

ミジンコウキクサを試験生物とした生長阻害試験法の検討

石原 悟, 近藤美和

独)農林水産消費安全技術センター 農薬検査部

ミジンコウキクサ (*Wolffia globosa*) を試験生物とした生長阻害試験法を検討した。ミジンコウキクサは SIS 培地 (Swedish standard medium) で良好な生長が認められた。*Lemna* 属ウキクサに対する生長阻害試験の試験指針 (OECD-TG221) の環境条件下で培養したところ、7日間の培養で約 10 倍 (葉状体数) の生長が認められ、ミジンコウキクサの生長速度が OECD-TG221 の基準を満たしていることを確認した。より簡易な試験法開発のため、試験容器として 48well のマルチディッシュプレート (48 well プレート) の使用を検討した。基準物質 (3,5-ジクロロフェノール) を被験物質として生長阻害試験を行った結果、葉状体数から算出した生長速度を基に算出した半数生長阻害濃度は、100 mL ビーカー、48 well プレートを試験容器とした試験でそれぞれ 3.06, 3.10 mg/L であり、同程度の結果が得られた。以上の結果より、OECD-TG221 に準じた試験における試験生物として、ミジンコウキクサが有用であることが示唆された。また、微小なミジンコウキクサを試験生物とした特徴を生かし、生長阻害試験の試験容器として、48 well プレートが利用できると思われる。

Keywords : ウキクサ, 生長阻害試験, 除草剤, リスク評価

結 言

ため池や水路などに生息する浮遊植物のウキクサを試験生物とした生長阻害試験は、国際的な試験指針 (OECD-TG221) が定められている¹⁾。現在のところ、我が国ではウキクサ生長阻害試験を、水生生物に対する影響評価体系に取り入れていない。一方、欧米では除草剤など植物に対して生理活性を有する化学物質の非標的水生植物に対する影響評価に利用されている²⁾³⁾。OECD-TG221 では試験生物として *Lemna* 属ウキクサであるコウキク (*L. minor*) およびイボウキクサ (*L. gibba*) の使用が推奨されている。*Lemna* 属ウキクサは小型の水生植物であるが (図 1)、試験指針に従い試験を行うには、多量の培地が必要 (100 mL ビーカーを試験容器と使用した場合、1 試験当たり 5 L 程度必要) であるとともに、大型の恒温槽などの設備を要する。また、結果解析の一つである葉状体面積の算出には、画像処理ソフトなどを要する。

本研究では最も小型なウキクサであるミジンコウキクサ (*Wolffia globosa*) (図 1) に着目し、OECD-TG221 で定められた試験条件で当該生物を試験生物とした試験が可能であるか確認すると共に、微小なミジンコウキクサを試験生物とする特徴を生かした、より簡易な試験法を検討した。また、ミジンコウキクサの基準物質 (3,5-ジクロロフェノール)

ール) に対する感受性を明らかにした。なお、本研究は平成 23 年度課題「農薬の河川一次生産者に対する環境影響評価手法の高度化の検討」の一環として行った。

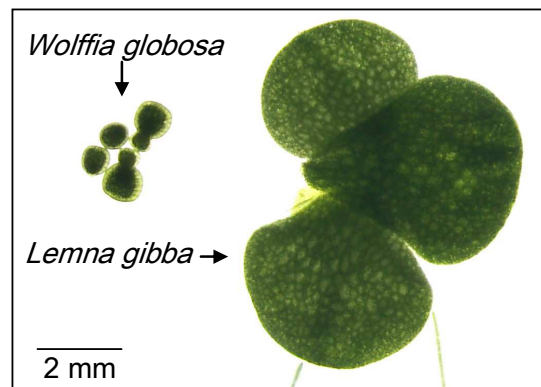


図 1. ミジンコウキクサ (*Wolffia globosa*) およびイボウキクサ (*Lemna gibba*)

材料および方法

1. 培養条件の検討

1.1. 試験生物

ミジンコウキクサ (図 1) は茨城県つくば市のハス田をより採取した個体をクローン増殖して用いた。室内での継代培養を容易にするため、70-80% エタノールへの浸漬による除藻を行い、微細藻類が繁殖しない系統を確立して使用した。培養には照明

(NEC 製, FL8N, 昼白色蛍光灯) 付き培養器 (IKUTA 製, A4201D2L) を用い, 継代培養の環境条件は, 培地; 1/4 強度の Hutner 培地⁴⁾, 24 時間明期, 温度; 24±2°C, 光量子量; 100±20 μE・m⁻²・s⁻¹ とし, 1-2 ヶ月毎に新鮮な培地に植継いだ. なお, ミジンコウキクサの移植には, 先端ループ径が 1 mm の細菌接種用ループを用いた.

1.2. 培地の検討

生長阻害試験に使用する培地の検討には, 以下の 3 種類の培地を用いた. ①: 1/4 強度 Hutner 培地 (継代培養用の培地), ②: SIS 培地 (OECD-TG221 における *L.minor* 用培地)¹⁾, ③: 20×AAP 培地 (OECD-TG221 における *L.gibba* 用培地)¹⁾. 各種培地の調製には市販の一般および特級品の試薬を用いた. 100 mL ビーカーを試験容器 (培地量は 100 mL) として培養を行い, 培養 7 日後の外観 (葉状体の色調), 生長速度 ($\mu_{0.7}$) および倍加時間 (T_d) から, ミジンコウキクサの生長阻害試験に用いる培地の適性を評価した. 培養の環境条件 (温度および光量子量) は継代培養時と同条件とした. 生長速度 ($\mu_{0.7}$) および葉状体の倍加時間 (T_d) は以下の式 (1) (2) よりそれぞれ算出した.

$$\mu_{0.7} = (\ln N_7 - \ln N_0) / 7 \quad \dots \dots (1)$$

N_0 : 試験開始時の葉状体数(個)

N_7 : 7 日後の葉状体数(個)

$$T_d = \ln 2 / \mu_{0.7} \quad \dots \dots (2)$$

葉状体の色調は生体画像解析システム・スキャナライザー (Lemna Tec 社製 Scanalyzer) を用いて試験容器上部から葉状体の写真を撮影し, 画像解析を行うことにより測定した. なお, 培養条件の検討は, 2 週間以上の順化期間を設けて実施した.

2. 48 well プレートを使用した際の培養条件の検討

2.1. 試験開始時の葉状体数の検討

48 well プレートを試験容器として生長阻害試験を行う際の試験開始時の葉状体数について検討した. 培地量は 1.5 mL/well とし, 試験開始時の葉状体数を 1,2,3 個/well と変え, 継代培養時と同条件で培養した. 試験は 4 連で行い, 培養 7 日後に葉状体数を計測して 0-7 日間の生長速度および葉状体の倍加時間を算出し, 100 mL ビーカーを試験容器として使用した際 (試験開始時の葉状体数 = 9 個/容器)

の結果と比較した.

2.2. 培地量の検討

48 well プレートを試験容器として生長阻害試験を行う際の培地量について検討した. 試験開始時の葉状体数を 2 個/well とし, 培地量を 0.5, 0.7, 0.9, 1.1, 1.3, 1.5 mL/well と変え, 継代培養時と同条件で培養した. 試験は 4 連で行い, 培養 7 日後に葉状体数を計測して 0-7 日間の生長速度および葉状体の倍加時間を算出した.

3. 基準物質に対する感受性

3.1. 100 mL ビーカーを試験容器として使用した試験

3,5-ジクロロフェノール (和光純薬 一般) を被験物質として OECD-TG221 に準じ生長阻害試験を行った. 試験容器として 100 mL ビーカーを使用し, 培地量は 100 mL/容器とした. 試験開始時の葉状体数は 9 個/容器とし, 環境条件は継代培養時と同条件とした. 試験は 3 連, 5 曝露濃度区で行い, 曝露開始 7 日後に葉状体数を計測し, 0-7 日間の生長速度を前述の式 (1) より算出した. 試験開始時および終了時に各曝露濃度区の試験溶液中の被験物質濃度を HPLC (UV) により以下の条件で測定した.

[HPLC 測定条件] 装置: LC-20 SPD-M20A (島津製作所), カラム: カプセルパック C18MGIII 15cm (資生堂), 温度 40°C, 溶離液: アセトニトリル/水=5/5, 流量: 1.0 ml/min, 検出器: PDA (検出波長 200 nm), 注入量 10 μl

半数生長阻害濃度 (7d-ErC₅₀) の算出には試験開始時と終了時の試験溶液中の被験物質濃度の幾何平均値を用いた. Microsoft Excel のソルバー機能を利用し, 非線形最小二乗法によるロジスティック回帰分析を行い, 7d-ErC₅₀ を算出した.

3.2. 48well プレートを試験容器として使用した試験

試験開始時の葉状体数, 連数, 試験容器および培地量以外は, 前述の 3.1 と同条件で生長阻害試験を行った. 試験開始時の葉状体数は 2 個, 連数は 4 連, 培地量は 1.5 mL/well とした. 7d-ErC₅₀ の算出は 3.1 と同様に行った.

結果および考察

1. 培地の検討

1/4 強度 Hutner 培地で継代培養を行っているミジンコウキクサを OECD-TG221 の *Lemna* 属ウキクサ用の培地である SIS 培地および 20×AAP 培地に植え継いで培養したところ、SIS 培地では、OECD-TG221 の基準（倍加時間 2.5 日以下）を満たす増殖が認められた。一方、20×AAP 培地では、培養を続けた個体の葉状体の色調が、他の培地での培養と比較し薄くなる傾向が認められ、正常に培養は出来なかった。OECD-TG221 の推奨培地 2 種で比較すると、ミジンコウキクサの生長阻害試験には SIS 培地の方が適していると考えられた。

SIS 培地を用い、OECD-TG221 の試験指針に準じミジンコウキクサを培養した時の生長曲線を図 2 に示す。試験開始時の葉状体数 9 個で培養を開始したところ、7 日後の葉状体数の平均値は 91 個で、およそ 10 倍の増殖（倍加時間 2.1 日）が認められた。

以上の結果から、ミジンコウキクサは SIS 培地を使用することにより、OECD-TG221 に準じた試験が可能な試験生物であると考えられた。

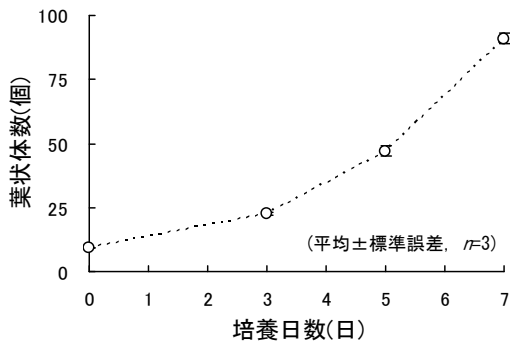


図 2. SIS 培地を用い、OECD-TG221 の試験指針に準じミジンコウキクサを培養した時の生長曲線

2. 48 well プレートを使用した際の培養条件の検討

2.1. 試験開始時の葉状体数の検討

試験開始時の葉状体数を 1, 2, 3 個と変え、7 日間培養したところ、7 日後の葉状体数の平均値はそれぞれ、14, 23, 27 個であった。倍加時間はそれぞれ 1.8, 2.0, 2.2 日であり、全ての試験区で OECD-TG221 の基準（倍加時間 2.5 日以下）を満たす増殖が認められた（図 3）。ウキクサ生長阻害試験において試験結果のばらつきを抑制するには、試験開始時における試験生物の生長段階を揃えることが重要である。ミジンコウキクサは微小な植物であるため、肉

眼による外観観察で生長段階を判別することは難しい。特に葉状体が 1 個の個体では、個体が分裂直後なのか分裂間近であるのか判別できない。試験開始時の葉状体数を奇数に設定した場合、必ず葉状体が 1 個の個体を使用しなければならないため、試験開始時に試験生物の生長段階を揃えることがより困難になると想定された。そこで、48 well プレートを試験容器としてミジンコウキクサの生長阻害試験を行う場合、試験開始時の葉状体数は、2 個（分裂途中の 1 個体を使用）が妥当と考えられた。

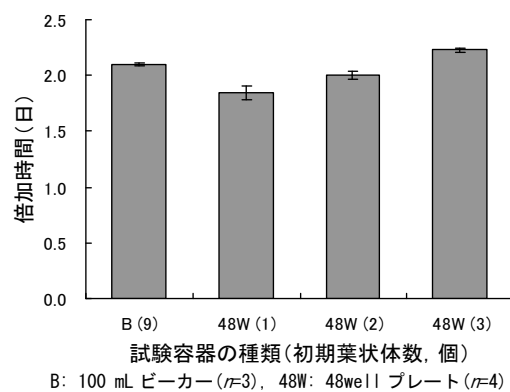


図 3. 異なる試験容器および葉状体数で培養したミジンコウキクサの倍加時間の比較（エラーバーは標準誤差を示す）

2.2. 培地量の検討

1 well 当たりの培地量について検討した結果、培地量の減少に伴い生長速度が低下する傾向が認められた。しかし、その影響は小さく、1 well 当たりの培地量が 0.5 mL（最大容量は 1.5 mL）の場合でも、倍加時間は OECD-TG221 の基準（倍加時間 2.5 日以下）を満たしていた（図 4）。

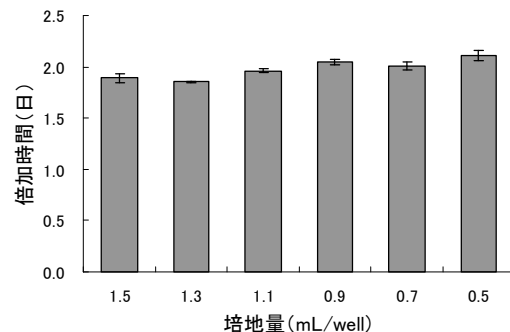


図 4. 1well 当たりの培地量を変え培養したミジンコウキクサの倍加時間の比較（エラーバーは標準誤差を示す, n=4）

48 well プレートを試験容器として使用する際の 1 well 当たりの培地量は、0.5-1.5 mL が妥当と考えられた。

3. 基準物質に対する感受性

3,5-ジクロロフェノールを被験物質とした生長阻害試験を 48 well プレートを用いて行った結果 (図 5), 葉状体数の生長速度から算出した 7d-ErC₅₀ は 3.10 mg/L であり, OECD-TG221 に準じて行った結果 (7d-ErC₅₀ 3.06 mg/L) と同程度の結果が得られた (図 6)。ミジンコウキクサを試験生物とする場合, 試験生物の大きさを考慮し, 小型の試験容器を用い, 省スペースで試験を実施できることが示唆された。

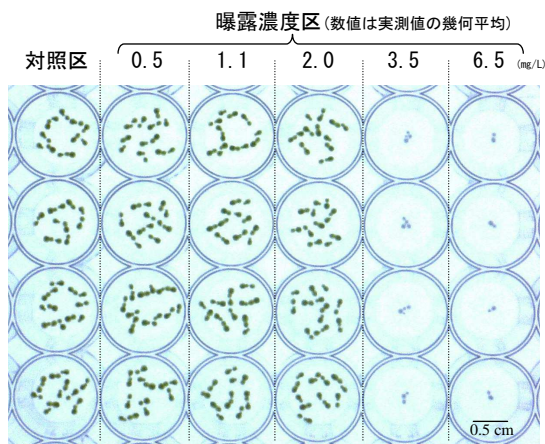


図 5. 曝露 7 日後のプレートの状態 (被験物質: 3,5-ジクロロフェノール)

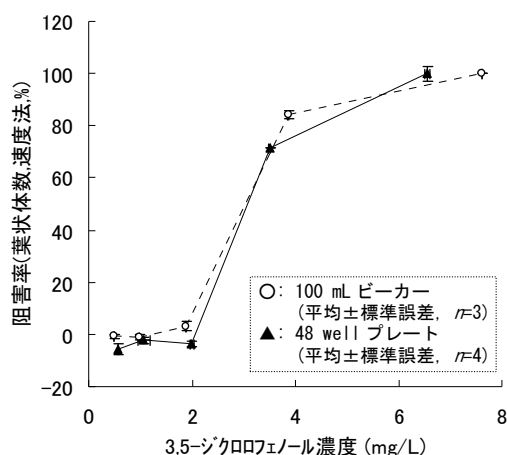


図 6. 濃度-阻害率曲線 (被験物質: 3,5-ジクロロフェノール)

葉状体数から算出した生長速度を基に算出した 7d-ErC₅₀ で比較すると, ミジンコウキクサの 3,5-ジクロロフェノールに対する感受性の高さは *Lemna* 属ウキクサ (7d-ErC₅₀: *L.minor*; 2.97-3.26 mg/L, *L.gibba*; 6.16-6.68 mg/L, *L.aoukikusa*; 3.34-3.66 mg/L)⁵⁾ と同等もしくはそれ以上であった。ミジンコウキクサの化学物質に対する感受性が OECD-TG221 の試験推奨種と同等もしくはそれ以上であることが期待される結果であった。

おわりに

ミジンコウキクサの葉状体は, 長さ 0.3-0.8 mm, 幅 0.2-0.5 mm, 厚さ 0.2-0.6 mm⁶⁾ と微小であることから, より小型の試験容器で試験を実施できることが期待された。本研究では微小なミジンコウキクサを試験生物とする特徴を生かし, 48 well プレートを試験容器とした生長阻害試験法の開発を試みた。その結果, 小型の試験容器を使用しても信頼性の高い結果が得られることを示せた。今回提案する試験法では, ErC₅₀ を算出する試験を実施するにあたり 0.5 L 程度の培地しか要せず, 試験に伴う廃液も減少できるため, より低コストでの試験が可能である。また, 試験で特殊な測定機器や大型の培養器を使用しないという利点も有する。

本成果は, 農薬の水生生物への影響試験法として, ウキクサ生長阻害試験の我が国への導入を検討する際に活用されることが期待される。

引用文献

- 1) OECD(2006)OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 221: *Lemna* sp. Growth Inhibition Test
- 2) SANCO(2002)Working Document Guidance Document on Aquatic Ecotoxicology in the context of the Directive 91/414/EEC, Sanco/3268/2001 rev.4 (final), 18-19
- 3) U.S.EPA(2007)40 CFR Part 158, Data Requirements for Pesticide Registration,
- 4) W. E. Loomis (Ed.), Growth and Differentiation in Plants., Iowa State College Press, Iowa, pp. 417-447., 1953.
- 5) 石原悟ら: 環境毒性学会誌 13(2), 131-139 (2010)
- 6) 角野康郎, 日本水草図鑑, 文一総合出版,1994.