

II-2. 海産植物プランクトン急性毒性(生長阻害)試験法

1. 植物プランクトン急性毒性試験法の概要

近年、内分泌かく乱物質や流出油などの各種有害化学物質の海洋生物へ及ぼす影響が問題となっている。海産植物プランクトンは海洋生態系の一次生産者として重要な位置を占めており、その増減は海域の生物生産に大きな影響を及ぼすと考えられる。そこで有害化学物質の海産植物プランクトンに対する影響を明らかにするためには毒性試験を行う必要がある。一部の海産植物プランクトンの培養は、魚類などの飼育と比較しても比較的容易で、実験規模も小さい。そのため毒性未知の化学物質の毒性評価方法としても有効と考えられる。

ここに提案する試験法は主にOECDガイドライン¹⁾を基本とし、海産植物プランクトンを用いた場合の試験条件を新たに規定したものである。試験法については2で述べ、3では試験法を解説した。

2. 試験法

1) 試験法の原理

植物プランクトンの生長に及ぼす化学物質の影響を調べるため、

- ・被験物質を含まない対照区と、種々の被験物質濃度区のプランクトン現存量を経時的に一定期間(例えば96時間)測定する。
- ・各実験区の植物プランクトンの生長(生長曲線下の面積、あるいは生長速度)を求める。
- ・統計的手法などを用い被験物質による植物プランクトンの生長阻害率を算出する。

2) 試験の準備

(1) 試験生物(注1)

被験物質に対する感受性が種によって異なることから、実験に使用するプランクトンは異なる植物門から複数種選択することが望ましい。供試種として推奨される種を表II-2-1に示した。

(2) 実験培地(注2)

培地は基本的に海水強化培地のF/2培地²⁾を使用する(表II-2-2)。

表II-2-1 実験で使用した植物プランクトン

植物門	綱	種名	使用を推薦している方法
緑色植物門	緑藻	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	ASTM ³⁾ , APHA <i>et al.</i> ⁴⁾ , U. S. EPA ⁵⁾⁶⁾
	プラシナ藻	<i>Tetraselmis tetratheta</i>	
ユーグレナ植物門	ユーグレナ藻	<i>Eutreptiella</i> sp.	
不等毛植物門	珪藻	<i>Skeletonema costatum</i>	ASTM, APHA <i>et al.</i> , U. S. EPA, ISO ⁷⁾ , 国環研 ⁸⁾
		<i>Thalassiosira pseudona</i>	ASTM, APHA <i>et al.</i> , U. S. EPA
		<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	ASTM, ISO
		<i>Chaetoceros calcitrans</i>	
	ラフィド藻	<i>Heterosigma akashiwo</i>	国環研
ハプト植物門	ハプト藻	<i>Pavlova lutheri</i>	APHA <i>et al.</i>
	ハプト藻	<i>Isochrysis galbana</i>	APHA <i>et al.</i>
渦鞭毛植物門	渦鞭毛藻	<i>Prorocentrum minimum</i>	
紅色植物門	紅藻	<i>Champia parvula</i>	Weber <i>et al.</i> ⁹⁾

表II-2-2 F/2培地の組成

F/2培地	
NaNO ₃	1g/100mL(10mg/mL)×7.5mL=75 mg
Vitamin B ₁₂	0.01g/100mL(0.1mg/mL)×0.005mL(5μL)=0.5μg
Biotin	0.01g/100mL(0.1mg/mL)×0.005mL(5μL)=0.5μg
Thiamine HCl	0.1g/100mL(1mg/mL)×0.1mL(100μL)=100μg
Na ₂ SiO ₃ 9H ₂ O	1g/100mL(10mg/mL)×1mL=10 mg
f/2metal ¹⁾	1 mL
Seawater	1000 mL

1) f/2metal	
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	4.4 g
CoSO ₄ 7H ₂ O	12mg
ZnSO ₄ 7H ₂ O	21mg
MnCl ₂ 4H ₂ O	180mg
CuSO ₄ 5H ₂ O	7mg
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	7mg
Distilled water	1L

(3)器具および装置

①培養器具 (注3)

24×200mm、容量64mlネジ口試験管(対照区を含めた濃度区数×3~5連分の本数)

試験管立て (口径24mm試験管用)

②培養装置

インキュベーター(白色蛍光灯装備)

③測定装置 (注4)

ターナーデザイン蛍光光度計(キュベットホルダー口径24mm、キュベット蓋特注---試験管が入るよう長くする)

分光光度計

④その他実験器具 (注5)

a. 滅菌

オートクレーブ

アルミホイル

b. 濾過

吸引濾過セット(ガラス製が望ましい)

減圧ポンプまたはアスピレーター

ピンセット

ガラス繊維濾紙(粒子保持能0.7μm以下)

アルミホイル

c. 試薬調製

蒸留水製造装置または蒸留水

pHメーター

マイクロピペット(2μL~10μL, 10μL~50μL, 50μL~200μL, 200μL~1000μL, 1000μL~5000μL)(オートクレーブ可)

ピペットチップ(要オートクレーブ)

メスフラスコ(100mL, 1L)

電子天秤

薬包紙

葉さじ

d. 分注

ディスペンサー

メスシリンダー(50mL)

ディスポメスピペット(1mL)滅菌済み

ディスポメスピペット(5mL)滅菌済み

ディスポメスピペット(10mL)滅菌済み

安全ピペッター、ピペットコントローラー

ガスバーナー

クリーンベンチ

e. 試薬保存

フィルターカートリッジ(目合い0.2μm滅菌済み)

ディスポシリンジ(滅菌済み)

マイクロチューブ(要オートクレーブ)

冷蔵庫

冷凍庫

⑤培養試薬

7)NaNO₃, 4)Na₂SiO₃ 9H₂O, 9)Vitamin B₁₂, 1)Biotin, 1)Thiamine HCl, 1)Na₂EDTA 2H₂O, 1)CoSO₄ 7H₂O, 1)MnCl₂ 4H₂O, 1)Na₂MoO₄ 2H₂O, 1)0.1mol/LHCl, 1)0.1mol/LNaOH, 1)TRIS, 1)NTA

3)試験条件 (インキュベーターの設定) (注6)

(1)水温

22℃程度にする。

(2)海水

外洋表層水を使用することが望ましい。

(3)照度

3500lux程度にする。

(4)植物プランクトンの初期添加濃度

実験期間中、植物プランクトンの生長が定常期に入らない程度の濃度に設定。

(5)被験物質濃度

公比2程度が望ましい。

(6)明暗周期

14時間明期(14L):10時間暗期(10D)程度にする。

(7)排水処理

施設の排水基準に基づいて適切に処理する。

4)試験操作(注7)

(1)培地の作成方法

培地の作成は以下の通りである。

- ①ガラス繊維濾紙を吸引濾過セットに装着し、濾過海水を作成する。
- ②1Lのメスフラスコなどを用い、表Ⅱ-2-2の組成になるよう試薬、濾過海水を混合してF/2培地を調製する。
- ③ディスペンサーを用いてF/2培地を30mLづつ、ネジ口試験管に分注する。
- ④分注後試験管は121℃、20分オートクレーブで滅菌する。
- ⑤24時間以上放置する。
- ⑥培養実験に使用する。

(2)予備実験(注8)

①目的

- ア. 対照区(被験物質を含まない)の生長曲線を観察する。
- イ. in vivo蛍光とchl aあるいは細胞数との関係を調べる。
- ウ. 本実験で使用する対数増殖期のプランクトンを培養する。
- エ. 被験物質の毒性予測を行う。

②方法

- ア. 実験で使用するプランクトンの保存株をメスピペットあるいはマイクロピペットを用い0.6μL(培地の1/50)程度採取し、培地の入った数本の試験管に添加する。実験開始時から毎日1回、1週間程度in vivo蛍光を測定する。プランクトンの生長曲線を片対数グラフ上にプロットし本実験で添加するプランクトン量、および本実験のプランクトン培養期間を決定する。
- イ. アで使用した定常期のプランクトンを、滅菌海水で1/2ずつ希釈しながら、in vivo 蛍光とchl aあるいは細胞数を測定し、回帰直線を求める。
- ウ. アの結果を基に高濃度で、対数増殖期になるプランクトンの培養期間を決定し準備培養を行う。
- エ. 公比10となるよう培地を作成し、準備培養したプランクトンを添加し96時間藻類生長阻害試験を行う。試験結果からおよその影響濃度範囲を決定する。

(3)本実験(注9)

①試験濃度の決定

予備実験の影響濃度範囲から、本実験の試験濃度範囲を決定する。濃度の公比は、2程度が望ましい。

②被験物質濃度調製

試験管に被験物質を添加する。1濃度区につき、3連以上が望ましい。

溶解剤を用いない場合は、滅菌済み培地に被験物

質を添加して、24時間攪拌後目合い0.2μmのフィルターで濾過したものを最高濃度区として、残りの濃度区は滅菌済み培地で1/2ずつ希釈することにより作成する。被験物質濃度は実験開始前、終了後に機器分析を行うことが望ましい。

難水溶性有害化学物質の試験の場合は、溶解剤として有機溶剤あるいは界面活性剤を使用しても良い。DMSO、アセトン、DMFが望ましい。許容濃度は100ppmまでとする。

この場合、通常の対照区の外に溶解剤対照区も設ける。

③プランクトンの接種

予備実験で決定した、添加するプランクトンの培養期間、添加量に従い、プランクトンを各試験管に接種する。

④生長測定

実験開始直後から毎日1回、96時間後まで各試験管のin vivo 蛍光を観察する。得られた蛍光値はグラフにプロット後、以下の計算式により50%生長阻害濃度(EC₅₀)、あるいは0%生長阻害濃度(EC₀)や無影響濃度(NO EC)を計算する。

5)結果の解析および取りまとめ(注10)

(1)EC₅₀計算方法

①各サンプル毎に生長曲線下の面積(A)を計算する。

$$A=(N_1-N_0)/2 \times t_1+(N_1+N_2-2N_0)/2 \times (t_2-t_1)+\dots \\ + (N_{n-1}+N_n-2N_0)/2 \times (t_n-t_{n-1})$$

ここで、

N₀=試験開始時(t₀)のin vivo蛍光

N_i=t_i時のin vivo蛍光

N_n=t_n時のin vivo蛍光

t_i=試験開始後最初にin vivo蛍光を測定した時間

t_n=試験開始後n回目にin vivo蛍光を測定した時間

②各実験濃度区のサンプル毎に、植物プランクトンの生長阻害率(I_A)を次式により計算する。

$$A_c=(A_c1+A_c2+A_c3+\dots+A_cn)/n$$

$$I_A=(A_c-A_t)/A_c \times 100$$

ここで、

A_c=対照区の生長曲線下の面積の平均

A_{c1}=1番目の対照区的面積

A_{cn}=n番目の対照区的面積

A_t=各実験濃度区の生長曲線下の面積

各実験濃度区のI_A及び被験物質濃度を片対数上にプロット後、プロットが直線になる部分について回帰直

線を求め、 $I_A=50$ となる濃度を EC_{50} 、 $I_A=0$ となる濃度を EC_0 、 $NOEC$ は対照区の値と統計的に有意差を示さない最も高い濃度とする。

3. 試験法の解説

注1 試験種の選定:試験種として推奨種(表Ⅱ-2-1)か、わが国沿岸に生息する種から複数選定する。プランクトンの種類により、被験物質に対する感受性、生長速度、扱い易さ等が異なる。また、試験藻類は無菌株を用いるのが望ましい。

プランクトン株購入機関としては、

- 1)国立環境研究所 環境基盤技術ラボラトリー微生物系統保存施設
〒305-8506 茨城県つくば市小野川16-2
電話:0298-50-2556 FAX:0298-50-2587
- 2)American Type Culture Collection(ATCC) <http://www.atcc.org/>
- 3)Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton (CCMP)
<http://ccmp.bigelow.org/>
- 4)CSIRO Marine Research
CSIRO Microalgae Research Centre
FAX +61-3-6232-5471, Email microalgae@marine.csiro.au
- 5)The Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP) <http://www.ife.ac.uk/ccap/>
- 6)The University of Texas at Austin(UTEX): The Culture Collection of Algae
<http://www.bio.utexas.edu/research/utex/old/>等がある。

注2 培地: 海水強化培地のF/2培地は、国立環境研究所に登録されている海産プランクトンの多くで使用されている¹⁰⁾。

蒸留水に必須栄養塩類を添加して調合する人工海水は、海水の成分がすべて既知であるという利点等がある一方で、海水強化培地に比べ生長が悪い場合があり¹⁾、添加する試薬が多く培地作成に手間がかかる等の欠点がある。代表的な人口海水としては、ProvasoliのASP系培地、DroopのS、T、U、V培地¹²⁾、HarrisonのE SAW¹³⁾等¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾がある。

また、培地に添加する微量金属混液には、EDTAなどのキレート剤が含まれているが、EDTAは重金属の毒性を変化させる可能性が報告されており¹⁹⁾²⁰⁾、重金属の毒性試験を行う際にはEDTAの取り扱いに注意する必要がある。

各試薬は既知濃度のストックを作成すると培地の調製が容易になる。例えば、各試薬は電子天秤上に薬包

紙を置き薬さじを用いて1g、あるいは10gを計量し100 mLのフラスコに加え蒸留水で溶解し、冷蔵庫で保存しておく。

100mL中に1g試薬を添加した場合、ストック試薬の濃度は $1g/100mL=0.01g/mL=10mg/mL$ となり、仮に培地に10mg試薬を添加する時はマイクロピペットを用いて1mL添加すればよい。ただし、分解を受けやすいと考えられるビタミン類はディスポシリンジで吸引後、フィルターカートリッジで濾過滅菌し、マイクロチューブに入れ冷凍庫で保存する。

培地のpHは、8.0前後が望ましい。培地のpH調整は、0.1molHCl、あるいは0.1molNaOHを少量ずつ添加して行う。通常F/2培地のpHは、調整を行わなくてもpH8.2程度になる。pHを調整するのはpHが高くなると沈殿を生じ、またpHがあまりに低いとプランクトンの生長に影響を及ぼす可能性があるためである。

培地のpHは藻類が増殖するとアルカリ側に変化し、実験開始時に比べ1以上上昇する場合もある。微細藻類生長阻害試験でpHが重要な場合、TRIS〔トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン〕などのpH緩衝液等を加えることにより、pH変化を押さえることが可能である。ちなみに、TRISのpH調整の最適範囲はpH6.7 - 10.0²¹⁾とされている。

また、植物プランクトンの最適塩分濃度は種類により異なるので、培地の塩分は蒸留水で希釈して調整する。

注3 培養器具、装置: 24×150mmネジ口試験管を使用しても良い。

ターナー蛍光光度計で直接測定が可能のため、口径24mmのねじ口試験管を使用する。

注4 測定装置: プランクトン量の測定方法は、①顕微鏡による観察、②パーティクルカウンターによる計数、③抽出した濾過サンプルのクロロフィル色素の測定、④分光光度計による濁りの測定、⑤ルミカウンターによるATP量の測定、⑥蛍光光度計によるin vivo 蛍光の測定、あるいは⑦炭素の同位体を用いた光合成活性の測定、⑧DNA量の測定などがある。しかし、①顕微鏡による計数は熟練を要し、時間がかかる、②パーティクルカウンターによる計数は、珪藻の*S. costatum*のように細胞が繋がっているプランクトンでは測定が難しい、測定1回につき200mL程度必要とする、③抽出した濾過サンプルのクロロフィル色素を測る方法はin vivo 蛍光に比べ濾過など手間がかかる、④分光光度計を用い濁りを測る方法はプランクトン以外の濁りも測定するためin vivo 蛍光に比べ精度が劣る、⑤ATPを測る方法は完全に無菌化されていないとプランクトン以外のATPを測定する可能性がある、分析に手間がかかる、⑥in vivo 蛍光はプランクトンの

密度が高いとプランクトン量との相関が悪くなる、クロロフィル色素の抽出法に比べ感度が劣る、⑦光合成活性の測定は放射性同位体を用いる場合があるため、特別な施設が必要等の問題点がある。

以上の短所を考慮に入れ、in vivo蛍光が最も簡便で優れた測定法と考えられる。ターナーデザイン蛍光光度計はプランクトンの入った試験管から培地を採取することなく、試験管をそのまま測定できるため、プランクトン量の測定は簡便に行うことができる。ただし、キュベットの蓋を長くしないと24×200mmネジ口試験管は測定できない。

注5 その他の実験器具：b. 濾過、吸引濾過セットは、ガラス製を用いるとオートクレーブが可能であり便利である。

ピンセットはガラス繊維フィルターの取り外しに用いる。ガラス繊維フィルターは濾過海水作成、またはクロロフィル量の測定で使用。アルミホイルは器具類をオートクレーブにかける際、器具の回りを包んだり、クロロフィル量を測定する際にガラス繊維フィルターを包むため使用する。

c. 試薬調製、蒸留水は、各試薬の既知濃度のストックを作成する時に使用する。pHメーターは培地のpHを調整するとき使用する。マイクロピペット、ピペットチップ類は培地への各試薬の既知濃度のストック添加、準備培養したプランクトンの培地への添加、被験物質の培地への添加に使用する。電子天秤、薬包紙、薬さじは培地を作成する際に使用する。

d. 分注、ディスペンサーは作成した培地を試験管に分注する際に使用すると便利である。メスシリンダーは培地作成、培地を試験管に分注するとき使用する。ディスポメスピペット類、ガスバーナー、クリーンベンチは、プランクトンの植え継ぎの際に使用する。

e. ストック試薬、フィルターカートリッジ、ディスポシリンジ、マイクロチューブはビタミン類の濾過保存の際に使用する。冷蔵庫、冷凍庫はストック試薬の保存で使用。

f. 培養試薬、試薬は試薬特級を用いる。

注6 インキュベーターの設定：①最適温度はプランクトンの種類により異なり、20～25℃が多くの種で最適温度であることから、中間の22℃を最適温度とした。②3500luxで最もよい生長が認められた。これより低照度(2000lux)でも高照度(6000及び9000lux)でも生長が悪い。試験管が陰を作らないよう注意する。③基本的には明暗周期14L:10Dであるが、12L:12Dでも構わない。ただし、連続照射は概日リズムを壊すため良くない。

注7 培地の作成：③分注は50mLメスシリンダーを用いても良いが、大容量(50mLまで)を分注できるピン

型のディスペンサーを用いると便利である。④オートクレーブにかける際、ネジ口試験管の蓋はゆるめておく。⑤オートクレーブ後24時間以上放置するのは、培地を冷却するとともに、培地に空気を接触させるためである。

注8 予備実験：①本実験でのプランクトンの添加量を定めるため対照区の生長曲線を観察する。予備実験開始96時間後にプランクトンが完全に定常期に入っていれば、本実験でのプランクトンの添加量を減らし、対数増殖期になるまでの期間が長ければ、プランクトンの添加量を増やす。②in vivo蛍光は単位を持たないため、Chlaあるいは細胞数との相関をとらないとプランクトン濃度を求めることができない。また、in vivo蛍光は高濃度のプランクトンの測定にはむかないため、実験におけるプランクトンの濃度範囲内でin vivo蛍光が、Chlaあるいは細胞数と高い相関関係にある濃度範囲を知る必要がある。③プランクトンの生長が影響を受けるおよその被験物質濃度を知る。この結果を参考に本実験の濃度範囲を決定する。

注9 本実験：プランクトン、被験物質の添加等の操作はクリーンベンチで行うか、クリーンベンチがない場合は実験机を70～80%エタノール溶液で洗浄、拭き取り後、ガスバーナーをつけた状態で行うと良い。また、実験に用いる器具類はあらかじめオートクレーブにかけておくとうまい。

注10 結果の解析：EC₅₀の計算は、OECDガイドラインを参考とする。NOECは、一元配置の分散分析あるいは多重比較により、対照区の生長と有意差を示さない最も高い濃度として算出する。統計ソフトを用いると便利である(例えばSPSS Base)。参考書としては吉村²²⁾がある。

また、EC₅₀、50%致死濃度(LC₅₀)、NOECを求めるプログラムも開発されている²³⁾。

引用文献

- 1) (財)化学品検査協会編 1981. 201 藻類生長阻害試験. OECD化学品テストガイドライン. 831-841.
- 2) Guillard, R. R. L. and Ryther, J. H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleave) Gran. *Can. J. Microbiol.*, 8, 229-239.
- 3) The American Society of testing materials. 1996. Annual book of ASTM Standards. West Conshocken, 575-585.
- 4) APHA-AWWA-WPCF. 1989. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 17th ed.

- 5) US. EPA 1971. Algal assay. Bottle test. Corvallis, OR: National Eutrophication Research Program, Pacific Northwest Environmental Research Laboratory.
- 6) US. EPA 1974. Marine algal assay procedure bottle test. Corvallis, OR: Eutrophication and Lake Restoration Branch National Environmental Research Center.
- 7) International Organization of Standardization 1995. Waterquality-Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricorutum*. ISO 10253.
- 8) 環境庁 国立公害研究所(現 国立環境研究所) 1978-1979. 藻類の培養試験法によるAGPの測定. 陸水域の富栄養化に関する総合研究(X)
- 9) Weber C., Horning WB., Klemm DJ., Neiheisel TW., Lewis PA., Robinson E., Menkendick JM. and Kessler FA. 1988. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters of marine and estuarine organisms. EPA 600/4-876/028. Cincinnati, OH: Environmental Monitoring Support Laboratory.
- 10) (財)地球・人間環境フォーラム 2000. GEF 保存株リスト 2000 -微細藻類及び原生動物-
- 11) McLachlan J 1959. The growth of unicellular algae in artificial and enriched sea water media. *Can. J. Micro.*, 5, 9-15.
- 12) Provasoli, McLaughlin JJA, and Droop MR 1957. The development of artificial media for marine algae, *Archiv. fur Microbiologie*. 392-428.
- 13) Harrison PJ, Waters RE and Taylor FJR 1980. A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. *J. Phycol.*, 16, 28-35.
- 14) McLachlan J 1964. Some considerations of the growth of marine algae in artificial media., *Can. J. Micro.*, 10, 769-782.
- 15) 西澤一俊, 千原光雄 1972. 藻類研究法, 281-293.
- 16) Morel FMM, Rueter JG, Anderson DM and Guillard RRL1979. Aquil: A chemically defined phytoplankton culture medium for trace metal studies. *J. Phycol.*, 15, 135-141.
- 17) Keller MD, Selvin RC, Claus W and Guillard RRL1987. Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton. *J. Phycol.*, 23, 633-638.
- 18) 池谷 透 1996. 海洋植物プランクトンの単離と培養. 月刊海洋 号外 10, 93-96
- 19) 堀 英夫, 立石晶浩, 高柳和史, 山田 久1996. 海産魚を用いる有害物質の毒性試験における人工海水の試験用水としての適正評価. 日本水産学会誌. 62, 614-622.
- 20) 山田 久1996. 海産魚を用いる有害化学物質の生物濃縮試験法. 水, 5, 22-33.
- 21) 渡辺 信 1988. 環境微生物実験法. 須藤隆一編, 190-193.
- 22) 吉村 功 1987. 毒性・薬効データの統計解析, 57-69.
- 23) 吉岡義正. EC50, LC50, NOECを求めるプログラム. エコトキシコロジー研究会会報, 3, 7-12.

<奥村 裕>