

スサビノリの殻胞子と発芽体を用いた 毒性試験法

高見徹¹・丸山俊朗²・鈴木祥広³・三浦昭雄⁴

¹ 学生会員 宮崎大学大学院工学研究科システム工学専攻 (〒889-21 宮崎市学園木花台西 1-1)

² 正会員 工博 宮崎大学教授 工学部土木環境工学科 (〒889-21 宮崎市学園木花台西 1-1)

³ 正会員 水産博 宮崎大学助手 工学部土木環境工学科 (〒889-21 宮崎市学園木花台西 1-1)

⁴ 理博 青森大学教授 工学部生物工学科 (〒030 青森市幸畑 2-3-1)

本研究は有害物質の沿岸生物への影響を評価するために、スサビノリ糸状体から放出される殻胞子と発芽体を用いた毒性試験法の開発を目的とした。殻胞子は成熟した糸状体を明期10時間、水温15℃、1/20PES培地で培養7日後の明期開始後3時間以内に全日放出数の80%が放出される。殻胞子の着生基質はガラスプレートが最適であった。ガラスプレートへの殻胞子の着生は自然沈降法が最適であった。殻胞子の着生率と発芽体の生残率は、放出時期と数が異なる殻胞子を用いた場合でも高い再現性を示した。

Key Words : bioassay, conchocelis, conchospore, germling, *Porphyra yezoensis*, toxicity test

1. はじめに

近年、環境に放出される単一または複数の有害物質の生態系に及ぼす影響を短時間に評価することを目的として、供試生物の選定、管理・入手(培養)方法、ならびに実際の操作方法が開発されてきている。OECDとUSEPAは、数種類の生物を用いた毒性試験のマニュアルを作成した¹⁾²⁾。現在、毒性試験用の供試生物として、魚類^{1)~4)}、植物プランクトン¹⁾⁴⁾、動物プランクトン¹⁾、無脊椎動物^{2) 3)}等が提案されている。ところが、供試生物として大型藻類(海藻)を用いた毒性試験研究の例は極めて少なく、米国カリフォルニア州が策定したジャイアントケルブ(*Macrocystis pyrifera*)³⁾とUSEPAが策定したワツナギソウ(*Champia parvula*)²⁾の初期発生段階を用いる短期間試験法の2例しかみあたらない。海藻は、われわれの食料として用いられるだけでなく、沿岸海域における主要な一次生産者であり、多様な生物の生息場となる海藻群落を形成し、極めて重要な役割を果たしている⁵⁾。沿岸生物の影響評価を行う上で、海藻は欠くことのできない生物の一つである。わが国においても、海藻群落の保全の立場から、海藻を供試体とした毒性試験法の開発が期待される。

毒性試験に採用すべき供試生物は、(1)国民がよく知っていて³⁾、(2)産業上の重要種(有用海藻)で

あり^{3) 4)}、(3)適時必要数を入手でき⁶⁾、(4)有害物質に対する影響が短時間で鋭敏かつ確実に発現して定量的に示すことができ⁶⁾、(5)感受性のばらつきが少ない種である⁴⁾ことが望ましい。さらに試験法は誰もが簡易に行えることが重要である。わが国において、ジャイアントケルブは産せず、ワツナギソウは有用海藻ではないため、毒性試験結果が与える産業界への影響力に乏しいと考えられる。さらにジャイアントケルブ遊走子を用いた試験法は、遊走子嚢を備えた胞子葉を生育現場で採取しなければならず、採取した季節によって同一物質に対する感受性が異なる³⁾。ワツナギソウ分枝を用いた試験法は、精子嚢と受精毛を備えた分枝の受精の成否を観察しなければならず、海藻培養の専門家によって、あるいはその監督の下に行われなければならない²⁾。さらに受精の成功を示す嚢果の形成と、試験に供するまでの分枝の培養に時間がかかる。

わが国では、1960年代にノリ(海苔)養殖に及ぼす各種排水の影響が論じられ^{7) 8) 9)}、さらに1985年以降丸山らによってノリ葉状体(foliose thallus, 図-1¹⁰⁾)を供試生物とした毒性試験の研究が行われてきた^{11)~16)}。ノリは、(1)わが国における代表的な食用海藻の一つであり、わが国の養殖水産物の中で生産量第1位と生産金額第2位を維持しており¹⁷⁾、(2)実験室で生活環を完結でき、生活環の全ての生

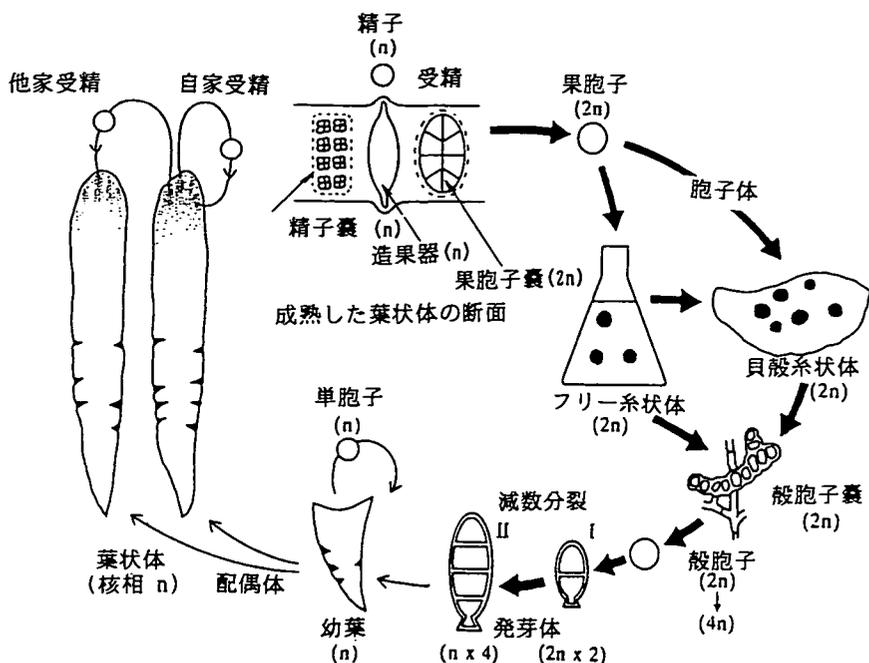


図 - 1 スサビノリ (*Porphyra yezoensis*) の生活環¹⁰⁾

長段階の供試体を通年入手でき、(3) 有害性物質に対する感受性が高い等の理由から、供試生物として最適である^{16), 18)}。しかし、葉状体(葉長約1 cm)を供試生物とした場合、殻胞子から葉状体を得るには約1カ月の培養期間を要し^{19), 20)}、形状の均一な葉状体を得るには培養の習熟が必要である。また、かつて有害性物質のノリに対する影響を評価する方法として行われた光合成阻害やリン吸収阻害の測定は設備と操作が複雑であって一般的でない²¹⁾。

本研究は、ノリの糸状体(conchocelis)から放出される殻胞子(conchospore)と数細胞期までの発芽体(germling)の初期発生段階を供試生物として用い、誰もが短期間に簡易かつ確実に行うことのできる毒性試験法を開発することを目的としている。殻胞子は直径 $14.2 \pm 1.9 \mu\text{m}$ ($n=120$)で、完全な球形に近く、内部に紅色の星形の色素体を有しており、顕微鏡下(倍率 $100\times \sim 200\times$)で容易に観察できる利点がある。また、殻胞子を用いることで、着生、発芽、ならびに細胞分裂の段階を顕微鏡下で容易に観察でき、葉状体を用いるよりも、試験の所要期間を大幅に短縮できる。さらにノリは殻胞子の発芽時に減数分裂が起こることから¹⁰⁾、毒物に鋭敏に反応すると思われる。

殻胞子を供試体とする毒性試験法の開発では、殻胞子が基質に着生する段階と着生後の発芽体の生長

段階への影響を定量化する必要がある。そのためには第一に、必要数の殻胞子を常に安定して入手できる培養条件をみい出すことが必要である。第二に、得られた必要数の殻胞子が確実に基質に着生し、正常に発芽して数細胞期の発芽体に生長させるための適切な着生基質の種類と着生方法をみい出すことが必要である。上述の事柄に関する研究はいくつか行われている^{20), 22)}。しかし、用いた糸状体量に対する時間当たり、1日当たりの殻胞子放出数の関係や単位着生基質面積当たりの殻胞子着生数等の定量化を行うまでには至っていない。

そこで(1)成熟した糸状体から殻胞子の入手までの所要培養時間、(2)試験に必要な数の殻胞子の入手可能な期間、(3)殻胞子の着生基質の種類、(4)基質への適切な着生方法の選定、ならびに(5)殻胞子の放出時期の違いによる殻胞子着生率と生残率の再現性に関する知見を得たのでここに報告する。

2. 材料および方法

(1) ノリの生活環

ノリは、図-1に示したように、葉状体(核相 n)である配偶体と糸状体(核相 $2n$)である胞子体との間で規則正しい世代交代を行う¹⁰⁾。ノリはこれら全ての段階を明暗期、光量子密度(照度)、温度を制御す

ることによって実験室での培養が可能である¹⁹⁾。糸状体は天然では貝殻に侵入して貝殻糸状体 (shell-inhabiting conchocelis) に生長する。貝殻がなければ、フリー糸状体 (free-living conchocelis) となる。フリー糸状体は、細断してもそれぞれの細片が増殖し、遺伝子型が同一の分枝群 (クローン) を容易に作るができる¹⁰⁾。さらにフリー糸状体は、実験室において月に1度程度の培地交換のみで長期間の保存培養が可能であり、これを密閉容器などによって容易に輸送することもできる。フリー糸状体は、日長条件を変えることによって、殻胞子嚢 (conchosporangium) を形成して成熟する。続いて温度と光の刺激を与えることによって殻胞子を放出する。放出された殻胞子は基質に着生後、減数分裂を行い、発芽して発芽体 (germling) となり、細胞分裂を繰り返して葉状体に生長する。

(2) フリー糸状体、殻胞子、発芽体の培養

本実験に用いたノリは、青森大学工学部で保存培養を続けたササビノリ (*Porphyra yezoensis* U-511 株) フリー糸状体 (以下、糸状体と略称する) である。これを宮崎大学工学部研究室で以下の条件で培養した。糸状体を長日・高温条件 (明暗期 14hL:10hD, 光量子密度 $10 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$, 温度 23°C) で随時栄養増殖させ、その増殖した糸状体の一部を順次短日・高温条件 (明暗期 10hL:14hD, 光量子密度 $10 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$, 温度 23°C) で1カ月以上培養し、成熟させた。次いで短日・低温条件 (明暗期 10hL:14hD, 光量子密度 $140 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$, 温度 15°C) に移して殻胞子を放出させた。

糸状体の栄養増殖 (長日・高温条件) と成熟 (短日・高温条件) を図る培養では、Provasoli's enriched seawater (PES)²³⁾ を用いた。殻胞子の放出と発芽体の生長 (短日・低温条件) を図る培養では、PESの栄養塩類が1/20の濃度になるように調製した培地¹¹⁾ (以下、1/20PES培地と略称する) を用いた。1/20PES培地の窒素とリンの濃度は、有明海ノリ栽培漁場の漁期の平均濃度のそれぞれ約2倍と約1倍に相当する¹¹⁾。1/20PES培地の作成方法を表-1に示した。培地に用いた海水は宮崎市青島海岸にて採水し、メンブレンフィルター ((株) 東洋濾紙会社製, 孔径 $0.45 \mu\text{m}$, 直径 47mm) で濾過後、高温高圧滅菌 (121°C , 1.2atm , 30min) したものをを用いた。培養は照明時間を調整できるように改良したインキュベーター ((株) 三洋電機製, MIR152型) 内で行った。

(3) 明期開始後の殻胞子放出数の経時変化

成熟した糸状体は暗期から明期に移行する際の点

表-1 PES培地 (Provasoli's enriched seawater) の作成方法²³⁾

(1) Provasoliの海水補強栄養剤の組成

蒸留水	1000 ml
NaNO ₃	3500 mg
Na ₂ グリセロリン酸	500 mg
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄)·6H ₂ O	175.5 mg
Na ₂ EDTA	150 mg
PII 金属混液 ^{a)}	250 ml
ビタミン B ₁₂	0.1 mg
チアミン	5.0 mg
ピオチン	0.05mg
"Tris" (Sigma Co.)	5000 mg
pH	7.8

a) PII 金属混液の組成

蒸留水	1000 ml
H ₃ BO ₃	1140 mg
FeCl ₃ ·6H ₂ O	49 mg
MnSO ₄ ·4H ₂ O	164 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22 mg
CoSO ₄ ·7H ₂ O	4.8 mg
Na ₂ EDTA	1000 mg

(2) PES培地と1/20PES培地¹¹⁾の調整

	海水補強栄養剤	ろ過滅菌海水
PES培地	20ml	1000ml
1/20PES培地	1ml	1000ml

灯による光の刺激で殻胞子を放出し始めるので²⁴⁾、必要数の殻胞子を確実に入手するために、明期開始後の殻胞子放出数の経時変化を把握する。

短日・高温条件で成熟した糸状体を200ml容三角フラスコに1/20PES培地200mlを入れ、短日・低温条件に移して糸状体が浮遊する程度の緩やかな通気を行った。実験は3回行い、暗期から明期に変わってから60分間隔で明期終了までそれぞれ別に用意した15℃に保った1/20PES培地に糸状体を移した (以下、この操作を“培地交換”という)。

殻胞子放出数は、糸状体を取り出した培地の1mlをポリスチレン製の細胞組織培養用24ウェルプレート (商品名: Cell Wells 24 well plate, Corning製, 直径15.5mm, 容量3.4ml) に注入して、全ての殻胞子が底面に沈降する約1時間静置した後、倒立顕微鏡 ((株) ニコン製, TMD300型) を用いて計数した。

Test-1では、暗期の殻孢子放出数も計数した。この場合、消灯直後に培地を交換し、次の日の点灯直前に培地の全量を採取し、親水性ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) フィルター (商品名: オムニポア, Millipore製, JHWP01300型, 孔径 $0.45\ \mu\text{m}$, PTFEフィルターは液中で透明に変わるので顕微鏡観察ができる) によって濾過し、濾紙をスライドガラスに設置し、顕微鏡を用いて濾紙上に捕捉された全ての殻孢子を計数した。

(4) 殻孢子放出数の経日変化

成熟した糸状体を短日・低温条件に移しても、直後から殻孢子を放出するとは限らない。そこで、殻孢子の放出が初認される経過日数とこの条件下での放出期間、ならびに毒性試験に必要な殻孢子数を確保するための糸状体量を明らかにするため以下の実験を行った。

糸状体を短日・低温条件で30日間培養し、毎日点灯3時間後に培地を交換して、使用した培地から $200\ \mu\text{l}$ のマイクロピペットで $100\ \mu\text{l}$ 、放出数の少ない場合には $1000\ \mu\text{l}$ のマイクロピペットで $1000\ \mu\text{l}$ (各回につき $n=3$) を取り出し、殻孢子数を計数して、培地 $1\ \text{ml}$ 当たりの放出殻孢子濃度の経日変化を求めた。この実験を10回繰り返した。用いた糸状体の湿重量は $0.259\sim 0.688\ \text{g}$ (平均 $0.457\pm 0.123\ \text{g}$) で、糸状体の湿重量と培養30日間の全殻孢子放出数の関係を求めた。なお、糸状体の湿重量は、糸状体をメンブレンフィルター (前述) で減圧濾過 ($100\ \text{mmHg}$, $10\ \text{sec}$) 後、秤量した。湿重量 $x\ (\text{g})$ と乾重量 $y\ (\text{g})$ の関係は、 110°C , $120\ \text{分間乾燥}$ で、 $y=0.097x$, ($r^2=0.97$, $n=15$) であった。

(5) 殻孢子の着生基質

殻孢子は、基質に着生しなければ細胞分裂、すなわち発芽しない²⁴⁾ので、殻孢子の着生しやすい基質は、発芽率が高いと考えられる。毒性試験には、より多くの着生と高い発芽率の得られる基質が必要である。また、取扱いの容易な基質が良い。そこで、基質の選択にあたって、以下の条件を求めた。

- (1) 入手が容易である。
- (2) 顕微鏡による観察が可能のように透明である。
- (3) 大きさの揃った規格で、着生面が平滑である。
- (4) 洗浄と滅菌が容易である。
- (5) 表面が親水性で細胞の接着性が高い。

殻孢子の着生基質として、(1) ガラスプレート (商品名: マイクロカバーガラス, 武藤化学製, $10\ \text{mm}\times 10\ \text{mm}$, 厚さ No.1: $0.12\sim 0.17\ \text{mm}$), (2) セラミックスメンブレンフィルター (商品名: Anopore™メン

ブレン, Nunc製, 孔径 $0.2\ \mu\text{m}$, 直径 $25\ \text{mm}$) (以下, セラミックスフィルターと略称する), (3) PTFEフィルター (前述), ならびに (4) 6ウェルプレート (商品名: Cell Wells 6 well plate, Corning製, 直径 $34.6\ \text{mm}$, 底面積 $944\ \text{mm}^2$, 容量 $16.8\ \text{ml}$) (以下, ウェルプレートと略称する) で実験した。4種類の基質は全て水中で透明もしくは半透明である。ガラスプレートは安価で入手が容易である。セラミックスフィルターとウェルプレートは細胞の組織培養用に開発されたので、またPTFEフィルターは親水処理されているので、殻孢子が容易に着生すると考えた。4種類の基質はそれぞれ5枚ずつ用意し、予め濾過滅菌海水に一昼夜浸したものをを用いた。

殻孢子の基質への着生方法は、ガラスプレート, セラミックスフィルター, ならびにPTFEフィルターの場合、それぞれの基質を1つのウェルプレートの底面につき1枚ずつ設置し、ウェルプレートの場合はそのまま殻孢子懸濁液 $10\ \text{ml}$ を注入し、自然沈降によって基質上に殻孢子を着生させた (以下, 自然沈降着生法と称す)。4種類の基質への着生には全て同日に採取した殻孢子懸濁液を用いた。殻孢子懸濁液は実験当日の点灯後3時間以内に糸状体から放出されたものを使用した。基質上の殻孢子密度が約 $200\ \text{細胞}/\text{cm}^2$ とするため殻孢子懸濁液を $1/20\ \text{PES}$ 培地で希釈し、約 $200\ \text{細胞}/\text{ml}$ とした。

24時間以内に着生した殻孢子を健全な殻孢子とみなした。24時間後、ガラスプレート, セラミックスフィルター, ならびにPTFEフィルターについては、着生していない殻孢子を洗い流す (基質の洗浄) ため、基質表面を濾過滅菌海水中に1度水面と垂直に浸してから取り出し、再び $1/20\ \text{PES}$ 培地が入ったウェルプレートの底に設置した。ウェルプレートの場合は、 $10\ \text{ml}$ の $1/20\ \text{PES}$ 培地交換を2回行った。基質の洗浄後、残存殻孢子を計数した。殻孢子着生率は、それぞれの基質 $1\ \text{cm}^2$ に自然沈降させた殻孢子数 (約 $200\ \text{細胞}$) に対する、洗浄後の残存した殻孢子数の比で求めた。

毒性試験に用いる発芽体の生残率は、着生殻孢子を短日・低温条件で7日間培養し、2日毎に計数して着生殻孢子数と発芽体数の比で求めた。検鏡によって細胞内の色素が脱色したり、基質上から脱着した殻孢子と発芽体を死亡個体とみなした。これら24時間後の殻孢子着生率と培養7日後までの生残率から適切な基質を選定した。

(6) 殻孢子の基質への着生方法

毒性試験に殻孢子を用いる場合、できるだけ早く、また均一に基質に着生させる必要がある。そこで、既

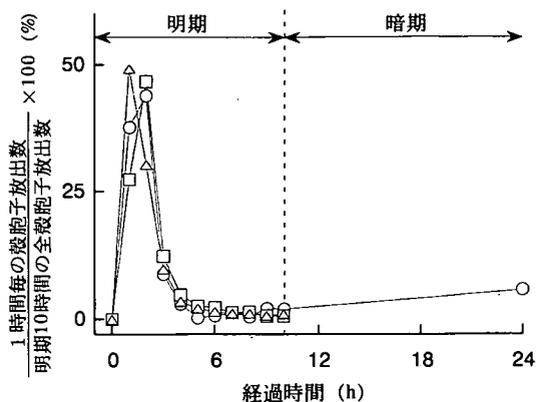


図-2 明期10時間の全殻胞子放出数に対する点灯後の経過時間毎の殻胞子放出数の割合
○, Test-1; □, Test-2; △, Test-3

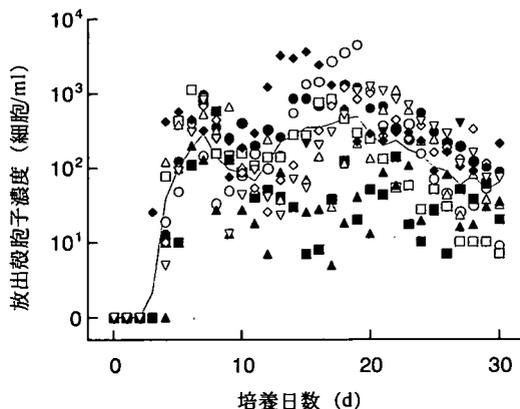


図-3 フリー糸状体からの殻胞子放出数の経日変化 (実線は10回の実験の平均値を示す)

述のガラスプレートを用いた自然沈降着生法を含めた以下の4種類の着生方法の比較を行った。

(1) 自然沈降着生法: ガラスプレートをウェルプレートの底面に設置し、殻胞子懸濁液 5 ml と 1/20PES 培地 5 ml の混合液 10 ml を注入し、24 時間静置し、着生させた。

(2) 減圧濾過着生法: セラミックフィルターを濾過器に設置し、はじめに殻胞子懸濁液 5 ml を、続いて 1/20PES 培地 25 ml を吸引ポンプによって減圧濾過 (300 mmHg) して殻胞子を基質に強制的に着生させた。

(3) 加圧濾過着生法: PTFE フィルターを専用のフィルターホルダー (Millipore 製, SX001300 型) に設置し、注射器を用いてはじめに殻胞子懸濁液 5 ml を続いて 1/20PES 培地 25 ml を加圧濾過して殻胞子を基質に強制的に着生させた。

(4) 曝気着生法: 2 枚 1 組に重ね合わせたガラスプレート (18 mm × 18 mm) を 100 ml の殻胞子懸濁液の水面付近に水面と垂直に浸漬するように設置し、24 時間の曝気を行い着生させた。2 枚のガラスプレートは、プラスチック製のクリップを用いて固定した。水面への設置は、殻胞子懸濁液を入れた 100 ml 容ビーカーの口に渡した針金にクリップを吊り下げるにより行った。

減圧濾過着生法と加圧濾過着生法では着生操作後、1/20PES 培地 10 ml を入れたウェルプレートに基質を設置し 24 時間静置した。

全ての基質は予め濾過滅菌海水に一昼夜浸したものをを用いた。着生実験は全て同日に採取した約 200 細胞/ml の殻胞子懸濁液を用いた。自然沈降着生法、減圧濾過着生法、ならびに加圧濾過着生法はそれぞれ 3 組ずつ行い、曝気着生法は 1 個のビーカーのみ

に 2 組合せ計 4 枚のガラスプレートを設置した。適切な着生方法の選定は 24 時間後の着生率と培養 7 日後までの生残率から判断した。

(7) 殻胞子の放出時期の違いによる着生率と生残率の再現性

殻胞子を用いた毒性試験では、着生率、生残率、発芽率、ならびに細胞分裂速度によって影響を評価することから、それらの再現性に関する知見は極めて重要である。

そこで糸状体を短日・低温条件で 30 日間培養し、4 日毎に放出された殻胞子をガラスプレートに自然沈降着生法で着生させ、放出時期の違いによる 24 時間後の着生率、培養 7 日後の生残率を求めた。以上の実験について、別々に培養した糸状体を用いて 3 回繰り返した。

3. 実験結果および考察

(1) 明期開始後の殻胞子放出数の経時変化

明期10時間の全殻胞子放出数に対する点灯後の経過時間毎の放出数の割合を図-2に示した。3回の実験とも殻胞子の放出は点灯直後から始まり、点灯後3時間以内に全放出数の86.0~90.3% (平均88.4 ± 2.2%, n=3)を放出するという極めて類似した傾向を示した。3時間以降放出数は急激に減少し、5時間以降はほとんど放出されなかった。Test-1において暗期14時間の放出数は、1 ml 当たり 89 細胞であり、これは明期10時間の全放出数の僅か5.7%であった。アサクサノリ貝殻糸状体の自然条件での殻胞子放出数は、午前中あるいは日出から数時間後までがピークであると報告されており^{25), 26), 27)}、本実験結果は

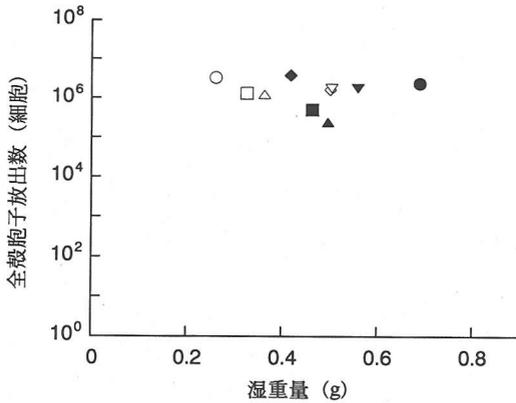


図-4 フリー糸状体の湿重量と30日間に放出された殻胞子数の関係

その現象を定量的に裏付けた。以上、1日のうちで最も効率よく殻胞子を入手するには、200ml容フラスコに成熟した糸状体を入れて、点灯後3時間以内に採取すればよいことが明らかとなった。

(2) 殻胞子放出数の経日変化

放出殻胞子濃度の経日変化を図-3に示した。殻胞子の放出は、糸状体を短日・低温条件に移して一部、3日後あるいは5日後から始まったものもあったが、平均して4日後に始まった。4日後の平均放出殻胞子濃度は、 70 ± 130 細胞/ml ($n=10$)であった。4日以降、放出殻胞子濃度は徐々に高くなり、10回のうちの7回の実験では7日後に最初のピークを迎えた(平均 540 ± 310 細胞/ml, $n=10$)。7日から11日にかけて、放出殻胞子濃度は低下したが(11日後で平均 110 ± 80 細胞/ml, $n=10$)。その後再び上昇し、15日~20日後に2度目のピークを迎えた(19日後で平均 900 ± 1310 細胞/ml, $n=10$)。その後、徐々に低下し、30日後に至って 110 ± 120 細胞/ml ($n=10$)となった。

このように殻胞子の放出は、糸状体を短日・低温条件に移して約4日後から30日後まで毎日続いており、自然条件での貝殻糸状体の殻胞子放出期間²²⁾と同様な結果が得られるとともに、放出の周期性を明らかにできた。

毒性試験に殻胞子を用いるためには約100細胞/ml以上の殻胞子濃度が望まれるので、放出の始めのピークまでの約7日間、2度目のピークまでの間の数日間、ならびに20日以降を避ければ試験可能となる。

糸状体の湿重量と30日間に放出された全殻胞子数の関係を見ると(図-4)、糸状体の湿重量の多寡に関わらず、放出された全殻胞子数は $10^5 \sim 10^6$ 細胞の

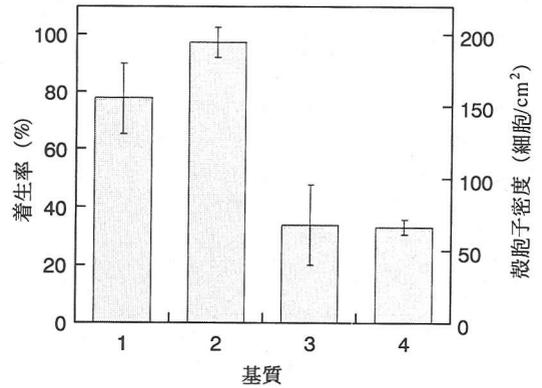


図-5 ガラスプレート(1)、セラミックスフィルター(2)、PTFEフィルター(3)、ならびにウェルプレート(4)における24時間後の殻胞子着生率と着生殻胞子数 ($n=5$; エラーバーはSDを示す)

範囲にあった。このことは、成熟した糸状体約0.3gを用いれば、短日・低温条件で培養を始めてから約7日以後に、ほぼ確実に100細胞/ml以上の放出殻胞子を手取できることを示している。30日間を通してみると、放出殻胞子濃度のピークが生じることから、糸状体を2系統以上培養し、それらの培養期間を1ないし2週間程度ずらすことによって、実験可能な殻胞子数を毎日入手できる。

(3) 殻胞子着生基質の選定

自然沈降着生法による4種類の基質への殻胞子着生率を図-5に示した。着生率はセラミックスフィルターが最も高く($97.3 \pm 5.3\%$, $n=5$)、次いでガラスプレート($77.6 \pm 12.3\%$, $n=5$)、PTFEフィルター($33.8 \pm 13.9\%$, $n=5$)、ウェルプレート($33.2 \pm 2.5\%$, $n=5$)の順となった。セラミックスフィルターの表面は他の3種類の基質表面と比較して凹凸が多く、凹凸の間に殻胞子の一部分が落ち込み、脱落しづらくなることで着生率が高まったと考えられる。表面が平滑なガラスプレート、PTFEフィルター、ならびにウェルプレートでは、ガラスプレートの着生率が最も高かった。

次に、殻胞子着生後の培養時間と発芽体の生残率の関係を図-6に示した。ガラスプレートとウェルプレート上の発芽体の生残率は、培養7日後において、それぞれ $99.6 \pm 0.8\%$ ($n=5$)、 $99.1 \pm 1.5\%$ ($n=5$)と高く、PTFEフィルター上では $82.9 \pm 8.0\%$ ($n=5$)とそれらに次いだ。しかし、セラミックスフィルターは、高い着生率にも関わらず、7日間の培養で徐々に生残率が低下し始め、7日後には $25.2 \pm 6.2\%$ ($n=5$)まで低下した。観察の結果、セラミックスフィルター

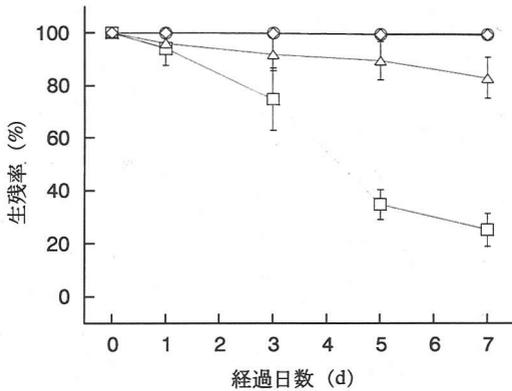


図-6 ガラスプレート (O), セラミックスフィルター (□), PTFE フィルター (△), ならびにウェルプレート (◇) 上の発芽体の生残率の経時変化 (n=5, エラーバーはSDを示す)

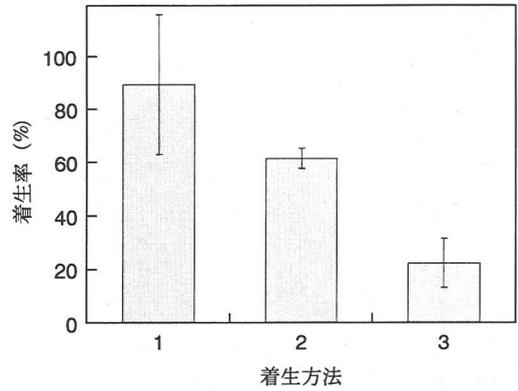


図-7 ガラスプレートへの沈降着生 (1), セラミックスフィルターへの減圧濾過着生 (2), ならびにPTFE フィルターへの加圧濾過着生 (3) における基質への殻胞子着生率 (n=3, エラーバーはSDを示す)

上の生残率の低下は死亡によるものであった。

以上の結果から、4種類の基質の中で殻胞子着生基質には、高い着生率 ($77.6 \pm 12.3\%$, n=5) と生残率 ($99.6 \pm 0.8\%$, n=5) を示したガラスプレートが最も適していることが明らかとなった。

(4) 殻胞子の基質への着生方法の選定

自然沈降着生法, 減圧濾過着生法, ならびに加圧濾過着生法における殻胞子着生率を図-7に示した. 着生率はガラスプレートを用いた自然沈降着生法が最も高く ($89.4 \pm 26.3\%$, n=3), 次いでセラミックスフィルターを用いた減圧濾過着生法 ($61.4 \pm 3.8\%$, n=3), PTFE フィルターを用いた加圧濾過着生法 ($22.2 \pm 9.1\%$, n=3) の順となった. したがって, ガラスプレートを用いた自然沈降着生法を用いることによって, 約80%の着生率が得られる. ガラスプレートを用いた曝気着生法では, ガラスプレート1枚 (1 cm^2) 当たりの着生数は0~2個体と僅かであった. 曝気着生法については追加実験を行ったが, ガラスプレート1枚当たりの着生数は2~58個体とばらつきが大きく, しかもガラスプレートの四辺の周囲のみに集中して着生していることが多かった. このことから, 曝気着生法は試験法としては適切でないことが明らかとなった.

それぞれの基質と着生法によって着生した殻胞子の7日後の生残率は, ガラスプレートを用いた自然沈降着生法で $83.3 \pm 6.0\%$ (n=3), PTFE フィルターを用いた加圧濾過着生法で $67.3 \pm 13.1\%$ (n=3) と高かった. 一方, セラミックスフィルターを用いた減圧濾過着生法では, $18.8 \pm 2.3\%$ (n=3) と低かった.

以上の結果から, 毒性試験のための殻胞子の着生

方法として, ガラスプレートを着生基質とした自然沈降着生法が最適であることが明らかとなった.

(5) 殻胞子の放出時期の違いによる着生率と生残率の再現性

短日・低温条件で糸状体を30日間培養し, 4日毎に放出された殻胞子のガラスプレートへの24時間後の着生率およびその7日後の生残率を図-8に示した. 4日毎に放出された殻胞子のガラスプレートへの24時間後の着生率の平均値と標準偏差は, $70.2 \pm 9.7\%$ (n=21) となった. このことから, 放出時期の異なる殻胞子を用いても, 殻胞子放出数が低い場合も高い場合でも, 一定の高い着生率が得られることが明らかとなった. したがって, ガラスプレート上に200細胞の殻胞子を自然沈降法で着生させると, およそ120~160細胞 (平均140細胞) の殻胞子を着生させることができる.

7日後の発芽体の生残率の平均値と標準偏差は, $80.4 \pm 15.8\%$ (n=21) で, 3回の全ての試験を通してかなり安定していた. このことから, 糸状体からの殻胞子の放出時期, および放出数に関わらず, 一定の高い生残率を得られることが明らかとなった. したがって, ガラスプレート上に200細胞の殻胞子を自然沈降法で着生させ, 約140細胞の殻胞子が着生した場合, 7日間培養後におよそその約80%である90~130個体 (平均110個体) が生残すると見積もることができる.

(6) スナビノリ殻胞子と発芽体を用いた毒性試験法に関する考察

10mm × 10mm のガラスプレート上の殻胞子数と

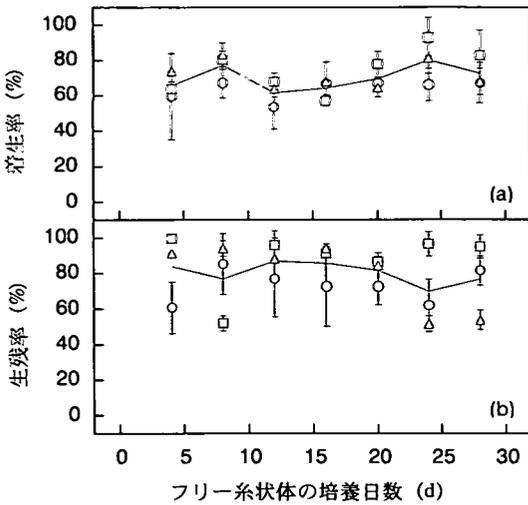


図-8 フリー糸状体から放出された4日毎の殻胞子の24時間着生率(a)と7日後生残率(b)(エラーバーは各実験のSD(n=3)を、実線は3回の繰返し実験の平均値を示す)
○, Test-1; □, Test-2; △, Test-3

発芽体数から試験結果を評価する場合、適切な必要個体数は、データのばらつきと計数時間から、約100個体と考えられる。一定期間の培養後の個体数が100個体となるようにガラスプレート上に沈降させる殻胞子の数は、平均着生率と平均生残率から、約200細胞が適当であることがわかった。

ジャイアントケルプ遊走子を用いた毒性試験法³⁾では、試験容器に7500細胞/mlとなるように遊走子を添加し、無作為に抽出した胚胞子100個体の発芽率と発芽した胚胞子(10個体)に形成される発芽管の長さを測定している。この試験法では、基質に実際に着生した遊走子の個体数を計数しないため、有害物質による生残率を検出できない。また発芽管の長さ(生長)を僅か10個体から判定するために結果のばらつきが大きくなると思われる。ワツナギソウ分枝を用いた毒性試験法²⁾では、試験容器に雄分枝1片と雌分枝5片を入れ、受精の成功した雌分枝のみに形成される成熟した嚢果の数を計数している。この試験法では、雌雄分枝に受精毛あるいは雄精体嚢が形成されるまで、つまり試験に利用可能となるまでと、嚢果の形成までに時間がかかるようである。これに対してノリ殻胞子は、生残率、発芽率が明確に把握され、分裂した細胞と死亡したものが明瞭な形状の違いとして識別できるだけでなく、試験に利用できるまでに要する培養期間が明らかな点ではるかに優れている。また、放出時期の異なる殻胞子を用いても、放出数の異なる殻胞子を用いても、常にほぼ

一定の着生率と生残率を得ることができる。これらのことから、殻胞子は毒性試験の供試体として極めて優れていると考えられる。したがって、本研究に従ってノリ殻胞子を用いた毒性試験を行えば、適時確実に一定数の供試体を手で取り、毒性試験において極めて重要な条件を満足できる。また、着生率と生残率の高い再現性から、ノリ殻胞子は有害物質に対する感受性においても高い再現性が期待できる。

本研究で得られた結果から、毒性試験に用いるノリ殻胞子の準備方法を以下に列挙する。

(1) 糸状体をPES培地、短日・高温条件(10hL:14hD, 10 μ E/m²/sec, 23°C)で1カ月間培養し、成熟させる。

(2) 成熟した糸状体の湿重量約0.3gを200mlの1/20PES培地に入れ、短日・低温条件(10hL:14hD, 140 μ E/m²/sec, 15°C)で緩やかな通気培養を7日間継続する。

(3) 培養7日以後の点灯3時間以内に50 μ m格子のナイロンメッシュを用いて殻胞子を濾取する。次いで殻胞子濃度C(細胞/ml)を測定し、C=約100細胞/ml以上の殻胞子が放出されていることを確認する。殻胞子濃度が高い場合には、100細胞/ml程度となるように、殻胞子懸濁液を1/20PES培地で希釈する。

(4) 24ウェルプレートの底面にガラスプレート(10mm×10mm)を設置し、殻胞子懸濁液3mlを注入する。これを短日・低温条件で24時間静置培養する。

(5) ガラスプレート上に沈降する殻胞子数は、C=100細胞/mlの場合、100細胞/ml×3ml×A/B=160細胞と見積もることができる。ここで、A=100mm²(ガラスプレートの面積)、B=188mm²(24ウェルプレートの底面積)を表す。この場合、着生率と生残率の再現性の結果から得た平均着生率と平均生残率から見積もると、7日後に生残する個体数は、約90個体となる。

(6) 殻胞子懸濁液注入24時間後、濾過滅菌海水中にガラスプレートを静かに一度浸漬する方法で洗浄後、ガラスプレートを別に用意した濾過滅菌海水を入れた24ウェルプレートに設置する。

(7) 顕微鏡下でガラスプレート上の全ての殻胞子を計数する(発芽体があれば、それも別に計数する)。このときの殻胞子(と発芽体)数を毒性試験の初期値とする。

(8) 以上の(1)~(7)の操作を行った後、予め調製した試験培地(例えば、廃水添加海水)に殻胞子の着生したガラスプレートを曝露し、毒性試験を開始する。

4. まとめ

ノリの初期発生段階を用いた毒性試験法の開発のために、糸状体からの殻胞子の放出数と周期、着生基質、着生方法などを検討し、以下の知見を得た。

(1) 殻胞子は、成熟した糸状体から点灯後3時間以内に1日放出数の約80%が放出される。

(2) 殻胞子の放出は、糸状体を短日・低温条件下で培養後、約4日後から始まり、少なくとも30日後まで継続する。

(3) 殻胞子の着生には、ガラスプレートを用いた自然沈降着生法が最適である。

(4) ガラスプレートへの殻胞子の着生率と発芽体の7日後の生残率は、殻胞子放出時期と殻胞子放出数が異なる場合においても、高い再現性を示し、それぞれ $70.2 \pm 9.7\%$ ($n=21$) と $80.4 \pm 15.8\%$ ($n=21$) であった。

本研究によって、殻胞子を適時確実に入手することが可能となった。また殻胞子の基質への着生率と生残率は常に安定していることが明らかとなった。これらのことから、殻胞子を供試体とした毒性試験法は、入手や数量に制限を受けることなく、かつ極めて再現性の高い手法であるといえる。

参考文献

- 1) OECD: Section 2 Effects on biotic systems, OECD guidelines for testing of chemicals, OECD Publications, pp.201-209, 1984.
- 2) USEPA (Cincinnati, OH): Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms, EPA-600/4-87/028, pp.1-417, 1988.
- 3) Hunt, J.W., Anderson, B.S., Turpen, S.L., Coulon, A.R., Martin, M., Palmer, F.H., and Janik, J.J.: Experimental evaluation of effluent toxicity testing protocols with giant kelp, mysids, red abalone, and topsmelt, Marine bioassay project forth report, State Water Resources Control Board, Division of water quality report No.89-5WQ, pp.91-143, 1989.
- 4) APHA, AWWA and WPCF: Part 8000 Toxicity, *Standard method for the examination of water and wastewater*, 18th Ed., APHA, pp.8-1-8-82, 1992.
- 5) 徳田廣: 地球生態系と海藻, 海藻資源養殖学 (徳田廣, 大野正夫, 小河久朗), 緑書房, pp.1-12, 1986.
- 6) 小林直正: 水生無脊椎動物による水汚染の生物検定 増補版, サイエンス社, p.28, 1993.
- 7) 尾形英二, 宮城英雄: 各種工場廃水がアサクサノリの光合成におよぼす影響, 水処理技術, Vol.5, No.11, pp.9-26, 1964.
- 8) 山田信夫: 海藻の呼吸に及ぼす遊離塩素の影響, 水産増殖, Vol.7, No.3, pp.24-28, 1960.
- 9) 藤谷超, 千国史郎: 各種方法による廃水のノリに及ぼす影響の比較, 水産増殖, Vol.7, No.3, pp.48-52, 1960.
- 10) 三浦昭雄: ノリ, 食用海藻の栽培(三浦昭雄編著), 恒星社厚生閣, pp.11-24, 1992.
- 11) 丸山俊朗, 三浦昭雄, 吉田多摩夫: 静置培養における養殖ノリの生育に及ぼす都市下水処理水の影響, 日本水産学会誌, Vol.51, pp.315-320, 1985.
- 12) 丸山俊朗, 三浦昭雄, 吉田多摩夫: 養殖ノリの生育に及ぼす下水処理水の影響評価のための採水時間, 日本水産学会誌, Vol.53, pp.2235-2241, 1987.
- 13) 丸山俊朗, 三浦昭雄, 吉田多摩夫: 養殖ノリの生育に及ぼす塩素殺菌都市下水処理水の影響, 日本水産学会誌, Vol.53, pp.465-472, 1987.
- 14) Maruyama, T., Ochiai, K., Miura, A. and Yoshida, T.: Effects of chloramine on the growth of *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta), *Nippon Suisan Gakkaishi*, Vol.54, pp.1829-1834, 1988.
- 15) 丸山俊朗, 熊谷和也, 三浦昭雄: 塩素消毒によって生成されるモノクロロミンのノリの生育阻害濃度, 第28回下水道研究発表会講演集, pp.189-191, 1991.
- 16) 丸山俊朗, 三浦昭雄: 海藻を供試体とした都市下水処理水の生物検定, 水環境学会誌, Vol.16, No.5, pp.327-338, 1993.
- 17) 全国海苔貝類漁業協同組合連合会: ノリ業界の現況, p.6, 1995.
- 18) 尾形英二: ノリを主とする水産植物の廃水対策の問題点, 水処理技術, Vol.4, No.3, pp.6-12, 1963.
- 19) Iwasaki, H.: The life-cycle of *Porphyra tenera* in vitro, *Biol. Bull.*, Vol.121, pp.173-187, 1961.
- 20) 黒木宗尚: 養殖アマノリの種類とその生活史, 東北海区水産研究所研究報告, No.18, pp.1-115, 1961.
- 21) 尾形英二: 廃水対策としての水産植物の生物試験, 水処理技術, Vol.2, No.10, pp.43-48, 1961.
- 22) 黒木宗尚, 秋山和夫, 佐藤誠一: アマノリ類の糸状体の生長・成熟と光条件, 東北海区水産研究所研究報告, No.20, pp.121-183, 1962.
- 23) 岩崎英雄: 培養液の種類と組成, 藻類研究法(西澤一俊, 千原光雄編集), 共立出版, pp.281-293, 1979.
- 24) 今田克, 斎藤祐一: アマノリ属 *Porphyra* の殻胞子付着材としての粉体の応用, *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, Vol.49, No.3, pp.399-407, 1983.
- 25) 山崎浩: アサクサノリ(*Porphyra tenera* KJELLM)糸状体の生態 III 特に糸状体より放出された胞子について, *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, Vol.20, No.6, pp.447-450, 1954.
- 26) 須藤俊造, 丸山武男, 梅林修: アサクサノリ "Conchocelis-Phase" からの胞子放出について, *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, Vol.20, No.6, pp.490-493, 1954.
- 27) 黒木宗尚, 平野和夫: アサクサノリの糸状体の単胞子放出について 第2報 放出の日周期, 東北海区水産研究所研究報告, No.4, pp.279-282, 1955.

(1996. 8. 5 受付)

TOXICITY TESTING USING CONCHOSPORES AND THEIR GERMLINGS OF *PORPHYRA YEZOENSIS*

Tohru TAKAMI, Toshiro MARUYAMA, Yoshihiro SUZUKI and Akio MIURA

The objective of this study is to establish the methodology of toxicity test of detrimental substances using conchospores and their germlings of *Porphyra yezoensis*. Release of conchospores from mature free-living conchocelis took place after 7 days when the culture transferred from 23°C to 15°C temperature conditions with 10hL : 14hD in 1/20PES medium, and 80% of conchospores were released for first 3 hours when the light condition was changed from off to on in a day. As substrata to be adhered conchospores, the glass plate was the most adequate and concerning the method of adhering conchospores, natural sedimentation of conchospores onto the glass plate was the most adequate. Adhesion and survival ratios of conchospores were constant, even if the date and the number of collecting conchospores were different.