

機関番号：17102

研究種目：基板研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20510157

研究課題名 (和文) メダカの活動電位計測による水質汚染監視に関する研究

研究課題名 (英文) Biomonitoring of water contamination based on analysis of the action potential of killifish

研究代表者

吉富 邦明 (YOSHITOMI KUNIAKI)

九州大学・日本エジプト科学技術連携センター・教授

研究者番号：30150501

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、魚における呼吸障害が毒物暴露によるストレスの良い指標となるという事実に基づいて、呼吸の筋肉活動電位から生じる電場を測定し分析した。正確に電場を検出するために、チタン合金電極を使用した。使用した毒物は青酸カリと殺虫剤スミチオン(フェニトロチオン)である。急性で致死量に近い毒性効果により呼吸活動が増大することが示された。活動電位のパワー・スペクトルの時間特性から、メダカにより1時間で濃度0.1mg/Lのシアンと1mg/Lのスミチオンの検出が可能であることを示した。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, based on the fact that respiratory impairment in fish serves as a good indicator of toxicant exposure stress, the electric field resulting from respiratory muscle action potentials were measured and analyzed. In order to detect the electric field accurately, titanium alloy electrodes were used. The toxicant used were potassium cyanide and insecticide Sumithion (fenitrothion). Acute and sublethal toxic effect was indicated by increased breathing activity. The time characteristic of the power spectrum of the action potential showed that killifish is able to detect a cyanide concentration of 0.1mg/L and a Sumithion of 1mg/L in an hour.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2009年度 | 600,000 | 180,000 | 780,000 |
| 2010年度 | 600,000 | 180,000 | 780,000 |
| 総計 | 2,500,000 | 750,000 | 3,250,000 |

研究分野：電磁波工学

科研費の分科・細目：社会・安全システム科学、安全工学

キーワード：メダカ、水質汚染監視、活動電位

1. 研究開始当初の背景

水道水は、河川や湖沼、地下水などから採取した原水に浄水処理を行い利用者に給水

されるが、安全のために細かな水質基準が設定されている。しかし、水質検査は特定の毒物物質の検出に限られることと水質検査に

は試料水の採取から結果を得るまでかなり時間がかかるという問題点がある。このため、未知の毒物を含めた毒物物質を総合的に監視し、突発的な水質異常を早期に把握するために、水道法では魚類を原水で飼育し生態を確認することが義務付けられている。

監視魚には OECD（経済協力開発機構）の検査対象魚であるヒメダカが用いられることが多い。ヒメダカは環境の変化に敏感で、毒物に対する反応が速いため、その行動パターンを監視することにより微妙な水質変化を早期に検知できると考えられている。

全国には水道水源が 30 万カ所以上あると報道されており、これらの水道水源の水質監視用に魚類を用いた簡便な毒物監視装置の開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、「メダカの活動電位信号の電力スペクトルの解析から得られる呼吸活動情報」と「メダカの活動電位信号の波形の解析から得られる魚の向きと行動の変化の情報」を解析し、それらを併用することによって精度のよい新たな毒物汚染監視システムの構築について研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 行動観察の容易な小型水槽を作成し、代表的な試薬や水質汚染物質（シアン化カリウム、硫酸銅、農薬など）の暴露濃度とメダカの活動電位の基礎データを収集し、各種の毒物に対するメダカの反応の把握を行う。

(2) 試作信号増幅器の回路の修正・調整を行い、一層の低雑音化を図る。

(3) フナやバスに関する文献資料を参考にして毒物及び濃度の選択を行い、文献報告内容との比較を行いながら実験を進める。

(4) 水温、溶存酸素濃度などのパラメータを変化させたときの影響も詳細に観察し、毒物検出装置としての実用化に向けた研究も行う。

4. 研究成果

試験水槽（縦 465mm、横 150mm、水深 130mm）及びタンクに総貯水量 20L の汲み置き水道水（水温約 25℃）を毎分 3L 循環させ、15 匹のヒメダカから発生する活動電位を計測した。1 対の電極（幅 33mm、長さ 200mm、厚さ 1mm）を水槽の注水口と排水口付近に鉛直に置き、電極間の距離は 300mm とした。電極に発生する電圧を 10 万倍に増幅し帯域通過フィルタ（0.7Hz～30Hz）を通した後にサンプリング周波数 270Hz で標本化を行い約 60 秒間時間信号を取得し、その後高速フーリエ変換処理をした。この操作を約 60 秒周期で繰り返しデータを収集した（図 1）。

(1) 商用電源等の発する電磁雑音環境においてメダカの活動電位信号を取得するための電磁雑音遮断法と増幅器回路の開発に成功した。

(2) 毒物暴露後、活動電位のパワースペクトルは低周波数領域（2Hz 以下）の電力に対して高周波数領域（2Hz～12Hz）の電力の比率が急上昇することが判明した。

(3) 試験水槽に 15 匹のメダカがいる場合、シアンを検出濃度は 0.1mg/L（シアン化カリウム濃度 0.25mg/L）、農薬（スミチオン）の検出濃度は 1mg/L 程度であることが分かった。

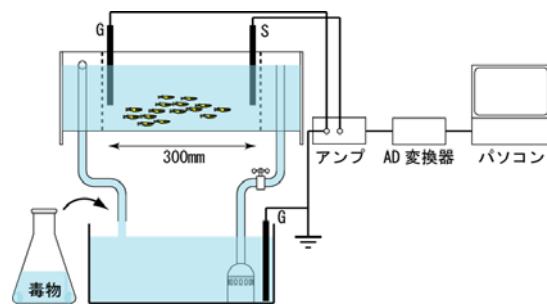


図 1 実験装置

電極で検出されるメダカの活動電位は数 μV 程度できわめて微弱であるが、この信号を高精度に検出するための電極として白金・酸化イリジウム系の塩素発生用チタン電極が有効であることを見出した。塩素発生用チタン電極を使用すると水と電極の接触により発生する雑音電圧がステンレス電極や銅電極に比較して極めて小さくなる（図 2）。

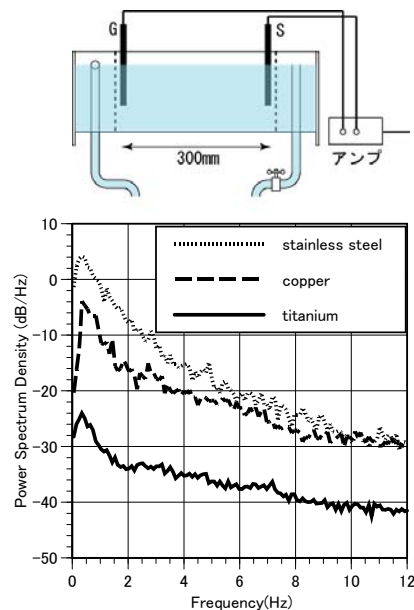


図 2 水流により電極に発生する雑音電圧のパワースペクトル密度（増幅後の信号）

1匹のメダカを小型のケージに入れ、間隔100mmの電極内に置いたときに観測される活動電位を図3、図4に示す。

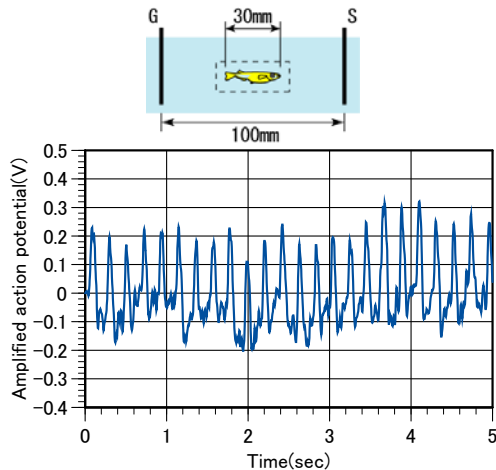


図3 メダカ(1匹)の活動電位

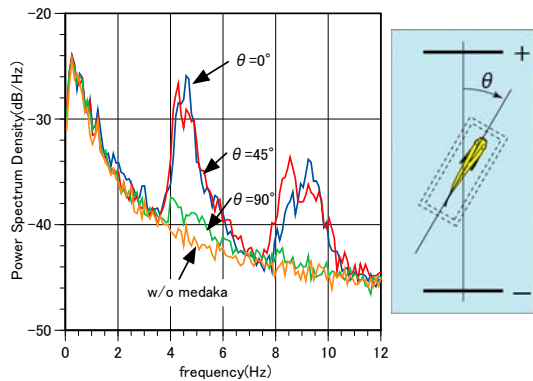


図4 メダカの向きとパワースペクトル密度

メダカの頭部がプラス電極側、尾部がマイナス電極側である。記録波形はピーク振幅が約0.3ボルトである。アンプの利得は100dB(10万倍)であるからメダカが発生する電極間の電圧は約 $3\mu\text{V}$ である。電極を結ぶ軸に対してメダカが平行に向くと検出電圧は最大となり、垂直方向を向くと最少となる。活動電位がメダカの体軸に関して前後方向には非対称であるため前後に置いた電極間には電位差があるが、左右では対称であるため左右に置いた電極間には電位差がないためである。

毒物暴露は図1の下部タンクに毒物を投入し、ポンプで水を循環させることにより行った。図5はシアン化カリウム(1mg/L:シアン濃度0.4mg/L)に暴露されたメダカの活動電位のパワースペクトル密度の時間変化を示す。横軸は毒物暴露開始を $t=0$ とした経過時間、縦軸は活動電位信号の周波数、色はパワースペクトル密度のレベルを表す。シアン濃度0.4mg/Lはシアンの排水基準濃度1mg/Lよりも希薄な値である。 $t=0$ の暴露開始後、直ちに約4Hz以上の周波数成分が増大している

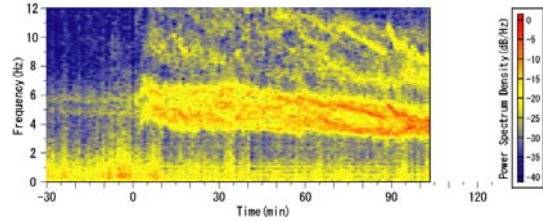


図5 シアン化カリウム(1mg/L:シアン濃度0.4mg/L)に暴露されたメダカ(15匹)のパワースペクトル密度

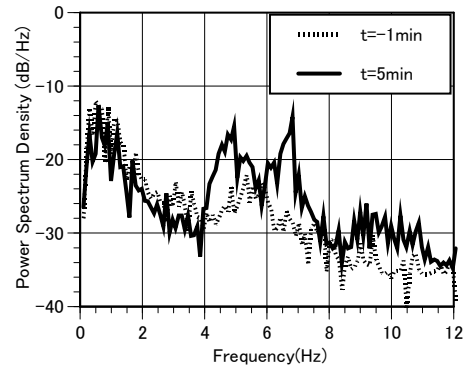


図6 シアン化カリウム(1mg/L)暴露の1分前と5分後のパワースペクトル密度

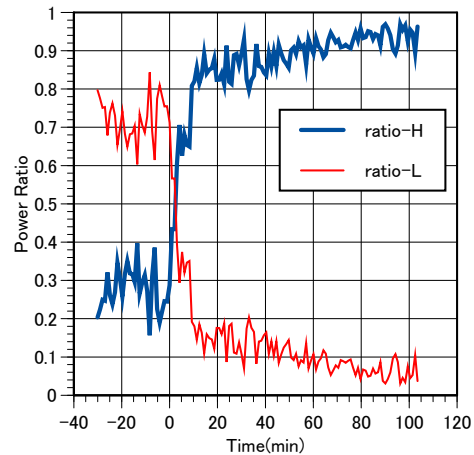


図7 シアン化カリウム(1mg/L)暴露時の全電力に対する2Hz以上の信号成分の割合ratio-Hと2Hz以下の信号成分の割合ratio-L

ことが分かる。図6はシアン化カリウム暴露前後のパワースペクトルである。目視観察によれば、4Hz以上の活動電位は主に呼吸活動による鰓の動きと胸びれや尾ひれの細かな動き、4Hz以下の活動電位は遊泳と電極に対する体の向きの変化によるものと推測できる。図6から、シアン化物の暴露による呼吸障害がストレスとなり、呼吸活動が通常よりも激しくなった様子が分かる。

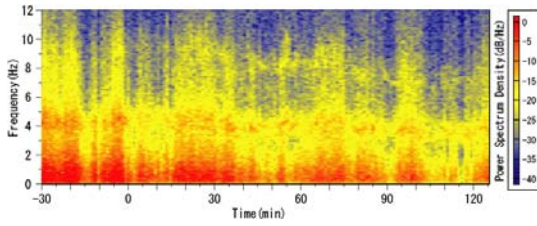


図8 シアン化カリウム (0.25mg/L:シアン濃度 0.1mg/L)に暴露されたメダカ(15匹) のパワースペクトル密度

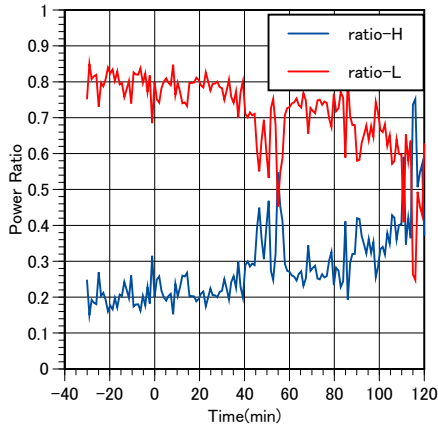


図9 シアン化カリウム (0.25mg/L) 暴露時の電力比率

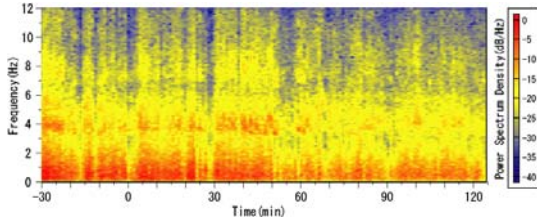


図10 シアン化カリウム (0.1mg/L:シアン濃度 0.04mg/L)に暴露されたメダカ(15匹) のパワースペクトル密度

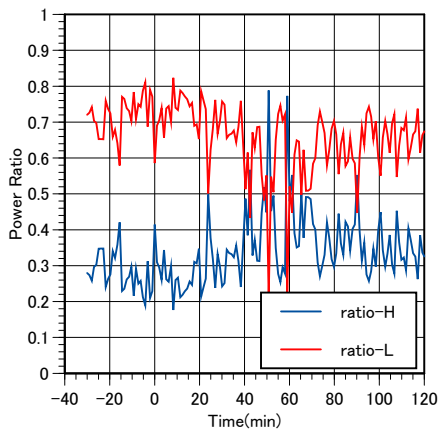


図11 シアン化カリウム (0.1mg/L) 暴露時の電力比率

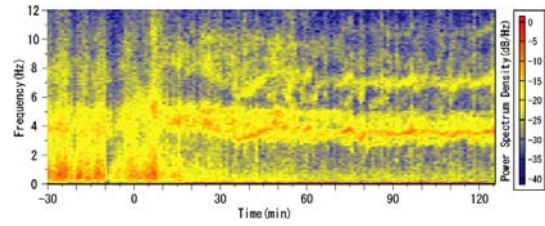


図12 スミチオン(4mg/L)に暴露されたメダカ(15匹) のパワースペクトル密度

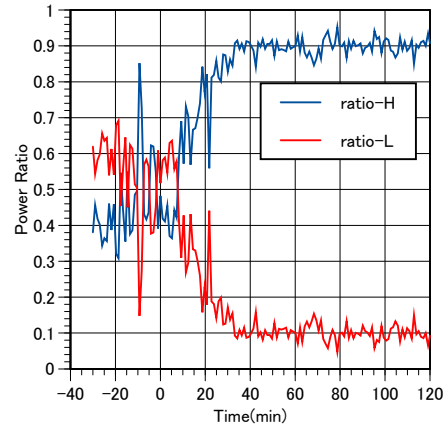


図13 スミチオン(4mg/L) 暴露時の電力比率

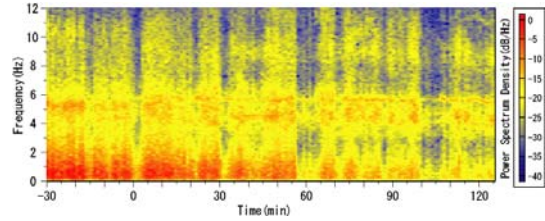


図14 スミチオン(1mg/L)に暴露されたメダカ(15匹) のパワースペクトル密度

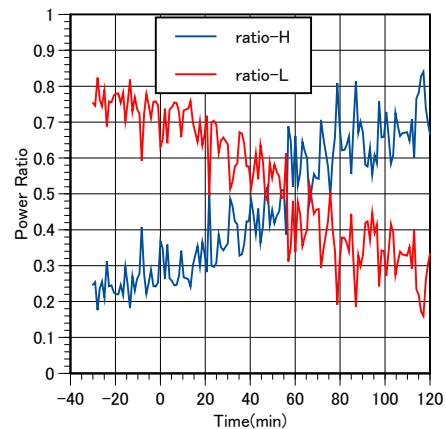


図15 スミチオン(1mg/L) 暴露時の電力比率

図7は活動電位信号(12Hz以下)の全電力に対する2Hz以上の信号成分の電力割合ratio-Hと2Hz以下の信号成分の電力割合ratio-Lの時間変化を示したものである。活動電位信号のパワースペクトルは時間とともに変動するが、全電力の大きさで正規化した電力割合はメダカの数や電極との位置関係およびメダカの個体差によらずほぼ一定となる。図7から、濃度1mg/Lのシアン化カリウム暴露によってメダカの呼吸活動による活動電位信号の電力が通常の遊泳活動による活動電位信号の電力に対して相対的に急増している様子が分かる。

濃度0.25mg/Lのシアン化カリウム暴露(図8、9)、濃度0.1mg/Lのシアン化カリウム暴露(図10、11)、濃度4mg/Lのスミチオン暴露(図12、13)、濃度1mg/Lのスミチオン暴露の様子を同様に示す。シアン化カリウムの濃度が0.25mg/Lおよび0.1mg/Lでは、毒物暴露後、徐々に呼吸障害の影響が表れ、暴露後約1時間経過して呼吸活動による活動電位信号の電力が通常の遊泳活動による活動電位信号の電力を超えることが分かる。

スミチオンは毒性の弱い殺虫剤であるが、濃度4mg/Lでのメダカの反応は濃度1mg/Lのシアン化カリウムへの暴露の場合と似ている。また濃度1mg/Lのスミチオンに対しては、毒物暴露後、約1時間経過した時に呼吸活動による活動電位信号の電力が通常の遊泳活動による活動電位信号の電力を超えることが分かる。

まとめ

本研究では、魚における呼吸障害が毒物暴露によるストレスの良い指標となるという事実に基づいて、呼吸の筋肉活動電位から生じる電場を測定し分析した。正確に電場を検出するために、チタン合金電極を使用した。使用した毒物は青酸カリと殺虫剤スミチオン(フェニトロチオン)である。急性で致死量に近い毒性効果により呼吸活動が増大することが示された。活動電位のパワー・スペクトルの時間特性から、メダカにより約1時間で濃度0.1mg/Lのシアンと1mg/Lのスミチオンの検出が可能であることを示した。

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)

[学会発表] (計1件)

吉富邦明、メダカの活動電位の高精度計測と水質異常監視への応用、第62回全国水道研究発表会、日本水道協会、2011年5月18日、大阪国際交流センター。

[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1件)

名称：水質連続監視方法
発明者：吉富邦明
権利者：九州大学、田村善胤、日研システム株式会社
種類：特許
番号：特許第4652119号
取得年月日：2010年12月24日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉富 邦明 (YOSHITOMI KUNIAKI)

九州大学・日本エジプト科学技術連携センター・教授

研究者番号：30150501

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし