

生態影響試験法セミナー

OECDテストガイドライン 「藻類生長阻害試験」の改定の 考え方について

独立行政法人 国立環境研究所

化学物質環境リスク研究センター

菅谷 芳雄

OECD TG 201の改訂経過

1981	テストガイドライン 201	採択
1984	同	改訂
1997	同 改訂提案	承認
	Norway (lead country)	
1998-1999	Expert Group meeting	
(2000	ガイダンスドキュメント23	承認)
2000	11月ドラフトTG	発表・回覧
2001	各国コメント、AUG問題	
2002	改訂ドラフト	発表・回覧
2003	WNT15(合意されず)	
	Expert meeting	最終ドラフト
2004	WNT16	承認
2004	Joint meeting 資料(今回使用)	

改訂理由

概要	適用生物種の拡大	
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	分類学上
	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	分類学上
	<i>Navicula pelliculosa</i>	新規
	<i>Anabaena flos-aquae</i>	新規
	<i>Synechococcus leopoliensis</i>	新規
	GHSとの整合	
	生長速度法を「科学的に正しい」	
	ガイダンスドキュメントとの整合	
	GD23 試験困難物質	
	新GD 統計処理	

生長と生長速度(反応変数)

用語の整理

Endpoint **Inhibition of Growth**

Response variable

Growth rate; Scientifically relevant

: 平均生長速度

: 区間生長速度

(Yield); specific regulatory requirements in some countries

Growth: 生物量(乾燥重量)の増加

生物量(藻類生物量の変化を測定する): dry weight/ml

生物量に換算可能な測定項目

cell counts

cell volume,

fluorescence,

optical density, etc.

A conversion factor between the measured surrogate parameter and biomass should be known.

試験手順はどう変わるか

妥当性クライテリア

- 1) 平均生長速度
0.92 /day (= 3日間で16倍)
- 2) 対照区における区間(1日当たり)
生長速度の変動係数
35 % 以下
- 3) 対照区の平均生長速度の変動係数
緑藻2種 7 % 以下
その他 10 % 以下

指数増殖期の維持

Lag phase をなくす
試験の短縮 48時間試験も可

試験デザイン:

繰り返し数 対照区 6 以上
暴露区 3 以上

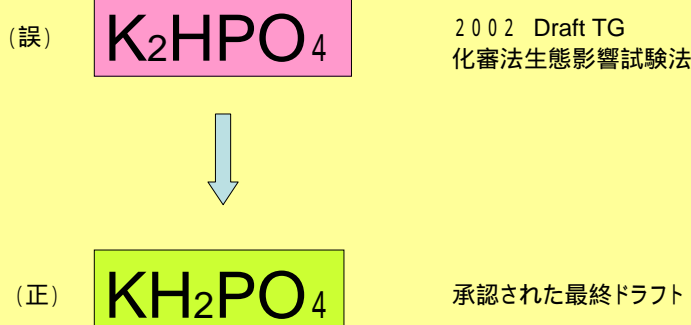
目的(EC_x か NOEC か)
安定した試験結果

pH 変動は、0.5 unit 以下.1.5未満に……
ただし、毒性値の信頼性を損なうか？

その他の変更

- 1) 不安定な被験物質は、毎日濃度を測定
- 2) pHの変動を抑えることと、その手段
- 3) 推奨培地(AAP)培地の追加……………OECD培地とは異なる
- 4) 参照物質として、3,5-Dichlorophenol
- 5) 試験の適用範囲と試験困難物質の試験法(文献紹介)
- 6) 毒性値の算出法

【注意】 OECD培地



評価法：生物代謝の抑制

Relationships of growth rate

$$r \approx \frac{1}{T_c} \approx \frac{1}{size} \approx \text{metabolic_rate} / \text{unit_weight}$$

T_c : generation time

生長速度と代謝は比例：代謝の阻害の程度を示す

N. Nyholm in 1990
Arch. Environ. Contam. Toxicol. 19: 518-522 (1990)

$$\frac{E_b C_{50}}{E_r C_{50}} = 10 \left[\left(\frac{1}{\alpha} \right) * \left(\frac{\ln 2}{\mu_{max} * t} - 0.5 \right) \right]$$

Ratio is not constant and depends on

- slope of response curve, α
- species-specific maximal growth rate, μ_{max}
- test duration, t

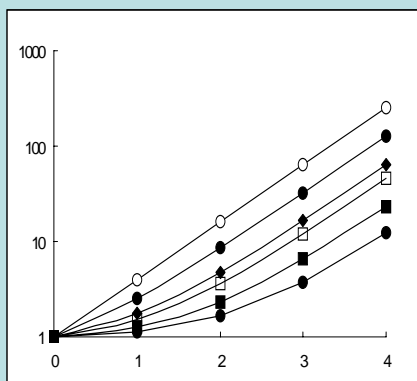
EbC50は、試験条件で変動する

試験は全期間を通じて
指数増殖期

暴露区でも指数増殖し
ていれば、生長速度の
阻害率から毒性値

収量(Yield)は原則用
いない

評価法：個体の死亡

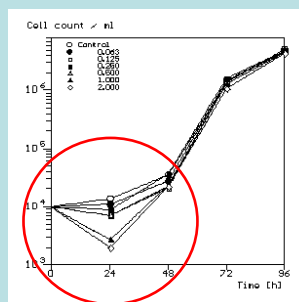


区間生長速度 $r(0-1) < r(1-2) < r(2-3)$
 暴露濃度が高いほど顕著なLag phaseが見られる

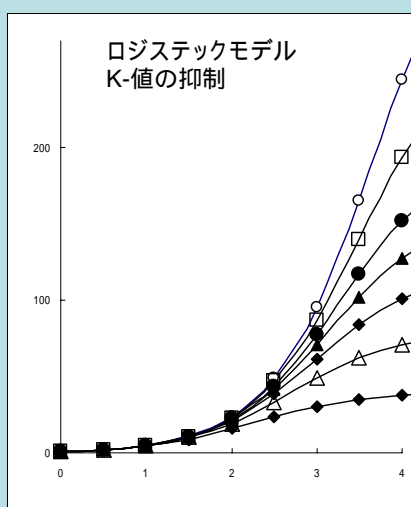
予備培養が不十分

被験物質濃度が減少

部分的な死亡があるが
 生長には影響しない場合



評価法：環境容量の抑制



被験物質の影響だが……

生物への直接的な影響ではなく
 培地の性質を変えただけ (物理
 化学的影響) で、「真の毒性」
 ではない?

このTGでは扱わない

実際には平均生長速度に表れる
 部分のみ評価

科学的な検討が必要

推奨種の標準的な基礎データ

Appearance and characteristics of recommended species

	<i>P. subcapitata</i>	<i>D. subspicatus</i>	<i>N. pelliculosa</i>	<i>A. flos-aquae</i>	<i>S. leopoliensis</i>
Appearance	Curved, twisted single cells	Oval, mostly single cells	Rods	Chains of oval cells	Rods
Size (L x W) μm	8-14 x 2-3	7-15 x 3-12	7.1x3.7	4.5x3	6x1
Cell volume ($\mu\text{m}^3/\text{cell}$)	40-60 ¹	60-80 ¹	40-50 ¹	30-40 ¹	2.5 ²
Cell dry weight (mg/cell)	2-3x10 ⁻⁸	3-4x10 ⁻⁸	3-4x10 ⁻⁸	1-2x10 ⁻⁸	2-3x10 ⁻⁹
Growth rate ³ (day ⁻¹)	1.5-1.7	1.2-1.5	1.4	1.1-1.4	2.0-2.4

¹ Measured with electronic particle counter

² Calculated from size

³ Most frequently observed growth rate in OECD medium at light intensity approx. 70 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 21 °C

培地の調製法の留意点

電氣的粒子計測装置：ろ過滅菌は0.22 μm のフィルターを使用する。

その他：0.45 μm でよい。

培地のpHは、培地の炭酸水素ナトリウム濃度によって異なる。
大気CO₂が十分溶解して平衡状態となった場合に次の式で示される。

$$\text{pHeq} = 11.30 + \log[\text{HCO}_3]$$

15 mg NaHCO₃: pHeq = 7.5 (U.S. EPA medium)

50 mg NaHCO₃: pHeq = 8.1 (OECDmedium).

Q1 エンドポイントであるbiomass法とrate法でEC50が10倍異なる事がある。試験設定濃度ではそれぞれのエンドポイントに対応した濃度区を設定する必要があるのか？

考え方：

Q2 予備試験の結果、最高濃度でも明確な阻害が見られない場合の正規試験の試験デザインは？限度試験で有意、正規試験で有意でない場合はどちらを優先するか？

考え方：

Q3 生長速度法での表記は、(0-3d)ErC50 か
(0-72h)ErC50か

考え方：

Q4 TGでは水温は設定値 ± 2 、ならば19~23 の変動幅
であっても試験は有効か？

考え方：

Q5 密閉容器での試験の場合、pHの変動が1.5より大きい事もある。そのような場合の試験は妥当か？

考え方：

Q6 72時間後の濃度測定の結果が測定限界以下になりました。実測平均値で毒性値を計算すべきでしょうかどうすればよいでしょうか？

考え方：

Q7 OECD - テストガイドライン201(1984)では毒性値を生長速度法の場合、(24-48h)ErC50と(24-72h)ErC50で出すことになっていますが、それでも72hEC50値と言ってよいのですか？

考え方：

Q8 藻類の密度を毎日決まった時間にサンプリングして計測して72h-EC50値を算出していますが、3日目は定時より2時間ほど遅れてしまいました。この試験は74h試験として報告しなければならないのでしょうか？

考え方：

Q9 培養液に藻類を接種するのと、被験物質を添加するのとどちらを前に行うべきでしょうか？

考え方：

Q10 試験終了時の被験物質濃度を測定するためのサンプルは試験法では遠心分離となっていますが、この前処理はフィルターでろ過する方が短時間で済み十分だと思うのですが妥当ですか？

考え方：

Q11 試験法では終了時に顕微鏡観察を行って形態異常の有無がないかどうかチェックするとありますが、具体的にはどのような点に気をつけて観察するのですか？またその結果はどのように毒性値に反映すべきなのですか？

考え方：

Q12 生長曲線をとってみると lag phase が見られました。毒性値の算出方法は通常の場合で行いましたが妥当ですか？

考え方：

NOTES