

## 論文要旨

論文題目 : 藻類発光阻害試験による環境汚染物質の評価

氏名 : 大曲 遼

本研究では、藻類発光阻害試験を標準法である藻類生長阻害試験のスクリーニングおよび大学等における排水管理の現場へ導入することを目指した研究の一環として、4-NP 異性体 (4-NP's; 全 19 種: 直鎖型異性体 1 種, 分岐型異性体 18 種)および重金属類を対象とし、藻類発光阻害試験から藻類への影響評価を行った。4-NP's および重金属類の EC<sub>50</sub> 値や遅延発光の阻害率、曝露 24 時間内での挙動を評価し、毒性の特徴や序列、また、単純な毒性値 (EC<sub>50</sub> 値など) からはみられない毒性の傾向などを把握することで、多種の環境試料や排水試料による評価が可能となる。また、本研究で得られるそれらの評価結果と過去の文献による藻類影響を比較・検証することで、藻類生長阻害試験でのスクリーニングに応用可能であることを明らかにすることを目的とした。

第 1 章では、多種の化学物質が示す藻類毒性を評価していく上で、迅速かつ簡便な藻類バイオアッセイが必要不可欠であり、現在、標準法として存在する藻類生長阻害試験 (TG-201) では評価完了までに時間を要すること、そして、試験期間中に行う藻類細胞の観察などが煩雑さに起因していることなどを挙げた。そして、近年、藻類生長阻害試験に代わる、あるいはその前処理として導入が検討されている藻類発光阻害試験が研究開発されていること、そして、多くの異性体を持つ NP の中で最も強い毒性を示すとされる 4-NP 異性体や重金属類の藻類毒性評価が重要であり、今後の藻類バイオアッセイに関して藻類発光阻害試験が適切に利用可能であるかの調査を目的とすることを示した。

第 2 章では、19 種 4-NP 異性体(直鎖型異性体 1 種, 分岐型異性体 18 種)を対象物質として藻類発光阻害試験を行った。

本研究では藻類発光阻害試験の立場上、4-NP's の藻類 EC<sub>50</sub> 値を予測値として扱っている。算出された各 EC<sub>50</sub> 値は 4-NP 異性体によって異なる値を示した。13 種 4-NP's において最も強い毒性値 (EC<sub>50</sub> 値) を示したのは直鎖型異性体である 4-n-NP (0.4±0.1 µg/mL) であった。この結果

は、直鎖型の構造を持った NP 異性体は分岐型の NP 異性体に比べ藻類毒性が強くなる傾向を示唆するものである。また、短期毒性評価手法への展望を考慮し、曝露後 1 時間および 6 時間の藻類 EC<sub>50</sub> 値を算出して時間経過による毒性変化を観察した結果、4-NP 異性体の多くは曝露時間と共にその EC<sub>50</sub> 値が増加傾向（藻類毒性が低下）にあった。

遅延発光の阻害率においては、EC<sub>50</sub> 値と同様に 4-n-NP が全体を通して高い阻害率を示しており、高濃度区では 99.92 % の阻害率であった。一方で、NP-D において興味深い挙動がみられ、高濃度区では最も低い阻害率（65.59 %）を示したが、低濃度区では比較的強い阻害効果（11.58 % - 濃度区 0.1 µg/mL では分岐型異性体で最高値）がみられた。

藻類遅延発光低下率から、多くの 4-NP 異性体は曝露後 1-6 h でその毒性影響が極端に強くなり、その後は低下する傾向にあった。しかし、数種の異性体は曝露後 6-24 h で更なる毒性発現を示しており、これらの毒性評価は曝露評価時間の延長や 72-96 h 藻類生長阻害試験による評価が極めて重要である。また、高濃度区では直鎖型異性体 4-n-NP の影響が確かに強かったが、低濃度区においては分岐型異性体の影響が明らかに強かった。これは 4-NP 分岐型異性体の更なる観察が重要であることを示唆しており、今後は多角的な毒性評価や、河川水など実際の水環境中における存在量の解明が重要である。また、本研究において、4-NP 異性体に曝露された *P. subcapitata* の挙動は過去の文献で報告された NP に曝露された藻類の挙動と類似する点が多かったことから、藻類発光阻害試験による NP の毒性評価は再現性が高く有用であると考えられる。

第 3 章では、遅延発光への影響が明らかにされていない鉛、クロム、セレン、鉄、マンガン、ニッケルの 6 種重金属類および鉛、クロムの複合試料を藻類発光阻害試験により評価した。鉛（98 µg/L）、クロム（100 µg/L）、ニッケル（662 µg/L）、鉄（850 µg/L）は藻類の遅延発光を阻害しており、特に鉛とニッケルは光合成組織に強く作用していることが示唆された。一方で、セレン、マンガンにおいては遅延発光への阻害影響などがみられなかった。以上の結果から、藻類発光阻害試験は鉛、クロム、ニッケル、鉄に対して高い感度を持っていることが示されたが、セレン、マンガンに関しては、より高濃度での曝露試験から、その挙動を明らかにする必要性が示唆された。また、鉛、クロムの複合評価では、鉛およびクロムの毒性傾向を反映した結果が相乗・拮抗作用として示されたことから、今後は様々な化学物質の組み合わせにより複合影響の評価能を検討していく事が重要である。

第 4 章では、本研究の総括を行い、NP 異性体および重金属類の毒性評価に関して、藻類発光阻害試験が標準法である藻類生長阻害試験のスクリーニングとして十分に貢献可能である事を

示した。しかしながら、現在の藻類バイオアッセイにおいては、迅速で簡便な試験法が複数存在しており、試験藻類の種においても *P. subcapitata* だけに限定的ではなく多様化している。その中において、藻類発光阻害試験は「減衰曲線による作用機序の推測」が可能であり、このような特徴は他の藻類バイオアッセイでは現在までに報告されていない。しかし、現段階では、光合成組織への作用機序推察は非常に限定的な評価になるのが現状である。そのため、今後は、藻類のどの部分に作用することで影響が発現するのかが把握されている化学物質を対象とした研究を行うことが重要であり、これにより作用機序の推察をより幅広く行うことが可能となる。また、それに合わせ多様な藻類種による藻類発光阻害試験の知見が必要であると考えている。