

淡水藻類を用いる生長阻害試験方法 ～実践的なノウハウの紹介～

山守 英朋, 長谷川 絵理, 岡村 祐里子, 大畑 史江

Alga, *Pseudokichneriella subcapitata*, Growth Inhibition Test Method

～Introduction of Our Practical Tips ～

Hidetomo Yamamori, Eri Hasegawa, Yuriko Okamura, Fumie Ohata

はじめに

わが国でも、諸外国と同様な排水試験方法として、「生物応答を用いた排水試験法」の導入が検討されている。この試験法では、魚類、甲殻類、藻類の3種の水生生物を用いて、事業所排水の毒性を直接測定し評価する。名古屋市環境科学調査センター(以下当センター)では、平成23年度より、これに対応すべく、魚類、甲殻類、藻類について、試験設備や試験方法の検討を行ってきた。

本報告では、生物応答を用いた排水試験法(検討案)¹⁾の藻類を用いた試験(以下試験法案)について、各調査機関の裁量に任されている部分を、より具体的に紹介するとともに、実際試験を行う際の問題点等について解説する。

なお、試験方法の概略等は、平成25年3月1日付けの「生物応答を用いた排水試験法(検討案)」を参照されたい。

試験方法の検討

1. 試験生物

試験法案によれば、試験生物は、ムレミカズキモ(Fig.1:*Pseudokichneriella subcapitata*)が推奨され、国立環境研究所にて分譲されている。(微生物系統保存施設:NIES-35)

分譲された株は、C寒天培地にストリークされた状態で送付されるので、予めC培地を準備し、到着後速やかに懸濁し経代培養を開始する。

本株の倍加時間は、約9.5時間(後述前培養の項の培養条件の場合)で、 4.00×10^6 cells/ml程度まで指数的に増加した。また、試験法案で推奨されているOECD培地においても、生長速度は同様であった。

試験株および保存株は、OECD培地またはC培地で培養し、概ね 2.00×10^6 cells/mlとなった細胞懸濁液0.9mlを2mlのクライオチューブに分注し、10%になるように滅菌したジメチルスルフォキシド(和光純

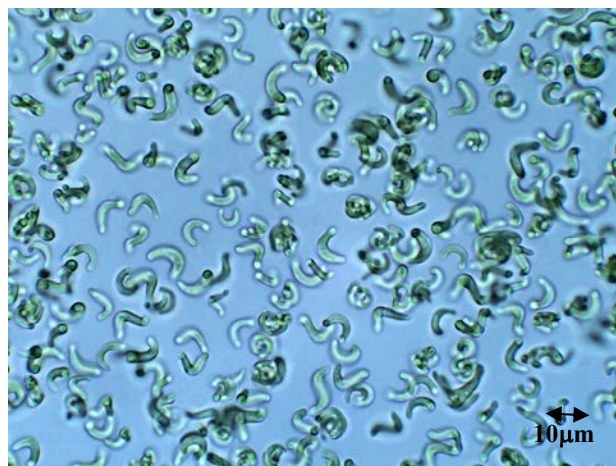


Fig.1 ムレミカズキモの顕微鏡写真(×400)

薬:生化学用)を添加した。これを、細胞凍結ユニット(ミスターフロスティール)に入れ、-80℃の冷凍庫中で凍結した。その後、ユニット中からクライオチューブを取り出し、ラックに収納し、液体窒素保存槽内にて保管した。

試験に際し、凍結試験株を取り出し、37℃に設定した恒温槽で、クライオチューブ内の氷晶が完全に消えるまで良く振り融解した。その後、OECD培地に移し、試験と同様な条件にて、培養増加させ試験に供した。

なお、凍結保存した試験株を解冻し、試験に供する際、凍結による細胞株へのダメージがないことを、生長速度を測定することにより確認している(凍結から、約2年経過した株でも、生長速度の変化は認められていない)。以上の凍結・融解手順は、全て無菌的に、クリーンベンチ内で行った。

なお、通常の試験には、前試験で陰性対照として使用した細胞懸濁液を、OECD培地で希釈して、次の試験に供し、一連の試験が終了した時点で、試験株を廃棄した。

2. 培養方法

1) 培地

凍結保存株用には、C培地を用いた。凍結試験株

および試験用には、OECD 培地を用いた。
それぞれの組成を以下に示す。

C 培地(pH7.5)

・ Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	150mg/L
・ KNO ₃	100mg/L
・ β-Na ₂ glycerophosphate · 5H ₂ O	50mg/L
・ MgSO ₄ · 7H ₂ O	40mg/L
・ Vitamin B ₁₂	0.1μg/L
・ Biotin	0.1μg/L
・ Thiamine HCl	10μg
・ PIV metals	3ml/L
・ Tris(hydroxymethyl)aminomethane	500mg/L
・ Dist. Water	

PIV Metals

・ Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	1000mg/L
・ FeCl ₃ · 6H ₂ O	196mg/L
・ MnCl ₂ · 4H ₂ O	36mg/L
・ ZnCl ₂	10.4mg/L
・ CoCl ₂ · 6H ₂ O	4mg/L
・ Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	2.5mg/L
・ Dist. Water	

OECD 培地(pH8.1)

①液

・ NH ₄ Cl	15mg/L
・ MgCl ₂ · 6H ₂ O	12mg/L
・ CaCl ₂ · 2H ₂ O	18mg/L
・ MgSO ₄ · 7H ₂ O	15mg/L
・ KH ₂ PO ₄	1.6mg/L
・ Dist. Water	

②液

・ FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.064mg/L
・ Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	0.1mg/L
・ Dist. Water	

③液

・ H ₃ BO ₄	0.185mg/L
・ MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.0015mg/L
・ ZnCl ₂	0.003mg/L
・ CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.0015mg/L
・ CuCl ₂ · 2H ₂ O	0.00001mg/L
・ Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.007mg/L
・ Dist. Water	

④液

・ NaHCO ₃	50mg/L
・ Dist. Water	

なお、OECD 培地は、①液を規定濃度の 100 倍濃度で、②～④液を 1000 倍濃度で、濃厚保存液を作成し、培地作成時に、滅菌蒸留水 1L に対し、①液を 10ml、②～④液を 1ml 添加し、OECD 培地とした。

なお、作成した濃厚保存液は、④液のみ 0.22μm のメンブランフィルターにてろ過滅菌し、①～③液はオートクレーブで滅菌し、室温で保存した。

これら濃厚保存液は、室温で長期保存しても、雑菌等により、培養液が白濁していないことは確認しているが、②液は、長期間保存することで、力価が低下し、藻類の生長速度が低下する場合があった。したがって、陰性対照の生長速度が低下したと思われる場合には、②液を再調整する必要がある。

2) 前培養

Fig.2 に典型的な細胞増殖曲線の一例を示す。指数増殖期に達するまでの期間は、初期生物量等に依存するため、あわせて、実験条件等も記載する。

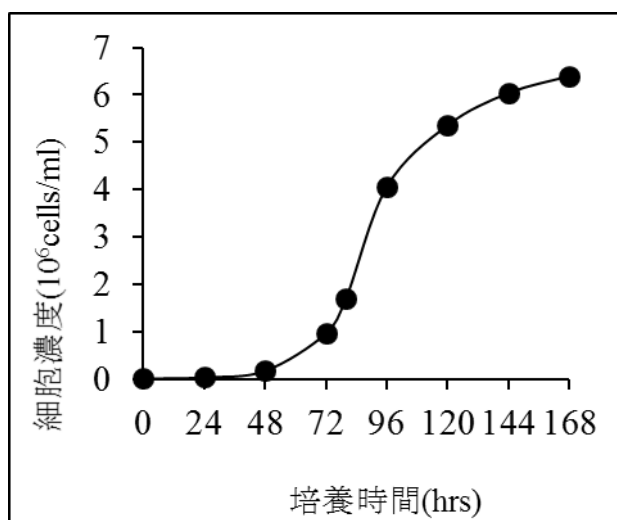


Fig.2 典型的な細胞増殖曲線

- ・ 試験容器 300ml の三角フラスコ
- ・ OECD 培地 100ml 添加
- ・ 初期生物量は 5000cells/ml
- ・ 培養温度 23℃、照度 70～80μmol/m²/s、24 時間明期

この例では、細胞倍加時間は、約 9.5 時間で、培養開始から、4 日目まではほぼ指数的に増加して、それ以降、生長速度は減少した。また、長期間培養した場合、細胞数は 7 日目でプラトーに達し、それ以降減少していった。試験には、指数増殖期にある細胞を用いることから、培養開始 72 時間後で、1.00×10⁶cells/ml 程度の前培養細胞を用いるのが望ましい。

3. 試験容器、装置および器具

試験容器と培養装置を Fig.3 に示した。試験容器には、300ml 容の三角フラスコを用い、試験装置は、(株)サンキ精機製、光照射式振とう培養機 SCS-20RL を使用した。



Fig.3 藻類培養フラスコと培養装置内部

また、生物量計測装置としては、血球計算盤 (Fucks-Rosenthal 型)を用い、顕微鏡下(倍率 200 倍)で細胞を計数した。

このタイプの血球計算盤(計算盤上に 256 の区画がある)は、絶対数が少ない細胞の計数に向いており、初期細胞濃度が 5000cells/ml の場合、256 区画全てを計数しても、細胞数は 16 個であり、全ての区画を計数する必要があった。一方で、72 時間後、 1.00×10^6 cells/ml に達したものでは、概ね 100cells 程度となる区画数を計数し、計算にて細胞濃度を算出しても(この場合は、256 区画中 8 区画を計数)、大きな誤差とはならなかった。

また、本試験は、滅菌器材を用い、操作はクリーンベンチ内で行った。

しかし、無菌操作の必要性を検証するため、あえて、光照射振とう培養装置内で、開放系で培養したものと、シリコン栓で密栓したもので、培養し比較した。Fig.4 に結果を示した。OECD 培地のみ添加した系(写真の左側のフラスコ)では、特に白濁などは認められなかった。また、ムレミカズキモを植種した系(中央のフラスコは開放培養、右側フラスコは密閉培養)では、ほぼ同様な細胞生長速度(順に $1.837, 1.844d^{-1}$)であり、影響は認められなかった。OECD 培地は、無機塩のみの構成となっており、貧栄養のため、雑菌等の繁殖が起こる可能性は低いと考えられ、厳格な無菌操作の必要性はないと思われた。

一方、細胞を計数する際には、ゴミや微粒子等が混入することにより、誤差となる可能性が考えられ

るため、可能な限り、微粒子の混入を排除する必要はあった。したがって、試験試料を $0.22\mu m$ のメンブランフィルター等で処理することは必要であった。



Fig.4 72 時間培養後の各培養液の状態

(注)モノクロ写真では判別が困難であるため、Web 版のカラー写真を参照してください。

4. 試験操作・試験条件等

1) 光照度の平均化

光照射式振とう培養機において、中心部は 9000 ルクスを超えている場所もあるが、周辺部では 6000 ルクスの場所も認められる。したがって、場所によって光の当たり方が異なり、生長速度に影響することが懸念された。

	1	2	3	4	5	6
A	1.718	1.795	1.786	1.843	1.872	1.850
B	1.740	1.797	1.791	1.817	1.845	1.835
C	1.755	1.802	1.841	1.850	1.848	1.808
D	1.810	1.819	1.825	1.831	1.831	1.802
E	1.752	1.793	1.752	1.793	1.817	1.752

Fig.5 培養装置の培養位置と生長速度の一例

装置内の各培養位置における生長速度の差異について検証した。培養容器を動かすことなく位置を固定し 72 時間培養し、各位置の生長速度を測定した。結果を Fig.5 に示した。30 地点の平均生長速度は $1.806d^{-1}$ 、標準偏差は $0.038d^{-1}$ であった。この平均値に対する生長阻害率を求めると、最大で 4.86%(1-A 地点)となり、周辺部では、3%近い阻害率を示す場所も認められた。阻

害率が 4%を超過すると、統計的な有意差が認められる場合もあることから、24 時間毎の細胞数の測定の際、培養容器の位置を変えて、光照射量による誤差を、可能な限り排除した。

2) 最高濃度区への栄養塩の添加

試験法案によると、80%濃度区を最高濃度区として試験することになっている。その際の培養液中の栄養塩濃度は、陰性対照の 1/5 濃度となるため、栄養塩不足による、細胞の生長阻害を招くことが懸念された。

Fig.6 に、蒸留水の藻類生長阻害試験結果を示す。これによると、栄養塩を添加しなかった 80%濃度区では 6.9%の生長阻害率を示したが、栄養塩を添加した 80%濃度区では、生長阻害は認められなかった。このような場合、ばらつきの大きさ次第で、統計的な有意差は認められる場合が考えられる。

したがって、試験に際し、80%濃度区には、OECD 培地の 80%相当の栄養塩を添加し、試験することとした。

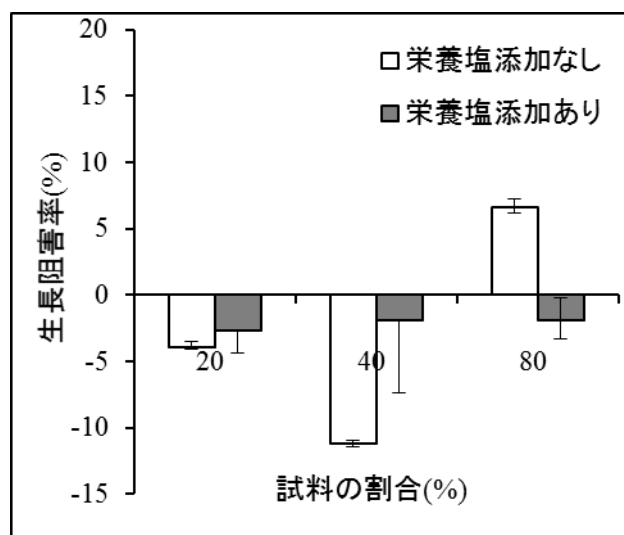


Fig.6 蒸留水の藻類生長阻害試験結果

3) 細胞の感受性試験

細胞の感度変化等をチェックする目的で、細胞を凍結から融解した場合や継続使用している細胞株でも定期的に、ポジティブコントロール(重クロム酸カリウム)による感受性試験を実施した。NOEC($K_2Cr_2O_7$)は、0.156mg/L または 0.312mg/L が得られており、平均値 ± 1 濃度区の範囲内には収まっていた。

4) 培養温度の影響

Fig.7 に、実験月ごとの陰性対照の生長速度を示した。太いバーは、平均値 $\pm 1\sigma$ の範囲を表し、細いバーは、それぞれ最小値および最大値を表している。

これによると、8月、9月の生長速度が小さく、ばらつきが大きいことが分かる。

この原因について調査したところ、当センターの光照射振とう培養装置は、冷却機能を持ち、室温-10℃まで冷却可能とのことであったが、夏場の極端に暑い時期の場合、終業後空調が切れると、実験室の温度上昇が起こり、恒温槽が 23℃に維持できず、場合によっては 30℃付近まで上昇していることが分かった。

そのような場合は、温度が高温となった結果、生長速度が抑えられる可能性が考えられた。

したがって、以後、夏場酷暑期の試験を回避するか、または、個別空調にて、室温の上昇を抑えることとした。

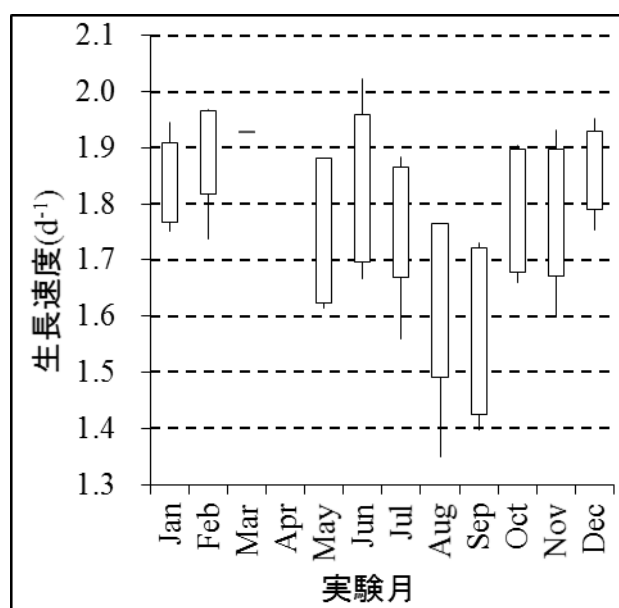


Fig.7 月毎の生長速度の平均値・範囲

5) 栄養塩濃度の影響

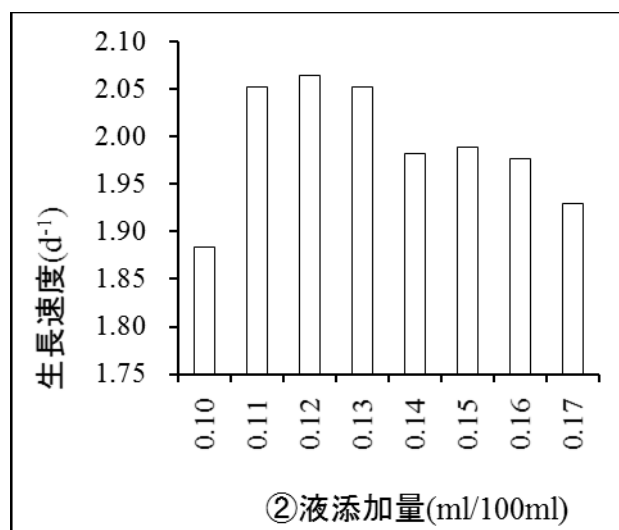


Fig.8 ②液添加量と生長速度との関係

細胞を顕微鏡下で観察していると、陰性対照のみ細胞径が小さく、生長速度が小さくなることがあった。

原因を調査したところ、培養液の濃厚保存液を作成して、一定期間経過すると表れてくることが分かった。そのため、OECD 培地作成用の濃厚保存液の影響について検討した。

①～③液の影響を個別に検討したところ、②液が影響していることが分かった。Fig.8 に②液の添加量と生長速度との関係を示した。

これによると、規定添加量の 0.1ml では、生長速度が小さく、細胞径も小さい細胞(Fig.9)であり、培養液の色も非常に薄い緑色であった。

添加量 0.11～0.13ml では、添加量の増加により、徐々に細胞径が大きくなるとともに、生長速度も大きくなり(Fig.10)，培養液の色も徐々に濃い黄緑色を呈した。

また、更に添加したものでは、細胞径は大きくなったものの、細胞同士がくっついて、細胞数は減少した(Fig.11)。

したがって、②液は、時間経過とともに、濃度変化が起こり、追加しないと、栄養塩不足となることが分かった。以後、濃厚保存液は、長期保存せず、少量を頻繁に作成することとした。

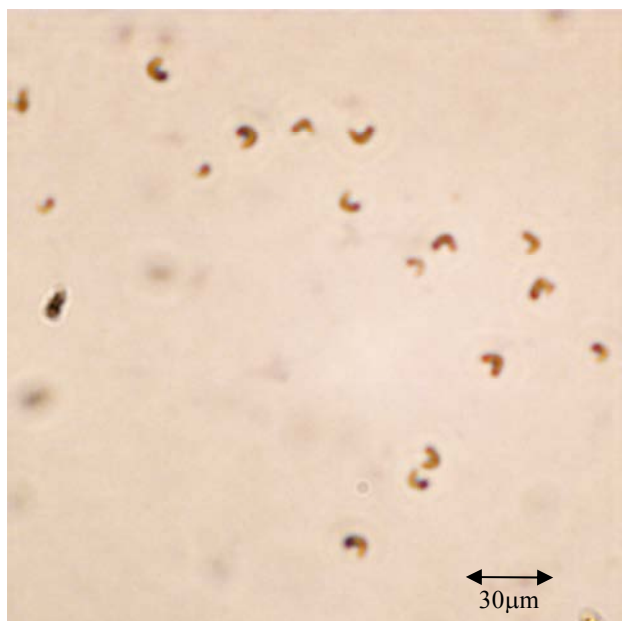


Fig.9 ②液 0.1ml 添加時の血球計算盤一分画の顕微鏡写真(×200)

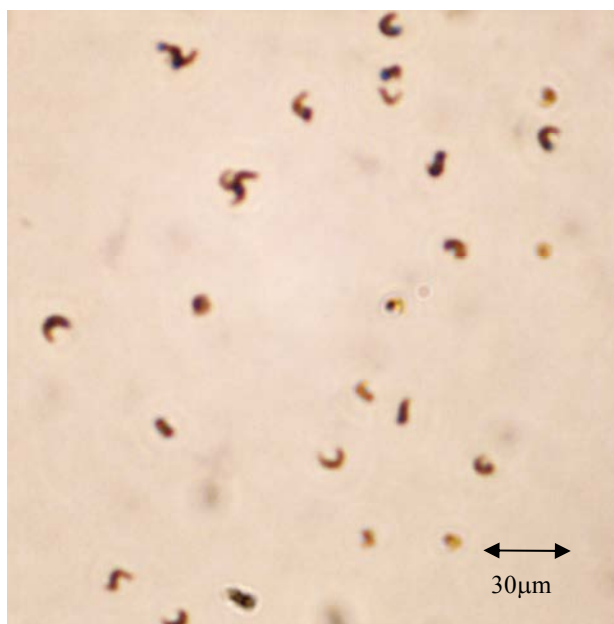


Fig.10 ②液 0.13ml 添加時の血球計算盤一分画の顕微鏡写真(×200)

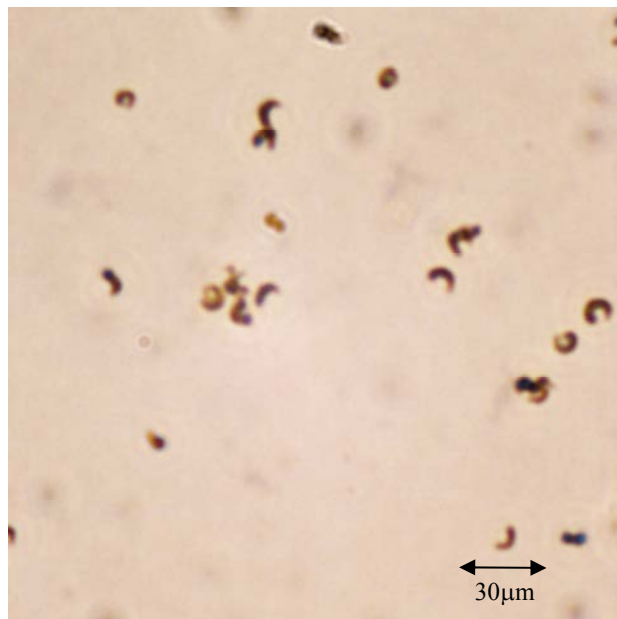


Fig.11 ②液 0.17ml 添加時の血球計算盤一分画の顕微鏡写真(×200)

結果の算出方法の検討

試験法案では、24 時間ごとに細胞濃度を測定し、72 時間後の被検試料の細胞生長速度と、陰性対照の細胞生長速度とを比較する。その結果、統計的に有意な減少が認められるかについて検定し、有意差が認められた最小濃度区を最小影響濃度(LOEC)、その一段階低濃度の濃度区を最大無影響濃度(NOEC)として評価する。当センターでは、統計解析ソフトウェアとして、日本環境毒性学会の EcoTox Statics²⁾を使用した。

以下に、解析上の注意点について記述する。

1) 生長速度の算出

試験法案では、生長速度を求めるために、0 時間目と 72 時間目の細胞濃度を求める必要がある。当センターの場合、Fucks-Rosenthal 型血球計算盤で行っているため、実際の細胞を顕微鏡下で観察しながら、計数を行っている。

その細胞数は、0 時間目は 5000cells/ml 程度、72 時間目は、生長阻害を受けない場合、 1.00×10^6 cells/ml となる。その場合、実際の計数は、0 時間目の場合、血球計算盤の全 256 分画を数え 16 個程度、72 時間目は 8 分画を数え 100 個程度となる。

ここで、それぞれの細胞を計数する際の 1 個当たりの誤差を考えた場合、0 時間目の細胞 1 個の誤差は、72 時間目の細胞 1 個当たりの誤差に比べ、約 6.5 倍誤差が大きくなる。特に、0 時間目の細胞は、数が少なく、ゴミや水滴等も非常に目立つため、細胞に近い形で観察される場合もあり、0 時間目の細胞を計数する際には、測定スライド枚数を増やすなど、精度を担保する必要がある。

2) 統計解析結果の判定

本試験は、Dunnett の多重比較検定を行い、陰性対照の生長速度と、被検試料の 1 つの濃度区の生長速度とを比較する。比較の結果、統計的に有意に、生長速度が抑制されている場合、有意差ありという結果となるが、基本的には、陰性対照の 6 試料の平均値およびそのばらつきと、被検試料 3 試料の平均値とそのばらつきの大きさを比較することとなる。

そのため、陰性対照や被検試料の一濃度区の試料間のばらつきが非常に小さい場合、わずかな差でも、有意差が出てくることが考えられる。

この場合、再試験を行った場合、試験結果が異なることも考えられるため、統計解析の有意差検定の結果は尊重するものの、生長阻害率が著しく小さい場合（目安として 10%程度の生長阻害率が得られない場合）は、確認のため再試験を行うか、非線形回帰分析により EC_x(x は阻害率が入る)を推定し指標とすることが望ましい。

文 献

- 1) 排水（環境水）管理のバイオアッセイ技術検討分科会：生物応答を用いた排水試験法（検討案）（2013）
- 2) 日本環境毒性学会ホームページ，
<http://www.intio.or.jp/jset/ecotox.htm>