

第一回生態影響試験チャレンジテスト (国立環境研究所の結果)

○阿部良子¹、山岸隆博¹、堀江好文²、渡部春奈¹、山本裕史¹、鑪迫典久¹
1 国立研究開発法人国立環境研究所 2 秋田県立大学

▶ 方法 (模擬排水の作成)

複数工場排水



混合



ろ過後
分配



500mL~6L

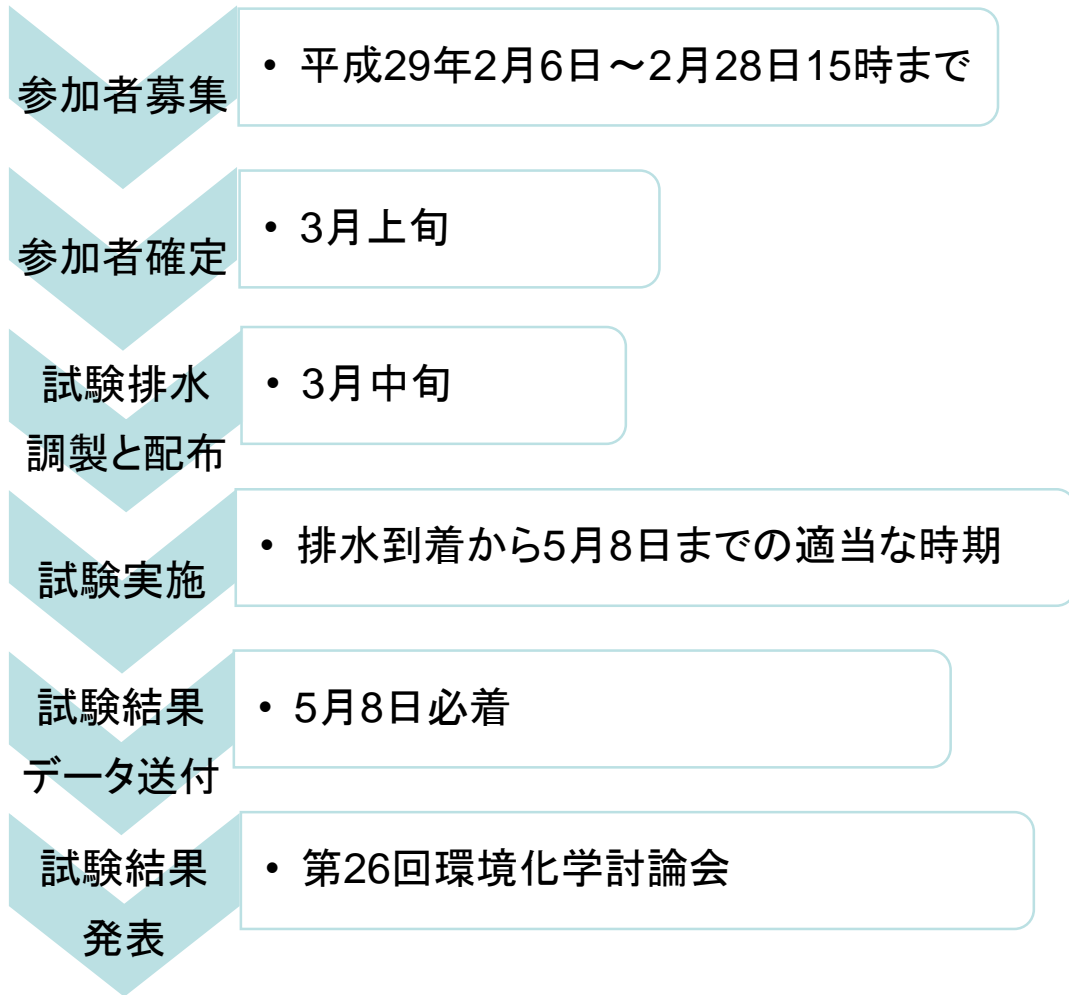
各試験機関に配送



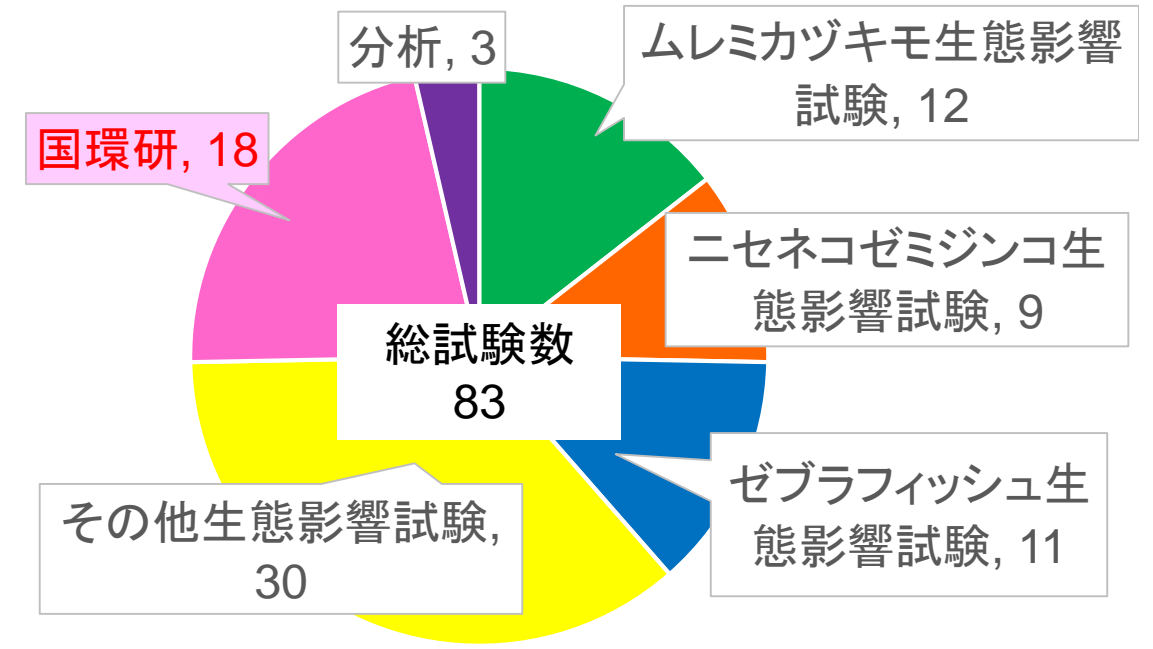
画像:至福の隙間

pH	DO(mg/L)	電気伝導度 (mS/m)	塩分(%)
7.75(26.4°Cの時)	7.45	0.812	0.44

▶ 方法（試験スケジュールと参加機関）



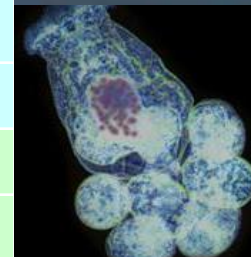
民間企業 (GLP)	公的機関・大学 (国環研含む)	地環研	総参加機関
14(4)	10	3	27



- ムレミカツキモ生態影響試験
- ニセネコゼミジンコ生態影響試験
- ゼブラフィッシュ生態影響試験
- その他生態影響試験
- 国環研
- 分析

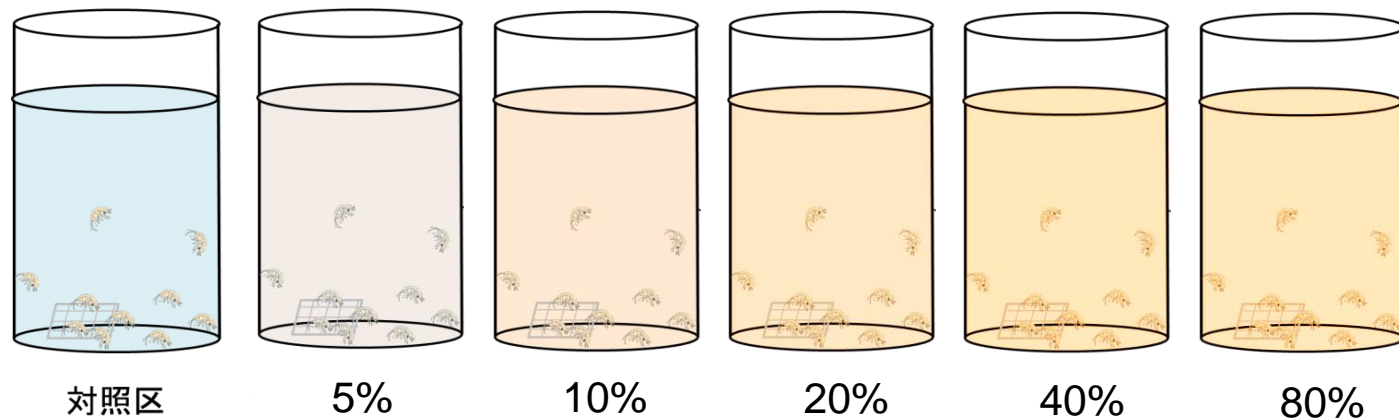
▶ チャレンジテスト国環研での試験一覧

	試験法
1	魚類胚・仔魚期毒性試験
2	ニセネコゼミジンコ繁殖試験
3	藻類成長阻害試験
4	ヨコエビ急性毒性試験
5	OECD TG203 (100%のみの限度試験)
6	メダカ免疫クロマトビテロジェニンアッセイ
7	海産藻類生長阻害試験
8	藻類クロロフィル遅延発光試験(2種)
9	Microtox試験
10	ホウネンエビ亜致死毒性試験 (RAPIDTOXKIT F)
11	ホウネンエビ急性毒性試験 (THAMNOTOXKIT F)
12	ツボワムシ急性毒性試験 (Acute ROTOXKIT F)
13	ツボワムシ短期慢性毒性試験 (Short-chronic ROTOXKIT F)
14	繊毛虫慢性毒性試験 (Chronic PROTOXKIT F)
15	カイミジンコ亜慢性毒性試験
16	海産珪藻類生長阻害試験 (MARINE ALGALTOXKIT)
17	シオミズツボワムシ急性毒性試験 (Acute ROTOXKIT M)

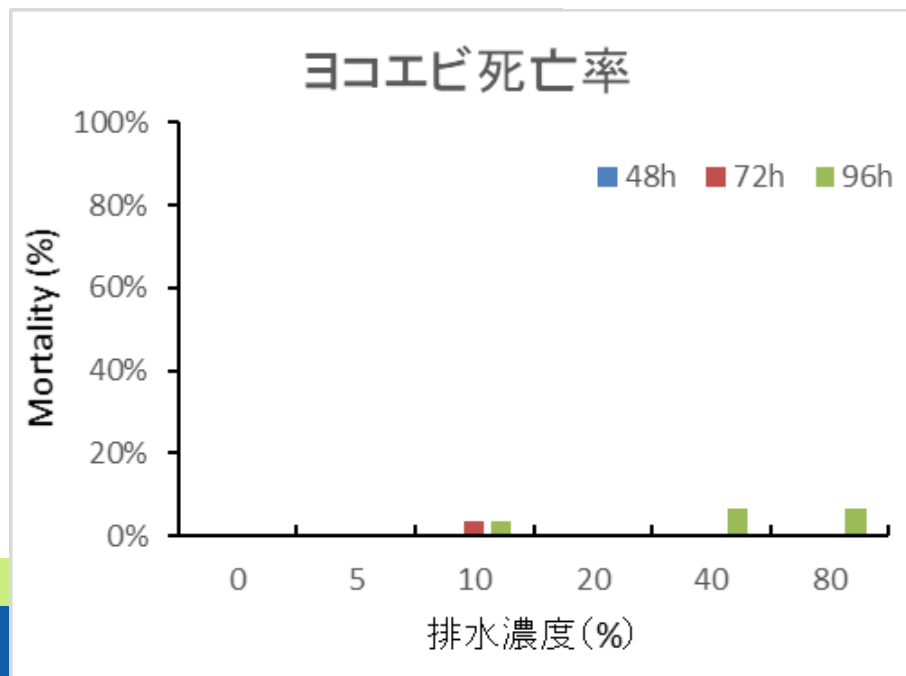
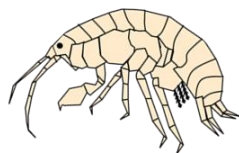


▶ ヨコエビ96時間急性試験 (Environment Canada 2013) (*Hyalella azteca*)

ヨコエビ96時間急性試験	
供試生物	ヨコエビの生後1~4日の仔虫を2日間給餌し馴化して、生後3~6日となったもの
曝露期間	96時間(観察は24時間ごと)
濃度区	対照区、5、10、20、40、80%
試験生物数	10頭/1容器、3連
試験溶液	脱塩素水
試験液量	200 mL、約3 cm平方のナイロンメッシュ1枚
試験容器	300 mLトールビーカー
明暗周期	16時間明、8時間暗
換水	なし
給餌	試験開始前と48時間後にYCT 0.5 mL/容器
エンドポイント	生死(生存) LC ₅₀ (半数致死濃度)
解析手法	対数ロジスティック法
試験成立条件	対照区に10%を超過した致死が認められないこと

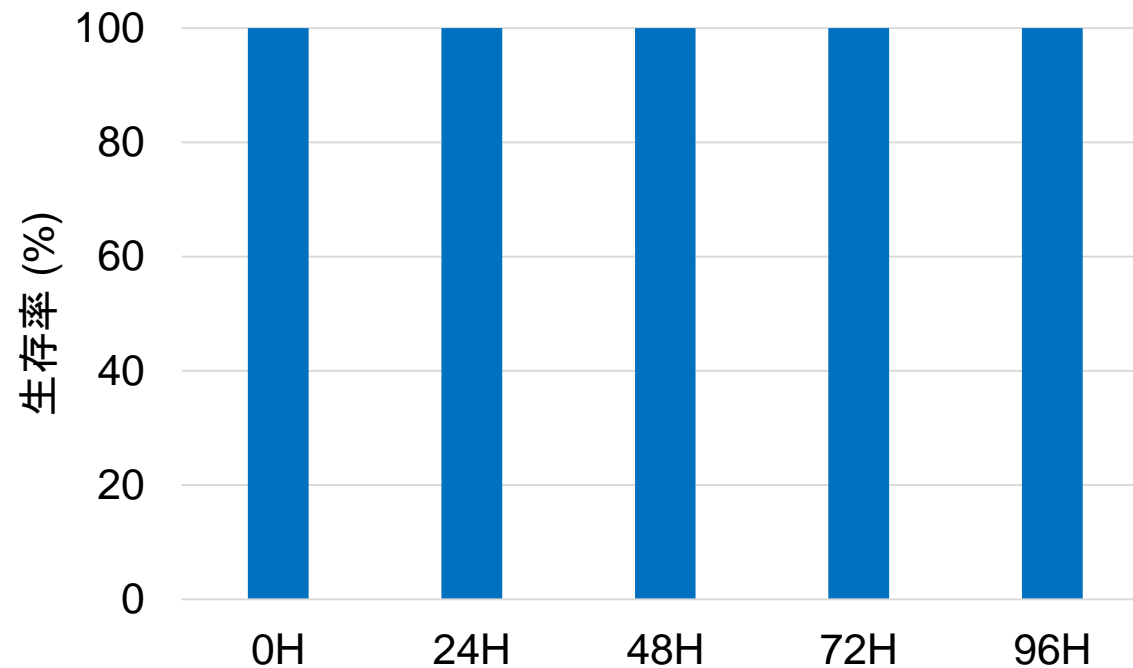


繰り返し
3連



▶ OECD TG203 (100%のみの限度試験)

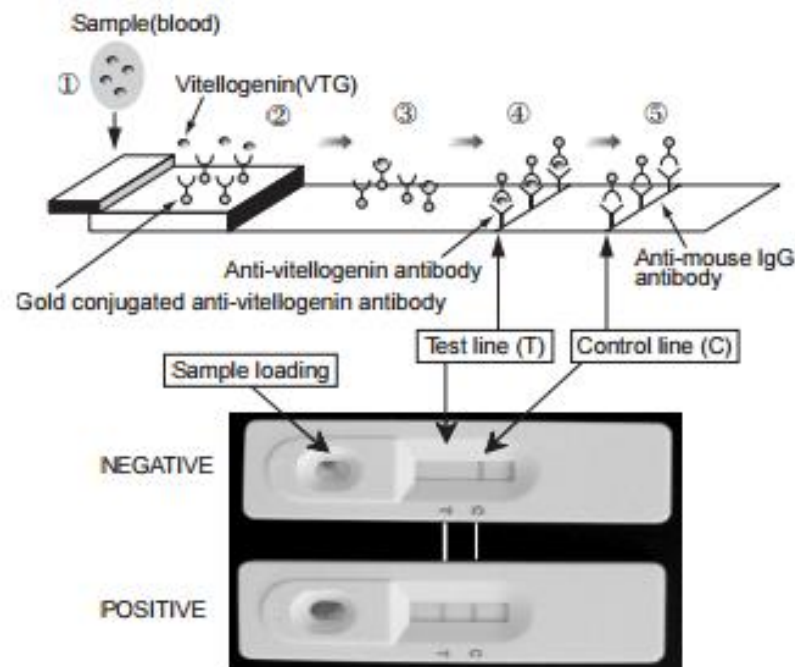
試験条件	OECD TG203
供試生物	ゼブラフィッシュ (<i>Danio rerio</i>)
ばく露方式	半止水式
試験期間	96時間
水温 (°C)	26±1°C
光条件	室内光レベル, 白色蛍光, 16時間明: 8時間暗
試験用水 (対照区)	活性炭ろ過水道水
試験容器	5L容ガラス製水槽
試料量/容器	3L
生物数/容器	10個体 (オス5, メス5)
繰り返し	1連
濃度区	1濃度区 (排水濃度100%の限度試験)
供試生物の齢	2cm前後の成魚
給餌	なし
換水	毎日
エンドポイント	生存率



▶ メダカビテロジェニン測定(簡易イムノクロマト)

試験条件	メダカビテロジェニン測定
供試生物	メダカ (<i>Oryzias latipes</i> .)
ばく露方式	止水式
試験期間	72時間
水温 (°C)	26±1°C
光条件	室内光レベル, 白色蛍光, 16時間明: 8時間暗
試験用水 (対照区)	活性炭ろ過水道水
試験容器	5L容ガラス製水槽
試料量/容器	2L
生物数/容器	3個体 (オス3)
繰り返し	1連
濃度区	1濃度区 (排水濃度100%の限度試験)
供試生物の齢	3.5cm前後の成魚
給餌	1日2回 (4.5×10 ⁶ 個/Lを1.5mL)
換水	なし
エンドポイント	血中ビテロジェニン濃度

簡易イムノクロマト 原理



学会誌「EICA」第9巻第1号(2004)より

サンプル添加後 5 分以内
Tラインにバンドが認められない場合
ビテロジェニン濃度は 0.1µg/ml 以下



5分以内Tラインにバンドが出現
Cラインより後にTラインが出現

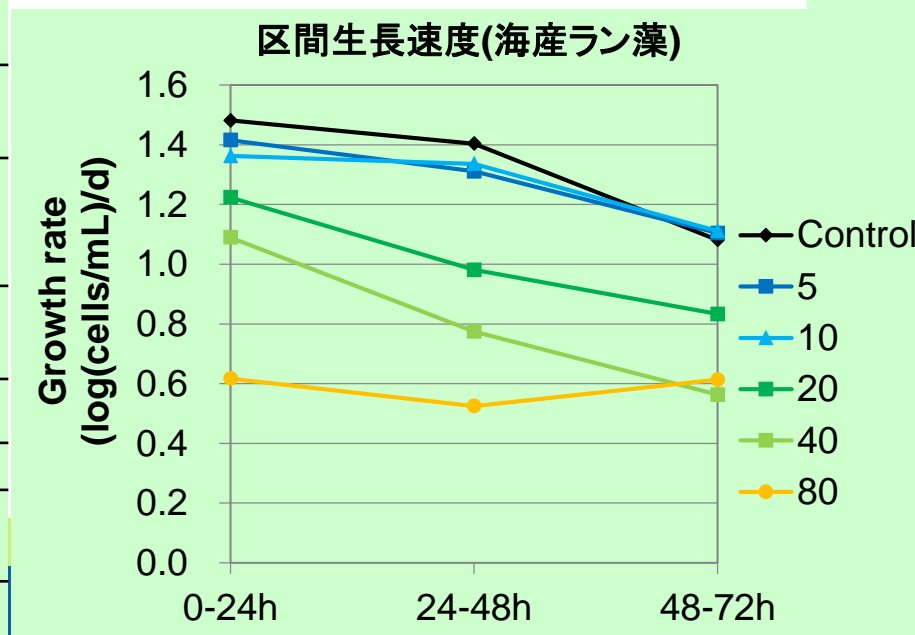
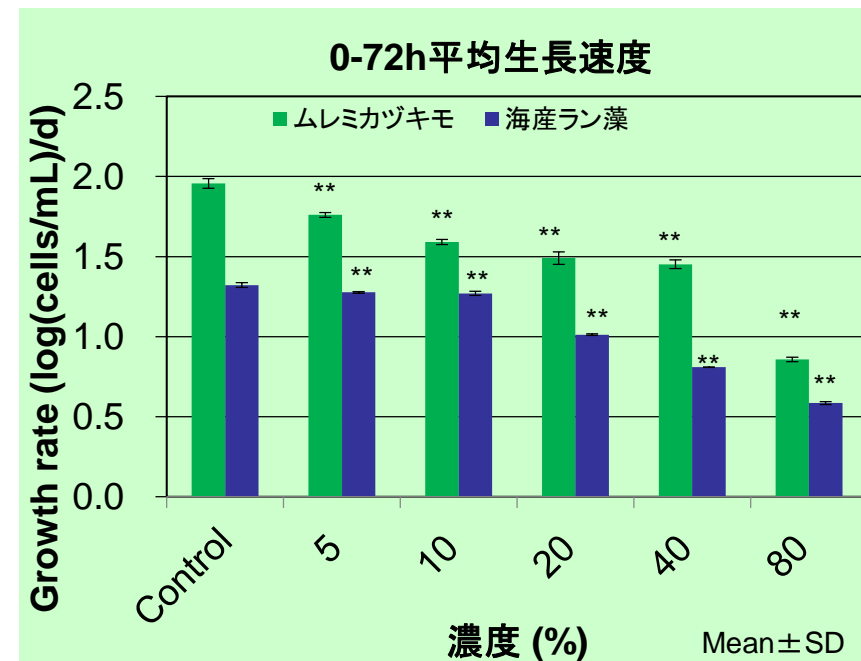
↓
VTG濃度 1.0µg/mL以上

▶ 海産藻類生長阻害試験

試験条件	OECD TG201
供試生物	海産ラン藻 (<i>Cyanobium sp.</i>)
ばく露方式	止水式, 連続振とう100 rpm
試験期間	72時間
水温 (°C)	23±2°C
光条件	60-120 μmol/m ² /s 白色蛍光, 連続光
試験用水 (対照区)	ASW-SN培地
試験容器	300 mL容ガラス製三角フラスコ
試料量/容器	100 mL
生物数/容器	1 × 10 ⁶ cells/mL
繰り返し	6連(対照区) 3連(濃度区)
濃度区	5濃度区 (排水濃度80, 40%, 20%, 10%, 5%, 2.5%)
供試生物の齢	2-4日前培養した 指数増殖期の細胞
給餌	なし
換水	なし
測定方法	24, 48, 72時間後のOD値測定 波長670nm
エンドポイント	生長速度

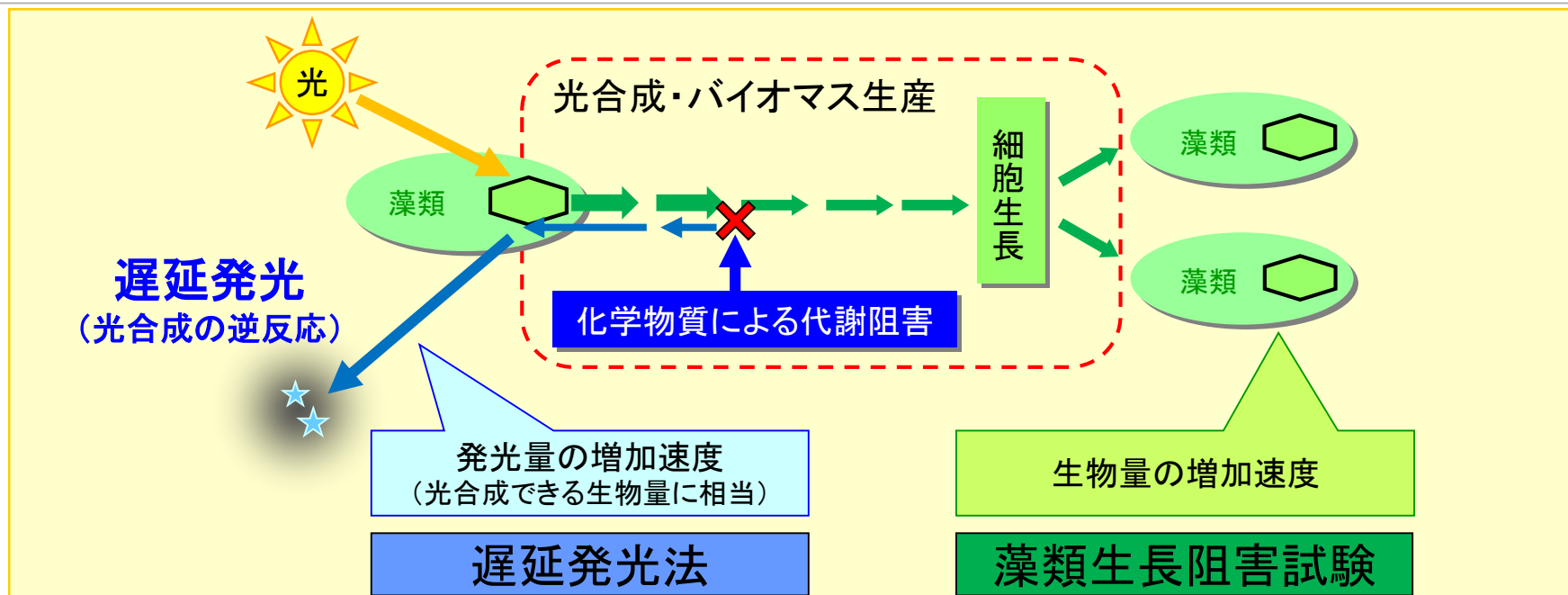


<http://bccm.belspo.be/>より



	EC50	EC10	NOEC	TU
ムレミカツキモ	79.6	7.02	<5	>20
海産ラン藻	62.0	-	<5	>20

藻類の遅延発光による影響評価法(遅延発光法)



藻類を試薬化した迅速・簡便な試験手順

-80℃で保存



凍結藻類

前培養

1時間



均質な藻類



検体を混合

培養

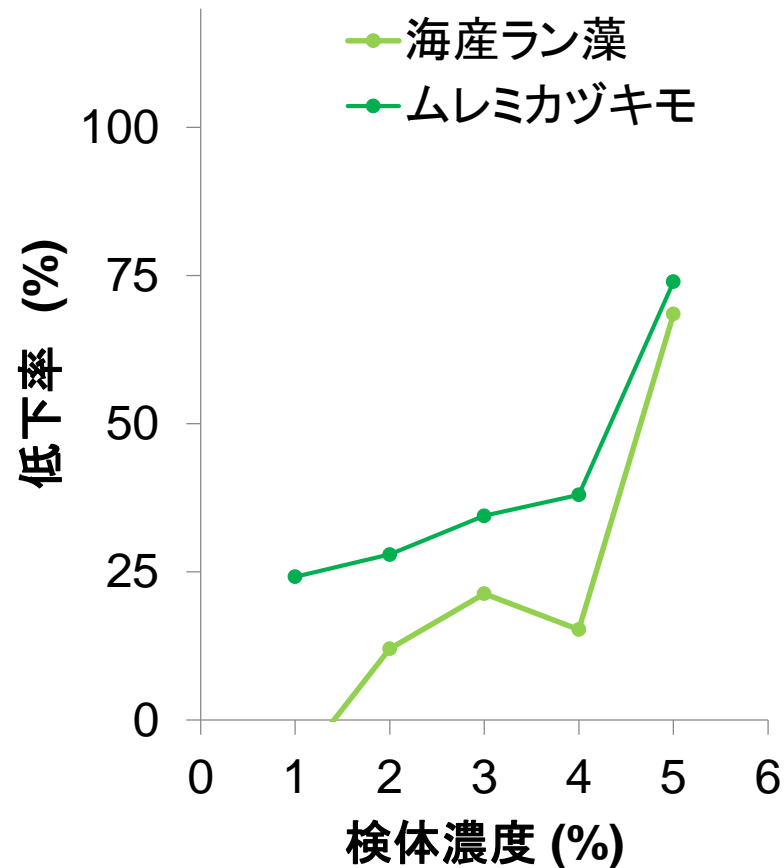
24時間



遅延発光計測用
高感度ルミノメータ

藻類の遅延発光による影響評価法(遅延発光法)

ムレミカツキモ (*Pseudokirchneriella subcapitata*) 海産ラン藻 (*Cyanobium sp.*) 比較



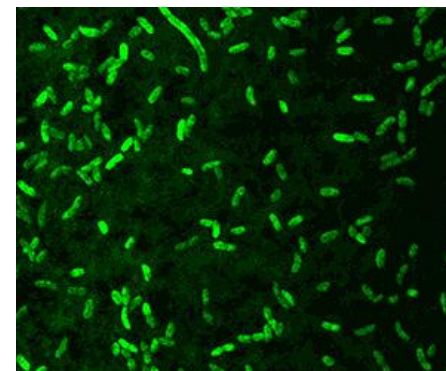
	EC ₅₀	EC ₁₀	NOEC	TU
ムレミカツキモ	19.5	3.5	<5	>20
海産ラン藻	25.9	8.4	10	10

▶ Microtox試験

Microtox試験とは...

海洋性発光細菌(*Vibrio Fisheri*)を用いて

その光の変化量を測定することにより水生毒性を評価する方法



by E Nelson and L Sycuro,
provided courtesy of
the *Vibrio fischeri* Genome Project.

原理

海洋性発光細菌を試料にばく露し、5、15 分後の発光阻害を測定



フラビンモノヌクレオチド(FMN) が還元され、

FMNH₂ になりこれがルシフェラーゼと反応

毒性物質が発光細菌に作用すると反応が阻害され発光量が減少

発光量からガンマ関数を算出

$$\gamma = (I(0) \cdot \text{BR} - I(t)) / I(t) = I(0) \cdot \text{BR} / I(t) - 1$$

I(0): 試料を入れる直前の発光量

I(t): 試料添加 t 分後の発光量

BR: 試料添加 t 分後の対照の発光量/試料を入れる直前の対照の発光量

$$E(\%) = I(0) \cdot \text{BR} - I(t) / I(0) \cdot \text{BR} \times 100 = \gamma / (1 + \gamma) \times 100$$

E: 阻害率(t 分後に阻害を受けなければあるはずの光の量に対する

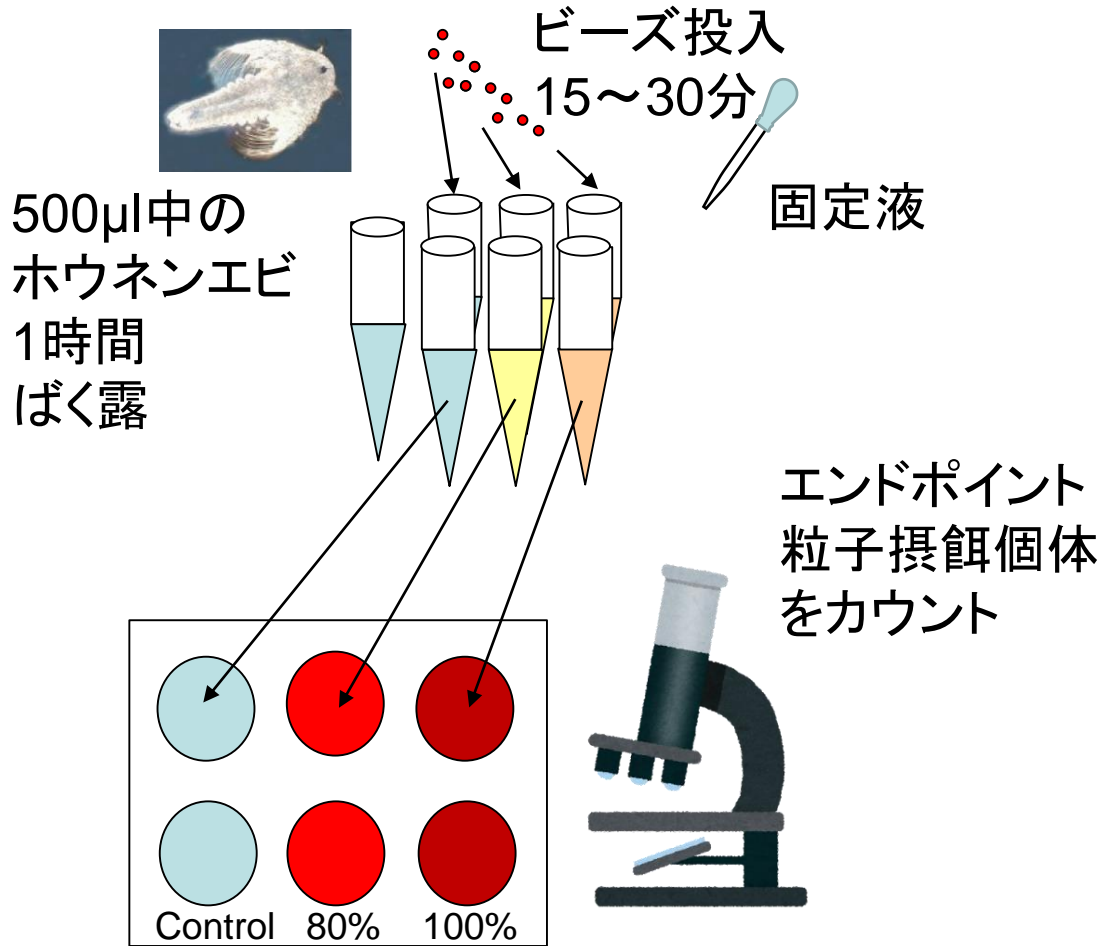
t 分後に失われた光の量の比)

EC50は、 $\gamma=1$ のときの濃度

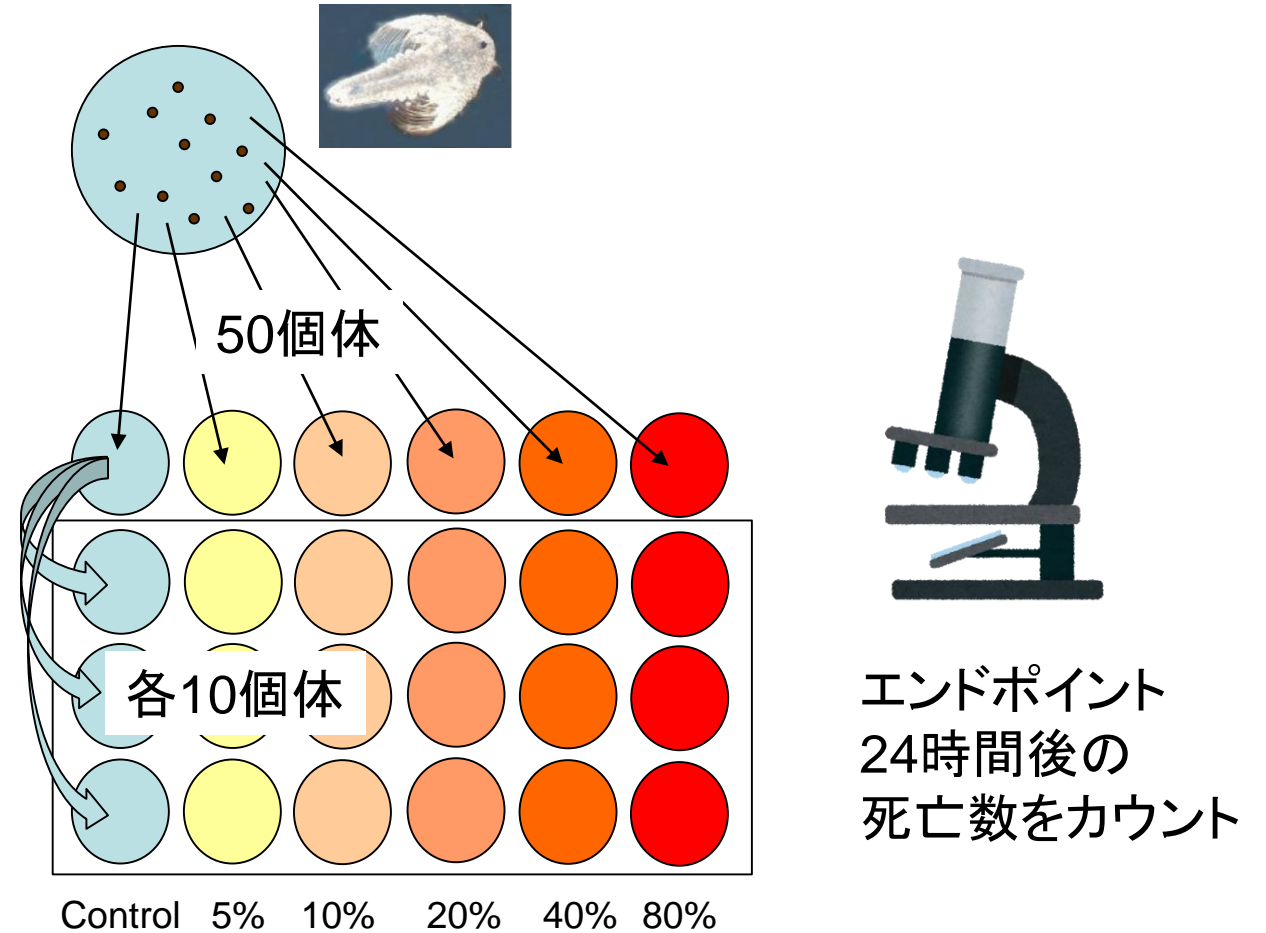


%	5分後	15分後
EC ₁₀	59.9 (38.7-92.9)	>80
EC ₂₀	>80	>80
EC ₅₀	>80	>80

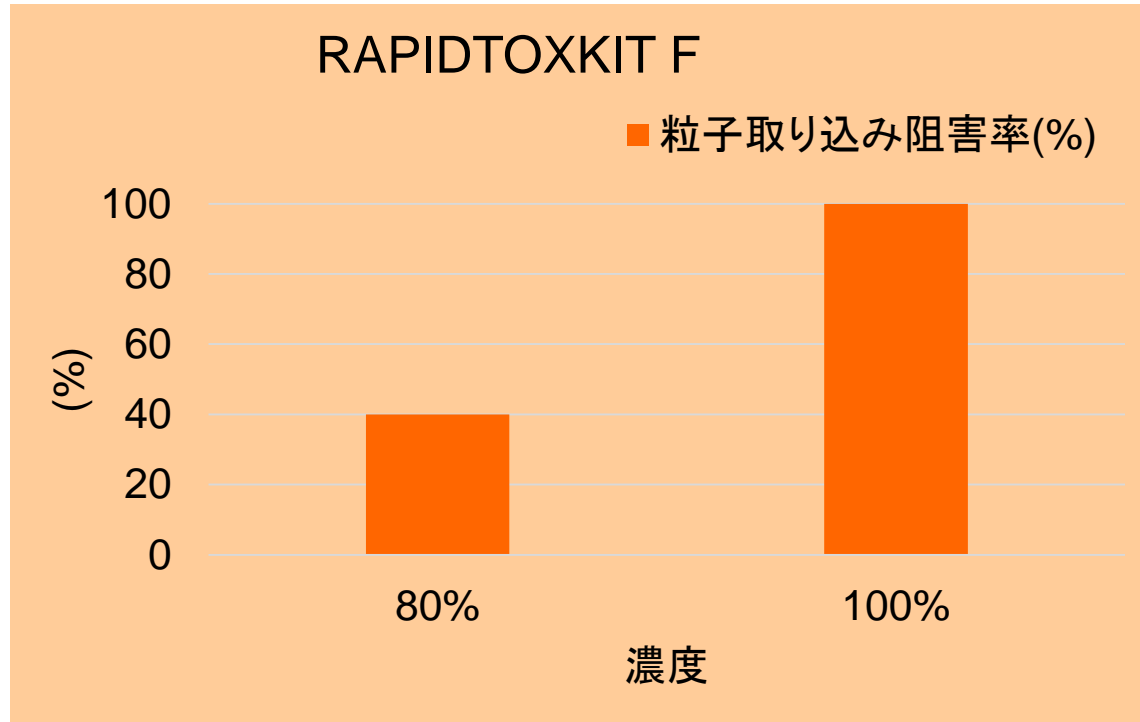
▶ ホウネンエビ亜致死毒性試験 (RAPIDTOXKIT F)



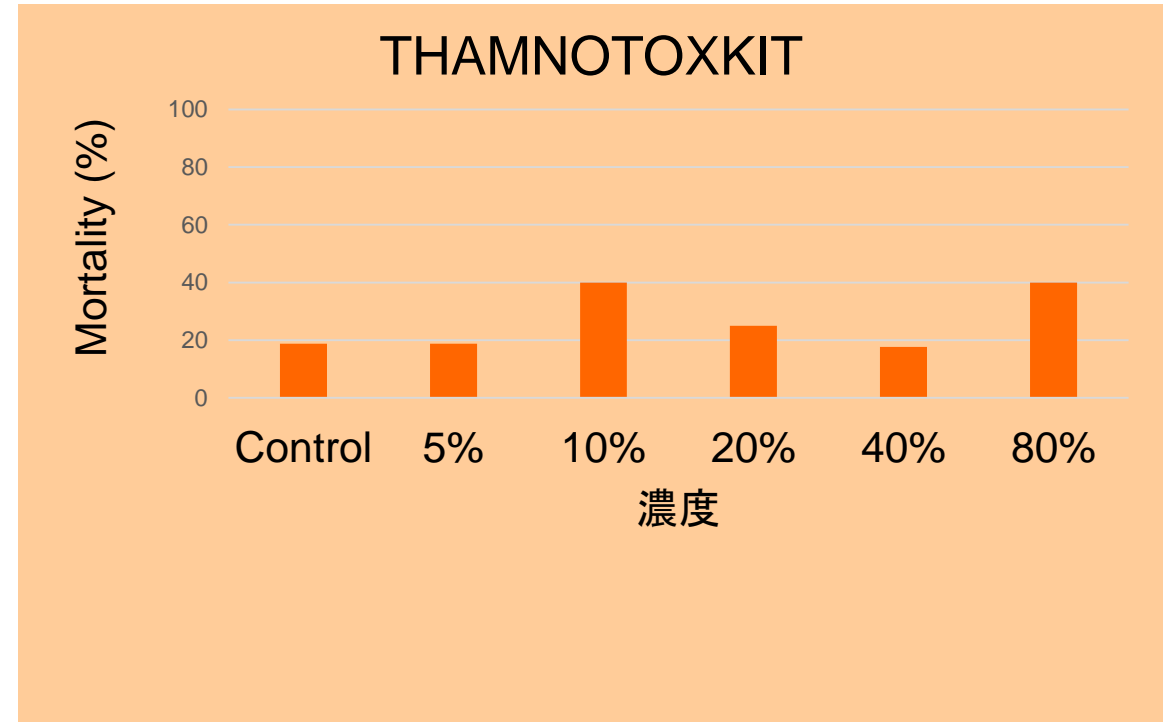
▶ ホウネンエビ急性毒性試験 (THAMNOTOXKIT F)



▶ ホウネンエビ亜致死毒性試験 (RAPIDTOXKIT F)



▶ ホウネンエビ急性毒性試験 (THAMNOTOXKIT F)



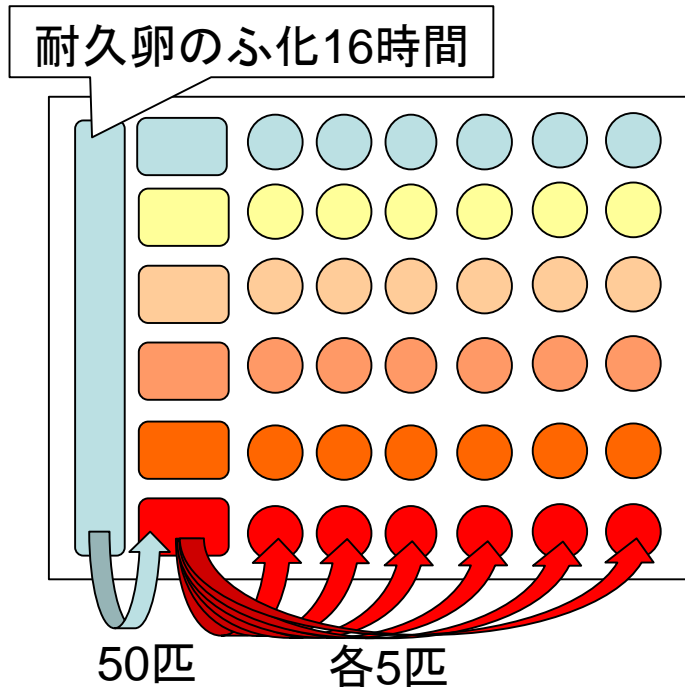
粒子取り込み阻害率

$$= (\text{コントロールの着色生物率} - \text{試験区の着色生物率}) / \text{コントロールの着色生物率} \times 100$$

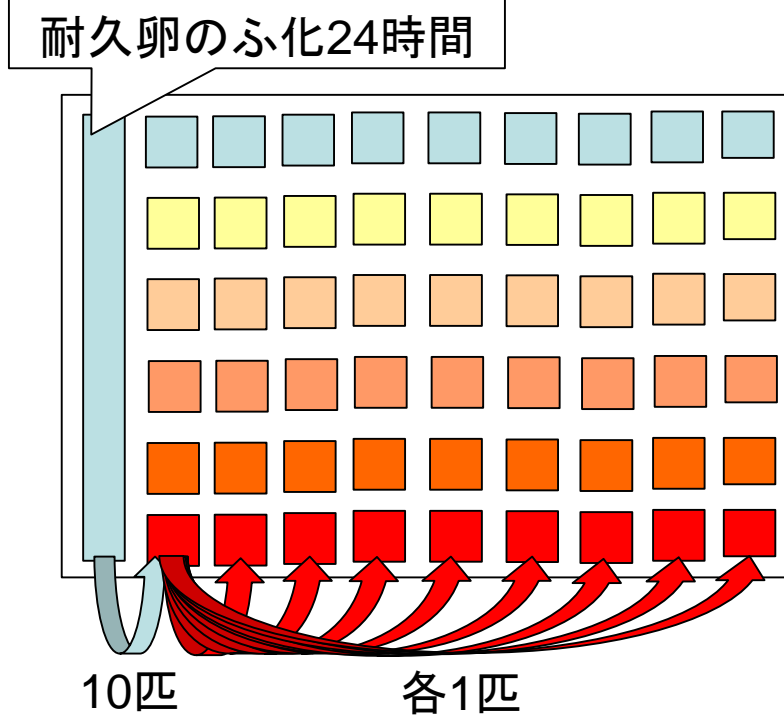
コントロールの着色生物率

$$= \text{コントロールの着色生物数} / \text{コントロールの生物数} \times 100$$

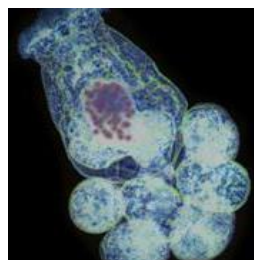
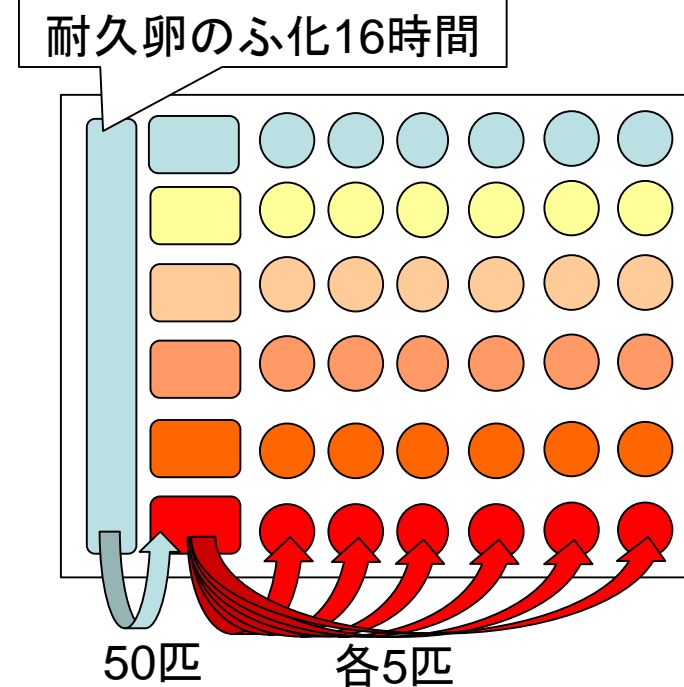
▶ ツボワムシ(*Brachious calyciflorus*)
急性毒性試験
(Acute ROTOXKIT F)



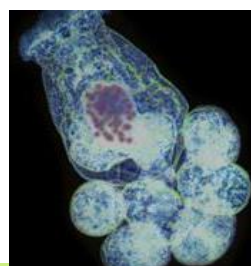
▶ ツボワムシ(*Brachious calyciflorus*)
短期慢性毒性試験
(Short-chronic ROTOXKIT F)



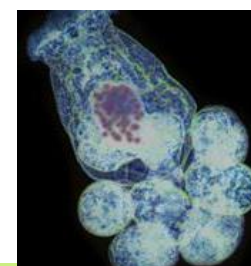
▶ シオミズツボワムシ
(*Brachious plicatiliis*)急性毒性試験
(Acute ROTOXKIT M)



24時間後
生死の観察



48時間後
繁殖数の観察

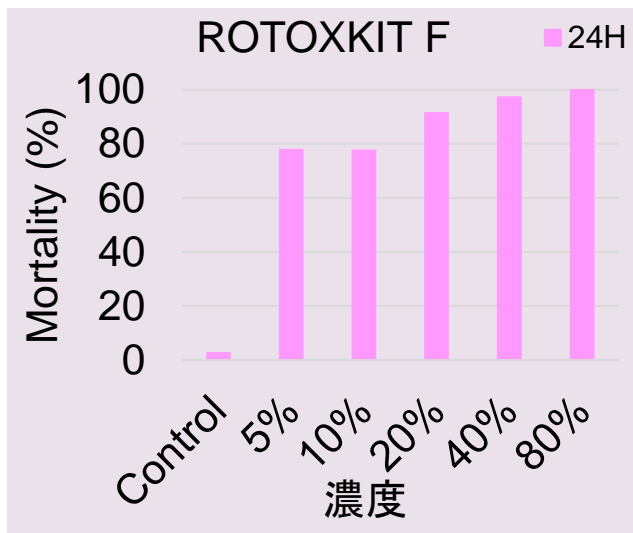


24, 48時間後
生死の観察

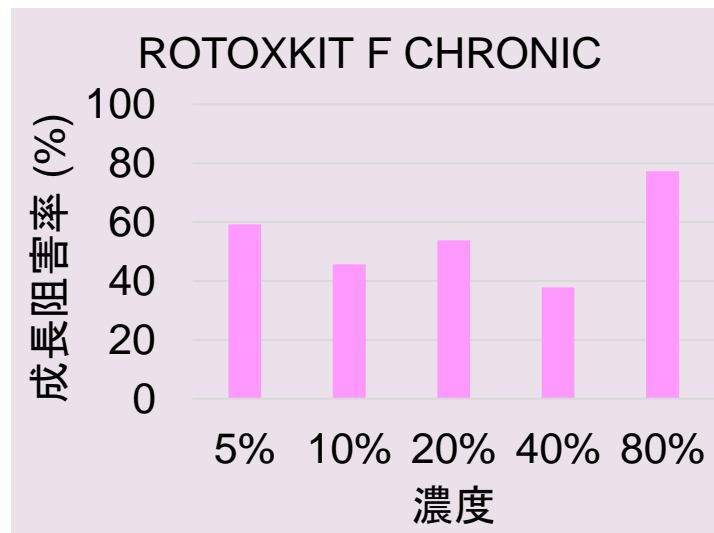


ニセネコゼミジッコ
の1/4サイズ

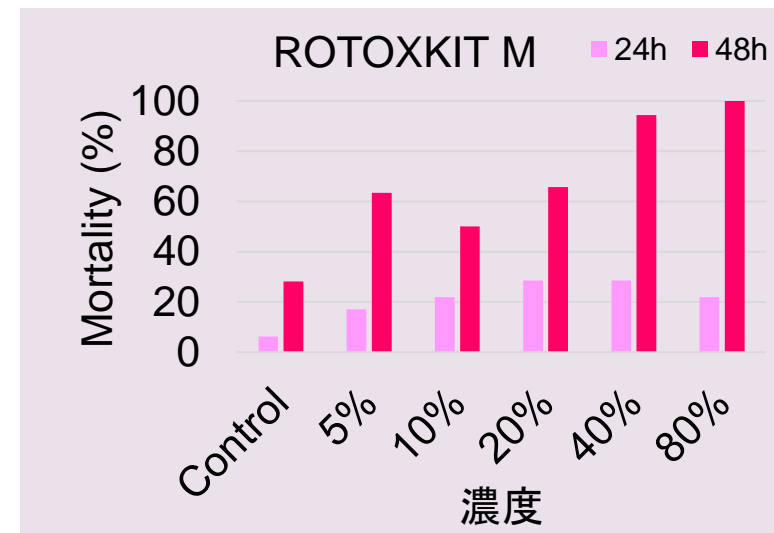
▶ ツボワムシ (*Brachious calyciflorus*)
急性毒性試験
(Acute ROTOXKIT F)



▶ ツボワムシ (*Brachious calyciflorus*)
短期慢性毒性試験
(Short-chronic ROTOXKIT F)



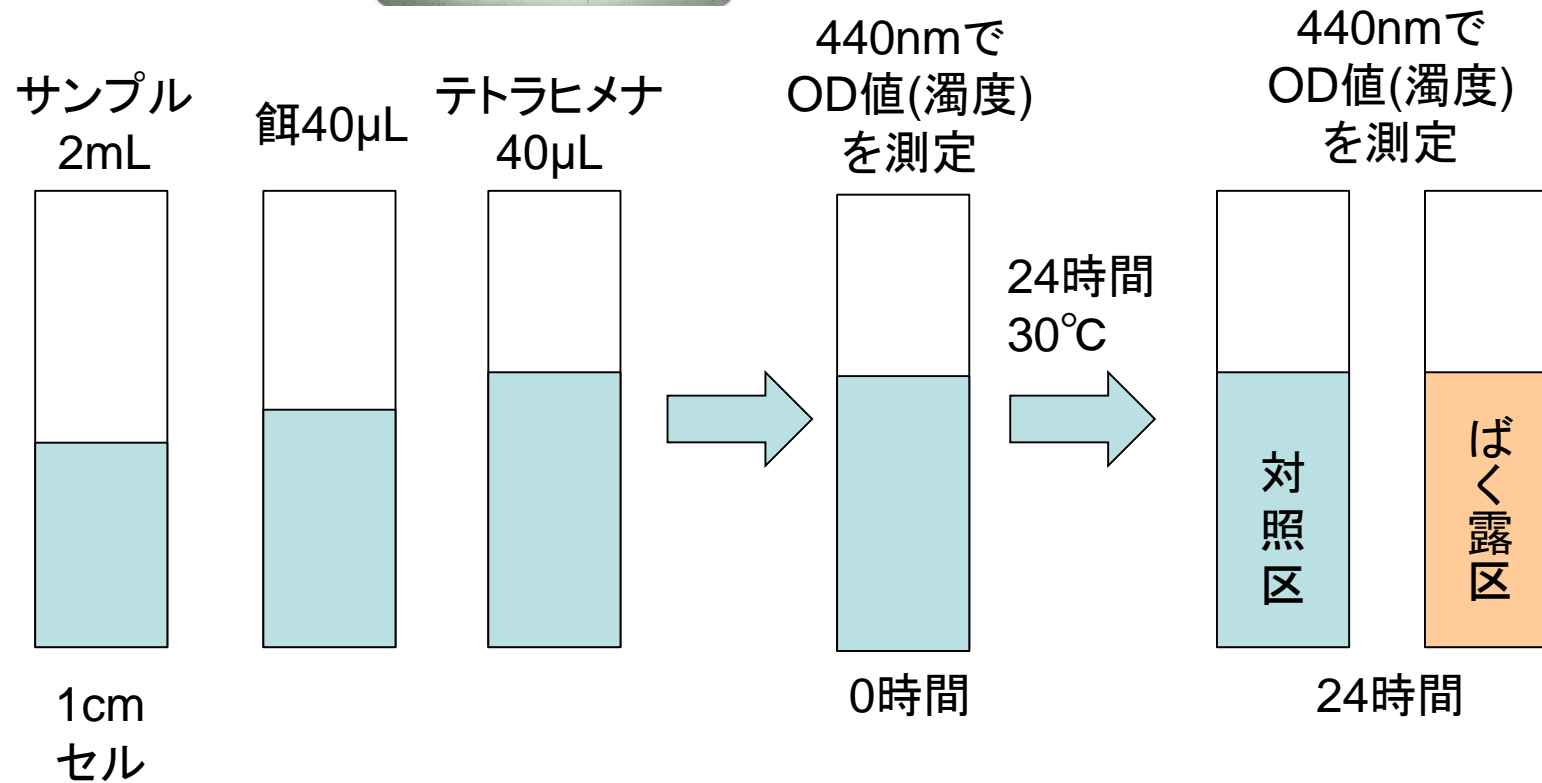
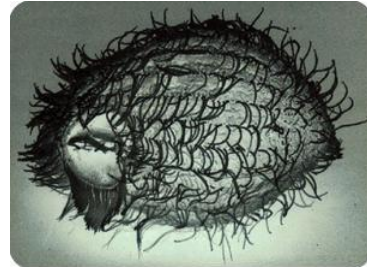
▶ シオミズツボワムシ (*Brachious plicatiliis*)急性毒性試験
(Acute ROTOXKIT M)



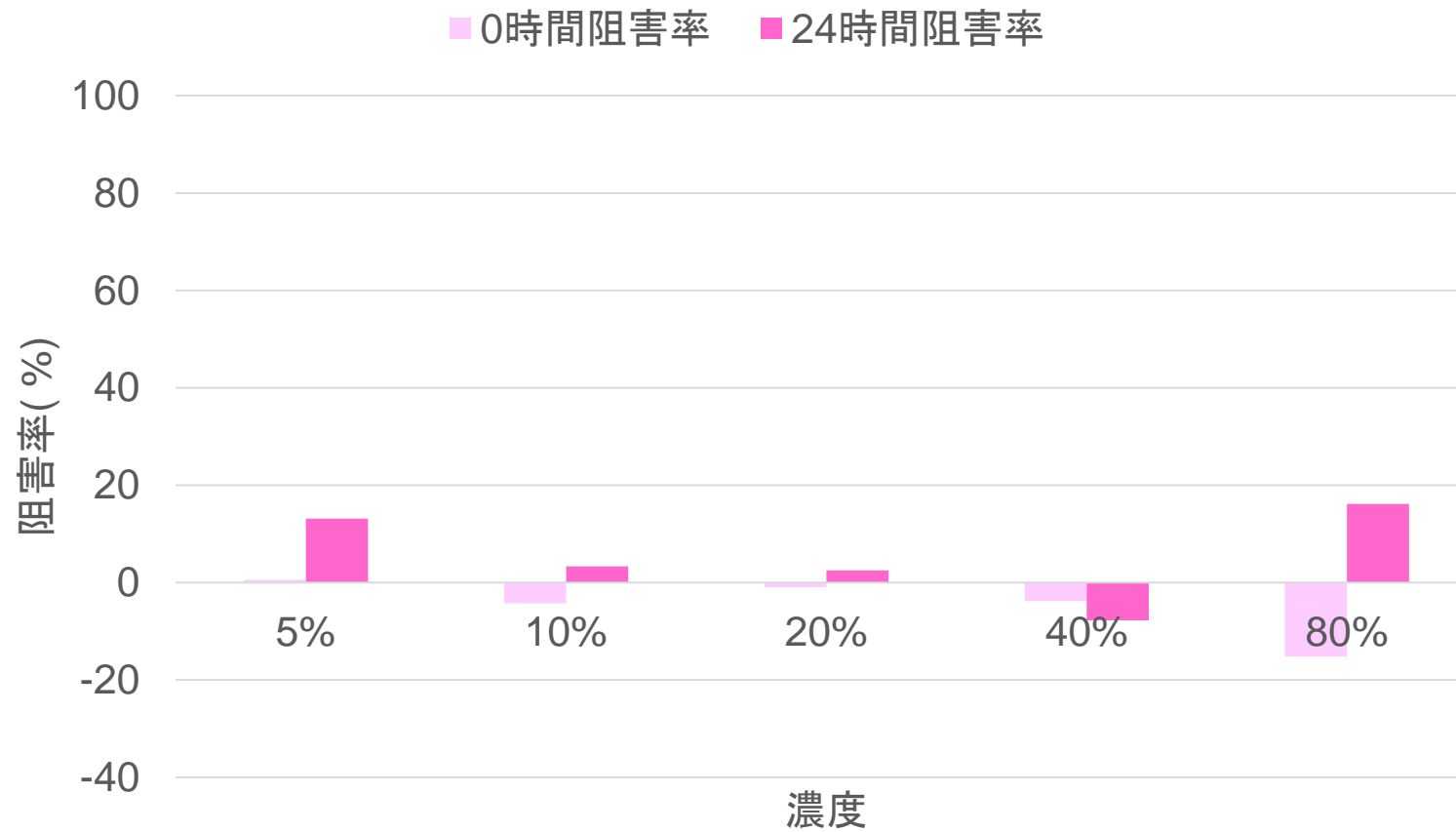
成長阻害率=(コントロールの増加率-濃度区の平均)
/コントロールの増加率×100
コントロールの増加率=(コントロールの平均-1)/2

	EC50	EC10	NOEC	TU
ROTOXKIT F	<5	<5	<5	>20
ROTOXKIT M 24h	N.D	N.D	N.D	N.D
ROTOXKIT M 48h	18.8	7.98	5	20
ROTOXKIT F CRONIC	N.D	N.D	N.D	N.D

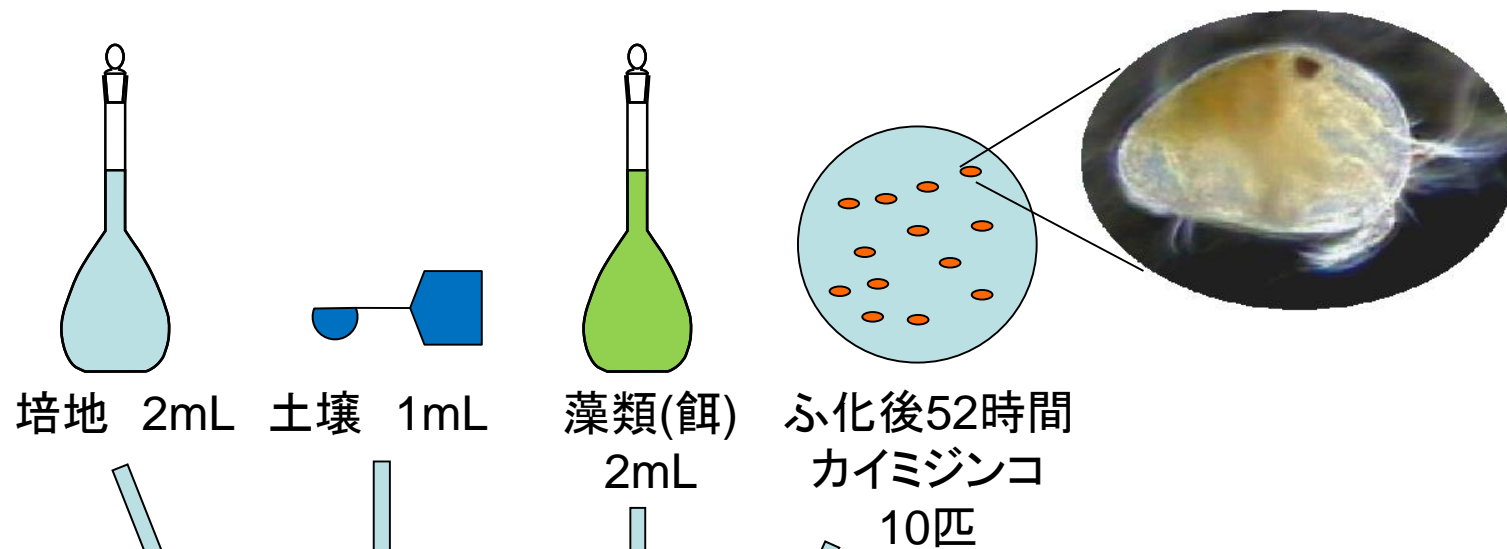
▶ 繊毛虫慢性毒性試験 (Chronic PROTOXKIT F)



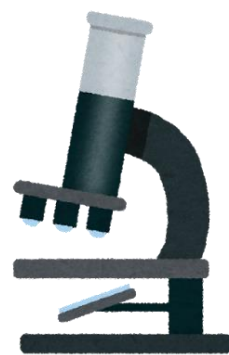
▶ 纖毛虫慢性毒性試驗 (Chronic PROTOXKIT F)



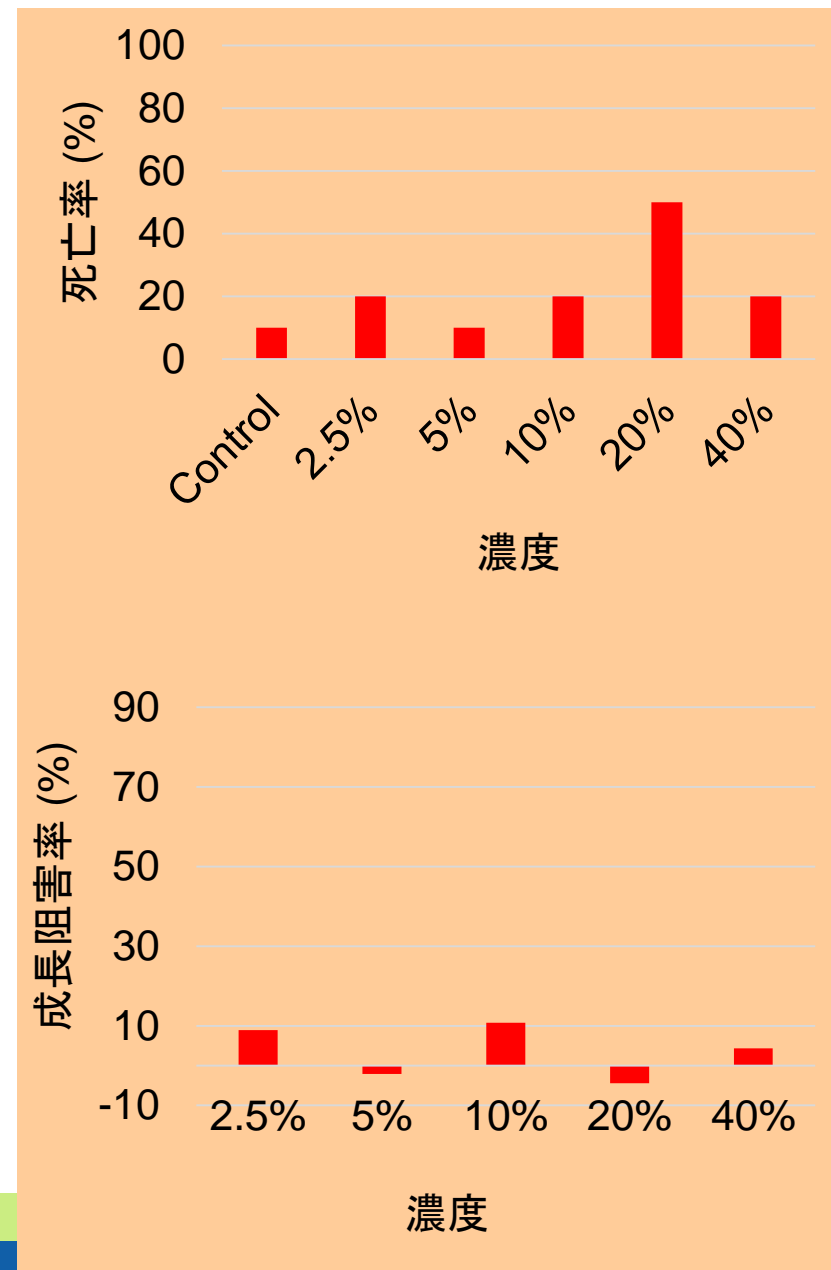
OSTRACOD TOXKIT F (カイミジンコ亜慢性毒性試験)



暗所25°C 6日間ばく露



生死観察
体長測定

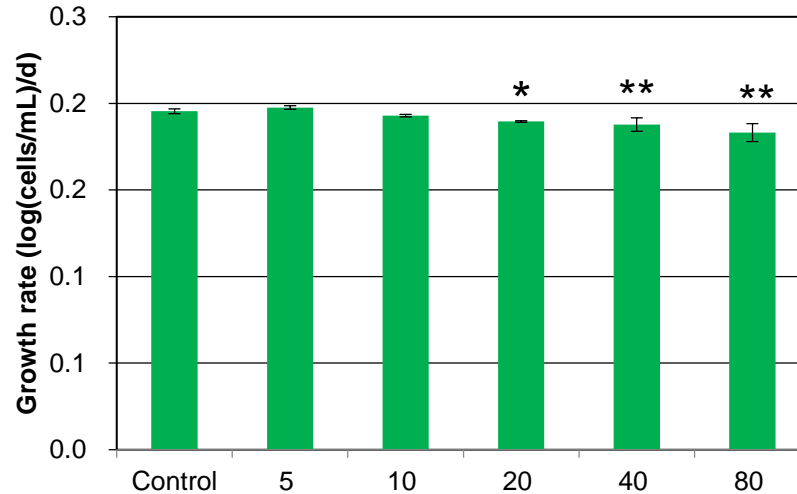


▶ 海産珪藻類生長阻害試験 (MARINE ALGALTOXKIT)

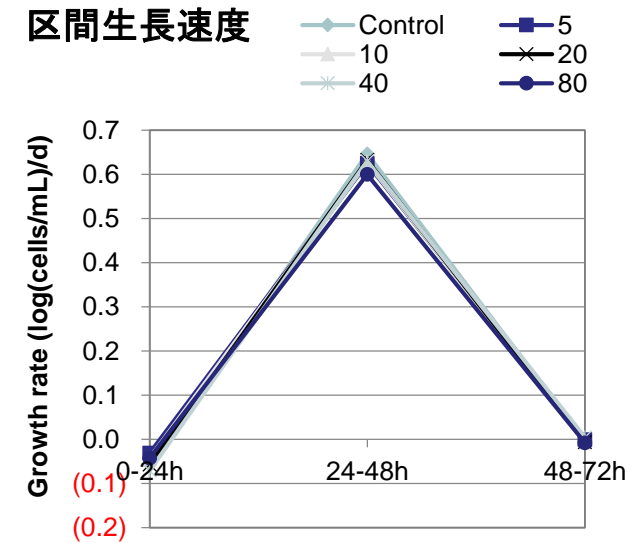
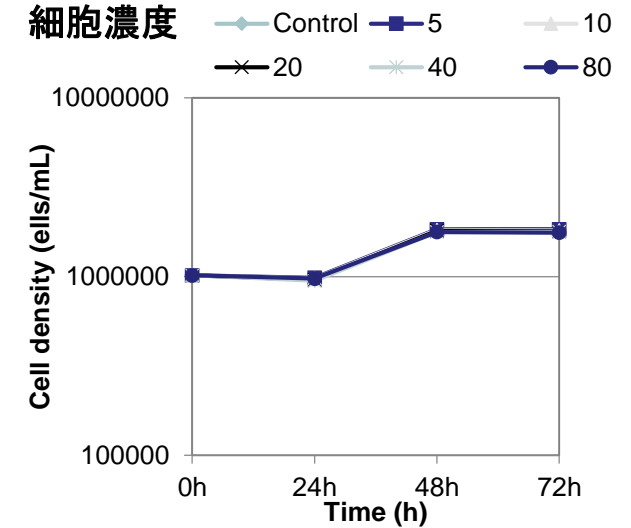
試験条件	MARINE ALGALTOXKIT
供試生物	珪藻 (<i>Phaeodactylum tricornutum</i>)
ばく露方式	止水式,
試験期間	72時間
水温 (°C)	20°C
光条件	10000 lux (サイドの照明) 又は 3000-4000 lux (下からの照明) 白色蛍光, 連続光
試験用水 (対照区)	キット付属の培地用試薬で調製
前培養	72時間
試験容器	キット付属のセル(約30mL)
試料量 / 容器	25mL
生物数 / 容器	1×10^6 algal/mL
繰り返し	3連
濃度区	5濃度区 (排水濃度100%, 80%, 40%, 20%, 10%, 5%,)
供試生物の齢	72時間前に前培養した指数増 殖期の細胞
給餌	なし
換水	なし
測定方法	24, 48, 72時間後のOD値測定 波長670nm
エンドポイント	成長阻害



0-72h平均生長速度



	EC50	EC10	LOEC	NOEC	TU
TOXKIT	>80	>80	20	10	10
ラン藻 (TG201)	60.8	9.75	5	<5	>20
ラン藻 (遅延発光法)	25.9	8.4	20	10	10



	試験法	EC50	EC10	NOEC (%)	TU
1	魚類胚・仔魚期毒性試験	6.06	<1.25	1.25	80
2	ニセネコゼミジンコ繁殖試験	13	6.25	2.5	40
3	藻類生長阻害試験	79.6	7.02	<5	>20
4	ヨコエビ急性毒性試験	>80	>80	80	1.25
5	OECD TG203 (100%のみの限度試験)	N.D	N.D	N.D	N.D
6	メダカビテロジェニンアッセイ	N.C	N.C	N.C	N.C
7	海産藻類生長阻害試験	60.8	9.75	<5	>20
8	藻類遅延発光法(ムレミガヅキモ)	19.5	3.5	<5	>20
8	藻類遅延発光法(海産ラン藻)	25.9	8.4	10	10
9	Microtox試験	>80	>80	>80	<1.25
10	ホウネンエビ亜致死毒性試験(RAPIDTOXKIT F)	<80	<80	<80	>1.25
11	ホウネンエビ急性毒性試験(THAMONOTOXKIT F)	N.D	N.D	N.D	N.D
12	ツボワムシ急性毒性試験(Acute ROTOXKIT F)	<5	<5	<5	>20
13	ツボワムシ短期慢性毒性試験 (Short-chronic ROTOXKIT F)	N.D	N.D	N.D	N.D
14	繊毛虫慢性毒性試験(Chronic PROTOXKIT F)	N.D	N.D	N.D	N.D
15	カイミジンコ亜慢性毒性試験	N.D	N.D	N.D	N.D
16	海産珪藻類生長阻害試験 (MARINE ALGALTOXKIT)	>80	>80	10	10
17	シオミズツボワムシ急性毒性試験 (Acute ROTOXKIT M)	18.8	7.98	5	20

N.D: No data, N.C: No calculation

▶ まとめと考察

- TG201で海産ラン藻と淡水のムレミカツキモは同程度の感受性を示した
 - TOXKITでは海産珪藻は海産ラン藻に比べやや感受性が低い
 - 遅延発光法ではTG201と同等の結果が得られた
- ⇒試験法が異なっても検出が可能

- ワムシは淡水・海水共に急性毒性試験では影響が検出できたが、短期慢性毒性試験は検出できなかった
- ⇒ワムシの扱いには技術を要するため、試験者の鍛錬が必要である

- メダカ簡易イムノアッセイよりビテロジェニンが検出された
- ⇒**内分泌かく乱作用(女性ホルモン作用)が検出された**

- ヨコエビ、ホウネンエビの急性毒性試験、カイミジンコの亜慢性毒性試験、ゼブラフィッシュの急性毒性試験、TOXKIT繊毛虫の慢性毒性試験、Microtox試験では影響が検出できなかった

生物応答を用いた排水管理手法試験の**代替法の開発**に際して、**試験生物や試験方法を十分に考慮**する必要がある

各試験担当者

魚類胚・仔魚期毒性試験：八木, 秋田県立大学 堀江様

ニセネコゼミジンコ繁殖試験：生態毒性研究室 渡部

藻類成長阻害試験：山岸

ヨコエビ急性毒性試験：生態毒性研究室 渡部

OECD TG203 (100%のみの限度試験)：八木

メダカ イムノクロマト ビテロジェニンアッセイ：小塩

海産藻類生長阻害試験：山岸

藻類クロロフィル遅延発光試験(2種)：山岸

Microtox試験：阿部

ハウネンエビ亜致死毒性試験(RAPIDTOXKIT F)：阿部

ハウネンエビ急性毒性試験(THAMNOTOXKIT F)：阿部

ツボワムシ急性毒性試験(Acute ROTOXKIT F)：阿部

ツボワムシ短期慢性毒性試験(Short-chronic ROTOXKIT F)：阿部

繊毛虫慢性毒性試験(Chronic PROTOXKIT F)：阿部, 山岸, 小塩

カイミジンコ亜慢性毒性試験：阿部

海産珪藻類生長阻害試験(MARINE ALGALTOXKIT)：阿部, 山岸

シオミズツボワムシ急性毒性試験(Acute ROTOXKIT M)：阿部