

平成15年度

環境省請負事業結果報告書

平成15年度底生生物生態影響予備試験

平成 16 年 3 月

財団法人
化学物質評価研究機構

目 次

	頁
第1章 調査の目的と概要	1
1.1 調査の目的	1
1.2 調査の概要	1
1) 調査の経緯	1
2) 試験の概要	1
3) 調査実施機関及び実施担当者	1
第2章 調査方法	2
2.1 被験物質	2
1) 被験物質に関する情報	2
2) 供試試料	2
2.2 試験材料と方法	3
1) 試験生物	3
2) 試験用水	3
3) 試験装置	3
4) 底 質	3
5) 試験条件	3
6) 実験操作	4
7) 観察と測定	5
8) 結果の処理	9
第3章 調査結果	11
3.1 各項目における観察及び測定結果	11
1) 試験生物の羽化数	11
2) 蛹脱皮殻の大きさ	15
3) 平均変態速度	16
4) 試験容器内の状態	17
5) 水 質	18
3.2 被験物質の生物に対する毒性	24
1) 結果の評価	24
2) 考 察	24
第4章 調査結果のまとめ	28
付属資料1 観察及び測定結果の詳細	
付属資料2 試験に使用した脱塩素水道水の水質	
付属資料3 検量線及び分析チャート	
付属資料4 結果の処理に関する計算データ	

第1章 調査の目的と概要

1.1 調査の目的

水環境中において底質中の残留の可能性が高いと予想される化学物質を対象として、底生生物を用いる生態影響試験の試験法の確立に資するための情報を得ることを目的とした。本試験ではペンタクロロフェノールを被験物質として選択し、難水溶性物質における試験実施上の問題点等の抽出を行った。

1.2 試験の概要

1) 調査の経緯

前年度までの調査では、国内種であるセスジユスリカ(*Chironomus yoshimatsui*)が、OECDドラフトテストガイドラインに準拠した試験法で所定の結果が得られるかを確認し、試験で生じた幾つかの問題点についてその後検討を行い、最適な各種条件についての調査を実施しているが、それらの検討結果を受け、今回の調査では難水溶性物質を対象とした予備試験を実施し、試験操作上の問題点等の抽出を行った。

2) 試験の概要

独立行政法人 国立環境研究所が提供するセスジユスリカ(*Chironomus yoshimatsui*)を用い、高純度のペンタクロロフェノール(PCP)を底質に添加しセスジユスリカに対する底質/水系毒性試験を実施した。

この試験は、環境省が示す試験手順書及びOECDドラフトテストガイドライン218に従って実施した。

3) 調査実施機関及び実施担当者

(1) 調査実施機関

財団法人 化学物質評価研究機構

化学物質安全センター 管理部

久留米事業所

東京都文京区後楽1-4-25 日教販ビル7F

福岡県久留米市中央町19-14

(2) 実施担当者

所 属	氏 名	連絡先
財団法人 化学物質評価研究機構 化学品安全センター 久留米事業所 試験第4課長 主任研究員		
	研 究 員	
	研 究 員	
	研 究 員	

第2章 調査方法

2.1 被験物質

1) 被験物質に関する情報

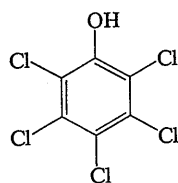
被験物質とその情報を以下に示す。

出典；The Dictionary of Substances and their Effects(1992)

(1) 名称：ペンタクロロフェノール

(2) CAS番号：87-86-5

(3) 構造式



(4) 分子式： C_6HCl_5O

(5) 分子量：266.34

(6) 物理化学的性質等

①融点：190.5℃

②分配係数： $\log P_{ow} = 6.35$

③蒸気圧：0.02 Pa (1.5×10^{-4} mmHg) (20℃)

④溶解度：水 10 mg/L (20℃)

ベンゼン、エタノール、エーテルなどの有機溶媒に易溶

2) 供試試料

供試試料に関する情報を以下に示す。供試試料に関する情報については供給者提供資料によった。

(1) 供試試料名：ペンタクロロフェノール標準品

(2) ロット番号：RWP9881

(3) 含有量：100.0%(GC-FIDによる)

(4) 供給者：和光純薬工業株式会社

2.2 試験材料と方法

1) 試験生物

- (1) 種 : セスジユスリカ(*Chironomus yoshimatsui*)
- (2) 起 源 : 栃木県日光市湯元産
- (3) 入 手 元 : 独立行政法人 国立環境研究所で継代飼育したもの
- (4) 受精卵の順化 : 入手した受精卵はふ化するまで、試験条件と同じ水質(脱塩素水道水)、水温(23±1℃)で通気を行いながら止水条件下で順化した。
- (5) 供 試 段 階 : 1令幼虫(ふ化後24時間以内)

2) 試験用水

十分にエアレーションし温度調節した脱塩素水道水を用いた。脱塩素水道水の使用時には、残留塩素濃度が0.02 mg/L以下であることを確認した。試験に用いた試験用水の水質測定結果を付属資料2に示す。

3) 試験装置

- (1) 試験容器 : ガラス製腰高シャーレ(内寸 : 直径8.5 cm、高さ15 cm)
- (2) 蓋 : ポリエチレン製カップ(リスパック株式会社製 : 200B ; φ 101 mm × 高さ44 mm)底面にナイロンメッシュを設置
- (3) 恒温槽 : 加熱冷却装置により試験容器内の水温を23±1℃に維持可能なもの
- (4) 通 気 : エアー配管を繋いだガラス製パスツールピペットを使用
- (5) ポ ン プ : エアレーションポンプ HP α 10000(株式会社NISSO製)

4) 底 質

本試験では人工底質を調製し試験に用いた。調製した人工底質の組成を以下に示す。全成分は(独)国立環境研究所より供給されたものを使用した。なお、調製した人工底質中の有機体炭素量は1.6 wt%^{*1}であった。

人工底質の組成

成分組成	乾燥重量比	製 造 元 等
ピートモス	5%	Sphagnum moss peat (カナダ産 pH未調整)
カオリン	20%	はくとう土 (和光純薬工業株式会社製)
石英砂	75%	Quartz fine granular 1.07536.1000 (MERCK製)
C1(ホソソウ粉)	0.75% ^{*2}	—

^{*1}TOCによる土壌標準分析(測定法 : 15A 乾式燃焼法)

^{*2}上記3成分の総重量に対する添加割合を示す。

5) 試験条件

(1) 暴露条件

- ①方 式 : 被験物質を含む人工底質と上層水を入れた試験容器に試験生物を暴露した。試験は試験液を交換しない止水式で行った。
- ②期 間 : 28日間
- ③試験濃度 : 7濃度区[80、45、25、14、8、4.5及び2.5 mg/kg(公比約1.78)]
- ④対 照 群 : 被験物質を含まない人工底質により調製した対照区を設けた。
- ⑤連 数 : 4連/試験区
- ⑥生 物 数 : 80個体/試験区(1試験容器につき20個体)
- ⑦収 容 密 度 : 2.84 cm²/個体(1個体当りの底面積)

(2) 環境条件

- ①水 温： 23±1℃
- ②照 明： 室内灯による16時間明/8時間暗の明暗周期
- ③照 度： 500～1000 Lux (実測値 611～960 Lux)
- ④給 餌： 人工底質調製時にC1(ホソソウ粉末)を人工底質量の0.75%混入させた。それ以外に給餌は行わなかった。
- ⑤通 気： パスツールピペットにより行い、その先端が水深3～4 cmの位置にくるよう調節した(通気の程度：3～4 bubbles/sec.)。但し、生物投入後(暴露開始後)24時間までは通気を行わなかった。

(3) 底質・上層水・間隙水の条件

- ①底質の水分含量： 30.1%
[(間隙水含有底質重量－乾燥土壌重量)/乾燥土壌重量×100]
- ②上層水の水深： 8.8 cm (底質厚の4倍)
上層水の蒸散により減深が認められた場合、この水深になるまで脱塩素水道水を補充した。
- ③上層水量： 約500 mL

6) 実験操作

(1) 人工底質調製

試験に用いた人工底質の調製手順を以下に示す。

人工底質は試験区毎に調製した。

- ①乾燥(85℃×48時間)させたピートモスを秤量し、蒸留水を加えて水になじませたものをガラス容器に移し、室温下でマグネティックスターラーにより48時間攪拌した。
- ②攪拌24時間の時点でピートモス懸濁液のpHを確認した結果、pHは3.3～3.5であり、pH許容値(7.0±0.5)に近づけるためpH調整が必要と判断し、炭酸カルシウム*¹を乾燥人工底質重量の0.1%相当分添加した。
- ③攪拌終了後、ピートモス懸濁液を遠心分離(10,000g×30 min.)し、沈殿した画分のみを他の底質成分(カオリン、石英砂、C1)と共にミキサー*²により約10分間混合した。
- ④予め準備した被験物質を吸着させた石英砂*³を所定量*⁴添加後、さらに約10分間ミキサーにより混合した。
- ⑤調製した人工底質を試験容器に均等量分取(人工底質設定量：150 g(乾燥重量)/試験容器)した。
- ⑥人工底質を入れた試験容器に脱塩素水道水を底質層厚の4倍量になるまで注入した。その際調製した人工底質の混合状態を崩さないよう、サイフォンを用いて流量を調節しながら慎重に注いだ。
- ⑦23±1℃の恒温水槽内に試験容器を設置し、その後7日間通気を行った。通気はエア配管を繋げたパスツールピペットにより行い、その先端が水深3～4 cmの位置にくるよう設置した(通気の程度：3～4 bubbles/sec.)。

⑧通気開始後6日後に全試験容器のpHを確認したところ、7.20～8.01であった。可能な限りpHは7.0±0.5の範囲内にすべきと考え、HClを適宜添加し、pHを6.99～7.10に調整した。しかし、翌日(試験開始日)にはほぼ前日の数値に近い7.11～8.01まで戻っていたため、これ以上のpH調整を行わずに本試験を実施した。

*¹和光純薬工業株式会社製 試薬特級99.5%以上 Lot.No. CKG2830

*²株式会社愛工舎製作所製 ケンミックス アイコー・PRO シェフ

*³ 石英砂10g当り1 mLのアセトン(アセトン5,000 和光純薬工業株式会社製)に必要な量の被験物質を溶解させた被験物質溶液をパスツールピペットを用いてシャーレ内の石英砂に均一になるように添加後、約12時間ドラフト内に放置しアセトンを留去させた。

*⁴ 1容器当り10 gの割合

(2) 試験生物の投入

通気開始7日後に、実体顕微鏡で運動性を確認した1令幼虫をパスツールピペットを用いて試験容器内に投入した。その際、生物は水面下で投入し、水面付近に浮遊していないことを確認した。

7) 観察と測定

(1) 試験生物の羽化数

暴露期間中、各試験容器での雌雄別の羽化数を1日1回確認した。雌雄の判定は成虫の触角の形状で行った。

(2) 蛹脱皮殻の大きさ

試験生物の羽化後に確認された蛹脱皮殻は、随時ノギスを用いて長さを測定した。

(3) 試験容器内の状態

暴露期間中、試験容器内の状態(試験液、巣穴の有無、水面浮遊の蛹数他)を肉眼で観察できる範囲で1日1回確認した。また、死亡を確認した個体については確認した時点で速やかにとり除いた。

さらに、試験終了後に底質中の残存幼虫の存在について確認を行った。以下にその手順を示す。

① 上層水を取り除いた試験容器から底質全量を取り出す。

② 2.5 L円形ガラス容器の開口部にナイロン製のメッシュを張り、その上に①で取り出した底質を全量のをせる。

③ 脱塩素水道水を底質にかけながら底質を崩しメッシュに残った幼虫を確認する。

(4) 水 質

①溶存酸素濃度、pH及び水温

全試験容器について、暴露開始時及び暴露終了時を含む2回/週の頻度で測定した。溶存酸素濃度は溶存酸素計58型(Yellow Springs Instrument CO., Inc.)、pHはガラス電極式水素イオン濃度計HM-14P型(東亜ディーケーケー)及び水温は検定済ガラス製棒状温度計で測定した。

②硬度、pH及び水温

対照区的全試験容器及び試験最高濃度区(80 mg/kg区)の1試験容器について、暴露開始時及び暴露終了時に測定した。全硬度はEDTA滴定法、アルカリ度は酸消費量(JIS K 0101)により測定した。

(5) 被験物質濃度の測定

① 分析対象及び分析頻度

分析対象区： 対照区、14及び80 mg/kg区（各測定日について1試験容器）

分析対象部： 上層水、間隙水及び底質中

分析頻度： 試験開始前に7日間と設定された平衡化期間中の24及び96時間後
生物投入後(試験開始後)0、7、28日目

② 分析用試料の採取

上層水： 上層水中層付近を駒込ピペットを用いて必要量採取

間隙水： 上層水を全量除去した後、間隙水を含んだ底質を遠心分離(10,000g×
30 min.)後、水層を間隙水として採取

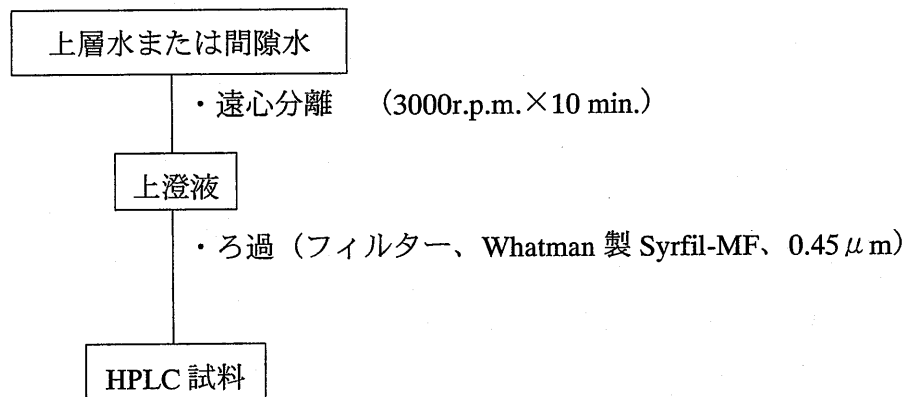
底質： 間隙水採取時の遠心分離後での残渣を底質分析試料とした

③ 前処理操作

a. 試験液(上層水、間隙水)

採取した上層水及び間隙水は以下のフロースキームに従って前処理操作を行い、
分析試料とした。ただし、検量線の範囲内を超えた場合は、適宜、脱塩素水道水で
希釈して分析試料とした。

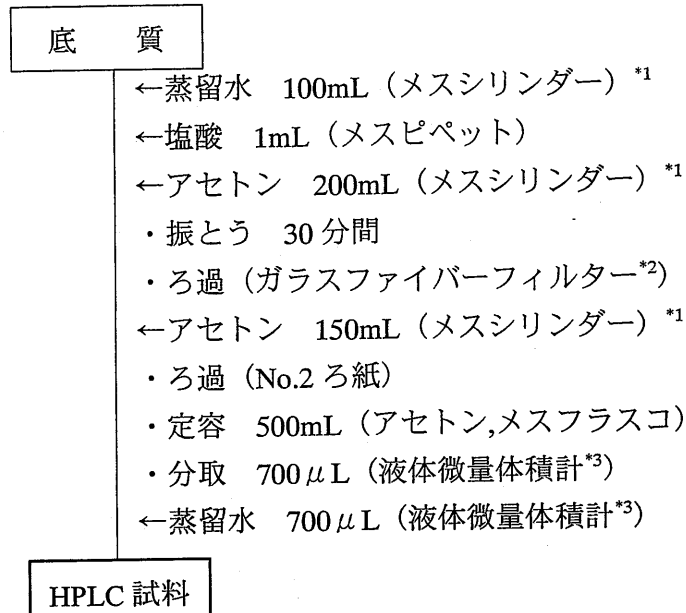
フロースキーム



b. 底質

採取した底質は、次頁のフロースキームに従って前処理操作を行い、分析試料と
した。ただし、検量線の範囲内を超えた場合は、500mL定容した試料を適宜、20%
蒸留水-アセトン溶液で希釈し、その後のフロースキームに従って前処理操作を行い、
分析試料とした。

フロースキーム



*1 底質を洗いこみながら添加した。

*2 ADVANTEC製 GA-200

*3 エッペンドルフ社製

④分析手法

前処理操作を行って得られた分析試料は、以下の定量条件に基づき高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により被験物質の定量を行った。分析試料中の被験物質濃度はクロマトグラム上の被験物質のピーク面積を濃度既知の標準溶液のピーク面積と比較し、比例計算して求めた。なお、底質中の被験物質濃度(mg/kg)については、底質を前処理して得られた分析用試料に含まれる被験物質濃度(mg/L)を、1試験容器あたりの底質量(実測値)をもとに換算して算出した。

分析機器の定量条件

機 器	高速液体クロマトグラフ
ポ ンプ	島津製作所製 LC-10ADvp
検 出 器	島津製作所製 SPD-10Avp
オートインジェクター	島津製作所製 SIL-10ADvp
カ ラ ム	L-column ODS 15 cm × 2.1 mm ϕ ステンレス製
カラム温度	40 $^{\circ}$ C
溶 離 液	アセトニトリル/りん酸緩衝液(pH2.5)* 75/25(v/v)
流 量	0.2 mL/min.
測定波長	214 nm
注 入 量	50 μ L (試験液)、10 μ L (底質)
感 度	
検 出 器	0.5 AU/1 V (試験液)、1.0 AU/1 V (底質)

* 20 mmol/L りん酸二水素カリウムをりん酸でpH2.5に調整

⑤標準溶液の調製

分析試料中の被験物質濃度を求めるための標準溶液の調製は次のように行った。

a. 試験液(上層水、間隙水)

被験物質20.0 mgを電子分析天びんで正確にはかりとり、アセトニトリルに溶解して1,000 mg/Lの被験物質溶液を調製した。これをアセトニトリルで希釈して100 mg/Lの被験物質溶液を調製した。続いて脱塩素水道水で希釈して10.0 mg/Lの被験物質溶液を調製した。さらに脱塩素水道水で希釈して0.100 mg/Lの被験物質溶液を調製した。この被験物質溶液を脱塩素水道水で希釈して0.0100 mg/Lの標準溶液を調製した。

b. 底質

被験物質20.0 mgを電子分析天びんで正確にはかりとり、アセトンに溶解して1,000 mg/Lの被験物質溶液を調製した。これを20%蒸留水-アセトン溶液で希釈して40.0 mg/Lの被験物質溶液を調製した。続いて20%蒸留水-アセトン溶液で希釈して4.00 mg/Lの被験物質溶液を調製した。さらにこれを20%蒸留水-アセトン溶液/蒸留水1/1(v/v)になるように希釈して2.00 mg/Lの標準溶液を調製した。

⑥検量線の作成

a. 試験液(上層水、間隙水)

⑤の標準溶液の調製と同様にして0.00100、0.00500、0.0100及び0.0200 mg/Lの標準溶液を調製した。これらを④の定量条件に従って分析し、得られたそれぞれのクロマトグラム上のピーク面積と被験物質濃度により、検量線を作成した。本試験の分析に用いた検量線を付属資料3に示す。なお、被験物質の定量下限は定量性が確認された範囲内の最小の標準溶液濃度(0.00100 mg/L)とした。よって、上層水あるいは間隙水中の被験物質の定量下限濃度は前処理操作を考慮して0.00100 mg/Lとした。

b. 底質

⑤の標準溶液の調製と同様にして0.200、1.00、2.00及び4.00 mg/Lの標準溶液を調製した。これらを④の定量条件に従って分析し、得られたそれぞれのクロマトグラム上のピーク面積と被験物質濃度により、検量線を作成した。本試験の分析に用いた検量線を付属資料3に示す。なお、被験物質の定量下限は定量性が確認された範囲内の最小の標準溶液濃度(0.200 mg/L)とした。よって、底質中の被験物質の定量下限濃度は前処理操作を考慮して0.400 mg/Lとした。

⑦回収試験及びブランク試験

③の試験液及び底質の前処理操作における回収率については以下の手順で求めた。

a. 試験液(上層水、間隙水)

上層水にアセトンに溶解させた被験物質溶液を添加(被験物質添加量：100 µg)し、回収用試験液とし、回収試験を行った。測定した回収率は100%であった。得られた回収率は100%であったため、回収率補正は行わなかった。

b.底質

石英砂10 gにアセトンに溶解させた被験物質溶液を添加(被験物質添加量: 2,100 μ g)し、ドラフト内で乾燥させた後、人工底質150 gと合わせ回収用試料とし、回収試験を行った。また、被験物質を加えない人工底質150 g(アセトンを添加)について、回収試験と同じ操作によりブランク試験を行った。測定した回収率は、それぞれ103.6、97.6%(平均101%)であった。得られた回収率の平均は101%であったため、回収率補正は行わなかった。

8) 結果の処理

結果の算出には設定濃度を用いた。

(1) NOEC/LOECの算出

①羽化率の算出

試験容器毎の羽化率(Emergence Ratio: ER)を以下の式に基づいて算出した。また、雌雄を区別した羽化率についても併せて算出した。

羽化率(%) $ER = ne/na$

ne=試験容器当りの羽化個体数 (全羽化個体数 or 雄個体 or 雌個体)

na=試験容器当りの投入した試験生物数(20個体)

②有意差検定

得られた羽化率のデータは検定前に逆正弦変換により分散の安定化を行った。逆正弦変換データについてBartlettによる等分散検定を行った後、各濃度区と対照区との有意差($p < 0.05$)の有無について一元配置分散分析及びDunnnettの検定により検定を行った。この有意差検定の結果からLOEC及びNOECを評価した。羽化率に関する有意差検定はEcotox Statics ver.2.2により実施した。雌雄比についてはカイ二乗検定により有意差検定を行った。雌雄比の検定については、統計処理ソフトSPSS ver.10.0を用いた。

(2) EC50の算出

①羽化率によるEC50

a.相対羽化率の算出

対照区の羽化率と各濃度区の羽化率より以下の式に基づき相対羽化率(Relative Emergence Ratio: RER)を求めた。

相対羽化率(%) $RER = ERa/ERb \times 100$

ERa=濃度区の羽化率

ERb=対照区の羽化率

b.EC50(ER)の算出

EC50は設定濃度と算出した相対羽化率を基にProbit法により算出した。また、それらの95%信頼限界も算出した。EC50(ER)及び95%信頼限界はEcotox Statics ver.2.2を用いて算出した。

②変態速度(Development Rate)によるEC50

a. 平均変態速度の算出

各観察日に羽化した個体数を基に以下の式により平均変態速度を求めた。

$$X = \sum f_i x_i / n_e$$

f_i : $i-1 \sim i$ 日に羽化した個体数

x_i : $1/(i-1/2)$

n_e : 1容器当りの総羽化個体数

b. EC50(DR)の算出

a. で求めた試験容器毎の平均変態速度と試験濃度に有意な濃度-反応関係があるかどうかを検定し、ある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を算出する。

(3) 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401 規則Bによった。

第3章 調査結果

3.1 各項目における観察及び測定結果

1) 試験生物の羽化数

(1) 羽化数、雌雄比

暴露期間中に観察された各試験区における羽化数及び羽化数より算出した羽化率と相対羽化率を表1、羽化数と性比の関係を図1に示した。対照区における羽化率(全体)は81.3%であり、試験成立条件(70%以上)を満足させるものであった。2.5 mg/kg区では対照区とほぼ同等の羽化率を示したが、それ以上の濃度区では8⇔14 mg/kg区において若干反応数で逆転がみられるものの、被験物質による羽化数阻害の影響が概ね濃度依存的に認められ、羽化率について8 mg/kg区以上の濃度区で対照区と比較して統計学的な有意差が認められた。

雌雄の偏りについては、4.5 mg/kg区で雄が少ない(or 雌が多い)結果となったが、それ以外の試験区では雌雄の大きな偏りはみられなかった。性比について4.5 mg/kg区でのみ対照区と比較して統計学的な有意差($p < 0.01$)が認められたが、それ以外の濃度区で有意差はみられず、濃度-反応に相関が認められないことから、4.5 mg/kg区での有意差は被験物質による影響とは考え難く、生物側の要因等のバラツキの結果生じた可能性が高い。従って、羽化率に関する有意差検定は雌雄を合わせた全体の数値を用いて実施した。

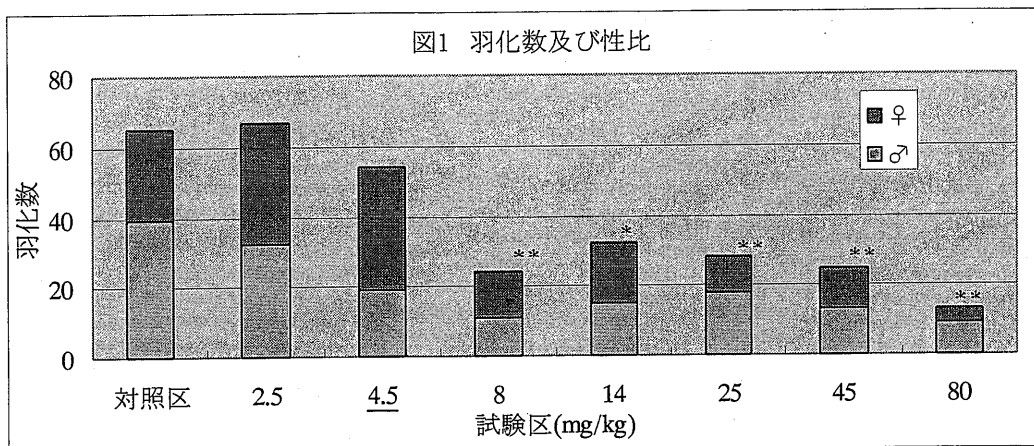
表1 羽化数及び羽化率

試験区 (mg/kg)	羽化数 (羽化率%)			相対羽化率 (%)
	♂	♀	全体	
対照区	39 (48.8)	26 (32.5)	65 (81.3)	—
2.5	32 (40.0)	35 (43.8)	67 (83.8)	103
4.5	19 (23.8)	35 (43.8)	54 (67.5)	83.1
8	11 (13.8)	13 (16.3)	24 (30.0)	36.9**
14	15 (18.8)	17 (21.3)	32 (40.0)	49.2*
25	18 (22.5)	10 (12.5)	28 (35.0)	43.1**
45	13 (16.3)	12 (15.0)	25 (31.3)	38.5**
80 ^f	9 (11.3)	4 (5.0)	13 (16.3)	20.0**

下線のついた試験区は雌雄比に関して有意差($p < 0.01$)が認められたことを示す。

* 羽化率に関して統計学的有意差($p < 0.05$)が認められたことを示す。

** 羽化率に関して統計学的有意差($p < 0.01$)が認められたことを示す。



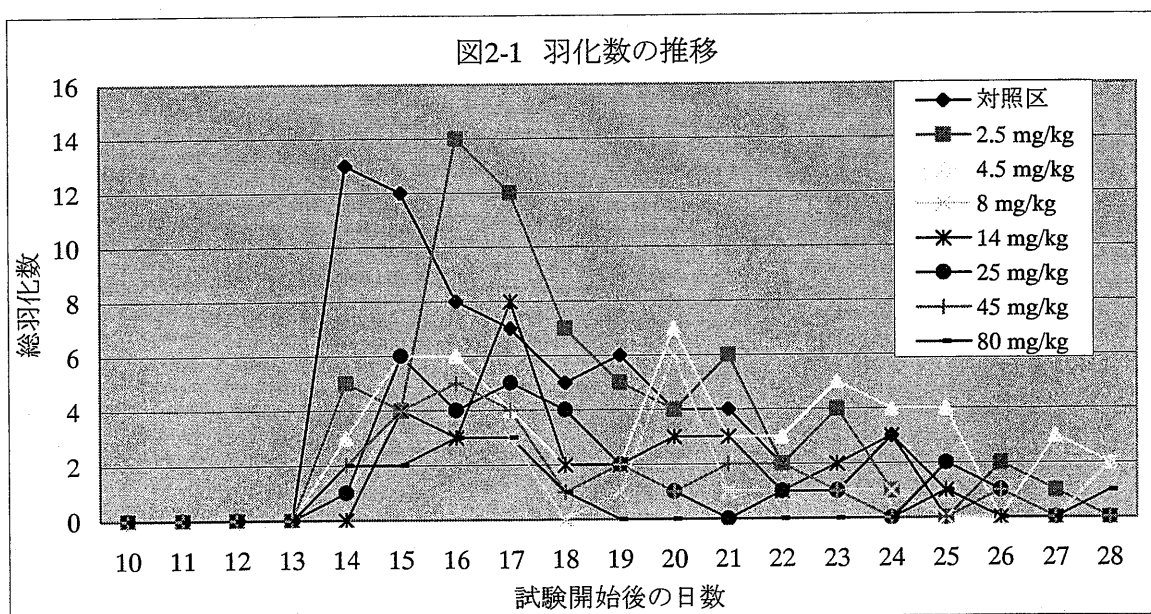
下線のついた試験区は雌雄比に関して有意差($p < 0.01$)が認められたことを示す。

* 羽化率に関して統計学的有意差($p < 0.05$)が認められたことを示す。

** 羽化率に関して統計学的有意差($p < 0.01$)が認められたことを示す。

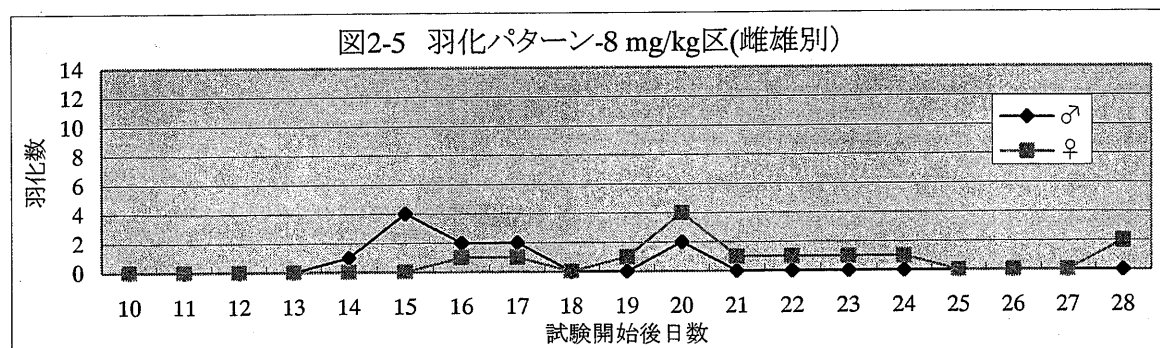
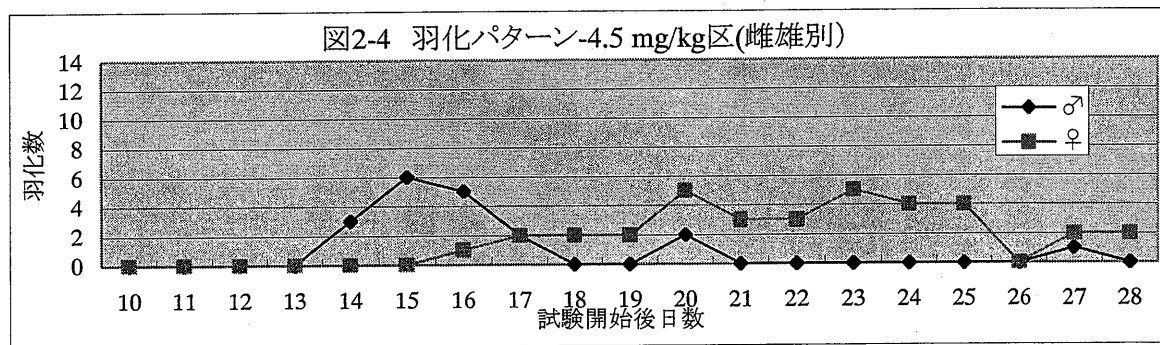
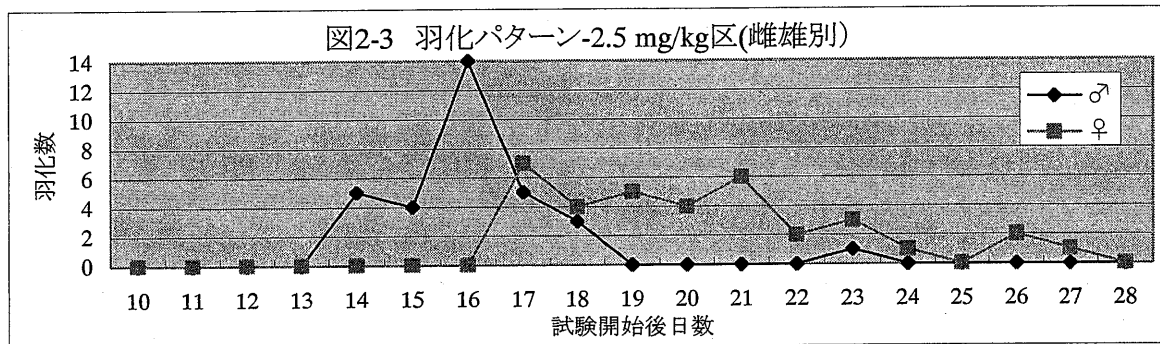
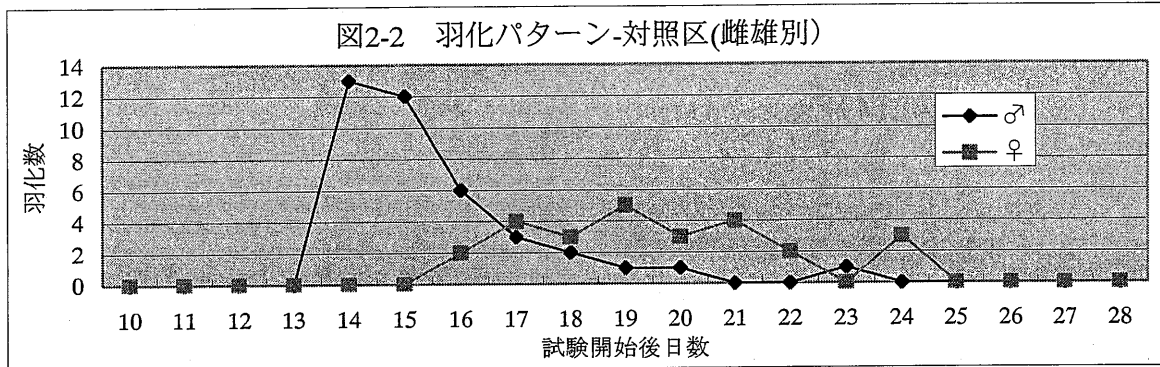
(2) 羽化日数

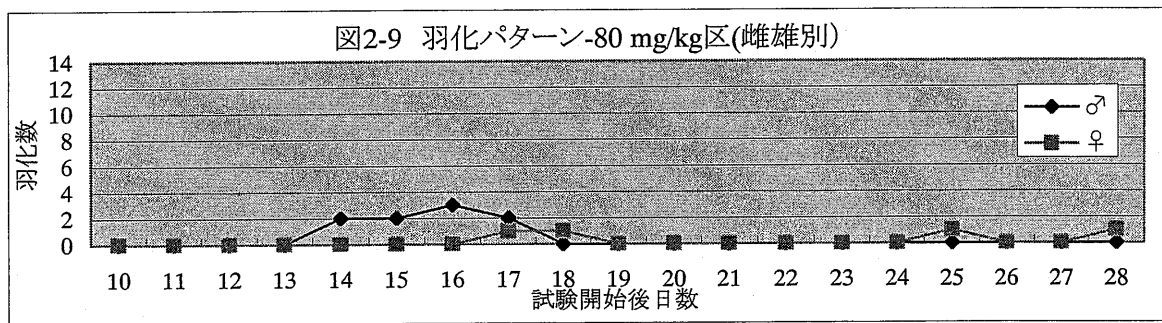
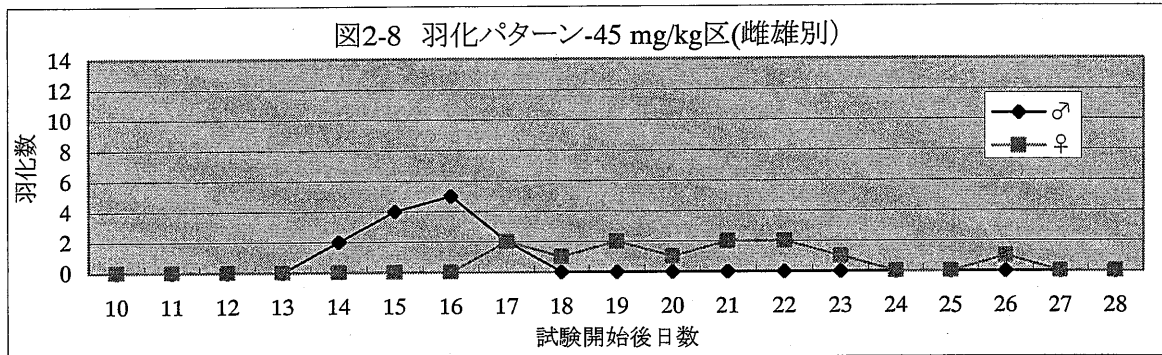
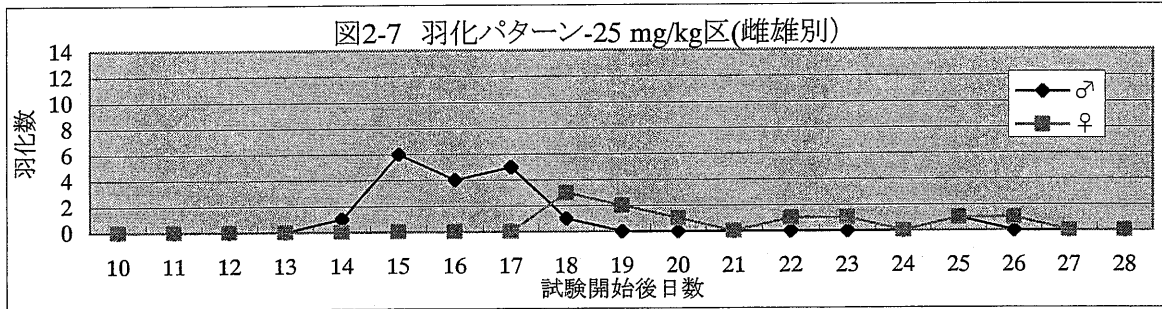
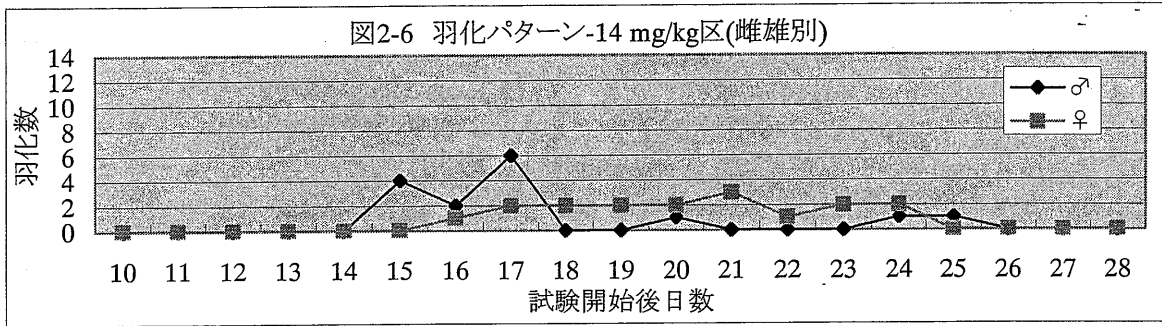
暴露期間中に観察された羽化数の推移を図2-1に示す。対照区における羽化は試験開始後14~24日で確認されたが、テストガイドラインにおける試験成立条件では「対照区での羽化が試験開始12日~23日にあること」と既定されており、本試験ではその条件から若干逸脱した結果となった。しかしながら、羽化の遅れは1日に留まり、また24日目の羽化数は3個体と対照区の総羽化数(65個体)の5%未満であることから、試験結果に影響する可能性は低いものと考えられる。対照区及び2.5 mg/kg区では羽化日数について明確なピークが存在(図1参照)するが、それ以外の濃度区では顕著なピークは認められなかった。



(3) 雌雄別羽化パターン

全試験区における雌雄別の羽化パターンについて以下の図2-2～2-8に示した。対照区では、雄の羽化開始日に数日遅れで雌の羽化が始まる典型的なパターンを示しており、同様のパターンは他の試験区でも確認できる。雄の羽化数について、対照区及び2.5 mg/kg区では明確なピークが認められるが、それ以上の試験区では羽化数の減少に伴い、顕著なピークは認められなかった。雌の羽化数については全試験区においてあまり明確なピークはみられなかった。



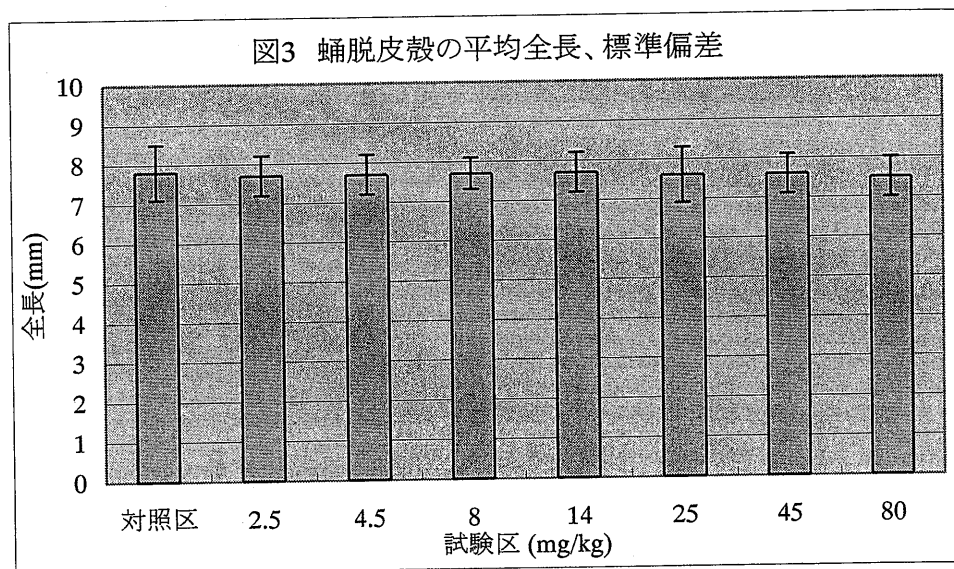


2) 蛹脱皮殻の大きさ

試験区毎に暴露期間中に観察された蛹脱皮殻の全長の測定結果を表3及び図3に示す。今回、脱皮殻での雌雄判別は行わなかったため、下表の数値は雌雄混合のものである。その結果、蛹脱皮殻の全長は高濃度ほど僅かではあるが減少する傾向が確認された。対照区との比較で、全濃度区とも統計学的な有意差は認められなかった。

表3 各試験区での蛹脱皮殻の全長

試験区 (mg/kg)	蛹脱皮殻の全長(mm)
	平均±SD (最低～最高)
対照区	7.8 ± 0.7 (5.3～8.9)
2.5	7.7 ± 0.5 (5.5～8.6)
4.5	7.7 ± 0.5 (5.8～8.9)
8	7.7 ± 0.4 (6.8～8.4)
14	7.7 ± 0.5 (6.8～8.8)
25	7.6 ± 0.7 (4.8～8.7)
45	7.6 ± 0.5 (7.0～8.6)
80	7.5 ± 0.5 (6.7～8.5)



3) 平均変態速度

試験容器毎に算出した平均変態速度を表4に示す。この結果からは濃度-反応の関係は認められず、PCPの毒性は生長速度には影響を与えなかったと判断された。従って、平均変態速度からのEC50算出は行わなかった。

表4 各試験容器での平均変態速度

試験区 (mg/kg)	試験容器			
	A	B	C	D
対照区	0.0559	0.0601	0.0603	0.0697
2.5	0.0544	0.0581	0.0613	0.0566
4.5	0.0467	0.0562	0.0497	0.0597
8	0.0532	0.0637	0.0559	0.0547
14	0.0595	0.0570	0.0558	0.0540
25	0.0707	0.0571	0.0555	0.0662
45	0.0546	0.0565	0.0610	0.0637
80	0.0679	0.0645	0.0542	0.0609

4) 試験容器内の状態

試験期間中に観察した各試験区での試験容器内の状態を表5-1に示す。対照区と比較した場合、4.5 mg/kg区までは特段の差異は認められなかったが、8 mg/kg区以上の濃度区では土壌表面に形成された巣穴数が少なく、さらに45 mg/kg区以上では羽化直前の蛹が水面に長期間浮遊し、浮遊後蛹のまま死亡する個体も確認された。試験開始10日後以降で上層水の濁りが一部の容器で認められたが、限られた濃度区でのみ生じたわけではなく、同一試験区での4容器内で様々であった。

また、試験終了後に底質中の残存幼虫の有無を確認したが、4.5、8、14及び45 mg/kg区では底質中の幼虫の存在が確認できた(下表5-2参照)。それ以外の試験区では幼虫は認められなかった。これらのことから、4.5~45 mg/kg区の試験区では、被験物質の垂致死的影響により羽化の遅延が発生し、そのため試験終了時において底質中に生存個体が残存したのではないかと考えられる。高濃度になるに従い残存個体数は減少し、80 mg/kg区では残存個体はみられなかったが、これは高濃度区では被験物質が致死的影響を及ぼしたため試験開始後早期に生物が死亡し、死亡個体は試験終了時まで底質中で分解・消失したため、幼虫が存在しなかったのではないと思われる。

表5-1 試験容器内の状態

試験区(mg/kg)	試験容器内の状態
対照区	試験開始5日後に巣穴確認、容器によって濁り有り
2.5	試験開始5日後に巣穴確認、容器によって濁り有り
4.5	試験開始5日後に巣穴確認、容器によって濁り有り
8	試験開始5日後に巣穴(少なめ)確認、容器によって濁り有りあり
14	試験開始5日後に巣穴(少なめ)確認、容器によって濁り有りあり
25	試験開始5日後に巣穴(少なめ)確認、容器によって濁り有りあり
45	試験開始5日後に巣穴(少なめ)確認、容器によって濁り有りあり 水面に数日間(最長9日間)浮遊し続ける蛹を数個体確認
80	試験開始5日後に巣穴(少なめ)確認、容器によって濁り有りあり 水面に数日間(最長2日間)浮遊し続ける蛹を1個体確認

表5-2 底質中の残存個体数

試験区 (mg/kg)	底質中の残存個体数 (試験終了後)
対照区	0
2.5	0
4.5	5
8	1
14	3
25	0
45	1
80	0

5) 水 質

(1) 溶存酸素濃度及び水温

試験期間中に測定した溶存酸素濃度及び水温を表6、試験期間中における各項目の測定値の推移を図6-1、6-2にまとめた。溶存酸素濃度については、全試験区で試験濃度における飽和溶存酸素濃度*の60%を超えており、溶存酸素濃度に関する試験成立条件(飽和濃度の60%以上)を満たしていた。試験開始21日後以降で若干濃度の減少が確認されたが、これは試験容器内に繁殖した微生物による酸素消費増が原因ではないかと思われる。繁殖試験開始21日後では試験生物の水温についても、全ての測定値は試験設定濃度である $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ の範囲内にあり、水温に関する試験成立条件($\pm 1^{\circ}\text{C}$ を超える変動がないこと)も満たしていた。

* $22\sim 24^{\circ}\text{C}$ の飽和溶存酸素濃度：8.53～8.25 mg/L(JIS K 0102)

表6 各試験区におけるDO、水温測定結果

試験区 (mg/kg)	平均 \pm SD (最低～最高)	
	DO(mg/L)	水温($^{\circ}\text{C}$)
対照区	7.3 \pm 0.7 (5.6～8.3)	23.1 \pm 0.3 (22.7～23.8)
2.5	7.3 \pm 0.6 (6.0～8.2)	23.2 \pm 0.3 (22.7～23.8)
4.5	7.5 \pm 0.6 (5.5～8.3)	23.2 \pm 0.3 (22.8～23.8)
8	7.6 \pm 0.5 (5.7～8.2)	23.1 \pm 0.2 (22.9～23.6)
14	7.3 \pm 0.6 (5.8～8.1)	23.2 \pm 0.2 (22.8～23.6)
25	7.5 \pm 0.6 (6.0～8.2)	23.2 \pm 0.2 (22.9～23.6)
45	7.5 \pm 0.6 (6.0～8.2)	23.2 \pm 0.2 (22.9～23.6)
80	7.5 \pm 0.6 (6.1～8.2)	23.2 \pm 0.2 (22.9～23.6)

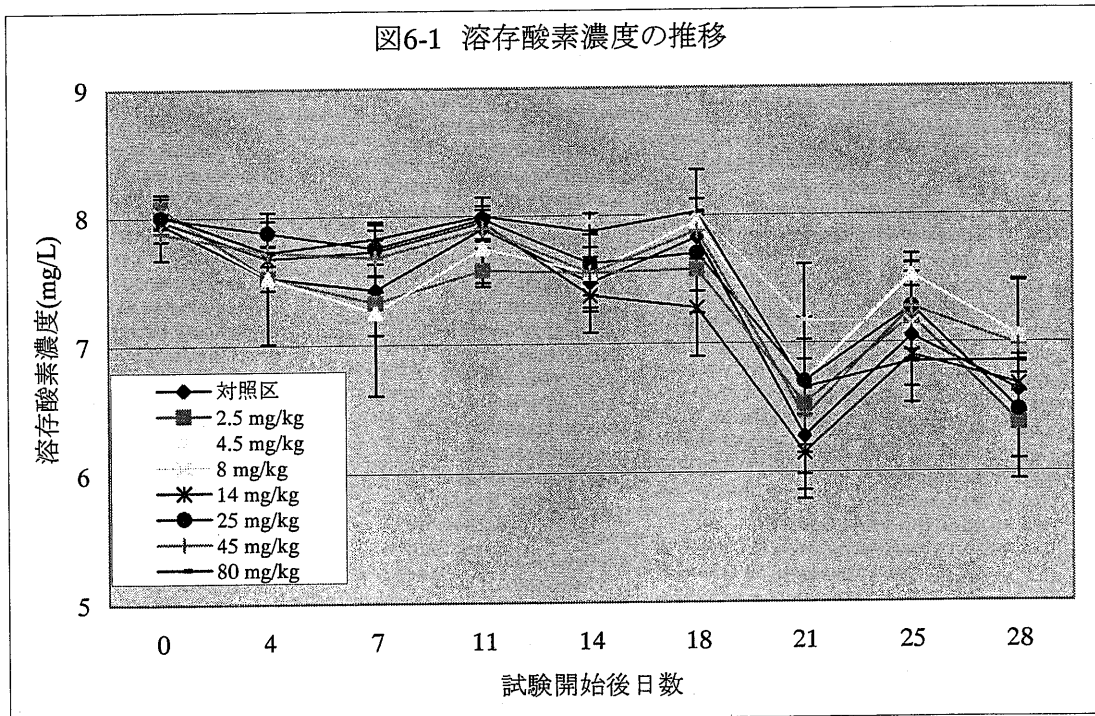
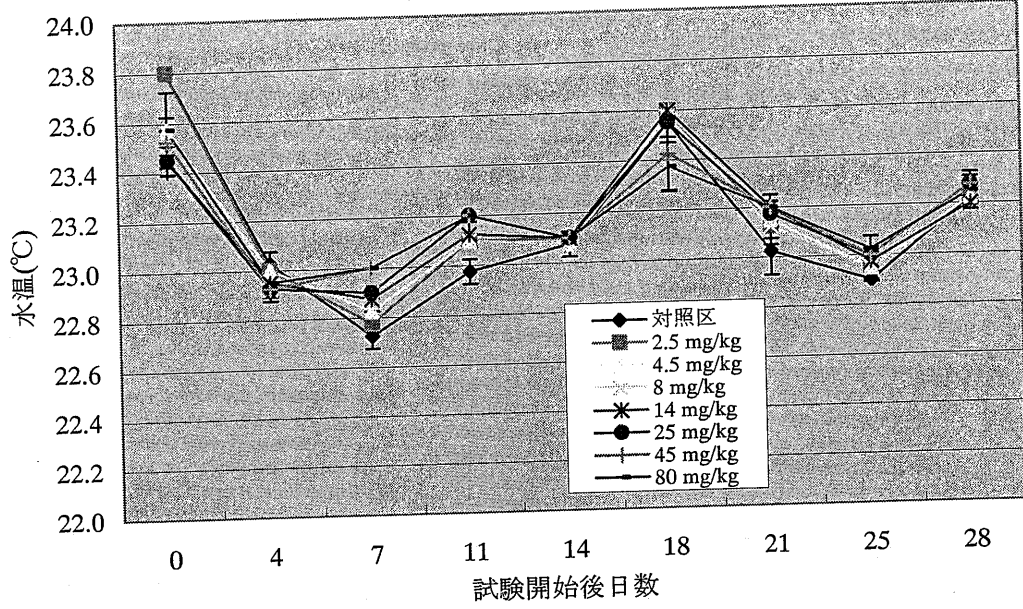


図6-2 水温の推移

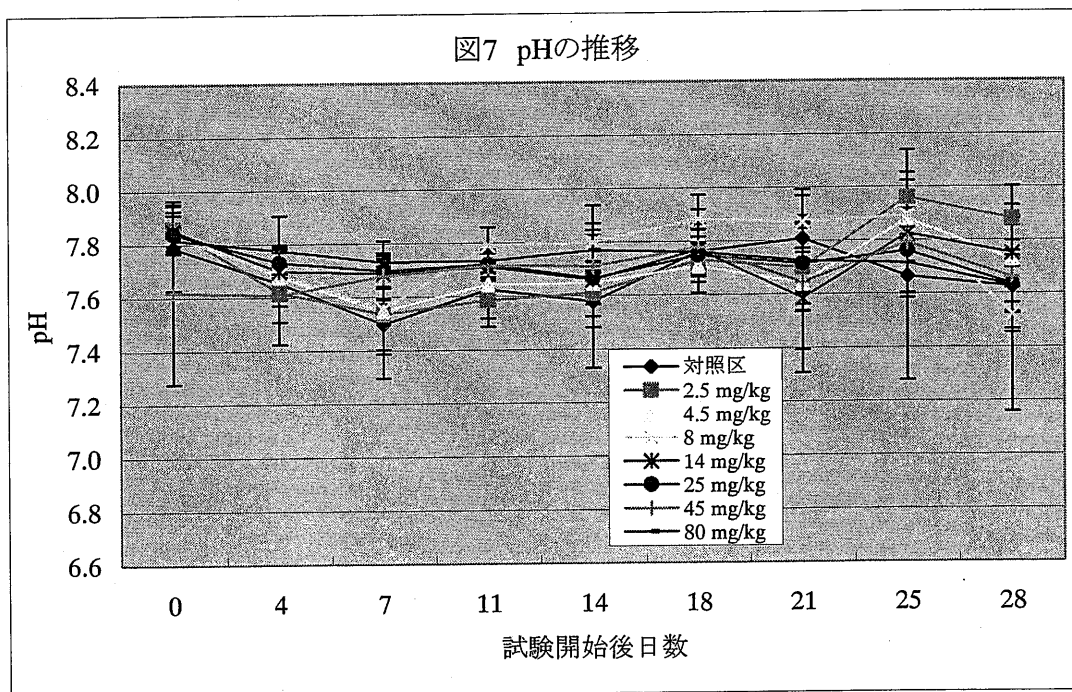


(2) pH

試験開始前日及び暴露期間中に測定したpHを表7、試験期間中の測定値の推移を図7にまとめた。試験開始時のpHは7.11～8.01の範囲にあり、テストガイドラインで規定されているpH6～9の範囲内であった。試験期間中のpHは目立った変化はみられず、試験終了時での値は試験成立条件(全ての試験容器で6～9の範囲内)を満足させるものであった。

表7 各試験区におけるpH

試験区 (mg/kg)	試験開始前日		試験開始時	試験終了時	試験期間中 平均±SD
	調整前	調整後			
対照区	7.20～7.82	7.05～7.10	7.63～8.01	7.51～7.88	7.67 ± 0.20
2.5	7.85～8.01	7.02～7.07	7.77～7.95	7.76～8.04	7.72 ± 0.17
4.5	7.76～7.89	7.02～7.07	7.78～7.92	7.54～7.99	7.70 ± 0.16
8	7.76～7.95	7.03～7.05	7.80～7.88	7.20～7.99	7.76 ± 0.20
14	7.75～7.89	7.03～7.05	7.81～7.96	7.57～7.87	7.73 ± 0.13
25	7.77～7.92	6.99～7.05	7.74～7.90	7.53～7.76	7.72 ± 0.10
45	7.21～7.87	7.01～7.03	7.11～7.85	7.51～7.93	7.69 ± 0.17
80	7.79～7.89	6.99～7.02	7.76～7.85	7.54～7.69	7.74 ± 0.09



(3) 硬度及びアンモニア濃度

試験開始時及び終了時に測定した硬度及びアンモニア濃度を表8にまとめた。

硬度については試験用水として使用した脱塩素水道水の数値(平均40 mgCaCO₃/L付近)と比較すると、開始時の時点で対照区及び80 mg/kg区共に低く、暴露終了時では更に低い結果が得られた。

アンモニア濃度については開始時と終了時の測定値を比較すると大幅に濃度が低下していた。濃度低下について一般論での解釈をすれば、試験容器内に発生した硝化細菌によりアンモニアが亜硝酸や硝酸に酸化されたためと考えるべきであろう。なお、測定時のpH及び解離定数より算出した非解離型アンモニア濃度も併記した。

表8 各試験区におけるpH

項目		対照区	試験最高濃度区
硬度 (mg CaCO ₃ /L)	開始時	24.9~27.3	25.7
	終了時	8.4~10.2	10.6
アンモニア濃度 (mg/L)	開始時	1.57~2.41 (0.0516~0.141)*	1.44 (0.0556)*
	終了時	0.02~0.90 (0.000925~0.0390)*	0.03 (0.000715)*

*非解離型アンモニア換算値

非解離アンモニア濃度=(測定濃度)×[OH]/Kb

ここでKb(解離定数)= 1.75×10^{-5}

(2) 被験物質濃度

①各層における被験物質濃度

試験開始前の平衡化期間及び試験期間中に測定した上層水、間隙水及び底質中の被験物質濃度を表9、14及び80 mg/kg区における被験物質濃度の変化を図9-1、9-2に示す。その結果、OECDテストガイドライン218では底質中に被験物質を散布するため、底質中濃度が平衡化開始直後が高く、その後、徐々に底質中から上層水及び間隙水中へ被験物質の移行が確認された。各濃度区における底質中濃度の対設定値は、80 mg/kg区では平衡化開始直後ではほぼ設定値通りの結果が得られたが、14 mg/kg区では平衡化開始直後でも対設定値は非常に低く、その後の経過としては80 mg/kg区同様、徐々に底質中濃度が低下する傾向を示しつつも対設定濃度は終始低い結果であった。14 mg/kg区の底質中濃度の対設定値が低かったことの原因は不明であるが、容器間のばらつきが殆ど無かったことから、底質調製時、4容器に分割する前に被験物質のロスが生じた可能性が高い。

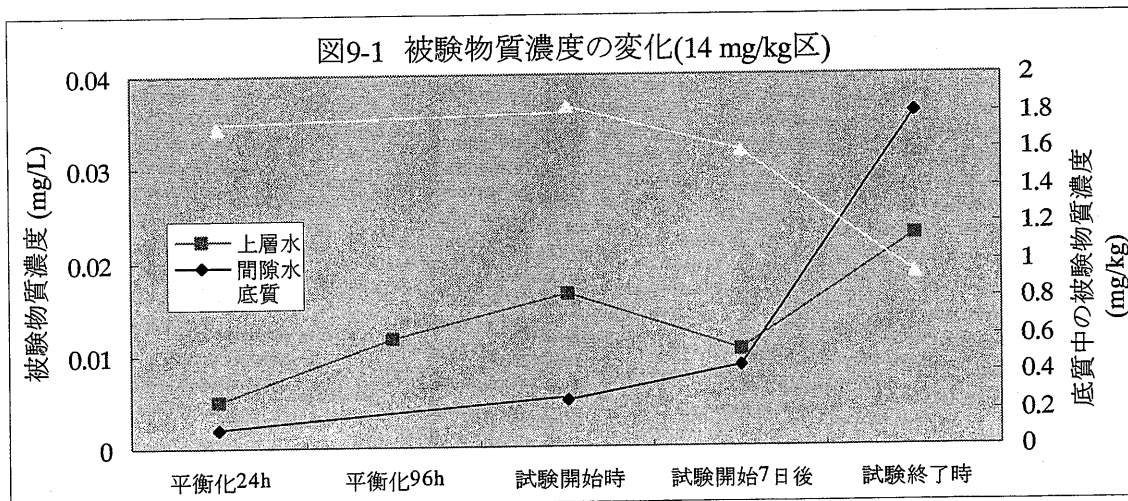
試験で設定した7日間の平衡化期間については、底質中濃度については大きな変動はみられなかったが、上層水及び間隙水中濃度の推移から判断すると、7日間で平衡に達したとは考え難い。

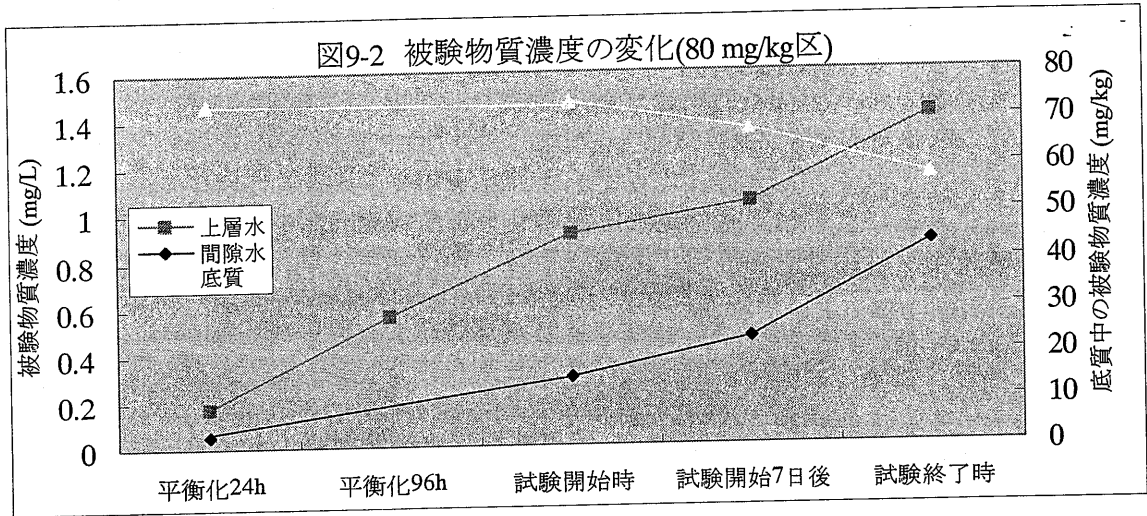
表9 被験物質濃度測定結果

試験区 (mg/kg)	上層水、間隙水：mg/L、底質：mg/kg (対設定値%)					
	平衡化期間		試験開始時	試験開始7日後	試験終了時	
	24時間後	96時間後				
対照区	上層	—	—	n.d.	n.d.	n.d.
	間隙	—	—	n.d.	n.d.	n.d.
	底質	—	—	n.d.	n.d.	n.d.
14	上層	0.00501	0.0116	0.0165	0.0104	0.0227
	間隙	0.00193	—	0.00506	0.00863	0.0358
	底質	1.72(12.3)	—	1.83(13.4)	1.59(11.6)	0.933(7.21)
80	上層	0.177	0.565	0.911	1.04	1.41
	間隙	0.0492	—	0.291	0.455	0.861
	底質	73.6(97.7)	—	73.6(95.6)	67.6(88.8)	57.7(77.9)

n.d. : 0.00100 mg/L(上層水・間隙水)、0.400 mg/L(底質)

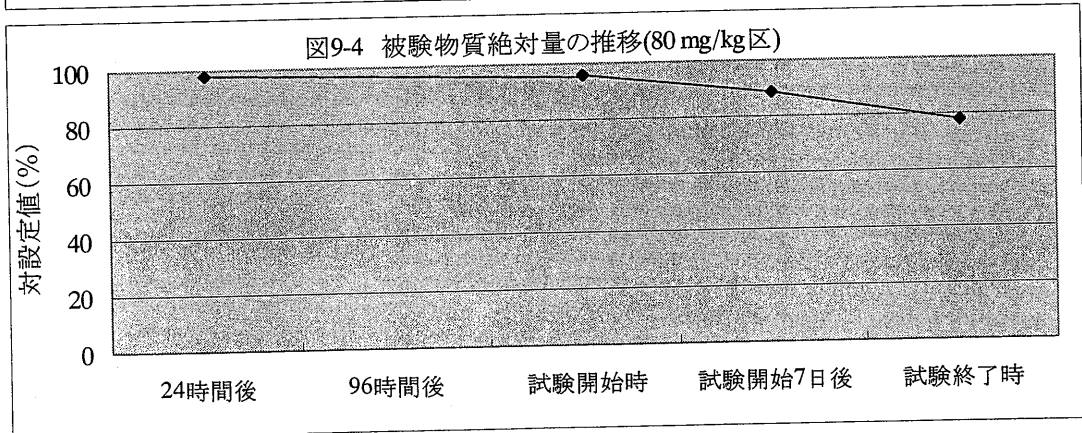
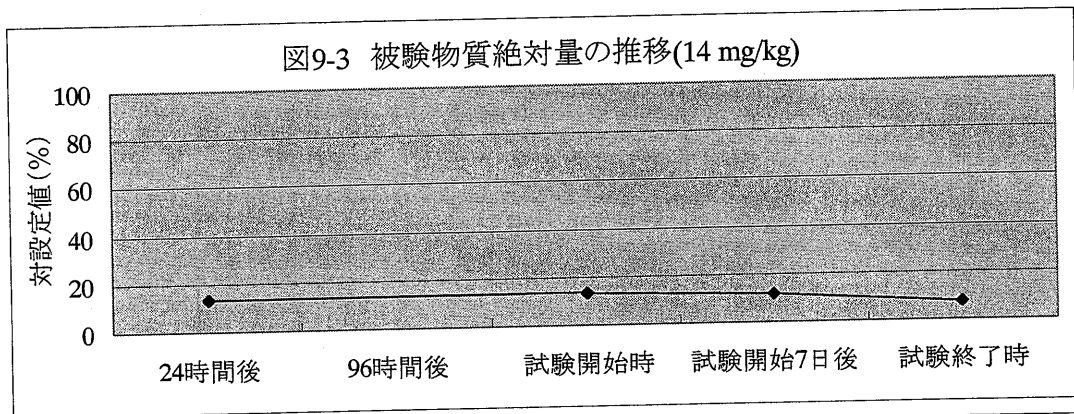
— : 測定せず





②試験容器中に存在する被験物質絶対量の推移

各層中の被験物質濃度より算出した試験容器中に存在する被験物質絶対量の初期投与量(理論量)に対する割合(対設定値%)の推移を以下の図9-3、9-4に示した。今回測定を行った14、80 mg/kg区共に試験容器内の被験物質絶対量は時間の経過と共に徐々に減少し、減少率は80 mg/kg区で若干高かった。絶対量減少の原因として生物(試験生物及び試験容器内で繁殖した微生物)による取り込みが考えられるが、PCPの濃縮性(BCF=53)はあまり高くないため断定はできない。PCPは水中光分解のデータ(WP-DT₅₀:5day)もあるため、光分解による低下の可能性も考えられる。



3.2 被験物質の生物に対する毒性

1) 結果の評価

(1) NOEC/LOEC

各試験区での羽化率を基に算出した、本試験におけるNOEC及びLOECを以下に示す。なお、NOEC/LOEC算出に用いた統計プログラムの出力データを付属資料4に示す。

試験期間	NOEC	LOEC
28 day	4.5 mg/kg	8 mg/kg

(2) EC50

被験物質のセスジユスリカに対する28-day EC50、95%信頼限界、算出に使用した回帰式の情報及び算出法を以下に示す。平均生長率による算出については、EC50算出のための適切なデータが得られなかったため算出していない。なお、NOEC/LOEC算出に用いた統計プログラムの出力データを付属資料4に示す。

	28-day EC50 (mg/kg)	95%信頼限界 (mg/kg)	回帰式の 傾き	標準誤差	EC50算出法
羽化率	13.7	8.49~22.0	-1.32	0.29	Probit

2) 考察

本予備試験ではセスジユスリカを用いて難水溶性物質ペンタクロロフェノールについての毒性影響調査を行いつつ、OECDドラフトテストガイドラインに既定されている手順に沿って実際に試験操作を行い、試験実施上の問題点について併せて抽出を行った。

ここではまず、「本試験がテストガイドラインでの要求を満たしているか」について検証を行い、次に、試験実施上の問題点や、テストガイドラインの様々な内容・記述が適切かどうかについて項目別に考察してみた。

(1) 試験のクライテリア

初めにOECD T.G.218(DRAFT)に規定されているクライテリアについて検証を行った。OECD T.G.218(DRAFT)に既定されている4種のクライテリア(①対照区の羽化率、②対照区での羽化日数、③溶存酸素濃度及びpH、④水温)の内、本試験では②のみ規定から外れた結果となった。この原因については試験生物と試験環境条件の2つの側面からそれぞれ考察を行った。

まず、試験生物については、豊富なバックグラウンドデータを有する系統であるので問題はないと思われるが、試験生物提供先(茨城県)から当施設(福岡県)へ卵塊送付時の水温が冬季であったため到着時14℃と低く、また輸送にも2日間を要した。カナダ環境局発行のユスリカ試験TG*1では幼虫順化の際、温度変化は2℃/day以内とすべきとの記述があるが、今回卵塊の水温順化の際、±2℃/dayを守ると低温での順化が長引き孵化遅延により試験開始予定日に孵化個体が得られなくなる恐れがあったため、当施設で卵塊受領後、受領容器ごと23℃水槽に浸し温度順化(温度変化9℃/day)を行った。これらはあくまで試験開始前の生物の状況であるが、これらの

ことが、後の羽化日数に影響を与えた可能性がある」と推察された。

次に試験環境条件であるが、クライテリアに含まれる項目(溶存酸素濃度、pH、水温)については全て基準値以内であったので問題はないと判断した。それ以外のTGでの規定(収容密度、照度、硬度、底質の組成、有機炭素含有量、上層水量等)については全て許容範囲内もしくは規定値で実施しており問題ないとする。TGでの要求事項ではないが、「仕様書」には通気位置を底質面から3~4cmとせよとあるが、本試験では水深3~4cmの位置で通気を実施した。溶存酸素の維持については問題なかったが、平成14年度底生生物試験に関する国環研の調査報告^{*2}では通気位置を底質面から3~4cmの位置とした場合、羽化数が良好である結果が得られている。しかし、羽化日数については変化がなかったため、今回の羽化遅延との関連は低いのではないと思われる。

*1 「Biological Test Method: Test for Survival and Growth in Sediment Using the Larvae of freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*) 1997, Environment Canada」

*2 「平成14年度 底生生物試験法の検討調査報告書 独立行政法人 国立環境研究所 (平成15年3月)」

(2) 試験実施上の問題点

①人工底質のpH調整のタイミング

pH調整については今回の試験で悩まされた最たる部分であったが、そのpH調整を余儀なくさせる原因であるピートモスは、添加する被験物質が吸着する可能性が最も高い有機成分であることは間違いないが、これは試験実施上非常に重要であると同時に注意すべき部分でもある。ピートモス単体では非常にpHが低く、そのため、低pH環境で変化するような被験物質をpH未調整のまま混合させると被験物質が影響を受ける可能性がある。テストガイドラインには最終的な混合底質のpHを規準値以内(7.0 ± 0.5)に調整することのみ記述があり、そのタイミングについて何も書かれていない。今回の実験ではこの点を重要視し、被験物質投入時(混合時)にはpH調整を終えていることが必須と考え、ピートモス前処理時(底質混合前)に CaCO_3 添加によりpH調整を行った。ここでpH調整を行うと水懸濁液に CaCO_3 を添加することになるため、pHが調整しやすいという利点もある。仮に、被験物質の低pHによる影響を無視出来るとしても、底質のpHを CaCO_3 添加により 7.0 ± 0.5 以内に調整をするのは実操作として非常に手間がかかることが予想される。以上の理由により、ピートモス48時間攪拌時にpH調整を終える等の、pH調整のタイミングに関しての詳細をテストガイドラインで規定されるべきと考える。

②ピートモス入手

今回人工底質の成分については全て国環研より提供された。その中で、試薬の形で提供された石英砂及びカオリンについては、いつでも同品質のものを入手できるが、ピートモスについては一般で同品質のものを入手するのは今のところ困難であるように思われる。今後、化審法等でこのテストガイドラインに基づく試験実施が要求される可能性があるため、各ラボが各種材料入手する際、ピートモスは試薬ではないため、その入手ルートは様々になる可能性があるが、ピートモスは先に述べたように被験物質が吸着する重要な成分であるため、その供給ルートを同じ(可能なら国環研のような機関で常時提供)にすることが望ましい。

③混合後底質の水分含量

ピートモスは前処理として水中で48時間攪拌を行い、その後水分を除去して他の成分と共に混合することになるが、攪拌後のピートモス懸濁液は「仕様書」にあるような静置のみでは完全に沈殿せず、何らかの方法により水分除去を行う必要がある。今回は遠心分離(10,000g×30min.)により水分を除去したが、遠沈管内のピートモス全量を取り出すため少量の水で遠沈管内を洗った。ここで使用した水分はそのまま底質に移行するため、底質混合時にさらに水分を添加することはしなかった(ここで入れなくても、恐らくテストガイドラインに規定される各成分混合後の水分含量30~50%に達していたと思われる)。テストガイドラインで水分量を調整する理由は底質混合の際、各底質成分及びpH調整のためのCaCO₃が十分に混ざるように湿らせておくためではないかと思われるが、テストガイドラインで水分含量を規定してしまうと、遠沈管洗いこみ時の水使用量や遠心分離後のピートモス中の水分量等まで確認する必要性が生じる。テストガイドラインで水分量を調整する理由が前述の通りであるなら、最終的に均質な人工底質が調製できさえすればよく、水分含量は規定する必要は無いように思われる。

④被験物質の添加法

被験物質の添加は、テストガイドライン通りアセトンに溶解させた被験物質を石英砂に吸着させ、その石英砂を人工底質に混合させたが、本試験で測定した14 mg/kg区での被験物質絶対量は理論量を大きく下回っていた。同試験区内の別容器でも同様に低いため、底質混合時の被験物質の偏りに起因するものではなく、底質に被験物質を添加した時点でロスが生じていたと考える。最も可能性が高いのは石英砂に被験物質を吸着させる際のガラス製シャーレへの吸着が考えられるが、これについては設定濃度が低くなるに従い、シャーレへの吸着によるロスの可能性は高くなるはずである。試験では被験物質濃度の測定を行えば実測濃度での評価が可能のため問題ないかもしれないが、被験物質によっては濃度測定が困難な場合もあるため、ロスの無い或いは限りなく少なくなるような被験物質の添加方法を考案する必要がある。

⑤平衡化時間の設定

底質からの溶出速度や分解速度等は被験物質の性状に依存するため、平衡化時間の標準化は難しいと推測される。今回設定された7日間については被験物質濃度測定結果から判断すると、十分な平衡には達していないように思われる。仮に検討により平衡化に十分な期間を割り出し、それに基づき本試験を行うことも可能であるが、現在のところ、平衡に達したとみなせる判断基準が不明である。従って、平衡化期間を被験物質毎に設定する必要があるのなら、その判断基準を明確にする必要がある。

⑥上層水中の懸濁物

上層水での被験物質濃度の測定では、分析前の前処理において遠心分離を行っているが、上層水の遠心分離で得られた残渣の取り扱いが検討課題と考えられる。この残渣は試験系では上層水中に浮遊(懸濁)していたものと思われるが、沈殿していない以上、この残渣に含まれる被験物質が直接底質中に存在する試験生物に影響を与える可能性は低いと考えられるため、ここでの残渣も底質分析時と同様の前処理を行い、得られた被験物質量は上層水中濃度に含めるべきと思われる。

⑦試験開始時のpH許容範囲

試験開始時に投入される生物は孵化直後であり、直ぐに底質中に移動することができない。それは数日間上層水にさらされることを意味し、試験開始時の上層水のコンディション次第でその後の結果に影響を与える可能性が高いため、試験開始時の水質には特に注意すべきである。テストガイドラインでの試験開始時のpH許容範囲は6~9と結構広いが、恐らくこの範囲ではアンモニア等の毒性は無いというデータが取られているはずである。しかし、被験物質によってはpHの変化に伴い、毒性が変動するものもあり、許容範囲内にあるとはいえ、pH6の試験系とpH9の試験系では結果に差が生じる恐れがある。試験開始直後の生物は前述の通りであるため、試験開始時のpHには特に注意する(pH許容値を狭める)必要があるのではないか。

第4章 調査結果のまとめ

- ・ 水環境中において底質中で残留の可能性の高い物質の1つであるペンタクロロフェノールを被験物質とし、セスジユスリカを用いてOECDドラフトテストガイドライン218での内容に準拠した形で予備的試験を実施した。その結果、テストガイドラインでの有効性基準を一部逸脱した部分もあったが、概ねTG通りに試験を実施できたのではないかとと思われる。
- ・ OECDテストガイドラインに従った実試験操作に関しては幾つかの疑問点生じ、これらについては今後試験実施者間の意見交換や試験手法検討を行う必要性を感じた。さらに、テストガイドライン上に既定する必要の無い部分や、逆に既定が必要な部分については、OECDに対してコメントすることも必要かもしれない。