

(速報)

植物プランクトン細胞の生死判別

— 自然海水中に存在する植物プランクトンへの生体染色法の適用可能性 —

鋤崎 俊二・韓 東勲

1. はじめに

2004年2月に、国際海事機関(IMO)においてバラスト水を介した有害な水生生物や病原微生物の移動による、環境、健康、財産、資源への危害を防止することを目的としたバラスト水管理条約が国際条約として採択された。本条約によって、将来的には国際航海に従事するすべての船舶に対して、バラスト水管理条約で採択された基準値(表1)を遵守することが義務づけられる。

表1に示す基準値では、排出水中に存在する生物のうち、最低寸法(minimum dimension)50 μm 以上の生存生物が1 m^3 あたり10未満で、かつ最低寸法10 μm 以上50 μm 未満の生存可能生物が1 mlあたり10未満でないと、バラストタンクからの排出はできないことになっている。また、人間に対する健康の基準として、3種類の指標微生物についても排出基準値が設定されている。このため、バラスト水対策においては、これら基準値を達成できる技術の開発が進められている。

なお、本基準値で該当する生物のうち、10 μm 以上の生物に関しては、処理後の生死状態を個体(細

胞)レベルで判定することが求められている。バラスト水管理条約では、『生物の生死判定方法は、形態上の変化、運動性、生命に関わる染料を使用する染色、或いは分子技術を含む。ただし、これに限定せず、適切な方法により生死判定を通じ決定されることが出来る』と記載されている。該当生物のうち、動物プランクトンは運動性の可否判定や生体染色法を通じてその生死を判断する手法が報告されている(Gaff & Okong'O-Ogola, 1970; Dressel *et al.*, 1972; Crippen & Perrier, 1974)。一方、植物プランクトンに関しては、大半が運動能力を持たないため、細胞の活性状態を判断する方法として、主に細胞内に有する活性度合が反映される物質の多寡を対象に研究が行われてきた。近年の研究としては、蛍光顕微鏡でRB(rodamin B)、CFW(calcofluor white)やFDA(Fluorescein diacetate)を用いた植物プランクトンの活性測定法が報告されているが(Pouneya 1997; 山田, 2000)、現場での測定には時間と施設の制限があり汎用性に乏しい。

Crippen & Perrier(1974)は、動物プランクトンと培養した植物プランクトンを用い、Neutral Red

表1 バラスト水管理条約で採択された基準値

1.	less than 10 viable organisms per cubic metre greater than or equal to 50 micrometres in minimum dimension.; and
2.	less than 10 viable organisms per milliliter less than 50 micrometres in minimum dimension and greater than or equal to 10 micrometres in minimum dimension.; and
3.	less than the following concentrations of indicator microbes, as a human health standard:
①	Toxicogenic <i>Vibrio cholera</i> (serotypes O1 and O139) with less than 1 Colony Forming Unit (cfu) per 100 milliliters or less than 1 cfu per 1 gramme (wet weight) of zooplankton samples.
②	<i>Escherichia coli</i> less than 250 cfu per 100 millilitres.; and
③	Intestinal <i>Enterococci</i> less than 100 cfu per 100 millilitres.

($C_{15}H_{17}ClN_4$ 、以下 NR)と、Evans Blue($C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$ 、以下 EB)による生体染色法によって、プランクトンの生死区分の可能性を検討している。彼らは、NRを用いることで、植物プランクトンの活性細胞と非活性細胞を簡便かつ明確に区分できることを報告した。ただし、培養細胞を用いた結果であるため、自然海水中に存在する多種の植物プランクトンに対しても適用可能であるかは明確でない。ここでは、生死判定法の一つとして、自然海水中の植物プランクトンに対する NR や EB による生体染色法の有効性について検討した結果を報告する。

2. 材料と方法

1) 植物プランクトンの採取

2005年10月と11月に東京湾奥部の表層海水をバケツによって採取した。採取した海水は2Lの褐色ポリ瓶に收容し、氷を充填したクーラボックス内で冷・暗条件にして実験室へ持ち帰った。

2) 植物プランクトン細胞の染色

海水中の植物プランクトンを対象に、Crippen & Perrier(1974)に準拠した方法で NR と、EB を用いた生体染色を資した。NR染色法は赤色色素が生細胞の細胞膜の Ca-チャンネルを通してリソゾーム(lysosome)に取り込まれ蓄積する性質を利用した方法で、細胞膜が損傷を受けると取り込みが阻害される性質を用いて簡便に染色判定が可能である。生きている細胞は細胞質が赤色またはうすピンク色に染まり(写真1)、染まらない細胞は死細胞として判定できる(写真2)。また、EBの染色機構もNRと同様であるが、本方法では、生細胞は染まらないが、死細胞は青黒く染まる。

各染色剤は、予め蒸留水に溶かし1%(w/v)溶液を作成した。NRは海水サンプル10mlに1%溶液を5 μ l(最終濃度1:200,000 w/v)、EBは海水サンプル10mlに1%溶液を10 μ l(最終濃度1:100,000 w/v)添加した。

NRは室温で約5分間染色し、EBは1時間室温で

染色した後に、計数板に移して素早く細胞の染色度合いを観察しながら計数を行った。染色有無(生死判定)と計数作業はNRの場合は染色剤添加後5分、30分、1時間および2時間後に、EBは1時間、2時間および24時間後にそれぞれ行った。なお、細胞内に色素胞が入っていない植物プランクトンは計数対象から外した。

また、植物プランクトンが完全に死滅している場合の染色性を確認するため、試料を最終濃度が2%になるよう中性ホルマリンで固定し、細胞を死滅させた直後に染色を資す試験も同時に実施した。

3. 結果と考察

1) NR と EB の染色性の違い

NRを用いた場合、出現した全ての種類の植物プランクトンが染色できた(写真1)。また、細胞は染色後2~3時間まで退色せずに持続した。さらに、運動性を有する渦鞭毛藻類などは動かなくても染まったままに在る種も見られた(写真3)。

一方、EBを用いた場合、2時間後まですべての種が染まらず、24時間後に *Skeletonema costatum* と *Eucampia zodiacus* の群体中の1~2細胞が染まったのみであった。このため、自然の植物プランクトン群集を対象として、生死判別をおこなうためには、NR染色法の方がより適していると判断された。また、試料を最終濃度が2%になるよう中性ホルマリンで固定し、植物プランクトン細胞を死滅させた後にNR染色を資した場合には、すべての細胞は染色されなかった。したがって、死滅した細胞は速やかにNRの染色性が無くなり、その生死状態をより精度良く判断できると考えられた。

2) NR で染色された植物プランクトンの種組成

今回用いた海水試料中の総細胞数は、約470~13,200細胞/mlの範囲にあり、典型的な赤潮が発生した時期も含まれる。優占種としては *S. costatum*、*Cyclotella* sp.、*Chaetoceros debile*、*Pseudo-nitzschia multistriata* などの珪藻類の他、渦鞭毛藻類の

Prorocentrum minimum が優占する場合もあった。また、海水試料中に出現した植物プランクトンは合計 54 種類で、東京湾で普遍的に出現する珪藻類と渦鞭毛藻類が最も多かった。さらに、珪藻類の中でも円心目の種類が多く、羽状目の種類は少なかった。NR で染色された植物プランクトンの分類群を見ると、珪藻類、黄色鞭毛藻類、渦鞭毛藻類、クリプト藻類、ラフィド藻類、ハプト藻類、ユーグレナ藻類など出現したすべての植物プランクトン種が染色された(表 2)。細胞の大きさ別に見た場合においても 10 μm 以下のナノプランクトンに属するクリプト藻類、ハプト藻類、20 μm 以上のマイクロプランクトンの他、100 μm 以上の大型珪藻類である *Coscinodiscus asteromphalus* や渦鞭毛藻類の *Noctiluca scintillans*、*Ceratium* 属も染色された。このため、植物プランクトンの分類群や細胞サイズが異なる場合においても、NR による染色性能に違いはないと考えられた。

また、表 3 には NR で染色された細胞数と非染色の細胞数を示した。今回使用した海水試料では、植物プランクトン細胞の約 87 ~ 97% が染色されたことから、植物プランクトン群集の大半は生存していたと推定された。1996 年 ~ 2003 年にかけて日本周辺海域に生息する植物プランクトン群集を対象に、蛍光色素である FDA(フルオレイセンジアセテート)を用いた染色法での研究例((財)海洋生物環境研究所, 2004)でも、植物プランクトン細胞の 89 ~ 93% が生存していると報告されており、今回の植物プランクトン試料についても同程度の活性を有していたものと考えられた。

4. まとめ

Crippen & Perrier(1974)による培養細胞を用いた染色法において、多くの植物プランクトン種の活性度合いを細胞レベルで区分できることが報告されているが、自然海水中に生息する植物プランクトンにおいても、活性度合いに応じた染色結果が得られ、NR染色法の適用できる可能性が強く示唆された。

バラスト水管理条約で定められる基準値を達成で

表 2 NR で染色された植物プランクトンの種類

No.	種 名
1	珪藻類 <i>Skeletonema costatum</i>
2	<i>Leptocylindrus danicus</i>
3	<i>Leptocylindrus minimus</i>
4	<i>Thalassiosira rotula</i>
5	<i>Thalassiosira</i> spp.
6	<i>Cyclotella</i> sp.
7	Thalassiosiraceae
8	<i>Coscinodiscus asteromphalus</i>
9	<i>Coscinodiscus granii</i>
10	<i>Actinopterychus senarius</i>
11	<i>Rhizosolenia fragilissima</i>
12	<i>Rhizosolenia phuketensis</i>
13	<i>Rhizosolenia setigera</i>
14	<i>Chaetoceros affine</i>
15	<i>Chaetoceros danicum</i>
16	<i>Chaetoceros debile</i>
17	<i>Chaetoceros lorenzianum</i>
18	<i>Chaetoceros sociale</i>
19	<i>Chaetoceros</i> spp.
20	<i>Cerataulina pelagica</i>
21	<i>Ditylum brightwellii</i>
22	<i>Eucampia zodiacus</i>
23	<i>Neodelphineis pelagica</i>
24	<i>Navicula</i> spp.
25	<i>Pleurosigma</i> sp.
26	<i>Nitzschia</i> sp. (cf. <i>pungens</i>)
27	<i>Nitzschia</i> sp.
28	<i>Pseudo-nitzschia multistriata</i>
29	<i>Cylindrotheca closterium</i>
30	黄色鞭毛藻類 <i>Distephanus speculum</i>
31	渦鞭毛藻類 <i>Prorocentrum micans</i>
32	<i>Prorocentrum minimum</i>
33	<i>Prorocentrum triestinum</i>
34	<i>Noctiluca scintillans</i>
35	<i>Gymnodinium breve</i>
36	<i>Gymnodinium</i> sp.
37	<i>Gyrodinium dominans</i>
38	<i>Gyrodinium spirale</i>
39	<i>Gyrodinium</i> sp.
40	Gymnodiniales
41	<i>Heterocapsa lanceolata</i>
42	<i>Protoperidinium bipes</i>
43	<i>Protoperidinium</i> spp.
44	<i>Ceratium furca</i>
45	<i>Ceratium fusus</i>
46	<i>Ceratium tripos</i>
47	<i>Oxytoxum</i> sp.
48	Peridinales
49	クリプト藻類 Cryptomonadaceae
50	ラフィド藻類 <i>Fibrocapsa japonica</i>
51	<i>Heterosigma akashiwo</i>
52	ハプト藻類 Haptophyceae
53	ユーグレナ藻類 Euglenophyceae
54	不明鞭毛藻類 unidentified flagellates

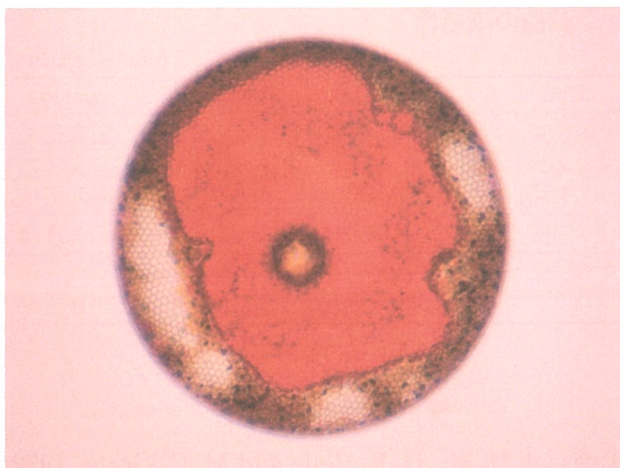


写真1-1 *Coscinodiscus asteromphalus* (直径 180 μm)

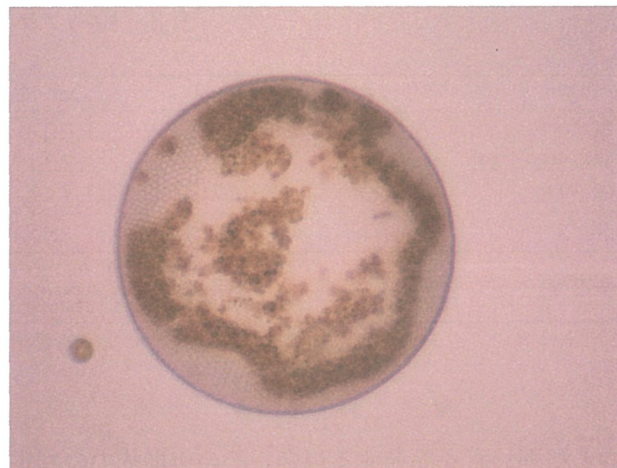


写真2-1 *Coscinodiscus asteromphalus* (直径 160 μm) 死細胞



写真1-2 *Ditylum brightwellii* (短径 28 μm)



写真2-2 *Ditylum brightwellii* (短径 26 μm) 死細胞

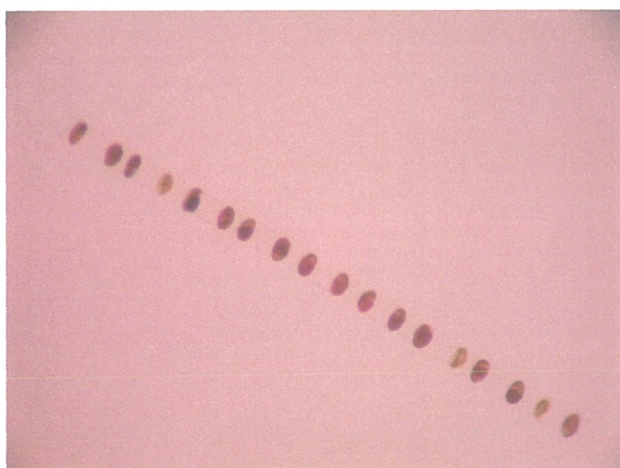


写真1-3 *Skeletonema costatum* (短径 6 μm)



写真3 *Gyrodinium spirale* (短径 34 μm)

表3 植物プランクトン細胞の染色性

	Oct.4	Oct.7	Oct.12	Oct.18	Nov.10	Nov.17	Average
染色細胞数	6,610	11,960	1,507	1,035	455	1,005	3,762
非染色細胞数	590	1,210	234	125	15	70	374
総細胞数	7,200	13,170	1,741	1,160	470	1,075	4,136
活性度(%)	91.8	90.8	86.6	89.2	96.8	93.5	91.4
優占種	<i>P. multistriata</i> <i>S. costatum</i>	<i>P. multistriata</i> <i>Cyclotella</i> sp.	<i>P. multistriata</i> <i>Cyclotella</i> sp.	<i>P. multistriata</i>	<i>P. minimum</i> <i>P. triestinum</i>	<i>S. costatum</i> <i>C. debile</i>	

(unit : cells/ml)

注)活性度(%) : 染色された細胞数/総細胞数×100で算出した

きる処理装置を開発する場合、その処理能力の判定をおこなうためには、より短期間に生物の生死状態を個体(細胞)レベルで判定する必要がある。今回用いたNR法は、比較的簡便に使用することができ、5分程度の染色時間で速やかに結果が判るため、その判定手段として有効な手法であると考えられた。

今後は、さまざまなプランクトン組成を持つ水域で同様な実験を重ね、データの蓄積を図るとともに、よりよい方法を検討する必要がある。

引用文献

- Crippen, R. W. and J. L. Perrier, 1974. The use of neutral red and evans blue for live-dead determinations of marine plankton. *Stain Technology* 49: 97-104.
- Dressel, D. M., D. R. Heile and M. C. Grote, 1972. Vital staining to sort dead and live copepod. *Chesapeake Sci.* 13: 156-159.
- Gaff, D. F. and O. Okong'O-Ogola, 1970. The use of non-permeating pigments for testing the survival of cells. *J. Exp. Bot.* 22: 756-758.
- Pouneva, Irina, 1997. Evaluation of algal culture viability and physiological state by fluorescent microscopic methods. *Bulg. J. Plant Physiol.* 23: 67-76.
- 山田 裕, 2000. FDA を用いた植物プランクトンの活性測定法. *海生研ニュース* 68: 6-8.
- 財団法人海洋生物環境研究所, 2004. <http://www.kaiseiken.or.jp/publish/itaku/h15shusui.pdf>. (2006. 1. 24 参照).