

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*1・下地良男*2・鈴木 剛*3

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するので、ここではその概要のみを記す。

1. 目的

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。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) 継代培養条件の検討

元種となる共生藻は種苗生産したヒレジャコ及びヒレナシジャコの外套膜より取り出した。外套膜表皮を薄く剥ぎ、洗浄後、海水と共にミキサーで粉砕し、泡状の固形物を除き元種原液とした。培養は平底フラスコを用い恒温培養室で通気を行なった。恒温培養室は8:00~20:00の12時間照明とし、設置翌日を培養1日目とした。蒸発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、把握した。容器内に研磨用布状たわし小片を投入し、付着した共生藻を剥ぎ落とした。次に培養液100 mlをブレンダーで1分間、ジェネレーションホモジナイザーで1分間攪拌し、血球計算盤で6回計数後、平均値を細胞密度とした。

前年度までの試験結果から培養水温30℃、光強度60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、試験開始密度40 $\times 10^4$ cells/ml、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 $\times 10^4$ cells/mlに達することが明らかになったが、夾雑物が共生藻の増殖の妨げになったと考えられた。今年度は元種の単離培養

及び大量元種の雑藻混入防止手法の検討を行うと共に通気培養による継代培養条件の検討を行った。試験にはP-ES改変培地の他、シャコガイ共生藻で培養実績のある海産微細藻類用ダイゴIMK培地も用いた。

元種単離培養試験は外套膜表皮の部分を薄く剥ぎ、洗浄後、粉砕し得られた元種原液を計数し細胞密度を推定した。これを滅菌海水で2回希釈洗浄し、細胞密度を40cells/mlに調整した。これを単離培養の試料とした。試料分離用のスライドガラスはテフロン粘着テープを貼り、メスでくり抜き、パスツールピペット1滴分の穴を確保した。これを位相差顕微鏡下($\times 200$)で観察した。色、形、大きさの正常な共生藻が1個のみ観察され、且つ他の藻類が混在しないことを確認し、培地を満たした試験管に採取した。この試験管を振盪培養し、藻体の増殖を待った。

雑藻混入防止試験は共生藻が外套膜表皮内に生存する特徴を利用して大量元種選抜手法の検討を行った。共生藻細胞の増殖に悪影響を及ぼさない夾雑物の混入防止方法を検討した。試験は水洗処理区(外套膜表皮の水道水洗浄)、ゲルマニウム処理区(二酸化ゲルマニウム溶液を培養液中に投与)、カルキ処理A区(外套膜表皮のカルキ溶液1分30秒間洗浄)、カルキ処理B・C区(上記A同様にカルキ溶液3分間洗浄)、カルキ処理D区(上記C同様にカルキ溶液5分間洗浄)、イソジン・カルキ処理区(カルキ原液で殻を洗浄したヒレジャコをイソジン溶液で3時間薬浴し、外套膜表皮を上記D同様にカルキ溶液5分間洗浄)の7区で行った。

継代培養試験は初代培養と同一の条件(水温30℃、光強度60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、試験開始密度40 $\times 10^4$ cells/ml、塩分34)で継代培養し、細胞密度が300 $\times 10^4$ cells/mlに達した事例の追試験を行った。細胞密度の増殖推移では無く、各培養試験の培養7~15日目の最

*1・*2 嘱託職員

*3 非常勤職員

高細胞密度で培養状態を判断した。

(2) 運動型細胞への変異条件の検討

運動型細胞の出現率を高める条件の検討を行った。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。材料の培養器から研磨用布状たわし小片で共生藻を剥ぎ落とし、試料を回収し、希釈海水で 800 ml にした。調理用ハンドミキサーで 20 秒間攪拌刺激を与えた後、試験管に 5 ml 採取した。それをピペットで 10 回攪拌し、試料を血球計算盤に採った後、それをバット内に静置した。試料の乾燥を防ぐためにバット内には、濡れタオルを入れ、透明板で蓋をした。バットは計数時以外、恒温室内に設置し光強度は培養時と同じ $60\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ とした。試験開始時間は、ハンドミキサー刺激を与えた時間とした。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、試料を血球計算盤に採った後、血球計算盤内での細胞の変異を連続して観察した。予備試験の結果から出現率のピークが刺激後 90 分以内には極めて少ないことから、刺激後 90 分以降、60 分置きに計数を行い、出現率の最高値を求めた。運動型計数用試料内の総細胞数（静止型細胞数+運動型細胞数）全数計数し、直接算出することで出現率の精度を高めた。一つの試験区で 3 個の血球計算盤を用いて静止型細胞を毎回全数計数し、運動型細胞はその 9 倍の面積を計数し、それを平均した。

細胞形態の違いによる共生試験（運動型細胞の有利性の検討）を行った。ヒメジャコ及びシラナミ孵化幼生を用いて、試験区毎に恒温室内に設置した組織培養プレート 3 面に初期仔貝 36 個体を飼育し、通常区（共生藻投与前に培養容器から採取し、試験管にセットし、投与前にハンドミキサーで攪拌）及び運動型細胞区（投与前に培養容器から採取し、ハンドミキサーで 20 秒間攪拌）を設け比較した。毎日、30 個を各穴に投与し、共生成立の確認を行い、換水は 5 日毎に別プレートに仔貝を移した。

(3) 共生藻種類の検討

種類の異なるシャコガイ初期仔貝に対して他の種類から採取した共生藻を投与して共生成立を観察す

る試験を行った。共生事例を探索すると共に、共生成立後の飼育試験を行った。ヒメジャコ仔貝にヒメジャコ共生藻、ヒレジャコ共生藻、シラナミ共生藻を単独で投与し、試験区毎に組織培養プレート 2 面に仔貝計 24 個体を飼育した。毎日、共生藻を給餌し、共生成立の確認を行った。換水は 3~4 日毎に別プレートに仔貝のみを移した。別種シャコガイ共生藻と共生した稚貝飼育試験は超精密濾過海水で飼育し、ヒレジャコ共生藻を単独投与して共生成立させた後、超精密濾過海水で継続飼育したヒレナシジャコ稚貝（平均殻長 8.0mm）を超精密濾過海水区と砂濾過海水区で飼育した。温室内に設置した 500 l 水槽に各試験区 198 個体収容し、流水飼育を行った。1ヶ月毎に稚貝を剥離、計数、殻長測定を行った。試験期間は 118 日間であった。

3. 結果及び考察

(1) 継代培養条件の検討

ヒレジャコ共生藻を試験管 100 本に採取し、分離 28~36 日後に 6 本の試験管で藻体の増殖を確認した。これを継代し、振盪培養を継続した。分離後 179 日まで観察した結果、共生藻細胞の死滅、もしくは他の藻類の混入が確認され、単離培養は出来なかった。共生藻細胞及び周辺粘液状物質中の他の藻類を根絶できなかったと推察された。

雑藻混入防止方法と夾雑物混入までの日数との関係は、外套膜表皮をカルキ（有効塩素 4.8%）溶液で短時間洗浄したカルキ処理 A 区、有効塩素 0.6~1.2% で 3 分間洗浄したカルキ処理 B 区及び C 区は通常手法の水洗処理区と差はなく、21 日で夾雑物が混入した。水洗処理後、二酸化ゲルマニウム 1% 溶液を培養液中に投与したゲルマニウム処理区は、28 日であったが、共生藻の細胞破壊が観察された。カルキ処理 D 区は、有効塩素 0.6% 溶液で 5 分間洗浄し、41 日で夾雑物が混入した。カルキの使用事例としては最も良い結果であった。全試験区中の最良事例はイソジン・カルキ処理区で、57 日間夾雑物が観察されなかった。この方法は、カルキ原液（有効塩素 12%）を殻に塗布し、殻洗浄したヒレジャコをイソジン 1.5% 溶液で 3 時間薬浴し、その貝から採

取した外套膜表皮を有効塩素 0.6%カルキ溶液で 5 分間洗浄した。シャコガイ生体の殻洗浄、薬浴が有効であると推察された。

初代培養及び継代培養における最高細胞密度及び、培養条件別最高細胞密度の比較を行った結果、培養形態については、初代培養 18 事例中 14 事例で最高細胞密度 300×10^4 cells/ml に達したのに対して継代培養 19 事例で同密度に達したのは 6 事例のみであった。ヒレジャコ初代培養の最高細胞密度の平均値 (以下、平均値) 359×10^4 cells/ml に比較してヒレジャコ継代培養の平均値 274×10^4 cells/ml は低く、初代培養と同水準の細胞増殖は見られないことが判明した。継代 2 代目の平均値 291×10^4 cells/ml は継代 3~5 代目の平均値 261×10^4 cells/ml に比べて高かった。これは継代培養の代数が多くなるにつれて細胞増殖し難いことを示した。最高細胞密度到達日数 7~9 日目の平均値 290×10^4 cells/ml は 11~14 日目の平均値 266×10^4 cells/ml に比べて高かった。夾雑物の混入は培養日数が増加するほど増殖阻害することが考えられた。継代培養時の元種密度は、 $40 \sim 50 \times 10^4$ cells/ml の平均値 265×10^4 cells/ml は、 $60 \sim 100 \times 10^4$ cells/ml の平均値 $286 \sim 289 \times 10^4$ cells/ml に比較して低かった。初代培養における最適元種密度 40×10^4 cells/ml では継代培養条件下では増殖し難いことが推察された。ヒレナシジャコ初代培養の平均値 403×10^4 cells/ml はヒレジャコ初代培養の平均値 359×10^4 cells/ml を上回った。次年度追試験を重ねて事例数を増やし検討したい。

(2) 運動型細胞への変異条件の検討

刺激時の細胞密度の違いによる運動型細胞の出現率は、高密度区 (225×10^4 cells/ml) の出現率最高値 (以下、最高値) は 28.4%、低密度区 (107×10^4 cells/ml) の最高値は 27.7% で大差なく、高出現率であった。試料の希釈濃度と出現率は無関係であると考えられた。

刺激時の希釈海水の違いによる運動型細胞の出現率は、水質無変化区 (上澄み希釈) の最高値 20.8%、水質変化区 (滅菌海水希釈) の最高値 21.3% で大差なく、高出現率であった。シャコガイ種苗生産水

槽に共生藻を投与する際に共生藻培養液とシャコガイ飼育水の水質の違いが運動型細胞の出現率にどのような影響を及ぼすか不明であった。この結果から培養液と飼育水の水質差は飼育水槽内における運動型細胞の出現率に影響を与えないことが判明した。

刺激時刻の違いによる運動型細胞の出現率は、全試験区の最高値は低かった。9:30 刺激区 (光刺激後 90 分後) の最高値は 5.9% で、11:00 刺激区 (光刺激後 180 分後) の最高値は 2.2% となり、12:30 刺激区 (光刺激後 240 分後) の最高値は 0.9% で最も低かった。照明点灯後 90 分以上経過後に刺激を与えると出現率は低下すると考えられた。従来のシャコガイ種苗生産時の共生藻投与は午前中に行っている。刺激時刻に関する試験結果から、運動型細胞の出現率を高めるためには、9:30 投与が良いと推察された。

培地の違いによる運動型細胞の出現率は、P-ES 改変培地が 24.9%、グイ¹ IMK 培地が 24.8% で差は無く、2 種の培地の違いに運動型細胞の出現率に及ぼす影響は無いと推察された。

刺激時の温度降下による運動型細胞の出現率は、常温区の最高値 25.1%、刺激後温度降下区 (徐々に降下) の最高値 20.9%、刺激時温度降下区 (急激な降下) の最高値 15.3%、であった。培養海水温からの温度降下は運動型細胞の出現率に悪影響を与え、特に急激な温度降下が起こることで出現率は明らかに低下した。急激な温度降下が起こることで出現率が低下する事が判明したため、温度差について追試験を行った。温度降下 A 区 (-2.5°C) の最高値 8.4%、温度降下 B 区 (-5.5°C) の最高値 3.5% であった。 -3.0°C は出現率を約半分まで低下させることが判明した。春季のシャコガイ種苗生産時には飼育水温 (25°C) が共生藻培養水温 (恒温室 $28 \sim 30^{\circ}\text{C}$) よりも下がる。急激な温度降下を避けるためには、飼育水温と培養水温の差を徐々に縮めた後の投与が望ましいと考えられた。

刺激後の温度上昇による運動型細胞の出現率は、常温区の最高値 24.4%、刺激後温度上昇区 (徐々に上昇) の最高値 25.5% で、大差は無いと判断された。培養海水温からの緩慢な 4.5°C の温度上昇は運

動型細胞の出現率に悪影響を与えないと推察された。追加試験の結果、常温区の最高値 11.4%、刺激時温度上昇区(急激に上昇)の最高値 2.2%であった。急激な 6.0°C 上昇は出現率の明らかな低下を招いたと判断された。夏季のシャコガイ種苗生産時には飼育水温(33°C)が培養水温(恒温室 28~30°C)よりも上昇する。急激な温度上昇を避けるためには、飼育水温と培養水温の差を徐々に縮めた後の投与が望ましいと考えられた。

刺激後の光強度差による運動型細胞の出現率は、通常区(60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)の最高値 8.3%、強光区(100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)の最高値 7.9%で、大差は無いと判断された。しかし、シャコガイ種苗生産時の飼育水槽の光強度は最大 800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ に達する。次年度、追試験を重ね、強光が出現率に及ぼす影響について検討したい。

培養時の光条件の違いによる運動型細胞の出現率は、通常照明区の最高値 3.7%、連続照明全 4 区は 0~0.4%と低かった。連続照明条件で運動型細胞の出現率が低下することは明らかであった。運動型細胞が出現するためには暗期が必要であると推察された。

初代培養日数の違いによる運動型細胞の出現率は、無培養区は運動型細胞は計数されず、培養 2 日目の最高値 3.2%、培養 4 日目の最高値 3.7%、培養 6 日目の最高値 11.4%であった。シャコガイ体内から採取した直後の共生藻は運動型細胞には変異し難く、同一条件下の培養において培養 6 日目までは運動型細胞の出現率は明らかに培養日数に比例して高まった。

培養形態の違いによる運動型細胞の出現率は、継代培養 A 区(5代)の最高値は 22.1%で高かったが、他の継代培養 2 区の最高値は 3.5~3.8%であった。保存培養 2 区の最高値は 2.2~2.3%と低かった。

今年度の運動型細胞への変異試験で得られた出現率最高値は、前年度までの試験結果を大きく上回った。主な要因として以下のことが考えられた。

試験方法の改善(攪拌刺激時の試料の恒温化及び攪拌刺激後、血球計算盤に採取した試料の乾燥防

止・恒温化・光強度保持)及び計数精度の向上(運動型細胞出現率算出のための分母に当たる総細胞数を直接計数)

上記以外に前年度までの出現率を大きく上回った理由として今年度使用した試験材料の問題が挙げられる。今年度の変異試験全 13 回中 12 回の試験材料に初代培養を用いたことである。今年度判明した運動型細胞の出現率を向上させるための条件を以下に示した。

①光強度 60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ で 8:00~20:00(12時間)照明の光条件下で共生藻を培養する。

②光刺激が与えられた 90 分後の 9:30 にハンドミキサーで 20 秒間(試料 800 ml)、ピペットで 10 回(5 ml)の攪拌刺激を共生藻に与える。

③刺激時及び刺激後に試料に温度、光強度の変化を与えないように配慮する。

これらの条件を満たした初代培養の出現率最高値平均は 15.1%(3.2~28.4%)で、その内、培養日数が 6 日目を以降の 10 事例の出現率最高値平均は 20.0%(5.9~28.4%)であった。先の継代培養条件の検討において継代培養では初代培養と同等の細胞増殖が見られない事が判明しており、運動型細胞の出現率においても継代培養は初代培養と同等の結果が得られなかったものと判断された。しかし、初代培養の場合、共生藻元種をシャコガイ生体からの採取に頼るため、季節変動、生育環境等によるシャコガイの活力状態の影響を受けやすいと推察された。

今後は、継代培養を用いた安定的な運動型細胞出現率の向上技術の開発を行う。

細胞形態の違いによる共生試験(運動型細胞の有利性の検討)は、ヒメジャコ 3 回、シラナミ 1 回の全 4 回の試験を行ったが、通常区、運動型細胞区共に 1 個体の共生成立仔貝も生残せず 288 個体が死亡した。全試験の共生率は 0%であった。日令 13~28 までに試験終了した。これらの試験に供した孵化幼生を飼育した大型水槽の種苗生産結果も非常に悪く、試験に供した孵化幼生の活力に問題があったと考えられた。今後もこの試験を行う方針である。試験回次を増やし、飼育手法に問題が無かったか再検

討したい。

(3) 共生藻種類の検討

3回の試験を行ったが、全試験区共に1個体の共生成立仔貝も生残せず216個体が死亡した。全試験の共生率は0%であった。日令18～37までに試験終了した。これらの試験に供した孵化幼生を飼育した大型水槽の種苗生産結果も非常に悪く、試験に供した孵化幼生の活力に問題があったと考えられた。今後もこの試験を行う方針である。試験回次を増やし、飼育手法に問題が無かったか再検討したい。

ヒレジャコ共生藻と共生したヒレナシジャコ稚貝は、共生後も超精密濾過海水のみで飼育し、日令254で殻長8mmに成長した。試験開始後も92日間(日令346)で76.3%生残し、殻長17.3mmに成長した。砂濾過海水で飼育した対照区と比較しても良い成績であった。118日(日令372)で急激に斃死し、生残率は15.2%に低下したが、これは冬季の低水温の室内飼育による光強度不足が原因したと考えられた。室内大型水槽による種苗生産においても日常的に起こる現象であるため、ヒレジャコ共生藻と共生したヒレナシジャコに特徴的な斃死ではないと考えられた。この試験結果から別種シャコガイ共生藻と共生しても正常に成育し得ることが推察された。

4. 今後の課題

- (1) 長期安定的に継代培養を行うために他藻類混入のない元種を確保する技術を検討する。
- (2) 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技術を開発する。
- (3) 共生藻とシャコガイ初期仔貝との共生率を高める技術を開発する。
- (4) シャコガイ共生藻の種を決定する。