

魚類急性毒性試験等における 毒性症状の記載について

鑪迫 典久

(独) 国立環境研究所環境リスク研究センター

背景

- **化審法試験法通知及び環境省の実施する生態毒性試験の仕様書において、魚類の毒性症状についての記載が求められている。**
- **毒性症状の定義および記載方法については試験施設の判断に依存している。**
- **魚類急性毒性試験において、重篤な毒性症状は、生態毒性に関する重要な知見である。**
- **毒性症状の記載を今後化学物質の安全性評価判断に用いるかどうかは未定であるが、将来的に有効な共通財産となるように整備したい。**
- **よって症状の定義を明確にし、記載法を統一することが望ましいと考えられる。**

問題点

- 毒性症状の表記に用いられている語句が試験施設間で統一されていない。
- 毒性症状の解釈と語句が一致していない。
- 語句は同じだが異なる症状を示していることがある。
- 症状は同じだが異なる語句を使用していることがある。

目標

- **魚類の毒性症状における記載の統一及び重篤な毒性症状の定義の明確化。**
 - **毒性症状表記に使用する単語を統一する。**
 - **毒性症状の判断と表記する語句を一致させる。**
 - **記載方法を統一する。**

手順

- **各試験施設の協力を得て進める。**
 - **各試験施設の症状表記に用いている単語
および症状との対応についての調査**
- **海外で用いられている表記法の調査**
- **化審法の目的に順じた表記法の提案**

現行魚類の毒性症状についての記載（1）

化審法試験法通知（平成15年11月21日3省局長通知）

- 暴露開始後少なくとも24、48、72、96時間後に魚の様子を観察する。
- 観察可能な動き（例えば、鰓蓋の動きなど）がなく、尾柄部に触れて反応がない場合には魚は死亡しているとみなす。
- 観察時に死亡魚を取り除き死亡率を記録する。
- 暴露開始後、3時間と6時間後にも観察することが望ましい。
- 平衡、遊泳行動、呼吸機能、体色などに異常が観察された場合は記録しておく。

現行魚類の毒性症状についての記載 (2)

藻類、ミジンコ及び魚類の急性毒性に対する試験手順

例 (平成15年11月版、国立環境研究所)

(一部分略)

- 観察可能な動き (例えば、鰓蓋の動きなど) がなく、尾柄部に触れて反応がない場合には魚は死亡しているとみなす。
- 平衡、遊泳行動、呼吸機能、体色などに異常が観察された場合や、亜致死的な影響が観察された場合は具体的に記録する。死亡の他にも、行動や外見の異常が見られた場合には記録する。その他特異的症例 (背曲がり、出血、体色変化、粘液の分泌、平衡失調、立鱗等) が観察された場合には別途具体的にその旨を記載する。
 - ・異常呼吸：対照区の魚と比較して鰓蓋の動きが異なるもの。
 - ・異常遊泳：明らかに対照区の魚と異なる遊泳をしたもの。動作の緩慢、過敏、痙攣、反転、鼻上げ等。
 - ・遊泳不能：底部または水面で動いてはいるものの、水中を遊泳することが不可能なもの。横転、仮死を含む。

現行魚類の毒性症状についての記載 (3)

環境省生態毒性試験（平成18年度既存化学物質等生態毒性試験実施事業仕様書）

▶ 魚類急性毒性試験において、ばく露区での行動異常等の毒性症状についての観察結果は、原則として症状を呈した個体数を記載すること。個体数を記載しなかった場合は、その理由を記載すること。

EPAの表記法 (参考)

term	Definition
General behavior	Observable responses of the test fish, individually or in groups, to their environment.
Quiescent	Marked by a state of inactivity or abnormally low activity; motionless or nearly so.
Hyperexcitable	Reacting to stimuli with substantially greater intensity than control fish.
Irritated	Exhibiting more or less continuous hyperactivity.
Surfacing	Rising and remaining unusually long at the surface.
Sounding	Diving suddenly straight to the bottom; remaining unusually long at the bottom.
Twitching	Moving the body or parts of the body with sudden jerky movements.
Tetanus	In a state of tetany; marked by intermittent tonic spasms of the voluntary muscles.
Flaccid	Lacking tone, resilience or firmness; weak and enfeebled; flabby.
Normal	Unaffected by or not exposed to a particular experimental treatment; conforming to the usual behavioral characteristics of the species.
Pigmentation	Color or skin due to deposition or distribution of pigment.
Light discolored	Color appearance lighter than usual for the species.
Dark discolored	Color appearance darker than usual for the species.
Varidisclored	Color appearance abnormally varied; mottled.
Integument	The skin
Mucus shedding	Observably losing mucous skin coating to an abnormal degree.
Mucus coagulation	Showing observable clumping or clotting of the mucous skin coating, especially at the gills
Hemorrhagic	Visibly bleeding as from gills, eyes, anal opening

用語
行動一般
無活動
過剰反応
過敏
浮上
潜行
ひきつり
筋緊張性痙攣
弾性低下
正常
色彩
明色化
暗色化
変色
外皮
粘膜剥離
粘膜硬化
出血

つづき

Swimming	Progressive self-propulsion in water by coordinated movement of tail, body, fins.
Ceased	Broken off or tapered off to a stop.
Erratic	Characterized by lack of consistency, regularity, or uniformity; fluctuating, uneven; eccentric.
Gyrating	Revolving around a central point; moving spirally about an axis.
Skittering	Skimming hurriedly along the surface with rapid body movements.
Inverted	Turned upside down, or approximately so.
On side	Turned 90° laterally, more or less, from the normal body orientation.
Respiration	Physical action of pumping water into mouth and out through gills, so as to absorb oxygen
Rapid	Observably faster than normal to a significant degree
Slow	Observably slower than normal to a significant degree
Irregular	Failing to occur at regular or normal intervals
Ceased	Broken off or tapered off to a stop
Gulping air	Swimming at surface with mouth open and laboriously pumping surface water and air through gills.
Labored	Performed with apparent abnormally great difficulty and effort

遊泳
停止
不安定
旋回
アメンボ行動
逆さ遊泳
傾泳
呼吸
速い
遅い
不規則
停止
空気飲み (鼻上げ)
疲弊

各試験施設のアンケート結果の記載例 (抜粋)

➤ 行動が停止した場合

- 遊泳不能、不活発、横転、反転、遊泳行動異常、着底、異常遊泳、無活動、活動(度)低下、うつぶせ、完全平衡喪失、嗜眠状態、仮死

➤ 行動が異常の場合

- 旋回、スパイラル遊泳、コークスクリュウ遊泳、回転、狂奔、平衡失調、方向不定遊泳、異常遊泳、興奮、過敏

➤ 体色が変化した場合

- 明色化、暗色化、体色の変化、体色黒化、体色淡化、白化、暗化、変色、該当無し

語句の統一の考え方

- 症状を細かく規定すると、判断に差が生じ、統一が難しい
- 化審法では死因まで言及するわけではなく、細かな症状の違いを必要としていない。また詳細な症例のデータ利用を考えていない。
- 生データ（実験ノート等）への詳細な症状の記載は推奨するが、報告書には簡素化した記載にする。
- 重篤であるか否かが重要
- 96時間目における重篤の目安として120～144時間後には死に至ると思われる状態としてはどうだろうか。

魚類の毒性症状について、A：死亡・重篤、B：異常、C：正常の3つに分類し、それぞれの定義（案）を示す

分類		記載事項	症状の定義(案)
A	死亡・重篤	死亡	観察可能な動き（例えば鰓蓋の動きなど）がなく、尾柄部に触れて反応がない状態。
		遊泳不能	鰓蓋のみが動いているが、遊泳等の運動が停止、または極度の異常を示している状態。これまでの仮死、横臥、横転等が相当する。
B	異常	遊泳異常	正常ではない遊泳行動を示す状態。以下の症状が含まれる。 <ul style="list-style-type: none"> ・ 表層遊泳（表層で遊泳。鼻上げ等を含む。） ・ 平衡失調（平衡感覚が失われており、背泳、スパイラル遊泳（鉛直方向）、コークスクリュー遊泳（水平方向）等をしている） ・ 方向不定遊泳（方向感覚がなく遊泳方向が定まらない。） ・ 過活発（活動量が増加している、興奮、狂奔等） ・ 不活発（活動量が低下している） ・ 痙攣
		外見異常	正常ではない外見を示す状態。①表面に関する異常と②形態に関する異常の2つに分類する。
		①表面異常	<ul style="list-style-type: none"> ・ 体色変化（明化・暗化） ・ 出血（内出血を含む） ・ びらん（ただれる） ・ 鰭腐れ ・ 立鱗（鱗が逆立つ） ・ 脱鱗 ・ 粘液異常（粘液過剰分泌、粘液凝固等）
		②形態異常	<ul style="list-style-type: none"> ・ 背曲がり ・ 骨折 ・ 眼球異常（眼球突出等）
		呼吸異常	正常ではない、鰓蓋の動きを示す状態。増加または減少がある。
C	正常	なし	遊泳行動及び外見に異常がみられない状態。

最終報告書の記載方法（案）

- 少なくとも、「死亡、遊泳不能、遊泳異常、外見異常（①表面異常、②形態異常）、呼吸異常、正常」のいずれかを記載し、全生存個体中のそれぞれの個体数がわかるように記載する。
- 症状が重複して観察される場合には、より重篤な分類（A>B）を優先する。
- 分類Bの症状が重複して観察される場合には、併記する。
- ただし一つの個体が呈している症状がわかるように記載する。

最終報告書の記載方法（例）

濃度区	症状等の区分	X h	Y h
A mg/L	死亡	1/8	3/7
	遊泳不能	2/8	2/7
	遊泳異常	3/8 1個体は+呼吸異常、 1個体は+表面異常	1/7 以下の*は全て同一個体
	外見異常		
	①表面	1/8 1個体は+遊泳異常	1/7 *
	②形態	0/8	1/7 *
	呼吸異常	2/8 1個体は+遊泳異常	1/7
正常	1/8	0/7	

今後の予定

- **症状の表記および記載法の統一について、関係各機関の意見を参考にしながら進めていく。**
- **英語表記、OECDとの整合性についても考慮する。**

関係各機関の皆様のご協力に感謝いたします。