

カブトガニは海底熱水活動の探査プローブ？ —生体防御反応を応用した迅速・超高感度探査法—

三田直樹¹⁾

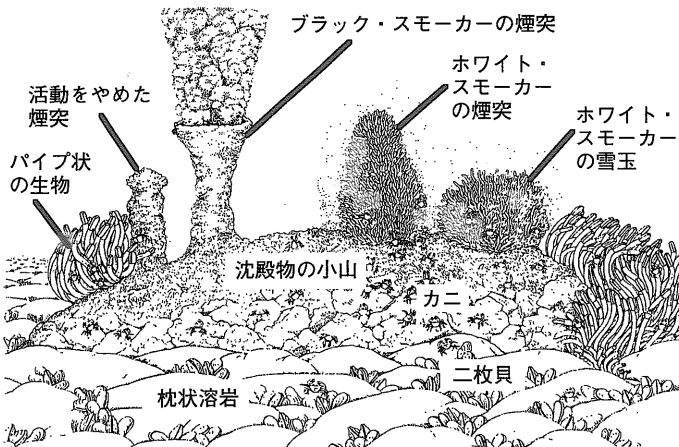
1. はじめに

今まで、一般に深海は「高圧で冷たく、光が届かない暗黒の世界」で、とても生物などは住めそうもない極限環境と考えられてきました。ところが1977年、従来の深海のイメージを大きく変える「海底熱水鉱床」の存在が、エクアドル沖にあるガラパゴス拡大軸の深海底で発見されました。米国の潜水調査船「アルビン」が、重金属イオンや硫化水素に富んだ熱水を激しく噴出しているブラック・スモーカー（黒い重金属硫化物から成る、煙突状の構造物）を見つけたのです。

ここでは重金属硫化物や酸化物などの鉱床が現在も活発に生成中であるため、地球科学者達の大きな注目を集めています。また、この熱水の流れに沿ってチューブワーム、蟹、海老、貝などの動物が群棲していますが、彼らは硫化水素をエネルギー源と

して海水中の二酸化炭素を固定して有機物を作る硫黄酸化細菌を、食料源または共生体としています。深海熱水系は、生命の起源の研究、特異な生態系の研究、及び新しい有用微生物資源の探索の研究対象として、生命科学者達からも熱い視線が注がれているのです。

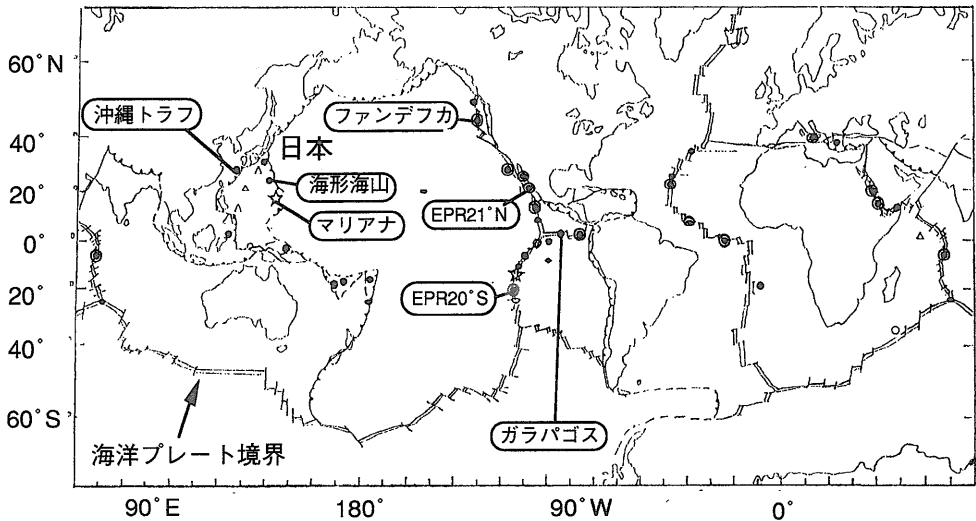
Corliss *et al.* (1979)はガラパゴス沖深海底の H_2S を含む2つの熱い噴出水中に、高濃度の硫黄酸化細菌が存在することを報告していますが、マクドナルドとルーエンダイク(1980)も引続き、メキシコ西岸沖のEPR(東太平洋海膨, East Pacific Rise)での同様な発見を報告しました。彼らが作成した、この奇妙な光景の概念図を第1図に示します。これら深海の熱水性鉱床および熱水性含重金属堆積物の分布は、第2図に示したように、世界中の海底に存在しています。当然、火山国である日本の周辺でも、その存在が期待されました。地質調査所は



第1図 海底熱水鉱床の概念図(マクドナルド・ルーエンダイク, 1980).

1) 地質調査所 地殻化学部

キーワード：深海熱水系, 海底熱水活動, 海底熱水鉱床, 探査法, 熱水ブルーム, 細菌現存量, リポ多糖, LPS, カブトガニ, リムルステスト, 酵素反応



第2図 海底における熱水性鉱床および熱水性含重金属堆積物の分布図(水野, 1983に加筆). EPRは東太平洋海膨(East Pacific Rise)の略で, 米大陸西側海岸に沿った海底の拡大場所のことである. 海形海山は小笠原原島西方の海底火山である. ●印は, 酸化物の存在する場所. ○は, 硫化物や硫酸塩の存在する場所.

1984~1989年度にかけて, 地質調査船「白嶺丸」を用いてわが国周辺の海底熱水活動の調査研究を行ない, 多くの成果を得ております.

今までラボワークが主体であった筆者にとって, 揺れる調査船内での研究には大きな不安がありましたが, この不思議な海底熱水活動域に魅せられて伊豆・小笠原弧(第2図の海形海山を含む), マリアナトラフ, 沖縄トラフに, 思い切って飛び出して行くことになりました. しかしこの時点では, 船上で直ちに熱水の広がり(ブルーム)を捕らえる効果的な地球化学的方法はまだなかったので, 新開発を試みることにしました.

その結果, 深海熱水系に特有の濃密な微生物バイオマスに着目し, その指標物質であるLPS(リポ多糖, Lipopolysaccharide)を船上で迅速・簡便・超高感度に測定して熱水ブルームを検出する新探査法

を開発し, 3つの海底熱水活動域で検討して効果のあることを確認しました. カプトガニの生体防御反応を利用した, この新しい試みを紹介します.

2. 新探査法開発の動機

多くの科学者を引き付ける, 神秘的とも言える海底熱水活動を調査研究するには, まず第一に, 熱水が噴出している場所を探索しなくてはなりません. 試料を採取してから, 船内で直ちに海底熱水活動の兆候を判定するためのデータが得られれば, 兆候の程度を反映させて船が速やかに移動し, 次々とサンプリングしながら活動海域を絞り込んで, 熱水噴出の有望箇所に近付くことが可能な筈です.

筆者は1987年の夏から白嶺丸に乗船することになったのをきっかけにして, 船上での迅速探査に役

第1表 海底熱水活動域の迅速探査に用いる指標の条件

- | | |
|-----|--|
| (1) | 指標物質の濃度は, 一般の深海と海底熱水系で明らかな差があること |
| (2) | 指標物質の濃度は, 熱水噴出部から離れていても検出可能なこと |
| (3) | 指標物質の濃度は, 短時間で正確かつ精度よく測定可能なこと |
| (4) | 指標物質の濃度は, 揺れる船内でも容易に測定可能なこと
(時間や手間のかかる濾過・濃縮などの前処理を必要としないこと) |
| (5) | 指標物質の測定方法は, できるだけ高感度であること
(上記(1)~(4)の要件達成に, 大きく貢献する) |
| (6) | 揺れる船内なので, 測定はできるだけ火気を使わずにすむこと |

第2表 海底熱水活動の主な化学的及び微生物学的指標

試料	指標	試料量 (目安)	前処理操作	測定法	測定場所	所要時間
表層堆積物	1) Mn, Fe, Co, Ni, Cuなどの重金属	数 gr.	乾燥, 酸分解, 抽出, 濾過, 濃縮など	原子吸光	研究所	数日
海水	2) 溶存態・懸濁態のMn, Fe, Co, Ni, Cuなどの重金属	1,000 ml	濾過, イオン交換濃縮など	原子吸光やICP	研究所	数日
	3) 溶存CH ₄ , ³ He	100 ml	ガス追出し, 濃縮など	ガスクロ, 質量分析	研究所	数日
	4) 細菌数	10 ml	固定, 濾過, 蛍光染色	顕微鏡下で計数	研究所	1試料につき1時間以内
	5) ATP, DNA	1,000 ml	濾過, 濃縮など	蛍光光度法	研究所	
	6) LPS	0.1 ml	【不要】	吸光光度法	船内	1-2時間

立つ地球化学的な方法を検討してみることにしました。そのような方法は、第1表に示したような要件を満たしていることが重要と考えられます。そこで海底熱水活動の兆候を調べるのに用いられている従来の主な化学的及び微生物学的な指標と、今回紹介する新指標LPS(リポ多糖, lipopolysaccharide)の特徴を、第2表に示しました。筆者が従来から取り組んでいた、海底堆積物の重金属濃度から熱水活動の兆候を調べる方法も、他の従来の指標と同様に、揺れのある船上で迅速に測定するには無理があるため、残念ながら適していませんでした。

このため、新たに「効率の良い、リアルタイム探査方法」を開発する必要性が生じました。いろいろと検討した結果、海底熱水活動域の細菌現存量が大きいことに着目し、その固有な菌体成分であるLPSの迅速測定が可能のために、本物質が有力候補として浮上してきました。

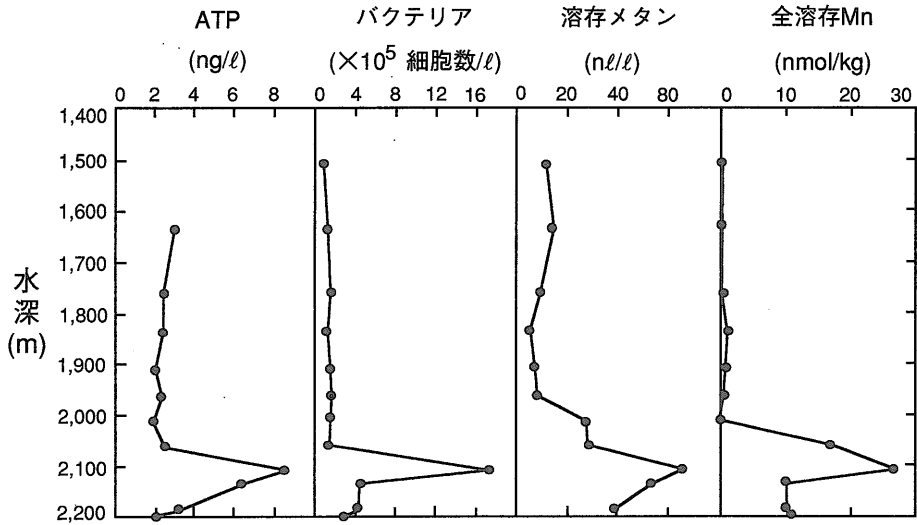
3. 海底熱水活動域の濃密な細菌現存量に着目

一般の深海域は「貧栄養で、微生物現存量が少ない」のに対して、海底熱水系では「濃密な微生物(特に細菌)バイオマスが存在する」ことが報告されています。Corliss *et al.* (1979)が報告したガラパゴス海嶺の熱水中の高濃度な硫酸化細菌の存在の他にも多くの類似例が報告されていますので、そのうちの幾つかを紹介します。深海の熱水噴出孔に発生す

る細菌の“地球微生物学的”な研究に関しては、Jannasch and Mottl (1985)や三田・前田(1988)の総説が参考となります。

Baross and Deming (1983)はチムニーから採取した306°Cの噴出水を、現場圧の265気圧で培養した結果、少なくとも250°Cで成長する好熱菌が存在することを報告しました。これに対しては、増加した粒子は人工的なものや混入物ではないかというTrent *et al.* (1984)の疑問が投げかけられ、更にBaross and Demingがその疑問を否定するといったように、大変な話題となりました。また、Wirsen *et al.* (1986)は、EPR 21°Nで採取した約20°Cの噴出水中に約10⁵ cells/mlの細菌群が存在し、その中には硫酸化細菌の割合が最も多く、メタンとメチルアミンを酸化する細菌も存在することを報告しました。また、Winn *et al.* (1986)は、ファンデフカ海嶺のチムニーの20 mと50 m上方にある熱水ブルームには、蛍光を発する無機粒子が多くて正確な総菌数を測定できなかったが、噴出温水中の総菌数は2試料で1.3×10⁸と7.6×10⁷ cells/mlであったと報告しています。彼らによると、更に、同海嶺西のブルーム中の、ATP(アデノシン三リン酸)、細菌数、メタン、全溶存Mnの鉛直分布を調査し、海底(水深、約2,200 m)上方約3 m~約1,200 mにおけるその分布は、各々に同様な傾向を示し、海底直上100 m付近に最高濃度が検出されました。第3図に、これらの鉛直分布を示します。

従って、深海水中の濃密な細菌現存量の存在は、



第3図 ファンデフカ海嶺西のプルーム中の、ATP、細菌数、溶存メタン、全溶存Mnの鉛直分布(Winn *et al.*, 1983)

海底熱水活動の兆候を知るための有力な指標になると考えられました。

4. 海洋細菌現存量の指標物質 LPS

細菌現存量の測定には様々な方法がありますが、その中から船上においてリアルタイムな結果が得られる、熱水活動域の探査に適したものを選択しなくてはなりません。そこで、海水中の細菌現存量の測

定方法の主なものを、第3表に整理してみました。いずれの方法も、測定値を炭素量に換算して現存量を求めることができます。蛍光顕微鏡による細菌数の計数が標準的に採用されていますが、細菌の大きさや形状によっては細菌数から単純に現存量の比較はできないこともあり、読み取りの誤差も影響するので注意を要します。また、菌体成分に着目した場合には、生化学的な手法で定量可能ですが、細菌の成長段階や菌種によって含有量が変動する場合には

第3表 海水中の細菌現存量の主な測定方法(三田・前田, 1988を一部改変)

測定方法	特徴
1. 直接計数法	
1) 落射型蛍光顕微鏡法	蛍光染色を用いる。標準的方法で、2)の装置より安価で手軽。
2) 走査型電子顕微鏡法	高分解能。細菌の微細構造の観察に優れている。
3) フローサイトメトリー	直接計数法の中で最も迅速。野外使用はまだ困難。
4) 蛍光抗体法	特定の菌に特異的で迅速・高感度。抗体作成に手間を要する。
2. 培養計数法	
5) 寒天培地平板法	目的菌の分離培養に適す。直製法より約2~4桁低い計数値。
6) 最確数法(MPN法)	同上(液体培養)。5)で培養不可の菌も一部可。計数値は5)より約1桁高い。
3. 菌体成分による測定法	
7) 核酸(特にDNA)	生存細胞の指標。細菌と他の微生物との分別が困難。
8) アデノシン三リン酸	同上。
9) ムラミン酸	グラム陰性菌*に対し藍藻は500倍、グラム陽性菌は3倍多く含む。
10) リポ多糖(LPS)	グラム陰性菌*に固有で、測定は迅速・高感度。構造により若干活性に差を生ず。

* 海洋細菌の大部分がグラム陰性菌である。

現存量への換算精度が低下するので、やはり注意を要します。

ところで、Sieburth(1979)は海洋細菌の大部分がグラム陰性菌であることを、また Raetz(1978)は細菌内毒素がグラム陰性菌細胞の外壁に固有の構成成分である LPS であることを報告しています。従って、第3表からも明らかなように、LPS は海洋細菌に固有の菌体成分であるので、他の指標と比べて選択性が高いといえます。そして、後述のカプトガニの血球抽出成分を使用した LPS の測定方法(リムルステスト)は、簡便で迅速に測定でき、しかも高感度なために現在のところ、最も適当な方法と考えられます。更に、揺れのある船上でも容易に実施することができます。

海底熱水活動のない一般の海水を対象にして、海洋細菌の現存量測定にリムルステストを応用した例としては、Watson *et al.* (1977), Maeda and Taga (1979), Maeda *et al.* (1983), Tominaga *et al.* (1986)などの報告がありますが、これらについては後程、詳しく述べることにします。

以上のことから LPS 測定法は、第1表に示した探査指標の要件をかなり満たすと考えられましたので、実際に白嶺丸で海底熱水活動域の海水を採取して LPS(細菌現存量)ブルームの広がり調べ、船上で迅速に探索するのに適した方法であるかどうかを検討することにしました。

5. LPS 測定法とカプトガニ —生体防御反応の応用—

5.1 リムルステストの概要

生きた化石と言われるカプトガニは、外傷を受けると局所で血リンパがゲル状に固まる性質を持っています。この現象は、20世紀の初期から観察されてきましたが、その原因については長い間不明でした。1956年、Bang によってこのゲル形成が海水中の *Vibrio* 感染によって引き起こされることがつきとめられました。その後、Levin and Bang (1964) は、血リンパの変形細胞(amebocytes)が極微量のグラム陰性菌のエンドトキシン(内毒素, endotoxin)に触れると、瞬時に凝集するとともに、血リンパ凝固の起こることを発見しました。

一方、医学分野では注射液中に予期せずして混入

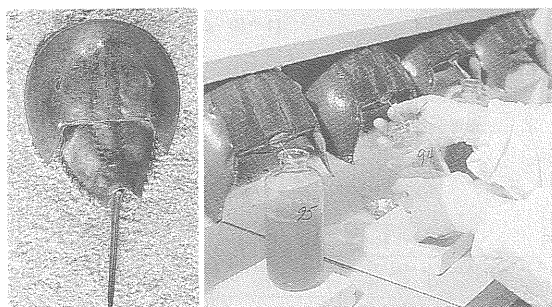


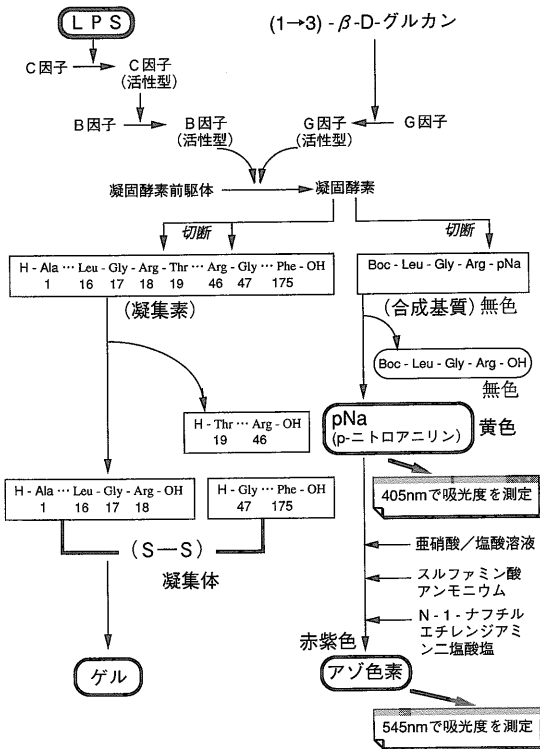
写真1 海辺のカプトガニとカプトガニから採血している様子(Whittaker Bioproduct, Inc. のパンフレットより。同社と提携している和光純薬から許可を得て掲載)

する物質が体内に入ると、発熱や重いショックを起こすことが知られており、この発熱性物質をピロジェン(pyrogen)と呼んでいます。ピロジェンの中で代表的なものがグラム陰性菌のエンドトキシンで、このエンドトキシンが、グラム陰性菌の細胞壁に固有に存在する耐熱性の LPS です。従来は、ウサギを用いた発熱性物質の試験が定められていましたが、これを補足する形でカプトガニの巧みな生体防御の現象を利用した「リムルステスト(*Limulus test*)」が登場しました。リムルステストは、その後、日本薬局方(第11改正追補)で採用されています。また最近、合成基質として Boc-Val-Leu-Gly-Arg-EHA を用い、EHA(N-エチル-N-ヒドロキシエチルフェニレンジアミン)の呈色(緑色)から吸光度法によって LPS 濃度を定量する方法も開発されています。

ナノグラム量の細菌内毒素や発熱性物質を検出する方法であるリムルステストは、当初、米国産のカプトガニ(*Limulus polyphemus*)血球抽出液を用いて開発されたことに因んで、このように呼ばれています。本法は他の検出法と比較して、簡便さ・迅速さ・感度・精度・特異性・経済性などの点で現在のところ最も優れていると考えられますので、医薬品や水道水の検査、及び臨床検査に広く応用されています。写真1に、カプトガニと血液を採集している様子を示します。

5.2 測定原理と海洋分野への応用

リムルステストによる LPS 測定の原理を簡単に説明しますが、詳しくは中村ほか(1983)の総説を参考にしてください。わが国では、日本産カプトガ



【ゲル化法】 【発色合成基質法】

第4図 日本産カプトガニ(*T. tridentatus*)における2つの凝集経路の概要とリムルステストの原理 (Obayashi *et al.*, 1983)

T. tridentatus の血球抽出物を用いてリムルステストの反応機構の分子レベルでの解明が進み、LPSの測定方法は飛躍的に改良されました。Obayashi *et al.* (1983)が報告したリムルステストの原理図を第4図に示します。

血球抽出物は、各種の酵素前駆体と凝集素から構成されています。Nakamura *et al.* (1976, 1977)は、各種の発色合成アミノ酸基質を用いて凝集素が加水分解を受けるアミノ酸配列を研究しました。それによると、LPSは酵素前駆体である分子量が約130,000の二本鎖のC因子を活性化して、セリンプロテアーゼである三本鎖の活性型C因子を生じさせます。増幅(カスケード)反応によって最終的に生じた活性型のB因子が、分子量約20,000の凝集素を加水分解によって切断し、その結果ゲル生成が起きて、凝集することがつきとめられました。

リムルステストを最初に一般海水中の細菌現存量の測定に応用したのは Watson *et al.* (1977)で、生

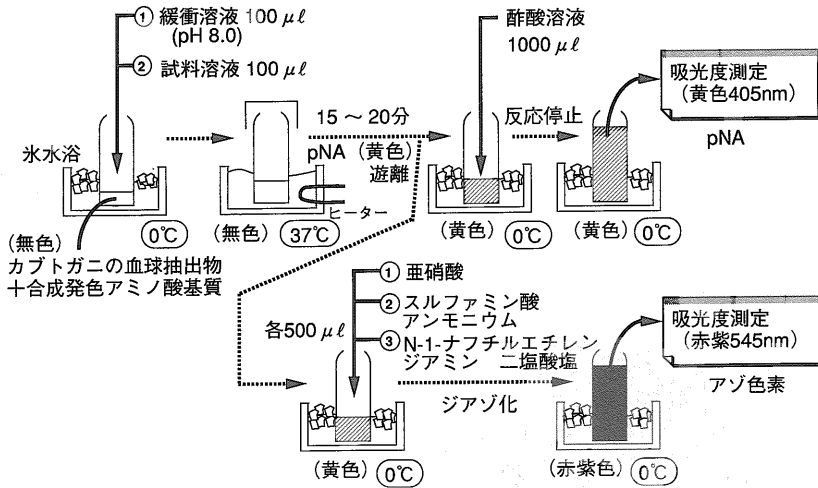
じたゲルの濁度からLPSの量を求めました。彼らは、腸内細菌である大腸菌を用いて細菌細胞の炭素量に換算する係数として、炭素/LPSの値を6.35(範囲: 3.5~9.0)と報告しています。次に Maeda and Taga (1979), Maeda *et al.* (1983)は、合成基質のうち Boc-Leu-Gly-Arg-pNA を血球抽出物と併用し、加水分解によって生じた pNA (パラニトロアニリン, p-nitroaniline) の呈色(黄色)から吸光光度法によって海水中の LPS 濃度を定量した結果、細菌現存量の測定方法として優れていることを確認しました。また、彼らは海洋細菌である *Vibrio anguillarum* を用いて、炭素量への換算係数を11.7(範囲: 6.7~16.7)と報告しました。Watson *et al.* (1977)の値は海洋細菌についての換算ではないので、海洋細菌に適用するには Maeda らの値が適していると思われます。

その後、(1->3)-β-D-glucan などの偽陽性物質の存在が明らかになり、血球物質中の反応因子である G 因子を除去した試薬を用いて、Obayashi *et al.* (1983)は臨床への応用を研究し、LPS に特定な測定方法を確立しました。これによって、1 pgLPS/ml まで検出可能になりました。この試薬を用いて Tominaga *et al.* (1986)は、南極海の表面から深部に至る海水中の LPS 分布を調べ、1,000 m 以深では、LPS 濃度は平均して 0.1 ng/ml であることを報告しています。

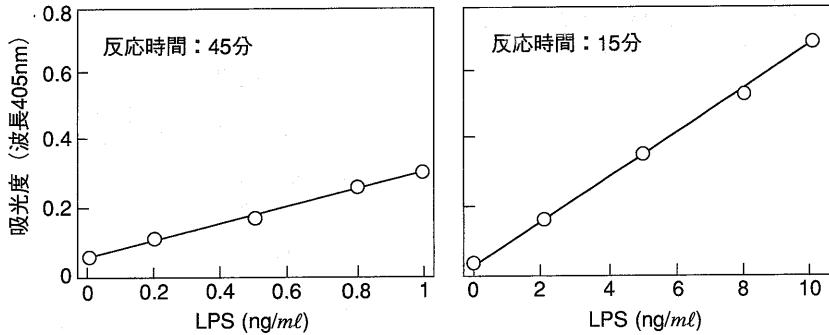
これらのことから、筆者は Obayashi *et al.* (1983), Maeda and Taga (1979), Maeda *et al.* (1983), Tominaga *et al.* (1986)らの方法を組み合わせた、発色合成アミノ酸基質(Boc-Leu-Gly-Arg-pNA)を用いた吸光光度法を、海底熱水活動域と非活動域(一般海域)での船上調査で採用することにしました。

5.3 簡単操作で広い濃度範囲に対応

リムルステストによる LPS 測定は、カプトガニの生体防御反応を活用した方法なので複雑なように感ずるかも知れませんが、第5図に示したように実際の測定操作は意外に簡単です。しかも第4図からもわかるように、この酵素反応系は増幅(カスケード)反応です。従って、低濃度試料は反応時間を長くし、高濃度試料は反応時間を短くすることで、試料の濃縮や希釈操作を伴わずに、広い測定濃度範囲を容易にカバーできる利点を有しています。



第5図 リムルステストによるLPS定量操作



第6図 リムルステストの反応時間を変えることによって、定量濃度範囲を調節できる例 (Maeda and Taga, 1979)

第6図にその一例を示しますが、更に広い範囲の濃度の定量が可能です。このように、リムルステストは大変に優れた分析方法と言えるでしょう。

ただし、極微量の細菌現存量を測定できる超高感度な方法ですから、金属やガラス器具は250°Cで2時間以上は乾熱滅菌し、プラスチック器具はγ線滅菌済みの使い捨てのものを購入するなどして、使用器具はLPSフリーの(LPSの全く無い)ものを準備します。また、細菌によって器具が汚染されないように、常に注意を必要とします。操作の詳細や注意点については、前田・三田(1990)が判り易く解説していますので、参考にしてください。

6. さあ洋上調査へ！

6.1 調査の概要

乗船前には、地質学、鉱物学、地球物理学、地球化学などの各分野の研究者が集まって、調査海域についての様々な情報交換と調査方法について話し合います。そして、白嶺丸の船長以下、主要な乗組員とも打ち合わせが行なわれ、日程や関連作業の関係を良くします。これらの打ち合わせは、船内でも逐次行なわれ、できるだけ大きな成果を挙げられるように、お互いが協力しあっています。また、調査の途中には、船内に成果の最新情報を掲示するなどして、乗船者一同の関心を高める試みも行なわれました。

船上では試料海水の採取後、直ちにLPSの測定を行ないました。これは、細菌の増殖や死滅が進行

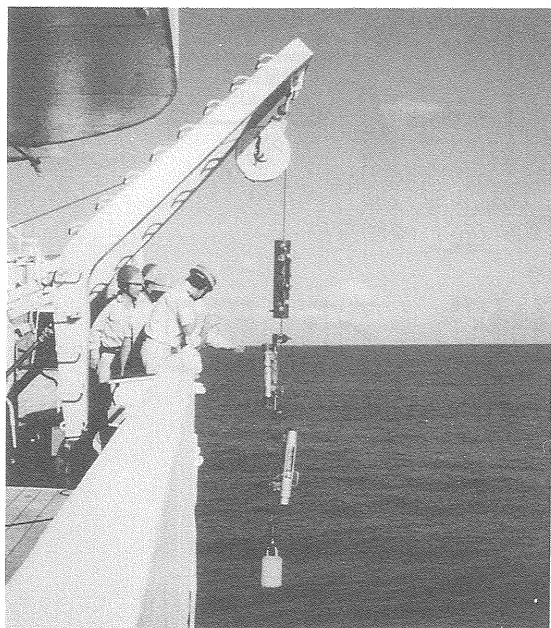


写真2 採水器をワイヤーに取り付けて深海に投入開始

しないうちに測定する必要があるからです。採水器を海中に投入している様子、海水を採水器から分取している様子、及びLPSを測定している様子をそれぞれ写真2, 3, 4に示します。ステンレス製のワイヤーに先端からオモリ、ピンガー（音波発信機）、TD計（水温と水深記録計）及び採水器の順に取り付けます。複数の採水器はそれぞれを目的の深度に達するように、次々と取り付けられていきます。ピンガーの海底反射音を船内のモニターで観測しながら海底からの距離を常に把握し、必要により海底の泥の巻き上がりが無いように採水器をゆっくりと小刻みに昇降させて、目的の距離を維持します。最も海底面に近い設定のときには、一番下の採水器が海底の表面から約5m直上に維持されることもあります。海底堆積物の巻き上がりによる混入はうまく避けられています。

目的の深度で採水が無事に完了するとピンガーの反射音が変わるので、ワイヤーが巻き上げられ、採水器は次々と船内の研究室に運ばれます。直ちに海水試料を氷冷箱内の滅菌済み容器に分取した後、できるだけ速やかにLPS測定を開始しなくてはなりません。このために、食事のタイミングをずらすこともありました。船が揺れている中で、細かい神経を使いながらの測定操作は結構大変ですが、体が船の

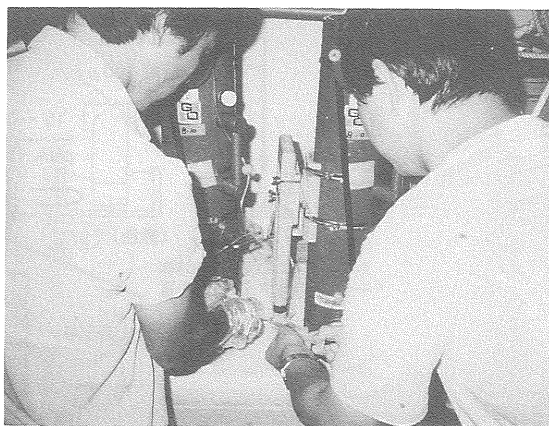


写真3 船内の研究室に取り込んだ採水器から、試料海水を採取。左は重金属測定用の試料を分取する下島公紀博士（電力中央研究所・当時、広島大学）。右はLPS測定と顕微鏡観察用の試料を分取する筆者。

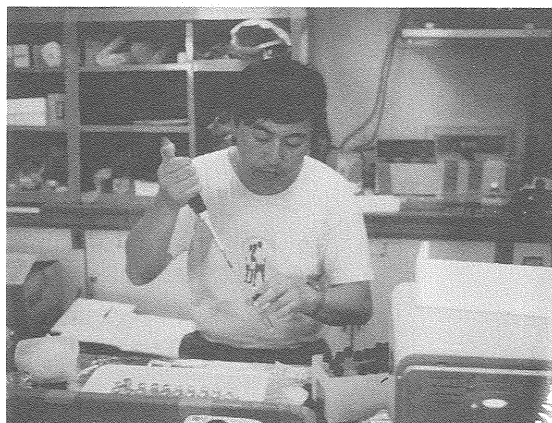
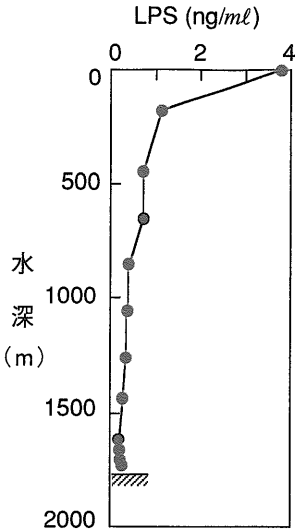


写真4 採水後、直ちにガラス製毛细管を用いて、水冷中のリムルステスト試薬アンプルに試料海水（水冷）を分注している筆者。船が揺れても使えるように分析機器類はしっかりと固定してあるが、人間は絶えず揺れに対してバランスをとりながら操作しなくてはならない。

揺れるタイミングに馴れてくると、なんとかうまく行くものです。通常は試料の分取から約1~2時間以内に、早いときには1時間以内に分析値を得ることができました。

6.2 一般海域のLPS分布

海底熱水活動のない一般の深海水は、栄養分が乏しいので微生物現存量が少ないといわれています。そこでまず、海底熱水活動海域との比較海域として、島弧から離れた大陸棚斜面を選び、水面から海



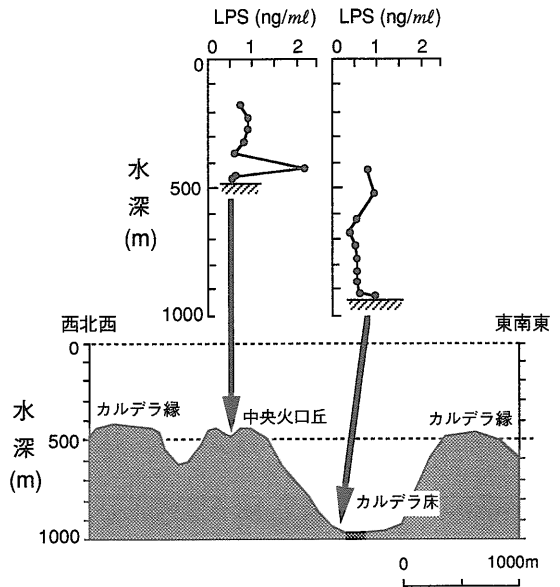
第7図
一般外洋域の海水中のLPS濃度分布(Mita *et al.*, 1988). 青が島東方(32°25'N, 140°20'E)における大陸棚斜面上にて採取.

底直上に至るまでの海水中のLPS分布を調べました。その結果、第7図のように、水面のLPS濃度は約4 ng/mlと最大値を示しますが、深くなるにつれて激減し、深度1,000 m付近から海底(水深約1,800 m)直上まではほぼ一定の値(約0.4 ng/ml)になることがわかりました。この分布形は、Tomina-ga *et al.* (1986)が報告した南極海での一般海水の例と良く似ています。

6.3 海底熱水活動域のLPS分布

ここでは、冒頭で述べた白嶺丸による3つの調査海域のうち、伊豆・小笠原弧における代表的な海底熱水活動域である、海形海山のカルデラ内でのLPS分布調査結果を紹介します[Mita *et al.* (1988), Mita and Maeda (1989)].

ここは、小笠原諸島の父島西方海域にある海底火山です。湯浅ほか(1987)は、カルデラ床に潜水調査船「しんかい2000」で着底して調査中に、一匹の小魚が観察窓の前でピクピクとけいれんを起こしながら横たわり、やがて死んでいくのを観察しました。また、カルデラ内には黄褐色～赤褐色の温泉沈殿物の漂いがあり、厚く堆積しているところからは「ゆらぎ」が観察されたことも報告しています。Urabe *et al.* (1987)もこのカルデラ壁から、熱水性の重金属硫化物の存在を発見しています。このように、海底熱水活動の存在する可能性が推定されていたので、ここで海水中のLPS分布を調べて、熱水ブルームの存在を探査する試みを展開しました。



第8図 海形カルデラ(第2図の海形海山に位置する)の、中央火口丘直上とカルデラ床直上の海水中のLPS濃度分布。カルデラの西北西-東南東の横断面図(上嶋・村上, 1989)に、Mita *et al.* (1988), Mita and Maeda (1989)のLPS分布データを重ねて表示した。

海形カルデラでは、中央火口丘とカルデラ床における海水中のLPS分布を調べました。その結果を第8図に示します。

まず、中央火口丘の直上では海底から約50 mのところ異常に高濃度な場所があり、その上にもやや高濃度のゾーンがありました。この時の海水中の大型細菌(長さ2 μm 以上)の細胞数の分布とLPS濃度のそれとが良く一致しました。通常、熱水活動のない海域での海水中の細菌の大きさは0.6 μm 程度がほとんどですので、海底熱水系での栄養供給状態がよいことを示唆しています。また、LPS濃度の分布は、ファンデフカ海嶺でWinn *et al.* (1986)が報告したバクテリアの分布と良く似ています。ただし、彼らの結果よりも海底に近いところに高濃度域があるので、ブルームの広がりやの程度に違いがあるといえます。

次に、カルデラ床の上部では深度500 m付近に高濃度帯がありましたが、これは中央火口丘の水深よりやや深い程度なので、中央火口丘からの熱水ブルームが広がっていることを示していると思われる。また、カルデラ床直上にも高濃度帯が発見され

ました。これは、湯浅ほか(1987)が報告した「ゆらぎ」を作り出す熱水の存在を示唆しているのかも知れません。

7. おわりに

伊豆小笠原弧での調査結果からは、リムルステストによる LPS 濃度の測定が船上で海底熱水活動域を探査するのに適した、簡便な迅速・超高感度な方法であることが判りました。今後、海底熱水活動があるかもしれない海域で、グリッドをきってこのような調査を展開することで熱水ブルームを捕らえ、活動域を絞ることができると考えられます。そして、熱水の噴出している場所での神秘的とも言える世界に遭遇し、新たな知見を得ることができるよう。

本研究を実施するにあたり、多くの研究者や白嶺丸関係者の方々にお世話になり、工業技術院生命工学工業技術研究所の東原孝規博士、水産庁養殖研究所の前田昌調博士、及び地質調査所の中尾征三博士には、研究全般にわたって指導していただきました。また、前田博士と東原博士には本稿を読んでもいただきました。ここに、これらの方々には謝意を表します。

文 献

Baross, J. A. and Deming, J. W. (1983) : Growth of 'black smoker' bacteria at temperature of at least 250°C. *Nature*, **303**, 423-426.

Corliss, J. B., Dymond, J., Gordon, L. I., Edmond, J. M., von Herzen, R. P., Ballard, R. D., Green, K., Williams, D., Bainbridge, A., Crane, K. and van Andel, T. H. (1979) : Submarine thermal springs on the Galapagos Rift. *Science*, **203**, 1073-1083.

Jannasch, H. W. and Mottl, M. J. (1985) : Geomicrobiology of deep-sea hydrothermal vents. *Science*, **23**, 717-725.

上嶋正人・村上文敏(1989) : 深海テレビ及びカメラによる伊豆一小笠原海域(GH87-3)の熱水活動調査。工業技術院地質調査所昭和62年度研究概要報告書「海底熱水活動に伴う重金属資源の評価手法に関する研究」, 43-57.

Levin, J. and Bang, F. B. (1964) : The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **115**, 265-274.

マクドナルド, K. C.・ルーエンダイク, B. P. (1980) : 東太平洋海膨の熱水噴出。サイエンス, **11**, No. 7, 78-93(中村保夫・藤岡換太郎訳)。

Maeda, M. and Lee, W. J. and Taga, N. (1983) : Distribution of lipopolysaccharide, an indicator of bacterial biomass, in sub-

tropical areas of the sea. *Mar. Biol.* **76**, 257-262.

前田昌調・三田直樹(1990) : 微生物量。沿岸環境調査マニュアルⅡ(日本海洋学会篇), 恒星社厚生閣, p. 282-288.

Maeda, M. and Taga, N. (1979) : Chromogenic assay method of lipopolysaccharide (LPS) for evaluating bacterial standing crop in seawater. *J. Appl. Bacteriol.*, **47**, 175-182.

三田直樹・前田昌調(1988) : 海底熱水活動に伴う細菌の存在とその現存量の測定方法。地球化学, **22**, 第1号, 106-113.

Mita, N. and Maeda M. (1989) : A new biogeochemical method to prospect submarine hydrothermal activity. *Proceedings of Techno-Ocean '88, International Symposium*, **1**, 70-73.

Mita, N., Maeda, M. and Tominaga, H. (1988) : A new rapid prospecting method for submarine hydrothermal activity by determining lipopolysaccharide as bacterial biomass. *Geochem. J.*, **22**, 83-88.

水野篤行(1983) : 概論：海底の熱水性鉱床 とくに多金属塊状硫化物鉱床について, 海洋科学, **15**, No. 10, 565-581.

中村隆範・盛田隆司・平永万寿代・宮田敏行・岩永貞昭(1983) : 細菌内毒素によるカプトガニの血球細胞の活性化とその分子機構。日本細菌学雑誌, **38**, 781-803.

Nakamura, S., Morita, T., Iwanaga, S., Niwa, M. and Takahashi, K. (1977) : A sensitive substrate for the clotting enzyme in Horseshoe Crab hemocyte. *J. Biochem.*, **81**, 1567-1569.

Nakamura, S., Takagi, T., Iwanaga, S., Niwa, M. and Takahashi, K. (1976) : A clottable protein (coagulogen) of horseshoe crab hemocytes structural change of its polypeptide chain during gel formation. *J. Biochem.*, **80**, 649-652.

Obayashi, T., Tamura, H. Tanaka, S., Ohki, M. Takahashi, S., Arai, M., Masuda, M. and Kawai, T. (1983) : A new chromogenic endotoxin-specific assay using recombinant *limulus* coagulogen enzymes and its clinical applications. *Clinica Chimica Acta*, **149**, 55-65.

Raetz, C. R. H. (1978) : Enzymology, genetics and regulation of membrane phospholipid synthesis in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*, **42**, 614-659.

Sieburth, J. McN. (1979) : *Sea Microbes*, Oxford University Press, New York, 491pp.

Tominaga, H., Fukui, F. and Tanaka, S. (1986) : Vertical distribution of lipopolysaccharide in the Antarctic Ocean and its adjacent sea. In Abstract, The 8th symposium on polar biology, National Inst. Polar Res., 21.

Trent, J. D., Chastain, R. A. and Yayanos, A. A. (1984) : Possible artefactual basis for apparent bacterial growth at 250°C. *Nature*, **307**, 737-740.

Urabe, T., Yuasa, M., Nakao, S. and on-board scientists (1987) : Hydrothermal sulfides from a submarine caldera in the Shichito-Iwajima ridge, Northwestern Pacific. *Mar. Geol.* **74**, 295-299.

Watson, S. W., Novitsky, T. J., Quinby, H. L. and Valois, F. W. (1977) : Determination of bacterial number and biomass in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 940-946.

Winn, C. D., Karl, D. M. and Massoth, G. J. (1986) : Microorganisms in deep-sea hydrothermal plumes. *Nature*, **320**, 744-745.

Wirsen, C. O., Tuttle, J. H. and Jannasch, H. W. (1986) : Activities of sulfur-oxidizing bacteria at the 21°N East Pacific Rise.

Mar. Biol., 92, 449-456.

湯浅真人・浦辺徹郎・村上文敏(1987): 伊豆・小笠原弧 海形カルデラの熱水変質帯 — 「しんかい2000」による潜水調査一. 地質ニュース, 第391号, 6-8.

MITA Naoki (1993): Does horseshoe crab tell us a hydrothermal active area in deep-sea? — A unique exploration applying biological protective reaction.

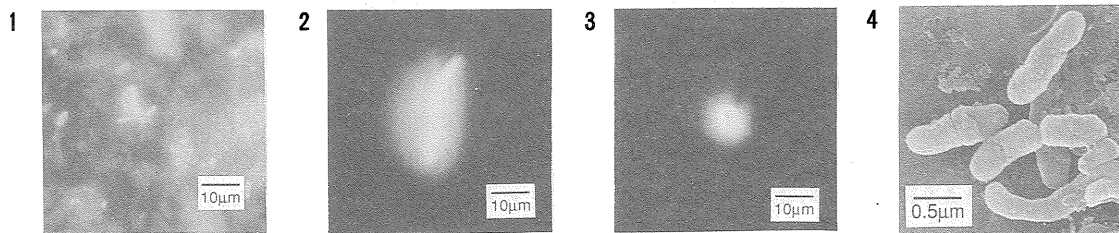
(受付: 1993年6月14日)

関連写真

海底熱水活動域の大型細菌と浮遊粒子

地質調査所 三田直樹

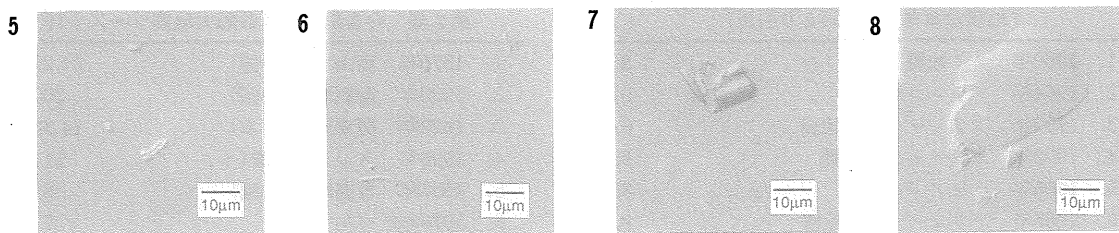
海底熱水活動域の高 LPS 濃度の深海水から発見された、大型細菌と鉍物片らしい結晶。海水は採取後、直ちに電子顕微鏡観察用グルタルアルデヒドを添加して微生物を固定し、冷蔵したものを観察した。



1~3. 海形カルデラ中央火口丘の深海水から採取された大型の細菌で、海底直上約50 m の試料から検出された(本文の第8図を参照)。一般の海洋細菌の大きさは $0.6 \mu\text{m}$ 程度であるから、これらが異常に大きいことがわかる。蛍光色素アクリジンオレンジ(AO)で染色し、 $0.2 \mu\text{m}$ 孔径のニュークレポフィルターで濾過し、フィルター上の細菌を落射型蛍光顕微鏡によって紫外線照射下での蛍光を観察した。AOは主に菌体中の核酸と反応結合し、蛍光顕微鏡下でオレンジ色(白黒印刷では、白く見える)を発する。

1はクビレが見られる桿菌。2は大きさと形状が、海底熱水系で動物と共生している硫酸化細菌に似ている。3は大型の球菌。

4. マリアナトラフの深海水から採取された、分裂中の桿菌(走査型電子顕微鏡で観察)。



5~8. マリアナトラフの深海水から採取された大型の細菌と鉍物片らしい構造物。10,000 rpm の遠心分離によって集め、微分干渉(ノマルスキー)顕微鏡を用いて、染色せずに立体的に表面構造を観察した。

5は、大型の桿菌の先端にボール状の突起が見られ、アイスランドで見つかっている *Thermoproteus* という好熱性イオウ依存古細菌と、形状が良く似ている。この桿状の古細菌は大きく屈折したり、Y字型に枝分かれしたり、桿菌の端から球状の細胞が押し出されてゴルフクラブ状を呈したりすることが知られている。6もクビレがあり、写真の上左側の細菌は分裂中である。7と8は、鉍物片のように見える結晶。