

海産性単細胞真正眼点藻 *Nannochloropsis Oculata* ST-3 株に対するホルムアルデヒドの影響に関する研究

吉田宏亮*¹・石井 洋*²・小林幸夫*³・齋藤 寛*³

Effects of Formaldehyde on the Marine Microalga *Nannochloropsis Oculata* ST-3 Strain

Kosuke YOSHIDA, Hiroshi ISHII, Yukio KOBAYASHI and Hiroshi SAITO

Abstract

In this study, effects of formaldehyde on the marine microalga *Nannochloropsis oculata* ST-3 strain were investigated. Increasing concentrations of formaldehyde caused increased growth retardation of the ST-3 strain. This is especially seen in the growth curve of the ST-3 strain exposed at 10ppm formaldehyde for the first time which showed a lag phase for 9 days. However the growth curve of the ST-3 strain exposed at 10ppm formaldehyde for the 2nd time showed a lag phase only for 2 days. Therefore, the ST-3 strain may have adapted to formaldehyde at 10ppm. Concentrations of formaldehyde in the medium decreased with growth of the ST-3 strain. Concentration of formaldehyde in the ST-3 strain was also low. Therefore, it is possible that formaldehyde moved into the ST-3 strain and then reacted with free amino group which existed in the ST-3 strain and formed imine.

1. はじめに

ホルマリンとはホルムアルデヒドを約37%含有する水溶液であり、劇物および毒物取締法で濃度1%以上は劇物指定されている。またホルマリンは強力な殺菌作用があるが、人への急性毒性が確認されているため食品添加物への使用は禁止されている。

このホルマリンが、全国各地のトラフグの養殖に寄生虫駆除の目的で大量に使用されていたことが1997年の厚生省調査で明らかになった。使用されたホルマリンは未処理のまま海中に廃棄されたとされ、1996年から発生したアコヤガイ大量斃死の原因がホルマリンによるものではないかという指適もあり、水産庁次長通達によりホルマリンを成魚に使用することについては全面的に禁止された(1997年12月22日)。しかし、水産庁通達では法的拘束力がなく、ホルマリン以外の薬品は効き目が薄いとされ、その後もホル

マリンが使用されたという報道が伝えられた(2003年4月23日, 毎日新聞)。大量のホルマリンが海中に流出したら、海洋生物の生態系に多大な影響を与え、今後は魚介類を介して人体へ影響を及ぼす可能性がある。

このような背景にもかかわらず、ホルマリンの代替薬品の研究・開発ばかりが先行して、海洋生物に対するホルマリンの毒性を調査・研究している報告は少ない。いくつかの報告のうち、アコヤガイはホルマリン濃度が20ppmで感受性を示し、50ppm以上では急性毒性を示し、その際殻を強く閉じて死亡することが明らかになっている(秋山・齋藤, 2001)。また、2種類の珪藻類、浮遊性の *Chaetoceros gracilis*, 弱い付着性を持つ *Nitzschia* sp. はともにホルムアルデヒド5ppm以上の濃度区では増殖は認められなかった(鈴木・徳田, 1998)。今後は水産養殖の場で頻繁に利用されている海洋生物に及ぼすホルマリンの影響を研究する必要がある。

Nannochloropsis oculata (*N. oculata*) は海産性の微細

2005年1月18日受理

*1 東海大学大学院海洋学研究科海洋生物科学専攻 (Master's Course of Marine Bioscience, Graduate School of Marine Science and Technology, Tokai University)

*2 東海大学非常勤講師 (Tokai University)

*3 東海大学海洋学部清水教養教育センター (General Education Program Center, Shimizu Campus)

藻類であり、水産養殖の場で広く利用されている。特に日本においては魚介類の養殖における種苗生産に欠かすことのできない小型動物プランクトン、特にシオミズツボワムシの主試料として *N. oculata* が頻繁に利用されている。*N. oculata* で培養したシオミズツボワムシは、海産魚類の必須脂肪酸とされる EPA (20:5n-3) を多く含んでおり、飼料価値の維持の面からも奨励されている (吉松・林ら, 1995)。またワムシ給餌期, *N. oculata* を 100~160 万 cell/mL の濃度で添加することによって、マツカワ仔魚のワムシ摂餌活性を顕著に向上できることが示されている (萱場・杉本ら, 2002)。

そこで本研究では、食物連鎖において一次生産者である海産性単細胞真正眼点藻 *Nannochloropsis oculata* に対してホルマリンがどのように影響を与えていくかを明らかにしたい。

2. 実験材料と方法

2-1 実験操作条件

本研究で用いたすべての器具と培地はあらかじめ乾熱滅菌機 (170°C, 150分間, WFO-600SD, EYELA) またはオートクレーブ (121°C, 1.2 気圧, 20分間, SS-235, TOMY) を使用し滅菌した。また以降の実験操作は全てクリーンベンチ (S-1800SV, SHOWA) 内で無菌的に行なった。

2-2 実験材料

本研究では石井ら (2003) に純粹培養された海産性単細胞真正眼点藻 *N. oculata* ST-3 株を実験材料とし、培地は 0.368g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.70g KCl , 8.00g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 24.0g NaCl , 0.10g NaNO_3 , 0.014g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.126g NaHCO_3 , 0.181g Na_2EDTA , 0.50g Clewat32, 1.0mL 混合ビタミン (0.20mg ビタミン B_{12} , 1.00mg ビオチン, 100mg 塩酸チアミンを 1L の蒸留水に溶解したもの) を 999mL の蒸留水に溶解したもの (以後 TN 培地とする) を使用した。また 75.0mg NaNO_3 , 6.0mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10.0mg $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 0.50 μg ビタミン B_{12} , 0.5 μg ビオチン, 100 μg 塩酸チアミン, 1.0mL f/2 metals (3.16g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 12.0mg $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 21.0mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 180mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 7.0mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 7.0mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4.4g Na_2EDTA) を 999mL の海水 (海洋科学博物館からくみ上げた地下水) に溶解したものを使用した (以後 f/2 培地とする)。

2-3 ST-3 株の継代培養

滅菌シャーレ (SH90-15E, IWAKI) 内に寒天 (1% (w/v)) を添加した TN 培地を固化させ平面培地を作成した。この平面培地に ST-3 株を代用白金耳で塗布し、インキュベータ (培養温度 25°C, 約 3 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 連続照射, CF-305, TOMY) 内で数週間静置培養した。

2-4 ST-3 株の前培養

500mL 三角フラスコ中に約 300mL の TN 培地を入れ、これに 2-3 で培養した ST-3 株を代用白金耳を用いて浮遊させた。このフラスコの口部は通気用のガラス管 (先にはシリコンチューブで噴射管を取り付けたもの) を通した綿栓で封をした。培養は、蛍光灯 2 本による光照射 (約 80 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, 明暗周期 12 時間) しながら、室温で行なった。通気はミリポアフィルター (0.45 μm) を用いて無菌的に行なった。この方法で一週間培養したものを前培養とした。

2-5 細胞数と細胞懸濁液の濁度の関係

本研究に用いる ST-3 株の細胞懸濁液の濁度は、分光光度計 (U-3210, HITACHI) を用いて波長 720nm における吸光度 (A_{720}) を測定することにより、光合成色素の影響を殆ど受けることなく測定することができ、また A_{720} は細胞数と比例関係 ($\text{Cells} = (5.680 \times 10^7) A_{720}$, $R^2 = 0.985$) にあることが報告されている (石井ら, 2003)。そこで本研究は、細胞数の測定を濁度法で行なった。

2-6 実験の培養方法と試料の採取

あらかじめ前培養によって培養した ST-3 株の細胞懸濁液を 500mL 平底丸型フラスコに適量に移し、濁度 A_{720} の値が約 0.04 (2.3×10^6 個) になるように f/2 培地で調整した。このフラスコの口部は通気用のガラス管と細胞懸濁液採取用のステンレスチューブ (フラスコ外部の先にはシリコンチューブ取り付けピンチコックによって栓をしたもの) を通した綿栓で封をした。培養は水温調節機 (SEAPALEX 1020, NISSO) と投げ込み式ヒーター (100W, KONISHI) によって水温を 25°C に保った水槽 (60×36×30cm) 内で行なった。光照射、通気は 2-4 と同様の方法で行なった。細胞濁度液の採取はシリコンチューブにシリンジを付け、ピンチコックを開いて吸引して行なった。採取した細胞懸濁液は濁度、およびホルムアルデヒド濃度の測定に使用した。

2-7 ホルムアルデヒドの ST-3 株に与える影響

f/2 培地中のホルムアルデヒドが ST-3 株に与える影響について検討した。培地中のホルムアルデヒド濃度を 0, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20ppm に調整した。培養および細胞の採取方法は 2-6 と同様の方法で行ない、平均世代時間を算出した。また培養経過に伴う培地中のホルムアルデヒド濃度を Nash 法 (T. Nash, 1953) を用いて測定した。すなわち、採取した細胞懸濁液を GF/F ガラスマイクロファイバーフィルター ($\phi 25\text{mm}$, Whatman, England (以後 GF/F)) で吸引濾過し、培地と細胞に分けた。さらに、培地に同量のアセチルアセトン溶液 (150g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, 3mL CH_3COOH , 及び 2.0mL $\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{COCH}_3$ を蒸留水で 1000mL とした) を加え、60°C で 10 分間反応させた。

冷却後、生成した 3,5-ジアセチル-1,4-ジヒドロルチジン（以後 DDL とする）の黄色発色を分光光度計を用い、波長 415nm における吸光度で測定した。

2-8 10ppm ホルムアルデヒドで増殖した ST-3 株の増殖実験

2-7 の 10ppm ホルムアルデヒドで増殖した ST-3 株を用いて、再びホルムアルデヒドを添加した培地で増殖実験を試みた。まず細胞懸濁液 (A_{720} 値は 1.57) を 25ml 取り出し、滅菌済みの遠心管に入れ、遠心機 (MX160, TOMY) で遠心した (8000rpm, 10分間, 25°C)。上澄み液を除去した遠心管に f/2 培地を入れ、試験管ミキサー (MT-31, YAMATO) で攪拌させた後、再び遠心機で遠心した。この操作を 2 回繰り返して細胞を洗浄した後、ホルムアルデヒド濃度が 0, 10, 20ppm になるように調製した f/2 培地に細胞を添加し、全量を 500mL に調整した。培養および細胞の採取は 2-6 と同様の方法で行い、平均世代時間を算出した。培地中のホルムアルデヒド濃度は 2-7 と同様の方法で測定した。

2-9 10ppm ホルムアルデヒドの存在下における ST-3 株の細胞内のホルムアルデヒド濃度の測定

ST-3 株は 2-6 の 10ppm ホルムアルデヒドで増殖した細胞を使用し、細胞内のホルムアルデヒド濃度の測定を検討した。まず細胞懸濁液を遠心機により細胞と培地に分離した (9000rpm, 5分間, 4°C)。その沈殿物を凍結融解し、

リン酸バッファー 10mL 添加した後、ホモジナイザーで破壊した (Duty cycle 50%, Output control 6, SONIFIER 450, BRANSON)。その抽出液を GF/F を用いて吸引ろ過し、ろ液を回収した。そのろ液を Nash 法を用いて反応させ、生成物である DDL を試料とし、その試料中の DDL を HPLC (島津製作所) により、検出波長を 415nm に設定し、試料を 20 μ L 注入し測定した。分析カラムは CAPCELL PAK C18 UG120 S-5 μ m (4.6 mm ϕ ×250mm, 資生堂) を使用した。溶離液は H₂O/MeOH=40/60 にし、流速 1mL/min に設定し送液した。保持時間より DDL の同定を、ピーク面積より作成した検量線を用いて DDL の定量を行い、それをホルムアルデヒド濃度に換算した。カラム温度は恒温水槽を用いて 45°C に保った。

3. 結果と考察

3-1 ホルムアルデヒドの ST-3 株に与える影響

ホルムアルデヒドが ST-3 株に与える影響を検討した。

ホルムアルデヒド濃度を 0, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20ppm になるように調整した f/2 培地を用いて、ST-3 株の細胞増殖を観察した結果、添加しない場合 (0ppm) と 5ppm ホルムアルデヒドの濃度条件下では、実験開始から通常に細胞が増殖し、増殖曲線に差はなかった (Fig. 1)。さらに、これら 2 つの濃度条件下では細胞の増殖速度に顕著な差はなかった (Table 1)。しかし、6ppm 以上では濃

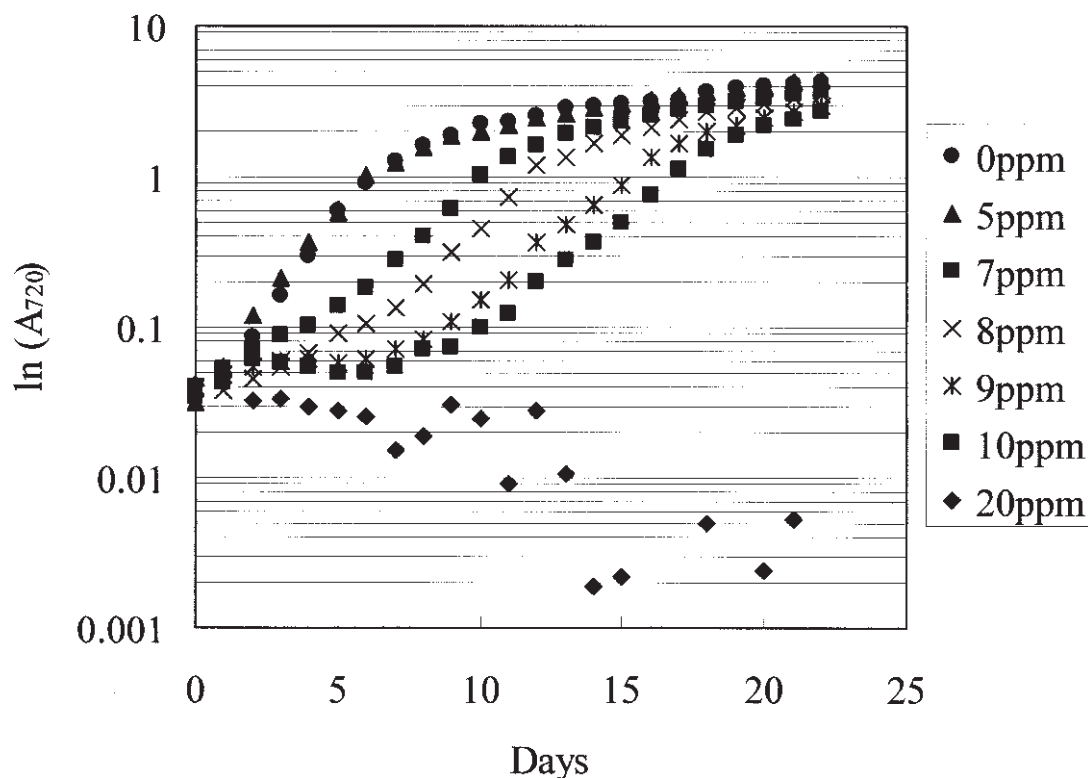


Fig. 1 Growth curves of the ST-3 strain exposed to formaldehyde.

Table 1 Average generation time (AGT, AGT*) of the ST-3 strain exposed to formaldehyde at various concentrations.

	0ppm	5ppm	7ppm	8ppm	9ppm	10ppm	200ppm
AGT (h)	28.0	28.1	38.4	41.5	47.9	49.4	—
AGT* (h)	28.4	—	—	—	—	28.5	43.6

AGT* : The ST-3 strain exposed at 10ppm formaldehyde at first was used.

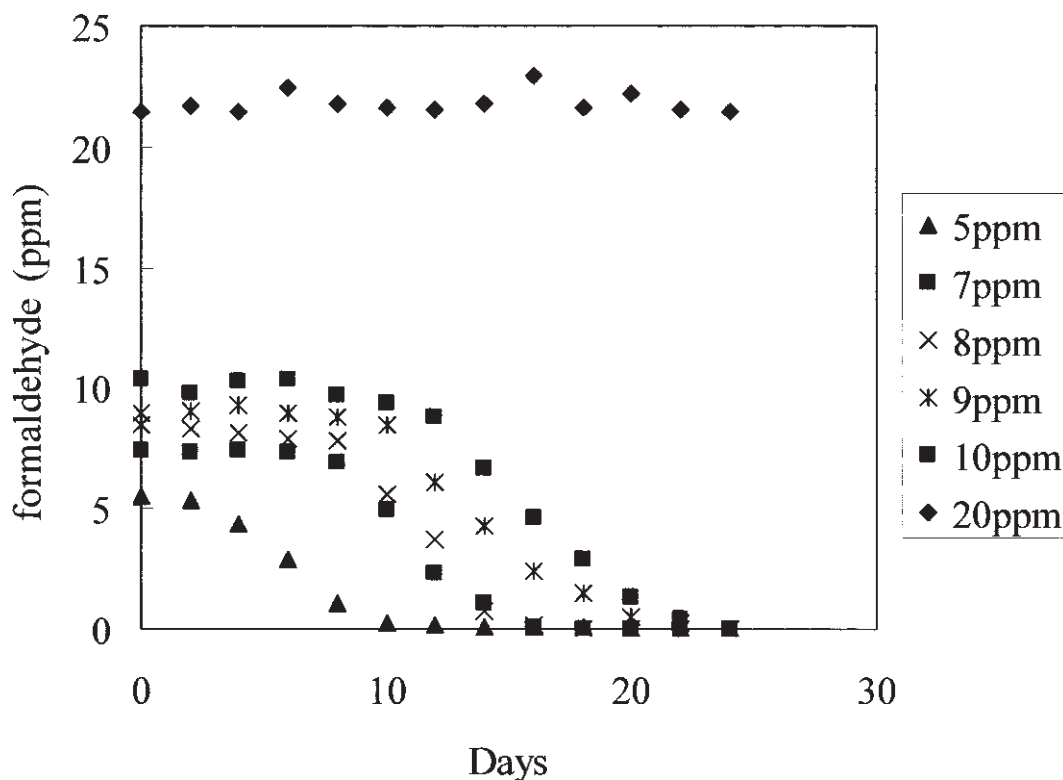
度が高くなるにつれて増殖阻害が大きくなった。特に 10 ppm ホルムアルデヒドの場合は、実験開始から 9 日間の誘導期が観察され、また 20ppm の場合は実験終了まで細胞の増殖は観察されなかった。さらに、培地中のホルムアルデヒド濃度が高くなるに従って細胞の増殖速度が遅くなった。これらの結果から、ST-3 株の増殖においては 5ppm 以下のホルムアルデヒドは影響を及ぼさず、6ppm 以上では濃度が高くなるに従って、細胞の増殖阻害への影響が大きくなることが考えられる。トラフグの養殖時に散布したホルムアルデヒド濃度は約 500ppm という高濃度で未処理のまま海中に廃棄されていた。このことは ST-3 株の生育可能な 10ppm の約 50 倍、2 種類の珪藻類の場合約 500 倍（鈴木・徳田, 1998）近いホルムアルデヒドを与えることになり、表層水に生育する植物プランクトンのほとんどが死滅すると考えられる。さらに食物連鎖の一次生産者である植物プランクトンが急激に減少することにより、海水中の生態系が崩れてしまう可能性が考えられる。

また、培養経過に伴う培地中のホルムアルデヒド濃度を測定したところ、細胞の増殖と伴に濃度が減少した (Fig.

2)。細胞が増殖しない 20ppm の場合については、培地中のホルムアルデヒド濃度は減少しなかった。これらの結果から、培地中のホルムアルデヒドは細胞内に取り込まれた可能性が考えられる。

3-2 10ppm ホルムアルデヒドの培地で増殖した ST-3 株を用いた培養実験

3-1 の 10ppm ホルムアルデヒドで増殖した定常期の細胞を用いて、再び 0, 10, 20ppm ホルムアルデヒドに調整した培地で増殖過程を観察した。0ppm の場合は誘導期が 1 日間、10ppm の場合は誘導期が 2 日間観察され、その後これら 2 つの濃度条件下の細胞増殖に顕著な差は観察されなかった (Fig. 3)。また 20ppm の場合は 13 日の誘導期が観察され、その後細胞が増殖した。これらの結果と 3-1 を比較すると、10ppm ホルムアルデヒドの場合は誘導期が 9 日間から 2 日間に減少し、さらに添加しない場合 (0 ppm) との増殖速度の差もなくなった (Table 1)。また 20ppm ホルムアルデヒドの場合、3-1 とは違い、細胞の増殖が観察された。従って、これらの本研究で用いた ST-3

**Fig. 2** Changes of formaldehyde in the medium with the passage of incubation.

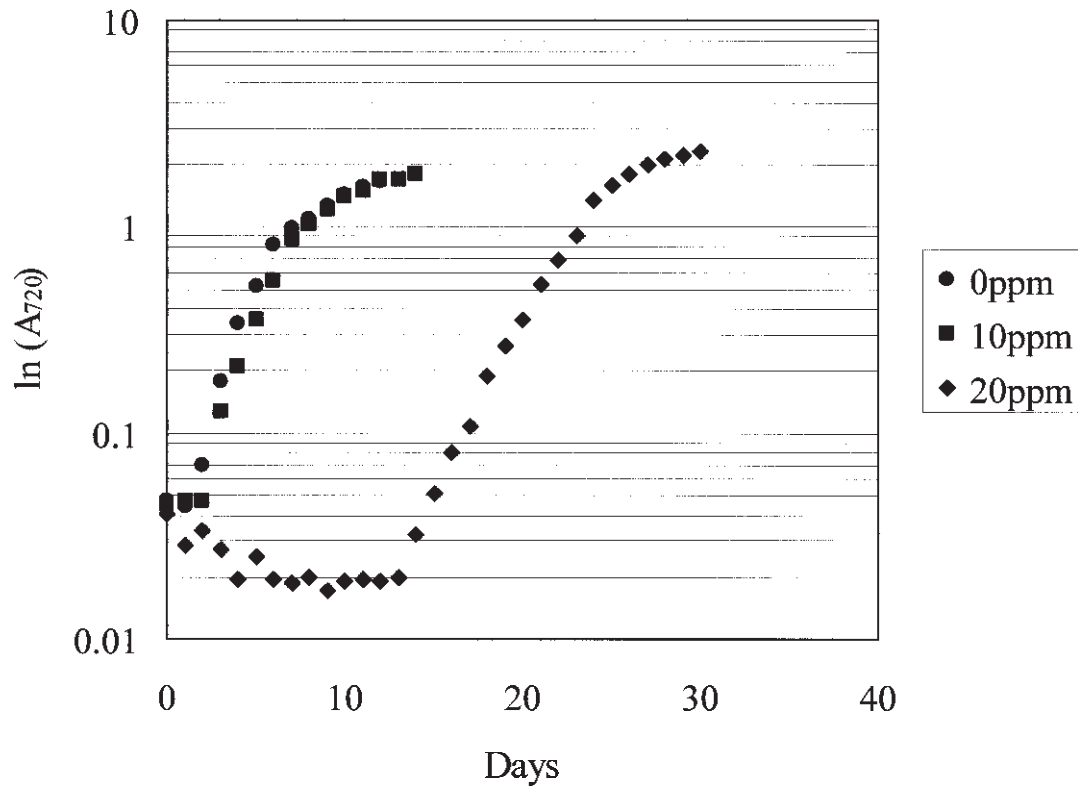


Fig. 3 Growth curves of the ST-3 strain exposed to formaldehyde for the 2nd time. The ST-3 strain exposed at 10ppm formaldehyde at first was used.

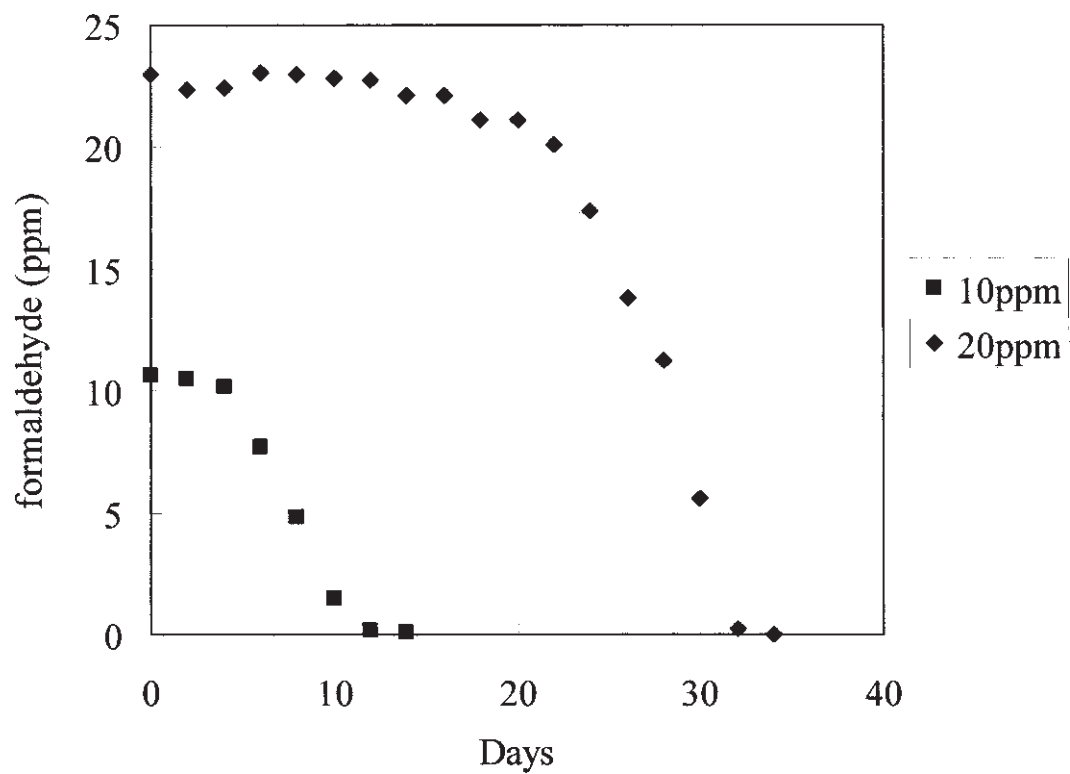


Fig. 4 Changes of formaldehyde in the medium with the passage of incubation. The ST-3 strain exposed at 10ppm formaldehyde at first was used.

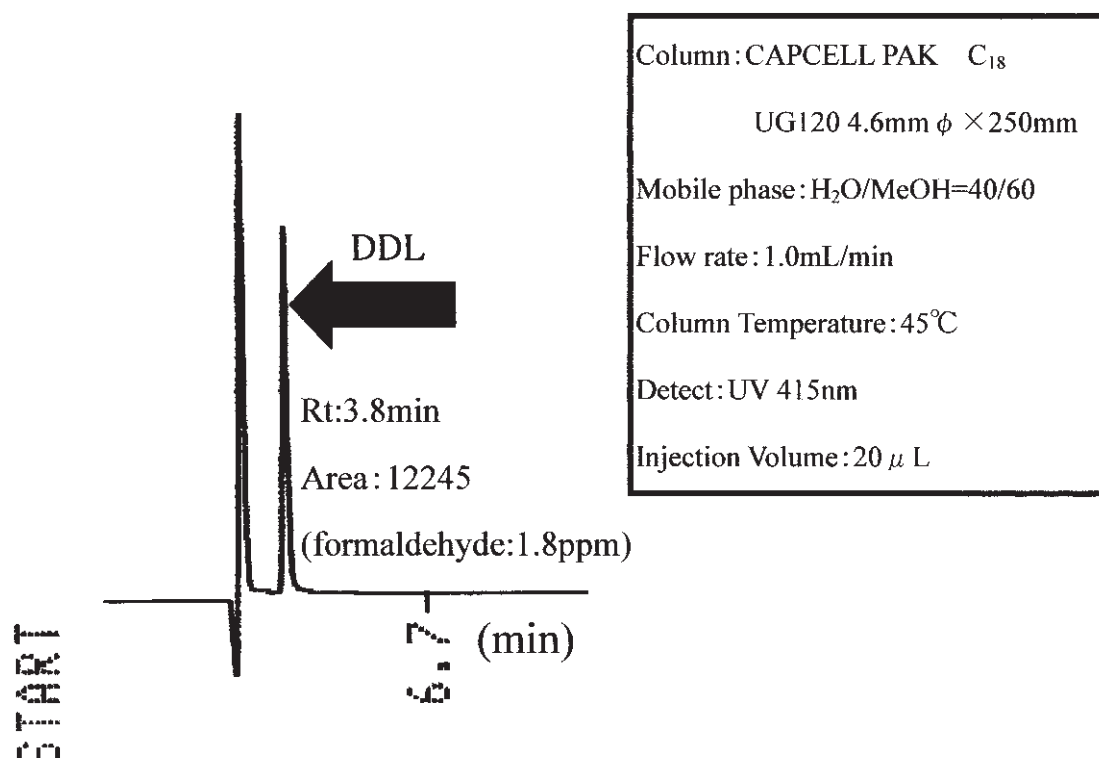


Fig. 5 Chromatogram of DDL and formaldehyde in the cells.

株はホルムアルデヒドの環境下に適応する能力を持っている可能性が考えられる。

さらに培養経過に伴う培地中のホルムアルデヒド濃度を測定したところ、細胞の増殖に伴い濃度が減少した (Fig. 4)。これは、3-1 と同様に、培地中のホルムアルデヒドが細胞内に取り込まれた可能性が考えられる。

3-3 10ppm ホルムアルデヒドの存在下における ST-3 株の細胞内におけるホルムアルデヒド濃度の測定

3-2 の 10ppm ホルムアルデヒドで増殖した ST-3 株の細胞を用いて、細胞内のホルムアルデヒド濃度の測定を検討した。2-6 の方法で Nash 法により生成した DDL の同定や定量を HPLC で行った結果、DDL の保持時間 (Retention time) は 3.8 分、ピークエリアは 12245 であり (Fig. 5)、ホルムアルデヒド濃度に換算すると 1.8ppm であった。一般的にホルムアルデヒドは遊離アミノ基と反応してイミンを形成する。したがって今回の結果からは、細胞内に取り込まれたホルムアルデヒドの約 80% は、細胞内に存在する遊離したアミノ基と反応してイミンを形成した可能性が考えられる。しかし、現段階では構造の解明には至っていない。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、東海大学海洋学部海洋科学科熊澤修造教授には多くの助言をいただき、また実験装置を

快く貸していただきました。ここに深く御礼を申し上げます。

また東海大学海洋学部水産学科増殖過程 秋山信彦助教授、東海大学海洋学部水産学科非常勤助手 北野忠氏、並びに秋山研究室の学生諸氏には植物プランクトンと海水などをご提供していただき深く御礼を申し上げます。

引用文献

- 秋山信彦, 齋藤 寛 (2001): アコヤガイ, *Pinctada fucata martensii* に対するホルマリンの影響, 東海大学紀要海洋学部 第52号 9-28.
- 石井 洋, 齋藤 寛, 秋山信彦, 小林幸夫 (2003): 内分泌攪乱化学物質ビスフェノール A とノニルフェノールが海産性単細胞真正眼点藻 *Nannochloropsis oculata* ST-3 株の増殖に与える影響, 「海—自然と文化」東海大学紀要海洋学部 第1巻第1号 93-98 (2003).
- 萱場隆昭, 杉本 卓, 佐藤敦一 (2002): マツカワ仔魚の初期摂餌及び生残に及ぼすナンノクロロプシス *Nannochloropsis oculata* 添加飼育影響, 北水試験報 63, 55-63.
- T.Nash (1953): The Colorimetric Estimation of Formaldehyde by Means of the Hantzsch Reaction, *Biochem.J.*, 55, 416-421.
- 鈴木満平, 徳田雅治 (1998): 珪藻の増殖に影響を及ぼすホルマリン濃度について, *Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult.* No. 27, 43-45.
- 吉松隆夫, 林 雅弘, 戸田享次, 古市政幸, 北島 力 (1995): メナダ仔魚の必須脂肪酸要求と飼育槽へのナンノクロロプシスの添加効果, *日本水産学会誌* 61(6), 912-918.

要 旨

水産養殖の食物連鎖においてもっとも底辺に位置する植物プランクトンの一種の海産性単細胞真正眼点藻 *Nannochloropsis oculata* (ST-3 株) の増殖に対してホルムアルデヒドが与える影響を検討した。ホルムアルデヒド濃度が 5ppm 以下では、増殖に顕著な差はなかったが、6ppm 以上では濃度が高くなるにつれて増殖阻害が大きくなった。特に 10ppm ホルムアルデヒドの増殖の場合は、9 日間の誘導期が観察された。さらに培養経過に伴う培地中のホルムアルデヒド濃度を測定したところ、細胞が増殖するに従ってホルムアルデヒド濃度は減少した。10ppm ホルムアルデヒドで増殖した定常期の細胞を用いて、再び 10ppm ホルムアルデヒドに調整した培地で増殖過程を観察したところ、誘導期が 9 日間から 2 日間に減少した。さらに培養経過に伴う培地中のホルムアルデヒド濃度を測定したところ、細胞の増殖と共に濃度が減少した。この結果から ST-3 株はホルムアルデヒドの環境下に適応する能力を持っている可能性が考えられる。10ppm ホルムアルデヒドで増殖した ST-3 株の細胞内におけるホルムアルデヒド濃度を測定したところ、1.8ppm 検出された。この結果より、細胞内に取り込まれたホルムアルデヒドの約 80% は、細胞内に存在する遊離したアミノ基と反応してイミンを形成した可能性が考えられる。