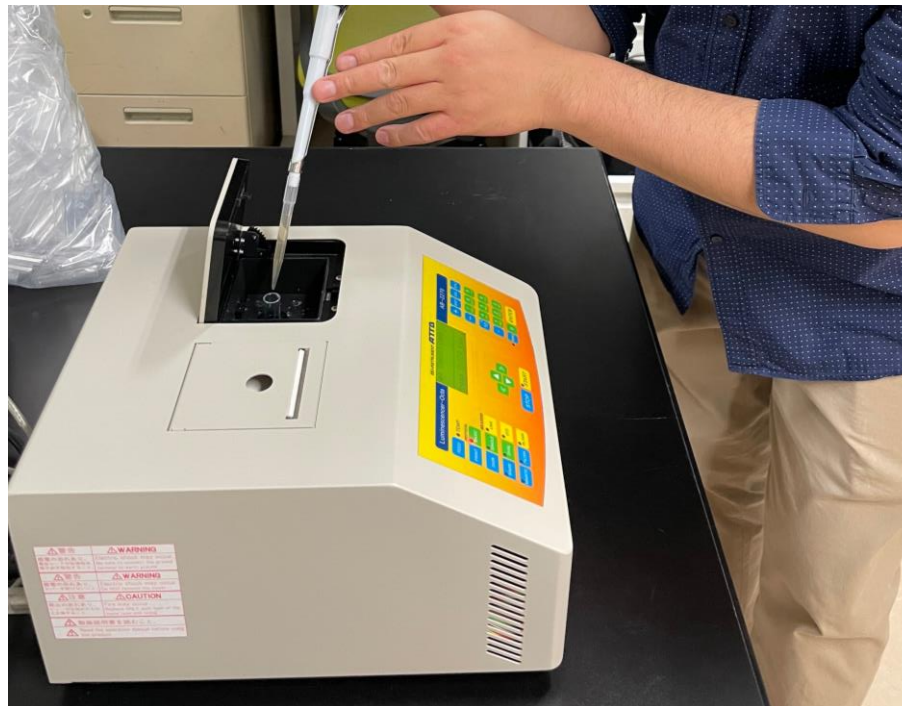


スーパーオキシドレベルを指標とする 赤潮の魚毒性推定マニュアル



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

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、餌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

目次

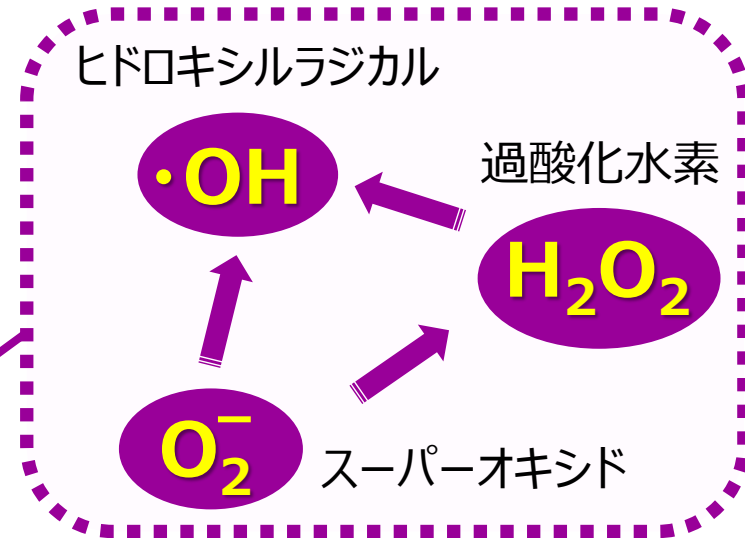
1. 活性酸素レベルを指標とする赤潮の魚毒性推定の原理	4～6
2. 活性酸素レベルを指標とする赤潮の魚毒性推定方法	
(1) 対象となる赤潮プランクトン	7
(2) 必要な試薬	8
(3) 必要な機器、道具	9
3. 測定方法	
(1) 試薬の調製	10
(2) ルミノメーターの事前設定	11
(3) 測定直前のルミノメーターの操作	12
(4) 測定手順	13～14
(5) 測定上の注意	15
4. 参考資料	16～21
5. 参考文献	22

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

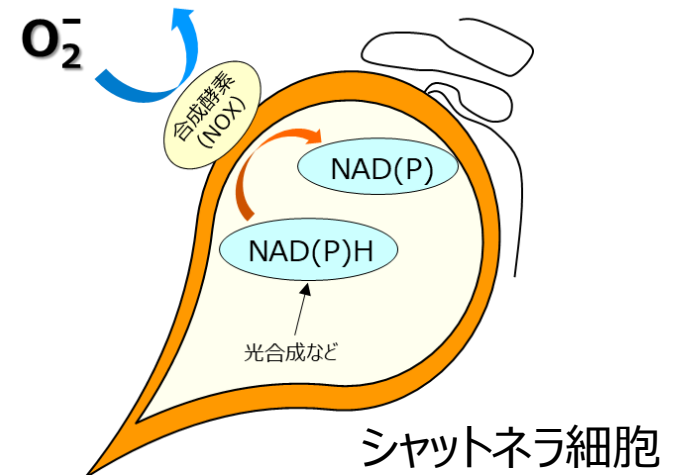
活性酸素とは？

・・・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)

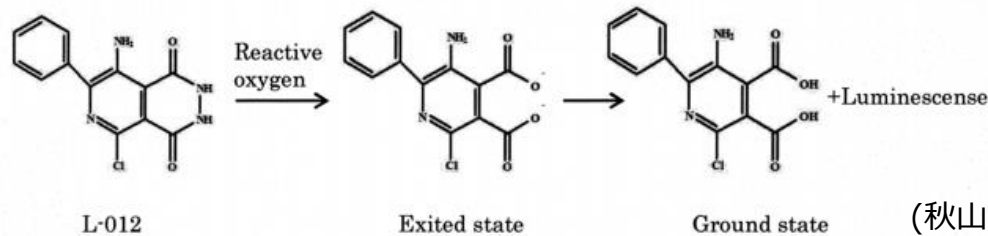


1. 測定原理

・化学発光反応

L-012 (8-amino-5-chloro-7-phenylpyrido[3,4-d]pyrodazine-1,4-(2*H*,3*H*) dione sodium salt)

検出対象： O_2^- ， $HO^\cdot$ ， $HOCl$



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。

・スーパーオキシド消去反応

Superoxide dismutase (SOD) : O_2^- の特異的消去酵素

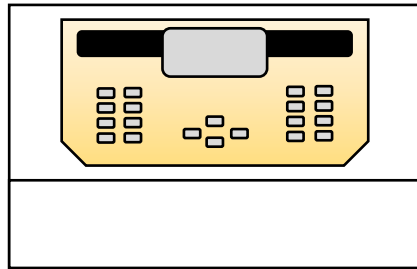


L-012存在下でSODがスーパーオキシドを特異的に消去することで、バックグラウンドの発光値を検出します。

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



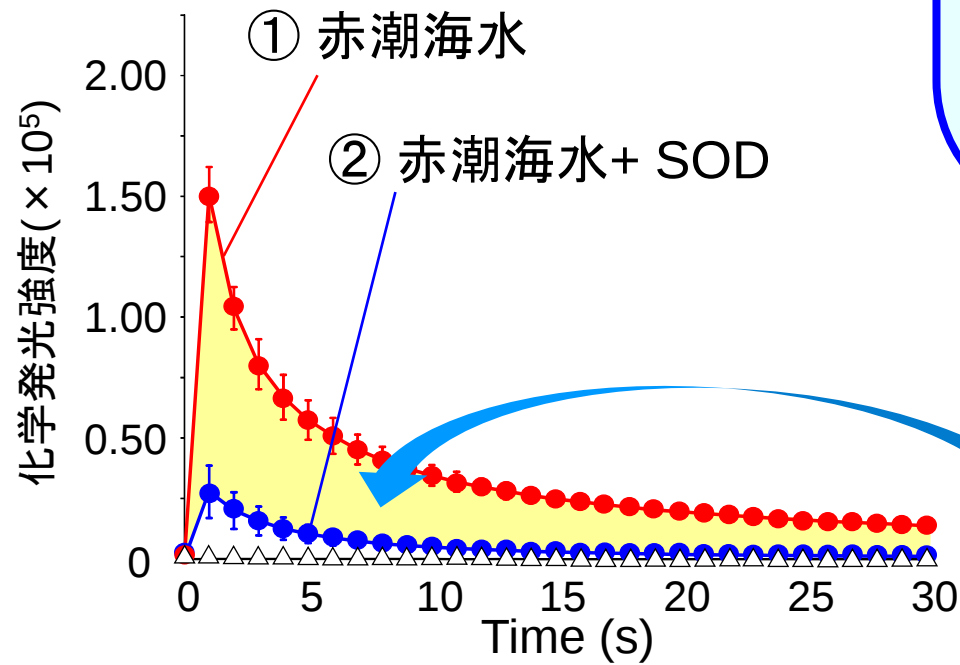
Ⅲ 培養液 (970 μL)

Ⅱ PBS or SOD (20 μL)

Ⅰ L-012 (10 μL)

O_2^- と発光試薬が反応して発光

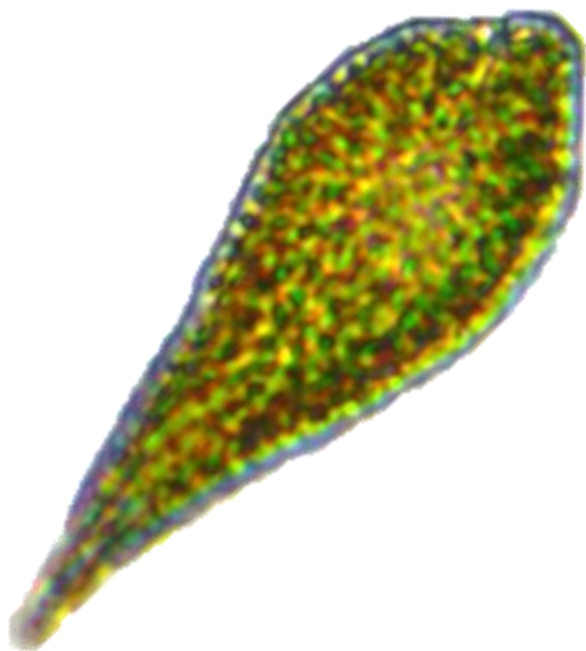
PBS : Phosphate buffered saline
SOD : Superoxide dismutase
L-012 : 化学発光試薬



① - ②

= O_2^- 産生レベル (黄色部分)

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*)

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>

2. (3) 必要な機器、道具

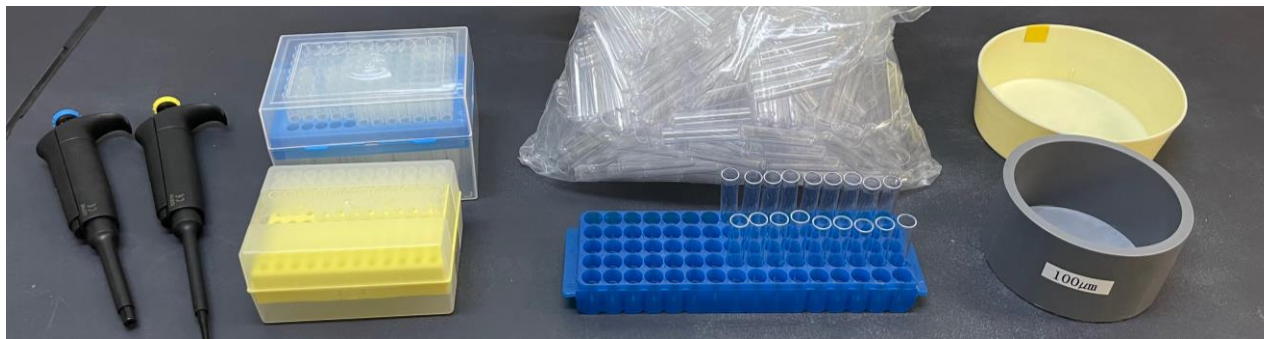
- ルミノメーター：発光量を計測する機器。
アトー製 AB-2270 ルミネッセンサー-Octa。

<https://www.atto.co.jp/products/luminescencedetection/luminometer/AB-2270>

- ・現場で使用する場合、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：塩ビ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：マイクロチューブなどに分注して、-20℃以下。遮光。

➤ PBS (無色透明)

【調整法】

① 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)

・塩化カリウム 2 g (最終濃度27 mM)

・リン酸水素二ナトリウム 1 2 水和 36.3g (最終濃度100 mM)

・リン酸二水素カリウム 2.4 g (最終濃度18 mM)

② 6Nの塩酸でpH=7.4に調整。

③ 1 Lにメスアップして、オートクレーブして4℃以下で保存（10倍濃度）。

④ ③を超純水で1/10に希釈して使用。

・保存：マイク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のPBSに2.56mgを溶解。

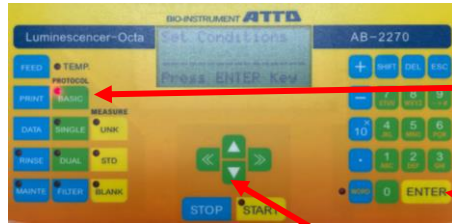
・保存：マイクロチューブなどに分注して-20℃以下。



L-012 PBS SOD

3. (2) ルミノメーターの事前設定

- ①電源を入れ、ENTERを押します。
下方方向のボタンを押して次画面を表示します。

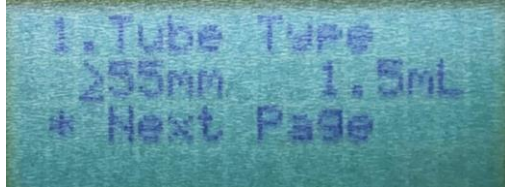


1. BASICを
選択しておく

2.

3.

- ②使用するチューブを55 mmに設定します。



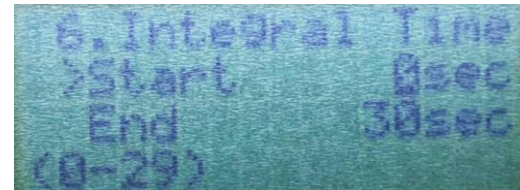
- ③計測時間を30 secに設定します。



- ④結果の表示設定をIntegralに設定します。



- ⑤積算する計測時間を0-30 secに設定します。



- ⑥感熱紙に印刷される表示形式を選択します。



ON : 毎秒の計測値を表示
OFF : 積算値のみを表示

※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

①ルミノメーターの電源を入れます。

②PROTOCOLのBASICを選択します。



③MEASUREのUNKを押し、計測名を入力します。



④ENTERを押した後、サンプル数を入力します（最大50サンプル）。



⑤ENTER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

①試薬 (L-012、SOD) の解凍・準備、ルミノメーターの電源を入れる。

②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。

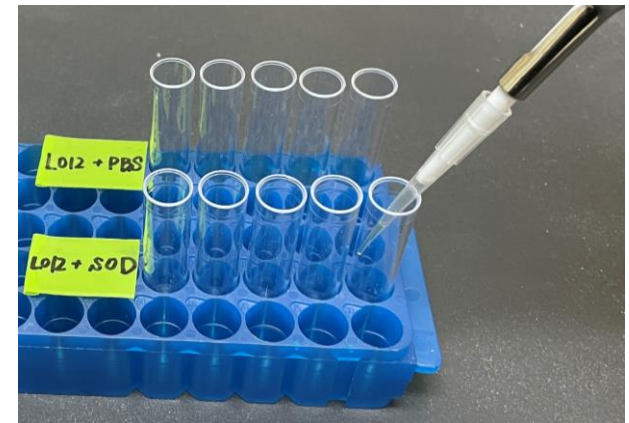


③L-012を10 μL ずつ、全て*のチューブに入れる。

*サンプル数の2倍の本数

④PBSを20 μL ずつ、半数のチューブに入れる。

⑤SODを20 μL ずつ、残り半数のチューブに入れる。



⑥④のチューブをルミノメーターにセットし、970 μ Lのサンプルを入れる。

⑦ルミノメーターで発光量（積算値）を計測。

※測定される発光量は相対値であり、**relative luminescence unit (RLU)** という単位が表示される

⑧⑤のチューブをルミノメーターにセットし、970 μ Lのサンプルを入れる。

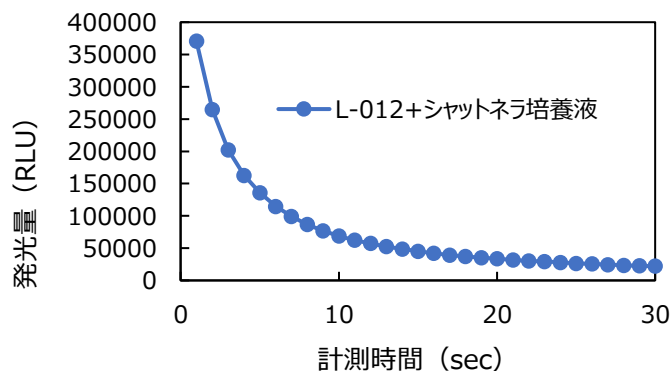
⑨ルミノメーターで発光量（積算値）を計測。

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。



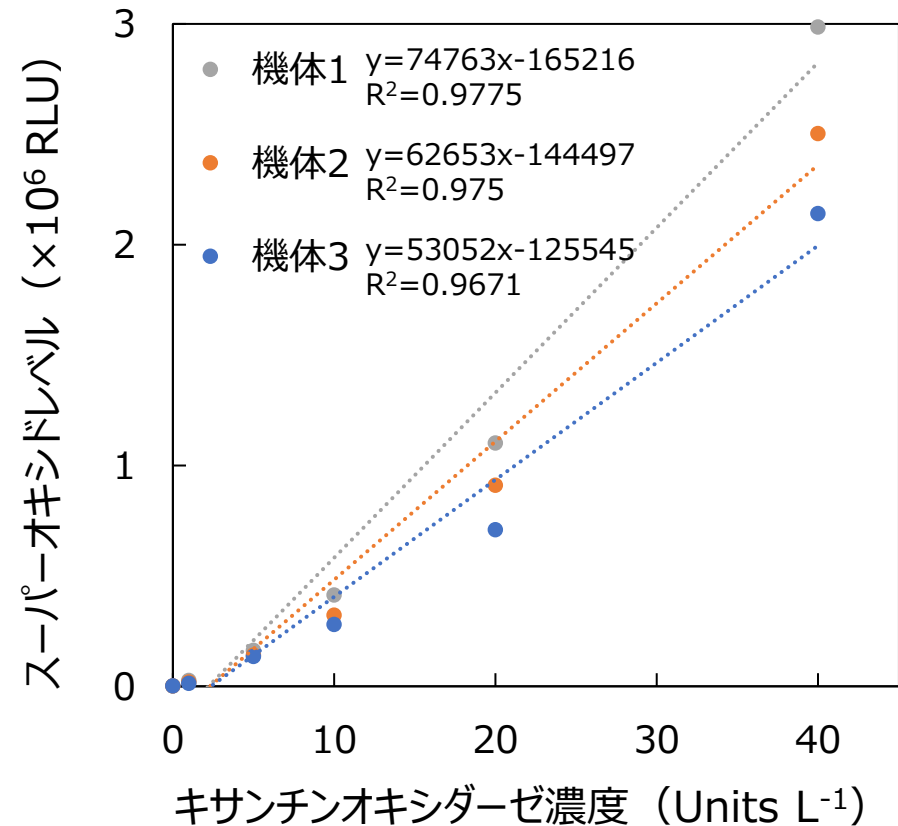
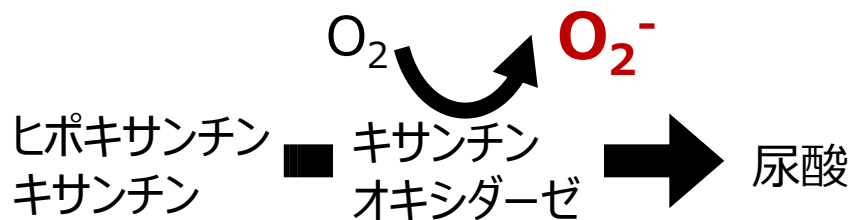
←L-012とシャットネラが混合されると
細胞が弱り、速やかに発光値が減衰する

- 試薬は、測定場所まで冷媒を入れた発泡スチロールなどで保管し、低温、遮光を保ちましょう。
- 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

機体番号	1	2	3
使用年数	1	5	2

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。



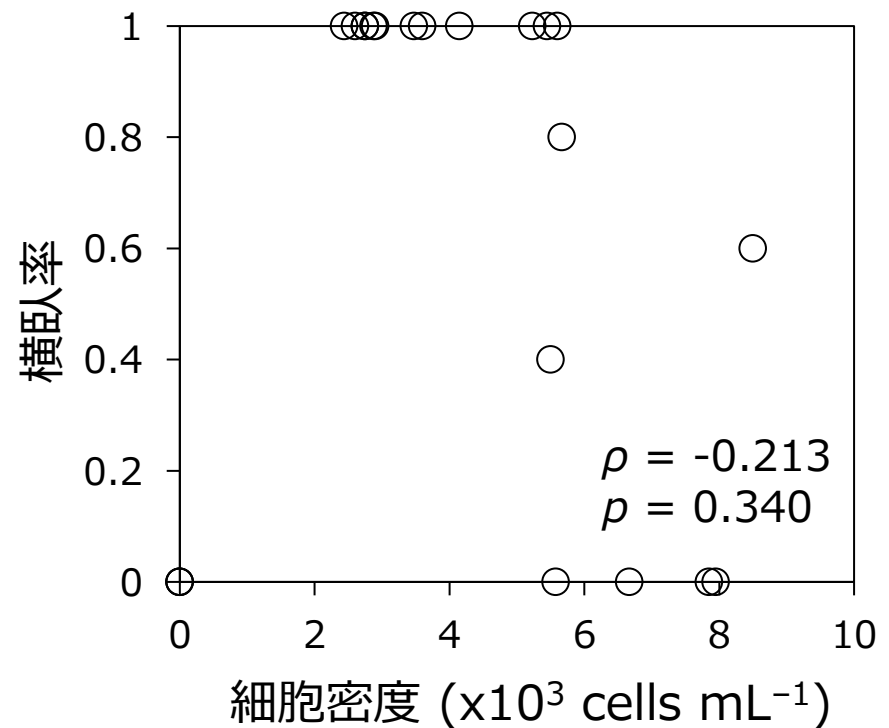
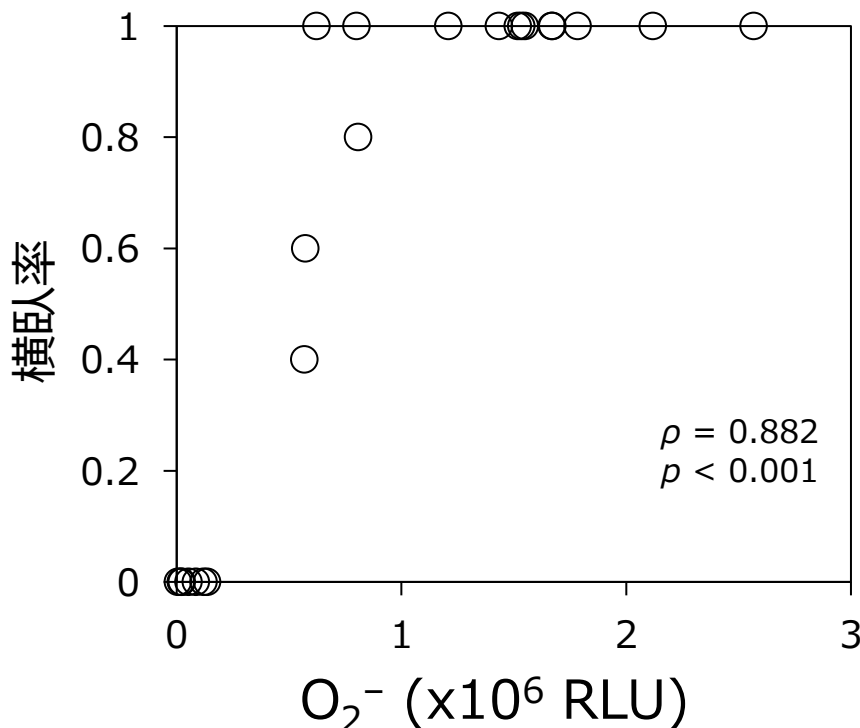
機体間でわずかに差があるが、データの解釈に影響を及ぼすほどではない

4.参考資料：スーパーオキシドレベルとブリへの毒性との関係 (培養株を用いた実験)

Shikata et al. (2021) Antioxidants

【手順】

- ①異なるシャットネラ培養株について、培養液のスーパーオキシドレベルを計測
- ②ブリ稚魚（平均6g）に培養液を暴露し、8時間後の横臥（ひん死状態）率を計測



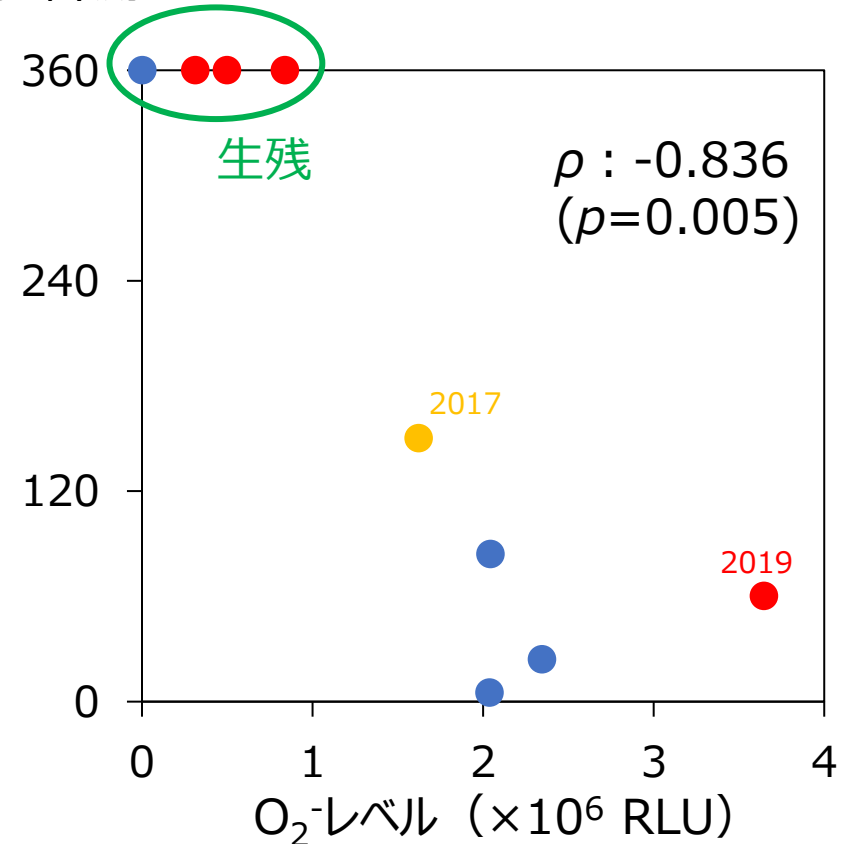
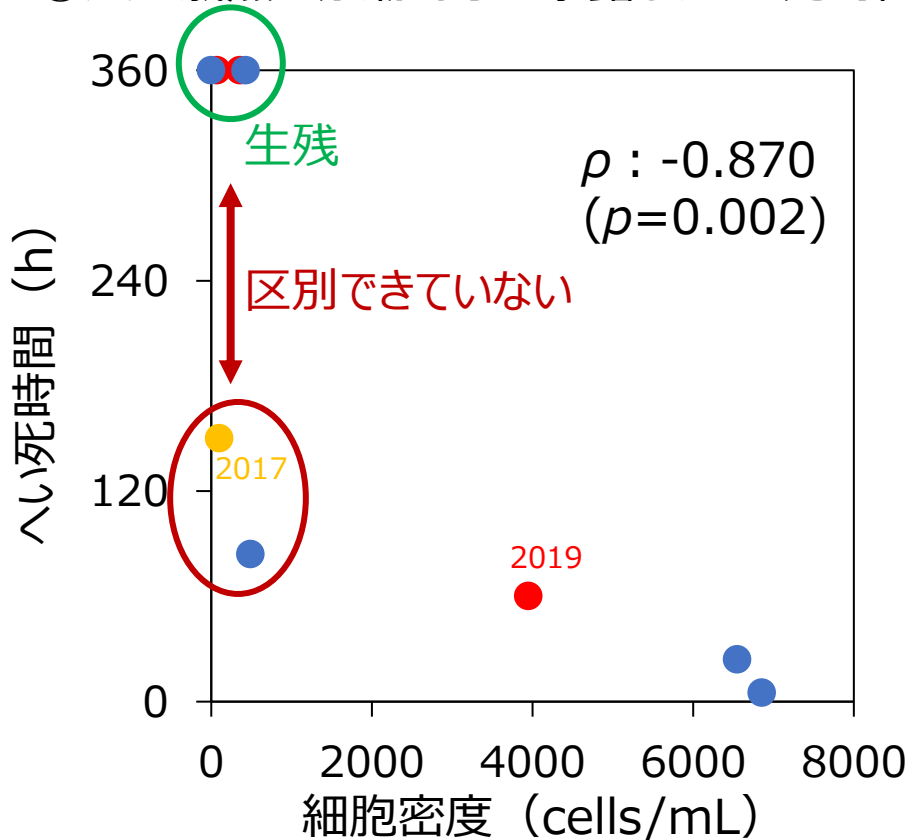
- スーパーオキシドレベルが高いほど毒性が高い。
- 500万RLU以上で横臥状態が生じる。
- この設定では細胞密度と毒性の間に有意な相関がない。

4. 参考資料：スーパーオキシドレベルと魚毒性の関係 (現場赤潮海水を用いた実験)

湯浅 (2022) 養殖ビジネス

【手順】

- ①異なる日時、場所で採取したシャットネラ赤潮海水のスーパーオキシドレベルを計測
- ②ブリ2歳魚に赤潮海水を暴露し、へい死時間を計測



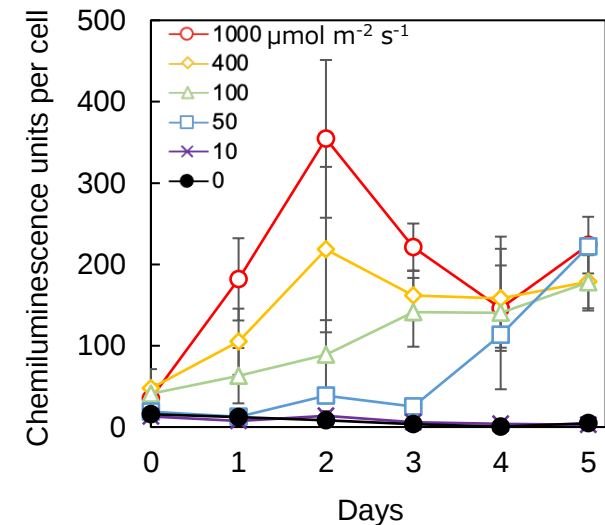
いずれも致死時間と有意に相関があるが、赤潮が薄い場合の毒性の検出率は、細胞密度よりもスーパーオキシドレベルの方が正確に計測できる。

4. 参考資料：スーパーオキシドレベルは原因プランクトンの生理状態や環境条件によって変化する

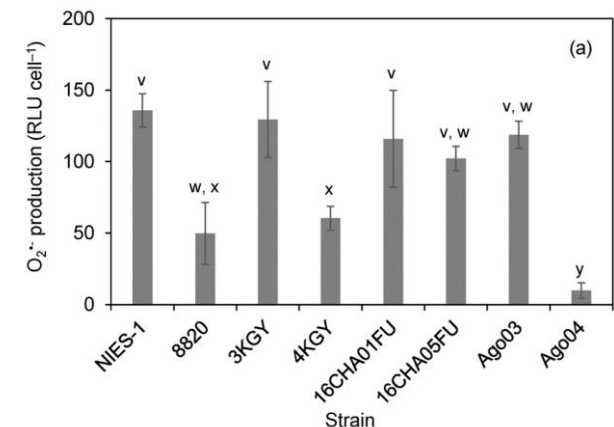
- 増殖フェーズ (Kim et al. 2004)
- 時間帯 (Kim et al. 2004)
- 光強度 (Yuasa et al. 2020)
- 栄養塩 (Yuasa et al. 2020)
- マンガン濃度、水温、塩分 (Yamasaki et al. 2021)
- 株 (Shikata et al. 2021)

培養光強度

Yuasa et al. (2020) J. photobiol. photochem. B: Biol.



Shikata et al. (2021) antioxidants

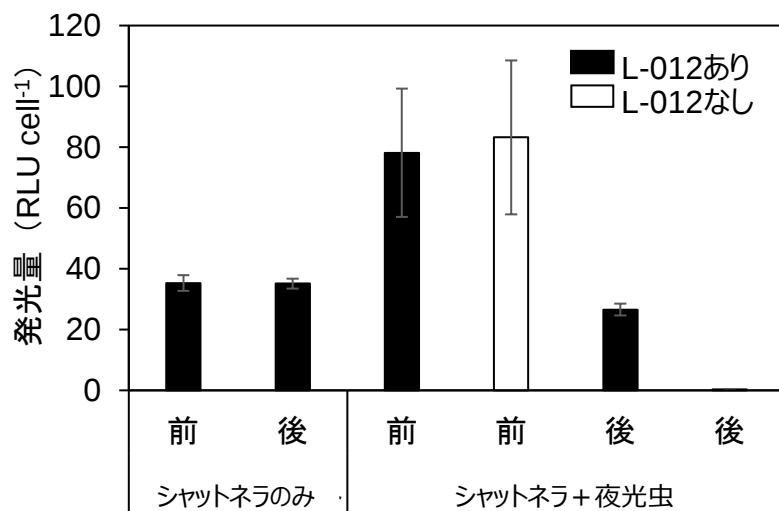


4. 参考資料：スーパーオキシドレベルに対する物理刺激の影響

湯浅（2022）養殖ビジネス

ふるい分け前後のシャットネラと夜光虫培養液の発光レベル

20,000 cells mL⁻¹のシャットネラ培養液と5 cells mL⁻¹の夜光虫培養液50 mLを混合し、目合い100 μmのふるいで濾過を行った。



赤潮海水のスーパーオキサイドレベルに対する採水手法の影響

2019年八代海のシャットネラ赤潮海水を、バケツあるいは電動ポンプで採水し、直ちにスーパーオキサイドレベルと細胞密度を計測した。

採水方法	採水場所	シャットネラ 細胞密度 (cells mL ⁻¹)	スーパーオキサイド レベル	細胞あたりの スーパーオキサイド レベル
手汲み採水	龍ヶ岳	3950	3648402	924
ポンプ採水		2816	2775	0.985

- ✓ シャットネラ培養液を目合い100 μmのふるいに通しても、スーパーオキシドレベルに影響はほとんどない。
- ✓ 赤潮海水をポンプで採水すると、スーパーオキシドレベルが劇的に低下する。
(しかし、魚毒性はある程度維持される)

5. 参考文献

1. 秋山佳織, 太田安彦, 徳永賢治 (2012) 化学発光法による全血を用いた好中球活性酸素産生能の検討. 生物試料分析 35: 140–145.
2. Hallegraeff GM, Dorantes-Aranda JJ, Mardones J, Seger A (2017) Review of progress in our understanding of fish-killing microalgae: Implications for management and mitigation. In: Marine and Fresh-Water Harmful Algae. Proceedings of the 17th International Conference on Harmful Algae (eds Proença LAO, Hallegraeff GM). International Society for the Study of Harmful Algae and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 148–153.
3. 今田伊助, 佐藤英介, 井上正康 (1999) 生体における活性酸素・フリーラジカルの産生と消去. 化学と生物 37: 411–419.
4. 小田達也 (2016) 2-11 *Chattonella*の魚毒性発現機構ー活性酸素関与の可能性. “有害有毒プランクトンの科学” (今井一朗・山口峰生・松岡数充編). 恒星社厚生閣, 東京, pp. 139–144.
5. Shikata T, Yuasa K, Kitatsuji S, Sakamoto S, Akita K, Fujinami Y, Nishiyama Y, Kotake T, Tanaka R, Yamasaki Y (2021) Superoxide production by the red tide-producing *Chattonella marina* complex (Raphidophyceae) correlates with toxicity to aquacultured fishes. *Antioxidants* 10: 1635.
6. Yuasa K, Shikata T, Ichikawa T, Tamura Y, Nishiyama Y. (2020) Nutrient deficiency stimulates extracellular secretion of superoxide in the noxious red-tide-forming algae *Chattonella antiqua*. *Harmful algae* 99: 101938.
7. Yuasa K, Shikata T, Kitatsuji S, Yamasaki Y, Nishiyama Y. (2020) Extracellular secretion of superoxide is regulated by photosynthetic electron transport in the noxious red-tide-forming raphidophyte *Chattonella antiqua*. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 2020; 205: 111839.
8. 湯浅光貴 (2022) 新しい赤潮研究と赤潮対策 第8回 有害赤潮プランクトンによるスーパーオキシド産生と魚類へい死. “養殖ビジネス” 緑書房, 東京, 754:47-51