

海洋生物工学科 2005 年研究業績

A. 研究発表

1. 論文

- (1) The immunotoxic effects of tributyltin on non-specific biodefense system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Ayako Nakayama, Yoko Kurokawa, Eijiro Kawahara, Naoko Kitayoshi, Hiroya Harino, Toshiaki Miyadai, Tadahisa Seikai and Shinichiro Kawai

Jap. J. Environ. Toxicol., 8 (1), 23-35 (2005)

The immunotoxic effects of tributyltin (TBT) exposure on the respiratory burst activities of neutrophils in head kidney (HK) and peripheral blood(PBL), and lysozyme activities of plasma were examined in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). After fish were exposed to TBT at the concentration of 5, 10 and 20 $\mu\text{g/L}$ for 5 days, and 5 $\mu\text{g/L}$ for 14 and 28 days, leukocytes obtained from HK and PBL were evaluated for the active oxygen production by flow cytometry (FCM). The contents (%) of neutrophils population in total leukocytes collected from HK of fish exposed to 20 $\mu\text{g/L}$ of TBT for 5 days was clearly increased compared with the control group. However, respiratory burst activity of neutrophils in the exposure group decreased compared with the control group. The increase of neutrophils from fish exposed to 5 $\mu\text{g/L}$ of TBT for relatively long term exposure (14 and 28 days) was observed only in PBL. These results indicate that high level exposure of TBT stimulated immune function of rainbow trout temporally, and neutrophils were actively produced in HK, however neutrophils themselves showed weak productivity of active oxygen. It was observed that lysozyme activities decreased in the group exposed to 10 $\mu\text{g/L}$ for 5 days, while TBT concentration in blood increased in accordance with the TBT concentration in water ranging from 0 to 10 $\mu\text{g/L}$. We supposed that immunotoxic effects of TBT were apparent both as immunostimulative and immunosuppressive, and these immune responses might be dependent on the TBT concentration of exposure.

- (2) Euryhaline *Brachionus* strains (Rotifera) from tropical habitats: morphology

and allozyme patterns

Tomonari Kotani, Atsushi Hagiwara, Terry W. Snell and Manuel Serra
Hydrobiologia, 546, 161–167 (2005)

The euryhaline rotifer *Brachionus* is a complex of sibling species. Although many investigations have been carried out in the past, the relationships among the Spanish species, the tropical SS strains and the clusters previously described, remained unknown. In this study, allozyme data for five populations from the tropics and two from Spanish lagoons — one of them *B. ibericus* and the other *B. rotundiformis* — were combined with data from the previous studies. Cluster analysis based on genetic distance allowed the 74 strains to be divided into two major groups. One group was associated with *B. plicatilis*-like strains, and the other group was associated with *B. rotundiformis* and *B. ibericus*. This latter group was divided into two clades. One of these clustered most with the S-morphotype strains and the *B. ibericus* species. The other clustered most closely with the tropical (SS) strains and the *B. rotundiformis* Spanish species. These results show a correspondence between the species description based on Spanish strains and the allozyme groups identified in a larger collection of strains.

(3) Performance of a closed recirculation system for larviculture of red sea bream,
Pagrus major

Tsutomu Tomoda, Hiroshi Fushimi and Hisashi Kurokura
Fisheries Science, 71(5), 1179–1181 (2005)

30 日間のマダイ種苗生産試験を、従来の掛け流し方式を対照区として閉鎖循環方式を用いて行った。閉鎖循環式システムは二つの 5 m³ 飼育水槽と受水槽、泡沫分離装置、生物濾過槽、循環ポンプおよび紫外線殺菌装置で構成した。生物餌料には L 型ワムシとアルテミア幼生を用いた。閉鎖循環式システムの水質は、掛け流し方式と同等レベルを維持でき、飼育は十分に可能であった。また、閉鎖循環式システムによる飼育成績は成長、生残面からも対照区と同等であった。試験結果から、閉鎖循環式システムのマダイ種苗生産への応用が証明された。

(4) Thermal tolerance traits of juveniles of the ayu *Plecoglossus altivelis* and Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* evaluated by their caudal fin cells
Kenji Sakamoto, Masamichi Nakajima and Nobuhiko Taniguchi
Aquaculture, 246, 93–99 (2005)

The thermal tolerances of the ayu *Plecoglossus altivelis* and Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* were evaluated by assaying the primary culture cells and free cells from their caudal fins (at 43°C for 2 h) in comparison with the whole body tolerances of juveniles (at 30°C for the ayu and 32°C for the Japanese flounder). Primary culture cells and free cells were assayed separately and similar results were obtained for each type of cells. The thermal tolerance values observed in the whole body were significantly correlated with the values obtained from both the primary culture cells and the free cells. These results suggest that there is a significant correlation between the *in vivo* and *in vitro* thermal tolerances in these fish. In the case of the ayu, significant differences were observed between two lines for the mean tolerance values evaluated by all three methods. This finding suggests that cell assays with primary culture cells or free cells from a caudal fin clip could be useful for evaluating the genetic variation and genetic mechanisms of thermal tolerance of fish.

(5) Immunostimulatory effects of fermented vegetable products on the non-specific immunity of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*

Takayuki Ashida and Eiji Okimasu

Fisheries Science, 71, 257–262 (2005)

The stimulatory effect of fermented vegetable product (FVP) upon the phagocytic and superoxide generation of leukocytes was studied in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. The phagocytic activity of casein-induced, intraperitoneal leukocytes was investigated and quantified, that is the activity significantly increased ($P < 0.05$ or < 0.01) by the addition of FVP beyond 3mg/kg body weight. Further analysis investigated the effect of FVP on superoxide generation in leukocytes. Established *in vitro* cytochrome c reduction assay was used to measure superoxide generation; reduced levels of FVP in assay samples had a profound effect on superoxide generation. FVP was also incorporated in commercial diets and fed to Japanese flounder for 4 weeks. The phagocytic activities and superoxide generation of peritoneal induced leukocytes were significantly higher ($P < 0.05$, < 0.01) in fish fed the FVP supplemented diet than fish fed the control diet. FVP feeding in fish had a significantly higher ($P < 0.05$) activity of lysozyme than in the control fish.

2. 報文

(1) 生分解性プラスチックの海洋における分解 (解説)

北口博隆

福山大学生命工学部年報 (4), 21-26 (2005-9)

プラスチックは我々の生活に欠かせない素材であるが、廃棄されたプラスチックは、環境中に長期間滞留して様々な問題を引き起こす。海洋においては、ゴーストフィッシングやプラスチックからの化学物質の漏出による海洋生物への影響が懸念されている。このような背景から、生分解性プラスチックの開発が進められており、すでに市場に出回るものも増えている。しかし、生分解性プラスチックの分解性能は、決められた条件における分解性を基準にしており、環境中における生分解の速度はばらつきが大きい。海洋からも生分解性プラスチック分解細菌が分離されているが、海洋では生分解性プラスチックの分解性は比較的低く、数ヶ月から数年の比較的長期間かけて分解すると考えられるため、安易な投棄は避けるべきである。

3. 口頭発表

(1) 紅藻スサビノリの硝酸同化に関与する遺伝子の解析

松本竜也・西村寿弘・山岸幸正・三輪泰彦

日本藻類学会第 29 回大会 (京都)、講演要旨集、p. 94 (2005-3)

窒素は植物の生長に不可欠な栄養元素である。一般に植物は、細胞内に吸収した硝酸イオンを硝酸還元酵素 (NR) によって亜硝酸イオンに還元し、さらに亜硝酸還元酵素 (NiR) によってアンモニウムイオンに還元してアミノ酸合成に用いることが知られている。海藻においては窒素同化機構に関する細胞・分子レベルでの研究は少なく、未知の部分が多い。そこで紅藻スサビノリを材料として窒素同化機構の解明を目指した。スサビノリの培養葉状体から調製した素抽出液から NR および NiR の活性を検出した。つぎに、かずさ DNA 研究所のスサビノリ EST 解析の情報をもとに 3'RACE 法により cDNA の単離を行った。その結果、単離した NR ホモログをコードする cDNA は 2,987 bp の長さで 892 アミノ酸残基からなる ORF を、NiR ホモログをコードする cDNA は 2,226 bp の長さで 598 アミノ酸残基からなる ORF をコードしていた。各遺伝子産物は緑藻 *Chlamydomonas* のものと高い相同性を示した (NR; 46.5%, NiR; 55.3%)。モチーフ検索の結果、NR ではモリブデンとヘムの各結合ド

メインが、NiR では鉄/イオウおよびシロヘム結合部位がそれぞれ推定された。さらにEMBL3 のスサビノリゲノムライブラリーから *NR* および *NiR* 遺伝子を単離して解析を行った。両遺伝子ともイントロンは存在しなかった。現在、*NR* および *NiR* 遺伝子の翻訳領域を用いた大腸菌内でのタンパク質の発現を試みている。

(2) 紅藻スサビノリのアルカリ性ホスファターゼ遺伝子の発現解析

三輪泰彦・吉水正則・山岸幸正

日本藻類学会第 29 回大会 (京都)、講演要旨集、p. 94 (2005-3)

大型海藻のリン酸環境の適応機構は不明な点が多い。そこで紅藻スサビノリのリン酸飢餓の環境変化に適応した遺伝子の発現調節機構の解明を目指した。我々はグリセロリン酸を含まない合成培地 (-Pi) で培養したスサビノリ葉状体において pH8 付近に至適 pH をもつアルカリ性ホスファターゼ (ALP) を見出した。そこで -Pi で培養した葉状体から硫酸分画、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー、限外濾過法により均一なタンパク質まで精製した結果、ALP が 76 kDa のポリペプチドで、二量体を形成していることが明らかになった。精製 ALP の N 末端のアミノ酸配列から 76 kDa のポリペプチドをコードする cDNA の部分クローンを取得した。次にオリゴキャップ法を用いて cDNA の 5' 末端を決定した結果、完全長 cDNA は、全体で 2,294 bp の長さで 705 アミノ酸残基 (75,159 Da) からなる ORF をコードしていた。推定上のプロセッシング部位のアミノ酸配列と精製 ALP の N 末端のものが完全に一致したことから成熟型は 658 アミノ酸残基 (70,570 Da) からなることが示唆された。また精製 ALP の *N*-グリカナーゼによる分解産物を解析した結果、ALP は 6 kDa の *N*-結合型糖鎖をもつ糖タンパク質であることが示唆された。さらにノーザン解析や定量的 PCR を行った結果、リン酸飢餓条件下で特異的に約 2,600 base の *ALP* 遺伝子の転写産物の誘導合成がみられた。

(3) 紅藻スサビノリの窒素吸収に関与する遺伝子の解析

山岸幸正・西村寿弘・三輪泰彦

日本藻類学会第 29 回大会 (京都)、講演要旨集、p. 94 (2005-3)

窒素は植物にとって多量に必要とされる重要な栄養元素である。海藻はほかの海洋

植物と競合しながら海水中の限定された窒素を吸収して有効に利用していると考えられるが、海藻の窒素吸収機構については不明な点が多い。本研究では、紅藻スサビノリの窒素吸収機構を分子レベルで解明することを目的とし、窒素吸収に関わるトランスポーター遺伝子の解析を行った。まず、EST 解析の情報をもとに 3'RACE 法により cDNA の単離を試みた。その結果、硝酸トランスポーター (NRT) ホモログをコードする cDNA は 1,876bp の長さで 479 アミノ酸残基からなる ORF を、一方アンモニアトランスポーター (AMT) ホモログをコードする cDNA は 1,833 bp の長さで 483 アミノ酸残基からなる ORF をコードしていた。各遺伝子産物を相同性検索したところ前者は珪藻類やヒメツリガネゴケの NRT、後者は細胞性粘菌、シロイヌナズナやイネの AMT と比較的高い相同性を示した (それぞれ ~45.2%, ~48.6%)。スサビノリの NRT は NRT2 ファミリーに属する高親和性の NRT であると推定された。スサビノリの NRT および AMT の構造を TMHMM プログラムを用いて推定したところ、それぞれ 12 回および 11 回の膜貫通領域をもつ膜タンパク質であることが示唆された。つぎに、 λ EMBL3 のスサビノリゲノムライブラリーから *NRT* 遺伝子を含む DNA クローン を単離し、解析を行った。本遺伝子にはイントロンが含まれなかった。

(4) 紅藻スサビノリのリン酸トランスポーターホモログ遺伝子の構造と発現

岸田将義・山岸幸正・三輪泰彦

日本藻類学会第 29 回大会 (京都)、講演要旨集、p. 94 (2005-3)

大型海藻は恒常的にリンが飢餓状態にある環境下でも生存できるしくみをもつと考えられる。そこで紅藻スサビノリのリン酸飢餓状態に対する適応機構を分子レベルで解明することを目指した。今回、リン酸飢餓に応答して発現するリン酸トランスポーターホモログ遺伝子を単離したので報告する。Degenerate プライマーを用いた 3'-RACE 法でアルカリ性ホスファターゼ遺伝子を単離する過程でリン酸飢餓条件によって特異的に増幅される 1.8 kb の DNA 断片を検出した。この断片の塩基配列を決定し、さらにオリゴキャップ法により cDNA の 5' 末端を決定した結果、全長 2,020 bp からなる cDNA は 615 アミノ酸残基からなる ORF をコードしていた。ホモロジー検索の結果、この推定アミノ酸配列はアカパンカビや緑藻の *Chlamydomonas* および *Tetraselmis* のリン酸トランスポーターとそれぞれ相同性 (31.8%, 44.4%, 31.3%) を示した。次に遺伝子の構造を解析した結果、リン酸トラン

スポーター (*PHT*) 遺伝子内に 1 つのイントロン (323 bp) が存在することが明らかになった。ノーザン解析を行った結果、リン酸飢餓条件下で特異的に約 2,600 base の転写産物の誘導合成がみられた。現在、タンパク質を同定するために中央部分にある親水性領域を大腸菌内で発現させ、組換えタンパク質に対する抗体を作製中である。

(5) 紅藻スサビノリのリン酸結合タンパク質遺伝子の発現解析

河野貴文・矢野陽子・山岸幸正・三輪泰彦

日本藻類学会第 29 回大会 (京都)、講演要旨集、p. 94 (2005-3)

大型海藻の環境適応機構の分子レベルでの研究は全く皆無である。そこで紅藻スサビノリを研究対象としてリン酸飢餓に対する適応機構の解明を目指した。我々は、これまでにグリセロリン酸を含まない合成培地 (-Pi) で培養したスサビノリ葉状体において大量に誘導合成される 32 kDa のタンパク質を検出した。このタンパク質の機能を解析するために -Pi で培養した葉状体から硫酸分画、ゲル濾過法、限外濾過法により 32 kDa のタンパク質を均一なタンパク質まで精製した。精製タンパク質の N 末端のアミノ酸配列をもとに合成した degenerate プライマーを用いて 3'-RACE を行い、cDNA の部分クローンを得た。さらにオリゴキャップ法とプライマー伸長法を用いて cDNA の 5' 末端を決定した結果、完全長 cDNA は、全体で 1,231 bp の長さで 323 アミノ酸残基からなる ORF をコードしていた。ホモロジー検索の結果、323 アミノ酸残基からなるタンパク質は海産の藍藻や大腸菌のリン酸結合タンパク質とそれぞれ高い相同性を示した。そこで [³²P] 正リン酸と精製タンパク質の相互作用をゲル濾過法によって解析した結果、タンパク質溶出ピーク画分に放射能活性が検出されたことから 32 kDa のタンパク質がリン酸結合タンパク質 (PBP) であると結論した。ノーザン解析とウェスタン解析の結果、*PBP* 遺伝子はリン酸飢餓によって発現誘導されることが明らかになった。

(6) 地下海水を利用した海藻陸上養殖—水質が海藻生長に与える影響

江端弘樹・鳶田智・四ツ倉典滋・佐藤義夫・平岡雅規・山岸幸正

日本藻類学会第 29 回大会 (京都)、講演要旨集、p. 94 (2005-3)

地下海水は水温や塩分が年間を通してほぼ一定で、生物の生育に必要な栄養分が豊

富であるため、魚介類の飼育、藻類の培養など様々な分野での利用が期待されている。我々は、昨年度より、静岡県静岡市において地下約 50m から汲み上げられている清浄な地下海水を用いて、海藻の陸上養殖技術の開発試験を実施している。

周年に渡る、水温、塩分、pH、ORP、栄養塩（三態 N、P、Si）、マンガンおよび鉄などの測定を行った結果、この地下海水は水温が約 20℃ で周年安定しており、無酸素で、硫化水素、鉄、マンガン、三態窒素などを豊富に含んでいること、中でも、マンガンとアンモニウム塩が非常に高濃度（それぞれ 3.69–4.28 ppm, 71.2–403 μM）であることが明らかとなった。イバラノリ属、コンブ属、イワヅタ属などの数種の海藻を地下海水を用いて予備的に室内培養実験を行った結果、数種において生長阻害傾向が見られた。

そこで、地下海水中の濃度が特に高いマンガンとアンモニウム塩に着目し、これらをさまざまな濃度で添加した海水培地で海藻を培養し、これらの成分が藻体生長に与える影響について報告する。

（7）海洋細菌によるノリ付着珪藻 *Tabularia affinis* 殺滅のための培養条件の検討

石田祐三郎、満谷淳、北口博隆

平成 17 年度日本水産学会大会（東京）、講演要旨集、p. 254（2005–4）

養殖ノリ葉体に付着して品質低下を引き起こす珪藻 *Tabularia affinis* は、従来行われている酸処理では除去が困難である。そこで、珪藻殺滅細菌を用いた除去技術の開発を目指し、沿岸海域から分離した珪藻殺滅細菌 *Pseudoalteromonas* sp. A25 株を用い、珪藻 *T. affinis* を殺滅する条件を培養実験によって検討した。その結果、*Pseudoalteromonas* sp. A25 株は溶存態有機物（DOC）の存在下では *T. affinis* を殺滅せず、DOC が枯渇すると *T. affinis* を殺滅した。このことから、*Pseudoalteromonas* sp. A25 株は、利用可能な DOC が枯渇すると珪藻を殺滅して、その細胞内容物を利用して増殖すると考えられた。

（8）包括固定化した殺藻細菌の赤潮原因藻に対する殺藻効果

北口博隆、満谷淳、石田祐三郎

第 8 回マリンバイオテクノロジー学会大会（熊本）、講演要旨集、p. 84（2005–5）

元来自然環境中に生息する赤潮原因藻を殺滅する細菌（殺藻細菌）を用いた、「環境にやさしい」生物的赤潮防除法の確立を目指し、殺藻細菌を固定化したリアクターの構築を試みた。珪藻殺滅細菌 *Pseudoalteromonas* sp. A25 株を寒天ゲルに包括固定化した担体 150 g を、水中ポンプとカラムからなるリアクターに充填し、

天然海水 20 l に珪藻 *Skeletonema costatum* を細胞密度 1×10^5 cells/ml で接種した 30 cm 角水槽中に設置した。ポンプを流速 1.9 l/min で稼動しながら 1 週間培養し、経時的に *S. costatum* の細胞密度を計測して殺藻効果を判定した。細菌固定化担体を充填したリアクターを設置した水槽では、培養開始後 2 日で *S. costatum* は死滅し、平板法では A25 株と考えられる黄色いコロニーが 1×10^5 cells/ml 以上観察された。このことから、殺藻はリアクターからの細菌の漏出による実験系内の殺藻細菌の増加によるものと推察され、本リアクターは閉鎖海域において、殺藻細菌を連続的に散布することで赤潮原因藻を殺滅する効果を有するのではないかと考えられた。

(9) トラフグ口白症に対する注射ワクチンの有効性

福岡利広、河原栄二郎、楠田理一

平成 17 年度日本魚病学会大会（津）、講演要旨集、p. 33 (2005-10)

これまでに、本症病魚磨碎濾液を不活化してトラフグに接種すると、本症 に対して感染防御効果が得られることを明らかにした。そこで、クサフグ脳由来の初代培養細胞に病魚磨碎濾液を接種して培養後、上清を不活化し、その感染防御効果について調べた。供試魚には体重約 21 g のクサフグを用い、25 °C で飼育した。初代培養細胞は供試魚の脳を 0.2 % トリプシン処理後、FBS 5 % を含む L-15 培地と MEM 培地の混合培地を用い、 1×10^6 cells / ml に調整した。調整後、25 °C で 72 h 培養し、病魚磨碎濾液を接種した。接種後、25 °C で 1 w 培養後の上清をメンブレンフィルターで濾過してウイルス液とした。ウイルス液の病原性は、供試魚にウイルス液 0.1 ml を筋肉内接種し、斃死の有無を観察して調べた。ワクチンはウイルス液にホルマリン 0.2 % を添加し、4 °C で 30 h 静置して作製した。ワクチンの有効性は、供試魚にワクチン 0.1 ml を腹腔内接種して免疫し、3 w 後にウイルス液 0.1 ml を筋肉内接種し、斃死の有無を観察して検討した。また、免疫後に頭腎の抗体産生細胞数を測定したさらに、中和抗体価は段階希釈した血清とウイルス液を等量混合し、25 °C で 2 h および 4 °C で一晩静置後、培養細胞に接種して測定した。ウイルス液を接種した供試魚はすべて斃死し、またホルマリン処理したウイルス液を接種した供試魚はすべて生存した。したがって、クサフグ脳由来の初代培養細胞でウイルスの増殖が可能で、ウイルスはホルマリンで不活化されと考えられる。ウイルス液接種で攻撃後の生存率はワクチン接種区のほうが対照区と比べて高い値となった。また、ワクチン接種区では頭腎の抗体産生細胞数は増加し、血中抗体価は上昇した。以上のことから、クサフグ脳由来の初代培養細胞で培養したウイルスを不活化して腹腔内接種すると、本症に対して感染防御効果が認められ、これをワクチ

ンとして応用できると推察される。

(10) ブリおよびヒラメに対するアジュバント添加ノカルジアワクチンの有効性

河原栄二郎、楠田理一、川上秀昌

平成 17 年度日本水産学会中国・四国支部大会（宇和島）、講演要旨集、p. 12
(2005-10)

(11) Cultivation and application of copepod and cladoceran for larval rearing in Japan: past, present and future

Tomonari Kotani, Hiroshi Fushimi and Hisahide Suzuki

Larvi 2005 -4th Fish & Shellfish Larviculture Symposium, Ghent, Belgium, 2005-9.

Zooplankton as live food for marine finfish larviculture are still important in aquaculture. Although *Artemia* nauplii had been introduced as live food since the 1940s, it was already known that their nutrition, especially DHA-EPA contents, was so poor for larval fishes to culture. And *Artemia* nauplii were too large (400 μm -) to apply to larval fishes of some species just after hatch. In order to search the smaller size and more abundant nutrition of live food, various species of zooplankton used to be attempted in marine larval rearing worldwide, also in Japan. Many species of zooplankton were collected from natural seawaters, and then fed on larval fishes directly in hatcheries. Although their nutritional value for larval fishes was abundant, it was difficult to culture most of them. The harvested quantities from natural seawaters fluctuated and the supplies for larvae, therefore, were unstable. It was possible to culture some species of copepod and cladoceran in the open pond. Those cultures were also unstable, and they needed the large area, such as an open pond, and a great deal of labor to maintain them.

Euryhaline rotifer *Brachionus* was introduced as first live food for larval fishes in the 1960s in Japan. Rotifer was easier and more stable to be cultured and many hatcheries began to use it as live food. In the 1990s, most hatcheries of the world were using rotifer and *Artemia* as live food for larval fishes, and copepod and cladoceran seldom got used. Moreover, micro artificial diet for larval fishes were developed and the feeding system mainly performed in present, rotifer-*Artemia*-micro artificial diet, was established. In Japan, many studies of feeding or culturing of copepod and cladoceran used to be performed but not so many in present. Little hatcheries in Japan are feeding copepods collected from wild to larval fishes, but many avoid it to prevent fishes from the risk, such

as disease including VNN. Therefore most hatcheries are according to the feeding system, rotifer-*Artemia*-artificial diet.

Recently, *Artemia* eggs have got difficult to be supplied stably and they have got more expensive. Copepod and cladoceran are expected as the replacement live feed of *Artemia*. Frozen copepod gets distributed commercially and used as the supplemental feed during fed on *Artemia*. Although the use of frozen copepod is getting to spread, it is still expensive and its quality is various by products. Moreover, some problems, e.g. skeletal deformity and malpigmentation, have been still insoluble with the feeding system, rotifer-*Artemia*- artificial diet, or the improvement of the nutrition contents of the present feeding system. Some studies got rid of the malpigmentation by feeding on copepod, and some reported the success of the cultivation of small mouth larval fish such as grouper larvae by feeding on the nauplii of copepod. In each study, copepod was collected from open seawater, or cultured in the open pond. In order to supply copepod and cladoceran stably with good quality to larval fishes, it is necessary to develop in-door intensive culture technology.

The followings are important to develop the intensive culture of copepod and cladoceran and to supply them stably: 1) screening the species of micro algae and concentration of the culture, 2) how to maintain the culture water quality and 3) mass production of their resting eggs for storage.

(12) Developmental stage and morphogenesis of finfish larvae, with special reference to improvement of larval health

Hiroshi Fushimi, Tomonari Kotani, Hisahide Suzuki and Masahiro Hayashi

Larvi 2005 - 4th Fish & Shellfish Larviculture Symposium, Ghent, Belgium, 2005-9.

Introduction

To a greater or less, there are deformities in hatchery-raised juveniles. It is the key factor for survival in the field after release and for stocking effectiveness. It is also key issue of severe mortality and low market price in aquaculture industry. Fish quality, or ecological robustness, is defined as the ability to adapt to natural conditions at release site. The objective of the production of the hatchery-raised seed is to supply high quality seeds for stock enhancement and aquaculture. One of the main causes of deformity should be some nutritional condition of live feed, such as Vitamin A, D, and DHA concentration. We are now conducting the research and development on determination of suitable nutritional

condition of live food, such as rotifer and *Artemia*, for finfish larviculture.

Materials and methods

In first, we conducted the experimental larviculture of *Paralichthys olivaceus*, *Inimicus japonicus*, and *Takifugu rubripes* with gradient of stocking density of newly hatched embryo, the suitable stocking density of newly hatched embryo. Second, we examined the relative growth of *P. olivaceus*, *I. japonicus*, *T. rubripes*, *Seriola quinqueradiata*, *Seriola dumererili* and *Pagrus major*. Third, we characterized developmental stages of larvae using the combination of relative growth, external and skeletal morphogenesis. Finally, we conducted experimental larval rearing using live food with different Vitamin A and HUFA concentration, determined the safety level of Vitamin A concentration level of live feed, such as rotifer, *Artemia* and their combination.

Results and discussion

There were remarkable density dependent growth and survival performance in the experimental larviculture on *P. olivaceus* and *I. japonicus*. Outbreak of biting behavior of larval *T. rubripes* that should be one of the causes of severe mortality was also density dependent. We clarified the presence of the suitable stocking density defined as resulted highest growth and survival for finfish larviculture. The suitable stocking density of hatched out embryo were 20,000 inds/m³ for *P. olivaceus*, 15,000inds/m³ for *I. japonicus* and 5,000inds/m³ for *T. rubripes*.

Usually, relative growth of finfish had multiple allometric regression curves. We defined the developmental stage according to the characteristics of relative growth in the course of larval development, and distinguished the special features of morphological and skeletal development. The course of development of finfish larvae divided 7-8 stages. The definition of developmental stage differs from the morphological classification of development. Cartilages of skull and shoulder girdle appeared at the stage of free embryo in common. These components developed using endogenous nutrients. Another skeletal component appeared and developed using exogenous nutrients. The causes of skeletal deformities should classify by endogenous/maternal effects and exogenous one.

We conducted the experimental larviculture of *P. olivaceus*, *I. japonicus* and *P. major* to clarify the effect of vitamin A concentration on occurrence of deformity. To evaluate the effect of rotifer feeding period, we used L-rotifer cultured by *Chlorella* enriched by *Nannochloropsis* and *Artemia* enriched by Marine omega^R as control. For treatment, we used L-rotifer enriched by experimental agents with vitamin A concentration of 150IU/g, 750IU/g, 1500IU/g and 7500IU/g, respectively, and *Artemia* enriched by Marine omega^R. In the case of *P. olivaceus*, there were no significant differences of the

performance of larviculture in the course of rotifer feeding period. In the case of using rotifer with 212IU/g vitamin A concentration reflected 750IU/g vitamin A concentration of enrichment agent, lowest skeletal abnormality occurrence rate was achieved at 38-46 DAH, just after metamorphosis. Specific skeletal abnormality appeared at the case of excess and deficiency of vitamin A concentration, respectively. We also conducted the experimental larviculture using L-rotifer enriched by *Nannochloropsis* and *Artemia* enriched by experimental enrichment agents with gradient of vitamin A concentration, such as 150IU/g, 750IU/g, 1500IU/g, and 7500IU/g, respectively. There were no significant differences of the performance of larviculture in the course of rotifer feeding period. In the course of *Artemia* feeding period, highest growth rate and lowest malpigmentation achieved in the case of feeding *Artemia* with 325IU/g vitamin A concentration reflected 750IU/g vitamin A concentration of enrichment agent. Skeletal abnormality occurrence rate was lowest in the same case, also. Excess and deficiency of vitamin A of live feed affected the health of hatchery-raised juveniles of *P. olivaceus*, *I. japonicus* and *P. major*. In the case of *P. olivaceus*, vitamin A concentration of rotifer should be most important key issue for occurrence of skeletal deformity. Rotifer with Vitamin A concentration of 212IU/g reflected 750IU/g of enrichment agent was recommended for improvement of the health of hatchery-raised juveniles. Vitamin A concentration of *Artemia* (50-2831IU/g) did not cause skeletal deformity of hatchery-raised *P. olivaceus* juveniles raised by rotifer with Vitamin A of 212IU/g. Safety level of Vitamin A concentration of *Artemia* for *P. olivaceus* should be higher than reported level of 50 IU/g *Artemia* on a dry matter basis.

(13) How to improve the health and quality of finfish larvae?

Hiroshi Fushimi

First Regional Workshop on Enrichment and Techniques for Enrichment of Live Food for Use in Larviculture, Urmia, Iran. 2005-3.

While stock enhancement and aquaculture have their origins in antiquity, development of modern techniques began in the late 1800s and the beginning of the 1900s. In 1887, the first rearing trial of red sea bream *Pagrus major* was carried out in Okayama Prefecture, and Kajiyama and Nishioka attained successful larviculture in 1930. In 1961, the Japan Fisheries Agency (JFA) established a plan to promote coastal fisheries by stock enhancement. This was the first step of modern research and development of hatchery technology for intensive larviculture Japan. The Seto Inland Sea Fish Farming

Association (SISFA) was established in 1963 and merged with Japan Sea Farming Association (JASFA) in 1978, with the goal of developing the needed technology for stock enhancement. Since the establishment of SISFA, the goal of development of marine finfish and shellfish hatchery technology in Japan is developing intensive mass production system.

In the late 1970s, the technology of artificial seed production of red sea bream *Pagrus major* had been established, and intensive mass production system of red sea bream developed until the middle of 1980s. The intensive mass production technology of red sea bream supported the development of hatchery technology for other finfish species.

The first runner of development of hatchery technology of Crustacea was Kuruma prawn *Penaeus japonicus*, and second one was swimming crab *Portunus trituberculatus*.

The hatchery-raised red sea bream have dominated the finfish aquaculture trade. Hatchery-raised red sea bream juveniles for stock enhancement and aquaculture numbered 63 million individuals in 1988. A successfully average of 96 million red sea bream juveniles was successfully raised in hatcheries, both of belonging to official and private bodies, each year from 1993 to 1998. Of these 30 million individuals were used for stock enhancement and 67 million for aquaculture.

Hatchery-raised juveniles are used not only for stock enhancement but also aquaculture. The number of hatchery-raised seed for stock enhancement and aquaculture were 726 million and 418 million, respectively.

The aquaculture of many species relies upon a supply of hatchery-raised finfish juveniles. The capture of natural seedlings and young red sea bream for aquaculture has drastically decreased due to the progress of artificial seed production. Hatchery-raised finfish seedlings, ocellate puffer, striped jack, and Japanese flounder, supply the demands of aquaculture.

The development of hatchery-technology was assisted by progress made in early developmental biology, physiological studies of fish larvae, nutrition requirement, and rotifer production techniques. Remarkable progress has been made in developing labor-saving mechanizations such as the automation of feeding and bottom sweeping equipment, seedling transfer and counting pump systems, and apparatus for continuous culturing of rotifers and water quality monitoring.

The development of enriched live food and micro-formulated diets has resulted in improved survival rates and fish condition for hatchery-raised juveniles. Nutritional studies on finfish and shellfish larvae have contributed to recent progress in improving health and quality of hatchery-raised juveniles.

To a greater or less, there are deformities in hatchery-raised juveniles. It is the key factor for survival in the field after release and for stocking effectiveness. It is also key issue of severe mortality and low market price in aquaculture industry. Fish quality, or ecological robustness, is defined as the ability to adapt to natural conditions at release site. The objective of the production of the hatchery-raised seed is to supply high quality seeds for stock enhancement and aquaculture. The key concept is improving fish quality, i.e., increasing the aptitude of fish for release, so that fewer fish needed to be produced in the hatchery, and thus, decreasing the cost for stock enhancement and aquaculture.

One of the main causes of deformity should be nutritional condition, such as Vitamin A, D, and DHA concentration. We are now conducting the research and development on determination of suitable nutritional condition of live food, such as rotifer and *Artemia*, for finfish larviculture. In first, we decided suitable stocking density of newly hatched embryo. Second, we decided and characterized developmental stages of larvae under laboratory condition using the combination of allometric growth and morphogenesis. Finally, we conducted experimental larval rearing of using live food with different Vitamin A and HUFA concentration. Safety level of Vitamin A concentration for Japanese flounder should be higher than reported level. Nutritional condition of rotifer should be more important than that of *Artemia* for improvement of health and quality of hatchery-raised finfish juvenile.

- (14) Developmental stage and morphogenesis of hatchery-raised finfish larvae – as a fundamental basis of prevention against skeletal deformity.

Hiroshi Fushimi

FWO Contact Group “Nutritional and Microbial Studies in Larval Aquaculture”
Workshop “Deformities in Fish Larvae”, Brussels, Belgium. 2005–3

- (15) How to improve the stocking effectiveness?

Hiroshi Fushimi

Larvi 2005–4th Fish & Shellfish Larviculture Symposium, Ghent, Belgium,
2005–9.

- (16) 人工飼育下におけるブリ仔稚魚の相対成長に基づく発育段階

工藤雅之、友田努、鈴木久英、伏見浩

平成 17 年度日本水産学会大会（東京）、講演要旨集、p. 106（2005–4）

【目的】人工飼育下でのブリ仔稚魚期の全長に対する各部位の相対成長を明らかにすることによって、発育段階を決定することを目的とした。

【方法】飼育条件下におけるブリ仔稚魚の発育段階を全長に対する体長，体高，頭長，躯幹長，尾部長，上顎長および吻長の割合から相対成長係数を算出し、それに基づいて発育段階を区分した。

【結果】発育段階を9つのステージに区分した。St. 0：孵化胚から頭部骨格の軟骨要素が出揃うまでに相当し、吻長の相対成長が顕著な優成長を示した。St. 1-1：仔魚が開口する時期に相当し、体長の相対成長係数が0.98から0.86へ移行した。St. 1-2：神経弓門と血管弓門の出現が完了する時期に相当し、上顎長が優成長から等成長を示し、吻長でも優成長から等成長へ変化した。St. 2：脊索末端の上屈が始まる時期に相当し、頭長が優成長から等成長へ変化した。St. 3：脊柱の骨格要素が出揃う時期に相当し、体高が優成長から等成長へ、躯幹長が劣成長から等成長へ、尾部長が等成長0.85から0.91へ変化した。St. 4：脊柱の硬骨化の完了時期に相当し、躯幹長の係数が等成長0.85から1.14へ移行した。St. 5-1：仔魚膜が消失して稚魚となる時期に相当し、体長が等成長0.86から1.04へ移行した。St. 5-2：黒色横帯が出現する時期で、体高が等成長1.04から0.94へ移行した。St. 6：尾部長が等成長から優成長へ変化した、全ての骨格系が硬骨化を完了して若魚となった。

(17) 人工飼育下のブリ仔稚魚発育段階における外部・骨格形成

工藤雅之、友田努、鈴木久英、伏見浩

平成17年度日本水産学会大会（東京）、講演要旨集、p. 107（2005-4）

【目的】ブリの人工種苗生産では発育形成過程を知る上で、外部・骨格形成について把握することは重要である。本研究は、先に規定した発育段階を基に、ブリ仔稚魚の外部・骨格形成について明らかにすることを目的とした。

【方法】標本に透明化二重染色を施し、描画装置付実態顕微鏡を用いて観察と描画を行った。明らかとなった発育段階に基づいて外部形態と骨格の特徴を記載した。

【結果】発育段階を9つのステージに区分した。St. 0（TL 2.72～3.73 mm）：孵化直後の全長3.0～3.4 mmの胚は筋節数14+13=27であり、骨格要素は認められなかった。全長3.7～4.0 mmには黒色色素胞が出現し、頭部骨格の軟骨要素が出揃った。St. 1-1（TL 3.73～5.64 mm）：全長3.9～4.2 mmに開口して仔魚となった。神経弓門と血管弓門が出現した。準下尾骨が出現した。St. 1-2（TL 5.64～6.42 mm）：神経弓門と血管弓門の出現が完了した。脊索の表面に凹凸が出現し、椎間板様組織の

形成が始まった。St. 2 (TL 6.42~6.88 mm)：脊索末端の上屈が始まった。St. 3 (TL 6.88~13.16 mm)：脊索末端の上屈が完了した。脊柱の骨格要素が出揃った。下尾骨板が形成された。St. 4 (TL 13.16~14.68 mm)：筋節がV型からW型へ変化し、脊柱の硬骨化が完了した。St. 5-1 (TL 14.68~17.31 mm)：各骨格要素および鰭条が定数に達し、仔魚膜が消失して稚魚となった。St. 5-2 (TL 17.31~29.38 mm)：黒色横帯が出現した。St. 6 (TL 29.38~64.52 mm)：鰭条を含め全ての骨格系が硬骨化を完了して若魚となった。

(18) 生物餌料中のビタミンA含量によるヒラメ仔稚魚の骨格異常出現

大後戸貴浩、岡田貴之、鈴木久英、小谷知也、雪野継代、林雅弘、伏見浩
平成17年度日本水産学会大会（東京）、講演要旨集、p.101（2005-4）

【目的】ヒラメの骨格異常の発生にはビタミンA（以下VA）の過不足が影響する。本研究は、VA含量の異なる栄養強化剤で培養した生物餌料を給餌することによって、骨格異常の少ない生物餌料中の安全なVA含量を定めることを目的とした

【方法】VA含量を4段階（150~7,500 IU/g）に調製した栄養強化剤を用意した。ワムシをナンノクロプシス（*Nannochloropsis* sp.）及びアルテミアをマリンω（日清ファインケミカル）で強化し仔稚魚に給餌した区を対照区とし、以下の3実験を実施した。I) ワムシのVA強化条件だけを変え、アルテミアはマリンωで強化。II) ワムシはナンノで強化しアルテミアのVA強化条件だけを変える。III) ワムシのVA強化条件を750 IU/gとし、アルテミアのVA強化条件のみを変える。得られたサンプルに二重染色を施し、骨格を観察した。各試験区間で骨格異常の発生率を比較した。

【結果】ワムシのVA強化条件のみを変えた場合、VA含量750 IU/gと対照区の骨格異常発生率が低かった（それぞれ57%, 61%）。また、7,500 IU/gの区では骨格異常発生率が高く（100%）、尾骨に特徴的な異常が認められた。アルテミアのVA強化条件のみを変えた場合、7,500 IU/gの区で骨格異常発生率が高く（90%）、椎体に特徴的な異常が認められた。また、ワムシを750 IU/gに設定した場合、アルテミアのVA強化条件を変えても骨格異常発生率に差はほとんど無く、椎体や尾骨に特徴的な異常も発生しなかった。したがって、ワムシの栄養強化剤中のVA含量を750 IU/gとして飼育を行えば骨格異常の発生が抑えられ、同条件でワムシを強化すれば、アルテミアに対してはどのVA強化条件でも骨格異常の発生が抑えられると判断した。

(19) ヒラメ仔稚魚の飼育成績に及ぼす生物餌料中のビタミンA含量の影響

大後戸貴浩、岡田貴之、鈴木久英、小谷知也、雪野継代・林雅弘、伏見浩
平成17年度日本水産学会大会（東京）、講演要旨集、p. 101（2005-4）

【目的】ヒラメの種苗生産過程では仔稚魚の骨格異常の発生による飼育成績の低下が数多く報告されている。骨格異常発生にはビタミンA（以下VA）の過不足が原因となることが知られているが、ヒラメ仔稚魚を安定的に生産できるVA量は明らかでない。本研究は健全なヒラメ種苗を育成する為に生物餌料中の安全なVA含量を定めることを目的とした。

【方法】VA含量を4段階（150～7,500 IU/g）に調製した栄養強化剤を用意した。ワムシをナンノクロロプシス（*Nannochloropsis* sp.）及びアルテミアをマリンω（日清ファインケミカル）で強化し仔稚魚に給餌した区を対照区とし、以下の3実験を実施した。I) ワムシのVA強化条件だけを変え、アルテミアはマリンωで強化。II) ワムシはナンノで強化しアルテミアのVA強化条件だけを変える。III) ワムシのVA強化条件を750 IU/gとし、アルテミアのVA強化条件のみを変える。5日毎にサンプルを採取し、全長と生残の測定を行った。各試験区の全長と生残を観察し、各試験区間で比較した。

【結果】ワムシのVA強化条件を変えた場合、VA含量750 IU/gの試験区での成長が良好であった。また、アルテミアのVA強化条件のみを変えた場合、同じく、750 IU/gの条件で成長及び生残共に良好であった。しかし、ワムシのVA強化条件を750 IU/gに設定した場合、アルテミアのVA強化条件を変えても、成長、生残に差は生じなかった。但し、対照区に比べ、試験区での生残が改善された。したがって、VA含量を750 IU/gに調製した強化剤で強化したワムシを給餌すれば成長が良く、高い生残率でヒラメを飼育できる。また、同条件でワムシを強化すれば、アルテミアに対しては、どのVA強化条件でも、ヒラメ仔稚魚の成長、生残は良好であると判断した。

(20) 人工飼育下の外部形態からみたカンパチ仔稚魚発育段階の形態形成（予報）

新谷祐一、工藤雅之、鈴木久英、小谷知也、伏見浩

平成17年度日本水産学会大会（東京）、講演要旨集、p. 106（2005-4）

【目的】カンパチ仔稚魚の形態変化についての記載はあるものの、発育段階の区分に沿った記載は無い。そこで、本研究では、人工飼育されたカンパチ仔稚魚の相対成長に基く発育段階の区分を用い、各段階における外部形態の特徴を明らかにした。

【方法】2004年の飼育によって得られたカンパチ仔稚魚の標本から、各発育段階に相当するものを選出し、描画装置付き実体顕微鏡を用いて外部形態のスケッチをし

た。

【結果】発育段階を0～9の10段階に区分した。ステージ0 (TL 2.4～3.8 mm) : 孵化直後の胚は、長精円形の卵黄が頭部前方に突出していた。卵黄表面には格子状の模様があり、油球の一部が卵黄表面より突出していた。黄色素胞が体の各部に点在した。ステージ1 (TL 3.8～4.7 mm) : 開日して仔魚となつた。卵黄、油球共にほぼ吸収されるが胸鰭直下にわずかに残っていた。眼の黒化が開始し、黒色素胞が体の背、腹側に分布し、黄色素胞は肛門周辺で観察できた。ステージ2 (TL 4.7～6.2 mm) : 黒色素胞が体の背、腹側に樹月旨状に広がった。その後、各鰭の基底部が発達し、原基が出現した。ステージ3 (TL 6.2～7.9 mm) : 脊索末端の上屈が開始した。各鰭の基底部の発達と鰭条発達が観察できた。ステージ4 (TL 7.9～9.4 mm) : 脊索末端の上屈途中で各鰭条が伸長し、尾鰭が出来た。ステージ5 (TL 9.4～10.0 mm) : 全ての鰭条が完成されるが、肛門前方に仔魚膜が少し残っていた。ステージ6 (TL 10.6～14.6 mm) : 黒色素叢は腹部に分布し、体全体に黒色素が点在した。ステージ7 (TL 14.6～18.5 mm) : 黒色素が全体に点在し、尾柄部に黒色素横帯が観察できた。筋節がV型からW型になり、仔魚膜も消失し稚魚になった。ステージ8 (TL 18.5～23.8 mm) : 胸鰭後方と尾柄部に黒色素横帯が観察できた。ステージ9 (TL 23.8～59.3 mm) : 8本の黒色素横帯が出現し、その後、3本の色素縦帯が観察できた。

(21) 人工飼育下におけるカンパチ仔稚魚の相対成長に基く発育段階区分

新谷祐一、工藤雅之、鈴木久英、小谷知也、伏見浩

平成17年度日本水産学会大会（東京）、講演要旨集、p. 106（2005-4）

【目的】カンパチは人工種苗生産種として期待の大きい魚種であるが、現在までのところ量産技術が確立されたとは言い難い。本研究では、飼育技術確立の為の基礎的知見を得るために、人工飼育下におけるカンパチ仔稚魚の発育段階の区分を行った。

【方法】2004年の飼育によって得られたカンパチ仔稚魚の標本を用いて、全長、標準体長、頭長、軀幹長、尾部長、体高を測定した。全長に対する各部位の相対成長を算出し、相対成長式が複数の場合には屈曲点を算出した。本研究では相対成長計数が1.2以上の場合を優成長、0.98以上1.2未満を等成長、0.8未満を劣成長とみなした。

【結果】全長に対する各部位の相対成長は全て複相アロメトリーを示した。これらの相対成長を基に成長の特徴が同一な時期を判別し、発育段階を10段階に区分した。頭長は全長4.71 mmの時に屈曲点があるものの全長9.40 mmまで優成長を、全長9.40～14.55 mmの間は劣成長を、全長14.55～59.28 mmは等成長を生じた。体高は全長

4.71 mmの時、屈曲点があるものの全長6.20 mmまで優成長を、全長9.40~59.28 mmは等成長を生じた。発育の初期に見られる頭長の優成長は脳神経系の発達による体の統御機構の発達、それに加え体高の優成長は消化管の変形による摂餌機能の発達を意味すると考えられた。尾部長は全長6.20 mmまで等成長を、全長6.20~7.91 mmの間は劣成長を、全長7.91~59.28 mmは等成長を生じた。尾部長の等成長は、遊泳機能の発達が体の統御機構および摂餌機能の発達のように急速には進まないことを意味すると考えられた。消化管の伸長が起こる躯幹長では、全長9.40 mmまでは劣成長を、全長9.40~59.28 mmは等成長を生じた。このことよりカンパチ仔稚魚は頭部を優先的に発達させ、その後各部位の発達に伴って各機能を有していくと考えられた。

(22) 生物餌料中のn-3HUFA量およびDHA/EPA比がオニオコゼ仔稚魚の飼育成績に与える影響

渡部洋輔・藤木渉・鈴木久英・小谷知也・雪野継代・林雅弘・伏見浩
平成17年度日本水産学会大会（東京）、講演要旨集、p. 102（2005-4）

【目的】 海産仔魚は、正常な成長および発達のために、n-3HUFAを要求する。近年、n-3HUFA量だけでなく、DHA/EPA比も影響することが報告されている。オニオコゼ種苗生産では、仔魚の生産歩留まりは低く、安定した生産を行える飼育技術の開発が求められている。本研究では、生物餌料中のn-3HUFA量およびDHA/EPA比がオニオコゼ仔稚魚に与える影響について検討した。

【方法】 生物餌料中のDHA/EPA比が0/1, 1/1, 2/1および3/1となるよう栄養強化を実施したワムシ *Brachionus plicatilis* およびアルテミアをそれぞれ給餌する試験区と、ワムシを *Nannochloropsis oculata* およびアルテミアをマリンω（日清マリンテック）で栄養強化を行い給餌する区を対照区として設けた。各飼育区に2水槽を使用した。飼育期間は孵化後、55日とした。着底稚魚が出現した15日齢から順次取り上げを行い、54日齢に再度取り上げを行った。15日齢の取り上げ時と54日齢の再取り上げ時に成長、生残および骨格異常を観察し、各試験区間で比較した。

【結果】 15日齢における取り上げ時の成長および生残に差は無く、骨格異常率も各区で差は無かった。54日齢の再取り上げ時には、試験区の3水槽で稚魚が生き残らず、骨格異常は高率(80~100%)で発生した。この原因は、栄養強化剤の栄養組成にあると考えられ、生物餌料のn-3HUFA強化条件は、再検討する必要があると判断した。

(23) シオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* の活性に与える栄養強化剤の影響

(予報)

源河輝久・小谷知也・鈴木久英・雪野継代・林雅弘・伏見浩

平成 17 年度日本水産学会大会 (東京)、講演要旨集、p. 91 (2005-4)

【目的】海産魚介類種苗生産で、一般に仔魚の給餌を行う際には、初期餌料であるシオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* (以下ワムシ) に対して、仔魚の成長に必要な栄養素を補うために二次培養を実施し、栄養強化を行う。二次培養による栄養強化がワムシの生物学的あるいは生化学的特性に対する影響について検討を行った例は少ない。本研究では、栄養強化がワムシの生物学的特性に及ぼす影響について検討した。

【方法】実験は、二次培養前の淡水クロレラ (24×10^6 細胞 /ml) で常時培養しているものを対照区として用いた。試験区として、淡水クロレラを使用した一次培養後、無給餌 (24 時間)、低密度 (2.4×10^6 細胞 /ml) 及び高密度 (24×10^6 細胞 /ml) 淡水クロレラ (24 時間)、市販冷凍濃縮ナンノクロロプシス (60×10^6 細胞 /ml) (24 時間)、市販栄養強化剤 (8 及び 24 時間) の処理を施した計 6 試験区を設定した。各試験区から得た単性生殖卵から孵化した個体を、淡水クロレラ懸濁液 (24×10^6 細胞 /ml) で個体別培養し、それぞれの寿命の測定と産仔数の計数を実施した。また、各試験区から選抜した個体のバッチ培養による比増殖率 (r) の測定と、遊泳力測定の試験を行った。

【結果】個体別培養から得た産仔数 (15~20 個体)、寿命 (11~13 日) に試験区間で有意な差はなかった。比増殖率 (r) はナンノ区 ($r = 0.36 \pm 0.05$) で高く、低密度クロレラ区と無給餌区で低くなる傾向が見られた (各 $r = 0.3 \pm 0.03$, 0.28 ± 0.05)。高密度クロレラ区は他の試験区と比較して、遊泳力が高い傾向が見られた。市販栄養強化剤による目立った影響はいずれの試験でも観察されなかった。今後は、栄養強化前後の生化学的特性の変化について検討し、ワムシに対する栄養強化の影響について総合的な研究を実施する。

(24) 人工飼育下におけるオニオコゼ仔稚魚の相対成長に基づく発育段階

伏見浩・藤木渉・渡部洋輔・鈴木久英・小谷知也

平成 17 年度日本水産学会大会 (東京)、講演要旨集、p. 105 (2005-4)

【目的】飼育条件下におけるオニオコゼの孵化から稚魚に至るまでの成長と発育の特性を明らかにし、オニオコゼ仔稚魚の相対成長を基に発育段階を区分した。

【方法】孵化仔魚の収容密度を 5000, 10000, 15000, 20000, および 25000 尾/ m^3 として飼育を行った。収容密度と成長および生残との関係を基に飼育のための最適収容

密度を定めた. この最適収容密度による飼育を行い, 0~30 日齢の標本を用いて相対成長を調べた. 相対成長の特徴が同じ期間を一つの発育段階とした.

【結果】収容密度と成長速度および日間減少係数との関係は二次回帰式で表された. それぞれの極大・極小値を与える収容密度を最適収容密度とした. 成長速度からは 11250 尾/ m^3 , 減少係数からは 17750 尾/ m^3 のときに最も良い飼育成績を示した. 従って, 飼育条件には環境収容量が存在し, この飼育条件下では 15000 尾/ m^3 の収容密度を最適収容密度と考えた. この収容密度で孵化仔魚の飼育を行ったところ, 生残率は 65%と極めて高かった. 全長に対する体各部位の相対成長は, 全て複相アロメトリーを示した. 全長に対する体長, 頭長, 軀幹長および尾部長の相対成長を組み合わせ, 発育段階を 0~7 に 8 区分した. 発育段階 (St) の特徴を以下に記した. St0: 各相対成長係数は頭長 (1.8631), 軀幹長 (0.9223), 尾部長 (1.2025), 頭高 (1.4980), 尾鰭長 (2.3933), 体長 (0.9267) であった. St1: 頭長が等成長 (1.1067) に変化した. St2: 尾部長が等成長 (0.9057) に変化した. St3: 尾部長が劣成長 (0.1541) に変化した. St4: 頭長が優成長 (1.7200), 体長が劣成長 (0.5705) に変化した. St5: 頭長が優成長 (1.3552), 頭高が等成長 (1.0803), 尾鰭長が優成長 (1.7193) を経て劣成長 (0.7173), 体長が等成長 (0.9200) に変化した. St6: 尾部長が劣成長 (0.6622) に変化した. St7: 軀幹長が優成長 (1.9234) に変化した.

(25) 人工飼育下におけるオニオコゼ仔稚魚発育段階における外部・骨格形成

伏見浩・藤木渉・渡部洋輔・鈴木久英・小谷知也

平成 17 年度日本水産学会大会 (東京)、講演要旨集、p. 106 (2005-4)

【目的】前報で述べた各発育段階の外部形態と骨格の形成過程を明らかにする.

【方法】発育段階の区分のために用いた標本に透明化二重染色を施し, 描画装置付実態顕微鏡を用いて観察と描画を行った. 観察結果に基づき, 各発育段階の外部形態と骨格の特徴を記載した.

【結果】各発育段階 (St) の特徴を以下に示す. St0: 未開口で内部栄養に依存している胚の段階. 胸鰭原基を除き, 骨格要素は認められなかった. St1: 卵黄吸収が完了し, 開口してワムシの摂餌を始め, 仔魚となった. 筋節は V 字型を示した. 角骨, 舌顎骨, 前鰓蓋骨, 間舌骨, 角舌骨, 副蝶形骨, 擬鎖骨, 烏口骨, 肩甲骨および射出骨が出現した. St2: 主上顎骨, 胸鰭条原基, 第 1~5 神経弓門および下尾骨が出現した. St3: 脊索末端が上屈を始めた. 鼻孔が単孔で出現した. 後翼状骨, 主鰓蓋骨, 第 6~27 神経弓門および第 10~27 血管弓門が出現した. St4: アルテミアの摂餌を開始し, 脊索は上屈を続けた. 前上顎骨, 歯骨, 前鰓蓋骨, 下鰓蓋骨, 腰帯, 背鰭条, 臀鰭条, 第 8~9 血管弓門および上尾骨が出現した. St5: 脊索は上屈を完了した. 鼻孔は二孔になり,

各鰭条が定数に達した。筋節が V から W 字型になった。吻軟骨, 涙骨, 眼下骨, 神経間棘および血管間棘が出現した。第 1~4 神経弓門が骨化し始めた。第 1~7 椎体から分節し, 骨化し始めた。St6: 体側に褐色素胞が出現した。胸鰭遊離軟条は遊離を始めた。軟骨要素を残した部位は終生軟骨の吻軟骨と強膜骨, 神経間棘および血管間棘であった。全ての椎体の骨化が完了した。St7: 胸鰭第 1 鰭条が伸長を開始した。終生軟骨を残し全ての骨格要素は骨化を完了した。

(26) トラフグ仔魚の飼育成績に及ぼす収容密度の影響

脇山嘉透・小谷知也・鈴木久英・伏見 浩

平成 17 年度日本水産学会大会 (東京)、講演要旨集、p. 103 (2005-4)

【目的】トラフグ種苗生産の主要な減耗要因の一つとして噛み合いが知られている。種苗生産歩留まり向上のために噛み合いの防除が重要である。本研究では、予備飼育実験の結果から収容密度が噛み合い発生に関係すると考えられたので収容密度が噛み合い発生に及ぼす影響を明らかにしようとした。

【方法】孵化仔魚の収容密度を 5,000~25,000 尾 /m³ の 5 段階、反復数 2 とし、孵化から 55 日令まで飼育を行った。各飼育区の噛み合いの観察と生残の測定を実施した。次に、飼育後期に生じた噛み合いを防ぐため、飼育初期の噛み合いが少なかった 5000 尾 /m³ で全長約 9mm まで飼育した後、1,000~4,000 尾 /m³ の 4 密度区 (反復数 2) に分槽して、噛み合いの発生と生残率を調べた。

【結果】噛み合いが発生するまでは、全ての飼育区の生残は最高 78% と高かった。収容密度が増加すると噛み合いの開始時期が早くなり、生残率は低下した。斃死個体は小型個体に集中していた。収容密度 5,000 尾 /m³ の飼育区の生残率は 25.5% と最高であった。分槽後の斃死個体は小型個体に集中していた。全長約 9mm のときに 2,000 尾 /m³ に分槽することがもっとも効率的な飼育結果を得られた。

以上の結果から、孵化仔魚収容密度を 5000 尾 /m³ として全長 8-9mm まで飼育し、その後、2000 尾 /m³ の密度に分槽すると、トラフグ種苗生産歩留まりが向上すると判断した。

(27) 生物餌料中のビタミン A 含量がオニオコゼ仔稚魚の飼育成績に与える影響

鈴木久英・藤木渉・渡部洋輔・小谷知也・雪野継代・林雅弘・伏見浩

平成 17 年度日本水産学会大会 (東京)、講演要旨集、p. 101 (2005-4)

【目的】オニオコゼ種苗生産では高率で骨格異常が発生することが知られており、骨格異常発生率を低下させる技術の開発が求められている。骨格異常を誘発する要

因としてはヒラメでビタミンA過剰が知られている。本研究で、韻のビタミンA3封陸紺牛を段階的に変え、餌料生物中のビタミンA含量がオニオコゼ種苗生産の飼育成績にあたえる影響について検討した

【方法】 ビタミンA含量が150～7500IU/gの4段階になるよう調整され伸軒鱗Jを用いて強化されたワムシ*Brachionus plicatilis*およびアルテミアをそれぞれ給餌する試験区a～dと、ワムシを*Nannochloropsis oculata*およびアルテミアをマリンω（日清マリンテック）で栄養強化を行い給餌する区を対照区として設けた。各飼育区に2水槽を使用した。飼育期間は孵化後55日とした。着底仔魚の出現し始めた15日齢から順次取り上げを行い、54日齢に再度取り上げを行った。15日齢の取り上げ時と54日齢の再取り上げ時に成長、生残および骨格異常を観察し、各試験区間で比較した。

【結果】 成長および生残については15日齢、54日齢共に有意差は見られなかった。骨格異常の発生率について χ^2 検定を行った結果、15日齢時の異常発生率はd(84%)>a(80%)=c(80%)>対照区(70%)>b(60%)となり、特に異常率の高かった上尾骨ではビタミンA含量が多くなるほど異常率が上昇した。54日齢時の異常発生率はd(94%)>c(74%)>対照区(56%)>a(55%)>b(47%)となり、神経棘および神経間棘で異常率が高かった。成長、生残および骨格異常を検討した結果、b区のビタミンA含量750IU/gが他に比べ骨格異常の発生率を低下させると考えられた。

(28) 海産カイアシ類 *Acartia tsuensis* の人工飼育法検討とその餌料価値について

小谷知也・萩原篤志・Maria V. C. Grageda・阪倉良孝

平成17年度日本水産学会大会（東京）、講演要旨集、p. 92（2005-4）

【目的】 天然では、海産仔魚によるカイアシ類幼生は海産仔魚の主要な初期餌料であるが、安定的なカイアシ類培養は困難で、種苗生産用初期餌料としての活用例は少ない。本研究はカイアシ類大量培養技術開発を目的とし、異なる微細藻類の給餌と飼育水交換が個体群増殖に与える影響について検討した。また、培養カイアシ類の海産仔魚への餌料価値についても検討した。

【方法】 実験には *Acartia tsuensis* を使用した。微細藻類 3 種（*Chaetoceros gracilis*、*Isochrysis galbana*、*Tetraselmis tetrahele*）を給餌した場合のノープリウス幼生の発達を比較した。次に、異なる換水法（無換水、毎日部分換水、3日毎全換水）で10日間培養し、個体数の変化を比較した。餌料価値の検討には、*A. tsuensis* と *Artemia* ノープリウス幼生（無強化及び強化）の脂肪酸組成の分析を行い、同時に各餌料生物をマングローブ・キリフィッシュ *Rivulus marmoratus* ふ化仔魚に20日令まで給餌し、仔魚の成長と脂肪酸組成を比較した。

【結果】*C. gracilis* 給餌区ではノープリウス幼生がコペポダイド期に達するまで4~5日要したのに対し、*I. galbana*、*T. tetrathele* 給餌区では、いずれも3日目には変態を開始した。飼育水を3日毎に全換水した場合には安定的に培養出来た。一方、他の換水方法では、一時的に個体数は増加し、その後減少した。10日令の仔魚の体長(平均±SD)は強化 *Artemia* 給餌区(6.1±0.2mm)に比較して *A. tsuensis* 給餌区(6.5±0.5mm)で大きくなった。*A. tsuensis* のDHA含有量は強化 *Artemia* の45%であったが、20日令の仔魚のDHA含有量は、両者で同程度であった。

(29) サンプルングを行う仔稚魚飼育における生残率の推定法

小谷知也・鈴木久英・脇山嘉透・渡邊洋輔・大後戸貴浩・伏見浩

平成17年度日本水産学会大会(東京)、講演要旨集、p.102(2005-4)

【目的】小型水槽を用いて行う小規模な仔魚飼育実験では定期的に飼育魚の標本採取を行うことが多い。この場合、採取魚の総尾数が収容尾数に対してかなり多くなることがある。このような場合に、取上げ尾数を用いて生残率や減少係数を算出することには無理がある。ここでは、このような場合の減少係数と生残率の算出方法を提案する。

【方法】仔魚の飼育期間を通じて減少係数を一定、あるいは一定とみなしうる期間を対象にする。初期収容尾数と取上げ尾数が明らかな場合を考える。取上げ尾数は一定の減少係数と標本採取時に起こる瞬間的な個体数の減少の組み合わせによって決定されたとする。最終取り上げ尾数から生残率と1日当り減少係数(出発)を算出する。この出発減少係数を用い、Excelのワークシート上で、日齢ごとの生残尾数と標本採取尾数を逐次計算する。減少係数を順次変化させて、飼育結果を十分に再現できる減少係数(最終)を求める。最終減少係数から生残率を算出する。

【結果】定期的にサンプルングや夜間の柱状サンプルングによる計数を行なった1 m³用水槽を用いたヒラメ、オニオコゼおよびトラフグの飼育結果に本法を適用した。必要な入力項目は、初期収容尾数、日齢とサンプルング尾数、柱状サンプルングによる採集尾数と取上げ尾数である。Excelを用いた逐次計算によって簡単に減少係数と生残率を推定することができた。

B. 総説

C. 著書

(1) 海洋の生物環境における微生物の役割

満谷 淳

海の環境微生物学 (石田祐三郎, 杉田治男 編), pp. 47-61, 恒星社厚生閣 (2005-6)

本書は、海洋における微生物の役割を、生物生産と物質循環の視点から解説し、富栄養化、環境汚染などの問題と微生物との関係を論じ、さらに海洋環境の修復に微生物を利用するバイオレメディエーションについて理解することを目的にまとめられた。著者は、なかでも海洋の生物環境における微生物の役割を解説する部分を担当した。まず、海洋環境の特徴を紹介し、ついで海洋に生息する生物群集、特に微細藻類と細菌の役割について、海洋の食物網と物質循環の面から論じた。

(2) 海洋環境の保全のための微生物による環境修復

北口博隆

海の環境微生物学 (石田祐三郎, 杉田治男 編), pp. 185-190, 214-218, 恒星社厚生閣 (2005-6)

本書は、海洋における微生物の役割を、生物生産と物質循環の視点から解説し、富栄養化、環境汚染などの問題と微生物との関係を論じ、さらに海洋環境の修復に微生物を利用するバイオレメディエーションについて理解することを目的にまとめられた。著者は、赤潮の対策に赤潮原因藻を殺滅する細菌を利用する研究の進展状況を概観する項目と、海洋におけるプラスチック汚染の現状と対策に関する項目を担当し、海洋環境保全に微生物を利用する環境修復技術の一端を紹介した。

(3) Intensive cultivation of a subtropical paracalanid copepod, *Parvocalanus* sp., as prey for small marine fish larvae

Robin J. Shields, Tomonari Kotani, Augstin Molnar, Kimo Marion, Jon Kobashigawa & Larren Tang.

Copepods in Aquaculture (C.-S. Lee, P. O' Bryen, N. Marcus, eds). pp. 209-223. Blackwell Publishing. Ames, U. S. A.

A small paracalanid copepod, *Parvocalanus* sp., was isolated from Hawaiian coastal waters and subjected to a series of laboratory experiments to ascertain the effects of different combinations of microalgae (*Chaetoceros* sp. and *Isochrysis* sp.) on copepod survival, growth and fecundity. Adult copepods exhibited the highest survival when fed *Chaetoceros* sp., whereas fecundity was highest (up to 21 offspring/adult/day) when *Chaetoceros* sp. was offered in combination with *Isochrysis* sp. The viability of nauplii produced by adult

copepods fed *Chaetoceros* sp. was lower than from adults fed *Isochrysis* sp., in terms of survival and growth. *Chaetoceros* sp. was also an inferior diet for nauplii. Copepodid stages of *Parvocalanus* sp. exhibited similar survival on all diet combinations, but had the greatest growth when fed *Isochrysis* sp. Large quantities of *Parvocalanus* sp. were also cultured routinely in 400L tanks using a mixed diet of *Chaetoceros* sp. and *Isochrysis* sp. Copepod population densities fluctuated cyclically in these cultures, with nauplius densities ranging from approximately 1 to 30/mL. Up to 49 million *Parvocalanus* sp. nauplii were harvested per 400 L tank during preliminary 30 day trials to assess nauplius harvesting techniques. Red snapper, *Lutjanus campechanus*, larvae offered *Parvocalanus* sp. nauplii exhibited significantly greater survival to day 7 post-hatch (50.3%) compared to larvae fed ss-type rotifers (2.6%) and were significantly larger in size, confirming the efficacy of *Parvocalanus* sp. nauplii as a first feed for small subtropical marine fish larvae.

D. その他

(1) 紅藻スサビノリの環境適応機構について

山岸幸正

藻類談話会、(2005-11)

(2) 西日本各県の魚病発生状況および魚病対策

河原栄二郎

平成 16 年度岩手県水産生物防疫対策会議 (2005-3)

(3) アユ冷水病ワクチン等に関する研究

河原栄二郎

平成 16 年度養殖衛生管理技術開発研究成果報告書、日本水産資源保護協会、
29-35 (2005-3)

(4) 瀬戸内の魚と魚の病気のはなし

河原栄二郎

岡山県高等学校教育研究会理科部会生命科学公開講演会 (2005-11)

(5) 瀬戸内の仲間たち、メバル

河原栄二郎

朝日新聞 2005 年 2 月 1 日日刊、朝日新聞社、大阪、25 面 (2005)

- (6) 瀬戸内の仲間たち、トラフグ
河原栄二郎
朝日新聞 2005 年 2 月 8 日日刊、朝日新聞社、大阪、29 面 (2005)
- (7) 瀬戸内の仲間たち、コノシロ
河原栄二郎
朝日新聞 2005 年 2 月 15 日日刊、朝日新聞社、大阪、33 面 (2005)
- (8) 瀬戸内の仲間たち、カサゴ
河原栄二郎
朝日新聞 2005 年 2 月 22 日日刊、朝日新聞社、大阪、29 面 (2005)
- (9) 瀬戸内の仲間たち、マナマコ
河原栄二郎
朝日新聞 2005 年 3 月 1 日日刊、朝日新聞社、大阪、29 面 (2005)
- (10) 瀬戸内の仲間たち、サヨリ
河原栄二郎
朝日新聞 2005 年 3 月 8 日日刊、朝日新聞社、大阪、30 面 (2005)
- (11) 瀬戸内の仲間たち、シロウオ
河原栄二郎
朝日新聞 2005 年 3 月 29 日日刊、朝日新聞社、大阪、29 面 (2005)
- (12) 瀬戸内の仲間たち、アイナメ
河原栄二郎
朝日新聞 2005 年 4 月 5 日日刊、朝日新聞社、大阪、33 面 (2005)
- (13) 瀬戸内の仲間たち、ウミタナゴ
河原栄二郎
朝日新聞 2005 年 4 月 12 日日刊、朝日新聞社、大阪、29 面 (2005)
- (14) 瀬戸内の仲間たち、シャコ
河原栄二郎

朝日新聞 2005 年 4 月 19 日日刊、朝日新聞社、大阪、29 面 (2005)

- (15) 瀬戸内の仲間たち、コチ

河原栄二郎

朝日新聞 2005 年 4 月 26 日日刊、朝日新聞社、大阪、29 面 (2005)

- (16) 瀬戸内の仲間たち、イサキ

河原栄二郎

朝日新聞 2005 年 5 月 3 日日刊、朝日新聞社、大阪、29 面 (2005)

- (17) 瀬戸内の仲間たち、アイゴ

河原栄二郎

朝日新聞 2005 年 5 月 10 日日刊、朝日新聞社、大阪、33 面 (2005)

- (18) 瀬戸内の仲間たち、メジナ

河原栄二郎

朝日新聞 2005 年 5 月 17 日日刊、朝日新聞社、大阪、29 面 (2005)

- (19) 瀬戸内の仲間たち、アサリ

河原栄二郎

朝日新聞 2005 年 6 月 7 日日刊、朝日新聞社、大阪、32 面 (2005)

- (20) 瀬戸内の仲間たち、ハモ

河原栄二郎

朝日新聞 2005 年 6 月 14 日日刊、朝日新聞社、大阪、33 面 (2005)

- (21) 瀬戸内の仲間たち、ハウボウ

河原栄二郎

朝日新聞 2005 年 7 月 5 日日刊、朝日新聞社、大阪、33 面 (2005)

- (22) 瀬戸内の仲間たち、マアジ

河原栄二郎

朝日新聞 2005 年 7 月 12 日日刊、朝日新聞社、大阪、33 面 (2005)

- (23) 瀬戸内の仲間たち、タツノオトシゴ

河原栄二郎

朝日新聞 2005 年 8 月 30 日日刊、朝日新聞社、大阪、33 面 (2005)

(24) 瀬戸内の仲間たち、スズメダイ

河原栄二郎

朝日新聞 2005 年 9 月 27 日日刊、朝日新聞社、大阪、33 面 (2005)

(25) 瀬戸内の仲間たち、ヒイラギ

河原栄二郎

朝日新聞 2005 年 10 月 18 日日刊、朝日新聞社、大阪、29 面 (2005)

(26) 瀬戸内の仲間たち、クサフグ

河原栄二郎

朝日新聞 2005 年 10 月 25 日日刊、朝日新聞社、大阪、29 面 (2005)

(27) 瀬戸内の仲間たち、カブトガニ

河原栄二郎

朝日新聞 2005 年 11 月 15 日日刊、朝日新聞社、大阪、29 面 (2005)

(28) 瀬戸内の仲間たち、マナガツオ

河原栄二郎

朝日新聞 2005 年 12 月 13 日日刊、朝日新聞社、大阪、33 面 (2005)

(29) 瀬戸内の仲間たち、セトダイ

河原栄二郎

朝日新聞 2005 年 12 月 20 日日刊、朝日新聞社、大阪、33 面 (2005)