

着色性物質の藻類生長阻害試験 の手順について

菅谷芳雄 国立環境研究所
化学物質環境リスク研究センター

何が問題か？

藻類生長阻害試験はOECDテストガイドライン201(改訂予定)

着色性物質は試験困難物質……OECD ガイダンスドキュメント23

参考文献として

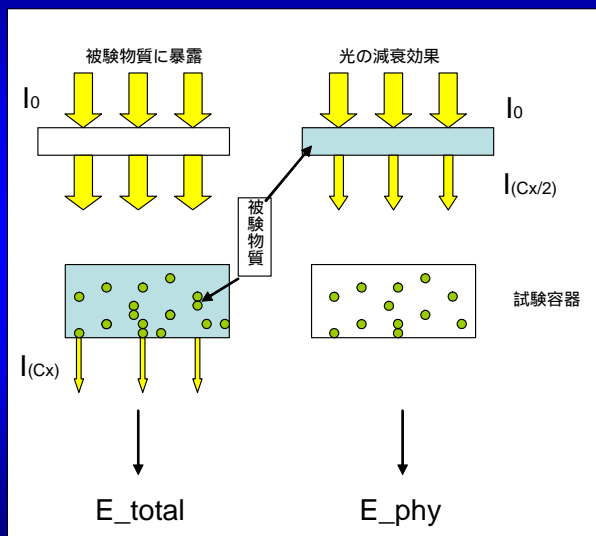
ETAD (The Ecological and Toxicological Association
of Dyes and Organic Pigments Manufactures)の手法



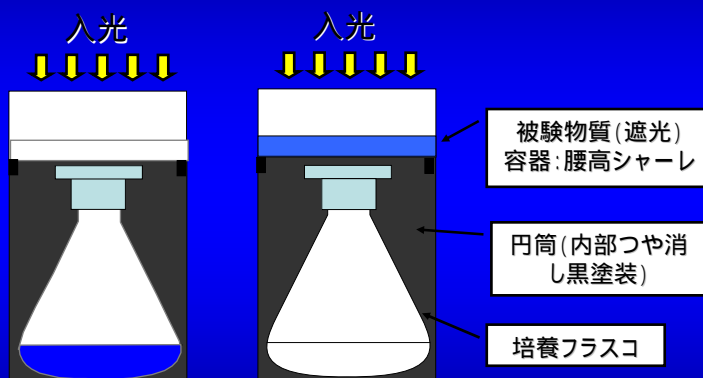
毒性モデル 簡便法提案

Cleuvers M., R. Altenburger and H.T. Ratte (2002): Combination effects of light and toxicity in algal tests, *J. Environ. Qual.* 31: 539-547.
Kwan K.K.(1989) : Testing of coloured samples for toxicity by the algal-ATP bioassay Microplate technique, *Environ. Poll.* 60: 47-53.
Cleuvers M. & A. Weyers (2003): Algal growth inhibition test: does shading of coloured substances really matter?, *Water Res.* 37: 2718-2722.

ETADの着色性物質の藻類生長阻害試験法



ETADの手法

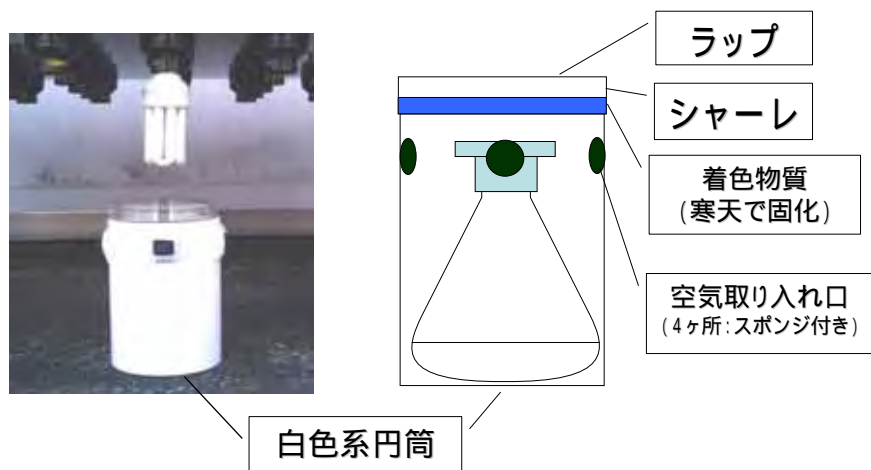


算出式 Effect Summation Model : $E_{total} = E_{tox} + E_{phy}$

試験系の確立

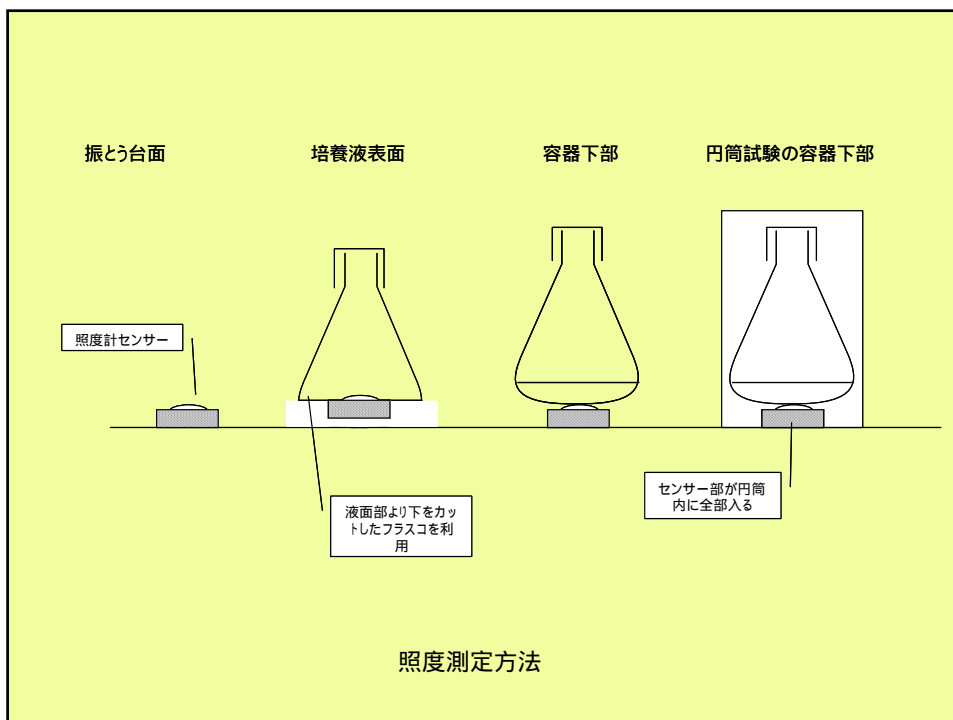
- 藻類生長阻害試験における着色性物質の評価方法としての円筒試験の試験系確立を目的
- Cleuvers M. et.al. (2002) 円筒試験方法
 - 忠実な再現難しい
- 試験の実施が可能である試験系を確立
 - OECDテストガイドライン201に準拠
 - 試験に必要な照度を確保するため
 - 藻類培養試験器の改良
 - 円筒内部の色を白系統に変更
 - ガイドライン基準を守るため
 - 空気の交換を促す対策

確立した試験系



装置および器具	藻類培養試験器	<ul style="list-style-type: none"> ・ 通常用いる直管型の蛍光灯および分散版を外す ・ 光源が円筒の真上に来る様にソケット固定板を振とう台に固定する
	照明	<ul style="list-style-type: none"> ・ 光源としてU管型蛍光灯(パナソール[®]、20W、白色光)を使用する ・ 光源は円筒の真上に来る様に配置する ・ 光量調整はスライダックによる電圧調整による ・ 加熱防止のため、試験器内の照明数は20個以内
	円筒	<ul style="list-style-type: none"> ・ 白色の塩化ビニル製パイプ(外径 11.4 cm(内径 10.8 cm)、高さ 17 cm)を使用 ・ 通気用としてフラスコの口の付近に直径 1 cmの円形の穴を4ヶ所空けて、スポンジを付ける
	シャーレ	<ul style="list-style-type: none"> ・ 直径 11 cm、高さ 18 mmのガラス製を使用 ・ テープで円筒に固定する
	シャーレ内の液	<ul style="list-style-type: none"> ・ 液深 8 mm(三角フラスコ内培地の高さの 1/2) ・ 溶液のゆれ防止対策として 0.8 %寒天で固める ・ 乾燥・溶融防止対策としてシャーレをラップで覆う
	フラスコ	<ul style="list-style-type: none"> ・ 通気性シリコン栓付きガラス製300mL三角フラスコを使用(通常の条件)
試験条件	初期細胞濃度	・ 0.5×10^4 cells/mL
	暴露方式	・ 振とう培養(50 rpm)
培養時の有効性	毎日の変動係数	・ 6 ~ 30 %
	終了時pH上昇	・ 0.5程度
	終了時細胞数	・ 約 5×10^5 cells/mL(初期細胞濃度の約 100倍)

(株)クレハ分析センター



色素(ブリリアントブルー)と毒性物質(3,4DCA)
混合溶液の阻害率(%)

		3,4DCA濃度(mg/L)			
		0	1.8	3.2	5.6
色素濃度	0	0	36.7	58.5	88.1
	5.2	14.8	45.6	58.0	86.7
	10	19.8	48.4	56.5	83.3
	60	55.1	60.5	64.5	80.4

Effect model の検討

混合溶液の生長阻害率の実測値 (Etotal) ,

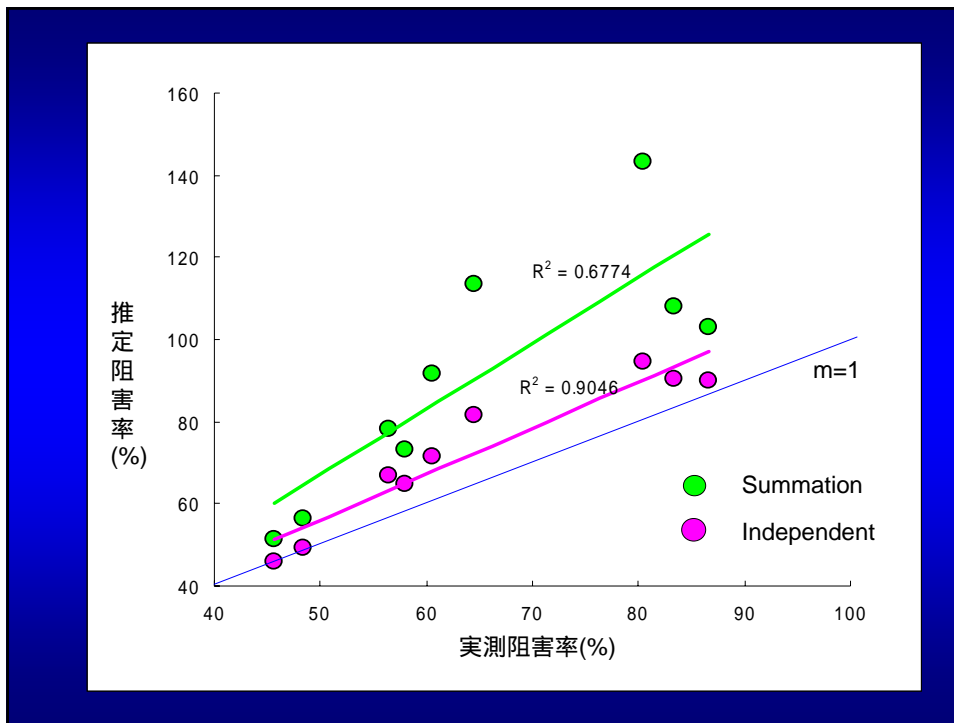
色素だけの阻害率の実測値 (Ephy)

Effect Summation model (ES): $E_{total} = E_{tox} + E_{phy}$

Independent action model (IA): $E_{total} = E_{tox} + (1 - E_{tox}) \times E_{phy}$
 $= E_{tox} + E_{tox} \times E_{phy} - E_{tox} \times E_{phy}$

DCA conc.	0	1.8	3.2	5.6	
Etotal	0	45.6	56.5	80.4	
Ephy	0	14.8	19.8	55.1	
Etox_mea	0	36.7	58.5	88.1	
Etox_est_sum	0	30.8	36.7	25.3	ES
Etox_est_ind	0	37.5	47.9	69.6	IA

DCA単独の生長阻害率(Etox_mea)



Lambert-Beer の法則 $\log \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot c \cdot l = A$

I_0 : 入射光の強さ I : 透過光の強さ ϵ : 吸光係数 c : 溶液の濃度
 l : 媒質の厚さ

水深は一定, 濃度 C_x mg/l として 相対吸光係数 k とおくと
 $\ln(I_0/IC_x) = kC_x$ $k = -\ln(IC_x/I_0)/C_x$

濃度	実測照度	k
0	5700	-
5.2	2900	0.13
10	1900	0.11
60	300	0.05

光の分散が無視できない (高濃度域でも光は多い)

遮光容器中着色物質濃度 (mg/L)		着色物質無添加の 3,4-DCA 0 mg/Lを基準		各着色物質の 3,4-DCA 0 mg/Lを基準	
		ErC ₅₀ (95%信頼限界) (mg/L)	Probit回帰式適 合性	ErC ₅₀ (95%信頼限界) (mg/L)	Probit回帰式適 合性
着色物質無添加		2.64 (2.38 ~ 2.89)	適合する	-	-
ボルドーS (赤色系色素)	90	3.05 (2.80 ~ 3.31)	適合する	3.36 (2.85 ~ 3.36)	適合する
プリリアントブルーF CF (青色系色素)	7	2.75 (2.53 ~ 2.98)	適合する	2.89 (2.67 ~ 3.11)	適合する
	50	2.58 (2.34 ~ 2.81)	適合する	2.84 (2.61 ~ 3.07)	適合する

ガイドンスドキュメント23では

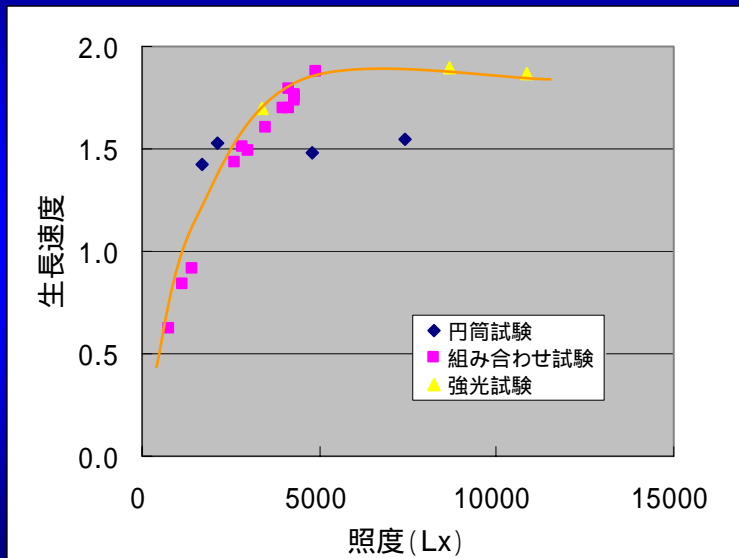
どうするか？

光分散の影響のない濃度での試験

照度の調節

試験液量を減らして
光分散を最小に

光強度と生長速度の関係(一例)



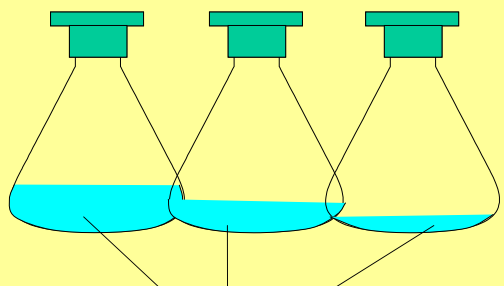
試験液量を減らした標準法の試験

遮光効果
濃度変動

大
小

中
中

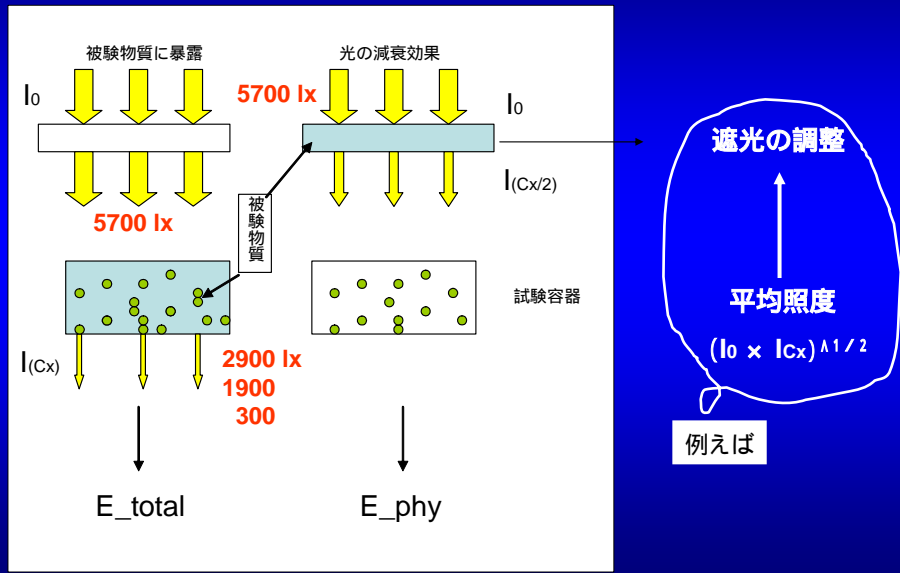
小
大



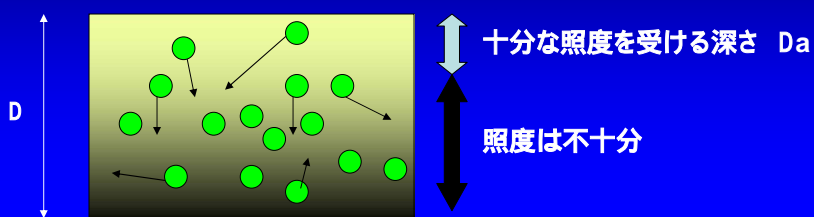
濃度の変動が
無視できる場合
は適用可能

対照区の生長速度は同じか?

ETADの着色性物質の藻類生長阻害試験法

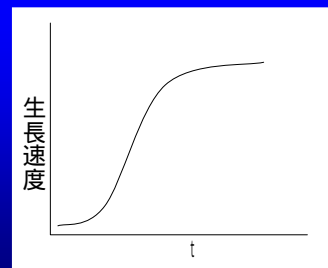


もう一つの危惧



光合成には、連続光は必要ない……パルス光で必要十分

$$t = D_a / D$$



着色性物質の藻類生長阻害試験の手順について

1. はじめに

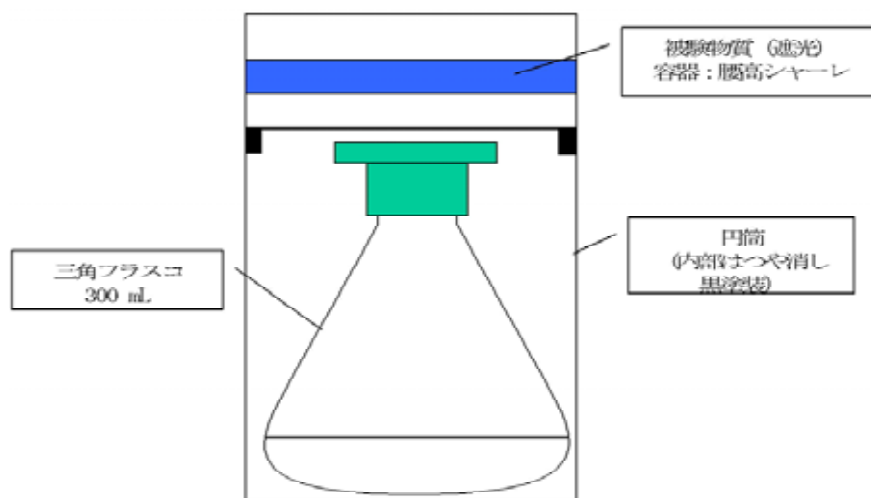
着色性物質は OECD ガイダンスドキュメント 23 において、試験困難物質に分類されている。現行の試験法は OECD テストガイドライン 201 (藻類生長阻害試験, 1984) であるが、このガイドラインは改訂ドラフトが合意されており、近々改訂・公表の見込みである。着色性物質の藻類試験の手順は、ガイダンスドキュメント 23 およびドラフトガイドラインとも、ETAD(The ecological and Toxicological Association of Dyes and Organic Pigments Manufactures)法を引用している。ところが、この手法については、最近になって批判が出されており (Cleuvers, et al.2002¹⁾)手法の見直しが必要となってきた。批判内容は、2.4 に紹介する毒性モデルに関するもので、そのほか簡便法についても言及している。環境省は平成 17 年度より開始する「試験困難物質に係る生態毒性試験・評価法確立調査」の予備検討として、平成 16 年度に藻類生長阻害試験における毒性評価法の検討に着手した。本報告はこれまでの検討の成果を取りまとめたものであり、今年度も検討を継続して行っている。

また、化審法の届出に必要な藻類生長阻害試験法は、改訂中のドラフトを基に作成されているため、1984 年度採択のガイドラインとは細部において異なるものであり、ガイドラインの改訂後にはその版に従って改訂されるべきものである。

2. 16 年度環境省の行った検討成果について

2.1 試験系の確立

OECD ガイダンスドキュメント 23 に引用されている着色性物質の試験法 (以下、ETAD 法) に用いられる試験系を確立した。下図は、ETAD 法で用いる試験容器を示しているが、以下の検討では、この内円筒内部の塗装は「黒色つや消し」とすべきであるが、十分な光量を得るために「白色」とした。



(つや消し黒塗装 白色に変更)

2.2 モデル物質の決定

遮光効果が大きく、試験条件下で安定で、かつ真の毒性が無視できるほど低い物質を検索し、ボルドーS(赤色系合成色素)、ブリリアントブルーFCF(青色系合成色素)を選んだ。この色素と毒性が既知の3,4ジクロロアニリン(3,4-DCA)の混合物を被験物質とした。

2.3 着色性物質の遮光効果を考慮すべき範囲

被験物質(3,4-DCAと青色色素の混合物)の遮光効果で試験容器底面の照度が一定値(1700 Lx)

底面照度	ErC ₅₀ に対する影響	
>1700 Lx 程度	影響が小さい	ErC ₅₀ 算出時には遮光の影響を考慮しなくても良い
< 1700 Lx 程度	影響が生じる	遮光の影響を考慮しない場合には、ErC ₅₀ がやや高く算出される 遮光の影響を考慮した(照度を揃えた)場合には ErC ₅₀ がやや低く算出される

2.4 物理的影響と真の毒性影響との複合毒性モデルの検討

遮光の影響を Ephy, 真の毒性影響を Etox, 合成された影響を Etototal とすると

ETAD 法では Effect summation model (ES) $E_{total} = E_{phy} + E_{tox}$ ……(1)式

Cleuvers らでは Independent action model (IA) $E_{total} = E_{phy} + E_{tox} - E_{phy} \times E_{tox}$ ……(2)式

を提唱しており、本調査ではモデル物質を用いた試験の結果、真の生長阻害率(3,4DCA 単独の毒性)を推定するには、(2)式が(1)式よりも優れていた。ただし(2)式を用いても Ephy による阻害率が高い濃度では予測値と実測値と乖離が大きい事が明らかになった(下表)。

(表) 3,4ジクロロアニリンの藻類生長阻害率(%)の実測値および推定値

Conc.as DCA(mg/L)	0	1.8	3.2	5.6
Etotal(直接暴露した場合)	0	45.6	56.5	80.4
Ephy(遮光した場合)	0	14.8	19.8	55.1
Etox_mea(実測値)	0	36.7	58.5	88.1
Etox_est_sum(ESによる推定値)	0	30.8	36.7	25.3
Etox_est_ind(IAによる推定値)	0	37.5	47.9	69.6

ETAD法の試験系は、被験物質の遮光の効果を試験容器の直上に別容器(腰高シャーレ)に被験物質を入れて補正しているが、試験溶液が強く着色する場合は被験物質による光の吸収だけでなく分散の影響がでるため、真の毒性の推定が正しく行えない事が示唆された。

3. 継続して検討すべき事項

(1) ETAD法の改良に関する検討

ETAD法では被験物質の着色による遮光の影響を推定するために、使用容器とは別に2分の1水深の被験物質容器を直上に設置して、試験溶液上面と容器直下の平均(幾何平均)照度となる条件での藻類生長を計測している。ただし、この方法では、光の分散が大きい場合には藻類が受け取る光強度を十分に補正できていない可能性が大きい。照度の試験溶液内の垂直分布を明らかにして、実験的に補正が可能であるかどうか検討する。

(2) 吸収・分散による遮光効果を減じた試験法の開発

遮光の影響を少なくするために試験溶液量を減じた試験条件での藻類生長阻害試験が可能かどうか、またはどの範囲まで可能か検討する。

(3) 着色性物質の試験の実施

着色性物質でしかも真の毒性もある被験物質について上記の手法による試験を実施し、試験方法論上の問題点を把握する。

(4) 着色性物質の「色」の違いの検討

16年度の青色色素の検討に加えて、赤色色素について同様の試験データを入手する。

4. 着色性物質の藻類生長阻害試験による影響評価(試案)

平成16年度に行った検討試験の結果を踏まえ、国内のGLP機関においてさらに検討を加え、標準操作手順(SOP)の策定が求められる。ここでは、化審法の要求する生態毒性試験データを作成する上ではどのような検討が必要であることを明らかにしたい。

4.1 着色性の程度に応じた「試験法」を選択

上記2.3に示した試験結果は、すべての試験機関の試験系にそのまま応用できるものではない。ただし、藻類の生育最適照度はある幅をもっていることは容易に想像できるものであるため、被験物質によって生じる遮光効果が一定以下である場合には、標準的な操作手順で評価可能である。そのため、次のような試験法選択のクライテリアを設けることは妥当である。

クライテリア	用いる試験法	毒性値
標準法における被験物質の生長阻害が最高暴露濃度でも観察されない	標準法	EC50 > 最高濃度
標準法による被験物質の遮光の程度(注1)は、一定値以下(注2)である。	標準法	EC50 = 試験結果 (真の毒性)

遮光の程度は一定値を越え，かつ，真の毒性は不明である	正確な毒性を評価するための試験法	$EC50 = \text{真の毒性} + \text{遮光の影響}$
----------------------------	------------------	-------------------------------------

(注1) 試験条件で試験用のフラスコ底部の照度(光強度:透過光)の測定値,一定の値もしくは,被験物質の吸収波長による補正を経た値.

(注2) 試験系によって異なるので,光強度-生長速度の関係(実験データ)から決定

4.2 着色性物質の試験法手順

標準的な手法を用いると「真の毒性」に「遮光の影響」が加わることにより,結果として被験物質の「真の毒性」の評価が困難となる場合には次に掲げる手法を選択して評価を行う.

選択のための要件	用いる試験手順	毒性評価
遮光の影響が小さく,かつ,光分解の懸念が小さい場合	標準法で,光強度を増加した試験を行う	$EC50 = \text{試験結果(真の毒性)}$.
遮光の影響が無視できない,かつ被験物質は試験条件で安定(揮発性物質ではない).	標準法で,試験液量を減少させる(遮光の影響を小さくする)	$EC50 = \text{試験結果(真の毒性)}$.ただし,試験液量の影響が無視できる場合
遮光の影響が無視できない,かつ真の毒性を正確に評価する必要がある場合	ETADの手法(注3)	$EC50 = \text{Independent Action Model}$ による阻害率から算出された真の毒性値

(注3) もし光の分散による効果が著しい場合には,濃度-生長阻害率関係の高濃度側で生長阻害率が低く推定される場合があるため,最高濃度区の真の阻害率を50%を超え,80%を超えない程度に設定してよい.

おわりに

環境省は平成17年度も継続して試験法の検討を行っており,「4.着色性物質の藻類生長阻害試験による影響評価(試案)」は,今後さらに改訂を行う予定である.

引用文献

- 1) Cleuvers M., R. Altenburger and H.T. Ratte (2002): Combination effects of light and toxicity in algal tests, *J. Environ. Qual.* **31**: 539-547.