

# 生物餌料の培養技術に関する研究（要約）

玉城 信・池之内晴美\*

本研究の詳細は特定研究開発促進事業、生物餌料の培養技術に関する研究報告書において水産庁に報告し、報告書は別途に印刷したので、ここではその概要のみを記す。

## 1. 目的

本県の採貝漁業の重要種であるシャコガイ類の種苗生産時における最も大きな減耗期は、初期殻頂期仔貝と共生藻（*Gymnodinium* sp.）との共生関係が成立する時期である。現状では共生藻の培養手法が確立されていないため多くの成貝を犠牲にし、その外套膜から取り出した共生藻を仔貝に投与しているが常時良好な状態の共生藻を投与できていない。この研究では共生藻の保存、拡大培養条件を確立すると共に細胞形態変化及び別種シャコガイとの共生機構を解明し、シャコガイ種苗生産技術の高度化を図る。

## 2. 材料及び方法

### (1) 初代培養条件の検討

一元種となる共生藻はヒレジャコの外套膜より取り出した。外套膜の表皮の部分解剖バサミで薄く剥ぎ、洗浄後、超精密濾過海水1,000mlと共にミキサーに入れ粉碎し、溶解しない泡状の固形物を除き元種原液とした。培養には全てこの超精密濾過海水を用いた。培養は平底フラスコを用い恒温培養室で通気試験を行なった。恒温培養室の照明は8:00～20:00までの12時間照射とし、設置した翌日を培養1日目とした。蒸発した水分は毎日滅菌蒸留水で補った。共生藻の増殖状態は細胞数を計測した。共生藻は培養すると主に培養容器内ガラス面に付着する細胞が多いため、計数をする際には、容器内に滅菌したスコッチブライト小片を投入して振り回し、壁面に付着した共生藻を剥ぎ落とした。次に培養液100mlを

ブレンダーで1分間攪拌した後、ジェネレーションホモジナイザーで1分間攪拌し、試料を血球計算盤で各試験区毎に6回計数後、その平均値を細胞密度とした。培地は主にP-ES改変培地を使用した。初代培養試験1は水温4段階及び光強度3段階について9区の比較を行った。初代培養試験2は光強度3段階について3区の比較を行った。

### (2) 継代培養条件の検討

初代培養後通気停止し、光強度 $2\sim 3\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ で振盪培養した保存元種及び初代培養終了直後の元種を植え継いで継代培養試験を行った。培養海水、照明時間、蒸発した水分の補完方法、細胞密度の計数方法等は初代培養と同様に行った。継代培養試験1は初代培養と振盪培養元種からの継代培養を試みた。継代培養試験2は2種類の培地の比較を行った。継代培養試験3は元種履歴の異なる3種類の比較を行った。

継代培養中に夾雑物（珪藻類、緑藻類）の増殖による共生藻の増殖不良を防止する目的でシャコガイの外套膜から元種を採取する際の雑藻混入防止試験を行った。試験は外套膜を3種類の薬品で処理し、10区の比較を行った。

### (3) 運動型細胞への変異条件の検討

培養は初代培養試験、継代培養試験と同様の設備、器具及び条件で行い、培養後数日経過して増殖した試料内の運動型細胞の密度を計数した。静止型細胞を含む総細胞密度に占める運動型細胞の比率を出現率とした。攪拌による振動刺激試験を行う際の計数は培養容器底から計数毎に試料を採取して観察する手法を用いると、採取の度に試料に振動刺激が加わるため、試験開始時に刺激を与え、試料を血球計算盤に採った後、試料の乾燥に配慮して血球計算盤内の細胞の変異を連続して観察した。その際の光条件は恒温培養室から試料を採取し、刺激を与えた時

\* 嘱託職員

点までのものであり、血球計算盤内での光強度は顕微鏡室内照明の3~4  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ である。一つの試験区で2~3個の血球計算盤規定面積外側の面積(規定面 $\times$ 9)内の細胞を全数計数した。運動型細胞観察試験1は照明時間を変えた出現推移を観察した。運動型細胞観察試験2は光強度の異なる3区について比較した。運動型細胞観察試験3は培養履歴の異なる3区の比較を行った。運動型細胞観察試験4は攪拌刺激方法の異なる4区の比較を行った。運動型細胞観察試験5は攪拌刺激方法の異なる3区の比較を行った。運動型細胞観察試験6は試験期間及び観察間隔の異なる4区の比較を行った。細胞形態の違いによる共生試験ではシャコガイ初期仔貝との共生試験を組織培養プレートを用いて個別飼育し、照明時間の異なる2区の比較を行った。

#### (4) 共生藻種類の検討

シャコガイの共生藻はシャコガイの種類によって異なるものか、或いは同一のものなのかを推測するための試みとして種類の異なるシャコガイ初期仔貝に対して他の種類のシャコガイから取り出した共生藻を投与して共生成立の有無を観察する試験を行った。試験1はシャコガイ孵化幼生を収容した水槽を透明ビニールシートで覆い、夾雑物の混入が起らないようにして単独で別種のシャコガイの共生藻を日令2から投与して、通常の共生藻を投与した区と比較した。共生成立するまで試験を継続した。投与量、換水等の飼育手法は種苗生産の定法で行い、4区の比較を行った。試験2は組織培養プレートを用いて個別飼育し、シャコガイ初期仔貝の種類及び投与する共生藻の種類について3区の比較を行った。

### 3. 結果及び考察

#### (1) 初代培養条件の検討

培養水温20℃及び25℃が増殖に適していないことが明らかになり、30℃で最も安定的に増殖することが明らかになった。35℃も30℃と比較すると増殖は不安定であった。

光強度に関しては水温ほど明確な差は生じなかったが、40~80  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ が適当な光強度であると推察された。水温30℃、P-ES 改変培地、塩分34、試験開始密度40 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/mlの条件下での最

適光強度を求めた結果、60  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ で最も安定的に増殖することが明らかになった。外套膜表皮下にある共生藻が生存できるのは外套膜組織によって共生藻が強い光から守られているためである。初代培養試験の結果はこのことと符合した。

培養水温:30℃、光強度:60  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、試験開始密度:40 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/ml、培地:P-ES 改変培地、塩分:34の条件下で9~11日間初代培養すれば細胞密度は300 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/mlに達することが明らかになった。

#### (2) 継代培養条件の検討

継代培養試験1の結果から、P-ES 改変培地を用い保存元種を通気しながら継代培養できることが分った。従来、ほぼ同一条件で培養してもシャコガイ生体から元種を採取した初代培養と比較して継代培養では細胞の増殖が不安定であった。この原因としてP-ES 改変培地には含まれない増殖促進物質がシャコガイ体内に存在し、それが継代によって失われている可能性が考慮された。しかし、この試験ではP-ES 改変培地のみで継代後の増殖が観察されたため、シャコガイ体内の成分を特別に用いなくても継代培養が可能であることが示唆された。

継代培養試験2ではESM 培地を用いて水温30℃、光強度60  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、塩分34、試験開始密度40 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/mlの条件下で、継代後の増殖をP-ES 改変培地と比較したが、P-ES 改変培地を上回る増殖結果は得られなかった。

継代培養試験3は初代培養と同様の条件下で、元種履歴が増殖に及ぼす影響について試験した。試験開始密度40 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/mlで継代した区は培養11日目に300 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/ml以上に達した。これは初代培養及び振盪培養から試験開始密度80 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/mlで継代培養した事例と比較しても遜色ない結果であった。通気培養元種からの継代はこの試験で可能となった。しかし、シャコガイ生体から藻体を取り出して21日間振盪培養後に初代培養を行った区は9日目から11日目にかけて増殖速度が低下した。11日目の計数時に夾雑物の混入が観察され、この夾雑物混入が共生藻の増殖の妨げになったと考えられた。延べ55日間培養した継代3代目は同様の増殖は見られなかった。これも11日目に夾雑物が観察された。

通気による2代目の継代培養は初代培養と同様に可能ではあるが3代目以降は夾雑物の混入を防止しなければ初代培養と同様の増殖は期待できないことが推察された。

元種から夾雑物混入を防止する目的で行った雑藻混入防止試験の結果から次亜塩素酸ナトリウムで外套膜を洗浄すると58日目までは夾雑物が観察されることなく通気培養が可能であった。同様にエタノール処理、二酸化ゲルマニウム処理も無処理に比べると長期間の通気培養が可能であった。この結果から外套膜の薬品による洗浄処理は雑藻混入防止手法として有効だと考えられたが、夾雑物の完全な混入防止には至らず、継代培養4～5代目で夾雑物の混入が観察された。

### (3) 運動型細胞への変異条件の検討

初めに静止型細胞と運動型細胞の変異が起こる条件について検討した。その結果、光刺激が運動型細胞への変異の引き金になり、刺激に慣れると同一の光強度であっても運動型細胞は減少し、暗期を経て再び光刺激によって運動型細胞が増加することが分かった。

培養履歴によっても運動型細胞の出現率に差が生じた。保存培養区における運動型細胞の出現率は通気培養区に比べて低かった。これに対して継代培養区は初代培養と遜色ない出現率を示した。この出現率は静止型細胞の光刺激に対する感受性を示していると考えられた。

光刺激以外に適度の攪拌振動刺激によっても運動型細胞へ変異することが分かった。光刺激による運動型細胞出現ピーク時間である光刺激後3～6時間に当たる11:00～14:00頃に共生藻に攪拌刺激を与えると最も効率よく運動型細胞に変異し、長時間運動型細胞が存在することが明らかになった。更にこれらの試験結果で注目される点は出現継続時間である。明期内(8:00～20:00)に与えないと振動刺激は効果がないが、一旦刺激を受けて運動型細胞に変異した共生藻は暗期になっても数時間は運動型の形態を維持すると推察された。このことはシャコガイ種苗生産時の共生藻投与方法に応用できる。共生藻投与時に培養容器から取り出し攪拌刺激を与えて投与することが運動型細胞変異に有効であるばかりでなく

1日の共生藻投与回数を複数回に分けて投与すると飼育水槽内の運動型共生藻は長時間水槽内に出現し続ける可能性が高くなる。また前日までに投与した水槽の残餌共生藻に攪拌刺激を与えることで運動型細胞を増加させ得ると推察された。

静止型細胞から運動型細胞に変異する条件の一部(光、振動)が判明した。しかし、共生成立のために運動型が静止型に比べて有利かどうかは不明である。シャコガイ飼育は光強度 $120 \mu \text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 以上の明るい条件下で行うため、培養した共生藻を飼育容器に投与すると必然的に明期に運動型細胞は毎日出現する。この共生藻投与区を運動型細胞区とし、対照区として運動型細胞を出現させ難くした静止型細胞区を設定した結果、共生率は同じであったが共生成立した日令は運動型細胞区の方が早い傾向が認められた。

### (4) 共生藻種類の検討

別種シャコガイ初期仔貝に対して、今回サンゴ共生藻は共生しなかったが、シャコガイ共生藻は共生関係を成立させることができた。延べ7事例であるため今後、追試は必要である。この7事例の結果がシャコガイ共生藻の種の同一性を明らかにするものではないが、シャコガイ種類間の共生藻の相互利用の可能性は高まったと考えられる。非常に近い種類である可能性が示唆された。天然においてシャコガイが他種シャコガイの共生藻を取り込んでいるかどうかは不明であるが、種苗生産現場において共通の共生藻を飼育に用いることが可能となれば種苗生産技術の高度化につながると考えられた。

## 4. 今後の課題

- ・長期安定的に継代培養を行うために夾雑物(珪藻類、緑藻類、藍藻類)混入のない元種を確保する技術を検討する。
- ・運動型細胞への変異機構を解明し、運動型細胞の出現率を高める手法を開発する。
- ・共生藻とシャコガイ初期仔貝との共生率を高める手法を開発する。
- ・シャコガイ共生藻の種を決定する。