

OECDテストガイドラインのチートシート

Test No. 305: Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure

<https://doi.org/10.1787/9789264185296-en>

Test No. 305のガイドラインには**化学物質が魚の体内にどれくらい蓄積するか**を調べる際に必要な実験条件・解析方法などが書かれています。実験の方法は餌曝露と水曝露の二種類があるけども、水生環では水曝露で実験を行うことが多いので基本的に水曝露についての記述を抜粋しました。高井の主観で抜粋＆記述しているので**詳細は実際のガイドラインを読んでください**(がっとう気合い入れれば1日で読み切れます)。そして、このチートシートはあくまで参考の参考程度にしてください。チートシートは作成しましたが、実験の責任は負いません。「これ読んで実験したら致命的なミスをやらかしちゃったんですけど！なんでこれ書いてないの！」みたいなクレームには爆裂パンチをお見舞いします。

実験デザインの概要

実験は魚に化学物質を曝露する曝露期間と蓄積した化学物質を排出させるための排出期間で構成される。曝露期間は28日間が目安だけど化学物質の蓄積が平衡状態(2日以上の間隔を開けた3回のサンプリングで魚体内濃度が20%以上変動しない状態)になった場合はその時点で打ち切っても大丈夫(アントラセンの場合は7日間程度(メダカ、ジャワメダカ))。排出期間については、曝露期間最終日の蓄積量から95%程度が魚体から排出されるまで観察しないとだめ(アントラセンの場合は5日間程度(メダカ、ジャワメダカ))。

実験条件

水温	水温の変化はプラマイ2℃に抑える。
溶存酸素	飽和溶存酸素量(26℃で淡水の場合は8 mg/L、海水の場合は6.7 mg/Lくらい)の60%以上をキープする。
曝露濃度	- 曝露濃度は慢性毒性が出る濃度以下、もしくは半数致死濃度の1%を目安にする。 - 高濃度を設定する場合は96時間半数致死濃度を急性毒性濃度と慢性毒性濃度の比(急性毒性濃度/慢性毒性濃度)で割った濃度を目安にする。 - 水への溶解度を超えないように濃度を設定する。 - 曝露期間においては曝露物質の濃度を測定値プラマイ20%でキープする。 - 試験物質を含まない処理区(対照区)を設置する。
魚の状態	- 健康な魚(メダカの場合は全長3–5 cmが推奨)を選び、二週間前から試験時の水温と餌量に慣らせておく。 - 同じ年齢、成長具合の魚を使用し、一番小さな魚の体重が一番大きな魚の体重の2/3以下にならないようにする。

	・ 対照区、曝露区ともに致死率(病気率)が10%以下。
実験道具	化学物質の溶出が起きない材質(ガラス、ステンレス等)の実験器具を使用する。
飼育水	化学物質のコンタミが起きていない水を使用する。ミネラルなどを補充する場合はその量をしっかり記録しておく。使用した水のpH、硬度、全固形物(粒子濃度)、全有機体炭素を測定・記録し、できればアンモニウム濃度、窒素、アルカリ性も記録する(海水の場合は塩分濃度も)。
曝露物質	可能であれば水に溶解させたものをストック溶液として使用し、できるだけ溶媒や分散剤は使用しない。溶媒を使用する場合はアセトン、エタノール、メタノール、ジメチルホルムアミド、トリエチレングリコールを使用し、分散剤はTween 80、メチルセルロース、HCO-40(硬化ヒマシ油)を使用する。 <u>溶媒の濃度は100 mg/L(100 µL/L)を超えないこと。</u>
サンプルの数	・ 1回のサンプリングで4匹以上の魚をサンプリングする。 ・ 試験水槽に入れる魚の量は0.1-1 g-body weight/Lを超えないようにする(メダカだと2-3尾/Lくらい)。
サンプリング	・ 水のサンプリングは魚のサンプリングと同時(餌やり前)に行えばOK、ただもっと頻繁にやっても良い。 ・ 魚は曝露期間5地点、排出期間4地点でのサンプリングを目安にし、全長と体重も測定する。 ・ 基本的にサンプルはその日のうちに測定する(平衡状態に達したことを確認するためにも)。どうしてもその日のうちに測定することが困難な場合は適切な方法(化学物質が安定する方法)で保管すること。
餌	・ 馴化および試験期間の餌は脂質含量やタンパク質含量が分かるものを使用し、魚体重の1-2%量を毎日あげる。 ・ サンプリングによって水槽内の魚の数が増えたら、その数に合わせて餌の量を調節する(事前にスパーテル1杯分の粉餌がメダカ何匹分みたいな計測をしておく調整しやすい)。 ・ 食べ残しや糞は毎日掃除する(餌やり後の30-60分後くらいが目安)。
明暗周期	明期は12-16時間が推奨。
水質のチェック	溶存酸素と塩分濃度は曝露期間中に少なくとも3回(曝露開始時、曝露期間半ば、曝露期間最終日)測定し、排出期間は少なくとも1週間に1回。全有機体炭素は試験開始前(魚を入れる前)に測定する。水温は毎日、pHは曝露期間および排出期間それぞれの開始時と終了時に測定する。

データの解析

● 生物濃縮係数(Bioconcentration Factor、BCF)の計算

時系列で体内濃度をプロットし、曝露期間中に平衡状態(steady-state)に達した場合、以下の式(Eq. 1)で BCF_{ss} (the steady-state BCF)を計算する(C_f : 平衡状態の魚の平均体内濃度、 C_w : 平衡状態の化学物質の平均水中濃度)。水中濃度は単純な平均ではなく、時間加重平均を採用するとより良いらしい。

$$BCF_{ss} = \frac{C_f}{C_w} \quad (Eq. 1)$$

平衡状態に達していない場合は曝露期間および排出期間のデータでフィッティングを行なって BCF_K (the kinetic BCF)を計算する(フィッティングの方法は後述)。基本的に BCF_{ss} と BCF_K は下記の計算で同じくらいの値になるはず。

曝露期間の平衡状態においては取込と排出が釣り合っている状態なのでEq. 3より

$$\begin{aligned} k_1 \times C_{w-ss} &= k_2 \times C_{f-ss} \\ \frac{C_{f-ss}}{C_{w-ss}} &= \frac{k_1}{k_2} \\ BCF_{ss} &= \frac{k_1}{k_2} = BCF_K \end{aligned}$$

という感じ。

● 取込速度定数(k_1)および排出速度定数(k_2)の計算

生物への蓄積は以下のパラメータを使用して計算される。

	説明
k_1	取込速度定数 ($L \cdot kg^{-1} \cdot day^{-1}$)
k_2	排出速度定数 (day^{-1})
k_g	成長定数 (day^{-1})
k_m	代謝定数 (day^{-1})
k_e	排泄定数 (day^{-1})
C_w	化学物質の水中濃度 ($mg \cdot L^{-1}$)
C_f	化学物質の体内濃度 ($mg \cdot kg^{-1}$ wet weight)

魚への化学物質の蓄積は以下の式(Eq. 2)で表される。

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \times C_w - (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \quad (Eq. 2)$$

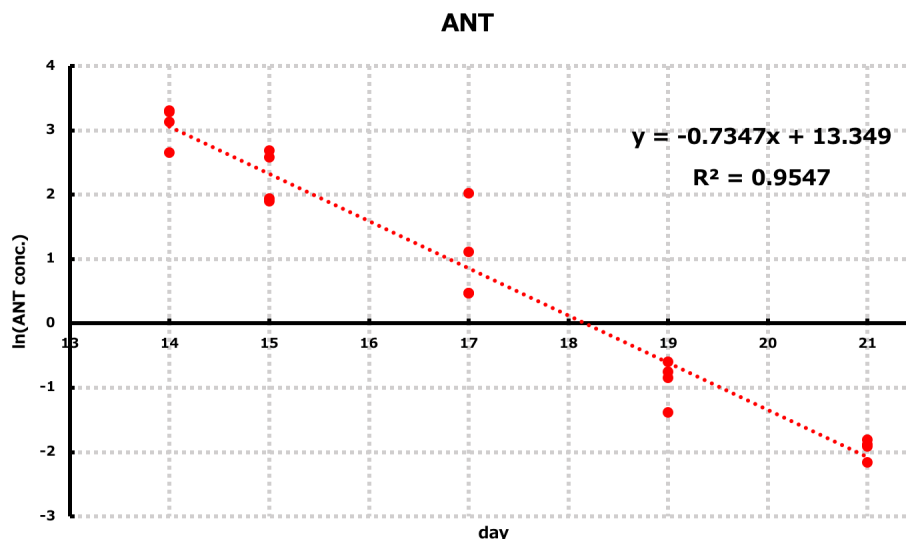
メダカの場合は k_g 、 k_m 、 k_e は無視できる(と思っている)ので

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \times C_w - k_2 \times C_f \quad (Eq. 3)$$

こんな感じの式(Eq. 3)になる。この式(Eq. 3)で計算を行うためには排出速度定数(k_1)と取込速度定数(k_2)が必要になるので、実験データを使用して排出速度定数(k_1)および取込速度定数(k_2)を求める。

○ 排出速度定数(k_2)の求め方

排出期間の体内濃度を自然対数にして、体内濃度と時間を線形回帰で分析する(下のグラフのような感じ)。で、回帰式の傾きが k_2 になる(下のグラフの例だと k_2 は0.735)。



o 取込速度定数(k_1)の求め方

曝露期間中の体内濃度を以下の式にフィッティングして k_1 を求める。 k_2 は上記で求めた値を使用する。 $C_f(t)$ と $C_w(t)$ は時間 t (day)における体内濃度と水中濃度。

$$C_f(t) = C_w(t) \times \frac{k_1}{k_2} \times (1 - e^{-k_2 t}) \quad (\text{Eq. 4})$$

ここで求めた k_1 、 k_2 を使用してグラフを描いてみて、実測値と同じような挙動になるかを確認する。全然ダメダメじゃんってなったら、以下の方法を試してみる。

● 上記の方法でダメダメフィッティングだった場合の対処法

以下の式でフィッティングを行って k_1 、 k_2 を求めてみる(t_c は曝露期間最終日)。

$$C_f = C_w \times \frac{k_1}{k_2} \times (1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad (\text{Eq. 5}) \quad C_f = C_w \times \frac{k_1}{k_2} \times (e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t_c < t \quad (\text{Eq. 6})$$

● 濃度依存の判断

複数の濃度区で実験を行った場合、各濃度区での取込速度定数/排出速度定数がプラマイ20%以内であれば濃度依存的な蓄積はないと判断。それ以上であれば濃度依存。

● 疎水性($\log K_{OW}$)を使用したパラメータの予測方法

化学物質の疎水性($\log K_{OW}$)がわかっている場合、以下の二通りの方法で k_2 を予測することができる(ただし、 $\log K_{OW}$ が3以上の場合)。

一つ目の方法は以下の式で k_2 を求める。

$$\log \log k_2 = 1.47 - 0.414 \log \log K_{OW} \quad (\text{Eq. 7})$$

二つ目の方法は以下の式(W は魚の体重(g wet weight))で k_2 を求める。

$$k_1 = 520 \times W^{-0.32} \quad (Eq. 8) \quad BCF = 10^{(0.910 \times \log \log K_{ow} - 1.975 \times \log \log (6.8 \times 10^{-7} \times K_{ow} + 1) - 0.786)} \quad (Eq. 9) \quad k_2 = \frac{k_1}{BCF} \quad (Eq. 10)$$

上記で求めた k_2 および以下の式を使用すると平衡状態になるまでの時間(day)を予測することもできる。例えば平衡状態の95%に達するまでの時間は

$$t_{95} = \frac{-\ln(0.05)}{k_2} = \frac{3.0}{k_2} \quad (Eq. 11)$$

こんな感じ。平衡状態の80%に達するまでは

$$t_{80} = \frac{-\ln(0.20)}{k_2} = \frac{1.6}{k_2} \quad (Eq. 12)$$

という感じになる。実験計画を立てる時の参考になるかも。

最後にもう一度だけお伝えしておきます。このチートシートは高井の主観で抜粋&記述しており、**僕の書き漏れや解釈ミスがないとも言いきれません**。ですので、**実際に実験を行う際は本物のガイドラインにさらっとでも目を通しておいください**。このチートシートである程度概要が把握できていれば英文ガイドラインでもそこまで苦にはならないと思います(ガイドラインなのでかなり優しい英語で書かれています)。

== 本物のガイドライン =====

OECD (2012), Test No. 305: Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264185296-en>.

=====