

クロロフィル遅延発光を利用した ウキクサ生長阻害試験の簡易試験法の開発

【はじめに】

農薬は農産物の生産に必要な不可欠な資材ですが、水田で使用される除草剤などの農薬は、降雨などにより農地から河川に流出する可能性があります。そのため、河川へ流出した農薬が水生生物に与える影響を毒性試験により確認する必要があります。

その試験方法として、藻類（下等植物）またはウキクサ（高等植物）について、対象農薬が、その生長をどの程度阻害するかを確認する試験（生長阻害試験）があります。国際的に定められているウキクサ生長阻害試験の試験指針*では、葉状体^{注1}面積などの生物量を評価指標として、生長に対する影響を確認することとしています。ただ、この方法は、結果が出るのに時間がかかります（試験期間：7日間）。

そこで、より短い期間で農薬の影響を調べる試験方法について、検討しました。

【簡易試験法の検討】

生物量の生長は、光合成活性と密接に関係しています。光合成活性が化学物質による代謝障害を受けて低下すると、光合成産物量が低下し、最終的に生物量の生長が低下します（図1）。

クロロフィル遅延発光（以下「遅延発光」という。）は、光合成活性の状態を反映し、活性が低下すると、発光量が低下します。

クロロフィル遅延発光：

植物細胞が光を受けた後、数分間にわたって継続する極めて微弱な蛍光。発光寿命が長いことから「遅延」発光と呼ばれています。

この特色を利用し、遅延発光量を評価指標として、まず藻類に対する農薬など化学物質の影響評価を行う研究がされました。この手法を用いることで、通常3日間の試験期間が必要とされる藻類生長阻害試験について、1日以内で同質の影響評価が可能という報告がされています**。

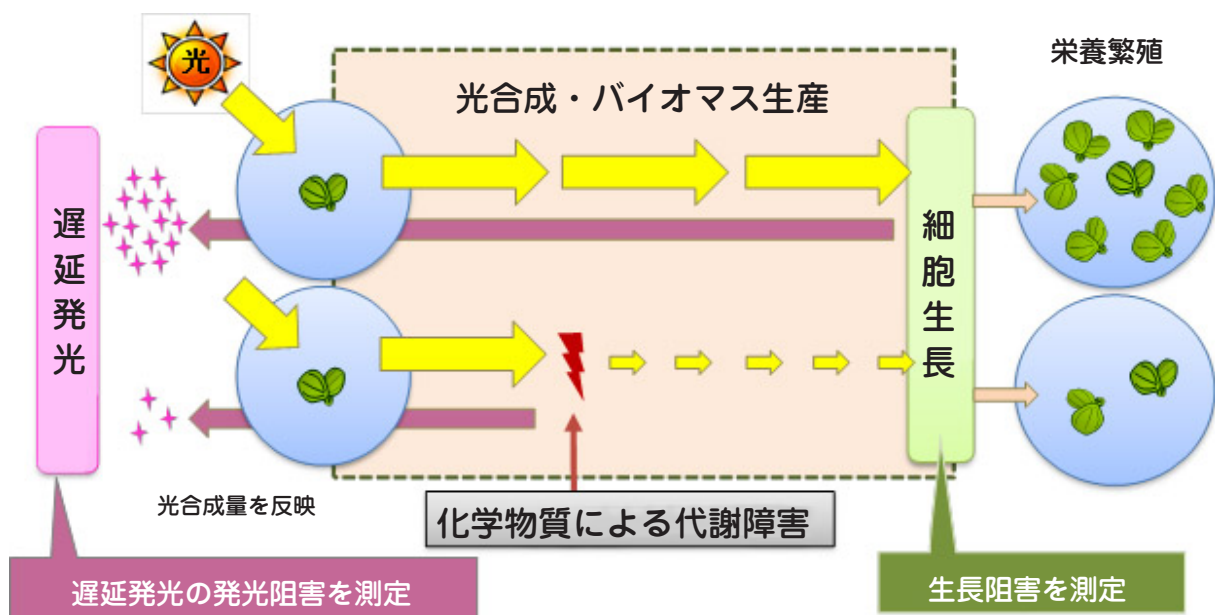


図1 生長阻害と遅延発光阻害の概要

* (株)浜松ホトニクスHPの図を改変して転載 (<http://www.hamamatsu.com/sp/hq/allutox/p03.html>)

そこで本研究では、遅延発光の利用により、既存法であるウキクサ生長阻害試験と比較して、ウキクサに対する毒性試験の試験期間がどの程度短縮できるか検討しました。

【方法】

試験生物にコウキクサ、対象農薬として光合成阻害作用を有する除草剤（シメトリン）を用いて、遅延発光量を評価指標とした試験（以下「発光阻害試験」という）を試みました。

表1 各試験の処理期間および評価指標

	処理期間	評価指標
発光阻害試験	1、3、6、24時間	遅延発光量
生長阻害試験	7日間	葉状体数

除草剤を与えたコウキクサ（5段階の濃度：12.5、25、50、100、200 ppb）の遅延発光量と、除草剤を与えないコウキクサの遅延発光量を比較し、発光阻害率を算出しました。

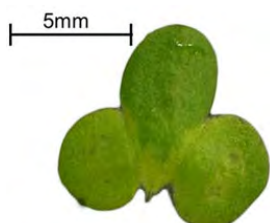


図2 試験生物のコウキクサ (*L. minor* L.)

除草剤処理を始めてから1、3、6、24時間後に各濃度区の遅延発光量を測定し、発光阻害率が50%となる濃度 (EC₅₀) を求め、生長阻害試験によるEC₅₀との比較を行いました。

EC₅₀ (Median Effect Concentration) :

一定条件下で試験生物の半数（50%）に何らかの影響（生育阻害など）を起こさせる化学物質の濃度。試験生物に対する化学物質の影響の度合いを示すときによく使用されます。

【結果】

各濃度区において遅延発光量を測定した結果、最も低い濃度区でも処理開始1時間後には遅延発光の阻害が確認され、早期にコウキクサに対する除草剤の影響を検出することができました（図3）。

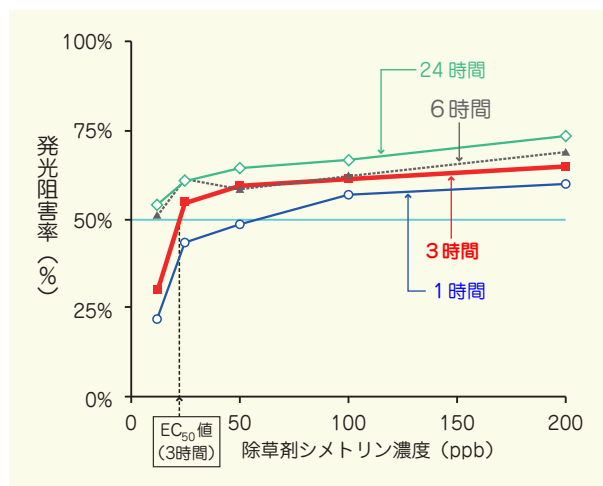


図3 各処理期間における濃度－阻害率曲線

また、各処理期間における遅延発光量を基にEC₅₀を算出した結果、処理開始3時間後でのEC₅₀（30 ppb）が生長阻害試験に基づいて算出したEC₅₀（27 ppb）と近似の値を示しました（表2）。

表2 各処理期間におけるEC₅₀値（単位：ppb）

発光阻害試験				生長阻害試験
1時間	3時間	6時間	24時間	7日間
67	30	4.3	3.7	27

【研究の成果】

遅延発光量を評価指標として用いることで、除草剤（光合成阻害剤）について、ウキクサに対する毒性試験の試験期間を7日間から3時間に大幅に短縮できる可能性が示されました。本技術は、水生植物への影響評価における簡易試験法としての利用が期待されます。

* 参考文献

OECD (2006), OECD guidelines for the testing of chemicals *Lemna* sp. growth inhibition test

** 参考文献

勝又政和 (2011), A new rapid test to estimate the influence of chemical substances on algal growth based on delayed fluorescence.

注1) ウキクサの体は葉のように見えますが、葉状体と呼ばれています。葉状体からは根や芽がでたり、花が咲いたりします。