

長期培養による *Chattonella antiqua* と *Chattonella marina* の サイズと形態の変化

大山憲一・吉松定昭

The Changes in the Size and Form of *Chattonella antiqua* and *Chattonella marina*
by Investigating Cultured Strains over a Long Period

Kenichi OYAMA and Sadaaki YOSHIMATSU

Abstract

The purpose of this study was to define the changes in the size and form of cells of noxious red tide algae *Chattonella antiqua* (Hada) Ono and *Chattonella marina* (Subrahmanyam) Hara et Chihara, whose cell size and cell form were used as main standards for identification of both species, by investigating cultured strains over a long period.

Eight strains of *C. antiqua* and *C. marina* examined in this study were collected and isolated from several areas of western Japan, mainly in Kagawa prefecture from 1970 to 1982. The size (cell length, cell width) of 50 cells of each strain were measured 9 days after inoculation in 2006, using the same method by which Yoshimatsu & Ono (1984) measured identical strains in 1982. And the ratio of cell length to cell width was estimated for all cells as an index of the form. The differences in the population means of cell length, cell width and the ratio of cell length to cell width were tested between the same strains measured in 1982 and 2006, and between both species measured in 2006 by the Student's t-test.

As the result, compared with the values measured 24 years ago, cell length and cell width of *C. antiqua* became 20% shorter and 11% wider respectively, resulting in a 28% fall in the ratio of cell length to cell width. So it was considered that *C. antiqua* became miniature and roundish, in addition length of its tail point was dulled during the long term culture, especially the dispersion of its cell length tended to vary widely. On the other hand, cell width and the ratio of cell length to cell width of *C. marina* became 10% wider and 10% lower respectively, so it was considered that *C. marina* became more roundish and length of its tail point was more dulled during the long term culture. Comparing *C. antiqua* with *C. marina* as species, the overlapped range of cell length of each species became widely, but cell length and cell width of *C. antiqua* were longer and wider than those of *C. marina* significantly ($P < 0.01$), and moreover the ratio of cell length to cell width of *C. antiqua* was higher than that of *C. marina* significantly ($P < 0.01$).

As mentioned above, it revealed that though the size and form of *C. antiqua* and *C. marina* varied to a certain extent during the long term culture, both species were distinguishable statistically, so there was no problem to distinguish both species as a unit of species by their shapes.

キーワード : 長期培養, 細胞長, 細胞幅, 細胞長・細胞幅比, *Chattonella antiqua*, *Chattonella marina*

香川県赤潮研究所では、2005年3月末現在、65種119株の微細藻類が保存・培養されている。¹⁾ 本研究においてこれらの培養株を用いた微細藻類の分類学的・生理生態学的研究が進められてきたほか、培養株は他の研究機関にも幅広く分譲され、多くの研究の材料として用いられてきた。¹⁾

しかし、現場海域から分離されて20年以上経過した培養株（以後「長期培養株」という）が、分離当初のサイズ・形態、増殖生理、毒性、遺伝情報等を保持しているかどうか研究された事例は少ない。長期培養によってそれらの特性が変化・変異する可能性も考えられることから、長期培養株を研究材料に用いる際には、その影響を確認しておく必要がある。

そこで本研究では、細胞のサイズと形態が主な同定基準となっている有害赤潮藻 *Chattonella antiqua* (Hada) Ono^{2,3)} と *Chattonella marina* (Subrahmanyam) Hara et Chihara^{4,5)} に着目し、吉松・小野 (1984)⁶⁾ が1982年に両種のサイズを測定したときと同一の株、同一の培養方法を用いて、24年後の2006年に再度サイズを測定し、長期培養による *Chattonella* のサイズと形態の変化を明らかにすることを目的とした。

材料および方法

供試株

吉松・小野 (1984)⁶⁾ が用いた株のうち、現在も香川県赤潮研究所で保存・培養されている *C. antiqua* 8

株、*C. marina* 8株 (Table 1) を用いた。採集年は、*C. antiqua* が1970～1982年、*C. marina* が1975～1982年で、いずれの株も分離後20年以上経過したものである。採集場所は香川県沿岸域を中心とした西日本各地である。

培養条件およびサイズの測定方法

ESM培養液,⁷⁾ 温度23°C, 光量子密度約35 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 24時間連続明条件で培養した。接種後9日目の対数増殖期の状態の各株50個体を光学顕微鏡 (400倍) を用いて細胞を観察・写真撮影し、パソコン画面上でサイズ (細胞長, 細胞幅) を測定した。測定には、フリーソフト「測ルンです」 (<http://www.forest.impress.co.jp/lib/dktp/desktop/dsktpextn/hakarundesu.html>) を使用した。形態の指標として、細胞長を細胞幅で除した細胞長・細胞幅比を用い、尾部の伸長の目安とした。培養容器は18×180mm試験管を用い、液量は約20mLで行った。写真撮影を効率よく行うため、測定時には試験管から培養液を容量約6mLの共栓付瓶の半分程度移し (約3mL), 吉松 (1987)⁸⁾ の方法に従って約20秒間軽く瓶を振とうし、遊泳運動を止めた状態で行った。なお、この振とうによる細胞のサイズと形態への影響はないことを事前に確かめてこの方法を採用した。

解析

吉松・小野 (1984)⁶⁾ が、ESM培養液, 温度23°C, 光量子密度約35 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 24時間連続明条件で *C. antiqua* および *C. marina* を培養し、接種後9～11日目の各株50細胞を光学顕微鏡 (200倍) で観察、接眼

Table 1 Strains of *Chattonella* used in the present study

Species	Strain name	Source (Pref.)	Year of isolation	Organs where original strains isolated
<i>Chattonella antiqua</i>	KA-72	Harima Nada (Kagawa)	1972	Kagawa Univ.
	KA-77	Harima Nada (Kagawa)	1977	Akashiwo Res. Inst. Kagawa Pref.
	KA-78	Harima Nada (Kagawa)	1978	Akashiwo Res. Inst. Kagawa Pref.
	KA-82	Harima Nada (Kagawa)	1982	Akashiwo Res. Inst. Kagawa Pref.
	HI-70	Hiroshima Bay (Hiroshima)	1970	Hiroshima Fish. Stn.
	HI-71	Hiroshima Bay (Hiroshima)	1971	Hiroshima Fish. Stn.
	TO-80	Uranouchi Inlet (Kochi)	1980	Akashiwo Res. Inst. Kagawa Pref.
	MI-80	Mikawa Bay (Aichi)	1980	Yokohama Higashi Senior High School
<i>Chattonella marina</i>	KA-81	Harima Nada (Kagawa)	1981	Akashiwo Res. Inst. Kagawa Pref.
	HIU-82	Hiuchi Nada (Kagawa)	1982	Akashiwo Res. Inst. Kagawa Pref.
	MA-75	Maizuru Bay (Kyoto)	1975	Hiroshima Fish. Stn.
	KG-77	Kinkou Bay (Kagoshima)	1977	Kagoshima Univ.
	KG-78	Kinkou Bay (Kagoshima)	1978	Kagoshima Fish. Stn.
	KG-82	Kinkou Bay (Kagoshima)	1982	Kagoshima Fish. Stn.
	HI-78	Hiroshima Bay (Hiroshima)	1978	Hiroshima Fish. Stn.
	OS-82-2	Osaka Bay (Osaka)	1982	Osaka Fish. Stn.

マイクロメーターを用いて測定した結果と比較し、各測定項目について、株間・種間の母平均の差をスチューデントのt検定により検定した。

結 果

細胞長，細胞幅，細胞長・細胞幅比の比較

本研究および吉松・小野 (1984)⁶⁾の結果から得られた、各株・種ごとの細胞長，細胞幅，細胞長・細胞

幅比の平均および標準偏差をTable 2に示すと同時に、両研究の間における各株・種ごとの母平均の差の検定結果も示す。

今回用いた*C.antiqua* 8株中、平均細胞長が最も長く、平均細胞幅が最も広がったのはKA-72株で、平均細胞長・細胞幅比も同株が最も高く、大型で尾部がよく伸長していた。逆に平均細胞長が最も短く、平均細胞幅が最も狭かったのはKA-77株で、平均細胞長・細胞幅比も同株が2番目に低く、尾部の伸長はほとんどの個

Table 2 The comparison of size and form of *Chattonella antiqua* and *Chattonella marina* by the long term culture

Part	Species	Strain name	Present study		Yoshimatsu & Ono (1984)		Significant difference
			Average	S.D.	Average	S.D.	
Cell length (μ m)	<i>C.antiqua</i>	KA-72	106.5	14.09	94.9	11.78	**
		KA-77	41.6	5.78	77.4	12.01	**
		KA-78	50.3	8.82	72.9	10.03	**
		KA-82	59.2	6.84	82.8	12.13	**
		HI-70	70.8	8.36	91.1	10.85	**
		HI-71	89.1	18.14	95.2	11.72	*
		TO-80	67.2	9.80	82.9	10.49	**
		MI-80	74.1	9.31	97.5	12.51	**
	Average	69.8	22.27	86.8	14.22	**	
	<i>C.marina</i>	KA-81	67.7	10.04	57.7	8.02	**
		HIU-82	63.8	8.83	50.7	7.44	**
		MA-75	43.3	5.04	53.2	7.56	**
		KG-77	43.0	5.37	45.5	4.99	*
		KG-78	37.5	3.56	54.1	10.20	**
		KG-82	54.0	7.16	42.4	6.42	**
		HI-78	41.4	5.36	46.2	5.92	**
OS-82-2		39.9	6.15	44.6	10.68	**	
Average	48.8	12.72	49.3	9.30	N.S.		
Cell width (μ m)	<i>C.antiqua</i>	KA-72	36.5	2.99	34.4	3.02	**
		KA-77	29.4	3.71	29.8	2.71	N.S.
		KA-78	36.0	3.82	31.2	3.00	**
		KA-82	29.7	2.64	27.0	1.84	**
		HI-70	36.2	5.26	29.3	2.78	**
		HI-71	33.8	3.29	31.9	2.36	**
		TO-80	34.9	2.87	31.0	2.98	**
		MI-80	34.2	3.03	30.8	3.54	**
	Average	33.8	4.40	30.6	3.44	**	
	<i>C.marina</i>	KA-81	31.1	3.89	31.4	2.68	N.S.
		HIU-82	29.7	3.37	25.4	2.77	**
		MA-75	25.5	2.46	29.9	3.03	**
		KG-77	31.3	2.90	26.3	2.10	**
		KG-78	31.7	2.29	26.2	3.62	**
		KG-82	26.9	1.87	21.9	2.12	**
		HI-78	30.1	2.48	30.3	3.08	N.S.
OS-82-2		29.0	2.67	22.5	3.23	**	
Average	29.4	3.47	26.7	4.36	**		
Ratio of cell length to cell width	<i>C.antiqua</i>	KA-72	2.93	0.42	2.77	0.32	*
		KA-77	1.42	0.15	2.59	0.29	**
		KA-78	1.41	0.26	2.35	0.34	**
		KA-82	2.00	0.23	3.06	0.34	**
		HI-70	1.98	0.25	3.12	0.33	**
		HI-71	2.64	0.48	2.99	0.34	**
		TO-80	1.93	0.29	2.69	0.31	**
		MI-80	2.18	0.28	3.19	0.40	**
	Average	2.06	0.59	2.85	0.43	**	
	<i>C.marina</i>	KA-81	2.21	0.43	1.84	0.21	**
		HIU-82	2.17	0.35	2.00	0.24	**
		MA-75	1.71	0.21	1.79	0.29	N.S.
		KG-77	1.37	0.13	1.73	0.17	**
		KG-78	1.18	0.09	2.06	0.25	**
		KG-82	2.01	0.25	1.93	0.19	N.S.
		HI-78	1.38	0.16	1.54	0.23	**
OS-82-2		1.39	0.26	1.96	0.24	**	
Average	1.68	0.46	1.86	0.28	**		

50 cells of each strain were measured. Significant difference indicates the difference in the population means of present study and Yoshimatsu & Ono(1984).

** : $P < 0.01$, * : $P < 0.05$, N.S. : not significant

体で見られなかった。これらの結果と吉松・小野 (1984)⁶⁾ の結果を比較すると、平均細胞長は8株中7株で吉松・小野 (1984)⁶⁾ の結果より短くなり、平均細胞長・細胞幅比も8株中7株で低くなった。逆に、平均細胞幅は、8株中7株で広くなった。各測定項目について、同一の株間の母平均の差の検定をしたところ、KA-77株の細胞幅で有意差がなかったほかは、全ての株間で有意差があった ($P < 0.01$ または $P < 0.05$)。本研究で得られた *C. antiqua* 8株の平均値は、細胞長 $69.8 \mu\text{m}$ 、細胞幅 $33.8 \mu\text{m}$ 、細胞長・細胞幅比 2.06 で、吉松・小野 (1984)⁶⁾ と比較すると、細胞長で 19.6% 短く、細胞幅で 10.5% 広く、細胞長・細胞幅比で 27.7% 低く、サイズおよび形態に有意差があった ($P < 0.01$)。また、標準偏差は本研究の方が大きく、特に細胞長のばらつきが大きかった。

いっぽう今回用いた *C. marina* 8株中、平均細胞長が最も長かったのはKA-81株で、平均細胞長・細胞幅比も同株が最も高く、中には尾部が伸長していた個体もあった。逆に平均細胞長が最も短かったのはKG-78株で、平均細胞長・細胞幅比も同株が最も低かった。これらの結果と吉松・小野 (1984)⁶⁾ の結果を比較する

と、平均細胞長は8株中5株で吉松・小野 (1984)⁶⁾ の結果より短くなり、平均細胞長・細胞幅比も8株中5株で低くなった。平均細胞幅は、8株中5株で広くなった。各測定項目について、同一の株間の母平均の差の検定をしたところ、KA-81株およびHI-78株の細胞幅、MA-75株およびKG-82株の細胞長・細胞幅比で有意差がなかったほかは、全ての株間で有意差があった ($P < 0.01$ または $P < 0.05$)。本研究で得られた *C. marina* 8株の平均値は、細胞長 $48.8 \mu\text{m}$ 、細胞幅 $29.4 \mu\text{m}$ 、細胞長・細胞幅比 1.68 で、吉松・小野 (1984)⁶⁾ の結果と比較すると、細胞長で 1.0% 短く、細胞幅で 10.1% 広く、細胞長・細胞幅比で 9.7% 低く、細胞長で有意差はなかったが、細胞幅と細胞長・細胞幅比では有意差があった ($P < 0.01$)。また、標準偏差は、本研究の方が細胞長と細胞長・細胞幅比で大きく、細胞幅では小さかった。

このように、今回用いた *C. antiqua* と *C. marina* の細胞長、細胞幅、細胞長・細胞幅比の母平均の差を比較すると、いずれの項目も有意な差があり ($P < 0.01$)、サイズ・形態によって両種を区別することができた (Fig. 1)。

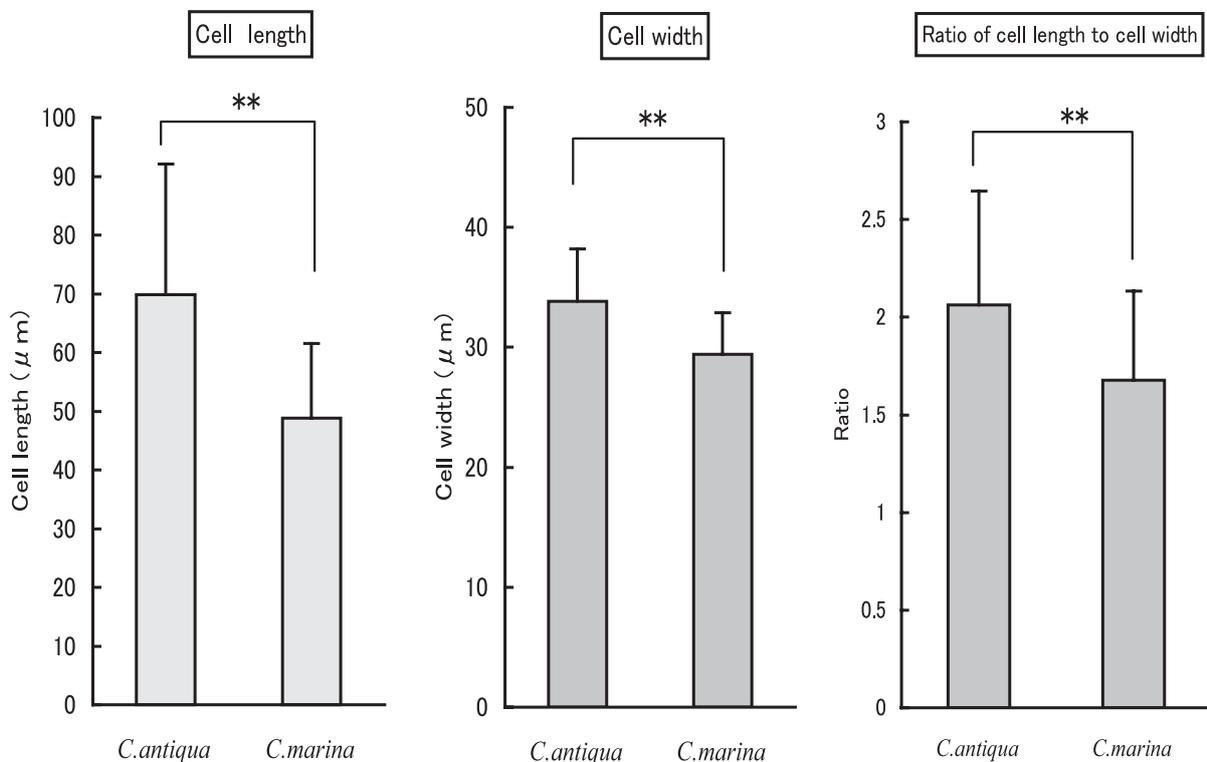


Fig.1 The comparison of size and form of *Chattonella antiqua* and *Chattonella marina* in the present study. 400 cells of both species were measured, respectively. Bars represent standard deviation. **: $P < 0.01$

細胞長と細胞幅の関係および細胞長と細胞長・細胞幅比の関係

本研究および吉松・小野 (1984)⁶⁾ の結果から得られた細胞長と細胞幅の関係をFig. 2に、細胞長と細胞長・細胞幅比の関係をFig. 3に示す。*C.antiqua*の細胞長の分布のばらつきが本研究では大きくなっており、*C.marina*の分布との重複範囲が吉松・小野 (1984)⁶⁾ の結果より広がっていた。細胞長と細胞長・細胞幅比は、細胞長が長くなるにしたがって細胞長・細胞幅比も高くなる傾向にあった。両者の関係をピアソンの相関係数検定により調べたところ、本研究で求めた*C.antiqua*の細胞長と細胞長・細胞幅比の間には統計

的に有意な ($P < 0.001$) 強い相関関係 ($r = 0.926$) が認められた。また、*C.marina*の細胞長と細胞長・細胞幅比の間にも統計的に有意な ($P < 0.001$) 強い相関関係 ($r = 0.885$) が認められた。また、両種の細胞長が重複する範囲の細胞長・細胞幅比の分布は近似する傾向にあった。いっぽう、吉松・小野 (1984)⁶⁾ の結果からも*C.antiqua*の細胞長と細胞長・細胞幅比の間にも統計的に有意な ($P < 0.001$) 強い相関関係 ($r = 0.749$) が認められ、また*C.marina*の細胞長と細胞長・細胞幅比の間にも統計的に有意な ($P < 0.001$) 相関関係 ($r = 0.558$) が認められた。

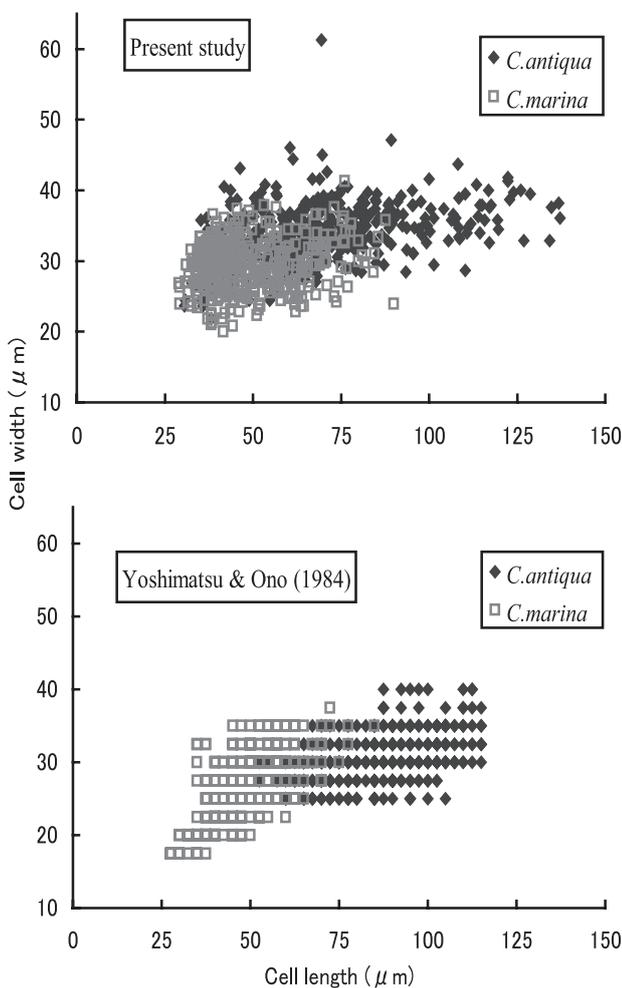


Fig.2 The relationship between cell length and cell width of *Chattonella antiqua* and *Chattonella marina* in the present study (upper) and Yoshimatsu & Ono(1984)(lower). 400 cells of both species were measured, respectively.

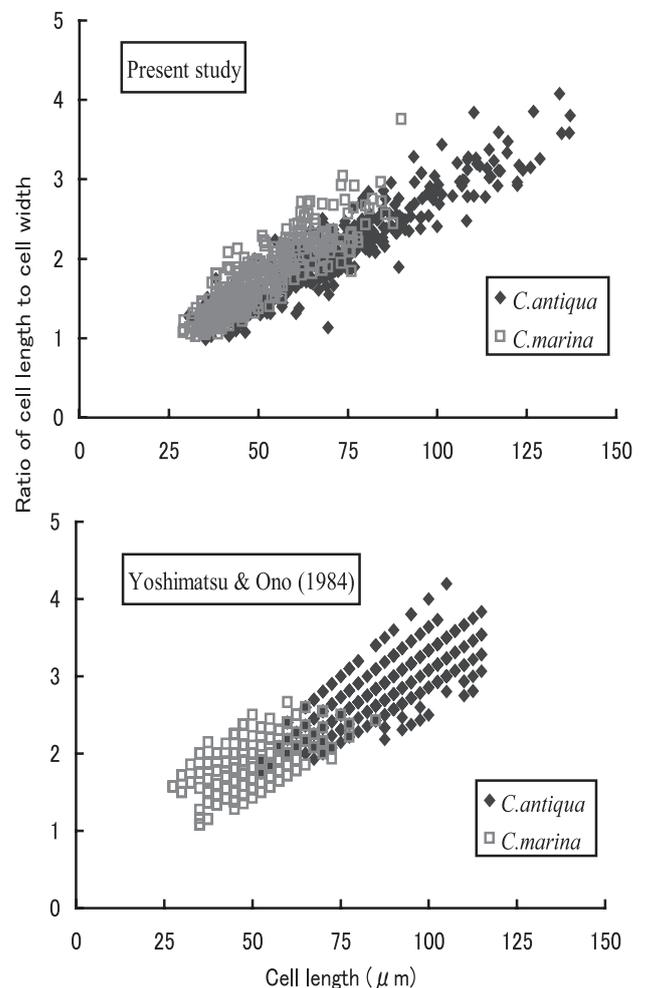


Fig.3 The relationship between cell length and ratio of cell length to cell width of *Chattonella antiqua* and *Chattonella marina* in the present study (upper) and Yoshimatsu & Ono (1984) (lower). 400 cells of both species were measured, respectively.

考 察

*Chattonella*は外部刺激等により容易に形態を変えることが知られ,⁹⁾ 特に*C. antiqua*は尾部の伸長部分が消失しやすく,⁶⁾ また定常期の後期から死滅期に至ると様々な異常形態が普通にみられるようになる。¹⁰⁾ このような原形質膜の変形を抑えるために、本研究では吉松・小野 (1984)⁶⁾ と同様に、供試株は増殖状態のよい系のみを用い、形態変化の少ない対数増殖期での個体を測定した。また、ESM培養液を用いたため天然海水や土壌抽出液の化学組成は24年前と全く同様であるとはいえないが、*Chattonella*の増殖生理¹¹⁾に影響を及ぼすような低塩分や低栄養塩になることはない。したがって、本研究と吉松・小野 (1984)⁶⁾ との結果の違いは、20年以上の長期培養による影響が最も大きいと考えられた。

今回、形態の指標として細胞長を細胞幅で除した細胞長・細胞幅比を用い、*C. antiqua*と*C. marina*の細胞長と細胞長・細胞幅比の間には有意な正の相関関係が認められた。*C. antiqua*の回帰直線の傾きの方が*C. marina*の傾きより高くなると期待されたが、両種の回帰直線の傾きは近似しており、*C. antiqua*の尾部の伸長の度合を示す指標として細胞長・細胞幅比は十分とはいえなかった。今後の課題として、両種の形態を表すより優れた指標を用いるため、他の測定部位、例えば細胞幅から尾部先端までの長さの2分の1の地点での細胞幅や尾部先端の尖りの有無等について検討する必要がある。

24年前に行われた吉松・小野 (1984)⁶⁾ の結果と比較して、*C. antiqua*の細胞長は19.6%短くなり、細胞幅は10.5%広くなり、細胞長・細胞幅比は27.7%低くなったことから、長期培養の期間中に小型化し丸みを帯び尾部の伸長が鈍化したと考えられ、特に細胞長のばらつきは大きくなる傾向が認められた。いっぽう*C. marina*の細胞幅は10.1%広くなり、細胞長・細胞幅比は9.7%低くなったことから、長期培養の期間中に丸みを帯び尾部の伸長はより鈍化するものと考えられたが、*C. antiqua*ほどばらつきの幅は大きくなかった。このような結果になった原因は明らかではないが、培養液中には含まれない微量な物質の影響や、シスト形成を経ない無性的2分裂による増殖¹²⁾の影響があったのかもしれない。

*C. antiqua*と*C. marina*を種単位で比較すると、吉松・小野 (1984)⁶⁾ の測定結果より本研究の方が細胞長の重複範囲が広がっているものの、*C. antiqua*の方が*C. marina*より細胞長、細胞幅ともに有意に長く ($P < 0.01$)、細胞長・細胞幅比も有意に高く ($P < 0.01$)、サイズ・形態ともに両者の区別が可能であっ

た。したがって、20年以上培養を継続しても種としての特徴を保持していたことが明らかになり、例えば細胞のサイズ・形態の比較の研究に長期培養株を用いても問題はないと考えられた。このように長期培養を施してもその形態に大きな変動は生じないということは、本研究によって得られた新しい知見である。今後、様々な年代に分離された培養株の塩基配列を解析し、遺伝子の変異も起きていないということを確認できれば、培養株の研究材料としての価値をさらに高めることができるだろう。ただ20年ないし30年という培養期間、言い換えると月1回の植え継ぎとして240回から360回の植え継ぎ回数が、生物にとって長いのか短いのかは不明である。今回と同様の実験を50年後、100年後に行うのもまた興味深い。

謝 辞

本研究をとりまとめるにあたり、香川県赤潮研究所顧問 岡市友利博士、小野知足博士には本文の校閲を賜り、また*Chattonella*の培養株を提供して頂いた。独立行政法人水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所 坂本節子博士、独立行政法人水産総合研究センター東北区水産研究所 神山孝史博士には、細胞のサイズの測定方法に関する助言を頂いた。また、高山晴義博士 (元広島水試)、鳥海三郎博士 (元横浜東高)、井上晃男博士 (元鹿児島大)、荒巻孝行氏 (元鹿児島水試)、矢持進博士 (大阪市立大)には、*Chattonella*の培養株を分与して頂いた。そして、香川県赤潮研究所 本田恵二主席研究員には貴重な意見を頂いた。ここに記して厚く御礼申し上げる。

引用文献

- 1) 香川県赤潮研究所：2006，平成16年度香川県赤潮研究所年報．24p.
- 2) Hada, Y. : 1974, The flagellata examined from polluted water of the Inland Sea, Setonaikai. *Bull. Plankton Soc. Japan*, **20**, 112-125.
- 3) Ono, C. & Takano, H. : 1980, *Chattonella antiqua* (Hada) comb. nov., and Its Occurrence on the Japanese Coast. *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.*, **102**, 93-100.
- 4) Subrahmanyam, R. : 1954, On the life-history and ecology of *Hornellia marina* gen. et sp. nov., (Chloromonadineae), causing green discoloration of the sea and mortality among marine organisms of the Malabar Coast. *Indian J. Fish.*, **1**, 182-203.
- 5) 原 慶明・千原光雄：1982，日本産ラフィド藻シ

チャットネラ (*Chattonella*) の微細構造と分類.

Jap. J. Phycol., **30**, 47-56.

- 6) 吉松定昭・小野知足：1984, *Chattonella antiqua* (Hada) Ono と *Chattonella marina* (Subrahmanyam) Hara et Chihara の大きさ, 形態による区分. 昭和57年度赤潮予察調査報告書 (香川県), 5-12.
- 7) 国立環境研究所：2004, NIES-Collection. List of Strains Seventh Edition Microalgae and Protozoa 2004. 国立環境研究所研究報告, **182**, 54.
- 8) 吉松定昭：1987, 生体標本観察のための游泳運動停止法. 赤潮生物研究指針, 日本水産資源保護協会編, 秀和, 東京, pp. 187-191.
- 9) 高山晴義：1983, 広島県沿岸に出現する赤潮生物 - I. *Chattonella antiqua* (Hada) Ono と *Chattonella marina* (Subrahmanyam) Hara et Chihara. 広水試研報, **13**, 59-64.
- 10) 結城勝久・小野知足：1980, 海産鞭毛藻類のクローン培養中に見られる形態変異. 香水試報, **17**, 1-21.
- 11) 山口峰生：2000, 赤潮原因プランクトンの増殖生理. 海洋植物プランクトンⅡ - その分類・生理・生態 -. 月刊海洋, 号外21, 107-115.
- 12) 今井一郎：2000, ラフィド藻類における分類と同定の問題点 - 生態研究の立場から -. 日本プランクトン学会報, **47**, 55-64.