

原著論文

## ナマコ種苗生産時に出現するコペポーダの影響について

野口浩介\*<sup>1</sup>・野田進治\*<sup>2</sup>Influence of Copepods which Occur during Seed Production of the Sea Cucumber, *Apostichopus japonicus*

Kohsuke NOGUCHI and Shinji NODA

Basic tests were conducted to develop a method for eliminating Copepods *Tigriopus japonicus*, which appeared during sea cucumber seed production. Regarding the influence of copepods both on the adhesion diatoms and sea cucumber juveniles, the diatoms were consumed within about seven days on the condition of 2 copepods /cm<sup>2</sup>. Meanwhile, a decrease in the number of sea cucumber juveniles (size of 0.4-1 mm) was observed on the condition of 0.2 copepods /cm<sup>2</sup>. When a copepod and a sea cucumber (1 mm in body length) were put in a container in which a diatom had been grown beforehand, the sea cucumber began to die after the diatom had been consumed by the copepod, but not before. Juvenile sea cucumbers were stained with UV fluorescent FITC and copepods which had caused their death were subjected to microscopic observation. As a result, it was conjectured that the cause of death of the sea cucumber juveniles was not predation but physical contact, because strong fluorescence was observed on legs, but none was observed in the stomach or feces of the copepods.

2010年10月1日受付, 2010年12月14日受理

マナマコ *Apostichopus japonicus* は北海道から九州さらに中国の浅海の転石帯に生息しており, 重要な食用種である。マナマコの資源添加のため, 1980年代から本邦各地で種苗生産が行われ, 現在では種苗生産技術は確立されつつあるが, 今最も問題となっているものの一つに, 稚ナマコ飼育時に発生するコペポーダ対策がある。

稚ナマコは, 多くの種苗生産機関で, 付着珪藻を繁茂させた塩化ビニール製の波板(以下, 付着珪藻板という)で初期飼育を行っており, 付着珪藻は, 稚ナマコの初期餌料としてきわめて重要なものとなっている。しかし, 佐賀県玄海水産振興センター(以下当センターとする)を含め多くの種苗生産機関では, コペポーダの大量発生により, 付着珪藻が全て摂餌され, 種苗の安定生産ができない状況にある。付着珪藻板に増殖したコペポー

ダの対策としては, 小林・石田<sup>1)</sup>がDEP製剤を使用する方法を開発し, また, 伊藤ら<sup>2)</sup>により, 処理時間, 濃度等, より詳細な使用方法が検討され, コペポーダ類の駆除法が確立された。その後, 各県でのマナマコ種苗生産において, これを使用したコペポーダの駆除が行われたが<sup>3)</sup>, 薬事法の改正(平成18年度)により, ナマコ種苗生産において薬品の使用が一切禁止されており, 現状に対応した新技術の開発が急務となっている。

コペポーダ類の駆除に関する新技術の開発に当たっては, 色々な対策を試行する必要があるが, そのためにはコペポーダによる付着珪藻, 稚ナマコへの影響についての基礎的知見を得ることが非常に重要である。付着珪藻板上にコペポーダが大量に増殖し, 付着珪藻が食害され, 凋落する問題については, 既に小林・石田<sup>1)</sup>が報

\*<sup>1</sup> 佐賀県玄海水産振興センター

〒847-0401 佐賀県唐津市鎮西町名護屋 6966

Saga Prefectural Genkai Fisheries Research and Development Center, 6966 Nagoya, Chinzei, Karatsu, Saga, 847-0401 Japan

noguchi-kousuke@pref.saga.lg.jp

\*<sup>2</sup> 佐賀県高等水産講習所

告し、またコペポーダによる稚ナマコへの食害については、高見ら<sup>4)</sup>が報告しているが、コペポーダと稚ナマコを混在させると、稚ナマコが死亡に至ることを報告しており、付着珪藻存在下での両者の関係などは検討されていない。そこで、当センターでは、コペポーダによる付着珪藻及び稚ナマコへの影響について、より詳細な試験を行い、稚ナマコの死亡原因の新たな知見を得ることが出来たので報告する。

## 材料と方法

**稚ナマコ** 当センターで種苗生産している変態着底直後の体長0.4 mmから10.0 mmの稚ナマコはピペットで水流を起こして付着珪藻板から剥がしたり、直接手で剥離し、実験に用いた。その後は、稚ナマコが安定して自然に体を伸ばすまで一定時間放置した後、万能投影機Nicon V-12BSを使用して体長を計測し、試験に使用した。

**コペポーダ** 当センターナマコ種苗生産時に発生するコペポーダを採取した。方法としては付着珪藻板1枚(40×32 cm)に出現したコペポーダを海水シャワーで脱離させ、ナイロンプランクトンネット(目合い50 μm)で採取した。採取したコペポーダはアダルト期、コペポダイト期、ノープリウス期、アダルト期懸垂の卵囊および脱落した卵囊をピペット(1 mlおよび2 ml)とパスツールピペットを用いて実体顕微鏡で観察した。アダルト期は、節足動物門、甲殻綱、ハルパクチクス目、ハルパクチクス科、*Tigriopus japonicus*(和名:シオダマリミジンコ)と判定した。コペポダイト期、ノープリウス期は、種まで判定できなかったものの、アダルト期が全てシオダマリミジンコであったことから、本研究で使用したコペポーダはシオダマリミジンコ(写真1)であると考えられた。付着珪藻および稚ナマコへの影響試験では、コペポーダはアダルト期とコペポダイト期を、また捕食試験はこの他にノープリウス期も用いた。

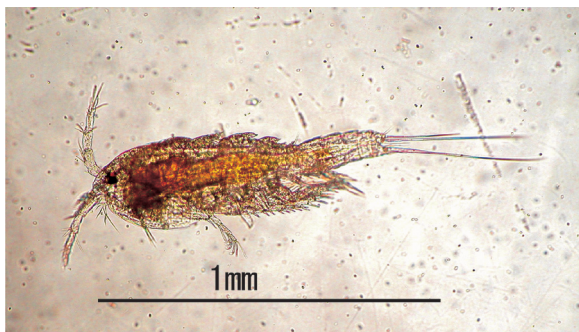


写真1. シオダマリミジンコ(*Tigriopus japonicus*)アダルト期

**付着珪藻** 当センター水槽の付着珪藻板に繁茂している数種の付着珪藻を採取して、直径8 cmの平板シャーレ上(底面積約50 cm<sup>2</sup>)(以下平板シャーレという)で培養した後、その中から*Navicula*属の付着珪藻を分離培養し、その後の実験に使用した。栄養塩として藻類培養液KW21((株)第一製網)とメタケイ酸ナトリウム(0.045 g/l)を使用した。

**コペポーダによる付着珪藻の摂餌試験** コペポーダが付着珪藻に及ぼす影響を調べるため、コペポーダの収容密度を変えて、付着珪藻の摂餌状況を調べた。前述の分離珪藻を平板シャーレ底面に付着させた後、平板シャーレにKW21とメタケイ酸ナトリウムを混合した滅菌海水を満たし、蛍光灯照度1,000 lxの条件下で種苗生産と同じ程度の密度約80×10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup>になるまで培養し、実験に供した。平板シャーレ内のコペポーダ収容密度区は、対照区(0個体/cm<sup>2</sup>)、0.2個体/cm<sup>2</sup>(10個体/シャーレ)、2個体/cm<sup>2</sup>(100個体/シャーレ)の3区とし、それぞれ3試験区ずつ設けた。コペポーダによる付着珪藻の摂餌状況は、実験7日目まで毎日0.5 mm四方(0.25 mm<sup>2</sup>)の付着珪藻数をランダムに10箇所、光学顕微鏡下(倍率×100)で計数した。光源は蛍光灯を用いて、照度1,000 lxになる位置に設置し、温度20℃の条件下で行った。なお、当センターでのナマコ種苗生産時の条件に準じて、稚ナマコが体長2.0~3.0 mmに達するまで1,000 lx以下の照度にしており、本試験も同様の照度に設定した。

**コペポーダによる稚ナマコへの影響試験** コペポーダによる稚ナマコへの食害などの悪影響を把握するため、コペポーダの密度と稚ナマコのサイズ別による試験を行った。稚ナマコサイズは体長0.4 mm以上1.0 mm未満、1.0 mm以上3.0 mm未満、3.0 mm以上5.0 mm未満、5.0 mm以上10.0 mm未満の4段階とし各々5個体ずつ、付着珪藻が存在しない平板シャーレに入れた。コペポーダは、各ナマコサイズ区とも0個体/cm<sup>2</sup>(対照区)、0.2個体/cm<sup>2</sup>、2個体/cm<sup>2</sup>、7個体/cm<sup>2</sup>、10個体/cm<sup>2</sup>の密度になるように調整し、各区ともそれぞれ3試験区ずつ設けた。死亡状況は、毎日3日目まで観察し、骨片が散乱し、運動性がない稚ナマコを死亡個体とした。なお、試験は照度1,000 lx、温度20℃の条件下で試験を行った。

**コペポーダによる稚ナマコ捕食試験** コペポーダが稚ナマコを実際に捕食しているか、または接触による傷害なのかを検証するため、FITC\*で染色した稚ナマコ(体長1.0~3.0 mm)とコペポーダ(10個体/cm<sup>2</sup>の密度)とともに同一容器に収容して、接触したコペポーダのどの

\* FITC: fluorescein isothiocyanate 黄緑色蛍光(λ<sub>em</sub> = 495 nm, λ<sub>ex</sub> = 520 nm)を発する蛍光色素  
核酸や抗体、タンパク質などの蛍光ラベルに汎用される

部分が発光するのかを観察した。予備試験として、稚ナマコがどのように発光するか検討した。FITC液は、 $0.2 \mu\text{m}$ のフィルターでろ過滅菌した海水にFITCを $1 \mu\text{l}/\text{ml}$ 濃度になるように調整し、作製した。そこへ、稚ナマコを10分浸漬し、滅菌海水で洗浄後、2日間飼育し、生存に問題ないことを確認した。その後、蛍光顕微鏡で稚ナマコを観察したところ、骨片や内臓は発光しないが、体表面（タンパク組織）がUV下で黄緑色に発光することが判明した。そこで、体組織をコペポータが捕食している場合、消化管やその排泄物が発光し、捕食していない場合は、接触している部分のみ発光すると推測した。稚ナマコが死亡したことを検鏡観察した後、積極的に死亡した稚ナマコに接触していたコペポータをパスツールピペットで個別に採取し、滅菌海水で3回洗浄した後、蛍光顕微鏡下において、コペポータの蛍光部位を観察した。観察は、アダルト期、コペポダイト期、ノープリウス期、各々20個体ずつ行った。なお、摂食試験は照度1,000 lx、温度 $20^{\circ}\text{C}$ の条件下で試験を行った。

**コペポータの稚ナマコ、付着珪藻に対する摂餌選択性試験** コペポータの稚ナマコと付着珪藻に対する摂餌選択性を検討するため、平板シャーレ底面に *Navicula* sp. を繁茂させた実験区（付着珪藻密度  $100 \times 10^4 \text{ cells}/\text{cm}^2$ ）と、付着珪藻が存在しない対照区とを設けて、稚ナマコ（体長  $1.0 \sim 3.0 \text{ mm}$ ）を5個体ずつ収容するとともに、コペポータを  $10 \text{ 個体}/\text{cm}^2$ の密度になるようにシャーレ内に収容し観察を行った。対照区および実験区は各3試験区ずつ設け、各区とも、3日に一度コペポータの糞を除去した。なお、照度1,000 lx、温度 $20^{\circ}\text{C}$ の条件下で試験を行い、稚ナマコが生存している期間、観察を続けた。

## 結 果

**コペポータによる付着珪藻の摂餌試験** 実験開始時に約  $80 \times 10^4 \text{ cells}/\text{cm}^2$ であった付着珪藻は対照区（コペポータ  $0 \text{ 個体}/\text{cm}^2$ ）では、7日目に  $100 \times 10^4 \text{ cells}/\text{cm}^2$ ま

で増殖した。コペポータの密度  $0.2 \text{ 個体}/\text{cm}^2$  区では2日目以降、付着珪藻細胞数は若干の減少がみられるものの、2～7日目まで  $60 \times 10^4 \text{ cells}/\text{cm}^2$  台で維持されていた。一方、コペポータの密度  $2 \text{ 個体}/\text{cm}^2$  区では、およそ7日目には全て摂餌された（図1）。

**コペポータによる稚ナマコへの影響試験** コペポータによる稚ナマコへの影響試験の結果を表1に示した。この結果、 $3.0 \text{ mm}$ 以上の各段階では、コペポータの収容数

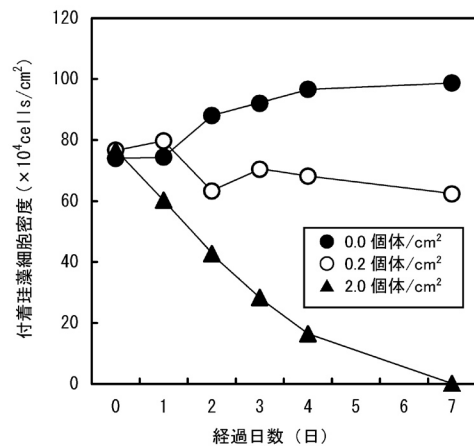


図1. コペポータの摂餌による付着珪藻細胞密度の変化

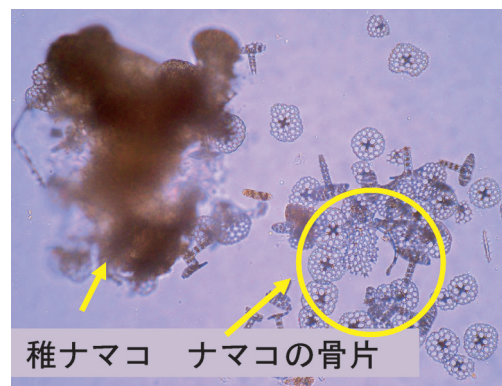


写真2. コペポータによって死亡した稚ナマコ

表1. コペポータ密度別実験区における稚ナマコ生残数の変化

コペポータ密度 (個体/cm <sup>2</sup> )	稚ナマコ体長 (mm)			
	0.4~1.0	1.0~3.0	3.0~5.0	5.0~10.0
0(対照区)	15	15	15	15
0.2	7	15	15	15
2	0	10	15	15
7	0	0	15	15
10	0	0	15	15

各々5匹ずつ3回試験し、全15個体のうちの試験開始後3日目の生残個体数を示した減少がみられた実験区をゴシックで示した

に関係なく死亡個体は見られなかったが、1.0 mm 以上 3.0 mm 未満サイズの稚ナマコでは、コペポーダが2個体/cm<sup>2</sup>以上の区で死亡がみられ、特に7個体/cm<sup>2</sup>以上の区では全て死亡した(写真2)。また、0.4 mm 以上 1.0 mm 未満サイズの稚ナマコでは、コペポーダが0.2個体/cm<sup>2</sup>以上の区で死亡がみられ、特に2個体/cm<sup>2</sup>以上の区では全て死亡した。稚ナマコが死亡するまでに要する時間は、コペポーダの密度と関係があり、密度が高くなればなるほど、短期間に死亡し、7個体/cm<sup>2</sup>以上の区では、実験開始後2日目に全て死亡した。全段階の稚ナマコも、コペポーダがいない対照区では死亡がみられなかったため、死因はコペポーダによるものと思われる。

**コペポーダによる稚ナマコ捕食試験** 稚ナマコに接触した各成長段階のコペポーダ20個体を蛍光顕微鏡で観察したところ、蛍光色は、アダルト期、コペポダイト期の脚部が最も発光しており(写真3)、ノープリウス期では体表全体が発光していた。アダルト期とコペポダイト期の消化管や排泄された糞からの発光は認められず、コペポーダは稚ナマコと接触し、体表部分を傷つけているものの、捕食していない可能性が示された。

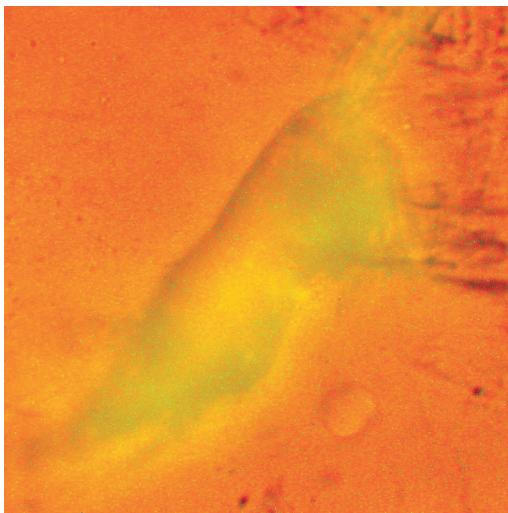


写真3. FITC染色した稚ナマコへ接触したコペポーダの染色部

**コペポーダによる稚ナマコ、附着珪藻への選択試験** 附着珪藻が存在しない対照区では2日目に稚ナマコが全滅したのに対して、附着珪藻を繁茂させた実験区では附着珪藻が繁茂していた6日目までは稚ナマコの死亡はみられず、7日目以降、附着珪藻の減少とともに稚ナマコの死亡が多くなり、9日目には全滅した(図2)。このように附着珪藻の有無によって、コペポーダによる稚ナマコの死亡状況に明瞭な差があることが認められた。

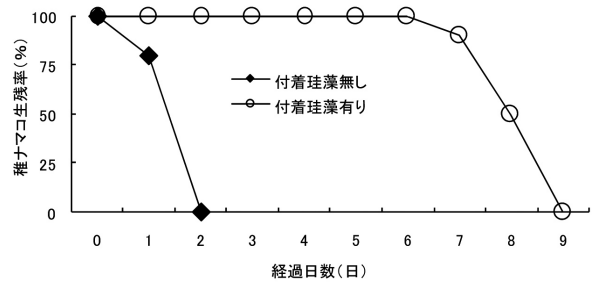


図2. 附着珪藻存在下でのシオダマリミジンコによる稚ナマコの生残

## 考 察

コペポーダによる附着珪藻の摂餌状況を見ると、コペポーダが0.2個体/cm<sup>2</sup>では、附着珪藻の細胞数は、食べ尽くされることはなく、若干減少する程度で殆ど影響はないが、2個体/cm<sup>2</sup>の密度では実験開始7日目で全て摂餌された。

また、コペポーダによる稚ナマコへの影響では、稚ナマコの体長が3.0 mm 以上の場合には、コペポーダが10個体/cm<sup>2</sup>の高密度であっても死亡は認められなかったが、稚ナマコ体長0.4~1.0 mm と1.0~3.0 mm での、コペポーダによる害作用を比較した結果では、前者では0.2個体/cm<sup>2</sup>以上、後者では2個体/cm<sup>2</sup>以上の区で、死亡が引き起こされ、稚ナマコのサイズが小さいほど、低密度のコペポーダでも影響が大きくなる傾向を示した。

FITC染色法を用いた捕食試験およびコペポーダによる稚ナマコ、附着珪藻の選択性試験の結果から、コペポーダは稚ナマコと接触しているものの、捕食していないことが示唆され、稚ナマコの死亡原因は、食害ではなく、接触による体表損傷によるダメージではないかと考えられた。これは、コペポーダ類が稚ナマコを食害するとの報告<sup>1,4)</sup>とは、異なる報告であるが、これらの報告は、稚ナマコが死亡する状況から食害と判断しているためである。稚ナマコの死亡が接触によるダメージであれば、飼育水槽中のコペポーダを低減させ、稚ナマコとの接触機会をできるだけ少なくすることにより、稚ナマコの生残率向上が図られるものと思われる。本研究結果から、種苗生産現場においてもコペポーダの密度を0.2個体/cm<sup>2</sup>以下に抑えることで、附着珪藻を維持培養することができ、健全な稚ナマコを育成することが可能であると考えられた。また、稚ナマコを体長3.0 mm 以上にできるだけ早く成長させることも、直接的被害を受けないためには、重要であると考えられた。このコペポーダ密度が一つの基準となり、この基準を確保・維持するための技術を開発する必要がある。

生産現場でコペポーダの密度を低くする方法については、各道県で技術開発が行われており、酒井・近田<sup>5)</sup>

は小型ポンプを稚ナマコ飼育水槽中に設置し、海水をくみ上げながら、コペポーダを50  $\mu$ m ネットで物理的除去する方法を考案し、種苗生産現場において、コペポーダを低密度に維持することに成功しており、稚ナマコの生残率向上等に成果をあげている。また、当センターでも、本研究の基礎的試験結果をもとに量産規模でのコペポーダ低減策を試行、検討しているが、基礎的研究を更に行うとともに、生産現場での実用化試験、実証化を図り、ナマコ種苗生産をより安定的に大量生産する技術に結びつける必要がある。

## 謝 辞

本報告は、農林水産技術会議「新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業，乾燥ナマコ輸出のための計画的生産技術の開発」の一環として研究した。ここに深謝致します。また、本論文をまとめるにあたり、懇切丁寧に査読し、有益なご助言を頂いた査読者の方々にお礼を申し上げます。

## 文 献

- 1) 小林 信・石田雅俊 (1984) 稚ナマコの減耗要因に関する二・三の実験. 栽培技研, 13, 41-48.
- 2) 伊藤史郎・川原逸朗・平山和次 (1994) マナマコ種苗の大量生産技術に関する研究. 栽培技研, 22, 83-91.
- 3) 池田善平・片山勝介 (1986) マナマコの種苗生産と稚ナマコ飼育方法について. 岡山水試研報, 1, 71-75.
- 4) 高見東洋・河本良彦・松浦秀喜 (1987) マナマコの栽培漁業化技術に関する研究. 山口県内海水産試験場報告, 17, 1-22.
- 5) 酒井勇一・近田靖子 (2008) マナマコ人工種苗の食害防除技術について. 北水試だより, 76, 8-14.