

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580275

研究課題名(和文) 培養カイアシ類を使った海産種仔稚魚の飼育モデル確立

研究課題名(英文) Establishment of rearing model of marine finfish larvae using cultured copepod

## 研究代表者

小谷 知也 (Kotani, Tomonari)

鹿児島大学・水産学部・准教授

研究者番号：30389069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本課題で、1)海産魚類種苗生産の餌料系列のモデルとなる海産カイアシ類の培養方法の強化と、2)培養カイアシ類の給餌効果を明らかにすることが出来た。

50～100L規模の継続的なカイアシ類培養が可能となり、実験室レベルでの仔稚魚飼育へのカイアシ類給餌が可能となった。また、仔稚魚飼育で一般的に生物餌料としている海産ワムシ類と混合給餌したところ、カイアシ類を優先的に選択することが明らかとなった。

脂肪酸分析の結果、カイアシ類は極性脂質中にDHAが多く、これを模してワムシの極性脂質にDHAを強化したところ、仔稚魚の生残と成長を改善することが出来た。

研究成果の概要(英文)：In this subject, we could establish the two followings; 1) the enhancement of cultivation method of the marine copepod which could be a model for the feeding regime in the larviculture of marine finfish, 2) the clarification of feeding effect of cultivated copepod. We could cultivate the marine copepod continuously in the 50-100L scale and feed them to finfish larvae and juveniles under laboratory condition. When the cultivated copepod was fed to finfish larvae with the rotifers which were used as the general feed for marine finfish larvae, those larvae ingested the copepod selectively.

As the result of fatty acid analysis, copepods included much amount of DHA in polar lipid. When rotifers were enriched DHA amount in the polar lipid modeled the fatty acid composition of copepod, the survival and growth of finfish larvae could be improved.

研究分野：水産増殖学

キーワード：カイアシ類 栄養価 摂餌選択性

### 1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで甲殻類橈脚亜綱(以下カイアシ類)培養技術の開発を行い、2種のカイアシ類(*Parvocalanus* sp.と*Acartia tsuensis*)で小中規模培養を実現している(Shields et al., 2005; Grageda et al., 2008)。また培養したカイアシ類を給餌することにより Red snapper *Lutjanus campechanus* とマングローブキリフィッシュ *Rivulus marmoratus* の仔稚魚飼育に成功している。天然域で仔稚魚の餌として利用されているのはカイアシ類が最も多く、天然海域から採取したカイアシ類を仔稚魚に給餌することにより、成長、生残、ストレス耐性を向上させることが既に知られている。しかし、カイアシ類の大量培養は成功しておらず、海産魚類種苗生産で初期餌料としてカイアシ類を実用レベルで用いている例はない。したがって、培養されたカイアシ類で仔稚魚を飼育し、成長や生残、活性を観察した例は極めて少ない。

一方、現況の魚類種苗生産で初期餌料として主に用いられているのは、天然域で餌料生物としては稀にしか利用されていない輪虫動物門の海産ツボワムシ類と節足動物門甲殻類のアルテミアである。これらの動物プランクトンは、仔稚魚が正常に成長・発達するために必要な栄養素を含んでおらず、栄養的に強化することで栄養素不足に対処している。しかし、強化の内容については、モデルとなる栄養素の組成があるわけではなく、問題が起こるたびに付け足すように対処するのみで、完成した栄養強化の体系が整っているわけではない。

### 2. 研究の目的

本研究は培養カイアシ類を用いた海産魚類仔稚魚飼育で、仔稚魚の天然域の餌料系列を模したモデル飼育を確立し、健全で健康度の高い高品質な仔稚魚を生産するための技術開発に繋げるための基盤となる研究を行うことを目的とした。研究期間内には以下のことを行った。

(1) 複数種の微細藻類を餌料として使用してカイアシ類の中規模(30~100L)培養を実施するとともに、より効率の良い培養を実施するための培養条件を明らかにした。

(2) 培養されたカイアシ類を海産魚の仔稚魚に給餌し、その給餌効果(仔稚魚の成長、生残、活性)について研究した。

(3) カイアシ類給餌で飼育した仔稚魚と栄養強化したワムシ・アルテミアの餌料系列で飼育した仔稚魚の給餌効果を比較した。

(4) 栄養強化したワムシ・アルテミアとカイアシ類の化学成分・組成を比較し、互いの給餌効果の違いとの関連性について検討した。

### 3. 研究の方法

研究は当初、本課題開始前に培養に成功していた *Temora turbinata* で試験を開始していたが、平成 24 年度末に培養用恒温槽の事故で培養が崩壊した。そのため、鹿児島県奄美大島役勝川河口でサンプリングを実施し、そこで得られた *Pseudodiaptomus inopinus* を実験材料として 25 年度及び 26 年度の試験を実施した。

#### (1) カイアシ類培養の効率化

カイアシ類に給餌する微細藻類の組み合わせおよび給餌量を検討した。検討項目は *T. turbinata* に関しては 7 日間の試験培養を行い、雌 1 個体の 1 日あたりの産卵数で試験区間を比較した。*P. inopinus* に関しては全体の個体数で比較した。

給餌する微細藻類には、珪藻類の *Chaetoceros neogracile* および *Phaeodactylum tricornerutum* を用いた。また、ハプト藻類の *Isochrysis* sp. タヒチ株および *Pavlova lutheri* も用いた。以上の 4 種を組み合わせで試験を実施した。

得られた結果を 40L での拡大培養に応用して実証試験を行った。

#### (2) カイアシ類給餌の効果

*P. inopinus* に対するマダイ仔魚の摂餌選択性について検討した。マダイ仔魚を栄養強化したワムシを給餌することにより飼育し、このマダイ仔魚を 5~20 日齢の間、5 日毎に飼育水槽から採取し、別に用意した実験水槽で実験を行った。実験にはワムシ 5 個体/mL に対してカイアシ類を 1 個体/mL、0.5 個体/mL、0.25 個体/mL に設定した 3 試験区の水槽を用意し、各試験区に収容したマダイ仔魚の 1-2 時間後、4 時間後、8 時間後の胃内容物を調べた。試験飼育水中のワムシおよび *Ps. inopinus* 数の比および胃内容におけるワムシ：*Ps. inopinus* 比から、Ivlev の選択指数を算出した。Ivlev の選択指数からマダイ仔魚の *Ps. inopinus* に対する摂餌選択性とその変化について検討した。

#### (3) マダイ仔魚に対するカイアシ類給餌とワムシ・アルテミア給餌の飼育成績による比較

マダイ仔魚に対して *Ps. inopinus* 単独給餌の場合とワムシおよびアルテミアを給餌した場合の生残および成長を比較した。



図1. 4L規模のカイアシ類培養の様子

*P. inopinus* 単独給餌については生産出来る *Ps. inopinus* の量が十分ではないため、安定して高密度で培養出来る 4L の培養を給餌する日数分準備し、1日1培養を消費することで毎日の給餌量を確保した(図1)。

マダイ仔魚飼育は 100L 水槽で実施し、ワムシ・アルテミア給餌区では 3 水槽、カイアシ類単独給餌区では 1 水槽を用いた。各水槽には卵を 2,000 粒ずつ収容した。飼育はふ化後 20 日齢まで実施した。ふ化から 5 日齢毎に体長測定用のサンプリングを行った。20 日齢時には生残個体を計数した。

#### (4) 栄養強化したワムシおよびアルテミアとカイアシ類の脂肪酸組成の比較

一般的な方法で栄養強化したワムシおよびアルテミアの脂肪酸組成をカイアシ類の脂肪酸組成と比較した。この時培養したカイアシ類からは十分なサンプル量が得られなかったため、市販の冷凍カイアシ類で分析を行った。

さらに、カイアシ類の分析結果を基に、ワムシの栄養強化方法改善を図り、改善した方法で栄養強化を行ったワムシの脂肪酸組成およびそれを使ったマダイ仔魚飼育成績についても検討した。マダイ仔魚の飼育については通常の栄養強化を施したワムシを給餌した場合と比較した。

### 4. 研究成果

#### (1) カイアシ類培養の効率化

*T. turbinata* に対する培養実験では微細藻類 3 種(珪藻: *Ph. tricornutun* (PHA)、ハプト藻: *Isochrysis* sp. タヒチ株 (ISO) および *Pa. lutheri* (PAV)) を組み合わせ、各組み合わせで乾燥重量が等しくなるように設定し、それぞれの組み合わせで細胞数を変化させた。

その結果、ハプト藻類どうしの組み合わせでは (PAV: ISO) 産卵数が劣り、ハプト藻および珪藻の組み合わせ (PHA: ISO および PHA: PAV) で産卵数が多くなった。これらの内、*Ph. tricornutun* と *Isochrysis* sp. タヒチ株の組み合わせで産卵数が多くなった(図2)。

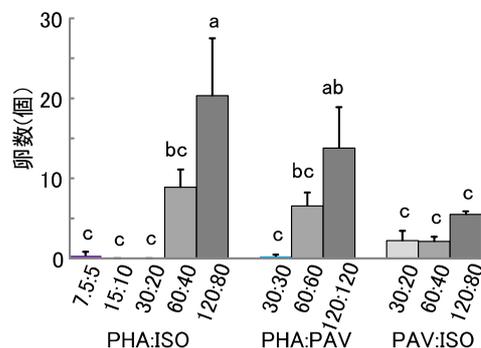


図2. *Temora turbinata* 雌1個体の1日あたりの産卵数。PHA: *Phaeodactylum tricornutum*, ISO: *Isochrysis* sp. タヒチ株, PAV: *Pavlova lutheri*. X軸の各数値は細胞密度(細胞数/mL)を表す。

一方、*Ps. inopinus* に対する培養実験では前述 3 種の微細藻類に加え、珪藻類 *C. neogracle* が使われ、さらに *T. turbinata* の結果を参考にして、珪藻類とハプト藻類の組み合わせのみが培養条件として検討された。また、3 種を混合した場合も実験条件として加えられた (PAV: ISO: PHA)。

その結果、すべての組み合わせで等量になるように給餌するとどの組み合わせでも大きな差はなかったが、*Isochrysis* sp. を *C. neogracle* の倍量で給餌する組み合わせで個体数が多くなった。

したがって、カイアシ類の培養には 2 種以上の微細藻類を組み合わせで給餌することが重要で、特に門レベルで同じ種類の微細藻類だけを混合することは避け、珪藻類とハプト藻類といった混合の仕方をするのが重要であることが明らかとなった。

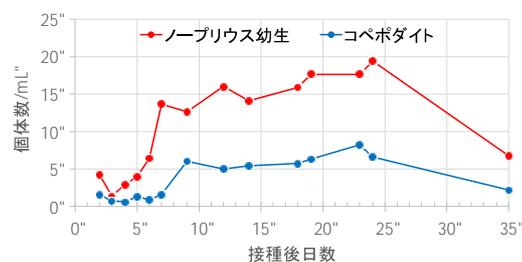


図3. *Pseudodiptomus inopinus* の 40L 規模での培養結果。

また、この結果に基づいて 40L の拡大培養を行った結果、1 ヶ月以上にわたって培養が可能となり、密度も 25 個体/mL 以上を達成した(図3)。

#### (2) カイアシ類給餌の効果

天然域ではカイアシ類が魚類仔稚魚の餌料として利用されていることが知られている。Kolkovski et al. (1997) は仔魚はカイアシ類と同じ甲殻類であるアルテミアを化学応答で認識して摂餌することを明らかにしている。ワムシと比較した時にカイアシ類を優先的に摂餌するかどうかを確認するためにワムシおよびカイアシ類の混合給餌による摂餌選択性を調べた。

その結果、5 日齢ではマダイ仔魚の *Ps. inopinus* に対する摂餌選択性は高くはなく、給餌 2 時間後までの選択性はむしろ負の傾向を示していた(図4)。10 日齢以降 *Ps. inopinus* に選択性を示すようになったが(図4) *Ps. inopinus* 給餌 2 時間以降に選択性を示すようになり給餌直後は食べ慣れているワムシに選択性を示したものと考えられる。また、*Ps. inopinus* の密度が減るとマダイ仔魚は選択性を示しにくくなる傾向もあった。20 日齢に給餌 2 時間後から高い選択性を示すようになった(図4)。

マダイ仔魚は *Ps. inopinus* に摂餌選択性を示したものと考えられるが、基礎飼育では *Ps. inopinus* を用いず、ワムシのみの給餌でマダイ仔魚を飼育したため、試験開始当初は

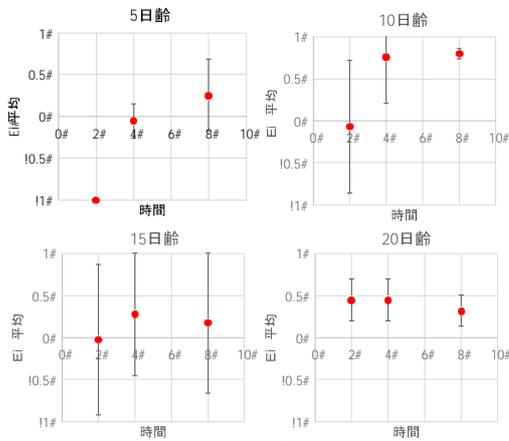


図4. ワムシ5個体/mLおよび*Pseudodiaptomus inopinus*1個体/mL収容環境下でのマダイ仔魚の*Ps. inopinus*に対するIvlevの選択指数の各日齢における経時的変化。

摂餌し慣れたワムシに選択性を示したものと考えられる。つまり、*Ps. inopinus*のみを飼育開始当初からマダイ仔魚に給餌した場合、マダイ仔魚は*Ps. inopinus*に対して終始強い選択性を示すものと考えられる。

当初の目的である仔稚魚飼育のモデル構築のためには*Ps. inopinus*が高い栄養価を有することが求められるが、使用している種以外の微細藻類給餌の検討を行っていない時点で、このような高い選択性を示したことにより、*Ps. inopinus*が生物餌料として高いポテンシャルを持っていることが考えられ、*Ps. inopinus*は海産魚類仔稚魚のモデルを構築する上で、非常に重要な生物餌料であると言える。

### (3) マダイ仔魚に対するカイアシ類給餌とワムシ・アルテミア給餌の飼育成績による比較

(1) では40Lでの*Ps. inopinus*培養に成功したが、100L水槽での飼育を20日程度続けるには、より多くの培養を確保する必要があるため、4Lの培養を給餌日数分準備した。一方、(2)の結果から、マダイ仔魚は飼育水中のカイアシ類密度が低くても積極的にカイアシ類を摂餌すると考えられたため、少量の培養でも問題が無いと判断して、試験を実施した。結果として、*Ps. inopinus*給餌区では10日齢過ぎから斃死が目立ち始め、15日齢時に*Ps. inopinus*給餌区の飼育を終了した。成長の解析については*Ps. inopinus*給餌区が15日齢で終了したために、5日齢毎の体長から回帰分析により指数関数で成長曲線を描き、その傾きを成長係数として、二元配置分散分析によりワムシ給餌区との比較を行った。

マダイ仔魚は0日齢で標準体長が $2.31 \pm 0.05 \text{ mm}$ であったが15日齢にはワムシ給餌区で $5.22 \pm 0.44 \text{ mm}$ 、*Ps. inopinus*給餌区で $5.48 \pm 0.69 \text{ mm}$ となり*Ps. inopinus*給餌区でやや大きかったが、有意差はなかった(図5)。一方、成長曲線の傾きは*Ps. inopinus*給餌区で有意に大きかった。

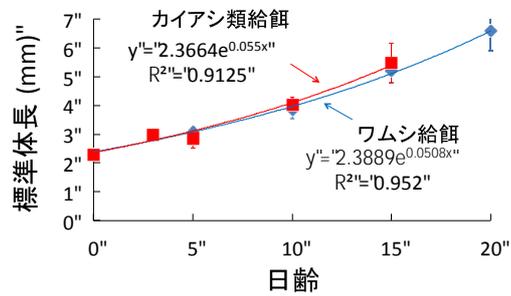


図5. ワムシ5個体/mLおよび*Pseudodiaptomus inopinus*1個体/mL収容環境下でのマダイ仔魚の*Ps. inopinus*に対するIvlevの選択指数の各日齢における経時的変化。

*Ps. inopinus*給餌区で生残出来なかったのは給餌量を十分確保できなかったためであると考えられ、特に重要であるとされているFirst feeding (Fyhn, 1989)が出来なかったために大量に斃死したものと考えられる。つまり、モデル飼育を構築するためには仔稚魚の成長に応じた適正な給餌量を確保することが必要である。このために、カイアシ類培養法の改善だけでなく、制限された給餌量下で飼育が実施できるように、小規模のマダイ仔稚魚飼育技術を開発する必要がある。

### (4) 栄養強化したワムシおよびアルテミアとカイアシ類の脂肪酸組成の比較

市販の冷凍カイアシ類の脂肪酸組成を分析すると非極性脂質中のDHA含有率は中国産カイアシ類で $6.16 \pm 4.87\%$ で、北極圏産カイアシ類で $4.80 \pm 1.05\%$ であったのに対し、極性脂質中では中国産カイアシ類で $14.73 \pm 8.54\%$ 、北極圏産カイアシ類で $19.52 \pm 4.74\%$ と極性脂質中で非常に高率であることが明らかとなった。一方、通常の方法で栄養強化を施した海産ツボワムシ類の非極性脂質中のDHA含有率は $5.46 \pm 2.84\%$ 、極性脂質中では $2.24 \pm 1.02\%$ と、特に極性脂質中で低率で市販カイアシ類に比べ栄養価的に劣ることが明らかとなった。カイアシ類をモデルとして考えた場合、極性脂質中のDHA含有率を上昇させることが餌料としての栄養価改善に繋がると考えられた。

そこで、栄養強化時間を長くすることによって栄養価改善を試みた。通常8-12時間で栄養強化を行うところ、24時間および常時強化を試行した。その結果、極性脂質中のDHA含有率は24時間強化で $3.02 \pm 1.06\%$ 、常時強化で $4.51 \pm 0.47\%$ と通常の栄養強化よりも改善することが出来た。さらに、常時強化ワムシを用いてマダイ仔魚を飼育したところ、成長および生残を改善することが出来た(投稿準備中)。

カイアシ類をモデルとして現状海産魚類種苗生産で生物餌料として使用されている海産ツボワムシ類の栄養価改善が成され、仔魚の飼育成績改善に繋がったが、栄養価としては、カイアシ類に及んでおらず、また摂餌誘引性についても改善されていない。しかし、カイアシ類を使った仔魚飼育方法の確立に

目処が立ち、カイアシ類を用いた仔魚飼育のモデル構築はほぼ達成できたものとする。今後は、達成できなかった培養カイアシ類の餌料である微細藻類種を変化させることによる栄養価改善に取り組むとともに、カイアシ類の摂餌誘引性の原因となる物質などを解明することが必要である。

#### <引用文献>

Shields, R. J., Kotani, T., Molnar, A., Marion, K., Kobashigawa, J., Tang, L. Intensive cultivation of a subtropical paracalanid copepod, *Parvocalanus* sp., as prey for small marine fish larvae. In: (Cheng-Sheng Lee, Patricia O' Bryen, Nancy Marcus, eds) *Copepods in Aquaculture*. 2005. pp. 209-223. Blackwell Publishing. Ames, U.S.A.

Grageda, M. V. C., Kotani, T., Sakakura, Y., Hagiwara, A. Effects of feeding copepod and *Artemia* on early growth and behaviour of the self-fertilizing fish, *Rivulus marmoratus*, under laboratory conditions. *Aquaculture* 281, 2008. 100-105.

Kolkovski, S., Arieli, A., Tandler, A., Visual and chemical cues stimulate microdiet ingestion in sea bream larvae. *Aquacult Int.* 5, 1997. 527-536.

Fyhn, H.J., First feeding of marine fish larvae: Are free amino acids the source of energy? *Aquaculture*. 80, 1989. 111-120.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

Tomonari Kotani 「Development and application of live feed for finfish larvae in aquaculture」The Omics in the Ocean - The international Symposium of Marine Biology and Biotechnology. 平成 27 年 9 月 16 日(予定). 屏東市(台湾)

原口拓己・小谷知也 「海産ツボワムシ類の極性脂質中 n-3 HUFA の強化方法の検討」日本水産学会. 平成 26 年 3 月 28 日. 北海道大学水産学部(北海道函館市)

原口拓己・小谷知也 「海産ツボワムシ類の極性脂質中 n-3HUFA の強化方法の検討」日本水産学会. 平成 25 年 3 月 27 日. 東京海洋大学(東京都港区)

菊地一真・船越亮平・小谷知也 「微細藻類種および細胞密度が浮遊性カイアシ類の産卵数に与える効果」日本水産学会. 平成 25 年 3 月 27 日. 東京海洋大学(東京都港区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小谷 知也 (KOTANI, Tomonari)

鹿児島大学・水産学部・准教授

研究者番号: 30389069