

第2部

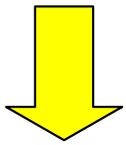
(4) 生態毒性試験実施にあたって の留意点

藻類生長阻害試験OECD-TG201(2006)の解説

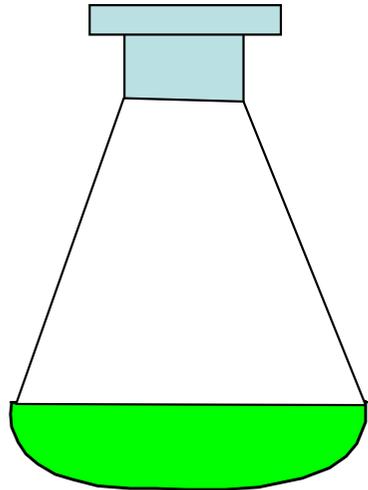
菅谷 芳雄

(独)国立環境研究所環境リスク研究センター

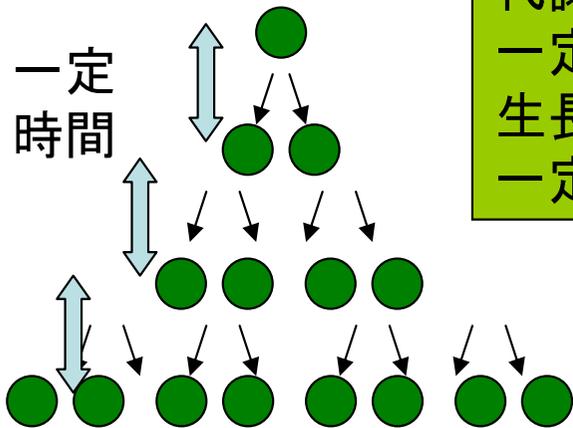
TG201



光源



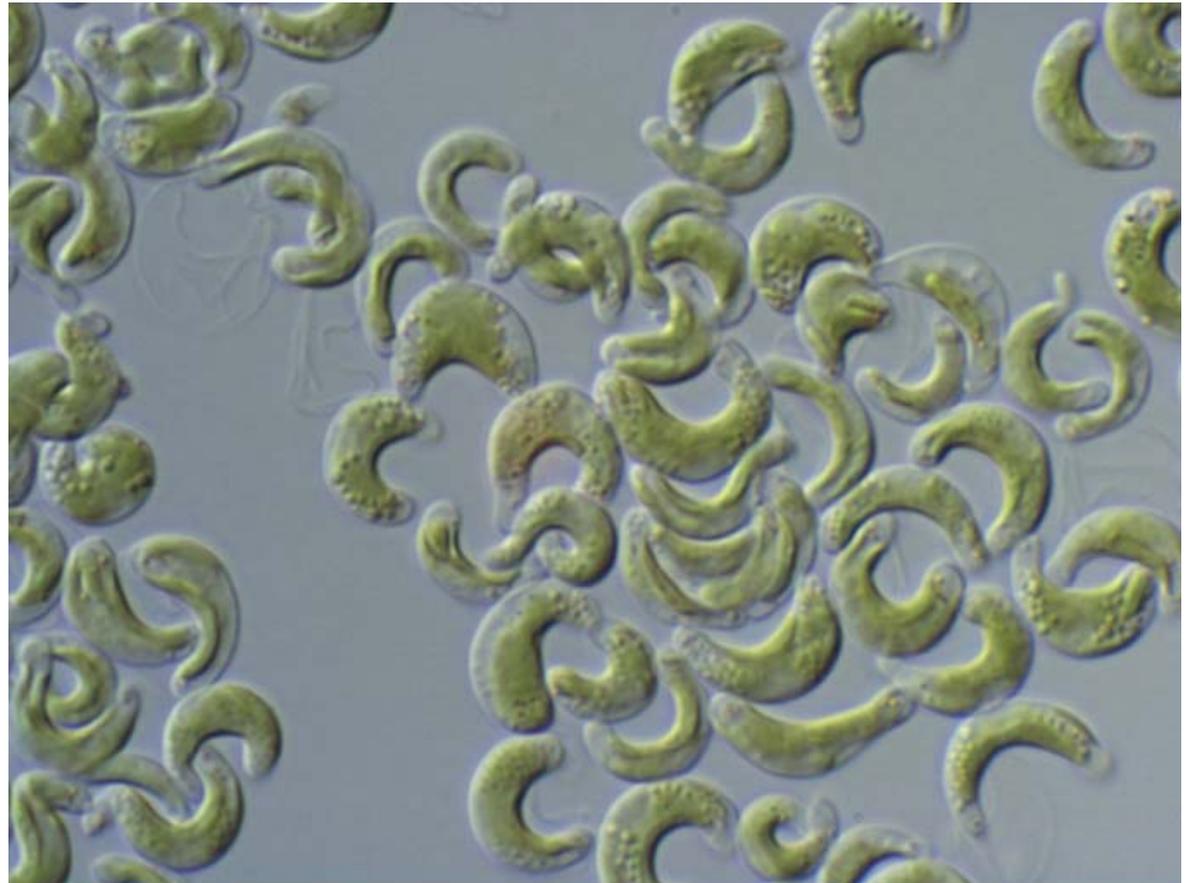
72時間培養



代謝速度が一定なら、生長速度も一定

生長速度

$$r = \ln(X(72h) / X(0h)) / 3\text{day} = 1.5 \text{ (90倍)} \sim 1.8 \text{ (225倍)}$$



NIES-35 *Pseudokirchneriella subcapitata*

10 μm

Relationships of growth rate

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

T_c : generation time

毒性値 ErC50: 生長速度が50%となる、濃度

OECD 試験ガイドライン201(2006) パラグラフ 5.

生長および生長阻害は時間の関数とする藻類の生物量(Biomass)の測定値から定量される。藻類の生物量は例えばmg乾燥重量/Lのように定義される。しかしながら、乾燥重量を測定することは困難なので、代替パラメーターが用いられる。それらは、細胞数が最も頻繁に用いられ、その他では細胞体積、蛍光、吸光度などである。ただしバイオマスと測定に用いた代替パラメーターの変換係数は明確にしておく必要がある。

測定方法	特徴
細胞数	細胞サイズに変動がない場合は、粒子計測装置を用いることで、高感度で測定可能。細胞の生死は区別できない外、試験液に粒子状の物質が存在する場合は、計測装置の利用は困難。
細胞体積	細胞サイズに関わりなく、生物量とより相関が高い、と予測される。細胞するとともに粒子計測装置で測定する。
クロロフィル蛍光	粒子計測装置と同程度の感度の高い測定が可能であり、細胞サイズに関わりなく、生物量と相関が高いと予測される。
光学的密度(吸光度)	一般的には十分な感度が得られない。

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

評価法：生物代謝の抑制

Relationships of growth rate

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

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

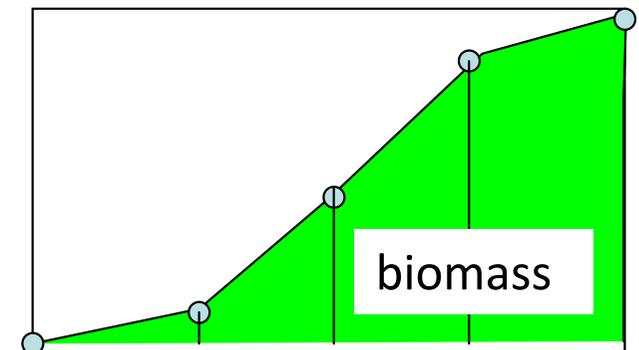
EbC50は、試験条件で変動する

試験は全期間を通じて
指数増殖期

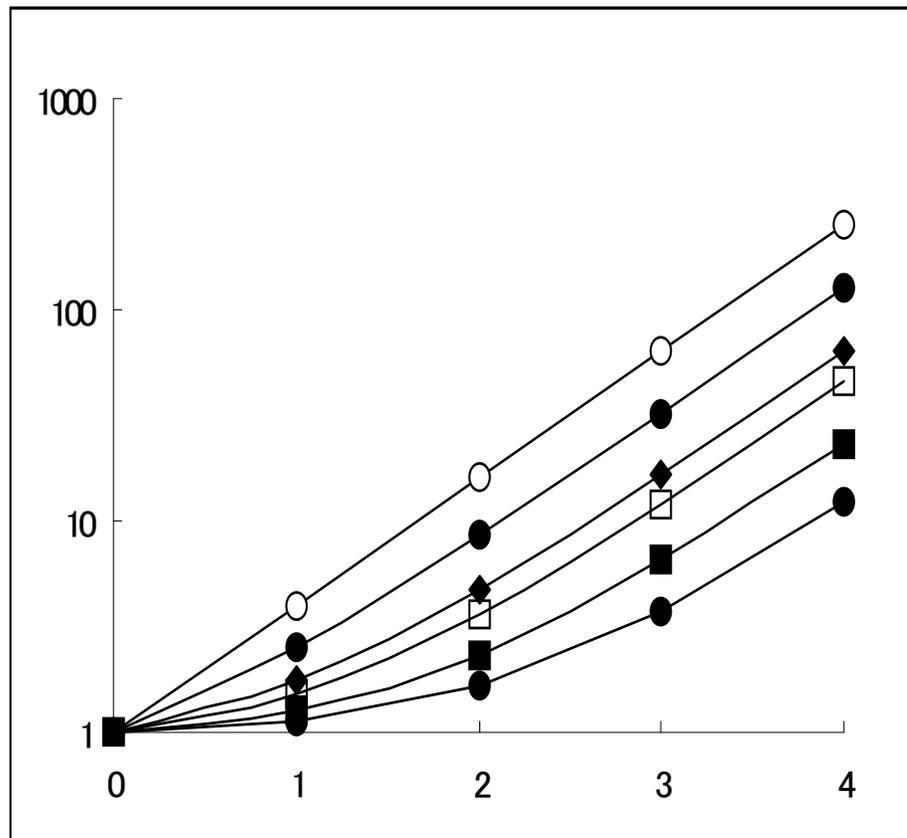
暴露区でも指数増殖し
ていれば、生長速度の
阻害率から毒性値

収量(Yield)は原則用
いない

※面積法



評価法：個体の死亡

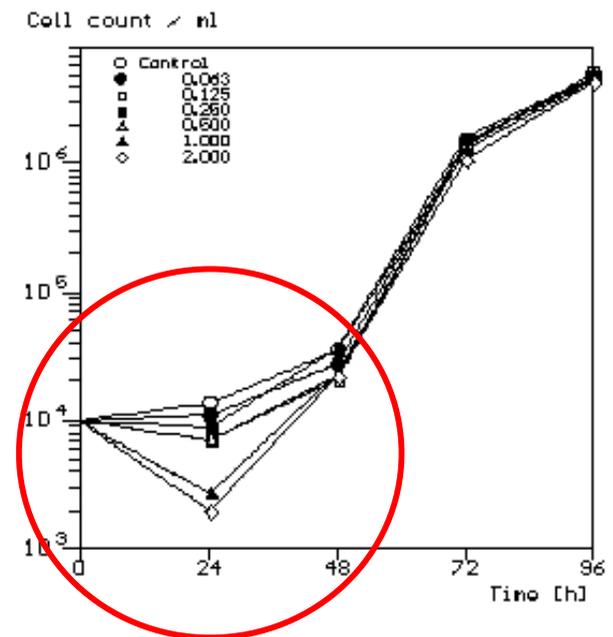


区間生長速度 $r(0-1) < r(1-2) < r(2-3)$
暴露濃度が高いほど顕著なLag phaseが見られる

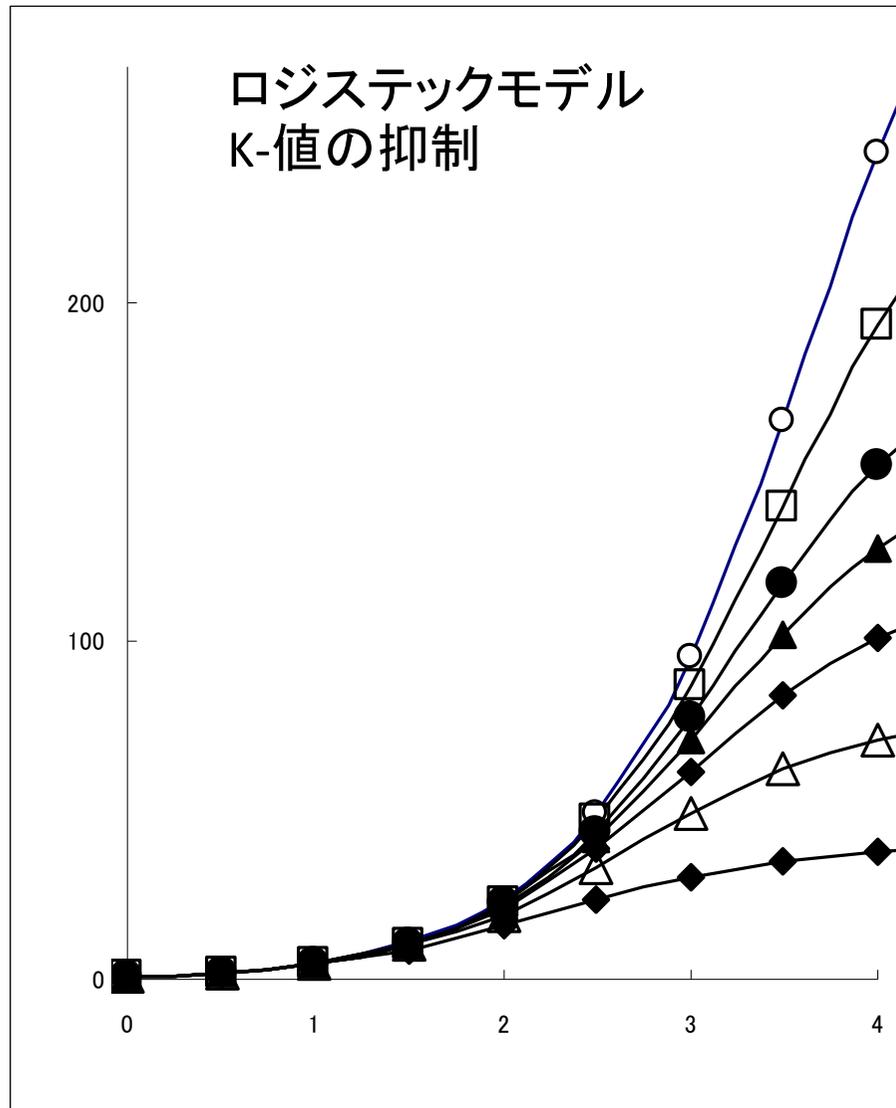
予備培養が不十分

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

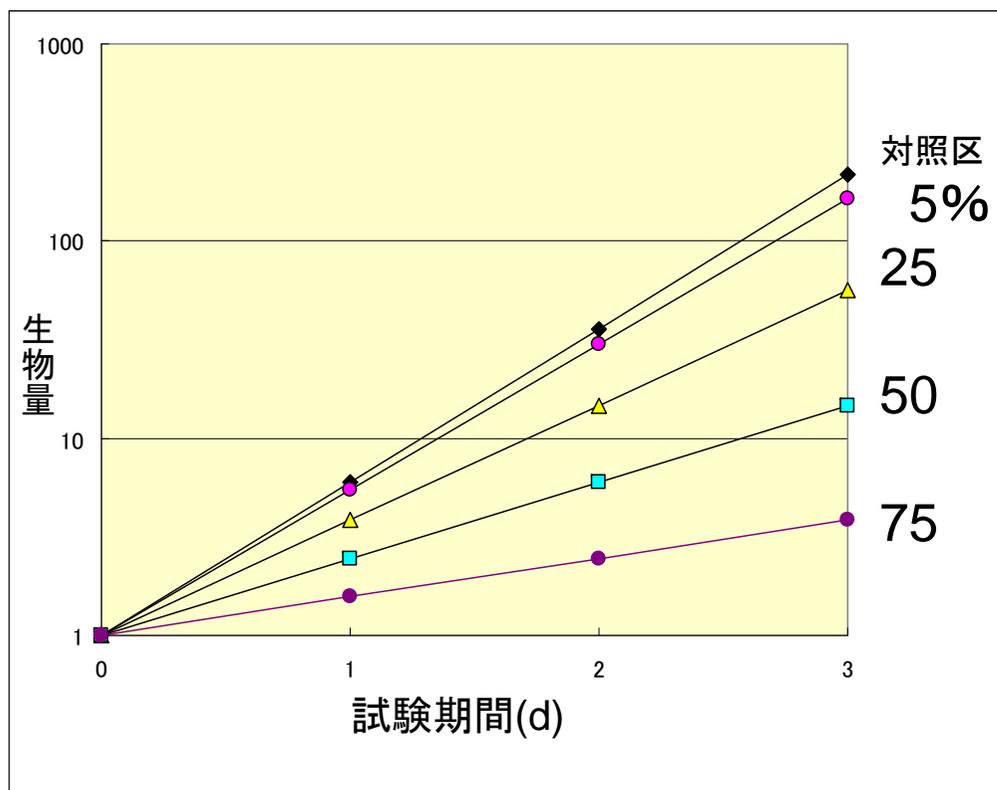
特に留意すべきガイドラインにおける規定

- (1) 試験濃度の設定
- (2) 被験物質の分析について
- (3) 分析値データの取扱について
- (4) 毒性値算出の基礎となるばく露濃度の決定について
- (5) 毒性値の算出方法

パラグラフ 22. (OECD 試験ガイドライン201(2006))

影響がでる可能性がある濃度範囲は、Range-finding試験結果から決定してよい。最終的な決定試験では、公比3.2を超えない幾何数列の少なくとも5濃度区を選択すべきである。反応曲線がもっと平坦な物質に対しては、もっと大きな公比が正当化されるであろう。濃度シリーズは藻類の生長速度の5-75%阻害を起こす範囲をカバーするようにすべきである。

生長速度の5-75%の生長阻害とは……



	生長速度	最終濃度
対照区	0%	0%
A	5%	23%
B	25%	74%
C	50%	93%
D	75%	98%

- 1) ErC50: 生長速度での阻害率で50%以上の濃度区は少なくてよい。
- 2) NOEC: 生長速度で5%未満でも有意差となることが多い。

試験の設計

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) 対照区における日間(1、2、3日目の)
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

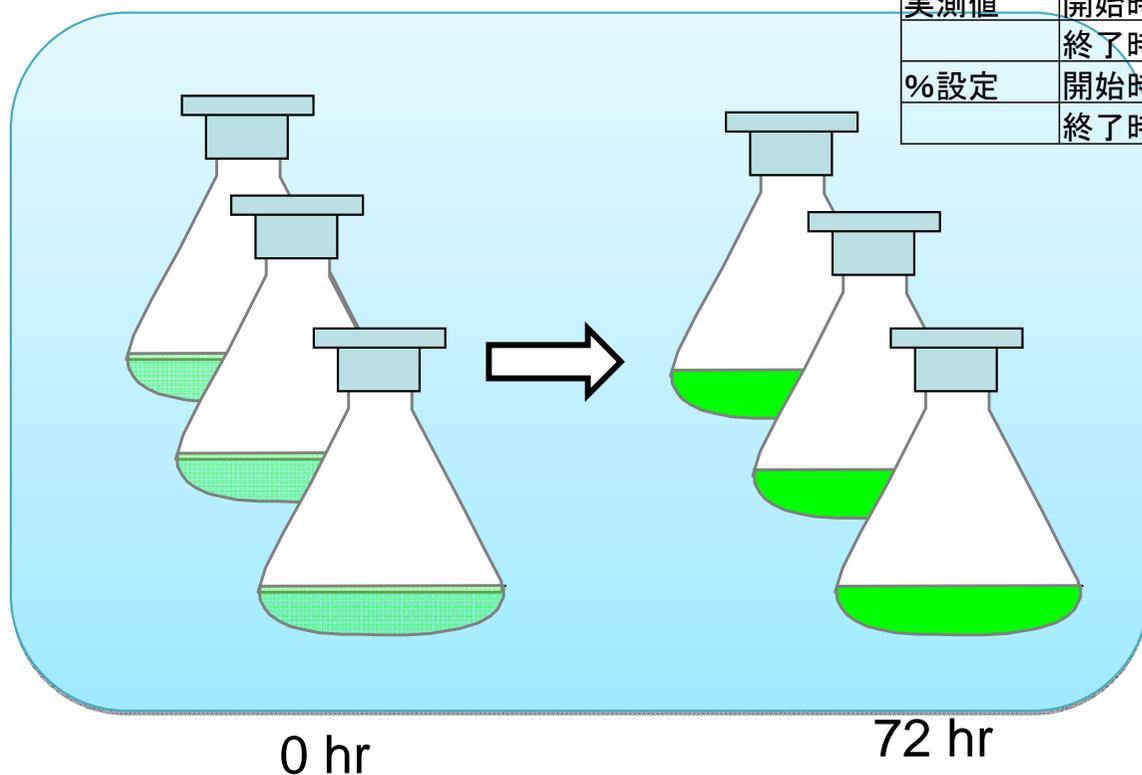
※ pH 変動は、0.5 unit 以下.1.5未満に……
ただし、毒性値の信頼性を損なうか？

パラグラフ37

- (1) 最低限3濃度区で曝露開始時と終了時に被験物質濃度を実測すること測定の結果、設定濃度からの変動が20%以内であれば、それ以上の分析は必要ない。
- (2) 変動が20%を越える場合は、全ての濃度区で分析する。
- (3) 揮発性、不安定性もしくは吸着性が激しい物質では、曝露開始時および終了時に加えて24時間間隔で測定を追加することが推奨される。
- (4) このような被験物質にあっては、繰り返しを多くすることが必要であろう。
- (5) 測定は、各濃度区で1容器のみ実施すればよい。(もしくは、各繰り返しから一定量をとってプールしてもよい)

試験物質の分析結果

		Min		EC50		Max
	設定値	5	10	20	40	80
実測値	開始時	5.1	8.8	19.6	37.9	81.0
	終了時	3.9	8.2	16.9	35.1	76.2
%設定	開始時	102%	88%	98%	95%	101%
	終了時	78%	82%	85%	88%	95%



開始時と終了時に試験物質濃度測定
変動幅が20%以内 → 3濃度区で十分
変動幅が20%超 → 全濃度区で測定

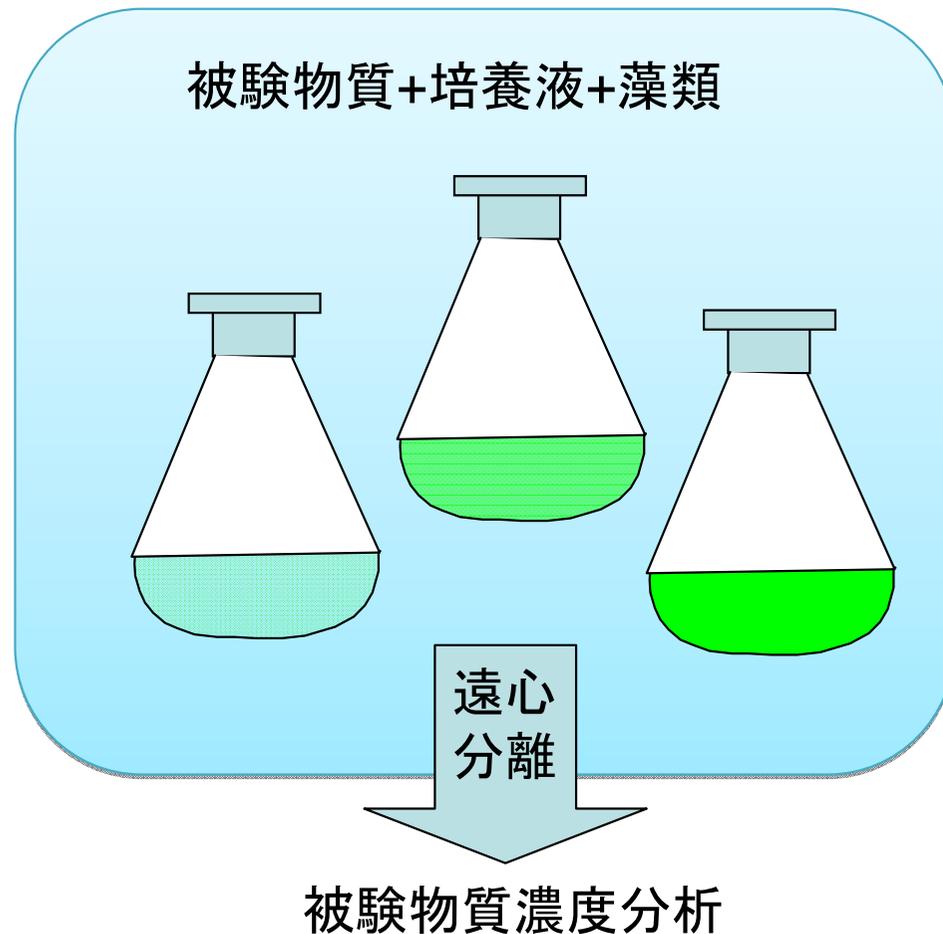


不安定な物質の場合はさらに追加
の測定が必要

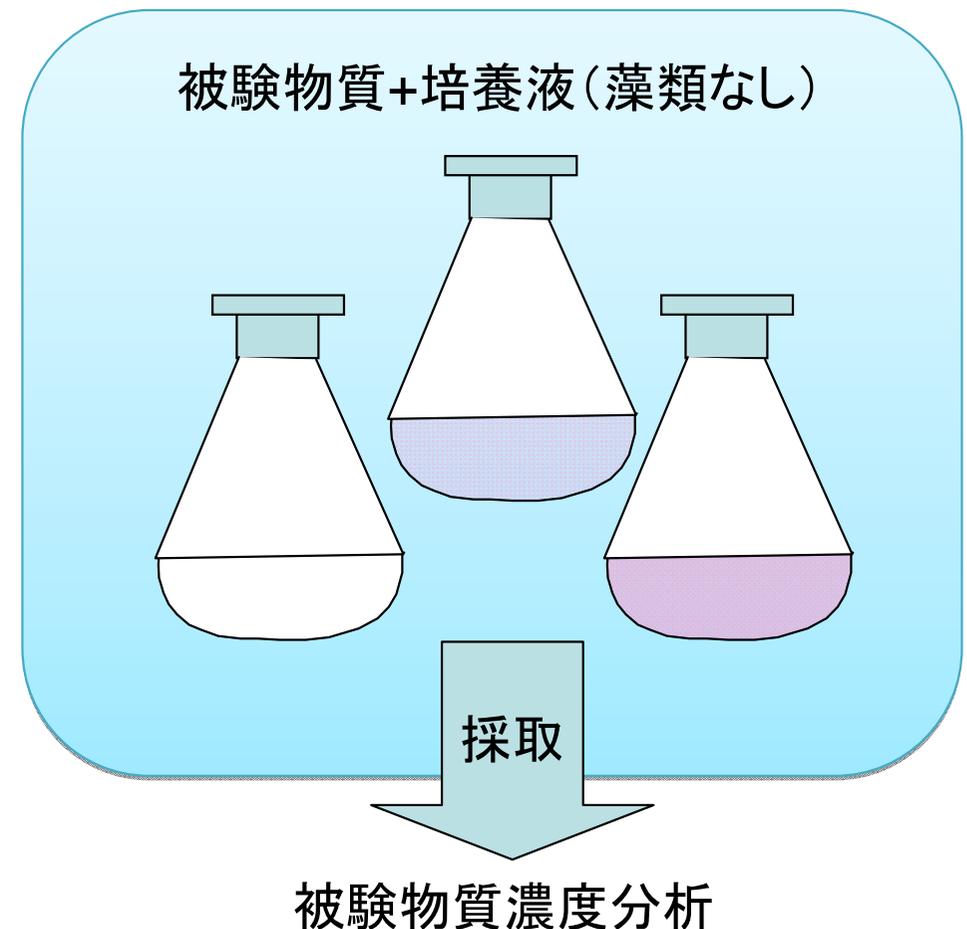
パラグラフ38

- (1) 試験期間中の曝露濃度分析のために特別に準備された媒体(試験溶液)は、試験用の培地と全く同様に取り扱われなければならない(つまり、藻類を植えられ、かつ同一条件で培養される)
- (2) もし、溶存態の被験物質の濃度測定が求められる場合は、媒体から藻類を分離する必要があり、その場合藻類を沈めるに十分かつ低Gの遠心分離が望ましい。

通常の濃度測定手順



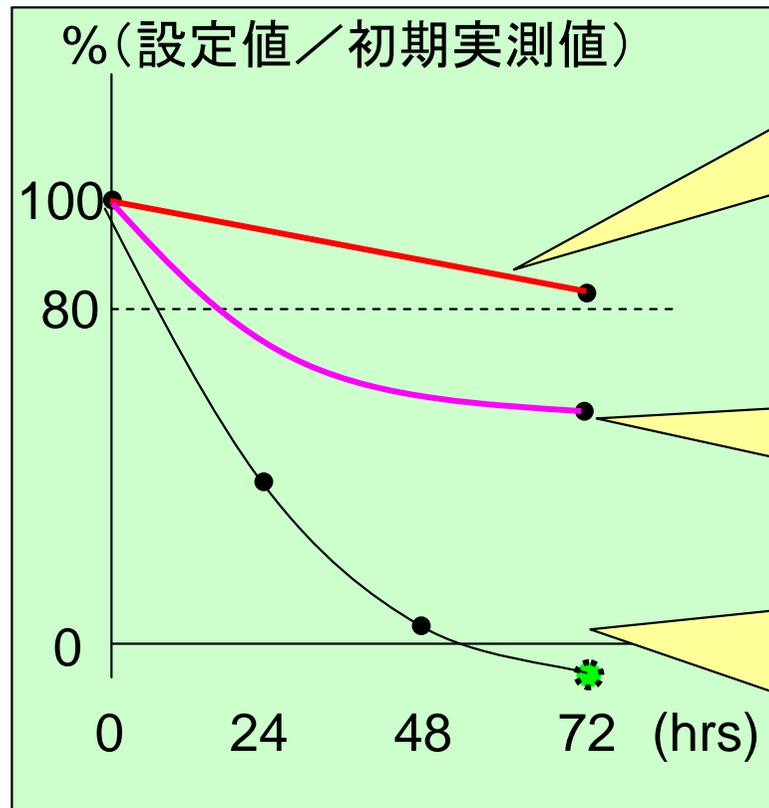
補完的な手順



パラグラフ39

(1) 試験期間中の被験物質濃度が設定値もしくは初期実測値からの変動が十分に±20%以内に維持できたとの証拠がある場合には、結果の分析(毒性値の算出)において設定値もしくは初期実測値を用いてよい。

(2) 設定値もしくは初期実測値からの変動が±20%範囲外の場合には曝露期間中の幾何平均濃度、もしくは、被験物質濃度の減少を推定するモデルに基づいて試験結果を分析すべきである。



曝露濃度データ

設定値(初期実測値)から変動が20%未満(予測される場合)
→設定値・初期実測値を用いる事は可
→最低濃度区の実測値から判断

設定値(初期実測値)から20%以上の変動
→適当な実測平均値(幾何平均など)

試験終了時に測定限界未満
→測定回数を増やし、終了時濃度を推定する。初期実測濃度とその推定値との適当な平均値
→デフォルト値(測定限界の1/2値:GD23)

パラグラフ40

- (1) 他のほとんどの水生短期毒性試験よりは、藻類生長阻害試験はよりダイナミックな試験である。そのため、実際の曝露濃度を決定することが困難であろうし、吸着性物質の低濃度曝露においては特にそのようであろう。
- (2) そのようなケースでは、増加した藻類体への吸着により試験溶液から被験物質が消失したとしてもそれは試験系から失われたことを意味しない。
- (3) 結果の分析にあたっては、試験経過中の試験物質濃度の減少が生長阻害率の減少に付随して起きているかどうかチェックすべきである。もしそのような場合には、試験物質濃度の減少を推定するモデルの利用を検討したほうがよいであろう。そうでなければ、試験結果の分析は初期(設定もしくは実測)濃度を基に実施すべきことは明らかであろう。

化学物質管理当局に提出する試験報告においては・・・

通常の試験手順では試験が困難(結果の解釈も含む)な物質の試験に関しては、別途OECD-ガイダンス文書があり、ガイドラインに示していない手順を用いる場合はこのガイダンスを根拠とすべきである。

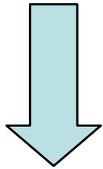
→ 何が、ダイナミックなのか？

	藻類	ミジンコ	魚類
選択可能な曝露方式	止水式	止水式 半止水式	止水式 半止水式 流水式
生物量 (密度)	指数関数的 に増加	死亡個体は 除去(減少)	死亡個体は 除去(減少)
その他の環境要因	・光(連続照明) ・pH上昇←光合成に伴うCO ₂ の減少、 密閉系の試験で顕著		

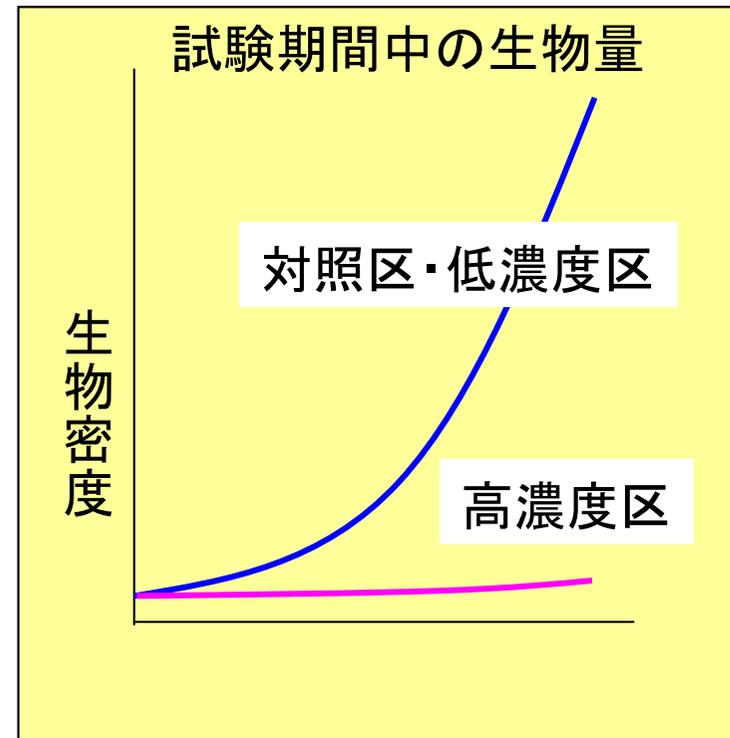
The alga growth inhibition test is a more dynamic test system than most other short-term aquatic toxicity tests.

- As a consequence, the actual exposure concentrations may be difficult to define, especially for adsorbing substances tested at low concentrations.

→どうして低濃度区だけ特別なのか・・・



藻類量が増えると・・・



藻類に吸着し易い物質は、溶液中から→藻類(吸着)に移動

光合成速度が増大 → 溶液のpHが上昇

藻類自らの影で光束密度が減少→光合成速度鈍化

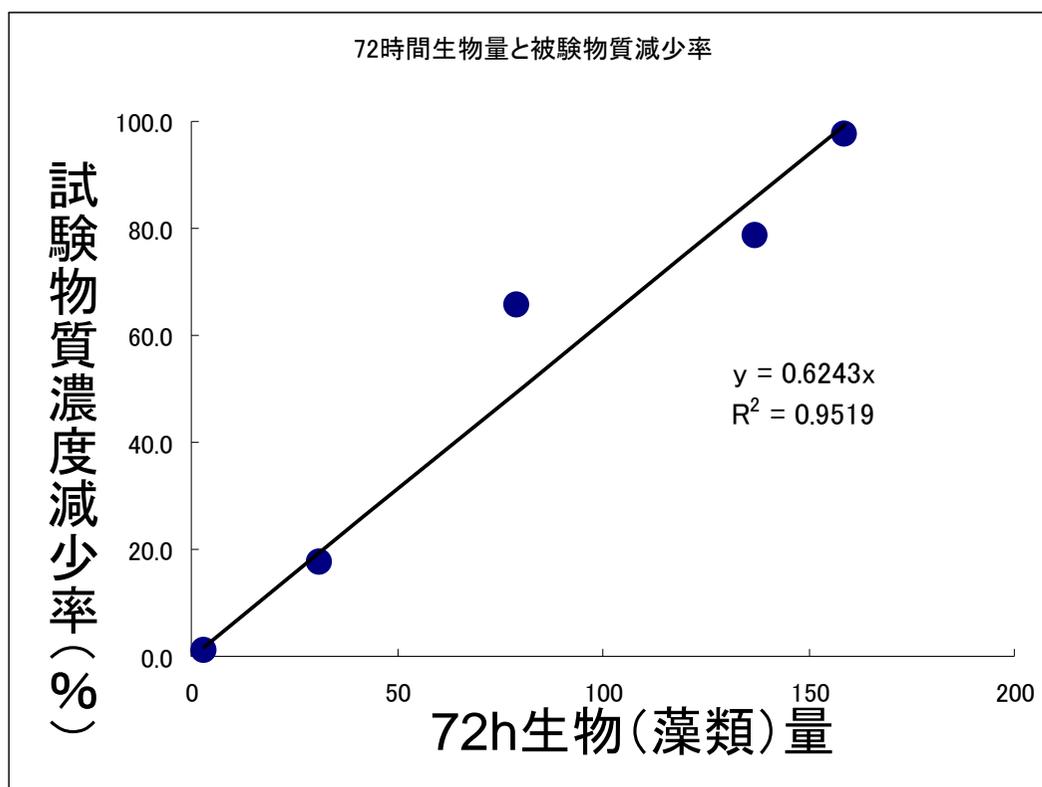
- In such cases, disappearance of the test substance from solution by adsorption to the increasing algal biomass does not mean that it is lost from the test system. →この事をどのように示すのか

When the result of the test is analysed, it should be checked whether a decrease in concentration of the test substance in the course of the test is accompanied by a decrease in growth inhibition. → 要するになんなのか？

試験物質濃度の減少が生長阻害の減少に付随して起こる……

試験物質濃度の減少率 * と 72時間後の生物(藻類)量が 比例

$$* 1 - [\text{実測値}(72\text{h}) / \text{実測値}(0\text{h})]$$



- ・予備試験で試験物質は試験条件で安定であることが示されている。
- ・予備試験で藻類に吸着することが示されている。

設定濃度	0h実測	72h実測	減少率	72h生物量
5	4.2	0.11	97.4	159
10	8.9	1.9	78.7	137
20	18.1	6.2	65.7	79
40	36.7	30.2	17.7	31
80	73.1	72.4	1.0	3

If not, it may be appropriate to base the analysis of the results on the initial (nominal or measured) concentrations

毒性値の算出の基になる「ばく露濃度」は、設定値もしくは初期実測濃度が適当

生物量が多いときほど、試験物質の減少が大きい場合は外にないのか？

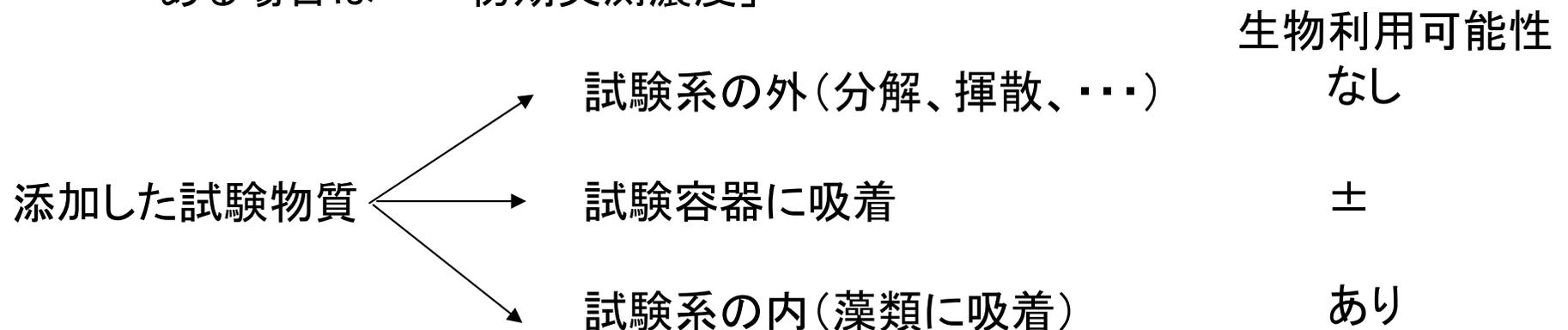
→ 生物量が多いほど、光合成量が多かったので、CO₂消費が多い
→ pHが上昇 → 加水分解速度が速い → 試験物質濃度が低下

対策

- ・加水分解性物質の場合は、pH変動を抑える。
- ・予備試験で、吸着性があるかどうかを検討しておく。

設定濃度 と 初期実測濃度 のどちらを使うべきか？

→ 設定濃度と初期実測濃度に差がある場合は・・・「初期実測濃度」



被験物質の水中安定性 →

- 試験環境で分解されない
- 水中での濃度が一定に保たれる

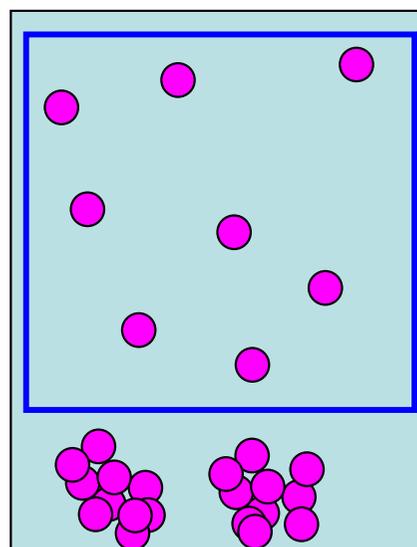
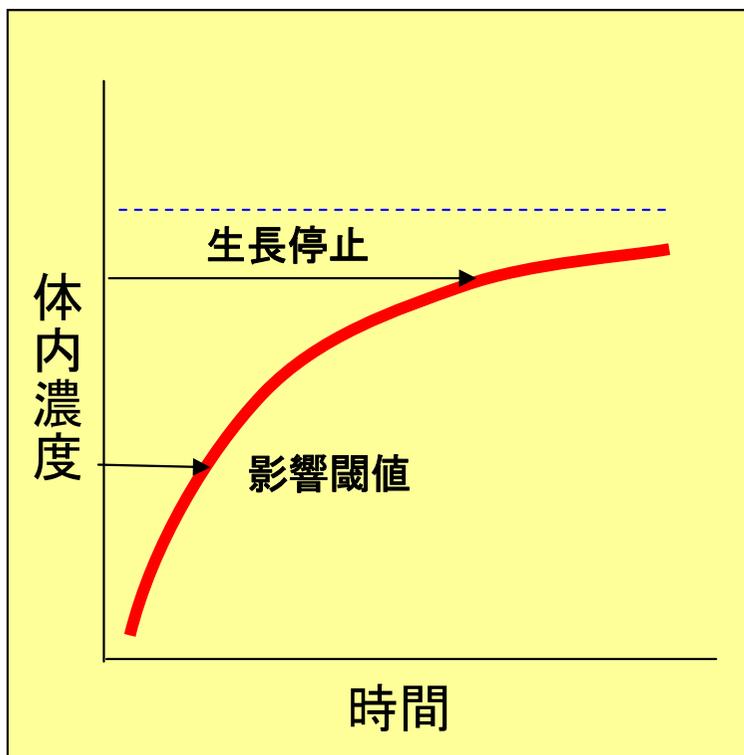
藻類への吸着が原因で濃度が低下する場合は、初期実測濃度で毒性評価

濃度設定：もう1つの問題

安定した「ばく露濃度」の試験が重要
・・・藻類試験は対策が制限

→ 不安定な物質の濃度設定

[限度試験では・・・]



飽和溶液＋粒子

粒子が試験結果に影響を与えない場合は、水溶解を超えて添加した試験はありうる。
飽和濃度を維持するため

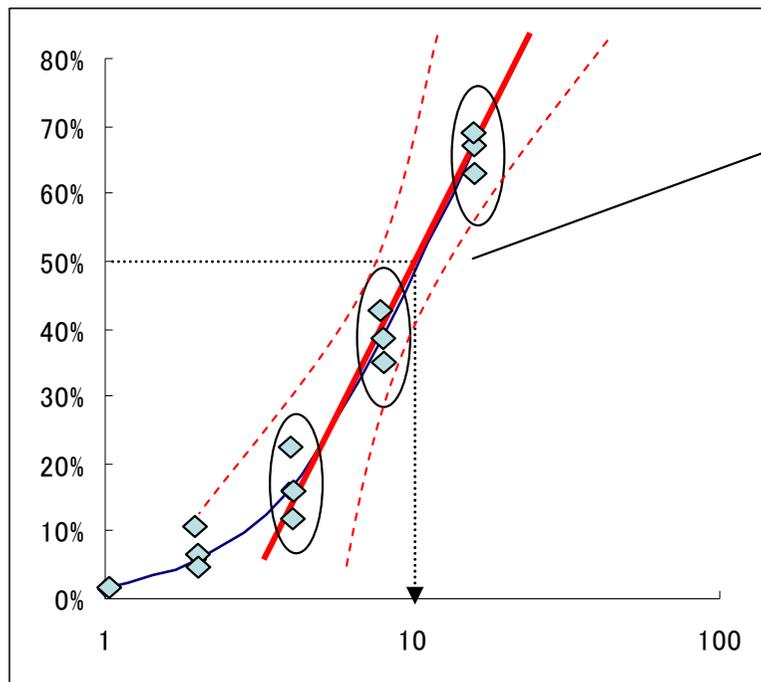
例：初期実測濃度が溶解度よりも低い：容器への吸着別の対策：conditioning

例：溶解度が定量下限以下手順で飽和濃度であることを示す必要がある。

パラグラフ 55

…… 回帰分析を個々の繰り返しデータを使って実施すべきであり、(濃度区の)グループ平均を用いてはならない。しかしながら、データがバラバラで非線形曲線フィッティングが困難であったり失敗してしまうのであれば、グループ平均を使っての回帰分析も飛び値と考えられる影響を減じる事も実行上、問題を回避できるかもしれない。ただしこのオプションの利用は個々の繰り返しデータを用いた場合は良い結果が得られなかったのであるから、通常の手順からの逸脱として報告しなければならない。

全繰り返しデータを用いた毒性値の算出



濃度(対数)－阻害率曲線

ErC50
EyC50

阻害率 $I = 1 - (rx / rc)$

rx: 濃度xの生長速度

rc: 対照区の生長速度

グループ平均を用いる場合には、報告書にその点の釈明が必要