

サケ科及びキュウリウオ科魚類の種苗生産技術向上に関する研究

水野 伸也（北海道立総合研究機構 さけます・内水面水産試験場）

mizuno-shinya@hro.or.jp

はじめに

サクラマス、シロザケを初めとするサケ科魚類、シシャモ、ワカサギを初めとするキュウリウオ科魚類は北海道で重要な栽培漁業対象種になっている。これらの漁業資源を維持安定化させるために、道内各地の河川または湖沼では、各魚種の種苗放流が行われている。ところが、各種苗には、質（健苗性）の低下、低回帰率、低孵化率等の問題が存在していた。これらの問題を解決するためには、健苗性の良い種苗を効率的に生産し、放流につなげることが重要である。そのため、本研究では、上記4種について健苗性評価技術及び健康診断技術の開発、健苗性向上または生残率向上のための飼育技術改良に取り組んできた。以下に本研究により得られた成果を概説する。

サクラマス種苗の健苗性評価技術及び健苗性向上のための飼育技術の開発

降海型サクラマス人工増殖の方法は、大きく2つに分類される。1つ目は孵化後1年以上経過し、降海直前に各種生理学的変化（銀化変態）が起こった幼魚（スマルト）を河川の下流域で放流する方法（スマルト放流）、2つ目は孵化後半年に満たない稚魚を河川の上流域で放流する方法（春稚魚放流）である。サクラマスの人工増殖では種苗放流の効果が低く、低回帰率が課題となっている。この課題解決のためには、高回帰率が期待できる質（健苗性）の評価指標を開発し、種苗に潜在する健苗性の問題を明らかにし、種苗の健苗性を向上させることが重要である。サケ科魚類の銀化変態に伴う海水適応能の発達には、鰓及び腎臓を初めとする浸透圧調節器官における様々な変化が関与する。本研究は、先ず鰓の浸透圧調節細胞である塩類細胞に注目し、その細胞の微細構造変化と細胞数増加が海水適応能の発達に重要な役割を果たしていることを明らかにした¹⁾。この塩類細胞で観察される主要な変化については、間腎腺から放出されるコルチゾルが細胞核内のコルチゾル受容体を介して誘導していることがわかった²⁾。また、コルチゾル受容体遺伝子の発現量増加がスマルトの海水適応能の発達に深く関与し、コルチゾルの作用により誘導されていることが解明された³⁾。さらに、浸透圧調節に関わる内分泌因子の1つレニンの産生細胞である腎臓の旁糸球体細胞については、銀化変態に伴い細胞数の増加及び細胞肥大が起こることがわかった⁴⁾。この細胞数増加はコルチゾルとアンジオテンシンIIの作用により誘導されていることが示された⁵⁾。また、本研究は、銀化変態に伴う背鰭先端黒化について、その黒化度合を画像解析で定量化する技術を開発し、その黒化度合の値が銀化変態に伴い有意に増加することを明らかにした⁶⁾。さらに、本研究ではスマルトの最大遊泳速度は血中ヘモグロビン量と筋肉中のATP量により制御されていることが新たに証明された⁷⁾。また、本研究は銀化変態に伴う鰓及び肝臓の各種代謝酵素遺伝子の発現量変化を調べ、各組織においてチトクロム酸化酵素遺伝子発現量の増加率が他の酵素遺伝子発現量の増加率に比べ最も大きいことを示した⁸⁾。以上の結果から、塩類細胞数、鰓コルチゾル受容体遺伝子の発現量、旁糸球体細胞数、背鰭先端の黒化度、血中ヘモグロビン量、筋肉中ATP量ならびにチトクロム酸化酵素遺伝子の発現量がスマルトの健苗性指標になり得ることが示唆された^{9),10)}。また、春稚魚及びスマルトの栄養状態の良否を評価することを目的として、体内の異物処理に関与するとされる腎臓のメラノマクロファージ(MM)に及ぼす種苗への絶食の影響を調べた。その結果、絶食に伴い腎臓中に占めるMMの割合が増加し、その割合が0.5%になった時、貧栄養状態に依存した斃死が起こった¹¹⁾。さらに、種苗を閉鎖系河川に放流し放流後のMMの動態を調べたところ、MMは生息密度または貯蔵脂肪量を表す肝臓中トリグリセリド含量各々との間に有意な相関をもつことが明らかになった¹²⁾。以上の結果から、MM

が種苗の栄養状態に関わる健苗性評価に有効な指標であることが示された。次に、スマルト種苗の抱える健苗性の問題点を明らかにするため、本研究は種苗の模範となる天然魚と種苗との間で健苗性の比較を行った。その結果、天然魚に比べ種苗では、血中ヘモグロビン量、筋肉中 ATP 量、最大遊泳速度及び肝臓チトクロム酸化酵素遺伝子の発現量の低下がみられ、種苗に貧血症状を初めとする健苗性の問題が起こっていることがわかった^{7), 8)}。さらに、天然魚と種苗との間で胃内容物の総鉄量の比較を行ったところ、種苗の総鉄量は天然魚のそれに比べ少なく、種苗の貧血の原因が餌料中の鉄不足に起因することが示唆された⁷⁾。この健苗性の問題を改善するために、本研究は幼魚の健苗性に与えるクエン酸鉄添加餌料の効果を調べた。その結果、クエン酸鉄 0.25% 添加餌を 3 ヶ月間給餌することにより、血中ヘモグロビン量、筋肉中 ATP 量及び最大遊泳速度の増加を初めとする有意な健苗性向上が観察された⁷⁾。また、クエン酸鉄添加飼料を用いてシロザケ稚魚で健苗性向上が可能かどうか検討するために、サクラマスで行った同様のクエン酸鉄添加試験をシロザケ稚魚で行った。その結果、クエン酸鉄 0.75% 添加飼料を用いた 2 ヶ月間半の飼育が ATP 量及び最大遊泳速度増加等の健苗性向上に有効であることが証明された¹³⁾。以上の結果から、サケ科魚類の健苗性向上にクエン酸鉄添加飼料が有効であることが示され、この有効添加濃度及び添加期間には魚種特異性があることが明らかになった。

シロザケ種苗の健康診断技術の開発及び最適な飼育環境条件の解明

シロザケ人工増殖は、孵化後半年間孵化場で人工飼育し、体重 1g 程度まで成長した稚魚を河川の中流または下流域で放流するものである。毎年、稚魚の放流数及び放流時期は予め決められているため、各孵化場は放流時期近くになると高密度飼育を余儀なくされる。孵化場では、高密度飼育に依存した飼育環境悪化により、稚魚にストレスがかかり細菌性疾病がしばしば発症することが問題となっている。この問題解決のためには、孵化場池で飼育されている稚魚の健康診断技術の開発ならびに稚魚の健康状態に悪影響を与えない最適な飼育環境条件の解明が必要である。本研究は、人為的にシロザケ稚魚の高密度飼育試験を行い、稚魚の各種生理学的パラメーターに与える高密度飼育の継時的影響を調べた。その結果、魚類の健康診断に従来用いられてきた血糖量及び血中コレステロール量が低下する前に、稚魚の体全体 ATP 量の増加及び体全体 ATP 合成酵素遺伝子の発現量減少が起こることがわかった。健康基準値について詳細に調べたところ、ATP 量の基準値は 10~100pmol/g 体重、ATP 合成酵素遺伝子発現量の基準値は 4fmol/g 体重以上であった。以上の結果から、体全体 ATP 量及び ATP 合成酵素遺伝子の発現量がシロザケ種苗の健康診断指標となることが示された¹⁴⁾。次に、増殖事業現場で飼育されている稚魚の指標値と飼育密度または溶存酸素量の関係を調べたところ、全ての指標の健康基準値は飼育密度 30kg/m³ 飼育水以下、溶存酸素量 8ppm 以上の領域に入っていることがわかった。この結果から、シロザケ稚魚の適正な飼育環境は、飼育密度で 30kg/m³ 以下、かつ溶存酸素量で 8ppm 以上であることが明らかになった¹⁵⁾。

キュウリウオ科魚類種苗の生残率向上技術の開発

自然環境下でキュウリウオ科魚類の受精卵は、膜表面に粘着性を有する反転膜で砂礫あるいは水草に付着する。ところが、この粘着卵を集約的管理するためのビン式孵化器にそのまま収容すると、卵が孵化器内で塊となり、塊内部で窒息死をひき起こす。この問題を解決するために、人工増殖用の受精卵には、これまでタンニン酸水溶液への浸漬による粘着性除去操作が施されてきた。タンニン酸には反転膜に存在する粘性タンパクを凝固させる作用があり、この作用が粘着性を失わせるだけでなく卵膜硬化を引き起こす。この卵膜硬化が仔魚の孵出を阻害し斃死を増加させ、ひいては低生残率の原因になっていると考えられている。本研究は、タンニン酸に代わる粘着性除去物質として、チョウザメ卵の粘性除去操作に使用されている白陶土（カオリン）に着目し、シシャモ卵の粘着性除去及び孵化に与えるカオリン処理の影響を調べた。自然産卵により得られた卵（自然卵）、カオリン処理卵及びタンニン酸処理卵の卵圧を比較した結果、カオリン処

理卵の卵圧はタンニン酸処理卵に比べ低く、自然卵と同等だった。この結果から、カオリン処理により卵膜の硬化は起こらないことが示された。また、5g/Lの濃度でカオリン処理を5分間行った時、最も効率的に卵の粘着性除去ができ、高い孵化率を得られることがわかった。カオリン処理卵の孵化率は、従来行われてきたタンニン酸処理卵の孵化率に比べ20%高く、孵化仔魚の海水適応能及び絶食耐性も高いことが確認された¹⁶⁾。さらに本研究では、卵粘性除去用の物質として、食品添加物で、かつ産業廃棄物であるホタテ貝殻粉末に注目し、ワカサギ卵を用いて上記のシシヤモ卵と同様の試験を行い、卵粘性除去への貝殻粉末の有効性を検討した。その結果、ホタテ貝殻粉末はカオリンと同等の効果を示し、孵出阻害を起こさないこともわかった¹⁷⁾。以上の結果から、受精卵の粘性除去処理について、シシヤモではカオリンがワカサギではホタテ貝殻粉末が有効であることが明らかとなった。また、シシヤモ孵化場が河口付近になく河川の上流に位置する場合、シシヤモの生活史に合わせて発眼卵を河口付近に運び放流する必要がある。ところが、どの胚発生段階になれば十分な海水適応能が備わるかはわかっていない。本研究では、胚発生に伴う海水適応能発達を調べた結果、胚体の眼にグアニン沈着が顕著になると17psu汽水に対する胚の耐性が十分になった。しかし、34psu海水に対する耐性は孵化まで不十分な状態が続いた。以上の結果から、シシヤモ胚の放流を行う場合、少なくとも胚体の眼にグアニン沈着が起こるまで待ってから放流する必要があることがわかった¹⁸⁾。

おわりに

本研究では、サケ科及びキュウリウオ科魚類の種苗生産技術向上に関して数多くの知見を得た。サクラマス増殖事業では、本研究で開発された健苗性向上のための飼育技術を活用して種苗生産が行われ、その種苗の放流効果検証が試験的に行われている。シロザケ増殖事業では、開発技術を活用して民間孵化場で生産される稚魚の健康診断が行われ、適正環境基準に従った飼育が一部の孵化場で開始されている。また、シシヤモ及びワカサギの増殖事業では、本研究で開発された卵の粘性除去技術が民間孵化場に完全移転され活用されている。今後は、より高い経済効果が見込まれる増殖事業を行っていくために、種苗生産技術をさらに効率化させる研究が必要である。一方で、放流種苗が天然資源に与える影響や対象魚の遺伝的多様性の維持が注視されるようになり、これら課題を考慮に入れた増殖事業を今後進めていく必要があるだろう。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導と激励を賜った北海道大学大学院水産科学研究院山内皓平名誉教授（現 愛媛大学社会連携推進機構教授、愛媛大学南予水産研究センター長）、足立伸次教授、北海道大学北方生物圏フィールド科学センター上田宏教授に謹んで感謝申し上げます。本研究について数々の有意義なご助言、実験へのご協力を賜った北海道大学大学院水産科学研究院原彰彦教授、工藤秀明准教授、井尻成保准教授、浦和寛助教、北海道大学北方生物圏フィールド科学センター川上優博士、北海道立総合研究機構さけます・内水面水産試験場の永田光博場長、小出展久部長、同場関係諸氏に心から御礼申し上げます。さらに、今回研究紹介の機会を与えていただいた財団法人農学会の先生方、日本農学進歩賞にご推薦いただいた公益社団法人日本水産学会の竹内俊郎会長、同学会会員の皆様に厚く御礼申し上げます。

引用文献

1. **Mizuno S**, Ura K, Okubo T, Chida Y, Misaka N, Adachi S, Yamauchi K. (2000) Ultrastructural changes in the gill chloride cell during smoltification in wild and hatchery-reared masu salmon *Oncorhynchus masou*. *Fisheries Science* 4: 670-677.
2. **Mizuno S**, Ura K, Onodera Y, Fukada H, Misaka N, Hara A, Adachi S, Yamauchi K. (2001) Changes in transcript levels of gill cortisol receptor during smoltification in wild masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *Zoological Science* 18: 853-860.
3. **Mizuno S**, Ura K, Fukada H, Shimizu M, Misaka N, Hara A, Adachi S, Yamauchi K. (1998)

- Changes in gill glucocorticoid receptor transcript levels during smoltification and effects of some hormones on its levels in masu salmon *Oncorhynchus masou*. ***Proceedings of International Congress of Fish Biology, Smolt Physiology and Behavior*** 153-156.
4. **Mizuno S**, Misaka N, Kasahara N. (2001) Morphological changes in juxtaglomerular cells of the kidney during smoltification in masu salmon, *Oncorhynchus masou*. ***Fisheries Science*** 3: 538-540.
 5. **Mizuno S**, Misaka N, Kasahara N. (2003) Effects of cortisol and salmon angiotensin II on the number and morphology of juxtaglomerular cells in the kidney of masu salmon, *Oncorhynchus masou*. ***Fish Physiology and Biochemistry*** 25: 249-254.
 6. **Mizuno S**, Misaka N, Ando D, Kitamura T. (2004) Quantitative changes of black pigmentation in the dorsal fin margin during smoltification in masu salmon, *Oncorhynchus masou*. ***Aquaculture*** 229: 433-450.
 7. **Mizuno S**, Misaka N, Ando D, Torao M, Urabe H, Kitamura T. (2007) Effects of enriched diet with iron citrate on hematological parameters and burst swimming velocity in hatchery-reared masu salmon *Oncorhynchus masou* during smoltification. ***Aquaculture*** 273: 284-297.
 8. **Mizuno S**, Urabe, H, Aoyama, T, Omori, H, Iijima, A, Kasugai, K, Torao, M, Misaka, N, Koide, N, Ueda, H. (2011) Changes in activity and transcript level of liver and gill metabolic enzymes during smoltification in masu salmon (*Oncorhynchus masou*). ***Aquaculture*** in press.
 9. **水野伸也**・三坂尚行・佐々木義隆・村上豊・安藤大成・北村隆也・神力義仁・笠原昇. (2002) 腎臓における傍糸球体細胞数を用いたサクラマススモルトの海水適応能評価. **北海道立水産孵化場研究報告** 56: 149-152.
 10. **水野伸也**・三坂尚行・宮腰靖之・安藤大成・北村隆也・神力義仁・佐々木義隆・村上豊・竹内勝巳・笠原昇. (2004) 新たな手法を用いたサクラマス幼魚の種苗性評価. **魚と水** 41: 49-50.
 11. **Mizuno S**, Misaka N, Miyakoshi Y, Takeuchi K, Kasahara N. (2002) Effects of starvation on melano-macrophage in the kidney of masu salmon, *Oncorhynchus masou*. ***Aquaculture*** 209: 247-255.
 12. **Mizuno S**, Misaka N, Miyakoshi Y. (2011) Assessment of nutritional conditions using kidney melano-macrophage density in hatchery-reared juvenile masu salmon *Oncorhynchus masou* released into a stream. ***Scientific Reports of the Hokkaido Salmon and Freshwater Fisheries Research Institute*** 1: 49-53.
 13. **Mizuno S**, Misaka N, Teranishi T, Ando D, Koyama T, Araya K, Miyamoto M, Nagata M. (2008) Physiological effects of an iron citrate dietary supplement on chum salmon *Oncorhynchus keta* fry. ***Aquaculture Science*** 56: 531-542.
 14. **Mizuno S**, Nakajima, M, Naito, K, Koyama, T, Saneyoshi, H, Kobayashi, M, Koide, N, Ueda, H. (2010) Physiological impacts of high rearing density on chum salmon *Oncorhynchus keta* fry. ***Aquaculture Science*** 58: 387-400.
 15. **Mizuno S**, Hatakeyama, M, Nakajima, M, Naito, K, Koyama, T, Saneyoshi, H, Kobayashi, M, Koide, N, Misaka, N, Ueda, H. (2010) Relationship between rearing condition and health in chum salmon (*Oncorhynchus keta*) fry. ***Aquaculture Science*** 58: 529-531.
 16. **Mizuno S**, Sasaki Y, Omoto N, Imada K. (2005) Elimination of adhesiveness in eggs of shishamo smelt *Spirinchus lanceolatus* with kaolin as method to result in high hatching rate under environment with high iron concentration. ***Aquaculture*** 242: 713-726.
 17. **Mizuno S**, Teranishi, T, Sasaki, N, Koide, N. (2010) Effects of treatment using unbaked scallop shell powder suspension on eliminating egg adhesiveness, hatching rate and larval quality in Japanese smelt eggs. ***Aquaculture Science*** 58: 97-104.
 18. **Mizuno S**, Sasaki Y, Imada K. (2006) Changes in seawater tolerance during development of eyed-stage embryos in shishamo smelt *Spirinchus lanceolatus*. ***Aquaculture Research*** 36: 615-619.

Studies on improvement of seed production techniques in salmonids and osmerids

Shinya Mizuno

(Salmon and Freshwater Fisheries Research Institute, Hokkaido Research Organization)

mizuno-shinya@hro.or.jp