

平成21年 6月19日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18580196

研究課題名（和文）レーザー誘起蛍光法を用いた海苔診断に関する研究

研究課題名（英文）Diagnostics of Susabi-nori (*Porphyra yezoensis*) by Laser-Induced Fluorescence Method

研究代表者

岡本 保 (OKAMOTO TAMOTSU)

木更津工業高等専門学校・電気電子工学科・准教授

研究者番号：80233378

研究成果の概要：本研究では海苔の生育診断法としてレーザー誘起蛍光法（Laser-Induced Fluorescence (LIF) 法）を提案した。まず、スサビノリについて、あかぐされ病などの病害の影響および淡水による影響などをLIF法により検討した。その結果、病害や淡水などのストレスの影響により、蛍光スペクトルが変化することを明らかにした。さらに、海苔のLIFスペクトルへの励起波長依存性も検討し、病害などの診断には500 nm付近の励起光が適していることを明らかにした。さらに、病害の部位を初期段階で診断するためにデジタルマイクロスコープを用いて、細胞レベルでの蛍光分布測定を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,900,000	0	1,900,000
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：海藻、レーザー誘起蛍光法、スサビノリ、光計測

1. 研究開始当初の背景

海苔の養殖では海を生産の場とするため、気象、海象の影響が大きく、海洋汚染や疾病による被害も問題となっている。従来は、海苔養殖の漁業従業者が、これらの影響を目視などの経験則によって判断していた。しかし、より安定した生産を行うために、疾病や障害を定量的に判断する方法が求められていた。そこで本研究では海苔の生育診断法としてレーザー誘起蛍光法（Laser-Induced Fluorescence (LIF) 法）を提案した。

2. 研究の目的

本研究では、疾病・障害などの状態の計測手段としてLIF法（Laser-Induced Fluorescence method；レーザー誘起蛍光法）を提案し、この手法を用いた海苔養殖管理技術の開発を行うことを目的としている。

3. 研究の方法

LIF法を用いた測定系を図1に示す。本研究では、励起光源としてcw-Ar⁺レーザー（GLG3020, NEC, 488.0 nm, 5 mW）を用い、

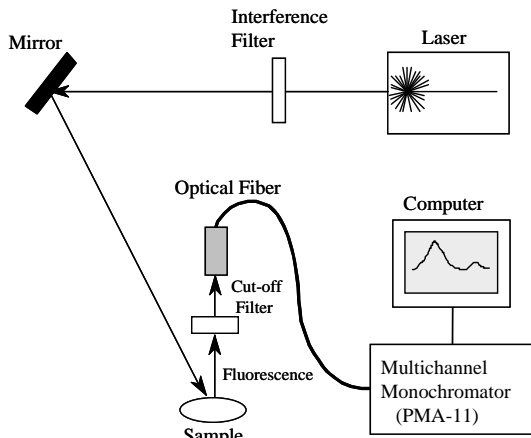


図1. LIF スペクトル測定系

LIF スペクトルの測定を行った。LIF スペクトル測定にはマルチチャンネル分光器 (PMA-11, PMA-12, 浜松ホトニクス) を用いた。レーザーは 488 nm 以外の発振線を取り除くために干渉フィルターを通し、ミラーで角度をつけて試料に照射した。レーザーの照射で得られた蛍光を光ファイバーで分光器に取り込んだ。また、励起光の影響を防ぐため、ロングパスフィルター (530 nm 以上を透過) を介してから光ファイバーで分光器に取り込んだ。測定した試料は千葉県水産総合研究センターで 18°C で培養した海苔を用いた。海水は 1mm のフィルターでろ過し、90°C で 3 時間熱処理したものを使用した。測定時間は約 1 秒である。

励起波長依存性の測定では、励起光源として He-Cd レーザー (IK3301R-G-S, 金門, 325.0 nm, 19 mW), 半導体レーザー (LDM375.10CW, オーテックス, 375.0 nm, 0.2 mW), 半導体レーザー (405-50-COL-003, オーテックス, 405.0 nm, 4.6 mW), cw Ar⁺ レーザー (GLG3020, NEC, 488.0 nm, 4.5 mW) の 4 つの波長のレーザーと、連続波長を有する Xe ランプ (L6759, 浜松ホトニクス, 150 W) 光を分光器で分光した光を用いた。

さらに、病害の部位を初期段階で診断するためにデジタルマイクロスコープを用いて、細胞レベルでの蛍光分布測定を試みた。蛍光分布の観察にはデジタルマイクロスコープ (VHX-900, キーエンス) を用いた。試料へ照射するための励起光源として cw-LD 励起固体レーザー (85BCD30, メレスグリオ; 発振波長 488 nm) を用いた。LIF スペクトルで特徴的に変化するピーク波長の干渉フィルターを介してデジタルマイクロスコープに画像として取り込み、蛍光分布測定を行った。

4. 研究成果

(1) 病害による影響

海苔養殖で生じる障害は様々な要因で起

こるが、本研究では病原微生物による疾病として、あかぐされ病、壺状菌病によるものについて調べた。あかぐされ病は、あかぐされ病菌が海苔に感染したもので、赤さび色の斑点ができる。壺状菌の感染は、寄生部位を退色させ、病変部細胞を崩壊させる。

LIF 法により正常な海苔、あかぐされ病の海苔、壺状菌病の海苔の LIF スペクトルを測定した結果を図 2 に示す。スサビノリは紅藻類で、光合成に関係する主色素としてクロロフィル a、補助色素としてフィコビルン (主としてフィコエリスリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン) などを含んでいる。正常な海苔は主として、フィコエリスリンに起因すると思われる 580 nm 付近の発光 (ピーク A)、アロフィコシアニンに起因すると思われる 660 nm 付近の発光 (ピーク B)、クロロフィルに起因すると思われる 685 nm 付近および 720 nm 付近の発光 (ピーク C, D) が観測された。また、図中に矢印で示すように 640 nm 付近に肩が見られるが、これはフィコシアニンの発光と考えられる。正常な海苔では 660 nm, 685 nm, 720 nm の発光強度が同程度なのに対し、580 nm の発光強度がその半分ほどの割合になっている。

あかぐされ病に感染した海苔では 580 nm 付近の発光強度が相対的に強くなっている。

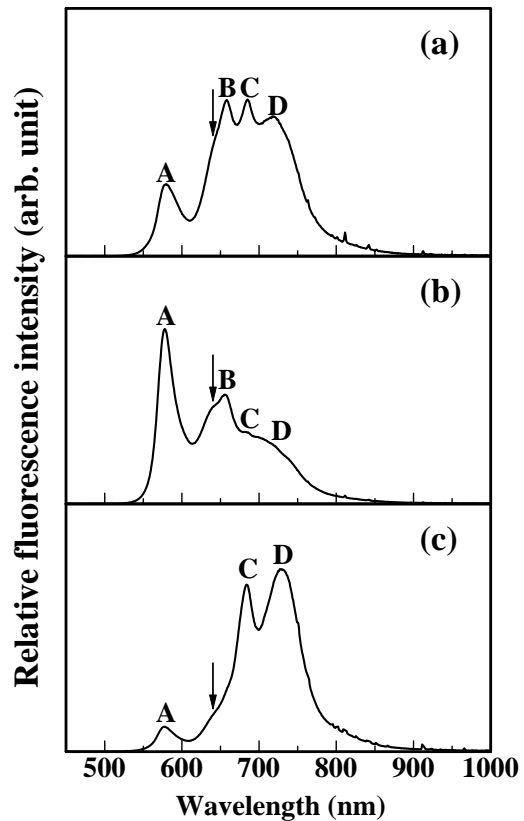


図2 (a) 正常な海苔、(b) あかぐされ病の海苔および(c) 壺状菌病の海苔の典型的な LIF スペクトル

これは、あかぐされ病に感染することによって、光合成反応中心（クロロフィル a）へのエネルギー移行が阻害されたためと考えられ、その結果として 580 nm 付近の蛍光が強くなったと思われる。

壺状菌病に感染した海苔では、580 nm, 660 nm 付近の発光強度が相対的に著しく弱くなっている。これは、フィコビリן系統が壺状菌によって破壊され、強度が減少したと考えられる。

(2) 淡水による影響

海苔の生育段階では、河川水の流入や、干潮時に空气中にさらされたときの降雨など、淡水の影響を受けることがある。そこで、海水中で培養した海苔を淡水に浸けたときどのように LIF スペクトルが変化するかを調べた。海水から淡水に試料を移したときのスペクトルの変化を図 3 に示す。この図では、淡水に移してから 200 秒までの LIF スペクトルを 10 秒間隔でプロットしてある。この図より、海水中から淡水に試料を移すと、元の正常な LIF スペクトルから変化して、580 nm のピークが淡水に浸けた時間とともに強くなっていくことがわかった。また、この 580 nm のピークは淡水に浸してから約 100 秒間でほぼ一定の発光強度になった。

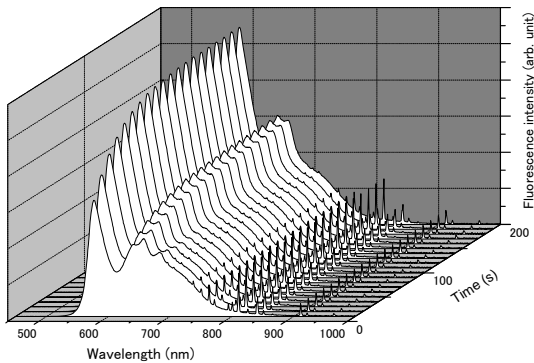


図 3 海水から淡水に移したときの LIF スペクトルの時間変化

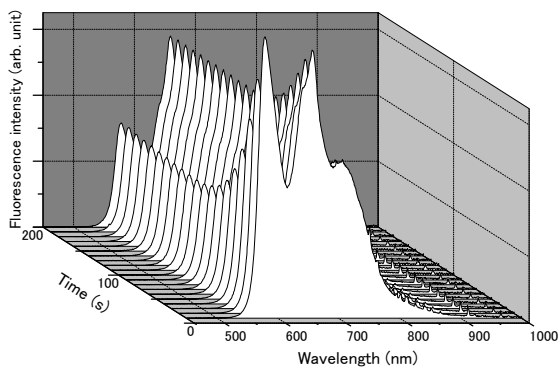


図 4 淡水に 3 時間浸した海苔を海水に移したときの LIF スペクトルの時間変化

さらに、淡水中から海苔を海水に戻したときの変化を測定した。その代表例として、図 4 に淡水に 3 時間浸けた後に海水に戻したときの LIF スペクトルの変化を示す。この図より、淡水に浸けておいた試料を海水に戻すと、海水に戻した時間の経過とともに 580 nm のピーク強度が大きく減少し、正常な海苔の LIF スペクトルに回復した。そのピーク強度はおよそ 100 秒間で一定になった。また、淡水に浸す時間が与える影響を検討した。図 5 に淡水に 36 時間浸した後に海水に戻した試料の LIF スペクトルの変化を示す。この図は、海水に戻してから 1200 秒まで 50 秒間隔でプロットした。この図によると、淡水に 36 時間浸すと、海水に戻しても大きな変化は見られず、580 nm のピーク強度は元に戻らないことがわかる。図 6 に淡水に 3 時間、24 時間および 36 時間浸した試料の 580 nm および 660 nm のピーク強度比 (F580/F660) の時間変化を示す。淡水に浸した時間が 3 時間および 24 時間の場合には、F580/F660 強度比が時間と共に減少し、約 100 秒で正常な海苔の場合と同程度 (約 0.5) まで回復している。しかし、淡水に 36 時間浸した場合には回復していない。これらの結果は、淡水に 36 時間程度以上浸すと海苔の細胞が破壊されることを示している。

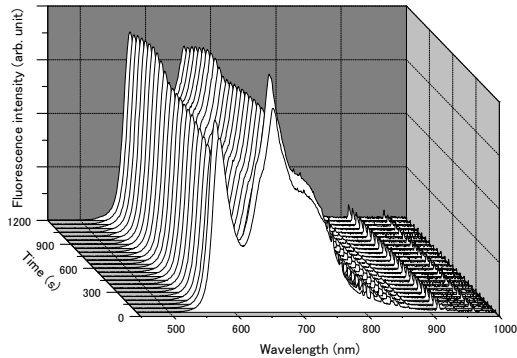


図 5 淡水に 36 時間浸した海苔を海水に移したときの LIF スペクトルの時間変化

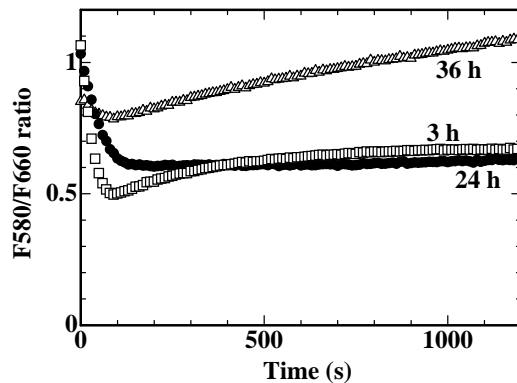


図 6 淡水に 3 時間、24 時間および 36 時間浸した試料の 580 nm および 660 nm のピーク強度比 (F580/F660) の時間変化

(3) LIF スペクトルの励起波長依存性
 海苔葉体内には様々な色素が含まれており、各色素で吸収する光の波長が異なっている。そのため入射する光の波長によって異なる

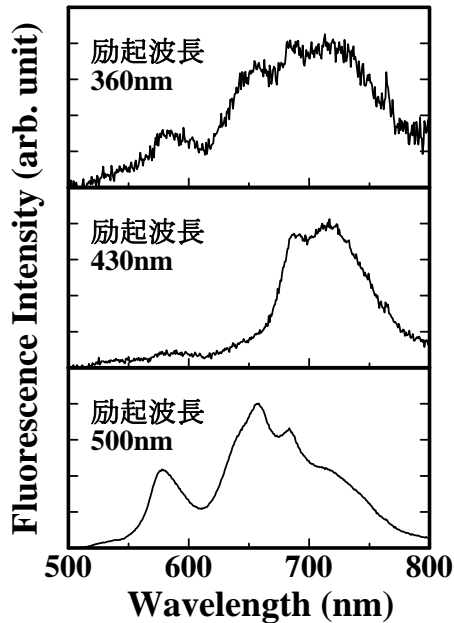


図7 光源としてXeランプを用いた場合のLIFスペクトルの励起波長依存性

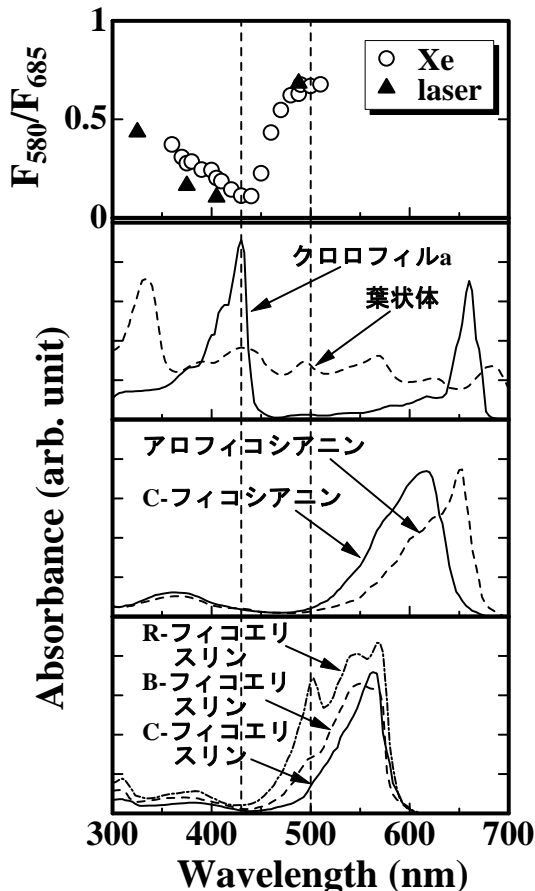


図8 580 nm/685 nmの強度比の励起波長依存性と光合成色素の吸収スペクトル

った色素が励起され、蛍光スペクトル形状も異なることが予測される。そこで蛍光スペクトルの励起波長依存性を測定し、吸収スペクトルとの比較検討を行った。

図7にXeランプを用いて得られた海苔の蛍光スペクトルの励起波長依存性を示す。これらの図より励起波長によってピーク強度比が変化することがわかる。

また、蛍光スペクトルと吸収の関係を探るため、図8に580 nmのピーク強度 (F580) と685 nmのピーク強度 (F685) の強度比

(F580/F685) の励起波長依存性および光合成色素の吸収スペクトルを示す。この図より、430 nm付近で強度比は最小となっていることがわかる。これは685 nm付近の発光の起源がクロロフィルaによるものであり、430 nm付近の励起光がクロロフィルaの最大吸収波長と一致し効率的に吸収され、685 nm付近の蛍光強度が強くなったためにF580/F685強度比が小さくなったと考えられる。また、500 nm付近では強度比は増加している。580 nm付近の発光の起源はフィコエリスリンによるものと考えられ、500 nm付近の励起光がフィコエリスリンの最大吸収波長と一致し効率的に吸収され、580 nm付近の蛍光強度が強くなったためにF580/F685強度比が大きくなったと考えられる。

図9に各ピーク強度 (F580, F660 (660 nmの蛍光ピーク強度), F685, F720 (720 nmの蛍光ピーク強度)) と530 nmから800 nmまでの積分強度の励起波長依存性を示す。励起波長430 nm付近では、580 nm、660 nm付近の蛍光強度がかなり弱くなっているが、685

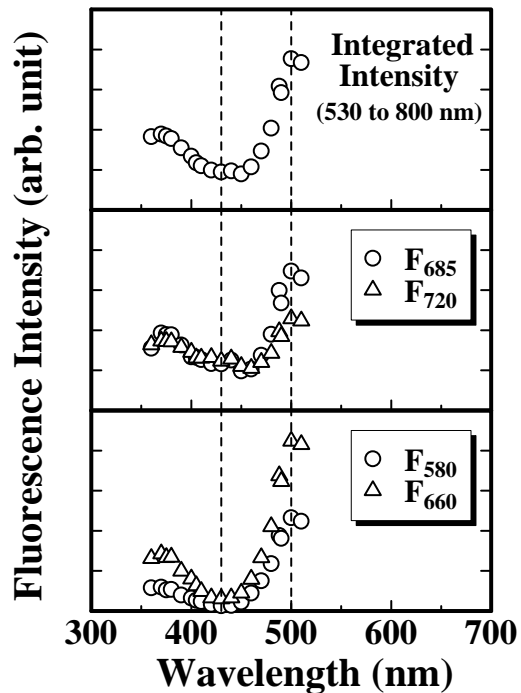


図9 各ピーク強度と530 nmから800 nmまでの積分強度の励起波長依存性

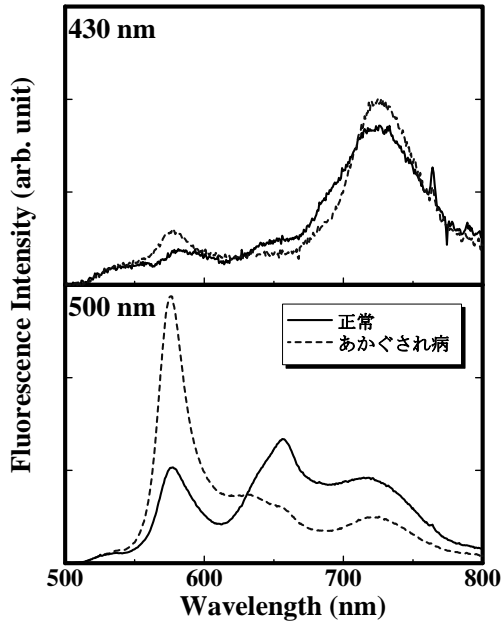


図 10 励起波長 430 nm、500 nm のときの正常な海苔およびあかぐされ病の海苔の LIF スペクトル

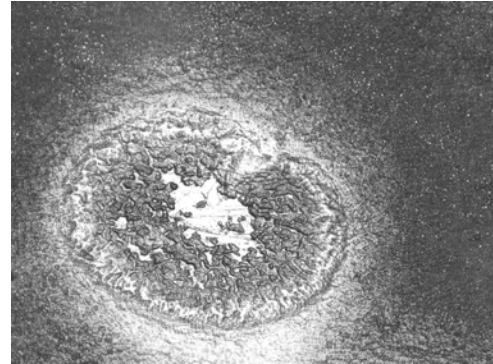
nm、720 nm 付近の蛍光強度は最大値の 1/2～1/3 程度の強度になっている。これは光合成の主色素であるクロロフィル a で効率よく吸収されるために、フィコエリスリンおよびアロフィコシアニンの蛍光強度が弱くなったと考えられる。一方、励起波長 500 nm 付近では全てのピーク強度で最大の値を示している。これはフィコエリスリンの吸収による影響と考えられる。フィコエリスリンは海苔の補助色素であり、吸収したエネルギーを光合成反応中心であるクロロフィル a へ効率的に移行させる。そのため、580 nm 付近のフィコエリスリンの蛍光と同時に 685 nm、720 nm 付近のクロロフィル a による蛍光も絶対強度が大きくなったと考えられる。

一方、500nm 付近では全てのピークの絶対強度で最大の値を示している。これはフィコエリスリンのはたらきによるものと考えられる。フィコエリスリンは海苔の補助色素であり、吸収したエネルギーを光合成反応中心であるクロロフィル a へ移行させる。そのため、580nm 付近のフィコエリスリンの蛍光や 660nm 付近の蛍光と同時に 685nm、720nm 付近のクロロフィル a による蛍光も絶対強度が大きくなったと考えられる。

次に、ストレスの影響を受けた試料の LIF スペクトルの励起波長依存性を検討した。図 10 に、特徴的な励起波長である、励起波長 430 nm、500 nm のときの正常な海苔およびあかぐされ病の海苔の LIF スペクトルを示す。励起波長 430 nm の光を試料に照射したときの LIF スペクトルは、各試料において目立っ

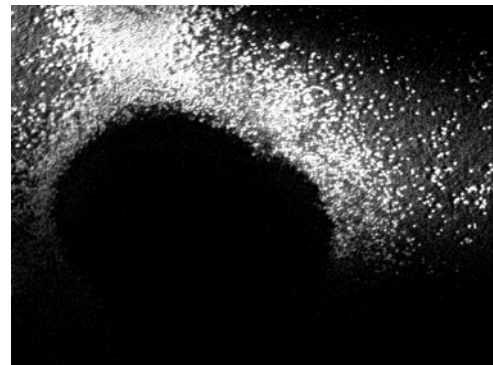
た変化はない。しかし、励起波長 500 nm の場合は蛍光スペクトルが大きく変化していることがわかる。特に、フィコエリスリンを発光起源とする 580 nm 付近の発光の励起光強度に大きな変化が見られる。この結果より、スサビノリのストレスの診断を行うには 500 nm 付近の励起波長が有効であると考えられる。

(4) 海苔の細胞レベルでの蛍光分布の測定
次に、病害の部位を初期段階で診断するためにデジタルマイクروسコープを用いて、細



500 μm

(a) 顕微鏡像



(b) 580 nm の蛍光分布画像



(c) 685 nm の蛍光分布画像

図 11 あかぐされ病に感染したスサビノリの顕微鏡像及び蛍光分布画像

胞レベルでの蛍光分布測定を試みた。図 11(a)にスサビノリの顕微鏡像、(b), (c)に LIF スペクトルで特徴的に変化するピーク波長の蛍光分布画像を示す。(b), (c)より、中央部のあかぐされ病に感染して細胞が死滅した部位からの蛍光は観測されなかった。しかし、細胞が死滅した周囲において 580nm 蛍光がその他の正常な部位に比べて強くなっている。つまり、あかぐされ病の感染した初期段階においては 580 nm の蛍光が強くなり、細胞が完全に死滅すると光合成色素が破壊されたために蛍光が観測されなくなると考えられる。また、画像上部に 685 nm の蛍光が消失し、580 nm の蛍光が強く観測できる部位があるが、これはあかぐされ病によってクロロフィルが先に破壊されるため、クロロフィル蛍光が消失し、補助色素のフィコエリスリン蛍光のみが見られたと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Tamotsu OKAMOTO, Yuki NAKAMURA, Kunio TAKAHASHI, Shohei KANEKO and Yuji SHIMADA, “Diagnostics of Susabi-nori (*Porphyra yezoensis*) by Laser-Induced Fluorescence Method”; Journal of Light & Visual Environment, Vol.32, No.4 (2008) pp.5~8, 査読有.

[学会発表] (計 8 件)

- ① 岡本保, 高玉篤志, 嘉数祐子, 高橋邦夫, 林俊裕, 島田裕至, 「レーザー誘起蛍光法を用いた海苔の生育診断技術の開発」, 電気学会光応用・視覚/計測合同研究会, LAV-09-23, IM-09-23, 2009年2月5日~6日, 宮崎, 電気学会研究会資料, pp.107-112 (2009).
- ② 村田和貴, 正木幸宏, 高玉篤志, 岡本保, 嘉数祐子, 高橋邦夫, 林俊裕, 島田裕至, 「葉色の異なったスサビノリにおけるクロロフィル蛍光への影響」, 2008年(第4回)電気学会東京支部千葉支所研究発表会, 2008年12月6日, 千葉, 講演論文集, pp.46-47 (2008).
- ③ 正木幸宏, 村田和貴, 高玉篤志, 岡本保, 嘉数祐子, 高橋邦夫, 林俊裕, 島田裕至, 「スサビノリに含まれる各種色素による蛍光スペクトルの励起波長依存性」, 2008年(第4回)電気学会東京支部千葉支所研究発表会, 2008年12月6日, 千葉, 講演論文集, pp.48-49 (2008).
- ④ 高玉篤志, 石井あつみ, 正木幸宏, 村田和貴, 岡本保, 高橋邦夫, 大野祐子, 金子昇平, 島田裕至, 「海苔生葉の蛍光スペクトルへの励起波長の影響」, 平成20年度(第41回)照明学会全国大会, 128,

2008年8月27日~28日, 東京, 講演予稿集, pp.220-221 (2008).

- ⑤ 石井あつみ, 高玉篤志, 岡本保, 高橋邦夫, 大野祐子, 金子昇平, 島田裕至, 「スサビノリのLIFスペクトルの励起波長依存性」, 2007年(第3回)電気学会東京支部千葉支所研究発表会, 2007年12月15日, 千葉, 講演論文集, pp.24-25 (2007).
- ⑥ 高玉篤志, 石井あつみ, 岡本保, 高橋邦夫, 大野祐子, 金子昇平, 島田裕至, 「LIF法による蛍光分布測定を用いたスサビノリの生育診断技術の検討」, 2007年(第3回)電気学会東京支部千葉支所研究発表会, 2007年12月15日, 千葉, 講演論文集, pp.26-27 (2007).
- ⑦ 高玉篤志, 石井あつみ, 岡本保, 高橋邦夫, 金子昇平, 島田裕至, 「レーザー誘起蛍光法を用いたスサビノリの生育診断」, 第13回日本高専学会研究発表会, 2007年9月1日~9月2日, 千葉.
- ⑧ 高橋星矢, 山崎香里, 中村友紀, 岡本保, 高橋邦夫, 金子昇平, 島田裕至, 「LIF法によるスサビノリへのストレスの影響の検討」, 2006年(第2回)電気学会東京支部千葉支所研究発表会, 2006年12月2日, 千葉, 講演論文集, pp.15-16 (2006).

[図書]

(計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 保 (OKAMOTO TAMOTSU)
木更津工業高等専門学校・電気電子工学科・准教授
研究者番号: 80233378

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

高橋 邦夫 (TAKAHASHI KUNIO)
木更津工業高等専門学校・基礎学系・教授
研究者番号: 40042642

大野(嘉数) 祐子 (OHNO-KAKAZU YUKO)
木更津工業高等専門学校・基礎学系・講師
研究者番号: 30455117