

第一回生態影響試験チャレンジテストの結果

Part2;様々な生態影響試験

国立研究開発法人国立環境研究所
環境リスク・健康研究センター
生態毒性標準拠点

○鑑迫典久、阿部良子

目的

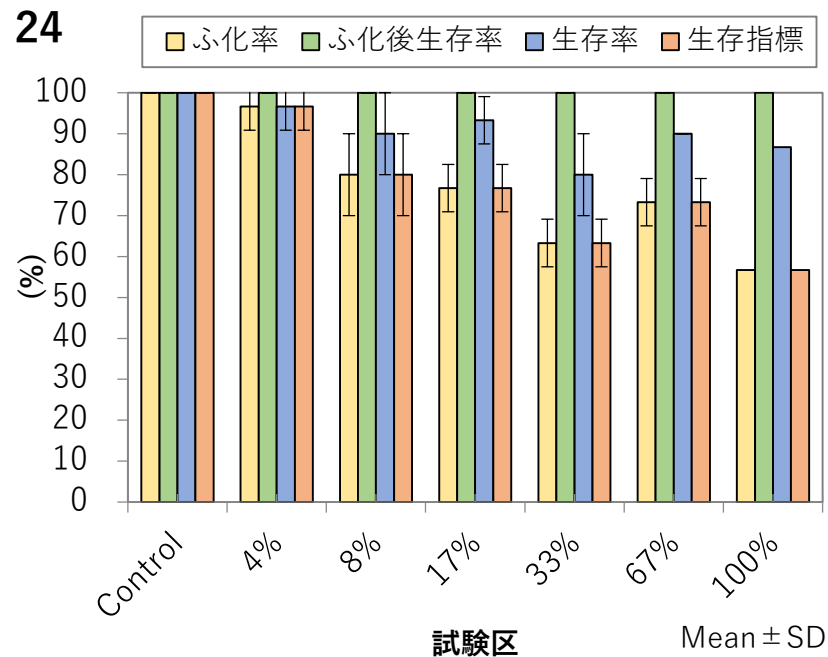
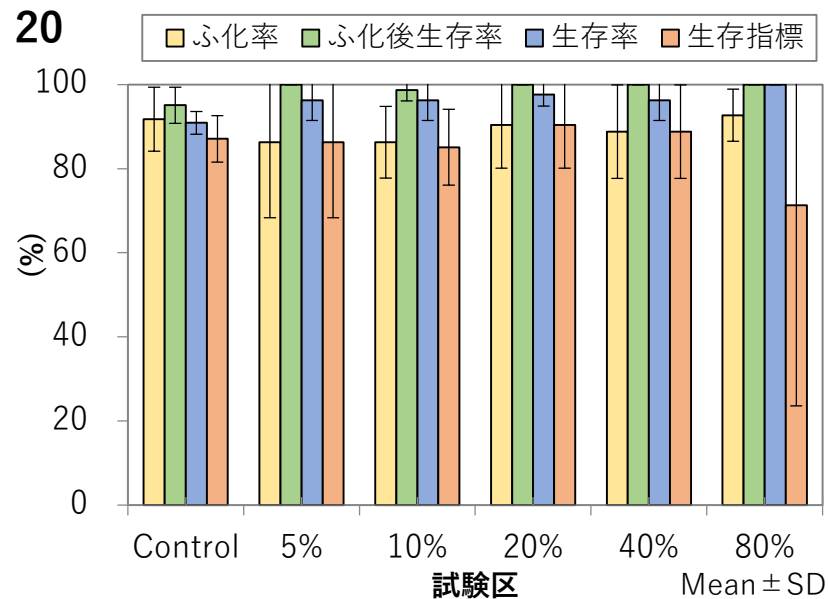
- 生物応答を用いた排水管理手法で推奨されている3種試験法以外の試験法を排水（複合化学物質、環境水）の評価に使えるか？
- 本法として、または代替法、簡易法としての可能性を探る。

ヒメダカのTG212(試験機関20, 24)

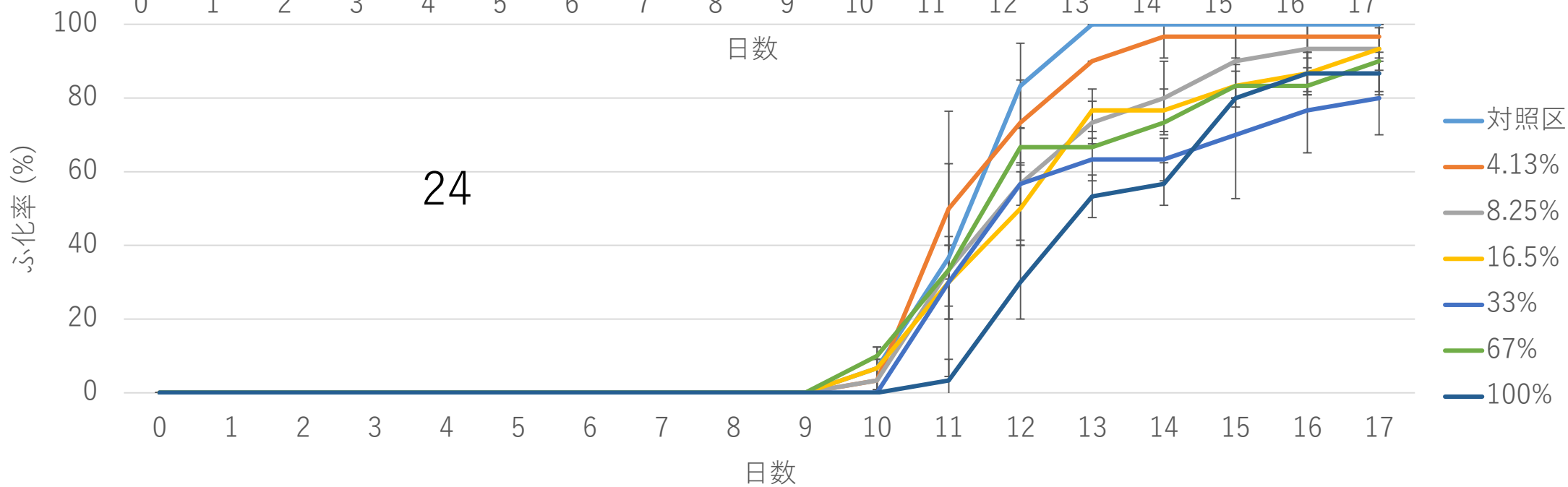
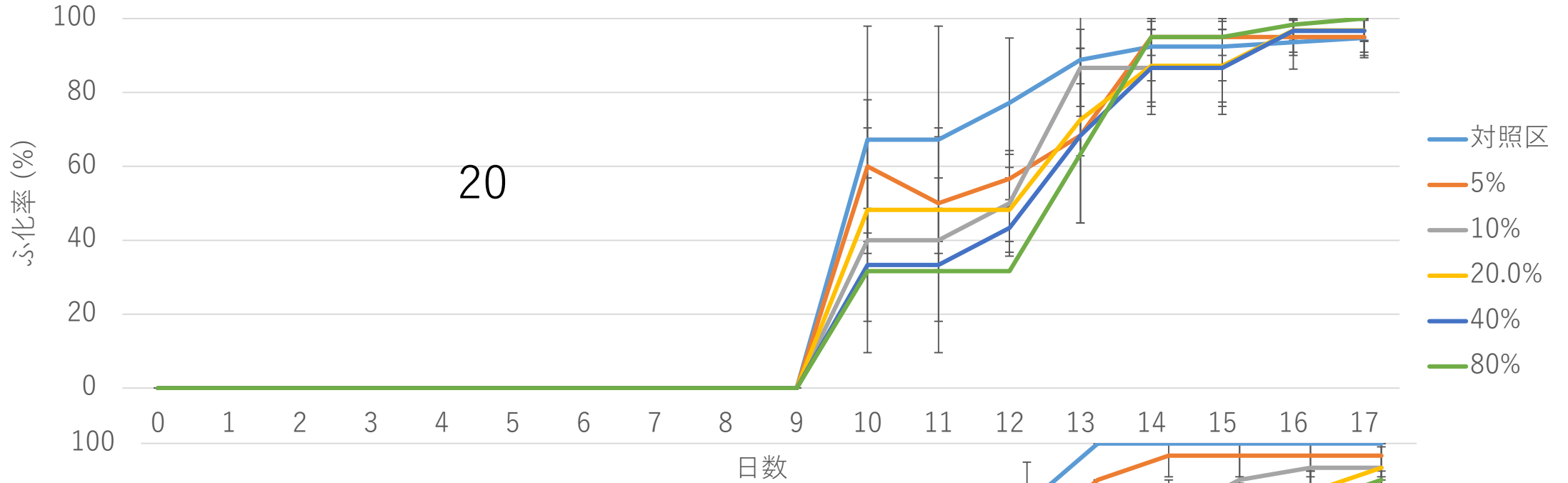
まとめ
 ゼブラフィッシュ以外にメダカも試験魚として使用できるが、試験期間が長く、試験が容易ではない。
 ラボ20は、検出できなかった。
 ラボ24は孵化遅延があり、ゼブラフィッシュと同じMOAが認められた。

試験機関	ふ化日	ばく露終了日	NOEC (%)				TU = 100/NOEC
			生存率	ふ化率	ふ化後生存率	生存指標	生存指標
20	11	17	>80	>80	>80	>80	<1.25
24	11.7	17	100	100	100	100	1

※14日までをふ化とする



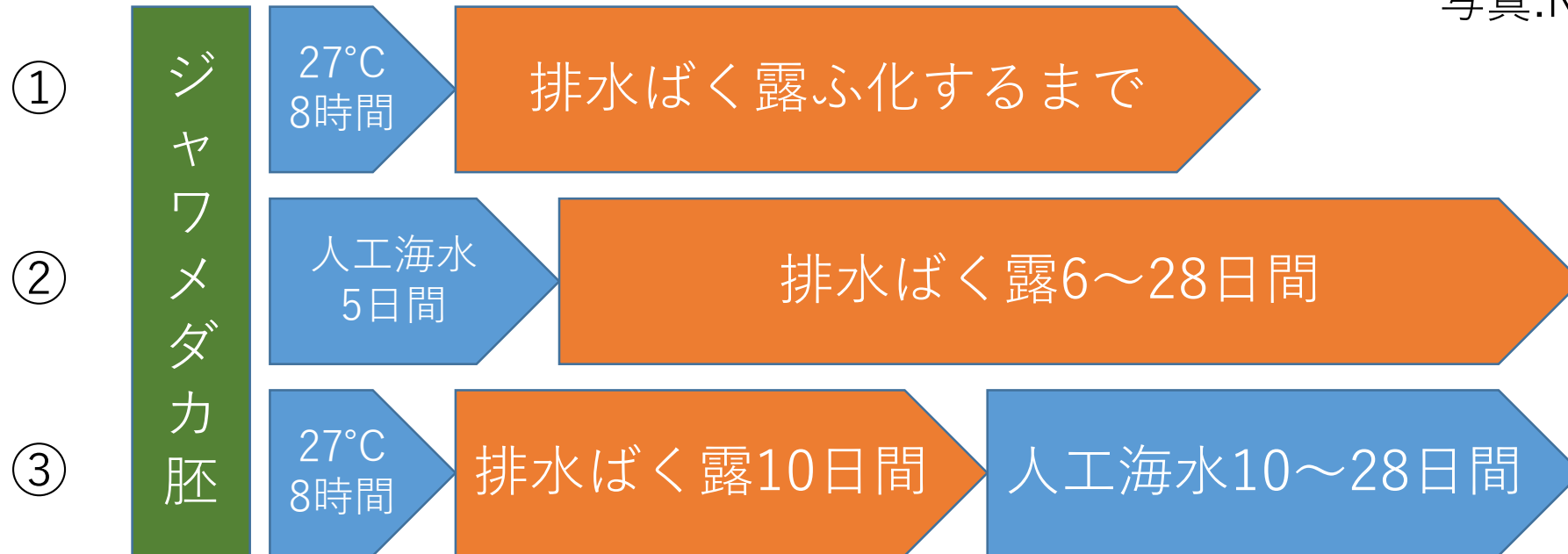
ヒメダカOECDTG212(試験機関20, 24)



ジャワメダカ (*Oryzias javanicus*) ばく露比較
(試験機関24；鹿児島大学 宇野先生)

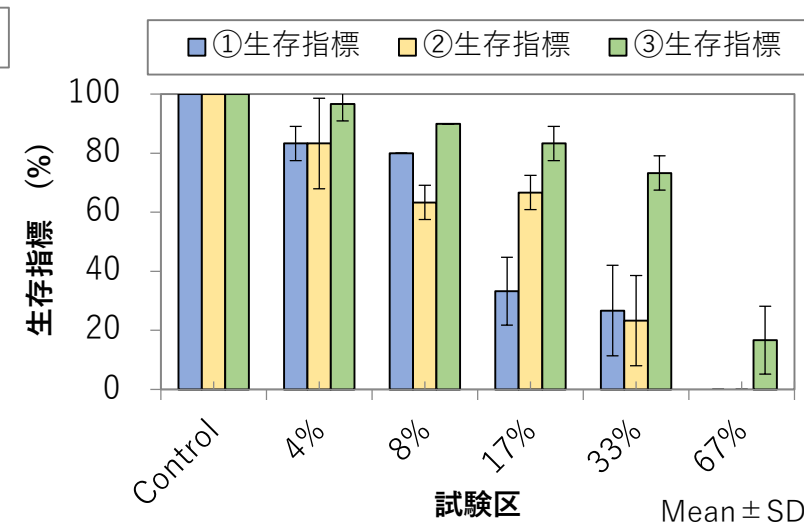
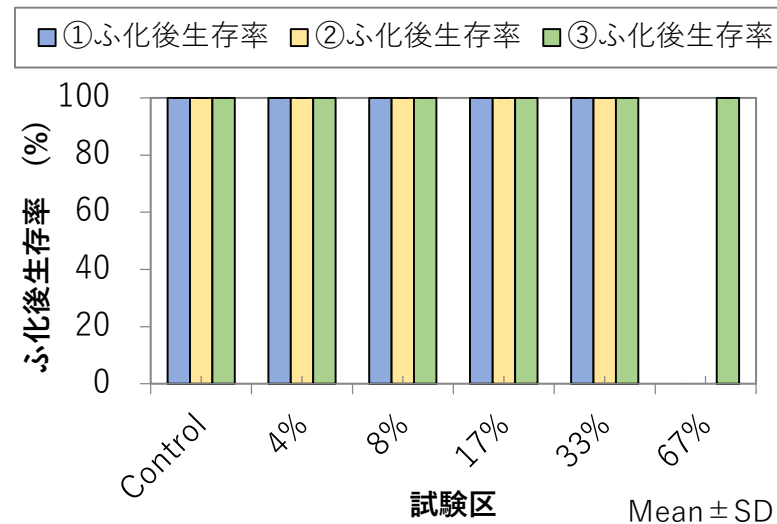
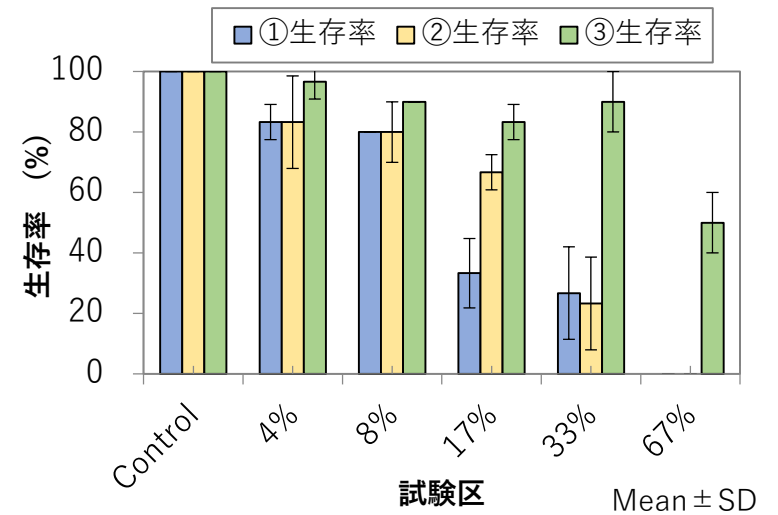
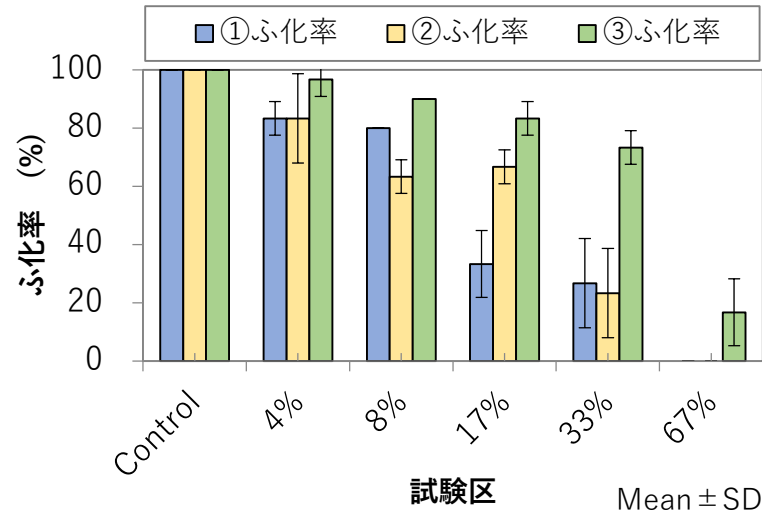
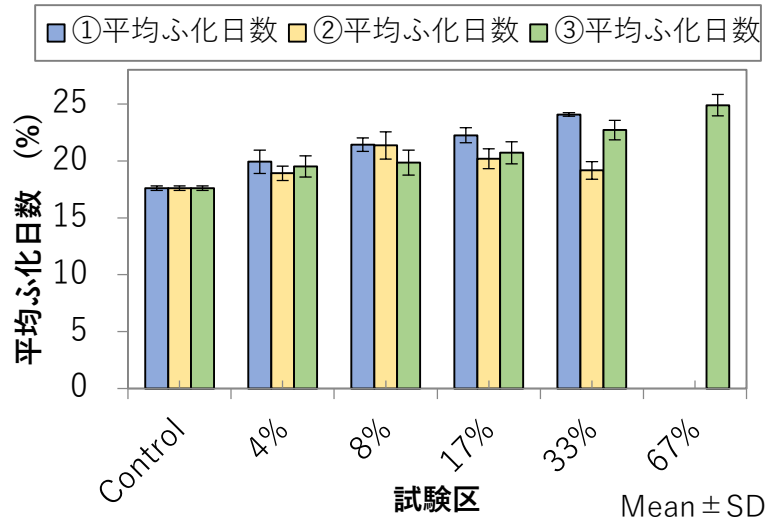


写真:NBDC HPより



ジャワメダカばく露比較(試験機関24)

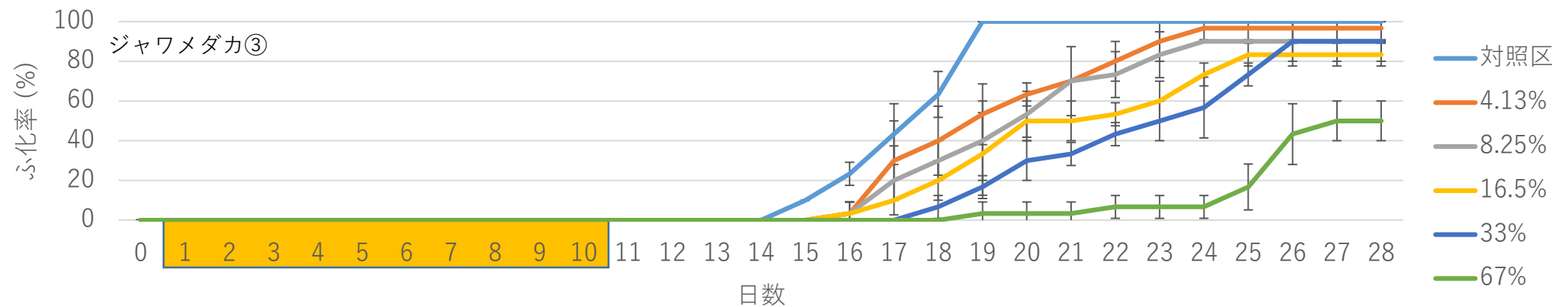
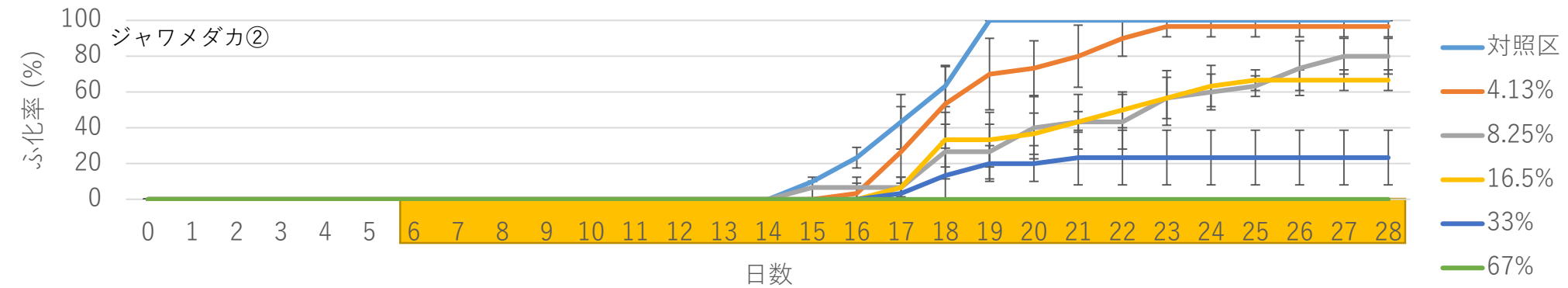
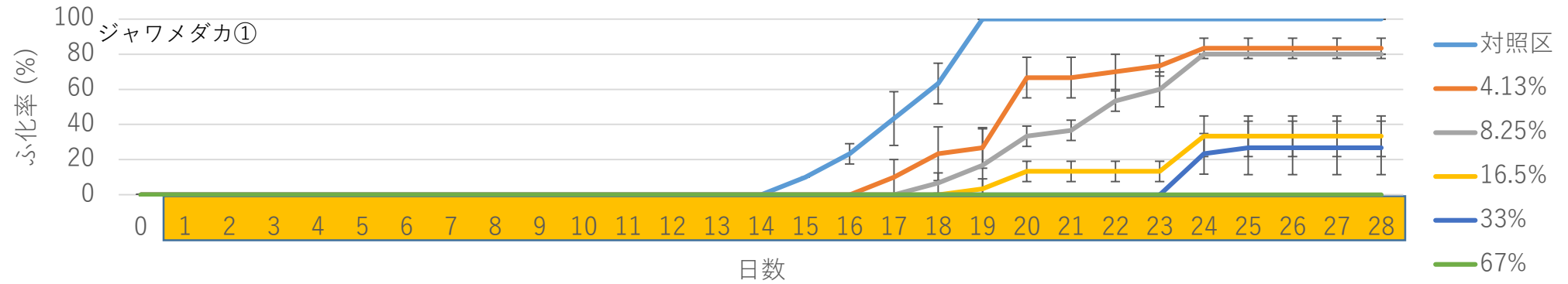
- ①27°C下で約8時間放置した胚を孵化するまで排水暴露
- ②産卵後5日間は人工海水で胚を飼育後、排水暴露（産卵後6日目より暴露開始）
- ③27°C下で約8時間放置した胚を10日間排水暴露後、人工海水で飼育



試験機関	ふ化日	ばく露終了日	NOEC (%)				TU =100/NOEC
			生存率	ふ化率	ふ化後生存率	生存指標	
ジャワメダカ①	24	17.6	28	33.3	33.3	33.3	3.00
ジャワメダカ②	24	17.6	28	33.3	33.3	33.3	3.00
ジャワメダカ③	24	17.6	28	66.6	66.6	66.6	1.50

ジャワメダカのふ化遅延

排水ばく露期間



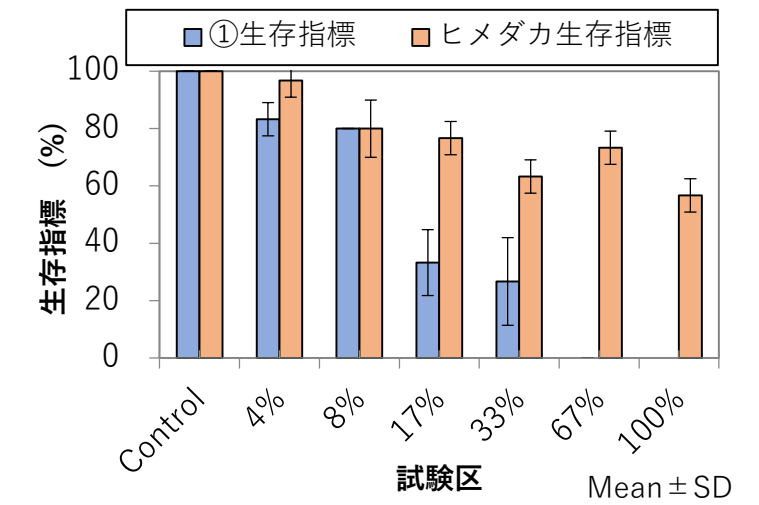
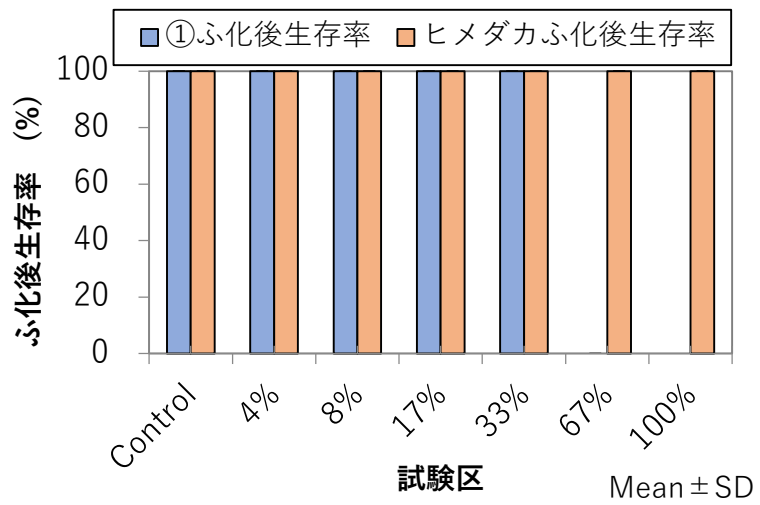
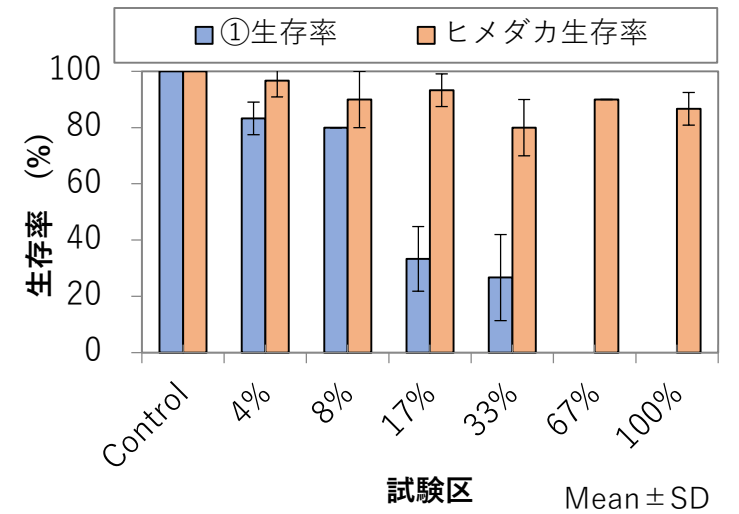
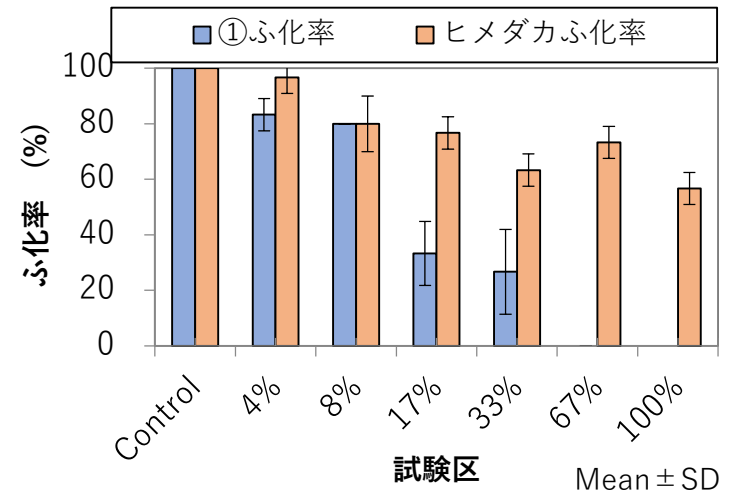
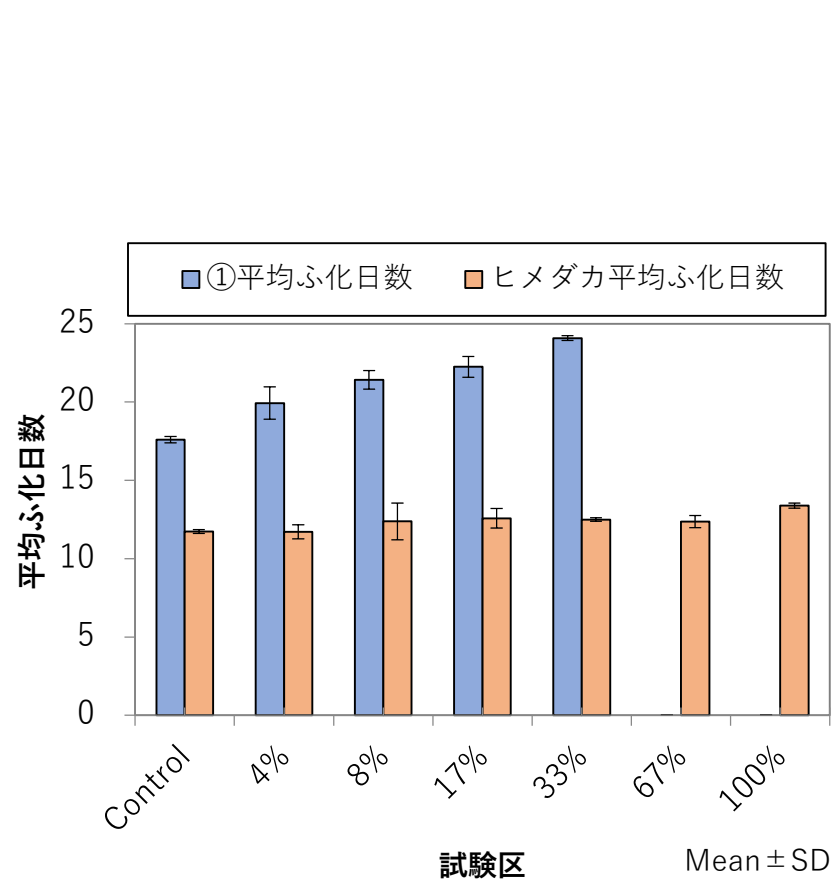
ジャワメダカ(*Oryzias javanicus*)ばく露比較(試験機関24)



まとめ

今回の排水の場合、孵化遅延物質が含まれていたこと、死かもしれば胚初期に作用するらしいこと、孵化後に死亡が見られたことから①の曝露プログラムが有効であった

ヒメダカとジャワメダカ比較(試験機関24)



試験機関	ふ化日	ばく露 終了日	NOEC (%)				TU =100/NOEC	
			生存率	ふ化率	ふ化後 生存率	生存指標	生存指標	
ジャワ メダカ①	24	17.6	28	33.3	33.3	33.3	3.00	
ヒメダカ	24	11.7	17	100	100	100	1.00	

※ヒメダカは14日まで、
ジャワメダカは25日までをふ化日で計算

海産生物影響試験法 (試験期間23; 水産研究・教育機構、隠塚先生)

試験液調製

試験水、MillQ水

試験水は上清を使用

人工海水調製

- ・ Lyman and Fleming
- ・ マリンアートSF-1

混合し濃度調整

試験水0, 6.25, 12.5,
25, 50, 100 %

甲殻類急性遊泳阻害試験

試験水と活性炭ろ過海水またはMillQ水を
塩分調整(3.0%)しながら3:1で混合
(試験水0, 5, 10, 20, 40, 80%)

試験生物: シオダマリミジンコ
ノープリウス幼生

- ・ 幼生5個体/2mL
- ・ 1濃度につき4連
- ・ 暗条件、24h試験
- ・ 温度 25.3 ± 0.2 °C (平均 \pm SD)
- ・ 付属肢を動かしても
15秒間遊泳しない

→ 遊泳阻害個体



藻類生長阻害試験

試験水と海水栄養強化培地SWM3培地を
3:1で混合 (試験水0, 5, 10, 20, 40, 80%)

試験生物: 海産珪藻2種

Skeletonema marinoi-dohrnii complex (NIES-324)

Chaetoceros neogracile (旧*Chaetoceros gracilis*)

- ・ 初期細胞密度: 5,000 cells/mL
- ・ 試験液量: 200 μ L、6連
- ・ 96穴プレート使用
- ・ 紫外線吸収膜付き蛍光灯
- ・ 14hL:10hD、光強度: 30 ± 2 μ mol m⁻² s⁻¹
- ・ 温度: 22.4 ± 0.5 °C、塩分: 3.4 ± 0.4 %
- 振とう60 rpm
- 72h培養試験

- ・ 相対蛍光度測定 (マルチラベルカウンタ)
励起波長: 430 nm、蛍光波長: 680 nm
0, 24, 48, 72 h

↓
・ 生長速度

↓
・ 生長速度阻害率



海産生物影響試験結果 (水産研究・教育機構)

甲殻類急性遊泳阻害試験

- ・何れの人工海水も使用可能 (対照区は遊泳阻害率10%以下)
- ・最高濃度区 (試験水80%) においても遊泳阻害率10-20%

藻類生長阻害試験

シオダマリミジンコを用いて試験可能だが感受性は低い

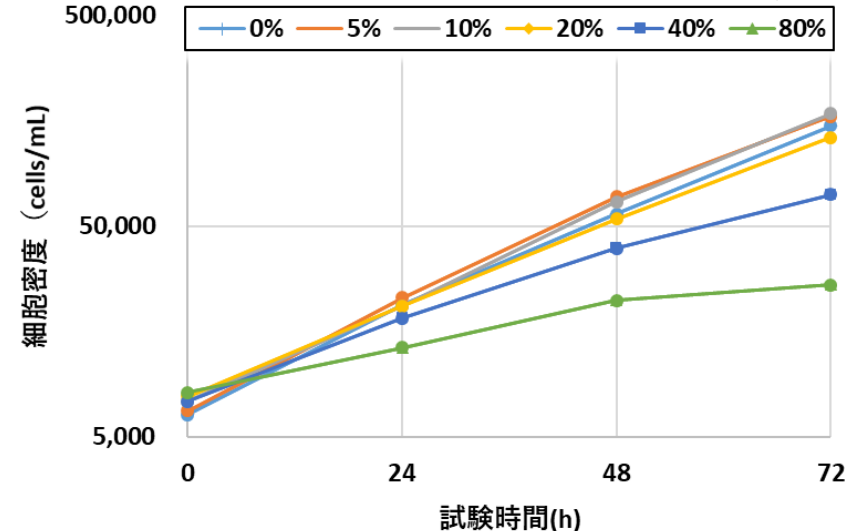
- ・Lyman and Flemingの人工海水
対照区: 48時間以降の生長が認められない
- ・マリンアートSF-1の人工海水
対照区の生物量、72時間で
スケルトネマ15倍、キートセロス30倍に増殖
- ・マリンアートSF-1の人工海水
キートセロスに対する影響濃度を計算

Lyman and Flemingの人工海水は藻類生長阻害試験に不適

マリンアートSF-1の人工海水は藻類生長阻害試験に有効

EC₅₀ : 57.5 (57.2-57.8) %
IC₂₅ : 34.6 (34.4-34.8) %
EC₁₀ : 20.8 (20.6-21.0) %
括弧内は95%信頼区間を示す
LOEC : 20% NOEC : 10%

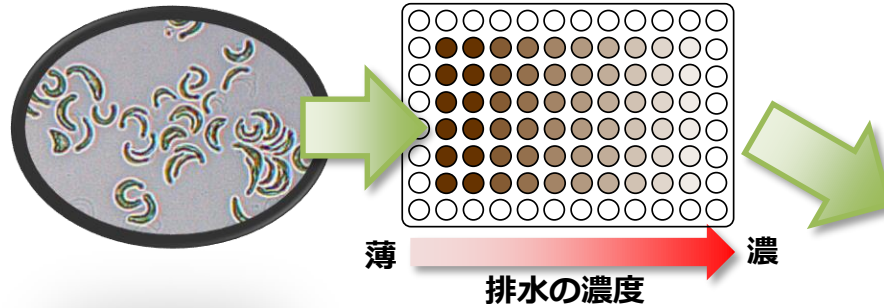
キートセロス細胞密度の経時的変化



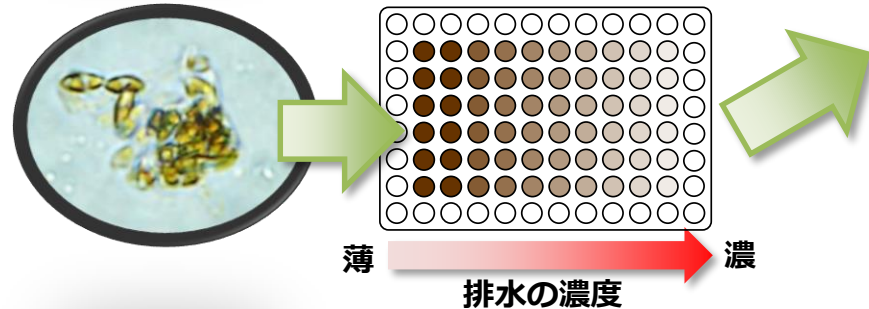
96穴マイクロプレートを使用した藻類試験(農業環境変動研究センター)

試験機関25;永井先生

緑藻
Pseudokirchneriella subcapitata



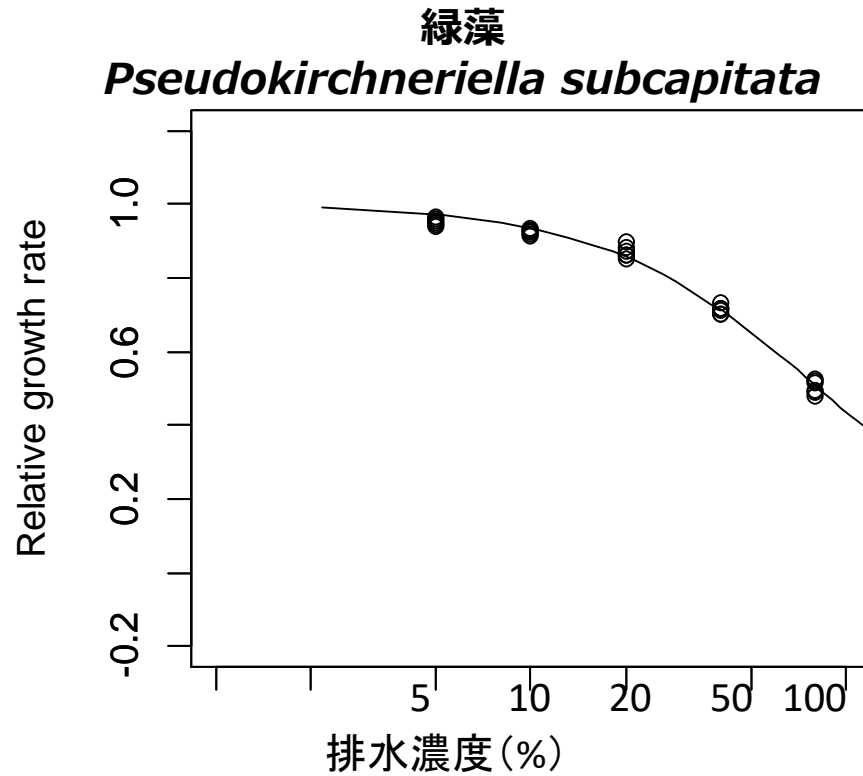
珪藻
Navicula pelliculosa



プレートリーダーによるin vivo蛍光測定

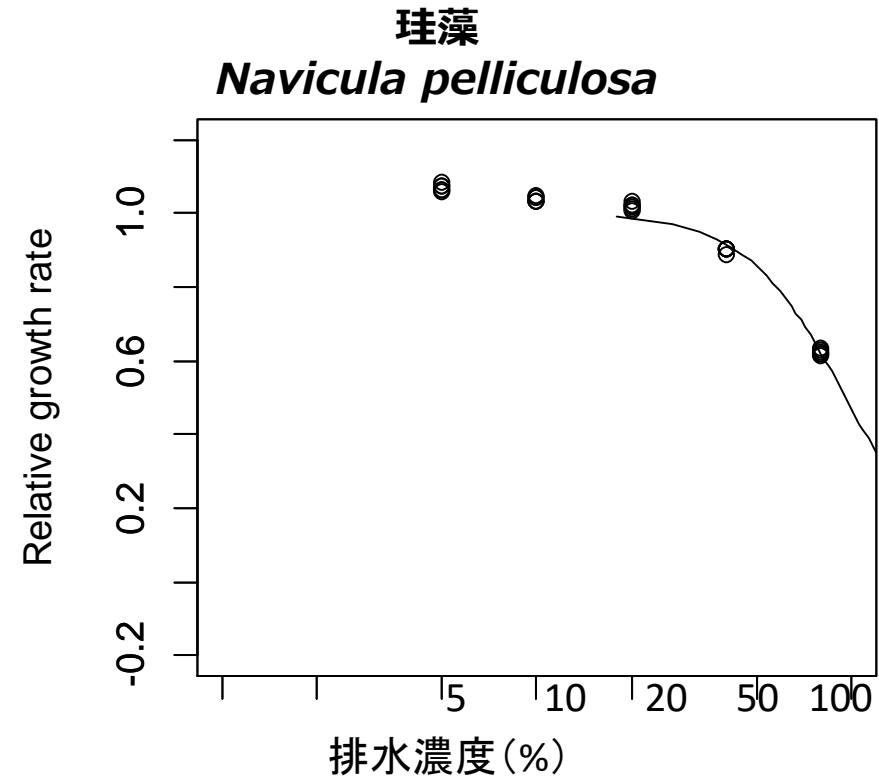
- 試験水は事前に孔径0.2umのフィルターで滅菌
- 試験液中のCSI培地の濃度が20%になるように添加
- 試験容器として96穴マイクロプレート (200uL/well) を使用、静置培養
- 藻類のバイオマスはin vivo蛍光として測定
- 増殖速度は1-4dの間で計算し、その3日間で妥当性基準をすべて満たす

96穴マイクロプレートを使用した藻類試験(農業環境変動研究センター)



EC50 = 82.1% (78.6-85.8%)

EC10 = 14.5% (13.4-15.6%)



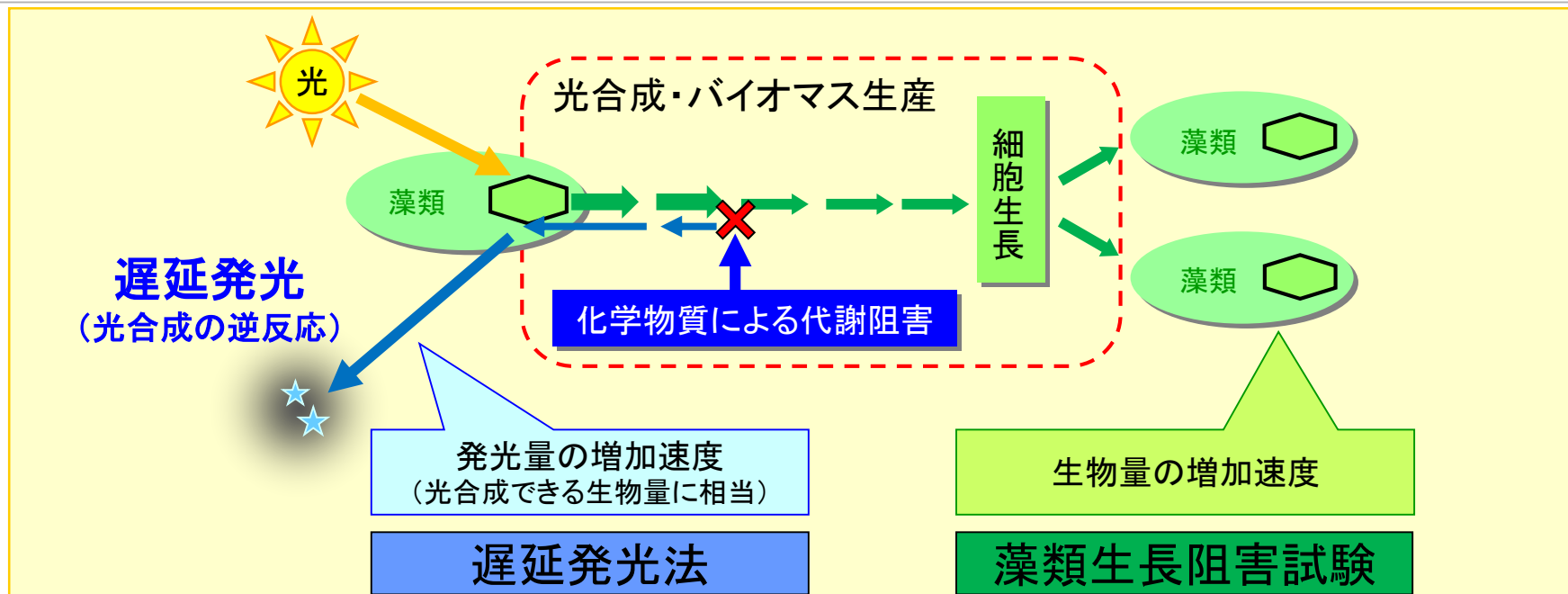
EC50 = 95.8% (88.6-103.6%)

EC10 = 43.1% (37.4-49.5%)

カッコ内は95%信頼区間

緑藻はTG201に比べてやや鈍いが、ラボ間のばらつきの範囲内にある。
珪藻は今回の排水に対しては、緑藻よりも鈍かった。

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

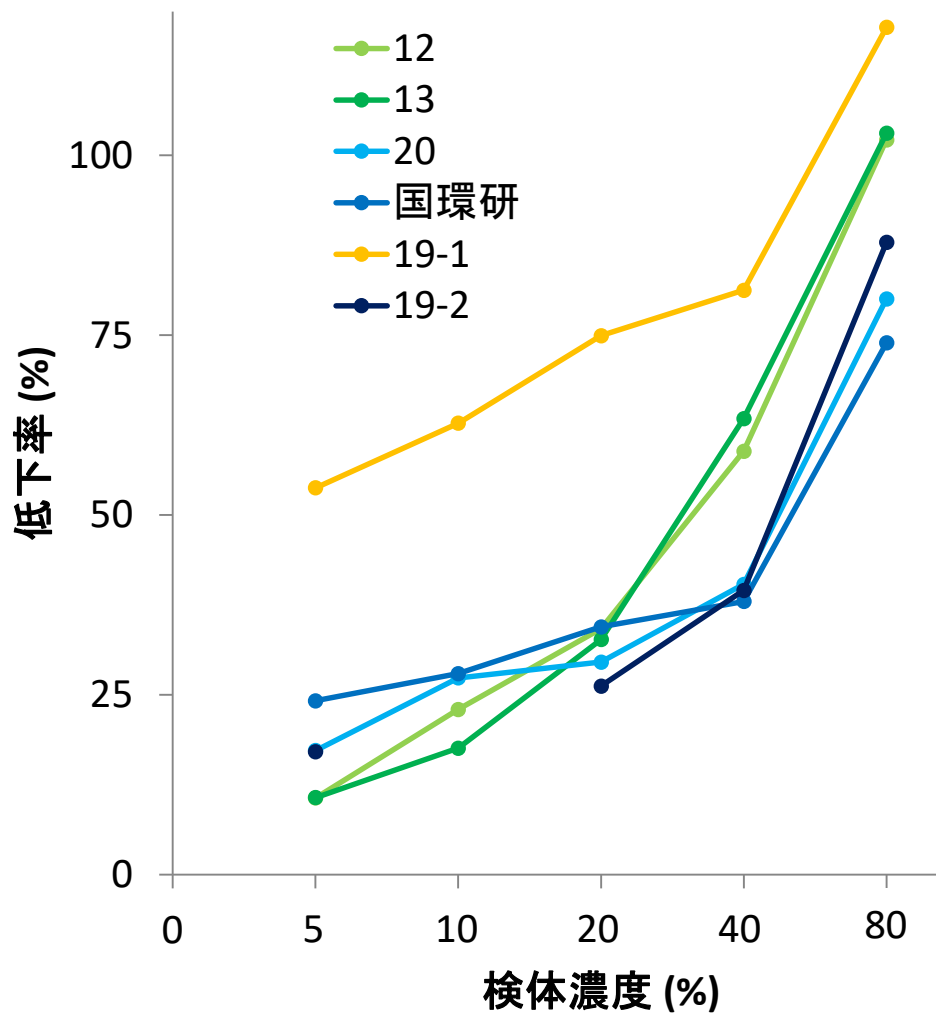
培養

24時間



遅延発光計測用
高感度ルミノメータ

発光量の増加速度の低下率による評価結果



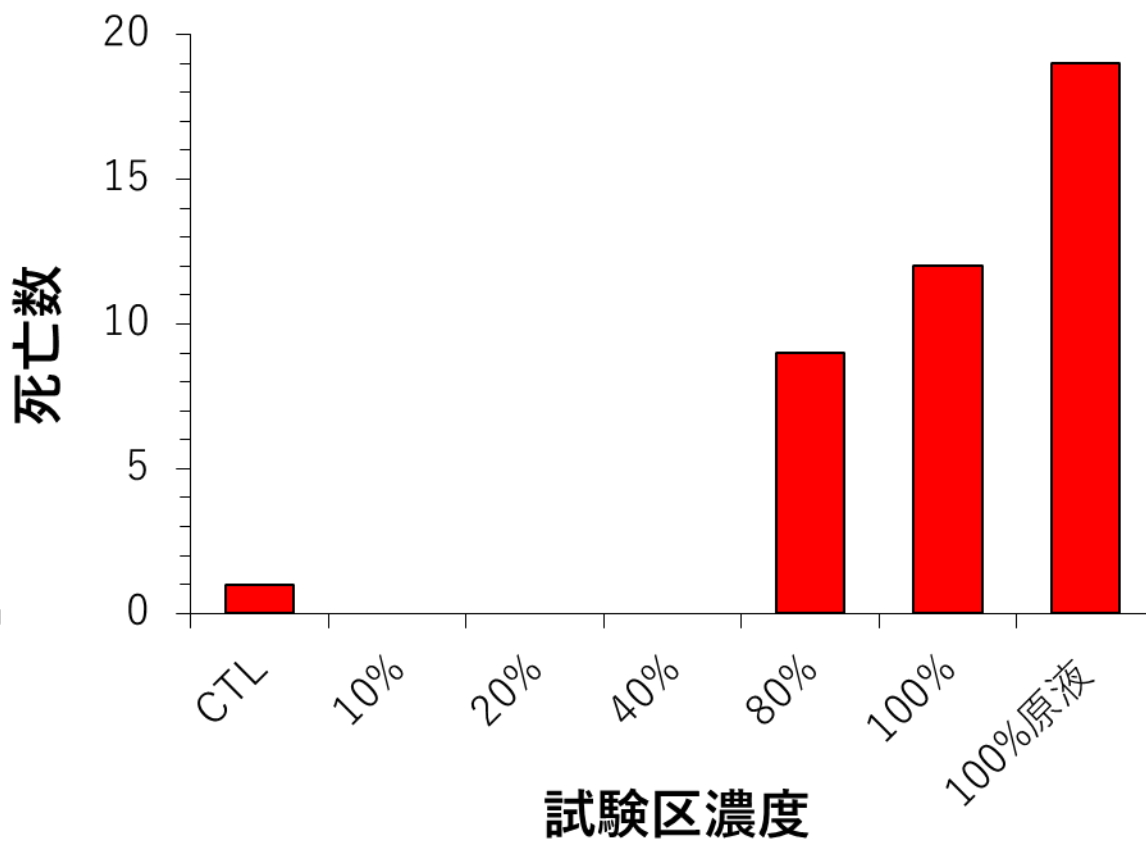
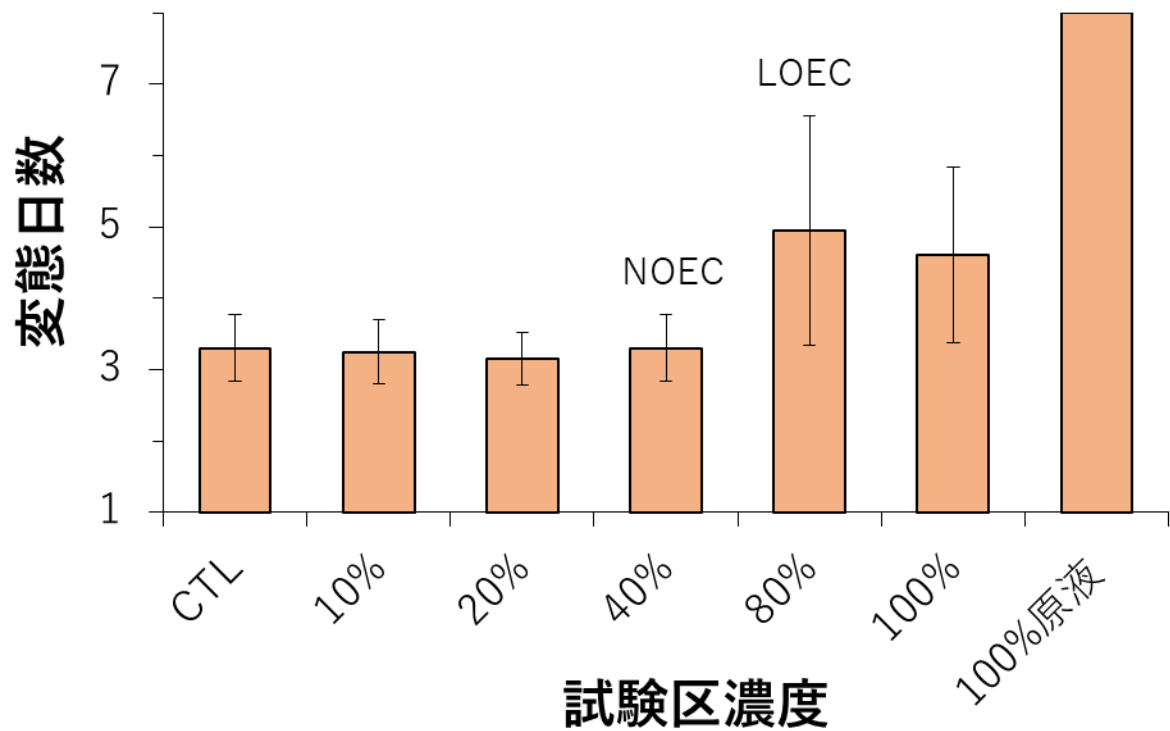
試験機関	EC ₅₀	EC ₁₀	NOEC
12	23.5	3.0	<5
13	23.7	7.0	<5
20	35.0	3.7	<5
国環研	19.5	3.5	<5
19	5.2	0.5	<5
平均	25.4	4.3	-
CV%	26.2	42.7	-
国環研 海産ラン藻	25.9	8.4	10

※19の結果は19-1のデータを使用
平均, CV%は19を除外して計算

シオダマリミジンコ (試験機関 8)

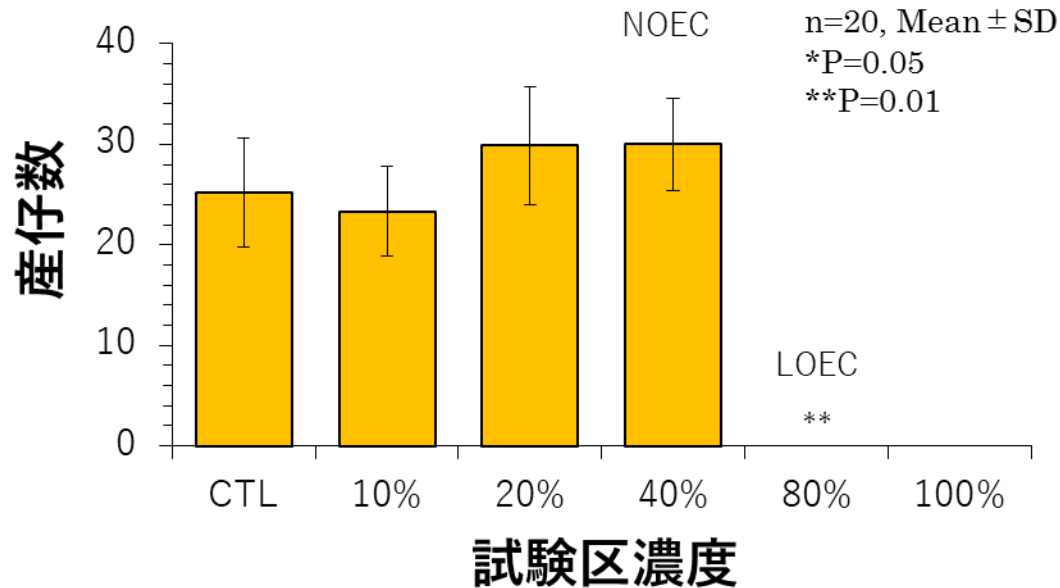
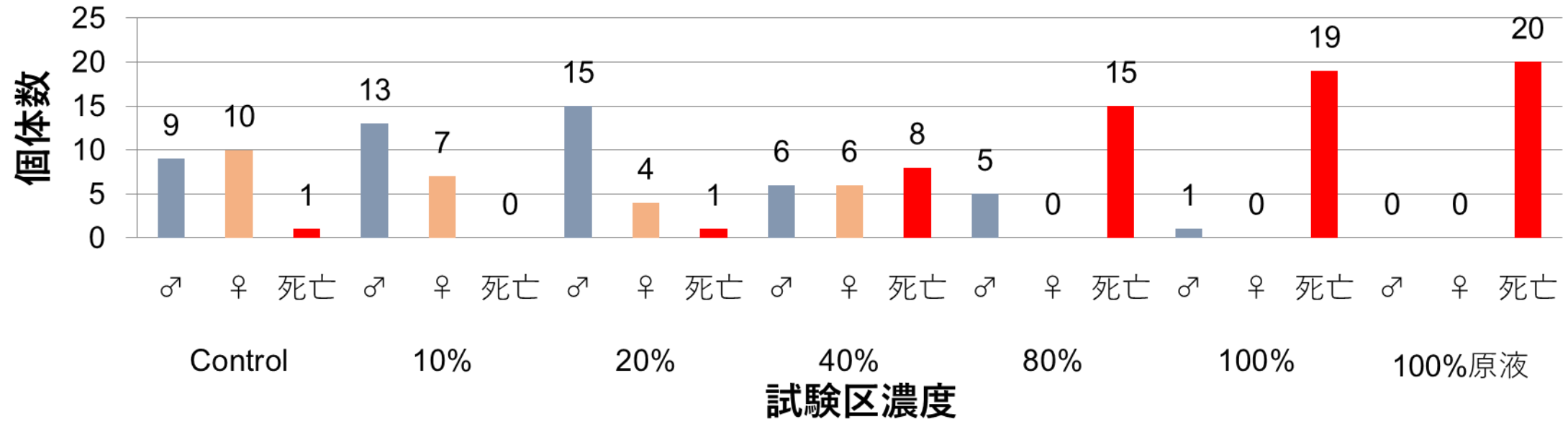
ノープリウス期

n=20, Mean \pm SD *P=0.05 **P=0.01



シオダマリミジンコ (試験機関 8)

コペポッド期



	NOEC (%)	TU	EC50 (%)	EC10 (%)
シオダマリミジンコノープリウス期変態 日数	40	2.5	>80	-
シオダマリミジンコペポッド期 産仔数	40	2.5	54.4	-

Microtox, ホソタマミジンコ急性毒性試験,オオミジンコ急性毒性試験,ヨコエビ急性毒性試験

試験機関		LC50 (%)	EC50 (%)	EC10 (%)
3	Microtox	N.D	>80	N.C
11	オオミジンコ急性毒性試験(TG202)	N.D	>80	74.0
15	オオミジンコ急性毒性試験(TG202)	N.D	>80	>80
16	ホソタマミジンコ遊泳阻害試験	N.D	>80	26.5
16	ヨコエビ急性毒性試験	N.D	>80	60.2
16	ゼブラフィッシュ胚期急性毒性試験	>80	11.4 [※]	N.C
19	オオミジンコ急性毒性試験(TG202)	N.D	>80	>80
国環研	Microtox	N.D	>80	>80
国環研	ヨコエビ急性毒性試験	N.D	>80	>80

※生存個体数に対する未孵化率

Part2の生態影響試験 まとめ

試験機関		NOE C (%)	TU	EC50(%)	EC10(%)
3	Microtox	N.D	N.D	>80	N.C
6	クロロフィル蛍光量	5	20	>80	22.3
8	シオダマリミジンコノープリウス期変態日数	40	2.5	>80	>80
8	シオダマリミジンコペポッド期産仔数	40	2.5	54.4	N.C
11	オオミジンコ急性毒性試験(TG202)	N.D	N.D	>80	74.0
12	藻類遅延発光	<5	>20	23.5	3.0
12	藻類遅延発光	<5	>20	N.C	N.C
12	藻類遅延発光	<5	>20	N.C	N.C
13	藻類遅延発光	<5	>20	23.7	7.0
15	オオミジンコ急性毒性試験(TG202)	N.D	N.D	>80	>80
16	ホソタマミジンコ遊泳阻害試験	N.D	N.D	>80	26.5
16	ヨコエビ急性毒性試験	N.D	N.D	>80	60.2
16	ゼブラフィッシュ胚期急性試験 ※	N.D	N.D	>80	>80
19	オオミジンコ急性毒性試験(TG202)	N.D	N.D	>80	>80
19	藻類遅延発光	<5	>20	5.2	0.5
20	ヒメダカ	>80	<1.25	>80	73.1
20	藻類遅延発光	<5	>20	35.0	3.7
23	キートセロス マリンアートSF-1	10	10	57.5	N.C
23	キートセロス Lyman and Fleming	N.D	N.D	N.D	N.D
23	スケルトネマ マリンアートSF-1	10	10	56.5	N.C
23	スケルトネマ Lyman and Fleming	N.D	N.D	N.D	N.D
23	シオダマリミジンコ マリンアートSF-1	N.D	N.D	N.D	N.D
23	シオダマリミジンコ Lyman and Fleming	N.D	N.D	N.D	N.D
24	ヒメダカ	100	1.0	>80	<5
24	ジャワメダカ①27°C8時間	33.3	3.0	17.1	<4.13
24	ジャワメダカ②5日間人工海水	33.3	3.0	19.8	4.35
24	ジャワメダカ③排水暴露後人工海水	66.6	1.5	45.4	16.0
26	Pseudokirchneriella subcapitata NIES-35	N.C	N.C	>80	14.5
26	Navicula pelliculosa UTEX-B673	N.C	N.C	>80	43.1

N.D: No data, N.C: No calculation※ ふ化遅延あり

国環研試験

試験法	EC50	EC10	NOEC (%)	TU
ヨコエビ急性毒性試験	>80	>80	80	1.25
OECD TG203 (100%のみの限度試験)	N.D	N.D	N.D	N.D
メダカビテロジェニンアッセイ	N.D	N.D	N.D	N.D
海産藻類生長阻害試験	60.8	9.75	<5	>20
藻類遅延発光法(ムレミガヅキモ)	19.5	3.5	<5	>20
藻類遅延発光法(海産ラン藻)	25.9	8.4	10	10
Microtox試験	>80	>80	>80	<1.25
ホウネンエビ亜致死毒性試験(RAPIDTOXKIT F)	<80	<80	<80	>1.25
ホウネンエビ急性毒性試験(THAMONOTOXKIT F)	N.D	N.D	N.D	N.D
ツボワムシ急性毒性試験(Acute ROTOXKIT F)	<5	<5	<5	>20
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
繊毛虫慢性毒性試験(Chronic PROTOXKIT F)	N.D	N.D	N.D	N.D
カイミジンコ亜慢性毒性試験	N.D	N.D	N.D	N.D
海産珪藻類生長阻害試験(MARINE ALGALTOXKIT)	>80	>80	10	10
シオミズツボワムシ急性毒性試験(Acute ROTOXKIT M)	18.8	7.98	N.D	N.D

分析(ICP-AES)

測定機器: ICPE-9820
(光測定方向: アキシャル)

一律排水基準(環境省)を超える金属はなし

単位 : ppm (μg/ml)

元素	As	B	Cd	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	P	Pb	Se	Zn
波長(nm)	193.759	249.773	214.438	267.716	324.754	238.204	259.373	231.604	178.287	220.353	196.090	213.856
定量下限値 (ppm)	0.05	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.1	0.02	0.05	0.005
定量上限値 (ppm)	75	25	5	25	10	5	5	2	100	100	100	5
control	N.D	0.035	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0.022
模擬排水	N.D	0.019	N.D	N.D	0.62	0.0054	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0.01
一律排水基準	0.1	10	0.03	2	3	10	10	-	16	0.01	0.1	2

発光細菌毒性	hER活性	medER活性	AhR活性	CAR活性	TR活性	RAR活性	備考
(1/IC50;CR)	ppt as E2	ppt as E2	ppt as b-NF	ppt as OP	ppt as T4	ppt as ATRA	
0.041	n.d.	238	1,141	13,455	n.d.	n.d.	活性測定用に精製した画分
0.021	n.d.	n.d.	n.d.	420	n.d.	n.d.	活性を阻害する物質が溶出している画分

- in vitroバイオアッセイの結果から、強いCAR（構成的アンドロスタン受容体）結合活性が認められた。
- 同活性が強い物質は、例えばp-t-オクチルフェノール、p-ノニルフェノール、p-クミルフェノール、フタル酸ベンジルブチル等多数。
- hER, RARに陰性且つmedER, AhR, CAR陽性の物質としては、インドール-3-カルビノール、ケルセン、2,2'-ジヒドロキシ-4,4'-ジメトキシベンゾフェノン、1-ヒドロキシピレン、2-シクロペンチルフェノールが挙げられる。
- このうち、発光細菌毒性を示すのはインドール-3-カルビノールと2-シクロペンチルフェノール。
- 複数の物質がそれぞれ異なる影響の原因となっていると思われる、物質の同定は困難。

hER陽性物質のスクリーニング分析（LC-TOF）結果

- Estrone
- 4-bromoestrone
- Zearalenone
- Estriol
- 4-chloroestriol
- p-t-Octylphenol
- Bisphenol A
- 2,4-dibromo-17 α -ethynylestradiol
- 6,8-dichlorogenistein

- in vitroバイオアッセイの結果ではhERは陰性だったが、妨害物質により活性が阻害されているようにもみえたため、hER陽性物質を対象としたLC-TOFによるスクリーニング分析を実施。
- 試料中に存在する可能性がある物質は左記の9物質。
- このうちp-t-オクチルフェノールは約700 ppb 検出。in vitroアッセイのCARでの13 ppbと矛盾。
- 特に黄色文字の物質は環境中に存在しないと思われる、多段階精密質量による確認試験が必要。
- 混合物中の活性要因物質の推定は単なるアッセイ、単なる化学分析では到達できず、ターゲット分析、ノンターゲット分析及び計算科学的解析のセットによる戦略的なアプローチが必要であることを改めて認識。

分析(GC-mass, LC-mass) 試験機関14;北九州大学 門上先生

水生生物に毒性を発現する可能性がある
濃度で検出されたのは4物質

分析法1(GC/MS)二重分析

試料50mL→ジクロロメタン抽出(15mL, 10mL各10min)
→脱水(無水硫酸ナトリウム)→ヘキサン10mL添加
→ロータリエバポレータ濃縮(5mL以下)→5mL定容
→1mL分取→内標準添加→GC/MS-Scan測定→AIQS解析

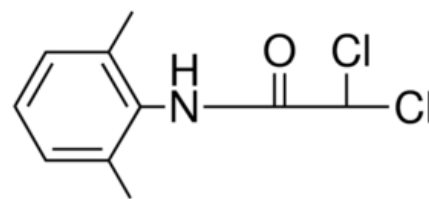
分析法2(LC/QTOF-MS)二重分析

試料50mL→固相抽出(Oasis HLB Plus)
→精製水洗浄(10mL)→空気通気乾燥(40min)
→溶出(MeOH 5mL, バックフラッシュ)
→5mL定容→1mL分取→内標準添加
→LC/QTOF-MS測定(ESI-Positive Mode)→AIQS解析

検出物質	検出濃度 ug/L	全分析結果 ug/L	測定機器
3-&4-ニトロアニソール	680	678, 686	GC/MS
シマジン	180	184, 182	GC/MS
ビスフェノールA	440	473, 415	GC/MS
Cymoxanil	150	160, 144, 149, 134	LC /QTOF-MS

その他:

2,2-Dichloro-N-phenylacetamide→大きなピーク



2-クロロアニリン, 3.2 ug/L,
N-フェニル-アセトアミド, 52 ug/L,
フルトラニル, 0.038 ug/Lなど

まとめと考察

- 海水・淡水、インビボ・インビトロ、急性・慢性の様々な生物試験を用いて、一つのサンプルについての結果を得ることができた。
- 生物試験には対象サンプルに対して得手不得手がある。それはGCで測れるものとLCで測れるものがあるのと同様。しかし、我々はまだ生物試験について機器分析ほどの知見を得ていない。
- 機器分析と生物試験の両輪によって新たな環境懸念物質の存在も明らかになる可能性が示された。
- 是非、第2回、3回とチャレンジテストを続けて、様々なサンプルでデータを蓄積して欲しい。

群盲撫象～我々は知ったつもりになっていたがまだ知らなければならぬことが沢山あるようだ。

*World Stories for
Children* (1916)



「あなた方は皆、正しい。あなた方の話が食い違っているのは、あなた方がゾウの異なる部分を触っているからです。ゾウは、あなた方の言う特徴を、全て備えているのです」