2013年度版

長崎大学水産学部
水産増殖学研究室

教授･萩原篤志

教授･阪倉良孝

水産増殖学研究室の研究課題と社会との接点

種苗生産（餌料生物・仔魚飼育） → 増養殖

餌料プランクトン
ワムシ
（体長 0.2 mm）

マハタ仔魚（4日令，体長2 mm）

マハタ成魚（体長～90 cm）

研究課題

良質の種苗を効率よく大量生産
→経験値を科学的な形式値へ
→基礎研究の充実

Ⅰ．餌料・栄養

1）餌料プランクトンの育種・保存

ワムシのカルチャーコレクション 1

ワムシの遺伝子解析 2

ワムシ耐久卵の商品化 3

プランクトンの健康度判定 4

生理活性物質 5,6

2）新規餌料プランクトンの開発 7

Ⅱ．飼育環境・仔魚飼育

3）仔魚の健康度判定技法開発 8

4）餌料系列の確立 9

5）新型水槽の開発 10

Ⅲ．共同研究機関および業績リスト 11,12

フィードバック

新しい種苗生産システム

長崎県総合水産試験場

養殖業者等

1. 海産ツボワムシ類の交雑による育種

【目的】　ワムシ有用新品種の開発
【成果】　①交雑株作製に成功
　　②交雑株の生物学的特性の解明

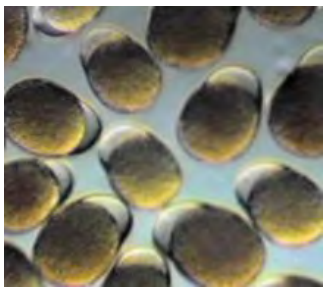
当研究室で保有するワムシ株カルチャーコレクション

様々な大きさのワムシ株と雄ワムシ（下左）

優良株選定

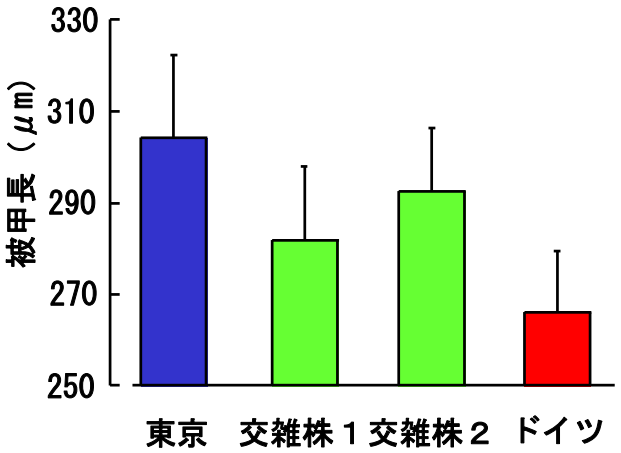
交雑

ワムシの交尾行動（模式図）



ワムシ受精卵

ふ化



Hagiwara, A., Suga, K., Akazawa, A., Kotani, T. & Sakakura, Y. (2007) Development of rotifer strains with useful traits for rearing fish larvae. Aquaculture 268, 44-52.

２．餌料用プランクトン「ワムシ」の遺伝子解析と外来遺伝子導入法の開発

【目的】

ワムシ生活史を遺伝子レベルで解析する際に有用な、ESTデータベースの作成とディファレンシャルディスプレイ法によるワムシ個体（雄・単生生殖雌・両性生殖雌）に特異的な遺伝子の特定をおこなう。前述の遺伝子データを基に、遺伝子操作を行い自然界に存在しない体サイズ・生殖特性・環境耐性を有する新品種ワムシを作出する。

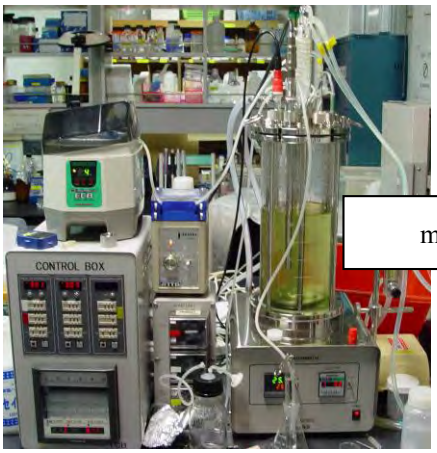
【成果】

①EST作成において、他生物由来の遺伝子配列の混入を防ぐ為、ワムシの純粋培養方法を確立した。（特願2003-382155）

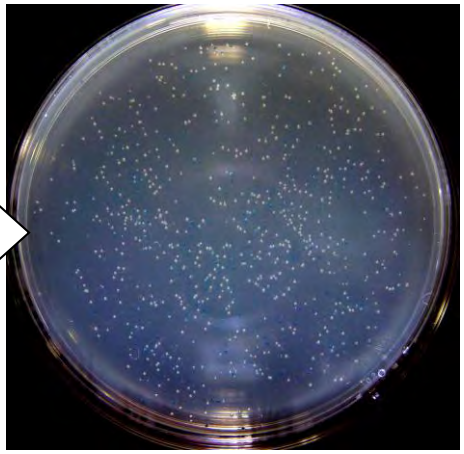
②純粋培養ワムシよりmRNAを精製し、cDNAライブラリーを構築した。

③マイクロマニピュレータによる、ワムシ卵への遺伝子導入方法を確立した。（特許準備中）

④ワムシの全ミトコンドリアゲノム配列を世界で初めて決定。

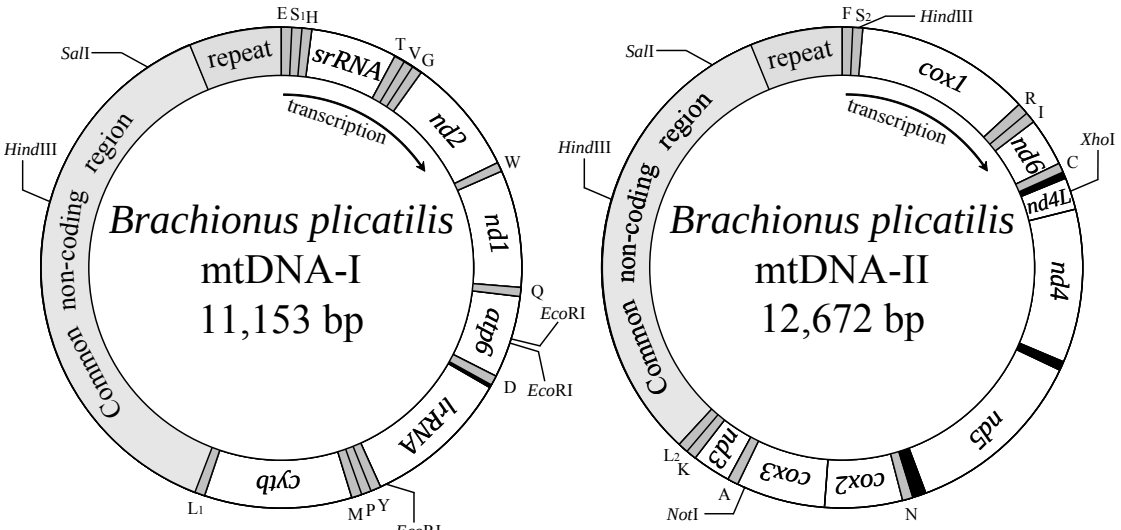


mRNA精製



ワムシの純粋培養装置　　ワムシcDNAライブラリー（大腸菌に導入・構築）

Suga, K., Welch, D.M., Tanaka, Y., Sakakura, Y. & Hagiwara, A. (2007) Analysis of expressed sequence tags of the cyclically parthenogenetic rotifer *Brachionus plciatilis*. PLoS ONE 2(8), 1-7.



ワムシの全ミトコンドリアDNA塩基配列。機能的に全く重複のない2つの環状遺伝子を有しており，これまで他の生物からこのような構造は全く報告されていない（Suga et al. 2008 Mol. Biol. Evol.）。

Suga, K., Welch, D.M., Tanaka, Y., Sakakura, Y. & Hagiwara, A. (2008) Two circular chromosomes of unequal copy number make up the mitochondrial genome of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Molecular Biology and Evolution 25(6), 1129-1137.

3. 海産魚ベビーフード「ワムシ」の耐久卵による保存とその商品化

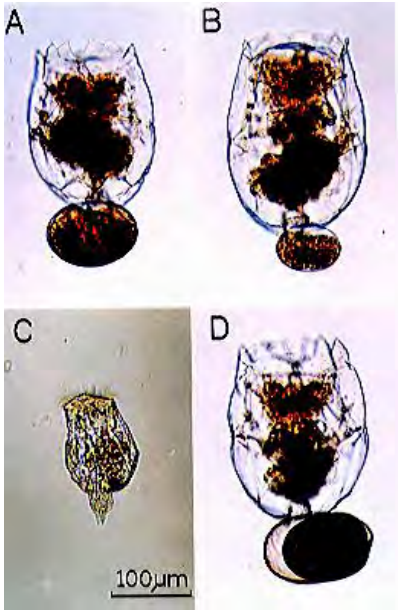
【目的】「ワムシ」の耐久卵量産技術の開発とその商品化

【成果】

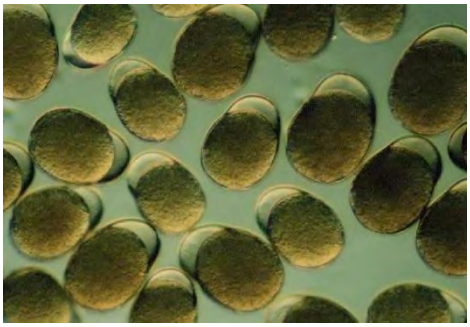
①生活環コントロールによる耐久卵量産技法の確立
（特許第3465050号,特願2003-323257）

②ワムシ耐久卵生産に対する人工海水の開発
（特許第3782999号）

③100億個レベルでの量産と缶詰化の成功



上図　生活環に出現する3タイプの雌ワムシ（A,B,D)と雄（C)



ワムシ耐久卵

右図　耐久卵1000万粒入りの缶詰
（試作品）

量産された耐久卵

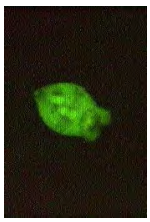
Hagiwara, A., W. G. Gallardo, M. Assavaaree, T. Kotani & A. B. de Araujo (2001) Live food production in Japan: recent progress and future aspects. Aquaculture 200 (1-2): 111-127.

4. 餌料用動物プランクトンの培養診断技術の開発

【目的】
海産仔魚の餌料として汎用されている海産ワムシ類の大量培養時に，その健康状態を知るための技法を開発する。

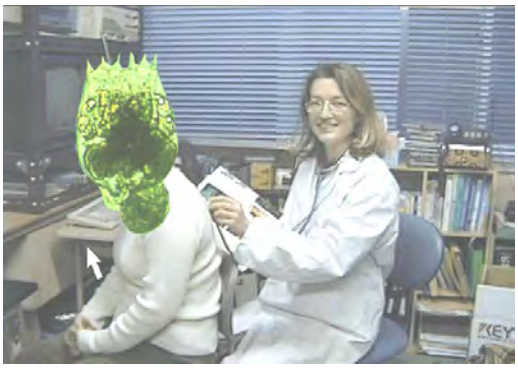
【成果】
①環境の変化はワムシの生理状態に影響を与え，個体の寿命や産仔数の変化をもたらす。この変化に応じてワムシの摂餌速度と遊泳速度が変化することを確認した。
②市販の蛍光性基質を用いた酵素活性測定を実施した。その結果，ワムシのグルコシダーゼやエステラーゼの活性が環境の変化や個体の生理状態と高い相関を示しながら変化することを確認し，ワムシ培養の不調を事前に予測することが可能となった。

グルコシダーゼ活性
（FDGlu）



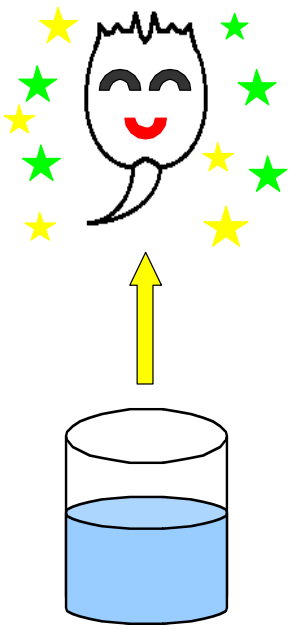
エステラーゼ活性
（cFDAam）

光学顕微鏡像　　蛍光顕微鏡像

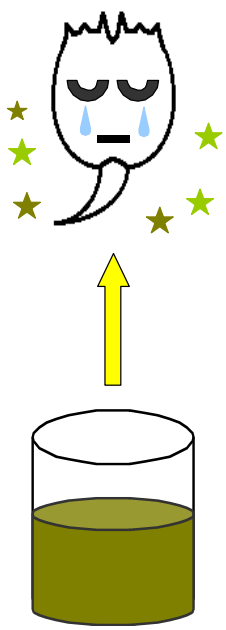


プランクトンの健康診断

「元気なワムシはピカピカ光るよ！」



「元気がないと光らない」



5. 海産ワムシ類に対するホルモン作用

【目的】

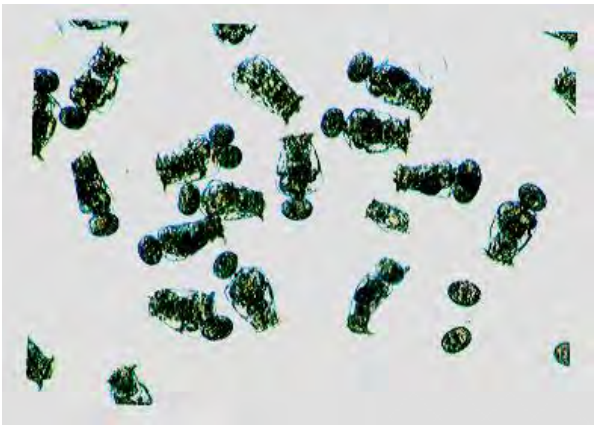
ワムシ類は魚介類幼生の餌料生物として世界中で培養されている有用動物であるが，内分泌の知見は皆無である。各種ホルモンのワムシに対する作用を解明する。

【成果】

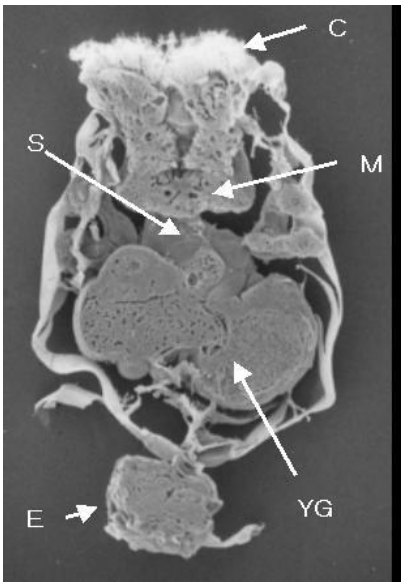
①各種ホルモン（神経伝達物質を含む）をワムシ培養中に添加したところ，γアミノ酪酸（GABA），ブタ成長ホルモン（GH）はワムシの増殖を促進し，セロトニン（5-HT）と幼若ホルモンの添加は耐久卵形成を誘導した。

② ワムシ培養が不調の時に，GABAの添加効果が顕著に現れ，個体群の増殖活性を高める作用がみられた。

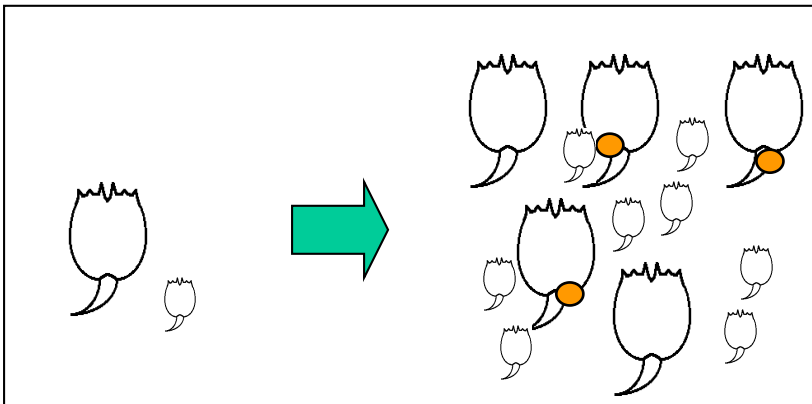
③ワムシ体内にGABAと5-HTが検出され（HPLC分析），神経伝達物質として機能している可能性が示唆された。また，ブタ成長ホルモンの抗体と反応するGH様物質がワムシ体内に存在することも確認された。



大量培養中のワムシ



海産ワムシの縦断面．細胞数は約800



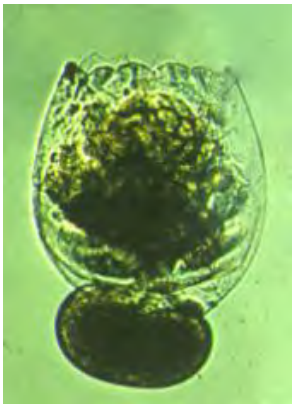
γアミノ酪酸，ブタ成長ホルモンの添加による個体群増殖の促進

- ✓ Assavaaree, M., Hagiwara, A. (2011) Fisheries Science
- ✓ Gallardo, W.G., Hagiwara, A., Hara, K., Soyano, K. (2006) Fisheries Science
- ✓ Araujo, A., Hagiwara, A. (2005) Hydrobiologia
- ✓ Gallardo, W.G., Hagiwara, A., Snell, T.W. (2001) Aquaculture Research

６．内分泌かく乱物質が動物プランクトン生活史に与える影響とその作用機構

カイアシ類
Tigriopus japonicus

ミジンコ類
Diaphanosoma celebensis



ワムシ類
Brachionus plicatilis

【目的】

高等動物に内分泌かく乱作用を示す物質が，動物プランクトン3種の生殖に与える影響と個体レベルでの作用機構を明らかにする。

【成果】

①各種化学物質を致死濃度以下で曝露したところ，生物種の生存には影響を与えないが，生殖特性に変化を生じる物質の存在を確認した。

（例：環境エストロゲンがミジンコ産仔数を増大；ﾌｪﾆﾄﾛﾁｵﾝなどがカイアシ類の雄の出現率を高める；メトプレン等がワムシ類の両性生殖誘導を促進。）

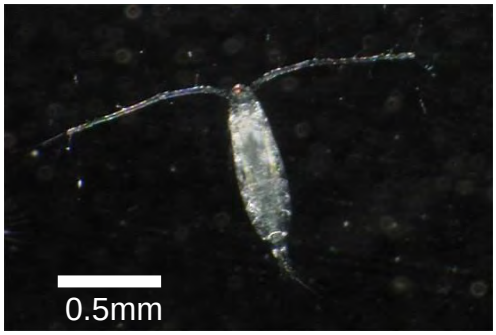
②各種殺虫剤を低濃度で曝露した場合，ワムシの個体群増殖や耐久卵形成には影響を与えないが，耐久卵の孵化能力を低下させることを発見。

- ✓ Dahms, H.-U., Hagiwara, A., Lee, J.-S. (2011) Aquatic Toxicology
- ✓ Marcial, H.S., Hagiwara, A (2007) Hydrobiologia
- ✓ Marcial, H.S., Hagiwara, A (2007) Fisheries Science
- ✓ Marcial, H.S., Hagiwara, A., Snell, T.W. (2005) Hydrobologia
- ✓ Marcial, H.S., Hagiwara, A., Snell, T.W. (2003) Environmental Toxicology and Chemistry

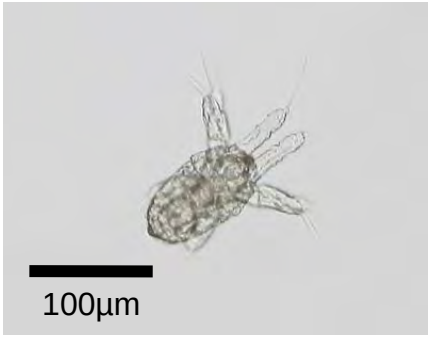
7. 海産カイアシ類の培養法確立と改良

【目的】　新しい仔魚用初期餌料の開発

【成果】　①カイアシ類人工培養法の確立
②カイアシ類同一個体群の長期間培養に成功
③カイアシ類培養に適した微細藻類の選定



海産カイアシ類*Acartia tsuensis*成体



海産カイアシ類*Acartia tsuensis*ノープリウス幼生

カイアシ類小規模培養（5L）

カイアシ類中規模培養（20L）の連続給餌および給水システム

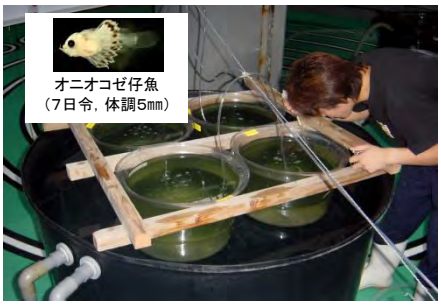
長崎県水試での大規模カイアシ類培養（400L）と作業風景

Hagiwara, A., W. G. Gallardo, M. Assavaaree, T. Kotani & A. B. de Araujo (2001) Live food production in Japan: recent progress and future aspects. Aquaculture 200 (1-2): 111-127.

8. 仔魚の健康度測定技法の開発

【目的】
海産仔魚の飼育時に，その健康状態をリアルタイムで測定するための技法を開発する。
【成果】
①産卵群によって仔魚の健康状態は異なり，良好な状態の仔魚ほど無給餌生残日数が長くなることを確認し，仔魚のトリプシンやエステラーゼ活性および遊泳行動が産卵群によって異なり，無給餌生残日数と強い相関をもつことが明らかになった。
②自家受精する海産魚マングローブキリフィッシュ（*Kryptolebias marmoratus*）クローン個体群をモデル実験系として，仔魚の酵素活性を個体レベルで測定する技法を確立した。
③産仔直後のカサゴ仔魚の健康度を，酵素活性と遊泳行動をパラメータにリアルタイム評価することが可能になった（特許第3493432号）。
④イサキ仔魚およびオニオコゼ仔魚の健康度を，それぞれ仔魚のエステラーゼ活性と遊泳行動および仔魚のトリプシン活性で評価できることを明らかにした。

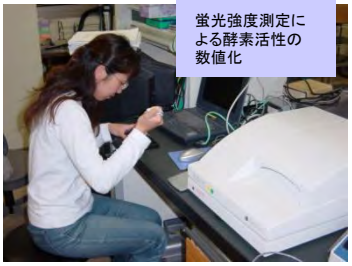
研究室での飼育実験



長崎県総合水産試験場での飼育実験

酵素活性および行動計測による仔魚の健康度評価

仔魚１尾当たりの酵素活性を測定



仔魚の行動観察と数値化

- ✓ Matsuo, Y., Kasahara, Y., Hagiwara, A., Sakakura, Y. & Arakawa, T. (2006) Evaluation of larval quality of viviparous scorpionfish *Sebastiscus marmoratus*. Fisheries Science 72(5), 948-954.
- ✓ Ruttanapornvareesakul, Y., Sakakura, Y. & Hagiwara, A. (2010) Screening of enzyme activity for assessing the condition of larvae in the seven-band grouper *Epinephelus septemfasciatus* and devil stinger *Inimicus japonicus*. Fisheries Science 76(2), 295-304.

9. 仔魚飼育の餌料系列開発

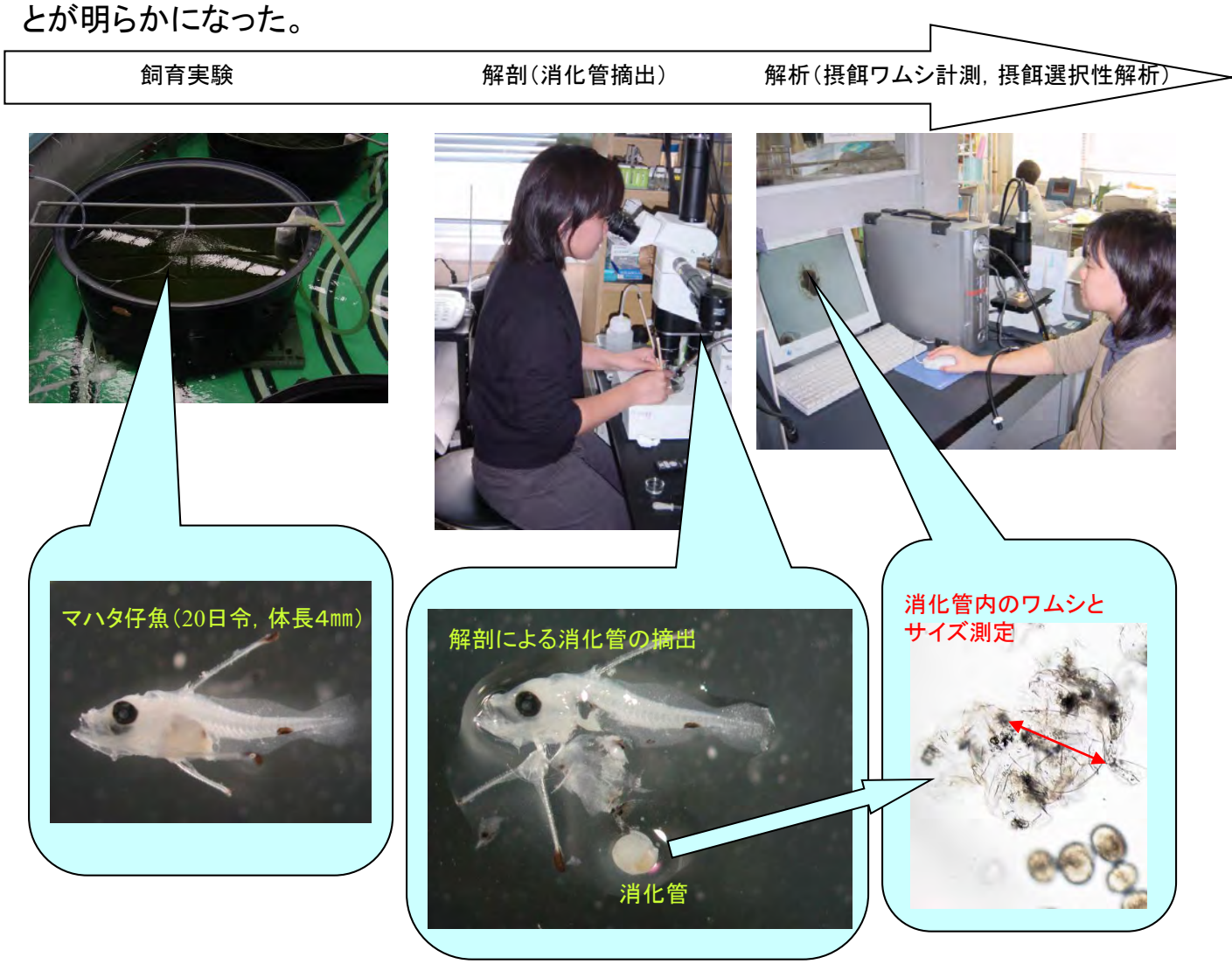
【目的】

生物餌料に対する仔魚の摂餌行動を解析することにより，最適な餌料系列を開発する。

【成果】

①長崎県特産種のマハタおよびオニオコゼについて，それぞれの仔魚の餌料生物（ワムシ，アルテミア）に対する詳細な餌料種・餌料サイズ選択性を明らかにした。

②得られた成果を基に新たな餌料系列を開発し，この餌料系列は仔魚の生残・成長，および必須脂肪酸（DHA）の蓄積について，従来の餌料系列よりも良い成績を示すことが明らかになった。



海産仔魚の摂餌選択性の解析手順

- ✓ Tanaka, Y., Sakakura, Y., Chuda, H., Hagiwara, A. & Yasumoto, S. (2005) Food selectivity of seven-band grouper *Epinephelus septemfasciatus* larvae fed different sizes of rotifers. Nippon Suisan Gakkaishi 71, 911-916.
- ✓ Akazawa, A., Sakakura, Y. & Hagiwara, A. (2008) Feeding selectivity of marine fish larvae, *Verasper variegatus*, *Seriola quinqueradiata* and *Platycephalus* sp. on different sizes and shape of three rotifer strains. Nippon Suisan Gakkaishi 74(3), 380-388.
- ✓ Pandey, B.D., Hagiwara, A. & Sakakura, Y. (2008) Feeding behaviour, feed selectivity and growth studies of mangrove killifish, *Kryptolebias marmoratus* larvae using various live and formulated feeds. Environmental Biology of Fishes 82(4), 365-375.

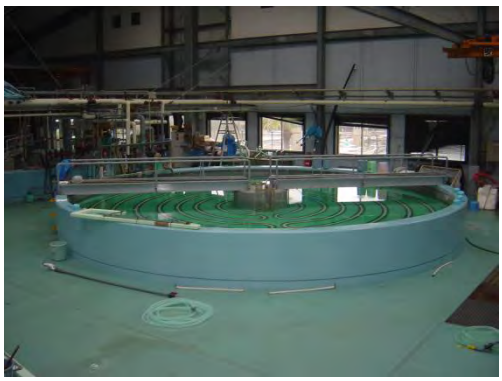
10. 新規飼育水槽の開発

【目的】

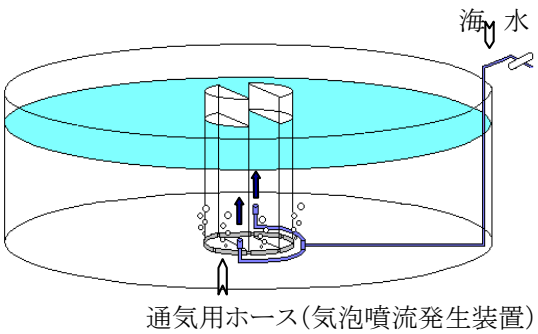
流体力学的および行動学的アプローチによって，飼育水槽内の流場と仔魚の分布を正確に把握することによって，仔魚飼育に適した水槽システムを開発する。

【成果】

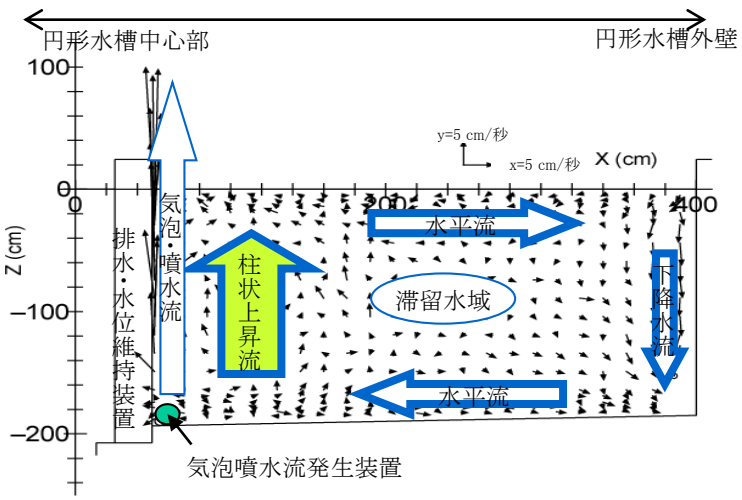
従来は大型水槽内に複数のエアストーンを設置して流れを形成していたが，流場に微細な乱れが多数生じていることが分かった。そこで，円形水槽の中央にエアストーンを集約し，水槽内に循環流を形成するとともに，仔魚が水面近傍に滞留できるような水槽を考案した。この新規開発水槽でマハタの初期飼育を実施したところ，従来の飼育法よりも3倍の生残率を安定して実現できた。



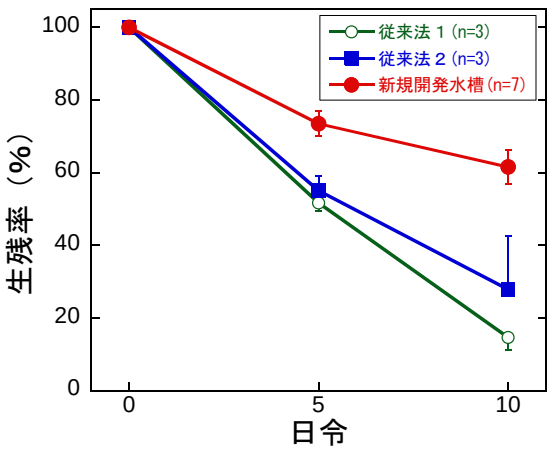
種苗生産用大型水槽（100トン）



新規開発水槽の概要



新規開発水槽内の流れを可視化



安定した大量飼育を実現

- ✓ Sakakura, Y., Shiotani, S., Chuda, H. & Hagiwara, A. (2007) Flow field control for larviculture of the seven-band grouper *Epinephelus septemfasciatus*. Aquaculture 268, 209-215.
- ✓ Ruttanapornvareesakul, Y., Sakakura, Y. & Hagiwara, A. (2007) Effect of tank proportions on survival of seven band grouper *Epinephelus septemfasciatus* (Thunberg) and devil stinger *Inimicus japonicus* (Cuvier) larvae. Aquaculture Research. 38(2), 193-200.

共同研究を実施している相手側機関（研究者）（過去３年間）

【国内】

長崎大学水産学部准教授

菅　向志郎 博士

ワムシ類の遺伝および育種

長崎県総合水産試験場，日本栽培漁業協会能登島事業場（現，独立行政法人水産総合研究センター・能登島栽培漁業センター），福岡県水産海洋技術センター・内水面研究所，奄美栽培漁業センター，瀬戸内海区水産研究所百島実験施設，東京海洋大学，福山大学

【海外】

ジョージア工科大学生物学科（米国，T.W. Snell博士），ゲルフ大学魚類学研究所（カナダ，P. Wright博士），バレンシア大学生態学研究所（スペイン，M. Serra博士），イスラエル陸水海洋研究所（イスラエル，E. Lubzens博士），ウッズホール海洋研究所（米国，D.M. Welch博士），ネスナ大学（ノルウェー，A.I. Olsen博士）サムラトランギ大学（インドネシア，I.F.M. ルメンガン博士），ハワイ大学（アメリカ，C. Tamaru博士，K. Cole博士），オレゴン州立大学（アメリカ，D. Noakes博士），韓国漢陽大学（J-S. Lee博士）

研究業績（抜粋）

【原著論文】

Suga, K., Welch, D.M., Tanaka, Y., Sakakura, Y. & Hagiwara, A. (2007) Analysis of expressed sequence tags of the cyclically parthenogenetic rotifer *Brachionus plciatilis*. PLoS ONE 2(8), 1-7.

Suga, K., Welch, D.M., Tanaka, Y., Sakakura, Y. & Hagiwara, A. (2008) Two circular chromosomes of unequal copy number make up the mitochondrial genome of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Molecular Biology and Evolution 25(6), 1129-1137.

Hagiwara, A., W. G. Gallardo, M. Assavaaree, T. Kotani & A. B. de Araujo (2001) Live food production in Japan: recent progress and future aspects. Aquaculture 200 (1-2): 111-127.

Hagiwara, A., Y. Kadota & A. Hino (2005) Maternal effect by stem females in Brachionus plicatilis : effect of starvation on mixis induction in offspring. Hydrobiologia 546: 275-279.

Kotani, T., Ihara, K. & Hagiwara, A. (2006) Cross-mating of euryhaline rotifer Brachionus plicatilis strains as a means to develop useful strains for larval fish food. Aquaculture 261, 495-500.

Marcial, H.S., Hagiwara, A. & T. W. Snell (2003) Estrogenic compounds affect development of harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus.* Environmental Toxicology and Chemistry 22(12):3025-3030.

Kotani, T. & A. Hagiwara (2003) Fertilization between the rotifer *Brachionus plicatilis* strains at different temperatures. Fisheries Science 69(5): 1078-1080.

Assavaaree, M., Hagiwara, A., Kogane, T. & M. Arimoto (2003) Effect of temperature on resting egg formation of the tropical SS-type rotifer *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff. Fisheries Science; 69: 520-528.

Marcial, H.S. & A. Hagiwara (2007) Effect of diazinon on life stages and resting egg hatchability of rotifer *Brachionus plicatilis*. Hydrobiologia 593: 219-225.

Araujo, A. B. de, A. Hagiwara & T. W. Snell (2001) Effect of unionized ammonia, viscosity and protozoan contamination on reproduction and enzyme activity of the rotifer *Brachionus rotundiformis*. Hydrobiologia 446/447: 363-368.

Gallardo, W.G., A. Hagiwara, K. Hara, K. Soyano & T. W. Snell (2000) GABA, 5-HT and other amino acids in the rotifers *Brachionus plicatilis* and *B. rotundiformis*. Comp. Biochem. Physiol. part A. 127(3): 301-307.

Kotani, T., M. Ozaki, K. Matsuoka, T. W. Snell & A. Hagiwara (2001) Reproductive isolation among geographically and temporally isolated marine *Brachionus* strains. Hydrobiologia 446/447: 283-290.

Grageda, MVC., Sakakura, Y., Minamimoto, M. and Hagiwara, A. (2005) Differences in life-history traits in two clonal strains of the self-fertilizing fish, *Rivulus marmoratus*. Environmental Biology of Fishes 73, 427-436.

赤澤敦司・阪倉良孝・萩原篤志 (2008) 大きさと形の異なるシオミズツボワムシ3株に対するホシガレイ, ブリ, ヨシノゴチ仔魚の摂餌選択性. 日本水産学会誌 74(3), 380-388.

田中由香里・阪倉良孝・中田 久・萩原篤志・安元 進 (2005) マハタ仔魚のワムシサイズに対する摂餌選択性. 日本水産学会誌 71, 911-916.

Sakakura, Y., Shiotani, S., Chuda, H. & Hagiwara, A. (2007) Flow field control for larviculture of the seven-band grouper *Epinephelus septemfasciatus*. Aquaculture 268, 209-215.

Shimizu, D., Sakiyama, K., Sakakura, Y., Takatani, T. & Takahashi, Y. (2008) Quantitative evaluation of post-release mortality using salt pond mesocosm: Case studies of hatchery and wild juvenile tiger puffer. Reviews in Fisheries Science 16(1-3), 195-203.

萩原篤志 (2007) シオミズツボワムシの生理機能と仔魚への餌料効果に関する研究. 日本水産学会水産学進歩賞受賞論文. 日本水産学会誌 73(3): 433-436.

【著書】

萩原篤志 (2000) 水生生物の内分泌系に及ぼす影響の実験的検証ー動物プランクトン. 水産環境における内分泌攪乱物質, 川合・小山編, 水産学シリーズ126, 恒星社厚生閣 pp. 120-129.

萩原篤志(2008) 養殖の餌と水ー陰の主役たち. 仔魚の餌料生物としての動物プランクトン. 恒星社厚生閣 pp.59-99.

Hagiwara, A., T. W. Snell, E. Lubzens & C. S. Tamaru (Eds.) (1997) Live food in aquaculture. Developments in Hydrobiology, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 326p.

【特許】

◎SS型ワムシ耐久卵量産技術

特許第3465050号

◎ワムシ冷蔵保存技術

特許第3412016号

◎カサゴ仔魚の活力評価技法

特許第3493432号

◎人工海水及びそれを用いた耐久卵の製造方法 特許第3782999号

◎高孵化率ワムシ耐久卵の生産方法

特願2003-323257

◎遺伝子導入用針 特願2003-404282

◎動植物プランクトンの無菌化方法及び当該無菌化方法を用いたワムシの培養方法

特願2003-382155