

生態毒性試験実施にあたって の留意点



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

難水溶性物質への助剤使用



被験物質が単一成分で難水溶性であり、再現性よく水溶解液を調製することが困難と予想される場合、生態毒性試験で使用が許可されている助剤（有機溶剤）を用いて、溶解度*以下での試験液調製を行ってもよいでしょうか。

（回答の要点）

- 助剤により、高い再現性が得られるのであれば、少なくとも溶剤に関してはその使用は科学的な根拠があり、容認される。

（留意点） 多成分である場合は判断の観点が異なる。



助剤使用で藻類試験対照区の連数は？



・藻類試験での対照区は試験法では6連を設けることが推奨されておりますが、助剤を使用して試験を行った場合、対照区及び助剤対照区のどちらも6連設けることが推奨されるでしょうか。

(回答の要点)

●原則として用いる助剤は試験結果に影響を与えないことが必要です。背景データでその点が示されているのであれば、当該試験の無処理（希釈水）対照区を6連とする必然性はない。

(留意点) 上記の背景データが無い場合は、当該試験に助剤使用の妥当性を組み込む必要があるため、6連とすることが望ましい。



分析感度の低い物質の試験



飽和液で生物影響が認められ、試験は飽和液を最高に濃度区を設けるのですが、分析感度が不十分で全濃度区で定量下限値未満となることがあります。例えば定量下限値が0.1mg/Lを上回る場合、藻類試験での三監判定基準NOECが0.1mg/Lを下回るかを判定できない状況が予想されます。より分析感度が良好な濃度分析方法がない場合、どのように試験を進めればよいでしょうか。

回答の要点

- 分析できない場合、曝露濃度の確認は手順でしか示すことができません。そのため、試験溶液の調製手順を正確に記録願います。
(留意点)この場合、毒性値算出の根拠は「設定濃度(添加濃度)」となります。
- 飽和溶液の調製では、試験困難性に関するガイダンス文書(No.23,OECD 2000)では、便宜的に48時間の攪拌で飽和に達しているものとみなします。
- 単一物質であれば、この飽和溶液を希釈することで、目的の溶液が得られますが、多成分物質の場合は、WAF(Water Accommodate Fraction)の試験となります。
- 非生物分解などの情報も重要です。



NOECの不等号表記は？



・最大無作用濃度（NOEC）は定義上「最小作用濃度（LOEC）より一段階下の試験濃度で、…」となっている。最高濃度で影響がみられずLOECは得られない場合は、最高濃度をNOECとするが、その場合の表記は「**.* mg/L」として問題ないか（定義上は「**.* mg/L」）。もしくは、LOECが得られていないことを示すために「 \geq **.* mg/L」とすべきか。

（回答の概要）

- 不等号を付けて、影響が観察された場合と、試験上限（または限度試験）で、影響が観察されなかったNOEC値を区別して下さい。

（留意点）試験の上限の濃度は、試験法で規定されています。水溶解度を上限とする場合には、既存の水溶解度データを考慮した対応が求められます。



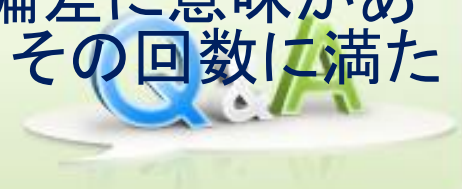
過去の試験成績利用と記載



- ・ 感受性試験結果の平均およびSDの算出において使用するデータは期間限定（過去5年間のもの等）したほうがよいでしょうか。
- ・ 感受性試験物質を変更する際にバックグラウンドデータとして使用するためには最低何回分のデータが必要と考えられているでしょうか。

（概要）

- 急性毒性試験のGLP試験では基準物質での確認試験を1回／半年で行い、当該試験がその試験所の平均の範囲である・・・試験系が正常に働いていることを示すとしています。
- そのため、その試験結果は、その試験所にとって平均的な範囲を示していることが必要であり、年数で期間を特定するのではなく、質的に同じであることが期待される期間のデータを示すべきだと考えます。
- 最低回数は、統計学的にその平均値と標準偏差に意味があるため、3回以上と考えることが妥当ですが、その回数に満たない場合は無効であるとは決めていません。



被験物質によるpH変動への対応



- ・ 魚類試験ではpHを調整することが望ましいとしているが、pH6.0~8.5の範囲外の場合は調整すると理解してかよい？
- ・ ミジンコ試験、藻類試験でも同様か？

回答の概要

OECD TGの急性毒性試験では、短期ばく露影響を対象とするためpHの調整は行わないことを原則としています。現行のガイドラインでも、ミジンコ試験ではTGの定めるpH範囲外の場合は追加試験を推奨しているだけです。

TG201 (藻類)

TG202 (ミジンコ) → pH調整・追加試験

TG203 (魚類)

ガイダンスドキュメント23 (3.10 Ionised substances)

被験物質そのものが原因でpHが変動する場合は、適当な酸、アルカリ、または緩衝剤を用いてpHを所定の範囲に調整することを推奨しています。

→ 試験の目的により判断は異なると考えられます。





被験物質によるpH変動への対応(2)

- 化審法は、化学物質の平常使用時の環境中での暴露を想定している。環境のpH緩衝作用や、低濃度・長期ばく露ではpHの変動は比較的小さいため、**魚類、ミジンコ、藻類のどの急性毒性試験ではあってもpHを調整した試験の実施が推奨されます。**
- 化審法での審査においては、試験データがあればpHを調整したデータを優先的に使用します。
(pHの影響であるかも知れない場合でも、pH調整した追加データがなければ、考慮されない。)



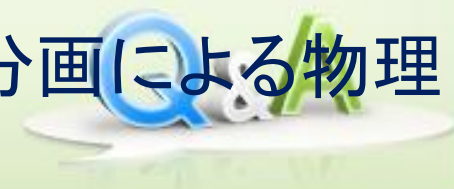
試験法通知の総則「3.難水溶性物質の取り扱い」



・「通常の測定法で溶解限度を求めることができない場合であって、溶解限度以下の濃度でLC50等の毒性値が求めることが出来ない場合」とあるが、溶解限度が分からないのに、溶解限度以下で毒性値が求めることができないということをどのように示せばいいのか？

また、分散可能とは、何を示して分散可能と判断すればいいのか？

- 溶解限度が不明であっても、48時間攪拌（低エネルギーの攪拌が推奨される）により、飽和溶液を調製したと見なし、その溶液（機械的分散液）に暴露して
 - (1)悪影響が見られない場合は、「溶解限度で影響が見られない」と判断できる。
 - (2)50%以下の死亡率（魚類）、遊泳阻害率（ミジンコ）、生長阻害率（藻類）であれば、急性毒性値は算出できないと判断される。
 - (3)50%以上の影響が見られる場合は、不溶分画による物理的影響であるかどうか検討する。





- (4) WAF(添加濃度)による暴露試験から毒性値の算出する。
- (5) WSF(Water Soluble Fraction);WAFにより調製した溶液から、遠心分離、ガラスフィルターろ過で不溶分(粒子)を除去する。この分散溶液に暴露した試験結果と(4)を比較して、不溶分の物理的影響の寄与分を明らかにする。

(留意点)

WAFの調製法は、OECD-ガイダンス文書No.23を参照のこと。

分散可能とは、被験物質が溶解または微粒子として一定の時間(半止水にあっては24時間程度)に渡り水中に懸濁した状態(一様な分布)を維持できることをいう。



被験物質の溶解度測定



1. 難水溶性の液体の被験物質の溶解度測定において、比重が1に近い場合は不溶解分の分離が困難であるが、どのようにして測定すればよいか。
2. 難水溶性や揮散性のある被験物質の場合、溶解度測定の際にバラツキが生じる（例えば $n=3$ の場合など）ことがある。このような場合のバラツキの許容範囲はどの程度であると考えればよいか。

測定法や許容範囲の目安は設けていない・・・

1. 水溶解度の測定が物質によっては困難であることは理解しており、そのために正確な数値を求めることを必須としていない。生態毒性試験の目的に合う程度の現実的な方法を、ラボで検討して載きたい。
2. 物性により再現性のある測定が困難である場合があることは理解できるが、バラツキの原因を報告載き、報告書の提出先でやむを得ないと判断されるよう努力されたい。



公比の考え方について



環境省主催の説明会の説明及び資料（試験手順例）はで、「可能な限り0%と100%影響する濃度が其々1濃度、一部影響する濃度が3濃度含むにうよるれま」、公比は「通常1.3~2.2」としている。一部影響する濃度が含まれなれま、或は3濃度未満の場合、公比を1.3にして試験をやり直すべきか？

(回答の概要)

- どの程度の公比まで小さくするかは、ラボの判断にゆだねられる。
- 化審法スクリーニング試験では、L(E)C₅₀を求めることが目的なので必ずしも100%影響濃度は必須ではない。

(留意点)基本は試験委託者の試験目的に合致することが求められよう



高揮散性物質の濃度維持



密閉容器を使用し、換水らがないし試験を行っても溶解限度の濃度維持が困難（例えば開始時の10%程度でま低下るす場合どな）で、もかし、供試生物に影響が見たっかなれら場合、にうよのど試験行うべきか。

- 密閉容器を用いる試験を行うことでよい。敢えて、流水式で試験を行う必要がないし、流水式がそのような物質に有効であるとは考えられない。
- たま、濃度低下を見込んでん溶解度以上の濃度設定を行とこうことで、有害性影響が観察されないことを示す場合はよいが、有害であることを示す場合は解釈が困難となる。

（留意点）なうよのこ物質の試験は、可能な限り試験法とOECD-ガイダンス文書No.23に従った手順で試験を実施すべきである。



無作為割付の考え方



魚類試験でいかに、供試魚を割付ける際に、意図的な選択操作にせずを成り行でき捕獲たし割付け法は、「無作為」と考かいよてえ。たま、自家繁殖等で母集団自体るあに程度の均質性が担保るいてれさ場合かうどは

(回答の概要)

- 感受性に関与する全要因について(例えば、体のサイズ;体長、体重、齢、代謝機能を含む生理状態)均質である場合は、無作為な割付自体は必要がないはずである。
- ところが、1つの水槽から魚をすくいあげて、順次試験容器に投入するので、「すくいあげられ易い」個体と「難しい」個体、最初にすくいあげられた個体と最後になった個体・・・は全く同じとは言えないと考えられる。
- そのため、すくい上げられた順に、対照区→第1濃度区→第2濃度区・・・のように割付るのは正しくない。



暴露期間の延長について



- ・ 2006年11月に開催された環境省主催の「生態毒性試験実施施設からの質問事項と説明会」において、「120時間まで延長するのは、96時間でも毒性症状が出ない場合である。」との説明であったが、その後の説明とは異なる。正確にはどうなのか？

回答の概要

- 魚類急性毒性試験で試験期間の延長が検討されたのは、96時間の時点で死亡はしていないが、 LC_{50} 値が判断根拠であるため瀕死の個体の取扱いを慎重を期すことが目的であった。
- 120時間まで延長した結果、瀕死個体が死亡すれば、その点を毒性値の決定の参考にする意図であった。

(留意点)

魚類の毒性症状の分類については、致死を免れない(時間がたてば死ぬであろう)「重篤な影響」の場合には、致死と同等に扱うことがある事を念頭に観察を行って欲しい。



ELS試験：被験物質の濃度変動



流水式で揮散性が強い物質の試験を行う場合、被験物質原液を24時間ごとに交換しても、原液の濃度が交換直後に比較して低下する。その結果、暴露水槽中の被験物質濃度は周期的に変動する。被験物質濃度の平均値をどのように算出すべきか。

回答の概要

- 定期的に交換する場合は、目的は暴露濃度の平均値を算出するためであるので、最高濃度が期待される新しい原液への交換の後(タイムラグを考慮)と、交換直前の濃度の幾何平均値を最低週1回求め、全体としてはさらにその算術平均を暴露濃度とする。

(留意点)

原液から直接揮散する場合と、試験用水との希釈時および試験溶液からの揮散と失われるプロセスが異なる。いずれにしても平均をとるので、試験期間を通じてどのプロセスでも一定の条件であることが求められる。

揮散性物質の藻類試験

四塩化炭素の試験例

OECD-CoCAM1 より

背景

- 揮散性物質を安定してばく露する手法として、密閉系（ヘッドスペースなし）の試験が有効である。
- 藻類試験では、光合成（炭酸同化作用）によるCO₂消費のため、時間の経過（生物量の増加）に伴いpHの上昇、生長速度の鈍化（毒性による増殖阻害影響と区別できない）が起こり、試験の妥当性に関わる。
- そのため、密閉系での試験手順としていくつかの特別な方法が提言されている。

揮散性物質特有の試験手順

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

四塩化炭素のTG201試験の概要(1)

- Growth inhibition of freshwater algae *Pseudokirchneriella subcapitata* by carbon tetrachloride was measured according to OECD Guideline 201. In order to take account of the volatility of the substance, the experiment was carried out in **stoppered flasks with no headspace**, and using a **medium buffered with HEPES** in order to avoid pH drift. Good recovery of the test substance was demonstrated through analytical measurement (GC/MS) and other validity criteria were met.

曝露の安定性(ヘッドスペースなし)

Nominal Concentration (mg/L)	Measured in non-inoculated solutions		
	Initial (mg/L)	Final (mg/L)	Final/Initial %
0(T)	< DL	< DL	-
5	2.21	2.21	100
8.5	3.35	3.56	106.3
14.6	6.88	7.32	106.4
25	14.0	13.9	99.3
42.7	24.9	23.7	95.2
73.1	47.0	48.9	104
125	114	117	102.6

(CoCAM1に提出されたDossierドラフト文書より)

- (1) 設定値と初期実測値は異なる(操作途中での減損は顕著で避けられない)
- (2) 密閉を保っていれば、0hと72hでは、実測値に差がない

→ ヘッドスペースなし・密閉条件では、ばく露濃度は安定する

CO₂源として重炭酸ナトリウムを多量添加 + pH緩衝剤を使用する手順

重曹 mg/L	指数増殖が期待できる 時間	到達密度	pH	ヘッドス ペース
100	48時間 開始 0.5~1 × 10 ⁴ cell/ml	48時間で16倍以上 72時間で60倍程度	72時間で 上昇顕著	あり
400	72時間 開始 10,000 cell/ml	72時間で127倍	0.1M/L-HEPES注 7.33-7.81	なし

疑問点

1. 大量の重曹, 緩衝剤(HEPES)添加が毒性を緩和しないか?
2. pHの上昇により毒性が緩和するのは一部の物質であり、一般的にはpHの上昇は許容できるのではないか?
3. 藻類量測定の精度が上がり、開始時の藻類密度の低減が可能となったので、少なくとも、48時間試験は従来の密閉式手順で可能で、72時間試験は必要ない?

(注) IUPAC 名 : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

別名 HEPES [分子式](#) C₈H₁₈N₂O₄S [分子量](#) 238.30 [CAS登録番号](#) [7365-45-9]

四塩化炭素のTG201試験の概要(2)

Brack & Rottler (1994)

- A gas-tight system for toxicity testing of volatile organic compounds (VOC) in a growth inhibition bioassay with the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* was developed based on the OECD TG 201 by Brack & Rottler, 1994. the article reports the toxicity of several substances among which CTC. A EbC_{10-72} h of 0.0717 mg/L (0.0572-0.0864 mg/L, 95 % CL) and a EbC_{50-72} h value = 0.246 mg/L (0.217-0.278 mg/L) are obtained.
- These results are to be used with care as no track record is available on this species and et EC are not growth rate based.

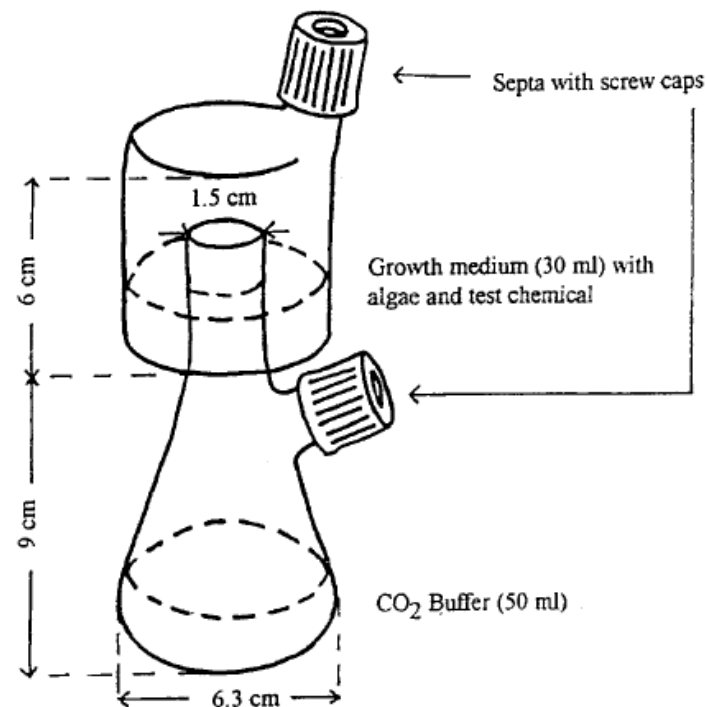


Fig. 1: Bipartite test vessel for toxicity testing of highly volatile chemicals with green algae

セプタム付きのキャップの使用は有効かもしれない。
二重のボトルの使用は、この論文の例だけで、その後追隨されていないので、
CO₂補給システムの手順には疑問がある。

揮散性物質の試験手順 まとめ

1. 次の場合には密閉系試験手順が推奨される。
 - (1)揮散が主要因で濃度が減少する
 - (2)被験物質が揮散し、作業者に無害ではない
2. 開始時の藻類密度を減じるなどの手順を用いてもなお、TG201(2006, 2011)の試験の妥当性基準を満足しない場合は、許容する条件の下で試験期間を短縮してよい。
3. 密閉系であるが、それでも濃度が減少する場合は、ヘッドスペースなしの手順の採用を検討する
※代替/追加法として、セプタム付きのキャップの使用を検討してもよい
4. pHの上昇(1.5以上)があっても、非解離性物質の場合は試験は妥当であるとみなす。
一方、解離性物質の場合にあつては、pKa値がpHの変動範囲内またはそれに近い場合は、試験の妥当性を個別に判断する。
5. 重炭酸ナトリウムの高濃度(最終濃度100mg/Lを越える)使用、緩衝剤の使用は、毒性を緩和しない範囲であること。

引用文献

- Brack W., and H. Rottler, 1994. Toxicity Testing of Highly Volatile Chemicals with Green Algae - A New Assay. Environ. Sci. & Pollut. Res. 1 (4) 223-228.
- David C. Herman, William E. Inniss and Colin I. Mayfield, 1990. Impact of volatile aromatic hydrocarbons, alone and in combination, on growth of the freshwater alga *Selenastrum capricornutum*. Aquatic Toxicology, 18 ; 87-100.
- Galassi, S. and M. Vighi, 1981. Testing toxicity of volatile substances with algae. Chemosphere 10, 1123-1126.
- Kühn, R. and M. Pattard, 1990. Results of the harmful effects of water pollutants to green algae (*Scenedesmus subspicatus*) in the cell multiplication inhibition test. Water Res. 24, 31-38.
- Good N. E., G. D. Winget, W. Winter, T. N. Connolly, S. Izawa, and R. M. M. Singh, 1966. Hydrogen Ion Buffers for Biological Research. Biochemistry 5(2); 467-477

参考文献

- OECD, 1984: Guideline for the testing of chemicals No. 201(1984) Alga, Growth Inhibition Test
- OECD, 2006: Guideline for the testing of chemicals No. 201(2006) Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test
- OECD, 2011: Draft IUCLID for Cas # 56-23-5 (Dossier) presented by ICCA/SWISS (not finalized document, material for the meeting of CoCAM 1)