

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：12614

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850136

研究課題名(和文) 餌料用動物プランクトンの行動解析および自動飼育技術の構築に関する研究

研究課題名(英文) Studies on the behavior analysis and establishment of automatic culture technology for zooplankton used as live food

研究代表者

遠藤 雅人(Endo, Masato)

東京海洋大学・その他部局等・助教

研究者番号：80397075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：海産仔稚魚に与える初期餌料は生きた動物プランクトンに大きく依存している。本研究ではその代表であるワムシおよびその次の段階で給餌されるアルテミアの増殖・培養環境と動画解析による行動との相関関係を導き、その状態を把握する方法を確立した。また、自動培養装置に適用可能な情報を収集し、これまで人の感覚で行われてきたワムシの活力判定を映像解析により数値化することで行った。これらの取得データおよび装置の開発を基にワムシの自動培養装置の開発・運用に伴う種々の条件設定の検討を行い、2次元動画解析装置を用いたワムシ自動培養装置を開発した。さらにワムシ・アルテミアを海産仔稚魚へ給与する自動給餌装置の開発を行った。

研究成果の概要(英文)：Current live food fed to marine fish larvae and juveniles depends on cultured live zooplanktons. In this study, the correlation between growth, culture environment for rotifer and Artemia, and their swimming behaviors analyzed by a two detention motion image analysis was derived, the method to grasp their conditions were established. The vitality of rotifer that has been analyzed by human senses were digitized by the collection of image analyzed data that can be used for automatic culture system of rotifer. The automatic culture system was developed by using the two detention motion image analyzing system and consideration of various condition settings needed for their operation. Furthermore, automatic feeding system of rotifer and Artemia fed to marine fish larvae and juveniles was developed.

研究分野：水族養殖学

キーワード：増養殖 餌料生物 種苗生産 ワムシ アルテミア 行動解析 自動培養 自動給餌

1. 研究開始当初の背景

魚類仔稚魚に与える初期餌料は現在、培養された生きた動物プランクトンに大きく依存している。これまでこの餌料生物と呼ばれる仔稚魚の餌用プランクトンの生産は世代交代が速いことによる増殖制御の不安定さや雑菌混入の影響等の環境制御の難しさから人間の感覚に依存した培養が行われ、特に海産仔稚魚の餌料として必須であるシオミズツボワムシ(以下、ワムシ)の培養は「職人技」として考えられてきた。同時に培養技術を広く普及させるため、様々な研究機関でワムシの増殖に関する生理・生態学的研究や培養技術の一般化を目指した教本づくりが進められた。しかしながら、現在のワムシ培養は顕微鏡下での目視観察による個体数や携卵率の把握が行われており、給餌に関しても魚類の飼育槽中のワムシ密度を計数して不足分を補充するなど、非常に労力を要する。また、その増殖速度は定数増殖期で200%/日程度となり、給餌量やタイミング、代謝物による培養環境の変化を考慮すると人間が随時観察を行い、培養管理を行うことにも限界があると考えられる。

そこで、この動物プランクトンの培養を自動化する試みが日本やノルウェーで行われている。先駆的な研究としてはノルウェー科学技術大学のグループが行っているワムシの計数装置を用いたもので既にワムシを仔稚魚に与える給餌装置と自動で培養する装置を開発している^{①,②}。

本研究との相違点はノルウェーのグループが開発した装置では根幹となるワムシを自動で観察する部分で工学的な検出器を用い、計数のみを行うが、本研究で用いる行動解析装置では水平方向の動画を撮影し、動物プランクトンの計数に加え、遊泳速度、遊泳加速度および回転角速度を測定できる点にある。動物プランクトンの行動解析装置はこれまでの研究助成により、試作が終了している。

本研究の最終目的はこれまでの人手を要する動物プランクトン生産を自動化することにある。独創的な点としてはこの自動化に際して動物プランクトンの行動解析を取り入れることである。動物プランクトンの行動解析においては生物を用いた毒性試験での検討が進められているが、培養自体に行動解析が導入され、自動で環境制御を進めるシステムについてはこれまで例がない。本技術は培養において動物プランクトンの行動を生かした状態で瞬時にデータ化できる新しい手法であり、状態把握が重要である餌料生物培養においては非常に画期的である。さらに自動化を行うことで時間的な制約が解除され、昼夜を問わず、データの蓄積や培養管理が可能となり、変動しやすい培養環境の安定化やそれに対応する動物プランクトンの増殖率の安定化が可能となる。また、数分間隔で得られる培養データの可視化により、高

増殖、高効率の培養法の確立が可能となる。また、環境変化と動物プランクトンの遊泳行動を比較することでその関連性についての新知見が得られる可能性もある。本装置を応用していくことでこれまで培養がほぼ不可能であったカイアシ類等の天然動物プランクトンを培養できる可能性も期待できる。培養可能な動物プランクトン種の幅が広がることにより、これまで種苗の大量生産ができなかった魚種への有益な餌料供給、あるいは海洋生物学や浮遊生物学分野での特定の種における生理・生態の研究にも貢献できる可能性を秘めている。

2. 研究の目的

本研究はワムシおよびその次の段階で給餌されるアルテミアの増殖・培養環境と動画解析による行動との相関関係を導き、その状態を瞬時に把握できる方法を確立し、自動培養装置に適用可能な情報を収集、すなわち、これまで人の感覚のみで行われてきたワムシの活力判定を映像解析により数値化を行うことでの確かな培養条件の維持、管理につなげる。動物プランクトンの培養状況を自動で的確に判断できれば、自動給餌装置において動物プランクトン培養槽は基より、魚類仔稚魚の飼育槽に給餌された後の動物プランクトンの状態をも把握して、種苗生産に活かす技術が構築できる。そこで本研究ではワムシの自動培養装置の開発に伴う種々の条件設定の検討および2次元動画解析装置を用いたワムシ、アルテミアを海産仔稚魚へ給与する自動給餌装置の開発を行った。

3. 研究の方法

(1) 2次元動画解析装置を用いたワムシの行動解析と環境因子との関連性

実験生物にはS型ワムシ八重山株 *Brachionus rotundiformis* を使用した。培養水量は80L、初期接種密度は100個体/ml、培養条件は水温28°C、塩分20psuとした。餌料は淡水クロレラを使用し、1日2回、 3.3×10^4 cell/個体・日の割合で給餌した。通気は無調整空気をエアストーンで個体数に応じて5~10L/minの範囲で調整した。培養は植え継ぎ培養法で、12日間の試験を2反復で行った。また、同様の条件で残存密度1,000個体/mLとなるように換水とワムシ回収を行う間引き培養で比較を行った。

培養環境は、溶存酸素(DO)、pH、アンモニアをそれぞれ毎日測定した。ワムシの行動は、動画撮影により行った。チャンバー(厚さ:1.5mm)に收容したワムシをCCDカメラにより上部から水平方向映像を撮影し、その動画より計測対象であるワムシを抽出するため、運動性のない物体の除去等の画像加工を施し、個体数、速度、加速度(絶対値)、進行方向角度を測定した。また、画像解析による自動計数の他にルゴール液で固定したワムシを顕微鏡下で計数した。

(2) ワムシ自動培養装置の開発

2次元動画解析による計数データから個体密度に対応した換水および給餌を自動的に行うワムシ培養装置を設計・開発し、ワムシの間引き培養を行い、装置の有用性を検討した。

実験には S 型ワムシ八重山株 *B. rotundiformis* を用い、14 日間の培養を 2 回行った。培養条件は培養水量 80L、水温 28°C、塩分 20psu、初期接種密度は 100 個体/mL、通気量は 5L/min とした。ワムシを撮影用チャンバーに導入し、CCD カメラにより撮影した後、動画解析を 3 時間毎に行って個体数データを取得した。換水は培養槽内に水位センサーを設置し、排水量および注水量を制御して行った。個体数データを基に毎日定時に培養槽内の個体密度が 1,000 個体/mL となるように換水を行った。なお、1,000 個体/mL 以下の場合には換水を行わない設定とした。給餌は濃縮淡水クロレラを 1 日 2 回、 3.3×10^4 cell/個体・日の割合で給餌する設定とし、チューブポンプにより培養槽に自動投入した。比較のため、実体顕微鏡下でワムシを 1 回/日で手動計数した。

(3) ワムシ自動培養時の培養条件の検討

① 給餌回数と高濃度酸素が及ぼす増殖への影響

2次元動画解析を取り入れたワムシの自動培養装置における給餌回数と溶存酸素の影響について調査した。給餌条件 2 種(2 回または 6 回/日)および通気条件 2 種(無調整空気または高濃度酸素)を組み合わせた計 4 種の試験区を設定して実験を行った。供試生物には S 型ワムシ *B. rotundiformis* を使用した。培養水量は 80L とし、培養水には 20psu の人工海水を使用し、水温 28°C、pH7.0 に調整した。培養期間は各試験区 10 日間とした。培養期間を通じて濃縮淡水クロレラを 3.3×10^4 cell/ind./day となるように自動給餌を行った。実験は 100ind./ml から開始し、1,000 ind./ml を超えた時点で残存するワムシが 1,000 ind./ml 前後となるように換水を行い、それに伴って排水された培養水中のワムシを収穫した。

② 低 pH と残存個体密度の影響

①の通常自動運転条件(空気通気、2 回/日給餌)下で pH 上昇を抑えるために 1 日 2 回飼育槽の pH が 6.0 となるように塩酸を用いて調整を行い、培養試験を行った。なお、この pH 制御はワムシに対して毒性のある非解離アンモニアの濃度を低濃度に抑え、増殖阻害を防止するための処理である。生産性を向上させるため、1,500 および 2,000 個体/mL を残存させる条件で間引き培養を行った。

(4) ワムシ・アルテミア自動給餌機の開発

一般的な海産魚における孵化直後からの餌料系列はワムシからアルテミア、アルテミ

アから配合飼料へと移行していく。移行する際には次の餌・飼料への馴致を目的として移行期間中に移行前後の餌・飼料を併用する。

本研究で開発するワムシ・アルテミア自動給餌機の特徴は 2次元動画解析により海産仔稚魚の飼育槽における餌料生物個体数や行動を把握し、飼育槽中の餌料密度を一定に保つよう制御することである。そこで 2次元動画解析によるワムシおよびアルテミアの個体識別を大きさで行うとともに個体数および行動が把握できる装置の開発を行った。さらに個体数に応じてそれぞれの餌料培養槽(栄養強化を施した後の餌料生物を収容する水槽)からポンプを用いて餌料を濃縮して供給するシステムの構築を行った。

4. 研究成果

(1) 2次元動画解析装置を用いたワムシの行動解析と環境因子との関連性

植え継ぎ培養において培養期間中の動画解析により計測した個体密度は培養 12 日目に培養槽 A では 2,068 個体/mL、培養槽 B は 3,224 個体/mL となり、その後速やかに減少した。手動計数との誤差は定数増殖期で 10.4% であり、停滞期以降は 22.1% と増加した。また、DO は個体数の増加に伴って低下したが、3mg/L 以上を推移した。pH は培養 12 日目より上昇がみられ、非解離アンモニア濃度は培養 12 日目より急激に増加し 10mgNH₃-N/L を上回った。ワムシの速度は培養の経過に伴い低下し、培養 12 日目には培養初日の 1/2 まで低下した。回転角速度、加速度(絶対値)も速

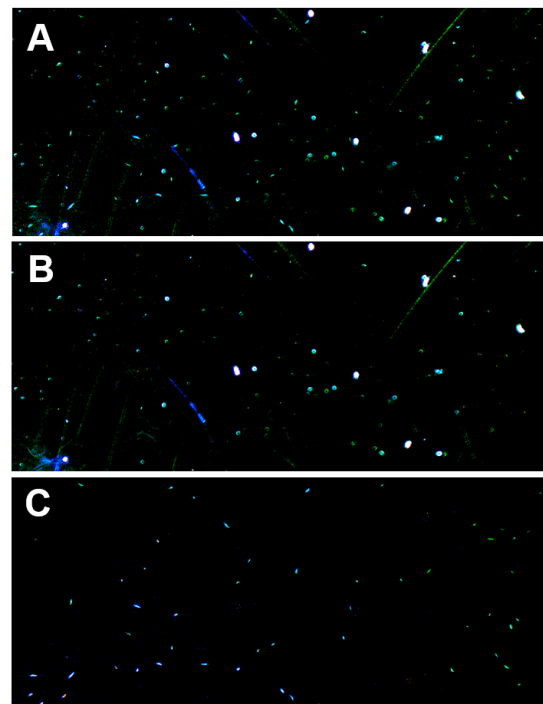


図 1 映像処理の一例 A: 撮影画像(元の画像)、B: 背景画像(静止物体のみを抽出)、C: 処理画像(運動物体:ワムシのみを抽出)

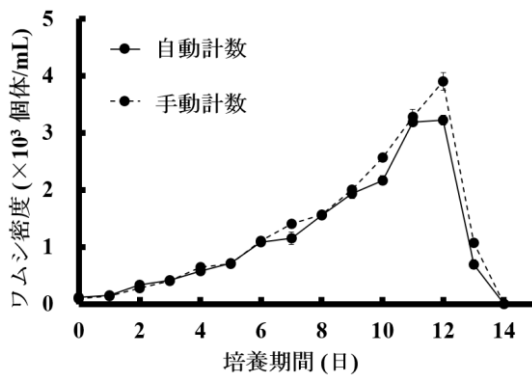


図2 植え継培養時におけるワムシの手動計数と自動計数の経時的变化(B水槽)

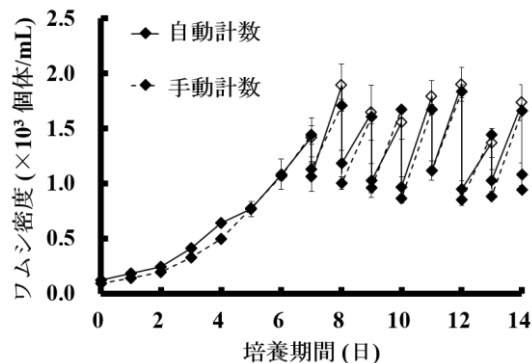


図3 間引き培養時におけるワムシの手動計数と自動計数の経時的变化(A水槽)

度と同様に低下がみられた。さらに、非解離アンモニアと速度、日間増殖率と速度の間に強い相関が認められた。間引き培養では培養期間中の動画解析により計測した個体密度は、培養槽Aでは培養7日目に1,442個体/ml、培養槽Bは培養6日目に1,224個体/mlに達し、それぞれ換水を開始した。換水は個体密度が1000個体/mlになるように12.5~50.0%の間で行った。手動計数との誤差は間引き開始前までは17.0%であったが、間引き期間では8.0%と誤差が減少した。

また、DOは個体数の増加に伴って低下したが、6mg/L以上を推移した。pHは7.8付近を推移し、非解離アンモニア濃度は徐々に増加し、培養7日目に1.2mgNH₃-N/Lに達し、その後低下した。ワムシの速度は培養6日目まで低下し、培養7日目から徐々に上昇した。さらに、換水を行った培養後半の速度と日間増殖率の間に強い相関が認められた。

以上の結果から、動画解析により遊泳するワムシの自動計数が可能であることが示され、定数増殖期では手動計数との誤差は10%程度であり、十分に自動飼育時の数値として利用できることが示唆された。さらに培養環境に応じてワムシの行動が変化することが明らかとなった。また、植え継ぎ培養と間引き培養のワムシの行動を比較した結果、ワムシの遊泳速度を指標に増殖率の推定が可能であることが示唆された。

(2) ワムシ自動培養装置の開発

自動培養装置は培養期間中、ほぼ正常に動作した。自動計数と手動計数の差は、 $0.6 \pm 8.2\%$ および $0.3 \pm 5.2\%$ となった。また、ワムシの回収は1回目の培養で7回、2回目の培養で10回行うことができた。回収量はそれぞれ 4.03×10^8 個体(湿重量 647g)および 4.92×10^8 個体(湿重量 789g)となった。同様の条件で行った手作業によるワムシの間引き培養では、ワムシの回収量は 3.78×10^8 個体(湿重量 609g)であった。

以上の結果から、動画解析による計数データを利用した換水および給餌を機械的に制御するワムシ自動培養装置が安定的に動作し、従来の手動による間引き培養と同等のワムシを回収できることが明らかとなった。

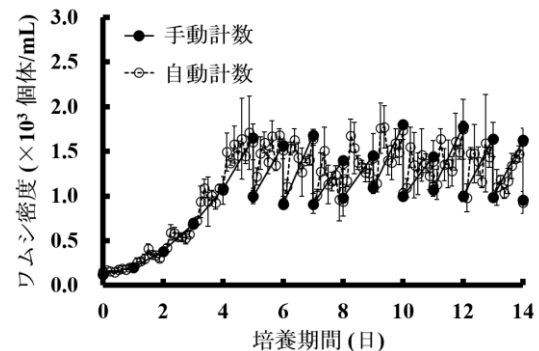


図4 ワムシ自動培養装置による間引き培養時におけるワムシの手動計数と自動計数の経時的变化(2回目)

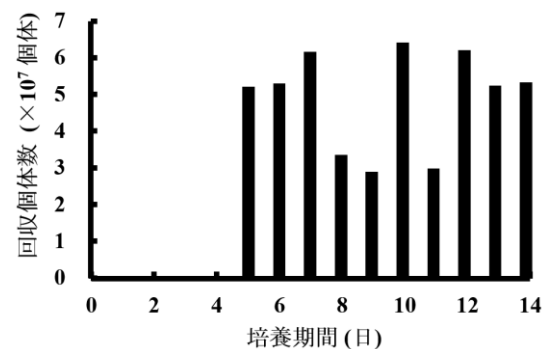


図5 ワムシ自動培養装置による間引き培養時におけるワムシの回収個体数の経時的变化(2回目)

(3) ワムシ自動培養時の培養条件の検討

① 給餌回数と高濃度酸素が及ぼす増殖への影響

全ての試験区で収穫開始以前よりも収穫開始後の比増殖率が高いという結果になった。収穫前の比増殖率を給餌条件間で比較すると、どちらの通気条件でも、2回/日給餌が高い値を示した。一方、同給餌回数条件の試験区で比較した場合、空気区が酸素区よりも高い比増殖率を示した。収穫開始後では、同給餌回数の試験区で比較した場合、収穫開始以前と同様、空気区が酸素区よりも高い比増殖率を示した。

殖率を示す結果となった。このことから、給餌回数の増加と高濃度酸素供給の影響は見られなかった。この原因としてクロレラ給餌密度が6回/日の給餌時に最適給餌密度以下であったこと、および間引き密度の設定が低すぎたことが挙げられる。ワムシ収穫量については無調整空気を通気した試験区では2回/日給餌の試験区が多く収穫されたが、高濃度酸素を通気した試験区では6回/日給餌の試験区が多く収穫された。

表1 ワムシ自動培養装置による間引き培養時の給餌回数と酸素供給が比増殖率および携卵率に及ぼす影響

比増殖率	収穫前	2回給餌・ 空気区	6回給餌・ 空気区	2回給餌・ 酸素区	6回給餌・ 酸素区
		0.48	0.45	0.40	0.37
収穫後	0.54	0.51	0.43	0.50	
携卵率 (%)	収穫前	15.6	19.6	12.7	22.8
		22.3	25.5	18.2	26.2

表2 ワムシ自動培養装置による間引き培養時の給餌回数と酸素供給がワムシ回収率に及ぼす影響

乾重量 (g)	2回給餌・ 空気区	6回給餌・ 空気区	2回給餌・ 酸素区	6回給餌・ 酸素区
	15.1	11.3	8.6	10.6
湿重量 (g)	345	258	242	262
	28.0	20.6	17.1	19.9

② 低 pH と残存個体密度の影響

1,500 個体/mL を残存させる条件での培養実験では培養2日目から、2,000 個体/mL を残存させる条件での培養実験では3日目から収穫(換水)が開始され、それぞれ 44.64×10^7 個体、 51.17×10^7 個体が収穫された。また、比増殖率は 1,500 個体/mL 残存時には 0.53 ± 0.00 (収穫前)、 0.53 ± 0.19 (収穫開始後)、2,000 個体残存/mL 時には 0.59 ± 0.17 (収穫前)、 0.51 ± 0.21 (収穫開始後) となった。非解離アンモニア濃度は 2,000 個体/mL 時の方が高かったが、1,500 個体/mL 時よりも収穫された総個体数が多く、比増殖率も高い傾向を示した。非解離アンモニアについては両条件下で増殖阻害の起こる濃度 2.1 mg/L 以下に濃度を抑えることができた。これらの結果から、1,500 個体/mL と 2,000 個体/mL を残存させる条件の比較では 2,000 個体/mL 残存の方が 1,500 個体/mL 残存よりも生産性が高いことが示された。また、両条件下においては pH の制御によって非解離アンモニア濃度の影響は少なかったと考えられた。

(4) ワムシ・アルテミア自動給餌機の開発 ワムシ・アルテミアを自動で給餌する装

置を開発した。まず、ワムシ・アルテミアを計測するソフトウェアの開発を行った。CCD カメラで取得した1秒間の映像から0.1秒/コマで画像を作成し、背景差分除去により運動物体のみの抽出を行う設定とし、2値化処理を行った後、ワムシおよびアルテミアを面積で判別する機構を組み込んだ。この機構が正常に動作するか確認するため、画面上のワムシおよびアルテミアの目視計測と自動計測についてそれぞれ行い、その差違について調査した。撮影範囲は $20 \times 15 \text{ mm}$ とし、撮影チャンバーの深さは 2 mm とした。ワムシおよびアルテミアのそれぞれの密度は約 50 個体/mL および 10 個体/mL として計測を行った。計測の結果、ワムシ、アルテミアの計数誤差はワムシ単独計測時で 15.8%、アルテミア単独計測時で 6.3% であった。ワムシおよびアルテミアを混合した際のそれぞれの誤差は 19.7% および 12.9% となった。本結果を踏まえて今後、撮影時間で精度が異なる背景差分の検討やそれぞれの撮影生物の認識面積の詳細検討を行うことで誤差を最小限にする必要である。

また、計測した密度計数データから仔稚魚の飼育槽中の餌料密度を維持するための餌料濃縮供給装置については開発が終了し、動作の確認も終了している。ワムシ・アルテミアの計数機構の精度に問題があることから

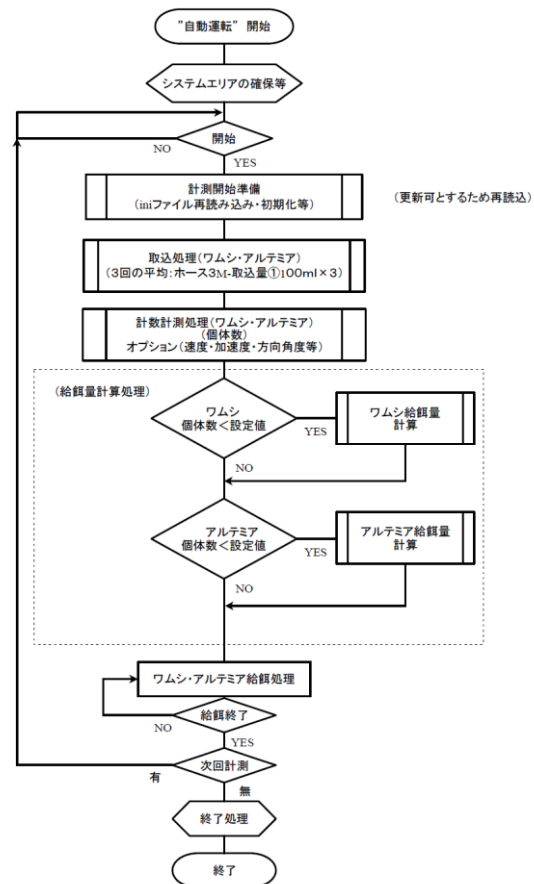


図6 ワムシ・アルテミア自動給餌装置の自動運転時の動作フロー

今後その精度を向上させた後、未達である海産仔稚魚の自動給餌実験を行う予定である。

<引用文献>

- ① Alver, M. O., Tennøy, T., Alfredsen, J. A., Øie, G., Olsen, Y., Automatic control of rotifer density in larval first feeding tanks. *Control Engineering Practice* 16, 2008, 347-355.
- ② Alver, M. O., Alfredsen, J. A., Øie, G., Storøy, W., Olsen, Y., Automatic control of growth and density in rotifer cultures. *Aquacultural Engineering* 43, 2010, 6-13.
- ③ Yu, J.-P. and Hirayama, K., The effect of un-ionized ammonia on the population growth of the rotifer in mass culture. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 52, 1986, 1509-1513.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① 遠藤雅人, 竹内俊郎, 閉鎖系における魚類の生産と微小重力影響, *Int. J. Microgravity Sci. Appl.* 査読無, 30(2), 2013, 111-119.

[学会発表] (計 1 件)

- ① 田中侑希、遠藤雅人、吉澤聡、竹内俊郎. シオミズツボワムシの自動培養時における給餌回数と溶存酸素が増殖率に及ぼす影響, 2015 生態工学会, 年次大会, 明治大学黒川農場, 神奈川. 平成 27 年 6 月 28 日.

[図書] (計 1 件)

- ① 遠藤雅人他, (株)アドスリー, 閉鎖生態系・生態工学ハンドブック(生態工学会出版企画委員会編), 2015, 448.

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

東京海洋大学水族養殖学研究室ホームページ

日本語

<http://www.s.kaiyodai.ac.jp/seibutsuHP/laboratory/seisan/2-4.html>

英語

<http://www.s.kaiyodai.ac.jp/seibutsuHP/english/laboratory/seisan/2-4.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 雅人 (ENDO, Masato)

東京海洋大学・学術研究院

海洋生物資源学部門・助教

研究者番号: 80397075