

佐藤博雄\*・山口征矢\*\*：染色法による微細藻類の生細胞と死細胞の判別

Hiroo SATOH\* and Yukuya YAMAGUCHI\*\*： Discrimination between live and dead cells in microalgal assemblages by a staining technique

Evans blue staining was applied for discriminating dead cells from live cells of microalgae. Sample cells of cultured diatoms, *Thalassiosira* sp., were prepared at five levels of dead cell percentages, 0, 25, 50, 75 and 100. Uptake of  $^{14}\text{C}$  by the samples indicated that photosynthesis levels well corresponded to the percentage of live cells; however, chlorophyll *a* measurements by spectrophotometric method did not show corresponding results. Percentage of the cells stained by Evans blue agreed well with the prepared percentage of dead cells in the total cell number of the samples, indicating usefulness of the staining in assessing proportion of dead cells in microalgal assemblages.

*Key Index Words:* Evans blue—microalgae—staining—*Thalassiosira*.

Hiroo Satoh, Tokyo University of Fisheries, Konan-4, Minato-ku, Tokyo, 108 Japan. Yukuya Yamaguchi, College of Liberal Arts, Saitama University, Urawa, Saitama, 338 Japan.

微細藻類群集の動態を研究する場合、現存量の正確な把握とともに、群集を構成する細胞の生死の割合を知ることは重要である。個々の細胞の生死を判定するには、各種の染色剤や蛍光剤で細胞を染色し計数する方法が提唱されている（例えば、KOEHRING, 1940；HESLOP-HARRISON and HESLOP-HARRISON, 1970；GAFF and OKONG'O-OGOLA, 1971；JARNAGIN and LUCHINGER, 1980；小杉, 1985）。このような方法を用いる場合には、それによって得られた死細胞率が細胞の生理的な失活の程度と正しく対応しているかどうかを検討しておく必要がある。著者らは、この点に関して手軽なエバンスブルー染色法（GRIPPEN and PERRIER, 1974）を用いて二三の検討を行ったので、その結果を報告する。

材料と方法：試料として海産珪藻の一種 *Thalassiosira* sp. を用いた。試料は、白色蛍光灯を用い、 $80 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ （明期14時間、暗期10時間）、 $20^\circ\text{C}$ の下で SW-II 培地（IWASAKI, 1961）を用いて培養し、その対数期の細胞を実験に用いた。

実験開始直前に試料を二分し、一方を $60^\circ\text{C}$ で10分間加熱処理し死細胞群とした。生細胞群および死細胞群の一定量ずつを混合し、試料中に死細胞がそれぞれ0, 25, 50, 75 および100%含まれるように調整した。これらの試料について、光合成活性およびクロロフィル *a* 量を測定すると共に、エバンスブルーによって染色された細胞を計数した。光合成活性の測定は $^{14}\text{C}$ 法によった。試料 80 ml 中に0.2 ml の  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ （比放射能  $10 \mu\text{Ci ml}^{-1}$ 、第一化学薬品㈱）を加え、 $200 \mu\text{E}$

$\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、 $20^\circ\text{C}$ で、3時間培養した後、直ちに試料をミリポアフィルター（RA, 孔径  $1.2 \mu\text{m}$ , Millipore Ltd.）でろ過捕集し、液体シンチレーション用バイアル中で90%アセトンを用いて溶解した後、液体シンチレーション用試薬の Dimilume-30（Packard Ltd.）を添加し、液体シンチレーションカウンター（Mark III, Seale Analytic Ltd.）によって放射能を測定した。クロロフィル *a* 量の測定は吸光法（SCOR-UNESCO, 1966）によって行なった。また、各試料を一定量とり、濃度が0.05%になるようエバンスブルーを加え、室温で10-20分間静置した後、ニュークレオポアフィルター（孔径  $3.0 \mu\text{m}$ , General Electric Ltd.）上に細胞を捕集し、ろ過海水で細胞表面に付着した染色液を洗浄し、乾燥した後、フィルターごとツェダー油を用いてスライドグラス上に封入し、顕微鏡下で細胞を計数し、青色に染色された細胞（死細胞）の割合を求めた。

結果と考察：試料中の全細胞数は  $4 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ 、生細胞100%の試料のクロロフィル *a* 量は  $46 \text{ mg m}^{-3}$ であった。生細胞100%の試料の測定値を100%とした場合、光合成活性とクロロフィル *a* 量の相対値を Fig. 1 に示した。各試料の光合成活性の相対値は、それぞれの生細胞の割合とよく一致し、光合成は生細胞の割合を示していると判断される。しかし、クロロフィル *a* 量の相対値は生細胞の割合と一致せず、死細胞100%の試料でも約30%減少したにとどまった。このことは、熱処理による細胞の死にもかかわらず、変性したクロロフィル色素が吸光法では測定に含まれてしまうこと

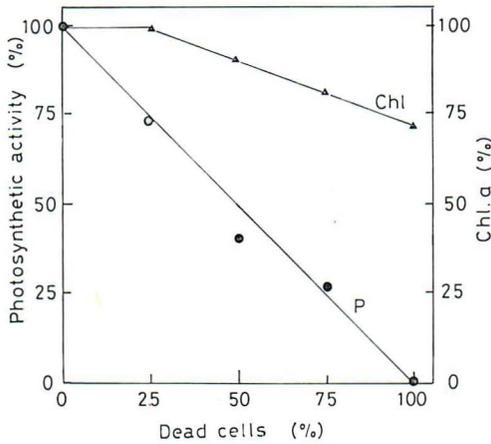


Fig. 1. Relationships between photosynthetic activity (P) and chlorophyll *a* concentration (Chl), and the percentage of dead cells.

を示唆している。Tsuji and Yanagita (1981) は蛍光顕微鏡による観察の結果から、クロロフィルによる蛍光は細胞の死後直ちに減少するが、24時間後でも約30%が残存していたと報告している。これらの結果は、吸光法によるクロロフィル量の減少から死細胞の割合を判定することは必ずしも容易でないことを示している。

エバンスブルー染色により死細胞は青色に染色される (Fig. 2)。各試料で青色に染色された細胞の割合は、あらかじめ調整した死細胞の割合とよく一致した (Table 1)。このことは、細胞が熱処理により失活した後直ちにエバンスブルーによって染色されることを示している。すなわち、エバンスブルー染色により、正確かつ容易に死細胞を判別することが可能である。

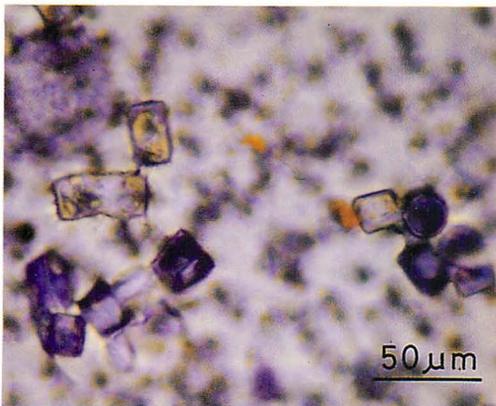


Fig. 2. Photomicrograph of live and dead cells of *Thalassiosira* sp. treated with Evans blue. Dead cells stained blue.

Table 1. Percentage of the stained cells in the total cell number in comparison to the dead cells prepared. Average of 5 samples each.

Dead cells prepared	100	75	50	25	0
Stained cells	99.6	75.9	52.2	20.8	0
S.D.	0.9	7.7	3.0	2.6	—

染色法により細胞の生死の判定を行う場合の難点は、染色剤によってはある種の細胞に染色むらが生じることである (CRIPPEN and PERRIER, 1974)。しかし、研究対象によって適切な染色剤を選択すれば、染色法は微細藻類の細胞の生死判定に極めて有効であり、手軽に利用できる利点を持っている。近年急速に発達した画像解析法 (FURUYA, 1982; TSUJI and NISHIKAWA, 1984) が応用できれば、それを併用することにより染色法の有用性はさらに増すものと考えられる。

#### 引用文献

- CRIPPEN, R.W. and PERRIER, J.L. 1974. The use of neutral red and Evans blue for live-dead determinations of marine plankton. *Stain Tech.* **40**: 97-104.
- FURUYA, K. 1982. Measurement of phytoplankton standing stock using an image analyzer system. *Bull. Plankton Soc. Japan*, **29**: 131-132.
- GAFF, D.F. and OKONG'O-OGOLA, O. 1971. The use of non-permeating pigments for testing the survival of cells. *J. Exp. Bot.* **22**: 756-758.
- HESLOP-HARRISON, J. and HESLOP-HARRISON, Y. 1970. Evaluation of pollen viability by induced fluorescence; intercellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain Tech.* **45**: 114-120.
- IWASAKI, H. 1961. The life-cycle of *Porphyra tenera* in vitro. *Biol. Bull.* **121**: 173-187.
- JARNAGIN, J.L. and LUCHINGER, D.W. 1980. The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a stain for evaluating viability of mycobacteria. *Stain Tech.* **55**: 253-258.
- 小杉正人 1985. 染色像による珪藻の生体・遺骸の識別法とその意義. 第四紀研究. **24**: 139-147.
- KOEHRING, V. 1940. The neutral red reaction. *J. Morph. Physiol.* **49**: 45-139.
- SCORE-UNESCO. 1966. Determination of photosynthetic pigments. *Unesco Monogr. Oceanogr. Methodol.*, **1**: 9-18.
- TSUJI, T. and YANAGITA, T. 1981. Improved fluorescent microscopy for measuring the standing stock of phytoplankton including fragile components. *Mar. Biol.* **64**: 207-211.
- TSUJI, T. and NISHIKAWA, T. 1984. Automated

identification of red tide phytoplankton *Prorocentrum triestinum* in coastal areas by image analysis. J. Oceanogr. Soc. Japan, **40**: 425-431.

(\*108 東京都港区港南4-5-7 東京水産大学 \*\*338 埼玉県浦和市下大久保255 埼玉大学教養部)

## 新 刊 紹 介

**G.E. FOGG & B. THAKE: Algal Culture and Phytoplankton Ecology.** 3rd ed. xiii+269 pp. The University of Wisconsin Press. Wisconsin (1987). \$ 25.00

植物プランクトンを対象とした生態学に関しては、いろいろな観点からの、それぞれ特色ある著書が多く出版されている。それらのうちで、わが国でもかなり多くの人に読まれてきた Fogg 教授の、生理生態の観点からまとめられた著書の第3版が、第2版から12年を経過して出版された。

常に野外と実験室とを結びつけて研究を進めてきた Fogg 教授が、彼の考えを十分に反映させた著書である。このような一人の研究者による、自分自身の自然観ないし研究観でつらぬかれている本を、比較的初学者に向けて書かれた教科書的な著書であったとしても、きっちり読むことは、その考え方、方法論に同意するかしないかは別にして、大切なことであり、この著書はそれに価するものである。

Fogg 教授は、水界の一次生産者である微細藻類の生態に関する種々の問題のうち、生長と分布をコントロールしている要因の解明、ならびに、時空間における生物の存在様式の生態的意義の説明と、それらを予測することをめざして行われている研究を、その限界と今後の課題とを含めてわかりやすく順に解説していく。ここでは微細藻類に関するこれら生態学の問題の解明には、その現象にかかわる種の general biology と physiological requirement and performance を明らかにすることができれば、かなりの部分を解明できると考える。特にそれらのうち、生長にかかわる問題の解析を最も重要視する。この問題の解析には培養実験が最も有効な手段である。パート1では、バッチ培養、同調培養、連続培養、混合培養により解明された、生長にかかわる生理的な側面を、これらの方法に

よる限界を十分示した上で説明していく。特に第3版では旧版ではふれていなかった、自然でのプランクトン群集中でみられているであろう、いろいろな種間での種々の相互関係を実験的に解析するための混合培養について1章が設けられている。

パート2では、自然の水界中での個体群の動態の解明に入る。このパートは、旧版がかなり大はばに書き改められている。この版で新たに導入されている水界の混合期の植物プランクトン群落と、成層期に見られる植物プランクトン群落とに分けての説明は明解で、植物プランクトンの生きざまと、それらの遷移等の問題を考える際に非常に得る所が大きい。

ある場でみられる植物プランクトンの種の多くは、そこで生長したのであるが、その場から死亡とか他の要因により取り除かれた残りでもある。自然での個体群の動態を考える場合には、生長の方からみる方法と同時に、lossの方からもみていかなければならない。各種にみられる生理的な適応には、生長のための適応と、それ以外に loss にそなえる、つまり loss をしずらくする、あるいは loss があっても生き残ることができる適応も重要である。生長の問題は比較的に実験室に持ち込みやすいが、lossの問題はなかなか困難である。実験室での研究をかなり重要視する生理生態学の立場からは、この視点は入りづらい。それ故、この方向からのアプローチに関する解説は少ないことはいかんともしがたいことである。このような意味からも、植物プランクトンの生態に興味ある方、他の見方からの研究の動行を知りたい方は、この本と同時に別の観点からの著書、例えば C. S. REYNOLDS の "The Ecology of Freshwater Phytoplankton", 384 pp. Cambridge University Press, (1984) などもあわせて読まれることをおすすめする。

(京都大学農学部附属水産実験所 中原紘之)