

ワムシの生物学と水産学：ミクロ生物の高等芸*

萩原 篤志

長崎大学大学院 水産・環境科学総合研究科

Force of microscopic animals: biology and fisheries science of rotifers

ATSUSHI HAGIWARA

Graduate School of Fisheries and Environmental Sciences, Nagasaki University, Bunkyo 1-14, Nagasaki 852-8521, Japan

Tel/Fax: 81-95-819-2830, Email: hagiwara@nagasaki-u.ac.jp

*受賞題目：餌料プランクトンの生物機能解明とその増養殖への応用に関する研究

1. はじめに

ワムシやアルテミアなどの餌料生物は、普通の人たちにはあまり知られていない。私自身も水産学の勉強を始めるまでは、その存在を知らなかった。私の研究は、知見の少なかったワムシ等の生き物を理解するため、広く浅くではあるが、ご専門の先生方に教えを請い、生物学や化学、物理学など、全般の勉強をしながら、奮闘してきたようなところがある。そして、これらの研究で国内最初の知見を得れば、世界初としてリードできる分野だったことは幸いであった。日本水産学会の大会のセッション名では「餌料生物」の分野が該当するが、私の立場では、単なる餌としての研究ではなく、仔魚を含めた動物プランクトンの種間関係の解明の場として捉えることが多い。ワムシの後頭棘の存在や付着行動、光走性や、ミジンコやカイアシ類の逃避行動によって、仔魚による被食をどの程度避けることができるか、これらは細々とではあるが、長年にわたり研究を続けている課題である。

恩師の故平野礼次郎先生と日野明德先生には、研究のきっかけを頂いた上、出来の良くない学生だった私を辛抱強く導いて下さったことに深く感謝している。ご多忙の先生方であったが、新しい知見を報告に行く都度、昼夜を問わず時間を割いて下さったことは、研究活動のモチベーションとなった。ワムシ（輪虫、rotifer）という名称は、体を回転させながら泳ぐことに由来している。顕微鏡の前でワムシの観察を日夜続けていた頃、すべてのワムシが右回りで泳いでいることに気がついた。それを報告に行くと、「それには気がつかなかった、大発見だ」と一緒に喜んで頂いたことは、今でもよく覚えている。地道な日々の活動があつてこそ、周囲の研究者へのサプライズの提供に繋がることを、肌で理解することができた。また、学位取得後に、ハワイの研究所でポスドクとして雇って頂いた李正森博士と、長崎大学に赴任後の上司だった平山和次先生には、以後長きにわたって懇切なご指導とご助言を頂いた。また、研究を推進する上で、良きパートナー達に恵まれたことも強い後押しとなった。国内では、大学の同僚や、水産の研究機関の方々と幾多の共同研究をさせて頂いた。国外にあつては、rotifer family と自称する研究仲間の存在が大きかった。これは理学畑の基礎研究の集団で、International Rotifer Symposium という小さな研究集会を3年ごとに開催している。大学院生を含めても100名程度の参加者であり、そのような小さな分野だからこそ、できるだけ多くの成果を上げられるよう、強い絆で活発な共同研究を行っている。rotifer family の由縁である。

一例を挙げよう。私が長崎大学に職を得て間もないころ、職場の同僚の玉置昭夫先生が私を含めた数名を誘って、その頃に出版されたばかりだった Mann and Lazier の “Dynamics of Marine Ecosystems” を輪読したことがある。生物学と物理学の両者の立場を交えての解説が新鮮だった。レイノルズ数が小さく水の粘性の影響を受けやすいマイクロな生き物にとって、水の中で生活することがどういうことか、明快に解説されていた。運よく職場に、水の粘性測定に詳しい村松毅先生がおられたので、さっそく測定方法を教えて頂き、装置を借りて、測定実験を半年間行った。そして、培養槽内の溶存有機物の増加による粘性の上昇が、ワムシの増殖を低下させる一因となるという成果を導くことができた。¹⁾ もう一つどうしてもやってみたかった研究は、水槽内の水の流れが仔魚に与える影響についてである。小さな仔魚が動物プランクトンを摂餌することの意味を物理学的に理解したかった。また、槽内の水の流れ方が仔魚飼育の成績に大きな影響を与えることは経験的に知られており、種苗生産現場の技術者たちがエアーストーンの配置や通気速度の設定を慎重に行っていたのを見て、水流が仔魚にどの程度ダメージを与えるのか、実際に流速のデータを測り

たいと思ったのである。前述の勉強会のメンバーで、船の周囲の水の流れを研究していた塩谷茂明先生に相談してみたところ、マクロの世界からミクロへの世界に移っての挑戦となるが一緒にやりましょう、ということになり、さっそく2種類の流速計を購入した。そして、地元の長崎県総合水産試験場と協力し、大型の種苗生産槽内の水流測定を開始した。しばらくして、長崎大に來られた阪倉良孝先生がこの研究に手を挙げ、100トン水槽内の流速を何と437箇所ですべて求めるという離れ業を行い、塩谷先生による数値解析を通じて、その後の成果発表に繋げた。²⁻⁵⁾ それまでの経験と勘による作業がデータ化され、以後、槽内の流速測定は、国内はもとより世界の種苗生産分野で普通に行われるようになった。

本稿では、このような研究例をいくつか紹介させて頂く。

2. 耐久卵の形成

ワムシはミジンコ等と同様に、環境が悪くなると耐久卵（図1）を作ると信じられてきたが、これは間違いである。と最初に指摘したのは日野明德先生である。両性生殖の発現頻度はワムシ株によって大きく異なるが、密度の上昇によって誘導が促進される。温度と塩分によってを促進する耐久卵形成の最初のステージであり、減数分裂を伴う *micitic female* と呼ばれる両性生殖個体の出現を検討した結果、外部環境がワムシの生育にとって良好なときに、これが起こることを見出した。それでは、それ以後のステージはどうなっているのだろうか。*micitic female* が出現し、これが半数体の雄ワムシを産み、雄と雌が交尾して受精し、耐久卵が形成される。それぞれのステージについて、個体レベルで培養を行って検討した結果、ワムシが単性生殖を活発に行う良好な環境下でのみ、これらの全てのステージが効率よく進行し、多数の耐久卵が作られることが分かった。⁶⁾

雌ワムシは単性生殖で20-30の子を生じるが、日野・平野⁷⁾ はそれらのうち長女から第5女までの子ワムシについて、25世代にわたって培養し、世代の累積が両性生殖を誘導することを示した。これらは母ワムシが若い時に生じた子を用いたものだったので、私は母ワムシの老化がどのような影響を与えるのか知りたかった。その結果、母親が若いほど、その子に両性生殖雌が現れやすく、母親の加齢にともなって単性生殖雌が多く産まれることが分かった。もう一つの発見は、同じ単性生殖雌でも、老いた母親から生まれたときほど、その子に両性生殖雌を多く産むということであった。したがって、餌料を含めた環境が良好で、ワムシが天寿を全うし、十分な産卵活動を行ったときに、両性生殖は最も活発になることが分かる。

この研究結果を得るには体力を要した。ワムシの産仔数が 20 の場合でも、1 個体のワムシを元に第 4 世代まで全個体を個体別に培養するなら、 $1 \times 20 \times 20 \times 20 = 8000$ 匹のワムシを培養する必要がある。実際には毎日新たに生まれたワムシから数個体を選んで培養したが、それでも毎日約 2,000-3,000 匹のワムシを観察し、新鮮な水に替え、餌を与える作業だけでも、睡眠時間を完全に失った。今であれば、もっとスマートなデザインで実験をするが、この実験で得られたものは、他の解析にも使用可能なかなりのビッグデータであった。今も体力と気力には多少の自信はあるが、若いときだったから出来たことだと思う。

では、「環境が悪くなると耐久卵を作る」というのは本当に間違いなのだろうか。耐久卵から孵化したワムシは幹母虫と呼ばれるが、この幹母虫が飢餓という悪環境を経験して生き延びると、その子孫の群は耐久卵を形成しやすくなることが分かった。⁸⁾ ワムシより寿命の長いミジンコでは、環境が悪くなると自分自身の中で両性生殖を発現する時間があるが、寿命の短いワムシでは、その発現は次世代以降になる。そしてそのときは環境状態が良好であることが必要なのである。

また、日野先生によるワムシ研究の成果の中に、ワムシの密度上昇にともなって両性生殖が誘導されるという現象が知られている。ワムシの両性生殖を誘導する物質があるのかもしれない。幸い、私が長崎大学でお世話になった直属の上司の平山和次先生がワムシの無菌培養技法を確立していたので、その設備を使い、微細藻の *Nannochloropsis oculata* を餌料とした無菌培養を得ることができた。また、同じ研究室の北村等先生が付着生物幼生の付着誘引物質を研究されており、抽出や分画の機器を使わせて頂いて、ワムシ抽出物の水溶性と脂質の画分を得ることができた。これらによって、ワムシの両性生殖は水溶性の化学物質によって誘導されることが分かった。⁹⁾ その後、両性生殖の誘導に関係する遺伝子を特定するに至っている。

3. 休眠

ワムシ類は、輪形動物門の微小動物の総称で、約 2200 種が報告されている。ほとんどは淡水域に分布する水生種である。多くが体長 1 mm 以下で、大型種でも体を構成する細胞数は 900 程度である。自作の顕微鏡で小動物を観察した Antony van Leeuwenhoek が 1702 年 2 月 9 日に知人に宛てた手紙の中で、屋根の樋から乾いた塵を採取し、水を加えて拡大観察したところ、1 時間後に何匹かの小動物が這い回っているのを見つけ、驚愕したことを伝えている。¹⁰⁾ この動物はのちにヒルガタワムシの仲間分類されている。ワムシ類は大きく Bdelloidea (ヒルガタワムシ綱) と

Monogononta（単生殖巣綱）とに分かれる。ヒルガタワムシでは雄がみられず、雌単独の単性生殖のみを行う。悪環境下でも強い耐性を示し、乾燥状態ではワムシが体を樽状に収縮させて休眠状態となる。100年以上にわたって休眠を維持したのち、水中で蘇生した例も報告されている。¹¹⁾

Leewenhoekが観察したのはまさにこの現象である。一方、水産分野で餌料生物として用いられるシオミズツボワムシは、単生殖巣綱に属し、雌による単性生殖のほか、雄の出現にともなう両性生殖を行って、耐久卵と呼ばれる受精卵を形成する。

私の卒業研究は、浜名湖に出現するワムシの生活史を調べることからスタートした。ところが、ワムシの出現時期は夏のシーズンだけだったので、他の時期は底泥中の耐久卵の分布や、形態、孵化を調べていた。大学院時代にはワムシの耐久卵研究に没頭するようになった。私が最初に得た教訓は、天然で起こっている現象のメカニズムを実験的に明らかにするには、緻密なデザインを徹底的に練らなければならない、ということだった。卒業研究の中で、屋外池の泥の中から耐久卵をふるいで分離し、さらに50%シヨ糖液を使って耐久卵を浮かせたのち、顕微鏡下で計数しながら、ガラス製のバイアルに移して、孵化実験を行ったことがある。そのとき、耐久卵は真っ暗の場所でも、明るい場所でも孵化したが、明るい場所に置かれたときに卵の孵化率が高くなるという現象がみられた。¹²⁾しかし、なぜ光の照射が孵化率を上昇させるのかという疑問が残った。ところが、自らワムシを培養して耐久卵を作らせてみると、あっけなくその答えが得られた。

ワムシには雌が単独でクローンの子孫を生じる単性生殖雌（amictic female）と、減数分裂を伴う両性生殖によって雄を生じたり、受精して耐久卵を形成する両性生殖雌（mictic female）がある。研究を進めていく過程で、受精した mictic female が形成する耐久卵は、核の数を増やし、卵膜を肥厚させながら、温度依存的にゆっくり発達を進めた。¹³⁾耐久卵の厚い二次卵膜には生体の防御に機能するムコ多糖が多く含まれていた。細菌による分解作用や物理的な外圧などのダメージを回避するのに役立っているのだろう。¹⁴⁾そして、光がないときには耐久卵は決して孵化しなかったのである。例えば25℃では、形成後4-5日で発生を止め、休眠状態となった。光があるときには、さらに1-2日かけて卵発生を続け、孵化に至る。ということは、上に述べた泥の中から分離した耐久卵には、発生が進み、すでに休眠状態にあった卵が混じっていたに違いない。私が実験的に照射した光は、孵化率を上昇させたのではなく、実際には、孵化実験を開始する前に、それらの耐久卵の一部は既に光に曝されていたために、その後暗黒下に移されても孵化することができたのである。この現象については、遺伝子レベルで成果が得られている。光照射開始後の遺伝子発現を

DDRT-PCR 法で解析したところ、照射前の休眠状態の耐久卵では、細胞防御関連と恒常性関連の遺伝子の蓄積が起こった。光照射開始から 4 時間までは、卵割等の変化は光学顕微鏡下で全く観察されなかったが、遺伝子レベルで大きな変化があり、変化光照射 30 分後には光刺激と胚発生に関連する遺伝子が確認された。しかし、光照射 4 時間後にはこれらの発現は停止し、細胞間物質輸送に関わる遺伝子群の発現が起こる。¹⁵⁾

孵化のパターンと耐久卵を幹母として形成される個体群の性状についても興味深い知見が得られた。例えば、低温下で孵化に阻害的な環境を経験したのち孵化させると、その後の個体群は単性生殖による個体群の増大が活発であったが、¹⁶⁾ 低温を経験しない卵の孵化に始まる個体群では両性生殖が活発に起こった。光に曝されず、孵化がいったんブロックされたのち、光照射すると孵化は一斉に起こったが、終始光をあてると孵化は散発的に起こった。また、耐久卵形成時と孵化時の塩分は、次世代個体群が増殖するための至適塩分に影響を与える。¹⁷⁾

すなわち、1) ワムシの耐久卵は、暗黒下で休眠状態を維持し、光の照射が引き金となって孵化し、2) 天然で春と秋に出現するワムシの場合、越冬した耐久卵から孵化したワムシは、春先の環境のもとで活発に個体群を増大させながら分布を広げ、3) 低温を経験していない耐久卵から秋季に生まれたワムシは活発に両性生殖をおこなって耐久卵を形成し、冬季の休眠に備える、というような天然でのワムシの生活が見えてくる。

4. 耐久卵の孵化と光

次なる疑問は、底泥の中の光の届きにくい場所に分布する卵が、なぜ孵化のために光を必要とするのか、ということであった。そこで、色ガラスフィルターを使って、どの波長の光が孵化を誘起するのか検討した。光源には、スライドプロジェクターに内蔵してあるハロゲンランプや、蛍光顕微鏡の光源のキセノンランプを用いた。この実験では、耐久卵の分離や移動を顕微鏡下で行い、このとき光に曝されるので、この操作の影響を排除できなければ、孵化に有効な光波長を特定できない。繰り返しになるが、耐久卵は、形成されてから約 5 日は遅い速度で発達し、この間の光照射は孵化を誘起しないので、その間に実験の準備をすればよい。その結果、波長が 350-400 nm の UV-A 領域の光が孵化のトリガーとして強く作用することが分かった。¹³⁾ このとき 30 分以内の光照射でも孵化を起こすには十分であった。

このことは、さらに新たな疑問を生んだ。耐久卵の孵化の引き金となる近紫外部の光は、水中で減衰しやすく、水底に到達しにくいからである。あるとき、暗室内で実験を行ったにもかかわらず耐久卵がたくさん孵化したことがあった。翌日一度繰り返すと、今度は孵化しなかった。何かの操作ミスがあつて孵化したのだろうということになったが、何故そういうことが起こったのか。後日気がついたことだが、普段暗室内に置いてある実験用の海水を使い果たしてしまったので、暗室の外の光のあたる部屋においてあつた海水を用いていたことに、後日になって気がついた。孵化のために光を必要としているのは、卵そのものではなく、卵の周囲にある海水かもしれない。その後の実験から、過酸化水素やプロスタグランジンを添加すれば、暗黒下でも耐久卵が孵化することが分かった。¹³⁾ すなわち、強いエネルギーをもった短波長光が海水に照射されて、光化学的に活性酸素が生成し、これが耐久卵内に含まれる高度不飽和脂肪酸を酸化して、卵内でプロスタグランジンが生成されるという流れが想定された。天然で海底の底泥に分布する耐久卵が劣悪な光環境下でどうやって効率よく孵化できるのか、常に疑問を感じていたが、光化学反応が関与しているならば、耐久卵の孵化にも支障はなさそうである。光化学的に海面で生成したヒドロキシルラジカル等の活性酸素はそれ自体の寿命は短くても、水中で連鎖的に酸化反応を起こし、底層にまで到達することができる。その頻度は日射が強い時期ほど高くなるだろう。これらのプロセスに関わる物質の存在を直接証明するには残念ながらまだ至っていない。

この成果を発表した頃、自分は30代半ばの年齢で、水産学の若手研究者としては手応えを得つつあつたものの、理学系の集まりであるRotifer familyの中ではどうかな、という感じを持っていた。Rotifer familyの最重鎮は何と言っても米国Dartmouth CollegeのJohn J. Gilbert博士である。長身で物静かな先生だが、淡水種のワムシを中心に生態学の分野できわめて活発な研究を行い、EcologyやLimnology and Oceanographyなどのジャーナルに、78才となった今でも第一著者として成果を発表し続けている。Scienceにも4報がある。その神様のようなGilbert先生の方から、私の研究発表のあと、昼食やCoffee breakのときにどんどん話しかけて頂いた。その後も電子メールでいろいろ有益なご助言を頂いた。このようなイベントがあると自信がついてくる。

5. 種分化

長崎大学に職を得てからお世話になってきた平山和次先生が、1980年代の後半に国内はもとより世界各地から収集したワムシ培養があつたおかげで、優良株の選択や株間の交雑など多くの研究課

題に取り組むことができた。現在 117 株の世界最大のカルチャーコレクションである。これらから、環境耐性が強いワムシや培養しているワムシの 50%以上が両性生殖個体となる株も作出している。¹⁸⁻¹⁹⁾ 基礎研究の材料としても有用であり、ワムシの種分化についてじっくり検討することができた。

餌料生物学としてのワムシの研究の源流は、伊藤隆先生による三重県の養鰻池の水変わりに関する一連の研究である。²⁰⁾ そして、静岡県水産試験場伊豆分場の大上皓久氏らがシオミズツボワムシの形態変異について報告し、²¹⁾ 以後、この変異のメカニズムについて、季節的な形態輪廻であるとする説や、種の違いによるとする説が提唱され、論議を呼んでいた。形態輪廻説の大元には、ワムシ類が環境によって顕著な形態変異を示すという淡水種での知見がある。例えばフクロワムシでは 3 タイプの形態が知られ、 α -トコフェロールが豊富な植物プランクトンを摂餌することによって大型化し、ついには肉食性の最大のタイプとなる。ツボワムシやカメノコウワムシでは、大型化したフクロワムシなどの捕食者が現れると、棘を伸長して被食を避けようとする。²³⁾ しかし、シオミズツボワムシにみられる形態の違いは形態輪廻であるという考え方は間違いであることが分かった。長崎大学の平山和次先生らが被甲の形態解析に加え、アロザイム分析と染色体核型分析による遺伝学的なアプローチによる成果を発表し、²³⁻²⁵⁾ 本種が 2 種以上から構成される複合種であるとの共通認識が国内外で得られた。同時に形態的に区別できない同型のワムシ株の間にも大きな遺伝的変異のあることが明らかになり、これらも後に別種として扱われることになる。

ワムシは寿命が短く、個体レベルでの培養も可能であることから、概念上の種分類の決め手となる生殖的隔離の有無をワムシ株の間で実際に求めることができる。この課題に対し、rotifer family の米国ジョージア工科大学の Terry Snell 教授との共同研究を開始した。当時大学院生だった小谷知也氏（現・鹿児島大学）らが加わった。そして、形態種として知られる、L, S, SS 型（図 2）のうち、L 型ワムシは S, SS 型ワムシと全く交尾をせず、両者を別種とみなすべきであること、S 型と SS 型の雌雄は交尾を行うが受精が起こらず、形態的にも大きな違いがあることから、これも別種として扱うべきであることを明らかにした。また、繊毛冠の部分と足の基部に存在する、我々が Mate recognition pheromone (MRP) と呼んでいるワムシの性フェロモンは、分子量 29000 の糖タンパク質で、雌の性フェロモンを雄が認識して交尾を開始するから、²⁶⁾（図 3）性フェロモンとその抗体を用いたアッセイ（例えば、特定株の性フェロモン抗体と他株の性フェロモンとの反応度測定、抗体を結合させた雌に対する雄の交尾頻度測定）が可能である。これらを用いた生化学的なア

ッセイから得られた結果は、実際の交尾行動を裏付けるものであった。²⁷⁾その後、ワムシの種分化について進化生態学の立場から検討してきたスペイン・バレンシア大学の Manuel Serra 博士との共同研究へ展開し、L, S, SS 型ワムシの遺伝的な違いをもとに、これらを別種として位置づけた。

²⁸⁾その後、欧米の研究者達が分子遺伝学的技法を適用して、ITS 1 (核リボソーム RNA のスペーサー領域) やミトコンドリア遺伝子の COI を用いた分子系統分類を行い、2015 月に開催された国際ワムシ学術シンポジウムで、シオミズツボワムシを 15 種に分類することとなった。²⁹⁾

ところで、市販の濃縮淡水クロレラを餌としてワムシを培養すると、ワムシはよく増えるが、本来交尾行動を行うはずの雄が、まった交尾をしなくなるという問題につきあたったことがある。仕方がないのでそのときは他の微細藻類を用いたが、たまたま 10 年ほどたってから疑問が解決した。クロレラにセレンを強化してワムシを培養し、それをマダイ仔魚に給餌して育てると、成長、生残、活力が上がる。³⁰⁾このとき、ついでにワムシへの餌料価値も検討したのだが、クロレラでは交尾しない筈の雄ワムシが、どんどん雌と交尾を始めたのである。³¹⁾セレンは脊椎動物の性機能を増進することが知られているが、ワムシについても然りだったのである。

また、フィールド研究を鹿児島県甕島の貝池で実施し、底泥のコアサンプルの年代測定を行うと共に、耐久卵の孵化実験を実施した。その結果、卵形成が 65 年前と判断される耐久卵から孵化が起こった。孵化したことが知られている世界最古のワムシ耐久卵である。そして、これらと当時の水中に出現していたワムシとの比較を行った結果、遺伝的な変異をほとんど起こしていないことが分かった。³²⁾地理的に大きな遺伝変異を示すワムシが、同じ場所では時間軸での遺伝的変異をほとんど示さなかったという結果は、その年の Trends in Ecology and Evolution 誌で紹介されるなど、高い関心を集めた。³³⁾

以上で述べた技法は実学にも応用でき、事業場等で培養している特定のワムシ株を遺伝学的に同定して、他株のコンタミがなかったかどうかの判定に活用できる。

ここで紹介したカルチャーコレクションには、ワムシに加え、ミジンコ類 2 種 3 株とカイアシ類 5 種が含まれている。これらは、餌料生物学のメインとも言える海産仔魚を初期飼育する際の餌料系列の検討にも役立った。例えば汽水産ミジンコの *Diaphanosoma celebensis* は、輸入資源に全面的に頼っているアルテミアの代替として使用可能であることを示した。ワムシのサイズは種や株の間で異なるが、水温、塩分、餌などの影響を受けてさらに変化し、その被甲長は 80~400 μm の範囲にわたる。サイズが異なるワムシを給餌すると、仔魚は成長に従って大きなワムシに対する選

択性が強くなり、仔魚が強い選択性を示す大きさのワムシを与えることによって、仔魚は最も良い成長を示す。これは常識として捉えられていることかもしれないが、いくつかの魚種で、どの時期にどの大きさのワムシを給餌すべきかという観点でデータを提供してきた。³⁴⁻³⁶⁾ もう一つは、仔魚が摂餌できるワムシの大きさは、仔魚の口径にもとづくが、どの大きさのワムシを選択的に摂餌するかについては魚種固有の性質があるということだった。長崎県総合水産試験場との共同研究で、ホシガレイ、ブリ、ヨシノゴチを用いた実験では、ヨシノゴチが3魚種の中で最も口径が小さかったにもかかわらず（開口時の口径；ホシガレイ 510 μ m, ブリ 280 μ m, ヨシノゴチ 260 μ m), 大きなワムシへの選択性が最も強かった。³⁷⁾

南西諸島で採集して海水に馴致した *Proales similis* というワムシは、シオミズツボワムシと同様に高密度が可能であり、体サイズが 60-80 μ m で SS 型ワムシよりさらに小さい種類である。これまで仔魚飼育が困難だったメガネモチノウオやベラ科の熱帯魚など口径の小さい仔魚の飼育に、初期餌料として効果を発揮している。³⁸⁻⁴¹⁾ ノルウェーではサケジラミの駆虫にベラ科の魚を使う試みがあるが、ここでも影の役者として活躍している。

6. ワムシの遺伝子

雄の交尾行動に影響を与えて生殖的隔離をもたらしているのは、雌ワムシが有する性フェロモンの構造の変異であるから、これに関連している遺伝子を調べることによって、本分類群の種分化のメカニズムに雄の交尾行動がどのように関わっているのか明らかになるかもしれない。

ところが、ヒトゲノムが解読された 2003 年の頃になっても、ワムシ類では分類学の分野で遺伝子を扱った例はあったが、機能性の遺伝子についての知見は皆無であった。この分野に踏み込みたいと思っていた矢先、分子生物学が専門の菅 向志郎博士（現在、長崎大学教員）が研究室のポスドクとして加わってくれた。そして、生活環に出現する全てのタイプのワムシ個体、単性生殖メスワムシ（約 3,400 個体）および雄ワムシ（約 7,800 個体）から cDNA ライブラリーを作成し、約 11,000 の遺伝子配列を解析して、世界最大規模（約 7,000 遺伝子）の EST データベースを構築することができた。^{42, 43)} 次に、15°C で培養することで両性生殖を誘導できるワムシ株を用い、サブトラクティブ cDNA ライブラリーより 768 個の遺伝子を解析し、両性生殖誘導に関連すると推定される 6 遺伝子を得た。⁴⁴⁾ 同様に、前述した耐久卵の休眠現象に関連した遺伝子や、寿命と産仔数を制御するインシュリン様シグナル伝達遺伝子、⁴⁵⁾ 個体群の増殖活性を高める作用を持つ GABA の受容体

遺伝子⁴⁶⁾など、ワムシ生活史をコントロールしているメカニズムについて、遺伝子レベルで知見が得られている。

ワムシのミトコンドリア DNA (mtDNA) についても知見がなく、過去に多数の研究者が試みたが未解明のままであった、その全塩基配列と構造決定に挑んだ。その結果、ワムシ mtDNA の遺伝子群は他の動物と同様であるものの、2つの環状構造を有し、かつそれぞれに共通な非常に長い遺伝子非コード領域を有するという皆が驚くような発見をした。動物の mtDNA は「36~37 個の遺伝子をコードする約 14~17 kbp の 1 つの環状構造の DNA」として普遍的な構造を持つとされてきた。しかし、ワムシ mtDNA は今までに報告のない特殊さで、また、この構造は、世界中に生息しているシオミズツボワムシの仲間に共通であることも確認した。⁴⁷⁾由来の異なるワムシ株の雌雄を用いて作製した交雑株をもちいて、この特殊構造の mtDNA は他の生物と同様に雌性遺伝することも明らかにしている。⁴⁸⁾

以上の研究の過程で、何回繰り返してもワムシの rRNA やゲノム DNA が断片化したものしか得られないという経験をした。これがワムシ類にとって何か意味があることなのかどうか、今後のトピックになるかもしれない。また、我々の研究グループが共同研究を行っている、韓国の李在晟博士は環境化学物質の毒性を遺伝子レベルで研究しており、各種の試験生物のゲノム解析に熱心である。ワムシ類のゲノム解析についても取組みが進んでいる。ワムシが生活史で示す諸現象のメカニズムについて、今後、遺伝子レベルでの知見が加速度的に増えていくものと思われる。

7. 種間関係

開放系で行うワムシの培養には、ワムシばかりではなく、いろいろな微小動物が出現する。いわゆるコンタミと呼ばれる現象である。そこでこれらの間の種間関係を実験生態学的に検討してみたいと思った。どのような種間関係があり、そこにどんなメカニズムがあるのか、知見は少なかった。

そこで、S型ワムシの培養に、L型ワムシ、原生動物 (*Euplotes* sp., *Vorticella* sp.), カイアシ類 (*Tigriopus japonicus*), 海産ミジンコ (*Diaphanosoma celebensis*)とアルテミア (*Artemia franciscana*)を共存させて個体数の増減を観察した。そして、これらとの種間関係は、大きく三つに分けられることが分かった。制限給餌下でS型ワムシは、L型ワムシ、海産ミジンコ、アルテミアと競争 (competition) し、それぞれを単独で培養する場合に比べ、双方の増殖が抑えられた。

Tigriops と *Vorticella* はワムシと共存したときに増殖が活発になったが、ワムシの増殖には変化がなく、片利作用の関係であることが分かった。コンタミする原生動物として *Vorticella* と共に代表格である *Euplotes* については、ワムシの増殖を抑制する片害作用がみられた。⁴⁹⁾

これらのうち、*T. japonicus* と *Euplotes* は餌として与えた *N. oculata* をほとんど利用しなかったにもかかわらず、良好な増殖を示したので、飼育槽内のワムシの排泄物や細菌を餌として積極的に利用したと推察した。原生動物の *Euplotes* については予想通りの結果であったが、*Tigriopus* とワムシの間に何が起きているのかが不明であった。幸い、私が長崎大学でお世話になった直属の上司の平山和次先生がワムシの無菌培養技法を確立していたので、その設備を用い、微細藻の *Nannochloropsis oculata* を餌料としてワムシと *T. japonicus* の無菌培養を確立できた。これにワムシの培養不調時に分離した細菌株を各々の培養に添加してみると、無菌培養下でワムシはよく増えるが、*T. japonicus* は全く増殖しないことがわかった。そしてワムシの増殖に有害な細菌の添加によってワムシの増殖は大きく抑制されたが、*T. japonicus* は細菌を餌として利用し、正常な増殖を示すことがわかった。この場合は片害作用を示したことになる。すなわち、飼育水中の細菌相によって、ワムシとコンタミ種との種間関係が変化することが分かる。⁵⁰⁾

ワムシ培養へのコンタミと言っても、コンタミする生物種によって多様な種間関係が存在する。このような培養状態にあるワムシの健康状態を診断し、問題がある場合には対策を提供することが課題となる。これについて次に述べたい。

8. ホルモンの作用

私が長崎大に職を得てから7, 8年過ぎた1990年代の後半に、新進気鋭の教員として征矢野清先生が赴任してきた。その生殖生理学の研究活動をそばで見ているうちに、ホルモンはワムシにどんな働きを与えるのだろうかと思うようになった。当時から、大きなワムシや、良い増殖を示すワムシを入手したいという種苗生産現場からの要望は強かった。また、個人としては耐久卵を量産できるようなワムシができないか興味があった。

そこで、神経伝達物質を含めた20種類のホルモンをワムシの培養に投与してみた。いわゆるバッチ培養である。そして、個体群の増殖、両性生殖の発現、および体サイズにどんな影響が現れるか調べた。ほとんどのホルモンには効果がなく、ネガティブなデータばかりたまっていく結果となったが、その中で、ブタの成長ホルモン(GH)とγ-アミノ酪酸(GABA)が無添加時

のそれぞれ 1.7 倍と 2.0 倍の増殖促進効果を示し、セロトニン (5-HT) と幼生ホルモン (JH) は両性生殖の発現頻度を増やすことを見つけた。さらに、ワムシの体サイズも少しではあるが GABA と JH によってそれぞれ 4.4% と 9.6% 大きくなった。⁵¹⁾

そのメカニズムを調べるために、それぞれの条件でワムシを 1 個体ずつ培養した。その結果、GH によるワムシ個体群増殖の促進については、生まれてから産仔を開始するまでの時間、すなわち世代時間を短縮させていることが分かった。一方、GABA と 5-HT には添加効果がみられず、実験を数回繰り返したがやはり同じ結果だった。バッチ培養での結果を再現できず、実験に間違いがあったのかもしれないと落胆した。しかし、あきらめずに考えていて気がついたことだが、そもそも、バッチ培養と個体別培養では、両者の環境が大きく異なっている。低密度で実施する個体別培養では環境は良好に保たれるが、バッチ培養ではワムシ密度の上昇につれて、餌の不足や水質の悪化がおこりがちである。これらを念頭に入れて実験を行ったところ、嬉しいことに予想が的中した。GABA と 5-HT は餌料が乏しい時や、非解離アンモニアの増加に伴う水質環境の悪化時に、増殖の促進効果や両性生殖の誘導促進の効果があったのである。GABA はワムシの産卵数を増やしていたのではなく、減るのを抑えていたのである。⁵²⁻⁵³⁾ ワムシの生化学分析を行ったところ、GABA と 5-HT はワムシ体内に元々存在していることや⁵⁴⁾、分子量 28kDa の GH 様物質も存在することも分かった。⁵⁵⁾ これらの化学物質は、高等動物のホルモンの場合とは異なり、かなり高い濃度でないと作用しなかった。したがって作用のメカニズムも根本的に異なるのだらうと思われたが、その答えはまだ得られていない。

この研究を行っていた少し後に、環境ホルモンの問題が取り上げられるようになり、私もこの研究に参加する機会を得た。研究の具体的内容については、成書⁵⁶⁻⁵⁹⁾にまとめているので、ここでの紹介は避けるが、この研究を通じて長年の疑問を一つ解決することができた。ワムシやミジンコを粗放的に屋外池で培養するときには、よく鶏糞を加えている。鶏糞が培池の中に共存する微細藻類の繁殖をサポートしていると捉えられていた。しかし、福岡県の内水面研究センターなどで市販のクロレラを用いたミジンコの高密度培養を行う場合にも鶏糞抽出液の添加はルーティンになっていたし、私の研究室で培養を行ってもその効果が確認された。鶏糞の抽出液には動物プランクトンの生殖を活発にする何かがある。しかし、それが何なのかずっとわからないままだった。しかし、答えが分かると、何ということにはなかった。天然の女性ホルモンであるエストラジオール

17βは鶏糞中にも含まれているが、これにはミジンコや *Tigriopus* などの産卵数を増やす作用があったのである。

9. 培養診断と治療

ワムシの携卵率は健康度を表す指標としてよく用いられるが、卵形成に要する時間を差し引くと、1~2日前の生理状態を反映していることになる。もっと簡便かつリアルタイムで測定する技法はないものだろうか。摂餌や遊泳などの行動特性は良い指標となる。しかし、工学研究者と共同開発した動画解析ソフトは仔魚やアルテミアの行動解析を可能にしたが、ワムシについては信頼性の高いデータを得るには不十分だった。次に、生化学的な指標となり得る、消化酵素の活性に着目した。この研究を行った1990年代半ばに、酵素との反応度に応じた蛍光を生じる基質が市販されるようになったので、早速これを用いることにした。ワムシの培養不調を起こすことが知られている飼育水の非解離アンモニア濃度と飼育水の粘度を上昇させたり、原生動物 *Euplotes* sp. を共存させたりすることにより、ワムシの生殖特性と酵素活性がどのように変化するかを調べた。まず、これらの増殖不調を起こす因子は、いずれも個別に飼育したワムシの寿命を短くすると共に、産仔数を減少させることを確認した。次に、同じ環境下で、ワムシを2時間曝した後に、エステラーゼ、グルコシダーゼ、ホスホリパーゼの蛍光性基質（各々 cFDAm, PLA2, FDGlu）を加え、ワムシの酵素活性を測定したところ、ワムシ消化管内のグルコシダーゼ活性が、ワムシの寿命、産仔数変化と極めて有意な相関を示し、ワムシの生理状態の鋭敏な指標となることを見つけた。^{60,61} この実験では、耐久卵をインキュベートし、孵化したばかりのワムシを用いた。この操作によって、質的に均一で、発達段階の揃ったワムシを実験に用いることができるからである。次に、実際に量産培養を行っている1トン水槽内のワムシに適用したところ、ワムシ密度の増減に呼応して、グルコシダーゼ、エステラーゼ、ホスホリパーゼの活性も変化し、実用的な診断技法となり得ることが示された。⁶² また、この研究技法は仔魚にも適用が可能で、酵素活性を指標としたマハタやオニオコゼの活力評価が可能であった。⁶³⁻⁶⁴

次に、不調なワムシ培養を改善できないか検討した。まず、遺伝的に異なるワムシ株の間で、非乖離アンモニアなどの培養不調をもたらす因子に対する耐性を調べたところ、株間で大きな違いがあった。従って、適株を選択することにより、培養不調を事前に防ぐことができる場合も多いと言える。次に、人為的にストレスを与え、増殖が不調になったワムシの飼育水中に、γアミノ酪酸を添加

したり、飼育水塩分を低下させたりすることによって、ワムシの個体当たりの産仔数が増大し、グルコシダーゼ活性も上昇するなど健康な状態に回復できることを示した。⁶⁵⁾ 魚介類の種苗生産では、毎年50%以上の事業場がワムシの培養不調を経験している。GABAや低塩分海水による処理は、ワムシの培養不調時の対策として活用が可能である。⁶⁶⁾ そのほか、仔魚の必須脂肪酸をワムシに強化するための二次培養時にも、ワムシのストレス軽減に対してGABA添加が役立つ。さらに、ワムシを低温で保存したり、冷蔵宅配便で移送したりする時にも、GABAは効果を発揮し、保存中の生残を高め、培養再開後の増殖を促進する。^{67,68)}

10. おわりに

本研究では、シオミズツボワムシ（以下ワムシと略す）の研究を軸に、多様な環境におかれた生活史の現象を調べることを主眼においた。そして、ワムシで得られた研究方法を、仔魚を含めた他の動物プランクトンに適用してきた。実験室内での研究活動が主体だが、野外調査も積極的に行い、本来の生活の一端を理解しようとしてきた。ワムシの両性生殖誘導と耐久卵形成については、私の研究のスタート時点からメインテーマである。基礎知見を得ると共に、これらを最大限に活用した共同研究を通じて90億個の耐久卵形成を実現した事例もある（図4）。これについては、いくつかの総説を公表しているのですが、⁶⁹⁻⁷²⁾ ここでは断片的なトピックをいくつか紹介するに留めた。

最近では、仔魚を含めた動物プランクトンの行動や種間関係に研究の重点をシフトすると共に、耐久卵の孵化率を上げる要因について、栄養や加齢、光環境の作用を検討している。⁷³⁻⁷⁷⁾ また、日本で開発され世界に普及した海産魚種苗生産技術ではあるが、餌料生物培養のコストがかかりすぎるため、東南アジアやアフリカなどの今後の世界の中心となるべき地域で普及されるに至っていないことが気になっている。低コストの安定的なワムシ培養技術を作り出すことが喫緊の課題であると考え、これについての研究も開始している。⁷⁸⁾

最後になりましたが、研究活動を通じて知り合い、昼夜を問わずお付き合い頂いた研究者の皆様、学生として共に研究に取り組んだ方々と、栄えある賞を分かち合いたいと思います。そして、多くの共同研究の機会を頂いた、旧・(社)日本栽培漁業協会、長崎県総合水産試験場、(国)水産総合研究センターの皆様、産業界に接する多くの場を御提供頂いたNPO法人アクアカルチャーネットワークの皆様に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Hagiwara A, Yamamiya N, de Araujo AB. Effect of water viscosity on the population growth of the rotifer *Brachionus plicatilis* Muller. *Hydrobiologia* 1998; **386/387**: 489-494.
- 2) Shiotani S, Hagiwara A, Sakakura Y, Chuda H. Estimation of flow in a rearing tank of marine fish larvae by simplified numerical computation - A case of two-dimensional flow. *Aquacultural Engineering* 2005; **32**: 465-481.
- 3) Sakakura Y, Shiotani S, Chuda H, Hagiwara A. Improvement of the survival in the seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, larvae by optimizing aeration and water inlet in the mass-scale rearing tank. *Fisheries Science* 2006; **72**: 939-947.
- 4) Sakakura Y, Shiotani S, Chuda H, Hagiwara A. Flow field control for larviculture of the seven-band grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Aquaculture* 2007; **268**: 209-215.
- 5) Sumida T, Kawahara H, Shiotani S, Sakakura Y, Hagiwara A. Observation of flow patterns in a model of a marine fish larvae rearing tank. *Aquacult. Engineer.* 2013; **57**: 24-31.
- 6) Hagiwara A, Hino A, Hirano R. Effects of temperature and chlorinity on resting egg formation in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1988; **54**: 569-575.
- 7) Hino A, Hirano R. Ecological studies of the mechanism of bisexual reproduction in the rotifer *Brachionus plicatilis*-II Effects of cumulative parthenogenetic generation on the frequency of bisexual reproduction. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1977; **43**: 1147-1155.
- 8) Hagiwara A, Kadota Y, Hino A. Maternal effect by stem females in *Brachionus plicatilis*: effect of starvation on mixis induction in offspring. *Hydrobiologia* 2005; **546**: 275-279.
- 9) Hagiwara A, Hamada K, Hori S, Hirayama K. Induction of monogonont rotifer (*Brachionus plicatilis*) sexual reproduction with bacterial coexistence and addition of rotifer extracts. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1994; **181**: 1-8.
- 10) Tunnacliffe A, Lapinski L. Resurrecting Van Leeuwenhoek's rotifers: reappraisal of the role of disaccharides in anhydrobiosis. *Philos Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2003; **358**: 1755-1771.
- 11) Gilbert JJ. Dormancy in rotifers. *Trans. Amer. Micros. Soc.* 1974; **93**: 490-513.
- 12) Hagiwara A, Hino A, Hirano R. Combined effects of environmental conditions on the hatching of fertilized eggs of the rotifer *Brachionus plicatilis* collected from an outdoor pond. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1985; **51**: 755-758.
- 13) Hagiwara A, Hoshi N, Kawahara F, Tominaga K, Hirayama K. Resting eggs in the rotifer *Brachionus plicatilis* development and effect of irradiation on hatching. *Hydrobiologia* 1995; **313/314**: 223-229.
- 14) Munuswamy N, Hagiwara A, Murugan G, Hirayama K, Dumont HJ. Structural differences between the resting eggs of *Brachionus plicatilis* and *Brachionus rotundiformis* (Rotifera, Brachionidae): an electron microscopic study. *Hydrobiologia* 1996; **318**: 219-223.
- 15) Kim HJ, Suga K, Kim BM, Rhee JS, Lee JS, Hagiwara A. Light-dependent transcriptional events during resting egg hatching of the rotifer *Brachionus manjavacas*. *Marine Genomics*

2015; **20**: 25-31.

- 16) Hagiwara A, Hino A. Effect of incubation and preservation on resting egg hatching and mixis in the derived clones of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia* 1989; **186/187**: 415-421.
- 17) Kim HJ, Hagiwara A. Effect of salinity during resting egg formation and hatching on descendent reproduction in the rotifer *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff. *J. Plankton Research* 2011; **33(7)**: 1033-1042.
- 18) Kotani T, Ihara K, Hagiwara A. Cross-mating of euryhaline rotifer *Brachionus plicatilis* strains as a means to develop useful strains for larval fish food. *Aquaculture* 2006; **261**: 495-500.
- 19) Suga K, Oshiyama N, Tanaka Y, Sakakura Y, Hagiwara A. Isolation of mixis-related genes from the rotifer *Brachionus plicatilis* using subtractive hybridization. *Hydrobiologia* 2010; **662**: 83-88.
- 20) 伊藤 隆. 輪虫の海水培養と保存について. 三重県立大学水産学部紀要 1960; **3**: 708-740.
- 21) 大上皓久. シオミズツボウムシの形態について. 静岡水試伊豆分場だより1976; **184**: 2-5.
- 22) Gilbert JJ. Induction and ecological significance of gigantism in the rotifer *Asplanchna sieboldi*. *Science* 1973; **181**: 63-66.
- 23) Fu Y, K Hirayama, Y Natsukari. Morphological differences between two types of the rotifer *Brachionus plicatilis* O. F. Muller. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1991a; **151**: 29-41.
- 24) Fu Y, K Hirayama, Y Natsukari. Genetic divergence between S and L type strains of the rotifer *Brachionus plicatilis* O. F. Muller. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1991b; **151**: 43-56.
- 25) Rumengan IFM, H Kayano, K Hirayama. Karyotypes of S and L type rotifers *Brachionus plicatilis* O. F. Muller. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1991; **154**: 171-176.
- 26) Hagiwara A, Kotani T, Snell TW, Assava-Aree M, Hirayama K. Morphology, reproduction and genetics of the tropical minute marine rotifer *Brachionus plicatilis* strains. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1995; **194**: 25-37.
- 27) Kotani T, Hagiwara A, Snell TW. Genetic variations among marine rotifer strains and function of mate recognition pheromone (MRP). *Hydrobiologia* 1997; **358**: 105-112.
- 28) Kotani T, Hagiwara A, Snell TW, Serra M. Euryhaline *Brachionus* strains (Rotifera) from tropical habitats: morphology and allozyme patterns. *Hydrobiologia* 2005; **546**: 161-167.
- 29) Mills SJ, Alcántara-Rodríguez A, Ciros-Pérez J, Gómez A, Hagiwara A, Galindo KH, Jersabek CD, Malekzadeh-Viayeh R, Leasi F, Lee JS, Welch DBM, Papakostas S, Riss S, Segers H, Serra M, Shiel R, Smolak R, Snell TW, Stelzer, Tang C, Wallace RL, Fontaneto D, Walsh EJ*. Fifteen species in one: deciphering the *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera, Monogononta) through DNA taxonomy. *Hydrobiologia* (in press) 2016;
- 30) Kim H, Sakakura Y, Maruyama I, Nakamura T, Takiyama K, Fujiki H, Hagiwara A. Feeding effect of selenium enriched rotifers on larval growth and development in red sea bream *Pagrus major*. *Aquaculture* 2014; **432**: 273-277.
- 31) Kim H, Nakamura K, Hagiwara A. Dietary effect of selenium-fortified *Chlorella vulgaris* on

- reproduction of *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera: Monogonta). *Int. Rev. Hydrobiol.* 2014; **99**: 161–165.
- 32) Kotani T, Ozaki M, Matsuoka K, Snell TW, Hagiwara A. Reproductive isolation among geographically and temporally isolated marine *Brachionus* strains. *Hydrobiologia* 2001; **446/447**: 283-290.
 - 33) Ricci C, Serra M, Snell T. Small, beautiful and sexy: what rotifers tell us about ecology and evolution. *Trends in Ecology and Evolution* 2000; **15**: 220-221.
 - 34) Hagiwara A, Suga K, Akazawa A, Kotani T, Sakakura Y. Development of rotifer strains with useful traits for rearing fish larvae. *Aquaculture* 2007; **268 (1-4)**: 44-52.
 - 35) 田中由香里, 阪倉良孝, 中田 久, 萩原篤志, 安元 進. 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 2005; **71**: 911-916.
 - 36) Pandey BD, Hagiwara A and Sakakura Y. Feeding behaviour, feed selectivity and growth studies of mangrove killifish, *Kryptolebias marmoratus*, larvae using various live and formulated feeds. *Env. Biol. Fish.* 2008; **82**: 365-375.
 - 37) 赤澤敦司, 阪倉良孝, 萩原篤志. サイズ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. 日本水産学会誌 2008; **74(3)**: 380-388.
 - 38) Hagiwara A, Wullur S, Marcial HS, Hirai N, Sakakura Y. Euryhaline rotifer *Proales similis* as initial live food for rearing fish with small mouth, *Aquaculture* 2014; **432**: 470-474.
 - 39) Wullur S, Sakakura Y, Hagiwara A. The minute monogonont rotifer *Proales similis* de Beauchamp: culture and feeding to small mouth marine fish larvae. *Aquaculture* 2009; **293**: 62-67.
 - 40) Wullur S, Sakakura Y, Hagiwara A. Application of the minute monogonont rotifer *Proales similis* de Beauchamp in larval rearing of seven-band grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Aquaculture* 2011; **315**: 355-360.
 - 41) 平井慈恵, 小磯雅彦, 照屋和久, 奥澤公一, 小林真人, 武部孝行, 佐藤 琢, 中村 航, 後藤敬行, 萩原篤志. メガネモチノウオ仔魚の飼育条件と微小餌料生物プロアレス *Proales similis* の餌料価値の検討. 水産技術 2012; **4(2)**: 57-64.
 - 42) Suga K, Mark Welch DB, Tanaka Y, Sakakura Y, Hagiwara A. Analysis of expressed sequence tags of the cyclically parthenogenetic rotifer *Brachionus plicatilis*. *Plos one* 2007; **8**: e671.
 - 43) Denekamp NY, Suga K, Hagiwara A, Reinhardt R, Lubzens E. A role for molecular studies in unveiling the pathways for formation of rotifer resting eggs and their survival during dormancy, *Topics in Current Genetics* 2010; **21**: 109-132.
 - 44) Suga K, Oshiyama N, Tanaka Y, Sakakura Y, Hagiwara A. Isolation of mixis-related genes from the rotifer *Brachionus plicatilis* using subtractive hybridization, *Hydrobiologia* 2011; **662**: 83-88.
 - 45) Yoshinaga T, Kaneko G, Kinoshita S, Watabe S. Insulin-like growth factor signaling pathway involved in regulating longevity of rotifers. *Hydrobiologia* 2004; **546**: 347-352.
 - 46) Marcial HS, Suga K, Kinoshita S, Kaneko G, **Hagiwara A**, Watabe S. Molecular cloning and

- localization of GABA receptor-associated protein in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Int. Rev. Hydrobiol.* 2014; **99**: 188-197.
- 47) Suga K, Mark Welch DB, Tanaka Y, Sakakura Y, Hagiwara A. Two circular chromosomes of unequal copy number make up the mitochondrial genome of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Mol. Biol. Evol.* 2008; **25**: 1129-1137.
 - 48) Suga K, Tanaka Y, Sakakura Y, Hagiwara A. Inheritance of mitochondrial DNA in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia* 2007; **593**: 167-173.
 - 49) Hagiwara A, Jung M, Sato T, Hirayama K. Interspecific interaction between marine rotifer *Brachionus plicatilis* and zooplankton species found in the rotifer mass culture tanks as contaminants. *Fisheries Science* 1995; **61**: 623-627.
 - 50) Jung MM, Hagiwara A. Effect of bacteria on interspecific relation between euryhaline rotifer *Brachionus rotundiformis* and harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus*. *Hydrobiologia* 2001; **446/447**: 123-127.
 - 51) Gallardo WG, Tomita Y, Hagiwara A, Soyano K, Snell TW. Effect of some vertebrate and invertebrate hormones on the population growth, mictic female production, and body size of the marine rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia* 1997; **358**: 113-120.
 - 52) Gallardo WG, Hagiwara A, Tomita Y, Snell TW. Effect of growth hormone and gamma-aminobutyric acid on *Brachionus plicatilis* (Rotifera) reproduction at low food or high ammonia levels. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1999; **240**: 179-191.
 - 53) Gallardo WG, Hagiwara A, Snell TW. Effect of juvenile hormone, and serotonin (5-HT) on mictic induction of the rotifer *Brachionus plicatilis* Muller. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2000; **252**: 97-1070.
 - 54) Gallardo WG, Hagiwara A, Hara K, Soyano K, Snell TW. GABA, 5-HT and other amino acids in the rotifers *Brachionus plicatilis* and *B. rotundiformis*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 2000; **127**: 301-307.
 - 55) Gallardo WG, Hagiwara A, Hara K, Soyano K. Growth hormone-like substance in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Fisheries Science* 2006; **72**: 781-786.
 - 56) 萩原篤志. 水産環境における内分泌攪乱物質 10.動物プランクトン 水産学シリーズ 126. 恒星社厚生閣, 東京, 2000; 120-129
 - 57) 萩原篤志. シオミズツボウムシの生活環に関わるホルモン. 化学と生物 2004; **42**: 591-595.
 - 58) 萩原篤志. 環境ホルモン～水産生物に対する影響実態と作用機構～動物プランクトンに対する影響と作用機構. 恒星社厚生閣 2006; 113-123.
 - 59) Dahms H, Hagiwara A, Lee JS. Ecotoxicology, ecophysiology, and mechanistic studies with rotifers. *Aquat. Toxicol.* 2011; **101(1)**: 1- 12.
 - 60) de Araujo AB, Hagiwara A, Snell TW. Effect of unionized ammonia, viscosity and protozoan contamination on reproduction and enzyme activity of the rotifer *Brachionus rotundiformis*. *Hydrobiologia* 2001; **446/447**: 363-368.
 - 61) de Araujo AB, Snell TW, Hagiwara A. Effect of unionized ammonia, viscosity and protozoan contamination on the enzyme activity of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquacult. Res.*

- 2000; **31**: 359-366.
- 62) de Araujo AB, Hagiwara A. Screening methods for improving rotifer culture quality. *Hydrobiologia* 2005; **546**: 553-558.
 - 63) Matsuo Y, Kasahara Y, Hagiwara A, Sakakura Y, Arakawa T. Evaluation of larval quality of viviparous scorpionfish *Sebastiscus marmoratus*. Evaluation of larval quality of viviparous scorpionfish *Sebastiscus marmoratus*. *Fisheries Science* 2006; **72**: 948-954.
 - 64) Ruttanapornvareesakul Y, Sakakura Y, Hagiwara A. Screening of enzyme activity for assessing the condition of larvae in the seven-band grouper *Epinephelus septemfasciatus* and devil stinger *Inimicus japonicus*. *Fisheries Science* 2010; **76**: 295-304.
 - 65) Hagiwara A, Gallardo WG, Assavaaree M, Kotani T, de Araujo AB. Live food production in Japan: recent progress and future aspects. *Aquaculture* 2001; **200**: 111-127.
 - 66) Gallardo WG, Hagiwara A, Snell TW. GABA enhances reproduction of the rotifer *Brachionus plicatilis* Muller: application to mass culture. *Aquacult. Res.* 2000; **31**: 713-718.
 - 67) Gallardo WG, Hagiwara A, Snell TW. Use of GABA to enhance rotifer reproduction in enrichment culture. *Aquacult. Res.* 2001; **32**: 243-246.
 - 68) Assavaaree, M., Hagiwara, A. Effect of gamma-aminobutyric acid and porcine growth hormone on survival of the euryhaline rotifers *Brachionus plicatilis* sp. complex preserved at low temperature. *Fisheries Science* 2011; **77**: 599-605
 - 69) Hagiwara A. Practical use of rotifer cysts. *Israel J. Aquaculture - Bamidgeh* 1994; **46**: 13-21.
 - 70) 萩原篤志. 海産ワムシの大量保存と休眠卵の利用. 栽培漁業技術開発研究 1996; **24**: 109-120.
 - 71) Hagiwara A, MD Balompapueng, N Munuswamy, K Hirayama Mass production and preservation of marine rotifer resting eggs. *Aquaculture* 1997; **155**: 223-230.
 - 72) 萩原篤志. 5章 仔魚の餌料生物としての動物プランクトン. 増補改訂版 養殖の餌と水—陰の主役たち, 杉田治男 編, 恒星社厚生閣, 東京, 2014; 75-117.
 - 73) Kim HJ, Sawada C, Hagiwara A. Behavior and reproduction of the rotifer *Brachionus plicatilis* species complex under different light wavelengths and intensities. *Int. Rev. Hydrobiol.* 2014; **99**: 151-156.
 - 74) Kim HJ, Sawada C, Rhee JS, Lee JS, Suga K, Hagiwara A. Nutritional effects on the visual system of the rotifer *Brachionus plicatilis* sensu stricto (Rotifera: Monogononta). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2014; **460**: 177-183.
 - 75) Kim HJ, Hagiwara A. Effect of female aging on the morphology and hatchability of resting eggs in the rotifer *Brachionus plicatilis* Muller. *Hydrobiologia* 2010; **662**: 107-111.
 - 76) Hagiwara A, Hino A. Feeding history and hatching of resting eggs in the marine rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1990; **56**: 1901-1907.
 - 77) Kim HJ, Hagiwara A. Effect of female aging on the morphology and hatchability of resting eggs in the rotifer *Brachionus plicatilis* Muller. *Hydrobiologia* 2010; **662**: 107-111.
 - 78) Ogello EO, Hagiwara A. Effects of chicken manure extract on the population growth, mixis induction and body size of the freshwater rotifer *Brachionus angularis* Gosse 1851. *Asian Fisheries Science*; **28**: 174-185.

図説明

図1 シオミズツボワムシの耐久卵

図2 シオミズツボワムシの3つの形態種（左からL型，S型，SS型）。バーは100 μ m

図3 シオミズツボワムシの交尾。左が雌，右が雄（写真提供：Claudia Ricci 博士と Giulio Melone 博士）

図4 50トン水槽で量産された耐久卵（左）。水槽底の白く（実際はオレンジ色）見えるのが耐久卵。右の写真は真空凍結乾燥を経て作成した耐久卵1000万入りの缶詰

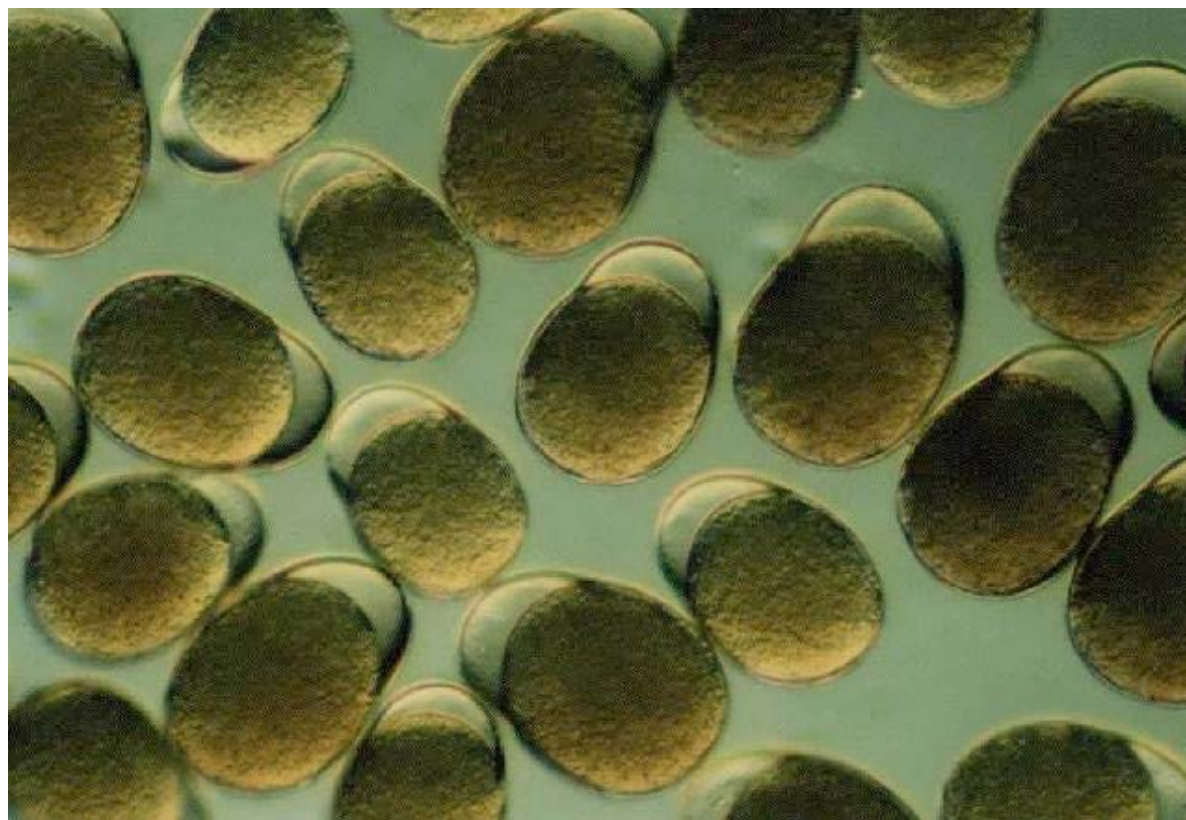


图 1

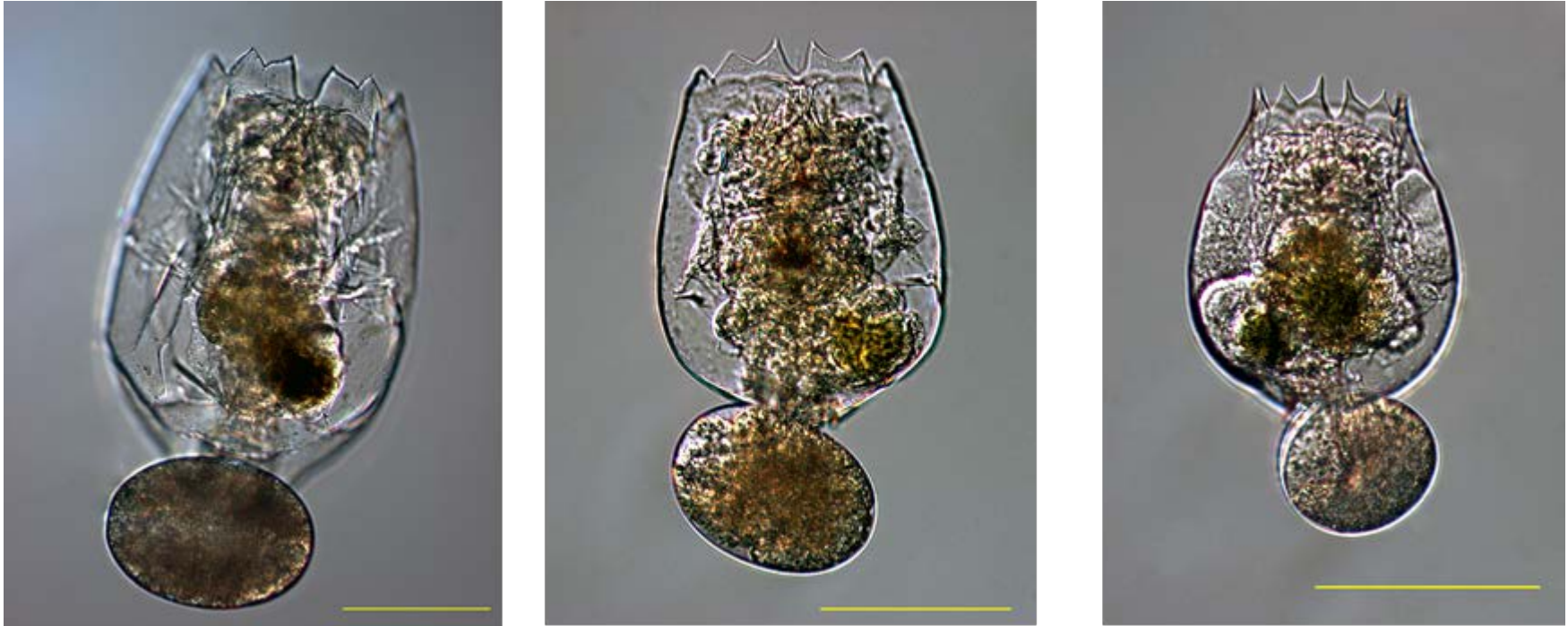


图 2

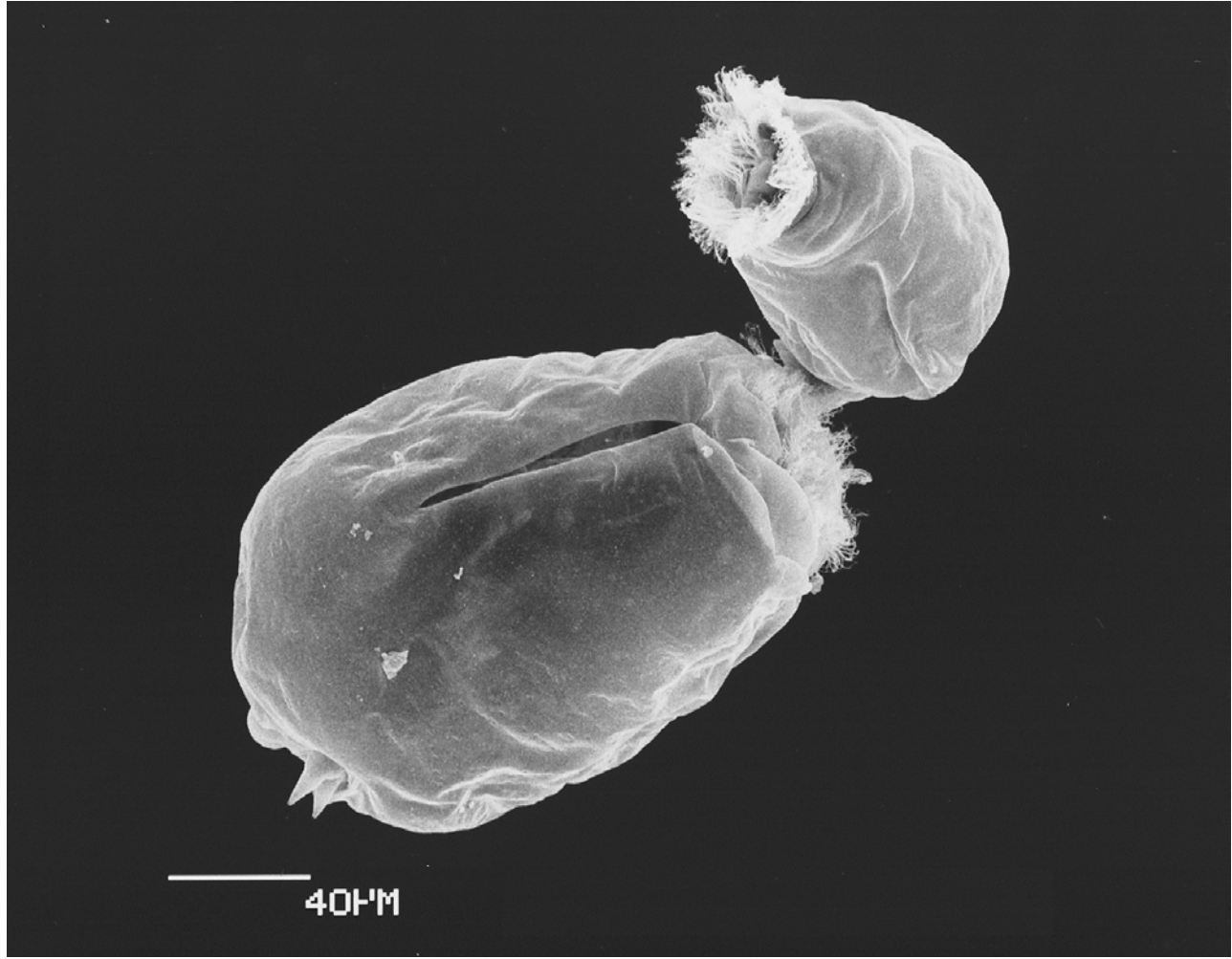


图 3



図 4