

## 動画画像解析を用いたミジンコ泳動阻害試験

高山勝己\*、平井恵子、長瀬駿、鍛田侑吾、清水涼子、吉村忠与志

福井工業高等専門学校物質工学科（〒916-8507 福井県鯖江市下司町）

\*takayama@fukui-nct.ac.jp

### Development of an image analysis system for toxicity testing using *Daphnia magna*

Katsumi TAKAYAMA,\* Keiko HIRAI, Shun NAGASE, Yugo KAJITA,

Ryoko SHIMIZU and Tadayosi YOSHIMURA

Department of Chemistry and Biology Engineering, Fukui National College of Technology

(Geshi-cho, Sabae-shi, Fukui 916-8507, Japan)

(Received October 7, 2009; Accepted October 16, 2009)

#### Abstract

An on-line monitoring system for the toxicity assessment of chemicals using *Daphnia magna* was studied. The behavior of *Daphnia magna* in micro well plates for organophosphorus pesticides (OPs) was observed through a web camera connected to a personal computer. The stock image data were analyzed using a laboratory image analysis program. *Daphnia magna* showed abnormal behavior, such as a rotational motion, in the presence of OPs. The motion of *Daphnia magna* in the localized area can be used as an index to determine toxicity to pesticides, which is recognized by our image analysis system. The present method is much more time-efficient than the conventional technique based on Japanese Industrial Standards (JIS).

**Key words:** Organophosphorus pesticides, On-line monitoring, *Daphnia magna*, motion analysis

#### 1. はじめに

バイオアッセイ(bioassay、生物検定法)とは、物質の安全性や毒性を調べる方法のひとつである。環境中には微量化学物質が数十万種以上も存在するといわれ、これらの環境での実態を個別に把握することは、費用、労力、時間の面で限界がある。

このため近年ではバイオアッセイによる簡便で迅速なスクリーニング法の確立が望まれてお

り、有害物質の毒性を総合的に評価する一つの選択肢として様々なところで利用されはじめてきている。

また、有害物質による環境毒性負荷の程度を評価し、その低減化を図ることで、未来環境に向け予防的対策を講じることがバイオアッセイの目標である。

バイオアッセイのひとつがミジンコ遊泳阻害試験である。その詳細な実験方法は JIS 規格

K0229「化学物質によるミジンコ類の遊泳阻害試験方法」によって定められている [1]。

しかし、この試験法は複数の容器を使用するために大型の恒温装置の確保や、一回の試験で用いるミジンコの個体数が大量に必要であることなど、研究室単位で試験を行うには難しい面が多々あるため簡便で迅速であるとはいえない。

昨年、我々はマルチプレートを用いたミジンコ遊泳阻害試験の簡素化に関する検討を行ったところ、対象サンプルの毒性判定には充分用いることができることを実証した [2]。ただし、毒性の判定には、目視による一定時間（例えば 12, 24 時間経過後）ごとのミジンコ遊泳阻害の判定が必要であり分析者にとって煩わしい作業である。

そこで、簡便化の第二ステップとして、ミジンコ遊泳阻害の判定を安価なウェブカメラとコンピュータによる動画解析システムを用いて行うための検討を試みた。

通常的环境下でミジンコは、上下のホッピング運動をしながら広範囲に動き回る。ところが殺虫剤などの毒物が投入されると、定位置での特異的な旋回運動をはじめたり、酸欠状態になると赤色に変色したりする [3, 4]。これらの現象は、動画解析を用いて毒性判定を行う上で、重要な基準因子となる。

## 2. 実験

### 2.1 供試生物

毒性判定用生物種は、オオミジンコ (*Daphnia magna*) であり、できるだけ同じ大きさの生後 2~3 日たった個体を用いた。

### 2.2 毒物試薬

毒物として有機リン系農薬フェントロチオン MEP (和光純薬工業株式会社) を選んだ。試験

濃度は有機リン系農薬の残留基準が 0 ppm (コントロール)、3 ppm とした。

### 2.3 動画撮影装置

動画撮影システムの概略図を図 1 に示す。スタンドでウェブカメラ (Microsoft、LifeCam VX-6000, 市販価格 5,000 円程度) を一定の高さに固定し、マルチウェルプレート内のミジンコを一定時間撮影した。

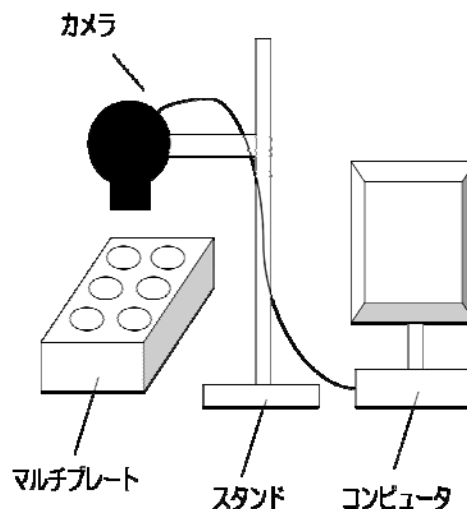


図 1 ミジンコ泳動動画解析システムの概略図

### 2.4 毒性試験方法

6 ウェルマルチプレート (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社製、6 ウェル細胞培養用マルチプレート) に 1 ウェルあたり水道水 2 ml を入れ、1 個体のミジンコを入れた。MEP 無添加または濃度が 3 ppm となるように添加後、オオミジンコの 2 次元方向の運動 (移動) を撮影した。動画撮影は最大で 30 分間行った。

### 2.5 撮影画像処理

ウェブカメラで撮影した動画データを画像処理により解析する簡易プログラムを製作した [5]。

簡易画像解析プログラムの処理手順を以下に示す。

- 1) 得られた動画データを静止画像データに変換した。撮影開始 10 分から 10 分 30 秒までの 30 秒間の動画データを用いた。1 秒の動画につき 30 枚の静止画像に変換するため、計 900 枚の静止画像データが得られた。今回は、処理時間の効率化のために動画データ 1/6 秒につき画像を 1 枚用いた解析を行った。そのため、実際に処理に使われた静止画像は 180 枚となった。
- 2) 得られた静止画像データを画像処理プログラムにより解析し、ミジンコ領域の重心座標 (x, y) を求めた。このミジンコ領域の重心座標を、マルチプレートのウェル内におけるミジンコの位置とした。
- 3) 2 枚の画像間のミジンコ座標((x, y)、(x', y'))の差異から、以下の式で移動距離 *l* を求めた。

$$l = \sqrt{(x'-x)^2 + (y'-y)^2}$$

### 3. 結果と考察

#### 3.1 希釈水の選択

毒性試験に用いる希釈水（マトリックス）によって、ミジンコに対する影響が変化する可能性があるため、水道水（7 日程度放置）、蒸留水、ミネラル水、イオン交換水、水槽内のいずれの水源を用いるのがよいか比較を行った。

24 穴のマルチプレートに各種の水およびミジンコを 5 体ずつ入れ、20℃恒温槽内に静置した。4、12、30、48 時間後にミジンコの生存数を観察し、生存率を算出した。

ミジンコの生存率と時間の関係を図 2 に示した。図に示したように、水道水と水槽水は、共に JIS 規格で定められている希釈水の条件となる生存率 90%以上を満たしていることが分かっ

た。よって本実験では、希釈水として水道水を用いることにした。

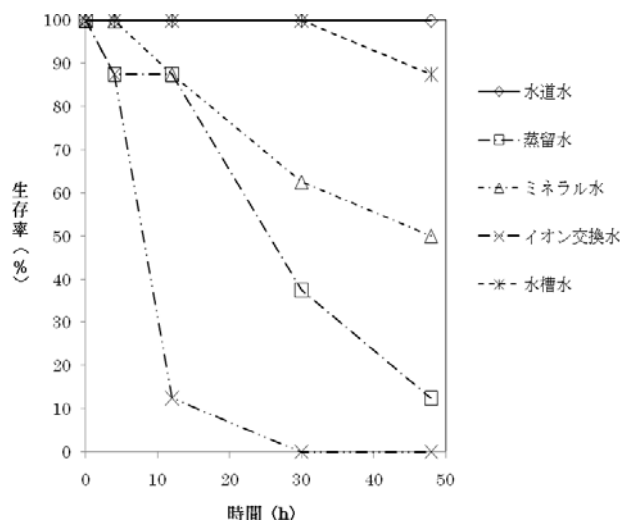


図 2 各種マトリックス水のミジンコ生存率に対する影響

#### 3.2 画像処理による毒性試験

##### 3.2.1 毒物存在下でのミジンコの軌跡

MEP 濃度 0 ppm および 3 ppm における動画画像処理から得られた、ミジンコの位置変化（撮影開始後 10 分から 30 秒間を抽出）を図 3～図 4 に示す。

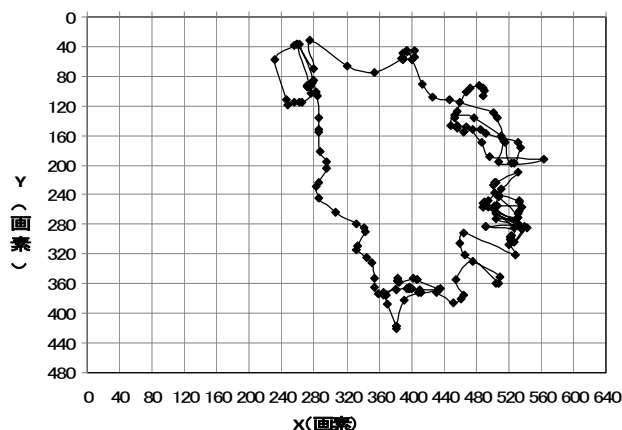


図 3 MEP 0 ppm におけるミジンコの移動軌跡  
撮影時間：10 分～10 分 30 秒

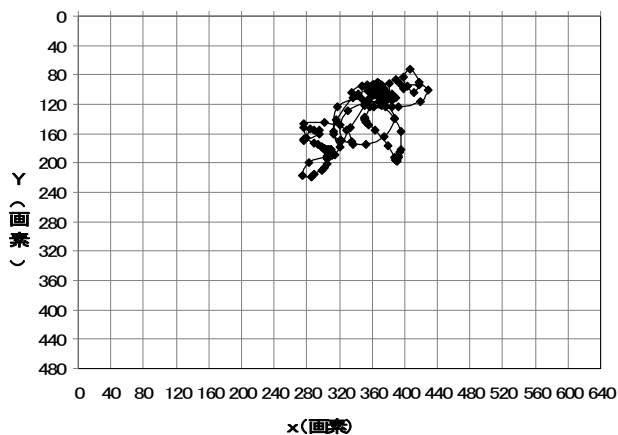


図4 MEP 3 ppm におけるミジンコの移動軌跡  
撮影時間：10分～10分30秒

図3から、MEP濃度0 ppmでのミジンコの挙動には、特に規則性や大きな変化は無く、マルチプレートのウェル内を円を描くように広く運動している様子が観察された。

一方、図4からわかるように、図3(0 ppm)と比べてMEP(3 ppm)存在下ではミジンコの移動範囲が狭くなっていることが分かった。また、ミジンコの小円を描くような運動(旋回運動)が随所で観察された。これはミジンコが毒性物質に反応して起こす異常行動であり、MEPの影響によるものと思われる。よって、ミジンコの狭い範囲での旋回運動を捉えることで、毒性の判定がより短時間で可能になるものと考えられる。MEP 3ppm存在下で、ミジンコは30分を越えると完全に動かなくなる。

### 3.2.2 一定時間間隔ごとのミジンコの移動距離

図5、図6に、MEP濃度0 ppmおよび3 ppmにおいて、10分経過後を起点にして一定時間ごとにミジンコが移動した距離をそれぞれプロットしたものを示した。図5から、MEP濃度0 ppmではミジンコが活発に運動している(振幅が大きい)ことが分かった。

これに対して、図6に示したようにMEP濃度3 ppmでは全体的に移動距離が小さくなっていることが分かった(振幅が小さい)。また、特に図中に丸で囲んだ範囲は、目視による観察でミジンコの異常行動(旋回運動)が見られた時間帯である。この時間帯での移動距離の値は、他の時間帯と比べて特に低い値を示している。このことから、振幅が低い値を示す時間帯をリアルタイムで検知することによって、毒性の判定が可能になるものと思われる。

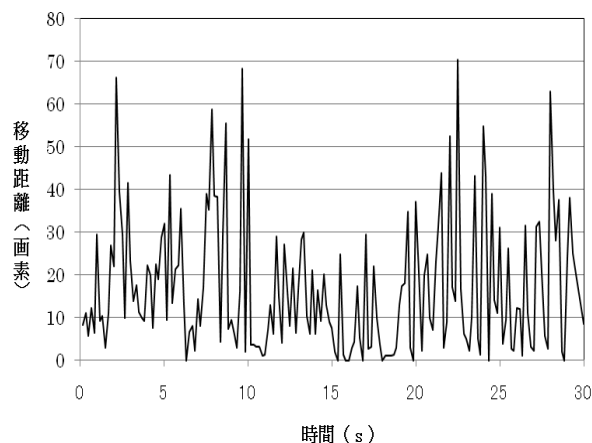


図5 MEP 0 ppm における一定時間ごとにミジンコが移動した距離の関係  
撮影時間：10分～10分30秒

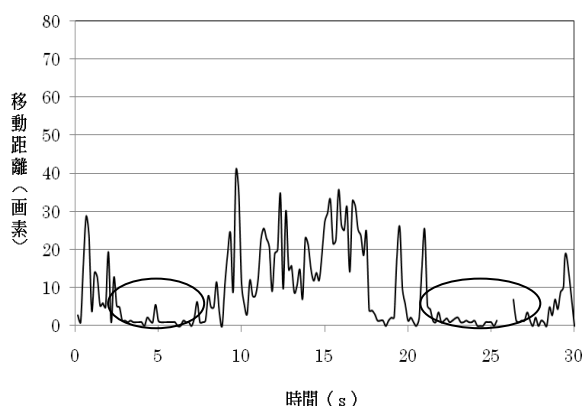


図6 MEP 3 ppm における一定時間ごとにミジンコが移動した距離の関係  
撮影時間：10分～10分30秒

#### 4. 結論

本研究により、動画処理を導入すれば、人による観察を必要としないミジンコ毒性判定試験が実現可能であることが示された。さらに本システムは、市販のウェブカメラとパーソナルコンピュータを用いたものであり、極めて廉価でシステムを組むことができる点がセールスポイントである。

今後はプログラムの改良を行い、リアルタイムでミジンコの異常行動を認識できる機能を付加することと、少なくとも 2 台同時計測システム（コントロール用と毒性評価サンプル用各 1 台）とすることが早急な検討課題である。

#### 参考文献

- 1) JIS 規格 K0229 化学物質などによるミジンコ類遊泳阻害試験方法
- 2) 清水涼子, 吉村忠与志, 高山勝己, 技術・教育研究論文誌, **15**, 51-54 (2008)
- 3) 花里孝幸、ミジンコ先生の水環境ゼミ, 地人書館 (2006)
- 4) 花里孝幸、ミジンコ, 名古屋大学出版会 (2008)
- 5) 長瀬駿、鍛田侑吾、平井恵子、画像処理によるミジンコの挙動解析とバイオアッセイへの試み、平成 20 年度電気関係学会北陸支部, **F16**, p108