

## 資料 有害ラフィド藻 *Chattonella antiqua* の基礎的な 大量培養技術開発

西 広海・田原義雄<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 商工労働水産部水産振興課

5 L 容フラスコを用いた *Chattonella antiqua* の大量培養試験を実施し、大量培養に適した培養条件を検討した。その結果、栄養強化海水培地の塩分は調整する必要はなく、培養開始時の本種の細胞密度が 100 cells/mL となるよう接種し、微通気によるガス交換を促すことで、本種の大量培養が可能になると考えられた。この *C. antiqua* の大量培養技術を用いることにより、赤潮発生現場でのブリに対する曝露試験だけでなく、任意の時期、細胞密度で室内試験を実施することが可能となった。

鹿児島県における有害ラフィド藻 *C. antiqua* による赤潮は、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対して被害をもたらしている。*C. antiqua* による赤潮は、1988 年に東町（現長島町）幣串地先で発生して以来、2015 年までに 13 件発生し、うち 10 件で漁業被害が発生している。なかでも 2009 年と 2010 年には、本種による赤潮が八代海だけでなく、有明海、橘湾の広い範囲で大規模に発生し、本県では 2009 年に約 20 億 3 千万円、2010 年には約 36 億 8 千万円と、2 年連続で大きな被害が発生するなど、本県のみならず、熊本県、長崎県における魚類養殖業に対し深刻な影響を与えた。

当所ではこの対策として、*C. antiqua* 赤潮の防除技術開発のために、本種を用いた魚毒性の把握、ブリ等の養殖対象種への影響、赤潮防除剤の開発といった様々な試験をこれまで実施してきた。なかでも西ら<sup>1)</sup>は、ブリに対する魚毒性の把握のため、2010 年に八代海で *C. antiqua* 赤潮が発生した際、これを赤潮発生海域で採取し、その場でブリへの曝露試験を実施し、その影響を把握したが、この方法は赤潮発生時にしか *C. antiqua* を大量に使用する試験を実施できない。このため、*C. antiqua* を大量かつ安定的に培養することにより、*C. antiqua* 赤潮が発生しなくても試験を周年実施できる体制を構築する必要がある、当所ではこれまで *C. antiqua* の大量培養技術の開発に取り組んできた。その成果として眞鍋ら<sup>2)</sup>は、1 kL ポリカーボネートタンクを用いて *C. antiqua* を培養し、11-18 日間で本種の細胞密度が  $1 \times 10^5$  cells/mL 以上に達し、タンクあたり  $2 \times 10^9$  cells 以上の細胞が得られ、本種の大量培養の基

本技術が開発できたことを報告している。

本稿では、上記報告の前段階である基礎試験として実施した、5 L 容フラスコを用いた *C. antiqua* の大量培養試験について取りまとめることにより、これまで当所が実施してきた、*C. antiqua* の大量培養技術開発の過程について、理解を深める一助とする。

### 材料及び方法

#### 1 *C. antiqua* の至適培養条件の検討

試験には 2009 年 8 月 4 日に八代海南部で採取した *C. antiqua* を、当所で分離培養したクローン株を用いた。

栄養強化海水培地は、当所地先の取水口から採水した砂ろ過海水を  $3 \mu\text{m}$  カートリッジフィルターでろ過し、オートクレーブ (SANYO 社製 MLS-3750) により滅菌処理 (120 °C, 3min) した海水に、f/2 培地<sup>3,4)</sup>から Cu と Si を除き、Se と Tris を添加した改変 f/2 培地 (表 1) を添加して調整したものを、5L 容フラスコに 5L 収容した。

温度環境は、試験を実施した飼育実験棟恒温培養室のエアコンを 24 °C に設定することで、一定となるよう調整した。

光環境は、試験に使用する 5L 容フラスコを照明付培養棚 (SANYO 社製 MLR-1546, 4 段の棚、棚当たり 40W 白色蛍光灯 2 本) に配置し、照度を 2,400 Lx から 4,300Lx に調整した。また付属のタイマーを用い、14 時間明 10 時間暗の明暗周期とした。

塩分は前述の滅菌海水の 35 を基本とした。塩分を下げる場合は、蒸留水製造装置 (ADVANTEC 社製 RFD240NA) で製造した蒸留水を混合し、海水

濃度屈折計（アズワン株式会社製 IS/Mill-E）で確認しながら目的の塩分となるよう調整した。

通気は、5L 容フラスコの口部に取り付けたシリコン栓に穴を開け、ガラス管（外径5mm, 内径3mm）をフラスコの底面上1cm付近まで到達するよう配管し、ビニールチューブで飼育実験棟恒温培養室のエア配管と接続して実施した。ほかに空気抜き用のガラス管を配管した。なお通気は、*C. antiqua* がフラスコの底面に沈殿しないよう栄養強化海水培地の攪拌する目的で行ったが、*C. antiqua* の属するラフィド藻綱の細胞は、細胞壁等の外皮構造を持たないため壊れやすく、<sup>5)</sup>通気による気泡の物理的的刺激で *C. antiqua* の細胞が破壊されないように考慮するため、必要最低限のごく微量とした（図1）。

表1 改変f/2培地組成

成分	添加量	保存液濃度	最終濃度
NaNO <sub>3</sub>	1mL	75g/1000mL	8.83×10 <sup>-4</sup> M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ・H <sub>2</sub> O	1mL	5g/1000mL	3.63×10 <sup>-5</sup> M
H <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	1mL	※1 参照	
Tris metals-1溶液	1mL	※2 参照	
Tris metals-2溶液	1mL	※3 参照	
Vitamin mix	0.5mL	※4 参照	
Tris	0.5g		
Seawater	1000mL		
pH 7.4			
※1 H <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>			
成分	添加量	保存液濃度	最終濃度
H <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	1mL	0.129mg/100mL	1×10 <sup>-10</sup> M
※2 Trace metals-1溶液			
成分	添加量	保存液濃度	最終濃度
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ・2H <sub>2</sub> O	1mL	0.63g/100mL	3×10 <sup>-8</sup> M
ZnSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	1mL	2.2g/100mL	8×10 <sup>-8</sup> M
CoCl <sub>2</sub> ・6H <sub>2</sub> O	1mL	1.0g/100mL	5×10 <sup>-8</sup> M
MnCl <sub>2</sub> ・4H <sub>2</sub> O	1mL	18.0g/100mL	9×10 <sup>-7</sup> M
蒸留水で1000mLに定容			
※3 Trace metals-2溶液			
成分	添加量	保存液濃度	最終濃度
FeCl <sub>3</sub> ・6H <sub>2</sub> O	3.15g	—	1×10 <sup>-5</sup> M
Na <sub>2</sub> EDTA・2H <sub>2</sub> O	4.36g	—	1×10 <sup>-5</sup> M
蒸留水で1000mLに定容			
※4 Vitamin mix			
成分	添加量	保存液濃度	最終濃度
Vitamin B <sub>12</sub>	1mL	0.1g/100mL	1×10 <sup>-10</sup> M
Biotin	10mL	0.01g/100mL	2×10 <sup>-9</sup> M
Thiamine・HCl	200mg	—	3×10 <sup>-7</sup> M
蒸留水で1000mLに定容			

### 1) 培養開始時の細胞密度及び通気の有無

開始時の *C. antiqua* の細胞密度を 1cell/mL 及び 100cells/mL になるよう接種し調整したものと、ガラス管で通気したものと無通気を組み合わせた4区を設定した。各区とも1基の5L 容フラスコを使用した（図1）。



図1 *C. antiqua*の培養状況

試験は、*C. antiqua* の細胞密度 1cell/mL の2区が 2009年11月20日から12月21日までの31日間、*C. antiqua* の細胞密度 100cells/mL の2区が 2009年11月26日から12月21日までの25日間とし、休日以外はほぼ毎日検鏡して *C. antiqua* の細胞密度を計数した。

### 2) 塩分

栄養強化海水培地を 5L 容フラスコ 1 基に 5L 収容し、塩分を 35 と 30 に調整した2区を設定し、*C. antiqua* 培養株を 100cells/mL になるよう接種し、通気で培養を行った。

試験は 2009年12月11日から12月28日までの17日間とし、定期的に検鏡して *C. antiqua* の細胞密度を計数した。

### 3) 培養開始時の細胞密度

栄養強化海水培地を 5L 容フラスコに 1 基あたり 5L 収容し、*C. antiqua* 培養株を 100cells/mL 及び 200 cells/mL となるよう添加した 2 区を設定し、通気で培養を行った。100cells/mL 接種区は 4 基、200 cells/mL 接種区は 2 基の 5L 容フラスコを使用した。

試験は 2010年1月29日から2月10日までの12日間とし、3日目以降は休日以外は毎日検鏡して *C. antiqua* の細胞密度を計数し、平均細胞密度を求めた。

### 2 プリ曝露試験用の大量培養

1の結果を踏まえ、プリの曝露試験に供する目的で *C. antiqua* 培養株の大量培養を 2 回実施した。1の1)と同じ海水に栄養強化海水培地の改変 f/2 培地を添加して調整したものを 5L 容フラスコに 5L

収容し, *C. antiqua* 培養株を 100cells/mL 及び 158 cells/mL になるよう接種し, 通気, 塩分 35 で培養を行った。1 回目は 11 日間, 2 回目は 9 日間の培養を行った。それぞれ 5L 容フラスコ 10 基を使用した。

## 結果

### 1 *C. antiqua* の至適培養条件の検討

#### 1) 培養開始時の細胞密度及び通気の有無

*C. antiqua* 培養株を 1cell/mL になるよう接種した区 (通気区及び無通気区) の細胞密度の推移を図 2a に, 100cells/mL になるよう接種した区 (通気区及び無通気区) の細胞密度の推移を図 2b に示した。

1cell/mL 接種区は, 通気区, 無通気区とも 10 日目まではほとんど細胞密度の差は見られなかったが, その後通気区の細胞密度が急激に増加し, 21 日目には 50,000cells/mL に達し, その後減少した。一方無通気区の細胞密度は, 11 日目以降は増加したものの, 最高細胞密度は 18 日目の 3,010cells/mL であり, その後減少した (図 2a)。

100cells/mL 接種区は, 通気区, 無通気区とも 4 日目まではほとんど細胞密度の差は見られなかったが, その後通気区の細胞密度が急激に増加し, 12 日目には 41,600cells/mL に達し, その後減少した。一方無通気区は, 5 日目以降は細胞密度は増加したものの通気区と比較して低調であり, 最高細胞密度は 7 日目の 3,200cells/mL であり, その後減少した (図 2b)。

#### 2) 塩分

試験区の *C. antiqua* の細胞密度の推移を図 3 に示した。培養開始 5 日目に, 塩分 30 区の細胞密度は 28,500cells/mL, 塩分 35 区は 17,000cells/mL となったが, 6 日目には塩分 30 区の細胞密度は 1,470 cells/mL, 塩分 35 区は 10,100cells/mL と減少した。その後両区とも細胞密度が再び増加したが, 7 日目以降で細胞密度が最も高くなったのは 14 日目で, 塩分 30 区は 17,700cells/mL, 塩分 35 区は 27,700 cells/mL であった。

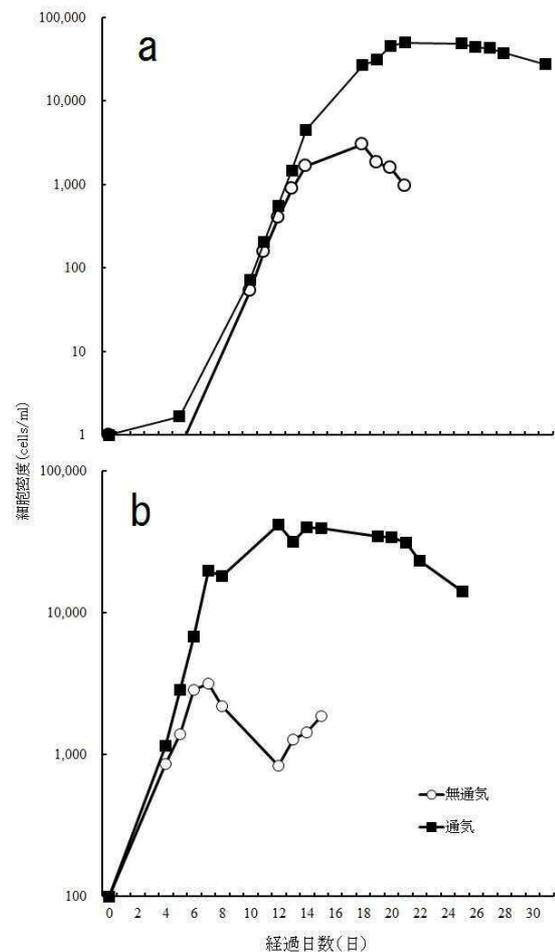


図2 通気の有無による *C. antiqua* の細胞密度の推移

- a. 開始時の細胞密度 1 cell/mL
- b. 開始時の細胞密度 100 cells/mL

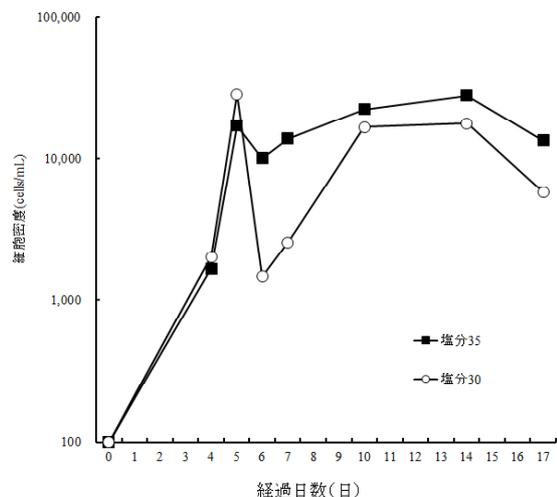


図3 塩分の違いによる *C. antiqua* の細胞密度の推移

### 3) 培養開始時の細胞密度

試験区の *C. antiqua* の平均細胞密度の推移を図4に示した。100cells/mL 接種区は、概ね順調に細胞密度が増加し、最高細胞密度は実験終了時である12日目の、18,300cells/mLであった。200cells/mL 接種区は、7日目までは100cells/mL 接種区を上回る細胞密度を示したが、その後2日間は細胞密度の増加が停滞し、その後再び増加した。最高細胞密度は100cells/mL 接種区と同じく実験終了時である12日目の17,900cells/mLであった。各試験区の5L容フラスコのうち、最高細胞密度となったものの推移を比較したものを図5に示した。12日目の最終的な細胞密度は100cells/mL 接種区が24,700cells/mLで200cells/mL 接種区が23,600cells/mLとほぼ同等であったが、200cells/mL 接種区は7日目以降の増殖速度が緩やかになったのに対し、100cells/mL 接種区は12日目までほぼ同様の増殖速度を示した。

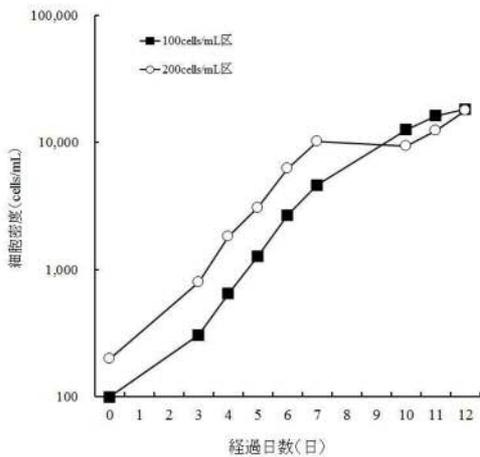


図4 *C. antiqua*の細胞密度の推移 (平均細胞密度)

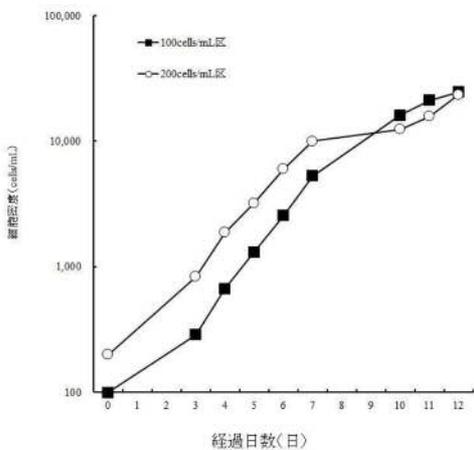


図5 *C. antiqua*の細胞密度の推移 (両区の最高細胞密度)

### 2 プリ曝露試験用の大量培養

1回目培養及び2回目培養の細胞密度の推移を図6に示した。1回目は、9日目に平均細胞密度が10,500cells/mL (7,170cells/mL-15,900cells/mL)となった。ここで10本の5L容フラスコのうち2本はブリの曝露試験に供したため、培養を終了した。その後残りの8本は培養を継続し、11日目には平均細胞密度が13,400cells/mL (11,100cells/mL-16,400cells/mL)となった。10本の5L容フラスコによる *C. antiqua* の総培養細胞数は、681,000,000cellsであった。2回目は、8日目に平均細胞密度が9,870cells/mL (6,280cells/mL-13,600cells/mL)となった。ここで10本の5L容フラスコのうち4本はブリの曝露試験に供したため、培養を終了した。その後残りの6本は培養を継続し、9日目に平均細胞密度が11,200cells/mL (7,900cells/mL-15,800cells/mL)となった。10本の5L容フラスコによる *C. antiqua* の総培養細胞数は、542,000,000cellsであった。

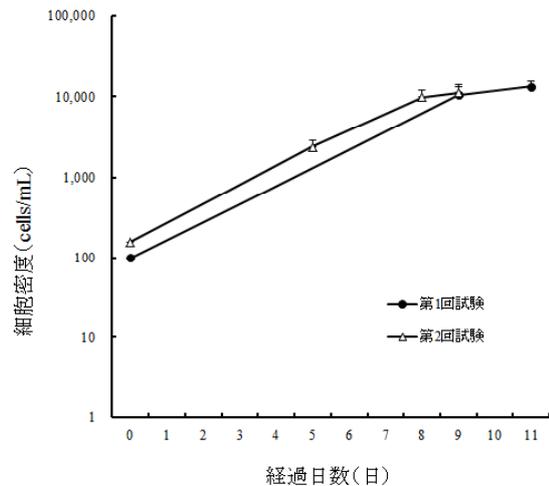


図6 *C. antiqua*の細胞密度の推移 (大量培養試験) バーは標準偏差を示す

### 考 察

#### 1 *C. antiqua* の至適培養条件の検討

##### 1) 通気の有無

通気の有無で比較すると、1cell/mL 接種区、100 cells/mL 接種区とも、通気区は培養当初は増殖が低調だったものの、その後急激に増殖し、到達した最高細胞密度は、無通気区と比較して圧倒的に高かった (図 2a, 2b)。Yamamoto and Nakahara<sup>6)</sup>は、ラン藻の *Mycrocystis aeruginosa* Kutzing の増殖におよ

ぼす曝気の影響を調べたところ、曝気をしない条件では速やかに定常状態に達したが、曝気をした場合は増殖し続け、この結果は溶存無機炭素が静置条件では制限因子になりやすく、CO<sub>2</sub>の取込効率が *M. aeruginosa* の優位性を考察する上で重要なことを示唆していると述べている。このようにガス交換の程度が培養容器中における植物プランクトンの増殖に大きな影響を与えることから、今回の試験でも通気により *C. antiqua* の増殖に影響を与えたものと考えられる。

## 2) 塩分

6日目に塩分30区、35区とも細胞密度が減少し、特に塩分30区は5日目の細胞密度と比較して大きく減少した。6日目前後の光環境は、明暗周期の当初の設定(14時間明10時間暗)は変更しておらず、機器の故障等も見られなかった。水温は5日目が24.8℃、6日目が24.1℃と、ほぼ設定した水温を保っていた。また7日目以降は細胞密度は徐々に高くなり、*C. antiqua*の細胞が変形する等の状態変化は観察されず、細胞密度が急激に減少した理由は不明である。

7日目以降では、塩分30区、35区とも14日目に最も細胞密度が高くなり、塩分35区の方が最高細胞密度は高かった(図3)。山口ら<sup>7)</sup>は、室内培養試験により *C. antiqua* の増殖に及ぼす水温と塩分の影響について調べ、*C. antiqua* の最大増殖速度を与える水温と塩分の組み合わせは、25℃と25‰(塩分25)であったとし、最大増殖温度である25℃における *C. antiqua* の増殖は10から35‰(塩分35)と極めて広い塩分範囲にわたって観察されたとしており、総合すると *C. antiqua* は広塩分性種であると判断されると述べている。今回の試験で塩分35のほうが高細胞密度が高かったが、これは *C. antiqua* が広塩分性種である特性によると考えられ、培養に用いる塩分35の滅菌海水を塩分30に調整するには蒸留水を加える必要があり手間がかかることから、あえて塩分を調整する必要はなく、通常得られる塩分35の滅菌海水をそのまま使用することで、大量培養に係る労力を軽減できるものと考えられる。

## 3) 培養開始時の細胞密度

培養開始時の *C. antiqua* の接種細胞密度を通気区同士と比較すると、最高細胞密度が1cell/mL接種区で50,000cells/mL、100cells/mL接種区が41,600

cells/mL とほぼ同等であったが、最高細胞密度に到達するまでの日数を比較すると、1cell/mL接種区が21日目であったのに対し、100cells/mL接種区は12日目と早かった(図2a, 2b)。岡市<sup>8)</sup>は、生物にとっての集合の利点について、繊毛虫の *Oxytricha* で、単独個体より複数個体の方が増殖率が高くなるというわれ、魚類などを含め、多くの生物について生態学的な観察がされていると述べている。

以上のことから今回の培養条件のうち、*C. antiqua* を栄養強化海水培地に100cells/mL接種し、通気して培養するのが有効と考えられる。

100cells/mL接種区と200cells/mL接種区とで比較した結果では、200cells/mL接種区は100cells/mL接種区より平均細胞密度が高くなると予想していたが、実際には200cells/mL接種区は一時増殖が停滞したこともあり、最終的な平均細胞密度は100cells/mL接種区とほぼ同等であった(図4)。200cells/mL接種区の増殖が一時停滞したが、培養した2基の細胞密度を比較すると、7日目は10,000cells/mLと10,400cells/mLでほぼ同等であったが、10日目に1基は12,400cells/mLと増加したが、もう1基は6,350cells/mLと細胞密度が約61%に減少した。それ以降は2基とも細胞密度が増加したが、この1基の細胞密度の減少が平均細胞密度に影響し、最終的な平均細胞密度が100cells/mL接種区とほぼ同等となった要因であった。測定した室温を見ると7日目が26.6℃であったのに対し、10日目は24.3℃と低下しており、このことが増殖に影響した可能性はあるが、200cells/mL接種区の残り1基と100cells/mL接種区の4基の細胞密度は増加していることから原因は不明である。

100cells/mL接種区と200cells/mL接種区の、最高細胞密度となったフラスコ同士を比較すると、両区の最終的な細胞密度はほぼ同等であったが、100cells/mL接種区は200cells/mL接種区より対数増殖期が長い傾向があった(図5)。そのため実際の *C. antiqua* の大量培養の際は、100cells/mLを接種して培養開始するほうが、*C. antiqua* 細胞の増殖活性の高い状態の期間が長く、曝露試験に供するのに適していると考えられる。

以上のとおり、*C. antiqua* の5L容フラスコを用いた大量培養に適した培養条件を検討した。

今回の試験結果から、栄養強化海水培地の塩分は調整する必要はなく35のままで使用し、培養開始

時の本種の細胞密度が 100cells/mL となるよう接種し、弱い通気によりガス交換を促すことで、本種の大量培養が可能になった。

また、*C. antiqua* をブリの曝露試験に供する際は、本種の活性が高いことが望ましいが、*C. antiqua* が最高細胞密度となる前の、増殖が活発である対数増殖期の細胞を使用することが望ましいものと考えられる。

## 2 ブリ曝露試験用の大量培養

2回の培養では、それぞれ5L容フラスコ10基を使用した。1回目培養では総計681,000,000cells、2回目培養では総計542,000,000cellsの*C. antiqua*が得られた。これをブリに曝露することにより、ブリの*C. antiqua*に対する耐性を把握することができた。ブリに対する曝露試験を実施したのは2010年3月で、*C. antiqua*が通常赤潮化しない冬季である。*C. antiqua*を大量培養することにより、赤潮の発生の有無にかかわらず、任意の時期に曝露試験を実施することが可能となった。さらに、*C. antiqua*を大量に培養することで、より大型の水槽で曝露試験を実施できる。大型の水槽であれば、ブリも大型魚を供試することが可能となる。今回培養した*C. antiqua*は、200L容角型水槽に海水を100-150L収容したものに、細胞密度が300-1,400cells/mLになるよう収容した。ブリは体重約600gのものを各5尾収容して試験を実施した。例えば海水100Lを*C. antiqua*の細胞密度が1,000cells/mLになるようにするには、100,000,000cellsの*C. antiqua*が必要となる。今回培養した細胞数では、5水槽程度をまかなえることになる。

この*C. antiqua*の大量培養技術を用いることにより、赤潮発現場でのブリ等に対する曝露試験だけでなく、任意の時期、任意の細胞密度で室内試験を実施することができ、*C. antiqua*赤潮が発生しなくても、より多くの知見を得ることが可能となった。

しかしながら養殖業者は、赤潮に対する養殖魚の耐性、特に実際に彼らが養殖しているサイズの養殖魚(1kg以上)についての知見を求めており、より大容量の水槽での曝露試験を実施する必要がある。現在では本稿による*C. antiqua*の培養試験による知見を進展させ、眞鍋ら<sup>2)</sup>によって1kLポリカーボネートタンクを用いた*C. antiqua*の大量培養の基本技術が確立するに至った。今後はこの技術を用い、より大型のブリを用いた曝露試験を実施して、*C.*

*antiqua*のブリに対する魚毒性の知見を蓄積することが重要と考えられる。

## 謝 辞

*C. antiqua*の大量培養試験に協力していただいた、当センター漁場環境部の皆様、及び栄養強化海水培地を作製するのに必要な、ろ過海水の滅菌処理作業に従事していただいた臨時職員の皆様に心から感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) 西 広海, 田原義雄, 徳永成光, 久保 満, 吉満 敏, 中村章彦. *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—. 鹿児島県水産技術開発センター研究報告. 2012; **3**: 34-36.
- 2) 眞鍋美幸, 西 広海, 川口吉徳. 有害ラフィド藻類 *Chattonella antiqua* の大量培養技術開発. 鹿児島県水産技術開発センター研究報告. 2014; **5**: 15-17.
- 3) Guillard R R L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In Smith W L and Chanley M.H (Eds.) *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, USA. 1975; 26-60.
- 4) Guillard R R L and Ryther J H. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. J. Microbiol.* 1962; **8** : 229-239.
- 5) 今井一郎. ラフィド藻類における分類と同定の問題点—生態研究の立場から—. 日本プランクトン学会報 2000; **47**(1): 55-64.
- 6) Yamamoto Y and Nakahara H. Competitive dominance of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in nutrient-rich culture conditions with social reference to dissolved inorganic carbon uptake. *Phycological Research*. 2005; **53**: 201-208.
- 7) 山口峰生, 今井一郎, 本城凡夫. 有害赤潮ラフィド藻 *Chattonella antiqua* と *C. marina* の増殖速度に及ぼす水温, 塩分および光強度の影響. 日本水産学会誌 1991; **57**: 1277-1284.
- 8) 岡市友利. 培養中にみられる鞭毛藻類のパッチ形成について. 海洋科学 1979; **11**: 650-654.