

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 23 日現在

機関番号：12401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26550045

研究課題名(和文) 超高感度光干渉法による重金属汚染の植物成長動態への極短時間影響評価

研究課題名(英文) Immediate evaluation of heavy metal effect on the plant growth dynamics using a highly sensitive interferometry technique

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、超高感度な光干渉法(SIT)に基づいて、新しい植物の環境(重金属)ストレスモニタリング技術の確立を目的とした。初めに、SITを用いて数秒単位での植物の極短時間の成長速度にナノメートルスケールの成長速度のゆらぎ(NIF)が存在することを確認した。次に、NIF現象に基づいて短時間の重金属であるカドミウムと微量必須元素である亜鉛の影響を調べた結果、それぞれ0.001mMと50ppmの濃度に対してわずか1時間後にNIFの有意な低下および増加がそれぞれ確認された。このように、NIFに基づく重金属ストレスの評価法は数時間という短い時間で植物の重金属ストレスを高感度に評価可能であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Leaf expansion measurements using Statistical Interferometry Technique, a sensitive interferometric technique at nanometric accuracy, revealed the presence of characteristic nanometric intrinsic fluctuations (NIF). In this study, we demonstrated that NIF are sensitive enough that they change under exposure of heavy metals, essential micronutrient zinc (Zn) and non-essential element cadmium (Cd), at relatively low concentrations. Results showed significant reduction of NIF for all Cd concentrations, and in contrast significant increase of the NIF for all Zn concentrations. There was significant reduction of the NIF for Cd exposure of concentrations of 0.001mM for even an hour, and significant increase of the NIF under 0.15mM Zn for 1hr exposure. The results imply that NIF can be not only used as a measure for the heavy metal stress but also it can be more sensitive to detect the toxic as well as positive effects of smaller amounts of the heavy metal on plants at an early stage.

研究分野：光計測

キーワード：重金属ストレス 植物成長の自発的ナノメートル揺らぎ 光干渉法 レーザースペックル 微量必須元素 重金属汚染 極短時間植物成長動態

### 1. 研究開始当初の背景

土壤汚染に関して、特に経済発展の著しい中国などでは工場や鉱山からの重金属を含む汚水の垂れ流しによって農地の汚染による収量の低下や健康被害が日増しに深刻さを増している。このような土壤汚染を修復する安価で広範囲に適用可能な手法として植物を用いた土壤浄化法がある(ファイトレメディエーション)。また、作物植物の収量を確保するためには、高濃度の重金属に対して耐性があり吸収効率の良い植物種を選択・育種する必要がある。しかしながら、耐性の評価には、乾燥重量や成長長さ測定などの従来法では長期間を必要とする。

我々はこれまでに、レーザー光のランダムな散乱場の統計的性質を基準として利用するという全く新しい原理に基づく超高感度な干渉計測法を開発した[1]。本手法を植物計測に応用すると植物の挙動を秒オーダーの極短時間の時間スケールでかつ成長変化をサブナノメートル( $10^{-10}\text{m}$ )の精度で計測することが出来る。初期の研究により、オゾンストレス下での植物の成長挙動を秒オーダーの実時間で計測することが可能であることが示され、新しい環境診断技術への可能性が示された[2,3]。本手法に基づく植物成長計測装置の試作機も製作されており、重金属に対する基礎研究にも着手しているが、より実証的研究が課題となっている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が提案している統計干渉法に基づいて、秒オーダーの極短時間における植物の葉などの成長挙動をサブナノメートルの分解能で連続的に *in situ* 計測できるシステムを用いて、植物の環境に対する極短時間成長動態を知ることにより、新しい植物の重金属ストレスモニタリング技術を確立することである。

本研究では具体的な土壤汚染物質として、重金属として亜鉛、カドミウムに焦点を絞り提案手法の有効性を検討する。対象植物として、ニラ、発芽直後のエンドウこれらの作物を含む植物の重金属ストレスを早期にかつ定量的に評価することを目的とした研究を行う。これにより、植物の重金属に対する耐性を簡便に評価し、将来的にファイトレメディエーションに適した植物種を効率的に選択評価するための新規な手法として発展させたい。

本研究のサブテーマを以下に要約する。

- 植物成長の極短時間形態応答の計測システムの改良・最適化
- 植物の極短時間成長動態による重金属ストレス評価と長期的生育状態予測の指標としての有効性の検証

### 3. 研究の方法

研究計画の初期段階は植物の成長計測に特

化した計測装置の改良・開発すなわち、可搬性、計測能力・計算能力の向上、簡便な操作性を持つ装置を作成する。また、この装置を用いた植物の重金属ストレス応答の更なる解析手法の開発をおこない、ストレス評価法としての有用性を定量的に評価する。計画中期から後半では、成長のナノメータゆらぎを含む極短時間の動態特性に関する基礎的な研究も合わせておこなった。

統計干渉法による計測は、単に植物表面の形態変化を読み取っているにすぎず、計測結果について従来法である生化学的な方法による結果との整合性を検証することは重要である。重金属ストレスの指標物質であるいくつかの酵素活性(SOD, POD, CAT)および  $\text{H}_2\text{O}_2$  などとの相関関係を明らかにすることにより、ナノメータゆらぎを含む極短時間成長動態の重金属ストレスの指標としての有効性の検証をおこなう。

#### (1) 測定装置およびその改良

Fig.1 に実験に用いた計測光学系を示す。光源として波長 633nm のヘリウムネオンレーザーを用いた。レーザー光はプリズム P1 により 2 つに分割され Piezo Electric Transducer (PZT) ステージにマウントされた可動プリズム P2 に入射した後レンズで測定対象の植物の葉を一点で照射する。葉の表面で散乱された 2 つの照明光は、ランダムな干渉により十分発達したスペックル場を発生する。これら 2 つのスペックル場の干渉パターンを CCD カメラにより計算機に取り込む。この干渉画像に対して統計干渉法のアルゴリズムを適用して、物体の微小な変位をサブナノメートルの精度で解析した。予備実験で使用した光学系では物体を照射する 2 つのレーザービームは互いに平行に物体を照射していた。これに対して本光学系では 1 点を照射するよう改良をおこなった。これにより、従来スペックルパターン(Fig.2 右下)のそれぞれ斑点模様の中に形成されていた微細な干渉縞を解消することができた。その結果 CCD カメラに要求されていた高い空間分解能の制限を緩和することができた。このこと

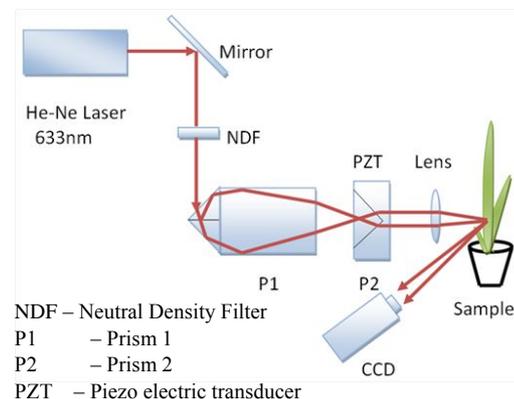


Fig.1 実験光学系

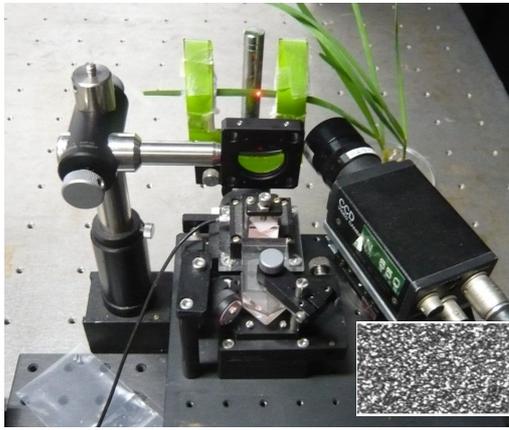


Fig.2 ナノメートル植物成長計測装置

はスペックルサイズを小さくすることを可能とし、画像中に含まれるスペックル粒子の数を大幅に増加することができた。統計干渉法においてはスペックル粒子の数が計測精度を決定するため、計測精度の向上を可能とした。さらに、一点のみの照射であるため、細い茎などを対象とする場合も利便性が大きく向上した。

#### (2) バイオスペックル抑制の検討

一般的に生物試料をコヒーレントな光で照明するとバイオスペックルと呼ばれる時間的に変化するスペックルパターンが発生する。バイオスペックル信号は生物試料の生物活性に関する情報を持つため最近注目を集めている。一方、本研究では植物の成長を表面の微小移動により計測しているため精度低下の要因となるのでバイオスペックルは抑制しなければならない。このため、葉の表面にコーティングを施し測定光の植物内部への侵入を防ぐ必要がある。しかし、表面へのコーティングは間接的な葉の表面移動を計測することになるのでその特性は注意深く検討する必要がある。

本研究では、コーティング無し、生体試料への影響は低いと考えられる小麦粉、黒鉛によるコーティングを検討した。SIT 光学系において2本のビームのうち1本のみを各条件のコーティングを施したサンプルに照射

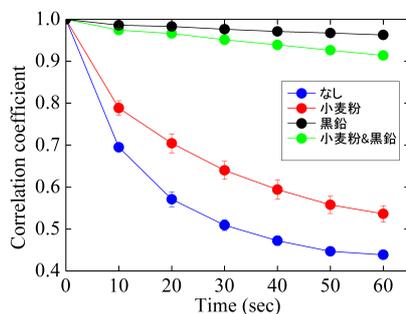


Fig.3 エンドウの茎に対する相関係数の低下

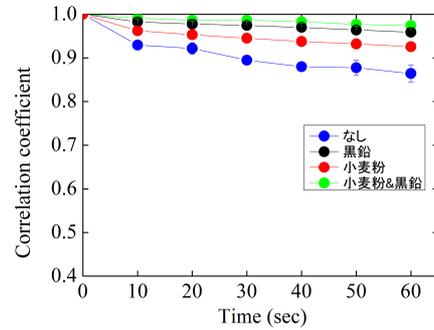


Fig.4 ニラに対する相関係数の低下

し、スペックルパターンを CCD カメラで観測した。スペックルパターンの時間的変化を調べるため、基準のスペックルパターンと、10、20、30、40、50、60 秒後のスペックルパターンとの相関係数を計算した。エンドウの苗の茎の結果を Fig.3 に、ニラの葉に対する測定結果を Fig.4 に示す。この結果より、バイオスペックルの影響は対象植物の性状により大きく影響を受けることがわかる。すなわち、半透明な発芽直後のエンドウの茎はプローブ光が内部まで入り込むため、バイオスペックルがより支配的となり短時間でパターンの相関の低下が生じている。従って、吸収率の高い黒鉛のコーティングが最も良い結果を与えている。一方、ニラでは比較的吸収が大きいためコーティングなしでも相関の低下は 10 秒後においても 10% 以下である。

このように対象試料に応じて表面コーティングの手法を変える必要があることが明らかとなった。以下の実験ではニラにおいては小麦粉のコーティングを採用した。

#### (3) 植物試料と重金属の暴露

植物試料として、作物植物でもあるニラ(発芽後 1~2 週)を用いた。重金属としては毒性の強いカドミウム( $\text{CdCl}_2$ )および微量であれば植物の育成を促進する微量必須元素である亜鉛( $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )を用いた。植物試料はポットから取り出し水洗いにより土壌を取り除いた後、精製水あるいは所定の重金属濃度に調製した液体に浸すことにより暴露をおこない数時間から 50 時間まで極短時間の植物成長速度の計測をおこなった。

#### (4) 自発的ナノメートル揺らぎの観測

異なる時間スケールで本測定装置を用いて葉の伸びを計測した結果を Fig.5 に示す。図から分かるように数時間のスケールでは植物の葉の成長は一定速度で単調に進行しているように見える(Fig.5(a))。しかし、1 分のスケールで観測するとナノメートルスケールで激しく揺らいでいることが分かる(Fig.5(b))。これは我々の提案する高感度の計

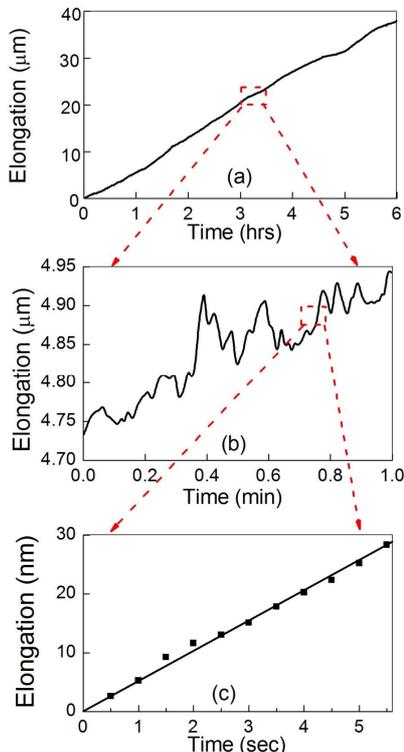


Fig.5 異なる時間スケールで計測した葉の伸び(a)1時間、(b)1糞、(c)5.5秒

測手法により初めて明らかにされた現象であり、極短時間の自発的ナノメートルゆらぎ(NIF)と呼ぶことにする。さらに秒スケールに拡大するとほぼ直線的に新調していることが分かる(Fig.5(c))。ここではこの直線の傾きを極短時間成長速度(RER)と呼ぶ。

#### 4. 研究成果

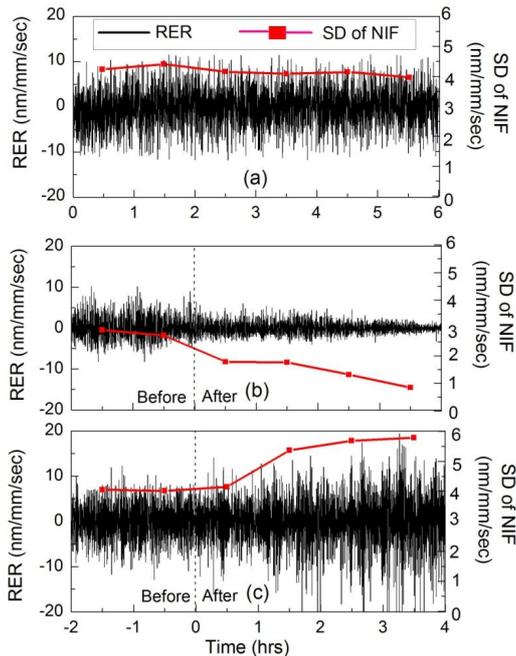


Fig.6 極短時間自発的成長ゆらぎの重金属依存性。(a)純水、(b)カドミウム(0.1mM Cd)、(c)亜鉛(0.75mM Zn)

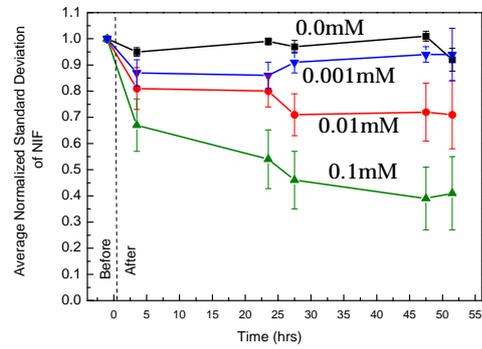


Fig.7 カドミウム暴露に対する NIF の標準偏差の依存性

#### (1) 自発的ナノメートル揺らぎの重金属依存性

Fig.6 に(a)純水のみ、(b)カドミウム(0.1mM Cd)および(c)亜鉛(0.75mM Zn)の暴露実験をおこない極短時間成長速度と NIF の標準偏差(SD)を変化を6時間に渡り計測した結果を示す。図から分かるように Cd による暴露では NIF が短時間で大きく減少することが分かる。僅か1時間後に38%の低下が見られる。一方、Zn では暴露開始2時間後で33%の増加が見られる。

Fig.7 に Cd 濃度 0, 0.001, 0.01, 0.1mM に対する NIF の標準偏差の時間に造成を示す。比較的小さな濃度 0.001mM においても僅か1時間後で有為な NIF の減少が確認された。また、濃度が高くなるに従って NIF の体が大きくなることが分かる。興味深いのは 0.001mM においては25時間以降回復傾向が見られる点である。これは植物が新しい環境に順応していることを示している。

一方、微量必須元素である亜鉛に対しては濃度 0.15, 0.75mM で僅か1時間後においてもいずれも有意な NIF の増加が観測された(Fig.8)。物差しによる3週間に渡る葉の伸長計測では 0.75mM に対しては約70%の葉の成長長さの増加が見られた。従って、SIT による NIF の観測では、本濃度では微量必須元素として正の効果もモニタ可能であることが示された。

#### (2) 生化学分析と重金属ストレスの評価

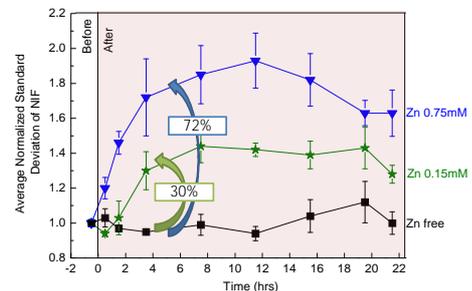


Fig.8 亜鉛暴露に対する NIF の標準偏差の依存性

重金属影響下の植物のストレスの評価では従来、重金属ストレスの指標物質であるいくつかの酵素活性(SOD, POD, CAT)および $H_2O_2$ 濃度に基づく分析がおこなわれてきた。Fig.9に一例として抗酸化酵素であるSOD活性をカドミウムおよび亜鉛暴露に対してそれぞれの時間変化を示した。Cdに対しては時間と共に数値が上昇することが分かる(Fig.9(a))。また、Cdの濃度が高いほど数値が高い。しかしながら、0.001mMに対して4時間後では有意な差が得られていないことが分かる。これはCAT、 $H_2O_2$ においても同様であった。Fig.9(b)に示すように亜鉛に対する暴露実験では、0.75mM Znにおいても1時間後では有意な差は得られなかった。

このような従来よりおこなわれてきた生化学的な分析に比べて我々のNIFに基づく手法では低濃度においても短時間で重金属の植物への影響を有意性を持って検出することができた。さらに、酵素活性や $H_2O_2$ によるぶんせきではCd,Zn双方に対して数値が増加しているが実際の植物への影響はCdは毒性を示し,Znは成長を促進しているがこれを識別することはできなかった。一方、NIFはCd,Znに対してゆらぎの大きさはそれぞれ減少と増加をそれぞれ示しており、重金属の毒性と促進性を識別してモニタすることが可能であった。

以上総括すると、成長のナノメータゆらぎに基づく手法は従来おこなわれてきた、乾燥重量による成長影響の評価や、生化学的な分析法ではなし得なかった無侵襲かつ短時間の植物の重金属耐性評価や植物による重金属汚染の評価法の可能性を示している。また、

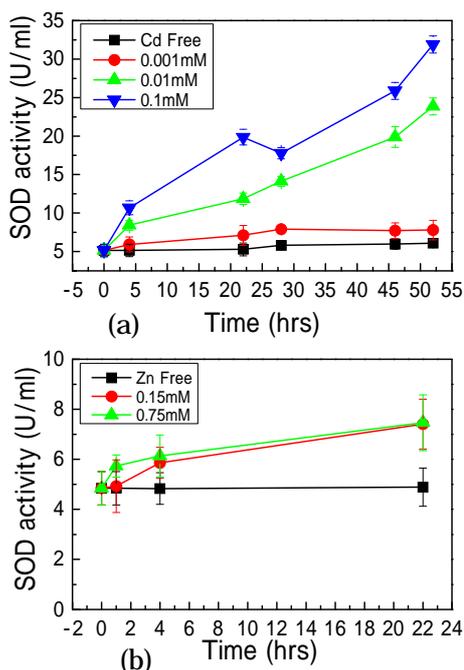


Fig.9 亜鉛暴露に対するNIFの標準偏差の依存性

将来的にはファイトレメディエーションに最適な植物種の開発において有益な評価手段となり得ることが期待される。

<引用文献>

[1] H. Kadono, Y. Bitoh, and S. Toyooka, J. Opt. Soc. AmA, 18, pp.1267-1274 (2001).  
 [2] A. P. Rathnayake, H. Kadono, S. Toyooka and M. Miwa, Journal of Forest Research, (2007)  
 [3] B.L.S. Thilakarathne, U. M. Rajagopalan, H. Kadono, T. Yonekura, SpringerPlus, 3:89 (2014).

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 1 件)

K. T. K. M. Desilva, H. Kadono, and U. M. Rajagopalan, "Monitoring of Cadmium influence on ultra short-term growth dynamics of plants using a highly sensitive interferometric technique, SIT," Proc. of SPIE Vol. 9660, [doi: 10.1117/12.2196866], 査読有, (2015).

[学会発表](計 6 件)

K. T. K. M. Desilva, and H. Kadono, "Monitoring ultra short-term growth dynamics of plants under the influence of zinc using a highly sensitive interferometric technique, SIT," 第63回応用物理学会春期講演会, 東京工業大学大岡山キャンパス(東京都港区)(2016.3).

K. T. K. M. Desilva, L. Tao, S. Yonemochi, K. Oh, and H. Kadono, "Monitoring of heavy metal influence on ultra short-term growth dynamics of plants using a highly sensitive interferometric technique, SIT, and physiological conditions," 生物環境工学会 2015, 宮崎県宮崎市シーガイアコンベンションセンター(2015.9).

K. T. K. M. Desilva, and H. Kadono, "Monitoring Cadmium influence on ultra short-term growth dynamics of plants using a highly sensitive interferometric technique, SIT," International conference on Speckle Metrology 2015, Mexico, Guanajuato, Hotel Camino Real, (2015.8).

K. T. K. M. Desilva, and H. Kadono, and T. Yonekura, "Monitoring effect of heavy metal on ultra short-term growth fluctuation of plants using a highly sensitive interferometric technique of statistical interferometry," 第55回光波センシング技術研究会, 東京理科大学森戸記念館(東京都新宿区),(2015.6).

K.T.K.M. De Silva, H. Kadono, and K.

Oh, “ Ultra-short term growth behavior of plants under the influence of Cadmium using a highly sensitive interferometric technique, SIT ”, 第 62 回応用物理学会春期講演会, 東海大学(2015.3).

K.T.K.M. De Silva, H. Kadono, and K. Oh, “ Investigation of ultra-short term growth behavior of plants under the influence of heavy metal using a Highly Sensitive Interferometric Technique,” 生物環境工学会 2014, 明治大学(東京都),(2014.9).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1)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

### (2)研究分担者

ラジャゴパラン ウママヘスワリ  
(RAJAGOPALAN Uma Maheswari)  
東洋大学・食環境科学部・助教  
研究者番号：40270706