

クロマグロ仔魚の生残におよぼすポリエチレングリコールの添加効果 と夜間照明法による沈降死対策

山田敏之・中塚直征¹・濱崎将臣・門村和志¹・吉川壮太・松村靖治

Effect on larval survival and growth by addition of polyethylene glycol and night-time lighting
in Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* (Temminck et Schlegel)

Toshiyuki YAMADA, Naoyuki NAKATSUKA¹, Masaomi HAMASAKI, Kazushi KADOMURA¹,
Souta YOSHIKAWA, AND Yasuharu MATSUMURA

Low survival of early-stage larvae is a serious barrier for mass seed production of Pacific bluefin tuna (PBT) *Thunnus orientalis*. We conducted two experiments with the aim to improve the survival of early-stage PBT larvae, i.e. until 10 days after hatching (10DAH). In the first experiment, we tested the effects of addition of polyethylene glycol 6000 (PEG) (at 0 μ g/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml) into the rearing tanks on PBT larval survival and growth (total length). The addition of PEG at 10 μ g/ml tended to improve the survival rate at 10DAH, while addition of PEG at 1 μ g/ml had no effect on larval survival. There were no differences in the total length at 10DAH between the three treatment groups. In the second experiment, we compared the effects of two methods, “night-time lighting” i.e. the new method and “night-time strong aeration” which is currently the main method used, on prevention of early larval sinking death which leads to mass mortality of early-stage PBT larvae. The larval survival rate at 10DAH was not different between the two methods, “night-time lighting” and “night-time strong aeration”. But, the total length of PBT larvae at 10DAH with night-time lighting was significantly larger than that with night-time strong aeration. These results suggest that the addition of a high-dose PEG into rearing tanks and night-time lighting during the first 10 days after hatching are effective methods for improvement of survival or growth of early larval PBT.

クロマグロ *Thunnus orientalis* は、長崎県における重要な養殖対象種であり、2016年の生産量4,414トン、生産額127億円は、全国一位の地位を占めている。¹⁾ また、長崎県内における養殖対象魚種の中でも生産額は最も高い²⁾。しかし、クロマグロ養殖は、種苗の大部分を天然魚に依存しており、³⁾ 漁獲量の変動や国際的な漁獲規制の強化等により、供給が不安定となる可能性が懸念される。今後、クロマグロ養殖の持続的

な発展のためには、種苗生産技術を確立し、人工種苗の比率を増大することにより種苗供給の安定化を図ることが必要である。

クロマグロの種苗生産では、ふ化後10日齢までの初期へい死、後期仔魚期以降の共食いによるへい死、稚魚期以降の水槽壁面等への衝突死等による減耗が知られているが、³⁾ 中でも、特に10日齢までの初期仔魚期のへい死率が高く、解決すべき重要な課題である。⁴⁾

¹ 長崎県五島振興局

この初期仔魚期のへい死に大きな割合を占める沈降死は、⁴⁾ 仔魚比重が増大することで、遊泳活動が緩慢になる夜間に仔魚が沈降し、^{5,6)} 底面への接触による外傷や局所的な酸素不足等によって生じるへい死であると考えられている。^{5,6)} 沈降死に対する対策としては、沈降が生じる夜間に、強通気や水中ポンプの吐出水で水流をつくり仔魚を浮き上らせる手法が用いられている。^{4,7)} さらに近年は、小規模水槽を用いてクロマグロ初期飼育時の沈降死を防止するために必要な夜間の通気量、水槽内の垂直方向の流れの速さ等が報告されている。^{8,9,10)} また、近年、24時間明条件飼育手法による初期仔魚期の生残向上効果が報告されている。¹¹⁾ しかし、このような、沈降死に対する対策が取られているにもかかわらず、依然として初期飼育時の生残率は不安定である。^{4,7,8)}

そこで、本研究では、ヒラメ、ウナギのふ化仔魚で生残率の向上効果が報告されているポリエチレングリコールの飼育水への添加^{12,13)}をクロマグロ初期仔魚の飼育にも適用し、その効果を検討した。さらに、沈降死対策として、人工照明によって夜間の遊泳活動を維持することで沈降死を防ぐ夜間照明法の効果について検討した。

材料と方法

受精卵および仔魚 金子産業株式会社・黒島事業場の養殖生簀で自然産卵により得られた受精卵を、残留塩素濃度 0.4 ppm に調整した電解海水により卵洗浄を行った後、実験 1 では飼育実験用の 500l ポリカーボネイト水槽に、実験 2 では 1kl ポリカーボネイト水槽にそれぞれ収容した。受精卵の収容密度は、実験 1 が 2 万粒/kl、実験 2 が 1 万粒/kl とした。受精卵は、収容水槽内でふ化させ、そのまま飼育実験に供した。

実験 1 ポリエチレングリコール (以下 PEG) がクロマグロの初期生残に及ぼす影響を検討するために、飼育海水に PEG 6000 (平均分子量 7300-

9,300) を添加する飼育実験を行った。試験区として対照区、 $1\mu\text{g/ml}$ 区および $10\mu\text{g/ml}$ 区の 3 区を設定し、それぞれ 3 水槽、計 9 水槽を用いた。飼育水には、紫外線殺菌海水を使用し 500l/日で常時注水を行った。予め PEG を 0.2g/ml の濃度で紫外線殺菌海水に溶解したストック溶液を作成し、これを毎朝、 $1\mu\text{g/ml}$ 区には 2.5ml、 $10\mu\text{g/ml}$ 区には 25ml、直接飼育水に添加した。PEG の添加期間は 1 日齢から 10 日齢までとした。通気は、エアストーン 1 個を水槽中央底面に設置し、受精卵収容から 2 日齢まで通気量を終日 500ml/分に設定し、3 日齢から実験終了までは、夜間の沈降死防止のため 18 時から翌 7 時まで通気量を 2,000ml/分に設定した。飼育水には、2 日齢以降実験終了まで市販の濃縮ナンノクロロプシス (ヤンマリン K1, クロレラ工業株式会社) 40ml を 1 日 4 回に分けて添加した。3 日齢から L 型シオミズツボワムシを水槽内密度が 10 個体/ml となるように毎朝 1 回給餌した。ワムシの栄養強化には、ワムシ 1 億個体当たり濃縮ナンノクロロプシス (ヤンマリン K-1, クロレラ工業) 200ml, マリングロス EX (マリンテック株式会社) 400ml, タウリン-飼料添加物(マリンテック株式会社) 200g をもちいた。2 日齢以降の光条件は、7 時から 18 時まで水槽中央部水面上約 10cm 付近の照度が 1,000 lux 程度となるように蛍光灯により照明を行い、18 時以降は消灯した。10 日齢で実験終了とした。

実験 2 夜間照明による沈降死対策の有効性を検討するために、夜間強通気区と夜間照明区を設定し、それぞれ 2 水槽、計 4 水槽をもちいて飼育実験を行った。夜間強通気区では、2 日齢から蛍光灯による照明を開始し、7 時から 18 時まで水槽中央部水面上 10cm 付近の照度が 1,000 lux 程度となるように設定し、18 時以降は消灯した。水槽底面中央部に 1 個のエアストーンを設置し、2 日齢までは終日 500ml/分の通気を行い、3 日齢以降は 18 時から翌 7 時までには沈降死防止のために 2,500ml/分の強通気と

した。夜間照明区では、2日齢までは夜間強通気区と同様の照度および照明時間設定としたが、3日齢から実験終了までは同様の照度条件で終日照明を行った。夜間照明区の通気は、実験期間中を通じて、終日500ml/分に設定した。飼育水には、両試験区とも紫外線殺菌海水を使用し、1,000l/日で常時注水を行い、実験1と同様の方法で、1日齢から10日齢まで飼育水中にPEG 10 μ g/mlを添加した。その他の飼育条件は実験1と同様とした。実験は10日齢で終了した。

水槽中の仔魚数は、1日齢および10日齢の夜間に柱状サンプリングにより得られた飼育水約5リットル中の仔魚を計数し、容積法により推定した。1日齢を実験開始日齢とし、生残率は、1日齢のふ化仔魚数に対する10日齢の生残尾数のパーセンテージとして計算した。1日齢、5日齢および10日齢に各水槽から10個体または20個体を取上げ、3-aminobenzoic acid ethyl ester methanesulfonateで麻酔後、万能投影機により全長の測定を行った。

統計解析には、EZR (<http://www.jichi.ac.jp/saitama-sct/SaitamaHP.files/statmed.html>, Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan)¹⁴⁾を用いた。実験1では、10日齢における生残率データをKruskal-Wallis検定に処し、全長データに対しては一元配置分散分析をおこなった。実験2では、全長データに対してスチューデントのt検定をおこなった。生残率については、n=2とサンプル数が少なかったことから検定は行わなかった。

結果

実験1 実験期間中の平均水温(±標準偏差)は、26.2°C(±0.0)であった。10日齢における、対照区、1 μ g/ml区、10 μ g/ml区の生残率は、それぞれ、0.0%-7.4%、0.0%-10.0%、9.5%-53%であり、その中央値は、それぞれ、0.9%、0.0%、49.5%であった(P=0.11, Kruskal-Wallis test n=3×

3)。5%有意水準で、有意差は認められなかったが、中央値は、10 μ g/ml区が、対照区、1 μ g/ml区よりも高い傾向が見られた。10日齢の平均全長(±標準偏差)は、対照区、1 μ g/ml区、10 μ g/ml区において、それぞれ6.36mm(±0.39)、6.25mm(±0.37)、6.55mm(±0.45)で有意な差は認められなかった(P=0.155, one-way ANOVA, n=20×3)(Fig. 2)。

実験2 実験期間中の平均水温(±標準偏差)は、27.1°C(±0.3)であった。夜間照明区および夜間強通気区の10日齢の生残率は、それぞれ、26.8%、32.5%および7.8%、48.9%であった。試験区内の水槽間の生残率のバラツキは、夜間照明区でより小さく、夜間照明区の生残率がより安定している傾向が示唆された。10日齢における夜間照明区と夜間強通気区の平均全長(±標準偏差)は、それぞれ、6.83mm(±0.46)および6.11mm(±0.48)で、夜間照明区が有意に大きかった(p<0.01, Student's t-test, n=20×3)(Fig.4)。

考察

実験1において、10日齢における対照区、1 μ g/ml区、10 μ g/ml区の生残率の中央値は、それぞれ0.9%、0.0%、49.5%であり、10 μ g/ml区の生残率が高い傾向が見られた。また、10 μ g/ml区の3水槽の生残率は、それぞれ53.6%、49.5%、9.5%で、2つの水槽で40%を超える高い生残率を示したのに対し、対照区および1 μ g/ml区では、生残率が10%を超える水槽はなかった。サンプル数がn=3と小さいことから統計的な有意差は認められなかったが、10 μ g/mlのPEGの添加は10日齢までのクロマグロ仔魚の生残率を向上させる効果があることが示唆された。一方、PEG 1 μ g/mlの添加では、対照区と比較して生残率の向上が見られなかったことから、PEGの添加効果は、濃度に依存することが示唆された。

後述するように、実験2の結果から、夜間

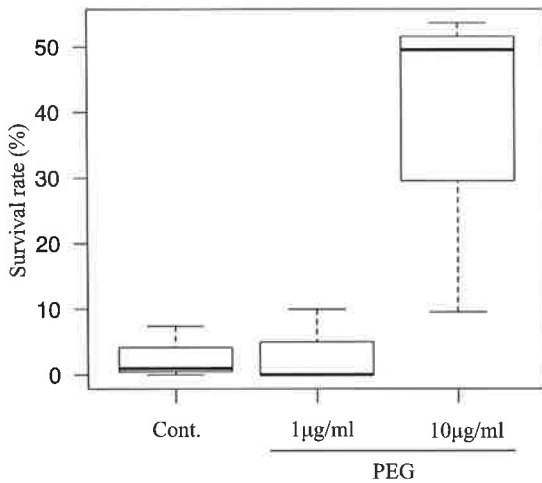


Fig.1. Survival rate of Pacific bluefin tuna larvae at 10 days after hatching in the first experiment (Kruskal-Wallis test, $P=0.11$). Cont, no PEG was added. The upper and lower ends of the vertical bars show the maximum and minimum values, respectively. The upper and lower ends of the boxes show 75% and 25% values, respectively, and the horizontal line in the box shows median value.

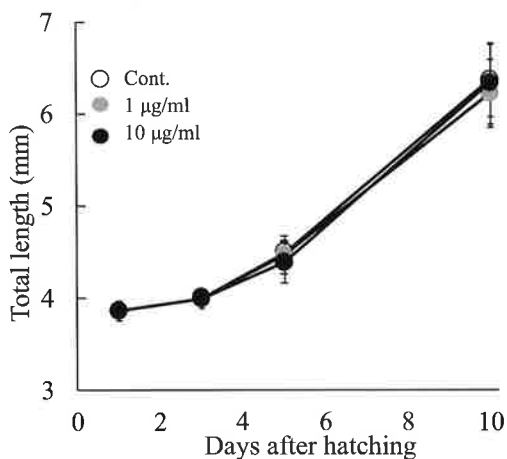


Fig. 2. Changes in the total length of Pacific bluefin tuna larvae in the first experiment with the different PEG doses. Cont, no PEG was added. Error bars represent standard deviations.

強通気法は夜間照明法に比較して、生残率のばらつきが大きいことが示唆された。実験 1 では、すべての試験区で夜間強通気法を採用しており、このことが、 $10 \mu\text{g/ml}$ 区でも 9.5% という低い生残率の水槽が生じた原因であるかもしれない。実験 1 では、試験区間で成長に差がみとめられなかったことから、PEG の添加は実験期間中の成長に抑制的な効果を示さな

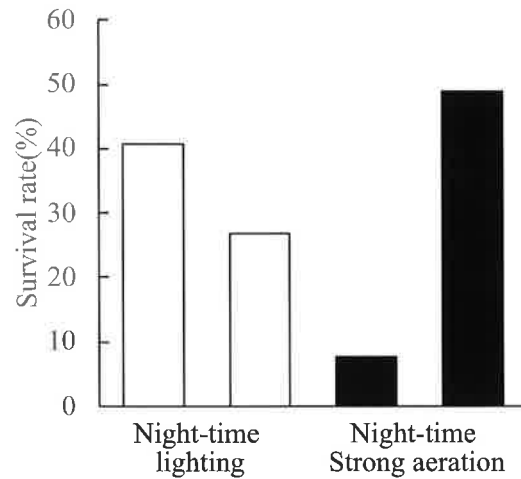


Fig.3. Survival rate of Pacific bluefin tuna larvae at 10 days after hatching in the second experiment, which were reared with the following two types of treatment during first 10 days after hatching : Night-time lighting , Night-time strong aeration.

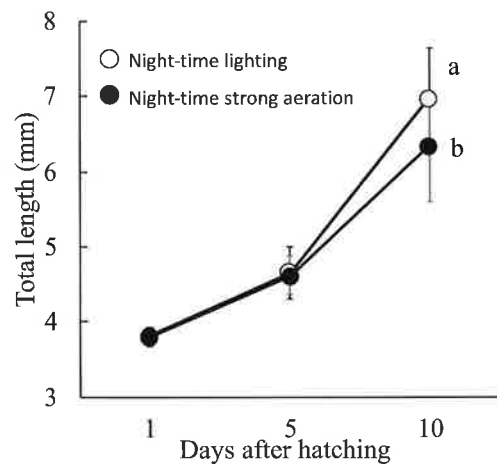


Fig.4. survival rate of Pacific bluefin tuna larvae at 10 days after hatching reared with the following two types of treatment during first 10 days after hatching : Night-time lighting , Night-time strong aeration. Error bars represent standard deviations. Different alphabets indicate statistical significance between groups ($p < 0.01$).

かったものと考えられる。以上のことから、今後適切な添加濃度等についてさらに検討を要するが、PEG の飼育水への添加は、クロマグロの初期飼育の生残率を向上させるための有効な手法であると期待できる。

Tagawa et al.は、ヒラメ卵黄期仔魚のハンドリングストレスによるへい死を、PEG $1 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で抑制できることを報告している。

¹²⁾ また、鵜沼らは、ウナギふ化仔魚の浮上へい死を、PEG1 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で抑制できることを報告している。¹³⁾ 本研究で生残率向上効果が示唆された PEG の濃度は、これらの報告よりも 10 倍高い 10 $\mu\text{g/ml}$ であった。これには、ヒラメ¹²⁾、ウナギ¹³⁾ の研究が止水条件下で行われているのに対し、本研究では、100%/日の換水を行っており、飼育水内の PEG 濃度が設定濃度を維持できていないことが関係している可能性がある。

Tagawa et al. は、PEG の「傷を癒す」効果により仔魚の生残率が向上している可能性について言及しているが、¹²⁾ 本研究の実験 1 では沈降死対策として夜間強通気を行っており、仔魚は強い機械的ストレスにより体表等に損傷を受けやすい状況におかれていたことが推察される。このことも、本研究における高い PEG 要求量 (10 $\mu\text{g/ml}$) と関係しているのかもしれない。

実験 2 では、クロマグロ初期仔魚の沈降死対策として夜間照明法の有効性について検討を行った。Kurata et al. は、沈降死対策として夜間照明法は夜間強通気法よりもクロマグロ初期仔魚の生残率を向上させることを報告しているが、¹¹⁾ 本研究では、夜間強通気区と夜間照明区間で 10 日齢における生残率の明瞭な違いは認められなかった。しかし、夜間強通気区で、水槽間の生残率のバラツキが大きかったのに対して、夜間照明区ではよりバラツキが小さく安定する傾向が見られた。夜間強通気区では、夜間に激しい飼育水の流動等による機械的ストレスにさらされる可能性が高いのに対し、夜間照明区では、緩やかな流動条件が維持され強通気条件のようなストレスを受けないものと予想される。クロマグロ初期仔魚は、サンプリング時のハンドリングストレス等にも非常に弱く容易にへい死することから、機械的ストレスはへい死の大きな要因となることが考えられる。したがって、夜間強通気による機械的ストレスが生残率を不安定とした原因である可

能性が考えられる。

実験 2 の 10 日齢の全長を比較すると、夜間照明区が夜間強通気区を上回っており、夜間照明区で成長が優れる可能性が示唆された。これは、Kurata et al. が報告している通り、¹¹⁾ 明条件の時間が長くなると、日間の摂餌量が増えることに起因していると考えられる。また、夜間照明法には、夜間強通気法と異なり朝と夕方の通気量調整等の作業が必要ないことから、飼育上の人為的ミスを減らすメリットもある。これらのことから、夜間照明法は、これまで実施されてきた夜間強通気法と同等かより優れた沈降死対策法であると考えられる。

本研究により、PEG (10 $\mu\text{g/ml}$) の添加によるクロマグロ初期仔魚の生残率向上効果が示唆された。今後さらに、PEG の添加効果に関する再現実験、換水条件等さまざまな飼育条件下における適切な添加濃度の探索を行うことにより、量産規模のクロマグロ種苗生産技術として本法の適用が可能になるものと期待される。また、本研究により夜間照明法による沈降死対策の有効性が確認できた。夜間照明法は、すでに、量産規模の種苗生産でも試みられているが、今後、さまざまな規模の飼育水槽に本法を適用するためには、夜間に仔魚を沈降させないための詳細な光強度条件等を明らかにする研究が待たれる。

謝辞

本研究をすすめるにあたり、小規模水槽をもちいたクロマグロ飼育技術について助言・指導をいただいた国立研究開発法人水産研究・教育機構国際水産資源研究所の田中庸介博士、同研究機構西海区水産研究所の玄浩一郎博士、橋本博博士、久門一紀氏、スクレッティング株式会社の伊奈佳晃博士および有限会社奄美養魚の塩澤聡氏に感謝します。また、クロマグロ受精卵を快く提供していただいた株式会社金子産業に感謝します。多忙な中、本文の校閲をお

引き受けいただいた京都大学農学研究科・海洋生物増殖学分野准教授 田川正朋博士に感謝します。

文献

- 1) 海面漁業生産統計調査 確報 平成28年漁業・養殖業生産統計 海面養殖業の部 2 大海区都道府県振興局別統計 養殖魚種別収獲量(種苗養殖を除く。) Available at: <https://www.e-stat.go.jp/dbview?sid=0003216660>.
- 2) 漁業産出額 確報 平成28年漁業産出額大海区都道府県別産出額(海面漁業・養殖業) 3 海面養殖業 Available at: <https://www.e-stat.go.jp/dbview?sid=0003270467>.
- 3) Sawada Y, Okada T, Miyashita S, Murata O, Kumai H. Completion of the Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* (Temminck et Schlegel) life cycle. *Aquaculture Research* 2005; 36: 413–421.
- 4) Tanaka Y, Kumon K, Nishi A, Eba T, Nikaido H, Shiozawa S. Status of the sinking of hatchery-reared larval Pacific bluefin tuna on the bottom of the mass culture tank with different aeration design. *Aquaculture Science* 2009; 57(4): 587–593.
- 5) 坂本亘, 岡本杏子, 上土生起典, 家戸敬太郎, 村田 修. クロマグロ仔魚の成長に伴う比重変化. *日本水産学会誌* 2005; 71(1):80-82.
- 6) Takashi T, Kohno H, Sakamoto W, Miyashita S, Murata O, Sawada Y. Diel and ontogenetic body density change in Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis* (Temminck and Schlegel), larvae. *Aquaculture Research* 2006; 37: 1172–1179.
- 7) 升間主計. 水産総合研究センター(旧日本栽培漁業協会)による クロマグロ栽培漁業技術の開発. *水産技術* 2008; 1(1):21-36.
- 8) 田中庸介, 久門一紀, 樋口健太郎, 江場岳史, 西明文, 二階堂英城, 塩澤聡. 小型水槽飼育におけるクロマグロ仔魚の初期生残の向上. *水産技術* 2010; 3: 17–20.
- 9) Nakagawa Y, Kurata M, Sawada Y, Sakamoto W, Miyashita S. Enhancement of survival rate of Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) larvae by aeration control in rearing tank. *Aquatic Living Resources* 2011; 24: 403–410.
- 10) 伊奈佳晃. クロマグロ仔魚の沈降死発生メカニズムに関する研究. 博士論文, 近畿大学, 大阪, 2015.
- 11) Kurata M, Tamura Y, Honryo T, Ishibashi Y, Sawada Y. Effects of photoperiod and nighttime aeration rate on swim bladder inflation and survival in Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis* (Temminck & Schlegel), larvae." *Aquaculture Research* 2017; 48(8): 4486-4502.
- 12) Tagawa M, Kaji T, Kinoshita M, Tanaka M. Effect of stocking density and addition of proteins on larval survival in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 2004; 230: 517–525.
- 13) 鶴沼辰哉, 黒川忠英, 徳田雅治, 野村和晴, 田中秀樹. 個別飼育法によるウナギの卵質評価で用いる添加物が形態異常に及ぼす影響. *水産増殖* 2011; 59(2):307–313.
- 14) Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplantation* 2013; 48: 452-458.