

有機スズ障害ユーグレナ細胞の機能回復に及ぼす高電圧静電場負荷水の効果

鈴木 鐵也¹⁾, 福永 健治¹⁾, 高間 浩蔵¹⁾,
岡村 睦雄²⁾, 大野 惇吉²⁾, 田中 達郎³⁾

¹⁾北海道大学水産学部食品化学第二講座*, ²⁾京都大学化学研究所有機単位反応研究部門**,
³⁾日本食品開発研究所***)

EFFECT OF HIGH VOLTAGE ELECTROSTATIC FIELD LOADED WATER ON THE EXCLUSION OF ORGANOTIN AND RESTORATION OF CELL MORPHOLOGY AND MOTILITY OF *Euglena Gracilis*

Tetsuya SUZUKI¹⁾, Kenji FUKUNAGA¹⁾, Kozo TAKAMA¹⁾,
Mutsuo OKAMURA²⁾, Atsuyoshi OHONO²⁾, and Tatsuro TANAKA³⁾

¹⁾Laboratory of Food Hygiene, Department of Food Science & Technology, Faculty of Fisheries,
Hokkaido University, Hakodate 041, Japan; ²⁾Institute for Chemical Research,
Kyoto University, Uji, 611, Japan; ³⁾Food Research and Development Inc., Kyoto, 613, Japan

A countermeasure to treat pollution of marine environment is to exclude harmful substance(s) from the body of intoxicated organism. In the present study, we used *Euglena gracilis* Z as a model organism to estimate effect of pretreatment on the restoration of once impaired cells by tributyltin chloride (TBTCI) intoxication. Exposing *Euglena* cells to TBTCI, the cells changed their shape into cyst form, and became almost inactive in a few minutes. When TBTCI-intoxicated *Euglena* cell was transferred into organotin free medium, TBTCI content in the cell decreased. However, cells neither regained motility nor returned cell shape to normal. On the other hand, when the intoxicated cells were incubated in water that was prepared by loading high voltage condenser electric potential, the cells regained motility, and the shape returned to normal by excluding tin prior to regaining motility. The present preliminary study gives an interesting hint on how to exclude toxic substance from intoxicated cells and restore once intoxicated cells to health.

*所在地：函館市港町3-1-1 (〒041)

**所在地：宇治市五ヶ庄官有地 (〒611)

***所在地：京都市東山区一の橋宮の内町29 (〒605)

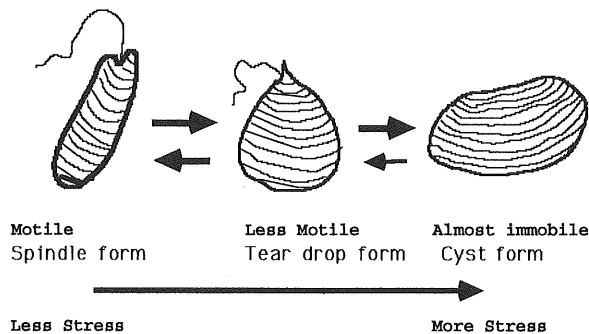
有機スズ化合物は船底塗料や漁網に防藻剤として用いられていたが、水圏生物にたいする影響が指摘され、現在では製造も使用も禁止あるいは規制されている。それにもかかわらず、水圏とくに表日本の内湾部での汚染が続いており、魚介類に対しての障害が現実のものとなりつつある^{1,2)}。また、食物連鎖により淡水産養殖魚からも有機スズ化合物が検出されている²⁻⁴⁾。いうまでもなく公害解決の最善の方法は原因物質の完全除去だが、実際にはそれは困難な場合が多い。次善の策は食物連鎖を遮断し、さらには公害物質で汚染を受けている生物から汚染物質を速やかに無毒化し、排出させてしまうことであろう。本研究は、公害物質により障害を受けた生物から速やかに公害物質を排出させ、生物機能を回復することを目的とするものである。筆者らは、最近注目を集めている生体機能に対する微弱エネルギーの効果⁵⁻⁷⁾が上記の目的に有効であるかどうかを水棲生物のモデルとしてユーグレナを用い、高電圧静電場負荷した水の効果について検討した。その結果、高電圧静電場負荷水が障害を受けたユーグレナの機能回復に興味深い効果を示した。

実験方法

実験に用いたモデル生物は淡水産プランクトンの一種ユーグレナである。ユーグレナ細胞は通常環境下では紡錘形で回転運動しながら前進・後退するが、物理的および化学物質などによるストレスにより鞭毛を切り離し、涙滴形を経て球形（シスト）となり、運動能を喪失する⁸⁾。有機スズの毒性発現とその回復実験にこの生物を選んだのは、被験物質 Tributyltin chloride (TBTCI) と 10^{-4} ~ 10^{-6} Mでの接触により速やかにその細胞形態を紡錘形→涙滴形→球形（シスト）へと可逆的に変化させること (Fig. 1)、さらにその変化がTBTCI濃度に比例するからである (Fig. 2)。

Protozoan flagellate, *Euglena gracilis* Z grown under light was used as a model organism.

Q: HOW DOES EUGLENA RESPOND TO UNFAVORABLE ENVIRONMENT?



In the present study *Euglena gracilis* Z was grown in glucose-ammonium sulfate medium (pH 3.5) under light.

Fig. 1. Typical morphological change of *Euglena gracilis* to stress

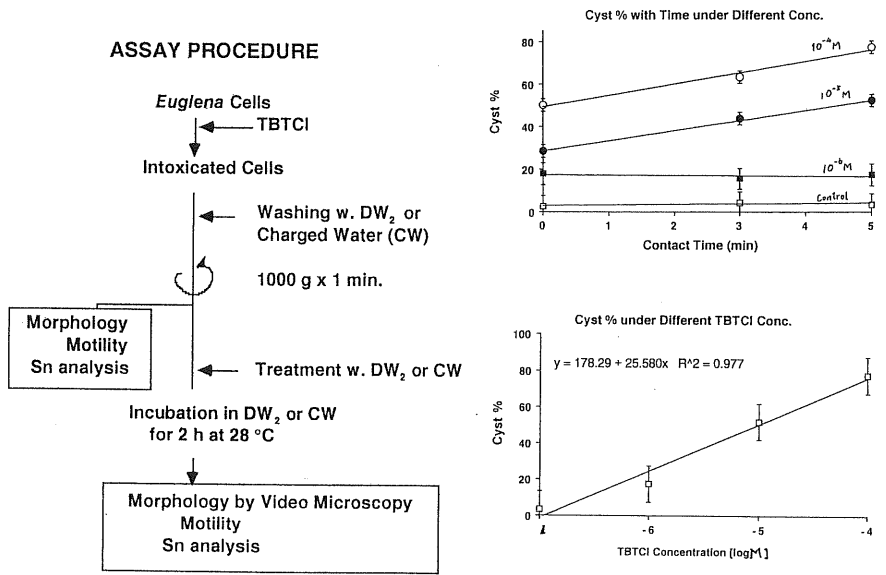


Fig. 2. Outline of toxicity assay procedure and confirmation of TBTCI concentration dependency on trans-formation of the cell

Euglena gracilis Z をグルコース・硫酸アンモニウム培地 (pH 3.5) に12時間間隔で照射下 (3700 lux) 培養し、定常期初期にある細胞を実験に用いた。細胞に対する障害発現ならびに回復実験の概要を Fig. 2 に示したが、詳細は別報を参照されたい⁹⁾。10⁻⁴~10⁻⁶M 濃度の TBTCI に短時間接触させて細胞機能に障害を発現させ、すなわち細胞形態をシスト化させた後、低速での遠心分離により細胞を数回洗浄し TBTCI を含まない培地に移し28℃で数時間保温し、細胞形態・運動能の回復の有無をビデオ顕微鏡法 (ARGUS-100 生物顕微鏡画像解析システム：浜松ホトニクス社製) により調べた。また、高電圧静電場発生装置を用いて高電圧電場環境下 (12 kV, 70 h) に置いて電場負荷処理を施した蒸留水で調製した TBTCI 不含培地についても同様の観察を行った。

細胞内のスズ含量の分析は湿式灰化後、フレームレス原子吸光法により調べた。また、高電圧電場処理水中のミネラル含量分析にはフレームレス原子吸光分析ならびに ICP 法を用いた。

高電圧電場処理水のマイクロクラスター分析には¹⁷O-NMR 法を用いた。細胞の形態観察には微分干渉顕微鏡、位相差顕微鏡画像をコンピュータ画像処理する方法の他に、走査型電子顕微鏡観察法を用いた。

運動能の回復の有無はビデオ画面中の一定体積当りのシスト細胞の占める割合並びに画面中の運動能を有する細胞の数の増減を TBTCI と接触させ、細胞を洗浄、新たな培地での保温を開始した時間を 0 時間とし、経時変化を比較して判定した。

実験結果並びに考察

TBTCI による細胞障害を発現後に異なる条件下で保温培養した実験系を Table 1 に示した。すなわち、重力ストレスによる形態変化の回復を調べるために、1) TBTCI との接触なしで培養したもの、2) TBTCI 接触後ただの蒸留水中で保温したもの (TBT/DW)、3) TBTCI 接触後高電圧電場負荷を白炭

Table 1.

**EXPERIMENT TO COMPARE
MORPHOLOGY RESTORATION & MOTILITY RECOVERY
UNDER DIFFERENT CONDITIONS**

SYSTEMS EXAMINED	Abbr.
1) w/o TBT Contact	Control
2) TBT Contact ➔ Incubation w. Dist. Water	TBT/DW
3) TBT Contact ➔ High Voltage Pulse Charged Water w. Charcoal	TBT/CDW-CC
4) TBT Contact ➔ H.V.D. Charged Water w/o Charcoal	TBT/CDW
5) TBT Contact ➔ H.V.P. Charged Water w. Activated Carbon	TBT/CDW-AC
6) TBT Contact ➔ H.V.P. Charged Water w. Charcoal Ash	TBT/CDW-ASH
7) TBT Contact ➔ Water w. Charcoal, but w/o H.V.P.	TBT/DW-CC
8) TBT Contact ➔ Water w. Charcoal Ash, but w/o H.V.P.	TBT/DW-ASH

H.V.P.: High Voltage Pulse; w/o:without.

浸漬下で行った水を加えて保温したもの (TBT/CDW-CC), 以下同様に, 4) 白炭非浸漬下蒸留水に電場処理した水を用いたもの (TBT/CDW), 5) 白炭の代わりに活性炭を用いた水 (TBT/CDW-AC), 6) 同質量の白炭を灰化したものを蒸留水に加えた後電場処理した水を用いたもの (TBT/CDW-ASH), 7) 白炭を浸漬したが電場負荷を行っていない水を用いたもの (TBT/DW-CC), 8) 同じく白炭の灰化物を加えただけの水 (TBT/DW-ASH) について細胞の形態と運動性回復を調べた。その結果, Fig. 3 に示すように TBTCI に接触直後にはいずれもシスト化している。しかし, 培養開始 2 時間後に比較すると, 電場負荷水中で保温培養した細胞では蒸留水のそれに比べて明らかに運動性の回復が認められる。中でも, TBT/CDW-CC に顕著なシスト細胞の減少, すなわち運動性の回復が認められ, その回復率は TBTCI 処理を行っていない細胞よりも高かった。2 時間後で比較するにせよ, 白炭浸漬の有無が細胞の形態と運動性回復に何等かの重要な役割を担っていることをうかがわせた。しかし, 電場を負荷しない白炭およびその灰化物浸漬水では, シスト化細胞の回復に全く効果を示さなかった。

TBTCI/DW と TBTCI/CDW-CC での細胞外へのスズの排出を比較したところ, 電場負荷水中にて保温した細胞では速やかにスズが排出され運動性も回復した (Fig. 4)。走査電子顕微鏡による観察でもシスト細胞から鞭毛を復活した紡錘形細胞に復帰していることが確認された。蒸留水中にて保温した細胞でもスズの排出が認められたが, 運動性の回復はなく走査電子顕微鏡による観察でも細胞はシスト形のままであった。スズの排出はおそらく細胞からの漏出によるものと考えられる。形態および運動性回復効果は, 白炭浸漬下電場負荷を行った水において顕著であることが明らかになった。その効果は予備実験において検討した水道水の方が蒸留水を用いた場合よりも大きかった。電場を負荷した水道水に含まれる元素を電場負荷を行わない水と ICP により比較したところ, 電場負荷のそれでは Fe 含量が著し

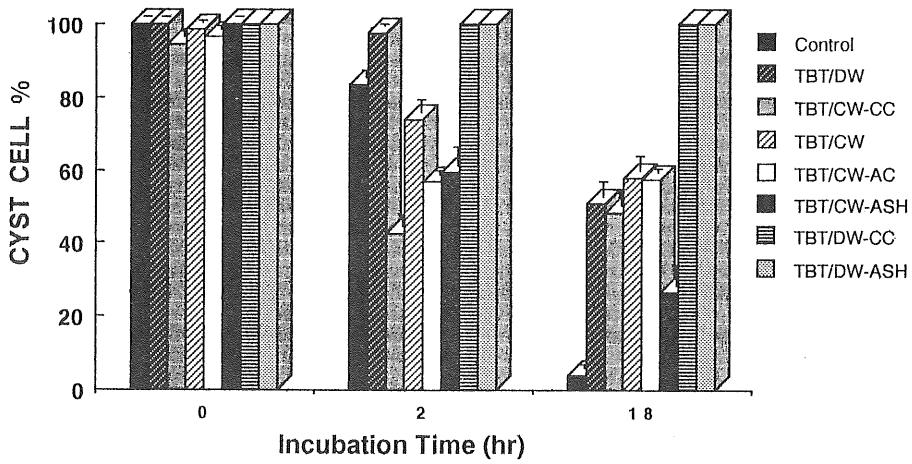
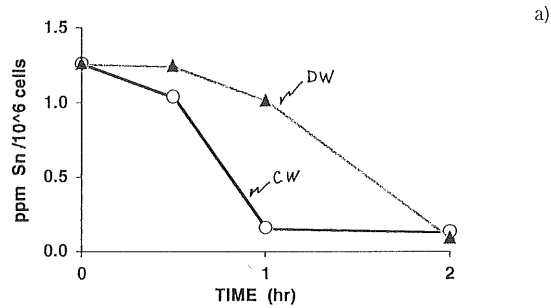
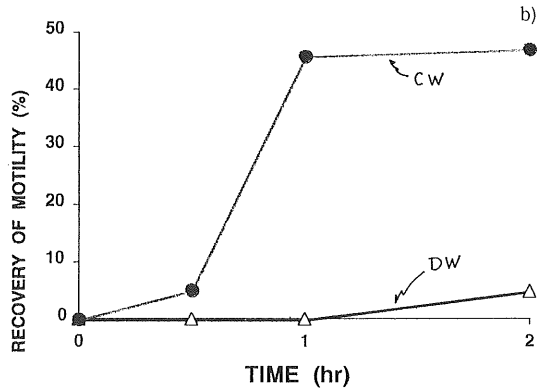


Fig. 3. Recovery of cell motility after exposing 0.5 mM TBTCI for 5 min



Exclusion of Tin from TBTCI-intoxicated Cells by Incubation with Distilled Water (DW) or Electrostatic Field Treated Water (CW)



Recovery of motility from TBTCI damaged Cells by Distilled Water (DW) or Electrostatic Field Treated Water (CW)

Fig. 4. Exclusion of tin from TBTCI-intoxicated cells by incubation with distilled water (DW) or electrostatic field treated water (CW) [Fig. 4a]

Recovery of motility from TBTCI damaged cells by distilled water (DW) or electrostatic field treated water (CW) [Fig. 4b]

く減少し、逆に Mn 含量が増加していた。しかし、蒸留水を用いた場合にはその様な結果は得られなかった。白炭および白炭灰化物を浸漬させた水に電場負荷した水では Ca, Mg, Fe 含量が他の水よりも多い傾向を示したが、元素の多寡が形態・運動性の回復に直接かかわっているとは考えにくい。

一方、水のマイクロクラスターの関与を¹⁷O-NMR法で比較したところ、電場負荷により水のスピン-格子緩和時間 (T₂) は明らかに変化するが、必ずしもクラスターが縮小することを示すものではなかった (Fig. 5)。

その効果発現のメカニズムに関しては未だ明らかではないが、形態の復元、運動性の回復には微量元素と高電圧電場負荷の両方、さらには、これに加えて何等かの要因が関与していることが考えられる。

謝 辞

本研究の実施にあたり *Euglena gracilis* Z を御供与いただいた大阪府立大学農学部中野長久教授にお礼申し上げます。また、高電圧電場負荷装置の使用に関して格別なご指導と御便宜をいただいた日本セルフーズ研究所赤沢徹氏に深謝いたします。さらに ICP 分析をいただいた日立計測サービスに感謝いたします。

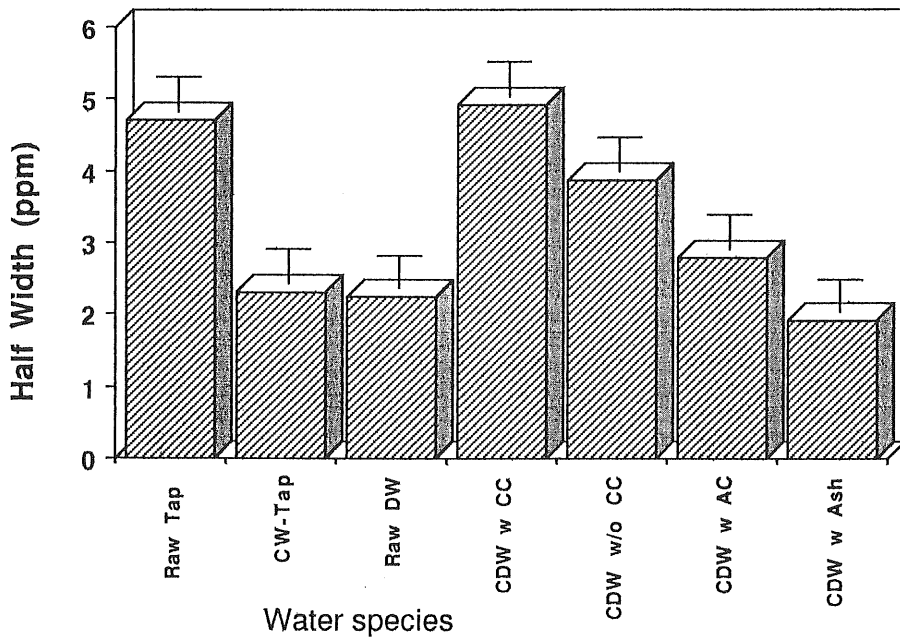


Fig. 5: Half widths of ¹⁷O of water species treated with high voltage electrostatic field under different conditions.

Raw Tap, tap water without any treatment; CW-Tap, high voltage electrostatic field pulse charged tap water; Raw DW, distilled water without treatment; CDW w CC, charged distilled water with charcoal; CDW w/o CC, charged distilled water without charcoal; CDW w AC, charged distilled water with activated carbon; CDW w Ash, charged distilled water with ash of equivalent weight of burnt charcoal.

文 献

- 1) 今枝一男, 大沢敬子, 内山一美 (1991) ぶんせき (2月号) : 131~133.
- 2) 日本水産学会シンポジウム委員会:有機スズ化合物による海洋汚染と水生生物への影響 (1992)
日本水産学会平成4年度春季大会講演要旨集:412~421.
- 3) 飯島正雄, 星野庸二, 能勢憲英, 衛生化学 37(4) : 296~299.
- 4) MÜLLER, M.D. (1987) Anal. Chem. 59 : 617~623.
- 5) 岩元陸夫 (1991) 食品と開発 26(7) : 2~12.
- 6) 松岡孝尚, 岩元陸夫 (1991) 日本食品工業学会誌 38 : 422~424.
- 7) 渡辺清紀 (1991) 食品と開発 26(7) : 14~20.
- 8) BOVEE, E.C. (1982) Biology of Euglena (ed. by D.E. Buetow) 143~168. New York : Academic Press.
- 9) SUZUKI, T., N., TAKAHASHI, K., FUKUNAGA, M., OKAMURA, T., TANAKA, and K. TAKAMA, (1993) Environ. Toxicol. Water Quality in press.