

平成 22 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19510030

研究課題名（和文）誘電解析法を用いた水環境の生物学的モニタリング

研究課題名（英文）An aquatic bio-monitoring system using dielectric analysis

研究代表者

洲崎 敏伸（SUZAKI TOSHINOBU）

神戸大学・理学研究科・准教授

研究者番号：00187692

研究成果の概要（和文）：本研究は、原生動物を用いて、水中における有害物質をモニターできる水質監視システムを開発することを目的とした。まず、原生動物懸濁液の誘電特性に関する測定データを解析するためのプログラムを自作した。これを用いてユーグレナなどの誘電挙動を測定・解析した結果、細胞体・細胞膜・およびオルガネラに生じる形態的・電気的性質の変化を誘電挙動の違いとして捉えることができ、本システムが有用であることが実証できた。

研究成果の概要（英文）：This research was aimed to develop a new approach for monitoring aquatic toxicants by using protozoan cells. A measuring device and a computer program were newly developed to monitor various morphological and electrical parameters of free-living protozoan cells in suspension. In order to evaluate feasibility of this system, *Euglena gracilis* was used as a test organism. As a result, the dielectric method presented here appeared to be applicable for monitoring toxicity on the cell shape and electrical properties of the plasma membrane and cell organelles.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：原生生物学

科研費の分科・細目：環境学（環境影響評価・環境政策）

キーワード：水質モニタリング、誘電解析、インピーダンス、原生動物、バイオアッセイ、国際研究者交流、中国

1. 研究開始当初の背景

(1) 未知の有害化学物質が水環境中に放出された場合、それを確実・迅速に検出する完全な環境汚染モニタリングシステムは、残念ながら今のところ存在していない。環境汚染

を早い段階で検出してそれを未然に防止することは重要かつ必要であるが、通常の化学分析法は検出に時間がかかり、早期の段階での水質汚染を検出することは難しい。そこで、生物材料を用いた水質モニタリングの試み

が、これまでもいくつかなされてきた。しかし、これらの方法には、1) 生物材料を準備することに経費と時間がかかる、2) 運動をモニターするための複雑な装置が必要である、3) 生物の示す変化を確認するのに少なくとも数十分の時間を要する、4) 検知感度が低い、4) 魚類などのような大型の生物体内に取り込まれた有害物質は、特定の臓器・組織に蓄積されることにより、生物体自体の観察可能な変化が生じるまでに時間がかかってしまうことがある、などの難点があった。すなわち、環境汚染をより早い段階で検出ために、これらの難点を克服する、高性能の生物検定系の開発が求められていた。

(2) 私たちの研究グループは、これまでに顕微画像解析法と電気生理学的手法を併用した新しい環境汚染モニタリングシステムとして、タイヨウチュウやユグレナなどの原生動物を利用したバイオアッセイシステムの可能性に関する基礎的実験を行ってきた。その結果、これらの原生動物には水環境中の有害物質に対してきわめて鋭敏な反応を示すことがわかった。そこで、このような基礎的知見を基に、原生動物を用いたまったく新しい水質モニタリング装置の開発を着想した。

2. 研究の目的

本研究の目標は、原生動物を水質汚染の指標生物として利用し、水中における有害物質の有無を即座に確認できるバイオモニタリングシステムを開発することとした。そのための具体的な目的としては、1) 細胞毒性のメカニズムを細胞生物学的に解明すること、2) モニタリングシステムを試作し、実際の性能の評価を行うこと、である。毒性メカニズムの解明に関しては、細胞に及ぼす様々な有害物質の効果を電子顕微鏡法により形態的に判定し、インピーダンス計測により、各細胞コンパートメントの持つ電気的特性の変化を判定する。モニタリングシステムの構築にあたっては、画像解析に加えてインピーダンス測定も可能となる装置の開発を目指した。画像解析とインピーダンス解析のためのプログラムは新たに設計・開発し、リアルタイムで原生動物細胞の形態と電気特性を計測できる水質監視装置を組み立てることとした。この装置にさまざまな濃度の有害化学物質を導入し、細胞の変化を測定した上で、試験液として実際の上水採取地の水試料を流し、その性能を評価する。本研究課題の目標が達成されれば、環境汚染に対するこれまでにない検出感度のバイオアッセイ系が確立され、有害化学物質による環境汚染の早期検出が可能となるであろう。

3. 研究の方法

(1) ユグレナに対する細胞の急性毒性のメカニズム

これまでの研究により、ユグレナやタイヨウチュウは、様々な重金属や有機化合物に対して鋭敏な急性の反応を示すことを見出している。低濃度の有害化学物質に対し、太陽虫は軸足の短縮反応を、ユグレナは細胞の球形化という顕著な反応を示す。しかし、これらの有害物質が、細胞のどのような領域に影響を及ぼしているのかについては、まったく調べられていなかった。

原生動物の細胞は、基本的には細胞膜に包まれた様々な細胞構造から成り、ヒトを含む多細胞生物と細胞構造はまったく同じであるので、毒性発現の機構も共通していると考えられる。細胞内部には、核や様々な細胞小器官が存在している。誘電解析法（インピーダンス法）は、このような細胞各部の物理的性質を、細胞を破壊することなく生きたままで計測することのできる優れた非侵襲的測定法である。そこで、様々な有害物質で処理した原生動物細胞を、並行板コンデンサー型測定セルを用いてインピーダンスを広帯域インピーダンスアナライザーで測定し、その電気的パラメータの周波数特性を調べた。得られたインピーダンス特性の測定データを、現象論解析および原生動物の細胞形態を反映した理論解析のアルゴリズムを用いて解析し、細胞各部の電気的パラメータを算出した。これにより、有害物質がどの細胞小器官に対してどのように影響を示したのかを推定した。

(2) インピーダンス解析システムの試作開発

次に、原生動物を水質汚染の指標生物として利用し、試験水中における有害物質の有無を即座に確認するためのバイオモニタリングシステムを開発した。モニタリングシステムの構造は、顕微鏡部分と画像解析部分、さらにインピーダンス解析部分からなる。セルには一方から試験水を導入し、他方から排出するように、小型ポンプを用いたフロースルー型のものとした。また、セルには並行板コンデンサー型の白金電極を挿入・装着し、細胞懸濁液全体のインピーダンスを測定した。インピーダンス解析のためのプログラムは新たに設計・開発した。

(3) モニタリングシステムの性能試験

このようにして作製したモニタリングシステムを用いて、様々な試験水の水質を監視するためのテスト運転を行った。まず、様々な有害物質を、様々な濃度で装置に流し、原生動物の反応性を調べた。

4. 研究成果

(1) 誘電解析プログラムの開発

測定により得られた原生動物の細胞懸濁液のインピーダンス特性のデータを、現象論解析および原生動物の細胞形態を反映した理論解析のアルゴリズムを用いて解析し、細胞各部の電気的パラメータを算出するためのWindows対応のコンピュータプログラムを新たに開発し、ホームページ上で公開した。これにより、有害物質がどの細胞小器官に対してどのように影響を示したのかを推定することが可能となった。誘電解析プログラムは、中国・寧波大学の馬青教授との国際共同研究により開発した。2008年10月22日～29日には、洲崎が寧波大学を訪問し、馬教授の研究室で稼動している誘電測定装置に解析プログラムを組み込む作業を行った。

実験材料の原生動物としては、ユーグレナとタイヨウチュウを選び、これらの生物が様々な重金属や有機化合物に対して鋭敏な急性の反応を示すことを確認した。具体的には、低濃度の有害化学物質に対し、太陽虫は軸足の短縮反応を、ユーグレナは細胞の球形化という顕著な反応を示した。これらの形態的变化をモニターできる、小型の顕微鏡装置の開発も行った。

(2) モニタリングシステムの試作と、実際の性能評価

様々な有害物質で処理した原生動物細胞を、並行板コンデンサー型測定セルを用いてインピーダンスを広帯域インピーダンスアナライザーで測定し、その電気的パラメータの周波数特性を調べた。また、ビデオ顕微鏡を用いて細胞の形態解析も行うことのできる水質監視バイオモニタリング装置の試作を行った。さらに、連続測定可能な誘電測定システムを開発することを目的として、流動

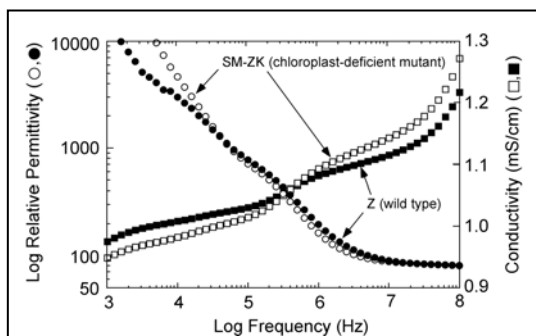


図1 誘電挙動の実測例

ミドリムシの葉緑体欠損株 (SM-ZK) と野生株 (Z) の細胞懸濁液の比誘電率 (relative permittivity) と導電率 (conductivity) の周波数依存性を示す。ユーグレナの細胞構造の変化を誘電挙動の変化として捉えることができた。

型測定セルを考案し、細胞の形態変化に対応した誘電パラメータの実時間測定を試みた。これらは、日本原生動物学会と日本動物学会にてその成果を発表した。さらに、この装置に誘電解析システムを組み込むための基礎的な検討を進めた。最後に、試作した装置を利用して、ユーグレナを用いたシステムの性能試験を行った。具体的には、①外的刺激を受けて球形化したユーグレナと正常なユーグレナの誘電挙動を比較することで、細胞の形態変化を電気的に推定可能かを検証した。また、②ユーグレナの葉緑体欠損株と正常株の誘電挙動を比較することにより、細胞を生かした状態で細胞内小器官である葉緑体の電気的特性を推定可能かどうか検討した。その結果、細胞の形態変化に加えて、ユーグレナの葉緑体の有無までも誘電挙動の違いとして捉えることが、この手法により可能であることがわかった (図1)。

本研究では、新たに開発したシステムが細胞の形状やオルガネラの変化を定量的にモニターできる優れた方法であることを実証した。今後は、この方法の実用化についての検討を行う必要がある。実用化に向けての問題点としては、①細胞懸濁液のインピーダンスを測定するための装置 (市販のインピーダンスアナライザー) は汎用性に乏しく、本システムに適合した新たなアナライザーの開発が必要である、②多種類の有害物質を全て網羅したシステムの検証がまだできていない、などがあげられる。しかし、これらが解決できれば、本システムは従来のシステムよりも安価に構築でき、高い感度を有するので、広範囲な現場における水環境バイオモニタリングシステムの標準形として発展する可能性がある。

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6件)

①Fukuizumi, S., Suzaki, T., Ando, M. (2010) Dielectric behavior of the flagellate *Euglena gracilis* SM-ZK, a permanent chloroplast-lacking mutant. Jpn. J. Protozool., 43:41-42.

②Enomoto, T., Fukuizumi, S., Edamatsu M., Suzaki T. and Ando, M. (2009) Improvement of a flow-through type chamber for an aquatic bio-monitoring system using adhesiveness to substratum of heliozoon cells. Jpn. J. Protozool., 42:22-23.

③Fukuizumi, S., Enomoto, T., Edamatsu, M.,

Suzaki, T., Ando, M. (2009) Continuous dielectric measurement system for monitoring cell-shape dynamics in the flagellate *Euglena gracilis*. Jpn. J. Protozool., 42:74.

- ④Suzaki, T. (2008) Development of a dielectric analysis program for monitoring morphological and physiological properties of protozoan cells. Jpn. J. Protozool., 41: 54-55.
- ⑤Fukuizumi, S., Edamatsu, M., Suzaki, T. and Ando, M. (2008) Dielectric analysis for cell shape changes in the flagellate *Euglena gracilis*. Jpn. J. Protozool., 41: 55-57.
- ⑥Yoshimura, C., Omura, G. and Suzaki, T. (2008) A revised monitoring system for aquatic toxicants using adhesiveness of heliozoon cells to substratum. Jpn. J. Protozool., 41: 57-58.

[学会発表] (計7件)

- ①福泉 翔・洲崎敏伸・安藤元紀. 葉緑体欠損ミドリムシの誘電挙動. 第41回日本原生動物学会大会 (2009年10月30-11月1日, 石巻専修大学)
- ②榎本淑恵・枝松緑・洲崎敏伸・安藤元紀. 原生生物タイヨウチュウを用いた新しい水質モニタリングシステム. 第80回日本原生動物学会大会 (2009年9月17-19日, 静岡市)
- ③福泉翔・榎本淑恵・枝松緑・洲崎敏伸・安藤元紀. 連続誘電測定によるミドリムシの細胞動態の解析. 第40回日本原生動物学会大会 (2008年11月1-3日, 筑波大学)
- ④榎本淑恵・福泉翔・枝松緑・洲崎敏伸・安藤元紀. タイヨウチュウ *Raphidiophrys contractilis* を用いた水質モニタリングシステムに応用可能な簡易型流動チャンバーの検討. 第40回日本原生動物学会大会 (2008年11月1-3日, 筑波大学)
- ⑤洲崎敏伸. 原生動物細胞の形態的・生理学的特性をモニターするための誘電解析プログラムの開発. 第39回日本原生動物学会大会 (2007年11月16-18日, 富山大学)
- ⑥福泉 翔・枝松 緑・洲崎敏伸・安藤元紀. 誘電解析法を用いたミドリムシの細胞変形能の解析. 第39回日本原生動物学会大会 (2007年11月16-18日, 富山大学)
- ⑦吉村知里・大村 現・洲崎敏伸. 基底面への接着力を指標としたタイヨウチュウ水質モニタリング装置の改良. 第39回日本原生動物学会大会 (2007年11月16-18日, 富山大学)

[その他]

ホームページ

<http://www.research.kobe-u.ac.jp/fsci-suzaki/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

洲崎 敏伸 (SUZAKI TOSHINOBU)
神戸大学・理学研究科・准教授
研究者番号: 00187692

(2) 研究分担者

吉村 知里 (YOSHIMURA CHISATO)
神戸大学・環境管理センター・助教
研究者番号: 60362761

安藤 元紀 (ANDO MOTONORI)

岡山大学・教育学研究科・准教授
研究者番号: 20222789