

エゾアワビ胚を用いた毒性試験の培養手順

武田 尚也・田井 梨絵

1. はじめに

エゾアワビの発生を毒性試験という形で観察する機会を得た。毒性試験では、正常な発生を観察するための一般的な培養手順とは異なる試験水の調整という特殊な条件設定が必要であるが、その培養手順の詳細は論文では省略されていることが多い。通常の発生観察では大容量の水槽を用い、エアレーションや換水をすることができ、操作は定性的であっても問題はない。一方で、毒性試験では対象物質の濃度を厳密に調整した試験区を多数用意するために、多数の小型容器を用いることとなり、エアレーションや換水ができず、操作は定量的でなければならない。よって、発生観察の手順をそのまま用いることはできない。このため、当該実験に最も適合する作業手順書がなく、相応しい培養手順を考えながらの作業が求められた。本稿では、試験中の試行錯誤の経験に基づき、毒性試験で記述されることが少ない培養手順の詳細について紹介する。

2. 材料

エゾアワビ (*Haliotis discus hannai*)

2017年3月20日、宮城県水産技術総合センター養殖生産部種苗生産施設で行われた、エゾアワビの人工採苗により得られた受精卵を用いた。

3. 受精卵の採取

3. 1. エゾアワビ成体

受精卵を採取するエゾアワビ成体は、十分に成熟し、生殖巣が貝殻からはみ出しているものを主体とする。生殖巣が緑色の個体が雌、白色の個体が雄である。

3. 2. 温度刺激などによる放卵・放精誘発

自然環境下において、エゾアワビの自然放卵・放精は夕方から夜にかけて行われる。そのため、種苗生産施設内での受精は昼夜反転させ行う。1週間以上昼夜反転して飼育された個体に対する人工採苗の作業はすべて暗黒条件下で行い、手元を懐中電灯で照らす以外はエゾアワビ成体に光刺激を与えないようにする。また、作業に使用する海水は紫外線照射で殺菌済みのものを使用する。紫外線照射した海水自体にも放卵・放精を誘発する作用があることが知られている（菊池・浮, 1974）。成体を水槽から採取し、殻と筋肉部を洗浄する。バットに海水で湿らせたガーゼを敷き、成体を殻が上になるように置き、乾燥しない程度に海水で湿らせたガーゼを被せる。これを20°Cの恒温室に1時間静置し、干出時間とする。干出が終了した成体を20°Cの誘発水槽に1個体ずつ入れ、30分かけて水温を23°Cまで上昇させる。誘発水槽の海水は低速のかけ流しにする。水温23°Cを2時間維持するが、この間に放卵・放精する個体も出現しうるため注意して観察する。水温維持の後、1時間に1°Cを目安として水温を低下させ、3時間後に20°Cに戻す。

3. 3. 未受精卵採取

エゾアワビ雌が放卵し、沈降した未受精卵が誘発水槽の底にある程度溜まったところで、サイフォン管を用いて未受精卵を吸い取り、300 µmのメッシュを通して雑物を除去しつつ、10L程度の受精用水槽に回収する。未受精卵は受精用水槽の底面を1層で覆う量を上限とする。未受精卵の採取が終了したところで、受精用水槽に海水を加え5L程度までメスアップする。

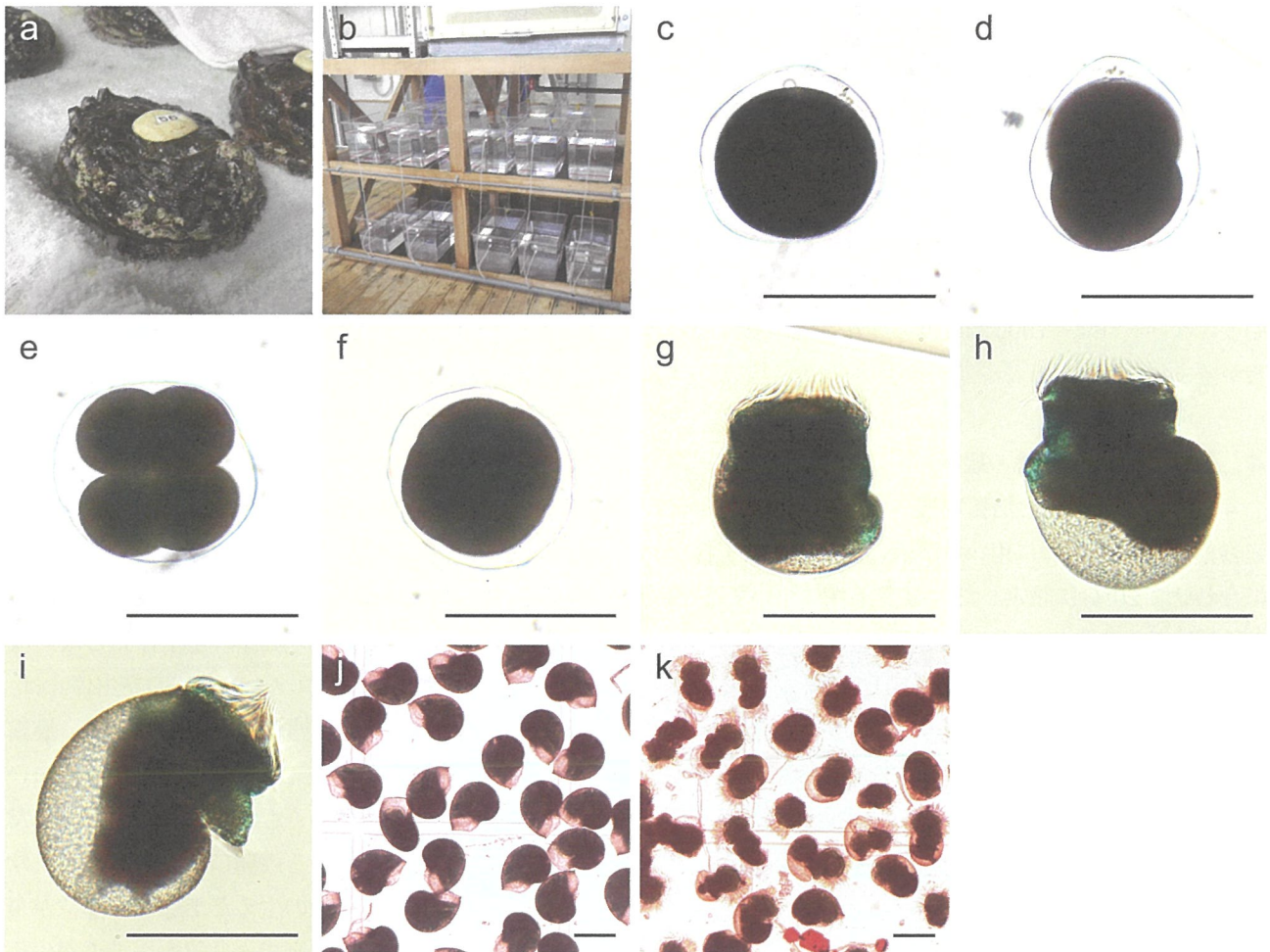


図1 エゾアワビ (*Haliotis discus hannai*)。a: 成体, b: 放卵・放精用水槽, c: 受精卵, d: 2細胞期, e: 4細胞期, f: 8細胞期, g: ベリジャー前期, h: ベリジャー中期, i: ベリジャー後期, j: 正常なベリジャー後期幼生, k: 異常な幼生。スケールはすべて200 μ m。

3. 4. 精子採取・受精・受精卵回収

エゾアワビ雄が放精したところで、白く濁った海水をスポイトで吸い取り採取する。この精子懸濁海水を3.3の受精用水槽に添加し、未受精卵を受精させる。添加量は海水が濁らない程度、受精時間は約1分とする。受精終了後、海水を満たしたバットに100 μ mのメッシュを貼った篩を置き、受精用水槽の懸濁液を篩に静かに注ぎ入れ、海水で軽く洗浄して余剰分の精子を除去する。洗浄後の受精卵は培養水槽に移し、海水を加えて5L程度までメスアップする。20 $^{\circ}$ Cで2時間培養する。

3. 5. 受精卵の状態確認

培養水槽中の受精卵を一部採取、検鏡して状態を確認する。受精直後の正常なエゾアワビ受精卵は、卵膜

を含めると直径200~240 μ m、卵膜は平滑でいびつな球状、囲卵腔は大きく、中心にある胚は球形であり、透過光下ではほとんど光を通さず青みがかった黒色に見える。エゾアワビ未受精卵は第一減数分裂中期の状態にあり、受精すると第一および第二極体を放出するが、胚の大きさに比べ極体は非常に小さい。このため、未受精卵と受精卵を見分ける時期は、明確に胚の形状が変わる2細胞期以降が确实である。20 $^{\circ}$ C培養の場合、2時間培養時点でほとんどの受精卵が2細胞期以降の分裂期にあれば、3.6へ進む。それ以外の場合は30分後に再び一部採取、検鏡し、ほとんどが2細胞期以降の分裂期にあれば3.6に、そうでなければ新たな受精卵または新たなエゾアワビ成体を用いて手順をやり直す。

3. 6. 受精率の算出

検鏡計数により、正常な分裂期にある受精卵の割合を算出することで受精率を調べる。培養水槽内をよく攪拌した後、口径約5 mmのスポイトを用いてサンプリングする。検鏡計数時は、枠付きの1 mm方眼入りスライドガラスとカウンターを用い、100倍以下の低倍率で検鏡すると作業がしやすい。カバーガラスをかける必要はない。100～1000個程度の受精卵を計数することが望ましい。

4. 暴露試験時の培養・観察

4. 1. 培養溶液と培養容器

暴露試験時の培養に用いる溶液の温度は、人工採苗に合わせて20°Cに設定した。温度条件については5.1で後述する。なお、ろ過海水は酸素濃度が低くなっているため、容器を十分攪拌し（10L容器に7割入れて2分間など）酸素を溶け込ませてから使う。培養容器は、胚が積み重なって酸欠にならないように、収容する受精卵数に対して底面積が十分に大きいものか、振盪機上に置くなどの工夫をしたものを使用する。

4. 2. 暴露試験

培養水槽をよく攪拌し、ピペットを用いて数ml程度を分取し、検鏡計数して培養水槽中の受精卵の総数を求める。試験区の設定では、培養水槽中の受精卵をビーカーなどに移し、沈殿させて濃縮する。受精卵が一様に分布するようビーカー内を緩やかに、かつ十分に攪拌しながら、各試験区の培養液にピペットを用いて必要量の受精卵を添加する。加える受精卵が多いほど検鏡計数が容易になるが、採取できた受精卵数と培養液の総量、そして卵の密度との兼ね合いを考える必要がある。筆者らが行った試験では、暴露開始から48時間後の検鏡計数時に100 μ mのメッシュを用いて溶液からエゾアワビ幼生のみを取り出す手順であったため、200 mlの容器に200個程度の受精卵を収容する低密度培養を行った。

4. 3. 観察

必要に応じて観察を行う。胚の観察は受精率の算出と同様にして、1試験区につき3回以上の計数を行い、

1回につき100個程度の胚を数えることが望ましい。筆者が参加した試験では、20°C培養において暴露開始から48時間後、受精から50時間後を検鏡計数のタイミングとし、正常個体と異常個体の割合を算出した。この段階ではベリジャー後期である。なお、受精から2時間で2細胞期から4細胞期、2.5時間で8細胞期、9時間で胞胚期、12時間でトロコフォア前期、19時間でトロコフォア後期、21時間でベリジャー前期、25時間でベリジャー中期、45時間でベリジャー後期まで発生が進んだ。受精後50時間後のベリジャー後期幼生の殻長径は270～300 μ m、殻短径は190～220 μ mであった。エゾアワビの発生異常は殻が形成されてから顕在化するものがあるため、ベリジャー後期における異常率の算出が容易である。発生後期においてよく観察された異常としては、トロコフォア期様の発生停止と殻形成異常とが挙げられる。トロコフォア期様の発生停止は、トロコフォア期のような形態から発生が進まず、暴露時間の経過に伴い繊毛の生えていない部分が徐々にびつな細胞塊に変形していくものである。殻形成異常は、ベリジャー後期における殻開口部および蓋が正常に形成されず、殻から繊毛の生えた半球形の部位が飛び出したものである。異常胚であっても、繊毛が生えるまで発生が進んだものは盛んに運動する。

4. 4. ルゴール・エオシン液

孵化した幼生は繊毛を動かして活発に遊泳するので、生きたままでは正確な計数と観察ができない。35% MgCl₂水溶液を滴下して麻酔をかけるか、ホルマリンを滴下して固定すれば動きが止まるが、ルゴール・エオシン液を用いてもよい。ルゴール・エオシン液については武田, 2016を参照。

5. 考察

5. 1. 温度条件と発生速度

培養液に使用する海水の水質や胚の遺伝的性質以上に、培養時の温度条件が発生速度に強く影響するようである。筆者らが参加した試験ではエゾアワビ受精卵を20°Cで培養し、受精後50時間でベリジャー後期幼生を観察したが、13～23°Cでは培養温度が高くなるほど発生速度は早くなる（関・菅野, 1977）。培養液

の温度は、試験のスケジュールに合わせて考慮して調整することが可能であり、培養に必要となる空間を最適な温度に設定できるよう準備しなければならない。また、培養液はあらかじめ過や対象物質の濃度調製、培養容器への分注などを終え、培養を開始する前に適切な温度に設定することに注意すべきである。

5. 2. 培養密度と培養容器

エゾアワビ受精卵は、孵化するまでの12時間は沈殿している。このため、添加した受精卵の数に対して培養容器の底面積が小さいと、受精卵が重なりあって下部のものが酸欠になり、異常発生あるいは死亡する危険性がある。培養容器は底面積が大きいものを用いるべきである。容器の底面積を大きくできない場合は、振盪機上に培養容器を置くなどの方法で、胚を沈殿させず常に海水とガス交換が可能にする。

筆者らが参加した試験では、直径60 mmの250 ml広口瓶を用いて、広口瓶1個につき200 mlの溶液と200個程度の受精卵を入れて低密度で培養を行った。暴露開始から48時間後、受精から50時間後の検鏡計数時には、100 μ mのメッシュと50 mlのプラスチックチューブ(胴径: 30 mm)を材料に作成した小型の篩を用いて、培養液からエゾアワビ幼生のみを取り出し、これをスライドグラスに移して検鏡することで各試験区の幼生のほぼ全量を観察することとした。なお、当初予定では100 μ mのメッシュをろ紙のように用いて培養液を漉し、これをスライドグラスに移して検鏡する予定であったが、試したところ表面張力などの要因により幼生の殻が割れてしまうことがわかったため、上記方法に変更した。しかしながら、検鏡毎に培養液を漉しスライドグラスに幼生を移す作業は手間がかかるため、

より簡便な方法を模索すべきである。検鏡後の培養液に対する水質測定を行わない場合は、培養液に直接ホルマリンを添加し、固定された幼生が容器の底に沈殿したものを濃縮するといった方法も考えられる。

5. 3. 改良点のまとめと今後の課題

本稿で記述した培養手順の改良点は、(1) 小型容器を用いた多数の試験区をエアレーションおよび換水なしで、対象物質の厳密な濃度設定で培養可能にしたこと、(2) 定量性を重視し、略記されがちな操作手順について詳細に記述したこと、(3) 正常発生率を精度良く算出するために必要となる検鏡計数の方法タイミングを明示したことである。今後の課題としては、より簡便な検鏡のための培養密度の調整、あるいは培養液と幼生とをより簡便に分離する方法の開発が挙げられる。

6. 謝辞

3日間に渡り試験の場を提供していただいた宮城県水産技術総合センター、エゾアワビの人工採苗についてご教授いただき、エゾアワビ受精卵を提供して下さった宮城県水産技術総合センター養殖生産部種苗生産施設、試験の機会を与えていただいた国立研究開発法人産業技術総合研究所の内藤航氏、共に試験を行った横浜国立大学の千葉健太氏、西村悠氏に、多大なるご協力をいただきました。改めてお礼申し上げます。

引用文献

- 菊池省吾・浮永久. 1974. アワビ属の採卵技術に関する研究 第2報 紫外線照射海水の産卵誘発効果. 東北水産研究所研究報告, 第33号, 79-86.
- 武田尚也. 2016. キタムラサキウニ胚およびマガキ胚の培養手順. 株式会社日本海洋生物研究所2016年年報, 52-57.
- 関哲夫・菅野尚. 1977. エゾアワビの初期発生と水温による発生速度の制御. 東北水産研究所研究報告, 第38号, 143-153.