

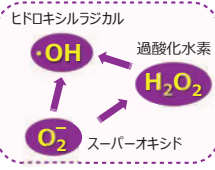
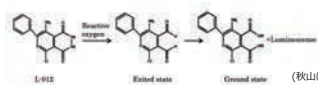
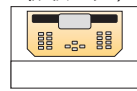
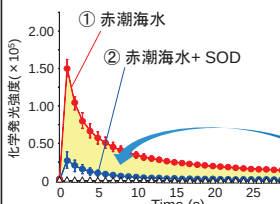
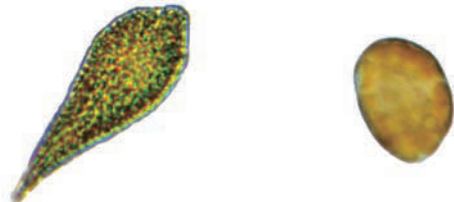
スーパーオキシドレベルを指標とする 赤潮の魚毒性推定マニュアル  令和5年3月 水産研究・教育機構 水産技術研究所 水産研究・教育機構 水産大学校 埼玉大学 1	はじめに ➤ 赤潮の被害軽減対策の効果を最大限に発揮させるためには、被害発生（養殖魚貝類のへい死）を事前に察知することが必要です。 ➤ 現在のところ、赤潮の毒性は原因プランクトンの細胞密度を指標として推定されています。 ➤ 原因プランクトンの計数には熟練と時間を要します。 ➤ 原因プランクトンの毒性は環境によって変化するため、細胞密度では正確に推定できない場合があります。 ・より簡便でより正確な赤潮の毒性推定手法が求められています。 ・現状より正確に魚毒性を定量できれば、阻止め等の実施や実施期間を減じ、二次的被害を抑止することも可能です。 ➡ 本マニュアルではスーパーオキシドレベルを指標とするシャットネラ赤潮の魚毒性推定について紹介します 2
目次 1. 活性酸素レベルを指標とする赤潮の魚毒性推定の原理..... 4～6 2. 活性酸素レベルを指標とする赤潮の魚毒性推定方法 (1) 対象となる赤潮プランクトン..... 7 (2) 必要な試薬 8 (3) 必要な機器、道具 9 3. 測定方法 (1) 試薬の調製 10 (2) ルミノメーターの事前設定 11 (3) 測定直前のルミノメーターの操作 12 (4) 測定手順 13～14 (5) 測定上の注意 15 4. 参考資料 16～20 5. 参考文献 21 3	1.赤潮のスーパーオキシド産生と魚毒性 スーパーオキシドとは？：活性酸素の一種 活性酸素とは？ ...酸素分子がより反応性の高い物質に変化したものの総称。殺菌作用があり、生体内のタンパク質や核酸などの機能を阻害することがある。(今田ほか, 1999)  ・シャットネラなど、一部の赤潮プランクトン種は大量のスーパーオキシドを細胞膜で産生して細胞外に放出することが知られており、魚毒性の原因となる可能性が指摘されています。(小田, 2016)  ・Chattonellaのスーパーオキシド産生レベルと魚類に対する毒性の強さとの間に相関関係が見出されています。(Shikata et al., 2021) 4
1. 測定原理 ・化学発光反応 L-012 (8-amino-5-chloro-7-phenylpyrido[3,4-d]pyridazine-1,4-(2H,3H) dione sodium salt) 検出対象：O₂⁻, HO[•], HOCl  発光試薬が活性酸素種と反応し、励起状態から基底状態に戻る際に発光します。(秋山ほか, 2012) ・スーパーオキシド消去反応 Superoxide dismutase (SOD) : O₂⁻ の特異的消去酵素 $2O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} O_2 + H_2O_2$ L-012存在下でSODがスーパーオキシドを特異的に消去することで、バックグラウンドの発光値を検出します。 5	1. 測定原理 化学発光法 化学発光測定装置 (ルミノメーター)  30 秒間の発光値を測定 Ⅲ 培養液 (970 μL) Ⅱ PBS or SOD (20 μL) Ⅰ L-012 (10 μL) O₂⁻ と発光試薬が反応して発光 PBS : Phosphate buffered saline SOD : Superoxide dismutase L-012 : 化学発光試薬  ① - ② = O₂⁻ 産生レベル (黄色部分) 6
2. (1) 対象となる赤潮プランクトン  シャットネラ Chattonella antiqua Chattonella marina Chattonella ovata ヘテロシグマ (Heterosigma akashiwo) 7	2. (2) 必要な試薬 ➤ L-012：活性酸素種と結合して発光する試薬。 https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/product/detail/W01W0112-0489.html ➤ PBS：リン酸緩衝食塩水（カルシウム、マンガン不含）。 ・市販品（例：https://nippongene.com/siyaku/product/buffer/stock-solution/10x-pbs-buffer.html） ➤ スーパーオキシドディスムターゼ、ウシ赤血球由来（Cu/Zn型）：SOD。活性酸素種のうちスーパーオキシドを特異的に分解する酵素。 https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/product/detail/W01W0119-1591.html 8

図 16. スーパーオキシドレベルを指標とする赤潮の魚毒性推定マニュアル.

2. (3) 必要な機器、道具

- ルミノメーター：発光量を計測する機器。
アト製 AB-2270 ルミネッセンサーOcta。
<https://www.atto.co.jp/products/luminescencection/luminometer/AB-2270>
※現場で使用する場合は、塩害予防の内部コーティングが必要。
- ピペットマン（2-20 μL 、200-1000 μL ）、チップ
- プラスチックチューブ：WATSON, 5841-255, 3 mL $\Phi 12 \times 55$ mm PS
- 100 μm 目合いのふるい：塩パイプにプランクトンネットを貼り付けたもの



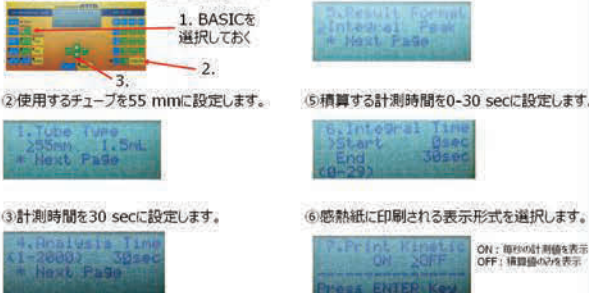
3. (1) 試薬の調製

- L-012（黄色）
 - 濃度：1 mM
 - 溶媒：水
 - 【例】322mLの超純水に100mgを溶解。
 - ※保存：マイロチューブなどに分注して、 -20°C 以下、避光。
- PBS（無色透明）
 - 【調製法】
 - 下記の試薬を混合し、900 mLの超純水に溶解する。
 - 塩化ナトリウム 80 g（最終濃度1.37 M）
 - 塩化カルシウム 2 g（最終濃度27 mM）
 - リン酸水素二ナトリウム12水和物 36.3g（最終濃度100 mM）
 - リン酸二水素カルシウム 2.4 g（最終濃度18 mM）
 - 6Nの塩酸でpH=7.4に調整。
 - 1 Lに2500Uを加えて、オートクレープで4℃以下で保存（10倍濃度）。
 - 3を超純水で1/10に希釈して使用。
 - ※保存：マイロチューブなどに分注して4℃以下。
- SOD（無色透明）
 - 濃度：10000U/mL
 - 溶媒：PBS
 - 【例】粉末が3900U/mgの場合、1mL/PBSに2.56mgを溶解。
 - ※保存：マイロチューブなどに分注して -20°C 以下。



3. (2) ルミノメーターの事前設定

- 電源を入れ、ENTERを押します。
下方向のボタンを押して次画面を表示します。
- 使用するチューブを55 mmに設定します。
- 計測時間を30 secに設定します。
- 結果の表示設定をIntegralに設定します。
- 積算する計測時間を0-30 secに設定します。
- 感熱紙に印刷される表示形式を選択します。



※本ページで省略してある設定は納品時の設定で問題ありません
※本ページの設定内容は機械に記録されるため、2回目以降は設定不要です。

3. (3) 測定直前のルミノメーターの操作

- ルミノメーターの電源を入れます。
- PROTOCOLのBASICを選択します。
- MEASUREのUNKを押して、計測名を入力します。
- ENTERを押した後、サンプル数を入力します（最大50サンプル）。
- ENTERを押すと、画像の表示になり、測定できる状態になります。



※詳細は機器の取扱説明書をご覧ください。

3. (4) 測定手順

- 試薬（L-012、SOD）の解凍・準備、ルミノメーターの電源を入れる。
- サンプルを100 μm 目合いのふるいに通す。
→ゴミや夜光虫などの発光生物をできるだけ除く。
- L-012を10 μL ずつ、全て*のチューブに入れる。
*サンプル数の2倍の本数
- PBSを20 μL ずつ、半数のチューブに入れる。
- SODを20 μL ずつ、残り半数のチューブに入れる。

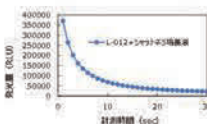


- L-012とシヤットネウが混合されると細胞が弱り、速やかに発光値が減衰する
- ④⑤のチューブをルミノメーターにセットし、970 μL のサンプルを入れる。
- ルミノメーターで発光量（積算値）を計測。
- ⑧⑤のチューブをルミノメーターにセットし、970 μL のサンプルを入れる。
- ルミノメーターで発光量（積算値）を計測。
- ⑩⑦で得られた発光量から⑨で得られた発光量を差し引いた値がスーパーオキシドレベル。



3. (5) 測定上の注意

- 計測はサンプリング直後に行いましょう。時間が経つと値が変化します。
- サンプルをチューブに入れたら、素早く蓋を閉めて計測を開始しましょう。
試薬とサンプルが混合されると、数秒で値が変化します。
- 試薬は、測定場所まで冷凍を入れた発泡スチロールなどで保管し、低温、避光を保ちましょう。
- ルミノメーターに保存しておけるデータ数は最大200です。データの抜き出しとルミノメーター内のデータ削除をこまめに行いましょう。
- 測定データには測定順に連番が記録されますが、1測定ごとにサンプル内容を記録できません。サンプル内容とデータ連番を照合できるように、別途記録する必要があります。



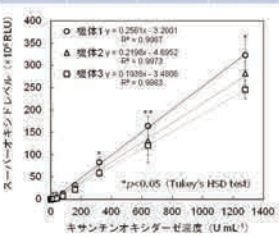
4. 参考資料：機体間の誤差

キサンチンオキシダーゼ系による酵素反応でスーパーオキシドを人工的に発生させて、ルミノメーターで発光量を計測。

ヒポキサンチン + キサンチンオキシダーゼ + $\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2^{\cdot -}$ + 尿酸

測定試料：500 μM ヒポキサンチン 10 μL
+ 各濃度のキサンチンオキシダーゼ 10 μL
+ 1mM L-012 10 μL
+ PBS or 1万U mL^{-1} SOD 20 μL
+ 滅菌透過海水 950 μL

機体番号	1	2	3
使用年数	1	5	2



機体間でわずかに差があるが、データの解釈に影響を及ぼすほどではなく、本手法にてデータ解釈の補正が可能

図 16. スーパーオキシドレベルを指標とする赤潮の魚毒性推定マニュアル（続き）。