

を示した。いずれの実験区も18~21日齢にかけて子魚の減耗が急増し、中でもA区とB区では、90%以上の子魚がこの時期に死亡した。最も活発な摂餌がみられたC区において生残率が38.1%と3区中最も高かった。

## 2. 子魚の初期摂餌、成長および生残に及ぼす飼育水中のナンノ濃度の影響

10日齢から25日齢までの子魚の群摂餌個体率をFig.61に示した。ナンノを添加しない④区では、他区と同様に13日齢から摂餌した個体が観察されたが、群摂餌個体率はロット1で19.0%およびロット2で32.3%と低く、その後も19日齢まで低値のまま推移した。これに対し、ナンノ添加濃度が最も高い①区においては、群摂餌個体率が13日齢時で既に71.4% (ロット1) および93.3% (ロット2) と極めて高く、16日齢以後はほぼ全ての子魚が摂餌していた。また、ロット1および2に共通して、13日齢および16日齢の発育段階において、ナンノ添加濃度が高い実験区ほど群摂餌個体率が高い傾向が認められた。

Fig.62に、摂餌個体における給餌8時間後の消化管内ワムシ数を示した。13日齢と16日齢時、消化管内ワムシ数はナンノ添加濃度に比例して値が有意に大きくなった。

19日齢以降も、ロット1の①区を除き、ナンノを添加した①~③区では、消化管内ワムシ数が④区の値を上回った。ロット1の①区では、16日齢まで活発な摂餌が認められたが、19日齢以後、摂餌が停滞し、25日齢時には消化管内にワムシが観察されてもその数は10個体/尾以下と少なかった。

Fig.63およびTable 21に各実験区の子魚の成長を示した。実験開始時における子魚の全長は、ロット1で7.13 ± 0.14mm、ロット2で6.79 ± 0.24mmであり、5歳魚由来であるロット1の子魚の方が大きかった。実験期間を通して成長に有意な違いは認められなかったが、④区の子魚は他区に比べて、やや成長が劣る傾向がみられた。

Fig.64およびTable 21に生残率の変化を示した。ナンノを添加した①~③区においては、Lot.2③区で19~22日

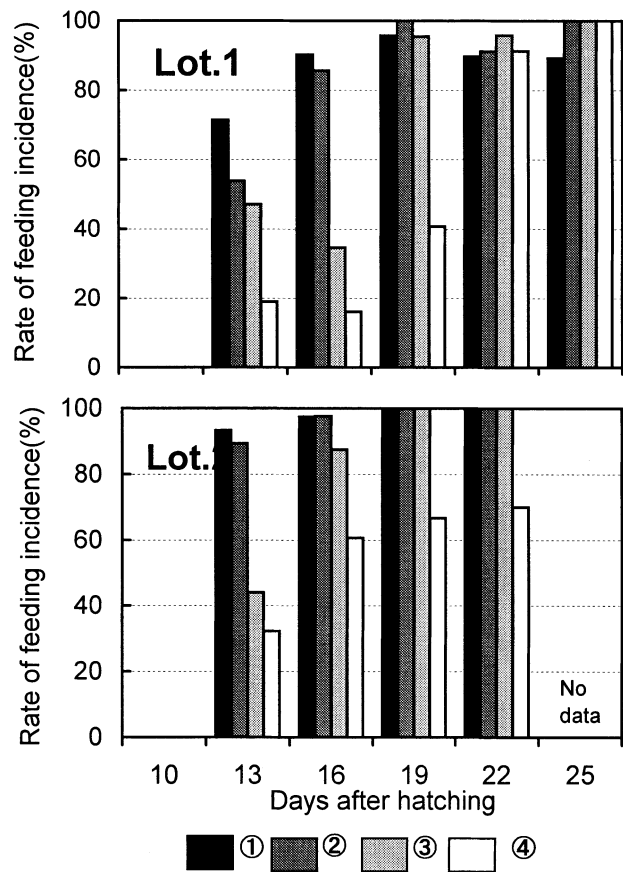


Fig.61 Changes in rate of feeding incidence 8 hours later after rotifer addition of larval barfin flounder reared in Nannochloropsis supplemented water at various densities.

Tank①, rearing with Nannochloropsis supplemented water at a density of 320 x 10<sup>4</sup> cell/ml; Tank②, rearing with Nannochloropsis supplemented water at a density of 160 x 10<sup>4</sup> cell/ml; Tank③, rearing with Nannochloropsis supplemented water at a density of 40 x 10<sup>4</sup> cell/ml; Tank④, rearing with non-supplemented water.

齢時にへい死がやや増加したが、実験終了時の生残率はいずれの区も50%以上と高かった。中でも、ロット1の②区は、実験期間を通して仔魚の減耗はほとんどみられず、生残率が90.7%と最高値を示した。これに対し、ナンノ無添加である④区では、17~22日齢時に仔魚の大量へい死が生じた。そのため、生残率は34.0% (ロット1) および7.1% (ロット2) となり、①~③区を大幅に下回った。また、④区において、正常に生き残っていた仔魚と、死亡した仔魚の外部形態を比較したところ、生存魚の消化管には摂食したワムシが認められたのに対し、死亡した仔魚は全く摂餌していなかった。さらに実験期間中、摂餌が急に減退したロット1の①区では、24日齢以降へい死が連続的に続き、生残率は57.6%であった。

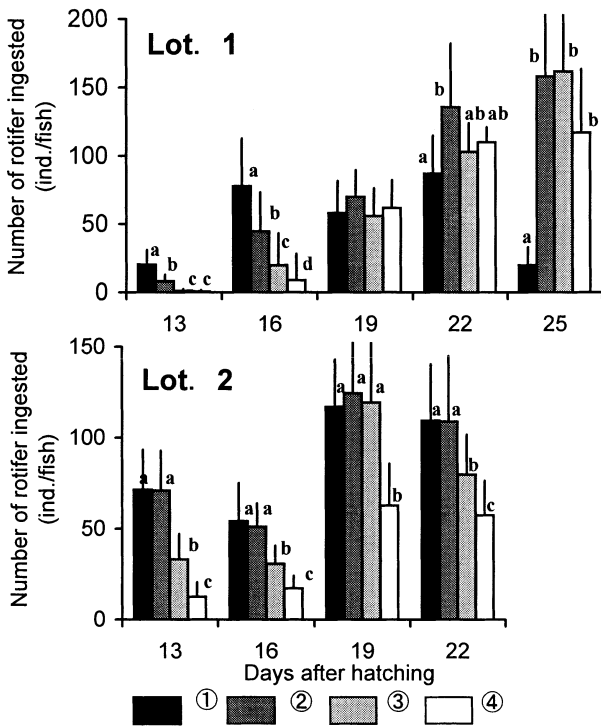


Fig.62 Changes in number of rotifer ingested 8 hours after rotifer addition of larval barfin flounder reared in Nannochloropsis supplemented water at various densities. Columns and vertical bars represent mean and SD of number of rotifer eaten by one larva, respectively. Columns with the different letter represent means that are statistically different at  $P < 0.05$ . Tank①, rearing with Nannochloropsis supplemented water at a density of  $320 \times 10^4$  cell/ml; Tank②, rearing with Nannochloropsis supplemented water at a density of  $160 \times 10^4$  cell/ml; Tank③, rearing with Nannochloropsis supplemented water at a density of  $40 \times 10^4$  cell/ml; Tank④, rearing with non-supplemented water.

考 察

本研究では、マツカワ仔稚魚飼育における種々の飼育環境因子の内、飼育水に添加するナンノが、仔魚の初期摂餌と成長、生残に及ぼす影響について解析した。

ナンノ添加海水中における仔魚の摂餌と通水との関連を調べた。13日齢の仔魚において、ワムシ添加から8時間通水せずに飼育した場合、活発な摂餌が認められ、給

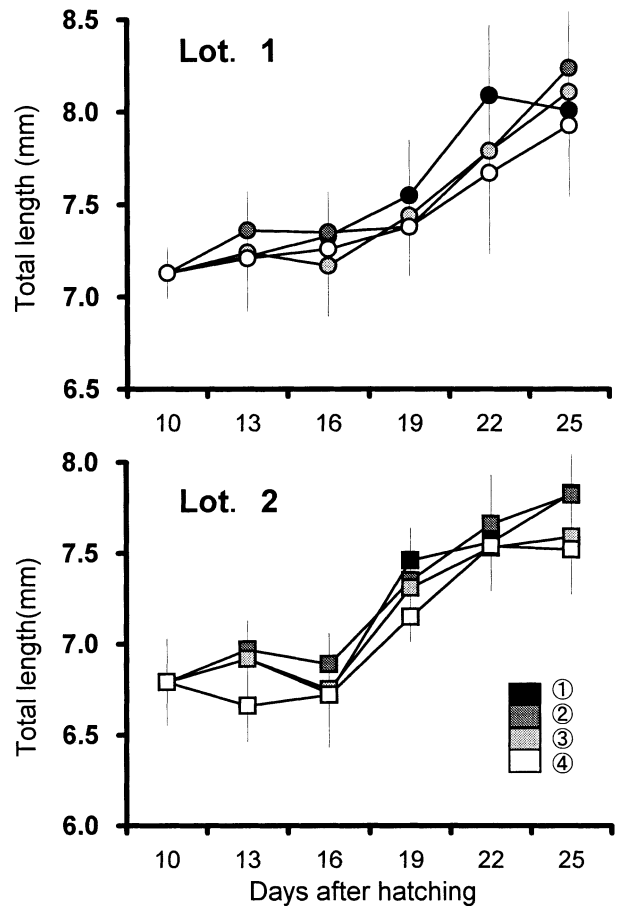


Fig.63 Changes in total length of larval barfin flounder reared in Nannochloropsis supplemented water at various densities.

Table 22 Growth and survival rate of larval barfin flounder reared in Nannochloropsis supplemented water at various densities.

Lot.	Group	Density of <i>N. oculata</i> ( $\times 10^4$ cell/ml)	Total length (mm)		Survival rate (%)
			10 days (Initial)	25 days	
1	①	320	7.13 ± 0.14	8.01 ± 0.31	57.6
	②	160	7.13 ± 0.14	8.24 ± 0.24	90.7
	③	40	7.13 ± 0.14	8.11 ± 0.44	77.9
	④	0	7.13 ± 0.14	7.93 ± 0.25	34.0
2	①	320	6.79 ± 0.24	7.83 ± 0.25	76.9
	②	160	6.79 ± 0.24	7.82 ± 0.30	70.5
	③	40	6.79 ± 0.24	7.59 ± 0.29	71.1
	④	0	6.79 ± 0.24	7.52 ± 0.25	7.1

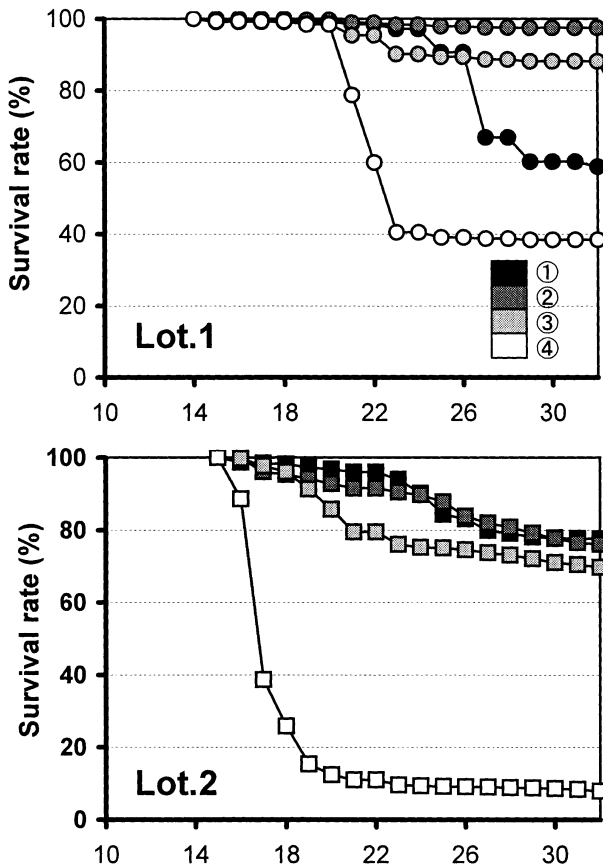


Fig.64 Changes in survival rate of larval barfin flounder reared in *Nannochloropsis* supplemented water at various densities.

Tank①, rearing with *Nannochloropsis* supplemented water at a density of  $320 \times 10^4$  cell/ml; Tank②, rearing with *Nannochloropsis* supplemented water at a density of  $160 \times 10^4$  cell/ml; Tank③, rearing with *Nannochloropsis* supplemented water at a density of  $40 \times 10^4$  cell/ml; Tank④, rearing with non-supplemented water.

餌6時間後にはほぼ全ての仔魚が飽食状態に達した。これに対し、給餌2時間後または4時間後から通水を行った場合、通水開始後、摂餌が急激に減退し、給餌から8時間経過しても60%以上の仔魚は全く摂餌できていなかった。また、通常、最も活発にワムシを摂食する20日齢時においても、これとほぼ同様の現象が認められた。これらの結果は、通水によって生じた水槽内の環境変化が、マツカワ仔魚のワムシ摂餌活性を低下させたことを明確に示している。仔魚の摂餌に関わった要因として、流れの強さなどの物理的な環境変化が直接的に影響したことも示唆されるが、本実験では、通水を開始すると飼育水中のナンノ濃度が流出によって急速に低下したことも示されている。そのため、ナンノ濃度の低下が仔魚の摂餌を減退させた原因である可能性も考えられ、それらの相互関連について詳しく解析する必要がある。

ナンノ添加濃度別飼育実験において、10~25日齢までの摂餌状況を比較した。その結果、ナンノを添加しない飼育群においては、止水条件下でも仔魚のワムシ摂餌は不活発であり、19日齢になっても空胃の個体が高い割合で観察された。これに対し、 $40$ 万cell/ml以上の濃度でナンノを添加した群では、早い発育段階(13日齢)から活発な摂餌が認められ、群摂餌個体率および消化管内ワムシ数のいずれも、実験期間を通してナンノ無添加群を上回った。さらに、13日齢と16日齢の発育段階において、ナンノ添加濃度が高い飼育群ほど、群摂餌個体率および消化管内ワムシ数が有意に高くなることが示された。これらの結果は、飼育水に添加したナンノには、マツカワ仔魚のワムシ摂餌を活性化する生理作用があり、また、その摂餌促進効果は、仔魚がワムシ摂餌を始めたばかりの発育段階において特に強く現れることを示している。そのため、前実験で通水を開始すると仔魚の摂餌が減退した原因として、飼育水の置換により水槽内のナンノ濃度が低下したことによる影響が大きいと考えられる。従って、仔魚の初期摂餌を向上するためには、飼育水中にナンノを高濃度で添加するとともに、仔魚が飽食するまでは通水を止めてナンノの流出を防ぐといった飼育管理が必要と思われる。

一方、本実験結果からは、ナンノがどのような作用機構によってマツカワ仔魚の摂餌を活性化するかは明らかにできなかった。他魚種において、ナンノと仔魚の摂餌との関連を示した飼育実験例はみあたらないが、数種の異体類<sup>124)</sup>では、天然海域で採集した仔魚の消化管から種々の植物プランクトンが検出されている。特に、冷水性の魚種や冬季に産卵する魚種の仔魚においては、植物プランクトンの摂食が頻繁に確認されている<sup>125)</sup>。さらに、低水温域で生息する魚種では、内部栄養(卵黄吸収)から外部栄養(餌の摂取)へと栄養源を転換する時期が長く、しかも基礎代謝量が少ないために植物プランクトンを取り込み、それらを大型餌料が摂餌できるようになるまでの補助的な餌料として利用することが推察されている<sup>125)</sup>。従って、冷水性カレイ類であるマツカワでも、内部栄養から外部栄養へと転換する10日齢~16日齢時に、餌料として植物プランクトンの要求性が高まることも考えられる。また、本実験で用いたナンノは、高度不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸(EPA)を多量に含有することが報告されている<sup>126,127)</sup>。EPAは、マダラ<sup>128)</sup>、メナダ<sup>129)</sup>、マコガレイ<sup>130)</sup>において仔稚魚期のへい死を抑制する効果があるとともに、マダイ仔稚魚<sup>131)</sup>ではEPAが不足すると開鰓障害や脊椎屈曲が生じることが報告され、仔稚魚の発育過程における重要な生理活性因子であることが知られている。マツカワ仔魚のEPA要求については

不明だが、ナンノ添加群の仔魚は、卵黄吸収期から摂餌初期にかけて飼育水中のナンノを受動的または能動的に取り込み、その栄養を利用した結果、遊泳力などの摂餌能力が高まって早い成長段階から活発にワムシを摂餌できたのかもしれない。

また、ナンノ添加が仔魚の摂餌促進に繋がったもう一つの要因として、水槽内の照度の低下が考えられる。ニシンの種苗生産過程において、ナンノまたは淡水クロレラを添加して水面照度を2~450 luxに下げることにより、刺激に対する過剰反応を軽減できることが示されている<sup>130)</sup>。反対にイカナゴ仔魚では、100 lux以上の明るさがワムシ摂餌に必要であることが飼育実験により確かめられている<sup>131)</sup>。マツカワ仔魚の光に対する行動学的な反応についての知見はないが、照度は正常な摂餌行動をおこす上で重要なファクターである可能性が高い。そのため、今後、ナンノ無添加の条件下で照度別の飼育実験を行い、飼育環境の明るさが仔魚の摂餌活性に及ぼす影響を把握する必要がある。これについては次節で述べる。

ナンノ無添加の飼育群では、17~22日齢の間に仔魚の死亡が急増し、35日齢時における生存率は30%以下と低かった。一方、ナンノを40万cell/ml以上の濃度で添加した飼育群では、同時期にやや死亡が増えたものの、生存率が70%以上と高かった。中でも、160万cell/mlの濃度で添加した飼育群においては、実験期間中、仔魚のへい死はほとんどみられず、生存率は90%をこえた。ナンノやその他の植物プランクトン、またはその濃縮品を添加した海水で飼育した結果、生存率が向上したという事例は、マダイ<sup>121)</sup>、キジハタ<sup>134)</sup>、マハタ<sup>135)</sup>、マガレイ(佐藤敦一：私信)など多くの魚種で報告されている。それらの役割として、水質の安定化、ワムシおよび仔魚の餌料、ストレス軽減などが推測されている。一方、本実験の場合、ナンノ無添加飼育群で死亡した仔魚は、ワムシをほとんど摂餌しておらず、空胃の個体ばかりであった。また、Ohkubo & Matsubara<sup>74)</sup>は、マツカワ受精卵とふ化仔魚中の栄養物質の変化を解析した結果、仔魚の発育において重要度が高いリン脂質や必須アミノ酸は、10日齢でふ化時の半分以下となることを報告している。これらの結果は、ワムシを摂餌できるようになる13日齢時に残された栄養源はごくわずかであり、この時点で十分摂餌ができない場合、内部栄養の供給が完全に枯渇する18~20日齢の成長段階でへい死に至ることを示唆している。このことから、飼育水にナンノを添加すると、特に初期の摂餌が促進されるため、内部栄養から外部栄養への転換がスムーズに行われて、栄養不足による大量減耗は生じないと考えられた。

また、吉松ら<sup>129)</sup>は、栄養強化したワムシをナンノ無添

加海水中に給餌すると、ワムシ中のn3系高度不飽和脂肪酸濃度は直線的に低下するが、ナンノ添加海水中(40~50万cell/ml)では脂肪酸濃度はほとんど変化しないことを報告している。本実験のナンノ添加群においても、給餌したワムシの餌料価値が長期間維持され、二次的要因として生存率の向上に関わった可能性がある。

今回、最も高濃度でナンノを添加した飼育群(320万cell/ml)の中には、19日齢まで良好な摂餌、生存を示したが、その後、摂餌が停滞し、へい死も増加した事例があった。この時点で飼育水の水質(溶存酸素、アンモニア濃度、亜硝酸濃度、pH)を検査したところ、他区に比べてpHが顕著に低下していることがわかった(pH7.4)。現在のところ、高濃度でナンノを添加したことと、pH低下との因果関係は明らかではない。しかし、過剰にナンノを添加すると、仔魚の遊泳や摂餌行動の観察が困難となるため、飼育環境の異常な変化を感知し、対処が遅れることも懸念される。従って、摂餌活性を高め、尚且つ適正な飼育管理を行うためには、100~160万cell/mlの濃度範囲でナンノを添加するのが最適であろう。

本実験の結果から、ワムシ給餌期に飼育水槽にナンノを100~160万cell/mlの濃度で添加することによって、マツカワ仔魚のワムシ摂餌活性を顕著に向上させることが示された。さらに、ワムシを摂餌し始めた時期(13~16日齢)の摂食量をできる限り高めることによって、本種の種苗生産で生じやすい18~20日齢時の大量減耗を抑制できることが示された。これらの知見は、生産不調を防ぎ、より安定的な種苗量産技術を開発するうえで極めて有用と思われる。一方、実際の種苗生産現場において、ナンノを維持および大量培養するには、設備投資や人的労力の負担が大きいなどのマイナス面も懸念される。そのため、今後、市販の濃縮ナンノや淡水クロレラの有効性についても検討し、種苗生産におけるコスト低下を図る必要があろう。また、マツカワ仔魚の摂餌活性や初期生存には、卵質の良否(第Ⅲ章)や水温(本章3節)などのその他の飼育環境因子も影響することが示されている。これらの知見を整理し、マツカワ仔魚の発育特性に適合した飼育条件を確立することが重要と思われる。

## 第2節 マツカワ仔魚の初期摂餌に及ぼす飼育環境因子の影響

魚類の初期減耗研究において、卵黄吸収(内部栄養)から摂餌(外部栄養)へ切り替わる時期は重要なターニングポイントとして考えられている<sup>136)</sup>。マツカワでは変態・着底前の浮遊生活期間に大量減耗が生じやすいことをすでに述べたが、その原因の一つとしてワムシ摂餌開

始から初期における摂餌不良が示唆された(本章第1節)。また、後章で述べるが、他の異体類と同様に、マツカワ人工種苗の中には体表の色素発現や眼の移動が正常に進まない形態異常個体が高頻度で出現する。ヒラメやマガレイにおいて、仔魚期における餌料条件は形態異常の発生に強く影響することが報告されている<sup>137,138)</sup>。従って、仔魚の初期発育期における餌料環境は生残のみならず、正常な発育を遂げるうえで最も重要なポイントといえる。そのため、健苗の安定生産を実現するには、対象種の摂餌特性を把握し、その知見に基づいて適正な餌料条件と給餌方法を整えることが必須である。

マツカワ仔魚の摂餌に関しては、中川<sup>139)</sup>により仔魚の全長とワムシおよびアルテミアの消化管内餌料数との関係が報告されたのみであり、未解明の部分が多い。また、運動機能や感覚機能が発達途上である初期発育期、仔魚の摂餌には様々な外部環境因子が影響していると考えられる<sup>140,141)</sup>。本章第1節において、飼育海水中に添加したナンノはマツカワ仔魚のワムシ摂餌を活性化作用を有し、ナンノ高濃度添加条件下で飼育するほど仔魚の初期摂餌レベルが高まることがわかった。しかし、ナンノ以外の飼育環境因子が仔魚の初期摂餌に及ぼす影響については全く知られていない。そこで本節では、ワムシ摂餌期の仔魚に焦点をあて、初期摂餌に及ぼす環境要因の影響について調べた。

## 材料と方法

### 1. 18日齢仔魚における日内ワムシ摂餌の観察

#### (1) 供試魚

1999年4月に、栽培センターで養成した3歳のマツカワ親魚雌雄から自然産卵法によって受精卵を得た。受精卵を水温8℃、流水(地先汲み上げろ過海水使用)、強通気条件下でふ化まで管理し、得られた仔魚を実験に使用した。

#### (2) 飼育環境条件

栽培センターで行っている従来の飼育条件下で仔魚飼育を行い、18日齢時における仔魚のワムシ摂餌状況を継続的に観察した。ふ化仔魚1.5万尾を1tパンライト水槽に収容し、飼育海水には調温したろ過海水を使用した。仔魚収容後、飼育水温を9℃から0.5℃/日の割合で徐々に上昇させ、16日齢以降は13~14℃の範囲になるように調温した。換水率は50%/日(5日齢時)から、仔稚魚の成長にあわせて流量を増加させた。また、水槽内にセラミック製エアストーンを1個設置し、0.6~0.8l/minの流量で通気を行った。10日齢からシオミズツボワムシを8~10個体/mlの密度となるように給餌した。また、ワムシを給餌する期間は、飼育水にナンノを添加した。な

お、ワムシは給餌前にアクアラン(BASF)で栄養強化を施したものである。

4月26日の10時から翌日の9時まで摂餌の周日観察を実施した。実験期間中、飼育水温は14℃とし、調温したろ過海水を200%/日の換水率で通水した。光条件は、26日10時~18時と27日8時~9時までの間、蛍光灯(一部、自然採光)により電照し、26日19時~27日7時までの間は消灯した。給餌は10時と16時に実施した。10時の給餌ではワムシを $15 \times 10^6$ 個体与え、同時にナンノを $4 \times 10^5 \text{ cell/ml}$ の濃度になるように飼育海水中に添加した。また、16時の給餌ではワムシのみを $10 \times 10^6$ 個体給餌した。いずれの給餌においても、給餌後は餌料の流出を抑えるために3時間通水を停止した。

### (3) 実験手法

実験開始(10時)から終了(9時)までの24時間、1時間置きに飼育水の水中照度、ワムシの残存量、仔魚の群摂餌個体率、摂餌個体における消化管内ワムシ数を調べた。水中照度は、飼育水中層に水中照度計を固定し、その値を1時間毎に読みとって観測した。また、ワムシ残存量は、飼育水上槽の3地点を無作為に選びそれぞれ1ml中のワムシ数を計数した。それらの平均値に水槽容量を乗し、全水槽中のワムシ残量を求めた。さらに仔魚を30尾無作為にサンプリングし、それらを10%中性ホルマリン海水で固定後、顕微鏡下で開腹し消化管内におけるワムシの個体数を計数した。また、採集した全仔魚のうち消化管内に5個体以上のワムシが認められた仔魚を摂餌した個体とみなし、群摂餌個体率を求めた。

## 2. 仔魚の摂餌に及ぼす照度条件の影響

### (1) 供試魚および飼育管理

実験には、2002年4月に4歳の人工養成魚の雌雄から人工授精によって得たふ化仔魚を用いた。実験開始までの期間、仔魚を1tパンライト水槽に収容し、水温14℃、流水(地先汲み上げろ過海水使用)、通気条件下で飼育管理した。餌料としてマリングロス(日清サイエンス)で栄養強化を施したシオミズツボワムシ(給餌期間10~35日齢)およびアルテミア(22~47日齢)を給餌した。ワムシおよびアルテミアの給餌密度は、それぞれ8~15個体/mlおよび1~5個体/mlとし、いずれも餌料の添加後は6時間通水を停止した。また、ワムシを給餌する期間は、飼育水にナンノを $8 \times 10^5 \text{ cell/ml}$ の濃度になるように添加した。

### (2) 照度別飼育実験

飼育環境の光条件(照度)が仔魚のワムシおよびアルテミア摂餌に及ぼす影響を明らかにするため、照度別飼育実験を行った。外部光を遮断した4つの実験区画を設

け、その中に100/角型水槽を一基ずつ設置した。いずれの水槽にも水温14℃の設定したろ過海水を100%/日の換水率で掛け流した。各区内に白熱灯と照度調節器を取りつけ、それぞれ水槽表面の照度が0, 16, 160, 1600Luxとなるように調整した。仔魚が12日齢（ワムシ摂餌開始時、ステージC）、20日齢（ワムシ摂餌の盛期、ステージD）および46日齢（アルテミア摂餌の盛期、ステージG）になった時点において、500尾ずつ仔魚を収容し、各照度条件で24時間無給餌のまま馴致飼育を行った。翌日、9時に13日齢と21日齢の仔魚にはワムシを、また47日齢の仔魚にはアルテミアをそれぞれ $20 \times 10^5$ 個体および $20 \times 10^5$ 個体給餌し12時間飼育した。なお、本実験期間において飼育水にナンノクロロプシスは添加しなかった。給餌後、2時間おきに仔魚30尾を無作為にサンプリングし、それぞれの摂餌個体率と消化管内餌料数を調べた。

### 3. 仔魚の摂餌に及ぼす飼育水中のワムシ量の影響

#### (1) 供試魚

実験には、2003年4月に4歳の人工養成魚の雌雄から人工授精によって得たふ化仔魚を用いた。10日齢の仔魚を1 t水槽4基に収容し4つの実験区を設けた。実験開始までの間は2(1)で示した条件で飼育した。

#### (2) 給餌量および給餌回数別の飼育実験

飼育水中のワムシ量の違いが仔魚の摂餌に及ぼす影響を明らかにするため、20日齢の仔魚を用い、給餌量および給餌回数別の飼育実験を行った。4つの実験区のうちLF区（Low level feeding group）では、実験開始日の9時に $5 \times 10^6$ 個体（通常仔魚飼育で与える半分の量）のワムシを給餌した。一方、MF区（Medium level feeding group）では同時刻にLF区の2倍量（ $10 \times 10^6$ 個体、通常のワムシ量）のワムシを給餌した。さらに、HF区（High level feeding group）では、飼育水中のワムシ量が長時間保たれるように、9時に $10 \times 10^6$ 個体、また15時に $5 \times 10^6$ 個体のワムシを給餌した（通常の1.5倍量）。またSHF区（Super High level feeding group）においては9時に $10 \times 10^6$ 個体、15時に $5 \times 10^6$ 個体、さらに21時に $5 \times 10^6$ 個体のワムシを与えた（通常の2倍量）。いずれの区も9時の給餌の際、ナンノを $8 \times 10^5 \text{ cell/ml}$ の濃度になるように添加した。飼育水中および仔魚の消化管内にワムシが残存しないように、実験を行う前日は給餌を行わなかった。実験期間中、9時～23時までは飼育水表面が800Luxの明るさになるように電照し、その後翌朝8時まで消灯した。

実験開始から2時間間隔で水槽内におけるワムシの残存量と仔魚の摂餌個体率、消化管内ワムシ数を測定した。

### 4. 仔魚の摂餌に及ぼす飼育水温の影響

#### (1) 供試魚

2000年の4月に、北海道日高海域で漁獲され栽培センターの親魚養成水槽で採卵まで飼育した天然魚の雌と人工養成魚の雄から卵と精子を採取し人工授精を行った。受精卵を水温8℃、流水（地先汲み上げろ過海水使用）、強通気条件下でふ化まで管理し、得られた仔魚を実験に使用した。

#### (2) 水温別飼育実験

飼育水温が仔魚のワムシ摂餌に及ぼす影響を調べるため、水温別の飼育実験を行った。1 t水槽4基にふ化仔魚を3.3万尾ずつ収容し、4つの実験区を設けた。いずれの区も収容時は水温9℃としたが、その後徐々に昇温し、18日齢以降は12℃、14℃、16℃および18℃となるように調温した。仔魚の平均全長が8.0～8.1mm（ワムシ摂餌盛期：ステージD）と8.9～9.1mm（ワムシ・アルテミア併用給餌期：ステージE）になった時点において給餌後8時間におけるワムシ摂餌状況を、また仔魚が10.2～10.3mm（アルテミア摂餌期、着底前：ステージF）と13.0～13.7mm（アルテミア摂餌期、着底開始：ステージG）になった時点においてはアルテミアの摂餌状況の変化について調べた。摂餌状況を観察する際、餌料の添加は一日一度9時に実施した。給餌量はワムシの場合 $15 \times 10^6$ 個、アルテミアの場合 $5 \times 10^6$ 個とした。ワムシを給餌する際、ナンノクロロプシスも $8 \times 10^5 \text{ cell/ml}$ の濃度になるように飼育水中に添加した。給餌後、1時間毎に仔魚を30尾ずつサンプリングし、時間経過に伴う群摂餌個体率および消化管内餌料数を解析した。

### 5. 統計学的解析

いずれの実験においても消化管内の餌料数は平均値±標準偏差で表した。実験区間の有意差は一元配置分散分析を行った後、Tukey多重比較によって検定した（有意水準5%）。

### 結 果

#### 1. 18日齢仔魚における日内ワムシ摂餌の観察

Fig.65に日内摂餌の観察を行った仔魚群の形態データを示した。発育ステージは上屈前仔魚であるステージDであり、平均全長は7.3mm（最大7.7mm、最小6.9mm）であった。Fig.66a～eに実験期間における電照条件、飼育水中内の照度、ワムシの残存量、群摂餌個体率および消化管内ワムシ数の継時変化を示した。観察を開始した10時では、飼育水中層の照度は53Luxであったが、ワムシとナンノの添加後、照度は20Luxまで急激に低下し、消灯までその値のまま推移した。消灯した20時以後は照度0



となったが、日の出時刻である6時から照度がわずかに高まり点灯とともに再び上昇した。

給餌前、飼育水中にワムシはほとんど残存しておらず、また仔魚の半数以上は空胃であった。ワムシ給餌後、飼育水中のワムシ量が急増するとともに仔魚は活発に摂餌を開始し、給餌1時間後、群摂餌個体率は100%となった。摂食個体における消化管内ワムシ数は個体によって幅がみられたが、給餌後すぐに増加し、給餌3時間後にピークに達した。消化管内ワムシ数はその後、飼育水中のワムシ残量の減少にともなって緩やかに低下したが、16時に2回目のワムシ給餌を行うと再び増加した。また、消灯後は仔魚の摂餌は不活発となり、飼育水中にワムシが残存しているにも関わらず、消化管内ワムシ数は緩やかに低下した。0時以後は空胃個体も出現し、5時には群摂餌個体率が20%以下となった。一方、自然採光の影響を受け照度がわずかに上昇する6時には、摂餌を再開する仔魚も認められ群摂餌個体率がやや高まった。

## 2. 仔魚の摂餌に及ぼす照度条件の影響

Fig. 67およびFig. 68に照度条件別摂餌実験における仔魚のワムシとアルテミア摂餌状況を示した。摂餌を開始する13日齢の仔魚の場合、高照度条件下ほど群摂餌個体率が高く、中でも1600Luxにおいて仔魚は最も活発な摂餌を示した(Fig. 65a)。摂食個体における消化管内ワムシ数も同様の傾向を示し、1600Luxでは他に比べて有意に値が上回った ( $P < 0.05$ )。また、20日齢になると光に依存する傾向はより顕著となり、1600Luxでは群摂餌個体率および消化管内ワムシ数のいずれも極めて高かったが、160Lux以下の環境下ではほとんどワムシを摂食することができなかった (Fig. 67b)。一方、着底生活を開始する47日齢になると、16Lux以下の照度条件下では摂餌できなかったが、160Luxにおいては活発な摂餌が認められた

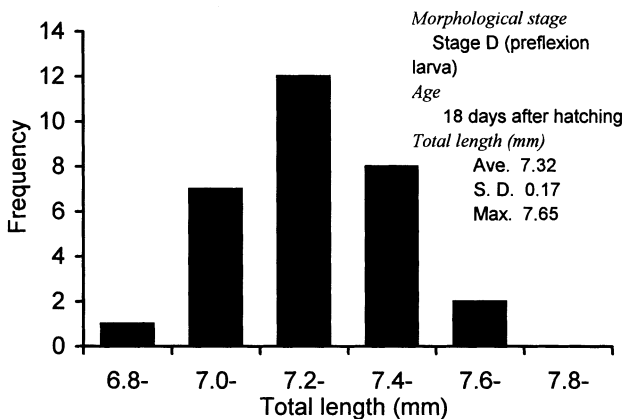


Fig.65 Morphological data of 18-day-old larval barfin flounder used for observation of daily feeding.

(Fig.68)。160Luxと1600Lux間で群摂餌個体率および消化管内アルテミア数に差はみられず、より暗い照度条件下においても摂餌することができた。

## 3. 飼育水中のワムシ量が仔魚の摂餌に及ぼす影響

Fig. 69bに飼育水中のワムシ残量の日内変化を示した。いずれの実験区も水槽内のワムシ量は給餌後急速に減少し、給餌量が最も少ないLF区では15時ですでに残存量がほぼゼロとなった。HF区およびSHF区では15時の給餌により水槽内のワムシ量が再び高値となったが、給餌直後から速やかに減少した。SHF区では21時に3回目の給餌を行ったことによってワムシ量が  $7 \times 10^6$  個体まで増加した。

Fig. 69cおよび69dに仔魚の摂餌個体率および消化管内ワムシ数を示した。いずれの区も9時の給餌後、仔魚は活発にワムシを摂食し、11:00には群摂餌個体率がほぼ100%となった。消化管内のワムシ数は13時まで順調に増加し、実験区間でその値に差はみられなかった。しかし、その後、LF区とMF区では水槽内のワムシ残存量が減少したため摂餌量が停滞し、19時以降は消化管内ワムシ数が徐々に低下した。LF区では1時から、MF区では3時から空胃の個体が出現した。これに対し、15時にワムシを補充したHF区の仔魚は活発な摂餌を続け、21時以後、消化管内ワムシ数は前2区のそれを有意に上回った。23時には消化管内ワムシ数がピークとなり、一個体当たり平均350個体ものワムシが消化管内に認められた。SHF区の仔魚もHF区と同様に23時まで活発な摂餌が認められたが、消化管内ワムシ数はHF区よりも下回って推移した。消灯した23時以降は、HF区とSHF区のいずれも消化管内ワムシ数が減少した。それぞれ3時と5時から空胃個体が出現し始め、9時にはほぼすべての仔魚が空胃であった。

## 4. 飼育水温が仔魚の摂餌に及ぼす影響

異なる水温条件下での仔稚魚の摂餌活性について発育段階ごと (ステージD~G) に解析した (Fig. 70a~d)。どの発育段階と水温条件下においても、仔魚は餌料添加後、速やかに摂餌を開始し、群摂餌個体率は給餌1時間後において100%となった。消化管内ワムシ数を調べた結果、ステージDの仔魚 (全長8.0~8.1mm) の場合、12℃~16℃の条件下ではワムシ摂食状況に明確な差がみられず、時間経過にともなって消化管内ワムシ数は徐々に上昇した (Fig. 70a)。一方、18℃では、給餌直後から仔魚は活発に摂餌し、その摂餌数は12℃~16℃における値を有意に上回った ( $P < 0.05$ )。ステージE (全長8.9~9.1mm) になると、ワムシ摂餌に及ぼす水温の影響はより明確にな

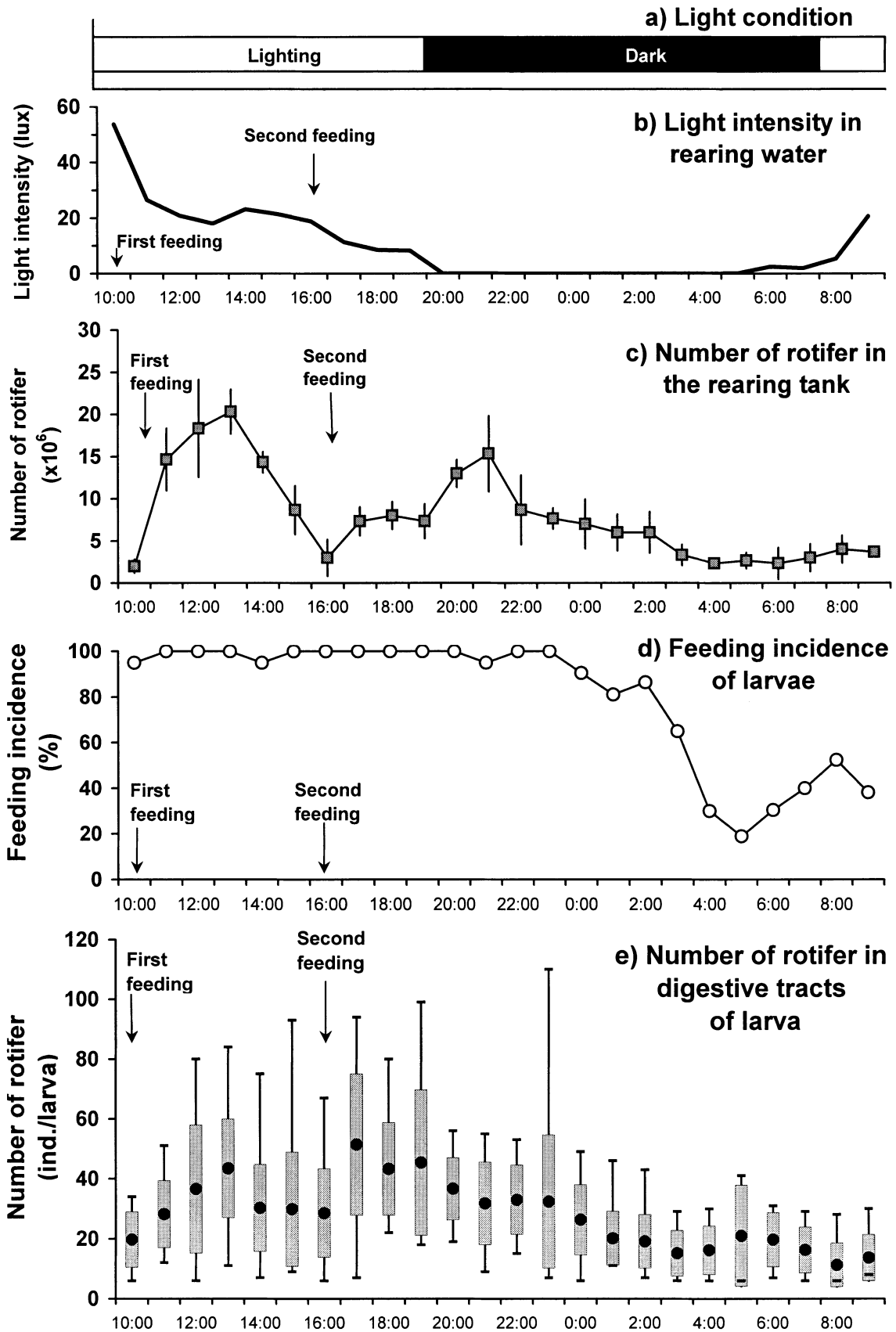


Fig.66 Changes in (a)light condition, (b)light intensity, (c)number of rotifer in the tank, (d)feeding incidence of larvae and (e)number of rotifer in digestive tracts of larva during the observation of daily feeding of 18 day-old larvae. (e) black point, mean value; column, SD; bar, maximum and minimum value.

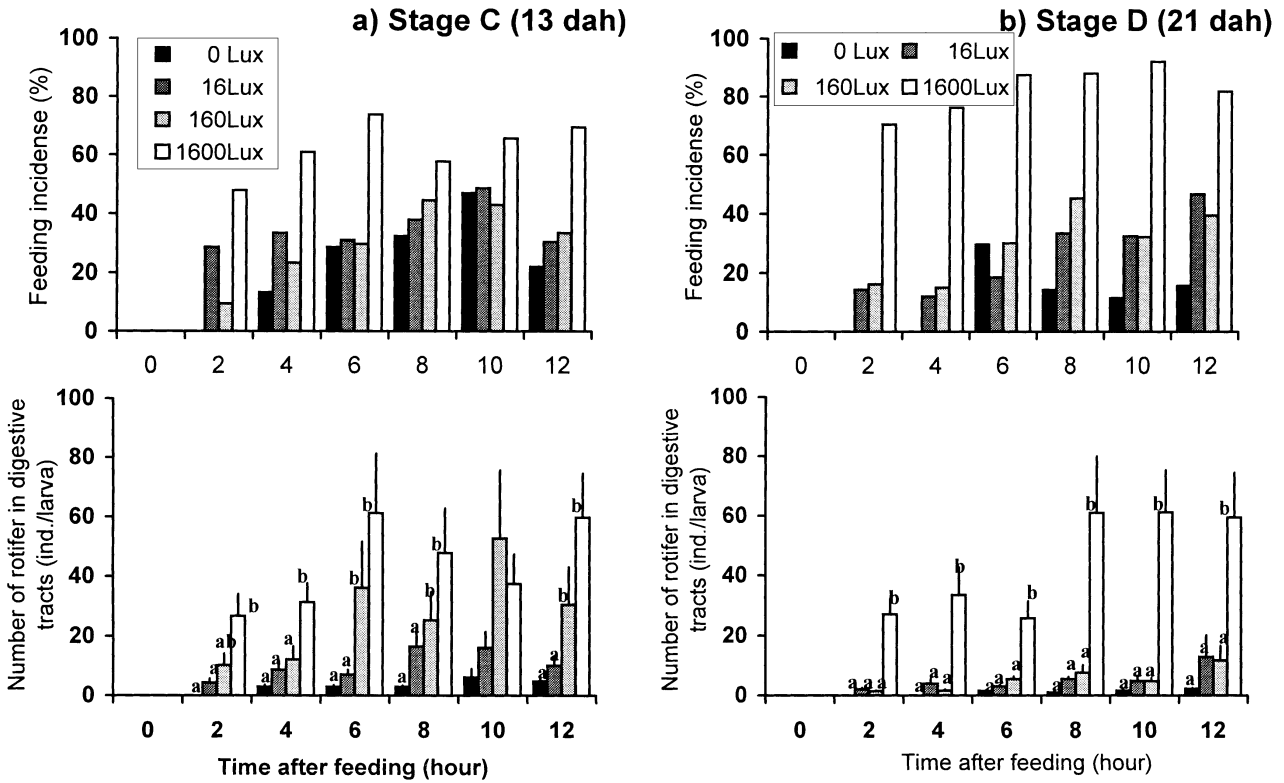


Fig.67 Effects of light intensity on rotifer feeding of larval barfin flounder developing to stage C or D. (a) 13 days after hatching, (b) 21 days after hatching. Mean value with different letters are significantly different at the 0.05 level within each light intensity levels.

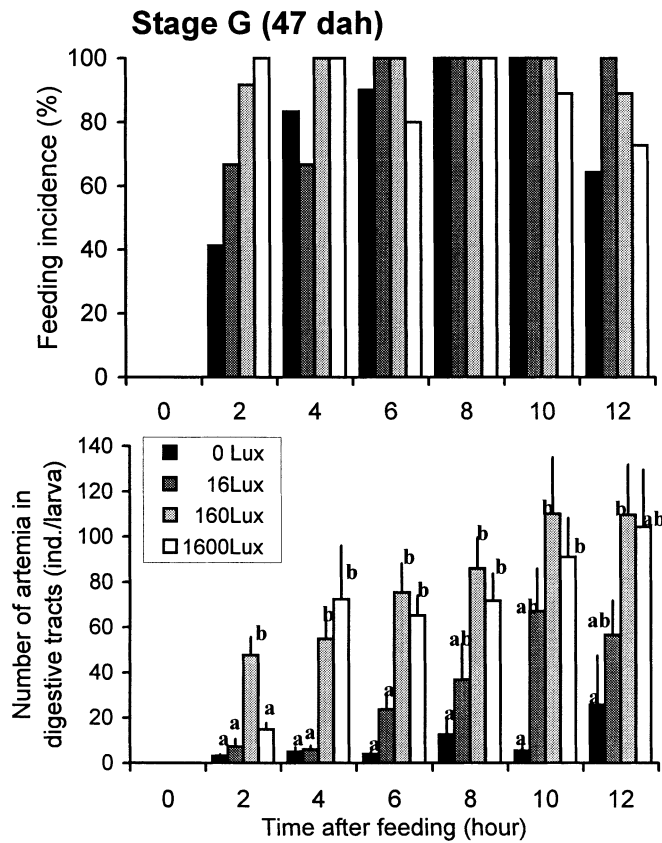


Fig.68 Effects of light intensity on Artemia feeding of larval barfin flounder developing to stage G (47 dah). Mean value with different letters are significantly different at the 0.05 level within each light intensity levels.

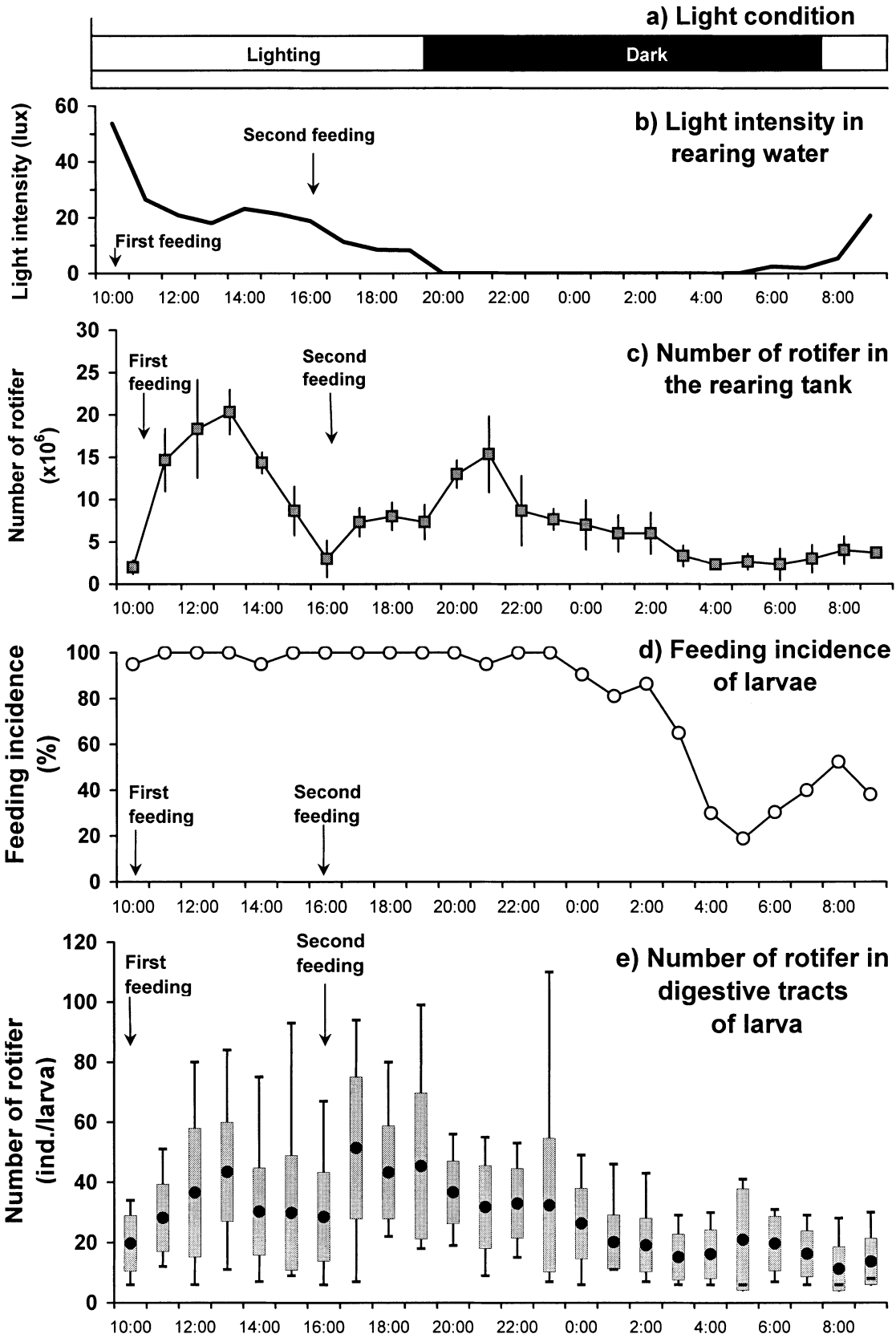


Fig.69 Changes in (a)light condition, (b)number of rotifer in the tank, (c)feeding incidence of larvae and (d)number of rotifer in digestive tracts of larva during the rearing experiment at various feeding levels using 20 day-old larvae. LF : low level feeding, MF : middle level feeding, HF : high level feeding, SHF : super high level feeding. Mean values with different letters are significantly different at the 0.05 level within each experimental groups.

り、高い水温条件下ほど摂餌が活発となる傾向がみられた (Fig.70b)。特に16℃と18℃の条件下と12℃と14℃の条件下とでは消化管内ワムシ数に明らかな差が認められた。

ステージF (全長10.2~10.3mm)とステージGの仔魚(全長13.0~13.7mm)において、給餌後の時間経過に伴う消化管内アルテミア数の変化を調べた。その結果、ワムシ摂餌期ほど顕著ではないが、ステージFにおいても高水温条件下ほどアルテミアを活発に摂餌する傾向が認められた (Fig.70c)。特に、水温16℃と18℃条件下では給餌1時間後ですでに消化管内アルテミア量がピーク値まで急増しており、低水温条件下に比べて摂餌活性が有意に高い

ことが示された。ステージGの仔稚魚の場合も同様であり、16℃と18℃の条件下では消化管内アルテミア数が12℃と14℃のそれを大きく上回ったまま推移した (Fig.70d)。

考 察

マツカワ種苗生産において、仔魚期の餌料環境はその後の成長と生残、また種苗の質に関わる重要な要因と考えられる。中でも、最初の外部栄養となるワムシの給餌条件には特に留意が必要である。本研究では、主としてワムシ摂食期の仔魚の摂餌活性に及ぼす飼育環境因子の影響を解明することを目的とした。

通常の飼育環境下において、18日齢仔魚の日内摂食状

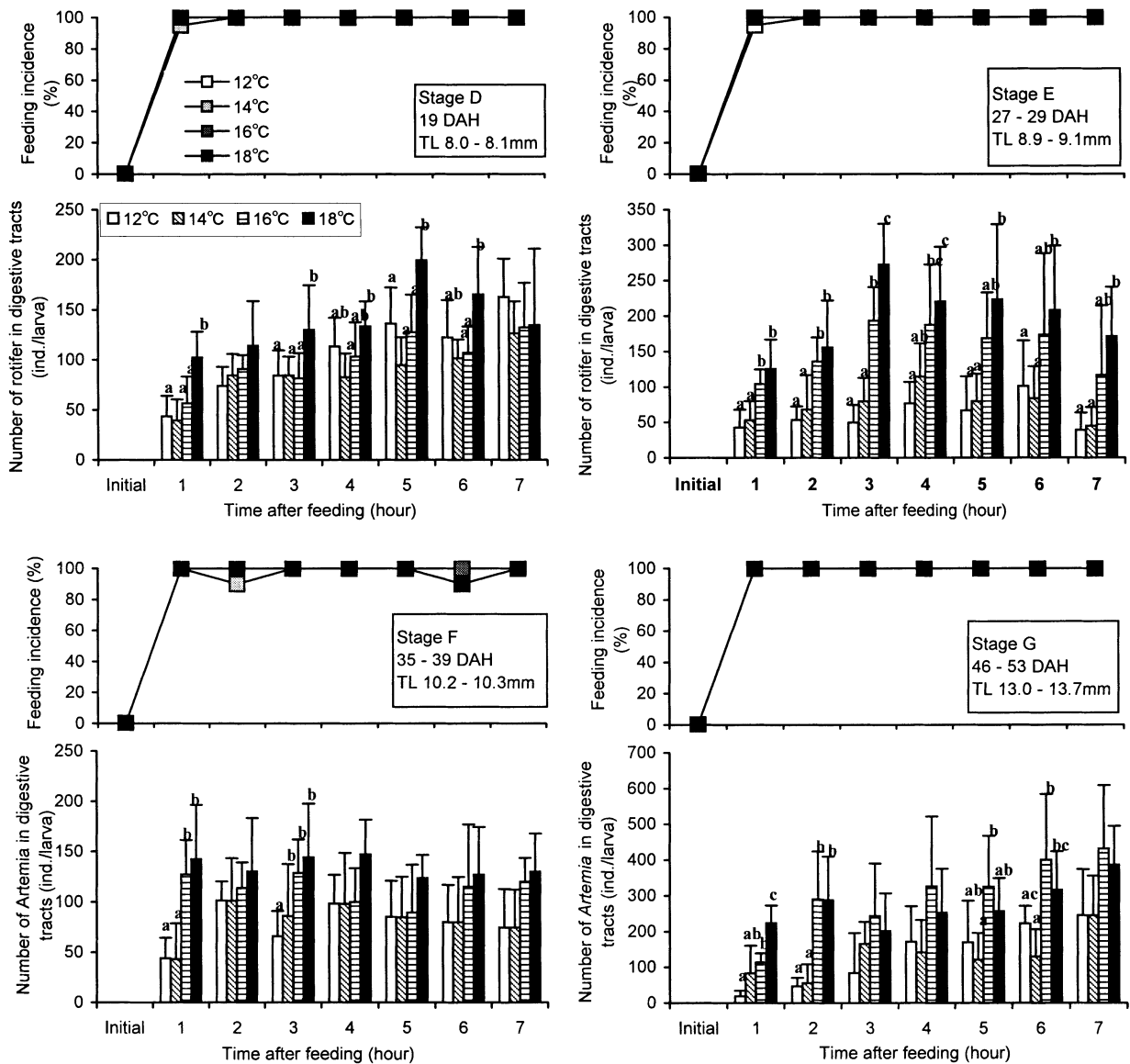


Fig.70 Effects of water temperature on feeding of larval barfin flounder developing to a) stage D (19 dah), b) stage E (27-29 dah), c) stage F (35-39 dah) and d) stage G (46-53dah). Mean values with different letters are significantly different at the 0.05 level within each water temperature levels.

況と水槽内環境を経時的に観察し、ワムシ摂餌に関わりうる因子を探索した。飼育水中にナンノクロロプシスを加え、且つ水槽内を電照した場合、仔魚は飼育水中のワムシ量の増加とともに活発に摂餌を開始し、消化管内のワムシ数は直線的に増加した。一方、摂食や排水によって水槽内のワムシ量が減少すると、摂餌は停滞し、消化管内ワムシ数も徐々に減少した。また、再度ワムシを給餌すると、活発な摂餌が始まり消化管内ワムシ数は再び上昇した。本研究では、仔魚の摂餌レベルを因る指標として消化管内餌料数を採用したが、仔魚は摂餌と同時に消化および排泄も行っているとも考えられ、実際に体内へ取り込んだワムシ数はこの値を上回ると推測される。しかし、消化管内で検出されたワムシ数だけを観測しても、その値は飼育水中のワムシ残存量と同調して変動したことから、水槽内の餌料の存在状況は仔魚の摂餌活性に強く影響すると考えられる。

一方、消灯後、暗条件になると、飼育水中にワムシがまだ残存しているにも関わらず仔魚の摂餌は停止し、消化・排泄により群摂餌個体率、消化管内ワムシ数ともに低下した。また、翌朝、日の出とともに飼育水の照度が高まると仔魚はわずかに残存したワムシを再び摂食し始めた。このことは、マツカワ仔魚の摂餌には、餌の絶対量のみならず、照度条件も密接に関連することを示唆している。そこで、これらの環境因子（照度と餌の絶対量）が仔魚の摂餌に及ぼす影響を確かめるため、環境条件別の摂餌実験により検証した。

照度別飼育実験の結果、ワムシ摂餌を開始したばかりである13日齢の仔魚(ステージC)の場合、0~1600Luxの範囲内において高照度条件下ほど仔魚の摂餌は明らかに活発となった。また、ワムシを盛んに摂食する21日齢になると、この傾向はより顕著となり、1600Luxの条件下では活発に摂餌できたが、160Lux以下の条件下では仔魚はほとんど摂餌できなかった。これらの結果から、ワムシ摂餌期のマツカワ仔魚の場合、餌料生物の捕獲と摂食には飼育環境の明るさが大きく影響し、高照度環境下ほど摂餌に適していると示唆される。同様の現象は、多くの海産魚種の仔魚でも報告されており<sup>141-143)</sup>、プレイス仔魚で1~10Lux<sup>144)</sup>、キジハタで35~160Lux<sup>145)</sup>、イカナゴで100Lux<sup>133)</sup>、Orange-spotted grouperで500Lux<sup>146)</sup>以上の明るさが摂餌に必要である。また、イカナゴ仔魚では摂餌可能の照度範囲がそれぞれの仔魚の分布水深とよく一致している<sup>133)</sup>。天然環境下におけるマツカワ浮遊仔魚の生態や分布水深については全く知見がないが、摂餌可能である照度範囲と考えると、マツカワ浮遊仔魚はごく表層部に生息するのかもしれない。

また、今回、変態途上であり、着底生活に移行したば

かりである46日齢の仔魚においても照度とアルテミア摂餌活性との関係について調べた。その結果、ワムシ摂餌期と同様に、この発育段階でも高照度条件下の方が摂餌活性が高かった。一方、21日齢時の仔魚は160Luxの条件下ではほとんど摂餌できなかったのに対し、47日齢になるとこの照度条件下でも仔魚はアルテミアを活発に摂食することができた。このことは、底棲生活への移行に伴いより暗い環境下でも餌の捕獲が可能となったことを明確に示している。一般に、異体類では変態期、浮遊生活から底棲生活へといった生態特性の変化が起こるが、同時に体各部位の構造や機能も著しく変化する<sup>147)</sup>。ヒラメにおいては底棲生活への移行直前に視細胞における双錐体と桿体が形成され、網膜感度が急速に高まる<sup>148)</sup>。マツカワ仔魚でも生活様式の変化に併せて視覚機能が強化され餌感知能力が高まったこと、また筋肉や骨格などの餌捕獲に関わる運動機能が強化したことが推測された。

ナンノ無添加で実施した本実験において、21日齢の仔魚は160Lux以下の照度ではワムシをほとんど摂餌できなかった。しかし、ナンノを飼育水中に添加した前述の実験では水中照度が20Luxまで低下したにもかかわらず、活発な摂餌が認められている。さらに本章1節で、飼育水中のナンノ濃度を高めるほどワムシ摂餌活性が向上することも示されている。今のところ、この矛盾については説明できないが、恐らくn3-HUFAが豊富なナンノは仔魚の利用しやすい栄養源であり活力向上作用がある、または給餌したワムシの活力維持に寄与している等の可能性が考えられ、ナンノによって低照度となっても摂餌できるのかもしれない。また、ナンノが存在しても真つ暗な条件下では仔魚は全く摂餌することができない。ワムシが取り込んだ物質は食粒として蓄積されるが、近年、食粒の色と背後の飼育水の色（明るさ）とのバランスがハタ仔魚の餌感知に大きく関与することが観察されている(阪倉、私信)。従って、ナンノ添加海水とワムシに光があたり、それによる光学的な作用が餌の発見に適した環境をつくっているのかもしれない。

給餌量別飼育実験において、給餌量が最も少なかったLF区でも他区と変わらず、給餌直後から活発な摂餌が認められた。しかし、LF区では水槽内のワムシ残量が最も早く枯渇し、その結果、摂餌が停止して消化管内のワムシ量は急減した。LF区の2倍量のワムシを一度だけ給餌したMF区では、LF区よりも仔魚は長く摂餌できたが、水槽内のワムシ量の低下とともに摂餌は減退した。一方、再給餌を行ったHF区とSHF区では実験期間を通して活発に摂餌を続け、消化管内のワムシ数は消灯するまで直線的に増加した。このことから水槽中のワムシ量と仔魚の摂餌量は同調的関係にあることが示され、マツカワ仔魚

が摂食できる期間と量は飼育水中に存在している餌の絶対量によっても決定されていると考えられる。

これと同様の現象はヒラメ仔魚でも認められており、ワムシおよびアルテミア給餌率が高いほど消化管内に認められる餌料個体数は比例的に増加する<sup>149)</sup>。またハタ類<sup>150, 151)</sup>やクロマグロ<sup>152)</sup>の仔魚においても餌料生物の給餌密度と仔魚の初期摂餌量との間に一定の関係が認められ、摂餌パターンに基づいてそれぞれの適正給餌量が示されている。21日齢のマツカワ仔魚1.5万尾を1t水槽で飼育する場合、約 $12 \times 10^6$ 個体のワムシを9時に給餌したとすると、15時には水槽内のワムシ残存量はほぼ枯渇した状態となる。そのため、摂餌を活性化し成長を促進するには給餌量を高める、またはこの時刻に再度給餌することが効果的と思われる。しかし、過剰給餌によるワムシの長期的な残留は栄養価の低下、水質の悪化へと繋がるため留意が必要と思われる。本種仔魚の摂餌は光条件によっても制限されることから再給餌を行う際は餌料添加後、5～6時間点灯する必要がある。また、萱野・山本<sup>79)</sup>は、キジハタ仔魚において過剰給餌が高成長へ繋がるとは限らず、かえって飼料転換効率の低下となることを指摘している。一部のカレイでは仔魚の成長速度が変態不全と密接に関連すると推測されており、適正な速度で変態過程の進行を促すことが形態異常を防除するうえで重要と考えられている<sup>153)</sup>。従って、適正な給餌条件を設定するにはマツカワが正常に発育できる成長速度についても把握する必要がある。

本実験内において、SHF区はHF区よりも給餌回数が多いにも関わらず、摂餌量は下回って推移した。今回はデータを示さなかったがSHF区は実験開始前から仔魚のへい死が他区よりもやや多く、水槽内の環境は他よりも劣っている傾向がみられた。そのため、仔魚の活力の差が摂餌活性の差として現れたと考えられる。従って、餌料の添加量とその摂餌状況は、仔魚の健康状態や飼育環境の良否を把握できる判断基準として有効と思われる。

ステージD～Gの仔魚のワムシとアルテミア摂餌に水温が及ぼす影響を調べた。その結果、ステージDおよびEのいずれの発育段階でも、12～18℃の範囲において、仔魚は高水温条件下ほど活発にワムシを摂餌した。ステージDでは18℃、ステージEでは16℃以上の条件下において、消化管内ワムシ数のピーク値が低水温条件下のそれよりも有意に上回った。アルテミアを摂餌するステージFおよびステージGにおいても同様であり、高水温条件下では低水温条件下に比べて消化管内アルテミア数が有意に優り、仔魚の摂餌活性が高いと考えられた。また、通常の種苗生産の飼育水温である14℃と各水温との間において、給餌1時間後の消化管内餌料数を比較した。そ

の結果、18℃で飼育した場合、摂餌量は14℃のその約2～3倍であった。以上のことから、水温はマツカワ仔魚の摂餌に極めて重要な影響を及ぼす環境因子であり、高水温飼育は仔魚の初期摂餌を高める上で最も効果的な方法であることが示唆された。一方、後章で詳述するが、本種の場合、他の異体類と同様に、仔魚期の飼育水温は白化個体や両面有色個体などの形態異常の出現に強く関連し、16℃以上の高水温条件下で飼育すると両面有色個体が高率で現れる。また、Goto *et al.*<sup>154)</sup>は、マツカワ仔稚魚が全長35mmに達するまでに高水温で飼育(18℃)すると遺伝的雌個体の雄化が誘引され、種苗の性比が著しく雄に偏ることを明らかにした。従って、高水温飼育は仔魚の摂餌を促進できる有効な手法ではあるが、正常な変態や性決定を阻害する可能性が高いため、実際の種苗生産現場においては避けるべきであろう。

以上の結果、マツカワ仔魚のワムシ摂餌に影響する環境要因としては、前節で明らかとなった①ナンノクロロプシス濃度に併せて、②光環境、③餌料の絶対量、④飼育水温が考えられた。②光環境に関して、照度が仔魚に対しどのような生理作用をもたらすのかは今後研究が必要とされるが、①ナンノの有無にかかわらず、少なくとも暗条件下では仔魚の摂餌が停止する。従って、仔魚の日内リズムを決定する等、餌の発見以外の別の作用を持っている可能性があり、適正な光周期と照度条件のもとに飼育環境を整備することが重要である。③餌料の絶対量は、仔魚と餌料との遭遇確率に影響し摂餌可能時間を決定する。日々成長する仔魚にとって必要とされる栄養量も順次変化する。そのため、設定した投餌量との差が生まれやすく、このことは成長不良や個体間の成長差の原因となる。また、過剰に給餌すると餌料は長期にわたって残存し、貧栄養餌料の摂餌や水質の悪化を引き起こす。そのため、飼育期間中、摂餌状況とワムシの残存量を定期的にモニターし、適正な給餌量と給餌間隔を調整することが必要がある。④飼育水温は仔魚の摂餌に極めて強く影響する要因であり、高水温飼育によって摂餌促進が可能であることがわかった。しかし、同時に健苗性を大きく損なう可能性もあり、摂餌、初期生残、変態、性分化などそれぞれの発育過程において適正水温範囲を把握することが重要であろう。以上、本節で得られた成果は、最良の仔魚飼育環境を整えるうえで極めて有用な知見となるであろう。

### 第3節 マツカワ仔魚の大量沈下減耗の発生要因とその防除（上屈仔魚期における減耗の防除対策）

本種の種苗生産過程において、浮遊仔魚期に大量減耗が生じやすく、中でも仔魚が全長約7.5mmとなった時点（18～20日齢，上屈前仔魚期）と全長約8.5mmとなった時点（26～28日齢，上屈仔魚期）に著しいへい死が認められる。本章第1節において、上屈前仔魚期に生じる減耗にはワムシ摂餌開始から初期における摂餌不良に原因があることを明らかにした。また、飼育海水へのナンノ添加濃度を高めると、仔魚の初期摂餌が活発化し、摂餌不良によるへい死を低減できることがわかった。一方、上屈仔魚となった段階で生じる減耗に関して、その発生機構はいまだ明らかになっていない。この時期、へい死がおこる直前に仔魚が底層へ一斉に沈下するという特異的な行動変化も観察されている。しかし、この沈下現象が発生する原因、またへい死との関連性については十分な検討がなされていない。そこで本節では、上屈仔魚期に発生する仔魚の大量沈下と減耗の原因を解明することを目的とした。浮遊生活期間における仔魚の発育、摂餌および行動特性について詳細に調べ、へい死との関連性を解析した。さらに、その知見に基づき、マツカワ仔魚の初期減耗を抑制できる飼育条件について考察した。

#### 材料と方法

##### 1. 供試魚

栽培センターで養成した3歳のマツカワ親魚雌雄から自然産卵誘導によって受精卵を得た。受精卵を水温8℃、流水（地先汲み上げろ過海水使用）、強通気条件下でふ化まで管理し、得られた仔魚を以下の実験に使用した。

##### 2. 仔魚の大量沈下および減耗の発生要因

上屈仔魚期に発生する仔魚の沈下と大量へい死の原因を探るため、40日齢になるまで仔魚を飼育し、遊泳行動、発育過程、摂餌および体密度の変化について詳細に調べた。

##### (1) 飼育条件

1999年4月に、ふ化後5日目の仔魚2万尾を実験水槽（1t透明水槽）へ収容した。飼育海水には調温したろ過海水を使用した。仔魚収容後、飼育水温を9℃から0.5℃/日の割合で徐々に上昇させ、16日齢以降は13～14℃の範囲になるように調温した。換水率は100%/日（5日齢時）～400%/日（40日齢時）とし、仔稚魚の成長にあわせて流量を増加させた。また、水槽内にセラミック製エアストーンを2個ずつ設置し、0.6～0.8l/分の流量で通気を行った。10日齢から給餌を開始し、仔魚の成長に併

せてシオミズツボワムシ（給餌期間10～35日齢）、アルテミア（22～40日齢）へと餌料を変化させた。ワムシおよびアルテミアの給餌密度は、それぞれ8～15個体/mlおよび1～5個体/mlとし、いずれも餌料の添加後は6時間通水を停止した。また、ワムシを給餌する期間は、飼育水にナンノクロロプシスを $8 \times 10^5 \text{ cell/ml}$ の濃度になるように添加した。なお、ワムシとアルテミアは、それぞれ給餌前にアクアラン（BASF社）およびDHAce（オリエンタル酵母）・メガビット（フジタ製薬）で栄養強化を施したものである。いずれの飼育水槽においても一日一回サイフォンによって残餌と死亡魚を除去した。また、遊泳生活を行う10～40日齢までの期間、サイフォンで吸い出された死亡魚を計数し、日間死亡数の変化を調べた。水温や給餌方法などの飼育条件は前述と同様とし、着底し始める40日齢まで飼育した。

##### (2) 遊泳行動

飼育期間中、仔魚の遊泳行動を継続的に観察し、成長に伴う行動パターンの変化を調べた。行動観察は水槽側面から目視によって行い、仔魚の分布深度や遊泳体勢などを主な観察ポイントとした。

##### (3) 形態変化

実験開始から2日間隔で仔魚を50尾ずつ無作為に採集した。それらをMS222で麻酔した後、実体顕微鏡下で全長測定および形態観察を行った。有瀧ら<sup>10)</sup>によって報告された「マツカワ仔稚魚の発育ステージ」に基づいて、その外部形態の特徴から採集した仔魚を発育段階別に区分した。すなわち、開口してワムシ摂餌を開始する上屈前仔魚をステージC、尾鰭の原基が出現するが、未だ直線状の脊索をもつ上屈前仔魚をステージD、脊索末端が上方へ屈曲し、尾鰭条が形成される上屈仔魚をステージE、さらに脊索末端の上屈が完了し、眼球移動の直前である上屈後仔魚をステージFとした（Fig.3）。各ステージの出現率を求め、浮遊生活期間における仔魚の発育過程を調べた。

##### (4) 摂餌状況の変化

摂餌状況を把握するため、給餌8時間後に仔魚を採集し、10%ホルマリン海水で固定した。それらを実体顕微鏡下で開腹して、消化管内におけるワムシとアルテミアの個体数を求めた。さらに、採集した全仔魚のうち摂餌が認められた仔魚の割合（群摂餌個体率）を算出した。

##### (5) 体密度の変化

実験期間における仔魚の体密度の日変化を調べた。体密度の測定は、Kitajima et al.<sup>15)</sup>による手法に基づいて実施した。1.020 g/cm<sup>3</sup>～1.071 g/cm<sup>3</sup>まで0.001 g/cm<sup>3</sup>間隔で段階的に密度を調整した人工海水系列を作製した。作製した人工海水を高さ20cm容積250mlの蓋付ガラス瓶で



保管し、水温を15℃に保った。10日齢から2日毎に仔魚を15尾ずつ無作為に抽出し、MS222によって麻酔した。全長を測定した後、それらをピンセットで種々の密度の人工海水中に移し、仔魚が中間層で静止した人工海水の密度をその仔魚の体密度と判断した。また、摂餌の有無によって体密度が異なることが予想されたため、体密度の測定は、餌料を十分摂食し飽食となった状態と、測定の前日に別水槽に移し24時間絶食させ空胃になった状態の2通りで実施した。さらに、測定時刻によっても体密度が変化することが予測されたため、予備実験として、8時、16時および20時と時刻を変えて測定した。しかし、測定時刻を変えても体密度に有意な変化はみられなかったことから、いずれの場合も体密度測定は16時に実施した。成長に伴う体密度の変化を明確にするため、無摂餌状態において、測定日間の平均体密度の差を検定するとともに(Tukey多重比較：有意水準5%)、48時間毎の体密度の増加率を求めた。

### 3. 通気量別飼育実験

通気によって水槽内に発生する流れが、仔魚の初期生残に及ぼす影響を調べるため、1999~2001年にかけて通気量別の飼育実験を行った。いずれの年の実験においても、0.5 t水槽3基にふ化仔魚を1万尾ずつ収容し、通気条件が異なる3つの実験区を設けた。各実験区ともに、17日齢まで通気量0.4ml/分/lで飼育したが、18日齢以後、それぞれ無通気、微通気および強通気条件となるように通気量を変化させた(1999年:0.00, 0.40および3.28ml/分/l, 2000年:0.00, 0.75および2.60ml/分/l, 2001年:0.00, 0.20および1.60ml/分/l)。飼育水槽内への通気はセラミック製エアストーンを通して行い、実験終了(36日齢)までそれぞれの通気条件のまま飼育した。飼育水温は、仔魚収容時の9℃から徐々に上昇させ、16日齢以降は13~14℃の範囲になるように調温した。換水率は100%/日(10日齢時)~350%/日(36日齢時)とし、仔魚の成長にあわせて流量を増加させた。給餌方法と生物餌料の栄養強化条件は前述と同様とした。実験期間中、飼育水上層と底層における溶存酸素濃度(DO)とpHを測定した。また、仔魚の遊泳行動および死亡状況を観察するとともに、実験終了時の生残率を比較した。併せて、通気量(Xi)と仔魚の生残確率(Yi)との関係を調べるため、最尤法によって生残確率曲線を求め、生残確率が最大値の95%となる推定通気量およびその95%信頼区間を調べた(Bootstrap法)。

## 結 果

### 1. 仔魚の大量沈下および減耗の発生要因

#### (1) 遊泳行動の変化

成長に伴う遊泳行動の変化を観察した。その結果、観察を始めた10日齢から24日齢までの間、ほぼすべての仔魚は体の長軸を水平に保ち、飼育水上層部を遊泳していた(Fig.71)。しかし、25日齢になると、ほとんどの仔魚が一斉に沈降し始め、中層または底層部へと位置した。また、沈降した仔魚を詳細に観察したところ、上層へ向けた突発的な浮上行動を頻繁に繰り返していた。一部の仔魚はこの深度に定位することができたが、約半数以上の仔魚は徐々に水槽底面まで沈下した。これらは水槽底面においても浮上・沈降行動を連続的に繰り返したが、その後へい死に至った。また、沈下を免れた仔魚は通気によって発生した気泡部の周囲(上向きの流れが生じている場所)に集中しており、40日齢になると変態の進行に伴って着底行動を開始した。

#### (2) 形態変化

Fig.72に10~36日齢における仔魚の全長および発育ステージの変化を示した。実験開始時、仔魚はステージC(全長 $7.1 \pm 0.3$ mm)であったが、徐々に形態形成が進み、14~24日齢時にステージD(全長 $7.0 \pm 0.2$ mm~ $7.7 \pm 0.4$ mm)、25~32日齢時にステージE(全長 $8.1 \pm 0.4$ mm~ $9.2 \pm 0.3$ mm)となり、さらに実験終了時はステージF(全長 $9.4 \pm 0.4$ mm)となった。また、仔魚の急激な沈降とへい死が発生する25~28日齢の期間、形態はステージDからステージEへと変化したばかりであった。この期間、全長に顕著な増加はみられなかったが、頭部や口部が著しく発達し、また体高も増加する傾向がみられた。

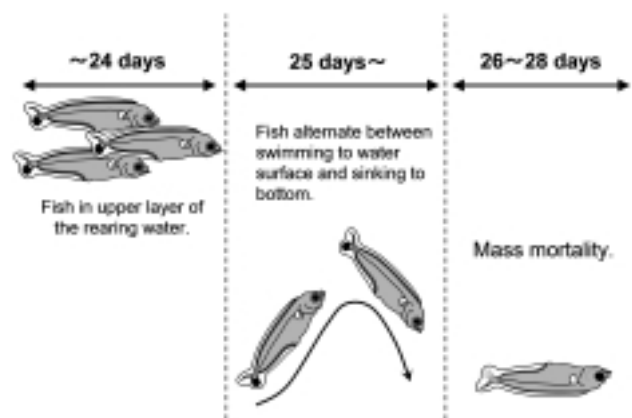


Fig.71 Changes in depth distribution and swimming behavior of larval barfin flounder during the early larval rearing phase.

(3) 摂餌状況の変化

Fig. 73に仔魚のワムシおよびアルテミア摂餌状況を示した。摂餌は12日齢から始まり、群摂餌個体率は14日齢以後、急速に上昇して、18日齢時に90%をこえた。給餌8時間後における消化管内ワムシ数は、成長にともなって増加し20日齢時にピークとなったが、その後、アルテミアの摂食が高まるにつれて徐々に低下した。消化管内アルテミア数は、給餌を開始した22日齢からほぼ直線的に増加し、36日齢時には一魚体当たり99.4±24.9個体のアルテミアを摂食していた。また、仔魚の沈降およびへい死が著しい25~28日齢時においては、主な餌料がワムシからアルテミアへと移行しており、その摂食量は日齢とともに増加した。

(4) 体密度の変化

Fig. 74に成長に伴う体密度の変化および増加率を示した。無摂餌状態で測定した場合、体密度は16~18日齢にかけて一時顕著な増加を示したが、その後、24日齢まで

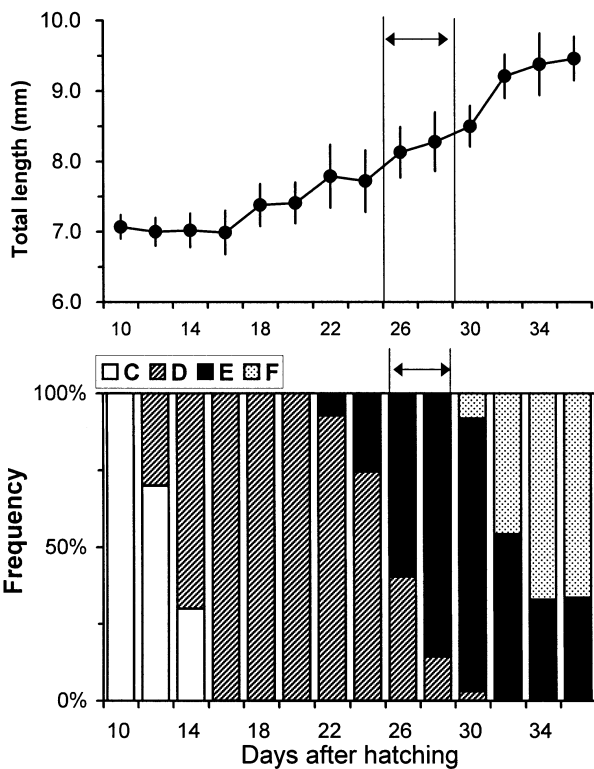


Fig.72 Changes in mean total length (upper figure) and composition of developmental stages (bottom figure) of larval barfin flounder during the early rearing phase. Upper figure, vertical bar indicates SD; Bottom figure, developmental stage according to Aritaki et al. (2000). Arrow indicates the age when mass mortality associated with sudden sinking usually occurs during seed production.

は安定した値となった。しかし、24日齢から体密度は急増し、30日齢でピークとなり、それ以後は再び安定値を示した。また、餌料を摂食して飽食となった時点で測定したところ、体密度は無摂餌状態に比べて0.0004~0.0071 g/cm<sup>3</sup>上回った値となり、消化管内に餌料が充満することによって仔魚全体の密度が高まった。さらに、無摂餌状態において、48時間における体密度の増加率を調べたところ、24~26日齢の成長段階において増加率が0.54%と最大値となった。仔魚が一斉に沈降し始める成長段階は25日齢以降であり、体密度が急増する日齢と一致していた。

2. 通気量別飼育実験

Fig. 75に1999~2001年に実施した通気量別飼育実験で

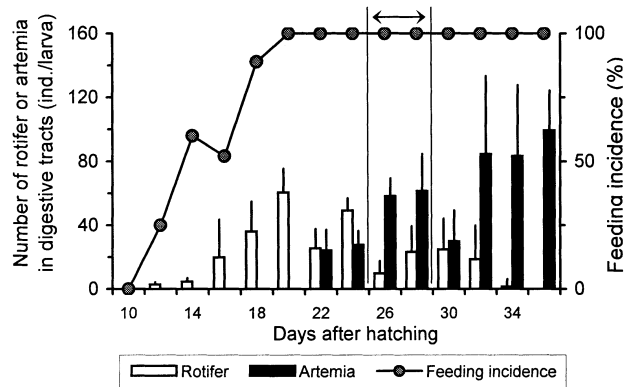


Fig.73 Changes in feeding incidence and the number of rotifer or artemia in the digestive tracts of larval barfin flounder during the early rearing phase. Vertical bar indicates SD. Arrow indicates the age when mass mortality associated with sudden sinking usually occurs during seed production.

の死亡数の日変化を、また、Table 22に飼育水の平均DOおよびpH、さらに36日齢時における生残率を示した。実験区間と水深別間のいずれを比較しても、平均DOおよびpHに明確な差は認められず、また、実験期間を通してDOおよびpHが急変することはなかった。いずれの年においても、18日齢以後、通気を停止した実験区では、仔魚の急激な沈降が発生し、24~26日齢の間にほぼ全ての仔魚が死亡した。また、通気量0.20~0.75ml/分/lとした微通気区においても、24~28日齢にかけて著しい仔魚の沈降とへい死が観察され、実験終了時の生残率は27.4~52.7%であった。これに対し、通気量を1.60~3.28 ml/分/lと通常より強めた強通気区では、水槽内に生

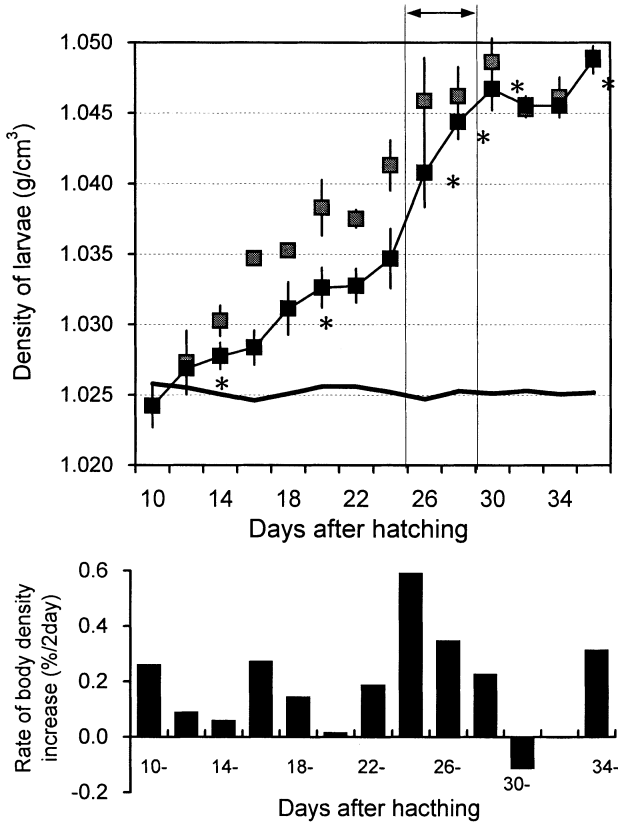


Fig.74 Changes in body density (upper figure) and rate of body density increase at 2 day intervals (bottom figure) of the larval barfin flounder during the early rearing phase. Upper figure, hatched squares and closed squares indicate the body density of larvae with and without food in digestive tracts, respectively. Black line shows the density of sea water. Vertical bar indicates SD. An asterisk indicates a significant difference compared the adjacent data point ( $p < 0.05$ ). Arrow indicates the age when mass mortality associated with sudden sinking usually occurs during seed production.

じた強い攪拌流によって仔魚は沈下せずに遊泳した状態を保ち、また生残率も74.3~89.0%と他の実験区に比べて極めて高かった。通気量( $X_i$ )と仔魚の生残確率( $Y_i$ )との関係は、 $Y_i = 0.862(1 - \exp(-X_i/0.782))$  の指数分布関数に回帰し、また、生残確率が最大値の95%となる推定通気量は $2.341 \text{ ml/分/l}$  (95%信頼区間 $2.15 \sim 2.55$ )であった (Fig.76)。

考 察

マツカワ仔魚飼育過程の中で18~20日齢時と25~28日齢時の2度にわたって大きな減耗が発生する。本章第1節で前者の減耗は摂餌開始時における摂餌不良が主な原因であり、内部栄養(卵黄吸収)から外部栄養(摂餌)への栄養転換が円滑に進まない場合に顕著に発生するこ

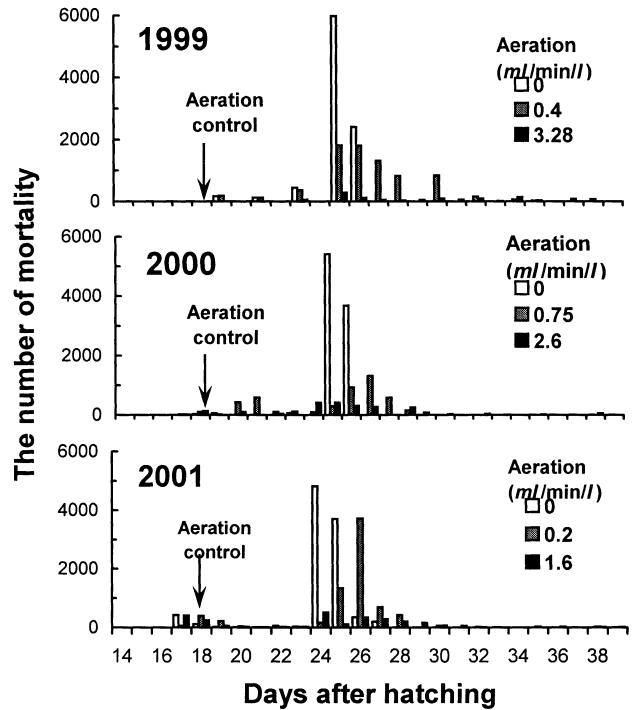


Fig.75 Effect of various aeration levels on mortality associated with sudden sinking in larval barfin flounder.

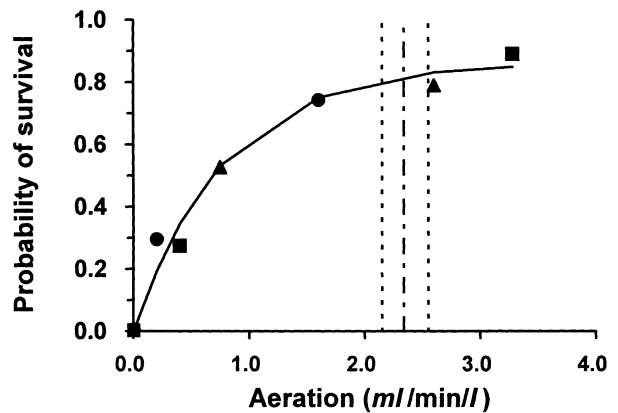


Fig.76 Relation between probability of survival and aeration analyzed by exponential regression with maximum-likelihood method. The vertical chain line indicates the value at probability 95%, and dotted lines indicate the 95% confidence intervals.

とを明らかにした。一方、26~28日齢時の死亡個体を観察した結果、いずれもワムシとアルテミアを十分摂食しており、飼育期間を通して摂餌状況に問題は認められない。また、先の減耗とは異なり、へい死が観察される前日から仔魚が一斉に底層に沈降するといった特徴的な行動変化も観察された。これらのことから、26~28日齢時に発生した減耗は、摂餌不良に起因しているのではなく、

Table 22 Survival of larval barfin flounder reared at various aeration levels.

Year	Exp. Tank	Aeration level (ml/min/l)	Mean DO (mg/l) * <sup>1</sup>		Mean pH * <sup>1</sup>		Survival rate * <sup>2</sup> (%)
			Upper	Bottom	Upper	Bottom	
1999	Strong aeration	3.28	8.7±0.2	8.7±0.2	8.0±0.1	8.1±0.1	89.0
	Gentle aeration	0.40	8.8±0.3	8.7±0.2	8.1±0.1	8.0±0.2	27.4
	No aeration	0.00	9.1±0.3	9.0±0.2	8.0±0.1	8.0±0.2	0.2
2000	Strong aeration	2.60	9.4±0.5	9.5±0.6	8.1±0.1	8.1±0.1	79.0
	Gentle aeration	0.75	9.6±0.6	9.3±0.4	8.2±0.1	8.1±0.1	52.7
	No aeration	0.00	9.3±0.5	9.4±0.7	8.2±0.1	8.1±0.2	0.0
2001	Strong aeration	1.60	8.2±0.4	8.2±0.2	—	—	74.3
	Gentle aeration	0.20	8.1±0.5	8.4±0.6	—	—	29.5
	No aeration	0.00	7.9±0.6	8.1±0.5	—	—	0.5

\*1: mean ± standard deviation

\*2: Survival rate was calculated in 36 dah.

その直前に発生する急激な沈下現象と何らかの関連があるものと推察される。

そこで、急激な沈下現象がなぜ生じるかを解明するため、体密度を測定し、発育過程の中で沈みやすさがどのように変化しているかを調べた。その結果、空胃状態で測定したところ、体密度は成長に伴って徐々に増加したが、中でも沈降が著しく発生する25～28日齢までの期間、特に急激な上昇を示した。このことは、この時期に仔魚の体は環境水に比べて比重が格段と高くなり、より沈降しやすい状態に変化したことを明確に示している。外部形態を経時的に観察したところ、体密度が急増する25～28日齢時は、ステージDからステージEへと変化したばかりであった。本種の場合、ステージEでは脊索の上屈に併せて、尾鰭をはじめとする各鰭の鰭条が形成されるため、前ステージより遊泳に適した体構造となる<sup>15)</sup>。また、同時に、頭部や口部が顕著に発達し、体高も急速に増大化することも知られている。そのため、この時期は筋肉や骨組織等の形成が前ステージに比べてより活発化していると考えられ、その結果として体密度が急速に増加したものと推測される。

さらに、仔魚が摂食し飽食状態となると、消化管内に餌料が充満した影響によって、体密度は無摂食状態の測定値を大きく上回った。実験期間における消化管内餌料数を調べた結果、25～28日齢時は、ワムシ摂餌からアルテミア摂餌へと移行し、アルテミアの摂食量が加速的に増加している時期に相当した。L型ワムシ一個体の湿重量は、株や培養環境によって幅があるものの2.3-5.1 $\mu$ gと報告されている<sup>156)</sup>。これに対し、アルテミア（北米ユタ

州産）一個体当たりの湿重量はふ化幼生の段階でも約14 $\mu$ g<sup>145)</sup>とワムシの値に比べて極めて大きい。従って、アルテミア摂餌量が高まるこの時期は、摂食した餌料分の密度増加も著しく、仔魚は飽食時にさらに沈みやすい状態になると考えられる。

多くの海産魚類において、卵や仔魚の浮沈には、環境水との密度バランスが大きく影響する<sup>157,158)</sup>。本種と同様にマダイ仔魚でも、ふ化から約10mmになるまでの初期発育過程において体密度が急増することが報告されている<sup>155)</sup>。一方、マダイ仔魚の場合、同時に鰾の形成も始まるため<sup>159)</sup>、体密度が増加しても鰾の膨張・収縮によって浮力を調節し、少ないエネルギー消費で鉛直移動や定位が可能である<sup>155)</sup>。これとは反対に、マツカワを含むほぼ全ての異体類では、その発育過程を通して鰾が形成されない。そのため、ヒラメ仔魚では、一日の中で活動が不活発となる時間帯に重力によって沈降することが観察されている<sup>160)</sup>。従って、異体類の仔魚にとって体密度の変化は鉛直分布に直接影響すると考えられる。このことから、マツカワ仔魚における急激な沈下現象は、初期発育が進む中で体密度が急増することにより引き起こされている可能性が高い。すなわち、体密度が緩やかに増加する24日齢までの期間、仔魚は遊泳や通気による飼育水の攪拌効果によって上層に定位できる。しかし、25～28日齢になると、体密度が遊泳能力をこえるほどに急増するため、均衡がくずれて一斉に沈降すると推測される。

上屈仔魚期の減耗には、その直前に発生する仔魚の沈降現象が関連すると推測された。そこで、通気量操作によって飼育水槽内の攪拌の強さを変化させ、沈降の抑制

を試みた。その結果、18日齢以降、通気を停止した実験区と微弱な通気条件下で飼育した実験区では、いずれも著しい沈下が発生し、36日齢時における生残率はそれぞれ0.0~0.5%および27.4~52.7%と低かった。これに対し、通気量を通常よりも強めて飼育した実験区では、体密度が急増する時期になっても仔魚は沈降せずに遊泳し続けた。さらに生残率も74.3~89.0%と他区を大きく上回った。以上の結果、25日齢以降に突発的に発生するマツカワ仔魚の沈下を抑制するには、体密度の増加に併せて通気を強めて飼育することが極めて有効であり、また、沈下を防ぐことによって、その後発生する大量へい死を防除できると考えられる。通気操作によって仔魚期の減耗を低減できたという実験例はブリ仔魚飼育でも報告されており、ブリの場合、通気法を工夫し水平および鉛直方向に流れをつくることの重要性が示唆されている<sup>161)</sup>。本実験において、流れの動態は目視で観察したのみであり、通気量が異なった場合、流向や流速がどのように変化するかは解析できなかった。一方、塩谷ら<sup>162)</sup>は、マハタ仔魚の飼育水槽内における流動状況を定量的に解析し、円型1t水槽にエアストーン1個で通気した場合（本実験とほぼ同じ設定）、通気源（エアストーン）から垂直上向きに強い流れが発生すること、またその流速は通気量の増加に伴って対数関数的に高まることを報告している。このことから、本実験の強通気区では、強い攪拌が恒常的に発生したため、鉛直分布の重心が上層部へ集中し大量沈下の発生を抑えたと推察される。

一方、攪拌が弱く、仔魚が底層に沈降してしまった場合、どんな要因が引き金となってへい死に至るのかは明らかにできなかった。沈降し始めてから死亡するまでの行動を観察したところ、仔魚は浮上するために表層へ向けて突発的に泳ぐが、再び静かに沈降するといった行動を連続的に繰り返していた。これと類似した行動は、カタチイワシ仔魚でも報告され、深度調節に重要な役割をもつと考えられている<sup>163)</sup>。しかし、鰾を持たないマツカワ仔魚において、浮上遊泳を繰り返すだけでは十分な浮力が得られず、かえってエネルギーを消耗し衰弱したことも死亡要因の一つとして考えられる。そのため、通気を強化し上昇流を発生させる方法は、遊泳力が十分に発達するまでの期間、仔魚の浮上遊泳を擁護し、エネルギー損失を低減するという面において有効性が高いと思われる。また、魚類仔魚において、遊泳や環境水の動きは呼吸を容易にするという面でも重要と考えられている<sup>146,164,165)</sup>。今回、いずれの実験区間でもDO測定値に明確な差はなく、また実験期間を通してDOの急変や局所的な低酸素環境は認められなかった。しかし、本来、浮遊する仔魚が水の動きが弱い水槽底面に沈下した場合、通常に

比べてガス交換の効率は著しく劣ると想像される。飼育環境水の流動性と呼吸能（ガス交換能）との関連性については、今後詳細に検討する必要がある。

本実験結果とは反対に、ハタ類<sup>146,166,167)</sup>やカンパチ<sup>168)</sup>等、比較的仔魚サイズが小さい種においては、通気が強い環境下で飼育すると、気泡接触による物理的障害や摂餌不良が起こるため、かえって生残率が低下すると報告されている。また、本種においても、卵黄嚢仔魚や上屈前仔魚の場合（13~20日齢）、0.4ml/分/l程度とやや穏やかな通気条件下の方が、摂餌個体率および単位時間あたりの摂食数が高く、発育に適している（萱場、未発表）。従って、仔魚の発育に適する流れ環境は、魚種によって、または同種でも発育レベルによって大きく異なることが示唆される。そのため、仔魚飼育期の通気量や通気方法を検討する際には、対照種の発育段階、遊泳行動、摂餌行動等について十分な観察が必要である。

以上の結果、マツカワ仔魚飼育において、上屈仔魚期に発生する大量沈下現象は、上屈前仔魚から上屈仔魚へと形態が変化する過程において体密度が急激に増加し、比重が増して沈みやすくなることに起因すると考えられた。また、体密度の増加にあわせて、通気を強めて水槽内に鉛直混合を起こし、物理的作用によって沈降を抑制すると、その後発生する大量減耗を防除できることが示された。これらの知見に基づき、今後、仔魚飼育過程における通気方法を改良することにより、初期減耗を低減し、より安定的な種苗生産が可能になるとと思われる。また、効率良く、且つ低コストで種苗生産を行うには、大型水槽を用いた集約的な飼育管理が不可欠である。そのため、水槽形状や容積が異なる場合における水槽内の流動環境についても解析する必要がある。さらに本結果は、マツカワでは、仔魚期という短い発育過程の中で体密度などの生理特性が大きく変化しており、それによって飼育環境因子に対する耐性や要求性が大きく変遷していることを明確に示している。従って、今後、仔稚魚育成技術開発を進める上で、仔魚の生残という指標のみならず、形態形成の速度、摂餌の可否、行動などについて詳細に把握し、設定した飼育環境との適合度を確認することが重要と思われる。

## 第VI章 マツカワ人工種苗における形態異常および性比の偏りの防除技術の開発

水産資源を底上げし漁業生産の安定化を図ることを目的として、現在、人工種苗の大量生産と放流事業が進められている。一方、近年、種苗放流事業の経済効果を把

握ることが強く求められるとともに、環境を重視した社会への移行によって、人工種苗が天然海域に及ぼす影響も懸念されている。従って、放流後も生残率がよく、且つ天然資源と隔たりのない形態と生理特性をもつ種苗を育成することが必要とされている。

前章で示したように、親魚養成と採卵技術の発展によってマツカワ種苗生産でも受精卵の安定確保が可能となり、また初期減耗防除技術の確立によって高い生残率で種苗を育てることができるようになった。しかし、生産された人工種苗の中には、体色、眼の位置、脊椎骨などに著しい異常をもった個体が高頻度で認められる。ヒラメなど他の異体類において、こうした形態異常魚は、正常魚に比べて摂餌能力や逃避能力が劣るため放流後の生き残りが悪いと考えられている<sup>169,170</sup>。また、成魚となって水揚げされた場合、その外観の異常性から商品価値を大きく損なうことも懸念されている。

併せて、本種においては、生産された種苗の性比が雄に偏りやすいことが問題となっている。この現象は、遺伝的雌個体が、生殖腺の性が決定する前に環境刺激によって不可逆的に雄へと分化したためと考えられる<sup>154</sup>。このような性比が著しく雄に偏った種苗群を継続的に放流した場合、大型で単価が高い雌魚の漁獲が減少するため漁獲収益が低下する。またこれらが再生産に加入した場合、マツカワ集団の遺伝構成に悪影響が及ぼされることも懸念される<sup>171</sup>。

以上のことから、今後、収益性が高く、且つ環境保全を考慮した責任ある栽培漁業を展開するためには、形態と生理の両面で健康な種苗を安定育成できる技術が不可欠である。そのためにはマツカワ仔稚魚における形態異常と性比の偏りの発生要因を明らかにし、適正な飼育環境を整える必要がある。そこで本章1節では、マツカワ人工種苗に認められる形態異常のうち変態過程の異常に起因する白化と両面有色化現象の発生要因について検討した。また2節では、本種の性決定メカニズムを明らかにするため、性決定に対する温度感受期の特定と飼育環境因子が性比に及ぼす影響について検討した。

## 第1節 マツカワ人工種苗における変態異常の発生に及ぼす飼育水温の影響と水温感受期の推定

通常、マツカワ仔魚は、ふ化直後から浮遊生活を送る後期仔魚までの間、左右相称の形態を有する。底棲生活への移行の際、変態過程を通して、眼、鼻の位置、顎骨、鰓弓、皮膚上の色素、鱗など数多くの部位で左右不相称化が生じ、その結果いわゆるカレイ型となる。一方、本種の人工種苗の中には、体色や眼の位置等に異

常をもった形態異常個体が多数認められる。中でも両体側面ともに色素が発現しない白化個体や両体側面ともに着色している両面有色個体はその主体を占める。

人工種苗の白化および両面有色化現象は、ヒラメ<sup>137</sup>、マコガレイ<sup>172</sup>、マガレイ<sup>173</sup>、ホシガレイ<sup>153</sup>、ババガレイ<sup>174</sup>、イシガレイ<sup>174</sup>、スナガレイ<sup>174</sup>、メイトガレイ<sup>175</sup>など数多くの異体類でも報告されている。近年、これらの有眼側および無眼側形態（体色、眼の移動方向、鱗の形状）の比較観察により、白化個体は両体側面に正常魚の無眼側形質が発現していること、また両面有色個体は両体側面ともに有眼側化していることが明らかとなった<sup>174</sup>。併せて、マツカワの形態異常個体においてもこれと同じ現象があてはまると報告されている<sup>174</sup>。すなわち、本種の白化および両面有色化は何らかの要因によって変態過程が正常に進まず、本来あるべき左右不相称の形態に分化できなかった結果であると推測される（変態に関連した形態異常）。

種苗生産履歴がない天然カレイにおいても白化個体や両面有色個体が認められているが<sup>20</sup>、その出現頻度は人工種苗に比べて極めて低い。そのため、形態異常の発生には発育過程における環境要因が強く影響していると考えられる。これまで数種の異体類において、水温<sup>138,172,173</sup>、栄養条件<sup>176</sup>、通気量<sup>177</sup>、注水量<sup>178</sup>、水槽の色<sup>179</sup>など、様々な環境要因と形態異常の発生との関連性が調べられてきた。その中でも水温は特に強く影響する要因として考えられている。しかし、これまでマツカワにおいて飼育水温と形態異常との関連性を示した実験例はまったくない。また、現在、本種の天然資源量は極めて低く天然発生した仔魚の捕獲はほぼ期待できない。そのため、マツカワ仔魚の発育に最も適した水温範囲を天然発生個体の生息状況から類推することは極めて難しい。そこで本研究では、マツカワ人工種苗の白化および両面有色化の発生に及ぼす水温の影響について調べた。さらに、発育レベル毎に水温を変化させる飼育実験を行い、形態異常の発生に対し水温が影響しうる発育時期（水温感受期）について調べた。

## 材料と方法

### 1. 供試魚

栽培センターで養成した4歳または5歳の人工養成魚の雌から人工搾出によって卵を採取した。これらに同年齢の雄から採取した精子を媒精し人工受精を行って受精卵を得た。受精卵を水温8℃、流水、通気（約800ml/分）した条件下でふ化まで管理し、得られた仔魚を実験に供した。また、実験を開始するふ化10日後（10日齢）までの間は、仔魚を水温9～10℃、流水、通気（約400ml/分）

した条件下で飼育した。

## 2. 水温別飼育実験（実験Ⅰ）における実験条件

本種の雌の場合、一度に採取できる卵数は10万粒以下と少ない<sup>13)</sup>。そのため、同一ロットの仔魚を用いて同時に多数の実験水槽を設定することは困難であった。そこで、本実験では2ロット分の仔魚を用い、実験を二度繰り返すことによって実験結果の再現性を確認することとした。

10日齢の仔魚を用い、水温別の飼育実験を行った。2001年4月4日に仔魚（同年3月25日ふ化）を2万尾ずつ1 t 円形水槽4基に収容した（試験1回目）。また、2001年4月13日に仔魚（同年4月3日ふ化）を2万尾ずつ1 t 円形水槽3基に収容した（試験2回目）。仔魚収容後、飼育水温を0.5~1.0℃/日の比率で徐々に上昇させた。試験1回目ではそれぞれ12℃、14℃、16℃および18℃、試験2回目では14℃、16℃および18℃まで昇温し、実験終了となる80日齢までそれぞれの設定水温のまま飼育した（Fig.76）。実験期間中は100~500%/日の換水率となるように調温海水を通水し、またセラミック製エアストーンによって200~1,000 ml/分の割合で通気した。10~35日齢までワムシを8~12個体/mlの密度になるように給餌した。なお、ワムシ給餌期間は飼育海水中にナンノクロプシスを100万細胞/mlの密度になるように添加した。また、23~70日齢時はアルテミアを1~5個体/mlの密度になるように給餌し、55日齢から実験終了までは市販のヒラメ仔稚魚用配合飼料（おとひめシリーズ・日清製粉）を与えた。本実験で餌料として使用したワムシとアルテミアは、給餌前にマリングロス（日清サイエンス）によって16時間栄養強化を施したものである。

## 3. 飼育水温転換実験（実験Ⅱ）における実験条件

10日齢の仔魚を用い、飼育水温転換実験を行った。2001年3月30日に仔魚（同年3月20日ふ化）を1万尾ずつ0.5 t 円形水槽4基に収容した（試験1回目）。また2002年4月2日にも仔魚（同年3月23日ふ化）を1万尾ずつ0.5 t 円形水槽5基に収容した（試験2回目）。各実験区における飼育水温をFig.77に示した。試験1回目において、実験期間中、水温を約13.5℃に保ったまま飼育する低水温対照区（Cont.LT；平均水温13.4℃）と、実験開始後約18℃まで昇温し高水温飼育を行う高水温対照区（Cont.HT；平均水温17.2℃）を設けた。一方、その他の実験区（TS-29d区およびTS-55d区）では、飼育期間中に高水温飼育から低水温飼育への切り替え（飼育水温転換）を行った。すなわち、両区とも実験開始後Cont.HT区と同水温まで昇温し高水温飼育を行ったが、TS-29d区

では仔魚が29日齢になった時点で、またTS-55d区では仔魚が55日齢になった時点においてCont.LT区と同じ水温まで徐々に降温した。降温後、これらでは実験終了まで低水温のまま飼育した。

試験2回目においても同様に低水温対照区（Cont.LT；平均水温13.5℃）と高水温対照区（Cont.HT；平均水温16.4℃）を設定した。さらに仔魚が27日齢、37日齢および51日齢になった時点で飼育水温転換を行うTS-27d区、TS-37d区およびTS-51d区を設けた。水温操作以外の飼育条件は前述した水温別飼育実験と同様とした。

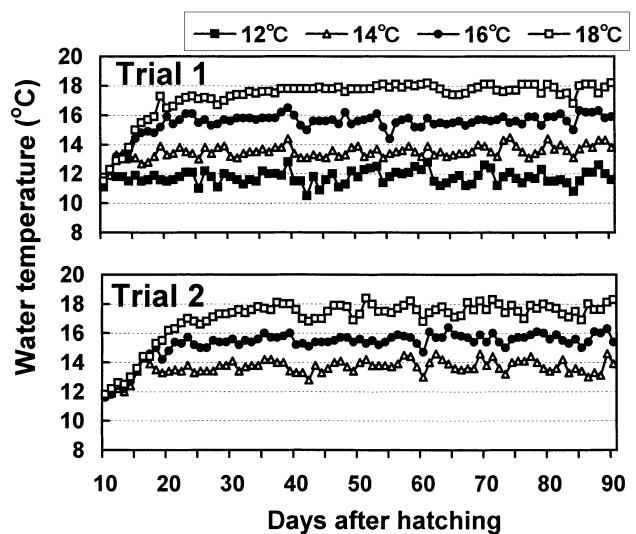


Fig.77 Rearing temperatures of each experimental tanks in the experiment I.

## 4. 仔稚魚の形態測定

水温別飼育実験および飼育水温転換実験ともに、実験開始から5日置きに30尾ずつサンプリングした。仔魚を麻酔した後、万能投影機およびノギスを用いてそれらの全長を測定した。また、仔魚の発育段階を比較するため、有瀧ら<sup>14)</sup>によって報告されたマツカワ仔魚の発育ステージ分類に基づきサンプルを以下の9段階に区分した。  
 ステージA：ふ化直後の卵黄囊仔魚，ステージB：卵黄囊仔魚（開口前，胸鰭が発達する），ステージC：上屈前仔魚（開口し，眼に黒色素が沈着する），ステージD：上屈前仔魚（尾鰭原基が発達），ステージE：上屈仔魚（脊索の上屈），ステージF：上屈後仔魚（変態初期，背鰭と臀鰭が出現する），ステージG：上屈後仔魚（変態中期，左体側の眼の移動が開始），ステージH：上屈後仔魚（変態後期，左眼が頭部正中線上に到達），ステージI：稚魚（変態完了，成魚と同様の鰭条が完成）。

水温の違いによる成長，発育の差を比較するため、水

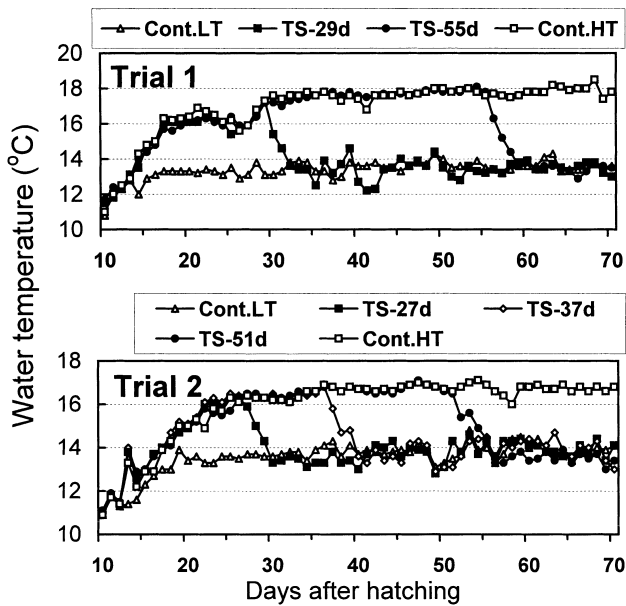


Fig.78 Rearing temperatures of each experimental tanks in the experiment II.

温別飼育実験においては同一日齢時における平均全長と、同一ステージに達した時点での平均全長をそれぞれ求め、Tukey多重範囲検定法により各実験区間における有意差を検定した ( $P < 0.05$ )。

## 5. 形態異常の出現率

形態異常の出現率を調べるため、90日齢時に各実験区から300尾ずつ無作為に抽出し、それらを10%中性ホルマリンで固定した。有瀧ら<sup>15)</sup>によって報告されたホシガレイ形態異常の分類基準に基づいて固定標本をタイプA, B, B' およびCに分類した。

**タイプA (正常個体Fig.79a) :** 右体側の眼はほとんど動いていない。左体側の眼は大きく動き、右体側へと移動している。右体側の黒色素は全体によく発現し、成魚と同様の紋様を形成する。左体側の黒色素は全体に発現することなく、全く無いか、部分的にのみ存在する。

**タイプBおよびB' (白化個体Fig.79bおよびc) :** 右体側の眼はほとんど動いていない(タイプB)か、大きく左体側へ動く(タイプB')。左体側の眼は大きく右体側へ移動している。右, 左体側とも正常魚の無眼側と同様、黒色素は全体に発現することなく、全く無いか、部分的にのみ存在する。

**タイプC (両面有色個体Fig.79d) :** 右, 左体側の眼は共に正常魚の有眼側と同様、ほとんど動いていない。右, 左体側とも正常魚の有眼側と同様、黒色素は全体によく発現し、成魚と同様の紋様を形成する。

いずれの実験でも各実験区におけるそれぞれのタイプ

の出現率を求めた。また、水温別飼育実験においては、14℃区~18℃区に関し、各タイプの出現率と水温(要因1)、またはロットの違い(要因2)との関連性について2要因分散分析(繰り返しなし)によって解析した。

## 結 果

### 1. 水温別飼育実験における仔魚の成長、発育および形態異常の発生

試験1回目および2回目のいずれにおいても、実験期間中、顕著なへい死は発生せず、生残率は前者で72.9%~90.5%、後者で50.4%~66.1%と高かった。Fig.80に実験期間における仔稚魚の成長を示した(試験1回目)。平均全長は飼育水温が高い区ほど有意に高く、実験を終了する90日齢時、18℃区の仔魚は12℃区の仔魚の約2倍であった。Fig.81に仔稚魚の発育ステージと日齢との関係を示した。飼育水温が高いほど仔魚の発育は早く進む傾向があり、変態開始期であるステージFの仔魚は12℃区で31日齢、14℃区で30日齢、16℃区および18℃区で29日齢から出現した。また、ステージF~Hの仔魚が観察された期間は12℃区で54日間、14℃区で41日間、16℃区で38日および18℃区で31日であり、低水温飼育区ほど変態期間が長い傾向がみられた。さらに各発育ステージに達した時点での平均全長を比較した(Fig.82)。その結果、ステージD, EおよびFにおいて高水温条件下で飼育した区ほど平均全長が有意に小さかった( $P < 0.05$ )。すなわち、高水温飼育区では低水温飼育区に比べて、変態直前から変態初期における発育が特に加速的に進行していると考えられた。

Fig.83に水温別飼育実験における形態異常の出現率を示した。正常個体であるタイプAの出現率は14℃区において最も高く(試験1回目59.0%, 試験2回目72.2%)、水温がそれ以上でも、またそれ以下になっても顕著に低下した。また、飼育水温が低いほど白化個体であるタイプBとB'の出現率が高くなり、12℃区では39.6%と全区中最も高かった。反対に、両面有色個体の出現率は飼育水温が高くなるとともに直線的に増加し、18℃区では白化個体はほとんど認められなかったものの、タイプC率は67.2%(試験1回目)および49.1%(試験2回目)と極めて高かった。さらに14℃区~18℃区に関して、各タイプの出現率と水温または仔魚のロットの違いとの関連性を2要因分散分析により解析した(12℃区は試験1回目のみで実施したため除外)。その結果、水温およびロットの違いの両要因ともにタイプAおよびCの出現率に対して強く影響していることが統計的に明らかとなった( $P < 0.05$ )。



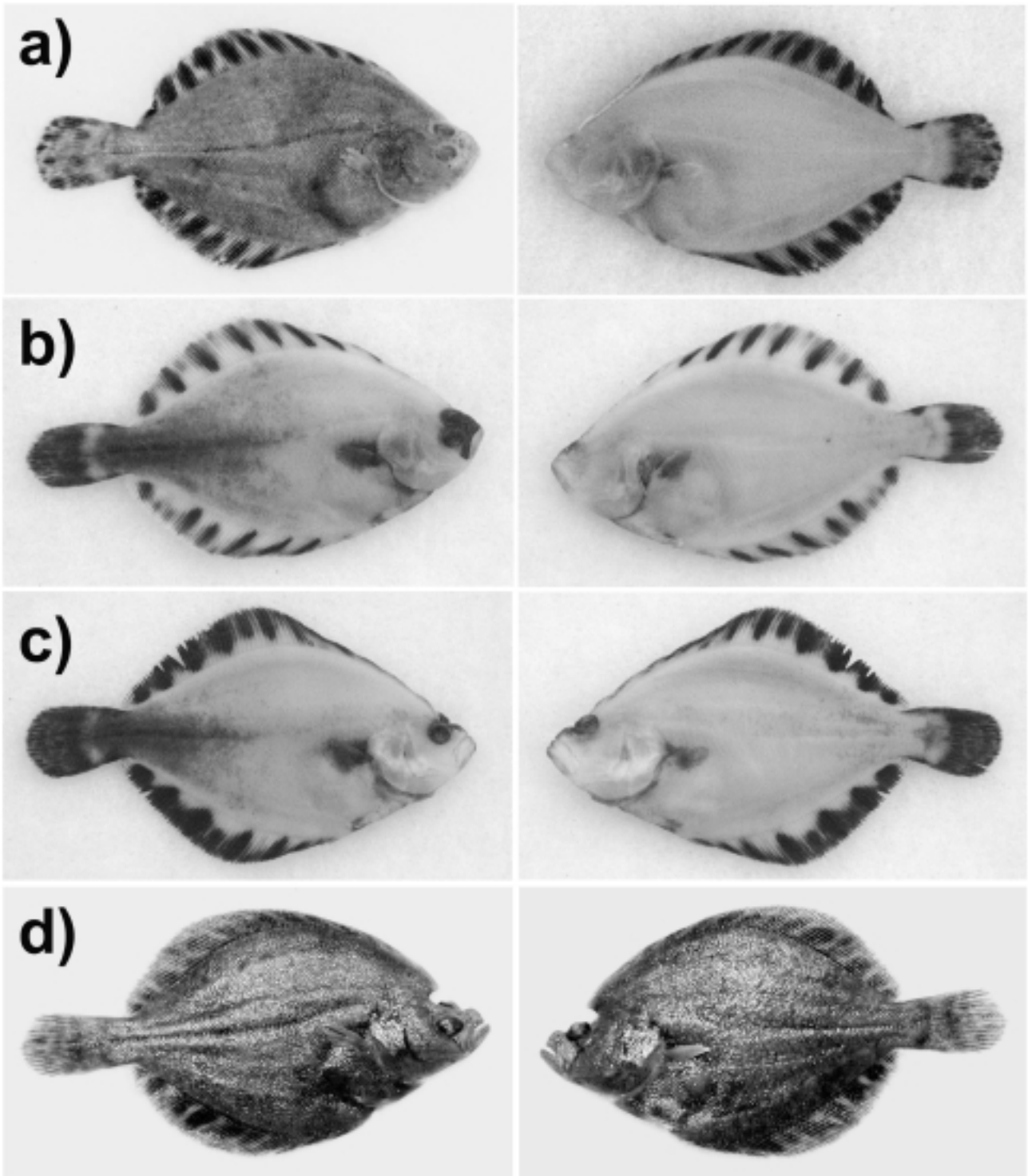


Fig.79 Morphological types in the hatchery-reared barfin flounder.

- a) Type A: normal fish (left eye migrates to ocular side and pigmentation appear in only ocular side)
- b) Type B: pseudoalbino fish (left eye migrates to ocular side, but pigmentation does not almost appear in both body sides)
- c) Type B' : pseudoalbino fish (both eye migrate to another body side and situate on the dorsal edge of the head, pigmentation does not almost appear in both body side)
- d) Type C: ambicolored fish (both eyes do not migrate, pigmentation appear in both body sides)

## 2. 飼育水温転換実験における形態異常の出現率

飼育水温転換実験における生存率は66.2～84.6% (試験1回目) および60.4～80.7% (試験2回目) であった。

試験1回目における形態異常の発生傾向を調べた。その結果、実験期間を通して低水温のまま飼育したCont.LT区は白化率(タイプB+B')が66.5%と極めて高く、正

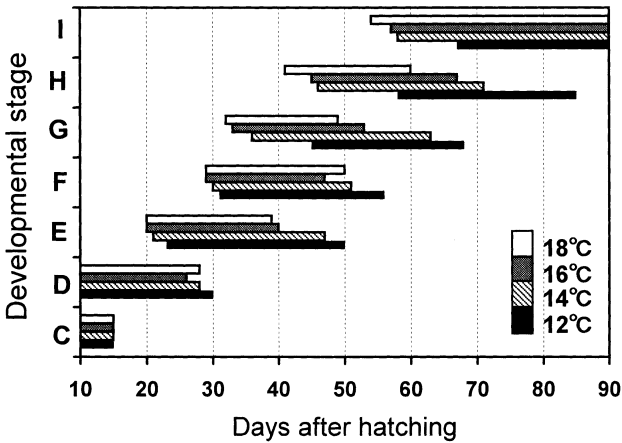


Fig.81 Changes in developmental stage compositions of barfin flounder (Trial 1) reared under different temperatures.

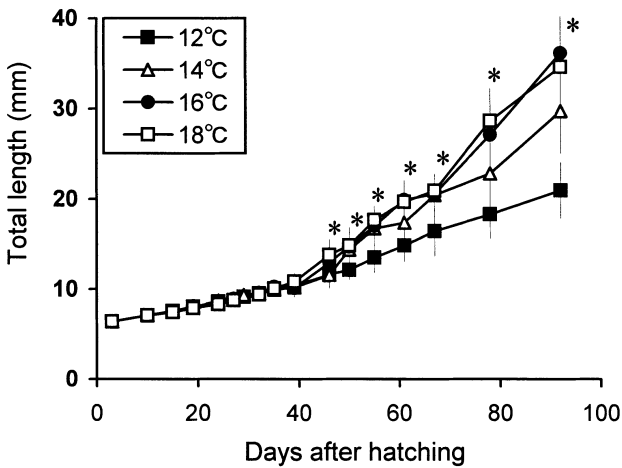


Fig.80 Changes in total length, body height and body height/total length of barfin flounder (Trial 1) reared at different temperatures. \* shows significant difference at level of 0.05 within the experimental groups.

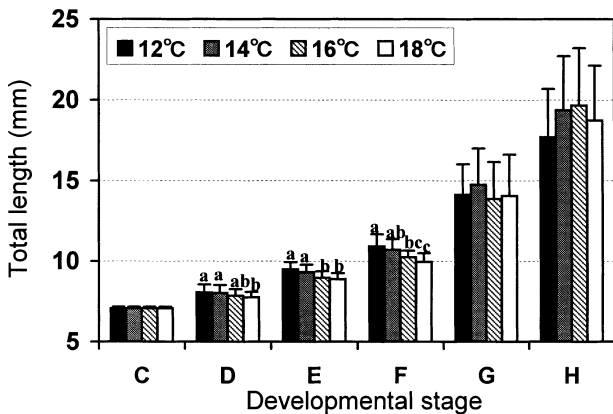


Fig.82 Average total length of each developmental stage at 4 different temperature in Experiment.I (Trial1). Means with different letters are significantly different at the 0.05 level within each stage. Vertical bar represents SD.

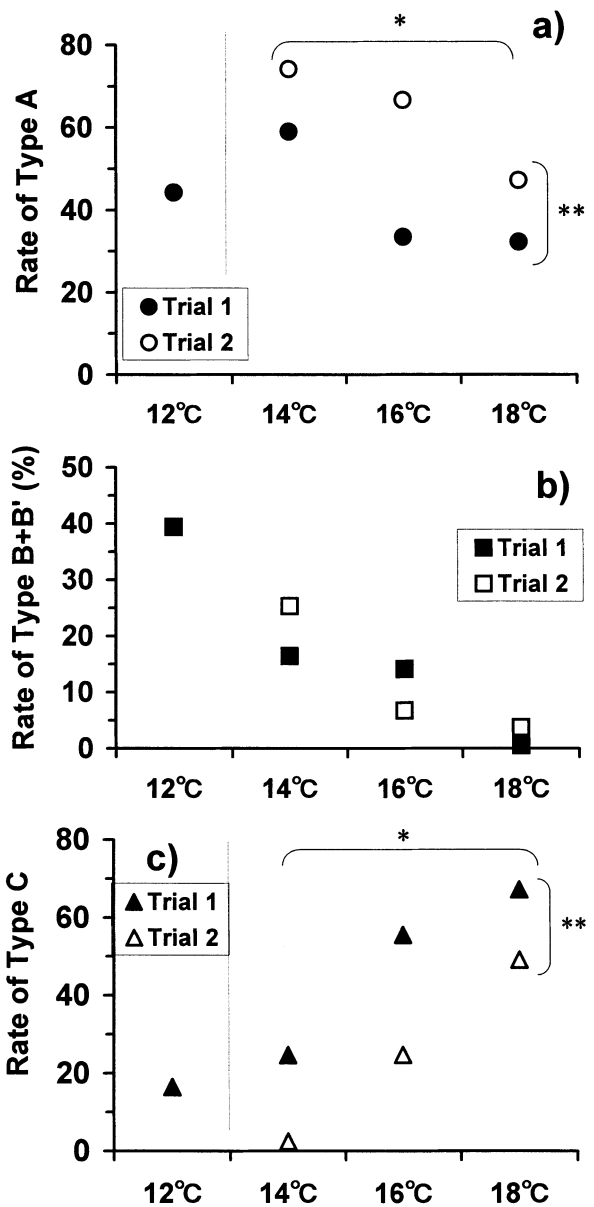


Fig.83 The percentage occurrence of type A (normal), type B and B' (pseudoalbino) and type C (ambicolored) in juvenile barfin flounder reared at various temperatures in experiment I. Closed marks, Trial 1; Open marks, Trial 2.

常個体(タイプA)の出現率が全区中最も低かった(Fig.84)。一方、29日齢まで高水温で飼育し、その後低水温飼育へと切り替えたTS-29d区においては、Cont.LT区に比べて白化率が大きく下回り、正常個体率が増加した。併せて、Cont.LT区ではみられなかった両面有色個体もわずかに認められ、形態異常の出現傾向が大きく変化した。また、55日齢まで高水温飼育を行ったTS-55d区の場合、白化個体はほぼ認められなかったが、両面有色率が54.0%と極めて高かった。同区における各タイプの出現率は、実験終了まで高水温のまま飼育したCont.HT区のそれとほぼ

一致した。

試験2回目では全実験区ともに1回目より正常個体率が高かったが、形態異常の出現状況は試験1回目と極めてよく似ていた。すなわちCont.LT区では白化個体のみが、Cont.HT区では両面有色個体のみが高率で出現し、さらに27日齢時に飼育水温転換を行ったTS-27d区では白化および両面有色の両タイプが認められた。37日齢時、または51日齢時に飼育水温転換を行ったTS-37d区とTS-51d区では形態異常のほぼ全てが両面有色個体であり、さらにその出現率はCont.HT区と等しかった。

Fig.85に試験2回目の実験期間における仔魚の発育ステージ組成の変化を示した。高水温飼育期間は低水温飼育時に比べて仔魚の形態形成がやや速く進行する傾向がみられた。また、飼育水温転換を行った時点での仔魚の発育レベルを調べたところ、TS-29d区およびTS-27d区では変態開始直前であるステージE、TS-37d区では変態初期であるステージF、TS-55d区およびTS-51d区では変態盛期であるステージG-Hであった。

さらに、形態異常の発生率と各発育ステージにおける

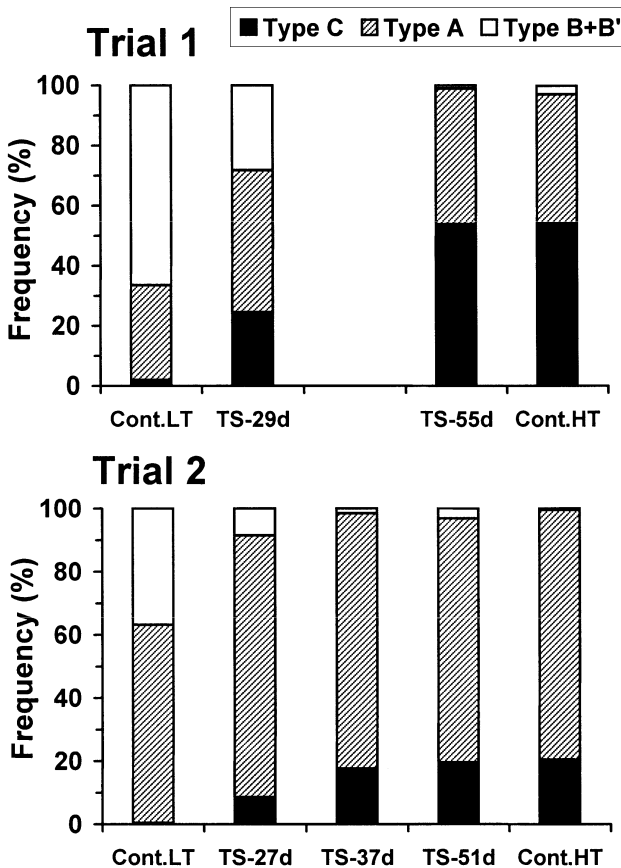


Fig.84 The percentage occurrence of type A (normal), type B and B' (pseudoalbino) and type C (ambicolored) in juvenile barfin flounder reared at various temperatures in experiment II.

平均水温との関係を比較した。その結果、白化率はステージDおよびステージEの時点での平均水温と強い負の相関を示し(相関係数  $r > 0.7$ )、中でもステージEの平均水温との間に特に強い相関関係が認められた(Fig.86)。また、両面有色率においてはステージE~Fにおいて相関係数が0.8以上となる正の相関を示し、これにおいてもステージEの平均水温と最も強い相関関係が認められた(Fig.87)。

考 察

12℃~18℃までの水温条件下で飼育したマツカワ仔稚魚の成長および発育を調べた。その結果、成長、発育のいずれも飼育水温が高いほど加速的な進行をみせた。水温はステージDからFになるまでの発育速度に対して特に強く影響し、高水温条件下では変態が早い日齢から、より小さい仔魚サイズのうちに開始することがわかった。これらの結果から、飼育水温はマツカワ仔魚の成長および発育を制御する重要な因子であり、水温によって変態の開始タイミングや進行速度が大きく変動すると考えられる。同様の現象はヒラメ<sup>180)</sup>、マコガレイ<sup>172)</sup>、マガレイ<sup>173)</sup>、ホシガレイ<sup>153)</sup>など他の異体類でも共通して認められている。第V章2節においてステージD~Gのマツカワ仔魚を用い、異なる水温下でのワムシ、アルテミア摂餌状況を比較した。その結果、いずれのステージでも12℃~18℃の範囲内において高水温条件下ほど摂餌活性が高くなり、ステージEの仔魚の場合、18℃下での時間当たり摂餌量は12℃下の約2倍であった。従って、本研究で認められた成長および発育速度の違いには、こうした栄養摂取量の差が強く反映したと推測される。

さらにこれまで多くの生体内、生体外実験によって異体類における変態は甲状腺ホルモンによって制御されていることが明らかとなった<sup>181-184)</sup>。マガレイ<sup>185)</sup>やホシガレイ<sup>186)</sup>では、組織内チロキシン(T4)濃度は変態始動期から盛期にかけて直線的に上昇すること、またこのホルモン分泌パターンは水温の影響を強く受け、高水温条件下ではT4サージがより早い時期に現われることが報告されている。今のところ、マツカワ仔魚の甲状腺機能については研究例がないが、おそらく上記の種と同様の生理機構がはたらいっている可能性が高い。そのため、本実験で変態時期や変態速度が大きく変動した原因の一つとして、エネルギー収支の変化に併せて甲状腺ホルモンの分泌パターンの変化も複合的に作用したのかもしれない。今後、マツカワ仔魚の内分泌制御機構について詳しく調べる必要がある。

水温別飼育実験において形態異常の出現状況を調べた。その結果、正常個体率は14℃区において最も高く、それ

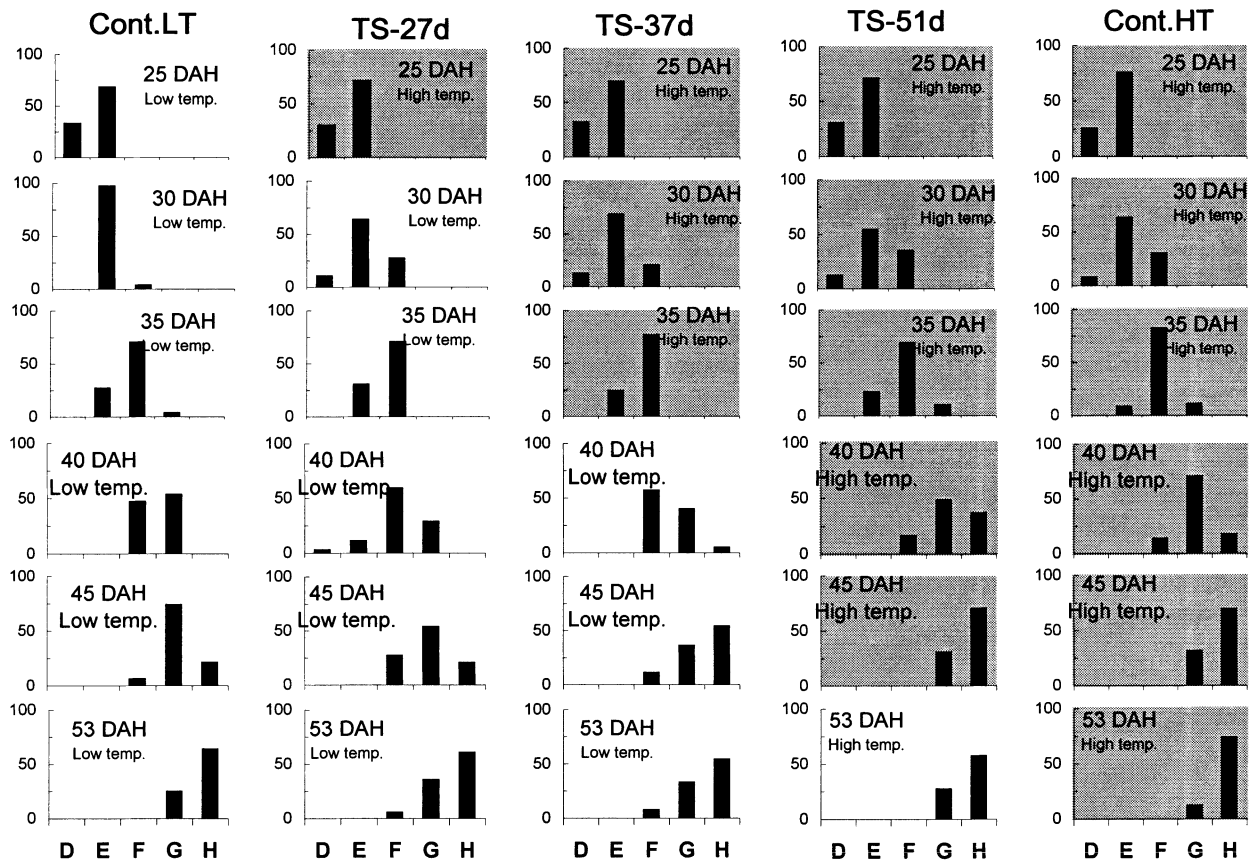


Fig85 Changes in developmental stage compositions of barfin flounder (Trial 2) reared under different temperatures in Experiment. II.

以上またはそれ以下の水温で飼育した群では正常個体率が明らかに低下した。また、水温によって形態異常の出現傾向も大きく変化し、12℃区では両面有色個体は全く認められないものの、白化出現率が極めて高かった。これに対し、16℃区および18℃区では白化は認められないが、両面有色個体が高率で出現した。中間の水温である14℃区では低率ではあるが、白化、両面有色のいずれも認められた。これらの結果は、マツカワ仔魚の形態異常の発生に飼育水温が深く関与していることを明確に示している。極めてよく似た現象は他のカレイ科魚類でも報告されており、人工飼育条件下の場合、マガレイ<sup>173)</sup>では約18℃、ホシガレイ<sup>153)</sup>では16~18℃といった温度帯で正常魚の出現率が最も高く、それらから外れた温度域では両面有色や白化が顕著に増加する。従って、カレイ科魚類の仔魚にとって水温は左右体側の分化の方向性（無眼側形状か、有眼側形状に分化するか）に影響する重要な因子である可能性が高い。本結果から考察すると、マツカワ仔魚の場合、左右不相称の形態へ分化するためには14℃という温度帯が最も適していると考えられる。

本研究では、高水温や低水温下で仔魚が発育した場合、どのような機構を経て形態異常が誘導されるのかは明らか

かにできない。しかし、カレイ類一般がそうであるように、マツカワの白化や両面有色化も変態過程の異常化が原因であることは疑いない<sup>157)</sup>。前述したように、本種仔魚の発育速度は水温によって大きく変動し、高水温下では急速な発育促進、低水温下では発育遅滞が認められた。このことが変態異常の直接的な原因かどうかは証明できないが、発育進度の変化によって変態を制御する甲状腺ホルモンの分泌タイミングと標的器官の機能的な発達度（甲状腺ホルモン受容体の発現など）との間にずれが生じた場合、正常な左右不相称化は達成できないのかもしれない。マツカワの複雑な変態機構を理解するためには、今後、甲状腺ホルモンの分泌や各器官における受容体の発現パターン、さらに水温がそれらに及ぼす影響について詳細に調べる必要がある。また、多くの異体類において、高度不飽和脂肪酸<sup>188)</sup>、リン脂質<sup>189)</sup>、ビタミンAとその関連物質<sup>190-193)</sup>などの栄養成分が形態異常発生に関っていると考えられている。これらの栄養素は皮膚組織の正常な分化や脳への視覚伝達に欠かせないロドプシンの形成に寄与し、特に体色発現機構と関わりが深いと推測されている。以前、我々は栄養強化条件が異なるワムシおよびアルテミアをマツカワ仔魚に給餌し形態異常の出現

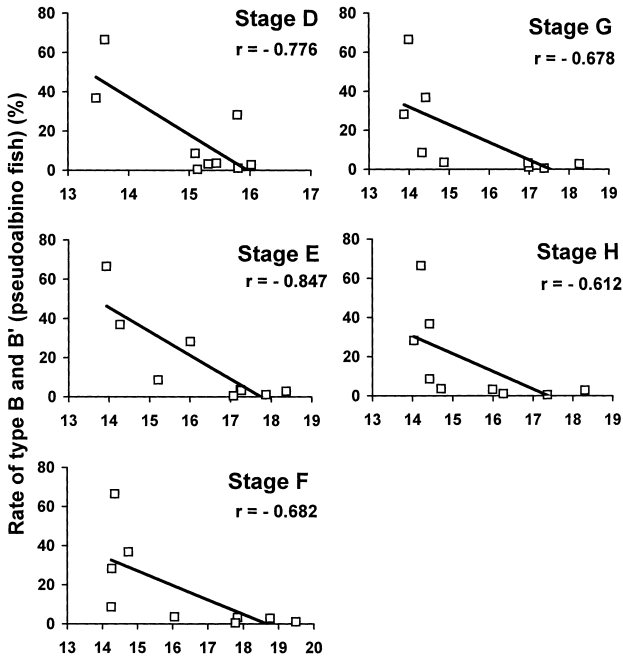


Fig.86 Relationship between average temperature on each developmental stage and the percentage occurrence of pseudoalbino fish in experiment II.

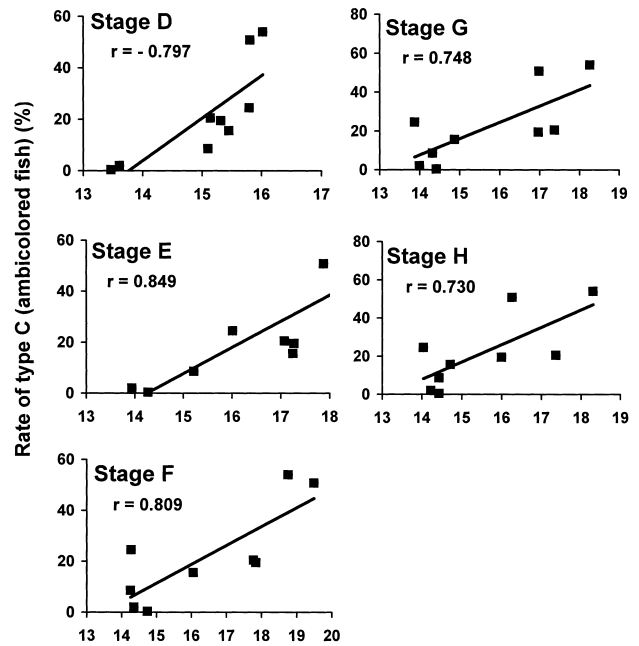


Fig.87 Relationship between average temperature on each developmental stage and the percentage occurrence of ambicolored fish in experiment II.

率を比較した。その結果、統計学的な有意差はみられなかったものの ( $P > 0.05$ ), ドコサヘキサエン酸含有量が低い餌料で飼育した場合、白化出現率が高くなる事例が多かった<sup>194)</sup>。本種の変態に及ぼす栄養素の役割についてはより詳細な検討が必要だが、水温は必須である栄養成分の利用や代謝効率を大きく変動させることから、間接的な要因として変態機構に影響するのかもしれない。

一方、本実験で、ほぼ同一の水温設定で飼育したにもかかわらず、試験1回目の仔魚は2回目よりも形態異常の出現率が高かった。この原因として、水温に対する感受性はロット(親の由来)の違いや個体間である程度差があることが推測される。ヒラメにおいて同一水槽内で飼育しても雌性発生群と通常交配群とでは、体色異常の発生状況が大きく異なると報告されている<sup>195)</sup>。従って、形態異常の発生しやすさには実験魚の遺伝的背景も影響する可能性がある。そのため、今後、環境要因と形態異常との関連性をより明確にするには、雌性発生魚やクローン魚など遺伝的に均一な個体群の実験使用も検討する必要があるだろう。

前実験において、マツカワ仔魚を14℃以上の高水温条件下で飼育すると両面有色個体の出現頻度が高くなり、反対に14℃より低い水温条件下で飼育した場合、白化個体が増加することが示された。そこでこの特性を指標とし、発育の途中で高水温飼育から低水温飼育へと切り替える実験を行い、形態異常の発生に対して水温が影響す

る発育段階を調べた。試験1回目において、実験期間を通し適温(14℃)よりも低い水温で飼育したCont.LT区では正常個体率が低く、白化個体が高率で出現した。これに対し、実験開始から29日齢まで高水温で飼育し、その後低水温飼育へと切り替えたTS-29d区では白化個体率が大幅に減少し、正常個体率が増加した。併せてCont.LT区ではみられなかった両面有色個体もわずかに出現した。このことは29日齢までの発育水温の違いによって形態異常の出現傾向に顕著な変化が現れたことを明確に示している。また、55日齢まで高水温飼育を続けその後低水温飼育へと転換した場合(TS-55d区)、白化はほとんど出現せず、両面有色率はTS-29d区よりもさらに高くなった。しかし、同区における各タイプの出現率は、実験期間を通して高水温のまま飼育したCont.HT区と同値であり、低水温飼育へ切り替えた影響は認められなかった。このことから形態異常の出現状況は55日齢になる前の発育水温の影響ですでに決定していたと示唆される。そこで、水温感受期をさらに絞り込むため、試験2回目では27日齢時(TS-27d)、37日齢時(TS-37d)および51日齢時(TS-51d)に飼育水温転換を行う実験区を設定した。その結果、TS-37d区およびTS-51d区では低水温飼育を行ったにもかかわらず両面有色個体のみが高率で出現し、またその割合はCont.HT区のそれとほぼ一致した。これに対し、TS-27d区は白化個体が出現し低水温に切り替えた影響が認められた。この結果から水温がマツカワの形態異常発生

に影響する時期は少なくとも37日齢より前であるとさらに限定することができる。また、この実験で飼育水温転換を行った27日齢時および37日齢時における仔魚の発育ステージを調べたところ、前者はステージE、後者はステージFの仔魚が主体であった。従って、マツカワ仔魚が正常に変態できるかどうかはステージEになるまでの発育過程で決定し、その期間における発育水温は形態異常の発生に強く影響することが示唆される。

形態異常の発生決定期を調べた研究例はヒラメでも報告されている。Seikai *et al.*<sup>196)</sup>はブラジル産アルテミア(高率で白化を発生させることが知られている)を発育ステージ別に給餌する実験を行った。その結果、ステージD～Eで給餌した群でのみ白化が高率で発生したことから、この発育ステージが形態異常の発生に何らかの意味をもっていると推測している。マツカワの場合、ステージEより小さい発育レベルで飼育水温転換を行うと生残率が低下する恐れがある。そのため、本手法によって水温感受性はいつから生じるかより限定することは困難であった。しかし、正常な変態を遂げるためには変態開始直前の発育状態が鍵であるという事象が、ヒラメ、マツカワの両種に共通して認められた点は非常に興味深い。また、本実験で異なる水温下でマツカワ仔魚を飼育すると変態開始前(ステージDおよびE)における発育速度が特に顕著に変動した。そのため、本種の場合、ステージD～Eは左右不相称に分化するための重要な準備段階であるが、不適切な環境要因(水温を含め)によりこの時期の発育進度や生理機構に乱れが生じると変態の異常化が引き起こされるのかもしれない。この仮説を検証し形態異常の防除技術を確立するには、今後、ステージD～Eにおける仔魚の発育メカニズムに焦点をあてて研究を進める必要がある。

以上の結果、マツカワ仔魚の変態に関連する形態異常には飼育水温が大きく影響することが示唆された。中でも、ステージEになるまでの発育段階は変態が正常に進むかどうかを決定づける重要な時期であり、高水温条件下で発育が進むと両面有色化が起りやすくなり、反対に低水温条件下においては白化が起りやすくなることが明らかとなった。そのため、本種の場合、水温約14℃で飼育すると正常個体の出現率が最も高くなると考えられる。一方、前述したように現在、天然海域におけるマツカワの変態期の水温や発育過程に関する知見は全くない。これまで北海道太平洋岸において成熟卵、または排卵卵をもった雌は4月～6月に漁獲されており<sup>4,104)</sup>、本種は主に春季に産卵すると推測される。しかし、推定した産卵期から推察すると、天然環境下では14℃よりも低い水温で初期発育が進行していると推測される。このことは同時

に、天然環境下ではより低い水温条件下でも白化が起らず正常に変態が進行する可能性を示唆している。従って、人工飼育環境下では餌料の質、密度、ストレスなど、正常な変態が進む上で障害となる要因が未だに多いのかもしれない。今後、本種仔魚の発育環境と変態メカニズムとの関係についてより詳細な解析を続ける必要がある。

## 第2節 マツカワの性決定(温度感受)期の特定および性決定に底質環境が及ぼす影響

雌雄異体生物の性決定メカニズムには、各個体の性が受精時の遺伝子型によって決定される遺伝性決定(genetic sex determination: GSD)と、発生中の外的環境刺激に応じて不可逆的に雄か雌になる環境性決定(environmental sex determination: ESD)<sup>197)</sup>が知られている。魚類全般を通して子の性比が安定的であるGSDが一般的であるが、近年、ESDを示す種が数多く報告されている。これらの種では、主に水温<sup>198-201)</sup>、密度<sup>202,203)</sup>、pH<sup>204)</sup>などによって性比が変動することが知られているが、中でも水温は特に強く作用する性決定環境因子として考えられている。

生殖腺が未分化な時期にマツカワを高水温条件下(18℃)で飼育すると、卵巣への分化が阻害され遺伝的雌個体が雄化し、性比が著しく雄に偏る<sup>154)</sup>。従って、本種は性的未分化期の水温によって性分化の方向が影響される温度依存型性決定(temperature-dependent sex determination: TSD)を示す。ヒラメ<sup>205)</sup>およびマコガレイ<sup>206)</sup>においても同様の現象が観察されており、カレイ目魚類でもTSDを示す種が多く存在することが示唆される。有用魚種の増養殖業を考える場合、ESDは性統御法の一つとして有効といえる。しかし、種苗放流による栽培漁業を想定した場合、人工飼育の影響によって性比が偏った種苗を放すことは、天然集団の遺伝的性質を変化させることが懸念され好ましくない<sup>171)</sup>。また、マツカワ人工種苗の場合、性比は雄に偏りやすいが、雌の方が成長が優れており経済的価値も高い。そのため、雌の漁獲減少は栽培漁業を進める上で経済効果にも悪影響を及ぼす。従って、今後、経済性が高く、環境に対して責任ある栽培漁業を進めるためには雌雄の比率が均等となる種苗生産技術を確立する必要がある。そのためには、本種の性決定メカニズムを早急に解明することが不可欠である。

これまでの研究でGoto *et al.*<sup>154)</sup>は、マツカワ仔魚の生殖腺の分化過程を組織学的に観察し、本種では全長35mmになると卵巣腔の形成が始まり生理的雌へ分化することを明らかにした。さらに、全長11mm以上の仔魚を用いて成長段階ごとに適水温(14℃)から高水温(18℃)へと

昇温する飼育実験を行い、平均全長40mmになる前に高水温飼育を行うと遺伝的雌の雄化が強く誘因されることを確かめた。このことから、マツカワの性決定に対して水温の影響が現れうる最大サイズ（温度感受期）は約35mmであると考えられる。一方、水温が性決定に対して影響を及ぼし始める最小サイズについては未だ知見がない。

また、上記の知見に基づき、現在マツカワ種苗生産では性決定が完了するまでの飼育水温を14℃以下に設定している。その結果、種苗の性比は概ね1:1に近づき、水温制御によってマツカワ人工種苗の性比の偏りを抑制できることが実証できた。しかし、生産年度や飼育群の中には、時として14℃以下で飼育しても性比が均等とならない事例もみられる。用いた親魚の性遺伝子型も考慮する必要があるが、マツカワの性決定に対して水温以外の飼育環境要因も複合的に影響していることが示唆される。そこで本研究では、マツカワの性決定に対する温度感受期を特定するとともに、性決定に及ぼす底質環境の影響について調べた。

## 材料と方法

### 1. 温度感受期の特定

性決定に対して水温の影響が現れ始める最小サイズを調べるため、発育段階毎に高水温(18℃)から適水温(14℃)へと変化させる飼育水温転換実験を行った。実験条件は、本章1節実験Ⅱに記載した通りである (Fig.76)。実験魚が全長10cmに達した段階でサンプリングし、開腹後、生殖腺の外部形状から雌雄を判別した。

### 2. 性決定に及ぼす一時的な水温上昇の影響

18日齢（平均全長8.1mm）の仔魚3,000尾ずつを500L水槽3基に収容し、3つの実験区を設けた。対照区は実験期間を通して14℃のままで飼育した。一方、昇温Ⅰ区においては、42日齢（全長12.3mm）から2日かけて18℃まで水温を上昇させた。5日間18℃で飼育した後、再び2日かけて14℃まで水温を低下させた。また、昇温Ⅱ区においては、42日齢時と75日齢時（平均全長25.8mm）に2回昇温操作を行った (Fig.88)。

### 3. 性決定に及ぼす底質環境の影響

全長8mmの仔魚を400尾ずつ200L水槽8基に収容し、砂敷き時期別の飼育実験を行った。Ⅰ区では実験期間を通して砂を敷かずに飼育した。一方、Ⅱ区では、着底を開始した時点（全長約11.0mm）から底面に砂があることを経験させるため、実験終了まで底に白色の貝化石結晶を敷いて飼育した。また、Ⅲ区およびⅣ区では砂を敷く時期を遅らせ、Ⅲ区では着底開始7日後（平均全長13.0

mm）から、Ⅳ区では着底14日後（平均全長16.0mm）から砂を敷いて飼育した。飼育水温は14℃とし、稚魚が100mmをこえた時点で実験終了とし各区の性比を比較した。

## 4. 統計学的解析

反復実験を行った降温時期別飼育実験および砂敷き時期別飼育実験においては、雌率データを逆正弦変換した後、Tukey法により多重比較を行った。また、反復実験がない場合は $\chi^2$ 検定により有意差を検定した。

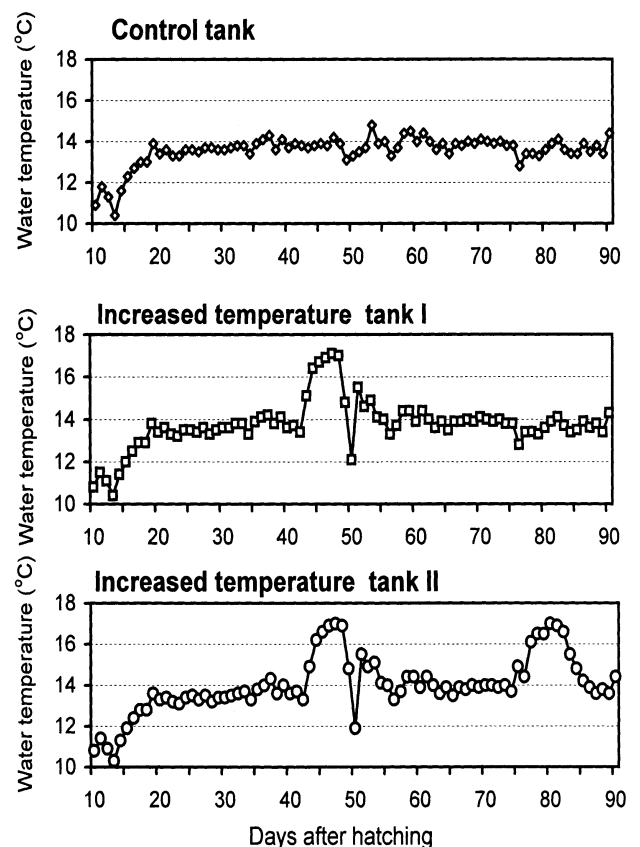


Fig.88 Change in water temperature during the rearing experiment with or without increased temperature manipulation for barfin flounder.

## 結果

### 1. 温度感受期の特定

Table 23およびFig.89に飼育水温転換実験における仔魚の生残率および雌出現率を示した。生残率はいずれの区も60%以上と高く、どの水温条件下でも良好に飼育できたと考えられた。

仔稚魚の性比について調べた結果、Cont.LT区では雌率が試験1回目で46.3%、2回目で43.3%であり、性比はほぼ1:1であった。一方、平均全長9.6mmまで高水温で飼育したTS-29dおよびTS-27d区では38.2および

35.3%と対照区に比べてやや雌率が低下した。11.5mmで降温したTS-37d区（試験2回目のみ）では雌率が11.0%まで急激に低下し、さらにそれ以上高温飼育を続けたTS-55d区、TS-51d区およびCont.HT区では雌率が5%以下となって、いずれもほぼ全雄となった。各データを変数変換後、統計学的に比較した結果、Cont.LT区に対しTS-29dおよびTS-27d区は有意水準5%で、またTS-55d区、TS-51d区およびCont.HT区は有意水準1%で雌率が低かった（Tukey多重比較）。

2. 性決定に及ぼす一時的な水温上昇の影響

Table 24に一時的昇温実験における仔魚の雌出現率を示した。昇温しなかった対照区の雌率は43.3%であった。これに対し、昇温I区の雌率は19.2%と対照区に比べて有意に低かった( $\chi^2$ 検定)。また、昇温II区の雌率も13.7%と対照区よりは明らかに低かったが、昇温I区と昇温II区との雌率に明確な差はみられなかった。

3. 着底期における底質環境が性比に及ぼす影響

Table 25およびFig.90に砂敷き時期別飼育実験における生残率および仔魚の雌出現率を示した。その結果、生残率は39.8~56.3%と実験区間で差はみられなかったが、小型水槽では飼育管理が難しく大型水槽で行った降温時期別飼育実験に比べて生残率が悪い傾向がみられた。砂を敷かずに飼育したI区において、雌率は23.5%および13.8%と水温14℃で飼育したにもかかわらず極めて低い値となった。また、着底後、砂を敷く時期を遅らせたIII区およびIV区でもI区と同様に雌率は20%程度と低かつ

た。これに対し、着底開始時から砂が存在したII区だけは雌率が39.4および45.9%と高く、他区を有意に上回った。

考 察

本研究では、マツカワの性決定に対する温度感受性の発現最小サイズを明らかにするため、降温時期別飼育実験を行った。その結果、14℃のまままで飼育した対照区で

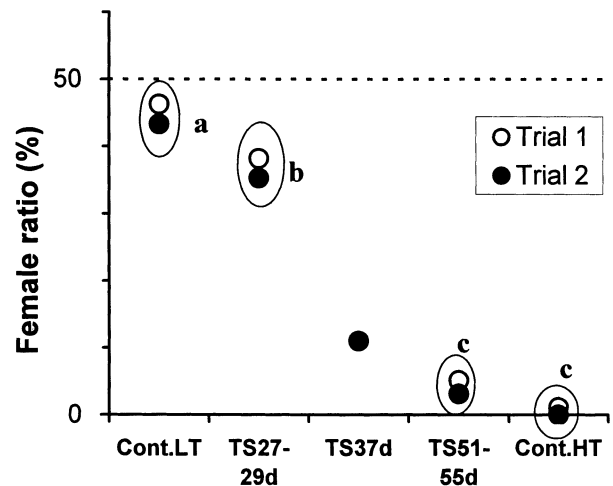


Fig.89 Percentage of females in groups shifted reciprocally between 18 oC and 13.5 oC at different stages of development in barfin flounder. Female percentages with different letters are significantly different at the level of 0.05 within the experimental groups by Tukey's multiple range test.

Table23 Percentage of females in groups shifted reciprocally between 18 oC and 13.5 oC at different stages of development in barfin flounder. Female percentages with different letters are significantly different at the level of 0.05 within the experimental groups.

Trial	Experimental group	Term of rearing at 18 °C		Survival rate (%)	Total (n)	Female (n)	Male (n)	Female ratio (%)
		dah*1	TL (mm)					
1	Cont. LT	—	—	84.6	286	133	153	46.3
	TS-29d	17 - 31	7.3 - 9.8	73.5	297	113	198	38.2*
	—	—	—	—	—	—	—	—
	TS-55d	17 - 58	7.3 - 16.1	71.6	266	14	252	5.1*
2	Cont. HT	17 - 120	7.3 - 120.0	66.2	273	3	270	1.1*
	Cont. LT	—	—	80.7	190	82	108	43.3
	TS-27d	17 - 29	7.2 - 9.6	60.4	181	64	117	35.3*
	TS-37d	17 - 44	7.2 - 11.5	78.9	201	22	179	11.0*
	TS-51d	17 - 58	7.2 - 15.5	61.5	176	6	170	3.1*
Cont. HT	17 - 150	7.2 - 120.0	78.9	213	0	213	0*	

Female percentages with asterisk differ significantly from the theoretical 1:1sex ratio by  $\chi^2$  test ( $p < 0.05$ ).



は、雌率が46.3および43.3%と高く、雌雄はほぼ1：1であった。これに対し、平均9.6mmまで高温で飼育すると雌率が38.2および35.3%と有意に低下した。さらに11.5mmまで高水温飼育を続けると雌率は11%まで急減し、さらにそれ以上高温飼育を続けた場合、ほぼ全雄となった。この結果は平均9.6mm～11.5mmまでの発育過程において、仔魚の温度感受性が特に強くなっていることを明確に示すとともに、平均9.6mmの時点においても一部の個体がすでに高温の影響で雄化していることを示唆している。そこで、このデータを基に温度感受性の発現開始サイズの推定を試みた。試験1回目のTS-29d区、試験2回目のTS-27d区およびTS-37d区について、降温する直前の仔魚の全長組成を調べたところ、いずれもFig.91に示したような正規分布に近似した。それぞれのCont.LT区の雌率を期待値と仮定すると、TS-29d区、TS-27d区およびTS-37d区では8.1% (= 46.3-38.2), 8.0% (= 43.3-35.3) および32.3% (= 43.3-11.0) 分の遺伝的雌が高温によって雄化したと考えられる。この時点では遺伝的雌雄間で成長差がないと考えられるため、それぞれその倍であ

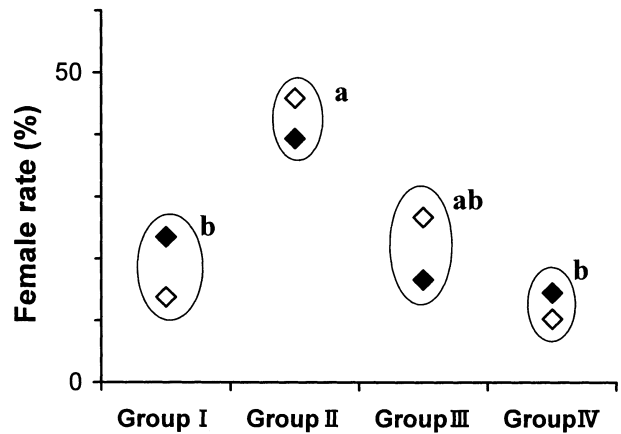


Fig.90 Effects of existence of sand in the bottom of rearing tank on sex differentiation in barfin flounder. Female percentages with different letters are significantly different at the level of 0.05 within the experimental groups by Tukey's multiple range test.

る16.2%, 16.0%および64.6%の仔魚がこの時期、すでに温度感受期に達していたのではないかと推測される。

Table 24 Percentage of females in groups reared at 14 oC and subjected to 18.0 oC increased temperature manipulation (I.T.M) in barfin flounder.

Experimental group	DAH* <sup>1</sup> when I.T.M. was conducted.		Survival rate (%)	Total (n)	Female (n)	Male (n)	Female ratio (%)
	DAH	TL(mm)					
Control	—	—	64.4	282	122	160	43.3
I.T.M-1	42	12.3	72.1	234	45	229	19.2*
I.T.M-2	42, 75	12.5, 25.8	50.9	306	42	264	13.7*

Female percentages with asterisk differ significantly from the theoretical 1:1sex ratio by  $\chi^2$  test ( $p < 0.05$ ).

\*<sup>1</sup>: day after hatching

Table 25 Effects of existence of sand in the bottom of rearing tank on sex differentiation in barfin flounder.

Experimental group	Timing of covering the bottom with sand		Survival rate (%)	Total (n)	Female (n)	Male (n)	Female ratio (%)
		TL (mm)					
I - 1 (control)	without sand		44.8	179	42	137	23.5*
I - 2 (control)	without sand		54.3	217	30	187	13.8*
II - 1	before onset of settlement	11	40.5	162	64	98	39.4
II - 2	before onset of settlement	11	50.5	202	93	109	45.9
III - 1	from 7days after settlement	13	48.8	195	33	162	16.6*
III - 2	from 7days after settlement	13	56.3	225	60	165	26.7*
IV - 1	from 14days after settlement	16	39.8	159	23	136	14.5*
IV - 2	from 14days after settlement	16	46.5	186	19	161	10.3*

Female percentages with asterisk differ significantly from the theoretical 1:1sex ratio by  $\chi^2$  test ( $p < 0.05$ ).

そこで、全長組成から求めた確率分布関数より温度感受期に達したと考えられる全長を求めた。その結果、それぞれ10.2mm, 9.9mmおよび10.1mmに相当し、いずれの区も約10mmに集束した。このことからマツカワの性決定に対する温度感受性は全長約10mmから発現し始めると推測される。従って、先の知見と併せると、本種の性決定に対する温度感受期は全長10mmから35mmまでであると考えられた。

そのため、この期間に、高水温飼育を行うと雄化が強く誘導されるため、性比の偏りを防ぐためには14℃以下の水温で飼育することが不可欠と考えられる。一方、短期的な水温上昇があった場合、雄化が起りうるかどうかについては知見が無かった。そこで、温度感受期における5日間の高水温刺激が雄化に及ぼす影響について調べた。その結果、全長12.2mmで昇温刺激を与えた飼育群では、刺激を与えない対照群よりも雌率が約20%程度低かった。従って、本種の場合、温度感受期に短期間でも水温が上昇すると雄化が起ると考えられる。キンギョにおいても生殖腺の性が未分化な状態に高水温（35℃）飼育を行うと遺伝的雌個体の雄化が誘導されるが、一方、一時的な昇温操作（ただし高温処理時間は24時間）を繰り返しても雄化はおこらないことが報告されている<sup>207)</sup>。この違いの原因として、本実験では高水温のまま保持した期間が5日とキンギョの場合よりも長かったこと、または魚種によって水温への感受性に違いがあることが推測される。

また、全長12.3mm時と全長25.8mm時に2度昇温操作を行った飼育群においては、一度だけ昇温した飼育群と比べ雌率に明確な違いはみられなかった。従って、2度目に行った昇温操作は性決定にはさほど影響しなかったと推察される。この結果は温度感受期の中でも水温が性決定に及ぼす影響は時期によって強弱があり、全長12.3mm時は25.8mm時に比べてその影響が強いということを示唆している。本種の生殖腺の性がどのような生理機構によって決定されるかは不明であるが、全長約11.0mmから20.0mmにかけて卵巣へと分化するうえで特に重要な生理変化が起るのかもしれない。

上記で明らかとなった温度感受期は、同時に変態による大幅な形態構造の変化や浮遊から底棲生活へといった行動特性の変化が起る時期でもある。そのため、この時に起る生理機構や環境の変化は性決定にも影響を及ぼす可能性がある。そこで、温度感受期におこる大きな変化の内、着底現象に注目し、底質環境が性決定に及ぼす影響について検討した。砂敷き時期別飼育実験を行った結果、砂を敷かず飼育したI区において、水温14℃で飼育したにも関わらず雌率が約20%と極めて低かった。

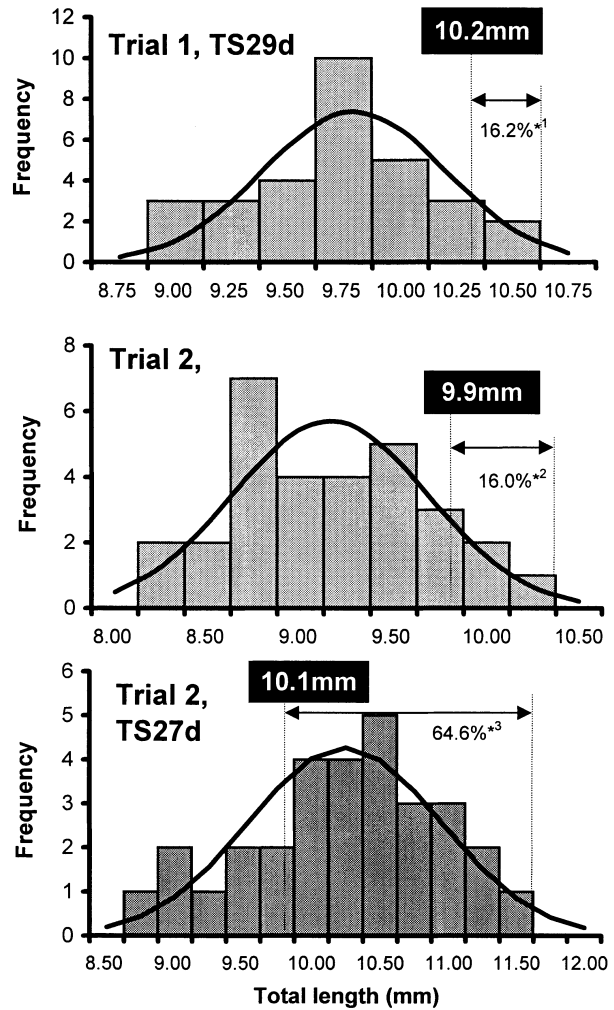


Fig.91 Estimation of the onset of temperature-sensitive period for sex determination in barfin flounder. \*1, (Trial 1, Cont.LT.♀% - TS29d♀%) x 2 = 16.2%; \*2, (Trial 2, Cont.LT.♀% - TS27d♀%) x 2 = 16.0%; \*3, (Trial 2, Cont.LT.♀% - TS37d♀%) x 2 = 32.3%.

今のところ、この原因は明らかにできないが、本実験は容量200lの小型水槽で実施した。小型水槽は飼育管理が難しく、生残率は大型水槽で行った先の実験に比べて劣っていた。そのため、小型水槽飼育に起因する水温以外の要因が性比に影響したと推察される。また、着底後、砂を敷く時期を遅らせたⅢ区およびⅣ区でも、Ⅰ区と同様に雌率が20%程度と低かった。これに対し、着底を開始する時点から砂が存在したⅡ区だけは、雌率が約40%と他区に比べて有意に高く、雄化は起っていないと考えられた。このことは、本実験で雄化を引き起こしている要因が「着底開始時における砂の存在」によってブロックされたことを明確に示している。今のところ、着底開始時の砂の有無によりどのような生理変化が起るのかは不明だが、マツカワ仔魚は着底する際、底への接地と浮

上をしばらくの間繰り返した後、着底場を決定するといった行動が観察される。また、砂を敷いた環境下では定地まで短時間で達成する傾向もみられる。小型水槽は着底スペースが少なく、また個体間距離が近い競争環境であり、着底しにくいストレス条件下と考えられる。そのような場合、砂の存在は着底をスムーズに達成させる上で重要な役割を担っていると考えられる。また、キングョでは性決定期間中、ストレスホルモンであるコルチゾル添加海水中に浸漬すると遺伝的雌の雄化が誘導されることが示されている<sup>20)</sup>。本種仔魚の着底開始サイズは約11mmであり、これは先に示した性決定への温度感受性が特に強くなるサイズとほぼ一致している。そのため、着底開始時に砂を敷いた実験区では、性決定に対し外部刺激の影響が特に強く現れる時期をストレス無く過ごせたため雄化が起らなかったと推測される。今後、着底期における行動変化を数値解析するとともに、コルチゾル量などの生理変化についても詳細に調べる必要がある。

以上の結果、マツカワ仔魚の性決定に対する温度感受性は全長10mmから発現し、卵巣の分化が始まる35mmまで続くことが明らかとなった。従って、この期間は高水温で飼育すると遺伝的雌の雄化が強く誘引されるため、飼育水温は14℃以下に設定することが必須といえる。一方、本研究では、適水温であっても水槽サイズなど飼育環境に不安定要素が加わると雄化が起こりうる可能性が示された。現段階では、何がどの様な機構を経て性決定に作用したかは明らかでない。しかし、着底開始時に砂を敷き、速やかに着底を促すと雄化は起らなかったことから、本種にとって底棲生活への切り替え時における生理変化は性決定にも重要な意義をもっていると思われる。一般に、性決定には性ステロイドホルモンが大きく関与すると考えられるが、水温やストレス因子はこれらのホルモン合成酵素の発現を直接的または間接的に阻害し、その結果、性比の偏りが生じた可能性も考えられる。従って、性決定に対して重要な変化が起きていると思われる着底開始期には、適正な環境を整えストレスを与えないことが性比の偏りを防ぐ上で重要といえよう。

## 第七章 総合論議

近年、北海道ではヒラメに継ぐ新たな栽培漁業対象種として冷水性の大型カレイであるマツカワを有望視している。本道では平成2年から本種の種苗生産技術開発に取り組んでいるが、その生産数や生産効率は年変動が大きく、未だ種苗を安定供給できる技術レベルには至っていない。その原因として、親魚雌雄の成熟時期の不一致、

採卵不調、卵質不良、仔魚飼育における大量減耗の発生、稚魚の形態異常や性比の偏り等、多くの問題があげられる。従って、これら諸問題を解決し、健康な種苗の大量、且つ、安定的生産技術の確立が囑望されている。そこで、本研究では、飼育環境下におけるマツカワ親魚の性成熟および産卵機構、さらに仔稚魚の発育機構について詳細に調べた。またその知見を基に種苗生産過程で生じる諸問題の原因を解明し、最適な飼育システムを確立することを試みた。

その結果、親魚の性成熟に及ぼす環境要因（水温）の影響が明らかとなり、水温操作によって雌雄の成熟時期のずれを同期化することに成功した。また卵質に起因する種々の問題について解析した結果、卵の受精能の劣化原因が判明したとともに、生き残りに優れた仔魚群（良質ロット）の早期判別指標やふ化仔魚の活力を向上できる親魚養成条件が明らかとなった。さらに、本研究では、これまで困難とされてきたマツカワ人工養成魚の自発的産卵を環境制御によって効果的に誘導できることを初めて証明した。マツカワ天然資源が激減し、人工養成魚を親魚とすることが余儀なくされている現在、この成果は極めて有益性が高く、新たな大量採卵技術として大きく期待された。また仔魚飼育過程における大量減耗の発生要因を解明し、給餌や通気制御など飼育条件の改良によって初期減耗を大幅に低減できることを証明した。併せて、形態異常や性比の偏りの発生機構を調べ、生理上も形態上も健康な種苗を育成できる飼育条件を明らかにした。以上のように、本研究によってこれまで障害となっていたマツカワ種苗生産における様々な問題を解決でき、良質卵の安定確保および健苗の大量、且つ安定生産が可能となった。

そこで、本研究で得られた実験成果に飼育観察から得た知見を加え、マツカワの親魚養成、採卵および仔稚魚飼育技術の要点を以下にまとめた。

### (1) 良質卵を安定確保できる親魚養成および採卵の要点 (Fig.92)

天然親魚の確保がほとんど期待できない本種にとって、種苗生産には人工養成魚を親魚として用いることが欠かせない。本種雄は満1歳2月から採精可能となるが、この年の採精量は少ないため、雌が初回成熟に達する満3歳の4月を初回の採卵、採精年とする。

#### 養成水槽・密度

現在、親魚養成に用いられている水槽は、容量が8～50 t、材質はコンクリート製、FRP製、キャンバス型である。親魚に与えるストレスを軽減するとともに取り上げなどの作業性を考慮すると、水深がやや浅く（1～1.5

m程度), 底面積が広い水槽が適すると思われる。養成密度は, 全長30mm (満2ヵ月) で2,000~3,000尾/m<sup>2</sup>, 全長150mm (満8ヵ月) で50~70尾/m<sup>2</sup>, 1歳以上で5~10尾/m<sup>2</sup>, 2歳以上では1.2~2.0尾/m<sup>2</sup>程度である。過密による成長不良や疾病の発症を防ぐため, 成長に合わせて, 適宜, 分槽する必要がある。

**水温**

雌雄ともにその性成熟過程は飼育水温によって強く制御されている。特に精子形成の進行には秋季から冬季にかけての水温低下が, 卵成熟および排卵には冬季から春季にかけての水温上昇が重要な刺激となっている。従って, 少なくとも採卵・採精の1年前からは水温管理が重要である。北海道太平洋岸の場合, 基本的に自然海水の水温変動でかまわないが, 上記の生殖メカニズムと自然海水の年変動を考慮して適宜加温冷却する必要がある。また, 秋季の水温低下時期や春季の昇温時期を調節することによりある程度の範囲で成熟期を前後させることが可能である。雌雄の成熟期のピークを同期化できると

もに作業スケジュールに合わせて採卵採精可能時期を決定できる。夏季に水温が22℃以上になると摂餌が減退し, また秋から冬にかけて6℃以下に低下すると摂餌が停止して成長も停滞する。卵黄形成の開始には親魚の成長度合いと何らかの関係があり, 満3歳になっても成長不良個体は成熟できない。さらに, 親魚の成育を促進すると活力が高い良質な仔魚が得られる。そのため, 0歳時と1歳時は成長重視の養成が必要であり, 低水温期間の一時的加温飼育, 餌料の改善, 適正収容密度での飼育等の方法により成長促進を図る必要がある。また, 水温が2℃以下となると, 低水温によってへい死する個体が認められるため, 注意が必要である。

**餌料**

親魚に与える餌料はその成長と肥育を決定するとともに, 卵質にも影響する。特に2歳8月以降は卵内栄養成分の取り込み活性が最も高くなる卵黄形成期を迎えるため, 有効成分(n3-HUFA等)を強化した餌料の給餌がより良いと思われる。配合飼料は比較的バランスが良く,

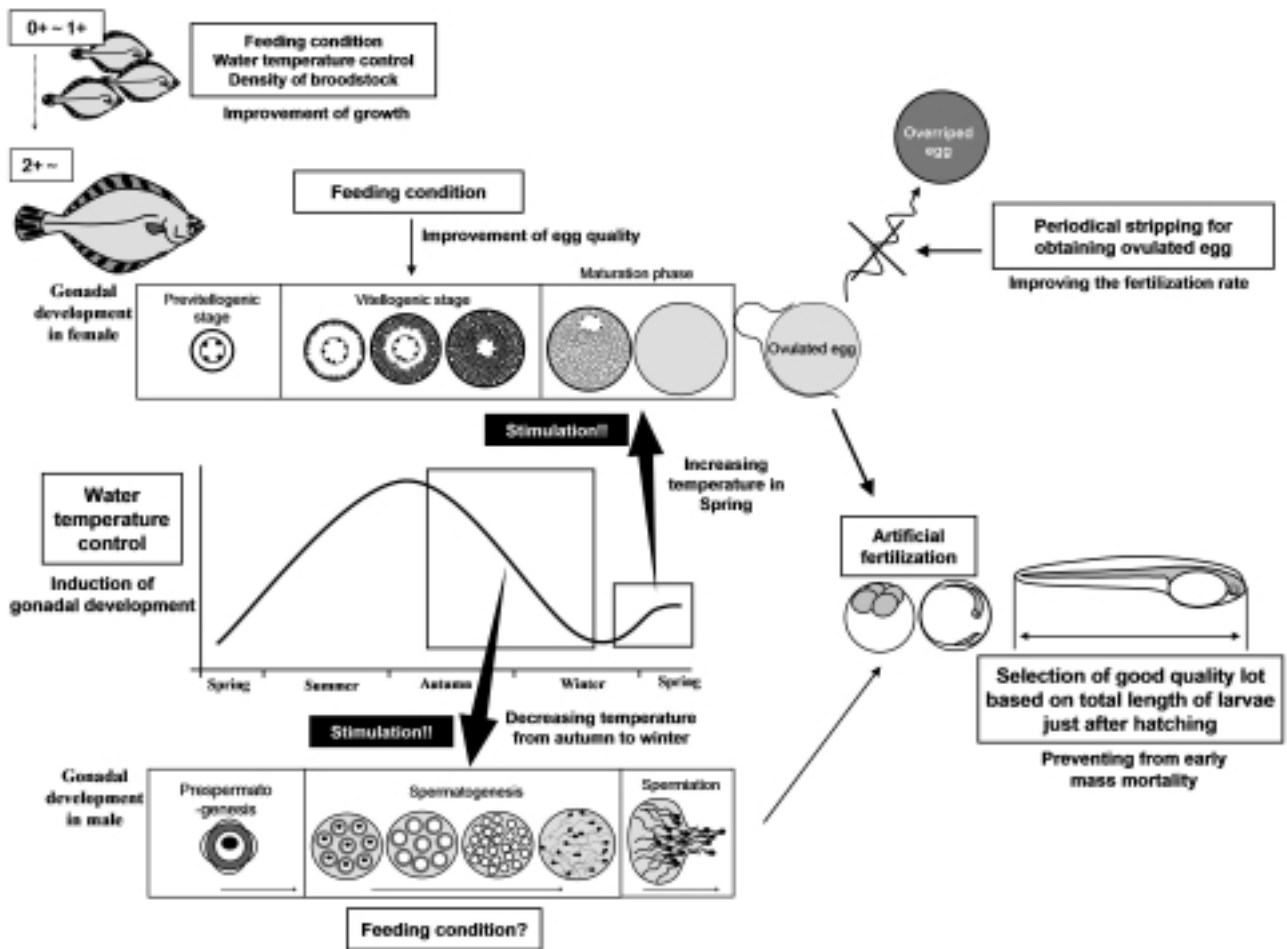


Fig.92 Schematic illustration of relationship between gonadal development of cultured barfin flounder and the method of rearing the brood stock.

コストも低いことから利用を検討する価値がある。

**人工授精**

成熟後、採卵するに際しては受精率およびふ化率が高い良質卵の安定確保が重要である。前述したように本種の雌は、水温6℃の場合、3-4日周期で排卵を繰り返す。一方、卵の体内残留による過熟は、その後排卵される正常卵の卵質をも低下させるため最も注意が必要である。排卵周期にあわせた定期的な採卵を心がけるとともに、自発的産卵誘導技術の併用も考慮すべきである。また、一般に種苗生産施設では、飼育収容限界数が決まっており、できる限り活力が高く生き残りがよいと思われるロットを選択する必要がある。各ロットのふ化直後の平均全長を比較し、サイズが大きいロットを選択することにより種苗生産の生産性がさらに向上すると考えられる。

**(2) 自発的産卵誘導のメカニズムと適正手法 (Fig.93)**

マツカワの成熟期から自発的な産卵に至るまでのメカニズムについて以下のように考察した。本種の水槽内での自発的産卵に関わる因子は促進要因と制限要因に大別できると考えられる。

**促進要因**

昇温刺激に代表される産卵期水温条件が含まれる。産卵期の直前である2月には雌の卵巢は第三次卵黄球期にあり、また雄は輸精管内に精子が認められ受精可能な状態にある。3月にかけて水温を徐々に6℃まで昇温することにより、最終成熟と排卵が促される。水温を6℃とした場合、排卵は3-4日間隔で繰り返される。排卵開始にあわせて昇温刺激(6℃から8℃へ一気に昇温し、翌日、再び6℃まで降温する操作)を行うと排卵周期に同調したスムーズな放卵を促すことができる。また、放卵を促進することにより過熟による卵質劣化を防ぎ、受精率向上に寄与していると思われる。同時に、昇温刺激は受精の誘起に関しても、直接的または間接的に作用することが認められている。雄の最終成熟および排精への影響はみられないが、昇温刺激を行うと受精誘起回数および受精率が向上することから放精や性行動の誘起等、何らかの形で効果があると考えられる。また、昇温刺激によって受精を誘起すると、その後は昇温刺激を行わなくとも、放卵、受精が続く可能性がある。従って、昇温刺激は頻繁に行う必要は無く、放卵量や受精率が低下し始めた場合に再度実施するのが適切であろう。

**制限要因**

飼育水槽内の雌収容数や収容密度が特に強い因子であると考えられる。過剰に収容すると、放卵不全や受精誘起回数の低下、受精率の低下を引き起こす。いずれも個

体間距離が狭まったことによるストレスに起因すると思われる。水槽規模とのバランスを考え収容数を決定する必要がある。また、飼育海水の換水性が悪いと放卵不全、受精誘起不全となることが多い。作用機序は未解明であるが、フェロモンなど飼育環境水の微妙な変化が産卵行動の誘起に関わっていると仮定した場合、未受精卵や過熟卵が常に水槽内で浮遊している状況は産卵に不適といえよう。基準として20%~30%/時に設定することが適切である。さらに環境水中で受精が成功するには雌雄が1m以内に近接して卵、精子を放出することが不可欠である。このことは本種の産卵にはペアリングを伴った産卵行動が必要であることを強く示唆する。ペアリングが起りやすい環境条件については行動観察を交えた解析が必要であるが、水槽形状、雌雄比、生殖能力の個体差等に関わると考えられる。これまでの飼育例から底面積が広く<sup>94)</sup>、雄を多く収容する(雌:雄=1:4程度)方が適切と思われる。

以上、本種の水槽内産卵は上記のような条件が揃ったうえで初めて達成されると考えられる。しかし、現在、

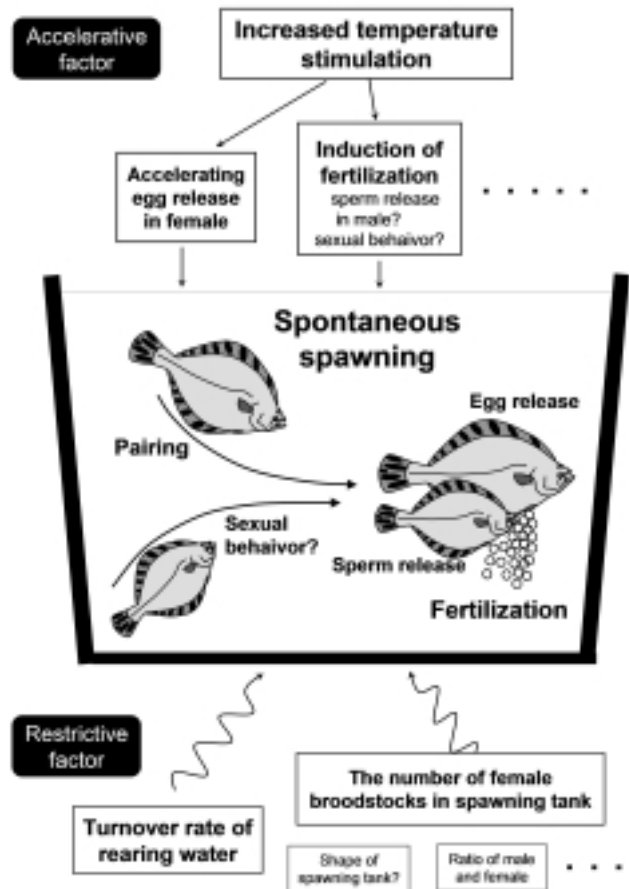


Fig.93 Schematic illustration of the mechanism of spontaneous spawning of cultured barfin flounder.

種苗生産が実施されている他魚種と比較して、水槽内産卵が達成しにくい（条件が厳しい）感がある。そのため、人間側の都合（作業計画）にあわせて採卵時期や採卵量を規定するには限界があることも考慮に入れる必要がある。従って、現段階では、採卵計画や採卵目的に応じて自発的産卵誘導と人工授精法を交えながら必要量の受精卵を確保するシステムが最良と考えられる。

### (3) 仔稚魚の発育特性とそれに対応する飼育の要点 (Fig.94)

健康な種苗を生き残り良く育てる上で特に留意すべき（避けるべき）ポイントを整理すると、摂餌不良（特に初期摂餌）、初期大量減耗、発育（速度）の異常化、変態不全（白化、両面有色）、性分化異常、ストレスがあげられる。それに対して人為制御できる飼育要因としては、水温、餌料条件（給餌量、給餌頻度、餌料の質）、通水、通気（飼育水の流れ）、照度（電照）、飼育水槽容積、収容密度、水質管理などがあげられる。これらの相互関係をよく理解し、不具合が生じない条件を設定する必要がある。

#### 卵管理

本種の受精卵は分離浮生卵であるが、浮力性が弱く、地先海水の塩分濃度、卵径の大小によっては受精していても沈下する可能性がある。卵管理水槽には、アルテミアふ化槽、またはパンライトふ化槽を用い、連続的に通気および通水を行う。受精卵は、水温5～10℃で管理した場合ふ化までに要する日数 $= -1.98 \times (\text{平均水温}) + 25.4$  ( $r^2=0.92$ ) という関係が認められる<sup>139)</sup>。すなわち、水温8℃の場合、9～10日でふ化する。また、卵発生過程に関しては、渡辺・鈴木に（1998）よって整理されている。

#### 飼育水温

ふ化水温の8℃から1℃/2～3日の割合で徐々に加温する。仔魚飼育水温は仔魚の摂餌、成長、発育、形態異常の発生、性分化など様々な発育過程に影響する最も重要なファクターである。高水温条件下では摂餌が高まり、高成長が期待できるものの、両面有色化や遺伝的雌の雄化といった健苗性が損なわれる。一方、低水温に設定すると性比の偏りは起らないものの、摂餌不良による成長遅延や初期減耗の増加が懸念され、さらに白化が著しく増加する。そこで、先ず健苗性を重視して考えると、本種の仔魚飼育期における飼育水温は約14℃を基本とするのが適当であり、少なくとも性決定が完了する全長35mmまではこの水温以下に保つ必要がある。また、性分化の温度感受期になる前であるステージDまでは一時的にやや高め的水温で飼育し（14.5～15.0℃程度）、その後、

速やかに14℃以下まで降温すると初期摂餌も高まるであろうし、白化の出現率もさらに低減できるかもしれない。これについては現在、検証中である。性決定後（全長35mm以上）は自然海水温による飼育が可能である。

#### 餌料条件

仔魚の初期摂餌は成長や初期減耗の発生に大きく影響するため、摂餌活性を高める手段が必要である。ワムシ給餌期間中は飼育水中にナンノを高濃度で添加する（100～160万cell/ml）、また電照時間の延長および給餌量、給餌頻度の増加によって摂餌可能時間を増やす方法が最も有効と思われる。一方、過剰給餌は餌料栄養価の低下や水質の悪化に繋がり、摂餌減退、成長不良、大量へい死の原因となる。また餌料不足は、直接的な飢餓要因に繋がるばかりではなく成長差が拡大し攻撃行動の発生を誘引する。できるだけ水槽内の残餌量、消化管内餌料数、摂餌個体率、仔魚の成長について定期的に計測し、適正給餌量や餌料種を変化させる時期を決定することが重要と思われる。以下に基準となる餌料系列および給餌法を示す。

10～35日齢（全長12mm）；ワムシ8～15個体/ml（飼育水中密度）、23（全長8mm）～65日齢（全長20mm）；アルテミア0.5～5個体/ml、45日齢（全長15mm）～；配合飼料。

他種と同様に、生物餌料の栄養強化は生残率の向上と正常な発育を促すうえで重要な操作と考える。本研究ではデータを示さなかったが、これまでマツカワ仔魚の初期生残および形態異常の発生に及ぼす餌料中の高度不飽和脂肪酸含有量の影響について検討した。その結果、ワムシおよびアルテミア中のHUFA含量、特にDHA含量は初期生残、仔魚期の遊泳行動、白化出現率に影響することが示唆されている。現在、その機能についてより詳細な解析を進めており、近い将来、栄養条件との関わりが明らかとなるであろう。

#### 通水および通気

通水および通気は、水槽規模や飼育システムにも影響されるため一概に規定できないが、いずれも飼育水の生化学的性状や流れ等の物理環境を決定する重要な要因である。ワムシ給餌期はナンノクロロプシスの流出も懸念されるため比較的低換水率で管理し（100%/日～300%/日）、アルテミア、配合飼料へと餌料種が変化し、タンパク摂取と排泄量が増加するのにあわせて換水率を高める必要がある（最大800%/日）。また、ステージDからEへ変わったばかりの発育期は、浮上能力を上回るほど体密度が急増する。仔魚の垂直分布や遊泳行動を観察しながら通気量やエアレーション数を調節して流れをつくり、遊泳を擁護して突発的な沈下を防ぐ必要がある。

**照度条件**

照度条件は仔魚の摂餌を決定する要因であることがわかった。暗すぎる飼育環境は仔魚の摂餌停止およびナンクロプシスの呼吸量増加による急性酸欠に繋がる恐れがある。水槽表面で800~1000Luxとするのが適切といえよう。

**飼育密度**

ふ化仔魚収容時の飼育密度は、飼育機関によって違いがみられ、0.2万尾~2万尾/tに設定している。高密度で収容し飼育する場合、餌料不足による成長遅滞や個体間距離の減少によるストレスなどが生じる可能性があるため、仔魚の成長にあわせて適宜、分漕する必要がある。また、飼育密度を低下させることによって、形態異常率の出現を低減できた事例もあり、生産目標数と生残率を考慮し設定するとよい。生産終了時(全長30mm)の最大収容密度は2,000~3,000尾/tである。

最後にFig.95に2002年までの北海道における種苗生産

結果を示した。未だ研究が必要な部分があるが、これまで得られた知見に基づき種苗生産技術の改良を行った結果、種苗生産数は当施設の収容限界数(10万尾)まで向上して安定推移し、生残率も年々向上している。生産過程で障害が生じたとしても、本研究で得られた親魚と仔稚魚に関する基礎知見に基づいて適切な処置、飼育操作の改良を施すことにより生産不調を回避できるであろう。

また、近年、人工種苗の安定供給が実現したためマツカワ種苗の大規模な試験放流も可能となった。これまでの放流試験の結果、一時は皆無にまでなったマツカワ漁獲量が徐々に増加し、2003年では10tを超えた。種苗放流効果が見え始めたとともに、放流技術や天然海域でのマツカワ生態に関する知見も続々と得られている。2003年、北海道水産林務部では北海道産マツカワの新名称として「王鰈」という名を掲げた。マツカワ栽培事業の本格化に向けて流通ベースへのせるため、知名度向上を図るとともにブランド化も進めている。また、現在、マツ

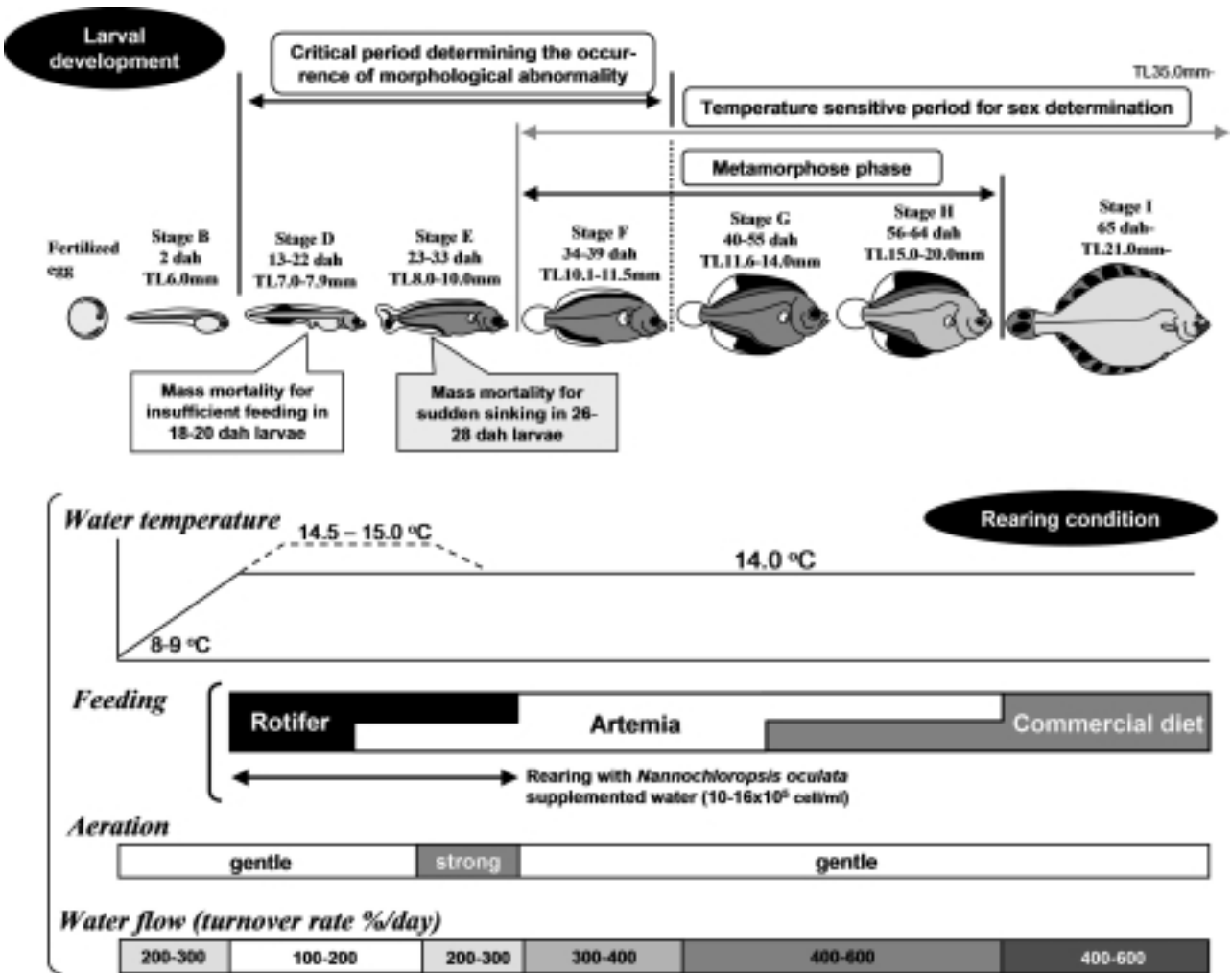


Fig.94 Processes of larval development of barfin flounder during seed production and their rearing condition.

カワの種苗量産施設の建設計画が進行中である。そのため、今後は量産規模への技術移転と応用を図ることが課題となる。種苗生産技術の更なる高度化や生産コストを考慮した新技術の開発が期待される。さらに、現在、放流種苗が環境に与える影響について広く論議されている。遺伝的多様性の保持と健苗育成技術の定着化についても課題となるだろう。最後に本研究で得られた知見が北海道のマツカワ栽培漁業の発展に寄与することを願い、稿を終える。

## 第Ⅷ章 要約

本研究では、マツカワ種苗生産技術の確立を目指し、飼育環境下におけるマツカワ親魚の性成熟、産卵および仔稚魚の発育に関する基礎知見を得るとともに、種苗生産過程で障害となっている緒問題の発生原因と防除策について検討した。まず、マツカワ雌雄の生殖年周期について詳細に調べるとともに、飼育水温がそれぞれの性成熟過程に及ぼす影響について解析した(第Ⅱ章)。続いて、マツカワの卵質に関して詳細に調べ、人工授精における受精率の低下原因について解析した。また、ふ化後の仔魚の生残ポテンシャルを反映する評価指標について検討するとともに、親魚の養成条件が卵質の良否に及ぼす影響について調べた(第Ⅲ章)。さらに、マツカワ人工養成魚における自発的産卵誘導技術の確立を目指し、水温操作による産卵誘起効果および産卵に関わる環境要因について検討した(第Ⅳ章)。また、仔魚期における大量減耗の発生要因を特定し、生き残りを高めるうえで適正な飼育条件について考察した(第Ⅴ章)。併せて、健苗育成技術を確立するため、マツカワ人工種苗の形態異常(変態異常)の発生機構について検討するとともに、性決定に対する温度感受期の特定を試みた(第Ⅵ章)。以下に得られた知見について要約する。

1. 自然海水の水温条件下で、マツカワ1歳魚と2歳魚を飼育し雌雄の性成熟過程を調べた。その結果、雄では1歳時の10月からGSIが増加し始め精子形成が開始した。GSIが最高値を示す12月～1月に精子形成後期となり、2月以後、運動活性が高い精子を得ることができた。2歳魚においても、1歳魚とほぼ同様の精巣発達が観察された。従って、本種雄の初回成熟年齢は満1歳の2月であることがわかった。
2. 自然海水温で飼育した1歳魚雌の性成熟過程について調べた結果、卵黄形成は誘起されず、卵巣内には周辺仁期の卵母細胞のみが観察された。2歳魚にな

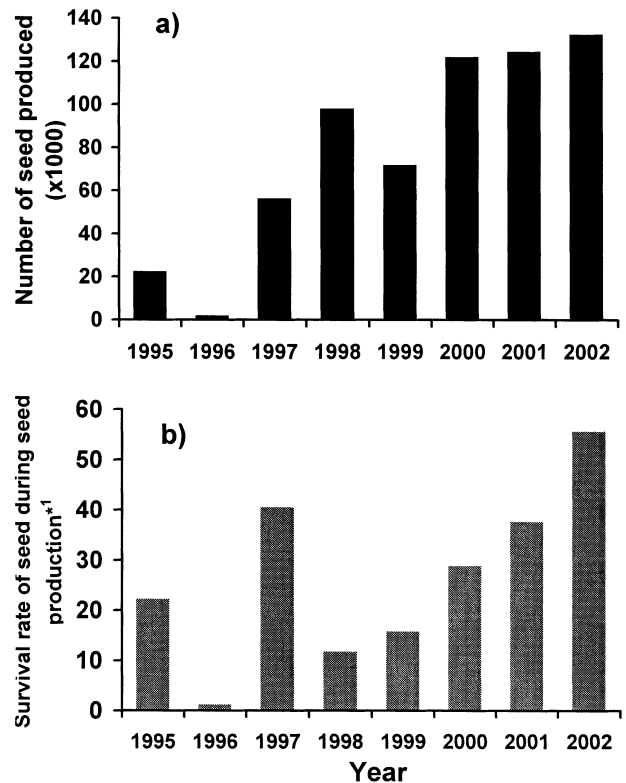


Fig.95 Annual production of barfin flounder at Hokkaido Institute of Mariculture.

\*1: = (total number of seed survived x 100) / (total number of larvae used for seed production)

ると、8月以降卵黄形成が開始し、11月には卵母細胞は第三次卵黄球期となった。3月になると最終成熟が誘起され、3月下旬から4月にかけて排卵した。以上の結果、自然海水温で飼育した場合、雄とは異なり雌の初回成熟年齢は満2歳の3月から3歳になった4月であると考えられた。

3. マツカワ雌雄の性成熟に及ぼす飼育水温の影響を明らかにするため、人工3歳魚を用いて水温別の飼育実験を行った。10月以後、自然海水温で飼育する実験群と、12月または2月まで18℃で加温飼育し、その後、自然海水温まで降温する実験群を設けた。その結果、自然海水温群の雄では、水温の低下に伴って精子形成が進行し2月に機能的な精子が得られた。これに対し、高水温飼育群では、精子形成の進行が著しく抑制された。そのため、雄の性成熟において、精子形成が進行し、成熟した精子に至るまでの過程には、秋季から冬季にかけての水温の低下が不可欠であると考えられた。一方、雌では、高水温条件下でも卵黄形成が正常に進行し、卵母細胞の成長が認められた。しかし、2月まで高水温飼育を継続すると卵成熟は誘起されず、卵母細胞は退行した。従って、雌の最終成熟と排卵には冬季から春季にかけての水



- 温上昇が必要であると考えられた。
4. マツカワ雌雄を自然海水温で飼育した場合、雄の方が雌よりも早い時期に成熟し、採精および採卵の開始時期はそれぞれ2月および4月であった。一方、10月から12月まで18℃の加温海水で飼育したところ、雄では、一定期間、精子形成の進行が抑制されたため、採精開始時期は4月となった。また、雌では高水温条件下でも卵黄形成は進行したため、採卵開始時期は4月のままであった。以上の結果、雌雄ともに12月までは18℃のまま飼育し、雄の性成熟の進度を遅らせることにより、雌雄ほぼ同時期に人工受精を実施できると考えられた。
  5. 人工受精における受精率、ふ化率の低下には、排卵後、長期間卵が滞留したことによる過熟化が考えられる。そこで、マツカワ卵の卵質劣化機構を明らかにするため、搾出した卵を72時間冷所保管し、受精率および発眼率の変化を解析した。その結果、排卵直後と思われる透明卵ロットは採卵後72時間経過しても受精率が高いままであったが、過熟卵が多く混在したロットでは培養開始後、受精率は急速に低下した。さらにそれらを混合して培養したところ、受精率は急激に低下した。このことから、透明卵（正常卵）は少なくとも72時間受精能を保持できるが、過熟卵に接触すると受精能が急速に劣化することが明らかとなった。
  6. 受精率とは異なり、透明卵が多いロットにおいても、発眼率は採卵後の時間経過に伴い直線的に低下した。このことから、マツカワ卵においては、排卵後、時間が経過すると、受精までは至っても胚発生に関わる生理機能に障害が生じ、正常にふ化できなくなることが考えられた。従って、良質な卵を安定的に確保するためには、排卵後はできる限り短時間で卵を採取し、過熟化の開始を抑止することが重要と思われる。
  7. 初回産卵であるマツカワ3歳魚、経産魚である4歳魚および5歳魚において、産出される卵およびふ化仔魚の性状の違いについて比較した。卵体積およびふ化仔魚の全長は親魚の年齢が高いほど増加する傾向があり、3歳魚は比較的小さい卵および仔魚を産むと考えられた。また、親魚が加齢するほど無給餌生残指数(SAI)が高い仔魚が得られる傾向がみられ、親魚の年齢によって得られる卵およびふ化仔魚の質的性状が異なることが示唆された。
  8. 33ロット分のふ化仔魚について、SAI値と由来となった親魚および卵、さらにふ化直後における仔魚の形態的データを比較した。その結果、SAIはふ化仔魚全長と高い正の相関を示し、仔魚サイズが大きいほどSAIが優れていることがわかった。従って、ふ化直後における仔魚の全長はその後の生残を現す有効な指標であり、種苗生産現場でも実用できる可能性が示された。
  9. ふ化時の仔魚サイズと関連する要因を調べるため、由来となった親魚および卵の形態特性と比較した。その結果、ふ化仔魚の全長は、親魚の肥満度および卵体積と正の相関を示した。そのため、親魚の栄養状態の良否は何らかの機構を経て、胚発生過程にプラスの効果をもたらし、ふ化仔魚の増大化に繋がる可能性がある。また、SAIと親魚の肥満度および卵体積との間に明瞭な関係はなかったことから、これらは仔魚サイズを決定する要因として、間接的に仔魚の初期生残に関わると考えられた。
  10. 雌親魚の成育状態が卵質に及ぼす影響を調べるため、0歳時から採卵（3歳）まで異なる水温で養成した3群の親魚について卵・ふ化仔魚の性状を比較した。その結果、成長が停滞する低水温期（0歳時と1歳時）に加温養成を行い、通常よりも成長を促進させた個体では、通常の養成魚よりも得られるふ化仔魚のサイズが大きくなり、またSAIも向上することがわかった。また、4歳魚と5歳魚の仔魚と比較してもSAIに差はなかったことから、低水温期の加温養成によって初回産卵である3歳魚からも良質な仔魚が得られると考えられた。
  11. 従来給餌している生餌4種、その生餌を主体として作成したモイストペレットおよび市販のヒラメ用配合飼料を与えて養成した親魚群の卵およびふ化仔魚の性状を比較した。その結果、卵体積、ふ化仔魚全長、受精率およびふ化率には実験区間でほとんど差はみられなかった。また、ふ化仔魚のSAIにおいては、統計学的有意差はないものの、配合飼料区の仔魚がモイストペレット区および生餌区のそれより高い傾向がみられた。
  12. 餌料別飼育実験で用いた餌料およびそれぞれの親魚から得られた卵の総脂質量および脂肪酸組成を調べた。その結果、母体が摂食した餌料中の脂質成分は卵内のそれへほぼ忠実に反映することが明らかとなった。また、平均SAI値が最も高かった配合区は、卵内脂質の総量が極めて高く、n3-HUFAの絶対量も3実験区中最大であった。他魚種において、n3-HUFAは仔魚の初期生残を向上する効果が示唆されている。そのため、マツカワにおいても卵内n3-HUFAの絶対量の差が初期生残能力の違いとして現れたと推察された。

13. 天然と人工飼育といった成育環境の差が卵質に及ぼす影響を把握するため、マツカワ天然魚および放流再捕個体（計7尾）から得た卵およびふ化仔魚の性状について解析した。卵内脂質成分を調べたところ、脂質含有量は人工養成魚に比べて比較的lowだったが、脂質中にしめるn3-HUFAなどの脂肪酸含有量は極めて高く、中でもDHAの含有量は特に高かった。また、天然成育魚由来の仔魚はいずれの年齢の人工養成魚よりもSAIが高く、活力が優れている傾向がみられた。この理由の一つとして、DHAなどn3-HUFAを卵中に多く含んでいたことが示唆された。
14. 人工養成マツカワの自発的産卵誘導技術を開発するため、本種の産卵に対する昇温刺激の効果について検討した。産卵期の人工3歳魚に定期的に昇温刺激を行ったところ、雌の放卵頻度および日間採卵数は明らかに増加した。さらに、受精誘起頻度および総受精卵数も著しく増加した。これらの結果から、昇温刺激は雌の放卵を促進するとともに、雌雄の産卵行動を誘起する効果があり、本種の自発的産卵誘導法として有効であることが明らかとなった。
15. 雌一尾における産卵特性および受精率に及ぼす昇温刺激の影響について調べた。その結果、昇温刺激は雌の排卵リズムにあわせた規則的な放卵を促す効果があることが示唆された。また、昇温刺激を定期的に行うと、受精率が高い良質卵が得られることが示された。この理由として放卵が連続的に誘起されるため、体内滞留による排卵卵の過熟化および受精能の低下が起るためであると考えられた。
16. 雄の精液産成に及ぼす昇温刺激の効果を調べるため、連続採精実験を行い、昇温刺激の有無による精液量およびスパマトクリット値の変化を調べた。その結果、実験期間を通して昇温刺激の有無に関わらず採精量およびスパマトクリット値に明確な差は認められなかった。従って、昇温刺激は雄の精液産生（最終成熟）に影響するのではなく、放精や性行動の発現に関わっている可能性が示された。
17. 自発的産卵における低受精率の原因を調べるため、搾出した排卵卵および精液を様々な状況下で水槽内に人為的に滴下し、その受精率からマツカワの受精行動を類推した。その結果、卵投入の30分後に精液を滴下しても受精率は低下しなかったが、精液滴下まで1時間以上経過すると、受精率は急速に低下した。従って、放卵しても最低30分までは卵の受精能は保たれていることが示唆された。また、卵・精液の滴下距離別の受精実験を行った結果、卵および精子の滴下距離が1 m以内である場合、受精率は対照区と差がみられなかったが、滴下地点が2 m以上離れると受精率は大幅に低下した。このことからマツカワの水槽内受精が成功するためには、雄が放出された卵の1 m以内に接近して放精する必要がある。そのため、自発的産卵による低受精率の原因として、ペアリングが不十分なまま放卵と放精が起こっていることが示唆された。
18. マツカワの自発的産卵誘起に及ぼす雌の収容数の影響について解析した。水槽内に雌を1尾から5尾と、雄を5尾ずつ収容して産卵誘導実験を行った。その結果、雌の収容数が増加するに従い、放卵数、受精誘起例数、受精率が低下した。従って、雌の個体数の増加によりマツカワの正常な自発的産卵行動が阻害されることが強く示唆された。
19. マツカワの自発的産卵と飼育環境の換水性との関連を調べるため、雌親魚を複数収容した条件下で換水率別の産卵誘導実験を行った。小型水槽および大型水槽を用いたいずれの実験においても、高換水率群では低換水率群よりも多くの受精卵が得られ、受精卵率も高い傾向がみられた。また、通水量が少なく飼育水が滞留した条件下では産卵不調が起こりやすく、飼育水の換水性を高く保つことは自発的産卵を安定的に誘起する上で必要と考えられた。従って、飼育水の換水率はマツカワの自発的産卵に対して制限要因となることが示唆された。
20. マツカワ仔魚飼育における初期減耗の発生状況を詳細に調べた。その結果、18~20日齢の上屈前仔魚と呼ばれる時点と、26~28日齢時の上屈仔魚になった時点の2度において、それぞれ異なる要因によって初期減耗が生じることが分かった。
21. 18~20日齢時に発生する仔魚の大量減耗には、飼育初期の摂餌状態が関連していると推測された。そこで、仔魚の初期摂餌および生残に及ぼす環境因子の影響について解析した。ナンノ添加濃度別飼育実験を行った結果、仔魚のワムシ摂餌量は飼育水中のナンノ濃度の増加に伴い顕著に増加した。また、ナンノ無添加飼育群では、17~22日齢の間に仔魚の死亡が急増したのに対し、ナンノを高濃度で添加した飼育群では実験期間中、仔魚のへい死はほとんどみられず、生残率は極めて高かった。このことから、飼育水に添加したナンノには、マツカワ仔魚の初期摂餌を活性化する生理作用があり、ワムシ給餌期に飼育水槽にナンノを高濃度で添加し、初期摂餌を高めることによって18~20日齢時の大量減耗を抑制できることが明らかとなった。
22. 仔魚の摂餌に及ぼす飼育環境の照度の影響を確かめ

- るため、照度別飼育実験を行った。その結果、ワムシ摂餌開始期およびワムシ摂餌盛期のいずれにおいても、0～1600Luxの範囲内において高照度条件下ほど仔魚の摂餌は明らかに活発となった。また、着底生活に移行したばかりである仔魚においても高照度条件下の方が摂餌活性が高かったが、この場合、浮遊生活期に比べより暗い環境下でも摂餌できるようになった。このことから、照度条件はマツカワ仔魚の摂餌の可否を決定する一要因であることが示唆された。
23. 仔魚の摂餌に及ぼす餌料の残存量の影響を確かめるため、給餌量別飼育実験を行った。その結果、水槽中のワムシ量と仔魚の摂餌パターンは同調的関係にあることが示され、マツカワ仔魚が摂食できる期間および量は飼育水中に存在している餌の絶対量によっても決定されていると考えられた。
24. ステージD～Gの仔魚のワムシおよびアルテミア摂餌に及ぼす水温の影響を調べた。その結果、いずれの発育段階でも、12～18℃の範囲において、高水温条件下ほど活発にワムシまたはアルテミアを摂餌した。従って、水温はマツカワ仔魚の摂餌に重要な影響を及ぼす環境因子と考えられた。しかし、仔魚期の水温は形態異常の出現や性比の偏りなど健苗性を大きく損なう可能性もあり、飼育水温を決定する際には注意が必要と思われた。
25. 26～28日齢時（上屈仔魚）の減耗期にへい死した個体について、死亡に至るまでの行動を観察した。その結果、へい死が増加する前日から仔魚が一斉に底層に沈降し、数日浮上行動を繰り返した後へい死に至っていることがわかった。また、急激な沈下現象がなぜ生ずるかを解明するため、体密度を継時的に測定したところ、体密度は成長に伴って徐々に増加したが、中でも沈降が著しく発生する25～28日齢までの期間、特に急激な上昇を示した。従って、マツカワ仔魚における急激な沈下現象は、この時期に遊泳能力をこえるほどに体密度が急増することに起因すると考えられた。
26. 上屈仔魚期の減耗には、その直前に発生する仔魚の沈降現象が関連すると推測された。そこで、通気量操作によって飼育水槽内の攪拌の強さを変化させ、沈降の抑制を試みた。その結果、18日齢以降に通気量を通常よりも強めて飼育すると、体密度が急増する時期になっても仔魚は沈降せず、さらに減耗も発生しなかった。このことから、体密度の増加に併せて通気を強めて水槽内に上昇流をつくり、仔魚の遊泳を擁護することによって、上屈仔魚期に発生する大量減耗を防除できると考えられた。
27. 人工種苗における形態異常の発生はマツカワ栽培漁業を進める上で重大な問題である。そこで形態異常の中で変態過程の異常に起因する白化および両面有色化の出現に及ぼす飼育水温の影響について調べた。12℃～18℃の温度範囲において水温別飼育実験を行った結果、正常個体率は14℃区において最も高く、それ以上またはそれ以下の水温で飼育した群では形態異常率が明らかに高かった。また、水温によって形態異常の出現傾向も大きく変化し、14℃を境に高水温条件下、または低水温条件下となるほどそれぞれ両面有色化および白化が起こりやすくなることが示された。従って、14℃という温度帯はマツカワ仔魚の生理機能や形態構造の変化が最も正常に進む適水温域であると考えられた。
28. 降温時期別飼育実験を行い、形態異常の出現に関わる発育段階の特定を試みた。その結果、ステージE前後における水温が形態異常の出現に大きく影響することが示され、この発育期はマツカワの変態の方向性を決定する極めて重要な発育段階であると考えられた。
29. マツカワの性決定（温度感受）期を特定するため、各発育段階毎に水温を高温（18℃）から低温（14℃）へと変化させる降温時期別飼育実験を行った。その結果、温度感受性は全長約10mmから発現し始めることがわかった。従って、既往の知見と併せると、本種の性決定に対する温度感受期は全長10mmから35mmまでであると考えられた。
30. 一時的な水温上昇がマツカワの性決定に及ぼす影響を明らかにするため、温度感受期に5日間の高水温刺激を行い、雄化が誘導されるかどうかについて調べた。その結果、全長12.2mmで昇温刺激を与えた飼育群では、刺激を与えない対照群よりも雌率が明らかに低下した。従って、温度感受期に短期間でも水温が上昇すると雄化が誘導されることが考えられた。また、全長12.3mm時と全長25.8mm時に2度昇温操作を行った飼育群においては、一度だけ昇温した飼育群と比べ雌率に明確な違いはみられなかった。従って、温度感受期の中でも、水温が性決定に及ぼす影響は時期によって強弱があることが示唆された。
31. 小型水槽を用いて仔魚を飼育したところ、水温14℃に設定しても雄化が誘導されたケースがみられた。雄化を促した要因は不明だが、本種の性決定には水温以外の飼育環境要因（水槽サイズなど飼育に関わるストレス要素）も影響することが示唆された。一方、小型水槽で飼育しても、着底開始時に底層に砂

を敷き着底をスムーズに促すと雄化は起らず性比の偏りはみられなかった。着底開始時は外部環境刺激によって雄化が誘導されやすい時期でもあり、砂の存在によってストレスを受けずに速やかに底棲生活へ移行できたことが正常な性分化に繋がったと考えられた。

## 謝 辞

稿を進めるにあたり、本研究に終始御懇切なるご指導と激励を頂いた北海道大学大学院水産科学研究科、山内皓平教授ならびに足立伸次助教授に心から感謝致します。また、ご多忙の中、御校閲を頂いた北海道大学大学院水産科学研究科、原彰彦教授、荒井克俊教授ならびに東藤孝助教授に深く感謝致します。

また、研究を進めるにあたり、数々の有意義な御助言、御教示頂いた独立行政法人水産総合研究センター北海道区水産研究所 松原孝博博士、安藤忠博士、大久保信幸博士、同厚岸栽培センター 錦昭夫場長、鈴木重則氏、森岡泰三氏、同宮古栽培センター 有瀧真人場長、同古満目栽培センター 渡辺研一博士、岩手県水産技術センター 山野目健氏には厚く感謝の意を表します。

また、本研究では、マツカワ天然魚および放流再捕魚の収集に際し、日高、胆振ならびに渡島管内の各海域協議会の皆様、そして水産技術改良普及指導所の皆様に多大なご協力をいただきました。心より感謝致します。

さらに、実験に協力して頂くとともに多大なご支援を頂いた前北海道立栽培漁業総合センター場長の宇藤均博士(現北海道立中央水産試験場場長)、元同センター魚類部長の高丸禮好氏(現北海道立網走水産試験場場長)、同センター現魚類部長の齋藤節夫博士、杉本卓主任研究員、松田泰平科長、佐藤敦一氏をはじめ研究職員、実験補助員の皆様には心から感謝致します。

## 文 献

- 坂本一男：“マツカワ”。日本産魚類大図鑑(益田一・尼岡邦夫・荒賀忠一・上野輝弥・吉野哲夫編)、東京、東海大学出版、1984、337。
- 落合明、田中克：“マツカワ”。新版「魚類学(下)」、東京、恒星社出版閣、1986、1092-1093。
- 尼岡邦夫、仲谷一宏：“マツカワ”。図鑑北日本の魚と海藻、札幌、北日本海洋センター、1983、134。
- 佐々木正義：日高及び胆振太平洋海域のマツカワの漁業実態と生態について。北水試だより。38、7-12 (1997)。
- 黒倉寿：“I 7人工受精と配偶子保存”。水族繁殖学(隆島史夫、羽生功編)。東京、緑書房、1989、166-194。
- 村上直人：マツカワの種苗生産。さいばい。48、32-36 (1988)。
- 高丸禮好、斎藤節夫、森立成：特定海域新魚種量産技術開発事業マツカワ。平成3年度北海道立栽培漁業総合センター事業報告。90-96 (1992)。
- 川真田憲治、杉本卓、森立成：特定海域新魚種量産技術開発事業マツカワ。平成8年度北海道立栽培漁業総合センター事業報告。54-59 (1997)。
- 岩井寿夫：“I 8発生とふ化管理”。水族繁殖学(隆島史夫・羽生功編)。東京、緑書房、1989、166-194。
- 足立伸次：成熟・産卵の人為的制御と卵質。月刊海洋。32(2)、120-126 (2000)。
- Koya, Y., Matsubara, T. and Nakagawa, T.: Efficient artificial fertilization method based on the ovulation cycle in barfin flounder *Verasper moseri*. *Fish. Sci.* 60(5), 537-540 (1994)。
- 渡辺研一：マツカワに発生したウイルス性神経壊死症の防除対策に関する研究。北海道大学大学院博士論文 (1999)。
- Arimoto, M., Mushiake, K., Mizuta, Y., Nakai, T., Muroga, K. and Furusawa, I.: Detection of striped jack nervous necrosis disease virus (SJNNV) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Fish Pathol.* 27, 191-195 (1992)。
- Mushiake, K., Arimoto, M., Furusawa, T., Furusawa, I., Nakai, T. and Muroga, K.: Detection of antibodies against striped jack nervous necrosis disease virus (SJNNV) from brood stocks of striped jack. *Fish. Sci.* 58, 2351-2356 (1992)。
- 有瀧真人、鈴木重則、渡辺研一：飼育したマツカワ仔稚魚の形態発育と成長。日水誌。66(3)、446-453 (2000)。
- 太田克彦、山野目健、大森正明：マツカワの成熟度について。平成8年度岩手県水産技術センター事業年報。182-192 (1997)。
- 太田克彦、山野目健、平嶋正則：マツカワの自然産卵に関する研究。平成9年度岩手県水産技術センター事業年報。172-177 (1998)。
- 中川亨：マツカワ。平成4年度日本栽培漁業協会事業年報。177-178 (1993)。
- 鈴木重則：マツカワ。平成11年度日本栽培漁業協会事業年報。198-200 (2000)。
- Norman, J.R.: “IV. Albinism, ambicoloration and

- reversal” . A systematic monograph of flatfishes (Heterosomata). Vol.I. London, Pettodidae, Bothidae, Pleuronectidae. British museum (Natural history). 1934, 22-29.
- 21) 小林牧人, 足立伸次: “生殖”. 魚類生理学の基礎 (会田勝美編). 東京, 恒星社厚生閣, 2002, 155-184.
- 22) Matsuyama, M., Adachi, S., Nagahama, Y. and Matsuura, S.: Diurnal rhythm of oocyte development and plasma steroid hormone levels in the female red sea bream, *Pagrus major*, during spawning season. *Aquaculture*. 73, 359-372 (1988).
- 23) 松浦修平, 古市政幸, 丸山勝彦, 松山倫也: マダイ 1尾のよる毎日産卵の確認とその卵質. 水産増殖. 36, 33-39 (1988).
- 24) Adachi, S., Ijiri, S., Soyano, K., Takamaru, N. and Yamauchi, K.: Proceedings of the Japan Society for Comparative Endocrinology, No.6, p.15 (1991).
- 25) Higashino, T., Miura, T., Miura, C. and Yamauchi, K.: Histological studies on early oogenesis in barfin flounder *Verasper moseri*. *Zool. Sci.* 19, 557-563 (2002).
- 26) 山野目健, 大森正明, 金辻宏明, 河原栄二郎: マツカワにおける雌特異血清蛋白の周年変化とLHRHaコレステロールペレットの産卵促進効果. 岩手県水技セ研報. 1, 13-19 (1997).
- 27) 松原孝博: 卵黄形成機構と卵黄の機能. 月刊海洋. 32(2), 107-112 (2000).
- 28) Matsubara, T. and Sawano, K.: Proteolytic cleavage of vitellogenin and yolk proteins during vitellogenin uptake and oocyte maturation in barfin flounder *Verasper moseri*. *J. Exp. Zool.* 272, 34-45 (1995).
- 29) Matsubara, T. and Koya, Y.: Course of proteolytic cleavage in three classes yolk proteins during oocyte maturation in barfin flounder *Verasper moseri*, a marine teleost spawning pelagic eggs. *J. Exp. Zool.* 278, 189-200 (1997).
- 30) Matsubara, T., Ohkubo, N., Andoh, T., Sullivan, C.V. and Hara, A.: Two forms of vitellogenin, yielding two distinct lipovitellins, play different role during oocyte maturation and early development of barfin flounder *Verasper moseri*, a marine teleost that spawns pelagic eggs. *Dev. Biol.* 213, 18-32 (1999).
- 31) 長浜嘉孝: “生殖”. 魚類生理学 (板沢靖男・羽生功編). 東京, 恒星社厚生閣, 1991, 243-286.
- 32) 三浦猛, 三浦智恵美: 精子形成機構. 月刊海洋. 32, 102-106 (2000).
- 33) 鈴木克彦: ヒラメ及びマツカワの生殖生理に関する研究. 北海道大学卒業論文. (1992).
- 34) Wallace, R.A.: “Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates” . *Developmental Biology* Vol.1, (Browder, L.W. ed.). New York, Plenum Press, 1985, 127-177.
- 35) Bromage, N.R.: “Broodstock management and seed quality - General considerations” , *Broodstock management and egg and larval quality* (Bromage, N.R. & Roberts, R.J. eds). Oxford, Blackwell Science, 1995, 1-24.
- 36) 朝比奈潔: “I. 4. 生殖周期と調節”. 水族繁殖学 (隆島史夫・羽生功 編). 東京, 緑書房, 1989, 103-131.
- 37) Matsuyama, M., Adachi, S., Nagahama, Y., Kitajima, C. and Matsuura, S.: Testicular development and serum levels of gonadal steroids during the annual reproductive cycle of captive Japanese sardine. *Japan. J. Ichthyol.* 37, 381-390 (1991).
- 38) Beacham, T.D. and Murray, C.B.: Influence photoperiod and temperature on timing of sexual maturity of pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha*. *Can. J. Zool.* 66, 1729-1732 (1988).
- 39) De Vlaming, V.L.: The effect of temperature and photoperiod on reproductive cycling in the estuarine gobiid fish *Gillichthys mirabilis*. *Fish. Bull.* 70(4), 1137-1152 (1972).
- 40) 松原孝博, 本田聡, 征矢野清, 和田時夫: 飼育下におけるマイワシ (*sardinops melanostictus*) の精巢発達に伴う血清ステロイドホルモンの変化. 北水研報告. 56, 7-16 (1992).
- 41) Matsuyama, M., yonda, M., Takeuchi, H., Kagawa, H., Kasiwagi, M., Tabata, K., Nagahama, Y., Ijiri, S., Adachi, S. and Yamauchi, K.: Diurnal periodicity in testicular activity in the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Sci.* 61(1), 17-23 (1995).
- 42) 森田純人, 松山倫也, 柏木正章: ササノハベラの生殖腺と血中ステロイドホルモンの季節変化. 日水誌. 63(5), 694-700 (1997).
- 43) Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H. and Nagahama Y.: Hormonal injection of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 5774-5778 (1991).

- 44) 松原孝博：“Ⅲ－9. 成熟，産卵リズム.マイワシ”. 海産魚の産卵・成熟リズム. 東京，恒星社厚生閣，1991，113-124.
- 45) Mushiake, K., Kawano, K., Kobayashi, T. and Yamazaki, T.: Advanced spawning in Yellowtail, *Seriola quinqueradiata*, by manipulations of the Photoperiod and water temperature. *Fish. Sci.* 64(5), 727-731 (1998).
- 46) 松山倫也：“Ⅲ－6 成熟，産卵リズム.マダイ”. 海産魚の産卵・成熟リズム(廣瀬慶二編). 東京，恒星社厚生閣，1991，78-91.
- 47) 萱場隆昭，杉本卓，佐藤敦一：特定海域新魚種定着促進技術開発事業(マツカワ). 北海道立栽培漁業総合センター事業報告書. 94-109 (1999).
- 48) 野村稔，酒井清，隆島史夫：ニジマス卵の過熟現象について－I. 日水誌. 40(10), 977-984 (1974).
- 49) Formacion M.J, Hori R and Lam T.J.: Overripening of ovulated eggs in gold fish I. Morphological changes. *Aquaculture*. 114, 155-168 (1993).
- 50) 持田和彦，有瀧真人，太田健吾，渡邊研一，大久保信幸，松原孝博：マツカワおよびホシガレイ精子の短期保存. 北水研報. 64, 25-34 (2000).
- 51) 酒井清：“産出卵の卵質評価－淡水魚”. 魚類の成熟と産卵(日本水産学会編). 東京，恒星社出版閣，1974，100-112.
- 52) 酒井清，野村稔，井上正昭，城条義興，武富正和：マダイの自然産出卵の卵質. 水産増殖. 33(1), 7-11 (1985).
- 53) Hay, D.E.: Effects of delayed spawning on viability of egg and larvae of pacific herring. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 115, 155-161 (1986).
- 54) 中田久，中尾貴尋，荒川敏久，松山倫也：ブリの人工授精における排卵後経過時間と受精率の関係. 日水誌. 67(5), 874-880 (2001).
- 55) Shein N.O, 中田久，荒川敏久，水野かおり，土内隼人，征矢野清：マハタ卵における排卵後の時間経過と受精率との関係. 平成11年度日本水産学会秋季大会講演要旨集，日本水産学会，仙台，64 (1999).
- 56) 萱場隆昭：マツカワ種苗生産技術開発の現状. 育てる漁業. 344, 3-7 (2002).
- 57) 森本晴之：“卵質”，魚類の初期減耗研究(田中克・渡邊良朗編). 東京，恒星社厚生閣，1994，83-96.
- 58) MacEvoy, L.A.: Ovulatory rhythms and overripening of eggs in cultivated turbot, *Scophthalmus maximus* L. *J. Fish Biol.* 24, 437-448 (1984).
- 59) Kjorsvik, E., Mangor-Jensen, A., Holmefjord, I.: Egg quality in fishes. *Adv. Mar. Biol.* 26, 71-113 (1990).
- 60) 川崎健：浮魚資源. 東京，恒星社厚生閣，1982，141-151.
- 61) Blaxter, J.H.S. and Hempel, G.: The influence of egg size on herring larvae (*Clupea harengus* L.). *J. du Cons.* 28, 211-240 (1963).
- 62) Bagenal, T.B.: The interrelation of the size of fish eggs, the date of spawning and the production cycle. *J. Fish Biol.* 3, 207-219 (1971).
- 63) Knutsen, G.M. and Tilseth, S.: Growth, development and feeding success of Atlantic cod larvae *Gadus morhua* related to egg size. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 114, 507-511 (1985).
- 64) Imai, C. and Tanaka, S.: Effect of sea water temperature on egg size of Japanese anchovy. *Nippon Suisann Gakkaishi.* 53, 2169-2187 (1987).
- 65) Imai, C. and Tanaka, S.: Effect of sea water temperature on the variability of batch fecundity of Japanese anchovy around Miura Peninsula, Central Japan. *Fish. Sci.* 63, 489-495 (1997).
- 66) Simpson, A.C.: The spawning of plaice in the North Sea. *Fish. Invest. Lond. Ser.* 2, 22, 1-111 (1959).
- 67) 萱野泰久，何玉環，原隆，福永丈人：年齢組成の異なるキジハタ親魚群の自然産出卵の卵質. 水産増殖. 46(2), 213-218 (1998).
- 68) 鶴田義成：カタクチイワシの成熟・産卵と再生産力の調節に関する研究. 水工研報告. 13, 129-168(1992).
- 69) Hislop, J.R.G., Robb, A.P., and Gauld, J.A.: Observation on effects of feeding level on growth and reproduction in haddock, *Melanogrammus aeglefinus* in captivity. *J. Fish Biol.* 13, 85-98 (1978).
- 70) Rana, K.J.: Influence of egg size on the growth, onset of feeding, point-of-no-return and survival of unfed *Oreochromis mossambicus* fry. *Acquaculture*. 46, 119-131 (1985).
- 71) 今井千文，田中昌一：摂餌開始期のカタクチイワシ仔魚の生残能力に対する卵サイズの影響. 日水誌. 64(1), 8-15 (1998).
- 72) 萱野泰久，尾田正：池中養成したキジハタ自然産出卵の卵質について. 岡山水試研報. 5, 48-52 (1990).
- 73) Mushiake, K., Kawano, K., Sakamoto, W. and Hasegawa, I.: Effects of extended daylength on ovarian maturation and HCG-induced spawning in yellowtail fed moist pellets. *Fish. Sci.* 60(6), 647-651 (1994).
- 74) Ohkubo, N., Matsubara, T.: Sequential utilization of

- free amino acids, yolk proteins and lipids in developing eggs and yolk-sac larvae of barfin flounder *Verasper moseri*. *Mar. Biol.* 140, 187-196 (2002).
- 75) Watanabe, T., Izquierdo, M.S., Takeuchi, T., Satoh, S. and Kitajima, C.: Comparison between eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in terms of essential fatty acid efficiency in larval red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 55, 1635-1640 (1989).
- 76) 隆島史夫：“成熟の基礎と親魚養成”. 平成元年度栽培漁業技術研修事業基礎理論コース親魚養成シリーズ. 水産庁, 1989, 1-8.
- 77) Watanabe, T. and Takashima, F.: Effect of tocopherol deficiency on carp-VI. Deficiency symptoms and changes of fatty acid and triglyceride distributions in adult carp. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 43, 819-830 (1977).
- 78) Watanabe, T., Itoh, A., Kitajima, C. and Fujita, S.: Effect of dietary protein levels on reproduction of red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 50, 1015-1022 (1984a)
- 79) 竹内昌昭, 石井清之助, 小木曾卓朗: 飼料ビタミンE量がアユのビタミンE蓄積, 産卵および卵質に及ぼす影響. 東海水研報告. 104, 111-122 (1981).
- 80) Watanabe, T., Takeuchi, T., Saito, M. and Nishimura, K.: Effect of low protein-high calory or essential fatty acid deficiency diet on reproduction of rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 50, 1207-1215 (1984b).
- 81) Watanabe, T., Arakawa T., Kitajima, C., Fujita, S.: Effect of nutritional quality of broodstock diets on reproduction of red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 50(3), 495-501 (1984c).
- 82) Watanabe, T. and Kiron, V.: “Red sea bream (*Pagrus mior*)”, Broodstock management and egg and larval quality (Bromage, N.R. & Roberts, R.J. eds). Oxford, Blackwell Science, 1995, 398-413.
- 83) Verakunpiriya, V., Mushiake, K., Kawano, K., and Watanabe, T.: Supplemental effect of astaxanthin in broodstock diets on quality of yellowtail eggs. *Fish. Sci.* 63, 816-823 (1997a).
- 84) Folch, J., Lee, M. and Stanley, G.H.S.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-507 (1957).
- 85) 山田作太郎, 北田修一: “分散分析”, 生物資源統計学. 東京, 成山堂, 2003, 93-121.
- 86) Watanabe T., Itoh A., Satoh S., Kitajima C. and Fijuta S.: Effects of dietary protein levels and feeding period before spawning on chemical components of eggs produced by red sea bream broodstock. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 51(9), 1501-1509 (1985).
- 87) Vassallo-Agius, R., Imaizumi, H., Watanabe, T., Yamazaki, T., Satoh, S. and Kiron, V.: The influence of astaxanthin supplemented dry pellets on spawning of striped jack. *Fish. Sci.* 67, 260-270 (2001a).
- 88) Zohar, Y., Harel, M., Hassin, S. and Tandler, A.: “Gilthead sea bream (*Sparus aurata*)”, Broodstock management and egg and larval quality (Bromage, N.R. & Roberts, R.J. eds). Oxford, Blackwell Science, 1995, 94-117.
- 89) Watanabe, T., Fujimura, T., Lee, M. J., Fukusho, K., Satoh, S. and Takeuchi, T.: Effect of polar and nonpolar lipids from krill on quality of eggs of red seabream *Pagrus major*. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 57(4), 695-698 (1991).
- 90) 古板博文, 田中秀樹: 卵質に及ぼす親魚の栄養状態の影響. 健苗育成技術開発研究成果. 47-63 (1997).
- 91) 松田泰平: マツカワ. 新北のさかなたち (上田吉幸, 前田圭司, 嶋田宏, 鷹見達也編). 北海道, 北海道新聞社, 2003, 242-245.
- 92) Fernandez-Palacios, H., Izquierdo, M., Robaina, L., Valencia, A. Salhi, M. and Montero, D.: The effect of dietary protein and lipid from squid fish meals on egg quality of broodstock for gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 148, 233-246 (1997).
- 93) Verakunpriya, V., Watanabe, K., Mushiake, K., Kawano, K., Kobayashi, T., Hasegawa, I., Kiron, V., Satoh, S. and Watanabe, T.: Effect of krill meal supplementation in soft-dry pellets on spawning and quality of egg of yellowtail. *Fish. Sci.* 63 (3), 433-439 (1997b).
- 94) 渡辺研一, 鈴木重則: 水槽内におけるマツカワの自然産卵と卵の発生状況から推測した産卵時刻. 日水誌. 65, 408-413 (1999).
- 95) Lam, T.J.: “Environmental influences on gonadal activity in fish”. *Fish Physiology*. (Hoar, W.S., Randall, D.J. and Donaldson, E.M. edit). New York, Academic Press. 1983, 65-116.
- 96) Zanuy, S., Carrillo, M. and Ruis, F.: Delayed

- gametogenesis and spawning of sea bass (*Discentrarchus labrax* L.) kept under different photo period and temperature regimes. *Fish Physiology & Biochemistry*. 2, 1-4 (1986).
- 97) 福所邦彦, 藤村卓也, 山本剛史: 加温循環式水槽によるマダイの親魚養成と早期採卵. 水産増殖. 34, 69-75 (1986a).
- 98) Arnold, C.R.: Controlled year-round spawning of red drum *Sciaenops ocellatus* in captivity. *Contributions in Marine Science*. 30, 65-70 (1988).
- 99) 齋藤節雄, 森立成, 草刈宗晴, 三浦宏樹: ヒラメ採卵に関する研究 第1報 温度処理による産卵の制御. 北海道水試研報. 36, 71-79 (1991).
- 100) 神保忠雄, 手塚信弘, 小磯雅彦, 鶴巻克己, 升間主計: 水温と光周期調整によるインダイの産卵制御. 水産増殖. 50, 189-196 (2002).
- 101) Yong, Z., Furukawa, K., Aida, K. and Hanyu, I.: Effects of water temperature and photoperiod on the initiation and termination of the autumn spawning season in Tobinumeri-Dragonet *Repomucenus beniteguri*. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 57, 1871-1876 (1991).
- 102) 川辺勝俊, 木村ジョンソン, 安藤和人, 垣内喜美男: 小笠原諸島父島における養成カンパチ2年魚の自然産卵. 水産増殖. 46, 31-36 (1998).
- 103) 宮下盛, 村田修, 澤田好史, 岡田貴彦, 久保喜計, 石谷大, 瀬岡学, 熊井英水: 養成クロマグロの成熟と産卵. 水産増殖. 48, 475-488 (2000).
- 104) 渡辺研一: 北海道太平洋沿岸で漁獲されたマツカワの排卵状況から推定した産卵期. 水産増殖. 46, 589-590 (1998).
- 105) 川辺勝俊, 加藤憲司, 木村ジョンソン, 岡村陽一, 竹之内卓夫, 吉田勝彦: 小笠原諸島父島におけるヒレナガカンパチの親魚養成と採卵. 水産増殖. 45, 201-206 (1997).
- 106) Watanabe, T., Vassallo-Agius, R., Mushiake, K., Kawano, K., Kiron, V. and Satoh, S.: The first spawning from striped jack broodstock fed soft-dry pellets. *Fish.Sci.* 64 : 39-43 (1998).
- 107) Furuita, H., Tanaka, H., Yamamoto, T., Shiraiishi, M. and Takeuchi, T.: Effect of high dose of vitamin A on reproduction and egg quality of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish.Sci.* 67, 606-613 (2001).
- 108) Vassallo-Agius, R., Watanabe, T., Imaizumi, H., Yamazaki T., Satoh, S. and Kiron, V.: Effects of dry pellets containing astaxanthin and squid meal on spawning performance of striped jack *Pseudocaranx dentex*. *Fish. Sci.* 67, 667-674 (2001b).
- 109) Hotta, K., Tamura, M., Watanabe, T., Nakamura, Y., Adachi, S. and Yamauchi, K.: Changes in spawning characteristics of Japanese whiting *Sillago japonica* under control of temperature. *Fish. Sci.* 67, 1111-1118 (2001).
- 110) 古川清, 会田勝美, 吉岡基, 佐藤英雄, 羽生功: シロギスの産卵リズムに及ぼす光周期と水温の影響. 日水誌. 57, 2193-2201 (1991).
- 111) Zhu, Y., Furukawa, K. and Aida, K.: Effects of photoperiod on spawning rhythm in the tobinumeri-dragonet *Repomucenus beniteguri*. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 57, 2033-2037 (1991).
- 112) Harahap, A.P., Takemura, A., Nakamura, S., Rahman, M.D. and Takano K.: Histological evidence of lunar-synchronized ovarian development and spawning in the spiny rabbitfish *Siganus spinus* (Linnaeus) around the Ryukyus. *Fish. Sci.* 67, 888-893 (2001).
- 113) 渡辺研一, 石間正浩, 川真田憲治, 吉水守, 絵面良男: マツカワにおけるウイルス性神経壊死症の発生. 北大水産彙報. 50, 101-113 (1999).
- 114) Watanabe, K., Suzuki, S., Nishizawa, T., Suzuki, K., Yoshimizu, M. and Ezura, Y.: Control strategy for viral nervous necrosis of barfin flounder. *Fish Pathology*. 33, 445-446 (1998).
- 115) 小林牧人: “魚類の性行動の内分泌調節と性的可逆性—魚類の脳は両性か?—”, 魚類のニューロサイエンス(植松一真, 岡良隆, 伊藤博信編), 東京, 恒星社厚生閣, 2002, 245-262.
- 116) 宇野将義・井野川仲男・黒倉寿: ニジマス・アマゴの人工授精への保存精液の利用. I. 液状保存精液の精子活力と受精能力. 水産増殖. 34, 107-111 (1986).
- 117) 高野和則: “生殖腺の成熟過程”. 魚類の成熟と産卵—その基礎と応用(日本水産学会編). 東京, 恒星社厚生閣, 1974, 18-30.
- 118) 山野目健・平嶋正則: マツカワの自然産卵に関する研究. 平成10年度岩手県水産技術センター年報 164-165 (1998).
- 119) Sorensen, P.W., Hora, T.J., Stacy, N.E. and Goetz, F.W.: F prostaglandins function as potent olfactory stimulants that comprise the postovulatory female sex pheromone in gold fish. *Biol. Reprod.* 39, 1039-1050 (1988).



- 120) Ogata, H., Kitamura, S. and Takashima, F.: Release of 13, 14-dihydro-15-keto-prostaglandin F2 $\alpha$  sex pheromone, to water by cobitid loach following ovulatory stimulation. *Fish. Sci.* 60(2), 143-148 (1994).
- 121) 九州・山口ブロック水産試験場マダイ種苗生産研究会：“Ⅱ飼育”. マダイ種苗生産技術の現状と問題点. 東京, 日本水産資源保護協会, 1977, 23-91.
- 122) 日本栽培漁業協会：シロギス. 日本栽培漁業協会事業年報, 156-158 (1984).
- 123) 太平洋北区栽培漁業協議会技術部会ヒラメ作業部会：“2. 種苗生産”. 太平洋北区におけるヒラメ種苗生産技術集. 東京, 日本栽培漁業協会, 1997, 12-53.
- 124) Last, J.M.: The food of four species of pleuronectiform larvae in the eastern English Channel and southern North sea. *Mar. Biol.* 45, 359-368 (1978).
- 125) 田中克：海産仔魚の摂餌と生残 1 天然海域における食性. 海洋と生物 11, 440-447 (1980).
- 126) 太田亨, 安藤靖浩：植物プランクトンの脂溶性生物活性物質の利用に関する研究. 水産学学術研究・改良補助事業報告 47-54 (1996).
- 127) Servel, M.O., Claire, C., Derrien, A., Coiffard, L. and Holtzhauer, Y.R.: Fatty acid composition of some marine microalgae. *Phytochemistry* 36, 691-693 (1994).
- 128) 鄭鋒, 竹内俊郎, 與世田兼三, 小林真人, 廣川潤, 渡邊武：アルテミア幼生給餌期のマダラ仔稚魚のアラキドン酸, EPAおよびDHA要求. 日水誌. 62(4), 669-676 (1996).
- 129) 吉松隆夫, 林雅弘, 戸田享次, 古市政幸, 北島力：メナダ仔魚の必須脂肪酸要求と飼育槽へのナンノクロロプシスの添加効果. 日水誌. 61(6), 912-918 (1995).
- 130) 竹内俊郎：“魚類における栄養素の欠乏症と要求量”. 平成3年度栽培漁業基礎理論コース仔稚魚の発育シリーズ. 東京, 水産庁, 1991, 1-68.
- 131) Kanazawa, A., Teshima, S., Tanaka, N., Imada, O. and Inoue A.: Tissue uptake of radioactive eicosapentaenoic acid in the red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 48, 1441-1444 (1982).
- 132) 山本義久：“Ⅶ仔稚魚の発育”. ニシンの種苗生産技術. (社) 日本栽培漁業協会, 2001, 31-41.
- 133) 日下部敬之, 中嶋昌紀, 佐野雅基, 渡辺和夫：大阪湾におけるイカナゴ *Ammodytes personatus* 仔魚の鉛直分布と摂餌に対する水中照度の影響. 日水誌. 66(4), 713-718 (2000).
- 134) 濱本俊策, 吉松定昭：渦鞭毛藻類 *Dinophyceae* 種のキジハタ *Epinephelus akaara* (Temminck et Schelegel) 仔魚への投餌効果. 香川水試報告 21, 63-72 (1984).
- 135) 土橋靖史, 栗山功, 黒宮香美：マハタ仔稚魚の生残と濃縮淡水クロレラ添加の影響. 平成14年度日本水産学会講演要旨 (2002).
- 136) Hjort, J.: Fluctuations in the year classes of important food fishes. *J. Cons. Int. Explor. Mer.* 1, 5-32 (1962).
- 137) 青海忠久：“異体類の種苗生産時にみられる体色異常”. 平成3年度栽培漁業基礎理論コース仔稚魚の発育シリーズ. 東京, 水産庁, 1991, 1-37.
- 138) 有瀧真人, 青海忠久, 小林真人：マガレイ仔魚の高水温飼育とアルテミア幼生早期給餌による形態異常の出現防除. 日水誌. 62(6), 857-864 (1996).
- 139) 中川亨：栽培漁業と新養成技術 マツカワ種苗生産. 水産の研究. 8, 71-77 (1989).
- 140) Mackenzie, B.R. and Leggett, W.C.: Quantifying the contribution of small-scale turbulence to the encounter rates between larval fish and their zooplankton prey: effects of wind and tide. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 73, 149-160 (1991).
- 141) Utne-Palm, A.C. and Stiansen, J.E.: Effect of larval ontogeny, turbulence and light on prey attack rate and swimming activity in herring larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 268, 147-170 (2002).
- 142) Baharona-Fernandes, M.H.: Some effect of light intensity and photoperiod on the sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) reared at the Center Oceanologique de Bretagne. *Aquaculture* 17, 311-321 (1979).
- 143) Duray, M. and Kohno, H.: Effects of continuous lighting on growth and survival of first-feeding larval rabbitfish, *Signanus guttatus*. *Aquaculture* 72, 73-79 (1988).
- 144) Blaxter, J.H.S.: Light intensity, vision, and feeding in young plaice. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2, 293-307 (1968).
- 145) 山本章造：キジハタ仔魚の摂餌日周期性の検討ならびに日間摂餌量の推定. 日水誌. 62(3), 399-405 (1996).
- 146) Toledo, J.D., Caberoy, N.B., Quinitio, G.F., Choresca jr C.H. and Nakagawa, H.: Effects of salinity and light intensity on oil globule absorption, feeding incidence, growth and survival of early-stage grouper *Epinephelus coioides* larvae. *Fish. Sci.* 68, 478-483 (2002).

- 147) 田中克：“変態の生理生態 変態の生態的意義”。ヒラメの生物学と資源培養（南卓志，田中克編）。東京，恒星社厚生閣，52-62（1997）。
- 148) 川村軍蔵：“発達過程の形態学的側面 感覚器官”。魚類の初期発育（田中克編），9-20（1991）。
- 149) Mobin, S.M.A., Kanai, K. and Yoshikoshi, K.: Application of higher feeding levels prompts larval and juvenile Japanese flounder to take food at a high rate. *Suisanzoshoku* 50(2), 213-218 (2002).
- 150) 萱野泰久，山本章三：キジハタ仔魚の摂餌開始期におけるタイ国産小型シオミズボワムシの適正給餌量。岡山水試報告 6, 96-99（1991）。
- 151) 川辺勝俊：アカハタ仔魚の初期餌料としてのいわゆるS型ワムシの有効性。水産増殖 47(3), 403-408（1999）。
- 152) Sawada, Y., Miyashita, S., Aoyama, M., Kurata, M., Mukai, Y., Okada, T., Murata, O. and Kumai, H.: Rotifer-size selectivity and optimal feeding density of bluefin tuna, *Thunnus thynnus*, larvae. *Suisanzoshoku* 48(2), 169-177 (2000).
- 153) 有瀧真人，太田健吾，堀田又治，田川正朋，田中克：異なる飼育水温がホシガレイ仔魚の発育と変態に関連した形態異常の出現に及ぼす影響。日水誌. 70(1), 8-15（2004）。
- 154) Goto R, Mori T, Kawamata K, Matsubara T, Mizuno S, Adachi S. and Yamauchi K.: Effects of temperature on gonadal sex determination in barfin flounder *Verasper moseri*. *Fish. Sci.* 65, 884-887 (1999).
- 155) Kitajima, C., Yamane, Y., Matsui, S., Kihara, Y. and Furuichi, M.: Ontogenic change in buoyancy in the early stage of red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59(2), 209-216 (1993).
- 156) 日野明德：“生物学的特性”。海産ワムシ類の培養ガイドブック（桑田博編）。東京，（社）日本栽培漁業協会，2000，7-42。
- 157) 田中克：海産仔魚の摂餌と生残 V 魚卵・仔魚の垂直分布と垂直移動。海洋と生物. 16, 379-386(1981).
- 158) Tanaka, Y.: Changes in the egg and larval densities of striped beakperch during development. *Mem. Fac. Agr. Kinki Univ.* 23, 19-24 (1990).
- 159) 北島力，塚島康生，藤田矢郎，渡辺武，米康夫：マダイ仔魚の空気呑み込みと鰾の開腔及び脊椎前屈症との関連。日水誌 47, 1289-1294（1981）。
- 160) 坂本亘：“仔稚魚の日周活動リズムと生き残り過程”。水産動物の日周活動（羽生功，田畑満生編）。東京，恒星社厚生閣，1988，101-116。
- 161) 山崎英樹，塩澤聡，藤本宏：日本栽培漁業協会におけるブリ種苗生産の現状。水産増殖. 50(4), 503-506（2002）。
- 162) 塩谷茂明，赤澤敦司，阪倉良孝，中田久，荒川敏久，萩原篤志：仔魚飼育水槽内の流場の計測—マハタ飼育水槽の検討例。水産工学. 39(3), 205-212(2003).
- 163) Hunter, J.R. and Sanchez, C.: Diel changes in swimbladder inflation of the larvae of the northern anchovy, *Engraulis mordax*. *Fish. Bull. U. S.* 74, 847-855 (1976).
- 164) Helvik, J.V. and Walther, B.T.: Environmental parameters affecting induction of hatching in halibut *Hippoglossus hippoglossus* embryos. *Mar. Biol.* 116, 39-45 (1993).
- 165) Weihs, D.: Respiration and depth control as possible responses for swimming of northern anchovy, *Engraulis mordax*, yolk sac larvae. *Fish. Bull. U. S.* 78, 109-117 (1980).
- 166) Ellis, E.P., Watanabe, W.O., Ellis, S.C., Gonza, J. and Morikawa A.: Effects of turbulence, salinity and light intensity on hatching rate and survival of nassau grouper, *Epinephelus striatus*. *J. Appl. Aquacult.* 7, 33-43 (1997).
- 167) 岩谷芳自：キジハタのふ化およびふ化仔魚に与える通気の影響。栽培技研. 27(2), 59-61（1999）。
- 168) 福澄賢二・中田久：未開発種苗生産技術開発 カンパチの種苗生産試験。平成8年度長崎県水産試験場事業年報. 65-66（1997）。
- 169) Houde, E.D.: Developmental abnormalities of the flatfish *Achirus lineatus* reared in the laboratory. *Fish Bull.* 69(3), 537-544 (1971).
- 170) Seikai, T., Watanabe, T., Shimozaki, M.: Influence of three geographically different strains of *Artemia nauplii* on occurrence of albinism in hatchery-reared flounder *Paralichthys Olivaceus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 53(2), 195-200 (1987).
- 171) 原田泰志，金岩稔：“放流と漁獲”。水産動物の性と行動生態（中園明信編）。東京，恒星社厚生閣，2003，125-137。
- 172) 睦谷一馬：人工飼育におけるマコガレイ仔稚魚の成長と変態について。水産増殖. 36(1), 27-32（1988）。
- 173) Aritaki M. and Seikai T.: Temperature effects on early development and occurrence of metamorphosis-related morphological abnormalities in hatchery-reared brown sole *Pseudopleuronectes*

- herzensteini. Aquaculture.* 240, 517-530 (2004).
- 174) 有瀧真人: “飼育したカレイ科魚類の変態期に発現する形態異常とその防除に関する研究”. 京都大学博士論文. (2004).
- 175) 北島力, 林田豪助, 安元進: 人工採苗メイトガレイの体色異常. 長崎県水試報告. 13, 17-23 (1987).
- 176) 竹内俊郎: “健苗育成と栄養要求”, ヒラメの生物学と資源培養(南卓志, 田中克編). 東京, 恒星社厚生閣, 1997, 96-106.
- 177) 福所邦彦, 山本剛史, 青海忠久: ヒラメ白化個体出現に及ぼす飼育中の通気量の影響. 養殖研報告. 10, 53-56 (1986).
- 178) 杉山元彦, 中野宏, 矢野豊, 福田雅明, 村上直人: 異体類の健苗育成に関する研究 I - 白化など異常個体出現に及ぼす注水量の影響について. 北水研報告. 50, 63-68 (1985).
- 179) 青海忠久: 人工採苗マコガレイの体色異常個体の出現に及ぼす飼育密度および水槽の色の影響. 水産増殖. 33, 119-128 (1985).
- 180) Seikai T, Tanangonan, J.B. and Tanaka, M.: Temperature influence on larval growth and metamorphosis of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in the laboratory. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 52(6), 977-982 (1986).
- 181) Inui, Y. and Miwa, S.: Thyroid hormone induces metamorphosis of flounder larvae. *Gen.Comp.Endocrinol.* 60, 450-454 (1985).
- 182) Miwa, S. and Inui, Y.: Effects of various doses of thyroxine and triiodothyronine on the metamorphosis of flounder *Paralichthys olivaceus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 67, 356-363 (1987).
- 183) Tanangonan, J.B., Tagawa, M., Tanaka, M. and Hirano, T.: Changes in tissue thyroxine level of metamorphosing Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* reared at different temperatures. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 55(3), 485-490 (1989).
- 184) De Jesus E.G, Inui Y. and Hirano T.: Cortisol enhances the stimulating action of thyroid hormones on dorsal fin-ray resorption of flounder larvae *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 79, 167-173 (1990).
- 185) 堀田又治, 有瀧真人, 田川正朋, 田中克: 水温を変えて飼育したマガレイの変態期における甲状腺ホルモンの動態. 日水誌. 67(6), 1120-1121 (2001).
- 186) Hotta, Y., Aritaki, M., Tagawa, M. and Tanaka, M.: Changes in tissue thyroid hormone levels of metamorphosing spotted halibut *Verasper variegatus* reared at different temperatures. *Fish. Sci.* 67, 1119-1124 (2001).
- 187) 有瀧真人: カレイ類の変態と形態異常. 月刊海洋 27, 732-739 (1995).
- 188) Estevez A. and Kanazawa A.: Fatty acid composition of neural tissues of normally pigmented and unpigmented juveniles of Japanese flounder using rotifer and *Artemia* enriched in n-3 HUFA. *Fish. Sci.* 62(1), 88-93 (1996).
- 189) Kanazawa, A.: Nutritional mechanisms involved in the occurrence of abnormal pigmentation in hatchery-reared flatfish. *J. World Aquat. Soc.* 24, 162-166 (1993).
- 190) 三木教立, 谷口朝宏, 浜川秀夫, 山田幸夫, 桜井則広: ビタミンA投与ワムシ給餌によるヒラメ白化防除. 水産増殖. 38(2), 147-155 (1989).
- 191) 山本剛史, 福所邦彦, 岡内正典, 田中秀樹, Nagata, W.D., 青海忠久, 渡辺武: ヒラメの白化個体出現に及ぼす変態期の餌料の影響. 58(3), 499-508 (1992).
- 192) Takeuchi, T., Dedi, J., Ebisawa, C., Watanabe, T., Seikai, T., Hosoya, K. and Nakazoe, J.: The effect of  $\beta$ -carotene and vitamin A enriched *Artemia* nauplii on the malformation and color abnormality of larval Japanese flounder. *Fish. Sci.* 61(1), 141-148(1995).
- 193) Haga Y, Takeuchi T., and Seikai T.: Influence of all-trans retinoic acid on pigmentation and skeletal formation in larval Japanese flounder. *Fish. Sci.* 68, 560-570 (2002).
- 194) 萱場隆昭, 松田泰平, 杉本卓: マツカワ種苗生産. 平成14年度資源増大技術開発事業報告書. (2003).
- 195) Tabata, K.: Application of the chromosomal manipulation in aquaculture of hirame *Paralichthys olivaceus*. *Bull. Hyogo Pref. Fish. Exp. Stn.* 28, 1-134 (1991).
- 196) Seikai, T., Shimazaki, M. and Watanabe, T.: Estimation of larval stage determining the appearance of albinism in hatchery-reared juvenile flounder *Paralichthys olivaceus*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 53(7), 1107-1114 (1987).
- 197) 山平寿智: “遺伝的性決定と環境性決定”, 水産生物の性と行動生態(中園明信編). 東京, 恒星社厚生閣, 2003, 89-104.
- 198) Baroiller, J.F., Chourrout, D., Fostier, A. and Jalabert, B.: Temperature and sex chromosomes govern sex ratios of the mouthbrooding cichlid fish

- Oreochromis niloticus*. *J. Exp. Zool.* 281, 207-216 (1995).
- 199) Craig, J.K. and Foote, C.J.: Evidence for temperature dependent sex determination in sockeye salmon *Oncorhynchus nerka*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53, 141-147 (1996).
- 200) Patino, R., Davis, K.B., Schoore, J.E., Uguz, C., Strusmann, C.A., Parkaer, N.C. and Goudi, C.A.: Sex differentiation of channel catfish gonads: Normal development and effects of temperature. *J. Exp. Zool.* 276, 209-218 (1996).
- 201) Blazquez, M., Zanny, S., Carillo, M. and Pieferrer, F.: Effects of rearing temperature on sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *J. Exp. Zool.* 281, 207-216 (1998).
- 202) Lowartz, S.M., Beamish, F.W.H.: Novel perspectives in sexual lability through gonadal biopsy in larval sea lampreys. *J. Fish Biol.* 56, 743-757 (2000).
- 203) Colombo, G., Grandi, G.: Histological study of the development and sex differentiation of the gonad in the European eel. *J. Fish Biol.* 48, 493-512 (1996).
- 204) Rubin, D.A.: Effect of pH on sex ratio in cichlid and poecillid (Teleostei). *Copeia*, 233-235 (1985).
- 205) Yamamoto, E.: Studies on sex manipulation and production of cloned populations in hirame flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Bull. Tottori Pref. Fish Exp. Stn.* 34, 1-145 (1995).
- 206) Goto, R., Kayaba, T., Adachi, S. and Yamauchi, K.: Effects of temperature on sex determination in marbled sole *Limanda yokohamae*. *Fish. Sci.* 66, 400-402 (2000).
- 207) Goto, R.: Studies on environmental factors influencing sex determination in Plueronactid, Cyprinid and Salmonid Fishes. Ph.D thesis, Graduate School of Fisheries Science, Hokkaido University (2000).