

カキ幼生計数法の簡便化— 沈降法による大きさ区分

猪子嘉生・中峠由紀

福山大学内海生物資源研究所

Simplification of the Method Counting the Larval Oyster, Crassostrea gigas;

Classification of Shell Height by the Sedimentation Method.

Yoshio Inoko and Yuki Nakatao

(Research Institute of Marine Bioresources, Fukuyama University, Ohama-cho, Inno-shima, Hiroshima 722-21, Japan)

Report Res. Inst. Marine Bioresources, Fukuyama Univ., No.5, 37-47 (1994).

The cell sizes of oyster larvae (Crassostrea gigas) collected from sea were fractionated by sedimentation through a glass tube filled with formalin / sea water. The larvae were sedimented at rates of 0.2-1.2 cm/sec according to the Stokes' formula. A buret with 80 cm length (50 ml) was not sufficient to fractionate a mixture of the larvae with 90-300 μ m shell height because of a shortage of sedimentation distance, but a glass tube with 130 cm length was satisfactory. A problem of this fractionation method seems to be that some fractions were contaminated with the larvae with different size. The reason is probably that some larvae with the same size have different cell density, giving different sedimentation velocity.

ま え が き

年生産量 2万 5千t、年生産金額 200億円を誇る広島特産のカキ養殖は採苗に始まる。産卵期は 7~9 月の 3か月間、総産卵数は 10^{16} の大量に上るが、発生が進むにつれ幼生数は幾何級数的に減

耗し、付着期幼生まで生残するものは極く限られた数になる。そのため広島市と広島県は多大の施設・設備・労力・経費・技術を費やし、幼生調査を実施し、幼生の成育・生残状況把握に努めている。

幼生調査は、産卵期間中広島湾奥部の数十か所でプランクトン幼生を採集し、約 0.1~0.3 mmの幼生を30μm 毎に区分・計数するもので、すべて熟練者の手作業である。顕微鏡下で瞬時に大きさを肉眼判定するとともに、計数する。従って、労力上の制約から検体数が限られ、調査精度向上のうえで大きな難点をとまなっている¹⁻³⁾。

本研究は、計数法簡便化の方法を探ろうとして、沈降法による大きさ区分の可能性を試みたものである。種々の条件下で沈降実験を行い、画分ごとの大きさの差・バラツキ等を測定し、分離の状況・成否等を検討した。若干の知見を得たので報告する。

ストークスの法則と理論的沈降速度

(1) ストークスの法則

流体中における剛体粒子の沈降速度に関しストークスの法則がある。ただし、流体は非圧縮性流体で、剛体の沈降速度は遅い条件下とされる。

粘性率 η の流体のなかを半径 a の球が速度 V で動くとき、球には

$$D = 6\pi\eta a V$$

の抵抗が働く。

ストークスが、「ストークス近似」によりこれを理論的に導いた。

すなわち、ナビエストークスの方程式

$$\frac{D\mathbf{v}}{Dt} = \mathbf{K} - \frac{1}{\rho} \text{grad } p + \frac{1}{\rho} \eta \cdot \Delta \mathbf{v}$$

ここで

$\mathbf{v}(u, v, w)$: 速度
\mathbf{K}	: 単位質量に働く力
ρ	: 流体密度
p	: 圧力
η	: 粘性率

において加速度を次の近似でおきかえる。

$$\frac{D\mathbf{v}}{Dt} = \frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} + u \frac{\partial \mathbf{v}}{\partial x} + v \frac{\partial \mathbf{v}}{\partial y} + w \frac{\partial \mathbf{v}}{\partial z} = \frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t}$$

この近似は粘性力に対し慣性力を無視することに相当し、レイノルズ数

$$Re = \rho a V / \eta$$

の小さい（大体 1以下）運動の場合により近似を与える^{4,5)}。

以上は物理分野への解説で、一般には次の説明が分かり易い。

水中における球の沈降運動を考えると、球には次の 3種の力が加わる。

$$\text{重力による下向きの力 } A = (4/3 \cdot \pi a^3) \rho_1 \cdot g$$

$$\text{浮力による上向きの力 } B = (4/3 \cdot \pi a^3) \rho_2 \cdot g$$

$$\text{上向きに働く抵抗力 } C = 6 \pi \eta a V$$

$$A = B + C$$

式を整理すると、次式（ストークスの式）がえられる。

$$V = 2 g \cdot a^2 (\rho_1 - \rho_2) / 9 \eta \quad \dots\dots (a)$$

$$V = g \cdot d^2 (\rho_1 - \rho_2) / 18 \eta \quad \dots\dots (b)$$

ここで

V : 剛体粒子の沈降速度

ρ_1 : 剛体密度

ρ_2 : 液体密度

g : 重力の加速度

a : 剛体粒子の半径

d : 剛体粒子の直径

η : 流体の粘性率

上式は次のようにも書ける。

$$\text{沈降速度} \quad \propto \text{半径の自乗} \quad / \text{剛体液体密度差}$$

$$\text{沈降距離} / \text{沈降時間} \quad \propto \text{半径の自乗} \quad / \text{剛体液体密度差}$$

$$1 / \text{沈降時間} \quad \propto \text{半径の自乗} \quad / \text{液体の粘性率}$$

$$\text{沈降時間} \quad \propto \text{液体の粘性率} / \text{半径の自乗}$$

剛体粒子の沈降速度が流体の粘性率に反比例することは、常識的にも推測される。しかし、半径の自乗に比例する点は、単に沈降剛体の断面積に比例した抵抗力が働くというものではない。いずれにしても、カキ幼生は殻高（殻長、殻幅等）の自乗に比例した速度で沈降することが期待できる。

(2) 理論的沈降速度

計算に先立ちディメンジョンをみておく。

A式において

左辺は

$$V = \text{cm} \cdot \text{sec}^{-1}$$

右辺は

$$\text{分子} \quad g \cdot a^2 (\rho_1 - \rho_2)$$

$$\begin{aligned}
&= \text{dyn} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{g} \cdot \text{cm}^{-3} \\
&= \text{g} \cdot \text{dyn} \cdot \text{cm}^{-1} \\
\text{分母 } \eta &= \text{g} \cdot \text{dyn} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{sec} \text{ (poise, ポアズ)} \\
\text{右辺} &= \text{cm} \cdot \text{sec}^{-1}
\end{aligned}$$

当然ながら、両辺ともに等しい。

それぞれ要素に数値を代入すると

$$\begin{aligned}
a &= 200 && (\mu\text{m}) \\
&= 2.0 \times 10^2 \times 10^{-6} \times 10^2 \\
&= 2.0 \times 10^{-2} && (\text{cm}) \\
\rho_1 &= 1.20 && *1 \\
\rho_2 &= 1.025 && *2 \\
g &= 980 \\
\eta &= 9.0 \times 10^{-3} \\
V &= 980 \times 2 \times 2 \times 10^2 \times 10^{-4} \times 0.175 \\
&\quad / (9 \times 9 \times 10^{-3}) \\
&= 980 \times 2 \times 4 \times 0.175 \times 10^{-4} \\
&\quad / 81 \times 10^{-3} \\
&= 1.69 && (\text{cm} \cdot \text{sec}^{-1})
\end{aligned}$$

200 μm の中型幼生で秒速 1-2 cm 程度であることが示される。もちろん殻高の自乗に比例し、大型幼生は速く、小型幼生は遅く沈降することが予測される。

- *1 10, 20, 30, 40, 50 % シヨ糖液を調整、浮遊法で密度測定をした。40, 50%液でもしばらくの間浮遊し、以後沈降した。これは、初めに幼生の体内水が脱水され、密度が高まって、次に沈降した結果と考える。正確な測定はできなかったが、カキ幼生の密度は極めて高く、1.2 ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)あるいはそれ以上と推定される。
- *2 通常沿岸海水の密度を採った。

材料及び方法

1 カキ幼生材料

実験に用いたカキ幼生材料はすべて、1994年広島湾で実施されたカキ採苗調査（幼生調査）試料を譲り受けたものである。産卵期間中、 $x \times 16$ ネット地で作成したプランクトンネットを垂直 5m 引きし、200 L の海水をろ過して、定量的に採集し、直ちに1-3% (V/V) のホルマリンを注加・固定し、検鏡に供される。時期・場所により採集量に大差があるので、十分な幼生試料が確保されるよ

あらかじめ沈降によって3大別(大中小)したものを、それぞれ沈降させ、沈降後時間を計測するとともに、沈降後の一部標本を抽出して殻高測定を行った。

平均殻高 $204\mu\text{m}$ の大型幼生が100秒(トップグループの沈降時間)以下と最も大きな沈降速度を示し、 $182\mu\text{m}$ の中型幼生が100秒余とこれに順じ、 $122\mu\text{m}$ の小型幼生が200秒弱と最も長時間を要した(Fig. 1-1)。ただし、各群ともかなりの殻高差があり、群内最小型幼生が沈降を終了するまでの時間は相当の範囲にわたった。

粘性率の高い10, 20, 30%シヨ糖液では、同じ殻高組成のものを比較するため、同一幼生試料を繰り返し用いた。沈降時間はそれぞれホルマリン海水の100秒弱に対し約100, 170, 330秒と沈降時間の増大、速度の低下があった(Fig. 1-2)。

以上理論が示すとおり、幼生の沈降速度は殻高には比例的に、粘性率には反比例的に変化することが確認できた。しかし、カキ幼生は球形ではないこと、幼生密度に相当大きな個体差があることから、種々理論値と異なる点も示された。

2 ビュレット及びガラス管による沈降

最大殻高 $270\mu\text{m}$ の幼生は97秒で沈降排出し始め、以後は 2^2 , 3^2 , 4^2 ... の時間差で、最大320秒後まで15分面を取った。分面番号の順に殻高範囲と平均殻高が小型へ移行し、望ましい殻高区分が示された。そして、分面番号7番、沈降時間にして146-160秒で $90\mu\text{m}$ 以下の最小型幼生が卓越する分面となった。以後の分面はすべて最小型幼生が卓越するが、同じ小型幼生でも沈降速度が大きく異なるものがあることが分った。これは幼生の活力差を示すものかもしれない。今後の興味ある課題である(Fig. 2A)。

第7分面で最小型になったことは、全殻高範囲($330\mu\text{m}$ 以下から $90\mu\text{m}$ 以下まで)を9区分するには沈降距離が不足するといえる。また、コック周辺に滞留するものがあって、それが終了時集中して排出される難点もあった。それらの点を改良する目的で、沈降距離が長く、コックのないガラス管を用いた実験を次に行った(Fig. 2B)。

沈降距離を1.3mにとり、分面数及び時間差はビュレットと同じとした。幼生試料はビュレットの実験と同じものを持ちいた。沈降距離を延長したことにより $90\mu\text{m}$ の最小型幼生が卓越する分面番号は11~12番以降と、出現幼生の殻高範囲が必要な分面数に細分化できた。1~11番まで順次平均殻高は大きいものから順次小さいものへ移行し、ほぼ望ましい区分結果が得られた。次に、沈降管の項で述べたとおり沈降実験操作上の便から一、二の改良をした沈降管での結果を述べる

3 改良ガラス管による沈降

最大殻高 $270\mu\text{m}$ 以上の大型幼生が約97秒後に沈降し始め、続く16秒間に殻高範囲 $300\sim 210\mu\text{m}$ 、平均殻高 $260\mu\text{m}$ の幼生が分面番号1として沈降した。さらに20秒、28秒、36秒... 間の分面2~6では殻高範囲が半分ずつ重複しながら順次小さい側へ移行し、それにつれ平均殻高も順次小さくなった。すなわち、沈降する幼生は順次大型幼生から中型幼生、中型幼生から小型幼生へ変化し

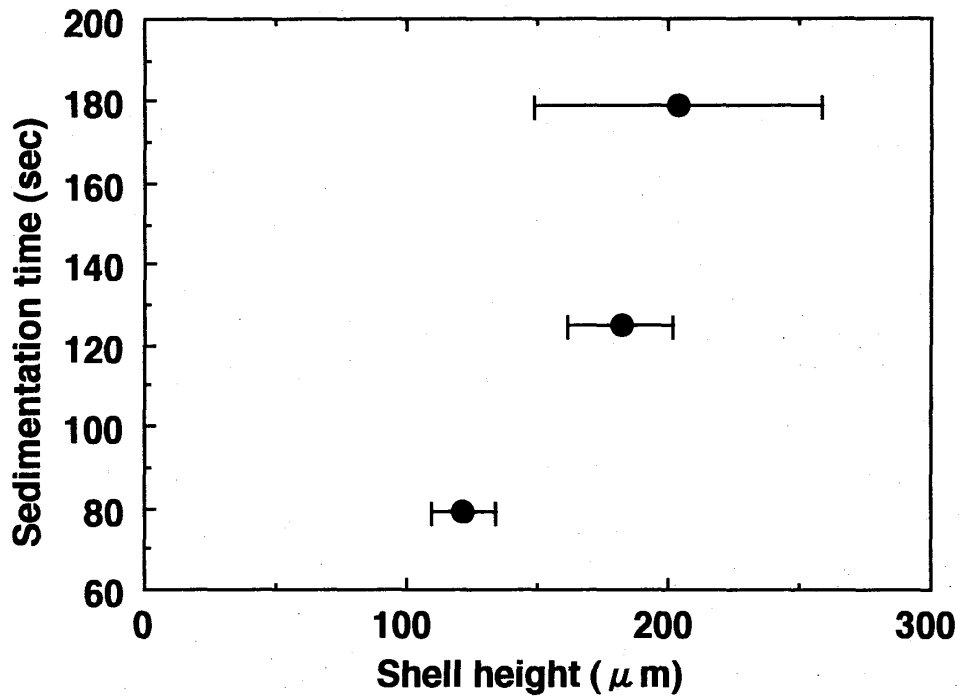


Fig. 1-1 Relationship of shell height and sedimentation time in oyster larvae.

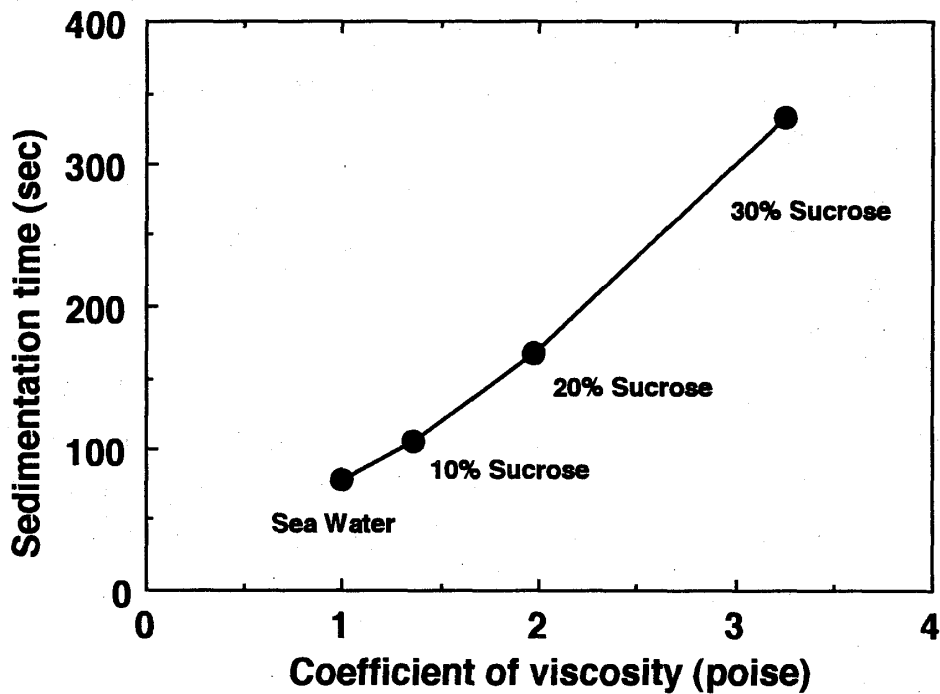


Fig. 1-2 Relationship of coefficient of viscosity and sedimentation time in oyster larvae.

う大量出現標本を数本以上合わせて、実験に用いた。

2 基本流体

基本流体（液体）はホルマリン海水とした。当初は洗浄等に自然海水を用いたため、しだいにホルマリン濃度が希釈され、幼生の腐敗が起り始めたので、以後は洗浄液にもホルマリン海水を使用し、ホルマリン濃度の希釈に注意した。

粘性率の高い流体としては 10, 20, 30 % ショ糖液を用いた。ただし、短時間内にも幼生の脱水が推察されたので、以後の実験はホルマリン海水だけとした。

3 沈降管

沈降管には 50 ml ビュレット、ガラス管、及び改良ガラス管の 3 種を用いた。ガラス管は内径 20 mm、長さ 130 cm で、下方先端をビュレットと同形に絞ったものである。ただし、素人加工のガラス管は滑らかな形状にならなかったため、改良ガラス管は、委託加工で滑らかな形状にするとともに、40 cm 長の連結型とした。なお、連結にはテフロン栓を用い、気密を保持した。

4 沈降実験

沈降実験では、どの沈降管の場合も上部に約 1-2 cm を残して基本流体を満たし、駒込めピペットで上部にカキ幼生試料を注入し、沈降後下部先端から順次排出されるカキ試料をピーカーに受け分画した。

当初は、試料注入後上部に密栓をしなかったため、幼生がコック部まで沈降するのを待ってコックを開き、以後幼生と海水を排出させた。しかし、以後は試料注入後、上部に密栓し液体は流出させずに、幼生だけを沈降・排出させ、分画（次項）した。

沈降時間は、試料注入後、沈降管長を沈降し幼生が先端から排出されるまでの秒数とした。正確には各分画の沈降開始時間であるが、以下これを単に沈降時間という。

5 分画と殻高測定

分画数は実験により 3~19 区の範囲で随時変えた。分画後、幼生を時計皿上に集め、万能投影機倍率 100 倍で観察、殻高測定を行った。

なお、当初（結果の項、実験 1）はホルマリン海水とともに幼生を排出させたが、実験 2 以降は、試料注入後直ちに密栓して、カキ幼生だけを沈降させ、順次、分取分画した。

殻高測定は分画幼生の一部を抽出し、万能投影機倍率 100x で観察、自記録ノギスを用い測定した。ノギスの読み取りは 0.01 mm まで、従って 0.1 まで記録されるが、計算は 1 μm 単位に丸めた。

その他の事項については、結果のそれぞれの項で述べる。

結果及び考察

1 ストークスの法則の確認

予備テストで、大型幼生が速く沈降し、小型幼生が遅れて沈降することが肉眼視できたので、あ

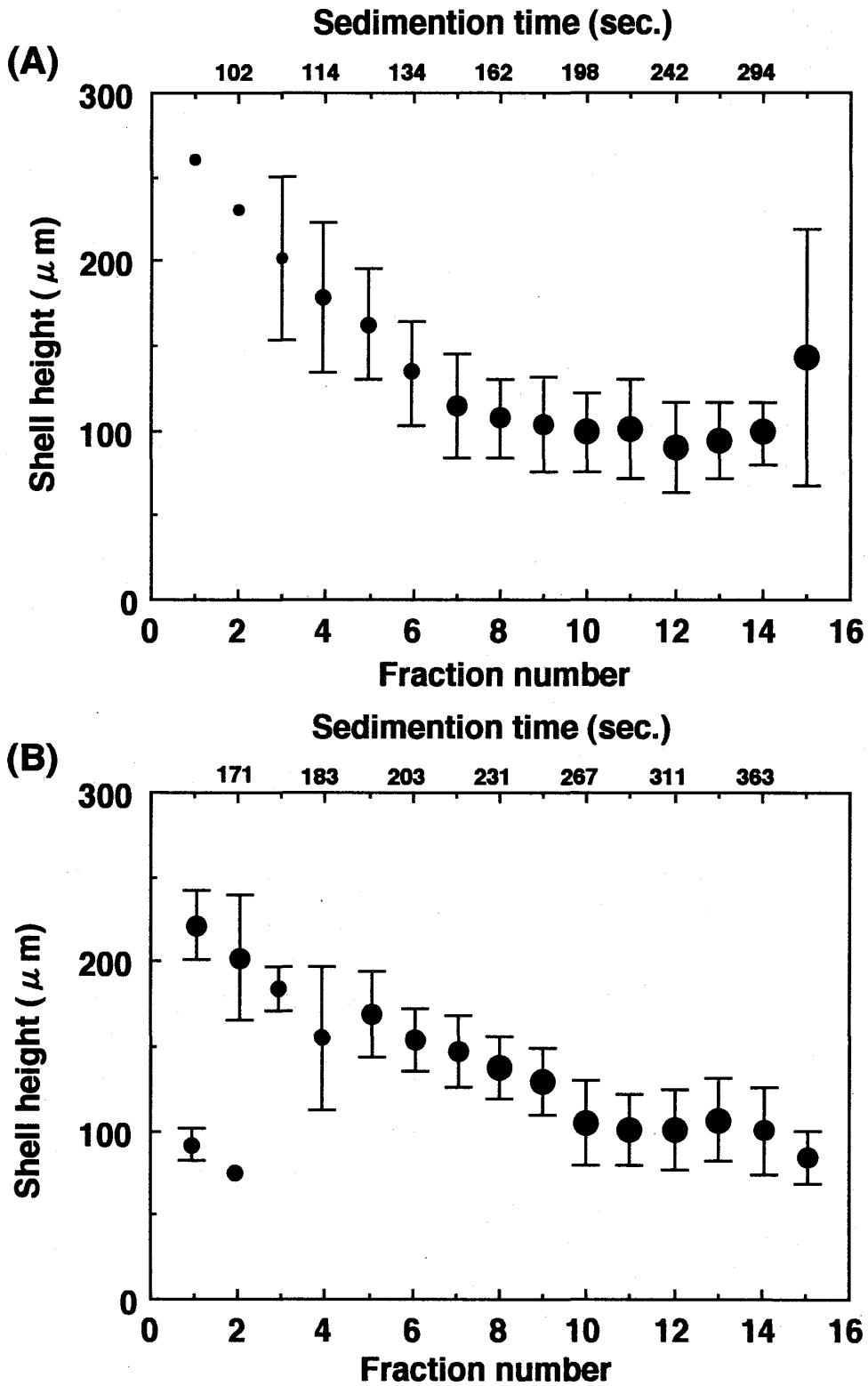


Fig. 2 Fractionation of oyster larvae with different size by sedimentation time using 50 ml buret (A) and 2 x 130 cm glass tube (B).

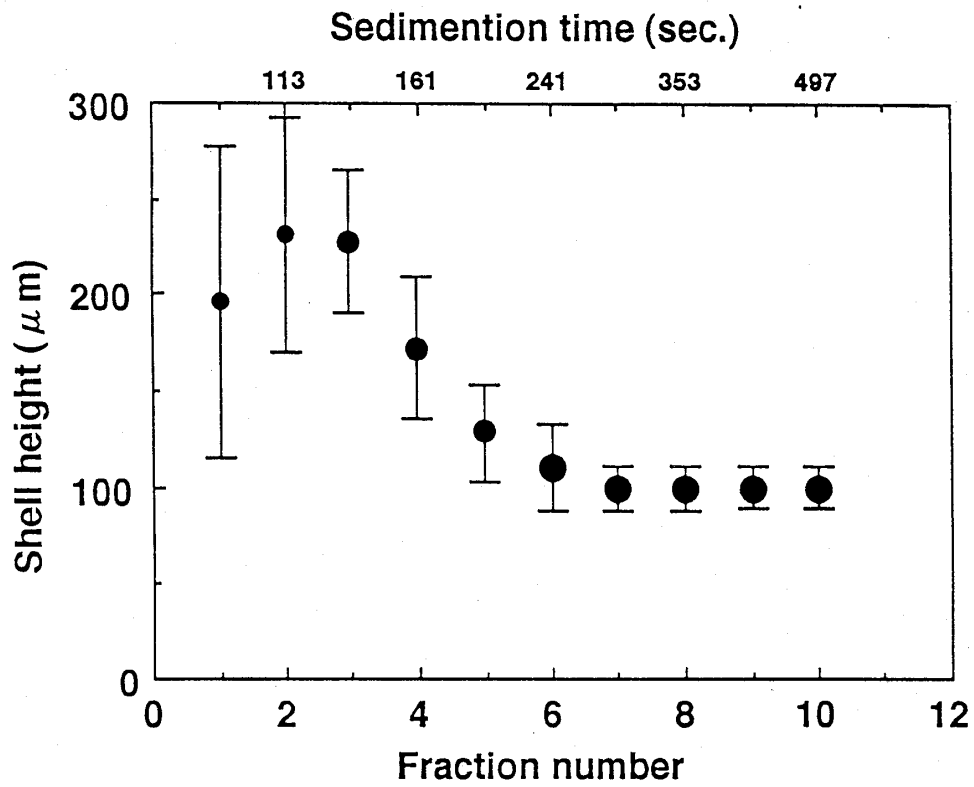


Fig. 3 Fractionation of oyster larvae with different size by sedimentation time using an improved glass tube.
 Individual number : ● < 10 ; ● > 10 ; ● > 10² ; ● > 10³

た。もちろん個体数は幾何級数的に増加した。

そして、分画番号 7番、沈降時間 293秒以降において最小型の 90 μ m 幼生が卓越した。続く 8, 9, 10 番まで遅れて沈降する小型幼生が多数存在することは、先述と同様であった。分画10番は約 500 秒以後の沈降で、密栓を抜き沈降を中止し、残存する幼生をすべて抜き取ったものであるが、同じ90 μ m 以下幼生で明らかに 2倍の沈降時間を要するものがあることを示している。

ただし、始めに沈降する大型幼生の中に相当数の中小型幼生が混じったし、逆に遅れて沈降する小型幼生のなかに、殻高の大き目のものが若干混じった。それは分画毎の殻高範囲のオーバーラップ、並びに平均殻高が滑らかな変化にならない結果となった (Fig. 3) 。

前者は、中小型幼生が大型幼生に押し下げられて沈降したものか、または幼生自体の密度のバラツキによるものと考えられ、後者は明らかに幼生自体の密度差によるものと推測できる。

いずれにしてもかなり大きな幼生自体の密度差があることは確実で、これが沈降法による殻高区分をやや困難にしていることが否定できない。また、幼生の形状が球形ではないこと、貝殻形では沈降方向による抵抗の変化は容易に想像できるところであるし、幼生試料注入時の十分な攪はんのためには20mmでも口径が不足だったかもしれない。これらが解明または制御できれば、本法による殻高区分は十分可能であると考えられる。

総 括

現行の幼生計数法は概略次のとおりである。まず、採集された幼生をすべて 1mm方眼 20x50mmの画線スライド上に載せ、顕微鏡下で熟練者が殻高を肉眼判定しながら、1個ずつ計数する。非熟練者は倍率 50xでは30 μ m の殻高差を判別しえないが、熟練者は瞬時に判定する。時にマイクロメータで補正する。しかも 9段階の殻高区別に 1個ずつ計数する。労力を軽減しつつ能率を上げるため、電気式カウンタが使用されることもあるが、1個ずつの計数に変わりはない。

幼生の出現が多いときはスライド上で一部抽出により計数する。ここで出現数の少ない大型幼生と出現数の多い小型幼生を同じ抽出率で検鏡・計数する不都合がある。

本研究は、第一に熟練者でなくとも殻高区分する方法はないか、第二に出現数に応じた抽出計数法が考えられないかの二点から、沈降法による殻高区分を検討したものである。

上述のとおり殻が球形ではないこと、及びカキ幼生自体に相当大きな密度差があることから、各分画に殻高範囲のオーバーラップがあり、当初の期待どおりの区分はできなかつたが、分画毎の平均殻高及び殻高範囲とも順次、小さい側へ移行し、ストークスの式が示す理論に沿った結果で、一応満足すべき区分結果であった。使用器具と二、三の沈降要領のうえで試行錯誤をしたが、さらに改良を加えれば、実用の可能性もあろう。

謝 辞

本研究を実施するに当たり、ストークスの抵抗法則及びストークスの式について懇切な解説をいただいた広島県立西部工業技術センター資源環境部本山浩司研究員に深謝します。

要 約

海で採集したカキ幼生を、ホルマリン海水を満したガラス管中を沈降させ、間隔の殻高別に区分することを試みた。幼生はストークスの法則に基づき、秒速 1.1~0.2 cm の速度で沈降した。殻高 90~300 μ m の幼生を 30 μ m 間隔に区分するのに、管長 80cm の 50ml ビュレットでは沈降距離が不足したが、130cm のガラス管ではほぼ必要な区分ができた。

当初は、流体と幼生を一緒に排出させたが、試料注入後直ちに密栓することで、幼生だけを沈降・排出させ、順次分画を取ることができた。50ml ビュレットを用いた場合はコック部分に溜るものがあり不都合を生じたが、先端を細くしたガラス管でその点は解決した。ガラス管は連結式として、任意の沈降距離を確保することもできた。

ただし、同一分画内に殻高の異なるものの混入があったし、同サイズでありながら相当の沈降速度の遅速があるなどの難点もあった。それは幼生自体の密度差によるところが大きいと見られた。

文 献

- 1) (財) 広島市水産振興協会：カキ採苗調査。平成 4 年度業務報告書，35-52 (1994)。
- 2) (財) 広島市水産振興協会：カキ採苗調査。平成 5 年度業務報告書，35-51 (1995)。
- 3) 広島県：かき採苗の手引。1974，pp.1-30。
- 4) 玉虫文一他：岩波理化学辞典第 3 版。岩波書店，1974 p.691,p.1008。
- 5) 日野幹男：流体力学。朝倉書店，初版，1992，pp.103-115。
- 6) 飯田修一他編：物理定数表。朝倉書店，1969，p.80。