

生物餌料の培養技術に関する研究 (要約)

平成8～12年度総括報告

玉城 信・池之内晴美^{*1} 下地良男^{*2}・岩井憲司

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、総括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

沖縄県の採貝漁業及び貝類養殖業の重要対象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との共生関係が成立する時期である。共生藻は、シャコガイ類の生存に直接関与している藻類である。この研究では共生藻の保存、培養条件を確立すると共に細胞形態変化及び他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

1) 元種単離培養試験

元種となる共生藻はシャコガイ外套膜より取り出し、以下の方法で採取後、振盪培養し、共生藻の増殖状況及び夾雑物混入の有無を調べた。ピペット法は、外套膜表皮の部分を薄く剥ぎ、洗浄後、滅菌海水と共にすりつぶし、ピペットで採取した。寒天平板法は、寒天に元種試料を塗布した。遠心分離法は、遠心分離器にかけ、上澄みを除去した沈殿物から採取した。初期仔貝洗浄法は、共生成立したシャコガイ初期仔貝をストレプトマイシン硫酸塩(以下マイシン)、二酸化ゲルマニウム(以下ゲルマニウム)、次亜塩素酸ナトリウム(以下カルキ)、ジクワット・パラコート液剤(以下パラコート)で浸漬、洗浄後、培養器に収容した。仔貝の殻及び軟体部表面の夾雑物を除去し、且つ培養器内で死亡仔貝体内から脱出した共生藻に影響を与えない薬品種類、濃度及び薬浴時間を探索した。希釈法は、希釈後、1細胞/1容

器ずつ採取した。培養器は、主にねじ口試験管及び三角フラスコを用いた。

2) 雑藻混入防止試験

外套膜表皮の前処理方法を検討した。エタノール、ゲルマニウム、カルキで洗浄した。イソジン・カルキ処理は、カルキで殻洗浄したシャコガイをイソジン薬浴し、外套膜をカルキで洗浄した。

3) 初代培養試験

培養水は全て超精密濾過海水(0.01 μ m)を熱処理して用いた。培養には500mlフラスコを用いた。恒温室の照明は8:00～20:00とし、蒸発水分は毎日補った。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に付着するため、計数は、容器内に研磨用布状たわしを投入して摩擦し、剥ぎ落とした。試料をピーカーで攪拌し、採取後、2倍希釈した。これを調理用ハンドミキサーで攪拌し、採取した。これをブレンダー、ジェネレーションホモジナイザーで攪拌し、試料を血球計算盤で6回計数し、平均値をとった。設置翌日を培養1日目とし、7～15日目の最高細胞密度で培養状態を判断した。

4) 継代培養試験

初代培養からの継代(継代培養)、振盪培養からの継代(再通気初代培養)及び再通気初代培養からの継代(再通気継代培養)で試験した。

(2) 運動型細胞への変異条件の検討

培養は継代培養試験と同様に行い、試料内の運動型細胞を計数した。細胞総数に占める運動型細胞の比率を出現率とした。試料を血球計算盤に採った後、血球計算盤内での変異を連続して観察した。血球計算盤は、バット内に静置し、試料の乾燥を防ぎ、透明蓋をした。光強度は培養時と同様にした。刺激時間を試験開始とし、刺激後30分以降、60分置きに、出現率最高値を求めた。1試験区毎に6試料の平均値をとった。

※1※2：嘱託職員

1)運動型細胞出現推移の把握

攪拌刺激の強弱、刺激時刻による出現推移を観察した。

2)刺激と運動型細胞出現率との関係

運動型細胞の出現推移を把握するために、異なる明条件及び照明時間での出現推移及び刺激時の水質、細胞密度及び温度による出現率の最高値を比較した。

3)共生藻履歴と運動型細胞出現率との関係

共生藻の増殖状態、培養形態及び元種株履歴について出現率最高値を分類、比較した。また、最も運動型細胞が出現し易い培養日数を求めた。

4)運動型細胞出現率向上試験

出現率向上のために培地換えの効果を確かめた。

(3)シャコガイ初期仔貝との共生の検討

1)細胞形態の違いによる共生試験

運動型細胞の共生時の有利性を明らかにするため検討した。シャコガイ初期殻頂期仔貝(以下、仔貝)を小型容器で飼育した。運動型細胞区は、光刺激、攪拌刺激等で出現率を高め、静止型細胞区は、連続照明、温度低下、強攪拌刺激等で出現率を低くして給餌し、共生成立の確認を行った。

2)他種シャコガイ仔貝との共生試験

共生成立前の仔貝に対して他種シャコガイ共生藻を投与して共生成立の有無を観察した。大型水槽では、夾雑物混入を防止して共生藻を投与した。小型容器では、上記試験1)と同様手法で飼育し、サンゴ共生藻も用いた。また、他種共生藻との共生稚貝飼育試験を行った。

3. 結果及び考察

(1)継代培養条件の検討

1)元種単離培養試験

ピペット法は、細胞死滅、夾雑物混入が確認された。

寒天平板法は藻細胞増殖が見られなかった。

遠心分離法は、遠心分離と沈殿物希釈を10回繰り返したが、夾雑物混入を防止できなかった。

仔貝洗浄法のマイシン・ゲルマニウム及び、カルキ、パラコート薬浴で効果があった。各薬品の適正な薬浴濃度と時間が解った。

希釈法でも夾雑物混入の無い増殖事例が得られた。

以上の結果からシャコガイ共生藻は、寒天培地で生育せず、遠心分離では夾雑物混入防止できないが、仔貝をマイシン・ゲルマニウム、カルキ及びパラコートで洗浄後、共生藻を得る方法で夾雑物混入の無い元種が得られることが解った。希釈法でも夾雑物混入の無い元種が得られた。希釈する元種に外套膜採取直後の細胞を用いたため、細胞周辺の粘液状物質が少なかったと推察された。希釈法は単離作業が容易で、試料数を増やすことが可能であった。

2)雑藻混入防止試験

元種単離培養は細胞増殖に時間が掛かるため、他の元種選抜も重要である。従来は、水道水で外套膜を手揉み洗浄している。しかし、継代培養の早期に夾雑物混入が起り、培養不調の一因になった。そこで、共生藻が外套膜表皮内に生存する特徴を利用して、外套膜表皮の前処理方法を検討した。水洗は、通気20日目で夾雑物混入が認められた。エタノール、ゲルマニウムは、長期培養可能であったが、藻細胞破壊が観察された。カルキ区は、41日で夾雑物が混入したが、細胞破壊も少なかった。全試験区中の最良事例はイソジン・カルキで、74日間夾雑物が観察されず、細胞増殖も水洗処理と差は無かった。

以上の結果からイソジン・カルキ処理手法の有効性が判明し、シャコガイ生体の洗浄が有効であったと推察され、長期間の安定培養が可能になった。

3)初代培養試験

試験1(光強度、水温)

20℃区で増殖せず、30℃区が、増殖良好であった。

試験2(光強度)

60 μ mol/m²/s 区が安定的に増殖した。110 μ mol/m²/s 区及び80 μ mol/m²/s 区は、不安定であった。

培養水温30℃で最も安定的に増殖することが明らかになった。これは種苗生産時も含めたシャコガイの生育適正温度帯とほぼ等しい。

水温30℃、P-ES改変培地、密度40×10⁴ cells/mlの条件下の最適光強度は、60 μ mol/m²/s であった。

シャコガイは殻長3mm以上になり殻が厚くなると

2,000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 以上の光強度下で順調に生育する。外套膜内の共生藻が生存できるのは外套膜組織によって強光から保護されているためである。試験2の結果から、シャコガイの生育の最適光強度と共生藻増殖の最適光強度が異なっていることが推察された。

初代培養では、培養水温30°C、光強度60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、試験開始密度 40×10^4 cells/ml、P-ES改変培地の条件下で培養すればよいことが明らかになった。

4) 継代培養試験

ヒレジャコ(以下ヒレ)共生藻59事例、ヒレナシジャコ(以下ヒレナシ)共生藻35事例の試験を行った。

ヒレ初代培養は、平均 360×10^4 cells/mlで、培地による差は無かった。ヒレ継代培養は、平均 267×10^4 cells/mlで、培地による差は無かった。これは初代培養と有意差が認められた($p < 0.01$)。ヒレ再通気初代培養P-ES改変培地(以下、P-ES)も平均 276×10^4 cells/mlで、初代培養と有意差が認められた($p < 0.01$)。ヒレ再通気初代培養が、IMK培地(以下、IMK)は、平均 373×10^4 cells/mlで、初代培養と有意差は認められなかった($p > 0.05$)。再通気初代培養IMKは、事例数が少なく、継代培養及び再通気初代培養P-ESとも有意差は認められなかった($p > 0.05$)が、継代培養と危険率10%以下($p < 0.1$)で有意差が認められたため、継代培養に比べて再通気初代培養IMKは細胞増殖に適していると示唆された。

ヒレナシ初代培養は、平均 400×10^4 cells/mlで、培地による差は無かった。ヒレナシ継代培養P-ESは平均 199×10^4 cells/mlで、初代培養と有意差が認められた($p < 0.01$)。ヒレナシ継代培養IMKは平均 427×10^4 cells/mlで継代培養P-ESと有意差が認められ($p < 0.01$)、初代培養と有意差は認められなかった($p > 0.05$)。

ヒレナシ継代培養にIMK培地が適していることを確かめるため、追試した結果、IMK平均 461×10^4 cells/ml、P-ES平均 197×10^4 cells/mlで両者に有意差が認められた ($p < 0.01$)。IMK培地がヒレナシ継代培養に適していることが解った。ヒレナシ継代培養が再通気初代培養と同様に増殖することが解った。

以上の結果から通気継代を繰り返すと共生藻が劣化し、増殖活力が低下したと考えられた。そこで、通気による連続培養を止め、保存し、再通気培養すれば初代培養と同等の増殖が期待できると考えた。P-ES培地のヒレ再通気初代培養は、初代培養と比較して増殖は劣ったが、IMK培地を使うと初代培養と同等に増殖した。IMK培地でのヒレ再通気初代培養は継代培養に比べて細胞増殖に適していると示唆された。

P-ES培地でのヒレナシ継代培養は、初代培養と比較して増殖は劣った。IMK培地でのヒレナシ継代培養は、P-ES培地に比べて増殖し、再通気初代培養と同等であることが解った。IMK培地がヒレナシ共生藻の培養に適していることが判明した。

培地はIMK培地が適していることが解った。ヒレとヒレナシでは特性が異なり、IMK培地でヒレナシ継代培養が可能だと判明した。ヒレ継代培養では初代培養と同等の増殖は期待できないが、保存と再通気を交互に繰り返す培養方式が適していると推察された。

(2) 運動型細胞への変異条件の検討

静止型細胞から運動型細胞への変異を観察した結果、運動型は変異時、細胞壁を破った。運動型には鞭毛が確認された。運動型は、2～3分間鞭毛先端に殻を付けて遊泳した。殻を振り解いた運動型は回転運動を開始した。静止型は球体であるが、運動型はダルマ型で、殻、夾雑物等に付着して運動した。活発な運動型の動きが緩慢になると球、又は楕円になり、静止状態になると球形になり、鞭毛は細胞から切り放された。

シャコガイ共生藻は外套膜表皮下に静止型として生存し、体外に出ると運動型細胞に変異する。しかし、培養中、運動型は少数しか出現しない。種苗生産水槽へ投与した共生藻は、静止型である。一方、仔貝が生残した飼育水槽では、運動型共生藻の存在割合が多いことが観察されており、細胞の形態と仔貝との共生に何らかの関係があることが考えられた。

1) 運動型細胞出現推移の把握

試験1(光刺激)

明条件8:00～20:00では、照明開始1時間後に運動型が観察され、3時間後に出現率はピークに達し

た後、減少し、11時間後には静止型のみとなった。照明再開5時間後には再び運動型出現率は高くなった。明条件14:00~2:00でも、同様に推移した。

光条件の差による運動型出現率は、12時間照明区3.7%に対し、24時間、48時間照明区0~0.4%と低かった。

試験2(攪拌刺激)

刺激60~150分後に出現率は最高になり、330~390分まで出現した。刺激強度を比較した試験では、手振り攪拌と比較してハンドミキサー攪拌区の出現率は、有意に高くなり($p<0.01$)、20秒区が最高であった。

試験3(刺激時刻)

出現率は9:30区23.2%、12:30区8.6%、16:30区0.5%で、出現率のピークは刺激後90分で共通していた。光刺激によるピーク時間に攪拌刺激を与えると効率的に運動型に変異することが明らかになった。

光刺激が運動型変異の引き金になり、刺激に慣れると減少し、暗期を経て再光刺激で増加することが分かった。連続照明条件で運動型出現率が低下することから、運動型出現には暗期が必要であると推察された。シャコガイ種苗生産時に培養容器から取り出し攪拌による刺激を与えて投与することが運動型変異に有効であり、水槽底面の残餌共生藻に攪拌による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。

2)刺激と運動型細胞出現率との関係

試験1(水質)

刺激時の水質変化による運動型の出現率は、水質無変化区20.8%、水質変化区21.3%で差はなかった。水質変化は、運動型出現率に影響しないことが判明した。

試験2(細胞密度)

運動型は、他の静止型に衝突する様が観察される。運動型が、他の静止型に刺激を与え、新たな変異を誘発することが想定された。そこで、試料の濃度を変え、刺激時の細胞密度と出現率との関係を調べた結果、高密度区の出現率28.4%、低密度区27.7%で差は無かった。細胞密度と出現率は無関係であると考えられた。

試験3(温度降下)

刺激時の温度降下による出現率は、常温区25.1%、温度降下区15.3%で、再試験の結果、温度降下A区(-2.5℃)の最高値8.4%、温度降下B区(-5.5℃)の最高値3.5%であった。急激な温度降下が出現率を低下させることが示唆された。

試験4(温度上昇)

刺激後の温度上昇による出現率は、常温区24.4%、緩慢上昇区25.5%で、差は無いと判断された。刺激時の急激な温度上昇による運動型出現率は、常温区11.4%、急激上昇区2.2%であった。急激な温度上昇は、運動型出現率を低下させることが解った。

以上の結果から培養液と飼育水の水質差及び細胞密度は運動型出現率に影響を与えないことが判明した。急激な温度変化は、運動型出現率を低下させることがわかった。春季のシャコガイ飼育水温(25℃)が培養水温(28~30℃)よりも低く、夏季は飼育水温(33℃)が培養水温よりも上昇する。急激な温度変化を避けるためには、差を徐々に縮め、投与する方が良いと考えられた。

3)共生藻履歴と運動型細胞出現率との関係

試験1(細胞密度・培養形態・元種株)

共生藻の増殖状態と運動型への変異の関係の関係を明らかにするために、細胞密度と運動型出現率との関係を調べた結果、共生藻の増殖状態と運動型出現率との間に、相関関係はないことが判明した。

培養形態及び元種株別運動型出現率の比較及び培養形態別出現率平均値の差を検定した結果、初代培養の出現率平均8.9%、継代培養の出現率平均7.2%、再通気初代培養の出現率平均13.9%、保存培養の出現率平均0.6%で、保存培養は初代培養と有意差が認められ($p<0.01$)、継代培養とも有意差が認められた($p<0.05$)。保存培養と再通気初代培養とは有意差は認められなかった($p>0.05$)が、危険率10%以下($p<0.1$)で有意差が認められたため、保存培養は再通気初代培養に比べても出現率が低いことが示唆された。他の3形態では、再通気初代培養の出現率が最も高かったが、ばらつきが大きく、3形態に有意差は認められなかった($p>0.05$)。複数の培養事例を持つ元種株について比較した結果、ヒレG株の出現率は高く、他株と差があると考えられた。ヒレG株再通気継代培養の出現率は、20.2%で、同株初代培

養の34.5%には劣ったが、他株継代培養の出現率と差があり、ヒレB株、ヒレナシE株の初代培養、ヒレナシC株再通気初代培養より高かった。ヒレG株は、運動型細胞に変異し易く、その特徴が継代後も受け継がれたことが示唆された。同一株の培養形態においては、初代培養若しくは再通気初代培養が継代培養、再通気継代培養より高かった。

試験2(培養日数)

培養日数の違いによる運動型出現率は、7日と9日以降を比較した6事例中5事例で7日が高く、9日と11日以降を比較した全6事例で9日が高かった。10日と11日に差は無く、6日目までの出現率は、培養日数に比例して高まり、6日は7日より低い事が示唆された。運動型出現率は培養7～9日目に高くなり、それ以降、運動型に変異し難くなる事が明らかになった。

以上の結果から共生藻の増殖状態と運動型への変異は相関しないことが判明し、保存培養からは運動型に変異し難いと推察された。元種株の履歴が運動型への変異に関与し、同一元種株においては、初代培養、再通気初代培養は、変異し易く、継代培養、再通気継代培養では変異し難くなると推察された。

運動型に変異し易い元種株は、採取したシャコガイの成育環境、季節等の要因によるものか、共生成立時に取り込んだ共生藻履歴に依存しているのか不明である。しかし、シャコガイ種苗生産現場では、高い運動型出現率を示した元種株を選択的に保存培養後、再通気初代培養し、高い運動型出現率を再現できる。

同一培養事例で培養7～9日目に運動型に変異し易く、それ以降、変異し難くなる事が明らかになった。

4)運動型細胞出現率向上試験

運動型出現率に及ぼす培地換え効果は、培養日数が同じ事例で、培地換えを行い、出現率が1.2～14倍に向上した。1事例は培地換え5日後に3.3～6.9倍になり、2事例は培地換え2～3日後に1.5～5.5倍に向上した。

以上の結果から培養途中での培地換えは運動型出現率向上効果があることがわかった。この結果を種苗生産に応用し、培養10日以上的事例では、培地

換えを行った後、餌料として用いる方が良いと考えられた。

(3)シャコガイ初期仔貝との共生の検討

1)細胞形態の違いによる共生試験

11回の試験回次中、全試験区で共生できなかった回次が7回あり、これらは、シャコガイ孵化幼生の活力に問題があったと考えられた。4回次中運動型区が静止型区の共生率を上回った例が2例あった。各回次の供試個体数が少なく、共生率が全体的に低かった。

シャコガイ種苗生産時の飼育水槽から採取した初期仔貝の周りに運動型細胞が蝟集する様子は従来の観察で見られるが、上記結果から共生成立時の運動型の有利性を明らかに出来なかった。しかし、運動型細胞が共生に有利に作用した1事例があった。今後、運動型出現率を人為的に高める手法を用いて追試し、運動型が仔貝と共生し易いことを明らかにする必要がある。

2)他種シャコガイ仔貝との共生試験

試験1(大型水槽飼育)

共生個体の生残率を共生率とした。ヒメジャコ共生藻は1回ヒレジャコ仔貝と共生し、ヒレジャコ共生藻は3回ヒメジャコ仔貝と共生した。他種共生藻投与区の共生率平均3.0%は、同種共生藻投与区の共生率平均3.7%に比較して低く、有意差は認められなかった($p>0.1$)。全試験区において共生成立個体が確認された。

試験2(小型容器飼育)

ヒメジャコ共生藻はヒレジャコ仔貝と1回共生し、ヒレナシジャコ仔貝と2回共生した。試験回次2は対照区に劣ったが、高い共生率であった。ヒレジャコ共生藻はヒメジャコ仔貝と1回共生し、ヒレナシジャコ仔貝と2回共生した。ヒレナシジャコ共生藻はヒメジャコ仔貝と4回全て共生できず、ヒレジャコ仔貝と1回共生した。シラナミ共生藻は3回、ハナヤサイサング共生藻、コモンサング共生藻は1回、ヒメジャコ仔貝との共生を試み、共生できなかった。ミドリイシサング共生藻はヒメジャコ仔貝との3回中1回共生した。

14回の試験中8回は対照区も仔貝と共生できず、これらの回次は、孵化幼生の活力に問題があったと

考えられた。対照区のみが共生したのは、ヒメジャコ仔貝の2回であった。他種シャコガイへの共生の試み30事例中8事例で共生成立した。共生不成立22事例中対照区も共生できなかった事例は16事例あった。

本試験の仔貝供試個体数は少なく、共生率が全体的に低いため今後の追試が必要だと思われた。しかし、他種シャコガイ仔貝との共生成立が8事例あったことから、シャコガイ種類間の共生藻の相互利用の可能性が示唆され、種苗生産現場において、培養共生藻の多面利用の可能性が開けた。また、1事例で、サンゴ共生藻がシャコガイ仔貝と共生したことで、他種類の共生藻をシャコガイ仔貝へ給餌できる可能性が開けた。

試験3(共生成立後飼育)

他種シャコガイ共生藻との共生仔貝が、共生成立後に同種シャコガイ共生藻を取り込み、体内の共生藻種が入れ替わるのか不明であった。そこで、他種シャコガイ共生藻との共生仔貝が、同種共生藻を取り込めない状況下で成育し得るのか試験を行った。

ヒレジャコ共生藻と共生したヒレナシジャコ稚貝は、92日間(日令346)で76.3%生残し、殻長17.3mmに成長した。以上の結果から他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示唆された。

4. 今後の課題

- ・単離培養元種からの継代培養の実用化をめざし、単離元種を利用した継代培養を確立し、より安定的、計画的なシャコガイ餌料培養技術を開発する。
- ・運動型細胞出現率の高い元種を入手するために、外套膜を採取するシャコガイの生育環境を検討し、優良元種を採取する。
- ・他種シャコガイとの共生試験を追試し、共生藻相互利用を確実にし、種苗生産の効率化に繋げる。