アコヤガイ外套膜から分離した外面上皮細胞の移植による真珠形成

淡路雅彦,^{1*} 山本貴志,² 柿沼 誠,³ 永井清仁,² 渡部終五⁴

(2014年2月24日受付, 2014年4月24日受理)

¹(財)水産総合研究センター増養殖研究所, ²ミキモト真珠研究所,³三重大学大学院生物資源学研究科, ⁴北里大学海洋生命科学部Pearl formation by transplantation of outer epithelial cells isolated from the mantle
of pearl oyster *Pinctada fucata*MASAHIKO AWAJI,^{1*} TAKASHI YAMAMOTO,² MAKOTO KAKINUMA,³
KIYOHITO NAGAI² AND SHUGO WATABE⁴

¹National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research Agency, Minami-Ise, Mie 516-0193, ²Pearl Research Laboratory, K. MIKIMOTO & CO., LTD., Shima, Mie 517-0403, ³Graduate School of Bioresources, Mie University, Tsu, Mie 514-8507, ⁴School of Marine Biosciences, Kitasato University, Sagami-hara, Kanagawa 252-0373, Japan

A method of forming pearls by transplanting outer epithelial cells (OEC) isolated from the mantle of pearl oyster *Pinctada fucata* was investigated. Two methods, 1) injection of OEC around the pearl nucleus inserted beforehand and 2) insertion of the pearl nucleus carrying a small pit inoculated with OEC, were compared in terms of performance. As a result, method 2 had a higher pearl formation rate than method 1. With method 2, about 70% of the inserted nuclei formed the nacreous layer when OEC were inoculated at 1×10^4 cells/nucleus. Next, OEC isolated from two types of pearl oyster that significantly differed in color (yellowness) of the shell nacre were mixed at four different ratios, and the prepared OEC mixtures were transplanted by method 2 to investigate the effects of the blend on the yellowness of harvested pearls. The yellowness of harvested pearls differed significantly in accordance with the mixing ratio.

キーワード：アコヤガイ, 外套膜, 外面上皮細胞, 細胞移植, 真珠, 真珠黄色度

アコヤガイ *Pinctada fucata* をはじめとする真珠貝を用いた真珠養殖では、真珠貝の外套膜の貝殻形成の活発な部分から切り出した小組織片（ピース）を貝殻で作った真珠核と共に同種の異個体（母貝）の体内に移植して真珠を生産する。¹⁾ ピースにはその構成組織の一つとして、本来は外套膜外側表面を覆い貝殻を形成する外套膜外面上皮細胞（外面上皮細胞）が含まれ、真珠が形成されるには外面上皮細胞が真珠核を取り巻く濾胞（真珠袋）を形成することが必須である。²⁾ 真珠袋の形成は以下のように創傷治癒反応と生体防御反応が組み合わさって進行する。まず移植に伴って母貝に生じる傷口は、遊走してきた血球が層状に重なって作る血球シートで塞がれ、その体表面側に周囲の表皮細胞が遊走し、血球シート内には細胞外マトリックスが合成されるという一連の創傷

治癒過程を経て修復される。³⁾ 一方、傷口内にあるピースと真珠核は一連の創傷治癒反応に加えて母貝の血球により異物と認識されて包囲化され、周囲に厚い血球シートが形成される。真珠核に接するように移植されたピースでは、その外面上皮細胞が体表の創傷治癒の場合と同様の挙動を示し、ピースから遊出して真珠核を取り巻く血球シート表層を遊走し、やがて真珠袋を形成する。そして本来の機能を再び発現して真珠核表面に真珠層をはじめとする貝殻構造を形成する。^{3,4)} 以上のように真珠袋形成には、ピースの外面上皮細胞と母貝の血球が重要な役割を果たす。一方、ピースを構成する組織のうち外面上皮以外の組織は組織学的には識別できなくなり、ピース由来の組織のほとんどは母貝体内で死滅し排除されることが考えられている。⁴⁾

移植されたピースの組織のうち真珠袋の形成に重要なのは外面上皮細胞であるので、ピースに換えて外面上皮細胞と真珠核を母貝体内に移植しても真珠が形成されることが考えられる。先行研究ではアコヤガイ外套膜をタンパク質分解酵素処理して得られた細胞や、組織培養条件下でアコヤガイ外套膜組織片から遊出した細胞を、挿核した真珠核周囲に注射して移植し、成功率は低い真珠が形成されることが示されている。^{5,6)} また、酵素処理と顕微鏡下での解剖操作で外面上皮細胞をシート状に分離、採取できることが示されている。⁶⁾ もし外面上皮細胞のみを移植して効率よく真珠を生産することができれば、通常のピースに含まれる死滅する組織を含まないので、それらへの母貝の血球の遊走が誘起されず、真珠袋内腔に細胞屑が包み込まれる機会の減少と共に母貝の生理的負担も低減し、真珠品質の向上に結び付くと予想される。³⁾ また、形質の異なる複数のピース貝から分離した外面上皮細胞を混合して移植した場合、複数の形質を兼ね備えた真珠を生産できる可能性も考えられる。さらに将来的には、真珠品質に関して優良な形質を持つ外面上皮細胞を培養して増殖させ、それを移植して真珠生産に用いることも考えられる。

外面上皮細胞の移植による真珠生産には以上のような利点が考えられるが、真珠形成率の高い移植法は未開発である。また予想される利点の実験的な検証も行われていない。そこで本研究ではアコヤガイ外面上皮細胞移植による真珠形成法を、外面上皮細胞を注射して移植する方法（注射法）と小さな穴を掘った核に外面上皮細胞懸濁液を入れて移植する方法（穴あき核法）により検討した。また穴あき核法を用い、貝殻真珠層の黄色度の異なるアコヤガイから分離した外面上皮細胞を様々な比率で混合して移植し、真珠黄色度への影響を検討した。

材料と方法

挿核、養生と養成 人工採苗後2年目のアコヤガイ（2年貝）を母貝として用い、生殖巣と収足筋の境界付近（うかし）に挿核した。本研究の挿核は全て1名の技術者が行った。挿核後のアコヤガイは養生籠に入れて三重県志摩市浜島町の真珠養殖場で垂下飼育し、適宜養殖籠を変えて養成した。

外套膜外面上皮細胞の分離 外面上皮細胞の分離はAwaji and Machii⁶⁾に従い、アコヤガイ2年貝から切り出した外套膜縁膜部を1 mg/mL 硫酸カナマイシン（11815-024, Life Technologies）を含む海産貝類用生理塩類液（BSS, pH 7.5）⁷⁾で洗浄後、1.25 mg/mL ディスパーゼ（17105-041, Life Technologies）・0.5 mg/mL コラゲナーゼ（034-10533, 和光純薬工業）を含むBSS（0.1 mg/mL 硫酸カナマイシン含有）に入れ25℃で6時間緩やかに振とうし、処理後の外套膜組織片から外

面上皮を実体顕微鏡下でピンセットを用いて剥離した。得られた外面上皮を0.4 mg/mL ヒアルロニダーゼ（羊精巣由来, 597-05343, 和光純薬工業）を含むBSSで洗浄し、それにより分散された外面上皮細胞を150×g, 4℃, 10分間遠心し、得られた沈殿をBSSに懸濁した。細胞数を次項の方法に従って計数し、残りの細胞懸濁液を再度遠心して得られた沈殿を用い実験計画に応じた細胞濃度の細胞懸濁液を調製した。

細胞計数法 細胞懸濁液30または50 μLを0.4 M クエン酸一水和物（031-03492, 和光純薬工業）・0.05% クリスタルバイオレット（038-17792, 和光純薬工業）水溶液0.5 mLに加え室温で約60分間攪拌した後、そのまま血球計数盤（ワンセルカウンター, バイオメディカルサイエンス）に入れて計数した。

注射法による真珠形成

1. 脱核率低減法の検討 注射法の予備試験において、試験期間中に真珠核が体外に出てしまうこと（脱核）が比較的多く観察されたため、脱核を防止する方法を検討した。2011年4月末に2年貝のうかしに真珠核（直径4.5 mm）1個を挿核した。挿核後12日目に材料貝を20個体ずつ7区に分け、そのうち3区に卵レシチン液、別の3区にザイモザン液、残りの1区（対照区）はBSSを真珠核付近に注射した。注射量は20 μL/個体とした。卵レシチン液は卵製レシチン（126-00812, 和光純薬工業）をBSSに重量比5:5, 6:4, 7:3で加えて激しく攪拌した後、超音波ホモジナイザー（Microson MS-50, Heat Systems-Ultrasonics, INC.）で処理して濃度の異なる3種類のエマルジョンを作成して注射に用いた。ザイモザン液はザイモザンA（269-01493, 和光純薬工業）をBSSに1, 5, 20 mg/mLで懸濁し、注射に用いた。注射には29G針付1 mL注射筒（BDプラスチックパック29G, 日本ベクトン・ディッキンソン）を用いた。そして注射14日後に試験貝を開殻し、各区の生残個体数、真珠核が体外に出た個体（脱核個体）の数を計数した。また各区で真珠核を体内に保持していた個体のうち4個体については、開殻後に真珠核を含む軟体部をデビッドソン液で固定し、その後真珠核を丁寧に除いて常法によりパラフィン包埋し、厚さ5 μmの組織切片を作成しヘマトキシリン・エオシン染色した。そして真珠核周囲の組織を透過型光学顕微鏡（BX51, オリンパス）で明視野観察した。

2. 真珠形成試験 2011年5月末にアコヤガイ2年貝のうかしに真珠核（直径4.5 mm）1個を挿核した。挿核後13日目に材料貝を20個体ずつ4区に分け、外面上皮細胞を0.46, 4.6, 46×10⁴ 細胞/mLの3種の濃度で5 mg/mL ザイモザンを含む20 mM ヘペス（346-01373, 和光純薬工業）含有BSS（ヘペスBSS, pH 7.5）に懸濁し、20 μL/個体を3区の材料貝の真珠核周

皿に注射した。また残る1区にはザイモザンを含まないへペスBSSに細胞を 4.6×10^4 細胞/mLの濃度で懸濁させた液を注射した。注射は1名の技術者が行った。注射3か月後に試験貝を開殻し、生残個体数、脱核個体数を計数した。そして得られた真珠の表面を実体顕微鏡(MZFLⅢ, ライカマイクロシステムズ)で観察し、真珠層が形成されている珠(真珠層真珠)、真珠層以外の結晶や沈着物が形成されている珠(非真珠層真珠)、真珠核表面に何も形成されていない珠(白珠)に区別して計数した。

穴あき核法による真珠形成

1. 真珠形成試験 真珠核(直径4.5 mm)にあらかじめ真珠用穴あけ機で直径1 mm 深さ0.5 から1.0 mmの穴を一つあけておき(穴あき核)、挿核時には穴に外面上皮細胞懸濁液1 μ Lを入れて用いた。2011年10月中旬にアコヤガイ2年貝150個体を25個体ずつに分け、各個体のうかしに外面上皮細胞を入れた穴あき核1個を挿核した。細胞懸濁液は細胞を5 mg/mL ザイモザン・ヘペスBSSまたはそれにアコヤガイコラーゲンを濃度1%で加えて粘性を高めた液に懸濁し、細胞濃度0.1, 0.5, 1.0×10^4 細胞/ μ Lに調整して合計6区の実験区を設定した。アコヤガイコラーゲンは外套膜から調製しアテロ化・サクシニル化したものを(株)御木本製薬から供与いただいた。2012年1月初めに試験貝を開殻し、各区の生残個体数、脱核個体数を計数した。実験期間が冬の低水温期で真珠層等の結晶層が薄く、肉眼での観察では結晶形成の判別が困難な珠もあったため、得られた真珠の表面を正立型金属顕微鏡で観察し(BX51, オリパス)、真珠層真珠、非真珠層真珠、白珠に区別して計数した。

2. ザイモザン濃度とゼラチン添加の影響の検討 2013年5月中旬にアコヤガイ2年貝150個体を30個体ずつに分け、前述と同様に作成した穴あき核(直径4.8 mm)に外面上皮細胞懸濁液1 μ Lを入れ、各個体のうかしに1個挿核した。細胞は0, 1, 5 mg/mL ザイモザン・ヘペスBSSそして5 mg/mL ザイモザン・ヘペスBSSに豚ゼラチン(TypeA, G2625, Sigma)を1または3%加えた液に細胞濃度 4.7×10^4 細胞/ μ Lで懸濁し、合計5区の実験区を設定した。挿核5か月後の10月中旬に試験貝を開殻し、生残個体数、脱核個体数を計数した。そして得られた真珠を実体顕微鏡で観察し、真珠層真珠、非真珠層真珠、白珠に区別して計数した。

3. 移植細胞数の検討 2013年5月中旬にアコヤガイ2年貝60個体を30個体ずつに分け、前項と同様に穴あき真珠核(直径4.8 mm)を用いて各個体のうかしに1個挿核した。外面上皮細胞懸濁液は5 mg/mL ザイモザン・ヘペスBSSに細胞を 1.0×10^4 または 5.0×10^4 細胞/ μ Lで懸濁して作成し、合計2区の実験区を設定

した。挿核5か月後の10月中旬に試験貝を開殻し、生残個体数、脱核個体数を計数した。そして得られた真珠を実体顕微鏡で観察し、真珠層真珠、非真珠層真珠、白珠に区別して計数した。真珠層真珠についてはその直径をマイクロゲージ(SM-528, テクロック)を用い0.01 mm単位で2か所測定してその平均値を真珠直径とし、真珠直径と真珠核直径の差の二分の一を真珠の巻きとした。

貝殻真珠層黄色度の異なる個体から分離した外面上皮細胞の混合移植 2012年7月中旬に、(株)ミキモト真珠研究所で選抜飼育されている貝殻真珠層黄色アコヤガイ(黄色個体)15個体および貝殻真珠層白色アコヤガイ(白色個体)6個体から外面上皮細胞を分離して0.1 mg/mL 硫酸カナマイシン・ヘペスBSSに懸濁し、細胞数を計数して10°Cで一晩保存した。翌日に黄色個体と白色個体の外面上皮細胞をその比率が3:0(すなわち黄色個体の細胞のみ)、2:1, 1:2, 0:3(すなわち白色個体の細胞のみ)となるように混合し、各混合液を150 $\times$ g, 4°C, 10分間遠心して得られた沈殿を 6.0×10^5 細胞/ μ Lとなるように1%豚ゼラチン・5 mg/mL ザイモザン・ヘペスBSSに懸濁した。そして穴あき真珠核(直径4.5 mm)に1核あたり1 μ Lの細胞懸濁液を入れ、各区30個体のアコヤガイ2年貝のうかしに1個挿核した。また真珠形成率等の比較のため通常的外套膜片と真珠核(直径4.5 mm)を用いた挿核も行い、アコヤガイ2年貝30個体のうかしに1個挿核した。挿核約5か月後の12月初めに試験貝を開殻し、生残個体数、脱核個体数を観察した。そして得られた真珠を実体顕微鏡で観察し、真珠層真珠、非真珠層真珠、白珠に区別して計数した。真珠層真珠については、真珠表面のシミの面積が全体の30%未満(A)、30から50%(B)、50%以上(C)の3種に分類し、Aに区分された真珠の巻きを前項の方法で、そして真珠黄色度を以下の方法で測定した。

真珠の黄色度(Yellowness index, YI)は高速分光光度計(CMS-35SP, 村色彩技術研究所)を用いて放射輝度率を測定し、CIE(国際照明委員会)1931表色系により三刺激値(X, Y, Z)を求め、川上ら⁸⁾に従いYIを以下の式で求めた。

$$YI = (1.250X - 1.038Z) / Y$$

測定はD65光源, 2°視野, 測定面積3 $\times$ 6 mm, 積分球内で真珠全体を拡散照明する条件で行った。

なお細胞を採取した貝の真珠層色についても放射輝度率を測定し、黄色度を同様に求めた。そのための貝殻真珠層試料は、右殻内面の真珠層部の中央腹縁付近を約10 mm角に切り出し、外面の稜柱層を研磨により除去して得た。測定は、D65光源, 2°視野, 測定面積3 $\times$ 6 mm, 白の背景色(校正用白色板)の条件で行った。

統計学的検定 統計学的検定にはエクセル統計2012

(社会情報サービス)を用い、実験計画に応じてカイニ乗検定および残差分析、フィッシャーの正確確率検定、コ克蘭・アーミテージ検定、コ克蘭・マンテル・ヘンツェル法による検定、クラスカル・ウォリス検定とスティール・ドワス法による多重検定、スチューデント *t* 検定を適用した。

結 果

注射法による真珠形成

1. 脱核率低減法の検討 BSS を注射した区では注射 14 日後までに 20 個体中 1 個体が死亡したが、他の区では斃死がなく生残個体数、脱核個体数は Fig. 1 のようになった。真珠核を保持していた場合、真珠核は挿核した部位 (うかし) 付近にあった。注射液にザイモザンを 1 または 5 mg/mL 加えた区では全ての個体が真珠核を保持していたが、他の区は脱核が観察された。また卵レシチン区では一部の個体の真珠核の周囲に淡黄色の膿状に集合した血球が観察された。脱核個体数の差をカイニ乗検定するため、コ克蘭の規則を満たすように卵レシチンを注射した 3 区を一つに、またザイモザンを注射した 3 区を一つに結合して検定を行ったところ有意な差があり (危険率 5%)、残差分析でザイモザン注

射区は脱核率が有意に低く (危険率 1%)、卵レシチン注射区は脱核率が有意に高い (危険率 5%) という結果になった。

真珠核周辺の組織像を Fig. 2 に示した。いずれの区も真珠核を取り巻く様に血球が集合しているのが観察され、BSS 区とザイモザン区では血球が偏平化して重層し、真珠核を包囲するのが観察された (Fig. 2a, b)。これに加えて卵レシチン区の一部の個体では真珠核周囲の生殖巣の結合組織に血球が多数浸潤するのが確認された (Fig. 2c)。血球の周囲組織への浸潤は BSS 区やザイモザン区では観察されなかった。

2. 真珠形成試験 前項の実験において注射液にザイモザンを加えると脱核が少なくなることが示されたため、ザイモザン 5 mg/mL を含む BSS に外面上皮細胞を異なる細胞濃度で懸濁させて注射し、真珠形成試験を行った。また、比較のためザイモザンを含まない区も設定した。試験終了時の生残個体数、脱核個体数は Fig. 3a のようになり、各実験区間に差があるとは言えなかった。また、ザイモザンの有無による脱核率の差は認められず (Fig. 3a)、前項の結果と異なっていた。

形成された真珠についてはその表面を実体顕微鏡で観察することで、真珠層真珠、非真珠層真珠、白珠に区別することができた (Fig. 4a-d)。白珠では真珠核表面が挿核前と変わらず全体に滑らかで光沢のあるもの (Fig. 4c) と、部分的あるいは全体に表面が粗く光沢が無くなり若干変形しているもの (Fig. 4d) が観察されたが、区別せず白珠とした。各区の観察結果を Fig. 3b に示した。4.6 × 10⁴ 細胞を注射しザイモザンの有無が異なる 2 区では白珠の出現率に有意な差があり、ザイモザンを含む場合は白珠の出現率が低くなった (フィッシャーの正確確率検定, 危険率 5%)。ザイモザンを含む注射液を用い細胞濃度を変えた場合、注射した細胞数が多くなるに従い真珠層真珠の出現率が有意に高くなり (コ克蘭・アーミテージ検定, 危険率 1%)、4.6 × 10⁴ 細胞を注射した場合 60% が真珠層真珠であった (Fig. 3b)。また 4.6 × 10⁴ 細胞を注射した区では、白珠が採取された

Fig. 1 Effects of Zymosan and yolk lecithin injection on the remaining of the pearl nucleus from the host pearl oysters. BSS, balanced salt solution.

Fig. 2 Effects of balanced salt solution (BSS), Zymosan and yolk lecithin injection on the tissues surrounding the inserted pearl nucleus: a, BSS; b, 20 mg/mL Zymosan BSS; c, yolk lecithin BSS emulsion (weight ratio 7 : 3). N, space occupied by the pearl nucleus; H, hemocyte layers surrounding the pearl nucleus; T, testis; O, ovary; asterisk, a region where hemocytes penetrate into the ovary. Scale = 50 μ m.

Fig. 3 Difference in pearl formation in relation to the number of outer epithelial cells transplanted by injection with or without Zymosan: a, effects on the remaining of the pearl nucleus; b, effects on the type of crystals formed on the surface of the pearl nucleus. BSS, balanced salt solution.

Fig. 4 Examples of pearls harvested from host pearl oysters transplanted with the outer epithelial cells by injection: a, nacreous pearl; b, non-nacreous pearl; c, pearl nucleus without any crystals or surface deposits; d, seed pearls (arrowheads) harvested with a pearl nucleus with a rough surface (asterisk). Scale = 1 mm.

2 個体と脱核していた 1 個体の体内に微小な真珠層真珠 (ケン真珠) が観察された (Fig. 4d)。

穴あき核法による真珠形成

1. 真珠形成試験 試験終了時の生残個体数, 脱核個

Fig. 5 Difference in pearl formation in relation to the number of outer epithelial cells transplanted with the pearl nucleus carrying a pit. The outer epithelial cells were suspended in Zymosan BSS with or without pearl oyster collagen: a, effects on the remaining of the pearl nucleus; b, effects on the type of crystals formed on the surface of the pearl nucleus.

体数は Fig. 5a の結果となり, 各実験区間に差があるとは言えなかった。採取された真珠の表面を顕微鏡観察することで真珠層真珠, 非真珠層真珠, 白珠に区別することができ (Fig. 6a-c), 各区の観察結果を Fig. 5b に示した。ザイモザン 5 mg/mL を含む BSS に細胞を懸濁させて移植した場合, 移植細胞数が増加するに従い真珠層真珠の形成率が有意に高まり (コ克蘭・アーミテージ検定, 危険率 1%), 1.0×10^4 細胞/核を移植した場合 45% が真珠層真珠であった。一方, 細胞懸濁液にザイモザン 5 mg/mL とともにアコヤガイコラーゲンを濃度 1% で加えた場合, ザイモザンのみの場合と比較して同じ移植細胞数でも真珠層真珠の形成率が有意に低くなり (コ克蘭・マンテル・ヘンツェル法, 危険率 5%), 1.0×10^4 細胞/核の場合真珠層真珠は 14% であった。

2. ザイモザン濃度とゼラチン添加の影響の検討 試験終了時の 5 区の生残個体数, 脱核個体数は Fig. 7a, 真珠核表面の実体顕微鏡観察結果は Fig. 7b のようになった。ザイモザン 1 mg/mL を含む細胞懸濁液を使用した場合, 他の区よりも脱核率が低く真珠層真珠の形成率が高かったが, 他の区と有意な差があるとは言えなかった。ザイモザン BSS に 1 または 3% で豚ゼラチンを添加して細胞懸濁液としても, 脱核や真珠形成に関し

5 mg/mL ザイモザン区との有意な差は認められなかった。

3. 移植細胞数の検討 試験終了時の2区の生残個体数, 脱核個体数は Fig. 8a, 真珠核表面の実体顕微鏡観察結果は Fig. 8b, 巻きの厚さは Fig. 8c のようになった。移植細胞数 1.0 あるいは 5.0×10^4 細胞/核において, 生残個体数, 脱核個体数, そして真珠層真珠の巻き

には有意な差が認められなかった。また採取された珠に占める真珠層真珠の割合は移植細胞数 1.0 および 5.0×10^4 細胞/核でそれぞれ 73%, 94% となり, 細胞数の多

Fig. 6 Surface structures of the pearls harvested from host pearl oysters transplanted with the pearl nucleus inoculated with the outer epithelial cells: a, nacreous layer with a typical arrangement of nacre tablets; b, non-nacreous layer (prismatic layer in this case with typical polygonal crystals); c, without any crystals or surface deposits. Fine layered structures originating from the pearl nucleus; d, nacreous pearl with a dimple at the site of the pit (arrow). Scale = 30 μ m.

Fig. 7 Effects of Zymosan and porcine gelatin concentration on pearl formation by the outer epithelial cells transplanted with the pearl nucleus carrying a pit. The outer epithelial cells were suspended in Zymosan BSS with or without porcine gelatin and inoculated at 4.7×10^4 cells/nucleus. a, Effects on the remaining of the pearl nucleus; b, effects on the type of crystals formed on the surface of the pearl nucleus.

Fig. 8 Difference in pearl formation in relation to the number of outer epithelial cells transplanted with the pearl nucleus carrying a pit: a, effects on the remaining of the pearl nucleus; b, effects on the type of crystals formed on the surface of the pearl nucleus; c, effects on the thickness of the pearl layer. Numbers in the column indicate the sample size.

Fig. 9 Effects of blending of outer epithelial cells isolated from two types of pearl oyster that differed in color (yellowness) of the shell nacre on pearl formation. The outer epithelial cells from pearl oysters with yellow nacre (Y) and white nacre (W) were mixed at four different ratios, and transplanted to host oysters with the pearl nucleus carrying a pit. Transplantation of a mantle graft with conventional methods (graft) was also conducted to compare the performance. a, Effects on the remaining of the pearl nucleus; b, effects on the type of crystals formed on the surface of the pearl nucleus; c, effects on the grade of pearls classified by percentage of the area with blemishes to the whole surface. For the grades A, B and C, see the text and Fig. 10; d, effects on the thickness of the pearl layer of the pearls classified as grade A. Numbers in the columns indicate the sample size, and bars indicate 95% confidence limits of the average.

Fig. 10 Grading of nacreous pearls by the extent of blemishes (arrowheads): a, grade A. Percentage of the area with blemishes to the whole surface is less than 30%; b, grade B. 30 to 50%; c, grade C. More than 50%. Scale = 1 mm.

い方が高くなったが有意な差があるとは言えなかった。真珠層真珠の表面には、真珠核に穴をあけた部分に浅いくぼみが認められた (Fig. 6d)。

貝殻真珠層黄色度の異なる個体から分離した外面上皮細胞の混合移植 外套膜外面上皮細胞の分離に用いたアコヤガイの貝殻真珠層の黄色度 (YI) の平均値±標準偏差は、黄色個体が 33.0 ± 6.6 ($n = 15$)、白色個体が

10.7 ± 5.7 ($n = 6$) となり、YI に有意な差が認められた (スチューデント t 検定, 危険率 0.1%)。この差は目視による観察でも判別可能であった。黄色個体と白色個体の外面上皮細胞を混合移植した 4 区と通常のピースを用いて挿核した区の生残個体数, 脱核個体数は Fig. 9a, 真珠核表面の観察結果は Fig. 9b, 真珠層真珠をシミの面積により分類した結果は Fig. 9c, 巻きの厚さは

Fig. 11 Effects of blending of the outer epithelial cells isolated from two types of pearl oyster that differed in the yellowness of the shell nacre on the yellowness of the harvested pearls. The outer epithelial cells from pearl oysters with yellow nacre (Y) and white nacre (W) were mixed at four different ratios, and transplanted to host oysters with the pearl nucleus carrying a pit. The yellowness of the pearls was expressed by the yellowness index (YI). Numbers in the columns indicate the sample size, and bars indicate 95% confidence limits of the average. Asterisk, significant difference (Steel-Dwass test, $p < 0.05$).

Fig. 9d となった。またシミの面積により品質を A から C に分類した真珠層真珠の例を Fig. 10 に示した。脱核個体数、結晶形成の状況、シミの面積において、混合移植した各区分で有意な差があるとは言えなかった。また巻きの厚さは黄色個体と白色個体由来の外面上皮細胞の混合比を 2 : 1 とした区 (Fig. 9d, Y2 + W1) の平均値がやや高かったが、他の混合移植区と有意な差があるとは言えなかった。また混合移植の各区と通常の挿核をした区分でも各測定項目に有意な差があるとは言えず、 6.0×10^5 細胞/核の混合移植で通常の挿核法と同じ程度の真珠形成が可能であった。シミの面積が少なく品質 A と評価された真珠層真珠の黄色度測定結果は Fig. 11 のようになった。黄色個体と白色個体由来の外面上皮細胞の混合比に応じて真珠黄色度が有意に変化し (クラスカル・ウォリス検定, 危険率 5%), 黄色個体由来細胞の比率が高い区の真珠黄色度が高くなる傾向が認められた。特に黄色個体由来細胞と白色個体由来細胞の混合比を 2 : 1 とした区 (Y2 + W1) は、白色個体由来細胞のみの区 (Y0 + W3) より真珠黄色度が有意に高くなった (スティーブ・ドワス多重検定, 危険率 5%)。この黄色度の差は目視による観察でも判別可能であり, Y0 + W3 区で形成された真珠は目視で白色と評価されるものであった。

考 察

アコヤガイなどの真珠貝を用いた真珠養殖では、母貝にピースと真珠核を移植して真珠を生産する。その際、移植されたピースに含まれる外面上皮細胞は移植後も生

き残って真珠核を包む真珠袋を作り、ピースに含まれる他の組織は死滅すると考えられている。⁴⁾ 本研究ではピースに換えて外套膜から分離した外面上皮細胞を移植した結果、注射法、穴あき核法共に適切な数の外面上皮細胞を移植すれば真珠層真珠が形成されることが明らかになった。現在のところ、外面上皮細胞を特異的に識別する簡便な方法が無いため、各実験で用いた細胞懸濁液中の外面上皮細胞の比率は正確には明らかでない。しかし移植に用いた細胞は外套膜外面上皮をシート状に剥離したものから調製されており,⁶⁾ 高い割合で外面上皮細胞が含まれていたと考えられる。また先行研究で和田⁵⁾ はアコヤガイ外套膜をタンパク質分解酵素 (プロナーゼ) で処理して得られた細胞を真珠核周囲に注射して移植し、採取された珠の 1 から 8% が真珠層真珠であったと報告している。今回の注射法で得られた結果はこの結果よりも真珠層真珠の形成率はるかに高い。移植した細胞中の外面上皮細胞の比率の高さや、真珠袋形成に十分な細胞数を移植したことが真珠層真珠の形成率向上に結び付いたと考えられる。

実験に用いた外面上皮細胞は、外套膜縁膜部のうち真珠養殖でピース作成用に使われる部分から分離した。その部分には、貝殻稜柱層の基質タンパク質遺伝子を発現する外面上皮細胞と、貝殻真珠層の基質タンパク質遺伝子を発現する外面上皮細胞が含まれ、それらの分布域が明瞭に分かれていることが報告されている。⁹⁾ このような貝殻形成機能の異なる 2 種類の外面上皮細胞が真珠袋を形成した際、それぞれどのような機能を再発現するのかは明らかでなく、これら 2 種類の細胞の構成比の差により真珠層真珠の形成率などに影響が出る可能性は否定できない。しかし一連の実験において縁膜部の切り出しは毎回同じ部位となるように行い、複数個体の外套膜から分離された外面上皮細胞は洗浄の過程で十分に混合されており、一つの実験内では全ての実験区に均質な外面上皮細胞が移植されていたと予想される。したがって一つの実験内で観察された真珠層真珠の形成率の差などは、移植された細胞の組成の差によるものではないと判断できる。

脱核防止法の検討において、あらかじめ真珠核のみを挿核し 12 日後にザイモザンを 1 または 5 mg/mL 含む BSS を真珠核周囲に注射すると脱核率が低下することが明らかになった (Fig. 1)。実験に用いたザイモザンは、生体防御反応の一種である血球の貪食反応を誘起する粒子としてアコヤガイの生体防御機構の研究に使われており,¹⁰⁾ 今回の実験においても母貝に投与されることで、BSS のみの注射よりも母貝血球の貪食反応や真珠核周囲への遊走を強く誘起する効果があったと予想される。組織像では、ザイモザン区と BSS 区の差は明瞭ではなく、真珠核を取り巻いて血球が偏平化して重層し、

血球シートを形成していた (Fig. 2a, b)。これは Suzuki *et al.*¹¹⁾ が生殖巣に真珠核のみを挿核したアコヤガイで観察している、無顆粒血球による血球シートに相当する構造と考えられる。一方、卵レシチン区は真珠核を取り巻く血球シートと共に周囲の生殖巣結合組織に多数の血球が浸潤している組織像が観察され (Fig. 2c)、一部の個体で真珠核の周囲に膿状に集合した血球が観察された。船越¹⁰⁾ は人為的に誘起したアコヤガイ外套膜の炎症反応の血球遊出期において、主に顆粒血球—Iで構成される膿が炎症部に出現し同じ種類の血球が組織中に浸潤するのを観察しており、卵レシチン区で観察された血球の浸潤や膿も顆粒血球—Iによるものと推定される。このように投与物質により母貝の生体防御反応に違いが生じ、卵レシチン区で脱核個体数が多い結果に結び付いたと考えられる。

注射法による真珠形成試験では、注射液中のザイモザンの有無は脱核個体数に影響しなかったが、白珠数はザイモザンを添加した区で有意に減少した (Fig. 3)。ザイモザンの有無が脱核個体数に影響しなかった点は脱核防止試験の結果と異なるが、外面上皮細胞を懸濁させたことによる組織屑等の混入や死滅する外面上皮細胞がザイモザンの添加と同様の効果をもたらした可能性が考えられる。一方、白珠数の減少はザイモザン添加により真珠袋の形成が促進されたことを示すと考えられる。外面上皮細胞が真珠袋を形成する際には、真珠核を取り巻く血球シートの表層と真珠核の間を遊走することが知られている。⁴⁾ 従ってザイモザン添加による血球シート形成の促進が真珠袋形成促進にもつながった可能性が考えられる。

以上のように注射法の検討では、外面上皮細胞の移植で真珠が形成されることが示されたのに加え、真珠核の保持や真珠袋形成に母貝の生体防御反応が深く関与することを示唆する結果が得られた。現行の真珠生産法では、真珠核とピースの移植により生じる傷で母貝の創傷治癒反応が誘起される。またピース内の筋肉など外面上皮細胞以外の組織が死滅する過程でも母貝の生体防御反応、特に血球シートによる真珠核、ピースの包囲化や死滅組織の貪食が強く誘起される。このような母貝の反応が脱核を防ぎ真珠袋形成を促進する役割を果たすことは従来から予想されていたが、³⁾ 実験による検討は行われていなかった。外面上皮細胞を移植して真珠を生産する場合、ピースを移植する現行法と比較して母貝に誘起される生体防御反応が弱い可能性があり、それを適度に調節する技術が重要と考えられる。また本研究では注射法、穴あき核法ともに、真珠核表面に結晶等が形成されず表面が粗くつやの無い真珠核も採集され、このような珠は白珠に区分した (Fig. 4d)。このような珠が生じる原因は明らかでないが、挿核後の生体防御反応などによ

り母貝体内で真珠核表面が溶解した可能性が考えられる。

外面上皮細胞の移植により真珠袋が形成されるには、移植された細胞が真珠核と接触し、血球シート表面を遊走することが必要である。注射法を用い 46×10^4 細胞/個体を移植した場合、母貝体内にケシ真珠が観察された (Fig. 4d)。このケシ真珠は、移植された外面上皮細胞のうち真珠核に接触できなかったものが他所に真珠袋を形成してできたものと考えられる。この観察に基づき、移植された外面上皮細胞が真珠核と確実に接触するように穴あき核法を考案した。その結果、注射法では 46×10^4 細胞/個体の移植で真珠層真珠形成率が約 60% であった (Fig. 3b) のに対し、穴あき核法では 1.0 から 5.0×10^4 細胞/核の移植で真珠層真珠形成率が約 45 から 94% となり (Fig. 5b, 7b, 8b)、穴あき核法を用いると注射法より少ない移植細胞数で真珠層真珠が形成されることが明らかになった。この結果は移植された細胞と真珠核の接触率が向上したことに起因すると考えられる。このように穴あき核法を用いることで、上皮細胞移植による真珠形成を比較的効率良く行うことが可能となった。

穴あき核を用いた真珠形成試験においては、挿核作業の過程で真珠核の小穴に入れた細胞懸濁液が失われないように、細胞懸濁液にアコヤガイコラーゲンあるいは豚ゼラチンを含ませて粘性を高め、その影響を検討した。その結果、アコヤガイコラーゲンを添加すると真珠層真珠の形成率が有意に低下したが (Fig. 5)、豚ゼラチンの添加ではそのような影響はなく (Fig. 7)、細胞懸濁液に混ぜるには豚ゼラチンの方が適していた。アコヤガイコラーゲンの添加で真珠層真珠の形成率が低下した原因は明らかでないが、外面上皮細胞やザイモザンがアコヤガイコラーゲン中に懸濁したことで、それらが誘起する母貝の生体防御反応が弱まった可能性が考えられる。

貝殻真珠層の黄色度が異なる個体 (黄色個体と白色個体) から分離した外面上皮細胞の混合移植では、黄色個体由来の細胞の比率が高いほど形成された真珠の黄色度が高い傾向が認められ、黄色個体 2 : 白色個体 1 で混合した区と黄色個体 0 : 白色個体 3 で混合した区では真珠黄色度に有意な差が生じた (Fig. 11)。アコヤガイ貝殻真珠層の黄色度の差は真珠層に含まれる黄色色素の量の差に基づくことが知られており、¹²⁾ 黄色色素は外套膜で産生され貝殻に分泌されると推定されている。¹³⁾ また貝殻真珠層の黄色度は遺伝性が高いことが知られており、¹³⁻¹⁵⁾ 貝殻真珠層の黄色度が高い個体や選抜系統の外套膜から採取したピースを用いて真珠を生産すると、黄色度の高い真珠が形成されることが示されている。¹³⁻¹⁵⁾ 今回の混合移植の実験結果はこれらの知見から予想される結果と一致している。混合移植で得られた真珠層真珠の表面を実体顕微鏡で観察したが黄色部と白色部の斑文

様などは観察されなかった。従って移植された外面上皮細胞はほぼ均等に混合して真珠袋を形成し、細胞の由来に応じて黄色色素の産生、分泌を行った結果、真珠層真珠の黄色度が変化すると推定される。和田^{15,16)}は貝殻真珠層色選抜系統の貝殻重量やそれらをピース貝として生産される真珠の重量を比較すると、黄色度の高い系統の方が貝殻や真珠が重いことを報告し、黄色色素の代謝と貝殻の成長量に関連する可能性を指摘している。しかし今回の実験では混合移植の各区間で真珠層真珠の巻きに有意な差は認められなかった (Fig. 9d)。このことから少なくとも今回観察された真珠黄色度の差は巻きの差に起因するものではないと考えられる。

混合移植の結果は、異なる個体から外面上皮細胞を分離して移植した場合、特定の個体の細胞だけが生き残るような現象は通常は起こらないことを示すと考えられる。すなわち真珠品質に関し異なる遺伝形質を持つ複数のピース貝から外面上皮細胞を分離して混合移植した場合、それぞれのピース貝の細胞が共存して真珠袋を形成する可能性が高い。真珠の品質を決める要因のうち、色、巻きなどは挿核に用いたピースの影響を受けることが知られている。^{13-15,17,18)}そしてこれらの知見に基づきピース貝の遺伝的改良が進められ、優良な色彩の真珠を生産するのに適するピース貝系統などが作成されており、^{15,17,19)}ピース貝の改良は今後さらに進むと予想される。このような優良なピース貝から外面上皮細胞を分離して混合移植した場合、形質の組み合わせによっては優良形質が共存した高品質な真珠の生産が可能になると期待される。

混合移植の実験ではピースと真珠核による通常の挿核を行う区も設け、生残個体数、脱核個体数、真珠層真珠数、巻きについて穴あき核法と比較した。その結果、これらの項目において穴あき核法と通常の挿核方法とで有意な差が認められなかった (Fig. 9)。現行の挿核法においてアコヤガイ2年貝をピース貝とした場合、1個体から切り出した外套膜縁膜部から通常約40個のピースを準備することが可能である。一方、2年貝の外套膜縁膜部からは外面上皮細胞数が通常 2×10^6 個程度分離できる。今回の実験において穴あき核法で1から 5×10^4 細胞を移植した場合、真珠層真珠形成率は約45から94%であった (Fig. 5b, 7b, 8b)。この程度の数の細胞を移植する場合、ピース貝1個体から真珠核40から200個分程度の細胞を準備できることになる。このように穴あき核法による外面上皮細胞移植では、移植細胞数を最適化することで一個体のピース貝から従来の挿核法よりも多くの真珠を生産することが可能になると予想される。

以上のように外面上皮細胞移植による真珠形成には混合移植による優良形質の共存や移植細胞数の最適化などの利点が予想されるが、本研究で考案した穴あき核法に

よる移植では真珠核の穴の位置に浅いくぼみのある真珠が形成される (Fig. 6d)。従って実用に用いるためにはさらに外面上皮細胞移植法を改良する必要がある。また外面上皮細胞以外の組織の移植が減ることで、真珠袋内腔に細胞屑が包み込まれる機会の減少や母貝の生理的負担の低減を予想したが、生残個体数、脱核個体数やシミの形成は通常の挿核法と差があるとは言えなかった (Fig. 9)。この点についてはさらに個体数を増やして検討する必要がある。そして将来的に実際の真珠養殖に応用するには、費用、手間、収益などコストパフォーマンスの向上を目指した技術改良が必要であろう。こうした真珠養殖への実用的な応用とともに、外面上皮細胞移植による真珠形成は、近年急速に情報が増えて関心が高まっている真珠形成過程での母貝とピース貝の遺伝学的・生理学的関係や、^{20,21)}真珠袋形成過程での細胞機能の変化、²²⁾挿核に伴う生体防御反応などを細胞レベルで研究するための新しい実験手法としても利用できる。そのような研究を通じて、高品質な真珠が形成される機構の細胞レベルでの理解が進むと期待される。

謝 辞

試験貝の養殖管理や浜揚げにご協力いただいた株式会社ミキモト真珠研究所の各位、そしてアコヤガイカラーゲンをご提供いただいた御木本製菓株式会社前山 薫氏、服部文弘氏に厚くお礼申し上げる。本研究は日本学術振興会学術研究助成基金助成金（挑戦的萌芽研究23658169）によって行った。

文 献

- 1) Wada KT. The pearl oyster, *Pinctada fucata* (Gould) (Family Pteriidae). In: Menzel W (ed). *Estuarine and marine bivalve mollusk culture*. CRC Press, Boca Raton. 1991; 245-260.
- 2) 和田浩爾. 第1章 生物が作る宝石。「真珠の科学—真珠のできる仕組みと見分け方—」真珠新聞社, 東京. 1999; 1-32.
- 3) 和田浩爾. 第2章 外套膜と真珠袋の構造と働き。「真珠の科学—真珠のできる仕組みと見分け方—」真珠新聞社, 東京. 1999; 33-68.
- 4) 町井 昭. 真珠袋形成に関する組織学的研究. 国立真珠研究所報告 1968; 13: 1489-1539.
- 5) 和田克彦. 2. 真珠形成細胞株の改良法の開発。「細胞融合・核移植による新生物資源の開発」(研究成果シリーズ235)農林水産技術会議事務局, 東京. 1990; 179-183.
- 6) Awaji M, Machii A. Fundamental studies on *in vivo* and *in vitro* pearl formation—Contribution of outer epithelial cells of pearl oyster mantle and pearl sacs. *Aqua-Biosci. Monogr.* 2011; 4: 1-39.
- 7) Machii A, Wada KT. Some marine invertebrates tissue culture. In: Mitsuhashi J (ed). *Invertebrate cell system applications*. Vol. II. CRC Press, Boca Raton. 1989; 225-233.
- 8) 川上元郎, 福田 保, 杉山芳雄. 第8章色差。「色彩科学ハンドブック」(日本色彩学会編)東京大学出版会, 東京. 1980; 257-297.

- 9) Sato Y, Inoue N, Ishikawa T, Ishibashi R, Obata M, Aoki H, Atsumi T, Komaru A. Pearl microstructure and expression of shell matrix protein genes MSI31 and MSI60 in the pearl sac epithelium of *Pinctada fucata* by *in situ* hybridization. *PLoS ONE* 2013; **8**: e52372.
- 10) 船越将二. 二枚貝類における血球の分類, 形態および機能に関する研究. 養殖研究所研究報告 2000; **29**: 1-103.
- 11) Suzuki T, Yoshinaka R, Mizuta S, Funakoshi S, Wada K. Extracellular matrix formation by amebocytes during epithelial regeneration in the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Cell Tissue Res.* 1991; **266**: 75-82.
- 12) 和田浩爾. 第4章 真珠の生体鉱物学. 「真珠の科学—真珠のできる仕組みと見分け方—」真珠新聞社, 東京. 1999; 123-168.
- 13) 和田浩爾. 黄色真珠の形成に関する実験生物学的研究. 国立真珠研究所報告 1969; **14**: 1765-1820.
- 14) 和田克彦. アコヤガイ *Pinctada fucata* の改良に関する研究. 養殖研究所研究報告 1984; **6**: 79-157.
- 15) 和田克彦. アコヤガイ貝殻真珠層色選抜系統で生産された真珠について. 養殖研究所研究報告 1985; **7**: 1-7.
- 16) 和田克彦. アコヤガイ貝殻真珠層色選抜集団における貝殻特性. 養殖研究所研究報告 1986; **9**: 1-6.
- 17) 岩永俊介, 山田英二, 川口 健, 細川秀毅. アコヤガイ殻体真珠層のa値を指標としたピース貝生産用親貝の選抜. 水産増殖 2008; **56**(2): 167-173.
- 18) 林 政博, 出口明彦, 小賀史哉, 山本隆文, 岩城 豊, 岩城秀夫, 伊藤孝男, 山本満彦, 野村清孝, 西川一生, 竹内章浩. 系統間の巻きの差違および左右の外套膜による巻きの差違. 全真連技術研究会報 2005; **19**: 1-4.
- 19) 林 政博. アコヤガイの殻体真珠層色の改良について. 全真連技術研究会報 1999; **14**: 1-14.
- 20) Fukushima E, Iwai T, Miura C, Celino FT, Urasaki S, Miura T. A xenograft mantle transplantation technique for producing a novel pearl in an Akoya oyster host. *Mar. Biotechnol.* 2014; **6**: 10-16.
- 21) McGinty EL, Evans BS, Taylor JUU, Jerry DR. Xenografts and pearl production in two pearl oyster species, *P. maxima* and *P. margaritifera*: Effect on pearl quality and a key to understanding genetic contribution. *Aquaculture* 2010; **302**: 175-181.
- 22) Inoue N, Ishibashi R, Ishikawa T, Atsumi T, Aoki H, Komaru A. Gene expression patterns in the outer mantle epithelial cells associated with pearl sac formation. *Mar. Biotechnol.* 2011; **13**: 474-483.