ズワイガニ幼生の生残と脱皮・成長に及ぼす n-3 高度不飽和脂肪酸の影響

小金隆之,^{1a} 團 重樹,² 浜崎 活幸^{3*}

(2009 年 6 月 19 日受付, 2009 年 8 月 6 日受理)

¹ 舩水産総合研究センター小浜栽培漁業センター,

² 舩水産総合研究センター玉野栽培漁業センター, ³ 東京海洋大学海洋生物資源学科

Effect of dietary n-3 highly unsaturated fatty acids on survival, molting and growth of larval snow crab *Chionoecetes opilio* reared in the laboratory

TAKAYUKI KOGANE,^{1a} SHIGEKI DAN² AND KATSUYUKI HAMASAKI^{3*}

¹Obama Station, National Center for Stock Enhancement (NCSE), Fisheries Research Agency (FRA), Obama, Fukui 917-0117, ²Tamano Station, NCSE, FRA, Tamano, Okayama 706-0002, ³Department of Marine Biosciences, Tokyo University of Marine Science and Technology, Minato, Tokyo 108-8477, Japan

The effects of varying levels of dietary n-3 highly unsaturated fatty acids (HUFA) and the ratios of docosahexaenoic acid/eicosapentaenoic acid (DHA/EPA) on survival, molting and growth of larval snow crab *Chionoecetes opilio* were examined in two separate experiments, in which larvae were reared in small containers until reaching the first stage crab. In experiment I, zoea larvae were fed rotifers enriched with n-3 HUFA at three levels, and rotifers without n-3 HUFA enrichment. In experiment II, zoea larvae were fed rotifers enriched with n-3 HUFA at a constant level, which was considered as optimum from experiment I, but having different DHA/EPA ratios, and fed non-enriched rotifers. In both experiments, megalopa larvae were fed non-enriched *Artemia* sp. Larval survival and growth were improved by feeding rotifers enriched with n-3 HUFA. The occurrence of abnormal moltings during the metamorphosis from megalopa to the first stage crab decreased with increasing n-3 HUFA content in rotifers. The better survival rates from the first zoea stage to the first crab stage were observed when zoeae were fed rotifers containing ~2.3 g/100 g n-3 HUFA (dry matter basis) with the DHA/EPA ratio of ~1.5.

キーワード：エイコサペンタエン酸, 栄養強化, 種苗生産, ズワイガニ, 脱皮異常, ドコサヘキサエン酸, ワムシ

ズワイガニ *Chionoecetes opilio* はクモガニ科に属する大型のカニ類で, 日本海における重要な漁業資源である。¹⁻³⁾ 本種の漁獲量は 1960 年代後半をピークに著しく減少したことから, 種苗放流による資源増殖を目標に種苗生産に関する技術開発研究が 1970 年代後半から本格化した。⁴⁾ しかし, 大型水槽を用いた種苗生産において, まとまった数量の稚ガニを生産した事例はほとんどみられず, 種苗量産が困難な種類に位置づけられてきた。⁵⁾ 本種の種苗量産が困難な原因として, ふ化直後の幼生は水面近くを遊泳しているが, 飼育日数の経過にと

もなって沈降し, 水槽底に堆積した沈殿物に絡まることで大量に死亡することが挙げられている。⁵⁾

著者らは, 水槽底に沈降した幼生が死亡する直接の原因として細菌感染を想定し, 飼育水への抗菌剤の添加効果を試験するとともに, 幼生の沈降防止のために飼育水の機械的攪拌を試みたところ, ゾエア期の生残率が大幅に向上し, 20 kL 水槽 1 基で 2 万尾以上のメガロパを生産することに成功した。^{6,7)} しかし, この時の飼育においても, メガロパ変態時および変態後に大量死亡が発生したことから, 本種の種苗量産技術を進展させるには, そ

* Tel : 81-3-5463-0538. Fax : 81-3-5463-0538. Email : hamak@kaiyodai.ac.jp

^a 現所属：舩水産総合研究センター屋島栽培漁業センター (Yashima Station, NCSE, FRA, Takamatsu, Kagawa 761-0111, Japan)

の防除が必須と考えられた。⁷⁾ 著者らの分析結果⁷⁾によれば、20 kL 水槽で飼育したズワイガニ幼生の n-3 高度不飽和脂肪酸 (n-3HUFA)、特にドコサヘキサエン酸 (DHA) 含量は成長にともない大幅に減少しており、この要因として給餌した生物餌料中に DHA はほとんど含まれていなかったことが関係していると考えられた。ガザミ *Portunus trituberculatus* やノコギリガザミ類 *Scylla* spp. の幼生は、餌料中にエイコサペンタエン酸 (EPA) や DHA などの n-3HUFA を必須脂肪酸として要求し、その欠乏は生残と成長に悪影響を及ぼすことが知られており、またガザミ幼生では EPA は生残に、DHA は成長に大きな影響を及ぼすことが指摘されている。⁸⁻¹⁶⁾ 以上のことから、ズワイガニの種苗生産におけるメガロパ変態時の大量死亡は、生物餌料中の n-3HUFA、特に DHA 不足に起因する可能性が考えられる。そこで本研究では、ズワイガニの種苗生産技術を確認する基礎として、餌料として用いるワムシ中に含まれる n-3HUFA 量および EPA と DHA の比率が幼生の生残と脱皮・成長に及ぼす影響を小型容器による飼育試験によって検討した。

材料および方法

抱卵雌の養成とふ化幼生 2003 年と 2004 年のそれぞれ 11~12 月に石川県能登半島沖で漁獲された抱卵雌を飼水産総合研究センター小浜栽培漁業センターに搬入し、既報¹⁷⁾の方法に従い養成した。養成には水温を 2~3°C に調整した循環ろ過方式の 900 L 水槽 6 基を用い、1 水槽あたり 2003 年は 55 尾、2004 年は 68~77 尾を収容した。水槽内でふ化した幼生は、水槽に付設した幼生回収槽のプランクトンネット (目合い 150 μ m、容量約 30 L) 中にオーバーフローで導き回収した。幼生は同一日に複数の雌からふ化したが、ふ化が起こった抱卵雌数については特定しなかった。

幼生の飼育試験は、2004 年と 2005 年にそれぞれ 1 回行った。2004 年には抱卵雌養成水槽 4 基において 2 月 13 日にふ化した幼生を採取・混合し、2005 年には同水槽 1 基において 3 月 11 日にふ化した幼生を採取し、飼育試験に供した。その際、走光性⁶⁾によって水面に浮上し、活発に遊泳する幼生を採取するようにした。

生物餌料と試験区の設定 ゾエアには後述するように脂肪酸組成の異なる L 型ワムシ *Brachionus plicatilis* sp. complex 小浜株 (以下、ワムシ) を、メガロパには n-3HUFA を栄養強化していないアルテミア *Artemia* sp. を給餌した。ワムシの培養は市販の濃縮淡水クロレラ (生クロレラ V12, クロレラ工業) を餌料に用い、水温 16°C で行った。ワムシの栄養強化は、10 L 容器に 500 個体/mL の密度で収容し、水温 16~17°C で 18 時間行った。栄養強化開始時には、後述のように試験区ごとに調整したオイル (総量 1 mL) を淡水 100 mL と卵黄約 0.5 mL と共に家庭用ミキサーに入れ、5 分間攪拌・乳乳化して 10 L 容器に添加した。アルテミアの耐久卵は北米産 (ユタ州ソルトレーク産; バイオマリン, 太平洋貿易) を使用し、28°C で培養してふ化した幼生を 48 時間後に回収した。

試験 I では、ワムシ中の n-3HUFA 含量が幼生の生残と脱皮・成長に及ぼす影響を把握するために、n-3HUFA を栄養強化していないワムシを給餌する 1 区と 3 段階のレベル (EPA と DHA の比率は一定) で栄養強化したワムシを給餌する 2~4 区を設定した。すなわち、ワムシ培養水に EPA28G オイル (EPA を 28.7%, DHA を 12.7% 含有, 日本化学飼料) を 2, 3, 4 区の順に 25 μ L/L, 50 μ L/L, 75 μ L/L の基準で添加し、2~4 区に給餌するワムシの n-3HUFA 含量を調整した。なお、各区の総脂質含量を同レベルに調整するため、各区とも OA オイル (オレイン酸エチル, 和光純薬工業) によって総オイル添加量を 100 μ L/L に調整した。

Table 1 Lipid enrichment protocol for rotifers for culturing zoeae of snow crab

Expt.	Rearing group	Concentration of enrichment material in a rotifer culture tank (μ L/L)			Calculated amount of EPA and DHA (μ L/L)			Calculated DHA/EPA ratio in enrichment materials
		EPA28G ^{*1}	DHA70G ^{*2}	Ethyl Oleate	EPA	DHA	EPA + DHA	
I	1	0	0	100	0	0	0	—
	2	25	0	75	7.2	3.2	10.4	0.4
	3	50	0	50	14.4	6.4	20.7	0.4
	4	75	0	25	21.5	9.5	31.1	0.4
II	1	0	0	100	0.0	0.0	0.0	—
	2	50	0	50	14.4	6.4	20.7	0.4
	3	25	14	61	7.8	13.1	20.9	1.7
	4	0	28	72	1.3	19.9	21.1	15.4

^{*1} EPA28G oil contains 28.7% eicosapentaenoic acid and 12.7% docosahexaenoic acid.

^{*2} DHA70G oil contains 4.6% eicosapentaenoic acid and 70.9% docosahexaenoic acid.

(Table 1)。

試験Ⅱではワムシ中の EPA と DHA の比率の違いが幼生の生残と脱皮・成長に及ぼす影響について検討することとし、無強化のワムシを給餌する 1 区、および試験Ⅰにおける幼生の生残率が最良であった 3 区と同レベルの n-3HUFA 含量で、EPA と DHA の比率を 3 段階に調整したオイルで栄養強化したワムシを給餌する 2～4 区を設定した。すなわち、ワムシ培養水に EPA28G オイルと DHA70G オイル (DHA を 70.9%, EPA を 4.6% 含有, 日本化学飼料) を 2, 3, 4 区の順にそれぞれ 50 $\mu\text{L/L}$ + 0 $\mu\text{L/L}$, 25 $\mu\text{L/L}$ + 14 $\mu\text{L/L}$ および 0 $\mu\text{L/L}$ + 28 $\mu\text{L/L}$ の基準で添加し、EPA と DHA の比率が異なるワムシを調整した。また、試験Ⅱでも OA オイルによって各区の総オイル添加量を 100 $\mu\text{L/L}$ に調整した。

幼生の飼育, 生残および発育日数 飼育容器にはポリエチレン製白色 1 L ビーカーを使用し、試験区ごとに試験Ⅰでは 2 個, 試験Ⅱでは 3 個を用いた。試験に用いた各ビーカーにふ化ゾエアを 30 尾ずつ収容して飼育を開始し、すべての生残個体が第 1 齢稚ガニへ脱皮した時点で試験を終了した。なお、メガロパ変態時の共食いを防ぐために、変態後のメガロパを収容するビーカーを別に用意し、変態当日の個体, 1 日後の個体および 2 日後以降の個体に分けて飼育した。飼育水温は、ウオーターバスによりズワイガニゾエア幼生の適正飼育水温と報告されている 14°C¹⁸⁾ に調整した。試験期間中の毎日午前 1 度測定した水温の平均値 (範囲) は、試験Ⅰでは 13.8°C (12.9～15.1°C), 試験Ⅱでは 13.6°C (13.1～14.4°C) であった。各ビーカーには、酸素の供給と餌料生物の沈下防止のため、パスツールピペットを通気管に用いて微量に通気した。ワムシの給餌密度は、試験Ⅰでは 40 個体/mL, 試験Ⅱでは 20 個体/mL とし、アルテミアの給餌密度は両試験とも 4 個体/mL とした。なお、ワムシ給餌密度 20 個体/mL と 40 個体/mL で飼育したズワイガニゾエア幼生の生残と成長に差がないことを別途確認している (小金ら, 未発表)。

飼育期間中には、1 日 1 回午前中に新しい海水と餌を入れたビーカーに広口ピペットを用いて幼生を移送した。またこの時、幼生の体表で付着細菌が繁殖し、幼生に悪影響を及ぼすことを防止するために、硫酸ジヒドロストレプトマイシンを飼育水に 20 mg/L になるように添加した。幼生の移送時には、生残個体数と齢期を記録した。飼育した各ビーカーでの生残率は、飼育開始時の個体数 (30 尾) に対する各齢期へ正常に脱皮した個体数の割合で算定し、その値を用いて試験区としての生残率を求めた。各齢期までの発育日数は、飼育開始日から各幼生が各齢期へ脱皮した日までの所要日数で表し、ビーカーごとに平均値を算出するとともに、その値を用いて試験区としての発育日数を求めた。また、稚ガニへの脱

皮時に脱皮殻を完全に脱ぎ切れていない異常個体が認められたことから、ビーカーごとに脱皮異常率 (異常個体数 ÷ 総脱皮個体数 × 100) を算出した。なお、試験Ⅱでは、生残と発育日数を求めたビーカーとは別に、各区ともビーカー 1 個を別に用意して幼生を飼育し、メガロパへ変態当日の個体 (10 尾) を採取して後述のように甲幅を測定した。

メガロパと稚ガニの甲幅の測定 両試験とも、各区から得られた第 1 齢稚ガニ (試験Ⅰ, $n=8\sim34$; 試験Ⅱ, $n=3\sim50$) を、脱皮を確認した当日に飼育ビーカーから採取し、時計皿に載せスライドガラスを慎重に被せてその動きを止め、万能投影機を用いて甲幅を測定した。また試験Ⅱでは、各区から得られたメガロパ ($n=10$) を 5% 中性ホルマリンで 1 日固定し、70% エタノールで保存後に、万能投影機で甲幅を測定した。

総脂質含量と脂肪酸組成の分析 飼育試験で用いたワムシ、アルテミアおよびふ化ゾエアを総脂質含量と脂肪酸組成の分析に供した。生物餌料は給餌期間を通じて 2～4 回/週の頻度で採取し、ゾエアはふ化当日の個体を採取した。分析用の試料は淡水で洗浄後、濾紙で水分を取り除き、-80°C で冷凍保存した。ワムシの試料は、両試験とも給餌期間を前期 (飼育開始 0～15 日), 中期 (同 16～30 日), 後期 (同 31～45 日) に区分し、各期間で採取した 5 試料 (各 1 g) を混合し、分析に供した。アルテミアの試料は、全期間分をまとめて分析に供した。また、ふ化ゾエアの試料は、試験Ⅰでは 2 回に分けて、試験Ⅱでは 1 回にまとめて分析した。

総脂質含量は、クロロホルム-メタノール法¹⁹⁾により抽出した脂質の重量百分率 (%、乾燥重量基準) で表した。抽出した脂質に水酸化カリウムとエタノールを加えて 40 分 80°C で加熱ケン化した後、不ケン化物を除去した。抽出された脂肪酸は三フッ化ホウ素メタノール法によりメチルエステル化した。²⁰⁾ 脂肪酸メチルエステルは n-ヘキサンで希釈し、シリカキャピラリーカラム (SUPELWAX 10, SUPELCO) を装備したガスクロマトグラフ (GC-17A, 島津製作所) を用いて分析した。キャリアガスとしてヘリウムガスを使用し、圧力は 80 kPa に調整した。注入・検出器の温度はそれぞれ 250°C と 270°C に調整し、カラムの温度は 175°C から毎分 1°C の割合で 225°C まで昇温させた。各種の脂肪酸メチルエステルは、脂肪酸メチルエステル標準試薬 (PUFA-3 Menhaden Oil, SUPELCO) との保持時間の比較により同定した。分析結果はクロマトパック (C-R8A, 島津製作所) を用いて解析し、²⁰⁾ 総脂質含量に各脂肪酸の組成比を乗じて脂肪酸含量 (g/100 g, 乾燥重量基準) とした。

統計処理 生残率, 発育日数, メガロパと第 1 齢稚ガニの甲幅, 脱皮異常率, ワムシの総脂質と脂肪酸組成

Table 2 Mean values of total lipid content and major fatty acid composition in rotifers, *Artemia* and first stage zoeae (Z1) of snow crab

Analyzed items	Expt. I						Expt. II					
	Rotifer (<i>n</i> =3) of each rearing group				<i>Artemia</i> (<i>n</i> =1)	Z1 (<i>n</i> =2)	Rotifer (<i>n</i> =3) of each rearing group				<i>Artemia</i> (<i>n</i> =1)	Z1 (<i>n</i> =1)
	1	2	3	4			1	2	3	4		
Total lipid (% dw)	18.73 ^{ab}	18.04 ^a	19.38 ^{ab}	20.85 ^b	12.71	12.58	21.24 ^a	21.45 ^a	20.92 ^a	19.95 ^a	23.53	9.01
Fatty acid (g/100 g dw)												
16 : 0	2.21 ^{ab}	2.12 ^a	2.25 ^{ab}	2.37 ^b	1.32	1.92	2.89 ^a	2.77 ^a	2.63 ^a	2.56 ^a	2.54	1.48
18 : 1	5.24 ^a	4.22 ^{ab}	4.08 ^{ab}	3.40 ^b	3.44	2.19	8.26 ^a	5.32 ^b	4.96 ^b	5.34 ^b	4.47	1.66
18 : 2n-6	3.26 ^a	3.24 ^a	3.44 ^a	3.44 ^a	0.53	0.11	3.49 ^a	3.32 ^a	3.43 ^a	3.37 ^a	1.27	0.07
18 : 3n-3	1.39 ^a	1.33 ^a	1.37 ^a	1.41 ^a	2.78	0.04	1.01 ^a	1.05 ^a	1.15 ^a	1.05 ^a	7.58	0.01
20 : 5n-3 (EPA)	0.12 ^a	0.52 ^b	1.11 ^c	1.78 ^d	0.54	2.29	0.10 ^a	1.49 ^b	0.91 ^c	0.38 ^d	0.43	1.54
22 : 6n-3 (DHA)	0.10 ^a	0.25 ^a	0.53 ^b	0.79 ^c	n.d.	1.48	0.03 ^a	0.67 ^b	1.38 ^c	1.75 ^d	n.d.	0.98
Σ saturated	4.24 ^a	4.06 ^a	4.00 ^a	4.33 ^a	2.23	2.82	4.89 ^a	4.91 ^a	4.77 ^a	4.41 ^a	4.06	2.19
Σ monoene	6.32 ^a	5.58 ^a	5.61 ^a	5.19 ^a	4.39	3.30	9.80 ^a	7.17 ^b	6.58 ^b	6.76 ^b	5.72	2.52
Σ n-6	3.81 ^a	3.81 ^a	4.09 ^a	4.25 ^a	1.03	1.14	4.08 ^a	4.16 ^a	4.35 ^a	4.21 ^a	1.86	0.80
Σ n-3	2.44 ^a	2.96 ^a	4.04 ^b	5.04 ^c	3.58	4.08	1.76 ^a	4.41 ^b	4.32 ^b	3.85 ^b	10.45	2.72
Σ n-3HUFA	0.58 ^a	1.25 ^b	2.26 ^c	3.29 ^d	0.59	3.93	0.37 ^a	2.59 ^b	2.55 ^b	2.41 ^b	0.73	2.63
DHA/EPA	0.83 ^a	0.49 ^{ab}	0.48 ^{ab}	0.44 ^b	—	0.65	0.26 ^a	0.45 ^a	1.52 ^a	4.62 ^b	—	0.64

See Table 1 for rearing group and rotifer enrichment conditions. Significant differences were found between enrichment groups of rotifers with different superscripts in the same row in each experiment ($P < 0.05$). *Artemia* was not enriched with n-3 HUFA.

の区間差は、分散分析と Tukey-Kramer 法による多重比較を用いて有意水準 5% で検定した。その際、生残率と脱皮異常率の値は逆正弦変換²¹⁾して使用した。

結 果

生物餌料およびふ化ゾエアの総脂質含量と脂肪酸組成
試験 I のワムシの総脂質含量は 18.04~20.85% の範囲を示し、4 区が 2 区に比べ高かったが ($P < 0.05$)、他の区間に差はなかった ($P > 0.05$) (Table 2)。ワムシの n-3HUFA 含量は、EPA28G オイルの添加量が多くなるにともなって増加し、各区間で有意差がみられた ($P < 0.05$)。EPA と DHA 含量にも同様の傾向が認められ、1 区と 2 区の DHA を除き、それぞれ各区間で有意差がみられた ($P < 0.05$)。EPA28G オイルを添加した 2~4 区の DHA/EPA 比は、0.44~0.49 でほぼ同じ値を示した ($P > 0.05$)。その他の脂肪酸組成をみると、オレイン酸の添加量の減少にともない 18 : 1 含量が低下する傾向を示した以外は大差なかった。

試験 II のワムシの総脂質含量は 19.95~21.45% の範囲を示し、区間差はなかった ($P > 0.05$)。EPA28G オイルと DHA70G オイルを添加した 2~4 区のワムシの n-3HUFA 含量は 2.41~2.59 g/100 g を示し、区間差はなかったが ($P > 0.05$)、無添加の 1 区 (0.37 g/100 g) と比較するといずれの試験区も有意に高かった ($P < 0.05$)。EPA 含量は 1, 4, 3, 2 区の順に、DHA 含量は 1, 2, 3, 4 区の順に次第に高くなり、両者とも各区間で有意差が認められた ($P < 0.05$)。また、DHA/EPA 比は 1, 2, 3, 4 区の順に高くなる傾向を示した。その他の脂肪酸組成をみると、1 区の 18 : 1 含量が

他区に比較して高い値を示した以外は大差なかった。

アルテミアの n-3HUFA 含量は試験 I (0.59 g/100 g) と試験 II (0.73 g/100 g) で大差はなく、DHA はいずれも検出されなかった。一方、総脂質含量は、試験 II (23.53%) が試験 I (12.71%) よりも高い値を示し、脂肪酸組成の中ではリノレン酸 (18 : 3n-3) 含量が試験 I (2.78 g/100 g) よりも試験 II (7.58 g/100 g) で高い特徴が認められた。なお、本研究ではアルテミアの分析回数が 1 回のみであったことから、この分析値の差がアルテミア耐久卵のロットの違いに起因するものか判断できなかった。

ふ化ゾエアの総脂質含量と n-3HUFA 含量は試験 I (12.58% と 3.93 g/100 g) が試験 II (9.01% と 2.63 g/100 g) よりも高い値を示したが、DHA/EPA 比はそれぞれ 0.65 と 0.64 と同様の値を示した。

幼生の生残と脱皮・成長 試験 I のゾエア期における生残率は、1 区で低く推移する傾向を示した (Table 3)。その後は、各区ともメガロパから第 1 齢稚ガニになるまでの間に大きく減耗したが、第 1 齢稚ガニまでの生残率は 1 区が 3 区に比較して有意に低い値を示した ($P < 0.05$)。ここで、第 1 齢稚ガニまでの平均生残率を給餌したワムシ中の n-3HUFA 含量に対してプロットしてみると、その関係は二次曲線で示され (Fig. 1)、その関係式から生残率が最大となる n-3HUFA 含量は 2.3 g/100 g と計算された。試験 II では、いずれの区も第 2 齢ゾエアまでは大きい減耗はみられなかったが、メガロパから第 1 齢稚ガニまでの減耗が大きく、特に 1 区の減耗率が最大で、第 1 齢稚ガニまでの生残率は他区に比べて有意に低い値を示した ($P < 0.05$)。

Table 3 Survival rates (mean $\pm$ standard deviation) from hatching to reach each developmental stage of snow crab

Expt.	Rearing group	Number of replications	Survival rate (%)		
			Second stage zoea	Megalopa	First stage crab
I	1	2	56.7 $\pm$ 14.1 ^a	48.3 $\pm$ 21.2 ^a	13.3 $\pm$ 0.0 ^a
	2	2	81.7 $\pm$ 7.1 ^{ab}	75.0 $\pm$ 16.5 ^a	35.0 $\pm$ 16.5 ^{ab}
	3	2	91.7 $\pm$ 2.4 ^{bc}	90.0 $\pm$ 0.0 ^a	56.7 $\pm$ 4.7 ^b
	4	2	100.0 $\pm$ 0.0 ^c	83.3 $\pm$ 9.4 ^a	41.7 $\pm$ 2.4 ^{ab}
II	1	3	95.6 $\pm$ 3.8 ^a	78.9 $\pm$ 6.9 ^a	3.3 $\pm$ 3.3 ^a
	2	3	93.3 $\pm$ 8.8 ^a	87.8 $\pm$ 6.9 ^a	42.2 $\pm$ 25.0 ^b
	3	3	91.1 $\pm$ 3.8 ^a	77.8 $\pm$ 11.7 ^a	52.2 $\pm$ 12.6 ^b
	4	3	94.4 $\pm$ 6.9 ^a	86.7 $\pm$ 10.0 ^a	55.6 $\pm$ 8.4 ^b

Survival rate (%) = (number of larvae normally molted to each stage) / (number of larvae stocked) $\times$ 100. Significant differences were found between groups with different superscripts in the same column in each experiment ($P < 0.05$).

Table 4 Developmental period in days (mean $\pm$ standard deviation) from hatching to reach each developmental stage of snow crab

Expt.	Rearing group	Number of replications	Developmental period (days)		
			Second stage zoea	Megalopa	First stage crab
I	1	2	18.4 $\pm$ 0.07 ^a	40.6 $\pm$ 0.07 ^a	76.2 $\pm$ 4.74 ^a
	2	2	17.8 $\pm$ 0.07 ^b	38.6 $\pm$ 0.14 ^b	71.0 $\pm$ 0.99 ^a
	3	2	17.5 $\pm$ 0.21 ^{bc}	38.5 $\pm$ 0.21 ^b	70.6 $\pm$ 0.07 ^a
	4	2	17.1 $\pm$ 0.00 ^c	37.9 $\pm$ 0.35 ^b	71.2 $\pm$ 2.83 ^a
II	1	3	18.1 $\pm$ 0.25 ^a	40.1 $\pm$ 0.44 ^a	76.8 $\pm$ 6.01 ^a
	2	3	16.9 $\pm$ 0.15 ^b	39.0 $\pm$ 0.95 ^{ab}	73.0 $\pm$ 2.61 ^a
	3	3	16.9 $\pm$ 0.29 ^b	38.4 $\pm$ 0.31 ^b	72.1 $\pm$ 0.25 ^a
	4	3	17.6 $\pm$ 0.25 ^a	39.0 $\pm$ 0.42 ^{ab}	73.6 $\pm$ 1.16 ^a

Significant differences were found between groups with different superscripts in the same column in each experiment ($P < 0.05$).

Table 5 Carapace width of megalopae and first stage crabs of snow crab

Expt.	Rearing group	Carapace width (mm)			
		<i>n</i>	Megalopa	<i>n</i>	First stage crab
I	1	—	8	2.59 $\pm$ 0.08 ^a	
	2	—	21	2.66 $\pm$ 0.08 ^a	
	3	—	34	2.67 $\pm$ 0.08 ^a	
	4	—	25	2.66 $\pm$ 0.12 ^a	
II	1	10	1.84 $\pm$ 0.10 ^a	3	2.70 $\pm$ 0.19 ^{ab}
	2	10	1.97 $\pm$ 0.09 ^b	38	2.80 $\pm$ 0.11 ^b
	3	10	2.10 $\pm$ 0.12 ^b	47	2.75 $\pm$ 0.09 ^{ab}
	4	10	2.10 $\pm$ 0.12 ^b	50	2.74 $\pm$ 0.09 ^a

Significant differences were found between groups with different superscripts in the same column in each experiment ($P < 0.05$).

次に、ふ化から各齢期までの所要日数をみると (Table 4), 両試験とも1区が他区に比較し長い傾向を示した。試験IIにおける各試験区のメガロパの甲幅は、1区が他区に比較して有意に小さい値を示した ($P < 0.05$) (Table 5)。また、第1齢稚ガニの甲幅は、試験I, II

Fig. 1 Relationship between n-3HUFA content in rotifers and survival rate from the first zoea stage to the first crab stage of snow crab. Symbols and bars indicate mean values and standard deviations, respectively. Dotted line indicates the optimum n-3 HUFA content in rotifers which gives the maximum survival rate by the quadratic equation shown in the graph.

Fig. 2 Relationship between n-3HUFA content in rotifers and percentage of larvae showing abnormal molting during the metamorphosis to the first stage crab of snow crab. Symbols and bars indicate mean values and standard deviations, respectively.

ともに1区で小さい傾向がみられた (Table 5)。第1齢稚ガニの脱皮異常率は、試験Ⅰでは区間で有意差は認められなかったが ($P>0.05$)、ワムシ中の n-3HUFA 含量の増加にともない指数関数的に減少する傾向を示した (Fig. 2)。試験Ⅱの脱皮異常率は試験Ⅰよりも低く、ワムシ中の n-3HUFA 含量の低い1区 (平均 25.0%) が含量の高い2区 (8.5%)、3区 (6.0%) および4区 (3.8%) よりも高い傾向を示したものの、区間差は認められなかった ($P>0.05$)。

考 察

試験Ⅰにおいて、n-3HUFA 強化ワムシをズワイガニのゾエア幼生に給餌した場合には、無強化のまま給餌した場合に比較し、第1齢稚ガニまでの生残率と成長はいずれも改善されるとともに、第1齢稚ガニへの脱皮異常率は n-3HUFA 含量の増加にともない低下する傾向を示した。また試験Ⅰでは、給餌したワムシ中の n-3HUFA 含量と第1齢ゾエアから第1齢稚ガニまでの生残率の関係をみたところ、生残率はワムシ中の n-3HUFA 含量が 2.3 g/100 g で最大となった。試験Ⅱにおいても、n-3HUFA 強化ワムシを給餌することによって、第1齢稚ガニまでの生残率と成長の改善効果が認められた。試験Ⅱにおける栄養強化したワムシを給餌した2~4区の n-3HUFA 含量は 2.41~2.59 g/100 g で近似しており、n-3HUFA の主要な構成要素である DHA と EPA の比率 (DHA/EPA 比) を3段階 (2区, 0.45; 3区, 1.52; 4区, 4.62) に変えて幼生の生残と成長に及ぼす影響を調べたところ、3つの区間で有意差は認められなかったものの、第1齢稚ガニまでの生残率は2区で劣る傾向がみられた。以上のことから、ズワイガニゾエア幼生に対してワムシを給餌し、メガロパから第1

齢稚ガニまでアルテミア (n-3HUFA 含量 0.59~0.73 g/100 g, DHA を含有しない) のみを給餌して飼育した場合、ワムシ中の適正 n-3HUFA 含量は 2.3 g/100 g 程度、またその含量での適正な DHA/EPA 比は 1.5 程度であると判断される。

カニ類幼生の栄養要求に関する情報は少なく、わずかに暖水性のガザミ類で必須脂肪酸要求に関する報告がなされている程度である。その結果によれば、ガザミ⁸⁻¹¹⁾ トゲノコギリガザミ *Scylla paramamosain*^{12,13)} アミメノコギリガザミ *Scylla serrata*¹⁴⁻¹⁶⁾ の幼生は何れも n-3HUFA を要求し、餌料に n-3HUFA を栄養強化することによって生残率と成長が改善されることが報告されている。また、アミメノコギリガザミでは、n-3HUFA を過剰に強化した餌料をゾエア幼生に給餌した場合、メガロパ変態時に脱皮異常が起り、生残率が大幅に低下することが知られている。¹⁴⁻¹⁶⁾ 本研究のズワイガニ幼生では、第1齢稚ガニまでの生残率は、ワムシ中の n-3HUFA 含量が 2.3 g/100 g の場合に比較し、3.3 g/100 g でやや低下する傾向がみられたものの (Fig. 1)、メガロパおよび稚ガニでの脱皮異常率が高まる傾向は認められなかった。本研究と同様の飼育方法および餌料系列 (ゾエア期に栄養強化したワムシ、メガロパ期に栄養強化していないアルテミアを給餌) で明らかにされたガザミのゾエア幼生の飼育に適したワムシ中の n-3HUFA 含量は、0.9~1.7 g/100 g であると報告されており、⁹⁾ また、EPA は幼生の生残率向上に影響するのに対し、DHA は成長速度を速め、甲幅を大きくする作用があるとされている。¹¹⁾ 今回の試験によって得られたズワイガニのゾエア幼生に対するワムシ中の好適 n-3HUFA 含量 (2.3 g/100 g) は、ガザミに比較すると高かった。また、前述のようにその好適な n-3HUFA 含量で DHA/EPA 比が高くても、发育速度や甲幅は変わらなかったことから、EPA と DHA の効果はズワイガニとガザミ幼生で異なるものと推察される。

前報では 20 kL 水槽でズワイガニ幼生を飼育した結果、メガロパ変態時および変態後に大量死亡が発生したことを報告した。⁷⁾ その際、ゾエアの餌料として用いたナンノクロロプシス *Nannochloropsis* sp. で栄養強化したワムシ、市販栄養強化剤で培養したアルテミア、あるいは未強化のアルテミアを分析したところ、n-3HUFA 含量はそれぞれ 1.79~2.26 g/100 g, 1.47~3.31 g/100 g および 0.62~0.73 g/100 g, DHA/EPA 比は 0~0.08, 0.04~0.23 および 0 であり、本研究の試験Ⅰで推定したズワイガニのゾエア幼生に給餌するワムシ中の好適 n-3HUFA 含量 (約 2.3 g/100 g) および試験Ⅱで推定した DHA/EPA 比 (1.5) と比較すると、n-3HUFA は栄養強化したワムシとアルテミアではほぼ同等であったものの、DHA/EPA 比はいずれの餌料も著しく低かつ

た。したがって、大型水槽を用いた種苗生産試験で発生したメガロパ変態時および変態後の大量死亡の原因の一つは、餌料中の DHA 不足にあるものと推察される。今後は、餌料への DHA 強化による生残率の改善効果について、実際に大型水槽を用いた種苗生産試験で確認する必要がある。

本研究では、ゾエア幼生にワムシのみを給餌したが、ズワイガニのゾエア幼生は脱皮・成長にともないワムシよりも大型のアルテミアに対する嗜好性が高くなることから、²²⁾ 実際の種苗生産ではワムシとアルテミアが併用給餌される。⁷⁾ また、種苗生産水槽に給餌した生物餌料の n-3HUFA 含量や脂肪酸組成は、給餌前の栄養強化方法に加え、飼育水中に添加した植物プランクトンの種類や量に大きな影響を受けることが確かめられている。^{14,23)} ズワイガニの種苗量産技術の確立に向けて、アルテミア中の n-3HUFA 適正含量や給餌した生物餌料の栄養価の維持・向上技術の開発などについて検討することも今後の重要な研究課題である。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、餌料培養や飼育試験にご協力いただいた水産総合研究センターの職員と非常勤職員各位並びに EPA28G オイルと DHA70G オイルを提供いただいた日本化学飼料株式会社に厚くお礼申し上げます。また、有益なコメントをいただいた匿名の査読者に深謝する。

文 献

- 1) 今 攸. ズワイガニ *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius) の生活史に関する研究. 新潟大学理学部付属佐渡臨海実験所特別報告 1980; **2**: 1-64.
- 2) 小林啓二. ズワイガニの増殖生態に関する研究. 鳥取県水産試験場研究報告 1989; **31**: 1-95.
- 3) 福井県水産試験場. 「続“越前ガニ”の世界, その生活史と生態」福井県, 敦賀. 1998.
- 4) 日本栽培漁業協会. 「日本栽培漁業協会 40 年史」日本栽培漁業協会, 東京. 2003.
- 5) 今 攸. ズワイガニの幼生飼育に関する現状と問題点. 栽培技研 1981; **10**: 125-136.
- 6) 小金隆之, 浜崎活幸, 團重樹. ズワイガニ種苗生産における飼育水の攪拌と薬浴による生残率の向上. 日水誌 2007; **73**: 226-232.
- 7) Kogane T, Dan S, Hamasaki K. Improvement of larval rearing technique for mass seed production of snow crab *Chionoecetes opilio*. *Fish. Sci.* 2007; **73**: 851-861.
- 8) 浜崎活幸, 竹内俊郎, 関谷幸生. 数種餌料で培養したワムシのガザミ幼生に対する餌料価値. 日水誌 1998; **64**: 841-846.
- 9) 竹内俊郎, 中本吉彦, 浜崎活幸, 関谷幸生, 渡邊 武. ガザミ幼生の n-3 高度不飽和脂肪酸要求. 日水誌 1999; **65**: 797-803.
- 10) 竹内俊郎, 佐藤敦一, 関谷幸生, 清水智仁, 渡邊 武. ガザミ幼生におけるワムシとアルテミアの給餌時期の検討. 日水誌 1999; **65**: 804-809.
- 11) 竹内俊郎, 佐藤敦一, 関谷幸生, 清水智仁, 渡邊 武. ガザミ幼生の脱皮率に及ぼす EPA と DHA の影響. 日水誌 1999; **65**: 998-1004.
- 12) 竹内俊郎, 小林孝幸, 清水智仁, 関谷幸生. ノコギリガザミ幼生におけるアルテミアの必要性と適正給餌時期の検討. 日水誌 2000; **66**: 984-992.
- 13) 小林孝幸, 竹内俊郎, 荒井大介, 関谷幸生. アルテミア摂餌期におけるノコギリガザミ幼生への EPA と DHA の給餌適正量. 日水誌 2000; **66**: 1006-1013.
- 14) Hamasaki K, Suprayudi MA, Takeuchi T. Effects of dietary n-3HUFA on larval morphogenesis and metamorphosis to megalops in the seed production of the mud crab, *Scylla serrata* (Brachura: Portunidae). *Aquacult. Sci.* 2002; **50**: 333-340.
- 15) Suprayudi MA, Takeuchi T, Hamasaki K, Hirokawa J. The effect of n-3HUFA content in rotifers on the development and survival of mud crab, *Scylla serrata*, larvae. *Aquacult. Sci.* 2002; **50**: 205-212.
- 16) Suprayudi MA, Takeuchi T, Hamasaki K. Essential fatty acids for larval mud crab *Scylla serrata*: implications of lack of the ability to bioconvert C18 unsaturated fatty acids to highly unsaturated fatty acids. *Aquaculture* 2004; **231**: 403-416.
- 17) 森田哲男, 野上欣也. 養成環境下におけるズワイガニ雌ガニの産卵とふ化. 栽培技研 2003; **31**: 5-9.
- 18) 小金隆之, 浜崎活幸, 野上欣也. ズワイガニ幼生の生残と発育日数に及ぼす水温の影響. 日水誌 2005; **71**: 161-164.
- 19) Folch J, Lee M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957; **226**: 497-509.
- 20) 「基準油脂分析試験法」(日本油化学会編) 日本油化学会, 東京. 2003.
- 21) 山田作太郎, 北田修一. 「生物統計学入門」成山堂書店, 東京. 2004.
- 22) 原田和宏, 山本 勉. ズワイガニ幼生に適した餌料の大きさと摂餌量の検討. 水産増殖 2000; **48**: 209-213.
- 23) 團 重樹, 小磯雅彦. 種苗生産水槽へ添加した微細藻類のワムシ n-3 高度不飽和脂肪酸含量に及ぼす影響. 水産増殖 2008; **56**: 603-604.