

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2020-80696
(P2020-80696A)

(43) 公開日 令和2年6月4日(2020.6.4)

(51) Int. Cl.			F I			テーマコード (参考)	
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02		2 G O 4 5	
G O 1 N	33/48	(2006.01)	G O 1 N	33/48	P	4 B O 6 3	
G O 1 N	33/52	(2006.01)	G O 1 N	33/52	A	4 B O 6 5	
C 1 2 N	1/20	(2006.01)	C 1 2 N	1/20	Z		
C 1 2 N	1/12	(2006.01)	C 1 2 N	1/12	Z		

審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2018-218366 (P2018-218366)
(22) 出願日 平成30年11月21日 (2018.11.21)

(出願人による申告)平成26年度から平成30年度内閣府総合科学技術・イノベーション会議により創設された「戦略的イノベーション創造プログラム(次世代海洋資源調査技術)」事業、国立研究開発法人国立環境研究所における「海洋生態系観測と変動予測手法の開発」、産業技術力強化法、第19条の適用を受ける特許出願

(71) 出願人 501273886
国立研究開発法人国立環境研究所
茨城県つくば市小野川16-2
(74) 代理人 100149548
弁理士 松沼 泰史
(74) 代理人 100192773
弁理士 土屋 亮
(74) 代理人 100181722
弁理士 春田 洋孝
(74) 代理人 100178847
弁理士 服部 映美
(72) 発明者 河地 正伸
茨城県つくば市小野川16-2 国立研究
開発法人国立環境研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 海水中の重金属の存在を検出する方法及びキット

(57) 【要約】

【課題】海水中の重金属の存在を検出する技術を提供する。

【解決手段】海水中の重金属の存在を検出する方法であって、下記工程(a)~(c):
(a)微生物を含む海水を採取する工程、(b)前記海水に死んだ微生物を染色する染色剤を添加し、死んだ前記微生物を染色する工程、(c)前記海水中の全微生物に対する死んだ微生物の割合を測定する工程、を行い、前記工程(c)で検出された割合が、前記海水中の重金属の存在量に対応する、方法。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

海水中の重金属の存在を検出する方法であって、

下記工程 (a) ~ (c) :

(a) 微生物を含む海水を採取する工程、

(b) 前記海水に死んだ微生物を染色する染色剤を添加し、死んだ前記微生物を染色する工程、

(c) 前記海水中の全微生物に対する死んだ微生物の割合を測定する工程、

を行い、前記工程 (c) で検出された割合が、前記海水中の重金属の存在量に対応する、方法。

10

【請求項 2】

死んだ微生物を染色する前記染色剤が Propidium Iodide である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記工程 (b) 又は (c) において、前記海水に、死んだ微生物及び生きた微生物の双方を染色する染色剤を更に添加し、前記海水中の全微生物を染色する、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

死んだ微生物及び生きた微生物の双方を染色する前記染色剤がサイバークリーン I 又はその誘導体である、請求項 3 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記工程 (c) を、フローサイトメーターを用いて行う、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記工程 (c) において、死んだ微生物の割合を微生物の集団ごとに測定する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記微生物の集団が、プロクロコッカス及び無色バクテリアを含む集団、シネココッカスを含む集団又は真核藻類を含む集団である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

工程 (a) の後、工程 (b) の前に、前記海水中の微生物を培養する工程を更に含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 9】

死んだ微生物を染色する染色剤を含む、海水中の重金属の存在を検出するためのキット。

【請求項 10】

死んだ微生物を染色する前記染色剤が Propidium Iodide である、請求項 9 に記載のキット。

【請求項 11】

死んだ微生物及び生きた微生物の双方を染色する染色剤を更に含む、請求項 9 又は 10 に記載のキット。

40

【請求項 12】

死んだ微生物及び生きた微生物の双方を染色する前記染色剤が、サイバークリーン I 又はその誘導体である、請求項 11 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、海水中の重金属の存在を検出する方法及びキットに関する。

【背景技術】

【0002】

50

近年、海底鉱物資源の開発に注目が集まっている。そして、海底鉱物資源の採取時に、重金属が周辺海域に漏洩・拡散するリスクが懸念されている。このため、海水中の重金属の存在を簡便に測定する技術の開発が求められている。

【 0 0 0 3 】

海水中の重金属の存在量を測定する手段としては、例えば、誘導結合プラズマ質量分析計を使用することが挙げられる。しかしながら、船において同分析計の設置要件を満たすことは極めて難しく、海底鉱物資源の採取海域で海水中の重金属の存在を検出することは困難である。

【 0 0 0 4 】

例えば、特許文献 1 には、接着性細胞を基板上の細胞接着性膜パターン表面上に選択的に接着培養し、続いて該接着性細胞を被毒性試験化学物質を含む培養液中で培養し、次いで該接着性細胞を染色し、該接着性細胞の生死細胞を基板の観察により計数して接着性細胞の生存率を決定することにより被毒性試験化学物質の毒性を定量することを特徴とする細胞毒性試験方法が記載されている。

10

【 0 0 0 5 】

特許文献 1 にはまた、細胞毒性試験にフローサイトメトリーを用いること、細胞溶液にトリパンブルー溶液を添加すると死細胞のみがトリパンブルーを細胞内へ取り込むこと、多数の細胞からなる試料はフローサイトメーターにより瞬時に、生細胞、死細胞、細胞破片の 3 群のスポットに区別できること、ヘキスト 3 3 3 4 2 とヨウ化プロピジウムの 2 つ色素により未固定細胞の DNA を染色すると、生細胞は青色、傷害を受けた細胞は赤色の蛍光を発するので、フローサイトメーターにより容易に両者が区別されることが記載されている。

20

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 6 】

【 特許文献 1 】 特開平 1 0 - 3 2 7 8 5 4 号公報

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 7 】

本発明は、海水中の重金属の存在を検出する技術を提供することを目的とする。

30

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 8 】

本発明は以下の態様を含む。

[1] 海水中の重金属の存在を検出する方法であって、下記工程 (a) ~ (c) : (a) 微生物を含む海水を採取する工程、(b) 前記海水に死んだ微生物を染色する染色剤を添加し、死んだ前記微生物を染色する工程、(c) 前記海水中の全微生物に対する死んだ微生物の割合を測定する工程、を行い、前記工程 (c) で検出された割合が、前記海水中の重金属の存在量に対応する、方法。

[2] 死んだ微生物を染色する前記染色剤が Propidium Iodide である、
[1] に記載の方法。

40

[3] 前記工程 (b) 又は (c) において、前記海水に、死んだ微生物及び生きた微生物の双方を染色する染色剤を更に添加し、前記海水中の全微生物を染色する、[1] 又は [2] に記載の方法。

[4] 死んだ微生物及び生きた微生物の双方を染色する前記染色剤がサイバークリーン I 又はその誘導体である、[3] に記載の方法。

[5] 前記工程 (c) を、フローサイトメーターを用いて行う、[1] ~ [4] のいずれかに記載の方法。

[6] 前記工程 (c) において、死んだ微生物の割合を微生物の集団ごとに測定する、[1] ~ [5] のいずれかに記載の方法。

[7] 前記微生物の集団が、プロクロロコッカス及び無色バクテリアを含む集団、シネコ

50

コッカスを含む集団又は真核藻類を含む集団である、[6]に記載の方法。

[8] 工程 (a) の後、工程 (b) の前に、前記海水中の微生物を培養する工程を更に含む、[1] ~ [7] のいずれかに記載の方法。

[9] 死んだ微生物を染色する染色剤を含む、海水中の重金属の存在を検出するためのキット。

[10] 死んだ微生物を染色する前記染色剤が Propidium Iodide である、[9] に記載のキット。

[11] 死んだ微生物及び生きた微生物の双方を染色する染色剤を更に含む、[9] 又は [10] に記載のキット。

[12] 死んだ微生物及び生きた微生物の双方を染色する前記染色剤が、サイバークリーン I 又はその誘導体である、[11] に記載のキット。

10

【発明の効果】

【0009】

本発明によれば、海水中の重金属の存在を検出する技術を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】(a) 及び (b) は、実験例 1 におけるフローサイトメトリー解析の結果を示すグラフである。

【図2】(a) ~ (f) は、実験例 2 で測定した代表的なヒストグラムである。

【図3】(a) ~ (f) は、実験例 3 で測定した代表的なヒストグラムである。

20

【図4】(a) ~ (c) は、実験例 4 で測定した代表的なヒストグラムである。

【図5】(a) ~ (f) は、実験例 5 で測定した代表的なヒストグラムである。(g) は、(a) ~ (f) の結果に基づいて P I 陽性微生物の割合を示したグラフである。

【図6】(a) ~ (f) は、実験例 6 で測定した代表的なヒストグラムである。(g) は、(a) ~ (f) の結果に基づいて P I 陽性微生物の割合を示したグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0011】

[海水中の重金属の存在を検出する方法]

1 実施形態において、本発明は、海水中の重金属の存在を検出する方法であって、下記工程 (a) ~ (c) : (a) 微生物を含む海水を採取する工程、(b) 前記海水に死んだ微生物を染色する染色剤を添加し、死んだ前記微生物を染色する工程、(c) 前記海水中の全微生物に対する死んだ微生物の割合を測定する工程、を行い、前記工程 (c) で検出された割合が、前記海水中の重金属の存在量に対応する、方法を提供する。実施例において後述するように、本実施形態の方法によれば、海水中の重金属の存在を簡便に検出することができる。

30

【0012】

工程 (a) では、微生物を含む海水を採取する。この海水は、重金属の存在を検出する対象の海水であり、例えば、海底掘削により海底鉱物資源の採取を行う現場の海域で採取した海水等が挙げられる。

【0013】

海水中には、微生物が含まれている。本実施形態の方法では、海水に含まれる微生物、特に植物プランクトンを利用して海水中の重金属の存在を検出する。本工程で採取した海水は、採取直後に以下の工程 (b) に適用することが好ましい。採取直後とは、例えば採取後 1 時間以内であってもよく、例えば採取後 30 分以内であってもよい。

40

【0014】

工程 (b) では、採取した海水に、死んだ微生物を染色する染色剤を添加し、死んだ前記微生物を染色する。死んだ微生物を染色する染色剤としては、生きた微生物を染色しないものであれば特に限定されないが、例えば、Propidium Iodide (CAS 番号 : 25535 - 16 - 4、以下、「P I」という場合がある。) を好ましく用いることができる。P I で染色した結果、死んだ微生物は染色されるが、生きた微生物は染色

50

されない。

【 0 0 1 5 】

続いて、工程（c）において、海水中の全微生物に対する死んだ微生物の割合を測定する。ここで、全微生物とは、生きた微生物と死んだ微生物の合計を意味する。例えば、海水中の微生物をPIで染色した結果、死んだ微生物は染色される。そこで、海水中の全微生物の数と死んだ微生物の数を測定することにより、海水中の全微生物に対する死んだ微生物の割合を算出することができる。海水中の全微生物に対する死んだ微生物の割合は、例えば、下記式（1）により算出することができる。

【 0 0 1 6 】

海水中の全微生物に対する死んだ微生物の割合（%）＝単位体積当たりの海水中の死んだ微生物の総数 / （単位体積当たりの海水中の死んだ微生物の総数 + 単位体積当たりの海水中の生きた微生物の総数）× 100 （1）

10

【 0 0 1 7 】

工程（c）を、フローサイトメーターを用いて行うと簡便である。また、近年、船に搭載できる小型のフローサイトメーターが市販されている。そこで、このようなフローサイトメーターを利用すれば、例えば、海底鉱物資源の採取現場の海域で採取した海水を用いて、現場で本実施形態の方法を実施することができる。これにより、海水の採取から海水中の重金属の存在の検出までの時間を大幅に短縮することができる。

【 0 0 1 8 】

実施例において後述するように、海水中の全微生物に対する死んだ微生物の割合は、海水中の重金属の存在量に対応する。すなわち、海水中の重金属の存在量が多いほど、海水中の全微生物に対する死んだ微生物の割合が増加する。したがって、本実施形態の方法により、海水中の重金属の存在量を推定することができる。

20

【 0 0 1 9 】

工程（b）又は（c）において、海水に、死んだ微生物及び生きた微生物の双方を染色する染色剤を更に添加し、海水中の全微生物を染色してもよい。これにより、海水中の全微生物の測定が容易になる。また、後述するように、死んだ微生物及び生きた微生物の双方を染色する染色剤で染色することによって初めて識別可能になる微生物が存在する。そこで、このような染色剤で染色することにより、海水中の重金属の存在の検出に利用することができる微生物の種類を増やすことができる。

30

【 0 0 2 0 】

死んだ微生物及び生きた微生物の双方を染色する染色剤としては、サイバークリーンI又はその誘導体を用いることができる。サイバークリーンI（CAS番号：163795-75-3）は、DNAと特異的に結合して蛍光を発する色素である。サイバークリーンIの誘導体としては、例えばサイバークリーンII（CAS番号：172827-25-7）等が挙げられるがこれに限定されない。

【 0 0 2 1 】

工程（c）において、死んだ微生物の割合を微生物の集団ごとに測定してもよい。海水中には、プロクロコッカス及び無色バクテリアを含む集団、シネココッカスを含む集団、真核藻類を含む集団が主に存在する。そして、これらの集団は、それぞれ重金属に対する感受性が異なることが予想される。つまり、微生物の集団は、プロクロコッカス及び無色バクテリアを含む集団、シネココッカスを含む集団又は真核藻類を含む集団であってもよい。工程（c）において、死んだ微生物の割合を微生物の集団ごとに測定することにより、海水中の重金属の存在量を推定することが可能になる。

40

【 0 0 2 2 】

あるいは、死んだ微生物の割合を微生物の集団ごとに測定することにより、次のような利点がある。実施例において後述するように、重金属の存在を検出する需要が想定される外洋域の海水（外洋海水）は、貧栄養である場合がある。そして、発明者らは、外洋海水中に、プロクロコッカス及び無色バクテリアが、重金属の存在の検出に十分な量存在することを明らかにした。一方、発明者らは、外洋海水中における、シネココッカスや真核

50

藻類の存在量は少ないことを明らかにした。

【 0 0 2 3 】

そこで、工程（c）において、死んだ微生物の割合を、プロクロロコッカス及び無色バクテリアを含む集団について測定することにより、貧栄養である外洋海水を用いた場合においても海水中の重金属の存在を検出することができる。より具体的には、プロクロロコッカス及び無色バクテリアを含む集団についての死んだ微生物の割合は、例えば、下記式（2）により算出することができる。

【 0 0 2 4 】

プロクロロコッカス及び無色バクテリアを含む集団についての死んだ微生物の割合（%） = 単位体積当たりの海水中的の死んだプロクロロコッカス及び死んだ無色バクテリアの総数 / （単位体積当たりの海水中的の死んだプロクロロコッカス及び死んだ無色バクテリアの総数 + 単位体積当たりの海水中的の生きたプロクロロコッカス及び生きた無色バクテリアの総数） × 100 （2）

【 0 0 2 5 】

本実施形態の方法は、工程（a）の後、工程（b）の前に、海水中的の微生物を培養する工程を更に含んでいてもよい。

【 0 0 2 6 】

実施例において後述するように、発明者らは、外洋海水中的における、シネココッカスや真核藻類の存在量が少ないことを明らかにした。そして、工程（a）の後、工程（b）の前に、海水中的の微生物を培養する工程を更に行うことにより、シネココッカスや真核藻類の存在量を増加させ、本実施形態の方法を実施することが可能となることを明らかにした。

【 0 0 2 7 】

また、上述したように、外洋海水中的に、プロクロロコッカス及び無色バクテリアを含む集団は重金属の存在量の測定に十分な量存在するが、この場合においても、工程（a）の後、工程（b）の前に、海水中的の微生物を培養する工程を更に行うことにより、プロクロロコッカス及び無色バクテリアを含む集団の重金属に対する感受性を向上させ、重金属の検出感度を向上させることができることを明らかにした。

【 0 0 2 8 】

海水中的の微生物の培養は、例えば、海水に培地を混合して静置すること等により行うことができる。培養時間は、例えば、4～48時間程度であってもよい。また、培養温度は例えば室温が挙げられる。また、培養時の明暗条件は、培養時間が24時間未満である場合には、連続明期の条件であることが好ましい。一方、培養時間が24時間以上である場合には、明期14時間、暗期10時間の条件で培養することが好ましい。明期における光量子量は、 $40 \sim 60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の条件であってもよい。

【 0 0 2 9 】

海水中的の微生物を培養する工程を実施する場合、工程（a）で採取した海水を採取直後に工程（b）に適用しないことになる。この場合、工程（a）で採取した海水を採取直後に培養する工程に適用することが好ましい。ここで、採取直後とは、例えば採取後1時間以内であってもよく、例えば採取後30分以内であってもよい。また、海水中的の微生物を培養する工程の後、例えば1時間以内に工程（b）に適用することが好ましく、30分以内に工程（b）に適用することが好ましい。

【 0 0 3 0 】

[海水中の重金属の存在量を検出するためのキット]

1実施形態において、本発明は、死んだ微生物を染色する染色剤を含む、海水中的の重金属の存在を検出するためのキットを提供する。本実施形態のキットにより、上述した、海水中的の重金属の存在を検出する方法を実施することができる。

【 0 0 3 1 】

本実施形態のキットにおいて、死んだ微生物を染色する染色剤は、生きた微生物を染色しないものであれば特に限定されず、例えば、Propidium Iodideを好ま

しく用いることができる。Propidium Iodideについては上述したものと同様である。

【0032】

本実施形態のキットは、死んだ微生物及び生きた微生物の双方を染色する染色剤を更に加えてもよい。

【0033】

死んだ微生物及び生きた微生物の双方を染色する染色剤は、サイバークリーンI又はその誘導体であってもよい。サイバークリーンI又はその誘導体については上述したものと同様である。

【実施例】

【0034】

次に実施例を示して本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0035】

[実験例 1]

(微生物集団の識別条件の検討)

天然海水には多様な種類の植物プランクトンが混在している。外洋域の天然海水には、プロクロコッカス、シネココッカス、真核藻類の3つの集団が主に存在することが知られている。本実験例では、フローサイトメーター (FCM) により、これらの集団を識別する条件を検討した。

【0036】

プロクロコッカスとして、NIES - 2885株 (国立研究開発法人国立環境研究所) を使用した。また、シネココッカスとして、NIES - 969株 (国立研究開発法人国立環境研究所) を使用した。また、真核藻類として、NIES - 1310株 (国立研究開発法人国立環境研究所) を使用した。まず、これらの微生物を混合培養した。続いて、微生物の培養液をフローサイトメーター (型式「On-chip Sort」、オンチップ・バイオテクノロジーズ社製) を用いて解析した。

【0037】

図1 (a) は波長488nmの励起光で励起した場合の代表的なFCM解析の結果を示すグラフである。横軸は543 / 22nmのバンドパスフィルターを用いて測定した蛍光強度を示す。なお、「543 / 22nm」の表記は、バンドパスフィルターの中心波長が543nmであり、ピーク透過帯幅が22nmであることを意味し、以下同様である。また、縦軸は676 / 37nmのバンドパスフィルターを用いて測定した蛍光強度を示す。

【0038】

その結果、シネココッカスと真核藻類の集団をそれぞれ識別できることが明らかとなった。しかしながら、プロクロコッカスの集団はノイズと重なってしまい、検出できないことが明らかとなった。図1 (a) 中、「Syn」はシネココッカスの集団を示し、「Euk」は真核藻類の集団を示し、「Noise」はノイズを示す。

【0039】

続いて、プロクロコッカス、シネココッカス及び真核藻類を混合培養した培地に、サイバークリーンI (サーマフィッシャーサイエンティフィック社) を、取扱説明書にしたがって終濃度1倍となるように添加し、室温で15分間静置した。続いて、フローサイトメーター (型式「On-chip Sort」、オンチップ・バイオテクノロジーズ社製) を用いて解析した。

【0040】

図1 (b) は波長488nmの励起光で励起した場合の代表的なFCM解析の結果を示すグラフである。横軸はFL2の蛍光強度を示し、縦軸はFL5の蛍光強度を示す。FL2は543 / 22nmのバンドパスフィルターを用いて検出した。また、FL5は676 / 37nmのバンドパスフィルターを用いて検出した。

【0041】

10

20

30

40

50

その結果、サイバークリーン I で染色することにより、プロクロロコッカスの集団がノイズと分離され、シネココッカス、真核藻類及びプロクロロコッカスの集団をそれぞれ識別できることが明らかとなった。図 1 (b) 中、「Syn」はシネココッカスの集団を示し、「Euk」は真核藻類の集団を示し、「Pro」はプロクロロコッカスの集団を示し、「Noise」はノイズを示す。

【 0 0 4 2 】

以上の結果から、サイバークリーン I で染色することにより、プロクロロコッカス、シネココッカス及び真核藻類の集団をそれぞれ識別できることが明らかとなった。なお、実際の海水を用いた解析では、プロクロロコッカスが検出される領域に無色バクテリアも検出される。

【 0 0 4 3 】

[実験例 2]

(湾内海水中の重金属の存在量の測定)

湾内海水を用いて、プロクロロコッカス及び無色バクテリアを含む集団における死んだ微生物の割合を測定し、重金属の存在を検出した。

【 0 0 4 4 】

具体的には、まず、日本国内の亜熱帯沿岸海域で採取した採取直後の湾内海水を容器に分注し、終濃度 0 . 5 p p m の亜鉛、鉛又は銅、及び、終濃度 5 p p m の亜鉛、鉛又は銅をそれぞれ添加して室温で 4 時間静置した。

【 0 0 4 5 】

続いて、各海水 1 0 0 μ L に、ジメチルスルホキシド (D M S O) 中、0 . 1 5 m M に溶解した Propidium Iodide (株式会社 同仁化学研究所、以下、「PI」という場合がある。) 3 μ L 及びサイバークリーン I (1 0 0 倍濃度ストック溶液) 1 μ L を添加し、室温で 1 5 分間静置した。

【 0 0 4 6 】

続いて、フローサイトメーター (型式「On-chip Sort」、オンチップ・バイオテクノロジー社製) を用いて解析した。なお、このフローサイトメーターは船に搭載することが可能である。まず、波長 4 8 8 n m の励起光で励起し、横軸に F L 2 の蛍光強度を示し、縦軸に F L 6 の蛍光強度を示す解析結果を得た。F L 2 は 5 4 3 / 2 2 n m のバンドパスフィルターを用いて検出した。また、F L 6 は > 7 1 0 n m のロングパスフィルターを用いて検出した。なお、「> 7 1 0 n m」の表記は、ロングパスフィルターが波長 7 1 0 n m 以上の光を透過することを意味し、以下同様である。続いて、得られた解析結果に基づいて、プロクロロコッカス及び無色バクテリアを含む集団にゲートを設定した。

【 0 0 4 7 】

続いて、設定したゲート中の微生物について、横軸に F L 5 の蛍光強度を示すヒストグラムを取得し、PI で染色された微生物の割合を観察した。PI で染色された微生物は死んだ微生物である。F L 5 は 6 7 6 / 3 7 n m のバンドパスフィルターを用いて検出した。また、対照として、重金属に暴露していない微生物についても同様の解析を行った。

【 0 0 4 8 】

図 2 (a) ~ (f) は、得られた代表的なヒストグラムである。図 2 (a) ~ (f) 中、横軸は PI による染色強度 (相対値) を示し、縦軸は細胞数 (相対値) を示す。図 2 (a) は 0 . 5 p p m の亜鉛を暴露した微生物の結果であり、図 2 (b) は 0 . 5 p p m の鉛を暴露した微生物の結果であり、図 2 (c) は 0 . 5 p p m の銅を暴露した微生物の結果であり、図 2 (d) は 5 p p m の亜鉛を暴露した微生物の結果であり、図 2 (e) は 5 p p m の鉛を暴露した微生物の結果であり、図 2 (f) は 5 p p m の銅を暴露した微生物の結果である。

【 0 0 4 9 】

その結果、0 . 5 p p m の銅を暴露した場合、5 p p m の亜鉛を暴露した場合、5 p p m の鉛を暴露した場合、5 p p m の銅を暴露した場合に、PI で染色された微生物の割合

10

20

30

40

50

が明瞭に増加したことが明らかとなった。この結果は、P Iで染色された微生物の割合の増加を検出することにより、海水中の重金属の存在量を推定できることを示す。

【 0 0 5 0 】

[実験例 3]

(外洋海水中の重金属の存在量の測定 - 真核藻類)

海底掘削を行う領域は外洋域であることが想定されている。そこで、重金属の存在量を測定する需要が想定される外洋海水中の微生物集団における死んだ微生物の割合を測定し、重金属の存在量を推定した。外洋海水として、日本国内の亜熱帯海域で採取した採取直後の海水を使用した。

【 0 0 5 1 】

予備検討した結果、外洋海水中の微生物は、栄養塩が多い湾内海水中の微生物と比較して生理的に不活性な場合が多く、湾内海水中の微生物よりも重金属に対する耐性が高い傾向にあることが明らかとなった。

【 0 0 5 2 】

本実験例では、外洋海水中の真核藻類に着目して、重金属の存在量を測定した。予備検討した結果、貧栄養である外洋海水中には、真核藻類の存在量が少ないことが明らかとなった。そこで、まず、外洋海水に E S M 培地を終濃度 2 5 % になるように添加して、室温で 4 時間静置し、プレ培養を行った。培養条件は、連続明期、光量子量 $40 \sim 60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ とした。

【 0 0 5 3 】

下記表 1 に E S M 培地の組成を示す。表 1 中、土壌抽出物は次のようにして調製した。まず、1000 mL の蒸留水に 200 mL の土壌（落葉広葉樹由来の土壌が好ましい。）を加え、105 で 1 時間オートクレーブした。試料が冷えた後に、再び 105 で 1 時間オートクレーブした。続いて、試料の上清をガラス繊維ろ紙（型式「GF/C」、GEヘルスケア社）及びセライトに通し、ろ液を更にガラス繊維ろ紙（型式「GF/F」、GEヘルスケア社）に通した。続いて、ろ液に蒸留水を加えて 1000 mL に調整した。続いて、ろ液を 10 mL の試験管に移し、121 で 20 分間オートクレーブ滅菌し、冷所で保存した。

【 0 0 5 4 】

【 表 1 】

ESM培地の組成

NaNO ₃	12mg
K ₂ HPO ₄	0.5mg
ビタミンB ₁₂	0.1 μg
ビオチン	0.1 μg
チアミンHCl	10 μg
Fe-EDTA	25.9 μg
Mn-EDTA	33.2 μg
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	100mg
土壌抽出物	2.5mL
海水	97.5mL
pH	8.0

【 0 0 5 5 】

続いて、プレ培養後の海水を容器に分注し、終濃度 1 ppm の亜鉛、鉛又は銅、及び、終濃度 5 ppm の亜鉛、鉛又は銅をそれぞれ添加して室温で 4 時間静置した。

【 0 0 5 6 】

続いて、各海水 100 μL に、DMSO 中、0.15 mM に溶解した P I 3 μL を添加し、室温で 15 分間静置した。

【 0 0 5 7 】

10

20

30

50

続いて、フローサイトメーター（型式「On-chip Sort」、オンチップ・バイオテクノロジー社製）を用いて解析した。まず、波長488nmの励起光で励起し、横軸にFL2の蛍光強度を示し、縦軸にFL6の蛍光強度を示す解析結果を得た。FL2は543/22nmのバンドパスフィルターを用いて検出した。また、FL6は>710nmのロングパスフィルターを用いて検出した。続いて、得られた解析結果に基づいて、真核藻類の集団にゲートを設定した。

【0058】

続いて、設定したゲート中の微生物について、横軸にFL5の蛍光強度を示すヒストグラムを取得し、PIで染色された微生物の割合を観察した。PIで染色された微生物は死んだ微生物である。FL5は676/37nmのバンドパスフィルターを用いて検出した。また、対照として、金属に暴露していない微生物についても同様の解析を行った。

10

【0059】

図3(a)~(f)は、得られた代表的なヒストグラムである。図3(a)~(f)中、横軸はPIによる染色強度（相対値）を示し、縦軸は細胞数（相対値）を示す。図3(a)は1ppmの亜鉛を暴露した真核藻類の結果であり、図3(b)は1ppmの鉛を暴露した真核藻類の結果であり、図3(c)は1ppmの銅を暴露した真核藻類の結果であり、図3(d)は5ppmの亜鉛を暴露した真核藻類の結果であり、図3(e)は5ppmの鉛を暴露した真核藻類の結果であり、図3(f)は5ppmの銅を暴露した真核藻類の結果である。

【0060】

その結果、1ppmの亜鉛を暴露した真核藻類、5ppmの亜鉛を暴露した真核藻類、5ppmの銅を暴露した真核藻類において、PIで染色された微生物の割合が増加した傾向が認められた。この結果は、PIで染色された真核藻類の割合の増加を検出することにより、海水中の重金属の存在量を推定できることを示す。また、貧栄養で真核藻類の存在量が少ない海水であっても、プレ培養することにより真核藻類の存在量を増加させることができること、更に、プレ培養した真核藻類を用いて海水中の重金属の存在を検出することができることが明らかとなった。

20

【0061】

[実験例4]

(外洋海水中的の重金属の存在量の測定 - シネココッカス)

本実験例では、外洋海水中的のシネココッカスに着目して、重金属の存在を検出した。外洋海水として、日本国内の亜熱帯海域で採取した採取直後の海水を使用した。

30

【0062】

予備検討した結果、貧栄養である外洋海水中には、シネココッカスの存在量が少ないことが明らかとなった。そこで、まず、外洋海水にESM培地を終濃度25%になるように添加して、室温で4時間静置し、プレ培養を行った。ESM培地の組成及び培養条件は、実験例3において上述した通りである。

【0063】

続いて、プレ培養後の海水を容器に分注し、終濃度5ppmの亜鉛、鉛又は銅をそれぞれ添加して室温で4時間静置した。

40

【0064】

続いて、各海水100μLに、DMSO中、0.15mMに溶解したPI 3μLを添加し、室温で15分間静置した。

【0065】

続いて、フローサイトメーター（型式「On-chip Sort」、オンチップ・バイオテクノロジー社製）を用いて解析した。まず、波長488nmの励起光で励起し、横軸にFL2の蛍光強度を示し、縦軸にFL6の蛍光強度を示す解析結果を得た。FL2は543/22nmのバンドパスフィルターを用いて検出した。また、FL6は>710nmのロングパスフィルターを用いて検出した。続いて、得られた解析結果に基づいて、シネココッカスの集団にゲートを設定した。

50

【 0 0 6 6 】

続いて、設定したゲート中の微生物について、横軸に F L 5 の蛍光強度を示すヒストグラムを取得し、P I で染色された微生物の割合を観察した。P I で染色された微生物は死んだ微生物である。F L 5 は 6 7 6 / 3 7 n m のバンドパスフィルターを用いて検出した。また、対照として、金属に暴露していない微生物についても同様の解析を行った。

【 0 0 6 7 】

図 4 (a) ~ (c) は、得られた代表的なヒストグラムである。図 4 (a) ~ (c) 中、横軸は P I による染色強度 (相対値) を示し、縦軸は細胞数 (相対値) を示す。図 4 (a) は 5 p p m の亜鉛を暴露したシネココッカスの結果であり、図 4 (b) は 5 p p m の鉛を暴露したシネココッカスの結果であり、図 4 (c) は 5 p p m の銅を暴露したシネココッカスの結果である。

10

【 0 0 6 8 】

その結果、5 p p m の亜鉛を暴露したシネココッカス、5 p p m の銅を暴露したシネココッカスにおいて、P I で染色された微生物の割合が増加した傾向が認められた。この結果は、P I で染色されたシネココッカスの割合の増加を検出することにより、海水中の重金属の存在量を推定できることを示す。また、貧栄養でシネココッカスの存在量が少ない海水であっても、プレ培養することによりシネココッカスの存在量を増加させることができること、更に、プレ培養したシネココッカスを用いて海水中の重金属の存在量を推定することができることが明らかとなった。

【 0 0 6 9 】

20

[実験例 5]

(外洋海水中の重金属の存在の検出 - プロクロロコッカス及び無色バクテリアを含む集団 1)

本実験例では、外洋海水中の、プロクロロコッカス及び無色バクテリアを含む集団に着目して、重金属の存在を検出した。外洋海水として、日本国内の亜熱帯海域で採取した採取直後の海水を使用した。

【 0 0 7 0 】

予備検討した結果、外洋海水は貧栄養であるにもかかわらず、外洋海水中には、プロクロロコッカス及び無色バクテリアが、解析に十分な量存在することが明らかとなった。そこで、まず、プレ培養を行わずに、重金属の存在を検出した。

30

【 0 0 7 1 】

外洋海水を容器に分注し、終濃度 1 p p m の亜鉛、鉛又は銅、及び、終濃度 5 p p m の亜鉛、鉛又は銅をそれぞれ添加して室温で 4 時間静置した。

【 0 0 7 2 】

続いて、各海水 1 0 0 μ L に、D M S O 中、0 . 1 5 m M に溶解した P I 3 μ L 及びサイバークリーン I (1 0 0 倍濃度ストック溶液) 1 μ L を添加し、室温で 1 5 分間静置した。

【 0 0 7 3 】

続いて、フローサイトメーター (型式「O n - c h i p S o r t」、オンチップ・バイオテクノロジー社製) を用いて解析した。まず、波長 4 8 8 n m の励起光で励起し、横軸に F L 2 の蛍光強度を示し、縦軸に F L 6 の蛍光強度を示す解析結果を得た。F L 2 は 5 4 3 / 2 2 n m のバンドパスフィルターを用いて検出した。また、F L 6 は > 7 1 0 n m のロングパスフィルターを用いて検出した。続いて、得られた解析結果に基づいて、プロクロロコッカス及び無色バクテリアを含む集団にゲートを設定した。

40

【 0 0 7 4 】

続いて、設定したゲート中の微生物について、横軸に F L 5 の蛍光強度を示すヒストグラムを取得し、P I で染色された微生物の割合を観察した。P I で染色された微生物は死んだ微生物である。F L 5 は 6 7 6 / 3 7 n m のバンドパスフィルターを用いて検出した。また、対照として、金属に暴露していない微生物についても同様の解析を行った。

【 0 0 7 5 】

50

図5(a)～(f)は、得られた代表的なヒストグラムである。図5(g)は、図5(a)～(f)の結果に基づいてPI陽性微生物の割合を示したグラフである。図5(a)～(f)中、横軸はPIによる染色強度(相対値)を示し、縦軸は細胞数(相対値)を示す。図5(a)は1ppmの亜鉛を暴露した微生物の結果であり、図5(b)は1ppmの鉛を暴露した微生物の結果であり、図5(c)は1ppmの銅を暴露した微生物の結果であり、図5(d)は5ppmの亜鉛を暴露した微生物の結果であり、図5(e)は5ppmの鉛を暴露した微生物の結果であり、図5(f)は5ppmの銅を暴露した微生物の結果である。図5(g)中、「Zn」は亜鉛を示し、「Pb」は鉛を示し、「Cu」は銅を示す。

【0076】

10

その結果、1ppmの銅を暴露した微生物、5ppmの銅を暴露した微生物において、PIで染色された微生物の割合が明瞭に増加したことが明らかとなった。

【0077】

この結果は、プロクロコッカス及び無色バクテリアを含む集団における、PIで染色された微生物の割合の増加を検出することにより、海水中の重金属の存在量を推定できることを更に支持するものである。

【0078】

また、貧栄養の外洋海水を用いた場合であっても、プロクロコッカス及び無色バクテリアを含む集団に着目すれば、プレ培養することなく、海水中の重金属の存在を検出することができることが明らかとなった。

20

【0079】

[実験例6]

(外洋海水中的の重金属の存在の検出 - プロクロコッカス及び無色バクテリアを含む集団2)

本実験例では、外洋海水中的の、プロクロコッカス及び無色バクテリアを含む集団に着目して、重金属の存在を検出した。外洋海水として、日本国内の亜熱帯海域で採取した採取直後の海水を使用した。

【0080】

予備検討した結果、外洋海水中には、プロクロコッカス及び無色バクテリアが、解析に十分な量存在することが明らかとなったが、本実験例では、プレ培養を行ったうえで、重金属の存在量を測定した。まず、外洋海水にESM培地を終濃度25%になるように添加して、室温で4時間静置し、プレ培養を行った。ESM培地の組成及び培養条件は、実験例3において上述した通りである。

30

【0081】

続いて、プレ培養後の海水を容器に分注し、終濃度1ppmの亜鉛、鉛又は銅、及び、終濃度5ppmの亜鉛、鉛又は銅をそれぞれ添加して室温で4時間静置した。

【0082】

続いて、各海水100μLに、DMSO中、0.15mMに溶解したPI 3μL及びサイバグリーンI(100倍濃度ストック溶液)1μLを添加し、室温で15分間静置した。

40

【0083】

続いて、フローサイトメーター(型式「On-chip Sort」、オンチップ・バイオテクノロジーズ社製)を用いて解析した。まず、波長488nmの励起光で励起し、横軸にFL2の蛍光強度を示し、縦軸にFL6の蛍光強度を示す解析結果を得た。FL2は543/22nmのバンドパスフィルターを用いて検出した。また、FL6は>710nmのロングパスフィルターを用いて検出した。続いて、得られた解析結果に基づいて、プロクロコッカス及び無色バクテリアを含む集団にゲートを設定した。

【0084】

続いて、設定したゲート中の微生物について、横軸にFL5の蛍光強度を示すヒストグラムを取得し、PIで染色された微生物の割合を観察した。PIで染色された微生物は死

50

んだ微生物である。FL5は676/37nmのバンドパスフィルターを用いて検出した。また、対照として、金属に暴露していない微生物についても同様の解析を行った。

【0085】

図6(a)～(f)は、得られた代表的なヒストグラムである。図6(g)は、図6(a)～(f)の結果に基づいてPI陽性微生物の割合を示したグラフである。図6(a)～(f)中、横軸はPIによる染色強度(相対値)を示し、縦軸は細胞数(相対値)を示す。図6(a)は1ppmの亜鉛を暴露した微生物の結果であり、図6(b)は1ppmの鉛を暴露した微生物の結果であり、図6(c)は1ppmの銅を暴露した微生物の結果であり、図6(d)は5ppmの亜鉛を暴露した微生物の結果であり、図6(e)は5ppmの鉛を暴露した微生物の結果であり、図6(f)は5ppmの銅を暴露した微生物の結果である。図6(g)中、「Zn」は亜鉛を示し、「Pb」は鉛を示し、「Cu」は銅を示す。

10

【0086】

その結果、1ppmの銅を暴露した微生物、5ppmの銅を暴露した微生物において、PIで染色された微生物の割合が明瞭に増加したことが明らかとなった。また、5ppmの亜鉛を暴露した微生物においても、PIで染色された微生物の割合が増加した傾向が認められた。

【0087】

この結果は、プロクロコッカス及び無色バクテリアを含む集団における、PIで染色された微生物の割合の増加を検出することにより、海水中の重金属の存在量を推定できることを更に支持するものである。

20

【0088】

また、プロクロコッカス及び無色バクテリアを含む集団に着目して海水中の重金属の存在を検出する場合であっても、プレ培養を行うことにより、海水中の重金属に対する感受性を上昇させることができることが明らかとなった。

【産業上の利用可能性】

【0089】

本発明によれば、海水中の重金属の存在を船舶内実験室で簡便に検出する技術を提供することができる。

【 図 1 】

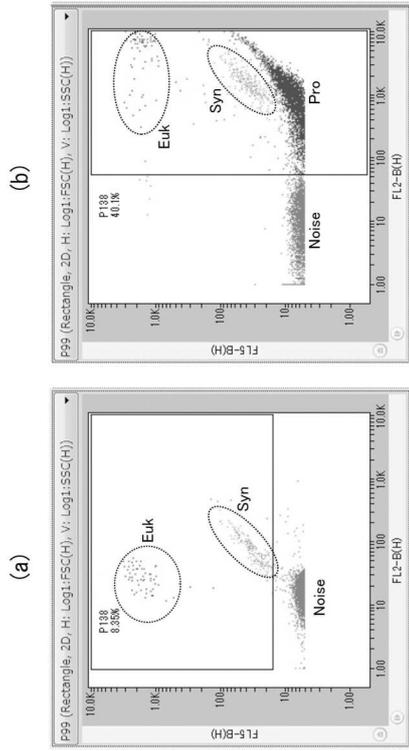


図 1

【 図 2 】

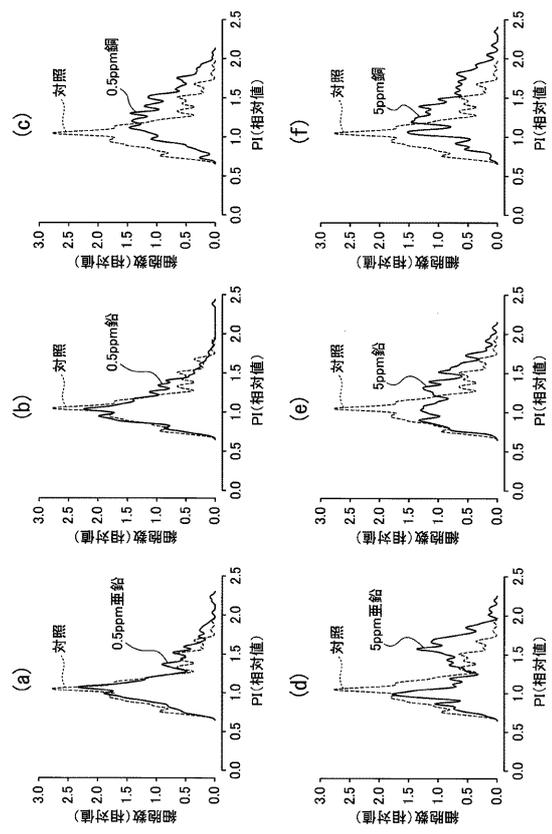


図 2

【 図 3 】

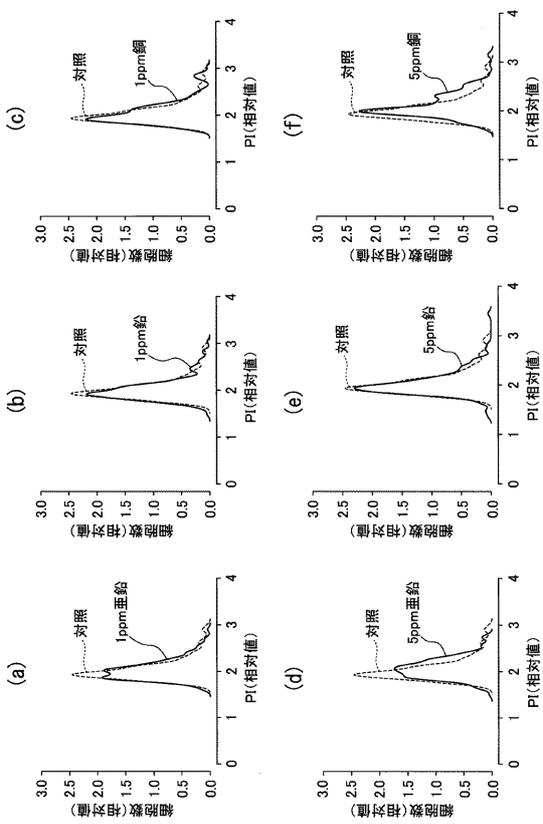


図 3

【 図 4 】

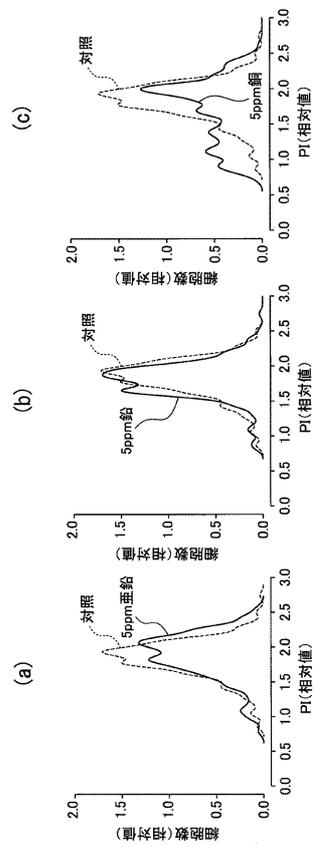


図 4

【 図 5 】

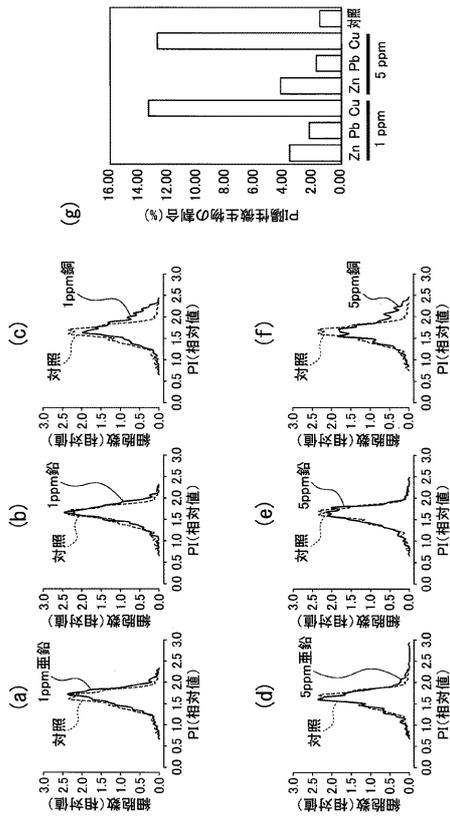


図5

【 図 6 】

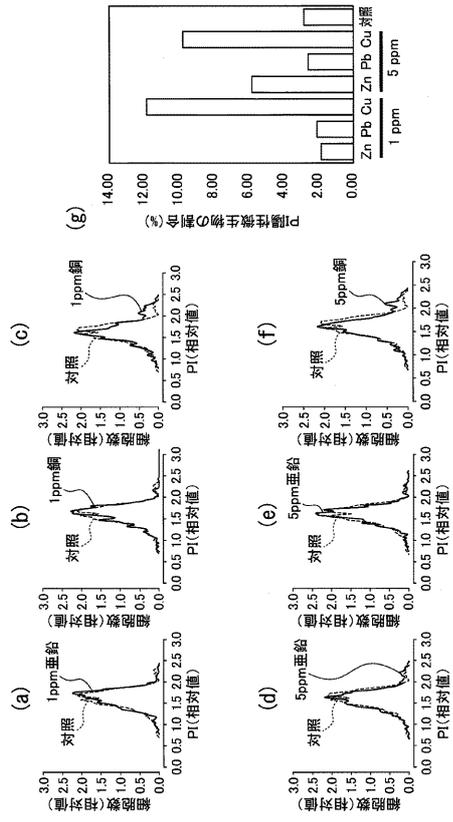


図6

フロントページの続き

(72)発明者 大田 修平

茨城県つくば市小野川 1 6 - 2 国立研究開発法人国立環境研究所内

(72)発明者 越川 海

茨城県つくば市小野川 1 6 - 2 国立研究開発法人国立環境研究所内

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB25 CB01 DB12 DB13 DB14 FA37 FB12
4B063 QA01 QA18 QQ05 QQ20 QR66 QR74 QS03 QS24 QS28 QX10
4B065 AA01X AA83X AC20 CA46