

えられた。

雑藻混入防止試験の結果からイソジン・カルキ処理手法の有効性が判明した(図1)。これは、シャコガイ生体の洗浄が有効であったと推察された。外套膜採取前のシャコガイ生体の洗浄方法に検討を加え、長期間の安定培養が可能になった。

初代培養試験1の結果から培養水温 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(図2)。35℃も 30℃と比較すると増殖は不安定であった。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。<sup>10)</sup>

光強度に関しては初代培養試験1の結果で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ため、更に初代培養試験2で水温 30℃、P-ES 改変培地、試験開始密度  $40 \times 10^4 \text{cells}/\text{ml}$  の条件下での最適光強度を求めた。その結果、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(図3)。

シャコガイは殻長 3 mm 以上になり殻が厚くなって不透明になると、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。<sup>1,3,10)</sup> 同時に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。<sup>3)</sup> 初代培養試験2の結果はこのことと符合した。また、シャコガイの生育に適した光強度と共生藻の増殖に適した光強度とは大きく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℃、光強度 60  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、試験開始密度  $40 \times 10^4 \text{cells}/\text{ml}$ 、P-ES 改変培地の条件下で 9～11 日間培養すればよいことが明らかになった。

継代培養試験の結果からヒレ継代培養は、初代培養と比較して増殖は劣った(表 21、22)。通気培養による継代を繰り返すことで共生藻細胞が劣化し、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、一度、振盪培養によって保存し、再通気初代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 改変培地で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、 $\text{Ca}^{2+}$  IMK 培地を使うと初代培養とほぼ同等の増殖がみられた(表 22)。 $\text{Ca}^{2+}$  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(表 21、22)。

P-ES 改変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(表 21、22)。 $\text{Ca}^{2+}$  IMK 培地でのヒレナシ継代培養は、P-ES 改変培地に比べて最高細胞密度が高く(表 21、22、図 4、5)、再通気初代培養と同等の増殖が可能であることが示唆された(表 21、図 6)。 $\text{Ca}^{2+}$  IMK 培地がヒレ以上にヒレナシ共生藻の培養に適していることが判明した。

シャコガイ 2 種の共生藻を用いた継代培養試験の結果から共生藻培養における培地は P-ES 改変培地よりも  $\text{Ca}^{2+}$  IMK 培地が適していることが解った。ヒレ共生藻とヒレナシ共生藻では培養特性が異なり、 $\text{Ca}^{2+}$  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、 $\text{Ca}^{2+}$  IMK 培地を用いて再通気培養すれば増殖が期待できるため、ヒレでは保存培養と再通気培養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

シャコガイの共生藻は外套膜表皮下に静止型細胞として生存し、シャコガイ体外に出ると 2 本の鞭毛を持った運動型細胞に変異する(図 7)。<sup>3, 21, 22, 23, 24, 25, 26)</sup> しかし、フラスコ内で培養した共

生藻の殆どは静止型細胞であり運動型細胞はごく少数しか出現しない。シャコガイ種苗生産水槽へ投与された共生藻の殆どは静止型細胞のままであることが多い。<sup>2)</sup> 一方、仔貝がある程度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<sup>1,10)</sup> 及びシャコガイ飼育下において晴天時の午前中に運動型細胞が多く存在することが観察されており、<sup>2)</sup> 細胞の形態とシャコガイ仔貝との共生の間に何らかの関係があることが考えられた。

運動型細胞出現率推移試験の結果から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(図 8、9)。連続照明条件で運動型細胞の出現率が低下することから、運動型細胞が出現するためには暗期が必要である<sup>15)</sup> と推察された。

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わかった。これらの試験結果から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 1.5 時間に当たる 9:30 に共生藻に攪拌による振動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(図 11、12、13)。このことはシャコガイ種苗生産時の共生藻投与方法及び飼育手法に応用できる。共生藻投与時に培養容器から取り出し攪拌による振動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り、前日までに投与した水槽底面の残餌共生藻に攪拌による振動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。

刺激と運動型細胞出現率との関係を解明する試験の結果から培養液と飼育水の水質差及び細胞密度(試料の希釈濃度)は運動型細胞の出現率に影響を与えないことが判明した(図 14、15)。急激な温度変化は、運動型細胞の出現率を低下させることがわかった(図 16、17、18、19)。春季のシャコガイ種苗生産時には飼育水温(25℃)が共生藻培養水温(恒温室 28 ~ 30℃)よりも低く、夏季の種苗生産時は飼育水温(33℃)が培養水温よりも上昇する。<sup>1,10)</sup> それらの時期の運動型細胞の出現率は低下していることが推察された。そこで、急激な温度変化を避けるためには、飼育水温と培養水温の差を徐々に縮め、投与する方が良いと考えられた。

共生藻履歴と運動型細胞出現率との関係を解明する試験の結果から共生藻細胞の増殖状態と運動型細胞への変異は相関しないことが判明し(図 20)、保存培養からは運動型細胞に変異し難いと推察された(表 24、図 21、表 25)。元種株の履歴が運動型細胞への変異に関与することが示唆され、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(表 24、図 22、表 26)。

運動型細胞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、初期殻頂期仔貝の共生成立時に取り込んだ共生藻の履歴に依存しているのかは不明である。しかし、シャコガイ種苗生産現場では、高い運動型細胞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、高い運動型細胞出現率を再現できる可能性が出てきた。

同一培養事例において培養 7 ~ 9 日目に運動型細胞に変異し易くなり、それ以降、変異し難くなることが明らかになった(図 23)。この結果は継代培養試験の最高細胞密度到達日数 9 日 ~ 13 日目に比較して早いピークであった。

運動型細胞出現率向上試験の結果から培養途中での培地換えは運動型細胞出現率を高める効果があることがわかった(図 24)。この結果をシャコガイ種苗生産に応用し、培養日数が 10 日以上経過した事例では、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。