

熊本県水産研究センター研究報告

第2号

目 次

1. 熊本県沿岸海域におけるヒラメ1才魚のイソクエン酸脱水素酵素アイソザイムによる 自然集団と放流集団の差異について……………	木村武志・平田郁夫・中村良成・竹田健一	1
2. クルマエビ養殖池への暗渠排水の効果……………	河辺 博・南部豊揮・藤田忠勝	7
3. 採卵用親魚ヒラメに発生した大量斃死について……………	木村武志・中野平二・梅本敬人・磯村憲司	17
4. ハマチ育成用飼料の開発に関する研究-1 3種の魚粉代替タンパク質を添加した飼料によるハマチの成長……………	中野平二・河辺 博・小山長久	23
5. 御所浦町嵐口地区養殖漁場の底質環境の変化について……………	平山 泉	29
6. ガザミの低温輸送に関する研究……………	松岡良三・山下幸寿	33
7. ヒラメ脳下垂体からの成長ホルモンc-DNAの分離……………	木村武志	39
8. トサカノリの種苗生産に関する研究 トサカノリの採苗と室内培養の試み……………	木村 修	47

平成 4 年 4 月

熊本県水産研究センター

熊本県沿岸海域におけるヒラメ 1才魚のイソクエン酸脱水素酵素アイソザイムによる自然集団と放流集団の差異について

木村武志・平田郁夫・中村良成*・竹田健一

The genetic distance of Natural and Released population of Hirame (*Paralichthys olivaceus*) in ARIAKE and YATUSHIRO inland sea by analyzing of liver isocitrate dehydrogenase (s-IDH)

Takeshi Kimura, Ikuo Hirata, Ryousei Nakamura and Kenichi Takeda
Kanagawa prefectural institute of fisheries*

ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) は栽培漁業における重要魚種として種苗生産及び放流が各地で盛んに行われており、その有効性が明らかにされてきている。そこでアイソザイム分析を用いて自然集団の地域ごとの遺伝的な違いを検討するとともに、自然集団及び人工種苗を放流して約1年後に採捕された放流集団の遺伝的特性を調査し、両者を比較することでヒラメの移動及び有効な放流方法の資料を得ることを目的として行った。

材料及び方法

分析に用いたヒラメは図1に示す大牟田・島原・松島・八代・出水の5海域で1990年1月に財団法人熊本県栽培漁業協会で生産された個体から放流時に無作為に抽出して分析に用いた。アイソザイムの調査にはすでに遺伝的多型が報告されている¹⁾肝臓のイソクエン酸脱水素酵素を支配するs-ldh遺伝子を用いた。

材料は活魚から直接肝臓を取り出したり、魚体を -20°C に保存しておいて適時肝臓を摘出した。アイソザイムの分離は既報に従い²⁾水平式デンブングル電気泳動法を用いて行った。用いたデンブングルはカナダ・コンノート研究所製精製デンブングル16.8gと市販のカタクリ粉12.0gを混合して緩衝液(1M MgCl_2 1.2ml, 0.1M NaCN 6ml, C-APM pH7.0(aminopropylmorpholine 24ml, citric acid 4.2g, to H_2O 1000ml) H_2O 1000ml)に溶かし加温溶解させ枠に入れて固めたものを1晩おいて用いた。泳動用の緩衝液は前途のC-APMを2.5倍に希釈したものをを用いて、60mAで2時間泳動した。肝臓は24穴のマイクロプレートに収容し、凍結させ解凍時にでるドリップをろ紙に染み込ませて試料とした。染色はNADP 6mg, PMS 1mg, $\text{Na}_3\text{isocitrate}$ 6mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 4mg, MTT 4mg, 0.2M Tris-HCl 10ml, H_2O 8mlに溶解して 37°C で反応させた。

体色異常については図2に示すようにこれまでの資源調査における判別基準に準じ無眼側の尾鰭を用いて識別を行い、+を自然集団、++、+++を放流集団とした。

結果及び考察

図3に示すようにイソクエン酸脱水素酵素の電気泳動像は移動度の大きい1本のバンドを示すA/A、移動度の遅い1本バンドを示すB/B、及び両方のサブユニットを生成し3本のバンドを示すA/Bの3型が観察された。表1に遺伝子型と遺伝子頻度について、表2に採集海域間の遺伝子頻度のt検定の結果を示した。また図4に調査地区のAの対立遺伝子頻度と表現型観察とハーディ・ワインベルグの平衡を仮定して求めた期待値のずれを検定

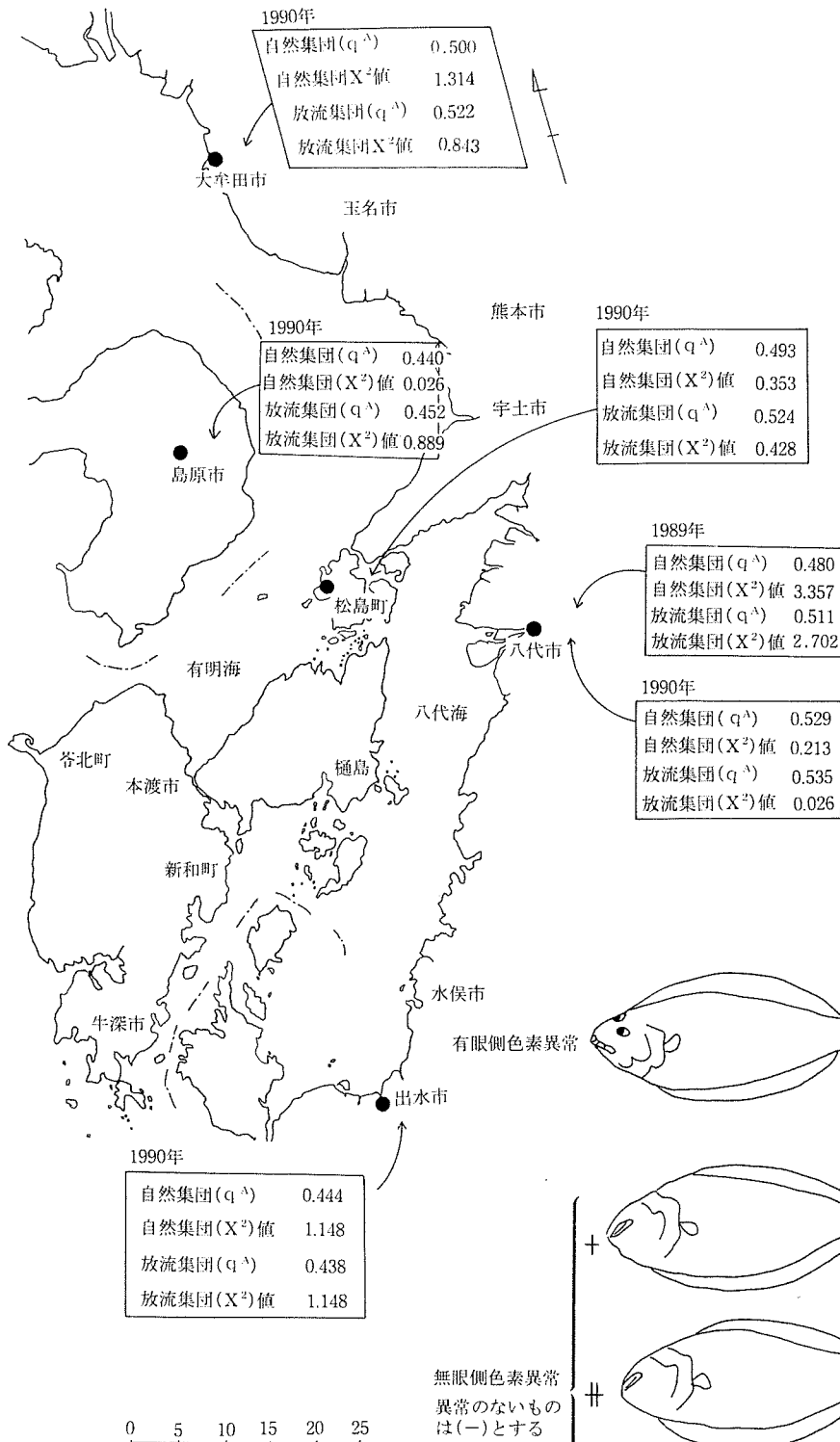
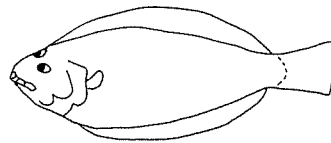
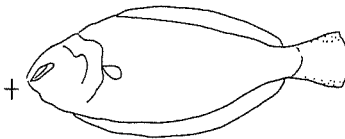


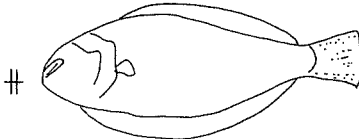
図1 採集場所



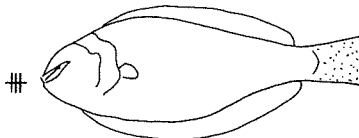
白色斑点(紋)が大小多少にかかわらず体表にみられる



尾鰭にわずかに褐色斑点がみられる斑点は縁辺に多い



褐色斑点はかなり多いか小さな斑紋がある斑点は鰭の縁辺中央部に及ぶ



褐色斑点が鰭全体に分布するか大きな斑紋があり鰭面積の1/3以上に及ぶ

図2 体色異常の識別

表1 ヒラメの *slah* 遺伝子型と遺伝子頻度

集 団	A/A	A/B	B/B	個体数	q	q	X ²	
自然集団 (体色異常 が ⁺ 、 ⁺ の個体)	大牟田	28 (31.1)	63 (56.9)	23 (26.0)	114	0.522	0.478	1.314
	島 原	24 (24.4)	63 (62.1)	39 (39.5)	126	0.440	0.560	0.026
	松 島	16 (17.3)	38 (35.5)	17 (18.2)	71	0.493	0.507	0.353
	八 代	20 (19.0)	32 (33.9)	16 (15.1)	68	0.529	0.471	0.213
	出 水	12 (14.2)	40 (35.5)	20 (22.3)	72	0.444	0.556	1.148
合 計	100 (105.2)	236 (225.2)	115 (120.6)	451	0.483	0.517	1.035	
放流集団 (体色異常 が ⁺ ⁺ ⁺ ⁺ ⁺ の 個体)	大牟田	17 (19.0)	42 (38.0)	17 (19.0)	76	0.500	0.500	0.843
	島 原	5 (6.3)	18 (15.4)	8 (9.3)	31	0.452	0.548	0.889
	松 島	5 (5.8)	12 (10.5)	4 (4.7)	21	0.524	0.476	0.428
	八 代	16 (16.3)	29 (28.4)	12 (12.3)	57	0.535	0.465	0.026
	出 水	2 (3.1)	10 (7.9)	4 (5.0)	16	0.438	0.562	1.148
合 計	45 (50.25)	111 (100.5)	45 (50.25)	201	0.500	0.500	2.194	
人工種苗	33 (24.6)	53 (69.8)	58 (49.6)	144	0.413	0.587	8.335*	

()内は期待値 * : 危険率5%で有意なもの

表2 *slah* 遺伝子座における集団間の遺伝子頻度の t-検定

集 団	自然集団					放流集団					
	大牟田	島原	松島	八代	出水	大牟田	島原	松島	八代	出水	人工種苗
自然集団											
大牟田											
島 原	1.834										
松 島	0.529	0.968									
八 代	0.128	1.625	0.569								
出 水	1.424	0.073	0.775	1.344							
放流集団											
大牟田	0.400	1.095	0.111	0.459	0.885						
島 原	0.990	0.170	0.529	0.994	0.103	0.620					
松 島	0.024	1.004	0.347	0.056	0.894	0.268	0.720				
八 代	0.237	1.734	0.664	0.095	1.439	0.553	1.072	0.123			
出 水	0.885	0.021	0.550	0.910	0.060	0.620	0.128	0.727	0.970		
人工種苗	2.437*	0.604	1.461	2.118*	0.566	1.588	0.552	1.327	2.227*	0.264	

* 危険率5%で有意差あり

したX²値を示した。

遺伝子頻度については全ての調査魚を通じて0.4~0.5の間で特に大きなばらつきは見られなかった。遺伝子頻度の差について t-検定を行った結果は自然集団の差の検定は全ての組み合わせで有意な差は認められず、熊本県沿岸のヒラメ1歳魚には遺伝的に異なる集団は存在しないと思われた。また放流集団間の検定でも有意な差は認められなかった。人工種苗との各地域との比較では自然集団の大牟田と八代、放流集団の八代と有意な差が認められた。自然集団及び放流集団の表現型の合計から各集団の遺伝子頻度を求め集団ごとに遺伝子頻度の差を検定したところ自然集団と放流集団には危険率5%で有意な差はなく、自然集団と人工種苗、放流集団と人工種苗では有意な差が認められた。

自然集団は八代を除く地域でA/Bのヘテロ個体の観察値が期待値より大きいヘテロ過剰の傾向を示した。この傾向は湾奥部の出水・大牟田で大きく湾口部の島原と松島で小さいことが伺えた。八代の自然集団の調査は1989年度にも0~1歳魚の小型魚を用いて行っているが、この時はハーディ・ワインベルグの平衡と有意に異なりヘテロ過剰の値を示したが今回の調査ではホモ過剰であった。遺伝子頻度の結果に従い、これらを1つの集団として全体を見ると自然集団は有意ではないがヘテロ過剰傾向にあることがいえる。

放流集団はいずれの地域もヘテロ過剰の傾向を示しているが、湾奥部の出水・大牟田だけでなく湾口部の島原

でもこの傾向は大きかった。八代では前述した1989年度の調査で高いヘテロ過剰の傾向を示したが、本年度はこの傾向は小さくなっている。またこれらを1つの集団として見ると放流集団においても有意ではないがヘテロ過剰傾向が認められた。

しかし人工種苗はA B, B Bのホモ個体の観察値が期待値より大きいホモ過剰の傾向を有意な差を持って示した。

これらの調査結果より放流されたホモ過剰の人工種苗が、再補されるまでにヘテロ過剰の集団に変化していることが考えられ、ホモ個体が放流後なんらかの選択を受けてヘテロが多数生存したと推察される。これは今回調査を行った自然集団もヘテロ過剰傾向にあることから自然集団の中で発生したホモの個体も何らかの選択を受けていることと同一と考えられる。よってヘテロ個体の優位性が考えられるが³⁾これについて1991年1月に財団法人熊本県栽培漁業協会が行ったヒラメ種苗生産において全長で選別した優良個体群(トビ群)と低成長群(ガリ群)のアイソザイム分析を行った。分析に用いた個体はふ化後50日目でトビ群の平均全長が46.6mm、ガリ群が25.8mmであり有意な差が見られた。分析の結果を表3に示した。X²値による統計的な差はなかったがトビ群はヘテロであるA Bの個体の観察値が期待値を上回るヘテロ過剰の傾向を示し、ガリ群はA A, B Bのホモの個体の観察値が期待値を上回るホモ過剰の傾向を示した。これより成長の良いヘテロの個体が放流後の歩留りも高い可能性が考えられる。

表3 1991年の(財)熊本県栽培漁業協会におけるヒラメ種苗生産時のアイソザイム分析の結果

群	平均全長 (mm)	遺伝子頻度			X ²
		A/A	A/B	B/B	
優良成長群	46.6	8 (9.61)	26 (22.82)	12 (13.56)	46 0.89
低成長群	25.8	11 (9.63)	21 (23.74)	16 (14.63)	48 0.64

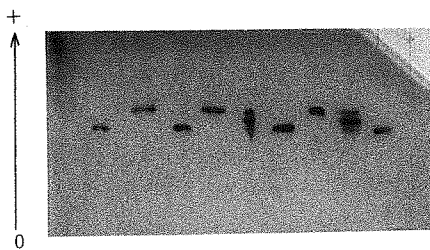
()は期待値

今回の調査結果で八代地区の自然集団が1989年度の値と大きく異なりヘテロからホモ過剰へ移行した結果になったが、八代地区では八代漁業協同組合独自で生産した種苗や種苗生産業者より購入した種苗を放流している。これは生産されたホモの個体が自然選択に対して通常生産された個体よりも選択を受けにくくなっている可能性が考えられ、すなわち種苗生産に使用した親個体が弱有害遺伝子をもつ割合が低くなっていた可能性がある⁴⁾ことを示唆する。しかしこれらが自然集団に世代をこえて与える遺伝的影響については検討する必要がある。

今回の調査でホモ過剰で放流された種苗が何らかの選択を受けてヘテロ過剰になり漁獲群に参加していくことと、ヘテロ個体は種苗生産において優位であるという2つの仮設が得られた。この仮設の証明のために今後のアイソザイムを用いた調査として今回実施したような人工種苗の放流時及び1年後の採捕時の遺伝子頻度の調査、種苗生産時における高成長個体の遺伝子頻度、体色異常判別による自然集団の遺伝子頻度の調査等について経年的に資料を蓄積しなければならない。また田畑らの報告と⁵⁾同様に遺伝子頻度が自然集団とことなる種苗を放流することが自然集団に与える影響についても検討する必要性があり、このためにも継続的調査が必要である。調査対象海域としては種苗放流事業が積極的に実施されている八代海を中心に有明湾口(島原)・湾奥(大牟田)において図4に示すフロー内容で調査を行い、遺伝的な検討を重ねる。

要 約

- 1) 熊本県沿岸海域で採捕されたヒラメ1歳魚を体色異常により自然集団と放流集団に分類してアイソザイム分析を行った。
- 2) 自然集団間において遺伝子頻度の地域間の有意差はなく熊本県沿岸のヒラメ1歳魚には遺伝的に異なる地域集団は存在しないと思われた。
- 3) 自然集団は八代地区を除いてヘテロ過剰傾向であり、湾奥部の大牟田・出水で傾向は大きく、湾口部の島原・松島で小さい傾向にあった。



B/B A/A B/B A/A A/B B/B A/A A/BB/B

図3 電気泳動像

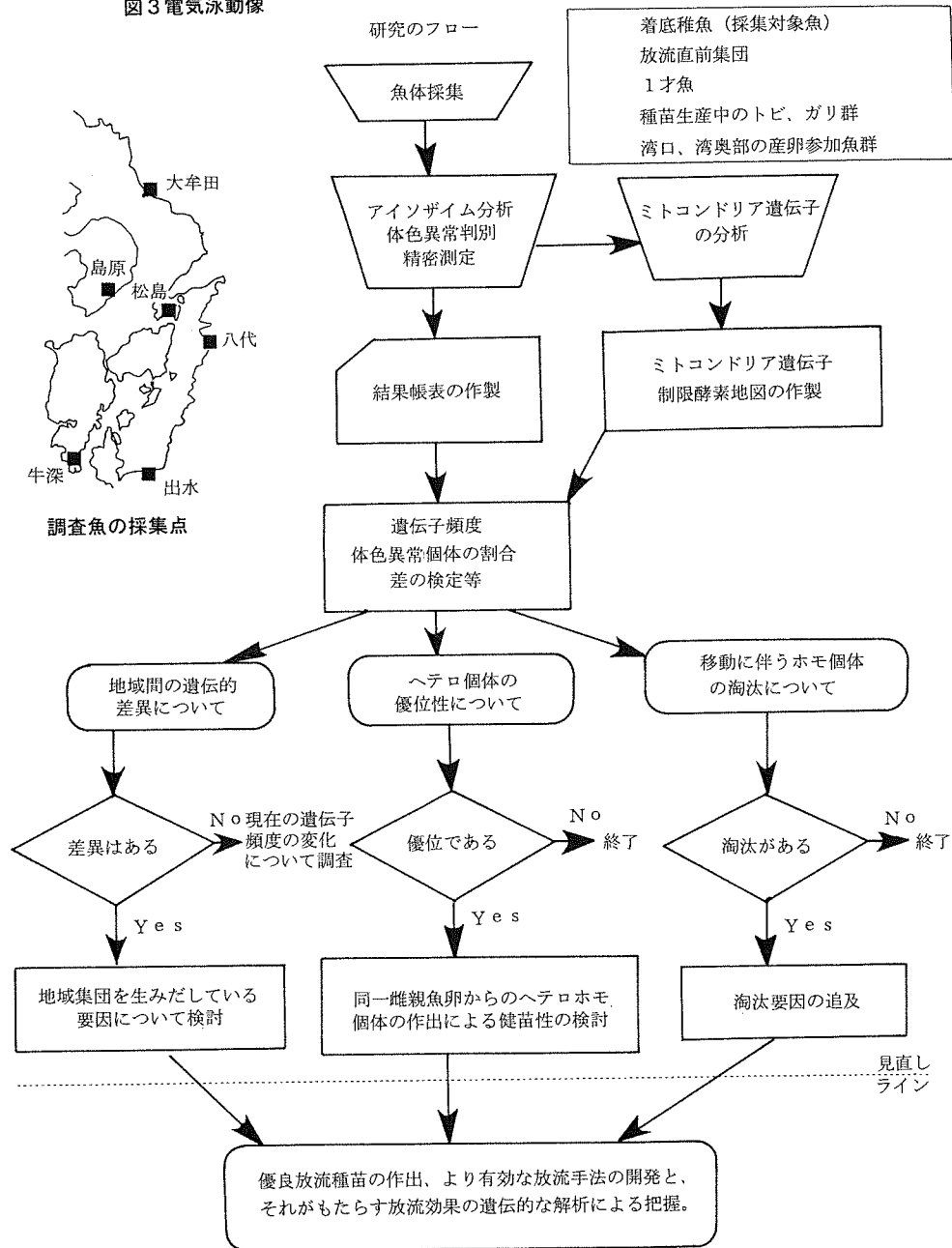


図4 今後の研究フロー

- (4) 1989年の調査では八代地区は有意ヘテロ過剰であったが今回の調査ではホモ過剰の傾向になっていた。
- (5) 自然集団と放流集団間の遺伝子頻度の差はみられなかった。
- (6) 放流集団間の遺伝子頻度の差はみられず、いずれの地域もヘテロ過剰の傾向であった。
- (7) 人工種苗は有意にホモ過剰であり、各集団との遺伝子頻度は有意な差があった。
- (8) 人工種苗生産でのトビ群はヘテロ過剰傾向で、ガリ群はホモ過剰傾向でありヘテロ個体の放流種苗としての優位性が推察された。

謝 辞

本文をまとめるにあたりご校閲を戴いた東北大学の農学部木島明博助教にこころより御礼申し上げます。

文 献

- 1) 藤尾芳久 (1984) アイソザイム分析手法による魚介類の遺伝的特性の解明に関する研究, 農林水産省特別試験研究費補助金による研究報告書 46
- 2) 谷口順彦・岡田容典 (1980) マダイの生化学的多型に関する遺伝学的研究, 日水誌 46 (4) 437-443
- 3) 藤尾芳久・佐々木信行・佐々木實・小金澤昭光 (1985) ヒラメのイソクエン酸脱水素酵素アイソザイムによる自然集団と放流集団との差異 東北水研研報47号 51-57
- 4) Masamichi Nakajima, Akihiko Kijima and Yoshihisa Fujio (1991) Difference of Average Standard Length in Heterozygous or Homozygous Individuals at The Isozyme Loci in Cultured stocks of Rainbow Trout in Japan Nippon Suisan Gakkaisi 57(6)1035-041
- 5) 田畑和男・反田實・長浜達章 (1987) 明石海峡及び播磨灘西部海域で漁獲された人工生産ヒラメ集団と天然ヒラメ集団の I D H アイソザイム遺伝子頻度の比較 兵庫県水試研報第25号25-32

クルマエビ養殖池での暗渠排水の効果

河辺 博・南部豊揮・藤田忠勝

Effects of culvert drain in the pond of the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*

Hirosi Koube · Toyoki Nanbu · Tadakatu Fujita

熊本県内における養殖によるクルマエビの収穫量は、1989年には912トンで全国の28.2%を占めていたが、その後減少してきている。その原因としては養殖池の底質や水質の悪化、病障害の多発などが考えられる。クルマエビは通常日中は砂底中に潜入し、この時には砂底直上の水を呼吸に利用している¹⁾。したがって、養殖池の底質や水質の悪化は、クルマエビの正常な生息を脅かすばかりでなく種々の疾病を引き起こす原因になると考えられる。山本ら²⁾は、砂の層の下に礫の層を設け、その礫層の中に暗渠排水パイプを埋設することによって還元層の生成を抑制し得ることを工学的な見地から述べている。鹿児島県水産試験場³⁻⁹⁾では、ブロックを並べその上に網を張り、砂を敷き詰めてコンクリートの養殖池を2重底にし、砂を通過した水を中央部に集めて排水することによって、底質の悪化を防ぐことを試みている。筆者らは、現在行われているクルマエビの養殖池に最も簡単で安価に利用できる方法として、砂中に農業で使用されている暗渠排水用のパイプを埋設する方法を考案し、その暗渠排水による水質改善の効果を、主に水質および水中の細菌数の変化より検討した。

材料および方法

実験は1990年6月4日から同月25日にかけて、熊本県栽培漁業協会大矢野事業場のコンクリート水槽(9.6m×2.8m×0.75m有効容積26.3m³)3面を用いて行った。各水槽には、図1のように砂を盛り上げて高さ約35cmの畝を2本設け、A池には片方の畝に1本、B池には両方の畝にそれぞれ各畝のほぼ中央の底に農業で使用されている暗渠排水用パイプ(多孔管パイプ、外径50mm、長さ8m)を埋設した。同パイプは砂の混入防止のために泉水用のガラスウールを巻いて設置した。又、畝の谷の部分には通気用に50cm間隔で直径1mmの穴を開けた塩化ビニールパイプ(内径13mm)を設置した。砂は、粒度組成でみると中砂と粗砂が主体で、中央粒径値が0.48mmで泥分率(粒径0.063mm以下の粒子の占める割合)が1.9%のものを用いた。海水は水中ポンプを用いて表1に示した注水量および換水率で各池に注水した。水深は畝の頂上部分では15cm、谷の部分では52cmとした。

クルマエビは、大矢野事業場で種苗生産されたもの(平均全長16.9mm、平均体重0.037g)10.5万尾を用いた。各池への放養尾数は表2に示すとおりである。各水槽への給餌は、配合餌料を朝夕の1日2回行い、その1日の量はクルマエビの総重量の約10%を基準とし、残餌が出ないように日々、池ごとに調節した。実験期間中の総給餌量は、A池では10.170g、B池では10.170g、C池では10.280gであった。水温およびPHの測定は毎日午前9時に行い、溶存酸素、アンモニア態窒素(NH₄-N)、亜硝酸態窒素(NO₂-N)、硝酸態窒素(NO₃-N)、リン酸態リン(PO₄-P)および細菌数の測定はクルマエビを収容した翌日の6月5日、6月12日、6月19日、6月25日の計4回それぞれ午前9時から午前10時の間に排水口で採水して行った。池ごとのクルマエビの成長は、6月12日、6月19日および6月25日に、各池より無作為に約45尾づつを取り上げて全長、体重を測定して調べた。実験終了後には池を干し、生残尾数を調べた。

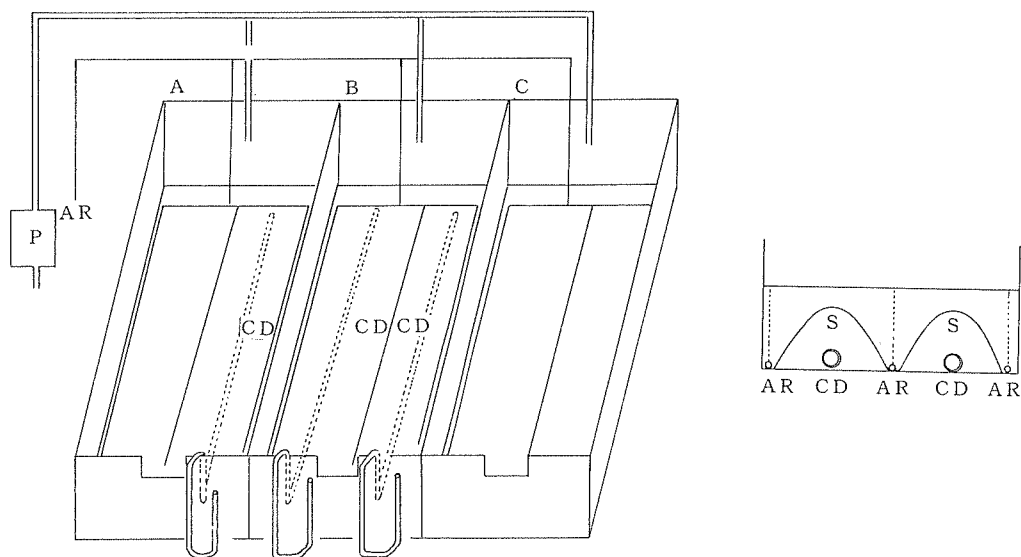


図1 池底に設けた2本の畝、畝の中の暗渠排水の配管、エアレイションの様子

Aは暗渠排水を1本、Bは同2本を設置した場合を、Cは同排水を施さない例を示す。ARはエアレイションを、Pはポンプを、CDは暗渠排水パイプを、Sは砂を示してある。

表1 各池ごとの注水および暗渠排水の状況

池名	A	B	C
暗渠排水のパイプ数	1	2	0
注水量 (ℓ/毎分)	36	36	36
換水率 (回転/日)	3.75	3.75	3.75
排水口からの排水量 (ℓ/毎分)	24	12	36
暗渠排水口からの排水量 (ℓ/毎分)	12	24	0

表2 各池のクルマエビの生存尾数

池名	A	B	C
放養時	35,000	35,000	35,000
取り上げ時	28,600 (81)	27,500 (78)	27,800 (79)

()内は生残率を示す。

結 果

1) 成長および生残尾数

全長は放養時に16.9mmであったが、21日後にはA池では36.8mm、B池では36.5mm、C池では35.8mmとほぼ同じ成長を示し、暗渠排水を設置したA、B池とそうでないC池との差はほとんどなかった。体重は、体長と同様の傾向を示し、6月25日にはA池、B池で0.31g、C池で0.29gとほぼ同じ体重であった。各池のクルマエビの生残尾数の数はA池では、28,600尾、B池では27,500尾、C池では27,800尾とほぼ同じであった。成長および生残尾数の面からみる限り暗渠排水を設置したA、B池と対象のC池との間にはほとんど差はなかった。つまり、各池における給餌量が同じ事、クルマエビの成長および生残尾数がほぼ同じ事から、残餌、排泄物、クルマエビの活動による底の状態の変化や池の攪拌など池に及ぼす窒素分など汚染の負荷は、各池でほぼ同じ状態であったと考えられる。

2) 水温

実験期間中の平均水温は、取水口では $22.7 \pm 1.2^\circ\text{C}$ 、A池の排水口では $24.1 \pm 1.4^\circ\text{C}$ 、B池の排水口では $24.1 \pm 1.4^\circ\text{C}$ 、C池の排水口では $23.9 \pm 1.4^\circ\text{C}$ で、各池とも取水口より各排水口の方が高かった(図4)。6月12日から6月13日に

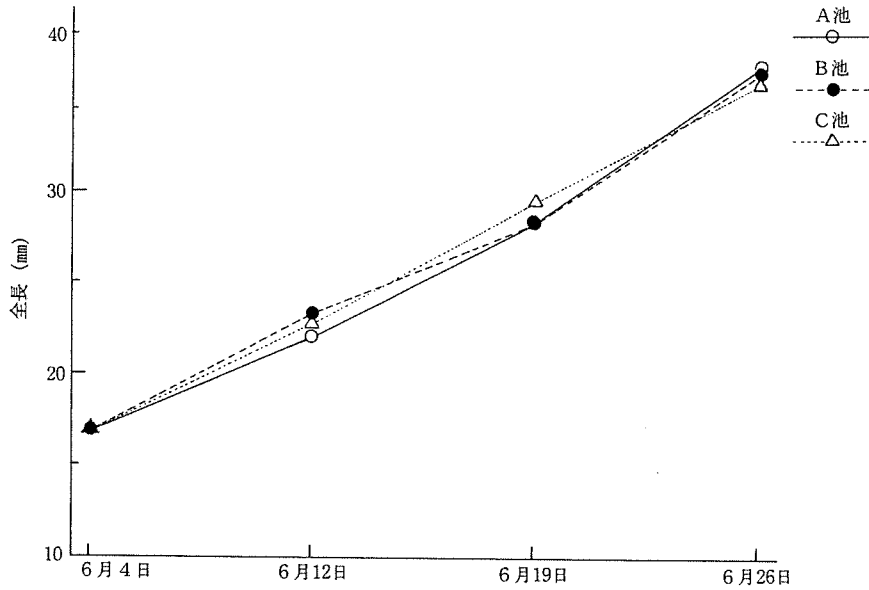


図2 クルマエビの全長の変化

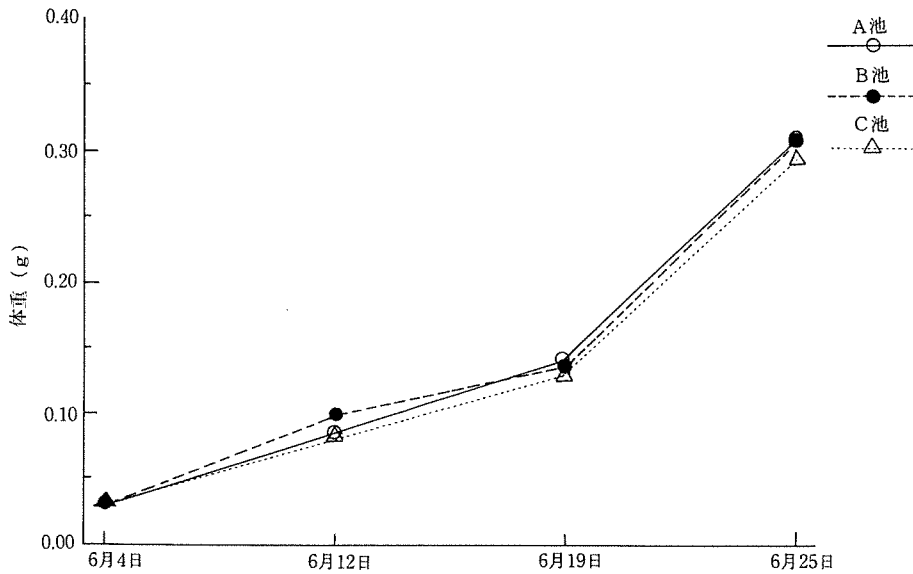


図3 クルマエビの体重の変化

かけての水温の急激な低下は、栽培協会の貯水池に一度貯めた海水を実験に供していたものを直接水産研究センター沖より揚水して使用方法に変えたことに伴うものである。各池の水温の変化はほぼ同様な変化を示している。最高および最低はそれぞれ各池で同じで、それぞれ6月7日の25.9℃、6月13日の20.3℃であった。

3) PH

PHの平均は、取水口では 8.15 ± 0.10 、A池の排水口では 8.21 ± 0.19 、B池の排水口では 8.22 ± 0.18 、C池の排水口では 8.20 ± 0.16 で、取水口より各池の排水口のPHが高かった。各池のPHの変化はほぼ同じ値を示した(図5)。

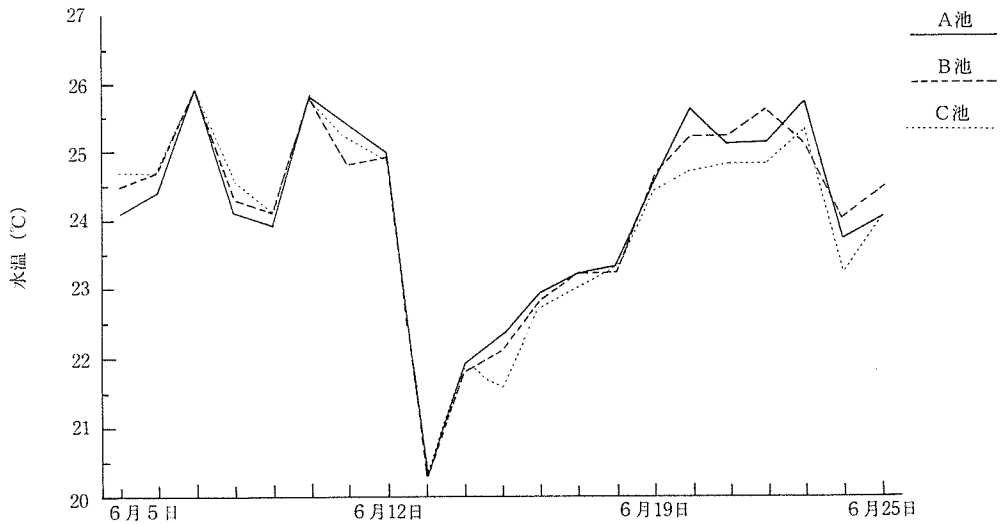


図4 水温の変化

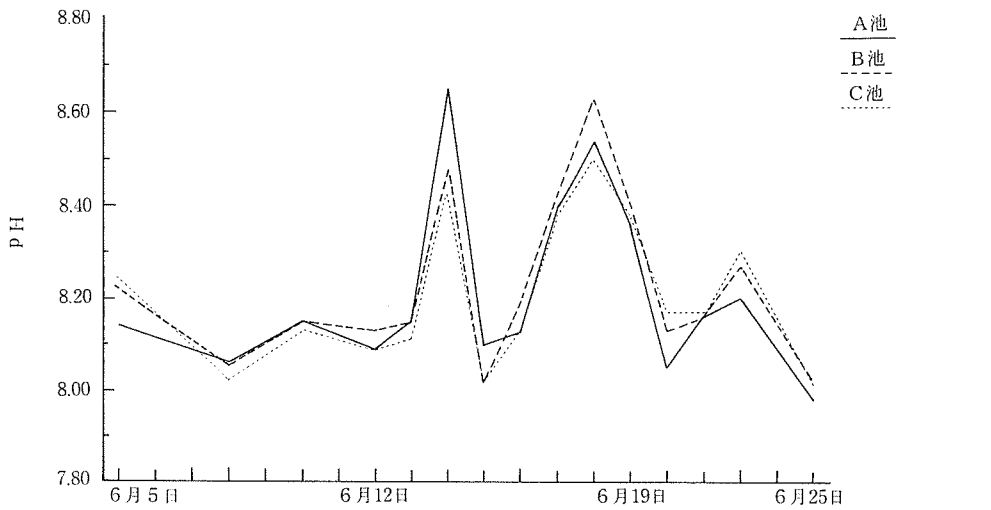


図5 pHの変化

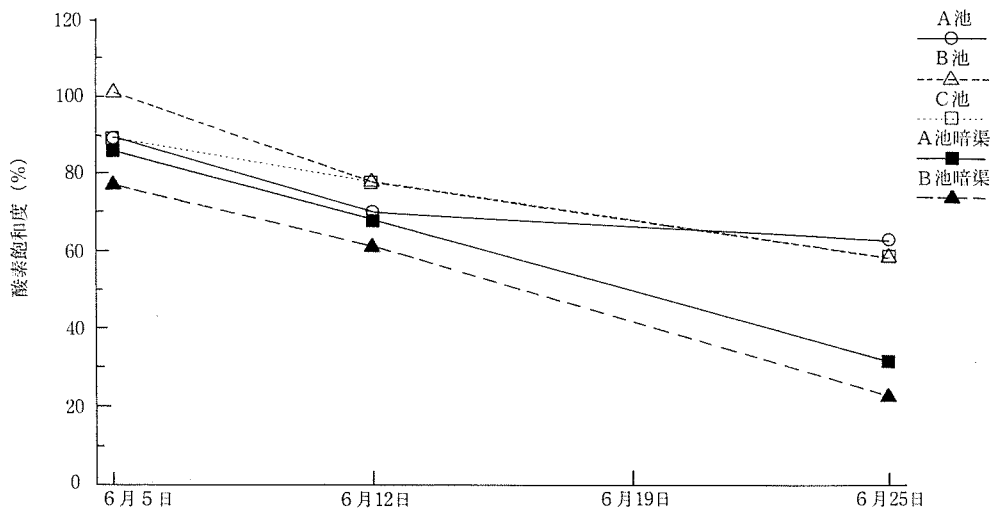


図6 酸素飽和度の変化

4) 溶存酸素

各池の排水口における酸素飽和度（溶存酸素）は、実験開始直後の6月5日には、B池では101%、A、C池では89.3%を示したが、実験の経過とともに減少して、6月25日にはA池62% (3.2ml/ℓ)、B、C池では58% (3.0ml/ℓ)を示した（図6）。一方暗渠排水口では、6月5日にA池では86%、B池では79%を示したが、6月25日には、A池では31% (1.9ml/ℓ)、B池では22% (1.1ml/ℓ)と著しく低下した。

5) アンモニア態窒素 (NH₄-N)

各池の排水口でのアンモニア態窒素の値は、測定期間を通じて全般に暗渠排水を設置したA、B池の方が設置しなかったC池よりもやや低い値を示し、6月19日までは各池ともにほとんど変化なかったが、それ以降6月25日にかけて増加した（図7）。この時（6月25日）には、A、B池、Cの排水口の値 (7.3~9.8 μg-at/ℓ) は取水口 (2.5 μg-at/ℓ) の約3~4倍を示した。一方暗渠排水からの排水の値は、A、B池とも実験開始直後の6月5日には、排水口よりも低い値 (0.59 μg-at/ℓ) を示した。6月19日にはA池で12.3 μg-at/ℓ、B池で9.45 μg-at/ℓ、6月25日にはA池では44.8 μg-at/ℓ、B池では12.61 μg-at/ℓと著しく増加した。

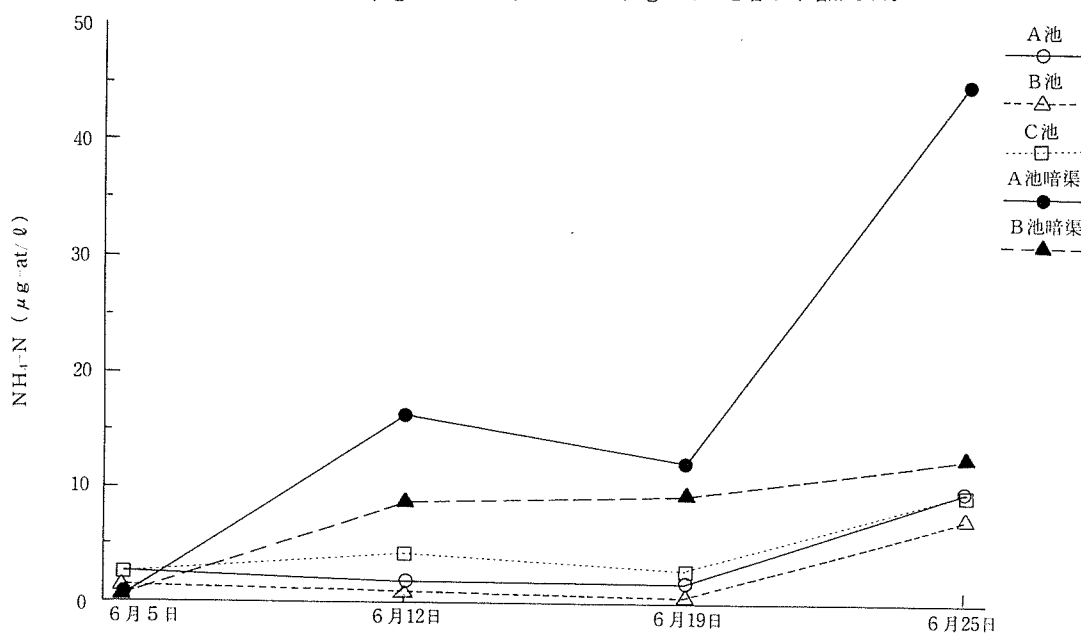


図7 アンモニア態窒素 (NH₄-N) の変化

6) 亜硝酸 (NO₂-N)

各池の排水口での亜硝酸態窒素の値は測定期間を通じて全般に低い値を示した（図8）。A、Bの暗渠排水の排水の値は6月25日には各池の排水口での値とほぼ同じであったが、6月12日にはA池では5.45 μg-at/ℓ、B池では6.31 μg-at/ℓと高い値を示し、6月19日には低い値を示して減少したが、6月25日には再び高い値を示した。

7) 硝酸態窒素 (NO₃-N)

各池の排水口での硝酸態窒素の値はアンモニア態窒素と同様に全般にA、B池の値の方がC池の値よりもやや低い値を示して変化し、各池ともに6月5日から6月12日にかけては、減少したがその後ほぼ実験終了時まで増加していた（図9）。一方暗渠排水からの排水の値は、各池の排水口からの値よりも著しく高く、特に6月12日以降にはその差は一層大きくなった。

8) 無機三態窒素 (D I N)

アンモニア態窒素、亜硝酸態窒素、硝酸態窒素の合計である無機三態窒素 (D I N) の値は各池の排水口では6月19日までほぼ同じであったが、6月25日には各池とも著しく増加した（図10）。一方、暗渠排水から排水の値は時間の経過とともに著しく増加した。

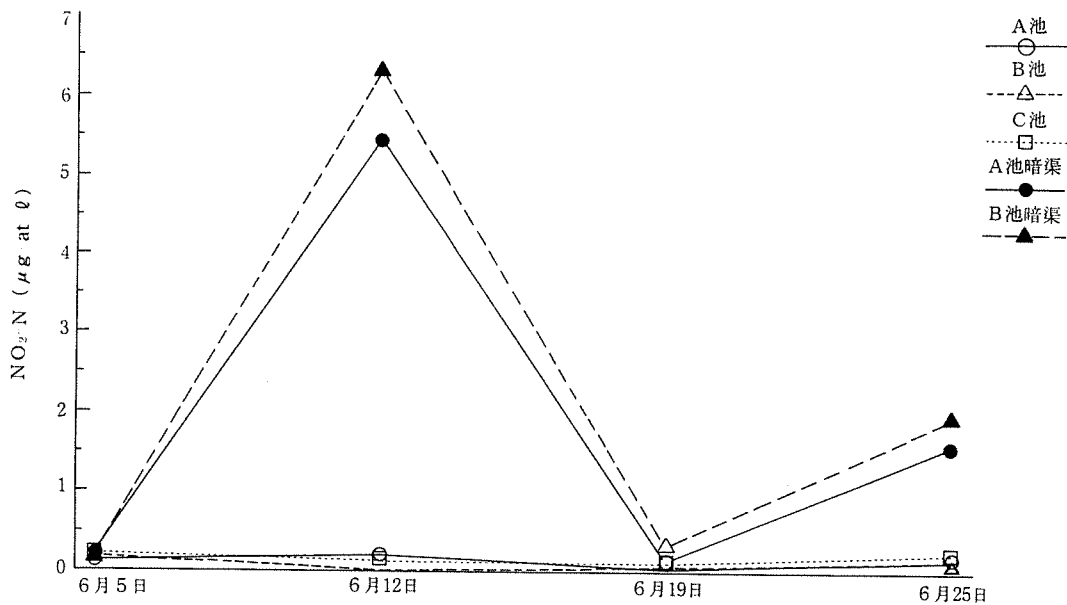


図8 亜硝酸態窒素 (NO₂-N) の変化

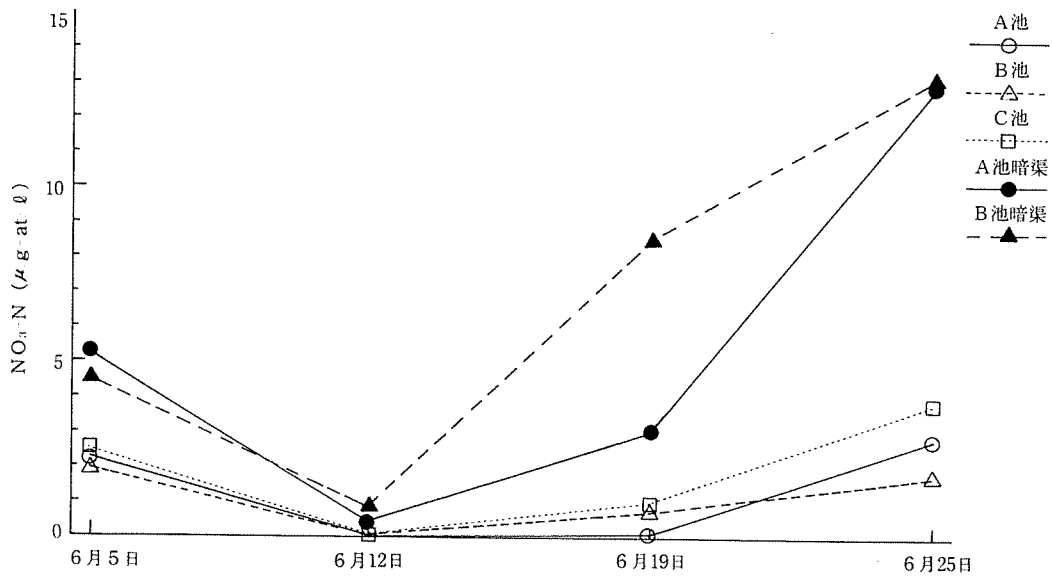


図9 硝酸態窒素 (NO₃-N) の変化

9) リン酸態リン ($\text{PO}_4\text{-P}$)

各池の排水口でのリン酸態リンの値はほぼ同じ ($0.28 \mu\text{g-at}/\ell$) であったが、その後わずかに増加した (図11)。一方、暗渠排水からの排水では実験開始当初の6月5日には各池の排水口より著しく高い値を示したが、6月12日には著しく減少して、各池の排水口よりわずかに高い程度まで減少したが、その後増加した。

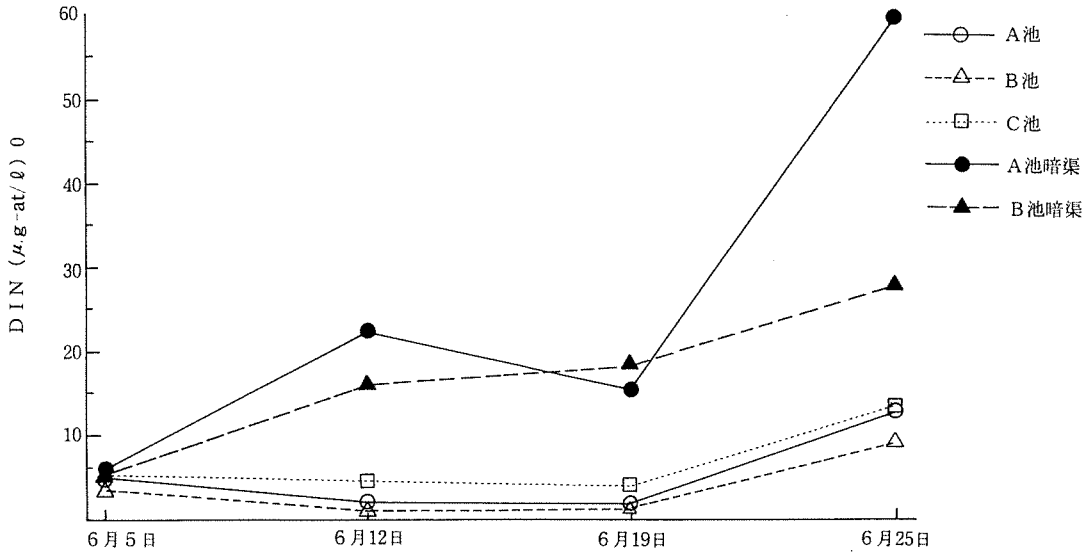


図10 無機三態窒素 (DIN) の変化

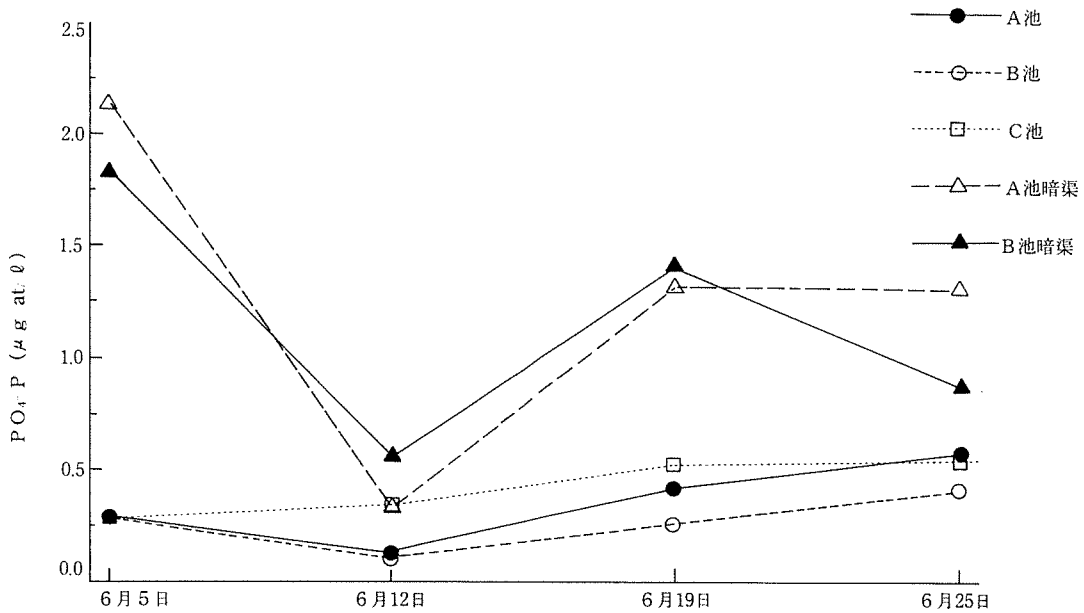


図11 リン酸態リン ($\text{PO}_4\text{-P}$)

10) 細菌数

細菌数は各池の排水口および暗渠排水口からの排水では経時的变化はほとんど認められず、暗渠排水を設置したA、B池の排水口での値は取水口での値とほぼ同様な値を示していたが、暗渠排水口からの排水の値はそれらの値よりも著しく高い値を示していた(図12)。一方、暗渠排水を設置していないC池の値はA、B池よりも著しく高く、暗渠排水口での値とほぼ同じ水準の値を示していた。

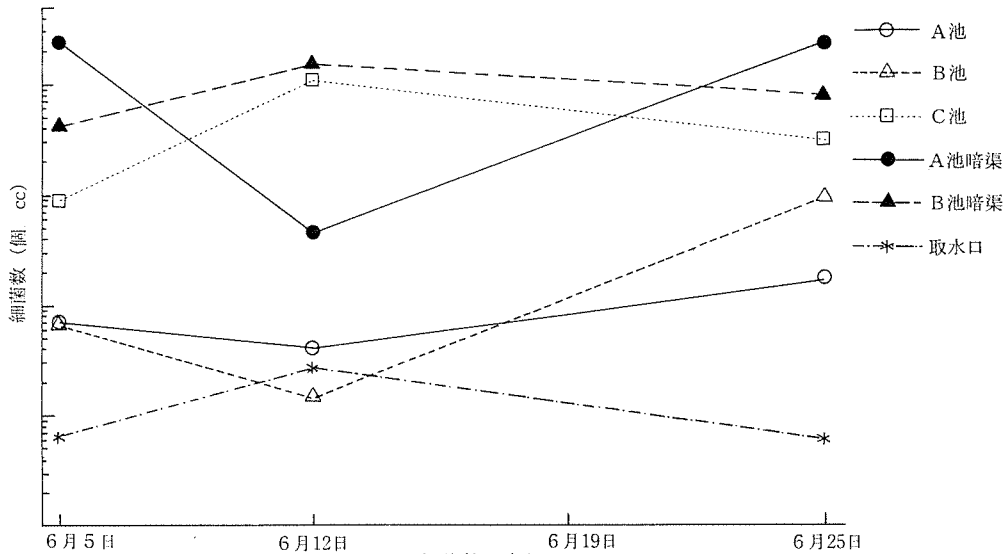


図12 細菌数の変化

考 察

各池の排水口から流出している水のアンモニア態窒素は、飼育開始直後には各池への取水と変わらない濃度であるが、飼育経過とともに増加して、取水口の約3~4倍前後の値を示している。同様に無機三態窒素(DIN)も著しく増加している。また、各池の排水口から流出している水の酸素飽和度は飼育初期においてはほぼ酸素飽和した状態であったが、その後減少している。これらのことから、各池の水質が次第に悪化していることが明かである。一方、A、B池の暗渠排水口から流出する水を見ると、飼育開始初期では酸素飽和度は高く、アンモニア態窒素は低い値を示していたが、6月25日になると酸素飽和度は実験開始時の1.3~1.4に減少し、アンモニア態窒素は増加している。アンモニア態窒素の全てが硝酸態窒素まで酸化されず一部そのまま排出されているが、これは底表面に堆積した有機物が、浸透する海水の流速が速いため硝酸態窒素まで酸化されずアンモニア態窒素で暗渠排水パイプを通過して排出されると考えられる。これらのことから水質と同様に底質も各池ともに汚染が進行していることが明かである。また、暗渠排水口から流出する水の酸素飽和度が飼育の経過とともに著しく減少したことから、底砂中で有機物の分解に酸素が消費される量が増加していることが明かである。したがって、暗渠排水を設置していないC池およびA池の畝のない片方では底砂中が無酸素となっており、還元層が発達していると考えられる。

Kawaiら¹⁰⁾はアンモニア酸化細菌および亜硝酸塩酸化細菌の増殖は、酸素飽和の時に最も大きく、酸素飽和度6%においてもある程度進行すると報告している。本実験において、暗渠排水口から流出する水の酸素飽和度は、6月25日においてもA池では31%、B池では22%を示している。これらのことから、暗渠排水による水の移動の様子は確認していないが、少なくとも水が流れている部分については畝の内部においてもアンモニアおよび亜硝酸塩酸化細菌は活発に活動していたものと考えられる。このことは暗渠排水口から流出する水中の亜硝酸塩および亜硝酸塩酸化細菌は活発に活動していたものと考えられる。このことは暗渠排水口から流出する水中の亜硝酸塩および硝酸塩が各池の排水口から流出する値よりも高いことから明かである。この時、底砂中に補給された

酸素の量を{(排水口から流出する溶存酸素量) - (暗渠排水口から流出する水の溶存酸素量)} × (暗渠排水口からの流出量) の式から試算すると、

$$A池: (4.57 - 2.28) \text{ ml} / \ell \times 12 \ell / \text{min} = 27.48 \text{ ml} / \text{min}$$

$$B池: (4.29 - 1.68) \text{ ml} / \ell \times 12 \ell / \text{min} = 31.32 \text{ ml} / \text{min}$$

$$(4.29 - 1.59) \text{ ml} / \ell \times 12 \ell / \text{min} = 32.40 \text{ ml} / \text{min}$$

$$\text{平均} = 30.40 \text{ ml} / \text{min}$$

となる。これらのことから1畝当たり毎分約30mlの酸素が補給されていることになる。一方、C池の海水中に浮遊する細菌数は暗渠排水パイプを設置している池よりも多かった。このことから、暗渠排水を設置しなければ池中および池底で発生した細菌は池中に浮遊し、排水口から流出するのみである。暗渠排水を設置すると底砂中を通過して暗渠排水から流出することが可能になるばかりでなく、池底およびその付近に発生した細菌が池中に浮遊することが押さえられていると考えられる。

以上のことから、暗渠排水パイプを設置することによって底砂中の還元層が発達することを防止することと併せて底砂をろ過層の代わりに利用できる可能性が明かとなった。合わせて、暗渠は池中の細菌数を減少させる特性があることが明かとなった。今回試みた方法は、現在行われているクルマエビ養殖池に利用でき、しかも農業用の暗渠排水用パイプを利用する方法で施工および資材が比較的安価にすむ利点が考えられる。しかし、養殖池に利用するに当たっては、暗渠排水パイプを埋設する深さ、間隔、パイプの径、また同パイプ中の排水を潮の干満を利用する方法、同パイプの設置の有効期間など検討する必要があると考えている。

要 約

- 1) 実験は1990年6月4日から21日間、熊本県栽培漁業協会大矢野事業場のコンクリート製の池に砂を盛り上げて畝を2本設け、農業用暗渠排水用パイプ(多孔管パイプ外径50mm、8m)を畝の中央に1本ずつ、片側に1本、および同パイプを埋設しない区をもうけ同パイプの水質および底質に及ぼす影響を調べた。クルマエビは、大矢野事業場で種苗生産された(平均全長16.9mm、平均体重0.037g)のものを各池に3.5万尾を用い放養した。給餌量の合計は同じとした。実験終了時のクルマエビの成長および生残率は各池ともほぼ同じ値を示した。
- 2) 暗渠排水を設置した池の排水口から流出する水中のアンモニア態窒素および細菌数は設置していない池のものよりも小さい値を示した。
- 3) 暗渠排水口から流出する水の酸素飽和度は22~31%で、アンモニア酸化細菌および亜硝酸塩酸化細菌の増殖の限界とされている値よりかなり高い値を示していた。

文 献

- 1) 今井丈夫：浅海完全養殖，恒星社恒星閣，1-450，(1971)
- 2) 山本正・市村武美・田地野直哉・石川雄介：クルマエビ養殖池における暗渠排水の目的、施工およびその効果について、水産増殖，8(2)，133-137，(1960)
- 3) 鹿児島県水産試験場：クルマエビ集約生産試験，鹿児島県水産試験場事業報告，402，(1970)
- 4) 鹿児島県水産試験場：クルマエビ集約生産試験Ⅱ，鹿児島県水産試験場事業報告，541-546，(1971)
- 5) 鹿児島県水産試験場：クルマエビ集約生産試験Ⅲ，鹿児島県水産試験場事業報告，585-591，(1972)
- 6) 鹿児島県水産試験場：クルマエビ集約生産試験Ⅳ，鹿児島県水産試験場事業報告，732-740，(1973)
- 7) 鹿児島県水産試験場：クルマエビ集約生産試験Ⅴ，鹿児島県水産試験場事業報告，48，(1974)
- 8) 鹿児島県水産試験場：クルマエビ集約生産試験Ⅵ，鹿児島県水産試験場事業報告，45，(1975)
- 9) 鹿児島県水産試験場：クルマエビ集約生産試験Ⅶ，鹿児島県水産試験場事業報告，52-53，(1976)
- 10) Kawai,A and Yosida,M.1968,Nitrifying bacteria in the coastal environments,Bull.Misaki Marine Biol.Inst.Kyoto Univ.,12,79-80(1968)

採卵用親魚ヒラメに発生した大量斃死について

木村武志 中野平二 梅本敬人* 磯村憲司**

*熊本県水産振興課栽培漁業協会派遣職員 **財団法人熊本県栽培漁業協会

On a massive mortality of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) cultured for taking eggs.

Takeshi Kimura, Heiji Nakano, Takato Umemoto, Kenji Isomura

熊本県栽培漁業協会ではヒラメの種苗生産事業に用いる卵の供給のため種苗生産したヒラメを海面筏に張った海底底付け網（縦10m×横10m×深さ：満潮時10m，干潮時8m，編目5cm）に収容して飼育している。平成2年度の飼育は300尾（雌：雄＝1：1）を収容し、凍結したイカナゴを解凍して10kg/日程度与えている。採卵のため平成2年の10月22日より陸上の円形コンクリート水槽（水量100kl，水深2m）に収容して80W蛍光灯8基を用いて平成3年3月4日まで午前0時まで電照による長日処理を行った。産卵水槽における収容状況は雄64尾、雌52尾（平均全長53.9cm，平均体重1.9kg）を収容した。産卵が終了したので再び海面筏に移動したところ、大量斃死が発生したのでこの魚病発生状況について報告する。

材料及び方法

斃死は水温が17.5℃になる平成3年5月上旬ころから発生し平成3年7月まで継続した。罹病魚は元気無く水面を浮遊しやがて海底や網のたわみに沈下して斃死した。斃死魚は網や潜水による取り揚げを行い焼却したが海底で腐敗し取り揚げられなかった個体も多く、最終的には平成3年7月10日に残った個体を全て取り揚げたところ、ほぼ100%が斃死していた。

斃死魚の調査は平成3年6月24日と平成3年7月12日に行い、細菌検査は1.5%のNaClを添加したBHI，通常のBTB，ティポール，TS及び海水サイトファグ寒天培地を用いて腎臓，脳及び体表病患部より細菌分離を行った。

病理組織の観察は6月の調査の際に腎臓，肝臓，生殖腺，筋肉，消化管を10%の中性ホルマリンで固定して脱水後、パラフィンで包埋し、5μmの切片としてヘマトキシリン・エオシンの2種染色を施した。

感染実験として7月12日に採集した全長38cm，体重760gの病魚の生殖腺を腹腔内液でホモジナイズして円心分離（5000r.p.mで10分間）を行い得られた上澄みとこれを0.45μmのフィルターでろ過したものをそれぞれ健康なヒラメ10尾（全長143.7mm）の腹腔内に100μlずつ注射した。飼育は100ℓ黒色ポリカーボネイト水槽で、ろ過海水を用いて流水飼育（20回転/日）を行った。実験期間は10日間とし期間中は無給餌で飼育した。

結果及び考察

図1に示すように今回の斃死は水温17.5℃から始まり24.0℃まで継続した。

外観症状は有眼側の体色が黒色化し（図2）、有眼側及び無眼側の体表に皮膚が剥がれ筋肉部が露出した部分（図3，4）が観察された。解剖すると若干の腹水の貯留と生殖腺の著しい蓄血及び出血（図5）、肝臓の肥大化（図6）、鰓ぐされ（図7）が観察された。

病魚の細菌検査は6月24日と7月12日に行い、6月の検査ではいずれの部位からも細菌分離はできなかったが

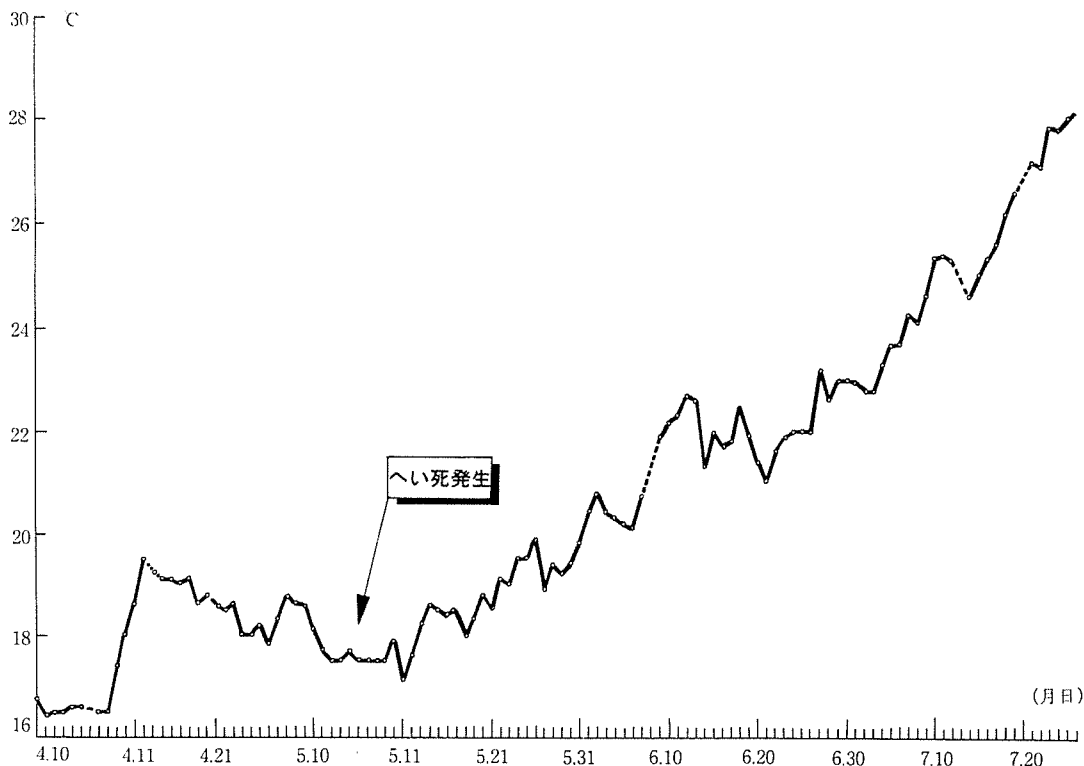


図1 魚病発生時の水温変化

7月では腎臓よりエドワジェラ・タルダ (*Edwardsiella tarda*) が分離された。また筋肉の露出部分には繊毛中のスクーティカ (*Scuticociliata*) の寄生が¹⁾多数見られた (図8)。

感染実験の結果を表1に示した。

フィルターろ過を行わない区は実験開始後8日間で全て斃死し、斃死魚はいずれも脱腸、肛門部発赤、腹水貯留、肝臓の壊死等のエドワジェラ症の症状を呈した。ろ過を行った区

表1 感染試験による斃死状況

区/日	7/12	13	14	15	16	17	18	19	20	累積斃死数
A区				1			1			2
B区			2		6	1			1	10

A区の斃死は飛び出しによるもの。

B区の斃死はいずれも腹部膨満、腹水貯留、脱腸の症状があった。

は水槽外への飛び出しによる斃死が2尾ある他は実験期間中いずれも斃死は無かった。期間中の水温は24℃~26.5℃であった。

病理組織切片の観察結果は腎臓において著しい出血、細尿管等の組織の融解と壊死、黒色体色細胞集塊、などの組織像が観察された (図9) 精巣は著しい出血、細胞の壊死が見られ (図10)、体側筋には粘液中にスクーティカの寄生が観察された (図11)。また肝臓には大きな病変は観察されなかった (図12)。

これらの結果より今回の大量斃死は7月の調査及び、感染実験の結果からはエドワジェラ病とスクーティカの寄生が主因と考えられる。しかし水温が20℃以下の6月の瀕死魚の検査では *Edwardsiella tarda* は分離されなく、培検したところエドワジェラ病に特徴的な肝臓の壊死、腹水の大量の貯留も見られなかった。また精巣の著しい出血が観察され、この際に作成した病理組織切片の観察では *Hirame rhabdovirus* 病 (HRV) に類似した組織像が観察された。²⁾HRVの九州における発生は報告されておらず、また既報³⁾⁴⁾によるとHRVは水温が15℃以上では発生せず、生殖腺の出血の他に筋肉中の激しい出血も伴うことが報告されており、本症状と異なる点もある。今後同様の症状が発生した場合にはウイルス病の確認が必要であると思われる。

要 約

1. 採卵用のヒラメ親魚に魚病が発生し、水温17.5℃（平成3年5月）から24℃（同年7月）までに100%斃死した。
2. 6月に調査した斃死魚からは病原細菌の分離はされなかったが7月の調査では*Edwardsiella tarda*が分離され、体表にはスクーティカの寄生がみられた。
3. 感染試験は0.45 μ mのフィルターを通さなかった区は全て斃死し、斃死魚はエドワジェラ病の症状を示した。フィルターを通過させた区は飛び出しによる以外は斃死はなかった。
4. 培検によると生殖腺の著しい発赤が観察され、腎臓の病理切片像からもHRVに類似した症状が観察された。

謝 辞

本文をまとめるにあたりご指導を戴いた北海道大学水産学部吉水守博士に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 乙竹 充・松里寿彦(1986)：ヒラメ稚魚のスクーティカ繊毛中(膜口類)症 養殖研究所報告第9号65-68
- 2) 大迫典久・吉水 守・五利江重昭・木村喬久(1988)：HRV感染ヒラメの病理組織学的検討 魚病研究23(2) 117-123
- 3) 五利江重昭・中本幸一・片嶋一男(1985)：海面小割養殖ヒラメのウイルス感染に起因すると考えられる斃死 兵庫県水産試験場研究報告第23号63-68
- 4) 五利江重昭・中本幸一・木村喬久(1986)：1985年兵庫県水産試験場に発生したヒラメのウイルス病について 兵庫県水産試験場研究報告第24号43-47

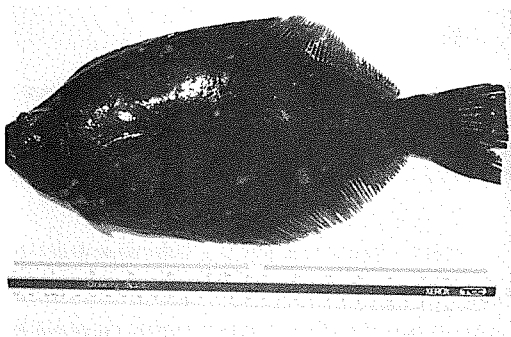


图 2

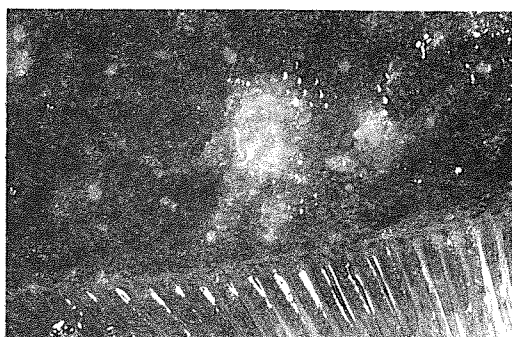


图 3



图 4

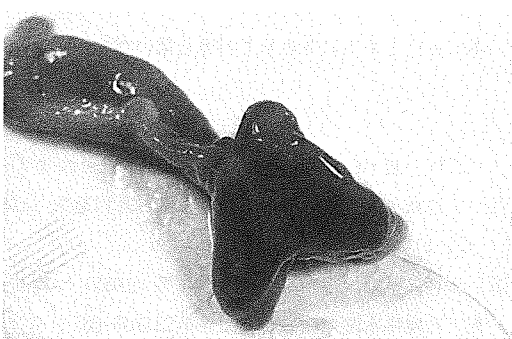


图 5

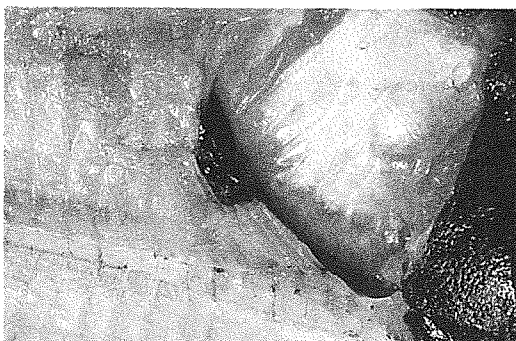


图 6



图 7

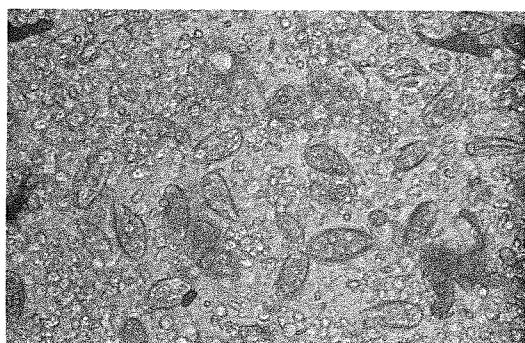


图 8



图 9

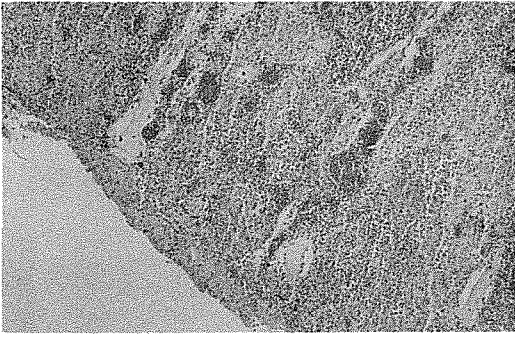


图10

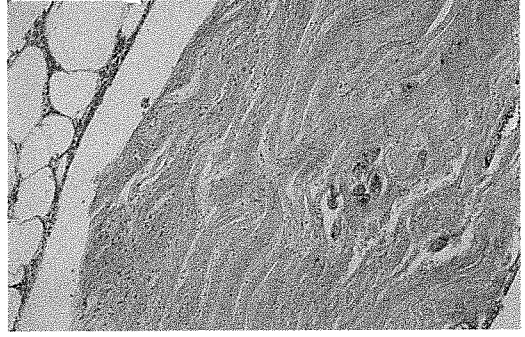


图11

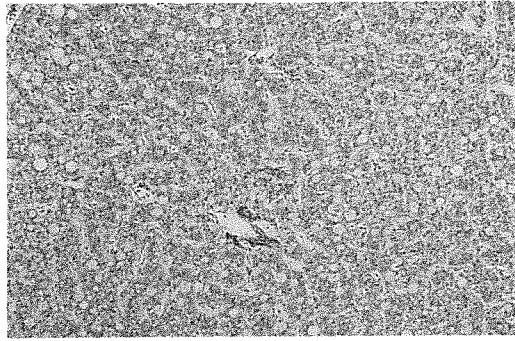


图12

ハマチ育成用飼料の開発に関する研究－1

3種の魚粉代替タンパク質を添加した飼料によるハマチの成長

中野平二・河辺 博・小山長久

Study of rearing diet for yellowtail-I

Growth of yellowtail reared by three diets added proteins substituting fish meal

Heiji Nakano Hiroshi Koube Nagahisa Oyama

ハマチ養殖の餌料は、当初、イワシ、サバの生餌、及び魚肉ミンチが主体に用いられていたが、これらはハマチに摂餌されずに水中に散逸する割合が多く、そのため餌料効率が悪く、養殖業が盛んになるにつれ漁場環境の悪化の原因となった。これらの欠点を補うため1984年頃より魚肉ミンチに魚粉、展着剤、栄養剤を加え、成形したモイストペレットが普及した。このモイストペレットは水中での散逸が少なく餌料効率が高い特徴を持つが、船上にモイストペレット製造器を設備する必要があるが、また長期保存が出来ないという欠点を持っている。

このような中で、新型の軟質ドライペレット(ソフトドライペレット)が開発された¹⁾。このソフトドライペレットはハマチが活発に摂餌し、保存性に優れ、また魚粉以外の蛋白質を利用できるという特徴を有している。

1990年より当センターにおいて、マリノフォーラム21よりの委託研究として、ソフトドライペレットをつかったハマチ飼育試験を開始し、1990年はソフトドライペレットにおける蛋白質、脂質の適正含有量について検討を行った。この結果に基づき1991年は、近年のイワシの漁獲量の減少に対応するため、ソフトドライペレットに含まれる魚粉の代替タンパク質として、大豆粕、コーングルテンミール、フェザーミールの3種を添加したソフトドライペレットで飼育したハマチと、モイストペレットで飼育したハマチとを餌料効率、生残率等で比較し、その有効性を検討した。

材料及び方法

供試魚

本センターの海面小割り筏で1990年6月から1年間ハマチ用ソフトドライペレットで飼育した魚を供試魚とした。開始時の各区尾数と平均体重、総重量を表1にした。

試験期間

試験前の馴致を1991年4月10日から6月24日に行い、試験期間は1991年6月28日から同年10月15日までとした。

表1 開始時の各区尾数と平均体重、総重量

	1区	2区	3区	4区	5区
尾数	112	111	110	128	110
総重量(kg)	148.26	146.78	146.96	167.12	142.44
平均体重(kg)	1.32	1.32	1.34	1.31	1.29

飼育生簀網は4.5m×4.5m×4.0m及び4.5m×4.5m×3.0mの6節ハイゼックス網を使用した。

試験区

表2に示した組成で魚粉の代替タンパク質の種類、割合を変えたソフトドライペレット各4区とモイストペレ

表2 ソフトドライペレット各区の組成 (%)

原料名	1区	2区	3区	4区
沿岸魚粉	50.0	30.0	30.0	30.0
小麦粉または生澱粉	8.42	5.42	10.42	7.92
45%大豆糟	15.0	15.0	15.0	15.0
コーングルテンミール	—	21.0	—	10.5
フェザーミール	—	—	16.0	8.0
リジン	—	1.0	1.0	1.0
フィードオイル	21.0	22.0	22.0	22.0
ビタミン混合	3.0	3.0	3.0	3.0
ホスビタンC	0.05	0.05	0.05	0.05
ミネラル混合	2.5	2.5	2.5	2.5
エントキシン	0.03	0.03	0.03	0.03

ト1区を設定した。ソフトドライペレットは日本配合飼料株式会社水産開発センターで2軸エクストルーダーを用いて計13mm、長さ16mm前後のものを作製した。

モイストペレットは本センターのモイストペレット造粒機により、魚肉（イカナゴ）：マッシュ＝1：1、総合ビタミン剤2.6%、フィードオイル10%の割合で混合しソフトドライペレットとほぼ同様の大きさになるように作製した。

給餌方法

給餌量はソフトドライペレット区は飽食量とし、モイストペレット区はソフトドライペレット区の蛋白質給餌量とほぼ同量となるようにソフトドライペレット区の1.3～1.5倍量を給餌した。

給餌は手撒きで、流出がないように観察しながら行い、月のうち第2・4土曜日と毎日曜日は給餌せず、それ以外は悪天候で筏にいけないうち以外は毎日給餌を行った。

飼料の一般成分分析

日本配合飼料株式会社水産開発センターでソフトドライペレット、モイストペレットの水分、粗脂肪、粗蛋白、灰分を常法により測定した。

魚体測定

取容時、終了時には一試験区当たりの総魚体重、総尾数、20～30尾当たりの尾叉長、体重、肝臓重量を測定し、中間時（8月2日、9月20日の2回）は30尾当たりの尾叉長、体重を測定した。

結果及び考察

飼料の一般成分分析

一般成分分析結果を表3に示した。

飼育成績

飼育期間中の水温を図1に示した。

飼育成績結果を表4に、尾叉長、体重の推移を図2、3に示した。また尾叉長、体重の終了時の有意差検定結果を表5に示した。

表3 一般成分分析結果 (%)

	1区	2区	3区	4区	5区
水分	10.3	7.4	8.5	7.8	36.4
粗蛋白	40.2	43.9	41.1	41.7	31.1
粗脂肪	23.8	23.7	24.4	25.2	19.1
灰分	10.3	7.6	7.8	7.8	7.0

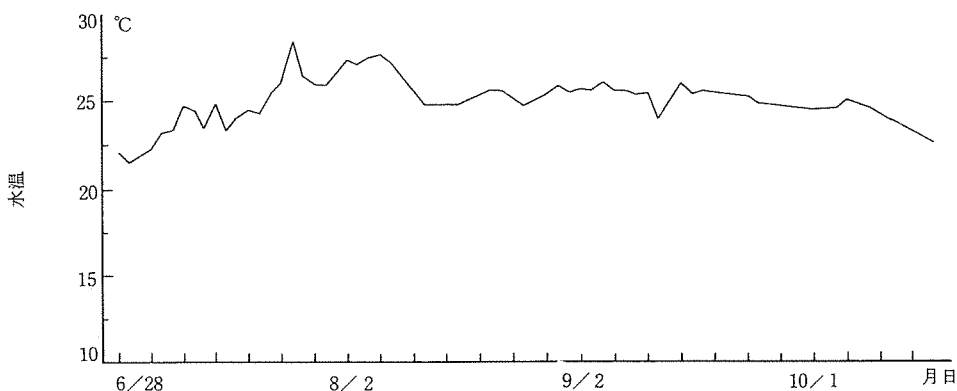


図1 飼育期間中の水温

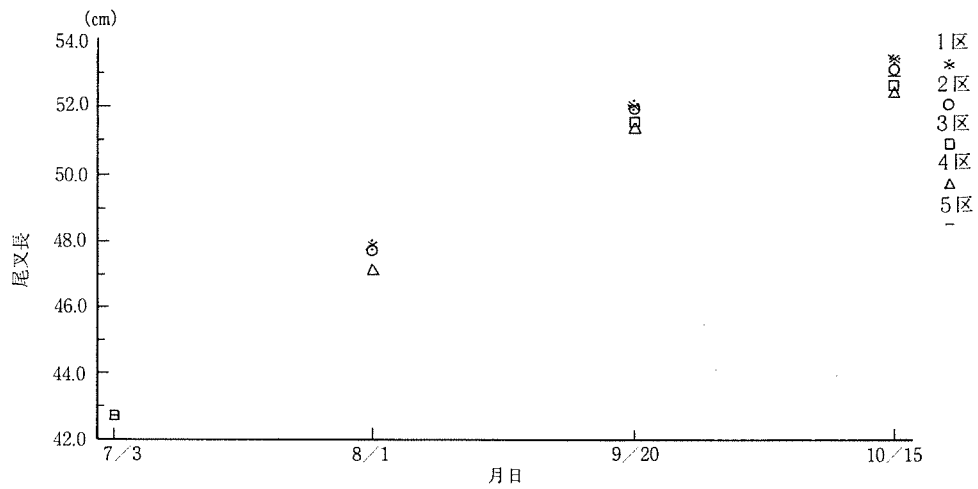


図2 尾叉長の推移

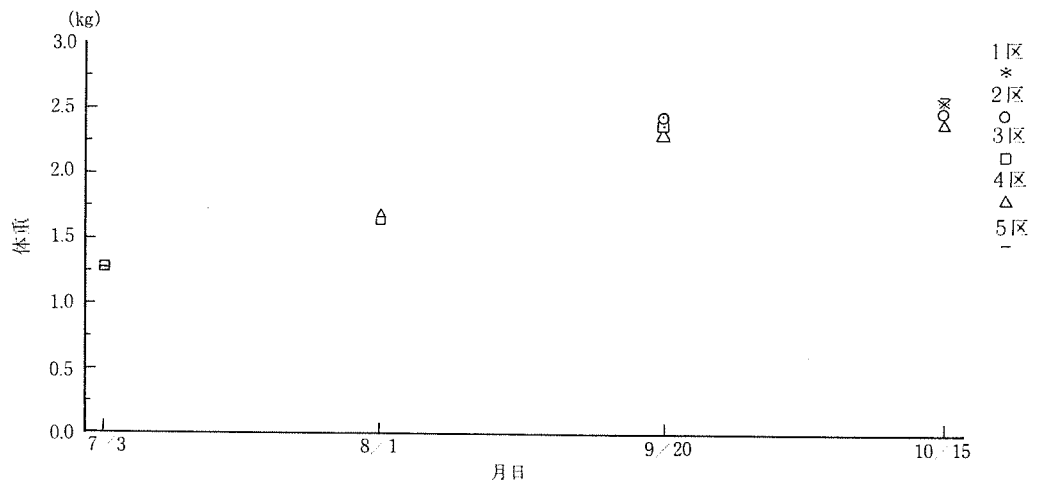


図3 体重の推移

表4 飼育成績結果

期間	項目	1区	2区	3区	4区	5区
収容時	尾数(尾)	112.00	111.00	110.00	128.00	110.00
	平均体重(kg)	1.32	1.32	1.34	1.31	1.29
	総重量(kg)	148.30	146.80	147.00	167.10	142.40
6/28 ~ 8/1 給餌日数 21	尾数(尾)	108.00	107.00	102.00	120.00	105.00
	平均体重(kg)	1.65	1.65	1.64	1.67	1.67
	総重量(kg)	183.00	166.90	172.20	204.50	170.40
	増重量(kg)	34.70	20.10	25.20	37.40	28.00
	給餌量(kg)	75.00	73.90	73.40	79.70	86.80
	餌料効率(%)	46.00	27.00	34.00	47.00	32.00
	生残率(%)	96.00	96.00	93.00	94.00	95.00
8/2 ~ 9/20 給餌日数 33	尾数(尾)	107.00	107.00	102.00	120.00	102.00
	平均体重(kg)	2.42	2.45	2.39	2.30	2.42
	総重量(kg)	258.90	262.20	243.80	276.00	246.80
	増重量(kg)	75.90	95.30	71.60	71.50	76.40
	給餌量(kg)	159.80	150.20	160.80	161.60	262.40
	餌料効率(%)	47.00	63.00	45.00	44.00	29.00
	生残率(%)	99.07	100.00	100.00	100.00	97.14
9/21 ~ 10/15 給餌日数 10	尾数(尾)	107.00	78.00	101.00	117.00	100.00
	平均体重(kg)	2.55	2.47	2.56	2.37	2.49
	総重量(kg)	272.95	192.17	258.51	276.79	248.91
	増重量(kg)	14.05	1.56	14.71	8.19	7.00
	給餌量(kg)	58.88	55.44	58.60	60.00	76.50
	餌料効率(%)	24.00	3.00	25.00	14.00	9.00
	生残率(%)	100.00	72.90	99.02	97.50	98.04
通算1 (1~3期)	増重量(kg)	124.65	116.96	111.51	109.69	106.51
	給餌量(kg)	293.68	279.54	292.80	301.30	425.70
	餌料効率(%)	42.00	42.00	38.00	36.00	25.00
	生残率(%)	95.54	70.27	91.82	91.41	90.91
	日間給餌率(%)	2.17	2.44	2.22	2.09	3.35
通算2 (1~2期)	増重量(kg)	110.60	115.40	96.80	108.90	104.40
	給餌量(kg)	234.80	224.10	234.20	241.30	349.20
	餌料効率(%)	47.00	51.00	41.00	45.00	30.00
	餌料効率dry(%)	53.00	56.00	45.00	49.00	47.00
	生残率(%)	96.00	96.00	93.00	94.00	93.00
	日間給餌率(%)	2.12	2.02	2.19	2.00	3.29
	日間給餌率dry(%)	1.90	1.87	2.01	1.84	2.09
	日間成長率(%)	1.09	1.11	1.04	1.02	1.13

表5 有意差検定結果

尾叉長	1区	2区	3区	4区	5区	体重	1区	2区	3区	4区	5区
1区		○	○	○	○	1区		○	○	○	○
2区			○	○	○	2区			○	○	○
3区				○	○	3区				○	○
4区					○	4区					○
5区						5区					

○…… 5%水準で有意差無し

△…… 5%水準で有意差あり

×…… 1%水準で有意差あり

1) 第1期 (1990年6月28日から1990年8月1日)

4区と5区が成長が良く各区の平均体重は1.65kg~1.67kgであった。生残率は各区とも大きな差はなかった。餌料効率は4・1・3・5・2の順に良く、2区は他の区に比べ低い値となった。

ハマチはソフトドライペレットを摂餌する場合はイクスの下で旋回しながら摂餌するため、浮いていた餌は摂餌されず、生け簀網の外に散逸していたのが観察された。これより、2区の餌料効率が低いのは、餌料が浮きやすかったため、生け簀の外に流出する餌が多かったためと考えられた。

2) 第2期 (1990年8月2日から1990年9月20日)

2区、1区、5区が成長が良かった。平均体重は2.3kg~2.45kgであり、生残率は各区とも大きな差はなかった。餌料効率は2・1・3・4・5の順に良く、2区は1期とは逆に他の区に比べ優れ、また5区は他の区に比べ低い値であった。これは2期の2区の飼料から、良く沈むように改良されたためと考えられた。また5区の餌料効率が低いのは、下記するようなモイストペレットとソフトドライペレットの特性によると考えられた。

3) 第3期 (1990年9月21日から1990年10月15日)

成長は3区、1区、5区の順に良かった。平均体重は2.37kg~2.56kgであり、餌料効率は3・1・4・5・2区の順に良かったが全体に1期、2期と比較し、低い値となった。これは他の試験期間に比べ2度の台風によって給餌日数が減少したこと及び、たも網ですくったり、麻酔をかけたことによるストレスが原因と考えられる摂餌の鈍化が長かったことが原因と考えられた。また2区が特に給餌効率が低かったのは10月3日の網替えの際に29尾逃がしその後摂餌が鈍り給餌した餌が流失することが多かったためと考えられた。

4) 通算

通算は第3期が台風の襲来や、飼育魚の逃げがあったため、第3期を含めると正常な値でなくなる恐れがあるため今回は第1期と第2期の期間を通算とした。その結果、餌料効率は2・1・4・3・5の順によく、5区は他の区に比べ、低い値であった。モイストペレットはソフトドライペレットに比べ柔らかく、このため摂餌後に一部がえらから放出される。モイストペレットを給餌した5区の餌料効率が低かったのはこのようなモイストペレットの特徴が原因して、全量を利用できなかったためではないだろうか。

日間成長率でみると、5・2・1・3・4の順に優れ、生残率は各区とも顕著な差は見られず特に問題はなかった。また日間給餌率では5・3・1・2・4区の順に優れていた。

餌料効率及び日間成長率の総合では2区及び1区が優れていたが2区は日間給餌率が他の区に比べ低く、また給餌するときの観察結果からも他の区に比べ、ハマチの摂餌が劣る傾向がみられた。

しかしながら、尾叉長、体重の有意差検定では全区に差は見られず、このことより各区とも同様な成長をしたと考えられた。

また今回の結果を1983年に高知県水産試験場で行われた2年ものハマチのモイストペレットによる飼育試験結果²⁾と比較したところ餌料効率 (16.3、27.8)、日間成長率 (0.39、0.26)、日間給餌率 (1.43、1.53)とも今回の結果は劣らない値を示し、今回使用したソフトドライペレットの有効性が推察された。

これらより、魚粉の代替タンパク質として大豆粕、コーングルテンミール、フェザーミールの3種を添加して使用した今回の組成のソフトドライペレットは十分餌として使用可能であると考えられた。

また磯部³⁾によると飼料原料コストを1区を100として比較すると2~4区は94~95%になり約5%のコスト削減になり、この点からも大豆粕、コーングルテンミール、フェザーミールの3種を添加したソフトドライペレットの有効性が考えられた。

要 約

(1) 魚肉代替蛋白を使ったソフトドライペレットを給餌した区の成長は通常のモイストペレットを給餌した区と比べ有為な差は認められなかった。

(2) ソフトドライペレットを給餌した区は通常のモイストペレットを給餌した区と比べ餌料効率が優れていた。

- (3) 生残率はソフトドライベレットを給餌した区と通常のモイストベレットを給餌した区とは差は見られなかった。
- (4) 餌料効率及び日間成長率では2区が優れていたが2区は他の区に比べ、ハマチの摂餌が劣る傾向がみられた。

文 献

- 1) 渡辺武他：ハマチ用ドライベレット 平成元年度日本水産学会春季大会講演要旨集（1990）
- 2) 高知県水産試験場：ハマチ配合飼料の実用化試験 昭和60年度指定研究報告書（1983）
- 3) 日本配合飼料他：ハマチ育成用飼料の開発 平成3年度マリノフォーラム21中間報告会資料（1990）

御所浦町嵐口地区養殖漁場の底質環境の変化について

平山 泉

Studies on chemical change of Bottom Mud in the Culture Grounds, Arakuchi, Gosyonoura.

Izumi Hirayama

熊本県では、県内の主要な養殖漁場の水質及び底質環境の変化を把握するため定期的な調査を実施しており¹⁾、並行して漁場老化の実態を正確に把握し、漁場の収容力について検討するため精密調査を行っている。神戸は峇北町巴湾について²⁾、著者は前報で牛深市茂串湾について³⁾、底質化学成分の鉛直分布と経年変化から漁場の収容力について検討している。

しかし、これらの漁場はいずれも老化の進んだ漁場であり、養殖漁場における初期の環境変化については調査されることがない。

1985年に機会があり養殖開始から4年目の漁場について2年間の調査を実施したのでその結果を報告する。

方 法

調査地点 調査漁場は御所浦島の北東部に位置し嵐口崎と前島の間に位置し、魚類養殖漁場として利用可能な場所であったが、台風期の北東の波浪の影響を強く受けるため、一部が真珠漁場として利用されているだけであった場所を、熊本県が1978年から1981年の4カ年で行った御所浦町嵐口地区浅海漁場造成事業で、85mの方塊式混成堤と30m 6基の浮き消波堤により造成された120,000m²の漁場である。(図1)

漁場内では、500台(5×5m筏換算)の筏が敷設されており、マダイ約100万尾が放養されている⁴⁾。

調査方法 1985年5月から1987年5月まで図2に示す漁場内の8調査点で、エクマン・バーズ採泥器を用い、底泥を採取した採泥器を船上に引き上げてから器内底泥に残った海水が流れ去るまで待ち、その後、口を開き静かに採泥器を上方にずらし底泥をケーキ上に残し、表面の酸化層をスパーテルで集め、COD、全硫化物及び強熱減量の分析に供した。

また、北原式B号採水器により、底上1mの採水を行い、水温と溶存酸素量についても調査した。

分析方法はCODが水質汚濁調査指針の方法⁵⁾、全硫化物が検知管法、強熱減量は貝殻成分の減量を避けるため600°C 2時間加熱する方法、溶存酸素量はウインクラー法によった。

結果及び考察

各分析値の変化 分析結果を養殖域(養殖筏下の定点)と非養殖域(養殖筏下以外の定点)に分け、平均値を図3、図4に示した。

酸素飽和度は、何れの区域においても、夏場低くなり冬場高くなるという顕著な季節変動を示した。

しかし、夏場の飽和度の低下には差がみられ、養殖域の低下が大きく、夏場の成層時期における底泥中の有機

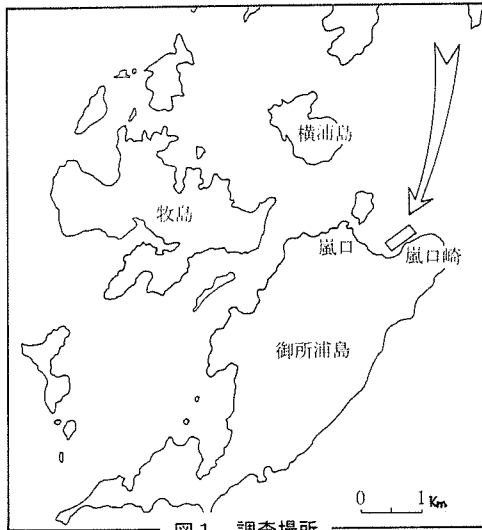


図1 調査場所

物分解にともなう溶存酸素の消費が窺われた。

CODは非養殖域では、分析値の変動は小さく 20mg/g 乾泥前後の値で推移した。養殖域では、非養殖域に比べ変動の幅が大きく、 $25\sim 45\text{mg/g}$ 乾泥の高いレベルで推移した。

全硫化物は、非養殖地域ではCOD同様変動幅が小さく $0.05\sim 0.26\text{mg/g}$ 乾泥の範囲で推移した。養殖域では非常に変動幅が大きく、 $0.26\sim 1.09\text{mg/g}$ 乾泥の範囲で推移していたが、その変動は、酸素飽和度の低下にともなって高くなり、回復にともなって低くなっているようであった。

強熱減量は非養殖域では、CODよりさらに変動が小さく、ほぼ横ばいで推移した。養殖域においては他の分析値に比べ変動幅は小さかったが、徐々に高くなる傾向にあった。

各分析値の経時的な傾向を見るため、調査を始めた1985年5月を1月目として調査終了の25月目までの相関を調べたところ養殖域の強熱減量にのみ有意な正の相関がみられたが、その他の分析項目には変動が大きいため有意な相関関係はみられなかった。

しかし、分析値の変動の主な要因は、酸素飽和度に代表されるように季節変動であると考えられたので、各分析値間の12カ月移動平均をとり季節変動を除去して相関を見ると、図5に示すとおり養殖域では何れも一時回帰の関係が強く、DOは負に、COD、全硫化

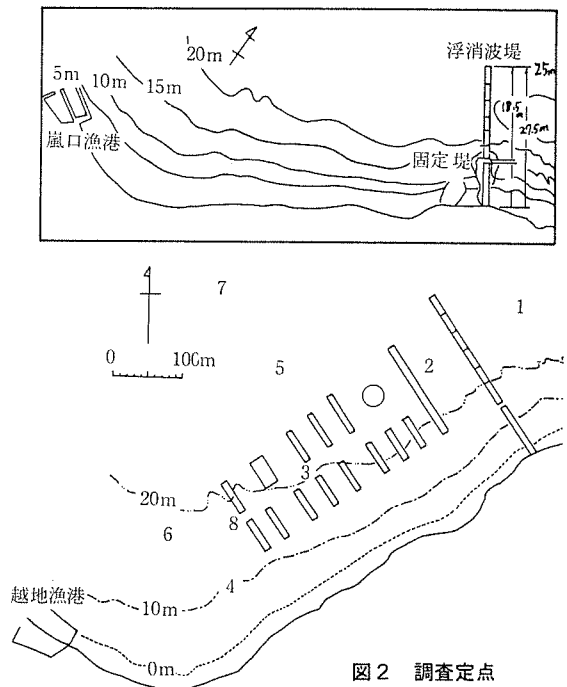


図2 調査地点

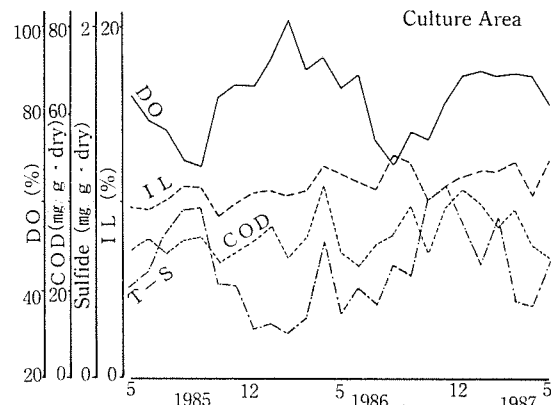


図3 造成漁場の底質環境の変化（養殖域）

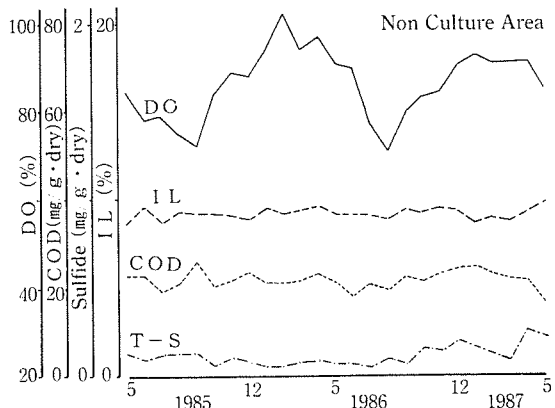


図4 造成漁場の底質環境の変化（非養殖域）

物及び強熱減量は正に、有意な相関 ($d < 0.01$) がみられ、以下の相関式が得られた。

$$\text{DO (\%)} : y = 86.80 - 0.165 \times t \quad r = -0.7844$$

$$\text{COD (mg/g 乾泥)} \quad y = 28.51 + 0.3455 \times t \quad r = 0.9271$$

$$\text{全硫化物 (mg/g 乾泥)} \quad y = 0.41 + 0.0138 \times t \quad r = 0.7407$$

$$\text{強熱減量 (\%)} \quad y = 9.96 + 0.0898 \times t \quad r = 0.9858 \quad (t : \text{月数})$$

つまり、漁場内の養殖筏を設置した場所の底質環境は年々悪化していると考えられた。

そこで、得られた相関式をもとに区間推定を行うと、一年間で、酸素飽和度で約2%の低下がみられ、CODでは約4 mg/g 乾泥、全硫化物では約0.16 mg/g 乾泥、強熱減量では約1%の上昇がみられる計算となった。

しかし、過去の調査で²⁾³⁾、全硫化物は年数を重ねるに従い指数的に上昇することが知られており、今回の推定値よりさらに早く上昇することが予想されるので、今後も補足的な調査を行い、推定値の修正を行う必要があると考えられた。

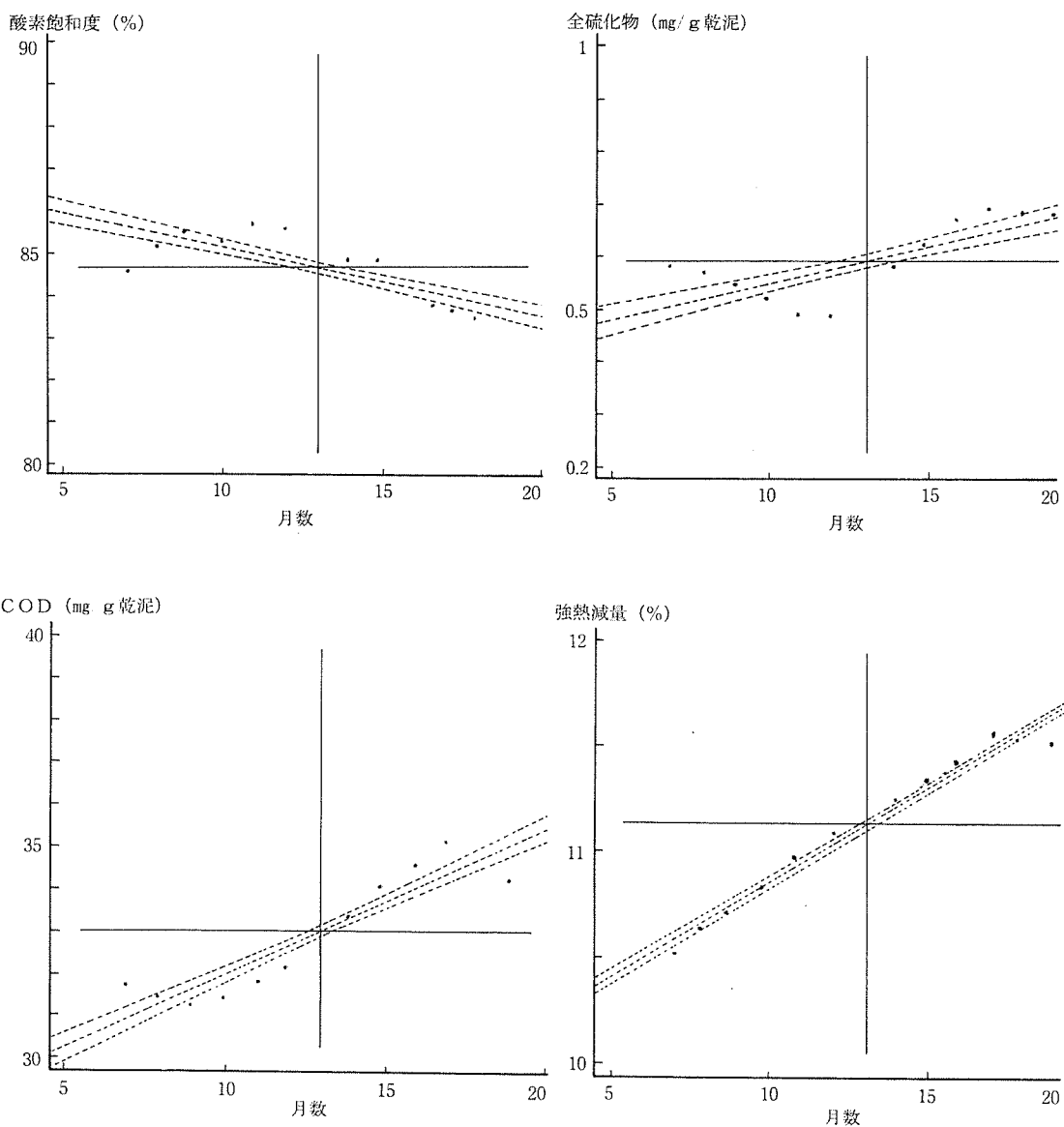


図5 養殖域における各分析項目の12ヶ月移動平均による相関

要 約

1. 比較的養殖年数の短い漁場について、初期の漁場環境の変化を明らかにするため、2年間の底質調査を実施した。
2. 酸素飽和度は、季節により大きく変化し、夏場低下し、冬回復した。
3. CODは、養殖域では非養殖域に比較し、変動幅が大きく、測定値も高かった。
4. 全硫化物は、養殖域での変動が大きく、その変動は酸素飽和度と逆に、夏高く冬低かった。
5. 強熱減量は、非養殖域ではほぼ横ばいであったが、養殖域では漸増傾向にあった。
6. 各分析値の変動の主要因は季節変動である。
7. 1985年5月を1月目として25月目までの各分析値の相関を調べたが、養殖域の強熱減量を除き、有意な相関関係はみられなかった。
8. 各分析値の季節変動を除去するため12カ月移動平均をとり相関をとり直すと、養殖域の各分析値には有意な相関関係がみられた。
9. 相関式をもとに区間推定を行うと、1年間で酸素飽和度は約2%低下し、CODは約4mg、全硫化物は約0.16mg、強熱減量は約1%の上昇がある計算となった。
10. 全硫化物の経年変化は指数的であるから、推定値より早く上昇すると考えられた。

文 献

- 1) 本田彰ほか：漁場環境管理試験，昭和48年度～平成元年度熊本水試事報（1974～1989）。
- 2) 神戸和生：養殖漁場の老化に関する研究－I，熊本水試研報，3，13-20（1983）。
- 3) 平山泉：茂串湾養殖漁場の底質について，熊本水試研報，4，51-58（1985）。
- 4) 熊本県水産振興課：養殖場造成事業（御所浦町嵐口地区養殖場造成事業効果調査）報告書。
- 5) 水産資源保護協会編：新編，水質汚濁調査指針，恒星社恒星閣，東京，1980，P P，244-245。

ガザミの低温輸送に関する研究

松岡良三・山下幸寿

Studies on the Low Temperature Transport of Swimming Crab (*Portunus trituberculatus* MIERS)

Ryouzou Matsuoka, Yukihiisa Yamashita

ガザミは現在僅かではあるが、天草から東京・大阪市場へ直接輸送されており、その際とられている方法は冷海水への浸漬による失神後、冷オガクズを用いたダンボール詰めとし、航空便により輸送している。この方法では東京の場合で荷造り後16～18時間で、大阪の場合には14～16時間でガザミを生きたまま市場に出す事が可能である。しかしながら、航空機利用の場合は輸送経費がかさみ、経営のメリットが少ない欠点がある。

ガザミの輸送の良否を左右させる要因としては、箱詰めするときの失神のさせ方、輸送するときの保蔵温度、オガクズの湿度等が考えられる。そこで、これらについての最適条件を求め、東京・大阪まで陸上輸送に要する36～40時間後に100%生残するよう最適方法を開発する目的で実験を行った。

実験方法

失神のさせ方については、急に冷海水に入れ失神させる急速冷却法と常温の海水にガザミを入れて徐々に冷却して失神させる緩速冷却法の検討を行い、保蔵温度については、恒温室を利用して各温度帯での時間別生残率を調べた。ただし、この場合は乾燥オガクズを用いて実験を行った。

また、実際に東京まで輸送を行い、室内実験結果との符合性を確かめた。

実験期間 実験は、平成2年5月末から9月初めまでと、平成3年6月から12月までの期間に実施した。

供試料 天草郡大矢野町沖で漁獲されたガザミを用いた。甲幅：11.5～21.8cm(平均15.8cm)、甲長：5.5～11.0cm(平均7.8cm)、体重97.1～572.2g(平均243.3g)。漁獲は主としてカニ網により行われ、入荷後は円形ポリカーボネート水槽に収容して蓄養した。

生残率の測定 一群10個体として生残率を測定した。なお、温度の調整はサンヨー冷凍冷蔵庫(pecu1600zwコントローラー付)及び恒温庫を使用した。また、生死の判定法としては、腹部生殖器部分を触れた際、動いたら生存(失神)、動かなかつたら死亡とみなした。

体内温度測定 アンリツ製作所デジタル表面温度計(内部温度センサー付)により測定した。

核酸関連物質分析 過塩素酸法により核酸抽出後、日立655A高速液体クロマトグラフ装置により定量した。

乳酸分析 酵素処理後、日立U-1100分光光度計により340nmでの吸光度を測定した。

結果および考察

冷却効果 ガザミを輸送する際には冷海水に浸漬けて失神させた後、箱詰めする方法が採られている。そこで、ここでは冷却の効果を調べてみた。図-1は急冷却した場合と非冷却の場合の保蔵温度20℃での生残率の変化をみたものである。6時間後まではどの群も変わりはないが、その後非冷却群<11℃冷却群<2℃冷却失神群のよう

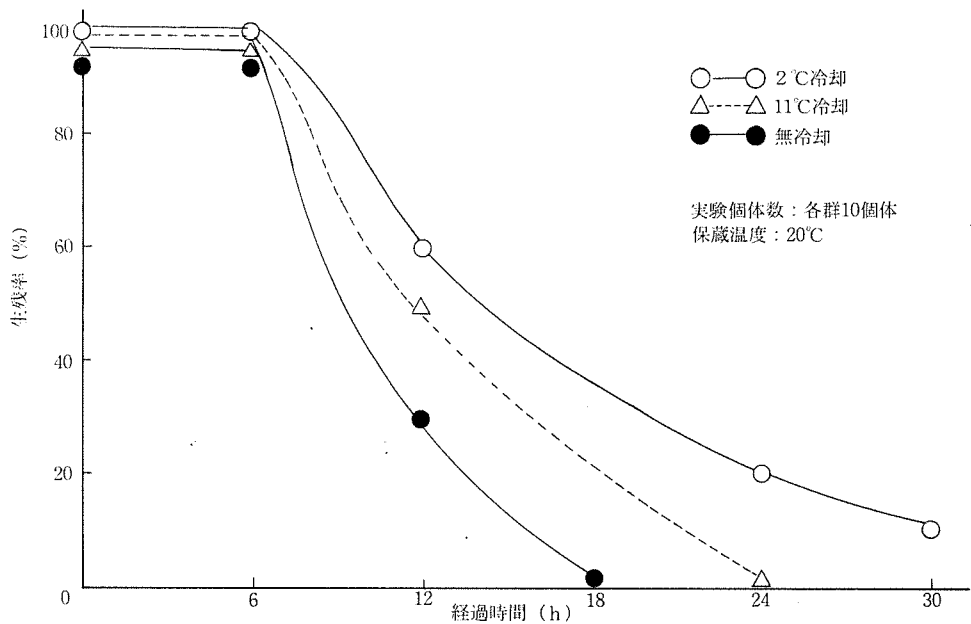


図1 冷却及び非冷却ガザミの20°C保蔵の時の生残率

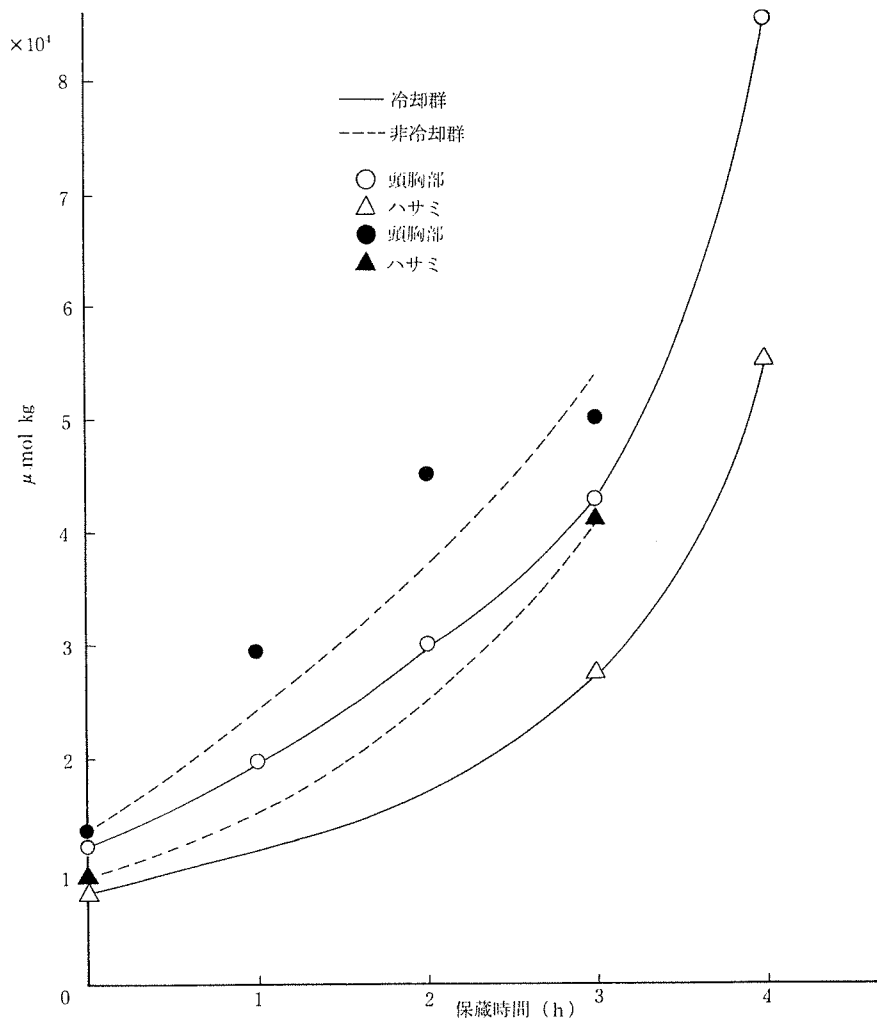


図2 非冷却群と急冷失神群の20°C保蔵における乳酸量比較

に生残率は高くなっている。図-2には非冷却群と急冷却失神群の20℃保蔵における筋肉中の乳酸量を調べたものであるが、ハサミ(掌筋)と頭胸部鰓付近の筋肉とも非冷却群の乳酸量が高くなっている。

同様に、酸素消費量並びに炭酸ガス排出量についても調べてみたが、図-3のように非冷却群の方が輸送には不利である。また、同じ冷却する場合でも2℃で冷却し失神させた方が、11℃で冷却しただけで失神させなかった群より生残率が高いことが判る。

冷却温度 冷却することによりガザミは失神

するが、急速冷却(海水温0.8℃)において浸漬時間5分の場合と30分の場合(いずれもガザミは失神)とでは、その後の生残率に大きな差異は生じなかった。しかしながら、別に冷蔵庫内で行った低温耐性実験では体内温度が約1℃になると死亡するものもはじめ、0～1℃になると約半数が死亡した。

したがって、冷却海水に長時間浸漬しておくと、その後の生残率にも影響が出るものと思われる。実験から通常ガザミは、体内温度が6℃ぐらいで失神するために、この程度で海水から取り上げた方がよい。この温度帯は、約0℃～1℃の冷海水に浸漬して10～15分で到達する。また、この失神の時、ガザミは遊泳脚にけいれんを起こし、手で取り上げ体を倒立状態にすると鰓脚の各関節が徐々に伸びる状態を示す。この状態を失神の判断基準とした。

保蔵温度 上記、急速冷却法を用いて、冷蔵

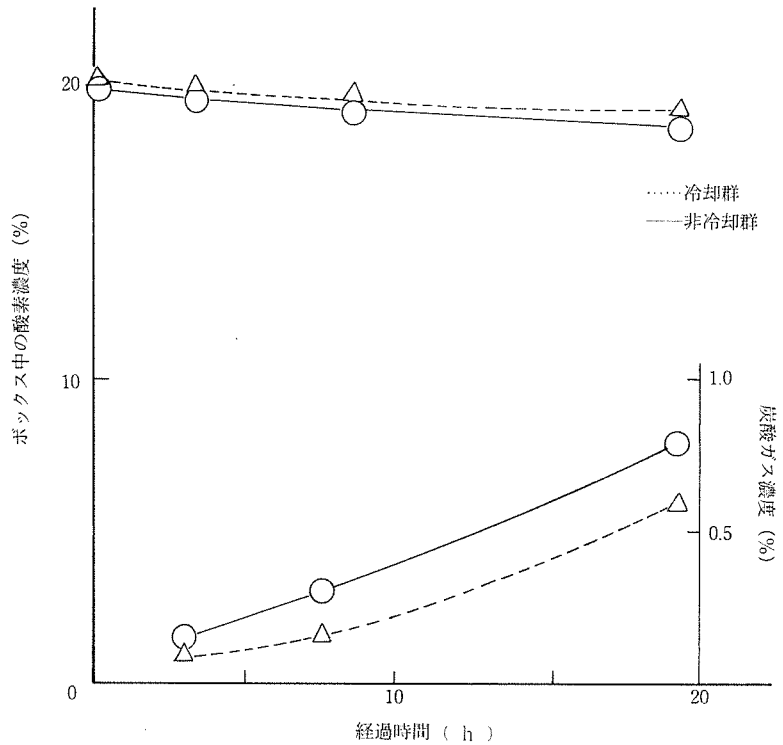


図3 冷却群及び非冷却群の10℃保蔵における酸素消費量と炭酸ガス排出量

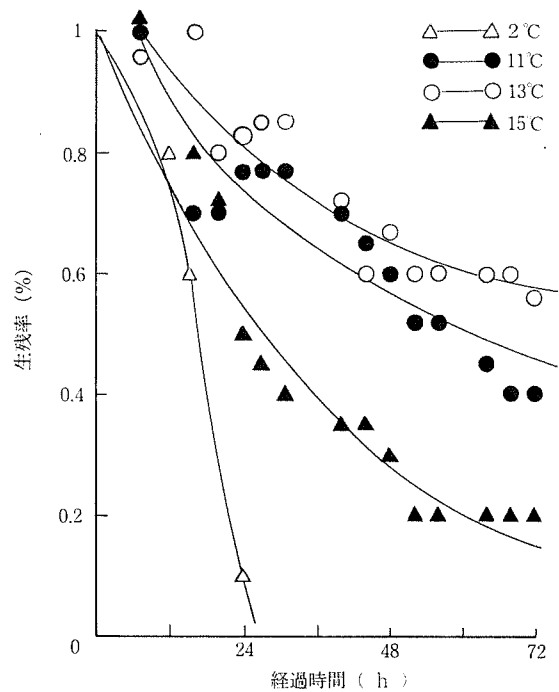


図4 各保蔵温度における生残率

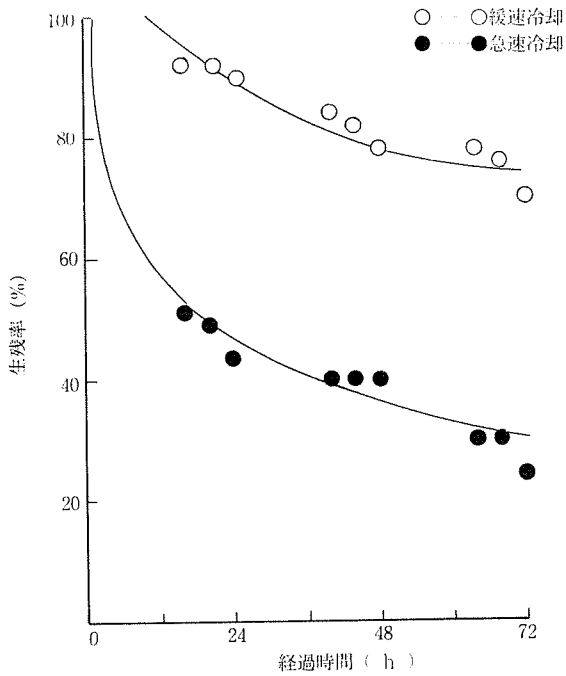


図5 各冷却法と生残率との関係

室内での乾燥オガズ温度を輸送温度として保蔵温度を設定した。

この温度設定に際しては、先ず大まかなる保蔵最適温度を知るために、2℃～20℃の範囲で予備試験を行った上で13℃付近が良さそうなので、次に11℃、13℃、15℃に保蔵温度を定め、繰り返し生残率を調べた。

その結果、図-4のとおり13℃の生残率がわずかではあるが、11℃のそれより良く、15℃ではあまり良い結果は得られなかった。

以上のことから、ガザミの保蔵温度は12～13℃が良いものと思われ、しかも、その温度は2℃も変化すると生残率にかなりの差が生ずることがあることから、保蔵温度についてはかなりの厳密さが要求されるものと思われる。

冷却方法 急速に冷却することによりガザミのショックが考えられたため、冷却の方法によりガザミの生残率にどのような差異が出るのか調べた。図-5はその結果を示すものであるが、明らかに緩速冷却の方が良いことが

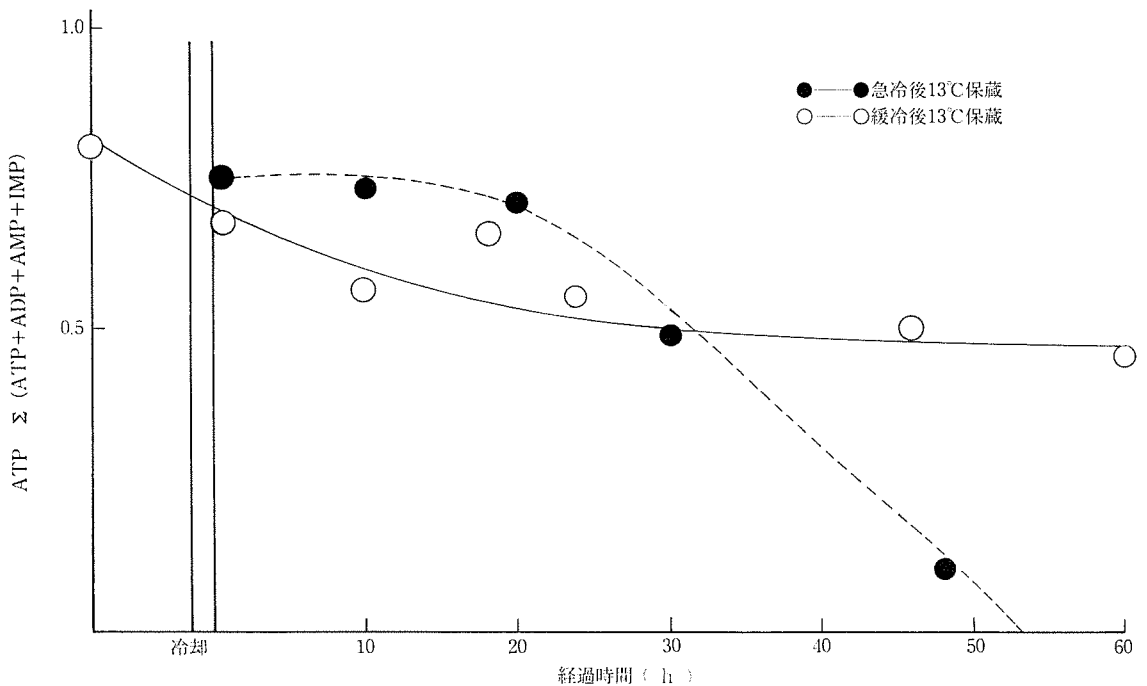


図6 急冷法と緩冷法の13℃保蔵によるATP活力比較

判る。ここで言う緩速冷却とは、6時間ほどかけて海水を常温から5～7℃まで冷却しガザミを失神させる方法である。ATP活性比較では、実験の当初から30時間くらいまでは急速冷却の相対活性値が緩速冷却のそれを上回っていたが、その後は逆転した。これは長時間にわたって生かしておくには緩速冷却が有利であることを示している。(図-6)

保蔵オガクズ 現在ガザミを輸送する場合には、クルマエビもそうであるが乾燥オガクズを用いている。そこでオガクズの湿度がガザミの生残率にどのような影響を与えるかを調べた。

図-7は、緩速冷却後、ガザミを13℃で保蔵した場合の乾燥オガクズと湿潤オガクズにおけるガザミの生残率を示したものである。東京まで陸上輸送に要する40時間前後の生残率をみると、乾燥オガクズは70%程度あるのに対し湿潤オガクズは85%と明らかに湿潤オガクズの方が良いということがわかる。

ところが、小売業者が行っている輸送方法では乾燥オガクズを用いている。上記の結果は慣用法とは矛盾するため、実験は日時を変えて何度も行った。図-7はそのうち代表的な例を示したものである。また、開封後のガザミの活発さからみても湿潤オガクズが優位であることがわかった。

輸送試験 以上のような室内実験の結果をふまえて、実際に輸送試験を試みてみた。

冷却方法は、緩速冷却法により午前10時に海水温度19.8℃から始め、午後4時30分に6.3℃になり、ガザミが失神した時点で取り上げ、湿潤オガクズに詰め、室温13℃のコンテナ(ヤンマー製)で東京まで輸送を行った。この際、コンテナは直ちに当センターからトラックにより運んでもらい、積み込み後は目的地(熊本県銀座熊本館)まで開閉すること無く運んだ。結果については表-1、図-8のとおりであり、室内実験とほぼ同じ結果を得た。また、ガザミの状態も不活発ではなく、手などを近づけるとそれに攻撃してくるなど非常に元気であった。

以上のことから、ガザミは東京まで陸上輸送が十分に可能であり、しかも東京に着いてからも非常に元気であったことから市場では高価格が期待できる。

輸送経費については今のところ検討していないが、今回輸送に使用したのはヤンマー製の専用コンテナである。このコンテナは4トン用であり、荷の量に関係な

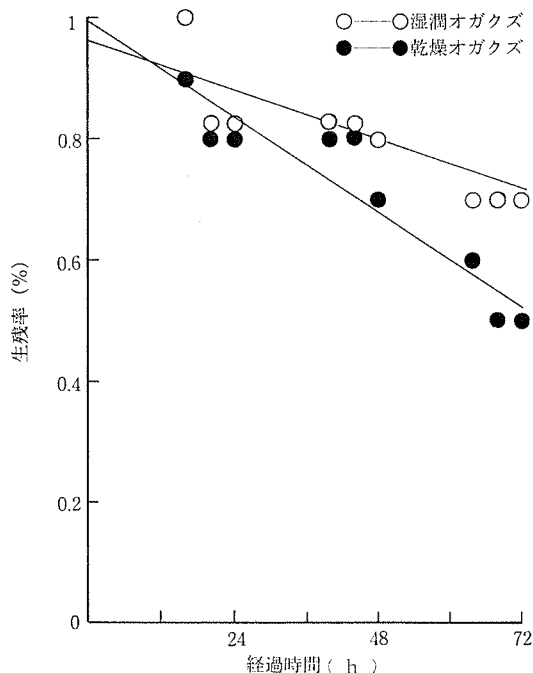


図7 各オガクズにおける生残率

表1 東京輸送時におけるガザミの生残率

	湿潤オガクズ	乾燥オガクズ
生残率	91.7%	58.3%

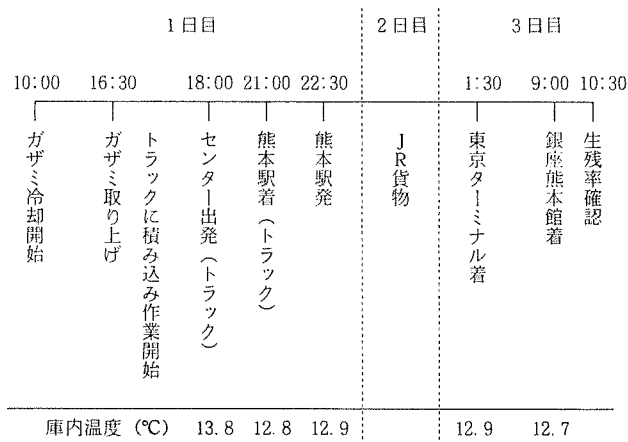


図8 輸送経過

く輸送費は同じである。この点が航空機を利用する場合と大いに異なる点である。従って、これらの点を考慮することによって、十分経費の軽減は可能であろう。

要 約

ガザミを東京まで陸上輸送するために研究を行った。その結果、ガザミは失神させる必要があり、失神のさせ方としては急に冷海水に入れて失神させるのではなく、常温から徐々に冷やし失神させる緩速冷却の方がその後の輸送に好結果をもたらす。輸送する際の温度は13℃が良く、また、オガクズも乾燥させたものより湿潤オガクズの方がはるかに良い結果をもたらす。

以上のような条件下では東京まで40時間かけて輸送することが可能である。

文 献

- 1) 諸岡 等：活魚輸送、日本水産資源保護協会、1966
- 2) 武田正倫：カニの生態と観察、ニューサイエンス社、1984
- 3) 本尾 洋：活魚輸送及び蓄養技術、養殖、1988
- 4) 熊本県水産研究センター、クルマエビ出荷輸送技術報告書、1991

ヒラメ脳下垂体からの成長ホルモンcDNAの分離

木村 武志

Isolation of growth hormone c-DNA gene from HIRAME (*Paralichthys olivaceus*) Pituitary gland

Takesi Kimura

生物の体内で微量に生産される蛋白質で産業的に有効な物質について、その遺伝子を分離しこれを大腸菌等の核外遺伝子に組み込み、細菌内で大量に生産させる手法は遺伝子組換え技術として広く産業界で利用されている。水産業界においても種々の養殖魚において、脳下垂体から分泌される成長ホルモン遺伝子の分離がなされておりこれを産業的に利用する研究が行われている。これに基づき本研究ではヒラメについて脳下垂体より成長ホルモンcDNAの分離を行った。

本研究を実施するにあたり熊本大学医学部遺伝医学研究施設分子遺伝部との共同研究を佐川先端技術振興財団からの助成を受けて行った。よって結果については1988年度佐川先端科学技術振興財団第1回助成研究報告書に「魚類における成長ホルモン遺伝子」という課題名で熊本大学医学部森浩禎、小椋光、熊本県水産試験場石田宏一、木村武志で報告されており、cDNAの塩基配列についてはNucleic Acids Reserch(Vol17 Number10 1989)にThe complete cDNA sequence for premature form of growth hormone of the flounder (*Paralichthys olivaceus*)という題でHirotsada Mori、Takesi Kimura他で報告した。

材料及び方法

(1) 脳下垂体からDNA及びpoly(A)⁺mRNAの分離

脳下垂体の採集は養殖業者から平均全長40cm、平均体重750gの魚体107尾を購入し、養殖場の水揚げ場で頭部を切り落として行った。取り出した脳下垂体は5個ずつ0.3mlのグアジニン溶液(6Mグアジニン、0.5%ザルコシル、0.1Mβ-メルカプトエタノール)を加えガラス製ボッター型ホモジナイザーで静かにホモジナイズした。エッペンドルフチューブに移し0.25mlのフェノール、50μlのクロロホルム、2MのNa-acetate30μlを加え4~5分ボルテックスミキサーで攪拌する。15分間冷やし15000回転で5分間遠心分離して水層を分離しエタノール750μlを加えてエタノール沈澱を行った。これをもう一度繰り返して、得られた沈澱を適量の滅菌水に解かしてDNAの混入したRNA溶液とした。

上記で得られたDNAと総RNAの溶液からオリゴ(dT)セルロースカラム(Collaborative Research Incorporated社製)を通してmRNAの分離を行った。溶液を65℃で5分間の熱処理を行い、0℃で1分間冷却した後、等量の2×結合バッファ(40mM Tris-HCl(PH7.6)、1M NaCl、2mM EDTA、0.2%SDS)を加え、前処理を行ったカラムを通した。出てきた溶液を再度熱処理及び氷冷を行い再びカラムを通し、また溶出した溶液を熱処理及び氷冷してカラムを通した。これでカラム中にpoly(A)mRNAが吸着された状態になっているのでこれを8ml1×結合バッファ(20mM Tris-HCl(PH7.6)、0.5M NaCl、1mM EDTA0.05% SDS)10mlをカラムに通してpoly(A)-mRNAを分離した。カラムチューブの先から滴下してくる溶出液を0.4mlずつチューブに取りエタノー

ル沈澱でRNAを回収した。

(2) cDNAの作成

得られたmRNAを鋳型にして京都大学ウイルス研究所重定博士より開発されたOKayama Bergプラスミドベクターps I 4001を用いてcDNAの作成を行った。ps I 4001は図1に示すように4332塩基対の二重鎖プラスミドであり、これを制限酵素KpnIで切断しターミナルデオキシトランスフェラーゼでTテールを付けたものである。

cDNAの作成に用いる基質以外の酵素類はアマシャム社製のcDNAクローニングキットを用いて反応を行った。基質は各dNTP(デオキシヌクレオチド三リン酸)が10mMになるように調整した。第1鎖の合成はキットに含まれている10×RTバッファ5μℓと基質dNTPs10μmA、1μg ℓのベクタープライマー1μℓ、滅菌水22.5μℓに精製した2~3μg相当のmRNAを65℃で5分間反応させて混合した。さらに0.7Mβメルカプトエタノール4μℓと20単位/μℓのRNaseH2.5μℓを加えて42℃で5分間反応させた。これに20単位の逆転写酵素1μℓを加えて再び42℃で30分間反応させ、さらに20単位の逆転写酵素を1μℓを加えて42℃で30分間反応させて氷上で冷却した。

第2鎖の合成はキット中の5×の第2鎖バッファ93.5μℓ、0.8単位/μℓのRNaseH2.5μℓ、4単位/μℓの大腸菌DNAポリメラーゼI12μℓ、滅菌水92μℓを混和して12℃で60分、22℃で60分、70℃で10分の反応を行った。これを軽く遠心してから4.5単位/μℓのT4DNAポリメラーゼ1μℓを加えて37℃で10分間反応させ0℃で冷却した。再び軽く遠心し200μℓ5倍のT4ライゲーションバッファと10mMのATP、10μℓの0.7Mβメルカプトエタノール、485μℓの滅菌水、5μℓのT4DNAライゲース(350単位/μℓ)を加えて16℃で60分間反応後4℃で一晩ライゲーション反応を行い、-20℃で保存した。

このようにしてcDNAを含むベクタープラスミドps I 4001を大腸菌にトランスフォーメーションした。今回用いた大腸菌はDH1で80mmのプラスチックシャーレ上でコロニーを得た。コロニーの出現しているプレートに蒸留水で湿らせてオートクレーブ処理を行ったニトロセルロースフィルターを静かにのせ、コロニーをフィルターに移し取った。このフィルターを丁寧に剥し、コロニーの付いている面を上にして新しいL寒天培地(50μg/μℓのアンピシリンを含む)にのせ、37℃で4~5時間育成させた。またこれを丁寧に剥し150μg/μℓのクロラムフェニコールを含むL寒天培地にのせて、37℃で一晩置いた。次にアルカリ変性溶液(0.5M NaOH、1.5M NaCl)で適当に湿らせた3MM濾紙の上にフィルターをコロニーの付いた面を上にして静かにのせ室温で15分間置き、ペーパータオルで余分のアルカリ溶液を吸い取ってから中和溶液(1M Tris 1.5M NaCl)で湿らせた濾紙の上で完全に風乾させた。濾紙ではさんで80℃で焼きつけた後、フィルターを予め65℃に温めた洗浄液(1% SDSを入れた3×SSC)に浸した。フィルターをラップの上に取り出して洗浄液を含ませたキムワイブで細胞の残骸など不要な部分を拭き取り、さらに65℃で一晩洗浄した。

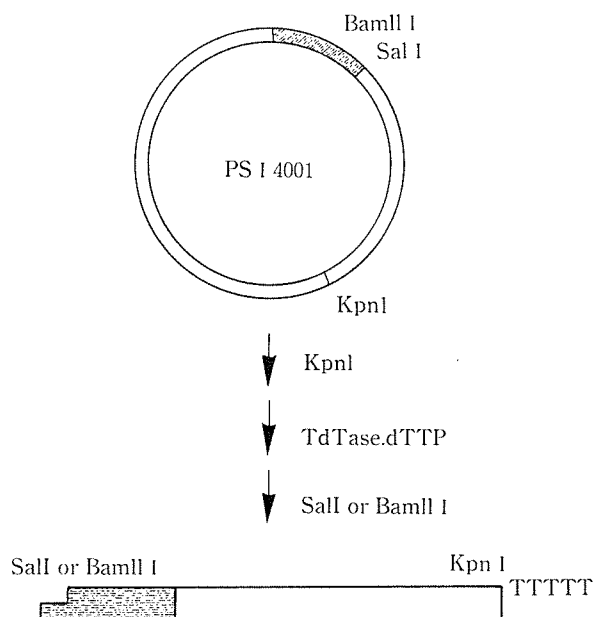


図1 ps I 4001ベクタープライマーの調整方法

(3) スクリーニング及び塩基配列の決定

cDNAプラスミドベクターを大腸菌DH1株に形質転換を行いクローニングを行った。DNA合成装置を用いて図2に示す80塩基対のプロープDNAを作成し³²Pで標識しサザンハイブリタイゼーションを用いてスクリーニングを行った。プラスチックバットにホルムアミドの入ったプレハイブリタイゼーション溶液(50%ホルムアミド、5×Denhart's solution 5×SSPE、0.1%SDS) 50mlを入れ、ここに100°Cで5分完全変性させたサケ精巢DNA溶液を500μl加えた。この中に気泡が入らないようにフィルターを入れ、42°Cで3時間インキュベートした。放射性同位元素³²Pでラベルした合成DNAプロープ溶液50μlと、プレハイブリタイゼーション溶液を30ml、サケ精巢DNA溶液300μlを混合したハイブリタイゼーション溶液にプレハイブリタイゼーションしたフィルターをプレハイブリ溶液をよく切ってから浸し、37°Cで一晩インキュベートした。フィルターを6×SSC/ピロリン酸で37°Cで1時間、47°Cで10分間震盪し乾燥した後に感光させた。

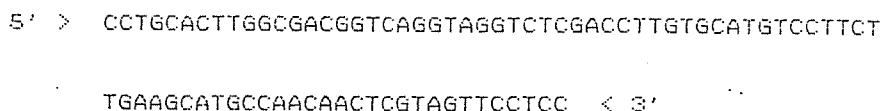


図2 スクリーニングに用いたプロープの塩基配列

(4) 塩基配列の決定

塩基配列の決定はM13ファージを利用したMessingらの方法によるものでタカラ酒造製のキット(M13Sequencing Kit)を用いた。原理はcDNAを一本鎖にして水酸基を持ったプライマーとDNA鎖の基になるアデニン、グアニン、チミン、シトシンの4種類のデオキシヌクレオチド3リン酸(dNTP)を入れ、ポリメラーゼにより一本鎖DNAを鋳型にプライマーを開始点にして相補的なDNAを合成させる。このdNTPには水酸基があるためこの合成は連続的に行われるがこの反応にジデオキシNTP(ddNTP)を入れてやるとポリメラーゼがdNTPの代わりにddNTPを取り込んだ場合、ddNTPは水酸基を持たないためにその後の合成は停止する。これによりいろいろな長さのDNAが合成される。ここでddNTPを放射性同位元素³²Pで標識しておけばオートラジオグラフで位置の確認が行えることになる。この反応液をポリアクリルアミドゲルによる電気泳動を用いることで、合成されたDNAが1塩基のものまで確認が行える。

これら遺伝子操作の実験の手法はMolecular Cloning(Cold Spring Harbor Laboratory 1982)を基礎にして行った。

結果及び考察

(1) 脳下垂体からDNA及びRNAの分離

脳下垂体1個の重量は5mgで、これからフェノール抽出を行ったRNAの保存状態を変性アガロースゲル電気泳動で確認したところ破壊されないrRNAの28Sと18Sの鮮明なバンドが見られた。RNAの収量は脳下垂体45個から32.5μgでこのうちpoly(A)⁺mRNAは約50%程度であると思われた。

(2) cDNAの作成及びスクリーニング

形質転換を行った結果80mmのシャーレ上で1枚当たり約500個のコロニーを得た。1次スクリーニングの結果を図3に示した。1次スクリーニングで得られたコロニーを滅菌した揚子でつり2次スクリーニングを行った。2次スクリーニングの結果を図3に示した。最終的に2500個のコロニーから11個の成長ホルモンcDNAを持つポジティブクローンが得られた。

(3) 塩基配列の決定

2次スクリーニングで成長ホルモンcDNAを持つ11個の大腸菌からプラスミドを取りだし最も大きいもの4個を選出した。このプラスミドを制限酵素EcoRI、PvuIで切り出して末端をT4DNAポリメラーゼ処理してアクリ

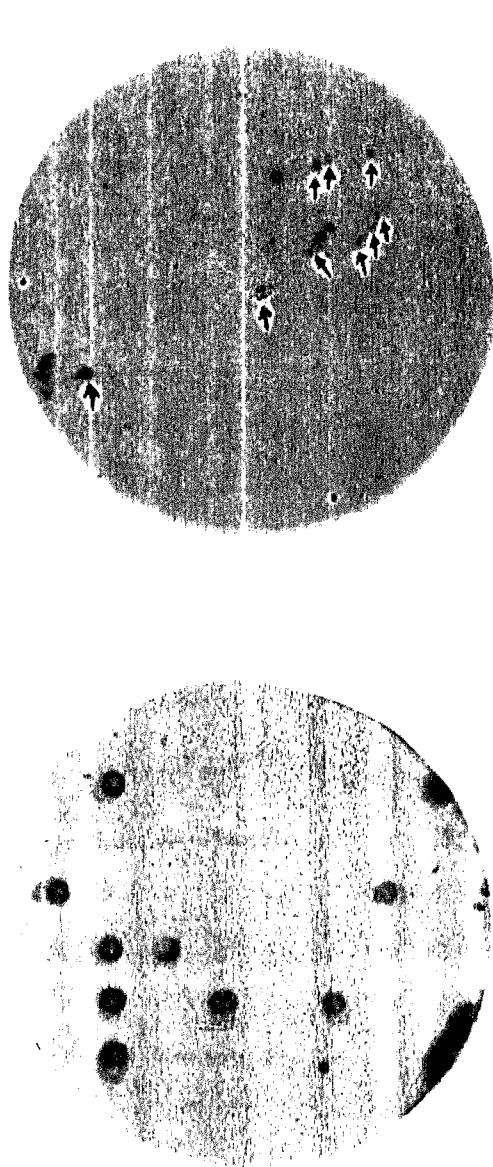


図3 1次スクリーニングおよび2次スクリーニングの結果
(一で示した部分がポジティブクローン)

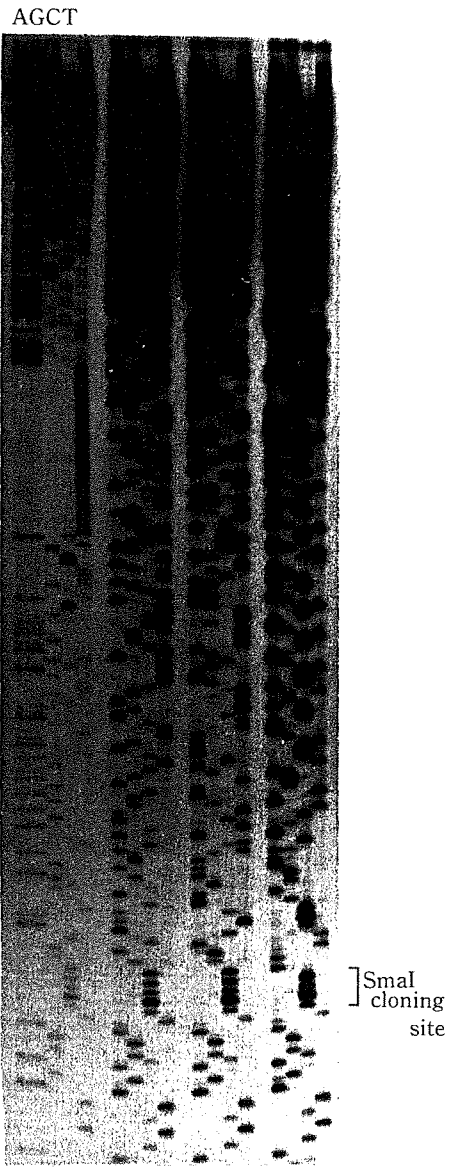


図4 塩基配列

ルアミドゲルで電気泳動して挿入部分のcDNAを切り出した。これをキット中のM13mp10ファージのSma I 部位にクローニングして塩基配列を決定した。オートラジオグラフィの結果を図4に示した。表1にヒラメ成長ホルモンcDNAの遺伝子配列を示した。831個のDNAより構成され成長ホルモンに転写されるのは73番目のATGで始まる部分で、アミノ酸ではメチオニンが転写開始暗号となっている。ここから123番目まではシグナルペプチドの部分で核内で転写されたmRNAが核膜を通過する場合に用いられる。翻訳の終了は643番目のナンセンスコドンとよばれるアミノ酸に翻訳されない部分である。

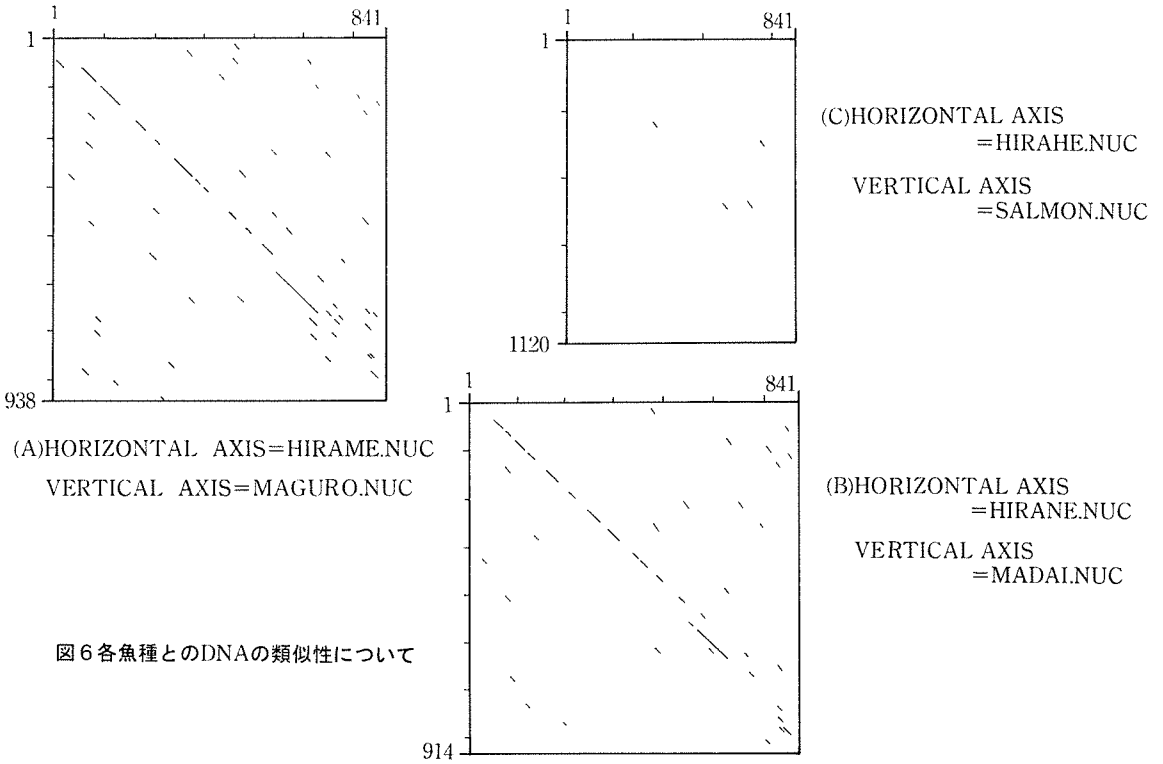


図6 各魚種とのDNAの類似性について

	signal peptide	GD1	
hirame	M---NRVILLL-----SVMC---VGVSSQPITENQRLFSIAVGRVQYLHLVAKKLFSDFENSLOLEQ---RLLNKIASKEFCHSD		
madai	M---DRVLMML-----SVLS---LGVSSQPITDQORLFSIAVSRVQHLHLLAQRLFSDFESSLOTEEQ---LKLNKI-FPQFCNSD		
sake	M---GOVFLLM-----PVLVSCFLSQCAIENQRLFNIAVSRVQHLHLLAQKMFNDFDGTLLPDER---RQLNKIFLLDFCNSD		
maguro	M---DRVFLLL-----SVLS---LGVSSQPITDQORLFSIAVSRVQHLHLLAQRLFSDFESSLOTEEQ---RQLNKIFLQDFCNSD		
huri		QPI TDSQHLFSIAVSRIQNLHLLAQRLSNFESTLQTEQ---RQLNKIFLQDFCNSD	
human	MATGSRTSLLAFGLLCLPWL---QEGSAFPTIPLSRFLDNAMLRARHLHQLAFDTYQEEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTS---LCFSE		
bovine	MMAAGPRTSLLAFALLCLPWT---QVVGAPPAMSLSGLFANAVLRAQHLHQLAADTFKEFERTYIPEGQRYIS-IQNTQVA---FCFSE		
mouse	MATDSRTSWLLTVSLLCLLWP---QEASAFPAMPFLSSLSFANAVLRAQHLHQLAADTYKEFERAYIPEGQRYIS-IQNAQAA---FCFSE		
rat	MAADSQTPWLLTFSLLCLLWP---QEAGALPAMPFLSSLSFANAVLRAQHLHQLAADTYKEFERAYIPEGQRYIS-IQNAQAA---FCFSE		
	GD2	GD3	GD4
hirame	NFLSPIDKHETQGSVQKLLSVSYRLIESWEFFSRFL--VASF-----AVR--TQVTSKLSSELMGMLLKLIEANQDG-----		
madai	YIISPDKKHETQRSSVLKLLSISYRLVESWEFFSRSL--SGGS-----APR--NQISPKLSSELMGMLLKLIRANEDG-----		
sake	SIVSPVDKHETQKSSVLKLLHISFRLLIESWEYPSQTLIISNSL-----MVRNANQISEKLSDLKVGINLLITGSQDG-----		
maguro	YIISPDKKHETQRSSVLKLLSISYRLVESWEFFSRSL--SGGS-----APR--NQISPKLSSELMGMLLKLIRANQDG-----		
huri	YIISPDKKHETQRSSVLKLLSISYRLVESWEFFSRSL--SGGS-----ALR--NQISPKLSSELMGMLLKLIRANQDG-----		
human	SIPTPSNREETQOKSNLELLRISLLLIQSWLGPVQFL--RSVFANSLVYGASD--SNVYDLLKDLLEEGIQTLMGRLLEDGSPRTGQI		
bovine	TIPAPTGRKNEAQKSDLELLRISLLLIQSWLGPVQFL--SRVFTNSLVFGTSD--RVYEKLDLEEGLALMRELEDGTPRAGQI		
mouse	TIPAPTGRKEEAQRTDMELLRFSLLLIQSWLGPVQFL--SRIFTNSLMFGTSD--RVYEKLDLEEGLALMRELEDGSPRVGQI		
rat	TIPAPTGRKEEAQRTDMELLRFSLLLIQSWLGPVQFL--SRIFTNSLMFGTSD--RVYEKLDLEEGLALMRELEDGSPRIGQI		
		GD5	
hirame	-----AGGFSESSVLQTPYGN-----SELFACFKKDMHKVETYLTVAKCRLFPPEANCTL		
madai	-----AEIFPDSSALQLAPYGNYYQSLGADESLRRTYELLACFKKDMHKVETYLTVAKCRLSPEANCTL		
sake	-----VLSLDDNDSQQLPPYGNYYQSLGGDGNVIRNYYELLACFKKDMHKVETYLTVAKCRKLSPEANCTL		
maguro	-----DEMFDASSALQLAPYGNYYQSLGADESLRYSYELLACFKKDMHKVETYLTVAKCRLSPEANCTL		
huri	-----AEMFSDVSALQLAPYGNFYQSLGGEELLRNYYELLACFKKDMHKVETYLTVAKCRLSPEANCTL		
human	FKQTYSKFDTNSHDDALLKN-----YGLLYCFKDKMDKVFETFLRIVQCR-SVEGSCGF		
bovine	LKQTYDKFDTNMRSDALLKN-----YGLLSCFRKDLHKTYETYLTVAKCRLRFPVSSCAF		
mouse	LKQTYDKFDANMRSDALLKN-----YGLLSCFKKDLHKAEYTYLTVAKCRLRFPVSSCAF		
rat	LKQTYDKFDANMRSDALLKN-----YGLLSCFKKDLHKAEYTYLTVAKCRLRFPVSSCAF		

図7 アミノ酸において、他魚種との類似性

- ③ アミノ酸においてサケで52.4%、マグロ66.7%、マダイ66.2%の類似性があった。
- ④ 配列の156番目から14個のアミノ酸の欠失部分があった。
- ⑤ マダイ、マグロ、サケ、ブリ、ヒラメのいずれの成長ホルモンにも5ヶ所の類似性の高い部分が見られた。

謝 辞

本研究を行うにあたり全般のご協力を戴いた森浩禎博士（現京都大学ウイルス研究所助手、当時熊本大学医学部助手）、恒成智子（当時熊本女子大学4年）に心よりお礼申し上げます。

参 考 文 献

- Susumu S., et al.(1985)Proc.Natl.Acad .Sci USA Vol82,4306-4310
Shigesada K.et al(1987)Gene.53:163-172
Messing J ., et al. (1981) Nucleic. Acids, Res., 9:309-321
Nobuyuki S., et al. (1988) Biochimica et Biochimica et Biophysica Acta 949 35-42
Ichiro K.,et al(1988)Nippon Suisan Gakkaishi 54(3)393-399

トサカノリの種苗生産に関する研究 トサカノリの採苗と室内培養の試み

木 村 修

Studies on Producing Seedling of *Meristotheca papulosa*
Experiment on Seed Collection and Indoor Cultivation of *Meristotheca papulosa*

Osamu Kimura

紅藻綱スギノリ目ミリン科トサカノリ属のトサカノリ *Meristotheca papulosa* は、本邦中南部太平洋岸から九州西岸の漸深帯に成育する有用藻類である。本県では天草下島の外洋に面した場所に生育しており、五和町二江、苓北町富岡、牛深市の南部から東部にかけて行われている潜水漁業（裸潜り）で、年間数百トンのレベルで水揚げされている。主な用途は海藻サラダや刺身の妻で、近年の健康食品への関心の高まりと共に需要が増加している。しかし、生産は天然ものみに依存しており、築磯等で増殖が試みられているが増産には結びついていないのが現状である。

そこで、将来興るであろう増養殖のニーズに対応するため、当センターでは平成2年度から種苗生産に関する研究を行ってきたが、本年度は、採苗、室内培養において、ある程度の知見が得られたので報告する。

材料および方法

採苗 1991年6月18日五和町二江において、潜水漁業（裸潜り）によって採集された母藻から嚢果体のみを選別し、海水と共にビニール袋に入れて持ち帰った。母藻は、付着物を除去し濾過海水で洗浄後10ppmの次亜塩素酸ソーダに30分浸漬し、精密ろ過海水を満した室内2トン水槽にアサリ貝用ネット6枚に0.6kgづつ入れて垂下した。その下にクレモナ糸（直径1.7mm）、ナイロンテグス（直径0.72mm）、カキ殻のそれぞれを径20mmの塩ビ管で作成した枠（45cm×30cm）に取り付けた採苗器と、胞子放出確認用のスライドグラスを置いた。採苗期間は止水で弱い通気を行った。開始時の水温は22.6℃で昼間の照度は800～1500luxであった。

また、同様に処理した母藻を恒温室内でシャーレ及びガラス水槽に収容し20℃、22.5℃で止水、通気と無通気、照度1500lux明暗12時間の各条件下でスライドグラス、ナイロンテグス、クレモナ糸に採苗した。

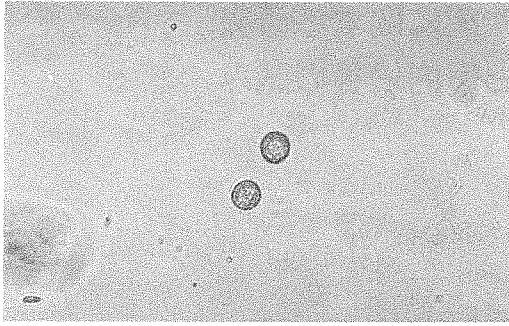
室内培養 2トン水槽で採苗したものは、同じ水槽で流水、通気で培養した。

沖出し 培養した種苗は7月、10月、11月に海中に垂下して、沖出しの時期及び方法を検討した。

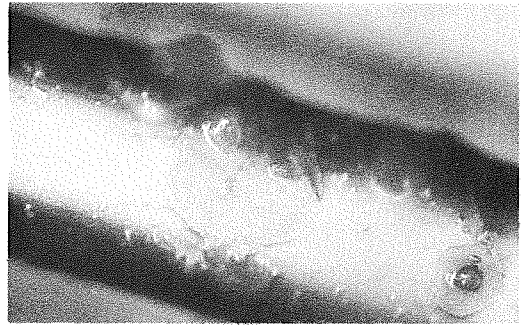
実験結果

胞子放出時期 新村¹⁾によると、トサカノリの胞子放出は鹿児島では5月下旬から7月で、6月がその盛期であるとされている。本県においては、6月初旬では嚢果体の出現割合は少なく、6月中旬から多くなり始めた。

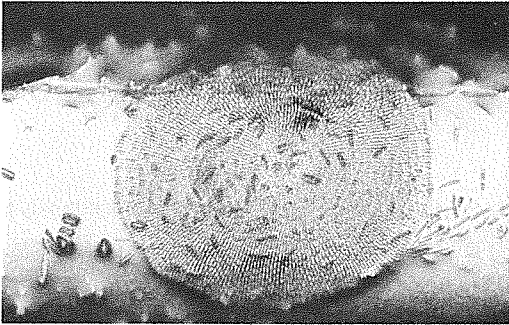
採苗 2トン水槽は、2日後の6月20日から放出がみられ、スライドグラスには150倍1視野で20～25個の胞子が付着していた。放出がみられて2日後にスライドグラスを入れて翌日再び放出数を調べたところ150倍1視野で10～15個の胞子がみられた。また、採苗基質による付着の差はなかった。胞子は径15～20μで1日後には2分裂し20～



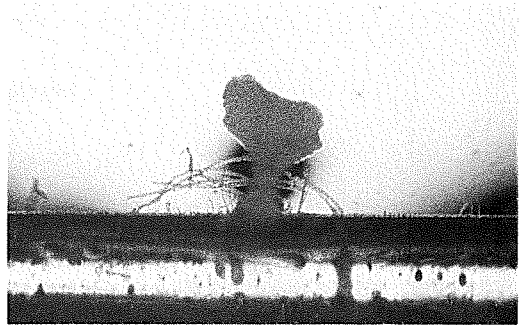
A : 採苗直後の孢子



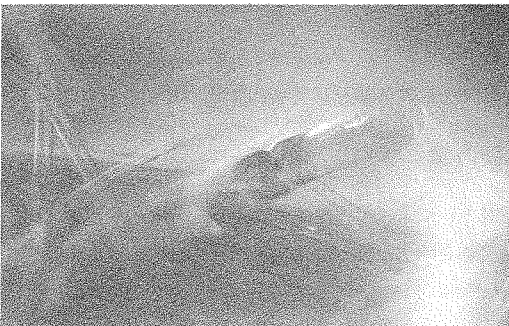
E 採苗40日後座から2本の直立体が出始めているところ



B : 採苗30日後の座 (盤状体)



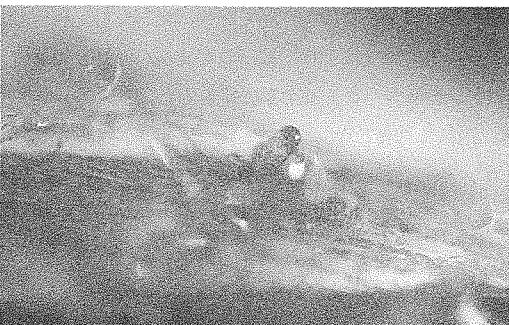
F : 採苗60日後の葉体 (全長 1mm)



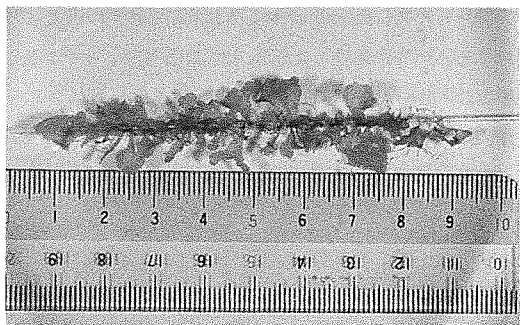
C : 採苗30日後のクレモナの繊維に巻き付いた座



G : 採苗75日後のナイロンテグス上の葉体(目盛りは 1mm)



D : 採苗30日後座から直立体が出てきているところ



H : 採苗160日後のナイロンテグス上の葉体

Fig1 トサカノリの成長過程

25 μ に成長していた。採苗終了時のナイロンテグスの孢子付着数は150倍1視野で3~5個であった。恒温室内で行ったものは、20℃と22.5℃で差はなかったが、通気をした方が孢子の放出が早かった。

成長 2トン水槽は採苗開始後2週間で母藻を取り上げ、濾過海水の流水として通気も行った。初期の成長は新村²⁾の報告とほぼ同様であり、採苗後の20日で直径50 μ 前後の盤状の座を形成した。その後、直径50~150 μ になった時点で座の中央付近の一部が盛り上がり、棒状の直立体が出来始め、次第に先端部が広がり葉状を呈するようになった。また、直立体は一つの座から複数発生するものもあった。(Fig 1) 採苗後約1カ月までは、採苗基質による成長差はなかったが、7月下旬からクレモナ系のトサカノリは枯死するものが多くなり8月上旬には消失した。

2トン水槽における成長はFig 2のとおりで採苗後150日で最大35mm最小3mm平均8.6mmであった。培養水温の変化をFig 3に示す。

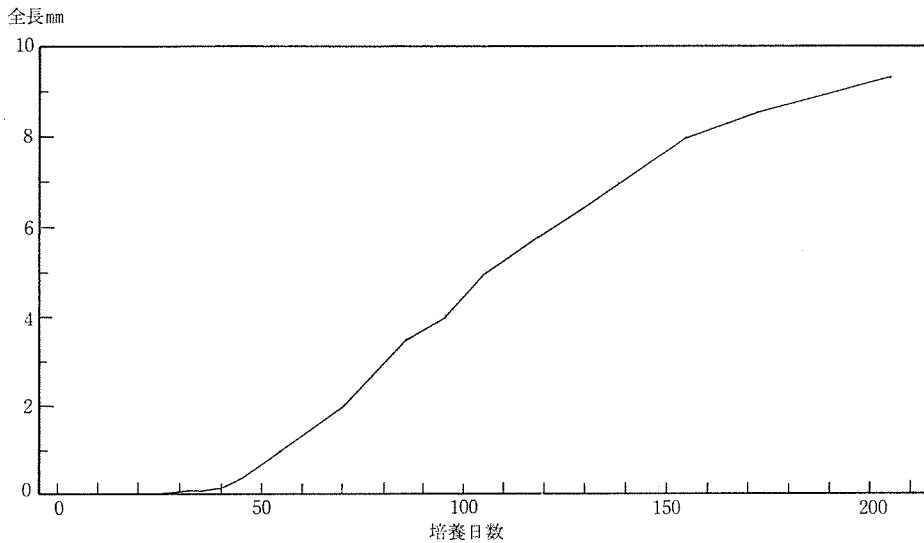


Fig 2 室内培養におけるトサカノリの成長

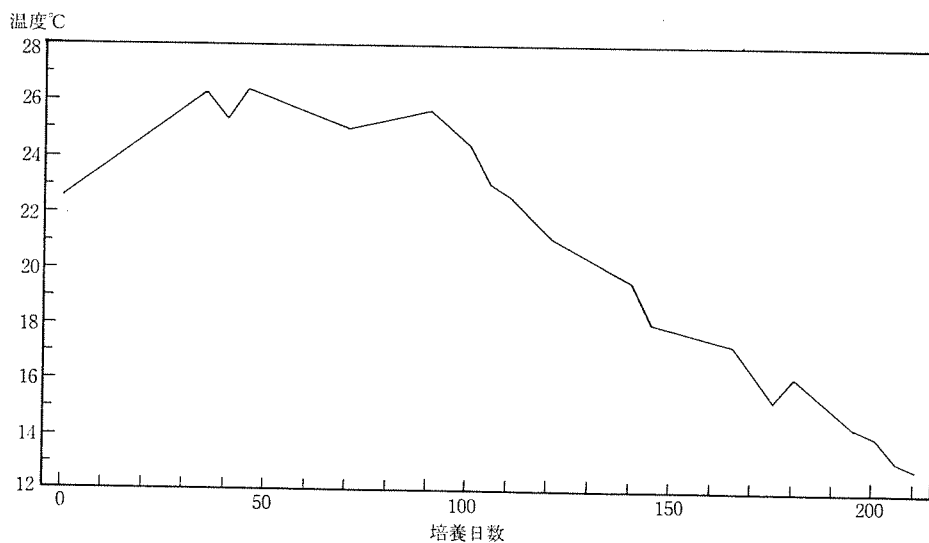


Fig 3 培養水温の変化

一方、恒温質で採苗したものは、採苗と同じ条件でPES補強海水を用いて、3日毎に換水し培養したが10日前後で全て枯死した。

付着基質による生残率の差 ナイロンテグス、クレモナ糸、カキ殻の各付着基質には生残率に差がみられた。クレモナ糸では先に述べたように1カ月程度で全て枯死しているが、ナイロンテグスとカキ殻では同時期に芽数の減少は見られたものの全て枯死するまでには至らなかった。また、カキ殻では内側と外側で差があり、採苗5カ月後の付着個数は外側が平均24、内側が82と明らかに内側の真珠層に付着したものが生残が良かった。実験に用いたクレモナ糸は表面に凹凸が多く、繊維が出ていたため座は平面的にならず、繊維に巻き付いた形のものも多く見られた。

沖出し 採苗1カ月後の7月22日に五和町二江のアワビ養殖用筏（水深7m）から水深2.5m及び4.5m（表層水温25.4℃）に、採苗器をそのままロープに吊るして垂下したが、30日後には全て消失していた。次に10月5日から当センターの棧橋（水深6m）から水深2mと4m（表層水温23.1℃）にトサカノリが付着しているナイロンテグスをロープに挟み込んで垂下したが、徐々に少なくなってゆき2週間後には消失した。また、この時消失跡を観察すると、座は残っており色彩も良いことから、葉体消失の原因は生理的なものではなく、食害ではないかと推察されたので、11月26日から当センター魚類養殖試験用筏（水深30m）から水深15m及び8m（表層水温17.6℃）に干物乾燥用の籠を利用した食害防止ネットに、トサカノリが付着しているナイロンテグスを塩ビ枠に巻いたものを入れて垂下した。水深15mに垂下したものは12月18日には消失していた。8mに垂下したものはワレカラやイトグサ等がかなり付着しているものの、平成4年1月6日の時点では葉体は大きくなっており、芽数の減少も認められなかった。

考 察

採苗時期 本県天草海域におけるトサカノリの胞子放出は、平成3年度は6月から8月にかけてであり、生育層の水温が19℃を超えた頃から放出が始まり、盛期は水温が23℃前後の頃であったと考えられる。

採苗から中間育成 採苗は胞子の放出時期の水温であれば容易である。しかしその後の成長は遅く珪藻や藍藻等に覆われてしまい、止水では10日前後しか培養できなかった。止水で培養する場合は喜田³⁾がおこなったように二酸化ゲルマニウム、パラコート剤、抗生物質を添加しなければ困難と思われる。

2トン水槽では常時流水で培養したが、夏場にこれをPES補強海水の止水条件にすると枯死してしまった。しかし、11月以降では枯死することなく成長する。このことからトサカノリは、幼体基あるいは高水温期（22℃以上）には活力が弱いので、種苗生産を行うにあたっては、この時期を短くしかつ育苗期間を短くするためにも、採苗はできるだけ遅く行う方が有利であると考えられる。

付着基質 クレモナ糸、カキ殻外側の成績が良くなかったのは、表面の突起や繊維により平面的な座の形成が妨げられ、しかも珪藻の付着が早いためではないかと思われる。そこで、養殖する場合は、作業性、収量等から考えてノリ網のようなものが適当と思われるが、表面が比較的滑らかで繊維が太く網糸も比較的太いものが適当だと思われる。

沖出し 現在試験中であるが、最適水深については透明度が影響すると思われる。当センター筏付近の透明度は五和町二江沖の1/2から2/3であり垂下水深15mは深すぎるようである。近くの海岸では干潮時水深1～2mのところには生育しているのでこの程度がよいのかもしれない。また、食害によると思われる葉体消失対策、付着物（汚れ）防止策についても今後検討しなければならない。

文 献

- 1) 新村 巖 (1974) トサカノリ生長の季節的消長と胞子放出期。藻類22 (4)
- 2) 新村 巖 (1974) トサカノリの胞子発生とその成長。藻類22 (3)
- 3) 喜田和四郎 (1991) 平成3年度日本水産学会秋季大会講演要旨集 208

熊本県水産研究センター

〒869-36 熊本県天草郡大矢野町大字中字瀬の内2450-2

TEL 0964-56-5111 (代表)

FAX 0964-56-4533

熊本県水産研究センター内水面研究所

〒861-42 熊本県下益城郡城南町大字千町

TEL 0964-28-6367

FAX 0964-28-4112

KUMAMOTO KEN SUISAN KENKYU SENTA HOKOKU

(REPORT OF KUMAMOTO PREFECTURAL
FISHERIES RESEARCH CENTER)

No2 APRIL. 1992

1	T.Kimura · I.Hirata · R.Nakamura · K.Takeda The genetic distance of Natural and Released population of Hirame (<i>Paralichthys olivaceus</i>) in ARIAKE and YATUSHIRO inland sea by analyzing isozyme of liver isocitrate dehydrogenase (S- IDH)	1
2	H.Koube · T.Nanbu · T.Fujita Effect of culvert drain in the pond of Kuruma Prawn, <i>Penaeus japonicus</i>	7
3	T.Kimura · H.Nakano · T.Umemoto · K.Isomura On a massive mortality of Japanese flounder(<i>Paralichthys olivaceus</i>)cultured for taking eggs.	17
4	H.Koube · H.Nakano · N.Oyama Study of rearing diet for yellowtail-I Growth of yellowtail reared by three diets added proteins substituting fish meal	23
5	I.Hirayama Studies on chemical change of Bottom Mud in the Culture Grounds, Arakuchi, Goshonoura	29
6	R.Matuoka · Y.Yamashita Studies on the Low Temperature Transport of Swimming Crab (<i>Portunus trituberculatus</i> MIERS)	33
7	T.Kimura Isolation of growth hormone C-DNA gene from HIRAME(<i>Paralichthys olivaceus</i>)pituitary gland	39
8	O.Kimura Studies on Seedling production of <i>Meristotheca papulosa</i> . Experiment on Seed Collection and Indoor Cultivation of <i>Meristotheca papulosa</i>	47