

1 藻類試験における生長過程の解析

1 . 1 生長速度の指数モデルとロジスティックモデル

藻類の細胞数やウキクサの生物量 (frond 数、葉面積、乾燥重量) は、栄養塩や光などの環境条件が急激には変化しない場合は、指数関数的に増加する事が知られている。

指数モデルは次式で表される $dN/dt = rN$ (式 1)

この式から明らかなように瞬間的な増加量 (dN/dt) はその時点の生物量 (N) に比例し、その比例定数は r としている。 r は一定の環境ではその種に特有の値であり、 $r = \mu -$ であり (動物の場合は $b - m$ と表記) μ は内的自然増加率 (単位時間当たり、単位生物量当たりの増殖量で動物の場合は出生率) は同じく減少率 (動物の場合は死亡率) である。藻類やウキクサの場合は自然界では当然減少するが試験系では便宜的に $= 0$ を仮定する。従って $r = \mu$ である。

この生長速度 r は、世代時間の逆数つまり藻類の場合は 1 日当たりの分裂回数と同義である。生物は一般にその体が小さいほど単位時間当たりの分裂回数大きく、単細胞藻類においても同様である。

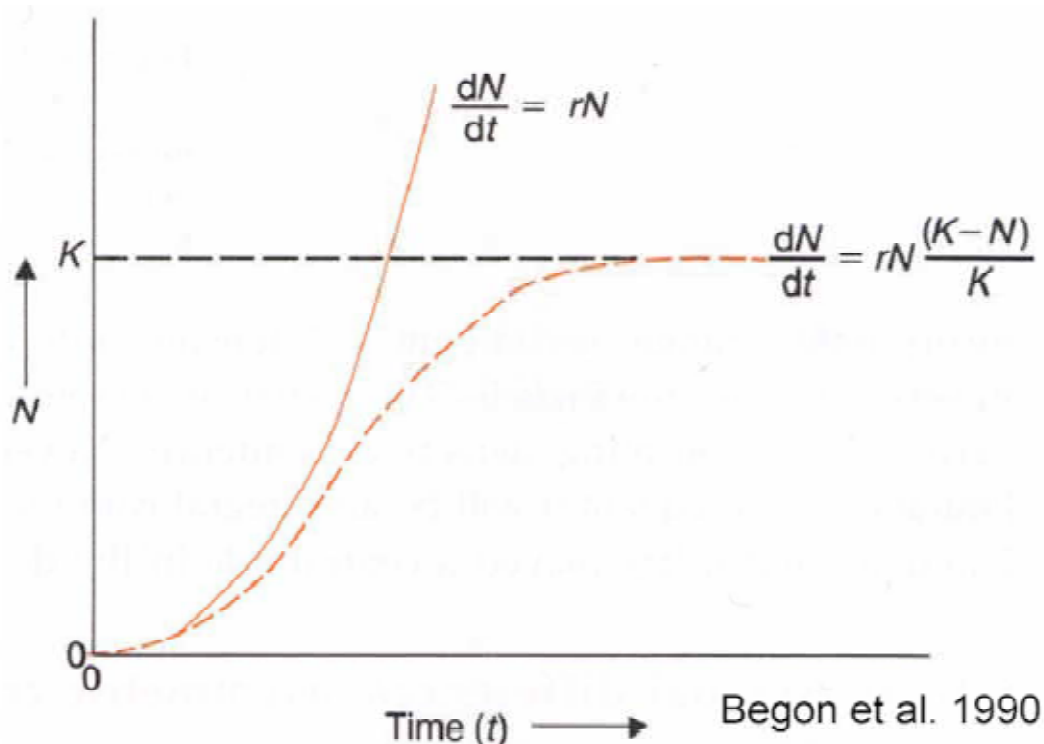
生物が単位時間あたりに消費するエネルギーの一定割合を次世代の生産に使うとすると、生長速度は単位体重あたりに呼吸速度とも比例関係がある (次式、Ratte, 1990)。ここで化学物質の影響が生物体の代謝速度に影響するとするとその阻害効果は比例関係にある生長速度の変化から算出することが正しいと主張されている。

Relationships of growth rate

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

T_c : generation time

式 1 の微分方程式を解いて一般式で表すと $N_t = N_0 e^{rt}$ (式 2)



(図 1) 指数関数モデルとロジスティックモデルによる生物の増殖曲線

藻類生長阻害試験は試験終了までにこの指数増殖期を継続しなければならない。実際の試験結果をみると必ずしも満足はできないもののほぼ 48 時間までは指数関数的増殖を示し、72 時間まで増殖速度を維持できる場合とそれまでより減少する傾向がでている場合がみられる。

時間経過に伴い増殖速度が減少するのは、第一に藻類が増殖するために必須の栄養素の濃度が低下しそれまでよりも利用しにくい状態になったり、藻類自身の密度増加により光エネルギーの供給が少なくなるためといった理由が考えられる。そのような有限の系では生物生長はロジステックモデルに従う。

ロジステックモデルは次式で表される

$$dN/dt = rN (K - N) / K \quad (\text{式 3})$$

$r = \mu -$ ($= 0$ と仮定する) で、種特異的な値。

K : ある環境では、種に特異的な一定の値で環境収容力 (環境容量) と呼ばれる。

N : 生物量

式 3 の一般式は

$$N = \frac{K}{1 + (K - N_0) e^{-a \cdot t} / N_0}$$

または

$$N = \frac{K}{1 + e^{-a-rt}}$$

ここで $e^{-a} = (K - N_0) / N_0$

ただし $e^{-a-rt} = e^{-a} / e^{rt}$ (式4)

ロジスティックモデルでは、瞬間増殖速度は指数関数モデルよりも (N / K) だけ少ない。そして N はやがて K に近づき増殖が停止する。つまり生長速度 r は試験開始時点で最大値を示しその後は減少する。ロジスティック曲線はいわゆる S 字（シグモイド）曲線で示され、経過時間のごく初期には指数関数で近似される。

2 生長阻害率算出法の検討，生長速度法と面積法の比較

藻類生長阻害試験においては現行の OECD テストガイドライン 201 (1984) は生長速度 (Growth rate) 法と面積法 (生長曲線下の面積) の 2 つを採用している。これらを含めて下に示すようなパラメータを用いて阻害率の算出に使用している。

- Cell number; final cell count FCC

$$N_t$$

- Growth rate, (μ or r)

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t}$$

- Interval growth rate, r^* ($t = 1$ d)

$$\mu = \ln N_t - \ln N_{t-1}$$

- Biomass-integral; area under the growth curve, AUG

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} (t_2 - t_1) + \dots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} (t_n - t_{n-1})$$

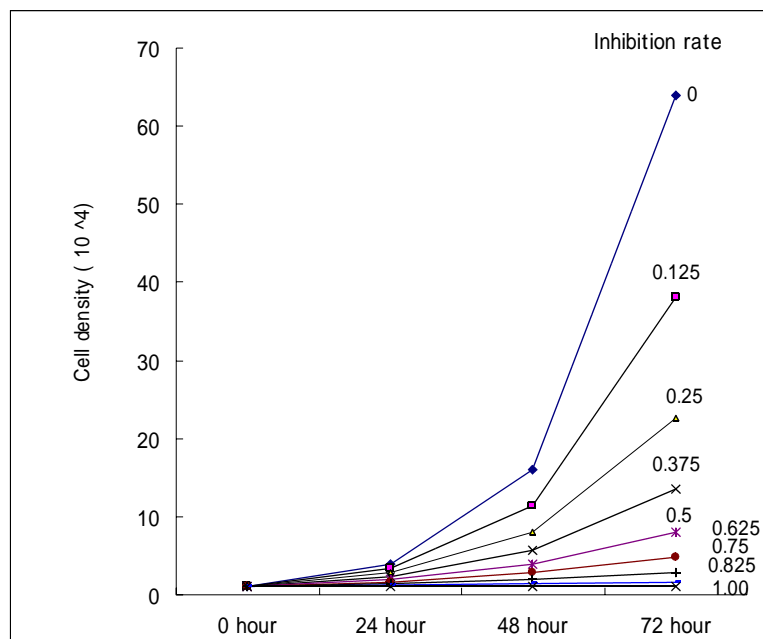
N : cell count; t : time [d]

なお，現在 OECD テストガイドライン 201 改定案が作成されておりそこでは速度法と最終細胞数（対数値）が提案されているがこの点については別の節で触れる。

2.1 生長速度法および面積法による阻害率の算出

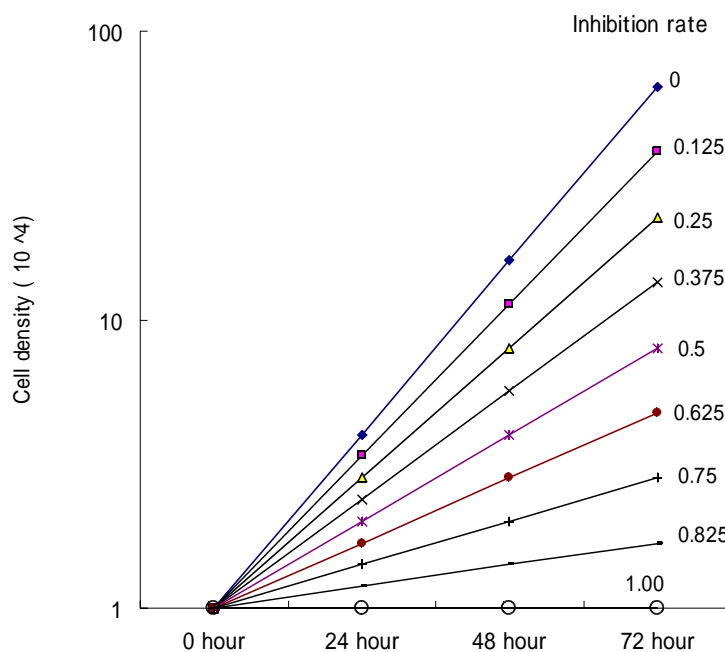
ロジスティックモデルにおいては試験の初期には指数関数で近似できることはすでに述

べた通りである．そのため指数関数モデルをもとに阻害率と暴露濃度との関係を見る．



(図 2) 指数増殖モデルでの増殖曲線

初期細胞濃度： 1×10^4 cells/ml 最大生長速度：0.69 /day (1 日に 2 回分裂する速度)
 の条件で阻害率を 0 ～ 1 まで変化させた場合の生長曲線である．
 この図の縦軸を対数で表すと



(図 3) 図 2 の縦軸を対数で表示

とそれぞれの濃度 (阻害率) の曲線は直線になる．ただし化学物質の影響が暴露時間の経過に伴って変化しない場合を想定している．

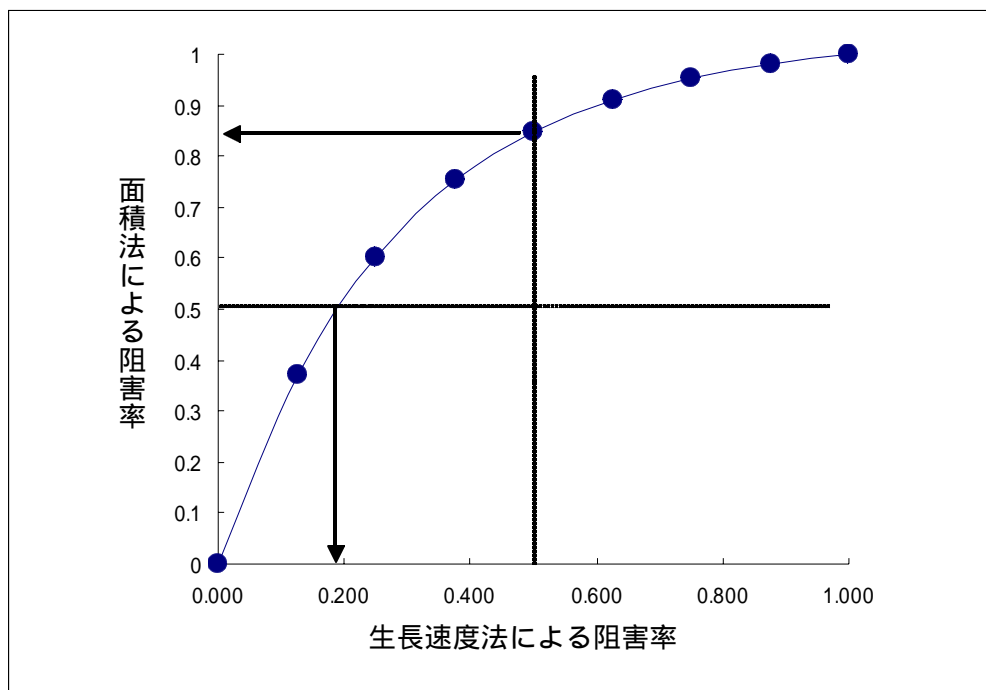
一方，まったく同じ条件で面積法による阻害率を上記と同じように変化させると，同一

の試験結果であっても異なる阻害率となる．上記の場合の面積法による阻害率を計算するし表 1 と図に示す．

(表 1) 生長速度法と面積法による阻害率の比較

速度法	面積法
0.000	0.000
0.125	0.370
0.250	0.603
0.375	0.752
0.500	0.848
0.625	0.911
0.750	0.953
0.875	0.981
1.000	1.000

ただし，最大生長速度(対照区での速度)を 0.69/日 試験期間を 72 時間とした場合．

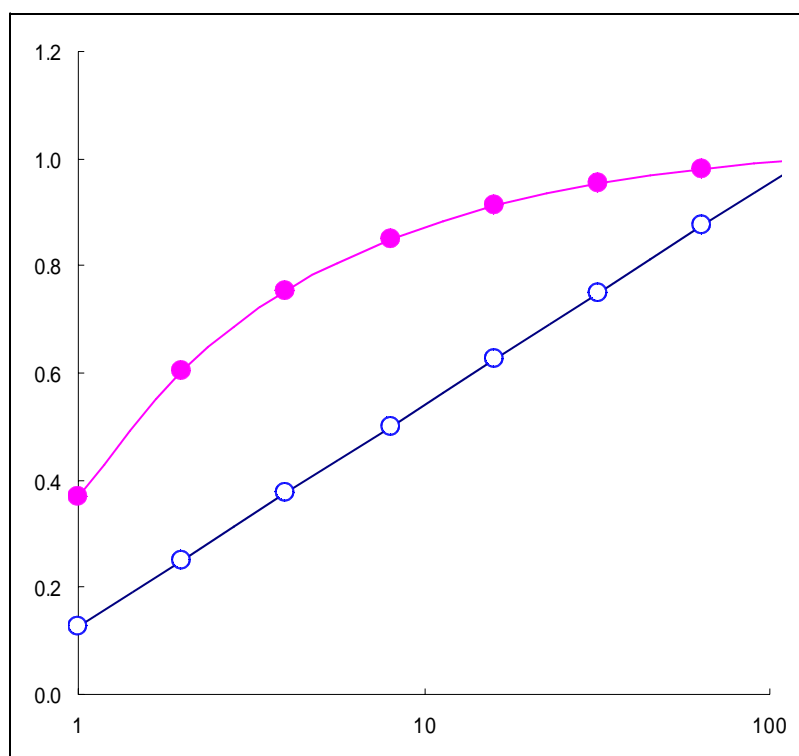


(図 4) 面積法および速度法による生長阻害率の比較，データは表 1 と同じ．

図から明らかな通り，この初期条件（生長速度と試験期間）では生長速度法による 50 %生長阻害は面積法では約 85 %生長阻害に当たり，面積法での 50 生長阻害は速度法の 20 %弱にあたる．当然の事ながら初期条件が変化するとその違いは顕著になったり，曖昧なものとなるものの一致するのは阻害率 0 %と 1 0 0 %だけでその他は異なる．

(表 1 b) 暴露濃度を仮に 1mg/L ~ 128mg/L とした場合

濃度	阻害率	
	成長速度法	面積法
1	0.125	0.369604
2	0.250	0.603189
4	0.375	0.752274
8	0.500	0.848485
16	0.625	0.911341
32	0.750	0.952961
64	0.875	0.980923
128	1.000	1



(図 5) 表 1 b を図に示す。

このデータでは、(0-72 時間) $ErC_{50} = 8 \text{ mg/l}$

面積法の場合は、濃度反応関係が直線ではないので、直線近似のためには、適当な変換が必要であり通常はロジットまたはプロビットに変換した後に直線回帰式から求める。ここでは単純に区間推定を行い、

(0-72 時間) $EbC_{50} = 1.47 \text{ mg/l}$ が得られる。

この例では、 $EbC_{50} / ErC_{50} = 1.47 / 8.0 = 0.18$ がえられる。

N. Nyholm(1990) はそれぞれの阻害率の比を数学的に解いて下に示す式で表した。

N. Nyholm in 1990

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

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

Ratio is not constant and depends on

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

この式によれば , 速度法による 50 % 生長阻害濃度 ($E_r C_{50}$) を分母にし , の面積法による 50 % 生長阻害濃度 ($E_b C_{50}$) を分子にした場合の比は , 濃度反応曲線の傾き () , 対照区での生長速度 (最大生長速度 : μ_{\max}) および暴露時間 (t) によって変化する。

【注意】濃度反応曲線の傾きは速度法における濃度 (X 軸 / 対数) と阻害率 (Y 軸、0 ~ 1) によって作られる傾きと推測される。図 5 の例では被験物質濃度と阻害率の関係は無視しているが、上記の式で $\alpha = 0.33$ ($1/\alpha = 3$) を入れた場合にほぼ等しい。

【スロープの大きさと両毒性値の比の実例】

	Slope of the dose/response relationship					
	Steep		Moderate		Flat	
	0-72h	0-96h	0-72h	0-96h	0-72h	0-96h
E_cC_{50}	3.7	3.1	0.8	0.5	0.3	0.2
E_bC_{50}	3.9	3.3	0.9	0.6	0.4	0.2
E_rC_{50}	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
ErC_{50}^*	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
ErC_{50}/EcC_{50}	2.7	3.2	12.5	18.8	34.2	60.6
ErC_{50}/EbC_{50}	2.5	3.0	10.6	16.4	27.1	50.0

上の表は Ratte, 1998 からの引用であるが、スロープを急（3.1-3.9）、中間（ほぼ1）、緩やか（0.3 程度）分類して速度法と面積法を比較すると、スロープが急では3倍、中間では10倍、緩やかでは40倍とスロープが緩やかになるほど、両者の差が大きくなった。

2.2 化学物質の作用メカニズムと阻害率の変動

化学物質の影響が生物の代謝速度を遅らせその結果生長速度を遅らせるという、メカニズムである場合は、テストガイドラインが規定している通り、その生長曲線はこの試験条件では指数増殖モデルに適合していると考えられる。しかしながらこの作用機序だけでなく化学物質の藻類生長に及ぼす生態学的な影響はその表れ方により、Ratte（2003）ではいくつかのパターンを紹介し、その中で実験者の誤った操作に起因したものを除くと次のようにまとめる事ができる。つまり

（1）化学物質は直接または間接的に藻類に働き生長速度を減少させる。

前節参照

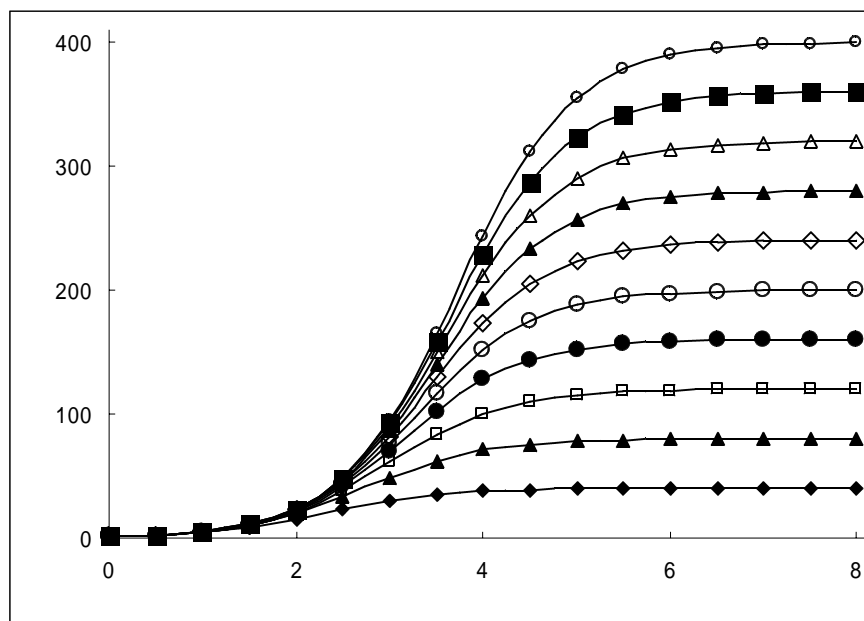
（2）藻類に間接的に働き、藻類の最高到達密度（環境容量）を減少させる。

ロジスティック増殖モデルによる解析が必要である。

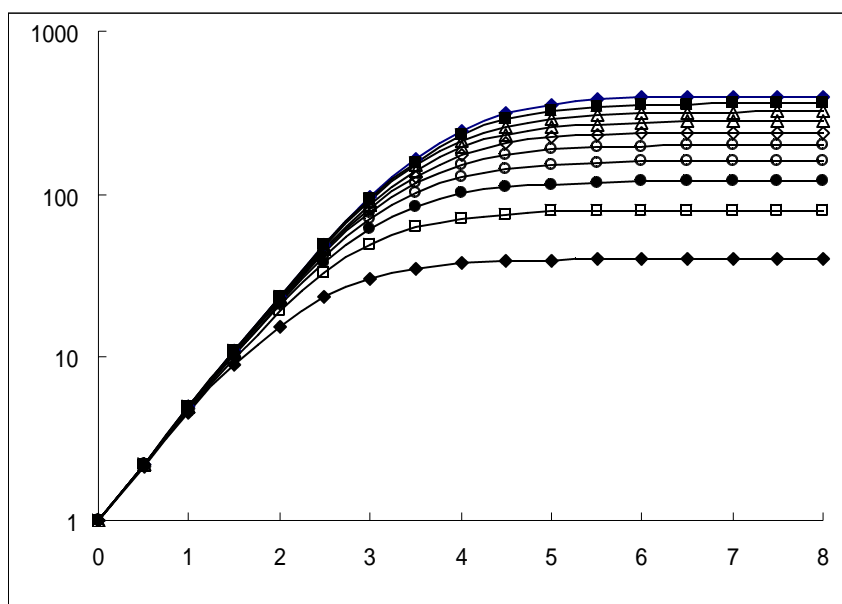
（3）藻類に直接致死的に働き、試験個体群の一部または全てを死亡または不活性にする。

【ロジスティック増殖曲線】

式3および式4で示されるS字上の曲線がロジステック曲線と呼ばれており、生物の生長（個体数の増加）における一般的なモデルである。



(図 6) ロジスティクモデルにおける K 値を変化させた場合の藻類の生長曲線



(図 7) 図 6 の Y 軸を対数変換したもの

作図条件 : 初期濃度 1 (通常は $\times 10^4$ cell/ml)
 環境容量 K 400 (阻害のない対照区での最大密度)
 生長速度 r $\ln(5) = 1.61$ (1 日に 5 倍になる速度) 一定
 阻害率 0, 0.1, 0.2, \dots 0.8, 0.9
 (ただし阻害は K の減少として現れるとした)

(表2) 図6および図7の元のデータ

阻害率	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
K	400	360	320	280	240	200	160	120	80	40
No	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
r	1.61	1.61	1.61	1.61	1.61	1.61	1.61	1.61	1.61	1.61
e ^a	399	359	319	279	239	199	159	119	79	39

t	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
0.0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0.5	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
1.0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
1.5	11	11	11	11	11	11	11	10	10	9
2.0	24	23	23	23	23	22	22	21	19	16
2.5	49	49	48	47	45	44	42	38	33	24
3.0	95	93	90	87	82	77	70	61	49	30
3.5	165	158	149	140	129	117	102	84	62	35
4.0	244	229	212	194	174	152	128	101	71	38
4.5	311	286	261	233	205	175	144	111	76	39
5.0	355	323	290	257	223	188	152	116	78	40
5.5	378	342	306	269	232	194	156	118	79	40
6.0	390	352	314	275	236	197	158	119	80	40
6.5	395	356	317	278	238	199	159	120	80	40
7.0	398	358	319	279	239	199	160	120	80	40
7.5	399	359	319	280	240	200	160	120	80	40
8.0	400	360	320	280	240	200	160	120	80	40

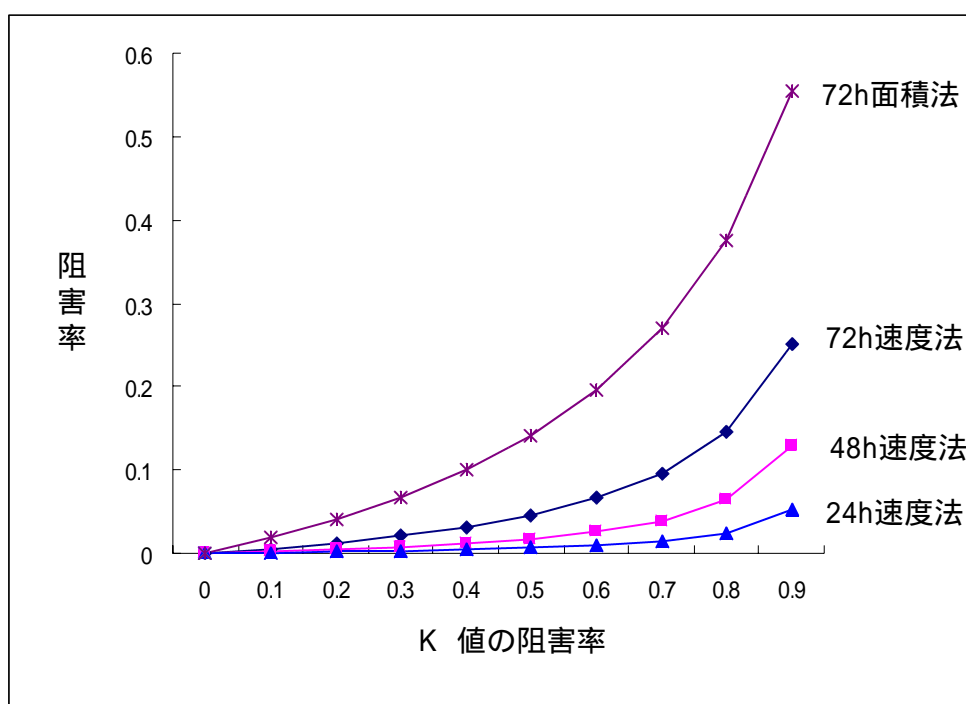
3日後の細胞濃度

FCC(72h)/K	0.24	0.26	0.28	0.31	0.34	0.39	0.44	0.51	0.61	0.76
------------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

図 6 および図 7 に示した通り、ロジスティックモデルでは生長速度の最大値は試験開始直後であり、図では約 2 日ほどはほぼ指数モデルで近似できる事がわかる。しかしながら 3 日目にはすでに生長速度はそれまでよりも明らかに低下している。この低下分は環境容量 K が十分大きい場合は生長速度の低下はさらに遅れるが、実際の藻類試験においては、揮発性物質やキレート物質の実験において用いる手法により環境容量が対照区でも通常のそれよりも遙かに小さい事が考えられる。そのような物質の試験においては十分に考慮されるべき作用機序といえる。

表 2 では、この条件では暴露日数の経過に伴い仮定した K 値に近づき、8 日目にはほぼすべての区でその値となるが、指数増殖を前提としたテストガイドラインでの暴露期間は 3 日であるのでその時点での到達細胞数と K 値との比は K 値が大きいほど小さく、対照区では 24%、一方、 K 値の阻害率 90% では 76% と計算される。

このことから、 K 値を阻害した場合は、 N_t ($t=3\text{day}$): 最終細胞濃度法 (FCC) を用いて毒性値を導こうとしても正確な値は得られない。また、元来、生長速度は一定値を仮定しているものであるので、速度法による毒性値は見かけだけのものである (図 8)。



(図 8) K 値の阻害率と面積法および速度法による阻害率の関係

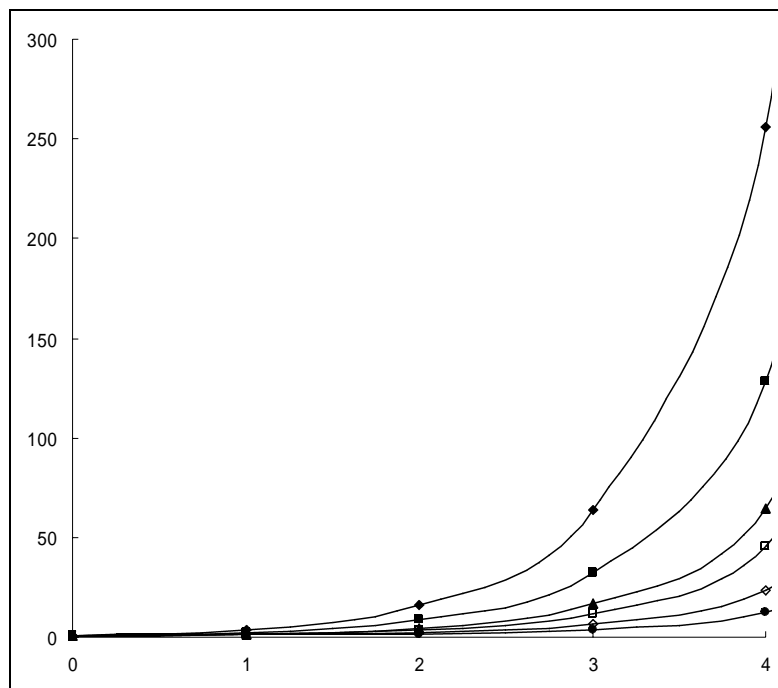
【死亡率モデル】

試験開始とともに藻類細胞は被験物質に暴露されるが、この時藻類個体群の内、ある確率で藻類細胞は致死的な影響を受けると仮定する。つまり、ミジンコや魚類でおこる反応形式で、それぞれの個体が固有にもっている感受性が個体群の中で正規分布していると考えられ、影響はある細胞には致死的に、別の細胞にはまったく影響しないと仮定する。また、この暴露では、藻類細胞は死亡していたとしても、即座に細胞が崩壊することはまれであり、通常の観察では活着している細胞と死んでいる細胞の区別は不可能である。そのため影響を受けて、細胞としては不活性な状態であっても細胞濃度には寄与すると仮定せざるをえない。表3にこのモデルにおける増殖曲線を示す。

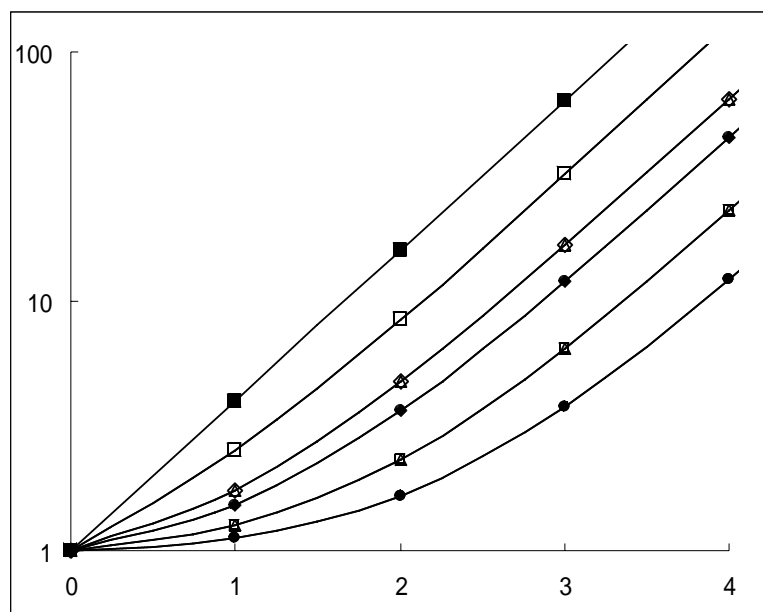
(表3) 試験初期に致死的な影響のみが生じた場合の生長曲線

阻害率(死亡率)	0	0.5	0.75	0.825	0.9125	0.95625
初期濃度	1	1	1	1	1	1
初期活性細胞濃度	1	0.5	0.25	0.175	0.0875	0.04375
生長速度 ($=\ln(4)/da y$)	1.39	1.39	1.39	1.39	1.39	1.39
暴露期間	0	1	1	1	1	1
	1	4	2.5	1.75	1.525	1.13125
	2	16	8.5	4.75	3.625	2.3125
	3	64	32.5	16.75	12.025	6.5125
	4	256	128.5	64.75	45.625	23.3125
	5	1024	512.5	256.75	180.025	90.5125

この表の一部を図に示す(図9および図10)。



(図9) 表3を図示したもので暴露期間は4日まで、藻類密度は300まで示す。



(図10) 同前(縦軸を対数で表示)

図10および、仮定から明らかなように、試験開始直後は死亡率の高い区ではほとんど増えない(一部の細胞しか活性がないため、影響を受けなかった細胞は、対照区と同じ速度で増殖している)。時間経過とともに、生長速度は対照区と同じになる(図10の傾きはどの曲線も同じになる)。

このモデルは、増殖に休止期間があるタイプの反応を表現できる点に特徴がある。このモデルをロジスチックモデルと組み合わせれば、K 値が阻害されていないとすれば、どの濃度でも同じ最終濃度に達する。ただし、到達までの期間が延長することになる。

3 生態リスク評価に係る藻類試験の問題点と適用範囲

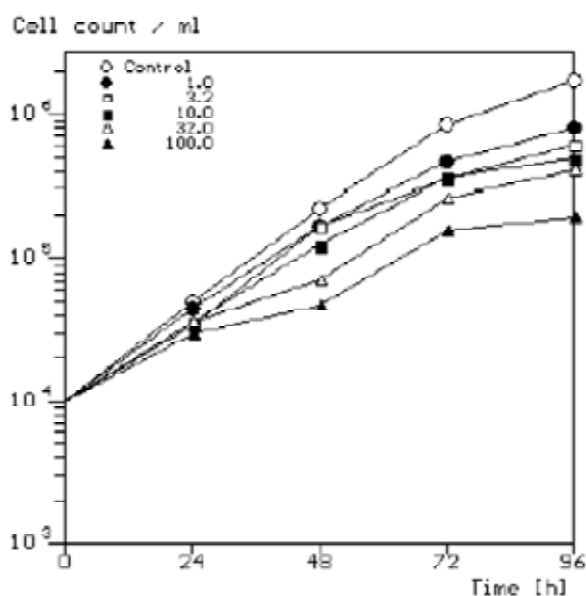
以上、3つのモデルについて見てきたが、実際の藻類生長阻害試験では、様々な増殖曲線および濃度反応曲線が試験結果として提出されている。

Ratte(2003)は、試験の誤操作を含めて実際の試験結果について紹介している。誤操作の点を除いても、被験物質の試験環境中での安定性に関する点にも言及しており、示唆に富む指摘である。ここでは以上の検討結果を踏まえていくつかの問題点と指針を提案しておく。

【藻類生長阻害試験の問題点】

(1) OECD テストガイドライン 201 は本質的に指数増殖モデルを基本としており、生長速度への影響だけが起きている場合は速度法での評価が望ましく、対数最終濃度法はその場合は取り入れるべきではない。

(2) 被験物質の影響が、生長速度以外に及ぼすようなタイプであった場合は、速度法で評価すべきでなく、環境容量が問題となるであろう密閉試験条件や被験物質がキレート物質であるような試験では、最終濃度法(対数でも可)が適している。ただし、試験期間は長いほど正しい評価が可能で、現行の72時間では正しい評価ができない可能性が高い。



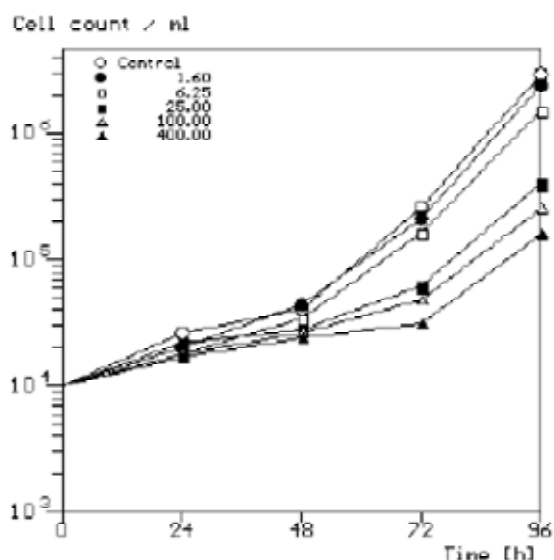
(図11) 環境容量 K の阻害が予想される例 (Ratte, 1998 より)

どの濃度区でも72時間までは指数増殖しているがその後は、生長速度が鈍化している。生長速度の阻害では説明ができない。特に、最高濃度でも生長速度の低下が見られており、被験物質が高濃度ほど環境容量 K 値を引き下げている可能性が高い例である。もし速度

法で毒性値を算出するとKの阻害を仮定した場合よりも高い毒性値を得る事になる。

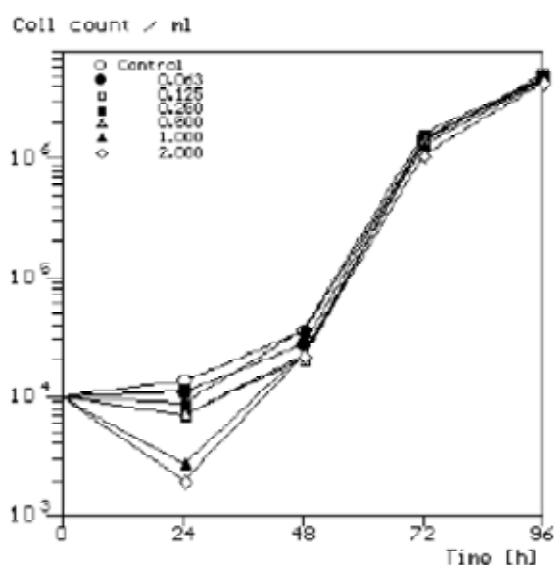
(3) 試験開始直後に増殖が見られないタイプ(休止期間をもつ反応)では,(ア)致死的影响がある場合,(イ)被験物質が不安定でしかも増殖を阻害するある閾値をもっている場合(Ratte,2003 参照)が考えられ,その場合は速度法を用いて評価してはならない。

図12は休止期間のあるタイプの実例であるが,48時間までは増殖が抑えられている。対照区では48時間の実測値は予想より低いため測定の誤差が無視できないもののそれを除けば暴露区の反応は,死亡率モデルに沿っている。図12は死亡細胞と活性のある細胞を区別できない測定法(粒子計測装置など)での測定結果であるが,蛍光光度計など死んでいる細胞と分別できる装置を用いて計測すると,図13のように高濃度区では初期濃度よりも低い値が(24時間目)観測される。このたち下がり部分は明らかに藻類細胞が不活性化つまり死亡していると考えて間違いない。



(図12) 休止期間のある生長曲線の例(Ratte, 1998 より)

72時間以後の生長速度はどの濃度区でも同じである。



(図 1 3) 休止期間のある生長曲線で活性細胞だけを選択的にカウントした場合の例(同前)
最高濃度区とその下の濃度区の 2 つの区では初期濃度よりも低い値となっている。

(4) 面積法は対数面積法であれば、速度法に代用できる場合があるが、原理的には評価法としては意味がない。ただし、限られた試験結果から同一の手法による評価をすべき簡易法としては別の意味がある。つまり、速度法だけで評価し得ない反応パターンについて、特に休止期間をもつ反応に対しても阻害率を提示できる点が優れている。ただし、それは最終濃度法以上のものではない。

【藻類生長阻害試験の結果をどうみるか】

以上述べてきたとおり、試験結果を単に速度法や対数最終濃度法で単純に割り切って毒性値の計算を行うには問題が多い。毒性値の算出の前に、被験物質の毒性および試験条件での安定性について検討する必要がある。その上でどの評価法が適しているか決定しなければならないし、特にその結果を、野外の藻類群集への適用や長期慢性毒性に外挿する場合には特に注意が必要である。

休止期間をもつ反応についての一例

被験物質が致死的な影響を与える場合、休止期間をもつ反応が見られる事はすでに示した通りであるが、その評価は極めて重大な意義をもつ。用いた試験生物の感受性はただ 1 種の感受性分布によるものであり、野外群集のように複数の種が共存する系においては、感受性が高い藻類から低いものまでその感受性分布ははるかに広い事が予想される。そこに被験物質が作用した場合、確かに感受性の低い種は生き残り、群集としての増殖活性は維持されたとしても、感受性の高い種はその時点で回復不可能な致死的な影響を受けてその系から消滅する事になる。生長速度は休止期間を過ぎれば対照区と同じ速度で増殖でき

るため、この試験ではまったくその影響をみる事ができない。

【ロジスティックモデル／死亡率モデルによる毒性値の算出】

藻類生長阻害試験から算出される毒性値は多くの制限付のものであることを認識した上で被験物質の毒性評価をすべきである。もし生長曲線および濃度反応曲線に生長速度の阻害では説明ができない場合は、(1) 暴露期間を延長して、ロジスティックモデルによる毒性値を使う事を検討すべきである。(2) 休止期間が見られた場合は、死亡率を直接計測できる手法(平板培養法) もしくは光合成活性を直接計測する(可能ならば時間単位で) 手法で得たデータをもとに死亡率モデルによる毒性値を使用すべきである。ただし、両試験法ともに、公定法としては現在までのところ制定されたものがなく今後、試験法としての開発が必要である。

(暴露時間の延長する場合の留意点)

- ・図 7 および図 1 1 に示すような環境容量 (K) の減少を主な反応とする場合にのみ有効な手段であり、この手法を一般化してはならない。

- ・被験物質が試験条件で安定である場合に適応できるもので、不安定な暴露環境では別の評価法を選択する必要がある。

- ・環境容量 (K) の減少する場合の生長曲線は試験経過時間でその初期には対照区と暴露区で区別できないが、暴露時間の経過に伴い(増殖量の増大に伴って) 細胞密度の差が顕在化する。影響が顕在化までの経過時間を早めるためには、初期濃度を高くする方法も有効である。もし生長速度 (r) が $\ln(5)/\text{日}$ 程度である場合は暴露時間は 4 日 (9 6 時間) 程度で毒性値算出に必要なデータが得られるはずである。被験物質の安定性を考慮して暴露終了時間を選定すべきである。

- ・試験中の濃度反応関係から、典型的な環境容量 (K) 阻害が明らかになるはずであるから、その場合は (予備試験で被験物質の安定性の確認されている場合)、ロジスティック増殖モデルに従って環境容量 (K) 値を推定し、暴露濃度との関係を図にプロットする。また、EC50 値の算出のためには、近似的に最終濃度 (例えば 9 6 時間) と濃度の関係をプロットして、毒性値を求める。

・ 藻類試験法の改訂について（OECD-TG201改訂版の理解のために）

1 . 科学的に正しいエンドポイントは何か？

Unlimited Condition では藻類（生物）の生長速度は Exponential に増殖するため一定である事が一般的である。また、化学物質が生物に直接作用してその生物活性を低下させる場合は代謝速度の低下を伴うものでありその程度は生長速度に現れる。

そのため、TG201 改訂版では、科学的に正しいエンドポイント（Response variable）は

Exponential Growth phase が維持されている限りは Growth rate の阻害率で、

ここで求めるのは、0-72hEC50 である。

(24-48h)EC50 などの部分的な試験期間の値は通常使用しない。もし使うとすれば何らかの科学的・実践的な理由が必要（妥当性）。

また、面積法などの数値が必要とないので、公比はこれまでよりも小さくできるようになっている。

The reasons for preferring *growth rate* have been discussed extensively within the expert group and have been summarised in the current paper by Källqvist (2001). In a contribution to the 5th Nord-UTTE Network Meeting (30.9. - 2.10.2002, Smygehus, Sweden) Källqvist (2002) provided a very clear and concise presentation of unintended inconsistencies due to using biomass-related test parameters (e.g. dependence of test results on test duration, possible misinterpretation of inter-species differences in sensitivity: e.g. toxicity on species with lower growth rates is underestimated compared to species with higher growth rates, when biomass-related test parameters are used).

Källqvist 1998: Background Document for the Revision of OECD Test Guideline 201: "Alga Growth Inhibition Test". Norwegian Institute for Water Research., 12 pp.

Källqvist 2001: Revision of OECD Test Guideline 201. Algal Growth Inhibition Test. Norwegian Institute for Water Research., 13 pp.

Källqvist 2002: Growth rate or biomass as endpoint in the alga growth inhibition test. Contribution to 5th Nord-UTTE Network Meeting, 30.9. - 2.10.2002, Smygehus, Sweden. (Abstracts, pp. 41-42 + PowerPoint presentation.)

Nyholm 1985: Response variables in algal growth inhibition tests with algae. Water Research Vol. 19, pp. 273-279.

Staveley, J. 1999: An Evaluation and Comparison of the Relative Merits of Various Parameters Used to Express the Results (at 72 and 96 hours) of Algal Toxicity Tests. OPPT Report.

Ratte 1998: Influence of the growth pattern on the EC₅₀ of cell number, Biomass Integral and Growth Rate in the Algae Growth Inhibition Test. RWTH Aachen University of Technology., Umweltbundesamt Project No. 360 030 10, 114 pp.

2. その他の阻害様式をどうみるか？

1) Lag phase のある阻害

化学物質の生物生長への影響が致死的（不活性化）である場合、濃度 - 生長阻害率曲線は Lag phase を伴うがそれは見かけのもので、致死的影響を受けた個体と正常個体の割合に応じて Lag phase の長さ異なる曲線が得られる。その外、前培養が不十分であった場合（対照区でも観察される）や、被験物質濃度が減少する場合にも見られる。

- (1) 外的な要因によるものでない事を確認
- (2) 致死的な影響を受ける前に、生物活性の低下が観察される事が普通であり、低濃度での暴露を行う。

2) Limited Growth

Stationary phase での最高到達密度を阻害する生長阻害様式であり、被験物質濃度が高い場合に試験期間を通じての Exponential growth phase が維持できない場合を言う。

原理的に本試験法で毒性影響の程度を測ることはできない。

- (1) 対照区での生長は正常か確認
- (2) キレート作用の影響か確認 真の毒性か？（各国行政当局判断）

【真の毒性と物理化学的影響】

当該化学物質がキレート作用のために藻類生長阻害を引き起こす場合の判断

- (1) 実環境中で影響がでる可能性はあるのか？
キレート作用は自然界の Ca で相殺されるか
- (2) 環境中に存在する物質によるキレート作用の程度との比較
- (3) キレート作用以外の物理的影響はどう判断されるか？
pH 着色性 . . .

3. 外挿による毒性値は有効か？

急性毒性値として使用される事が多い EC₅₀ を推定する根拠とした阻害率がいずれも 50 % 以下である場合、EC₅₀ 値は外挿推定となるが、その場合に EC₅₀ 値は不確定とし EC₁₀ のみを有効なものとして、慢性毒性値の NOEC 値と同等とする

(各国コメント)

4 . 試験の信頼性チェックに妥当性クライテリアをどう利用するか

VALIDITY OF THE TEST

11. For the test to be valid, the following performance criteria should be met:

The biomass in the control cultures should have increased exponentially by a factor of at least 16 within the 72-hour test period. This corresponds to a specific growth rate of 0.92 day⁻¹. For the most frequently used species the growth rate is usually substantially higher (see Annex 2). This criterion may not be met when species that grow slower than those listed in Annex 2 are used. In this case, the test period should be extended to obtain at least a 16-fold exponential growth in control cultures. The test period may be shortened to at least 48 h to maintain unlimited, exponential growth during the test as long as the minimum multiplication factor of 16 is reached

- ・ 72 時間に生物量が 16 倍以上に増加する試験系であること

The mean coefficient of variation for section-by-section specific growth rates (days 0-1, 1-2 and 2-3) in the control cultures (See Annex 1 under “coefficient of variation”) must not exceed 35%. See paragraph 49 for the calculation of section-by-section specific growth rate. This criterion applies to the mean value of coefficients of variation calculated for replicate control cultures.

- ・ Exponential growth phase を維持していることを示すための基準であり
対照区での生長速度が一定であれば、

r (0–24h) の 平均値 (繰り返し間、n=6)

r (24–48h) の 平均値 (繰り返し間、n=6) CV < 35 %

r (48–72h) の 平均値 (繰り返し間、n=6)

The coefficient of variation of average specific growth rates during the whole test period in replicate control cultures must not exceed 7% in tests with *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Desmodesmus subspicatus*. For other less frequently tested species, the value should not exceed 10%

繰り返し間の生長速度の CV 値であるため、クリアするのは比較的容易である。
ただ

しこれを満足することを理由に、繰り返しの数 (対照区で最低 6) を減らしてはならない。対照区の繰り返し数の増加は統計処理上の理由による。

5 . Initial biomass の設定に関して

エンドポイントが成長速度であると明確にされたため、これまで生物量を推定するための測定が細胞濃度であれ、クロロフィル濃度であれ、生物量に変換できるものであればそれは問題にしない。しかしながら、試験機関はそれぞれその機関独自の変換ファクターを求めておくこと。そのことは初期生物量で The initial biomass should not exceed 0.5 mg/l as dry weight. と規定されており、機関は基礎データでこのことが満足していることを確認しなければならない。

なお、それぞれの機関がこのドラフトで推奨される細胞数での初期密度、たとえば、*Pseudokirchneriella subcapitata* 5x10³ - 10⁴ cells/ml の範囲内で自由に変更して用いることは可能であるが、これまでの当該 SOP の変更を行う場合や基準物質の試験とは異なる場合はその旨、最終報告書にも反映しなければならない。ただし、以下のコメントのとおり、

試験条件によっては、十分な検討を要する。

The cell density should be low enough to allow exponential growth throughout the test. Experience have shown that 10⁴ cells/ml of Pseudokirchneriella in combination with light and temperatures towards the upper part of the recommended ranges may result in too high cell density towards the end of the test which in turn leads to reduced growth rate and too high pH-drift in the control. This can be avoided if inoculum density is reduced to 5x10³. A degree of flexibility on this point helps the laboratories in selecting a test regime that fulfils the validity criteria. The recommended cell density for Scenedesmus subspicatus will be changed to the same as for Pseudokirchneriella.

．その他の各国コメントから

1 ．前培養の期間は 2 - 3 日か 2 - 4 日か？

4 日だと Stationary phase に入る可能性があり、2 - 3 日が適当

2 ．キレート物質である EDTA の使用には注意、鉄イオンとのバランスが鍵

Denmark: Error in balancing iron and EDTA in the OECD medium

An old mistake made by the secretariat for the ISO algal toxicity working group ISO TC147/SC5/ WG5 (replacement of an amount of 100 µg/l Na₂EDTA) agreed by the working group with nonequivalent 100 µg/l Na₂EDTA.2H₂O without lowering the equimolar iron concentration) has been carried over. The iron surplus in relation to EDTA can potentially cause unpredictable/not reproducible iron precipitation and hence growth problems. In accordance with a decision by the ISO, it is suggested to maintain the concentration of 100 µg/l Na₂EDTA.2H₂O and lower the added concentration of FeC_{13.6}H₂O from 80 µg/L to 64 µg/L - slightly below the stoichiometrically balanced concentration of 72.6 µg/L. Thereby, a slight surplus of EDTA is left to compensate the binding capacity of trace metals and in addition allow some photochemical decomposition of Fe.EDTA

As EDTA is still essentially balanced in proportion to iron, the medium still allows a reasonably sensitive test with materials containing heavy metals..

“*) The molar ratio of EDTA to iron slightly exceeds unity (the equimolar concentration of iron salt

would be 72.6 µg/l with 100 µg/l of EDTA salt). This prevents iron precipitation and at the same

time, chelation of heavy metal ions is minimised.”

3 ．試験開始時の pH の調整方法

Denmark: Correction of stated pH adjustment procedure

The pH to be prescribed must be the pH prevailing when the medium is in equilibrium with atmospheric air (or generally speaking with the gas phase in contact with the medium). This pH depends on the bicarbonate concentration (or the alkalinity). With 15 mg/l NaHCO₃ pHeq = 7,5 (U.S. EPA medium) and with 50 mg NaCO₃/l, pH = 8,1 (ISO/OECD medium).

At 25°C, the following relationship applies:

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

derived from the Henry's law constant for CO₂ and the pK_{as} of the carbonate system, the concentration referred to is the molar concentration. This equation and other information on

pH control in algal cultures can be found in Nyholm, N., Källqvist, T. (1989): A Critical Review on Methodologies for Growth Inhibition Toxicity Tests with Freshwater Algae. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 689-703.

When preparing media, add the prescribed amount of sterile filtered NaHCO_3 to an autoclaved medium that has cooled to room temperature and equilibrate by bubbling with sterile, filtered air for some hours.

Acid or base must not be added since this affects the alkalinity and hence equilibrium pH.

Proposal: Replace the last 2 lines on the first page of Annex 3 by the following:

“The pH of the medium is obtained at equilibrium between the carbonate system of the medium and the partial pressure of CO_2 in atmospheric air. An approximate relationship between pH at 25°C and the molar bicarbonate concentration is

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

With 15 mg/l NaHCO_3 , $\text{pHeq} = 7.5$ (U.S. EPA medium) and with 50 mg NaCO_3/l , $\text{pH} = 8.1$ (OECD medium).

When preparing media, add the prescribed amount of NaHCO_3 solution (conveniently sterile filtered) to an autoclaved or otherwise sterilised medium at room temperature (if autoclaved allow time for cooling) and equilibrate with the atmospheric CO_2 by bubbling with sterile, filtered air for some hours.

Acid or base should not be added, since this affects the final bicarbonate concentration and hence the equilibrium pH obtained after CO_2 exchange with air. Note that the mass transfer rate of CO_2 is slow at the low partial pressure in air and that it takes some time (hours) to reach equilibrium (the needed equilibration time can be reduced by vigorous aeration and the use of diffuser stones).”

Proposal: In the first table in Annex 3, bottom line, right column:

Correct the stated pH 8.3 of the OECD medium to pH 8.1.

4 . 藻類の学名変更した根拠文献

Germany: *Desmodesmus* is a new taxonomic name for *Scenedesmus* (cf. Hegewald, e. (2000), Arch. Hydrobiol. Suppl. 131; Algological studies 96, 1-18).

Desmodesmus subspicatus (formerly known as *Scenedesmus subspicatus*), 86.81 SAG

5 . 化学的に不活性な材質：ガラス製でも重金属の場合は注意

Glass is not the preferred choice for test containers when metal toxicity bioassays are being carried out. Even when glassware is silanised with Coatasil, significant losses of metals such as copper and uranium occur (up to 20%) (See review by Stauber and Davies, 2000, Environ. Rev.8 255-301).

6 . ガラス容器の洗浄

Indicate what is meant by “thoroughly washed”. For example, indicate that glassware has to be

acid washed (3N acid wash) or use of non-phosphate detergents, etc.

7 . 容器サイズはある程度フレキシブルであるべき : Acceptable

Proposal: Change Paragraph 13 into:

“The test flasks will normally be glass flasks of dimensions sufficient to obtain a ratio of water/air

interface area to liquid volume of at least 0.15 cm²/ml (e.g. 250 ml conical flasks are suitable when the volume of the test solution is 100 ml and 2 cm Ø cylindrical glasses are suitable for a volume of 5 ml). Small volumes will generally provide the best mass transfer conditions for CO₂, while the problem of sorption to the glass surface decreases with increasing volume.”

ただし、分析用に十分なサンプル量が得られる場合と解釈される。被験物質の性質による。

8 . 他の生物種ではそれに合わせた試験条件で : Acceptable

In Australia, we carry out a lot of bioassays with tropical green algae (*Chlorella sp*, *Monoraphidium arcuatum*) which are run at 27 ± 1°C. Again it needs to be stated that the incubation temperature can be varied to suit tropical species tests.

More sophisticated counting instruments are now also used including flow cytometers so this should be inserted into the text after electronic particle counter.

9 . 濃度測定の頻度と特に不安定な物質の測定と WAF の場合

What to do when no analytical method is available or when the test substance is too unstable to be analysed?

There may be situations where analytical verification is not possible, i.e. when testing water accommodated fractions of multi-component test substances. An absolute requirement for analytical verification should not prevent testing in such cases.

If the substance is too unstable for analysis, it is probably to unstable for testing as well?

10 . 初期濃度の分析は藻類を接種した後か前か？

Is it necessary to analyse media with algae at the start of the test?

No, the low cell density at the start of the test will not affect the initial concentration of the

test substanc."during the test" has been inserted in paragraph 34.

1 1 . 試験中の被験物質の安定性の基準 (2 0 %) とブランクの関係

Paragraphs 34 and 35. Include the use of “blanks” in one of these paragraphs.

Blanks are test vessels prepared exactly the same way as the test vessels that are inoculated with algae (e.g., use same size vessel, same volume of solution, same incubation) but they are **not inoculated**. These blanks can be used to determine if any observed loss of test substance from solution is due to adsorption to, or degradation by the algae, or due to other degradation processes (e.g., hydrolysis, photolysis, volatilization). Without using blanks it is not possible to understand the behavior of the test substance in the test system. It is recommended that blanks be prepared for at least the highest and lowest test concentrations.

It may be useful to analyse test solutions with and without algae and at different times during the test in order to describe the behaviour of certain test substances. The question is: What should be the minimum requirement?

ここでは、20%以上の変動（減少）があれば、なんらかの要因の検討が必要で、その1つとしてブランク（藻類なし）の分析が有用であり、減少要因が別の検討では明らかではないのであれば、この過程は必須と解される。

1 2 . 平均濃度の算出の際の方法は？

Technical comments. Why not geometric mean values?

Accepted. Geometric mean value may represent the average exposure concentration better.

必ずしも、幾何平均、時間加重平均など特定の手法を明示していない。それは、被験物質の分析精度（再現性）に変動要因がある場合、被験物質の挙動に変動要因がある場合で異なるためにあえて明示しない。

（注）幾何平均および時間加重平均は、単純減少（exponential）の場合は正当であるが、初期濃度よりも後の計測の方が増加している場合にも時間加重平均値を用いている報告書があるが、これは正しいものではない。また、pH の変動に伴って、または藻類の増殖に伴って被験物質濃度が変動する場合があるがその場合は単純な減少とはいえず、別の検討が必要である。

1 3 . 吸着性の物質の場合

Regarding test substances that decrease in concentration (transform) throughout the study: rather than automatically using the initial nominal or measured concentration, it would be

more appropriate to measure the concentrations at the beginning, middle and end of the test duration and use scientific judgement to determine what concentrations should be used to estimate the toxicity endpoint of interest (e.g., EC₅₀, EC₁₀, NOEC).

*Agree. This is what is recommended in section 35. Section 36 addresses specifically loss of test substance by adsorption to the algae. In this case, analysis of the test solutions with algae will not show a significant decline in concentration of the test substance, while analysis of the medium after removal of algae shows that the concentration decreases as the alga cell density increases. As pointed out by Denmark below, this problem is only relevant for substances with log K_{ow}>6. It should also be noted that this effect is less important at concentrations that inhibits the growth of algae than at lower concentrations. At EC₅₀ (for growth rate) the biomass density after 48 hours in a test with *P. subcapitata* is less than 1 mg/l and the portion adsorbed to algae is only approx. 2% at log K_{ow}=5 and 16% at log K_{ow}=6. The biomass density in a algae test is low as compared to an acute *Daphnia*-test (2 ml/animal correspond to a biomass density up to approximately 6 mg/l).*

Thus, it may not be necessary to stress this point specifically in the algal test?

If the dissolved concentration is very low due to sorption onto the algae and the flask wall, it may be preferable to quantify exposure as the sorbed concentration in the algal phase (mg sorbed substance/mg algal dry matter). Normally the concentration of chemical sorbed to the microscopic algae is in quasistationary equilibrium with the dissolved concentration and can be predicted from the latter using a simple linear partition coefficient, K_d. With carbon making up 50% of the dry weight, a₀ partition coefficient for neutral hydrophobic compounds can usually be estimated as $K_d = 0.41 \cdot 0.5 \cdot K_{ow}$ (mg/g dry weight)/(mg/l). This becomes important for logK_{ow} > approx. 6. Sorption to glass walls may be a slower process and unfortunately it may be significant at lower K_{ow}'s. Here the dynamics sorption/desorption may be important. The influence of sorption to glass walls can be reduced by presaturating test flasks repeatedly with test solution for each concentration tested.

The use of initial concentrations instead of average concentrations in situations where the test material disappears rapidly may not be appropriate, although the response results from integration over time giving automatic more weight to the initial phase. The test result must always relate to a time with known and reasonably well defined exposure. If this is not feasible due to losses of the compound, the test design must be altered, e.g. by decreasing the test time or by repetitive spiking with new test compound solution.

Proposal: In paragraph 36: Replace the sentence: "In such cases ..lost from the test system" by:

“Sorption to algae or to flask walls will diminish the effective dissolved concentration of test substance and thus decrease the exposure”

Proposal: After paragraph 36, add the following: “If the dissolved concentration is very low due to sorption onto the algae and the flask wall, it may be preferable to quantify the exposure as the sorbed concentration in the algal phase (mg sorbed substance/ mg algal dry matter). As a rule of thumb, this is not relevant for substances with $\log K_{ow} < 5$. Reference is made to the OECD Monograph No. 23 on difficult substances, sections 3.1 and 3.6 (2). ”

1 4 . 限度試験の連数

Four replicates of the test concentration may be sufficient to give enough degrees of freedom for simple t test comparisons with controls.

The requirement of at least 6 replicates should be retained.

1 5 . 限度試験から正規試験へ

The draft TG does not lay down the circumstances under which the results of limit test are insufficient. We propose to amend the sentence given below.

"If a mean decrease of 25% or more in growth rate (or log-biomass integral) is found in a limit test,
a full test should be carried out."

Not accepted. - This would depend on the documentation requirement. If determination of NOEC is required, a full test must be performed if a statistically significant growth inhibition is observed in the limit-test.

1 6 . 初期細胞密度は実測か設定値か？

Why is the average growth rate based on the unreliable biomass concentration at the start of the test while the more reliable measurements after 1 and 2 days are not used for a determination of the growth rate by regression? Compared with the extensive discussion on statistical aspects this improvement should not be considered as difficult.

In section 51 is also regression analysis of the concentration response curve.

Note that the recommendation is to use the nominal start concentration, which is generally more reliable than measured concentrations at this low level. The point in recommending calculation of average growth rate from start to end is that it is more appropriate when growth is not exponential. In this case the two alternatives may give rather different results, while the difference will normally be negligible for exponentially growing cultures.

Proposal: Include option to calculate growth rate by regression analysis when inspection of growth curves indicate exponential growth. (if the regression analysis gives $r^2 < 0.9$, average

specific growth rate should be calculated from cell density at the start end of the test period.)