

(試験手順例)

藻類生長阻害試験 (平成18年11月版)

はじめに

本書は平成 16 年 4 月 1 日より施行される「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）」改正法に基づく新規化学物質の届出に際して、試験データが要求される「藻類生長阻害試験」について、推奨種である淡水産単細胞緑藻類 *Pseudokirchneriella subcapitata* を用いた際の標準的な試験手順例をまとめたものである。

藻類生長阻害試験は、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して行う。本試験において生長とは暴露期間中の生物量の増加をいう。

なお、本手順例は平成 18 年 11 月時点の情報に基づいてまとめたものであり、今後新たな知見が得られた場合には適宜見直しを行っていく性格のものである。

改正履歴

作成：平成 15 年 11 月

改正：平成 18 年 11 月（厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長及び環境省総合環境政策局長通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」の改定（平成 18 年 11 月 20 日）に伴い、毒性値の算出方法、培地の組成等の変更）

目次

第1節	被験物質の情報	1
1.1	名称、構造式および物理化学的性状	1
1.2	被験物質の保管方法および保管条件下での安定性	1
	(1) 保管方法	1
	(2) 被験物質の確認および保管条件下の安定性	1
第2節	試験生物	2
2.1	試験種	2
2.2	提供機関	2
2.3	藻類の維持	3
2.4	試験系の再現性	3
第3節	試験の準備	4
3.1	試験器具	4
	(1) 主な器具	4
	(2) 器具の素材・容量	4
	(3) ガラス器具の洗浄	4
3.2	試験機器	5
3.3	培地	5
第4節	前培養	6
第5節	試験溶液の調製と試験濃度の設定	6
5.1	試験溶液の調製	6
	(1) 培地に対する溶解性	6
	(2) 試験溶液調製法の決定	7
5.2	試験濃度の設定	7
	(1) 対照区・助剤対照区の設定	7
	(2) 予備試験	7
	(3) 試験濃度の設定	8
	(4) 記録	8
5.3	分散系での試験	8
第6節	試験条件	8
第7節	生物量の測定	9
第8節	被験物質濃度等の測定	10
8.1	被験物質濃度の測定	10
8.2	試験環境の測定	11
第9節	試験の有効性	11
第10節	試験結果の算出	12
10.1	生長速度の比較(速度法)	13
10.2	毒性値の算出	14
	(1) 50%生長阻害濃度(EC ₅₀)の算出	14
	(2) 最大無作用濃度(NOEC)	15

文献・資料.....	15
(1) 基本とした資料.....	15
(2) 引用文献.....	15
(3) 参考文献・資料.....	15
参考資料 試験結果のとりまとめに必要な表の例.....	17

第1節 被験物質の情報

1.1 名称、構造式および物理化学的性状

試験の実施方法を検討する上で参考とするため、以下に示す項目の情報をできるだけ集める。特に、対水溶解度や蒸気圧の情報は試験溶液の調製や試験容器の選択といった試験実施の基礎的な部分に深く関係するので、重要である。

- ・新規化学物質の名称（IUPAC 命名法による）
- ・別名
- ・CAS 番号
- ・構造式又は示性式（いずれも不明な場合は、その製法の概要）
- ・分子量
- ・試験に供した新規化学物質の純度（%）
- ・試験に供した新規化学物質のロット番号
- ・不純物の名称及び含有率
- ・蒸気圧
- ・対水溶解度
- ・1-オクタール/水分配係数
- ・融点
- ・沸点
- ・常温における性状
- ・安定性
- ・溶媒に対する溶解度等

（留意点）

- ・出典（供給者提供資料、文献名等）を明らかにすること。
- ・試験実施機関による測定値の場合は簡単な測定条件等（対水溶解度の場合：20℃、48時間攪拌、HPLC 分析または目視判定等）を明らかにすること。

1.2 被験物質の保管方法および保管条件下での安定性

（1）保管方法

被験物質の性状に合わせ保管する。必要に応じ、遮光保管または冷蔵庫、冷凍庫に保管する。

（2）被験物質の確認および保管条件下の安定性

入手した被験物質についてスペクトル（赤外吸収スペクトル、マススペクトル、NMR スペクトル等）を測定し、被験物質の特性が認められることを確認する。試験終了時にも同様にスペクトルを測定し、試験開始前に測定したスペクトルとの比較により、保管時の安定性を確認する。

第2節 試験生物

2.1 試験種

本試験では、淡水産単細胞緑藻類である *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) F.Hindák を用いる。本種は、単細胞であること、細胞が計測する上で適当なサイズであること、培養株の維持が容易であることなどから藻類の生長阻害試験には最も適当な藻類種といえる。これまで *Selenastrum capricornutum* として知られ、多くの藻類増殖試験や生長阻害試験に用いられてきた培養株は、形態的特徴から *P. subcapitata* が正しい種名とされ、OECD テストガイドライン 201 藻類生長阻害試験 (2006.3 採択) でもこの種名が使われている。

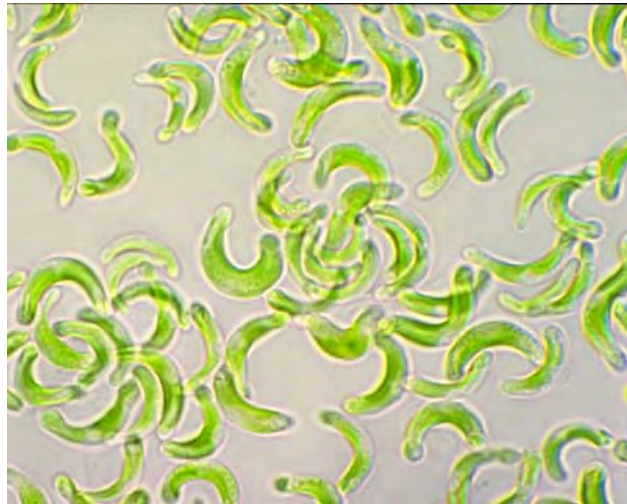


写真 2.1 *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) F.Hindák

2.2 提供機関

Pseudokirchneriella subcapitata の培養株は現在世界各国の保存機関に保存されている。わが国では、独立行政法人国立環境研究所 微生物系統保存施設より提供されているほか、米国タイプカルチャーコレクション、ドイツのゲッチンゲン大学藻類保存施設からも購入できる。

(a)独立行政法人 国立環境研究所 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：029-850-2556 FAX：029-850-2587
電子メール：mcc@nies.go.jp
ホームページ：http://www.nies.go.jp/biology/mcc/home_j.htm

(b)American Type Culture Collection (ATCC)

国内正規販売代理店 ホームページ：

<http://www.summitpharma.co.jp/japanese/service/ATCC.html>

(c) ドイツ ゲッチンゲン大学藻類保存施設

ホームページ：<http://wwwuser.gwdg.de/~epsag/phykologia/epsag.html>

2.3 藻類の維持

試験期間中とは異なり、栄養塩の豊富な培地を用いる方が藻類を容易に長期間維持することができる（例；C培地、ブリストル培地など）¹⁾。20-25℃で、試験条件程度（60μmol/m²/s）の光強度で十分増殖させた後、これより弱い光強度の場所に移すと比較的長期間植え継ぎせずに維持することができる。この場合植え継ぎは数ヶ月毎で十分である。維持培養の場合は、12時間ごとの明暗周期をつけてもよいので、直射日光のあたらない明るい室内に置いて差し支えない。しかし、頻繁に生長阻害試験を実施する場合など、試験条件に近い光条件で培養することにより、前培養で指数増殖期の藻類を得やすくなる。

2.4 試験系の再現性

無菌培養株を使用する場合は、定期的に（少なくとも、6ヶ月毎）細菌の有無を検査して無菌状態であることを確認する必要がある。

試験の再現性を保証するため、基準物質（重クロム酸カリウム、試薬特級）による生長阻害試験を行い、供試藻類の感受性に变化がないことを調べる。なお、基準物質検定の結果は記録しておく。表 2.1 に、参考として、環境省の生態影響試験事業における基準物質（重クロム酸カリウム）の藻類に対する毒性値の例を示した。

表 2.1 重クロム酸カリウム（無水）に対する *Pseudokirchneriella subcapitata* の生長阻害試験結果^{※1}

試験施設名	藻類 72hr-ErC ₅₀ ^{※2} (mg/L) 重クロム酸カリウム(ニクロム酸カリウム)				
	AVE	MIN	MAX	標準偏差	試験回数
A	1.1	0.72	1.5	0.2	n=25
B	0.93	0.84	1.1	0.08	n=6
C	0.95	0.85	1.1	0.079	n=8
D	0.83	0.69	0.94	0.099	n=13
E	1.0	0.96	1.1	0.11	n=2

※1 化学物質 GLP（動植物毒性試験）適合試験施設から提供頂いたデータを記載

※2 ErC₅₀ 速度法による半数影響濃度

第3節 試験の準備

3.1 試験器具

(1) 主な器具

試験に必要な器具を以下に示した。

- ・三角フラスコ
- ・メスフラスコ
- ・メスシリンダー
- ・シリコン栓
- ・ピペット
- ・マイクロピペット
- ・メンブレンフィルター（孔径：0.45 μ m、0.22 μ m）
- ・分注器

等

(2) 器具の素材・容量

試験や前培養には、藻類に十分な光が供給されるよう、透明なガラス製容器を用いる。通常 250-300mL の三角フラスコを用いるが、被験物質の分析に大量の試験溶液を必要とする場合には 500mL のフラスコを用いる。250-300mL の三角フラスコを用いる場合、試験溶液量は 100mL とする。通気性のあるシリコン栓を用いるが、被験物質が揮散しやすい物質の場合等、必要に応じてガラス共栓フラスコを用いた密閉条件で試験を行う。

また、被験物質が着色性で試験の際に供試藻類に光が十分に供給されないことが予想される場合は、扁平フラスコや容量の大きな三角フラスコを使用する等、試験溶液の厚みを減らし、光が十分供給される工夫が必要である。また、光の減衰が藻類の生長に及ぼす影響を事前に調べておくことが望ましい²⁾。なお、被験物質が藻類に対して毒性があり、かつ毒性と光減衰の影響を分けて評価する必要がある場合には、OECDテストガイドラインおよびOECDガイダンスドキュメントNo.23 が引用している文献を参照すべきである。

(3) ガラス器具の洗浄

三角フラスコ、ピペット、シリンダー等、試験物質や培地に用いた物質等がふれたガラス器具は洗浄する必要がある。ガラス器具の洗浄は以下の点に留意して行う。なお、試験前に行う容器や器具の洗浄方法としてASTMの標準ガイド³⁾で示されている事例も参考となる。

他の材質の器具についても同様の洗浄を行う。

- ①無リン洗剤で洗浄
- ②剛毛ブラシを使って、ガラス製品の内壁に付いた物質を除去する
- ③水道水で十分すすぎ、適切な方法（例えば、金属やアルカリを取り除くために酸を用いる、あるいは有機化合物には有機溶媒を用いる）で洗浄する
- ④最後に蒸留水、超純水等で十分すすぐ
- ⑤ゴミの混入しない場所に保管する

3.2 試験機器

試験に必要な主な機器を以下に示した。

- ①培養に用いる装置：温度、照明条件を一定に維持できる培養器又は培養室、化学天秤、ろ過装置、遠心分離器、振とう器（100 rpmを超える速度が制御できる回転式あるいは振動式振とう培養器³⁾）、オートクレーブ 等
- ②試験溶液の調製に用いる装置：スターラー、超音波洗浄機 等
- ③藻類の観察又は生物量の計測装置：光学顕微鏡（100～400倍³⁾）、粒子計数装置 あるいは血球計算盤、吸光光度計、分光光度計 等
- ④環境測定装置：温度計、pHメーター、光量子計、照度計 等

3.3 培地

次の組成の培地を用いる。

- ・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
- ・リン酸二水素カリウム 1.6 mg/L
- ・塩化鉄（Ⅲ）六水和物 0.064 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

これらのうち、比較的多量に加える成分は直接超純水（ミリQ水）などに添加するが、微量成分は濃厚溶液を作成し、適当量加える。大気と平衡状態であれば、pHは8.1となる。平衡になっていない場合は、エアレーションや攪拌等を行う。pH調

整に塩酸や水酸化ナトリウム水溶液は使用してはならない。

ろ過滅菌の場合は 0.22 μm 程度の孔径のフィルターを用いる。オートクレーブによる滅菌より、ろ過滅菌の方が沈殿物形成などの可能性が少ないため、推奨される。

米国環境保護庁 AAP-培地など、同程度の組成をもつ培地を使用することもできる。

第 4 節 前培養

試験には指数増殖期の藻類を用いる必要がある。維持培養中など、増殖を抑制されている藻類をそのまま試験条件に移すと、順調な増殖を開始するまでに遅延（ラグ）があり、正しい試験結果が得られない。そこで、試験を開始する前に、試験条件と同じ条件で 2～4 日間培養し、指数増殖期の藻類を得る。変形や異常な形態のものが出現した場合は使用しない。

指数増殖に達するまでの前培養の期間や、添加する生物量は、使用する培養装置の温度や光強度、培地の容量などに依存する。したがって、あらかじめ前培養に使用する培養装置や条件で培養して生長曲線を描き、どの程度の生物量を添加すると、何日後に指数増殖期になり、どの程度の生物量が得られるかを調べておく必要がある。目安となる方法を以下に示した。

- ・ 250mL の三角フラスコに 100mL の試験培地を入れる。
- ・ 滅菌したピペットを用いて、試験種が約 25,000 cells/mL となるように接種する。この際、加える藻類懸濁液は 5mL 以内になるようにする。
- ・ 振とう培養する（温度 23 \pm 2 $^{\circ}\text{C}$ 、照度約 60-80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、連続光）
- ・ 毎日細胞数を計数し、生物量が 0.5–1 $\times 10^6$ cells/mL に達した時点で本試験に供する。なお、通常 3 日程度でこの濃度まで増殖するが、3 日後に生物量が 0.5–1 $\times 10^6$ cells/mL に達しない場合は前培養の期間を 1 日程度延長するか、培養条件を変えて前培養をやり直す。

第 5 節 試験溶液の調製と試験濃度の設定

5.1 試験溶液の調製

（1）培地に対する溶解性

被験物質の対水溶解度値を参考にしつつ、培地に対する溶解性を確認する。溶解性の判定は、100mg/L 以上であれば目視にて可とし、100mg/L 以下の場合は化学分析により溶解限度を求めておく。測定方法は、例えばフラスコ攪拌法とする。測定温度は試験温度とし、48 時間攪拌後、静置し、上清液から遠心分離等によって不溶物を除去した後分析する。

(2) 試験溶液調製法の決定

試験溶液調製法は以下の事項を考慮して決定する。

- 試験濃度は原則として培地に対する溶解限度以下に設定することとするが、100mg/L以上の濃度で試験を行う必要はない。
- 試験溶液は、被験物質が水溶性の場合は、培地に溶解した濃厚な被験物質溶液（原液）を培地と混合することにより、設定濃度の試験溶液を必要量調製する。
- 被験物質が難水溶性の場合で、培地に添加し、機械的（攪拌、超音波処理等）に溶解させることが困難な場合や秤量等が困難な場合は、助剤としてジメチルホルムアミド、トリエチレングリコール、メタノール、アセトン、エタノール、メチルセロソルブ等の試験種に対する毒性が低く、被験物質の対水溶解度を増すことのない有機溶剤を必要最少量使用して原液を調製し、培地と混合することにより試験溶液を調製してもよい。なお、助剤濃度は最高でも100mg/L又は0.1mL/Lとし、各試験濃度区で一定濃度とする。
- 暴露期間中における濃度維持の方法について検討する。
 - ・吸着性のある被験物質の場合：物質が吸着しにくく、藻類の生長に影響を及ぼさない素材の試験容器を検討する。また、藻類への吸着を極力減らすため、初期細胞濃度を 0.5×10^4 cells/mLと低めに設定してもよい。
 - ・揮発性のある被験物質の場合：揮発による物質の消失を防ぐため、密閉系（栓付三角フラスコ等を使用）で試験を行う。なお、密閉系での試験の場合は、対照区の生物量が初期密度の少なくとも16倍になっていれば、試験期間は48時間に短縮してもよい。
- 試験条件下での被験物質の安定性を確認するためには、藻類を入れない区を設けることが被験物質の濃度減少の理由を明らかにする上で推奨される。

5.2 試験濃度の設定

(1) 対照区・助剤対照区の設定

対照区には被験物質が含まれない培地を用いることとするが、試験溶液の調製に助剤を使用した場合には、対照区に加え、試験溶液の調製に用いた濃度と同じ濃度の助剤を加えた助剤対照区を設ける。

(2) 予備試験

本試験の実施に先立ち、第6節以下を参考に、公比10以下で原則として3～6段階の試験濃度区を設定した予備試験を行い、本試験に適用する濃度を決定する。NOECが試験上限濃度(100mg/L)又は試験溶液調製可能な最高濃度以上と予想される場合、予備試験はこの1濃度で行う場合もある。予備試験では連数を1～3連とし、72時間後に（必要に応じて24、48時間後も）藻類密度を測定する。

(3) 試験濃度の設定

本試験での被験物質濃度は、予備試験での72時間-EC₅₀値を含み、公比を1.3~2.2(50%阻害濃度近辺で公比を狭めるなどの変則公比を採用する場合もある)程度にとり、等比級数的に5段階以上の濃度を設定する。その際、可能な限り、藻類の生長を75%程度阻害する濃度と、全く阻害しない濃度が各々1濃度、一部阻害する濃度が3濃度含まれるようにする。

予備試験の結果、試験上限濃度(100mg/L)又は試験溶液を調製可能な最高濃度で影響が認められなかった場合は、本試験ではその濃度のみの限度試験とする。また、報告書には限度試験であることを明記する。

(4) 記録

試験溶液の調製法及び調製後の状態(外観等)を記録しておく。また、原液について、使用時調製か保存原液かの別を記録し、保存原液を使用した場合には保存条件及び保存条件下での安定性についても記録する。

5.3 分散系での試験

上記5.1で、溶解限度測定のために作成した飽和溶液中の被験物質の濃度が検出限界未満であった場合で、予備試験の結果等から当該飽和溶液より低い濃度ではEC₅₀が得られないことが予想された場合には、そもそも被験物質が溶解しているものと判断することができないことから、分散系で試験を行う。試験濃度は分散可能な上限の濃度とするが、100mg/L以上の濃度で試験を行う必要はない。被験物質は、超音波や有機溶剤に溶かした濃厚原液を用いて分散させることとするが、被験物質が分散剤や乳化剤とともに使用されるものである場合には、助剤としてクレモフォールRH40、0.01%メチルセルロース、HCO-40等の試験種に対する毒性が低く、被験物質の対水溶解度を増すことのない分散剤を必要最小量使用して試験溶液を調製してもよい。なお、作成した飽和溶液中の被験物質の濃度が検出限界未満の場合であっても、当該飽和溶液より低い濃度で毒性が発現する場合には、被験物質は培地に溶解しており、その溶解した被験物質による毒性が発現したものとみなすことができる。

被験物質が混合物の場合、または試験条件で分解し混合物となる場合など、被験物質そのものの溶解濃度を測定できない場合には、添加濃度(Loading rate)での毒性値を算出する場合がある。この場合はEC₅₀に代わってEL₅₀、NOECに代わってNOELRなどの略号で区別する。

第6節 試験条件

以下の条件で試験を行う。藻類の接種は、無菌室やクリーンベンチなど無菌的な条件で行う。

- ・培養方式：非揮発性物質；開放系（通気性のよいシリコン栓）
揮発性物質；密閉系（共栓フラスコなどの密栓容器）
原則として振とう培養（100rpm）
（揮発性が高く、振とうにより被験物質濃度が減少しやすい場合は、静置培養を行うこともある。ただし、その際でも1日に2回程度フラスコを振とうする。）
- ・暴露期間：原則として72時間（ただし、第9節「試験の有効性」をすべて満たしていれば短期間の試験や長期間の試験でもよい。）
- ・試験液量：100 mL／容器（250～300mLの三角フラスコの場合）
- ・連数：3容器／暴露区、6容器／対照区（助剤対照区を設けている場合には、対照区については3容器、助剤対照区については6容器）、なお、限度試験の場合は暴露区、対照区ともに6連以上とする。
- ・生物量：初期生物量が乾燥重量で0.5mg/Lを超えないように設定する。ただし藻類への吸着性の高い試験物質の場合は少なくしてもよい。
- ・試験温度：21-24±2℃
- ・照明：白色又は昼光色の蛍光灯を用い、フラスコ液面付近の光強度が60-120μmol/m²/sになるよう連続かつ均一に照射する。

すべての試験容器が均一に照射されることを確認するため、あらかじめ試験容器を設置する培養器内の照度分布を測定しておく。また、試験期間中、定期的にフラスコの位置を入れ替えるなどの工夫も必要である。

光強度で照度単位luxからエネルギー単位μmol/m²/sへはおよその換算が可能で、その換算係数は、蛍光灯メーカーなどから得ることが可能な場合がある。文献値は白色蛍光灯で0.016、インターネット情報では白色又は昼光色の場合、それぞれ0.013及び0.014である。換算係数は蛍光灯の波長分布に依存するので製品により異なるため、光量子計での測定が推奨される。

予備試験の結果、対照区（又は助剤対照区）のpHの変動が1.5以上と予想される場合は、以下の操作を行うことにより、変動を小さくすることができる。なお、通常の試験では、pHの変動は0.5以下に抑えられる。

- ・揮発性物質でない場合は、振とう培養の回転数を増してCO₂の交換を促進する。
- ・初期細胞濃度を低くすることによってCO₂の要求を減じる。

第7節 生物量の測定

各試験容器を培養装置に設置し試験を開始する。その後、24、48 および72 時間に、すべての試験容器について生物量を測定する。通常は対照区における生物量が72時間の培養で100倍以上となる。なお、生物量は直接計測する事が困難であるため、細胞数、細胞容積（総体積）、クロロフィル濃度を測定してもよい。細胞数の計測には粒子計数装置を用いて行うのが簡便である。ただし、生物量以外の測定値を用いる場

合には当該測定値と生物量の関係を明らかにしておく。

藻類の変形等異常を確認するため、生物量の測定時に各試験溶液を少量スライドグラスにとり、100～400 倍の光学顕微鏡下で観察し、異常が見られた場合には記録する。

第 8 節 被験物質濃度等の測定

8.1 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EC₅₀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。また、暴露期間中に設定濃度より 20%以上変動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。さらに、揮発性あるいは分解性の物質など、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 時間間隔の分析を追加する。分析の感度、条件等により、試料が多量に必要な場合は、別に試験容器を作り、試験と同量の藻類を接種し、同様の条件で培養したものを用いる。

分析は、各試験濃度区について各濃度区から 1 容器、もしくは各連から一定量を採取した後混合した試験液を分析する。

(注意) 試験終了時の到達藻類濃度が同一濃度区の他の容器に比べて有意に低い、もしくは高いと判断された場合には、個々の容器の被験物質濃度を測定すべきである。各濃度から 1 容器、もしくは、混合したサンプルを分析してよいのは、各繰り返し間に差がないと判断された場合だけである。もし、差が生じていた場合にはすべての容器の濃度を測定する事が望ましい。

分析の前には、サンプルを遠心分離し、藻類を除去してから行う。

なお、分析法についてはサンプリング手法、前処理法、計測法（検出限界および測定限界、回収率、検量線、測定チャート等）を記録し、報告すること。

事前に被験物質の試験条件での安定性を確認し、十分な証拠がある場合には下記の濃度区を適用する。化審法では一律に全濃度区で試験開始時と終了時の測定が必要である。

例： 設定濃度	100 mg/L	100 mg/L	100 mg/L
初期実測濃度	90 mg/L	75 mg/L	85 mg/L
試験終了時実測濃度	85 mg/L	79 mg/L	60 mg/L
評価に用いる濃度	90, or 100 mg/L	75 mg/L	71 mg/L
	(より確からしい値)	(初期実測)	(幾何平均)

なお、被験物質濃度が著しく減少する場合には、試験困難物質として本ガイドラインの外、OECD ガイダンスドキュメント No.23 に従う。

8.2 試験環境の測定

暴露期間中、培養装置内の温度、光強度を少なくとも1日1回測定する。

試験溶液のpHを試験開始時及び終了時に測定する。少なくとも、試験終了時のpHは、すべての容器について測定することが望ましい。暴露期間中、対照区（助剤対照区を含む。）のpHは通常の場合、1.5以上変動しない。

第9節 試験の有効性

Pseudokirchneriella subcapitata 及び *Desmodesmus subspicatus* では、以下の条件を満たさない場合、試験を不成立とし、再試験を行う。

- ・ 対照区（助剤対照区を含む）の生物量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（助剤対照区の毎日の生長速度の変動係数を含む）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（助剤対照区の繰り返し間の生長速度の変動係数を含む）が7%を超えないこと

日間変動係数および繰り返し間変動係数の算出例

藻類密度				平均生長速度	区間生長速度			CV
0h	24h	48h	72h	0-72h	0-24h	24-48h	48-72h	
0.5	4.35	32.1	80.3	1.69	2.16	2.00	0.92	0.40
0.5	4.36	29.4	83.9	1.71	2.17	1.91	1.05	0.34
0.5	3.99	30.4	86.4	1.72	2.08	2.03	1.04	0.34
0.5	3.83	36.55	107	1.79	2.04	2.26	1.07	0.35
0.5	4.11	31.35	91.6	1.74	2.11	2.03	1.07	0.33
0.5	3.57	27.35	90.7	1.73	1.97	2.04	1.20	0.27
平均値				1.73	区間変動係数(平均)			34%
標準偏差				0.03				
繰り返し間変動係数				2%				

- ・ pH の変動は試験の妥当性の基準とはなっていないが、被験物質が金属化合物、または試験液中で部分的にイオン化する物質(特に pKa 値が試験水の pH に近い場合)では pH の違いが毒性の強弱に関わるため、可能な限り一定にすることが求められる。

第 10 節 試験結果の算出

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。平均値の算出は、濃度変動が分解等による減少と考えられる場合には幾何平均や時間加重平均を、分析誤差によるものと考えられる場合は算術平均により行う。

暴露期間中、被験物質濃度が設定濃度または初期実測濃度の $\pm 20\%$ 以内に保たれていなかった場合は、暴露期間中の測定濃度の幾何平均を用いて結果の算出を行う。また、分析が困難な物質や極めて不安定な物質で設定値を用いることに合理性がある場合はその旨を報告書に記載し、設定値を採用してもよい。予想される主な減少理由(例：揮発、加水分解、光分解等)を報告書に記載する。

各試験濃度区と対照区(助剤対照区を含む。)の生物量を暴露期間と被験物質濃度とともに表にする。各試験濃度区と対照区(助剤対照区を含む。)について、生物量の繰り返しの間の平均値を時間に対してプロットし、生長曲線を描く(図 10.1)。このとき、対照区(助剤対照区を含む。)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。

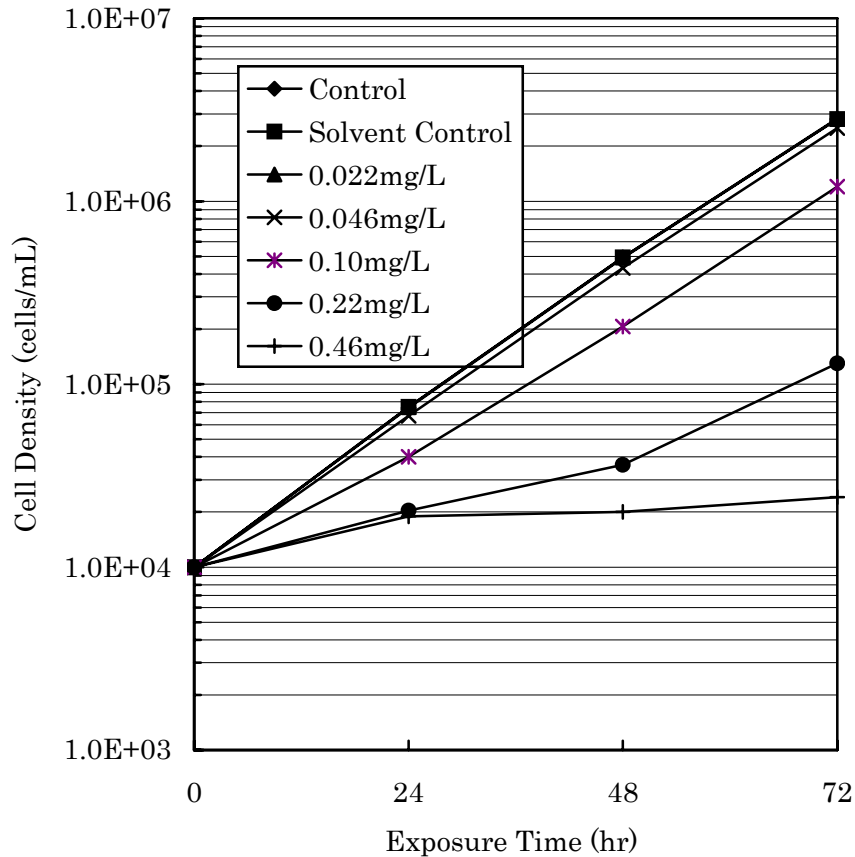


図 10.1 Algal Growth Curve of *Pseudokirchneriella subcapitata*

出典) 住化テクノサービス株式会社(2001): 平成 12 年度生態影響試験最終報告書,
(5H-Dibenzo[a,d]cyclohepten-5-one)

被験物質濃度と影響の関係は、10.1 に示す速度法を用いて計算する。なお、限度試験の場合には、対照区（助剤対照区を設けている場合には助剤対照区）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。

10.1 生長速度の比較（速度法）

指数関数的に増殖しているときの生長速度は、各々の試験容器について次のようにして計算される。

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i}$$

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。
- X_i = t_i 時の生物量。試験開始時(t_0)の生物量については設定値を用いる。
- X_j = t_j 時の生物量。
- t_i = 暴露開始後*i*回目に生物量を測定した時間(d)
- t_j = 暴露開始後*j*回目に生物量を測定した時間(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。なお、生長速度は、生物量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(助剤対照区を設けている場合には助剤対照区)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。

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

10.2 毒性値の算出

(1) 50%生長阻害濃度 (EC₅₀) の算出

I_μ の値を被験物質濃度の対数に対してプロットする(例: 図 10.2)。その回帰式等を用いて50%生長阻害濃度を求める。 I_μ より導かれたEC₅₀はErC₅₀と表す。

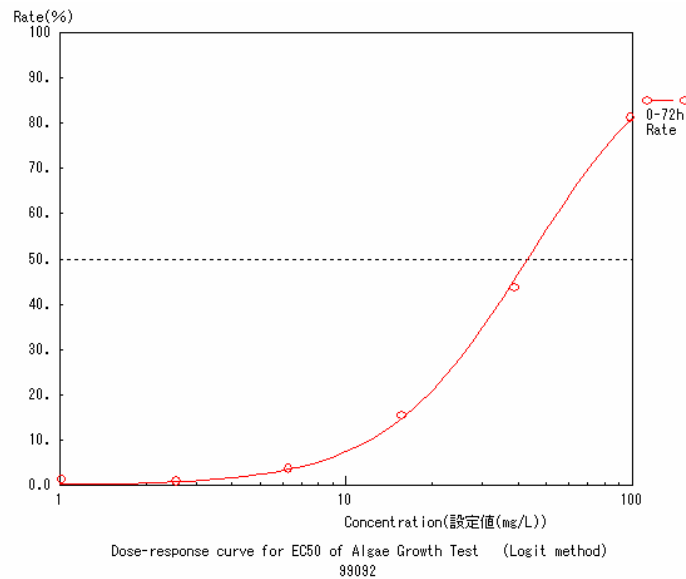


図 10.2 Concentration-Inhibition Curve Based on I_μ Values Calculated from the Growth Rates

出典：(財) 化学物質評価研究機構 (2004)：平成 15 年度生態影響試験最終報告書 (m-ニトロアニリン) の結果を基に作成

(2) 最大無作用濃度(NOEC)

統計的手法*により対照区（助剤対照区を設けている場合には助剤対照区）と比較して有意差の認められない最高試験濃度を最大無作用濃度(NOEC)とする。速度法により求めた場合はNOEC（速度法 0-72hr）と記載する。

*例：多群の比較； Bartlett の等分散検定、一元配置分散分析（ANOVA）、Dunnnett または Williams の多重比較検定
2群の比較； F 検定および Student の t 検定を用いる。

文献・資料

(1) 基本とした資料

本書の作成に当たっては以下の資料を基にした。

- ・ 厚生労働省・経済産業省・環境省（2003）：新規化学物質等に係る試験の方法について（平成 15 年 11 月 21 日 薬食発第 1121002 号、平成 15・11・13 製局第 2 号、環保企発第 031121002 号）「化学物質の藻類生長阻害試験、ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験 IV 藻類生長阻害試験
- ・ 厚生労働省・経済産業省・環境省（2006）：「新規化学物質等に係る試験の方法について」の一部改正について（平成 18 年 11 月 20 日 薬食発第 1120001 号、平成 18・11・13 製局第 2 号、環保企発第 061120001 号）
- ・ OECD（2006）：OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS PROPOSAL FOR UPDATING GUIDELINE 201, Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test:pp.25.

(2) 引用文献

- 1) 笠井文絵（2003）：藻類 第 2 章藻類・ウキクサ・陸生植物，日本環境毒性学会編 生態影響試験ハンドブックー化学物質の環境リスク評価ー，朝倉書店:26-37.
- 2) ISO（1999）：Water QualityーGuidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waste water, ISO 14442:pp.14.
- 3) American Society For Testing and Materials（1997）：Standard Guide for Conducting Static 96-h Toxicity Tests with Microalga1,E 1218 -97a:pp.14.

(3) 参考文献・資料

- 1) 種名の変更については以下の知見が参考になる。
- ・ J.W.G. Lund(2003) : <http://windermere.ceh.ac.uk/fritsch/Features.htm>
 - ・ Nygaard, G., Komarek, J., Kristiansen, J. & Skulberg, O.M. 1986. Taxonomic designations

of the bioassay alga NIVA-CHL-1 ("*Selenastrum capricornutum*") and some related strains. *Opera Botanica* 90:5-46

2) 引用文献以外の藻類の培養、藻類生長阻害試験については以下の知見が参考になる。

- American Society For Testing and Materials (1998) : Standard Practice for Algal Growth Potential testing with *Selenastrum capricornutum*, D 3978 –80:pp.5.
- Environmental Canada(1992):Biological Test Method: Growth Inhibition Test Using the Freshwater Alga *Selenastrum capricornutum*, Report EPS 1/RM/25:pp.41.
- ISO (1989) : Water Quality-Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*, ISO 8692:pp.6.
- 茂岡忠義 (2003) : 藻類生長阻害試験－OECD 化学品テストガイドラインに準拠した試験方法－, 第2章藻類・ウキクサ・陸生植物, 日本環境毒性学会編 生態影響試験ハンドブック－化学物質の環境リスク評価－,朝倉書店:38-43.
- 西澤一俊・千原光雄編(1974) : 藻類研究法、共立出版:pp.754.

3) 試験困難物質の試験については以下の知見が参考になる。

- OECD(2000) : OECD SERIES ON TESTING AND ASSESSMENT Number 23,
- GUIDANCE DOCUMENT ON AQUATIC TOXICITY TESTING OF DIFFICULT SUBSTANCES AND MIXTURES

4) 毒性値の統計解析手法については以下の知見が参考になる。

- American Society For Testing and Materials (2003) : Standard Practice for Statistical Analysis of Toxicity Tests Conducted Under ASTM Guidelines, E 1847 –96:pp.10.
- OECD(2006) : OECD SERIES ON TESTING AND ASSESSMENT Number 54, CURRENT APPROACHES IN THE STATISTICAL GUIDANCE TO APPLICATION - ANNEXES

参考資料 試験結果のとりまとめに必要な表の例

藻類の生長阻害試験をとりまとめる際に必要な表を、例として以下に示した。

表 1. *Cell Densities of Pseudokirchneriella subcapitata during the 72-Hour Exposure*

Nominal Concentration (Measured Conc. at 0 Hr)		Cell Density (cells/mL)			
(mg/L)	Vessel No.	0 Hour	24 Hours	48 Hours	72 Hours
Control	1	10000	63920	407600	2433000
	2	10000	63340	401900	2394600
	3	10000	66720	418600	2370600
	Average	10000	64660	409367	2399400
	SD	0	1807	8489	31476
10 (10)	1	10000	63780	436700	2731000
	2	10000	64900	457700	2962000
	3	10000	65520	461500	2809600
	Average	10000	64733	451967	2834200
	SD	0	882	13357	117448
18 (18)	1	10000	61860	432400	2774600
	2	10000	61300	434400	2643200
	3	10000	62720	433400	2734000
	Average	10000	61960	433400	2717267
	SD	0	715	1000	67279
32 (32)	1	10000	56900	404400	2437200
	2	10000	57360	398200	2551800
	3	10000	59300	404000	2571400
	Average	10000	57853	402200	2520133
	SD	0	1274	3470	72488
56 (56)	1	10000	48700	297000	1920000
	2	10000	49440	308200	1904000
	3	10000	47200	284000	1873000
	Average	10000	48447	296400	1899000
	SD	0	1141	12111	23896
100 (100)	1	10000	27560	83400	335500
	2	10000	26540	85400	321100
	3	10000	27380	91200	354800
	Average	10000	27160	86667	337133
	SD	0	544	4051	16909

SD: Standard Deviation

表2 Percent Growth Inhibition of *Pseudokirchneriella subcapitata*

Nominal Concentration (Mean Measured Conc.)		Growth Rate	
(mg/L)	Vessel No.	Rate μ (0-72)	Inhibition (%) ^{*1} $I \mu$ (0-72)
Control	1	1.6930	
	2	1.7076	
	3	1.7176	
	4	1.7887	
	5	1.7367	
	6	1.7334	
	Average SD	1.7295 0.0332	0.00
0.22 (-)	1	1.7933	
	2	1.7183	
	3	1.7038	
	Average SD	1.7385 0.0480	-0.52
0.46 (0.34)	1	1.7694	
	2	1.7339	
	3	1.7108	
	Average SD	1.7380 0.0295	-0.50NS
1.0 (0.72)	1	1.6952	
	2	1.6770	
	3	1.6740	
	Average SD	1.6821 0.0115	2.74NS
2.2 (1.63)	1	1.3164	
	2	1.0809	
	3	0.9776	
	Average SD	1.1250 0.1737	34.95**
4.6 (3.40)	1	0.3526	
	2	0.3640	
	3	0.5325	
	Average SD	0.4163 0.1007	75.93**
	1	0.3595	

10 (7.57)	2	0.2718	
	3	0.2918	
	Average	0.3077	82.21**
	SD	0.0459	

表3. Measured Concentrations of the Test Substance in Test Water

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)			
	0 Hour	Percent of Nominal	72 Hours	Percent of Nominal
Control	<0.1	—	<0.1	—
10	10	100	10	100
18	18	100	18	100
32	32	100	33	103
56	56	100	58	104
100	100	100	100	100

表4. pH Values

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration at 0 Hr (mg/L)	Vessel No.	pH	
			0 Hour	72 Hours
Control	-	1	7.7	9.9
10	10	1	7.7	9.7
18	18	1	7.8	9.9
32	32	1	7.8	9.3
56	56	1	7.8	8.8
100	100	1	7.7	8.0

表5. Daily Temperature, Light Intensity and Revolution in the Incubation Chamber

Exposure Period (Hours)	Temperature (°C)	Light Intensity (lx)	Revolution (rpm)
0	23.1	4200~4600	100
24	22.9	4300~4600	100
48	22.9	4100~4400	100
72	22.8	4100~4400	100
Range	22.8~23.1	4100~4600	100

出典) 表 1、3～5 : 住化テクノサービス (株) (2003) : 平成 14 年度生態影響試験最終報告書 (N,N-ジエチル-3-メチルベンズアミド)
表 2 : (株) クレハ分析センター (2005) : 平成 16 年度生態影響試験最終報告書 (3,4-ジクロロニトロベンゼン) 一部改定