

資 料

## 蛍光法によるクロロフィル *a* 濃度測定の研究機関比較

児玉武稔<sup>\*1</sup>・小埜恒夫<sup>\*2,3,4</sup>・葛西広海<sup>\*3</sup>・清本容子<sup>\*5</sup>・桑田 晃<sup>\*6</sup>

### Inter-laboratory comparison of *in vitro* chlorophyll *a* concentration using fluorometric methods

Taketoshi KODAMA, Tsuneo ONO, Hiromi KASAI, Yoko KIYOMOTO and Akira KUWATA

*In vitro* chlorophyll *a* concentration was compared among five laboratories using fluorometric methods with five pure chlorophyll *a* working solutions to evaluate the inter-laboratory difference of chlorophyll *a* concentration based on fluorimeters and their own calibrations. The coefficients of variation (*CV*s) of chlorophyll *a* concentration measured by six fluorimeters were 9.1–10.2%. The *CV*s of replication ( $n = 5$ ) were within 3.2% by one fluorimeter. While the chlorophyll *a* fluorescence values in samples transported to/from various laboratories were lower than those of non-transported samples, high concentrations were reported from the transported samples. Therefore, the difference of chlorophyll *a* concentration was attributed to the difference of calibration of each fluorimeter. Compared with previous replicate measurements, the *CV*s in our study were at the same level as or smaller than most of those in previous studies. In addition, reported accuracies of chlorophyll *a* concentration estimated by satellites and *in vivo* chlorophyll fluorimeters are lower than those of our *in vitro* chlorophyll *a* measurements. Hence, while further cross-calibrations among laboratories will be necessary, the values of *in vitro* chlorophyll *a* concentrations could be treated as featuring less than 10% uncertainty (*CV*).

キーワード：クロロフィル *a*, 蛍光法, 植物プランクトン, 植物色素  
2016年4月13日受付 2016年12月16日受理

海洋の大部分で植物プランクトンの炭酸固定が出発点となり、生物生産が駆動される。植物プランクトンの炭酸固定量、すなわち、基礎生産量（一次生産量）を推定する上で、植物プランクトン現存量は重要な指標である。したがって、海洋観測では環境水中の植物プランクトン現存量の測定は、継続的にかつ日常的になされており、古くは細胞数の計数、新しいものでは遺伝子やタンパク質量の測定など様々な手法が考案されている。

その中でも最も一般的なのはクロロフィル *a*（葉緑素、以後 Chl *a*）濃度の測定である（Parsons *et al.* 1984）。Chl *a* は光合成において光エネルギーを吸収する役割をもつ植物色素の1つで、光合成作用の主体を担っており、Chl *a* 濃度から植物プランクトンそのものの現存量推定が可能である。Chl *a* 濃度の測定方法は様々であり、蛍光光度センサーによって水温・塩分・溶存酸素濃度などと同じように、直接、海水中の植物プランクトンの Chl

\*1 国立研究開発法人 水産研究・教育機構 日本海区水産研究所 資源環境部  
〒951-8121 新潟県新潟市中央区水道町1丁目5939-22

Fisheries Oceanography Department, Japan Sea National Fisheries Research Institute, Japan Fisheries Research and Education Agency, Suido-cho 1-5939-22, Chuou, Niigata, Niigata, 951-8121, Japan  
takekodama@affrc.go.jp

\*2 国立研究開発法人 水産研究・教育機構 中央水産研究所

\*3 国立研究開発法人 水産研究・教育機構 北海道区水産研究所

\*4 現：国立研究開発法人 水産研究・教育機構 国際水産資源研究所

\*5 国立研究開発法人 水産研究・教育機構 西海区水産研究所

\*6 国立研究開発法人 水産研究・教育機構 東北水産研究所

*a* 濃度を測定できる (*in vivo* Chl *a* 濃度)。また、人工衛星でとらえた海色を利用して海面の Chl *a* 濃度 (海面 Chl *a* 濃度) の推定もされている。

一方で、これらの *in vivo* Chl *a* 濃度や海面 Chl *a* 濃度については校正が必要であり、したがって、海水中の植物プランクトンを捕集し有機溶媒に抽出して *in vitro* Chl *a* 濃度 (以後、*in vitro* は省略) を測定する必要がある。Chl *a* 濃度測定方法としては、最初に吸光度法が提案された (Richards and Thompson 1952)。しかし、検出感度が低く大量の水を濾過する必要があり、効率的な測定には向いていなかった。その後、Yentsch and Menzel (1963) が提案し、改良が進められている蛍光法は、Chl *a* に対して特異性が高く、少量の濾過で済むため、効率的である。ただし、蛍光法では、他の植物色素の影響を完全に取り除くことは不可能であり、正確な Chl *a* 濃度の推定には高速液体クロマトグラフィーの利用が必要である (Jeffrey *et al.* 1997)。この手法については、近年、超高速液体クロマトグラフィーの利用によって、濾過量・測定時間ともに大幅に減少しており (Fu *et al.* 2012)、今後、広く普及する可能性があるが、現状では、蛍光法による測定が最も広く採用されている。

水産研究・教育機構 (以後、機構) においても沿岸から沖合にかけての海洋観測調査で、海洋観測指針 (気象庁 1970) に準じた蛍光法による Chl *a* 濃度を測定している。蛍光法による Chl *a* 濃度測定においても、吸光度と標準液を利用した校正が必要であるが、その校正については研究所でそれぞれおこない、比較校正はほとんどなされていない。このことはつまり、海域間の Chl *a* 濃度の違いを評価する際に、その違いが実際の違いなのか、測定された機械による違いなのかを評価することを難しくしている。したがって、本研究では、機構内の 5 庁舎において、蛍光法による Chl *a* 濃度について機械に依存した差がどの程度生じるのかについて評価することを目的としておこなった。

## 材料と方法

日本全国 5 箇所が存在する機構の庁舎 (北海道区水産研究所釧路庁舎、東北区水産研究所塩釜庁舎、日本海区水産研究所新潟庁舎、中央水産研究所横浜庁舎、西海区水産研究所長崎庁舎) のクロロフィル分析用の蛍光光度計で、同一の試料を分析した。Chl *a* 粉末 (和光純薬工業, Lot No. ECH2934, 純度 98.3%) を *N,N*-ジメチルホルムアミド (特級, 和光純薬工業, 以後 DMF) で溶解させ、さらにその溶液を同じ DMF で S1 から S5 の 5 段階に希釈した。その際、厳密な希釈はしなかったため、これらの 5 種類の溶液中の絶対的な Chl *a* 濃度は分からないが、通常測定する Chl *a* 濃度範囲と溶媒抽出時の濃縮率 (数~数十倍) を勘案し、0~約 100  $\mu\text{g/L}$  となるように調製した。5 種類の溶液を、冷凍・暗条件で保冷剤とともに

に保冷容器に入れ、新潟市から各庁舎に送付した。輸送による分解などを評価するため、試料は 2 セット送付し、1 セットは各機関で分析し、もう 1 セットは新潟庁舎に返送し分析した。分析は標準液の調製から 50 日以内に完了した。

蛍光法による Chl *a* 濃度の測定方法は主に酸添加法 (Holm-Hansen *et al.* 1965) と酸非添加法 (Welschmeyer 1994) の 2 種類があり、各庁舎の蛍光光度計 (Turner Designs, 10-AU) のモジュールに合わせた方法で測定した。その結果、酸添加法で 2 セット (A, B)、酸非添加法で 4 セット (C~F) 測定した。庁舎数と測定セット数の違いは、2 種類の機械を利用した場合があるためである。2 種類の機械がある庁舎では、まず、酸非添加法で測定し、その後、同一の試料を酸添加法で測定した。酸添加法はクロロフィル *b* の影響をうけることが知られているが (Welschmeyer 1994)、本研究では、高純度の Chl *a* 標準物質を用いており、方法による濃度差はほぼ存在しない。

## 結果とデータの検証

新潟庁舎以外に郵送し返送されてきた試料 (各試料  $n=4$ ) と新潟庁舎で 50 日間冷凍保存されていた試料 (各試料  $n=5$ ) 間には 5 段階のうち 4 段階の試料 (S1~S4) で、酸添加法によって測定した蛍光値 (酸添加前と添加後の差) に違いが認められ、冷凍保存されていた試料に対し、輸送を経験した試料は蛍光値が平均値で比較した場合 91~97% に低下していた (図 1)。すなわち、蛍光値で S1 は  $190 \pm 6$  から  $178 \pm 5$  へ、S2 は  $96.2 \pm 1.2$  から  $90.6 \pm 0.7$  へ、S3 は  $17.1 \pm 0.2$  から  $15.8 \pm 0.4$  へ、S4 は  $8.83 \pm 0.24$  から  $8.33 \pm 0.13$  へとそれぞれ有意に低下した (Mann-Whitney *U* test,  $p < 0.05$ )。本研究で溶媒に用いた DMF は Chl *a* の保存性が高く、冷蔵・暗条件下では 1ヶ月程度は変化しないことが報告されているが (Suzuki and Ishimaru 1990)、冷凍・暗条件下であっても輸送中に Chl *a* が分解されていることが示唆された。Chl *a* は主に熱、pH の変化、酸素によって分解されることが知られているが (Jeffrey *et al.* 1997)、本研究では値が低下した要因については分からなかった。

各庁舎での分析結果 (A~F) を比べると庁舎間に差が見られ、S1~S4 については、C が最も高く、次いで A と D が高く、そして B と E、F は低くほぼ同じ濃度であり (表 1, 図 2)、各標準液の濃度における変動係数 (CV) は 9.8~10.2% であった (表 1)。S5 については、CV は他の試料よりもやや低く (9.1%, 表 1)、C が最も高い濃度を報告していることは S1~S4 と一致しているが、ついで B の報告値が高くなっており、庁舎間の変動は S1~S4 に認められた傾向とは異なった (表 1, 図 2)。これらの庁舎間での濃度差は、いずれも新潟庁舎で 5 回繰り返し測定をおこなった際の CV は 3.2% 以下であっ

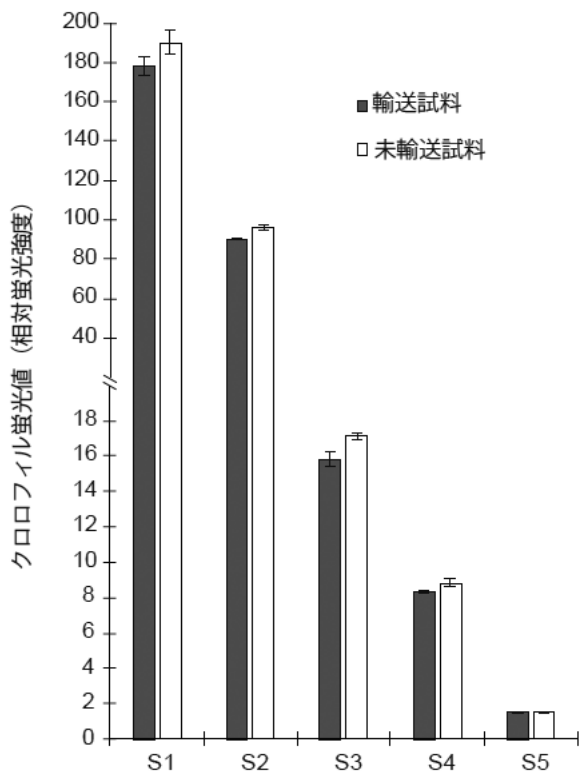


図 1. 各 Chl a 標準液 (S1~S5) における新潟庁舎で酸添加法のモジュール設定で同時測定した輸送経験試料 (黒) と未輸送保存試料 (白) 間の蛍光値の違い  
上部のバーは標準偏差を示す

たことから、測定精度では説明できない。上記の考察のように輸送中の分解の違いが影響している可能性があるが、返送された試料には庁舎ごとの傾向は認められなかった。したがって、本研究で得られた濃度差は、機器設定や校正の違いに依存していると考えられる。特に、C については、B や E、F と比較すると S1~S4 の濃度が 26% 以上、高くなっていた (表 1, 図 2)。すなわち、機構における Chl a 濃度については最大で 25% 程度の差が生じているといえる。

本研究では、各庁舎で、測定の 1ヶ月前以内に Chl a の標準物質による校正をおこなうか、測定の直前・直後

に固形標準物質 (Turner Designs, Solid Standard) の値が校正時に測定した値から大きく、新潟庁舎の場合は 5% 以上、変化していないことを確かめてから測定をおこなっている。また、上述したように S1~S4 の濃度については、C が最も高く、A、D がそれに続き、B、E、F が同程度であるという傾向は同じであった (表 1, 図 2)。すなわち、本研究で得られた庁舎間の濃度差は、各庁舎における蛍光光度計の校正過程で生じた差を反映していると考えられる。蛍光光度計の校正は、Chl a の標準物質を DMF で溶解させ、吸光光度計で濃度決定した原液の希釈液列を作成し、それを蛍光光度計で測定し、得られた蛍光値を対応させることでおこなう。測定結果が庁舎ごとに異なる要因としては、校正過程で生じた誤差や作業中の Chl a の分解などが考えられるが、本研究では、その点は明らかにできなかった。

### データ利用の注意点

過去の Chl a 濃度の研究所間比較をみると、Moon *et al.* (2014) は、韓国国内では Chl a の蛍光法による測定の研究間での CV は 1.45~2.05% で、手法を高速液体クロマトグラフィーや吸光光度法まで対象に広げても 1.07~2.95% であることを報告している。この値は本研究で得られた結果 (9.1~10.2%) よりも小さい。一方、Schilling *et al.* (2006) はバルト海から得られた 2 種類の天然海水から調整した試料をドイツ国内の 11 機関で測定したところ 12~31% の変動があったことを報告している。また、Nusch (1984) は、日本規格協会 (2001) でその結果に間違いがある可能性が指摘されているものの、3 種類の試料を 17~18 実験室で測定したところ CV が 5~11% であったことが報告している。これらの値は本研究と同等程度ある。日本においても古谷 (1996) が国内 26 機関での比較をおこなっており、本研究と同様に Chl a 標準物質をターナー蛍光光度計で測定した場合の CV は本研究の結果よりも高い 16.1~27.7% であったことを報告している。また、高速液体クロマトグラフィーによる測定方法の比較では、地中海で取得された試料では 4 研究室間の平均値よりも 20% 以上高い研究室もある (Claustre *et al.* 2004)。また、天然試料では同じ場所

表 1. 各標準液 (S1~S5) に含まれる Chl a 濃度の各庁舎 (A~F) での測定結果とその平均値, 標準偏差, 変動係数

区分	A ( $\mu\text{g/L}$ )	B ( $\mu\text{g/L}$ )	C ( $\mu\text{g/L}$ )	D ( $\mu\text{g/L}$ )	E ( $\mu\text{g/L}$ )	F ( $\mu\text{g/L}$ )	平均 ( $\mu\text{g/L}$ )	標準偏差	変動係数: CV (%)
S1	88.5	74.9	97.3	88.3	76.9	74.8	83.5	8.49	10.2
S2	45.0	39.8	50.2	45.0	39.8	38.0	43.0	4.21	9.8
S3	8.11	7.06	8.94	8.02	6.95	6.87	7.66	0.76	9.9
S4	4.14	3.60	4.60	4.14	3.57	3.55	3.94	0.39	10.0
S5	0.719	0.787	0.791	0.718	0.619	0.644	0.713	0.065	9.1

カッコ内は単位を示す

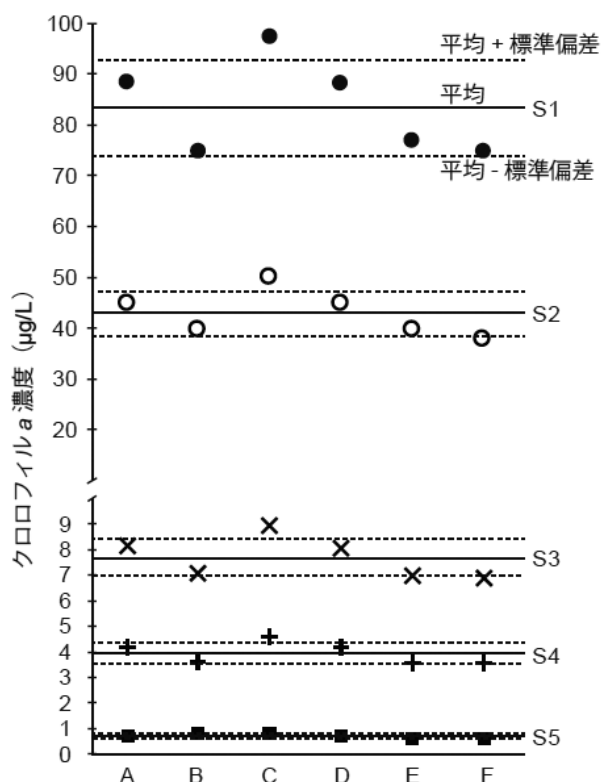


図2. 標準液 (S1; ●, S2; ○, S3; ×, S4; +, S5; ■) 中の Chl a 濃度の各機関での違い (A~F) A, B は酸添加法, C~F は酸非添加法で測定された各標準液での実線, 点線はそれぞれ各試料の平均値, 平均値±標準偏差を示す

から得られた試料を同じ機械で測定しても 28~72% 程度ばらつくことも報告されている (Dos Santos et al. 2003)。したがって、機構内での Chl a 濃度のばらつきは小さいとは言えないが、天然試料の測定結果については庁舎ごとのバイアスを考慮する必要はなく、蛍光法による Chl a 濃度の測定結果についてはこの程度の不確かさは含まれているものとして取り扱うべきである。

Chl a 濃度は人工衛星や蛍光光度計で直接、海水を測定することでも値が得られるが、人工衛星を利用した海面 Chl a 濃度は、南大洋での結果から精度が 35% であったこと (Fantoni et al. 2010)、海水を直接測定した *in vivo* Chl a 濃度は、昼夜に差があることが知られており、その差は海域によって異なり (Holm-Hansen et al. 2000)、昼夜間の差が数倍になることもある (Dandonneau and Neveux 1997)。したがって、蛍光法による Chl a 濃度の推定は、人工衛星や現場センサーと比較すると信頼性が高い方法であるといえる。しかし、今後、気候変動にともなう海洋環境変動の検出ではより高い精度での分析が必要になってくることが考えられ、このような研究所間での比較や相互検定などを今後も継続的にこなうと

もに、同様のモニタリングをおこなっている他機関との比較についても検討する必要がある。

## 謝辞

本資料を出版するにあたって編集委員ならびに 2 名の匿名査読者から有意義なコメントをいただいた。本研究を実施するにあたっては、水産総合研究センターの運営費交付金ならびに農林水産技術会議課題「気候変動に対応した循環型食料生産等の確立のためのプロジェクト」から助成をうけた。

## 参考文献

- Claustre H, Hooker S B, Van Heukelem L, Berthon J F, Barlow R, Ras J, Sessions H, Targa C, Thomas C S, van der Linde D, Marty J C (2004) An intercomparison of HPLC phytoplankton pigment methods using in situ samples: application to remote sensing and database activities. *Mar. Chem.*, **85**, 41-61.
- Dandonneau Y, Neveux J (1997) Diel variations of *in vivo* fluorescence in the eastern equatorial Pacific: an unvarying pattern. *Deep-Sea Res. II*, **44**, 1869-1880.
- Dos Santos A C A, Calijuri M C, Moraes E M, Dorno M A T, Falco P B, Carvalho D P, Deberdt G L B, Benassi S F (2003) Comparison of three methods for Chlorophyll determination: Spectrophotometry and Fluorimetry in samples containing pigment mixtures and spectrophotometry in samples with separate pigments through High Performance Liquid Chromatography. *Acta Limnol. Bras.*, **15**, 7-18.
- Fantoni R, Fiorani L, Okladnikov I G, Palucci A (2010) Comparison of SeaWiFS, MODIS-Terra, MODIS-Aqua and MERIS satellites in the Southern Ocean. *Optoelectron Adv. Mat.*, **4**, 764-768.
- Fu W, Magnúsdóttir M, Brynjólfsson S, Pálsson B Ø, Paglia G (2012) UPLC-UV-MS<sup>E</sup> analysis for quantification and identification of major carotenoid and chlorophyll species in algae. *Anal. Bioanal. Chem.* **404**, 3145-3154.
- 古谷研 (1996) 蛍光法によるクロロフィル a の測定「NASDA/EORC OCTS technical memorandum volume 3: 校正・検証のためのトールズデータ取得マニュアル」(宇宙開発事業団地球観測データ解析研究センター編), 宇宙開発事業団, 東京, p. 10-23.
- Holm-Hansen O, Lorenzen C J, Holmes R W, Strickland J D H (1965) Fluorometric determination of chlorophyll. *J. Cons. int. Explor. Mer.* **30**, 3-15.
- Holm-Hansen O, Amos A, Hewes C (2000) Reliability of estimating chlorophyll a concentrations in Antarctic waters by measurement of *in situ* chlorophyll a fluorescence. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **196**, 103-110.
- Jeffrey S W, Mantoura R F C, Wright S W (1997) Phytoplankton pigments in oceanography: Guidelines to modern methods. UNESCO Publishing, Paris, 661 p.
- 気象庁 (1970) 植物色素の測定「海洋観測指針」(気象庁編), 日本海洋学会, 東京, p. 250-254.
- Moon C R, Kang D J, Park M O, Noh J H, Yoo I J, Moon J E, Shin K H, Kim Y S, Choi J K, Suh Y S (2014) An inter-laboratory



- comparison study on chlorophyll a determination in seawater. *The Sea, J. Korean Soc. Oceanogr.*, **19**, 76-87. (in Korean with English Abstract)
- 日本規格協会 (2001) 水質—化学的パラメータの測定—クロロフィル a 濃度の吸光光度定量, 日本規格協会編, 東京, 15 p.
- Nusch E A (1984) Results of interlaboratory ringtests concerning the determination of chlorophyll-a in water. *Z. Wasser. Abwass. For.*, **17**, 89-94.
- Parsons T R, Maita Y, Lalli C M (1984) A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. Pergamon Press, Oxford, 173 p.
- Richards F A, Thompson T G (1952) The estimation and characterization of plankton populations by pigment analyses. 2. A spectrophotometric method for the estimation of planktonpigments. *J. Mar. Res.*, **11**, 156-172.
- Schilling P, Powilleit M, Uhlig S (2006) Chlorophyll-a determination: results of an interlaboratory comparison. *Accred. Qual. Assur.*, **11**, 462-469.
- Suzuki R, Ishimaru T (1990) An improved method for the determination of phytoplankton chlorophyll using N, N-dimethylformamide. *J. Oceanogr. Soc. Japan*, **46**, 190-194.
- Welschmeyer N A (1994) Fluorometric analysis of chlorophyll a in the presence of chlorophyll b and pheopigments. *Limnol. Oceanogr.*, **39**, 1985-1992.
- Yentsch C S, Menzel D W (1963) A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. *Deep Sea Res.*, **3**, 221-231.