

内分泌性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

石井 洋*1・齋藤 寛*1・秋山信彦*2・小林幸夫*1

Effects of endocrine disrupter chemicals bisphenol A and *p*-nonylphenol on marine microalga *Nannochloropsis oculata* ST-3

Hiroshi ISHII, Hiroshi SAITO, Nobuhiko AKIYAMA and Yukio KOBAYASHI

Abstract

In aquaculture food chains, marine microalga *Nannochloropsis oculata* is used as a primary productivity. Industrial pollution of endocrine disrupter chemicals (EDs) has recently broken out in the coastal aquaculture. Effects of EDs on marine microalga *N. oculata* ST-3 strain were investigated with bisphenol A (BPA) and *p*-nonylphenol (*p*-NP). The concentration of BPA and *p*-NP in the algal culture was controlled at 1 (or 1.5), 3, 6, 9 and 18ppm for examining growth curve of ST-3 strain. The growth of ST-3 strain was not affected by both EDs up to the doses of 3ppm, but it was at the concentration of BPA and *p*-NP in the range of 6-18 ppm. Furthermore, the cultures of ST-3 strain, contaminated by each EDs at 3ppm, were compared with the culture at 0ppm on different temperature conditions; 20°C and 30°C. These growth rates at 30°C in the presence of 3ppm EDs were significantly higher than those of 20°C. At the stationary phase, the distribution of intra- and extra-cellular EDs was investigated under two different temperatures (20°C and 30°C). The intracellular BPA increased with the decrease in extracellular BPA from 0.0131 to 0.0955 ppm at 20°C. It showed 7.3 times higher than that at time zero. Therefore, ST-3 strain might have bioaccumulated at the low concentration of BPA.

1. はじめに

海産性の微細藻類 *Nannochloropsis oculata* (*N. oculata*) は真正眼点藻の1種に属し、今までに栄養細胞の形態から2種に分類されている (HIBBERD, 1981)。 *N. oculata* は以前、緑藻に分類され、頻繁に海産クロレラと呼ばれていた。しかし、現在は微細構造や光合成色素 (主にクロロフィルaと数種類のカロテノイドを持ち、クロロフィルbとcは見られない) の組成から真正眼点植物に分類されている。 *N. oculata* は海洋のプランクトンとして広く分布しており、日本国内においても沿岸海域に生息し、富栄養化した海域で大発生する。

この *Nannochloropsis* は水産養殖の食物連鎖におけるもっとも底辺に位置する植物プランクトンの一種として広く養殖業界で利用されている。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餌料として *N. oculata* が頻繁に利用されている。またこの *N. oculata* は他の微生

物 (菌類, 細菌類) と比較して独立栄養的な生産により、我われ人間の健康維持に効果的なエイコサペンタエン酸 (EPA; 20:5n-3) などの不飽和脂肪酸を大量に生産する (ZITTELLI *et al.*, 1999)。細胞内の脂肪酸含量は、約30%、その内の約35%の割合が EPA であると言われている。したがって、EPA などの高度不飽和脂肪酸は餌料として重要視されている。

近年、環境中に放出した難分解性または非分解性の化学物質の残留による海洋汚染が問題になっている。その中でも生体内のホルモン様に作用する内分泌性攪乱化学物質 (環境ホルモン) による生物への影響が深刻化している。我が国の水産養殖業界においてもこれら内分泌性攪乱化学物質による海産魚の暴露の危険性を認識することが必要である。それら難分解性の内分泌性攪乱化学物質は、毒性が強く生体内に容易に進入し、長期間留まる性質がある。特に食物連鎖の上位に位置する海産哺乳類のイルカやアザラシなどの肝臓または皮下脂肪中には内分泌性攪乱化学物質が高濃度となって蓄積している (TANABE *et al.*, 1994)。内分泌性攪乱化学物質は

2003年10月1日受理

*1 東海大学海洋学部清水教養教育センター

*2 東海大学海洋学部水産学科

海産哺乳動物の個体数減少，内分泌系の疾病，免疫機能の失調や腫瘍などの異常に関与していることが示唆されている。汚染海域から離れたところに生息する海産哺乳動物の内分泌性攪乱化学物質の曝露経路は，捕食する魚介類が原因であることが分かっている。このような食物連鎖の上位には海産哺乳類に限らず，陸上動物さらには人間にも曝露する危険性が十分に考えられる。近年，我々の食卓に上がる魚介類のほとんどが養殖ものである。内分泌性攪乱化学物質が養殖魚介類に曝露していることは予想される。

そのような状況下で餌料価値がある微細藻類の内分泌性攪乱化学物質による濃縮または吸着に関する研究は，頻繁に報告されるようになった。例えば *Nannochloropsis* や *Isochrysis* の polychlorinated biphenyls (PCB) の取り込み (WANG *et al.*, 1998), *Nannochloropsis* や *Dunaliella* による直鎖型 alkylbenzene sulfonate (LAS) の濃縮 (SAEZ *et al.*, 2001) に関する研究報告がある。そこで本研究では第一次生産者である微細藻類 *N. oculata* を実験材料とし，内分泌性攪乱化学物質の影響について検討する。内分泌性攪乱化学物質の中でもビスフェノール A (BPA) と *p*-ノニルフェノール (*p*-NP) は河川や下水道などの汚水から高濃度で検出されており，海洋汚染さらには沿岸域の養殖施設への被害が懸念されるため，BPA と *p*-NP が，*Nannochloropsis oculata* ST-3 株の増殖にどのような影響を与え，濃縮されて行くのかを明らかにする。

2. 実験材料と方法

2-1 実験材料と純粋培養

本研究では海産性真正眼点藻 *N. oculata* 株を実験材料とし，培地は 0.368g CaCl₂ · 2H₂O, 0.70g KCl, 8.00g MgSO₄ · 7H₂O, 24.0g NaCl, 0.10g NaNO₃, Na₂HPO₄ · 12H₂O, 0.181g Na₂EDTA, 0.50g Clewat32, 1.0 mL 混合ビタミン (0.20mg ビタミン B12, 1.00mg ビオチン, 100mg 塩酸チアミン以上を 1L の蒸留水に溶解) の以上の成分を 999mL の蒸留水に溶解したものを使用した (以後 TN 培地とする)。

まず本研究の実験材料である *N. oculata* 株の純粋培養の確立を行なった。TN 培地に *N. oculata* 株を接種し，振とう機 (NR-3, TAITEC) により培養し，増殖が確認された細胞懸濁液を 100 μ L 採取し 900 μ L の TN 培地が入ったエッペンドルフチューブに注入し，よく攪拌した。この 1/10 倍に希釈された細胞懸濁液 100 μ L を別の TN 培地 900 μ L に添加し，1/100 倍に希釈した。このように段階希釈法により 10-8 倍希釈まで行い，それぞれ段階希釈した細胞懸濁液を 100 μ L 採取し，TN 寒天培地にターンテーブルとコンラージ棒により塗布した。その後，インキュベーター (培養温度 25°C, 2000lux 連続照射, CF-305, TOMY) 内で静置培養した。*N. oculata* 株のコロニーが形成したのち，単一コロニーを TN 寒天培地に接種した。本研究ではこの単離した *N. oculata* 株を菌株 ST-3 とし，実験に使用した。

尚，本研究で用いた全ての器具と培地はあらかじめ乾熱滅

菌器 (170°C, 150分間, WFO-600SP, 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。これら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 菌株 ST-3 の継代培養

TN 培地に寒天を添加し (1% (w/v)), オートクレーブにて滅菌した後，滅菌シャーレ (SH90-15E, IWAKI) 内で固化した平面培地，または，直径 16.5mm のネジ蓋式試験管に作成した斜面培地に菌株 ST-3 を代用白金耳で塗布し，インキュベーター内に静置し，連続照射下で数週間培養した。実験には，平面培地または斜面培地で培養した菌株 ST-3 を約 40mL の TN 培地に代用白金耳を用いて浮遊させ，振とう培養を行ったものを用いた。

2-3 細胞数と細胞懸濁液の濁度の測定

本研究で用いた菌株 ST-3 の細胞数と細胞懸濁液の濁度との相関を調べた。あらかじめ TN 培地で振とう培養した菌株 ST-3 の細胞懸濁液約 200mL を 2L 三角フラスコに入れ，TN 培地 1800ml を加えた。そ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) 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。細胞懸濁液の採取に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た。培養は，温度調節器 (SEAPALEX1020, NISSO) によって 25°C に保った水槽内で行い，太陽光による光照射を行なった。通気はミリポアフィルター (0.45 μ m) を用いて無菌的に行なった。細胞数の測定は血球計算盤 (THOMA, NITIRIN) を用い，位相差顕微鏡 (KC, OLYMPUS) 下で計数した後，細胞懸濁液 1ml 中の細胞数に換算した。細胞懸濁液の濁度は分光光度計 (U-3210, HITACHI) を用い，波長 720nm における吸光度 (A720) を測定し細胞濁度とした。

2-4 通気培養と試料の採取

あらかじめ通気培養によって培養した菌株 ST-3 の細胞懸濁液を平底丸フラスコ (容量 500mL 又は，1L) に適量移し，濁度 A720 の値が約 0.04 (2.3 \times 10⁶個) になるように約 10~20 倍の TN 培地で希釈した。温度は水槽 (60 \times 36 \times 30cm) 中に投げ込みヒーター (100W, KONISHI) と温度調節器により 20°C (または 30°C) に保ち，通気培養を行なった。尚，通気と細胞の採取は 2-3 と同様の方法で行った。採取した細胞懸濁液は濁度の測定に使用した。

2-5 BPA と *p*-NP の菌株 ST-3 株の増殖に与える影響

TN 培地中の BPA と *p*-NP が細胞増殖に与える影響について検討した。あらかじめ TN 培地で培養した菌株 ST-3 を遠心機 (MX160, TOMY) により集菌 (4960 \times g, 10分間, 25°C) し，細胞数が約 2.3 \times 10⁶個になるように，0~18ppm-BPA (または *p*-NP) 添加済み TN 培地を加えた。培養お

よび細胞の採取方法は2-4と同様の方法で行なった。ただし、培養温度は25°Cに調節した。

2-6 BPA と *p*-NP の存在下における菌株 ST-3 の増殖と細胞内外の BPA と *p*-NP の抽出

菌株 ST-3 は前培養により対数増殖期後期に達した細胞を使用し、3Lの平底フラスコに BPA と *p*-NP の最終濃度が 3ppm になるように調製した TN 培地と細胞懸濁液を合計 2.5L になるように添加した。2-4 と同様の条件で培養を行ない、細胞数の測定を行なった。BPA と *p*-NP の抽出のために細胞懸濁液採取用のステンレスチューブに取り付けたシリコンチューブからシリンジ (50mL 用) を使用し、培養日数 25-27 日目の細胞増殖末期または、定常期に入った菌株 ST-3 の 500mL の細胞懸濁液を採取した。その懸濁液を GF/C ガラスマイクロファイバーフィルター (ϕ 47mm, Whatman, England (以後 GF/C)) でろ過し、細胞と培養液を分離した。細胞は GF/C と共にデシケーター (Sanplatec Co., 東京) 内で乾燥させたのち、乾燥細胞を含む GF/C を 90% (v/v) メタノール (MeOH) に懸濁し、攪拌子を使って 1 時間、室温で攪拌し、抽出液を GF/C を用いて吸引ろ過し、ろ液を回収した。ろ液はロータリーエバポレーター (設定温度 40°C) によって濃縮した。それら濃縮した試料はジエチルエーテルと蒸留水を 1:1 の割合でスキープ型分液漏斗内にて 2 層分配法により分取した。ジエチルエーテル層を回収し、濃縮乾固した。その試料を 100mL の 10% MeOH に溶解し、超音波破碎機 (出力 45W, 約 5 分) を用いて懸濁した後、あらかじめ MeOH と蒸留水で平衡化した Sep-Pak C18 カートリッジ (2g/12cc, WATERS) に通して試料を吸着させた。そのカートリッジに蒸留水、10, 20, 30% MeOH を連続的に通して洗い流した後に 40mL の MeOH によって溶出し、ロータリーエバポレーターで濃縮した。その試料を 1-2 mL の MeOH に超音波破碎機を用いて懸濁し、その 1 mL を遠心チューブに取り遠心 (13750×g, 10分間, 4°C) し、上澄み液 20 μ L を HPLC 用シリンジで採取し、HPLC で分析した。一方、細胞を除去した後の培養液は Sep-Pak C₁₈ カートリッジに通し、蒸留水、10, 20, 30% MeOH を連続的に通した後に 40mL の MeOH によって溶出した。濃縮後、細胞抽出液と同様の方法で HPLC により分析を行った。

2-7 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析

本研究において BPA と *p*-NP の同定や定量は HPLC (島津製作所) で行なった。用いた HPLC は SPD-10AV UV 検出器, LC-10AD 送液ポンプ (×2), DGU-12A デガッサー, C-R6A クロマトパックで構成されている。カラムは CAPCELL PAK C₁₈ UG120 S-5 μ m (4.6×250mm, 資生堂) を使用した。なお、カラムの温度は恒温水層により 45°C に保った。溶離液は、BPA の検出には 60% MeOH を用い、*p*-NP の検出には 100% MeOH を用いて流速 1 mL/min に設定し送液した。それぞれの検出波長は BPA の場合は 254nm, *p*-NP の場合は 277nm に設定した。

3. 結果と考察

本実験の材料である *Nannochloropsis oculata* ST-3 株は食物連鎖の下位に位置し、第一次生産者である。海産養殖における種苗生産で使用する動物プランクトンの栄養源になくなくてはならない餌料微細藻類の 1 つである。まず、単離した菌株 ST-3 の純粋培養における細胞の濁度と細胞数との関係を調べた (Fig. 1)。吸光度は光合成色素による吸収の殆どないと考えられる 720nm で測定をおこない細胞濁度とした。その結果、本株において細胞数と A₇₂₀ の間に比例関係が認められたため、細胞数の測定は濁度法で行なった (Fig. 1)。

次に、菌株 ST-3 の増殖に及ぼす BPA の影響を調べた。Fig. 2 は BPA を最終濃度が 0, 1.5, 3.0, 6.0, 9.0, 18.0 ppm になるよう調製した培地における菌株 ST-3 の増殖曲線を示し、縦軸を対数で表示した。添加しない場合 (0 ppm) と 1.5, 3.0 ppm の BPA を添加した場合の菌株 ST-3 の増殖曲線は、実験開始から吸光度が顕著に増加し、対数増殖期に入って 11 日目 (Fig. 2 の破線) まではそれら 3 つの濃度の直線の傾きに顕著な差は観察されなかった。しかし、6.0 ppm 以上の濃度で添加したときの細胞の濁度は、6.0 と 9.0 ppm で始めの 3 日間にわずかな増殖が観察されたが、それ以降は 18.0 ppm を添加した場合と同様に実験終了まで細胞の増殖は観察できなかった (Fig. 2)。これらの結果から、3.0 ppm の BPA を添加した場合と添加しなかった場合 (0 ppm) で殆ど同様の増殖が観察されたため、菌株 ST-3 の増殖には 3.0 ppm 以下の BPA では影響がないと考えられる。また、高濃度の BPA で増殖を阻害したということは、増殖にともなって BPA は細胞内に取り込まれ、直接生体内の機能に作用したと示唆された。したがって、添加濃度が増殖可能な 3.0 ppm 以下の場合、BPA が菌株 ST-3 の細胞内へ取り込まれ、蓄積する可能性が考えられる。

また、*p*-NP についても、同様に菌株 ST-3 の増殖に及ぼす影響を調べた (Fig. 3)。*p*-NP の最終濃度が 0, 1.0,

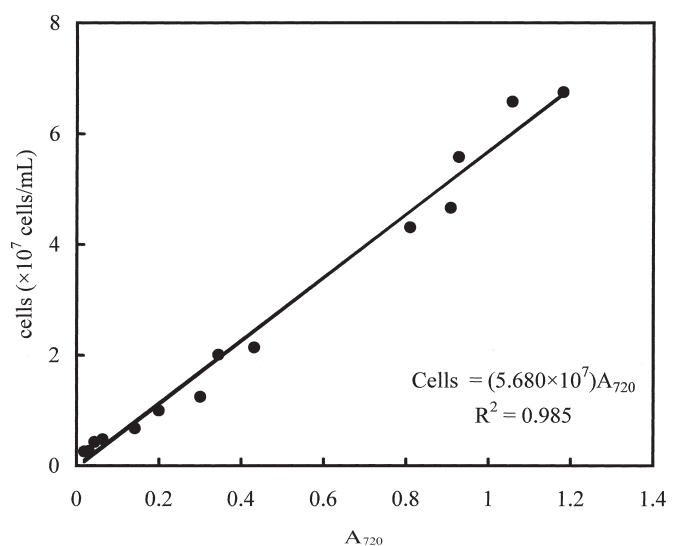


Fig. 1 Relationship between cell number of *Nannochloropsis oculata* ST-3 and absorbance at 720nm.

3.0, 6.0, 9.0, 18.0ppm になるように調製した培地によって実験を行なった。添加濃度が1.0と6.0ppmの *p*-NP では実験開始から細胞が急激に増殖し、対数増殖期が観察され、直線性は7日目まで続き、それ以降は定常期に入った。添加しない場合(0 ppm)と3.0ppmの場合では、定常期間中の吸光度が1.0と6.0ppmの場合と比較して低くなったが、Fig. 3の対数増殖期の傾きは11日目(破線)まで殆ど変わらなかった。

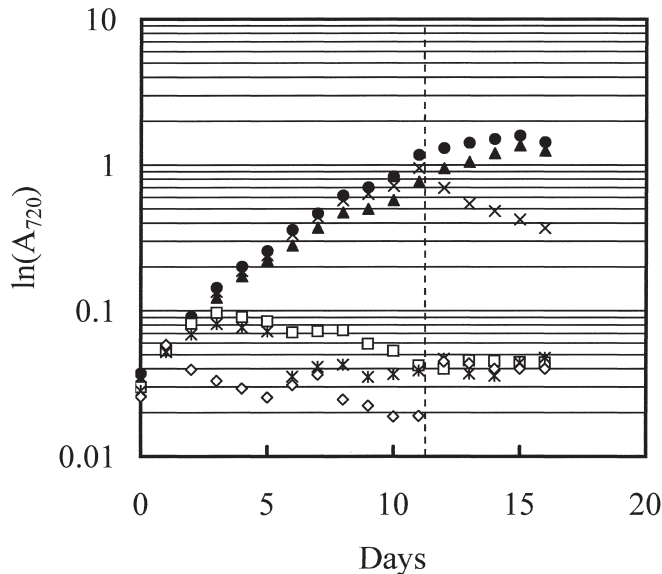


Fig. 2 Growth curves of *Nannochloropsis oculata* ST-3 exposed to bisphenol A for 16 days. Circles (●), crosses (×), triangles (▲), squares (□), asterisks (*), and diamonds (◇) represent the values in the medium with bisphenol A concentration at 0, 1.5, 3, 6, 9, 18 ppm, respectively.

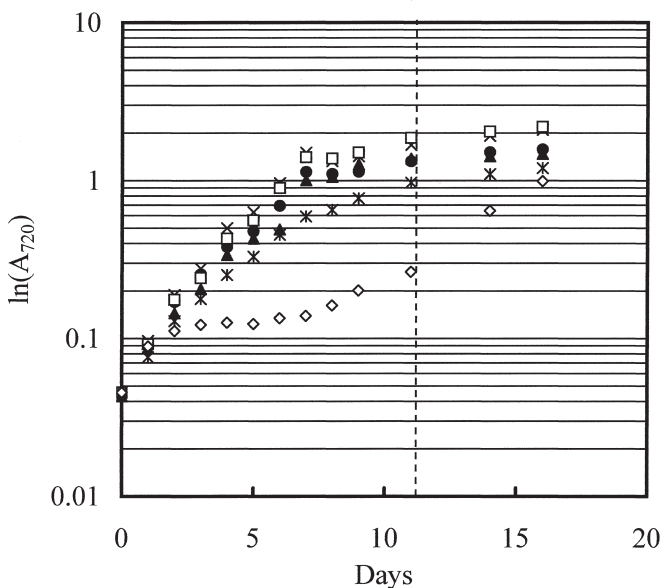


Fig. 3 Growth curves of *Nannochloropsis oculata* ST-3 exposed to *p*-nonylphenol for 16 days. Circles (●), crosses (×), triangles (▲), squares (□), asterisks (*), and diamonds (◇) represent the values in the medium with *p*-nonylphenol concentration at 0, 1, 3, 6, 9, 18 ppm, respectively.

た。しかし、18.0ppmの濃度の *p*-NP で培養したとき、明らかに実験開始から1週間は菌株 ST-3 の増殖抑制が観察され、その後8日目から徐々に細胞数が増加した。*p*-NP は、9.0ppmの濃度までほとんど細胞の増殖に影響を与えない。18.0ppmの濃度では細胞増殖を抑制しているが、BPAの6.0ppm以上の濃度の場合とは違い、完全には増殖を阻害していない。

これら2つの内分泌性攪乱化学物質は、高濃度下で菌株 ST-3 の増殖阻害を起こし、その中でも阻害効果が現れず、添加しなかったときの増殖と比較して顕著な差が観察されなかった増殖可能な濃度3.0ppmの条件で以後の実験を試みた。

本実験では最適生育温度である25°C以外(YAMAZAKI & HIRATA, 1995)の20°Cと30°Cで菌株 ST-3 の増殖を比較し、BPAと *p*-NPをそれぞれ最終濃度が3.0ppmになるように添加し、各温度における増殖に影響があるか比較した(Fig. 4と5)。まず、培養温度20°Cにおける菌株 ST-3 の増殖曲線は、実験開始直後から13日目までは急激な細胞数の増加を示し、それ以降は定常期に入り細胞数に大きな変化は観察されなかった(Fig. 4)。一方、30°Cの条件下では実験開始から6日目までは誘導期が続き、その後、対数増殖期に入るが20°Cでの培養時の増殖と比較して急激な増殖は観察されなかった。したがって2つの温度条件での対数増殖期には顕著な差が現れ、菌株 ST-3 は20°Cで培養したときの増殖が速く、短期間で定常期に達することがわかった。また長期間(26日以降)の培養では20°Cと30°Cの細胞数にはほとんど差が無くなくなった。

次に20°Cと30°Cのそれぞれの培養温度で3ppmのBPAを添加した場合、30°Cの培養条件においては実験開始から5日目までは誘導期が観察され、その後19日目まで対数増殖期が続いた(Fig. 4)。また、添加しなかった場合の増殖曲線と殆ど一致し、3ppmのBPAの添加した場合、30°C条件下における菌株 ST-3 の増殖にはほとんど影響しないことがわかった。一方、20°Cで培養を行なった菌株 ST-3 の増殖曲線は19日まで緩やかな増殖が続き、その後直線的な増殖が観察された。添加しなかったときの増殖曲線と比較して、顕著な差が観察された(Fig. 4)。Fig. 5はBPAと同様の培養温度の条件下で *p*-NPを3ppm添加したときの増殖曲線を示した。30°Cの培養条件において実験開始から9日目までは誘導期が観察され、その後23日目まで対数増殖期が続いた。一方、20°Cで培養を行なった菌株 ST-3 の増殖曲線は17日まで誘導期が続き、その直後から急激な増殖が観察された。3ppmの *p*-NPを添加した場合、BPAの添加の場合と異なり温度差に関係なく30°Cにおいても増殖に影響を与えることがわかった。

以上の結果からBPAと *p*-NPの添加において、菌株 ST-3 の増殖は低温でBPAの影響を受け、 *p*-NPの添加では温度に関係なく増殖に影響を与えた。これはおそらく培養温度の違いによる細胞膜構造の変化とは関係なく *p*-NPがBPAよりも菌株 ST-3 の細胞内に取り込まれやすいからと考えられる。しかしTable 1の結果における細胞の内外の分布で *p*-NPとして確認できなかったことと矛盾する。このことはおそらく菌株 ST-3 細胞内に取り込まれた *p*-NPが何らか

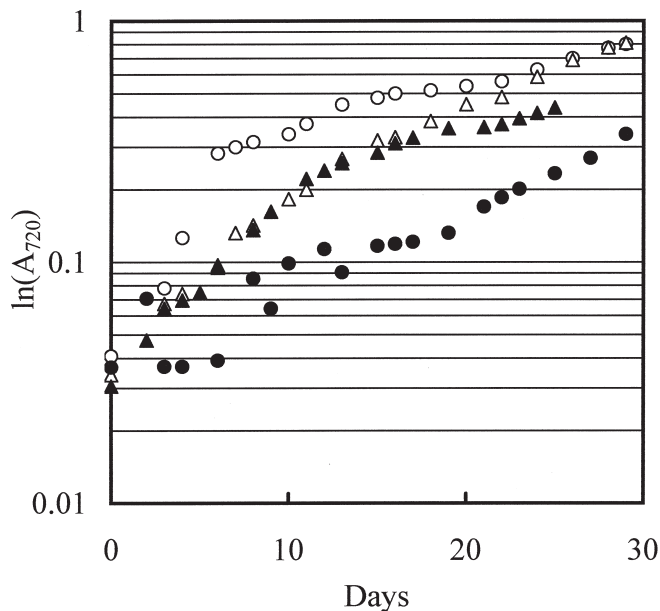


Fig. 4 Effect of temperature of the medium on growth of *Nannochloropsis oculata* ST-3 exposed to 3 ppm bisphenol A for 29 days. Symbols: ○ and ●, temperature at 20°C; △ and ▲, temperature at 30°C. Closed and opened symbols represent the cultures with and without bisphenol A, respectively.

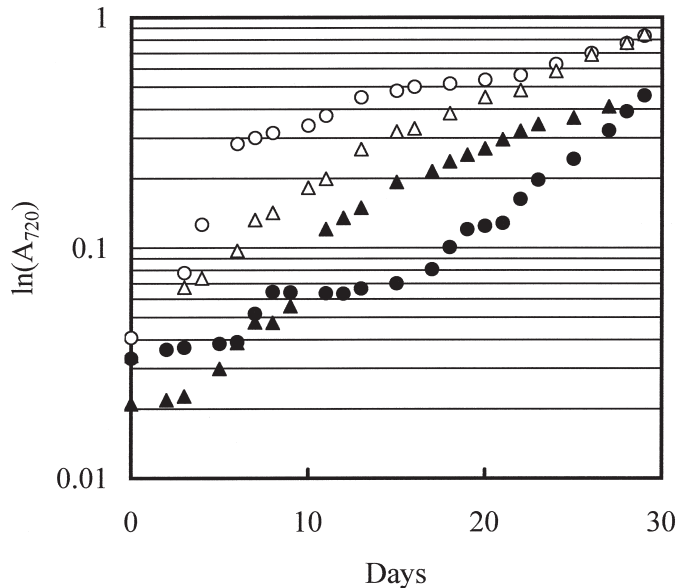


Fig. 5 Effect of temperature of the medium on growth of *Nannochloropsis oculata* ST-3 exposed to 3 ppm *p*-nonylphenol for 29 days. Symbols: ○ and ●, temperature at 20°C; △ and ▲, temperature at 30°C. Closed and opened symbols represent the cultures with and without *p*-nonylphenol, respectively.

の細胞内作用を受け分解した可能性が示唆される。また低温条件下における誘導期の超過は、*p*-NPの分解が菌株ST-3の増殖に影響しているか、もしくは前培養時の培養温度約25°Cからの水温低下が細胞内の活性を抑制し、増殖に影響を与えていると考えられる。加えて、*Nannochloropsis* sp.は、細胞内の不飽和脂肪酸の生産量が培養温度に依存し、低温度の20°Cと高温度の30°Cまたは35°Cを不飽和脂肪酸の生産量において比較すると、高温度の条件で顕著に低下するとJAMES *et al.* (1989) は報告している。このことから培養温度の低下により細胞内で飽和脂肪酸の不飽和化が菌株ST-3の増殖に影響を与えていると考えられる。

さらに、菌株ST-3のBPAと*p*-NPの細胞への蓄積について検討するために、細胞懸濁液を細胞と培地に分け、細胞内外の2つの物質の分布を検討した (Table 1)。その結果を20°Cと30°Cで表したのが Table 1である。細胞内のBPAの蓄積量は、実験開始時と終了時 (25日目) を比較すると20°Cの培養条件下で7.3倍、30°Cの培養条件下で1.6倍と両方の条件とも培地中の濃度が減少することによって増加した。

一方、*p*-NPの細胞内の蓄積量は、実験開始時と終了時 (27日目) を比較すると20°Cでは1.1倍、30°Cでは1.4倍になった。以上の結果からBPAは20°C条件下で培養した菌株ST-3の細胞内に蓄積し易いことがわかる。これは、低温条件下で細胞内の不飽和脂肪酸の存在比に変化が起こり、BPAが脂肪酸組織に溶解しやすくなったと考えられる。一方、*p*-NPにおいては、実験終了時の細胞内の*p*-NP濃度の低さと両温度における培地中の濃度変化から考えても、*p*-NPとしての細胞内への蓄積の可能性は非常に低いと考えられる。これは前述したように細胞内に取り込まれた後に*p*-NPは分解した可能性が示唆される。今回の論文では掲載しないが、細胞から抽出した*p*-NPのHPLCのクロマトグラムには、*p*-NPのピーク以外に分解産物と考えられる数本のピークが検出された。

今回の実験結果から菌株ST-3は培養温度が30°Cで3.0 ppmのBPAを添加した場合で添加しない場合の増殖と差がなく、細胞内にBPAを蓄積した。以上のことから考えても内分泌性攪乱化学物質による曝露、さらには蓄積から防がな

Table 1. Changes in BPA and *p*-NP concentration in the cells and in the medium of *N. oculata* ST-3 grown at 20°C and 30°C. Each cultures containing 3ppm BPA and *p*-NP was incubated for 25 and 27 days, respectively.

Cultivation time (d)		Bisphenol A		<i>p</i> -Nonylphenol	
		0	25	0	27
20°C	Cells	0.0131 ppm	0.0955 ppm	0.0248 ppm	0.0263 ppm
	Medium	2.130	1.950	0.5834	0.1336
30°C	Cells	0.0148	0.0239	0.0110	0.0151
	Medium	1.541	0.0239	0.4614	0.1335

ければならない。特に内分泌性攪乱化学物質が検出される沿岸域の養殖業において対策を急がなければならないであろう。

謝 辞

本研究の遂行ならびに本稿の作成にあたり、当時、東海大学海洋学部水産学科在籍、現在、(株)ホサカマリーンプロジェクト下田営業所下田海中水族館の鈴木朋実氏にご協力して頂き、心から感謝いたします。

また東海大学海洋学部水産学科非常勤助手 北野忠氏、東海大学海洋学研究科水産学専攻 須藤慶子氏、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。

本研究の遂行にあたり、東海大学海洋学研究科海洋生物学専攻 山口京士氏、当時、東海大学海洋学部水産学科在籍 服部哲也氏、東海大学海洋学部水産学科 吉田宏亮氏には、ご協力、ご助言をいただきました。ここに深く感謝致します。

引用文献

HIBBERD, D. J. (1981): Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae and Tribohyceae (synonym Xanthophyceae). *Bot. J. Linn. Soc.*, 82,

93-119.

JAMES, C. M., S. AI-HINTY and SALMAN (1989): Growth and ω 3 fatty acid and amino acid composition of microalgae under different temperature regimes. *Aquaculture*, 77, 337-351.

SAEZ, M., A. GOMEZ-PARRA and E. GONZALEZ-MAZO (2001): Bioconcentration of linear alkylbenzene sulfonates and their degradation intermediates in marine algae. *Fresenius Anal. Chem.*, 371, 486-490.

TANABE, S., H. IWATA and R. TATSUKAWA (1994): Global contamination by persistent organochlorines and its ecotoxicological impacts on marine mammals. *Sci. Total Environ.*, 154, 163-177.

WANG, J. S., H. N. CHOU, J. -J. FAN and C. -M. CHEN (1998): Uptake and transfer of high PCB concentrations from phytoplankton to aquatic biota. *Chemosphere*, 36, 1201-1210.

YAMAZAKI, S. and H. HIRATA (1995): CO₂ concentration change in *Nannochloropsis* sp. culture medium. *Aqua. Eng.*, 14, 357-365.

ZITTELLI, G. C., F. LAVISTA, A. BASTIANINI, L. RODOLFI, M. VINCENZINI and M. R. TREDICI (1999): Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. cultures in outdoor tubular photobioreactors. *J. Biotechnol.*, 70, 299-312.

要 旨

海産性単細胞真正眼点藻 *Nannochloropsis oculata* から菌株 ST-3 を確立し、内分泌攪乱化学物質のビスフェノール A (BPA) と *p*-ノニルフェノール (*p*-NP) が菌株 ST-3 の増殖に与える影響を調査した。それぞれの物質を0-18ppm になるように添加し、増殖過程を観察した。両物質とも3ppm の濃度では生育には殆ど影響がなかった。また、培養温度を20°Cと30°Cで3ppm の両物質を添加して増殖を調べたところ、BPA では20°Cでは強い増殖抑制効果が観察されたが、30°Cでは増殖にあまり影響はなかった。一方 *p*-NP は両温度で増殖を抑制する効果が現れた。また両物質とも20°Cの培養で誘導期が約14日間と長かったが、30°Cでは約5日の誘導期で増殖が始まった。特に実験終了時(25日目)の細胞内のBPA は開始時(0日目)の濃度と比較して20°Cで7.3倍、30°Cで1.6倍になった。ゆえに本株は環境中のBPA を生物濃縮する可能性が示唆された。