

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：12401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21152

研究課題名(和文) 光学的画像変換を利用したバイオアッセイにおける統一化生物活性評価法

研究課題名(英文) Universal evaluation of biological activities for bioassay based on optical image conversion

研究代表者

門野 博史(Kadono, Hirofumi)

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：70204518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、個々の環境汚染化学物質を特定することなく、細菌、藻類やプランクトンなどの生物を用いることにより毒性を総合的に評価するバイオアッセイと呼ばれる直接毒性評価(DTA)手法が注目されている。

本研究では、個々の個体に注目するのではなくこれら指標微生物の集合体としての運動活性をオンサイトで迅速かつ安価に評価する手法を開発する。本手法ではプランクトンをレーザー光で照明した際生じるバイオスペックルの変動の早さに基づいて、環境毒性下のプランクトンの遊泳能力を判定する。従来用いられてきた顕微鏡による観察が不要であるため、一度に数千から数万個体の評価が可能となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、個々の個体に注目するのではなくこれら指標微生物の集合体としての運動活性をオンサイトで迅速かつ安価に評価する光学的手法の開発をおこなった。本手法では、対象生物が菌糸やプランクトンのように全く異なる構造であっても共通したスペックルパターンへと画像変換されるので、生物試料の形態によらず解析手法は共通した方法をとることができるという利点がある。加えて、光学系が単純であるのでオンサイトで迅速かつ安価にバイオアッセイをおこなうことができる。東南アジアなどの途上国では地下水のヒ素などによる汚染のために健康被害が生じており、開発手法はこのような地域で特に有効である。

研究成果の概要(英文)：Recently, a direct toxicity assessment (DTA) method called bioassay, which comprehensively evaluates toxicity by using organisms such as bacteria, algae, and plankton without specifying individual environmental pollutants, has attracted attention. However, the conventional method of identification using a microscope cannot process a large number of individuals due to focal depth of the imaging system.

In this study, we develop an on-site, rapid, and inexpensive method to evaluate the motor activity of these indicator microorganisms as an aggregate rather than focusing on individual organisms. This method evaluates the swimming ability of plankton under environmental toxicity based on the rapid fluctuation of biospeckle generated when plankton are illuminated by laser light. Since the method does not require conventional microscopic observation, it is possible to evaluate thousands to tens of thousands of plankton at a time.

研究分野：光計測

キーワード：Laser speckle bioassay micro-bioassay biospeckle environmental toxicity

1. 研究開始当初の背景

近年、種々の化学物質による汚染が深刻な環境問題となっている。従来、環境汚染の評価は個々の化学物質を特定し生物への毒性を評価してきた。しかし、現在化学物質は約2億種登録されており、環境汚染物質を分析、特定しその毒性を評価することは技術的にもコスト的にもますます困難となっている。例えば、ダイオキシン汚染の例を挙げると、ダイオキシンには200を超える異性体が存在しているがWHOではこのうち29種を毒性の強い物質として指定している。したがって、これらの物質を識別して毒性等量进行评估しなければならない。このためには、分解能の高い質量分析機などの高価な設備が必要となり、オンサイトで簡便に毒性を評価することは不可能である。これに代わって最近では個々の化学物質を特定することなく、生物を用いることにより毒性を総合的に評価するバイオアッセイと呼ばれる直接毒性評価(DTA)手法が注目されている。用いる指標生物としては、細菌、藻類、ミジンコ、魚など多岐にわたる。このうち微生物を用いる手法はマイクロバイオアッセイと呼ばれている。注目する特徴量として、死亡率、成長、繁殖さらにプランクトンの遊泳阻害や形態の変化などがある。通常、これらの特徴量の評価は顕微鏡を用いて個々の個体を識別して計測する必要がある。加えて、生物試料は個体差が大きいため確度の高い評価値を求めるためには多数の個体を計測する必要があり迅速な毒性評価を困難にしている。高倍率の光学顕微鏡による観察では被写界深度が狭く、特にプランクトンなどの微生物の遊泳特性の正確な観測は困難となる。また、被写界深度の制限により一度に多数の個体の評価が困難となる。

一方、東南アジアなどの途上国では地下水のヒ素などによる汚染のために健康被害が生じておりオンサイトで迅速にかつ安価に毒性を評価する手段が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、マイクロバイオアッセイにおいて、菌類やプランクトンなどの対象生物に対してはじめに光学的画像変換を行うことにより共通した特徴を有する画像(レーザーバイオスペckルパターン)へ変換することにより、小型かつ安価で用いる指標生物によらず統一された毒性評価法の開発を目的としている。

散乱性の強い物体にレーザー光のようなコヒーレントな光を照明すると、試料からの散乱光のランダムな干渉により観察面にレーザースペckルパターンと呼ばれるランダムな斑点模様が生ずる。対象物が生物試料であると、生物としての活動により生じるスペckルパターンが動的に変動する。したがって、逆にバイオスペckルパターンの動特性を解析することにより集合体としての生物試料の生命活動、動き、形態変化の統計量を瞬時に解析することができる。特筆すべきことは、生物試料より生じるスペckルパターンの空間特性は生物試料のプランクトン、菌、バクテリアなどの形態によらず光の波長や光学系により一意に決定されるパラメータを持つ共通したパターンに変換されるという点である。したがって、その後の解析手法は共通した方法をとることができる。

3. 研究の方法

(1)原理

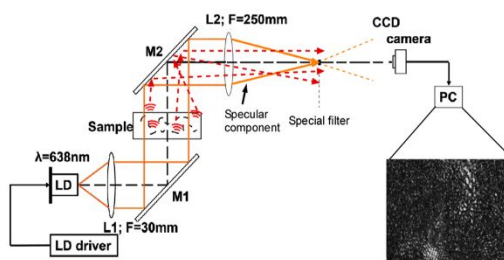


Fig.1 プランクトンによるバイオスペckル観測実験系

Fig.1 に提案したプランクトンの遊泳活性に基づくバイオスペckル観測実験光学系を示す．光源として波長 638nm の半導体レーザーを用いて試料プランクトンであるゾウリムシを照射した．レンズ L_2 によりフーリエ変換後，試料の回折パターンを CCD カメラで撮像し，計算機により画像解析をおこなった．本光学系では，プランクトンにより散乱されない透過光成分を除去するため試料のフーリエ面に空間フィルタを挿入することにより，バイオスペckルパターンのコントラストを改善している．

Fig.2(a)に本実験で用いたゾウリムシの観察画像を示す．この試料を厚さ数ミリの試料セルに入れ，直径 15mm の領域をレーザー光で照射すると 2(c)に示すバイオスペckルと呼ばれるランダムなパターンが発生する．特筆すべき点は，前述したように試料が Fig.2(b)に示す構造の全く異なる菌糸であっても Fig.2(c)と同様なスペckルパターンを生じることである．すなわち，本手法では対象物の空間的構造によらず統一されたスペckル画像に変換されるため，以降の解析においては全く同じ手法を適用することができる．

(2)データ解析法

Fig.2(c)のバイオスペckルパターンは試料微生物の遊泳速度を反映しており，プランクトンの遊泳活性が高ければ早く変動し，逆に緩慢であればパターンの変動は遅くなる．この特性を利用することにより水質の毒性を定量的に評価することができる．このためのデータ解析法として画像に対する相互相関関数に基づく相互相関法および 2 つの時間的に隣接する画像間の差に基づく差画像法を試みた．

相互相関法では，動画として取得した時間 t_0, t_i における画像をそれぞれ $I(t_0; x, y), I(t_i; x, y)$ とすると 2 つの画像の相互相関係数は以下の式で与えられる．

$$\rho(t_i) = \frac{\sum_{x,y}\{I(t_i; x, y) - \langle I \rangle\}\{I(t_0; x, y) - \langle I \rangle\}}{\sqrt{\sum_{x,y}\{I(t_i; x, y) - \langle I \rangle\}^2 \sum_{x,y}\{I(t_0; x, y) - \langle I \rangle\}^2}} \quad (1)$$

ここで， $\langle I \rangle$ は時間平均である．一例として，ゾウリムシの育成適温である温度 25 と不適な 5 に対して観察されたデータから画像間の時間差を関数として得られた相互相関関数を示す．5 の環境下では遊泳活性が低下しているためスペckルパターンの変動が緩やかとなりその結果関数の分布幅が広がっている．本手法では，相関係数が $1/e$ に低下する時間差を相関時間として遊泳能力を評価するパラメータとしている．このように，ゾウリムシの遊泳活性とバイオスペckルパターンの時間的変動に明らかな相関関係が確認される．

差画像法では，時間 k だけ離れた 2 つの画像 $I(t_i), I(t_{i+k})$ に対して次式を計算する．

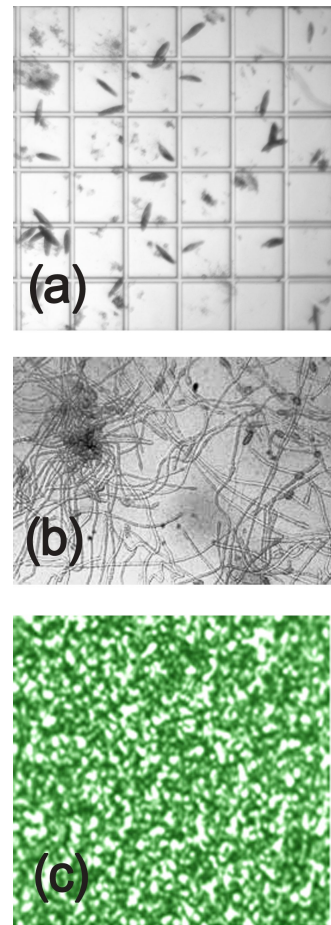


Fig.2 レーザー光を(a) ゾウリムシ，(b) 菌糸に照射した際に生じる，(c)バイオスペckルパターン

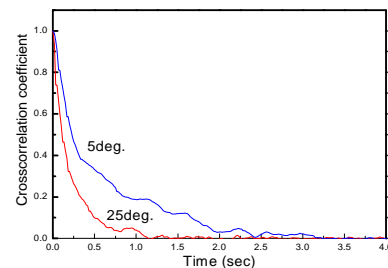


Fig.3 Correlation coefficient between bio-speckle patterns

$$\text{Difference ratio} = \frac{\sum_{i=1}^N |I(t_i) - I(t_{i+k})|}{\sum_{i=1}^N I(t_i)} \quad (2)$$

4. 研究成果

(1) ゾウリムシを用いた遊泳活性の評価

実験では動物プランクトンとして、細胞表面に約 3000 本の繊毛を持ち遊泳能力を持つゾウリムシを用いた。具体的には、体長 200-300 μm の P.Caudatum および 30-40 μm の P.chilomonas を用いた。

Fig.4 に P.Caudatum および 30-40 μm の P.chilomonas を試料セルに封入し、バイオスペckルパターンより得られた相互相関関数を示す。大まかな傾向としてゾウリムシの運動により相関時間は 0.2~0.3 秒であることがわかるが、P.chilomonas では単調に相関係数が低下するのに対して P.Caudatum では大きな揺らぎが生じており、相関時間を正確に評価することが困難であることがわかる。これは P.Caudatum の個体長が大きくサンプルセル中に十分な数の個体が存在しなかったためスペckルパターンの変動が散発的になったことが大きな原因である。

しかし、このような揺らぎの大きな相関関数を与える試料に対しても(2)式で与えられる差画像法は比較的良好的な計測が可能であることがわかった。

つぎに、環境条件として HCl を用いて水質の pH を変えて実験をおこなった。Fig.5 は差画像法を適用し、時間差 1, 2, 3sec に対する相対差分の pH に対する変化である。コントロール (pH7.0) に対して pH が 4 以上では大多数のゾウリムシが遊泳能力を失うため変動が小さくなることわかる。

つぎに、小型のゾウリムシ種(P.Caudatum)を用いて相互相関法により計測した結果を Fig.6 に示す。この場合はゾウリムシの密度が 3000-5000/cm³ と大きく改善しているため、良好な相互相関関数が得られた。これによりやはり pH4 を超えると遊泳活性が極端に低下することが定量的に計測できたことがわかる。さらに、興味深い点として、pH5-6 の領域においてコントロール(pH7.0)に比べて遊泳活性が増加していることがわかる。このことは、正常環境に比べて環境の酸性化という環境条件の悪化に対して回避行動を取るために遊泳活性が増加している可能性を示唆している。

(2) 重金属による水質汚染の評価

基礎実験により提案手法の有効性が確認できたので、つぎに、実際の環境で起こりうる重金属による汚染評価を目標として実験をおこなった。重金属として Zn を用いた。Zn の環境基準濃度は 5mg/L であり、この 20 倍までの濃度で暴露をおこなった(Fig.7)。図からわかるように、約 5mg/L で相関時間は最小値を取りその後濃度と共に相関時間は急激に増加した。Zn 60mg/L 以上ではほぼゾウリムシが遊泳能力を失ったことがわかる。興味深い点は、環境基準である 5mg/L において最も活動的になっていることである。Zn は植物や動物にとって微小栄養素であり、これにより活

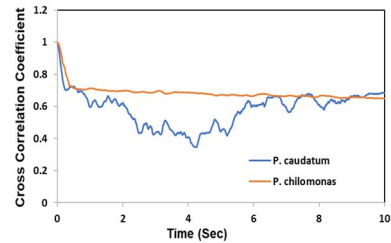


Fig.4 P.Caudatum, P.chilomonas に対する相互相関関数

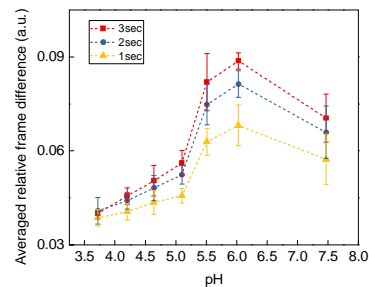


Fig.5 pH に対するゾウリムシの遊泳活性の変化

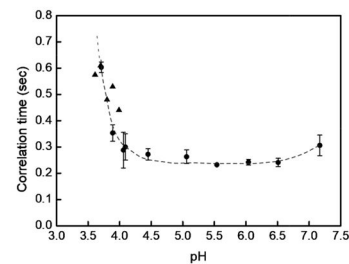


Fig.6 P.Caudatum, P.chilomonas に対する相互相関関数

性化した可能性がある。

(3)総括

高倍率の光学顕微鏡を用いて個体を個々に識別してその生死を判断する従来の観察では顕微鏡の被写界深度が浅く、特にプランクトンなどの微生物の遊泳特性の正確な観測は困難となる。また、被写界深度の制限により一度に多数の個体の評価が困難となる。一方、本手法は、複数のプランクトン全体を集合的に評価できるため効率が良く運動能力を定量的に評価できることが利

点である。また、異なる構造を持つ微生物であっても同一なスペックルパターンに変換しているため共通な解析手法を適用できる。このため、考慮する時間スケールが異なるだけで菌類を用いたバイオアッセイなどにも適用可能である。また、高価な高倍率結像系を持たないため非常に安価に実装でき、プランクトンの状態を判断する観察者のスキルも不要となる。

このような技術はとりわけ水環境の汚染が深刻なアフリカや東南アジアでは有効な手法となる。しかしながら、プランクトンによっては特定の汚染物質に対して特異的な挙動を示すことがあるので、指標生物の選定に当たっては慎重に考慮する必要があるだろう。総合的水質評価には従来 COD, BOD が用いられてきたが生物の毒性とほとんど関連しないためバイオアッセイは今後ますます重要になるであろう。

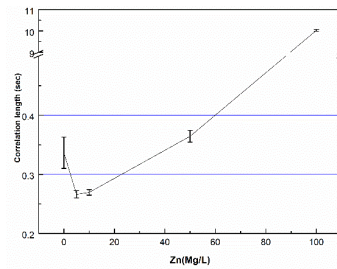


Fig.7 亜鉛濃度に対する P.chilomonas の遊泳活性の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 保科 拓也、門野 博史、ラジャゴパラン ウママヘスワリ
2. 発表標題 バイオスペckルのプランクトンを用いたバイオアッセイへの応用
3. 学会等名 2021年 第82回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 保科 拓也、門野 博史、Umamaheswari Rajagopalan
2. 発表標題 バイオスペckルのプランクトンを用いたバイオアッセイへの応用
3. 学会等名 2022年 第69回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Devi Arti Devi、Hirohumi Kaodono、R.Uma Maheswari
2. 発表標題 Application of bio-speckle on micro-bioassay with plankton III
3. 学会等名 第83回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Arti Devi、Hirofumi Kadono、Uma Maheswari
2. 発表標題 First and reliable micro-bioassay technique based on biospeckle
3. 学会等名 SPIE Photonics West 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shiori Sato
2. 発表標題 Laser speckles for evaluation of microplastic effects on Brine Shrimp (BS) mobility
3. 学会等名 Optics & Photonics Japan 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Devi Arti, H. Kadono, R. Uma Maheswari
2. 発表標題 Application of bio-speckle on micro-bioassay with plankton
3. 学会等名 第84回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	ラジャゴパラン ウママヘスワリ (Rajagopalan Umamaheswari) (40270706)	芝浦工業大学・工学部・教授 (32619)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------