

希釈水および対照区	OECD 培地	活性炭濾過上水	活性炭濾過上水
試験濃度区	4～6 濃度区＋対照区		
希釈系列	最高濃度のストック溶液を希釈水により公比 2（適宜）で希釈		
エンドポイント	生長（細胞数、増殖速度）	生残と産仔数	孵化率、孵化後生存率、生存率、生存指標

【参考】生物毒性試験実施作業手順

藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) 繁殖阻害試験法

1. 供試生物種

試験には、単細胞緑藻類であるムレミカツキモ *Pseudokirchneriella subcapitata*（旧称 *Selenastrum capricornutum* Printz）を用いる。

入手後の管理は C 培地（付表 A）を用いて無菌的に継代培養を行う。

本株の感受性は対照物質として、重クロム酸カリウムを用いて確認した。重クロム酸カリウム（pH 7.8）に対する EC50 は、1.1538mg/L（95%信頼限界：1.0695<\* < 1.2549）であった。

2. 試験の概要

本試験は、対象化学物質が藻類生長に与える影響を調べる。

藻類の標準培地（OECD 培地）中で藻類を培養し、培地中に被験物質を添加した場合と添加しない場合との間で、増殖した細胞数にどのような変化が生じるか、観察を行う。その細胞数の変化から増殖速度を計算し、藻類生長への影響を評価する手法である。OECD テストガイドライン TG201 及び化審法の藻類試験法として示されている。

3. 供試個体を得るための培養方法

3. 1 培地

次の組成の OECD 培地（付表 B）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

これらを直接超純水（ミリ Q 水）添加する。ろ過滅菌は、0.22 μm 孔径のフィルターを用い

る。pHを測定し、必要ならば pH7.5~8.5 の範囲に、NaOH または HCl で調整する。

### 3. 2 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。

1) 250mL の三角フラスコに 100mL の試験培地を入れる。

2) 滅菌したピペットを用いて、試験細胞数が約 5,000 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。

3) 温度  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、照度約  $60\text{--}80 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ 、連続照射光の条件下で、振とう培養する。

4) 毎日、細胞数を計数し、生物数が  $0.5\text{--}1 \times 10^6$  cells/mL に達した時点で本試験に供する。

5) 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  $0.5\text{--}1 \times 10^6$  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。

## 4. 試験方法

### 4. 1 試験条件

試験容器は滅菌したものを使用し、必要に応じてその他の器具の滅菌を行った。また、藻類の接種も無菌条件下で行った。

暴露方式： 止水式、振とう培養 (100rpm)

暴露期間： 72 時間

試験液量： 100mL

連数： 3 容器/試験区、6 容器/対照区

初期細胞濃度： 前培養した藻類  $5 \times 10^3$  cells/mL

試験温度：  $23 \pm 2^\circ\text{C}$

照明：  $60\text{--}120 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$

pH： 試験液の pH は 7.8~8.0 に調整した

### 4. 2 試験容器、藻類培養試験装置及び機器

試験容器： 300mL 容量ガラス製三角フラスコ (金属栓)

藻類培養試験装置： 振とう培養器 TB-30RLVS /高崎科学器械株式会社

光学顕微鏡： システム生物顕微鏡 B×51 /OLYMPUS

粒子計数装置： 粒子計数分析装置 CDA-500

粒子分布解析装置： PDA-500 /Sysmex 株式会社

pH 計： pH METER, D-51 /HORIBA

照度計： Light Meter LI-250 LI-COR Radiation Sensor LI190SA Quantum Sensor /LI-COR, Inc.

### 4. 3 試験溶液の調製と濃度の設定

試験溶液は、被験物質を OECD 培地に溶解して作成する。

最高濃度は、EC50 等の指標値の計算に十分な阻害が生じる濃度とする。なお、毒性が弱く十分な阻害を生じさせるために高濃度曝露が必要となる場合には、「100mg/L」、または「被験物質の水溶解限度」を最大濃度とし、それ以上の濃度における試験は行わない。

最低濃度は、阻害率に対照区との有意差がなくなり、NOEC が算出できる濃度とする。

希釈における公比は 2 で設定する。1 濃度区における繰り返し数は、3 連で実施する。

#### 4. 4 試験操作

前培養した藻類の細胞数を計測し、温度を  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  にした試験溶液中に細胞濃度が  $5 \times 10^3$  cells/mL となるように、前培養液の一定量を試験溶液の入った容器に添加する。各試験容器を培養装置に設置し、曝露を開始する。細胞濃度は、測定時間毎に、各試験容器より試験溶液約 1mL を採取し、粒子計数装置を用いて計数する。また、異常があった時には、試験終了時の細胞の形態観察を顕微鏡下で行う。

試験区における pH は、曝露終了時に測定する。曝露期間中、培養装置内の温度及び照度を少なくとも 1 日 1 回測定する。

#### 4. 5 試験成立の条件

以下の条件を満たさない場合、試験を不成立とし、再試験を行った。

- ・対照区（助剤対照区を含む）の生物量が、曝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、曝露期間を通じて 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

### 5. 統計処理

#### 5. 1 生長曲線

試験区および対照区の細胞濃度の平均値を時間に対してプロットし、生長曲線を作成する。このとき、対照区の生長曲線が、曝露機関を通じて指数増殖期にあることを確認する。

#### 5. 2 生長阻害率の算出

生長速度の比較（速度法）

対数増殖（指数生長）している培養条件における細胞濃度の平均の生長速度（ $\mu$ ）は、次の式より算出した。

$$\mu_{i-j} = (\ln N_j - \ln N_i) / (t_j - t_i)$$

$\mu_{i-j}$  :  $t_i$  時から  $t_j$  時までの、通常日当たりの期間の生長速度。

$N_i$  :  $t_i$  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た。

$N_j$  :  $t_j$  時の実測細胞濃度 (cells/mL)

$t_i$  : 曝露開始後  $i$  回目に細胞濃度を測定した時間

$t_j$  : 曝露開始後  $j$  回目に細胞濃度を測定した時間

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、対照区の 1 日毎の生長速度を求め、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。

各試験濃度区における生長（速度）阻害率（ $I\mu$ ）は、対照区の生長速度の平均値（ $\mu c$ ）と各試験濃度区での生長速度の平均値（ $\mu t$ ）との間の差として次のように計算した。

$$I\mu = (\mu c - \mu t) / \mu c \times 100$$

$\mu c$  : 対照区の平均生長速度

$\mu t$  : 各濃度区における平均生長速度

### 5. 3 50%生長阻害濃度（EC50）の算出

$I\mu$  または  $IA$  の値を被験物質濃度の対数に対してプロットし、回帰式等を用いて 50% 阻害濃度を求める。

### 5. 3 最大無影響濃度（NOEC）

統計的手法により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。

(付表 A) C 培地の組成および調製方法

以下の成分を精製水で 2L に定容とし pH を HCl または NaOH で 7.5 とする。

C 培地

	Stock Solution	
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	10 mg/ml	30 ml
KNO <sub>3</sub>	10 mg/ml	20 ml
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	10 mg/ml	8 ml
β-グリセロリン酸ナトリウム	10 mg/ml	10 ml
チアミン	10 mg/ml	0.2 ml
ビタミン B12	100 μg/ml	0.2 ml
ビオチン	1 μg/ml	0.2 ml
PIVメタル	1 μg/ml	6 ml
Tris		1 g
DW		1930 ml

pH 調製：1N-HCl または 1N-NaOH で 7.5 に調整。ただし、添加量は 4ml 以下

PIVメタル

	Stock Solution		
DW			965 ml
Na <sub>2</sub> EDTA			1 g
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.5 g / 50ml		19.6 ml
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.5 g / 50ml		3.6 ml
ZnCl <sub>2</sub>	0.5 g / 50ml	10 倍希釈	10.5 ml ①
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.5 g / 50ml	10 倍希釈	0.4 ml ②
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.5 g / 50ml	10 倍希釈	1.25 ml ②

① ZnCl<sub>2</sub> 0.5 g を精製水 50ml に溶解する。塩酸をパスツールピペットで 1～2 滴入れ（透明になる）完全に溶かす。この溶液を 1/10 に希釈する。

② CoCl<sub>2</sub> 0.5 g を精製水 50mL に溶解する。この溶液を 1/10 希釈する。

\* PIVメタルは金属が過剰に溶解しているため、冷蔵庫の中で沈殿が生じる場合がある。その際は塩酸を少し加えると溶解する。

(付表 B) OECD 推奨培地の組成および調製方法

(OECD テストガイドライン 201, Alga, Growth Inhibition Test (1984))

以下の成分を精製水で 1L に定容とする。pH は約 8 である。

OECD 培地

	Stock Solution	OECD medium	
		1L	2L
HBO <sub>3</sub>	100 μg/ml	1.85 ml	3.7 ml
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	100 μg/ml	4.15 ml	8.3 ml
ZnCl <sub>2</sub>	10 μg/ml	0.3 ml	0.6 ml
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	100 μg/ml	0.8 ml	1.6 ml
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	100 μg/ml	1 ml	2 ml
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	10 μg/ml	0.15 ml	0.3 ml
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	10 μg/ml	0.7 ml	1.4 ml
CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.1 μg/ml	0.1 ml	0.2 ml
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	10 mg/ml	1.8 ml	3.6 ml
NH <sub>4</sub> Cl	10 mg/ml	1.5 ml	3 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 mg/ml	1.6 ml	3.2 ml
NaHCO <sub>3</sub>	10 mg/ml	5 ml	10 ml
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	10 mg/ml	1.2 ml	2.4 ml
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	10 mg/ml	1.5 ml	3 ml
DW		980 ml	1960 ml

(977)

pH

約 8 になっているかどうかチェックする。

0.1N NaOH 1 滴半加えて 8.0 にあわせる。

表 OECD 培地の組成

Nutrient	Concentration (mg/L)
HBO <sub>3</sub>	0.185
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.415
ZnCl <sub>2</sub>	0.003
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.08
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	0.1
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.0015
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.007
CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.00001
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	18
NH <sub>4</sub> Cl	15
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.6
NaHCO <sub>3</sub>	50
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	12
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	15
DW	980 ml

## 【参考】ニセネコゼミジンコを用いた亜急性毒性試験法

### 1. 供試生物種

*Ceriodaphnia dubia* の和名は「ニセネコゼミジンコ」であり、親虫は体長 0.9~1.0mm、仔虫は 0.1mm 程度の小型のミジンコである。今回の試験では、1994 年に US-EPA から分与してもらい独立行政法人・国立環境研究所にて継代飼育されている遺伝系統を、当施設甲殻類・水生昆虫試験室において飼育・繁殖させて使用した。ニセネコゼミジンコの寿命は約 3 週間であり、60 日以上生存するオオミジンコ (*Daphnia magna*) よりライフサイクルは短い。

### 2. 試験の概要

カナダ環境省によるミジンコ亜急性毒性試験 “Test of Reproduction and Survival Using the Cladoceran *Ceriodaphnia dubia*” (Environment Canada, 2007) を参考とした試験方法である。単為生殖で増殖するミジンコの特徴をいかし、一定期間 (7-8 日) にメスが産む仔虫の数が、被験物質中で変化 (減少) することを影響の指標とする試験である。試験を安定して行うためには、対照群における産仔数を、試験間である程度一定に保つことが重要であり、そのためには餌の量、pH、温度、溶存酸素、硬度などの水質要件を厳密に管理する必要がある。

### 3. 供試個体を得るための飼育方法

#### 3. 1 飼育水

淡水処理装置で製造した「調温清浄濾過水」を、 $25 \pm 1^\circ\text{C}$  で一晚エアレーションしながら放置する。その後、溶存酸素量が 90% になるように、再度エアレーションを行う。次に、pH を測定し、必要ならば pH 6.5~8.5 の範囲に NaOH または HCl で調整する。US-EPA から分与された飼育開始当初の硬度は 220mg/l ( $\text{CaCO}_3$  として) であったが、日本の環境水は軟水であるため、徐々に硬度を上げて飼育し、試験開始時までには調温清浄濾過水の原水である水道水と同じ 80mg/l 前後に馴化した。調温清浄濾過水の水質は飼育・試験用水として適当であることを分析によって確認した。

#### 3. 2 飼育方法

最初に継代飼育及び馴化のための大量飼育を行う。試験に用いる少なくとも 3 週間前から、30~40 匹のミジンコを 500ml ビーカーで飼育し、馴化を行う。

大量飼育は週に 3 回全換水し、換水時に仔虫は捨てる。生後 1 週間以上経過した成熟個体から生まれたメス仔虫を毎週あたらしい世代培養用の個体とし、継代を行う。試験を毎週定期的に開始するために、1 週間ずつ開始時期をずらした大量飼育群を用意する。

餌は、YCT (Marinco Bioassay Laboratory, Inc., FL, USA) と単細胞緑藻クロレラ (*Chlorella vulgaris*、クロレラ工業株式会社より購入) を与えた。YCT は、30ml あたり  $100 \mu\text{l}$ 、クロレラは約  $1.4 \times 10^6$  cells/ml の濃度に維持されるように毎日与える。

以上の飼育培養は、甲殻類・水生昆虫試験室において、水温  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、明期 16 時間・暗期 8 時間の日長条件に設定したクロマトチャンバー内で行う。

換水時など、ミジンコを取り扱う場合には、個体を痛めないため、1ml 容量の使い捨てガラスピペットの先端を切って直径 3mm 程度に穴を広げ、切り口をバーナーで焼いてなめらかにしたものを使用する。ミジンコは空気に触れないように水と一緒に移動させつつ、水の持ち込みはできるだけ最小限にとどめるようにする。



### 3. 3 供試個体の準備

試験には、生後 1 週間以上経過した成熟個体から 24 時間以内に生まれてきたメス仔虫を用いる。仔虫は生後 24 時間以内であり、かつ供試仔虫の成長のばらつきは 12 時間以内でなくてはならない。しかし、実際上は 8 時間以内の仔虫を得ようとするとき夜中に換水や試験を行わなくてはならないため、仔虫の大きさを目視で確認し、ある程度大きさをそろえることで対応する。

試験開始前日には、生後 1 週間以上経過した成熟個体のうち、育房内に発生途中の胚を持つ個体を選び出し、30ml の調温清浄濾過水を満たした 50ml ガラス製カップで、YCT (30ml あたり 100  $\mu$ l) と餌のクロレラを濃度が  $1.4 \times 10^6$  cells/ml 程度になるように与えて、個別飼育を行う。翌日、カップを調べて、仔虫を産出したカップのうち、肉眼で仔虫の健康に異常が認められないものだけを試験に用いる。なお、試験に用いる仔虫を得るための親個体は、試験の繰り返し回数 (N=10) だけ用意する。

### 4. 試験方法及び条件等

#### 4. 1 試験条件

曝露方式： 半止水式 (週 3 回換水)  
曝露期間： 7-8 日間  
試験液量： 30ml / カップ  
連数： 10 カップ / 濃度区  
供試生物数： 10 個体 / 濃度区 (1 個体 / カップ)  
試験濃度： 公比 2、6 - 7 濃度区 (対照区を含む)  
試験温度：  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  (週一回測定)  
溶存酸素濃度： 80%-99% (週 3 回測定)

サンプルの溶存酸素量が 40~100% の場合には、エアレーションは行わなくともよい。40% 未満の場合には、15~30 分間エアレーションを行い、溶存酸素量を 90~100% にしてから試験を行う。

pH： 6.5~8.5, pH の調整には 1N の HCl または NaOH を用いる。  
硬度： 75-85 mg/l  
照明： 室内光で、明期 16 時間、暗期 8 時間の日長条件  
餌： 単細胞緑藻クロレラ (*Chlorella vulgaris*、クロレラ工業株式会社より購入)  
YCT (Marinco Bioassay Laboratory, Inc., FL, USA)  
給餌量： クロレラは、 $1.4 \times 10^6$  cells/ml 程度の濃度になるように毎日給餌を行う。  
YCT は、毎日 30ml に対して 100  $\mu$ l ずつ与える。  
試験容器： 50ml ガラス製カップ

#### 4. 2 環境測定機器

水温計： 棒状標準温度計  
pH/DO 計： HORIBA 社製 pH/DO メーター D-55

#### 4. 3 試験装置

試験は、甲殻類・水生昆虫試験室で行うのが望ましい。例えば、甲殻類・水生昆虫試験室に設置したクロマトチェンバー内で行う。

#### 4. 4 試験操作

試験における同一濃度での繰り返し数は10、被験物質の希釈倍率は2とする。同じ親から産まれた同一腹仔の仔虫をすべての希釈段階に配置し、これを一群とするのが好ましい。その群を繰り返し数(10)だけ用意する。

毎日ミジンコの生死観察と産まれた仔虫の計数を行い、観察結果を記録用紙に記入する。試験は、対照群の試験個体の60%あるいはそれ以上が3腹産んだ時点で終了し、最長でも試験期間は8日間とし、他の暴露区の産仔数も集計する。

#### 4. 5 試験液の調製

飼育水に、直接、被験物質を溶解させて調製、あるいは助剤としてジメチルホルムアミド(DMF)を用いたストックソリューションを用意してから試験液の調製を行う。試験液は、ストックソリューションを10000倍に希釈し、助剤濃度が0.01%(v/v)になるようにして調製する。

対照及び試験水の希釈には飼育水を用いる。

#### 4. 6 試験成立の条件

以下のいずれかに該当する場合には、試験は不成立であったと見なす。

- ・対照群の試験個体の死亡率が、20%を超える場合
- ・8日間で対照群の少なくとも60%が、3腹産んでいない場合
- ・対照群における生存仔虫数が、最初の3腹で平均して15に満たない場合
- ・対照群において、休眠卵生産が確認された場合

#### 5. 統計処理

総産仔数は、まず一元配置の分散分析(ANOVA)で実験処理効果の統計学的有意性を5%のレベルで検定し、有意性が確認された場合には、さらに対照群あるいは助剤を用いた場合には助剤対照群と各濃度群との多重比較をDunnnett's testで行う。等分散性が満たされていないデータは、対数変換を行い、変換によって等分散性が満たされれば分散分析を行う。変数変換によっても等分散性が満たされない場合には、ノンパラメトリック検定を行う。これらの解析は解析ソフトJMP(Ver. 6.0.3, SAS Institute, Inc., Japan)を用いて行うことができる。

また槐堀のデータについては、産仔数が対照群の半数になる濃度(EC50値)の推定を行う。EC50値は、まずサンプルの対数濃度に対する産仔数の変化の関係をロジスティック回帰モデルにあてはめ、得られた係数の推定値から算出する。統計ソフトはR(R Development Core Team, 2009)を用いることができる。

#### 6. 引用文献

- 1) Environment Canada (2007) Biological Test Method: Test of Reproduction and Survival Using the Cladoceran *Ceriodaphnia dubia*. 74pp.
- 2) R Development Core Team. 2009. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, <http://www.R-project.org>

## 【参考】ゼブラフィッシュを用いた延長魚胚毒性試験

### 1. 試験の概要

受精直後の卵が胚を経て孵化し、卵黄を吸収して仔魚として生育するまでの過程（9日間）における、生存及び成長に、被験物質の存在が及ぼす影響（主に死亡率）を指標とする。

OECDのテストガイドラインである「魚類の胚・仔魚期における短期毒性試験(Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages [TG212])」及びOECDのドラフトガイドラインとして提案されている「魚類胚毒性試験(Fish Embryo Toxicity (FET) Test)」に準じつつ、一部を改変した手法を示す。

この試験は、卵から胚・孵化・摂餌を開始するまでの成長という生活史の中の重要かつ複数の段階に対する影響を把握できることから、成長に長い時間が必要で世代交代を含めた慢性毒性試験の実施が困難である魚類への影響を検討する際に、慢性毒性に相当する指標を推定できる手法として有効と考えられる。

また、この試験の曝露期間における供試生物の発生は卵から胚の段階であることから、生物個体としては確立していない状態とみなされ、動物愛護の視点から実験によって必要以上に生物に苦痛を与えることを避けるためにも適していると考えられる。

### 2. 供試生物種

本試験においては、ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) を用いる。

この魚種は、OECDのテストガイドラインをはじめとする、魚類毒性試験の多くの標準法において指定または推奨生物種となっており、幅広く試験に用いられている。

ゼブラフィッシュは、卵から孵化するまでの期間が約4日間である。一方、魚類毒性試験に多く使用されている別の魚種であるメダカ (*Oryzias latipes*) は、卵から孵化まで8~10日を要する。このことから、ゼブラフィッシュは、卵から胚発生を経て摂餌前の仔魚に至るまでの段階に与える影響を、より短期間で把握することが出来るという利点がある。

### 3. 試験方法

#### 3. 1 試験に用いる受精卵の採取

##### 3. 1. 1 親魚の飼育条件

親魚の飼育は、温度が $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ に設定された室内に設置したガラス水槽中で行う。飼育に用いる水は、淡水処理装置で処理された“調温清浄濾過水（以後「飼育水」）”を約300mL/minの流速で連続して水槽内に注入・排水して流水式で行う。採卵に用いる親魚は、誕生後4~12ヶ月程度の個体を使用する。採卵前の期間は、オスとメスを別々の水槽に隔離し、1水槽あたりオス約30個体、メス約20個体の密度で飼育する。

##### 3. 1. 2 受精卵の採取条件

###### 1) 親魚のペアリング

試験のために採卵する前日の17時前後に、オスとメスを同じ産卵用水槽中に移動する。産卵用の水槽はガラス製で容量10Lのものを3個用意し、沈降卵である事、及び親魚が食べるのを防

ぐため、水槽の底には直径1～1.5cmのガラスビーズを敷き詰める。また、1水槽あたりの個体数は、オス10個体前後、メス6個体前後とし、使用する水は上述の親魚の飼育と同じ飼育水を用いる。

その後、水槽全体を暗箱で覆い、暗条件として翌日まで静置する。

## 2) 産卵の開始

前日に用意した水槽を覆っている暗箱を取り外し、明条件とすることが刺激となり産卵行動が開始され、放卵・放精が行われる。1.5時間程度の間、受精卵が得られる。

## 3) 採卵

放卵後、受精卵は水槽の底に敷き詰めたビーズの隙間に落ち込み、親魚からの接触を受けなくなる。放卵終了後、産卵用水槽から親魚を取り除き、水槽中のガラスビーズとともに、卵を目合い2mm程度のステンレスネット上に移し、ネットを通過した卵を回収する。

## 4) 受精卵の選別

回収した卵は、未受精卵を含むため、実体顕微鏡下で、卵の中が空洞や白濁していないこと、かつ細胞分裂による細胞塊が確認できること、形が球形でゆがみのないことなどに基づいて、観察し受精卵を選別する。選別した受精卵は、胚発生段階が原腸陥入完了前のものを試験に用いることから、産卵のために暗条件から明条件に変化させた後、4時間以内に試験水への曝露が開始されるように作業を行う。

## 3. 2 曝露方法

### 1) 試験溶液の調整

希釈系列における最高濃度は、EC50等の指標値の計算が可能となる十分な阻害が生じる濃度とする。毒性が弱く、十分な阻害を生じさせるために高濃度が必要となる場合には、「100mg/L」、または「被験物質の水溶解限度」を最大濃度とし、これ以上の濃度における試験は行わないこととする。

最低濃度は阻害率に対照区との有意差がなくなり、NOECが算出できる濃度とする。希釈における公比は、2で設定する。1濃度区における繰り返し数は、4とする。

サンプル水及び希釈に用いる飼育水は、試験開始前に温水浴によって試験温度である $26 \pm 1^\circ\text{C}$ まで加温してから使用する。

### 2) 曝露条件

曝露方式：	半止水式（48時間毎換水）
曝露期間：	9日間
曝露容器：	ガラス製カップ（Φ50×55mm）
試験液量：	50mL／カップ
連数：	2カップ／濃度区
供試生物数：	15個体／カップ
試験温度：	$26 \pm 0.5^\circ\text{C}$ （曝露装置のインキュベーターで調温）
pH：	6.5～8.5
溶存酸素濃度：	溶存酸素濃度が酸素飽和度の60～100%の範囲（およそ5mg/L以上）
照明：	明期：暗期＝16：8の長日条件
給餌：	なし

### 3) 換水方法

容量の約90%にあたる曝露容器中の試験水を、ピペットで除去した後、新たに調整した試験水を追加する。除去した供試後の水は、水質の測定に供する。

### 3. 3 観察記録

#### 1) 観察・測定項目及び方法

##### i) 生物

24時間毎に、孵化、死亡（孵化前、孵化後）、形態異常、行動異常等を観察する。卵の死亡判定指標は、器官形成前においては卵黄の白濁及び胚の萎縮、器官形成後においては心臓の拍動及び体の動きを判断基準とする。仔魚の死亡判定指標は、遊泳、ヒレの動き、口の開閉、心臓の拍動、血流の有無、体の白濁を判断基準とした。形態異常の判別には、発生停止、眼球形成不全、脊索異常、水泡を用いる。行動異常の判別には、体勢維持不能及び遊泳不能等を用いる。死亡数、生存卵数及び生存仔魚数について記録する。

##### ii) 水質

試験開始時及び48時間毎の換水時に、ガラス電極法によりpH、隔膜電極法により溶存酸素濃度、棒状標準温度計を用いて水温を測定する。その他、測定法として評価されている方法を用いてもよい。曝露前後の水質について記録する。

#### 3. 4 試験成立の条件

以下の条件に該当する場合は、試験は不成立であったとみなす。

- ・曝露開始1日目の生存卵数に対して、孵化した数が85%未満であった場合。
- ・溶存酸素濃度が飽和酸素濃度の60%未満であった場合。
- ・曝露装置内の温度が24.5～27.5℃の範囲を超えた場合。

#### 4. 生物影響指標の計算

生物影響の指標として、孵化率、仔魚生残率及び繁殖率を用いる。

##### 1) 孵化率

曝露した受精卵数に対して、孵化した仔魚の数（供試卵数と死亡卵数の差）の割合（%）を算出する。

##### 2) 仔魚生残率

孵化した仔魚の数に対して、9日目の試験終了時に生存している仔魚の数の割合（%）を算出する。

##### 3) 繁殖率

孵化率と仔魚生残率の積として割合（%）を算出する。

##### 4) 半数阻害濃度(EC50)の算出

繁殖率を試験濃度の対数値との関係としてプロットし、濃度依存的な関係が変化する部分の回帰式から、繁殖率が50%となる濃度を求め、半数阻害濃度とする。繁殖率は、各試験区の繁殖率（Bt）を対照区の繁殖率（Bc）で補正した値  $[Bt \div Bc \times 100]$  として計算する。

##### 5) 無影響濃度(NOEC)の算出

対照区と各濃度区と繁殖率についての多重比較をDunnett's testで行い、対照区と繁殖率に有意差がみられなくなる最高濃度をNOECとする。

【参考】表 活性汚泥呼吸阻害試験条件

	活性汚泥呼吸阻害試験 (TG218)
活性汚泥	財団法人 化学物質評価研究機構より購入した汚泥を培養
MLSS	約 4 g/L (純水にて希釈)
接触時間	3 時間
試験温度	20±2°C
曝気	1 L/min 程度
試験液容量	500 mL
合成下水(1 L)	ペプトン 16g, 肉エキス 11g, 尿素 3g, 塩化ナトリウム 0.7g, 塩化カルシウム 2水和物, 硫酸マグネシウム 7水和物 0.2g, リン酸水素二リウム 2.8g
曝露方法	水 250 mL に粉末を投入し、48 時間攪拌後、合成下水 200mL、活性汚泥 (MLSS 約 1.5g/L) と混合
濃度区あたりの繰り返し数	1 連
試験濃度区	3 濃度区 + 対照区 (基準物質は 5 濃度)
基準物質	3-5 ジクロロフェノール
エンドポイント	3 時間接触後の呼吸阻害

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tamura, I., Kagota, K., Yasuda, Y., Yoneda, S., Morita, J., Nakada, N., Kameda, Y., Kimura, K., Tatarazako, N., Yamamoto, H.	Ecotoxicity and screening level ecotoxicological risk assessment of five antimicrobial agents: triclosan, triclocarban, resorcinol, phenoxyethanol and	J. Appl. Toxicol.	33 (11)	1222- 1229	2013
Suzuki, T., Kosuge, Y., Hosaka, M., Nishimura, T., Nakae, D.	Occurrence and behavior of the chiral anti-inflammatory drug naproxen in an aquatic environment	Environ. Toxicol. Chem.	33 (12)	2671- 2678	2014



## IV. 研究成果の刊行物・別刷

# Ecotoxicity and screening level ecotoxicological risk assessment of five antimicrobial agents: triclosan, triclocarban, resorcinol, phenoxyethanol and *p*-thymol

Ikumi Tamura,<sup>a</sup> Kei-ichiro Kagota,<sup>a</sup> Yusuke Yasuda,<sup>a</sup> Saori Yoneda,<sup>b</sup> Junpei Morita,<sup>b</sup> Norihide Nakada,<sup>c</sup> Yutaka Kameda,<sup>d</sup> Kumiko Kimura,<sup>e</sup> Norihisa Tatarazako<sup>f</sup> and Hiroshi Yamamoto<sup>g\*</sup>

**ABSTRACT:** Acute and chronic (or sub-chronic) toxicity of five selected antimicrobial agents, including triclosan (TCS), triclocarban (TCC), resorcinol, phenoxyethanol and *p*-thymol, was investigated using the conventional three-aquatic-organism battery. These compounds are widely used in cosmetics and other personal care products and their ecological risk has recently become a significant concern. As results of toxicity tests, TCS was found to be most strongly toxic for green algae [e.g. 72 h no observed effect concentration (NOEC) of 0.50  $\mu\text{g l}^{-1}$ ] among the selected compounds, followed by TCC, while TCC was more toxic or similar to TCS for *Daphnia* and fish (e.g. *Daphnia* 8 day NOEC of 1.9  $\mu\text{g l}^{-1}$ ). Having compared the predicted no effect concentration (PNEC) determined from the toxicity data with measured environmental concentrations (MEC), the preliminary ecological risk assessment of these five antimicrobials was conducted. The MEC/PNEC ratios of TCS and TCC were over 1 for some monitoring data, especially in urban streams with watershed areas without sewage service coverage, and their potential risk for green algae and *Daphnia* might be at a level of concern, although the contribution of TCS/TCC on the total toxicity of the those sites needs to be further investigated. For the three other antimicrobials, the maximum MEC/PNEC ratio for resorcinol was 0.1–1, but those for phenoxyethanol and *p*-thymol were <0.1 and their risk to aquatic organisms is limited, although the additive effects with TCS, TCC and other antimicrobial agents, such as parabens, need to be further examined in future studies. Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

Supporting information may be found in the online version of this article.

**Keywords:** antimicrobial agents; triclosan; triclocarban; phenoxyethanol; ecotoxicity; green algae; *Ceriodaphnia dubia*; ecological risk

## INTRODUCTION

Antimicrobial agents have recently been used for a wide variety of purposes in foods, pharmaceuticals, cosmetics, clothes and plastic products (Nishihara and Korai, 2005). In Japan, people began to be concerned about preventing food poisoning caused by pathogenic *E. coli* such as O-157 and salmonellas, and several antibacterial agents were developed in the 1990s, including those with inorganic silver. By 1998, various antimicrobial products with antibacterial agents had become commercially available and extremely popular in Japan.

Among these antibacterial agents, triclosan (2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether; TCS) has widely been used in hand soap, toothpaste, underarm deodorants and plastic products in many developed countries (Nishihara and Korai, 2005; Perencevich *et al.*, 2001). Therefore, it has frequently been detected in effluent from sewage treatment plants and in the aquatic environment in concentrations as high as 0.1  $\mu\text{g l}^{-1}$  (e.g. McAvoy *et al.*, 2002; Nakada *et al.*, 2006; Okuda *et al.*, 2008). Additionally, triclosan is an ether antimicrobial with a broad spectrum of bacteriostatic activities, and it has been extensively investigated mainly because of its relatively strong toxicity on aquatic organisms in

concentrations of 0.1–100  $\mu\text{g l}^{-1}$  (e.g. Orvos *et al.*, 2002; Tatarazako *et al.*, 2004; Ishibashi *et al.*, 2004; and Dussault *et al.*, 2008).

\*Correspondence to: Hiroshi Yamamoto, Institute of Socio, Arts and Sciences, The University of Tokushima, Minamijosanjima-cho 1-1, Tokushima, 770-8502, Japan. Email: hiroshi@ias.tokushima-u.ac.jp

<sup>a</sup>Graduate School of Integrated Arts and Sciences, The University of Tokushima, Tokushima, Japan

<sup>b</sup>Faculty of Integrated Arts and Sciences, The University of Tokushima, Tokushima, Japan

<sup>c</sup>Research Center for Environmental Quality Management, Kyoto University, Kyoto, Japan

<sup>d</sup>Center for Environmental Sciences in Saitama, Saitama, Japan

<sup>e</sup>Saitama City Institute of Health Science and Research, Saitama, Japan

<sup>f</sup>National Institute for Environmental Studies, Tsukuba-City, Ibaraki, Japan

<sup>g</sup>Graduate School of Integrated Arts and Sciences, The University of Tokushima, Tokushima, Japan

Triclocarban (3,4,4'-trichlorocarbanilide; TCC) is a carbanilide-type antimicrobial and has strong activities on Gram-positive bacteria. TCC is used for a wide variety of purposes and is often used together with TCS in some consumer products. TCC has been detected in effluents of wastewater treatment plants, surface water and drinking water at concentrations as high as  $6.75 \mu\text{g l}^{-1}$  (Halden and Paull, 2004). In Chinese rivers, the detected concentrations ranged from 6.5 to  $478 \text{ ng l}^{-1}$  (Zhao *et al.*, 2010). While the aquatic toxicity of TCC for algae was slightly weaker than that of TCS, that for fish and crustaceans is known to be stronger than that of TCS, such that the 28 day reproduction no observed effect concentration (NOEC) is  $0.13 \mu\text{g l}^{-1}$  for *Mysidopsis bahia* (TCC Consortium, 2002), which suggests potentially high ecological risk for aquatic organisms. As for the ecological risk of TCC, the High Production Volume (HPV) program of the Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD), directed by Monsanto Co. and Procter & Gamble, has extensively investigated and published a final report (TCC Consortium, 2002). In addition, the US Environmental Protection Agency's (EPA) ECOTOX database includes most of these data (US EPA, 2011).

Our research group has been focusing on the ecological risk posed by TCS, especially in hot spots in urban streams with no sewage system coverage (Tamura *et al.*, 2010), in the process of investigating the ecological risks of a class of preservatives, parabens (Yamamoto *et al.*, 2007, 2011). TCC could also be a significant concern owing to the potential coexistence with TCS, whose hazard quotient was reported to be over 10 by Brausch and Rand (2011), which suggests that several antimicrobials

could have additive effects and could be a significant concern for the ecological risk as a whole in surface water.

In recent years, 2-phenoxyethanol (phenoxyethanol) has been extensively used as an alternative preservative to parabens, whereas 4-isopropyl-3-methyl phenol (*p*-thymol) has been used as an alternative to triclosan in cosmetics. Resorcinol has been widely used in hair dyes and acne treatments, and the IPCS's Concise International Chemical Assessment Documents (WHO, 2006) reported the risk assessment, but the presented data on toxicity are highly limited for *Daphnia* and absent for algae. Given the potential ecological risk for sites contaminated by hair dyes and effluent from rubber factories, a full set of toxicity data is necessary.

In the present study, we selected five antimicrobials – TCS, TCC, resorcinol, phenoxyethanol and *p*-thymol (Fig. 1, Table 1) – used in liquid soaps and cosmetics as disinfectants or preservatives. Their acute and (sub-)chronic toxicities were examined using three taxa of aquatic organisms – green algae, *Daphnia*, and fish. Comparing the toxicity data and the measured environmental concentrations (MECs), screening level ecological risk assessment for these compounds was conducted.

## MATERIALS AND METHODS

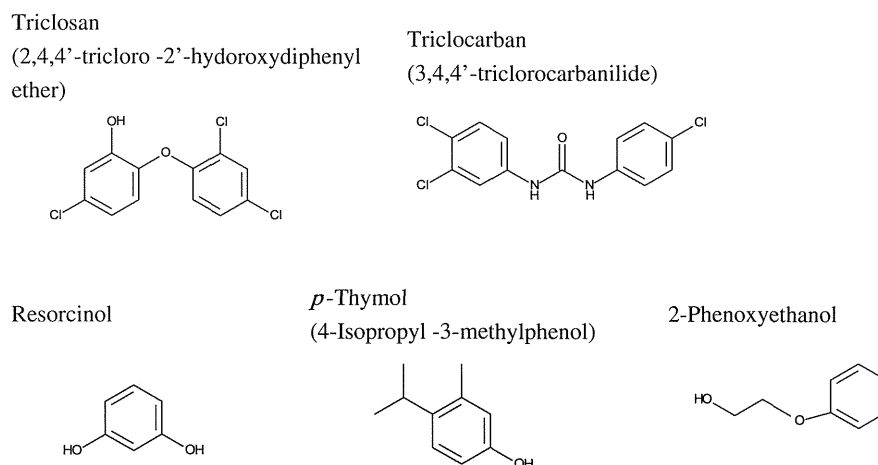
### Materials

TCS (98%) was purchased from Wako Pure Chemical Co. (Osaka, Japan) while TCC (99%) was purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Resorcinol and *p*-thymol were

**Table 1.** Physical/chemical properties of the selected antimicrobial agents

	CAS no.	Aqueous solubility ( $\text{mg l}^{-1}$ )	$\text{pK}_a$	$\log K_{ow}$	Usage
Triclosan (TCS)	3380-34-5	1.3	$7.80 \pm 0.35$	4.66	Antifungal agent, hand soap
Triclocarban (TCC)	101-20-2	0.10	$12.77 \pm 0.70$	4.90	Antifungal agent, hand soap
Resorcinol	108-46-3	1600	$9.45 \pm 0.10$	1.03	Hair dye and preservative in cosmetics
<i>p</i> -Thymol	3228-02-2	860	$10.36 \pm 0.18$	3.52	Antifungal agent, hand soap
Phenoxyethanol	122-99-6	1700	$14.36 \pm 0.10$	1.10	Preservative in cosmetics

Aqueous solubility and  $\text{pK}_a$  values are cited from Sci Finder Scholar while  $\log K_{ow}$  values are cited from Kowwin.



**Figure 1.** Chemical structure of the selected antimicrobial agents.

purchased from Wako Pure Chemical Co. (Osaka, Japan) with minimum purity of 99%. Phenoxyethanol was purchased from Tokyo Chemical Industry Co. Ltd (Tokyo, Japan) with a purity of 98.5%. Acetone 5000 of analytical grade for PCB and pesticides was purchased from Wako Pure Chemical Co. (Osaka, Japan) and was used as a solubilization agent of TCS and TCC.

## Toxicity Testing

### Algal growth inhibition test

Unicellular green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (NIES-35 strain) was purchased from the National Institute for Environmental Studies (Tsukuba, Japan) to conduct the algal growth inhibition test, which is in conformity to the OECD guideline for testing chemicals (OECD, 2006). Briefly, at least three replicates of the mixture with OECD medium (40 ml) were prepared in 100 ml Erlenmeyer flasks for at least five concentrations in an incubator (23 °C, 6400 lx). The initial cell count was set at  $5 \times 10^3$  cells ml<sup>-1</sup>. The number of algal cells was determined using optical density at a wavelength of 750 nm using a spectrophotometer (Hitachi U-2001). The static system was used and the concentrations of the tested compounds were monitored at the beginning and the end of the incubation using an HPLC system equipped with a UV-visible and a fluorescence detector (LC-10AVP series, Shimadzu, Kyoto, Japan). The inhibition ratio was determined for each flask by comparing with the blanks (or solvent blanks for TCS and TCC) at 72 h on the basis of growth rate and geometric mean of the measured concentration of the selected antimicrobials. The 50% effect concentration (EC<sub>50</sub>) values were determined using probit or logit conversion with Ecotox-statics version 2.6d (Yoshioka, 2001) distributed by the Japan Society for Environmental Toxicology. The NOEC was also determined using the software and was used for the chronic data as described in OECD (2002).

### Daphnia immobilization test

*Daphnia magna* were purchased from the National Institute for Environmental Studies (Tsukuba, Japan), and were acclimated in the laboratory of the University of Tokushima at least for 3 months in M4 medium. The *Daphnia* were used for the immobilization test conducted in conformity to the OECD test guideline for testing chemicals (OECD, 2004). Briefly, four replicates of five neonates were prepared in 50 ml beakers for at least five concentrations and blanks. The photoperiod was a 16 h light and 8 h dark cycle in an incubator set at 20 °C. The static system was used for the test. Dissolved oxygen (DO) and pH of the solution were also monitored at the beginning and the end of the test. The number of immobilized *Daphnia* at 48 h was counted. To calculate their geometrical mean, concentrations of the tested antimicrobials were analyzed using the HPLC presented above. The median effect concentration (EC<sub>50</sub>) was determined based on the measured concentration using probit or logit conversion with Ecotox-Statics version 2.6d as described above.

### Fish acute toxicity test

Fish acute toxicity was tested using Japanese medaka (*Oryzias latipes*) purchased from the National Institute for Environmental Studies (Tsukuba, Japan) and acclimated in the laboratory of the University of Tokushima at least for 3 months. The acute tests were conducted in conformity to the OECD guideline for testing

chemicals no. 203. Duplicates of five juvenile fish were prepared in a 100 ml beaker for at least five concentrations and blanks (and solvent blanks for TCS and TCC). The test was conducted at 25 °C with a photoperiod of 16 h light and 8 h dark. The solution was replaced at 48 h and the concentrations of the tested antimicrobials were analyzed using the HPLC presented above. The DO and pH of the solution were checked at 0, 48, and 96 h. The number of dead individuals was counted at 96 h and the median lethal concentration (LC<sub>50</sub>) was determined on the basis of geometrical mean of the measured concentrations of the tested antimicrobials using probit or logit conversion with Ecotox-Statics version 2.6d as with *Daphnia* and algal tests.

### Daphnid reproduction test

Owing to the constraints on time and cost, the *Ceriodaphnia dubia* three-brood reproduction test (Environment Canada, 2007; US EPA, 2002) was conducted instead of the *Daphnia magna* reproduction test (i.e. OECD guideline for testing chemicals no. 211, 2008). Since the former test lasts 8 days and can significantly save time and cost, it is often used to evaluate the toxicity of chemical compounds and effluent in North America. Briefly, *Ceriodaphnia dubia* were purchased from National Institute for Environmental Studies (Tsukuba, Japan) and acclimated in the laboratory of the University of Tokushima at least for 3 months. Ten replicates of *Ceriodaphnia* were placed in each snap cap of 30 ml size to prevent a shortage of DO. Five concentrations and blanks were prepared with dechlorinated tap water for each antimicrobial test, and the survival and the number of neonates was counted for eight days, when most of the *Ceriodaphnia* had finished delivering three broods. The solutions were replaced every 48 h (i.e. a semi-static system) and the concentration before and after the replacement was analyzed using the HPLC. Only the numbers of first three broods were counted and compared with the blanks. Multiple comparisons were conducted to determine NOEC values as presented above for the algal test. Again, the geometrical mean of the measured concentration of the selected antimicrobials was used for the determination of NOEC.

### Fish short-term toxicity test on embryo and sac-fry stages

The fish early life stage test of the OECD test guideline no. 210 takes almost 40 days and we used the sub-chronic test of the OECD test guideline no. 212 using zebrafish (*Danio rerio*) larvae, which requires a much shorter time (2–3 days) for hatching compared with medaka (8–10 days). At least three replicates of 15 embryos were placed in 50 ml beaker for five concentrations. The solutions were replaced every 48 h (i.e. a semi-static system) and the concentration of the selected antimicrobials was monitored using the HPLC as presented above. The DO and pH were also monitored at the replacement of the solutions. The percentage hatching and the survival rate of the larvae were evaluated until the egg yolk had disappeared. The NOEC for hatching and the survival of larvae was determined using the probit or logit conversion with Ecotox-Statics version 2.6d as described above. Again, the geometrical mean of the measured concentration of the selected antimicrobials was used to determine NOEC.

## Preliminary Ecological Risk Assessment

The MECs were collected from the literature (Coogan *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2010; Lindström *et al.*, 2004; Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2008; Halden and Paull, 2004; Nishi *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2008;