

## 海産カイアシ類 *Tigriopus japonicus* の生残, 発育, 繁殖に対する 鶏糞抽出液の添加効果

菊池 学<sup>1</sup>・山出貴弘<sup>1</sup>・金 禎珍<sup>1</sup>・阪倉良孝<sup>1,2</sup>・萩原篤志<sup>1,2,\*</sup>

### Effects of chicken manure extract on the survival, development and reproduction in the marine copepod *Tigriopus japonicus*

Gaku KIKUCHI<sup>1</sup>, Takahiro YAMADE<sup>1</sup>, Hee-Jin KIM<sup>1</sup>, Yoshitaka SAKAKURA<sup>1,2</sup>  
and Atsushi HAGIWARA<sup>1,2,\*</sup>

**Abstract:** This study investigated the effects of chicken manure extract (CME) on the survival, development and reproduction of the marine harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus* through individual cultures with two diets, *Tetraselmis tetrathele* and *Chlorella vulgaris*. There was no difference in development and survival of nauplii between two microalgal diets. However, by feeding *C. vulgaris*, mass mortality occurred just after the metamorphosis to copepodite stage. This mortality was avoided by the addition of CME. *T. japonicus* fed on *C. vulgaris* diet with CME showed 7.4 times higher survival, 1.7 times faster development and 1.5 times higher reproduction than those without CME. *T. tetrathele* with CME induced 1.7 times higher reproduction of *T. japonicus* than those without CME. CME contains particles that are relevant with *T. tetrathele* and *C. vulgaris*, but the same effect of CME was observed with 0.22 µm filtered CME. It is likely that the amount of bacteria and 17β-Estradiol was below the level of that positively affects the growth and reproduction of *T. japonicus*.

**Key words:** *Tigriopus japonicus*; Chicken manure extract; Life history; Metamorphosis

現在, 魚類種苗生産では仔魚の餌料としてブラインシュリンプ *Artemia* spp. の幼生が広く利用されている。*Artemia* はシストの状態で長期間保存可能で, 容易に孵化させることができるため, 仔魚用餌料として利用しやすい (Léger and Sorgeloos 1992)。しかし, その供給は天然資源に依存しており, 主産地である米国 Great Salt Lake の *Artemia* シストの収穫量は毎年大きく増減しているため (State of Utah 2017), 価格の高騰と品質の低下を招きやすい。また, *Artemia* は海産魚類の必須脂肪酸であるドコサヘキサエン酸 (DHA) やエイコサペンタエン酸 (EPA) などの高度不飽和脂肪酸の含量が低く (渡辺ら 1978), 栄養強化

後の DHA がレトロコンバージョンによって EPA に変換される (林 1993)。

天然では, カイアシ類が仔魚の主要な餌料となっているが, 高密度の量産培養が困難なため, 種苗生産時の餌料生物として用いられた例は少ない。国内では1970年代にシオダマリミジンコ *Tigriopus japonicus* が, カイアシ類の中では安定的に培養可能な唯一の種類として注目され, 栄養強化を行わなくても十分量の必須脂肪酸を含有し, 海産仔魚に対する栄養価も優れていることが報告されている (福所 1980; 福所ら 1980; 渡辺ら 1978)。その後, *Artemia* のシスト製品の普及と栄養強化技術の進展に伴い, *T. japonicus*

2019年3月12日受付; 2019年10月15日受理。

<sup>1</sup>長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科 (Graduate School of Fisheries and Environmental Sciences, Nagasaki University, 1-14 Bunkyo, Nagasaki 852-8521, Japan).

<sup>2</sup>長崎大学海洋未来イノベーション機構 (Organization for Marine Science and Technology, Nagasaki University, 1-14 Bunkyo, Nagasaki 852-8521, Japan).

\*連絡先 (Corresponding author): E-mail, hagiwara@nagasaki-u.ac.jp (A. Hagiwara).

を仔魚飼育に使用する例はみられなくなった。一方、*Artemia* には前述の問題のほか、近年、重要な種苗生産対象種となっているクロマグロ *Thunnus orientalis* の種苗生産時に *Artemia* を給餌すると、生残と成長が著しく低下することも報告されている (Seoka et al. 2007)。国外でもワムシと *Artemia* の餌料系列による海産仔魚飼育が標準的に用いられているが、カラヌス目の *Acartia* sp. や *Parvocalanus* sp. などを培養し、養殖対象種の仔魚飼育に給餌した例 (Doi et al. 1997; Schipp et al. 1999; Støttrup et al. 1986) が報告されている。近年では、タイセイヨウクロマグロ *Thunnus thynnus* 仔魚への餌料効果が認められたカイアシ類 *Acartia tonsa* (Evjemo et al. 2014) の活用が注目を集めている。しかし、カイアシ類の使用はいずれも研究段階にとどまっており、種苗の量産に必要なだけの数のカイアシ類を生産する技術の開発はこれからの課題である。

Hagiwara et al. (2016) は *T. japonicus* がマダイ *Pagrus major* 仔魚に対して高い餌料価値があることを報告すると共に、鶏糞抽出液 (CME) を培養水に添加することで10個体/ml 以上の密度で *T. japonicus* を生産でき、かつ安定した培養が可能であることを明らかにした。この鶏糞抽出液の調整方法は、福岡県水産海洋技術センター内水面研究所で開発されたもので、ミジンコ類の培養に添加するとミジンコの生産性が上がることから、20年以上前から用いられている (中本 2008)。しかし、ミジンコやカイアシ類への作用機構については不明のままであることから、本研究では、まず CME が、*T. japonicus* の生活史のどの部分に対して作用するのか明らかにするため、生残、発育および繁殖に与える影響について個体別培養を通じて検討した。*T. japonicus* の培養には、*Tetraselmis tetrathele* (Hagiwara et al. 1995) や *Nannochloropsis oculata* (Jung et al. 1997) などが用いられているが、これらの微細藻の培養には水槽の確保と労力が必要となり、量産培養を行う上での制約となることから、容易に入手できる市販のクロレラの給餌についても検討し、CME の添加効果について合わせて検討した。

次に、CME の添加効果が、カイアシ類が捕食可能な CME 中の粒子や細菌にあると考え、粒子数と細菌数の計数を行った。CME 中の溶存物質については、CME がニワトリ由来の雌性ホルモン17  $\beta$ -Estradiol ( $E_2$ ) を含有しており (萩原 2006; 中本 2008; Ogello and Hagiwara 2015)、 $E_2$  は0.01-10  $\mu\text{g/l}$  の添加では影響を与えないが (Marcial et al. 2003)、100  $\mu\text{g/l}$  で本種の産仔を促進することが知られている (Marcial et al. 2002)。本研究では、*T. japonicus* に対する  $E_2$  添加の影響について検討した。

## 材料および方法

### 供試生物

*T. japonicus* は静岡県の浜名湖 (東京大学附属水産実験所) で採取された株を、継代培養したものを使用した (Hagiwara et al. 1995)。長崎県総合水産試験場で採水した天然海水 (34 ppt) を GF/C フィルター (1822-47, Whatman) を用いて濾過後、加圧滅菌 (121°C, 20分) して *T. japonicus* の培養海水とした。800 ml 容ガラス製マヨネーズ瓶に培養海水を700 ml 入れ、水温25 $\pm$ 1°C、観察時以外は光条件を全暗として *T. japonicus* の培養を行った。餌料には、微細藻類の *Tetraselmis tetrathele* を用い2.5 $\times$ 10<sup>5</sup>細胞/ml となるよう、3日に1回給餌した。

### CME の作製

福岡県水産海洋技術センター内水面研究所では、発酵鶏糞から調整した鶏糞抽出液をミジンコ類の培養に添加し、培養を行っている (中本 2008)。この調整法に従って、本研究に用いる CME を作製した。市販の発酵鶏糞 1 kg (鶏ふん, クリーンアルファー) と貝化石 (リヴァイタルグリーン, グリーン・カルチャア) 10 g を水道水 5 l に入れて沸騰させた後、弱火でかき混ぜながら3時間加熱後、蓋をして一晩室温で静置した。上澄み液を目合い200  $\mu\text{m}$  のプランクトンネットで濾過し、沈殿物もプランクトンネットで搾り取ることで CME を作製した。作製した CME は使用するまで最長6カ月、4°Cで冷蔵保存した。

### CME が *T. japonicus* の生活史パラメータに与える影響

設定した3つの給餌条件、すなわち無給餌、*T. tetrathele* 給餌 (2.5 $\times$ 10<sup>5</sup>細胞/ml)、*Chlorella vulgaris* 給餌 (25 $\times$ 10<sup>5</sup>細胞/ml、スーパー生クロレラ V-12, クロレラ工業) に、CME を添加した滅菌海水 (34 ppt) を用いた場合と CME 無添加の滅菌海水を用いた場合を組み合わせ、計6通りの実験条件を設定した。CME の添加濃度は、*T. japonicus* の増殖を最も促進する 2 ml/l に設定した (Hagiwara et al. 2016)。*T. tetrathele* は Erd-Schreiber 改変培養液 (Hagiwara et al. 1994) 中で通気培養したものを用いた。CME が *T. japonicus* の生残と発育に与える影響を調べるため、各々の培養水をそれぞれ24穴マルチウェルプレートに1培養器あたり 2 ml ずつ入れ、これらにノープリウス I 期の *T. japonicus* を1個体ずつ収容した。各々の実験条件に対し、18個体ずつ培養を行った。水温を 25 $\pm$ 1°C、観察時以外は光条件を全暗とし、20日間毎日新しい培養水に移しながら、生死と脱皮の有無を調

べた。これらのデータを、ノープリウス期（孵化から変態まで）とコペポダイト期（変態から成体まで）の2つの発育段階に分けて分析した。

次に、CMEが本種の繁殖に与える影響を調べるため、800 ml容ガラス製マヨネーズ瓶を用い、各々の培養水で1カ月間培養した *T. japonicus* の中から交尾ペアを採取した。その後、各々の培養水が2 ml入ったマルチウェルプレートの1培養器に交尾中の *T. japonicus* を1ペアずつ収容し、上記6通りの培養条件に対し、それぞれ12ペアを供試した。無給餌区の個体は *T. tetrathele* 給餌で1カ月培養した個体の中から採取した。交尾が終了し、雄が雌から離れた時点で雄を培養水から取り除いた。毎日新しい培養水に移しながら、10回目の産仔まで産仔数を計数し、産仔10回の平均産仔数と産仔間隔を比較した。産仔間隔は産仔1回に要する日数で表した。

ノープリウス期とコペポダイト期の生残率をそれぞれ培養水間で比較するために  $\chi^2$  検定を行い有意差 ( $P < 0.05$ ) が検出された場合には、さらに多重比較検定 (Tukey-WSD) を行った。

次式に示す発育日数の逆数 (発育指数) を指標として、それぞれの発育の速さを比較した。

$$\text{ノープリウス期の発育指数} = \frac{1}{\text{孵化から変態(コペポダイト I 期)までに要した日数}}$$

$$\text{コペポダイト期の発育指数} = \frac{1}{\text{変態(コペポダイト I 期)から成体までに要した日数}}$$

発育指数の等分散性を Bartlett 検定により確認後、餌料種、CME 添加の有無および発育段階の3要因間で差を比較するために三元配置反復分散分析 (Three-way repeated measures ANOVA) を行い、交互作用が検出された場合 ( $P < 0.05$ ) には、さらに多重比較検定 (Tukey-HSD) を行った。

産仔10回の平均産仔数の等分散性を Bartlett 検定により確認後、給餌区と CME 添加区の間で差を比較するため、2元配置分散分析 (Two-way ANOVA) を行った。交互作用 ( $P < 0.05$ ) が検出された場合には、さらに多重比較検定 (Tukey-HSD) を行った。

CME 因子 (細菌, 粒子,  $E_2$ ) が *T. japonicus* の繁殖に与える影響

CME を  $0.22 \mu\text{m}$  の親水性 PES フィルター (MILLEX GP, Millipore Corporation) に通し、 $0.22 \mu\text{m}$  以上の大きさの粒子を取り除いたろ過 CME (以下、FCME)

を作製した。CME の *T. japonicus* 培養水への添加濃度はここでも  $2 \text{ ml/l}$  とした。CME にはニワトリ由来の雌性ホルモン  $17\beta\text{-Estradiol}$  ( $E_2$ ) を  $0.62 \mu\text{g/l}$  含有するとの報告に基づき (中本 2008), CME を与えず  $E_2$  を  $0.00124 \mu\text{g/l}$  ( $=1.24 \text{ ng/l}$ ) 添加した場合についても検討した。すなわち、CME ( $2 \text{ ml/l}$ ), FCME ( $2 \text{ ml/l}$ ) および  $E_2$  ( $1.24 \text{ ng/l}$ ) をそれぞれ添加した滅菌海水 ( $34 \text{ ppt}$ ) と無添加の滅菌海水に *C. vulgaris* ( $25 \times 10^5$  細胞/ml) を入れて (対照区), 計4通りの実験条件を設定した。各々の培養水を24穴マルチウェルプレートに1培養器あたり2 ml 入れ、 $25^\circ\text{C}$  のインキュベーター内に24時間静置した。その後、各々の培養水を ZoBell 培地 (Marine Agar-2216, Difco Laboratories) に塗抹し、 $25^\circ\text{C}$  のインキュベーター内で24時間細菌を培養した。そして、培地上のコロニー数を計数し、培養水中の細菌数を測定した。また、粒子計数分析装置 (CDA-500, シスメックス) を用いて、CME の懸濁態粒子組成を測定した。

次に、各々の培養水を24穴マルチウェルプレートに1培養器あたり2 ml ずつ入れ、これらに交尾中の *T. japonicus* を1ペアずつ収容した。上記4通りの培養条件に対し、それぞれ15ペアを供試した。収容した交尾中の *T. japonicus* は、800 ml 容ガラス製マヨネーズ瓶を用いて、各々の培養水で1カ月培養した個体の中から採取した。水温を  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  とし、観察時以外は光条件を全暗に設定した。毎日新しい培養水に移しながら、すべての個体が死亡するまで産仔数を計数した。交尾が終了し、雄が雌から離れた時点で雄を培養水から取り除いた。そして、生涯産仔数と生涯産仔回数および初回産仔10回中の平均産仔数と産仔間隔を比較し、CME 中の  $0.22 \mu\text{m}$  以上の大きさの粒子と  $E_2$  が本種の繁殖に与える影響を求めた。

Bartlett 検定により、培養水中の細菌数に等分散性が検出されなかったため、Kruskal-Wallis 検定を行うことで培養水間の差を比較した。有意差 ( $P < 0.05$ ) が検出された場合には、さらに多重比較検定 (Steel-Dwass 法) を適用した。

生涯産仔数と生涯産仔回数および初回産仔10回中の平均産仔数の等分散性を Bartlett 検定により確認後、培養水間で差を比較するため、それぞれ一元配置分散分析 (One-way ANOVA) を行った。交互作用 ( $P < 0.05$ ) が検出された場合には、さらに多重比較検定 (Tukey-HSD) を行った。Bartlett 検定により、産仔間隔に等分散性が検出されなかったため、Kruskal-Wallis 検定を行うことで培養水間の差を比較した。有意差 ( $P < 0.05$ ) が検出された場合には、さらに多重比較検定 (Steel-Dwass 法) を行った。



## 結 果

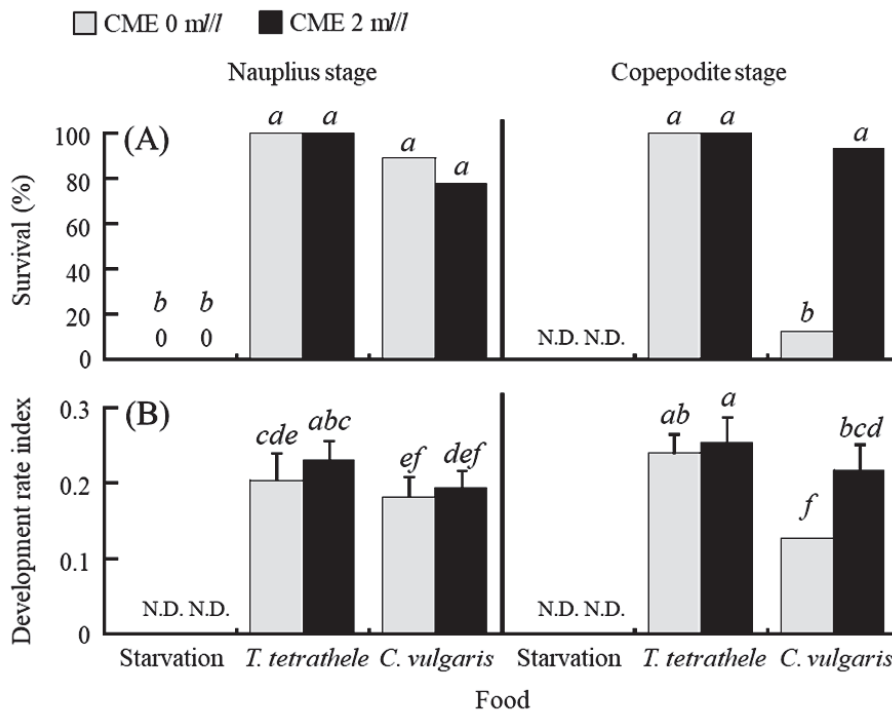
CME が *T. japonicus* の生活史パラメータに与える影響

*T. japonicus* のノープリウス期とコペポダイト期の生残率と発育指数（発育所要日数の逆数，growth rate index）を Fig. 1 に示した。無給餌の場合は全ての個体がノープリウス期（II-IV期）で死亡した。*T. tetrathele* 給餌の場合，ノープリウス期の生残率は CME 添加に関わらず100%であり，*C. vulgaris* 給餌でも生残率（CME 無添加区88.9%，CME 添加区77.8%）は高く，餌料種と CME 添加の有無による差はみられなかった。コペポダイト期の生残率（ノープリウスからコペポダイトに変態した個体のうち成体に達した個体の割合）は *T. tetrathele* 給餌では CME 添加の有無に関わらず100%であった。一方，*C. vulgaris* 給餌のとき，CME 無添加区で多くの個体がコペポダイト I 期から II 期に進む前に斃死し（Fig. 2），生残率は12.5%であったが，CME 添加区のコペポダイト期の生残率は92.9%で COE 無添加区より7.4倍高くなった（Tukey-WSD,  $P < 0.05$ ,  $n = 2-18$ ）。

*T. japonicus* の発育の速さには，餌料種と CME の有無が強い影響を与え，その影響の度合いは *T. japonicus* の発育段階によって異なった（Table 1）。三要因の間で交互作用が検出されたため，多重比較

検定を行ったところ（Three-way repeated measures ANOVA, 餌料種  $P < 0.01$ , CME  $P < 0.01$ , 発育段階  $P < 0.01$ , 餌料種  $\times$  CME  $\times$  発育段階  $P < 0.01$ ,  $n = 2-18$ ），ノープリウス期では餌料種に関わらず，CME 添加の発育への効果はみられなかった。コペポダイト期については，*T. tetrathele* 給餌の場合，CME 無添加区（ $0.24 \pm 0.02$ ）と CME 添加区（ $0.25 \pm 0.03$ ）の発育に差はみられなかったが，*C. vulgaris* 給餌では CME 無添加区（0.13）に比べ CME 添加区（ $0.22 \pm 0.03$ ）の発育が1.7倍速くなった（Tukey-HSD,  $P < 0.01$ ,  $n = 2-18$ , Fig. 1）。

*T. japonicus* が産出する卵嚢一つあたりの平均産仔数と，卵嚢の産出間隔をそれぞれ Fig. 3 と Fig. 4 に示した。平均産仔数は餌料種と CME の影響を受けることがわかった。また，餌料種と CME に交互作用が検出されたため，多重比較検定を行った（2-way ANOVA, 餌料種  $P < 0.01$ , CME  $P < 0.01$ , 餌料種  $\times$  CME  $P < 0.02$ ,  $n = 8-10$ ）。無給餌では CME の有無に関わらず産仔は起こらなかったが，*T. tetrathele* 給餌では卵嚢あたりの産仔数が CME 無添加区（ $21.0 \pm 3.8$ ）に比べ CME 添加区（ $35.5 \pm 2.0$ ）で1.7倍増加した。また，*C. vulgaris* 給餌でも，CME 無添加区（ $16.9 \pm 3.1$ ）より CME 添加区（ $24.9 \pm 6.5$ ）の方が産仔数は1.5倍多かった（Tukey-HSD,  $P < 0.05$ ,  $n = 8-10$ , Fig. 3）。*T. japonicus* の産仔間隔は，CME



**Fig. 1.** Effect of culture medium on survival (A) and development rate index (B) of *T. japonicus* during nauplius and copepodite stages. Each column indicates the mean and standard deviation, respectively. Different alphabetical letters denote significant differences (A:  $a > b$ , Tukey-WSD,  $P < 0.05$ ,  $n = 2-18$ , B:  $a > b > c > d > e > f$ , Tukey-HSD,  $P < 0.05$ ,  $n = 2-18$ ).

を添加することで短くなり、餌料種による違いはみられなかった (Two-way ANOVA, 餌料種  $P = 0.09$ , CME  $P < 0.01$ , 餌料種 \* CME  $P = 0.70$ ,  $n = 8-10$ , Fig. 4)

CME 因子 (粒子, E<sub>2</sub>, 細菌) が *T. japonicus* の繁殖に与える影響

CME の粒子組成を Fig. 5 に示した。CME にはバクテリアと同サイズである1-3  $\mu\text{m}$  の粒子が最も多く含まれていた ( $4.1 \times 10^8/\text{ml}$ )。また, *C. vulgaris* と同サイズ (5-9  $\mu\text{m}$ ) の粒子が  $1.7 \times 10^5/\text{ml}$ , *T. tetrathele* と同サイズ (10-16  $\mu\text{m}$ ) の粒子が  $5.1 \times 10^4/\text{ml}$  含まれていることもわかった。各々の培養水中の Zobell 培地上の生菌数を Table 2 に示した。生菌数 ( $\times 10^4$  CFU/ml) は CME 区 ( $16.1 \pm 1.7$ ), FCME 区

( $1.9 \pm 0.3$ ) と対照区 ( $1.5 \pm 0.3$ ), E<sub>2</sub> 区 ( $1.3 \pm 0.4$ ) の順に多かった (Steel-Dwass 法,  $P < 0.05$ ,  $n = 9$ )。

生涯産仔数, 孵化能力を有する卵囊の産出回数, および初回から10回目までに産出された卵囊の産出間隔と卵囊あたりの産仔数を Fig. 6 に示した。対照区 ( $198.9 \pm 118.0$ ) と E<sub>2</sub> 区 ( $159.7 \pm 94.5$ ) よりも, CME 区 ( $397.1 \pm 101.5$ ) と FCME 区 ( $391.3 \pm 125.2$ ) の生涯産仔数が多かった (Tukey-HSD,  $P < 0.05$ ,  $n = 13-15$ )。孵化能力を有する卵囊の産出回数は FCME 区 ( $22.0 \pm 3.7$ ) が対照区 ( $13.6 \pm 6.5$ ) と E<sub>2</sub> 区 ( $15.1 \pm 6.1$ ) よりも多くなった (Tukey-HSD,  $P < 0.05$ ,  $n = 13-15$ )。また, CME 区 ( $18.4 \pm 4.1$ ) の卵囊産出回数も FCME 区と同等であった。初回産仔10回中の平均産仔数は, CME 区 ( $27.7 \pm 4.7$ ), FCME 区 ( $22.6 \pm 4.8$ ), 対照区 ( $16.4 \pm 3.4$ ) と E<sub>2</sub> 区 ( $12.4 \pm 2.6$ )

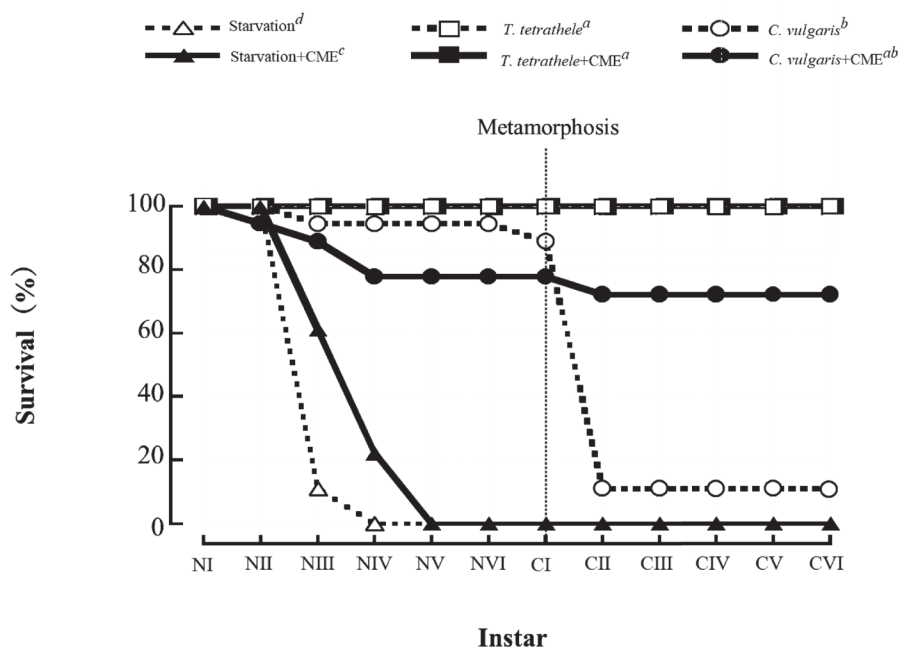
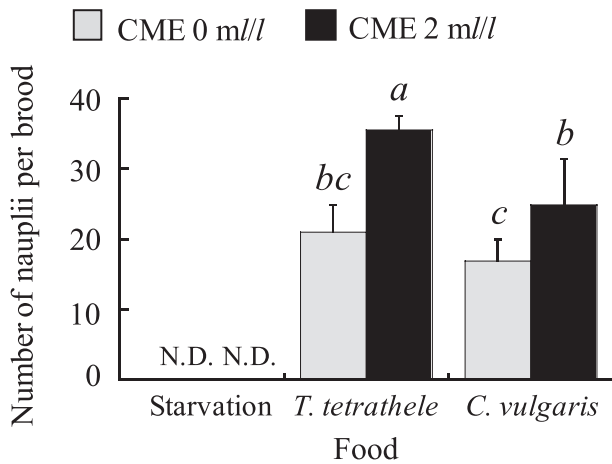


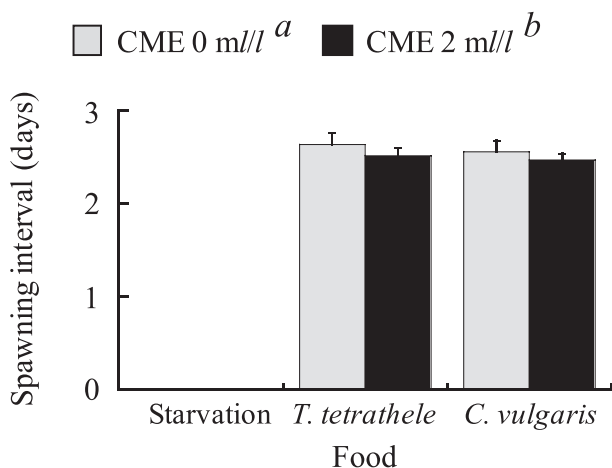
Fig. 2. Effects of culture medium on survival of *T. japonicus* (N: Nauplii, C: Copepodites). Each plot indicates the percent of survived individuals. Different alphabetical letters denote significant difference ( $a > b > c > d$ , Log-rank test,  $p < 0.01$ ,  $n = 18$ ).

Table 1. Effects of food (no food, feeding of *T. tetrathele*, *C. vulgaris*), with and without the addition of chicken manure extract (CME) and developmental stages (nauplii and copepodite) on development rate were computed (Three-way repeated measures ANOVA)

Factor	$n$	$df$	Sum of squares	Mean squares	F	$p$
Food	45-72	1	0.04084	0.04084	60.022	0.0000000006
CME	54-63	1	0.01623	0.01623	23.856	0.00001
Stage	51-66	1	0.01385	0.01385	20.364	0.00004
Food*CME	18-36	1	0.00001	0.00001	0.017	0.89739
Food*Stage	15-36	1	0.00279	0.00279	4.095	0.04872
CME*Stage	20-34	1	0.00051	0.00051	0.743	0.39298
Food*CME*Stage	2-18	1	0.00894	0.00894	13.142	0.00071
Residuals		47	0.03198	0.00068		



**Fig. 3.** Fecundity of *T. japonicus* exposed to different concentrations of Chicken manure extract and different food items. Each column and bar indicates the mean and standard deviation, respectively. Different alphabetical letters denote significant differences ( $a > b > c$ , Tukey-HSD,  $P < 0.05$ ,  $n = 8-10$ ).

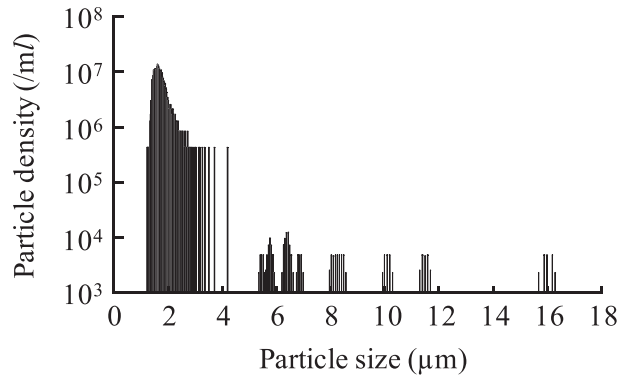


**Fig. 4.** Spawning interval of *T. japonicus* exposed to different concentrations of Chicken manure extract (CME) and different food items. Each column and bar indicates the mean and standard deviation, respectively. Different alphabetical letters denote significant differences ( $a > b$ , Two-way ANOVA, Food  $P = 0.09$ , CME  $P < 0.01$ , CME\*Food  $P = 0.70$ ,  $n = 8-10$ ).

の順で多かった (Tukey-HSD,  $P < 0.05$ ,  $n = 9-15$ )。CME 区 ( $2.5 \pm 0.1$ ) と FCME 区 ( $2.6 \pm 0.2$ ) の産仔間隔 (日) は対照区 ( $2.8 \pm 0.4$ ) と同等で,  $E_2$  区 ( $3.2 \pm 0.6$ ) よりも短かった (Steel-Dwass test,  $P < 0.05$ ,  $n = 9-15$ )。

## 考 察

本研究では, CME の添加の有無が *T. japonicus* の生活史特性 (生残, 発育, 繁殖) に与える影響につ



**Fig. 5.** Particle size distribution in Chicken manure extract. Each column indicates the density of particle with a certain size.

**Table 2.** Number of viable bacteria in each culture medium (control, no addition; CME, addition of chicken manure extract; FCME, addition of 0.22  $\mu\text{m}$  filtered CME and addition of  $E_2$ )

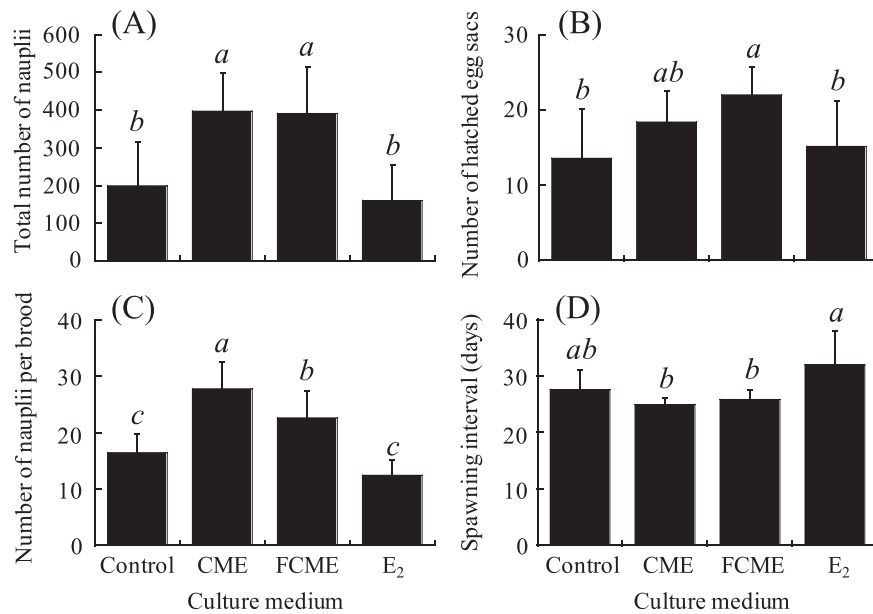
Viable bacteria count ( $\times 10^4$ C.F.U./ml)			
Control	CME	FCME	$E_2$
$1.5 \pm 0.3^{bc}$	$16.1 \pm 1.7^a$	$1.9 \pm 0.3^b$	$1.3 \pm 0.4^c$

Values are means  $\pm$  standard deviations. Different alphabetical letters denote significant difference ( $a > b > c$ , Steel-Dwass test,  $P < 0.05$ ,  $n = 9$ ).

いて, 三通りの給餌条件 (無給餌, *T. tetrathele* 給餌, *C. vulgaris* 給餌) の間で検討した。

微細藻の無給餌下では, CME を添加しないとき, ノープリウス幼生はIV期に達する前に全個体が死亡したが, CME を添加するとIV期に達する個体が現れた (Fig. 1)。CME 無添加で微細藻を給餌した場合については, *T. tetrathele* 給餌のとき, *C. vulgaris* を給餌した場合に比べて, *T. japonicus* は良好な発育と繁殖を示した (Fig. 1)。*C. vulgaris* 給餌では, コペポダイトに変態するまで高い生残を示したが, 変態後の活力低下が顕著で, コペポダイトII期に達する前に死亡する個体が多く現れた (Fig. 2)。生残した個体についても発育の遅延がみられた (Fig. 1)。しかし, 雌がいったん成熟し, 産卵を開始すると, その後の産卵間隔と一つの卵囊から生じるノープリウス幼生の数は両餌料種間で同等の値を示した (Fig. 3, 4)。これらのことから, ノープリウス幼生からコペポダイト幼生に変態する時期に必要な栄養素ないしは摂取するエネルギー量が *C. vulgaris* では不足していた可能性があるかと推察された。

次に, 微細藻を給餌し, かつ CME を添加した場合, *T. tetrathele* を餌料としたときには, CME 添加の有無に関わらず *T. japonicus* の生残と発育は同等であっ



**Fig. 6.** Total number of *T. japonicus* nauplii (A) and hatched egg sacs (B) during life span culture in different medium treated (CME; chicken manure extract: 2 mL/l, FCME; filtered CME: 2 ml/l, E<sub>2</sub>: 0.00124 µg/l). Number of *T. japonicus* nauplii per a brood (C) and spawning interval (D) for the first to 10th spawning in different media. Each column and bar indicates the mean value and standard deviation, respectively. Different alphabetical letters denote significant differences (A:  $a > b$ , Tukey-HSD,  $P < 0.05$ ,  $n = 13-15$ , B:  $a > b$ , Tukey-HSD,  $P < 0.05$ ,  $n = 13-15$ , C:  $a > b > c$ , Tukey-HSD,  $P < 0.05$ ,  $n = 9-15$ , D:  $a > b$ , Steel-Dwass test,  $P < 0.05$ ,  $n = 9-15$ ).

たが、CME 添加によって本種の産仔数は1.7倍増加した。市販の *C. vulgaris* を給餌した場合、ノープリウス期の生残と発育には CME 添加の影響がみられなかったが、コペポダイト期では、CME 添加によって変態後のコペポダイト I 期の生残を高め、成体に達するまでの生残率が CME 無添加に比べて7.4倍高くなり (93%)、発育も1.7倍速くなった。このとき、産仔数も1.5倍増加した。以上より、CME は *T. japonicus* の発育と繁殖に大きな効果を与え、生残、発育、産仔に対して促進的に作用していることがわかった。*T. japonicus* は、孵化後5回の脱皮を繰り返してノープリウスVI期となり、その後に変態を行いコペポダイト I 期となる (古賀 1970)。そしてコペポダイト I 期からコペポダイトVI期にかけて性成熟が進む (Egami 1951)。発育とともに性成熟が進行するコペポダイト期では、ノープリウス期よりもエネルギー消費が多く栄養要求が変化する可能性がある。また、本研究では、*C. vulgaris* と *T. tetrathele* の給餌密度を体積換算で一定となるように設定したが、エネルギーの摂取効率の点で *C. vulgaris* より大型の *T. tetrathele* の給餌が有効に働いた可能性も考えられる。市販の *C. vulgaris* に CME を添加することによって、*T. japonicus* は *T. tetrathele* とほぼ同等の発育、生残、繁殖を示すようになったことから、*T. japonicus* の量産培養の技術開発に繋がる成果が得られたと判断する。

CME はカイヤシ類だけでなく、タマミジンコ

*Moina macrocopa* と汽水産ミジンコ *Diaphanosoma celebensis* の増殖 (中本ら 2008; 中本 2008; Marcial and Hagiwara 2007; Hagiwara et al. 2016) や、淡水産のコガタツボワムシ *Brachionus angularis* の増殖 (Ogello and Hagiwara 2015) も促進することが報告されている。本研究では、CME 中のカイヤシ類が摂餌可能な大きさの粒子数、CME 添加による培養水中の細菌数、および E<sub>2</sub> が本種の生活史特性 (生残、発育、繁殖) に与える影響を検討した。

CME 中には *T. tetrathele* や *C. vulgaris* と同等の大きさの粒子が、それぞれ  $5.1 \times 10^4/\text{ml}$  および  $1.7 \times 10^5/\text{ml}$  含まれていたが、これらを含まない FCME 添加の場合と比べて、産卵間隔や総産仔数に違いはみられなかった。これらの密度で微細藻を給餌したとしても濾過食性の動物プランクトンの培養には不足しており、CME 中の粒子がエネルギー源になった可能性は低いと判断される。

シオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* (以下ワムシ) の培養槽では、Zobell 培地上で、通常  $10^7-10^8$  CFU/ml の値を示し、細菌がワムシの重要なエネルギー源となることが報告されているが (安田・多賀 1980; Hino et al. 1997; Balompapueng et al. 1997)、本研究では *T. japonicus* の培養水中の生菌数は、最大でも CME 区の  $1.6 \times 10^4$  CFU/ml に留まった。本研究では全菌数の測定を行っていないが、Zobell 培地上の生菌数で比較したワムシと *T. japonicus* 間



の大きな違いは、ワムシ類とは違い、カイアシ類は細菌による分解を受けにくいフィーカルペレットを排泄することに起因すると推測される。一方、*T. japonicus* は、無菌下ではほとんど増殖しないことや (Jung and Hagiwara 2001), ワムシと共存させた混合培養で高い増殖率を示す例が知られている (福所 1980; Hagiwara et al. 1995)。また、Jung and Hagiwara (2001) は、ワムシの増殖を抑制するが、*T. japonicus* の増殖を促進する細菌株を見いだしている。これらは、*T. japonicus* の発育と繁殖には、水中の細菌が重要な働きを有することを示すものであるが、CME 添加に由来する培養水中の細菌が *T. japonicus* のエネルギー源になり得るとは考えにくい結果となった。

本研究で検討した  $E_2$  濃度 (1.24 ng/l) では、*T. japonicus* の繁殖に変化はみられなかった。CME 中の  $E_2$  濃度として、福岡県水産海洋技術センター内水面研究所での測定値 (0.62 µg/l, 中本 2008) と、Ogello and Hagiwara (2015) による  $0.53 \pm 0.35$  µg/l の 2 例が報告されている。 $E_2$  は *T. japonicus* の産仔を促進することが知られているが、その最低影響濃度 (LOEC) は 100 µg/l と報告されている (Marcial et al. 2002)。この濃度に比べると、既報の CME 中の  $E_2$  濃度は 2 オーダー以上低い濃度であることから、少なくとも常に CME 中の  $E_2$  が単独で *T. japonicus* の増殖を促進させているわけではなさそうである。鶏糞の発酵処理や抽出液の作製過程で鶏糞中の  $E_2$  の減耗が起こらなかったとした場合、元の鶏糞 1 kg 中に  $E_2$  は約 3 µg 含まれていたと見積られる。一方、Xu ら (2018) は中国江蘇省の各地で採取した家畜排泄物のエストロゲン量を測定し、鶏糞中の  $E_2$  は 0–227.1 µg/kg (n=12) であったことを報告している。 $E_2$  以外のエストロゲンを含め、家畜排泄物の水中生物に与える影響については、まだ不明の点が多い。

本研究では、CME 中の具体的にどの成分が *T. japonicus* の繁殖を向上させるのか明らかにできなかったが、CME 中の細菌を含めた懸濁態粒子よりも、むしろ溶存態の物質が強く作用している可能性が示唆された。鶏糞由来の物質のみならず、CME 作製過程で加えた貝化石由来のミネラル等を含め、さらに検討を継続する必要がある。

## 要 約

鶏糞抽出液 (CME) は、ハルパクチクス目 *Tigriopus japonicus* の増殖を促進し、培養を安定させることが知られている。本研究ではまず、*T. japonicus* の培養の好適餌料とされる *T. tetrathele* と市販の *Chlorella vulgaris* を給餌し、*T. japonicus* の生

活史パラメータ (生残、発育、繁殖) に与える影響を検討した。その結果、ノープリウス幼生の発育と生残には餌料種間で差がなかったが、*C. vulgaris* 給餌ではコペポダイト幼生へ変態直後に大量斃死が起こったが、この斃死現象は、CME の添加で大きく改善され、*C. vulgaris* 給餌ではコペポダイト期の生残、発育および卵嚢あたり産仔数がそれぞれ 7.4 倍、1.7 倍、1.5 倍増加した。一方、*Tetraselmis tetrathele* 給餌では CME 添加により産仔数のみ 1.7 倍増加した。CME 中には *T. tetrathele* や *C. vulgaris* と同等の大きさの粒子が存在するが、これらを濾過によって除去しても、本種の発育や繁殖に影響はみられなかった。CME に由来する細菌や  $17\beta$ -Estradiol の量は少なく、*T. japonicus* の発育や繁殖に効果を与える可能性は低いと判断された。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、多大な協力をいただいた Helen Marcial 博士に深く感謝いたします。本研究は JSPS 科研費 JP 17H03862 の助成を受けたものです。

## 文 献

- Andersen, H. R., L. Wollenberger, B. Halling-Sørensen and K. O. Kusk (2001) Development of copepod nauplii to copepodites- a parameter for chronic toxicity including endocrine disruption. *Env. Toxicol. Chem.*, **20**, 2821-2829.
- Balompueng, M. D., A. Hagiwara, A. Nishi, K. Imaizumi and K. Hirayama (1997) Resting egg formation of the rotifer *Brachionus plicatilis* using semicontinuous culture method. *Fish. Sci.*, **63**, 236-241.
- Doi, M., A. Ohno, Y. Taki, T. Singhairaiwan and H. Kohno (1997) Nauplii of the calanoid copepod, *Acartia sinjiensis* as an initial food organism for larval red snapper, *Lutjanus argentimaculatus*. *Suisanzoshoku*, **45**, 31-40.
- Egami, N. (1951) A note on the sex-differentiation of the marine copepod, *Tigriopus japonicus*. *Annotationes Zoologicae Japonenses*, **24**, 131-136.
- Evjemo, J. O., D. X. Nam, A. Hagemann, Y. Attramadal, E. Kjørsvik and G. Øie (2014) First feeding of Atlantic Bluefinn tuna (*Thunnus thynnus*) and European lobster (*Homarus gammarus*) using intensively produced *Acartia tonsa*. *European Aquaculture Society*, Spain, 14-17.
- 福所邦彦 (1980) 油脂酵母によるティグリオプスのシオミズツボワムシとの混合生産. 日水誌, **46**, 625-629. [Fukusho, K. (1980) Mass production of a copepod, *Tigriopus japonicus* in combination culture with a rotifer *Brachionus plicatilis*, fed  $\omega$ -yeast as a food Source. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **46**, 625-629 (in Japanese with English abstract).]
- 福所邦彦・荒川敏久・渡辺 武 (1980) 油脂酵母で培養し



- たティグリオプスのマコガレイ仔稚魚に対する餌料価値. 日水誌, **46**, 499-503. [Fukusho, K., T. Arakawa and T. Watanabe (1980) Food value of a copepod, *Tigriopus japonicus*, cultured with  $\omega$ -yeast for larvae and juveniles of mud dab *Limanda yokohamae*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **46**, 499-503 (in Japanese with English abstract).]
- 萩原篤志 (2006) 動物プランクトンに対する影響と作用機構. 環境ホルモン (「環境ホルモン-水産生物に対する影響実態と作用機構」編集委員会編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 113-123.
- Hagiwara, A., K. Hamada, S. Hori and K. Hirayama (1994) Increased sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Rotifera) with the addition of bacteria and rotifer extracts. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **181**, 1-8.
- Hagiwara, A., M. Jung, T. Sato and K. Hirayama (1995) Interspecific interaction between marine rotifer *Brachionus plicatilis* and zooplankton species found in the rotifer mass culture tanks as contaminants. *Fish. Sci.*, **61**, 623-627.
- Hagiwara, A., C.-S. Lee and D. J. Shiraiishi (1995) Some reproductive characteristics of the broods of the harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus* cultured in different salinities. *Fish. Sci.*, **61**, 618-622.
- Hagiwara, A., H. J. Kim, H. Matsumoto, Y. Ohta, T. Morita, A. Hatanaka, R. Ishizuka and Y. Sakakura (2016) Production and use of two marine zooplanktons, *Tigriopus japonicus* and *Diaphanosoma celebensis*, as live food for red sea bream *Pagrus major* larvae. *Fish. Sci.*, **82**, 799-809.
- Hino, A., S. Aoki and M. Ushiro (1997) Nitrogen-flow in the rotifer *Brachionus rotundiformis* and its significance in mass cultures. *Hydrobiologia*, **358**, 77-82.
- 林 雅弘 (1993) *Euglena* による多不飽和脂肪酸の蓄積とその利用. オレオサイエンス, **42**, 265-271. [Hayashi, M. (1993) Accumulation of polyunsaturated fatty acids in *Euglena* and utilization. *Oleo. Sci.*, **42**, 265-271 (in Japanese with English abstract).]
- 古賀文洋 (1970) *Tigriopus japonicus* MORI, かいあし類の生活史について. 日本海洋学会誌, **26**, 11-21. [Koga, F. (1970) On the life history of *Tigriopus japonicus* MORI (Copepoda). *J. Oceanogr. Soc. Jpn.*, **26**, 11-21 (in Japanese with English abstract).]
- Jung, M.-M., A. Hagiwara and K. Hirayama (1997) Interspecific relations in the marine rotifer microcosm. *Hydrobiologia* **358**, 121-126.
- Jung, M.-M. and A. Hagiwara (2001) The effect of bacteria on interspecific relationships between the euryhaline rotifer *Brachionus rotundiformis* and the harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus*. *Hydrobiologia*, **446/447**, 123-127.
- Léger, P. and P. Sorgeloos (1992) Optimized feeding regimes in shrimp hatcheries. In "Marine Shrimp Culture: Principles and Practices" (ed. by A. W. Fast and L. J. Lester), Elsevier, New York, pp. 225-244.
- Marcial, H. S., A. Hagiwara and T. W. Snell (2002) Effect of known and suspected endocrine disrupting chemicals on the demographic parameters of the copepod *Tigriopus japonicus*. *Fish. Sci.*, **68**, 863-866.
- Marcial, H. S., A. Hagiwara and T. W. Snell (2003) Estrogenic compounds affect development of harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus*. *Environ. Toxicol. Chem.*, **22**, 3025-3030.
- Marcial, H. S. and A. Hagiwara (2007) Multigenerational effects of 17 $\beta$ -estradiol and nonylphenol on euryhaline cladoceran *Diaphanosoma celebensis*. *Fish. Sci.*, **73**, 324-330.
- 中本 崇・丸山 功・木村 浩・稲田善和・萩原篤志 (2008) クルマエビの生物餌料としての枝角類2種 (*Moina macrocopa*, *Diaphanosoma celebensis*) の餌料効果. 水産増殖, **56**, 31-36. [Nakamoto, T., I. Maruyama, H. Kimura, Y. Inada and A. Hagiwara (2008) Two cladoceran species *Moina macrocopa* and *Diaphanosoma celebensis*, as live feed for larval prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquacult. Sci.*, **56**, 31-36 (in Japanese with English abstract).]
- 中本 崇 (2008) ミジンコ類の大量培養技術の開発と魚介類幼生への餌料効果に関する研究. 福岡県水産海洋技術センター研究報告, **18**, 173-214.
- Ogello, E. O. and A. Hagiwara (2015) Effects of chicken manure extract on the population growth, mixis induction and body size of the freshwater rotifer *Brachionus angularis* Gosse 1851. *Asian Fish. Sci.*, **28**, 174-185.
- Seoka, M., M. Kurata, Y. Hatanaka, A. K. Biswas, A. C. Ji and H. Kumai (2007) Possible nutrients *Artemia* affecting the larval growth of pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. *Aquacult. Sci.*, **55**, 55-64.
- State of Utah (2017) Great Salt Lake ecosystem program. <https://wildlife.utah.gov/gsl/harvest/index.php>, accessed on 17 Jan. 2018.
- Schipp, G. R., J. M. P. Bosmans and A. J. Marshall (1999) A method of hatchery culture of tropical calanoid copepods, *Acartia* spp. *Aquaculture*, **174**, 81-88.
- Støttrup, J. G., K. Richardson, E. Kirkegaard and N. J. Pihl (1986) The cultivation of *Acartia tonsa* Dana for use as a live food source for marine fish larvae. *Aquaculture*, **52**, 87-96.
- Xu, P., X. Zhou, D. Xu, Y. Xiang, W. Ling and M. Chen (2018) Contamination and risk assessment of estrogens in livestock manure: a case study in Jiangsu Province, China. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **15**, 125; doi: 10.3390/ijerph15010125
- 渡辺 武・荒川敏久・北島 力・福所邦彦・藤田矢郎 (1978) 脂肪酸組成からみた仔稚魚用生物餌料の栄養価. 日水誌, **44**, 1223-1227. [Watanabe, T., T. Arakawa, C. Kitajima, K. Fukusho and S. Fujita (1978) Nutritional quality of living feed from the viewpoint of essential fatty acids for fish. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **44**, 1223-1227 (in Japanese with English abstract).]
- 安田公昭・多賀信夫 (1980) 餌料細菌を用いるシオミズツボワムシの培養. 日水誌, **46**, 933-939. [Yasuda, K. and N. Taga (1980) Culture of *Brachionus plicatilis* Muller using bacteria as food. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **46**, 933-939 (in Japanese with English abstract).]