

IV 藻類生長阻害試験

目的

本試験は、指数増殖期の藻類を被験物質に暴露し、対照区に対する生長阻害率を測定することにより、藻類の生長に対する被験物質の毒性を明らかにすることを目的とする。なお、本試験において生長とは暴露期間中の細胞濃度（培地 1ml 当たりの細胞の数）の増加をいう。

1 供試生物

Pseudokirchneriella subcapitata（旧名 *Selenastrum capricornutum*）が推奨されるが、*Scenedesmus subspicatus* など、他の種を用いてもよい。なお、これら以外の種を使用する場合には、暴露期間中、指数増殖期が維持されることが確認されていなければならない。

2 試験容器及び機器

本試験では次に示す試験容器及び機器を用いる。

(1) 試験容器

試験容器等、試験溶液と接触する器具はすべてガラス製又は化学的に不活性な材質でできたものを用いる。試験容器は、空気に接する面が十分確保できるものを用いる。例えば、100mL の容量の試験溶液には 250mL の三角フラスコが適している。

被験物質が揮散しやすい物質の場合は、密栓付フラスコを使用するなど適切な対応を行う。

(2) 培養装置

培養は、温度、照明条件を一定に維持できる培養器又は培養室において行う。

(3) 細胞濃度計数装置

細胞濃度の計数は、例えば、粒子計数装置、顕微鏡下での血球計算盤の使用、蛍光光度計、分光光度計又は比色計を用いて行う。なお、分光光度計を使用して低濃度の細胞濃度を測定する場合は、少なくとも 4 cm の光路長のセルを使用する。

3 培地

次の組成の培地又はこれと同程度の組成の培地が推奨される。

- ・塩化アンモニウム 15 mg/L
- ・塩化マグネシウム六水和物 12 mg/L
- ・塩化カルシウム二水和物 18 mg/L
- ・硫酸マグネシウム七水和物 15 mg/L
- ・リン酸水素二カリウム 1.6 mg/L
- ・塩化鉄（Ⅲ）六水和物 0.08 mg/L
- ・エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 0.1 mg/L

- ・ホウ酸 0.185 mg/L
- ・塩化マンガン四水和物 0.415 mg/L
- ・塩化亜鉛 0.003 mg/L
- ・塩化コバルト六水和物 0.0015 mg/L
- ・塩化銅二水和物 0.00001 mg/L
- ・モリブデン酸二ナトリウム二水和物 0.007 mg/L
- ・炭酸水素ナトリウム 50 mg/L

これらを混合の上、塩酸又は水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH を 8.3 に調整し、滅菌する。

4 前培養

藻類を試験条件にじゅん化させ、試験に用いる指数増殖期の前培養液を得るため、暴露開始前に 2～3 日間以上、試験と同条件で前培養を行う。前培養液に接種する藻類の生物量を調整し、暴露開始時に指数増殖期になるようにする。

5 試験溶液

各濃度の試験溶液の調製は、必要量の被験物質を培地で直接溶解するか、あるいは、適切な濃度の被験物質の原液を調製し、原液を培地で希釈することにより行う。この他、試験溶液の調製に関しては、Ⅲ総則の 2 試験溶液の調製（助剤の使用）によるものとする。

6 試験条件

(1) 暴露期間

7 2 時間以上とする。

(2) 初期細胞濃度

試験での初期細胞濃度は、藻類が暴露期間中指数関数的な増殖を維持できるように十分低くする。乾燥重量が 0.5mg/L を超えないように設定する。例えば、*Pseudokirchneriella subcapitata* では $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ cells/mL ととすることが推奨される。他の種を使う時は生物量で同程度となるようにする。

(3) 試験濃度

少なくとも 5 濃度区を等比級数的にとる。この濃度範囲で、0～90% の生長阻害を起こす範囲が含まれることが望ましい。なお、100mg/L 以上の濃度で試験を行う必要はない。

別に対照区をおく。やむを得ず助剤を使用した場合は、助剤対照区を設ける。

(4) 連数（繰り返し）

各試験濃度区について 3 連とする。対照区については 6 連で試験を実施することが望ましい。

(5) 培養方法：

- ・温度 21～24℃の範囲内で設定し、各試験容器間の変動は±2℃以内とする。
- ・照明 60-120 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ （白色又は昼光色の蛍光灯を用い、連続的かつ均一に照射する。）
- ・培養方法 振とう培養（被験物質が揮発性でない場合は、試験容器は通気性のよい蓋を用いる。暴露期間中、藻類は懸濁状態にしておく必要がある。）

7 被験物質への暴露の開始

各試験容器に、6（2）に基づき設定した初期細胞濃度になるように前培養した藻類を接種して暴露を開始する。

8 細胞濃度の測定

各試験容器の細胞濃度は、少なくとも暴露開始後24、48及び72時間後に測定する。ろ過滅菌した培地を粒子計測装置のバックグラウンドや分光光度計等のブランクとして用いる。

9 被験物質濃度等の測定

(1) 被験物質濃度の測定

被験物質の濃度は、少なくとも最低及び最高試験濃度区並びに予測される EC_{50} 付近の試験濃度区について暴露開始時及び終了時に測定することとする。また、暴露期間中に初期濃度より20%以上低下することが予測される場合は、すべての試験濃度区について暴露開始時及び終了時に測定することが望ましい。さらに、揮発性あるいは吸着性の強い物質など、暴露期間中に著しく濃度が低下することが予測されるものについては、暴露期間中24時間間隔で分析を追加することが望ましい。

(2) 試験環境の測定

試験溶液のpHを暴露開始時及び終了時に測定する。暴露期間中、対照区のpHは通常の場合、1.5以上変動してはならない。

10 限度試験

100mg/L又は水溶解限度のより低い方の濃度で被験物質が毒性を示さないことが予想される場合等には、この濃度で限度試験を行い、NOEC等がこの濃度より大きいことを示すことができる。前述の試験条件および有効性の基準は、限度試験にも適用するが、試験の連数は2倍に増やすこととする。対照区と試験濃度区の生長の平均値を比較するために、t検定等の統計解析を行う。

11 試験の有効性

次の条件が満たされる場合、試験は有効とみなされる。

- ・ *Pseudokirchneriella subcapitata* では、対照区の細胞数が暴露期間中に少なくとも 16 倍に増殖すること
- ・ 対照区の毎日の生長速度の変動係数が暴露期間を通じて 35 % を超えないこと。
- ・ 対照区の繰り返し間の生長速度の変動係数が 15 % を超えないこと

1 2 結果の算出方法

1 2. 1 結果の取扱い

結果の算出は、原則として被験物質の実測濃度の適切な平均値に基づいて行う。暴露期間中、被験物質濃度が初期濃度の ± 20% 以内に保たれていたことが証明できる場合には、初期濃度に基づいて結果の算出を行うことができる。

各試験濃度区と対照区の細胞濃度を暴露期間と被験物質濃度とともに表にする。各試験濃度と対照区の細胞濃度の平均値を時間に対してプロットし、生長曲線を描く。このとき、対照区の生長曲線が、暴露期間を通じて指数増殖期にあることを確認する。

被験物質濃度と影響の関係は、1 2. 2 及び 1 2. 3 に示す両方の方法を用いて計算することが望ましい。

1 2. 2 生長速度の比較

指数関数的に増殖しているときの生長速度は次のようにして計算される。

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln N_j - \ln N_i}{t_j - t_i}$$

ここで、

μ_{i-j} = t_i 時から t_j 時までの期間の生長速度。通常、日当たり (d^{-1}) で表す。

N_i = t_i 時の実測細胞濃度 (cells/mL)。試験開始時 (t_0) の細胞濃度については設定値を用いる。

N_j = t_j 時の実測細胞濃度 (cells/mL)

t_i = 暴露開始後 i 回目に細胞濃度を測定した時間 (d)

t_j = 暴露開始後 j 回目に細胞濃度を測定した時間 (d)

EC₅₀ を算出する場合は、暴露開始時から 72 時間後までの暴露期間を通じた生長速度を求める。試験の有効性を調べるためには、対照区の 1 日ごとの生長速度を求め、毎日の生長速度の変動係数が暴露期間を通じて 35% を超えないことを確認する。

なお、生長速度は、実測細胞濃度の対数を時間に対してプロットし、その回帰直線の傾きから導くこともできる。

各試験濃度区における生長 (速度) 阻害率 (I_{μ}) は、対照区の生長速度の平均値 (μ_c)

と各試験濃度区での生長速度の平均値 (μ_T) との間の差として次のように計算する。

$$I_\mu = \frac{\mu_c - \mu_T}{\mu_c} \times 100$$

1 2 . 3 生長曲線下の面積の比較

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

生長曲線の下での面積は次の式に従って計算される。

ここで、A = 面積

N_0 = 暴露開始時 (t_0) の設定細胞濃度 (cells/mL)

N_i = t_i 時の実測細胞濃度 (cells/mL)

N_n = t_n 時の実測細胞濃度 (cells/mL)

t_i = 暴露開始後最初に細胞濃度を測定した時間

t_n = 暴露開始後 n 回目に細胞濃度を測定した時間

各試験濃度区における生長阻害率 (I_A) は、対照区の生長曲線下の面積 (A_c) と各試験濃度区での生長曲線下の面積 (A_t) との間の差として次のようにして計算する。

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

1 2 . 4 毒性値の算出

I_μ 又は I_A の値を被験物質濃度の対数に対してプロットする。その回帰式等を用いて 50% 阻害濃度を求める。 I_μ より導かれた EC_{50} は ErC_{50} 、 I_A より導かれた EC_{50} は EbC_{50} と表す。

なお、生長速度での小さな変化は生物量にすると大きな変化になることから、 EbC_{50} と ErC_{50} は数値として比較できるものではない。

また、対照区と各試験濃度区の μ_{0-3d} 又は A の値について、分散分析と多重比較を行い、それぞれの場合について $NOEC$ を求める。

1 3 結果のまとめ

試験の結果は様式 7 によりまとめ、最終報告書を添付するものとする。