

生態影響に関する化学物質審査規制 ／試験法セミナー（平成 21 年度）

- <東京> 日時：平成 22 年 1 月 25 日（月）13:30～17:00
 場所：砂防会館 別館 1 階 シェーンバッハ・サボー
- <大阪> 日時：平成 22 年 1 月 28 日（木）13:30～17:00
 場所：新梅田研修センター 本館 4 階 405 ホール

主催：環境省・（独）国立環境研究所

協力：日本環境毒性学会

目次

○ プログラム	1
○ 化学物質審査規制法の改正について	3
○ 海外の化学物質管理の動向について	2 5
○ 化学物質 GLP（動植物毒性試験）に関する動向について	3 7
○ 生態毒性試験実施にあたっての留意点	
・発表スライド	4 5
・OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No.201 (2006) (Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test)	5 5
○ 生態毒性 QSAR モデルの解説 (KATE、OECD QSAR Toolbox デモンストレーション)	8 1

プログラム

時 間	内 容	講演者等
13:00～	受付	
13:30～13:35	開会挨拶	環境省
【第1部】 化学物質審査規制に関する国内外の動向		
13:35～14:35	化学物質審査規制法の改正について	環境省環境保健部化学物質審査室
14:35～15:05	海外の化学物質管理の動向について	宮地 繁樹 (財)化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所
15:05～15:20	休憩	
【第2部】 生態毒性試験及び生態毒性 QSAR に関する事項		
15:20～15:30	化学物質 GLP（動植物毒性試験）に関する動向について	環境省環境保健部化学物質審査室
15:30～16:10	生態毒性試験実施にあたっての留意点	菅谷 芳雄 (独) 国立環境研究所環境リスク研究センター
16:10～16:40	生態毒性 QSAR モデルの解説 (KATE、OECD QSAR Toolbox デモンストレーション)	蓮沼 和夫 (独) 国立環境研究所環境リスク研究センター 吉岡 義正 (大阪会場のみ) 大分大学教育福祉科学部
16:40～16:55	総合質疑	
16:55～17:00	閉会挨拶	(独) 国立環境研究所

*各講演には質疑応答が含まれます。

*プログラムの内容及び講演者は予告なく変更になることがあります。ご了承ください。

化学物質の審査及び製造等の規制 に関する法律の改正について

平成22年1月

環境省環境保健部
化学物質審査室

目次

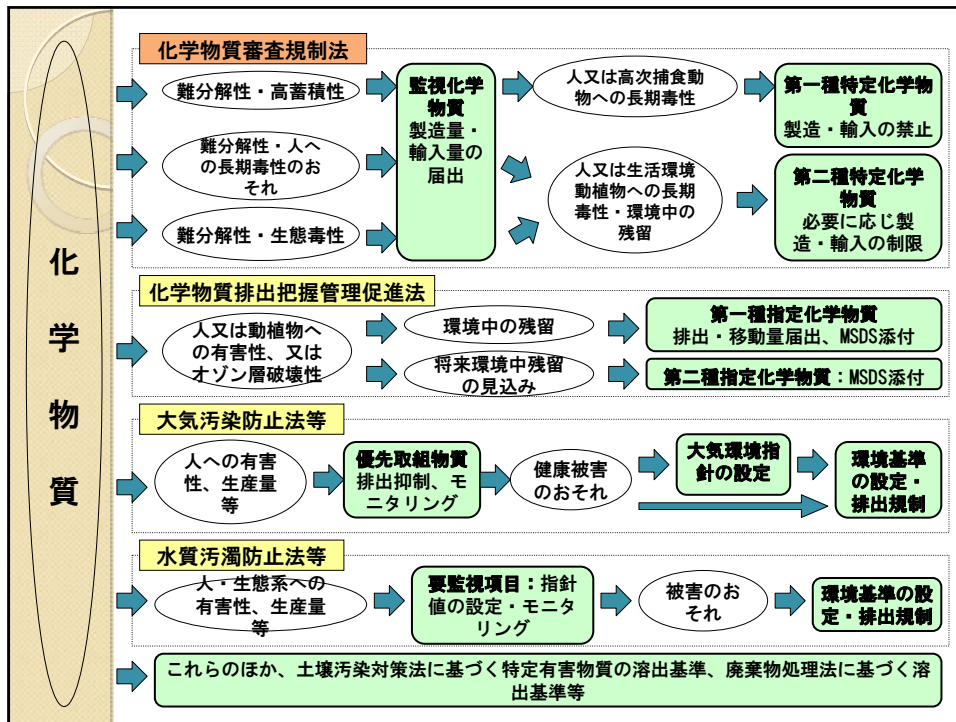
- 1.我が国における化学物質管理政策について
- 2.化学物質審査規制法の改正について

1. 我が国における化学物質管理政策について

- 化学物質管理に関する法制度の状況
- 化学物質審査規制法の概要
- 現行化学物質審査規制法の施行状況

化学物質管理に関する法制度の状況

一般環境 を通じた ばく露	<p>化学物質審査規制法</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 残留性、生物蓄積性、長期毒性をもつ物質の製造・使用の原則禁止 ○ 残留性、長期毒性をもつ物質の製造・使用の制限、表示義務 ○ 上記に該当するおそれのある物質の製造量の届出 ○ 新規化学物質の残留性、蓄積性、長期毒性等の審査 	<p>毒物劇物取締法</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 著しい毒性をもつ物質の製造、使用等の規制 ○ 毒物・劇物の製造、販売、使用等の登録・届出、表示義務、MSDS添付 ○ 毒物・劇物の廃棄の規制 	<p>農薬取締法</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 農薬登録（毒性・残留性の検査、基準に適合しないものは登録保留） ○ 無登録農薬の製造・使用の禁止 ○ 表示義務（使用方法等） ○ 使用規制（使用基準の遵守、水質汚濁性農薬の指定とその使用の制限）
	<p>化学物質排出把握管理促進法</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 人又は動植物に有害で、環境に残留する物質等の排出・移動量の届出・推計 ○ 上記物質及び将来の環境残留が見込まれる物質へのMSDS添付 		
	<p>環境基本法、大気汚染防止法、水質汚濁防止法、廃棄物処理法等</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 人の健康の保護及び生活環境の保全のための環境基準を設定 ○ 大気、水への有害物質の排出、廃棄物からの溶出等を規制 		
人への直接 ばく露	<p>薬事法</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 医薬品、医薬部外品、化粧品等の製造等の許可制、販売の制限、表示義務等 		
	<p>食品衛生法</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 食品及び食品添加物の製造・使用等に関する規格の制定、表示義務等 		
	<p>有害物質含有家庭用品規制法</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 家庭用品における有害物質の含有量、溶出量、発散量に関する基準を設定 		
作業環境	<p>労働安全衛生法</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 労働者に健康被害を生ずる物の製造、使用等の禁止 ○ 上記のおそれのある物の製造等の許可制、表示義務、MSDS添付 ○ 新規化学物質の変異原性等の調査 		



化学物質審査規制法の概要

- ・ 1973年制定。新規の化学物質の製造・輸入に際し、その物質の分解性、生物への蓄積性、人や動植物への毒性を事前に審査するとともに、有害性等の状況に応じた製造・輸入、使用の規制を行う。
 - ・ 第1種特定化学物質(PCB等16物質)
 - ・ 製造・輸入、使用の事実上の禁止
 - ・ 第2種特定化学物質(トリクロロエチレン等23物質)
 - ・ 製造・輸入の予定、実績の届出
 - ・ 製造量・輸入量の制限(必要があれば)
 - ・ 取扱いに係る技術上の指針の遵守等
 - ・ 第1種監視化学物質(36物質)、第2種監視化学物質(952物質)、第3種監視化学物質(157物質)
 - ・ 製造・輸入の実績の届出

化審法改正の経緯

昭和48年

PCB類似の難分解性、高蓄積性、長期毒性（人健康）の物質の製造・輸入等を規制

昭和61年

難分解性で長期毒性を有するが、蓄積性を有さない物質（トリクロロエチレン等）についても、環境中での残留の状況によっては規制の必要性が生じたことから法改正

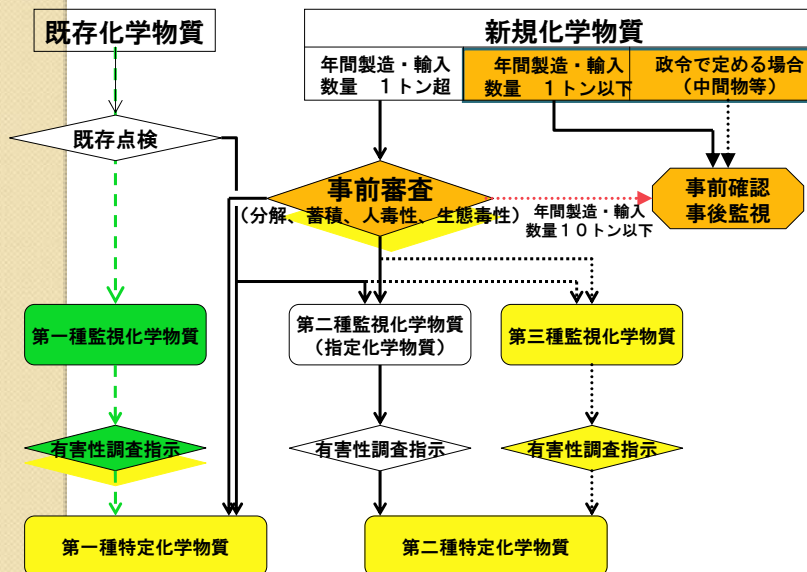
平成12年

省庁再編に伴い、従来の厚生省・通産省共管から、環境省を加えた3省で共管

平成15年

動植物への影響に着目した審査・規制制度（注：長期毒性に生態影響を追加）や、環境中への放出可能性を考慮した審査制度を導入

現行化審法における審査・規制制度の概要



製造・輸入事業者への有害性情報の報告義務付け

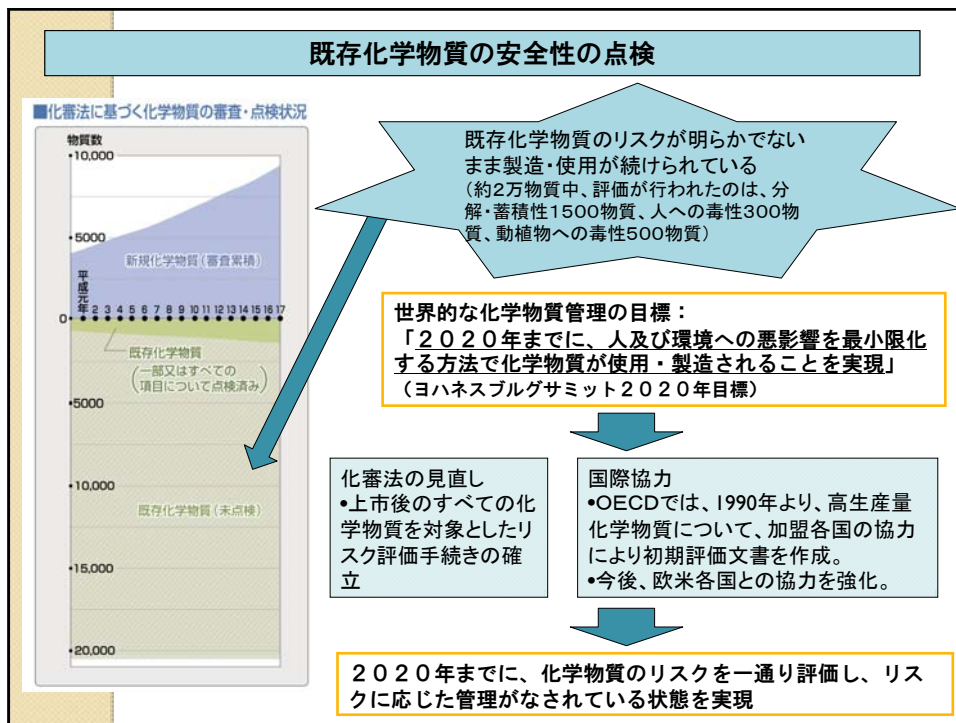
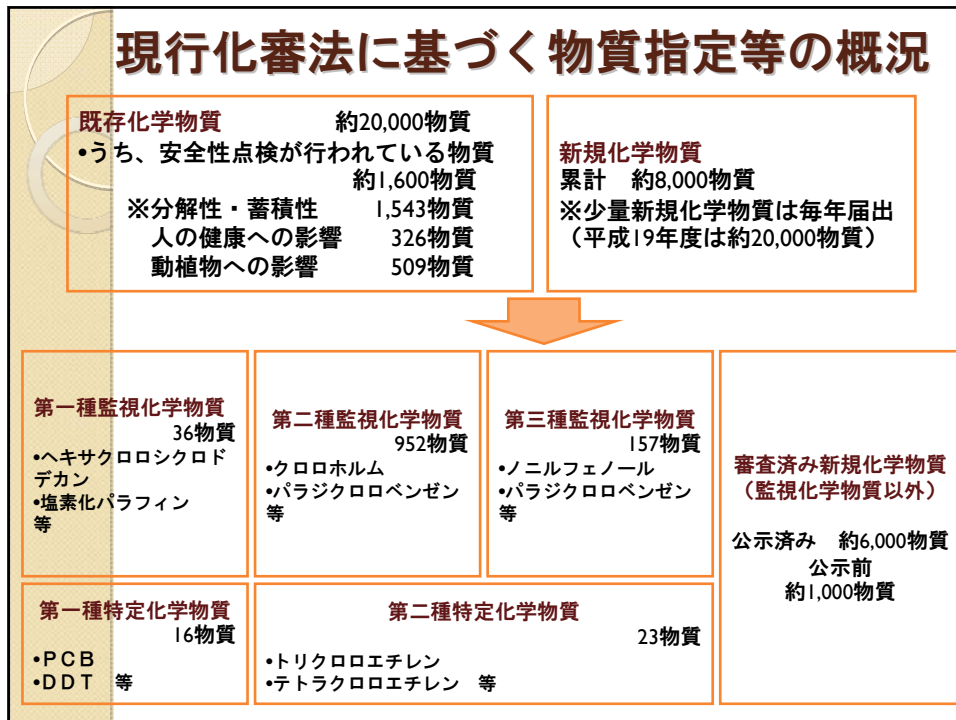
規制対象物質に対する規制措置の内容

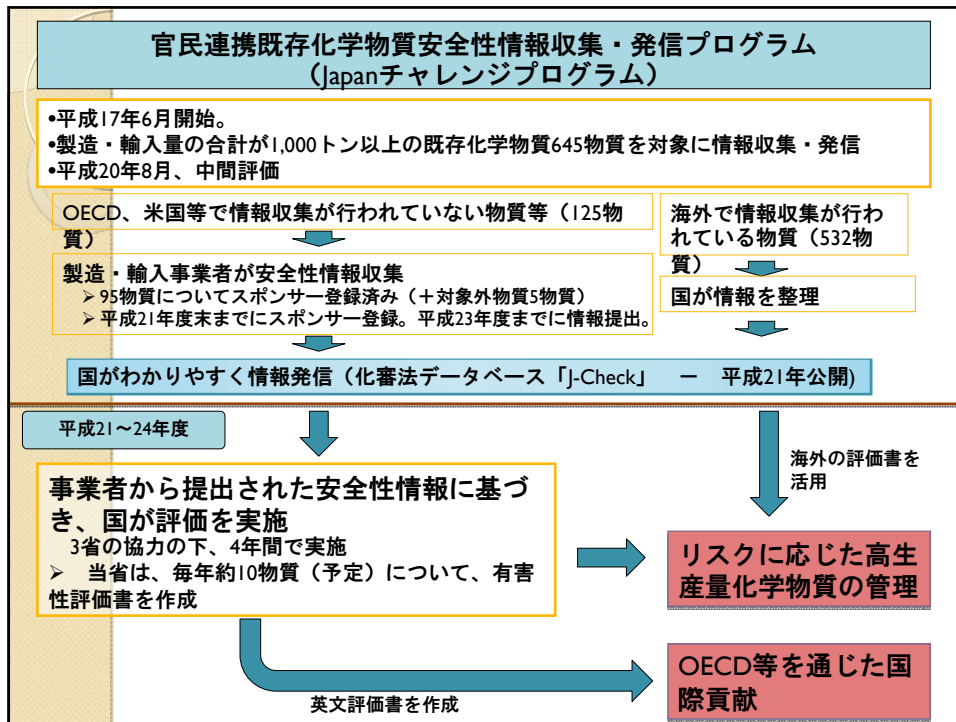
第一種特定化学物質	<ul style="list-style-type: none"> ・ 製造・輸入の許可（事実上禁止） ・ 特定の用途以外での使用の禁止 ・ 政令指定製品の輸入禁止 ・ 回収等措置命令（物質・製品の指定時、法令違反時）
第二種特定化学物質	<ul style="list-style-type: none"> ・ 製造・輸入の予定／実績数量、用途等の届出 ・ リスクの観点から必要に応じて、製造・輸入予定数量等の変更命令 ・ 取扱いに係る技術上の指針の公表・勧告 ・ 表示の義務・遵守勧告 ・ 指導・助言（環境汚染防止のため必要な場合）
監視化学物質	<ul style="list-style-type: none"> ・ 製造・輸入実績数量、用途等の届出 ・ 物質の名称、届出数量の公表 ・ 指導・助言（環境汚染防止のため必要な場合） ・ リスクの観点から必要に応じて、有害性調査の指示

現行化審査の施行状況

新規化学物質の審査等

- 化学物質の数
 - － 既存化学物質 20,576物質
 - － 新規化学物質届出件数（昭和49年～平成20年） 11,201物質
 - － 少量新規化学物質届出件数（平成20年度） 21,356物質
- 審査件数と判定状況（平成20年度）
 - － 新規化学物質の審査 676件
（うち、二監判定 34件、三監判定 16件）
 - － 既存化学物質の審査（既存点検） 99件
（うち、一監判定 1件、二監判定 25件、三監判定 64件）
 - － 低生産量新規化学物質に係る確認 797件
 - － 中間物等に係る確認 176件





Japanチャレンジプログラムの中間評価① (2008年8月)

プログラム全体の評価

- ◆ **産業界と国の連携によるプログラムの推進、政府部内における連携の強化、国際的な取組との協調、収集情報の一元管理・公表という点において、当初の提案より遅れが見られるものの進展。本プログラムは全体として適切な枠組みであった。**
- ◆ **スポンサー未登録物質が残っていること等については、自主的取り組みのインセンティブが働かないこと等のプログラムの問題点であるとの指摘もあり。**

14

Japanチャレンジプログラムの中間評価②

今後の進め方

- ◆平成21年3月末までは引き続きスポンサー獲得に向けた働きかけを継続。平成21年3月末時点でスポンサー未登録物質があれば、必要な対応を検討。
- ◆J-CHECK（データベース）について、ユーザーの利用しやすさの面から改善。
- ◆本プログラムにより得られた安全性情報について、海外に向けた情報発信の強化・OECDプログラムへの貢献。
- ◆本プログラムにより得られた安全性情報について、平成24年度中を目途に、国が各化学物質の有害性評価を実施。スポンサー企業に対しては、安全性情報収集報告書を出来る限り早期に、遅くとも平成23年度中に提出するよう協力を依頼。
- ◆2009年4月以降の取組については、Japanチャレンジプログラムの経験と成果を十分に踏まえ、化審法見直しの検討状況を見つつ検討。その際、新たに高生産量となった物質を考慮するとともに、必要に応じて無機化学物質の扱い、リスクの観点も踏まえた優先順位付け等の改善の余地あり。

化審法データベース（J-CHECK）

- ◆化学物質の安全性情報の発信基盤として、平成20年5月27日、これまでのデータベース（3省共同化学物質データベース）をリニューアルし、「**化審法データベース（通称：J-CHECK：Japan Chemicals Collaborative Knowledge Database）**」としてウェブサイト公開。
- ◆J-CHECKでは、Japanチャレンジプログラムにおいて収集された化学物質の安全性情報収集報告書や、これまで国が行ってきた既存化学物質の安全性点検の試験報告書など、より**詳細な情報の発信にも取り組んでいく**予定。
- ◆URL：<http://www.safe.nite.go.jp/jcheck>

2.化学物質審査規制法の改正について

- 改正化審法見直しの経緯
- 改正化審法の概要
- 改正化審法施行令の概要

化学物質審査規制法の見直しの経緯①

2003年改正法施行後5年（2009年）を目途に見直し

2008年1月 化学物質審査規制法に関する審議開始

→ 厚生科学審議会、産業構造審議会と合同審議

2008.1.31 第1回化審法見直し合同委員会

2008.2.19～7.10 第1～4回化審法見直し合同WG

2008.8.28 第2回化審法見直し合同委員会

2008.10.23 第3回化審法見直し合同委員会

2008年10月31日から12月1日

合同委員会報告書案についてパブリックコメント

2008年12月22日

「今後の化学物質環境対策の在り方について」の答申

2009年2月24日

「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律の一部を改正する法律案」閣議決定

化学物質審査規制法の見直しの経緯②

- 2009年2月24日 衆議院に提出
- 4月17日 衆議院本会議で可決、参議院に送付
- 5月13日 参議院本会議で可決、成立
- 5月20日 「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律の一部を改正する法律」公布



19

改正化学物質審査規制法の概要

包括的な化学物質管理の実施によって、有害化学物質による人や動植物への悪影響を防止するため、化学物質の安全性評価に係る措置を見直すとともに、国際的動向を踏まえた規制合理化のための措置等を講ずる。

改正の背景・必要性

1. 化学物質に対する関心の増大
(国民の安心・安全)
2. 化学物質管理に関する国際目標達成の必要性
 - 2020年までに、すべての化学物質による人の健康や環境への影響を最小化。(2002年環境サミット合意)
 - 欧州では、新規制 (REACH) が2007年に施行。
 - 化審法 (1973年制定) では、それ以降の新規化学物質についてすべて事前審査を実施。
 - 一方、法制定前の既存化学物質については、国が一部安全性評価を行ってきたが、多くの化学物質についての評価は未了。
3. 国際条約との不整合
 - 国際条約 (ストックホルム条約) で、2009年5月、追加された対象物質について、一部例外的に使用を認める合意がなされた。
 - 現行法では、例外使用の規定が制限的であり、我が国に必須の用途が確保できないおそれ。

改正の概要

(1) 既存化学物質対策

- 既存化学物質を含むすべての化学物質について、一定数量以上製造・輸入した事業者に対して、その数量等の届出を新たに義務付け。
- 国は、上記届出を受けて、詳細な安全性評価の対象となる化学物質を、優先度を付けて絞り込む。これらについては、製造・輸入事業者には有害性情報の提出を求め、人の健康等に与える影響を評価。
- その結果により、有害化学物質及びその含有製品を、製造・使用規制等の対象とする。

(2) 国際的整合性の確保

- 国際条約で新たに規制対象に追加された物質について、厳格な管理の下で使用できるようにする。
 - 半導体、泡消火剤向けの用途等

改正化審法のポイント①

(1) リスクベース管理への移行

$$\boxed{\text{リスク}} = \boxed{\text{有害性 (ハザード)}} \times \boxed{\text{環境排出量 (曝露量)}}$$

有害性：化学物質が人や環境中の動植物に対して、どのような望ましくない影響を及ぼす可能性があるか

曝露量：人や動植物が、どのくらいの量（濃度）の化学物質にさらされているか



化学物質の「有害性（ハザード）」に着目した規制体系から、人及び動植物へどれだけ影響を与える可能性があるかの「環境排出量（曝露量）」を加味した、**「リスク」ベースの規制体系**へ移行。

21

改正化審法のポイント②

(1) 既存化学物質も含めた包括的管理制度の導入

- ① 既存化学物質を含む**すべての化学物質**について、一定数量以上の製造・輸入を行った事業者に対して、**毎年度その数量等を届け出る義務**を課す。
- ② 上記届出の内容や有害性に係る既知見等を踏まえ、優先的に安全性評価を行う必要がある化学物質を「**優先評価化学物質**」に指定する。
- ③ 必要に応じて、優先評価化学物質の製造・輸入事業者には有害性情報の提出を求めるとともに、**取扱事業者にも使用用途の報告**を求める。
- ④ 優先評価化学物質に係る情報収集及び安全性評価を段階的に進めた結果、**人又は動植物への悪影響が懸念される物質**については、現行法と同様に「**特定化学物質**」として製造・使用規制等の対象とする。
- ⑤ これまで規制の対象としていた「**環境中で分解しにくい化学物質**」に加え、「**環境中で分解しやすい化学物質**」についても対象とする。

改正化審法のポイント③

(2) 流通過程における適切な化学物質管理の実施

- 特定化学物質及び当該物質が使用された製品による環境汚染を防止するため、**取扱事業者に対して、一定の取扱基準の遵守を求めるとともに、取引に際して必要な表示を行う義務を課す。**

流通過程における化学物質管理の促進

- 二特に係る技術上の指針、表示義務の対象に、使用製品を取り扱う者を拡大
- **監視化学物質、優先評価化学物質**を事業者間で譲渡等する場合には、相手方事業者に対して当該化学物質等が、それぞれ監視化学物質、優先評価化学物質であることを伝達するよう努める

改正化審法のポイント④

(3) 国際的動向を踏まえた審査・規制体系の合理化

- 今後ストックホルム条約の規制対象となった物質について、条約で許容された例外的使用を厳格な管理の下で認めるため第一種特定化学物質に係る規制の見直しを行う等、規制の国際整合化を行う。

改正の背景・必要性

国際条約との不整合

- 国際条約(ストックホルム条約)で、2009年5月、追加された対象物質について、一部例外的に使用を認める合意がなされた。
- 現行法では、例外使用の規定が制限的であり、我が国に必須の用途が確保できないおそれ。

改正の概要

国際的整合性の確保

- 国際条約で新たに規制対象に追加された物質(PFOS)について、厳格な管理の下で使用できるようにする。
 - － 半導体、泡消火剤向けの用途等
- 一特の使用制限措置の見直し。それに伴い、基準適合義務の拡大、表示義務の新設。

改正化審法のポイント⑤

関係大臣への通知

○三大臣（厚生労働大臣・経済産業大臣・環境大臣）が、化審法に基づいて化学物質の性状に関する知見を得た場合、**他の法令に基づく措置に資するため、必要に応じ所管大臣へ当該知見の内容を通知。**

→今次改正によって集積される化学物質に係る情報を**関係省庁間で共有し、各法令に基づく化学物質規制をより効果的なものとする。**
など。

具体的な改正内容

(1) 第一段階改正（平成22年4月1日施行）

① 良分解物質を対象化

改正化審法においては、難分解性の性状を有する化学物質に限定することなく、**環境中に存在することにより人の健康、動植物に係る被害の懸念がある化学物質**を規制対象へ

現行化審法

難分解性の性状を有する化学物質による環境汚染を防止することを目的とする。

→難分解性物質は長期間環境に残留する性格を有するため

改正化審法

良分解性物質であっても、分解される量を上回る量が環境中に放出されることにより、人健康や動植物に影響が生じる可能性あり

→難分解性を有しない物質についても規制対象へ

② 低懸念ポリマーの確認制度の導入

低懸念ポリマーを、新規化学物質の製造・輸入にあたる事前届出を行う必要がない対象として追加。

現行化審査

新規化学物質のうち、製造・輸入にあたる事前届出を行う必要がない場合

- ・ 試験研究用途
- ・ 試薬
- ・ 取扱い方法等からみて、環境汚染が生じるおそれがないもの
- ・ 少量新規化学物質

など

改正化審査

新規化学物質のうち、製造・輸入にあたる事前届出を行う必要がない場合

- ・ 試験研究用途
- ・ 試薬
- ・ 取扱い方法等からみて、環境汚染が生じるおそれがないもの
- ・ 少量新規化学物質
- ・ **低懸念ポリマー**

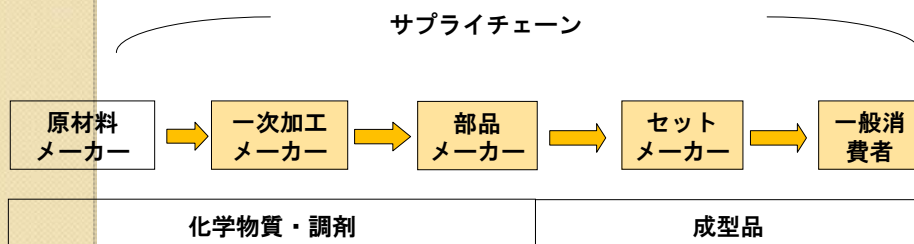
など

③ サプライチェーンに係る情報伝達

○ 第一種監視化学物質を事業者間で譲渡

→ 化学物質が第一種監視化学物質であること等を**伝達する努力義務**を課す。

○ 第二種特定化学物質等及び第一種監視化学物質について、三省及び所管大臣は取扱事業者に対して、その**取り扱いの状況の報告**を求めることができる。



④ 第一種特定化学物質に係る措置

- 第一種特定化学物質が代替困難であり、人の健康又は環境への被害が生じない場合には、**エッセンシャルユースとしてその使用が認められる。**
- 第一種特定化学物質及びその含有製品について、ラベル等による**表示及び基準適合義務**が課せられる。

現行化審法

- 第1種特定化学物質の限定的使用の要件
 - ・ 代替がないこと
 - ・ **一般消費者の生活用品に供されるものではなく、環境汚染を生じるおそれがないこと**
- 第1種特定化学物質を使用する場合には、技術上の基準適合義務



改正化審法

- 第1種特定化学物質の限定的使用の要件
 - ・ 代替がないこと
 - ・ **環境汚染が生じて人健康又は生活環境動植物の生息等に係る被害を生ずるおそれがないこと**
- 第1種特定化学物質を使用する場合には、技術上の基準適合義務及び**表示義務**



⑤ 第二種特定化学物質に係る措置

政令で指定された**第二種特定化学物質が使用されている製品**についても、**環境汚染を防止するための技術上の指針の公表**を行う。

第二種特定化学物質が使用されている**製品の取扱事業者**についても、**表示の義務**を課す。

現行化審法

- 第二種特定化学物質について環境汚染を防止するための技術上の指針の公表
- 政令で指定された製品で第二種特定化学物質が使用された製品については第二種特定化学物質の取扱事業者に表示の義務



改正化審法

- 第二種特定化学物質及び政令で指定された**第二種特定化学物質が使用されている製品**について、技術上の指針の公表を行う
- 第二種特定化学物質が使用されている製品の**取扱事業者**にも表示の義務をかける



(2) 第二段階改正（平成23年4月1日施行）

① 一般化学物質の製造・輸入量等の届出（新設）

- 1トン以上の化学物質を製造輸入する者は、毎年度、**製造・輸入量や用途等について届出**を行う。
- 届出がなされた化学物質のリスク評価を行い、必要に応じて、**優先評価化学物質に指定**する。

・ 届出対象物質から除外される物質

- ① 試験研究用途
- ② 製造・輸入量が1トン未満の化学物質
- ③ リスクが低いと認められる化学物質

・ 公知でない有害性情報を得た場合には、3省庁（環境省、厚生労働省、経済産業省）に届け出る。

※特定化学物質、優先評価化学物質及び監視化学物質については、それぞれの規定で届出を行っているため、本規定における届出は不要。

31

② 優先評価化学物質（新設）

- **リスクが十分に低いと判断されない化学物質**を優先評価化学物質に指定
- 1トン以上の製造・輸入をする者は、毎年度、**製造・輸入数量・用途等について届出**を行う。
- 詳細なリスク評価を段階的に行い、必要に応じて、**第二種特定化学物質に指定**する。
- 公知でない有害性情報を得た場合には、三省庁に届け出る（努力義務）。
- 優先評価化学物質には下記の義務等が課せられる。
 - ① 製造・輸入事業者
 - ・ 製造輸入数量及び用途の届出
 - ・ サプライチェーンにおける情報伝達の努力義務
 - ・ 国による簡易毒性試験実施の求め
 - ・ 国による有害性情報実施の指示
 - ② 使用事業者
 - ・ 情報伝達の努力義務
 - ・ 国による取扱状況報告の求め

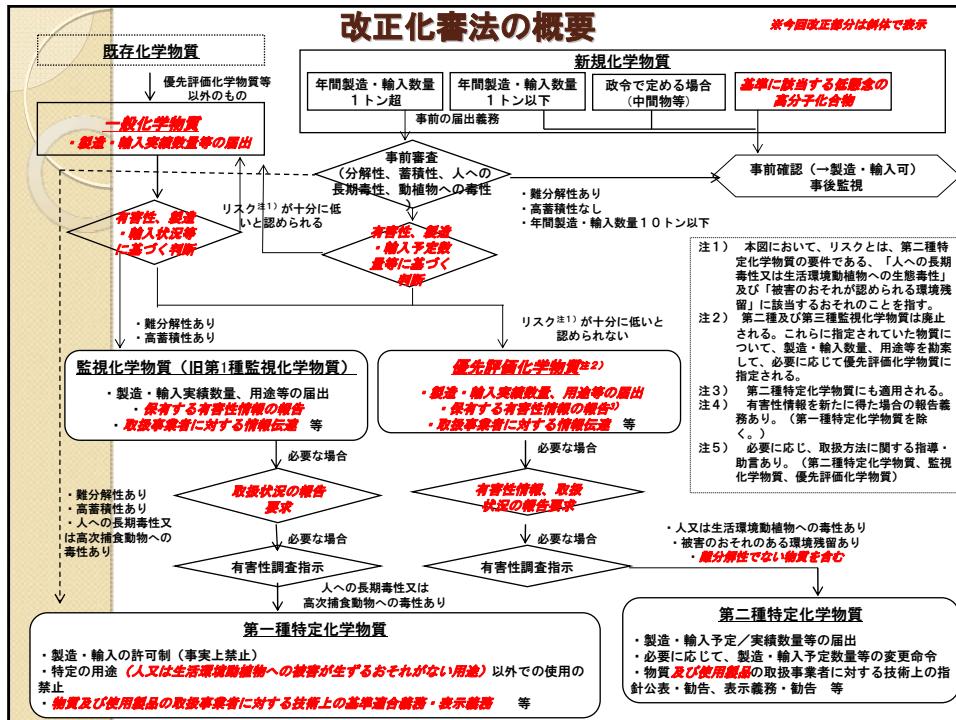
32

③監視化学物質の扱いについて

○**第二種監視化学物質・第三種監視化学物質**は、**優先評価化学物質の新設により廃止**。

○**第一種監視化学物質**は、「**監視化学物質**」と名称を変更。

33



改正化審法施行令の概要

35

改正化審法施行令の概要

1. 特定化学物質関係

(1) 第一種特定化学物質の追加

- ・新たにストックホルム条約の対象となった12物質を追加

- ① ペルフルオロ（オクタン-1-スルホン酸）（別名PFOS）又はその塩
- ② ペルフルオロ（オクタン-1-スルホニル）=フルオリド（別名PFOSF）
- ③ ペンタクロロベンゼン
- ④ $r-1, c-2, t-3, c-4, t-5, t-6$ -ヘキサクロロシクロヘキサン（別名 α -ヘキサクロロシクロヘキサン）
- ⑤ $r-1, t-2, c-3, t-4, c-5, t-6$ -ヘキサクロロシクロヘキサン（別名 β -ヘキサクロロシクロヘキサン）
- ⑥ $r-1, c-2, t-3, c-4, c-5, t-6$ -ヘキサクロロシクロヘキサン（別名 γ -ヘキサクロロシクロヘキサン）
- ⑦ デカクロロペンタシクロ[5.3.0.0^{2,6}.0^{3,9}.0^{4,8}]デカン-5-オン（別名クロルデコン）
- ⑧ ヘキサブプロモビフェニル
- ⑨ テトラブプロモ（フェノキシベンゼン）（別名テトラブプロモジフェニルエーテル）
- ⑩ ペンタブプロモ（フェノキシベンゼン）（別名ペンタブプロモジフェニルエーテル）
- ⑪ ヘキサブプロモ（フェノキシベンゼン）（別名ヘキサブプロモジフェニルエーテル）
- ⑫ ヘプタブプロモ（フェノキシベンゼン）（別名ヘプタブプロモジフェニルエーテル）

(2) 第一種特定化学物質が使用された輸入禁止製品の追加

- ・第一種特定化学物質が使用された製品の輸入を禁止。
(PFOS又はその塩等3物質について14製品を指定。)

<PFOS又はその塩>

- ①航空機用の作動油
- ②糸を紡ぐために使用する油剤
- ③金属の加工に使用するエッチング剤
- ④半導体（無線機器が3メガヘルツ以上の周波数の電波を送受信することを可能とする化合物半導体を除く。）の製造に使用するエッチング剤
- ⑤メッキ用の表面処理剤又はその調整添加剤
- ⑥半導体の製造に使用する反射防止剤
- ⑦研磨剤
- ⑧消火器、消火器用消火薬剤及び泡消火薬剤
- ⑨防虫剤（しるあり又はありの防除に用いられるものに限る。）
- ⑩印画紙

<テトラブロモジフェニルエーテル・ペンタブロモジフェニルエーテル>

- ①塗料
- ②接着剤

(3) 第一種特定化学物質を使用できる用途の指定

- ・第一種特定化学物質について、代替が困難であり、その使用による健康又は生活環境動植物の生息等に係る被害を生じるおそれがない場合、技術上の基準適合義務及び表示義務を遵守することで、例外的に使用を認める。

(PFOS又はその塩について3用途を指定。(ただし、泡消火薬剤については、技術上の基準適合義務と表示義務が課される。))

○第一種特定化学物質の限定的用途

<PFOS又はその塩>

- ①エッチング剤（圧電フィルタ又は無線機器が3メガヘルツ以上の周波数の電波を送受信することを可能とする化合物半導体の製造に使用するものに限る。）の製造
- ②半導体用のレジストの製造
- ③業務用写真フィルムの製造

○第一種特定化学物質を含む製品で技術上の基準・表示義務を満たす必要のある製品

<PFOS又はその塩>

- ①エッチング剤（圧電フィルタ又は無線機器が3メガヘルツ以上の周波数の電波を送受信することを可能とする化合物半導体の製造に使用するものに限る。）
- ②半導体用のレジスト
- ③業務用写真フィルム
- ④消火器、消火器用消火薬剤及び泡消火薬剤 (当分の間)

(4) 技術上の指針の公表及び表示義務が課される第二種特定化学物質が使用された製品の指定

- ・ 第二種特定化学物質が使用された製品に技術上の指針の遵守が求められる。
- ・ 第二種特定化学物質を含んだ製品の取扱事業者に表示義務が課せられる。(3物質について11製品を指定。)

第二種特定化学物質を含む製品で技術上の指針・表示義務を満たす必要のある製品

<トリクロロエチレン>

- ① 接着剤 (動植物系のものを除く。)
- ② 塗料 (水系塗料を除く。)
- ③ 金属加工油
- ④ 洗浄剤

<テトラクロロエチレン>

- ① 加硫剤
- ② 接着剤 (動植物系のものを除く。)
- ③ 塗料 (水系塗料を除く。)
- ④ 洗浄剤
- ⑤ 繊維製品用仕上加工剤

<トリブチルスズ化合物>

- ① 防錆剤及びかび防止剤
- ② 塗料 (貝類、藻類その他の水中の生物の付着防止用のものに限る。)

2. 一般化学物質等の届出関係

- ・ 一般化学物質及び優先評価化学物質の届出を求める製造・輸入数量を**1トン以上 (/年度/1社)**と定める。

3. 施行日について (2009年10月30日公布)

- ・ 2010年 4月1日
 - 第一種特定化学物質の追加、エッセンシャルユースの追加、技術上の指針の公表及び表示義務が課される第二種特定化学物質が使用された製品の指定
- ・ 2010年 5月1日
 - 第一種特定化学物質が使用された輸入禁止製品の追加
- ・ 2010年 10月1日
 - 第一種特定化学物質・含有製品の基準適合義務及び表示義務
- ・ 2011年 4月1日
 - 一般化学物質・優先評価化学物質の届出義務

化審法に係る情報の参照先

<経済産業省 HP>

http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/index.html

<環境省 HP>

<http://www.env.go.jp/chemi/kagaku/index.html>

<厚生労働省 HP>

<http://www.nihs.go.jp/mhlw/chemical/kashin/kashin.html>

41

ご静聴ありがとうございました。

42

平成21年度
生態影響に関する化学物質審査規制/試験法セミナー

海外の化学物質管理の 動向について

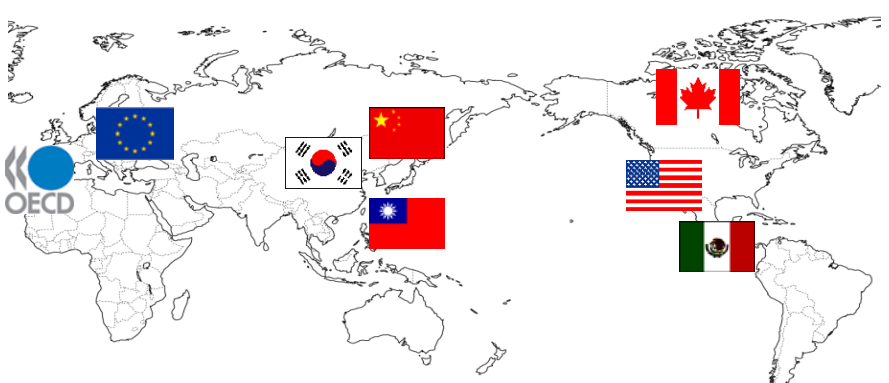
(財)化学物質評価研究機構
宮地繁樹

1

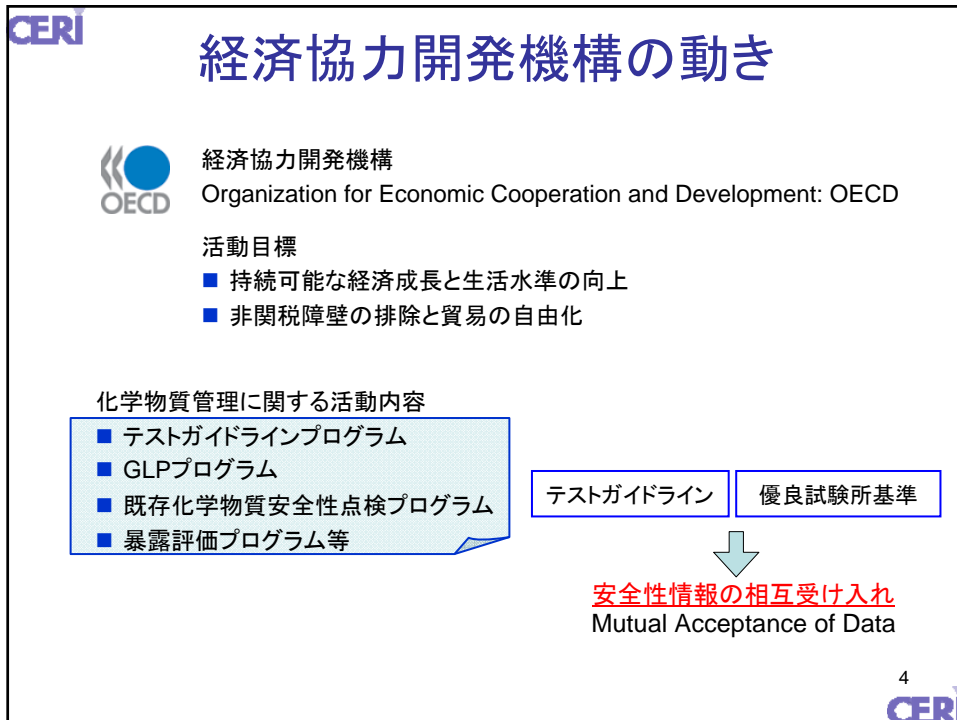
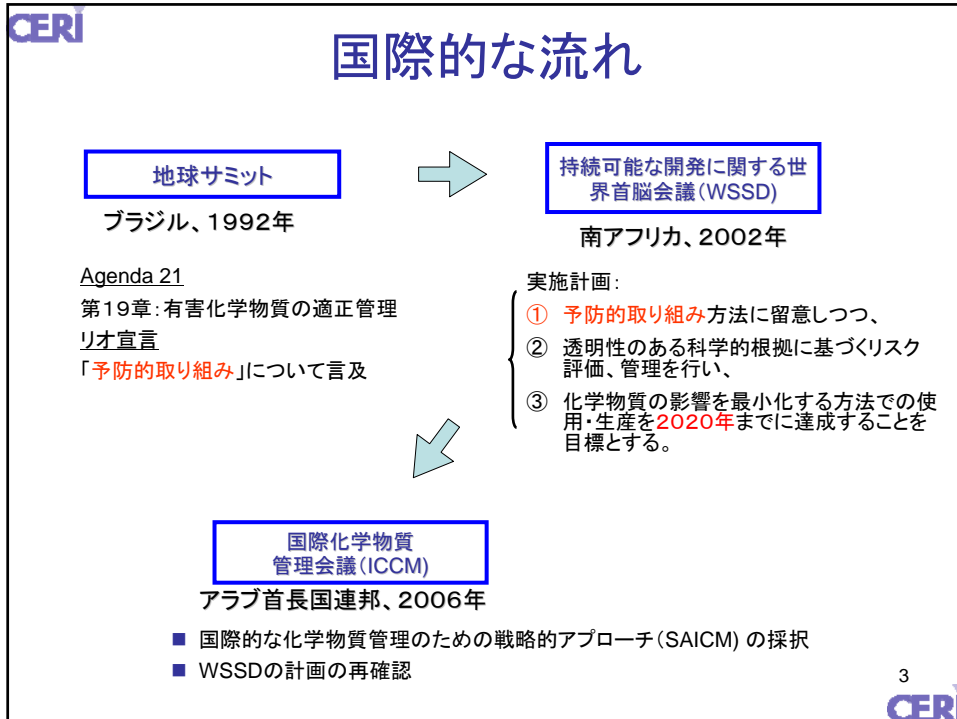
CERI

目次

- OECDの動き
- EUの動き
- 米国の動き
- カナダの動き
- 台湾の動き
- 中国の動き
- 韓国の動き
- まとめ



The map shows the geographical locations of the regions and countries listed in the table of contents. The OECD logo is placed over Europe. The EU flag is placed over Europe. The USA flag is placed over North America. The Canada flag is placed over North America. The South Korea flag is placed over East Asia. The China flag is placed over East Asia. The Taiwan flag is placed over East Asia. The Mexico flag is placed over Central America. The CERI logo is in the bottom right corner.



CERI

濃縮度試験法の改訂

OECDテストガイドライン 305: 濃縮度試験

現在

- 試験物質を試験水に溶解させて、魚に暴露する。
- 二濃度を設定する。

↓

改訂案

{

- 一濃度での予備的な試験を認める。
→ 動物愛護の観点から試験魚の削減
- 水に溶けにくい試験物質については、**経口による濃縮性**を評価する。

↓

リングテストを実施予定

(複数の試験機関により、同一試験物質を用いて試験を実施し、結果の再現性等を確認する。)

5 **CERI**

CERI

新しい生態毒性試験スキーム(案)

Fish Threshold Approach

試験の流れ

藻類と甲殻類の急性毒性試験を実施

↓

より低いLC50値/EC50値を決定

↓

この濃度のみを用いて、**魚類**の急性毒性試験を実施

死亡無し

↓

終了

死亡有り

↓

1/3の設定濃度で再度、試験を実施

↑

- 2006年4月に提案
- 提案国: EC
- ガイドラインではなく、ガイドドキュメントとなった。


↓

2010年4月開催の第22回テストガイドライン会合で承認される見込み

6 **CERI**

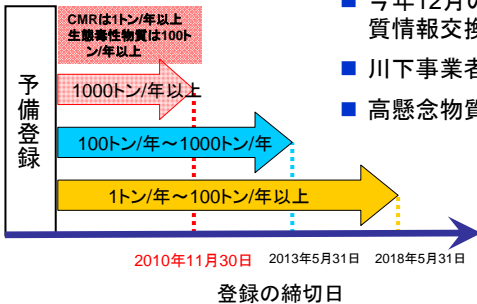
CERI

EUの動き



REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals)の導入

- 今年12月の登録(Registration)に向けて、物質情報交換フォーラムの動きが活発化。
- 川下事業者にも規制の影響がある。
- 高懸念物質の特定。



7 **CERI**

CERI

候補物質リスト

物質名	指定理由
Triethyl arsenate	発がん性
Anthracene	PBT
4,4'- Diaminodiphenylmethane	発がん性
Dibutyl phthalate	生殖発生毒性
Cobalt dichloride	発がん性
Diarsenic pentaoxide	発がん性
Diarsenic trioxide	発がん性
Sodium dichromate	発がん性、変異原性、生殖発生毒性
5-tert-butyl-2,4,6-trinitro-m-xylene	vPvB
Bis (2-ethylhexyl)phthalate	生殖発生毒性
Hexabromocyclododecane and all major diastereoisomers identified:	PBT
Alkanes, C10-13, chloro	PBT
Bis(tributyltin)oxide	PBT
Lead hydrogen arsenate	発がん性、生殖発生毒性
Benzyl butyl phthalate	生殖発生毒性


PBT: Persistent, Bio-accumulative and toxic
vPvB: very Persistent and very Bio-accumulative

※今年1月、更に物質の追加が行なわれた。現在、15物質が指定されており、今後も増大すると予想される。

8 **CERI**

CERI

アメリカの動向



Toxic Substance Control Act (TSCA)
により、化学物質を管理

- 新規化学物質の事前審査において、必要なデータセットを定めていない。
- 届出者は保有している情報を提出する。

USチャレンジプログラムの実施

- 我が国のJapanチャレンジプログラムのモデル
- 高生産量化学物質(100万ポンド/年、454トン/年)以上の化学物質を対象
- カテゴリー評価が多い。
- 米国環境保護庁のHP、High Production Volume Information Systemで、内容を公開

9
CERI

CERI

TSCAリフォーム

米国環境保護庁長官 Lisa Jacksonは、議会に対して、**TSCAの見直しを強く要求**している。


見直しに関する6つの原則

- 原則1: 科学とリスクに基づき、化学物質をレビューする。
- 原則2: 新規化学物質、**既存化学物質に限らず、製造者は安全性情報を環境保護庁に提出**する。
- 原則3: リスク管理の決定は、子供に対する影響、経済的費用、代替物質の可能性等を考慮する。
- 原則4: 製造者と環境保護庁は、優先順位を決定し、適切な期間内に評価を行う。
- 原則5: グリーンケミストリーを奨励すると共に、取組みの透明性、パブリックアクセスを高める。
- 原則6: 以上を推進するために、環境保護庁に十分な予算を与える。

10
CERI

CERI

カナダの動向



カテゴリーライゼーションプロジェクト

- 23,000の既存化学物質について、優先順位付けを実施
- 2006年後半に終了

カテゴリーライゼーションのスキーム

```

    graph TD
      A[23,000の既存化学物質] --> B[人暴露の可能性]
      A --> C[難分解性、濃縮性]
      B --> D[優先物質]
      C --> E[人に対する毒性]
      C --> F[環境生物に対する毒性]
      E --> D
      F --> D
  
```

優先物質の分類:

- 高優先物質: 500
- 優先物質: 4,300
- 中優先物質: 2,500
- 低優先物質: 1,200

195の最優先物質に付いて、スクリーニング評価を実施中。

11 **CERI**

CERI

化学物質管理における北米協力

Security & Prosperity Partnership of North America

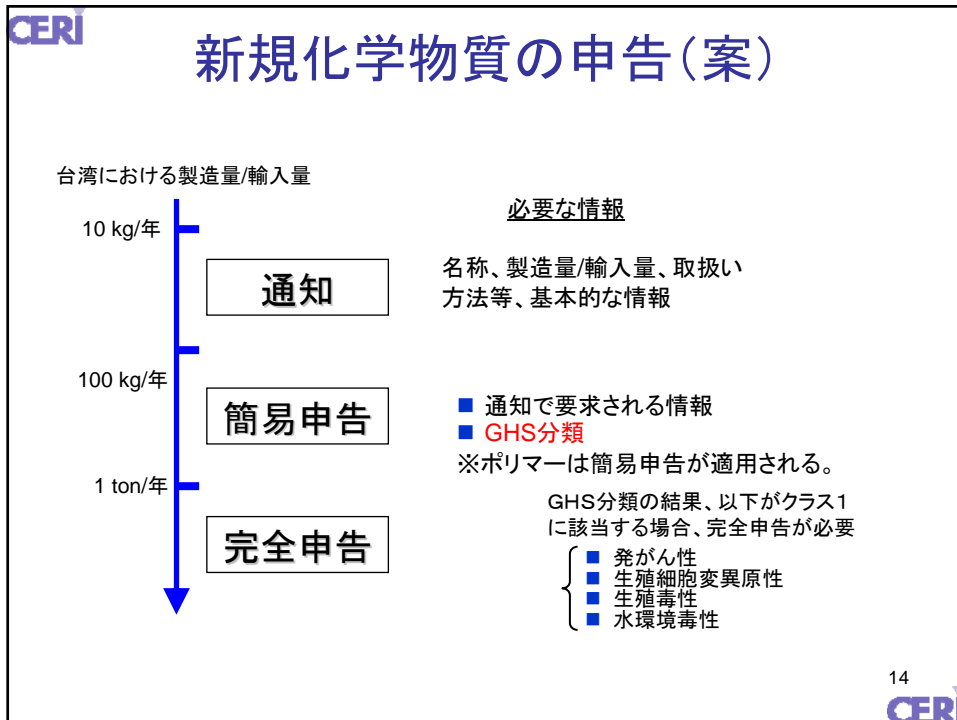
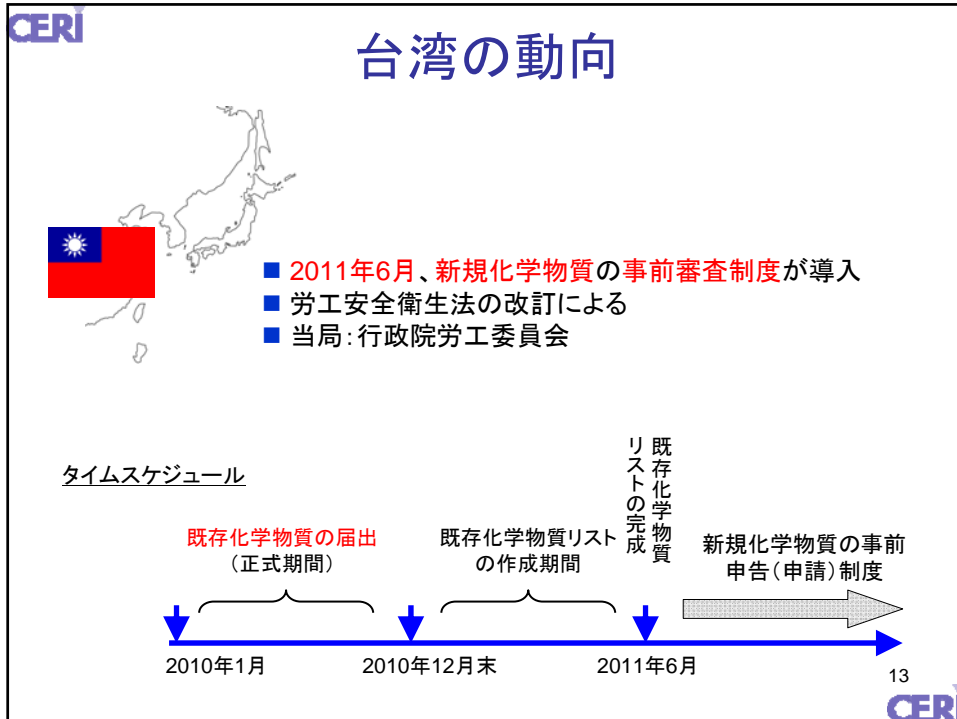
2007年8月、ブッシュ大統領(米国)、ハーパー首相(カナダ)、カルデロン大統領(メキシコ)が合意。



公約

- カナダと米国は、メキシコと協力して、メキシコの化学物質リストを作成する。
- 化学物質の安全性試験及び評価の新しいスキームを研究する。
- 各国の科学的情報及び評価・管理手法を共有するメカニズムを構築する。
- メキシコの化学物質評価及び管理能力を向上させる。
- 持続可能な開発に関する世界サミットの目標が2020年であることを再確認する。

12 **CERI**



CERI

必要な情報項目

完全申告に必要な情報

- 物質の基本情報
- **GHS分類**及び表示
- 物質の製造、使用及び暴露
- 物理、化学的特性
- 環境分布
- **生態毒性情報**
- 毒性情報
- 分析方法
- 安全使用情報
- 参考文献
- 評価報告

それぞれが、具体的にどのようなの
のかは、現在のところ明確ではない。

少なくとも二カ国以上で申請されている化学物質については、簡略化した
審査になる可能性がある。

15 CERI

CERI

中国の動向



2003年に導入した**新化学物質環境管理弁法**
により、新規化学物質を規制

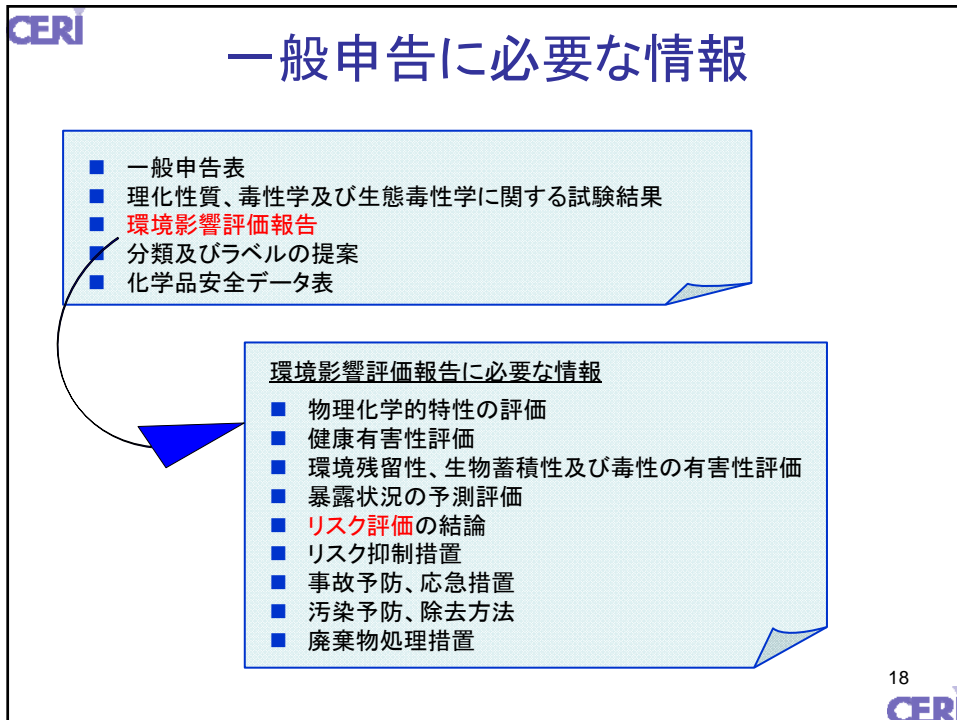
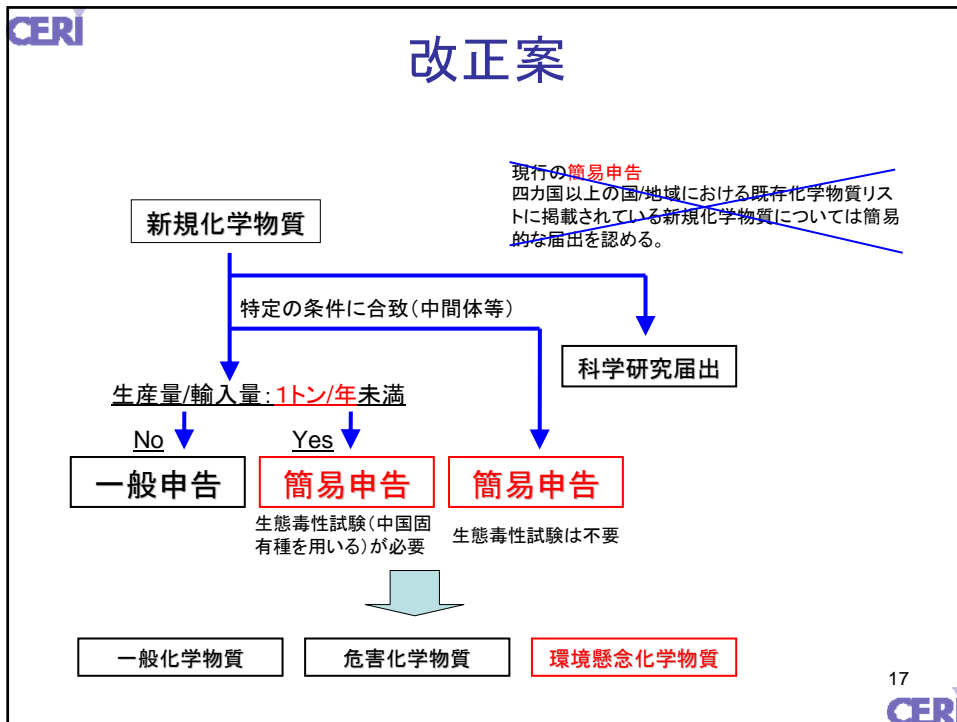
↓

改正予定(2010年10月15日)

改正ポイント


- 簡易申告制度の変更
- 裾切値の明確化
- 環境影響評価報告の義務付け
- 環境懸念化学物質カテゴリーの導入

16 CERI



CERI

韓国の動向



有害化学物質管理法により、新規化学物質の事前審査制度を有する。

2007年: 通常届出に対して生態毒性試験結果を導入

- 藻類生長阻害試験
- ミジンコ急性遊泳阻害試験
- 魚類急性毒性試験

2009年: 通常届出に対して、以下の試験結果を導入

- 皮膚刺激性試験
- 眼刺激性試験
- 皮膚感作性試験

19 **CERI**

CERI

まとめ(1)

REACH 世界の化学物質管理制度に大きな影響

化学物質の安全性評価、管理の主体

国、政府 → **企業**

既存化学物質について

- 欧州のREACH
- 米国のUSチャレンジプログラム
- 米国のTSCAの見直し
- カナダのカテゴリライゼーションプログラム、リスク評価
- Japanチャレンジプログラム
- 化審法改正

新規化学物質について

- 台湾による事前審査制度の導入

20 **CERI**

まとめ(2)

- 地球サミット、「持続可能な開発に関する世界首脳会議」の決定事項に従い、国際機関、各国が活動している。
- 経済協力開発機構では、濃縮度試験に関するガイドラインの改訂が予定されている。
- 欧州のREACH規制では、今年11月末に最初の登録期限を迎える。
- 米国では、環境保護庁長官によるTSCAの見直しが提案されている。
- カナダでは、カテゴライゼーションプログラムに引き続き、優先物質のリスク評価が行われている。
- 台湾では、2012年を目標に、新規化学物質の事前審査制度が導入される。
- 中国では、新化学物質環境管理弁法の改正が予定されている。

21

ご清聴、ありがとうございました。

22

化学物質GLP(動植物毒性試験)に関する動向について

平成22年1月

環境省環境保健部
化学物質審査室

目次

1 GLP制度の概要について

2 最近の動向について

有害性試験の実施と活用

<国内>

化審法をはじめとする政府の規制導入の判断材料

<海外>

- 欧州REACHをはじめとする海外の化学物質管理システムへの対応
- OECD/HPVプログラムなどの国際的な情報共有

→試験結果の信頼性の確保が国際的なレベルで必要・重要

有害性試験

- OECD試験法ガイドライン
 - 1981年以来、OECDにおいて、国際的に共通の試験法ガイドラインを作成
 - 物理化学的特性
 - 分解性・濃縮性
 - 生態毒性
 - 藻類、ミジンコ、魚類等を用いた致死性、繁殖影響等の試験
 - 哺乳類への毒性
 - ネズミ等を用いた急性毒性、慢性毒性、発がん性等の試験



MAD (Mutual Acceptance of Data) システム

◆MADシステム

同一の化学物質の届出、登録の際に新たなデータを作成する手間を省き、同じデータを使うことを可能とするシステム

◆MADシステムを支えるプログラム

テストガイドライン(世界中の試験施設で同じように試験が行われるようにするため、試験方法を詳細に記述)およびGLP(良質かつ正確な試験結果を提供するための試験所における管理や試験実施、報告などに関する基準)によって担保

OECD GLP 原則

- **GLP原則**は、1981年の「**データの相互受け入れ**に関する理事会決定」の中の重要な部分である。
- 1989年の「**GLPの遵守**に関する理事会決定・勧告」では、国によるGLP査察制度の構築等が求められている。
- 関連して、OECDから以下のようなガイダンス文書が発行されている。
 - No 1 : OECD GLP原則
 - No 2 : GLP適合性モニタリングの改訂指針
 - No 3 : 施設査察及び試験査察実施のための改訂ガイダンス

OECD/GLP原則における要求項目

1. 試験施設の組織と職員
2. 信頼性保証プログラム
3. 施設
4. 機器、材料及び試薬
5. 試験系
6. 被験物質及び対照物質
7. 標準操作手順書
8. 試験の実施
9. 試験結果の報告
10. 記録及び試資料の保管と維持

日本におけるGLPプログラムの概要

GLP プログラム	省庁	関連機関
1. 医薬品・医療機器	厚労省	医薬品医療機器総合機構
2. 労働化学物質	厚労省	労働安全衛生総合研究所
3. 農薬・殺虫剤	農水省	農林水産消費安全技術センター
4. 動物医薬品	農水省	動物医薬品検査所
5. 飼料添加物	農水省	農林水産消費安全技術センター
6. 化学品 1) 人毒性 2) 分解性・蓄積性 3) 生態毒性	1) 厚労省	国立医薬品食品衛生研究所
	2) 経産省	製品評価技術基盤機構
	3) 環境省	国立環境研究所

化審法の下で要求されるGLP試験について

- 新規化学物質の審査に使用する有害性試験結果は、原則として「化学物質GLP」に適合する試験施設で行われたものでなければならない。
(OECD-GLP原則に適合した他の国の試験施設で行われた試験についても認められる。)
- 国によって（もしくは製造・輸入業者によってボランティアに）行われる既存化学物質の試験についても、GLP試験施設で行われたものでなければならない。

化審法の下で要求されるGLP試験について

- 環境省、厚生労働省、経済産業省は化審法の下でのGLP原則を定めている。これは、OECD-GLP原則に適合したものである。
- 三省では、試験施設がGLP原則に適合しているか確認するための、共通の実施手順（必要とされる書類、書面審査、査察等）を定めている。
- 三省では、それぞれの特徴に従って、化審法で要求される各GLP試験について役割分担を行っている。

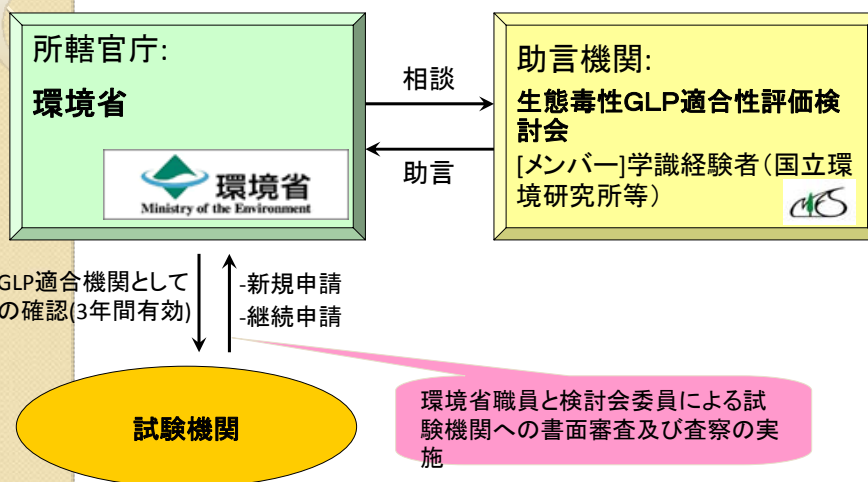
省庁	化審法GLPの下での役割分担	GLP試験(例)
環境省	生態毒性	藻類生長阻害試験、ミジンコ急性遊泳阻害試験、魚類急性毒性試験、ミジンコ繁殖試験、魚類初期生活段階毒性試験、底質添加によるユスリカ毒性試験、鳥類繁殖試験
厚生労働省	人毒性	哺乳類28日間反復投与毒性試験、細菌復帰突然変異試験、哺乳類培養細胞染色体異常試験、哺乳類慢性毒性試験、生殖能・後世代影響試験、催奇形成試験、変異原性試験、がん原性試験、生体内運命試験、薬理学試験等
経済産業省	分解性・蓄積性	分解度試験、濃縮度試験

内容:

1 GLP制度の概要について

2最近の動向について

生態毒性GLPにおける適合確認プロセス



今年度の環境省によるGLP適合確認

- 今年度は5件の更新、1件の新規申請。
- 新規申請は鳥類繁殖試験。我が国では初めての確認事例。
- 更新の試験施設についても、ミジンコ繁殖試験や底質添加によるユスリカ毒性試験で項目の追加があった。

生態毒性GLPについて

- ・ 動植物毒性試験について
動植物毒性試験の種類及びそれぞれの試験に係るGLP適合性確認を受けている試験施設数は以下のとおり。
(平成22年1月1日現在)

試験項目	試験施設数
藻類生長阻害試験	9
ミジンコ急性遊泳阻害試験	9
魚類急性毒性試験	9
ミジンコ繁殖試験	5
魚類初期生活段階毒性試験	3
底質添加によるユスリカ毒性試験	3
鳥類繁殖試験	1

ご静聴ありがとうございました。

「生態影響に関する化学物質審査規制／試験法セミナー」

第2部 (4) 生態毒性試験実施にあたって の留意点

藻類生長阻害試験OECD-TG201(2006)の解説

菅谷 芳雄

(独)国立環境研究所環境リスク研究センター

TG201

光源

72時間培養

一定時間

代謝速度が一定なら、生長速度も一定

NIES-35 *Pseudokirchneriella subcapitata* 10 μm

生長速度

$$r = \frac{\ln(X(72\text{h})/X(0\text{h}))}{3\text{day}}$$
$$= 1.5 \text{ (90倍)} \sim 1.8 \text{ (225倍)}$$

Relationships of growth rate

$$r \approx \frac{1}{T_c} \approx \frac{1}{\text{size}} \approx \text{metabolic_rate} / \text{unit_weight}$$

T_c : generation time

毒性値 ErC50: 生長速度が50%となる、濃度

OECD 試験ガイドライン201(2006) パラグラフ 5.
 生長および生長阻害は時間の関数とする藻類の生物量(Biomass)の測定値から定量される。藻類の生物量は例えばmg乾燥重量/Lのように定義される。しかしながら、乾燥重量を測定することは困難なので、代替パラメーターが用いられる。それらは、細胞数が最も頻繁に用いられ、その他では細胞体積、蛍光、吸光度などである。ただしバイオマスと測定に用いた代替パラメーターの変換係数は明確にしておく必要がある。

測定方法	特徴
細胞数	細胞サイズに変動がない場合は、粒子計測装置を用いることで、高感度で測定可能。細胞の生死は区別できない外、試験液に粒子状の物質が存在する場合は、計測装置の利用は困難。
細胞体積	細胞サイズに関わりなく、生物量とより相関が高い、と予測される。細胞するとともに粒子計測装置で測定する。
クロロフィル蛍光	粒子計測装置と同程度の感度の高い測定が可能であり、細胞サイズに関わりなく、生物量と相関が高いと予測される。
光学的密度(吸光度)	一般的には十分な感度が得られない。

推奨種の標準的な基礎データ

Appearance and characteristics of recommended species

	<i>P. subcapitata</i>	<i>D. subspicatus</i>	<i>N. pelliculosa</i>	<i>A. flos-aquae</i>	<i>S. leopoliensis</i>
Appearance	Curved, twisted single cells	Oval, mostly single cells	Rods	Chains of oval cells	Rods
Size (L x W) μm	8-14 x 2-3	7-15 x 3-12	7.1x3.7	4.5x3	6x1
Cell volume (μm ³ /cell)	40-60 ¹	60-80 ¹	40-50 ¹	30-40 ¹	2.5 ²
Cell dry weight (mg/cell)	2-3x10 ⁻⁸	3-4x10 ⁻⁸	3-4x10 ⁻⁸	1-2x10 ⁻⁸	2-3x10 ⁻⁹
Growth rate ³ (day ⁻¹)	1.5 -1.7	1.2-1.5	1.4	1.1-1.4	2.0 -2.4

¹ Measured with electronic particle counter

² Calculated from size

³ Most frequently observed growth rate in OECD medium at light intensity approx. 70 μE m⁻² s⁻¹ and 21 °C

評価法：生物代謝の抑制

Relationships of growth rate

$$r \approx \frac{1}{T_c} \approx \frac{1}{\text{size}} \approx \text{metabolic_rate / unit_weight}$$

T_c : generation time

生長速度と代謝は比例：代謝の阻害の程度を示す

N. Nyholm in 1990
Arch. Environ. Contam. Toxicol. 19: 518-522 (1990)

$$\frac{E_b C_{50}}{E_t C_{50}} = 10 \left[\left(\frac{1}{\alpha} \right) * \left(\frac{\ln 2}{\mu_{\max} * t} - 0.5 \right) \right]$$

Ratio is not constant and depends on

- slope of response curve, α
- species-specific maximal growth rate, μ_{\max}
- test duration, t

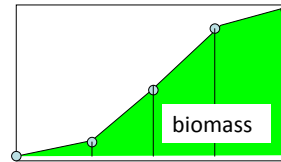
Ebc50は、試験条件で変動する

試験は全期間を通じて
指数増殖期

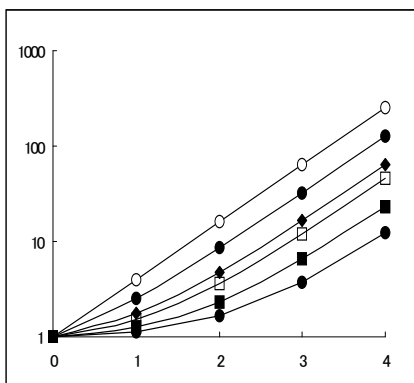
暴露区でも指数増殖し
ていれば、生長速度の
阻害率から毒性値

収量 (Yield) は原則用
いない

※面積法



評価法：個体の死亡

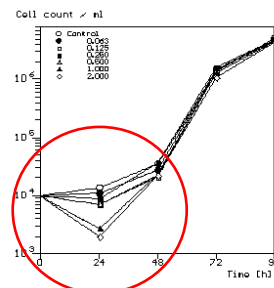


区間生長速度 $r(0-1) < r(1-2) < r(2-3)$
暴露濃度が高いほど顕著なLag phaseが見
られる

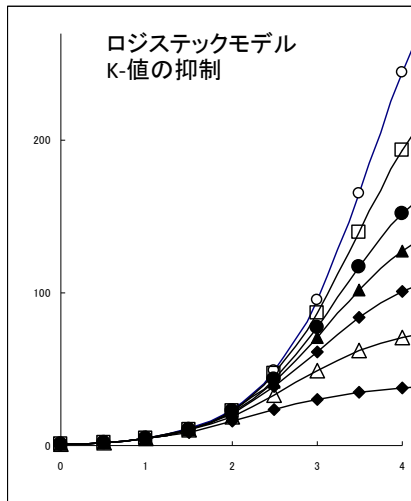
予備培養が不十分

被験物質濃度が減少

部分的な死亡があるが
生長には影響しない場合



評価法：環境容量の抑制



被験物質の影響だが……

生物への直接的な影響ではなく
培地の性質を変えただけ(物理
化学的影響)で、「真の毒性」
ではない?

このTGでは扱わない

実際には平均生長速度に表れる
部分のみ評価

科学的な検討が必要

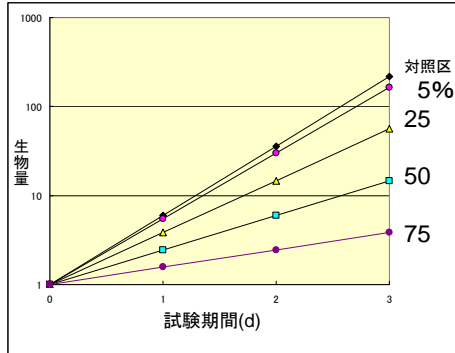
特に留意すべきガイドラインにおける規定

- (1) 試験濃度の設定
- (2) 被験物質の分析について
- (3) 分析値データの取扱いについて
- (4) 毒性値算出の基礎となるばく露濃度の決定について
- (5) 毒性値の算出方法

パラグラフ 22. (OECD 試験ガイドライン201 (2006))

影響がでる可能性がある濃度範囲は、Range-finding試験結果から決定してよい。最終的な決定試験では、公比3. 2を超えない幾何数列の少なくとも5濃度区を選択すべきである。反応曲線がもっと平坦な物質に対しては、もっと大きな公比が正当化されるであろう。濃度シリーズは藻類の生長速度の5-75%阻害を起こす範囲をカバーするようにすべきである。

生長速度の5-75%の生長阻害とは……



	生長速度	最終濃度
对照区	0%	0%
A	5%	23%
B	25%	74%
C	50%	93%
D	75%	98%

- 1) ErC50: 生長速度での阻害率で50%以上の濃度区は少なくてよい。
- 2) NOEC: 生長速度で5%未満でも有意差となることが多い。

試験の設計

妥当性クライテリア

- 1) 平均生長速度
0.92 /day (= 3日間で16倍)
- 2) 対照区における日間(1、2、3日目の)生長速度の変動係数
35 % 以下
- 3) 対照区の平均生長速度の変動係数
緑藻2種 7 % 以下
その他 10 % 以下

指数増殖期の維持

- Lag phase をなくす
- 試験の短縮 48時間試験も可

試験デザイン:

繰り返し数 対照区 6 以上
暴露区 3 以上

- 目的(ECx か NOEC か)
- 安定した試験結果

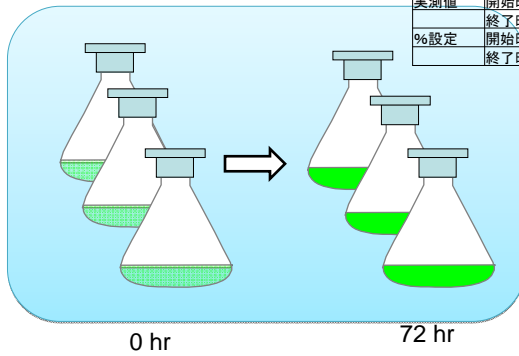
※ pH 変動は、0.5 unit 以下.1.5未満に……
ただし、毒性値の信頼性を損なうか？

パラグラフ37

- (1) 最低限3濃度区で曝露開始時と終了時に被験物質濃度を実測すること測定の結果、設定濃度からの変動が20%以内であれば、それ以上の分析は必要ない。
- (2) 変動が20%を越える場合は、全ての濃度区で分析する。
- (3) 揮発性、不安定性もしくは吸着性が激しい物質では、曝露開始時および終了時に加えて24時間間隔で測定を追加することが推奨される。
- (4) このような被験物質にあつては、繰り返しを多くすることが必要であろう。
- (5) 測定は、各濃度区で1容器のみ実施すればよい。(もしくは、各繰り返しから一定量をとってプールしてもよい)

試験物質の分析結果

		Min		EC50		Max	
設定値		5	10	20	40	80	
実測値	開始時	5.1	8.8	19.6	37.9	81.0	
	終了時	3.9	8.2	16.9	35.1	76.2	
%設定	開始時	102%	88%	98%	95%	101%	
	終了時	78%	82%	85%	88%	95%	



開始時と終了時に試験物質濃度測定
 変動幅が20%以内 → 3濃度区で十分
 変動幅が20%超 → 全濃度区で測定

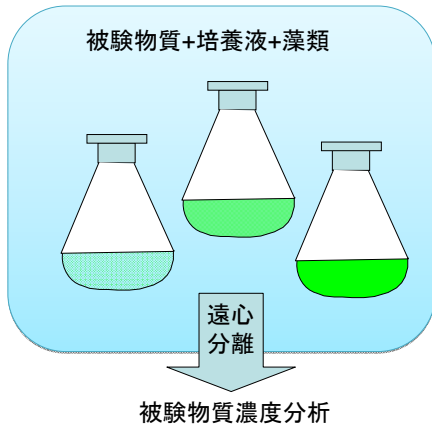


不安定な物質の場合はさらに追加の測定が必要

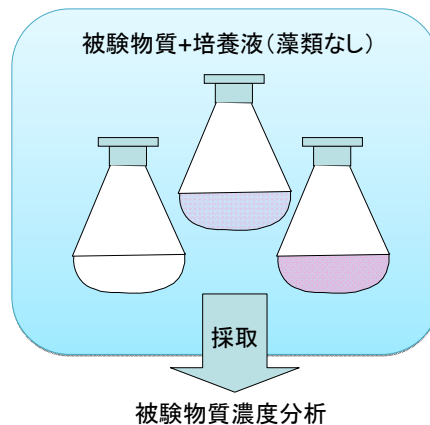
パラグラフ38

- (1) 試験期間中の曝露濃度分析のために特別に準備された媒体(試験溶液)は、試験用の培地と全く同様に取り扱われなければならない(つまり、藻類を植えられ、かつ同一条件で培養される)
- (2) もし、溶存態の被験物質の濃度測定が求められる場合は、媒体から藻類を分離する必要があり、その場合藻類を沈めるに十分かつ低Gの遠心分離が望ましい。

通常の濃度測定手順

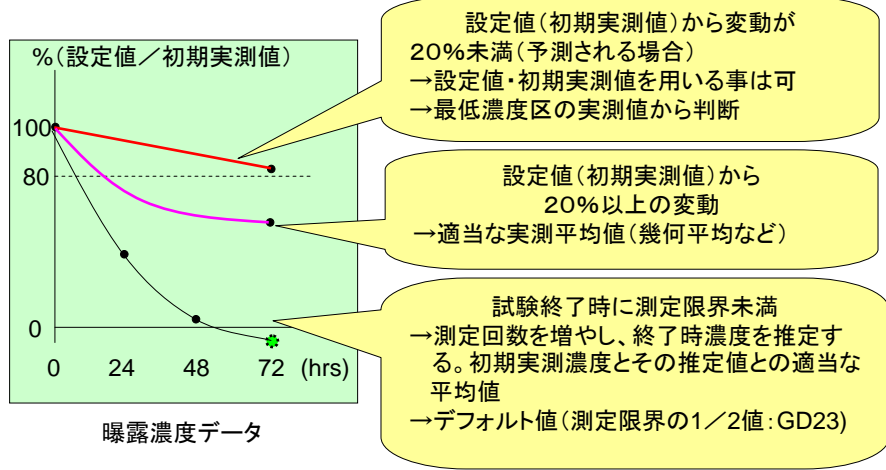


補完的な手順



パラグラフ39

- (1) 試験期間中の被験物質濃度が設定値もしくは初期実測値からの変動が十分に±20%以内に維持できたとの証拠がある場合には、結果の分析(毒性値の算出)において設定値もしくは初期実測値を用いてよい。
- (2) 設定値もしくは初期実測値からの変動が±20%範囲外の場合には曝露期間中の幾何平均濃度、もしくは、被験物質濃度の減少を推定するモデルに基づいて試験結果を分析すべきである。



パラグラフ40

- (1) 他のほとんどの水生短期毒性試験よりは、藻類生長阻害試験はよりダイナミックな試験である。そのため、実際の曝露濃度を決定することが困難であろうし、吸着性物質の低濃度曝露においては特にそのようであろう。
- (2) そのようなケースでは、増加した藻類体への吸着により試験溶液から被験物質が消失したとしてもそれは試験系から失われたことを意味しない。
- (3) 結果の分析にあたっては、試験経過中の試験物質濃度の減少が生長阻害率の減少に付随して起きているかどうかチェックすべきである。もしそのような場合には、試験物質濃度の減少を推定するモデルの利用を検討したほうがよいであろう。そうでなければ、試験結果の分析は初期(設定もしくは実測)濃度を基に実施すべきことは明らかであろう。

化学物質管理当局に提出する試験報告においては・・・
通常の試験手順では試験が困難(結果の解釈も含む)な物質の試験に関しては、別途OECD-ガイダンス文書があり、ガイドラインに示していない手順を用いる場合はこのガイダンスを根拠とすべきである。

→ 何が、ダイナミックなのか？

	藻類	ミジンコ	魚類
選択可能な曝露方式	止水式	止水式 半止水式	止水式 半止水式 流水式
生物量(密度)	指数関数的に増加	死亡個体は除去(減少)	死亡個体は除去(減少)
その他の環境要因	<ul style="list-style-type: none"> ・光(連続照明) ・pH上昇←光合成に伴うCO₂の減少、密閉系の試験で顕著 		

The alga growth inhibition test is a more dynamic test system than most other short-term aquatic toxicity tests.

- As a consequence, the actual exposure concentrations may be difficult to define, especially for adsorbing substances tested at low concentrations.

→ どうして低濃度区だけ特別なのか・・・

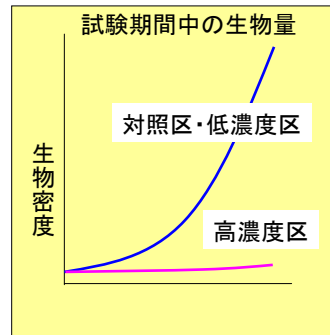


藻類量が増えると・・・

藻類に吸着し易い物質は、溶液中から→藻類(吸着)に移動

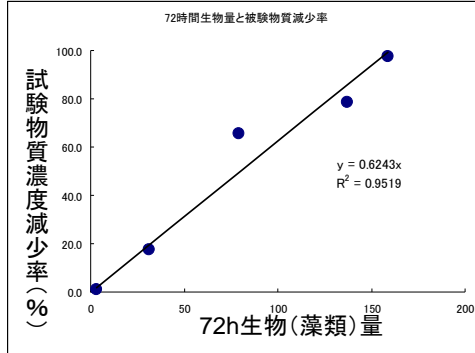
光合成速度が増大 → 溶液のpHが上昇
藻類自らの影で光束密度が減少→光合成速度鈍化

- In such cases, disappearance of the test substance from solution by adsorption to the increasing algal biomass does not mean that it is lost from the test system. → この事をどのように示すのか



When the result of the test is analysed, it should be checked whether a decrease in concentration of the test substance in the course of the test is accompanied by a decrease in growth inhibition. → **要するになんなのか？**

試験物質濃度の減少が生長阻害の減少に付随して起こる・・・
 試験物質濃度の減少率 * と 72時間後の生物(藻類)量が 比例
 * $1 - [\text{実測値}(72\text{h}) / \text{実測値}(0\text{h})]$



- ・予備試験で試験物質は試験条件で安定であることが示されている。
- ・予備試験で藻類に吸着することが示されている。

設定濃度	0h実測	72h実測	減少率	72h生物量
5	4.2	0.11	97.4	159
10	8.9	1.9	78.7	137
20	18.1	6.2	65.7	79
40	36.7	30.2	17.7	31
80	73.1	72.4	1.0	3

If not, it may be appropriate to base the analysis of the results on the initial (nominal or measured) concentrations

毒性値の算出の基になる「ばく露濃度」は、設定値もしくは初期実測濃度が適当

生物量が多いときほど、試験物質の減少が大きい場合は外にないのか？

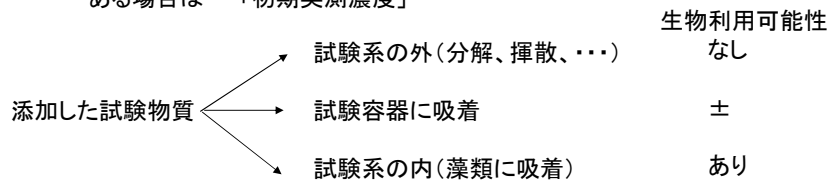
→ 生物量が多いほど、光合成量が多かったため、CO₂消費が多い
 → pHが上昇 → 加水分解速度が速い → 試験物質濃度が低下

対策

- ・加水分解性物質の場合は、pH変動を抑える。
- ・予備試験で、吸着性があるかどうかを検討しておく。

設定濃度 と 初期実測濃度 のどちらを使うべきか？

→ 設定濃度と初期実測濃度に差がある場合は・・・「初期実測濃度」

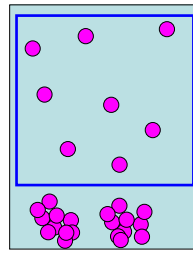
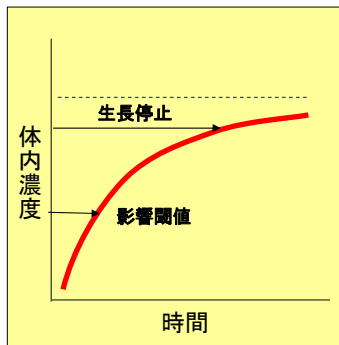


- 被験物質の水中安定性 →
- 試験環境で分解されない
 - 水中での濃度が一定に保たれる

藻類への吸着が原因で濃度が低下する場合は、初期実測濃度で毒性評価

濃度設定：もう1つの問題

安定した「ばく露濃度」の試験が重要 → 不安定な物質の濃度設定
 ……藻類試験は対策が制限



[限度試験では…]

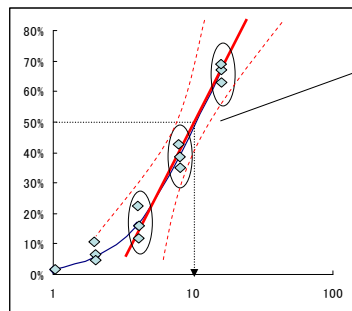
粒子が試験結果に影響を与えない場合は、水溶解を超えて添加した試験はありうる。飽和濃度を維持するため

- 例：初期実測濃度が溶解度よりも低い：容器への吸着別の対策：conditioning
- 例：溶解度が定量下限以下手順で飽和濃度であることを示す必要がある。

パラグラフ 55

…… 回帰分析を個々の繰り返しデータを使って実施すべきであり、(濃度区の)グループ平均を用いてはならない。しかしながら、データがバラバラで非線形曲線フィッティングが困難であったり失敗してしまうのであれば、グループ平均を使つての回帰分析も飛び値と考えられる影響を減じる事も実行上、問題を回避できるかもしれない。ただしこのオプションの利用は個々の繰り返しデータを用いた場合は良い結果が得られなかったのだから、通常の手順からの逸脱として報告しなければならない。

全繰り返しデータを用いた毒性値の算出



濃度(対数)－阻害率曲線

ErC50
EyC50

$$\text{阻害率} = 1 - (rx / rc)$$

rx: 濃度xの生長速度
rc: 対照区の生長速度

グループ平均を用いる場合には、報告書にその点の釈明が必要

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS

Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test

INTRODUCTION

1. OECD Guidelines for Testing of Chemicals are periodically reviewed and updated in the light of scientific progress. With respect to Guideline 201, Alga, Growth Inhibition Test (adopted June 1984), the need to extend the Guideline to include additional species and update it to meet the requirements for hazard assessment and classification of chemicals has been identified. The revision has been completed on the basis of extensive practical experience, scientific progress in the field of algal toxicity studies, and extensive regulatory use, which has occurred since the original adoption.

2. Definitions used are given in Annex 1.

PRINCIPLE OF THE TEST

3. The purpose of this test is to determine the effects of a substance on the growth of freshwater microalgae and/or cyanobacteria. Exponentially growing test organisms are exposed to the test substance in batch cultures over a period of normally 72 hours. In spite of the relatively brief test duration, effects over several generations can be assessed.

4. The system response is the reduction of growth in a series of algal cultures (test units) exposed to various concentrations of a test substance. The response is evaluated as a function of the exposure concentration in comparison with the average growth of replicate, unexposed control cultures. For full expression of the system response to toxic effects (optimal sensitivity), the cultures are allowed unrestricted exponential growth under nutrient sufficient conditions and continuous light for a sufficient period of time to measure reduction of the specific growth rate.

5. Growth and growth inhibition are quantified from measurements of the algal biomass as a function of time. Algal biomass is defined as the dry weight per volume, e.g. mg algae/litre test solution. However, dry weight is difficult to measure and therefore surrogate parameters are used. Of these surrogates, cell counts are most often used. Other surrogate parameters include cell volume, fluorescence, optical density, etc. A conversion factor between the measured surrogate parameter and biomass should be known.

6. The test endpoint is inhibition of growth, expressed as the logarithmic increase in biomass (average specific growth rate) during the exposure period. From the average specific growth rates recorded in a series of test solutions, the concentration bringing about a specified x % inhibition of growth rate (e.g. 50%) is determined and expressed as the E_rC_x (e.g. E_rC_{50}).

7. An additional response variable used in this Guideline is yield, which may be needed to fulfil specific regulatory requirements in some countries. It is defined as the biomass at the end of the exposure period minus the biomass at the start of the exposure period. From the yield recorded in a series of test solutions, the concentration bringing about a specified x % inhibition of yield (e.g., 50 %) is calculated and expressed as the E_yC_x (e.g. E_yC_{50}).

201

OECD/OCDE

8. In addition, the lowest observed effect concentration (LOEC) and the no observed effect concentration (NOEC) may be statistically determined.

INFORMATION ON THE TEST SUBSTANCE

9. Information on the test substance which may be useful in establishing the test conditions includes structural formula, purity, stability in light, stability under the conditions of the test, light absorption properties, pKa, and results of studies of transformation including biodegradability in water.

10. The water solubility, octanol water partition coefficient (P_{ow}) and vapour pressure of the test substance should be known and a validated method for the quantification of the substance in the test solutions with reported recovery efficiency and limit of detection should be available.

VALIDITY OF THE TEST

11. For the test to be valid, the following performance criteria should be met:

- The biomass in the control cultures should have increased exponentially by a factor of at least 16 within the 72-hour test period. This corresponds to a specific growth rate of 0.92 day^{-1} . For the most frequently used species the growth rate is usually substantially higher (see Annex 2). This criterion may not be met when species that grow slower than those listed in Annex 2 are used. In this case, the test period should be extended to obtain at least a 16-fold growth in control cultures, while the growth has to be exponential throughout the test period. The test period may be shortened to at least 48 hours to maintain unlimited, exponential growth during the test as long as the minimum multiplication factor of 16 is reached.
- The mean coefficient of variation for section-by-section specific growth rates (days 0-1, 1-2 and 2-3, for 72-hour tests) in the control cultures (See Annex 1 under “coefficient of variation”) must not exceed 35%. See paragraph 49 for the calculation of section-by-section specific growth rate. This criterion applies to the mean value of coefficients of variation calculated for replicate control cultures.
- The coefficient of variation of average specific growth rates during the whole test period in replicate control cultures must not exceed 7% in tests with *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Desmodesmus subspicatus*. For other less frequently tested species, the value should not exceed 10%.

REFERENCE SUBSTANCE

12. Reference substance(s), such as 3,5-dichlorophenol used in the international ring test (1), may be tested as a means of checking the test procedure. Potassium dichromate can also be used as a reference substance for green algae. It is desirable to test a reference substance at least twice a year.

APPLICABILITY OF THE TEST

13. This Guideline is most easily applied to water-soluble substances which, under the conditions of the test, are likely to remain in the water. For testing of substances that are volatile, strongly adsorbing, coloured, having a low solubility in water or substances that may affect the availability of nutrients or minerals in the test medium, certain modifications of the described procedure may be required (e.g., closed system, conditioning of the test vessels). Guidance on some appropriate modifications is given in (2) (3) and (4).

DESCRIPTION OF THE METHOD**Apparatus**

14. Test vessels and other apparatus which will come into contact with the test solutions should be made entirely of glass or other chemically inert material. The items should be thoroughly washed to ensure that no organic or inorganic contaminants may interfere with the algal growth or composition of the test solutions.

15. The test vessels will normally be glass flasks of dimensions that allow a sufficient volume of culture for measurements during the test and a sufficient mass transfer of CO₂ from the atmosphere (see paragraph 30). Note that the liquid volume must be sufficient for analytical determinations (see paragraph 37).

16. In addition some or all of the following equipment may be required:

- Culturing apparatus: a cabinet or chamber is recommended, in which the chosen incubation temperature can be maintained at $\pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Light measurement instruments: it is important to note that the method of measurement of light intensity, and in particular the type of receptor (collector), may affect the measured value. Measurements should preferably be made using a spherical (4π) receptor (which responds to direct and reflected light from all angles above and below the plane of measurement), or a 2π receptor (which responds to light from all angles above the measurement plane).
- Apparatus to determine algal biomass. Cell count, which is the most frequently used surrogate parameter for algal biomass, may be made using an electronic particle counter, a microscope with counting chamber, or a flow cytometer. Other biomass surrogates can be measured using a flow cytometer, fluorimeter, spectrophotometer or colorimeter. A conversion factor relating cell count to dry weight is useful to calculate. In order to provide useful measurements at low biomass concentrations when using a spectrophotometer, it may be necessary to use cuvettes with a light path of at least 4 cm.

Test organisms

17. Several species of non-attached microalgae and cyanobacteria may be used. The strains listed in Annex 2 have been shown to be suitable using the test procedure specified in this Guideline.

18. If other species are used, the strain and/or origin should be reported. Confirm that exponential growth of the selected test alga can be maintained throughout the test period under the prevailing conditions.

Growth medium

19. Two alternative growth media, the OECD and the AAP medium, are recommended. The compositions of these media are shown in Annex 3. Note that the initial pH value and the buffering capacity (regulating pH increase) of the two media are different. Therefore the results of the tests may be different depending on the medium used, particularly when testing ionising substances.

201

OECD/OCDE

20. Modification of the growth media may be necessary for certain purposes, e.g. when testing metals and chelating agents or testing at different pH values. Use of a modified medium should be described in detail and justified (3)(4).

Initial biomass concentration

21. The initial biomass in the test cultures must be the same in all test cultures and sufficiently low to allow exponential growth throughout the incubation period without risk of nutrient depletion. The initial biomass should not exceed 0.5 mg/L as dry weight. The following initial cell concentrations are recommended:

<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> :	$5 \times 10^3 - 10^4$	cells/mL
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	$2-5 \times 10^3$	cells/mL
<i>Navicula pelliculosa</i>	10^4	cells/mL
<i>Anabaena flos-aquae</i>	10^4	cells/mL
<i>Synechococcus leopoliensis</i>	$5 \times 10^4 - 10^5$	cells/mL

Concentrations of test substance

22. The concentration range in which effects are likely to occur may be determined on the basis of results from range-finding tests. For the final definitive test at least five concentrations, arranged in a geometric series with a factor not exceeding 3.2, should be selected. For test substances showing a flat concentration response curve a higher factor may be justified. The concentration series should preferably cover the range causing 5-75 % inhibition of algal growth rate.

Replicates and controls

23. The test design should include three replicates at each test concentration. If determination of the NOEC is not required, the test design may be altered to increase the number of concentrations and reduce the number of replicates per concentration. The number of control replicates must be at least three, and ideally should be twice the number of replicates used for each test concentration.

24. A separate set of test solutions may be prepared for analytical determinations of test substance concentrations (see paragraphs 36 and 38).

25. When a solvent is used to solubilise the test substance, additional controls containing the solvent at the same concentration as used in the test cultures must be included in the test design.

Preparation of inoculum culture

26. In order to adapt the test alga to the test conditions and ensure that the algae are in the exponential growth phase when used to inoculate the test solutions, an inoculum culture in the test medium is prepared 2-4 days before start of the test. The algal biomass should be adjusted in order to allow exponential growth to prevail in the inoculum culture until the test starts. Incubate the inoculum culture under the same conditions as the test cultures. Measure the increase in biomass in the inoculum culture to ensure that growth is within the normal range for the test strain under the culturing conditions. An example of the procedure for algal culturing is described in Annex 4. To avoid synchronous cell divisions during the test a second propagation step of the inoculum culture may be required.

OECD/OCDE

201

Preparation of test solutions

27. All test solutions must contain the same concentrations of growth medium and initial biomass of test alga. Test solutions of the chosen concentrations are usually prepared by mixing a stock solution of the test substance with growth medium and inoculum culture. Stock solutions are normally prepared by dissolving the substance in test medium.

28. Solvents, e.g. acetone, t-butyl alcohol and dimethyl formamide, may be used as carriers to add substances of low water solubility to the test medium (2)(3). The concentration of solvent should not exceed 100 µl/L, and the same concentration of solvent should be added to all cultures (including controls) in the test series.

Incubation

29. Cap the test vessels with air-permeable stoppers. The vessels are shaken and placed in the culturing apparatus. During the test it is necessary to keep the algae in suspension and to facilitate transfer of CO₂. To this end constant shaking or stirring should be used. The cultures should be maintained at a temperature in the range of 21 to 24°C, controlled at ± 2°C. For species other than those listed in Annex 2, e.g. tropical species, higher temperatures may be appropriate, providing that the validity criteria can be fulfilled. It is recommended to place the flasks randomly and to reposition them daily in the incubator.

30. The pH of the control medium should not increase by more than 1.5 units during the test. For metals and compounds that partly ionise at a pH around the test pH, it may be necessary to limit the pH drift to obtain reproducible and well defined results. A drift of < 0.5 pH units is technically feasible and can be achieved by ensuring an adequate CO₂ mass transfer rate from the surrounding air to the test solution, e.g. by increasing the shaking rate. Another possibility is to reduce the demand for CO₂ by reducing the initial biomass or the test duration.

31. The surface where the cultures are incubated should receive continuous, uniform fluorescent illumination e.g. of «cool-white» or «daylight» type. Strains of algae and cyanobacteria vary in their light requirements. The light intensity should be selected to suit the test organism used. For the recommended species of green algae, select the light intensity at the level of the test solutions from the range of 60-120 µE·m⁻²·s⁻¹ when measured in the photosynthetically effective wavelength range of 400-700 nm using an appropriate receptor. Some species, in particular *Anabaena flos-aquae*, grow well at lower light intensities and may be damaged at high intensities. For such species an average light intensity in the range 40-60 µE·m⁻²·s⁻¹ should be selected. (For light-measuring instruments calibrated in lux, an equivalent range of 4440 – 8880 lux for cool white light corresponds approximately to the recommended light intensity 60-120 µE·m⁻²·s⁻¹). Maintain the light intensity within ±15% from the average light intensity over the incubation area.

Test duration

32. Test duration is normally 72 hours. However, shorter or longer test durations may be used provided that all validity criteria in paragraph 11 can be met.

Measurements and analytical determinations

33. The algal biomass in each flask is determined at least daily during the test period. If measurements are made on small volumes removed from the test solution by pipette, these should not be replaced.

201

OECD/OCDE

34. Measurement of biomass is done by manual cell counting by microscope or an electronic particle counter (by cell counts and/or biovolume). Alternative techniques, e.g. flow cytometry, *in vitro* or *in vivo* chlorophyll fluorescence (5) (6), or optical density can be used if a satisfactory correlation with biomass can be demonstrated over the range of biomass occurring in the test.

35. Measure the pH of the solutions at the beginning and at the end of the test.

36. Provided an analytical procedure for determination of the test substance in the concentration range used is available, the test solutions should be analysed to verify the initial concentrations and maintenance of the exposure concentrations during the test.

37. Analysis of the concentration of the test substance at the start and end of the test of a low and high test concentration and a concentration around the expected EC₅₀ may be sufficient where it is likely that exposure concentrations will vary less than 20% from nominal values during the test. Analysis of all test concentrations at the beginning and at the end of the test is recommended where concentrations are unlikely to remain within 80-120 % of nominal. For volatile, unstable or strongly adsorbing test substances, additional samplings for analysis at 24 hour intervals during the exposure period are recommended in order to better define loss of the test substance. For these substances, extra replicates may be needed. In all cases, determination of test substance concentrations need only be performed on one replicate vessel at each test concentration (or the contents of the vessels pooled by replicate).

38. The test media prepared specifically for analysis of exposure concentrations during the test should be treated identically to those used for testing, i.e. they should be inoculated with algae and incubated under identical conditions. If analysis of the dissolved test substance concentration is required, it may be necessary to separate algae from the medium. Separation should preferably be made by centrifugation at a low g-force, sufficient to settle the algae.

39. If there is evidence that the concentration of the substance being tested has been satisfactorily maintained within ± 20 % of the nominal or measured initial concentration throughout the test, analysis of the results can be based on nominal or measured initial values. If the deviation from the nominal or measured initial concentration is not within the range of ± 20 %, analysis of the results should be based on geometric mean concentration during exposure or on models describing the decline of the concentration of the test substance (3) (7).

40. The alga growth inhibition test is a more dynamic test system than most other short-term aquatic toxicity tests. As a consequence, the actual exposure concentrations may be difficult to define, especially for adsorbing substances tested at low concentrations. In such cases, disappearance of the test substance from solution by adsorption to the increasing algal biomass does not mean that it is lost from the test system. When the result of the test is analysed, it should be checked whether a decrease in concentration of the test substance in the course of the test is accompanied by a decrease in growth inhibition. If this is the case, application of a suitable model describing the decline of the concentration of the test substance (7) may be considered. If not, it may be appropriate to base the analysis of the results on the initial (nominal or measured) concentrations.

Other observations

41. Microscopic observation should be performed to verify a normal and healthy appearance of the inoculum culture and to observe any abnormal appearance of the algae (as may be caused by the exposure to the test substance) at the end of the test.

Limit test

42. Under some circumstances, e.g. when a preliminary test indicates that the test substance has no toxic effects at concentrations up to 100 mg/L or up to its limit of solubility in the test medium (whichever is the lower), a limit test involving a comparison of responses in a control group and one treatment group (100 mg/L or a concentration equal to the limit of solubility), may be undertaken. It is strongly recommended that this be supported by analysis of the exposure concentration. All previously described test conditions and validity criteria apply to a limit test, with the exception that the number of treatment replicates should be at least six. The response variables in the control and treatment group may be analysed using a statistical test to compare means, e.g. a Student's t-test. If variances of the two groups are unequal, a t-test adjusted for unequal variances should be performed

DATA AND REPORTING**Plotting growth curves**

43. The biomass in the test vessels may be expressed in units of the surrogate parameter used for measurement (e.g. cell number, fluorescence).

44. Tabulate the estimated biomass concentration in test cultures and controls together with the concentrations of test material and the times of measurement, recorded with a resolution of at least whole hours, to produce plots of growth curves. Both logarithmic scales and linear scales can be useful at this first stage, but logarithmic scales are mandatory and generally give a better presentation of variations in growth pattern during the test period. Note that exponential growth produces a straight line when plotted on a logarithmic scale, and inclination of the line (slope) indicates the specific growth rate.

45. Using the plots, examine whether control cultures grow exponentially at the expected rate throughout the test. Examine all data points and the appearance of the graphs critically and check raw data and procedures for possible errors. Check in particular any data point that seems to deviate by a systematic error. If it is obvious that procedural mistakes can be identified and/or considered highly likely, the specific data point is marked as an outlier and not included in subsequent statistical analysis. (A zero algal concentration in one out of two or three replicate vessels may indicate the vessel was not inoculated correctly, or was improperly cleaned). State reasons for rejection of a data point as an outlier clearly in the test report. Accepted reasons are only (rare) procedural mistakes and not just bad precision. Statistical procedures for outlier identification are of limited use for this type of problem and cannot replace expert judgement. Outliers (marked as such) should preferably be retained among the data points shown in any subsequent graphical or tabular data presentation.

Response variables

46. The purpose of the test is to determine the effects of the test substance on the growth of algae. This Guideline describes two response variables, as member countries have different preferences and regulatory needs. In order for the test results to be acceptable in all member countries, the effects should be evaluated using both response variables (a) and (b) described below.

- (a) Average specific growth rate: this response variable is calculated on the basis of the logarithmic increase of biomass during the test period, expressed per day
- (b) Yield: this response variable is the biomass at the end of the test minus the starting biomass.

201

OECD/OCDE

47. It should be noted that toxicity values calculated by using these two response variables are not comparable and this difference must be recognised when using the results of the test. EC_x values based upon average specific growth rate (E_rC_x) will generally be higher than results based upon yield (E_yC_x) if the test conditions of this Guideline are adhered to, due to the mathematical basis of the respective approaches. This should not be interpreted as a difference in sensitivity between the two response variables, simply that the values are different mathematically. The concept of average specific growth rate is based on the general exponential growth pattern of algae in non-limited cultures, where toxicity is estimated on the basis of the effects on the growth rate, without being dependent on the absolute level of the specific growth rate of the control, slope of the concentration-response curve or on test duration. In contrast, results based upon the yield response variable are dependent upon all these other variables. E_yC_x is dependent on the specific growth rate of the algal species used in each test and on the maximum specific growth rate that can vary between species and even different algal strains. This response variable should not be used for comparing the sensitivity to toxicants among algal species or even different strains. While the use of average specific growth rate for estimating toxicity is scientifically preferred, toxicity estimates based on yield are also included in this Guideline to satisfy current regulatory requirements in some countries.

Average growth rate

48. The average specific growth rate for a specific period is calculated as the logarithmic increase in the biomass from the equation for each single vessel of controls and treatments [1]:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} \text{ (day}^{-1}\text{)} \text{ ----- [1],}$$

where:

μ_{i-j} is the average specific growth rate from time i to j ;

X_i is the biomass at time i ;

X_j is the biomass at time j

For each treatment group and control group, calculate a mean value for growth rate along with variance estimates.

49. Calculate the average specific growth rate over the entire test duration (normally days 0-3), using the nominally inoculated biomass as the starting value rather than a measured starting value, because in this way greater precision is normally obtained. If the equipment used for biomass measurement allows sufficiently precise determination of the low inoculum biomass (e.g. flow cytometer) then the measured initial biomass concentration can be used. Assess also the section-by-section growth rate, calculated as the specific growth rates for each day during the course of the test (days 0-1, 1-2 and 2-3) and examine whether the control growth rate remains constant (see validity criteria, paragraph 11). A significantly lower specific growth rate on day one than the total average specific growth rate may indicate a lag phase. While a lag phase can be minimised and practically eliminated in control cultures by proper propagation of the pre-culture, a lag phase in exposed cultures may indicate recovery after initial toxic stress or reduced exposure due to loss of test substance (including sorption onto the algal biomass) after initial exposure. Hence the section-by-section growth rate may be assessed in order to evaluate effects of the test substance occurring during the exposure period. Substantial differences between the section-by-section growth rate and the average growth rate indicate deviation from constant exponential growth and that close examination of the growth curves is warranted.

OECD/OCDE

201

50. Calculate the percent inhibition of growth rate for each treatment replicate from equation [2]:

$$\%I_r = \frac{\mu_c - \mu_T}{\mu_c} \times 100 \text{ ----- [2]},$$

where:

- %I_r: percent inhibition in average specific growth rate;
- μ_c mean value for average specific growth rate (μ) in the control group;
- μ_T average specific growth rate for the treatment replicate.

51. When solvents are used to prepare the test solutions, the solvent controls rather than the controls without solvents should be used in calculation of percent inhibition.

Yield

52. Yield is calculated as the biomass at the end of the test minus the starting biomass for each single vessel of controls and treatments. For each test concentration and control, calculate a mean value for yield along with variance estimates. The percent inhibition in yield (%I_y) may be calculated for each treatment replicate as follows:

$$\% I_y = \frac{(Y_c - Y_T)}{Y_c} \times 100 \text{ ----- [3]}$$

where:

- % I_y: percent inhibition of yield;
- Y_C: mean value for yield in the control group;
- Y_T: value for yield for the treatment replicate.

Plotting concentration response curve

53. Plot the percentage of inhibition against the logarithm of the test substance concentration and examine the plot closely, disregarding any such data point that was singled out as an outlier in the first phase. Fit a smooth line through the data points by eye or by computerised interpolation to get a first impression of the concentration-response relationship, and then proceed with a more detailed method, preferably a computerised statistical method. Depending on the intended usage of data; the quality (precision) and amount of data as well as the availability of data analysis tools, it may be decided (and sometimes well justified) to stop the data analysis at this stage and simply read the key figures EC₅₀ and EC₁₀ (and/or EC₂₀) from the eye fitted curve (see also section below on stimulatory effects). Valid reasons for not using a statistical method may include:

- Data are not appropriate for computerised methods to produce any more reliable results than can be obtained by expert judgement - in such situations some computer programs may even fail to produce a reliable solution (iterations may not converge etc.)
- Stimulatory growth responses cannot be handled adequately using available computer programs (see below).

Statistical procedures

54. The aim is to obtain a quantitative concentration-response relationship by regression analysis. It is possible to use a weighted linear regression after having performed a linearising transformation of the response data - for instance into probit or logit or Weibull units (8), but non-linear regression procedures are preferred techniques that better handle unavoidable data irregularities and deviations from smooth

201

OECD/OCDE

distributions. Approaching either zero or total inhibition, such irregularities may be magnified by the transformation, interfering with the analysis (8). It should be noted that standard methods of analysis using probit, logit, or Weibull transforms are intended for use on quantal (e.g. mortality or survival) data, and must be modified to accommodate growth or biomass data. Specific procedures for determination of EC_x values from continuous data can be found in (9) (10) and (11). The use of non-linear regression analysis is further detailed in Annex 5.

55. For each response variable to be analysed, use the concentration-response relationship to calculate point estimates of EC_x values. When possible, the 95% confidence limits for each estimate should be determined. Goodness of fit of the response data to the regression model should be assessed either graphically or statistically. Regression analysis should be performed using individual replicate responses, not treatment group means. If, however nonlinear curve fitting is difficult or fails because of too great scatter in the data, the problem may be circumvented by performing the regression on group means as a practical way of reducing the influence of suspected outliers. Use of this option should be identified in the test report as a deviation from normal procedure because curve fits with individual replicates did not produce a good result.

56. EC_{50} estimates and confidence limits may also be obtained using linear interpolation with bootstrapping (13), if available regression models/methods are unsuitable for the data.

57. For estimation of the LOEC and hence the NOEC, for effects of the test substance on growth rate, it is necessary to compare treatment means using analysis of variance (ANOVA) techniques. The mean for each concentration must then be compared with the control mean using an appropriate multiple comparison or trend test method. Dunnett's or Williams' test may be useful (12)(14)(15)(16)(17). It is necessary to assess whether the ANOVA assumption of homogeneity of variance holds. This assessment may be performed graphically or by a formal test (17). Suitable tests are Levene's or Bartlett's. Failure to meet the assumption of homogeneity of variances can sometimes be corrected by logarithmic transformation of the data. If heterogeneity of variance is extreme and cannot be corrected by transformation, analysis by methods such as step-down Jonkheere trend tests should be considered. Additional guidance on determining the NOEC can be found in (11).

58. Recent scientific developments have led to a recommendation of abandoning the concept of NOEC and replacing it with regression based point estimates EC_x . An appropriate value for x has not been established for this algal test. A range of 10 to 20 % appears to be appropriate (depending on the response variable chosen), and preferably both the EC_{10} and EC_{20} should be reported.

Growth stimulation

59. Growth stimulation (negative inhibition) at low concentrations is sometimes observed. This can result from either hormesis ("toxic stimulation") or from addition of stimulating growth factors with the test material to the minimal medium used. Note that the addition of inorganic nutrients should not have any direct effect because the test medium should maintain a surplus of nutrients throughout the test. Low dose stimulation can usually be ignored in EC_{50} calculations unless it is extreme. However, if it is extreme, or an EC_x value for low x is to be calculated, special procedures may be needed. Deletion of stimulatory responses from the data analysis should be avoided if possible, and if available curve fitting software cannot accept minor stimulation, linear interpolation with bootstrapping can be used. If stimulation is extreme, use of a hormesis model may be considered (18).

Non toxic growth inhibition

60. Light absorbing test materials may give rise to a growth rate reduction because shading reduces the amount of available light. Such physical types of effects should be separated from toxic effects by modifying the test conditions and the former should be reported separately. Guidance may be found in (2) and (3).

Test report

61. The test report must include the following:

Test substance:

- physical nature and relevant physical-chemical properties, including water solubility limit;
- chemical identification data (e.g., CAS Number), including purity (impurities).

Test species:

- the strain, supplier or source and the culture conditions used.

Test conditions:

- date of start of the test and its duration;
- description of test design: test vessels, culture volumes, biomass density at the beginning of the test;
- composition of the medium;
- test concentrations and replicates (e.g., number of replicates, number of test concentrations and geometric progression used);
- description of the preparation of test solutions, including use of solvents etc.
- culturing apparatus;
- light intensity and quality (source, homogeneity);
- temperature;
- concentrations tested: the nominal test concentrations and any results of analyses to determine the concentration of the test substance in the test vessels. The recovery efficiency of the method and the limit of quantification in the test matrix should be reported.;
- all deviations from this Guideline;
- method for determination of biomass and evidence of correlation between the measured parameter and dry weight;

Results:

- pH values at the beginning and at the end of the test at all treatments;
- biomass for each flask at each measuring point and method for measuring biomass;
- growth curves (plot of biomass versus time);
- calculated response variables for each treatment replicate, with mean values and coefficient of variation for replicates;
- graphical presentation of the concentration/effect relationship;
- estimates of toxicity for response variables e.g., EC₅₀, EC₁₀, EC₂₀ and associated confidence intervals. If calculated, LOEC and NOEC and the statistical methods used for their determination;
- if ANOVA has been used, the size of the effect which can be detected (e.g. the least significant difference);
- any stimulation of growth found in any treatment;
- any other observed effects, e.g. morphological changes of the algae;

201

OECD/OCDE

- discussion of the results, including any influence on the outcome of the test resulting from deviations from this Guideline.

LITERATURE

- (1) International Organisation for Standardisation (1993). ISO 8692 Water quality – Algal growth inhibition test.
- (2) International Organisation for Standardisation (1998). ISO/DIS 14442. Water quality – Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waster water.
- (3) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- (4) International Organisation for Standardisation (1998). ISO 5667-16 Water quality – Sampling – Part 16: Guidance on Biotesting of Samples.
- (5) Mayer, P., Cuhel, R. and Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Research* 31: 2525-2531.
- (6) Slovacey, R.E. and Hanna, P.J. (1997). In vivo fluorescence determinations of phytoplankton chlorophyll, *Limnology & Oceanography* 22, 5, pp.919-925
- (7) Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L. and Batley, G.E. (2003) Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2073-2079.
- (8) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol.* 19, 713-718.
- (9) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 157-167.
- (10) Bruce, R.D., and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11:1485-1494.
- (11) OECD. (2005). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- (12) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.* 50: 1096-1121
- (13) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.
- (14) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482-491.

OECD/OCDE

201

- (15) Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27: 103-117.
- (16) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 519-531.
- (17) Draper, N.R. and Smith, H. (1981). *Applied Regression Analysis*, second edition. Wiley, New York.
- (18) Brain, P. and Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

201

OECD/OCDE

ANNEX 1

DEFINITIONS

The following definitions and abbreviations are used for the purposes of this Guideline:

Biomass is the dry weight of living matter present in a population expressed in terms of a given volume; e.g., mg algae/litre test solution. Usually “biomass” is defined as a mass, but in this test this word is used to refer to mass per volume. Also in this test, surrogates for biomass, such as cell counts, fluorescence, etc. are typically measured and the use of the term “biomass” thus refers to these surrogate measures as well.

Coefficient of variation is a dimensionless measure of the variability of a parameter, defined as the ratio of the standard deviation to the mean. This can also be expressed as a percent value. Mean coefficient of variation of average specific growth rate in replicate control cultures should be calculated as follows:

1. Calculate % CV of average specific growth rate out of the daily/section by section growth rates for the respective replicate;
2. Calculate the mean value out of all values calculated under point 1 to get the mean coefficient of variation of the daily/section by section specific growth rate in replicate control cultures.

EC_x is the concentration of the test substance dissolved in test medium that results in an x % (e.g. 50%) reduction in growth of the test organism within a stated exposure period (to be mentioned explicitly if deviating from full or normal test duration). To unambiguously denote an EC value deriving from growth rate or yield the symbol “E_rC” is used for growth rate and “E_yC” is used for yield.

Growth medium is the complete synthetic culture medium in which test algae grow when exposed to the test substance. The test substance will normally be dissolved in the test medium.

Growth rate (average specific growth rate) is the logarithmic increase in biomass during the exposure period.

Lowest Observed Effect Concentration (LOEC) is the lowest tested concentration at which the substance is observed to have a statistically significant reducing effect on growth (at $p < 0.05$) when compared with the control, within a given exposure time. However, all test concentrations above the LOEC must have a harmful effect equal to or greater than those observed at the LOEC. When these two conditions cannot be satisfied, a full explanation must be given for how the LOEC (and hence the NOEC) has been selected.

No Observed Effect Concentration (NOEC) is the test concentration immediately below the LOEC.

Response variable is a variable for the estimation of toxicity derived from any measured parameters describing biomass by different methods of calculation. For this guideline growth rates and yield are response variables derived from measuring biomass directly or any of the surrogates mentioned.

Specific growth rate is a response variable defined as quotient of the difference of the natural logarithms of a parameter of observation (in this Guideline, biomass) and the respective time period

Yield is the value of a measurement variable at the end of the exposure period minus the measurement variable's value at the start of the exposure period to express biomass increase during the test.

OECD/OCDE

201

ANNEX 2

STRAINS SHOWN TO BE SUITABLE FOR THE TEST

Green algae

- *Pseudokirchneriella subcapitata*, (formerly known as *Selenastrum capricornutum*) , ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG
- *Desmodesmus subspicatus* (formerly known as *Scenedesmus subspicatus*) 86.81 SAG

Diatoms

- *Navicula pelliculosa*, UTEX 664

Cyanobacteria

- *Anabaena flos-aquae*, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A
- *Synechococcus leopoliensis*, UTEX 625, CCAP 1405/1

Sources of Strains

The strains recommended are available in unialgal cultures from the following collections (in alphabetical order):

ATCC: American Type Culture Collection
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209
USA

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa
Institute of Freshwater Ecology,
Windermere Laboratory
Far Sawrey, Amblerside
Cumbria LA22 0LP
UK

SAG: Collection of Algal Cultures
Inst. Plant Physiology
University of Göttingen
Nicholausberger Weg 18
D-3400 Göttingen
GERMANY

UTEX Culture Collection of Algae
Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology
School of Biological Sciences
the University of Texas at Austin
Austin, Texas 78712
USA.

201

OECD/OCDE

Appearance and characteristics of recommended species

	<i>P. subcapitata</i>	<i>D. subspicatus</i>	<i>N. pelliculosa</i>	<i>A. flos-aquae</i>	<i>S. leopoliensis</i>
Appearance	Curved, twisted single cells	Oval, mostly single cells	Rods	Chains of oval cells	Rods
Size (L x W) μm	8-14 x 2-3	7-15 x 3-12	7.1 x 3.7	4.5 x 3	6 x 1
Cell volume ($\mu\text{m}^3/\text{cell}$)	40-60 ¹	60-80 ¹	40-50 ¹	30-40 ¹	2.5 ²
Cell dry weight (mg/cell)	$2-3 \times 10^{-8}$	$3-4 \times 10^{-8}$	$3-4 \times 10^{-8}$	$1-2 \times 10^{-8}$	$2-3 \times 10^{-9}$
Growth rate ³ (day ⁻¹)	1.5 -1.7	1.2-1.5	1.4	1.1-1.4	2.0 - 2.4

¹ Measured with electronic particle counter

² Calculated from size

³ Most frequently observed growth rate in OECD medium at light intensity approx. $70 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 21 °C

Specific Recommendations on Culturing and Handling of Recommended Test Species*Pseudokirchneriella subcapitata* and *Desmodesmus subspicatus*

These green algae are generally easy to maintain in various culture media. Information on suitable media is available from the culture collections. The cells are normally solitary, and cell density measurements can easily be performed using an electronic particle counter or microscope.

Anabaena flos-aquae

Various growth media may be used for keeping a stock culture. It is particularly important to avoid allowing the batch culture to go past log phase growth when renewing, recovery is difficult at this point.

Anabaena flos-aquae develops aggregates of nested chains of cells. The size of these aggregates may vary with culturing conditions. It may be necessary to break up these aggregates when microscope counting or an electronic particle counter is used for determination of biomass.

Sonication of sub-samples may be used to break up chains to reduce count variability. Longer sonication than required for breaking up chains into shorter lengths may destroy the cells. Sonication intensity and duration must be identical for each treatment.

Count enough fields on the hemocytometer (at least 400 cells) to help compensate for variability. This will improve reliability of microscopic density determinations.

An electronic particle counter can be used for determination of total cell volume of *Anabaena* after breaking up the cell chains by careful sonification. The sonification energy has to be adjusted to avoid disruption of the cells.

OECD/OCDE

201

Use a vortex mixer or similar appropriate method to make sure the algae suspension used to inoculate test vessels is well mixed and homogeneous.

Test vessels should be placed on an orbital or reciprocate shaker table at about 150 revolutions per minute. Alternatively, intermittent agitation may be used to reduce the tendency of *Anabaena* to form clumps. If clumping occurs, care must be taken to achieve representative samples for biomass measurements. Vigorous agitation before sampling may be necessary to disintegrate algal clumps.

Synechococcus leopoliensis

Various growth media may be used for keeping a stock culture. Information on suitable media is available from the culture collections.

Synechococcus leopoliensis grows as solitary rod-shaped cells. The cells are very small, which complicates the use of microscope counting for biomass measurements. Electronic particle counters equipped for counting particles down to a size of approximately 1 µm are useful. *In vitro* fluorometric measurements are also applicable.

Navicula pelliculosa

Various growth media may be used for keeping a stock culture. Information on suitable media is available from the culture collections. Note that silicate is required in the medium.

Navicula pelliculosa may form aggregates under certain growth conditions. Due to production of lipids the algal cells sometimes tend to accumulate in the surface film. Under those circumstances special measures have to be taken when sub-samples are taken for biomass determination in order to obtain representative samples. Vigorous shaking, e.g. using a vortex mixer may be required.

201

OECD/OCDE

ANNEX 3

GROWTH MEDIA

One of the following two growth media may be used:

OECD medium: Original medium of OECD TG 201, also according to ISO 8692
US. EPA medium AAP also according to ASTM.

When preparing these media, reagent or analytical-grade chemicals should be used and deionised water.

Composition of The AAP-medium (US. EPA) and the OECD TG 201 medium.

Component	AAP		OECD	
	mg/L	mM	mg/L	mM
NaHCO ₃	15.0	0.179	50.0	0.595
NaNO ₃	25.5	0.300		
NH ₄ Cl			15.0	0.280
MgCl ₂ ·6(H ₂ O)	12.16	0.0598	12.0	0.0590
CaCl ₂ ·2(H ₂ O)	4.41	0.0300	18.0	0.122
MgSO ₄ ·7(H ₂ O)	14.6	0.0592	15.0	0.0609
K ₂ HPO ₄	1.044	0.00599		
KH ₂ PO ₄			1.60	0.00919
FeCl ₃ ·6(H ₂ O)	0.160	0.000591	0.0640	0.000237
Na ₂ EDTA·2(H ₂ O)	0.300	0.000806	0.100	0.000269*
H ₃ BO ₃	0.186	0.00300	0.185	0.00299
MnCl ₂ ·4(H ₂ O)	0.415	0.00201	0.415	0.00210
ZnCl ₂	0.00327	0.000024	0.00300	0.0000220
CoCl ₂ ·6(H ₂ O)	0.00143	0.000006	0.00150	0.00000630
Na ₂ MoO ₄ ·2(H ₂ O)	0.00726	0.000030	0.00700	0.0000289
CuCl ₂ ·2(H ₂ O)	0.000012	0.00000007	0.00001	0.00000006
pH	7.5		8.1	

- The molar ratio of EDTA to iron slightly exceed unity. This prevents iron precipitation and at the same time, chelation of heavy metal ions is minimised.

In test with the diatom *Navicula pelliculosa* both media must be supplemented with Na₂SiO₃·9H₂O to obtain a concentration of 1.4 mg Si/L.

OECD/OCDE

201

The pH of the medium is obtained at equilibrium between the carbonate system of the medium and the partial pressure of CO₂ in atmospheric air. An approximate relationship between pH at 25 °C and the molar bicarbonate concentration is:

$$\text{pH}_{\text{eq}} = 11.30 + \log[\text{HCO}_3^-]$$

With 15 mg NaHCO₃/L, pH_{eq} = 7.5 (U.S. EPA medium) and with 50 mg NaHCO₃/L, pH_{eq} = 8.1 (OECD medium).

Element composition of test media

Element	AAP mg/L	OECD mg/L
C	2.144	7.148
N	4.202	3.927
P	0.186	0.285
K	0.469	0.459
Na	11.044	13.704
Ca	1.202	4.905
Mg	2.909	2.913
Fe	0.033	0.017
Mn	0.115	0.115

201

OECD/OCDE

Preparation of OECD medium

Nutrient	Concentration in stock solution
Stock solution 1: macro nutrients	
NH ₄ Cl	1.5 g/L
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1.2 g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.8 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.5 g/L
KH ₂ PO ₄	0.16 g/L
Stock solution 2: iron	
FeCl ₃ ·6H ₂ O	64 mg/L
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	100 mg/L
Stock solution 3: trace elements	
H ₃ BO ₃	185 mg/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	415 mg/L
ZnCl ₂	3 mg/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1.5 mg/L
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.01 mg/L
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7 mg/L
Stock solution 4: bicarbonate	
NaHCO ₃	50 g/L
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	

Sterilize the stock solutions by membrane filtration (mean pore diameter 0.2 µm) or by autoclaving (120 °C, 15 min). Store the solutions in the dark at 4 °C.

Do not autoclave stock solutions 2 and 4, but sterilise them by membrane filtration.

Prepare a growth medium by adding an appropriate volume of the stock solutions 1-4 to water:

Add to 500 ml of sterilised water:

- 10 ml of stock solution 1
- 1 ml of stock solution 2
- 1 ml of stock solution 3
- 1 ml of stock solution 4

Make up to 1 000 mL with sterilised water.

Allow sufficient time for equilibrating the medium with the atmospheric CO₂, if necessary by bubbling with sterile, filtered air for some hours.

Preparation of U.S. EPA medium

1. Add 1 mL of each stock solution in 2.1–2.7 to approximately 900 mL of deionized or distilled water and then dilute to 1 litre.

2. Macronutrient stock solutions are made by dissolving the following into 500 mL of deionised or distilled water. Reagents 2.1, 2.2, 2.3, and 2.4 can be combined into one stock solution.

- 2.1 NaNO_3 —12.750 g.
- 2.2 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ —6.082 g.
- 2.3 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ —2.205 g.
- 2.4 *Micronutrient Stock Solution*—(see 3).
- 2.5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ —7.350 g.
- 2.6 K_2HPO_4 —0.522 g.
- 2.7 NaHCO_3 —7.500 g.
- 2.8 $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ —See Note 1.

NOTE 1: Use for diatom test species only. May be added directly (202.4 mg) or by way of stock solution to give 20 mg/L Si final concentration in medium.

3. The micronutrient stock solution is made by dissolving the following into 500 mL of deionised or distilled water:

- 3.1 H_3BO_3 —92.760 mg.
- 3.2 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ —207.690 mg.
- 3.3 ZnCl_2 —1.635 mg.
- 3.4 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ —79.880 mg.
- 3.5 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ —0.714 mg.
- 3.6 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ —3.630 mg.
- 3.7 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ —0.006 mg.
- 3.8 $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ —150.000 mg. [Disodium (Ethylenedinitrilo) tetraacetate].
- 3.9 $\text{Na}_2\text{SeO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ —0.005 mg See Note 2.

NOTE 2: Use only in medium for stock cultures of diatom species.

4. Adjust pH to 7.5 ± 0.1 with 0.1 N or 1.0 N NaOH or HCl.

5. Filter the media into a sterile container through either a 0.22 μm membrane filter if a particle counter is to be used or a 0.45 μm filter if a particle counter is not to be used.

6. Store medium in the dark at approximately 4°C until use.

201

OECD/OCDE

ANNEX 4**EXAMPLE OF A PROCEDURE FOR THE CULTURING OF ALGAE****General observations**

The purpose of culturing on the basis of the following procedure is to obtain algal cultures for toxicity tests.

Use suitable methods to ensure that the algal cultures are not infected with bacteria. Axenic cultures may be desirable but unialgal cultures must be established and used.

All operations must be carried out under sterile conditions in order to avoid contamination with bacteria and other algae.

Equipment and materials

See under Test Guideline: Apparatus.

Procedures for obtaining algal cultures***Preparation of nutrient solutions (media):***

All nutrient salts of the medium are prepared as concentrated stock solutions and stored dark and cold. These solutions are sterilised by filtration or by autoclaving.

The medium is prepared by adding the correct amount of stock solution to sterile distilled water, taking care that no infection occurs. For solid medium 0.8 per cent of agar is added.

Stock culture:

The stock cultures are small algal cultures that are regularly transferred to fresh medium to act as initial test material. If the cultures are not used regularly they are streaked out on sloped agar tubes. These are transferred to fresh medium at least once every two months.

The stock cultures are grown in conical flasks containing the appropriate medium (volume about 100 ml). When the algae are incubated at 20°C with continuous illumination, a weekly transfer is required.

During transfer an amount of "old" culture is transferred with sterile pipettes into a flask of fresh medium, so that with the fast-growing species the initial concentration is about 100 times smaller than in the old culture.

The growth rate of a species can be determined from the growth curve. If this is known, it is possible to estimate the density at which the culture should be transferred to new medium. This must be done before the culture reaches the death phase.

Pre-culture:

The pre-culture is intended to give an amount of algae suitable for the inoculation of test cultures. The pre-culture is incubated under the conditions of the test and used when still exponentially growing, normally after an incubation period of 2 to 4 days. When the algal cultures contain deformed or abnormal cells, they must be discarded.

ANNEX 5**DATA ANALYSIS BY NONLINEAR REGRESSION****General considerations**

The response in algal tests and other microbial growth tests - growth of biomass - is by nature a continuous or metric variable – a process rate if growth rate is used and its integral over time if biomass is selected. Both are referenced to the corresponding mean response of replicate non-exposed controls showing maximum response for the conditions imposed - with light and temperature as primary determining factors in the algal test. The system is distributed or homogenous and the biomass can be viewed as a continuum without consideration of individual cells. The variance distribution of the type of response for a such system relate solely to experimental factors (described typically by the log-normal or normal distributions of error). This is by contrast to typical bioassay responses with quantal data for which the tolerance (typically binomially distributed) of individual organisms are often assumed to be the dominant variance component. Control responses are here zero or background level.

In the uncomplicated situation, the normalized or relative response, r , decreases monotonically from 1 (zero inhibition) to 0 (100 per cent inhibition). Note, that all responses have an error associated and that apparent negative inhibitions can be calculated as a result of random error only.

Regression analysisModels

A regression analysis aims at quantitatively describing the concentration response curve in the form of a mathematical regression function $Y = f(C)$ or more frequently $F(Z)$ where $Z = \log C$. Used inversely $C = f^{-1}(Y)$ allows the calculation of, EC_x figures, including the EC_{50} , EC_{10} and EC_{20} , and their 95% confidence limits. Several simple mathematical functional forms have proved to successfully describe concentration - response relationships obtained in algal growth inhibition tests. Functions include for instance the logistic equation, the nonsymmetrical Weibul equation and the log normal distribution function, which are all sigmoid curves asymptotically approaching one for $C \rightarrow 0$ and zero for $C \rightarrow \text{infinity}$.

The use of continuous threshold function models (e.g. the Kooijman model "for inhibition of population growth" Kooijman et al. 1996) is a recently proposed or alternative to asymptotic models. This model assumes no effects at concentrations below a certain threshold EC_{0+} that is estimated by extrapolation of the response concentration relationship to intercept the concentration axis using a simple continuous function that is not differentiable in the starting point.

Note that the analysis can be a simple minimization of sums of residual squares (assuming constant variance) or weighted squares if variance heterogeneity is compensated

Procedure

The procedure can be outlined as follows: Select an appropriate functional equation, $Y = f(C)$, and fit it to the data by non-linear regression. Use preferably the measurements from each individual flask rather than means of replicates, in order to extract as much information from the data as possible. If the variance is high, on the other hand, practical experience suggests that means of replicates may provide a more robust mathematical estimation less influenced by systematic errors in the data, than with each individual data point retained.

Plot the fitted curve and the measured data and examine whether the curve fit is appropriate. Analysis of residuals may be a particular helpful tool for this purpose. If the chosen functional relationship to fit the concentration response does not describe well the whole curve or some essential part of it, such as the response at low concentrations, choose another curve fit option - e.g., a non-symmetrical curve like the Weibul function instead of a symmetrical one. Negative inhibitions may be a problem with for instance the

201

OECD/OCDE

log - normal distribution function likewise demanding an alternative regression function. It is not recommended to assign a zero or small positive value to such negative values because this distorts the error distribution. It may be appropriate to make separate curve fits on parts of the curve such as the low inhibition part to estimate EC_{low} figures. Calculate from the fitted equation (by "inverse estimation", $C = f^{-1}(Y)$), characteristic point estimates EC_x 's, and report as a minimum the EC_{50} and one or two EC_{low} estimates. Experience from practical testing has shown that the precision of the algal test normally allows a reasonably accurate estimation at the 10 % inhibition level if data points are sufficient - unless stimulation occurs at low concentrations as a confounding factor. The precision of an EC_{20} estimate is often considerably better than that of an EC_{10} , because the EC_{20} is usually positioned on the approximately linear part of the central concentration response curve. Sometimes EC_{10} can be difficult to interpret because of growth stimulation. So while the EC_{10} is normally obtainable with a sufficient accuracy it is recommended to report always also the EC_{20} .

Weighting factors

The experimental variance generally is not constant and typically includes a proportional component, and a weighted regression is therefore advantageously carried out routinely. Weighting factors for a such analysis are normally assumed inversely proportional to the variance:

$$W_i = 1/\text{Var}(r_i)$$

Many regression programs allow the option of weighted regression analysis with weighting factors listed in a table. Conveniently weighting factors should be normalized by multiplying them by $n/\sum w_i$ (n is the number of datapoints) so their sum be one.

Normalizing responses

Normalizing by the mean control response gives some principle problems and gives rise to a rather complicated variance structure. Dividing the responses by the mean control response for obtaining the percentage of inhibition, one introduces an additional error caused by the error on the control mean. Unless this error is negligibly small, weighting factors in the regression and confidence limits must be corrected for the covariance with the control (Draper and Smith, 1981). Note that high precision on the estimated mean control response is important in order to minimize the overall variance for the relative response. This variance is as follows:

(Subscript i refers to concentration level i and subscript 0 to the controls)

$$Y_i = \text{Relative response} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

with a variance $\text{Var}(Y_i) = \text{Var}(r_i/r_0) \cong (\partial Y_i / \partial r_i)^2 \cdot \text{Var}(r_i) + ((\partial Y_i / \partial r_0)^2 \cdot \text{Var}(r_0))$

and since $(\partial Y_i / \partial r_i) = 1/r_0$ and $(\partial Y_i / \partial r_0) = r_i/r_0^2$

with normally distributed data and m_i and m_0 replicates: $\text{Var}(r_i) = \sigma^2/m_i$

the total variance of the relative response Y_i thus becomes

$$\text{Var}(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2 \cdot m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4 \cdot m_0$$

The error on the control mean is inversely proportional to the square root of the number of control replicates averaged, and sometimes it can be justified to include historic data and in this way greatly reduce the error. An alternative procedure is not to normalize the data and fit the absolute responses including the control response data but introducing the control response value as an additional parameter to be fitted by non linear regression. With a usual 2 parameter regression equation, this method necessitates the fitting of 3 parameters, and therefore demands more data points than non-linear regression on data that are normalized using a pre-set control response .

Inverse confidence intervals

The calculation of non-linear regression confidence intervals by inverse estimation is rather complex and not an available standard option in ordinary statistical computer program packages. Approximate confidence limits may be obtained with standard non-linear regression programs with re-parameterisation (Bruce and Versteeg, 1992), which involves rewriting the mathematical equation with the desired point estimates, e.g. the EC_{10} and the EC_{50} as the parameters to be estimated. (Let the function be $I = f(\alpha, \beta,$

Concentration) and utilize the definition relationships $f(\alpha, \beta, EC_{10}) = 0.1$ and $f(\alpha, \beta, EC_{50}) = 0.5$ to substitute $f(\alpha, \beta, \text{concentration})$ with an equivalent function $g(EC_{10}, EC_{50}, \text{concentration})$.

A more direct calculation (Andersen et al, 1998) is performed by retaining the original equation and using a Taylor expansion around the means of r_1 and r_0 .

Recently "boot strap methods" have become popular. Such methods use the measured data and a random number generator directed frequent re-sampling to estimate an empirical variance distribution.

Kooijman, S.A.L.M.; Hanstveit, A.O.; Nyholm, N. (1996): No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. *Water Research*, 30, 1625-1632.

Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.

Bruce, R..D. and Versteeg,, D.J.(1992) A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. *Environ. Toxicol. Chem.*11, 1485-1494

Andersen, J.S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A. & Nyholm, N. (1998): Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics*, 3, 405-420.



生態毒性QSARモデルの解説 (KATE、OECD QSAR Toolbox デモンストレーション)

大分大学教育福祉科学部
吉岡 義正(大阪会場のみ)
(独)国立環境研究所 環境リスク研究センター
蓮沼 和夫

2010年1月25日(月)東京会場

2010年1月28日(木)大阪会場

1

はじめに

**QSARで得られた予測結果は、化審法の届出に必要な生態
毒性試験結果として利用することは出来ません**

2

QSARとは

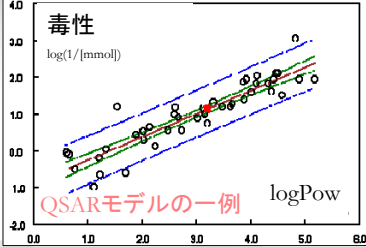
■ Quantitative Structure-Activity Relationshipの略

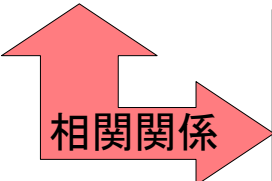
■ 化学物質の構造上の特徴

- 脂肪族C: 2個
- 芳香族原子: 6個

■ 物理化学的パラメータ

- LogP_{ow} (水-オクタノール分配係数): 3.2





■ 生物学的活性(毒性等)

- 構造活性相関(SAR)
 - 好氣的分解性・難分解性
- 定量的構造活性相関(QSAR)
 - 魚類 LC_{50} : 7.8mg/L

3

KATEの解説



4

生態毒性予測システムKATE

- KATE (KAshinhou Tool for Ecotoxicity) は・・・
 - 化学物質の部分構造から毒性値を予測：
 - 魚類急性毒性試験における半数致死濃度 (LC₅₀)
 - ミジンコ遊泳阻害試験における半数影響濃度 (EC₅₀)

2009年3月

・スタンドアロン版「KATE on PAS」公開
 ・Web版「KATE on NET」公開

2008年1月

試用版(KATE Ver0.1)公開

2007年7月

3省合同審議会※に対し、
 予測結果の提供を開始

2004年

環境省の請負業務として研究・開発
 開始(2004年度～2009年度)

注)※: 薬事・食品衛生審議会薬事分科会
 化学物質安全対策部会化学物質調査会、
 化学物質審議会審査部会、中央環境審議
 会環境保健部会化学物質審査小委員会

2つのKATE

スタンドアロン版
KATE on PAS

インターネット版
KATE on NET

FITSを導入したシステム

- 秘密保持の問題、透明性の確保、ライセンス上の問題からスタンドアロン版を開発
- 両者とも予測結果は同一
 - ただし、logPow予測アルゴリズムが両者で異なる
 - ユーザーがlogPを入力しない場合、
 - 予測値に差異が生じる可能性がある

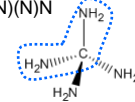
スタンドアロン版: EPA KOWWIN
 インターネット版: ClogP

PAS

- PAS (Platform for Assessment from Structure)[※]は・・・
 - 構造分類に基づく物性や毒性を予測するための独自のシステム
 - 部分構造の取得プログラム (FITS; Fragment Identification by Tree Structure)、構造図の表示・入力プログラムなどからなる統合システム
- FITSは部分構造の規定に独自のルールを使用
 - 主体部分は、1次元構造を基本としたFITS記述です。
F/01211/**C=CNC=C**/1JnC=O,3V3,3B3,2Cy,3Cy,4Cy,2Rs4,/ |

例: NC(N)(N)Nの構造でNCNの構造の数を、目的に応じて1-6個まで定義できます。

SMILES: NC(N)(N)N



注) ※: PASの開発は、2000～2002年度(H12～14)環境省環境研究総合促進費「環境中の複合化学物質による次世代影響リスクの評価とリスク支援に関する研究」の一環として大分大学で実施。また、「環境データの解析と環境中生物影響評価に関する研究」として、2005～2008年度(H17～20)には(独)国立環境研究所と大分大学との委託・共同研究として実施。

7

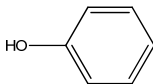
KATEでの予測方法

ユーザーの操作

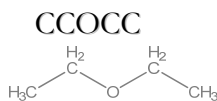
化学物質の構造 (SMILES)の入力

- SMILES: 化合物の分子構造を線形表記した識別子

- フェノール: c1ccccc1O



- ジエチルエーテル:



KATE内部での動作

クラス分類

QSAR 式の選択

logPow代入



予測毒性値を出力

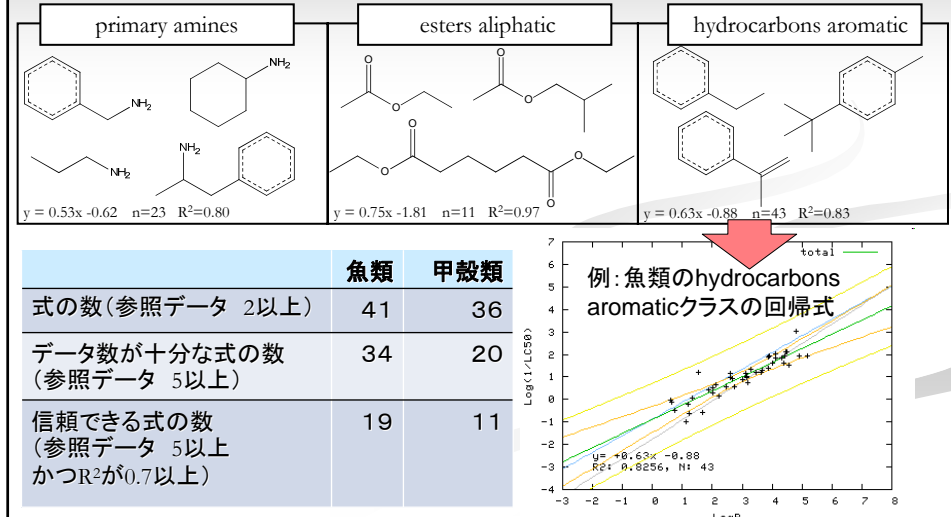
- 化学物質の構造に基づくクラス分類した線形式を使用
- 水一オクタノール分配係数 (logPow)の値から単相関で毒性値を予測

8

KATEのクラスについて

- 魚類・甲殻類合わせ約80種類のQSAR式・クラスが存在

【魚類クラスの参照物質一例】



Neutral Organicsクラスについて

- 脂肪族炭化水素、スルホキド、脂肪族・芳香族エーテル、脂肪族・芳香族ケトン、アルコールといった単純な麻酔作用のみで毒性が説明できると考えられる分子種の一覧が生物種ごとに用意されており、これらはNeutral Organicsというクラスとして再定義されています。
- KATEでNeutral Organicsに分類されるクラス群:
 - alcohols or ethers aliphatic, ethers aliphatic, ethers aromatic, hydrocarbons aliphatic, ketones, nitriles aliphatic, phosphate, sulfoxides

スタンドアロン版KATE on PAS 入力画面

KATE on PAS出力(概要)画面

試験生物	エンドポイント	LC50	EC50	推定値	logP範囲	判定
試験生物	96-hr	LC50	2.6 mg/L	0.800<==<5.170		○
試験生物	48-hr	EC50	1.1 mg/L	0.650<==<5.170		○

KATE on PAS出力(詳細)画面

参照物質(QSAR式作成の根拠となった
実測毒性値が入手可能な物質)一覧

魚類QSAR式

100414 : Benzene, ethyl- : 1000628
 100896 : Pyridine, 2-ethyl- : 1000136
 100740 : Pyridine, 2-ethyl- : 1000236
 104518 : Benzene, butyl- : 1000341
 106423 : Benzene, 1,4-dimethyl- : 1000612
 109383 : Benzene, 1,3-dimethyl- : 1000490
 109383 : Benzene, methyl- : 1000365
 109394 : Pyridine, 4-methyl- : 1000299
 109396 : Pyridine, 3-methyl- : 1000552
 109088 : Pyridine, 2-methyl- : 1000020
 109377 : 4-Pyridone : 1000417
 110009 : Furan-4 : 1000120
 110021 : Thiophene : 1000916

----- KATE on PAS Estimation -----
 SMILES : CC(C)Cc1ccccc1
 名称等 : C10H14 分子量 : 134.22
 縮略式 : logP : 4.110 (EPA 実測値)

==== 判定 ====
 ○ : [このクラス]の参照物質にも含まれ、適用範囲内と判断されます。

==== クラス選択理由 ====

汚染原	設定	検出
芳香族 原子	>0	8
脂肪族 N NO	=0	0
脂肪族 O	=0	0
脂肪族 S	=0	0
脂肪族 P	=0	0
脂肪族 carbon-halogen	=0	0
脂肪族 NO2	=0	0
芳香族 n	=0	0
芳香族 o	=0	0
芳香族 s	=0	0
芳香族 carbon-halogen	=0	0

==== 検出部分構造と数 ====

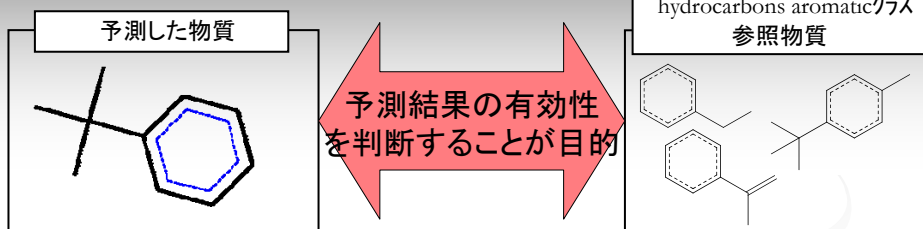
4808 脂肪族 C	4
4310 芳香族 原子	6

==== カテゴリー 部分構造 ====

5056 脂肪族-CH3	3
5083 芳香族-t-Bu	1
5201 benzene	1
5236 Aromatics	1

緑線=回帰式の信頼区界(90%両側), 青線=予測値の信頼区界(90%両側)

判定について



- 構造C判定: 予測する化学物質のもつ部分構造すべてが、
 - ○: [そのクラス]の参照物質にも含まれる。
 - △: [そのクラス]または[Neutral Organicクラス]の参照物質にも含まれる。
 - ×: [そのクラス]や[Neutral Organicクラス]の参照物質には含まれない部分構造がある。
 として評価される。
- LogP判定: 予測した物質のlogPowがQSAR回帰式の有効範囲内に入っているか評価される。
 - KATE on PAS: 有効範囲外の場合、『>P』又は『<P』と評価
 - KATE on NET: 有効範囲内の場合は『○』、範囲外は『×』と評価

KATE今後の課題

- 環境省生態影響試験の反映
 - 2008年3月版→2009年3月版
- クラス分類の修正
- logPow予測アルゴリズムの統一化(EPA KOWWINに統一)
- logPowが大きい物質の毒性が過大評価される問題を修正

15

OECD (Q)SAR Application Toolbox の解説

16

OECDにおける取組

- 2002年3月 QSARの規制利用に関するICCAワークショップ(於ポルトガル・Setubal)
- 2004年11月第37回合同会合
 - ①QSARの規制利用に係るバリデーション原則に合意(Setubal原則の確認)
 - ②専門家グループ→QSARアドホックグループ(Ad Hoc Group on (Q)SARs)への改組提案(※QSAR専門家の集まりから、QSARを規制等に利用する者も参加する枠組みへ拡大)
- 2006年6月 第1回QSARアドホックグループ開催
- 2007年4月 第2回QSARアドホックグループ開催
- 2008年3月 (Q)SAR Application Toolbox1.0公開
- 2008年12月 (Q)SAR Application Toolbox1.1公開
- 2009年2月 第1回(Q)SAR Application Toolbox管理会合開催
- 2009年10月 第2回(Q)SAR Application Toolbox管理会合開催
- 2010年1月 (Q)SAR Application Toolbox1.1.02公開
- 2010年10月 (Q)SAR Application Toolbox2.0公開予定
- 2012年 (Q)SAR Application Toolbox3.0公開予定

17

OECD/QSARモデルの規制利用のためのバリデーション原則

- 1: Defined Endpoint(定義されたエンドポイント)
- 2: Unambiguous Algorithm(曖昧でないアルゴリズム)
- 3: Defined Domain of Applicability(定義された適用可能領域)
- 4: Appropriate Measures of Goodness-of-fit, Robustness and Predictivity(モデルの当てはまりの良さ・頑健さ・予測可能性に関する適切な指標)
- 5: Mechanistic Interpretation, if possible(可能ならば、反応機構の面からの解釈)

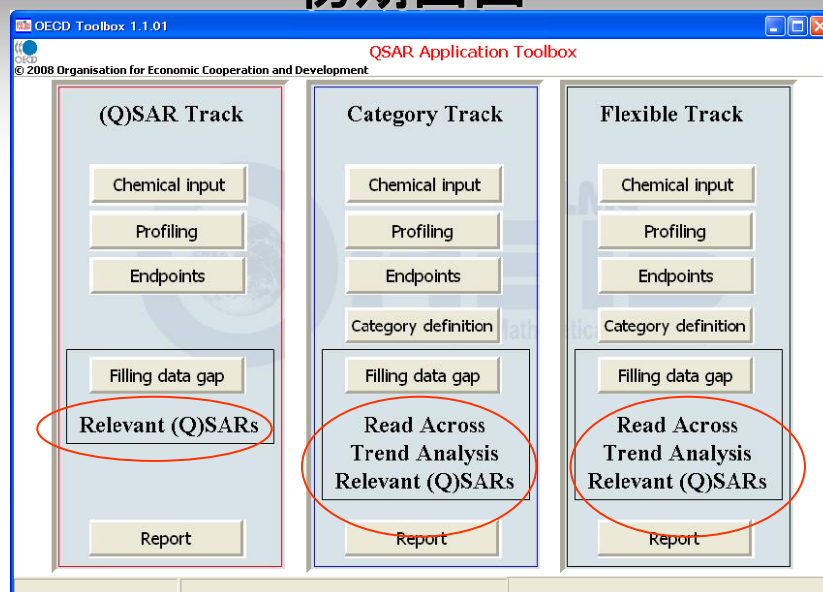
18

OECD (Q)SAR Application Toolbox

- 例えば、以下の事例に用いることが可能
 - Read-Across又はTrend Analysisを用いることで、類似物質の確認及びその実験データの取得、データギャップの補完
 - メカニズム又は作用機序に基づいた、大量の化学物質のカテゴリライズ
 - 登録されているQSARモデルを用いたデータギャップの補完
 - Read-Acrossを行なうため、潜在的な類似物質のロバストネスの評価。
 - QSARモデル構築

19

初期画面



20

各ステップの機能

- Chemical Input(化学物質の入力)
- Profiling(プロファイリング)
 - ターゲット物質について、官能基の個数やDNA結合性などの属性情報を入手
- Endpoints(エンドポイント)
 - ターゲット物質について、毒性値などのエンドポイントとなる情報を入手
- Category Definition(カテゴリーの定義)
 - ターゲット物質と類似する物質を探索しカテゴリーを定義
 - 類似物質のエンドポイント情報を入手
- Filling Data Gap(データギャップ補完)
 - Read-across、Trend analysis、(Q)SARを用いることで、データギャップを補完
- Report(レポート作成)

21

KATE, OECD (Q)SAR Application Toolboxデモ

- 百聞は一見にしかず！！
- 下記ページもご参照下さい。
 - 過年度セミナーテキスト ダウンロードページ
<http://www.nies.go.jp/risk/seminar.html>
 - 生態毒性予測システムKATE 関連情報
<http://kate.nies.go.jp/>
 - OECD (Q)SAR Project 関連情報
<http://oecd.org/env/existingchemicals/qsar>
 - 環境リスク研究センター ホームページ
<http://www.nies.go.jp/risk/index.html>



22

ご静聴ありがとうございました

23