

<報 文>

## 実験動物としてのホタルトビケラの累代飼育法\*

野崎 隆夫・島田 武憲\*\*

### 1. はじめに

河川には魚類を始め昆虫、藻類、バクテリアなどさまざまな生物が生息し、複雑な生態系が構成されている。このような河川生態系に化学物質が流入した場合の影響を評価するためには、化学物質に対する感受性が生物種によって異なることが考えられるので、できる限り多くの系統の生物を用いて評価する必要がある。そして、野外で採集した生物は採集地域などによって感受性が異なることが考えられるので、影響評価用の生物は実験室内で累代飼育された生物を用いることが望ましい。

しかし、河川生態系を構成する生物の中で、種類数・個体数ともに多い底生動物については、甲殻類やユスリカ類などが累代飼育されているものの、カゲロウ、カワゲラ、トビケラなど溪流を代表する水生昆虫類は飼育が困難と考えられ、実験動物化された種類はほとんどない<sup>1,2)</sup>。われわれはトビケラ目エグリトビケラ科に属するホタルトビケラ (*Nothopsyche ruficollis* Ulmer) を、実験動物として用いるため飼育法の検討に取り組んできたが、累代飼育のめどが立ったのでその方法について報告する。

### 2. 方 法

#### 2・1 ホタルトビケラ

本種の幼虫は砂粒で作った筒巢を持つ携巢型のトビケラ (図1) で、関東地方以西の平地や丘陵の流れに生息し、冬から初夏にかけて石面に付着した藻類などを摂食しながら成長する<sup>3,4)</sup>。発育の完了した終齢 (5 齢) 幼虫は川岸の岩のすきまなどで夏眠したのち、秋

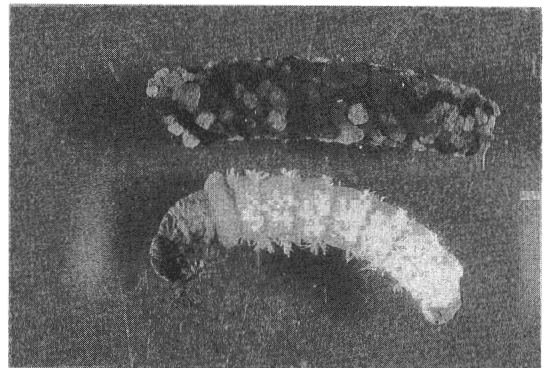


図1 ホタルトビケラの幼虫 (下) とその筒巢 (上)

から冬にかけて蛹化および羽化を行うという年一化の生活環を持つ<sup>3,4)</sup>。われわれが累代飼育を行っているホタルトビケラの初代成虫は、1993年5月21日神奈川県三浦半島を流れる森戸川上流部において採集した終齢幼虫約1,000個体を、大型飼育水槽において水温 15~17°C、気温 17~22°C および自然日長で飼育し羽化させたものである。

#### 2・2 成虫の飼育

成虫の飼育は図2に示した小型のポリスチレン製容器 (190×130×160mm) を用い、水分補給のために底に湿らせたナイロンマットを敷いた。本種の成虫は交尾や産卵のために栄養が必要であることがわかったので (Nozaki and Shimada, 印刷中)、小型のシャーレに入れたナイロンマットに水で薄めた蜂蜜をふくませて与えた。また産卵場所として、黒色の 35mm フィルム用ケースの中に市販の観賞魚水槽用の苔 (ミズキャ

\* Culture of *Nothopsyche ruficollis* (Ulmer) as a laboratory test organism

\*\* Takao Nozaki and Takenori Shimada (神奈川県環境科学センター) Kanagawa Environmental Research Center

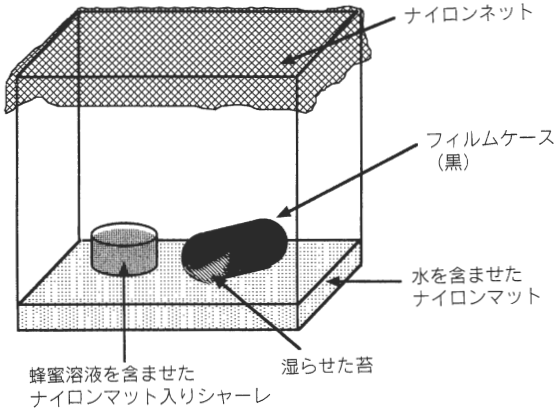


図2 成虫の飼育容器 (190×130×160mm)

ラハゴケ *Taxiphyllum barbieri* (Card. et Copp.) を敷いたものを底面のマット上に置いた。この飼育容器を 13℃ (照明周期12時間明12時間暗) に調節した恒温器中に置き、羽化した成虫を随時移した。

日常の管理としては飼育容器をできるかぎり毎朝点検し、産みつけられた卵塊や死亡個体を取り出した。餌用のシャーレは週に1ないし2回取り替え、カビなどが発生しないように心がけた。

### 2・3 卵の飼育

卵はゼラチン質の卵塊として産みつけられる。その飼育には小型のシール容器 (90×75×40mm) を用い、底に敷いた湿らせたティッシュペーパーの上に卵塊を載せて孵卵した。卵の発育に及ぼす温度の影響を調べるため、1993年11月および12月に飼育下で産卵された卵塊のうち、産卵された日が明らかな34卵塊を、温度を0, 4, 8, 12, 16, 20および25℃の7段階に設定した恒温器中で孵卵した。

卵が孵化するまでに要する期間は、同一卵塊中の卵であってもばらつきがあることが知られるが<sup>3)</sup>、先に孵化した幼虫がゼラチン質の中に留まったままのため、卵塊中の孵化個体数の経日変化を追跡するのは困難であった。そこで、最初の幼虫が孵化した日と卵塊中の卵がほとんどすべて孵化し終わった日 (卵塊の外側から観察する限りすべての卵が孵化した日) を記録した。孵化の観察は各温度区ごとに毎朝行った。なお、照明周期は12℃で孵卵した6卵塊中3卵塊のみ長日条件 (16時間明8時間暗) とし、他はすべて観察時以外暗条件とした。

### 2・4 幼虫および蛹の飼育

初齢幼虫は通常孵化が完了してもゼラチン質の中に留まっているので、幼虫をゼラチン質ごと市販の稚魚

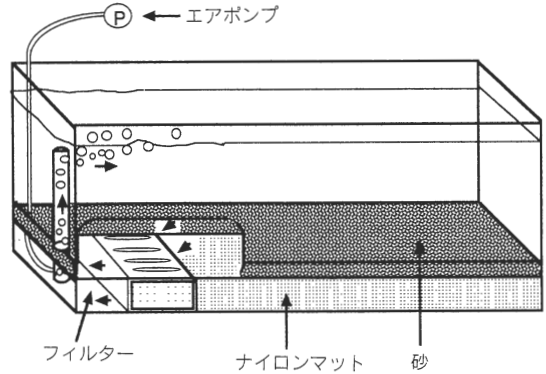


図3 幼虫の飼育容器 (300×100×120mm)

用水槽 (300×100×120mm, コモンケース: スドー) に入れ飼育した (図3)。水槽の底には nylon マットを敷き、その上に幼虫の巣材料として水洗した川砂または20~150メッシュの石英砂 (宮崎化学薬品) を敷いた。餌は、市販の甲殻類用のもの (オカヤドカリ・ザリガニの餌: 日本配合飼料) を適時与えた。幼虫の発育がほぼ完了し餌の消費が減った頃、幼虫の休眠および蛹化場所として水槽の隅に nylon マットを立て、その一部が水面上に出るようにした。水槽の清掃は排泄物などが砂の上をめだつ時のみサイホンで吸い出し、減少分の水を足すだけであるが、一つの水槽に1卵塊の幼虫 (約200個体) を飼育した場合、4齢幼虫までほとんどその必要はなかった。

幼虫が羽化までに要する期間に及ぼす温度と日長の影響をみるため、1994年1月10日に孵化が完了した卵塊を1卵塊ずつ水槽に入れ18℃長日 (16時間明8時間暗)、12℃長日および12℃短日 (10時間明14時間暗) の3条件に設定した恒温器内に長日条件で各3槽、短日条件には1槽置いた。18℃においた水槽中のほとんどの個体が終齢幼虫となり水槽の汚染が頻繁になった44日目に、すべての水槽の幼虫を無作為に各30個体残し、その後それらの成虫が羽化した日を記録した。なお18℃および12℃長日条件の水槽から、各1槽を飼育開始100日後に12℃短日条件に移した。

15℃長日 (16時間明8時間暗) 条件における幼虫の成長を観察するため、1994年2月2日に孵化が完了した3卵塊を一つの水槽に入れ、随時サンプリングした個体をホルマリンで固定した。固定した個体を幼虫、前蛹、蛹に分類し、幼虫は頭幅を測定し齢期を決定するとともに、終齢幼虫の乾重量を測定した。また成虫は羽化日を記録するとともに、乾重量を測定した。なお乾重量は60℃で24時間乾燥後、24時間デシケーター

中に放置したものを0.1mgまで測定した。

### 3. 結果と考察

#### 3・1 成虫の飼育

成虫は飼育に使用した小型の容器の中で交尾し、ほとんどの卵塊を黒色のフィルムケース内の壁面または苔の上に産みつけた。雌雄12対を別々の容器で飼育したとき11個体の雌が産卵し（1卵塊中の平均卵数194個）、そのうちの4個体はさらに2卵塊目（同前122個）も産卵した（Nozaki and Shimada, 印刷中）。この場合、雌の羽化後産卵までに要する期間は最短6日であった。なお成虫の飼育を行った温度や日長などの条件は、本種成虫の野外での出現期の気象条件にほぼ一致させたが、より効率よく産卵させるための条件については未検討である。高温（23℃）で飼育したとき、寿命は短くなるものの雌の卵巣の成熟に要する期間も短くなるので（野崎未発表）、より早く卵が得られるかもしれない。

飼育容器に関しては累代飼育に使用している恒温器のスペースを考慮して、小型の容器に多数個体を同時に入れているが、少なくとも10個体ぐらゐは同時に飼育しても産卵などにめだつた影響は認められなかった。しかし餌の取替えや卵塊の有無のチェックの際、個体数が多いと逃げられることがしばしばあった。さらに、容器を恒温器から出して室温にさらすと壁面に結露が生じやすいことから、飼育スペースなどに余裕があれば、より管理しやすい飼育容器を作成する方がよいと思われる。

#### 3・2 卵の飼育

さまざまな温度で孵卵した場合、卵塊中の卵がほとんど孵化した卵塊の割合と、卵塊中の最初の卵が孵化するまでに要した期間を表1に示した。すなわち、4℃から16℃ではすべての卵塊でほとんどの卵が正常に孵化したが、それより高温および低温では卵の発生に異常が見られた。20℃では6卵塊中2卵塊はほとんどの卵が孵化したが、残りのうち2卵塊は孵化しない卵がめだち（未計数）、2卵塊は数卵（1個および7個）しか孵化しなかった。さらに、25℃では3卵塊すべてが1卵も孵化しなかった。ほとんど、またはすべてが孵化しなかった卵塊は内部までカビが繁殖していたが、このカビのために卵の発生が妨げられたのか、卵の発生が異常だったためにカビが侵入したのかは明らかでない。また、0℃では3卵塊中1卵塊で2卵が孵化したのみで（240日目および262日目）、他はすべて孵化しなかったが、発育零点に近い温度に長期間置かれたためと思われる。

表1 卵の孵化に及ぼす温度の影響

孵卵温度 (°C)	n	ほとんどの卵が孵化した卵塊の割合(%)	孵化に要した日数 (平均±標準偏差)
0	3	0	240<
4	6	100	75.5±2.5
8	5	100	41.0±1.6
12	3	100	24.0*±1.5
12**	3	100	25.0*±0.6
16	5	100	20.4±1.5
20	6	33	(17.2±1.3)
25	3	0	—

\*：有意差なし（t検定，P>0.1）

\*\*：照明周期を16時間明8時間暗とした。他はすべて観察時以外暗条件

4℃から16℃の範囲では、卵塊中の最初の卵が孵化するまでに要した日数は有効積算温度則によく合い、発育零点は-0.2℃、有効積算温量は約310℃・日と計算された。すなわちこの温度範囲において、孵化までに要する期間を20日から75日の間で自由に調節することが可能で、幼虫を実験動物として供給する際の生活環境調節の手段として有効であろう。なお12℃長日条件においた場合の孵化までに要する期間は、12℃暗条件においた場合の期間と有意の差はなかった（t検定，P>0.1）、少なくとも卵期においては日長の影響はないものと思われる。

最初の卵が孵化してからほぼすべての卵が孵化するまでの期間には差があることが知られるが<sup>3)</sup>、今回の観察でも最短4日から最長14日の差がみられた。しかしその期間には、孵卵温度の違いによる差は見られなかった。12℃以上では幼虫の孵化が開始した頃からゼラチン質が軟化する傾向がみられ、16℃ではくずれたゼラチン質から先に孵化した幼虫が這い出す場合もあった。全卵孵化して幼虫飼育に移行するまでは、卵塊中に留まっている方が幼虫の管理や取扱いが容易なので、とくに急がない場合は12℃より低い温度で飼育した方がよいと思われる。

#### 3・3 幼虫の飼育

##### 3・3・1 異なる飼育条件による影響

異なる条件（水温および日長）で飼育した場合の羽化までに要した日数と各水槽の飼育個体数を30個体にした後（飼育開始44日以降）の羽化率を表2に示した。羽化までに長日条件で飼育した個体は12℃の場合に平均189日、18℃の場合平均206日で羽化した（飼育条件AおよびB）。短日条件では12℃でしか飼育をしなかったが、羽化までに平均331日かかり羽化率も低

表2 異なる幼虫飼育条件における羽化期の変動

幼虫の飼育条件*	羽化までに要した日数 (平均±標準偏差)	羽化率(44日目の 幼虫数に対する%)	n
A: 18°C長日	206 <sup>a</sup> ±12	83	60
B: 12°C長日	189 <sup>b</sup> ±8.3	77	60
C: 12°C短日	331 <sup>c</sup> ±18	50	30
D: 条件 A で100日間飼育後条件 C	170 <sup>d</sup> ±4.1	100	30
E: 条件 B で100日間飼育後条件 C	165 <sup>e</sup> ±3.3	90	30

\*: 照明周期は、長日を16時間明8時間暗、短日を10時間明14時間暗とした  
a-e: すべての組合せで有意差が認められた (t検定, P<0.01)

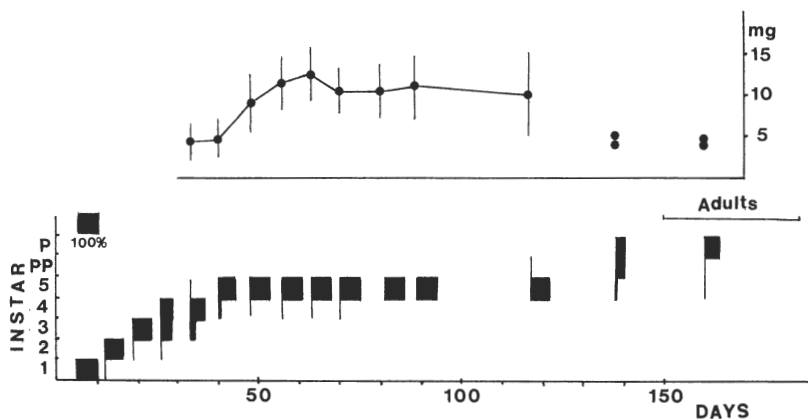


図4 15°C長日(16時間明8時間暗)条件におけるホタルトビケラの発育と成長  
下: 齢期構成の変化と成虫の出現期 (PP: 前蛹, P: 蛹)  
上: 5 齢幼虫の重量変化 (平均乾重量と標準偏差)

かった(飼育条件C)。また、長日で飼育した後短日において場合元の集団より羽化までの期間が短縮され、ばらつきも小さくなった(飼育条件DおよびE)。

長日で飼育した場合、短日で飼育したときよりも明らかに早く成虫が羽化した。これは野外個体群における初齢幼虫の出現から成虫の出現時期までの期間約10カ月<sup>3)</sup>と比べても明らかに短かった。これは、幼虫で夏眠を行うヨーロッパ産の *Anobolia furcata* Brauer の休眠には光周期が関与し<sup>5)</sup>、同じくヨーロッパ産の *Anobolia nervosa* (Curtis) の幼虫夏眠は幼虫を長日で飼育した場合消去されることが知られるので<sup>6)</sup>、本種の夏眠にも光周期が関与し、幼虫を長日で飼育したときはその休眠が消去されたとも考えられる。しかし長日で飼育していたものを短日に移したとき、羽化までの期間がさらに短縮したことから、休眠が完全に消去されたのではなく短縮されたと考えた方がよいと思われる。18°Cで飼育した群は12°Cで飼育した群に比

べ、幼虫の成長は早いと考えられるにもかかわらず羽化までの期間が長くかかったことも、同じ長日条件ならば低温の方が残った休眠期間がより短くなるためかもしれない。

本種の成長や休眠の生理的機構の詳細についてはいまだ不明なことが多く、今後さらに検討する必要がある。それが明らかになれば生活環を短縮させるだけでなく、休眠を自在に制御し、実験動物として安定して供給することが可能になると思われる。

なお本種の休眠および蛹化は野外では陸上で行われるが<sup>3)</sup>、飼育下ではそれらを水中で行う個体もいた。しかし蛹が羽化のために巣から出ても、水面まで泳ぎ上がることはできなかったため、水面上まで這い上がるためのマットは必要であった。

### 3・3・2 15°C長日条件における成長

図4に15°C長日条件(16時間明8時間暗)で幼虫を飼育した場合の齢期構成の変化と終齢幼虫の重量の変

化を示した。幼虫は短期間に成長し、水槽での飼育開始後33日目には終齢幼虫が出現し40日目には85%、48日目には95%の個体が終齢幼虫となった。終齢幼虫の重量は、個体によってばらつきが大きいもののその平均値は48日目まで急増し、その後の変化は小さくなった。そして70日前後から不活発な個体が見られ始め、ナイロンマットの水面上に登る個体もみられた。また、同時に餌の消費量も減少した。117日目に前蛹、138日目に蛹が初めて観察され、羽化は150日から182日(169±9.1日)にかけて見られた。

この結果、初齢幼虫から羽化までに要する期間は12℃や18℃よりさらに短くなり、成虫から卵を得てそれを孵化させるまでの期間を加えても、ほぼ年に2世代を繰り返させることが可能となった。前述したように休眠期間を制御することにより、1世代に要する期間をより短縮できる可能性も強いが、限られた人手と機器で飼育する場合は、常時同じ温度ならびに日長条件で飼育する方が管理が容易であるので、実用的にはこの条件で飼育するのがよいと思われる。なお羽化した成虫の乾重量は雄5.7±0.8mg(n=12)、雌10.6±1.8mg(n=10)で、初代の成虫(羽化期中期の11月27日および28日に羽化した個体)は雄4.3±0.4mg(n=17)、雌7.2±1.4mg(n=10)であり、雌雄ともに飼育個体の方が有意に重かった。(t検定, P<0.01)。この原因として、人工飼料で飼育された幼虫が野外で育った幼虫より大型であった可能性や、初代成虫は終齢幼虫を野外と同じ条件で長期間休眠させて得たため代謝による損失が大きかった可能性が考えられる。いずれにしても飼育下の方が大きな個体を得られたことから、体重からみる限り本飼育法に重大な問題はないと思われる。

#### 4. おわりに

本種の飼育を開始してからすでに5世代目の成虫が羽化し始めており(1996年1月現在)、ほぼ累代飼育のめどは立ったといえる。しかしこの間に得られたデータは断片的なものも多く、個々の飼育技術についてはまだまだ改良の余地がある。また北米で累代飼育されさまざまな実験に用いられた *Clistoronia magnifica* (Banks) は、近親繁殖による影響で30世代で終了していることから<sup>7)</sup>、飼育法だけでなくそのような観点からも考慮する必要がある。

おわりに当たり、幼虫飼育のための人工飼料についてご教示くださいました草野晴美氏(多摩動物公園)ならびに産卵用に用いた苔の同定をしてくださった岩片紀美子氏(平岡環境科学研究所)に深謝いたします。

#### —参考文献—

- 1) 畠山成久: 動物プランクトン、底生生物に対する有害汚染物質の影響評価法、水質汚濁研究, Vol. 11, No. 11, pp. 676-680, 1988.
- 2) 野崎隆夫: トビケラ類の累代飼育は困難か?, エコトキシコロジー研究会会報, Vol. 1, No. 3, pp. 8-10, 1995.
- 3) 野崎隆夫, 小林紀雄: 森戸川(神奈川県三浦半島)におけるホタルトビケラの生活史, 特に幼虫の陸上夏眠と蛹化および陸上産卵について, 陸水学雑誌, Vol. 48: pp. 287-293, 1987.
- 4) 野崎隆夫: ホタルトビケラ属—生活史と分布, 柴谷・谷田編「日本の水生昆虫」, 東海大学出版会, 東京, pp. 99-108, 1989.
- 5) Novak, K.: Entwicklung und diapause der Koehlerfliegenlarven *Anabolia furcata* Br. (Trichopt.) Cas. Csl. Spol. ent., Vol. 57, pp. 207-212.
- 6) Denis, C.: Larval and imaginal diapauses in Limnephilidae, In Crichton, I. (ed.) Proc. 2nd Int. Symp. Trichoptera, Junk, The Hague, pp. 109-115, 1978.
- 7) Anderson, N. H. and D. L. Belnavis: Long-Term rearing of the limnephilid caddisfly, *Clistoronia magnifica*. In Tomaszewski (ed.) Proc. 6th Int. Symp. Trichoptera, Adam Mickiewicz Univ. Press., pp. 137-141, 1991.