

表7 雑藻混入防止試験の培養方法及び条件

水 温	28.0 ~ 30.6 °C
光 強 度	60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$
培 地	P-E S 改変培地
雑藻混入防止処理 方法と培養方法	<p>カルキ処理 A : 外套膜表皮を次亜塩素酸ナトリウム (有効塩素 2.4%) 溶液で 3 分間洗浄後、通気培養</p> <p>    "    B : 上記 A 同様に有効塩素 3.6% 溶液で 3 分間洗浄後、通気培養</p> <p>    "    C : 上記 A 同様に有り効塩素 4.8% 溶液で 2 分間洗浄後、通気培養</p> <p>エタノール処理 : 上記カルキ同様にエタノール (70%) 溶液で 5 分間洗浄後、通気培養</p> <p>ゲルマニウム処理 : 上記カルキ同様に二酸化ゲルマニウム (1%) 溶液で 5 分間洗浄後、通気培養</p> <p>無処理保存 A : 外套膜表皮を通常手法 (水洗い) で処理後振盪培養</p> <p>    "    B : 上記 A 同様</p> <p>    "    C : 上記 A 同様</p> <p>無処理通気 A : 上記無処理保存同様に処理後、通気培養</p> <p>    "    B : 上記 A 同様</p>

### 3. 運動型細胞への変異条件の検討

培養は初代培養試験、継代培養試験と同様の設備、器具及び条件で行い、培養後数日経過して増殖した試料内の運動型細胞の密度を計数した。静止型細胞を含む総細胞密度に占める運動型細胞の比率を出現率とした。攪拌による振動刺激試験を行う際の計数は培養容器底から計数毎に試料を採取して観察する手法を用いると、採取の度に試料に振動刺激が加わるため、試験開始時に刺激を与え、試料を血球計算盤に採った後、試料の乾燥に配慮して血球計算盤内での細胞の変異を連続して観察した。その際の光条件は恒温培養室から試料を採取し、刺激を与えた時点までのものであり、血球計算盤内での光強度は顕微鏡室内照明の 3~4  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  である。一つの試験区で 2~3 個の血球計算盤規定面積外側の面積 (規定面  $\times$  9) 内の細胞を全数計数した。

運動型観察試験 1~6 の条件等は表 8~表 13 に示し、細胞形態の違いによる共生試験方法の詳細は表 14 に示した。

表8 運動型細胞観察試験1の培養方法及び条件

試験期間及び観察間隔	15:00～翌日 19:00 2時間置き28時間
水 温	28.9～30.8℃
照 明 時 間	14:00～2:00 (12時間)
光 強 度	80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$
計数試料抜き取り方法	手振りスコッチブライト剥離のみ、ピペット抜き取り
試験開始細胞密度	$270 \times 10^4 \text{ cells}/\text{ml}$
培 地	P-E S 改変培地

表9 運動型細胞観察試験2の試験方法及び条件

試験期間及び観察間隔	9:00～翌日 13:00 2時間置き28時間
培 養 履 歴	光強度60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ で初代培養7日間
水 温	29.1～31.1℃
照 明 時 間	8:00～20:00 (12時間)
光 強 度	A : 130 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ B : 60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ C : 25 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$
試験開始細胞密度	$116 \times 10^4 \text{ cells}/\text{ml}$

表10 運動型細胞観察試験3の試験方法及び条件

試験期間及び観察間隔	9:00～翌日 13:00 2時間置き28時間
培 養 履 歴	A : 保存培養区 (光強度15 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ で振盪培養7日間) B : 継代培養区 (Aと同一条件後、光強度60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ で通気培養7日間) C : 初代培養区 (光強度60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ で初代培養7日間)
水 温	29.1～31.1℃
照 明 時 間	8:00～20:00 (12時間)
光 強 度	60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$
試験開始細胞密度 ( $\times 10^4 \text{ cells}/\text{ml}$ )	A : 97 B : 78 C : 116

表11 運動型細胞観察試験4の試験方法及び条件

試験期間及び観察間隔	12:45 開始後、運動型細胞が消滅するまで20分置き
培養履歴	継代培養(5代目)、延べ82日間
攪拌刺激方法	A:スコッチブライト剥離(手振り攪拌) 30秒 B:A攪拌後、ハンドミキサー(13,000回/分)攪拌 30秒 C: " 10秒 D: " 20秒
照明時間	8:00~20:00(12時間)
光強度	60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$
試験開始細胞密度	100 $\times 10^4$ cells/ml

表12 運動型細胞観察試験5の試験方法及び条件

試験期間及び観察間隔	A・B・C:10:30 開始後、運動型細胞が消滅するまで30分置き A'・B'・C':20:30 開始後、30分置き A''・C'':翌日 8:00 開始後、30分置き
培養履歴	継代培養(5代目)、延べ84日間
攪拌刺激方法	A・A'・A'':攪拌無し(培養器底面からピペットにて採取) B・B':スコッチブライト剥離(手振り攪拌) 30秒 C・C'・C'':B攪拌後、ハンドミキサー(13,000回/分)攪拌 20秒 " "
照明時間	8:00~20:00(12時間)
光強度	60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$
試験開始細胞密度	A・A'・A'':計数無し(推定100 $\times 10^4$ cells/ml以上) B・B'・C・C'・C'': 100 $\times 10^4$ cells/ml

表13 運動型細胞観察試験6の試験方法及び条件

試験期間及び観察間隔	A:11:30 開始後、運動型細胞が消滅するまで20分置き B:14:30 開始後、" C:17:30 開始後、" D:19:30 開始後、"
培養履歴	継代培養(5代目)、延べ82日間
攪拌刺激方法	スコッチブライト剥離(手振り攪拌)30秒後、ハンドミキサー(13,000回/分)攪拌 20秒
照明時間	8:00~20:00(12時間)
光強度	60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$
試験開始細胞密度	100 $\times 10^4$ cells/ml