

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：57501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26350259

研究課題名(和文) 不溶性フィブロイン膜固定化発光細菌を用いた微生物実験

研究課題名(英文) Microbial experiment using insoluble fibroin membrane-immobilized luminescent bacteria

研究代表者

二宮 純子(Ninomiya, Junko)

大分工業高等専門学校・一般科理系・准教授

研究者番号：60632726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：不溶性フィブロインフィルム(以下、IFFという)を作製し、発光細菌をIFFに固定化したチューブを用いて毒性試験を行う実験教材の作成を試みた。硫黄源要求性を示す*V. fischeri* (ATCC 49387) は、界面活性剤である直鎖状アルキルベンゼンスルホン酸塩(LAS)に対して発光増加を示すため、LASを含む洗濯用合成洗剤に対して低濃度では発光増加を示し、LASの検出が可能であることが示唆された。発光細菌をIFFに固定化した場合、溶液中における感受性試験よりも鋭敏な反応を示すことが明らかとなった。IFFに発光細菌を固定化した毒性試験は、環境教育の新たな実験教材として有効であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We tried to prepare an experimental teaching material to prepare an insoluble fibroin film (hereinafter referred to as IFF) and perform toxicity test using a tube in which luminescent bacteria are immobilized on IFF. *V. fischeri* (ATCC 49387) showing the requirement for sulfur source showed increased emission relative to the linear alkylbenzene sulfonate (LAS) which is a surfactant. When luminescent bacteria were immobilized on IFF, it was revealed that they showed a sharper reaction than the susceptibility test in solution. It was suggested that the toxicity test with luminescent bacteria immobilized on IFF is effective as a new experimental teaching material for environmental education.

研究分野：理科教育

キーワード：環境教育 発光細菌 実験教材 毒性試験 フィブロイン

### 1. 研究開始当初の背景

海洋性発光細菌 *Vibrio fischeri* を用いた急性毒性試験法は ISO で策定され、アメリカ環境庁 (USEPA) の毒性評価の標準方法として認証を受けたマイクロバイオテストキットのマイクロトックス (Microtox™) では *Vibrio fischeri*、トックススクリーン (ToxScreen-) では *Photobacterium leiognathi* の発光細菌がそれぞれ利用されている。これらの発光細菌は発光強度が高く、毒物に対して感度が高いため、環境中の毒性評価として安定した結果を示すことが知られている。特に *Vibrio fischeri* は鮮度の良いイカなどの海産魚介類から分離および純化することができるため、理科教材として用いられた実習実践報告がある。しかし、発光細菌の分離および純化にはオートクレーブなどの滅菌装置や実験者の技術が必要なため、一般教員へ普及することは困難である。

### 2. 研究の目的

本研究では、不溶性フィブリン膜に固定化した発光細菌を用いた微生物実験を提案し、簡便性・迅速性を有し、低コストの教材の実用化を目指している。発光細菌を活用すれば、細菌を用いる体験的な学習の機会を容易に提供し、細菌や微生物に関連する単元学習への意欲も強く喚起することが出来ると期待される。また、環境分野においても、海洋性発光細菌 *Vibrio fischeri* を用いた急性毒性試験法は国際標準化機構 (ISO) で策定され、バイオアッセイキットが市販されている。本研究は、このような国際的な環境保全の視点に立った教材の実用化につながると考えている。

### 3. 研究の方法

#### (1) 発光細菌の固定化担体である不溶性フィブリン膜 (IFF) の改良

フィブリンは蚕繭に含まれる不溶性のタンパク質である。本研究では、蚕繭からフィブリンを抽出し、塩化カルシウム溶液で加水分解することによりフィブリン溶液を得た。このフィブリン溶液にグリセロールを添加し、不溶性フィブリン膜 (IFF) を作製した。IFF を接着させたガラスチューブに海洋性発光細菌 *V.fischeri* の培養液を加え、一定時間経過後、IFF に付着していない *V.fischeri* の洗浄除去を行い、IFF への細菌の固定、及び発光強度の評価を行う。(右図) これまでの研究で、海洋性発光細菌 *V.fischeri* において、発光強度が高く、良好な結果を得ている。また、IFF に付着した *V.fischeri* が Polysaccharaide を分泌することが確認されている。そこで、IFF に多糖であるアルギン

酸を添加することで、細菌の付着率の増加と発光強度の安定化を目指す。

#### (2) 発光細菌を供試生物とした毒性試験

発光細菌 *V. fischeri* を供試生物とした毒性試験の有毒化学物質として重金属イオン、防かび剤、界面活性剤を使用した。毒物への感受性試験として、96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに、発光細菌の培養液を入れ、有毒化学物質を所定濃度 (~10mg/L) になるように添加する。この時、発光細菌に添加した化学物質の暴露時間と発光強度の変化量から、発光阻害率 (%) を求め、毒性試験の感受性を明らかにした。

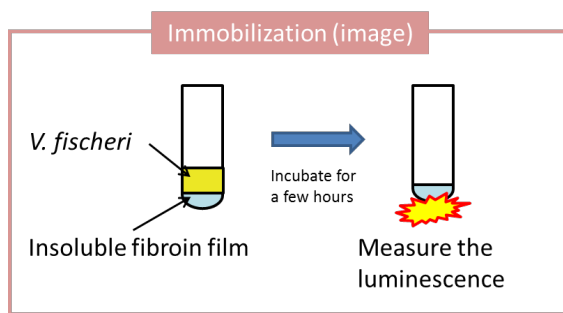
不溶性フィブリン膜 (IFF) ならびにフィブリンにアルギン酸添加したフィブリン膜 (IFAF) に発光細菌を固定化し、毒物を暴露して発光増減率を求め、その毒性評価について検討した。

### 4. 研究成果

アルギン酸を添加した IFF を水溶液に浸漬した場合、タンパク質であるフィブリンは溶出しませんが、膜自体が溶液中で脆弱化することが明らかとなった。不溶性フィブリン膜 (IFF) ならびにフィブリンにアルギン酸添加したフィブリン膜 (IFAF) を作成し、発光細菌の付着実験を行なった。発光細菌の発光強度は再現性が高いが、付着した生菌数の結果にはバラつきが大きい。担持膜と保存条件についてさらなる改良が必要である。しかしながら、IFF に発光細菌を固定化したチューブを用いて毒性試験を行ったところ、感受性試験よりも鋭敏な反応を示すことが明らかとなった。

発光細菌の重金属に対する毒性試験では、海洋性発光細菌である *V. fischeri*、および淡水性発光細菌である *Photobacterium luminescens* を供試生物として、各種重金属に対する感受性の検討を行った。*V. fischeri* を供試生物とした場合は、水銀 Hg 濃度 5.0mg/L 以上において発光阻害率がほぼ 100% であった。さらに、他の金属混合条件下においても水銀 Hg に対して発光阻害率を示し、高い感受性を有することが明らかとなった。一方、淡水性発光細菌 *P. luminescens* を供試生物とした場合は水銀 Hg とカドミウム Cd に対して金属濃度 5.0mg/L 以上で発光阻害率が 90% 以上の結果を示した。

また、農作物の防カビ剤として用いられるイマザリル IMZ とチアベンダゾール TBZ、オルトフェニルフェノール OPP ならびにオルトフェニルフェノール塩 OPPNa に対する感受性試験を行った。供試生物に *V.fischeri* と同じ海洋性発光細菌 *Allivibrio fischeri* (ATCC7744) を用いて比較実験を行った。毒物に対する感受性は、供試生物や培養条件によって異なるため、同じ毒物に対して *V.fischeri* と *A.fischeri* の発光挙動が同じとは限らないため、いく



つかの生物モデルを並行して用いながら、毒性試験の指標とする必要があると考えられる。

*V.fischeri* に LAS を曝露したところ, LAS 濃度 0.05 ~ 10.0mg/L に対して発光増加する傾向を確認できた。さらに, LAS を含む市販の洗濯洗剤 (5 種) に対して発光増加が確認された。市販の洗剤には, LAS 以外の化学物質が含まれているが, そのような夾雑な条件下においても LAS の感受性を確認できたことは重要である。

IFF に発光細菌を固定化した毒性評価は、溶液中における感受性試験よりも鋭敏な反応を示し、重金属だけでなく、合成洗剤に含まれる LAS の検出、防カビ剤に対しても有効であり、環境教育の新たな実験教材として有効であることが示唆された。

#### 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)

[雑誌論文](計 1 件)

・Hitomi Kuwahara, Junko Ninomiya, Hiroshi Morita, Control of *Allivibrio fischeri* Luminescence and Decrease in Bioluminescence by fungicides, *Biocontrol Science* Vol 23., No.2, 2018, 査読有

[学会発表](計 31 件)

・Junko Ninomiya, Hitomi Kuwahara, Takashi Furukawa, Takahisa Ueno, Hiroshi Morita, Toxicity assay using luminescent bacteria for fungicides (OPPNa, OPP), 2017 Global Conference on Engineering and Applied Science (GCEAS) (国際学会), 2017 年

・Hitomi Kuwahara, Junko Ninomiya, Chinatsu Nagahama, Hiroshi Morita, Application of luminescence of marine luminous bacteria *Allivibrio fischeri* to toxicity assays for postharvest pesticides imazalil and thiabendazole, The international research conference on engineering and technology (国際学会), 2017 年

・Junko Ninomiya, Takashi Furukawa, Takahisa Ueno, Hiroshi Morita, Sensitivity of luminescent bacteria in heavy metals( $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ), The International Research Conference on Engineering and Technology (国際学会), 2017 年

・Hitomi Kuwahara, Junko Ninomiya, Hiroshi Morita, RELATIONSHIP BETWEEN CELL GROWTH AND

LUMINESCENCE OF USING FOUR MARINE LUMINOUS BACTERIA IN ARTIFICIAL SEA WATER AND SEA WATER MEDIUM, International Congress on Chemical, Biological and Environmental Sciences(国際学会), 2017 年

・吉野佑弥, 杉原勇也, 上野崇寿, 二宮純子, 森田洋, 市販の合成洗剤に対する発光細菌の感受性について、日本理科教育学会、2017 年

・佐藤司怜, 二宮純子, 森田洋、フィブロン溶液の長期保存、日本理科教育学会、2017 年

・H. KUWAHARA, J. NINOMIYA, and H. MORITA, Relationship between cell growth and luminescence bacteria in artificial sea water and sea water medium, The Water and Environment Technology Conference 2016 (国際学会), 2016 年

・二宮純子、上野崇寿、森田洋、発光細菌を用いた界面活性剤 LAS の毒性評価、日本化学会第 97 回春季年会、2016 年

・二宮純子、杉原勇也、上野崇寿、森田洋、発光細菌を用いた界面活性剤の毒性評価、日本理科教育学会第 66 回全国大会、2016 年

・吉野祐弥、杉原勇也、二宮純子、森田洋、合成洗剤に対する発光細菌の感受性試験、日本理科教育学会九州支部大会、2016 年

・C. NAGAHAMA, H. KUWAHARA, J. NINOMIYA, and H. MORITA, Application to the toxic inspection to the food additive of *Allivibrio fischeri*, 12th Asian Congress of Nutrition Pacifico Yokohama, kanagawa, Japan(国際学会), 2015 年

・C. NAGAHAMA, H. KUWAHARA, J. NINOMIYA, and H. MORITA, Study on application of *Allivibrio fischeri* for the toxicity test, 17th International Conference on Energy, Environmental and Chemical Engineering (国際学会), 2015 年

・H. KUWAHARA, J. NINOMIYA, and H. MORITA, RELATIONSHIP BETWEEN CELL GROWTH AND LUMINESCENCE OF MARINE LUMINOUS BACTERIA IN ARTIFICIAL SEA WATER AND SEA WATER MEDIUM, 22nd International Academic Conference on Engineering, Technology and Innovations (国際学会), 2015 年

・C. NAGAHAMA, H. KUWAHARA, J. NINOMIYA, and H. MORITA, TOXICITY TESTING USING MARINE LUMINESCENT BACTERIUM *Allivibrio fischeri*, 22nd International

Academic Conference on Engineering, Technology and Innovations (国際学会), 2015年

・長浜千夏、桑原 眸、二宮純子、森田 洋、海洋性発光細菌 *Allivibrio fischeri* による毒性検査、第 22 回日本生物工学会九州支部宮崎大会、2015年

・二宮純子、森田洋、絹フィブロイン膜を用いたタンパク質の検出反応、日本理科教育学会九州支部沖縄大会、2015年

・二宮純子・古川 隼士・森田 洋、フィブロイン-アルギン酸膜への *Vibrio fischeri* の固定化とその保存方法、日本化学会第 96 回春季年会京都、2015年

・平野 瑠唯・杉原 勇也・上野 崇寿・二宮純子・森田 洋、発光細菌 *V.fischeri* を用いた水質汚染の評価方法、日本化学会第 96 回春季年会京都、2015年

・村田加奈子、古川隼士、二宮純子、発光細菌を用いたバイオアッセイキットの保存性の検討、日本水環境学会九州沖縄支部研究発表会、2015年

・長浜千夏、桑原眸、二宮純子、森田洋、海洋性発光細菌 *Allivibrio fischeri* を利用した毒性検査、日本菌学会第 59 回大会、2015年

・長浜千夏、桑原眸、二宮純子、森田洋、バイオアッセイによる環境評価法、福岡県環境教育学会 第 18 回年会、2015年

・長浜千夏、桑原眸、二宮純子、森田洋、*Allivibrio fischeri* を利用した防ばい剤のバイオアッセイ技術、日本防菌防黴学会 第 42 回年次大会、2015年

・長浜千夏、桑原眸、二宮純子、森田洋、海洋性発光細菌 *Allivibrio fischeri* を用いた毒性検査、微生物学の新たな発展、ゲノムから機能・実用に関する九州シンポジウム、2015年

・長浜千夏、桑原 眸、二宮純子、森田洋、海洋性発光細菌を利用した防ばい剤のバイオアッセイ技術、日本農芸化学会 2016 年度大会 2015年

・二宮純子、古川隼士、森田洋、発光細菌を供試生物とした毒性試験について、日本理科教育学会九州支部大会、2014年

・二宮純子、古川隼士、野仲壮真、森田洋、発光細菌を用いた水環境の毒性評価の教材化～「自然環境の保全と科学技術の利用」の実験～、日本理科教育学会全国大会、2014年

・二宮純子、古川隼士、森田洋、発光バクテリアの生物発光阻害を用いた毒性試験について、第 14 回環境技術学会年次大会、2014年

・野仲壮真、二宮純子、古川隼士、発光細菌を供試生物とした毒性評価に関する基礎的検討、土木学会、2014年

・恵良真理子、二宮純子、田部井陽介、森田洋、発光細菌を用いた新規バイオセンサー、第 73 回農業食料工学会年次大会、2014

年

・桑原眸、二宮純子、森田洋、海洋性発光細菌の発光因子、平成 26 年室内環境学会学術、2014年

・桑原眸、二宮純子、森田洋、Luminescence inducer of *Allivibrio fischeri* under artificial sea water、The 29 th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON OKHOTSK SEA & SEA ICE、2014年

・

〔図書〕(計 0 件)

〔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 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
二宮純子 (Ninomiya Junko)

研究者番号：60632726

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：

(4) 研究協力者 ( )