

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450271

研究課題名(和文) 難種苗生産魚種の飼育環境制御による革新的生産システムの開発

研究課題名(英文) Development of an innovative production system by controlling the rearing environment of fish species that are difficult to produce

研究代表者

石橋 泰典 (ISHIBASHI, Yasunori)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：90247966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：マグロ類，ブリ類，ハタ類の量産が困難な難種苗生産種に共通する摂餌不良，浮上死，沈降死の初期減耗対策に焦点を絞り，様々な検討を行った。まず，対象種の各種視物質オプシン遺伝子を調べた結果，どの魚種も3種類以上が発現し，スマおよびクエは10種以上も発現することがわかった。また，仔魚のオプシン遺伝子の発現様式が魚種で異なり，一部の遺伝子が特定の時期に発現または消失すること，特定の波長光で摂餌，行動等が制御できること等が示唆された。さらに，丸底水槽の使用で対象種の生残率が顕著に優れること，クロマグロでは初期減耗期に限定した高密度生産が可能なこと等，飼育環境制御による新しい種苗生産法のモデルが開発された。

研究成果の概要(英文)：To control mass larval death due to poor feeding, surface death, and sinking death, some experiments were performed in tuna, amberjack, and grouper, species that are difficult to mass produce. Investigation of opsin gene expression in the target species revealed that at least three opsin genes were expressed in a given fish species, and kawakawa (*Euthynnus affinis*) and longtooth grouper (*Epinephelus bruneus*) expressed >10 opsin genes. It was also suggested that the opsin gene expression in larvae differ among fish species, and food intake, behaviors, and frequency of surface death can be controlled using light of specific wavelengths. Additionally, a model of a new seed production system was developed, which includes the usage of a round bottom tank to enhance the survival rate in some target species and for high-density production during the larval death period in Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*).

研究分野：水産増殖学

キーワード：仔稚魚 難種苗生産魚種 種苗生産 飼育方法 飼育環境 流動制御 光環境 高密度

## 1. 研究開始当初の背景

近年、海産魚の種苗生産技術が急速に発展し、栽培漁業、養殖業が盛んになった。しかし、現在の種苗生産技術でも、マグロ類、ブリ類、ハタ類のように量産化がまだ困難な高級魚が残されており、難種苗生産魚種と称される。これらの魚種は、日本を始め、世界の国々でも需要の高いことが知られている。

マグロ類は、クロマグロを中心に国内での種苗生産技術の開発が目覚ましい。申請者らは、共食い、衝突死等の主な原因を解明し、夜間の電照飼育、水槽の壁面模様等の様々な対策技術を開発した。しかし、初期減耗については、原因が解明されつつあるものの、対策は技術者の技量によるところが大きい。

一方、ブリ類は、世界的に需要が大きく、国内でも古くから養殖が盛んである。近年、カンパチの天然輸入種苗に寄生虫が発見されてからは、安全な国内産人工種苗の要望が高まった。現在は、産卵、共食いの問題が緩和され、人工種苗が生産されるが、沈降死等の初期減耗が課題の一つとして残される。

他方、ハタ類は、熱帯から温帯に幅広く生息し、高級魚としての地位を保ってきたが、乱獲による資源量の減少が心配されて久しい。日本でも需要は高いが、良質卵の採取や小型生物餌料の確保がネックとなり、技術開発はそれほど進まなかった。近年、多くの問題が改善され、種苗生産が可能になったが、現在でも初期減耗、形態異常の発生が著しい。

このように、マグロ類、ブリ類、ハタ類種苗の生産技術革新に対しては世界的にも期待が大きいですが、それが困難な原因には意外と共通点が多く、いずれもふ化後数日以内にみられる摂餌不良、浮上死、沈降死等の初期減耗が産業的量産化を妨げているのである。

現在、浮上死の対策としては、飼育水に油脂を添加し、表面張力を低下させて仔魚の水面吸着を防ぐ方法が一般的に行われる。この方法は、生産現場で利用されるが、油膜が仔魚の鰾開腔行動を阻害するため、後に鰾の形成不全に伴う形態異常等を増加させる。一方、沈降死に対しては、夜間の通気量制御等で生残率が改善されるが、水槽形状が施設毎で異なるために流動の把握が困難で、技術者の技量によるところが大きい。また、沈降現象は夜間に仔魚の体比重が高まることで発生するが、鰾開腔の有無が仔魚の体比重に直接影響するため、浮上死と沈降死の対策がそれぞれ相殺し合って生産効率を下げている。さらに、これらの魚種はいずれも卵質が不安定で、給餌開始期に摂餌不良を起こしやすい。

多くの海産仔魚は水面で空気を飲み込むことで、気道を通じた鰾の開腔を行うが、最近、クロマグロの鰾開腔が3日齢に起きる事が見出された。一方、浮上死は鰾開腔日の高照度で発生し易いが、ヒラマサは逆に高照度で鰾開腔率が高くなる。他方、海産仔魚の網膜は摂餌とともに機能するが、摂餌開始期にどの程度発達するかについては不明な点が多

い。すなわち、摂餌開始数日後の光の強度と波長が、摂餌量、鰾開腔率、浮上死率に直接影響する可能性が高いと考えられる。また、鰾開腔率が高ければ、後の形態異常が減り、夜間の体比重増加が抑えられて沈降死も減るため、特定波長光に対する行動の知見は重要な情報になる。さらに、現行の夜間の通気量制御は技術者の技量によるために生残率が不安定であり、適切な光環境下で別の流動制御法を開発することが急務と考えられる。

流動制御は、大型水槽を使うよりも、循環流を形成し易い特定形状の中・小型水槽の方が管理し易い。また、浮上死や沈降死は、主に10日齢までの飼育初期に発生するが、この時期は成長が遅く、魚体が小さい。このため、10日齢までの飼育初期に限定すれば高密度生産が可能と考えられる。すなわち、流動を調整し易い形状の水槽と制御法、適切な光環境を用いれば、初期減耗の発生期だけ複数の小型水槽で仔魚を高密度生産することが可能と考えられる。沈降現象が終わった後に、最も状態の良い水槽群を選抜して大型水槽へ広げる方法が開発できれば、安定的な生産方法として合理的である。しかし、光環境、水槽形状、流動制御法等を組み合わせる中・小型水槽を効率的に管理し、初期減耗の発生期間だけ、高密度飼育で対応する生産システムの知見は、見受けられない。

## 2. 研究の目的

本研究は、マグロ類、ブリ類、ハタ類の難種苗生産魚種で共通して起きる摂餌不良、浮上死、沈降死等の初期減耗に焦点を絞り、新しい種苗生産システムの開発に向けて様々な取り組みを行った。具体的には、まず、対象種の視覚について魚種間で比較を行い、仔稚魚の視物質オプシン遺伝子の発現様式等を調べた。また、光の強度、波長等が仔稚魚の遊泳行動、摂餌率、飼育成績等に及ぼす影響を検討した。続いて、優れた光環境下で飼育水の流動を好適に制御できる水槽と制御方法の検討を行った。さらに、仔魚の高密度飼育の上限値を調べ、初期減耗期に限定した特殊な飼育方法を見出すことで、対象種の種苗生産技術を大きく変えるような生産方式の開発を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 光波長特性

#### a. 視物質オプシン遺伝子の同定

スマおよびキハダ(マグロ類)、カンパチ(ブリ類)、並びにクエ(ハタ類)の稚魚、成魚をそれぞれ取り上げ、麻醉・即殺後に RNA later 溶液中で網膜を採取して、冷凍保存した。DNA および RNA を抽出後、RNA を逆転写して、cDNA 合成した。得られた各種 DNA を PCR し、電気泳動でバンドを検出した。各魚種の DNA 断片を目的のバンドから抽出し、TA クローニング後に、シーケンシングを行った。得られた塩基配列を BLAST 検索にかけ、既報

の視物質オプシン遺伝子との相同性を確認した。なお、クエおよびスマについては、中村らのクロマグロ用プライマーも使用し、詳しく検討した。

#### b. 分光応答および暗所視感度特性

明順応および暗順応下でクエの網膜電図による分光応答をそれぞれ測定した。具体的には、クエ稚魚(10ヶ月齢)を麻酔後に不動化し、口から海水を還流して呼吸を維持した。キセノン灯(150 W)と分光器によって得た単波長光(340-640 nm)を刺激光源とした。明順応時の光子量は、ND フィルターを使い、 $1 \times 10^{15}$  photons/cm<sup>2</sup>/s に、暗順応時のそれは  $6.3 \times 10^{11}$  photons/cm<sup>2</sup>/s にそれぞれ統一し、眼球に照射(300ms)した。網膜で発生した電圧を銀線電極で検出し、増幅器、AD変換器を経由してPCに取り込んだ。明順応の実験は昼間に、暗順応の実験は夜間に行った。また、明順応の測定時には刺激光源とは別に電球を点灯し、網膜の明順応を維持した状態で測定した。暗所視感度は、分光応答とほぼ同じ網膜電図用の実験装置で測定した。すなわち、光源に503 nmの緑色LEDによる単色光を使い、光の強度を段階的に変えて、生じた電圧を網膜活動の指標にした。

#### (2) 仔稚魚におけるオプシン遺伝子の発現解析と摂餌、行動等に及ぼす光波長の影響

上記(1)で使用した特異的プライマーを用い、クロマグロ、キハダ、カンパチおよびクエ仔稚魚の発育に伴うオプシン遺伝子の発現解析を行った。特に、クエの視物質オプシン遺伝子は、特異的プライマーとクロマグロ用プライマーを併用し、4日齢から10ヶ月齢の仔稚魚を用いて詳しく検討した。

光波長の影響を見るため、クロマグロ仔魚等を赤外線ビデオカメラ付き小型チャンバーに収容し、白、UV、青、緑および黄色LEDの光強度に対する浮遊、沈降等の遊泳行動を調べた。また、ピーカーに各種日齢のクロマグロ、キハダ、クエ仔魚等を収容し、一定光子量の上記LEDおよび暗黒下で、腸管ワムシ数を測定した。さらに、同じ光環境下で日齢の異なるクロマグロおよびクエ仔魚を収容し、浮上死亡率等をそれぞれ比較した。

#### (3) 対象種毎の飼育水流動制御法

クロマグロ、キハダ、カンパチおよびクエ仔魚の初期減耗を軽減するため、飼育水の流動条件が生残率等に及ぼす影響を調べた。すなわち、水槽形状および水流発生法の異なる200 L透明水槽に対象種の卵をそれぞれ収容し、10日齢まで飼育して、飼育成績を求めた。試験区は、平底および丸底水槽に通気を設けた平底および丸底通気区、水槽の中央排水管内に下向き水中ポンプを設けた平底および丸底循環区の4試験区とした。続いて、適切な流動条件を検討するため、丸底水槽に一部の対象種仔魚を収容し、通気量が40~600 ml/

分、ポンプ流量が0.5~6.0 L/分の試験区を設けて、飼育成績を比較した。

#### (4) 初期減耗期に限定した高密度飼育法

流動が優れた環境下で初期減耗を軽減し、どの程度の高密度飼育ができるかを検討した。すなわち、ポンプ循環式の200L丸底水槽に0.3万~10万尾/m<sup>3</sup>の密度でクロマグロ仔魚を収容し、飼育成績を比較した。続いて、大型水槽で初期減耗期に限定した高密度飼育の影響を試行的に調べた。具体的には、クロマグロ仔魚を複数の底面円錐型水槽に従来の10倍程度の密度で収容し、通常のコンクリート水槽のそれと飼育成績を比較した。

### 4. 研究成果

#### (1) 光波長特性

##### a. 視物質オプシン遺伝子の同定

クエ、スマ、キハダ、カンパチ等の各種オプシン遺伝子を解読したところ、どの魚種でも3種類以上のオプシン遺伝子の発現が確認された。詳細に調べたクエ2歳魚の網膜からは、オプシン遺伝子コード領域の塩基配列が10種類 [Rh1(桿体); Rh2A1-1, Rh2A1-2, Rh2A2, g6738, g6740(緑錐体); SWS1(UV錐体); SWS2A1, SWS2A2(青錐体); LWS(黄-赤錐体)]同定された。また、同様にスマからは、オプシン遺伝子コード領域の塩基配列が11種類 [Rh1; Rh2A1, Rh2A2, g6738, g6740, Rh2B1, Rh2B2; SWS1; SWS2A, SWS2B; LWS] 解読された。海産魚から5種類以上のRh2関連遺伝子が見つかった例は少ない。これより、クエおよびスマが、広帯域の可視波長域を持つこと等が示唆された。

##### b. 分光応答および暗所視感度特性

明順応: クエ10ヶ月齢魚の昼間における明順応の分光応答曲線を図に示した(図1)。

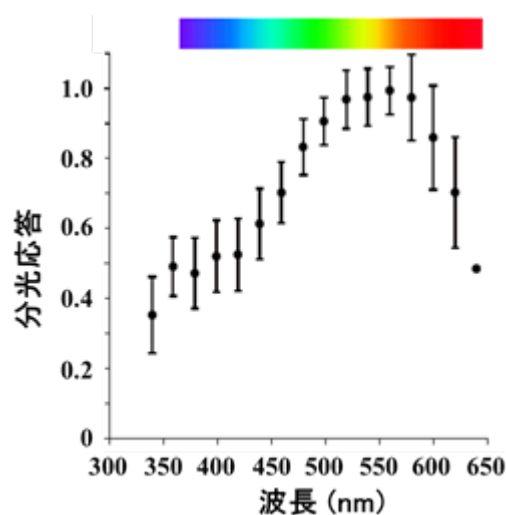


図1. 明順応したクエ10ヶ月齢魚の分光応答

光強度を $10^{15}$ に統一した時の電圧を相対値で縦軸に示し、横軸には光の波長を示した。この図よりクエは見える光の波長が幅広く、最大感度が580 nm付近にあることがわかった。

た。400 から 580 nm の可視光の範囲では、RT-PCR で検出された 3 種類のオプシン遺伝子に対応するピークが観察された。すなわち、感度の高い順に、LWS = 580 nm, Rh2 = 500 nm, SWS2 = 400 nm 付近であることが示唆された。水中での減衰が大きい長波長光を感じる LWS オプシンを発現し、580 nm 付近に最大感度があることは、沿岸の比較的浅い水深に多く生息するクエの生態に関連すると考えられた。2 歳魚では SWS1 オプシン遺伝子 (Violet-UV) は RT-PCR によって検出されず、10 ヶ月齢魚でも SWS1 の発現量が低くなっていた。しかし、10 ヶ月齢魚の網膜電図では 360 nm 付近に小さなピークが観察された (図 1)。360 nm 付近の UV 感度ピークは、SWS1 以外の視物質が紫外部にもつ 2 番目の感度ピーク、すなわち、バンドによるものと考えられた。

暗順応: クエ 10 ヶ月齢魚の夜間暗順応時の分光応答曲線を調べたところ、夜間には感度の高い桿体が主に働くため Rh1 オプシンによる 500 nm 付近に感度のピークが見られた。また、昼間と同様に 360 nm 付近ではバンドによると考えられる 2 番目のピークが観察された。これより、クエの眼は夜間も緑色の光が多い沿岸の光環境に適応していること、バンドによる UV 感度により、見える波長の範囲が広いこと等が示唆された。

暗所視感度: 暗所視感度の測定に際し、網膜電図で電圧が 0 になる閾値を求めることが困難なため、反応が最大値の 5% になる値、すなわち、相対値が 0.05 に達する光の強さの対数値を  $\text{Log}(0.05 I)$  として閾値の代わりに用いた。その結果、クエは、既報のクロマグロやマサバより感度が高く、シマアジと同様に暗所視感度の高いこと等が示唆された。

## (2) 仔魚におけるオプシン遺伝子の発現解析と摂餌、行動等に及ぼす光波長の影響

クロマグロ、キハダ、カンパチおよびクエの各種オプシン遺伝子の発現様式は魚種によって異なり、一部のオプシン遺伝子が特定の時期に発現または消失する傾向が観察された。また、クロマグロ仔魚では、摂餌開始期にはほとんどの視細胞オプシン遺伝子が発現しており、摂餌開始期から多くの波長光を視認できる可能性のあることが示唆された。一方、クエ仔魚の各種オプシン遺伝子の発現解析を行った結果、14~40 日齢の仔魚期に LWS の発現が見られなくなった (図 2)。また、発育に伴って SWS1 から SWS2 へオプシン遺伝子が入れ替わる傾向が観察され、発育初期に視感度特性の変化すること、特定の波長光が種苗生産に利用できる可能性の高いこと等がそれぞれ示唆された。

キハダ、スマ、カンパチおよびクエ仔魚の沈降頻度、遊泳行動、速度は、日齢、光波長、光強度によって異なること等が示唆された。また、魚種、発育段階で多少は異なるものの、クロマグロ仔魚では、特定の波長光で摂餌活性、遊泳速度、浮遊率、浮上死発生率等の高

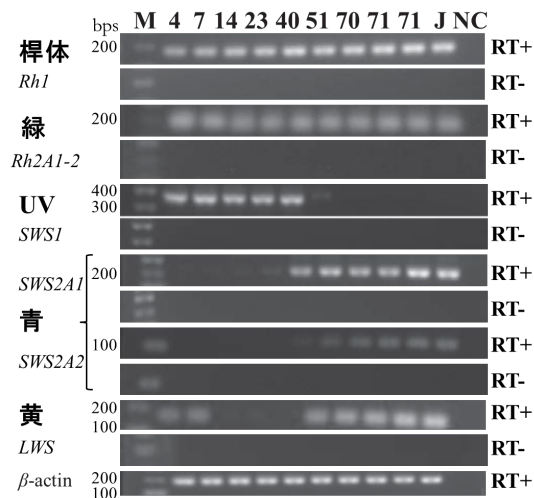


図 2. クエ仔稚魚の発育に伴うオプシン遺伝子の発現様式. M, ladder marker; NC, negative control (without samples); Nos. 4-71 日齢仔魚; J, 10 ヶ月齢稚魚; RT+, reverse-transcribed samples; RT-, minus reverse transcriptase (“-RT”) controls.  $\beta$ -actin の発現は positive control として示した。

まることがそれぞれ示された。すなわち、仔魚期の初期は各種波長光で摂餌、行動、飼育成績等を制御できる可能性の高いことが、示唆された。

## (3) 対象種毎の飼育水流動制御法

クロマグロ、キハダおよびカンパチ仔魚の飼育成績は、下部が半球状の水槽底面に水を噴射する丸底循環方式で優れていた。一方、クエでは、底面が半球状の水槽でエアレーションを施す丸底通気区の生残率および成長が優れていた。どの魚種でも底面が半球状の水槽を用いることで優れた飼育成績が得られたが、魚種によって適正な流速に大きな違いのあること等が示唆された。

## (4) 初期減耗期に限定した高密度飼育法

クロマグロでは、10 日齢の生残率と成長が密度の増加に応じてわずかに低下したが、10 万尾/ $\text{m}^3$  の仔魚生産数は 0.3 万粒/ $\text{m}^3$  のその数倍以上になり、高密度飼育が有効なことが示唆された。すなわち、クロマグロ仔魚は、従来の数倍以上の高密度でも 10 日齢程度までは飼育できることが示唆された。

これらの実用性を見るため、1  $\text{m}^3$  底面円錐型水槽の高密度飼育と 20  $\text{m}^3$  コンクリート水槽の通常飼育と比較した結果、生残率等に差は無かった。すなわち、最適な水槽形状、流動条件下で、3~10 万粒/ $\text{m}^3$  の卵を収容しても生残率が高く、初期減耗期だけ複数の 1~2  $\text{m}^3$  程度の小型水槽で高密度生産し、全長 5mm 以降に状態の良い水槽群を選んで大型水槽へ広げる方法が効率的であることが示唆された。これより、新しい種苗生産モデルが開発され、今後さらに効率化を目指して詳細を検討する必要があると考えられた。



5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Taro Matsumoto, Yasunori Ishibashi, Sequence analysis and expression patterns of opsin genes in the longtooth grouper *Epinephelus bruneus* Fisheries Science, 査読有, Vol. 82, 17-27, 2016.

Taro Matsumoto, Yasunori Ishibashi, Electroretinographic evaluation and SWS1 opsin gene expression in vision of juvenile longtooth grouper *Epinephelus bruneus* (Bloch, 1793) Marine & Freshwater Behaviour & Physiology, 査読有, Vol. 48, 381-395, 2015.

Taro Matsumoto, Yasuo Agawa, Tokihiko Okada, Yoshifumi Sawada, Yasunori Ishibashi, Opsin gene analysis in the cultured kawakawa *Euthynnus affinis*, Aquaculture Science, 査読有, Vol. 63, 179-189, 2015.

[学会発表](計11件)

池田大起, 石橋泰典, 飼育水の流動条件がクエ仔魚の成長, 生残率等に及ぼす影響, 平成29年度日本水産学会春季大会, 東京海洋大学, 東京都港区, 2017年3月27日.

Momoko Kobayashi and Yasunori Ishibashi, Effects of photo environmental control on the feeding, survival rate and behaviour of the larval long-tooth grouper, *epinephelus bruneus*, The Joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology & the 87th Meeting of the Zoological Society of Japan, Nov. 17-18, 2017, Okinawa Convention Center, Ginowan, Japan.

辻 貴大, 石橋泰典 クロマグロの卵および仔魚の飼育成績等に及ぼす紫外線の影響, 平成28年度日本水産増殖学会大会, 三重大学, 三重県津市, 2016年11月3日.

池田大起, 武田崇史, 石橋泰典 クロマグロ仔魚の生残率, 成長等に及ぼす水流発生法および高密度飼育の影響, 平成28年度日本水産増殖学会大会, 三重大学, 三重県津市, 2016年11月3日.

小林桃子, 石橋泰典 各種波長光がクエ仔魚の飼育成績等に及ぼす影響, 平成28年度日本水産増殖学会大会, 三重大学, 三重県津市, 2016年11月3日.

長岡生真, 三好映実, 谷口友希, 石橋泰典 クロマグロ仔魚の視物質オプシン遺伝子の発現様式と遊泳行動, 摂餌率, 浮

上死亡率等に及ぼす各種波長光の影響, 平成28年度日本水産学会秋季大会, 近畿大学農学部, 奈良県奈良市, 2016年9月9日.

池田大起, 山本紗耶加, 北村章博, 石橋泰典 クエ仔魚の生残率, 摂餌, 成長等に及ぼす水槽形状および水流発生法の影響, 平成28年度日本水産学会秋季大会, 近畿大学農学部, 奈良県奈良市, 2016年9月9日.

小林桃子, 石橋泰典 クエ仔魚の摂餌, 浮上死亡率, 遊泳行動等に及ぼす各種波長光の影響, 平成28年度日本水産学会秋季大会, 近畿大学農学部, 奈良県奈良市, 2016年9月9日.

石橋泰典 クロマグロ種苗生産の各種技術的課題と対策, 取り組み, 平成28年度日本水産学会秋季大会, 第68回漁業懇話会講演会「クロマグロの持続的利用に向けた漁業技術研究」, 近畿大学農学部, 奈良県奈良市, 2016年9月8日.

三好映実・谷口友希・石橋泰典 クロマグロ仔魚の遊泳行動等に及ぼす各種光波長の影響, 平成27年度日本魚類学会 第48回大会, 近畿大学農学部, 奈良県奈良市, 2015年9月5日.

松本太郎, 橋本伸一郎, Daniel Margulies, Vernon P. Scholey, 石橋泰典 キハダのオプシン遺伝子, 平成26年度日本水産学会秋季大会, 九州大学, 福岡県福岡市, 2014年9月20日.

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: 飼育方法

発明者: 石橋泰典, 辻 貴大, 小林 桃子

権利者: 近畿大学

種類: 特許

番号: 特願 2017-036616

出願年月日: 2017年2月28日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石橋 泰典 (ISHIBASHI, Yasunori)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号: 90247966

(2) 連携研究者

松本 太郎 (MATSUMOTO, Taro)

近畿大学・農学部・研究支援員

研究者番号: 60454625

(3) 研究協力者

倉田 道雄 (KURATA, Michio)

近畿大学・水産研究所・技術職員