

マハタの種苗生産技術開発に関する研究

土橋 靖史

Study on Seed production of the Sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*

Yasushi TSUCHIHASHI

目 次

第1章 総合緒言	25
第2章 雄性化のためのホルモン投与法の検討	26
2-1 緒 言	26
2-2 材料および方法	26
2-2-1 供試魚	
2-2-2 MT経口投与用飼料の作製	
2-2-3 MTインプラントの作製	
2-2-4 実験1 (MT経口投与試験)	
2-2-5 実験2 (海面生簀でのMTインプラントの埋込試験)	
2-2-6 実験3 (陸上水槽でのMTインプラントの埋込試験)	
2-3 結果および考察	28
2-3-1 実験1 (MT経口投与試験)	
2-3-2 実験2 (海面生簀でのMTインプラントの埋込試験)	
2-3-3 実験3 (陸上水槽でのMTインプラントの埋込試験)	
2-3-4 G S Iの変動	
第3章 種苗生産における仔魚の活力とその生残におよぼす水温、照明およびフィードオイルの影響	31
3-1 緒 言	31
3-2 材料および方法	32
3-2-1 供試卵	
3-2-2 無給餌生残指数 (S A I)	
3-2-3 水温	
3-2-4 照明	
3-2-5 フィードオイル	
3-2-6 大量飼育	
3-3 結果および考察	35
3-3-1 S A I	
3-3-2 水温	
3-3-3 照明	
3-3-4 フィードオイル	
3-3-5 大量飼育	

第4章 種苗生産におけるウイルス性神経壊死症（VNN）防除策の検討	38
4-1 緒言	38
4-2 材料および方法	38
4-2-1 ウイルス遺伝子の検出に基づく親魚の選別	
4-2-2 オキシダント海水による卵消毒法の検討	
4-2-3 オゾン処理海水による飼育	
4-3 結果および考察	40
4-3-1 ウイルス遺伝子の検出に基づく親魚の選別	
4-3-2 オキシダント海水による卵消毒法の検討	
4-3-3 オゾン処理海水による飼育	
第5章 人工種苗の環境ストレス耐性	44
5-1 緒言	44
5-2 材料および方法	44
5-3 結果および考察	44
第6章 マハタ種苗生産技術における本研究結果の応用	46
要約	47
謝辞	48
文献	48

第1章 総合緒言

マハタ *Epinephelus septemfasciatus* (Fig.1.) はズキ目ハタ科マハタ属に属し、本州中部以南の太平洋西部およびインド洋に分布している、主に釣りや底曳網で漁獲される市場価値の高い魚種である。近年、本種の養殖が各地で行われているが、その種苗のほとんどは韓国等の外国から輸入される天然稚魚である。そのため、需要と供給のバランスが著しく不安定で、国内の関連業界は人工種苗量産技術の開発を強く望んでいる。

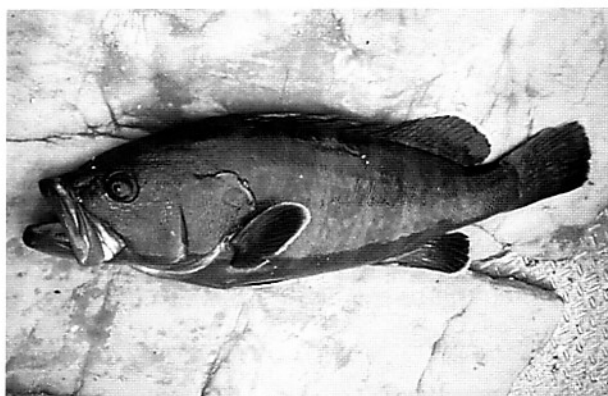


Fig. 1. Sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*

本種の種苗生産に関する研究は、愛媛県、長崎県、近畿大学、民間会社等において1990年代から行われているが、まだ量産できる段階には至っていない。

マハタの属するハタ科魚類は、日本国内に11属約70種が生息している。雌から雄への性転換、仔魚期の変態が特徴である。このうち水産上有用で、これまでに種苗生産が試みられているのは、キジハタ *Epinephelus akaara*、アカハタ *E. fasciatus*、スジアラ *Plectropomus leopardus*、ヤイトハタ *E. malabaricus*、クエ *E. moara* およびマハタの6種であるが、いずれも種苗量産技術は確立されていない。

日本国内におけるこれら6魚種の種苗生産技術開発の歴史は、以下のとおりである。

キジハタは本州中部以南から中国の沿岸岩礁域に生息する小型（最大全長40cm）のハタ科魚類で、高級魚として取り扱われている。本種の種苗生産技術開発は、1967年に瀬戸内海栽培漁業協会で行われ、以後西日本各県の種苗生産機関で行われているが、飼育初期の大量減耗により、種苗の量産ができなかった。1988年に10万尾以上の種苗量産が可能となったが、1991年以降はウイルス性神経壊死症（VNN）の発症等により生産は不安定となっている。

アカハタは本州中部以南、インド洋および太平洋の熱帯から温帯域の沿岸岩礁域に生息する小型（最大全長40cm）のハタ科魚類である。本種は1983年に東京都水産試験場で初めて自然産卵による採卵が行われた。その後1990年頃から高知県水産試験場、和歌山県水産増殖試験場で種苗生産技術開発が行われ、1998年に東京都水産試験場が初めて万単位の種苗生産に成功した。

スジアラは南日本からオーストラリアのグレートバリアリーフのサンゴ礁域に生息する中型（最大全長60cm）のスジアラ属のハタ科魚類である。本種の種苗生産技術開発は、日本栽培漁業協会八重山事業場で1985年から開始され、1991年には万単位の生産、そして1997年には10万尾以上の種苗量産が可能となったが、その後は初期の大きな減耗や疾病の発症等により生産は不安定となっている。

ヤイトハタは和歌山県以南から沖縄、インド洋、西太平洋域に生息する大型（最大全長120cm）のハタ科魚類である。本種の種苗生産技術開発は、沖縄県水産試験場で1994年から開始され、1997年には10万尾以上の種苗量産が可能となったが、その後は疾病の発症等により生産は不安定となっている。

クエは南日本沿岸から東シナ海、台湾にかけての岩礁域に広く分布する大型（最大全長120cm）のハタ科魚類である。本種の種苗生産技術開発は、1981年から日本栽培漁業協会、1983年から近畿大学が取り組み始めた。そして1985年に屋島水族館が水槽内自然産卵、仔稚魚の飼育に成功した。1986年には近畿大学、日本栽培漁業協会、長崎県水産試験場が人工授精および仔稚魚の飼育に成功した。しかし、良質卵の確保、仔稚魚の飼育が困難で、飼育初期の減耗が大きく、その後約10年間種苗を量産することができなかった。1998年に和歌山水産増殖試験場が初めて10万尾以上の種苗量産に成功し、その後、日本栽培漁業協会、三重県科学技術振興センター水産研究部の3機関で10万尾以上の種苗量産に成功したが、初期減耗やVNNの発症等によりその生産はいまだ不安定となっている。

そしてマハタの種苗生産技術開発は、1980年代から開始された。1980年に静岡県栽培漁業センターが4kgの個体から開腹により、1981年に長崎県水産試験場が4.5kgの個体2尾から熟卵を得ているが精液を採取することができず、人工授精には至らなかった。1987年に長崎県水産試験場が人工授精および仔稚魚の飼育に成功し、600尾の稚魚を生産した。しかし、良質卵の確保、仔稚魚の飼育が困難で、飼育初期の減耗が大きく、その後10

年間以上種苗を量産することができなかった。1999年に三重県科学技術振興センター水産研究部と長崎県総合水産試験場が万単位の種苗量産に成功し、2001年に三重県科学技術振興センター水産研究部が初めて10万尾以上の種苗量産に成功したが、初期の大きな減耗やVNNの発症等によりその生産はいまだ不安定となっている。

これらハタ科魚類の種苗生産が困難な主要因には、卵質の不良、初期餌料の不適合、仔魚の活力不足、不適切な飼育環境およびVNNが考えられている。

三重県ではマハタを養殖用対象種として取り上げ、種苗を量産するための研究を1996年から開始した。筆者はこの研究に開始当初から参加している。これまでの研究によりマハタの親魚養成、採卵ならびに仔稚魚の飼育技術について、ある程度の見通しをつけることができた。本論文はその間の研究結果をとりまとめたものである。

第2章では雄性化のためのホルモン投与法を検討し、第3章では種苗生産における仔魚の活力とその生残におよぼす水温、照明およびフィードオイルの影響について述べる。第4章では種苗生産におけるVNN防除策を検討する。第5章では生産した人工種苗の環境ストレス耐性について報告する。最後の第6章ではマハタ種苗生産技術における本研究結果の応用について述べる。

現在、我が国の沿岸で取り組まれている増養殖対象魚種の中にはマダイ *Pagrus major*、ヒラメ *Paralichthys olivaceus*、トラフグ *Takihugu rubripes* のように種苗生産および養殖技術が確立し、事業化されている魚種もある。しかし一方では、マハタをはじめとしたハタ類、マグロ類、ウナギ等のように種苗生産が困難な魚種も少なくない。本研究の成果は単にマハタのみならず、他のハタ類や他魚種の種苗生産技術開発にも応用が可能であると考えられ、魚類養殖業の発展に寄与することが期待される。

第2章 雄性化のためのホルモン投与法の検討

2-1 緒言

マハタは雌性先熟の雌雄同体性を示し、通常6kg以上の大型魚でないと雄にならないため、雄親魚の確保が種苗生産を実施する上での大きな問題点となっている。

三重県も、1996年から研究に取り組み、親魚の飼育を行っているが、親魚39尾（天然魚、全長49.3~77.6cm、体重1.9~9.9kg）のうち精液を分泌した雄は1996年の1尾だけであった。しかも、その雄は同年中に死亡し、その後は人工授精による採卵が実施できないでいる。

ハタ科魚類は、雌にメチルテストステロン（MT）を投与することによって雄性化を誘起できることが知られているが、マハタの雄性化のための最適なMT投与方法やMT投与による雄性化で得られた精液の有効性についての知見はほとんどない。

本章では、マハタ未熟雌に対するMT投与実験を行い、有効な投与方法、投与量、ならびにそれによって得られた精子の運動能に関するいくつかの知見を得たので、その結果を報告する。

2-2 材料および方法

2-2-1 供試魚

本実験は1997年3月から1998年3月の1年間実施した。実験1および2に用いたマハタは、韓国産の天然種苗を三重県尾鷲栽培漁業センター（Fig.2）の海面生簀において養成した4歳魚（全長45.7~54.1cm、体重1.3~2.8kg）60尾であった。実験開始前に5尾を取り上げて生殖腺の組織学的観察を行い、周辺仁期の未成熟な雌の群であることを確認した。



Fig. 2. Mie Prefectural Owase Fish Farming Center

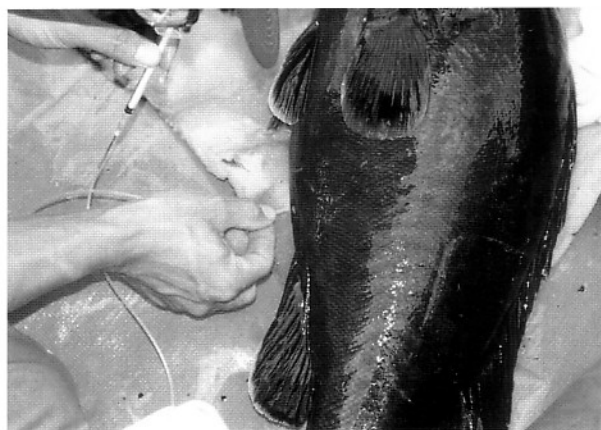


Fig. 3. Checking the sex of sevenband grouper

実験3に用いたマハタは、国内産の天然種苗を三重県尾鷲栽培漁業センターの75m³陸上水槽において養成した魚9尾（全長70.9~79.0cm，体重6.5~9.9kg）であった。実験開始前に供試魚の生殖腔にポリエチレンチューブを挿入して卵巣卵を採取し（Fig.3.），周辺仁期の未成熟な雌であることを確認した。

2-2-2 MT経口投与用飼料の作製

MT（和光純薬工業）1gを100%エタノール1,000mℓに溶解し，霧吹きでマダイ用配合飼料（マルハ，ノヴァ）に飼料1kg当たりMT 10mgとなるよう吸着させた後，給餌に使用するまで冷蔵庫内（4℃）で乾燥させた（Fig.4.）。



Fig. 4. Oral administration of methyltestosterone in the sevenband grouper (10mgMT/kg diet)

2-2-3 MTインプラントの作製

100mgのMTを200 μ ℓの95%エタノールに溶解し，800 μ ℓのひまし油（castor oil）を添加して混和した（1mg MT/10 μ ℓ）。医療用シリコンチューブ（サイラスティックチューブ，外径2.41mm，内径1.57mm，以下チューブと略す）を1.2cm（MT 1mg含有用）および2.7cm（MT 4mg含有用）の長さで切断し，チューブの一端をシリコン接着剤で密封して数時間放置後，オートピペットを用いてMT溶液をそれぞれ10 μ ℓおよび40 μ ℓチューブ内に注入し，次いでチューブの他端を密封して，インプラントを作製した（Fig.5.）。コントロールとして95%エタノール200 μ ℓとひまし油800 μ ℓを混合させたものを同じ方法で40 μ ℓチューブ内に封入した。チューブは使用まで冷蔵庫内（4℃）で保存した。



Fig. 5. Implantation of methyltestosterone (1mg or 4mg MT in a silastic capsule)

2-2-4 実験1（MT経口投与試験）

3月4日に供試魚20尾（平均全長49.3 \pm 2.3cm，平均体重2.0 \pm 0.4kg）をエチレングリコール・モノフェニルエーテル400ppmにより麻酔後，個体識別のため標識（ピットタグ）を装着して，海面生簀（3m \times 3m \times 3m）に収容し，マダイ用配合飼料を給餌して予備飼育した。MT含有飼料の給餌は3月14日より開始し，2ヶ月間週2回飽食量を給餌した（A群）。1ヶ月後の4月14日および2ヶ月後の5月13日にそれぞれ5尾取り上げ，魚体測定と排精の有無を腹部圧搾により確認した後，生殖腺を摘出して重量測定後，生殖腺の一部をBouin氏液で固定した。その後はMTを含まないマダイ用EPを週2回飽食量給餌し，1年後の1998年3月5日に2尾取り上げ，魚体測定，生殖腺摘出を行うとともに，排精の有無を確認した。生殖腺指数（GSI）は，生殖腺重量 \times 100/体重の式で算出した。固定した生殖腺は，定法にしたがい，パラフィン包埋し，5 μ mのパラフィン切片を作製後，マイヤーのヘマトキシリン・エオシンの二重染色を行った。試験期間中の水温は，表層および2m層について1日1回測定した。

2-2-5 実験2（海面生簀でのMTインプラントの埋込試験）

3月4日に供試魚40尾を海面生簀に収容し，マダイ用EPを給餌して予備飼育した。3月12日に供試魚を麻酔して，標識を装着後，腹部をメスで切り，13尾ずつ，1mg（B群），4mg（C群）およびコントロール（D群）のMTインプラントを生検針で腹腔内に埋め込んだ（Fig. 6.）。その後マダイ用EPを週2回飽食量給餌した。1ヶ月および2ヶ月後，これら3群から5尾ずつ取り上げて魚体測定，排精の確認と生殖腺の摘出を行った。さ



Fig. 6. Experiments of implantation of methyltestosterone on the sex reversal in the sevenband grouper

らに1年後にも各2尾を取り上げて魚体測定と生殖腺の摘出を行うとともに、排精の有無を確認した。GSIの算出および生殖腺標本の処理は前述したとおりである。

2-2-6 実験3 (陸上水槽でのMTインプラントの埋込試験)

4月25日に供試魚のうち5尾(全長70.9~76.6cm, 体重6.5~9.5kg)について魚体重1kg当たりMT1.0~1.3mgとなるようMTインプラントを埋め込んだ。約1ヶ月後の5月23日以降、定期的に供試魚を取り上げ、腹部圧搾により排精の有無を確認した。試験期間中の水温は1日1回測定した。

2-3 結果および考察

2-3-1 実験1

結果をTable 1.に示した。実験開始時の水温は14.5℃であった。4月上旬に15℃を越え、6月に20℃台、7月下旬に25℃以上になった。その後、8月上旬に5m層で20℃以下と急に低下することもあったが、それ以外は水温が高く、8月29日に27.6℃を記録した。9月以降、水

温は次第に低下し、11月中旬に20℃以下、1月上旬に15℃台になった。3月の取り上げ時の水温は15.7℃であった。

実験期間中マハタの摂餌は良好で、1回の投餌で265~415gのEPを摂餌した。個体毎の摂餌量の違いによりMTの投与量にも差があったと考えられるが、1個体当たりの平均投与量は約1.5mg(0.75mg/kg)であった。

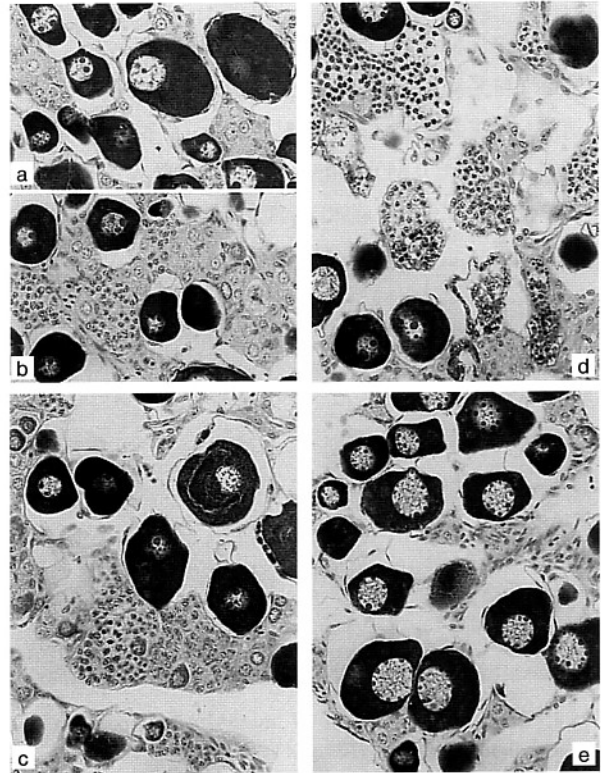


Fig. 7. Gonads of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* (a,b: group A; c:group B; d:group C; e:group D) 1 month after the initiation of treatment.

- a: Ovary, group A: Oral administration of methyltestosterone (10mg/kg diet),
- b: Hermaphroditic gonad, group A
- c: Hermaphroditic gonad, group B: Methyltestosterone (1mg) in a silastic capsule/fish
- d: Hermaphroditic gonad, group C: Methyltestosterone (4mg) in a silastic capsule/fish
- e: Ovary, group D: Control

Table 1. Effects of oral administration* of methyltestosterone (10mg/kg diet) on the sex reversal in sevenband grouper

Months after the initiation of treatment	N	TL(cm) (mean±SD)	BW(kg) (mean±SD)	GSI (mean±SD)	Sex distribution			Spermiation
					female	intersex	male	
0	5	49.3±2.3	2.0±0.4	0.025±0.002	5	0	0	0
1	5	49.5±2.3	2.1±0.3	0.058±0.010	0	2	3	0
2	5	49.5±2.2	2.0±0.3	0.067±0.009	0	1	4	0
12	2	53.8±0.4	2.5±0.1	0.065±0.010	2	0	0	0

*Administration was carried out twice a week for two months

実験期間中に死亡した個体はなかった。1ヶ月後に取り上げた5尾のうちの3尾には周辺仁期卵の生殖腺から精母細胞の形成がみられた (Fig.7a, 7b.)。2ヶ月後に取り上げた個体の生殖細胞は20~95%が精細胞であり、一部精子の形成も認められた。しかし、全体としては周辺仁期の卵が多数残存しており、雄性化の程度には個体差があった (Fig.8a, 8b.)。排精調査では、精液を分泌した個体はなかった。1年後には、周辺仁期の未熟な完全な雌に戻っていた (Fig.9a.)。

塚島 (1983) は、マハタにMTを1mg/魚体重kgとなるよう餌料に混入して経口投与し、6尾中4尾で精液の分泌を確認しているが、経口投与の中止後は、全個体で精液の分泌が確認されなくなったことを報告している。ティラピア *Tilapia nilotica* (現 *Oreochromis nilotica*) では雄性化に有効なMTの濃度は30~100 $\mu\text{g/g}$ 餌料と推定

されているが、餌の摂餌量が低下した場合には完全な性転換が得られないと報告されている。したがって、経口投与で確実かつ持続的に雄化するためにはMTの投与量や投与期間を再検討する必要がある。

今回の実験では、1年後に雄から雌へという通常とは逆の性転換が起こっていた。同じマハタ属のクエでも未成熟雌にMTを投与して人為的に雄性化した個体が翌年には未成熟または成熟した雌へ戻ること (土橋, 未発表), キジハタも雄から雌へ性転換することが知られている。天然海域のマハタにおけるこのような逆の性転換の有無は不明である。マハタ属魚類の性転換機構に関するより詳細な研究が望まれる。

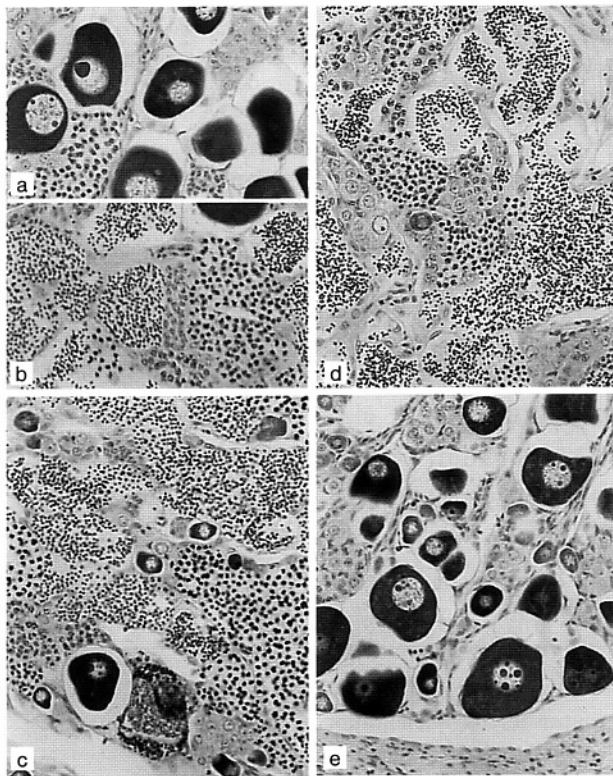


Fig. 8. Gonads of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* (a,b:group A; c:group B; d:group C; e:group D) 2 month after the initiation of treatment
a: Hermaphroditic gonad, group A: Oral administration of methyltestosterone(10mg/kg diet)
b: Mature testis, group A
c: Mature testis, group B: Methyltestosterone (1mg) in a silastic capsule/fish
d: Mature testis, group C: Methyltestosterone (4mg) in a silastic capsule/fish
e: Ovary, group D: Control

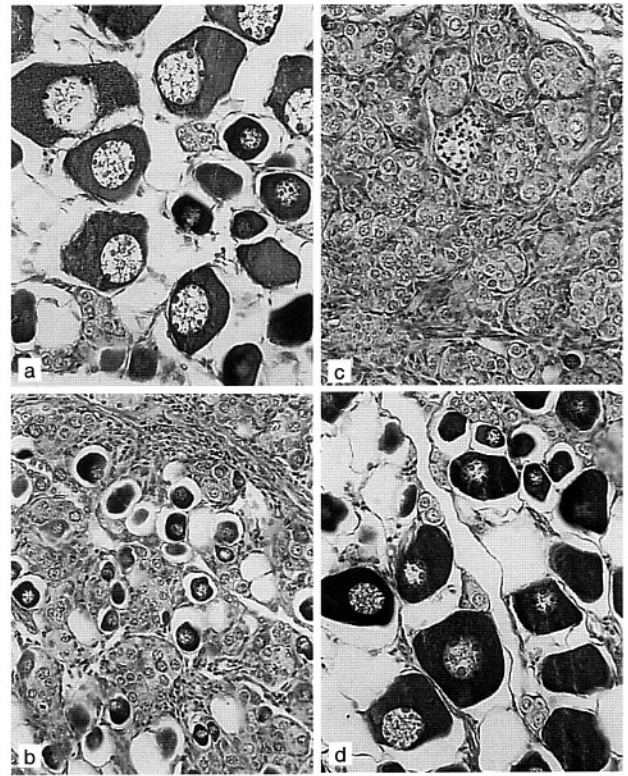


Fig. 9. Gonads of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* (a: group A; b:group B; c:group C; d:group D) 12 month after the initiation of treatment
a: Ovary, group A: Oral administration of methyltestosterone(10mg/kg diet)
b: Hermaphroditic gonadgroup, B: Methyltestosterone (1mg) in a silastic capsule/fish
c: Testis, group C: Methyltestosterone(4mg) in a silastic capsule/fish
d: Ovary, group D: Control

2-3-2 実験2

結果を Table 2. に示した。MT インプラントの埋込による死亡はなく、埋込5日後の3月17日には活発な摂餌を行っていた。1ヶ月後にはB群(1mg), C群(4mg)ともに周辺仁期卵の崩壊と精母細胞の形成がみられた(Fig.7c, 7d.)。2ヶ月後の生殖腺ではB群(1mg), C群(4mg)ともに生殖腺細胞の90%以上が精細胞で占められ、精子の形成がみられた(Fig.8c, 8d.)。とくにB群(1mg)は5尾中2尾, C群(4mg区)は5尾において排精調査で精液の分泌がみられ、活発な精子運動が確認された。1年後には、MTインプラントB群(1mg)は雌雄同体に戻っていたが、C群(4mg)は雄の状態を維持していた(Fig.9b, 9c.)。D群(コントロール)の個体は、全期間を通じて実験開始時と同様に周辺仁期の未熟な卵で占められていた(Fig.7e, Fig.8e, Fig.9d.)。

1年後の供試魚の腹腔内には、チューブの存在が確認された。結晶テストステロン(T)をつめたチューブでは、1年もしくはそれ以上効果が持続するが、ひまし油

に溶かしたMTは放出が早く、約2ヶ月毎に埋込を繰り返すと効果が高いことが報告されている。またボラ *Mugil cephalus* にひまし油に溶かしたMTまたはTを埋込むと約2ヶ月間血中ステロイド量に影響を与えることが報告されている。これらのことから、本実験におけるMTインプラントの効果は約2ヶ月で、1年後にはチューブ内にMTが残っているかどうかは不明ながら、生理的影響を与えるほどの放出はないと考えられる。

2-3-3 実験3

結果を Table 3. に示した。試験期間中の水温は16.7~21.7℃であった。MTインプラントの埋込による死亡はなかった。埋込1ヶ月後には排精は認められなかったが、1ヶ月と10日後には1尾、さらに、その5日後および7日後にはそれぞれ3尾と4尾において排精が認められた。2ヶ月後には5尾全個体で排精が認められ、検鏡の結果、精子の運動は活発であった。なお、この精液は人工授精試験に用いたところ、授精能力を有することが確認され

Table 2. Effects of implantation of methyltestosterone on the sex reversal (1mg or 4mg in a silastic capsule/fish) in sevenband grouper

Experimental group	Months after the initiation of treatment	N	TL(cm) (mean±SD)	BW(kg) (mean±SD)	GSI (mean±SD)	Sex distribution			Spermiation
						female	intersex	male	
Control	1	5	50.3±1.9	2.0±0.3	0.039±0.006	5	0	0	0
	2	5	50.9±1.9	2.2±0.3	0.036±0.010	5	0	0	0
	12	2	51.8±3.6	2.2±0.4	0.096±0.015	5	0	0	0
MT1mg	1	5	50.4±1.1	2.1±0.2	0.065±0.014	0	0	5	0
	2	5	50.9±1.2	2.2±0.3	0.075±0.011	0	0	5	2
	12	2	52.8±0.6	2.4±0.0	0.016±0.004	0	2	0	0
MT4mg	1	5	50.1±1.3	2.0±0.2	0.071±0.019	0	0	5	0
	2	5	50.7±1.2	2.2±0.2	0.070±0.005	0	0	5	5
	12	2	52.8±0.0	2.3±0.0	0.022±0.002	0	0	2	0

Table 3. Results of excuse of spermiatoin in sevenband grouper the by implantation of methyltestosterone (MT 3-6mg/fish)

No.	TL(cm)	BW(kg)	MT(mg)	spermiation (Date)				
				May 23	Jun 4	Jun 9	Jun 11	Jun 23
1	70.9	7.02	7.0	No	No	No	No	Yes
2	70.6	6.53	7.0	No	Yes	Yes	Yes	Yes
3	72.6	8.40	8.0	No	No	Yes	Yes	Yes
4	76.6	9.50	12.0	No	No	Yes	Yes	Yes
5	75.4	9.00	12.0	No	No	No	Yes	Yes
			total	0	1	3	4	5

た。1年後の排精調査でも5尾全個体で精液の分泌が確認された。供試魚のうちMTを投与しなかった4尾は2ヶ月後には未成熟な雌のまま、1年後には成熟した雌となったことから、実験2と同様、MTの投与により雄性化し、1年後も雄の状態を維持していたと考えられる。

2-3-4 GSIの変動

供試魚各群のGSIの変動を未熟雌、雄およびこれらの中に位置する性に分けてFig.10.に示した。実験開始時のGSIは0.02~0.04と低く、4月、5月は0.04~0.15と若干増加したが個体差が大きかった。翌年の3月には0.01~0.09と低下した。コントロールの未熟雌とMT投与により雄性化した雄でGSIの差は認められなかった。

本実験によるマハタのGSIの値は他の魚種と比較するとかなり低い値であった。同じマハタ属のキジハタでは0.12~0.53、またヒトミハタ *Epinephelus tauvina* では0.07~0.21であることが報告されているので、GSIが小さいことはマハタ属の雄に共通する特徴であって、人為的に性転換させた魚にだけみられる異常ではないと考えられる。

以上、本章では、MTインプラントの埋込により体重1kg当たり2mgのMTを投与することによって、マハタ未熟雌を完全かつ持続的に雄性化できることが明らかになった。またMTインプラントの埋込による雄性化では、授精能力のあることが確認された。ただし、排精が確認された個体の精液量は、1ml以下と少なかった

ので、今後は生殖腺の発達を促進し、排精量を増加させるホルモン処理を検討することを課題としたい。

第3章 種苗生産における仔魚の活力とその生残におよぼす水温、照明およびフィードオイルの影響

3-1 緒言

本種の種苗生産に関する研究は、三重県では1996年から研究が開始され、1999年には万単位の生産に成功したが、その生産過程における初期減耗が極めて大きく、この間の生残率向上が急務となっている。

初期減耗の主要因には、初期餌料の不適合、仔魚の活力不足、不適切な飼育環境、およびVNNが考えられている。このうちの初期餌料については、小型ワムシの給餌による生残率の向上が認められている。しかし、本種の仔魚の活力についての知見はなく、水温や照明等の飼育条件についても不明な点が多い。飼育環境の急変によって起こるといわれている仔魚の浮上へい死については、飼育水へフィードオイルを添加すると効果があるという報告があるが、この時に形成される水面の油膜は、開鰓率を低下させるという指摘もある。

そこで本章では、マハタ仔魚の初期生残率の向上を目的として、仔魚の活力判定法の1つとされる無給餌生残指数 (Survival Activity Index, 以下SAI) を測定するとともに、水温、照明時間、および飼育水へのフィー

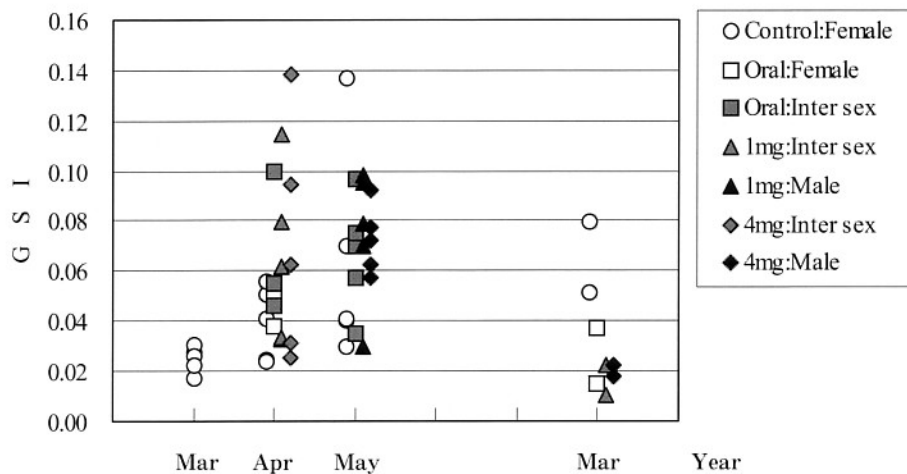


Fig. 10. Changes in gonadosomatic index in cultivated sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* (Control: untreated, Oral: Oral administration of methyltestosterone(10mg/kg diet), twice a week for two months, 1mg: methyltestosterone(1mg) in a silastic capsule/fish, 4mg: methyltestosterone (4mg) in a silastic capsule/fish).

ドオイル添加が仔魚の生残に及ぼす影響について検討し、その結果から量産規模での実証試験を行った。

3-2 材料および方法

3-2-1 供試卵

本実験は1999年～2001年の3年間実施した。毎年、水温が20℃前後となる5月中旬以降に、三重県尾鷲栽培漁業センターの海面生簀および陸上水槽で養成したマハタ親魚 (Fig.11.) にヒト胎盤性性腺刺激ホルモン (hCG) を背筋部に注射し、約40時間後、搾出・乾導法による人工授精卵を得た (Fig.12.)。これらの卵については、浮上卵率、受精率、卵径および孵化率を算出した (Fig.13.)。VNNの発症防止を目的として、残留オキシダント海水による受精卵消毒 (0.5ppmで60秒間) も行った。



Fig. 11. Sevenband grouper (female, TL85.0cm, BW14.0kg)



Fig. 12. Artificial fertilization in the sevenband grouper

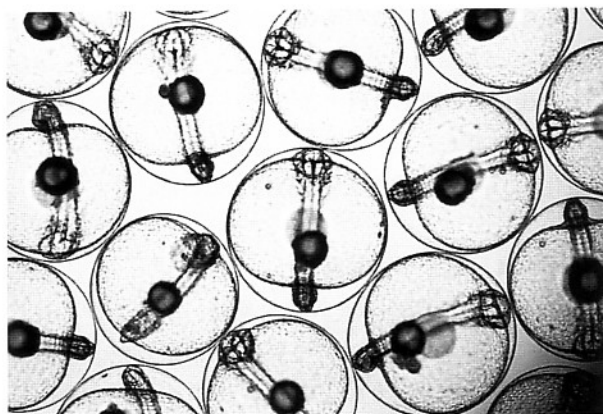


Fig. 13. Fertilized egg of sevenband grouper

3-2-2 無給餌生残指数 (SAI)

3年間に22回の試験を行った。紫外線殺菌海水500ml入りのビーカーに受精卵を150粒ずつ収容し、孵化後の仔魚 (Fig.14.) が全て死亡するまで無給餌飼育した。飼育期間中の水温は22.0℃で、換水と通気は行わなかった。死魚については、毎日午前11時頃に除去し、累積死亡数と仔魚の開口時 (Fig.15.) の生残率を求めた。これらの結果を次式に代入してSAIを算出した (Fig. 16.)。

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

N : 試験開始時の仔魚数

h_i : i日目の累積死亡数

k : 生残率が0になる日数

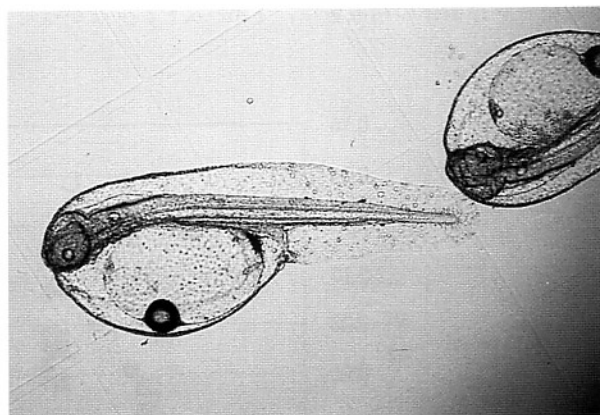


Fig. 14. Hatching larvae in the sevenband grouper

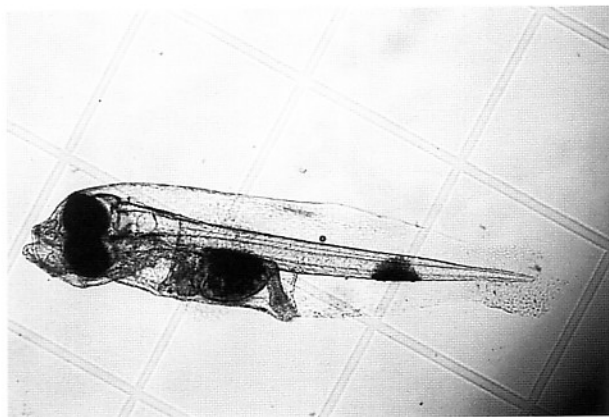


Fig. 15. Sevenband grouper larvae at 3days after hatching

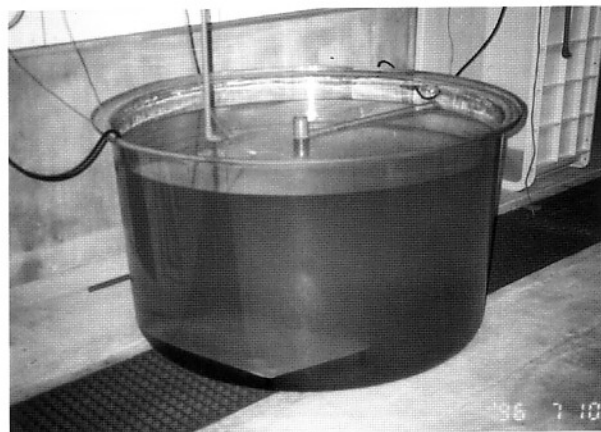


Fig. 17. Breeding experiments tank (1m³) in the sevenband grouper



Fig. 16. Experiment of survival activity index in the sevenband grouper

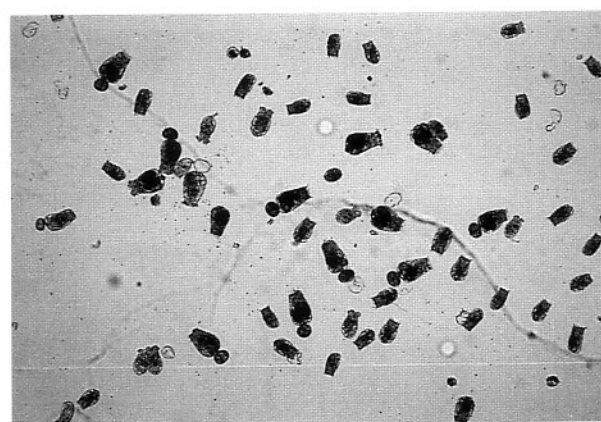


Fig. 18. SS type Rotifer

3-2-3 水温

水温を自然区（コントロール，19.5～20.5℃），22.5℃区，および25.0℃区に設定した1m³水槽（Fig.17.）に，受精卵をそれぞれ約15,000粒収容し，孵化仔魚が日齢10になるまで給餌飼育した（1999年5月28日～6月6日）。孵化率は93.9%，開口時生残率は93.8%，SAIは36.3で，供試卵としての卵質には特に問題は無いと判断された。仔魚については，毎日，8，12，16時の3回，全水槽から各10尾を採取し，開口時期と卵黄・油球の消失時期を観察した。試験終了時には生残率を求めた。試験期間中の飼育水には，毎日，午前と午後の2回，ナンノクロロプシス *Nannochloropsis* sp. 培養水（2,000万細胞/ml）を添加した。同時に，日齢3以降の仔魚には栄養強化した（マリングロス・日清マリンテック，スーパー生クロレラV12・クロレラ工業）タイ国原産のS型ワムシ小型種 *Brachionus rotundiformis*（Fig. 18，以下，タイ産ワムシ）を約10個体/mlとなるよう給餌した。

3-2-4 照明

水温試験と同じ供試卵を用い，照明を自然光区（日照時間5～19時，水温25.0℃区と同）および自然光+人工光（17～8時に40W蛍光灯点灯）による昼夜連続区に設定した水槽において試験した。自然光の水面照度は150～250 lx，人工光のそれは約500 lxであった。水温は25.0℃であった。その他の観察項目と飼育条件は水温試験と同じであった。

3-2-5 フィードオイル

オイルの無添加区および添加区に設定した50m³水槽（Fig.19.）に，受精卵をそれぞれ約150万粒収容し，日齢60まで飼育した（1999年5月28日～7月26日）。孵化率，開口時生残率，およびSAIはそれぞれ94.0%，94.6%，33.9で，供試卵としての卵質には特に問題は無いと判断された。オイルの添加量は，日齢0～30において，毎日，8時と17時の2回，4ヶ所の通気場所周辺に1mlずつとした（0.12ml/m²表面積）。生残率は日齢10と60にお

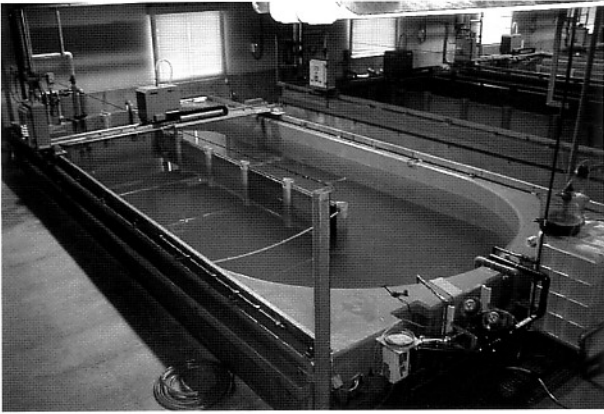


Fig. 19. Mass production tank (50m³) in the sevenband grouper

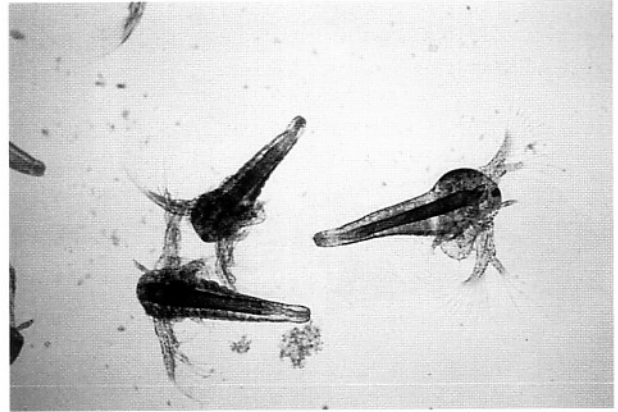


Fig. 22. Artemia

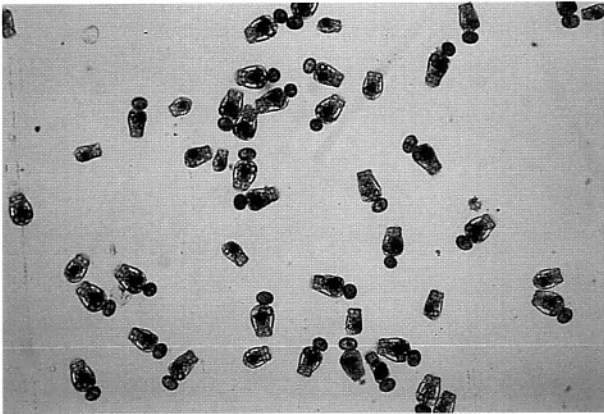


Fig. 20. S type Rotifer

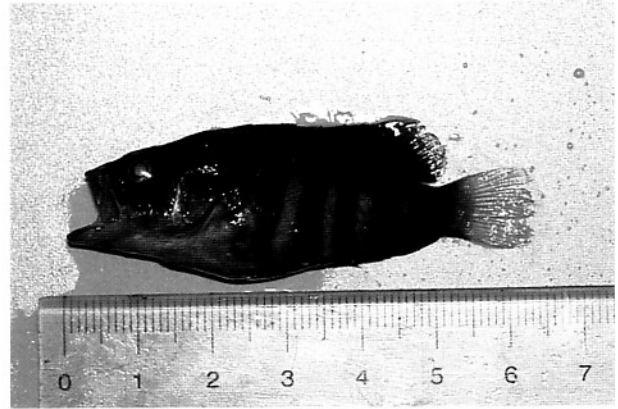


Fig. 23. Sevenband grouper juvenile at 60days after hatching

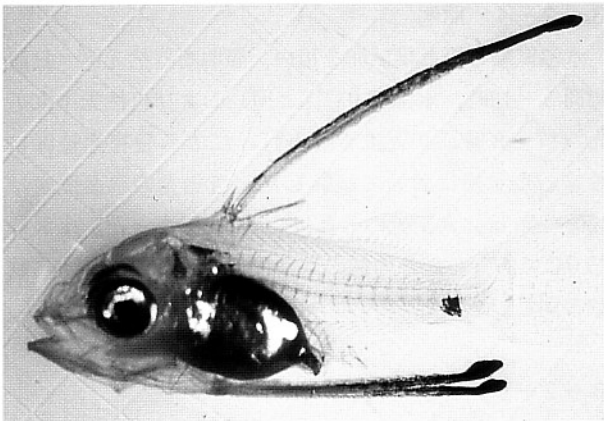


Fig. 21. Sevenband grouper larvae at 24days after hatching

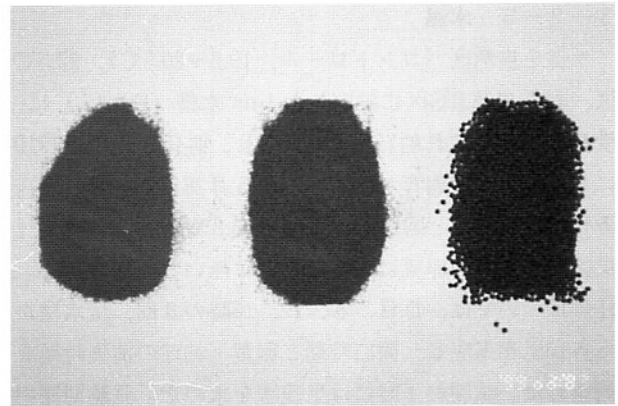


Fig. 24. Commercial compound food

いて決定した。この時、前者は直径50mmの亚克力パイプによる10点柱状サンプリングにより、後者は全個体取り上げによって測定した。開鰓率は、日齢15と60の各50尾について、それぞれ実体顕微鏡および軟X線写真撮影によって測定した。水温は25.0℃、照明は日中の直射

日光が水槽に当たらないようにして水銀灯3個を点灯した(5~19時)。ナンノクロロプシスは、日齢0~50において、飼育水へ約50万細胞/mlとなるよう添加した。餌料には、日齢3~9ではタイ産ワムシ、日齢10~38ではS型ワムシ(Fig.20.)、日齢24(Fig.21.)~50ではア

ルテミア *Artemia salina* (Fig.22.), 日齢33~60 (Fig. 23.)では市販の海産仔稚魚用配合飼料 (マルハ, ラブ・ラァバ, Fig.24.)を使用した。生物餌料は全て栄養強化したものであり, ワムシ類の投与量と回数は前述したとおりである。

3-2-6 大量飼育

前述の環境条件の試験結果を基に, 量産規模での飼育試験を1999年~2001年の3年間に7回行った。50m³水槽に, 受精卵を約90~187万粒収容し, 日齢60まで飼育した。水温は, 孵化後に1℃/日ずつ加温し, 25.0℃で恒温とした。照明はフィードオイル試験を基本としたが, 日齢3~10においては, 200W白熱灯3個による夜間照明 (18~6時) も行った。その他の観察項目と飼育条件はフィードオイル添加試験と同じであった。

3-3 結果および考察

3-3-1 SAI

結果を Table 4. に示した。仔魚は孵化後10日目までに全個体がへい死した。開口時の生残率は7.2~94.6%で大きく異なった。SAIも2.3~39.4と大きく異なった。SAIと開口時生残率の間には高い相関が認められ (Fig. 25, $r=0.862$, $p<0.01$), SAIが10以下では開口時生残

Table 4. Results of artificial fertilization and survival activity index in the sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*

No.	Year date	Floating eggs rate (%)	Egg diameter (μ)	Hatching rate (%)	Survival rate at 3 days after hatching (%)	SAI
1	1999.5.26	86.6	830	94.0	94.6	33.9
2	1999.5.26	92.8	823	93.9	93.8	36.3
3	1999.5.26	17.5	807	45.0	76.0	20.4
4	1999.5.26	42.9	810	97.1	93.0	39.4
5	1999.5.28	93.2	763	91.6	78.4	12.2
6	1999.5.29	59.4	764	9.0	24.4	4.4
1	2000.5.17	37.5	816	97.7	58.9	12.2
2	2000.5.17	94.5	818	69.7	66.2	15.8
3	2000.5.17	91.5	820	90.3	64.1	14.9
4	2000.5.17	98.7	809	59.2	62.0	12.4
5	2000.5.17	87.9	790	96.0	92.4	19.9
6	2000.5.17	93.0	800	93.3	82.4	19.9
7	2000.5.18	43.8	797	65.1	45.4	7.5
1	2001.5.23	76.6	816	96.4	91.9	28.8
2	2001.5.23	67.2	824	98.7	86.1	20.5
3	2001.5.23	82.6	793	95.7	75.6	19.3
4	2001.5.23	98.0	796	97.5	61.0	13.5
5	2001.5.23	75.4	815	94.9	7.2	2.3
6	2001.5.23	98.8	769	98.8	61.0	13.5
7	2001.5.23	91.8	795	98.7	89.0	22.4
8	2001.5.23	68.4	779	82.5	76.4	16.2
9	2001.5.23	64.6	783	82.5	76.4	16.2

率が10%以下となった。

孵化仔魚の活力の数値化は, SAIを使用することによって可能となった。しかし, 無給餌生残試験による孵化仔魚の活力判定は, 結果が判明するまで1週間から10日の期間を必要とする。したがって, 生産に使用する前に孵化仔魚の活力を把握することはできない。そのため, SAI, 開口時生残率と浮上卵率, 孵化率, 卵径との関連性について検討したが, 特に相関は認められなかった。

萱野等 (1990) は, キジハタにおいてSAIと孵化率の間には正の相関が認められていると報告しているが, マハタでは相関は特に認められなかった。マハタの採卵は, キジハタの自然産卵による採卵と異なり, hCG投与により個体毎に排卵誘導し, 採卵しているため, 親魚の栄養状態の差により, 同じ孵化率の卵であっても, その後の生残に差がおきると考えられる。マハタの種苗生産の場合, 採卵した受精卵を孵化前に飼育水槽に収容しており, 今後は孵化前に仔魚の活力と結びつく卵質の評価を行う必要がある。

次に無給餌生残試験を行う場合, 水温の設定が問題となる。マハタの採卵適水温および孵化可能な水温は明らかにされていないが, 各生産機関では20~23℃で採卵し, 20~25℃で孵化させており, 本研究ではSAIの試験水温を22℃とした。シマアジ *Pseudocaranx dentex* およびブリ *Seriola aureovittata* では試験水温が高くなるほどSAIが低下しており, 高水温ほど仔魚の発育および卵黄等の内部栄養の消失速度が早くなることから, 無給餌条件下では早く死に至るためと考えられ, 水温別試験により補正式が算出されている。今後, 各生産機関のマハタ仔魚の活力を比較するにあたっては試験水温を同一にするか, 補正式を求め, 水温差によるSAIの補正が必要である。

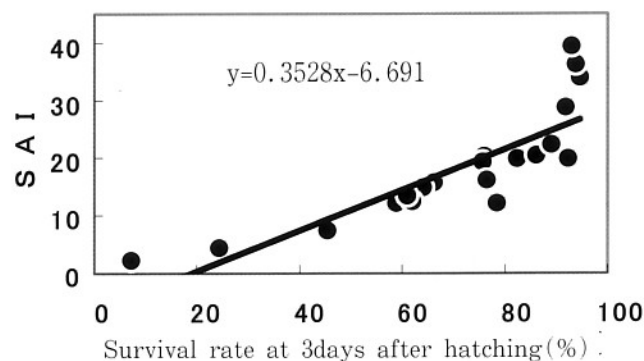


Fig. 25. Relationship between SAI and Survival rate at 3days after hatching ($r=0.862$, $P<0.01$) sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*

3-3-2 水温

結果を Table 5. に示した。開口時間は自然水温区に対して、25℃区は24時間早かった。開口時の卵黄径の減少率は自然水温区の21.5%に対して、25℃区は19.0%、油球径の減少率は22.5℃区の50.0%に対して、25℃区は36.8%といずれも25℃区の方が大きかった。卵黄の消失時間は自然水温区に対して、25℃区は37時間早かった。油球の消失時間も自然水温区に対して、25℃区は35時間早かった。日齢5以降各試験区とも大きく減耗したが、特に自然水温区では成長が停滞し、顕著であり、日齢10の生残率は自然水温区の0.06%に対して25.0℃区が9.22%であった。日齢10の全長は自然水温区の2.6mmに対して25.0℃区が3.2mmであった。

マハタの種苗生産では、これまで20℃前後で採卵を行うため、飼育水温は20℃もしくは、2～3℃加温して22～23℃で飼育する例が多かった。しかしこの結果により、それよりも高い25℃区が生残および成長が良いデータが得られた。

孵化仔魚は高水温ほど卵黄、油球等の内部栄養を早く消失し、25℃区では他の試験区よりも卵黄消失時間が16～37時間、油球消失時間が10～35時間早くなった。一方仔魚の成長速度も早くなり、開口時間は5～24時間早くなった。また開口から卵黄、油球全てが消失する時間は、60～71時間となった。

ハタ類の孵化仔魚は、小型で摂餌開始時の口径が小さいことから、初期餌料であるワムシの大きさが、また開口後短時間で内部栄養が吸収されるため、外部栄養への転換の時期が、仔魚の生残に大きな影響を及ぼすと報告されている。試験結果から、より高い水温である25℃区での飼育の方が卵黄および油球が早く吸収されるものの、成長が早く、口径も大きくなり、より大きなサイズのワムシが早く摂餌可能となるため、スムーズに外部栄養への転換が行えるものと考えられる。

今回の試験では、25℃以上の試験区を設定しなかったが、日齢15以降の仔魚を用いた水温別飼育試験では28℃で飼育した試験区でも稚魚まで生産できたことから（土橋、未発表）、上限水温については検討する必要がある。

3-3-3 照明

結果を Table 6. に示した。日齢5のワムシ摂餌率は照明区が100%であったのに対し、コントロールは64.0%であった。日齢10生残率はコントロールが9.22%、照明区が21.32%であった。日齢10の平均全長については、各試験区とも3.2mmと差は認められなかった。

この結果から、照明区の方が生残率が高いデータが得られた。仔魚は無摂餌の時、開口後一定時間を経過すると消化・吸収機能が著しく低下し、その後摂餌しても以後の生残には致命的になる時期、Point of No Return

Table 5. Results of the breeding experiments of sevenband grouper larvae at different water temperatures

Experimental group	Number of hatching larvae	Mouth opening			Disappearance time		10 days after hatching		
		Time (h)	Yolk absorption rate (%)	Oil globule absorption rate (%)	Yolk (h)	Oil globule (h)	T.L. (mm)	Number of survived larvae	Survival rate(%)
19.5-20.5℃	14,000	94	21.5	42.1	148	165	2.62±0.07	9	0.06
22.5℃	14,000	75	20.3	50.0	127	140	3.03±0.12	437	3.12
25.0℃	14,000	70	19.0	36.8	111	130	3.24±0.22	1,298	9.22

Table 6. Results of the breeding experiments of sevenband grouper larvae in the different lighting time protocols

Experimental group	Number of eggs	Hatching rate (%)	Number of hatched larvae	SAI	10 days after hatching			
					T. L. (mm)	Number of survived larvae	Survival rate (%)	
Natural lighting	15,000	93.9	14,000	37.7	3.20±0.19	1,298	9.22	
24hrs continuous lighting	15,000	93.9	14,000	37.7	3.24±0.23	2,985	21.32	

(PNR)が存在する。その時期は開口後マダイで2日間、ブリで1日間、イシダイ *Oplegnathus fasciatus* で12時間以内とされている。ハタ類のPNRについては明らかにされていないが、キジハタでは上記の魚種よりも短く6~9時間前後と考えられている。マハタにおいても、飼育水温および卵黄、油球の消失時間からキジハタ同様短いと考えられる。そのため、1回のみ試験結果ではあるが、日齢5でのワムシ摂餌率がコントロールの64.0%に対し、照明区が100.0%であった事とあわせて、コントロールではPNRが夜間にかかる摂餌することができず、生残率が低下したが、照明区では夜間でも摂餌することができ、生残率が向上したと考えられる。

今回の試験では連続照明による初期生残率の向上効果を示唆するデータが得られたが、川辺(1999)はアカハタの種苗生産において、取上げまで照明を8~22時の間、点灯することにより、安定した生産を行っており、マハタにおいても照明時間や期間について、検討する必要がある。

3-3-4 フィードオイル

結果をTable 7, 8.に示した。コントロールでは日齢5以降、浮上へい死の個体が多数確認されたが、添加区では浮上へい死はほとんど認められなかった。日齢10の生残率はコントロールの23.1%に対して添加区は56.9%であった。しかし日齢10以降、棘を伸長する変態期には、添加区水面のオイルのアクに棘がからまりへい死する個

体がみられた。

その後、コントロール、添加区ともに日齢20以降大型魚の攻撃による小型魚の減耗が大きく、日齢60の生残率はコントロールが0.90%、添加区が1.33%となった。

日齢15および60の開鰓率は、コントロールは90.0%および100%、添加区は94.0%および100%と開鰓率に差は認められなかった。

この結果から、オイル添加は日齢10までの浮上へい死による減耗防止に効果を示すデータが得られ、キジハタでの浮上へい死防止策での報告と一致した。さらに開鰓には影響がないことが確認された。しかし日齢60での生残率には大きな差は認められず、同じハタ科魚類であるクエにオイルを添加したところ、開鰓率の低下がみられたことから(土橋, 未発表)、今後はオイルの添加期間および添加量を検討する必要がある。

3-3-5 大量飼育

結果をTable 9.に示した。7例全てで稚魚(日齢60)までの生産を行うことができ、その内5例では10,000尾以上の稚魚を生産することができた。SAIは8.9~39.4、日齢10の生残率は31.3~68.7%で相関は認められなかったが、SAIが10以下の8.9の飼育例で日齢10の生残率は31.3%と最も低かった。孵化から日齢60までの生残率は0.07~3.52%であった。水温、照明およびフィードオイルの試験結果に基づき、事業規模での量産実証試験を行ったところ、SAIが10よりも高いマハタ孵化仔魚を用いる

Table 7. Results of the breeding experiments of sevenband grouper larvae on the feed oil addition

Experimental group	10 days after hatching				60 days after hatching		
	Number of hatched larvae	T. L. (mm)	Number of survived larvae	Survival rate (%)	T. L. (mm)	Number of survived larvae	Survival rate (%)
Control	1,487,000	3.31±0.26	343,000	23.1	46.82±3.82	13,516	0.90
Oil	1,393,000	3.45±0.25	793,000	56.9	45.54±4.04	18,536	1.33

Table 8. Comparison of swim bladder inflation in the sevenband grouper larvae reared in the tanks with feedoil added and the control tank

Experimental group	10 days after hatching			60 days after hatching		
	Number	Number of swim bladder inflation	Swim bladder inflation rate (%)	Number	Number of swim bladder inflation	Swim bladder inflation rate (%)
Control	50	45	90.0	50	50	100.0
Oil	50	47	94.0	50	50	100.0

Table 9. Results of mass production breeding experiments in the sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*

Year	No.	Number of eggs	Number of hatched larvae	Hatching rate (%)	SAI	10 days after hatching		60 days after hatching		
						Number of survived larvae	Survival rate (%)	T. L. (mm)	Number of survived larvae	Survival rate (%)
1999	1	1,483,000	1,392,500	93.9	39.4	793,000	56.9	45.54±4.04	18,536	1.33
2000	1	1,174,000	765,000	65.2	12.8	410,300	54.5	37.67±2.86	544	0.07
2000	2	1,809,000	1,129,000	62.4	8.9	353,100	31.3	39.69±4.24	2,435	0.18
2000	3	1,729,000	1,302,000	75.3	15.1	894,800	68.7	40.27±2.91	31,500	2.41
2001	1	1,891,000	1,826,000	96.6	13.0	765,000	41.1	40.56±2.24	16,700	0.89
2001	2	1,891,000	1,826,000	96.6	13.0	1,007,000	54.1	36.69±5.96	65,700	3.52
2001	3	1,891,000	1,826,000	96.6	13.0	677,000	36.4	37.45±3.09	47,600	2.55

と開口時生残率が50%以上で、日齢10までの減耗をある程度防止することができ、試験の再現をはかることができた。マハタの稚魚までの生産報告は、これまでに数例あるのみであるが、日齢10での生残率は11.7~35.0%であり、それらの報告と比較してもこの結果は、現時点でのマハタ種苗生産技術開発のレベルでは高く、また安定したものである。

しかし、孵化仔魚から日齢60までの生残率はわずか0.1~3.5%と低く、安定していない。マハタ仔魚は日齢10以降表層に濃密なパッチを形成し、パッチ内で仔魚が物理的、生理的ストレスを受け、減耗すると考えられる。今後は日齢10以降のパッチ密度を減少させるような照度、流れ等の飼育環境について検討し、安定した種苗生産技術の開発を行う必要がある。

第4章 マハタ種苗生産におけるウイルス性神経壊死症 (VNN) 防除策の検討

4-1 緒言

三重県では、1996年から本種の種苗生産に関する研究に取り組んでいるが、生残率は低く、特に1998年および1999年にはVNNの発生により大量死が認められている。原因ウイルスの感染経路は不明であるが、シマアジの場合と同様、垂直感染と水平感染とが考えられる。シマアジとマツカワ *Verasper moseri* では、ウイルス検査による親魚の選別、残留オキシダントを含む海水（オキシダント海水）による卵消毒、活性炭による残留オキシダント除去海水（オゾン処理海水）による仔魚の飼育により、VNN防除に効果のある事が報告されている。

そこで本章では、マハタ種苗生産におけるVNNの防

除対策として、これらの手法の有効性、特に水平感染防除の重要性を検討した。

4-2 材料および方法

4-2-1 ウイルス遺伝子の検出に基づく親魚の選別

本実験は1999年から2001年の3年間実施した。1999年は、三重県尾鷲栽培漁業センターの海面生簀および75m³陸上水槽（砂ろ過海水を飼育水に使用）で5年養成したマハタ親魚（天然魚、全長47.4~83.6cm、体重2.1~13.0kg）から採取した精液、卵巣卵および受精卵を用いた。種苗生産には紫外線殺菌海水を使用した。親魚には標識（ピットタグ）を装着し、個体識別を可能にした。親魚をエチレングリコール・モノフェニルエーテル400ppmにより麻酔後、加熱滅菌したポリエチレンチューブを生殖腔に注入し、精液および卵巣卵を採取した。ウイルスが検出されなかった雄および雌を用い、ヒト胎盤性性腺刺激ホルモン（hCG）投与による人工授精後、活性炭により残留オキシダントを除去し、無毒化した海水（以下、オゾン処理海水）で洗卵した浮上卵を受精卵として採取した。

2000年2月にウイルスが検出されなかった個体を、オゾン処理海水を飼育水に使用した75m³陸上水槽に35尾収容し、周年養成した。ウイルスが検出された個体は、海面生簀に収容し、引き続き周年養成した。海水のオゾン処理には、オゾン発生装置（Fig.26、オゾンバリアOZF-010、OZF-030：荏原実業製）を使用した。2000年、2001年は、陸上水槽で選別飼育した親魚から同じ方法で精液、卵巣卵および受精卵を採取した。ウイルス遺伝子の検出は、1999~2001年の毎年5月に行い、1999~2000年はPCR法、2001年はnested-PCR法により行った。

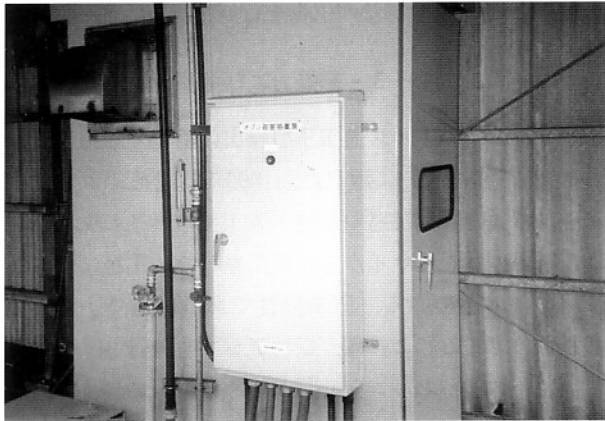


Fig. 26. Equipment for ozonation of seawater

核酸抽出前の処理法は、精液は遠心分離し、その上清を用いた。卵巣卵および受精卵はホモジナイズした。

4-2-2 オキシダント海水による卵消毒法の検討

原因ウイルスは、0.5ppmの残留オキシダント濃度30秒の処理で不活化効果が認められている。しかし、マハタの卵消毒に用いるためには、卵への影響について確認する必要がある。そこで0.5ppmのオキシダント海水を用い、以下の3つの消毒試験を行った。オキシダント濃度の測定はオートリジン法により行った。試験期間中の水温は22.0℃とした。

発生段階：2000年5月に同じ親魚由来の胞胚中期（受精後6時間）および眼胞出現期（受精後24時間）の卵3万粒を0.5ppmのオキシダント海水30ℓ入りの水槽で60秒消毒した後、オゾン処理海水500ml入りのビーカーに100粒ずつ収容した。受精卵がふ化に要する時間は22℃で40時間程度であることが、これまでに行った実験により明らかにされている（土橋、未発表）。そこで60時間静置をふ化に十分な時間とみなし、この時点でふ化仔魚、未ふ化生残卵（ふ化していないが、卵膜内で生存が確認された卵、以下、未ふ化卵）、死卵（胚が萎縮白濁した卵）を計数した。対照区としてオキシダントを含まない砂ろ過海水で60秒消毒した卵を供した。以上の試験は4回行い、その平均値を求めた。

消毒時間：2000年5月に眼胞出現期（受精後24時間）の卵を0.5ppmの残留オキシダント海水で1分、2分、3分、4分、5分消毒した後、オゾン処理海水500ml入りのビーカーにそれぞれ100粒ずつ収容した。先と同様60時間後に、ふ化仔魚、未ふ化卵を計数した。対照区として砂ろ過海水で5分間消毒した卵を供した。以上の試験は4回行い、その平均値を求めた。



Fig. 27. Disinfection of sevenband grouper fertilized eggs with residual oxidant seawater

量産規模の卵消毒：2000年および2001年の5月に21回の試験を行った。親魚毎に眼胞出現期（受精後24時間）の卵50～100万粒を0.5ppmのオキシダント海水500ℓ入りの水槽で60秒消毒した後、オゾン処理海水で60秒洗卵した（Fig.27.）。受精卵をオゾン処理海水500ml入りのビーカーに150粒ずつ収容した。受精60時間後、ふ化仔魚、未ふ化卵、死卵を計数して除去後、全個体がへい死するまで観察し、仔魚のへい死尾数および生残日数からSAIを算出した。

4-2-3 オゾン処理海水による飼育

2000年5月にオゾン処理海水と砂ろ過海水による無給餌生残試験を行った。試験水温は22.0℃とした。各海水500ml入りのビーカーにそれぞれ受精卵を150粒ずつ収容した。試験方法は前述の卵消毒と同一とした。オゾン処理海水区については、試験開始時と終了時にオキシダント濃度を測定した。

消毒試験で用いた卵の一部を用いて、2000年から2001年の2ヶ年に計8例の量産規模での種苗生産試験を行った。50m³水槽を使用し、受精卵を約117～189万粒（ふ化率62.4～96.6%、ふ化仔魚数765,000～1,826,000尾）収容した。飼育水温はふ化後、1日に1.0℃ずつ加温し25.0℃とした。飼育海水には、オゾン処理海水を用いた。飼育水にはナンノクロロプシスを飼育水1ml当たり約50万細胞となるように日齢0から50まで添加した。餌料には、日齢3～9ではタイ国原産S型ワムシ小型種、日齢10～38ではS型ワムシ、日齢24～50ではアルテミア、日齢33～60では市販の海産仔稚魚用配合飼料（マルハ、ラブ・ラァバ）を使用した。ワムシの二次培養、アルテミアの培養および収穫時の洗浄にはオゾン処理海水を使用した。日齢60で全個体を取り上げ、計数するとともに

ウイルス遺伝子の検出を行った。種苗生産途中での検出は2000年の3飼育例のみを行った。検出法は親魚の選別時と同一とし、2000年はPCR法、2001年はnested-PCR法により行った。検出部位は眼球および脳を用いた。

シマアジではVNNは仔魚期前期から稚魚期に発症するが、マハタでは稚魚期以降でも発症が認められる。そこで、種苗生産試験で生産した稚魚（PCR陰性）を用いて、オゾン処理海水と砂ろ過海水による稚魚飼育試験を行った。2000年は、試験区として50m³水槽3槽を使用し、稚魚（平均全長45.5mm、平均体重2.0g）を約2,000～20,000尾収容した。対照区として1m³水槽1槽に試験区と同じ群の稚魚を200尾収容した。飼育水温は自然水温とした。飼育海水には試験区にはオゾン処理海水、対照区には砂ろ過海水を用いた。餌料には、海産魚用配合飼料（マルハ、ノヴァ）を自動給餌機および手撒きにより毎日給餌した。2001年は、試験区として50m³水槽4槽を使用し、稚魚（平均全長37.7mm、平均体重1.1g）を約15,000～20,000尾収容した。対照区として50m³水槽3槽を使用し、試験区と同じ群の稚魚を約15,000～20,000尾収容した。飼育水温、飼育海水および餌料は、2000年の試験と同一とした。試験期間中は、毎日死亡個体を計数して取り上げ、累積死亡率を求めた。試験終了時およびVNNの発生時にはウイルス遺伝子の検出を行った。検出法は親魚の選別時と同一とし、2000年はPCR法、2001年はnested-PCR法により行った。検出部位は眼球および脳を用いた。以上の試験に用いた水槽および飼育器具は事前に有効塩素濃度50ppm、またはオキシダ

ント海水0.5ppmで24時間消毒を行った。

4-3 結果および考察

4-3-1 ウイルス遺伝子の検出に基づく親魚の選別

結果をTable 10. に示した。1999年は精液では6尾中4尾、卵巣卵では16尾中6尾、人工授精直後の受精卵では5尾中1尾からウイルスが検出された。検査に供した受精卵は前述の如く、PCR陰性であった親魚から得られたものである。これは、シマアジでも報告されているように、採卵時のハンドリング等のストレスにより、親魚体内でウイルスが増殖して、卵を汚染し、検出感度以上のウイルス量となったため、検出されたと考えられる。1999年の検査でPCR陰性であった親魚のみから採取した2000年の検査では卵巣卵、精液および受精卵のいずれからもウイルスは検出されなかった。同じ親魚から採取した2001年のnested-PCR法による検査でも卵巣卵、精液および受精卵からウイルスは全く検出されなかった。

シマアジではPCR陽性と判定された親魚について同法を用いて各組織におけるウイルスの存在が調査されており、生殖線、腸管、胃、腎臓、および肝臓にウイルスが存在することが確認され、腸管および生殖線に存在するウイルスが垂直感染の感染源になるものと判断されており、PCR法が親魚選別のために実施されている。そして同法による親魚の判定結果とそれらから生まれた仔魚におけるVNNの発生との間には相関関係があり、本法の有効性が示されている。同じマハタ属のクエでは垂直感染が感染経路であると推定されており、マハタ親魚

Table 10. Detection of nodavirus gene from the semen, ovary egg and fertilized egg of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* by Polymerase Chain Reaction

Year	Sample	Number of samples	Number of negative	Number of positive	Positive rate (%)
1999	Ovary egg	16	10	6	37.5
	Semen	6	2	4	66.7
	Fertilized egg	5	4	1	20.0
2000	Ovary egg	21	21	0	0.0
	Semen	10	10	0	0.0
	Fertilized egg	8	8	0	0.0
2001	Ovary egg	19	19	0	0.0
	Semen	14	14	0	0.0
	Fertilized egg	9	9	0	0.0

の卵巣卵および精液からウイルスが検出されたことから、マハタにおいても垂直感染が本病の主要な感染経路であると推定される。2000年および2001年の種苗生産ではVNNが発生しなかったことより、親魚の選別およびオゾン処理海水による親魚養成は有効な方法であると考えられた。今後は、より検出感度の高い検査方法の導入とともに他の防除対策と併用することが必要である。

4-3-2 オキシダント海水による卵消毒法の検討

発生段階の試験結果を Table 11. に示した。対照区および試験区間に差は認められなかった。マハタでは人工授精後、卵管理水槽に約24時間受精卵を収容し、卵管理中に発生した沈下卵を除去後、飼育水槽に収容し、種苗生産を行っている。卵のハンドリングをなるべく少なくするという点からも、飼育水槽収容時に卵消毒を行うことがマハタ種苗生産の現場では妥当と考えられた。

消毒時間の試験結果を Table 12. に示した。未ふ化卵の割合は、対照区では0.5%であったが、消毒時間1分では3.0%、2分では38.5%と時間の経過と共に未ふ化率が高くなり、3分以上では未ふ化率と死卵率の合計は95.0%以上となった。ふ化率は4分以上では0%となっ

た。未ふ化卵は、ふ化はしないが2日間は心臓の拍動が確認され、卵内で頭部と尾部が重なり合う程の成長を続けたが、その後全個体が死亡し、ふ化は認められなかった。未ふ化卵の発生に関して、本研究ではシマアジおよびマツカワで行われている0.5ppmの濃度でのみ試験を行ったが、同濃度のオキシダント海水で消毒した場合、消毒時間の長さが未ふ化卵の発生に影響していることが示された。さらに未ふ化卵の発生率が3分間消毒区で急増加しており、一定の消毒時間を超えれば、未ふ化卵が急増することが示された。未ふ化卵の発生原因は、オキシダントの作用による卵膜の変性と卵膜の膨張過程の欠如と推定されており、同様な現象はシマアジおよびマツカワでも報告されている。しかし、魚種により未ふ化卵の発生率は異なり、シマアジでは0.5ppm、3分消毒まで、マツカワでは0.5ppm、15分消毒まではふ化率に影響しないことが確認されている。これらの結果と比較するとマハタ卵のオキシダント海水に対する感受性は高く、0.5ppmでの消毒時間は60秒以内にする必要があることが明らかになった。

量産規模の試験結果を Table 13. に示した。ふ化率は9.0~98.7%、未ふ化率は0.4~51.3%、SAIは3.6~39.4

Table 11. Effects of disinfection with ozonated seawater(0.5mg/ℓ TROs^{*1}, 60sec) on the hatching rate at different embryonic developmental stages of sevenband grouper

Experimental group	Embryonic developmental stage of fertilized eggs at disinfection	Hatching rate ^{*2} (%)	Delayed hatching rate ^{*3} (%)	Dead egg rate (%)
control	blastula stage	98.5	0.0	1.5
disinfected	blastula stage	97.5	0.0	3.0
control	appearance of optic vesicle	99.5	0.5	0.0
disinfected	appearance of optic vesicle	100.0	0.0	0.0

*¹ Total residual oxidants in seawater

*² At 60hours after artificial fertilization

*³ Not hatched but alive egg

Table 12. Effects of disinfection with ozonated seawater containing 0.5mg/ℓ TROs on fertilized eggs of sevenband grouper

Experimental group	Disinfection time (min)	Hatching rate (%)	Delayed hatching rate (%)	Dead egg rate (%)
control	—	99.0	0.5	0.5
disinfection-1	1	95.0	3.0	2.0
disinfection-2	2	60.0	38.5	1.5
disinfection-3	3	5.0	93.0	2.0
disinfection-4	4	0.0	99.5	0.5
disinfection-5	5	0.0	96.0	4.0

Table 13. Results of disinfection with ozonated seawater(0.5mg/ℓ TROs, 60sec) of fertilized eggs of sevenband grouper on a mass production scale

Year	No.	Number of fertilized eggs (x 10 ⁴)	Hatching rate (%)	Delayed hatching rate (%)	SAI*
1999	1	63.8	93.9	3.1	36.3
	2	78.8	94.0	3.4	33.9
	3	76.2	91.6	3.8	12.2
	4	51.5	97.1	1.4	39.4
	5	50.0	52.4	11.6	5.6
	6	62.7	45.0	7.7	20.4
	7	52.7	9.0	44.4	4.4
	8	50.0	21.5	51.3	3.6
2000	1	51.2	65.1	14.7	7.5
	2	51.2	97.7	0.4	12.2
	3	73.6	69.7	8.8	15.8
	4	86.4	90.3	3.1	14.9
	5	62.4	59.2	3.6	12.4
	6	92.8	96.0	3.7	19.9
	7	52.8	93.3	6.1	19.9
2001	1	79.4	96.4	1.7	28.8
	2	50.9	98.7	0.7	20.5
	3	93.9	95.7	3.2	19.3
	4	80.0	96.2	2.1	13.5
	5	93.8	98.7	0.4	22.4
	6	99.2	82.5	13.1	16.2

* Survival activity index at 22°C

の範囲にあり、未ふ化卵の割合が10%以上あった5例のうち4例のSAIが10以下であった。オキシダントに対する感受性は卵の状態および取り扱いより異なることが示唆された。SAIが10以上の卵を用いた種苗生産試験ではいずれも稚魚までの生産ができていることから、実際に種苗生産に使用する卵であれば、0.5ppm、60秒の消毒がふ化率を大きく低下させることはないと考えられる。

なお、本ウイルスは受精卵の表面に付着しているだけなのか、それとも卵の中に侵入しているのかは現在のところ不明である。本研究の結果のみでは、マハタにおける実際的な消毒効果に関しては証明されないが、タイセイヨウオヒョウ *Hippoglossus hippoglossus* では、オキシダント海水による卵消毒でウイルス不活化効果と仔魚生存率の向上が認められ、親魚由来のウイルスは卵内部に存在するよりも卵表面に付着している可能性が高いことが示唆されている。

4-3-3 オゾン処理海水による飼育

無給餌生残試験結果を Table 14. に示した。試験1、

試験2ともにふ化率に差は認められなかった。SAIは試験区の方が対照区よりもいずれも高かった。試験開始時のオキシダント濃度は0.02ppm、終了時は検出されなかった。水平感染防止のため、原因ウイルスの不活化効果が認められている0.5ppmの残留オキシダント濃度で30秒以上の処理がされているオゾン処理海水の有効性について検討した結果、卵や仔魚に対する影響は認められなかった。マハタ受精卵や仔魚においてもシマアジ、マツカワ、ヒラメで報告されているように、オゾン処理海水の影響を受けないことが明らかになった。

種苗生産試験の結果、8例全てで稚魚(日齢60)までの生産を行うことができ、その内5例では10,000尾以上の稚魚を生産することができた。PCR法による検査では稚魚(日齢60)からウイルスは全く検出されなかった。2000年の飼育例のうち10,000尾以上の生産ができなかった3例のへい死魚については、PCR法による検査とともに体内でのウイルスの増殖が確認できる蛍光抗体法による検査を行ったが、ウイルスの検出および増殖は認められなかった。

稚魚飼育試験の結果を Table 15. に示した。2000年の試験では試験区の3例全てで VNN の発生は認められず、累積死亡率は1.4~2.8%であった。試験終了時の PCR 法による検査では、ウイルスは全く検出されなかった。対照区では試験開始後21日目に VNN が発生し、累積死亡率は46.0%となった。PCR 法による検査ではウイルスが検出された。飼育期間中の水温は21.9~26.4℃であった。2001年の試験では試験区の4例で VNN の発生は認められず、累積死亡率は1.6~2.2%であった。試験終了時の PCR 法による検査ではウイルスは全く検出されなかった。対照区では3例全てで試験中に VNN が発生し、累積死亡率は87.9~88.9%となった。PCR 法による検査ではいずれもウイルスが検出された。飼育期間中の水温は25.2~27.4℃であった。

VNN は、飼育している魚の一部に本病が発生すると瞬く間に同一水槽中の魚に伝染するが、これは水平感染によるものと考えられる。シマアジでは、同居感染により実験的に水平感染が成立することが確かめられている。当施設の飼育海水が取水されている地先では、海面生簀

において PCR 陽性のマハタ親魚が養成されているとともにマハタ養殖が行われており、2000年および2001年には夏から秋にかけて VNN が発生している。上記の稚魚飼育試験の結果から、VNN の感染経路は飼育海水からの水平感染が示唆されるとともに、オゾン処理海水の使用により、ウイルス感染価が低下し、VNN の発症を防止したと考えられた。

シマアジおよびマツカワにおいて実施されている、ウイルス検出による親魚の選別、オキシダント海水による卵消毒、オゾン処理海水による飼育、これらを組み合わせることで実施することにより、2000年~2001年の2年間、マハタ種苗生産過程での VNN の発生は認められず、本病の発生を防止し得ることが明らかになった。

シマアジにおける VNN の発生は、仔魚期前期から稚魚期までの発症である。しかし、マハタでは稚魚期以降1.5kg以上の個体でも、転覆病と呼ばれるように、腹部を上にして浮遊するような状態を呈する VNN の発生がみられることから、マハタの養殖過程では今後、ワクチネーション等の予防免疫に関する検討が必要である。

Table 14. Survival activity index (SAI) of larval sevenband grouper reared in ozonated seawater and sand filtered seawater

No.	Experimental group	TROs concentration (mg/ℓ)	Hatching rate (%)	SAI
1	sand filtered seawater	0.00	92.3	20.7
	ozonated seawater	0.02	91.6	25.9
2	sand filtered seawater	0.00	91.1	9.9
	ozonated seawater	0.02	93.4	14.0

Table 15. Results of rearing of sevenband grouper juveniles in ozonated seawater and sand filtered seawater

Year	No.	Seawater	Tank (m ³)	Number	Breeding days	Occurrence of VNN	Accumulated death rate(%)	PCR* ¹ . * ²
2000	1	ozonated	50	10,000	35	No	2.3	Negative
	2	ozonated	50	20,000	35	No	2.8	Negative
	3	ozonated	50	2,000	35	No	1.4	Negative
	4	filtered	1	200	25	Yes	46.0	Positive
2001	1	ozonated	50	17,000	55	No	2.2	Negative
	2	ozonated	50	20,000	55	No	1.6	Negative
	3	ozonated	50	20,000	55	No	3.0	Negative
	4	ozonated	50	15,000	55	No	1.7	Negative
	5	filtered	50	20,000	65	Yes	88.9	Positive
	6	filtered	50	20,000	55	Yes	88.6	Positive
	7	filtered	50	15,000	55	Yes	87.9	Positive

*¹ Year 2000, at 25 days after breeding starts (at occurrence of VNN)

*² Year 2001, at 45 days after breeding starts (at occurrence of VNN)

第5章 人工種苗の環境ストレス耐性

5-1 緒言

三重県では種苗生産技術の開発と並行し、生産した人工種苗を用いて、県下で試験養殖を行っている。しかし、本種の養殖技術についても確立されておらず、本県の海産魚養殖の代表的魚種であるマダイとの混合養殖か、単独養殖においてもマダイの養殖技術を応用して飼育しているのが現状である。そのような中、海面生簀において試験養殖しているマハタ人工種苗が、高水温期に大量死亡したり、集中豪雨後の急激な塩分低下によるとみられる大量死亡が発生している（土橋、未発表）。

養殖対象魚としての適応性を判断するには市場性ととも環境ストレスへの耐性が重要な要因の一つである。海産魚類の養殖対象魚種であるマダイ、ヒラメ、トラフグおよびクエでは、これまでに高水温、低水温、低塩分、低酸素等の環境ストレス耐性について試験され、報告されている。

マハタについては、過去に韓国産の天然種苗で、生存可能水温は9℃から34℃、摂餌可能水温は12℃から32℃と報告されている。人工種苗においては水温17、23、27℃で飼育された種苗の水温耐性試験が行われ、死亡水温は飼育水温の影響を受け、低温側の死亡水温は17℃区が最も低く、高温側の死亡水温は27℃区が最も高くなると報告されている。しかし、人工種苗の低塩分および低酸素耐性についての報告はこれまでなく、同じ試験条件下で試験された他の養殖対象魚種との比較についての知見もない。

そこで本章では、マハタ人工種苗の高水温、低水温、低塩分、低酸素等の環境ストレス耐性について調査するとともに、同じ試験条件下で海産魚養殖の代表的魚種であるマダイ人工種苗と、同じマハタ属のクエ人工種苗およびマハタ人工種苗1歳魚で同様の試験を行い、その結果を比較した。

5-2 材料および方法

本実験は、2002年の11月に行った。水温20℃で飼育したマハタ人工種苗（182日齢）を、同じく水温20℃に調整した塩分34.5pptのろ過海水40L入りのアクリル水槽5槽に5尾ずつ収容し、それぞれ高水温区、低水温区、低塩分区、低酸素区および対照区とした（Fig.28.）。

試験方法は村田等（1995）の方法に準じ、高水温および低水温区は、電気式ヒーターおよびクーラーを用いて

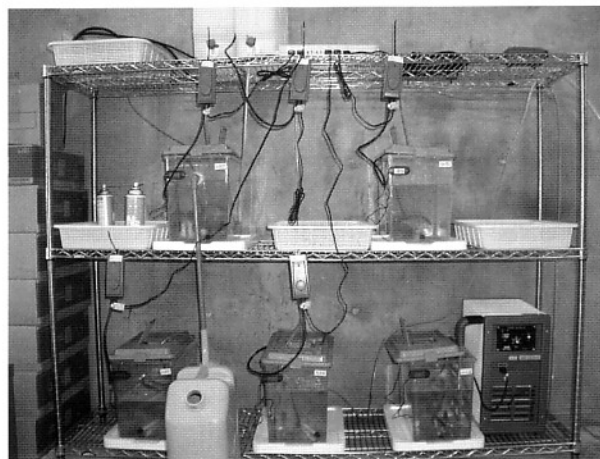


Fig. 28. Experiment of resistance to environmental stress in the sevenband grouper juveniles

1時間に4℃上昇および低下させた。低塩分区は、水道水をチオ硫酸ナトリウムで中和して、水温20℃に調整した後、試験水槽に注入し、1時間に8pptずつ塩分を低下させた。低酸素区は、空気かわりに窒素ガスを通気し、溶存酸素量を徐々に低下させた。

測定項目としては、試験終了後、供試魚の全長、体長および体重を測定した。水温、塩分および溶存酸素量については、各試験区とも15分毎に水温、塩分、溶存酸素計（YSIモデル85型）により測定した。

次に供試魚の1分間の鰓蓋運動数を目視で計数するとともに、供試魚の狂奔、横転および鰓蓋運動停止、死亡の状態を観察した。また横転時および死亡時の水温、塩分および溶存酸素量を測定した。同様の試験をクエ（166日齢）、マダイ（225日齢）およびマハタ人工種苗1歳魚（545日齢）を用いて行った。

5-3 結果および考察

試験に用いた供試魚は、いずれも2001年および2002年に三重県尾鷲栽培漁業センターで生産した種苗であり、マハタは、平均全長 13.5 ± 0.8 cm、体長 11.1 ± 0.7 cm、体重 47.8 ± 7.4 g、クエは、全長 13.7 ± 0.5 cm、体長 11.0 ± 0.4 cm、体重 37.5 ± 5.0 g、マダイは、全長 13.4 ± 0.5 cm、体長 11.1 ± 0.5 cm、体重 43.6 ± 4.9 g、マハタ1歳魚は、全長 24.6 ± 0.3 cm、体長 20.8 ± 0.3 cm、体重 289.1 ± 12.8 gであった（Table 16.）。

結果をTable 17~20.に示した。対照区では各魚種とも実験終了時まで、死亡は認められなかった。

高水温区では、鰓蓋運動数は他の魚種と同様、水温上昇とともに増加する傾向が認められ、横転時には開始時の約2倍以上の運動数となった。水温32.1℃で狂奔および

び横転する個体が認められ、平均死亡水温は $34.0 \pm 0.4^\circ\text{C}$ となった。この値はクエよりも有意に低く ($p < 0.05$, t 検定), マダイおよびマハタ1歳魚よりは有意に高い値であった ($p < 0.01$)。

低水温区では、鰓蓋運動数は他の魚種と同様、水温低下とともに低下する傾向が認められ、横転時には開始時の約6割の運動数となった。水温 7.7°C で狂奔および横転する個体が認められ、平均死亡水温は $6.9 \pm 0.2^\circ\text{C}$ となった。この値はクエよりも有意に高く ($p < 0.01$), マダイおよびマハタ1歳魚とは有意な差は認められなかった。

なお、死亡水温は試験開始前の馴化水温の違いによって変化し、低および高水温で馴化した場合は、死亡水温

の下限および上限がそれぞれ低下および上昇する。本試験からは馴化水温 20.0°C における死亡上限および下限温度が明らかになった。

低塩分区では、鰓蓋運動数は他の魚種と同様、横転時までほとんど変化は認められなかった。塩分 0.5ppt で狂奔および横転する個体が認められ、塩分が 1ppt 以下となってから死亡に至る平均時間は 2.0 ± 0.2 時間となった。この値はクエよりも有意に短く ($p < 0.01$), マダイよりも有意に長く ($p < 0.01$), マハタ1歳魚とは有意な差は認められなかった。広塩性魚類のヒラメおよびクロダイ *Acanthopagrus schlegeli* は淡水中でそれぞれ 19.0 ± 3.5 および 74.3 ± 17.1 時間生存する。本試験および

Table 16. Detail of sevenband grouper and other fish used for resistance to environmental stress experiments

Species	Number	Days after hatching	Total length* (cm)	Body length* (cm)	Body weight* (g)
Sevenband grouper 1	25	182	13.5 ± 0.8	11.1 ± 0.7	47.8 ± 7.5
Kelp grouper	25	166	13.7 ± 0.5	11.0 ± 0.4	37.5 ± 5.0
Red Sea bream	25	225	13.4 ± 0.5	11.1 ± 0.5	43.6 ± 4.9
Sevenband grouper 2	15	545	24.6 ± 0.3	20.8 ± 0.3	289.1 ± 12.8

* Mean \pm SD

Table 17. Tolerance limits of sevenband grouper and other fish for high water temperature experiments (Mean \pm SD)

Species	Started Motion of opeculum (motions/min)	Laid down Motion of opeculum (motions/min)	Laid down Water temperature ($^\circ\text{C}$)	Fell dead Water temperature ($^\circ\text{C}$)
Sevenband grouper 1	49.3 ± 4.7	114.7 ± 2.5	32.8 ± 0.3	34.0 ± 0.4
Kelp grouper	50.7 ± 9.0	61.3 ± 5.0	34.3 ± 0.1	$35.1 \pm 0.7^*$
Red Sea bream	126.7 ± 8.1	175.3 ± 7.4	31.4 ± 0.1	$32.2 \pm 0.6^{**}$
Sevenband grouper 2	46.7 ± 2.5	63.3 ± 0.9	32.2 ± 0.4	$32.9 \pm 0.2^{**}$

* Significantly different from the values of sevenband grouper 1 ($p < 0.05$)

** Significantly different from the values of sevenband grouper 1 ($p < 0.01$)

Table 18. Tolerance limits of sevenband grouper and other fish for low water temperature experiments (Mean \pm SD)

Species	Started Motion of opeculum (motions/min)	Laid down Motion of opeculum (motions/min)	Laid down Water temperature ($^\circ\text{C}$)	Fell dead Water temperature ($^\circ\text{C}$)
Sevenband grouper 1	49.3 ± 4.7	30.7 ± 2.5	7.5 ± 0.1	6.9 ± 0.2
Kelp grouper	50.7 ± 9.0	32.0 ± 2.8	7.9 ± 0.5	$4.9 \pm 0.1^*$
Red Sea bream	126.7 ± 8.1	64.7 ± 2.5	8.9 ± 0.2	7.1 ± 0.5
Sevenband grouper 2	46.7 ± 2.5	28.7 ± 2.5	7.4 ± 0.4	6.4 ± 0.3

* Significantly different from the values of sevenband grouper 1 ($p < 0.01$)

Table 19. Tolerance limits of sevenband grouper and other fish for low specific salinity experiments (Mean±SD)

Species	Started Motion of opeculum (motions/min)	Laid down Motion of opeculum (motions/min)	Laid down Low specific salinity (ppt)	Fell dead Low specific salinity* (hours)
Sevenband grouper 1	49.3±4.7	50.0±4.3	0.5±0.1	2.0±0.2
Kelp grouper	50.7±9.0	50.7±2.5	0.3±0.1	5.7±0.8**
Red Sea bream	126.7±8.1	146.7±7.4	1.0±0.2	0.3±0.2**
Sevenband grouper 2	46.7±2.5	58.7±6.6	0.7±0.0	2.3±0.1

* Defined as the time needed to lay down or fall dead after water specific salinity level reduced to 1.0ppt.

** Significantly different from the values of sevenband grouper 1 (p<0.01)

Table 20. Tolerance limits of sevenband grouper and other fish for low dissolved oxygen experiments (Mean±SD)

Species	Started Motion of opeculum (motions/min)	Laid down Motion of opeculum (motions/min)	Laid down Low dissolved oxygen (mg/ℓ)	Fell dead Low dissolved oxygen (mg/ℓ)
Sevenband grouper 1	49.3±4.7	91.3±3.4	0.57±0.06	0.50±0.05
Kelp grouper	50.7±9.0	71.3±2.5	0.54±0.13	0.45±0.03
Red Sea bream	126.7±8.1	158.7±5.2	0.96±0.07	0.87±0.03*
Sevenband grouper 2	46.7±2.5	58.7±4.7	0.79±0.14	0.55±0.02

* Significantly different from the values of sevenband grouper 1 (p<0.01)

これらの報告から、マハタ稚魚は広塩性魚類には分類できないが、マダイよりは高い低塩分性耐性を持つことが明らかになった。

低酸素区では、鰓蓋運動数は他の魚種と同様、溶存酸素量低下とともに増加する傾向が認められ、横転時には開始時の約2倍近い運動数となった。溶存酸素量0.62 mg/ℓで狂奔および横転する個体が認められ、平均死亡溶存酸素量は0.50±0.05mg/ℓとなった。この値は、クエおよびマハタ1歳魚と有意な差は認められず、マダイよりは有意に低い値であった (p<0.01)。

以上の結果からマハタ人工種苗の環境ストレス耐性は、同属のクエよりは弱いものの、海産魚養殖の代表的魚種であるマダイよりは強い耐性を示し、養殖対象魚種としての適正を備えているものと考えられた。

今後は環境ストレスと疾病発症との関連性を検討するとともに、ストレス時の生理状態の把握や環境ストレス耐性強化に結びつく飼育法等を検討したい。

第6章 マハタ種苗生産技術における本研究結果の応用

筆者らの研究グループ（三重県科学技術振興センター水産研究部，三重県尾鷲栽培漁業センター，独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所，三重大学生物資源学部）は，1996年から「新魚種（マハタ）量産技術開発」事業に着手し，親魚養成，性転換，初期飼育，VNN対策等の種苗生産技術はほぼ確立したと考える。その結果，1999年から2003年まで5年間連続してマハタの種苗生産に成功するとともに，2001年には国内で初めて10万尾以上の種苗生産に成功しており，その再現性も確認することができた。三重県のマハタ種苗生産尾数は全国でもトップレベルであり，1999年から2001年までの累積生産尾数は，生産量全体の約50.9%を占めている。

また，他機関においても長崎県，愛媛県等の試験研究機関および民間の種苗生産機関で開発した技術が利用されている。さらに中国海南省水産研究所，韓国済州道海洋水産資源研究所およびインドネシアバリ島の水産研究所等，海外の試験研究機関から研究員が研修に訪れ，技術の習得に努めるとともに，韓国済州道海洋水産資源研

究所については、2003年3月と7月に筆者が現地に訪れ、雄性化および初期飼育技術の指導を行っている。本研究により、マハタ人工種苗が生産できるようになり、魚類養殖業者に種苗が供給できるようになった意義は大きい。

また本研究の成果は単にマハタのみならず、他のハタ類や他魚種の種苗生産技術開発にも応用が可能であると考えられ、魚類養殖業の発展に寄与することが期待される。

三重県では1999年から生産した種苗を県内の魚類養殖業者に試験配布しており (Fig.29.)、2001年に試験養殖された魚 (Fig.30.) を市場出荷したところ、1,800~2,400円/kgと養殖マダイを大きく上回る価格で取引され、人工種苗の市場性が確認された。今後もより安定した種苗生産技術の開発を行い、マハタの完全養殖化を実現させていきたい。



Fig. 29. Harvested sevenband grouper juveniles

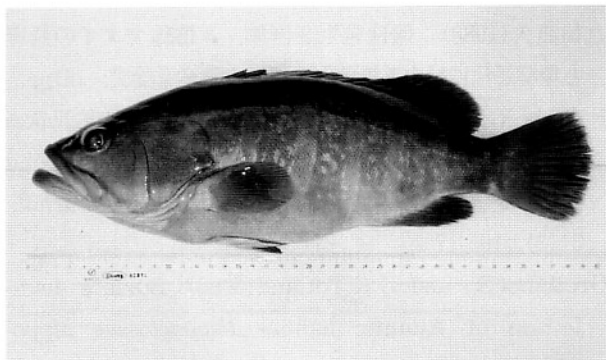


Fig. 30. Sevenband grouper at 2years after hatching (TL40.0cm, BW1.2kg)

要 約

1) 雄性化のためのホルモン投与法の検討

マハタ未熟雌に経口または医療用シリコンチューブの埋込によってメチルテストステロン (MT) を投与した。対照区の生殖腺は実験期間を通じ、全て周辺仁期の未熟卵で占められていた。MT 経口投与区は、2ヶ月後には精子も見られたが、周辺仁期の卵が数多く残存しており、雄性化の程度は低かった。MT インプラントの埋込による投与区は1 mg, 4 mgともに2ヶ月後には活発な精子形成が見られた。1年後には、経口投与区は完全な雌、MT インプラント1 mg 区は雌雄同体に戻っていたが、4 mg 区は雄の状態を維持していた。したがって、MT インプラントの埋込により体重1 kg 当たり2 mgのMT を投与することによって、マハタ未熟雌を完全かつ持続的に雄性化できることが明らかになった。

2) 種苗生産における仔魚の活力とその生残におよぼす水温、照明およびフィードオイルの影響

マハタの種苗生産過程における仔魚の活力を判定するために、無給餌生残指数 (SAI) を測定した。仔稚魚の生残率向上を目的として、水温、照明、飼育水へのフィードオイル添加の影響について検討した。SAI と開口時生残率の間には強い正の相関が認められ ($r = 0.862$, $p < 0.01$), SAI は仔魚の活力判定指標として有効なことがわかった。孵化直後から日齢10までの仔魚の生残率は、水温では自然区 (19.5~20.5℃) より25.0℃区で、照明では自然光区より自然光+人工光の昼夜連続区で、オイル添加試験では無添加区より添加区で、それぞれ高かった。これらの良い方の条件で、SAI が10以上の仔魚を大量飼育した時の日齢10の生残率は36.4~68.7%で、これは他の種苗生産機関から報告されている11.7~35.0%よりも高かった。

3) 種苗生産におけるウイルス性神経壊死症 (VNN) 防除策の検討

マハタの種苗生産で発生する VNN の防除を目的として、PCR 法を用いたウイルス遺伝子検出による親魚の選別、オキシダント海水による受精卵消毒、およびオゾン処理海水による仔魚の飼育を行った。その結果、2000~2001年の8例の飼育例全てで VNN の発生は認められず、稚魚まで生産することができた。取り上げた稚魚を砂ろ過海水で飼育したところ、4例の飼育例全てで VNN による大量死が発生したのに対し、オゾン処理海水での7

例の飼育例全てで引き続き VNN の発生は認められなかった。以上の結果からこれらの対策は、マハタ種苗生産における VNN 防除対策として有効であると判断された。

4) 人工種苗の環境ストレス耐性

マハタ人工種苗を対照区、高水温区、低水温区、低塩分区、低酸素区に5尾ずつ収容し、耐性を調査した。同様の試験をクエ人工種苗、マダイ人工種苗、マハタ人工種苗1歳魚を用いて行った。対照区では各魚種とも実験終了時まで、死亡は認められなかった。高水温区の死亡水温はクエよりも低く、マダイ、マハタ1歳魚より高かった。低水温区の死亡水温はクエよりも高く、マダイ、マハタ1歳魚と差はなかった。塩分が1pptにまで低下した後死亡に至るまでの時間は、クエよりも短く、マハタ1歳魚と差はなく、マダイよりも長かった。低酸素区の死亡時の溶存酸素量はクエ、マハタ1歳魚と差はなく、マダイよりも低かった。以上の結果からマハタ人工種苗の環境ストレス耐性は、同属のクエよりは弱いものの、海産魚養殖の代表的魚種であるマダイよりは強い耐性を示し、養殖対象魚種としての適正を備えているものと考えられた。

謝 辞

本研究の全般にわたる指導と本論文の校閲を賜った三重大学生物資源学部柏木正章教授、吉岡基助教授に深謝する。

本研究の機会を与えて頂くとともに、ご指導下さった三重県科学技術振興センター水産研究部丹羽誠元部長、三重県尾鷲栽培漁業センター辻ヶ堂諦元所長に心からお礼申し上げます。

独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所の田中秀樹博士には、親魚生殖腺の組織学的観察やホルモン投与に関して丁寧なご指導を頂いた。三重県尾鷲市役所の栗藤和治水産振興課長からは試験魚の提供を受けた。三重県科学技術振興センター水産研究部尾鷲水産研究室の田中真二研究員、栗山功研究員には VNN ウイルスの検出にあたり協力をいただいた。また研究の遂行にあたり、インドネシア研修生の Bejo Slamet 博士、三重県尾鷲栽培漁業センターの黒宮香美技師をはじめとする職員の皆様には多大のご協力を賜った。これらの方々に対して厚くお礼申し上げます。最後に、本研究は三重県単独事業：平成8～10年度「新魚種量産技術開発事業」、平成11～14年度「クエ・マハタ種苗量産技術確立事業」によったことを記して、感謝の意を表する。

文 献

- 赤澤敦司・萩原篤志・中田 久・荒川敏久(1999)：初期飼育環境がマハタ仔魚の摂餌と生残に与える影響。平成11年度日本水産学会秋季大会講演要旨集。
- Arimoto, M., K. Mori, T. Nakai, K. Muroga, and I. Furusawa (1993): Pathogenicity of the causative agent of viral nervous necrosis disease in striped jack, *Pseudocaranx dentex* (Bloth & Schneider). *J. Fish Dis.*, 16(5), 461-469.
- 有元 操 (1995)：シマアジのウイルス性神経壊死症に関する研究。博士論文、京都大学、京都。
- 有元 操・丸山敬吾・古澤 巖 (1994)：シマアジのウイルス性神経壊死症の発生状況。魚病研究, 29(1), 19-24.
- C.S. Tamaru, C.D. Kelley, C.-S. Lee, and K. Aida, and I. Hanyu, (1989): Effects of Chronic LHRH-a + 17-Methyltestosterone or LHRH-a + Testosterone Therapy on Oocyte Growth in the Striped Mullet (*Mugil cephalus*). *Genelal and Comparative Endocrinology*, 76, 114-127.
- Dalla Valle, L., L. Zanella, P. Patarnello, C. Paolucci, P. Belvedere and L. Colombo (2000): Development of a sensitive diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on rt-PCR. plus nested PCR. *J. Fish Dis.*, 23, 321-327
- E. Y. CHEN, M. CHOW, T. M. CHAO and R. LIM, (1977): Artificial spawning and larval rearing of the grouper, *Epinephelus tauvina* (FORSKAL) in Singapore. *Singapore J. Pri. Ind.*, 5(1), 1-21.
- 戎田典久(1988)：雌性発生2倍体、3倍体マダイの飼育と環境悪化に対する抵抗力。近畿大学卒業論文, 121pp.
- Fukuda, Y., H. D. Nguyen, M. Furuhashi, and T. Nakai (1996): Mass mortality of cultured sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Fish Pathol.*, 31(3), 165-170.
- Grotomol, S., and G. K. Totland (2000): Surface disinfection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* eggs with ozonated sea-water inactivates nodavirus and increases survival of the larvae. *Dis. Aquat. Org.*, 39, 89-96.
- 福永恭平・野上欣也・吉田儀弘・浜崎活幸・丸山敬悟 (1990)：日本栽培漁業協会・玉野事業場における最近のキジハタ種苗生産量の増大と問題点について。栽培

- 技研, 19(1), 33-40.
- 狭間弘学 (1992): 種苗生産技術開発研究事業1 アカハタ種苗生産試験. 和歌山県水産増殖試験場報告, 22, 1-3.
- 濱本俊策・木羽野元秀・横川浩治 (1986): キジハタのふ化仔魚飼育時における小型飼料の有効性と照明効果. 香水試研報, (2), 1-12.
- 磯野良介・伊藤康男・木下秀明・城戸勝利 (1993): シロギス卵・稚魚の生残に及ぼす海水オゾン処理の影響. 日水誌, 59(9), 1527-1533.
- 伊藤慎吾・吉水 守・呉明柱・日向進一・渡辺研一・早川 豊・絵面良男 (1996): 海水のオゾン処理による飼育水の殺菌効果とヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) およびマツカワ (*Versper moseri*) の生存率に及ぼす影響. 水産増殖, 44(4), 457-463.
- 北島 力・高屋雅生・塚島康生・荒川敏久 (1991): マハタの卵内発生および飼育による仔稚魚の形態変化. 魚類学雑誌, 38(1), 47-55.
- 加藤利弘・川上秀昌・森実庸男 (1998): マハタ種苗生産試験, 愛媛水試事報, 121-125.
- 金城清昭・仲本光男 (1994): 大型ハタ類の親魚養成 (海産魚類増養殖試験). 平成4年度沖縄県水産試験場事業報告, 150-158.
- 金城清昭・中村博幸・大嶋洋行・仲本光男 (1999): 1997年のヤイトハタ種苗生産の概要 (海産魚類増養殖試験). 平成9年度沖縄県水産試験場事業報告, 139-140.
- 北島 力・塚島康生・藤田矢郎・渡辺 武, 米 康夫 (1981): マダイ仔魚の空気呑み込みと鰓の開腔および脊椎前彎症との関連. 日水誌, 47(10), 1289-1294.
- 萱野泰久・尾田 正 (1990): 池中養成したキジハタ自然産出卵の卵質について. 岡山水試報, (5), 48-52.
- 萱野泰久・何 玉環 (1999): キジハタ仔魚の初期摂餌と成長. 水産増殖, 45(2), 213-218.
- 川辺勝俊 (1999): 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.
- 川辺勝俊 (1999): アカハタの種苗生産. 平成11年度東京都水試事報, 75-76.
- Lee, C.-S., Tamaru, C.S. and Kelley, C.D., (1986): Technique for making chronic release LHRH-a and 17 α -methyltestosterone pellets for intramuscular implantation in fishes. Aquaculture, 59, 161-168.
- 村井 衛・青木雄二・西村和久 (1984): アカハタの採卵について. 栽培技研, 13(1), 63-67.
- 真鍋三郎・春日 公 (1989): 水槽内におけるクエの産卵行動と初期生活史について. 動物園水族館雑誌, 30(1), 16-24.
- Mor, Martin A. Jr., (1969): Biology of the red grouper *Epinephelus morio* (VALENCIENNES) from the eastern Gulf of Mexico. Florida Dept. Nat. Res. Prof. papers No.10, 95.
- 虫明敬一・関谷幸生 (1993): シマアジふ化仔魚の活力判定の試み. 水産増殖, 41(2), 155-160.
- 虫明敬一・藤本 宏・新聞脩子 (1993): プリふ化仔魚の活力判定の試み. 水産増殖, 41(3), 339-344.
- Mushiaki, K., T. Nishizawa, T. Nakai, I. Furusawa, and K. Muroga (1994): Control of VNN in striped jack: Selection of spawners based on the detection of SJNNV gene by polymerase chain reaction (PCR). *Fish Pathol.*, 29(3), 177-182.
- 室賀清邦・古澤 徹・古澤 巖 (1993): 総説シマアジのウイルス性神経壊死症. 水産増殖, 46(4), 473-480.
- 虫明敬一・有元 操 (2000): シマアジのウイルス性神経壊死症 (VNN) に関する防除対策. 栽培技研, 28, 47-55.
- 三村 元・長光貴子・片山泰人・長瀬俊哉 (1999): 海水中の残留オキシダントのオートリジン法による簡易測定. 水産増殖, 47(1), 103-110.
- 虫明敬一・中井敏博・室賀清邦・関谷幸生・古澤 巖 (1993): シマアジのウイルス性神経壊死症: 仔魚の発病に対する親魚の抗体価および産卵飼育方法の影響. 水産増殖, 41(3), 327-332.
- 虫明敬一 (2000): シマアジ親魚の産卵に伴って増殖するウイルス性神経壊死症 (VNN) 原因ウイルス (SJNNV) とその抑制対策. 水産増殖, 48(1), 109-115.
- 三村 元・長瀬俊哉・片山泰人・難波憲二 (1999): 未ふ化生残卵の生理学的および組織学的考察. 日水誌, 65(3), 448-456.
- 三村 元・長瀬俊哉・片山泰人・長光貴子・難波憲二 (1998): オゾン処理海水のヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) 卵に対する影響. 水産増殖, 46(1), 101-110.
- 村田 修・宮下 盛・那須敏朗・熊井英水 (1995): 交雑魚マダイ×クロダイの成長, 外部形態および環境ストレス耐性. 水産増殖, 43(1), 145-141.
- 村田 修・宮下 盛・那須敏朗・熊井英水 (1995): 交雑魚マダイ×ヘダイの成長, 外部形態および環境ストレス耐性. 水産増殖, 43(4), 475-481.
- 中村 将・岩橋正雄 (1982): ティラピア *Tilapia nilotica* の雄性ホルモン処理による雄化の実用化試験.

- 日水誌, 48(6), 763-769.
- Nguyen,H.D., K.Mushiake, T.Nakai, and K.Muroga (1997): Tissue distribution of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in adult striped jack. *Dis. Aquart. Org.*, 28(2), 87-91.
- 中井敏博・Nguyen Huu Dung・西澤豊彦・室賀清邦・有元 操, 大槻観三 (1994): クエおよびトラフグにおけるウイルス性神経壊死症の発生. *魚病研究*, 29(3), 211-212.
- Nguyen,H.D., T.Nakai, and K.Muroga (1996): Progression of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) infection naturally and experimentally infected striped jack *Pseudocaranx dentex* larvae. *Dis. Aquart. Org.*, 24(2), 99-105.
- 那須敏朗・村田 修・宮下 盛・家戸敬太郎・池田静徳・熊井英水 (1993): マハタ幼魚の成長に及ぼす飼育水温の影響. 平成5年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 308.
- 岡村雄吾 (1990): 種苗生産技術開発試験 (アカハタ). 昭和63年度高知県水産試験場事業報告書, 1-6.
- 岡田貴彦・澤田好史 (1999): 最新海産魚の養殖, 第3章クエ, 湊文社, 東京, 173pp.
- 挾間弘学 (1999): クエ種苗生産技術開発試験. 和歌山県農林水産総合技術センター水産増殖試験場報告, 31, 1-5.
- 岡田貴彦・米島久司・向井良夫・澤田好史 (1996): 人工孵化クエ稚魚の環境ストレス耐性について. 近畿大学水産研究所報告, (6), 139-146.
- 水産庁・(社)日本栽培漁業協会編 (2001): 平成11年度栽培漁業種苗生産, 入手・放流実績 (全国), 資料編, 67p.
- (社)日本栽培漁業協会編 (1993): 平成3年度日本栽培漁業協会事業年報. Ⅲ種苗生産技術開発の概要, Ⅲ-3種苗生産技術の開発, Fキジハタ, 162pp.
- (社)日本栽培漁業協会編 (1993): 平成3年度日本栽培漁業協会事業年報. Ⅲ種苗生産技術開発の概要, Ⅲ-3種苗生産技術の開発, Kスジアラ, 175-176.
- (社)日本栽培漁業協会編 (1999): 平成9年度日本栽培漁業協会事業年報. Ⅲ種苗生産技術開発の概要, Ⅲ-3種苗生産技術の開発, Kスジアラ, 184-186.
- (社)日本栽培漁業協会編 (1999): 平成11年度日本栽培漁業協会事業年報. Ⅲ種苗生産技術開発の概要, Ⅲ-3種苗生産技術の開発, Kスジアラ, 171-176.
- 崎山一孝 (1993): 日本栽培漁業協会におけるクエの種苗生産の現状. *水産増殖*, 41, 570-571.
- (社)日本栽培漁業協会編 (2002): 平成12年度日本栽培漁業協会事業年報. 12上浦事業場, 6-(4)クエの量産飼育試験, 289pp.
- 静岡県栽培漁業センター編 (1980): なむら第8号. 1pp.
- Smith,C.L., (1959): Hermaphroditism in some serranid fishes from Bermuda. *Pap. Michigan Acad. Sci., Arts, and Letters*, 44, 111-119.
- Smith,C.L., (1965): The patterns of sexually and the classification of serranid fishes. *Amer. Mus. Novit.*, No.2207, 1-20.
- S.M.TAN and K.S.TAN, (1974): Biology of the tropical grouper, *Epinephelus tauvina* (FORSKAL) I. A preliminary study on hermaphroditism in *E.tauvina*. *Singapore J.Pri.ind.*, 2(2), 123-133.
- 新聞脩子・辻ヶ堂諦 (1981): カサゴ親魚の生化学的性状と仔魚の活力について. *養殖研報*, (2), 11-20.
- (社)日本栽培漁業協会編 (1995): ウイルス性神経壊死症防除技術開発のこれまでの成果, 91p.
- 社団法人水産資源保護協会編 (1986): 浅海養殖, 大成出版社, 東京, pp.46-47.
- 澤田好史・家戸敬太郎・倉田道雄・山本眞二・村田 修・熊井英水 (1996): 人工孵化マハタの初期成長およびそのクエとの比較. 平成8年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, 79.
- 立原一憲・宮木廉夫・蛭子亮制 (1993): 魚類種苗生産技術研究, 長崎水試事報, 179p.
- 東京都水産試験場 (1999): A小笠原養殖技術開発試験, 3. アカハタ種苗生産試験. 平成10年度東京都水産試験場報告, 76-77.
- 照屋和久・升間主計・本藤 靖 (1992): 水槽内でのスジアラの産卵および産卵行動. *栽培技研*, 21(1), 15-20.
- 多和田真周・仲盛 淳・仲本光男・柏瀬純司 (2003): ヤイトハタ種苗生産. 平成13年度沖縄県水産試験場事業報告, 151-153.
- 土橋靖史・栗山 功・岡田一宏・高鳥暢子 (2003): クエ・マハタ種苗量産技術確立事業 (種苗生産技術開発). 平成14年度三重県科学技術振興センター水産研究部事業報告, 108-109.
- 立原一憲・蛭子亮制 (1993): マハタの種苗生産と養殖. *水産増殖*, 41, 570pp.
- 土橋靖史・栗山 功・黒宮香美 (2000): クエ・マハタ種苗量産技術確立事業 (種苗生産技術開発). 平成11年度三重県科学技術振興センター水産研究部事業報告,

- 162-171.
- 竹本悟郎・山田敏之・中田 久 (2000) : I. マハタ種苗生産試験. 平成11年度長崎県総合水産試験場事業報告, 95pp.
- 土橋靖史・栗山 功・黒宮香美 (2002) : クエ・マハタ種苗生産技術確立事業-I 種苗生産技術開発. 平成13年度三重県科学技術振興センター水産研究部事業報告, 111-113.
- 塚島康生・北島 力 (1983) : メチルテストステロン経口投与によるマハタの雄性化の促進. 長崎水試研報, 9, 55-57.
- 塚島康生・吉田範秋 (1984) : メチルテストステロン経口投与によるクエの雄性化の促進. 長崎水試研報, 10, 101-102.
- 田中秀樹・広瀬慶二・野上欣也・服部圭太・石橋矩久 (1990) : キジハタの性成熟と性転換. 養殖研報, 17, 1-15.
- 土橋靖史・田中秀樹・黒宮香美・柏木正章・吉岡 基 (2003) : マハタ雄性化のためのホルモン投与法の検討. 水産増殖, 51(2), 189-196.
- 土橋靖史・栗山 功・黒宮香美・柏木正章・吉岡 基 (2002) : マハタ種苗生産におけるウイルス性神経壊死症(VNN)の防除対策の検討. 水産増殖, 50(3), 355-361.
- 土橋靖史・栗山 功・黒宮香美・柏木正章・吉岡 基 (2003) : マハタの種苗生産過程における水温, 照明およびフィードオイルの影響. 水産増殖, 51(1), 49-54.
- Tanaka, S., H. Aoki, and T. Nakai (1998): Pathogenicity of the nodavirus detected from diseased sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Fish Pathol.*, 33(1), 31-36.
- 豊岡幸一 (1979) : ヒラメの環境悪化に対する抵抗力試験. 近畿大学卒業論文, 78pp.
- 棚田美幸 (1980) : トラフグの種苗生産と養成に関する研究. 近畿大学卒業論文, 149pp.
- 渡辺研一 (2000) : 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. 特別研究報告15号, 社団法人日本栽培漁業協会, 東京.
- 渡辺研一・吉水守 (1998) : オゾン処理海水を用いた飼育器具類および受精卵の消毒. 魚病研究, 33(3), 145-146.
- 山下金義 (1975) : スズキおよびイシダイ仔魚における点灯効果. 長崎水試研報, (1), 39-46.
- 山岡耕作 (2001) : キジハタ仔魚期に起こる「浮上へい死」とその原因を探る. 増殖, 緑書房, 東京, (2), pp.76-80.