

FDA を用いた植物プランクトンの活性測定法

はじめに

現在、当所は通商産業省資源エネルギー庁から委託を受けて「取水生物影響調査」を行っています。発電所では、冷却水として取水される海水とともに動植物プランクトンや魚卵、稚仔魚が取り込まれます。このような微小な生物は、熱交換による温度ストレス、付着生物防除対策として注入されている塩素や防汚塗料による化学的ストレス、また剪断応力やキャビテーション^{注1}などによる機械的ストレスなどを受けると考えられます(GESAMP, 1984他)。取水生物影響調査は、発電所に取り込まれた微小な生物に対するこれらストレスの影響程度を評価することを目的としています。

これら微小な生物への影響を評価する場合、個々の個体の生存率または細胞の活性度を迅速かつ正確に測定する必要があります。動物プランクトンや稚仔魚といった運動能力を持った生物は、針などを用いて刺激を与えてやると動くことから、容易に活性判定がおこなえます。

一方、運動能力のない植物プランクトンは、従来、細胞分裂の可否や増殖率を用いて活性判定を行ってきました。しかし、これらの方法は、影響を受けた細胞を数日間培養する必要があります。発電所通過直後の影響を評価することができません。そのため、植物プランクトンの活性判定には様々な染色剤が用いられてきましたが、それらに対する評価は様々でした。

今回紹介する実験は、蛍光染色剤であるFDA (fluorescein diacetate)を用いて測定した植物プランクトンの活性度と¹⁴C法を用いて測定した生産力との比較を行い、植物プランクトンに対するFDA染色法の有効性について検討したものです。

なお、本実験は上記の委託調査成果の一部であり、また平成9年9月に英国Southampton Oceanography CentreにおいてFawley aquatic research laboratory Ltd.のMartin H. Davis博士との共同実験として行ったものです。その時の実験の様子などは、海生研ニュースNo.60「海外出張記 英国における共同実験雑感」にご紹介しております。

FDA染色法とは

FDA染色法は、凍結融解された植物細胞プロトプラストの生存判定や培養した緑藻類細胞の生存判定に使用されており、これを単細胞生物である植物プランクトンに応用したものです。

植物プランクトンの細胞内に取り込まれたFDAは、細胞内の酵素の一つ、エステラーゼと反応し、蛍光を発するフルオレセインに変化します。しかし、活性状態の低い植物プランクトンの細胞内では、FDAはエステラーゼと反応せず、蛍光を発しません(菅原, 1987)。このことから、蛍光顕微鏡下で植物プランクトンを観察し、蛍光を発している細胞と発していない細胞をそれぞれ計数することによって活性度を算出することができます。

FDA染色をおこなった植物プランクトンの蛍光顕微鏡写真を写真1に示しました。写真中央のC字状のものが珪藻類*Chaetoceros debile*の群体です。その内、黄緑色に光っている部分が活性の高い細胞を、中央部にある光っていない部分が活性の低い細胞をそれぞれ示しています。

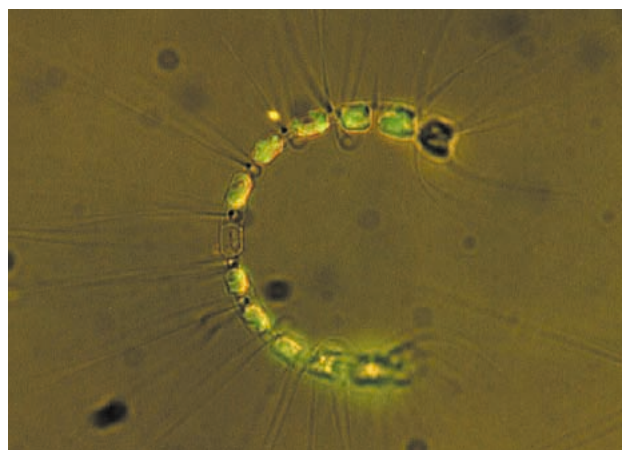
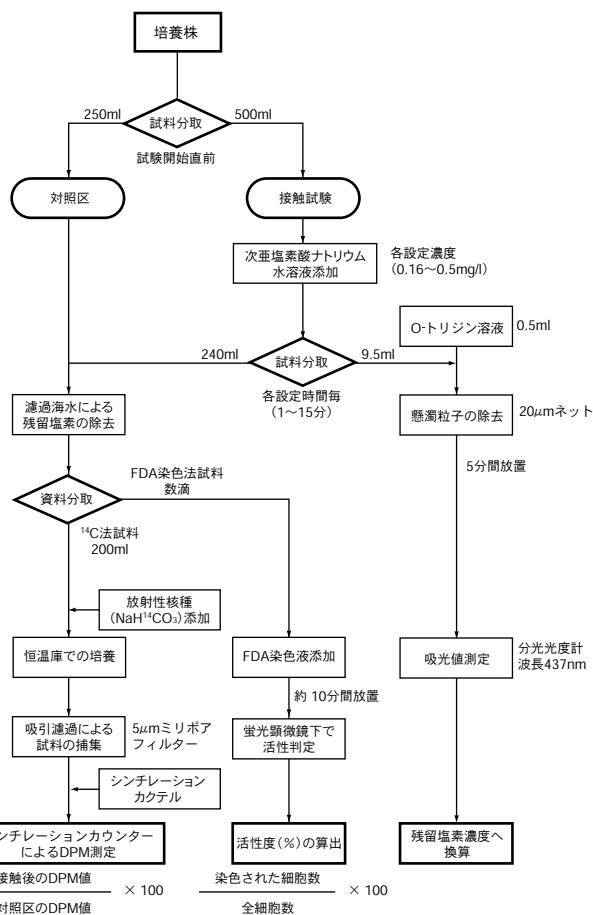


写真1 FDA染色をおこなった植物プランクトンの蛍光顕微鏡写真

材料及び方法

f / 2培地を用いて水温20℃, 5,000 lux. で単離培養した海産珪藻の一種*Chaetoceros compressum*を試料としました。第1図に本実験の作業フローを示します。試料の活性度を適度に低下させるために、数段階の濃度に設定した次亜塩素酸ナトリウム水溶液を試料に添加し、数分間、塩素に接触させた後、残留塩素を除去するため濾過海水を用いて洗浄しました。その後、洗浄した試料を二分し、一方をFDA染色法試料とし、もう一方を¹⁴C法試料としました。なお、洗浄操作による試料への影響を考慮し、対照区についても同様の洗浄操作を行いました。



第1図 本実験の作業フロー

FDA染色試薬は、あらかじめFDA0.1gを100%アセトン20mlに溶解させた0.5%FDA貯蔵液を作成し、フリーザーで保存しておきます。この貯蔵液を試験直前に、最終濃度0.01%となるように濾過海水を加えて希釈し、0.01%FDA溶液を調製します。この0.01%FDA溶液は調製後、氷などを用いて冷やし、2時間程度で調製しなおす必要があります。

次に、FDA染色法試料をスライドグラス上に数滴取り、そこに0.01%FDA溶液を加えた後、直ちに蛍光顕微鏡下で蛍光を発している細胞と蛍光を発していない細胞をそれぞれ計数し、次式を用いて活性度を算出しました。

$$\text{活性度}(\%) = \frac{\text{蛍光を発している細胞数}}{\text{全細胞数}} \times 100$$

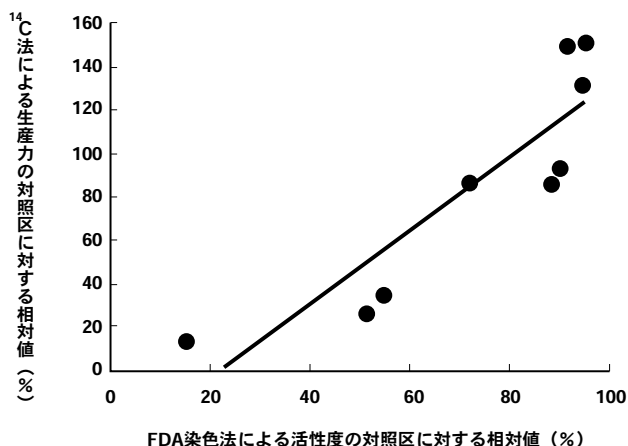


写真2 英国での実験風景
植物プランクトンの塩素接触(上段)と
クールラボセンター門(下段)

¹⁴C法試料はトレーサーとしてNaH¹⁴CO₃を試料中に1μCiとなるように添加し、20℃、5,000 lux.で2時間培養しました。培養後、試料を孔径5μmのミリポアフィルターで捕集し、一晩かけて乾燥させました。乾燥したフィルターに、シンチレーションカクテル(Ultima Gold XR scintillator)を加え、充分溶解させた後、細胞内に取り込まれた¹⁴C量を液体シンチレーションカウンターにより計数しました。なお、計数によって得られたDPM値を生産力の指標として用いました。

結果及び考察

第2図にFDA染色法による活性度と¹⁴C法による生産力を、それぞれ対照区に対する相対値で示しました。生産力側で、いくつか100%を越えるものの、活性度と生産力との間には、危険率5%で有意な正の相関関係が認められ、単相関係数は0.771でした。



第2図 FDA染色法による活性度と¹⁴C法による生産力の比較

次に、両法による測定値のばらつきについて比較しました。第1表に同一試料をそれぞれ3回ずつ測定した場合の、FDA染色法の結果を上段に、¹⁴C法の結果を下段に示しました。それぞれの変動係数は、FDA染色法で2.0~7.6%と小さく、¹⁴C法の5.4~6.6%と比較して、ほぼ同程度のばらつきを示しました。

以上の結果から、FDA染色法により求めた活性度は、個々の細胞の生産力と良く対応していると考えられ、測定値のばらつきも小さいことから、植物プランクトンの活性度を迅速に測定する方法として十分有効であると考えられました。

第1表 両法による測定値のばらつき

	変動係数	標準偏差	FDA 染色法による活性度 (%)			
			平均	1回目	2回目	3回目
試料 1	2.8%	2.2	76.2	75.7	78.5	74.2
試料 2	2.0%	1.2	58.5	57.2	59.1	59.3
試料 3	2.6%	1.2	47.4	46.3	48.7	47.1
試料 4	7.6%	2.8	36.4	36.3	39.2	33.7

	変動係数	標準偏差	¹⁴ C法によるDPM値			
			平均	1回目	2回目	3回目
試料 1	5.4%	246.8	4545.0	4429.4	4828.4	4377.2
試料 2	6.6%	208.6	3149.9	2910.7	3294.1	3245.0
試料 3	5.7%	173.0	3024.4	2851.2	3024.9	3197.1

今後の展望

FDA染色法は、その利点として、複雑な手順が無く、迅速かつ正確に活性度を測定可能であること、また、複数種の混合試料を用いた場合でも、それぞれの種ごとに活性度が測定可能であること、さらに、測定中に個々の細胞の形態観察が直接おこなえることが挙げられます。一方、細胞の中間的な活性状態の評価には、蛍光強度などの客観指標を用いることも考えられ、その応用が期待されます。

このFDA染色法と従来の細胞分裂の可否や増殖率で見るといった遅発的影響の評価に適した方法と組み合わせることで、よりの確な影響評価を可能にすると考えています。

参考文献

GESAMP 1984 (IMO/ FAO/ Unesco/ WMO/ WHO/ IAEA/ UN/ UNEP Joint Group of Experts on the Scientific Aspect of Marine Pollution), Thermal discharges in the marine environment. *Rep. Stud. GESAMP*, (24):44p
 菅原康剛 1987, 凍結融解された植物細胞の生存率測定法, 凍結保存—動物・植物・微生物—, 酒井昭編, 朝倉書房:176-179

(中央研究所 海洋環境グループ 山田 裕)

この研究成果は、平成11年度日本海洋学会秋季大会において口頭発表されました。

注):キャビテーションとは、ポンプやプロペラによって圧力が低下し、気泡が発生する現象。発生した気泡の崩壊時に、極めて高い圧力が生じる。