

藻類発光阻害試験による環境汚染物質の 評価

2017年7月

熊本県立大学大学院 環境共生学研究科

大曲 遼

目次

第1章 緒言.....	3
1. 研究の背景.....	3
2. 藻類生長阻害試験(標準法：TG-201).....	4
3. 藻類発光阻害試験.....	5
4. ノニルフェノール (NP).....	8
5. 本研究の目的.....	9
第2章 緑藻類 <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> を用いた藻類発光阻害試験による13種	
4-NP 異性体の毒性評価.....	12
1. 目的.....	12
2. 材料および方法.....	13
2-1 供試藻類.....	13
2-2 曝露物質.....	13
2-3 曝露培養.....	14
2-4 遅延発光の計測.....	16
3. 結果および考察.....	18
3-1 予測 EC ₅₀ 値の算出.....	18
3-2 藻類発光阻害率の比較.....	21
3-3 発光量の速度低下率(発光強度の減少).....	22
3-4 減衰曲線による作用機序の予測.....	26
3-5 4-NP ジアステレオマー(立体異性体)における藻類毒性の違い.....	32
4. 第2章のまとめ.....	36
第3章 緑藻類 (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>) の遅延発光による重金属類の毒性評	
価.....	37
1. 目的.....	37
2. 材料および方法.....	37
2-1 供試藻類.....	37
2-2 曝露物質.....	38
2-3 曝露培養.....	38
2-4 遅延発光の計測.....	38

3. 結果および考察.....	39
3-1 鉛の影響.....	40
3-2 ニッケルの影響.....	41
3-3 クロムの影響.....	42
3-4 セレンの影響.....	43
3-5 鉄の影響.....	44
3-6 マンガンの影響.....	45
3-7 各評価金属類の EC ₅₀ 値 (藻類発光阻害試験).....	46
3-8 鉛およびクロムによる複合影響の評価.....	47
4. 第 3 章のまとめ.....	51
第 4 章 総括.....	52
引用文献.....	55
謝辞.....	69

第1章 緒言

1. 研究の背景

現在、大学等における排水管理は、水質汚濁防止法により定められた特定の化学物質(排水基準項目)を対象とした個別の濃度分析により行われている。しかし、この手法では、排水基準項目に記載されていない化学物質の有無を十分に把握することが出来ない上、多種多様な化学物質の共存による生物種等への複合的な毒性影響などの評価が不可能である。そのため、この様な排水管理の現場において、実際の生物種を使った生態毒性評価手法(バイオアッセイ)の導入が重要である。中でも、WET (Whole Effluent Toxicity) 手法は、魚類や藻類など複数の生物種を用いて、化学物質を特定することなく排水規制を行う手法であり、多種の化学物質を総体として評価することが可能で、既に米国などで採用されている¹⁾。

このWET手法において、水生生態系の一次生産者である藻類の毒性評価は特に重要であり²⁾、現在、藻類に関する毒性評価は、72時間藻類生長阻害試験(OECD Test Guideline 201: TG-201)としてOECDによって規格化されている³⁾。この試験は、藻類の生長を直接的に観察できるが、試験時間および費用が大きいことが問題視されており、その要因として化学物質の毒性評価が完了されるまでに72時間以上を要する点や、専門的技術の要求性が高いことなどが考えられる。これは、10万種以上の化学物質が製造・販売されている現代において⁴⁾、それらの含む排水および環境試料の連続的かつ多数の評価が非常に困難である事を示唆している。

この様な背景から、近年は藻類バイオアッセイに関する多くの評価手法が研究開発されている⁵⁾⁻⁹⁾。その中で、藻類が発する遅延発光に着目した藻類バイオアッセイ(藻類発光阻害試験)が、簡便、迅速、低コストな評価手法として新たに研究・開発されている¹⁰⁾⁻¹⁵⁾。この試験は化学物質に曝露した藻類から計測される遅延発光量の変化から化学物質の藻類毒性を評価する。また、この藻類発光阻害試験の最大の特徴は、従来の試験に比べ、多種の化学物質による複合影響をより簡便・迅速に評価することが可能な点であり、多くの試験が要求される排水管理や環境試料の評価において、非常に有益な試験手法であるといえる。

上記の様に、この試験を排水管理や環境試料の評価に応用する場合、多くの期待は複合評価の簡便性に起因すると考えられる。しかし、藻類発光阻害試験では、化学物質単体による影響から複合曝露時の影響を評価するため、事前に化学物質単体による評価を行い、遅延発光への影響を確認する必要がある。この様に化学物質単体に対する遅延発光の挙動が明らかでない場合、複合影響を正確に評価することができない。しかしながら、一般的な有機化学物質とごく一部の重金属類を除いて、藻類発光阻害試験を用いた

評価報告は十分にされていないのが現状である。また、大学などを含む多数の研究機関では、その特徴から様々な研究存在し、それに伴う実験が日々実施されており、多様な有機物質や重金属類による汚染が懸念される。しかし、前述のように遅延発光に関する化学物質の影響評価が極端に少ないことから、それらが複合的な影響を示すと予想される研究排水や環境試料の評価を行う為には、これら化学物質単体による影響評価が特に重要である。

2. 藻類生長阻害試験(標準法 : TG-201)

藻類生長 (growth) を指標とした藻類バイオアッセイであり、化学物質を指数増殖期の藻類に 72~96 時間曝露し、その生長阻害率を測定することで、藻類への毒性影響を評価する試験である。この試験では、供試生物の成長率を 50%減少させると算定される化学物質濃度 (EC₅₀) を求める。この藻類生長阻害試験は、経済協力開発機構 (Organization for Economic Co-operation and Development ; OECD) のテストガイドラインによっても規格化されている代表的な生態毒性試験のひとつである¹⁶⁾。また、この試験における生長とは、曝露期間中の生物量 (培地 1 ml 当たりの細胞の数) の増加量を指している。

試験には指数増殖期の藻類を用いる必要があり、維持培養中など、増殖を抑制されている藻類を試験に供じた場合、順調な増殖を開始するまでに遅延 (ラグ) が生じ、正しい試験結果が得られない。そのため、試験開始前に、試験条件と同条件下で 2~4 日間の培養を行い、指数増殖期の藻類を得る必要がある。また、変形や異常な形態のものが出現した場合、それは使用できない。

指数増殖期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、予め前培養で使用する培地装置や様々な条件で培養を行い、生物曲線を作成する事で、どの程度の生物量を添加すると、何日後に指数増殖期に入り、その結果得られる生物量などの調査をしておかなければならない。

藻類の維持においては、試験で用いる培地ではなく、栄養塩の豊富な培地を使用した方が藻類の長期間維持を容易に行うことができる (例:C 培地、ブリストル培地など)。20~25℃で、試験条件程度 (60 μ mol/m²/s) の光強度で十分に増殖後、これ以下の弱い光強度下に移行した場合、比較的長期間は植え継ぎなしでそれを維持することができる。

この場合植え継ぎは数ヶ月に1度で十分だと考えられている。維持培養の場合は12時間ごとの明暗周期を設けることが可能なため、直射日光のあたらない明るい室内に静置してもよい。しかし、頻繁に生長阻害試験を実施する場合などは、試験条件に近い光条件で培養することで、前培養の際に容易に指数増殖期の藻類を獲得できる。また、無菌培養株を使用する場合は、定期的に（最低でも半年周期）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に基準物質（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変化がないことを調査するのも重要である。

生長阻害試験では、前培養などの準備を含めた場合、1つの化学物質を評価するのに最低72時間以上を要求されることに加え、無菌培養設備や大型の光照射型培養装置、培養の特殊性から専門的な技術及び知識を必要とするため高額な人件費等が必要となる。そのため、コスト面での負担も大きくなる。さらに現状では、リスク評価の基準が化学物質による生長阻害のみで、毒性発現のメカニズムなどの質的評価が行われていないことも、環境保全推進のためには不十分であると指摘されている。そのため、迅速かつ簡便で、発現メカニズム等も網羅した化学物質の生体（生態）リスク評価手法の確立が急務となっている。

3. 藻類発光阻害試験

藻類発光阻害試験は藻類が発する遅延発光を指標とした新規藻類バイオアッセイである。遅延発光とは、光照射（励起光）を受けた光合成生物を暗所下に移行することでみられる発光現象であり、Strehler and Arnold (1951) によって発見された¹⁷⁾。また、バイオマスや、光合成生物の生理状態を評価する新たな *In vivo* だと考えられており¹⁸⁾、全ての光合成生物が遅延発光を発すると報告されている¹⁹⁾。遅延発光は、主として光化学系Ⅱ（PSⅡ）におけるクロロフィル a（P680）の光放出に起因しており、これは励起されたプラストキノン（Q_A）と P680 の間で電荷の再結合による電子の放出に起因すると考えられている²⁰⁾。さらに、光化学系Ⅰ（PSⅠ）は、遅延発光の放射を行っていないと報告されている¹⁸⁾。しかし、これとは異なる原理も報告されており、その実態は未だに明らかではない²¹⁾。その中で、遅延発光に関する以下のような報告が存在する。遅延発光は、藻類の光合成量を反映するため、その発光強度は、存在する藻類のバイオマスを測定することに利用できる¹⁸⁾。また、Katsumata *et al.*, (2005, 2006) に

よって生長阻害試験との相関関係が報告されており、遅延発光を指標とした試験は簡便かつ迅速な試験として、大量の化学物質を評価できると述べられている^{10), 11)}。

同様の評価手法としてクロロフィル蛍光（即時蛍光 - prompt fluorescence : PF）を用いたバイオアッセイが研究されている。クロロフィル蛍光の計測手法としては、パルス光を用いたパルス変調蛍光（PAM : Pulse Amplitude Modulation）測定およびポンプ&プローブ法の他に、光合成の主要経路である PS II および PS I にそれぞれ由来する波長 684nm と 735nm の比率(F684 / F735)を用いたものがある^{22)・26)}。PF による藻類バイオアッセイは、遅延発光による試験と同様に迅速で簡便、低コストな試験手法と評価されている。両発光現象の違いとして、以下の点が挙げられる。PF は、数ナノ秒以内の発光現象であり、ミリ秒～秒単位で発光を続ける遅延発光に比べ極めて短い¹⁸⁾。また、遅延発光は、PF に比べ高い感度を示す一方で¹⁹⁾、その光強度は PF の 1%以下と非常に弱いものである。

PF による試験は化学物質の複合影響の評価をできることが示唆されている^{27), 28)}。一方で、遅延発光による毒性評価も化学物質の複合影響を簡便・迅速・容易に評価可能であると報告されており、Katsumata らは除草剤(ジウロン, シマジン)と水銀による複合曝露の影響を評価している¹⁰⁾。また、Takeuchi らは数種の金属類を含有する工場排水の毒性評価を行っており、この報告は複合影響と同時に、本試験手法が環境水の評価に使用できることを示している¹⁴⁾。

この様に、迅速な評価系を有した藻類試験は少なからず報告されている。しかし、遅延発光による毒性評価のもう一つの特徴として、原因物質の特徴や同定に関する情報(化学物質の光合成に対する作用機序)を獲得可能なことが挙げられる^{12), 29)}。遅延発光の主要な発生要因は電荷分離後の PS II で生じる逆反応であるため、ATP や、チラコイド膜のプロトン勾配、低温ストレス、生体異物、励起光のスペクトルおよび強度の質、細胞株の生長段階など、多用な生理的变化や、化学物質などの影響を受ける^{30)・36)}。このように藻類への影響は多様な生理的变化や様々な化学物質による異なる作用機序が絡んだ結果引き起こされており、遅延発光はそれら様々な要因を反映した挙動を示す。しかし、クロロフィル蛍光は電荷分離前の励起されたクロロフィルが基底状態に遷移する際のエネルギー放出に起源を持っているため、既存の迅速な評価試験ではこれらに関する詳細な情報は得ることが出来ず、基本的には試験指標に対する影響の有無のみを評価するものになる。遅延発光による試験では、遅延発光の計測により減衰曲線を得ることができ、この曲線は存在する化学物質や藻類の環境条件によりその形状が変化する。

この変化を観察することで遅延発光の増減に関する評価だけでなく、化学物質の特定や、その作用機序、そして気温(水温)や光強度の影響などを評価することができる。

遅延発光の簡単な発生過程を **Figure. 1** に示す。PS II (光化学系 II) および PS I (光化学系 I) は光合成の主要反応経路であり、クロロフィルとタンパク質から構成されている。また、PQ(プラストキノン), b₆f (シトクロム b₆f 複合体), PC(プラストシアニン) は電子受容体であり、PS II で獲得した電子を PS I に受け渡す役割がある。流れとしては、PS II にあるクロロフィル(P680)が電子を獲得後、直後に存在する PQ や b₆f, PC に電子を流していき、PS I のクロロフィル(P700)に伝達する。これら、光合成反応は明所下で引き起こされ(ブロック線の矢印)、暗所下ではこれとは逆の流れが引き起こされる (**Figure. 1** 点線矢印)。この逆流現象の結果、PS II にあるクロロフィルに電子が再結合することで遅延発光が生じる。これが光合成の逆反応と称される要因であり、遅延発光の強度が増減するのは、化学物質により光合成反応で行われる電子伝達が阻害されるためである。また、前述したように遅延発光を計測することで減衰曲線を得ることが出来る (**Figure. 1** 下図)。この減衰曲線は 2 つのピークを持っていることが報告されており、1 つ目のピークは計測開始後 0.1 秒地点で観測でき、光合成の主要部である PS II に起因することが示唆されている。**Figure. 1** 右下の図中にある赤曲線は 0.1 秒地点においてその他の曲線よりも高位に存在しており、これは PS II の中で行われる電子伝達が阻害された結果、余剰電子が発生したことにより起因している。2 つ目のピークは計測開始後約 10 秒地点でみることができ、PS I に関係していると考えられている。PS I から生じる電子伝達の逆流が阻害された結果、2 つ目のピークが消滅すると報告されている。また、2 つのピーク間の挙動は PS II と PS I の間に存在する電子受容体 PQ, b₆f, PC で行われる電子伝達の阻害影響などを反映する可能性が指摘されている。Katsumata らは PQ, b₆f, PC 間の電子伝達を阻害する DBMIB (2,5 - dibromo - 3 - methyl - 6 - isopropyl - p - benzoquinone) を曝露した藻類の遅延発光を計測し、第 2 のピークが通常よりも速く出現することを報告している¹²⁾。更に、Chuenwarin らも *Arabidopsis* を用いた遅延発光の阻害試験から、第 2 のピークが PS II 以降の光合成細胞に起因する挙動を反映していると指摘している²⁹⁾。

このような特性から、大量の化学物質を対象とした簡易スクリーニング等への応用が期待されている。

4. ノニルフェノール (NP)

米国化学会 (American Chemical Society) の情報部門である Chemical Abstracts Service (CAS) は、公表された全ての化学物質の情報を収集および体系化する世界で唯一の機関であり、1 億種以上の化学物質が登録されている。化学物質は、技術の発展に伴い膨大な数が生産・使用されており、人類の生活環境にも深く関係している。しかし、その一方で、地球温暖化やオゾン層の破壊、酸性雨による森林の消失、湖沼の酸性化等の環境問題を招く要因でもあり、ヒトや野生動植物などの生物種に様々な影響を与えることが度々報告されている^{37)・49)}。

近年、野生生物やヒトの健康へ悪影響を及ぼしているとして、内分泌かく乱物質が高い関心を集めている。その 1 つがノニルフェノール (NP) である (Figure. 2)。NP は、アルキルフェノール類に分類される有機化合物で、非イオン界面活性剤として幅広く使用されている⁵⁰⁾。ノニルフェノールエトキシレート (NPEOs) の主原料であり、この他、製薬業界や殺虫剤産業など、様々な産業分野でも使用されている⁵¹⁾。また、NP の生産量や使用量は増加傾向にあり、アルキルフェノール類における生産量全体の 80% を占めているといわれる^{2), 52)}。環境中に放出された NPEOs は、ノニルフェノールジエトキシレート (NP2EO)、ノニルフェノールモノエトキシレートへ

(NP1EO) と分解されていき、分解ごとにその毒性が強くなる⁵³⁾。その後、NP1EO が分解されることで、NP が生成される (Figure. 3)^{54)・56)}。そのため、NPEOs や NP が下水処理場由来の廃水や、環境水および堆積物中から検出されると世界中で報告されている^{50), 57)}。オランダでは、工業廃水や下水処理場廃水などから $< 240 \sim 3.9 \text{ E4 ng/L}$ 、環境水からは $< 110 \sim 4100 \text{ ng/L}$ が検出されており、魚類に対するエストロゲン様作用を引き起こす主要な物質だと示唆されている⁵⁸⁾。また、日本においても河川水中から $0.05 \sim 1.08 \mu\text{g/L}$ 、堆積物から $30 \sim 13000 \mu\text{g/kg}$ 、下水処理場廃水から $0.08 \sim 21.2 \mu\text{g/L}$ の NP がそれぞれ検出されている⁵⁹⁾。

1991 年、NP は、人の乳ガン細胞の培養実験中に内分泌かく乱物質の疑いが指摘されたことから注目を集め⁶⁰⁾、今日までに、様々な生物に対する発がん性や病理組織学的な作用⁶¹⁾、発育異常や性分化疾患、雌雄同体個体の増加、繁殖活動の減少等が報告されている⁵¹⁾。さらに、水生生物への明確な悪影響も確認され⁶²⁾、魚類の急性毒性は $17 \sim 3000 \mu\text{g l}^{-1}$ 、無脊椎動物および藻類に関しても、それぞれ $21 \sim 3000 \mu\text{g l}^{-1}$ 、 $27 \sim 2500 \mu\text{g l}^{-1}$ であると報告されている⁶³⁾。また、現在でも NP を対象とした様々な研究が行われている^{64)・66)}。

また、NP はノニル基の分岐および置換位置によって、理論上 170 種以上の異性体が存在すると報告されており^{67), 68)}、その毒性は、異性体により異なることが指摘されている⁶⁹⁾。その一方で、NP の毒性は異性体混合物として評価されることが殆どで、異性体単体としての毒性評価事例は極めて少ない。そのため、異性体単体の生態毒性評価は非常に重要であり、特に藻類への影響を把握することは上述の理由から緊急の課題である。しかし、従来の藻類試験では、全 NP 異性体 (NP's) の毒性を評価するのは非常に困難であり、迅速かつ単純な試験系が求められる。

5. 本研究の目的

本研究では、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、藻類発光阻害試験により藻類への影響を明らかにすると共に、過去の報告などと比較する事で、標準法である藻類生長阻害試験のスクリーニングや、環境試料の評価、そして排水管理への導入が可能であるかを調査することを目的とした。

第 2 章では、13 種 4-NP 異性体(直鎖型異性体 1 種, 分岐型異性体 12 種)および 6 種 3 ペアの 4-NP 立体異性体(ジアステレオマー)の藻類毒性を藻類発光阻害試験により評価し、各異性体の藻類毒性やその傾向、そして、立体異性体のペア間における藻類毒性の差異、そして、既存の報告などと比較する事で本試験の再現性などを調査することで、4-NP 異性体の藻類毒性および TG-201 のスクリーニングとしての実用性などを示す事を目的とした。

第 3 章では、藻類発光阻害試験により、排水基準に設定される重金属類およびニッケルの藻類毒性を評価し、それら金属類の遅延発光への影響を明らかにする事で、環境試料の評価や排水管理への導入を検討するための基礎的なデータの収集を目的とした。

第 4 章では、第 2 章、第 3 章で得られた試験結果をもとに、藻類発光阻害試験の活用性 (藻類生長阻害試験のスクリーニング、環境試料の評価、排水管理への導入など)に関して、総括としてまとめた。

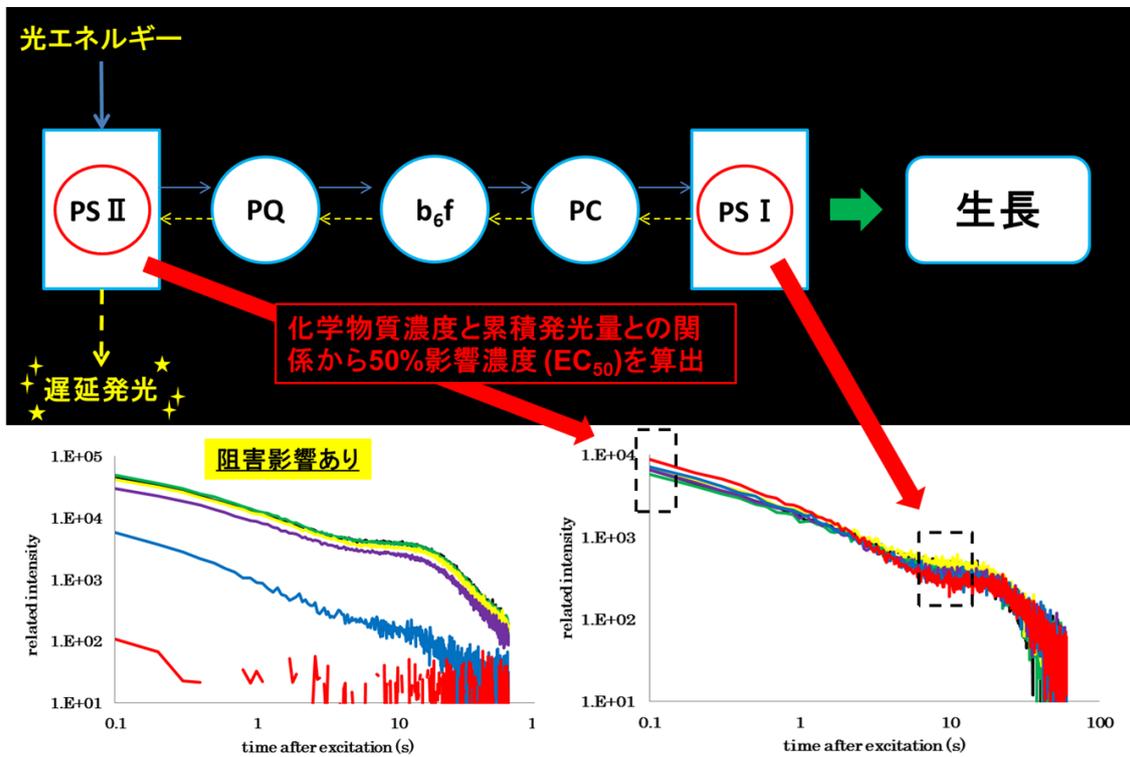


Figure. 1 藻類遅延発光(DL)の簡易的な生成フロー
 PS II および PS I は光合成の反応中心であり、PQ(プラストキノン)、b₆f(シトクロムb₆f複合体)、PC(プラストシアニン)は電子伝達物質を示す。

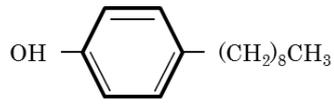


Figure. 2 NPの基本構造
 フェノールにノニル基(C₉H₁₉)が結合した物質の総称

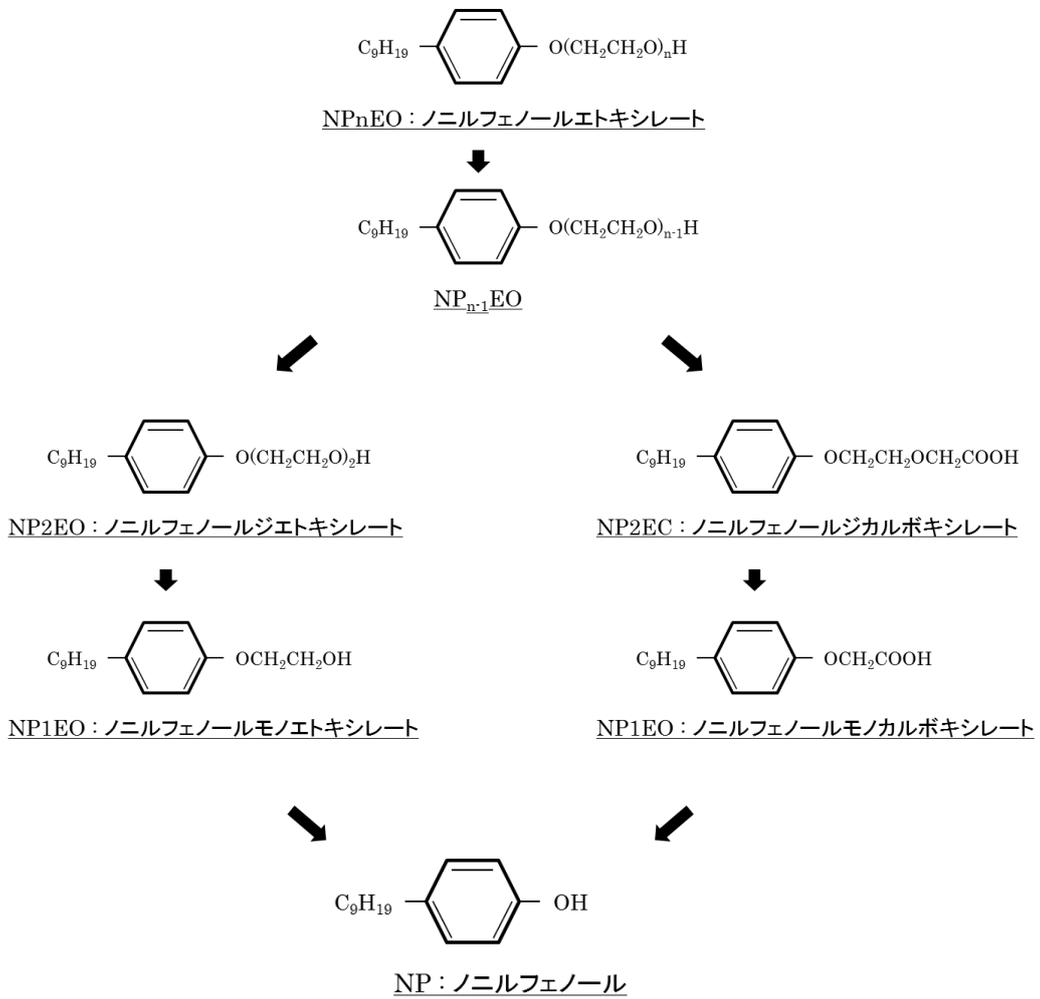


Figure. 3 自然環境中におけるNPの分解生成過程

第2章 緑藻類 *Pseudokirchneriella subcapitata* を用いた藻類発光阻害試験による 13種 4-NP 異性体の毒性評価

1. 目的

4-NP 異性体 (4-NP's) は NP's の中で最も強い毒性を持つと指摘されている異性体群である。スイスの下水処理場では、汚泥から最大で 2.53g/kg の 4-NP が、処理場由来の廃水からは最大で 1000 μ g/L の 4-NP 含有が報告されており、カナダの下水処理場では廃水から <1~30 μ g/L, 汚泥中からは >100 μ g/g の 4-NP が検出されている^{70)・74)}。また、アメリカの地質調査所(U.S. geological survey)が行ったアメリカ全土の水質調査では、4-NP の検出率が極めて高かったことが報告されている⁷⁵⁾。一方で、日本の河川水中からも高頻度で検出されており、その濃度域は 0.14 μ g/L~3.08 μ g/L と報告されている⁷⁶⁾。魚類を用いた 4-NP の毒性評価は比較的多く報告されており、メダカ(*Oryzias latipes*)の慢性毒性試験ではその LOEC (17.7 μ g/L) および NOEC (8.2 μ g/L)に加え、性分化への悪影響が示唆されている⁷⁷⁾。また、数種の魚類において 4-NP によるビテロゲニン(VTG)の誘導や生殖能への影響が報告されている^{78)・80)}。一方で藻類に関する報告として、Perron & Juneau (2011)により 4-NP が藻類光合成に何らかの影響を与えることが示唆されているが⁸¹⁾、明確な毒性影響やその発現メカニズムなどは明らかにされていない。また、魚類などと比較して藻類に関する 4-NP's の報告事例は極めて少なく、各異性体を単体として扱った毒性評価の報告はされていない。

そのため、13種 4-NP 異性体および6種3ペアの 4-NP 立体異性体(ジアステレオマー)を対象とした藻類発光阻害試験により、4-NP 異性体の藻類毒性を明らかにすること、そして、本試験の毒性傾向と報告された NP の一般的な藻類毒性を比較することで藻類生長阻害試験のスクリーニングとしての実用性などを明らかにすることを目的とした。また、遅延発光の計測により得られる減衰曲線を用いた藻類光合成細胞などへの作用機序の推察も行った。

2. 材料および方法

2-1 供試藻類

本試験では、*Pseudokirchneriella subcapitata* (旧名:*Selenastrum capricornutum*) を用いた。*P. subcapitata* は OECD (藻類生長阻害試験) で推奨されている代表的な供試藻類であり、多くの毒性試験で用いられている。また、培養液は OECD 培地を採用しており、調整後の培地を株式会社浜松ホトニクスより提供された。OECD 培地は、塩化アンモニウム (NH_4Cl : 15 mg/L)、塩化マグネシウム六水和物 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 12 mg/L)、塩化カルシウム二水和物 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 18 mg/L) 硫酸マグネシウム七水和物 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 15 mg/L)、リン酸二水素カリウム (KH_2PO_4 : 1.6 mg/L)、塩化鉄(III)六水和物 ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0.064 mg/L)、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム ($\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2, 2\text{H}_2\text{O}$: 0.1 mg/L)、ホウ酸 (H_3BO_3 : 0.185 mg/L)、塩化マンガン四水和物 ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 0.415 mg/L)、塩化亜鉛 (ZnCl_2 : 0.003 mg/L)、塩化コバルト四水和物 ($\text{CoCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 0.0015 mg/L)、塩化銅二水和物 ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.00001 mg/L)、モリブデン酸二ナトリウム二水和物 ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.007 mg/L)、炭酸水素ナトリウム (NaHCO_3 : 50 mg/L) を含んでいる。藻類 (20×10^6 cells/ml) は藻類懸濁液として -80°C で凍結保存されており、凍結藻類キット解凍装置により解凍後、 $800\mu\text{L}$ の OECD 培地を含んだガラスチューブ ($25\text{ mm}^2 \times 85\text{ mm}$) に $620\mu\text{L}$ の藻類懸濁液を注入し 1 時間の前培養を行った (25°C , $50\text{ }\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$)。

2-2 曝露物質

本研究では、約 170 種存在する NP 異性体の中で、13 種 4-NP 異性体(直鎖型異性体 1 種、分岐型異性体 12 種) および 6 種 3 ペアの 4-NP 立体異性体(ジアステレオマー)を曝露物質として採用した。4-NP 異性体は、NP 異性体の中で水環境中から高頻度で検出されており、内分泌かく乱作用が強いと報告されている。しかし、分岐型 4-NP 異性体は CAS 番号の設定がなく毒性影響に関する報告も希有であり、加えて製造および販売もされていない。そのため、本試験では日本大学生物資源科学部 片瀬隆雄教授により合成および提供されたものを使用した。

各 4-NP 異性体は、その濃度が 30,100,300,1000,3000 $\mu\text{g/mL}$ となるように調整後、

-20℃で保管した。また、調整後の濃度は、曝露試料調整時に 1000 倍希釈される。また、調整時の溶媒にはエタノールを採用した。

2-3 曝露培養

ガラスチューブに 8.99mL の OECD 培地を注入した後、1-2 で調整した各 4-NP 溶液を 0.01mL 投入し(1000 倍希釈)、検体試料とした。また、8.99mL の OECD 培地に、0.01mL のエタノールを調整することで対照区を設けた。その後、各検体試料に、前培養を行った藻類懸濁液をそれぞれ 1mL ずつ添加して曝露試料とした。遅延発光の計測は、曝露培養開始時点から 0, 1, 6, 24 時間後の計 4 回行った。また、試験期間の間、曝露試料は 25℃、50 μ mol/m²/s の条件下で曝露培養を継続した。

2-3-1 試験操作

藻類発光阻害試験の実施にあたり、発光計測および藻類培養を除いた前処理等の作業は原則としてクリーンベンチ内で行った。

① 器具および計測装置の準備

凍結藻類キット (-80℃保存)

試料調製に使用する培養計測チューブ+通気蓋

先太チップ

ミリシール

OECD 培地および滴下器具

被験物質原液 (13 種 4-NP 異性体)

光照射型インキュベータ (培養計測チューブ回転振とう装置を設置)

光量 50 μ mol/m²/s (白色蛍光灯連続照明)、温度 25℃

高感度ルミノメータ

凍結藻類キット解凍装置

② 凍結藻類キットからの藻類懸濁液の調製

- i. クリーンベンチ内で、培養計測チューブに OECD 培地 800 μL を入れる
- ii. 凍結藻類キットを解凍装置に挿入後スイッチを入れる
- iii. 解凍した濃縮藻類懸濁液を先太チップで軽くピペッティングして、620 μL を培養計測チューブに入れる（溶け残りがある場合は、細胞を損傷させないようにピペッティングで溶かす）
- iv. 滴下器具を培養計測チューブに設置後、OECD 培地を 5 mL 滴下する
- v. 濃縮藻類懸濁液の添加から 10 分経過後、ピペットで攪拌し、ミリシールで通気蓋に封をする（iii~v は 10 分間を計測しながら行う）

③ 藻類懸濁液の回復培養

- i. 光照射型インキュベータ内に設置した培養計測チューブ回転振とう装置に②-v の培養計測チューブをセットする
- ii. 装置のスイッチを入れて、1 時間回復培養を行う

④ 検体溶液の調製

培養計測チューブに各濃度の検体溶液を調整する（被験物質入り OECD 培地、全量 9 mL \times 6 本）

濃度区は、対照区(0.1%EtOH)、0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように調整する（試験濃度の \times 1000 倍の溶液を事前に調製後、それを 8.99 mL の OECD 培地に 0.01 mL 添加した）

⑤ 暴露および 0 時間の発光計測

- i. 1 時間の回復培養を行った藻類懸濁液を緩やかにピペットで攪拌し、④で調整後の検体溶液に 1mL ずつ先太チップで添加して計測試料を調整する（調整後は 10 分間静置する。また、各濃度区の調製は 4 分間隔で行う）
- ii. ミリシールで通気蓋に封をする
- iii. 高感度ルミノメータにて、0 時間の発光計測を行う

⑥ 計測試料の培養

0 時間の発光計測が完了した試料から、培養計測チューブ回転振とう装置にセットし、暴露培養を開始する

⑦ 培養後の発光計測

0 時間の発光計測時間を起点に暴露 1, 6, 24 時間後に発光計測を行う

2-4 遅延発光の計測

本研究で使用した装置は、Katsumata *et al.*, (2009) および Takeuchi *et al.*, (2014) が報告した計測装置と同様のものであり^{13), 14)}、超高感度ルミノメータと呼ばれている (Figure. 5)。この装置には、チューブホルダーが設置されており、藻類を入れたガラスチューブを固定する。さらに、光電子増倍管が備えられており、励起光は、500 nm の白色ダイオード (LED) から供給されている。光電子増倍管へ励起光の照射を防止するため、LED と光電子増倍管の間にシャッターを設けている。藻類から放たれた遅延発光は、光電陰極へ通される。その後、遅延発光のシグナルは、USB インターフェイスを経由し、PC へ移される。遅延発行に関する信号は、数値データとして PC に記録される。

計測の流れとしては、藻類を入れたガラス管が機器内のホルダーにセットされた後、白色 LED から励起光が 10 秒間照射される。励起光の照射時は、シャッターは閉じられている。その後、再び暗所に 5 秒間だけ置かれ、700 nm の LED ($20 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) による照射を 1 秒間だけ行う。照射終了後、LED は消され、シャッターは開かれる。そして、0.1 秒刻みで 60 秒、遅延発光の計測が行われる。遅延発光の相対強度は、計数として表示される。1 ~ 60 秒間における遅延発光の強度は積分され、その結果を DFI とした。DFI は、除草剤や光合成阻害剤の影響を受け阻害されるため¹³⁾、 EC_{50} および NOEC を算出する従来型の評価手法である藻類細胞と同様な評価が出来る¹⁴⁾。 EC_{50} および NOEC を算出する場合、Ecotox-Statics (analysis software) を用いており、通常は、藻類生長阻害試験の結果によって求めている。しかし、過去の研究では、DFI の結果を代用して EC_{50} および NOEC の算出が行われている¹⁴⁾。

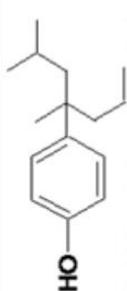
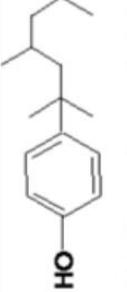
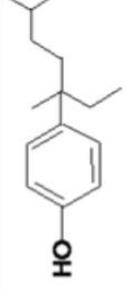
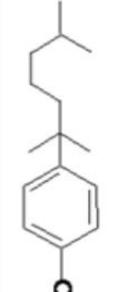
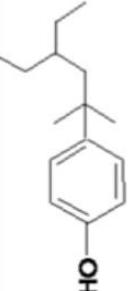
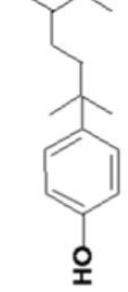
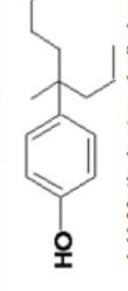
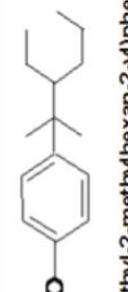
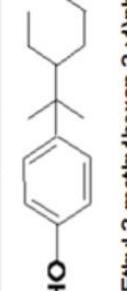
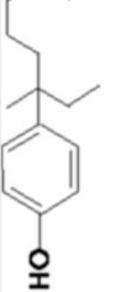
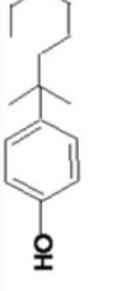
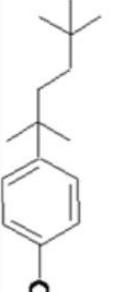
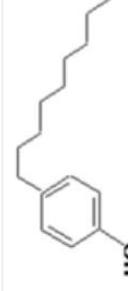
 <p>4-(2,4-Dimethylheptan-4-yl)phenol (NP-A)</p>	 <p>4-(2,4-Dimethylheptan-2-yl)phenol (NP-B)</p>	 <p>4-(3,6-Dimethylheptan-3-yl)phenol (NP-C)</p>	 <p>4-(2,6-Dimethylheptan-2-yl)phenol (NP-C')</p>
 <p>4-(4-Ethyl-2-methylhexan-2-yl)phenol (NP-D)</p>	 <p>4-(2,5-Dimethylheptan-2-yl)phenol (NP-F)</p>	 <p>4-(4-Methyloctan-4-yl)phenol (NP-H)</p>	 <p>4-(3-Ethyl-2-methylhexan-2-yl)phenol (NP-I)</p>
 <p>4-(3-Ethyl-2-methylhexan-2-yl)phenol (NP-I)</p>	 <p>4-(3-Methyloctan-3-yl)phenol (NP-N)</p>	 <p>4-(2-Methyloctan-2-yl)phenol (NP-O)</p>	 <p>4-(2,5,5-Trimethylhexan-2-yl)phenol (NP-Q)</p>
 <p>4-N-nonylphenol (4-n-NP)</p>			

Figure. 4 13種4-NP異性体の構造式, IUPAC名および略式
4-n-NPは直鎖型異性体であり、NP-A ~ NP-Qは分岐型異性体である

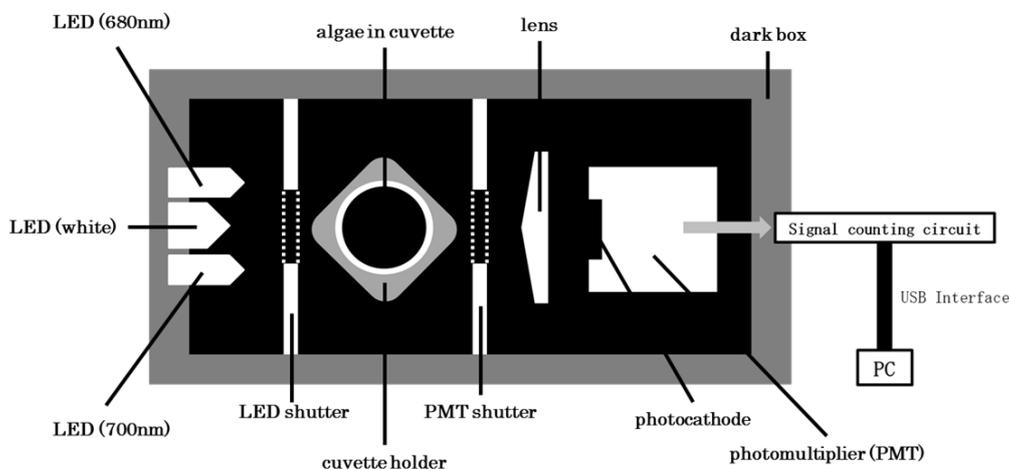


Figure. 5 遅延発光の計測装置 (Type-7100, Hamamatsu Photonics)

3. 結果および考察

3-1 予測 EC₅₀ 値の算出

藻類発光阻害試験により算出した 13 種 4-NP's の藻類 EC₅₀ 値を Table 1 に示した。

13 種 4-NP's において最も毒性が強い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) であり、最も毒性が低い値を示した異性体は分岐型である NP-D であった。また、算出された各 EC₅₀ 値は異性体によって異なる値を示した。このような結果から、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が考えられる。

Hense *et al.*, (2003) は NP が緑藻類 *Scenedesmus subspicatus* の生長を阻害したことを報告しており⁸²⁾、その EC₅₀ 値は 0.87~0.98 μg/mL であった。Wang *et al* (2007) は *Microcystis aeruginosa* を用いて NP の生長阻害試験を行い、その EC₅₀ 値が 0.67~2.96 μg/mL であることを示している⁸³⁾。また、*Chlorella vulgaris* に対する NP の EC₅₀ 値は 1.3 μg/mL であり、この値は藻類に対する NP の一般的な数値であると報告されている⁵⁰⁾。これら報

告されている藻類に対する NP の EC₅₀ 値に比べ、本試験で算出された 4-n-NP の EC₅₀ 値は非常に低く、藻類に対して極めて強い毒性影響を持っている可能性が高い。

藻類発光阻害試験による化学物質の藻類毒性評価は曝露開始後 6 時間以内での評価完了が可能なことから、迅速な評価系であると言及されることが多い。そのため、本試験でも曝露後 24 時間時点における 4-NP's の毒性評価に加え曝露 1 時間および 6 時間での毒性評価 (EC₅₀ 値) も表記した (Table 1)。4-NP's の多くは曝露時間とともに EC₅₀ 値の緩和を示した。また、Figure. 6 では藻類発光阻害試験による EC₅₀ 値に加えて、既報の魚類 (*Oryzias latipes*) LC₅₀ 値⁸⁴⁾ および甲殻類 (*Americamysis bahia*) の LC₅₀ 値⁸⁵⁾ を記載している。限定的ではあるが、藻類に対する影響は NP-O > NP-N > NP-I > NP-C' > NP-Q であり、魚類では NP-O > NP-N > NP-Q > NP-I > NP-C'、甲殻類では NP-N > NP-Q > NP-I > NP-C' > NP-O となっていた。これは、4-NP's の毒性影響が試験生物種によって異なる可能性を示唆している。

NP 同位体の内分泌かく乱作用は直鎖型異性体に比べて分岐型異性体で強くなると報告されている。Kobayashi *et al.*, (2013) は *Oryzias latipes* を用いた 4-NP's の生態毒性試験で、直鎖型異性体に対して分岐型異性体でその毒性が強くなる傾向を示している⁸⁴⁾。しかし、藻類発光阻害試験による評価結果ではそれらの報告とは異なる挙動がみられ、分岐型 4-NP's に比べて直鎖型異性体(4-n-NP)でその影響が有意に強くなっていた。また、4-n-NP の毒性影響は *Oryzias latipes* よりも *P.subcapitata* で強くみられた。これは魚類と藻類における 4-NP's の作用機序 (代謝経路や内分泌機能など) に起因していると考えられる。事実、内分泌かく乱物質は様々な生物機能に作用することが知られている。化学物質が示す生物への毒性影響は用量反応と密接に関係しているため、様々な毒性影響を考慮してその評価を行う必要がある。

Table 1 藻類遅延発光に関する13種4-NP異性体のEC₅₀値

4NP's	EC ₅₀ (μg/mL)			4NP's	EC ₅₀ (μg/mL)		
	1h	6h	24h		1h	6h	24h
4-n-NP	0.60	0.40	0.40	NP-H	0.7	0.80	1.6
NP-A	2.0	1.3	1.0	NP-I	1.1	0.90	1.5
NP-B	1.0	1.0	1.9	NP-M	1.4	1.7	1.6
NP-C	1.0	1.0	1.0	NP-N	0.80	1.4	1.2
NP-C'	1.5	1.0	2.1	NP-O	1.4	1.7	1.2
NP-D	2.5	2.8	4.0	NP-Q	0.80	1.4	1.6
NP-F	0.8	1.0	1.7				

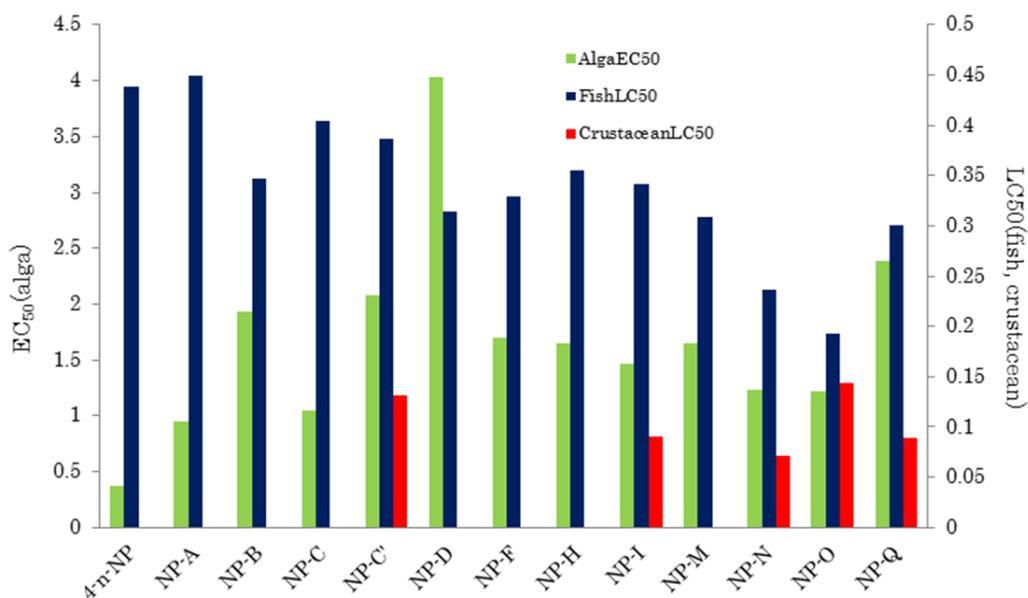


Figure. 6 4-NP異性体に関する藻類遅延発光のEC₅₀値と、ヒメダカ(*Oryzias latipes*)およびアミ(*Americamysis bahia*)のLC₅₀値の各傾向

3-2 藻類発光阻害率の比較

Figure. 7 に曝露 24 時間後の藻類発光阻害率を示した。この結果は、4-NP's が藻類の生長を阻害する事を示唆している。

直鎖型異性体である 4-n-NP は特に高い発光阻害率を示しており、曝露濃度区 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の全異性体において最高値(12.63%, 35.41%, 95.75%, 99.92%)であった。曝露区 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 90%以上の発光阻害率を示したのは 4-n-NP だけであり、曝露区 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では 4-n-NP のみ藻類生長の阻害がみられた。最も低い発光阻害率を示したのは分岐型異性体 NP-D で、その阻害率は 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 65.59%であった。分岐型異性体では NP-A が最も強い発光阻害を示しており、曝露区 0.3, 1.0, 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 13.29%, 51.01%, 90.08%であった。また、高濃度区(1.0 および 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)の発光阻害率で最も低値を示したのは NP-D であったが、低濃度区(0.03 および 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)では比較的高い値(4.81%および 11.58% ; 濃度区 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では分岐型異性体で最高値)を示していた。

異なる生物種による試験結果ではあるが、興味深い報告がいくつかある。Correa-Reyes *et al.*, (2007)は *Artemia* および *Caenorhabditis elegans* に微量の NP を曝露した結果、その生長が促進されたと報告している⁸⁶⁾。また、藍藻類 *Microcystis* に NP を曝露したことで同様の生長促進効果が報告されている⁸³⁾。NP は藻類を含む多様な生物種に対して明らかな毒性を示すことが多くの研究から実証されているが、その一方で上記報告のように有益な効果をもたらす事例も僅かではあるが存在している。

そして、生長助長効果は藻類発光阻害試験においても観察され、数種の分岐型 4-NP 異性体において低濃度区で藻類発光の増加がみられた。藻類の遅延発光は、その光合成量を正確に反映することから、発光量増加は藻類生長の促進を裏付けると考えられる。このため、4-NP's はその存在量が低濃度である場合、藻類の生長を促進する可能性が本試験結果からも示唆された。

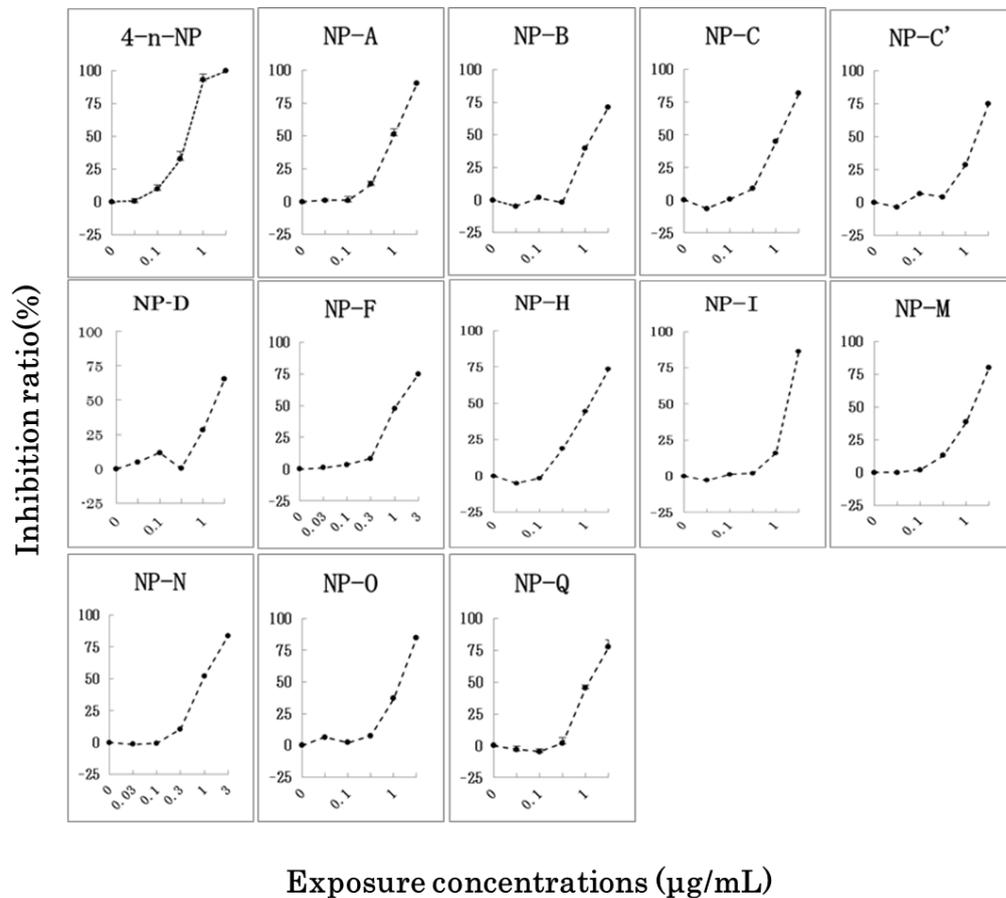


Figure. 7 緑藻類 *Pseudokirchneriella subcapitata* の遅延発光に対する4-NP異性体の発光阻害率

3-3 発光量の速度低下率（発光強度の減少）

従来法である藻類生長阻害試験（TG-201）では、計測した生物量から藻類細胞数の増加率（増加速度）を算出し、化学物質の毒性評価を行っている。藻類発光阻害試験では遅延発光量を生物量の代理値として増加速度を算出している。増加速度は数式1により算出した。増加速度の算出手順は、従来の藻類の化学物質影響評価手法であるOECDテストガイドライン201（TG-201）に準じて行った。

本試験では、発光量より算出した増加率を速度低下率として表した。算出された0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 µg/mlの速度低下率をFigure. 8-12に示す。

数式 1 : 増加速度 $\mu_{ij} = \ln X_j - \ln X_i / t_j - t_i$

μ_{ij} : 時間*i*から時間*j*の計測区間の増加速度 (時間の単位は日)

X_i : 時間*i* の発光量 (時間の単位は日、発光量はその時間の計測値)

X_j : 時間*j* の発光量 (時間の単位は日、発光量はその時間の計測値)

Figure. 8-12 に示した 1-6 h は曝露後 1 時間から 6 時間の発光低下率を、6-24 h は曝露後 6 時間から 24 時間の低下率を示している。そのため、1-6 h で示される変化を短期曝露の影響とし、6-24 h で示される変化を中~長期曝露の影響と考えた。

直鎖型異性体である 4-n-NP は全曝露濃度区で比較的高い低下率を示しており、特に高濃度区である 1.0 および 3.0 $\mu\text{g/mL}$ では 1-6 h, 6-24 h 共に最も強く影響していた。また、4-n-NP における低下率は分岐型異性体のものと比較して 3 倍以上高い数値であった。しかし、低濃度区では分岐型異性体の低下率が高い傾向にあり、曝露濃度 0.03, 0.1 $\mu\text{g/mL}$ の 1-6 h においては NP-C' が最も強く影響していた。特に曝露濃度 0.03 $\mu\text{g/mL}$ に関しては全体的に分岐型異性体で強い影響がみられたことから、曝露濃度が高くなると直鎖型異性体(4-n-NP)の毒性が強くなるが、低濃度の場合は分岐型異性体の毒性が高くなる可能性がある。国内の水環境中では 0.14 $\mu\text{g/L}$ ~3.08 $\mu\text{g/L}$ で 4-NP's の検出報告がされていることから、今後はより低濃度における分岐型 4-NP's の毒性評価が重要であると考えている。

多くの 4-NP's は 6-24 h に比べ 1-6 h でその低下率が高くなる傾向にあった。これは、4-NP's に曝露された *P. subcapitata* の耐性や、曝露期間中に 4-NP's の分解が生じた可能性を示している。過去の研究で、NP の毒性に対して緑藻類は高い耐性を持っている可能性が指摘されている⁶²⁾。更に、*Isochrysidales galbana* による NP の効果的な除去効果が示されており⁸⁷⁾、NP が藻類細胞内に濃縮されるケースもみられる⁸⁸⁾。そのため、このような現象が本試験内においても引き起こされている可能性がある。また、藻類発光阻害試験では 24 時間の曝露培養を白色蛍光灯下で行うため、4-NP's の光分解が生じている可能性が考えられる。

NP-M や NP-N など僅かな異性体において曝露 6-24 h で藻類影響の発現がみられたが、4-NP 異性体の多くは曝露 1-6 h で藻類生長の阻害を強く引き起こしており、6-24

h ではその影響が緩和される傾向にあった。このような結果は、4-NP's が非常に高い確率で藻類毒性を発現すること、そして、その毒性が曝露時間や濃度により多用に変化することを示唆しており、藻類バイオアッセイにおいて短期曝露の影響評価が非常に重要であることを示している。

公定法である TG-201 は、藻類を対象として化学物質などに 72 時間以上曝露させることでその影響を評価している。この手法は長期曝露の毒性評価に長けているが、数時間あるいは 1 時間未満など短期間で発現する影響を見落とす可能性が高い。一方で、藻類発光阻害試験は最短で曝露 1 時間未満での評価が可能であり、迅速簡便な試験手法としては唯一の評価系である。そのため、藻類バイオアッセイにおいて、遅延発光は迅速に毒性評価を行える生物指標であり、今後は大量の化学物質を対象とした一斉スクリーニングへの活用が見込まれる。

また、これまでの研究から、藻類種により化学物質への感度が異なることが示唆されており、同じ緑藻類となるが *Chlorella vulgaris* と *P. subcapitata* では NP への挙動に大きな違いがあると報告されている⁵⁰⁾。これまでの藻類発光阻害試験では TG-201 の推奨種である緑藻類 *P. subcapitata* により藻類毒性を評価しているが、地域や環境により生息する藻類種の序列は異なるため、今後は多様な藻類種を供試藻類とした藻類発光阻害試験での評価報告が重要であると考えられる。

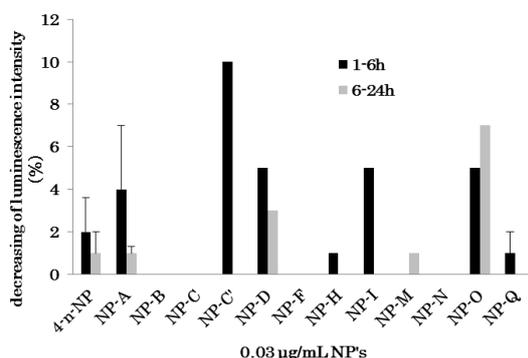


Figure. 8 0.03 µg/mLの4-NP異性体を曝露した緑藻類 *Pseudokirchneriella subcapitata* から生じる遅延発光の速度低下率

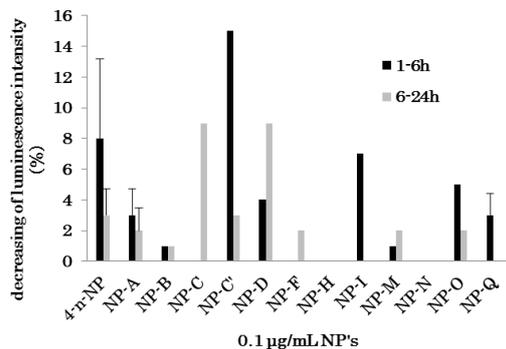


Figure. 9 0.1 µg/mLの4-NP異性体を曝露した緑藻類 *Pseudokirchneriella subcapitata* から生じる遅延発光の速度低下率

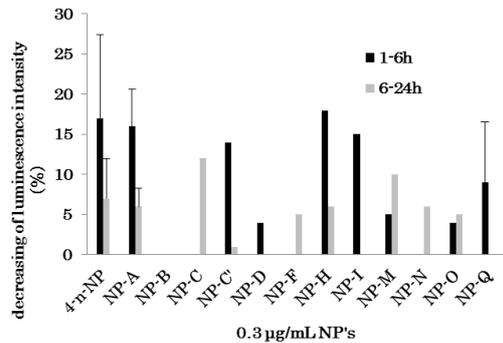


Figure. 10 0.3 µg/mLの4-NP異性体を曝露した緑藻類 *Pseudokirchneriella subcapitata* から生じる遅延発光の速度低下率

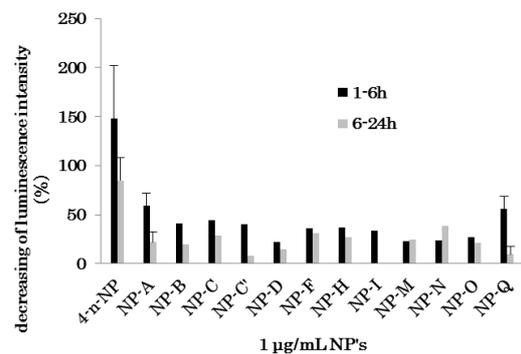


Figure. 11 1.0 µg/mLの4-NP異性体を曝露した緑藻類 *Pseudokirchneriella subcapitata* から生じる遅延発光の速度低下率

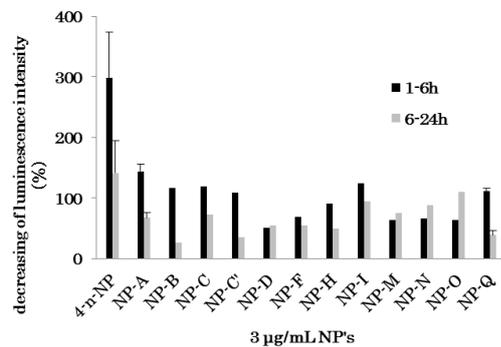


Figure. 12 3.0 µg/mLの4-NP異性体を曝露した緑藻類 *Pseudokirchneriella subcapitata* から生じる遅延発光の速度低下率

3-4 減衰曲線による作用機序の予測

藻類からの遅延発光は計測開始直後から時間経過に伴い発光量が徐々に減衰する曲線を示し、これを遅延発光減衰曲線と称している。前述のように減衰曲線は2つのピーク(極大値)をもつ特徴的な形状をし、曲線の形状などは藻類の光合成細胞と密接に関係していると考えられている。そのため、減衰曲線の形状から曝露物質が光合成過程のどの様な部位に作用したかを推察可能だと指摘されている。

此处では、13種4-NP'sの中から最もEC₅₀値が低かった4-n-NP、全異性体で最もEC₅₀値が高かったNP-D、分岐型異性体で最も強く影響したNP-A、低濃度区で強い影響を示したNP-C'を対象として、それら4-NP'sが有する光合成への作用機序を推察した(Figure. 13 – 16)。

4-n-NP(直鎖型異性体)

Figure. 13 に4-n-NPを曝露した藻類 *P. subcapitata* の遅延発光から得られた減衰曲線を示した。0 hの3 µg/mlにおいて、0.1秒地点の発光強度が対照区に対し大きく増加していた。これは、光合成の初期課程(PS II)で電子伝達が阻害されたためだと考え

られる。光照射した藻類を暗所に移した場合、葉緑体内の光エネルギー（電子）は通常の光合成経路を逆流する。この逆流した電子が葉緑体内の細胞（クロロフィル）と結合することで遅延発光を引き起こしている。つまり、PS II からプラストキノンプール(PQ)への伝達が阻害された結果、0.1秒地点の発光強度が増加したと考えられる。この傾向は*Arabidopsis thaliana*にDCMUを曝露した試験でも報告されており、DCMUはPS IIにあるQ_Bキノン電子受容体(Q_B)からPQへの電子伝達を阻害する。そして、1~10秒地点で対照区と交錯し発光強度が大きく低下しており、第2ピークの僅かな生成阻害がみられる。第2ピークの発生はPS I から生じる電子の逆流に起因すると考えられており、同様の現象がアンチマイシンAにより引き起こされている。アンチマイシンAは光合成阻害剤の1種であり、フェレドキシンを介したPS I からb₆fへの伝達(循環伝達系：cyclic electron flow)を阻害する。このことから、4-n-NPは少なくとも光合成電子伝達経路の2ヶ所以上に作用する可能性がある。その後、曝露時間の経過により毒性影響の深刻化がみられ、1 hでは第2ピークが生成されておらず、6, 24 hにおいては信号の著しい減退および途絶が生じていた。信号の途絶は藻類細胞数が極端に減少したために計測機器が発光を検知できなかったことが原因であると考えられるため、特に24 hでは藻類細胞の著しい死滅が生じている可能性が高い。

1, 6, 24 hの1 μ g/mLでも明確な毒性影響を示しており、1 hでは0 hの3 μ g/mlでみられた挙動が生じている。また、6, 24 hでは第2ピークの消滅が確認でき、cyclic electron flowの明らかな阻害が示唆された。更に、試験を通じて発光強度の増加がみられず、24 hでは藻類細胞数が減少している可能性が高いため、1 μ g/mLが藻類光合成を完全に阻害していると考えられる。また、0.03~0.3 μ g/mLにおいても光合成への影響がみられたが、完全な阻害や細胞の死滅を招くような影響はみられなかった。しかし、24 hの0.1, 0.3 μ g/mLにおいて、藻類の生長阻害が引き起こされ始めている可能性があり、今後は曝露時間を延長した観察が必要であると考えている。

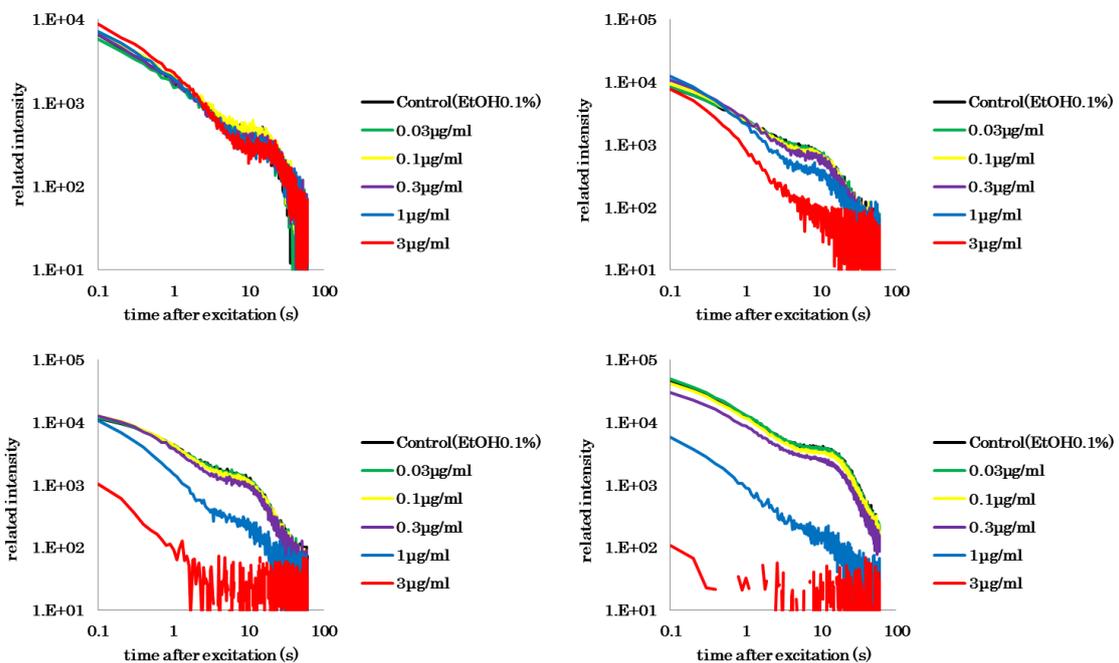


Figure. 13 4-n-NPの影響を受けた遅延発光の減衰曲線
 左上は曝露後0 h, 右上は1 h, 左下は6 h, 右下は24 hを示している。

NP-D

Figure. 14 に NP-D を曝露した藻類 *Pseudokirchneriella subcapitata* の遅延発光から得られた減衰曲線を示した。4-n-NPと同様に0 hの3 µg/mlにおいて、0.1秒地点の発光強度が対照区に比べ増加していたため、光合成の初期段階における電子伝達を阻害していると考えられる。その後時間経過により生長阻害が引き起こされていたが、細胞の減少や死滅など重篤な影響はみられなかった。また、4-n-NPでみられたような第2ピークの消滅も生じていなかった。

その他濃度区では、6, 24 hの1 µg/mLで僅かな生長阻害の可能性が示唆された程度で大きな影響はみられなかった。NP-Dにおいては、PS II 域での電子伝達阻害や生長阻害がみられたが、0-24 hにかけて全濃度区で藻類細胞の増殖が示唆されたことから、細胞の死滅など重篤な影響を招く可能性は低いと考えられる。

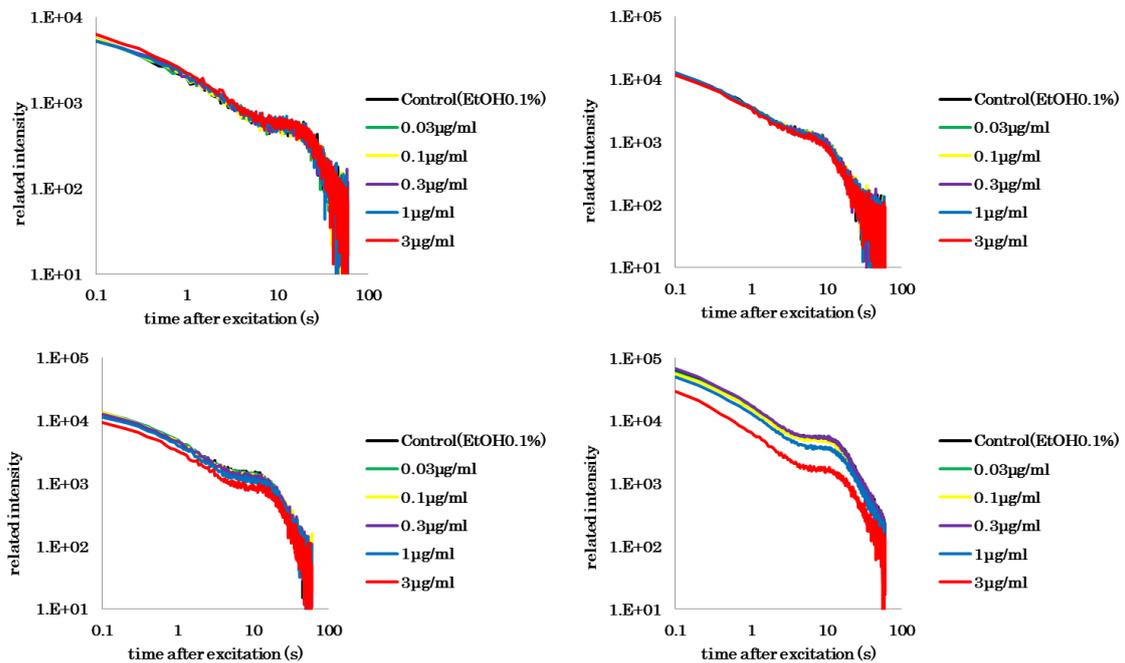


Figure. 14 NP-D の影響を受けた遅延発光の減衰曲線
 左上は曝露後0 h, 右上は1 h, 左下は6 h, 右下は24 hを示している。

NP-A

Figure. 15 に NP-A を曝露した藻類 *Pseudokirchneriella subcapitata* の遅延発光から得られた減衰曲線を示した。0 hの3 µg/mlでは、計測開始後0.1秒で発光強度の低下がみられた。1 hの3 µg/mlで発光強度の明らかな低下が生じていたため生長阻害の兆候がみられたが、その他濃度区では影響がみられなかった。6 hでは1 hと同様に3 µg/mlで生長阻害が示唆され、0.3, 1 µg/mLの減衰曲線で凹部分の僅かな落ち込みと第2ピーク出現の遅延がみられた。一方で24 hの0.3, 1 µg/mLでは藻類生長の阻害が示唆され凹部の落ち込みも僅かにみられたが、第2ピークへの影響は確認できなかった。しかし、24 hの3 µg/mlで特異的な形状がみられ、凹部および第2ピークの発生が遅れており、第2ピークに関しては対照区および0.03~1.0 µg/mLのものに比べより高いピークになっていた。シトクロムb₆f複合体(b₆f)に特異的に作用する阻害剤の影響で凹部の発生が抑制されることが報告されている。24 hの3 µg/mlでは対照区に比べ凹部の抑制がみられ

なかったことから、b_{6f}への影響はないと考えられる。減衰曲線にみられる凹凸の生成は循環伝達系を介したPS I からPQおよびb_{6f}への伝達などが関与しており、特に第2ピークの発生には循環伝達系が重要である。第2ピークの発生を阻害したアンチマイシンAがPS I からb_{6f}の循環伝達を阻害することが示されている。24 hの3 μg/mlの減衰曲線では第2ピークの発生こそ遅れていたが抑制などの影響はみられなかったことから、PS I → b_{6f}の循環伝達系への阻害影響は生じていないと考えられる。しかし、これらの報告から、PS I → PQの循環伝達系は第2ピークの発生に関与しないと考えられると同時に、3 μg/mLのNP-AがPS I → PQ 間を阻害していることを示唆している。つまり、PS I → PQの循環伝達系は凹部から第2ピークへの移行部の形成に作用しているが、その経路が阻害されたために凹部の形成遅延を招いたと考えられる。また、第2ピークが対照区などと比較して高くなったのは、PS I → PQ 間の阻害によりPS I → b_{6f}経路に電子が集中した事に起因している可能性がある。

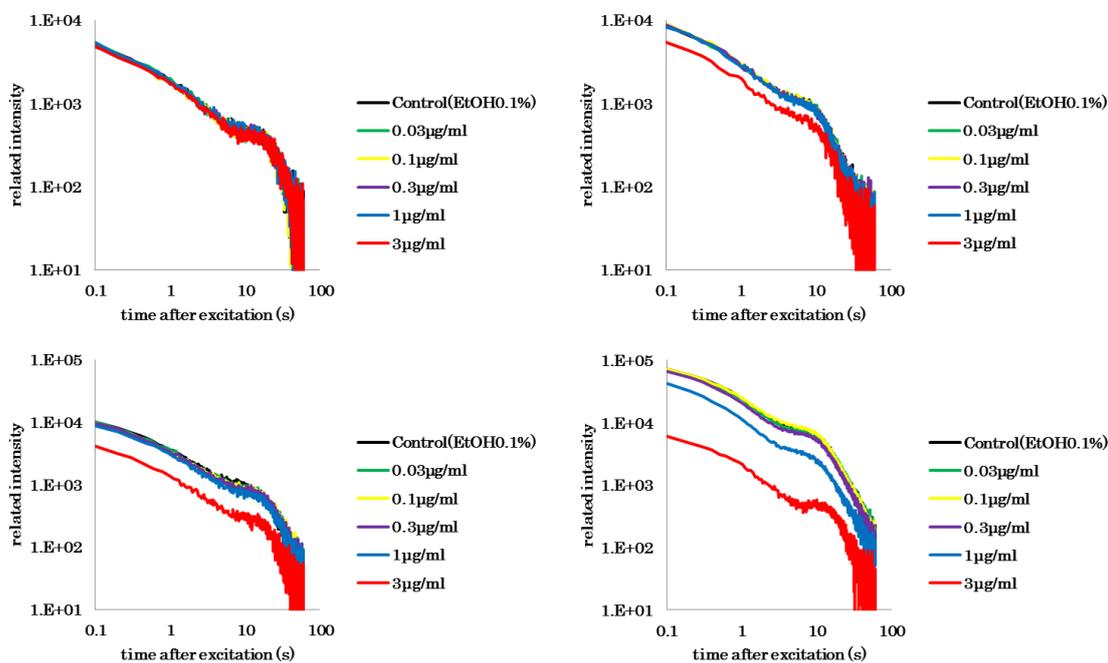


Figure. 15 NP-Aの影響を受けた遅延発光の減衰曲線
 左上は曝露後0 h, 右上は1 h, 左下は6 h, 右下は24 hを示している。

NP-C'

Figure. 16 に NP-C' を曝露した藻類 *Pseudokirchneriella subcapitata* の遅延発光から得られた減衰曲線を示した。4-n-NPやNP-Dと同様に0 hの3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ において、0.1秒地点の発光強度が対照区に比べ増加していたため、光合成の初期段階 (P680 \rightarrow Q_B \rightarrow PQ)における電子伝達を阻害していると考えられる。また、第2ピーク前にみられる凹部が対照区に比べ僅かに浅くなっている。この傾向はDBMIB (2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-p-benzoquinone)を曝露した*P.subcapitata*の減衰曲線でも観察されている。DBMIBは電子伝達阻害剤で、シトクロムb₆f複合体 (b₆f)にあるプラストキノールの酸化を阻害する。このことから、4-n-NP同様に曝露直後から光合成電子伝達経路の2ヶ所以上に作用する可能性がある。また、1, 6, 24 hの3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 6, 24 hの1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では生長阻害が示唆されたが、細胞数自体は増殖している可能性がある。

曝露濃度区0.03, 0.1, 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ においては1 hで凹部の僅かな阻害傾向があったが、0, 6, 24 hでは目立った影響はみられなかった。

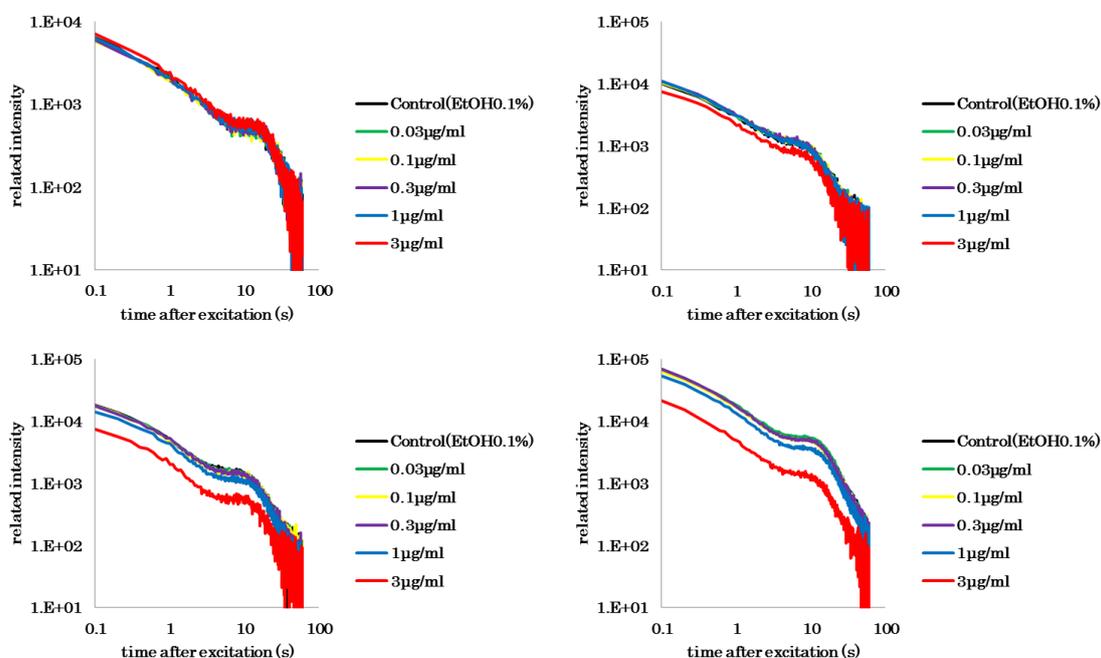


Figure. 16 NP-C'の影響を受けた遅延発光の減衰曲線
左上は曝露後0 h, 右上は1 h, 左下は6 h, 右下は24 hを示している。

3-5 4-NP ジアステレオマー (立体異性体) における藻類毒性の違い

近年、化学物質の立体構造に着目した議論が盛んに行われており⁸⁹⁾、現在流通する殺虫剤の3割はキラリティーを持った化学物質を含んでいると報告されている⁹⁰⁾。立体異性体間においては、その物理化学的特性が酷似する傾向にあると示唆されている一方で、生物種に対する影響には大きな違いがあると報告されている⁸⁹⁾。Jia *et al.*, (2015) は立体異性体の関係にある (+)-TFLV と (-)-TFLV で、*Danio rerio* の急性毒性が異なることを示しており⁹¹⁾、Zhang *et al.*, (2011) や、Ciminiello *et al.*, (2014) も同様に立体異性体間で生体毒性に強弱があると報告している^{92), 93)}。

Makino *et al.*, (2008) によって市販の NP 混合液から 6 種 3 ペアの 4-NP 立体異性体(ジアステレオマー ; NP-J, NP-L; NP-K, NP-P; NP-E, NP-G) の検出が報告されている⁹⁴⁾。NP の立体異性体において、その異性体間における構造の違いとその生態毒性に言及した文献は非常に少なく、藻類を対象とした研究報告はされていない。

そのため、6 種 3 ペアの 4-NP ジアステレオマーを対象とした藻類発光阻害試験により、各 4-NP 立体異性体を示す藻類生長(藻類遅延発光) への影響を評価し、各ペア間における毒性の傾向を明らかにした。

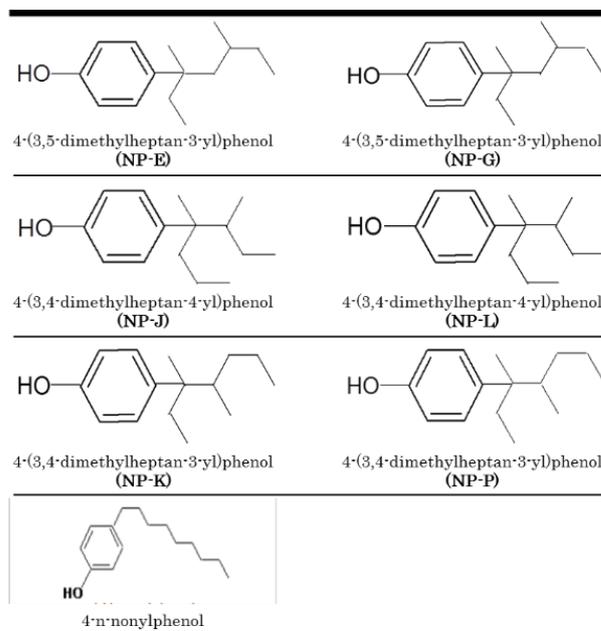


Figure. 17 6種3ペアの4-NPジアステレオマー
NP-EとNP-G, NP-JとNP-L, NP-KとNP-Pがそれぞれ立体異性体の関係にある。4-n-NPは直鎖型異性体で比較のために記載。

3-5-1 藻類 EC₅₀ 値および遅延発光阻害率

Table 2 に藻類発光阻害試験による EC₅₀ 値を示した。NP-P が 0.6 µg/mL と最も強い影響を示しており、順に NP-L (0.8 µg/mL), NP-K (1.3 µg/mL), NP-G (1.4 µg/mL), NP-J (1.9 µg/mL), NP-E (2.6 µg/mL) であった。また、各立体異性体のペアにおいては、NP-J < NP-L, NP-K < NP-P, NP-E < NP-G となっていた。

6 種 4-NP ジアステレオマーの曝露 24 時間後における遅延発光阻害率を Figure. 18 に示した。全物質で遅延発光の阻害がみられ、NP-P:90.07%, NP-L:85.09%, NP-G:82.93%, NP-K:82.3%, NP-E:75.79%, NP-J:73.41% であった。NP-P は全曝露濃度区において比較的強い阻害影響を有しており、曝露濃度区 0.3~3.0 µg/mL では最も高い阻害率を示した。そのため、分岐型異性体においては特に藻類毒性が強いことが示唆された。一方で、低濃度区 (0.03 µg/mL) においては NP-E (8.94%), NP-K (7.07%), NP-P (6.82%) が強い阻害率を示しており、過去に報告した同濃度区における 4-NP's の遅延発光阻害率と比較しても最も高い値であった。また、各ペアにおける影響差では、NP-J < NP-L, NP-K < NP-P, NP-E < NP-G となっており、EC₅₀ 値と同様の傾向を示した。

3-1・3-4 では、13 種 4-NP's の各 EC₅₀ 値が 0.4~4.0 µg/mL であり、12 種分岐型異性体に比べ直鎖型異性体である 4-n-NP の藻類毒性が強いことを明らかにした。ここでは立体異性体の関係にある 6 種 3 ペアの 4-NP's (NP-J, NP-L; NP-K, NP-P; NP-E, NP-G) を対象に毒性評価を行い、その立体構造との関係性に着目した。

Makino *et al.*, (2008) により⁹⁴⁾、NP-K および NP-P の立体構造が核磁気共鳴スペクトル (1H NMR) から明らかにされている (Figure. 19)。また、NP-P (δ 0.58), NP-L (δ 0.58) の β カーボンに結合するメチル基から発せられるプロトンシグナルは、それら立体異性体である NP-K (δ 0.87), NP-J (δ 0.88) のプロトンシグナルに比べ低値を示している。高磁場にあるメチルプロトンシグナルはベンゼンリングの異方性効果との関係が示唆されており、4-NP's の立体構造においてはメチル基がベンゼン環の上部に存在することが望ましいと考えられている。Figure. 19 に示した NP-P, NP-K の構造は分子力学計算により最適化された状態にあると指摘されている。また、γ カーボンにメチル基が結合した NP-E および NP-G のプロトンシグナルは δ 0.76 および δ 0.49 であると報告されている。

4-NP ジアステレオマーの藻類毒性と構造の関係性は、各 EC₅₀ 値およびその遅延発光の阻害率から評価した。各ペアにおいて、高磁場にメチルプロトンシグナルを持つ

NP-P および NP-L はそれぞれのペアである NP-K および NP-J に比べ EC₅₀, 遅延発光阻害率共に強い毒性影響を示した。また、γ カーボンにメチル基がある NP-G および NP-E に関しても、より高磁場にシグナルを持つ NP-G の藻類毒性が強い傾向にあった。これらの結果から、β および γ カーボンに結合するメチル基のプロトンシグナルがより高磁場に起因した異性体(NP-P, NP-L, NP-G)程、藻類毒性が強まる可能性が指摘される。

4-NP ジアステレオマーの藻類毒性は曝露時間や濃度に依存して多用な挙動を示したが、メチル基のプロトンシグナルにも関係していると考えられる。

Table 2 6種4-NPジアステレオマーの藻類遅延発光に関するEC₅₀値
4-n-NPは直鎖型異性体で、比較対象として記載

<i>4NP's</i>	EC ₅₀ (μg/mL)		
	1h	6h	24h
NP-E	0.5	0.8	2.6
NP-G	1.3	0.8	1.4
NP-J	0.9	0.7	1.8
NP-K	1.4	0.8	1.3
NP-L	N.D	0.5	0.8
NP-P	0.9	0.7	0.6
4-n-NP	0.60	0.40	0.40

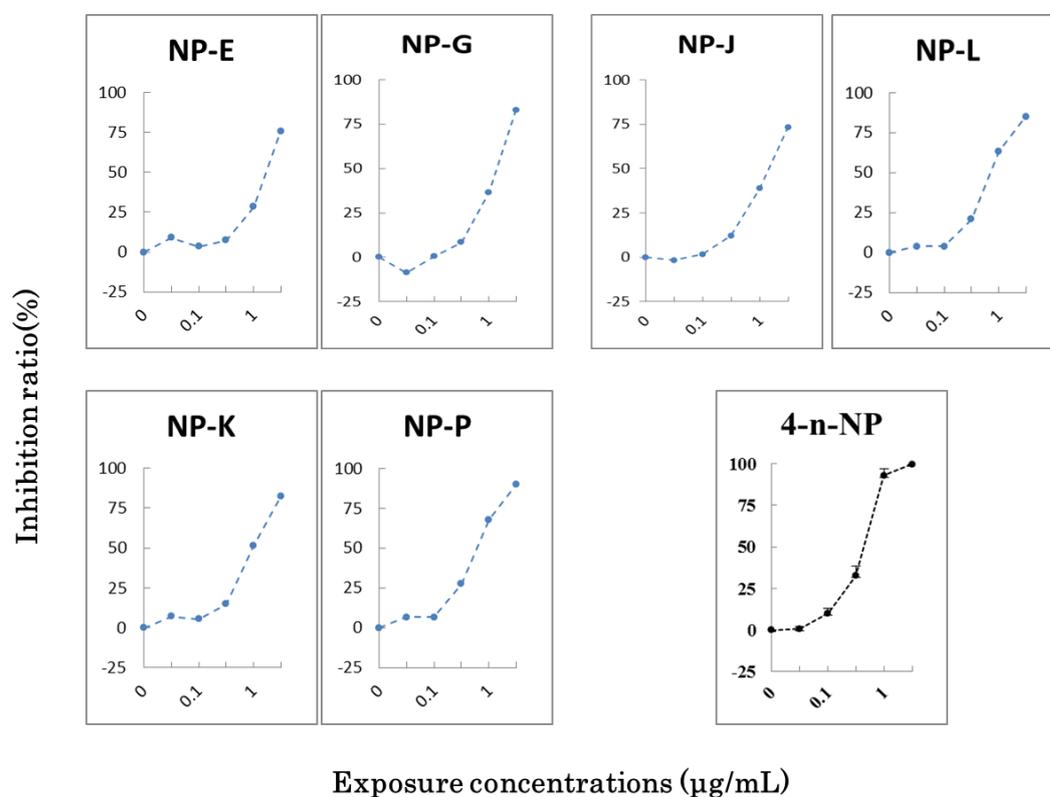


Figure. 18 緑藻類 *Pseudokirchneriella subcapitata* の遅延発光に対する4-NPジアステレオマーの発光阻害率

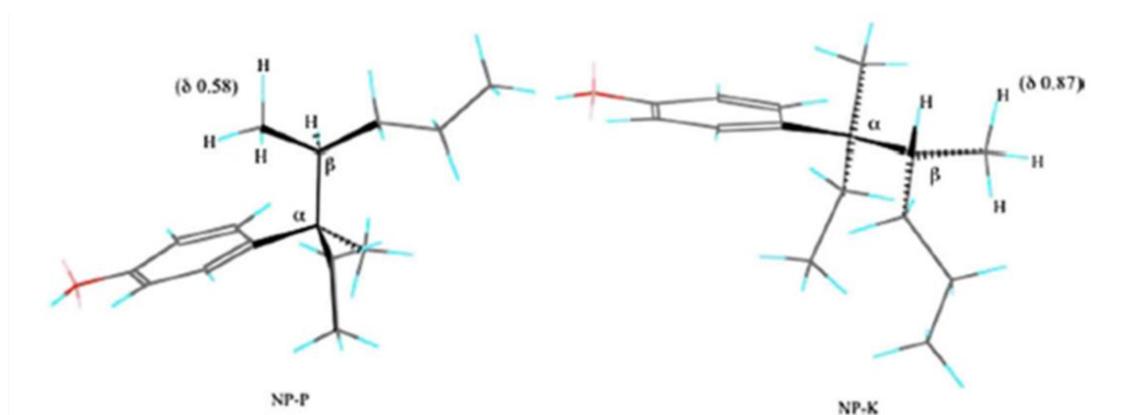


Figure. 19 核磁気共鳴装置(NMP)によるNP-KおよびNP-Pの立体構造(Makino *et al.*, 2008)

4. 第2章のまとめ

第2章では、遅延発光を利用した藻類発光阻害試験を用いて、13種4-NP's(直鎖1種；分岐12種)および6種3ペアの4-NP立体異性体(ジアステレオマー)を対象とし、4-NP'sの藻類毒性や藻類発光阻害試験の再現性などを明らかにした。

藻類発光阻害試験による予測 EC_{50} 値は $0.4\sim 4.0\ \mu\text{g/mL}$ であり、直鎖型異性体である4-n-NPが最も強い毒性を示した。また、多くの異性体が曝露後6時間以内により強い影響を示しており、6-24hでは影響が低下する傾向にあった。そのため、従来のような評価完了に72時間以上を有する藻類生長阻害試験では、藻類に対する正確な影響を見落としかねないことが示唆された。しかしその一方で、NP-M, NP-N, NP-Oなど1-6hに対して6-24hで毒性影響の更なる発現がみられた異性体は、評価時間の延長や藻類生長阻害試験による再評価がより重要であると考えられる。

また、4-NP立体異性体である(NP-E, NP-G)、(NP-J, NP-L)、(NP-K, NP-P)の3ペアを対象として、各異性体ペア間における立体構造の違いが藻類毒性に及ぼす影響を評価した。NP-E, NP-Gのペアは γ -炭素に結合したメチル基の位置が、NP-J, NP-L, NP-K, NP-Pのペアは β -炭素に結合したメチル基の位置が異なり、各立体異性体のメチル基から発せられるプロトン信号も報告されている(NP-E: 80.76, NP-G: 80.49、NP-J: 80.88, NP-L: 80.58、NP-K: 80.87, NP-P: 80.58)。

本試験で算出した4-NP立体異性体の藻類 EC_{50} 値において、各ペア間でその値に差がみられ、NP-J ($1.9\ \mu\text{g/mL}$) < NP-L ($0.8\ \mu\text{g/mL}$)、NP-K ($1.3\ \mu\text{g/mL}$) < NP-P ($0.6\ \mu\text{g/mL}$)、NP-E ($2.6\ \mu\text{g/mL}$) < NP-G ($1.4\ \mu\text{g/mL}$)となっていた。また、遅延発光の阻害率においてもNP-J (73.41%) < NP-L (85.09%)、NP-K (82.3%) < NP-P (90.07%)、NP-E (75.79%) < NP-G (82.93%)となっており、これら EC_{50} 値と阻害率の傾向は各ペアが示すプロトン信号の傾向と完全に一致していた。そのため、4-NP立体異性体の各ペアが示す藻類毒性は、 β -炭素あるいは γ -炭素に結合するメチル基の位置に起因しており、メチル基がより高磁場に存在するときに藻類毒性が強くなる可能性が考えられる。

また、本試験により藻類発光阻害試験が4-NP立体異性体の立体的構造の違いを反映した影響を検出可能であることが明らかとなり、この特性は異なる化学物質の評価でも有効であると考えられる。

第3章 緑藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) の遅延発光による重金属類の毒性評価

1. 目的

微量の亜鉛や鉄など一部の重金属類は生物にとって必須栄養元素である一方、過剰な摂取は重篤な毒性影響を引き起こす。また、重金属類は食物連鎖を通して生物体内へ濃縮されるなど、人間や自然環境にとって大きな汚染源となっており⁹⁵⁾、世界中で重金属類による水生生態系への汚染が深刻な問題となっている⁹⁶⁾⁻⁹⁸⁾。また、それら汚染は多種の重金属類が複合的に影響している例もあり⁹⁶⁾、今後は金属類単体の影響だけではなく、それらの複合影響を考慮した排水管理や環境試料の評価が重要になると考えられる。

その中で、微細藻類を使ったバイオアッセイは、細胞サイズが小さく、管理や分析が容易、一度の試験に膨大な生物量を用いることが可能、そして、繁殖(生長)が容易である点から生態毒性試験として非常に優れた特性を持っており、重金属類を含む試料の汚染影響を評価する手段として、非常に有効であると考えられる。また、これらの特徴に加えて、新規藻類バイオアッセイである藻類発光阻害試験は、単純かつ迅速に化学物質単体および複合時の藻類影響を評価可能であるため、簡便迅速な汚染評価の手法として環境試料の評価や排水管理などへの実用が見込まれている¹⁰⁾⁻¹⁴⁾。

その一方で、遅延発光に関する重金属類の影響報告は極めて少なく、複合的な汚染も予想される排水・環境試料の評価に藻類発光阻害試験を導入する場合、それら化学物質の単体時における影響の有無が重要となる。

そのため、第3章では、排水基準値が設けられている重金属類を対象に、遅延発光に関する影響報告の有無を調査し、その中で、遅延発光に関する知見がない重金属類を藻類発光阻害試験により評価することにした。そして、それら重金属類の藻類遅延発光への影響を明らかにすることで、環境試料の評価や排水管理などへの実用性を検討した。

2. 材料および方法

2-1 供試藻類

本試験では、*Pseudokirchneriella subcapitata* (旧名:*Selenastrum capricornutum*) を用いた。*P. subcapitata* は OECD (藻類生長阻害試験) で推奨されている代表的な供試藻類であり³⁾、多くの毒性試験で用いられている。また、培養液は OECD 培地を採用した。OECD 培地は、塩化アンモニウム (NH₄Cl : 15 mg/L)、塩化マグネシウム六

水和物 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 12 mg/L)、塩化カルシウム二水和物 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 18 mg/L) 硫酸マグネシウム七水和物 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 15 mg/L)、リン酸二水素カリウム (KH_2PO_4 : 1.6 mg/L)、塩化鉄(III)六水和物 ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0.064 mg/L)、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム ($\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2, 2\text{H}_2\text{O}$: 0.1 mg/L)、ホウ酸 (H_3BO_3 : 0.185 mg/L)、塩化マンガン四水和物 ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 0.415 mg/L)、塩化亜鉛 (ZnCl_2 : 0.003 mg/L)、塩化コバルト四水和物 ($\text{CoCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 0.0015 mg/L)、塩化銅二水和物 ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.00001 mg/L)、モリブデン酸二ナトリウム二水和物 ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.007 mg/L)、炭酸水素ナトリウム (NaHCO_3 : 50 mg/L) を含んでいる。藻類 (20×10^6 cells/ml) は藻類懸濁液として -80°C で凍結保存されており、凍結藻類キット解凍装置により解凍後、9.6 mL の OECD 培地を含んだガラスチューブ ($25 \text{ mm}^2 \times 85 \text{ mm}$) に約 400 μL (0.4 mL) の藻類懸濁液を注入し 1 時間の前培養を行った ($24^\circ\text{C} \pm 1$, $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)。

2-2 曝露物質

試験物質には、鉛、ニッケル、クロム、セレンの標準溶液 (和光純薬) を用いた。鉛は 2000, 4000, 6000, 8000, 10000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、クロムは、60000, 80000, 90000, 100000, 120000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、ニッケル、セレンは 1000, 3000, 10000, 30000, 100000 $\mu\text{g}/\text{L}$ のストック溶液を作成後、曝露試料として使用した(各溶液は、曝露試料調整時に 100 倍希釈される)。

2-3 曝露培養

OECD 培地を専用の培養チューブに 9.4 mL 移し、2-2 で調整したストック溶液を 0.1 mL 添加した 5 濃度区の試料と、超純水 0.1 mL を添加した試料(対照区)の計 6 濃度区の検体溶液を作成した。その後、回復培養を完了した藻類 0.5 mL を各検体溶液に加え、全量 10mL の曝露試料を作成した。各曝露試料は、24 時間の曝露培養 ($50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, $24 \pm 1^\circ\text{C}$) を行い、曝露開始 0, 6, 24 時間後に各試料の遅延発光を計測した。

2-4 遅延発光の計測

藻類の遅延発光は、高感度ルミノメーター (TYPE-7100, Hamamatsu Photonics, Japan; Figure. 1) によって計測した。過去の報告でも同様の計測機器を使用して藻類の遅延発光を計測している^{13)・14)}。計測手順としては、白色 LED から、計測機器中にセッ

トされた培養チューブに対して励起光が 30 秒間照射される。そして、5 秒間の遮光後、700 nm の赤色 LED によって励起され、その後 60 秒間、遅延発光の計測が行われる。計測した 60 秒間の遅延発光量を積分したものは、DLI (Integral delayed luminescence) と呼ばれる。

藻類の遅延発光量は、除草剤や光合成阻害剤によって減少することが報告されている^{10)・13)・15)}、同様の効果を示す物質などに対して、DLI を藻類生長の代理値として、それら物質の EC₅₀ 値 (50% effect concentration) や NOEC (non-observed effect concentration) を算出できる。また、DLI と藻類生長阻害には、相関関係が示されている。本試験で評価した各重金属類の EC₅₀ 値は、Ecotox-Statics (analysis software) によって算出した。

3. 結果および考察

排水基準に設定されている砒素(As)、カドミウム(Cd)、クロム(Cr)、銅(Cu)、鉄(Fe)、水銀(Hg)、マンガン(Mn)、鉛(Pb)、セレン(Se)、亜鉛(Zn)の 10 種に、光合成生物に対し非常に強い毒性を示すことが報告されているニッケル(Ni)を加えた全 11 種の重金属類を対象とし、藻類生長阻害試験および遅延発光への影響値(文献値)を纏めた(Table 3)。

勝又らは、藍藻類 *Spirulina platensis* を用いて水銀の毒性影響を明らかにしており、10-30 µg/L の水銀を曝露した結果、20 µg/L 以上で *S. platensis* の遅延発光を有意に阻害したことを報告している¹⁰⁾。また、Drinovec らの研究では、*Lemna minor* の遅延発光を指標として、カドミウム、銅、亜鉛の毒性評価を行っており、それぞれの EC₅₀ 値が 57±13 mg/L、2.0±0.2 mg/L、981±175 mg/L であると示している⁹⁹⁾。

調査の結果、砒素、クロム、鉄、マンガン、鉛、セレン、ニッケルの 7 種に関して、遅延発光への影響報告がされてない事が判明した。本研究では、その中でも、光合成への影響が報告されているクロム、鉛、セレン、ニッケルを対象として、藻類発光阻害試験による評価を行った。

Table 3 藻類遅延発光(DL)によるEC₅₀および藻類生長阻害試験によるEC₅₀の文献値

	藻類発光阻害試験(遅延発光: DL)	藻類生長阻害試験
砒素 (As)	-	0.26 - 4.7 mg/L ¹⁰⁰⁾
カドミウム (Cd)	57±13 mg/L, 0.07 mg/L ⁹⁹⁾	0.01 - 0.13 mg/L ⁹⁶⁾
クロム (Cr)	-	-
六価クロム	-	0.04 - 0.9 mg/L ⁹⁶⁾
銅 (Cu)	2.0±0.2 mg/L ⁹⁹⁾	0.02 - 0.94 mg/L ⁹⁶⁾
鉄 (Fe)	-	3.28 - 4.95 mg/L (Fe III) ¹⁰¹⁾
水銀 (Hg)	0.01-0.03 mg/LでDLを阻害 ¹⁰⁾	0.007 - 0.05 mg/L ¹⁰⁰⁾
アルキル水銀	-	0.001 mg/L ¹⁰⁰⁾
マンガン (Mn)	-	8.3 mg/L ¹⁰²⁾
鉛 (Pb)	-	0.29 - 2.7 mg/L ⁹⁶⁾
セレン (Se)	-	0.0615×10 ³ - 0.143×10 ³ mg/L ¹⁰³⁾
亜鉛 (Zn)	981±175 mg/L ⁹⁹⁾	50 - 310 mg/L ⁹⁶⁾
ニッケル (Ni)	-	0.15-0.3 mg/L ⁹⁶⁾

3-1 鉛の遅延発光阻害評価

20-100 µg/L の鉛を曝露した *P. subcapitata* の遅延発光量を Figure. 20 に示す。対照区に対して、曝露濃度 40-100 µg/L で有意に遅延発光量が減少していた。最低濃度区である 20 µg/L においても遅延発光量の減少傾向が示されたが、統計的な有意差はみられなかった。また、曝露濃度 60 µg/L に対して、曝露濃度 80 および 100 µg/L の遅延発光量で僅かな増加傾向がみられた。過去には、*P. subcapitata* に鉛や銅を曝露した結果、高濃度区では、その毒性影響が緩和したことが報告されており、藻類由来の有機物などが関与した可能性が示唆されている¹⁰⁴⁾。通常、このような傾向は、藻類試験における正確な毒性評価を阻害すると懸念されるが、藻類発光阻害試験では、最短で 15-60 分未満での評価が可能であるため、上記のような緩和影響がみられる前に評価を完了することが可能である。また、本試験の様に試験時間を 24 時間に設定した場合でも、1 度目の評価完了から濃度を再設定し、再度評価を実施しても 48 時間程度での毒性評価が可能である。しかし、従来の藻類試験では、72-96 時間の曝露試験を行った後、そこから藻類生長が評価される為、評価完了までに最短でも 72 時間以上が必要とされ、再試験ともなれば、更にその倍の時間が要求される。このような不足の事態は、多種の化学物質が混在する排水試料ではより発生率が高いと予測される。その様な未知試料の評価に関し

て、迅速な毒性評価が可能である藻類発光阻害試験は高い適応性を示すと考えられる。

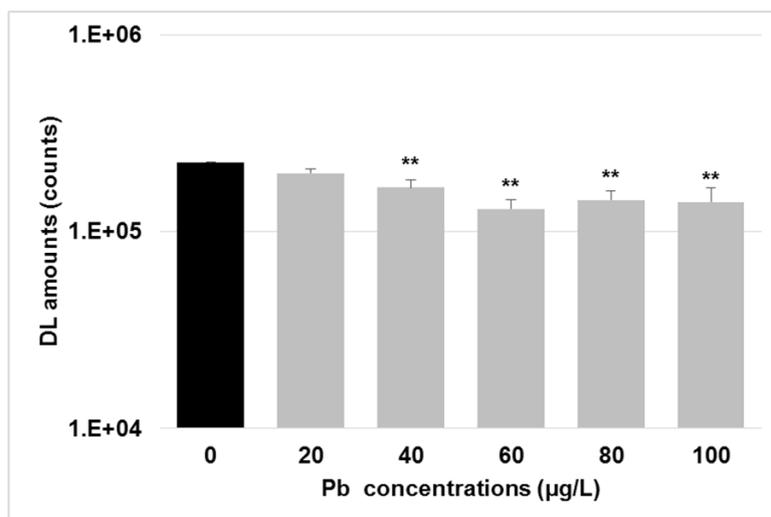


Figure. 20 鉛に曝露された*P. subcapitata*の遅延発光量

3-2 ニッケルの遅延発光阻害評価

10-1000 µg/L のニッケルを曝露した *P. subcapitata* の遅延発光量を Figure. 21 に示す。対照区に対して、曝露濃度 100-1000 µg/L で有意に遅延発光の阻害がみられた一方で、低濃度区(10, 30 µg/L)では、遅延発光への影響はみられなかった。ニッケルが光合成に与える影響については多くの知見があり、高濃度のニッケルは光合成の電子伝達阻害に加え¹⁰⁵⁾⁻¹⁰⁷⁾、二酸化炭素の固定や気孔伝導度にも影響を及ぼすことが報告されている¹⁰⁸⁾。また、植物へのニッケル曝露の結果として、クロロフィル(Chl)含量や、カロテノイド、電子伝達物質(シトクロム b_{6f} および b₅₅₉、フェレドキシン、プラストシアニン)への影響が報告されている^{107),108)}。この様にニッケルは、重金属類の中でも光合成に対して多様な影響を示しており、その阻害メカニズムも多岐に渡ると考えられる。そのため、光合成と密接に繋がる遅延発光を指標とした藻類発光阻害試験は、それら様々な影響を総体として一度に検出することが可能であり、簡便にニッケルの影響を評価することが出来る。

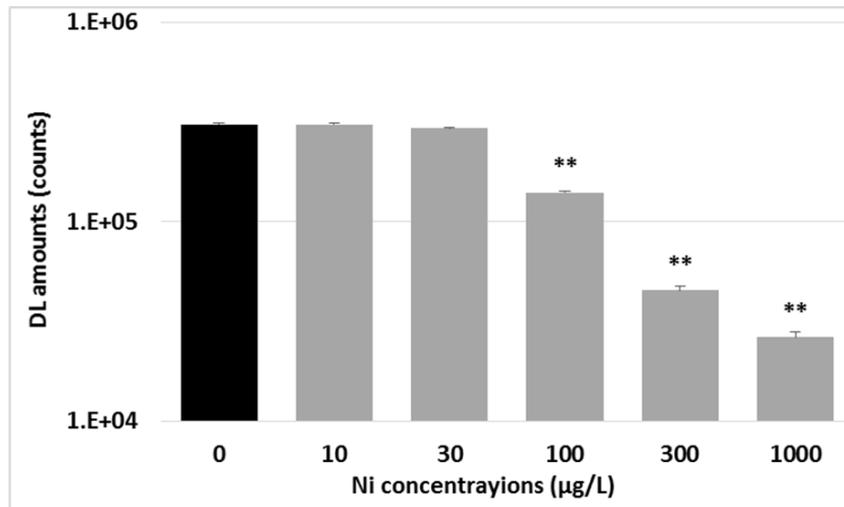


Figure. 21 ニッケルに曝露された*P. subcapitata*の遅延発光量

3-3 クロムの遅延発光阻害評価

600-1200 µg/Lのクロムを曝露した *P. subcapitata* の遅延発光量を Figure. 22 に示す。対照区に対して、全濃度区で有意に遅延発光量が減少していた。プレ試験で 10,30,100,300 µg/L のクロムを *P. subcapitata* に曝露した所、10-100 µg/L では遅延発光への影響がみられなかった(not shown)。これらの結果は、低濃度のクロムが藻類の光合成を阻害しないことを示唆しており、その存在量が 100µg/L 以下では、遅延発光による検出が困難であることを、そして、300 µg/L 以上では、クロムの影響を明確に感知出来ることを示している。また、Takami らは、クロムを淡水性緑藻類に曝露した場合、48 時間で電子伝達系や光合成機能に強い悪影響を及したと報告しているが、短時間の曝露では、逆に光合成の機能を活性化したことを示唆している¹⁰⁹⁾。これは 24 時間でクロムの阻害影響を正確に示した藻類発光阻害試験の迅速な評価系を示すものである。また、曝露 6 時間の観察では遅延発光量の増加(光合成機能の活性化)はみられなかった(not shown)。つまり、短期曝露の試験であってもクロムの存在による阻害影響や EC₅₀ 値の正確な評価を妨害される懸念がないことを示唆している

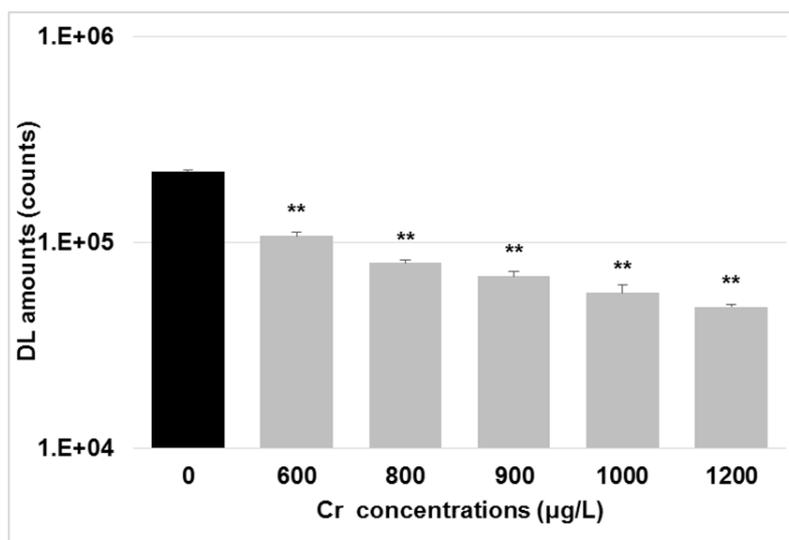


Figure. 22 クロムに曝露された*P. subcapitata*の遅延発光量

3-4 セレンの遅延発光阻害評価

10-1000 µg/L のセレンを曝露した *P. subcapitata* の遅延発光量を Figure. 23 に示す。全曝露濃度区で対照区と同等の遅延発光量が示され、統計的にも有意な影響はみられなかった。

遅延発光は光合成の挙動を正確に再現するため、遅延発光の阻害を示さなかったセレンは、光合成組織に作用しない、或いは極めて小さな影響しか持っていない可能性がある。これは、藻類発光阻害試験によるセレンの評価が非常に困難であることを示す結果であるが、Ibrahim and Anne らは、セレンが緑藻類(*P. subcapitata*)の急性毒性を引き起こすには、5 mg/L 以上の存在量が必要であることを¹⁰³⁾、Eisler は、複数の藻類 (*Anacystis nidulans*, *Anabaena variabilis*)を用いた曝露試験でセレンの EC₅₀ 値が 15~40 mg/L であると報告している¹¹⁰⁾。これらの報告は従来の藻類生長阻害試験においてもセレンの影響が極めて小さいこと、また、セレンが藻類生長の脅威になり難い事示すものであるため、WET などの排水管理では、より複雑な生体構造を有し、多様な感度を示す魚類などの高次生物による影響評価が重要になると考えられる。その一方で、排水管理においては、その影響を検出することが重要である為、今後はより高濃度のセレンに曝露することで藻類遅延発光の挙動を調査する必要がある。

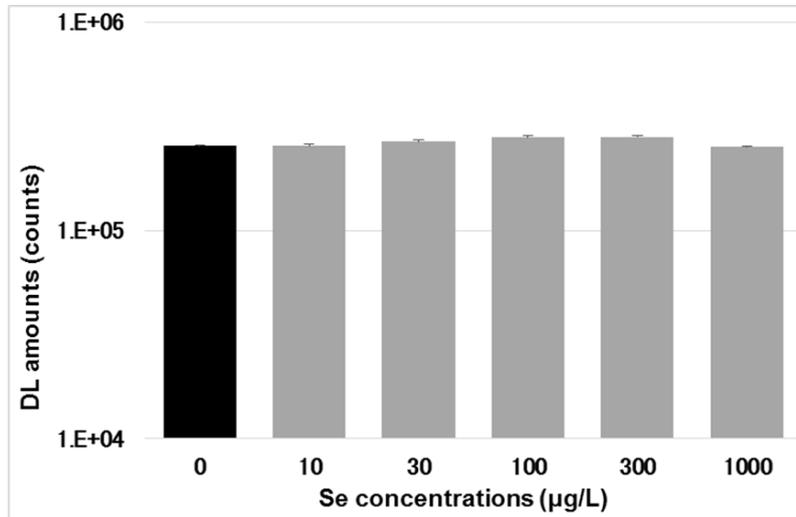


Figure. 23 セレンに曝露された*P. subcapitata*の遅延発光量

3-5 鉄の遅延発光阻害評価

250-5000 µg/L の鉄を曝露した *P. subcapitata* の遅延発光量を Figure. 24 に示す。その曝露濃度が 500 µg/L 以上であるとき、有意に藻類の遅延発光を阻害していた。藻類光合成組織に関する鉄の阻害影響はこれまでに報告されていないが、本結果では遅延発光(光合成)への強い影響が示唆された。その一方で、鉄は溶液中の養分と供沈殿する事で藻類に対して間接的に毒性として作用する可能性が示唆されており¹⁰⁾、今後は鉄の発光阻害要因を明確にする事が重要であると考えられる。

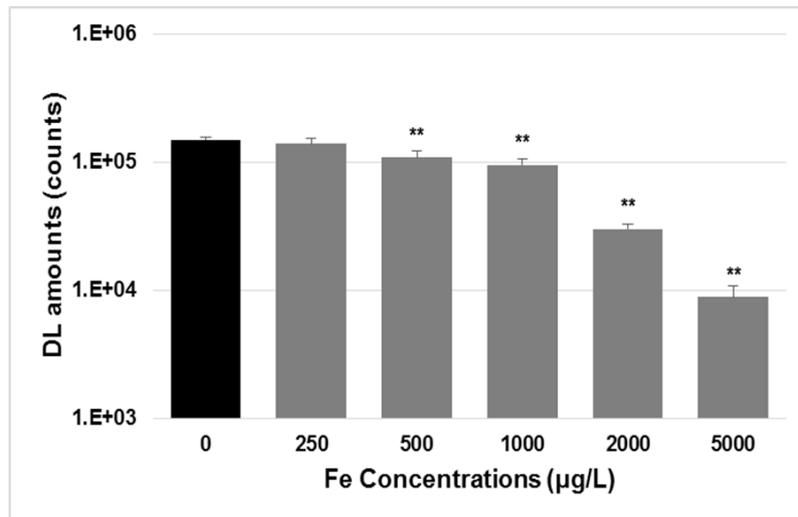


Figure. 24 鉄に曝露された*P. subcapitata*の遅延発光量

3-6 マンガンの遅延発光阻害評価

250 - 5000 µg/L のマンガン曝露した *P. subcapitata* の遅延発光量を Fig. 25 に示す。曝露濃度 5000 µg/L のみ、藻類の遅延発光を有意に阻害しており、250 - 2000 µg/L では遅延発光への影響はみられなかった。マンガンにおいては、藻類光合成への明確な阻害影響は報告されていない。しかし、遅延発光が光合成の挙動を反映する点から、藻類が 5000 µg/L 以上のマンガンと接触した場合、その光合成組織に有害な影響を及ぼす可能性が極めて高い事が示唆された。今後は、より詳細な毒性値の算出などを目的として、曝露濃度区の再検討を含めたマンガンの更なる影響評価を行っていく必要がある。

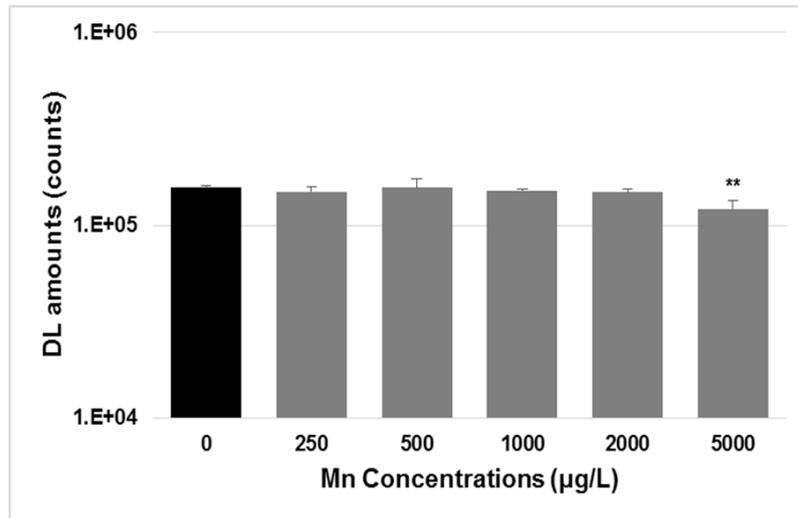


Figure. 25 マンガンに曝露された*P. subcapitata*の遅延発光量

3-7 各評価金属類の EC₅₀ 値 (藻類発光阻害試験)

Table 4 に、藻類発光阻害試験から算出された EC₅₀ 値(EC₅₀)と、藻類生長阻害試験による EC₅₀ の文献値を示した。セレン、マンガンを除く 4 物質で比較的良好な感度を示しており、特に鉛の EC₅₀ は 98 µg/L であり、文献値に比べ約 3 倍 - 27 倍と非常に高い感度で鉛の毒性値を示した。また、ニッケルに関しても、100 µg/L と、鉛同様に文献値に比べ高い感度を示していた。これらの結果から、鉛およびニッケルの藻類毒性発現は、特に光合成への作用に起因する可能性が高いと考えられ、クロムにおいては、光合成以外での毒性影響が大きな割合を占めている可能性がある。

Table 4 Pb, Ni, Cr, Se, Fe, Mn に関する藻類発光阻害試験の結果(DL)および文献値(growth)の比較

<i>Test metals</i>	EC₅₀ (µg/L; algal DL)	EC₅₀ (µg/L; algal growth)
Pb	98	290-2700^{96), 111)}
Ni	100	150-300^{96), 112)}
Cr	662	40-900^{96), 111)}
Se	1000<	61.5 × 10³-143 × 10³¹⁰³⁾
Fe	850	3280 - 4950¹⁰¹⁾
Mn	>5000	8300¹⁰²⁾

3-8 鉛およびクロムによる複合影響の評価

本研究では、藻類発光阻害試験による複合試料の評価能を明らかにするため、遅延発光阻害を強く引き起こした鉛およびクロムの複合試料を用いて試験を行った。また、複合影響の評価はアイソボログラムにより実施した。

3-8-1 アイソボログラム

アイソボログラムは薬物の併用効果を評価する手法であり、主に薬理学の分野で用いられている。

アイソボログラムでは、複合試料を形成する物質の単体時における影響値(EC₅₀ 値など)から求められる相加直線 (line of additivity)と、複合試料の影響値から表される併用効果直線により複合影響を評価しており (Figure. 26)、両直線の関係性から得られる併用効果値が< 1であれば相乗的に、= 1なら相加的、> 1の場合は拮抗的に作用すると予測される (Figure. 27)。また、相加直線と併用効果直線の交点は複合的な影響がみ

られると考えられる予測値と定義されており、この予測値に対する実測値(複合試料の評価によって実際に得られる影響値)の位置関係からも試験試料の複合作用を予測する事が可能である。予測値に対して実測値が下部に位置する場合は相乗的に、上部なら拮抗的な作用と予測できる。

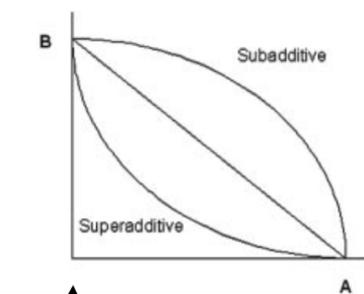
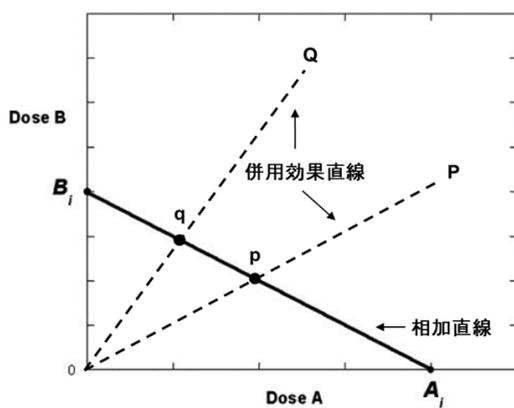


Figure. 26 アイソボログラムによる薬物併用効果の評価 (Tallarida, 2006)

$\text{併用効果値} = \frac{\text{実測値 } pA \text{ or } qA}{EC_{50}\text{値 } A_i} + \frac{\text{実測値 } pB \text{ or } qB}{EC_{50}\text{値 } B_i}$
<ul style="list-style-type: none"> • 効果値 < 1 → 相乗作用 • 効果値 = 1 → 相加作用 • 効果値 > 1 → 拮抗作用

Figure. 27 アイソボログラムによる併用効果値の算出式

3-8-2 曝露濃度

Table 5 に複合試料における鉛およびクロムの含有量を示した。鉛とクロムの含有量は 3-5 で得られた EC₅₀ 値を基準としており、各濃度区は公比 2 で調整されている。濃度区 1,5 は鉛,クロム単体時の試験区であり、濃度区 3 は両物質の毒性値を等倍で調整した試料となる。曝露区 2 は鉛が高濃度、クロムが低濃度で調整されており、曝露区 4 は鉛が低濃度、クロムが高濃度で含まれる試験区となっている。

X:鉛
Y:クロム

Table 5 複合試料の鉛およびクロム濃度

濃度区	control(曝露0)	1/4 × (X, Y)	1/2 × (X, Y)	1 × (X, Y)	2 × (X, Y)	4 × (X, Y)
1	0	X:Y =1:0 25, 0	X:Y =1:0 50, 0	X:Y =1:0 100, 0	X:Y =1:0 200, 0	X:Y =1:0 400, 0
2	0	X:Y =1.5:0.5 25, 50	X:Y =1.5:0.5 50, 100	X:Y =1.5:0.5 100, 200	X:Y =1.5:0.5 200, 400	X:Y =1.5:0.5 400, 800
3	0	X:Y =1:1 25, 150	X:Y =1:1 50, 300	X:Y =1:1 100, 600	X:Y =1:1 200, 1200	X:Y =1:1 400, 2400
4	0	X:Y =0.5:1.5 3, 50	X:Y =0.5:1.5 6, 110	X:Y =0.5:1.5 12, 220	X:Y =0.5:1.5 25, 450	X:Y =0.5:1.5 50, 900
5	0	X:Y =0:1 0, 150	X:Y =0:1 0, 300	X:Y =0:1 0, 600	X:Y =0:1 0, 1200	X:Y =0:1 0, 2400

単位: ppb (公比 2)

3-8-3 複合影響の評価

Figure. 28 に本試験で得られた鉛,クロムの併用効果直線および相加直線を示した。曝露区 2,3 では、予測値に対して◆で示した実測値は大きく上部に位置しており、両試料の EC_{50} 値は 261, 465 $\mu\text{g/L}$ であった。また、得られた EC_{50} 値と鉛, クロムの存在比から、両試料で複合影響が観測された際の鉛, クロム量を算出した結果、曝露区 2 では、鉛=87 $\mu\text{g/L}$ 、クロム=174 $\mu\text{g/L}$ 、曝露区 3 では鉛=66 $\mu\text{g/L}$ 、クロム=398 $\mu\text{g/L}$ となった。これらの結果から、曝露区 2 の併用効果値は、 $87 / 71 + 174 / 684 = 1.22 + 0.25 = 1.49$ 、曝露区 3 の併用効果値は、 $66 / 71 + 398 / 684 = 0.92 + 0.58 = 1.50$ となった。これらの結果から、鉛, クロムの複合試料において、藻類毒性 (EC_{50} 値) を基準に鉛とクロムが同程度の毒性を示す割合で含まれているとき、また、クロムに対して鉛が高い割合で存在する場合は、拮抗的な複合影響を示す可能性が示唆された。一方で、 EC_{50} 値を基準とした存在量が鉛 < クロムである曝露区 4 では、予測値に対して実測値は下部に位置しており、その EC_{50} 値は 380 $\mu\text{g/L}$ であった。また、この時の鉛, クロム量は鉛 = 20 $\mu\text{g/L}$ 、クロム = 360 $\mu\text{g/L}$ であり、その併用効果値は $20 / 71 + 360 / 684 = 0.28 + 0.52 = 0.80$ となった。これらの結果から、 EC_{50} 値を基準にクロムが高濃度で存在する場合、鉛とクロムの複合影響は相乗的な作用を示す可能性が示唆された。

鉛, クロムの複合評価に用いたアイソボグラムは、薬理学 (薬物の併用効果) で多用される一方で、重金属類などの環境汚染物質を対象とした例は存在しない。しかし、本評価において、予測値に対する実測値の位置と併用効果値の傾向が一致していた事、また、鉛とクロムの毒性傾向を反映した結果を示した事から、今後は種々の環境汚染物質の複合評価にも活用可能であることが示唆された。

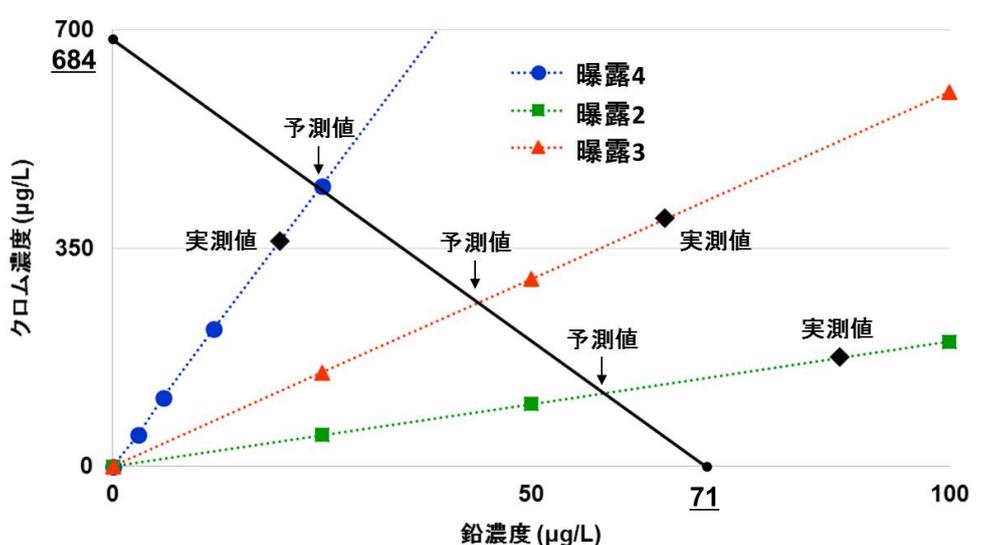


Figure. 28 アイソボグラムによるPb, Cr複合影響の評価

4. 第3章のまとめ

本章では、藻類発光阻害試験および遅延発光に関する知見が少ない重金属類の影響を明らかにするため、藻類発光阻害試験による毒性評価を実施した。本試験では、鉛、ニッケル、クロム、セレン、鉄、マンガンを評価対象とし、それらの藻類遅延発光への影響を明らかにした。また、藻類発光阻害試験による複合影響の評価能を明らかにする事を目的として、鉛およびクロムの複合試料を対象に評価を行った。

試験の結果、鉛、ニッケル、クロム、鉄は *P. subcapitata* の遅延発光を有意に阻害しており、 EC_{50} 値に関しても非常に高い感度で算出した(特に鉛およびニッケル)。一方で、本試験の曝露濃度区 (10-1000 $\mu\text{g/L}$) では、セレンおよびマンガンによる遅延発光への毒性影響などはみられなかった。そのため、両物質は藻類 (*P. subcapitata*) の遅延発光および光合成の機能を阻害する様な影響を持っていない、或いは、その影響が極めて小さい可能性が高いことが示唆された。ただ、排水管理などにおいては、極めて高濃度の含有も想定されるため、今後は、より高い曝露濃度区による毒性評価が重要であり、セレンやマンガンを含む排水などへの適応性を詳細に調査する必要がある。また、藻類発光阻害試験による 6 物質の毒性評価は、既存の評価報告で示される毒性傾向と類似しており、本手法が極めて高い再現性を示す新規藻類バイオアッセイであることが示唆された。また、複合試料(鉛,クロム)の試験では、アイソボログラムによりその影響を評価した。アイソボログラムによる評価では、複合試料の相乗・拮抗的な作用を明らかにし、鉛およびクロムの藻類毒性を反映した挙動を示した。そのため、藻類発光阻害試験およびアイソボログラムは環境汚染物質の複合評価を迅速に行える事が示唆されたが、今後は種々の化学物質を組み合わせた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 総括

本研究では、藻類発光阻害試験を迅速簡便な環境試料の評価手法、大学等の排水管理への導入、標準法である藻類生長阻害試験のスクリーニング法としての実用を目指した研究の一環として、19種 4-NP 異性体(直鎖型異性体 1種, 分岐型異性体 18種) および排水基準項目である重金属類を対象に藻類発光阻害試験による毒性評価を行った。化学物質の EC₅₀ 値や遅延発光の阻害率、曝露 24 時間内での挙動を把握することで、その毒性の序列や、単純な毒性値(EC₅₀ 値など)等からみることが出来ない毒性の傾向などを把握し、藻類生長阻害試験における評価対象を抜粋することが可能となる。また、本研究で得られる対象物質の毒性傾向とこれまでに報告された藻類影響を比較・検証することで、新規藻類バイオアッセイである藻類発光阻害試験の再現性などを明らかにすることを目的とした。

第1章では、大学等の排水管理において複数種のバイオアッセイによる評価が求められており、特に水生生態系の基礎を担う藻類の毒性評価は極めて重要である事を示した。そして、大量の試料を評価する上で、迅速で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、また、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、迅速、簡便、安価な藻類バイオアッセイとして、藻類の遅延発光を指標とした藻類発光阻害試験が研究開発されていることを明らかにした。そして、排水管理や環境試料の評価を行う上で、化学物質の複合影響が重要であり、藻類発光阻害試験は迅速簡便に遂行可能であるが、そのためには、化学物質単体による遅延発光への影響の有無が重要である事を示した。そして、本研究では、藻類毒性が明らかになっていない 4-NP 異性体、遅延発光に関する知見が不足する重金属類を対象として、藻類発光阻害試験の実用性などの調査を目的とすることを示した。

第2章では、13種 4-NP 異性体(直鎖型異性体 1種, 分岐型異性体 12種) および 6種 3 ペアの 4-NP 立体異性体(ジアステレオマー)を対象物質として藻類発光阻害試験を行った。

算出された各 EC₅₀ 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(EC₅₀ 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。これは、Kobayashi *et al.*, (2014)が報告した 4-NP 異性体による魚類(ヒメダカ; *Oryzias latipes*)の毒性傾向とは正反対の結果であった。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 EC₅₀ 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 EC₅₀ 値が増加傾向にあった(毒性の低下)。

遅延発光の阻害率においては、EC₅₀ 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 は、高濃度区で最も低い阻害率(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。

Figure. 8-12 の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、今後は、曝露時間を延長した評価の必要性が示唆された。また、高濃度区では直鎖型異性体 4-n-NP の影響が明らかに強かったが、低濃度区においては分岐型異性体の影響がより強くみられた。これは実際の水環境中においては、分岐型異性体のリスクが高くなる事を示唆している。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、これまでに報告された NP に曝露された藻類の挙動と、同様の傾向を示した事から、藻類発光阻害試験は非常に高い再現性をもつ藻類バイオアッセイである事が示された。

また、4-NP 立体異性体(ジアステレオマー)の藻類 EC₅₀ 値において、各ペア間でその値に差がみられ、NP-J (1.9 µg/mL) < NP-L (0.8 µg/mL), NP-K (1.3 µg/mL) < NP-P (0.6 µg/mL), NP-E (2.6 µg/mL) < NP-G (1.4 µg/mL)となっていた。また、遅延発光の阻害率においても NP-J (73.41%) < NP-L (85.09%), NP-K (82.3%) < NP-P (90.07%), NP-E (75.79%) < NP-G (82.93%) となっており、EC₅₀ 値の傾向と一致していた。これら EC₅₀ 値と阻害率の傾向は各ペアが γ-炭素あるいは β-炭素に持つメチル基に起因すると考えられた。また、藻類発光阻害試験が 4-NP 立体異性体の僅かな構造変化による毒性影響の違いを検出可能であることを明らかにした。

第 3 章では、遅延発光への作用が明らかになっていない重金属類 Pb, Ni, Cr, Se, Fe, Mn を対象に藻類発光阻害試験を行った。

Pb, Ni, Cr, Fe は、有意的に *P. subcapitata* の遅延発光を阻害しており、それぞれの EC₅₀ 値は 98 µg/L, 100 µg/L, 662 µg/L, 850 µg/L であった。これらの毒性値は、一般的な

藻類バイオアッセイである藻類生長阻害試験 (TG-201)の文献値に比べ低値を示していた事から、本手法が高い感度でこれら金属類の毒性影響を検出可能である事を明らかにした。一方で、*P. subcapitata* の遅延発光は、Se (10 - 1000 µg/L)および Mn(250-2000 µg/L)の影響を一切受けておらず、その毒性値は算出できなかった事から、セレンおよびマンガンの藻類毒性 (光合成への影響) が強くない可能性が示唆された。

また、アイソログラムを用いて Pb, Cr の複合影響を藻類発光阻害試験により評価した結果、鉛とクロムの存在比によって相乗的および拮抗的な作用がみられ、鉛, クロムの毒性傾向を反映した結果を示した。この様な結果から、藻類発光阻害試験およびアイソログラムは化学物質の迅速な複合評価に利用可能である事が明らかとなった。

19種 4-NP 異性体および重金属類を対象とした藻類発光阻害試験の結果、4-NP 異性体および Pb, Ni, Cr, Fe による遅延発光の阻害がみられ、特に金属類においては非常に高い感度でそれらの毒性を評価した。また、4-NP 異性体に対しては、各 EC₅₀ 値や遅延発光阻害率で多用な挙動を示し、4-NP 立体異性体の僅かな構造の違いを反映した事から、藻類発光阻害試験が化学物質の異性体を単体として明確に評価できる可能性が示唆された。これらは、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実用可能である事を示す結果であり、排水管理や環境試料への適用性調査の基礎的な知見となる。

今後の展開として、排水管理などでの実用化を目的として、複数の化学物質による複合影響の評価が重要となる。加えて、Se や Mn のように光合成組織への影響が弱い、或いは影響しない物質の調査を継続的に行い、遅延発光に対する影響の有無を明らかにする事で、藻類発光阻害試験が適切な評価手法となる物質、ならない物質の線引きが非常に重要であると考えられる。また、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、この様な特徴はその他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、光合成組織への影響が明確化されている化学物質を対象とした試験により、減衰曲線の形状と光合成への作用機序の関係性を明らかにすること、そして、多用な藻類種による試験の評価が望まれる。

引用文献

- 1) USEPA (2004) WET Implementation Guidance, EPA 832-B-04-003
- 2) Haifeng, Q., Xiangjie, P., Shutian, S., Shuqiong Y., Haiyan, Jiang., Zhifan L., Zhengwei, F. : Effect of nonylphenol on response of physiology and photosynthesis-related gene transcription of *Chlorella vulgaris*: *Environ Monit Assess* 182, 61-69, 2011
- 3) OECD (2011) Guideline for testing of chemicals No. 201. freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test. Adopted: 23 March 2006, Annex 5 corrected: 28 July 2011, Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- 4) Tanaka, H., KIM, J.H., Nakamura, S., Sudo, R. : Toxicity of Alkylphenols to Unicellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Japan Society on Water Environment* 25, 39-45, 2002.
- 5) Blanck, H., Wallin, G., Waengberg, S.A. : Species-dependent variation in algal sensitivity to chemical compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 8, 339-351, 1984.
- 6) Lukavsky, J. : The evaluation of algal growth potential (agp) and toxicity of water by miniaturized growth bioassay. *Water research* 26 (10), 1409-1413, 1992.
- 7) Radetski, C.M., Férard, J.F., Blaise, C. : A semistatic microplate-based phytotoxicity test. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14 (2), 299-302, 1995.
- 8) Rojickova, R., Dvorakova, D., Marsalek, B. : The use of miniaturized algal bioassay in comparison to the standard flask assay . *Environmental Toxicology and Water* 13 (3), 235-241, 1998.
- 9) Philippe, E and Guy, V. : The F684/F735 chlorophyll fluorescence ratio : a potential tool for rapid detection and determination of herbicide phytotoxicity in algae. *Water Research* 37, 1983-1990, 2003

- 10) Katsumata, M., Koike, T., Nishikawa, M., Tsuchiya, H.: Influences of herbicides and mercury on blue green alga *Spirulina platensis* Analysis of long-term behavior of *S. platensis* delayed fluorescence: *Journal of Japan Society on Water Environment* 28 (1), 23-28, 2005.
- 11) Katsumata, M., Koike, T., Nishikawa, M., Kazumura, K., Tsuchiya, H.: Rapid ecotoxicological bioassay using delayed fluorescence in the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*: *Water Research*: 40, 3393-4000, 2006.
- 12) Katsumata, M., Takeuchi, A., Kazumura, K., Koike, T. : New feature of delayed luminescence: Preillumination-induced concavity and convexity in delayed luminescence decay curve in the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*: *Journal of photosynthesis and photobiology B: Biology*: 90, 152-162, 2008.
- 13) Katsumata, M., Koike, T., Kazumura, K., Takeuchi, A., Sugaya, Y. : Utility of Delayed Fluorescence as Endpoint for Rapid Estimation of Effect Concentration on the Green Alga *Pseudokirchneriella subcapitata*: *Bull Environ Contam Toxicol*: 83(4), 484-487, 2009.
- 14) Takeuchi, A., Katsumata, M., Koike, T., Takata, Y., Itatsu, Y., Kusui, T. : Comparison of the Conventional Algal Growth Inhibition Tests Using Cell Counting and Algal Bioassay Using Delayed Fluorescence: Application to Industrial Effluents: *Journal of Water and Environmental Technology*: 12(4), 367-377, 2014.
- 15) Chuenwarin, P., Shimazaki, A., Shimizu, M., Kobayashi, Y., Katsumata, M., Kobayashi, H. : Nondestructive evaluation of photosynthesis by delayed luminescence in *Arabidopsis* in Petri dishes. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* (online), 2015
- 16) Kuramitz, H., Sazawa, K., Nanayama, Y., Kudo, C., Kawakami, T., Hata, N., Taguchi, S: Estimation of suppressive effect of dissolved organic matter on Copper toxicity using the microscaled algal growth inhibition test. *Journal of Japan Society on Water Environment* 132, 309-314 2009.

- 17) Strehler, B.L., Arnold, W: Light production by green plants. *The Journal of General Physiology* 34, 809-820, 1951.
- 18) Berden-Zrimec, M., Drinovec, L., Zrimec, A., Tišler, T: Delayed fluorescence in algal growth inhibition tests: *Central European Journal of Biology* 2(2), 169-181, 2007
- 19) Jursinic, P.(ed.) 1986: Delayed Fluorescence: Current Concepts and Status. *New York: Academic Press.*
- 20) Rutherford, A.W., Govindjee., Inoue, Y: Charge accumulation and photochemistry in leaves studies by thermoluminescence and delayed light emission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 1107-1111, 1984.
- 21) Yan, Y., Popp, F.A., Sigrist, S., Schlesinger, D., Dolf, A., Yan, Z., Cohen, S., Chotia, A. Further analysis of delayed luminescence of plants. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 78, 235-244, 2005
- 22) Schreiber, U., Müller, J.F., Haugg, A., Gademann, R: New type of dual-channel PAM chlorophyll fluorescence for highly sensitive water toxicity biotests. *Photosynthesis Research* 74, 317-330, 2002
- 23) Chekalyuk, A.M., Hoge, F.E., Wright, C.W., Swift, R.N., Yungel, J.K: Airborne test of laser pump-and-probe technique for assessment of phytoplankton photochemical characteristics. *Photosynthesis Research* 66, 45-56, 2000
- 24) Kosumi, D., Kusumoto, T., Fujii, R., Sugisaki, M., Iinuma, Y., Oka, N., Takaesu, Y., Taira, T., Iha, M., Frank, H.A., Hashimoto, H: One - and two-photon pump-probe optical spectroscopic measurements reveal the S₁ and intramolecular charge transfer states are distinct in fucoxanthin. *Chemical Physics Letters* 483, 95-100, 2009.
- 25) Kosumi, D., Abe, K., Karasawa, H., Fujiwara, M., Cogdell, R.J., Hashimoto, H., Yoshizawa, M: Ultrafast relaxation kinetics of the dark S₁ state in all-trans- β -carotene explored by one- and two-photon pump-probe spectroscopy. *Chemical*

Physics 373, 33-37, 2010.

- 26) Eullaffroy, P., Vernet, G: The F684/F735 chlorophyll fluorescence ratio : a potential tool for rapid detection and determination of herbicide phytotoxicity in algae. *Water Research* 37, 1983-1990, 2003.
- 27) Babu, T.S., Marder, J.B., Tripuranthakam, S., Dixon, D.G., Greenberg, B.M: Synergistic effects of a photooxidized polycyclic aromatic hydrocarbon and copper on photosynthesis and plant growth: evidence that in vivo formation of reactive oxygen species is a mechanism of copper toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 1351-1358, 2001.
- 28) Frankart, C., Eullaffroy, P., Vernet, G: Photosynthetic responses of *Lemna minor* exposed to xenobiotics, copper, and their combinations. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53, 439-445, 2002.
- 29) Chuewrin, P., Shimazaki, A., Shimizu, M., Kobayashi, Y., Katsumata, M., Kobayashi, H: Nondestructive evaluation of photosynthesis by delayed luminescence in *Arabidopsis* in Petri dishes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 80, 452-460, 2016.
- 30) Avron, M., Schreiber, U: Properties of ATP-induced chlorophyll luminescence in chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 546, 448-454, 1979.
- 31) Wraight, C.A., Crofts, A.R: Delayed fluorescence and the high-energy state of chloroplasts. *European Journal of Biochemistry* 19, 386-497, 1971.
- 32) Melcarek, P.K., Brown, G.N: Effects of chill stress on prompt and delayed chlorophyll fluorescence from leaves. *Plant Physiology* 60, 822-825, 1977.
- 33) Drinovec, L., Drobne, D., Jerman, I., Zrimec, A: Delayed fluorescence of *Lemna minor* : a biomarker of the effects of copper, cadmium and zinc. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 72, 896-902, 2004.
- 34) Jolit, P., Jolit, A: Dependence of delayed luminescence upon adenosine triphosphatase activity in *Chlorella*. *Plant Physiology* 65, 691-696, 1980.

- 35) Wang, C., Xing, D., Chen, Q: A novel method for measuring photosynthesis using delayed fluorescence of chloroplast. *Biosensors and Bioelectronics* 20, 454-459, 2004.
- 36) Monti, M., Zrimec, A., Beran, A., Berden Z.M., Drinovec, L., Kosi, G., Tamberlich, F: Delayed luminescence of *Prorocentrum minimum* under controlled conditions. *Harmful Algae* 4, 643-650, 2005.
- 37) Benachour, N., Aziz: ArisToxic effects of low doses of Bisphenol-A on human placental cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 241, 322-328, 2009.
- 38) Al-Hiyasat, A.M., Darmani, H., Elbetieha, A.M: Effects of bisphenol A on adult male mouse fertility. *Oral sciences* 110, 163-167, 2002.
- 39) Holan, J.R., King, C.K., Sfiligoj, B.J., Davis, A.R: Toxicity of copper to three common subantarctic marine gastropods. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 136, 70-77, 2016.
- 40) Feron, V.J., Cassee, F.R., Groten, J.P., van Vliet, P.W., van Zorge, J.A., International issues on human health effects of exposure to chemical mixtures. *Environ. Health Perspect.* 110, 893-899, 2002.
- 41) Duan, Z., Zhu, L., Zhu, L., Kun, Y., Zhu, X: Individual and joint toxic effects of pentachlorophenol and bisphenol A on the development of zebrafish (*Danio rerio*) embryo. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71, 774-780, 2008.
- 42) Safe, S.H: Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Environmental Impact, Biochemical and Toxic Responses, and Implications for Risk Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 24, 87-149, 1994.
- 43) Van den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, A.T., Brunström, B., Cook, P., Feeley, M., Giesy, J.P., Hanberg, A., Hasegawa, R., Kennedy, S.W., Kubiak, T., Larsen, J.C., Leeuwen, F.X., Liem, A.K., Nolt, C., Peterson, R.E., Poellinger, L., Safe, S., Schrenk, D., Tillitt, D., Tysklind, M., Younes, M., Waern, F., Zacharewski, T: Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ Health Perspect* 106, 775-792, 1998.

- 44) Van Den Berg, M., Craane, B.L.H.J., Sinnige, T., Van Mourik, S., Dirksen, S., Boudewijn, T., VAN DER GAAG, M., Lutke-Chipholbte, I.J., Spenkelink, B., Brouwer, A: Biochemical and toxic effects of polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-*P*-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) in the cormorant (*phalacrocorax carbo*) after in ovo exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13, 803-816, 1994.
- 45) Van Birgelen, A., Van der Kolk, J., Fase, K., Poiger, H., Brouwer, A., VandenBerg, M: Toxicity and biochemical potencies of polychlorinated biphenyl congeners relative to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in three months feeding studies in the rat. *Organohalogen Compd* 10, 373-376, 1992.
- 46) Brouwer, A., Kukler, A., VandenBerg, K.J: Alterations in retinoid concentrations in several extrahepatic organs of rats by 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl. *Toxicology* 50, 317-330, 1988.
- 47) Brouwer, A., Hakansson, H., Kukler, A., VandenBerg, K.J., Ahlborg, U.G: Marked alterations in retinoid homeostasis of Sprague-Dawley rats induced by a single i.p. dose of 10 pg/kg of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin *Toxicology* 58, 267-283, 1989.
- 48) Hakansson, H., Johanson, L., Ahlborg, U.G: Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on tissue levels of vitamin A and on the distribution and excretion of the endogenous pool of vitamin A in the marginally vitamin A sufficient rat. *Chemosphere* 17, 1781-1793, 1988.
- 49) Chen, L.C., Berberian, I., Koch, B., Mercier, M., Azais-Braesco, V., Glauert, H.P., Chow, C.K., Robertson, L.W: Polychlorinated and polybrominated biphenyl congeners and retinoid levels in rat tissues: Structure-activity relationships. *Toxicology and Applied Pharmacology* 114, 47-55, 1992.
- 50) Gao, Q.T., Tam, N.F.Y: Growth, photosynthesis and antioxidant responses of two microalgal species, *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*, to nonylphenol stress. *Chemosphere* 82, 346-354, 2011.

- 51) Vazquez-Duhalt, R., Marquez-Rocha, F., Ponce, E., Kicea, A. F., Viana, M.T: Nonylphenol, an intergrated vision of a pollutant. *Applied Ecology and Environmental Research* 4,1-25, 2005.
- 52) Naylor, C.G: Environmental fate and safety of nonylphenol ethoxylates. *Textile Chemist and Colorist* 27, 29-33, 1995.
- 53) Gigier, W., Brunner, P.H., Schaffner, W: 4-Nonylphenol in sewage sludge : accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. *Science* 225, 623-625, 1984.
- 54) Ahel, M., Giger, W., Koch, M: Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Water Research* 28, 1131-1142, 1994a.
- 55) Ahel, M., Giger, W., Schaffner, C: Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment- II. Occurrence and transformation in rivers. *Water Research* 28, 1143-1152, 1994b.
- 56) Comber, M.H.I., Williams, T.D. Stewart, K.M: The effect of nonylphenol on *Daphnia magna*. *Water Research* 27, 273-276, 1993.
- 57) Corvini, P. F. X., Schäffer, A., ScSchlosser, D: Microbial degradation of nonylphenol and other alkylphenols--Our evolving view. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72, 223-243, 2006.
- 58) Vethaak, A.D., Lahr, J., Schrap, S.M., Belfroid, A.C., Rijs, G.B., Gerritsen, A., de Boer, J., Bulder, A.S., Grinwis, G.C., Kuiper, R.V., Legler, J., Murk, T.A., Peijnenburg, W., Verhaar, H.J., de Voogt, P: An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of the Netherlands. *Chemosphere* 59, 511-524, 2005.
- 59) Isobe, T., Nishiyama, H., Nakashima, A., Takeda, H: Distribution and behavior of nonylphenol, octylphenol, and nonylphenol monoethoxylate in Tokyo metropolitan area: Their associate with aquatic particles and sedimentary distributions. *Environmental Science & Technology* 35, 1041-1049, 2001.

- 60) Sato, A.M., Justicia, H., Wray, J.W., Sonnenschein, C: p-Nonylphenol: An estrogenic xenobiotic related from modified polystyrene. *Environmental Health Perspectives* 92, 164-173, 1991.
- 61) Uguz, C., Togan, I., Eroglu, Y., Tabak, I., Zengin, M., Iscan, M: Alkylphenol concentrations in two rivers of Turkey. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 14, 87-88, 2003.
- 62) Staples, C., Mihaich, E., Carbone, J., Woodbrun, K., Klecka, G: A weight of evidence analysis of the chronic ecotoxicity of nonylphenol ethoxylates, nonylphenol ether carboxylates, and nonylphenol. *Human and Ecological Risk Assessment* 10, 999-1017, 2004.
- 63) Servos, M.R: Review of the aquatic toxicity, estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenols and alkylphenols polyethoxylates. *Water Quality Research Journal of Canada* 34, 123-177, 1999.
- 64) Hirano, M., Ishibashi H., Matsumura, N., Nagao, Y., Watanabe, N., Watanabe A., Onikura, N., Kishi, K., Arizono, K: Acute toxicity responses of two crustaceans, *Americamysis bahia* and *Daphnia magna*, to endocrine disrupters. *Journal of Health Science* 50, 97-100, 2004.
- 65) Ishibashi, H., Hirano, M., Matsumura, N., Watanabe, N., Takao, Y., Arizono, K: Reproductive effects and bioconcentration of 4-nonylphenol in medaka fish (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 65, 1019-1026, 2006.
- 66) Hirano, M., Ishibashi, H., Kim, J.W., Matsumura N., Arizono, K: Effects of environmentally relevant concentrations of nonylphenol on growth and 20-hydroxyecdysone levels in mysid crustacean, *Americamysis bahia*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 149, 368-373, 2009.
- 67) Bhatt, B.D., Prasad, J.V., Kalpana, G., Ali, S: Separation and characterization of isomers of *p-nonylphenols* by capillary GC/GC-MS/GC-FTIR techniques. *Chromatographic Science* 30, 203-210, 1992.

- 68) Wheeler, T.F., Heim, J.R., La Torre, M.R., Janes, A.B: Mass spectral characterization of p-nonylphenol isomers using high-resolution capillary GC-MS. *Chromatographic Science* 35, 19-30, 1997.
- 69) Kim, Y.S., Katase, T., Makino, M., Uchiyama, T., Fujimoto, Y., Inoue, T., Yamashita, N: Separation, structural elucidation and estrogenic activity studies of the structural isomers of 4-nonylphenol by GC-PFC coupled with MS and NMR. *Australasian Journal of Ecotoxicology* 11, 137-148, 2005.
- 70) Giger, W., Brunner, P.H., Schaffner, C: 4-Nonylphenol in Sewage Sludge: Accumulation of Toxic Metabolites from Nonionic Surfactants. *Science* 225, 623-625, 1984.
- 71) Stephanou, E., Giger, W: Persistent organic chemicals in sewage effluents. 2. Quantitative determinations of nonylphenols and nonylphenol ethoxylates by grass capillary gas chromatography. *Environmental Science Technology* 16, 800-805, 1982.
- 72) Ahel, M., Giger, W: Determination of Alkylphenols and Alkylphenol Mono- and Diethoxylates in Environmental Samples by High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry* 57, 1577-1583, 1985.
- 73) Ahel, M., Conrad, T., Giger, W: Persistent Organic Chemicals in Sewage Effluents. 3. Determinations of Nonylphenoxy Carboxylic Acids by High-Resolution Gas Chromatography/Mass Spectrometry and High-Performance Liquid Chromatography. *Environmental Science Technology* 21, 697-703, 1987.
- 74) Lee, H.B., Peart, T.E: Determination of 4-Nonylphenol in Effluent and Sludge from Sewage Treatment Plants. *Analytical Chemistry* 67, 1976-1980, 1995.
- 75) Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T: Pharmaceuticals, Hormones, and Other organic Wastewater Contaminations in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. *Environmental Science Technology* 36, 1202-1211, 2002.
- 76) Tsuda, T., Takino, A., Muraki, K., Harada, H., Kojima, M. Evaluation of 4-

- nonylphenols and 4-tert-octylphenol accumulation and excretion experiments. *Water Research* 35, 1786-1792, 2001.
- 77) Yokota, H., Seki, M., Maeda, M., Oshima, Y., Tadokoro, H., Honjo T., Kobayashi, K: Life-Cycle Toxicity of 4-nonylphenol to Medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicological and Chemistry* 20, 2552-2560, 2001.
- 78) Kang, I.J., Yokota, H., Oshima, Y., Tsuruda, Y., Hano, T., Maeda, M., Imada, N., Tadokoro, H., Honjo, T: Effects of 4-nonylphenol on Reproduction of Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. *Toxicological and Chemistry* 22, 2438-2445, 2003.
- 79) Harries, J.E., Runnalls, T., Hill, E., Harris, C.A., Maddix, S., Sumpter, J.P., Tyler, C.R: Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Science and Technology* 34, 3003-3011, 2000.
- 80) Jobling, S., Sheahan, D.A., Osborne, J.A., Matthiessen, P., Sumpter, J.P: Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to environmental estrogens. *Environmental Toxicological and Chemistry* 15, 194-202, 1996.
- 81) Perron, M.C., Juneau, P. 2011. Effect of endocrine disrupters on photosystem II energy fluxes of green algae and cyanobacteria. *Environmental Research* 111, 520-529.
- 82) Hense, B.A., Jüttner, I., Welzl, G., Severin, G.F., Pfister, G., Behechti, A., Schramm, K.W: Effects of 4-nonylphenol on phytoplankton and periphyton in aquatic microcosms: *Environmental Toxicology and Chemistry*: 22, 2727-2732, 2003.
- 83) Wang, J., Xie, P., Guo, N. : Effects of nonylphenol on the growth and microcystin production of *Microcystis* strains: *Environmental Research*: 103, 70-78, 2007.
- 84) Kobayashi, J., Sun, C., Ji, H., Ishibashi, Y., Shinohara, R., Minoru Koga, M., Arizono, K. : Acute toxicity of 4-nonylphenol isomers to larval medaka *Oryzias latipes*: *Journal of Environment and Safety*: 4, 9-14, 2013 (in Japanese).

- 85) Yoshizu, R. : Ecological effect of 4-Nonylphenol Isomers in mysid Crustacea (*Americamysis bahia*): *Graduation work summaries in department of Environmental Symbiosis at Prefectural University of Kumamoto*: 2010.
- 86) Correa-Reyes, G., Viana, M.T., Marquez-Rocha, F.J., Licea, A.F., Ponce, E., Vazquez-Duhalt, R. : Nonylphenol algal bioaccumulation and its effect through the trophic chain: *Chemosphere*: 68, 662-670, 2007
- 87) Ahel, M., McEvoy, J., Giger, W. : Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of non-ionic surfactants in freshwater organisms: *Environmental pollution*: 79, 243-248, 1993
- 88) Preuss, T.G., Gehrhardt, J., Schirmer, K., Coors, A., Rubach, M., Russ, A., Jones, P.D., Giesy, J.P., Ratte, H.T. : Nonylphenol isomers differ in estrogen activity: *Environmental Science & Technology*: 40, 5147-5143, 2006.
- 89) Liu, W., Gan, J., Schlenk, D., Jury, W: Enantioselectivity in environmental safety of current chiral insecticides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 701-706, 2005.
- 90) Garrison, A. W: Probing the enantioselectivity of chiral pesticides. *Environmental Science and Technology* 40, 16-23, 2006.
- 91) Jia, Q., Xu, N., Mu, P., Wang, B., Yang, S., Qiu, J: Stereoselective separation and acute toxicity of Tau-Fluvalinate to Zebrafish. *Journal of Chemistry* 2015, 5 pages, 2015.
- 92) Zhang, A., Xie, X., Ye, J., Lin, C., Hu, X: Stereoselective toxicity of malathion and its metabolites, malaaxon and isomalathion. *Environmental Chemistry Letters* 9, 369-373, 2011.
- 93) Ciminiello, P., Aversano, C.D., Iacovo, E.D., Forino, M., Tartaglione, L., Pelin, M., Sosa, S., Tubaro, A., Chaloin, O., Poli, M., Bignami, G: Stereoisomers of 42-Hydroxy Palytoxin from Hawaiian *Palythoa toxica* and *P. tuberculosa*: Stereostructure elucidation, detection, and biological activity. *Journal of Natural*

Products 77, 351-357, 2014.

- 94) Makino, M., Uchiyama, T., Saito, H., Ogawa, S., Iida, T., Katase, T., Fujimoto, Y.: Separation, synthesis and estrogenic activity of 4-nonylphenols: Two sets of new diastereomeric isomers in a commercial mixture. *Chemosphere* 73, 1188-1193, 2008.
- 95) Bleackley MR, MacGillivray RTA. : Transition metal homeostasis: from yeast to human disease: *BioMetals*: 24, 785-809, 2011
- 96) Magdaleno, A., De Cabo, L., Arreghini, S., Salinas, S. : Assessment of heavy metal contamination and water quality in an urban river from Argentina: *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology*.: 18(1), 113-120, 2014.
- 97) Gu, Y.G., Lin, Q., Huang, H.H., Wang, L., Ning, J.J., Du, F.Y. : Heavy metals in fish tissues/stomach contents in four marine wild commercially valuable fish species from the western continental shelf of South China Sea: *Marine Pollution Bulletin*: 2016 (in press)
- 98) Salt, DE., Kato, N., Krämer, U., Smith, R.D., Raskin, I. : The role of root exudates in nickel hyperaccumulation and tolerance in accumulator and nonaccumulator species of *Thlaspi*: *Phytoremediation of contaminated soil and water*: 1999.
- 99) Drinovec, L., Drobne, D., Jerman, I., Zrimec, A. : Delayed fluorescence of *Lemna minor*: a biomarker of the effects of copper, cadmium and zinc. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 72, 896-902, 2004.
- 100) Emmanuel, E., Balthazard-Accou, K., Joseph, O. : Impact of urban wastewater on biodiversity of aquatic ecosystems. *Environmental management sustainable development and human health* 29, 399-424, 2009.
- 101) Arbildua, J.J., Villavicencio, G., Urrestarazu, P., Opazo, M., Brix, K.V., Adams, W.J., Rodriguez, P.H. : Effect of Fe (III) on *Pseudokirchneriella subcapitata* at circumneutral pH in standard laboratory tests is explained by nutrient sequestration. *Environmental Toxicology and Chemistry* 36 (4), 952-958, 2017.

- 102) Reimer, P.S. : Environmental effects of manganese and proposed freshwater guidelines to protect aquatic life in British Columbia. 1999.
- 103) Ibrahim, A.M and Spacie, A. : Toxicity of inorganic selenium to the green alga *Selenastrum capricornutum* printz. *Environmental and Experimental Botany* 30 (3), 265-269, 1990.
- 104) Koukal, B., Rossé, P., Reinhardt, A., Ferrari, R., Wilkinson, K.J., Loizeau, J.L., Dominik, J. : Effect of *Pseudokirchneriella subcapitata* (chlorophyceae) exudates on metal toxicity and colloid aggregation. *Water Research* 41, 63-70, 2007.
- 105) Tripathy, B.C., Bhatia, B., Mohanty, P. : Inactivation of chloroplast photosynthetic electron transport activity by Ni²⁺. *Biochimica et Biophysica Acta* 638, 217-224, 1981.
- 106) Mohanty, N., Vass, J., Demeter, S. : Impairment of photosystem 2 activity at the level secondary quinone electron acceptor in chloroplasts treated with cobalt, nickel and zinc ions. *Physiologia Plantarum* 76, 389-390, 1989.
- 107) Krupa, Z., Siedlecka, A., Maksymiec, W., Baszyński, T. : In vivo response of photosynthetic apparatus of *phaseolus vulgaris* L. to nickel toxicity. *Journal Plant of Physiology* 142, 664-668, 1993.
- 108) Sheoran, I.S., Singal, H.R., Singh, R. : Effect of cadmium and nickel on photosynthesis and the enzymes of the photosynthetic carbon reduction cycle in pigeon pea (*Cajanus cajan* L.) *Photosynthesis Research* 23, 345-351, 1990.
- 109) Takami, R., Almeida, J.V., Vardaris, C.V. : The interplay between thiol-compounds against chromium (VI) in the freshwater green alga *Monoraphidium convolutum*. Toxicology photosynthesis and oxidative stress at a glance. *Aquatic Toxicology* 118, 80-87, 2012.
- 110) Eisler, R. Selenium hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. *Biological report* 85, 1985.

- 111) Gueguen, C., Gilbin, R., Pardos, M., Dominik, J. Water toxicity and metal contamination assessment of a polluted river: the upper vistula river (Poland). *Applied Geochemistry* 19, 153-162, 2004.
- 112) Geis, S.E., Fleming, K.L., Korthals, E.T., Searle, G., Reynolds, L., Karner, D.A. : Modifications to the algal growth inhibition test for use as a regulatory assay. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 36-41, 2000.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御懇切丁寧な御指導御鞭撻を賜り、そして公私ともに絶大なる御支援により終始支えて下さり常に最良最善へと導いてくれました熊本県立大学 環境共生学部 資源循環化学研究室 石橋 康弘 教授に心から御礼申し上げます。

また、本研究の遂行、本論文作成におきまして有益な御助言を頂きました熊本県立大学 環境共生学部 環境安全性学研究室 有菌 幸司 教授に深く感謝致します。

公私ともに多大なる御助言、御鞭撻を賜り有意義な研究環境および学生生活を与えて下さった熊本県立大学 環境共生学部 環境分析化学研究室 小林 淳 准教授、ならびに水環境科学研究室 阿草 哲郎 准教授に深く感謝致します。

数多くの研究の遂行および学術研究報告を初めとした様々な研究活動におきまして、終始懇切丁寧な御指導、御鞭撻を頂き、多大な御尽力を下さりました国立大学法人 愛媛大学 農学部 生態系保全学研究室 石橋 弘志 准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり実験装置一式をご提供いただき、学術論文の作成に際しまして、多大なる御力添えと御激励を賜りました浜松ホトニクス株式会社 中央研究所 勝又政和 氏、ならびに竹内 彩乃 氏、幾島 裕子 氏、佐藤 由紀子 氏に心より深く感謝致します。

また、公私ともに支えて下さり素晴らしい研究環境を与えて下さりました熊本県立大学 資源循環化学研究室 薬師寺 佑佳 助手、吉本 圭佑 氏(元熊本県立大学環境共生学部助手)、ならびに大田 政志 氏(元熊本県立大学環境共生学部助手)、松尾 英樹 氏(元熊本県立大学環境共生学部助手)、長崎総合科学大学 生命環境工学コース 中道 隆広 助教授、有明工業高等専門学校 内田 雅也 講師に心より厚く深く感謝しております。

そして、公私ともに常に温かく協力して下さいました資源循環化学研究室、環境分析化学研究室、水環境科学研究室、食環境安全性学研究室の皆様心より感謝致します。

最後となりましたが、これまで公私とも多くの活動に置きまして支えて下さりました全ての方に厚く御礼申し上げます。そして、何よりこれまでの長く険しい学業生活を支えてくれた家族に深く感謝しております。