

海産微細藻類の凍結保存について

誌名	水産増殖 = The aquiculture
ISSN	03714217
著者	杉山, 昭博 金城, 盛徳
巻/号	36巻3号
掲載ページ	p. 253-258
発行年月	1988年12月

海産微細藻類の凍結保存について

杉山 昭博・金城 盛徳
(沖縄県水産試験場八重山支場)

Freeze-Preservation of Marine Microalgae

Akihiro SUGIYAMA and Seitoku KINJŌ

通称海産クロレラ、テトラセルミス、およびキートセロスなどの微細藻類は魚類等種苗生産時の初期餌料(ワムシ等)の培養、および直接餌料として広く利用されている。しかし、一般に種の保存は継代培養法で行われており、継代途中で雑物が混入したり、温度調整の事故等で種断絶の危険性がある。また、保存株が多くなれば継代操作も繁雑になるため、種を安全で簡便に保存するため凍結保存法を検討する^{1,2)}。

材料および方法

材料 沖縄県水産試験場八重山支場地先海域から採集し、ワムシ類の培養に使用している通称海産クロレラ(種名不確定、以下クロレラと略)、農林水産省養殖研究所から分譲されたテトラセルミス *Tetraselmis tetraathele*、およびシラヒゲウニなどの種苗生産に使用しているキートセロス *Chaetoceros gracilis* (沖縄県栽培漁業センター由来)を用いた。

前培養 供試株をミッケル海水(ALLEN & NELSON, 1910)³⁾に25℃、6,000 lx(24時間照射)で静置培養し(以下の培養条件は同じ)、充分発育のみられる培養液を3,000 r.p.m., 10分間遠心分離して上清を捨て、滅菌海水で数回洗浄した。その後、ミッケル海水寒天平板培地上に画線培養し、細菌の汚染がないと思われる単一コロニーを再び平板培地で培養して凍結保存用の原株とした。なお、キートセロスは無菌化が充分でない。原株をミッケル海水で3日間培養して2等分し、

片方は凍害防御剤としてグリセリン10%とジメチルスルホキシド(DMSO)5%濃度になるように加え、無添加区とともに24時間培養した。凍結開始時の各株濃度は凍害防御剤含有区のクロレラは 2.0×10^6 、テトラセルミスは 2.9×10^5 、キートセロスは 9.1×10^5 、凍害防御剤無含有区のクロレラは 9.7×10^5 、テトラセルミスは 7.3×10^4 、キートセロスは 1.3×10^6 (細胞数/ml)である。

凍結条件 培養液1mlを滅菌済ポリプロピレンチューブ(12.5×49mm)に分注し、その後超低温フリーザー(-70℃)に直接入れた区(Direct区)、4℃で24時間培養後に-20℃で保存した区、および4℃と-20℃で順次24時間ずつ培養した後-70℃に凍結した区(Step区)の3区を設定した。保存期間は1週間、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、および1年間で、いずれの実験区も同じ条件を3区設定して3系列の幾何平均を求めた。

融解条件と増殖力の測定 40℃の水槽中で急速融解し、3,000 r.p.m.で10分間遠心分離して上清を捨て、滅菌海水で数回洗浄した。その後前培養と同じ条件で培養し、血球計算盤を用いて細胞数を測定した。

結 果

クロレラの凍結保存1年間の結果は図1に示す通りである。凍結保存原株のミッケル海水水中での増殖を破線で示して比較した(テトラセルミスとキートセロスでも同じ)。-20℃保存の凍害防御剤無含有区は、凍

受領日：昭和63(1988)年6月24日

索引語：テトラセルミス・クロレラ・キートセロス/種の凍結保存/凍害防御剤

連絡先：〒907-04 沖縄県石垣市字川平 828-2 沖縄県水産試験場八重山支場 杉山昭博

Address：A. SUGIYAMA, Yaeyama Branch, Okinawa Pref. Fish. Exp. St., Ishigaki-shi, Okinawa 907-04

結 1 週間では増殖開始が培養13日目頃からと原株に比べて著しく遅れていた。また、1ヶ月以上の保存株は増殖しなかった。防御剤含有区は凍結1週間では原株とほぼ同じ増殖がみられ、1ヶ月では増殖開始が遅れ、

また3系列中の1つは増殖しなかった。なお、3ヶ月以上の保存株は増殖しなかった。

-70°Cに保存した区は凍害防御剤の有無に関係なく1年間増殖がみられた。また、防御剤含有区では凍結

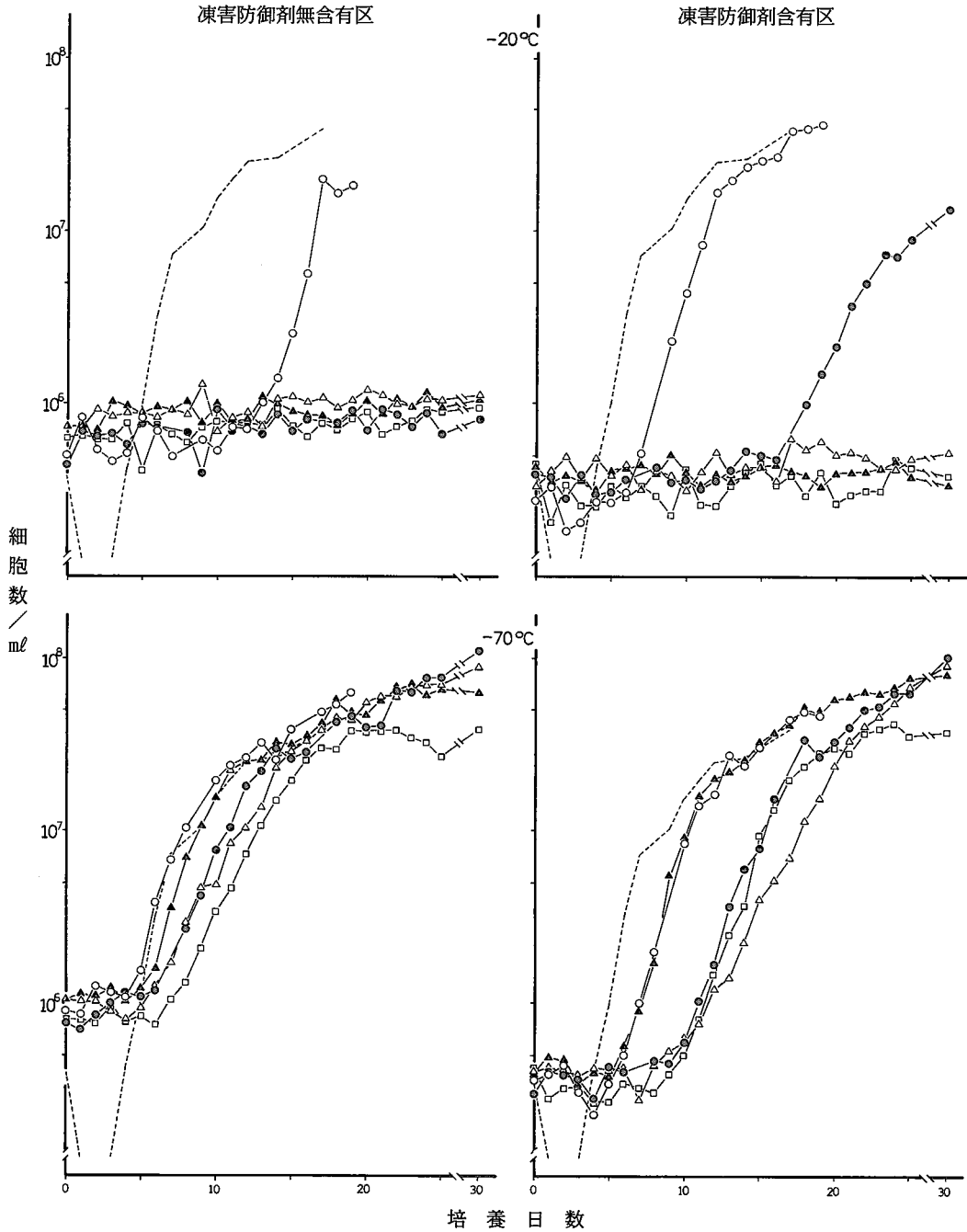


図1 クロレラの増殖性
保存期間 (○: 1週間, ●: 1ヶ月, △: 3ヶ月, ▲: 6ヶ月, □: 12ヶ月)

1ヶ月、3ヶ月、および1年後の増殖開始時期が多少遅れる傾向がみられた。なお、Step区はDirect区とほぼ同じ増殖性がみられたために資料は省略した。

テトラセルミスの凍結保存1年間の結果は図2に示

す通りである。-20°C保存の凍害防御剤無含有区では凍結1ヶ月目まで増殖したが、増殖の開始が遅れる傾向がみられ、また3ヶ月以上の保存では増殖しなかった。防御剤含有区では凍結3ヶ月まで増殖したが、保

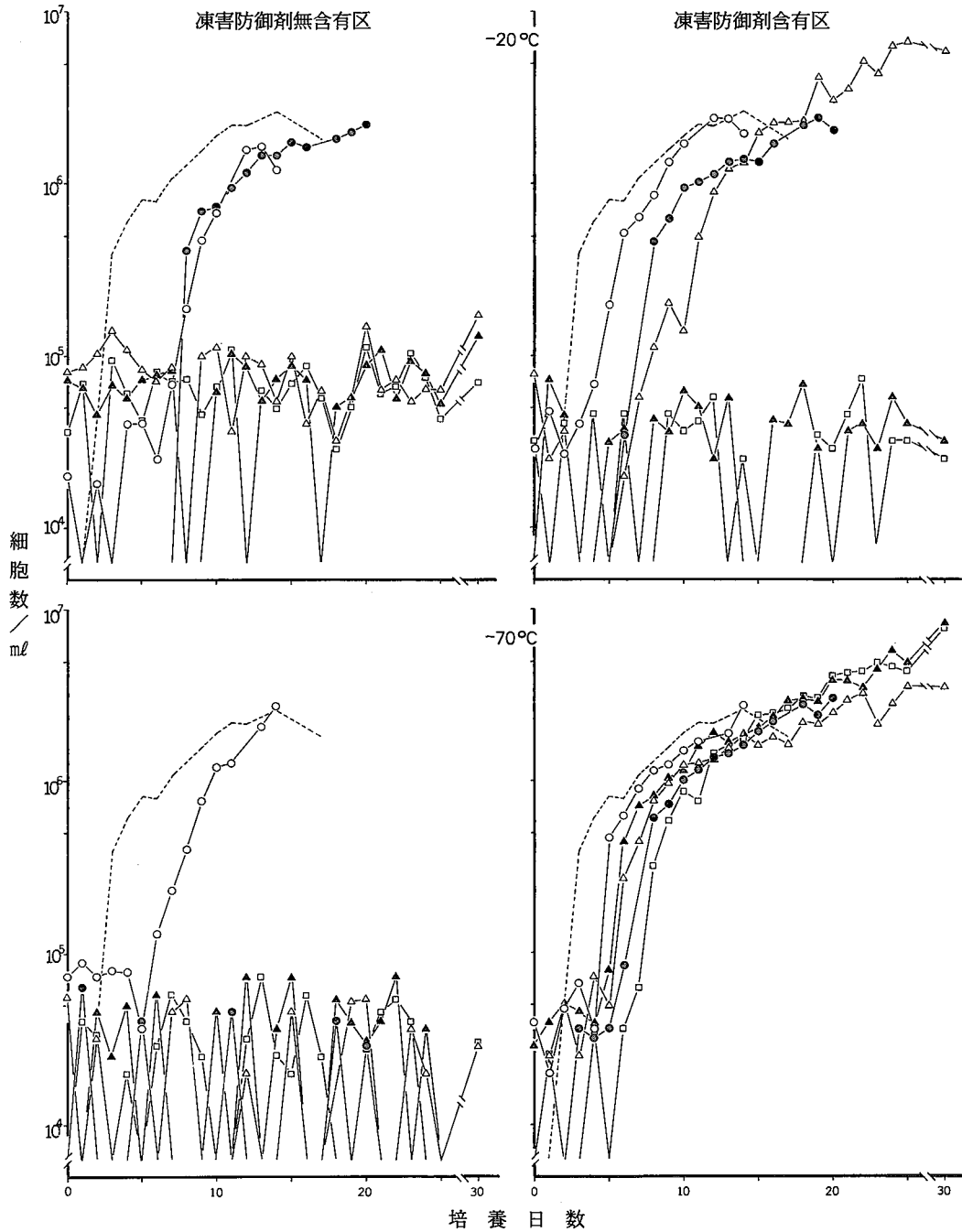


図2 テトラセルミスの増殖性
保存期間 (○: 1週間, ●: 1ヶ月, △: 3ヶ月, ▲: 6ヶ月, □: 12ヶ月)

存期間が長くなるにしたがって増殖の開始が遅れ、6ヶ月以上では増殖しなかった。

-70°C保存の凍害防御剤無含有区では凍結1ヶ月以上の保存株は増殖しなかった。また、防御剤含有区で

は1年間増殖がみられた。なお、Step区はDirect区とほぼ同じ増殖性がみられたために資料は省略した。

キートセロスの凍結保存1年間の結果は図3に示す通りである。-20、-70°Cとも凍害防御剤無含有区で

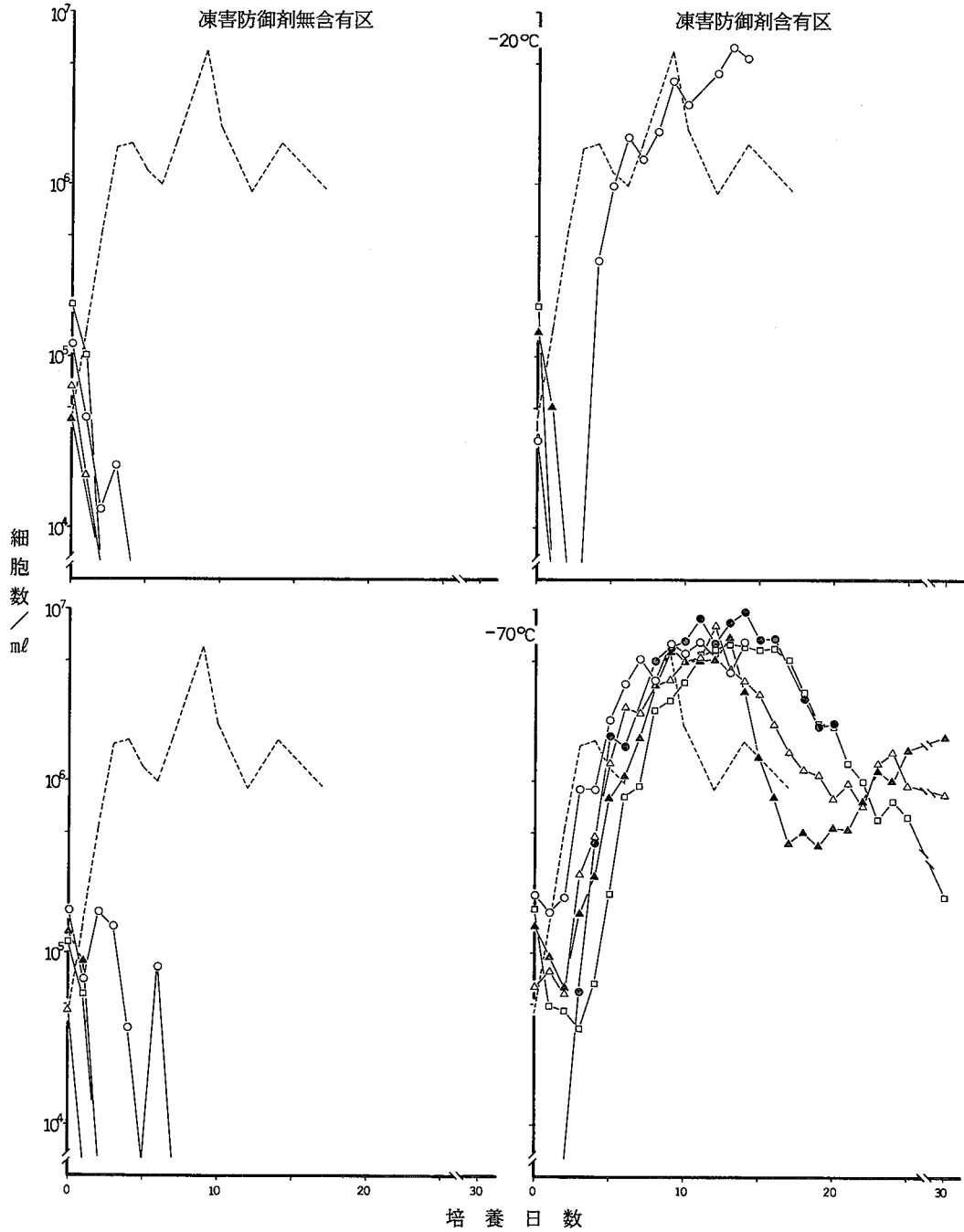


図3 キートセロスの増殖性
保存期間 (○: 1週間, ●: 1ヶ月, △: 3ヶ月, ▲: 6ヶ月, □: 12ヶ月)

は凍結1週間目から増殖がみられなかった。また、 -20°C の防御剤含有区では凍結1週間の保存株は増殖したが、それ以上の保存では増殖しなかった。 -70°C の防御剤含有区では1年間増殖がみられた。なお、 -70°C Step区はDirect区とほぼ同じ増殖性がみられたために資料は省略した。

考 察

一般に、凍結保存法は動植物の細胞培養において系統保存や実験材料の維持などに利用され、継代培養法での他物汚染、種の断絶、および性状変異の危険性や維持管理の複雑性などの問題点がある程度克服できると考えられている。佐藤⁹⁾は細胞の凍結保存法について内外の文献を調べ、一般的な凍結による細胞障害は1)細胞内外にできる氷の結晶による機械的障害、2)脱水に伴う塩類濃度の上昇、細胞構成物の表層の接触による不可逆的結合、および structured water 喪失によるタンパクおよび膜の変性など、3) pH の変化などによる、と要約している。そして、保存方法は緩速凍結で、温度は -100°C 以下が理想的、保護剤はグリセリンやDMSOなど、融解は 37°C の水槽内で急速に行う必要がある。また、機械を用いずに緩速凍結するための簡便法として 0°C (30分) $\rightarrow -20^{\circ}\text{C}$ (60分) $\rightarrow -80^{\circ}\text{C}$ (120分) $\rightarrow -196^{\circ}\text{C}$ に順次移すことが有効であると述べている。また、竹内⁹⁾は凍結保存法の基礎的な技術を紹介している。すなわち、供試する細胞は対数期、または対数期直後のものが良く、必要ならば低温処理をして耐寒性を増大する。凍害防御剤としてはグリセリン (5~15%)、DMSO (2.5~10%)、グルコース (4~5%)、エチレングリコール (2.5%) などの単独、または併用使用。保存操作の概略は、細胞の低温処理 ($+4^{\circ}\text{C}$) \rightarrow 凍害防御剤添加 \rightarrow 予備凍結 (-10°C ~ -50°C) \rightarrow 超低温貯蔵 (-196°C) \rightarrow 急速融解 ($+40^{\circ}\text{C}$ ~常温) \rightarrow 生死判定または再培養と記載している。

最近、渡辺⁹⁾は微細藻類の凍結保存方法を確立するため、凍結条件の検討が必要であることを指摘している。そして、内因子として前培養温度、培養齢、および培地中の栄養塩類と耐凍性の関係、外的因子として凍結速度、凍害防御剤、2段階凍結、および融解速度について述べている。さらにクロレラ、プロトテカほかのクロロコックム目、ミドリムシ、およびクラミドモナスの凍結保存の方法について詳解している。

以上のことから、凍結保存方法を詳しく検討するためには前培養方法、材料の培養齢、凍結速度、凍害防御剤の種類、および融解速度等を調べる必要がある。

本報告では、一般的で比較的簡単に行える方法で微細藻類の長期保存の可能性を検討した。すなわち、前培養温度は -70°C Direct区では 25°C $\rightarrow -70^{\circ}\text{C}$ 、Step区は 25°C $\rightarrow 4^{\circ}\text{C}$ (24時間) $\rightarrow -20^{\circ}\text{C}$ (24時間) $\rightarrow -70^{\circ}\text{C}$ 、 -20°C 区は 25°C $\rightarrow 4^{\circ}\text{C}$ (24時間) $\rightarrow -20^{\circ}\text{C}$ である。1年間の結果ではDirect区とStep区の増殖性には差がみられず、今後の資料から検討する。材料の培養齢については今回供試した材料はいずれも対数増殖期と考えられ、今後保存中の生存率を高めるためには、培養ステージと細胞内水分量の関係を正しく把握する必要がある。凍結速度の試験を行うためには特別な機器が必要で今回は調査できなかったが、培養温度から直接凍結保存温度に移せない種類については検討すべきであろう。凍害防御剤については種々の記載があり、保存材料に最適な方法を比較検討すべきであると思われるが、今回は一般的に用いられているグリセリンとDMSOを用いた。融解温度については、いずれの研究者も $+40^{\circ}\text{C}$ 付近の水槽中で急速融解する方法を用いており、実際に行う上での注意点は融解しすぎないことである。

なお、今回は保存株を培養して増殖の有無を観察したが、凍結の影響を詳しく解析するためには生存率の算出が必要と思われる。また実験は3年間を予定しており、本報では1年間の結果を取りまとめて報告した。

最後に、本研究は特定研究開発促進事業・初期餌料の培養技術開発研究の一部として行ったことを記し、関係各位に感謝いたします。また、農林水産省養殖研究所福所邦彦育種研究室長、岡内正典氏にはテトラセルミスを分譲いただき、また本研究について貴重な御助言をいただきましたことを深謝いたします。さらに、沖縄県栽培漁業センター主任研究員島袋新功氏にはキートセロスを分譲していただきましてお礼申し上げます。

要 約

微細藻類の凍結保存試験を1年間行って以下の結果を得た。

- 1) 通称海産クロレラは、凍害防御剤の有無に関係なく -70°C で1年間の保存の後でも増殖性がみられた。
- 2) テトラセルミスは、凍害防御剤含有培地で -70°C に保存した場合、1年後でも増殖性がみられた。
- 3) キートセロスはテトラセルミスと同様に、凍害防御剤含有培地で -70°C に保存した場合、1年後でも増殖性がみられた。

文 献

- 1) 杉山昭博・多和田真周・金城盛徳(1987): 昭和61年度 特定研究開発促進事業・初期餌料の培養技術開発研究報告書. 沖水試資料, 97, pp. 1-6.
- 2) 杉山昭博・前田訓治・金城盛徳(1988): 昭和62年度 特定研究開発促進事業・初期餌料の培養技術開発研究報告書. 沖水試資料, 101, pp. 1-3.
- 3) 市村輝宜(1985): 藻類研究法. 共立出版, 東京.
- 4) 佐藤二郎(1986): 組織培養. 朝倉書店, 東京, pp. 168-176.
- 5) 竹内正幸(1986): 新植物組織培養. 朝倉書店, 東京, pp. 374-379.
- 6) 渡辺 信(1987): 凍結保存. 朝倉書店, 東京, pp. 254-256, 258-264.