

水温コントロールによるL型ワムシ（上浦株）耐久卵 の生産試験

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2025-04-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小金, 隆之, 萩原, 篤志, 今泉, 圭之輔 メールアドレス: 所属:
URL	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2014457

This work is licensed under a Creative Commons
Attribution 4.0 International License.



水温コントロールによる L 型ワムシ（上浦株） 耐久卵の生産試験

小金隆之*¹・萩原篤志*²・今泉圭之輔*¹

Resting Egg Formation of the Rotifer *Brachionus plicatilis* (Kamiura strain) under Temperature Regulation

Takayuki KOGANE, Atsushi HAGIWARA,
and Keinosuke IMAIZUMI

1996 年 6 月 6 日受理

海産ツボワムシ（以下ワムシと呼称）の耐久卵は、人為下での保存が容易であり、必要な時にふ化させて目的に応じた使用ができることから株の保存に有効な手段と考えられる。

L 型ワムシの耐久卵は低温、低塩分下、及び高密度下（最高密度 10 個体/ml 以下の室内実験）で培養水の交換をしない状態で高い頻度で形成されることが東大株で確かめられおり、株によりその特性や耐久卵の生産能力が異なることもわかっている²⁻⁶。したがって耐久卵の大量生産を目的とする場合には、培養環境を適正に維持すると同時に耐久卵の生産性が高い株を選択することが重要である。これに基づいた実験例として L 型長崎株を用い、50 m³ 水槽 1 面で 35 億粒の耐久卵を生産した Hagiwara らの報告⁷が挙げられる。

この長崎株は、過去に東京大学農学部と長崎大学水産学部で、基礎研究の材料として頻繁に用いられてきた経緯があるものの、実際の種苗生産の餌料として大量培養された実績はほとんどない。したがって、この耐久卵を元種とした培養を種苗生産現場に普及させることに対して、大量培養された実績がほとんどない点で問題を残しており、耐久卵を元種とした培養を種苗生産現場に普及させることに対する懸念も指摘されている（今泉私信）。一方、種苗生産に対して実績のあるワムシ株の耐久卵の

生産例としては、国内では日栽協屋島事業場で培養されている屋島 L 型株を用いた例⁸があるのみで、ほかに、ハワイの Oceanic Institute でサバヒーとボラの種苗生産に用いられたハワイ S 型株の例⁹があるにとどまっている。このうち、屋島株は通常の種苗生産を目的とした培養条件下では全く両性生殖を起こさず、10°C に水温を下げることによって耐久卵が形成されること⁹、長期間低温培養を行った後に昇温する、水温刺激（約 12°C から 29°C へ）により効率良く耐久卵が生産されること⁸が確かめられている。しかし、この手法が他のワムシ株に対しても同様に適用できるのかどうかについては検討例がない。また、この耐久卵形成現象のメカニズム、すなわち急激な温度上昇にともなう刺激が両性生殖の誘導を促進するのか、あるいは Hagiwara ら⁷が指摘しているように、低温処理によって両性生殖を誘導させ、以後の高温下での培養を通じて、耐久卵形成に到るまでの両性生殖ステージの進行を加速させているのか、十分明確にはされていない。低温処理期間をどこまで短縮できるのか（今村ら⁸では 1, 2 ヶ月間）についても検討の余地があると思われる。

そこで、本研究では、日栽協上浦事業場で長年にわたって種苗生産用餌料として培養され、20°C 下での継代培養では耐久卵の形成がほとんど起こらない上浦 L

*¹ 日本栽培漁業協会上浦事業場 〒879-26 大分県南海部郡上浦町津井浦 (Japan Sea-Farming Association, Kamiura Station, Tsuiura, Kamiura, Ohita 879-26 Japan).

*² 長崎大学 〒852 長崎県長崎市文教町 1-14

型株を材料とした。今村らの「水温刺激」手法⁸⁾を適用すると共に、そのメカニズムの解明と適正な低温処理期間を求めることを目的として検討を行った。

材料と方法

材料 試験に使用した上浦株は、1988年に上浦事業場のワムシ培養水槽から採取された耐久卵を、1991年にふ化させた後、20°C、塩分27‰下で継代培養したワムシと、同耐久卵を1994年にふ化させた後同条件下で継代培養していたワムシを1995年11月16日に混合したものである。元株は昭和40年に上浦町地先にそそぐ小川の潮溜りで採集、培養されたと云われている¹⁰⁾。上浦事業場では過去に他所の株を導入した例があることから、本試験に使用した株が原種と異なる可能性も全く否定することはできないが、1987年以降、3～5年おきに実施している上浦株のアイソザイム分析からは遺伝的な違いはみつかっていない（萩原未発表）。

元種の低温処理 前述のワムシを恒温器（NK式温度勾配恒温器、日本医科器機製作所）内の25ℓプラスチック容器（実水量20ℓ）に43個体/mlの密度で収容し（図1）、水温を11.7°C（11.4～12.0）で処理したものを以後の昇温培養に供試した。低温処理培養は36日間（1995年11月23日～12月29日）継続し、昇温培養に対する対照とした。塩分は培養7日目まで27‰で培養したが両性生殖誘導率の増加が全く起こらなかったことから、8日目以降両性生殖の誘導をより確実に起こすことを目的として17‰に下げた^{3,4)}。ワムシ収容時に *Nannochloropsis oculata*（以下ナンノクロロプシス）を1,000万細胞/mlになるよう給餌し、以後濃縮した冷凍ナンノクロロプシスを1日当たり平均650（0～910）万細胞/ml、6.1（0～18）万細胞/個体（すなわち、ワムシ1個体当たり平均

6.1（0～18）万細胞に相当）となるよう1日1回あるいは2回に分けて添加した。低温処理期間は0、10、20、30日の4通りとした。培養期間中エアホースを通じて少量の通気を施した。

昇温培養 前述の低温処理を施したワムシを25（±0.2）°C下に移し、引き続き6日（後述のI、II区）または8日（III、IV区）間の培養を行った。今村ら⁸⁾は昇温時の水温を29°Cに設定したが、本研究ではL型ワムシの増殖の至適水温が25°C付近にあること¹¹⁾に基づいた。培養容器には恒温器内に設置した1ℓ三角フラスコを使用し、培養水量を0.5ℓとした（図1）。低温処理期間が0、10、20、30日間のワムシを使用した昇温培養試験を各々順にI、II、III、IV区とした（表1、図2）。

収容に際しては低温処理期間中のワムシ密度と両性生殖誘導率に応じて、これを適宜希釈し、昇温培養を開始した。低温処理中の両性生殖誘導率が低率の時（すなわち個体群増殖率が大きい）は昇温培養開始時のワムシ密度を低く抑え、逆に両性生殖が活発な場合（ワムシの増殖はあまり起こらない）は高密度で昇温培養を開始した。低温処理が0日と10日のとき両性生殖誘導率は低率で（それぞれ0%、結果を参照）ほとんどの雌が単性生殖卵を携卵していた。昇温培養後に個体群の急速な増殖が予測されたので、昇温培養I区とII区の試験開始時のワムシ密度を、各々43、18個体/mlと低く設定した。一方、低温処理期間が20日と30日の場合、高い頻度で両性生殖が発現し（それぞれ10.8%、36.7%）昇温にとまなう個体群の増殖があまり起こらないと推測されたので、昇温培養III区とIV区では、前述のI区、II区よりも高い密度でワムシ培養を開始した。また低温処理培養を希釈せずにそのまま昇温させた場合と、2倍に希釈したのち昇温させた場合を用意し、両者を比較した（表1）。実験開始時のワムシ密度は、III区では164（III-1区）および74（III-2区）個体/ml、IV区では487（IV-1区）および244（IV-2区）個体/mlとした。

餌料には濃縮した冷凍ナンノクロロプシスを1日1回あるいは2回に分けて翌日に残らない程度給餌した。各区の1日当たりの給餌密度とワムシ1個体当たり給餌量は、I区が1,310（0～2,270）万細胞/ml/日と7.7（0～21）万細胞/個体/日、II区では580（0～2,270）万細胞/ml/日と23.3（0～125）万細胞/個体/日、III-1区で1,860（1,000～3,000）万細胞/ml/日と7.7（5～10）万細胞/個体/日、III-2区で1,290（500～3,000）万細胞/ml/日と8.9（6～13）万細胞/個体/日、IV-1区では3,500（2,000～4,000）万細胞/ml/日と5.5（4～7）万細胞/個体/日、IV-2区で1,940（1,000～3,000）万細胞/ml/日と6.2（4～9）万細胞/個体/日となった。ただし、I区のみワムシ収容時にナンノクロロプシスを1,000万細胞/mlになるよう給餌した。通気は収容密度が高いことを考慮してIII区とIV区のみ行った。塩分は17‰になるよう調整した（1回目昇温試験のみ27‰）。

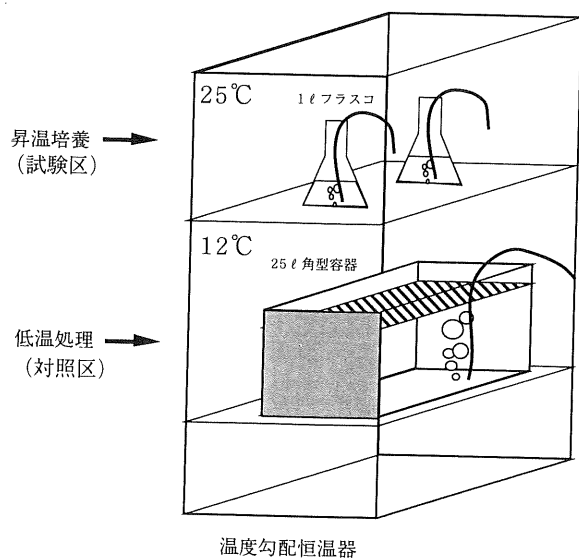


図1. 試験装置

表 1. L 型ワムシ上浦株の水温コントロールによる耐久卵生産試験の方法

試験区	容器 (培養水量 l)	水温	塩分 濃度	通気	収容時の希釈条件	餌料
低温培養 (対照区)	角型プラス チック容器 (20)	20°C で継代培養した ワムシを 12°C に 降温して培養	17‰ (0~7 日目は 27‰)	あり	継代培養株を 1,000 万 セル/ml のナンノク ロロプシス培養水で 2 倍に希釈して収容	収容時ナンノクロロプシスを 1,000 万セル給餌以後、冷凍 ナンノクロロプシスを 1 日当 たり 300~900 万セル 1 日 1 回 または 2 回に分けて給餌
昇温試験 I 区	三角フラスコ (0.5)	20°C で継代培養した ワムシを 25°C に 昇温して培養	27‰	なし	元種培養水を そのまま収容	冷凍ナンノクロロプシスを 1 日当たり 500~4,000 万セル 1 日 1 回または 2 回に分けて給 餌 (I 区のみ収容時にナンノ クロロプシスを 1,000 万セル 給餌)
II 区	三角フラスコ (0.5)	12°C で 10 日間低温 培養したワムシを 25°C に昇温して培養	17‰	なし	元種培養水を 5 倍に 希釈して収容	
III 区-1	三角フラスコ (0.5)	12°C で 20 日間低温 培養したワムシを 25°C に昇温して培養	17‰	あり	元種培養水を そのまま収容	
III 区-2	三角フラスコ (0.5)	同上	17‰	あり	元種培養水を 2 倍に 希釈して収容	
IV 区-1	三角フラスコ (0.5)	12°C で 30 日間低温 培養したワムシを 25°C に昇温して培養	17‰	あり	元種培養水を そのまま収容	
IV 区-2	三角フラスコ (0.5)	同上	17‰	あり	元種培養水を 2 倍に 希釈して収容	

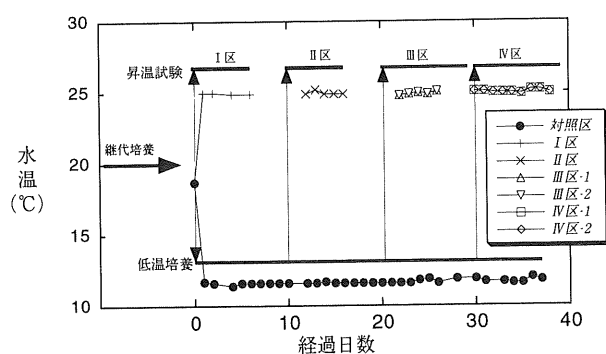


図 2. 水温と実験期間

測定項目 対照区と昇温試験区から培養水 1 ml を 2 日に 1 回採取し、雌個体数、雄個体数、卵数を調べた。雌個体は、単性生殖卵を携帯した雌、雄卵を携帯した雌、耐久卵を携帯した雌、卵を携帯していない雌に分け、卵も単性生殖卵と雄卵および耐久卵に区別して計数した。

結 果

試験結果を表 2 と図 3 に示した。

低温処理培養 (対照) 対照区の低温処理終了時 (36 日目) の全雌密度は 701 個体/ml であった (表 2, 図 3)。両性生殖誘導率 (〔雄卵を携帯した雌数と耐久卵を携帯した雌数の総数/全携卵雌数〕×100%) は培養開始から 14 日目までは 0~4% の範囲で増減したが、16 日目以降増加し、36 日目には 41.2% になった (図 4)。雄個体密

度は 22 日目までは 0~7 個体/ml の範囲で増減し、24 日目以降明瞭な増加がみられ、36 日目には 132 個体/ml に達した (図 5)。耐久卵は 36 日目に初めて 4 個/ml 出現した (図 6)。試験終了時には 72,000 粒の耐久卵が生産された。

昇温試験 低温処理期間が 0 および 10 日の I, II 区では、6 日間の昇温培養終了時の全雌密度は 236 個体/ml (I 区)、80 個体/ml (II 区) で、単性生殖によってワムシが活発に増殖した (図 3)。これに対し、雄密度と両性生殖誘導率は 1 個体/ml, 0% (I 区) および 0.5 個体/ml, 0% (II 区) で両性生殖はほとんど発現せず、両区とも耐久卵は全く形成されなかった (図 4~6)。

一方長期間の低温処理を施した場合、8 日間の昇温培養を終了した時点での全雌密度は、III 区では 410 (III-1) および 328 (III-2) 個体/ml で、IV 区では 1,021 (IV-1) および 539 (IV-2) 個体/ml であった (図 3)。III 区の両性生殖誘導率の最大値はそれぞれ 54.0% (III-1, 8 日目) および 44.4% (III-2, 4 日目) で、雄の最高到達密度は 139 個体/ml (III-1, 8 日目) および 99 個体/ml (III-2, 6 日目) であった (図 4, 5)。耐久卵は、III-1, 2 区とも 6 日目に初めて観察され、ともに 8 日目に最大の 30 (III-1) および 21 (III-2) 個/ml に達した (図 6)。耐久卵生産数は III-1 区では 15,000 個、III-2 区では 10,500 個であった。

昇温開始時に低温培養中の両性生殖誘導が最も活発だった IV 区では、昇温培養期間中の両性生殖誘導率が最大 59.6% (IV-1, 8 日目)、44.2% (IV-2, 2 日目) で、

表 2. L 型ワムシ上浦株の温度コントロールによる耐久卵生産試験の培養結果

実験区名	培養 水量 (l)	低温 処理 (日)	昇温培養 日数 (試験期日)	収容時				終了時				単位水量 当たり 耐久卵 生産数 (個/l)	平均 水温 (°C)	冷凍 ナンノ 給餌量 (細胞/ ml/日)
				雌個体 密度 (個体 /ml)	両性 生殖 誘導率 (%)	雄個体 密度 (個体 /ml)	耐久卵 密度 (個 /ml)	雌個体 密度 (個体 /ml)	両性 生殖 誘導率 (%)	雄個体 密度 (個体 /ml)	耐久卵 密度 (個 /ml)			
低温培養 (対照区)	20.0	36 (H6.11.23 ~12.29)		43	0.0	3.0	0.0	701	41.2	132.0	4.0	4,000	11.7	660
I 区	0.5	0	6 (H6.11.23 ~11.29)	43	0.0	3.0	0.0	236	0.0	1.0	0.0	0	24.9	1,260
II 区	0.5	10	6 (H6.12.3 ~12.9)	18	0.0	0.0	0.0	80	0.0	0.5	0.0	0	25.0	580
III 区-1	0.5	20	8 (H6.12.13 ~12.21)	164	3.2	9.0	0.0	410	54.0	139.0	30.0	30,000	24.9	1,860
III 区-2	0.5	20	8 (H6.12.13 ~12.21)	74	5.3	4.0	0.0	328	26.6	59.0	21.0	21,000	24.9	1,290
IV 区-1	0.5	30	8 (H6.12.23 ~12.31)	487	36.7	49.0	1.0	1,021	59.6	245.0	51.0	51,000	25.1	3,500
IV 区-2	0.5	30	8 (H6.12.23 ~12.31)	244	36.7	24.5	0.5	539	23.1	50.0	27.0	27,000	25.1	1,940

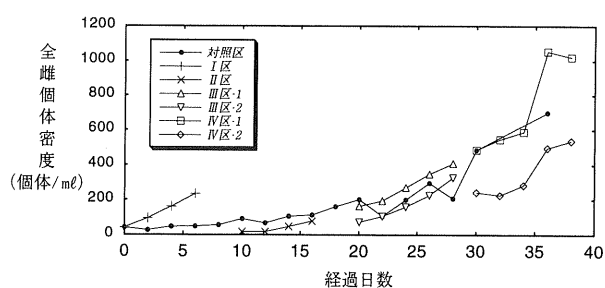


図 3. 全雌個体密度

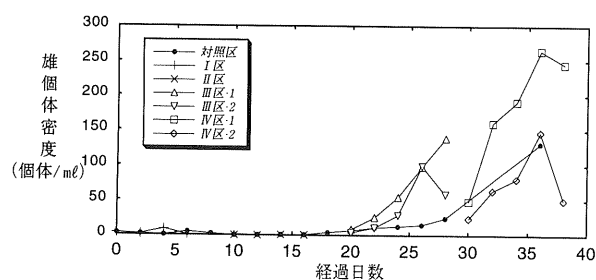


図 5. 雄個体密度

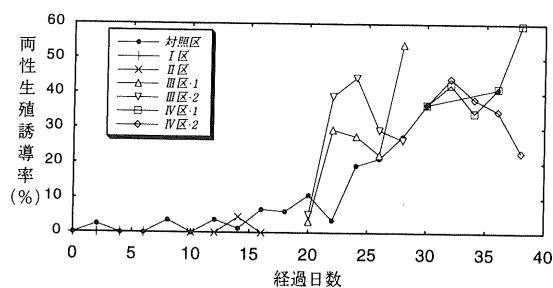


図 4. 両性生殖誘導率

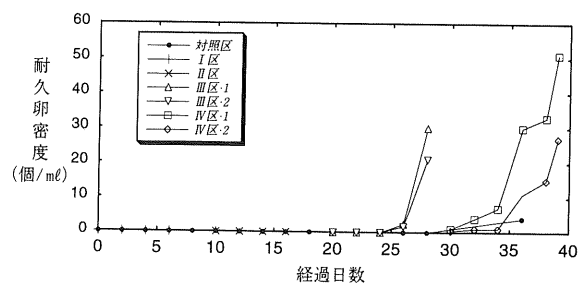


図 6. 耐久卵密度

雄の最高密度は 265 個体/ml (IV-1, 6 日目), 148 個体/ml (IV-2, 6 日目) であった (図 4, 5)。培養開始後 1 日目から既に耐久卵が観察され (IV-1, 1 個/ml, IV-2, 0.5 個/ml), 9 日目にはそれぞれ 51 個/ml (IV-1), 27 個/ml (IV-2) となった (図 6)。耐久卵生産数は IV-1 区が 25,500 個, IV-2 区が 13,500 個であった。

考 察

本試験結果から, L 型屋島株を用いた耐久卵の量産法が L 型上浦株に対しても適用でき, 12°C の低温培養を行った後に 25°C に昇温することにより, 耐久卵を生産

できることが確かめられた。また、そのためには一定期間の低温処理が必要なことがわかった。対照区の両性生殖誘導が16日目以降に活発になったことから最低16日間の低温処理が必要であると判断された。今村ら⁸⁾の水温刺激による耐久卵の生産手法では1~2ヵ月間の低温(8~14°C)培養後の昇温(約29°C)により3~10日目に耐久卵が形成されることが確かめられていたが、本試験を通じて上浦株では低温処理期間がかなり短くて良いことが明らかになった。ただし、今回の試験では低温処理開始時に雄個体がわずかながら(3個体/ml)すでに出現していたので、全く雄がみられない場合この日数はどう変化するのか、他株を用いた場合も含めて、今後検討していく予定である。

実験 I, II で耐久卵が形成されず、III, IV でのみ耐久卵形成が起こったことは、低温処理期間が一定の長さに達しないワムシ培養では昇温させても耐久卵形成に至らないことを示している。このことから、水温上昇が刺激となって両性生殖を誘導させるのではなく、低温処理によって両性生殖を誘導させ、以後の高温下での培養を通じて、耐久卵形成に至るまでの以後の両性生殖ステージの進行を加速させていると考えられた。

今回の試験で、低温培養を継続することにより耐久卵が形成されることも確かめられた。その試験終了時の耐久卵生産量は4,000個/lであったのに対し、水温をコントロールした場合はほぼ同期間内で最大その13倍の51,000個/lが生産された。水温コントロールによる方法は低温を終始維持する場合に比べて、効果的に耐久卵を採取できることが確かめられた。

両性生殖誘導率の最大値は、III区とIV区何れも高密度区の方が低密度区に比べて高かった。日野ら⁶⁾は飼育水の交換は両性生殖の誘導要因を希釈するため mictic-female の出現を抑制すると考察している。その後、Hagiwara ら¹²⁾は水中のバクテリアやワムシの水溶性抽出物の添加により、両性生殖の誘導が促進されることを報告した。以上のことから、本試験の高密度区では低温培養水をそのまま収容したため、誘導要因が希釈されずに済んだ結果、両性生殖誘導率が低密度区に比べて高くなったと考えられた。

本試験の耐久卵生産効率を今村ら⁸⁾の試験と比較すると、単位水量当たりおよそ6~10倍の比で耐久卵が生産され、雄個体の最大密度も8~9倍高かった。2者の主な培養条件の相違点には給餌方法、塩分(今村ら⁸⁾の研究では海水の希釈を行っていない)、株、培養容量(今村ら⁸⁾の報告では4m³)が挙げられる。後者では低温培養時に毎日培養水の一部をナンクロプシスで交換し、昇温時には48時間バッチ培養を3~5回繰り返した。その結果今村らは植え替え時の雄個体の流失を問題点として指摘し、対処法として濃縮クロレラを使用した換水を行わない培養方法を将来の課題としている⁸⁾。本試験で耐久卵生産密度が高かった理由には、そのように、低温

培養と昇温培養を通じて、濃縮ナンクロプシスを餌料として無換水で培養したことにより、両性生殖誘導要因の希釈と雄個体の流失を回避できたことと、今村ら⁸⁾の報告後明らかにされた低塩分による両性生殖誘導の促進効果に着目した実験設定を行ったこと等が挙げられる。昇温培養開始時の両性生殖誘導率が十分高い場合、収容密度を本研究の設定よりもさらに高いものにすることにより、いっそう効率的な耐久卵形成が起こることも予測される。

今後の課題としては、低温培養時の適正な水温と塩分の検討、そのときの培養期間の検討などのほか、昇温時の適正な収容密度および高温培養時の適正な培養方法とさらに他の株への適用等が考えられる。また多数の元種確保を目的とした、培養のスケールアップの検討も必要である。

文 献

- 1) HAGIWARA, A., K. HAMADA, A. NISHI, K. IMAIZUMI, and K. HIRAYAMA (1993) Dietary Value of Neonates from Rotifer *Brachionus plicatilis* Resting Eggs for Red Sea Bream Larvae. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 99-104.
- 2) HINO, A., and R. HIRANO (1984) Relationship between Water Temperature and Bisexual Reproduction Rate in the Rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **50**, 1481-1485.
- 3) HAGIWARA, A., A. HINO, and R. HIRANO (1988) Effects of Temperature and Chlorinity on Resting Egg Formation in the Rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 569-575.
- 4) HINO, A., and R. HIRANO (1988) Relationship Between Water Chlorinity and Bisexual Reproduction Rate in the Rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 1329-1332.
- 5) HAGIWARA, A., A. HINO, and R. HIRANO (1988) Comparison of Resting Egg Formation Among Five Japanese Stocks of the Rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkai*, **54**, 577-580.
- 6) HINO, A., and R. HIRANO (1976) Ecological Studies on the Mechanism of Bisexual Reproduction in the Rotifer *Brachionus plicatilis*—I, General Aspects of Bisexual Reproduction Inducing Factors. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **42**, 1093-1099.
- 7) HAGIWARA, A., K. HAMADA, A. NISHI, K. IMAIZUMI, and K. HIRAYAMA (1993) Mass Production of Rotifer *Brachionus plicatilis* Resting Eggs in 50 m³ Tanks. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 93-98.
- 8) 今村茂生・芦立昌一・東條英雄 (1979) 温度刺激によるシオミズボワムシの耐久卵採取方法について。栽培技研, **8**, 53-61.
- 9) HAGIWARA, A., and C.-S. LEE (1991) Resting Egg Formation of the L- and S-type Rotifer *Brachionus plicatilis* under Different Water Temperature. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 1645-1650.
- 10) (社)日本栽培漁業協会 (1993) 日本栽培漁業協会 20 年史。

- (社) 日本栽培漁業協会, 東京, 52 pp.
- 11) RUMENGAN, J. F. M., and K. HIRAYAMA (1990) Growth responses of genetically distinct S and L type rotifer (*Brachionus plicatilis*) strains to different temperatures. Proc. 2nd Asia. Fish. Forum, ed by R. HIRANO and I. HANYU, Asian Fisheries Society, Manila, pp. 33-36.
- 12) HAGIWARA, A., K. HAMADA, S. HORI, and K. HIRAYAMA (1994) Increased sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Rotifer) with the addition of bacteria and rotifer extracts. *J. Exp. Mar. Biol.*, **181**, 1-8.