

(3) 初代培養試験

初代培養試験は、ヒレジャコ外套膜を薄く剥ぎ、洗浄後、滅菌海水 1,000ml と共に滅菌したミキサー(11,000 回転/分)ですりつぶし、溶解しない泡状の不純物を除き元種とした。培養水は全て超精密濾過海水(0.01 μm 以下中空糸膜カット)を熱処理して用いた。培養には 500ml 平底フラスコを用いた。恒温室の照明は 8:00 ~ 20:00 とし、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、^{11,12)} 計数をする際には、容器内に滅菌した研磨用布状たわし小片を投入して摩擦し、剥ぎ落とした。¹³⁾ 回収した試料を 500ml ビーカー

で 5 回交互に移し替え攪拌し、250ml を採取し、計数用試料として 2 倍希釈した。これを調理用ハンドミキサー(13,000 回転/分)で 10 秒間攪拌し、100ml 採取した。これをブレンダー(18,500 回転/分)、ジェネレーションホモジナイザー(25,000 回転/分)で各 1 分間攪拌し、試料を血球計算盤(改良ノイバウエル 2 面タイプ)で 6 回計数し、平均値をとった。^{2,13,20)} 設置した翌日を培養 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。表 4、表 5 に初代培養試験の培養方法及び条件を示した。

表 4 初代培養試験 1 の培養方法及び条件

| | |
|---|--|
| 水温及び光強度 | 20°C · 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 区 |
| | 20°C · 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 区 |
| | 20°C · 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 区 |
| | 25°C · 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 区 |
| | 25°C · 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 区 |
| | 25°C · 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 区 |
| | 30°C · 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 区 |
| | 30°C · 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 区 |
| | 30°C · 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 区 |
| 35°C · 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 区 | |
| 試験開始細胞密度 | 20 × 10 ⁴ cells/ml |
| 培地 | P-ES 改変培地 |

表 3 雑藻混入防止試験の方法

| | | |
|--------------|--|--|
| 外套膜洗浄方法 | 水洗 | 水道水で 5 分間手揉み洗浄(通常手法) |
| | エタノール | エタノール(70%)溶液で 5 分間洗浄 |
| | ゲルマニウム A | 二酸化ゲルマニウム 1% 溶液で 5 分間洗浄 |
| | ゲルマニウム B | 水洗後、二酸化ゲルマニウム 1% 溶液を培養液中に 3 ml/1,000 ml 投与 |
| | カルキ(2.4%) | 次亜塩素酸ナトリウム(有効塩素 2.4%) 溶液で 3 分間洗浄 |
| | カルキ(3.6%) | 〃 (有効塩素 3.6%) 溶液で 3 分間洗浄 |
| | カルキ(4.8%) | 〃 (有効塩素 4.8%) 溶液で 2 分間洗浄 |
| | カルキ(1.2%) | 〃 (有効塩素 1.2%) 溶液で 3 分間手揉み洗浄 |
| | カルキ(0.6%) | 〃 (有効塩素 0.6%) 溶液で 3 分間手揉み洗浄 |
| | カルキ(0.6%) | 〃 (有効塩素 0.6%) 溶液で 5 分間手揉み洗浄 |
| イソジン ・カルキ | カルキ(有効塩素 12%) を殻に塗布し、殻洗浄したシャコガイをイソジン(有効ヨウ素 10 mg ポビドンヨードを 100 mg/ml 含有) 1.5% 溶液 20L で 3 時間薬浴し、外套膜を有効塩素 0.6% カルキ溶液で 5 分間手揉み洗浄 | |
| 培養形態 | 通気培養 | |
| 培養器 | 500ml、1,000ml、3,000ml 平底フラスコ | |
| 夾雑物混入の確認 | 培養後、顕微鏡観察し、夾雑物を確認した時点で培養終了とし、各手法中の最長期間事例をその手法の混入日数とした。 | |

表 5 初代培養試験 2 の培養方法及び条件

| | |
|----------|---|
| 水 温 | 27.8 ~ 33.2°C |
| 光 強 度 | 60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 区 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 区 110 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 区 |
| 試験開始細胞密度 | 40 × 10 ⁴ cells/ml |
| 培 地 | P-ES 改変培地 |