

## 底質添加によるユスリカ毒性試験について

### 1. はじめに

#### 1.1 背景

化学物質の中で難水溶性物質については、もっぱら水中で生活する生物種を用いた試験ではその影響を正確に把握できない場合が多い。また、そのような化学物質は環境に放出された場合には、その物理化学的性状から水中の浮遊粒子や底質粒子に吸着する事が予想される。環境中では加水分解・光分解・生物的分解などで消失するが、分解速度よりも負荷が多ければ結果として底質に蓄積する。一定濃度を超過して蓄積すれば、底質および底質表面に生息する生物群に有害な影響を与えることになる。

このような認識のもとに、OECD は 1991 年 5 月に底質中の化学物質の影響評価に関するワークショップを開催し、次の 3 つの方法を適用すべき手法として選定した (OECD, 1992<sup>1)</sup>)。これらは、底質の間隙水中の化学物質濃度が毒性に関与し、底質中濃度よりも関連が大きいとの Ziegenfuss et al.(1986)<sup>2)</sup>の指摘を受けてのものである。その 3 つの手法とは以下のようなものである。

#### 1) 底質 - 水平衡分配(EP)法

底質を含む水系に流入した化学物質(ここでは有機物)は、難分解性かつ低揮発性の場合は、底質中の有機炭素と水(上層水および底質粒子の周りにある間隙水)との間の平衡常数に従い両者への分配が起こる。

底質-水分配係数  $K_{sw} = C_s/C_w$

$C_s$  ; 底質中の化学物質濃度

$C_w$  ; 上層水もしくは間隙水中の化学物質濃度

ここで、 $K_{sw}$  は対象としている有機物質がイオン性でない場合には、 $K_{ow}$  (オクタノール - 水分配係数) と底質中の有機炭素量( $f_{oc}$ )の積と見なしてよい事が知られている。

$$K_{sw} = K_{ow} * f_{oc}$$

ただし平衡に達するまでの時間は、底質を構成する底質粒子の粒度分布によってことなり、砂質のように比較的荒いものの方が泥質より平衡に達する時間は短い (Permeability の違い)。つまり底質への有機物質の移動は底質に添加した場合は、底質から間隙水を通して上層水に移動し、逆に上層水に添加した場合は底質および間隙水に移動するが、平衡状態では上層水濃度と間隙水濃度は同じなり、底質濃度は各物質の  $K_{sw}$  値により決定される。

ここで底生生物と水生生物の薬剤感受性が同じであると仮定すると、水生生物の LC50 値などの毒性値から底質の毒性値が換算される。この場合、便宜的に底質中の有機炭素含量は 5 % として計算する事が普通であるが、実際には評価すべき底質の有機炭素量を使

用することになる。

この手法は、非イオン性有機化学物質に適用できるが、もし適当な分配モデルがあれば、その他の物質群に対しても有効である。

## 2) 間隙水法

もし物性が明らかでない等の理由で EP 法が適用できない場合でも、間隙水中の化学物質濃度が実測できる場合は、同様の方法で底質の評価が可能である。手法としては底質に化学物質を添加して水と底質との間の分配平衡が成立した後に、遠心分離等の方法で間隙水中の化学物質濃度を測定するもので、ごく単純な試験系である。しかし上述の通り、底質の有機炭素含量が結果に大きく関与する事からどのような底質を用いるかで左右される。間隙水中の濃度を水中生物の毒性値と比較する点は同じである。

## 3) 底質毒性試験法

上記2法では評価し得ない物質については、さらに実験的に底質環境を作り、その中に被検物質を添加した試験を行う必要がある。この時点では、公定試験法は存在せず、後に制定された US-EPA(1994)<sup>3)</sup>のもとになった試験手法を検討し新たな試験法の開発・ガイドライン化を行う事となった。

## 1.2 OECDのテストガイドラインの制定

1994年に設置された底質毒性試験法ガイドライン制定のための専門家グループはドラフトガイドライン案(1998ドラフト)をまとめ各国に示した。この案は各国に回覧されるとともに公表(コメントの募集)され、翌2001年5月のWNT会合ではじめて論議された。以後、数次の修正が行われ、2003年月のWNT会合で合意し、2004年4月に採択された。

初期ドラフトからの変更点は次の通りである。

- (1) *Chironomus yoshimatsui* (和名:セスジユスリカ)の追加と試験水温, 餌量など, 本種に特異的な試験条件の加筆。
- (2) 通気量, 対照区での最低羽化率(試験の妥当性クライテリア)の変更
- (3) 被験物質と人工底質を混合し上層水を加えてから試験開始までの期間
- (4) 上層水の硬度の上限の設定
- (5) 被験物質のLogKowが5より大きい場合の試験手順の追加, その場合に餌として使用する植物粉末に関する事項の追加
- (6) 人工底質の構成要素に関する一部記述の削除
- (7) 試験のエンドポイントに関する一部記述の削除
- (8) 試験データの統計処理に関する全面的な見直し

### 1.3 我が国の取り組み

環境省は 2001 年に底質毒性試験法に関する調査に着手し、国立環境研究所をはじめ国内試験機関とともに 2 回の国内リングテストを行ってきた。その成果は、化審法における底質添加によるユスリカ毒性試験の策定に反映されている。ただし、この試験法は OECD での採択前に作成され、また環境省の検討調査が終了する前であったため詳細については、本報告、その他の文書が参考になるはずである。

### 2. 底質試験法の手順

ここで紹介する手順は、2003 年度に環境省が行った、吸着性化学物質 (LogKow>5) の国内リングテストのための試験手順である。試験を行った物質はペンタクロロフェノール (PCP) で、実際の試験はここで示す手順書をもとに物質の特性を考慮して行われた。各試験機関からの報告書は別添 1 ~ 4 の通りである。

---

---

#### OECD テストガイドライン 218 における難水溶性物質の試験手順書

2004 年 6 月

#### 本手順書の適用範囲

OECD テストガイドライン 218 は同 219 とともに 2003 年 5 月の WNT 会合で合意をみた。この後、Joint Meeting の承認後さらに OECD 理事会の承認を受け、2004 年 4 月に採択されている。本手順書は Joint Meeting に提出される予定の文書に基づいて作成した。本試験法については 2002 年の WNT 会合ですでに大筋が合意されており、この時点でのドラフトに従って 2002 年度は 3 つの国内試験機関の参加のもとに国内リングテストを被験物質としてピレンを用いて実施した。ただし最終的に採択されたガイドラインとは細部の規定が異なる部分があり結果的にはテストガイドラインに正確に従うものではなかった。

本試験手順書は、テストガイドライン最終案に基づくとともに同文書で規定している被験物質が 5 以上の Log Kow 値を有する場合の試験法についての手順を示すもので、2002 年度に実施した手法とは異なるものである。ユスリカを用いた底質毒性試験は、国の内外ともに例が少なく同テストガイドラインに従う試験の問題点の抽出とその対応策を検討しておく事は緊急の課題である。

#### (2003 年度国内リングテストのための手順書)

ここに示す手順は、現時点で最も望ましいと考えられるものを記述したものであり、TG 最終案に従いつつ必要に応じて改善を重ねていくべきものである。また本手順書は、試験

手順をもれなく記述するものではなく、記述のない部分は TG 最終案を参照することとする。これらの性格を有するため、本手順書による試験は検討のためであり、非 GLP 試験を想定している。

#### 1. 使用する生物種

*Chironomus yoshimatsui* (和名セスジユスリカ) を試験生物として使用する。

独立行政法人国立環境研究所で保有する感受性系統(起源は栃木県日光市湯元産)を試験生物として使用することとし、同研究所より無償で卵期(発送時で産卵後 24 時間以内)のものが配布される。

#### 2. 被験物質の選定

物性が logKow 値が 5 より大きい物質で可能な限り TG 最終案の REFERENCE SUBSTANCES(Paragraph 9)に記載された 5 物質 (lindane, trifluralin, pentachlorophenol, cadmium chloride and potassium chloride) から選定するが、この限りではない。

#### 3. 観察すべき事項

最も重要なエンドポイントは羽化率とし、Probit 法 または 直線回帰法による EC50 値および TG 最終案の示す方法で NOEC 値を求める。ただし、観察日毎の羽化個体数(雌雄別)および環境条件等試験結果の解析に必要なデータを記録する。

特に、試験の妥当性クライテリアである、次の点を明らかにするデータは必ず求めること。

- (1) 対照区での羽化率が最低でも 70% であること。
- (2) 対照区での羽化が試験開始 12 日から 23 日にあること。
- (3) 試験終了時にすべての試験容器の pH および溶存酸素濃度を計測すること。  
およびそれらは溶存酸素は飽和濃度の 60% 以上、pH は 6 以上 9 以下であること。
- (4) 試験水温は適当な間隔をおいて定期的に測定し、温度の変異は  $\pm 1$  以内であること。

#### 4. 試験方法

##### 4.1 試験環境

照明：光周期 16L8D

水温：23 ~ 25  $\pm$  1      試験期間中および全試験容器の水温が上記の範囲内にあること

pH：実験スタート時点で 6 ~ 9 の範囲

硬度：上層水の硬度は 250 以下 (CaCO<sub>3</sub> 換算で 250mg/L 以下)

DO：ごく弱い通気を行い、溶存酸素濃度を飽和濃度の 60%以上に保つ。

濃度段階 5 以上 (対照区は別) 公比 2 以下、各濃度とも繰り返し数 4 以上、幼虫密度 20 個体/容器 (羽化率および死亡率が 5 ~ 95%の濃度区を 3 以上得ること)

(例) 濃度段階数 7

対照区 1

繰り返し数 4

濃度測定用追加分 2 濃度 × 4 (測定可能ならば減らしてもよい)

40 容器 / 試験

4.2 試験容器 直径 8 cm 前後の円筒形ガラス容器を用いる。

4.3 底質 人工底質を用いる。

その調製法は以下のとおりとする。

1) *Sphagnum* spp. のピートモス (pH 無調製) を乾燥する。

ピートモス (粉末) は独立行政法人国立環境研究所が一括購入し、試験機関に配布する。

2) 乾燥したピートモスを粉碎し、オープニング 250μm の篩を通す。

3) 粉末になったピートモスの重量を測り、所定量をガラス容器に移し、少量の純水で練り、均一にペースト状にする。

4) 全量をガラス製三角フラスコ (ビーカーも可) に希釈水 (上層水として用いる水) を加えながら移し所定量とする。

5) マグネットスターラーで 2 日間攪拌する。

6) 静置して沈殿した画分を用いる。

7) ピートモス (上記) を乾燥重量で 5 % 量, 試薬級のカオリン (和光純薬製) を 20 % 量, 石英砂 (メルク社、Quarz, fine granular, [1.07536.1000](#)) を 75 % 量, および植物粉末を 0.5% から 1% の範囲を容器に入れ, さらに, ここで石英砂に吸着させた被験物質 (後述) を十分に混合する。

8) 希釈水をごくゆっくり所定量 (水深で底質の 4 倍量) まで入れる。この際, 混合した人工底質のコンポーネントの混合状態をくずさないようにする。必要ならばここで pH の調製を行う。

(注意) ピートモス, カオリン, 石英砂および植物粉末は, 国立環境研究所が一括購入し各試験機関に配布する。

#### 4.4 石英砂への被検物質の吸着

- (i) 石英砂を1試験容器当たり10gをガラス製シャーレにとる。
- (ii) アセトン(10g当たり1ml以下;同一濃度区の繰り返しの方も同時に行うので、繰り返し4の場合は40g)に溶かした被検物質を先細のガラス製ピペットで石英砂全体に注ぎ、直ちにステンレス製薬さじで混合する。
- (iii) ドラフトの中に放置してアセトンを蒸発させて除去する。
- (iv) 10gずつ分けて、上記8)に加える。

#### 4.5 試験手順

- 9) 通気用のガラス製(ステンレス製でも可)の管(パスツールピペット)を底質表面から3-4cmの位置にセットし、通気して7日間放置する。
- 10) 実験開始時点の水質測定を行う。

全容器    pH、DO、水温

対照区、最高濃度区                      アンモニア濃度、硬度

被検物質濃度：最高濃度区およびより低いいずれかの1濃度区の濃度を測定する。

上層水：底質を乱さないように上層水のサンプルを一部または全量採取する。

間隙水：底質を遠心分離して(または他の適当な方法で)間隙水を採取する。

底質：間隙水を除去した底質中の被検物質濃度を測定する。

\* なお、被検物質の濃度測定は今回の試験においては、業務範囲外とする。

- 11) 通気を止めて、セスジユスリカ1令幼虫(ふ化後24時間以内)20個体をピペットを用いて試験容器に入れる。
- 12) 次の日に通気を再開する。
- 13) pH、DO、水温については適当な間隔(2回/週)で測定を行う。  
異常行動の観察：底質に潜っていた幼虫が、底質表面や水中にはい出る事があるので、その幼虫数を記録する。  
蒸発した水の補給：蒸留水を加えて水量を一定に保つ。
- 14) 暴露(幼虫投入)開始12日頃  
：対照区ではユスリカは蛹化がはじまる。給餌量に注意。
- 15) 同 14日頃

: 対照区では羽化 ( ) の方が 2 日程度早い) がはじまる。給餌を終了してもよい。

: 観察は毎日行い、羽化および羽化失敗数 ( 雌雄別 ) を記録し、羽化個体は取り除く。

16) 対照区で最後の羽化が観察された日から数えて 5 日経過した段階で実験を終了してよい。ただし最長 28 日間。

17) 試験終了時点の水質測定を行う。項目は 12) と同じ。

18) 被検物質の濃度測定 ( もし行うのであれば次の手順で行う )

最高濃度区およびより低いいずれかの 1 濃度区の濃度を測定する。

上層水: 底質を乱さないように上層水のサンプルを一部または全量採取する。

ガラスシャーレに底質を移し、底質に残った幼虫数と重量を記録する。

間隙水: 底質を遠心分離して(または他の適当な方法で)間隙水を採取する。

底 質: 間隙水を除去した底質中の被検物質濃度を測定する。

## 5 . データの記録と統計処理

01) 羽化個体数 ( 雌雄別 ) を容器毎に集計する。

なお、雌雄で感受性差がないと判断された場合には雌雄を区別せずに以下の統計検定を実施する。

02) 被検物質濃度は実験開始時の底質濃度 ( 底質乾燥重当たりの被検物質重量 )

( NOEC/LOEC の算出 )

03) 羽化率 (  $ER = n_e / n_a$  ): 1 容器当たり羽化数 / 1 容器に入れた幼虫数 : 20 個体 ) を求める。

04)  $ER_{\text{arc}} = \arcsin( ER )$  を求める。

05) 容器毎に  $ER_{\text{arc}}$  を求め、これから適当な ANOVA 法で NOEC/LOEC を求める。

( EC50 の算出 )

06) 容器毎の羽化個体数を求め、2) で求めた被検物質濃度との関係をグラフ化し、濃度 - 反応関係を明らかにする。

07) 対照区の羽化個体数で補正した後に相対羽化率が 5-95% の範囲の濃度区データを用い

\*、濃度 - 反応関係に合った手法\*\*で EC50 値を計算する。

\* この範囲は 20 個体使用しているのので、1 個体でも対照区より少なかった濃度区も

また、1 個体でも羽化した濃度区のデータを用いることとなるが、あくまでも濃度と反応の関係が明らかな場合に適当な回帰式で計算するものである。回帰式の適合度の検定結果も考慮すること。

\*\* 理論的にはプロビット式が適合すると考えられるが、いくつかの手法を試す。

( Development rate )

08) 平均生長時間を求める\* ( 毎日観察する場合 )

$$x = \frac{\sum f_i x_i}{n_e}$$

$f_i$  :  $i-1 \sim i$  日に羽化した個体数  
 $x_i$  :  $1/ (i-1/2) \text{ 1/day}$   
 $n_e$  : 1 容器当たり羽化個体数

\*上記の式で求めるが、国立環境研究所が13年度調査で使用した電子ファイルが利用可能

09) 平均生長時間と暴露濃度に有意な濃度 - 反応関係があるかどうか検定する。あった場合は、

その関係を示すグラフと適当な回帰式を求め、さらに EC50 を求める。

## 6 . レポートについて

以下について報告書において可能な限り記述する。

特に次の点に留意すること

01) 物質情報は文献値を用いてよいが、物質の安定性については実験条件での実測値から安定性について考察すること。

02) 試験生物情報は次の通りであるので参考にすること。

種名 : セスジユスリカ、 入手元 : 独立行政法人国立環境研究所

起源 : 1994 年栃木県日光市湯元で採取された個体を入手元で継代飼育したもの

03) 実験底質は人工底質を用いるものとし、自然底質は不可である。

04) 記述は簡潔に、しかし試験全体が再現できるように行う。

05) 統計処理した場合は、手法名称や結果だけでなく、用いたデータセットを含め途中の経過を用いた統計プログラムの出力データを添付すること。また、結果についての考察を付記すること。

06) 本請負試験の報告は近い将来の試験法の解説作成や GLP に基づく請負調査実施の際の参考にするためのものであるので、試験担当者がテストガイドラインについて

疑問に思ったこと



改善・改変すべきこと

より明確に記述すべきこと（規定しておいた方がよいこと）

その他

について、別項目を立てて報告すること。

---

---

### 3. 予備試験および試験結果の概要

#### 3.1 ペンタクロロフェノール（PCP）の予備試験結果

（方法に関する特記事項）

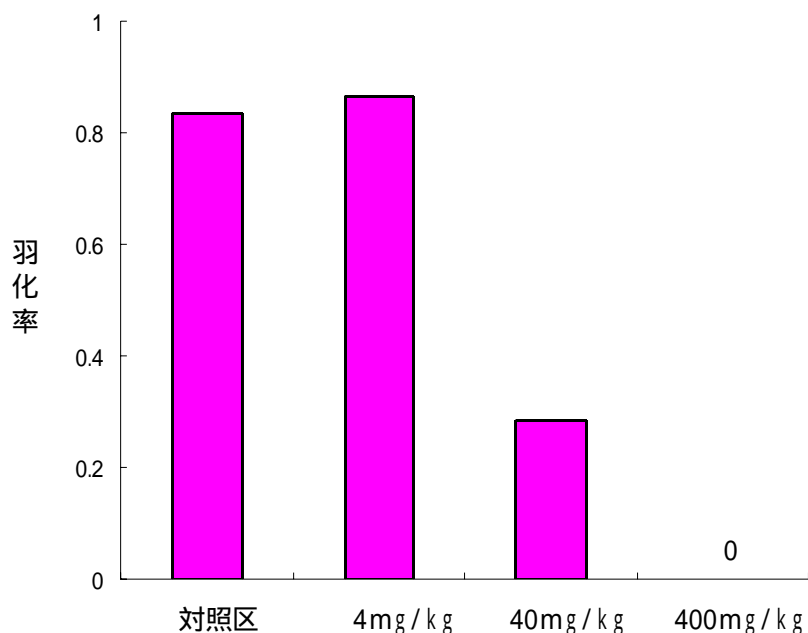
正規試験に先立って、前節に示す試験手順に従って PCP 濃度 0, 4, 40 および 400 mg/kg の 4 段階, 1 濃度区 3 繰り返し（容器）, 1 容器当たりユスリカ 1 日齢（孵化後 24 時間以内）20 個体を用いた試験を行った。用いた植物粉末は無農薬栽培したハウレンソウで同じくピートモスのその成分含有率を（表 1.1）に示す。

最終ドラフトテストガイドラインでは餌として与える植物粉末の量は 0.5% であるがこの試験手順では 1% とした。その理由は、別の試験で餌の不足が羽化に要する期間が著しく延長し、ガイドライン上 28 日間の標準的試験期間を超える可能性があったため、羽化の終了を待つと被験物質の安定性からして試験困難に陥る恐れがあったことによる。

（表 1.1）ペンタクロロフェノールの試験に用いた  
ハウレンソウ粉末とピートモスの分析結果

サンプル名	wt(mg)	N%	C%	H%
ピートモス	3.597	0.58	45.08	6.07
	3.333	0.55	44.99	6.12
	3.066	0.54	45.05	6.19
AVE		0.56	45.04	6.12
ハウレンソウ	9.048	5.82	36.86	3.78
	8.276	5.87	37.06	4.61
	8.770	5.85	36.68	4.05
AVE		5.85	36.87	4.15

( 予備試験結果と考察 )



( 図 1 ) ペンタクロロフェノールの底質毒性試験結果

予備試験の結果を ( 図 1 ) に示す . 暴露は 2003 年 12 月 14 日に開始したが , 12 月 29 日 ( 15 日目 ) から羽化が始まり翌年 1 月 5 日の羽化を最後に羽化がみられなくなったので 1 月 7 日には試験を終了した . 羽化個体は雌雄別に数を数えたが雌雄差がないと仮定し雌雄合計の羽化率を算出し , 図 1 に示す . この図から明らかなように対照区 83 % および 4 mg/kg 区 87 % と同程度の羽化率を示し , 最大無作用濃度はこの試験からは 4 mg/kg , EC50 は 4 mg/kg と 40 mg/kg の間と推定された . この試験では 40 mg/kg では 20 ~ 40 % の羽化率であり平均羽化率は 28 % ( n=3 ) であった . 最高濃度の 400 mg/kg 区では羽化個体はまったく見られなかった .

雌雄差については , 対照区および羽化率で影響がないと判断された 4 mg/kg 区では雌雄の比率がそれぞれ ( オス : メス = 28 : 22 ) および ( オス : メス = 25 : 27 ) とその比率は 1 前後であったが , 羽化率に明らかな影響があった 40 mg/kg では ( オス : メス = 15 : 2 ) と著しくメス個体が少なかった . ここから次の可能性が示唆された .

( 1 ) ペンタクロロフェノールに対する本来の感受性に雌雄差が存在する .

( 2 ) 羽化に要する時間が長いメス個体ではより多く暴露されて羽化が阻害された . つまり , ペンタクロロフェノールはユスリカ体内に蓄積してから影響を発現するため , 生理的な感受性差はないものより多く蓄積したメスに影響がでた .

( 3 ) ( 1 ) と ( 2 ) が複合的に作用した .

( 4 ) ペンタクロロフェノールは間接的にユスリカの生息環境を悪化させ , メスの発育を

著しく低下（羽化に要する時間が延長する）し，試験終了時では未羽化個体が残存していた．

などの理由が考えられる．特に40 mg/kg 区では羽化に要する期間が4 mg/kg 区よりもオス個体でも延長し，総羽化個体数が少ないので統計解析にはなじまないもののその羽化ピークは3～5日間後に現れている．発育速度も阻害している可能性が高い．これらの状況から，濃度40 mg/kg 前後においては羽化阻止率だけでなく，変態速度による影響および感受性の雌雄差についても詳しくみておくことが必要と考えられる．

（予備試験に基づく正規試験の濃度設定）

予備試験結果から判断して4～400 mg/kg の区間で試験を行う事が妥当と考えられたが，（1）40 mg/kg 前後での変態時間への影響を詳しくみる必要があること，（2）ペンタクロロフェノールの最大無作用濃度（NOEC）を算出するために400 mg/kg より低い濃度つまり最高濃度80 mg/kg 程度に設定する事の方が本物質の毒性を明らかにする上で有意義であると判断した．また国内リングテストでの濃度設定は試験結果が前後する場合も考えて，対照区1および暴露区7，暴露濃度2.5から80 mg/kg とした．なお，この設定濃度はリングテストに参加した4つの国内試験機関とも同一で試験を行うよう要請した．

### 3.2 国立環境研究所におけるペンタクロロフェノールの正規底質毒性試験成績

（試験環境 pH）

ペンタクロロフェノールは水中で比較的安定ではあるものの，加水分解を起こす物質である．従って上層水もしくは間隙水の pH は自然環境条件に近い7前後であることが望ましい．高い pH 環境下では自然条件よりもペンタクロロフェノールがより分解される可能性が高いと考えられる．今回の試験においては人工底質の調製初期には上層水での pH は7～8であったが，暴露開始時の2004年2月23日では実測値7.75～8.38（平均値，n=4）であった．7日間の安定化期間の間に上昇したものである．ただし今回は著しく上昇して pH 9を越える事はないと判断して暴露開始時に pH の調製せず試験を開始した．

pH の測定は暴露開始時を含めて週1～2回，合計6回行った．全体として pH 9を越えるような数値は観測されなかったが比較的高い値であった．

（環境条件 溶存酸素濃度）

上層水中の溶存酸素濃度は比較的安定した値が観測された．この試験においては一定流量の通気を行っており，通気が切れないかぎりその水温の飽和濃度の70%程度を維持している．従って人為的なミスや機器のトラブルがない場合は特に変動の大きい，試験結果に影響を及ぼす要因にはならない．

(環境要因 アンモニア濃度)

本試験においてはアンモニア性窒素の起源は窒素固定細菌の活性を別とすれば餌として与えた植物粉末である。すでに過去の調査で検討したとおりピートモスに含まれる窒素はその起源とは考えにくい。植物粉末はドラフトガイドライン上は 0.5 % (底質重当たり) であるが、今回は 2 倍の 1 % を入れた。そのため、植物粉末に由来する N 量は 1 容器当たり  $1.5\text{g} \times 5.8\% =$  約 88mg である。上層水量を 400ml とすると濃度は最大 220mg/L となる。アンモニア濃度の実測値は最大 11.4mg/l であり、用いた植物粉末からアンモニアへ急速に変換されているものとは言えないが、アンモニア濃度は餌とするユスリカ幼虫の活性に比例して濃度は高くなる傾向にあった。アンモニア濃度はそれ自身では毒性の現れる濃度ではないものの、これ以上の上昇は好ましくない (特に高い pH 条件では) と考えられ、植物粉末の量はこれ以上の増加は好ましくなく、また 0.5 % では不足する事が予想されるため最適量の検討が必要である。

(表) ペンタクロロフェノールの正規試験における試験環境データ

pH	2月23日	3月1日	3月4日	3月8日	3月12日	3月15日
対照区	8.21	8.30	8.43	8.54	8.57	8.53
2.5	8.38	8.29	8.42	8.56	8.57	8.57
4.5	8.21	8.29	8.28	8.47	8.53	8.50
8.0	8.01	8.36	8.32	8.47	8.57	8.58
14.2	7.75	8.25	8.16	8.41	8.53	8.58
25.3	7.75	8.30	8.25	8.33	8.44	8.43
45.0	7.75	8.29	8.23	8.37	8.48	8.55
80.0	8.14	8.14	8.13	8.13	8.33	8.38
DO	2月23日	3月1日	3月4日	3月8日	3月12日	3月15日
対照区		5.71	5.66	5.44	6.20	6.43
2.5		5.65	5.59	5.74	6.13	6.56
4.5		5.77	5.44	5.73	6.12	6.30
8.0		6.31	5.66	6.03	6.18	6.58
14.2		6.13	5.06	5.98	6.58	6.75
25.3		6.37	5.67	5.94	6.39	6.25
45.0		6.40	5.52	5.95	6.44	6.54

80.0		6.42	5.63	5.70	6.42	6.13
NH3	2月23日	3月1日	3月4日	3月10日	3月12日	3月15日
対照区			4.30	3.55		
2.5			3.60	1.95		
4.5			5.65	4.15		
8.0			5.70	4.55		
14.2			5.55	6.05		
25.3			7.20	8.00		
45.0			5.85	6.95		
80.0			5.35	5.60		

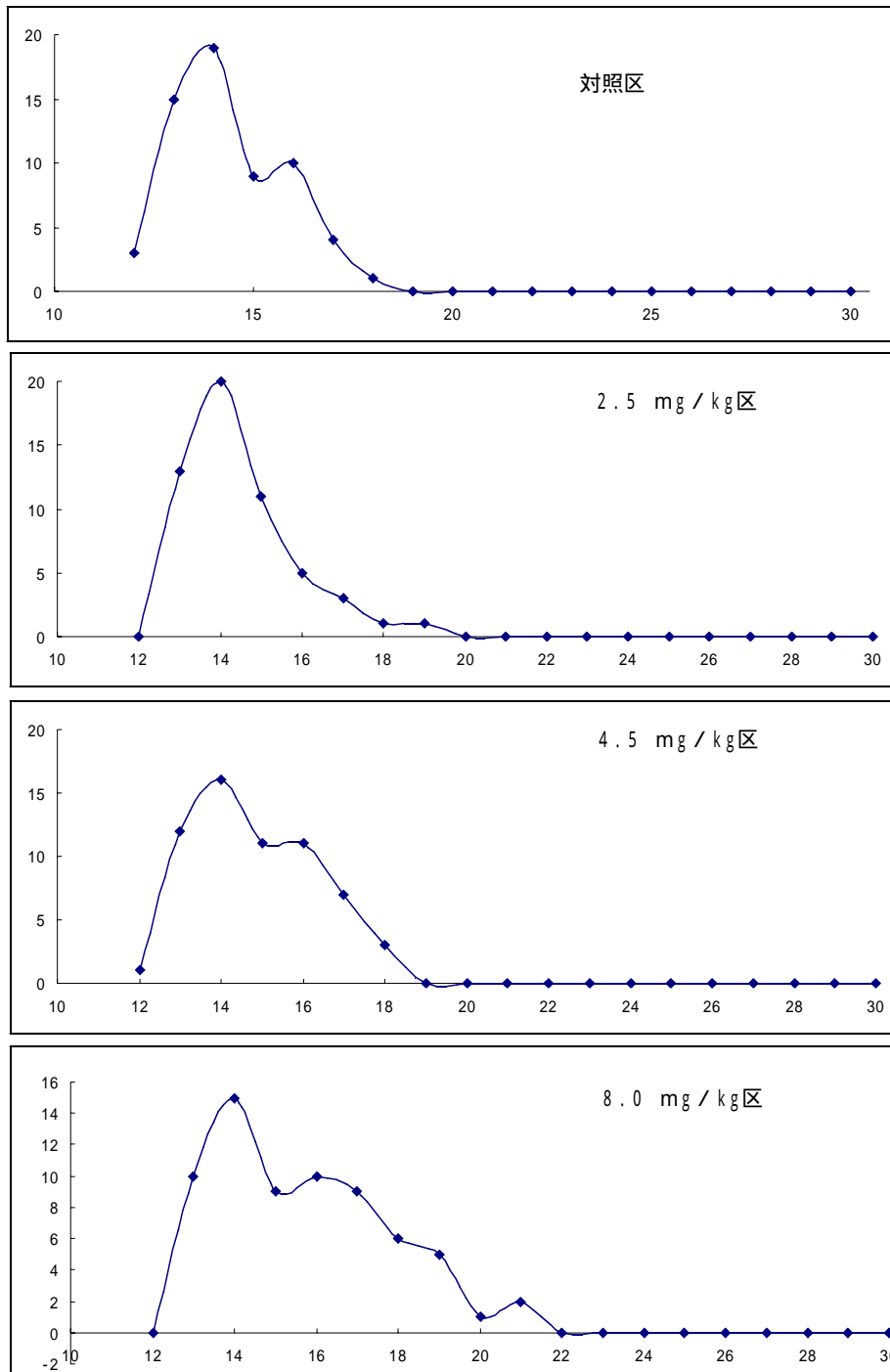
(羽化パターン)

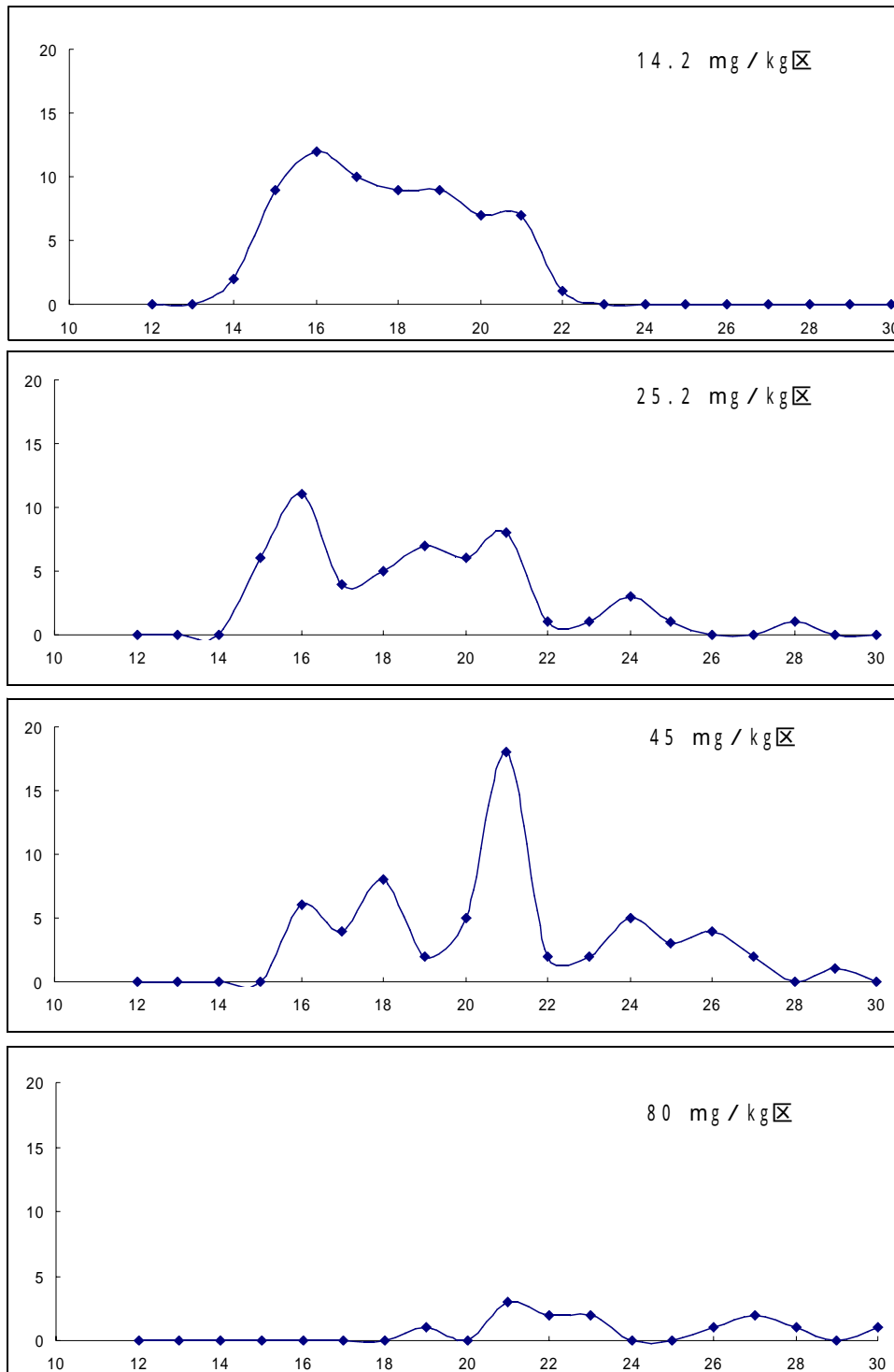
羽化数および変態速度を示す一方、図2に正規試験における1日当たり羽化個体数の変動を示した。この図は雌雄を区別しないでそれらの合計羽化個体数をプロットしたものであるが、対照区から8.0mg/kg区までの区ではまずオスの羽化があり、その後メスの羽化ピークが見られた。1日当たりの羽化個体数を示す図からは、羽化率の減少より先に羽化に要する時間(変態速度)が14.2mg/kg区より高い暴露濃度区次第に顕著になった(バラツキが大きく、ピークの高さが低下した)。なお、変態速度については後述する。

しかしながら予備試験で予測された被験物質の羽化率への雌雄差は明らかではなかった。なお、羽化においてオス個体がメス個体に先駆けて羽化する事は、(1)成虫の体重がオス個体よりメス個体の方が大きい。蛹世代および成虫は一切摂食しないと考えられもっぱら幼虫時代に摂食して栄養を蓄えて次世代生産(卵形成)に使用する。この事から幼虫の成熟時の体重はすでにオス個体よりもメス個体の方が大きい。十分な栄養が与えられる環境にある場合(または雌雄が同じ環境で生育するため)幼虫期はオスよりもメス個体の方が期間も長い。(2)オス個体が羽化しても直後から受精能力はなく、遅れて羽化するメス個体に同調して受精可能となる(近縁種である力科の場合)。通常は野外個体群は世代が重なり(越冬は幼虫期で行うがそのサイズはまちまちで、春先に成熟サイズの個体が一斉に蛹となり羽化する。この試験の対照区および低濃度区での羽化パターンは、このような本来セスジユスリカが持っている羽化の典型的なパターンに一致しており、試験条件は過密でも、餌の不足、環境要因の悪化を疑わせるものがないものと考えられる。

45mg/kg区および最高濃度区である80mg/kg区では対照区に比べて最初の羽化個体が観られた日が遅れるとともに、羽化ピークが明確でない。このようなばらつきは被験物質の

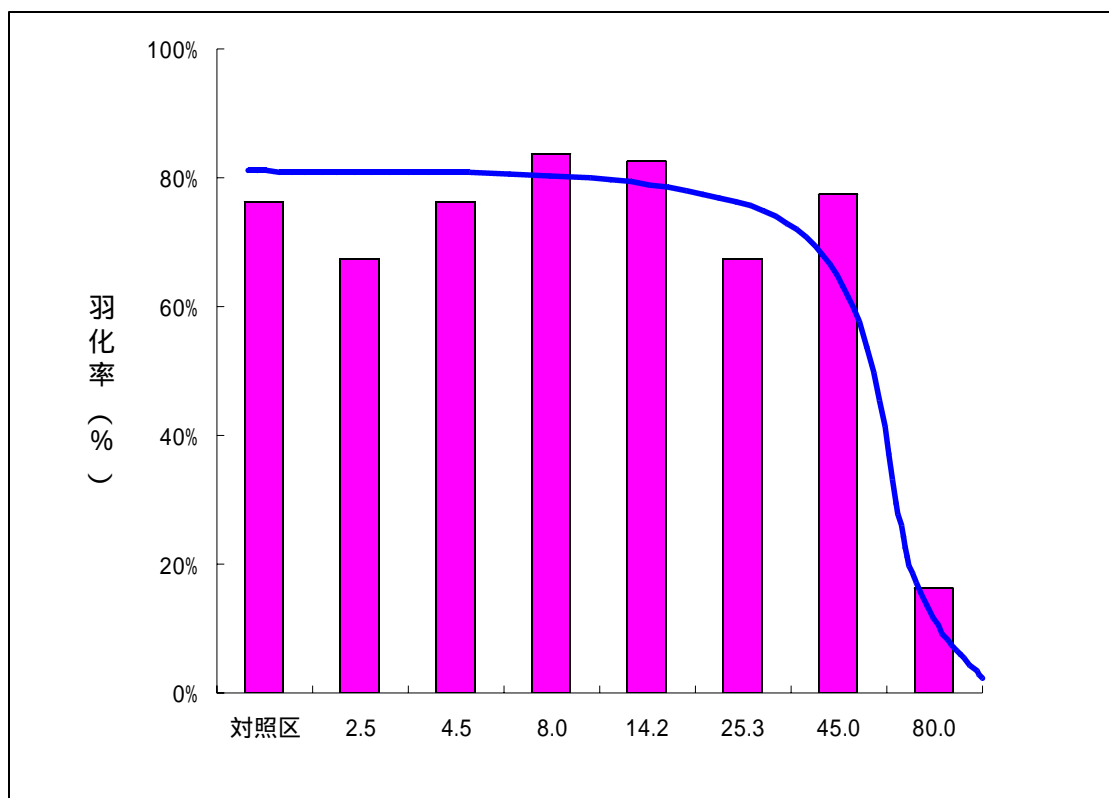
影響が関与したものと推察されるが、その影響は PCP の直接の影響であるのか、餌となる植物粉末に作用して餌としての質を劣化させたものであるか等の間接的な影響であるか、その点はここでは明らかではない。特に強調すべきは、最終的な羽化率では差のない 45mg/kg 区でもなんらかの影響があったとみるべきである。このような垂致死的な影響については、今後の研究で明らかにしていく予定である。





( 図 2 ) PCP 正規試験における羽化パターン

(羽化率)



(図3) 正規試験における PCP 濃度と平均累積羽化率

PCP 正規試験においては対照区から 45mg/kg までの羽化率で比較する限りは差がなく、しかもここまでの区では平均羽化率は 70 % を越えていた。影響が観察されたのは 80mg/kg 区であり、羽化率は 16% (対照区の 21 %) まで減少していた。ここから EC50 は、45 ~ 80mg/Kg, NOEC = 45mg/kg となった。

(変態速度)

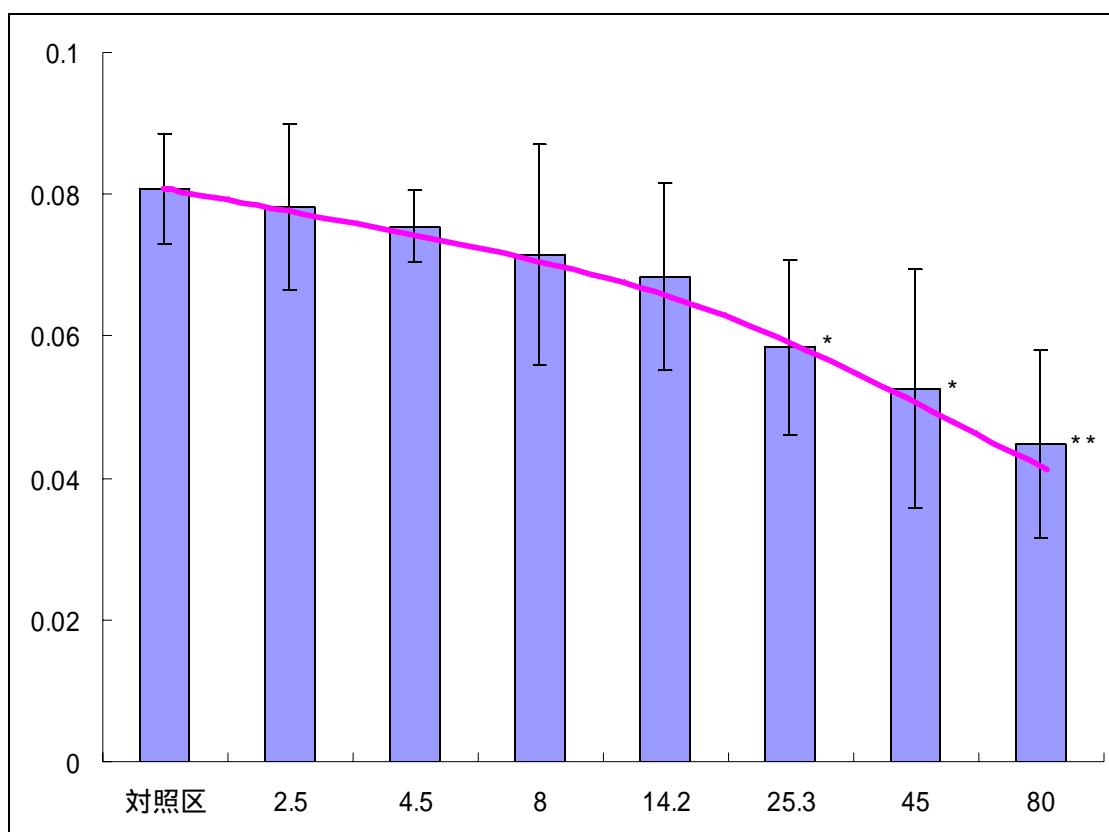
すでに見てきたとおり、PCP 暴露濃度が高くなるに従って、羽化に要する期間は延びており変態速度は減少した。t 検定の結果は 25.3mg/kg 区以上の区では対照区と有意な差がある事が明らかになった。

従って、NOEC = 14.2mg/kg となった。



(表) 正規試験における PCP 暴露の変態速度に対する影響

	1	2	3	4	平均	SD
対照区	0.081	0.071	0.090	0.083	0.081	0.008
2.5	0.078	0.084	0.089	0.062	0.078	0.012
4.5	0.074	0.072	0.083	0.073	0.075	0.005
8.0	0.074	0.087	0.050	0.076	0.072	0.016
14.2	0.063	0.069	0.055	0.086	0.068	0.013
25.3	0.052	0.045	0.069	0.069	0.058 <sup>*</sup>	0.012
45.0	0.051	0.041	0.077	0.041	0.052 <sup>*</sup>	0.017
80.0	0.038	0.049	0.031	0.061	0.045 <sup>**</sup>	0.013



(図4) 正規試験における変態速度と PCP 暴露濃度の関係

縦線は標準偏差 ( ± 1 SD) , アスタリスクはそれぞれ信頼レベル ( p<0.05 , p<0.01 ) を示す .

### ( 毒性値と結果への考察 )

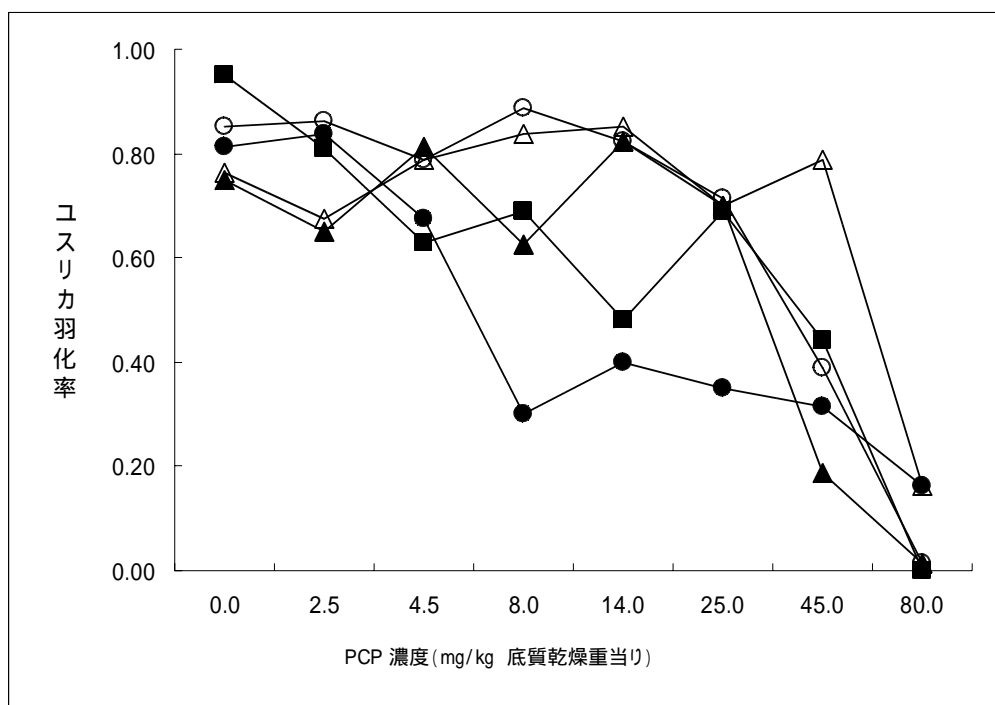
PCP を被験物質として予備試験と正規試験を実施した。この2つの試験結果を比較すると予備試験では 40mg/kg 区で羽化率に明らかな差があったが、正規試験では 45mg/kg 区における羽化率では差がなくその点は異なる影響であった。

毒性値としては正規試験の値を尊重し便宜的な EC50 を、45mg/Kg 以上 80mg/Kg 以下とした。なお、区間推定にとどめたのはこの濃度区以外に影響が観察された区がなかったためである。なお、その後他の機関の結果を参照し、最終的な EC50 値を次節に示すように 60mg/L とした。

NOEC については、羽化率から求めた NOEC = 45mg/kg と変態速度から求めた NOEC = 14.2mg/kg の2種類の値が存在するが、後者は濃度反応関係が明らかであるため信頼性が得られ、また後者の方がより低い値であることからこの値を採用すべきである。従って、PCP の NOEC は 14.2mg/kg であった。この値についても底質中濃度の実測値を採用すべきであるためここでは暫定値としておく。

### 3.3 国内リングテスト結果の相互比較

国内4試験機関と国立環境研究所は、上記の試験手順に従いペンタクロロフェノールの毒性試験を行った。図5は、暴露濃度(設定値)と羽化率の関係を示したものであるが、



( 図 5 ) 国内リングテストにおける PCP 濃度と羽化率

そのパターンは暴露濃度の上昇につれて羽化率が減少する同様の傾向を示している。OECD のテストガイドラインの妥当性クライテリアである対照区の羽化率 70 %はどの機関も超えており、羽化率からの毒性値の算出が可能であった。50%羽化阻害率 (EC50 値) の平均は 37mg/Kg で最小値 (13.7) と最大値(60) との間には5倍の開きはあるものの3機関は平均値の 37mg/Kg に近い値であった。また、NOEC 値についても同様であった。

国内リングテストにおける PCP のユスリカ底質毒性試験結果

	A 研究所	B 研究所	C 研究所	D 研究所	本研究所	平均
50 %羽化阻害濃度	37.4	37	38	13.7	60	37.2
無影響観察濃度	14	14	25	4.5	25	16.5

単位 (mg/kg 底質乾燥重)

#### 4. 人工底質の調製法の検討

##### 4.1 餌としての植物粉末の種類と調製法

2002 年度の調査において、用いることのできる植物種を検討してシロツメクサ、ホウレンソウ、クワについては OECD テストガイドライン案にその記述を追加した。ところが原案にありすでに実験的に確かめられているイラクサに比べて、上記の種は限られた条件でしかその有効性が確認されていない。つまり植物粉末を人工底質に混合してユスリカに与えるのであるが、stabilisation 期間を 48 時間の場合の羽化率が 70 %を越える事を確かめただけで、期間が7日間とした方がよい(安定化に時間を要する被験物質の)場合についてはまったく実験的保証がない。

ここでは難水溶性(疎水性)物質の試験に使用する植物粉末について検討した結果を報告する。

人工底質の調製手順は先に示した通りであるが、ピートモスを2日間、攪拌するが、この操作はガイドラインでは特有のバクテリア相を繁殖させる(Conditioning)のためと説明されている。それならば、この時点で植物粉末と混合することで、人工底質の調製時に植物粉末を加える場合に比べてより安定したバクテリア相を形成することが可能性が高い。そのため、餌として加える植物粉末を添加後ピートモスの攪拌を行った結果を紹介する。

##### 【方法】

1. ピートモスを2日間、上層水と同じ水(ガイドライン上は純水)に浸漬し攪拌するが、これとは別に、同様に植物粉末(この実験ではホウレンソウの粉末を用いたが、別にクワも用いた)を浸漬し攪拌した。

2. 遠心分離して上澄みを捨て、人工底質と混合した。この時点でpHを8になるよう

に水酸化ナトリウムを用いて調製した。

3．調製した人工底質をユスリカ試験用容器に入れ、少量の脱塩素上水（試験用水）を加え1晩放置した。

4．適度に水分を蒸発させた後、さらに上層水を底質の4倍量（体積）加えて、通気を行い、7日間放置した。

5．ここでpHを8に再度調製した（塩酸を使用）。

6．ふ化後1日以内のユスリカ幼虫約20個体を容器に入れて、2時間ほど通気を停止してユスリカの定着を待って、再び通気を開始した。

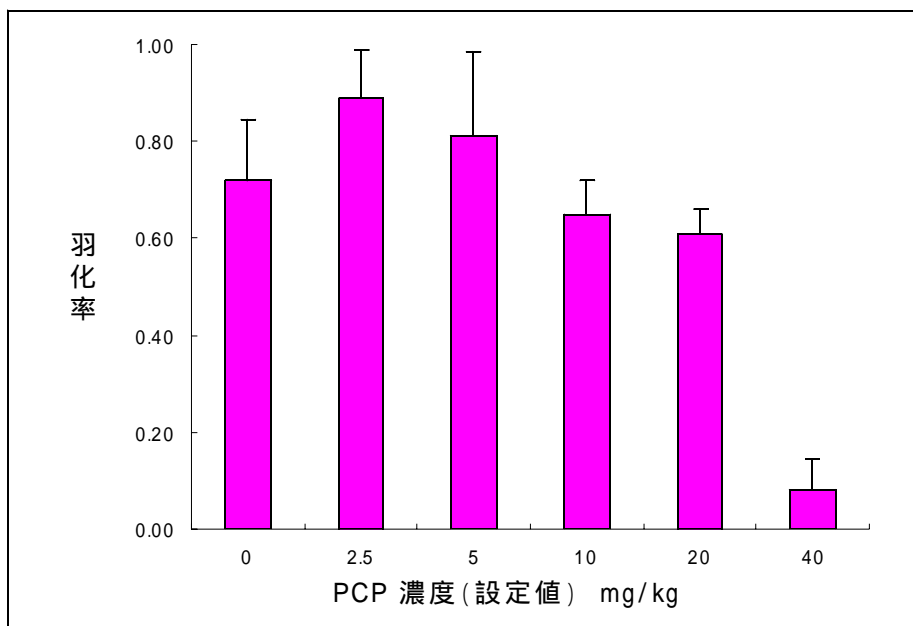
7．以後はユスリカが羽化するのを待ち、観察を継続した。

植物粉末も含めて48時間浸漬して、上述の正規試験とほぼ同様の試験を行った。ただし、1容器当たりのユスリカ幼虫投入個体数は正確に20個体になっていない。そのためデータの集計上は1容器当たり25個体とした。また、PCP濃度は設定値で、0、2.5、5.0、10、20および40mg/kgとした。

#### 【結果】

羽化率（図6）は、対照区で70%を越えており試験としては有効であった。

PCP濃度設定が正規試験に比べて低い方にシフトしている関係で20mg/kgまでの区は対照区と差が見られず、羽化率から算出されるEC50値は20～40mg/kg（プロビット法で毒性値を算出するにはデータが不足しているため区間で示す）。またNOECは20mg/kgであった。

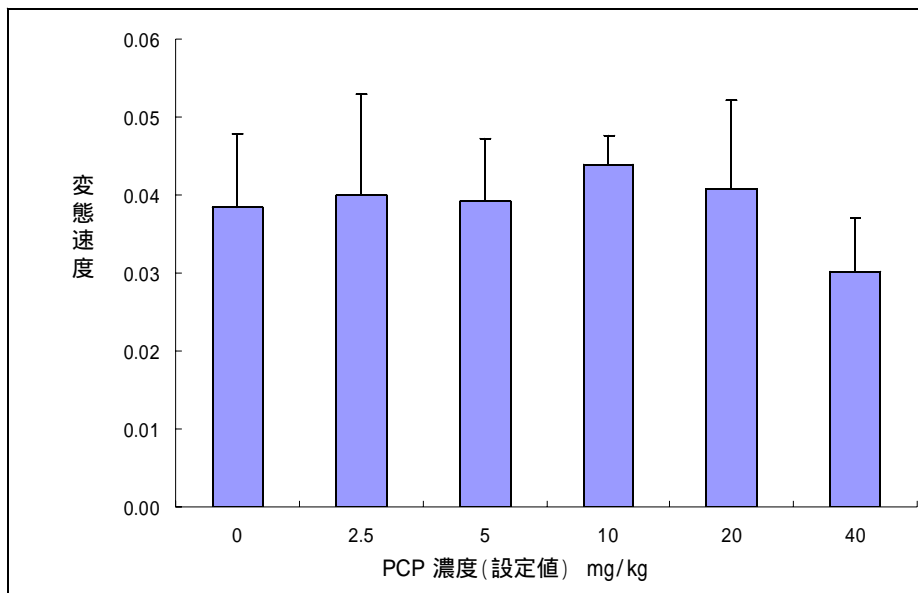


( 図 6 ) 餌としての植物粉末を事前に 4 8 時間 , 上層水に浸漬した  
場合の , ペンタクロロフェノールのユスリカの羽化率に及ぼす影響

図から明らかなように , 濃度反応関係は , 正規試験と矛盾するものではないことがわ  
かった .

( 羽化パターンに及ぼす影響 )

変態速度は 4 つのくり返し間では大きなバラツキがあったが , 平均値としては対照区か  
ら 20mg/kg までの間で差が認められなかった . 平均値は 0.04 前後であったが , この数値  
は正規試験の対照区よりは明らかに小さいもので , 全体として羽化が遅くなっていた事が  
うかがえる . なお , 最高濃度区から得られた変態速度は , 羽化個体数が少ないことから統  
計的に比較し得るデータとは見なせないために , ここでは論じないこととする .

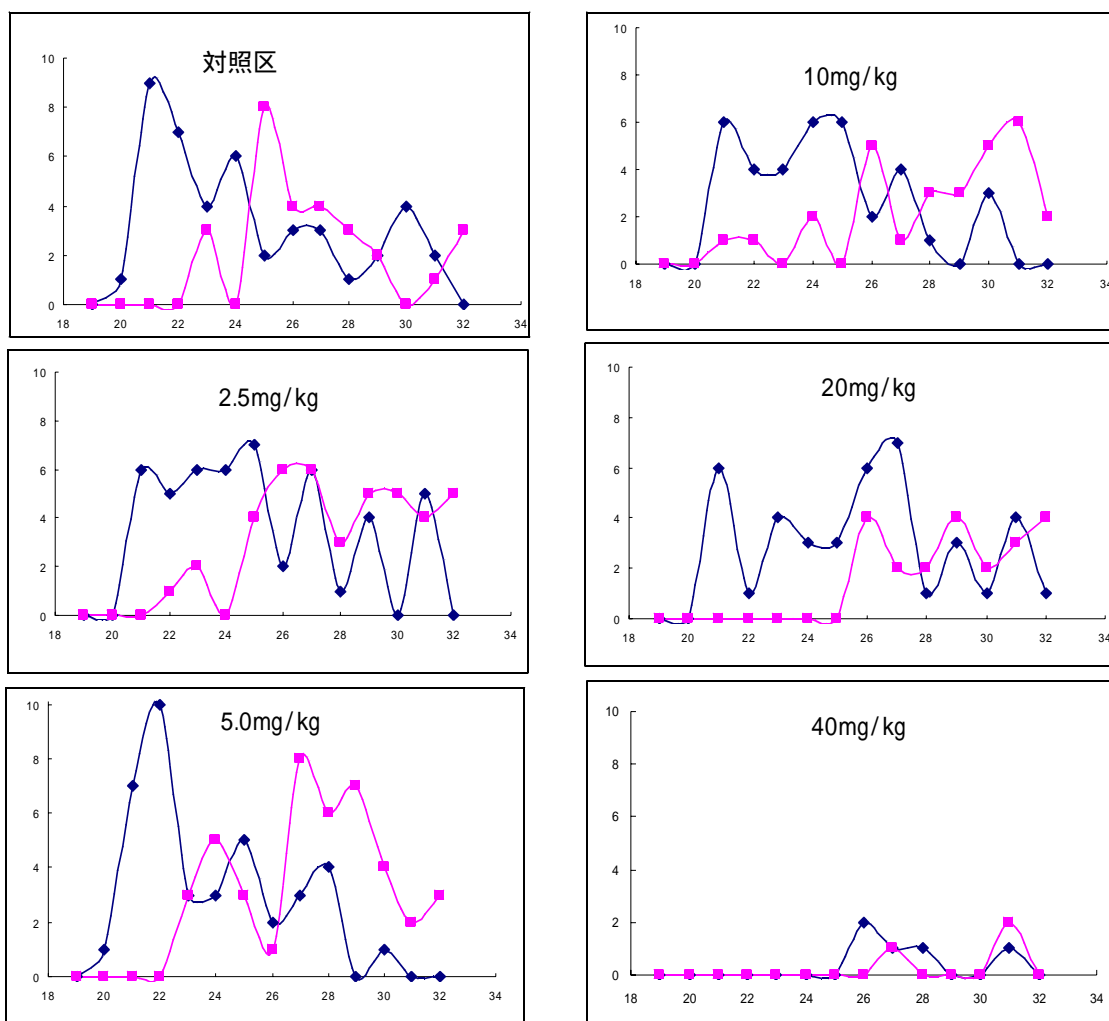


( 図 7 ) 餌としての植物粉末を事前に 4 8 時間 , 上層水に浸漬した  
場合の , ペンタクロロフェノールのユスリカの変態速度に及ぼす影響

羽化のパターンを ( 図 8 ) に示す . 最大の特徴は羽化に要する期間が著しく延長してお  
り , ガイドライン上求められている 28 日間でも対照区でさえも羽化が終了しなかった点  
である . PCP がユスリカの成長を遅延させる場合があることは , 正規試験の結果からも  
示唆されたところであるが , 対照区と比較して変態速度が 20mg/kg までほぼ一定である  
ために特別に PCP の影響であったとはいえない .

注目すべき点は , 羽化個体の大きさが著しく小型化する傾向が目視観察されている点で  
ある . この事の確認のためには試験水温を一定にした試験で PCP の影響がない対照区で

の羽化成虫の乾燥重量との比較が必要である。



( 図 8 ) 餌としての植物粉末を事前に 4 8 時間 , 上層水に浸漬した場合の ,  
ペンタクロロフェノールのユスリカの羽化パターンに及ぼす影響

( 考 察 )

以上のようにユスリカの羽化が遅延した直接の原因は , 餌としての植物粉末を事前に 48 時間浸漬した結果であると考えられる . 浸漬している間に有機物量の減少は起きていないとすれば , 餌としての質の劣化があったといえる . 結果としては遅延はあるが羽化率には影響がないことことから , ユスリカの生存に関わるような質の変化があったのではないと考えられる . この点は , 昨年度で餌料の検討を行っており ( ただし魚用餌料の粉末を水に溶いて一定量与える方法の場合 ) , 餌を少なく与えた場合のユスリカの羽化の状況とよく似た反応であった .

ひとつの重要な問題は , 4 8 時間の浸漬を行わずとも植物粉末は人工底質に混合されて

最低48時間の被験物質の安定化期間があるほか、特にLog Kowが5より大きい物質の場合は、ガイドラインが指示する最低48時間以上、7日間の安定化期間をとるように推奨されている。本報告のPCP予備および正規試験のどちらも7日間の安定化期間を設けているので、その間に餌としての劣化が起きる可能性が否定できない。つまり、安定化期間についても標準化しておかないと不十分な試験になる可能性がある。

## 6. おわりに

ユスリカを用いた底質毒性試験はOECDでは慢性毒性試験法の1つと理解されている。幼虫、さなぎ、成虫と複数のライフステージに渡る試験であり、また、ユスリカの生活史の中で感受性が最も高いと考えられる若齢幼虫期を含む点、そしてエンドポイントが垂致死的なものである事を根拠としての判断である。しかしながらまだ試験法が制定されただけで、その試験結果はごく限られたものである。本試験法が化学物質管理の上で重要な位置にある事は疑いないことであるが、試験としての妥当性は確認されたものの、ここで得られた毒性値をどのように管理のためのクライテリアに反映させるかについては必ずしも科学的な結論を得たわけではない。OECD加盟各国がそれぞれ、試験を実施してそのデータを積み重ねて行くと同時にさらに毒性値と実環境中での影響についての検討が必要であらう。

- 1) OECD (1992) Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals *in sediment*, *in Environment Monographs No.60 (1993)*
- 2) Ziegenfuss, P.S et al.(1986) Methodology for assessing the acute toxicity of chemicals sorbed to sediments: testing the equilibrium partitioning theory. *in Aquatic toxicology and Environmental Fate*. (eds., T.M. Poston and R. Purdy), Vol.9, 479-493. ASTM STP921, Philadelphia
- 3) US-EPA(1994): Procedures for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. US Environmental Protection Agency (EPA), Washington DC.

## OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS

### Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment

#### INTRODUCTION

1. This Test Guideline is designed to assess the effects of prolonged exposure of chemicals to the sediment-dwelling larvae of the freshwater dipteran *Chironomus* sp. It is based on existing toxicity test protocols for *Chironomus riparius* and *Chironomus tentans* which have been developed in Europe (1)(2)(3) and North America (4)(5)(6)(7)(8) and ring-tested (1)(6)(9). Other well documented chironomid species may also be used, e.g. *Chironomus yoshimatsui* (10)(11).

2. The exposure scenario used in this guideline is spiking of sediment with the test substance. The selection of the appropriate exposure scenario depends on the intended application of the test. The scenario of spiking sediment is intended to simulate accumulated levels of chemicals persisting in the sediment. This exposure system involves spiking sediment of a sediment-water test system.

3. Substances that need to be tested towards sediment-dwelling organisms usually persist in this compartment over long time periods. The sediment-dwelling organisms may be exposed via a number of routes. The relative importance of each exposure route, and the time taken for each to contribute to the overall toxic effects, is dependent on the physical-chemical properties of the chemical concerned. For strongly adsorbing substances (e.g. with  $\log K_{ow} > 5$ ) or for substances covalently binding to sediment, ingestion of contaminated food may be a significant exposure route. In order not to underestimate the toxicity of highly lipophilic substances, the use of food added to the sediment before application of the test substance may be considered. In order to take all potential routes of exposure into account the focus of this Guideline is on long-term exposure. The test duration is in the range of 20 - 28 days for *C. riparius* and *C. yoshimatsui*, and 28 - 65 days for *C. tentans*. If short-term data are required for a specific purpose, for example to investigate the effects of unstable chemical, additional replicates may be removed after a ten-day period.

4. The measured endpoints are the total number of adults emerged and the time to emergence. It is recommended that measurements of larval survival and growth should only be made after a ten-day period if additional short-term data are required, using additional replicates as appropriate.

5. The use of formulated sediment is recommended. Formulated sediment has several advantages over natural sediments:

- the experimental variability is reduced because it forms a reproducible "standardised matrix" and the need to find uncontaminated and clean sediment sources is eliminated;
- the tests can be initiated at any time without encountering seasonal variability in the test sediment and there is no need to pre-treat the sediment to remove indigenous fauna; the use of formulated sediment also reduces the cost associated with the field collection of sufficient amounts of sediment for routine testing;
- the use of formulated sediment allows for comparisons of toxicity and ranking substances accordingly.

6. Definitions used are given in Annex 1.



### **PRINCIPLE OF THE TEST**

7. First instar chironomid larvae are exposed to a concentration range of the test chemical in sediment - water systems. The test substance is spiked into the sediment and first instar larvae are subsequently introduced into test beakers in which the sediment and water concentrations have been stabilised. Chironomid emergence and development rate is measured at the end of the test. Larval survival and weight may also be measured after 10 days if required (using additional replicates as appropriate). These data are analysed either by using a regression model in order to estimate the concentration that would cause x % reduction in emergence or larval survival or growth (e.g. EC<sub>15</sub>, EC<sub>50</sub> etc.), or by using statistical hypothesis testing to determine a NOEC/LOEC. The latter requires comparison of effect values with control values using statistical tests.

### **INFORMATION ON THE TEST SUBSTANCE**

8. The water solubility of the test substance, its vapour pressure, measured or calculated partitioning into sediment and stability in water and sediment should be known. A reliable analytical method for the quantification of the test substance in overlying water, pore water and sediment with known and reported accuracy and limit of detection should be available. Useful information includes the structural formula and purity of the test substance. Chemical fate of the test substance (e.g. dissipation, abiotic and biotic degradation, etc.) also is useful information. Further guidance for testing substances with physical-chemical properties that make them difficult to perform the test is provided in (12)

### **REFERENCE SUBSTANCES**

9. Reference substances may be tested periodically as a means of assuring that the test protocol and test conditions are reliable. Examples of reference toxicants used successfully in ring-tests and validation studies are: lindane, trifluralin, pentachlorophenol, cadmium chloride and potassium chloride (1)(2)(5)(6)(13).

### **VALIDITY OF THE TEST**

10. For the test to be valid the following conditions apply:

- the emergence in the controls must be at least 70% at the end of the test. (1)(6);
- *C. riparius* and *C. yoshimatsui* emergence to adults from control vessels should occur between 12 and 23 days after their insertion into the vessels; for *C. tentans*, a period of 20 to 65 days is necessary.
- at the end of the test, pH and the dissolved oxygen concentration should be measured in each vessel. The oxygen concentration should be at least 60 per cent of the air saturation value (ASV) at the temperature used, and the pH of overlying water should be in the 6-9 range in all test vessels;
- the water temperature should not differ by more than  $\pm 1.0$  °C. The water temperature could be controlled by isothermal room and in that case the room temperature should be confirmed in an appropriate time intervals.

## OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS

### Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Water

#### INTRODUCTION

1. This Test Guideline is designed to assess the effects of prolonged exposure of chemicals to the sediment-dwelling larvae of the freshwater dipteran *Chironomus* sp. It is mainly based on the BBA guideline using a sediment-water test system with artificial soil, and water column exposure scenario (1). It also takes into account existing toxicity test protocols for *Chironomus riparius* and *Chironomus tentans* which have been developed in Europe and North America (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8) and ring-tested (1)(6)(9). Other well documented chironomid species may also be used, e.g. *Chironomus yoshimatsui* (10)(11).

2. The exposure scenario used in this guideline is water spiking. The selection of the appropriate exposure scenario depends on the intended application of the test. The water exposure scenario, involving spiking of the water column, is intended to simulate a pesticide spray drift event and covers the initial peak of concentrations in pore water. It is also useful for other types of exposure (including chemical spills) except accumulation processes lasting longer than the test period.

3. Substances that need to be tested towards sediment-dwelling organisms usually persist in this compartment over long time periods. The sediment-dwelling organisms may be exposed via a number of routes. The relative importance of each exposure route, and the time taken for each to contribute to the overall toxic effects, is dependent on the physical-chemical properties of the chemical concerned. For strongly adsorbing substances (e.g. with  $\log K_{ow} > 5$ ) or for substances covalently binding to sediment, ingestion of contaminated food may be a significant exposure route. In order not to underestimate the toxicity of highly lipophilic substances, the use of food added to the sediment before application of the test substance may be considered. In order to take all potential routes of exposure into account the focus of this Guideline is on long-term exposure. The test duration is in the range of 20 - 28 days for *C. riparius* and *C. yoshimatsui*, and 28 - 65 days for *C. tentans*. If short-term data are required for a specific purpose, for example to investigate the effects of unstable chemical, additional replicates may be removed after a ten-day period.

4. The measured endpoints are the total number of adults emerged and the time to emergence. It is recommended that measurements of larval survival and growth should only be made after a ten-day period if additional short-term data are required, using additional replicates as appropriate.

5. The use of formulated sediment is recommended. Formulated sediment has several advantages over natural sediments:

- the experimental variability is reduced because it forms a reproducible "standardised matrix" and the need to find uncontaminated and clean sediment sources is eliminated;
- the tests can be initiated at any time without encountering seasonal variability in the test sediment and there is no need to pre-treat the sediment to remove indigenous fauna; the use of formulated sediment also reduces the cost associated with the field collection of sufficient amounts of sediment for routine testing;

- the use of formulated sediment allows for comparisons of toxicity and ranking substances accordingly: toxicity data from tests with natural and artificial sediments were comparable for several chemicals (2).

6. Definitions used are given in Annex 1.

### **PRINCIPLE OF THE TEST**

7. First instar chironomid larvae are exposed to a concentration range of the test chemical in sediment-water systems. The test starts by placing first instar larvae into the test beakers containing the sediment-water system and subsequently spiking the test substance into the water. Chironomid emergence and development rate is measured at the end of the test. Larval survival and weight may also be measured after 10 days if required (using additional replicates as appropriate). These data are analysed either by using a regression model in order to estimate the concentration that would cause x % reduction in emergence, larvae survival or growth (e.g. EC<sub>15</sub>, EC<sub>50</sub>, etc.), or by using statistical hypothesis testing to determine a NOEC/LOEC. The latter requires comparison of effect values with control values using statistical tests.

### **INFORMATION ON THE TEST SUBSTANCE**

8. The water solubility of the test substance, its vapour pressure, measured or calculated partitioning into sediment and stability in water and sediment should be known. A reliable analytical method for the quantification of the test substance in overlying water, pore water and sediment with known and reported accuracy and limit of detection should be available. Useful information includes the structural formula and purity of the test substance. Chemical fate of the test substance (e.g. dissipation, abiotic and biotic degradation, etc.) also is useful information. Further guidance for testing substances with physical-chemical properties that make them difficult to perform the test is provided in (12).

### **REFERENCE SUBSTANCES**

9. Reference substances may be tested periodically as a means of assuring that the test protocol and test conditions are reliable. Examples of reference toxicants used successfully in ring-tests and validation studies are: lindane, trifluralin, pentachlorophenol, cadmium chloride and potassium chloride. (1)(2)(5)(6)(13).

### **VALIDITY OF THE TEST**

10. For the test to be valid the following conditions apply:
- the emergence in the controls must be at least 70% at the end of the test. (1)(6);
  - *C. riparius* and *C. yoshimatsui* emergence to adults from control vessels should occur between 12 and 23 days after their insertion into the vessels; for *C. tentans*, a period of 20 to 65 days is necessary.
  - at the end of the test, pH and the dissolved oxygen concentration should be measured in each vessel. The oxygen concentration should be at least 60 per cent of the air saturation value (ASV) at the temperature used, and the pH of overlying water should be in the 6-9 range in all test vessels;