

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月18日現在

機関番号：82708
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22658062
 研究課題名（和文） 硫黄同位体比の微細分布を用いた鉢クラゲ類平衡石の形成過程に関する研究
 研究課題名（英文） Study on the development of statolith of scyphozoa using detailed distribution of sulfur isotope
 研究代表者
 豊川 雅哉 (TOYOKAWA MASAYA)
 独立行政法人水産総合研究センター・西海区水産研究所・主任研究員
 研究者番号：60371837

研究成果の概要（和文）：鉢クラゲ類の平衡石の硫黄同位体比（ $\delta^{34}\text{S}$ ）を初めて測定した。ミズクラゲの平衡石の $\delta^{34}\text{S}$ は 10.8‰ (sd = 0.26, N = 10) の海水中で 12.0‰ (sd = 0.20, N = 3)、-0.4‰ (sd = 0.21, N = 7) の海水中で 2.2‰ (sd = 0.07, N = 2) であった。同位体分別は +1.2 から +2.6‰ と考えられた。硫黄同位体試薬で平衡石を標識し、NanoSIMS 分析用の試料を作成した。

研究成果の概要（英文）：Sulfur isotope ratio ($\delta^{34}\text{S}$) of statolith of *Aurelia* sp. was analyzed. The $\delta^{34}\text{S}$ of statolith of *Aurelia* sp. medusae which were raised in seawater of 10.8‰ (sd = 0.26, N = 10) was 12.0‰ (sd = 0.20, N = 3), those in seawater of -0.4‰ (sd = 0.21, N = 7) was 2.2‰ (sd = 0.07, N = 2). The isotope fluctuation was +0.7~ +2.2‰.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	0	1,300,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	180,000	2,080,000

研究分野：水産学

科研費の分科・細目：

キーワード：生態・行動、二次イオン質量分析、NanoSIMS、硫酸カルシウム、ミズクラゲ

1. 研究開始当初の背景

刺胞動物門の鉢クラゲ類にはミズクラゲ、エチゼンクラゲなど、大発生が社会問題化しているクラゲを含む。寿命は約1年とされるが、齢形質が確立していないため、成長速度や発生時期の正確な推定が困難である。

魚類では耳石の日周輪解析による日齢査定が、孵化時期の推定や体長組成の分析に用いられており、微量元素や同位体の組成比から水温や塩分など環境履歴の復元にも利用

されている。

鉢クラゲ類の平衡胞を構成する平衡石は硫酸カルシウム ($\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$) の結晶である。クラゲの成長とともに平衡石数が増加することや、平衡石の内部に輪紋が見られることから、齢形質として使える可能性があるが、平衡石の形成や肥大の過程は詳しく知られておらず、齢形質として認められるに至っていない。平衡石を齢形質として使うためには、新しい結晶ができる部位や、輪紋の形

成に関わる規則性を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

(1)本研究では、鉢クラゲ類平衡胞のナノスケールの元素組成、安定同位体比を走査型二次イオン質量分析計 (NanoSIMS) で分析し、発生時期や環境履歴の推定を可能にすることを目的とする。そのために、以下の2つが必要である。

(2)平衡石を硫黄の安定同位体 (^{34}S) で標識し、平衡胞中および平衡石断面上の硫黄同位体比 ($\delta^{34}\text{S}$) の分布を分析することで、平衡石形成における規則性を明らかにする。

(3)平衡石が形成される際に、環境水中から硫酸イオンを取り込むが、その際の同位体分別の大きさを明らかにする。

3. 研究の方法

(1)標識した平衡石の NanoSIMS による分析

直径 1 cm 程度にまで飼育したミズクラゲを、硫黄同位体試薬入りの人工海水中で 2 日間飼育し、平衡石を標識した。一部の個体は直ちに平衡胞を摘出し、90%エタノールで固定した。残りの個体はさらに飼育してから平衡胞を摘出した。摘出した平衡胞は、100%エタノール、次いで酸化プロピレンで置換し、さらにアラルダイト樹脂と置換し、加熱して硬化させた。硬化させた試料を研磨し、分析面を出して分析用試料とした。

(2)平衡石形成の際の同位体分別

①人工海水 3 種と自然海水について、0.4 μm のフィルターで濾過した後、常法で硫酸イオンを硫酸バリウムとして沈殿させ、燃焼-質量分析法で $\delta^{34}\text{S}$ を測定した。

②硫酸カルシウム 3 種を希塩酸で溶解し、常法で硫酸バリウムとして沈殿させ、燃焼-質量分析法で $\delta^{34}\text{S}$ を測定した。一方で硫酸カルシウムのままで同様に $\delta^{34}\text{S}$ を測定し、硫酸バリウム化した場合と比較した。

③燃焼-質量分析法では試料をスズ箔で包んで燃焼させるが、スズは融点が高いため、平衡胞の有機物を燃焼させて平衡石を残すには、融点が高い容器に入れて燃焼させる必要がある。燃焼後残った平衡石は回収が困難なので、燃焼に使用した容器ごと分析する必要がある。硫酸カルシウムをスズ箔で包んだ場合、銀箔で包んだ場合、銀箔で包んでさらにスズ箔で包んだ場合について、それぞれ燃焼-質量分析法で $\delta^{34}\text{S}$ を測定した。

④燃焼-質量分析法では分析値の量依存性が

知られている。試料量の効果を調べるため、硫酸カルシウムを 0.047-0.218 mg 銀箔とスズ箔で包み、燃焼-質量分析法で $\delta^{34}\text{S}$ を測定した。③で同様の方法で分析した試料量 0.409-0.465 mg の測定値を加えて試料量への測定値の依存性を解析した。

⑤ミズクラゲポリプを人工海水 2 種中で飼育し、水温を 23°C から 10°C まで低下させてクラゲを発生させた。発生させたクラゲは同じ銘柄の人工海水中で水温 23°C で飼育し、直径約 1 cm まで成長させた。成長したクラゲから平衡胞を摘出し、90%エタノールで固定した。平衡胞を約 90°C に加熱した MiliQ 水で洗浄し、脱塩した。脱塩した平衡胞を 100%エタノール中で保存し、銀箔で約 50 個ずつ包んだ。銀箔に入れた平衡胞を 500°C で 4 時間加熱し、有機物を飛ばして分析用試料とした。銀箔をさらにスズ箔で包んで燃焼-質量分析法で $\delta^{34}\text{S}$ を測定した。

4. 研究成果

(1)標識した平衡石の NanoSIMS による分析

図 1 のように、NanoSIMS 分析用の試料は作成できた。NanoSIMS による分析は、研究期間終了後の、2012 年度に行う予定である。

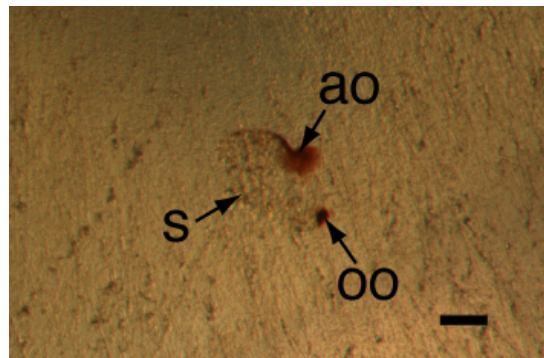


図 1 包埋研磨した平衡胞試料。スケールは 100 μm 、s: 平衡石、ao: 反口側眼点、oo: 口側眼点。

(2)平衡石形成の際の同位体分別

①人工海水と自然海水の $\delta^{34}\text{S}$

各種人工海水と自然海水の $\delta^{34}\text{S}$ は 10‰オーダーで異なっており、異なる同位体比条件下での同位体分別の実験や、標識とするために使用できることがわかった (表 1)。

表 1 各種人工海水と海水の $\delta^{34}\text{S}$ 。sd は標準偏差

	平均 (‰)	sd	標本数
人工海水 A 社	10.8	0.26	10
人工海水 B 社	-0.4	0.21	7
海水 (東京湾)	20.4	0.15	4

②硫酸カルシウムの $\delta^{34}\text{S}$ の分析法による違い

硫酸バリウム化してから燃焼-質量分析法で測定した場合と、硫酸カルシウム粉末のまま測定した場合を比較したところ、3種の試薬全てで直接分析した方が $\delta^{34}\text{S}$ が高くなり、その差は+0.1-0.5‰であった。測定値のばらつきも、やや大きくなった (表 2)。

硫酸カルシウムを硫酸バリウム化して分析するには、大量の試料が必要で、微量の平衡石を分析するには、硫酸カルシウムそのまま分析することが避けられない。バイアスは硫酸バリウム化によるものなのか、硫酸バリウムと硫酸カルシウムの燃焼過程の違いによるものなのか不明だが、海水中の硫酸イオンの $\delta^{34}\text{S}$ は硫酸バリウム化して測定したので、平衡石の $\delta^{34}\text{S}$ では、このバイアスを補正する必要がある。この測定結果を以下のモデルを仮定して線形分析したところ、直接分析の方が平均 0.28‰ (sd = 0.080) 測定値が大きくなることが示された。従って、直接分析による測定値から 0.28‰引く補正を行うこととした。

$$\Delta = a + b_1 * \text{Method} + b_2 * \text{Suppl} + e$$

Delta: $\delta^{34}\text{S}$ の測定値、Method: 測定方法、Suppl: 薬品の供給元、a, b1, b2: 係数、e: 正規分布する誤差項

表 2 硫酸カルシウムの供給元、および分析法別の $\delta^{34}\text{S}$ 。分析数は全て 2

	平均 (‰)	sd	分析法間の差 (‰)
硫酸バリウム化後分析			
A 社	20.6	0.07	
B 社	1.2	0.02	
C 社	-0.8	0.08	
直接分析			
A 社	21.1	0.14	+0.5
B 社	1.3	0.15	+0.1
C 社	-0.6	0.09	+0.2

③燃焼-質量分析法で銀箔を使った場合の影響

硫酸カルシウムを銀箔だけで包んだ場合、測定値が 1‰程度高くなるだけでなく、ばらつきも大きくなった。銀箔をさらにスズ箔で包んだ場合は、測定値のばらつきはスズ箔だけで包んだ場合と変わらず、平均値は 0.2‰大きくなった。(表 3)。平衡石の分析の際には銀箔をさらにスズ箔で包む必要があることが示された。また、測定値から 0.2‰減ずる補正を行うこととした。

表 3 スズ箔および銀箔とともに燃焼した場合の硫酸カルシウムの $\delta^{34}\text{S}$ 。分析数は全て 3

試料の包み方	平均 (‰)	sd
スズ箔のみ	12.3	0.08
銀箔のみ	13.4	0.17
銀箔とスズ箔	12.5	0.06

④試料量の効果

硫酸カルシウム試料量が約 0.2 mg では、試料量約 0.4 mg の時と分析値に変わりはないが、試料量が約 0.1 mg 以下では試料量が少なくなるにつれて分析値が大きくなった。(図 2)。従って、試料量が少ない時には補正の必要があることが示された。

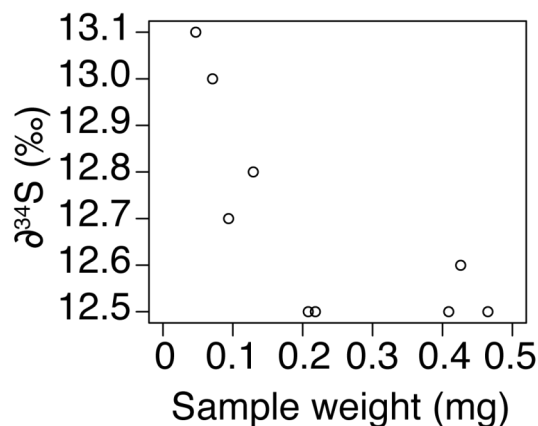


図 2 硫酸カルシウムの試料量と $\delta^{34}\text{S}$ 測定値の関係。

平衡石の分析では、硫酸カルシウムとしての重量ではなく、燃焼-質量分析法で質量数 64 と 66 (SO_2 の質量数) のカウントで得られる電圧×時間のピーク面積の合計と $\delta^{34}\text{S}$ の関係で補正の方が簡便かつ正確に試料量を反映する。図 3 に示すように、7.048-47.160 Vs の範囲で、ほぼ直線関係が成り立つので、以下の一次式により補正することにした。

$$D_{mod} = D_{mes} - 0.62 + 0.014247 \times \text{Area}$$

(7.048 < Area < 47.160)

D_{mod}: 補正した δ³⁴S、D_{mes}: δ³⁴S の測定値、
Area: 質量数 64 と 66 のピーク面積の合計 (Vs)

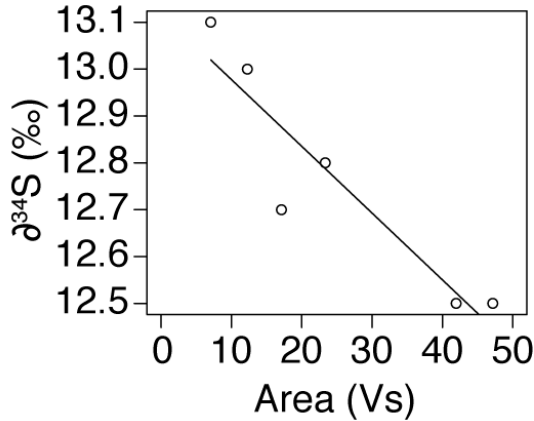


図3 硫酸カルシウム分析時の質量数 64 と 66 のピーク面積の合計 (但し 7.048 < Area < 47.160) と δ³⁴S 測定値の関係。

⑤ ミズクラゲ平衡石の同位体分別

①で δ³⁴S を分析した人工海水 A 社、および人工海水 B 社を使って、水温約 23℃ で育成したミズクラゲの平衡石の δ³⁴S は、補正後でそれぞれ平均 12.0‰ (sd = 0.20, N = 3), 2.2‰ (sd = 0.07, N = 2) となり (表 4)、同位体分別の大きさは +1.2‰ から +2.6‰ であった。

表 4 ミズクラゲの平衡石の δ³⁴S。

人工海水	測定平均 (‰)	補正後平均 (‰)	sd	測定数
A 社	12.6	12.0	0.20	3
B 社	2.9	2.2	0.07	2

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊川 雅哉 (TOYOKAWA MASAYA)

独立行政法人水産総合研究センター・西海

区水産研究所・資源海洋部・主任研究員

研究者番号: 60371837

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

佐野 有司 (SANO YUJI)

東京大学・大気海洋研究所・海洋化学部

門・教授

白井 厚太郎 (SHIRAI KOTARO)

東京大学・大気海洋研究所・国際沿岸海洋

研究センター・助教