

## 平成 16 年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

|  |    |   |        |             |        |                      |        |
|--|----|---|--------|-------------|--------|----------------------|--------|
| ふりがな   |    | くまい ひでみ   |        |             |        |                      |        |
| 研究代表者氏名  |    | 熊井 英水   |        | 所属研究機関・部局・職 |        | 近畿大学・水産研究所・教授        |        |
| 研究課題名  | 和文 | クロマグロの資源増殖に関する生物・生化学的研究   |        |             |        |                      |        |
|  | 英文 | Biological and Biochemical Studies on Resource Propagation of Pacific Bluefin Tuna <i>Thunnus thynnus</i> |        |             |        |                      |        |
| 研究経費   |    | 平成14年度  | 平成15年度 | 平成16年度      | 平成17年度 | 平成18年度               | 総合計    |
| 16年度以降は内約額<br>金額単位：千円  |    | 40,200  | 15,500 | 11,200      | 10,800 | 10,800               | 88,500 |
| 研究組織（研究代表者及び研究分担者）   |    |   |        |             |        |                      |        |
| 氏名   |    | 所属研究機関・部局・職   |        | 現在の専門       |        | 役割分担（研究実施計画に対する分担事項） |        |
| 熊井 英水  |    | 近畿大学水産研究所・教授  |        | 水産増殖学       |        | 研究全体の総括              |        |
| 村田 修   |    | 近畿大学農学部・教授  |        | 水産増殖学       |        | 成熟・産卵促進に関する統括        |        |
| 太田 博巳  |    | 近畿大学農学部・教授  |        | 魚類生殖生理学     |        | 精子成熟課程の解明            |        |
| 家戸 敬太郎   |    | 近畿大学水産研究所・講師  |        | 魚類遺伝育種学     |        | 養殖漁場の環境モニタリング        |        |
| 瀬岡 学   |    | 近畿大学水産研究所・助手  |        | 水産増殖学       |        | 成熟度の周年変化と産卵          |        |
| 宮下 盛   |    | 近畿大学水産研究所・教授  |        | 水産増殖学       |        | 初期発育・種苗生産に関する統括      |        |
| 田中 克   |    | 京都大学フィールド科学教育センター・教授  |        | 水産生物学       |        | 主要内分泌器官の個体発生         |        |
| 澤田 好史  |    | 近畿大学水産研究所・助教授   |        | 水産増殖学       |        | 仔稚魚の発育と初期減耗要因の検討     |        |
| 石橋 泰典  |    | 近畿大学農学部・助教授   |        | 魚類環境生理学     |        | 仔魚期の遊泳力と各種化学成分       |        |
| 石丸 克也  |    | 近畿大学水産研究所・助手  |        | 魚病学         |        | 仔稚魚の発育と疾病            |        |
| 滝井 健二  |    | 近畿大学水産研究所・教授  |        | 魚類栄養学       |        | 栄養素代謝・飼料開発の統括        |        |
| 細川 秀毅  |    | 高知大学農学部・教授  |        | 水族栄養学       |        | 摂餌刺激物質・栄養素代謝         |        |
| 宇川 正治  |    | 日清丸紅飼料(株)水産研究所・副所長（研究職）   |        | 栄養生理学       |        | 飼料の物性・形状の検討          |        |
| 当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）   |    |   |        |             |        |                      |        |
| <p>最近における世界のクロマグロ資源の著しい減少は、主に、我が国における無制限な輸入量の拡大に基づくとする批判を多く聞くようになった。そこで、本研究ではこのクロマグロの資源増殖を推進するために、最先端の生物・生化学的手法を駆使して、親魚の催熟や種苗の量産に係る高度養成技術の開発を行う。</p> <p>本研究では 1)成熟・産卵促進に係る生理機構の解明、2)初期発育期間における多量斃死の発生機構と防止策、3)仔稚魚の栄養・エネルギー要求と実用配合飼料の開発などに的を絞り、基礎・応用的知見を多数集積するとともに有用な情報を発信する。</p> <p>本研究の成果はクロマグロを含めたマグロ類の資源増強だけでなく、これからの資源管理に関するグローバルな施策を打ち出すために、貴重で有意な示唆が得られるものとする。</p> |    |   |        |             |        |                      |        |

これまでの研究経過（研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。）

本研究は成熟・産卵促進、初期発育・種苗生産および栄養素代謝・飼料開発のセクションに分け、以下に示すように本研究組織のみが得ることのできる多数の貴重な知見を得た。

### 1) 成熟・産卵促進セクション

クロマグロの産卵条件と精子の凍結保存法の開発を中心に検討した。1)平成15年度における大島実験場（和歌山県）および奄美実験場（鹿児島県）の産卵期間・水温は、それぞれ8/5～9/1・19～26 および6/29～8/4・25～29 であり、採卵数はそれぞれ5,300千および97,000千粒であった。2)両実験場の年間水温はそれぞれ27.0～12.8 および29.8～19.1 であり、奄美実験場の♀および♂GSIは7～9月および4～8月に高かった。クロマグロの産卵は水温が高く日内あるいは期間内変動の小さい奄美実験場が安定していた。3)また、大島実験場の産卵が不安定かつ短期間である原因として、黒潮流軸の変化と潮汐が関与して水温を大きく変動させていることが示された。4)クロマグロ精子の凍結保存法を開発するための予備的検討をマサバとサワラで行い、10% DMSOと90%ウシ胎児血清混合液で希釈し、-50 /minの冷却速度で-50 まで冷却した後に液体窒素に浸漬する方法が優れていることを明らかにした。

### 2) 初期発育・種苗生産セクション

初期発育期間の化学成分や耳石の変化・群行動の発現、種苗生産技術の高度化、生物餌料の栄養強化などの研究を行った。1)DNA・RNA含量、RNA/DNA、タンパク質/DNAはふ化20～25日後より著増し、T<sub>3</sub>はふ化19～30日後より高値を維持することが示されたが、人工飼育下の耳石形成が不安定で異常がみられた。2)群形成はサワラでふ化19日後に認められたが、マサバは餌料の種類によって異なり、マダイ仔魚給餌でふ化18日後に発現し、プランクトン給餌ではふ化22日後でもみられなかった。DHA含量がマダイ仔魚に高かったので、DHAと中枢神経系の形成とが深く関連すると推察された。3)ふ化直後から9日後までの仔魚の比重は24.3～27.1で、経日的に僅かずつ上昇する傾向にあった。また、ふ化10日後までの優れた生残と成長は、ナノクロロプシス10<sup>6</sup>cells/ml・栄養強化ワムシ10 ind./ml・水温26 ・塩分30pptで得られた。4)仔魚における腸内細菌数はふ化後に10～10<sup>5</sup> CFU/mgの範囲で徐々に増加した。飼育水の細菌数も腸内細菌の変化と類似したが、餌料のそれは10<sup>4</sup>～10<sup>5</sup> CFU/mgであり、ふ化4日後では*Vibrio*属細菌2種を同定し、ふ化5～30日後では*Vibrio*属細菌（55%）が優占していた。5)ふ化10日後までの多量浮上死を飼育水面の油膜形成（フィードオイル）で抑制できた。成長と生残率は24Lと14L:10Dの明暗周期が優れていた。6)稚魚期の衝突死は光、明暗周期、低酸素、輸送、ハンドリングなどによるコルチゾル含量の増加と、エネルギー状態や出力の高まりが深く関連することを示唆した。7)DHAの強化でアルテミア中性脂質画分のDHA含量は増加したが、極性脂質画分にDHAの多いイシダイふ化仔魚の給与が仔稚魚の成長と生残率を高く維持したことから、極性脂質画分のDHAを要求することが示された。

### 3) 栄養素代謝・飼料開発セクション

摂餌刺激物質、栄養素要求、配合飼料に関する検討を行った。1)摂餌刺激活性はヒトの旨み成分であるイノシン酸(IMP)とグルタミン酸・ヒスチジンの3種化合物の併用で高かった。しかし、IMPに味覚神経の高い電気生理学的な応答が得られたが、グルタミン酸やヒスチジンの応答は低かった。2)稚魚の麻酔には0.2 ml/l 2-フェノキシエタノールが適していた。また、4日間以上の絶食は体重1g前後の稚魚の生残率を10%以下まで低下させること、エネルギー、タンパク質および脂質の体重維持要求量は、それぞれ142.7 kJ、5.46gおよび0.44g/100g体重・日であることなどを示した。3)クロマグロ稚魚ではマサバ稚魚に比べて、配合飼料とイカナゴミンチを等量混合したOMPに対するタンパク質、脂質、糖質、エネルギーの見掛けの消化率は低く、摂取、標準代謝、熱量増加や活動エネルギーなどが著増した。クロマグロは高い栄養要求や成長を維持するために摂餌量を増加させることが示唆された。4)配合飼料とイカナゴをクロマグロ稚魚に飽食量与えて10日間飼育した。配合飼料区ではイカナゴ区より摂餌率と成長率は低く、生残率、飼料効率、タンパク効率、タンパク質蓄積率、肝臓・胃・幽門垂を含む腸重値とトリプシン様酵素活性などは高かった。

特記事項（これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。）

#### 1) クロマグロの完全養殖

種苗生産を行ってから 5 および 6 年間経過したクロマグロ親魚が、平成 12 年 6～8 月に飼育生簀内で自然産卵し、世界で初めてクロマグロの完全養殖を達成した。

大島実験場で天然起源の養成親魚が 1995 および 1996 年に産卵した。その卵を収容しふ化させてから養成した 2 群の親魚が、それぞれ 7 および 6 歳に達した 2002 年 6 月 23 日より産卵を開始した。産卵期間は 8 月 5 日まで続いたが、台風の接近や天候不順のためか合計 13 回の産卵と約 2,000 千粒の採卵にとどまった。以上の産卵状況から、産卵個体数は 1～2 尾と推定されたが、卵径 1 mm、発生率 92.6～100% の良質卵が得られた。このうち 1,340 千粒を供して種苗生産を行い、17,307 尾の稚魚を沖出して完全養殖を達成した。2004 年 2 月現在、2002 および 2003 年産の完全養殖魚を、それぞれ 1,130 および 1,872 尾を飼育している。また、2002 年から奄美実験場（鹿児島県）でも本格的にクロマグロ養殖試験を開始し、産卵期間の長期化と採卵数の大幅な増加が見込めるデータを得たことから、これからの本研究課題を推進する上で大きく貢献することが期待される。

#### 2) クロマグロの産卵制御

奄美および大島実験場における産卵成績から、クロマグロの成熟・産卵は日照時間より水温に大きく依存することが推察された。特に、産卵期間内における水温の急激な変化が産卵を抑制することが示唆され、将来、陸上水槽での産卵制御に資する貴重な知見を得た。

#### 3) クロマグロ仔魚の生残率と飼育環境

ふ化 10 日後までの仔魚は、鰾の開腔や拡張・収縮機能の不全によって浮上死し大きく減耗する。そこで、飼育水にスケトウダラ肝油を添加して油膜を形成させたところ、浮上死を防止できることがわかった。また、この期間の至適な飼育条件は水温 26℃、塩分濃度 30 ppt、強化ワムシ密度 10 ind./ml、飼育水のナノクロロプシス密度  $10^6$  cell/ml であることを示唆した。これらは種苗生産の技術向上に貢献する貴重な知見である。

#### 4) クロマグロ仔稚魚の DHA 要求

DHA を中性脂質画分に多く含む栄養強化アルテミアに比べて、極性脂質画分に多く含むイシダイふ化仔魚を給与すると、高い生残率、飼育成績、DHA 含量などが得られたことから、クロマグロ仔稚魚は極性脂質画分の DHA を選択的に要求することが示された。また、マサバの群形成に及ぼす DHA の影響から、中枢神経系の形成と DHA との関連性が示されたので、クロマグロでも種苗生産技術を確立するため、DHA についてさらに検討する必要がある。

#### 5) クロマグロ稚魚における消化と配合飼料による飼育

魚粉主体の配合飼料とイカナゴミンチを等量ずつ混合して調製したモイストペレットに対する、クロマグロ稚魚のタンパク質、脂質、糖質およびエネルギーの見掛けの消化率は、それぞれ 82、85、90 および 84% であり、マサバの 94、96、93 および 94% に比べて劣り、摂取、標準代謝、熱量増加や活動エネルギーは逆にクロマグロで顕著に高かった。クロマグロは高い栄養要求や早い成長を維持するために、摂餌量を増加させて対応することが示唆された。また、魚粉・スケソウダラ肝油から成る配合飼料と、対照のイカナゴ切餌をクロマグロ稚魚に飽食量与えて 10 日間飼育したところ、摂餌率と成長率はイカナゴ区で高く、生残率、飼料効率、タンパク効率、タンパク質蓄積率、終了時の体重に対する肝臓、胃および腸重値、幽門垂を含む腸組織のトリプシン様酵素活性などは配合飼料区で高かった。クロマグロは消化し難い配合飼料（魚粉）に対して、消化器官を肥大させるとともに消化酵素の合成・分泌を増大させるが、消化に長時間を要することから摂餌量が減少して、成長が劣ったものと推察された。これまで配合飼料による飼育が難しかった原因の一端をはじめて明らかにできた。配合飼料の実用化には消化性の高いタンパク質原料を検索する必要があることが示された。

研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(発表予定のものを記入することも可能。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。)

#### 著書

- ・ 熊井英水, マグロ類の増養殖の現状と将来, (小野征一郎編著 『マグロの科学 - その生産から消費まで - 』成山堂書店, 2004年3月)

#### 総説

- ・ 熊井英水, クロマグロの完全養殖に至る経緯と将来展望, 食の科学, 309, 4-13, 2003
- ・ 宮下 盛・村田 修・澤田好史・岡田貴彦・熊井英水, クロマグロ増養殖の歴史と現況, バイオインダストリー, シーエムシー出版, 21(2), 2004, 7-17
- ・ 宮下 盛, クロマグロ増養殖研究がスタートするまで, アクアネット, 7(1), 2004, 46-48
- ・ 村田 修, 天然幼魚の活け込み方法の模索, アクアネット, 7(1), 2004, 44-48
- ・ 澤田好史, 養成クロマグロの成熟と産卵に関する研究, アクアネット, 7(3), 2004, 48-51

#### 論文

- ・ Munday, B.L., Sawada, Y., Cribb, T. and Hayward, C.J., Diseases of tunas, *Thunnus* spp., Journal of Fish Diseases, 26(4), 2003, 187-206
- ・ Masuda, R., Shoji, J., Nakayama, S. and Tanaka, M., Development of schooling behavior in Spanish mackerel *Scomberomorus niphonius* during early ontogeny., Fisheries Science, 69, 2003, 772-776
- ・ Nakayama, S., Masuda, R., Shoji, J., Takeuchi, T. and Tanaka, M., Effect of prey items on the development of schooling behavior in chub mackerel *Scomber japonicus* in the laboratory, Fisheries Science, 69, 2003, 670-676
- ・ 熊井英水・宮下盛, クロマグロの完全養殖の達成, 日本水産学会誌, 69(1), 2003, 124-127
- ・ Sawada, Y., Miyashita, S., Murata, O. and Kumai, H., Seedling production and generation succession of the Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*. Marine Biotechnology, 2004, (in press)

#### 学会発表

- ・ Tanaka, M., Kawai S. and Kurokawa T., Early ontogeny of the digestive system in teleosts - generality and variability. 26th Annual Larval Fish Conference, July 2002, Bergen
- ・ Sawada Y., Miyashita S., Murata O. and Kumai H., Problems in the seedling production of northern bluefin tuna, *Thunnus orientalis*, Temminck and Shlegel, Annual meeting of the European Aquaculture Society, Seafarming today and Tomorrow, Extended Abstracts and Short Communication, European Aquaculture Society, Special publication, (32), October 2002, 464-465.
- ・ Sawada Y., Miyashita S., Murata O., and Kumai H., Early development and seedling production technology of the Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*, Annual meeting of the European Aquaculture Society, Beyond monoculture, Extended Abstracts and Short Communication, European Aquaculture Society, Special publication, (33), August 2003, 303-304.
- ・ Sawada Y., Miyashita S., Murata O. and Kumai H., Seedling production and generation succession of Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*, Marine Biotechnology Conference 2003, Book of Abstracts, p.86, September 2003
- ・ その他国内における口頭発表約20件。