

# 生態毒性試験実施にあたって の留意点



生態影響に関する化学物質審査規制／試験法セミナー  
菅谷 芳雄（独）国立環境研究所環境リスク研究センター

# 化審法新規登録の際に要求される対象物質



化審法の届出の際に要求される動植物試験では、届出物質そのものの外にも、試験を行うことがあるのでしょうか？その場合、どのような物質について試験を行うのですか？

- 生分解性試験で残留（添加量に対して1%以上）した物質を生態毒性試験対象としてデータが要求されます。
- 試験物質が試験条件で変化（加水分解、酸化など）し、分解物を生じる場合、分解物の毒性に着目した試験手順と評価が必要となります。→ 試験困難物質\*として、OECDガイダンス文書（No.23）\*の推奨する試験手順を用いることになりまるので、環境省との事前協議をお奨めします。

\* 不安定性だけでなく、種々の試験困難性がありますが、それぞれについての指針を提供しています。



# 動植物試験のばく露濃度の決定



生態毒性値の算出根拠とするばく露濃度はどのように決定するべきか  
OECD 試験ガイドラインと化審法試験法では異なるのでしょうか？  
試験困難物質には当たらない、試験条件で比較的安定な物質の場合に  
ついてはどのように考えるのでしょうか？

(要点) 試験ガイドラインもその採択時期により、ばく露濃度決定のための被験物質濃度の化学分析の頻度等の規定がまちまちです。化審法の届出の際に要求するスクリーニング毒性試験（魚類、ミジンコ、藻類の短期試験）は、OECDのTG203, 202及び201に相当し、現行では優占評価化学物質に相当するかどうかの判定に用いていますので、毒性値算出の根拠としてのばく露濃度は、可能な限りより確からしい実測値を基にしています。



# ばく露濃度の決定の際の「平均値」は？



- ・ばく露濃度を実測値から算出する場合に、平均値を用いているのですが、算術平均、幾何平均、時間加重平均、などいくつもの平均がありますが、その使い分けはどうすべきですか？

(要点) 実測平均値を使う場合、どの平均手法をもちいるのか？

試験法で推奨されている場合(オオミジンコ繁殖試験)を除き  
止水式、半止水式で濃度減少がある場合は幾何平均が適していることが多いが、濃度変動が小さい場合は、算術平均が適している場合がある(流水式試験など)。

(留意点)

- 平均の取り方についても、報告書で具体的に記述すること
- 設定値や初期実測値を用いて、平均値を用いない場合がある。

# 平均値算出法について



算術平均:濃度の変動は、ランダムである場合。

幾何平均:濃度が大きく変動する場合に適している。

:開始時と終了時に加えて実測データがある場合はガイダンスドキュメント23Annex2による):

時間加重平均: TG211(ミジンコ繁殖試験法) Annex2による。指数減衰する場合の濃度曲線の下での面積に該当する。

設定濃度	0h	72h	算術	幾何	時間
0	0	0	0	0	0
0.14	0.14	0.10	0.12	0.12	0.12
0.39	0.38	0.27	0.32	0.32	0.32
1.10	1.12	0.77	0.95	0.93	0.94
3.10	3.15	2.24	2.70	2.66	2.68
8.60	8.67	6.38	7.53	7.44	7.48
24.00	23.72	17.50	20.61	20.37	20.49

※毒性値の算出根拠として、化審法試験法では、試験条件下で安定な物質で開始時および終了時の実測濃度が設定濃度の±20%以内である場合は設定濃度を用いてもよい、それ以外は幾何平均を推奨している。

# 試験ガイドライン改訂予定



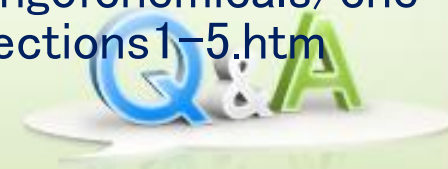
OECDの試験ガイドラインの内、化審法で求められる試験法で改訂が予定されるものがありますか？

## 回答の要点

- OECD-TG 211(オオミジンコ繁殖試験)の改訂案がOECDのNC会合で合意されたので、近く公表される予定。
- OECD-TG 210(魚類初期生活段階毒性試験)の改訂作業中であり、パブリックコメント中(〆切10月19日)。
- 新規試験法、FET(Zebra fish 魚類胚毒性試験)案が合意されたが、化審法の魚類急性試験法には代替しない。パブリックコメントは9月14日に終了

ドラフトガイドラインは以下のOECDのサイトで公開中

<http://www.oecd.org/env/chemicalsafetyandbiosafety/testingofchemicals/chemicalstestingdrafttoecdguidelinesforthetestingofchemicals-sections1-5.htm>



# ミジンコ繁殖試験の改定案



## 1) 基本的には、反応変数を

「試験終了時に生存していた親ミジンコ当たりの総正常仔ミジンコ産出数」から、「偶発的に死亡した場合を除く、試験開始時の親個体当たりの総正常仔ミジンコ産出数」への変更。

## 2) 統計解析手法の記述追加

## 3) 限度試験



# 藻類試験に用いる種の「系統」



- ・ **OECD TG 201**で推奨されている珪藻で、*Navicula pelliculosa*, UTEX 664 が掲げられています。ところが、この系統が入手できなくなっております。その場合、どの系統を使用すべきでしょうか？

## (回答の概要)

残念ながら、**UTEX Culture Collection of Algae** のホームページ ([http://web.biosci. utexas.edu/utex/](http://web.biosci.utexas.edu/utex/)) で検索しても該当する系統はヒットしませんでした。よって、UTEXからは当該系統は新たに入手できないようです。

試験法ガイドラインでは、「系統」を限定してはいませんので、UTEXの他の系統や、その他の系統でも、試験の妥当性基準を満足するのであれば、問題はない。

## (留意点)。

もし毒性試験に用いる場合は、試験以前にいくつかの点は確認が必要。





# 藻類試験での生物量測定



OECD試験ガイドラインが改定されて、生長速度は「生物量」を基に算出することになると理解していますが、それでは、改訂前(TG201,1984)のように粒子計測装置の細胞数計測値は使用できないことになるのですか？

要点：生物量は物質の量で通常は乾燥重量で表されます。しかし72時間指数増殖している藻類を直接計測できるのは粒子計測装置を用いる方法など限られています。細胞数と生物量は、藻類の1個当たりの重さが変化しない場合は比例関係にありますので、細胞数は生物量に代替できます。また細胞分裂サイクルで細胞1個当たりの生物量は変化しますが、サイクルが同調していない場合は、ある時点での測定値は個体群の平均値とみなせますので、これも問題ありません。

- 一定の条件を満たせば、利用できる
- 粒子計測器の測定モードを変更すれば利用できる  
(通常、藻類体積－乾燥重量は良好な比例関係)



# 細胞数以外の計測法 (例)



Table 3 — EC values calculated on the basis of different parameters for biomass in a test of  $K_2Cr_2O_7$  with *P. subcapitata*

Parameter	EC <sub>50</sub> mg/l	95 % Confidence interval	EC <sub>10</sub> mg/l	95 % Confidence interval
Cell numbers	0,83	0,77 to 0,88	0,41	0,34 to 0,47
Total cell volume	0,99	0,93 to 1,07	0,38	0,33 to 0,45
<i>In vivo</i> fluorescence	0,69	0,66 to 0,71	0,37	0,34 to 0,40
Fluorescence with DCMU	0,66	0,64 to 0,89	0,38	0,35 to 0,41

TECHNICAL REPORT ISO/TR 11044  
First edition 2008-12-01

- 1) 3, 5-DCPは、細胞サイズに影響を与える
- 2) EC10値程度の低ばく露レベルでは、どの測定法でも一定の毒性値が得られており、細胞サイズは主に高ばく露濃度域の事象であると示唆される。



# 藻類試験での生物量測定



## 留意点

### 1) 細胞数を利用する場合

→ 藻類の平均体積（粒径）が許容の範囲であることを示す（粒子計測装置の粒径分布記録

→ 定期的な計測器の校正（粒径・粒子数）

### 2) 細胞体積（他の測定値※も同様）を利用する場合

→ 体積－乾燥重量が比例関係にあることを示す。



# 揮散性物質の藻類試験



密閉系を用いてもなお、被験物質濃度を一定に保つことが難しい藻類試験で留意すべきことは何ですか？

- ばく露濃度を一定に保つためには、ヘッドスペースを小さくすることは有効な手段である。
- 密閉系で通常の手順で試験を行えば、pHの上昇、生長速度の鈍化で試験の妥当性基準をクリアできない。



- そのため、密閉系での試験手順としていくつかの特別な方法が提言されているが、妥当性の検証が必要。



# 揮散性物質特有の試験手順



- 試験期間を48時間とする。（Kühn & Pattard, 1990; OECD, 2006）
- 大きな密閉容器を用いてヘッドスペースを十分にとる（Galassi & Vighi, 1981）
- 試験期間中の増殖を抑えて、一定の生長速度を維持する。  
開始時の藻類密度を低くする。  
光強度を低くして、生長速度を抑える。
- 緩衝剤を用いてpHを安定させる
- 通常より多い0.4%の炭酸水素ナトリウムを用いる（Herman et al., 1990）。
- 試験途中のサンプリングは密閉状態を維持しつつ行う（Brack W & Rottler H, 1994）。



# 揮散性物質の試験法、まとめ（案）



1. 次の場合には密閉系試験手順が推奨される。
  - (1)揮散が主要因で濃度が減少する
  - (2)被験物質が揮散し、作業者に無害ではない
2. 開始時の密度の低減などの手順を採用してもなお、TG201(2006, 2011)の試験の妥当性基準を満足しない場合は、許容する条件の下で試験期間を短縮してよい。
3. 密閉系であるが、それでも濃度が減少するヘッドスペースなしの手順の採用を検討する  
※代替/追加法として、セプタム付きのキャップの使用を検討してもよい
4. pHの上昇(1.5以上)があっても、非解離性物質の場合は試験は妥当であるとみなす。  
解離性物質の場合には、pKa値やその他の毒性情報から、個別に試験の妥当性をから判断する。
5. 重炭酸ナトリウムの高濃度使用、緩衝剤の使用は、毒性を緩和しないとの追加情報が有る場合にのみ許容される(なお、既存の試験結果については別途検討する)。



# その他の疑問点



会場からの質問に可能な限りお答えします。  
また、この場では結論が出せない場合は、後日  
検討の結果をなんらかの形でお知らせします。

