

小型魚類の水質汚染監視用バイオアッセイシステムの開発

非会員 曾 智^{*,**} 非会員 宮本健太郎^{***}
非会員 平野 旭^{****} 正員 辻 敏夫^{*5}

A Bioassay System for Water-Quality Monitoring Using a Small Fish

Zu Soh^{*,**}, Non-member, Kentaro Miyamoto^{***}, Non-member, Akira Hirano^{****}, Non-member, Toshio Tsuji^{*5}, Member

(2012年8月29日受付, 2013年3月5日再受付)

As cases of accidental water contamination caused by factory disposal and other influences are reported often, early detection of contamination is becoming an important issue in terms of safe water supplies and environmental protection. In recent years, bioassay systems have attracted attention because they enable water quality assessment based on the biological responses of fish, thereby removing the need for chemical examination. In this regard, several bioassay systems premised on the monitoring of swimming behavior or bioelectrical signals as indicators of contamination have been proposed. However, conventional systems can overlook contamination that affects non-monitored indicators. This paper proposes a bioassay system allowing simultaneous monitoring of swimming behavior and bioelectric signals from small fish. The results of experiments on 10 test fishes confirmed that the system can detect contamination within 10 minutes of 0.5% ethanol being added. These outcomes validated the applicability of the proposed system for the detection of water contamination.

キーワード: 生体電気信号, バイオアッセイシステム, 水質汚染, ゼブラフィッシュ

Keywords: bioelectric signals, bioassay system, water contamination, zebrafish

1. はじめに

2005年以降, 工場排水等による水質汚染事故は毎年1200件以上報告されており^①, 水質汚染の早期発見は安全な水の供給と環境保護の観点から重要な課題となっている。しかしながら, 現状では, 水質汚濁防止連絡協議会が市民や河川管理者などの連絡を受けて対応していることから水質汚染が早期に発見できない恐れがある。このような状況から, 厚生労働省はバイオアッセイ等による水質管理を推奨している^②。

バイオアッセイとは生物の反応から環境の変化を推定する手法である。これまで一般的に用いられてきた化学分析のように汚染物質を特定することはできないが, 水質を連続的に監視し, 生体への総合的な影響を評価できるといった利点がある。そのため, 化学分析の必要性をスクリーニングする手法として注目されており, 1987年に米国が世界で初めて水質検査のためのバイオアッセイの導入に成功している^③。そして, 現在欧米諸国では有害物質の排出規制や化学物質毎ごとの排水基準を補完する水質管理手法として積極的に利用されている^④。

このようなバイオアッセイシステムでは, 一般的に魚類が試験生物として用いられており, 魚が遊泳する行動をカメ

* 広島大学大学院医歯薬保健学研究院
〒734-8553 広島県広島市南区霞一丁目2番3号
Institution of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University
1-2-3, Kasumi, Minami, Hiroshima, Hiroshima 734-8553, Japan

** 日本学術振興会
〒102-8472 東京都千代田区一番町8番地
Japan Society for the Promotion of Science
8, Ichibancho, Chiyoda, Tokyo 102-8472, Japan

*** 広島大学大学院工学研究科
〒739-8527 広島県東広島市鏡山1-4-1
Graduate School of Engineering, Hiroshima University
1-4-1, Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8527, Japan

**** 呉工業高等専門学校電気情報工学科
〒737-8506 広島県呉市阿賀南2-2-11
Department of Electrical Engineering and Information Science, Kure National College of Technology
2-2-11, Aka-Minami, Kure, Hiroshima 737-8506, Japan

*5 広島大学大学院工学研究院
〒739-8527 広島県東広島市鏡山1-4-1
Institute of Engineering, Hiroshima University
1-4-1, Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8527, Japan

ラで撮影し、画像処理することで異常行動を監視する手法が主に用いられてきた。たとえば、Kang *et al.*⁽⁵⁾や Andrew *et al.*⁽⁶⁾は試験魚としてメダカを用いて、水質汚染後の運動の減少や滞在位置の偏りを検出するシステムを提案している。しかしながら、有害物質の影響は必ずしも異常行動として現れるとは限らないため、これらのシステムでは魚が死亡するまで汚染が発見されない可能性があった。この問題に対して、近年では環境の変化に対して敏感な応答を示す生体電気信号を監視する手法が提案されている。たとえば、Shedd *et al.*⁽⁷⁾は、ブルーギルの生体電気信号から呼吸頻度に関する情報を抽出し、その変化を捉えて水質汚染の判別を行うシステムを提案している。このようなシステムでは、計測信号のノイズを低減するために遊泳を制限しており、ストレスによる呼吸の乱れが誤判別を引き起こしてしまう可能性がある。これに対して我々の研究グループでは、メダカの生体電気信号を非接触非拘束条件下で計測するシステムを構築し、自由遊泳時の生体電気信号から水質汚染を判別するバイオアッセイシステムを構築した⁽⁸⁾。これらの従来システムは遊泳行動か生体電気信号のどちらか一方しか計測対象としていないため、特に水質汚染の初期において、水質汚染の影響が一方の計測対象のみに限定して現れる場合は汚染の発見が遅れる可能性があった。また、運動による呼吸頻度の増加といった計測対象間の相互作用を検知できないため、魚の自発的な状態変化を水質汚染として誤判別してしまう可能性がある。

そこで、本論文では試験魚の自由遊泳時の生体電気信号計測と遊泳行動の解析を同時に行ない、得られた情報を統合して評価可能な水質汚染判別システムを提案する。なお、従来システムと同様⁽³⁾⁽⁴⁾に提案システムは、浄水場や工場排水など、正常であれば水質は安定しており、水温、光源といった計測条件はコントロール可能な環境下で用い、汚染物質の混入以外の急激な水質変化は起こらないという条件下での使用を想定する。提案システムでは生体信号情報として呼吸頻度を用いる。これは、農薬⁽⁹⁾、重金属⁽¹⁰⁾、石油製品⁽¹¹⁾など多岐にわたる汚染物質に対して魚の呼吸頻度が上昇すると報告されているためである。また、Nimkerdphol and Nakagawa⁽¹²⁾は次亜塩素ナトリウム (NaClO) をゼブラフィッシュが泳ぐ水槽に投入した場合、NaClOの濃度に比例して遊泳速度が上昇すると報告していることから、提案システムでは行動情報として遊泳速度を利用する。魚の遊泳速度は、金魚⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾やメダカ⁽¹⁵⁾を用いたバイオアッセイシステムにおいて、古くから水質汚染を示す指標として一般的に用いられているが、呼吸頻度と遊泳速度を併用したシステムは著者らが知る限り報告されていない。

以下、2では魚から発生する呼吸波と試験魚について説明する。3では提案システムの構成として、試験魚の生体電気信号の計測からカメラを用いた遊泳行動解析、水質汚染の判別におよぶ一連の処理について述べる。4・5では生体電気信号の計測および、工場排水等が流出し続けた場合を想定した水質汚染判別実験と考察について報告する。

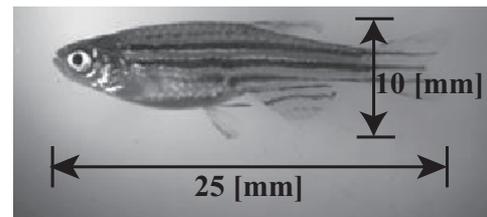


Fig. 1. Size of adult zebrafish

2. 呼吸波と試験魚

呼吸波とは、魚の生体膜を通して体外と体内をイオンが移動することによって魚体周辺に生じる電位変動である⁽¹⁶⁾。イオンは鰓の開閉に伴って活発に移動するため、呼吸波は鰓蓋の開閉に同期している⁽¹⁷⁾。我々の研究グループにおいても、メダカを対象として呼吸波と鰓蓋運動を同時に解析した結果、両者の周波数は一致していることを確認しており、呼吸波は水温などの環境条件によって2~10 [Hz]の間で変動することを報告している⁽⁸⁾。呼吸は、延髄に存在する呼吸中枢の自律的なリズムにより発生しており⁽¹⁸⁾、化学環境の変化に鋭敏に反応する⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾ことが知られているため、本研究では、水質変化を知ることのできる情報源として、呼吸波を計測対象とした。

提案システムでは、試験魚として OECD テストガイドライン⁽²¹⁾において試験生物に指定されているゼブラフィッシュを用いた。Fig. 1 にゼブラフィッシュの拡大写真を示す。ゼブラフィッシュは体長が20~30 [mm]程度の小型魚類であり、基礎生物学研究の材料としてだけでなくヒト疾患モデル動物として重要な役割を果たしている⁽²²⁾。また、ゼブラフィッシュは金属や農薬などの様々な化学物質に対する影響が数多く調査されており、毒性検査に関する知見が豊富に蓄積されているため⁽²³⁾、本論文ではバイオアッセイシステムの試験魚として採用した。

3. 水質汚染判別システム

提案する水質汚染監視用システムを Fig. 2 に示す。提案システムは生体信号処理部、遊泳行動解析部、水質汚染判別部から構成されている。本論文では信号処理の複雑化を回避するため、計測対象はゼブラフィッシュ1匹ずつとする。以下、計測に用いた水槽とシステムを構成する各部位について説明する。

(3・1) 計測水槽部 計測水槽部では、非接触・非拘束条件のもとで試験魚の呼吸波、および、行動を計測する。計測水槽のサイズは試験魚が自由に遊泳できるように、試験魚の背面の断面積 (20~30 [mm²]) と比較して52倍程度とした (140(W)×110(D)×50(H) [mm])。本システムが計測対象とする呼吸波は μV オーダーであるため、微弱な生体電気信号計測を可能とする脳波計 (EEG-1200; 日本光電) を信号増幅器として用い、計測電極には生体信号の計測に一般的に用いられている Ag-AgCl 電極を採用した。そし

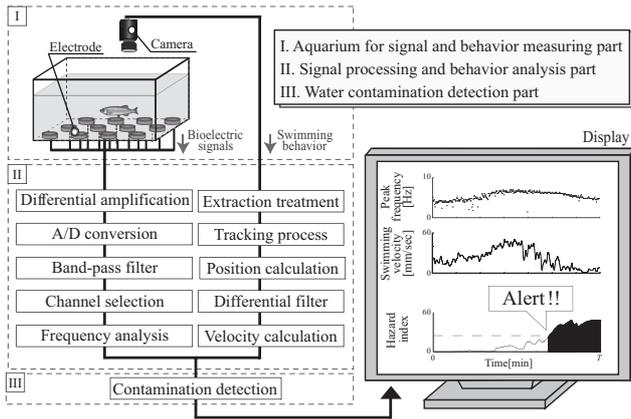


Fig. 2. Structure of the proposed system.

て、試験魚が水槽内を自由に遊泳しても呼吸波を計測できるように、 L 個の電極を水槽底面に格子状に配置した。

また、計測信号の S/N 比の向上を目的として、計測信号に対し双極導出法による作動増幅を行った。差動増幅器の正の入力は各電極で計測した電位であり、負の入力は Fig. 3 において上端の両隅に配置した 2 つのリファレンス電極の平均電位である。なお、増幅器の基準点となるニュートラル電極は水槽中央部に配置した (Fig. 2 参照)。

さらに、行動を計測するためにモノクロカメラ (ひまわり GE60:ライブラリー) 一台を計測水槽が俯瞰できる位置に取り付けた。

〈3・2〉 生体信号処理部 生体信号処理部では、PC に入力された信号に対してフィルタ処理、信号選択、周波数解析を行い、呼吸波の周波数スペクトルを算出する。まず、インターフェースモジュール (PCI-3521:インタフェース) を用いて計測した信号を AD 変換し、サンプリング周波数 f_s [Hz] で解析用 PC に取り込む。次に、入力信号に対してバターワース型バンドパスフィルタ (低域カットオフ周波数 f_{low} [Hz], 高域カットオフ周波数 f_{high} [Hz]) で濾波することにより、呼吸波が含まれる周波数領域の信号を抽出する。ここで、 L 個の電極から計測された信号のうち、実効値 $R_i (i = 1, \dots, L)$ が最大の信号を解析用信号として選択する。

$$R_i = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{n=n_0}^{n_0+(N-1)} x(n)^2} \dots \dots \dots (1)$$

ただし、 $x(n)$ は離散時刻 n における計測信号、 N は窓幅である。周波数解析では、突発的なノイズの影響を受けにくい特長をもつ AR モデル⁽²⁴⁾ を用いて、信号の周波数スペクトルを求める。AR モデルは次式で与えられる。

$$x(n) = - \sum_{k=1}^K a(k)x(n-k) + \varepsilon(n) \dots \dots \dots (2)$$

ここで、 $\varepsilon(n)$ は予測誤差 (ホワイトノイズ) を表し、 K は AR モデルの次数である。このモデルは適切な AR パラメータ $a(k)$ により、過去の計測信号から現在の信号データ $x(n)$

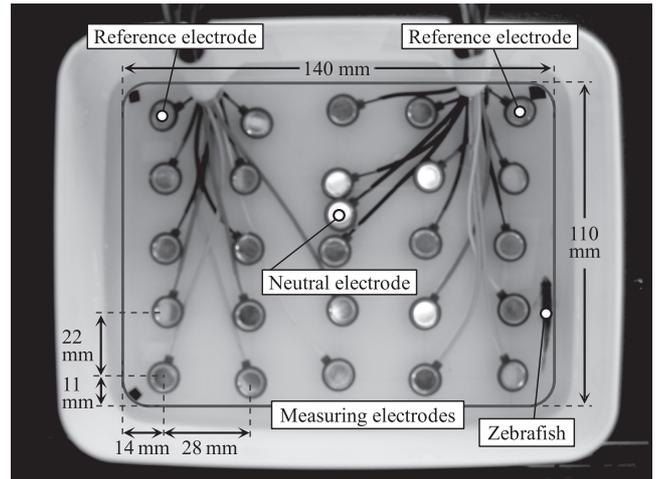


Fig. 3. Electrode arrangement in the measurement aquarium

を予測する。なお AR モデルのパラメータは、時間窓 T_w 、オーバーラップ T_o として、Yule-Walker 法により算出する。時刻 n におけるパワースペクトル密度 (PSD) $P(n, f)$ は、求めた AR モデルを用いて次式により計算する。

$$P(n, f) = \frac{\sigma_\varepsilon^2}{\left| 1 + \sum_{k=1}^K a(k)e^{j2\pi kf} \right|^2} \dots \dots \dots (3)$$

また、周波数スペクトルの変動に注目するため、(3) 式の PSD を次式により 0 ~ 10 [Hz] の範囲で正規化する。

$$\tilde{P}(n, f) = \frac{P(n, f)}{\max(P(n, f))} \quad (f = [0, 10]) \dots \dots \dots (4)$$

以上のようにして求めた周波数スペクトルを時系列で PC ディスプレイに表示することにより、周波数成分を観察することが可能となる。また、各時刻において $\max(P(n, f))$ となる周波数 f をピーク周波数 $f_{max}(n)$ と定義し、水質汚染判別部へ出力する。

〈3・3〉 遊泳行動解析部 遊泳行動解析部では、動画像処理により水平面における魚の遊泳速度を計算する。まず、フレームレート F_b [fps] で撮影した動画像 (Fig. 4 (a)) に対して試験魚に対応する輝度を抽出し、その重心点を魚の位置として算出する (Fig. 4 (b))。次に、算出した位置の時系列データに対して微分フィルタを用いて速度 $V(n)$ を算出し (Fig. 4 (c))、水質汚染判別部へ出力する。なお、算出された速度には突発的なノイズが含まれている可能性があるためにバターワース型 m 次ローパスフィルタ (カットオフ周波数 f_{cut}) を用いて平滑化する。

〈3・4〉 水質汚染判別部 水質汚染判別部では、生体信号計測部と遊泳行動解析部で算出した呼吸波のピーク周波数 $f_{max}(n)$ と魚の遊泳速度 $V(n)$ の 2 つの指標を用いて汚染状態の判別を行う。ただし、これらの指標は尺度が異なるため、提案法ではマハラノビス距離を用いて指標を統合した。マハラノビス距離は、正規母集団と標本との距離尺度

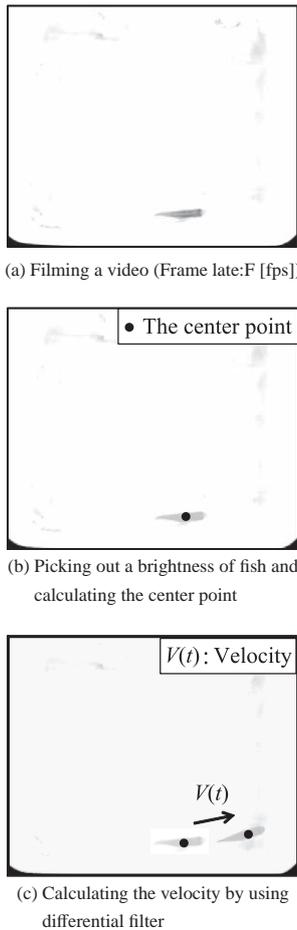


Fig. 4. Methods of swimming velocity analysis

を表す指標である⁽²⁵⁾ため、正常な水質における $f_{\max}(n)$ と $V(n)$ を正規母集団とすることで、未知の水質の状態をマハラノビス距離で評価することができる。提案法では汚染判別のためのマハラノビス距離 $M(n)$ を以下の式で定義する。

$$M(n) = \sqrt{(\mathbf{I}(n) - \boldsymbol{\mu})^T \boldsymbol{\Sigma}^{-1} (\mathbf{I}(n) - \boldsymbol{\mu})} \dots \dots \dots (5)$$

なお、 $\mathbf{I}(n) = [f_{\max}(n), V(n)]^T$ は時刻 n における $f_{\max}(n)$ と $V(n)$ のベクトル、 $\boldsymbol{\mu} = [\bar{f}_{\max}(n), \bar{V}(n)]^T$ は水質正常時における $f_{\max}(n)$ と $V(n)$ の平均値ベクトル、 $\boldsymbol{\Sigma}^{-1}$ は水質正常時における $f_{\max}(n)$ と $V(n)$ の共分散行列の逆行列である。このようにして、正常な水質における信号と行動の情報を基準となる正規母集団とし、水質監視を始めた後の信号と行動の情報を標本とみなすことで水質の状態をマハラノビス距離の大きさに評価できる。以下に提案汚染判別アルゴリズムを示す。

Step 1 : 水質が正常の状態では T_d [s] 間計測した $f_{\max}(n)$ を水質正常時の母集団とし、時刻 n におけるマハラノビス距離 $M(n)$ を算出する。

Step 2 : $M(n)$ の突発的な変化を抑えるために、以下の式で示される 1 次の IIR フィルタに $M(n)$ を入力し、危険度 $D(n)$ を算出する。

$$D(n) = \alpha D(n-1) + \beta M(n) \dots \dots \dots (6)$$

ここで、 α, β は IIR フィルタの係数である。これらのパラメータにより、現在時刻のマハラノビス距離に対する危険度 $D(n)$ の感度を調整できる。

Step 3 : 水質正常時の T_d [s] 間における $D(n)$ の平均値 \bar{D}_d と、標準偏差 σ_d を算出する。

Step 4 : 危険度 $D(n)$ が警報閾値 $D^{TH} (D^{TH} = \bar{D}_d + \gamma \sigma_d)$ を越えたときに警報を発する。

4. 実験方法

提案システムの有効性を確認するために、まず、試験魚の運動を拘束して遊泳による影響を低減した状態で呼吸波を計測可能か検証し、次に、エタノールを用いた水質汚染判別実験を行った。以下、実験方法および実験条件について述べる。

〈4・1〉呼吸波計測実験 体長約 25 [mm] ゼブラフィッシュ 7 匹 (Fish A, …, Fish G) を計測対象として、提案システムが呼吸波を計測可能か検証した。計測電極は拘束した魚の真下に L 個配置し、拘束には各魚の形状に合わせて加工したガーゼを用いた。以下に、信号計測に関する実験条件を示す。

- 計測水槽部
 - 電極数: $L = 2$
 - 水量: 400 [ml]
- 生体信号計測部
 - サンプリング周波数: $f_s = 1000$ [Hz]
 - バンドパスフィルタ: $n = 6, f_{low} = 1$ [Hz], $f_{high} = 10$ [Hz]
 - 時間窓: $N = 30000$
 - AR モデル: 次数 $K = 400$, 解析時間窓 $T_w = 30$ [s],
 - オーバーラップ $T_o = 20$ [s]

〈4・2〉呼吸頻度と遊泳速度の同時計測実験 呼吸頻度と遊泳速度の関係を調べるために、水槽内を魚が自由遊泳している状態で呼吸波と行動を 60 分間計測した。計測対象は呼吸波計測実験に用いた個体とは異なるゼブラフィッシュ 3 匹 (Fish a, Fish b, Fish c) とした。システム各部のパラメータと実験条件は以下のように設定した。

- 計測水槽部
 - 電極数: $L = 25$, 格子状 (5×5) に配置 (Fig. 2 参照)
 - 水量: 400 [ml]
- 生体信号計測部
 - 〈4・1〉呼吸波計測実験の条件と同様
- 遊泳行動計測部
 - フレームレート: $F_b = 60$ [fps]
 - ローパスフィルタ: $m = 3, f_{cut} = 0.01$ [Hz]

なお、水深方向への魚の移動が水平方向の遊泳速度算出に影響を与えないように水深は従来文献⁽²⁶⁾にもとづき約 20 [mm] とした。

〈4・3〉水質汚染判別実験 提案システムを用いて水質汚染の判別ができるか確認するために、計測水槽内に断続的

に化学物質を投入することで水質汚染を人為的に引き起こした。投入する化学物質はオンラインデータベース「ECOTOX」 (http://cfpub.epa.gov/ecotox/advanced_query.htm) を参考に半致死濃度 (LC₅₀) が比較的高い (毒性が弱い) エタノールを採用した。

計測対象は〈4・1〉と〈4・2〉で用いた個体とは異なるゼブラフィッシュ10匹 (Fish1, ..., Fish10), 計測時間は50分間とした。監視対象の水源に混入した汚染物質が徐々に流入する状況を想定し, 10分ごとにエタノール濃度が0.5[%]増加するように消毒用エタノールを試験水に投入した。また, コントロール群として, 同様の実験条件において, 別のゼブラフィッシュ5匹に対して10分おきに脱塩素水を2[m]ずつ投入する実験を行った。脱塩素水とは魚を飼育するために水道水を数日間取り置きし, 水中の塩素濃度を低減させた水である。システム各部の設定は〈4・2〉と同様であり, 水質汚染判別部は以下のように設定した。

●水質汚染判別部

基準データの取得時間: $T_s = 5$ [min]

IIR フィルタ係数: $\alpha=0.99, \beta=0.01$

警報閾値係数: $\gamma=8$

なお, 警報閾値を算出するための T_s は水質正常時10分間のうち, 前半5分間の計測結果を使用した。これは, 後半5分間において, 水質が正常と正しく判別されるか確認するためである。

5. 結果と考察

〈5・1〉呼吸波計測実験 実験結果の一例として Fish A における計測結果を Fig. 5 に示す。Fig. 5 (a) は計測された信号波形の一例で, Fig. 5 (b) は周波数スペクトルの時間推移を示している。ここで, PSD の大きさはグレースケールにて表示しており, 白色に近くなるほど値が大きい。この結果より周期的な信号である呼吸波[®]を計測できていることが確認できた。

次に, 個体差を検証するために呼吸波の振幅情報を表す実効値 (RMS) および周波数情報を表すピーク周波数 $f_{max}(n)$ を算出した。また, バラツキの大きさを表す変動係数 (C_V) をそれぞれについて算出した。なお, C_V は以下の式で計算できる。

$$C_V = \frac{\sigma}{z} \dots \dots \dots (7)$$

ここで, z, σ は RMS, $f_{max}(n)$ の平均値と標準偏差を表す。Fig. 6 (a) は各試験魚の RMS の平均値とその C_V であり, Fig. 6 (b) は各試験魚の $f_{max}(n)$ の平均値とその C_V である。Fig. 6 (a) より, 試験魚間で RMS の平均値の大きさが異なるが C_V は平均値から標準偏差の0.2倍しか変化していないことがわかる。また Fig. 6 (b) より, 試験魚間で $f_{max}(n)$ の値の大きさが異なるが C_V は RMS 同様0.2以下であり, 変化が少ないことがわかる。以上のことから, 呼吸波の振幅と周波数は個体によって値が異なるが, 水質正常時には同一個体内の変動は少ないことが確認できた。

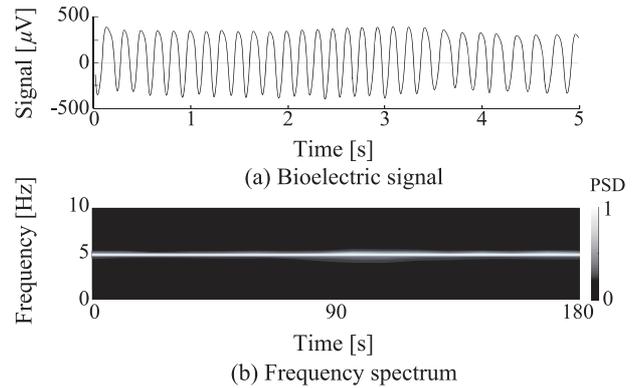


Fig. 5. Examples of ventilatory signals (Fish A)

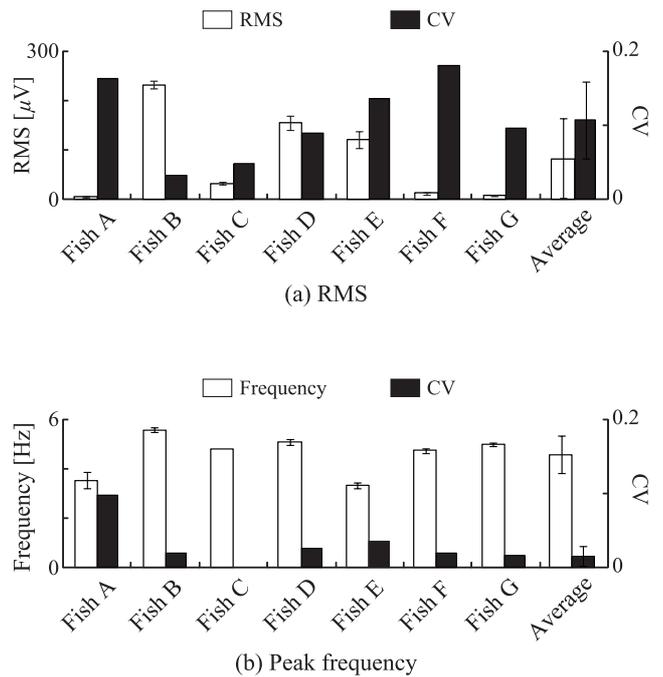


Fig. 6. Experimental results of RMS and peak frequency

〈5・2〉呼吸頻度と遊泳速度の同時計測実験 Fig. 7 に遊泳速度と呼吸波のピーク周波数 (呼吸頻度) について計測した結果を示す。図において, 各点は30秒間平均の呼吸頻度と遊泳速度を示している。図より, 遊泳速度と呼吸頻度との間に弱から中程度の相関が認められた。Bagatto et al. は, ゼブラフィッシュの稚魚を水が一定速度で流れる筒の中に入れ, 魚の遊泳速度と酸素消費量を計測した。その結果, 両者の間に相関関係が存在することを発見した⁽²⁷⁾。酸素を取り込むための呼吸頻度が遊泳速度に相関しているという実験結果はこの従来知見と一致する。

また, Bagatto et al.⁽²⁷⁾は遊泳トレーニングの経験によって酸素消費量は異なることも報告しており, これが Fig. 7 にみられるような相関の個体差の原因であると考えられる。以上より, 呼吸頻度と遊泳速度の間の共分散を考慮したマハラノビス距離を用いて, 試験魚の状態を表現する必要性が示された。

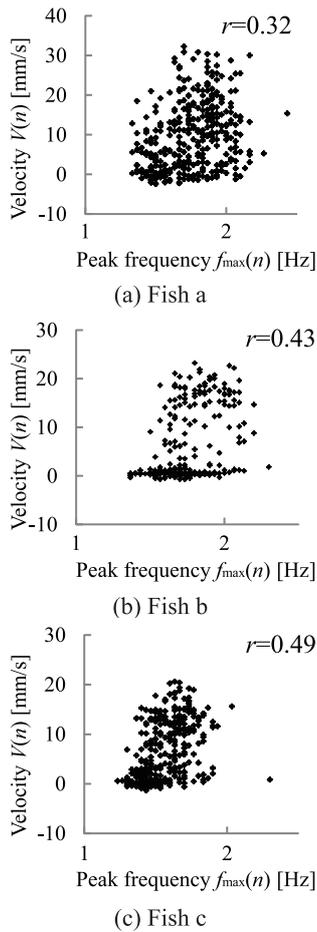


Fig. 7. Relationship between peak frequencies and swimming velocities

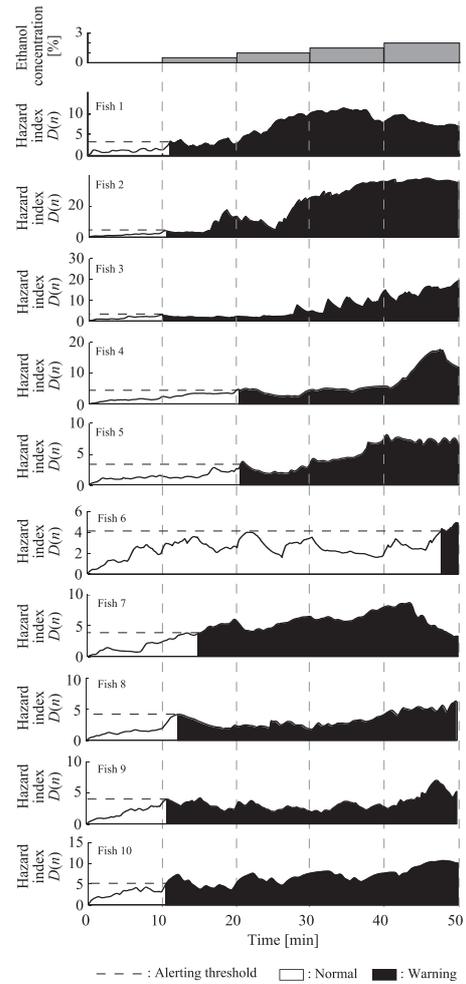


Fig. 9. Resulted hazard index for each test fish ($\gamma = 8$)

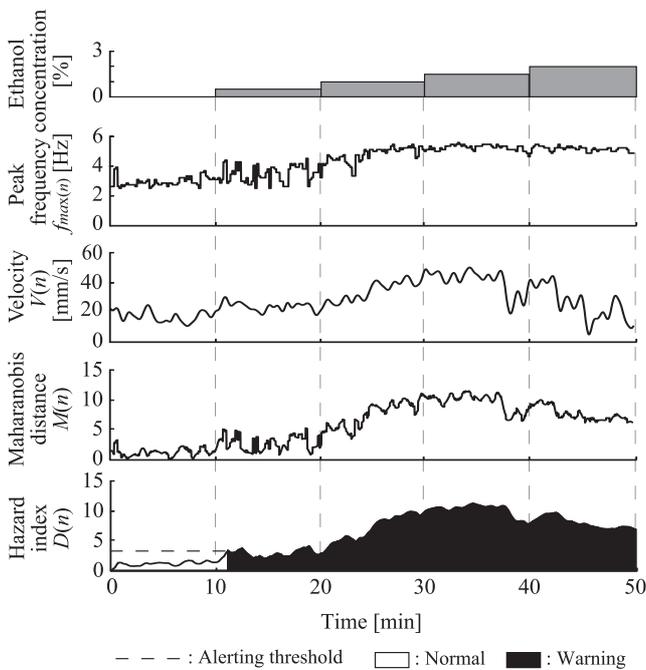


Fig. 8. Examples of experimental results (Fish1)

に示す。図は上から、投入したエタノールの濃度、ピーク周波数 $f_{\max}(n)$ 、遊泳速度 $V(n)$ 、 $f_{\max}(n)$ と $V(n)$ を用いて算出したマハラノビス距離 $M(n)$ 、および、 $M(n)$ に対して IIR フィルタをかけた危険度 $D(n)$ の結果である。図より、 $f_{\max}(n)$ と $V(n)$ はエタノール濃度の変化に伴い変動しており、 $M(n)$ と $D(n)$ は 10 [min] 以降で増加傾向にあることが分かる。この傾向は、Fig. 9 に示すように全個体に共通して観測された。また、 $D(n)$ は $M(n)$ と同様の変化を示しているが、 $M(n)$ で見られるような突発的な変化が軽減されていることが分かる。

ここで、全計測時間中のエタノール濃度が増加する 10 分間毎の $D(n)$ の平均値を算出し、魚の飼育に用いている脱塩素水を投入したコントロール群と比較した。その結果を Fig. 10 に示す。図において、黒の棒グラフで示すコントロール群は、 $\bar{D}(n)$ が大きく変化してないことがわかる。エタノールを投入した場合とコントロール群の 10 分間ごとの $\bar{D}(n)$ を Welch の方法による t 検定を用いて比較すると、10-20 [min] の時間帯以降全ての時間帯の間に有意水準 1 [%] の有意差が確認できた。なお、どちらも水質の状態が正常である 0-10 [min] の時間帯では有意差はない。この結果から、エタノールの影響によって $D(n)$ が変化したことを

〔5・3〕 水質汚染判別実験 実験結果の一例として Fish1 の全計測時間における各指標と危険度 $D(n)$ を Fig. 8

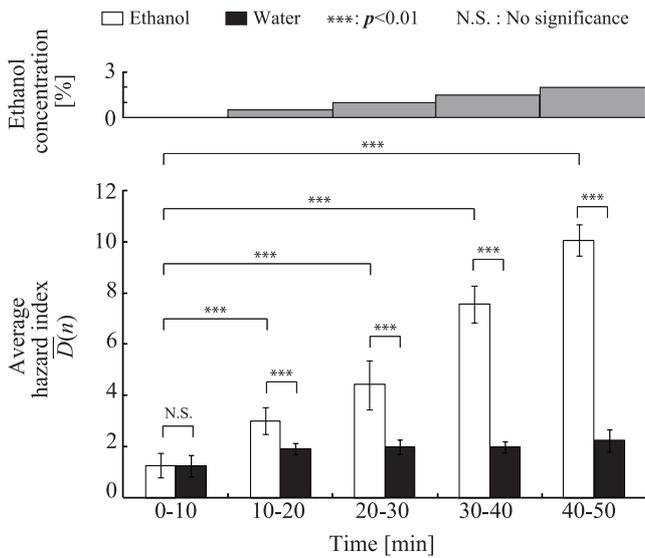


Fig. 10. Relationship between maharanobis distance of ethanol and control group

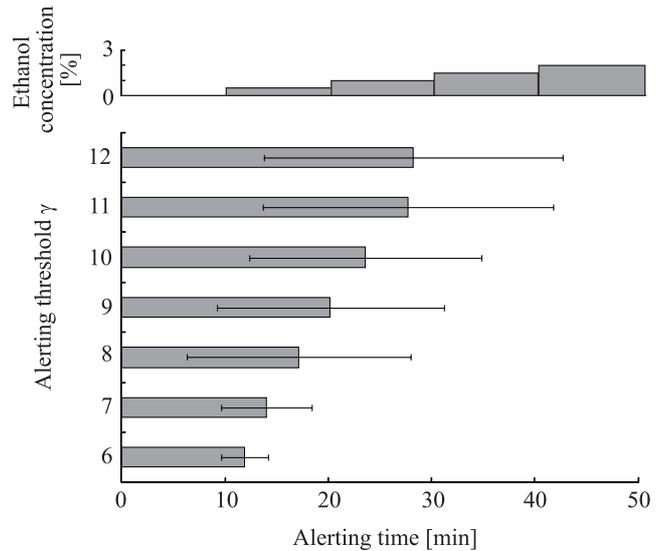


Fig. 12. Alerting time of each alerting threshold γ

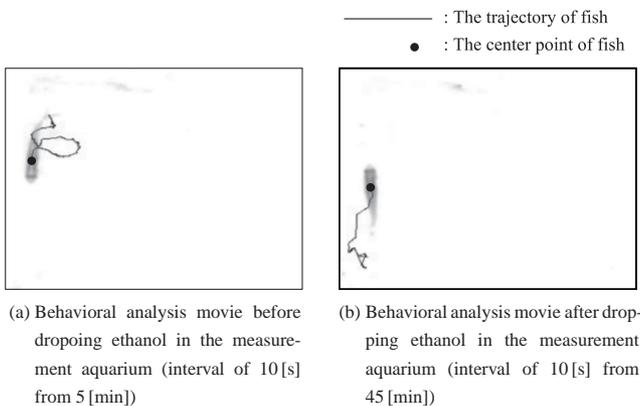


Fig. 11. Comparison between before dumping ethanol and after dumping ethanol (Fish1)

確認できた。

Fish1において、危険度 $D(n)$ が警報閾値 $D^{TH}(\gamma=8)$ を超えた時刻は実験開始後 12 [min] であり、エタノール濃度が 0.5 [%] になった直後で汚染と判別できた。 $f_{max}(n)$ の 0-10 [min] の前半の時間帯に注目すると、魚の遊泳行動などの影響によるものと考えられる突発的な変化が見られる。また、40-50 [min] の時間帯における $V(n)$ は 0-10 [min] の水質が正常な時間帯とほぼ同程度である。Fig. 11 (a) は 5 [min] から 10 秒間 (エタノール投入前)、(b) は 45 [min] から 10 秒間 (エタノール濃度 2 %) の遊泳軌跡を示しているが、これらの間に大きな違いは観測できない。この結果は、呼吸波のピーク周波数 $f_{max}(n)$ もしくは遊泳速度 $V(n)$ のどちらか一方のみに着目していると、誤判別を引き起こしてしまう可能性を示唆している。これに対して、提案法が用いている指標 $M(n)$ と $D(n)$ では $f_{max}(n)$ の突発的な変化や $V(n)$ の減少を抑えられていることが分かる。エタノールを投入した際の $\bar{D}(n)$ に対して分散分析を行った結果、全体に有意水準 1 [%] の有意差が確認できたため、多重比較を行うと、

0-10 [min] の $\bar{D}(n)$ とそれ以降の $\bar{D}(n)$ の間に有意水準 1 [%] の有意差が確認できた。以上より、警報閾値 D^{TH} に適切な値を設定することで警報が発せられることを確認できた。

次に、汚染判別の閾値に関するパラメータが判別に及ぼす影響について検討する。警報閾値 D^{TH} の係数 γ の値をそれぞれ変更したときの警報を発する時間の平均値と標準偏差を Fig. 12 に示す。図より、 γ の値を下げると警報を発する時間も早くなることがわかる。しかしながら、 $\gamma=6,7$ の場合には水質正常時 0-10 [min] の間に警報が発せられてしまう個体がいることを確認した。また、 $\gamma=11,12$ の場合には全計測時間 50 [min] で警報を発さない個体がいることを確認した。これらの結果から、本論文の実験条件下においては $\gamma=8,9,10$ のうち一番早く警報を発することができる $\gamma=8$ が適切な閾値の条件であることがわかった。

〈5・4〉一定のエタノール濃度環境下におけるゼブラフィッシュの反応 〈5・3〉より、汚染物質の混入濃度が増加しながら流入する状況において、提案システムは魚の呼吸頻度と遊泳速度の変化から汚染を検出できることが確認された。しかしながら、この変化がエタノール濃度の増加によるものか、エタノールが存在する水槽の中で長時間、遊泳した影響によるものかは不明である。そこで、計測開始から 60 分まで脱塩素水の中に魚を遊泳させ、その後、濃度が 1 [%] となる量のエタノールを投入して一定に保ち、合計 120 分間遊泳行動と呼吸頻度を計測した。その他の実験条件は〈5・3〉と同様とした。ゼブラフィッシュ 3 匹の実験結果を Fig. 13 に示す。各図は上段からエタノール濃度、呼吸頻度、遊泳速度、マハラノビス距離、危険度である。図より、10 分ごとに 0.5 [%] ずつエタノール濃度を増加させた場合にはほとんどの個体で観測された危険度の持続的な上昇は観測されなかった。したがって、この反応はエタノール濃度が断続的に増加した場合に起こる現象であることが示された。

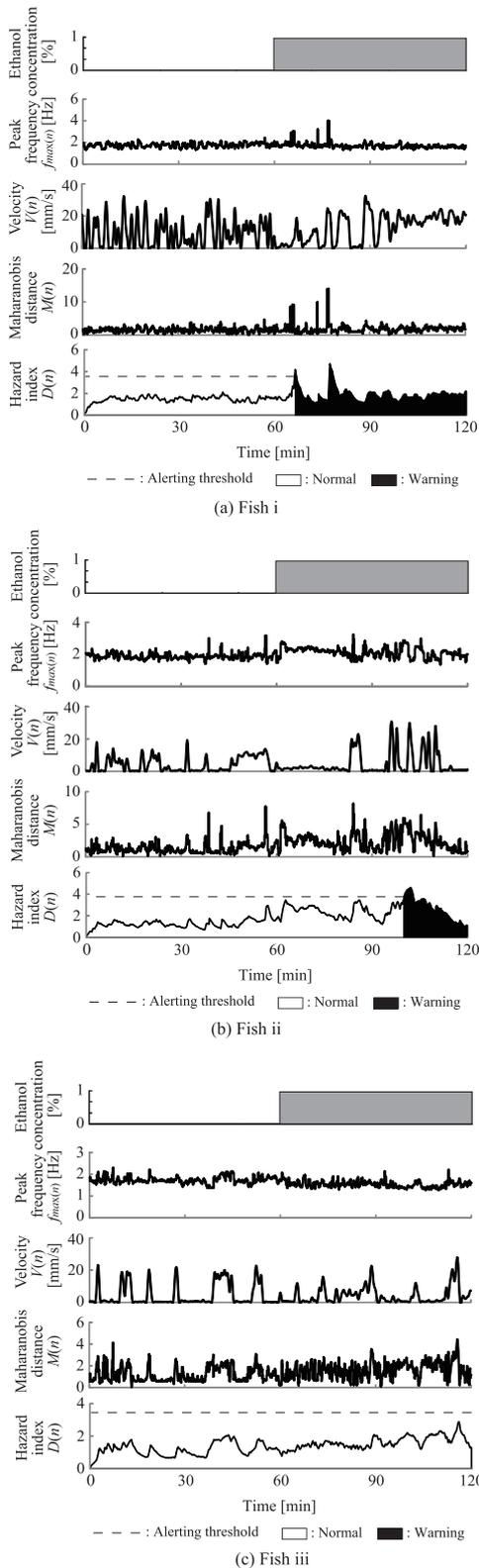


Fig. 13. Water contamination experiments under ethanol concentration of 1[%]

〈5・3〉と同様に $\gamma = 8$ と設定すると Fish i は汚染後約 40 分, Fish ii は汚染後約 8 分に汚染と判別された。一方で Fish iii については計測時間内に危険度 $D(n)$ が閾値を超えず, 汚染されたことを判別できなかった。これは, エタノールの濃度が低く保たれている実験条件では, 魚は画一的な反応

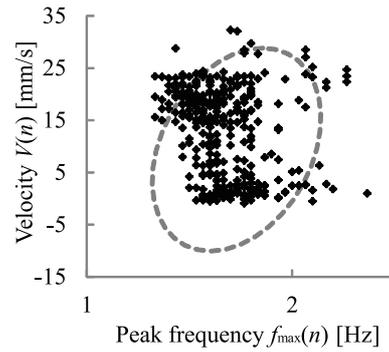


Fig. 14. Distribution of velocities and ventilatory frequencies after water contamination

を示さず, 汚染物質への耐性や順応に関する個体差が判定結果に影響してしまうためであると考えられる。汚染濃度が低く保たれた状態において, どのようにして個体差を考慮するかについては, 今後, 複数個体を用いた多数決による判別法などの導入を検討する必要がある。

また, Fig. 13 (a),(b) より, この実験条件では呼吸波の変化は小さく, 遊泳速度に比較的大きな変化が見られることが分かる。Fig. 14 に Fish ii におけるエタノール投入後の呼吸頻度と遊泳速度の分布を示す。図中, 破線の楕円は基準データの分布から算出された危険度の閾値に相当する信頼楕円である。この信頼楕円外部にプロットされた点によって水質が汚染されていると判別される。信頼楕円の左上外部に多くの点が集まっていることから, 呼吸頻度だけでなく, 遊泳速度が水質正常時から離れたことによって危険度が上昇していることが分かる。以上の結果は, 遊泳速度が汚染を判別するために重要な情報であることを示す例である。

6. まとめ

本論文では小型魚類を対象とした水質汚染監視システムを提案した。提案システムは, 非接触・非拘束状態で自由遊泳中の試験魚の生体電気信号と遊泳行動を同時に計測することで, 呼吸頻度と遊泳速度から算出した危険度を用いて水質汚染判別を行う。実験の結果, 断続的にエタノール濃度が上昇する実験条件においては, 適切な閾値を設定することで水質の汚染を判別できることを確認した。

今後は, 実際に提案バイオアッセイが運用される環境を想定して, 水質汚染の原因となる化学物質を用いて長時間の汚染判別実験を行い, 最適な基準データの取得時間と γ の決定法について検討する。また, 汚染物質に対する反応の個体差を考慮して, 汚染物質の濃度が低く保たれている場合に対しても的確な判別ができるよう複数個体による汚染判別システムを構築する必要がある。実用化に際しては, 魚介藻類が入った飼育用水槽と計測用の水槽を別々に用意して通常は魚介藻類が入った水槽で試験魚を飼育し, バイオアッセイを行う時に試験魚を計測用水槽に移すなど, 飼育時の魚のストレスを軽減する手法についても検討する予定である。

謝 辞

本研究で用いたゼブラフィッシュは広島大学大学院生物圏科学研究科・吉田将之准教授にご提供いただいたものであり、ここに御礼申し上げます。また、システム構成や汚染判別方法などに関して貴重なご意見をいただいた広島大学大学院工学研究院・栗田雄一准教授に御礼申し上げます。本研究は JSPS 科研費 20115010 の助成を受けたものです。

文 献

- (1) 国土交通省:「平成 22 年全国一級河川の水質現況の公表について」(2011)
- (2) 厚生労働省:「米国の同時多発テロ」を契機とする国内におけるテロ事件発生に関する対応について」(2001)
- (3) 鈴木基之・内海英雄:「バイオアッセイ水環境のリスク管理」, 講談社 (1998)
- (4) U.S. EPA: Whole Effluent Toxicity: “Guidelines Establishing Test Procedures for the Analysis of Pollutants”, Federal Register, No.60 (1995)
- (5) I. J. Kang, J. Moroishi, A. Nakamura, K. Nagafuchi, S. G. Kim, and Y. Oshima: “Biological Monitoring for Detection of Toxic Chemicals in Water by the Swimming Behavior of Small Freshwater Fish”, Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University, Vol.54, pp.209-214 (2009)
- (6) A.S. Kane, J.D. Salierno, G.T. Gipson, T.C.A. Molteno, and C. Hunter: “A Video-based Movement Analysis to Quantify Behavioral Stress Responses of Fish”, Water Research, Vol.38, No.54, pp.3993-4001 (2004)
- (7) T.R. Shedd, W.H. van der Schalie, M.W. Widder, D.T. Burton, and E.P. Burrows: “Long-Term Operation of an Automated Fish Biomonitoring System for Continuous Effluent Acute Toxicity Surveillance”, Bull. Environ. Contam. Toxicol., Vol.66, pp.392-399 (2001)
- (8) M. Terawaki, A. Hirano, Z. Soh, and T. Tsuji: “Unconstrained and Noninvasive Measurement of Bioelectric Signals from Small Fish, Artificial Life and Robotics”, Vol.14, No.3, pp.342-347 (2009)
- (9) J.M. McKim, P.K. Schmieder, G.J. Niemi, R.W. Carlson, and T.R. Henry: “Use of Respiratory-Cardiovascular Responses of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) in Identifying Acute Toxicity Syndromes in Fish: Part 2, Malathion, Carbaryl, Acrolein and Benzaldehyde”, Environ. Toxicol. Chem., Vol.6, pp.313-328 (1987)
- (10) J.R. Skidmore: “Respiration and Osmoregulation in Rainbow Trout With Gills Damaged by Zinc Sulphate”, J. Exp. Biol., Vol.52, pp.481-494 (1970)
- (11) W.S.G. Morgan: “The Use of Fish as a Biological Sensor for Toxic Compounds in Portable Water”, Prog. Wat. Tech., Vol.10, pp.395-398 (1978)
- (12) K. Nimkerdphol and M. Nakagawa: “Effect of Sodium Hypochlorite on Zebrafish Swimming Behavior Estimated by Fractal Dimension Analysis”, J. Biosci. Bioeng. Vol.105, pp.486-492 (2008)
- (13) F.B. Davy, H. Kleerekoper, and J.H. Matis: “Effects of Exposure to Sublethal DDT on the Exploratory Behavior of Goldfish (*Carassius auratus*)”, Water. Resour. Res., Vol.9, pp.900-905 (1973)
- (14) P. Weis and J.S. Weis: “Schooling Behavior of *Menidia menidia* in the Presence of the Insecticide Sevin (Carbaryl)”, Marine biology, Vol.28, pp.261-263 (1974)
- (15) 竹内健一郎・加藤信介・徐長厚・千野聡子・熊谷一清・長谷川あゆみ: 「バイオセンサーによる室内空気質測定に関する研究 (その4) 化学物質曝露時のメダカの挙動解析」, 日本建築学会大会学術講演梗概集 (2007)
- (16) 浅野昌充・羽生 功: 「魚類の行動と生体電気, 回遊魚の生物学 (森沢正昭編)」, pp.181-195, 学会出版センター (1987)
- (17) 岩田宗彦・平野哲也: 「浸透圧調整, 魚類生理学 (坂沢 靖男・羽生 功編)」, pp.125-15, 東京恒星社厚生閣 (1991)
- (18) E.D. Adrian and F.J.J. Buytendijk: “Potential Changes in the Isolated Brain Stem of the Goldfish”, J. Physiol., Vol.71, pp.121-135 (1931)
- (19) 尾崎久雄: 「魚類生理学講座 第 2 巻呼吸の生理」, p.43, 緑書房 (1970)
- (20) M.G. Jonz and G. Zaccane: “Nervous Control of the Gills”, Acta. histochem., Vol.111, pp.207-216 (2009)
- (21) Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD): Test No.203: Fish, Acute Toxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals (1992)

- (22) 岡本 仁:「動物に精神疾患はあるか?魚は心の解明に役立つか?～還元主義的心の研究の材料としての魚～」, 分子精神医学, Vol.6, No.4, pp.377-386 (2006)
- (23) A.J. Hill, H. Teraoka, W. Heideman, and R.E. Peterson: “Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity”, Toxicol. Sci., Vol.86, pp.6-19 (2005)
- (24) 白井支朗・伊藤宏司・三田勝巳:「生体信号処理の基礎」, pp.107-155, オーム社 (1985)
- (25) 永田 靖・棟近雅彦:多変量解析法入門, pp.99-117, サイエンス社 (2001)
- (26) 来山茂央・曾 智・平野 旭・辻 敏夫・滝口 昇・大竹久夫: 「呼吸波計測に基づく小型魚類遊泳行動の非接触・非拘束計測」, 計測自動制御学会論文集, Vol.48, pp.151-158 (2012)
- (27) B. Bagatto, B. Pelster, and W.W. Burggren: “Growth and Metabolism of Larval Zebrafish: Effects of Swim Training”, J. Exp. Biol., Vol.204, pp.4335-4343 (2001)

曾 智 (非会員) 2010 年広島大学博士課程後期修了。2012 年より広島大学大学院医歯薬保健研究科において、学術振興会特別研究員 (PD) 現在に至る。博士 (工学)。International Symposium on Artificial Life and Robotics (AROB) Young Author Award (2009), 日本味と匂学会論文賞 (2012) などを受賞。人工生命体, ニューラルネット, 生体信号解析などの研究に従事。



宮 本 健太郎 (非会員) 2011 年広島大学工学部第二類卒業。2013 年より広島大学大学院工学研究科博士課程前期, 現在に至る。魚類の生体信号解析, 信号処理, 行動解析に関する研究に従事。



平 野 旭 (非会員) 2008 年広島大学大学院工学研究科博士課程後期修了。民間企業勤務を経て, 2010 年より呉工業高等専門学校助教, 現在に至る。博士 (工学)。人工生命体, シミュレーション生物学, バイオミメティクス制御などの研究に従事。



辻 敏 夫 (正員) 1985 年広島大学大学院工学研究科博士課程前期修了。同年広島大学工学部助手。1994 年同助教授を経て, 2002 年より同大学大学院工学研究科教授。現在, 同大学大学院工学研究院教授。工学博士。計測自動制御学会学術奨励賞 (1986), 論文賞 (2002, 2008), バイオメカニクス学会論文賞 (1990), 日本義肢装具学会論文賞 (2000), 日本医科機器学会論文賞 (2003, 2005, 2007, 2009, 2013), 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス部門学術業績賞 (2004), IEEE R & A Society The K. S. Fu Memorial Best Transactions Paper Award (2004) などを受賞。人間とロボットの運動制御, 生体信号解析, ニューラルネット, ヒューマン・マシシステムなどの研究に従事。

