

イケチョウガイ外套膜の組織片培養

東 怜・村地信彦

Organ Culture of Mantle Tissue of the Freshwater Mussel, *Hyriopsis schlegeli*

Satoru HIGASHI and Nobuhiko MURACHI

ABSTRACT

Organ culture from the mantle tissue of the freshwater mussel, *Hyriopsis schlegeli* was initiated.

Creeping activities in the explants were apparent at several hours culture. The effects of pH, temperature and composition of culture medium on the creeping activities of explants were studied.

The medium which was evaluated to be the most successful is given in Table 2.

真珠の形成には、外套膜に由来する分泌性の上皮組織である真珠袋が体組織中に作られることが必要であり、この真珠袋から内腔に向けて分泌された粘液が石灰化を起こして真珠が形成される。このために、分泌組織の機能の研究が真珠養殖では重要な問題になっていて、その一つの方法として、外套膜の組織片培養が試みられるようになった。

海産二枚貝のアコヤガイでは、町井氏によって外套膜の組織片培養がはじめて行なわれ、原片とそれから遊出する細胞をガラス容器内で維持し、原片を含む上皮の再生と、それより有機物が分泌されて原片の外面に沈着することが確かめられている^{1,2)}。

しかしながら、淡水産二枚貝の組織片培養については、いままで全く行なわれていない。近年、琵琶湖における淡水真珠の母貝であるイケチョウガイの減少は著しいものがあり、その資

源の枯渇が心配されている折から、淡水真珠養殖の基礎的研究として、イケチョウガイ外套膜の組織片培養を試みた。

今回の実験では、組織片移植後の細胞遊出現象に焦点を絞り、外套膜の組織片培養における基礎的な培養条件を定めることにした。

材料および方法

実験に使用したイケチョウガイ (*Hyriopsis schlegelii*) は、養殖場より入手した生後3~4年の貝を実験室内の大型水槽中で餌育し、大体3ヶ月以内に実験に供した。

組織片培養にあたっては、貝殻をよく洗った後、殻を開き外套膜の膜縁部を鋏で帯状に切り取り、色素のついた周縁部をとり除く。ひも状になった外套膜縁部をカナマイシン (500 γ / m l) を含む塩類液を入れたシャーレに入れ、滅菌濾紙で組織片の表面から出る粘液をすくい

とりながら5回移しかえて洗う。次に組織片の入った最後のシャーレをクリーンベンチ中に移し、高圧滅菌処理をした生理塩類液（カナマイシンを含まず）で同様に5回移しかえて洗う。その後ガラス板上でメスを用いて組織片を0.5mmないし1mm角に細切する。細切した小片はLUX 5325プラスチック培養管に1つずつ入れ、その中に培地を小片が浸るぐらいに入れ、恒温器内で培養した。

液体培地は、表1の組成のものを基本培地として用いた。

表1. 基本培地の組成

塩類補強液	13.0ml
NaCl	4.4 g/500ml
KCl	0.2 g/500ml
CaCl ₂	0.2 g/500ml
NaHCO ₃	0.04 g/500ml
TC 培地199, 10x	7.0ml
牛胎児血清	5.0ml
1 M HEPES	0.5ml (最終濃度10mM)
ラクトアルブミン水解物	3.0ml (最終濃度0.3%)
フロロサイトシン	0.5ml
カナマイシン	0.1ml (200γ/ml)
蒸留水	20.9ml

5-フロロサイトシン（ロッシュ製）は、菌類の成長を抑制するもので、培養期間中カビなどに汚染されたものはみられなかった。

培地の水素イオン濃度の調製には、Tris と HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic Acid) を用い、HEPES で pH 7.0、7.5、8.0、Tris で8.5、9.0に調製した。

培養は、炭酸ガス調整装置のない低温恒温器と DALTON の恒温恒温室で行なった。

ラクトアルブミン水解物は、半井薬品製を用いた。

イケチョウガイの血清成分は、注射器で心臓穿刺法により採血した血液を毎分3000回転で30分間遠心分離し、その上澄液をミリポアフィルター（HA 0.45 μm）で濾過滅菌したものを用いた。

牛胎児血清は、三菱化成製を用いた。

細胞遊出の観察には、NIKON の倒立顕微鏡ダイヤフォト TMD を用い、遊出速度の測定は微速度ビデオによった。

観 察 法

今回の培養では、主として円い細胞が多数重なるように集まってできる細胞遊出帯が目立った。この遊出帯を構成する細胞の大きさは、直径13~17 μm 程度のものである。中には、培養3~5日後から長径30~40 μm、短径10 μm 程度の細長い繊維芽細胞であろうと思われる細胞が現われるのも観察された。

培養後、細胞は原片より時間経過とともに遊出してくるが、その移動速度は最も速いものでは毎秒約2 μm、遅いものでは毎秒約0.2 μm と大きな差がみられた。このため、培養条件の検討には、遊出速度を基準にすることは困難である。そこで、培養条件の差を数量的に表現するために、遊出指標（Creeping Index）を設定した。これは、原片全体からの細胞遊出状態を4段階に区分し、それぞれを0、1、2、3としたものである。図1 a のように移植した状態のままのものを0、図1 b のように移植片縁の一部から細胞が粒状に遊出しているものを1、図1 c のように移植片縁のほぼ全体から細胞が遊出しているものを2、図1 d のように移植片縁の周囲にまで遊出細胞が広がったものを3とした。各培養条件の数量化については、一条件あたり10本の同一個体から移植した組織片を培養し、観察時におけるそれぞれの状態に対する遊出指標の平均値を求めた。

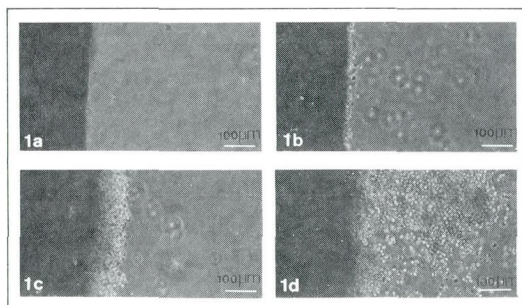


図1. 細胞遊出指標 CI (Creeping Index)。

a, CI=0。b, CI=1。c, CI=2。d, CI=3。

結 果

細胞遊出に与える培地の水素イオン濃度の影響

水素イオン濃度の緩衝剤としては Tris と HEPES を用いたが、両者の違いは細胞遊出に全く影響を与えない。培地の水素イオン濃度は、HEPES で pH 7.0、7.5、8.0、Tris で pH 8.5、9.0 に調製して培養したが、培養中の pH はほとんど変動は見られなかった。

培地は表 1 の基本培地を用い、温度は 20℃ で培養した。

その結果は図 2 に見られるように、pH 7.5、8.0、8.5 で良好な遊出が認められるが、特に pH 8.0 が優れていた。

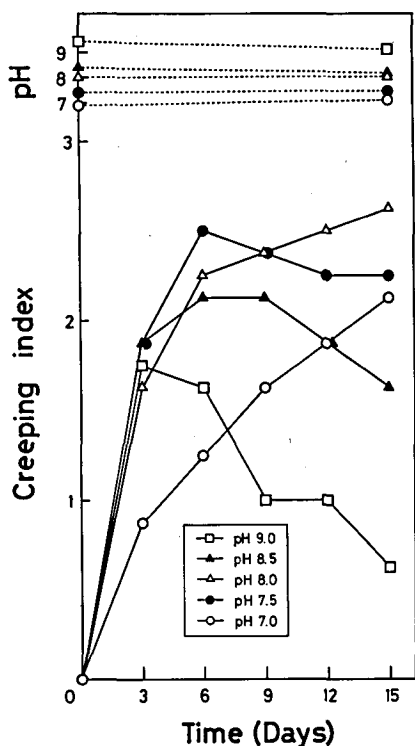


図 2. 細胞遊出に与える pH の影響。
縦軸：遊出指標、横軸：培養日数。
□：pH 9.0、▲：pH 8.5、●：pH 7.5、○：pH 7.0。

細胞遊出に与える温度の影響

pH 8.0 の基本培地を用いて、温度を 10℃、15℃、20℃、25℃、30℃ の 5 条件下で培養した。

その結果は図 3 に示すように、10℃ では著しく遊出が遅れるが、15℃～20℃ においては良好な遊出が観察された。

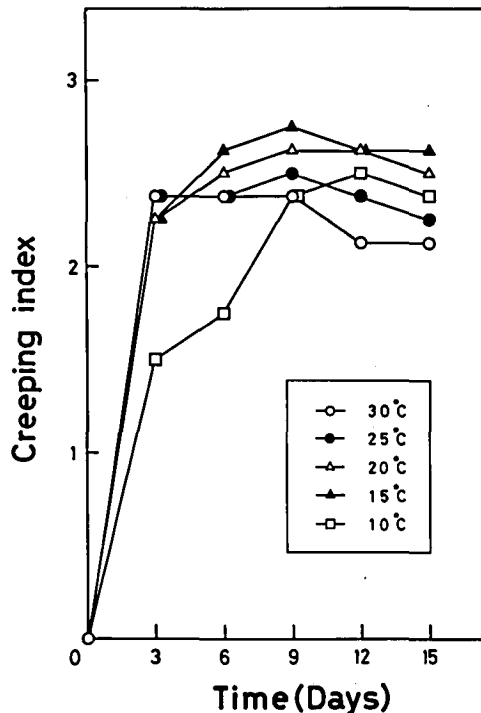


図 3. 細胞遊出に与える温度の影響。
縦軸：遊出指標、横軸：培養日数。
○：30℃、●：25℃、△：20℃、▲：15℃、□：10℃。

細胞遊出に与えるラクトアルブミン水解物の影響

pH 8.0、20℃ の条件下で、基本培地にラクトアルブミンの水解物を最終濃度で 0%、0.1%、1.0%、5.0%、10% になるように添加した (図 4)。

図 4 から分かるように、ラクトアルブミン水解物の濃度は 5% で最も良好な遊出が認められるが、10% では阻害的に働いている。

細胞遊出に与える血清成分の影響

基本培地に、イケチョウガイの血清成分を最終濃度で 0%、1.0%、10%、20% になるように添加し、pH 8.0、温度 20℃ の条件下で培養した (図 5)。

その結果は図 5 に示すように、培地に 10% の割合で血清成分を含むもので良好な細胞遊出が観察された。

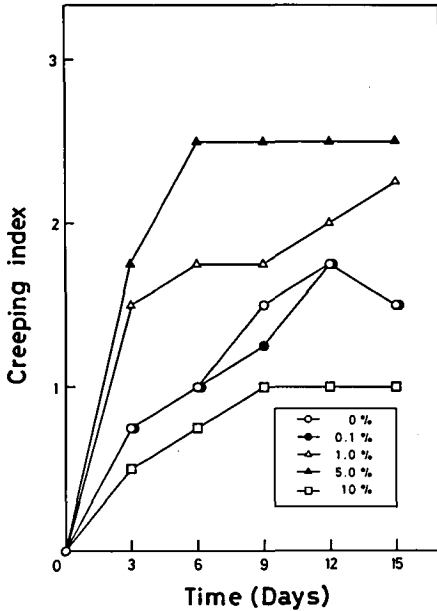


図4. 細胞遊出に与えるラクトアルブミン水解物の影響。

縦軸：遊出指標、横軸：培養日数。

○：0%、●：0.1%、△：1.0%、▲：5.0%、□：10%ラクトアルブミン濃度。

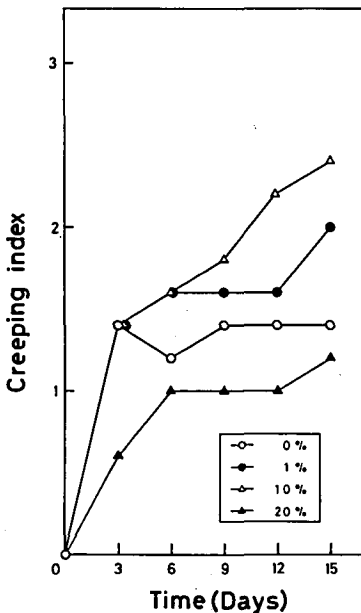


図5. 細胞遊出に与えるイケチョウガイ血清成分の影響。

縦軸：遊出指標、横軸：培養日数。

○：0%、●：1%、△：10%、▲：20%血清濃度。

考 察

培地の水素イオン濃度の影響をみると、組織片からの細胞遊出は図2に見られるように、pH 8.0で最大になっているが、これはイケチョウガイの体液のpHが8.0であることと一致している。

培養温度は、図3から分かるように15℃～20℃で最も良好な遊出が認められた。これも水温が春季で10℃、夏期で30℃近くにまでなる琵琶湖において、20℃前後の水温の時期にイケチョウガイの貝殻成長が最も盛んになることと一致している。

培地への添加物については、図4に見られるようにラクトアルブミン水解物を最終濃度5.0%添加したもので良好な遊出が認められた。このことから、培地を3～4日ごとに交換しながら移植片を長期間培養するためには、移植後1週間前後にラクトアルブミン水解物の濃度が5.0%の培地を用い、それ以後は培地の交換ごとに徐々に低濃度にしていくように調節することが必要のように思われる。

イケチョウガイ血清成分を培地に添加した場合については、図5に見られるように10%濃度で最も良好な細胞遊出が認められた。カキにおいても体組織の抽出液が組織片培養に有効なことが報告されている³⁾。しかしながら、これらが基本培地の牛胎児血清にとって代りうるものであるかは疑問である。イケチョウガイ体液のアミノ酸、糖をはじめその他の必須成分の量も考慮に入れて、イケチョウガイの組織片培養培地を作成することが必要である。

以上の実験より、イケチョウガイ外套膜の組織片培養では、pH 8.0、20℃の条件下で、基本培地(表1)にラクトアルブミン水解物を5.0%、イケチョウガイ血清成分を10%添加した培地(表2)が、最も良好な細胞遊出を与えるものである。

表2. 改良培地の組成

塩類補強液	13.0ml
NaCl	0.4 g /500ml
KCl	0.2 g /500ml
CaCl ₂	0.2 g /500ml
NaHCO ₃	0.04 g /500ml
TC 培地199, 10x	7.0ml
牛胎児血清	5.0ml
イケチョウガイ血清成分	5.0ml
1 M HEPES	0.5ml (最終濃度10mM)
ラクトアルブミン水解物	2.5 g (最終濃度5.0%)
フロロサイトシン	0.5ml
カナマイシン	0.1ml (200γ/ml)
蒸留水	18.9ml

要 約

イケチョウガイの外套膜縁部の組織片培養を行なった。

培養は閉鎖的な環境のもとで、培地交換は行わず、15日間の細胞遊出活動を観察した。細胞遊出に及ぼす培地の水素イオン濃度、温度および培地への添加物の影響を調べた結果、pH

8.0、20℃の条件下で、ラクトアルブミン水解物を5.0%、イケチョウガイ血清成分を10%の割合で基本培地に添加したものが良好な細胞遊出が認められた。

これらの結果より、イケチョウガイの外套膜の組織片培養における最適培地を作成した。

謝 辞

組織培養の技術については、養殖研究所の町井昭氏より種々御教示を頂いた。

イケチョウガイは、滋賀県近江八幡市の滋賀真珠有限会社および守山市の神保真珠商店のご好意により提供して頂いたものを用いた。厚く御礼を申し上げます。

文 献

- 1) 町井昭、1968、国立真珠研究所報告、13、1489～1539
- 2) 町井昭、1974、国立真珠研究所報告、18、2111～2117
- 3) 家山博史、田窪満智子、森部司郎、1979、愛媛大学紀要 (自然科学)、B (生物学)、8、87～90