



平成30年度化審法セミナー

東京 イイノホール（平成31年2月12日）

大阪 新梅田研修センター（平成31年2月25日）

OECD試験法に係る最近 の動向について

国立環境研究所

環境リスク・健康研究センター

山本 裕史



国立環境研究所とは(1)

1974年に設立（国立公害研究所として）

200名の研究職員、700名程度の事務職員・契約職員



Ministry of the Environment
Government of Japan



国立環境研究所とは(2)

研究組織



- ▶ 地球環境研究センター
気候変動をはじめとした地球環境問題解決に貢献



- ▶ 環境リスク・健康研究センター
環境リスクの評価・管理により、人の健康および生態系に与えるリスクの低減に貢献



- ▶ 生物・生態系環境研究センター
生物多様性の保全と、生態系サービスの持続可能な利用の実現に貢献



- ▶ 環境計測研究センター
環境計測技術等の革新的進展、計測データの信頼性の保証や管理の充実に貢献



- ▶ 琵琶湖分室



- ▶ 資源循環・廃棄物研究センター
資源の持続可能な利用と、資源利用に伴う廃棄物等の環境負荷の低減に貢献



- ▶ 地域環境研究センター
国内やアジアにおける地域環境問題の解決に貢献



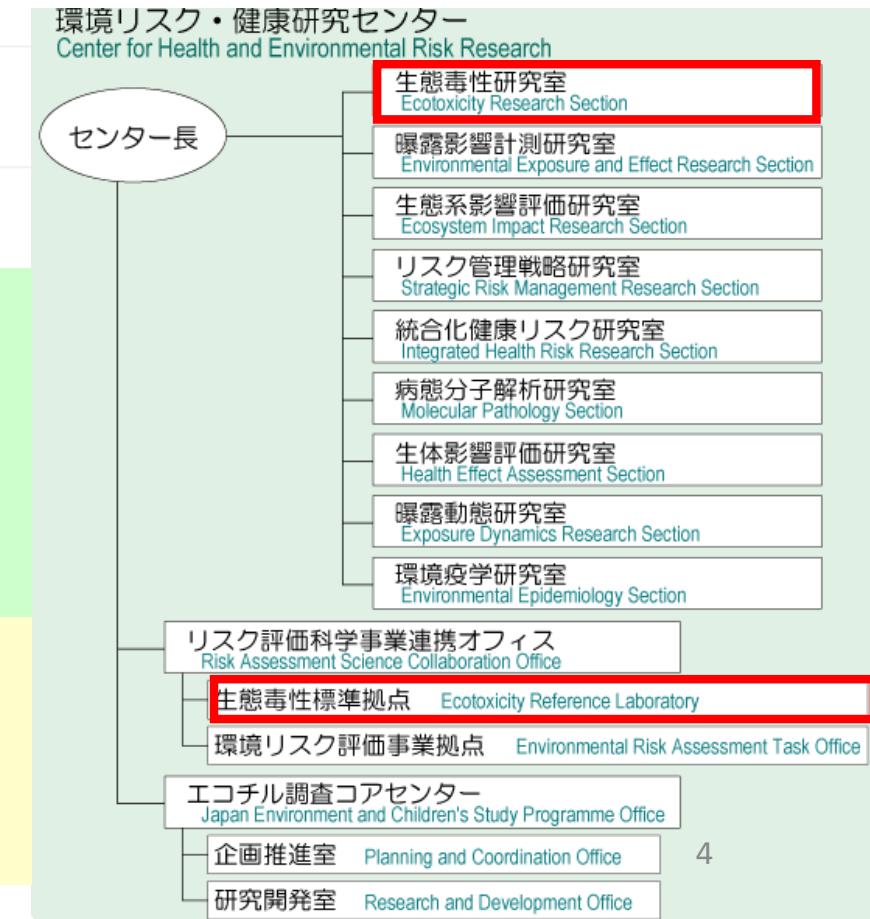
- ▶ 社会環境システム研究センター
環境と経済が調和する持続可能な社会への転換に貢献



- ▶ 福島支部

生態毒性研究室において、分子レベル、細胞・組織レベル、個体・個体群レベルで化学物質の環境生物への影響を評価

生態毒性標準拠点において、生態毒性試験の開発や国内外の標準化、セミナーでの啓発などを実施







生態毒性試験の高度化(1)



国立環境研究所、
環境リスク・健康研究
センター 生態毒性研
究室・生態毒性標準拠
点で鋭意遂行中

- 生態毒性試験や試験生物種の多様化（OECDテストガイドラインは247まで）への対応が必要

平成29年に

OECD TG No.244 (活性汚泥中の原生生物阻害試験)

OECD TG No.245 (ミツバチ慢性経口毒性)

OECD TG No.246 (マルハナバチ急性接触毒性)

OECD TG No.247 (マルハナバチ急性経口毒性) が承認、公開



生態毒性試験の高度化(2)

ワンボックス多媒体モデル



国立環境研究所HP「環境儀No.50」より

物性などにより、土壤や底質に蓄積しやすい疎水性物質については底生・土壤生物の試験、揮発性物質は陸上植物・昆虫等の試験が必要！？

→化審法でも、水生生物を用いた生態毒性試験に偏った評価からの考え方の変更が必要？

海産・汽水生物を用いた慢性毒性短期試験法の開発

環境省環境研究総合推進費（H30-32）



サブ1：



国立環境研究所

- ・海産微細藻類の試験法開発
- ・リングテストの主宰・遂行、試験法案のとりまとめ
- ・実験生物分譲システムの確立

外部機関

リング
テストの依頼



リングテストの共同実施

サブ2：



国立研究開発法人
水産研究・教育機構 瀬戸内海区水産研究所

瀬戸内海区水産研究所

- ・海産魚類（マダイ、シロギス等）大型藻類（ワカメ等）の試験法開発



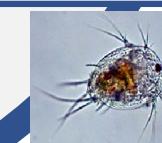
サブ3：



公益財団法人
海洋生物環境研究所

海洋生物環境研究所

- ・海産甲殻類（シオダマリミジンコ等）・海産貝類（アワビ・バイ等）の試験法開発



**試験法、試験生物等の
情報・資材の共有**



サブ4：



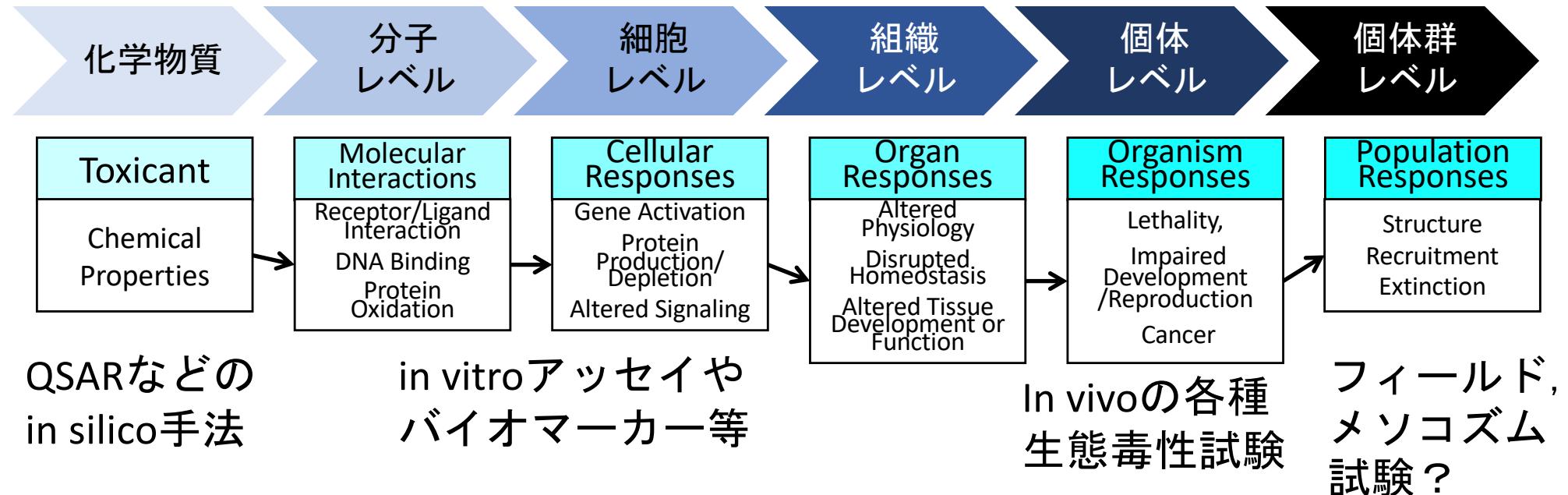
国立大学法人
鹿児島大学
KAGOSHIMA UNIVERSITY

- ・汽水魚類（ジャワメダカ・マミチョウ等）と汽水甲殻類（アミ等）の試験法開発





AOPやIATAの活用

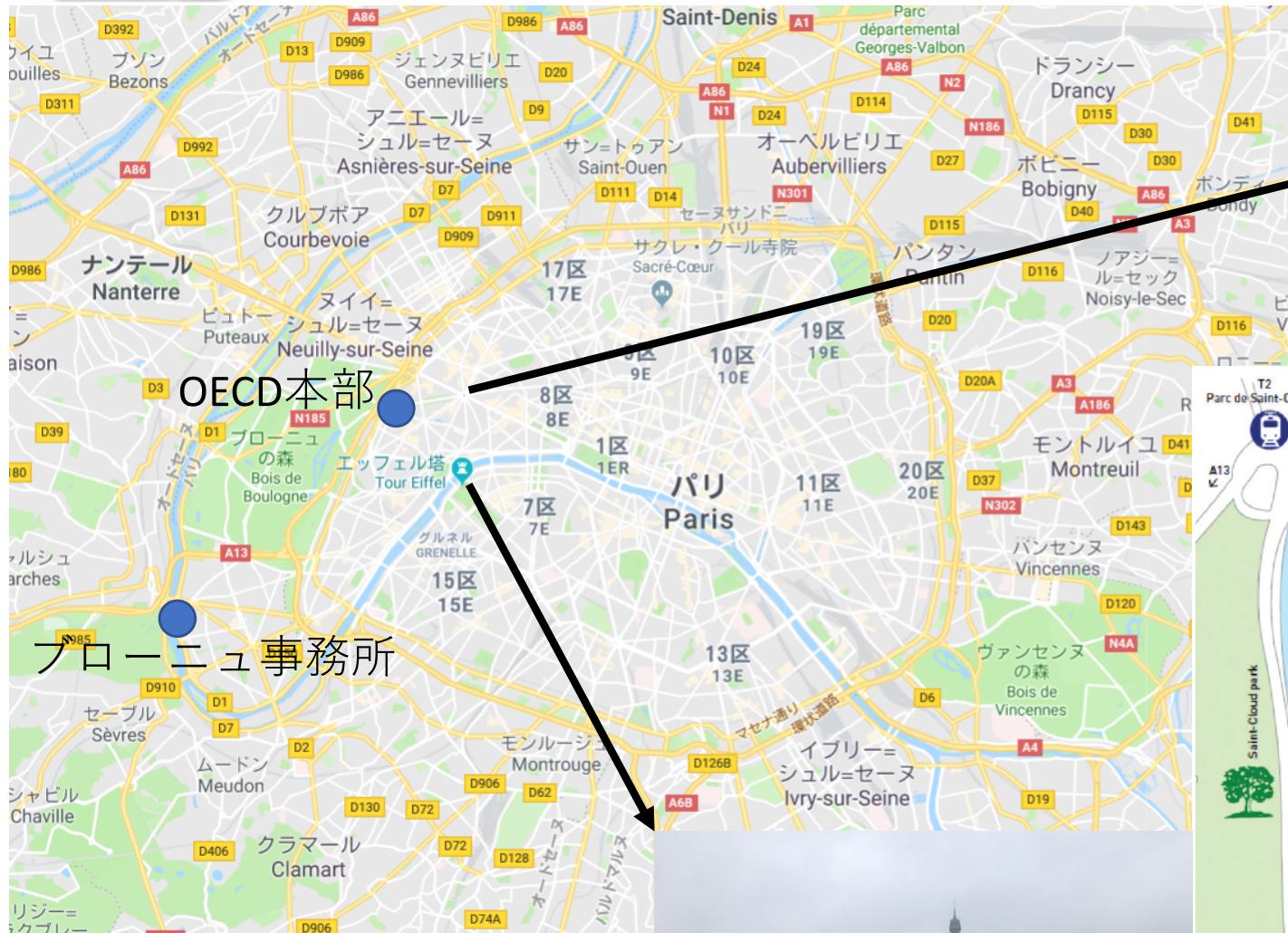


- 生態毒性でAOPが提案されているケースは内分泌かく乱などわずかにとどまる
- 生態毒性では多くのケースでin silico手法の活用+専門家判断による効率的な試験指示が現実的

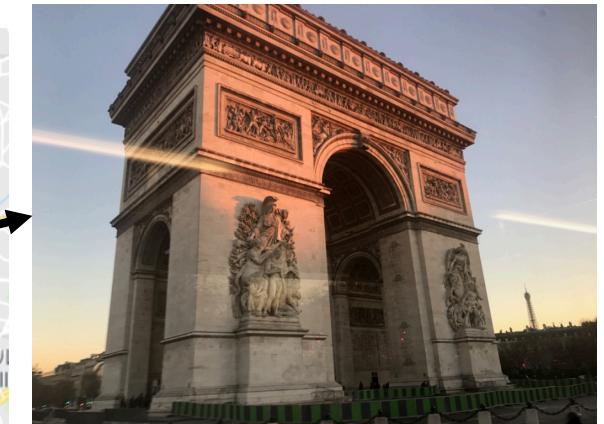
AOP: Adverse Outcome Pathway

IATA: Integrated Approaches to Testing and Assessment

WNT@OECDブローニュ事務所



Google Map より





OECD WNT (2018年4月)

- 生態毒性関連（200シリーズ）については、新たな試験法の承認はなし

- Guidance Document No.23の改正の承認
→2018年7月にSecond Editionが公開

- Test Guideline No.203（魚類急性毒性試験）の改正に関する議論
→Moribundity（瀕死）をエンドポイントとして利用するための改正の提案



Guidance Document No.23



Organisation for Economic Co-operation and Development

ENV/JM/MONO(2000)6/REV1

Unclassified

English - Or. English

6 July 2018

ENVIRONMENT DIRECTORATE

**JOINT MEETING OF THE CHEMICALS COMMITTEE AND THE WORKING PARTY
ON CHEMICALS, PESTICIDES AND BIOTECHNOLOGY**

試験困難物質の水相中での水性毒性試験に関するガイダンス文書

**GUIDANCE DOCUMENT ON AQUEOUS-PHASE AQUATIC TOXICITY
TESTING OF DIFFICULT TEST CHEMICALS**

SERIES ON TESTING AND ASSESSMENT

No. 23 (Second Edition)



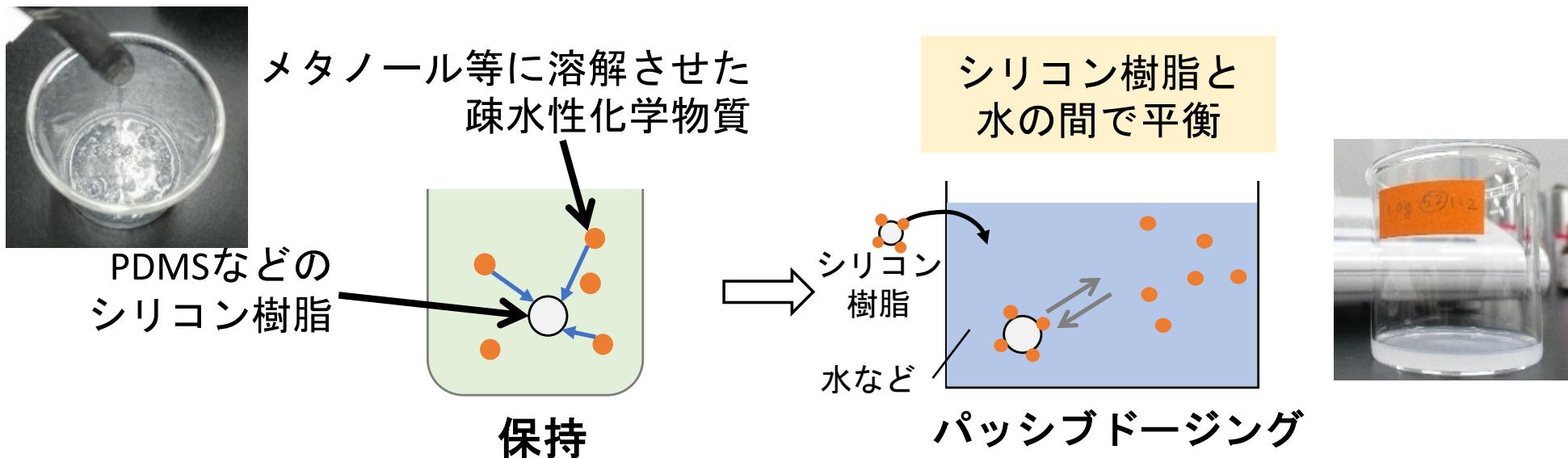
Guidance Document No.23

6. GENERAL CONSIDERATIONS ON SELECTION OF EXPOSURE SYSTEM	22
7. STOCK AND TEST SOLUTION PREPARATION AND EXPOSURE SYSTEMS FOR DIFFICULT TEST CHEMICALS	24
7.1. POORLY/SPARINGLY WATER-SOLUBLE TEST CHEMICALS	25
7.1.1. Solubility experiment to determine saturation concentration under test conditions	25
7.1.2. Test solution preparation methods	27
7.1.2.1 Direct addition	27
7.1.2.2 Generator systems	29
7.1.2.2.1 Saturator columns	29
7.1.2.2.2 Solid/liquid saturator systems	30
7.1.2.2.3 Liquid/liquid saturator units	31
<u>7.1.2.2.4 Passive dosing</u>	31
7.1.2.3 Dispersions and emulsions	31
7.1.2.4 Solvents	33
7.2. VOLATILE TEST CHEMICALS	35
7.3. TEST CHEMICALS THAT DEGRADE IN THE TEST SYSTEM	37
7.3.1. Photolysis	38
7.3.2. Hydrolysis	39
7.3.3. Oxidation	40
7.3.4. Biodegradation	40

試験溶液作成方法として、Generator Systemの中に飽和カラムなどに加え、新たにパッシブドージング手法が追加

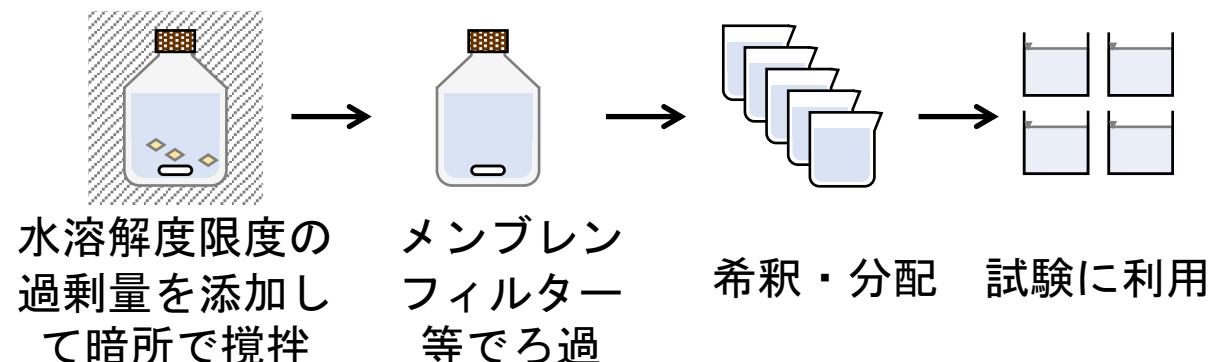
パッシブドージング手法とは

- シリコン樹脂(ポリジメチルシロキサン: PDMS等)に保持させて、そこからの再分配によって水中濃度を維持
- すでに疎水性有機物(PCB, PAHs等)で水溶解度限度程度を維持できるという報告あり(Mayer et al. 1999, Smith et al. 2010)
- 従来法との比較研究が不十分
→国立環境研究所で検討を実施



従来の手法

- Water-Soluble Fraction (WSF) : 水溶性画分

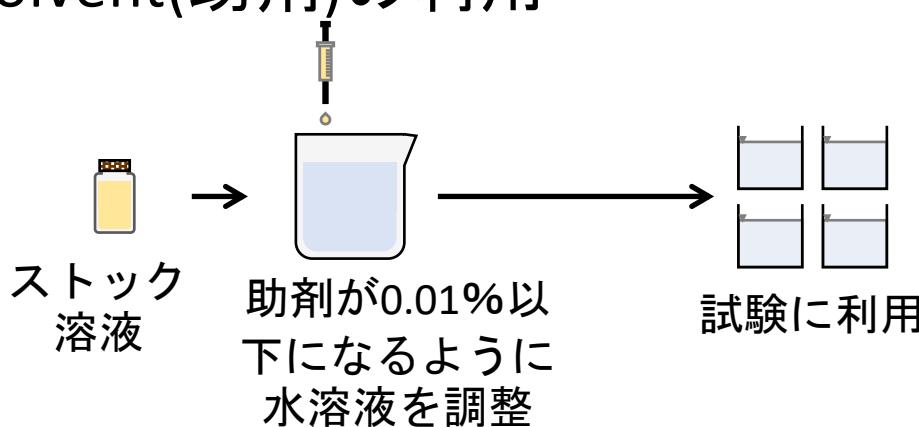


- Water-Accommodated Fraction (WAF) : 水性画分

ろ過せず、懸濁状態で中層から採取して試験に利用

- DMF等のSolvent(助剤)の利用

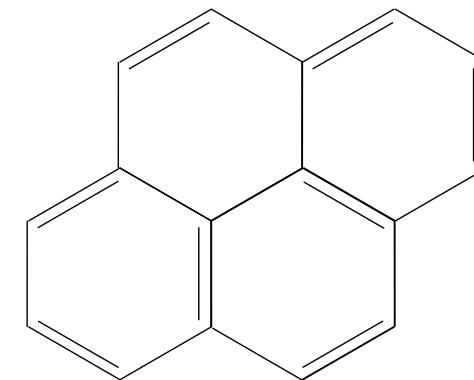
ジメチルホルムアミド(DMF)等の助剤に10000倍以上の濃縮液を作成



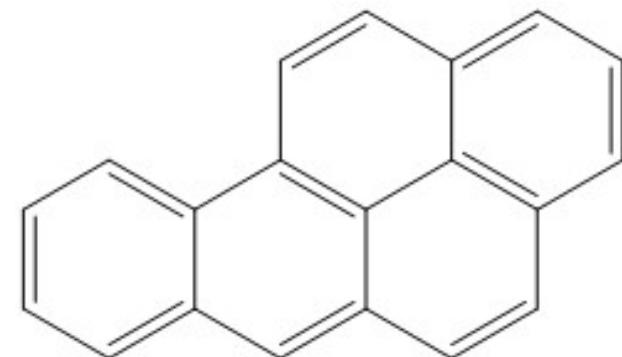
モデル物質

難水溶性物質の代表例として、多環芳香族炭化水素(PAHs)を選定

- Pyrene
四環のPAHで排ガス等に含まれる
(USEPAの16 PAHsの1つ)
log Kow: 4.88~5.32
水溶解度: 135 µg/L (25°C)

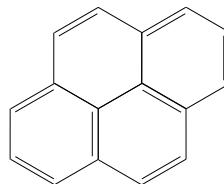
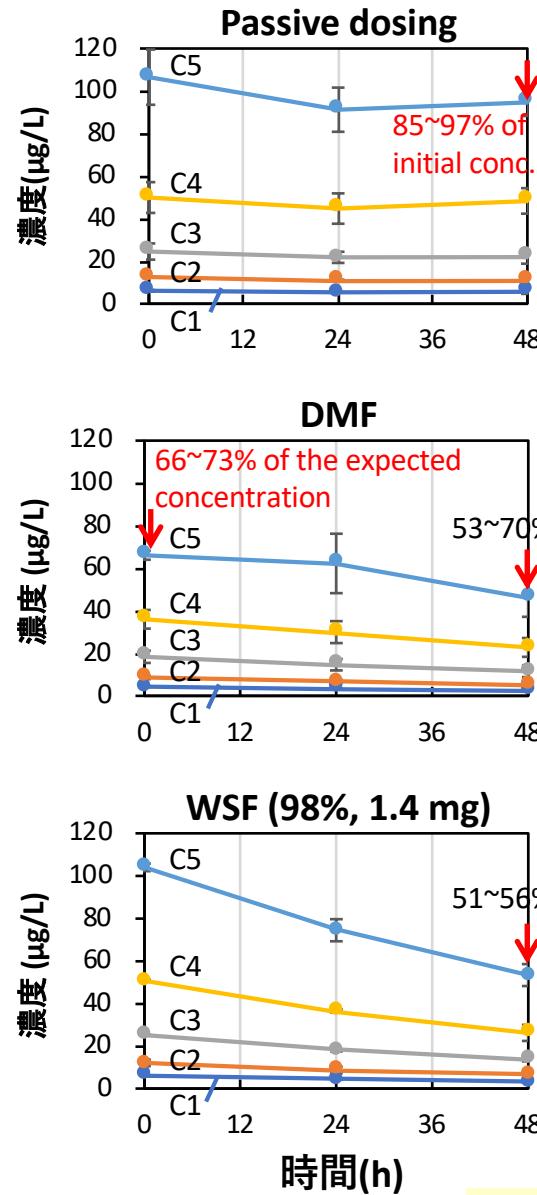


- Benzo [a] pyrene (BaP)
五環のPAHで発がん性物質
log Kow: 5.97~6.20
水溶解度: 1.6 µg/L, 25°C

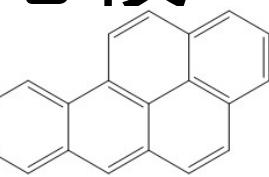
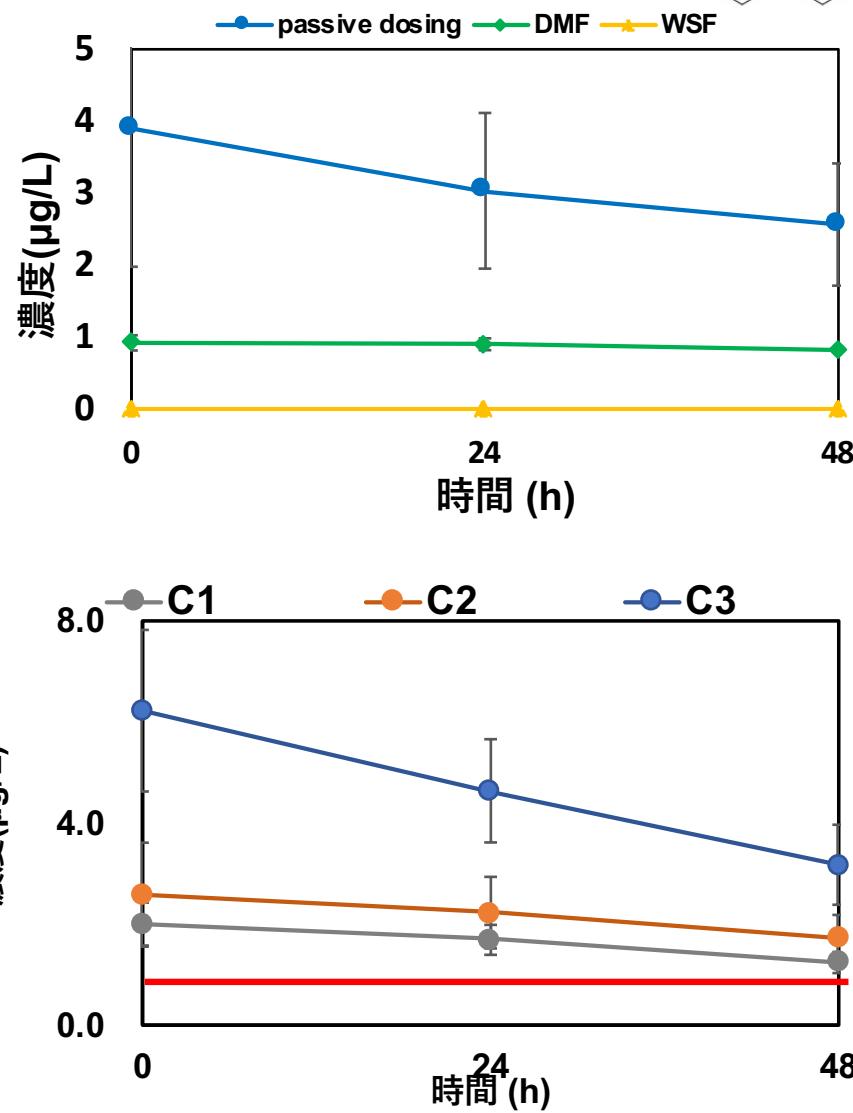


パッシブドーディングと従来法の比較

Pyreneの場合

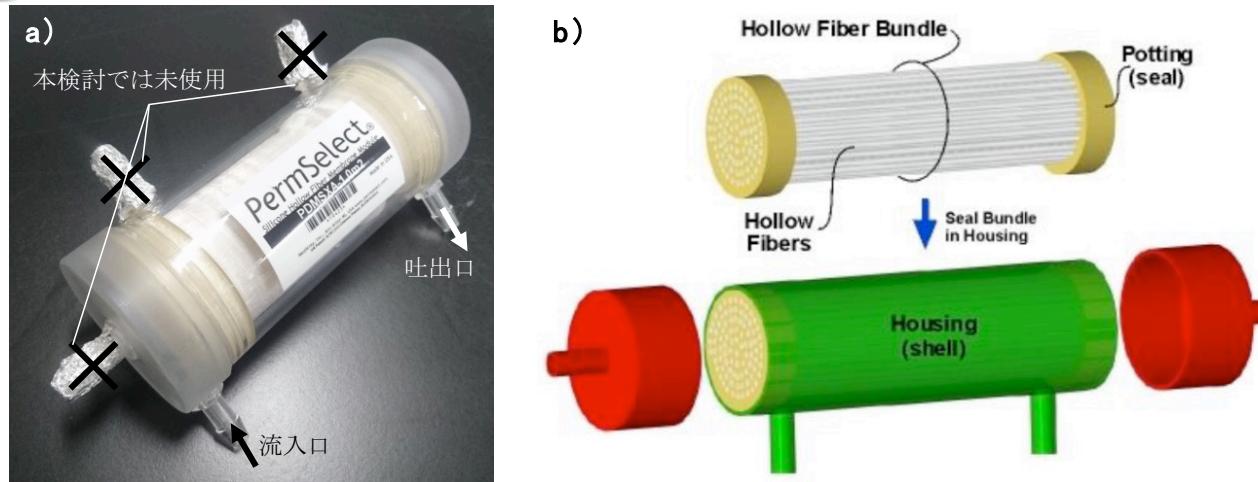


Benzo[a]pyreneの場合

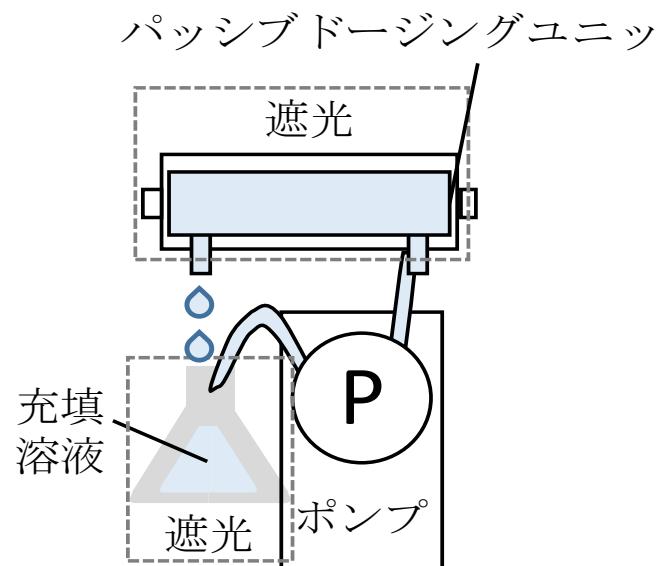


従来法に比べて Passive Dosingでは濃度が高く維持¹⁷

流水式曝露装置への適用可能性検証

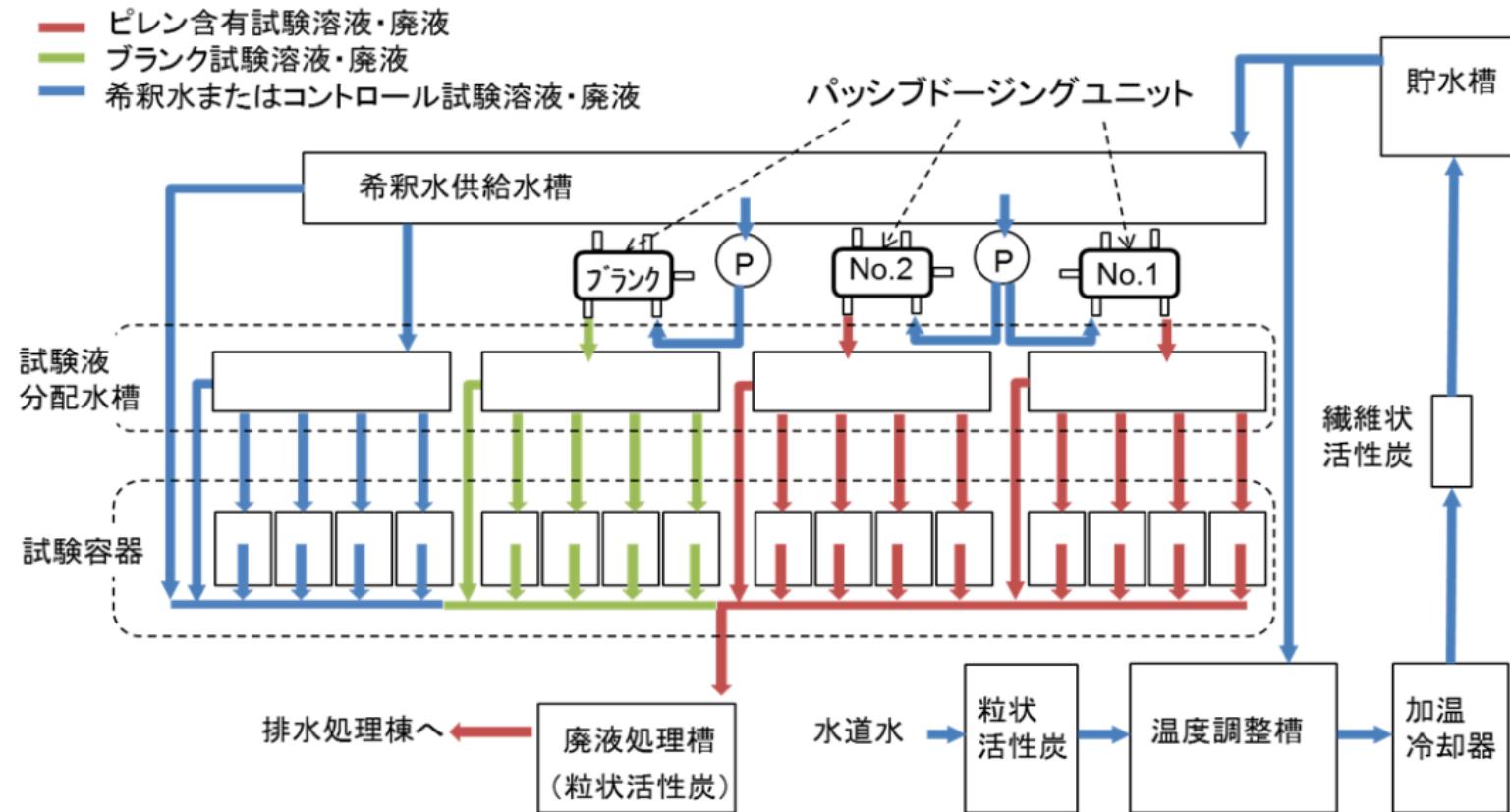


Adolfsson-Erici et al. (2012)を参考に、PermSelect (PDMSXA-1.0、MedArray, Inc 社製) を用いてOECD TG210 (魚類初期生活段階試験：ふ化後30日)への適用を想定した濃度確認実験を実施



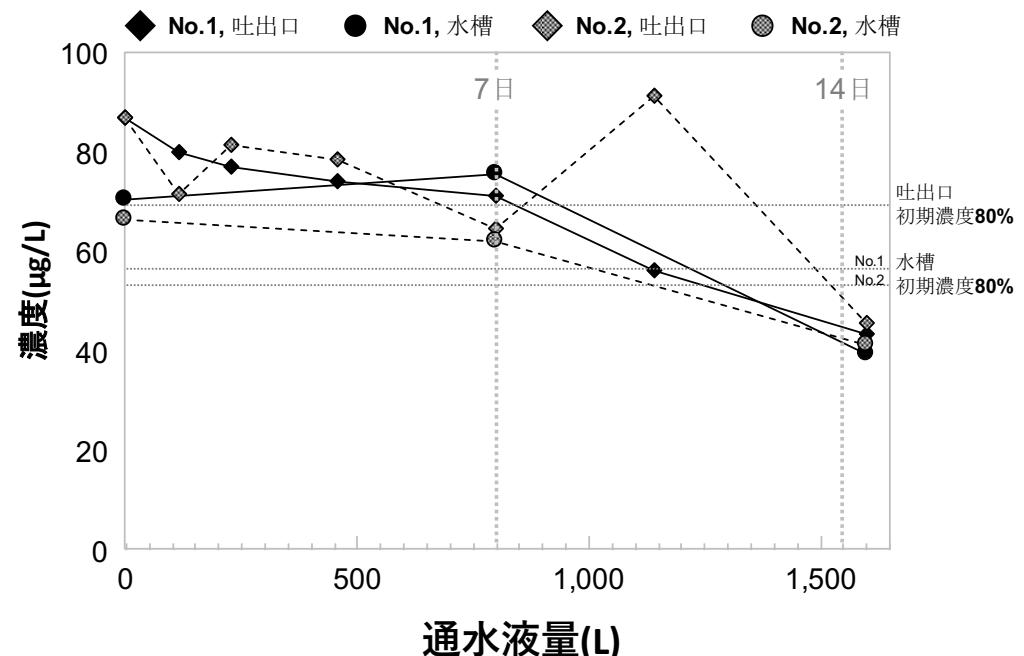
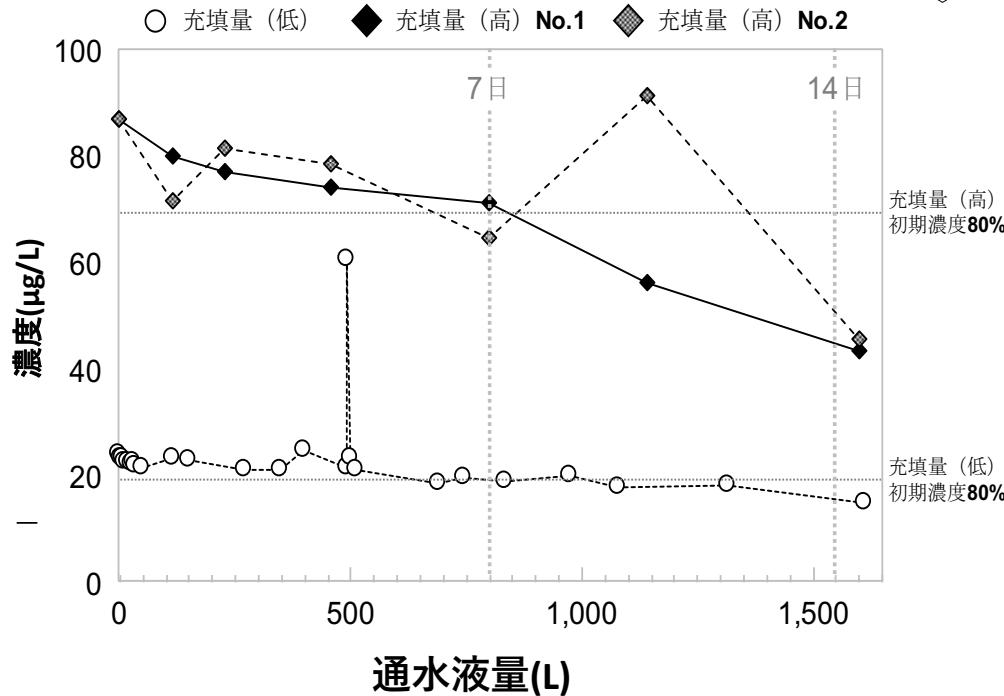
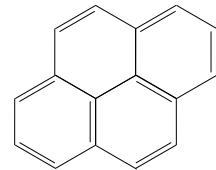
メタノール溶液に溶解したPAHsをポンプで還流して保持

流水式曝露装置の構成



流水式曝露装置を想定して濃度維持の
状況について検証

流水式曝露装置での検証結果



高濃度区（充填量が多い）側では、TG210で必要な30日間の約半分の14日間程度で濃度が低下：シリコン樹脂の容量を考えて濃度設定を行うことが重要



OECD WNT（2018年4月）

- 生態毒性関連（200シリーズ）については、新たな試験法の承認はなし

- Guidance Document No.23の改正の承認
→2018年7月にSecond Editionが公開

- Test Guideline No.203（魚類急性毒性試験）の改正に関する議論
→Moribundity（瀕死）をエンドポイントとして利用するための改正の提案

- 欧州（リード国は英国とスイス）は動物愛護の観点・データ収集の観点から個体識別（個別飼育、インプラント、タグ付け、入れ墨等）とMoribundityに関連する診断項目リストを提案

OECD TG203の修正案への対応

- ・ 欧州各国は賛成、米国は従来通りの致死の利用を主張
- ・ 日本は、TG203の改正に検証が済んでいない内容を導入し、各國からのデータ収集をはかる手法には反対意見を述べる
- ・ 一方で、データの収集には協力
- ・ 最後の改正（1992年）からのアップデート（魚種の追加等）も行われる

VMG-eco@OECD本部

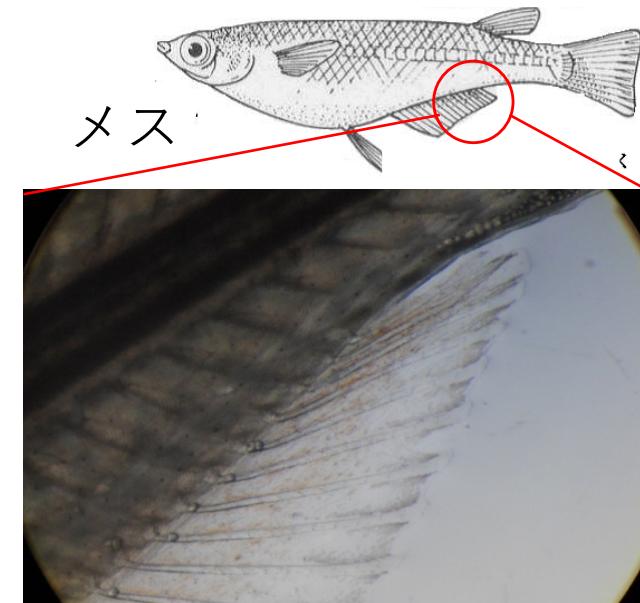
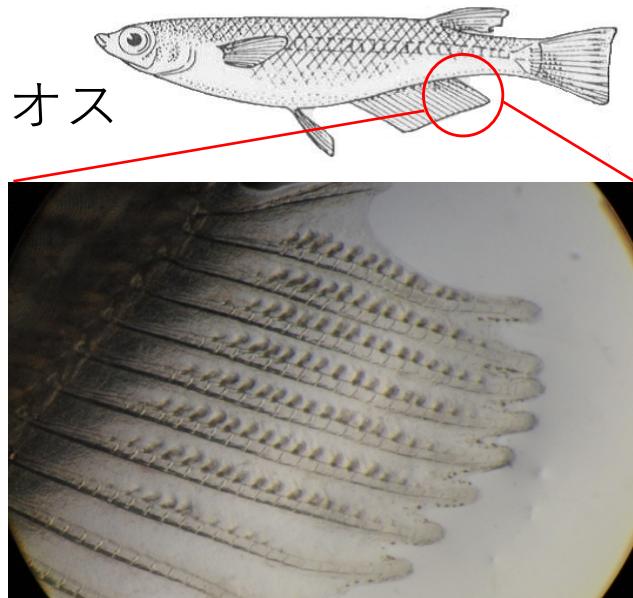


OECD VMG-eco (2018年10月)

- 試験法に関する各国の専門家が集まり、議論するための会合
- 日本からは内分泌かく乱関係の試験法（MEOGRT、メダカ抗アンドロゲン検出試験、ミジンコ幼若ホルモンスクリーニング試験、ミジンコ多世代試験等）について報告
- OECD TG203（魚類急性毒性試験）の改正についても議論
- 魚類胚や細胞株を用いた試験提案が増加傾向に（欧州からの動物愛護、代替法の流れ）



幼若メダカ抗アンドロゲン作用 スクリーニング試験(JMASA)



メダカ (*Oryzias latipes*)



JMASA試験の特徴

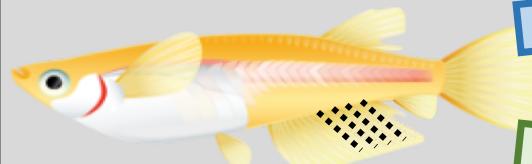
JMASA



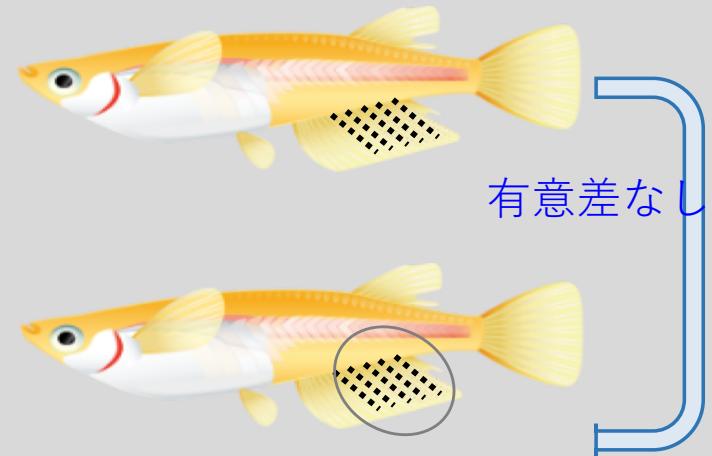
- 幼若体
- 性未成熟
 - 乳頭状小突起なし



TG 229



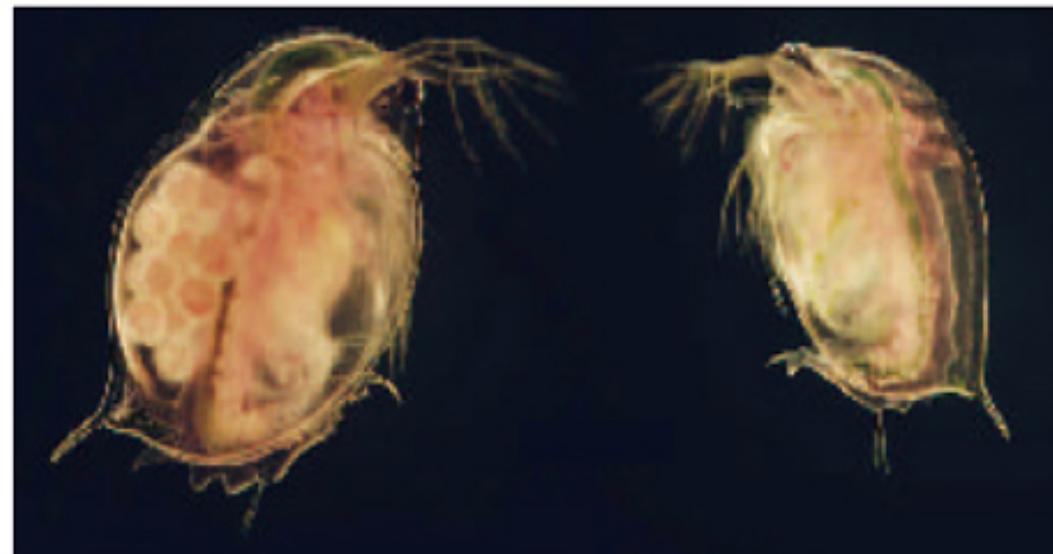
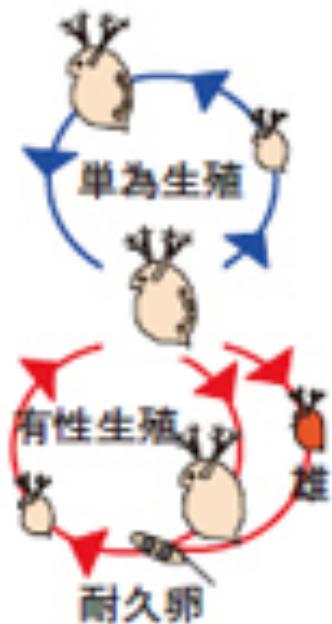
- 成体
- 性成熟後
 - 乳頭状小突起あり





ミジンコ幼若ホルモン スクリーニング試験(JHASA)

ミジンコの生活史

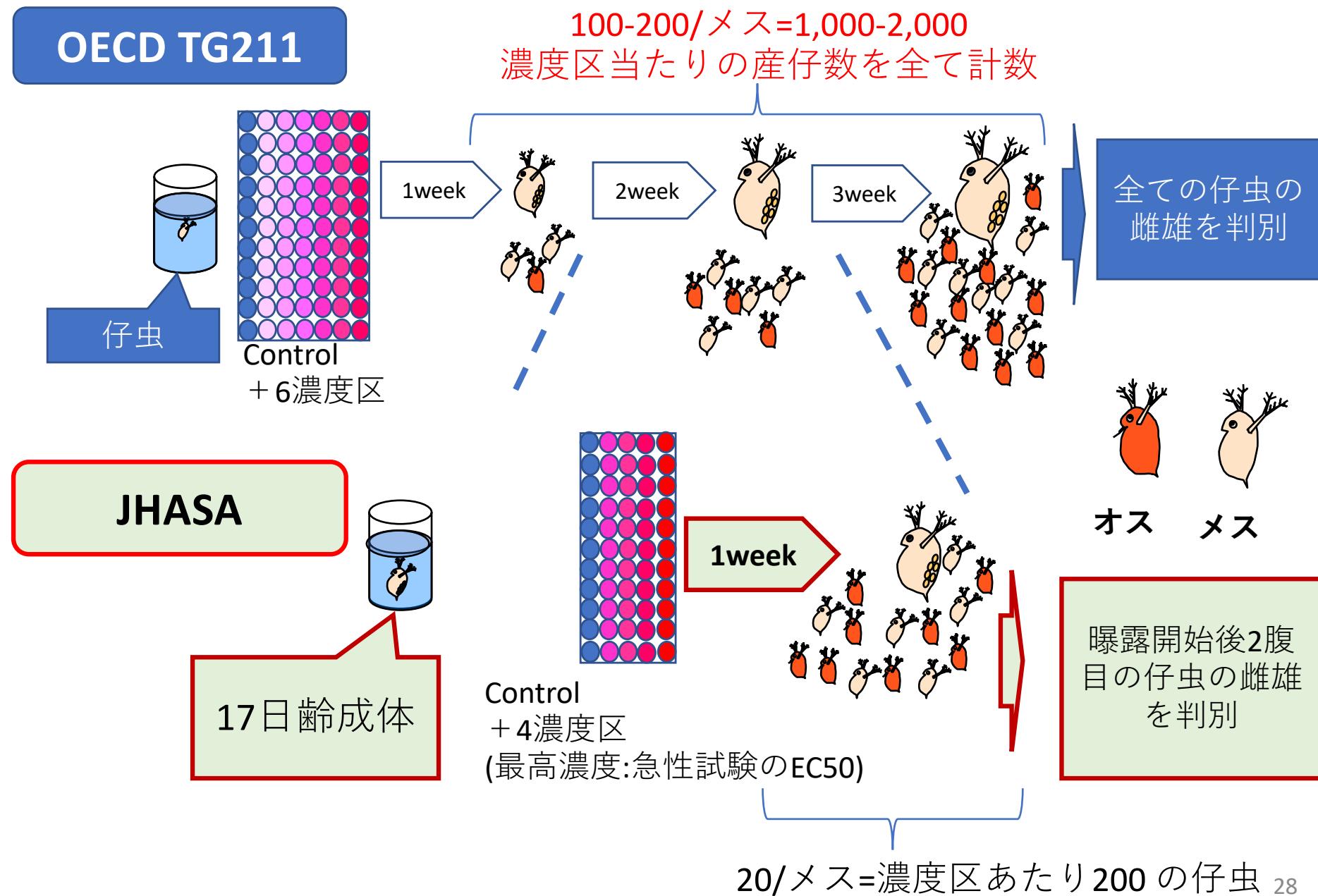


♀

オオミジンコ(*Daphnia magna*)

♂

OECD TG211 Annex 7とJHASA



TG203の改訂についての議論

- ・個体識別(Annex 7)の有無やClinical Sign (Annex 6)のGD作成など、議論となっている案件について、アンケート形式で進行
- ・欧洲の動物愛護（魚体数の削減やMoribundityの利用+安楽死）と、米国（+日本）の従来通りの致死をエンドポイントとして改正を最低限に収める考え方とのせめぎあい
- ・何回かのコメントティングラウンドが行われ、VMG-eco直後には400個のコメント

Clinical Signs (Annex 6, Table 1)

集団行動（集散）、平行感覚（平衡失調等）、観察される行動（多動性、あえぎ等）、外見（脱色、浮腫等）、刺激的行動などを0～3のランクに分けて細かく診断？

致死との関連性を判断

	Clinical sign	Definition	Synonyms	0 - Normal (Absent)	1- Minor	2 - Medium	3- (Severe)
Distribution	Loss of schooling/ shoaling behaviour	Individual fish show loss of aggregating & social interactions	Isolation, social isolation	Normal			Observed
	Dense schooling / shoaling behaviour	Increase in clumped association of fish	Crowding	Normal			Observed
	Vertical distribution surface	Abnormal depth selection, close to water/air interface	On/at/near/just below surface/top	Normal			Observed
	Vertical distribution bottom	Abnormal depth selection, close to base of tank	Lying on/ orientation to / collecting at / near / just above bottom	Normal			Observed
Equilibrium & buoyancy	Abnormal horizontal orientation	Loss of balance displaying as abnormal horizontal orientation/posture in water column	Keeling, lost righting reflex	Normal	Intermittent, partial, slight leaning, attempts to correct	Constant heavy leaning, on side	Upside down
	Abnormal vertical orientation	Head-up or head-down posture		Normal	Intermittent, partial, slight pitching (up or down)	Constant pitching (up or down)	Head directed
	Loss of buoyancy control	Floating at surface or sinking to the bottom		Normal			Floating at : to the bottom
Observed behaviours	Hypoactivity	Decrease in spontaneous activity	Torpid, apathy, lethargy, weak, immobility, inactivity, ceased swimming, quiescent	Normal (calm) swimming activity			No visible spontaneous movements
	Hyperactivity	Increase in spontaneous activity	Erratic swimming, skittering	Normal (calm) swimming activity			Rapid erratic movements
	Spiral swimming	Rotation on vertical or horizontal axis; erratic movements, often in bursts	Spiralling, rolling, tumbling, corkscrew swimming	None			Observed
	Hyperventilation	Increased frequency of opercular ventilatory movements	Rapid/strong respiratory rate/ function	Normal			Fast opercular movements
	Hypoventilation	Decreased frequency of opercular ventilatory movements	Reduced/laboured/weak/slow respiration/respiratory action/ventilation	Normal			Slow (and shallow) opercular movements
	Irregular ventilation	Irregular opercular ventilatory movements	Sporadic / spasmodic respiration / gill movement	Regular ventilation			Erratic open mouth movements
	Increased ventilation depth	Increased amplitude of opercular movements	Heavy gill movements, strong ventilation, strongly extended gills, abnormal opercular activity, operculae spread apart, mouth open	Normal			Operculae & mouth open
	Convulsions	Abnormal, involuntary and uncontrolled contraction of muscles	Seizures, twitching, muscle spasms, shaking, shuddering, vibration	None			Observed
	Coughing	Fast reflex expansion of mouth and operculae not at water surface - assumed to clear ventilatory channels	Abnormal opercular activity	None			Observed
	Gulping	Mouth (and opercular) movements at water surface, resulting in intake of water & air.	Piping	None			Observed
	Gasping	Occasional expansion of mouth and operculae not associated with ventilation; not at water surface	Yawn	None			Observed
	Surface escape / avoidance behaviours		Jumping, surfacing	None			Observed
	Bottom escape / avoidance behaviours		Diving, sounding	None			Observed
	Irritated skin behaviours	Flashing, scraping, rubbing		None			Observed
Appearance	Aggression and/or cannibalism	Aggression, direct attack, domination of choice tank locations, pick at or eat bodies of dead fish	Normal				Observed
	Tetany	Rigid body musculature	Paralysis	None		Intermittent	Permanent
	Skin colour - darkening	Changed / increased / darkened colour / pigmentation / melanistic markings	Normal			Tan/brown	Black
	Skin colour - lightening	Pallor, pale; changed/weak pigmentation	Normal				Pale
	Skin colour - mottled	Discoloured	Normal				Mottled
	Oedema	Abdominal swelling due to accumulation of fluid	Distended/swollen/blated abdomen/gut area; droopy	Normal		Distended abdomen	Abdomen constricted vertical and abdominal
	Haemorrhagic areas - petechiae	Pinhead sized spots due to intra-dermal or sub-mucus haemorrhage		None	<10% of skin area	10-30% of skin area	>30% of skin area
	Haemorrhagic areas - haematomas	Area of blood due to intradermal or sub-mucus haemorrhage	Small/big haematoma	Normal	<10% of skin area	10-30% of skin area	>30% of skin area
	Exophthalmia	Swelling within orbital socket resulting in bulging of eye out of socket	Exophthalmos, exophthalmus, popeye, protruding eyeball	Normal	1 or 2 eyes slightly extended	Unilateral - one eye fully extended	Bilateral - both eyes extended
Provoked behaviour	Mucus secretion	Excess mucus production	Mucus build-up (check eyes); increased secretion (mucus on skin or in water); mucus loss	None			Observed
	Faecal (anal) casts	String of faeces hanging from anus		None			Observed
	Visual and tank knocking stimulus - over reactive	Overhead fright (startle) response to hand passing over top of tank or avoidance reaction to light beam; Fright (startle) response to tank rapped lightly	Hyperexcitability; hyperactivity after stimulus/threat	Normal			Excessive response
	Visual and tank knocking stimulus - under reactive		Not responsive to external stimulation; inactivity after stimulus/threat	Normal		Reduced	Total loss
Tactile stimulus-under reactive			Not responsive to external stimulation; inactivity after stimulus/threat	Normal		Reduced	30 Total loss

日本の化審法等との関連性

- ・各魚種について、性成熟前に限る際の個体サイズについての聞き取りがあり：メダカについては国立環境研究所での知見を元に2.2 cm程度と回答
- ・他の魚種についても決定、汽水魚（シーブスヘッドミノー）や海産魚（マダイ）の追加
- ・安楽死の手法（脳の破壊）の制限？
- ・試験機関ごとの成長曲線（オスの乳頭状小突起などの二次性徴との関連性）の把握が必要
- ・個体識別とMoribundは延期で、魚種の追加などの更新を優先する方向で

今後の予定

- ・4月に開催予定のWNTで生物種などの更新部分だけを先行承認？
- ・Moribund + Clinical Signについては継続審議

Webkisの更新

化学物質データベース

Webkis-Plus

1月8日にリニューアル

環境リスクに着目した様々な化学物質関連情報を集約し、化学物質データベースとして提供しています。

Home

化学物質検索

農薬製剤検索

環境分析法検索

出典検索

その他

更新履歴

Webkis-Plusについて

環境リスク・健康研究センターでは、化学物質を正しく管理・利用するために必要な情報を入手できる基盤整備を行っています。以前公開していた化学物質データベースWebKis-Plus（以降、旧WebKis-Plusという）と環境測定法データベースEnvMethod（以降、旧EnvMethodという）を統合して、新しいWebkis-Plusにリニューアルしました。本データベースでは、旧WebKis-Plusと同じように神奈川県環境科学センターの化学物質安全情報提供システム（KIS-NET）で公開されていたデータにいくつかの参照元からの情報を収集・追加して公開しています。リニューアルに際して、カテゴリを見直すとともに一部の古いカテゴリ情報を一時的に削除しました。最新の情報に精査したうえで、順次公開していく予定です。

Webkis-Plusの特徴

- 約70の出典からの10,000物質以上の情報を掲載しています。

担当は 環境リスク・健康研究センター
今泉 圭隆 主任研究員

<https://www.nies.go.jp/kisplus/>

KATEの更新

1月30日にKATE2017 on NET正式版を公開

国立環境研究所 > 環境リスク・健康研究センター > 生態毒性予測システム



KAshinhou Tool for Ecotoxicity 生態毒性予測システム

English

更新履歴

サイトポリシー

よくある質問
FAQ



2019-01-30

生態毒性予測システムKATEのインターネット版（KATE on NET）の更新版（KATE2017 on NET正式版）を公開しました。更新履歴もご参照ください。検証済みブラウザ Firefox KATE2017 on NET正式版の改良のために、皆様のご意見・ご感想などをお待ちしております。

宛先：国立環境研究所 環境リスク・健康研究センター KATE担当 kate@nies.go.jp

生態毒性予測システム「KATE（ケイト）」について

生態毒性予測システム（通称：KATE^{※1}）は、環境省の請負業務（平成16年度から平成30年度）として、国立環境研究所 環境リスク・健康研究センターにおいて、研究・開発された生態毒性QSARシステム。化学物質の部分構造から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）等の生態毒性を予測することを目的としています。KATE2017 on NET正式版の改良のために、皆様のご意見・ご感想などをお待ちしております。

化学物質情報の入力は、CAS番号^{※2}検索や構造式エディタを用いた作図等によるSMILES^{※3}で行い、log P^{※4}によるQSAR予測を行います。

KATEに用いるQSAR式に係る研究・開発は国立環境研究所において実施されています。

※1 KAshinhou Tool for Ecotoxicity

※2 化学物質を特定するための最大10桁の数値からなる識別子

※3 化合物の分子構造等を印刷可能な文字で線形表記した識別子

※4 オクタノール・水分配係数（化学物質の生物への取り込みの指標）を指します。EICネットの用語解説も参照

KATEの構築に当たっては、環境省が実施した生態毒性試験結果（藻類生長阻害試験、ミジンコ急性遊泳阻害試験、ミジンコ繁殖試験、魚類急性毒性試験、魚類初期生活段階毒性試験）および米国環境保護省の魚類急性毒性試験結果を参考データとして用いています。

今後、試験結果が追加された場合には、QSARモデルの見直しを行う予定です。

従来の魚類・甲殻類急性に加え、藻類と魚類・甲殻類慢性毒性予測の機能が追加

QSAR Toolboxへの接続予定

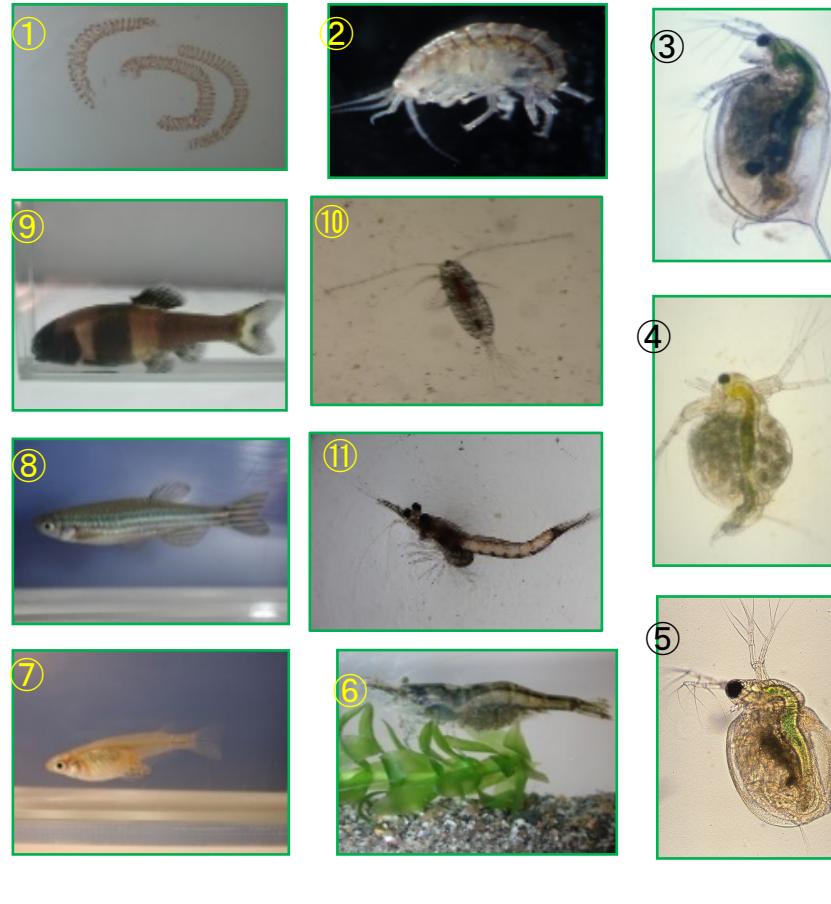
<https://kate.nies.go.jp/>

水生生物分譲業務について

化審法+農取法対象の試験生物種の販売

実験水生生物の有償分譲の対象種・系統

①	セスジユスリカ	<i>Chironomus yoshimatsui</i>
②	ヨコエビ	<i>Hyalella azteca</i>
③	オオミジンコ	<i>Daphnia magna</i>
④	タマミジンコ	<i>Moina macrocopa</i>
⑤	ニセネコゼミジンコ	<i>Ceriodaphnia dubia</i>
⑥	ヌカエビ	<i>Paratya compressa improvisa</i>
⑦	ヒメダカ	<i>Orizias latipes</i>
⑧	ゼブラ	<i>Danio rerio</i>
⑨	ファッドヘッドミノー	<i>Pimephales promelas</i>
⑩	アカルチア	<i>Acartia tonsa</i>
⑪	アミ	<i>Americamysis bahia</i>
⑫	ミジンコ6種	<i>Daphnia pulex</i> 他5種
⑬	コウキクサ	<i>Lemna minor</i>



<https://www.nies.go.jp/kenkyu/yusyo/suisei/index.html>

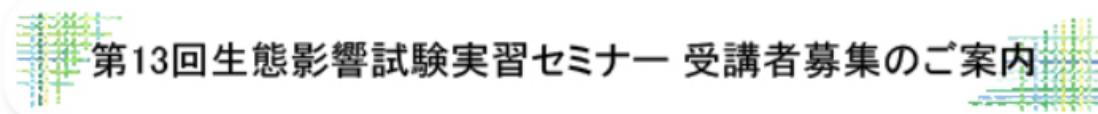


生態影響試験実習セミナー

第13回はミジンコ、
平成30年12月開催

リスク評価科学事業連携オフィス
生態毒性標準拠点 Ecotoxicity Reference Laboratory

第14回は6月
開催予定



※本セミナーは終了致しました※
多数のご参加、誠にありがとうございました。

環境リスク・健康研究センター リスク評価科学事業連携オフィス 生態毒性標準拠点では、生態影響試験に関する標準機関として、幅広い機関への試験の普及を図るため、平成23年度より「生態影響試験実習セミナー」を開催しております。

第13回目となる今回は、主にニセネコゼミジンコを用いた繁殖試験を対象に、試験経験があり試験精度の向上等を目指したい方を対象に、平成30年12月5日(水)～7日(金)の3日間の日程で開催します。皆様のご参加をお待ちしております。

日 程	平成30年12月5日（水）～7日（金） 5日：10:00～17:30、6日：10:00～17:15、7日：10:00～15:00
場 所	国立環境研究所 環境リスク研究棟 〒305-8506 茨城県つくば市小野川16-2
対 象	ニセネコゼミジンコを用いた繁殖試験の精度向上や更なる活用等を目指したい方※
定 員	20名 参加者は各機関につき2名 定員超過の場合、生態影響試験の経験等を考慮し参加者決定
参加費	5,000円 (但し、昼食費、懇親会費は含まれません)



毒性解析ソフトウェアのアンケート

国立環境研究所環境リスク・健康研究センター生態毒性標準拠点・生態毒性研究室では、生態毒性解析ソフトウェアの使用実態について把握し、日本環境毒性学会Ecotox Statics（元 大分大学吉岡先生が開発）を補完+後継するRベースのソフトウェアの開発・検討に役立てる予定です

希望者には、アンケート用紙をお配りしますので、その旨をnecotox@nies.go.jp（林 岳彦 主任研究員）にご連絡ください