

1. 研究課題名：深海環境における条件変化の生物に与える影響の研究
2. 研究機関：三菱重工業株式会社 長崎研究所 化学研究室
3. 研究者：竹内和久
4. 研究協力者：藤岡祐一（三菱重工業株式会社 長崎研究所 化学研究室）
5. 研究期間：平成8年度

## 6. 要約

深海資源の開発及び利用の際の深海環境のアセスメントの方法の一つとして高圧下における微小動物の飼育，観察技術及び生物評価法検討とともに，高圧下において環境条件の変化が生物に与える影響を調べた。新規に開発した微小動物高圧飼育装置により，加圧条件下で，微小動物が飼育できること，環境条件の変更が可能であること，また微小動物の運動状況が観察できることを確認した。生物評価法の一手段として蛍光微小球を利用した摂餌の評価を検討し，YG（1 $\mu$ m：生化学工業）を用いることにより，体内に取り込まれた蛍光微小球が観察できることを確認した。海岸から採取した線虫に対して加圧飼育を試みたところ 320 気圧程度の加圧は短期間であれば，致死的でないことを確認した。塩酸で pH を 7 に調整した海水中に有孔虫をいれ，常圧下と加圧下で 12 時間静置したところ，常圧，加圧ともに殻の溶解が観察され，従来報告のあった pH 6~5.5 より高い pH で短期間でも影響が出る可能性を見出した。また加圧下ではその傾向が強くなることを確認した。

本研究によりこれまで評価手段のなかった高圧下での微小動物への環境攪乱の影響に関し，微小動物高圧飼育装置を開発し，飼育，観察法を確立した。本研究は今後必要となる深海環境のアセスメントの際，深海の微小動物に対する影響の定量的な評価につなげる。

## 6. 研究背景

深海生態系は多様性に富んでおり，地球規模での物質循環の中で大きな役割を果たしている。また人間の手がほとんど加えられていないため，未知の遺伝子の宝庫としても期待されている。一方将来鉱物資源の開発としてマンガング塊の採掘や地球温暖化対策の一つとしての CO<sub>2</sub> 海洋隔離等，深海に人間の手が加えられようとしている。このような現状において深海資源の開発及び利用には深海環境のアセスメントが必要である。

深海の生態系を評価する上で微生物と線虫類が重要であると考えられる。微生物は有機物の分解者としてのみならず，未知の遺伝子資源として期待されている。線虫類は海底生態系における後生動物の中で最も個体数が多く，多様性も大きい。これまで深海生物の高圧下での研究は主に微生物で行われており，線虫類や有孔虫類等の小型生物で研究はほとんど無い。よってこれら小型生物への影響を調査するための手段を得る必要がある。深海環境は低温・高圧で特徴づけられる。深海環境での環境攪乱に対する生物への影響を評価のためには，小型生物を高圧で飼育し観察できる実験装置の開発及び評価法の確立が必要である。

## 7. 研究の目的

深海生物への環境攪乱の影響を評価するため高圧下での微小動物飼育装置の開発を行う。それら微小動物の高圧下での観察方法の確立と生物の活性評価法を検討する。またそれらの

技術をもとに環境攪乱の生物活動に与える影響を検討する。

## 8. 材料と方法

### 8.1 小型生物加圧飼育実験装置の開発

#### 8.1.1 設計仕様

設計仕様は以下の通りとした。

耐 圧：400 気圧

CO<sub>2</sub> 海洋隔離が想定されている水深付近の圧力とした。

温 度：2 ~ 10

深海の温度とした。

観察窓：15 mm

深 さ：2 mm

材 質：チタン合金

腐蝕及び強度を勘案し決定した。

#### 8.1.2 装置詳細の検討

本研究では圧力容器構造，温調法，制御法，観察法を検討した。観察は落射照明と実体顕微鏡の併用及び長作動距離レンズと CCD カメラの併用の 2 通りの方法を用い，観察の対象として線虫の運動性で評価した。

#### 8.1.3 環境条件変更法の検討

海水中の pH，栄養塩，酸素濃度などの環境条件変更法を検討した。pH 8 の海水を槽内に満たし，加圧ポンプにより pH 5 の海水を送ることにより槽内の条件の変更を調べた。評価は槽出口から排出される海水を 96 穴マイクロプレートの各ウェルに 2 滴ずつ採取し，そこにプロモクレゾールパープル（変色域：紫 6.8 ~ 5.2 黄）を添加し，黄色に変色した時点で槽内が置換されたものとした。ポンプの回転数を変化させ回転数と置換時間を調べた。

### 8.2 微小動物への影響評価法検討

蛍光微小球による摂餌評価法を検討した。対象微小動物として線虫類を用いた。本実験では海岸より砂ごと採取し，実験室で飼育したものから，適宜ソーティングして用いた。2~4 mm の大型で体の途中まで段々模様があるものを *Mesacanthion sp.* と同定して供試した。使用した蛍光微小球は表に示す。摂餌を調べるために 24 穴マイクロプレートのウェルに 1 ml の海水と 3~4 個体の線虫を入れ 1/1000 の体積の蛍光微小球（ラテックス濃度 2.5%）を接種した。使用した蛍光微小球を表に示す。それを 3 日間恒温槽内で飼育後，プレパラートに固定し，蛍光顕微鏡下で観察した。

表 本研究に使用した蛍光微小球

蛍光微小球		波長 (nm)		蛍光顕微鏡	
サイズ	名称	励起	蛍光	機種	キューブ
1.0 μm	Y G	458	540	IX-70	WBU
1.0 μm	B B	355	408	AH3-RFC	U356
1.0 μm	N Y O	530	590	IX-70	WIG

### 8.3 環境攪乱の生物に与える影響検討

#### 8.3.1 微小動物への圧力の影響検討

浅海から得られた線虫に関し、圧力の影響を調べた。8.2 と同様にしてソーティングした線虫を槽内に 5 個体入れ、加圧し、24 時間後の生死の状況を加圧下で CCD カメラ及び長作動距離レンズを用いて観察した。

#### 8.3.2 pH 変化の有孔虫への影響検討

浅海から得られた有孔虫に関し、pH 変化と圧力の影響を調べた。浅海の砂からソーティングした有孔虫を塩酸で pH 7.0 に調整した海水中に入れ、常圧下と加圧下で 12 時間静置後、取り出し顕微鏡下で溶解状況を観察した。加圧には小型生物加圧飼育実験装置を用いた。

## 9. 結果

### 9.1 小型生物加圧飼育実験装置の開発

#### 9.1.1 装置詳細の検討

試作品及び完成品の観察部の図面を図 9.1 に示す。また完成品の全体像及び観察セル部を写真 9.1, 9.2 に示す。試作品では圧力を耐圧窓側面で受ける構造であり、完成品は耐圧窓の飼育槽側で受ける構造である。圧力を維持する意味では試作品の方が優れているが、小型生物のハンドリング上不具合が生じたため、飼育槽にアクセスしやすい完成品の構造とした。

温度調節は試作品ではウォータージャケット式としたが、結露の問題等を生じたため、恒温槽を用いることとした。深海生物を採取することを考えると、より新鮮なサンプルの処理が必要となる。海洋観測船には低温実験室を装備しているものもあり、本装置はそのような環境で使用されることが望ましい。

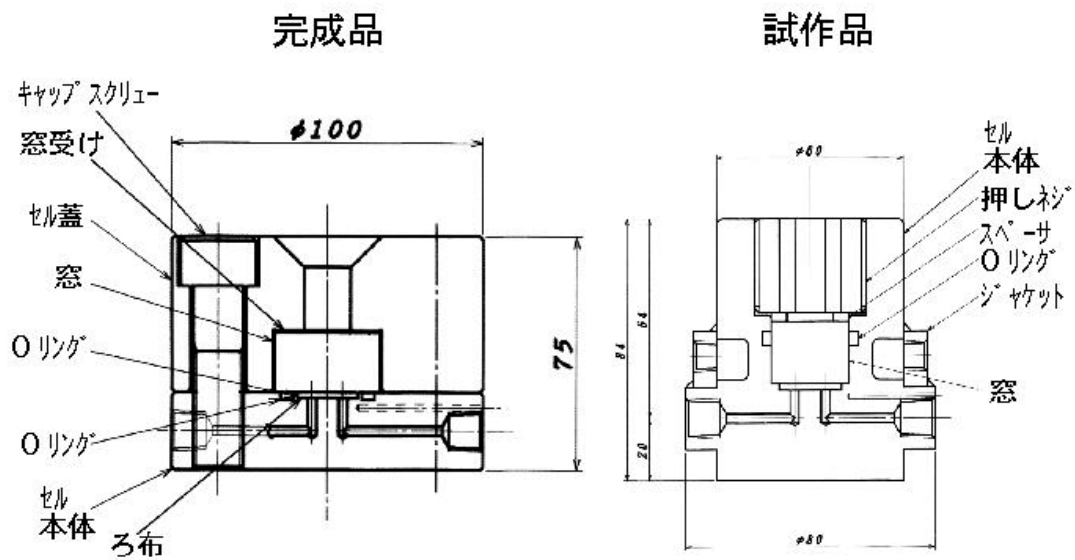


図 9.1 観察セル部の製作図



写真 9.1 小型生物加圧飼育実験装置外観

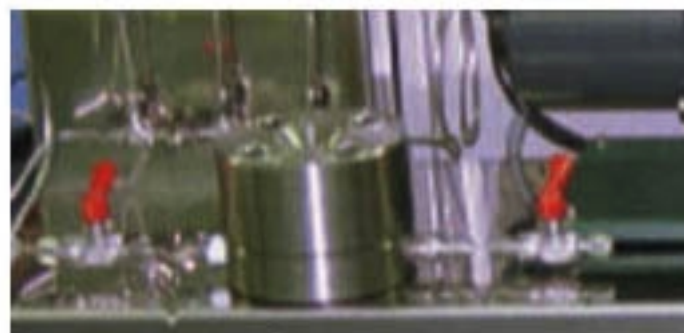


写真 9.2 小型生物加圧飼育実験装置セル

本装置の制御はパソコンと制御ソフトを用いることとした。生物実験においては様々な条件の検討が必要であり，実験目的により制御法が変わることが多くある。今回用いた制御ソフトは演算モジュールの組み合わせにより，簡単に制御法の変更が可能であるとともに，得られるデータはデジタルで記録される。本試験装置で用いた最もシンプルな制御プログラム及びインターフェイスを図 9.2, 9.3 に示す。プログラムは信号入力部，ユーザー入力部，データ変換部，データ記録部，データ表示部からなり，温度及び圧力のデータの表示，グラフ化，保存が可能であるとともに，加圧ポンプの on, off をマウスにより入力できる。

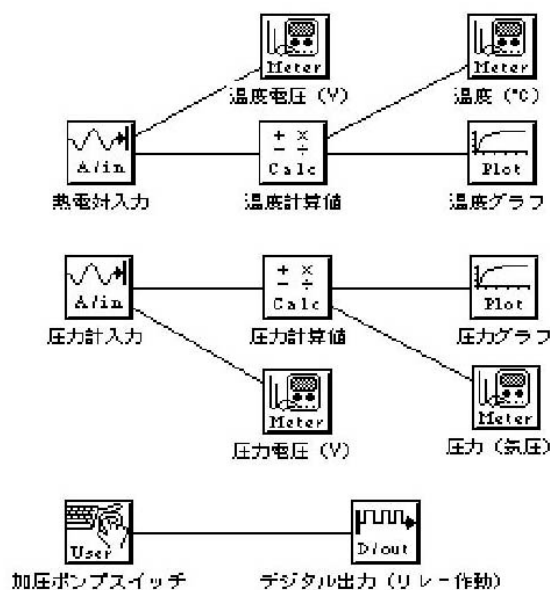


図 9.2 制御プログラム

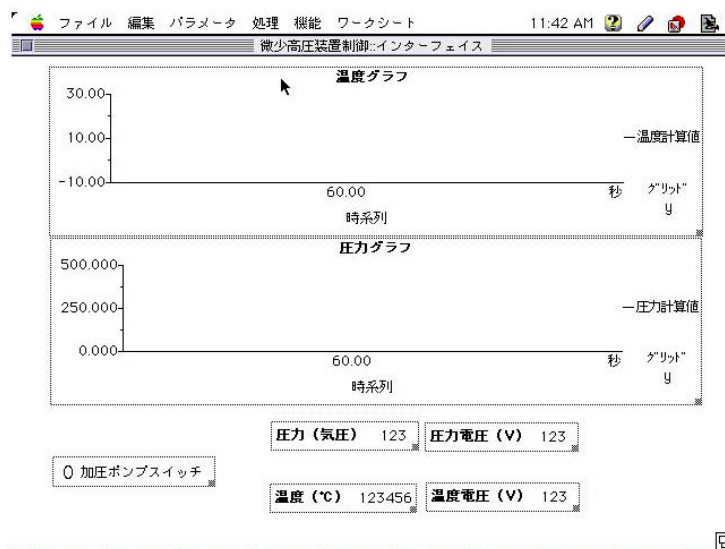


図 9.3 制御インターフェイス

実体顕微鏡による観察では観察窓面での乱反射により、線虫の存在の確認ができなかった。長作動距離レンズの場合、偏光板、照明の強度の調整により観察窓を通して装置内での線虫の運動を観察可能であった。本研究においては安全性を考慮し、ポリカーボネート樹脂を観察窓に用いた。より光学的によい結果を得るためには、サファイアガラス等の光学的に均質かつ傷がつきにくい材料を使うことにより解決できる。本装置において、ポリカーボネート樹脂と同サイズのサファイアガラスを用いる事により強度的には十分であるが、ふたの押さえ等は厳密に均等な力がかかるようにする必要がある。

### 9.1.2 環境条件変更法の検討

ポンプ回転数と変色点に至るまでの運転時間の関係を図 9.4 に示す。容器内の液体はポンプの回転数によらずほぼ 20 ml 流出させたところでほぼ完全に置換された。この結果から総容量の約 6 倍量の液体を流出させることで容器内の条件を完全に変更可能であることを確認した。

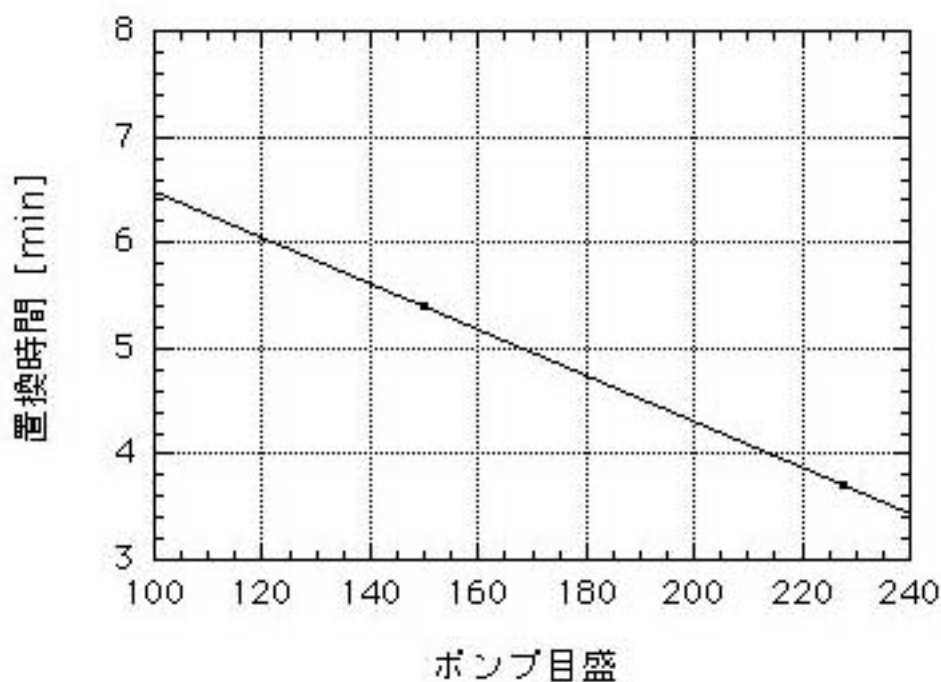


図 9.4 ポンプ目盛と変色点に至るまでの置換時間の関係

### 9.2 微小動物への影響評価法検討

蛍光微小球を接触させた線虫を写真 9.3 に示す。いずれの条件においても微分干渉観察では蛍光微小球の判別はできなかった。BB 及び NYO では自家蛍光が強いため蛍光微小球と線虫の判別が困難であった。YG では線虫内の蛍光が観察可能であった。

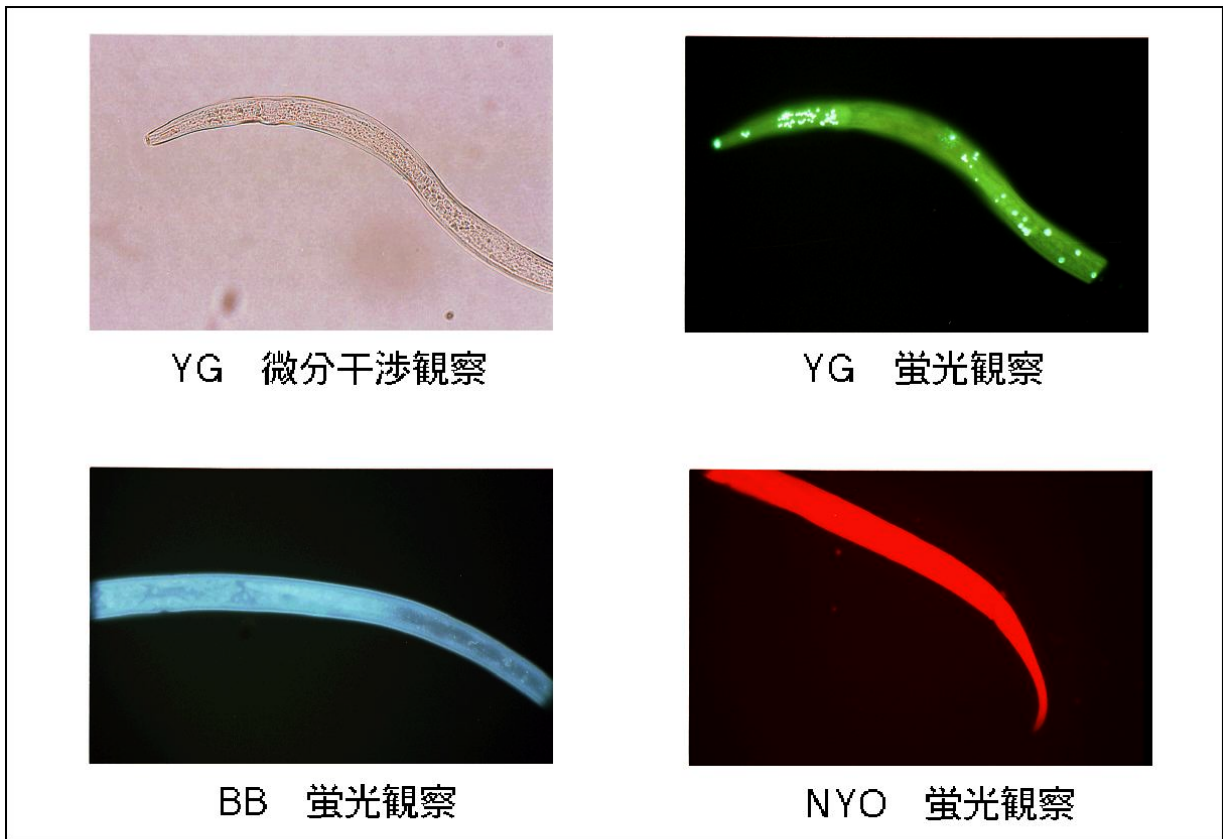


写真 9.3 蛍光微小球を摂食させた線虫の顕微鏡写真

### 9.3 環境攪乱の生物に与える影響検討

微小動物への圧力の影響試験において *Mesacanthion sp.* の各圧力で飼育した場合の 1 日後においては常圧から 350 気圧まで全ての個体が生存できることを確認した。pH 変化の有孔虫への影響試験において各圧力条件における pH 変化前後の状態を写真 9.4 に示す。pH 7 に静置することにより炭酸カルシウムの殻の溶解が観察された。また常圧に比較して高圧下において顕著な溶解が見られた。

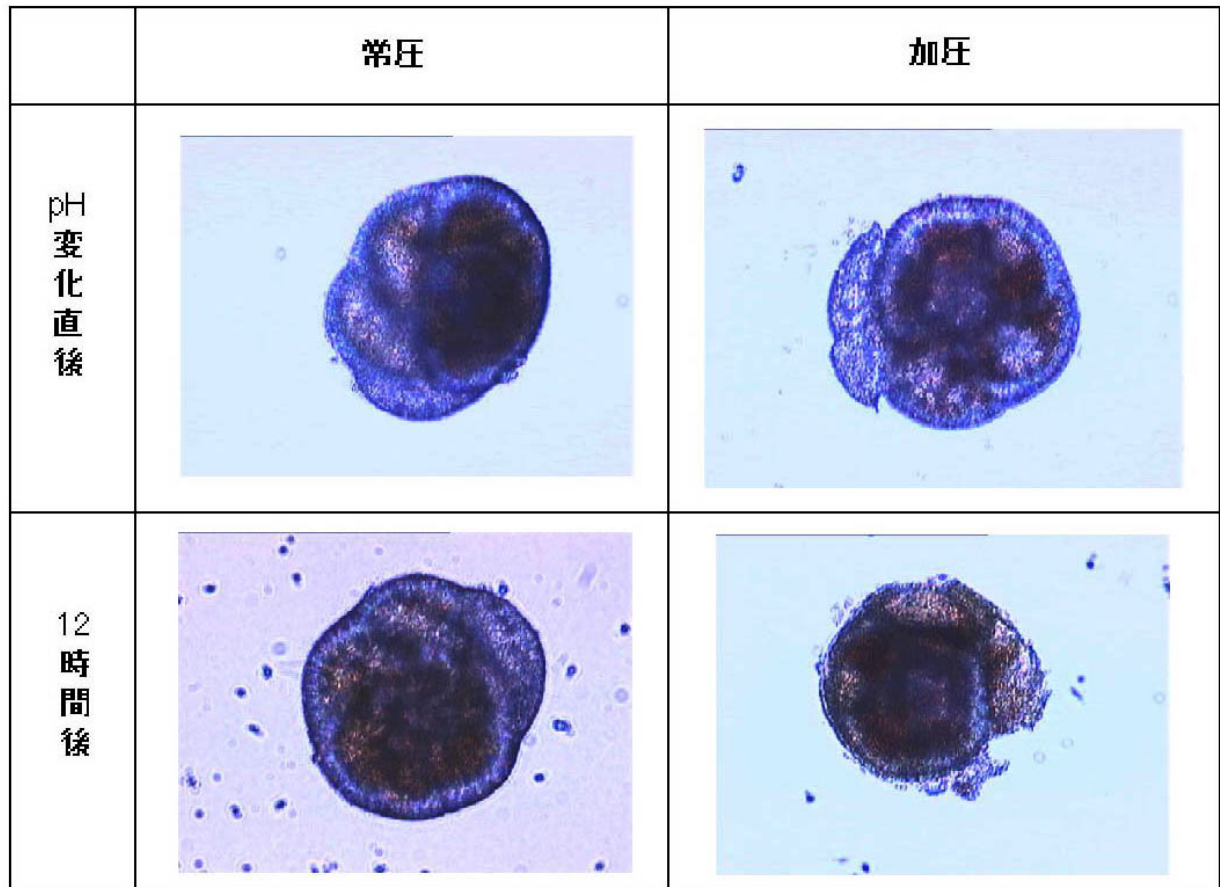


写真 9.4 pH変化及び圧力の有孔虫への影響

## 10.考察

### 10.1 微小動物への影響評価法検討

今回の結果では BB 及び NYO では自家蛍光が強いため蛍光微小球と線虫の判別が困難であるが、YG では線虫内の蛍光が観察可能であった。今回使用した *Mesacanthion sp.* は蛍光微小球が腸管内に入っていることから自然の状態ではバクテリアあるいは懸濁態有機物を摂食しているものと推定された。定量的な判断のためには線虫の外側に付着しているものと腸管内のものを厳密に区別する必要があるため、今後洗浄法に関しても検討する必要がある。

### 10.2 環境攪乱の生物に与える影響検討

#### 10.2.1 微小動物への圧力の影響検討

今回の結果において浅海種の線虫においても短期間の加圧であれば死滅するわけではないことが確認されたが、高圧下にさらされることにより、ガス取り込み速度や物理的な環境が変化するため、それに伴う特殊なタンパクの誘導、あるいは細胞の構造変化の可能性がある。本試験では生理学的なデータは取得していないが、いずれにしてもその変化が致命的なものではないと考えられた。



### 10.2.2 pH 変化の有孔虫への影響

今回の実験において pH 7 に静置することにより炭酸カルシウムの殻の溶解が観察され、常圧に比較して高圧下において顕著な溶解が見られた。これまでの研究で線虫やバクテリアの生死に関し、pH 6~5.5 以下の条件で短期間に影響が出ると報告されている。しかしながら本試験により有孔虫に関しては更に高い pH においても影響が出ることを確認できた。これは炭酸カルシウムを持つ生物に対しては、生理学的な影響に加え、物理化学的な影響すなわち、炭酸カルシウムの平衡が大きく影響すると考えられる。通常海洋表面では炭酸カルシウムに対して過飽和であるが、今回の実験においては pH の低下により炭酸カルシウムに対して未飽和になり、溶解が始まったものと考えられる。また高圧下では、更に未飽和の度合いが大きくなるため、溶解量が多くなったものと考えられる。

## 11. 今後の展開

本研究によりこれまで評価手段のなかった高圧下での微小動物への環境攪乱の影響に関し、飼育、観察法を確立すると同時に、活性評価法の一つとして蛍光微小球を用いた摂餌評価法を検討した。今後は更にこれらの方法を組み合わせて深海の微小動物に対する環境攪乱の影響を評価法を検討するとともに、生理学的なデータ取得に関しても検討する。

## 12. 参考文献

なし

## 13. 研究業績

13-1. 原著論文：なし

13-2. 総説など：なし

13-3. 国際学会発表：なし

13-4. 国内学会発表：なし

13-5. 新聞など：なし

13-6. 特許申請：なし