

# 好適培養条件下におけるマナマコの幼生成長速度

吉田 渉<sup>1</sup>・大嶋 真謙<sup>2</sup>

<sup>1</sup>弘前大学農学生命科学部生物学科

<sup>2</sup>現)株式会社 シャトー海洋調査 環境調査部

(2016年11月8日受付)

## 序 論

近年ナマコ価格の上昇からナマコ漁に関わる採取戸数が増え、ナマコ漁獲量が減少している。この地域（京都府宮津湾）では平成19年の45トン进行ピークに漁獲量の減少が続いたことから、漁期の11月～翌年4月までの漁獲戸数及び戸数当たりの漁獲量が調べられた。その結果、最高採取戸数は平成18年の14戸であったが、それ以降急増して平成19年には20戸まで増加した。一戸当たりの漁獲量は平成18年の2.5トンをピークに減少を続け、平成25年度には約0.6トンまで減少した。これは、平成19年のピーク時の総漁獲量45トンを境に高い漁獲圧力（多い採取戸数）が長く続いたために資源量が減少したと結論された。漁業関係者は大胆な漁獲規制、すなわち採取戸数制限や一戸当たりの漁獲量規制を行わないと資源の回復は難しいと現状報告を行った（ナマコ勉強会。平成26年5月20日 京都府水産事務所資料）。このような事例は、従前の桁引き漁（ナマコ漁獲方法の一つ）により漁獲できる量が減った例であり、漁獲圧がもっと小さかったら将来ずっと得られていたはずの漁獲（漁獲量）が得られなくなる状態、すなわち生産乱獲（yield overfishing, 漁獲量に対する乱獲）と判断される。資源量の減少に歯止めをかける方策の一つとして、漁獲制限の他に、種苗放流があるが、宮津湾では実現していない。ナマコの種苗生産は北海道、青森などでは漁協や自治体、近年では宮城や兵庫などの民間企業でも精力的に行われている。ナマコの種苗生産方法は親の捕獲、採卵・採精、受精、幼生飼育、稚ナマコ育成のステップからなる。種苗生産技術の成熟や新技術の導入により、幼生飼育の現場では様々な問題を抱えるようになった。たとえば幼生の成長の遅延、斃死、未変態、低採苗率、飼育水槽での成長のバラツキなどである。今回、ナマコ幼生の成長向上及び高残存率に関わる添加物を探索する目的で、ナマコの幼生成長から変態に関わるパラメータを解析した。

ナマコと同じ棘皮動物のウニの幼生は飼育海水中に石灰藻を入れて培養すると、稚ウニへの変態が誘起される。

その誘起物質はジプロロメタン $\text{CH}_2\text{Br}_2$ であることが、Taniguchi *et al.* (1994) により明らかにされた。間接発生型のウニ類であるキタムラサキウニ *Storogylocentrotus nudus*、ムラサキウニ *Anthocardis crassipina*・アカウニ *Pseudocentrotus depressus* (高ら1996 a) はジプロロメタンにより変態が誘起される。さらに種苗生産の対象であるシラヒゲウニ *Tripneustes pileolus* においてジプロロメタンの有効性調査が行なわれた (中田ら 2003)。これらの報告で扱われているウニ類の幼生変態誘とは八腕幼生期に生じるウニ原基から稚ウニへと変態する現象である。ウニ幼生に対する変態誘起には、石灰藻ピリヒバ *Corallina pilulifera* に含まれる遊離のEPA (エイコペンタエン酸) やその水溶性抽出物が重要な役割を果たしている (高ら1996 b)。一方でナマコ類においては、緑藻 *Ulveella lens* がマナマコ *Apostichopus japonicus* のドリオラリア幼生からペンタクツラ幼生への変態誘起作用を有すること (Ito and Kitamura 1997)、L-DOPA などの神経伝達物質が同じマナマコの幼生変態を誘起するとの報告がある (Matsuura *et al.* 2009)。

マナマコの幼生餌料は浮遊珪藻 *Chaetoceros gracilis* (キートセロスグラシリス) が第一選択であり、国内外において同属 *Chaetoceros muelleri* に代表される各種 *Chaetoceros* 属を用いた飼育事例 (吉田 2012) が多数報告されている。微細珪藻ハプト藻 *Pavlova* の単独給餌では変態期まで生育しないこと (酒井・元谷 2004) や、ハプト藻 *Isochrysis* の単独餌料では変態が不十分であるため、*Chaetoceros gracilis* との併用が試みられている。また、最近ではクリプト藻 *Rhodomonas* sp. (ロドモナス) のナマコ浮遊幼生の飼料価値に関する報告がある (山本ら 2015)。このようにマナマコ幼生の餌料開発状況をみると生餌の種類及び用量においてある程度のレベルに到達している。しかながら、マナマコの人工的な幼生飼育環境下、特に人工海水を使用した培養条件下では、栄養補給面から単一珪藻の餌料だけでは十分とはいえない。棘皮動物に属する間接発生型のマナマコは、浮

遊幼生期のアウリクラリア幼生を経てドリオラリア幼生、ペンタクツラ幼生へと変態し、稚ナマコになる(吉田ら 2002)。このような間接発生型の幼生は変態に伴う体長収縮時期が飼育状態を判断する材料の一つとなっている。また、間接発生型(マナマコ, ハネジナマコ *Holothuria scabra* など)は、直接発生型(キンコ *Cucumaria japonica* など)よりも発生過程での餌要求量は極めて高いと考えられ、ナマコ類の間接発生種はその生育及び変態において添加餌料が大きな影響を与えるとされる(Yoshida *et al.* 2012)。このことからマナマコの幼生時の人工飼育においてはサプリメント剤の開発が必要である。しかしながら実施例や開発事例は少なく、その候補となる海藻本体や海藻抽出エキスを添加して幼生飼育した知見が乏しいのが現状である。

ナマコの幼生飼育過程に未変態のまま、アウリクラリア幼生で最終的に死亡するケースが散見される。この浮遊幼生飼育中に見られる未変態の状況を改善し、人為的に変態を誘起できれば、種苗生産上有益である。そこで、ウニ類で効果が認められている変態誘起物質ジプロモメタン添加海水中でマナマコ幼生を飼育し、その成長と生育の影響を調査したので報告する。また海藻ウミトラノヲ *Sargassum thunbergii* の水抽出物がマナマコ幼生の生存、成長、変態に好影響を与えたので、それについて報告する。

## 材料および方法

### マナマコ浮遊幼生

供試体は青森市水産指導センターで2013年6月7日に人工授精された胚を用いた。提供された胚は弘前大学の研究室に持ち帰り、同年6月12日まで通常飼育し、アウリクラリア幼生(中期)を使用した。2014年に実施したウミトラノヲ水抽出液添加飼育試験では2014年6月26日に人工授精した胚を供試体とし、2013年の試験と同じように、中期アウリクラリア幼生を使用した。2015年に実施したジプロモメタン及びウミトラノヲ水抽出液添加試験では、2015年7月21日に人工授精した胚を用いた。

### ジプロモメタン飼育海水の調製

人工海水(マリンアート Hi: 富田製薬) 500ml にジプロモメタン  $\text{CH}_2\text{Br}_2$  (和光純薬工業) を 2.5ml 加え、よく混ぜた。このジプロモメタン・ストック人工海水はジプロモメタン飽和海水 (12,000 ppm) として、スクリー付きメジューム瓶で作成後、一晩静置してから、その上清を飼育海水として使用した。ジプロモメタン海水 (6,000 ppm) は、幼生密度を調整した幼生を含む海水 100ml と飽和ジプロモメタン海水 (12,000 ppm) を 100ml 加え、希釈によりジプロモメタンの濃度が半分になるように作成した。5種類の異なる海水中的ジプロモメタン濃度 (6,000 ppm, 3,000 ppm, 1,500 ppm, 300 ppm, 30 ppm) で試験された。

### ウミトラノヲ *Sargassum thunbergii* 水抽出液添加飼育海水 (Sg) の調製

乾燥ウミトラノヲ粉末 1g に蒸留水 100ml を加え、乳鉢と乳棒で破碎したものを、ろ紙 (No.2: ADVANTEC) で濾過し、濾液を得た。この濾液は再度フィルター滅菌 (0.02 $\mu\text{m}$ ) され、使用するまで 4 $^{\circ}\text{C}$  で保存した。調製した水抽出液は滅菌ピペットで適量を計り、飼育海水中に滴下した。

### 幼生飼育条件

幼生を収容した各種ビーカー (200ml, 1L, 2L) は、シリコンチューブを通したガラス管の先端が底の中央にくるようにセットされ、対流が生じるエア量に調整した (Fig. 1)。試験開始時の幼生飼育密度は 2 ~ 2.8 匹  $\text{ml}^{-1}$  とした。飼育中は餌として濃縮 *Chaetoceros gracilis* (YANMAR, 1 億 cells  $\text{ml}^{-1}$ ) を飼育容器 1L 当たり、5000 万 cell を 2 日毎に与えた。飼育水の交換は飼育開始 2 日目、5 日目、8 日目に半量を交換、または無換水とした。幼生飼育は室温 20 $^{\circ}\text{C}$  に設定された飼育室、または常温 22.5 ~ 25.0 $^{\circ}\text{C}$  で行われた。

ウミトラノヲ抽出液の添加は、2013年の試験では飼育開始日から 2 日目、5 日目、8 日目、2014年の試験では 3 日目、6 日目の計 2 回、2015年の試験では 2 日目、5 日目に行った。各用量区に 2 セットの培養基で飼育した。

### 幼生体長計測及び形態観察

試験飼育海水中からホルピペットにて浮遊幼生を 5 ~ 15 匹を回収し、10%ホルマリン海水になるようにホルマリンを加えて固定し、エンブリオディッシュに移してから光学顕微鏡 (Nikon, ECLIPSE 50i) で観察した。浮遊幼生はデジタル顕微鏡撮影システム (Nikon, DIGITAL SIGHT) で撮影後、アウリクラリア幼生体長 (Fig. 2) を計測し、形態観察を行った。

## 結果

### ジプロモメタン添加海水中的幼生飼育

6,000 ppm  $\text{CH}_2\text{Br}_2$  処理区においては、飼育開始 2 時間後に 2 匹の幼生の崩壊が認められ、5 時間後には観察された全ての個体が崩壊した。この時点で 6,000 ppm の濃度における飼育試験を終了した。6,000 ppm では、幼生が生存できないことがわかったので、3,000 ppm, 1,500 ppm の濃度で新たな飼育試験を実施した。飼育期間中の体長推移を Fig. 3 に示す。ジプロモメタン飼育水では、幼生の体長は試験開始時に比べて小さくなっていることが判った。また、通常アウリクラリア幼生からドリオラリアに変態するには、後期アウリクラリア幼生の過程を経る。この過程では体長の伸長及び球状体形成が起

こる。観察したいずれの期間において球状体の形成が認められず、その後のドリオラリア幼生への変態は起こらなかった。ジプロモメタン3,000及び1,500 ppmの濃度ではマナコ幼生の変態に効果はなく、アウリクラリア幼生に対してむしろ体長の萎縮を促し、成長を阻害する結果となった。

**ウミトラノヲ水抽出液添加 (Sg) 海水中の幼生飼育**

ウミトラノヲ抽出液を添加した体長推移を Fig. 3と Fig. 4に示す。またドリオラリア幼生の出現時期と発現頻度、並びに幼生形態を調査した。ウミトラノヲ抽出液を5 ml添加した試験区では飼育8日目(受精後12日目)には体長730, 769 $\mu\text{m}$ の2個体、10日目(受精後14日目)の718 $\mu\text{m}$ の1個体で球状体 [elastic ball, hyaline sphere (HS)] が観察された (Fig. 3)。一方で対照区 (=無添加

区)では、14日目(受精後18日目)に、体長782, 833 $\mu\text{m}$ の2個体、飼育開始後16日(受精後20日)に、体長923, 872 $\mu\text{m}$ の2個体で観察された (Fig. 3)。この結果はウミトラノヲ抽出液を添加した場合、通常飼育条件より球状体を有するアウリクラリア幼生(後期アウリクラリア幼生)が早く出現したことを示しており、抽出液添加が球状体形成を早めたか、もしくは発生を早めた結果と判断できた。また、もう一つの対照区では、球状体形成を伴わない体長の減少が認められ、種苗生産過程でよく見られる飼育水槽毎に異なる発育不良が見受けられた。以上、ウミトラノヲ抽出液を中期アウリクラリア幼生飼育中に添加することは、速く球状体を形成させ、かつ発育不良を回避し、最終的に着底幼生(ペンタクツラ幼生)を得る方法として有用と考えられた。

ついで、アウリクラリア幼生の成長並びにドリオラリア

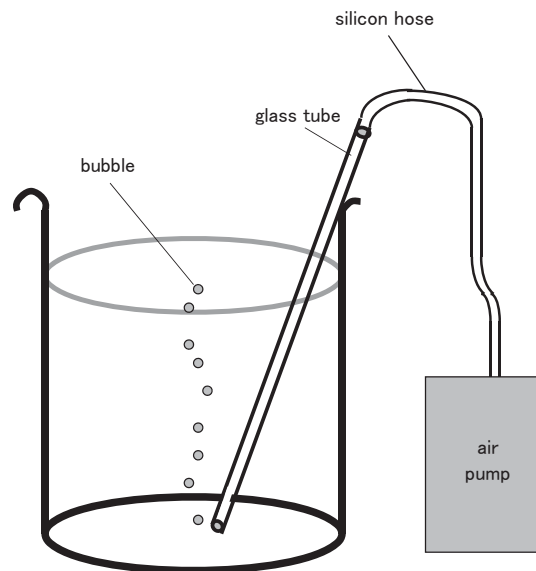


Fig. 1. A culture vessel for larval breeding of sea cucumber

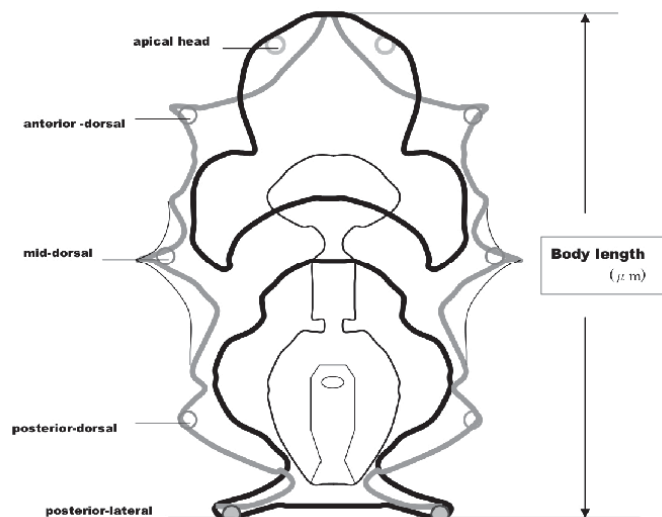


Fig. 2. Late auricularia larva of sea cucumber *Apostichopus japonicus*

への変態に効果があった用量, すなわち中用量 ( $5 \text{ ml l}^{-1}$ ) 及び低用量 ( $2.5 \text{ ml l}^{-1}$ ) の試験区を設定し, 飼育期間中の幼生体長及び出現幼生を調査した (Fig. 4)。その結果, 中用量区では飼育開始後7日目にアウリクラリア幼生の平均体長は $825 \mu\text{m}$ で最大になり, 8日目には観察した27% (4/15) がドリオラリア幼生であった。一方で, 低用量区及び無添加区では4日目にアウリクラリア幼生の平均体長 (低用量区:  $798 \mu\text{m}$ , 無添加区:  $758 \mu\text{m}$ ) が最大で, それ以降は体長が減少した。ペンタクツラ幼生の出現は7日目に低用量区で11% (1/9), 中用量区では7% (1/15) とそれぞれ低頻度であった (Fig. 4)。中用量区においてドリオラリア幼生が確認された以降にペ

ンタクツラ幼生が観察されなかったのは, ドリオラリア幼生からペンタクツラへ幼生への変態が速く進んだことに起因すると考えられた。アウリクラリア幼生では通常の発育過程では時間とともに胃の拡張が起こり, 腸体腔 (右水体腔囊) が形成され発達する (吉田ら 2002)。ウミトラノヲ中用量区では6日目に, 発達した胃と腸体腔 (右体腔囊) が観察されたが, 低用量区と発育不良の無添加区では胃の萎縮が認められ, 腸体腔の形成は見られない。また, 中用量区でのアウリクラリア幼生の球状体形成は5日目においては頂頭域及び前背域といった上方部2対が顕著に観察された後, 7日目において不完全な5対の球状体 [球状体形成部位: 頂頭 apical head (aph),

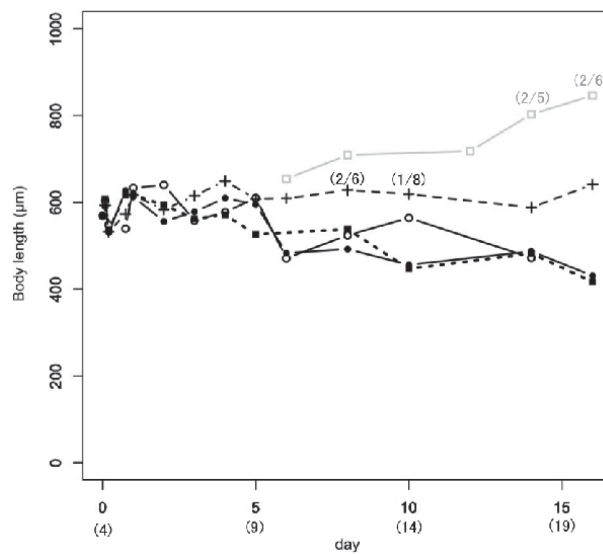


Fig. 3. Larval body length ( $\mu\text{m}$ ) of *Apostichopus japonicus* in the various culture conditions. —○—,  $3,000 \text{ rpm CH}_2\text{Br}_2$ ; —●—,  $1,500 \text{ rpm CH}_2\text{Br}_2$ ; --+--, Sg ( $5 \text{ ml l}^{-1}$ ); —□—, control; ( ), the days after fertilization. ( / ), (the number of larvae with 5 pair HSs / the number of observed larvae)

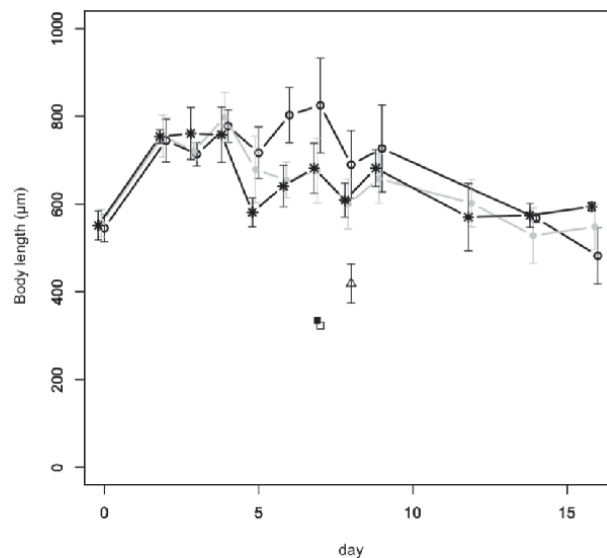


Fig. 4. The larval growth and metamorphosis in the culture conditions including Sg extracts. —○—, Sg  $5 \text{ ml l}^{-1}$ ; —●—, Sg  $2.5 \text{ ml l}^{-1}$ ; —\*—, control; □, △, doliolaria larva in Sg ( $5 \text{ ml l}^{-1}$ ); pentactula larva in Sg ( $5 \text{ ml l}^{-1}$ ); ■, pentactula larva in Sg ( $2.5 \text{ ml l}^{-1}$ )



前背 anterior-dorsal (ad), 中背 mid-dorsal (md), 後背 posterior-dorsal (pd), 後側 posterior lateral (pl); see Fig. 1] が観察された。その後のキートセロス単独の給餌飼育では、中用量区においてのみ稚ナマコが多数産出されたが、低用量区及び無添加区では殆ど産出されなかった (data not shown)。

**添加物に対する幼生の成長速度**

添加物の有無及び用量の違いによる幼生成長の影響を調査する目的で、新たに低用量 (300ppm, 30ppm) のジプロモメタン、高用量 (10ml l<sup>-1</sup>) のウミトラノヲ水抽出液添加の下で、幼生飼育試験を行った。アウリクラリア幼生の成長解析には飼育開始後 0, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12日目の幼生体長 (変態中及び変態終了を含む) を使用した。各試験区の成長比較のために相対成長速度 (SGR) 及び成長速度 (GR) (Jobling 1994) を算出した。

S L<sub>2</sub>: 試験開始後の平均体長 (μm)

D: 飼育日数 (開始後日数 - 開始時 0 日)

飼育開始時から飼育 3 日目までの SGR (3d) と飼育開始時から飼育 6 日目までの SGR (6d) の相対成長速度を各試験区の平均体長データを元に上記の式から算出した。独立に行った試験 (テスト 1 及びテスト 2) の SGR (3d) 及び SGR (6d) を Fig. 5 に示す。テスト 1 及びテスト 2 の全試験区 (対照区, ジプロモメタン区, ウミトラノヲ区) で、マイナス成長は見られなかった。テスト 1 では、全試験区において、SGR (6d) は SGR (3d) より 1.5 倍から 2 倍近い値を示し、飼育開始初期よりも後半の成長が速かったことがわかる。一方、テスト 2 では SGR (6d) は SGR (3d) を下回っている (ジプロモメタン 300ppm を除く)。これは飼育開始初期の成長は速いが、その後の成長の鈍化を検出したことになる。SGR (3d~6d) を求めれば、その飼育期間の成長程度について詳しく知ることができる (data not shown)。

1) 相対成長速度 SGR (Specific Growth Rate)

$$SGR (d^{-1}) = \{ (\ln SL_2 - \ln SL_1) / D \} \times 100$$

S L<sub>1</sub>: 試験開始時の平均体長 (μm)

2) 成長速度 GR (L) (Growth Rate (Length))

$$GR (\mu m/day) = (L_2 - L_1) / D$$

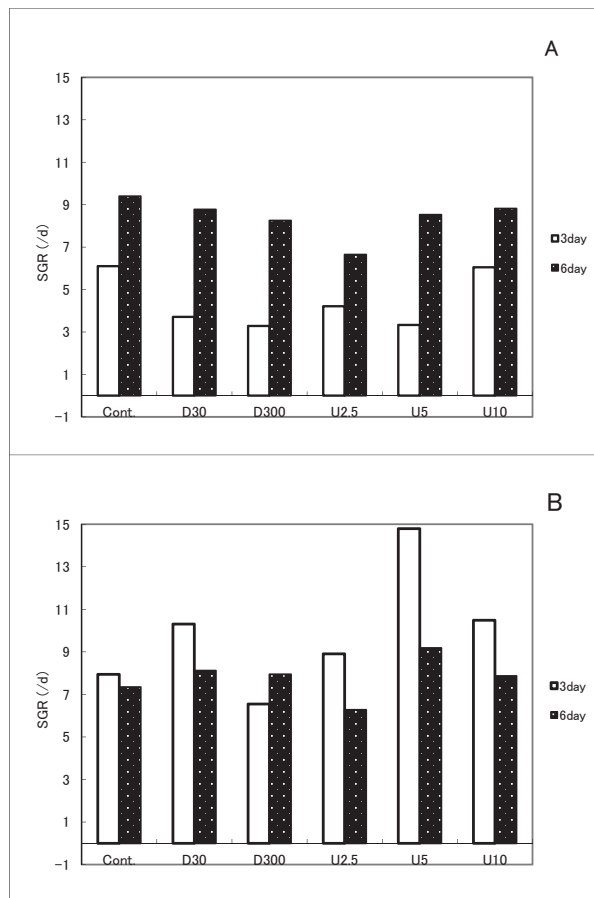


Fig. 5. Larval specific growth rate (SGR) for 3 or 6 days in various culture conditions. Cont., control; D30, CH<sub>2</sub>Br<sub>2</sub> 30 ppm; D300, CH<sub>2</sub>Br<sub>2</sub> 300 ppm; U2.5, add 2.5ml Sg extract l<sup>-1</sup>; U5, add 5ml Sg extract l<sup>-1</sup>; U10, add 10ml Sg extract l<sup>-1</sup>. Panel A, test 1. Panel B, test 2.

- L<sub>1</sub>: 試験開始時の体長 (μm)  
 L<sub>2</sub>: 試験終了後の体長 (μm)  
 D: 飼育日数 (開始後日数 - 開始時 0 日)

成長速度 GR (L) すなわち日間成長率 (μm/day) は回帰直線 ( $y=ax+b$ ) の傾き  $a$  として表される。GR (L) は MS エクセルのツール、データ分析、回帰分析を用いて算出した。GR (L) = 傾き  $a$  の信頼区間 95 並びに 99% 下限及び上限値を元に GR (L) の有意差検定を行った。GR (L) 6d の算出には飼育開始時と飼育 6 日目の個々の体長データを用いた。先の SGR と同様に独立した 2 回の試験 (テスト 1 とテスト 2) の GR (L) 6d を Fig. 6 に示した。

テスト 1 では対照区 (Cont.) の *Cheatoceros* 単独飼料で飼育した場合がもっとも早い成長速度であった。ジプロモメタン添加区 (30 ppm 及び 300 ppm) での幼生成長速度は対照区より低く、300 ppm では対照区と比較して有意に低かった。ウミトラノヲ添加区の成長速度は、対照区と比較して全用量 (2.5, 5, 10 ml) で低く、中でも低濃度 (2.5 ml 添加) では対照区と比較して有意に低かった。テスト 2 ではウミトラノヲ添加 5 ml で高い成長速度であったが、いずれの試験区とも有意な成長速度の差は認められなかった。以上の結果から、ウミトラノヲ水抽出液を添加して幼生飼育する場合には添加量を 5 ~ 10 ml l<sup>-1</sup> にすると速い成長が期待できる。低濃度の添加はむしろ成長速度を低下させる結果となった。低用量 (30 ppm 及び 300 ppm) のジプロモメタンの添加は、幼生成長速度促進に効果は認められなかった。

## 考察

### 幼生成長解析

#### 1) 相対成長速度 SGR (L) と成長速度 GR (L)

SGR は別名瞬間成長係数とされ、飼料効果に対する評価基準としてナマコに用いられている (Liu *et al.* 2009, 小林ら 2011)。成長解析の対象となるのは殆どが稚ナマコであり、相対成長速度 SGR (W) には体重が用いられている。SGR は相対値として表されるために、実際の成長速度 GR (μm/day) はわからないのが難点である。そこで体長の相対成長速度から日間成長速度を得るため、アウリクラリア幼生体長の相対成長速度 SGR (L) と成長速度 GR (L) を比較した。SGR と GR の比較は回帰分析により SGR (6d) と GR (6d) の値をもとに相関を求めた。その結果、SGR 値と GR 値は高い相関 ( $R=0.96984$ ) が認められた (Fig. 7)。成長速度 GR (L) (μm/day) は日間成長率として飼育中の添加物に対する幼生成長速度の違いを知る一つの指標となりうる。

#### 2) 成長曲線 (growth curve)

魚類では成長過程で様々なサイズが漁獲されるため、成長パラメータは重要な解析要素である。魚類の標準的な成長は von Bertalanffy の式である。近年では、アサリ *Ruditapes philippinarum* の年齢形質である殻表リング数と殻長においては Gompertz 成長式が AIC 値より選択された (田村ら 2014)。今回、マナマコのアウリクラリア幼生の成長曲線を得るために 3 つの成長式 von Bertalanffy, Logistic, Gompertz の当てはめを行った。各体長が正規分布に従うと仮定した上で、五利江の方法 (2001) に従い、MS エクセルのソルバーを用いて、非線形最小二乗法により 3 つの成長式パラメータ推定

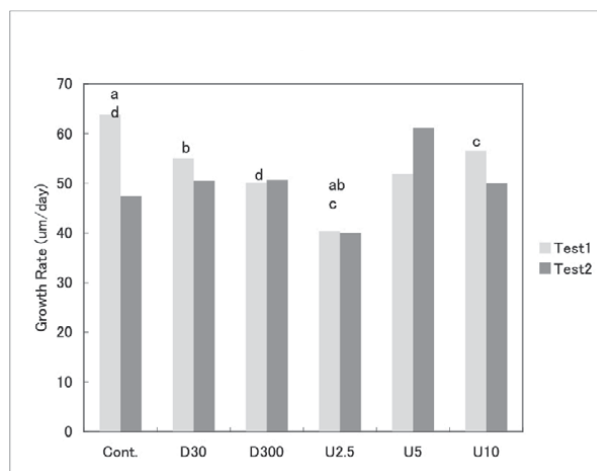


Fig. 6. Larval growth rate (GR) for 6 days in various culture conditions. Cont., control; D30, CH<sub>2</sub>Br<sub>2</sub> 30 ppm; D300, CH<sub>2</sub>Br<sub>2</sub> 300 ppm; U2.5, add 2.5ml Sg extract l<sup>-1</sup>; U5, add 5ml Sg extract l<sup>-1</sup>, U10, add 10ml Sg extract l<sup>-1</sup>. Same letter above the column denote significant difference between culture conditions. a, b, c,  $p < 0.01$ ; d,  $p < 0.05$

$(L_{\infty}, K, t_0)$  を行った。成長式の適合性選択にはAIC値の最小値をとる式を選択した。

von Bertalanffyの成長式

$$L_t = L_{\infty} [1 - e^{-K(t-t_0)}]$$

ロジスティック曲線の成長式

$$L_t = L_{\infty} / [1 + e^{-K(t-t_0)}]$$

ゴンペルツの成長式

$$L_t = L_{\infty} \exp[-e^{-K(t-t_0)}]$$

$L_t$  : 飼育開始  $t$  時間 (day) 後のアウリクラリア幼生体長 ( $\mu\text{m}$ )

$L_{\infty}$  : 極限体長 ( $\mu\text{m}$ )

$K$  : 成長係数

$t$  :  $L_t$  となる時間 (day)

$t_0$  :  $L_t = 0$  となる時間 (day)

AIC (赤池情報量基準)

$$AIC = n \times (\log(2\pi \times Se / n) + 1) + 2(p+2)$$

$n$  : サンプル数 (サンプルサイズ)

$Se$  : 残差平方和

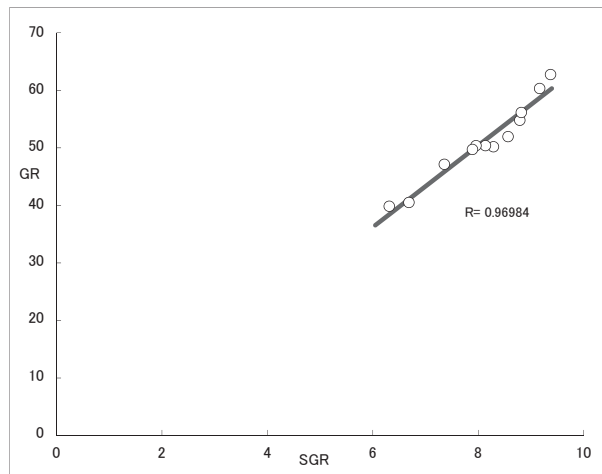


Fig. 7. The regression equation:  $y = 7.23221x - 7.07445$ .  $y$ , GR growth rate ( $\mu\text{m}/\text{day}$ );  $x$ , SGR Specific growth rate

Table 1. Least - squares estimators of each growth curve in normal culture condition.

Growth function	$L_{\infty}$	$K$	$t_0$	AIC
von Bertalanffy	802.07	0.3061	-3.115	304.716
Logistic	795.68	0.413	-1.141	303.795
Gomperzs	798.5	0.3575	-2.021	304.266

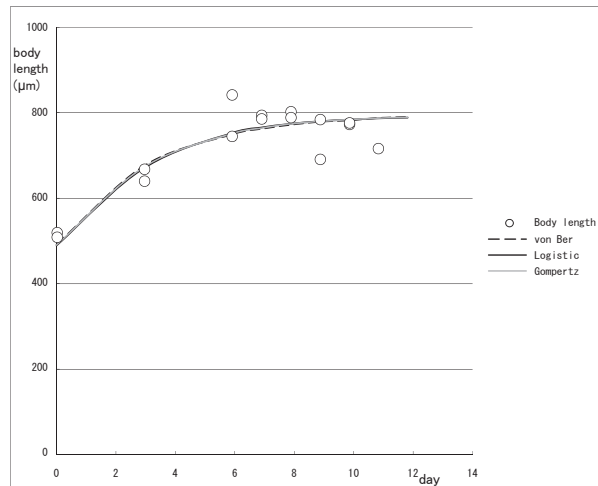


Fig. 8. Three growth curves of auricularia larva in normal culture condition. ---, von Bertalanffy; —, Logistic; —, Gompertz; ○, the mean of body length

$p$  :説明変数の数

$\log$  :自然対数

テスト1及びテスト2の対照区の合計4つの培養基の平均体長データと成長曲線3種を示す (Fig. 8)。各成長式のパラメータ ( $L_{\infty}$ ,  $K$ ,  $t_0$ ) 及びAICをTable 1に示した。成長曲線のAIC値より, ロジスティック曲線が最も適合する成長式となった。また, テスト1の対照区の2つの培養基の平均体長データを解析した場合においてもAIC値からロジスティック曲線が最も適合する結果となった (data not shown)。

### 3) 最大体長及び最大体長到達飼育日数

マナマコのアウリクラリア幼生は初期, 中期, 後期の発生段階を経て成長する。後期幼生期では通常球状体が形成され, 萎縮 (体長及び体幅が小さくなる) しながらドリオラリア幼生へと変態する。ドリオラリア幼生の期間は1~2日で, その後ペンタクツラ幼生に変態し, 着底する。アウリクラリア幼生は後期幼生時で最大体長をとり, その後, ドリオラリアに変態する過程で小さくなる。今回, 各種飼育条件下におけるアウリクラリア幼生の体長平均値から最大体長と最大体長に到達する飼育日数を下記の二次曲線 (放物線) の式に当てはめ, MSエクセルのソルバーを用いて, 非線形最小二乗法により, 3つのパラメータ ( $L_{max}$ ,  $t_{max}$ ,  $K$ ) 推定をおこなった。

$$L_t = K(t_{max} - t)^2 + L_{max}$$

$L_t$  : 飼育開始  $t$  時間 (day) 後のアウリクラリア幼生体長 ( $\mu\text{m}$ )

$L_{max}$  : 最大体長 ( $\mu\text{m}$ )

$K$  : 成長係数

$t$  :  $L_t$  となる時間 (day)

$t_{max}$  : 最大体長到達時間 (day)

解析にはテスト1及びテスト2の異なる培養条件下 (対照区 ジブプロモメタン区 (30ppm, 300ppm), ウミトラノヲ添加区 (2.5ml, 5ml, 10ml  $l^{-1}$ )) のアウリクラリア幼生の平均体長を用いた。各飼育条件における最大体長  $L_{max}$ , 最大体長到達時間  $t_{max}$ , 成長係数  $K$  をTable 2に, 二次曲線をFig. 9に示した。対照区の最大体長は785.9 $\mu\text{m}$ で, 最大体長到達飼育日数は8.4日であった。ウミトラノヲ2.5ml添加区では, 5mlや10ml添加した場合にくらべ, 最大体長は725.5 $\mu\text{m}$ で対照区より小さく, また最大体長到達日数は9.7日と長かった。ウミトラノヲ5及び10ml添加区では, 最大体長は対照区とほぼ同じであるが, 最大体長到達飼育日数はそれぞれ, 6.4日と7.0日であり対照区 (8.4日) より早く最大長に達した。ジブプロモメタン添加区の2用量区では, 最大体長及び最大体長到達飼育日数に大きな違いはなく, また対照区と同程度であった。二次曲線 (放物線) による最大体長及び最大体長到達日数のパラメータ推定はマナマコの幼生成長過程 (体長推移) を端的に表現することを可

Table 2. Least - squares estimators of a quadratic curve in various culture conditions.

	Cont.	Sg2.5	Sg5	Sg10	DM30	DM300
$L_{max}$	785.86324	725.461626	786.24574	767.03914	788.94315	774.97286
$K$	-4.285738	-2.342911	-7.540265	-5.832239	-4.351645	-4.959989
$t_{max}$	8.3744855	9.7091406	6.4114831	7.0007499	8.5919294	7.8910113

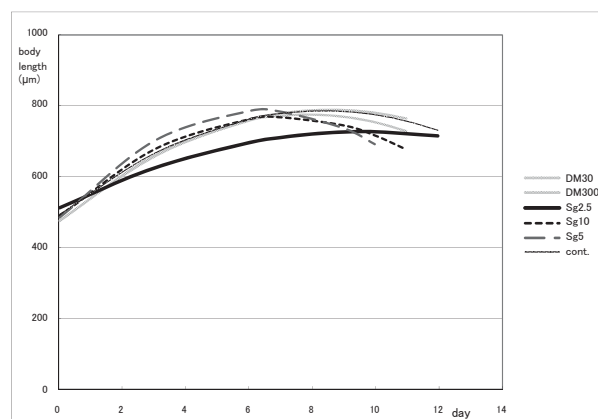


Fig. 9. Six quadratic growth curves of auricularia larva in various culture conditions. Cont., control; D30,  $\text{CH}_2\text{Br}_2$  30 ppm; D300,  $\text{CH}_2\text{Br}_2$  300 ppm; U2.5, add 2.5ml Sg extract  $l^{-1}$ ; U5, add 5ml Sg extract  $l^{-1}$ , U10, add 10ml Sg extract  $l^{-1}$



能にした。前述のGR及びSGRはアウリクラリア中期から後期前まで、そしてロジスチック成長式は極限体長に達した後期アウリクラリア幼生までである。二次曲線は初期アウリクラリアからドリオオリア幼生前までの成長解析に有用である。二次曲線の成長係数 $K$ は、その絶対値により成長速度の尺度として用いることができる。

## 要約

マナマコ幼生の成長に対する添加物の影響を評価した。アウリクラリア幼生の成長は相対成長速度SGR、成長速度GRならびに成長曲線growth curveにより調べられた。ウミトラノヲ水抽出液を添加した(5 ml l<sup>-1</sup>または 10 ml l<sup>-1</sup>) 場合の成長速度GR(日間成長率)は、51.9~56.6 $\mu$ m/dayとなり、低用量添加(2.5 ml l<sup>-1</sup>)より高用量での成長促進が期待された。ロジスチック成長式は初期アウリクラリア幼生から後期幼生までのナマコの体長に適合し、その式は $Lt = 795.68 / (1 + e^{-0.413(t - (-1.141))})$ となった。最大体長 $L_{max}$ 及び最大体長到達時間 $t_{max}$ を算出するために新たに二次曲線式(放物線)によるパラメータ推定を行った。ウミトラノヲ水抽出液を添加した場合、最大体長到達時間は6.4日、最大体長は786 $\mu$ mとなり、最大体長に達するまでの期間は対照区より1.6~2日短かった。低用量のジプロモメタン(30及び300 ppm)飼育では、成長係数 $K$ は-4.35~-4.96になり、対照区( $K = -4.28$ )と同じレベルで幼生成長促進効果はなかった。

## 謝辞

本研究を実施にあたり、マナマコの受精卵を提供くださいました青森市水産指導センター(現青森市水産振興センター)小山内詩織技師、小野圭司技師に深く感謝申し上げます。また、幼生飼育並びに計測にご協力頂いた勝間田 栞(弘前大学農学生命科学部学部生)さん、及川翔太(弘前大学農学生命科学部学部生)君に深謝いたします。なお本研究の一部は青森市受託研究ならびにJST復興推進プログラム(マッチング促進)「高級ナマコとアワビの陸上養殖事業」助成事業の一環として実施されました。

## 引用文献

五利江重昭(2001) MS-Excelを用いた成長式のパラメータ推定. 水産増殖, **49**(4), 519-527

Ito, S. and H. Kitamura (1997) Induction of larval metamorphosis in the sea cucumber *Stichopus japonicus* by periphytic diatoms. *Hydrobiologia*, **358**,

281-284

Joblbing, M. (1994) Fish bioenergetics. Chapman & Hall, London. 309 p.

高 炯範・土田 徹・北村等・平山和次(1996a) ジプロモメタンのムラサキウニおよびアカウニ幼生に対する変態誘起作用. *Sessile Organisms*, **13**(1), 7-9

高 炯範・北村等・平山和次(1996b) 石灰藻のピリヒバより抽出された水溶性物質によるアカウニ幼生の変態誘起. *Sessile Organisms*, **13**(1), 1-5

小林俊将・山口 仁・根田幸三(2011) 稚ナマコ飼育のための配合飼料の研究. 岩手水技セ研報, **7**, 15-18

Liu, Y., S. Dong, X. Tian, F. Wang and Q. Gao (2009) Effects of dietary sea mud and yellow soil on growth and energy budget of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka). *Aquaculture*, **286**, 266-270

Matsuura, H., I. Yazaki and T. Okino (2009) Induction of larval metamorphosis in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* by neurotransmitters. *Fish. Sci.*, **75**, 777-783

酒井勇一・元谷 怜(2004) 平成14年度 北海道立栽培漁業総合センター事業報告書. pp. 25-36

中田祐二・金田真智子・鳩間用一・渡慶次賀孝(2003) シラヒゲウニの種苗生産. 沖裁セ事報, 47-51

田村亮輔・中川宙飛・五嶋聖治(2014) 北海道函館湾におけるアサリの成長. 北海道大学水産科学研究彙報, **64**, 37-44

Taniguchi, K., K. Kurata, T. Maruzoi and M. Suzuki (1994) Dibromomethane, a chemical inducer of larval settlement and metamorphosis of sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. *Fish. Sci.*, **60**, 795-796

山本慧史・岡内正典・吉松隆夫(2015) マナマコ *Apostichopus japonicus* 浮遊幼生に対する微細藻類 *Rhodomonas* sp. の餌料価値. 日本水産学会誌, **81**(6), 973-978

吉田 渉・玉井敦司・谷中俊広・石田幸子(2002) 陸奥湾産マナマコの発生と人工飼育. 弘前大学農学生命科学部学術報告, **4**, 16-23

吉田 渉(2012) 中国におけるナマコ養殖. ナマコ学 —生物・産業・文化—(高橋明義・奥村誠一 編), 成山堂書店, 東京, pp. 115-128

Yoshida, W., S. Ishida, K. Ono, S. Izumi and K. Hasegawa (2012) Developmental styles and larval morphology of hybridized sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea). *Inv. Rep. Dev.*, **56**, 249-259

## Larval growth rate of sea cucumber *Apostichopus japonicus* in a good culture condition

Wataru YOSHIDA<sup>1,\*</sup> and Masakane OSHIMA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Agriculture & Life Science, Hirosaki University, Hirosaki 036-8561, Japan

<sup>2</sup>Chateau Marine Survey Co., Ltd

\*Corresponding author: Tel, (+81) 172-393793; Fax, (+81) 172-393793;

E-mail, wataruy@hirosaki-u.ac.jp (W. Yoshida)

(Received for publication November 8, 2016)

### SUMMARY

In sea cucumber *Apostichopus japonicus*, the larval growth analysis using body length was executed by SGR (specific growth rate), GR (growth rate) and growth curve. A growth rate was 51.9–56.6  $\mu\text{m}/\text{day}$  in Sg culture condition (add water extract from brown sea algae *Sargassum thunbergii*). Sg water extract have an effect on larval growth, because of the GRs in medium (5 ml  $\text{l}^{-1}$ ) and high dose (10 ml  $\text{l}^{-1}$ ) were higher than that in low dose (2.5 ml  $\text{l}^{-1}$ ). The logistic growth equation was fitted to the body length of early auricularia larva to late auricularia larva, the equation,  $L_t = 795.68 / (1 + e^{-0.413(t - (-1.141))})$  was obtained. Newly, maximum body length ( $L_{\max}$ ) and arrival time of  $L_{\max}$  ( $t_{\max}$ ) were presumed by a parameter estimation method. The estimated  $L_{\max}$  was 786  $\mu\text{m}$ , and  $t_{\max}$  was 6.4 days in Sg culture condition. The period until  $t_{\max}$  in Sg culture (medium and high dose) is shorter than that in control culture conditions for 1.6 – 2 days. This quadratic curve (parabola) equation was in good agreement with the actually growth of all auricularia larval stage (from early to late auricularia before doriolaria). The growth factors ( $K$ , -4.35 – -4.95) in dibromomethane ( $\text{CH}_2\text{Br}_2$ ) culture conditions (low conc., 30 or 300 ppm) were similar to the growth factor ( $K$ , -4.28) in control culture condition. For this reason, the dibromomethane have not growth promoting effect in sea cucumber *Apostichopus japonicus*.

Key words: sea cucumber, auricularia larva, specific growth rate, growth rate, SGR, GR, growth curve, dibromomethane, brown sea algae,  $L_{\max}$ ,  $t_{\max}$