

外観と骨格標本によるヒラメ稚魚の形態異常判別

菅 向志郎*¹, 中川 敏寛*², 中川 英敏*², 阪倉 良孝*¹, 萩原 篤志*³Identification of Malformation in Juvenile Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*)
Using External Morphology and Osteological ObservationKoushirou SUGA*¹, Toshihiro NAKAGAWA*², Hidetoshi NAKAGAWA*²,
Yoshitaka SAKAKURA*¹ and Atsushi HAGIWARA*³

To construct basis for malformation fish database, hatchery-reared Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* juveniles were sorted out into morphologically normal and abnormal fish using their external morphology and osteological observation. The malformed juveniles were classified into 8 types by their external morphologies, and the skeletal malformed sites were specified 6 out of 8 abnormal types. Total lengths of normal fish, which were judged by their external morphologies, tended to be larger than abnormal fishes. About 90% of normal fish, which were judged by their external morphology, had no skeletal malformed sites from their skeletal preparations. In contrast, the concordance rate of abnormal fishes between external morphology and skeletal observation was about 55%, and about 45% of abnormal fish, which were judged by their external morphology, had no skeletal malformed sites from their skeletal preparations. It is important to construct basis for morphologically abnormal fish database that skeletal normal fish could be accurately sorted into normal fish by external morphology.

Key Words : 外部形態 external morphology, 骨格標本 osteology, 形態異常 malformation,
ヒラメ稚魚 juvenile Japanese flounder

魚類種苗生産の現場において、骨形成の異常に起因する形態異常や色素異常の稚魚の発生が報告されている。これらの形態異常の発生は、種苗生産時に用いる餌料生物の栄養強化剤に添加するドコサヘキサエン酸^{1,2)}やビタミンAの多寡³⁻⁶⁾餌料生物であるワムシの培養状態⁷⁻⁹⁾栄養素の欠乏¹⁰⁾が要因として報告されている。しかし、実際にはこれらの要因を考慮した種苗生産を行っても、稚魚の形態異常の発生を完全に防ぐには至っていない。このため、種苗生産現場では、出荷時に外観による種苗の選別を行い、出荷可能な正常魚と形態異常が疑われる出荷不可な魚とに分別している。この選別は、外観から容易に識別できる形態異常魚を除き、僅かな形

態の差を基に識別するため、作業者の経験に依存しており、同一事業場内でも作業者間の差が生じる。このような選別の過程で生じる作業者間の作業効率の違いを改善し、種苗の品質の安定を図るには、正常魚と形態異常魚のデータベースを作製して選別基準を明確にし、選別作業における個人差を解消することが必要となる。このため、本研究では、種苗生産業者が生産したヒラメ稚魚を無作為にサンプリングした後、外観より出荷可能な稚魚か否かを選別し、これらの稚魚の骨格標本を作製・精査することで、正常魚と形態異常魚のデータベースの構築を試みた。

*1 長崎大学水産学部

Faculty of Fisheries, Nagasaki University

*2 株式会社 長崎種苗

Nagasaki Fish Seed Co., Ltd.

*3 長崎大学大学院生産科学研究科

Graduate School of Science and Technology, Nagasaki University

【材料と方法】

供試魚とサンプリング方法

本研究には, (株)長崎種苗で4回実施(孵化日:1回次, 2008年9月9日;2回次, 2008年10月11日;3回次, 2008年12月21日;4回次, 2009年1月16日)した種苗生産より得られた, 45~56日令のヒラメ稚魚を用いた。これらの稚魚を飼育水槽よりランダムに約20尾ずつ(合計90尾)サンプリングし, 氷水にて冷却死させた後に5%中性ホルマリンで固定した。これらのサンプルを水道水で洗浄し, ホルマリンを除去した後, 全ての稚魚の全長を測定した。次に, (株)長崎種苗で選別作業に従事している技術者が外観を基に, 出荷可能な稚魚と出荷不可の稚魚とに選別した。なお, 外観による出荷不可の判定は, (株)長崎種苗の定義に従って実施した(表1)。

表1 (株)長崎種苗でのヒラメ稚魚の形態異常の定義

形態異常の呼称	定義
ソリ	顔が上向き
オジギ	顔が下向き
短軀	頭部を除いた魚体が寸詰まり
丸	丸体型
アゴ	顎の長さが異常
エラ	エラと魚体にすき間が生じている
クチ	口先から目までの距離が短い
バランス	各部位ではなく全体的なバランスの異常

硬骨染色法による魚類透明骨格標本の作製

魚類の骨格二重染色法^{11,12)}を改変した下記の手順でサンプルの硬骨を染色した。まず, ホルマリンを除去した稚魚を飽和ホウ酸ナトリウム溶液に2日間浸漬し中性化した後, 脱イオン水で希釈した飽和ホウ酸ナトリウム溶液(7:3, v/v)にて調整した1%トリプシン溶液により37℃で2日間消化し, 組織の透明化を行った。透明化した稚魚サンプルを, アリザリンレッド染色液に1日浸漬し, 硬骨を染色した。余分な染色液を0.5%水酸化カリウム水溶液で洗浄し, 骨格標本を作製した。これらサンプルの骨格標本から骨格異常の有無を調べ, 外観より正常と判断した稚魚のうち, 骨格から見ても正常な稚魚の割合を正常率(%), 外観より出荷不可と判断した稚魚のうち, 骨格に異常を有していた稚魚の割合を異常率(%), として算出した。さらに, 全てのサンプルの外観と骨格標本をデジタルカメラで撮影し, 画像データとして蓄積した。

【結果と考察】

4回の飼育回次でサンプリングしたヒラメ稚魚を, 外観より出荷可能稚魚と出荷不可稚魚とに選別した。これら稚魚の全長を比較したところ, 1回次(t-test, $t=-2.079$, $p=0.0480$, $n=27$)および4回次(t-test, $t=-2.783$, $p=0.0115$, $n=22$)の

出荷可能な稚魚は出荷不可の稚魚よりも全長が大きかった(表2)。また, 2回次(t-test, $t=-2.019$, $p=0.0578$, $n=21$)と3回次(t-test, $t=-1.817$, $p=0.0860$, $n=20$)では有意差は見られなかったものの, 同様の傾向が見られた(表2)。出荷可能な稚魚の正常率および出荷不可の稚魚の異常率は, それぞれ83~96%, 44~67%であった(表3)。

表2 外観で判別したヒラメ出荷可能稚魚と出荷不可稚魚の全長(平均±標準偏差)

飼育回次	日 令	全 長 (mm)	
		出荷可能稚魚	出荷不可稚魚
1	45	29.0±2.7*	25.6±2.7
2	55	35.4±3.5	32.1±4.0
3	55	30.8±5.0	27.1±4.0
4	56	36.5±5.1*	28.8±6.8

*は各回次における判別群間の有意差を表す(t-test, $p<0.05$)

表3 外観および骨格標本を基にしたヒラメ出荷可能稚魚の正常率と出荷不可稚魚の異常率

飼育回次	出荷可能稚魚(尾)			出荷不可稚魚(尾)		
	外観	骨格標本	正常率(%)	外観	骨格標本	異常率(%)
1	24	23	96	3	2	67
2	12	10	83	9	4	44
3	10	9	90	10	5	50
4	8	7	88	14	8	57

正常率(%)は, 外観より正常と判断した稚魚のうち, 骨格から見ても正常な稚魚の割合, 異常率(%)は, 外観より出荷不可と判断した稚魚のうち, 骨格に異常を有していた稚魚の割合として算出した。

同一飼育回次で見ると, 出荷可能な稚魚は, 形態異常を有している出荷不可の稚魚よりも大きい傾向が見られたことから, 全長の小さな稚魚は, 骨格異常を有している可能性の高いことが明らかとなった。これは, 外観より正常魚か否かの識別が難しいヒラメ稚魚を選別する際に, 全長の大小によりある程度の選別が可能であることを示唆している。友田ら^{8,9)}は, 餌料として質の低下が指摘されている増殖停滞期のワムシ¹³⁾を給餌したヒラメ稚魚が, 対数増殖の初期と後期のワムシを給餌したヒラメ稚魚より低成長であり, 脊椎骨に異常を有する個体の出現頻度が高いことを報告している。この結果は, 本研究で得られた全長から骨格異常を判断する手法の確かさを支持する。

出荷可能な稚魚にわずかに含まれた骨格異常魚の脊椎の異常は軽微なものであった(図1-B)。この僅かな骨格異常による形態の変化から形態異常魚と判断することは困難であろう。一方, 外観から容易に判別可能な形態異常魚は, 頭部骨格または脊椎骨に明らかな異常が認められた(図1-D~H)。

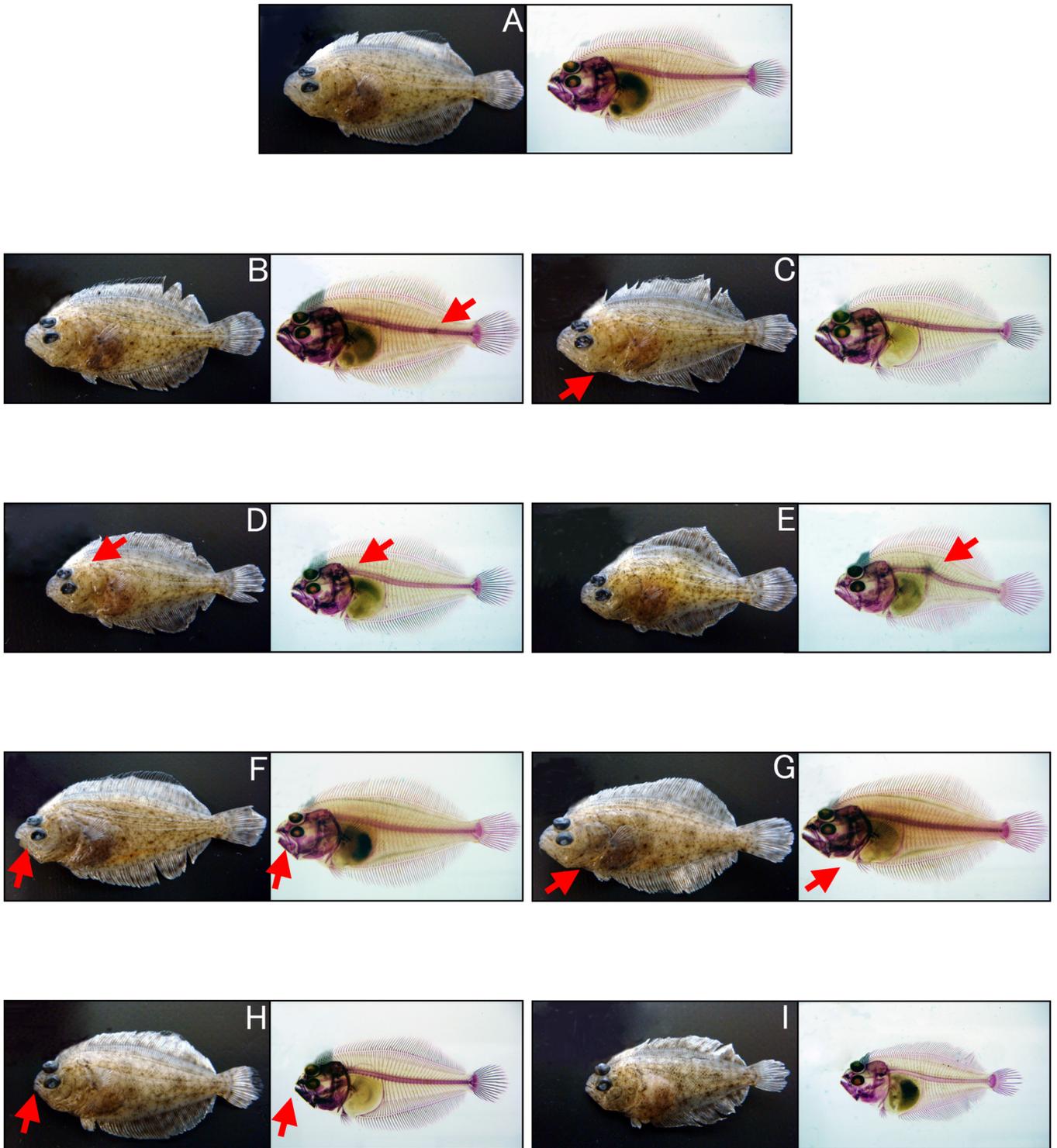


図1 正常魚と形態異常魚の外観および骨格標本

各形態異常の呼称（表1）と、各々に対応するヒラメ稚魚の外観と骨格標本を示す。A正常魚（全長 29.8 mm），B外観は正常で骨格標本は異常（31.4 mm），C外観は異常で骨格標本は正常（28.4 mm），D“オジギ”と呼称される形態異常魚（25.4 mm），E“丸”と呼称される形態異常魚（23.0 mm），F“アゴ”と呼称される形態異常魚（36.5 mm），G“エラ”と呼称される形態異常魚（34.9 mm），H“クチ”と呼称される形態異常魚（26.2 mm），I“バランス”と呼称される形態異常魚（20.4 mm）。赤い矢印は、形態および骨格の異常箇所を示す。

“バランス”と呼称される形態異常魚(図1-D)には, 骨格異常は見られないが, 正常魚(図1-A)と比較して明らかに体型が異なっていた。これらの稚魚は, 外観から形態異常魚として容易に判別可能である。外観で出荷不可と判断した稚魚の約半数は, 骨格に異常が全く認められなかった(図1-C)。

本研究で外観より正常魚の選別を行ったのは(株)長崎種苗の飼育技術者である。選別した稚魚の正常率の高さから, 外観より正常魚を選り分ける飼育技術者の選別能力の高さが明らかとなった。しかし, 外観から出荷不可と判別した稚魚には, 骨格に異常の認められない稚魚がおよそ50%含まれていた。この骨格異常が見られない稚魚は, 正常魚として出荷可能である。よって, これらの稚魚を正常魚として選別することで, 稚魚の出荷歩留まりを上げることが出来る。この選別を行うためには, 正常魚と形態異常魚の多くの骨格標本作製することで充実したデータベースを構築し, これを用いて選別業者の選別基準の統一を図る必要がある。しかし, 本研究で得られた標本数が少ないため, 今後より多くの標本数を集積し, 充実したデータベースを構築していくことが今後の課題である。

謝 辞

本研究は, 文部科学省科学技術振興調整費〈地域再生人材創出拠点の形成〉「海洋サイバネティクスと長崎県の水産再生」プログラムにより実施した。

参考文献

- 1) Watanabe, T., M.S. Izquierdo, T. Takeuchi, S. Satoh and C. Kitajima : Comparison between eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in terms of essential fatty acid efficacy in larval red seabream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55, 1635-1640 (1989).
- 2) 竹内俊郎, 鄭 鋒, 與世田兼三, 廣川 潤, 渡邊 武 : DHA 強化ワムシのマダラ仔魚に対する栄養価. *日水誌*, 60, 641-652 (1994).
- 3) Dedi, J., T. Takeuchi, T. Seikai and T. Watanabe : Hypervitaminosis and safe levels of vitamin A for larval flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed *Artemia* nauplii. *Aquaculture*, 133, 135-146 (1995).
- 4) Takeuchi, T., J. Dedi, Y. Haga, T. Seikai and T. Watanabe : Effect of vitamin A compounds on bone deformity in larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 169, 155-165 (1998).
- 5) Haga, Y., T. Takeuchi and T. Seikai : Influence of all-trans retinoic acid on pigmentation and skeletal formation in larval Japanese flounder. *Fish. Sci.*, 68, 560-570 (2002).
- 6) Haga, Y., T. Suzuki, H. Kagechika and T. Takeuchi : A retinoic acid receptor-selective agonist causes jaw deformity in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 221, 381-392 (2003).
- 7) 友田 努, 小磯雅彦, 桑田 博, 陳 昭能, 竹内俊郎 : 増殖ステージが異なるシオミズツボワムシのマダイ仔魚に対する餌料価値. *日水誌*, 70, 573-582 (2004).
- 8) 友田 努, 小磯雅彦, 桑田 博, 陳 昭能, 竹内俊郎 : 増殖ステージが異なるシオミズツボワムシのヒラメ仔魚に対する餌料価値. *日水誌*, 71, 555-562 (2005).
- 9) 友田 努, 小磯雅彦, 陳 昭能, 竹内 俊郎 : 増殖ステージが異なるワムシを摂餌したヒラメ仔魚の発育と形態異常の出現. *日水誌*, 72, 725-733 (2006).
- 10) Cahu, C., J.Z. Infante and T. Takeuchi : Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture*, 227, 245-258 (2003).
- 11) 福原 修, 田中 克 : 稚仔魚の硬組織の染色法. *海洋と生物*, 9, 97-99 (1987).
- 12) 河村功一, 細谷和海 : 改良二重染色法による魚類透明骨格標本の作製. *養殖研究所研究報告*, 20 11-18 (1991).
- 13) 小磯雅彦, 日野明德 : シオミズツボワムシの大量培養における増殖停滞の機構に関する研究. *水産増殖*, 50, 197-204 (2002).