

複合的水質監視装置の開発とナミウズムシの生態

山口県立山口高等学校 化学・生物部

I. はじめに

水の安全性を検査する方法の中で、生物検定としては、数日間の藻類の増殖から判断する方法やミジンコの遊泳阻害を目視で判断する方法¹⁾、或いは、メダカを用いた水質の連続監視²⁾ などがある。ミジンコや藻類を用いた試験は人手に頼ることが多く、費用や労力を要する。また、メダカを用いる方法については、動物実験の適切な施行の国際原則である3Rs (Replacement, Reduction, Refinement)³⁾に則して考えると、脊椎動物である魚類から無脊椎動物へ変更することが望ましいと思われた。

これらの課題を解決すれば、水の安全性試験を実施することが容易になり、人々の健康な生活を維持したり水環境を保全したりすることに役立てることができる。そこで、藻類やミジンコを用いる検査についてはコンピューターで自動監視できるシステムに変更することで労力の削減を図り、メダカを用いる検査については無脊椎動物への代替について検討した。

II. 複合的水質監視装置の開発

オオカナダモ (*Egeria densa*) の細胞に含まれる葉緑体は細胞の中を流れるように運動し、これを細胞質流動 (原形質流動) という。細胞質流動は、死細胞では見られない⁴⁾。このことから、コンピューターを利用して細胞質流動を自動監視すれば、植物細胞に致死的な影響を与える物質の有無をモニタリングすることができると考えた。藻類の増殖試験とは感度が異なるものの、オオカナダモの細胞質流動をコンピューターを利用して監視することで、労力の削減を図った。

ミジンコの遊泳阻害試験については、光に集まる性質 (正の光走性)⁵⁾を利用した。試験水を流入させる水槽にオオミジンコを入れ、この水槽の一端にオオミジンコを誘引する照明を設置した。照明周辺をUSBカメラによって監視し、オオミジンコが遊泳していれば安全な水であり、オオミジンコが遊泳していなければ遊

泳を阻害する物質が存在する可能性があると判定するシステムを構築した。

無脊椎動物への代替種については、きれいな水の指標生物であるナミウズムシ (*Dugesia japonica*) を選定した。ナミウズムシを入れた容器に試験水を流入させ、ナミウズムシの生存に影響を及ぼす物質が含まれている場合は衰弱して押し流される構造とし、ナミウズムシの有無によって水質を判定するシステムとした。また、ナミウズムシは再生能力が高く、虫体を二等分するように切断した場合、それぞれの断片は失われた部分を再生して二匹になる。予め虫体を二等分し、脳が無い尾部側の断片を水質監視に用いることで、ナミウズムシに与える苦痛を軽減するよう配慮した。

これらのオオカナダモの細胞質流動、オオミジンコの遊泳、ナミウズムシ尾部断片の有無を監視するシステムを組合せ、複合的水質監視装置を構築した。

1 研究の目的

脊椎動物を用いない生物検定を行い、コンピューターで監視することで労力やランニングコストを低減できる水質監視装置を開発することを目的とした。

2 材料

(1) オオカナダモ (*Egeria densa*)

萩市の阿武川下流域で採取し、大形のガラス水槽で、室温・恒明条件にて栽培した。

(2) オオミジンコ (*Daphnia magna*)

NBRPから分譲していただいた。カルキ抜き (テトラ社、コントラコロライン) で脱塩素した水道水を水槽に注ぎ、20℃に設定したインキュベーター内で、明暗サイクル14:10 (照明2270lux) で飼育した。緑藻 (セネデスムス属やアナベナ属) を1日1回、飼育水が薄く緑色を呈する濃度で与えた。

(3) ナミウズムシ (*Dugesia japonica*)

行動の実験には京都大学 井上 武 先生から分譲していただいた株を、毒性試験には山口市糸米川で採集

した個体群を用いた。人工海水（(株) ジャパンバイオケミカル）を0.05g/Lの濃度で溶解させた飼育水（水深1.0～1.5cm）にナミウズムシを入れ、20℃に設定したインキュベーター内で恒暗条件にて飼育した。ニワトリのレバーを3日に1回与え、その3時間後に新しい飼育水を入れた容器に移した。

3 オオカナダモの細胞質流動の監視

(1) 観察方法

連続して細胞質流動を観察する装置（図1）を作製し、10cm離れた部分の光量子束密度が $50\mu\text{mol}/\text{m}^2/2$ に調整したLEDを顕微鏡（ニコンD22-4211EL）に取り付けて観察した。各細胞の中で四隅にある4個の葉緑体の速度の平均値を一つの細胞の

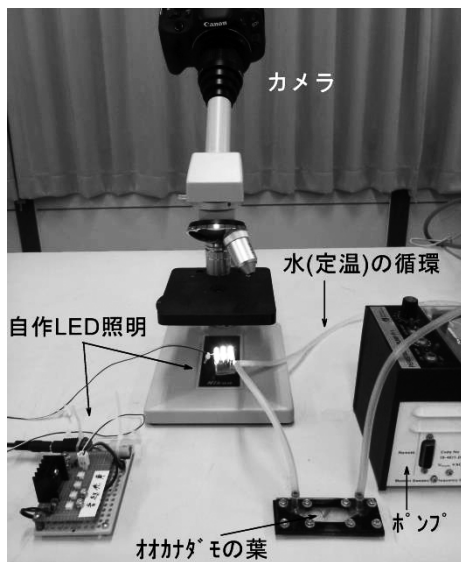


図1 細胞質流動の観察

速度とし、各群で約100個の細胞を計測した。

(2) 結果

- ① 5℃～25℃の水温では、温度が高いほど流速が速まる傾向があり、各温度間には5%水準で有意な差が検出された（Steel-Dwass法）（図2）。
- ② 細胞質流動の速度は、照射する光の色によって変化した。青色の光が最も速く、次いで白色、赤色、黄色の順となった（図3）。各群間には、5%水準で有意な差が検出された（Steel-Dwass法）。

(3) 考察

水温については、5～25℃まで流動が見られたため、これらの温度範囲において監視が可能であると推察される（図2）。細胞質流動には青色の光が有効であった（図3）。しかし、青色を照射した場合、長時間経過すると葉緑体が細胞の縁に集合して停止した（図4）。その

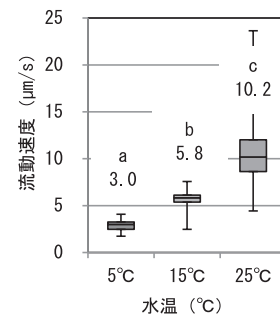


図2 水温と流動速度

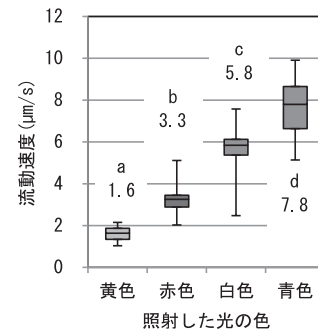


図3 光の色と流動
グラフの中の値は中央値、バーは最大・最小値、アルファベットは有意差を示す（ $P < 0.05$ ）

ため、光源としては、葉緑体が運動し続ける白色の方が適していた。

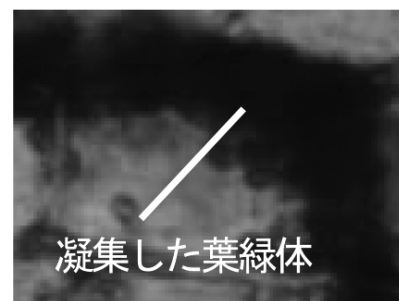


図4 葉緑体の凝集

4 オオミジンコの遊泳阻害の監視

(1) 観察方法と結果

ミネラルウォーターを入れた小型水槽（図5）にミジンコ1匹を入れて20℃に保った。光量子計（apogee、MQ-200）を用いて一定の光量子束密度（ $50\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ）に調整したLED（青色、緑色、黄色、赤色、白色）を小型水槽の端に密着させて光源とした。小型水槽を0（暗端）～7（光源側）の8区間に分け、オオミジンコの位置を2分後に記録した。なお、1匹のミジンコに対して10回行った平均値を求め、30匹（仔15匹・成体15匹）のデータを分析した。結果は図6に示した。



図5 光走性の実験方法

(2) 考察

オオミジンコは緑色の光源に引き寄せられる傾向があった(図6)。光源に近い部分を遊泳するオオミジンコをモニタリングすることで、自由に活動させつつ、遊泳阻害の状態を確認することが可能となった(図7)。

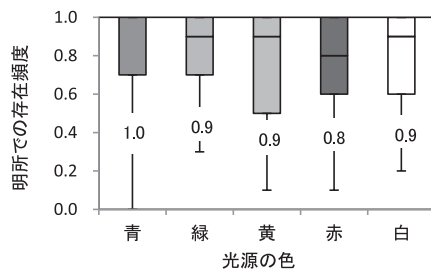


図6 光走性(親仔)
グラフ中の数字は中央値、バーは最小値、n=30

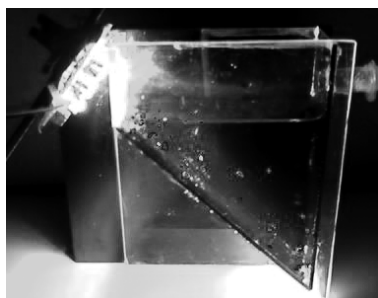


図7 ミジンコ監視部

5 ナミウズムシの尾部断片の監視

ナミウズムシは高い再生能力を有しており、体を切断した場合、2週間程度で元の状態にまで再生する。脳の機能的な再生は5日目に急速に起こり⁶⁾、刺激に反応する機構は4日目までの尾側断片には整っていない⁷⁾。そのため、切断後4日目までであれば、生物検定に用いる尾部断片に対して痛みや苦痛を与える可能性は低いと考えられた。ナミウズムシ切断後の尾部の行動について調べ、苦痛を与えない期間を推定した。

(1) 方法

頭部と尾部に2分するようにカミソリ刃を用いて切断した。水温を20℃に保ち、LEDライト(GEX社 AURORA、照度50lux)で照明しながら、カメラ(SONY HDR-AS15)を用いて60秒間隔でインターバル撮影を行った。撮影した画像を連続して比較し、ナミウズムシ断片の動きを確認した。

(2) 結果と考察

28時間まではほとんど運動しないことから、機能的な情報処理機構は存在しないと推察した。この時期の断片を生物検定に用いた場合は、苦痛を与えないと思われる(図8)。

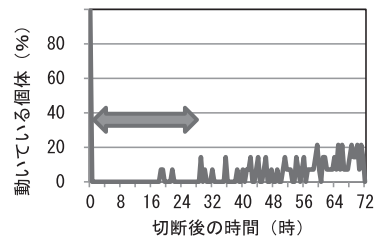


図8 切断後の時間と尾部断片の運動 n=15

6 毒性試験

(1) 方法

オオミジンコの急性遊泳阻害試験であるOECDテストガイドライン202に準拠して行った。

(2) 結果

CuSO₄に対するオオカナダモのLC₅₀は0.64~1.28mg/Lで、銅イオン換算では0.5mg/L以下であった。細胞質流動が停止する濃度が、水道水の基準値8)(1.0mg/L)以下であることから、水質監視に使用できることが分かった。サルコシル(界面活性剤)に対してはナミウズムシが敏感であった。生物種により毒性物質への耐性に違いがあることが確認できた(図9)。

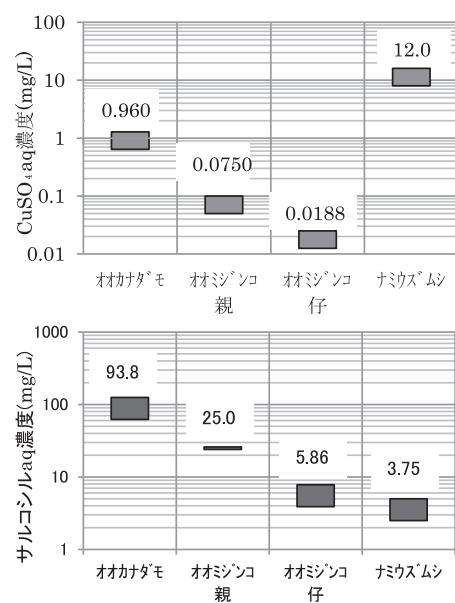


図9 薬品の種類とLC50(半数致死濃度)
数値は中央値、区間はLC50値

7 水質監視の開発と製作

上記の実験や観察の結果を活用し、水質監視装置を製作した。開発したシステムは、オオカナダモ監視部、オオミジンコ監視部、ナミウズムシ監視部、および、それらの判断出力を統合してグラフィカルに提示するフロントエンド部によって構成した。最初の3つはC言語と画像処理ライブラリOpenCVで実装し、最後のフロントエンド部はJavaで実装した。これらのプログラムは計算装置ASUS X200M上で並列実行される。

水質の判定は、3種の監視部で、それぞれ異なる画像処理の手法を用いている。ここでは、オオミジンコ監視部の処理について記載する。

オオミジンコを撮影した画像を用いて毒性物質の影響を検出する手法⁹⁾は開発されているが、既存の技術は小さなセルに入れた止水中の個体に対するモニタリングである。私たちが開発した装置では、自由遊泳させたミジンコを光に集めて監視している点が、既存のものとは異なっている。まず、USBカメラ (Logicool HD Webcam C310) でミジンコを撮影し、画像を取り込む。なお、起動時には、画像を撮影し、重み付き平均を更新することを繰り返して、平均画像を作成する¹⁰⁾。USBカメラから取り込んだ画像と作成した平均画像の差分を作成し、二値化をする。閾値処理のち、画像を平滑化し、別の閾値で二値化する。そして、ノイズを取り除くために、画像に収縮処理をかけて、探索窓の中にある輪郭を抽出する。輪郭の面積と円形度の基準でオオミジンコの成体を識別する。その後、探索窓の中にオオミジンコの成体がいなくなれば、オオミジンコの遊泳が阻害されたとみなし、警報を発する (図10)。

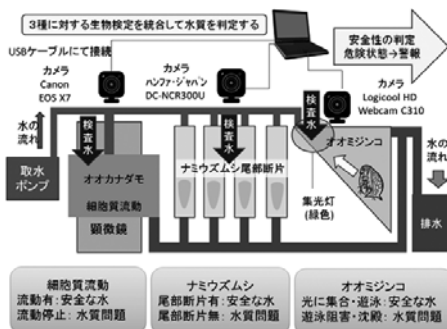


図10 3種の生物検定を用いた複合的水質監視装置

Ⅲ. ナミウズムシの生態

ナミウズムシを水質監視の生物検定に用いる場合、食物連鎖の中でどこに位置しているかを把握することは重要である。これまで、ナミウズムシは動物食性動

物である¹¹⁾と考えられてきたが、野外に生息する個体の中には体色が緑色のナミウズムシもいるため、藻類などの植物を捕食している可能性も考えられた。そこで、ナミウズムシの食性について明らかにするために、山口市内を流れる糸米川において、ナミウズムシや水生生物の生物量について調べた。

1 調査方法

山口県糸米川で、上流からA、B、Cの3地点を設定し、月に一度コドラート法にて水生生物を採集した (図11)。コドラート枠 (30cm×30cm) を川底に設置し、その範囲内の水生生物をシャベルを用いて砂利ごと採集して、砂利を除いて水生生物を集めた。採集した生物はガラス製のビンに入れて持ち帰り、生物種や個体



図11 調査地 (左からA地点、B地点、C地点)

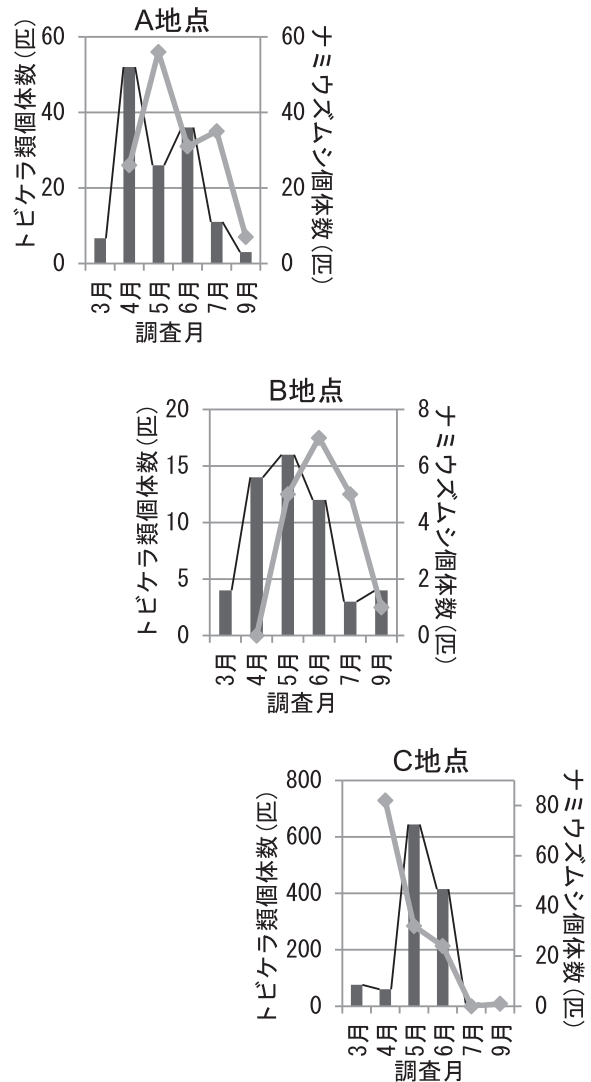


図12 トビケラ類とナミウズムシの個体数

数を記録した。個体の同定は『日本淡水生物学』(上野益三, (株)北隆館,1973)を参考にした。

2 結果と考察

調査期間:2015年3月~9月

C地点では、6月に環境の急変が起こり、それまでに生物量の大半を占めていたトビケラ類が激減し、代わりにカゲロウ類が急増した。一方、ナミウズムシは7月以降ほとんど見られなくなった。このことから、C地点のナミウズムシはトビケラ類を主に捕食していた可能性が考えられた。そこで、それぞれの地点において、トビケラとナミウズムシの個体数の変動を示した(図12)。このグラフから、トビケラの個体数の増減に伴ってナミウズムシの個体数が増減している可能性が推察された。今後、トビケラ類とナミウズムシとの関係を中心に調査を続けていく方針である。

IV. 今後の展望

今回開発した水質監視装置の実用化に向けて、システムの改良を進め、実際に継続運転をしながら信頼性を高めたい。また、有害物質の成分や濃度を推定できるように、検定に用いる生物種の選定や毒性試験のデータを蓄積したい。

V. 謝辞

細胞質流動については首都大学東京の門田明雄先生、オオミジンコに関する実験方法や飼育、毒性試験の方法などについては国立環境研究所の鑑迫典久先生、ナミウズムシに関する実験方法やデータの解析などについては京都大学の井上武先生、画像解析のソフトウェアの改善方法については山口大学の水上嘉樹先生、実験計画については山口大学の堀学先生から御指導を賜りました。なお、研究費はJST「中高生の科学部活動振興プログラム」による支援を受けています。また、オオミジンコは国立環境研究所水環境実験施設で継代飼育されている系統を、ナミウズムシは京都大学で飼育されている系統を分譲していただきました。皆様のご支援に心から感謝申し上げます。

VI. 引用文献

- 1) OECDにおける生態影響試験法及びGLP基準. 環境省p.1-16, (参照2016/04/24) <http://www.env.go.jp/chemi/seitai-kento/h13/02/01.pdf>

- 2) 四国総合研究所. “メダカdeモニタ”, (参照2016/04/24) <http://www.co.jp/service/environment/seibutumonita.htm>
- 3) 日本動物実験代替法学会. <http://www.asas.or.jp/jsaa/>, (参照 2015-09-26)
- 4) “細胞の運動と細胞骨格”. ニューステージ新生物図表. 浜島書店編集部. 浜島書店, p.48, 2011
- 5) U.C.Storz, R. J. Paul, “Phototaxis in water fleas (*Daphnia magna*) is differently influenced by visible and UV light”. *J Comp Physiol.* A183:709-717,1998
- 6) Takeshi Inoue, et al. “Morphological and Functional Recovery of the Planarian Photosensing System during Head Regeneration”. *Zoological Science* 21:275-283, 2004
- 7) Takeshi Inoue, et al. “Planarian shows decision-making behavior in response to multiple stimuli by integrative brain function”. *Zoological Letters* , 1-7, 2015
- 8) 厚生労働省,水質基準項目と基準値,2015年, <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/kijun/kijunchi.html> (参照 2016/04/24)
- 9) Kei TANIGUCHI, Kazuhiro SASA and Katsumi TAKAYAMA Development of a real-time image analysis system for toxicity testing using *Daphnia magna*.福井工業高等専門学校 研究紀要 自然科学・工学第46号, 2012
- 10) 永田雅人.実践 OpenCV 2.4 映像処理&解析.第一版、カットシステム,2013
- 11) “プラナリアの摂食行動の解析”.下山せいら.つくば生物ジャーナルVol.10 January,2011

山口県立高等学校 化学・生物部
3年 濱田 尚輝
松本 久也
原田 要