

①

博士論文

シマアジおよびブリの親魚養成技術の 開発に関する研究

(Studies on technical development of brood stock
management in striped jack and yellowtail)

平成6年7月

広島大学大学院生物圏科学研究科

虫明敬一

目 次

緒 論	1
第 1 章 シマアジの成熟および産卵に関する親魚養成技術	4
第1節 採卵用親魚の養成	4
1. 親魚の時期別養成管理	4
2. 寄生虫の駆除	5
第2節 養成親魚の産卵誘発	6
1. 加温処理	8
2. 加温とホルモンの併用処理	8
3. 水温上限制御処理	10
4. 無処理	10
5. その他	13
第3節 採卵とふ化仔魚の活力	15
1. 採卵方法の比較	17
2. 卵管理条件	20
3. 卵比重の変化	24
4. ふ化仔魚の活力判定	27
第4節 まとめ	39
第 2 章 シマアジのVNNに関する防除対策	41
第1節 間接ELISAによる親魚血漿抗体の検出	43
第2節 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	51
第3節 PCR法を用いたウイルス遺伝子の検出による産卵親魚の選別	59
第4節 ヨード剤を用いた卵消毒によるVNN防除の試み	68
第5節 まとめ	77

第3章	ブリの成熟および産卵に関する親魚養成技術	80
第1節	採卵用親魚の養成と採卵技術	80
1.	親魚の養成管理	80
2.	ホルモン処理による産卵誘発	82
3.	採卵と卵管理	86
4.	卵比重の変化	87
5.	ふ化仔魚の活力判定	89
第2節	産卵に及ぼす親魚養成餌料の影響	98
1.	モイストペレット給餌の効果	98
2.	ドライペレット給餌の効果	108
第3節	卵の最終成熟および産卵に及ぼす長日化処理の影響	112
第4節	まとめ	123
謝辞		125
要約		126
引用文献		130
SUMMARY		139

緒 論

海産魚介類の種苗生産技術は1960年代以降飛躍的に発展し、人工種苗放流技術開発による資源造成を目指した栽培漁業の取り組みが全国の関係各機関で推進されるようになってきている。1992年には魚類33種類および甲殻類12種類の人工種苗が放流されるに至っている（水産庁・日本栽培漁業協会，1994^{*1}）。人工種苗生産を行うに当たっては、親魚から大量の卵を確保することが先決問題であることは言をまたない。しかし近年、海産魚介類の天然資源量の減少に伴い十分量の成熟した親魚を入手することは、年々困難になってきている。そのため、栽培漁業の推進を図る上で、人工種苗生産に必要な大量の卵確保に向けて採卵用親魚の養成技術開発が重要な研究課題になってきている。

シマアジ *Pseudocaranx dentex*^{*2} は、わが国の本州中部以南から小笠原にかけて主に黒潮流域の太平洋沿岸に多く分布する回遊魚である。アジ科魚類の中でも最も美味とされ、その市場価値もきわめて高いことから産業上重要視されている。本種の養殖は、海面養殖が全国的に普及してきた1963年頃から始められ、1976年までは生産量も100トン未満の横這い状態であった（鳥島，1986）。その後、1983年には345トンまで漸増し、現在では千葉、静岡、三重、和歌山、高知、大分、長崎、宮崎および鹿児島県の各県で本種の養殖が行われ、漁業・養殖業生産統計年報によると1991年の年間生産量は1758トンにまで増加しており（Fig. 1）、養殖対象魚種としても重要な位置を占めている。本種の場合、天然種苗の量的確保が困難なため人工種苗を用いた増養殖の発展に期待せざるを得ない状況から、親魚養成技術の確立が強く望まれている。採卵用親魚の養成技術に関しては、これまでに岩本（1981）、原田ら（1984 a, 1984 b）、村井ら（1985 a）、松本・河野（1985）、加藤（1986）、長谷川（1986）、虫明ら（1989）および加藤ら（1990）の報告がある。これらの報告が示すように漁獲された天然成魚を飼育した養成親魚から安定した大量採卵を行うことは比較的困難であったが、1984年に東京都小笠原水産センターにおいて産卵誘発処理を施さずに大量の採卵に初めて成功した（村井ら，1985 a）。次いで、1986年に日本栽培漁業協会（以下日裁協と略記）古満目事業場において産卵誘発無処理での水槽内産卵に成功し、新たに水温上限制御処理を組み合わせることにより、比較的長期間にわたる大量の良質卵確保が可能となった（虫明ら，1989）。

また、1989年には新たに人工種苗放流による沿岸重要資源の資源培養を目標に飼付け型栽培漁業技術開発が始まった。その取り組みの先行対象魚種にシマアジが選定され、その生物学的種苗特性

^{*1} 水産庁・日本栽培漁業協会（1994）：平成4年度種苗放流実績。平成4年度栽培漁業種苗生産，入手・放流実績（全国）。水産庁・日本栽培漁業協会，東京，pp. 65-84.

^{*2} シマアジの学名は従来 *Caranx delicatissimus* であったが、Gushiken（1983）が *Pseudocaranx dentex*（Bloch et Schneider）を提唱し、現在ではこの学名が定着している。

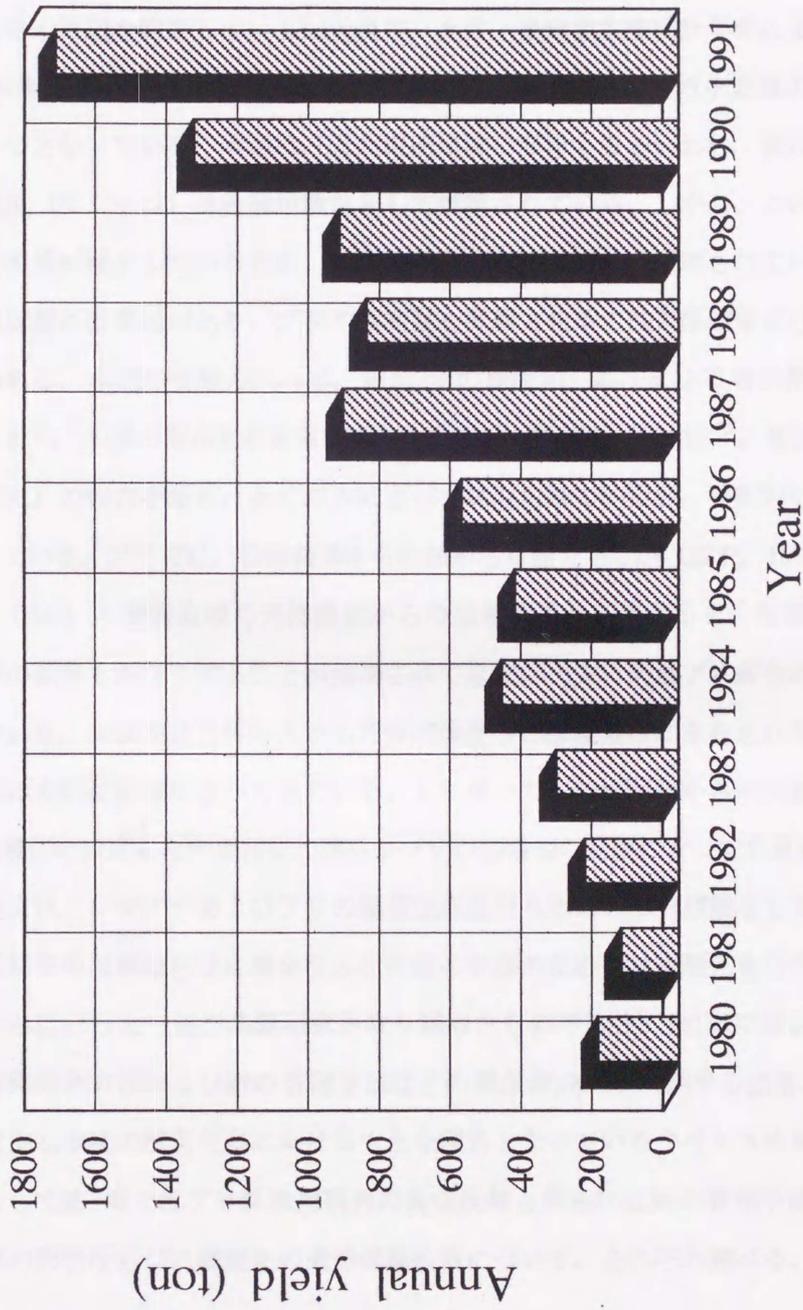


Fig. 1. Annual yield of striped jack by fishing and culture in Japan.

を生かした飼付け技術の開発が、現在静岡、三重、愛媛、高知、大分、長崎、熊本、鹿児島および沖縄の各県ならびに日裁協で行われている。この飼付け型栽培漁業技術開発は、現在進められているシマアジ放流種苗の飼付け漁場内での滞留あるいは逸散に関する要因の解析をもとにして、今後さらに高度回遊魚である他のアジ科魚類（ブリ *Seriola quinqueradiata* やヒラマサ *Seriola aureovittata*）ならびにクロマグロ *Thunnus thynnus* などの重要な栽培資源造成への応用も期待されている。

ブリは日本周辺を回遊している回遊魚で、漁業・養殖業生産統計年報によると1991年には漁業で約4万トン漁獲され、養殖で約15万トン生産されており、わが国の水産業の中でも最も重要な沿岸資源の一つとなっている。本種は、九州南西海域で産卵するといわれ、流れ藻について北上し回遊する幼稚魚（モジャコ）は養殖用種苗として捕獲されている。しかし、この天然モジャコも乱獲等により資源量が減少しているため、現在では漁獲期間が厳しく規制されている。また、同時に天然種苗の資源量には豊凶があり、ブリの増養殖を進展させるには天然種苗だけに依存できない状態になりつつある。本種の養殖の試みは、昭和2年の野網和三郎氏による香川県安土池での事例が最初である。また、本種の種苗生産を目的とした研究は、藤田ら（1965）¹、原田（1966）および榎田・落合（1971）の報告を始め、多くの人によって試みられているが、技術的にはまだ不確定要素が多く残されている。ブリでは、養殖親魚からの採卵も可能であるが（広沢、1972；落合・榎田、1979；有元ら、1987）、漁獲直後の天然親魚からの採卵成績と比較すると、採卵数が少なく受精後のふ化状況等の結果もかなり劣ることが指摘されてきた。一方、天然ブリ親魚の資源量は近年急激に落ち込んでおり、天然親魚自体の入手も定置網操業等の漁獲成績に左右されるため、安定した天然親魚の確保は次第に困難になってきている。したがって、養成親魚からの大量の良質な卵の確保に基づく人工種苗の安定した生産技術の確立がブリの増養殖の発展にとっても重要な課題となっている。

この論文は、シマアジおよびブリの種苗生産を行うための第一段階として、採卵用親魚の養成、良質な受精卵の確保ならびに健全なふ化仔魚の生産のための技術開発を行うため、日裁協古満目事業場を中心に行った一連の基礎研究を取り纏めたものである。第1章ではシマアジの採卵用親魚の養成、産卵誘発方法および卵の管理手法などの親魚養成全般に関する技術、第2章ではシマアジ仔魚期に発生し本種の種苗生産における大きな障害となっているウイルス性神経壊死症に関する防除対策、そして第3章ではブリ採卵用親魚の養成技術と得られた卵の管理手法、親魚の産卵に及ぼす飼育餌料の影響ならびに雌親魚の成熟促進技術について、それぞれ述べる。

¹ 藤田矢郎・道津喜衛・原田輝男（1965）：ホルモン刺激によるブリの人工採卵。昭和40年度日本水産学会秋季大会講演要旨集，308。

第1章 シマアジの成熟および産卵に関する親魚養成技術

種苗の量産を目的とした人工種苗生産を実施するに当たっては、飼育水槽および生物餌料培養水槽の数などの施設的な制約や生物餌料そのものの培養条件などの技術的問題がある。すなわち、生産尾数を増やすためには種苗生産回数を増加させる必要があり、そのためには親魚から長期間にわたり良質な卵を安定して確保する必要がある。

本章では、そのような条件を満たすために日裁協古満目事業場を中心に開発されたシマアジの親魚養成技術と産卵誘発処理方法、効率的なふ化仔魚生産のための卵の取り扱い方法と卵管理条件、および得られたふ化仔魚の活力判定手法について検討した。

第1節 採卵用親魚の養成

1. 親魚の時期別養成管理

シマアジの親魚養成は、親魚の成熟過程に合わせて養成期（6月～10月）、成熟期（11月～翌年1月）および産卵期（2月～5月）の3段階に分けて行った。いずれの年も養成期および成熟期における親魚養成は、古満目事業場海面小割生簀（ $5 \times 5 \times 5$ m；ポリエチレン製無結節網）で行い、産卵期は陸上水槽（実容量 65 kl；コンクリート製8角水槽）で行った。海上小割生簀および陸上水槽での親魚の収容密度は、それぞれ $2.16 \sim 3.57$ kg/m³ および $1.58 \sim 2.54$ kg/m³ であった。

養成期の親魚にはハマチ用配合飼料（丸紅飼料）と魚介肉ミンチ（マアジ *Trachurus japonicus*；マサバ *Scomber japonicus*；エビ（種不明）=2：1：1）とを等量混合して円柱状に造粒したモイストペレット（長さ 30 mm×直径 15 mm）を毎回魚体重の3.0%給餌した。いずれの年もモイストペレット 1 kgに対してNJフィードA（新日本飼料：外割5.0%）を添加した。このNJフィードAには、ビタミンB₁、CおよびEがそれぞれ2.0%、8.0%および2.0%含まれていた。次いで成熟期には、漸次マアジ、スルメイカ *Todarodes pacificus* およびエビをそれぞれ2：2：1の割合で混合した生餌に切り替えて給餌した（給餌率4.2%/魚体重/回）。成熟期に給餌した混合生餌には毎回NJフィードA（外割3.0%）のほか、フィードオイル（理研ビタミン：外割1.5%）およびビタミンEを強化したEフィードオイル（理研ビタミン：外割3.0%）を添加した。なお、養成期および成熟期における給餌はいずれの年も隔日給餌（3回/週）を原則とした。そして、産卵期には成熟期に給餌した餌と同じ組成の混合生餌にNJフィードA（外割3.0%）、Eフィードオイル（外割3.0%）およびイカ肝油（理研ビタミン：外割3.0%）を添加した餌を与えた。産卵期における給餌は、1987年において最終成熟期における親魚の腹部への脂肪蓄積を抑えることと水槽内の残餌処理作業の軽減化を目的として隔日給餌とした以外は、後述（第2章第2節）するように産卵期間中

の親魚の体力消耗を考慮して毎日給餌した（給餌率4.2%/魚体重/回）。

これまで行ってきたシマアジの産卵試験の結果から判断すると、親魚の成熟過程に合わせて養成時期を設定し、その時期ごとにモイストペレットと生餌とを給餌し分ける混合型の給餌が、本種の親魚養成ならびに安定した大量採卵を行うための有効な方法と考えられた。シマアジが養殖魚種として注目され始めた頃の親魚養成には、年間を通してマサバあるいはマイワシ *Sardinops melanosticta* だけの単一生餌、あるいはモイストペレットにおいてもマイワシのミンチを主としたタイプや配合飼料を主としたタイプの餌が多く用いられていた。しかし、このような給餌条件下で養成された親魚では腹部への脂肪蓄積が著しく、大量採卵はまず不可能なことが経験的に知られている。親魚養成における単一生餌給餌の欠点は、購入する生餌のロットにより品質が不安定であること、および栄養的バランスに偏りがあるために長期間の給餌が栄養性疾病を引き起こす可能性が高いことなどが考えられる。一方、混合生餌あるいはモイストペレットが有利な点は、比較的各種栄養素のバランスが保たれること、およびモイストペレットの場合には成熟および産卵に有効な各種成分の組成が自由に改変できること、餌に添加した各種有効成分が生餌に比較して海水中で溶出しにくく確実に魚体内に取り込まれることにあると言えよう。また、ブリにおいては、近年育成用飼料としてドライペレットが開発され、成長等に有効であると報告されている（Watanabe *et al.*, 1991c ; Viyakarn *et al.*, 1992）。ドライペレットは、生餌やモイストペレットに比べて漁場環境汚染の可能性が低いこと、品質が安定していること、各種栄養素の添加が容易なこと、餌由来の病原微生物感染の可能性がきわめて低いことおよび調餌作業の軽減化等の多くの利点を有することを考慮すると、シマアジにおいても今後ドライペレット給餌による親魚養成の可能性について検討する必要があると考えられる。さらに、産卵親魚のn3系高度不飽和脂肪酸欠乏により、それらの親魚から得られた仔魚の疾病に対する感受性増大の可能性も懸念される。本研究では、上述したようにこれまで親魚の産卵期にイカ肝油（外割3.0%）を添加して高度不飽和脂肪酸の強化を目的とした給餌を行ってきたが、この量的割合が適正なものであったかどうかについても、今後さらに検討を要する項目と考えられる。

2. 寄生虫の駆除

シマアジは養殖対象魚種の中では比較的疾病に罹りにくいと言われている。本種の再生産機構に関与し、仔魚期に大きな被害をもたらすウイルス性神経壊死症（第2章にて詳述）を除くと、稚魚から成魚への育成期間中の養殖の対象となる時期においては、これまでイリドウイルス感染症（井上ら, 1992^{*1}）、パストレラ症（Nakai *et al.*, 1992）、ミコバクテリウム症（楠田ら, 1993）、カ

^{*1} 井上 潔・山野恵祐・松岡 学・中島員洋・反町 稔（1992）： 数種の海産養殖魚類にみられた“イリドウイルス感染症”。平成4年度日本魚病学会春季大会講演要旨集，30。

リグス症、および黄色脂肪症（和田ら，1991）の報告がある程度である。これらの疾病のうち、シマアジの養殖あるいは採卵用親魚の養成を行う上で最も頻繁に見られるのが寄生性カイアシ類のカリグスによる寄生虫症である。Ogawa（1992）は、養殖シマアジの体表に寄生するカリグスを *Caligus longipedis* と同定し、本種は水温21.2°Cにおいて約2週間で回転する生活環を有することを報告している。*C. longipedis* の寄生自体が直接の原因となってシマアジの大量斃死を引き起こすことはないとしても、宿主がカリグス寄生により魚体を網地等に接触させることによって生じる体表部のスレからの細菌等の侵入し二次感染が生じる可能性は十分考えられる。古満目事業場においても養成中の親魚の体表縁辺部に *C. longipedis* の寄生がしばしば認められる。Fig. 2にシマアジ（尾又長56.9 cm，体重4.15 kg；12月（水温18.2°C））の左側体側における *C. longipedis* のカリムス期幼生の寄生例を示した。その駆虫対策としては、もっぱらその時の海水温と同水温に調温し十分にエアレーションを施した水道水を用いて約5分間の淡水浴を実施してきた。また、カリグス駆除にはブリのはだむし（*Benedenia seriolae*）症の駆除対策（後述：第3章第1節）と同様に過酸化水素（商品名：マリンサワー）による駆除も有効であると言われているが、古満目事業場では魚体への安全性を考慮して淡水駆除を行ってきた。シマアジが肌擦れに大変弱いことを考え合わせると、従来行ってきたように産卵水槽への収容ならびに沖出しなどのハンドリングを必要とする時に麻酔をかけながら淡水浴を行うのが、採卵用親魚への影響を最小限に抑える最も良い方法と考えられる。

第2節 養成親魚の産卵誘発

栽培漁業を推進する上で、成熟した親魚から大量の良質な卵を確保することは、その後に続く種苗生産のための第1段階である。天然魚としてのシマアジ成魚（魚体重1 kg程度）が漁獲されることはあっても、採卵可能な成熟親魚が漁獲されることはまずない。そのため、漁獲された天然種苗あるいは種苗生産された人工種苗を飼育して親魚を養成し、それらの親魚を用いて産卵を誘発する以外に安定した卵の入手方法はない。また、古満目事業場で確認された親魚の初産の年齢は、天然種苗由来および人工種苗由来の親魚でそれぞれ6歳および7歳であった。そのため、稚魚段階からのシマアジの親魚養成には長期間を要し、このことが天然親魚の入手がきわめて困難なことと相俟って、本種の親魚養成のネックになっていると言えよう。さらに、近年日本近海に棲息するシマアジの遺伝学的特性の違いが指摘されている。すなわち、本州、四国および九州の太平洋沿岸に棲息するシマアジのほとんどが脊椎骨数25のAタイプと称される形態学的特徴を有するのに対して、小笠原周辺海域に棲息するシマアジは脊椎骨数24のBタイプと報告されている（Yamaoka *et al.*, 1992；益田ら，1993）。脊椎骨数以外の両タイプの違いについては、外見上Bタイプの方が体色の青味が強く成長が早い点を除くとまだ十分に検討されておらず、今後の生態学的研究等が必要とされてい

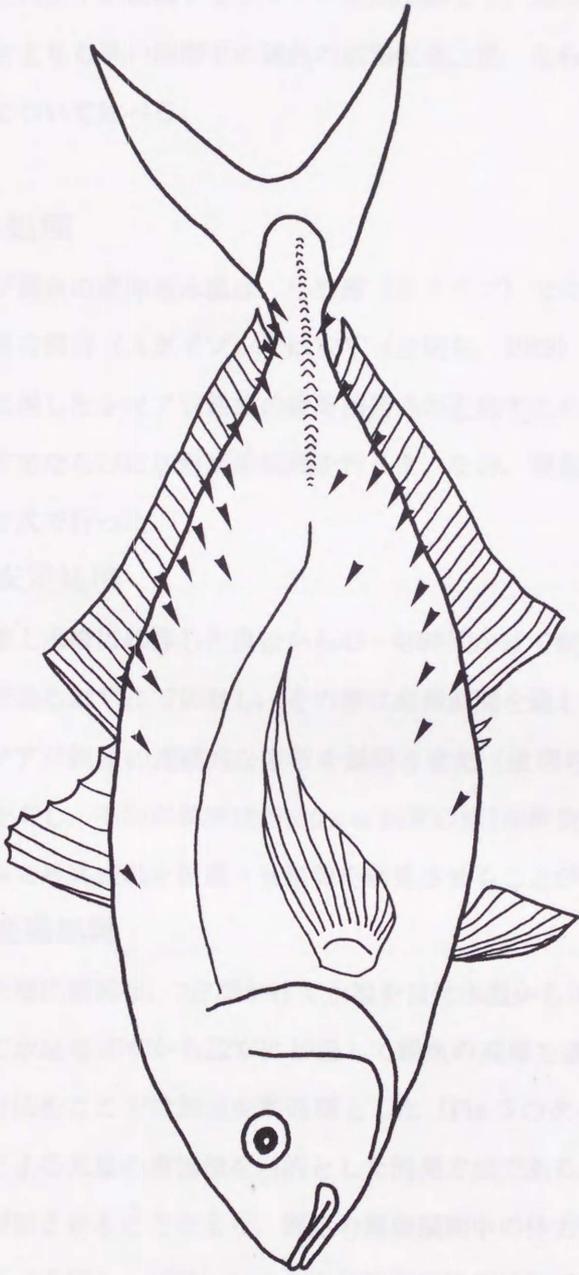


Fig. 2. Attachment sites of *Caligus longipedis* chalimus on striped jack (only left side of the body is shown).

る。村井ら（1985 a），加藤（1986）および加藤ら（1990）の報告は，小笠原父島で漁獲し飼育した親魚の養成ならびに自然産卵に関する試験結果であり，いずれも上記Bタイプのシマアジに関する報告と推察される。一方，日裁協古満目事業場で養成し本研究に供した採卵用親魚は，天然種苗および人工種苗由来の両親魚ともすべて脊椎骨数25のAタイプであった。

本節ではAタイプに属するシマアジ親魚に関して，通常の時期の産卵を目的とした誘発方法のほかに，通常よりも早い段階での親魚の成熟促進方法，ならびに親魚の産卵期間を延長させるための処理方法について述べる。

1. 加温処理

シマアジ親魚の産卵適水温は，小笠原（Bタイプ）では20℃（村井ら，1985 a）であるのに対して，高知県古満目（Aタイプ）では22℃（虫明ら，1989）と報告されている。したがって，本研究では試験に供したシマアジ親魚の産卵誘発処理を施すための飼育水の加温水温は22℃に設定し，以下の加温安定ならびに加温変動処理を行った。なお，親魚飼育水の加温はすべてボイラーによる加温水注入方式で行った。

1) 加温安定処理

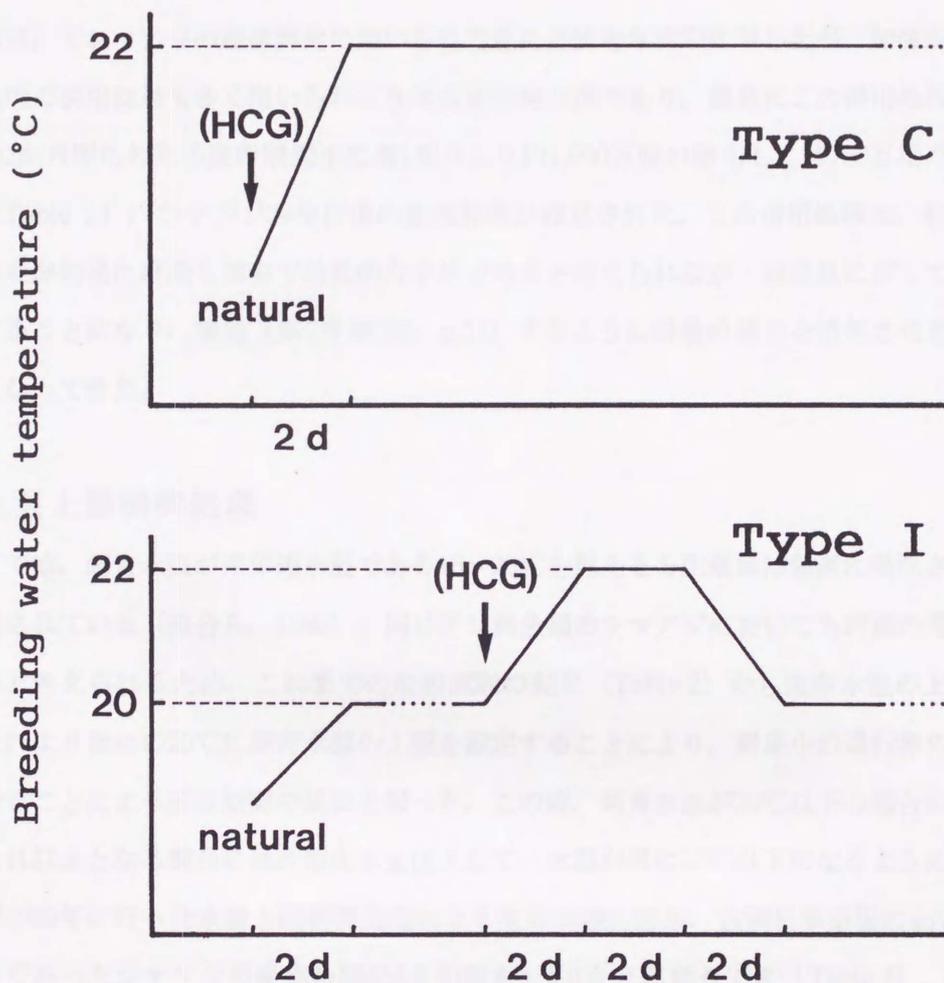
親魚を陸上水槽に収容した直後から45～48時間かけて飼育水温を自然水温（17～18℃）から産卵最適水温である22℃まで加温し，その後は産卵期間を通して22℃を維持するという加温安定処理により，シマアジ親魚の連続的な産卵を誘発させた（虫明ら，1989）（Fig. 3のタイプC）。過去に産卵経験を有し，平均卵巣卵径が650 μ m程度の第3次卵黄球期の卵を有する親魚であれば，加温安定処理のみで最終成熟を促進させ産卵を誘発させることが十分可能であった。

2) 加温変動処理

親魚を水槽に収容後，2日間かけて水温を自然水温から20℃まで加温して維持し，必要に応じて2日間かけて水温を20℃から22℃に加温して親魚の産卵を誘発し，産卵後には水温を2日間で20℃まで下げる方法をここでは加温変動処理とした（Fig. 3のタイプI）。加温安定処理が連続的産卵を促すことによる大量の卵確保を目的とした誘発方法であるのに対し，加温変動処理は必要に応じて断続的に産卵させることにより，親魚の産卵期間中の体力消耗を軽減させることを目的とした誘発方法である（虫明ら，1993 a）。この加温変動処理は加温安定処理に比較し得られる卵の量は少なくなる反面，親魚に過剰なストレスを与えることもなく比較的良質な卵の確保が可能であった（第2章第2節）。

2. 加温とホルモンの併用処理

シマアジの産卵試験に初産の親魚を使用する場合や生殖腺指数（gonado-somatic index : GSI）が



Type C: Water temperature was kept constantly at 22 °C for induction of spawning. d=day

Type I: Water temperature was raised intermittently from 20 °C to 22 °C each time when spawning was intended.

Fig. 3. Induction methods used in the study for striped jack spawners.

低い親魚を供する場合には、上記の加温安定処理だけでは完全に産卵を誘発することができなかつた。そのため、親魚を陸上水槽に収容する直前に、排卵促進用にブリでの試験結果（第3章第1節，p.82）を参考に魚体重1kg当たり600IUを基準注射量としてHCG（human chorionic gonadotropin：帝国臓器製薬）を背部筋肉内に注射した。注射した親魚は可能な限りショックを与えないように水槽に収容し、以後は上記の加温安定処理により22°Cで親魚の産卵を誘発した。Table 1に日裁協（古満目）でシマアジの産卵誘発に用いられてきた方法を年度別に示したが、加温安定処理とホルモン処理の併用は最も多く用いられてきた産卵誘発方法であり、親魚にこの併用処理を施すことにより約2か月間にわたる産卵期間中に雌1尾当たり約1,000万粒の卵もしくは700万尾のふ化仔魚が得られ（Table 2），シマアジふ化仔魚の量産体制が確立された。この併用処理は、特にシマアジ初産魚の産卵誘発には最も確実に効果的な手法であると考えられるが、経産魚に対しては連続産卵を誘発することになり、後述（第2章第2節，p.51）するように親魚の体力を消耗させることが最近明らかになってきた。

3. 水温上限制御処理

ブリでは、飼育水温が産卵適水温である18~20°Cを越えると生殖巣は急激に吸収されて退縮すると報告されている（落合ら，1980）。同じアジ科魚類のシマアジにおいても同様の現象が十分起こりうると考えられるため、これまでの産卵試験の結果（Table 2）から産卵水温の上限を22°Cと考え、それより低めの20°Cに飼育水温の上限を設定することにより、卵巣中の退行卵の出現時期を遅延させることによる産卵期間の延長を図った。この時、飼育水温が20°C以下の場合には自然水温とし、これ以上となる場合には冷却海水を注入して、水温が常に20°C以下になるようにした。1988年および1989年に行った水温上限制御処理による産卵試験の結果、古満目事業場において従来5月中旬までであったシマアジの産卵時期が6月中旬まで約1か月間延長でき（Table 2），遅い時期でのふ化仔魚の生産も可能となった。しかし、両年とも親魚は群として少なくとも40回程度の産卵を繰り返したことにより、体力を著しく消耗させ、後述するように神経壊死症原因ウイルスの体内増殖を招いたと考えられ、健全なふ化仔魚生産の観点から考えるとむしろマイナスに作用する処理方法と考えられた。

4. 無処理

シマアジ親魚の産卵誘発処理方法として、加温処理、加温とホルモンの併用処理および水温上限制御処理がそれぞれの目的に有効であることは上述した通りである。しかし、これらの処理による産卵誘発だけではAタイプのシマアジ本来の産卵生態については不明な点が多い。そこで、1986年から1990年の5年間にわたり、自然水温下で誘発無処理の産卵試験を行った。いずれの年も産卵は4

Table 1. Induction methods used for spawning of striped jack from 1985 to 1993 in JASFA (Komame)

Year	Induction method for spawning * ¹				
	C	I	C+H	N	ULC
1985	0/3* ²	ND* ³	2/3	ND	ND
1986	ND	ND	3/4	1/1	ND
1987	1/1	ND	2/3	1/1	ND
1988	ND	ND	2/3	1/1	1/1
1989	ND	ND	2/3	1/1	1/1
1990	3/3	ND	3/4	1/1	ND
1991	2/4	ND	3/3	ND	ND
1992	ND	5/5	ND	ND	ND
1993	ND	4/5	ND	ND	ND
Total	6/11	9/10	17/23	5/5	2/2

*¹ Induction method , C : water temperature was kept constantly at 22 °C, I : water temperature was raised intermittently from 20 °C to 22 °C, C+H: method C+HCG injection, N: water temperature was subjected to the natural fluctuations, ULC: water temperature was kept at 20 °C or lower.

*² Number of larval productions successful/conducted.

*³ ND, not done.

Table 2. Results of collecting eggs from brood stocks of striped jack at Komame Station of JASFA from 1985 to 1993

Year No.	Brood stock			Induction method of spawning*	Spawning temperature (°C)	Spawning period	Mean value/fish (x10 ⁴)				Hatching rate* ⁴ (%)	
	Origin* ¹	Age	No. (F:M)* ²				Total eggs produced	Floating eggs	Fertilized eggs	Hatched larvae		
1985	1	W	7	19 (10:9)	C+H	21.7-22.1	Mar. 9-Apr.14	354.9	224.8	209.3	165.2	46.5
	2	W	7	18 (12:6)	C+H	21.8-22.2	Mar.8-May 3	521.3	335.0	295.6	240.6	46.2
1986	1	W	8	24 (15:9)	C+H	19.1-22.1	Mar. 5-Apr.20	406.1	214.8	198.7	127.5	31.4
	2	W	8	24 (16:8)	C+H	20.3-22.4	Mar.14-May 2	558.5	248.8	221.6	133.6	23.9
	3	W	8	22 (8:14)	N	17.0-20.8	Apr.10-May 30	265.6	88.6	65.6	49.8	18.8
	4	W	6	25 (18:7)	C+H	22.0-22.1	May 5-May 13	10.8	0.9	0.2	0.2	1.9
1987	1	W	9	21 (11:10)	C+H	21.9-22.4	Mar.7-May 2	809.3	381.0	340.2	238.8	29.5
	2	W	10	28 (14:14)	C+H	19.5-22.3	Mar.12-May 8	861.5	384.5	336.9	207.0	24.0
	3	W	9	22 (11:11)	C	21.7-22.0	Mar.23-May 10	736.4	371.7	354.1	239.3	32.5
	4	W	9	18 (9:9)	N	16.4-22.9	Apr.5-Jun.1	407.0	110.3	99.0	64.6	15.9
1988	1	W	11	26 (16:10)	C+H	21.7-22.2	Mar.9-May 8	1211.4	893.8	788.3	677.3	55.9
	2	W	10	20 (10:10)	C+H	21.9-22.5	Mar.19-May 16	1136.8	943.7	833.3	742.3	65.3
	3	W	10	20 (10:10)	ULC	17.5-20.5	Apr.10-Jun.17	690.2	639.0	536.6	445.6	64.6
	4	W	10	19 (10:9)	N	17.5-22.5	Apr.10-May 29	328.3	295.3	238.3	174.4	53.1
1989	1	W	12	24 (12:12)	C+H	21.6-22.1	Mar.8-May 6	1166.6	1104.7	1009.8	863.2	74.0
	2	W	11	20 (10:10)	C+H	21.5-22.1	Mar.16-Apr.24	844.0	778.2	746.8	638.3	75.6
	3	W	11	19 (10:9)	N	17.7-22.6	Apr.4-Jun.12	661.6	631.7	616.1	567.5	85.8
	4	W	11	20 (10:10)	ULC	17.7-20.8	Apr.9-Jun.7	924.7	875.1	832.7	749.0	81.0
1990	1	W	12	8 (4:4)	C	21.6-21.8	Jan.10-Mar.22	1013.5	941.3	916.8	777.3	76.7
	2	W	12	10 (6:4)	C	21.7-22.4	Feb.28-Apr.29	1181.5	1117.2	1083.2	979.0	82.9
	3	W	13	21 (15:6)	C+H	21.5-22.4	Feb.23-Jun.4	1413.5	1349.7	1256.5	1101.8	77.9
	4	D	9	24 (12:12)	C+H	21.8-22.3	Apr.3-Apr.11	15.8	9.0	3.4	1.2	9.6
	5	W	12	19 (10:9)	N	17.4-22.3	Mar.30-Jun.4	490.7	461.2	426.9	332.9	67.8
	6	W	12	19 (12:7)	C	21.6-22.5	Mar.28-Jun.4	1117.6	1078.7	1033.1	936.9	83.8
	7	D	9	24 (12:12)	C+H	21.9-22.4	Apr.16-May 10	105.1	96.3	93.8	81.8	77.8
1991	1	D	6	21 (6:15)	C+H	21.7-22.3	Jan.13-Jan.18	21.3	16.8	12.5	6.7	31.3
	2	W	13	16 (9:7)	C	19.7-22.1	Mar.8-May 14	1212.6	1130.1	1016.0	938.8	77.4
	3	W	13	17 (6:11)	C	19.8-22.2	Mar.8-May 8	1392.7	1223.8	1101.8	994.0	71.4
	4	D, W	10, 7	25 (13:12)	C+H	19.2-22.2	Mar.7-Apr.17	61.8	47.9	38.6	27.2	44.1
	5	D	10	18 (8:10)	C+H	21.8-22.1	Apr.1-Apr.13	25.6	17.3	16.1	11.0	42.9
1992	1	D, W	11, 8	21 (7:14)	I	21.9-22.2	Jan.9-Mar.3	103.3	84.0	65.3	58.0	56.2
	2	W	14	9 (6:3)	I	20.1-22.3	Jan.16-Apr.23	1124.7	1043.8	911.8	852.0	75.8
	3	W	14	14 (6:8)	I	19.8-22.0	Jan.25-Apr.19	1036.3	923.8	780.7	716.5	69.1
	4	D	11	13 (6:7)	I	21.8-22.1	Jan.28-Apr.11	23.5	13.7	9.5	5.7	24.1
	5	D, W	7, 8	12 (7:5)	I	21.7-22.0	Feb.20-Apr.10	39.4	23.1	16.4	11.6	29.3
1993	1	D	12	13 (6:7)	I	21.8-22.1	Jan.16-Feb.8	54.0	46.2	42.7	39.2	72.6
	2	D, W	8, 9	16 (10:6)	I	21.6-22.0	Jan.31-Apr.12	333.4	306.8	284.7	269.5	80.8
	3	W	15	12 (6:6)	I	20.1-22.2	Jan.31-Apr.5	765.0	728.5	684.5	664.8	86.9
	4	W	15	12 (6:6)	I	19.8-22.0	Feb.27-May 17	1068.7	992.0	930.7	854.7	80.0

*¹ W: wild (captured and reared), D: domestic (reared from larval stage).

*² F: female, M: male.

*³ See footnote in Table 1.

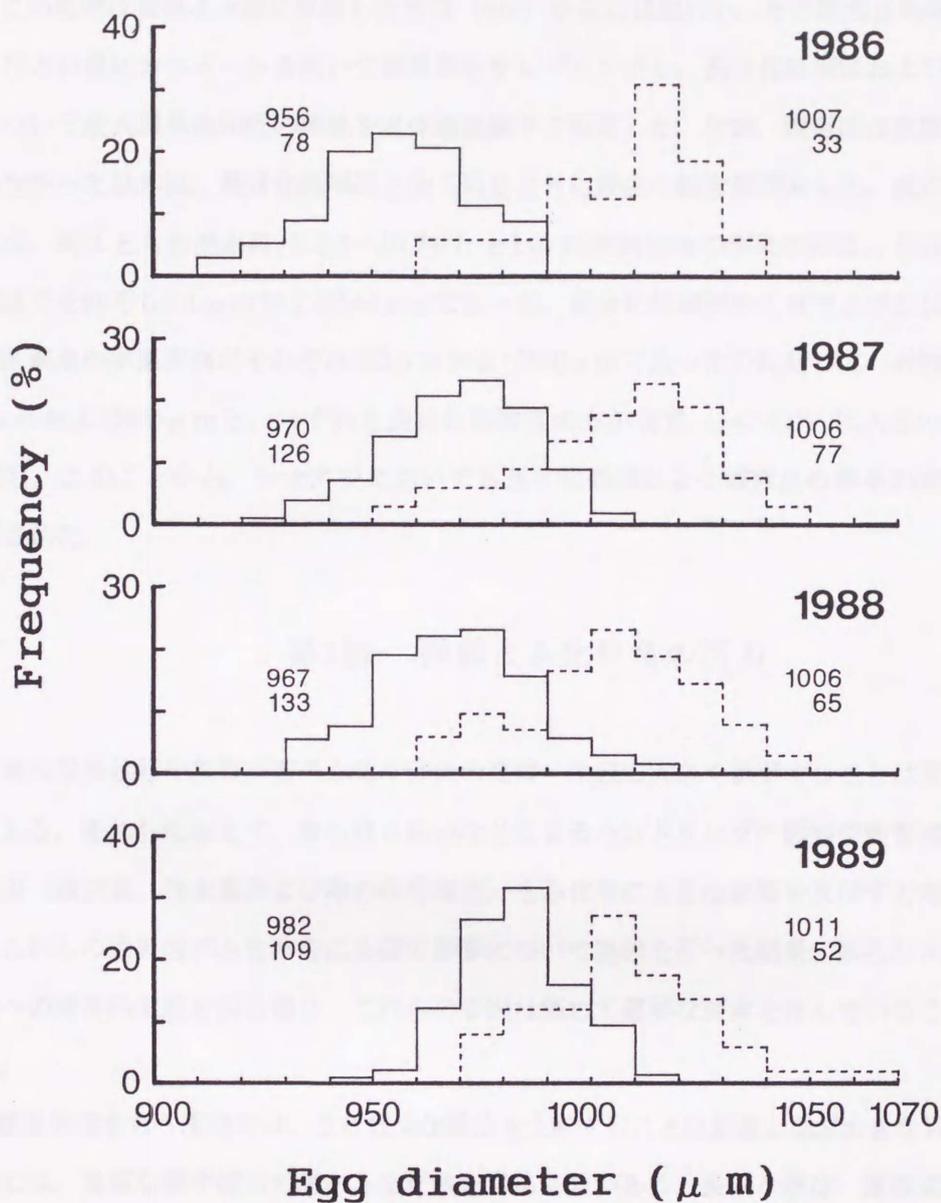
*⁴ Hatching rate was calculated by following equation:

$$\text{Hatching rate (\%)} = (\text{Number of hatched larvae}) \div (\text{Total eggs collected}) \times 100$$

月初旬（1990年のみ3月30日）から始まり、5月末までの約2か月間継続した（Table 2）。その間の水温は、16.4～22.9℃であった。村井ら（1985 a）および加藤ら（1990）は、小笠原におけるBタイプのシマアジの無処理での自然産卵が認められた水温は、それぞれ18.5～21.5℃および18.6～22.7℃であったと報告している。今回得られたAタイプのシマアジの産卵水温の範囲は、上限および下限ともこれらの水温を越える結果となり、Bタイプ親魚よりも広い水温帯で産卵可能であることが判明した。無処理で産卵させた雌親魚の1尾当たりの産卵数は266～662万粒であり、前述した加温安定処理区、加温変動処理区あるいは加温とホルモン併用処理区の親魚の産卵数と比較するといずれも少ない結果となった（Table 2）。これは、飼育水温が自然水温の変動に委ねられているために親魚の産卵適水温が維持されにくく連続的な産卵誘発を受けにくいことに起因していると考えられる。そのため、大量の卵を確保するという観点から判断すると、無処理での産卵は非効率的な方法と言える。しかし、無処理条件下で飼育した親魚の産出卵の卵径は、加温とホルモンの併用処理を施した親魚から得られた卵径よりも産卵期間を通して常に約40 μ m程度大きかった（Fig. 4）。このようなホルモン処理による産出卵の卵径への影響に関しては、カンパチ *Seriola dumelili*（立原ら、1993）においても報告されているが、ホルモンの作用機序と卵径との関係については不明のままである。村井ら（1985 b）はシマアジ親魚の卵巣卵の組織学的検査を行った結果、本種の卵巣卵の発達は非同時型に属することを報告している。このような非同時発達型の卵巣卵を有する魚種としては、マダイ *Pagrus major*（松浦、1972）、メダカ *Oryzias latipes*（Yamamoto and Yoshioka, 1964）およびアユ *Plecoglossus altivelis*（松山・松浦、1984）などが良く知られている。これらの魚種が多回産卵型魚種であり、産卵期は一般に長く、その間に未発達な卵母細胞から卵黄形成期への補充が起こると言われている（高野、1989）。シマアジの場合にも全く同様の可能性が示唆され、本種が多回産卵型の魚種であることを裏付けている。したがって、上述したような無処理と加温・ホルモン併用処理とによる卵径の違いは次のように推察された。すなわち、加温・ホルモン併用処理の場合には飼育環境水温が常に産卵適水温である22℃に保たれることにより、体内の成熟ホルモン等による排卵作用が促進されるため卵巣内での未完熟卵も排卵される可能性が高くなり、結果的に小型の卵径を有する卵が産卵されるのに対して、無処理の場合には自然水温の変動に合わせて親魚の体内リズムが変化し、産卵至適条件に達するまでに十分な卵黄蓄積等がなされた後に完熟卵を排卵するため、産出卵の卵径が現象的に大きいのではないかと考えられた。

5. その他

産卵試験に供する雌親魚の成熟を促進する手法の一つとして後述（第3章、p.112）するように長日化処理による卵形成の促進がブリでは認められているが（Mushiake et al., 1994 b）、シマアジ親魚にも同様の可能性があるかどうかを検討した。長日化処理方法の詳細に関しては後述（第3章



 Eggs obtained from striped jack brood stock kept constantly at 22°C of water temperature.
 Eggs from the fish under natural water temperature.

Fig. 4. Distribution of diameter of striped jack eggs obtained by different induction methods of spawning. Numerals in each figure represent the mean diameter (μ m) of eggs (upper) and examined number of eggs (lower).

第3節) するが、水槽上部に200 Wのランプ2基を設置し、18:00～24:00までの6時間水槽表面を照射した。この処理は親魚を水槽に収容した当日(0日)から21日間行い、その間長日処理開始0日、10日および21日後にカニューレを用いて卵巣卵をサンプリングし、長日化処理区および対照区の各雌親魚について最大卵巣卵50粒の卵径を実体顕微鏡下で測定した。なお、対照区は夜間の長日化処理を行わなかった以外は、長日化処理区と全く同じように親魚の飼育管理をした。長日化処理期間中の水温は、両区とも自然水温(18.4～19.7℃)とし、試験開始時の卵巣卵径は、長日化処理区および対照区でそれぞれ570 μ mおよび544 μ mであった。長日化処理開始10日および21日後には、長日化処理区親魚の卵巣卵径がそれぞれ753 μ mおよび840 μ mであったのに対して、対照区ではそれぞれ588 μ mおよび645 μ mと、いずれも長日化処理区の方が有意($p<0.01$)に大きい値を示した(Table 3)。このことから、シマアジにおいても長日化処理による雌親魚の卵巣の成熟促進の可能性が示された。

第3節 採卵とふ化仔魚の活力

産卵親魚の栄養状態や卵質が卵のふ化や仔魚の発育・生残に大きく影響することは言うまでもないことである。それらに加えて、卵の取り扱いなどによるハンドリングの影響や卵管理時における種々の要因(通気量、注水量および卵の収容密度)もふ化率に大きな影響を及ぼすと考えられる。本節ではこれらの諸要因がふ化率等に及ぼす影響について実験を行った結果、限られた産出卵からふ化仔魚への効率的生産を図る場合、これらの要因は極めて重要な要素を含んでいることが明らかとなった。

また、種苗生産を行う現場では、より健全な種苗を生産することは量産と並ぶ大きな目標である。そのためには、良質な卵や活力の高いふ化仔魚を得る必要がある。良質な卵は、産卵親魚の栄養状態に左右されるため、優良親魚の養成が重要となってくる。一方、仔魚の活力に関しては、これまでも経験的あるいは感覚的にある程度とらえられてきているものの、活力を仔稚魚の体重などと同様に数値化しない限り、科学的な検討対象とすることは困難である。人工種苗の質的評価に関しては、サケ *Oncorhynchus keta* (中野・白旗, 1988) で魚の成長記録と生体成分の分析や遊泳速度の測定による種苗性の評価、またマダイ(福原, 1974; 慶徳ら, 1985; 福原, 1986; 丸山ら, 1986) では無給餌飼育による仔魚の質的選別および空中乾出や麻酔抵抗性による種苗性の評価について検討がなされている。また、カサゴ *Sebastes marmoratus* ではふ化仔魚の無給餌飼育(飢餓耐性試験)を行い、その生残尾数と生残日数から無給餌生残指数(Survival Activity Index; 以下SAIと略記)を求めて、ふ化仔魚の活力判定の評価指標とすることが提案されている(新聞・辻ケ堂, 1981)。そこで、シマアジにおいてSAIがふ化仔魚の活力評価に応用できるかどうかについて

Table 3. Effect of extended daylength by artificial lighting on the ovarian maturation of female striped jack

Treatment of fish	Individual No. of female fish	Days after start of experiment		
		0	10	21
EDAL* ¹	1	578±22* ²	756±34	826±39
	2	569±27	728±31	845±37
	3	572±28	774±29	868±46
	4	553±22	780±51	823±39
	5	577±34	753±36	846±27
	6	573±25	729±35	834±38
	Mean±SE	570±26	753* ³ ±36	840* ⁴ ±38
Control	1	581±34	612±36	687±35
	2	527±35	589±42	642±28
	3	542±26	598±30	666±38
	4	540±31	556±28	597±42
	5	528±30	587±37	634±39
	Mean±SE	544±31	588±35	645±36

(done in 1992)

*¹ EDAL : extended daylength (18:00 to 24:00) by artificial lighting.

*² Mean of oocyte diameter ± standard error (µm).

*³ Significantly different (p<0.1) as compared with the mean of oocyte diameter at the 10th day in the control group (t-test).

*⁴ Significantly different (p<0.01) as compared with the mean of oocyte diameter at the 21st day in the control (t-test).

検討した。

本節では、シマアジの採卵方法、卵管理条件およびふ化仔魚の活力判定手法について述べる。

1. 採卵方法の比較

シマアジの卵は分離浮性卵である。したがって、産出卵の採集に当たっては水槽中央部から4本のサクシオンホース（直径50 mm）を用いてサイフォンで水槽の表層水を隣接した集卵槽に導入し、採卵ネット（直径70 cm×深さ60 cm）でろ過収集する方法をとった。採卵ネットに採集した卵は海水とともに掬い取ってバケツに収容し、その後メスシリンダーに再収容して浮上卵と沈下卵とに分離して浮上卵率を求め、水温22°Cに調温したふ化水槽（10 kl）に設置したふ化ネット（直径90 cm×深さ75 cm）に浮上卵のみを収容した。ここではまずバケツからメスシリンダーに収容する時の卵の取り扱い方法の違いが、卵の浮上卵率、ふ化率およびふ化仔魚の活力に及ぼす影響について検討した。

材料および方法

供試卵 1988年、1990年、1991年および1992年に行った試験には、いずれも天然魚を養成した親魚から得られた浮上卵を供した（Table 4）。卵は採卵ネットから約半数ずつ2つのバケツに収容して試験に供した。なお、Table 4には実験に供した卵の大きさ、平均油球数、および油球異常率（油球が2個以上ある場合を異常とした）を示した。

卵の取り扱い方法 試験に供した卵は次の2通りの方法で取り扱った。第一の方法は、ナイロン製防虫網（目合1.5 mm）と同製強力網（目合261 μ m）とを張った2つの洗卵枠をそれぞれ上下にセットし、その中にバケツ内のすべての卵を流し込んで、卵とゴミを選別した後、卵を2 lのメスシリンダーで浮上卵と沈下卵に分離した（以下洗卵枠法とする：Table 5で方法A）。第二の方法は、採卵した卵をバケツ内に静置して浮上卵を表面に浮上させ、ピーカーを用いて掬い取りメスシリンダーで浮上卵と沈下卵（a）とに分離した（以下掬い取り法とする：Table 5で方法B）。なお、バケツの底に沈下した卵（b）はメスシリンダーで計量し、浮上卵率を求める際には合計（a+b）を沈下卵量とした。

効果判定 卵の取り扱い方法の違いが卵質等に及ぼす影響については、水温22°Cで以下の3項目について効果判定を行った。

浮上卵率：それぞれの方法で卵を取り扱った時に得られた浮上卵数の供試卵数に対する割合で求めた。

ふ化率：それぞれの方法で扱った卵をふ化ネットに収容し、ふ化が完了した時点でふ化仔魚数を計

Table 4. Properties of striped jack eggs used in the handling experiments

Year	Brood stock		Mean diameter (μ m) \pm SD ^{*1}		Mean number of oil droplet	Abnormality ^{*3} (%)	
	Origin	Age	N=	Egg			
1988	W ^{*2}	10	150	1012 \pm 12	263 \pm 9	1.08	1.8
	W ^{*2}	10	100	1022 \pm 11	272 \pm 7	1.11	2.5
1990	W ^{*2}	12	150	1007 \pm 13	266 \pm 8	1.04	1.9
	W ^{*2}	13	150	1032 \pm 11	278 \pm 9	1.02	1.8
1992	W ^{*2}	14	200	1028 \pm 12	274 \pm 9	1.02	1.6

^{*1} SD: standard deviation.

^{*2} W: wild (captured and reared).

^{*3} Abnormal rate of eggs with oil droplet in high number.

Table 5. Effects of handling methods on egg qualities and SAI of larvae in striped jack

Year	Handling method* ¹ of eggs	Number of eggs		Floating eggs		No. of larvae (x 10 ³) c	Hatching rate (%) c/a	SAI* ² of larvae
		used (x 10 ³) a	No. (x 10 ³) b	rate (%) b/a	(%) c/a			
1988	A	949	538	56.7	268	28.2	8.35	
	B	949	902	95.0* ³	835	88.0* ⁴	12.20	
	A	1019	614	60.3	364	35.7	8.80	
	B	1019	1009	99.0* ³	963	94.5* ⁴	12.73	
1990	A	1562	872	55.8	509	32.6	3.04	
	B	1654	1628	98.4* ³	1492	90.2* ⁴	9.20* ⁵	
1991	A	1083	621	57.3	456	42.1	8.97	
	B	986	983	99.7* ³	944	95.7* ⁴	15.92* ⁵	
1992	A	1008	681	67.6	414	41.1	10.83	
	B	1294	1291	99.8* ³	1259	97.3* ⁴	19.72* ⁵	

*¹ Method A : eggs were separated from trash by filtering off through a net ; method B : eggs floating in the bucket were scooped up by using a beaker.

*² Survival activity index.

*³ Significantly different (p<0.05) as compared with the floating eggs rate in method A (t-test).

*⁴ Significantly different (p<0.01) as compared with the hatching rate in method A (t-test).

*⁵ Significantly different (p<0.01) as compared with SAI of larvae obtained from eggs treated by method A (t-test).

数して供試卵数に対する割合を求めた。

無給餌生残指数：得られたふ化仔魚を用いて飢餓耐性試験を行い、その結果から無給餌生残指数（SAI）（新聞・辻ケ堂，1981）を算出した。なお，飢餓耐性試験の詳しい方法は本節4のふ化仔魚の活力判定の項（p.27）に示した。

結果および考察

シマアジ卵の取り扱い方法の違いによる卵の浮上卵率とふ化率ならびにふ化仔魚のSAIに及ぼす影響について，1988年，1990年，1991年および1992年に行った試験結果をTable 5に示した。

洗卵枠法（方法A）で卵を取り扱った結果，各年とも浮上卵率およびふ化率はそれぞれ55.8～67.6%および28.2～42.1%であったのに対して，掬い取り法（方法B）ではそれぞれ95.0～99.8%および88.0～97.3%であった。掬い取り法で卵を取り扱うことにより浮上卵率で約2倍，ふ化率で約3倍の効率でふ化仔魚の生産が可能となり，ふ化率では各年とも洗卵枠法との間に有意（ $p < 0.01$ ）な差が認められた。ふ化仔魚のSAIにおいても各年とも掬い取り法で卵を扱った卵由来のふ化仔魚の方が高い値を示し，1990年，1991年および1992年には有意（ $p < 0.01$ ）な差が認められた。

洗卵枠法で卵を取り扱う際には，受精膜に物理的損傷を与えたために浮上卵率およびふ化率が低下したのではないかと考えられる。一方，掬い取り法の場合には，卵は海水とともに扱われるため受精膜損傷の危険性が極めて低く，ひいてはSAI値の高いふ化仔魚生産にもつながることが明らかとなった。実際の生産現場における採卵でも従来行ってきた洗卵枠法から掬い取り法に切り替えた結果，1988年以降浮上卵率の上昇により効率的なふ化仔魚生産が可能となった（Table 2）。掬い取り法は，洗卵枠法に比べると採卵作業に若干多くの時間を要するが，効率的なふ化仔魚生産には極めて有効な方法であると言える。なお，掬い取り法では表面のゴミも同時に掬取るため，卵をふ化ネットへの収容する時のゴミの混入により卵管理中の水質悪化が当初懸念された。しかし，ゴミは卵がふ化するまでにネット内に沈下し，沈下卵を除去する時に同時に除去できたので，卵管理中の水質悪化ならびにふ化仔魚取り上げの際には特に問題にはならなかった。

2. 卵管理条件

シマアジの卵をふ化ネット（実容量 413 l）中でふ化させる時の最適条件を把握するため，卵管理中の通気量，注水量ならびに卵の収容密度について検討した。併せてこれらの卵管理条件が仔魚に及ぼす影響を把握するため，仔魚膜の欠損異常率を検討した。

材料および方法

供試卵 試験には天然魚を養成した親魚から1988年3月10日、3月21日、4月3日、4月24日および4月28日に採卵した卵を供した (Table 6)。通気量および注水量の試験にはいずれの試験区においても各採卵回次に得られた卵を25万粒ずつ供した。試験水温は22°Cとした。

通気量 ふ化管理中の通気はふ化ネット内にエアーストン (直径40 mm, 球形) 1個を用いて行い、試験区には約100 ml 段階で200~2000 ml / 分の各通気区を設けた。また、通気自体の卵のふ化に及ぼす影響を検討するため毎回無通気区も併せて設けた。

注水量 ふ化管理中のふ化ネット内への注水は、砂ろ過海水をホース (直径13 mm)を用いて注入して行った。注水量試験区は、毎分3.2 l (1時間当たりの換水率50%), 5.2 l (80%), 6.5 l (100%), 7.8 l (120%), 9.8 l (150%) および13.0 l (200%) の各区を設けた。

卵の収容密度 卵の収容密度は、ふ化ネット当たり10万粒段階で30~200万粒の範囲とした。すべての収容密度区における通気量および注水量は、後述するような理由でそれぞれ700 ml / 分および6.5 l / 分とした。

仔魚膜の異常 ふ化直後の仔魚は、頭部を除く魚体全体が仔魚膜によって覆われている。この仔魚膜は魚体の成長とともに消失するが、その一部は鰭の原基になると考えられている。そこで、この仔魚膜欠損の有無を仔魚の形態異常の指標とし、ふ化直後の仔魚50尾について実体顕微鏡下で欠損の有無を確認した。

結果および考察

通気量 卵のふ化率に及ぼす通気量の影響を調べた結果、毎分700 ml の通気量まで通気量の増加に比例してふ化率の上昇がみられ、それ以上の通気量ではごく僅かながらふ化率が低下する傾向が認められた (Fig. 5)。なお、無通気区では卵は全くふ化しなかった。得られた仔魚の仔魚膜の異常率は通気量が1000 ml 位までは特に変化はなかったが、1000 ml 以上になると通気量の増加につれて高くなる傾向が認められた。これは、強通気によるネットとの接触にともなう仔魚膜の損傷、あるいは強通気そのものによる仔魚膜への物理的影響による結果と考えられた。卵管理中の通気は海水中への溶存酸素の補給とともに、通気によって生じる水流がネット内での卵の分布状態を一樣にし、また、ふ化直前の卵のネット底部への堆積を防ぐことで酸素供給にもなる。ふ化直前に卵の比重が大きくなり沈下・堆積する現象 (後述, p. 24) は、シマアジだけでなく、ブリやマダイなどの他魚種でも認められているが、その生態学的理由は今のところ不明である。無通気区で示されたような卵の沈下による酸素欠乏死および得られたふ化仔魚の仔魚膜の異常率を考えると、シマアジの卵管理中の最適通気量は700 ml / 分 / 413 l と考えられた。

注水量 通気量とともに卵管理中の重要な要因であるネット内への注水量の影響について調べ

Table 6. Properties of striped jack eggs used in these experiments

Date of collecting eggs	Total eggs collected ($\times 10^4$)	Floating eggs rate (%)	Fertilized eggs rate (%)	Diameter (Mean \pm SE*, μm)	
				Eggs	Oil droplet
Mar.10, 1988	624.8	98.6	99.2	1038 \pm 21	276 \pm 12
Mar.21	486.2	99.2	98.6	1030 \pm 36	278 \pm 9
Apr. 9	694.7	98.7	99.5	1028 \pm 30	268 \pm 11
Apr.24	584.3	97.2	96.3	1032 \pm 28	272 \pm 8
Apr.28	602.1	97.0	97.1	1026 \pm 29	269 \pm 13

* SE : standard error.

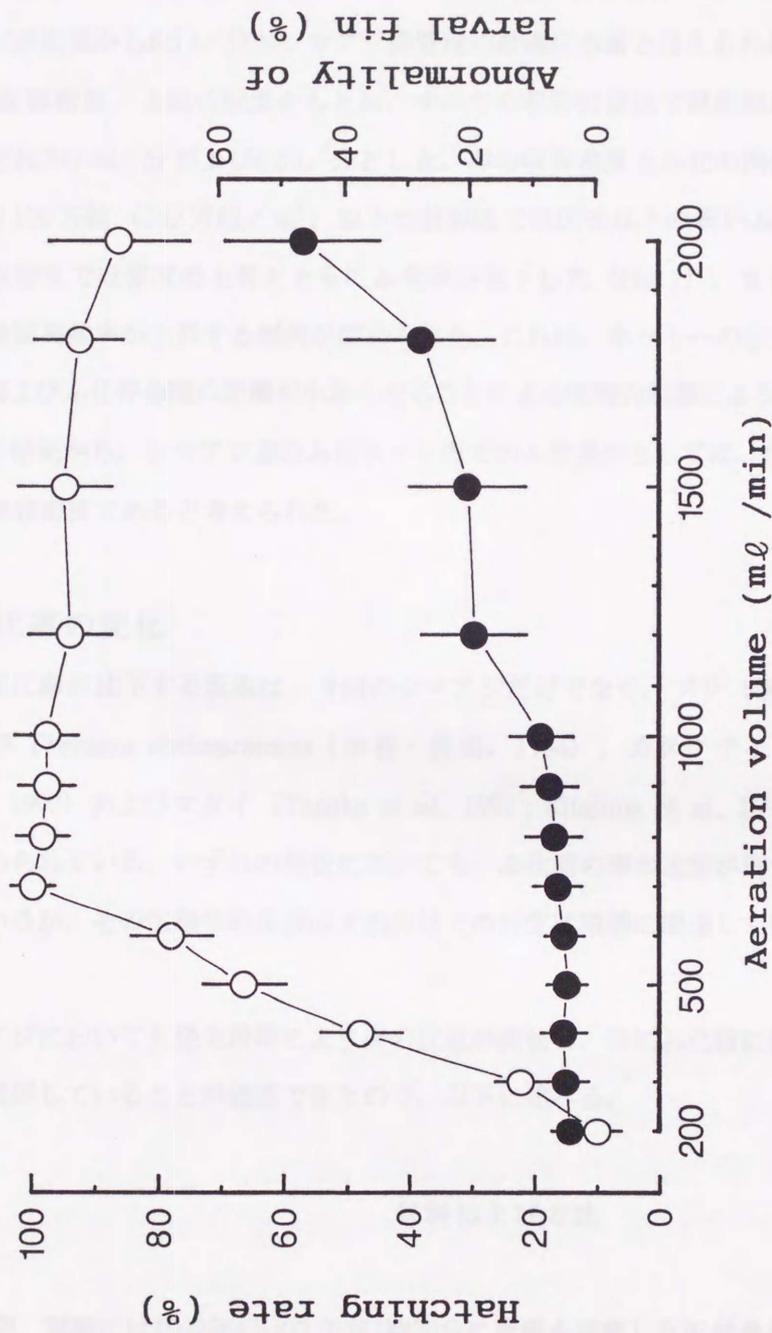


Fig. 5. Effect of aeration volume on hatching rate of striped jack eggs kept in a net (413 *l*) installed in a tank (10 *k*l). Open and closed circles represent the hatching rate and the abnormality of larval fin, respectively. Vertical bars show standard deviations.

た結果、毎分6.5 l 注水（約1時間で100%換水）区で最も高いふ化率が得られた（Fig. 6）。得られた仔魚の仔魚膜異常率は、毎分9.8 l 以上において注水量の増加とともに高くなる傾向が認められた。過剰の注水量は、通気量の場合と同様に、卵およびふ化仔魚に与える物理的損傷が大きく影響するためにはふ化率の低下ならびに仔魚膜異常率の上昇をもたらすものと考えられた。したがって、今回の試験結果から6.5 l/分がシマアジ卵管理の最適注水量と考えられた。

卵の収容密度 上記の結果をもとに、すべての収容密度区で試験期間中の通気量および注水量はそれぞれ700 ml/分および6.5 l/分とした。卵の収容密度とふ化の関係を調べたところ、1ネット当たり100万粒（242万粒/m³）以下の収容区では90%以上の高いふ化率を示したが、100万粒以上の収容区では密度の上昇とともにふ化率が低下した（Fig. 7）。また、ふ化率に反比例して仔魚の仔魚膜異常率が上昇する傾向が認められた。これは、ネットへの収容密度が高くなることにより、卵およびふ化仔魚間の距離が小さくなることによる物理的損傷による結果であると考えられた。これらの結果から、シマアジ卵のふ化ネット内でのふ化条件としては、100万粒（約240万粒/m³）が最大収容密度であると考えられた。

3. 卵比重の変化

ふ化前に卵が沈下する現象は、今回のシマアジだけでなく、ブリ（後述：第3章，p. 87），スケトウダラ *Theragra chalcogramma*（中谷・前田，1984），カタクチイワシ *Engraulis japonicus*（Tanaka, 1990）およびマダイ（Tanaka *et al.*, 1991；Kitajima *et al.*, 1993）などの海産魚類でも共通に認められている。いずれの報告においても、ふ化前の卵の比重が海水より大きくなることを確認しているが、その生態学的意義は天然海域での再生産機構に関連していると推察されているに過ぎない。

シマアジにおいても発生段階により卵の比重が変化し、特にふ化前に卵が沈下する現象は比重の増加に起因していることが確認できたので、以下に述べる。

材料および方法

供試卵 試験には1992年4月8日午前1時20分に産卵を確認した天然養成親魚から採卵した卵の一部を供した。これらの卵の浮上卵率，受精率，平均卵径および平均油球径は，それぞれ98.2%，97.5%，1038 μm および278 μm であった。なお，試験に用いた卵のふ化率は87.2%であった。また，供試卵はふ化ネット中では前述のような管理（水温22±0.3℃）を行い，試験時刻に達した時点でガラス製ピーカーで掬い取って試験に供した。

卵の比重測定 基本的にはTanaka（1990）の方法に準じて行った。すなわち，1 l のガラス製

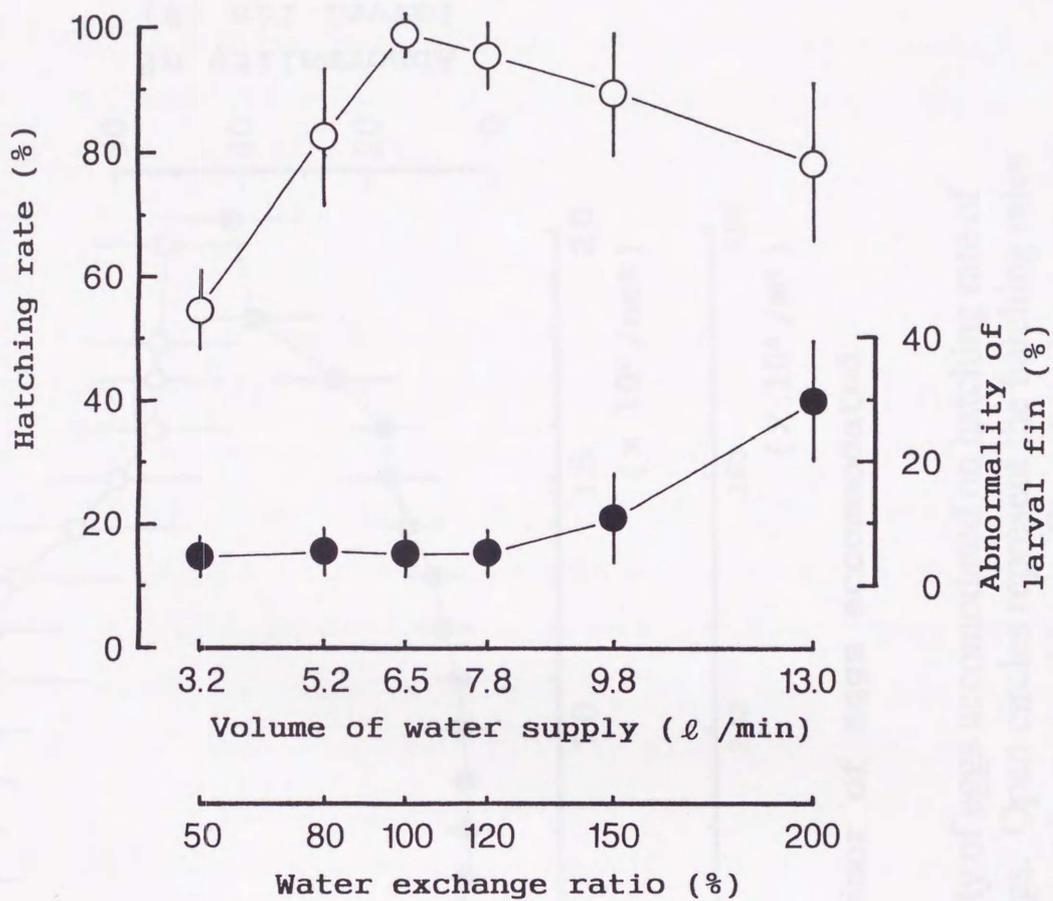


Fig. 6. Effect of water supply on hatching rate of striped jack eggs kept in a net (413 l) installed in a tank (10 kl). Open and closed circles represent the hatching rate and abnormality of larva fin, respectively. Vertical bars show standard deviations.

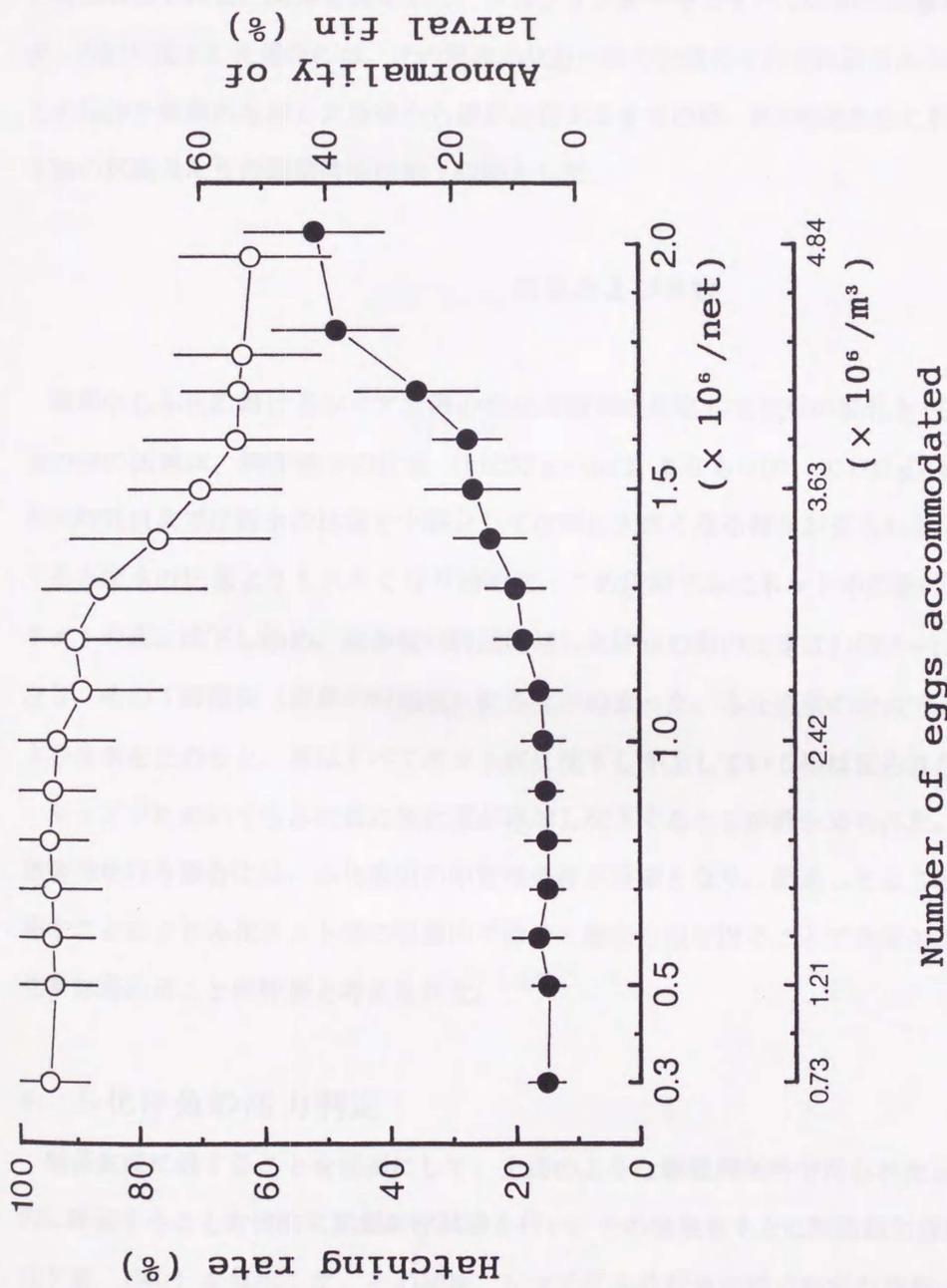


Fig. 7. Effect of density of eggs accommodated on hatching rate of striped jack eggs. Open circles represent the hatching rates with ranges shown by vertical bars. Closed circles represent the abnormality of larval fin with standard deviations shown by vertical bars.

メスシリンダーに NaCl あるいは蒸留水で比重を約 0.0004 g/cm^3 段階で $1.0221 \sim 1.0285 \text{ g/cm}^3$ に調整した海水（水温 22°C ）を 1 l 入れた。試験中の各メスシリンダーの水温はウォーターバスにより $22 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に保持した。次いで、先端を切った駒込ピペット（先端径 2.8 mm ）を用いて各メスシリンダーに 50 個ずつの卵を同時に収容した。そして、収容による卵の上下動の影響をなくするため、10 分間静置した後、結果を判定した。メスシリンダー中ですべての卵が表層に浮上あるいはシリンダーの底に沈下した場合には、その海水の比重が卵の比重のそれぞれ最高あるいは最低とみなした。この操作を親魚が産卵した直後から卵がふ化するまでの間、約 6 時間おきに計 9 回実施した。なお、1 回の試験当たりの観察時間は約 1 時間とした。

結果および考察

産卵からふ化におけるシマアジ卵の発生段階別に測定した比重の変化を Fig. 8 に示した。産卵直後の卵の比重は、飼育海水の比重 (1.0252 g/cm^3) よりも $0.001 \sim 0.002 \text{ g/cm}^3$ 小さく、その後、約 30 時間目までは海水の比重を上限として次第に大きくなる傾向が見られた。産卵後約 36 時間経過すると海水の比重よりも大きくなり始めた。この段階でふ化ネット中の卵のうち約 2 割程度の卵がネットの底に沈下し始め、産卵後 48 時間経過した時点の卵の比重は $1.0264 \sim 1.0274 \text{ g/cm}^3$ で最大となり、その 1 時間後（産卵 49 時間後）にふ化が始まった。ふ化直前の時点でふ化ネット内の通気および注水を止めると、卵はすべてネット底に沈下し浮上している卵は見られなかった。

シマアジにおいてもふ化前に卵比重が増加し沈下することが確かめられた。したがって、本種の卵管理を行う場合には、ふ化直前の卵管理条件が重要となり、前述したように適度な通気と注水を施すことによりふ化ネット等の容器内で卵の様な分散を図ることで酸素欠乏死等を防ぎ、そのふ化率を高めることが肝要と考えられた。

4. ふ化仔魚の活力判定

種苗生産に供することを前提にして、上述のような卵管理条件で得られたふ化仔魚の活力を客観的に評価することを目的に飢餓耐性試験を行い、その結果をもとに無給餌生残指数 (SAI) (新聞・辻ヶ堂, 1981) を算出した。その結果、シマアジふ化仔魚の活力判定の指標の一つとして、SAI が有効であると考えられた (虫明・関谷, 1993)。

材料および方法

供試魚 天然シマアジ 2 年魚を 1980 年より古満目事業場において飼育して養成した親魚から、

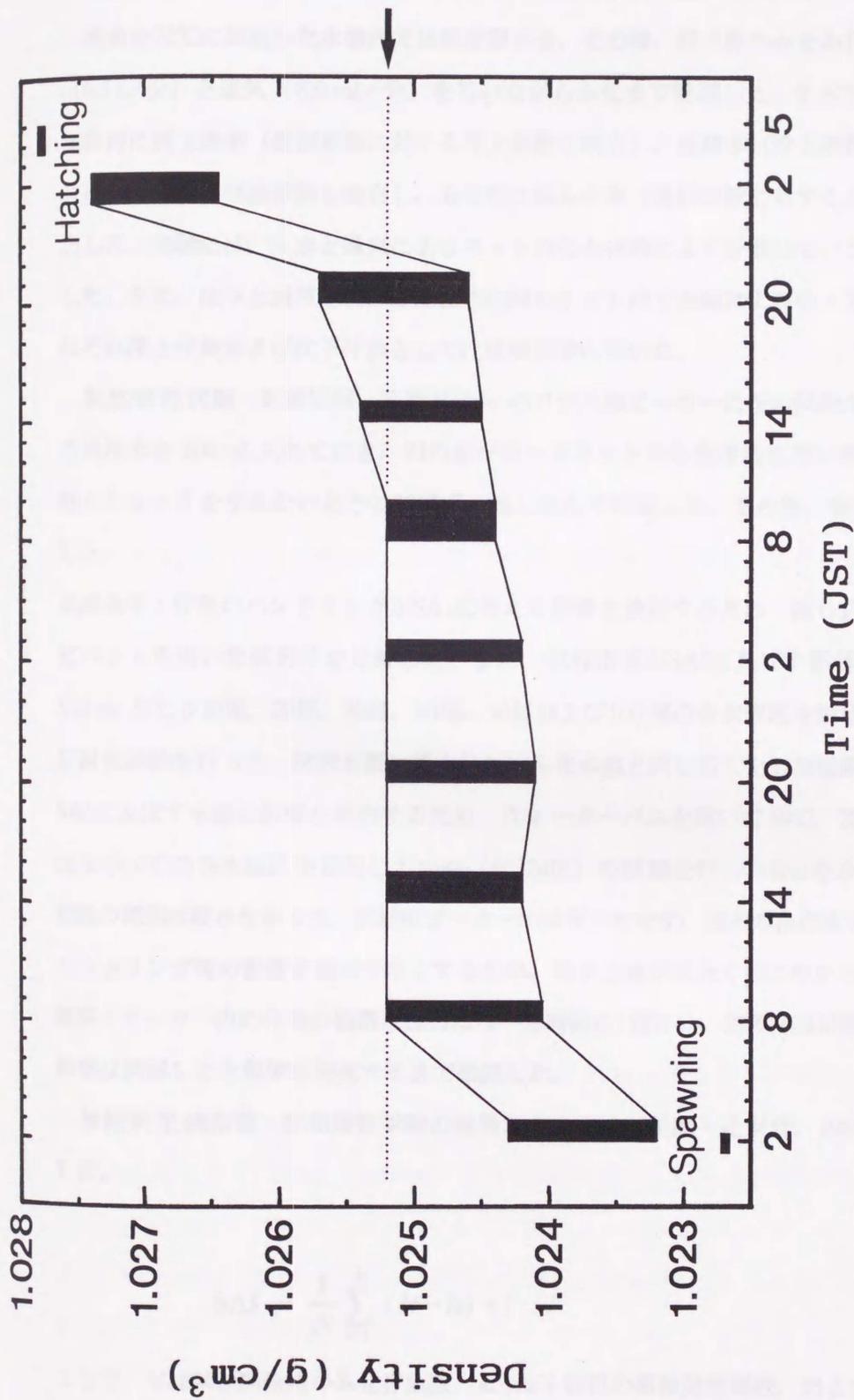


Fig. 8. Change in the egg buoyancy of striped jack from spawning to hatching. The heights and the widths of the columns represent the range of the egg density and periods for each measurement, respectively. The arrow shows the specific gravity of the rearing water (1.0252 g/cm^3).

1988～1992年に採卵して得たふ化仔魚（平均全長 3.0 ± 0.1 mm, 日齢0）を試験に供した。材料魚が特定の親魚からの仔魚に偏らないように、全産卵期間を通じて得られたふ化仔魚を試験に用いた。

親魚を 22°C に加温した水槽内で自然産卵させ、その後、浮上卵のみをふ化ネットに収容し、注水（ 6.5 l/分 ）と通気（ 700 ml/分 ）を行いながらふ化まで管理した。すべての採卵事例について、採卵時に浮上卵率（総採卵数に対する浮上卵数の割合）、受精率（浮上卵数に対する受精卵数の割合）、卵径および油球径を測定し、ふ化時にはふ化率（総採卵数に対するふ化仔魚数の割合）を算出した。実験には、注水と通気によりネット内に全体的によく分散している仔魚（分散仔魚）を供した。また、注水と通気を約10分間止めた時にネット内で表層および中・下層に分かれた仔魚をそれぞれ浮上仔魚および沈下仔魚として、比較実験に用いた。

飢餓耐性試験 試験容器：容量 500 ml のガラス製ビーカーに予め試験水温に調温しておいた砂ろ過海水を 200 ml 入れておき、別のビーカーでネットから無作為に掬い取ったふ化仔魚を可能な限りショックを与えないように30尾ずつ流し込んで収容した。その後、調温海水を加え 500 ml とした。

実験条件：仔魚のハンドリングがSAIに与える影響を検討するため、流し込みによる収容法と駒込ピペットを用いた収容法を比較した。また、収容密度がSAIに及ぼす影響を検討するため、海水 500 ml 当たり10尾、20尾、30尾、40尾、50尾および100尾の各収容区を設けて15回（計90区）の飢餓耐性試験を行った。試験水温は基本的にはふ化水温と同じ 22°C とし水温変化がないようにした。SAIに及ぼす水温の影響を検討するため、ウォーターバスを用いて 19°C 、 20°C 、 21°C 、 22°C 、 23°C および 24°C の各水温区を設定して54回（計324区）の試験を行い、SAIを求めた。この場合、水温馴致の期間は設けなかった。試験用ビーカーには覆いをせず、屋内の自然光条件下で実験を行った。ハンドリング等の影響を極力少なくするため、換水と通気は全く行わなかった。

観察：ビーカー内の仔魚の観察は毎日ほぼ一定時間に1回行い、斃死魚は計数して除去した。なお、観察は供試した全個体が斃死するまで継続した。

無給餌生残指数 飢餓耐性試験の結果から、次式（新聞・辻ケ堂, 1981）を用いてSAIを算出した。

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

ここで、 N は試験開始時のふ化仔魚数、 h_i は i 日目の累積斃死尾数、および k は生残尾数が0となるまでの日数である。

種苗生産試験 シマアジの飼育試験は、日裁協上浦事業場で行った。輸送したふ化仔魚は、ナンクロロプシス *Nannochloropsis oculata* を $0.5 \sim 1.0 \times 10^6$ cells/mlの密度で添加した飼育水槽に

収容した。以後、魚の全長が5~10 mmの期間はナンノクロブシスの密度を $1.0\sim 2.0\times 10^6$ cells/ml に上げた。その後、成長に伴ってL型ワムシ *Brachionus plicatilis*, アルテミアノープリウス *Artemia salina*, 天然採集コペポーダ (種不明), 養成アルテミア, 配合飼料およびミンチ肉 (アミ類 *Neomysis* spp. とサバを混合) を給餌した。飼育水温は、ふ化仔魚を22°Cの飼育水に収容した後, 1°C/日の割合で25°Cまで加温し, 以後は25°Cで安定させた。また, 日間換水量は魚の全長5 mm時で50%, 10 mm時で100%, 以降は最大350%まで適宜増加させた。

親魚の産卵条件 1988~1991年には, 2月下旬~3月上旬に親魚を陸上水槽 (容量65 kl) に収容した。収容当日から2日間かけて飼育水温を自然水温 (17~18°C) から22°Cまで加温し, 以後は22°Cに安定させて産卵を促した (加温安定型)。1992年には, ウイルス性神経壊死症 (後述: 第2章, p. 41) の発生率の低下を期待して, 通常よりも早い12月上旬に親魚を水槽に収容して水温20°Cで飼育し, 1月上旬から飼育水温を22°Cに加温して産卵を促した。初回産卵後は, 親魚の産卵行動などによる体力消耗を軽減するため, 水温を20°Cに下げて産卵を抑制し, 卵が必要な時にのみ水温を22°Cまで加温した (加温変動型)。なお, いずれの産卵試験でも給餌は毎日1回行った。

結 果

SAIと飼育試験 1988年から1992年にかけて行ったシマアジの飼育試験結果とそれぞれの飼育に供したものと同一ロットのふ化仔魚のSAIをTable 7に示した。なお, 1990年にはウイルス性神経壊死症 (後述) の発生により種苗が生産できなかったため表から除外した。

SAIが6以下のロットのふ化仔魚を使用した4例の生産では, すべての事例で仔魚の死亡率が高く, ふ化後10日目までに飼育を中止せざるを得なかった。一方, SAIが6より高いロットを使用した生産事例では, 30例のうち27例で全長25~30 mmの沖出しサイズの種苗を生産することができた。

また, 注水と通気を止めた時の浮上仔魚は, 沈下仔魚よりも常に高いSAIを示した (Fig. 9)。なお, 分散仔魚のSAIは, この両者のほぼ中間にあった。

親魚の産卵条件別SAI 産卵親魚の飼育管理水温を22°Cに加温して安定させる加温安定型では, 初回産卵後の経過日数とともにSAIは次第に低下した (Fig. 10 A)。一方, 水温20°Cで飼育し採卵する時だけ22°Cに加温する加温変動型では, 産卵期間を通してふ化仔魚のSAIは15以上と高く, 産卵後期においてもSAIの低下は見られなかった (Fig. 10 B)。

ふ化仔魚の試験条件別SAI 水温: 水温19~24°Cの範囲で試験を行った結果, 水温が低いほどSAIは高く, 水温が高くなるほどSAIが低くなる傾向が認められた (Fig. 11)。ここで, 試験水温を x (°C), 水温 x でのSAIを y とすると, $19\leq x\leq 24$ において,

$$y = -1.16x + 48.81$$

Table 7. Relationship between SAI of larvae and results of seed production of striped jack at Kamiura Station of Japan Sea-Farming Association

Year	S A I * ¹			
	0~6	6~12	12~18	18~24 24~30
1988	0/1* ²		2/2	
1989	0/1		2/3	4/5 1/1
1991	0/2	1/1	7/8	
1992			1/1	7/7 2/2
Total	0/4	1/1	12/14	11/12 3/3

*¹ Survival activity index.

*² Number of seed production trials successful/conducted.

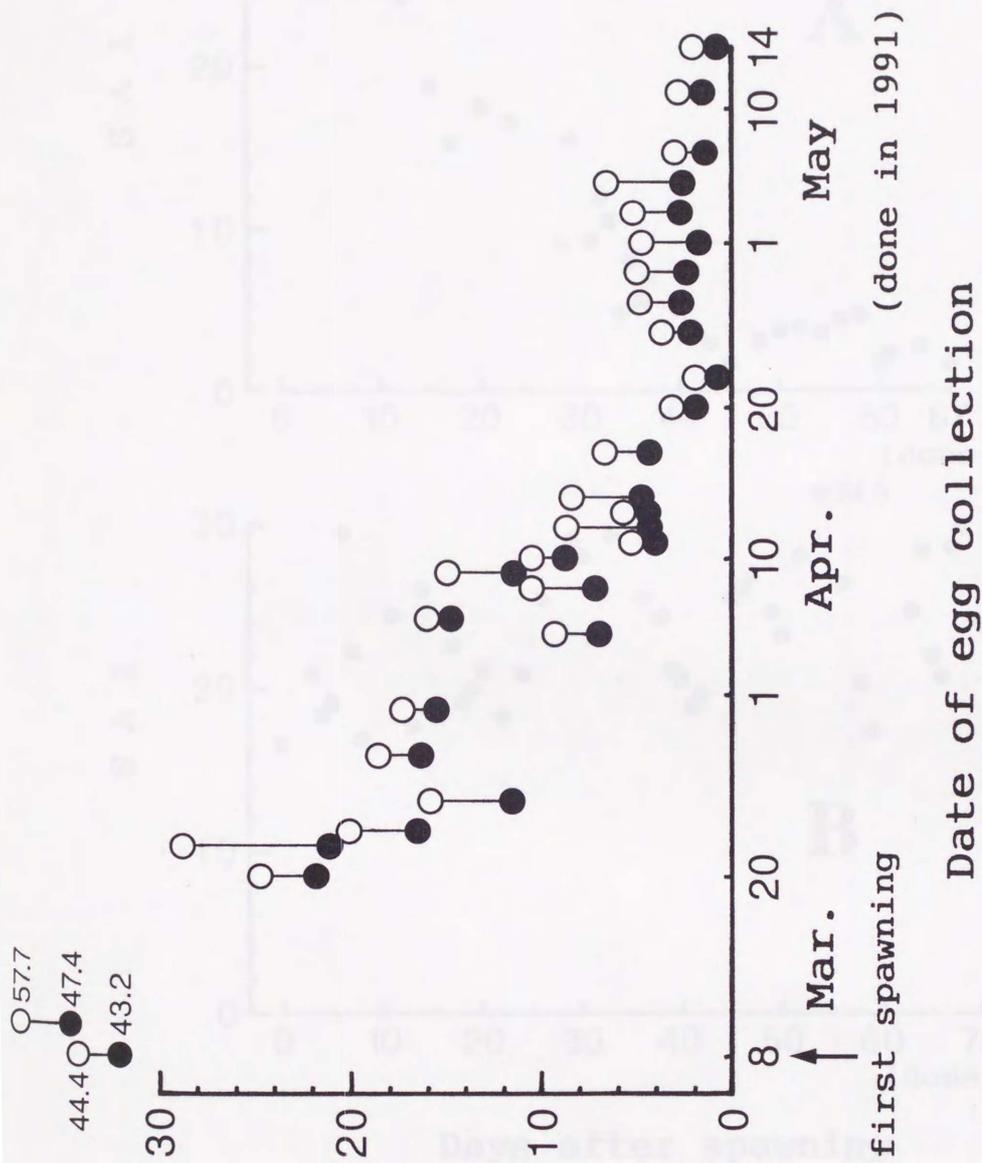


Fig. 9. Comparison of SAI between surface-floating striped jack larvae and non-surface-floating larvae in the hatching tank at 22 °C. ○, surface-floating larvae; ●, non-surface-floating larvae in the tanks without aeration or inflowing water.

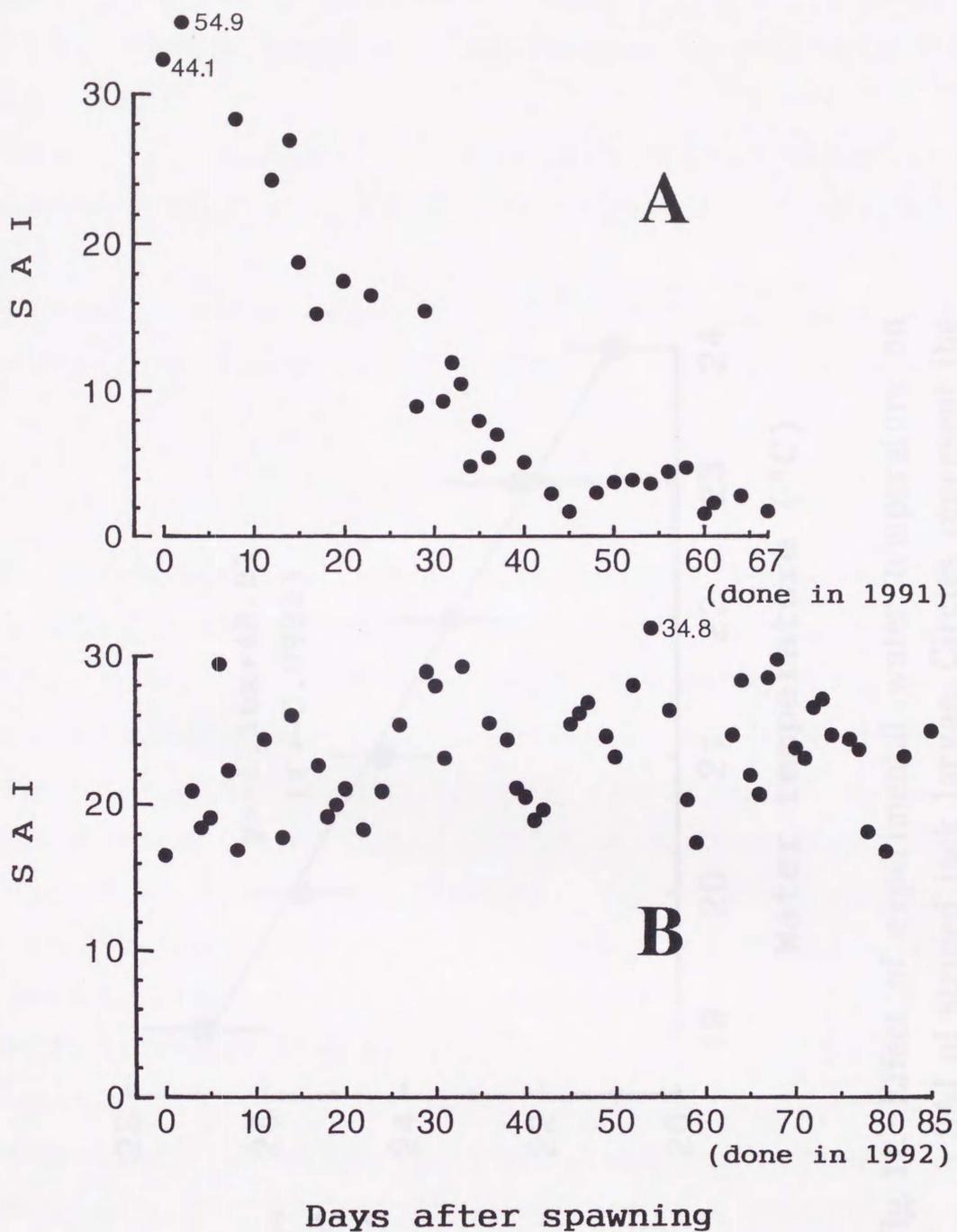


Fig. 10. Comparison of SAI of striped jack larvae obtained from spawners kept under continuous spawning conditions (A) and those kept under intermittent spawning conditions (B). Each point represents the mean of SAI in the duplicate tests at 22 °C.

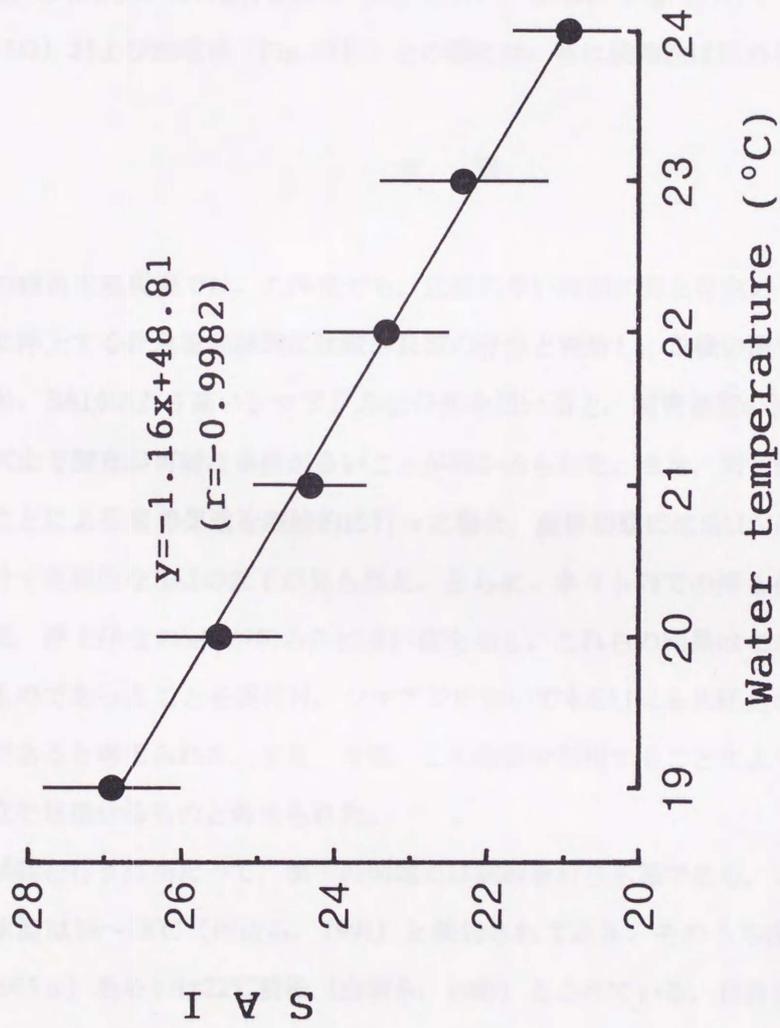


Fig. 11. Effect of experimental water temperature on SAI of striped jack larvae. Circles represent the mean \pm S.D. of SAI at each temperature.

となり、高い負の相関 ($r=0.9982$) が認められた。

収容密度：海水500 ml 当たり10尾から40尾収容した試験区では、SAIにほとんど差は見られなかった。しかし、50尾および100尾収容区では、30尾収容区と比較していずれも有意なSAIの低下が認められた (Table 8)。

仔魚のハンドリング：ふ化仔魚のピーカーへの収容方法について検討した結果、流し込み収容法による仔魚のSAIの方が、ピペット収容法の仔魚のSAIよりも有意 ($P<0.05$) に高い結果を示した (Fig. 12)。

卵質とSAI ふ化仔魚のSAIと浮上卵率 (Fig. 13A)，受精率 (Fig. 13B)，ふ化率 (Fig. 13C)，卵径 (Fig. 13D) および油球径 (Fig. 13E) との間には、特に関連性は認められなかった。

考 察

シマアジの種苗生産現場では、これまでも、比較的早い時期に得た仔魚のうち注水と通気を止めた時、水面に浮上する仔魚を経験的に比較的良質の仔魚と判断し、以後の飼育に供してきた。今回の試験により、SAIが6より高いシマアジふ化仔魚を用いると、飼育初期の減耗も比較的少なく、沖出しサイズまで飼育が可能な事例が多いことが確かめられた。また、同一親魚群を用いて飼育水温を高めることによる産卵促進を継続的に行った場合、産卵初期にはSAIが高いものの、その後産卵後期にかけて直線的なSAIの低下が見られた。さらに、ネット内での浮上仔魚と沈下仔魚に分けて調べた結果、浮上仔魚のSAIが明らかに高い値を示し、これらの結果はこれまでの経験的なやり方が妥当なものであったことを裏付け、シマアジにおいてもSAIはふ化仔魚の活力を判定する指標として有効であると考えられた。また、今後、この指標を利用することによりシマアジの種苗生産の技術的確立を目指せるものと考えられた。

飢餓耐性試験を行うに当たって、第一の問題点は試験を行う水温である。シマアジの場合には、ふ化可能な水温は18~26°C (川辺ら, 1991) と報告されており、そのうち産卵適水温は20°C前後 (村井ら, 1985 a) あるいは22°C前後 (虫明ら, 1989) とされている。日裁協では、これまで主に水温22°Cで産卵させ同じ水温でふ化まで卵管理を実施してきたため、試験水温の基準を22°Cに設定した。しかし、本実験で示されたように試験水温によりSAIが大きく変化することが明らかになった。今後、各生産機関での仔魚の活力を比較するに当たっては、水温差によるSAIの補正が必要となる。そのため、今回得られた水温とSAIの直線回帰式から、水温19~24°Cで行ったSAIを22°CでのSAIに換算する補正式を考案した。ここで、試験水温を x_1 (°C: $19 \leq x_1 \leq 24$)，水温 x_1 でのSAIを y_1 とすると、水温22°CにおけるSAI (y) は、

$$y = y_1 + 1.16 (x_1 - 22)$$

Table 8. Effect of experimental fish density on SAI of striped jack at 22°C.

Lot No. of spawners	N*1	Number of larvae in 500 ml					
		10	20	30	40	50	100
1	8	24.5*2(6.5)*3	23.8 (6.2)	23.5 (6.2)	23.2 (6.3)	19.9*4(5.0)	6.5*5(3.0)
2	7	26.0 (7.4)	25.0 (6.6)	24.0 (6.6)	23.2 (6.5)	20.1*4(4.8)	7.4*5(2.3)

(done in 1992)

*1 Number of experiments conducted.

*2 Mean value of SAI.

*3 Standard deviation.

*4 Significantly different ($p < 0.05$) as compared with SAI of 30 larvae (t-test).

*5 Significantly different ($p < 0.01$) as compared with SAI of 30 larvae (t-test).

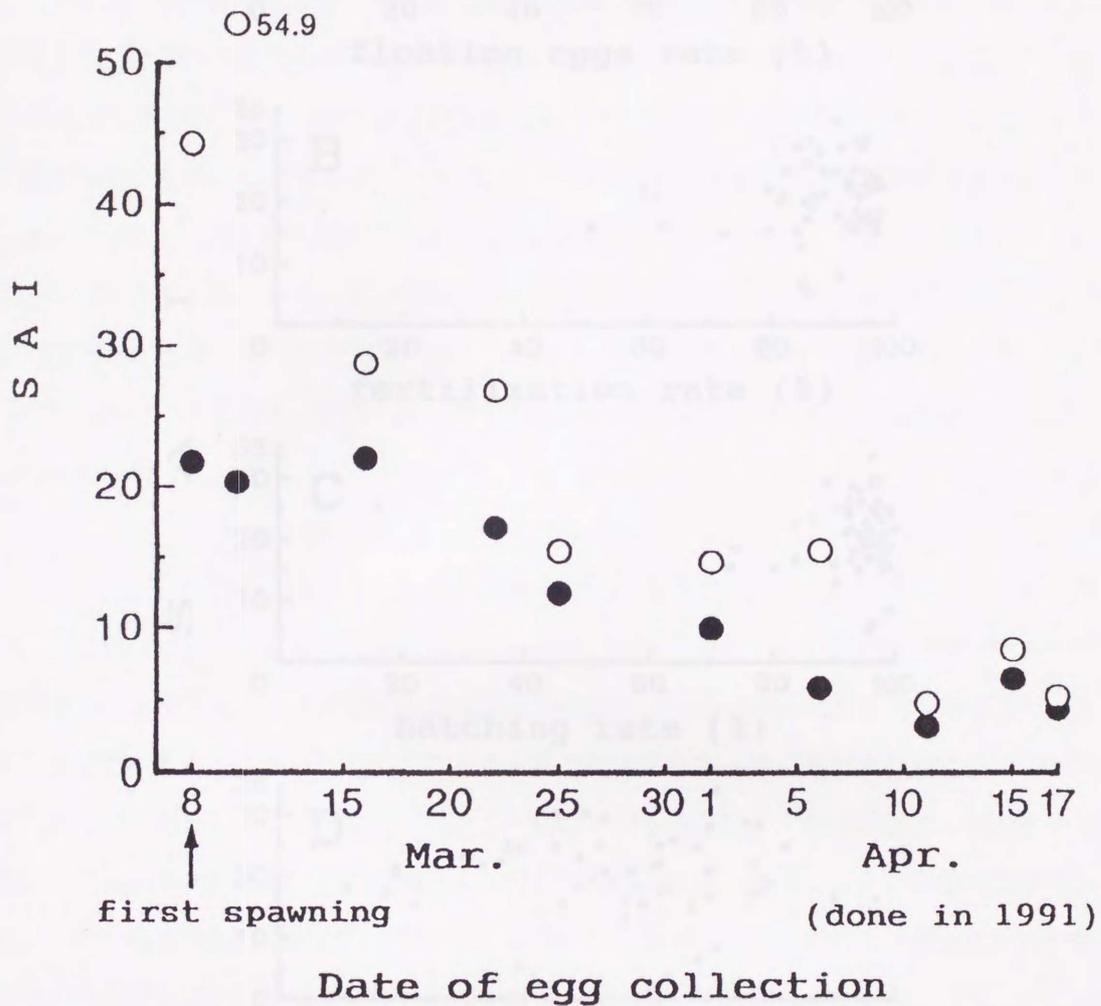


Fig. 12. Effect of handling method on SAI of striped jack larvae. ○, larvae were poured into an experimental vessel by using a beaker; ●, larvae were pipetted into an experimental vessel.

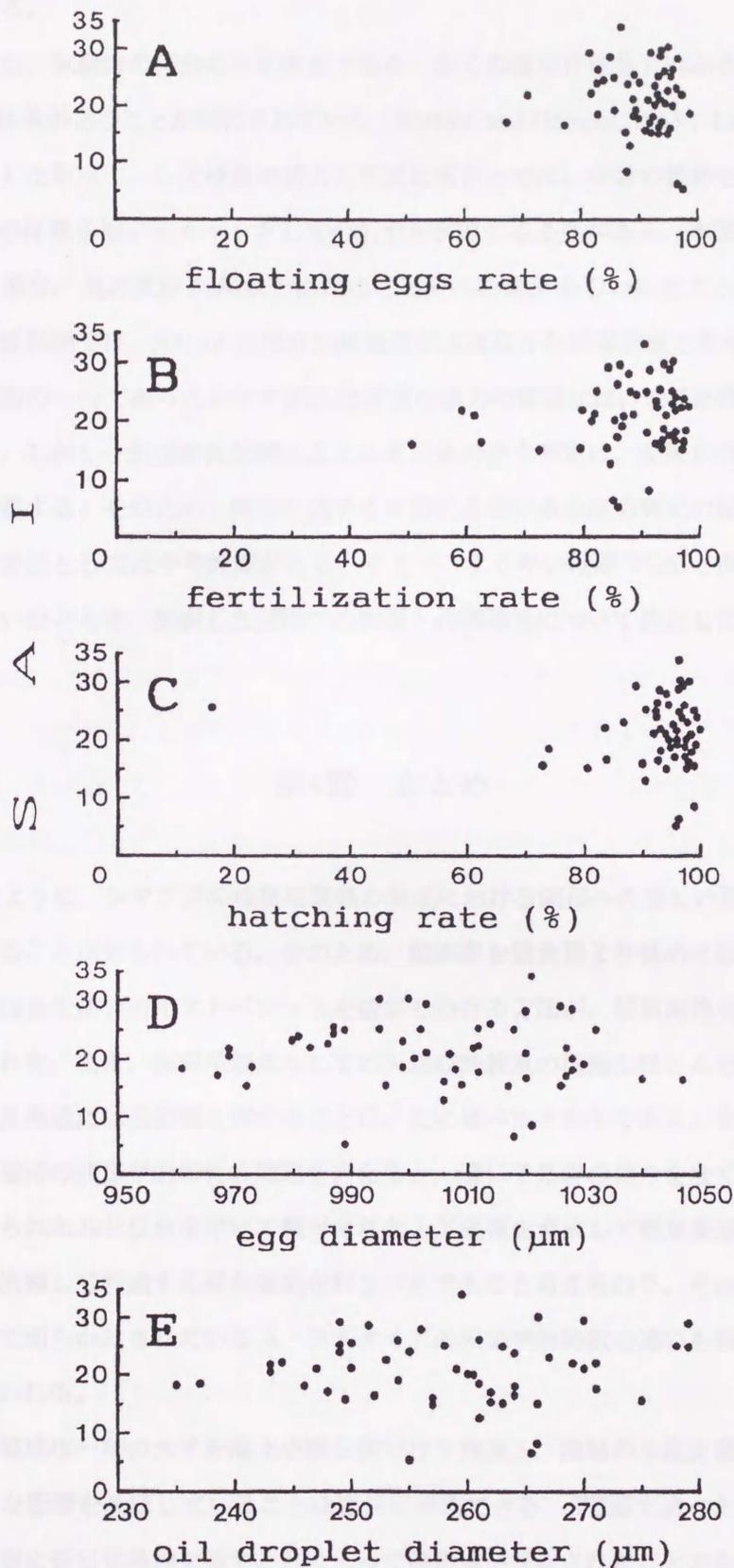


Fig.13. Relationships between egg quality and SAI of striped jack larvae. Floating-egg rate [floating eggs/total eggs spawned] (A), fertilization rate (B), hatching rate (C), egg diameter (D), and oil droplet diameter (E).

により求められる。

第二の問題点は、試験時の仔魚の収容密度である。多くの海産仔稚魚ではふ化直後から飢餓耐性にはかなりの個体差があることが報告されている (Blaxter and Hempel, 1963 ; Lasker *et al.*, 1970 ; Jones, 1972) 。したがって、ふ化仔魚の活力の判定に当たっては、少数の個体を用いて実験するよりも、より多くの仔魚を用いてロットとしての活力を判定する必要がある。本実験のように500 ml の容器を用いた場合、魚の数が50尾以上になると過密の影響があらわれたことから、シマアジふ化仔魚の飢餓耐性試験では、500 ml 当たり30尾程度がほぼ適正な収容密度と考えられた。

今回の試験目的の一つであったシマアジふ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になった。しかし、飢餓耐性試験によるふ化仔魚の活力判定は、結果が判明するまでに1週間前後の期間を要する。そのため、飼育に供する以前にふ化仔魚の活力判定の結果を得ることは難しく、実用的な方法としてはやや問題がある。そこで、より早い段階でSAIと関連するような判定項目が見出せないかと考え、採卵した段階での卵質との関連性について検討したが、特に関連は認められなかった。

第4節 まとめ

最初に述べたように、シマアジの採卵用親魚の養成における腹部への著しい脂肪蓄積は、産卵の大きな妨げとなることが知られている。そのため、給餌率を飽食量より低めに設定し、本種の成熟時期に合わせて混合生餌とモイストペレットを給餌しわけける方法が、採卵用親魚の養成には効果的であると考えられた。また、採卵用親魚としての天然成熟親魚の漁獲はほとんど期待できないことから、本種の親魚養成には長期間を要することは、先に述べたとおりである。さらに、近年問題視されている放流種苗の遺伝学的特性の問題を考えると、遺伝子系群の偏りをなくするためには特定の親魚群から得られたふ化仔魚を用いて飼育された人工種苗を育成して親魚養成を行うよりは、むしろ天然種苗を漁獲して育成する親魚養成を行うべきであると考えられる。その際、種苗の脊椎骨数などの現時点で明らかにされているA・B両タイプの形態学的特徴の違いを明確にしておく必要があるものと思われる。

海産魚の親魚養成は一年の大半を海上小割生簀で行う関係上、海域の水温変動や日長時間等が親魚の成熟に大きな影響を及ぼしていることは容易に推察できる。第2節で述べたように、シマアジ親魚の最終成熟期に長日化処理を施すことによって卵形成が促進されたことから、人為的環境条件下において親魚の最終成熟をある程度コントロールできるものと考えられる。このような手法は、今後早期採卵技術を確立するための必要不可欠な要素を含んでいると考えられる。

成熟させた親魚の産卵誘発方法に関していくつかの手法を述べたが、シマアジは採卵用親魚とし

て多年度にわたって使用するため、毎年産卵を経験させることによっていわゆる“産み癖”をつけることも安定した採卵を行う上で重要な要素と考えられる。これは、水温や光条件などの飼育環境の変化による、いわば成熟および産卵に関する体内リズムの習得といえるかも知れない。このようなリズムをシマアジ親魚の体内に構築させるためには、例えば、初産の年には加温安定とホルモンの併用処理で産卵を誘発し、次の年には加温安定あるいは加温変動などの温度処理のみで産卵誘発を行い、最終的には無処理による産卵へと誘導するといった産卵のさせ方が有効であろう。ブリのように天然資源量が急激に減少したとは言え、単年度のふ化仔魚の生産に必要な天然親魚あるいは成魚の補充が可能であり、また完全な養成親魚でも採卵用親魚として使用可能な魚種であれば、半年から1年といった比較的短期間の養成で採卵も可能である。しかし、シマアジではそういった短期間養成による親魚からの採卵はほぼ不可能である。そのため、上述したような親魚養成ならびに産卵誘発方法が必要となってくる。

シマアジ親魚から得られた卵の管理条件に関しては、水温および塩分に関する報告（村井ら、1987；川辺ら、1991；村井ら、1992）があるが、これらの条件設定だけで最適条件を把握することは困難である。そのため、本研究では卵管理中の通気量、注水量および卵の収容密度に関する実験を行った結果、卵の適正なふ化条件を把握することができた。また、卵管理中の卵比重の変化についての試験結果から、ふ化直前の卵管理条件の重要性も示唆された。魚類にはその魚種特有の再生産機構に関する生態があり、魚種ごとにこのような人為的卵管理条件を把握しなければ、効率的なふ化仔魚生産は望めないといっても過言ではあるまい。そのためには、卵の取り扱い方法等も含めて、今後他魚種でも同様の実験を行う必要があるだろう。

得られたふ化仔魚の活力を判定するための一つの指標として、飢餓耐性試験により算出されるSAIが有効であると考えられた。しかし、先にも述べたように、飢餓耐性試験の結果が判明するまでに1週間前後の期間を要することから、種苗生産を前提として仔魚の良否を判定する活力評価手法としてはあまり適当ではない。また、厳密に言うと、飢餓耐性試験は仔魚の活力そのものというよりも、むしろ親魚から付与された蓄積栄養の良否を判定する手法であり、仔魚の種苗性とは若干意味が異なる。種苗性の語義に関しては、いくつかの定義が与えられているが、種苗生産の観点からすると、生残率が高く成長の早い種苗と言えよう。その場合、これらの要素を検定するためにどのような指標を用いるかが大きな問題となる。近年、核酸比（RNA/DNA）等による生化学的手法を用いた稚仔魚の活力判定が試みられているが（福田ら、1986；滝井ら、1992）、まだ生産現場で実用できるような技術レベルまでには至っていない。したがって、今後科学的根拠にもとづいた種苗生産を目指していく上では、飼育に供する以前に判定結果が得られ、かつ仔魚の種苗性そのものを評価できるような迅速評価手法の開発が必要であると考えられる。

第2章 シマアジのVNNに関する防除対策

日裁協では、1978年以来シマアジの親魚養成技術開発に取り組み、前章で述べたような親魚養成技術の開発により、養成親魚からの長期間にわたる安定した大量採卵が可能になった。更に人工種苗生産回数の増加や種苗生産技術の向上と相俟って1988年には沖出しサイズ（全長28～31 mm）の種苗を約80万尾生産するに至った（Fig. 14）。しかし、その一方で1984年頃から仔魚期（全長7～8 mm）に原因不明の大量斃死が発生する事例が見受けられるようになり、1989年および1990年には日裁協のシマアジの種苗生産は全く不調に終わった。特に1990年には仔魚の飼育密度や水温、塩分および照度などの飼育環境条件について検討を行い、日裁協上浦および五島事業場で合計51例の種苗生産試験を行ったが、すべての飼育事例で仔魚期に原因不明の大量斃死が発生し、種苗の生産は全くできなかった（関谷，1992；塩澤，1992）。

1990年に大量斃死した仔魚を病理組織学的および電子顕微鏡観察に供した結果、仔魚の脳の中樞神経組織（神経冠）に空胞形成が認められ、その空胞中におびただしい数のウイルス粒子が確認され¹⁾、イシダイ *Oplegnathus fasciatus* で報告されているウイルス性神経壊死症（viral nervous necrosis：VNN）（Yoshikoshi and Inoue, 1990）に極めて類似した疾病であることが判明した（Mori et al., 1992）。同様の症状を呈するウイルス性疾病は、オーストラリアとタヒチにおける barramundi *Lates calcarifer*（Glazebrook et al., 1990；Renault et al., 1991；Mundy et al., 1992），ノルウェーにおける turbot *Scophthalmus maximus*（Bloch et al., 1991），フランスにおける seabass *Dicentrarchus labrax*（Breuil et al., 1991）および日本におけるキジハタ *Epinephelus akaara*（Mori et al., 1991）において報告されており、いずれの魚種でも仔稚魚期に発生している。

上述したように、1990年における日裁協のシマアジ種苗生産は、VNNの発生により多大な被害を受け（有元ら，1994），早急なVNN防除対策の確立が必要となってきた。そこで、日裁協では広島大学と京都大学との共同研究により、ウイルスに感染したシマアジ仔魚を材料として分画遠心法などによりウイルスの純化に成功し、ウイルスの核酸および外被タンパクなどの生化学的性状を検査した結果、VNN原因ウイルスはノダウイルス科に属するウイルスであることが判明し、striped jack nervous necrosis virus（SJNNV）と名付けられた（Mori et al., 1992）。また、感染実験を通してコッホの3原則が満たされることから、SJNNVがシマアジVNN原因ウイルスであることも確定した（Arimoto et al., 1993）。さらに、純化ウイルスを用いて家兎抗血清を作製し、SJNNVの検出系として間接ELISA（enzyme-linked immunosorbent assay）が確立されるとともに（Arimoto et al., 1992），親魚の血漿中のSJNNVに対する抗体を検出のための間接ELISAも確立さ

¹⁾ 長崎大学水産学部教授 吉越一馬博士私信。

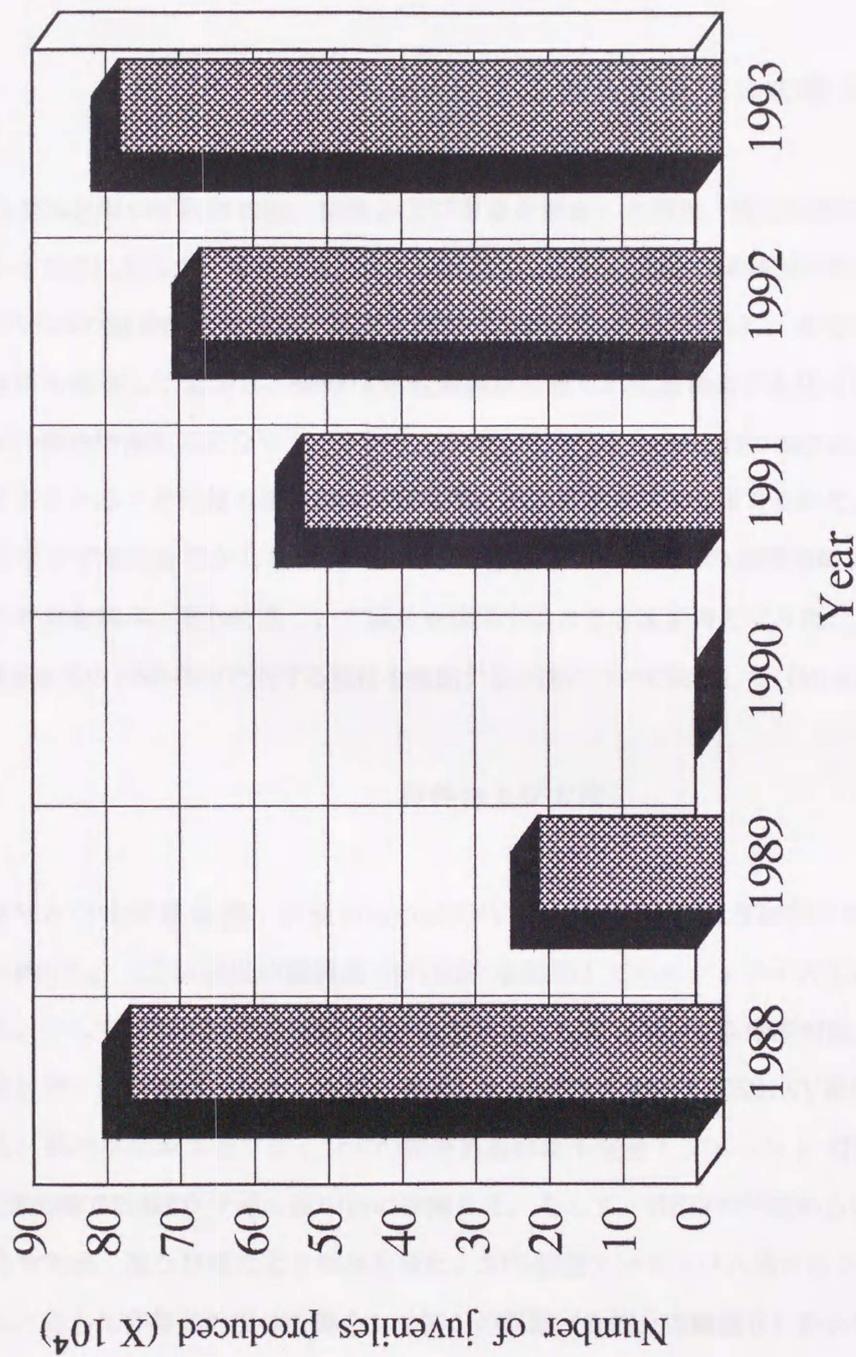


Fig. 14. Number of striped jack juveniles produced in seed production at JASFA in 1988 to 1993.

れた (Mushiake *et al.*, 1992)。また、最近の研究によりポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction : PCR) 法を用いたSJNNVの遺伝子レベルでの検出系が確立された (Nishizawa *et al.*, 1994)。

本章では、シマアジVNNの防除を目的として、これらの研究成果をもとにして行った親魚から卵および仔魚へのSJNNVの垂直感染防除対策について述べる。

第1節 間接ELISAによる親魚血漿抗体の検出

間接ELISAを用いて親魚の脳、精巣および卵巣を検査した結果、脳と精巣からはSJNNVは検出されなかったのに対して、卵巣からは65% (31例中20例) の割合でSJNNVが検出されたことから、シマアジVNNの感染源は雌親魚と推定された (Arimoto *et al.*, 1992)。そのため、産卵直前の雌親魚の卵巣を検査して選別し、SJNNV陰性親魚から得られた卵およびふ化仔魚のみを飼育に供することが本病の防除対策になりうると考えられた。しかし、産卵直前の親魚からの卵巣卵をサンプリングすることは、その後の親魚の産卵行動等に悪影響を及ぼすと考えられた。そこで、産卵に悪影響を及ぼさず親魚を生かしたまま検査しうる手法として、親魚の血漿中におけるSJNNVに対する抗体の有無を調べ、それに基づいて親魚を選別することをまず考えてみた。ここでは間接ELISAによる親魚血漿中のSJNNVに対する抗体を検出する方法について検討した (Mushiake *et al.*, 1992)。

材料および方法

SJNNVとウサギ抗血清 病魚からのSJNNVの純化は以下のように行った。すなわち、VNN罹病魚 (約100 g) に50mM炭酸緩衝液 (pH 9.6) を添加してホモジェナイズし、分画遠心法により濃縮した。そして、ショ糖密度勾配 (10~40%) および塩化セシウム密度勾配 (30~40%) 平衡遠心法によりウイルスを純化した。次に、純化したSJNNVを用いて抗SJNNV家兔血清を作製した。すなわち、純化ウイルスとフロインドの完全あるいは不完全アジュバント (Difco) とを等量混合して1週間間隔で計4回ウサギの筋肉内に接種した。そして、4回目の接種から10日後に採血し血液を凝固させた後、遠心分離により血清を得た。50%硫酸アンモニウム塩析により血清よりIgGを部分純化し、さらに非特異的抗体を健全シマアジの組織 (血液と内臓器官) から得た乾燥抗原で吸収除去した。

血漿サンプル 間接ELISAにおいては、純化したSJNNVで免疫した親魚の血漿を陽性対照として使用した。親魚 (9歳魚) への免疫抗原は、純化ウイルス溶液 (3 mg/ml) 6 ml をシャーレ (直径9 cm) に入れ、15Wの紫外線ランプ下で30分間照射して不活化したウイルス溶液をフロイン

ドの不完全アジュバントと等量混合して調製した。これを1週間間隔で3回親魚の背部筋肉内に接種した。3回目の接種から10日後に親魚をエチレングリコール・モノフェニルエーテル (400 mg/l) で麻酔し、ヘパリン処理した注射器で動脈球から採血した。血液は600 × g (3,000 rpm) で10分間遠心処理して血漿を分離し、NaN₃を0.1%となるように添加して4°Cで保存した。なお、陰性対照には大分県および千葉県で採集したそれぞれ天然0および2歳魚の血漿を用いた。

検査に供した血漿は、天然 (天然稚魚を採集して養成した魚) あるいは人工 (種苗生産した稚魚を養成した魚) 由来の成魚を日裁協古満目および五島両事業場で4~11年間飼育した親魚 (年齢: 6~13歳魚) 179尾から、1991年1月あるいは2月の産卵期直前に採血して得た血漿である。これらの親魚群のうち、130尾に関しては同年7月に再び採血した。これらの血漿サンプルに加えて、静岡県、千葉県、石川県、鹿児島県および東京都で飼育されていた93尾の親魚 (年齢: 2~13歳) についても1990年10月、12月および1991年1月に採血を行い検査に供した (Table 9)。

血漿イムノグロブリンの部分純化 免疫したシマアジ親魚の血漿を用いて、10 mMのリン酸緩衝液 (0.15 M NaCl, pH 7.2: 以下PBS) で平衡化したモノQカラム (Pharmacia) を用いて高速液体クロマトグラフィー (HPLC) でIgM画分を分離した。非吸着画分を溶出した後、吸着タンパクを0.5 ml/分の速さで0.15~1.0 M NaClの密度勾配PBS中に溶出させた。各画分の1 μlと純化ウイルス (2 mg/ml) 1 μlとを室温に保った温室で30分間混合させ、凝集反応を示した画分をIgM画分とした。しかし、HPLCによるIgMの部分純化は大量のサンプルを処理するには長時間を要することから、以下のようなDEAE-Sephadex A50 (Pharmacia) を用いた迅速で簡便な方法を考案した。すなわち、

1. エッペンチューブに血漿 (100 μl) とPBS (900 μl) を入れる、
2. これにPBSで平衡化したDEAE-Sephadex A50 (200 μl) を添加する、
3. 時々チューブを上下逆さまにしながら室温で30分間放置する、
4. 遠心処理 (500 rpm で30秒) した後、上清を捨て沈殿したSephadex粒子を1 mlのPBSで3回洗浄する、
5. 沈殿した粒子に1 MのNaClを含むPBSを1 ml添加する、
6. 遠心処理 (10,000 rpmで10秒) した後、上清を間接ELISAに供する

ことにより行った。

抗体検出のための間接ELISA 96穴マイクロプレート (テルモ) 上で上述の方法で部分純化したシマアジ親魚の血漿IgMを50mMの炭酸緩衝液 (pH 9.6) により2倍希釈系列を作成し、25°Cで2時間の吸着反応を行った。Tween 20 (0.05%) を含むPBS (以下PBST) でマイクロプレートの各穴を5回洗浄した後、純化ウイルス溶液 (100 ng) を各穴に200 μlずつ分注した。25°Cで2時間反応させた後、PBSTで5回洗浄した。次に、25%ブロッカー (大日本製薬) を含むPBSTで2,000倍

Table 9. Detection of plasma antibodies against SJNNV from striped jack brood stocks by indirect ELISA

Rearing place	Origin	Age (year)	Rearing period (year)	No. of fish		Detection rate (%)
				Antibody positive	Antibody negative	
Kochi Pref. (Komame Station)	W* ¹	13	11	31 (0.29-1.02)* ³	3 (0.00-0.04)	91.2
	W	6	4	17 (0.24-0.41)	4 (0.01-0.03)	81.0
	D* ²	10	10	18 (0.24-0.35)	7 (0.01-0.03)	72.0
	D	7	7	35 (0.44-0.58)	14 (0.00-0.09)	71.4
Nagasaki Pref.	D	10	10	26 (0.26-0.41)	4 (0.00)	86.7
(Goto Station)	D	7	7	14 (0.30-0.34)	6 (0.00-0.07)	70.0
Shizuoka Pref.	W	7-13	6	14 (0.28-0.32)	2 (0.00-0.03)	87.5
Chiba Pref.	W	2	2	6 (0.20-0.23)	3 (0.05-0.07)	66.7
Ishikawa Pref.	W	13	10	1 (0.43)	2 (0.00)	33.3
Kagoshima Pref.	W	3	1	12 (0.39-0.44)	43 (0.00-0.07)	21.8
Tokyo	W	2-10	2-5	3 (0.33-0.40)	7 (0.00-0.04)	30.0

*¹ Wild (captured and reared).

*² Domestic (reared from larval stage).

*³ ELISA absorbance at 405 nm.

に希釈したウサギ抗SJNNV抗体を200 μ l ずつ分注した。37°Cで2時間反応後、PBSTで5回洗浄した。さらに、PBSTで3,000倍に希釈したヤギ抗ウサギIgG抗体（アルカリフォスファターゼ標識；バイオラッド）を200 μ l ずつ各穴に分注し、37°Cで2時間反応させた。そして、PBSTで洗浄した後、p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム（1 mg/ml）を含むジエタノールアミン（pH 9.8）を200 μ l ずつ分注して室温で60分間酵素反応させ、ELISA用マイクロプレートリーダー（トーン）を用いて405 nmにおける吸光度（以下A405）を測定した。

結 果

HPLCによる血漿IgMの部分純化 免疫親魚の血漿をモノQカラムにかけて各フラクションに分けたところ、3番目のピークを示したフラクション（No. 7）において純化ウイルスとの凝集反応が認められた（Fig. 15）。

免疫親魚のELISA 免疫親魚および非免疫親魚の血漿からそれぞれHPLCでIgMを部分純化し、ELISAに供した結果をFig. 16に示した。免疫親魚の血漿IgMはSJNNV抗原に対して強い反応を示し、A405は血漿IgMの80倍から10,240倍までの希釈段階で濃度依存的であった。一方、非免疫親魚の血漿ではいずれの血漿IgM濃度においても反応を示さなかった。また、DEAE-Sephadex A50で処理した免疫親魚の血漿IgMは160倍から10,240倍希釈段階において、A405との間に濃度依存性を示した（Fig. 17）。しかし、未処理の血漿では160倍から5,120倍希釈の間で濃度依存性が見られたが、そのA405はDEAE-Sephadex A50で処理した血漿IgMよりも低い値であった。

これらの結果から判断して、抗体検出ELISAに供する血漿は、HPLCで処理する代わりにDEAE-Sephadex A50による前処理で十分であることが判明し、以下のELISAにはこの前処理方法を用いた。なお、親魚の抗体判定においては、30倍希釈した親魚の血漿IgMの吸光度（A405）から陰性対照の吸光度を引いた値が0.10以上となる場合を抗体陽性、0.10未満を抗体陰性とした。

検査血漿のELISA 各地の生産機関で飼育されたシマアジ親魚についてELISAによる抗体検査を行った結果、合計272尾中177尾（抗体陽性検出率65%）から抗体が検出された（Table 9）。抗体陽性および陰性のA405は、それぞれ0.20~1.02および0.00~0.09であった。抗体検出率と親魚の由来（天然か人工）や年齢との間には関連性が認められなかった。また、古満目および五島両事業場で飼育した130尾について性別との関連も検討したが、特に関連性は認められなかった（Fig. 18）。両事業場で養成した産卵親魚130尾について1991年7月に再度抗体検査を行った結果、抗体陽性検出率は1月には67.7%と高かったが、7月には25.4%と著しく減少した。しかし、一部の個体は1月に陰性であったが、7月には陽性に転じた。

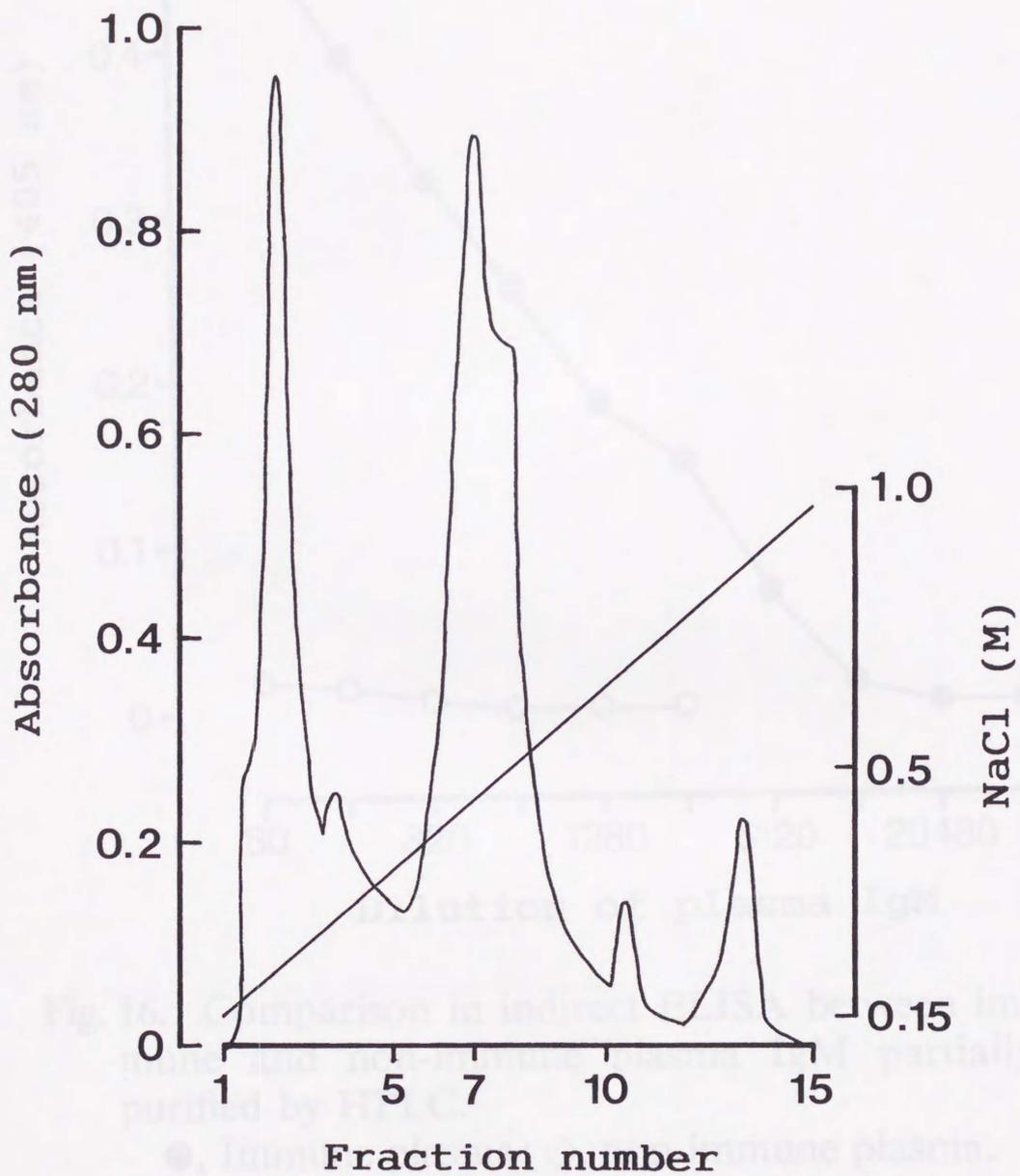


Fig. 15. Elution profile of anti-SJNNV striped jack serum by HPLC. Purified SJNNV agglutinated with fraction no. 7.

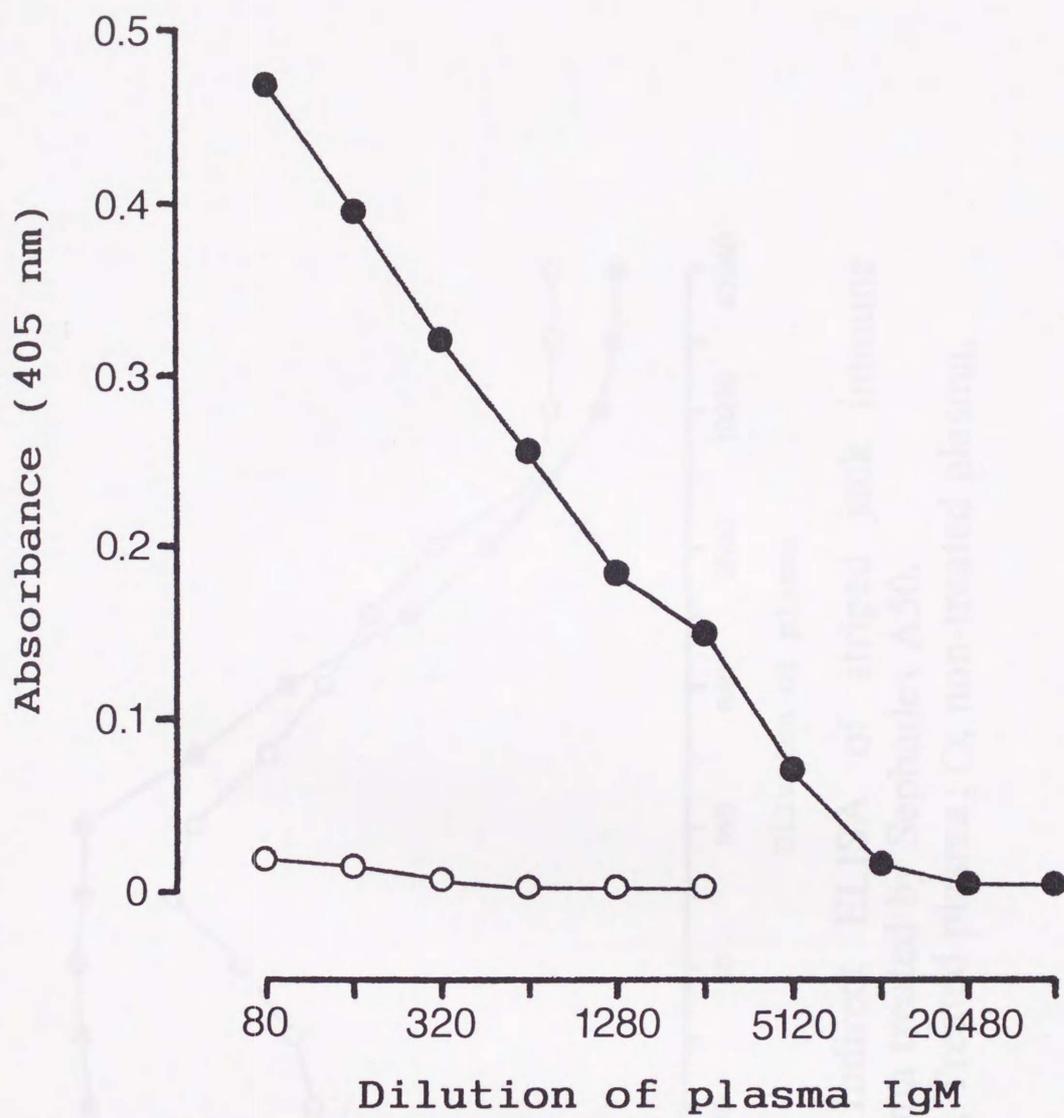


Fig. 16. Comparison in indirect ELISA between immune and non-immune plasma IgM partially purified by HPLC.

●, Immune plasma; ○, non-immune plasma.

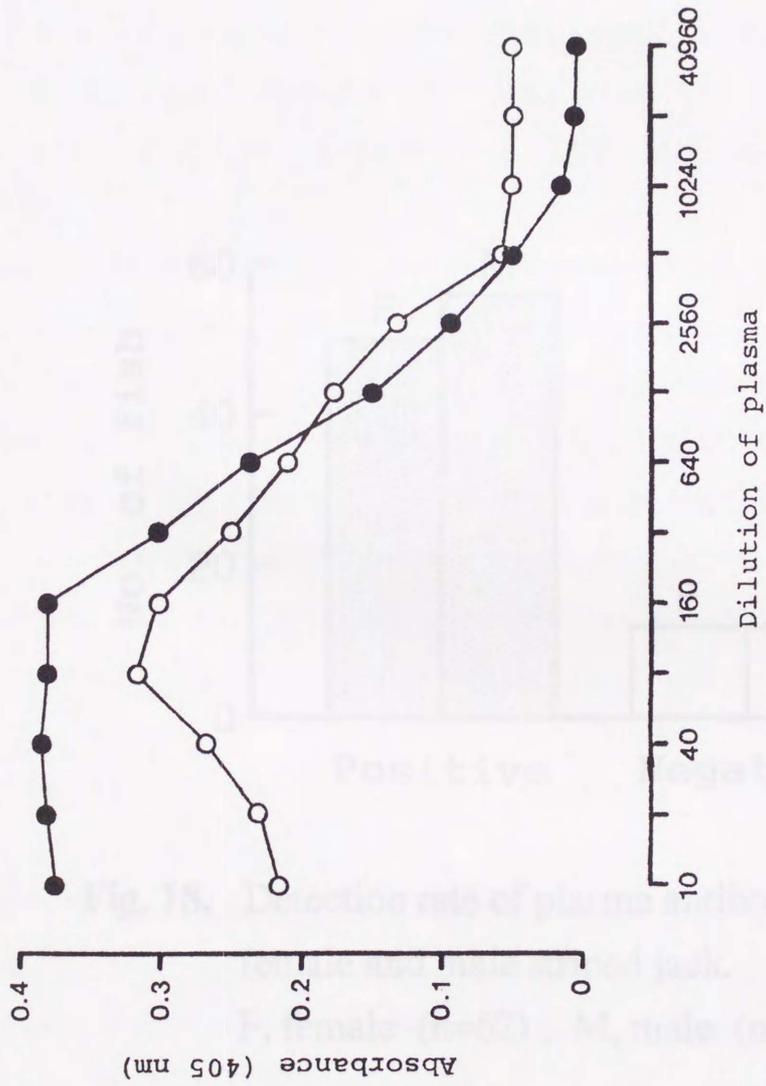


Fig. 17. Indirect ELISA of striped jack immune plasma treated by Sephadex A50.
 ●, Treated plasma; ○, non-treated plasma.

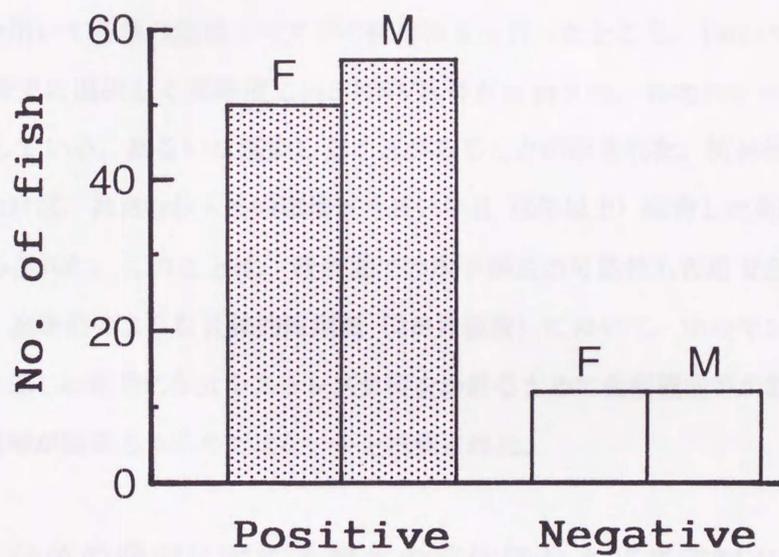


Fig. 18. Detection rate of plasma antibodies in female and male striped jack.

F, female (n=62) ; M, male (n=68).

考 察

この研究の当初は、未処理の血漿を用いて間接ELISAによる抗SJNNV抗体の検出を行ったが、Fig. 17に示されたようにA405と血漿IgMとの間には濃度依存性が見られず、非特異反応が含まれていることが推察された。これは、血漿中に抗体とウイルスとの特異的反応を阻害する物質が含まれていることに起因すると考えられる。この問題はHPLCにより血漿IgMを部分純化してELISAに供することで解決されたが、この前処理は特に大量のサンプルを処理する場合、長時間を要することから、DEAE-Sephadex A50を用いた簡便で迅速な前処理方法を考案し、その有効性も確認された。この前処理法に必要な血漿サンプルの量は、わずか0.1 mlであり、平均魚体重4.5 kgの産卵親魚から毎月1回の割合で0.5 mlの採血を行っても産卵行動等には特に悪影響を及ぼさないことも判明した。

間接ELISAを用いて各地の養成シマアジの抗体検査を行ったところ、Table 9に示されたように親魚の性別や由来に関係なく高頻度に抗SJNNV抗体が検出され、各地のシマアジ親魚の多くがSJNNVに感染している、あるいは感染したことがあることが示された。抗体検出率は、石川県での養成親魚を除けば、おおむね人為的環境下で長い年月（6年以上）飼育した高齢魚（6歳以上）で高い傾向が認められた。このことは、親魚間での水平感染の可能性も否定できないことを示唆している。また、産卵期のような比較的短期間（2か月程度）において、ホルモン処理や加温処理による産卵の繰り返しは親魚に多大なストレス負荷をかけるために免疫機能等が低下し、その結果としてウイルス増殖が誘発されるのではないかと推察された。

第2節 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

本節では日裁協古満目事業場において、シマアジ親魚における抗SJNNV抗体保有率の時期的な変動を調べるとともに、親魚における抗体の有無および産卵飼育方法の違いと、それらの親魚から得られた仔魚におけるVNNの発生との関係について検討した（虫明ら，1993 a）。

材料および方法

産卵供試親魚 産卵には、天然海域で採捕して飼育した天然養成魚およびふ化仔魚から飼育した人工養成魚の両方を供した。これらは、いずれも日裁協古満目事業場において5～12年間飼育されたものであり、VNNが発生した1989年および1990年に産卵親魚として用いられた5魚群（ロットA～E）である（Table 10）。親魚には背部筋肉内に標識（ピットタグ、直径2 mm×長さ11 mm、

Table 10. Brood stocks of striped jack used for spawning in 1991 and 1992

Lot No. of spawners	Origin	Age in 1992 (year)	No. of fish	Plasma antibody* ¹		Condition for breeding	
				1991	1992	1991	1992
A	W·D* ²	7·8·11	4·13·7	Negative	Negative	C* ³	I* ⁴
B	W	14	9	Positive	Negative	C	I
C	W	14	14	Positive	Positive	C	I
D	D	11	13	Positive	Negative	C	I
E	W·D	7·8	5·6	Positive	Negative	-	I

*¹ Detection of plasma antibody was done just before the spawning season.

*² W, wild (captured and reared); D, domestic (reared from larval stage).

*³ C, Water temperature was kept constantly at 22 °C for induction of spawning.

*⁴ I, Water temperature was raised intermittently from 20 °C to 22 °C each time when spawning was intended.

Identification Devices Inc.) を埋め込んで、個体識別を可能にした。

親魚血漿抗体の検出 親魚の血漿中の抗SJNNV抗体の検出は、前節に従って行った。すなわち、親魚を麻酔して動脈球から採血し、遠心分離により得た血漿からDEAE-Sephadex A50 (Pharmacia) によりIgMを部分純化して間接ELISAに供した。間接ELISAには、血漿 (IgM画分) -純化SJNNV-ウサギ抗SJNNV抗体-酵素標識ヤギ抗ウサギIgG抗体 (バイオラッド) の反応系を用い、検査試料の吸光度から陰性対照試料の吸光度を引いた値が、0.10以上の場合を抗体陽性と判定した。抗体検査は、1990年11月 (ロットEのみ)、1991年2月、7月、12月および1992年2月、4月、7月に行った。

親魚の産卵飼育条件 1991年には親魚 (ロットA~D) の飼育水温を22°Cに安定させ、産卵を継続的に誘発させた (加温安定型, Fig. 3のタイプC, p. 9)。一方、1992年には産卵を制御するために水温20°Cで飼育し、必要に応じて22°Cまで加温して産卵を誘起させた (加温変動型, Fig. 3のタイプI)。また、産卵期間中の親魚への給餌量の多寡と卵におけるSJNNVの出現状況との関係について検討するため、1991年にはロットCは隔日給餌 (3回/週: 給餌率 4.2%/魚体重/回) とし、残りのロットA、BおよびDには毎日1回給餌 (給餌率 4.2%/魚体重/回) を行った。1992年には全ロットに対し前年度と同じ給餌率で毎日1回給餌した。

ウイルス抗原の検出 親魚から産出されたすべての卵およびふ化仔魚 (日齢1) の抽出サンプルから、以下の方法で間接ELISAによりSJNNV抗原の検出を行った。すなわち、卵 (通常0.2 g; 約270個) または仔魚 (0.2 g; 約460尾) に0.05 M炭酸緩衝液 (pH 9.6) を加えて磨砕し、遠心処理 (10,000×g, 10分) により得られた上清を同緩衝液で128倍に希釈してELISAに供した。そして、405 nmにおける吸光度 (A₄₀₅) が0.10以上の場合をSJNNV抗原陽性と判定した。

仔魚の飼育試験 親魚ロット別に得たふ化仔魚群について、第1章 (p. 27) で述べた飢餓耐性試験を行って無給餌生残指数 (SAI) を求めた。また、一部のふ化仔魚群については、通常の生産方法に従い給餌しながら種苗生産サイズ (全長25~30 mm) までの飼育を試みた。

結 果

親魚からのウイルス抗体の検出 1991年および1992年の産卵供試親魚の血漿ウイルス抗体価を調べた結果、親魚の養成時期により抗体価が変動し、7月には抗体陽性魚が減少する傾向が認められた (Table 11)。親魚ロットAでは、1991年7月に24尾中3尾 (抗体陽性率 12.5%) から抗体が検出されたが、それ以外の検査ではすべて陰性と判定された。ロットBは、1991年2月の産卵試験には抗体陽性群として供したが、7月には抗体陽性率が22.2%に低下し、以後の検査ではすべて陰性と判定され、同様の傾向がロットDおよびEにも認められた。ロットCは、1992年2月の産卵試

Table 11. Detection of plasma antibody against SJNNV in striped jack spawners

Date of antibody detection	Lot number of striped jack brood stocks											
	A (N=24)		B (N=9)		C (N=14)		D (N=13)		E (N=11)			
	positive	negative	positive	negative	positive	negative	positive	negative	positive	negative	positive	negative
1990 Nov.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1991 Feb.	0	24 (0.00-0.05)	9	0 (0.29-0.49)	14	0 (0.39-1.01)	13	0 (0.14-0.25)	—	—	—	—
Jul.	3 (0.11-0.12)	21 (0.00-0.02)	2	7 (0.11-0.12)	7	7 (0.06-0.09)	3	10 (0.10-0.13)	3	10 (0.07-0.09)	3	8 (0.00-0.09)
Dec.	0	24 (0.00-0.09)	0	9 (0.05-0.09)	14	0 (0.11-0.16)	0	13 (0.03-0.09)	0	13 (0.00-0.09)	0	11 (0.00-0.09)
1992 Feb.	0	24 (0.02-0.09)	0	9 (0.04-0.09)	13	1 (0.10-0.19)	0	13 (0.04-0.09)	0	13 (0.04-0.09)	0	11 (0.02-0.09)
Apr.	0	24 (0.00-0.08)	0	8 (0.04-0.07)	9	5 (0.08-0.09)	2	11 (0.11-0.12)	1	11 (0.06-0.09)	1	10 (0.00-0.09)
Jul.	0	24 (0.00-0.06)	0	8 (0.02-0.06)	0	14 (0.03-0.08)	0	13 (0.02-0.08)	0	13 (0.02-0.08)	0	11 (0.01-0.06)

*1 number of fish positive or negative in plasma antibody.

*2 antibody level (ELISA absorbance at 405 nm).

験直前までは抗体陽性個体が50~100%と高い割合を占めたが、7月の時点にはすべて抗体陰性個体と判定された。

Table 10には、産卵直前の親魚における抗体保有の有無を示した。すなわち、1991年の産卵ではロットE（1990年11月検査）を除き産卵直前の2月に行った抗体検査の結果を、また1992年の場合には産卵期直前の12月に行った検査結果をそれぞれ示した。本表に示したように結果的には、1991年には抗体陽性親魚群が多く用いられ、逆に1992年には抗体陰性群が多く用いられた。

卵および仔魚からのウイルス抗原の検出と仔魚のSAI 1991年に各親魚ロット（A~D）から得たふ化仔魚のSAIと卵および仔魚からのウイルス抗原の検出結果をFig. 19に示した。親魚の産卵が繰り返されるにしたがって、SAIは次第に低下する傾向が見られた。親魚ロットA、BおよびCにおいては、SAIが比較的高かった産卵初期（3月）に得られた卵およびふ化仔魚（日齢1）からはSJNNV抗原は検出されなかった。しかし、親魚の産卵が繰り返され、ふ化仔魚のSAIが15ないし20以下に低下し始める頃から、卵のA405およびふ化仔魚からのウイルス抗原の検出頻度は次第に上昇し始め、産卵後期になるほどその傾向は強くなった。ロットBはほかと異なり隔日に給餌されていたが、卵のA405がほかのロットより、やや早期に上昇し始めた点を除けば、毎日給餌群との差は認められなかった。これらに対し、ロットDでは産卵期間が短かったためもあり、SAIの低下もなく、また卵・仔魚からもウイルス抗原は検出されなかった。なお、ロットAとBから得られたふ化仔魚の一部（Fig. 19の①~④）を通常の飼育試験に供した結果、ロットAからの4月11日に採卵した卵由来のふ化仔魚群（③；約60万尾）にVNNが発生して全滅した。

1992年の各親魚ロット（A~E）のふ化仔魚のSAIと卵および仔魚からのウイルス抗原の検出結果はFig. 20に示すとおりである。ロットAおよびDには、産卵の繰り返しによるSAIの低下が多少見られたが、ロットB、CおよびEではそのような低下傾向は見られず、ほぼSAIは15以上で推移した。また、いずれのロットの卵およびふ化仔魚からもSJNNV抗原は検出されなかった。なお、ロットA~Eから得られたふ化仔魚の一部（Fig. 20の①~⑨）を飼育試験に供した結果、それらのいずれの飼育過程においてもVNNは発生しなかった。

考 察

1991年の産卵期後半のロットBおよびCの親魚から得られた卵からSJNNV抗原が高頻度に検出されたことから、シマアジ仔魚における本病の感染源は親魚と考えられた。また、養成中の親魚の血漿から本ウイルスに対する抗体が高頻度に検出されることから、本ウイルス感染はシマアジ親魚間に広く起こっていると考えられる。本節では、約2年間にわたり同一魚群の抗体レベルの推移を追跡してみたわけであるが、1991年および1992年のいずれの年にも7月に調べた抗体保有率が、そ

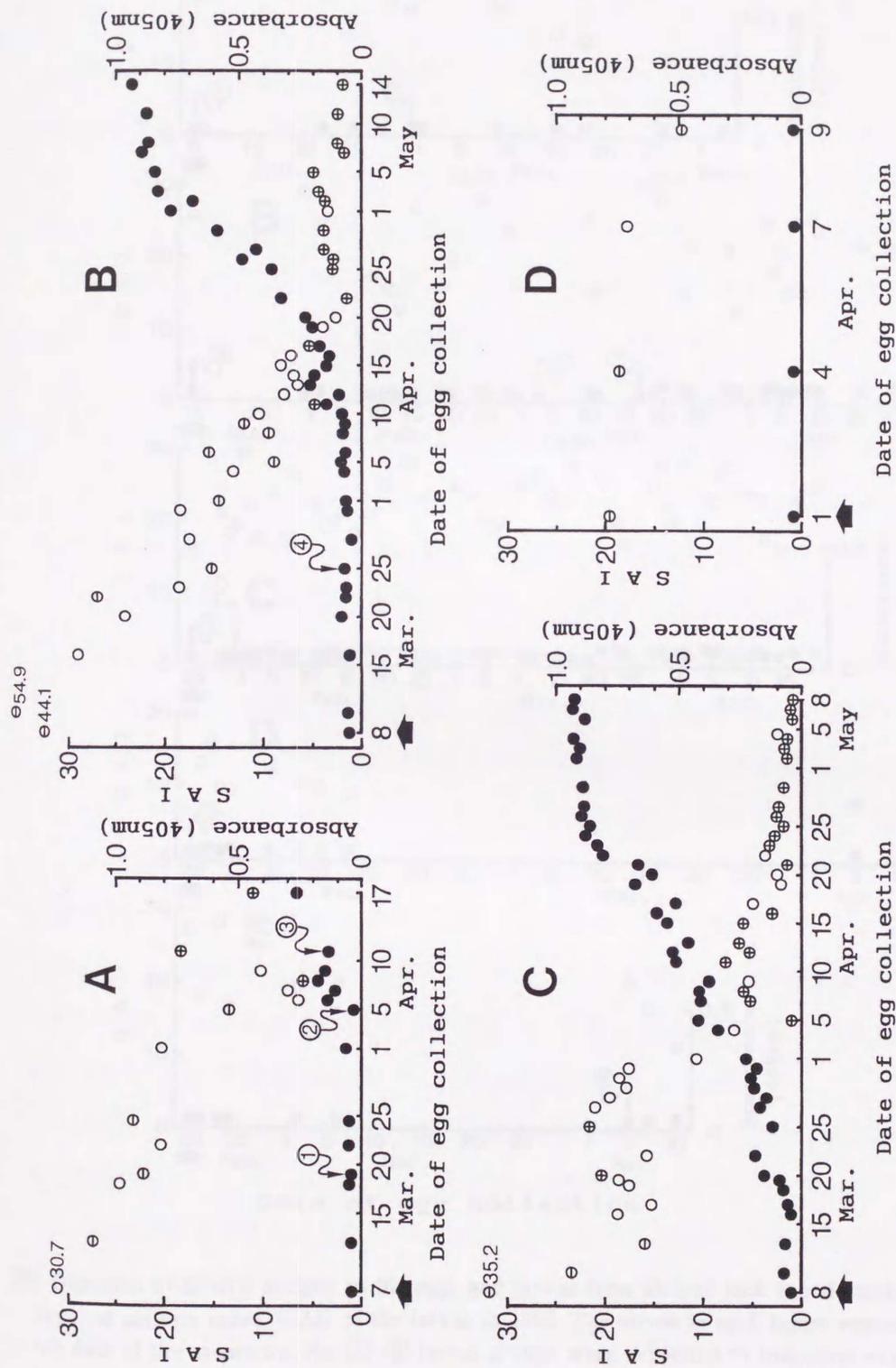


Fig. 19. Detection of SJNNV antigen in the eggs and larvae from striped jack brood stocks (Lots No.A-D) and survival activity index (SAI) of the larvae in 1991. The arrow in each figure represents the first spawning date of the spawners. No. ①-④ larval groups were subjected to long-term rearing experiments. ○, SAI of larvae; ⊕, SJNNV antigen was detected; ⊖, not detected; ●, SJNNV antigen of eggs (ELISA value at 405 nm).

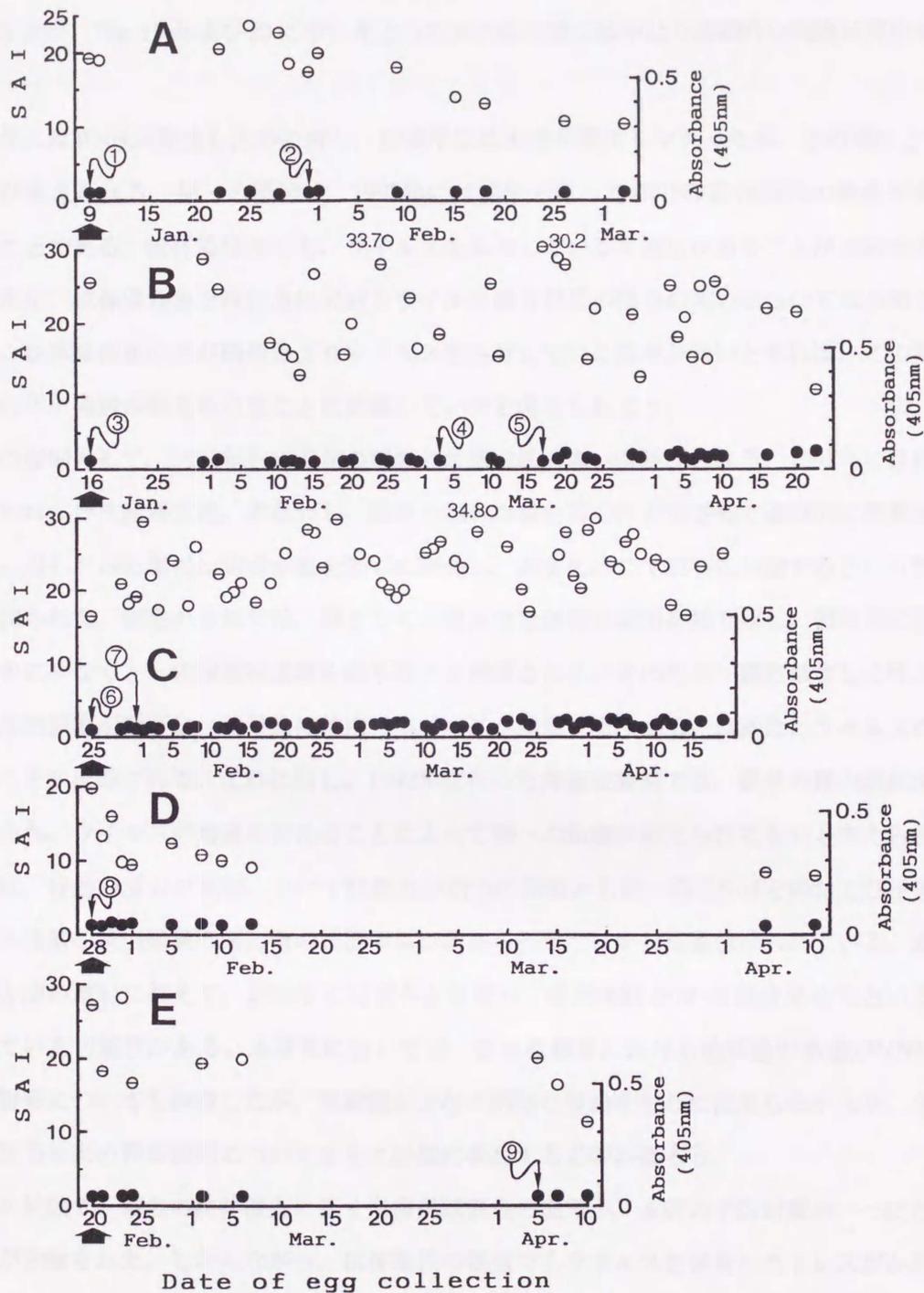


Fig. 20. Detection of SJNNV antigen in the eggs and larvae from striped jack brood stocks (Lots No.A-E) and survival activity index (SAI) of the larvae in 1992. The arrow in each figure represents the first spawning date of the spawners. No. ①-⑨ larval groups were subjected to long-term rearing experiments. ○, SAI of larvae; ⊕, SJNNV antigen was detected; ⊖, not detected; ●, SJNNV antigen of eggs (ELISA value at 405 nm).

の前の調査時に比べて低下している傾向が見られただけで、明瞭な季節変化は認められなかった。また、親魚における抗体の有無とそれらから得られた仔魚におけるウイルス抗原の検出結果とを比較してみたが、Fig. 19 および20 に示したようにそれらの間にはやはり直接的な関連は見出せなかった。

1991年にはVNNが発生したのに対し、1992年には本病が発生しなかったが、その理由として2つの要因が考えられる。第一の要因は、1992年には前年と違ってSJNNV抗体陰性の親魚が多く用いられたことである。抗体陰性魚でも、ウイルスを保有している可能性があることが本研究で明らかにされたが、抗体陽性魚と陰性魚におけるウイルス保有個体の割合の違いについては不明である。もしも、抗体陰性魚の方が陽性魚よりウイルスを保有している確率が低いとすれば、この第一の要因が1992年に発病が抑えられたことに貢献していたと考えられよう。

第二の要因として、1991年と1992年の親魚の産卵方法の違いが挙げられる。1991年には従来日裁協で行われていた産卵方法、すなわち、親魚の飼育水温を22°Cに安定させて連続的に産卵を誘発させたのに対し、1992年には飼育水温を20°Cに制御し、必要に応じて22°Cに加温するという加温変動方式が採られた。従来の方法では、群としての親魚はほぼ毎日産卵を繰り返し、個別別に見てもシーズン中に少なくとも10回前後産卵を繰り返すと判断される。そのため、親魚は著しく体力を消耗し、免疫機能等が低下し、結果的に体内でウイルスが増殖する、あるいは新たにウイルスの感染を受けることが推察される。これに対し、1992年に行った加温変動型では、親魚の体力消耗が最小限に抑えられ、ウイルスの増殖を抑えることによって卵への伝播が抑えられたものと考えられる。このことは、仔魚の活力の指標、ひいては親魚の活力の指標とも言い得るSAIと卵および仔魚からのウイルス抗原の検出結果の間に負の相関関係が認められたことから裏付けられている。また、産卵飼育方法の違いに加えて、1992年には前年と異なり、産卵時期を2か月程度早めたということも影響していた可能性がある。本研究においては、さらに親魚における給餌量の多寡がVNN発生に及ぼす影響についても検討したが、実験例が少なく明瞭な結論を得るには至らなかった。今後、親魚の抵抗力を高め得る要因についてさらに詳細に検討する必要がある。

今回の試験で、親魚の抗体検査に基づく産卵供試親魚の選別が、本病の予防対策の一つになり得る可能性が示唆された。しかしながら、抗体陰性の親魚でもウイルスを保有しストレスがかかればウイルスを排出する可能性があることから、さらに積極的に親魚の選別を行うためには、産卵直前の親魚の卵巣等から直接ウイルス抗原を検出する必要があると考えられる。しかし、これまで用いてきた間接ELISAでは、微量のウイルス抗原を検出することは難しいと考えられる。したがって、次のステップとしてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法などのより感度の高いウイルス検出方法を導入し、卵やふ化仔魚からSJNNVの検出を行う必要があると判断した。

第3節 PCR法を用いたウイルス遺伝子の検出による産卵親魚の選別

前節で述べたように、産卵期直前に間接ELISAによりSJNNVに対する特異抗体を持たないシマアジ親魚を選別し、それらの親魚を加温変動型（20°C↔22°C）で飼育管理してストレス負荷を軽減することによってVNNの発生を抑制し得ることが示唆された。しかし、ELISAによって抗体あるいは抗原が検出されなかった陰性親魚を用いた産卵試験においても、ふ化仔魚にVNNが発生する飼育事例が少数ながら見受けられた。これは、ELISAで微量の抗原を検出するのが難しいためと、抗体検出結果が必ずしもその時点におけるウイルスの存在を意味するものではないことによるものと考えられた。安定した人工種苗生産技術の確立のためには、SJNNVフリーに近い親魚から卵およびふ化仔魚を確保することが先決問題であり、そのためにはより感度の高いウイルス検出方法を導入し、その方法を用いて親魚や卵からSJNNVの検出を行う必要があると考えられた。

このような情況に鑑み、SJNNVの外被タンパク遺伝子（RNA2）のシーケンス解析結果^{*1}に基づき、PCR法によりRNA2遺伝子の一部を増幅してウイルスを検出する方法が開発された（Nishizawa *et al.*, 1994）。このPCR法を用いることによりSJNNVの5種類の異なった標的遺伝子領域（T1～T5；Nishizawa *et al.*, 1994）を増幅させることができ、100 fgのSJNNVのRNA遺伝子を検出することが可能となった。

本研究では、このPCR法を用いてシマアジ親魚の生殖巣からSJNNV遺伝子（T4領域）を検出し、親魚の血漿抗体との関係について検討するとともに、それらの親魚から得られた仔魚におけるVNN発生の有無との関係について検討した（Mushiake *et al.*, 1994 a）。

材料および方法

親魚からの生殖巣および血漿サンプル 試験には日裁協古満目事業場において6年以上飼育した親魚を各群12～16尾に分けた4群を供した（Table 12）。これらの親魚は、背部筋肉内に埋め込んだピットタグにより個体識別した。

親魚はエチレングリコール・モノフェニルエーテル（400 mg/l）で麻酔して、先ずヘパリン処理した注射器で動脈球から採血した。次いで、滅菌したカニューレを用いて個体別に生殖巣（精巣あるいは卵巣）の一部（約0.1 g）を採取した。いくつかの例外を除いて月に1回の頻度ですべての産卵親魚から生殖巣および血漿を採取した。血漿は、遠心処理（600 ×gで10分間）により分

^{*1} Mori, K., T.Nishizawa, T.Nakai, K.Muroga and I.Furusawa (1993) : Analysis of the coat protein gene (RNA2) of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). Second Symposium on Diseases in Asian Aquaculture, Phuket, Thailand, Fish Health Section, Asian Fisheries Soc., 口頭発表.

Table 12. Brood stocks of striped jack used for spawning in this study

Group of spawners	Origin*	Age in 1993 (year)	Number of fish (Male : Female)
1	D	12	13 (7 : 6)
2	D, W	8, 9	16 (6 : 10)
3	W	15	12 (6 : 6)
4	W	15	12 (6 : 6)

* D : domestic (reared from larval stage), W : wild (captured and reared).

離してELISAで抗体を検出するまで NaN_3 (0.1%) を添加して保存(4°C)した。また、生殖巣はELISAとPCR法によりSJNNVの検出を行うまで凍結保存(-80°C)した。

親魚の産卵条件と採卵 産卵親魚の飼育管理は、ストレスの影響を軽減するために飼育水温を必要に応じて20°Cから22°Cに加温する加温変動型で行った。1992年12月から1993年5月までの全親魚の産卵期間中は、夕方(17:00)から翌朝(9:00)までの間、毎日採卵ネットでろ過採集して採卵した。各親魚群から得られた浮上卵は、ふ化水槽(10kl)に設置したふ化ネットに収容してふ化させ、ふ化仔魚はパンライト水槽(1kl)に設置した別のふ化ネットに再収容して水温22°Cで無給餌による飼育を行った。各親魚群から得られたすべての卵サンプル(約0.2g)およびその卵から得られたふ化仔魚(約50尾)を日齢別に毎日1回サンプリングし、検査を行うまで凍結保存(-80°C)した。なお、無給餌条件下での仔魚は最長日齢10までしか生残できなかったため、仔魚のサンプリングは日齢1から10までとした。また、後述するように、PCR法によりNo.3および4の親魚群の生殖巣からSJNNV遺伝子が検出されたため、各親魚群からSJNNV陽性個体を選別除去してSJNNV陰性親魚だけを用いて追加産卵試験を行った。

親魚の血漿中抗SJNNV抗体の検出 血漿サンプルは、DEAE-Sephadex A50 (Pharmacia)を用いてIgM画分を部分純化した後、間接ELISAに供した。その際、陰性対照には大分県で採集した天然0歳魚の血漿を用いた。間接ELISAでの反応系には、血漿(IgM) - 純化SJNNV(100ng) - ウサギ抗SJNNV抗体(2,000倍希釈) - 酵素標識ヤギ抗ウサギIgG抗体(バイオラッド; 3,000倍希釈)を用い、検査対象魚の吸光度から陰性対照の吸光度を引いた値が0.10以上の場合を抗体陽性と判定した。

ELISAとPCR法によるSJNNV検出 親魚生殖巣、卵およびふ化仔魚からのSJNNV抗原および遺伝子(RNA2)の検出をそれぞれ間接ELISAおよびPCR法により行った。

ELISAによるウイルス検出では、サンプル(0.1g)に50mM炭酸緩衝液(pH9.6)0.9mlを添加してホモジェナイズし、遠心処理(10,000×gで5分間)により得られた上清をウイルス抗原検出用に開発した間接ELISAに供した。その際、ホモジェナイズした原液を同緩衝液で128倍に希釈した時の吸光度が0.10以上となる場合を、ウイルス抗原陽性と判定した。

PCR法によるSJNNVの核酸検出では、各生殖巣サンプル(0.1g)をジエチルピロカーボネイト(Sigma; 0.1%)で処理した蒸留水(0.5ml)と混合してホモジェナイズした後、10,000×gで10分間遠心分離した。その遠心上清に40μlのプロテイナーゼK(1mg/ml; ナカライテスク)と40μlのSDS(ラウリル硫酸ナトリウム; 10%)を添加して混合し、37°Cで30分間反応させた。そして、遠心分離(10,000×gで5分間)した後、フェノール・クロロホルム処理により全核酸を抽出した。SJNNVのRNA2遺伝子検出は、Nishizawa *et al.* (1994) に準じて行った。本実験においては、T4領域(426bp, Nishizawa *et al.*, 1994)を標的増幅遺伝子としてSJNNVの検出を行った。

すなわち、42°C (30分) および99°C (10分) 条件下で、逆転写酵素 (宝酒造, M-MLV) および下流プライマー (R3) を用いて、抽出したRNAから相補的DNA (cDNA) を合成させた。そして、上流プライマー (F2) とDNAポリメラーゼ (宝酒造) を添加し、DNA増幅器 (PC-700, アステック) を用いて、95°C (40秒), 55°C (40秒) および72°C (40秒) のDNA増幅サイクルを計25回繰り返した。増幅させたDNAは、2%アガロースゲル (アガロースME, ナカライテスク) で電気泳動し、紫外線照射により T4 領域におけるDNA増幅産物の有無を確認した。その際、陽性および陰性対照には、それぞれVNNが発生した時の罹病仔魚 (日齢6, 1990年) およびVNNが発生しなかった時の健全仔魚 (日齢8, 1992年) を使用した。

結 果

PCR法による親魚生殖巣からのSJNNV遺伝子の検出およびELISAによる親魚血漿抗体の検出結果を Table 13 に、また、各親魚群から得られた卵および日齢別の仔魚からのウイルス遺伝子の検出結果をFig. 21 にそれぞれ示した。1992年12月から1993年2月の産卵期直前には、いずれの親魚群においても生殖巣におけるSJNNV遺伝子および血漿における抗体は検出されなかった。親魚群1は2月8日までの産卵期間中に7回の産卵を繰り返したが、その間に得られた卵およびふ化仔魚からはSJNNV遺伝子は検出されなかった。しかし、産卵が終了した親魚を3月16日に検査した結果、13尾中2尾の親魚生殖巣 (精巣と卵巣) からウイルス遺伝子が検出された。親魚群2では産卵期間中に21回の産卵を繰り返したが、親魚生殖巣あるいは仔魚からはSJNNV遺伝子は全く検出されなかった。

親魚群3および4では、それぞれ3月22日および5月14日に行った最終検査において、PCR法により親魚生殖巣からSJNNV遺伝子が検出された。また、Table 13 に示されたように、親魚群3および4ではそれぞれ18回目 (3月22日) および40回目 (5月14日) の産卵で得られた浮上卵からはウイルス遺伝子は検出されなかったが、仔魚からは検出された (Fig. 22) 。ところが、各親魚群からSJNNV陽性個体を選別除去して陰性親魚群だけで行った追加産卵試験では、仔魚におけるVNNは発生しなかった (Table 13) 。

また、Fig. 21 に示されたように、親魚群3および4においてはそれぞれ14~18回目および31~41回目の産卵で得られたふ化仔魚においてもSJNNV遺伝子が検出された。そして、親魚の産卵が繰り返されるにしたがって、ウイルス遺伝子はより早い段階の仔魚から検出されるようになった。ELISAとPCR法はともに仔魚からのSJNNV検出には有効な手法であるが、ELISAよりもPCR法のほうがより早い仔魚の日齢でウイルスを検出することができた (Table 14) 。

すべての親魚群において、産卵が繰り返されるにしたがって親魚血漿中のウイルス抗体の陽性検出率も上昇した。しかし、前節でも示されたように、親魚生殖巣におけるウイルスの有無と血漿に

Table 13. Detection of SJNNV gene from gonads of spawners, eggs and larvae of striped jack by PCR and parental plasma antibodies against SJNNV by ELISA

Group of spawners	Sampling date	SJNNV in gonad		Plasma antibody		Round of spawning	SJNNV in	
		Male	Female	Male	Female		eggs	larvae
1	Dec. 1, 1992	0/7*1	0/6	0/7*2	0/6	0	-	-
	Jan.14, 1993	0/7	0/6	0/7	0/6	0	-	-
	Feb. 8	ND*3	ND	ND	ND	7th*4	-	-
	Mar.16	1/7	1/6	1/7	1/6	NS*5	-	-
2	Dec. 8, 1992	0/6	0/10	0/6	0/10	0	-	-
	Jan.29, 1993	0/6	0/10	0/6	0/10	0	-	-
	Mar. 1	0/6	0/10	1/6	0/10	12th	-	-
	Apr.13	0/6	0/10	3/6	0/10	21st	-	-
3	Dec. 2, 1992	0/6	0/6	0/6	0/6	0	-	-
	Jan.19, 1993	0/6	0/6	0/6	0/6	0	-	-
	Feb.18	0/6	0/6	0/6	0/6	7th	-	-
	Mar.22	2/6	0/6	2/6	1/6	18th	-	+
	Additional	0/4	0/6	0/4	1/6	19th	-	-
	Dec. 5, 1992	0/6	0/6	0/6	0/6	0	-	-
4	Feb.27, 1993	0/6	0/6	0/6	0/6	1st	-	-
	Apr.12	0/6	0/6	0/6	1/6	21st	-	-
	Apr.24	0/6	0/6	0/6	1/6	26th	-	-
	May 14	0/6	4/6	1/6	4/6	40th	-	+
	Additional	0/6	0/2	1/6	0/2	41st	-	-

*1 Number of fish SJNNV -positive/examined.

*2 Number of fish antibody-positive/examined.

*3 ND: Not done.

*4 The given round of spawning occurred following the sampling shown on the left.

*5 NS: Not spawned.

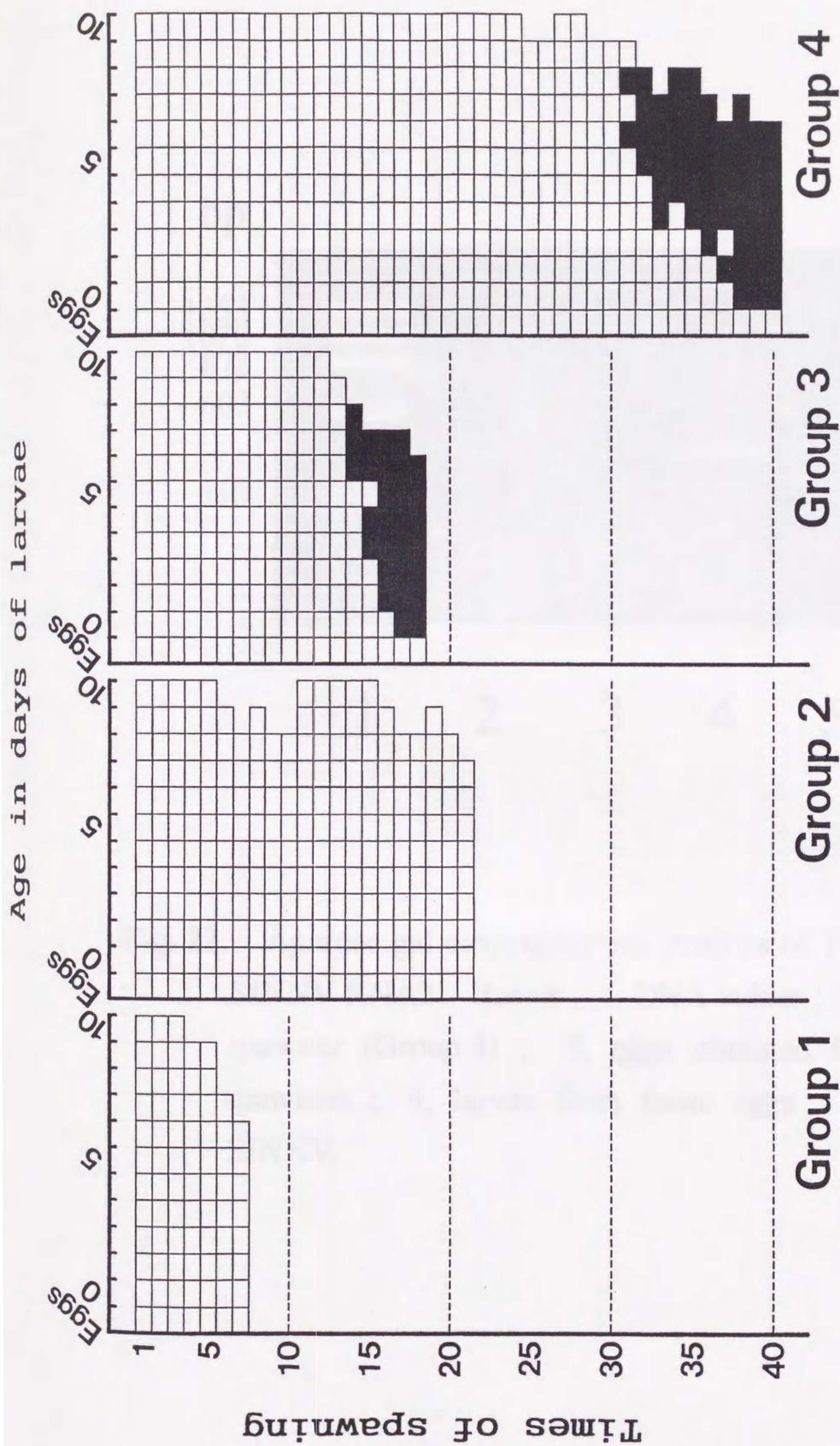


Fig. 21. Detection of SJNNV gene from eggs and larvae obtained from striped jack brood stocks (Group 1~4) by PCR. □ SJNNV gene negative, ■ SJNNV gene positive.



Fig. 22. Agarose gel electrophoresis profiles of T4 region of SJNNV RNA2. Lanes : 1, DNA ladder ; 2, gonad of spawner (Group 4) ; 3, eggs obtained from those spawners ; 4, larvae from those eggs ; 5, purified SJNNV.

Table 14. Detection of SJNNV from eggs and larvae by ELISA and PCR

Group of spawners	Date of spawning	Detection method	SJNNV in eggs and larvae								
			eggs	0	1	2	3	4	5	6	
3	Mar.27	ELISA	-	-	-	-	-	+	+	+	+
		PCR	-	+	+	+	+	+	+	+	+
4	May 14	ELISA	-	-	-	-	-	+	+	+	+
		PCR	-	+	+	+	+	+	+	+	+

おける抗体の有無とは必ずしも一致しなかった。すなわち、生殖巣からSJNNVが検出された個体では血漿抗体が陰性から陽性に転じたが、抗体陽性親魚の生殖巣からは必ずしもSJNNVは検出されなかった。

考 察

SJNNVのより感度の高い検出方法として、Nishizawa *et al.* (1994) によりSJNNVのRNA2 遺伝子を増幅させるPCR法が開発された。本研究では、このPCR法をシマアジ親魚の生殖巣、卵およびふ化仔魚からのSJNNV遺伝子の検出に応用した結果、Table 13 に示されたように親魚生殖巣におけるSJNNV遺伝子の検出結果と仔魚におけるVNNの発生とはよく一致した。また、親魚群3および4において産卵後期に得られた仔魚で連続的にVNNが発生したような場合でも、SJNNV陽性親魚を除去することによって仔魚におけるVNNの発生を防除することができた。これらの結果から、PCR法による生殖巣からのSJNNV遺伝子の検出結果に基いたシマアジ親魚の選別は、本種のVNN防除対策として有効であることが判明した。

PCR法はSJNNV遺伝子 (RNA2) の一部を検出する手法であり、PCR法による検査結果において陽性と判定された場合でも必ずしも感染性を有するウイルスが存在することを意味するわけではない。しかしながら、PCR法によりウイルス遺伝子陽性と判定された親魚から得られたふ化仔魚に実際にVNNが発生したことなどから、今回の試験ではPCR法により示されたSJNNV遺伝子の存在は感染性を有するSJNNVの存在を示しているものと考えられた。

また、本研究においては、産卵期間中に親魚の産卵が繰り返されるにしたがって親魚体内でSJNNVが増殖することも明らかとなった。このことから、親魚から仔魚への垂直感染の防除対策としては、産卵期間中の親魚の産卵回数を多くとも10回程度に留めることが重要であると考えられた。

産卵親魚におけるSJNNVおよび抗体を検査した結果、親魚群2における2回目 (3月1日) および3回目 (4月13日) の検査や親魚群4での3回目 (4月12日) および4回目 (4月24日) の検査結果に見られるように、生殖巣からSJNNV遺伝子は検出されなかったにもかかわらず抗体が検出された事例があった。これは、SJNNVが親魚の生殖巣以外の器官において増殖していることを示唆しており、今後、親魚がストレスを受けた時にSJNNVがどの器官で増殖するのかについても明らかにしていく必要がある。

第4節 ヨード剤を用いた卵消毒によるVNN防除の試み

これまでに述べてきたように、シマアジのVNNの感染源は雌親魚であると推定された。そこで、シマアジにおけるVNNの防除対策の一環として、SJNNVの垂直感染（経卵感染）を防除するため、サケ科魚類においてウイルス性疾病防除の目的で発眼卵の消毒に使われているポビドンヨードを用いて、シマアジの卵消毒効果について検討した。なお、*in vitro*実験ではSJNNVはヨード剤（50 mg/l）に対し感受性を示すことが報告されている（有元ら，1993^{*1}）。

材料および方法

供試卵 平成元年4月3日および4月6日に天然魚養成12年魚から採卵した浮上卵を使用して試験を行った。それらの卵の卵質性状は Table 15 に示した。

消毒剤 試験に用いたヨード剤は、外用消毒剤イソジン液（ポビドンヨード液：明治製菓）で、1 ml 当たり10 mg の有効ヨウ素（以下ヨウ素と記す）を含んでいる。ポビドンヨードを所定のヨウ素濃度となるように海水（22℃）に溶解し、消毒液1 l に対して上限5万粒の受精卵を収容した。消毒中は溶存酸素の補給ならびに消毒液と卵との接触を助けるためにエアーストン1個で通気を施した。消毒後の卵は、通常の卵管理と同様にふ化ネットに収容して通気と注水を施しながら水温22℃でふ化させた。

ヨウ素濃度 卵消毒に有効なヨウ素濃度を決定するに先立ち、卵消毒による受精卵のふ化に及ぼす影響について検討した。ヨウ素濃度0（対照区）、100、200、300、400 および500 mg/l の消毒液を作製し、各濃度の消毒液に卵を15分間接触させた。そして、ポビドンヨード消毒の影響により卵のふ化率が50%となる、いわゆる半数致死濃度（median tolerance limit：TLm）を Doudoroff *et al.*（1951）の方法を用いて求め、実際の卵消毒試験はそれ以下のヨウ素濃度で行った。

消毒時間 卵の正常発生を阻害しないような消毒液への卵の最適浸漬時間を把握するため、浸漬時間別消毒試験を行った。卵をヨウ素濃度0（対照区）、80 および200 mg/l の消毒液に10、15、20、30 および45分間浸漬して消毒液と接触させ、卵発生等に及ぼす影響について検討した。

消毒時期 消毒を行う卵の適正発生段階について検討した。同一親魚群の同一産卵時に得られた浮上卵の発生段階が4細胞期（産卵1.5時間後）、64細胞期（3.0時間後）、胚環期（9.5時間後）および発眼期（35.0時間後）に達した時点で経時的に採卵して試験に供した。一部例外を除き、各

^{*1} 有元 操・西澤豊彦・中井敏博・室賀清邦・三村 元・古澤 巖（1993）：消毒剤によるSJNNVの不活化。平成5年度日本水産学会秋季大会講演要旨集，1005。

Table 15. Striped jack eggs used for experiments in disinfection with iodine

Date of collecting eggs	Total eggs collected ($\times 10^3$)	Floating eggs rate* ¹ (%)	Fertilized eggs rate* ² (%)	Mean diameter (μm)	
				Eggs	Oil droplet
Apr. 3, 1989	4348	96.7	98.4	1020 \pm 27* ³	276 \pm 12
Apr. 6	1582	97.8	97.6	996 \pm 24	255 \pm 10

*¹ Rate of the number of floating eggs to that of total eggs collected.

*² Rate of the number of fertilized eggs to that of floating eggs.

*³ Standard error.

発生段階における卵消毒液のヨウ素濃度は、0 (対照区) , 50, 80, 100 および150 mg/l とした。
なお、消毒液への卵の浸漬時間はすべて15分間とした。

消毒回数 卵の発生段階が胚環期に達した時の1回消毒と胚環期および発眼期に達した時の2回消毒を行い、ポビドンヨード消毒による卵への影響について検討した。消毒はいずれもヨウ素濃度0 (対照区) , 80 および200 mg/l の消毒液に卵を15分間浸漬して行った。

卵消毒の効果判定 ポビドンヨードによる消毒の卵発生に及ぼす影響について検討するため、以下の3項目について効果判定を行った。

正常発生率：ふ化ネット内で消毒後24時間経過した卵をビーカーで無作為に約200個掬い取り、そのうち150個の卵について卵発生が正常に進行している卵数を計数し、次式により正常発生率を算出した。

$$\text{正常発生率 (\%)} = [\text{正常発生卵数}] \div 150 \times 100$$

ふ化率：ふ化ネット内の消毒後の卵からのふ化仔魚数を計数し、試験供試卵数に対するふ化仔魚数の割合で求めた。

無給餌生残指数：得られたふ化仔魚を用いて前述 (第1章, p. 29) の方法で水温22°Cにおける飢餓耐性試験を行い、無給餌生残指数 (SAI) を算出した。

SAIに及ぼす卵消毒有無の影響 ヨウ素濃度80 mg/l で15分間消毒を行った卵 (胚環期に1回) から得られたふ化仔魚の活力について、無消毒卵由来の仔魚と比較検討した。試験には、平成元年度に天然魚養成12年魚と人工魚養成9年魚から得られた卵を供した。両親魚群の採卵回次ごとに卵を消毒区および無消毒区用とに約半数ずつ分け、消毒区については上述のような消毒方法で、また無消毒区についてはポビドンヨードを含まない海水 (22°C) に浸漬した以外は消毒区と全く同じ方法で卵を取り扱った。

結 果

ヨウ素濃度 ヨウ素濃度別に行った卵消毒試験結果を Fig. 23に示した。ヨウ素の濃度と反比例してふ化率の低下がみられ、TLmは230 mg/l と算出された。この実験では100 mg/l の濃度でもふ化に対し影響を与えていたが、後の実験では80 mg/l の濃度ではほとんど影響が見られなかったため実際の卵消毒試験には80 mg/l をヨウ素濃度の基準とした。

消毒時間 消毒後の卵の正常発生率およびふ化率は、ヨウ素濃度が高くなるほど低くなる傾向が認められた (Table 16) 。しかし、仔魚のSAIは、ポビドンヨード (80 mg/l) と15分間接触させた卵から得られたふ化仔魚で最も高い値を示し、200 mg/l では低下する傾向が見られた。

消毒時期 卵の発生は、消毒が行われた卵の発生段階およびヨウ素濃度とは無関係にほぼ正常

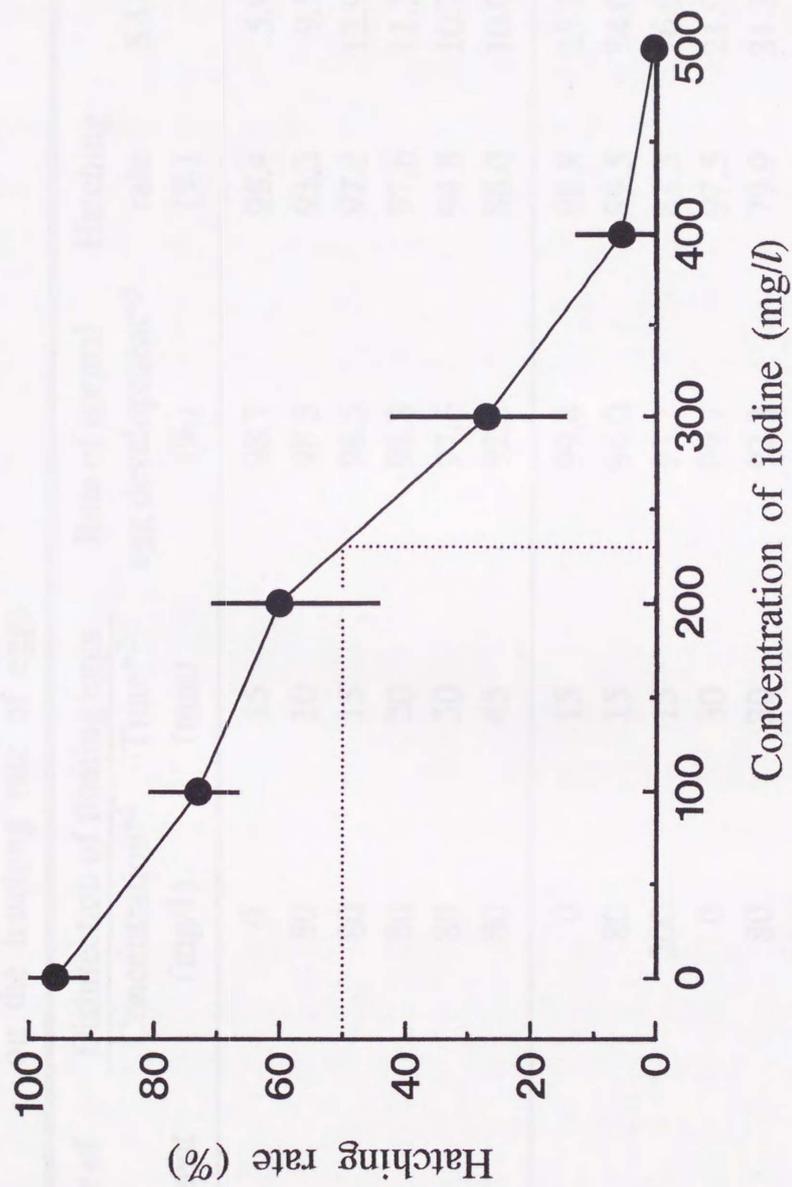


Fig. 23. Effect of iodine concentration on hatching rate of striped jack eggs. Vertical bars represent ranges of hatching rate.

Table 16. Effect of immersion time of striped jack eggs in iodine solution on the hatching rate of eggs

Number of experiment	Disinfection of floating eggs		Rate of normal egg development* ³ (%)	Hatching rate (%)	SAI* ⁴
	Concentration* ¹ (mg/l)	Time* ² (min)			
1	0	15	98.7	95.4	5.90
	80	10	98.5	93.3	9.50
	80	15	98.5	97.3	12.93
	80	20	98.8	97.6	11.34
	80	30	97.6	94.8	10.70
	80	45	92.3	88.0	10.07
2	0	15	99.8	98.8	25.75
	80	15	96.0	89.5	34.00
	200	15	93.2	81.3	16.90
	0	30	99.7	97.5	21.99
	80	30	92.3	79.9	31.35
	200	30	84.9	75.8	13.37

*¹ Concentration of iodine.

*² Immersion time of floating eggs in iodine solution.

*³ Rate (%) of normal egg development at 24 h after the disinfection

= Number of eggs showing normal development / total eggs examined (=150) X 100.

*⁴ Survival activity index at 22°C.

に進んだ (Table 17)。64細胞期あるいは胚環期に消毒を行った卵ではふ化率の低下はほとんど見られなかったが、発眼期に消毒を行った卵では、ヨウ素濃度が高くなるにつれてふ化率が低下する傾向が認められた。仔魚のSAIは、いずれの発生段階で消毒を行った卵から得られたふ化仔魚でもヨウ素濃度80 mg/l 区で最も高い結果が得られた。

消毒回数 正常発生率、ふ化率およびSAIのいずれの判定項目においても、2回目の試験で80 mg/l濃度区で2回消毒した卵のふ化率 (86.1%) を除いて、1回消毒区の方が2回消毒区よりも高い値を示した (Table 18)。しかし、ヨウ素濃度80 mg/l で2回消毒を行った卵から得られたふ化仔魚を種苗生産試験に供した結果、すべての仔魚に下顎部の形態異常が発生した。

SAIに及ぼす卵消毒有無の影響 天然魚養成12年魚および人工魚養成9年魚のいずれの卵から得られたふ化仔魚でも、ポピドンヨードによる卵消毒を行った方がSAIが高く、対照区よりも2~3日の延命効果が認められた (Fig. 24)。しかし、これらのふ化仔魚を通常の種苗生産試験に供した場合には、無消毒卵由来の仔魚よりは若干の延命効果が見られたものの、結果的にはいずれも仔魚期にVNNが発生し全滅した。

考 察

今回の試験は、SJNNVの経卵感染を防除するためにウイルスが卵表面に付着しているとの仮定のもとに行われたものである。試験の結果から、胚環期以降のシマアジの卵をヨウ素濃度80 mg/lの消毒液に1回だけ15分間浸漬しても、卵の正常発生率、ふ化率および仔魚のSAIからみてほとんど悪影響を与えないと考えられた。なお、2回消毒した卵由来の仔魚における下顎部の形態異常は、ヨウ素の毒性というより卵のハンドリングによる影響と考えられた。また、ヨウ素消毒を行った卵からふ化した仔魚のSAIの上昇は、卵表面の一部のSJNNVが不活化されたために発病が遅れたことによる延命効果と考えられた (Fig. 24)。しかし、実際の飼育試験においても若干の延命効果が認められただけで結果的にはVNNの発生により仔魚は全滅した。このことから、ポピドンヨードによる卵消毒だけでシマアジのVNNを防除することは不可能であると考えられた。これは、SJNNVは卵の表面に付着しているが、ヨードとの接触が十分でないために不活化できないのか、あるいはウイルスが卵の中に入り込んでいるため効果がないのか、今のところ明らかではない。今後他の消毒剤を用いたシマアジの卵消毒試験を実施する必要がある。

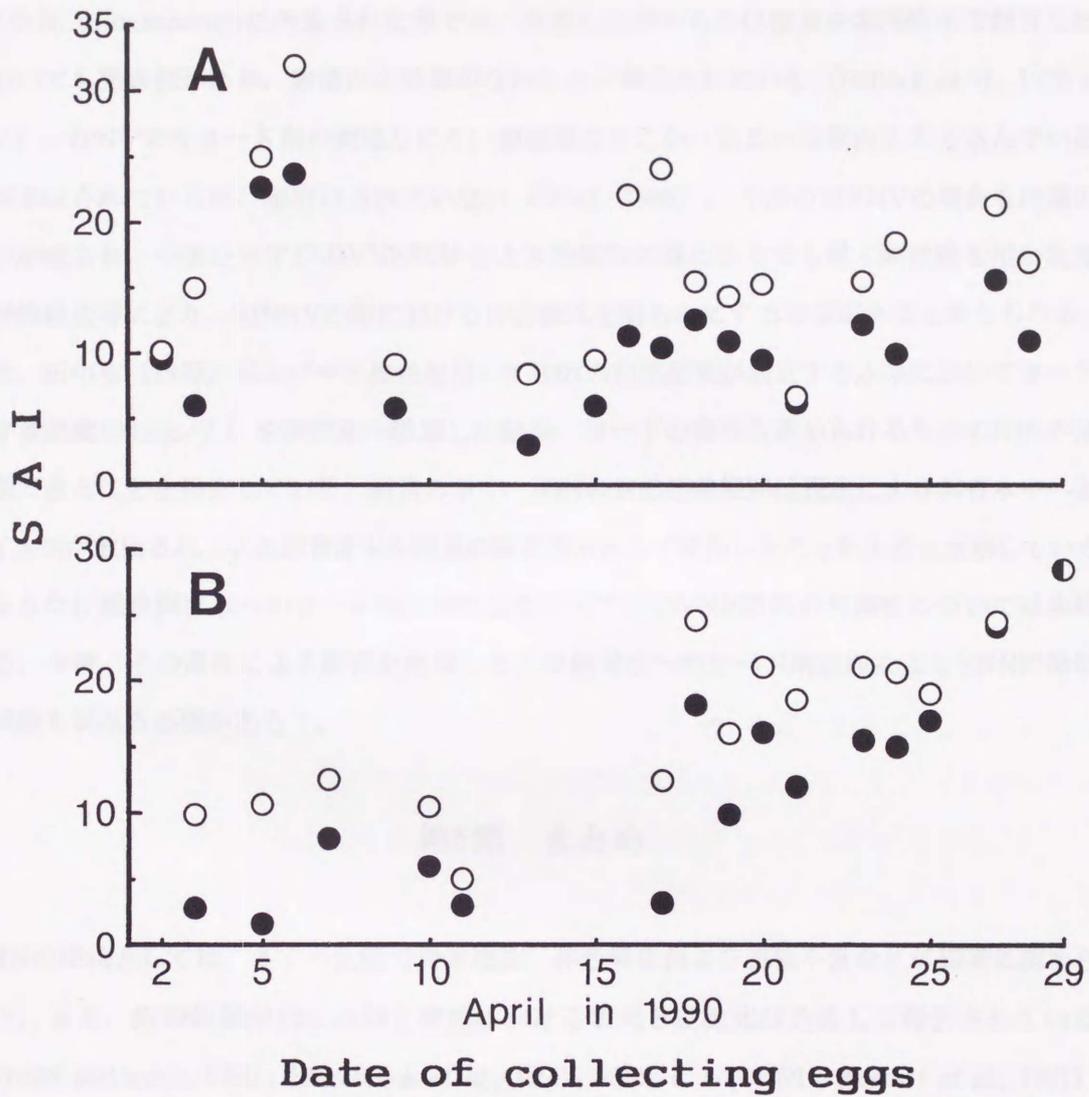
サケ科魚類においては、*in vitro*では伝染性膀胱壊死症原因ウイルス (IPNV) (Amend and Pietsch, 1972; Desautels and MacKelvie, 1975; 井上ら, 1990), 伝染性造血器壊死症原因ウイルス (IHNV) (Amend, 1976; Elliott and Amend, 1978; 井上ら, 1991) およびウイルス性出血性敗血症原因ウイルス (VHSV) (Amend and Pietsch, 1972) などの魚類病原ウイルスをはじめ、せっそ

Table 17. Effect of disinfection with iodine on egg development and larval survivability

Items	Developmental stage of floating eggs	Time after fertilization (h)	Concentration of iodine (mg/l)				
			0	50	80	100	150
Rate of normal egg development	4-cell stage	1.5	98.6	98.3	97.1	-	-
	64-cell stage	3.0	98.3	98.2	97.1	97.1	95.1
	Germ ring stage	9.5	96.3	94.9	96.1	95.2	95.4
	Eyed stage	35.0	96.7	-	95.6	93.5	92.4
Hatching rate of eggs	4-cell stage	1.5	96.7	95.9	96.1	-	-
	64-cell stage	3.0	98.5	96.3	89.7	91.3	79.7
	Germ ring stage	9.5	96.0	86.3	87.4	87.8	83.9
	Eyed stage	35.0	90.7	-	91.9	80.0	64.4
SAI of larvae	4-cell stage	1.5	3.70	5.33	6.80	-	-
	64-cell stage	3.0	3.16	4.43	7.03	5.47	6.03
	Germ ring stage	9.5	4.73	6.43	8.76	5.17	4.93
	Eyed stage	35.0	4.80	-	8.33	7.98	6.20

Table 18. Effect of the number of disinfection times by iodine on striped jack eggs

Disinfection of eggs with iodine		Rate of normal		Hatching	
Concentration (mg/l)	Immersion time (min)	Number of disinfection times (developmental stage of egg)	egg development (%)	rate (%)	SAI
0	15	1 (Germ ring)	99.6	98.5	5.90
0	15	2 (Germ ring and Eyed)	99.2	96.2	4.89
80	15	1 (Germ ring)	90.3	85.3	12.78
80	15	2 (Germ ring and Eyed)	64.7	50.7	12.96
0	15	1 (Germ ring)	100	99.4	22.87
0	15	2 (Germ ring and Eyed)	99.8	98.9	19.62
80	15	1 (Germ ring)	97.6	81.9	25.97
80	15	2 (Germ ring and Eyed)	90.3	86.1	23.66
200	15	1 (Germ ring)	86.5	84.4	20.58
200	15	2 (Germ ring and Eyed)	73.2	42.4	18.33



- : SAI of larvae obtained from eggs treated with iodophor (80 mg/l) for 15 min.
 ●: SAI of larvae from eggs without iodophor treatment (sham-immersion).

Fig. 24. Effect of disinfection with iodine in striped jack eggs on activity of the larvae.

う病原菌である *Aeromonas salmonicida* (Ross and Smith, 1972 ; Amend, 1974 ; 佐古ら, 1988) および細菌性腎臓病原菌である *Renibacterium salmoninarum* (Ross and Smith, 1972) などの魚類病原細菌ではポビドンヨードによる卵消毒の有効性が報告されている。しかし, *in vivo* では IPNV や *R. salmoninarum* に汚染された卵では, 消毒した卵からの仔稚魚を非汚染水で飼育した場合においても発病例があり, 卵消毒の効果がないことが報告されている (Bullock *et al.*, 1976 a , 1976 b) 。 IPNV ではヨード剤が到達しにくい卵表面のどこか, あるいは卵内に入り込んでいる可能性が示唆されているが, 証明はされていない (Wolf, 1988) 。 今回の SJNNV の場合も同様の可能性が示唆され, 今後シマアジの VNN 防除をより効果的に進める上でも電子顕微鏡を用いた免疫組織学的検査等により, SJNNV の卵における存在様式を明らかにする必要があると考えられる。

また, 田中ら (1992) はニジマス稚魚を用いて IHN の自然感染が成立する水系においてヨード剤 (ヨウ素濃度 100 mg/l) を飼育水へ添加した結果, ヨードの毒性も認められるものの IHN の発生が抑制できたことを報告している。報告の中で, IHN の自然感染経路は親魚により飼育水中へ大量のウイルスが放出され, その飼育排水を稚魚の飼育用水として使用したことによると推察している。このような仔稚魚飼育水へのヨード剤添加によるシマアジの VNN 防除の可能性については未検討である。今後, その毒性による影響を把握した上で飼育水へのヨード剤添加による VNN 防除に関する試験も試みる必要があるだろう。

第5節 まとめ

VNN の症状としては, 多くの魚種で異常遊泳, 体色黒化および摂餌不良などが顕著に認められており, また, 病理組織学的には脳と網膜における壊死と空胞化が共通して報告されている (Yoshikoshi and Inoue, 1990 ; Glazebrook *et al.*, 1990 ; Bloch *et al.*, 1991 ; Renault *et al.*, 1991) 。 これらの症状はシマアジにおいても認められることから, VNN に共通した症状と考えられる。また, シマアジにおいては当初 SJNNV の感染による鰾の異常肥大もその症状の一つと考えられていた。この鰾異常に関しては, VNN の症状の一つとして考えられる以前に種苗生産過程の原因不明の大きな減耗要因の一つとして捉えられていた (荒川ら, 1987 ; 関谷, 1991) 。 しかし, 近年この鰾異常は仔魚期における高度不飽和脂肪酸欠乏による症状の一つとも考えられている (奈良谷, 1994) 。 日裁協上浦事業場では, 東京水産大学との共同研究により飼育に供したふ化仔魚から全長 20 mm までのシマアジ仔稚魚の脂肪酸分析を行った結果, ふ化仔魚から全長 5 mm にかけて魚体中のドコサヘキサエン酸 (DHA) 含量が急激に減少していることが明らかにされた (関谷, 1991) 。 さらに, 鰾異常を呈する仔魚から間接 ELISA や PCR 法により SJNNV が必ずしも検出されないという事実からも, この鰾異常は VNN における特異的な症状ではなく, 栄養性疾患など他の要因によ

るものと考えられる。しかし、栄養性疾患により衰弱した仔魚のSJNNVに対する感受性が高くなるといった可能性も十分にあり得るので、この点に関して今後早急に検証する必要があるものと考えられる。

VNN原因ウイルスの分離を代表的な魚類由来細胞であるEPC（コイの上皮腫由来）、CHSE-214（マスノスケの胚組織由来）およびFHM（fathead minnowの尾柄組織由来）を用いて試みたが成功していない（Mori *et al.*, 1992）。イシダイのVNNにおいても細胞培養によるウイルス分離には成功していないが（Yoshikoshi and Inoue, 1990）、極く最近北海道でマツカワ（マツカワガレイ）*Verasper moseri* 稚魚にVNNが発生していることが確認され、病魚からCHSE-214細胞を用いてウイルス分離がなされたとの報告がある（石間ら, 1994¹）。ただし、この場合も継代はできていない。いずれにせよ、SJNNVを分離・培養しうる細胞系を樹立するための努力は今後も続ける必要がある。ところで、繰り返し述べてきているようにVNNは数種の魚類に発生し、わが国だけに限ってみてもシマアジを初め、イシダイ、キジハタ、クエ *Epinephelus moara*²、ヒラメ *Paralichthys olivaceus*（Nguyenら, 1993³）およびマツカワなどに発生している。これらの病気は一種類のウイルスによるものなのか、それともそれぞれ魚種に固有のウイルスによるものなのかを明らかにする必要がある。そのためには各魚種におけるVNN原因ウイルスの遺伝子レベルでの相同性を検討する必要があるとともに相互の病原性についての実験が必要であろう。

上述したように、シマアジ親魚からのVNNの垂直感染防除にはPCR法による生殖巣からのSJNNV検出に基づく親魚の選別が最も有効であると考えられた。しかしSJNNVに汚染されていない仔魚を種苗生産に供することができたとしても、仔魚の飼育過程でSJNNVに汚染された飼育水を無処理のまま使用するなどの飼育手法ではSJNNVの水平感染を容易に引き起こす可能性がある。そのため、飼育用水の殺菌や飼育者および水槽の消毒が必要となってくる。SJNNVの不活化には *in vitro* の実験に基づき、塩化ベンザルコニウム（50 mg/l）、ポピドンヨード（50 mg/l）、エタノール（60%）、メタノール（50%）およびSDS（100 mg/l）などの薬剤を始め、紫外線（100,000 $\mu\text{w} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$ ）、オゾン（0.1 mg/lで2.5分）、熱（65°C）および強アルカリ条件（pH 12）が有効であり、クレゾール、ホルマリン、エーテルおよびクロロホルムでは無効であったと報告されている（有元ら, 1993⁴）。これらの結果をそのまま応用できる局面もあろうが、実験の飼

¹ 石間正浩・吉水 守・呉 明柱・絵面良男・西澤豊彦・室賀清邦・渡邊研一・川真田憲治（1994）：マツカワの神経壊死症。平成6年度日本魚病学会春季大会講演要旨集，45。

² 広島大学生物生産学部助手 西澤豊彦博士私信。

³ Nguyen Huu Dung・中井敏博・西澤豊彦・室賀清邦・馬久地隆幸（1993）：ヒラメ稚魚におけるVNNの発生。平成5年度日本水産学会秋季大会講演要旨集，1007。

⁴ 有元 操・西澤豊彦・中井敏博・室賀清邦・三村 元・古澤 巖（1993）：消毒剤等によるSJNNVの不活化。平成5年度日本水産学会秋季大会講演要旨集，1005。

育水の殺菌および水槽や長靴などの消毒に応用するためには *in vivo* で確認していく必要がある。また、薬剤による卵の消毒法を確立するためには薬剤残留による仔稚魚への影響など生産現場における試験が重要である。

本章の第2節および第3節において、従来行ってきた加温安定処理などの親魚の産卵飼育手法では、産卵の繰り返しにより親魚に過剰なストレス負荷をかけることとなり、その結果として親魚に感染しているSJNNVの増殖が誘発されうることを述べた。一般に、感染症にはさまざまなストレスが深く関与していることはよく知られており、魚類においても同様の現象が認められている (Wedemeyer, 1970 ; Snieszko, 1974 ; Mazeaud *et al.*, 1977 ; Wedemeyer and Goodyear, 1984 ; Peters *et al.*, 1988) 。宿主 (魚類) が外部から強い刺激を受けることにより血液中のコルチゾール、コルチゾンあるいはカテコールアミンなどのステロイド系ホルモン濃度の上昇が認められ、これがストレスの一次反応と定義されている (Mazeaud *et al.*, 1977) 。これに引き続く二次反応として、液性および細胞性免疫能低下などの免疫抑制が起きる。その結果、宿主の病原微生物に対する感受性が高くなり、感染症を誘発しやすくなると考えられている (Mazeaud *et al.*, 1977) 。本研究においても、第3節の試験に供した親魚の産卵期間中における血漿コルチゾールを伊澤ら (1994¹) の方法を用いて予備的に定量した結果、産卵期直前には血漿コルチゾール濃度は28~37 ng/mlであったが、産卵末期には91~148 ng/ml に上昇し産卵の繰り返しによるコルチゾール濃度の上昇が認められ、その後にPCR法により親魚の生殖巣からSJNNVが検出された (虫明, 未発表) 。このことから、産卵の繰り返しは親魚にはきわめて大きなストレスとなり、親魚の産卵飼育技術の改善、例えば、産卵回数を減らすことや親魚の体力を高め得るような給餌方法などが重要な意味を持つと考えられる。今後、VNNの防除対策確立に向けて、これら親魚の飼育要因の検討も必要となろう。また、大腸菌 *Escherichia coli* を用いたSJNNVの外被タンパクの発現も試みられているが (森ら, 1994²) , 親魚を免疫することにより親魚におけるウイルス感染を防除できれば、その方向でのVNN対策もありうると思われる。

¹ 伊澤敏穂・香川浩彦・神戸川 明・廣瀬慶二 (1994) : コルチゾール測定のための酵素免疫測定法の確立. 平成6年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 1051.

² 森 広一郎・西澤豊彦・中井敏博・室賀清邦・古澤 巖 (1994) : 大腸菌を用いたSJNNV構造蛋白遺伝子の発現. 平成6年度日本魚病学会春季大会講演要旨集, 5.

第3章 ブリの成熟および産卵に関する親魚養成技術

ブリの種苗生産を目的とした研究は、多くの人によって試みられており（藤田ら，1965^{*1}；原田，1966；椋田・落合，1971），養殖魚からの採卵も可能であるが（広沢，1972；落合・椋田，1979；有元ら，1987），天然親魚からの採卵結果と比較すると採卵数が少なく受精後のふ化状況等の結果もかなり劣ることが指摘されてきた。一方，天然親魚の資源量は近年急激に落ち込んできており，安定した天然親魚の確保は次第に困難な状況になってきている。このような理由から，ブリ種苗を安定的に確保するために天然未成魚あるいは人工種苗生産魚などを用いて採卵用親魚を養成する技術の確立が強く望まれるようになってきている。

本章では，ブリの成熟および産卵に有効と考えられるモイストペレットの開発，ならびにその餌料を給餌して飼育した親魚を用いて電照処理やホルモン処理などの成熟促進およびHCG注射を施した誘発産卵により，雌親魚1尾当たりの採卵数およびふ化仔魚数がそれぞれ約200万粒および約80万尾の大量生産が可能となった親魚養成技術について述べる。

第1節 採卵用親魚の養成と採卵技術

1. 親魚の養成管理

ブリの親魚養成技術の開発において，親魚養成用の飼餌料の開発と疾病対策の2つが大きな問題となると考えられる。

従来のブリ養成においては，マイワシ，カタクチイワシおよびマサバなどの生餌中心の給餌が行われてきた。これらの生餌をブリに長期間単独投与することは，ビタミンB₁欠乏症を引き起こし，時には大量斃死を招くことが報告されている（石原ら，1974a，1974b）。また，ビタミンC欠乏により高い斃死率を示すことや酸化油を餌料に添加して与えることによる背こけ病の発生も報告されている（坂口ら，1969；坂口・浜口，1969）。生餌給餌による親魚養成には，近年の資源量の変動に伴い生餌餌料そのものが漁獲量に左右されやすいこと，品質の安定した餌の入手が困難なこと，残餌による漁場環境汚染の可能性が高いこと，添加した補足栄養物質等が餌から溶出しやすく魚体内への取り込み効率が悪いこと，および餌由来の病原微生物侵入の恐れがあることなど多くの問題点を含んでいる。そのため，能勢（1980）は，生餌給餌による飼育からモイストペレット給餌による飼育への移行の必要性を次のように述べている：「生餌冷凍魚をそのまま給餌した場合には餌中のタンパク含有率が著しく高くなり，摂取タンパク質の大部分はエネルギー源として消費

^{*1} 藤田矢郎・道津喜衛・原田輝男（1965）：ホルモン刺激によるブリの人工採卵。昭和40年度日本水産学会秋季大会講演要旨集，308。

されてしまうために、著しいタンパク質の浪費が行われている。配合飼料化あるいはモイストペレット化によって飼料中のタンパク質・カロリー比を適切に維持することにより、約30~40%のタンパク質を節約できる可能性がある。現在、約100万トンを超える生魚が餌として使用されていることを考えると、配合飼料化あるいはモイストペレット化の効用は大きいと考えられる」。このような理由から、後述するような比較的品質が安定し各種栄養物質を比較的容易に添加しやすいモイストペレットあるいはドライペレットによるブリ親魚の養成技術の開発が強く望まれる。

第二の問題点としては、特に寄生虫症および病原微生物による感染性の疾病が問題が挙げられる。ブリの飼育管理上、最も頻繁に見られる寄生虫病は、はだ虫と呼ばれる単生虫 *Benedenia seriolae* の寄生によるベネデニア症である。本種の卵はその一端に有する長いフィラメントで生簀の網地などに絡みつき、そこでふ化した仔虫（オンコミラキジウム）が容易に宿主に遭遇し、寄生後ブリの上皮細胞や粘液などを摂取する（小川，1983）。1965年頃からブリ養殖等において、トリブチルスズオキシド（TBTO）が網生簀の防汚塗料として使用され、寄生虫の防除に効力を発揮してきたものと考えられる。しかし、この有機スズ塗料の環境汚染や魚への影響を懸念する声が高くなり、また食品としての養殖魚の安全性の観点から有機スズを含む防汚剤の毒性が問題となり（江草，1990），1987年に自主的使用禁止の方針が打ち出され、現在ではほとんど使用されていない状況にある。この有機スズを含む防汚剤が使用されなくなっただけから、養殖場ではブリのはだ虫症等の単生虫症の被害が増大しているようである。古満目事業場では本虫の駆除に安全でかつ有効な淡水浴をこれまで行ってきたが、近年養殖場では過酸化水素（商品名：マリンサワー）を用いた駆除も行われている。また、定期的な生簀網の交換は、オンコミラキジウムの供給源を断つことから有効な防除方法であると考えられる。

養殖ブリにおける細菌感染症は数多く知られるが、*Enterococcus seriolicida* による連鎖球菌症および *Pasteurella piscicida* による類結節症が特に重要とされている（松岡・室賀，1993）。これらの細菌感染症に対しては予防免疫に関する研究もなされているが、有効なワクチンは開発されておらず、もっぱら抗生物質等による治療に依存している。

さらに近年、ウイルス性腹水症（江草・反町，1986）が発生し、計画通りの種苗生産ができない事例が見られている。この原因ウイルスは yellowtail ascites virus（YAV）と呼ばれ（反町・原，1985），採卵用親魚から仔魚への垂直感染の可能性も示されている（一色ら，1993）。このような再生産に関与したブリのウイルス性疾病の防除対策に関しては、今のところ技術的に確立されていない。このほかにも近年報告されているブリの重要な疾病には、1990年にマダイで始めて報告されたイリドウイルス感染症（井上ら，1992；Nakajima and Sorimachi，1994）と“黄疽症”（反町ら，1993；Iida and Sorimachi，1994）がある。前者は、これまでにブリのほかにカンパチ、シマアジ、スズキ、インダイおよびイシガキダイなどのわが国の重要な養殖対象魚種でも発生することが確認

されている（井上ら，1992¹⁾）。また，後者は血液中に認められる長桿菌に起因すると報告されているが（反町ら，1993），餌料の酸化脂肪によって黄疸症状が引き起こされる場合もあるようであり，生餌等の餌料の品質管理の重要性も指摘されている（松岡，1994）。現在までのところ稚魚期のウイルス性腹水症を除けば，ブリの種苗生産過程で特に問題となるような疾病は起こっていない。しかしながら，シマアジにおけるVNNのような深刻な病気の問題がブリに起こらないという保証はなく，病害対策をも念頭においた種苗生産システムの確立が必要と考えられる（Muroga, 1992）。

2. ホルモン処理による産卵誘発

天然海域で成熟した親魚では，産卵海域における水温条件や光条件などが産卵の促進要因となって再生産に関与していることはよく知られている。しかし，人為的環境下で飼育して成熟させた養成親魚の場合には，水温以外の物理的条件にはあまり注意が払われず，産卵誘発のために主としてホルモン処理について検討されてきている。

ブリの場合も，内田ら（1958）が長崎県男女群島女島で初めて本種の人工受精に成功して以来，再生産技術に関する研究が継続されてきているものの，養成親魚を用いた産卵無処理での大量の良質卵の確保は実現していない。そのため，ホルモン処理による直接的な排卵作用を誘発する手法が今なお継続して用いられている。しかしながら，ブリ親魚に対するホルモンの適正な投与量に関する報告もほとんどなく，生産現場ではこれまでの経験的手法に依存して産卵を誘発してきたのが実状である。

そこで，1986年から1991年の6年間にわたって日裁協古満目事業場で養成したブリ親魚にHCG注射を行い，その後の人工受精による採卵試験結果から本種の産卵誘発に有効と考えられるHCGの適正投与量を把握することを試みたので，以下に述べる。

材料および方法

供試魚 高知県古満目地先の定置網で漁獲し養成した天然魚養成雌親魚131尾および養殖業者が約2年半飼育した養殖魚養成雌親魚125尾の合計256尾を1986年から1991年に行った試験に供した（Table 19）。これらの親魚はいずれも生餌（マサバ：マアジ = 1：1）あるいはモイストペレット（第2節で説明，p. 98）を給餌して養成したものである。

ホルモン処理と人工受精 毎年雌親魚の卵巣卵が第3次卵黄球期（卵径約 700 μ m）に達した段階で背部筋肉内にHCG（帝国臓器製薬）を注射し，雌雄別に小割に収容した。HCGの注射量は，

¹⁾ 井上 潔・山野恵祐・松岡 学・中島員洋・反町 稔（1992）： 数種の高産養殖魚類にみられた“イリドウイルス感染症”，平成4年度日本魚病学会春季大会講演要旨集，30。

Table 19. Yellowtail brood stocks used for experiments of HCG injection

Year	Wild brood stocks*1		Rearing period		Diet*4	Rearing period		Diet
	Wild brood stocks*1		Rearing period			Rearing period		
	0*5	1	2	0.5		1.5		
1986	3*6	10		TF	10		MP	
1987		14	6	TF	10	12	MP	
1988	11	11	10	TF	16	9	MP	
1989		18	11	MP	15	10	MP	
1990	7	13	8	MP	12	11	MP	
1991		6	3	MP	12	8	MP	
Total	21	72	38		75	50		

*1 Captured by set-net fishery and reared at Komame Station.

*2 Captured at juvenile stage and reared for 2.5 years at a private farm followed by rearing at Komame Station.

*3 Rearing period (years) at Komame Station.

*4 TF, trash fish (mackerel and horse mackerel); MP, moist pellet (formula feed prescribed by National Research Institute of Aquaculture + trash fish (1:1)).

*5 Used for experiments just after captured by set-net fishery.

*6 Number of female fish used.

親魚の魚体重1 kg当たり500および1000 IUを目安とした。注射48時間後に親魚の腹部を押して精液および卵を搾出した。なお、いずれの年においても親魚の成熟に及ぼすハンドリングの影響を考慮して、取り扱い回数をできるだけ少なくするため供試親魚の魚体測定は採卵試験の時に行い、その結果から魚体重1 kg当たりの実際のHCG注射量を算出した。各年ともまず、雄3尾から採精し、受精を行うまでの数分間精液を冷蔵庫(4℃)に保存した。次いで、雌の各個体から卵を搾出し、乾導法により人工受精を行った。受精15分後に余分な精液を除去するために洗卵し、その後、浮上卵と沈下卵に分離して浮上卵率を求めた。なお、総採卵数は浮上卵量と沈下卵量との和として求めた。

結 果

1986年から1991年に行ったブリ親魚のHCG注射量別人工採卵試験結果をFig. 25に示した。結果的には600 IU/kg BW注射区の親魚から最も多くの卵(平均総採卵数82.4万粒)が採卵でき、かつ浮上卵率(90.4%)においても最も高い結果が得られた。また、400 IU/kg BW以下の注射区および900 IU/kg BW以上の注射区では1尾当たりの採卵数は50万粒以下と少なく、浮上卵率も50%以下に低下する傾向が認められた。

考 察

先に述べたように、現段階のブリの産卵飼育技術では誘発無処理条件下での親魚からの大量採卵はまず期待できない。そのために、古満目事業場ではHCG投与により産卵を誘発してきたが、2回目以降のHCG注射による人工採卵では採卵数等がきわめて低下することがこれまで経験的に知られている。また、水槽内でHCG注射による産卵を誘発した場合にも2回目以降の注射ではほとんど採卵できず、種苗生産に供するためのまとまった量のふ化仔魚を得ることは困難であると報告されている(楳田ら, 1981)。したがって、ブリ親魚の産卵誘発の場合にはHCG処理は1回に留め、魚体重1 kg当たり600 IUを注射するのが最も有効であると考えられた。

今回の試験では、産卵誘発のためのホルモン剤としてHCGを用いたが、過去にはシナホリン注射によるブリ天然親魚の卵巣卵の成熟促進が認められている(楳田ら, 1969)。また、近年GnRH(gonadotropin releasing hormone)を投与して宿主の有するGTH(gonadotropic hormone)の分泌を促進させることによる成熟促進および産卵誘発に関する研究が、大西洋サケ *Salmo salar* (Crim et al., 1986)、マボラ *Mugil cephalus* (Lee et al., 1987)、マダイ (Matsuyama et al., 1993)、ギンダラ *Anoplopoma fimbria* (Solar et al., 1987) およびムシガレイ *Eopsetta grigorjewi* (奥村・栄, 1993)などの海産魚で行われてきている。HCGが親魚の生殖巣に直接作用して産卵を誘発する一

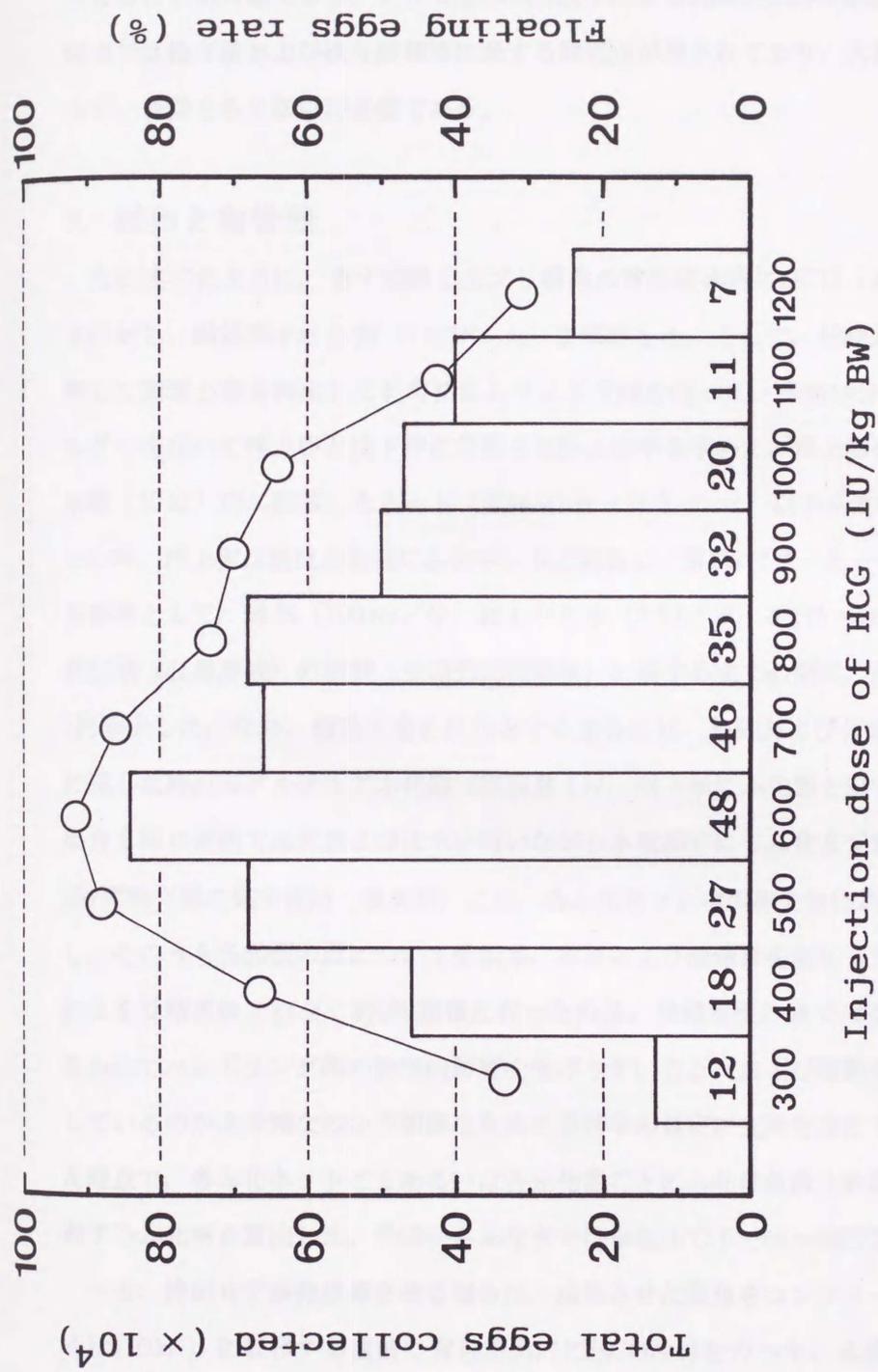


Fig. 25. Results of egg collection from yellowtail injected with each dose of HCG. Columns and circles represent the mean of total eggs collected and floating eggs rate, respectively. Value in each column shows the number of female brood stocks used in 1986 to 1991.

過性ホルモンであるのに対して、GnRHはアジュバントのようにオイルで被膜されたホルモンが徐々に染みだして作用する徐放性ホルモンであるため、比較的長期間にわたりGTHの分泌作用を促進させることが可能である。ブリでもGnRH投与による採卵の試みが試験的には行われているが、現時点では投与量および投与時期等に関する問題点が残されており、大量の卵確保には結び付いておらず、今後さらに検討が必要である。

3. 採卵と卵管理

先に述べたように、まず成熟したブリ親魚の背部筋肉内にHCG（基準投与量 600 IU/kg BW）を注射し、雌雄別々に小割（5×5×5 m）に収容した。そして、48時間後に親魚を取り上げ腹部を押しつけて精液と卵を搾出して乾導法により人工受精を行った。受精15分後に洗卵し、2 lのメスシリンダーを用いて浮上卵と沈下卵に分離させ浮上卵率を求めた。浮上卵は水温を20°Cに調温したふ化水槽（10 kl）内に設置したネット（直径90 cm×深さ60 cm、以下ふ化ネットと記す）に収容した。この時、浮上卵は親魚由来別にふ化ネットに収容し、第1章で述べたシマアジの卵管理条件（p. 20）を参考として、通気（700 ml/分）および注水（6.5 l/分）を行いながらふ化まで管理した。卵が囊胚期（胚盾形成）の初期（受精約28時間後）に達するまでの間に、発生が停止して沈下した卵を2回除去した。なお、種苗生産を目的とする場合には、施設および仔魚取り上げの都合上、囊胚期に達した時点でアルテミアふ化器（実容量1 kl、以下単にふ化器と記す）に卵を再収容した。この場合も同じ要領で通気および注水を行いながら水温20°Cにてふ化まで管理した。また、人工受精約6時間後（卵の発生段階：桑実期）には、各ふ化ネット中の卵を無作為に約100個ずつサンプリングし、そのうち各50個の卵について受精率、卵径および油球径を測定した。なお、受精率などの卵質評価を受精直後ではなく約6時間後に行ったのは、受精直後の卵では受精膜形成が不十分なためにきわめてハンドリング等の物理的影響を受けやすいこと、および細胞分裂初期の段階では卵が受精しているのか未受精なのか不明瞭なために受精率の算定に支障を来すためである。ふ化が完了した時点で、各ふ化ネットごとあるいは各ふ化器ごとにふ化仔魚数を計数し、各親魚ごとの採卵数に対するふ化率を算出した。受精からふ化までは水温20°C下で64～68時間を要した。

一方、搾出せず誘発産卵させる場合は、成熟させた親魚をコンクリート製産卵水槽（容量65もしくは110 kl）に収容する直前に背部筋肉内にHCG注射を行った。水槽内の産出卵の採集は、水槽中央部に設置した4本のサクシオンホースを用いて水槽の表層水を隣接した集卵槽に導入し、ネット（直径70 cm×深さ60 cm、以下採卵ネットと記す）でろ過収集する方法で行った。採卵ネットに採集した卵はバケツに収容し、その後メスシリンダーを用いて浮上卵と沈下卵に分離させて浮上卵率を求め、浮上卵のみをふ化ネットに収容した。なお、バケツからメスシリンダーへ卵を移す時、前述（第1章第3節、p. 17）の洗卵棒法と掬い取り法と比較したところ、掬い取り法の方が卵を傷つ

けず良質の卵を選別しうる事が判明したので、1988年以降はすべて掬い取り法で行った。誘発産卵により得られた卵の卵質評価は、浮上卵をふ化ネットに収容した直後に行った。これは、誘発産卵においては採卵ネットから卵を回収する時点（毎年午前9時頃）ですでに産卵後7～8時間を経過しているため卵の受精膜形成が十分に進んでおり、ハンドリングなどの物理的影響を受けにくいいためである。また、浮上卵をふ化ネットに収容した後の卵管理は、上述した人工受精による採卵の場合と全く同じ方法で行った。

4. 卵比重の変化

シマアジの卵と同様にブリの卵も分離浮性卵であり、上述の方法でブリの卵管理を行う場合、ふ化直前には必ず卵がふ化ネットあるいはふ化器の底に沈下する現象が認められる。本節では、ブリ卵における発生段階別の卵比重を測定した結果を示す。

材料および方法

供試卵 試験には1992年4月12日午前9時30分に天然魚養成2年魚（推定年齢5歳）から人工受精により得られた卵を供した。これらの卵の浮上卵率、受精率、平均卵径および平均油球径はそれぞれ95.1%、82.4%、1233 μ mおよび328 μ mであった。なお、試験に用いた卵のふ化率は64.7%であった。ふ化ネット中での卵管理は上述の方法で行い、試験時刻に達した時点でガラス製ピーカーで掬い取って試験に供した。卵収容からふ化までの間の卵の飼育水温は20 \pm 0.5 $^{\circ}$ Cに保持した。

卵の比重測定 シマアジで行った方法と全く同じ方法で卵の比重を測定した（第1章第3節，p. 24）。なお、比重測定には水温20 \pm 0.5 $^{\circ}$ Cに調温した海水を使用した。また、受精からふ化までの間に約6時間間隔で計11回の比重測定を行い、1回当たりの観察時間は約1時間とした。

結果および考察

ブリ卵の発生段階別に測定した比重の変化をFig. 26に示した。卵比重の変動傾向はシマアジでの結果にきわめて類似していた。すなわち、受精直後の卵では飼育海水の比重（1.0252 g/cm³）よりも0.001 g/cm³程度比重が小さく、その後、受精後48時間までは上限は海水の比重と同じであったが、下限は次第に大きくなる傾向が見られた。受精後54時間経過した時点で海水の比重よりも大きくなり始め、60時間経過後では卵の比重は1.0263～1.0274 g/cm³と最大に達した。そして、受精後約66時間でふ化が始まった。卵の比重が最大に達した時の値は、シマアジでの値（1.0264～1.0274 g/cm³）とほぼ同じであった。

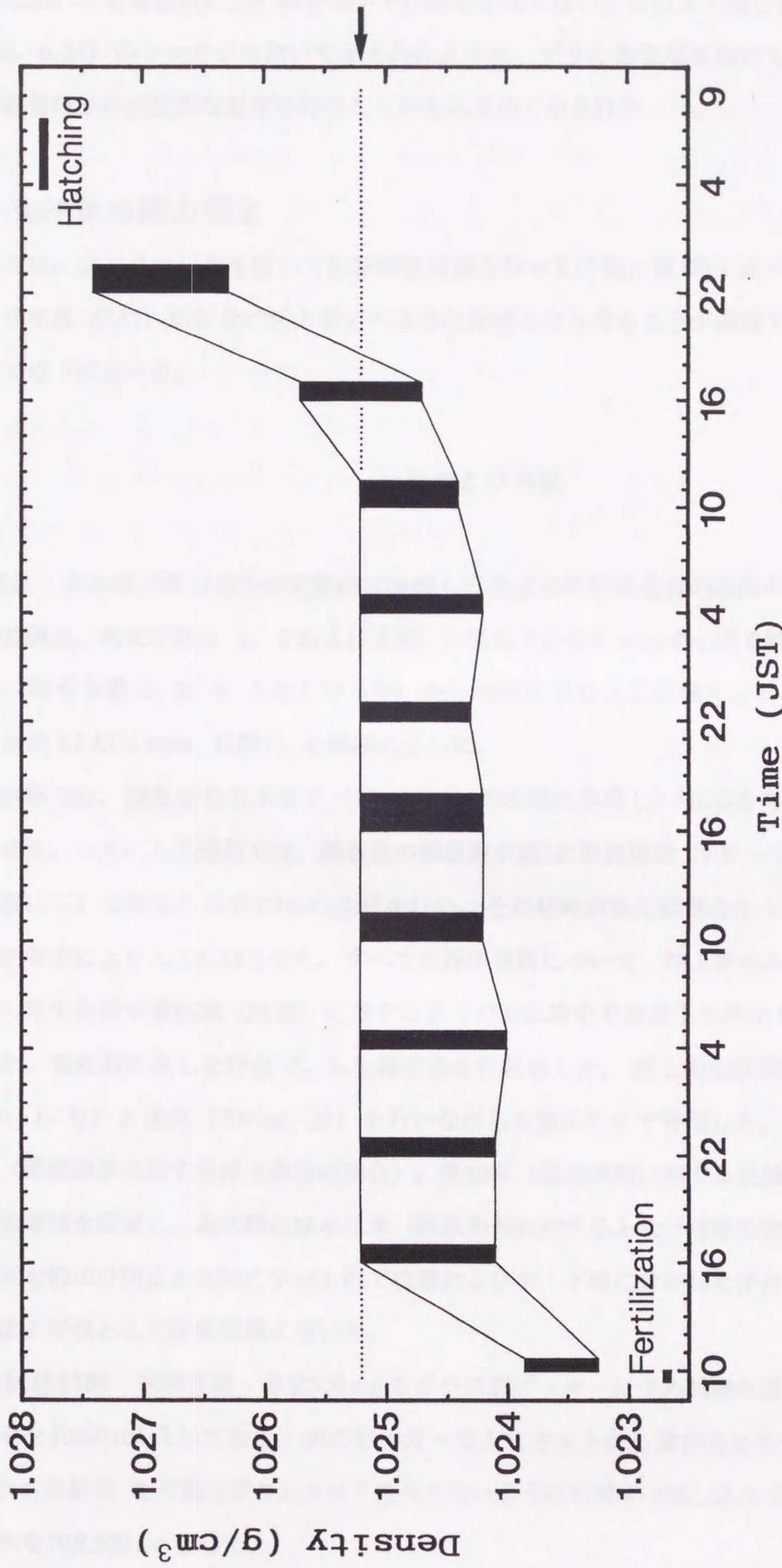


Fig. 26. Change in the buoyancy of yellowtail eggs obtained by artificial insemination from fertilization to hatching. The heights and the widths of the columns represent the ranges of the egg density and periods for each measurement, respectively. The arrow shows the specific gravity of the rearing water (1.0252 g/cm³).

ブリにおいても無通気による卵管理下では卵がふ化しないことはよく知られている。前述（第1章第3節，p.24）のシマアジにおいて示されたように，ブリの卵管理においても卵が沈下するふ化直前の卵管理条件が重要な意味を持つことがあらためて示された。

5. ふ化仔魚の活力判定

本節では，ブリふ化仔魚を用いて飢餓耐性試験を行った結果，第1章で述べたシマアジ同様に無給餌生残指数（SAI）が仔魚の活力判定の有効な指標となり得ることが確認できた（虫明ら，1993b）ので以下に述べる。

材料および方法

供試魚 高知県古満目地先の定置網で漁獲し日裁協古満目事業場の海面小割で飼育したブリ親魚（天然親魚，飼育年数0，1，2および3年）と種苗生産魚を同海面小割で飼育したブリ親魚（養成親魚，飼育年数2，3，4，5および6年）から誘発産卵と人工受精によって得られたふ化仔魚（平均全長 4.2 ± 0.1 mm，日齢0）を試験に供した。

誘発産卵では，親魚を自然水温下（ $18 \sim 19^{\circ}\text{C}$ ）の水槽に收容し，HCGを背部筋肉内に注射して産卵させた。一方，人工受精では，雌親魚の卵巣卵が第3次卵黄球期（ $700 \sim 720 \mu\text{m}$ ）に達した段階（海水温 19°C ）で雌雄各親魚にHCG注射を行い，その48時間後に腹部を圧して採卵および採精を行って乾導法により人工受精させた。すべての採卵事例について，浮上卵のみをふ化ネットに收容し，卵の発生段階が囊胚期（胚盾）に達するまでの間に途中で卵発生が停止して沈下した卵を2回除去した。囊胚期に達した時点で，ふ化器に卵を再收容した。浮上卵の收容からふ化までの間，注水（ 6.5 l/分 ）と通気（ 700 ml/分 ）を行いながら水温 20°C にて管理した。また，採卵時には浮上卵率（総採卵数に対する浮上卵数の割合），受精率（総採卵数に対する受精卵数の割合），卵径および油球径を測定し，ふ化時にはふ化率（総採卵数に対するふ化仔魚数の割合）を算出した。注水と通気を約10分間止めた時にネット内で表層および中・下層に分かれた仔魚をそれぞれ浮上仔魚および沈下仔魚として比較実験に用いた。

飢餓耐性試験 試験容器：容量 500 ml のガラス製ビーカーに予め試験水温に調温しておいた砂ろ過海水を約 200 ml 入れておき，別のビーカーでふ化ネットから無作為にすくい取ったふ化仔魚（いずれも日齢0）を可能な限りショックを与えないように30尾ずつ流し込んで收容した。その後，調温海水を加え 500 ml とした。

実験条件：收容密度が無給餌生残指数（SAI）に及ぼす影響を検討するため，上記9種類の各親魚群で誘発産卵により得られたふ化仔魚を用いて，海水 500 ml 当たり10尾，20尾，30尾，40尾，50

尾および100尾の各収容区を設けてそれぞれ8回（計432区）の飢餓耐性試験を行った。この試験における水温はふ化水温と同じ20℃とし、水温変化がないようにした。SAIに及ぼす水温の影響を検討するため、1年および2年飼育の天然親魚と4年および5年飼育の養成親魚から誘発産卵で得られたふ化仔魚を用いて、ウォーターバス方式で18℃、20℃、22℃および24℃の各水温区を設定し、各親魚群で30回（計480区）の試験を行いSAIを求めた。この場合、水温馴致の期間は設けなかった。また、同一親魚が連続的に産卵した時に得られたふ化仔魚の活力を知るため、3年飼育した養成親魚の最初の産卵から9日間にわたって毎日採卵し、得られたふ化仔魚を試験に供した。試験用ピーカーには覆いをせず、屋内の自然光条件下で実験を行った。ハンドリングなどの影響を極力少なくするため、換水と通気は全く行わなかった。

観察：ピーカー内の仔魚の観察は毎日ほぼ一定時間に1回行い、斃死魚は計数して除去した。なお、観察は供試した全個体が斃死するまで継続した。

無給餌生残指数 無給餌生残指数（SAI）は、前述（第1章第3節，p. 29）の方法で求めた。

初期飼育試験 誘発産卵と人工授精の両方から得られたふ化仔魚（日齢0）を日裁協屋島事業場に輸送し、予めナンノクロロプシスを 0.5×10^6 cells/mlの密度で添加した飼育水槽に収容し飼育試験を行った。飼育水温は、仔魚の収容時には20℃とし、その後、開口時から0.5℃/日の割合で22℃まで加温し、以後は22℃に安定させた。飼育餌料には、L型ワムシ、アルテミアノープリウスおよび養成アルテミアを用いた。日間換水量はふ化後3日までは5～10%、その後は50%まで適宜増加させた。日齢10になった時点で水槽内の仔魚数を計数し、ふ化後10日間の初期生残率を算出した。

結 果

SAIと初期生残率 1988年から1992年にかけて行った日齢10までのプリふ化仔魚の初期生残率と各飼育に供したものと同一ロットのふ化仔魚のSAIとの関係をFig. 27に示した。日齢10までの初期生残率（x）とSAI（y）の間には、

$$y = 0.22x + 10.19 \quad (r = 0.7321)$$

と正の相関関係が認められた。

また、同一親魚群が連続的に産卵した時に得られた仔魚では、産卵回数の増加とともに仔魚のSAIは次第に低下した。また、注水と通気を止めた時の浮上仔魚は、沈下仔魚よりも常に高いSAIを示した（Fig. 28）。

親魚の由来別・年齢別SAI 飢餓耐性比較試験の結果を親魚の由来、年齢および産卵方法別にTable 20に示した。誘発産卵および人工受精といった採卵方法、あるいは親魚の由来とは無関係に、

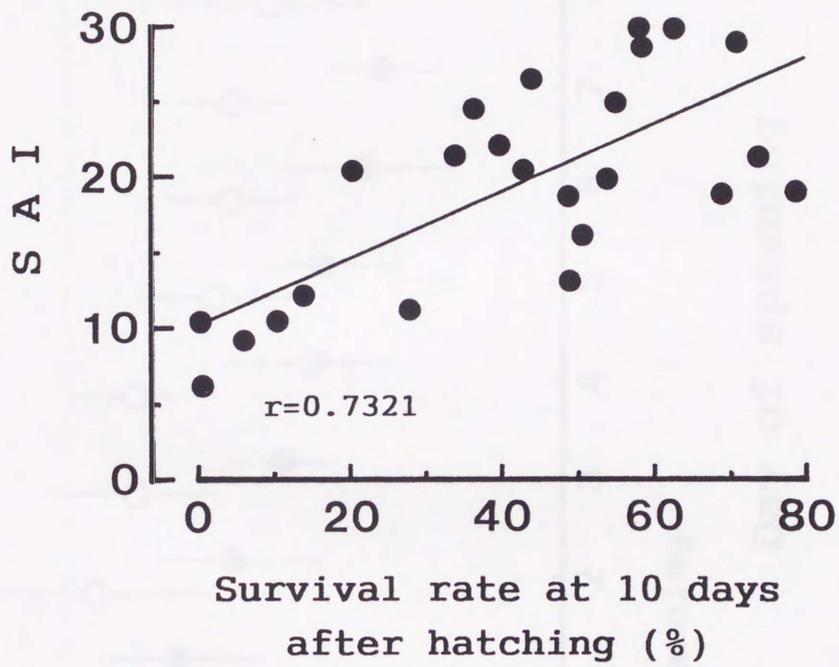


Fig. 27. Relationship between SAI of newly hatched larvae and survival rate of fed larvae in 10 days after hatching in yellowtail.

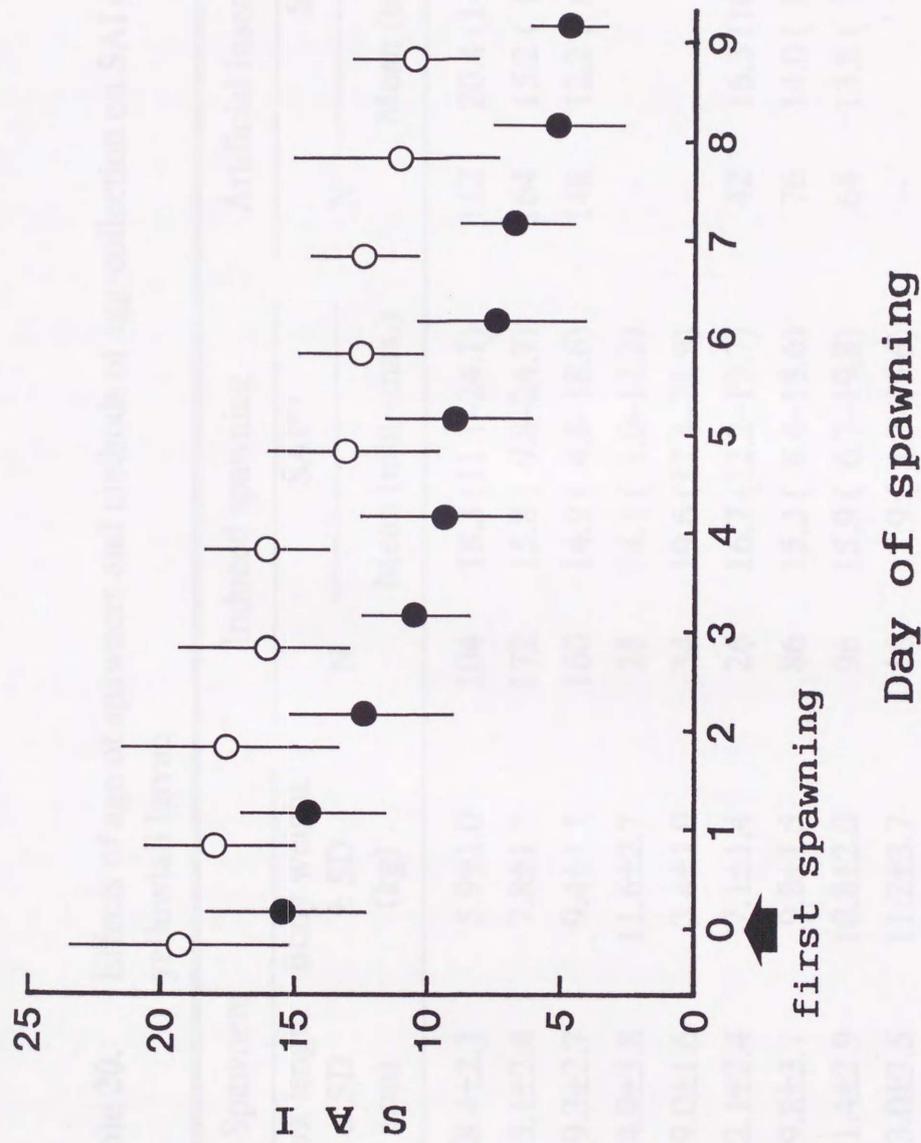


Fig. 28. Effect of multiple spawnings on SAI of yellowtail larvae. ○, surface-floating larvae and ●, non-surface-floating larvae in the tanks without aeration and inflowing water. Vertical bars represent standard deviations.

Table 20. Effects of age of spawners and methods of egg-collection on SAI of yellowtail larvae

Source and Age	Spawners		Induced spawning		Artificial insemination	
	Fork length ± SD (cm)	Body weight ± SD (kg)	N	SAI* ¹	N	SAI
				Mean (min.-max.)		Mean (min.-max.)
W* ² 0* ³	68.4±2.1	5.9±1.0	104	18.3 (11.1-24.1)	112	20.4 (14.7-27.3)
W1	75.1±2.4	7.8±1.2	172	15.8 (9.8-24.7)	164	15.2 (8.7-18.6)
W2	79.3±2.7	9.4±1.1	160	14.9 (4.8-18.6)	148	12.2 (6.9-14.8)
W3	84.9±3.8	11.6±2.7	28	4.1 (1.0-12.2)	-	-
D* ² 2	59.0±1.6	3.4±1.0	34	19.6 (17.4-21.9)	-	-
D3	72.1±2.4	7.1±1.4	26	16.7 (12.2-19.7)	42	16.3 (10.1-21.6)
D4	79.8±3.1	9.8±1.5	86	15.3 (8.4-18.6)	76	14.0 (8.8-17.2)
D5	81.4±2.9	10.8±2.0	96	15.9 (6.7-19.8)	64	13.8 (7.1-18.3)
D6	83.0±3.5	11.2±3.7	18	7.9 (1.7-15.6)	-	-

*¹ Survival activity index.

*² W, wild (captured and reared) ; D, domestic (reared from larval stage).

*³ Years of rearing in net-cages.

若齢の親魚から得られた仔魚ほど高いSAIを示した。また、同一親魚群から得られた仔魚のSAIには採卵手法の違いによる影響は認められなかった。

ふ化仔魚の試験条件別SAI 水温：水温18～24℃の範囲で試験を行った結果、水温が低いほどSAIは高く、水温が高くなるほどSAIが低くなる傾向が認められた (Fig. 29)。ここで、試験水温を x (°C)，水温 x でのSAIを y とすると、 $18 \leq x \leq 24$ において、

$$y = -1.13x + 38.75$$

となり、高い負の相関関係が認められた ($r = -0.9935$)。

収容密度：海水500 ml 当たり10尾から40尾収容した試験区では、SAIにはほとんど差は見られなかった。しかし、50尾収容区では若干のSAIの低下が見られ、さらに3年飼育天然親魚および6年飼育養成親魚以外の親魚群から得られた仔魚の100尾収容区では、30尾収容区と比較していずれも有意なSAIの低下が認められた (Table 21)。

卵質とSAI ふ化仔魚のSAIと浮上卵率 (Fig. 30A)，受精率 (Fig. 30B)，卵径 (Fig. 30D) および油球径 (Fig. 30E) との間には、特に関連性は認められなかったが、ふ化率 (Fig. 30C) との間には有意な相関関係が認められた。

考 察

ブリの種苗生産現場では、シマアジと同様にこれまで経験的に比較的早い時期に得た仔魚のうち、注水と通気を止めた時に水面に浮上する仔魚を比較的良質の仔魚と判断して以後の飼育に供してきた。今回の試験により、仔魚のSAIが高いロットほど飼育試験における初期生残率も高い傾向が認められた。また、日裁協五島事業場では、陸上水槽における日齢9までの生残率と稚魚を沖出しするまでの最終生残率との間に正の相関関係 ($r = 0.7342$) が認められている (有元, 1990)。本研究では由来と年齢の異なる親魚を用いたが、ブリの親魚養成に有効なモイストペレット (本章第2節, p. 98) が開発されたためもあり天然親魚と養成親魚の間には採卵成績に大きな差が認められず、また年齢が判明している養成親魚の場合、比較的若い親魚の方が良い結果をもたらしている。今回得られたSAIを見てもそれらと一致する結果が示され、仔魚のSAIが高いロットほど最終的な生残率が高いと判断し得るものと考えられた。

また、誘発産卵の場合には、産卵初期ほどSAIが高く、産卵ごとにネット内での浮上仔魚と沈下仔魚に分けて調べた結果、浮上仔魚の方が常に高いSAI値を示した。これらの結果は、これまでの経験的なやり方が妥当なものであったことを裏付け、シマアジ同様にブリにおいても、SAIがふ化仔魚の活力を判定する指標として有効であると考えられた。

シマアジ (第1章第3節) でも述べたように、飢餓耐性試験を行うに当たっての第一の問題点は試

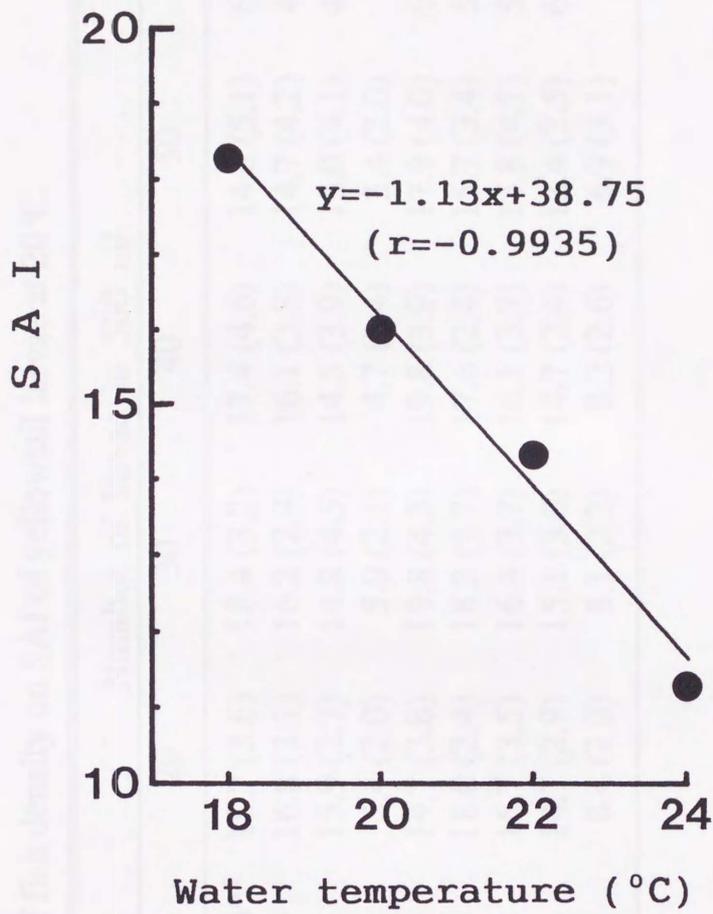


Fig. 29. Effect of experimental water temperature on SAI of yellowtail larvae. Circles represent the mean of SAI at each temperature.

Table 21. Effect of fish density on SAI of yellowtail larvae at 20 °C.

Spawner	N	Number of larvae in 500 ml					
		10	20	30	40	50	100
W0	8	19.7* ¹ (3.4)* ²	18.7 (3.6)	18.4 (3.2)	17.4 (4.6)	14.8 (5.1)	6.1* ³ (2.4)
W1	8	18.4 (3.3)	16.8 (3.1)	16.2 (2.9)	16.1 (3.8)	14.7 (4.2)	4.6* ³ (2.1)
W2	8	15.5 (5.1)	15.9 (2.7)	14.8 (4.5)	14.5 (3.9)	13.0 (4.1)	4.2* ³ (1.8)
W3	8	7.1 (1.8)	5.4 (2.0)	5.0 (2.1)	4.7 (1.4)	3.4 (2.0)	1.1 (1.0)
D2	8	20.1 (4.6)	19.7 (3.8)	19.8 (4.3)	19.8 (3.9)	17.9 (4.0)	6.2* ³ (3.0)
D3	8	18.6 (3.0)	18.0 (2.4)	18.3 (2.7)	17.6 (2.4)	15.7 (3.4)	5.8* ³ (2.6)
D4	8	17.0 (3.1)	16.7 (3.5)	16.4 (3.7)	16.1 (3.7)	14.8 (4.1)	5.7* ³ (2.1)
D5	8	15.4 (3.8)	14.7 (2.9)	15.1 (3.0)	14.7 (2.4)	12.4 (3.5)	6.1* ³ (2.0)
D6	8	9.4 (1.8)	8.4 (2.0)	8.1 (2.2)	8.2 (2.6)	6.9 (3.1)	2.2 (1.4)

*¹ Mean value of SAI.

*² Standard deviation.

*³ Significantly different ($p < 0.05$) as compared with SAI of 30 larvae of each adult fish (t-test).

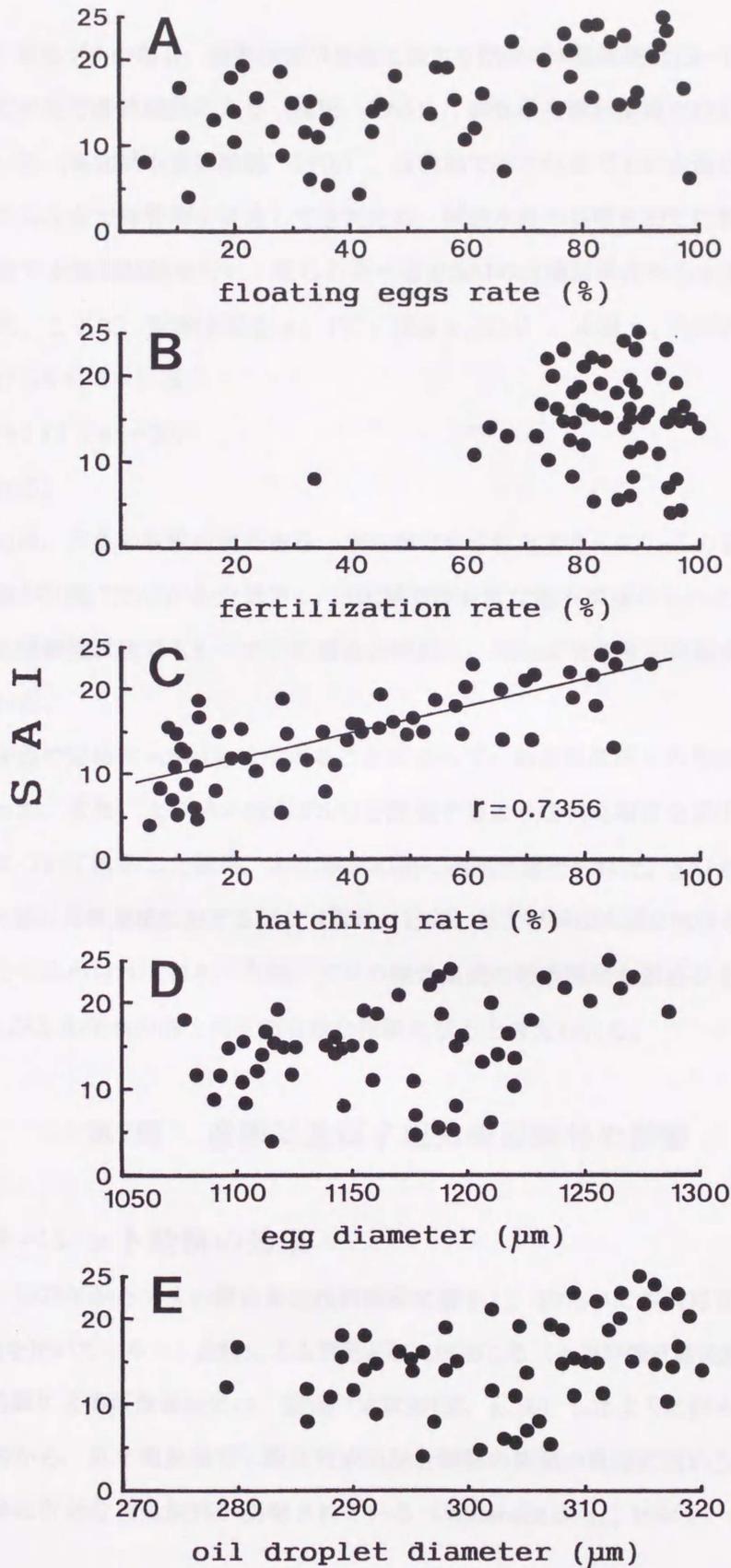


Fig. 30. Relationships between egg quality and SAI of newly hatched larvae in yellowtail. A, floating-egg rate [floating eggs/total eggs collected]; B, fertilization rate; C, hatching rate; D, egg diameter; E, oil droplet diameter.

験水温である。天然ブリの場合、成熟状態が最高に達する期間の水温範囲は16~19℃（楳田・落合，1971）で、19℃付近で最終成熟に入り（楳田，1991），高知県古満目海域では17~23℃で産卵すると報告されている（高知県水産試験場，1970）。日裁協ではこれまで主に水温19~20℃の範囲で産卵させ、20℃でふ化まで卵管理を実施してきたため、試験水温の基準を20℃に設定した。そこで、18~24℃の範囲で水温別試験を行い、得られた水温とSAIの直線回帰式から水温差によるSAIの補正式を考案した。ここで、試験水温を x_1 （℃：18 ≤ x_1 ≤ 24），水温 x_1 でのSAIを y_1 とすると、水温20℃におけるSAI（ y ）は、

$$y = y_1 + 1.13 (x_1 - 20)$$

により求められる。

第二の問題点は、仔魚の収容密度である。本実験で示されたように500 ml の容器を用いた場合、仔魚の収容尾数が50尾でSAIが多少低下し、100尾では有意な低下が認められた。したがって、ブリふ化仔魚の飢餓耐性試験でもシマアジの場合と同様に、500 ml 当たり30尾程度がほぼ適正な収容密度と考えられた。

ブリのふ化仔魚の場合にもSAIを使用することによって、ある程度活力の指標として使えることが明らかとなった。また、より早い段階でSAIと関連するような判定項目を見出すことを考えて卵質との関連性について検討した結果、ふ化率との間に相関が認められた。SAIとふ化率との相関に関しては、日裁協五島事業場におけるブリ（有元，1990）および岡山水試におけるキジハタ（萱野・尾田，1990）でも認められており、今後、ブリの親魚養成の技術開発を進める上で、ふ化率およびSAIのいずれもがふ化仔魚の活力判定の有効な指標になると考えられる。

第2節 産卵に及ぼす親魚養成餌料の影響

1. モイストペレット給餌の効果

日裁協では、1977年からブリの親魚養成技術開発に着手し、1978年に古満目事業場でマサバを給餌した養成親魚を用いてホルモン注射による誘発産卵に成功した（古満目親魚養成前進基地，1978）。しかし、生餌給餌による親魚養成には、前述（本章第1節，p. 80）したように様々な問題点がある。このような理由から、近年他魚種でも親魚育成用配合飼料の開発が急速に進められ、すでにマダイでは卵質向上等に有効な親魚飼料が開発されている（Watanabe *et al.*, 1984 a, 1984 b, 1984 c ; 渡邊，1985）。

本節では、モイストペレットが養殖ブリの人工採卵に及ぼす影響を生餌給餌の場合と比較した。また、モイストペレットにビタミンEとn3系高度不飽和脂肪酸をさらに強化した場合の成熟促進効果についても検討した。その結果、養殖2年魚のブリにモイストペレットを約5か月間給餌した親

魚からの採卵成績は、混合生餌で飼育養成した親魚から得られた成績と比較しても遜色がなく、かつ安定しており、養殖ブリが採卵用親魚として十分使えることが判明した（虫明ら，1993c）。それらの結果について以下に述べる。

材料および方法

親魚養成 毎年5月頃に採集されたモジャコを愛媛県の養殖業者が約2年半飼育した養殖ブリ2年魚（平均尾又長 70.2 cm，平均魚体重 6.55 kg）を親魚候補として毎年11月頃購入し，日裁協古満目事業場の海面小割（10×10×6 m）に収容して飼育した。養殖場で飼育されていた時の餌料がほとんどマイワシであったため，購入後約1か月間は生餌給餌（マサバ：マアジ=1：1）により馴致飼育した（以下一次養成とする）。その後，別々の小割（5×10×6 m）に分養して，約5か月間各試験餌料で養成（二次養成）した平均尾又長 74.7 cmの親魚を用いて採卵試験を行った。

1985年から1989年の間に行った養殖ブリの養成試験の給餌内容をTable 22に示した。対照区とした生餌給餌区においては，1987年以外の年は一次養成に継続して12月末までマサバとマアジを等量給餌し，1月からはこれらの他にスルメイカを加えて給餌した（マサバ：マアジ：スルメイカ=2：2：1）（以下TF-1とする）。1987年の場合は一次養成の段階からマイワシのみを与えて親魚養成を行った（以下TF-2とする）。一方，試験区には，水産庁養殖研究所で処方した配合飼料（以下養殖研配合と略記；Table 23）と魚介肉ミンチ（マサバ：マアジ：エビ（種不明）=2：1：1）を等量混合して円柱状に造粒したモイストペレット（長さ7 cm×直径3 cm）を給餌した。なお，各年とも採卵の15日前からはイカ肝油（理研ビタミン）6%のうち3%をアスタキサンチンを含むオキアミ抽出油（日本水産）に置換して添加した（以下MP-1とする）。また，1988年以降は，1月から養殖研配合にさらにビタミンE（ α トコフェロール：外割2%/kg配合）とイカ肝油（外割6%/kg配合）を追加してこれらの強化を図った（以下MP-2とする）。1989年には市販のハマチ用配合飼料（丸紅飼料）を用いて，MP-2と同じ割合でビタミンE，イカ肝油およびオキアミ抽出油を添加したモイストペレット（以下MP-3とする）を作製して給餌し，MP-2を給餌した親魚と同様の採卵成績が期待できるかどうかを比較検討した。

人工採卵および人工受精 各餌料で飼育した雌親魚の卵巣卵が第3次卵黄球期（卵径 700～720 μ m）に達した段階で背部筋肉内にHCGを注射し，雌雄別に各小割（5×5×5 m）に収容した。注射48時間後に親魚を取り上げ精液および卵を搾出した。なお，各年とも親魚の成熟に及ぼすハンドリングの影響を考慮して，取り扱い回数をできるだけ少なくするため供試親魚の魚体測定は採卵試験の時に行った（Table 24）。そのため，体重1 kg当たり600 IUをHCG注射量の目安としたが，親魚の成熟度合に個体差があり，結果的にはTable 24に示したようにHCG投与量は体重1 kg当たり479

Table 22. Experimental diets used for breeding of yellowtail brood stocks in each year

Year	Control group	Test group
1985	TF-1	MP-1
1986	TF-1	MP-1
1987	TF-2	MP-1
1988	TF-1	MP-2
1989	TF-1	MP-2, MP-3

Trash fish (TF): TF-1 = mackerel and horse mackerel, TF-2 = sardine.

Moist pellet (MP): MP-1 = formula feed prescribed by National Research Institute of Aquaculture (NRIA) + trash fish (1:1), MP-2 = NRIA formula feed supplemented with vitamin E and squid liver oil + trash fish (1:1), MP-3 = commercial formula feed supplemented with krill-oil extracts, vitamin E and squid liver oil + trash fish (1:1).

Table 23. Composition of the formulated diet for yellowtail

Ingredients	Composition (%)
White fish meal	65.0
Squid meal	10.0
Beer yeast	5.0
Gluten meal	1.0
Alpha starch	1.8
Vitamin mixture* ¹	2.0
Mineral mixture	1.0
Trace elements* ²	0.2
Feed oil	6.0
Squid liver oil* ³	6.0
Amino acid mixture* ⁴	1.0
Binder (Sutangado)* ⁵	1.0
Crude protein (in dry matter)	55%

*¹ Composition of vitamin mixture (%): vitamin B₁ 15.5, vitamin B₂ 6.2, vitamin B₆ 0.8, vitamin C 62.0, and vitamin E 15.5.

*² Composition of trace elements (%): AlCl₃ 0.3, KI 0.3, CuCl 0.2, MnSO₄·H₂O 1.6, CoCl 2.0, ZnSO₄ 6.0, ferric citrate 59.5, and cellulose powder 30.1.

*³ Half of squid liver oil was replaced by krill-oil extracts in the diets given for the last 15 days in the experiments.

*⁴ Composition of amino acid mixture (%): L-histidine 20.0, L-isoleucine 10.0, L-cystine 10.0, L-tryptophan 10.0, and dextrin 50.0.

*⁵ Product of Pfizer Chemical.

Table 24. Yellowtail used for egg collection by artificial insemination

Year	Diet* ¹	Start of experiment	Days of breeding	Fish size at egg collection			Injection dose of HCG* ³ (IU/kg BW)
				Fork length \pm SE* ² (cm)	Body weight \pm SE (kg)	Condition factor \pm SE	
1985	TF-1	Nov. 6, 1984	168	72.9 \pm 1.77	9.17 \pm 1.01	23.63 \pm 1.19	872
	MP-1	"	"	74.3 \pm 1.41	9.18 \pm 0.91	22.35 \pm 0.95	871
1986	TF-1	Nov. 6, 1985	171	75.8 \pm 1.25	8.91 \pm 0.92	20.38 \pm 0.98	898
	MP-1	"	"	76.0 \pm 1.29	8.81 \pm 0.82	20.06 \pm 0.88	908
1987	TF-2	Dec. 23, 1986	126	78.2 \pm 1.29	8.94 \pm 0.84	18.68 \pm 1.10	559
	MP-1	"	"	75.8 \pm 1.32	8.15 \pm 0.58	18.79 \pm 1.25	613
1988	TF-1	Oct. 26, 1987	188	74.6 \pm 1.30	8.39 \pm 0.95	20.23 \pm 1.39	644
	MP-2	"	"	75.7 \pm 1.61	9.07 \pm 1.09	20.82 \pm 1.25	662
1989	TF-1	Nov. 29, 1988	147	72.8 \pm 1.60	7.96 \pm 0.96	20.61 \pm 1.02	528
	MP-2	"	"	74.1 \pm 1.47	8.69 \pm 0.78	21.36 \pm 0.75	483
	MP-3	"	"	74.0 \pm 1.09	7.87 \pm 0.64	19.42 \pm 0.75	534

*¹ Trash fish (TF-1): TF-1 = mackerel and horse mackerel, TF-2 = sardine; Moist pellet (MP-1 ~ 3; see Table 1).

*² SE: standard error.

*³ HCG: human chorionic gonadotropin.

～908 IUとなった。各年とも人工採卵および人工受精は、前述（第1節，p. 86）した方法で行った。

無給餌生残指数 得られたふ化仔魚（日齢 0）を用いて仔魚の活力判定を行うために飢餓耐性試験（本章第1節，p. 89）を行い，その結果から無給餌生残指数（SAI）を算出した。

結 果

餌料種類別のブリの人工採卵 1985年から1989年の間に行った餌料種類別に養成したブリの人工採卵結果ならびに卵径と油球径の測定結果をTable 25 に示した。1985年および1986年には、対照区であるTF-1区と試験区であるMP-1区において、供試親魚尾数に対する採卵可能であった親魚尾数の割合（以下採卵成功率とする）はそれぞれ100%および77%と大きな差は見られなかった。また、総採卵数、浮上卵率、受精率およびふ化率，ならびに雌親魚1尾当たりの採卵数とふ化仔魚数においても差は認められなかった。しかし、卵径はいずれもMP-1養成親魚の卵の方が大きい値を示した。一方、天然魚の正常油球数は1個であるが、1985年のTF-1区の卵では平均油球数が4.6個とMP-1区の平均2.9個よりも有意に多く、また、TF-1区の油球数の異常率は82%と高かった（MP-1区は68%）。なお、1986年の平均油球数はMP-1区の1.5個に比べてTF-1区は1.8個と若干多い結果となったが、油球異常率はTF-1区およびMP-1区でそれぞれ48%および31%となり、前年に比べるとかなり少なくなった。

1987年には、TF-2区およびMP-1区の採卵成功率は、それぞれ92%および60%とマイワシを給餌した親魚の方が高い採卵成功率を示したが、雌1尾当たりの採卵数およびふ化仔魚数で比較すると差は認められなかった。また、卵径測定の結果では、MP-1区の方が若干大きい値を示した。両区の平均油球数は1985年および1986年の結果よりも少なくなり、両区とも油球異常率は約26%であった。

1988年および1989年の試験では、TF-1区と養殖研配合にビタミンEとイカ肝油をさらに強化したMP-2区における採卵成功率はほぼ同程度であった。しかし、雌1尾当たりの採卵数およびふ化仔魚数で比較すると、1988年のTF-1区がそれぞれ約56万粒および約17万尾であったのに対して、MP-2区ではそれぞれ70万粒および約34万尾で、採卵数は1.3倍に増え、ふ化率も約2倍と良好な結果が得られた。1989年もほぼ同様の結果が得られ再現性の高いことが確認できた。ところが、市販の配合飼料を用いたMP-3で養成した親魚では、採卵成功率が50%と低く、その他の成績もTF-1区と同様の結果が得られただけで、MP-2ほどの成熟および産卵への有効性は確認できなかった。1988年と1989年に得られた卵は、卵径および油球径ともMP-2区が最も大きく、MP-3区では卵径のみMP-2区とほぼ同じ値を示した。平均油球数は、1988年のTF-1区が1.2個であった以外は、いずれも1.1個で差は見られず、油球異常率は6～14%で初期に比べ著しく減少した。

Table 25. Results of artificial insemination of the eggs and measurements in diameter of eggs and oil droplets obtained from yellowtail fed with different diets

Year	Diet	Number of fish from which eggs were collected/conducted	Mean number* ¹ ($\times 10^3$) \pm SE		Number of eggs measured	Diameter (Mean \pm SE, μ m)		Mean number of oil droplet	Hatching rate (%)
			Total eggs collected	Floating eggs		Fertilized eggs	Egg		
1985	TF-1	13/13	658 \pm 48	643 \pm 44	482 \pm 50	1164 \pm 9	Not measured	4.6* ² (81.9)* ³	60.5
	MP-1	13/13	614 \pm 45	600 \pm 43	435 \pm 48	1197 \pm 9	"	2.9 (68.1)	61.7
1986	TF-1	10/13	463 \pm 28	347 \pm 31	220 \pm 37	1161 \pm 8	"	1.8 (47.8)	23.3
	MP-1	10/13	558 \pm 31	406 \pm 30	246 \pm 34	1206 \pm 8	"	1.5 (31.4)	18.1
1987	TF-2	11/12	325 \pm 57	315 \pm 52	238 \pm 48	1168 \pm 7	304 \pm 5	1.3 (26.4)	53.8
	MP-1	3/5	293 \pm 43	217 \pm 48	133 \pm 52	1184 \pm 6	298 \pm 5	1.2 (25.6)	39.9
1988	TF-1	4/5	558 \pm 41	503 \pm 53	385 \pm 37	1177 \pm 6	304 \pm 5	1.2 (14.2)	29.6
	MP-2	9/10	700 \pm 78* ⁴	673 \pm 68* ⁴	433 \pm 46	1196 \pm 5	327 \pm 5	1.1 (8.7)	48.4* ⁵
1989	TF-1	7/8	441 \pm 54	402 \pm 45	381 \pm 48	1179 \pm 6	298 \pm 6	1.1 (10.3)	36.3
	MP-2	6/8	707 \pm 82* ⁶	618 \pm 81* ⁶	525 \pm 69* ⁶	1219 \pm 6	309 \pm 5	1.1 (6.2)	69.7* ⁷
	MP-3	4/8	348 \pm 49	318 \pm 38	278 \pm 41	1212 \pm 6	284 \pm 6	1.1 (9.7)	64.7

*¹ Mean number of eggs per one female fish from which eggs were collected.

*² Significantly different ($p < 0.05$) as compared with the number of oil droplets (in eggs) obtained from yellowtail fed with moist pellet (MP-1) (t-test).

*³ (abnormal rate of the number of oil droplet).

*⁴ Significantly different ($p < 0.05$) as compared with mean number of eggs from yellowtail fed with trash fish (TF-1) (t-test).

*⁵ Significantly different ($p < 0.05$) as compared with the hatching rate in yellowtail fed with trash fish (TF-1) (t-test).

*⁶ Significantly different ($p < 0.01$) as compared with mean number of eggs from yellowtail fed with trash fish (TF-1) (t-test).

*⁷ Significantly different ($p < 0.01$) as compared with the hatching rate in yellowtail fed with trash fish (TF-1) (t-test).

ふ化仔魚の活力判定 1986年～1989年の各餌料試験区のふ化仔魚を用いて行った無給餌生残試験で得られたSAI値をTable 26に示した。1986年のTF-1区およびMP-1区のSAI値はそれぞれ18.6および4.4と、TF-1区の仔魚の方が有意に高い値を示した。さらに1987年もTF-2区の仔魚の方がMP-1区の仔魚よりも高いSAI値を示した。しかし、養殖研配合にビタミンEとイカ肝油の補足強化を図った1988年および1989年には、MP-2区から得られた仔魚の方がTF-1区よりも有意に高いSAI値が得られたが、1989年の市販配合飼料を用いたMP-3区では、ほぼその中間値が得られた。

考 察

5年間の実験結果を整理してTable 27に示した。1985年および1986年にはMP-1投与により、混合生餌のTF-1で養成した親魚の採卵成績と比較しても遜色のない採卵結果が得られた。また、1988年および1989年の試験ではビタミンEとイカ肝油を補足強化したMP-2の使用により、MP-2区の雌親魚1尾当たりの採卵数とふ化仔魚数は著しく増加し、また高いSAI値を有する仔魚の生産が可能となった。これらの成績は、過去に得られた天然親魚からの成績（雌1尾当たりの採卵数およびふ化仔魚数が1986年にはそれぞれ275千粒および189千尾、1988年では196千粒および68千尾）（河野，1988，1990）と比較しても著しく高い値となっている。しかし、市販の配合飼料にMP-2と同様にビタミンEとイカ肝油を添加して栄養強化を図ったMP-3で養成した親魚では、MP-2区ほどの採卵成績は得られなかった。MP-2で飼育された親魚の成熟に効果を示した成分は不明であるが、採卵成績において親魚用に開発した飼料との差が認められ、市販配合飼料が必ずしも採卵用のブリ親魚養成に適していないことが明らかにされた。いずれにしても、ビタミンEとイカ肝油を添加したMP-2を給餌して約5か月間養殖ブリ2年魚を飼育することで、採卵用親魚を養成し得ることが本試験により明らかとなった。

1987年には、養殖業者からの試験魚の入手が遅れたため馴致に時間がかかり、二次養成の期間も約3か月間と短くなり、MP-1に十分馴致できなかったことが原因でMP-1区よりもTF-2区の方が良い成績を示したものと考えられる。

マダイでは産卵前あるいは産卵期間中に冷凍オキアミを親魚に給餌することにより、採卵成績ならびに卵質が向上することが報告されている（Watanabe *et al.*, 1984 d, 1985 a, 1985 b, 1991 a, 1991 b）。今回の養殖ブリを用いた試験においても、TF-1とMP-1を給餌した親魚からの卵の平均油球数に有意な差が認められ、採卵前のイカ肝油からオキアミ抽出油への置換によって卵質の向上が見られた。

今回の試験において、各試験餌料で飼育したブリ親魚の排卵を促すためにHCG注射を行い、そ

Table 26. Comparison in activity among larvae obtained from yellowtail spawners fed with different diets

Year	Diet	Number of test	SAI* ¹ (Min.—Max.)
1985	TF-1	—	Not tested
	MP-1	—	"
1986	TF-1	4	18.63* ² (12.65—21.85)
	MP-1	4	4.43 (2.86— 6.12)
1987	TF-2	4	18.08 (14.68—20.85)
	MP-1	8	12.66 (11.10—14.15)
1988	TF-1	6	10.53 (3.45—16.00)
	MP-2	6	16.43* ³ (12.00—22.05)
1989	TF-1	12	10.52 (6.63—13.39)
	MP-2	12	16.29* ³ (7.97—21.20)
	MP-3	6	12.02 (7.16—16.52)

*¹ Survival activity index.

*² Significantly different ($P < 0.01$) from SAI of the larvae obtained from yellowtail fed with moist pellet (MP-1).

*³ Significantly different ($P < 0.05$) from SAI of the larvae obtained from yellowtail fed with trash fish (TF-1).

Table 27. Summary of the results on the effects of diet

Year	No. of fish from which eggs were collected/conducted	No. of eggs/fish	Hatching rate	Egg size	SAI
1985	TF-1=MP-1* ¹	TF-1≐MP-1* ²	TF-1≐MP-1	TF-1<MP-1* ³	—
1986	TF-1=MP-1	TF-1≐MP-1	TF-1≐MP-1	TF-1<MP-1	TF-1»MP-1* ⁴
1987	TF-2»MP-1	TF-2≐MP-1	TF-2>MP-1	TF-2<MP-1	TF-2>MP-1
1988	TF-1<MP-2	TF-1<MP-2	TF-1<MP-2	TF-1<MP-2	TF-1<MP-2
1989	TF-1>MP-2 MP-2>MP-3	TF-1<MP-2 MP-2>MP-3	TF-1<MP-2 MP-2≐MP-3	TF-1<MP-2 MP-2≐MP-3	TF-1<MP-2 MP-2>MP-3

TF-1, 2, MP-1~3: see Table 22.

Explanation: *¹ (=) Number of fish from which eggs were collected is the same in TF-1 and MP-1.

*² (≐) Number of eggs per fish is almost the same in TF-1 and MP-1.

*³ (> or <) Egg size is larger in MP-1 than TF-1.

*⁴ (» or «) SAI is much higher in TF-1 than MP-1.

のホルモン注射量は600 IU/kg BWを基準注射量とした。これは卵巢の成熟段階が第3次卵黄球期に達したブリを用いて、300~1,200 IU/kg BWの範囲でホルモン量別に人工採卵を行った結果、600 IU/kg BW注射区で最も採卵数が多く、かつ浮上卵率が高い結果が得られたためである（本章第1節，p. 82）。ホルモンの投与回数は、いずれの年も1回だけであったが、2回以上のホルモン投与による人工採卵では、2回目以降の採卵数はきわめて少なく、ふ化仔魚の活力も著しく劣ることがこれまで経験的に知られている。また、アユではHCGの多回注射が卵質（受精率やふ化率）に悪影響を及ぼすことが報告されている（Hirose, 1980）。このことから、ホルモンの多回投与は効率的な採卵結果には結びつかないことが推察される。

ブリは本来多回産卵型の魚種であるが、ホルモン注射による人工採卵では、卵巢内に形成された卵の一部しか有効に利用できず、2回目以降の人工採卵では上述のように効率的な採卵結果は期待できない。したがって、卵巢卵の有効利用を図る上でも、今後水槽等での自然産卵技術の確立を図っていく必要があると考えられる。

2. ドライペレット給餌の効果

前節において、ブリ親魚の成熟および産卵に対するモイストペレットの有効性を確認した。また、近年ブリにおいて育成用配合飼料として開発されたドライペレットを給餌することにより成長への有効性も確認されている（Watanabe *et al.*, 1991c ; Viyakarn *et al.*, 1992）。ドライペレットの利点は、モイストペレットと同様に餌料組成を自由に改変でき、その品質が生餌よりは比較的安定していることが上げられる。将来的にブリ親魚の養成餌料の完全配合化を目指すことは、海域環境の汚染を軽減するためにも重要と考えられる。

そこで、その手始めとして、まずドライペレットを給餌したブリ親魚からの採卵が可能であるかどうかについて検討した（渡邊ら，1993^{*1}）ので、以下に報告する。

材料および方法

供試魚 和歌山県においてドライペレット（坂本飼料，以下DPとする）およびマサバで飼育された天然魚養成3年魚をそれぞれ20尾（雄：雌=10：10，平均魚体重3.76kg）および10尾（5：5，平均魚体重3.97kg）を試験に供した。供試魚は平成5年2月14日に日裁協古満目事業場に搬入し、DPで飼育された親魚は各10尾（雄：雌=5：5）ずつ2区に分け、4月21日までそれぞれDPおよびモイストペレット（養殖研配合：魚介肉ミンチ=1：1，以下MP）を給餌（3回/週）した。一方、

^{*1} 渡邊 武・ウイラカピリア ウィス・竹内俊郎・虫明敬一・河野一利・長谷川 泉（1993）：ドライペレット（DP）によるブリ親魚の養成および産卵。平成5年度日本水産学会秋季大会講演要旨集，318。

マサバで飼育された親魚はアジとサバ (=1:1) の生餌 (以下TF) を同期間給餌 (3回/週) した。なお、産卵試験開始時 (4月24日) のDP, MPおよびTFの各給餌区親魚の体重はそれぞれ 4.13, 3.98 および 4.24 kg であった。

産卵試験 各餌料で飼育した親魚 (各区10尾, 雄:雌=5:5) を4月24日にコンクリート製8角水槽 (65 l) 3面に収容した。なお、収容直前に全親魚の背部筋肉内にHCG (基準注射量600 IU/kg) を注射して産卵を誘発した。産卵期間中の各水槽の親魚飼育水温は加温処理により 19.1 ± 0.4 °Cに保持した。

採卵および卵管理 親魚からの採卵および採卵した卵の飼育管理は、すべて本章第1節 (p.98) で述べた方法により行った。なお、卵管理中の水温は 20 ± 0.3 °Cとした。

卵質評価と仔魚の活力 得られた卵の卵質は、浮上卵率、受精率、卵径および油球径で評価した。また、ふ化時にはふ化率を算出するとともに、全採卵事例で得られたふ化仔魚 (日齢0) を用いて飢餓耐性試験 (本章第1節, p. 89) を行い、無給餌生残指数 (SAI) を算出した。

結果および考察

産卵試験と卵質 MP, DPおよびTFで養成したブリ親魚からの日別採卵結果および卵質測定結果をそれぞれ Fig. 31 および Table 28 に示した。初回産卵が認められたのは、MPおよびDP給餌親魚ではHCG注射2日後であったが、TF給餌親魚では11日後であった (Fig. 31)。これまでHCG注射による産卵誘発処理を行った場合、HCGは一過性に作用し、通常注射2日後に初回産卵が認められることが経験的に知られている。HCG注射2日後に産卵が認められなかったのは、注射の前後に急激な水温変化や過度のハンドリングなどのストレスを親魚に与えたか、あるいは、親魚の成熟状態が十分でなかったことに起因すると考えられる。しかし、TF区にだけ特別なストレスがかかったとは考えにくく、今回TF給餌親魚の産卵が著しく遅れたのは親魚の成熟が不十分であったためと考えられる。

一方、MPおよびDPのいずれの親魚餌料を給餌した親魚においても、これまでブリの産卵試験で見られたように初回産卵で最も多くの採卵が可能で、その後次第に産卵数が減少する傾向が認められた (Fig. 31)。MPおよびDPを給餌した親魚の産卵期間中の雌親魚1尾当たりの産卵数はそれぞれ65.2万粒および33.3万粒で (Table 28), MP給餌親魚で約2倍量の産卵が認められた。MP給餌区で約65万粒の採卵が可能であったが、前節で示した人工受精による採卵結果 (雌親魚1尾当たり約70万粒採卵) に比較すると、量的には若干低い値となっている。これはブリ親魚の大きさの違いによる孕卵数の違いに起因した結果と考えられる。

産卵数ではMP給餌親魚の方がDP給餌親魚よりも多い結果となったが、浮上卵率、受精率および

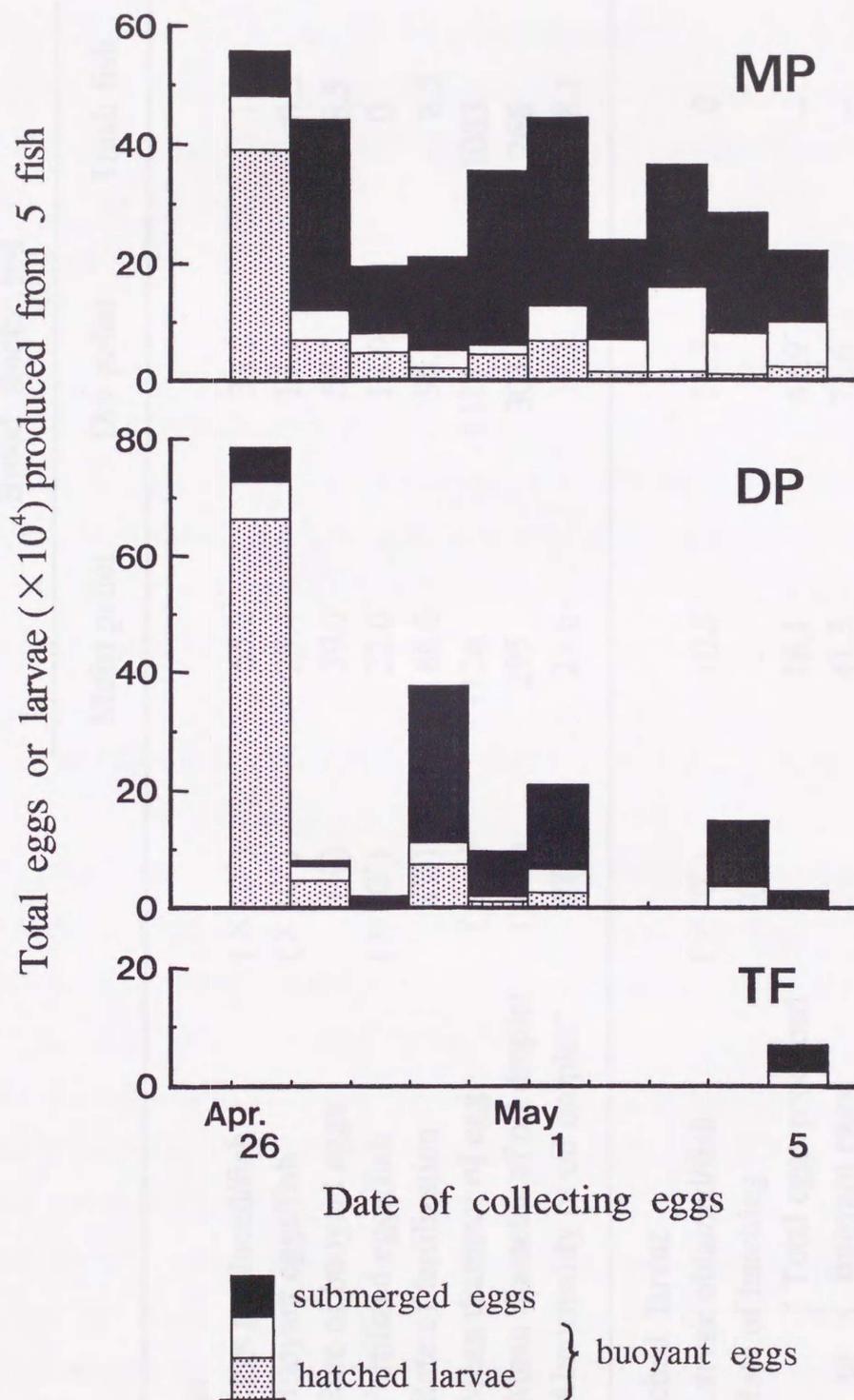


Fig. 31. Results of spawning by each brood stock of yellowtail fed moist pellet (MP), dry pellet (DP), or trash fish (TF) in 1993.

Table 28. Effect of diets for brood stock of yellowtail on the spawning and egg quality

	Brood stocks fed		
	Moist pellet	Dry pellet	Trash fish
Eggs			
Eggs produced/fish ($\times 10^4$)	65.2	33.3	1.3
Buoyant eggs/fish ($\times 10^4$)	25.4	19.7	0.5
Rate of buoyant eggs (%)	39.0	59.2	38.5
Fertilized eggs/fish ($\times 10^4$)	22.0	18.9	0
Rate of fertilization (%)	86.6	96.1	8.5
Mean diameter of egg (μ m)	1126	1124	1083
Mean diameter of oil droplet (μ m)	295	303	268
Abnormality of oil droplet* (%)	23.6	17.1	8.1
Hatched larvae			
Larvae obtained/fish ($\times 10^4$)	10.5	14.3	0
Rate of hatching (%)			
in {	16.1	42.9	-
Total eggs produced	41.3	72.6	-
Buoyant eggs	47.7	75.7	-
Fertilized eggs			

* Egg with more than two oil droplets.

ふ化率で比較すると、いずれもDP給餌親魚の方が高い値を示した (Table 28)。Fig. 31 に示されたようにMP給餌親魚の方がDP給餌親魚よりも2回目以降の産卵でも比較的多くの卵が得られたが、卵質は低下していた。このことは、MPへの馴致飼育期間が約2か月と短かったことに起因していると考えられる。いずれにせよ、今回の試験結果からDPによるブリ親魚養成の可能性が示唆された。今後、さらにDP組成の改善によるブリの産卵数の増加あるいは卵質の向上の可能性を検討する必要があるものと考えられた。

仔魚の活力 MP、DPおよびTFで養成した親魚から得られたすべてのふ化仔魚の飢餓耐性試験の結果をFig. 32に示した。MPおよびDP給餌親魚から得られた仔魚のSAIは、初回産卵由来の仔魚で最も高く次第に低下する傾向が認められた。両区の仔魚のSAI値の間には有意な差は認められなかった。一方、TF親魚からの仔魚では5月5日に1ロットの仔魚を用いて試験を行ったが、SAI値は3.92と低かった。得られた仔魚のSAI値から判断しても、ブリ親魚養成におけるMPおよびDP給餌による産卵への有効性が示唆された。なお、産卵初期に高いSAI値を有する仔魚が得られるのは、これまで行ってきたブリのHCG注射による産卵試験結果と同じであり、産卵初期の仔魚を種苗生産に供することによって比較的高い初期生残率が得られるものと考えられた。

第3節 卵の最終成熟および産卵に及ぼす長日化処理の影響

マダイ (Matsuyama *et al.*, 1993) で報告されているような非産卵期における採卵の可能性について、日裁協でもブリ親魚を用いて飼育環境条件のコントロール (水温や光) あるいはGnRHやHCGなどのホルモン注射による養成親魚からの通常の産卵期よりも早い時期での採卵の試みが行われている (有元, 1991, 1992, 1993; 河野ら, 1993)。

このような早期採卵試験を行う場合には、時期的にも早期に親魚を成熟させる必要があることから、栄養面での優良親魚の養成が必要不可欠な条件となってくる。前節でモイストペレットで飼育した養殖ブリが採卵用親魚として十分使えることを示したが、人工受精による採卵では、親魚の卵巣に形成された卵の一部しか有効に利用できないため、水槽内での自然産卵技術の確立が必要であることも指摘されている。

日裁協古満目事業場では、五島事業場での開発成果 (有元, 1991, 1992, 1993) を受け、モイストペレットで飼育した養成ブリ親魚を用いて産卵期直前に3~4週間の間、人工照明による長日化処理 (以下電照処理という) を行い、その後HCG注射による誘発産卵試験を行った。その結果、産卵期直前の電照処理が雌親魚の卵巣卵成熟に有効で、その後の誘発産卵試験においても大量の良質卵確保が可能であることが判明した (Mushiake *et al.*, 1994 b)。本節では、1991年から1993年に行った試験結果について述べる。

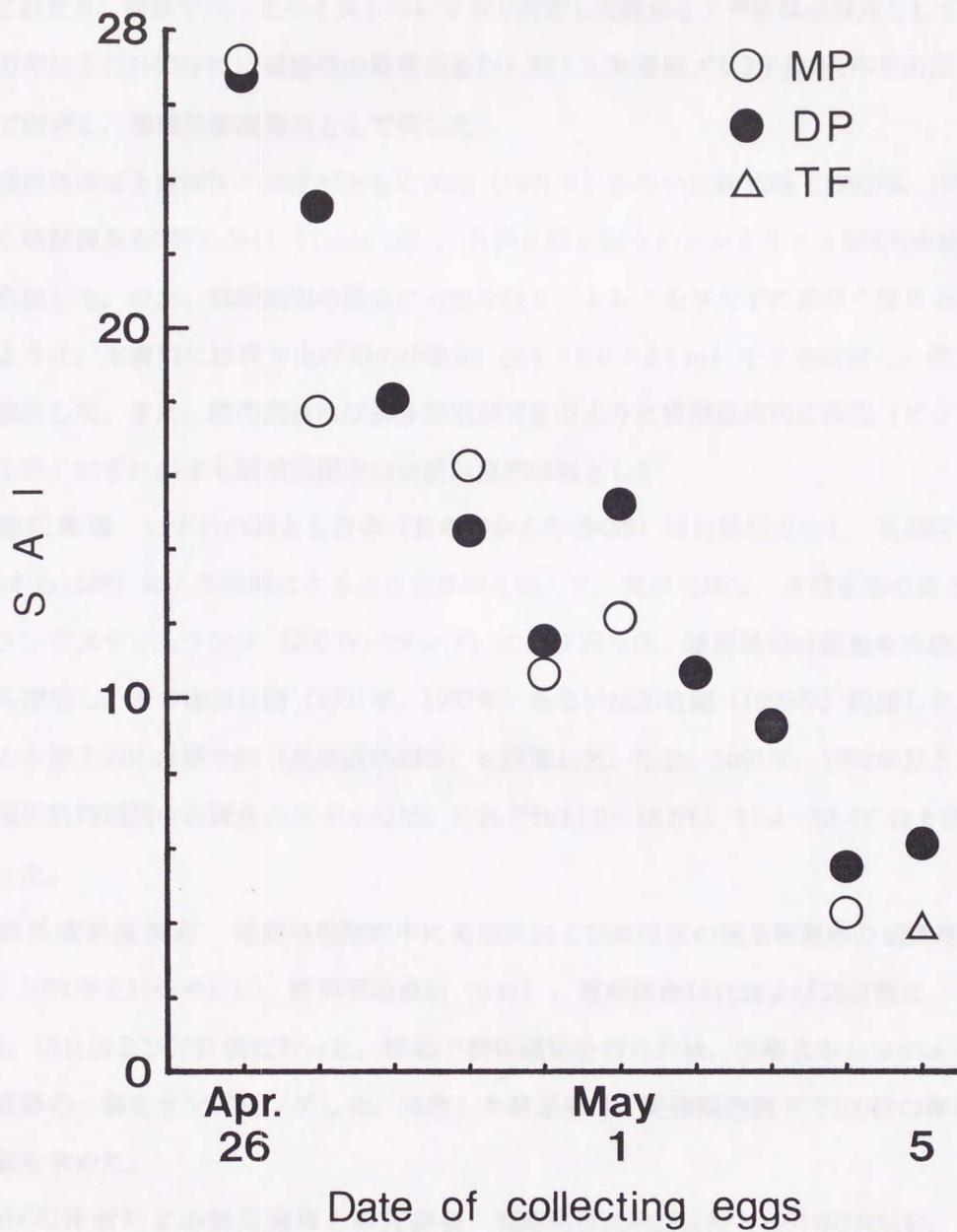


Fig. 32. Survival activity index (SAI) of yellowtail larvae obtained from each brood stock fed moist pellet (MP), dry pellet (DP), or trash fish (TF).

材料および方法

ブリ親魚養成 1991年には高知県古満目地先の定置網で漁獲し、古満目事業場海面小割で約2年間にわたり、前節で述べたモイストペレットで飼育した親魚を天然魚養成親魚として供した。一方、1992年および1993年には愛媛県の養殖業者から購入した養殖ブリ2年魚を1年半の間モイストペレットで飼育し、養殖魚養成親魚として供した。

電照処理区と対照区の両区がともに20尾（1991年）あるいは約10尾（1992年、1993年）となるように供試親魚を2群に分け（Table 29）、各親魚群を別々のコンクリート製八角水槽（容量110 l）に收容した。なお、試験期間中親魚に可能な限りストレスを与えずに素早く取り上げることができるよう、水槽内には取り上げ用の小割網（7.5 × 6.0 × 2.1 m）を予め設置し、親魚はその網の中に收容した。また、雌の親魚には個体識別ができるように背部筋肉内に標識（ピットタグ）を埋め込んだ。いずれの年も試験期間中の水温は自然水温とした。

電照処理 いずれの群とも日中（日の出から午後6時）は自然採光とし、電照区のみ夜間（午後6時から12時）に人工照明による長日化処理を施した。電照処理は、水槽水面の直上に設置した2個のタングステン・ランプ（200 W/ランプ）により行った。電照処理は親魚を水槽に收容した当日から開始し、その後28日間（1991年、1992年）あるいは20日間（1993年）継続した。各年ともすべての水槽上部には寒冷紗（光透過率40%）を設置した。なお、1991年、1992年および1993年における電照処理期間中の親魚の飼育水温は、それぞれ17.2～18.6℃、17.4～18.4℃および16.9～18.7℃であった。

卵巣成熟度調査 電照処理期間中に電照区および対照区の親魚卵巣の成熟度調査を3回行った。1991年と1992年には、電照開始直前（0日）、電照開始14日および28日後に、また1993年には0日、10日および20日後に行った。標識で個体識別を行った後、生殖孔からカニューレを挿入し、卵巣の一部をサンプリングした。採取した卵巣は、実体顕微鏡下で100粒の卵径を測定して平均値を求めた。

HCG注射による誘発産卵と卵質評価 電照処理開始28日後（1991年3月31日、1992年4月4日）あるいは20日後（1993年3月25日）に全雌雄親魚にHCG（基準注射量600 IU/kgBW）注射を行い、水槽内での産卵を誘発した。HCG注射2日後に親魚は産卵を始め、産卵試験期間中に産卵が認められる限り、毎日午後5時から明朝9時まで採卵を行った。1991年、1992年および1993年の産卵期間中の水温は、それぞれ18.6～19.1℃、18.4～19.0℃および18.7～19.3℃であった。1日の親魚1尾当たりの産卵数は、卵1 ml 当たりの卵数を計数して全体の体積に換算した。各親魚群から採卵した卵は2 l のメスシリンダーに收容後、浮上卵と沈下卵に分離させて浮上卵率を算出した。分離した浮上卵はふ化水槽に設置したふ化ネットに收容し、注水（6.5 l/分）と通気（700 ml/分）を施しながら

Table 29. Details of the yellowtail brood stocks used for the experiments

Year	Test group	Origin	Age (year)	Number of fish (M : F)* ¹	Diet	Fork length \pm SD (cm)	Body weight \pm SD (kg)	Condition factor \pm SD	Period of EDL* ² treatment
1991	EDL	Wild* ³	5	20 (12:8)	Moist pellet* ⁵	82.5 \pm 3.3	11.38 \pm 1.53	20.22 \pm 1.21	Mar.3-Mar.31
	Control	Wild* ³	5	20 (12:8)	Moist pellet	82.4 \pm 2.9	11.42 \pm 1.60	20.24 \pm 1.34	Mar.3-Mar.31
1992	EDL	Wild* ⁴	4	10 (6:4)	Moist pellet	77.8 \pm 2.1	9.31 \pm 0.83	19.79 \pm 1.36	Mar.7-Apr.4
	Control	Wild* ⁴	4	9 (6:3)	Moist pellet	76.6 \pm 1.3	8.70 \pm 0.54	19.38 \pm 1.46	Mar.7-Apr.4
1993	EDL	Wild* ⁴	4	12 (6:6)	Moist pellet	76.3 \pm 1.9	8.51 \pm 0.67	19.17 \pm 0.70	Mar.5-Mar.25
	Control	Wild* ⁴	4	12 (6:6)	Moist pellet	73.8 \pm 1.9	7.78 \pm 0.66	19.36 \pm 1.05	Mar.5-Mar.25

*¹ M: male, F: female.

*² EDL: extended daylength (18:00 to 24:00) by artificial lighting (two lights of each 200 W).

*³ Captured by set-net fishery and reared for 2 years.

*⁴ Captured at juvenile stage and reared for 4 years.

*⁵ Moist pellet: formula feed prescribed by National Research Institute of Aquaculture + trash fish (1:1).

ふ化まで管理した。

各年の電照区および対照区から得られた卵の卵径，受精率および油球数を求め，ふ化時に各ネット内のふ化仔魚数を計数してふ化率を算出した。また，浮上卵からの正常ふ化率は，仔魚の油球数，油球の位置（通常前方部）および形態異常（仔魚膜欠損）の有無により求めた。

ふ化仔魚の活力評価 1991年，1992年および1993年の全試験区で得られた仔魚の活力評価を行うため，前述した方法で水温20°Cにおける飢餓耐性試験を行い，無給餌生残指数（SAI）を算出した。

結 果

電照処理による卵巣卵の成熟 1991年から1993年に行った全試験区の卵巣卵径の経時的変化をFig. 33に示した。各年の試験開始時の卵巣卵径（0日目）は562～584 μ mの範囲にあった。1991年の対照区における試験開始14および28日後の平均卵巣卵径は，それぞれ669および701 μ mであった。一方，電照処理区ではそれぞれ768および835 μ mであった。電照処理区28日後の平均卵径は，対照区よりも有意（ $p < 0.01$ ）に大きかった。1992年の対照区における14および28日後の平均卵径はそれぞれ646および685 μ mであったが，電照処理区ではそれぞれ782および853 μ mといずれの調査日においても電照処理区の方が有意（ $p < 0.01$ ）に大きい値を示した。1993年における試験開始10および20日後の平均卵巣卵径は，対照区ではそれぞれ636および667 μ mで，電照処理区ではそれぞれ754および842 μ mであった。試験開始20日後の電照処理区の平均卵径は，対照区よりも有意（ $p < 0.01$ ）に大きかった。

産卵結果 1991年から1993年に行った電照処理区と対照区の親魚を用いたHCG注射による誘発産卵試験結果をFig. 34およびTable 30に示した。1991年には両区の親魚とも4月3日に産卵を始め，電照処理区の親魚は4月15日まで，また対照区の親魚は4月17日までともに毎日産卵した。産卵試験期間中に得られた対照区（'91C）および電照処理区（'91E）親魚の雌1尾当たりの産卵数は，それぞれ95.8万粒および203.0万粒であり，また浮上卵率はそれぞれ63.5%および81.6%であった。電照処理区と対照区との間に産卵数および浮上卵率における有意差が認められた（ $p < 0.01$ ）。通常，ブリの浮上卵は高いふ化率を有し正常発生率も高いが，沈下卵はそのほとんどすべてが未受精卵か死卵で占められており，このことから浮上卵率が卵質評価の重要な指標となっている。

1992年には両区の親魚とも4月7日に産卵を始め4月16日まで継続した。その間の対照区（'92C）および電照処理区（'92E）親魚の1尾当たりの産卵数は，それぞれ105.9万粒および213.9万粒であり，また浮上卵率はそれぞれ59.3%および66.3%であった。電照処理区親魚の産卵数は対照区親魚よりも有意（ $p < 0.01$ ）に多かった。

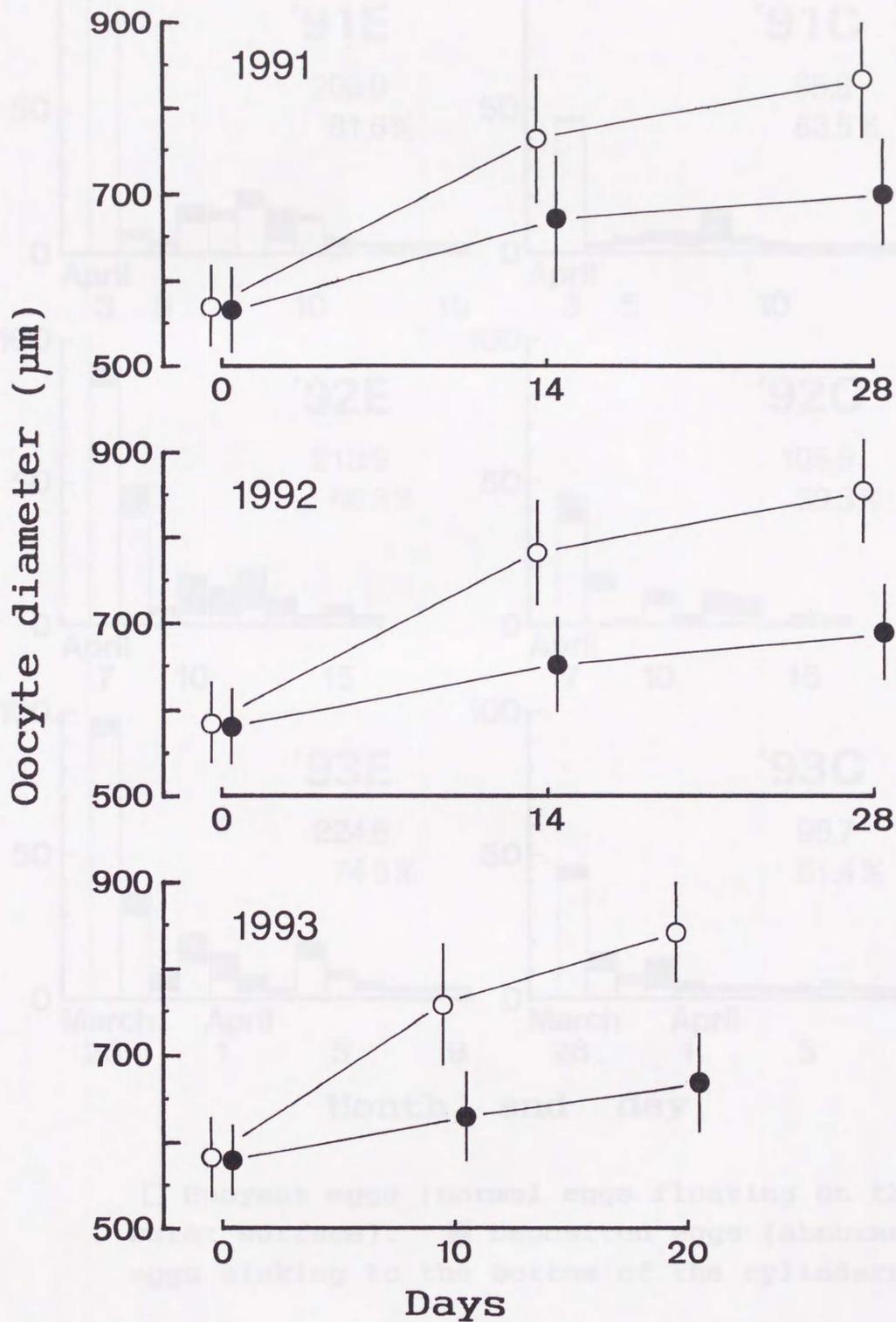
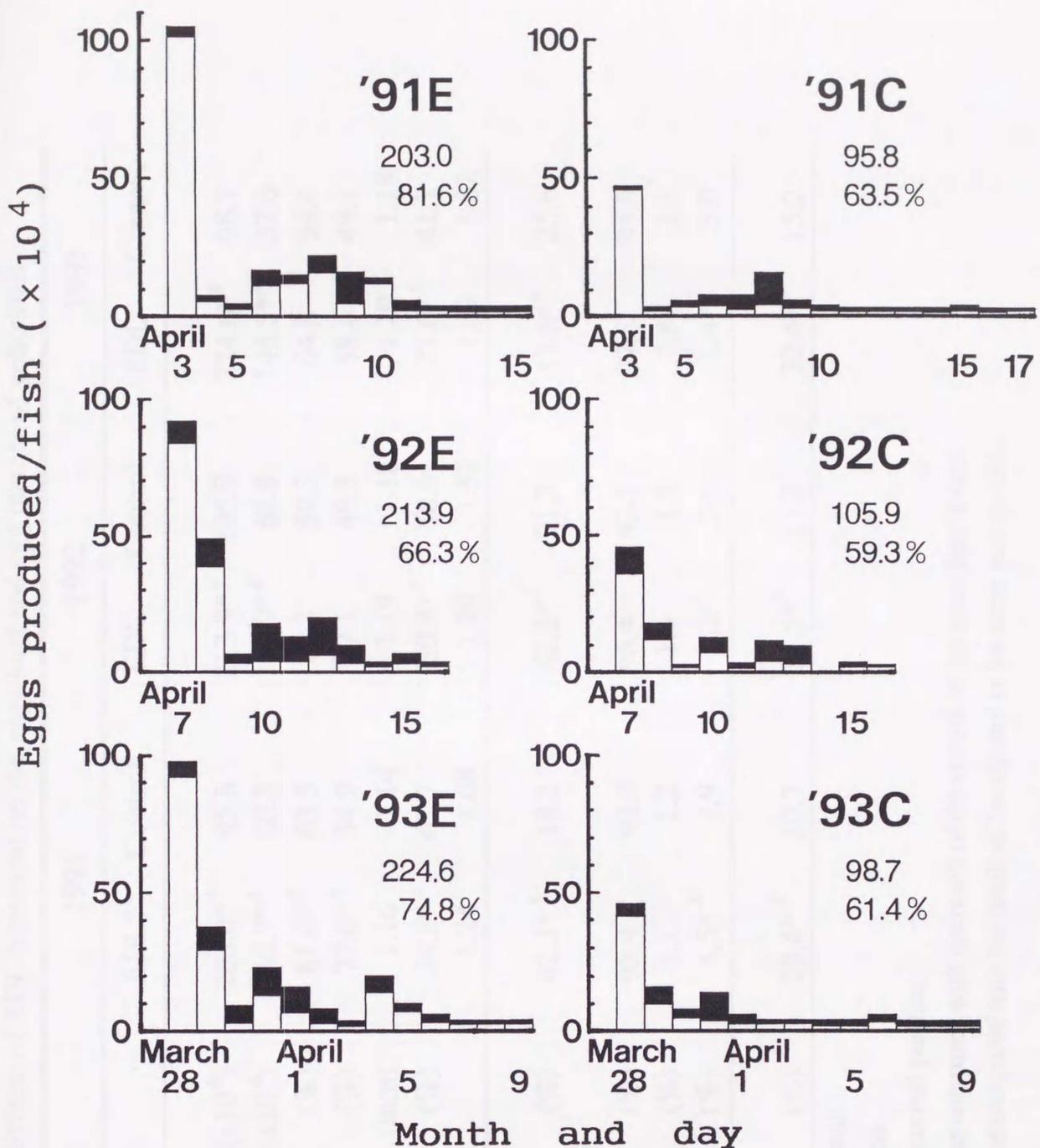


Fig. 33. Changes with time in mean oocyte diameter in ovary of yellowtail. Vertical lines represent standard error. ○ EDL treatment, ● control.



□ Buoyant eggs (normal eggs floating on the water surface). ■ Deposited eggs (abnormal eggs sinking to the bottom of the cylinders).

Fig. 34. Results of spawning of yellowtail in the EDL-treated ('91E, '92E, '93E) and the control ('91C, '92C, '93C) groups in 1991–1993. Numerals in each figure represent the average number ($\times 10^4$) of eggs produced per fish (upper) and percentage of buoyant eggs (lower).

Table 30. Effects of EDL treatment on the spawning and egg quality of yellowtail

Test group	1991		1992		1993	
	EDL* ¹	Control	EDL	Control	EDL	Control
Eggs						
Eggs produced/fish	(x10 ⁴)	203.0* ⁴	95.8	213.9* ⁴	105.9	224.6* ⁴
Buoyant eggs/fish	(x10 ⁴)	165.7* ⁴	60.8	141.9* ⁴	62.8	145.5* ⁴
Rate of buoyant egg	(%)	81.6* ⁵	63.5	66.3	59.3	64.8
Rate of fertilized egg	(%)	77.0* ⁵	54.9	57.1	49.3	58.4
Egg diameter	(mm)	1.16	1.14	1.19	1.18	1.20
Abnormal egg* ²	(%)	24.8* ⁴	61.7	30.4* ⁴	58.6	21.6* ⁴
Mean number of oil droplet		1.24	1.68	1.20	1.57	1.09
Hatched larvae						
Rate of hatching	(%)	42.3* ⁴	18.2	42.2* ⁴	21.3	43.6* ⁴
Normal larvae obtained from buoyant egg	(%)	95.4	90.9	96.4	95.1	97.8
Abnormality in Position* ³	(%)	1.1	1.2	1.4	1.3	0.8
egg droplet Number* ²	(%)	3.5* ⁴	7.9	2.2* ⁵	3.6	1.4* ⁵
Rate of normal larvae obtained	(%)	28.4* ⁴	10.7	31.5* ⁴	11.7	32.4* ⁴

*¹ EDL : extended daylength treatment.

*² Eggs with more than 2 oil droplets.

*³ Larvae with oil droplets at an abnormal position.

*⁴ Significantly different (p<0.01) as compared with the result of the control in the same year (t-test).

*⁵ Significantly different (p<0.05) as compared with the result of the control in the same year (t-test).

1993年においては両区親魚は3月28日から4月9日まで産卵した。対照区 ('93C) および電照処理区 ('93E) 親魚の1尾当たりの産卵数は、それぞれ98.7万粒および224.6万粒であり、また浮上卵率はそれぞれ61.4%および74.8%であった。産卵数は電照処理親魚の方が対照区親魚よりも有意 ($p < 0.01$) に多い結果を示した。

対照区の親魚では、いずれの年もHCG注射44~56時間後に初回産卵が認められたが、電照処理区では52~54時間後に同調的な産卵が認められた。

卵質 1991年から1993年の各試験区から得られた卵の卵径、卵と仔魚における油球数、および油球の位置、ふ化率および正常ふ化率をTable 30 に示した。また、1991年から1993年の産卵期間中に計6試験区から得られた卵の卵径の経時的变化をFig. 35 に示した。各試験区から得られた卵径は、いずれも初回産卵で得られたものが最大で産卵が繰り返されるにしたがって次第に小さくなった。

1991年、1992年および1993年において対照区から得られた2個以上の油球を有する異常卵の割合は、それぞれ61.7%、58.6%および41.7%であったのに対し、電照処理区ではそれぞれ24.8%、30.4%および21.6%であった。卵質評価の重要な指標であるふ化率は、対照区ではそれぞれ18.2% (1991年)、21.3% (1992年) および25.6% (1993年) であったが、電照処理区ではそれぞれ42.3%、42.2%および43.6%であった。総採卵数に対する正常ふ化率は、1991年、1992年および1993年の対照区ではそれぞれ約11%、12%および15%であったのに対して、電照処理区ではそれぞれ28%、32%および32%であった。

仔魚の活力 合計6試験区から得られたふ化仔魚のSAI値をFig. 36に示した。試験期間中の電照処理区親魚由来の仔魚のSAIは、対照区よりも常に高い値を示した。各年のいずれの試験区においても、初回産卵で得られた仔魚のSAI値が最も高く、その後産卵が繰り返されるにしたがってSAI値は次第に低下した。

考 察

Fig.33 に示された卵巢卵径の経時的变化から、電照処理によりブリの卵形成が促進されることが明らかとなった。また、卵質に関連する項目においても電照処理区の方が対照区よりも優れた結果が得られた (Table 30) 。電照処理によりブリの卵形成が促進されるメカニズムは不明であるが、産卵期直前に電照処理を行った親魚群の方が産卵試験において優れた結果を示すのは、電照処理により卵巢内に占める成熟卵 (卵径で700 μm 以上の第3次卵黄球期の卵) の割合が高くなるためと推察される。ブリの場合には、水温約19°Cで卵巢卵が完熟期を迎えると報告されている (楳田, 1991) 。しかしながら、今回の試験では電照処理による光条件と飼育水温条件の両方がブリの成熟に影響していた可能性がある。同様の傾向がこれまでシマアジ (第1章第2節, p. 13) , メダカ (

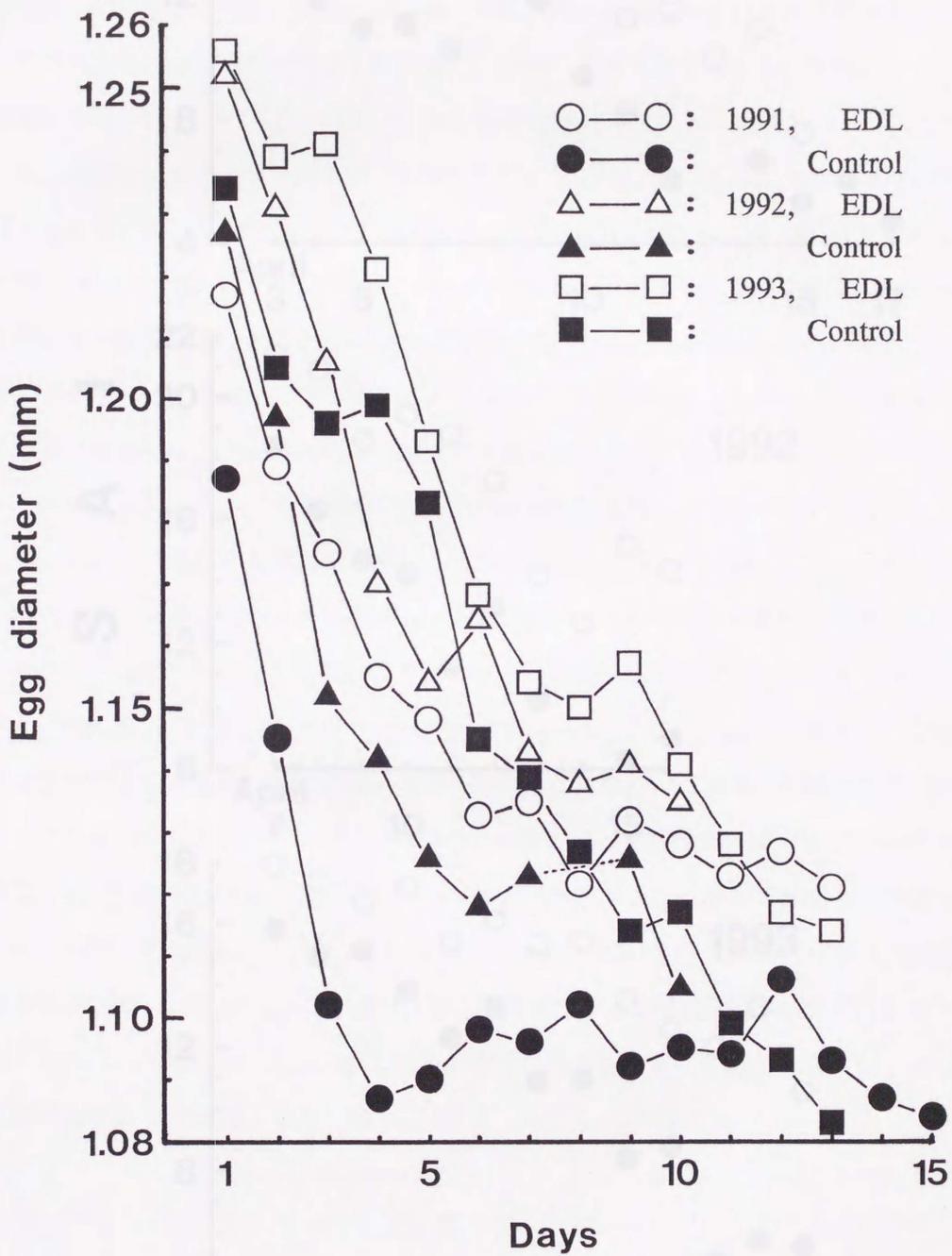


Fig. 35. Changes in diameter of eggs produced by each experimental brood stock over the spawning period in the years 1991, 1992, and 1993.

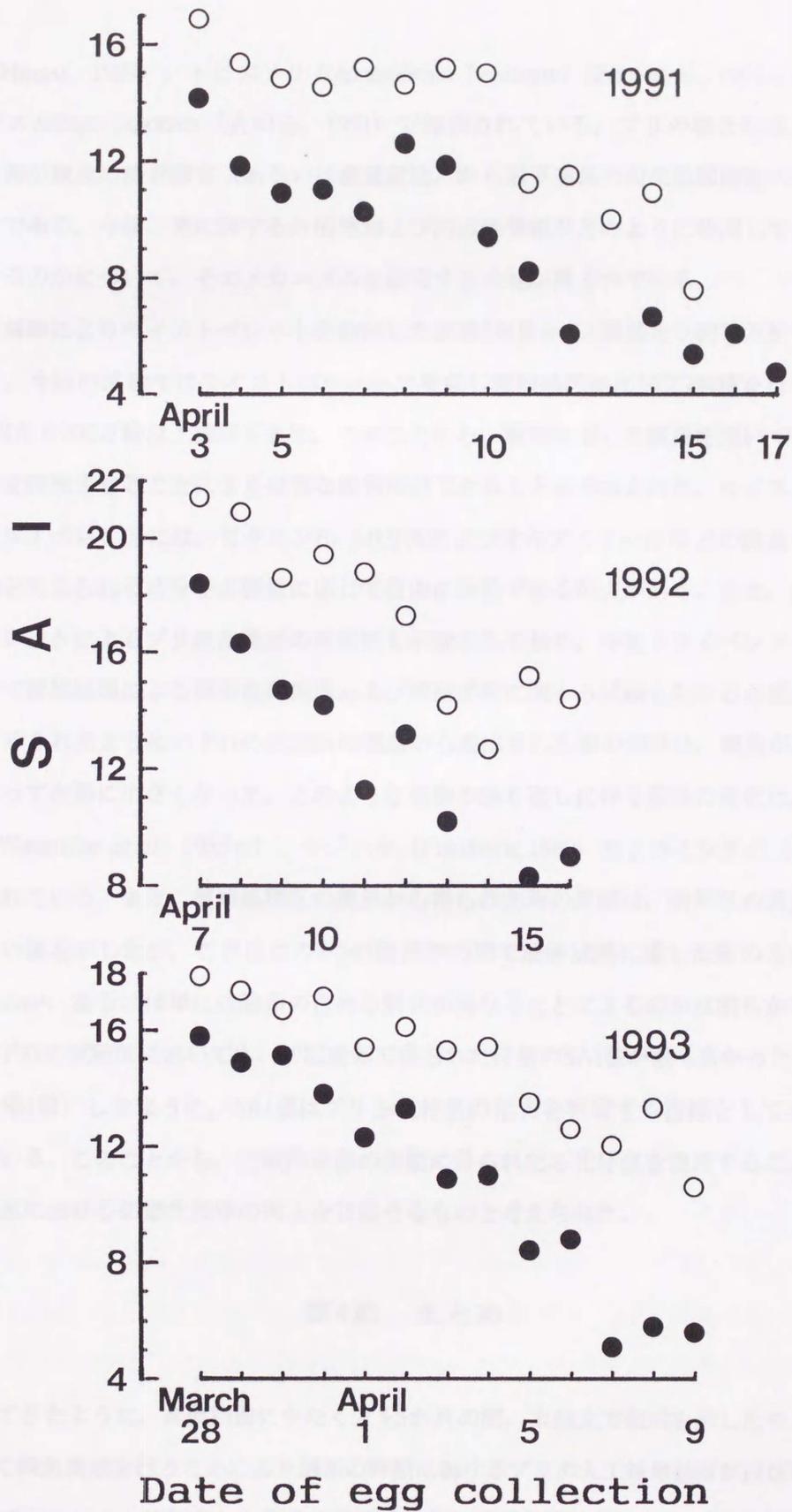


Fig. 36. Survival activity index (SAI) of yellowtail larvae obtained from brood stocks in the EDL-treated and the control groups.
 ○ EDL-treated, ● control.

Awaji and Hanyu, 1989), トビヌメリ *Repomucenus beniteguri* (Zhu et al., 1991 a, 1991 b) およびシロギス *Sillago japonica* (古川ら, 1991) で報告されている。ブリの場合には、電照処理による光の情報が親魚の感覚器官 (あるいは感覚細胞) から脳下垂体の向生殖腺細胞への伝達経路が不明のままである。今後、光に関する外因性および内因性情報がどのように作用してブリの最終成熟を促進するのかについて、そのメカニズムを研究する余地が残されている。

先に人工採卵によりモイストペレットを給餌した養殖2年魚から1尾当たり約70万粒を採卵したことを述べた。今回の試験ではモイストペレットで養成し電照処理後にHCG処理を行った誘発産卵により1尾当たり200万粒以上採卵できた。このことから、電照処理した親魚を用いてホルモン注射により産卵を誘発させることにより有効な卵利用ができることが示唆された。モイストペレットや前述したドライペレットには、ビタミンE, HUF Aおよびオキアミミールなどの親魚の成熟および産卵に有効と考えられる成分を必要量に応じて自由に調整できる利点がある。また、前述したようにドライペレットによるブリ親魚養成の可能性も示唆されており、今後ドライペレットで飼育した親魚を用いて電照処理による卵形成の促進および誘発産卵に関する試験も試みる必要がある。

Fig. 35 に示されたようにいずれの試験区の親魚から産出された卵の卵径は、親魚が産卵を繰り返すにしたがって次第に小さくなった。このような産卵の繰り返しの伴う卵径の変化は、これまでもマダイ (Watanabe et al., 1985 b), キジハタ (Fukuhara, 1989) およびイシダイ (伊藤, 1978) でも報告されている。また、電照処理区の親魚から得られた卵の卵径は、対照区の親魚からのものよりも大きい値を示したが、これはこの2つの親魚群の間で最終成熟に達した卵の大きさが異なることによるのか、あるいは単に成熟卵の占める割合が異なることによるのかは明らかではない。

各年のいずれの試験区においても、初回産卵で得られた仔魚のSAI値が最も高かった (Fig. 36)。前述 (本章第1節) したように、SAI値はブリふ化仔魚の活力を判定する指標として有効であると考えられている。このことから、比較的産卵の初期に得られたふ化仔魚を使用することによって、ブリ種苗生産における初期生残率の向上を目指せるものと考えられた。

第4節 まとめ

以上述べてきたように、産卵期前に少なくとも5か月の間、本論文で組成を示したモイストペレットを給餌して親魚養成を行うことにより通常の時期におけるブリの人工採卵技術がほぼ確立できた。一方、モイストペレットで飼育した親魚の最終成熟期に電照処理を施すことにより卵形成が促進され、その後のHCG注射により誘発産卵による大量採卵も可能となった。しかし、この電照処理による卵形成の促進およびHCGによる産卵を誘発される場合には、供試親魚の成熟段階が重要なポイントとなる。すなわち、本研究で使用したように雌の卵巣卵が第3次卵黄球期に達した親魚であ

れば電照処理により卵形成は促進されるが、卵巣が未発達な親魚では成熟促進はほとんど認められず、その後の大量採卵も期待できない。このような現象はシマアジにおいても同様に認められる。そのため、供試親魚の選択も重要であるが、それ以前に成熟親魚を仕立てる親魚養成技術が重要な開発項目である。古満目事業場では現在モイストペレットとドライペレット給餌によるブリの親魚養成を行っている。モイストペレットで飼育した親魚の場合、1月下旬から親魚の肥満度は急激に上昇し始め、3月下旬から4月上旬にかけて卵巣卵はほぼ確実に第3次卵黄球期に達することが確かめられている。しかし、生餌を与えて飼育した親魚では成熟に個体差が認められ、卵巣卵の発達段階も必ずしも一様ではなかった。したがって、このような生餌飼育親魚を電照処理に供することは、大量のふ化仔魚生産の観点からするとむしろ非効率的であると考えられた。

得られた卵のふ化までの管理条件およびふ化仔魚の活力判定については、それぞれ卵比重の変動からふ化直前の通気と注水の重要性およびSAIの指標としての有効性が確かめられた。しかし、シマアジでも述べたように、飢餓耐性試験による仔魚の活力判定は、仔魚の種苗性というよりもむしろ親魚から付与された蓄積栄養を評価する手法と考えられる。したがって、ブリにおいても生化学的手法などを用いて、今後種苗性そのものを評価できるような手法の開発が必要であると考えられた。

今後のブリの親魚養成技術開発においては、通常の時よりも早い時期での早期採卵技術の確立が大きな課題となっている。これは、種苗生産された人工種苗の大きさを同時期の天然種苗（モジャコ）の大きさに近づけるための技術開発である。従来行ってきたような4～5月に採卵して得られたふ化仔魚を用いた種苗生産では、生産された人工種苗の大きさが天然種苗に比較すると著しく小さいため、人工種苗放流の成果が挙がりにくいことが常々指摘されている。また、放流後においても放流漁場から逸散しやすく、大型魚種の食害を受けやすい傾向も見られている。そのため、早期採卵から得られた仔魚を用いた人工種苗生産が強く望まれるようになってきている。親魚からの早期採卵を行うためには、親魚を通常の時よりも早期に成熟させる飼育技術が必要であり、上述したような電照処理により親魚の最終成熟をコントロールするような手法の開発が有効と考えられる。このほかにもGnRHなどのようなホルモンを用いた成熟促進技術、あるいは周年にわたって人為的な水温条件下で管理することによる成熟促進技術に関しても、今後さらに研究の余地が残されていると思われる。

また、ブリでは再生産に関与する疾病として、ウイルス性腹水症が知られているが、本研究におけるシマアジのVNNで確立されたような防除対策は、今のところ確立されていない。多くの海産魚類のウイルス病に対しては、発病時に種苗の焼却処分が行われるのみで防除対策と呼びうるような方策は検討されていない。今後、このウイルス性腹水症に関してもブリ親魚の選別、卵およびふ化仔魚からのYAV検出などによる防除対策の確立が必要と考えられる。

謝 辞

稿を終わるに当たり、本研究を取り纏める契機を与えられ終始御懇篤な御指導と御助言を賜わり、また本論文の御校閲を頂いた恩師 広島大学生物生産学部 室賀清邦 教授に謹んで深謝の意を表します。

古澤 巖 教授を始めとする京都大学農学部植物病理学研究室の諸先生方および広島大学生物生産学部 中井敏博 助教授ならびに 西澤豊彦 助手には、シマアジのウイルス性神経壊死症に関する研究の遂行上、多大な御指導と御鞭撻を賜わるとともに論文の取り纏めに際し種々の貴重な御助言を賜わった。水産庁養殖研究所栄養代謝部 新井 茂 元部長（現在 水産庁日本海区水産研究所所長）、同繁殖生理部 広瀬慶二 元部長（現在 水産庁中央水産研究所生物機能部長）、同 香川浩彦 室長、同 新聞脩子 主任研究官、東京水産大学 渡邊 武 教授ならびに京都大学農学部 坂本 亘 教授には、ブリの親魚養成技術開発を進める上で終始御指導を頂くとともに、論文の取り纏めに際し有益な御助言を賜わった。また、広島大学生物生産学部 中川平介 教授ならびに 難波憲二 教授には本論文をお読み頂き種々の有益な御助言を賜わった。これらの御厚情に対してそれぞれ感謝の意を表します。

さらに、本研究の取り纏めに種々の御配慮と御鞭撻を頂いた日本栽培漁業協会 今村弘二 理事長、本間昭郎 元専務理事（現在 日裁協顧問）、須田 明 元常務理事（現在 日本鯉鮭漁業協同組合連合会顧問）、菅野 尚 常務理事、松岡玳良 常務理事、古澤 徹 技術参事、水田洋之介 技術部長、北田修一 元調査課長（現在 東京水産大学助教授）ならび長谷川 泉 場長に厚く御礼申し上げます。また、一部の実験に御協力頂き種々の貴重な御助言を頂いた上浦事業場 関谷幸生 元主任技術員（現在 玉野事業場場長）、五島事業場 有元 操 主任技術員、屋島事業場 藤本 宏 技術員、古満目事業場 河野一利 技術員ならびに日裁協の関係各位に御礼申し上げます。

要 約

(本論文はすでに発表した実験結果に未発表の実験結果を付け加えてまとめたものである)

第1章

シマアジの親魚養成技術と産卵誘発処理，効率的なふ化仔魚生産のための卵の取り扱いと卵管理条件，および得られたふ化仔魚の活力判定手法に関する技術の確立を試みた。

1) シマアジの親魚養成は，親魚の成熟状態に合わせて1年を養成期（6月～10月），成熟期（11月～翌年1月）および産卵期（2月～5月）の3期に分け，養成期にはモイストペレットを，成熟および産卵期には混合生餌をそれぞれ給餌するのが良いと考えられた。

2) また，養成中の親魚の体表に寄生する *Caligus longipedis* を駆除するためには，水槽への収容や沖出し時に麻酔と併用して淡水浴を行うのが，親魚への悪影響が少ない最も良い方法と考えられた。

3) 成熟させた親魚は，加温処理，加温とホルモンの併用処理，水温上限制御処理および無処理のいずれの方法によっても産卵した。

4) 加温処理は加温安定型（22°C一定）と加温変動型（20°C←→22°C）とに分けられ，前者は連続的な産卵を誘発する方法であるのに対して，後者は断続的に産卵を誘発する方法である。経産親魚で成熟した卵巣卵を有する親魚であれば，加温安定処理のみで十分産卵誘発可能であった。

5) 加温とホルモンの併用処理による産卵誘発処理により，大量のふ化仔魚生産が可能となった。この方法は，初産魚および生殖腺指数（GSI）が低い未成熟親魚の産卵誘発に最も適していると考えられた。

6) 水温上限処理は産卵期間の延長を図るために用いた手法であるが，結果的には親魚の体力を消耗させる可能性が高く，健全なふ化仔魚生産の観点からはむしろマイナスに作用すると考えられた。

7) 産卵誘発無処理による自然産卵試験を行った結果，古満目海域で成熟させたシマアジ親魚の産卵期は4月初旬から5月末までの約2か月間で，その時の産卵水温は16.4～22.9°Cであった。また，加温とホルモンの併用処理により得られた卵の卵径と比較すると，無処理で飼育した親魚から得られた卵の方が産卵期間を通して約40 μ m 程度大きい値を示した。しかし，親魚1尾当たりの産卵数は上記の方法に比べて著しく少なかった。

8) 得られた卵の卵質およびふ化仔魚に及ぼすハンドリングの影響について洗卵棒法と掬い取り法とで比較試験を行った結果，掬い取り法で卵を扱った方が，浮上卵率で約2倍，ふ化率で約3倍の効率でふ化仔魚生産が可能となった。また，得られたふ化仔魚においても掬い取り法の卵由来の仔

魚の方が高い無給餌生残指数 (SAI) を示し、掬い取り法の有効性が確かめられた。

9) 卵管理中の通気量、注水量および卵の収容密度について検討した結果、1つのふ化ネット中 (容量 413 l) ではそれぞれ 700 ml/分区、6.5 l/分区および 100 万粒収容区で最も高いふ化率を示した。また、産卵からふ化までのシマアジ卵の比重の変化を測定した結果、ふ化直前に卵比重が最大となり、このことから卵がふ化直前に沈下する現象が裏付けられるとともに、この時期における通気と注水の重要性が示された。

10) シマアジふ化仔魚の活力判定のための一つの方法として飢餓耐性試験を行い、SAIにより仔魚の活力を数値化することを試みた。その結果、生産試験において、SAIが高い仔魚を用いた事例ほど初期減耗も少なく、沖出しまでの生残率が高い結果が得られた。

11) 加温安定型で産卵を促進した親魚から得られた仔魚のSAIは、産卵初期には高かったが、その後次第に低下する傾向が認められた。一方、加温変動型で飼育した親魚からの仔魚では、産卵後期になってもSAIの低下は見られなかった。また、海水を静止させた条件下で浮上する仔魚と沈下する仔魚に分けて調べたところ、浮上仔魚のSAIが高かった。

12) これらの結果から、シマアジにおいてSAIがふ化仔魚の活力を示す有効な指標になると考えられた。さらに、水温 19~24°C の範囲において、試験水温 (x_1) と SAI (y_1) との間に、

$$y_1 = -1.16 x_1 + 48.81$$

と、有意な直線回帰が認められ、水温 22°C における SAI (y) への補正は、

$$y = y_1 + 1.16 (x_1 - 22)$$

により可能となった。

13) 浮上卵率、受精率、ふ化率、卵径および油球径などの卵質判定項目と SAI との間には、特に関連性は認められなかった。

第2章

シマアジの種苗生産過程において多大な被害を及ぼすウイルス性神経壊死症 (VNN) の防除を目的として、親魚養成過程における親魚から卵および仔魚への原因ウイルス (SJNNV) の垂直感染に対する防除対策を確立することを試みた。

14) シマアジ養成親魚の血漿から SJNNV に対する抗体の検出方法を確立した。イオン交換クロマトグラフィーにより簡易精製した血漿 IgM と純化ウイルスに対するウサギ 1 次抗体を用いた間接 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) により、供試した 272 尾中 177 尾 (65%) から抗体が検出された。また、親魚の性別や由来と抗体保有との間に一定の関係は認められず、本ウイルスの感染は養成シマアジに広範囲に起こっていることが明らかとなった。

15) 古満目事業場で飼育されたシマアジ親魚について、約 2 年間にわたり血漿中の抗 SJNNV 抗体

を追跡したところ、親魚のウイルス抗体保有率は7月に低下する傾向が見られたが、季節変化は認められなかった。

16) 1991年には抗体陽性親魚を多く用い、加温安定型(22°C)で連続的に産卵させた結果、抗体陽性および陰性のいずれの親魚群から得られたふ化仔魚にもVNNが発生した。一方、1992年には抗体陰性親魚群を主産卵群として加温変動型(20°C \leftrightarrow 22°C)で断続的な産卵誘発を図った結果、いずれの仔魚にもVNNは発生しなかった。

17) これらの結果から、抗体検査による親魚選別ならびに産卵飼育方法の改善により、仔魚におけるVNNの発生をある程度抑制し得ることが示唆された。

18) ポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction: PCR)法によりSJNNV遺伝子の一部を増幅してウイルスを検出する方法が開発され、その方法を用いてシマアジ親魚からSJNNVの外被タンパク遺伝子(RNA2)の検出を行い、親魚の生殖巣におけるウイルスの有無と仔魚におけるVNN発生との関係について検討した。

19) その結果、シマアジ親魚が産卵を繰り返すにしたがって生殖巣からSJNNV遺伝子が検出されるようになったが、抗体が検出される個体とウイルスが検出される個体とは必ずしも一致しなかった。

20) SJNNV陰性親魚群からの仔魚にはVNNは発生しなかった。一方、SJNNV陽性魚を含む親魚群の仔魚にはVNNが発生したが、この親魚群からウイルス陽性魚を除去して産卵させて得た仔魚にはVNNは発生しなかった。

21) したがって、PCR法によるSJNNV遺伝子の検出はVNN防除のための産卵親魚の選別に有効であると考えられた。

22) また、VNNが発生した時の仔魚からのSJNNVの検出において、間接ELISAでは日齢4で初めて検出されたのに対して、PCR法では日齢0で検出され、両法の検出感度の違いが実証された。

23) シマアジのVNNの防除対策の基礎として、ヨード剤を用いた卵消毒の有害性について検討した結果、胚環期以降の卵を有効ヨウ素濃度80 mg/lの消毒液に1回だけ15分間浸漬する方法が、卵の正常発生率、ふ化率および仔魚のSAIにほとんど悪影響を与えないことがわかった。

24) しかし、本消毒法を実施した卵由来の仔魚では対照区に比較して若干の延命効果は認められたものの結果的にはVNNの発生により全滅し、ヨード剤による卵消毒だけではVNNの防除は不可能と考えられた。

第3章

ブリ親魚から安定した大量採卵技術を確立することを目的とし、親魚の養成手法、親魚の成熟および産卵に及ぼす飼餌料の影響、および卵の最終成熟および産卵に及ぼす長日化処理の影響につい

て検討した。

25) 第3次卵黄球期に達したブリ親魚を用いて300~1,200 IU/kg BWの範囲でHCG注射を行い人工採卵を試みた結果、600 IU/kgBW注射区で最も採卵数が多く、かつ浮上卵率が高い結果が得られた。

26) 受精直後からふ化までの間のブリ卵の比重を測定した結果、その比重はふ化直前に最大となり、卵はふ化直前にネット内に沈下する傾向が見られた。このことから、先に述べたシマアジの場合と同様ふ化直前の通気と注水の重要性が示唆された。

27) 無給餌生残指数 (SAI) によりブリ仔魚の活力の数値化を試みた結果、SAIが高い仔魚のロットほど給餌飼育試験において日齢10までの初期生残率が高かった。また、海水を静止させた条件下で浮上する仔魚と沈下する仔魚に分けてSAIを検討した結果、浮上仔魚の方が高いSAIを示した。

28) 由来と年齢の異なる親魚を用いて、誘発産卵と人工受精の両方から得られた仔魚を用いて試験を行った結果、仔魚のSAIは親魚の由来あるいは採卵方法とは無関係に若齢魚ほど高い値を示した。

29) これらの結果から、ブリにおいてもSAIがふ化仔魚の活力を判定する指標として有効であると考えられた。また、水温18~24°Cの範囲において、試験水温 (x_1) とSAI (y_1) との間に、

$$y_1 = -1.13 x_1 + 38.75$$

と、有意な直線回帰が認められ、水温20°CのSAI (y) への補正は、

$$y = y_1 + 1.13 (x_1 - 20)$$

により可能となった。

30) 卵質判定項目とSAIとの関連性を検討した結果、ふ化率とSAIとの間に相関が認められた。

31) ブリの親魚養成を行う際の長期間にわたる生餌の単独投与は、成熟および産卵に必要な栄養素の欠乏をもたらす危険性が高く、必ずしも十分な採卵は期待できない。したがって、モイストペレットやドライペレット給餌による親魚養成技術の開発が必要と考えられた。

32) 5年間にわたり、養殖ブリ2年魚にモイストペレットあるいは混合生餌を給餌し、約半年間養成して乾導法による人工受精を行い、成熟・産卵に及ぼす餌料の影響を検討した。その結果、モイストペレットにビタミンE、イカ肝油およびアスタキサンチンを含むオキアミ抽出油を補足強化して養成した親魚で雌1尾当たりの採卵数70万粒、ふ化率60%、SAI20などの好結果が得られた。

33) ドライペレットを用いてブリの親魚養成および採卵の可能性について検討した結果、採卵数ではモイストペレット給餌親魚の方が良い結果が得られたものの、卵質ではドライペレット給餌親魚の方が優れた結果を示した。このことから、ドライペレットによるブリの親魚養成の可能性が示唆された。

34) モイストペレットで約2年間養成したブリ親魚を用いて産卵期直前に約4週間の長日化处理を

行い、親魚の卵形成に及ぼす影響を検討した結果、長日化処理区の雌親魚群では最大卵巣卵径が無処理区（対照区）よりも有意に増加した。

35) その後、両区の親魚にホルモン注射（HCG）を行い誘発産卵させた結果、長日化処理区の雌親魚では1尾当たり200万粒以上産卵し、また卵質も対照区より優れていた。これらの結果から、産卵期直前の長日化処理がブリの卵形成を促進することが明らかになるとともに、その後にホルモン注射を行って誘発産卵させることにより有効な卵利用が図れると考えられた。

引用文献

- Amend,D.F. and J.P.Pietsch (1972) : Virucidal activity of two iodophors to salmonid viruses.
J. Fish. Res. Board Can., **29**, 61-65.
- Amend,D.F. (1974) : Comparative toxicity of two iodophors to rainbow trout eggs. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **103**, 73-78.
- Amend,D.F. (1976) : Prevention and control of viral diseases of salmonids. *J. Fish. Res. Board Can.*, **33**, 1059-1066.
- 荒川敏久・高屋雅生・北島 力・吉田範秋・山下金義・山本博敬・Izquierdo Marina Soledad・渡辺武 (1987) : シマアジの種苗生産における2, 3の問題について. 長崎県水産試験場研究報告, No.13, 31-37.
- 有元 操・津崎龍雄・宿輪 仁 (1987) : ブリの親魚養成と自然産卵. 栽培技研, **16**, 63-79.
- 有元 操 (1990) : 成体の確保と採卵, ブリ. 日本栽培漁業協会事業年報昭和63年度, 27-29.
- 有元 操 (1991) : 成体の確保と採卵, ブリ. 日本栽培漁業協会事業年報平成元年度, 27-35.
- 有元 操 (1992) : 成体の確保と採卵, ブリ. 日本栽培漁業協会事業年報平成2年度, 29-33.
- Arimoto,M., K.Mushiake, Y.Mizuta, I.Furusawa, T.Nakai and K.Muroga (1992) : Detection of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) from striped jack by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) . *Fish Pathol.*, **27**, 191-195.
- 有元 操 (1993) : 成体の確保と採卵, ブリ. 日本栽培漁業協会事業年報平成3年度, 21-22.
- 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* (Bloch & Schneider) . *J. Fish Dis.*, **16**, 461-469.
- 有元 操・丸山敬悟・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**, 19-24.
- Awaji,M. and I.Hanyu (1989) : Temperature-photoperiod conditions necessary to begin the

- spawning season in wild type medaka. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**, 747.
- Blaxter, J.H.S. and G.Hempel (1963) : The influence of egg size on herring larvae (*Clupea harengus* L.) . *J. Cons.*, **28**, 211–240.
- Bloch, B., K.Gravningen and J.L.Larsen (1991) : Encephalomyelitis among turbot associated with a picorna virus-like agent. *Dis. Aquat. Org.*, **10**, 65–70.
- Breuil, G., J.R.Bonami, J.F.Pepin and Y.Pichot (1991) : Viral infection (picorna-like virus) associated with mass mortalities in hatchery-reared sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae and juveniles. *Aquaculture*, **97**, 109–116.
- Bullock, G.L., R.R.Rucker, D.F.Amend, K.Wolf and H.M.Stuckey (1976a) : Infectious pancreatic necrosis : transmission with iodine-treated and nontreated eggs of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) . *J. Fish. Res. Board Can.*, **33**, 1197–1198.
- Bullock, G.L., H.M.Stuckey and R.L.Herman (1976b) : Comparative susceptibility of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to the enteric red mouth bacterium and *Aeromonas salmonicida*. *J. Wildl. Dis.*, **12**, 376–379.
- Crim, L.W., B.D.Glebe and A.P.Scott (1986) : The influence of LHRH analog on oocyte development and spawning in female Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, **56**, 139–149.
- Desautels, D. and R.M.MacKelvie (1975) : Practical aspects of survival and destruction of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish. Res. Board Can.*, **32**, 523–531.
- Doudoroff, P., B.G.Anderson, G.E.Burdick, P.S.Galtsoff, W.B.Hart, P.Patrick, E.R.Strong, E.W.Surber and W.M.Van Horn (1951) : Bio-assay method for the evaluation of acute toxicity of industrial wastes to fish. *Sewage and Industrial Wastes*, **23**, 1380–1397.
- 江草周三・反町 稔 (1986) : ブリ稚魚の Yellowtail Ascites Virus (YAV) 感染症の病理組織学的研究. *魚病研究*, **21**, 113–121.
- 江草周三 (1990) : ブリ養殖における魚病の経年の多様化. *魚病論考—水産業と魚病*. 恒星社厚生閣, 東京, pp.32–54.
- Elliott, D.G. and D.F.Amend (1978) : Efficacy of certain disinfectants against infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish. Biol.*, **12**, 277–286.
- 福田雅明・矢野 豊・中野 広・杉山元彦 (1986) : クロガシラガレイ稚仔魚の成長に伴うタンパク質と核酸量の変化. *日水誌*, **52**, 951–955.
- 福原 修 (1974) : 初期の飢餓がマダイ仔魚の生残り, 成長および発育に及ぼす影響について. *南西水研報*, No.7, 19–29.

- 福原 修 (1986) : 種苗の健全性. マダいの資源培養技術 (田中 克・松宮義晴編), 恒星社厚生閣, 東京, pp.26-36.
- Fukuhara,O. (1989) : A review of the culture of grouper in Japan. *Bull. Nansei Reg. Fish. Res. Lab.*, No.22, 47-57.
- 古川 清・會田勝美・吉岡 基・佐藤英雄・羽生 功 (1991) : シロギスの産卵リズムに及ぼす光周期と水温の影響. *日水誌*, **57**, 2193-2201.
- Glazebrook,J.S., M.P.Heasman and S.W.de Beer (1990) : Picorna-like viral particles associated with mass mortalities in larval barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *J. Fish Dis.*, **13**, 245-249.
- Gushiken,S. (1983) : Revision of the caragid fishes of Japan. *Publ. Sesoko Mar. Sci. Cent. Univ. Ryukyus*, **2**, 135-364.
- 原田輝雄 (1966) : 人工ふ化, ブリの増殖に関する研究. 近畿大学水産研究所報告, No.1, 24-38.
- 原田輝雄・村田 修・宮下 盛 (1984a) : 養成シマアジの成熟と採卵. 近畿大学水産研究所報告, No. 2, 143-149.
- 原田輝雄・村田 修・宮下 盛 (1984b) : シマアジの人工ふ化飼育. 近畿大学水産研究所報告, No.2, 151-160.
- 長谷川 泉 (1986) : シマアジの親魚養成と産卵. *養殖*, **23**(8), 60-63.
- 広沢国昭 (1972) : ブリの採卵について. *栽培技研*, **1**(2), 17-24.
- Hirose,K. (1980) : Effects of repeated injections of human chorionic gonadotropin (HCG) on ovulation and egg qualities in the Ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **46**, 813-818.
- Iida,T. and M.Sorimachi (1994) : Cultural characteristics of the bacterium causing jaundice of yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Fish Pathol.*, **29**, 25-28.
- 井上 潔・池谷文夫・山崎隆義・原 武史 (1990) : IPNウイルスに対する市販消毒剤の殺ウイルス効果. *魚病研究*, **25**, 81-86.
- 井上 潔・池谷文夫・山崎隆義・原 武史 (1991) : IHNウイルスに対する市販消毒剤の殺ウイルス効果. *魚病研究*, **26**, 189-194.
- 井上 潔・山野恵祐・前野幸男・中島員洋・松岡 学・和田有二・反町 稔 (1992) : 養殖マダいのイリドウイルス感染症. *魚病研究*, **27**, 19-27.
- 石原 忠・保田正人・柏木 哲・八木基明 (1974a) : 海産魚のチアミナーゼの研究-V. カタクチイワシによるハマチの栄養性疾患とB₁の添加効果 (1). *日水誌*, **40**, 675-682.

- 石原 忠・保田正人・柏木 哲・秋山むつ子・八木基明 (1974b) : 海産魚のチアミナーゼ I の研究-IV. カタクチイワシによるハマチの栄養性疾患と B₁ の添加効果 (2) . 日水誌, **40**, 775-781.
- 一色 正・川合研児・楠田理一 (1993) : 採卵用ブリ親魚からの YAV と抗 YAV 中和抗体の検出. 魚病研究, **28**, 65-69.
- 伊藤捷久 (1978) : イシダイの自然産卵による採卵と仔魚のふ化について. 栽培技研, **7**(1), 5-12.
- 岩本 浩 (1981) : シマアジの養殖. 養殖, **18**(1), 74-76.
- Jones,A. (1972) : Studies on egg development and larval rearing of turbot, *Scophthalmus maximus* L., in the laboratory. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, **52**, 965-986.
- 加藤憲司 (1986) : 小笠原におけるシマアジの自然産卵. 養殖, **23**(8), 56-59.
- 加藤憲司・岡村陽一・木村ジョンソン・吉田勝彦 (1990) : 小笠原におけるシマアジの親魚養成と自然産卵. 栽培技研, **18**, 83-90.
- 川辺勝俊・村井 衛・加藤憲司・隆島史夫 (1991) : シマアジ卵発生に及ぼす水温の影響. 水産増殖, **39**, 211-216.
- 河野一利 (1988) : 成体の確保と採卵, ブリ. 日本栽培漁業協会事業年報昭和61年度, 17-18.
- 河野一利 (1990) : 成体の確保と採卵, ブリ. 日本栽培漁業協会事業年報昭和63年度, 21-23.
- 河野一利・虫明敬一・長谷川 泉 (1993) : 成体の確保と採卵, ブリ. 日本栽培漁業協会事業年報平成3年度, 19-21.
- 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. 岡山水試報, **5**, 48-52.
- 慶徳尚寿・安江 浩・田中 実・花岡絹代・中杉祥子・裏崎憲子 (1985) : タイ類種苗生産 1. ふ化仔魚の活力. 広島栽漁協種苗生産業報, No.4, 6-7.
- Kestemont,P. (1988) : Effects of hormonal treatments on induced ovulation in gudgeon, *Gobio gobio* L.. *Aquaculture*, **68**, 373-385.
- Kitajima,C., Y.Yamane, S.Matsui, Y.Kihara and M.Furuichi (1993) : Ontogenetic change in buoyancy in the early stage of red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 209-216.
- 古満目親魚養成前進基地 (1978) : 陸上水槽におけるブリの自然産卵. 栽培技研, **7**(2), 51-54.
- 高知県水産試験場 (1970) : ブリに関する研究. 高知水試調査研究報, **1**, 1-114.
- 楠田理一・井上正彦・杉浦浩義・川合研児 (1993) : 養殖シマアジ病魚から分離された *Mycobacterium* 属細菌の性状. 水産増殖, **41**, 125-131.
- Lasker,R., H.M.Feder, G.H.Theilacker and R.C.May (1970) : Feeding, growth, and survival of

- Engraulis mordax* larvae reared in the laboratory. *Mar. Biol.*, **5**, 345–353.
- Lee, C.S., C.S. Tamaru, G.T. Miyamoto and C.D. Kelley (1987) : Induced spawning of grey mullet (*Mugil cephalus*) by LHRH-a. *Aquaculture*, **62**, 327–336.
- 丸山敬悟・津村誠一・森岡泰三 (1986) : マダイ種苗の健全性に関する試験—1 粗放的生産魚と集約的生産魚の比較. 栽培技研, **15**, 157–167.
- 益田玲爾・塚本勝己・塩澤 聡・今泉圭之輔 (1993) : 九州および小笠原沿岸におけるシマアジの生態. 栽培技研, **22**, 55–65.
- 松本 淳・河野一利 (1985) : シマアジの採卵について. 栽培技研, **14**(1), 35–42.
- 松岡 学・室賀清邦 (1993) : 愛媛県下の養殖海産魚における細菌性疾病発生の歴史 (1966–1992年). 広島大学生物生産学部紀要, **32**, 109–118.
- 松岡 学 (1994) : ハマチ, 魚種別重要疾病の予防と治療. 養殖 (臨時増刊号), **31**(2), 149–151.
- 松浦修平 (1972) : マダイ卵巣卵の成熟過程と産卵数. 九大農学芸誌, **26**, 203–215.
- 松山倫也・松浦修平 (1984) : 琵琶湖産コアユの多回産卵現象. 日水誌, **50**, 183–187.
- Matsuyama, M., M. Hamada, T. Ashitani, M. Kashiwagi, T. Iwai, K. Okuzawa, H. Tanaka and H. Kagawa (1993) : Development of LHRH-a copolymer pellet polymerized by ultraviolet and its application for maturation in red sea bream *Pagrus major* during the non-spawning season. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 1361–1369.
- Mazeaud, M.M., F. Mazeaud and E.M. Donaldson (1977) : Primary and secondary effects of stress in fish : some new data with a general review. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **106**, 201–212.
- Mori, K., T. Nakai, M. Nagahara, K. Muroga, T. Mekuchi and T. Kanno (1991) : A viral disease in hatchery-reared larvae and juveniles of redspotted grouper. *Fish Pathol.*, **26**, 209–210.
- Mori, K., T. Nakai, K. Muroga, M. Arimoto, K. Mushiake and I. Furusawa (1992) : Properties of a new virus belonging to Nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis. *Virology*, **187**, 368–371.
- Mundy, B.L., J.S. Langdon, A. Hyatt and J.D. Humphrey (1992) : Mass mortality associated with a viral-induced vacuolating encephalopathy and retinopathy of larval and juvenile barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *Aquaculture*, **103**, 197–211.
- 村井 衛・青木雄二・西村和久・隆島史夫 (1985a) : 小笠原父島におけるシマアジの親魚養成と採卵. 水産増殖, **33**, 82–87.
- 村井 衛・青木雄二・西村和久・隆島史夫 (1985b) : 小笠原父島沿岸域における天然シマアジの性成熟過程と産卵期. 水産増殖, **33**, 76–81.

- 村井 衛・加藤憲司・中野 卓・隆島史夫 (1987) : シマアジの卵発生と仔魚の形態学的変化. 水産増殖, **34**, 217-226.
- 村井 衛・川辺勝俊・隆島史夫 (1992) : シマアジ卵の最適ふ化塩分および水温. 水産増殖, **40**, 261-268.
- Muroga, K. (1992) : Hatchery diseases of marine fish in Japan. In "Diseases in Asian aquaculture I" (ed. by M. Shariff, R. P. Subasinghe, and J. R. Arthur), Fish Health Section, Asian Fish. Soc., Manila, pp. 215-222.
- 虫明敬一・河野一利・長谷川 泉 (1989) : シマアジの採卵について-II. 栽培技研, **18**, 15-24.
- Mushiake, K., M. Arimoto, T. Furusawa, I. Furusawa, T. Nakai and K. Muroga (1992) : Detection of antibodies against striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) from brood stocks of striped jack. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 2351-2356.
- 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**, 155-160.
- 虫明敬一・中井敏博・室賀清邦・関谷幸生・古澤 巖 (1993a) : 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**, 327-332.
- 虫明敬一・藤本 宏・新聞脩子 (1993b) : ブリふ化仔魚の活力判定の試み. 水産増殖, **41**, 339-344.
- 虫明敬一・新井 茂・松本 淳・新聞脩子・長谷川 泉 (1993c) : モイストペレットで飼育した養殖ブリ2年魚の人工採卵. 日水誌, **59**, 1721-1726.
- Mushiake, K., T. Nishizawa, T. Nakai, I. Furusawa and K. Muroga (1994a) : Control of VNN in striped jack : Selection of spawners based on the detection of SJNNV gene by polymerase chain reaction (PCR). *Fish Pathol.*, (投稿中).
- Mushiake, K., K. Kawano, W. Sakamoto and I. Hasegawa (1994b) : Effect of extended daylength on ovarian maturation and HCG induced spawning of yellowtail fed moist pellet. *Fisheries Sci.* (投稿中).
- Nakai, T., N. Fujiie, K. Muroga, M. Arimoto, Y. Mizuta and S. Matsuoka (1992) : *Pasteurella piscicida* infection in hatchery-reared juvenile striped jack. *Fish Pathol.*, **27**, 103-108.
- Nakajima, K. and M. Sorimachi (1994) : Biological and physico-chemical properties of the iridovirus isolated from cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathol.*, **29**, 29-33.
- 中野 広・白旗総一郎 (1988) : サケの健苗性評価について. 日水誌, **54**, 1263-1269.
- 中谷敏邦・前田辰昭 (1984) : スケトウダラ卵の発生に対する水温の影響およびその浮上速度について. 日水誌, **50**, 937-942.

- 奈良谷 徹 (1994) : シマアジ種苗生産の現状. 養殖, 31(1), 80.
- Nishizawa,T., K.Mori, T.Nakai, I.Furusawa and K.Muroga (1994) : Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) . *Dis. Aquat. Org.*, 18, 103-107.
- 能勢健嗣 (1980) : 養魚と養魚飼料の現状. 魚類の栄養と飼料 (荻野珍吉編), 恒星社厚生閣, 東京, pp.1-11.
- 落合 明・楳田 晋 (1979) : ぶりの成熟と採卵に関する研究. 瀬戸内海栽培漁業協会研究資料, No.12, 1-15.
- 落合 明・鍋島 浩・楳田 晋・長谷川 泉 (1980) : 産卵期中のブリ生殖腺の成熟と体部粗脂肪の量的変化について. 日水誌, 46, 407-412.
- 小川和夫 (1983) : ブリのベネデニア症. 魚病学 (江草周三編), 恒星社厚生閣, 東京, pp.276-279.
- Ogawa,K. (1992) : *Caligus longipedis* infection of cultured striped jack, *Pseudocaranx dentex* (Teleostei: Carangidae) in Japan. *Fish Pathol.*, 27, 197-205.
- 奥村重信・栄 健次 (1993) : ムシガレイにおけるLHRH-a コレステロールペレットの成熟促進効果. 水産増殖, 41, 13-18.
- Peters,G., M.Faisal, T.Lang and I.Ahmend (1988) : Stress caused by social interaction and its effect on susceptibility to *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Dis. Aquat. Org.*, 4, 83-89.
- Renault,T., Ph.Haffner, F.Baudin Laurencin, G.Breuil and J.R.Bonami (1991) : Mass mortalities in hatchery-reared sea bass (*Lates calcarifer*) larvae associated with the presence in the brain and retina of virus-like particles. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 11, 68-73.
- Ross,A.J. and C.A.Smith (1972) : Effect of two iodophors on bacterial and fungal fish pathogens. *J. Fish. Res. Board Can.*, 29, 1359-1361.
- 坂口宏海・竹田文弥・丹下勝義 (1969) : ハマチのビタミン要求に関する研究-I. B₆およびC欠乏症について. 日水誌, 35, 1201-1206.
- 坂口宏海・浜口 章 (1969) : 酸化油添加飼料によるハマチの飼育とビタミンE添加の効果. 日水誌, 35, 1207-1214.
- 佐古 浩・石田典子・前野幸男・反町 稔 (1988) : *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*ならびに *V. ordalii* に対する各種消毒薬の殺菌作用. 魚病研究, 23, 219-229.
- 関谷幸生 (1991) : シマアジの種苗生産技術の開発. 平成元年度飼付け型栽培漁業技術開発報告書 (1) . 日本栽培漁業協会, pp.4-14.

- 関谷幸生 (1992) : シマアジの種苗生産技術の開発. 平成2年度飼付け型栽培漁業技術開発報告書 (2) . 日本栽培漁業協会, pp.10-14.
- 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, No. 2, 11-20.
- 塩澤 聡 (1992) : シマアジの種苗生産技術の開発. 平成2年度飼付け型栽培漁業技術開発報告書 (2) . 日本栽培漁業協会, pp.15-16.
- Snieszko, S.F. (1974) : The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *J. Fish Biol.*, **6**, 197-208.
- Solar, I.I., I.J. Baker and E.M. Donaldson (1987) : Effect of salmon gonadotropin releasing hormone analogue on ovarian hydration and ovulation in captive sablefish (*Anoplopoma fimbria*) . *Aquaculture*, **62**, 319-325.
- 反町 稔・原 武史 (1985) : 腹水症を呈するブリ稚魚から分離されたウイルスについて. 魚病研究, **19**, 231-238.
- 反町 稔・前野幸男・中島員洋・井上 潔・乾 靖夫 (1993) : 養殖ブリ“黄疸症”の原因. 魚病研究, **28**, 119-124.
- 立原一憲・蛭子亮制・塚島康生 (1993) : カンパチの産卵, 卵内発生および仔稚魚の形態変化. 日水誌, **59**, 1479-1488.
- 高野和則 (1989) : 卵巣の構造と配偶子形成. 水族繁殖学 (隆島史夫・羽生 功編), 緑書房, 東京, pp.3-34.
- 滝井健二・中村元二・高岡 治・古田晋一・熊井英水 (1992) : ふ化後におけるマダイ稚仔魚の核酸および一般成分の変化. 水産増殖, **40**, 285-290.
- 田中 眞・鈴木基生・植松新造・五十嵐保正・吉水 守 (1992) : 低濃度のヨードによる伝染性造血器壊死症の発生抑制について. 魚病研究, **27**, 175-176.
- Tanaka, Y. (1990) : Change in the egg buoyancy of Japanese anchovy *Engraulis japonicus* during embryonic development. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**, 165.
- Tanaka, Y., Y. Mukai, K. Takii and H. Kumai (1991) : Chemoreception and vertical movement in planktonic yolk-sac larvae of red sea bream *Pagrus major*. *J. Appl. Ichthyol.*, **7**, 129-135.
- 鳥島嘉明 (1986) : シマアジ. 浅海養殖 ((社)資源協会編), 大成出版, 東京, 266-278.
- 内田恵太郎・道津喜衛・水戸 敏・中原官太郎 (1958) : ブリの産卵および初期生活史. 九大農学芸誌, **16**, 329-342.
- 榎田 晋・広沢国昭・落合 明 (1969) : 高知県古満目漁場に来遊するブリ産卵群とシナホリンによる成熟促進について. 日水誌, **35**, 446-450.

- 楳田 晋・落合 明 (1971) : 産卵期前後における養成ブリの成熟について. 魚雑, **18**, 175-181.
- 楳田 晋・水内俊郎・落合 明・長谷川 泉 (1981) : 催熟したブリ親魚の水槽内産卵について. 栽培技研, **10**(2), 127-131.
- 楳田 晋 (1991) : ブリ. 海産魚の産卵・成熟リズム (水産学シリーズ No. 85, 広瀬慶二編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 92-100.
- Viyakarn, V., T. Watanabe, H. Aoki, H. Tsuda, H. Sakamoto, N. Okamoto, N. Iso, S. Satoh and T. Takeuchi (1992) : Use of soybean as a substitute for fish meal in a newly developed soft-dry pellet for yellowtail. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 1991-2000.
- 和田新平・畑井喜司雄・窪田三朗 (1991) : 養成シマアジに見られた黄色脂肪症の病理組織学的所見. 魚病研究, **26**, 61-67.
- Watanabe, T., T. Arakawa, C. Kitajima and S. Fujita (1984a) : Effect of nutritional quality of broodstock diets on reproduction of red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **50**, 495-501.
- Watanabe, T., S. Ohhashi, A. Itoh, C. Kitajima and S. Fujita (1984b) : Effect of nutritional composition of diets on chemical components of red sea bream broodstock and eggs produced. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **50**, 503-515.
- Watanabe, T., A. Itoh, C. Kitajima and S. Fujita (1984c) : Effect of dietary protein levels on reproduction of red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **50**, 1015-1022.
- Watanabe, T., A. Itoh, A. Murakami, Y. Tsukashima, C. Kitajima and S. Fujita (1984d) : Effect of nutritional quality of diets given to broodstock on the verge of spawning on reproduction of red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **50**, 1023-1028.
- 渡邊 武 (1985) : 親魚飼料. 養魚飼料 (水産学シリーズ No. 54, 日本水産学会編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 135-145.
- Watanabe, T., A. Itoh, S. Satoh, C. Kitajima and S. Fujita (1985a) : Effect of dietary protein levels and feeding period before spawning on chemical components of eggs produced by red sea bream broodstock. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **51**, 1501-1509.
- Watanabe, T., T. Koizumi, H. Suzuki, S. Satoh, T. Takeuchi, N. Yoshida, T. Kitada and Y. Tsukashima (1985b) : Improvement of quality of red sea bream eggs by feeding broodstock on a diet containing cuttlefish meal or on raw krill shortly spawning. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **51**, 1511-1521.
- Watanabe, T., M. Lee, J. Mizutani, T. Yamada, S. Satoh, T. Takeuchi, N. Yoshida, T. Kitada and T. Arakawa (1991a) : Effective components in cuttlefish meal and raw krill for improvement

- of quality of red sea bream *Pagrus major* eggs. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 681–694.
- Watanabe,T., T.Fujimura, M.Lee, K.Fukusho, S.Satoh and T.Takeuchi (1991b) : Effect of polar and nonpolar lipids from krill on quality of eggs of red sea bream *Pagrus major*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 695–698.
- Watanabe,T., H.Sakamoto, M.Abiru and J.Yamashita (1991c) : Development of a new type of dry pellet for yellowtail. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 891–897.
- Wedemeyer,G.A. (1970) : The role of stress in the disease resistance of fishes. *Spec. Publ. Am. Fish. Soc.*, **5**, 30–35.
- Wedemeyer,G.A. and C.P.Goodyear (1984) : Diseases caused by environmental stressors. In “Diseases of marine animals” Vol. IV, Part 1. (ed. by O.Kinne) , Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, pp.424–434.
- Wolf,K. (1988) : Infectious pancreatic necrosis. In “Fish viruses and fish viral diseases” , Cornell Univ. Press, Ithaca (N.Y.) , pp.115–157.
- Yamamoto,K. and H.Yoshioka (1964) : Rhythm of development in the oocyte of the medaka, *Oryzias latipes*. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, **15**, 5–19.
- Yamaoka,K., H.-S.Han and N.Taniguchi (1992) : Genetic dimorphism in *Pseudocaranx dentex* from Tosa Bay, Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 39–44.
- Yoshikoshi,K. and K.Inoue (1990) : Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel) . *J. Fish Dis.*, **13**, 69–77.
- Zhu,Y., K.Furukawa, K.Aida and I.Hanyu (1991a) : Effects of water temperature and photoperiod on the initiation and termination of the autumn spawning season in tobinumeri-dragonet *Repomucenus beniteguri*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 1871–1876.
- Zhu,Y., K.Furukawa and K.Aida (1991b) : Effects of photoperiod on spawning rhythm in the tobinumeri-dragonet *Repomucenus beniteguri*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 2033–2037.

SUMMARY

Part I

Striped jack *Pseudocaranx dentex* (Bloch et Schneider), Shimaaji in Japanese, is distributed in warm coastal waters around Japan from south of the central part of Honshu to Kyushu and Ogasawara Islands. In Japan, this fish species is known as one of the most

delicious and expensive fish.

This part describes the technical development of brood stock management, induction of spawning, eggs management, and evaluation of the larval activity in striped jack.

1) Yearly management of brood stocks was performed by dividing into 3 periods, breeding period (June to October), maturation period (November to January in the following year), and spawning period (February to May) according to the state of gonadal maturation of fish.

It was found appropriate to feed them on moist pellet in breeding period and on mixed trash fish in maturation and spawning periods.

2) When brood stocks were found attached by a skin parasite, *Caligus longipedis*, on their body surface, fish were anesthetized and immersed in fresh water on the occasion when they were transferred to tanks or the floating net-cage in order to minimize the stress effects to fish.

3) Mature striped jack were subjected to each treatment of the followings ; A : water temperature was kept constantly at 22 °C, B : water temperature was raised intermittently from 20 °C to 22 °C, C : water temperature was kept at 22 °C and HCG (human chorionic gonadotropin) was injected, D : water temperature was subjected to the natural fluctuation (16.4~ 22.9 °C), E : water temperature was subjected to the natural fluctuation but controlled not to exceed 20 °C.

4) Spawning occurred in any fish treated with the above 5 methods, however the most largest quantities of larvae were obtained from spawners treated by the method C. This method was applicable even to virgin spawners or immature fish with lower gonado-somatic index (GSI).

5) Brood stocks that had experienced spawning before were effectively induced to spawn by the method A.

6) The method E was conducted to make the spawning period last longer, however, this method resulted in giving heavier stress on the fish by repeated spawning for longer period.

7) Smaller number of eggs was obtained by the method D than other methods, but mean diameter of eggs obtained by this method were larger by 40 μ m than those obtained by the method C throughout the spawnin season.

8) Effects of the following two handling methods on egg qualities and survival activity index (SAI : survivability in starvation test) of larvae of striped jack were studied : In the first method eggs were passed through a nylon cloth filter to remove the trash, and in the

second method floating eggs were scooped up by using a beaker. As a result, the eggs treated by the latter method showed higher hatching rate than those treated by the former method by 3 times. Moreover, the SAI value of larvae from the latter method was higher than that treated by the former method.

9) Striped jack eggs in a net (ca 400 l) installed in a hatching tank (10 kl) showed the highest hatching rate under a condition of moderate aeration (700 ml/min) and moderate water supply (6.5 l/min). The highest limit of eggs to be accommodated in one net was found 1.0×10^6 .

10) The specific gravity of striped jack eggs was constant (1.0252 g/cm^3 ; slightly lower than that of sea water) from spawning to 30 h post-spawning. The gravity gradually increased from 36 h post-spawning and reached the maximum density ($1.0264 \sim 1.0274 \text{ g/cm}^3$) at just before hatching and eggs sank to the bottom of the net. This result indicates that the management of eggs at just before hatching is important for larval production.

11) Starvation tests were carried out mainly at 22°C in order to evaluate the activity of striped jack larvae. The larvae showing higher SAI values (>6) in the starvation test also showed higher survival rates in actual seed production process.

12) SAI values of the larvae, which were produced by keeping the spawners constantly at 22°C of water temperature, gradually decreased as spawning was repeated from March to May, while the value of the larvae from spawners kept intermittently at 22°C did not decrease even at the late spawning season. The larvae floating on the surface of stagnant water in the hatching tank showed higher SAI than non-floating larvae.

13) These results suggest that the SAI value is considered to reflect the activity of striped jack larvae, and it can be used as a practical indicator of the larval activity in the seed production. In addition, from the result of experiments on temperature effect, there was a correlation between water temperature (x_1) and SAI (y_1) as the following equation at the temperatures from 19 to 24°C ;

$$y_1 = -1.16 x_1 + 48.81 \quad (r = -0.9982)$$

And a revised equation to the SAI value (y) at 22°C was contrived as follows;

$$y = y_1 + 1.16 (x_1 - 22) \quad (19 \leq x_1 \leq 24)$$

14) There were no relationships between SAI and properties of eggs, *i.e.*, floating rate, fertilization rate, hatching rate, egg diameter, or diameter of oil droplet.

Part II

Japan Sea-Farming Association (JASFA) started a program for seed production of striped jack in 1978 and 800×10^3 juveniles were produced in 1988 owing to technical development in artificial spawning and rearing of larvae and juveniles. In 1989, however, viral nervous necrosis (VNN) disease was first recognized in produced larvae at Komame and Goto stations of JASFA and has been causing considerable losses during the last 5 years, particularly in 1990 when no juveniles were produced due to the disease. The agent was purified from diseased larvae and identified as a member of the family Nodaviridae, and the virus was designated SJNNV (striped jack nervous necrosis virus).

In this part, prevention of vertical transmission of SJNNV in seed production was attempted mainly by selecting viral-free spawners.

15) The prevalence of antibodies against the causative virus (SJNNV) was examined among brood stocks of striped jack by indirect ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), using partially purified plasma IgM, purified SJNNV, rabbit anti-SJNNV serum, and enzyme-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody. As a result, the antibody to SJNNV was detected at high frequency (65%) in plasma samples collected from brood stocks reared at various facilities regardless of their sex or origin (wild or domestic). This indicates that the virus is prevalent among cultured populations of this fish species.

16) Plasma antibodies against SJNNV were monitored in spawners reared at Komame Station of JASFA for about 2 years. There were no apparent seasonal changes in the antibody titer level, though it tended to decrease towards July.

17) In 1991, seed production was conducted by using specific antibody-positive and -negative spawners both induced to spawn by keeping continuously at higher temperature (22 °C), and VNN occurred. In 1992, mainly antibody-negative spawners were induced to spawn intermittently to minimize the stress effects, and VNN did not occur. This result suggested that VNN could be controlled by selection of spawners based on antibody detection and improvement of spawning induction method.

18) However, in some cases of seed production conducted later, VNN occurred even in the larvae obtained from antibody-negative spawners. Thus, a more sensitive detection method of the virus was required for the better selection of spawners. Detection of SJNNV from fish was made by amplifying a target sequence (T4) of the coat protein gene (RNA2) by PCR (polymerase chain reaction). Four spawner groups were examined at one month

intervals for the presence of SJNNV in their gonads and their offsprings (eggs and larvae) were subjected to rearing experiments to observe occurrence of VNN.

19) Detection rates of both SJNNV gene and plasma antibodies increased as spawnings were repeated in any groups. However, the presence of antibodies in the plasma was not always correlated with the presence of SJNNV in the gonad.

20) VNN did not occur in larvae obtained from SJNNV gene-negative spawner groups, but broke out in larvae from spawner groups including SJNNV gene-positive fish. The virus gene was not detected from eggs at any spawnings in any groups.

21) These results suggest that the selection of striped jack spawners based on the detection of SJNNV gene from gonads by PCR just before spawning is efficacious for the prevention of vertical transmission of SJNNV in seed production.

22) Although both ELISA and PCR were available to detect SJNNV from larvae, the latter method was found more sensitive than the former method.

23) From the standpoints of normal development of eggs, hatching rate, and the activity of larvae, a disinfection treatment of striped jack eggs (developmental stage on and after germ ring) by immersion in iodine solution (80 mg/l) at 22 °C for 15 min was found safe. However, the *in vivo* effectiveness of iodine treatment of eggs for the control of VNN was not observed.

Part III

Yellowtail *Seriola quinqueradiata* is one of the most important species in marine fishery resources and aquaculture in Japan. Great amounts of seed of this species are needed for augmentation of natural population and for net cage culture. However, it has become difficult to collect eggs from wild yellowtail, because the population of the fish in natural resources has decreased remarkably in recent years. This has made us dependent on reared yellowtail as primary candidates for spawners in order to obtain a large amount of eggs needed for seed production. In addition to the quantity of eggs, the quality of produced larvae and juveniles obtained from cultured brood stocks should be comparable with those from wild fish.

The purpose of this study was to establish the method for yellowtail brood stock management, including proper diets for maturation and spawning of the fish, and final maturation of spawners by extended photoperiods.

24) It is sometimes difficult to keep yellowtail in good health conditions by feeding on frozen or fresh trash fish because these diets are not always nutritionally satisfactory for yellowtail, especially spawners. Therefore, it was considered necessary to develop proper moist pellet or dry pellet for yellowtail spawners.

25) Among yellowtail spawners injected with HCG (human chorionic gonadotropin) ranging 300~1200 IU/kg BW, the highest number of eggs and the highest floating rate were obtained from the fish injected with a dosage of 600 IU/kg BW.

26) The specific gravity of yellowtail eggs ranged 1.0232~1.0252 g/cm³ until 48 h after fertilization. The gravity gradually increased from 54 h post-fertilization, and reached the maximum (1.0263~1.0274 g/cm³) just before hatching at about 60 h of post-fertilization. These results suggest that aeration and water supply are important at the period just before hatching as in the case of striped jack eggs.

27) Starvation tests were conducted during 1987 to 1991 mainly at 20 °C in order to evaluate the activity of yellowtail larvae. The larvae showing higher SAI values in the starvation test also showed higher survival rates in the rearing test from 0 to 10 days after hatching. The larvae floating on the surface of the hatching tank when water turbulence was stopped showed higher SAI than non-floating larvae.

28) The larvae obtained from younger spawners (3⁺) showed higher SAI than those from the older fish (5⁺, 6⁺) in starvation test. There was a positive correlation between the SAI and hatching rate.

29) These results suggest that the SAI value reflects the activity of yellowtail larvae, and can be used as a practical indicator of the larval activity in the seed production. Based on the results of experiments on temperature effect, the following equation between SAI (y_1) and water temperature (x_1) was introduced within a range of temperatures from 18 to 24 °C ;

$$y_1 = -1.13 x_1 + 38.75 \quad (r = -0.9935)$$

And a revised equation to the SAI value (y) at 22 °C was contrived as follows ;

$$y = y_1 + 1.13 (x_1 - 20) \quad (18 \leq x_1 \leq 24)$$

30) Five experiments on the effect of diets on maturation were carried out in 5 years using 4 year-old cultured yellowtail. In every experiment one group was fed frozen trash fish (TF group) and the other was fed moist pellets (MP group) for 5 months. Eggs and milt were stripped from the females and the males after hormone (HCG) injection, and fertilized by dry method of insemination.

31) As a result, approximately 700×10^3 eggs/fish were collected from the fish groups fed moist pellet, supplemented vitamin E, squid liver oil, and carotenoid oil extracted from krill, while about $300 \sim 400 \times 10^3$ eggs/fish were collected from TF groups. These results demonstrated that 2 year-old cultured yellowtail fed moist pellets can be used as spawners. Also improved moist pellets that was supplemented with vitamin E, squid liver oil, and carotenoid oil facilitated the larval production.

32) Three spawner groups fed trash fish (TF), moist pellet (MP), or dry pellet (DP) were compared in maturation and spawning by spontaneous spawning. The highest number of eggs was collected from MP group followed by DP group, and smallest amount of eggs were obtained from TF group. However, the qualities of eggs represented by floating eggs rate, fertilization rate, and hatching rate were superior in the DP group to the MP group. These results suggest that DP can be also used for rearing yellowtail spawners.

33) The effect of extended daylength (18:00~24:00) on maturation of the ovary and spawning of cultured yellowtail fed moist pellet was examined. In the experiments conducted in 1991, 1992 and 1993, the daylength was extended by 6 h for 20 or 28 days followed by an injection with the hormone, HCG. Female yellowtail brood stocks kept under extended daylength were induced to be matured more rapidly than those kept under natural lighting conditions.

34) The mean number of eggs produced per fish amounted to more than 2×10^6 in the extended daylength groups, while it was about 1×10^6 eggs in the control groups. The rate of normal eggs, rate of hatching, rate of normal larvae, and SAI of larvae obtained from the extended daylength groups were significantly higher ($p < 0.01$) than those of the control fish.

35) These results demonstrate that manipulation of daylength is an effective method for acceleration of final maturation in female brood stocks of yellowtail.