

短報 有害ラフィド藻 *Chattonella antiqua* の大量培養技術開発

眞鍋美幸・西 広海・川口吉徳¹

¹ 鹿児島県大隅地域振興局林務水産課

鹿児島県において最も警戒すべき赤潮生物種の一つである *Chattonella antiqua* を、容易かつ安定的に大量培養する技術を開発するため、1 kL ポリカーボネートタンクに改変 SWM-3 培地を 20 L 収容し、*C. antiqua* を 50 ~ 100 cells/mL 接種して、水温 24 °C、光強度約 60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、14 時間明 10 時間暗の明暗周期で静置培養したところ、11 ~ 18 日間で細胞密度は 1×10^9 cells/mL 以上に達し、タンクあたり 2×10^9 cells 以上の細胞が得られた。大型水槽に少量の培地を入れ、水深を極力浅く、表面積を極力大きくすることでガス交換が維持され、高密度培養が可能になったと推察される。本研究により *C. antiqua* 大量培養の基本技術が開発できたと考えられ、今後は大型魚類の曝露試験など赤潮対策研究への活用が期待できる。

Chattonella antiqua は主に 6 月下旬から 9 月上旬に内湾域で増殖して赤潮を形成する有害種である。鹿児島県における本種の赤潮は、1988 年以降、八代海において確認され、しばしば本県の魚類養殖業に被害をもたらしてきた。特に、2009 年と 2010 年には 2 年連続で八代海で大規模赤潮を形成し、養殖ブリ類に 57 億円を超える甚大な被害を与え、¹⁾ 本県において最も警戒すべき赤潮生物種の一つとなっている。

この対策として *C. antiqua* 赤潮の防除技術の開発が急務となっており、そのためには *C. antiqua* を用いて魚毒性の把握、魚体への影響、赤潮防除剤の開発といった様々な試験を実施する必要がある。当所では八代海で *C. antiqua* 赤潮が発生した際、これを採取してブリへの曝露試験を実施し、その影響を把握した。²⁾ しかしこの方法では、赤潮発生時にしか *C. antiqua* を大量に使用する試験は実施できない。上記課題解決を図るには、人為的に *C. antiqua* を大量かつ安定的に培養し、*C. antiqua* 赤潮の発生、非発生に関わらず試験を周年実施できる体制を構築する必要がある。

これまで当所では、5 L 容フラスコで微通気による本種の培養を行い、フラスコ 1 本あたり 7.5×10^7 ~ 10×10^7 cells (1.5×10^4 ~ 2.0×10^4 cells/mL) 程度の培養が可能となり、ブリ 2 年魚 (約 3,200 g) を供試魚として、1 kL 水槽を用いた曝露試験を実施した。³⁾ しかしこの手法では、必要細胞数を確保するために、5 L 容フラスコを大量に並べて培養しなくてはならず、試験規模に限界がある。同じラフィド藻類の赤潮プランクトンである

Heterosigma akashiwo では、より効率的な大量培養技術が開発されているものの、³⁾ 本種ではまだ確立されていない。

そこで本研究では、1 kL または 2 kL 水槽でブリ 2 年魚の *C. antiqua* への曝露試験を実施することを想定し、曝露時の細胞密度を 1,000 cells/mL とした時の各水槽の必要量である 1×10^9 cells と 2×10^9 cells を目標細胞細数として大量培養技術開発試験を実施したので報告する。

材料及び方法

試験には、2009 年 8 月 4 日に八代海南部で採集し当所では分離、継代培養した *C. antiqua* クローン株を用いた。培地は、砂ろ過海水を 3 μm カートリッジフィルターでろ過し、オートクレーブ (トミー工業株式会社製 ES-315) により滅菌処理 (120 °C, 20 min) した海水で、栄養強化培地である改変 SWM-3 培地 (表 1 山口未発表を一部改変) を調製して用いた。培養は当所の恒温飼育室に、1 kL ポリカーボネートタンク 1 基を設置し、培地 20 L を収容して行った。*C. antiqua* は、水温 15 ~ 30 °C、光強度 30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 以上で、明暗周期の暗期に概ね 1 日 1 回の細胞分裂が起こり増殖すること、⁴⁾ 天然海域で赤潮が発生した時の環境条件を勘案し、水温は空調により 24 °C、照明は 40 W 蛍光灯 (2 本 1 組) を上部に 2 基、側面に左右 1 基ずつ設置して光強度が約 60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ になるよう調整し、14 時間明 10 時間暗の明暗周期に設定した。また、水槽下には照明を反射させるためアルミシートを敷き、水槽上部は海水

表1 改変SWM-3培地組成 (一部改変)

成分	添加量	保存液濃度	最終濃度
NaNO ₃	2mL	21.25g/250mL	2.0mM
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	2mL	1.95g/250mL	0.1mM
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	2mL	7.105g/250mL	0.2mM
Na ₂ EDTA	2mL	1.40g/250mL	30 μM
Fe EDTA	2mL	0.105g/250mL	2 μM
Na ₂ SeO ₃	1mL	0.346mg/L	2nM
Tris	500mg		
P-1 Metal Sol.	10mL		下記参照
S3 Vitamins Sol.	2mL		下記参照
Sea water	1000mL		

pH 7.7-7.8

P-1 Metal Sol.	
成分	添加量
H ₃ BO ₃	6.183g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	692.5mg
ZnCl ₂	54.5mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	2.38mg
Distilled water	up to 1000mL

S3 Vitamins Sol.	
成分	添加量
Thiamine HCl	0.25g
Nicotinic acid	0.05g
Ca pantothenate	0.05g
p-aminobenzoic acid	5mg
Biotin	0.5mg
Inositol	2.5g
Folic acid	1mg
Thymine	1.5g
Vitamin B ₁₂	1mg
Distilled water	up to 1000mL

の蒸発を防ぎつつ完全に空気を遮断しないよう、透明ビニールシートで覆って僅かな間隙を設け、通気は行わず静置培養とした (写真1)。

試験は2回実施し、開始時の細胞密度は50~100 cells/mL程度の低密度が適していると考えられることから、⁹⁾ 第1回試験は50 cells/mL、第2回試験は100 cells/mLを接種して試験を開始した。培養中は定期的に培養水を1mL採取し、*C. antiqua*の細胞数を光学顕微鏡で計数した。

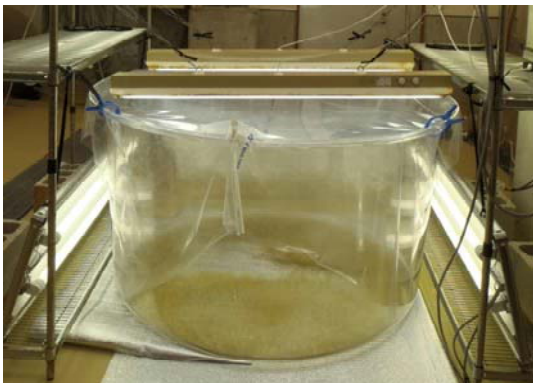


写真1 大量培養試験の様子

結果

図1に*C. antiqua*の細胞密度及びタンクあたりの

総細胞数の推移を示す。

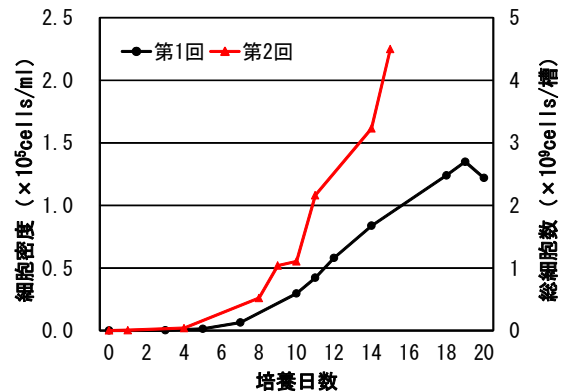


図1 細胞密度及びタンクあたりの総細胞数の推移

第1回試験は、培養開始から3日目まではタイマーの誤設定により一部照明が24時間明期となっていたため増殖は停滞したが、14時間明10時間暗の明暗周期に修正した4日目からは順調に増殖した。タンクあたりの総細胞数は、培養開始から12日目で 1.16×10^9 cells (0.58×10^5 cells/mL)、18日目に 2.48×10^9 cells (1.24×10^5 cells/mL)と目標細胞数を達成し、最大細胞数は19日目の 2.70×10^9 cells (1.35×10^5 cells/mL)であった。

第2回試験は、試験開始後9日目に光強度を一時低下 ($67 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s} \rightarrow 35 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) させたところ

増殖は一時停滞したが、11 日目に元の光強度に戻すと再び順調に増殖した。タンクあたりの総細胞数は、培養開始から 9 日目で 1.04×10^9 cells (0.52×10^5 cells/mL), 11 日目に 2.16×10^9 cells (1.08×10^5 cells/mL) と目標細胞数を達成し、最大細胞数は 15 日目の 4.5×10^9 cells (2.25×10^5 cells/mL) であり、この結果から第 1 回試験の再現性を確認した。

考 察

これまで *C. antiqua* は、フラスコレベルの少量の培地で静置培養を行えば、数万 cells/mL の高密度培養が可能であったが、容量が増すに連れ培養密度が減少するため大量培養が困難となっていた。^{5,6)} その原因の一つはガス交換の低下であると考えられたが、通気培養を行うと細胞形態の異常や生長低下が起り高密度培養はできなかった。^{5,6)} そこで本研究では、1 kL ポリカーボネートタンクに 20 L の培地を収容して静置培養を行った。この時の水深はわずか 2 cm 足らずで、空気に接している表面積は約 1.37 m²であった。このように大型水槽に少量の培地を入れ、水深を極力浅く、表面積を極力大きくしたことでガス交換が維持できたと推察され、20 L という容量でも高密度培養が可能になったと考えられる。なお、培養時の光強度は、本研究の第 2 回試験で 35 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ では増殖が一時停滞したことから 60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 程度を維持する必要があると思われる。

本研究の手法は、通常の動植物プランクトンの大量培養のように順次大きな水槽へ植え継いでいく必要もなく、1 つの水槽で 2 週間程度で $1 \times 10^9 \sim 2 \times 10^9$ cells を確保することができ、調整に手間がかかる培地も必要最小限の量にできるため、実用化可能な基本技術が開発できたと考えられる。また、必要細胞数に達した時点で海水等で希釈すれば、そのまま同じ水槽でブリ等大型魚類の曝露試験を効率的に行うことも可能であり、今後の赤潮対策研究への活用が期待できる。

なお、天然海域における *C. antiqua* 赤潮は、100 cells/mL 程度の着色を伴わない低密度でも養殖ブリ等を斃死させるため、他の赤潮プランクトンよりも毒性が強いことが知られている。²⁾ しかしながら、人為的に培養した *C. antiqua* の養殖ブリに対する致死量は数千 cells/mL を必要とし、*C. antiqua* 自体が弱毒化している可能性が考えられている。⁷⁾ 従って、今後の課題として、天然海域の *C. antiqua* 赤潮を再

現するには、培養細胞の毒性を確認するとともに、毒性が低い場合には、より毒性の強い *C. antiqua* の培養手法の開発が必要である。

謝 辞

本研究を行うにあたり、改変 SWM-3 培地の組成を提供いただいた独立行政法人水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所の山口峰生主幹研究員に感謝申し上げます。*C. antiqua* の大量培養試験に協力していただいた当センター栽培養殖部（現企画・栽培養殖部）の皆様にお礼申し上げます。

文 献

- 1) 西 広海, 田原義雄, 徳永成光, 久保 満, 吉満 敏, 中村章彦. 2009 年及び 2010 年に八代海で発生した *Chattonella antiqua* 赤潮. 鹿水技セ研報 2012; 3: 37-44.
- 2) 西 広海, 田原義雄, 徳永成光, 久保 満, 吉満 敏, 中村章彦. *Chattonella antiqua* 赤潮の養殖ブリに対する影響—養殖ブリに対する曝露試験—. 鹿水技セ研報 2012; 3: 34-36.
- 3) 多賀 茂. 研究 ヘテロシグマ・アカシオの餌料効果～赤潮プランクトン種のアサリ餌料としての可能性～. 「月刊アクアネット」湊文社, 東京. 2011; 6: 50-54.
- 4) 今井一郎. ラフィド藻赤潮の発生機構と予知. 「有害・有毒赤潮の発生と予知・防除—水産研究叢書 48」(石田祐三郎・本城凡夫・福代康夫・今井一郎編)日本水産資源保護協会, 東京. 2000; 29-70.
- 5) 眞鍋美幸. *Chattonella antiqua* 大量培養試験. 平成 23 年度鹿水技セ事報. 2012; 222-224.
- 6) 松山幸彦, 吉田 誠. 試験魚の選定と毒性評価試験法の開発. 平成 22 年度漁場環境・生物多様性保全総合対策委託事業 赤潮・貧酸素水塊漁業被害防止対策事業(シヤトネラ属有害プランクトンの魚介類への影響, 毒性発現機構の解明, 漁業被害防止・軽減技術に関する研究) 報告書. 2011; 13-17.
- 7) 折田和三, 西 広海, 田原義雄, 中村章彦. 赤潮総合対策調査事業—IV (赤潮被害防止緊急対策事業). 平成 23 年度鹿水技セ事報 2012; 110-123.

