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 18 年度)

日時:平成19年1月19日(金)10:00~16:30

場所:ベルサール九段 イベントホール

主催:環境省・(独) 国立環境研究所

協力:日本環境毒性学会

<u>目次</u>

	プログラム・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	1
	第1部】化学物質審査規制に関する動向	3
1.	化学物質審査規制法施行状況及び 化学物質審査規制に関する国際動向・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	5
2.	OECDテストガイドラインに係る動向と今後の見通し・・・・・・	14
3.	QSAR利用に関する国際動向・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	22 30
4.	輸送化学品の安全性評価に係る国連の取組・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	41
	第2部】生態毒性試験法に関する技術的事項	67
5.	化学物質審査規制法に基づく 藻類生長阻害試験法の改正内容について・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	69
6.	試験困難物質の試験・評価方法に係る検討状況 (難水溶性物質の試験法に関する検討の状況)・・・・・・・・	121
7.	魚類急性毒性試験等における毒性症状の記載について・・・・・・・	138

<u>プログラム</u>

時間	内 容	講演者等
10:00~10:05	開会挨拶	環境省
【第1部】化	学物質審査規制に関する動向	
10:05~10:40	化学物質審査規制法施行状況及び化	森下 哲
	学物質審査規制に関する国際動向	環境省環境保健部化学物質審査室長
10:40~11:20	OECDテストガイドラインに係る	戸田 英作
	動向と今後の見通し	環境省環境保健部環境安全課(OEC
		D/テストガイドライン作業部会議長)
11:20~12:10	QSAR利用に関する国際動向及び	大井 通博
	生態毒性QSARモデルの開発状況	環境省環境保健部化学物質審査室
	について	白石 寛明
		(独) 国立環境研究所環境リスク研究
		センター長
12:10~12:40	輸送化学品の安全性評価に係る国連	若林 明子
	の取組	(独) 国立環境研究所特別客員研究員
12:40~14:00	休憩	
【第2部】生	態毒性試験法に関する技術的事項	
14:00~14:50	化学物質審査規制法に基づく藻類生	坂西 義史
	長阻害試験法の改正内容について	環境省環境保健部化学物質審査室
		菅谷 芳雄
		(独)国立環境研究所環境リスク研究
		センター主任研究員
14:50~15:20	試験困難物質の試験・評価方法に係	斎藤 穂高
	る検討状況(難水溶性物質の試験法	(株)三菱化学安全科学研究所横浜研究
	に関する検討の状況)	所長
15:20~16:00	魚類急性毒性試験等における毒性症	鑪迫 典久
	状の記載について	(独)国立環境研究所環境リスク研究
		センター主任研究員
16:00~16:25	総合質疑	
16:25~16:30	閉会挨拶	(独)国立環境研究所

^{*}講演時間には10分程度の質疑応答が含まれます。

【第1部】化学物質審査規制に関する動向

化学物質審査規制法施行状況及び 化学物質審査規制に関する国際動向

環境省環境保健部化学物質審査室 森下哲

化学物質審査規制法の施行状況

(1)新規化学物質の審査

分解性、蓄積性、人への長期毒性、生態毒性を審査

(2)化学物質(新規・既存)の製造、輸入等の規制

- ①第一種特定化学物質 (製造・輸入の許可等) PCB等15物質
- ②第二種特定化学物質(製造・輸入予定数量の変更、表示等) トリクロロエチレン等23物質
- ③第一種監視化学物質 (製造・輸入数量の実績等の把握等) 酸化水銀(Ⅱ)等25物質
- ④第二種監視化学物質(製造・輸入数量の実績等の把握等) クロロホルム等859物質
- ⑤第三種監視化学物質(製造・輸入数量の実績等の把握等) ノニルフェノール等51物質

(平成18年12月26日現在)

第一種特定化学物質の追加に係る審議

(1)対象物質

2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4,6-ジ-tert-ブチルフェノール (官報公示整理番号:5-3580,5-3604、CAS No.3846-71-7)

(2)審議会の結論

平成17年11月 継続的に摂取される場合には、人の健康

を損なうおそれがある可能性がある

平成18年1月 第一種特定化学物質として指定すること

が滴当

平成18年7月 当該物質が使用されている場合には輸入

禁止の対象とすべき製品として化粧合板、 塗料等の8品目を対象とすることが適当

化学物質審査規制法に関するその他の動向 (1)Japanチャレンジプログラム

背景 既存化学物質の安全性点検の加速化 (国が実施→官民連携で実施)

開始 平成17年6月

概要 ①製造・輸入量が年間1000トン以上の665物質について 安全性情報(OECD/SIDSレベル)を収集・発信

②そのうち、国際機関等で情報収集の予定がない約160物質についてはスポンサー企業が安全性情報を収集

現状 約半数(78物質)についてスポンサー登録済み

今後 平成20年(2008年)に中間評価を実施予定

化学物質審査規制法に関するその他の動向 (2)BATの考え方を適用した副生HCB対策

背景 平成18年2月に、テトラクロロ無水フタル酸(TCPA)の 合成過程でHCBの副生が判明

考え方 ・第一種特定化学物質は、非意図的な副生であって も原則的には許容せず。

- ・しかし、代替が困難で副生が不可避なケースについては、副生量の低減に向けた最大限の努力がなされることを前提に、規制対象から除外。
- ・その判断基準として、必要に応じ、工業技術的・経済的に可能なレベル(BATレベル)を設定。
- 対 応 BAT委員会を設置。平成18年11月に、パブコメを経て報告書をとりまとめ。BATレベルは以下のとおり

TCPA中のHCB

200ppm

ソルベントレッド135中のHCB 10ppm

今後 製品中の有害化学物質のモニタリングを実施

国際動向:欧州REACHの成立

平成18年12月13日:欧州議会で承認 平成18年12月18日:欧州理事会で合意 平成19年6月~:段階的に施行

<REACHの特徴>

- 既存化学物質及び新規化学物質の登録を義務化 既存化学物質を新規化学物質と同様に取扱
- ・これまでは行政庁が実施していたリスク評価を事業者に義務付け 一定の化学物質について、製造輸入者の対し、化学物質安全性評 価報告書の作成と提供を義務付け
- ・ 同報告書の内容を行政庁が評価し、必要に応じ追加試験を要求
- · CMR物質等の高懸念物質に認可制(原則禁止、代替促進)を導入
- ・ それ以外の化学物質についてはリスク評価を実施し、リスク軽減が必要な場合には製造・上市・使用を制限。
- ・ サプライチェーンにおいて、製品に含まれる化学物質の安全性情報の 伝達を強化(注:使用者から供給者に対し、用途・ばく露情報等を提供)

国際動向:カナダの新たな化学物質管理

<スティーブン・ハーパー首相が新たな化学物質 管理計画を公表>

- 平成18年12月8日、カナダのスティーブン・ハーパー首相は、ローナ・アンブローズ環境相とトニー・クレメント保健相と共同で、新たな化学物質管理計画を公表した。
- 同首相は、「カナダは約23,000の既存化学物質のカテゴライゼーションを世界で最初に完遂した国になった。今後、この優先度に沿って行動を起こす。」と発言。カナダ政府は、今後4年間に渡り3億ドルを投じて化学物質管理計画を推進する予定。

(注)カナダのカテゴライゼーション

カテゴライゼーションは、化学物質のリスク評価・管理を行う際の第1段階を指し、毒性(人健康、環境)、分解性、蓄積性、ばく露の観点からスクリーニング評価が行われる。約23,000物質の既存化学物質について、カテゴラーゼーションを実施しており、2006年9月に、人の健康又は環境へのリスクの観点から、約4,000の物質について詳細な安全性評価の対象とする必要があることを公表している。

国際動向:米国TSCAの動き

- <米国環境保護庁は、米国高生産量チャレンジプログラムのスポンサーなし化学物質の製造・輸入事業者に対し、安全性情報の報告を義務付け>
- ・平成18年8月16日、米国環境保護庁は、有害物質規制法 (TSCA)に基づいて、米国高生産量チャレンジプログラムに おいてスポンサー企業がつかなかった243の化学物質を製 造・輸入している事業者に対し、有害性情報の同庁への報 告を義務付ける規則を公示。
- ・米国化学工業協会(ACC)は、公平な競争条件の確保に役立つとの観点から、同庁の決定を支持。

国際動向:2つの方向性

WSSD2020年目標(2020年までに化学物質を健康や環境への影響を最小化する方法で生産・消費)の達成のための取組が各国・地域でスタート

(1)高懸念物質

規制強化 → 原則禁止、代替促進

(2)通常の化学物質

リスク評価の適正な実施(必要に応じ規制)

→ 有害性:既存化学物質のリスク評価の促進 ばく露:サプライチェーンで情報の共有

国際動向:高懸念物質

く残留性有機汚染物質(POPs)>

- ・現行の12物質の廃絶に向けた取組が進展 非意図的な排出についてはBATを適用
- ・新規POPsの追加を検討中 早ければ平成21年春頃に条約附属書改正の見込み
- <重金属(水銀、鉛、カドミウムなど)>
 - ・国連環境計画(UNEP):グローバルな取組を推進中
 - •EU:ELV指令(平成12年施行)、RoHS指令(平成18年施行)
 - ・中国:EU類似制度を平成19年3月に施行予定
- <発ガン性、変異原性、生殖毒性(CMR)物質(-定程度以上)>
 - ・EUのREACHで登録対象の見込み

国際動向:通常物質のリスク評価の適正化

<有害性:既存化学物質>

E U REACHで対応(既存と新規を同様に取扱い)

米国 USチャレンジの実施(当初、2800物質を対象。その後、拡大)。スポンサー企業がつかない場合はTSCA に基づく命令を発出して情報収集・提供を義務付けカナダ カテゴライゼーションにより約4000の優先物質を抽出

くばく露:サプライチェーン>

E U REACHで化学物質情報をサプライチェーンで共 有する仕組みを導入

米国 製造者は、用途情報を収集し、行政庁に提供する義 務あり

我が国の化学物質対策の今後のポイント (1)先進国並のスキームに脱皮して、 効果的・効率的な管理を導入すべき

- ・ 化学品や化学品を利用した製品が国境を越えた取引が増加。
- ・ 化学物質規制もグローバル化の影響下にあり、国際整合性の向上が必要。
- ・ 化学物質審査規制法は、世界に先駆けて策定された画期的なもの。
- ・しかし、その仕組みは、欧米諸国とは異なり、ハ ザード重視の途上国型。
- ・ 有害性とばく露の双方を考慮したリスクベースのアプローチが必要。

我が国の化学物質対策の今後のポイント (2)世界最高品質の製品を供給できるよう、 情報管理システムを構築すべき

- ・ グリーン購入やREACH対応で、有害物質の使用を廃止又 は削減した製品の供給が増加。
- ・ 最終製品(自動車や電機電子機器)の部品等に使用される 化学物質について、サプライチェーン全体で情報を共有す ることが重要。
- ・ アーティクルマネジメント推進協議会(JAMP)のように、サ プライチェーンを通じて、製品含有化学物質情報を共有す るための自主的な活動が活発化。
- · その一方、アウトサイダーやルールを守らない者に対する対応が今後の課題。
- ・ 事業者の自主性を尊重しつつ、行政が補完的に関与することにより、事業者の公平な競争を確保するための仕組みの 構築が必要。

我が国の化学物質対策の今後のポイント (3)国内のみならず、海外から流入してくる有害物質 に対しても目配りを行うべき

- ・海外、特に東アジアからの化学品の輸入が拡大。 貿易の拡大に伴い、国外から有害物質が流入する おそれが増大。
- ・ 化学物質審査規制法は、製品に含まれて海外から もたらされる化学物質については、限定的に規制 を実施。
- ・ 海外から輸入される有害物質や製品に含まれて流入してくる有害物質を、監視する仕組み(製品モニタリング)が必要。

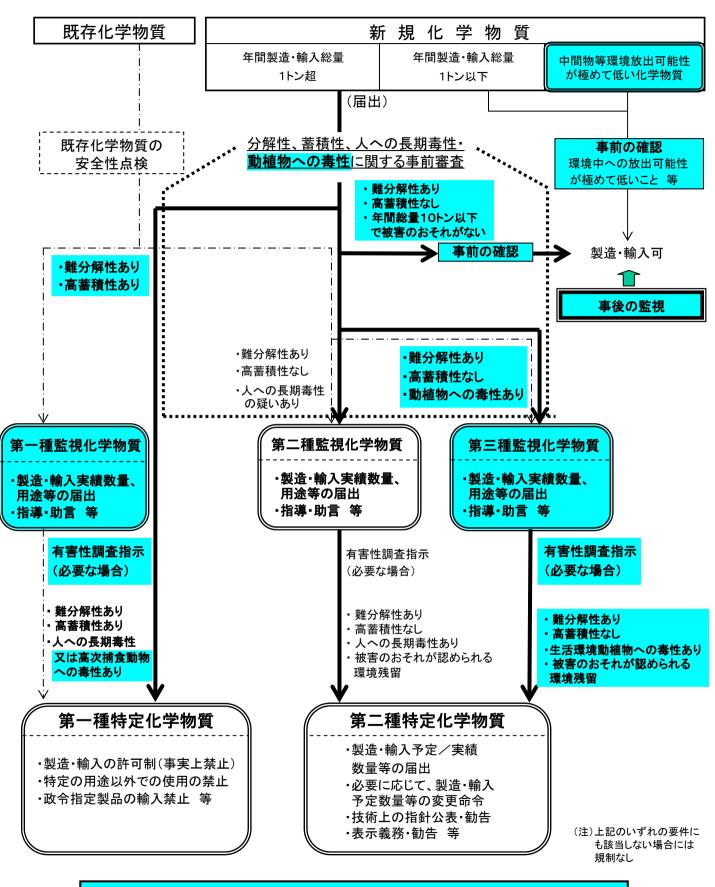
我が国の化学物質対策の今後のポイント (4)リスクの情報や技術ノウハウを国内で蓄積し、 将来の発展の基礎とすべき

- ・REACHでは、欧州域内で製造・輸入される化学物質について、リスク評価を事業者(複数の場合は共同)が実施。
- ・欧州でのリスク評価を、域外の事業者も参加(費用 負担)して実施する図式。生データやノウハウなど は、基本的に欧州域内に蓄積される。
- ・ 国内で基礎的な情報(有害性、ばく露、リスク)に関する情報を蓄積することは、今後、技術的な発展にも重要。
- ・今後、国内でもリスク評価を進めることが必要。

我が国の化学物質対策の今後のポイント (5)化学物質対策への取組が、社会的に評価される 世の中をつくるべき

- ・化学物質リテラシーの向上が必要。
- ・リスクコミュニケーションの実施が必要。
- ・ 事業者の努力を、事業者自らが国民にわかりやすく伝えることが必要。

化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律の概要



○製造・輸入事業者が自ら取り扱う化学物質に関し把握した有害性情報 の報告を義務付け 生態影響に関する化学物質審査規制/試験法セミナー

OECDテストガイドラインに係る 動向と今後の見通し

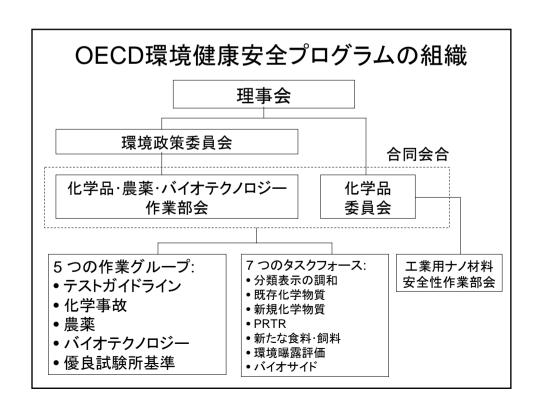
戸田英作 環境省環境保健部環境安全課 OECDテストガイドライン作業グループ議長

経済協力開発機構 (OECD)とは...

- 市場経済の先進国30カ国からなる国際機関
- 経済政策、開発協力、環境保全等を含む幅 広い政策を展開するためのフォーラム
- 加盟国代表よりなる理事会及びその下部機関(委員会、作業部会、作業グループ等)により意思決定がなされる

OECD環境保健安全プログラムの概要

- OECD加盟国が分担し、技術や知識を結集することにより、より良い仕事を迅速に行えるよう創設。
 - 以下の3つの目的に基づき運営。
 - 実験動物愛護の精神を考慮に入れた上での高品質な化学物質の試験および評価方法の確立
 - 化学物質管理の効率性、有効性の向上
 - 化学物質および化学製品の取引における非関税障壁の最小化
- 環境保健安全プログラムの経緯
 - 1971年 化学品プログラムの設立
 - 1970年代~ 特定の有害化学物質の情報の共有、新規化学物質の 評価(試験法・リスク管理方法)の開発
 - 1980年代~ リスク評価方法、リスク管理手法、化学事故の防止等、 既存化学物質対策
 - 1990年代~ 農薬、バイオテクノロジーを利用した製品、PRTR
 - 2000年代~ 内分泌かく乱作用、ナノテクノロジー、バイオサイド
- OECD環境安全プログラムは、加盟国政府及び化学産業において、化学物質の試験の重複を避けることにより、少なくとも年間6000万ユーロの経費節約効果があると見積もられている。



データの相互承認

(Mutual Acceptance of Data、MAD)

- 1981 年のデータの相互承認に関する理事会決定により、加盟国政府は、化学品の規制において、テストガイドラインと優良試験所基準(Good Laboratory Practice、GLP)に合致して他の国で得られた試験データを受け入れなければならないとされている。
- テストガイドラインは、化学物質の物理化学的特性、分解・濃縮性、生態毒性、人への毒性(哺乳類試験)に関し、国際的に調和した試験法を定めたもの
- GLP 原則への適合は、国際的に調和された手法により、各国により監視されている
- OECD加盟国のほか、イスラエル、スロベニア及び南アフリカが参加。中国、インド、ブラジル等についても交渉中。

OECDテストガイドライン

- 1981年の理事会決定に約50種のガイドラインを附属 書として添付。17回にわたり改正され、現在は約100 種
 - 第1部 物理化学的特性
 - 第2部 生態毒性
 - 第3部 残留性及び蓄積性
 - 第4部 哺乳類への毒性
- 第18回改正案につき、承認手続き中
 - 嫌気性バクテリアへの毒性試験
 - 第5部「その他」を新設、農薬残留試験等5種のガイドライン
- OECD事務局が有料で頒布していたが、2007年1月 より無料でダウンロード可能となった。

生態影響に関するテストガイドライン

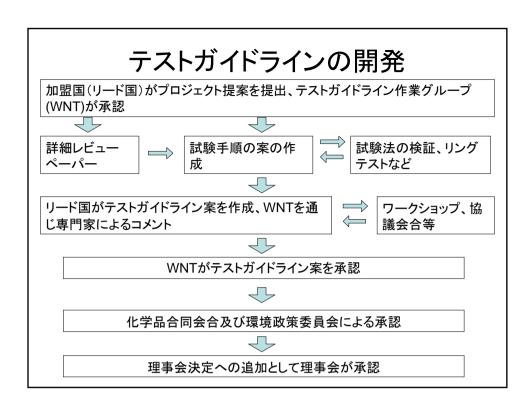
- 201 藻類生長阻害試験 (2006/3/23改正)
- 202 ミジンコ類急性遊泳阻害試験 (2004/4/12改正)
- 203 魚類急性毒性試験(1992/7/17改正)
- 204 魚類延長毒性試験-14日試験 (1984/4/4採択)
- 205 鳥類摂餌毒性試験(1984/4/4採択)
- 206 鳥類繁殖試験(1984/4/4採択)
- 207ミズ急性毒性試験(1984/4/4採択)
- 208 陸生植物生長試験(1984/4/4採択)
- 209 活性汚泥呼吸阻害試験(1984/4/4採 択)
- 210 魚類初期生活段階毒性試験(1992/7/17採択)
- 211 オオミジンコ繁殖阻害試験 (1998/9/21採択)
- 212 魚類胚·仔魚期短期毒性試験 (1998/9/21採択)

- 213 ミツバチ急性経口毒性試験 (1998/9/21採択)
- 214 ミツバチ急性接触毒性試験 (1998/9/21採択)
- 215 魚類稚魚成長毒性試験 (2000/1/21採択)
- 216 土壌微生物窒素無機化試験 (2000/1/21採択)
- 217 土壌微生物炭素無機化試験 (2000/1/21採択)
- 218 土壌中ユスリカ毒性試験 (2004/4/13採択)
- 219 水中ユスリカ毒性試験(2004/4/13 採択)
- 220 ヒメミミズ繁殖試験(2004/4/採択)
- 221 ウキクサ生長阻害試験(2005/3/23 採択)
- 222 ミズ繁殖毒性試験(2004/4/採択)
- 227 陸生植物活性試験(2006/7/19採 択)

生態影響に関するガイダンス文書等

- No.1 OECDテストガイドラインの作成のための ガイダンス文書
- No.3 水生環境影響評価のためのガイダンス文 書
- No.5 鳥類毒性に関するSETAC/OECDワーク ショップ報告書
- No.6 オオミジンコ繁殖毒性の最終リングテスト 報告書
- No.10 水生環境毒性データの統計解析に関するワークショップ報告書
- No.11 農薬及び工業化学品の水生環境試験法 に関する詳細レビュー文書
- No.23 試験困難物質の水生環境毒性試験に関 するガイダンス文書
- No.27 水生環境に有害な化学物質の分類のための調和システムの利用のためのガイダンス文書
- No.29 金属及び金属化合物の水媒体における 溶解・変態に関するガイダンス文書
- No.33 化学物質及び混合物の健康・環境有害性に関する調和された分類システム
- No.34 有害性評価のための新規又は改正試験 法の検証及び国際的な受け入れに関する ガイダンス文書
- No.44 化学物質の有害性・リスク評価に用いられる主要用語の解説

- No.46 甲状腺活性物質の検出のための両生類 変態試験に関する詳細レビュー文書
- No.47 内分泌活性物質の検出のための魚類ス クリーニング試験に関する詳細レビュー文
- No.49 (定量的)構造活性相関の検証のための 原則に関する専門グループ報告
- No.50 トキシコゲノミクスに関するOECD/IPCS ワークショップ報告書
- No.53 淡水静水フィールドシミュレーション試験 (屋外ミクロコズム・メゾコズム)試験に関す るガイダンス文書
- No.54 生態毒性データの統計解析の現行のア プローチ: 適用のためのガイダンス
- No.55 発生、生殖、内分泌かく乱作用に重点を 置いた水生節足動物のライフサイクル毒性 試験に関する詳細レビュー文書
- No.58 OECD加盟国における新規・既存化学 物質の評価における(定量的)構造活性相 関の規制的使用及び適用に関する報告書
- No.60 内分泌活性物質の検出のための魚類21 日間スクリーニング試験の検証のための初 期作業報告書(フェーズ1A)
- No.61 内分泌活性物質の検出のための魚類21 日間スクリーニング試験の検証報告書 (フェーズ1B)



テストガイドラインの検証(バリデーション)

- OECDテストガイドラインの開発に当たっては、試験法の妥当性の検証(validation)を経ることとされている。
- 試験法の検証に関するガイダンス文書では、以下のとおりの検 証の原則が定められている。
 - 試験法の根拠が入手可能であること(科学的根拠、規制目的、試験の必要性等)
 - 試験法のエンドポイントと関心のある生物学的現象との関係が記述されていること
 - 試験法の詳細な手順が入手可能であること
 - 試験施設内及び試験施設間の再現可能性が実証されていること
 - 試験法が対象とする代表的な参照物質を対象とする試験において、試験 法のパフォーマンスが実証されていること
 - 関心のある生物種と、関連する毒性データにより、試験法のパフォーマン スが評価されていること
 - 理想的には、試験法の有効性を示すデータはGLP原則に従って得られたものであること
 - 試験の有効性を示すすべてのデータが、専門家によるレビューのために 入手可能であること
- 試験法とその検証のためのデータは、独立のピアレビューを経るべきとされている。

テストガイドラインプログラムの活動計画

- 魚類胚毒性試験ガイドラインの作成
- 魚類急性毒性試験のリミット試験として のステップダウンアプローチに関するガイダンス文書の作成
- 鳥類摂餌毒性試験(TG211)の改訂
- 鳥類忌避試験に関するガイダンス文書 の作成
- 鳥類2世代試験に関する昭代レビュー文書及びガイドラインの作成
- 鳥類急性毒性試験ガイドラインの作成
- 嫌気性バクテリアの活性阻害(活性汚泥 からのガス発生の減少)試験ガイドラインの作成
- トビムシ繁殖試験ガイドラインの作成
- ダニ繁殖試験ガイドラインの作成
- 半フィールド条件におけるミツバチ繁殖 試験に関するガイダンス文書の作成
- フンバエ発達毒性試験ガイドラインの作成
- 底生・水生オヨギミミズ毒性試験ガイドラインの作成
- コペポーダ繁殖・発達試験ガイドライン の作成

(内分泌かく乱プログラム)

- 魚類21日間スクリーニング試験 法の開発及び検証
- 魚類ライフサイクル試験の開発及び検証
- 魚類性発達試験法の開発及び検 証
- 魚類長期試験に関する詳細レビュー文書の作成
- □ユー又書のTF成■ 両生類試験法の開発及び検証
- オオミジンコ繁殖毒性試験 (TG211)の内分泌作用への拡張
- アミ類ライフサイクル毒性試験ガイドラインの作成

OECD 内分泌かく乱物質試験評価 特別プログラム

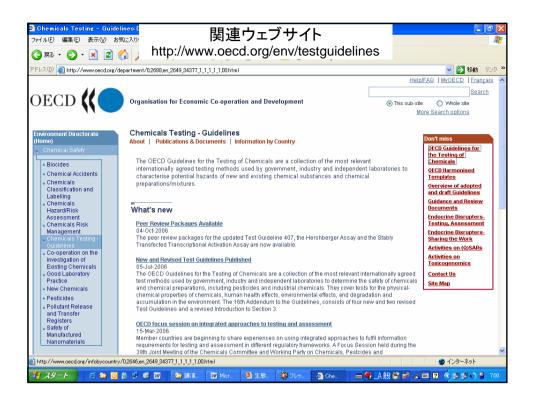
- 1996年に開始
- 以下を目的とする
 - 加盟国への情報提供及び活動の調整
 - 内分泌かく乱作用の試験のためのテストガイドラインの作成・改定
 - 有害性・リスク評価のためのアプローチの国際調
- 2002年、内分泌かく乱物質の試験評価のための倍 年的枠組みについて合意
 - 内分泌かく乱作用を通じた有害性の検出のための情報を 得る手段となるさまざまな試験法を位置づけた道具箱
 - 試験手順を定めるものではない

内分泌かく乱作用の試験・評価に関する概念的枠組み

- レベル1: 既存の情報による順位付け
 - 物理化学的特性、入手可能な毒性データ等
- レベル 2: 作用メカニズムに関する情報を示す試験管内試験
 - ホルモン受容体結合性
 - レポーター遺伝子試験(試験法検証報告書のピアレビュー中)
 - 構造活性相関等
- レベル3: 単一の内分泌作用に関するデータを示す動物試験
 - 子宮肥大試験(試験法検証作業終了、ガイドライン協議中)
 - ハーシュバーガー試験(試験法検証報告書のピアレビュー中)
 - 魚類スクリーニング試験(試験法検証報告書のピアレビュー開始予定)等
- レベル4:複数の内分泌作用に関するデータを示す動物試験
 - 改良OECD 407試験(試験法検証報告書のピアレビュー中)
 - 魚類生殖腺組織病理試験等
- レベル 5: リスク評価のための内分泌作用及びその他のメカニズムを通じた有害性データを示す動物試験
 - 哺乳類における一世代試験・二世代試験、魚類・鳥類・両生類・無脊椎動物におけるパーシャルライフサイクル・フルライフサイクル試験

最近の会合及び今後の会合予定

- 2006年3月 第9回内分泌かく乱試験評価タスクフォース(EDTA)(ストックホルム)
- 2006年4月 第18回テストガイドライン作業グループ(WNT)(ベルン)
- 2006年11月 化学品合同会合(ボン)
- 2006年12月 非動物試験法検証会合(東京)
- 2007年1月 哺乳類試験法検証会合(リューブリアナ)
- 2007年1月 生態試験法検証会合(マドリッド)
- 2007年3月27~30日 第10回EDTA及び第19回 WNT(パリ)



QSAR利用に関する国際動向

- 1. はじめに-QSARとは
- 2. OECDにおける取組
- 3. 諸外国におけるQSAR利用状況 (1)米国、(2)カナダ、(3)欧州
- 4. 我が国における利用の方向性(環境省としての方針)

環境省 化学物質審査室 大井 通博

<u>1. QSARとは</u>

(Quantitative) Structure-Activity Relationship 「(定量的)構造活性相関」

- 化学物質の構造と性状(有害性)の関係を基に性状 を予測するもの。
- 広義には、定性的な対応も含む(例:特定の官能基の 有無から物質の有害性の多寡を推測する)。
- より狭義には、構造を手がかりに有害性(毒性値)等を定量的に算出する仕組み(いわゆる"QSARモデル")。

生態毒性QSARモデルの例

政府で開発されたもの

- ①ECOSAR (米国EPA): 急性・慢性毒性 民間・研究機関のモデル
 - ②TOPKAT (Health Design Inc. & Oxford Molecular Group, Inc)

魚(ファットヘッドミノー)及びミジンコの急性毒性

- ③MCASE (Multicase Inc.) 魚(ファットヘッドミノー、グッピー)の急性毒性
- ④TIMES (Burgas大学) 急性毒性

【出典】OECD's Database on Chemical Risk Assessment Models http://webdomino1.oecd.org/comnet/env/models.nsf 等

<u>2. OECDにおける取組</u>

- 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)
- 2002年11月 第34回化学品合同会合(QSARに関する特別 セッション)

QSAR専門家グループ(QSAR Expert Group)設置を提案 2003年6月

専門家グループの活動計画(2年間)の策定

- 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)
- 2005年6月 第38回合同会合 アドホックグループの設置決定

(1) OECD/QSARモデルの規制利用の ためのバリデーション原則

QSARモデルを規制に適用する場合に、当該モデ ルが満たすべき5つの条件

- 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)

(2) OECD/QSAR利用に関するアドホックグループ

<作業計画>

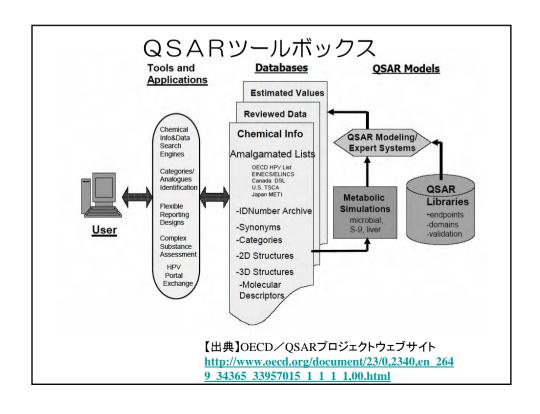
- ①「QSAR規制利用に関する報告書」のとりまとめ →(作業終了) 2006年8月 出版済み。
- ②「QSARモデルバリデーションに関するガイダンスドキュメント」作成

5つのバリデーション原則のより詳細な解説書。QSARモデルを規制に適用するに際してのバリデーション作業の参考となるもの。

- →(作業中) 本年前半のとりまとめ・公表予定
- ③QSARツールボックス(QSAR Application Tool Box)の構築
 →(作業中)

(3) OECD/QSARツールボックス

- ➤QSARモデル、化学物質データベース及び規制 情報を含むデータベース
- ▶OECDウェブサイト等からフリーにアクセスでき、 様々なQSARモデルを用いた各種エンドポイント の推定を可能とする。
- ▶2年間のPilot Phase(Phase1)
- ▶2008年3月までにプロトタイプの公開を目指す



3. 諸外国におけるQSAR利用状況①

出典:OECD/QSAR規制利用に関する報告書(2006) 他

(1)米国(EPA)

ECOSARを積極的に活用

- 新規化学物質の評価(TSCA: Toxic Substances Control Actに基づく事前審査において、届出データの不足をQSARで補完)
- 既存化学物質のスクリーニング(優先順位付け)に活用

3. 諸外国におけるQSAR利用状況②

(2)カナダ

- 新規化学物質審査における活用 届出者によって適切に評価され、政府もアクセス可能な場合、 試験データの代用とすることも可能。
- 既存化学物質の安全性評価における活用 2006年12月 新たな化学物質管理計画を公 表

23,000の既存化学物質のカテゴライゼーション (包括的なスクリーニング作業)を実施。その際 QSARも活用。

3. 諸外国におけるQSAR利用状況③

(3)欧州 < 現状 >

QSARは補完的なものと位置づけ

(Q)SARでの推定値は、あくまでも補完的な ツールであり、試験結果と併用することで物質 の物理化学的特性や生態毒性のより正確な情 報が得られる。

(新規化学物質及び既存化学物質のリスク評価に関するテクニカルガイダンス文書(TGD) PartⅢ, 2002)

3. 諸外国におけるQSAR利用状況④

(3)欧州 <今後>

REACHの下、より積極的なQSAR活用へ

動物愛護および試験コスト削減の観点から、(Q)SARはより活用されるべき。特に低生産量物質の化学物質のリスク評価に重要な役割。

("Assessment of additional testing needs under REACH" EC, September 2003)

RIP(REACH Implementation Project)3. 3における検討

"Technical Guidance Document on Information Requirements on Intrinsic Properties of substances"

4. 我が国における利用の方向性 (環境省としての方針)

第3次環境基本計画(2006年4月)を踏まえた対応

・・・・平成32年(2020年)までに有害化学物質によるリスクの最小化を図るべく、構造活性相関等の簡易・迅速な化学物質の安全性評価手法を開発し、人の健康及び生態系に与える影響について科学的知見に基づき評価を行い、適切な管理を推進します。

第2部第5節「化学物質の環境リスクの低減に向けた取組」 4. 重点的取組事項 (2)科学的な環境リスク評価の推進 より抜粋

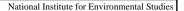
4. 我が国における利用の方向性 (環境省としての方針)

具体的には。。

- 1)国立環境研究所における生態毒性QSAR モデル開発(平成15年度~)
- 2)同モデルを含め、QSAR利用の在り方に関する検討
- →中央環境審議会化学物質環境対策小委員会 (昨年12月設置)における検討課題の一つ

参考情報源

- OECDのQSARプロジェクト http://www.oecd.org/document/23/0,2340,en_2649 34365 33957015 1 1 1 1,00.html
- 欧州(REACHほか)http://ecb.jrc.it/
- カナダの新たな化学物質管理計画(2006年12月8日報道発表)
 http://www.chemicalsubstanceschimiques.gc.ca/en/index.html





(独)国立環境研究所環境リスク研究センター 白石 寛明



Slide

National Institute for Environmental Studies

開発の背景



化学物質審査規制法での活用を目的とした(Q)SARの開発

- 新規化学物質審査における活用
- 既存化学物質安全性点検における活用

(Q)SARのエンドポイント

- 生分解性・濃縮性 経済産業省
- 人毒性(Ames等) 厚生労働省
- 生態毒性(魚類、甲殻類、藻類急性毒性) 環境省



Slide





対象モデル

名称	開発元	生物種	特徴
ECOSAR	US EPA	魚類、甲 殻類、藻 類	・部分構造等によるクラス分類 ・主にLogPとの単相関による予測
TOPKAT	Health Design Inc. & Oxford Molecular Group, Inc	魚類、甲 殻類	・部分構造等による最適モデルの選択 ・構造記述子、物性等を用いた重相関 による予測
TIMES	Univ. of Burgas	魚類、甲 殻類等17 種の生物 種	・クラス分類 ・LogP、3D記述子等を用いた予測
MCASE	Multicase Inc.	魚類	・部分構造等によるクラス分類 ・LogP他物性等を用いた予測



Slide

National Institute for Environmental Studies

※限度試験結果を除く





検証に用いたデータセット

- 環境省生態影響試験結果(平成7~15年度)※
 - 魚類(メダカ) 230物質
 - 甲殻類(オオミジンコ) 294物質
 - 藻類 232物質
- EPA Fathead Minnowデータベース
 - 魚類(ファットヘッドミノー) 580物質

検証方法

• 解析データセットの実測値とモデルによる予測値との相関解析

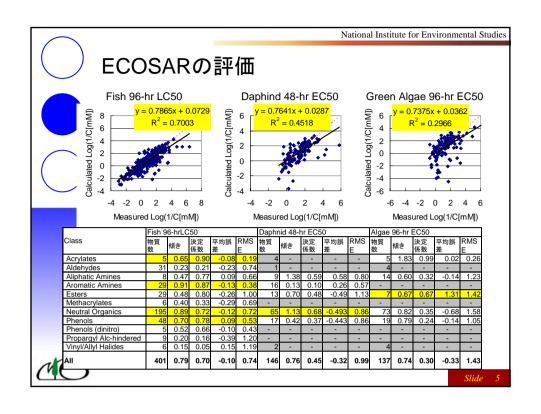
検証の指標

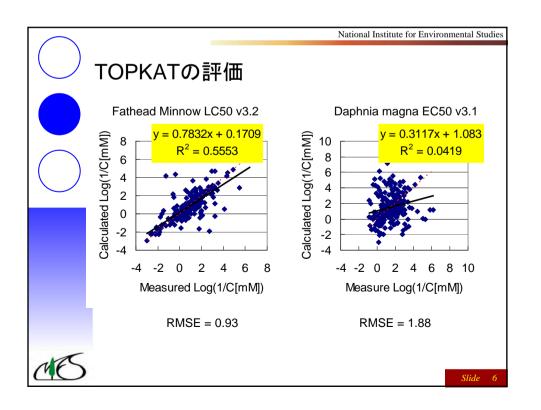
- 傾き(~1)、切片(~O)、決定係数(R²値)
- 2乗平均平方根誤差(RMSE: Root Mean Square Error)

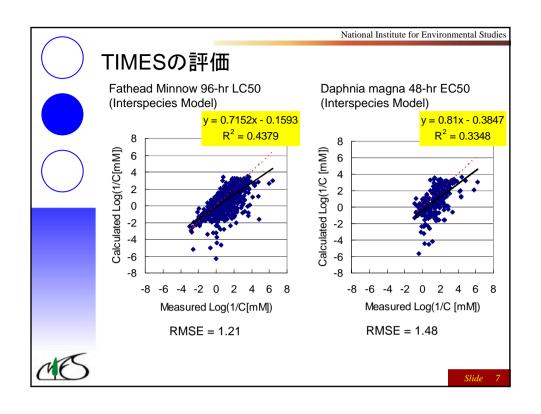
do

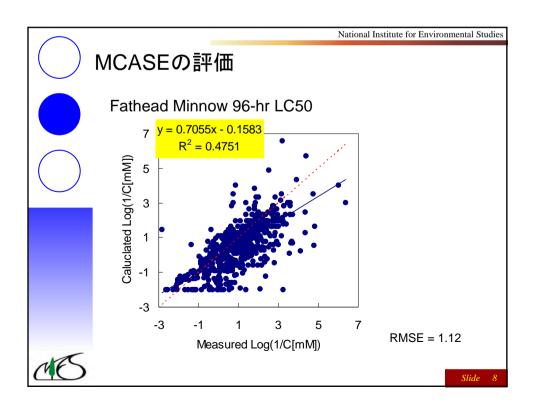
 $\Re RMSE = [\Sigma (Predicted Value - Observed Value)^2/n]^{0.5}$

Slide



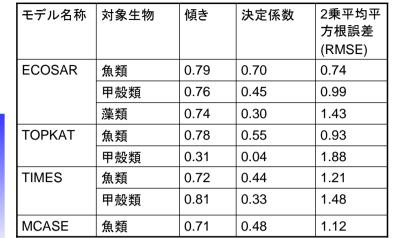








既存QSARシステムの評価のまとめ





Slide

National Institute for Environmental Studies

生態毒性予測システムの開発

エンドポイント及びデータセット



- 魚類、甲殻類、藻類の急性毒性
 - 魚類急性毒性試験 96hr LC50
 - 甲殼類急性遊泳阻害試験 48hr EC50
 - 藻類生長阻害試験 72hr EC50

データセット

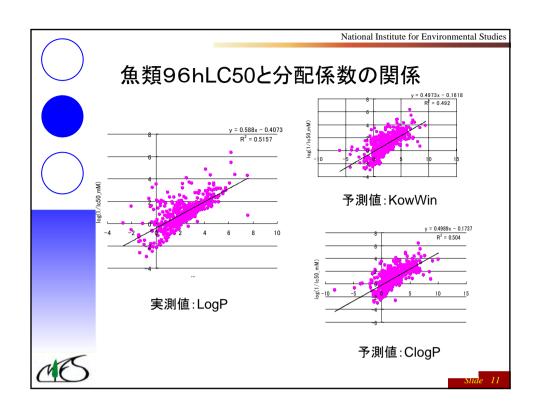
- 環境省生態影響試験結果(平成7年度~17年度)※
 - 魚類(メダカ) 275物質
 - 甲殻類(オオミジンコ) 347物質
 - 藻類 247物質

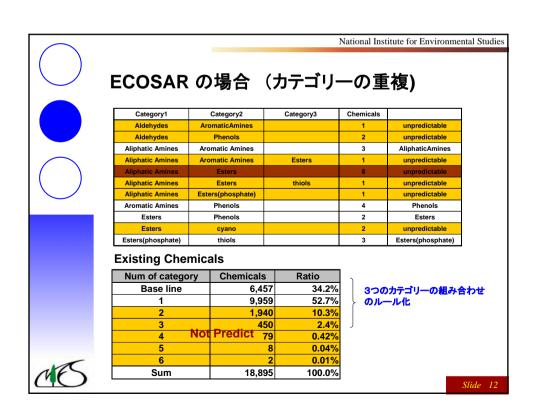
※ 限度試験を除く。

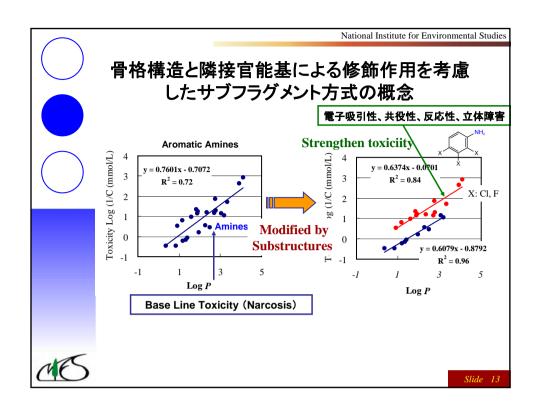
- EPA Fathead Minnowデータベース
 - 魚類(ファットヘッドミノー) 580物質

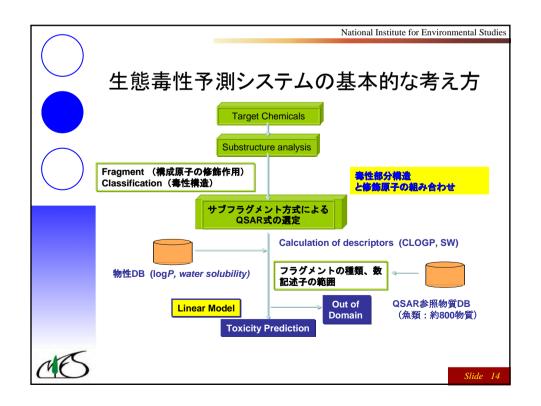


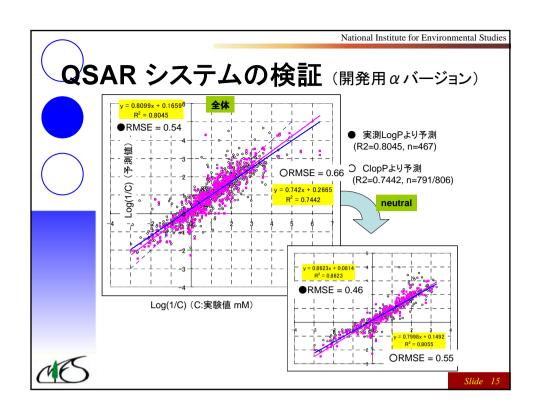
Slide 10

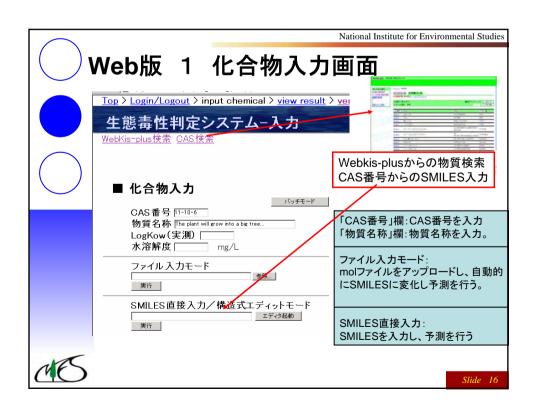


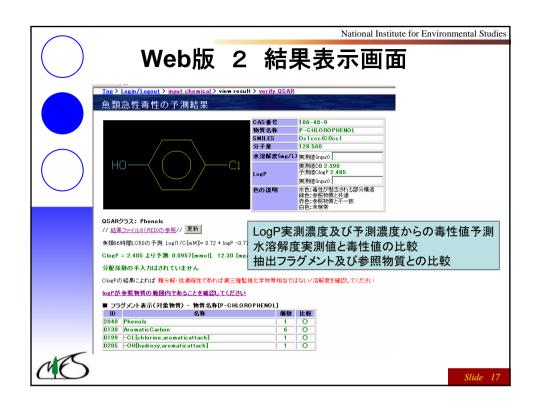


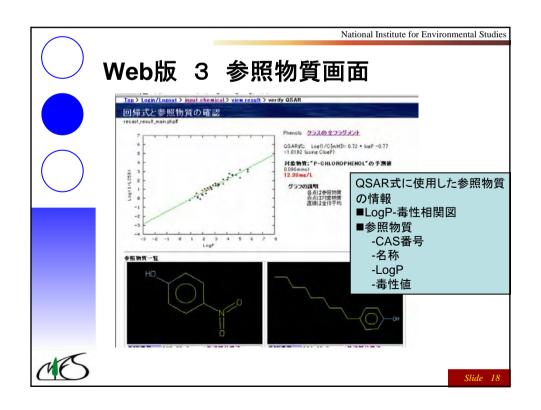




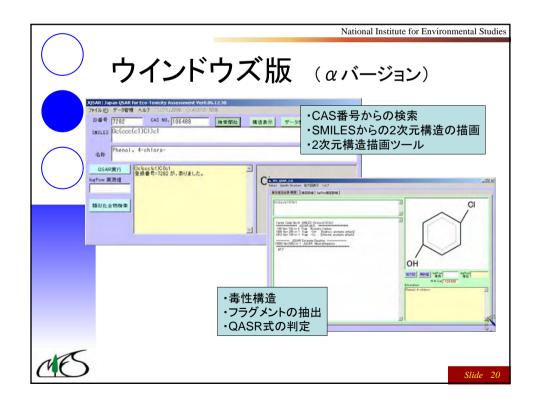


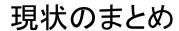














- 毒性データセットのスクリーニングおよびモデル構築等の作業に供するための開発基盤、枠組みの整備
- 魚類急性毒性についての構造活性相関モデルのサブフラグメント法による構築
- 生態毒性予測システム(WEB版、ウインドウズ版)の作成と、その公開に向けた準備
- OECD会合、第一回(定量的)構造活性相関についてのアドホックグ ループ会合(2006年6月、於イタリア、ストレーザ)にて生態毒性予 測システムの開発状況を報告

今後の予定

- 魚類モデルの検証(validation)と公開
- 化学物質のカテゴリー分類手法の検討、モデル構築手法の検 討、
- 甲殻類、藻類に対する毒性についてのQSARモデル構築



Slide 2

輸送化学品の安全性評価に 係る国連の取組

淑徳大学国際コミュニケーション学部 若林明子

マルポール条約

マルポール条約とは、船舶に起因する海洋汚染の防止のためにつくられた条約であり、GESAMPの活動の根拠となっている。

• GESAMPとは

Joint Group on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection of IMO /FAO /UNESCO /WHO /IAEA /UN /UNEP

有害化学物質等による海洋汚染を防止するため、IMOなどが構成員となっている、各分野の科学者による助言機関である。船舶で有害物質を輸送する場合には、付属書のガイドラインの分類に従って、輸送時の船の構造やタンクの洗浄液の取り扱い等が規制される。GESAMPは、船舶で輸送する主に有害液体物質の評価を行っている。

表 生物蓄積性及び生分解性(カラムA)

:	カラムA2: 生分解性		
レーティン グ	A1a: log <i>P</i> ow	A2b:BCF	
0	⟨1⟩ca.7	測定できない	R:易分解性
1	≧1-<2	≧1−<10	<u>凡</u> ·勿刀胜江
2	≧2-<3	≥10-<100	NR:易分解
3	≧3->4	≧100-<500	性でない
4	≧4-<5	≥500-<4000	
5	≧5	≧4000	

生分解性(A2)については、28日間の生分解試験で下記の結果が得られた場合に「易分解性」とされる。

- 1. 溶存態有機炭素(DOC)が70%以上分解。
- 2. 溶存酸素の減少あるいは二酸化炭素の発生が完全分解(理論値)の60%以上。
- 3. 生物化学的酸素要求量(BOD)/ 化学的酸素要求量 (CODcr)が0.5以上。
- 4. 他の説得力のある科学的な事実により28日以内に70% 以上が分解することが明らかな場合。

表 水生生物への毒性(カラムB)

レーティング	カラムB1: 急性毒性 LC/EC50(mg/l)	カラムB2: 慢性毒性 NOEC(mg/I)
0	>1000	>1
1	>100-1000	>0.1-≦1
2	>10-100	>0.01-≦0.1
3	>1-10	>0.001-≦0.01
4	>0.1-1	≦0.001
5	>0.01-0.1	
6	≦0.01	

慢性毒性データは、次のような物質の有害性を評価する際に重要である。

- 1. 難溶性であるため、飽和溶液中で毒性が現れないなど により急性毒性を正確に求めることが困難である。
- 2. 成長、発達あるいは繁殖に影響が出るなど、特定の慢性 毒性が疑われる。
- 3. 農薬などは特殊な生理活性を持つ。
- 4. 生分解性が低く、蓄積性が高いことが分かっている。

表 Lトの健康影響—哺乳類への急性毒性(カラムC)

レー ティ ング	カラムC1: 経口毒性 LD50(mg/kg)	カラムC2: 経皮毒性 LD50(mg/kg)	カラムC3: 吸入毒性 LC50(mg/l)
0	>2000	>2000	>20
1	>300-≦2000	>1000− ≦2000	>10−≦20
2	>50-≦300	>200-≦1000	>2-≦10
3	>5-≦50	>50-≦200	>0.5-≦2
4	≦5	≦ 50	≦0.5

表 刺激性、腐食性及び長期健康影響(カラムD)

レー ティン グ	カラムD1: 皮膚刺激性および腐 食性	カラムD2: 眼刺激性およ び腐食性	カラムD3: 長期健康影響
0	刺激性でない	刺激性でない	C:発がん物質
1	中程度刺激性	中程度刺激性	M:変異原物質
2	刺激性	刺激性	R:生殖毒物
3	3:重度刺激性また は腐食性 3A:腐食性(≦4時間) 3B:腐食性(≦1時間) 3C:腐食性(≦3分)	重度刺激性	S:感作性物質 A:吸入毒物 T:標的臟器全身 毒性 L:肺障害 N:神経毒物 I:免疫毒物

表 海洋のその他の利用への障害

カラム E1:着 臭	カラムE2:野生生 物および底生生物 への物理的影響	カラムE3	:海岸の快	適性阻害
NT:着 臭なし	Fp:残留性浮遊性 物質	レーティ ング	説明	措置
T:着臭	F:浮遊性物質	0	阻害なし	警告なし
試験陽 性	S:沈降性物質	1	わずかに 不愉快	警告、ただし 施設の閉鎖 はなし
		2	中程度の 不愉快	海浜閉鎖の 可能性あり
		3	極めて不 愉快	海浜閉鎖

表 有害液体物質の分類

分類	タンクの浄化作業またはバラスト水の排出作業により海 洋に排出された場合の有害液体物質の分類
X類	海洋資源または人の健康に重大な危険をもたらし、海洋環境中への排出を禁止することが正当化される有害液体物質;
Y類	海洋資源または人の健康に危険をもたらし、海洋環境中への排出を禁止することが正当化される有害液体物質;
Z類	海洋資源または人の健康に軽微な危険をもたらし、海洋環境中への排出を禁止することが正当化される有害液体物質;
その他 の物質 (OS)	海洋資源、人間の健康、快適性または海洋のその他の 適法な利用を損なうことはないと考えられるため、X類,Y 類またはZ類以外に分類されることが認められている物 質。

表	そ 有害液体物質分類ガイドライン						
rule	カラムA1 生物蓄積 性	カラムA2 生分解性	カラムB1 急性毒 性	カラムB2 慢性毒性	カラムD3 長期健康 影響	カラムE2 海洋野生 生物および底生生物 に対する影響	分 類
1			≧5				
2	≧4		4				
3		NR	4				X
4	≧4	NR			CMRTNI		
5			4				
6			3				
7			2				
8	≧4	NR		0でない			
9				≧1			Y
10						無機物質でない場合 FまたはS	
11					CMRTNI		
12	規則1から11および13のクライテリアに適合しない物質					Z	
13	A1欄が≦2であると判定される全ての物質、A2欄R,D3欄が空欄E2欄がFpおよび					os	

個品化学品輸送に係る分類

クラス1 火薬類(爆発性物質及び物品)

クラス2 高圧ガス

クラス3 引火性液体

クラス4 可燃性固体、自然発火性物質及び禁水性物質

クラス5 酸化性物質及び有機過酸化物

クラス6 毒物及び感染性病原物質

クラス7 放射性物質

クラス8 腐食性物質

クラス9 有害性物質(クラス1~8に該当しない物質)

GHSとは

世界的に統一されたルールに従って化学品を危険性や有害性ごとに分類し、その情報を一目で分かるような表示や安全データシートで提供しようとするものである。

物理化学的危険性の分類

- ①火薬類、②引火性/可燃性ガス、③引火性エアゾール、
- 4)酸化性ガス類、⑤高圧ガス、⑥引火性液体、⑦可燃性固体、
- ⑧自己反応性物質、⑨自然発火性液体、⑩自然発火性固体、
- 们自己発熱性物質、①水反応/禁水性物質、①酸化性液体、
- 仰酸化性固体、仍有機過酸化物、⑥金属腐食性物質

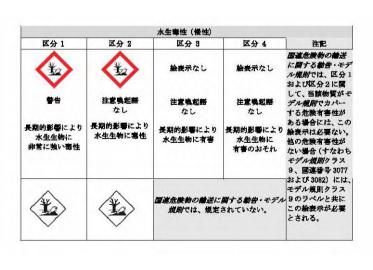
健康に対する有害性の分類

- ① 急性毒性
- ② 皮膚腐食性/刺激性
- ③ 眼に対する重篤な損傷性/眼刺激性
- ④ 呼吸器感作性または皮膚感作性
- ⑤ 生殖細胞変異原性
- ⑥ 発ガン性
- ⑦ 生殖毒性
- ⑧ 特定標的臟器/全身毒性(単回曝露)
- ⑨ 特定標的臟器/全身毒性(反復曝露)
- ⑩ 吸引性呼吸器有害性

		急性毒性:吸入		
区分 1	区分 2	区分 8	区分 4	区分 5
				シンボル なし
危険	危険	危険	警告	警告
吸入すると 生命に危険	吸入すると 生命に危険	吸入すると 有害	吸入すると 有害	吸入すると 有害のおそれ
	A		ル規則では規定さ	に関する動告・モ れていない
			は、絵表示下部角える。	基づくガスについ の番号 6 を 2 に量 の絵表示の色につ

急性区分	・魚類、甲殻 類、藻類への 急性毒性試 験結果	慢性区分	・魚類、甲殻類、藻類への 急性毒性試験結果・魚類、ミジンコ及び藻類へ の慢性毒性試験結果	•分解性	▪蓄積性
区 分 1	いずれかが ≦1mg/l	区 分 1	同左	易分解性でない	logPow≧4 但し BDF<500
区分2	いずれかが ≦10mg/l	区 分 2	同左 但し、慢性毒性試験結果が >1mg/lは除く	同上	同上
区 分 3	いずれかが ≦100mg/l	区 分 3	同左 但し、慢性毒性試験結果が >1mg/lは除く	同上	同上
区 水溶性が低く、水溶解度以 同上 logPow≥4 分 下で急性毒性の報告がな 4 い					

		水生毒性(急性)		4
区分 1	区分 2	区分 8	-	注配
*	絵表示なし	絵表示なし		国連危険物の輸送に 関する動告・モデル 規則では、区分1に 関して、当該物質が
警告	注意喚起語なし	注意喚起語 なし		モデル規則でカバー する危険有害性がある場合には、この絵 表示は必要ない。
水生生物に 非常に強い毒性	水生生物に 事性	水生生物に 有害		他の危険有害性がない場合(すなわちゃ デル規制クラス9、 関連番号3077および
(¥2)	国連危険物の輸送に 規則では、規定	関する 勧告・ モデル されていない。		3082) には、モデル 規則クラス9のラベ ルと共にこの絵表示 が必要とされる。

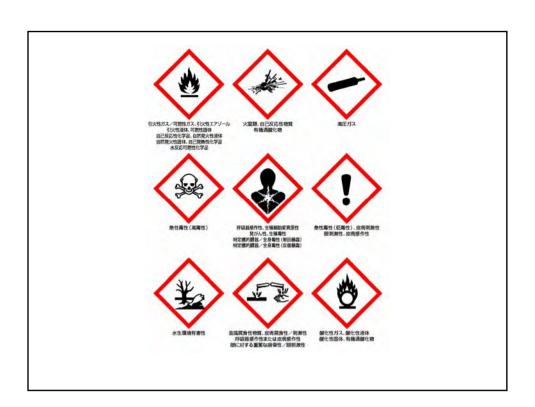


ラベル表示

GHSにおける表示の準備のための手順

- ① ラベル要素(シンボル、注意喚起後、危険有害性情報)の割り当て
- ② シンボルの記載(炎、円上の炎、爆弾の爆発、腐食性、ガスボンベ、どくろ、感嘆符、環境、健康有害性)
- ③ 危険有害性の絵表示(1つの頂点で正立させた正方形中に 記載)の記載、追加的な安全情報(例:危険有害性クラス)及 び様式を含む輸送の絵表示を規定
- ④ 注意喚起語(危険、警告)
- ⑤ 危険有害性情報
- ⑥ 注意書き及び絵表示
- ⑦ 製品及び供給者の特定
- ⑧ 複数の危険有害性及び危険有害性に関する情報の優先順 位
- ⑨ GHSラベル要素の配置方法
- (10) ラベルに関する特別な取り決め







化学物質と生態毒性について詳しく お知りになりたい方は こちらをご参照下さい。

参考図書:

「改訂版 化学物質と生態毒性」 若林 明子 著 丸善株式会社

輸送化学品の安全性評価に係る国連の取組 淑徳大学国際コミュニケーション学部 若林明子

1. はじめに

洗剤、農薬及びその他の工業製品など(以下化学品と略す)は、人々が快適な生活をおくる上で欠かせないものであるが、爆発性や引火性などの危険性や人の健康や生態系に悪影響を与えるものも多い。輸送に係わる人への危害、輸送機器(車両、船舶、航空機など)への損傷及び環境への悪影響を最小限に抑え、安全に輸送するためには、それらの化学品の危険性や有害性を正しく評価し、どのように管理すれば安全に輸送できるかを把握する必要がある。

現在、多くの国際機関で危険性や有害性の評価方法、輸送要件に関する国・地域における相互の調和に関する枠組み形成がなされてきている。

化学品の輸送には、容器に入れ包装した状態で輸送する個品輸送と、船舶の 船倉やタンクなどに直接積載して輸送するばら積み輸送の二通りがある。ばら 積み輸送はそのほとんどが船舶によるものである。道路叉は鉄道車両による輸 送は、国際輸送上では個品輸送とみなされている。なお、我が国の国内にあた っては、火薬類の分類の一部を除いては、独自の分類及び危険物評価を行って いる。

また、現在、安全輸送に関して新しいシステムの導入が図られている。化学品の分類および表示に関する世界調和システム(Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals: GHS)である。GHS は、輸送のみならず製造、貯蔵、消費、廃棄など有害化学品のライフサイクルの全てにおいてその分類(危険性評価)、表示などを世界的に調和しようとするものである。GHS の実施などに関する検討は、国連委員会を再編した危険物輸送・分類調査専門委員会の下部組織である分類調和専門小委員会で行なわれた。

本稿では、化学品を安全に輸送するためにこれらの製品や成分の有害性などをどのように評価しているかについて述べる。ばら積み輸送は事故時の被害が大きい可能性が高いため、個品に比較してより詳細な有害性評価がなされている。そこで、ばら積み輸送に関する評価について最初に述べた後に、個品輸送に関する評価や GHS について説明する。

2. GESAMP の有害性評価

2.1 マルポール条約と GESAMP の活動

GESAMP (Joint Group on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection of IMO /FAO /UNESCO /WHO /IAEA /UN /UNEP)は、有害化学物質等による海洋汚染を防止するための各分野の科学者による助言機関である。船舶で有害物質を輸送する場合には、付属書のガイドラインの分類に従って、輸送時の船の構造やタンクの洗浄液の取り扱い等が規制される。GESAMP は、船舶で輸送する主に有害液体物質の評価を行っている。

マルポール条約とは、船舶に起因する海洋汚染の防止のためにつくられた条約であり、GESAMPの活動の根拠となっている。船舶による海洋汚染の防止を目的に採択された「1954年の油による海水の汚濁の防止のための国際条約」は、1973年に海洋汚染防止の強化を図るために全面的に改正された「1973年の船舶からの汚染の防止のための国際条約」として採択された。この条約は石油に

よる汚染のみならず有害液体物質、汚水等も規制の対象とするなど船舶に起因する海洋汚染の防止についての包括的な規制を盛り込んでいた。1978年には、1973年条約の規制強化内容を強化するとともに、その早期実施を目的として採択された。この条約がいわゆるマルポール73/78条約であり、正式名を「1973年の船舶による汚染の防止のための国際条約に関する1978年の議定書」という。マルポール条約は本文及び五つの付属書から構成されている。我が国は1983年6月に加入し、同年10月から発行している。

船舶でこれらの有害物質を輸送する場合には、付属書のガイドラインの分類に従って、輸送時の船の構造やタンクの洗浄液の取り扱い等が規制される。ワーキンググループは、付属書IIの規定に基づいた汚染分類を国際間で適正に行うため、ばら積みの有害液体物質の評価を行っている。

2.2 評価の概要

船舶で運搬中の有害化学物質が海洋に排出された場合には、海にすむ生物が 重大な毒性影響を受ける可能性がある。さらに、自然環境の破壊のみならず、 気象や人類の生存環境にも影響が及ぶおそれもある。そのため、それらの汚染 を未然に防止することは重要である。一海域で生じた汚染は、長い時間には他 の海域にも広がることになる。また、貿易の拡大により、特定の国の沿岸海域 が外国船舶によって汚染されるおそれも増大してきている。

有害性の評価は、主として海に流出した際の水生生物に対する影響、輸送に係る人への健康影響及び漁業や沿岸の海岸施設の利用への影響の観点から以下の項目について行なわれている。

なお、評価に用いるデータは経済協力開発機構(OECD)テストガイドラインなど国際的に認知されている試験方法に従って出されたものが推奨されているランク付けについては、一括して表1に示した。

表 1 GESAMP の有害性評価手順における有害性のレーティング

	カラムA及びB 水生生物への影響								
	カラムA	:生物蓄積性及び	カラムB:水生	生生物への毒性					
レーテ	カラム A1 :	生物蓄積性	カラム A2 :	カラム B 1:	カラム B2 :				
ィング	A1a: log <i>P</i> ow	A2b : BCF	生分解性	急性毒性	慢性毒性				
				LC/EC ₅₀ (mg/l)	NOEC (mg/l)				
0	<1又は>ca.7	測定できない	<u>R</u> :易分解性	>1000	>1				
1	$\geq 1 - < 2$	≥ 1 -<10		>100-1000	>0.1−≦1				
2	≥ 2 -< 3	≥10-<100	<u>NR</u> :易分解性	>10-100	>0.01-≦0.1				
3	≥ 3 -> 4	≥100-<500	でない	> 1 - 10	>0.001−≦				
					0.01				
4	≥4-<5	≥500-<4000		>0.1-1	≦0.001				
5	≥ 5	≧4000		>0.01-0.1					

カラム C 及び D 健康影響(哺乳動物への毒性影響)						
レー	カラム	AC:ヒトの健康	康影響	カラム D :		
ティ				刺激性、腐食性及び長期健康影響		
ング	カラム C1:	カラム C2:	カラム C3:	カラム D1 :	カラム D2 :	カラム D 3:
	経口毒性	経皮毒性	吸入毒性	皮膚刺激性	眼刺激性お	長期健康影
	$\mathrm{LD}_{50}(\mathrm{mg/kg})$	LD ₅₀ (mg/kg)	LC ₅₀ (mg/l)	および腐食	よび腐食性	響
				性		
0	>2000	>2000	>20	刺激性でな	刺激性でな	C:発がん物質
				V	٧١	M:変異原物質
1	>300-	>1000-	>10-≦20	中程度刺激	中程度刺激	R:生殖毒物
	≦2000	≦2000		性	性	S:感作性物質
2	>50-	>200-	>2-≦10	刺激性	刺激性	A:吸入毒物
	≦300	≦1000				Γ:標的臟器全
3	>5-≦50	>50-	>0.5−≦2	3: 重度刺激性	重度刺激性	身毒性
		≦200		または腐食性		L:肺障害
				3A:腐食性		N:神経毒物
				(≦4時間)、		[:免疫毒物
				3B:腐食性		
				(≦1時間)、		
				3C:腐食性		
				(≦3分)		
4	≦5	≦50	≦0.5			

カラム E 海洋のその他の利用への障害						
カラム E1 : 着臭	カラム E2 : 野生生物	カラム E3:海岸の快適性阻害				
	および底生生物への	レーティ	説明	措置		
	物理的影響	ング				
NT: 着臭なし	<u>Fp</u> :残留性浮遊性物	0	阻害なし	警告なし		
T:着臭試験陽性	質	1	わずかに不愉	警告、ただし施設の閉鎖		
	$\underline{\mathbf{F}}$:浮遊性物質		快	はなし		
	<u>S</u> :沈降性物質	2	中程度の不愉	海浜閉鎖の可能性あり		
			快			
		3	極めて不愉快	海浜閉鎖		

2.3 カラムA:生物蓄積性と生分解性

生物蓄積性(A1)は、水環境中で水生生物、特に魚や貝が化学物質に曝露されたときの、生物への蓄積しやすさを示す指標である。A1a として物理的科学的係数であるオクタノール/水分配係数の対数 logPow、A1b として魚類や貝類を対象生物にして実測した BCF を評価に用いる。平衡状態での化学物質の生物中と水中の濃度の比を生物濃縮係数 (BCF)と呼ぶ。BCF の測定は生物を用いて試験するため時間と費用がかかるが、logPowによっても蓄積性のレベルは予測できることが分かっているため BCF が入手できない場合は評価に用いる。logPow と BCFの両方のデータが入手できるときは、後者を優先させる。

log Pow が 4 以上(同時に BCF が 500 以下のものは除く)、BCF が 500 以上のとき、その物質は濃縮性が高いと見なす。log Pow が 7 以上の物質は水に非常に溶けにくいため、高い蓄積性を示す可能性はないと思われる。同様に、分子量が1,000 以上の物質も水生生物に取り込まれにくいため蓄積されないとしている。しかし、ポリ塩化ビフェニル(PCB)やダイオキシン類では、 log Pow が 7 以上でも蓄積性があることがわかっているため、評価の際には化学物質のグループを考慮する必要がある。

無機化合物の蓄積性の評価に、logPow を用いることはもちろんできない。また、有機化合物でも界面活性剤や有機金属化合物の一部は試験により実際にBCFを求める必要がある。

 $\log P_{\mathrm{OW}}$ を求める方法としては OECD テストガイドライン (以下 TG と略す) 107 (フラスコ振とう法)、または 117 (高速液体クロマトグラフ法) などが推奨されている。BCF を求める方法としては TG305A から E を統合した 305 (生物濃縮:魚による流水試験) や、これらと同時の米国材料試験協会(ASTM)や、米国環境保護庁 (USEPA) の試験方法が推薦されている。

化学物質が環境に流出した際に分解するかどうかは、その物質を評価する際に非常に重要である。生分解性(A2)については、28 日間の生分解試験で下記の結果が得られた場合に「易分解性」とされる。

- 1) 溶存熊有機炭素(DOC)が70%以上分解。
- 2) 溶存酸素の減少あるいは二酸化炭素の発生が完全分解(理論値)の 60% 以上。
- 3) 生物化学的酸素要求量(BOD)/ 化学的酸素要求量(CODcr)が 0.5以上。
- 4) 他の説得力のある科学的な事実により 28 日以内に 70%以上が分解することが明らかな場合。

なお、生分解性は試験方法とそのとき得られた試験結果を示す必要がある。 試験方法としては、できれば海域環境での評価のための TG306(海水による生 分解性)を用いることが望ましい。しかし、TG301 (易分解性試験) の A (DOC ダイアウェイ試験)、B (CO2 発生試験)、C (修正 MITI 試験) DClosed Bottle 試験) E (修正 OECD スクリーニング試験)、及び F (Manometric Respirometry 試験) シリーズや ISO (International Organization for Standardization:国際 標準化機構) や ASTM の淡水試験も適用可能である。

2.4 カラム B: 水生生物への毒性

カラム B は B1 と B2の二つのサブカラムに分けられる。B1 は急性毒性を評価し、B2 は慢性毒性を評価する。前者は必ず要求されるが、後者は試験できる場合あるいはすることが適当と判断されたときに必要となる。

GESAMP で評価の対象となる化学物質の中には水に溶解しにくい物質が多い。そのような物質の場合には、まず、水溶解度を正確に測る必要がある。その後、水溶解度以下で試験を行い、毒性が現れないときは、毒性値は"溶解度(x mg/1)以上"と記し、毒性が現れた場合には詳細な試験を行う。

急性毒性のランクは今回の改定で、LC50 が 1,000mg/l以上から 0.01mg/l以下までに広がった。これは、船舶で多量に運搬する物質は、急性毒性が比較的弱くても評価が必要であり、一方、少量しか運搬しない物質については、毒性が強いときのみ問題となるからである。この項目の評価は付属書のIIばかりでなくIIIでも必要である。急性毒性データとしては、通常、96 時間魚類毒性試験での LC50、甲殻類に対する $48\sim96$ 時間毒性試験での LC50 または半数影響濃度 (EC50)、及び $70\sim96$ 時間藻類生長阻害試験での 50%生長阻害濃度(IC50)が用いられる。

複数の試験データが存在する場合には、環境保全を配慮しながらより適切な 試験結果を急性毒性の評価に用いる。

試験データは TG201 (藻類生長阻害試験)、203 (ミジンコ類急性遊泳阻害試験)、211 (オオミジンコ繁殖阻害試験) 及び 203 (魚類急性毒性試験) ならび にそれらと同等の ISO やASTM の試験方法で得られたものを用いて表に示した ランク付けを行う。

また、慢性試験は化学物質の水生生物への長期曝露の毒性影響を意味し、急性毒性とは独立のものと考え、急性毒性結果から外挿はしない。急性慢性毒性比は、多くの麻酔作用物質では10以下であると報告されているが、反応性物質や農薬などではより大きな値となることがあるからである。

慢性毒性試験結果は、次のような物質の有害性を評価する際に重要である。

- 1) 難溶性であるため、飽和溶液中で毒性が表れないなどにより急性毒性を 正確に求めることが困難である。
- 2) 成長、発達あるいは繁殖に影響が出るなど、特定の慢性毒性が疑われる。
- 3) 特殊な生理活性を持つ農薬など。
- 4) 生分解性が低く、蓄積性が高いことが分かっている。

慢性毒性試験に用いる試験生物種は、通常、急性毒性が高いものを選ぶ。

慢性毒性データを求めるための適当な試験としては、TG211 (オオミジンコ繁殖阻害試験)、210 (魚類初期生活段階毒性試験) がある。試験のエンドポイントとしては無影響濃度 (NOEC) を用いる。

なお、評価データとしては海水産生物によるものが望ましい。

2.5 カラム C: ヒトへの急性毒性(経口、皮膚への接触及び吸入)

ヒトの健康への短期的な影響として、汚染された水の摂取、皮膚への接触及び 吸入による毒性を評価するカラムである。有害性のランク付けを行う際に用い る数値としては、試験動物への毒性がヒトへの毒性と明らかに異なるという証 拠がある場合以外は、感受性の高い試験結果を採用する。

経口毒性の評価には、TG420 (急性経口毒性―固定用量法)、423、425 などの投与後 14 日間観察を行う標準的な試験から求めた LD50 を用いる。

経皮毒性はウサギに 24 時間曝露後 14 日間観察する TG402 により求めた試験結果が望ましい。

吸入毒性は、ラットに 4 時間吸入後 14 日間観察する TG403 により求めた試験データが望ましい。

2.6 カラム D:刺激性、腐食性及び長期的な健康影響

刺激性や腐食性は皮膚に対するものと眼に対するものに分けて評価する。また、このカラムでヒトの健康への長期影響も評価する。

カラム D1 における皮膚への刺激性が3とは、局部の皮膚の損傷を伴うはっきりと分かる紅斑がでた場合で、腐食性が3とは皮膚の深い部分までの壊死が生じた場合である。曝露時間が短い場合は時間によって3ランクに分けられる。

カラム D2 における眼への刺激性のランクが 3 とは、結膜浮腫や不可逆的な角膜損傷を伴う高い刺激性のことを示す。

カラム D3 のヒトへの長期的な健康影響は、慢性的な曝露による発ガンなどの 影響や呼吸器など特別な器官や組織への毒性を記述するカラムである。

2.7 カラム E: 海の多様な利用への影響

このカラムは、海上輸送の際の液体物質の積み卸しの排出や事故による漏出の 影響について評価する。海の多様な利用への影響としてここでは主に物理化学 的な影響をとりあげる。例えば、水に溶けにくく、かつ、浮上して水面を覆う 物質や沈降して海底を覆う物質は、漁業、沿岸の海岸施設の使用や野生生物に 大きな影響を与える。

E1 カラムは漁業への影響の中で着臭を評価するカラムである。船舶で運搬する化学物質の中には、クレゾール、クレオソート、クロロトルエン、クロロフェノール、メチルベンゼンなど多くの着臭物質がある。着臭の有無は、化学物質に曝露した魚を調理し、モニターに試食させることによって判断する。

カラム E2 は野生生物などへの不溶性の浮遊性物質や沈降性物質の影響を評価するカラムである。F は浮遊性物質を、Fp は持続する油膜を形成する浮遊性物質を、S は短時間で水に溶けず沈降して海底を覆う物質を示す。なお、液体では溶解度 1%未満を、固体では 10%未満を溶けないと見なす。

E3は沿岸の海岸施設への傷害を評価するカラムである。ヒトへの急性毒性が強い可能性がある、皮膚や眼への刺激性・腐食性の強い、ヒトへの発ガン性、変異原性や繁殖毒性のある物質などが流出した場合は警告が出され、海岸施設が閉鎖されることになる。

2.8 有害性液体物質の GESAMP での汚染分類

タンクの浄化作業またはバラスト水の排出作業により海洋に排出された場合 の有害液体物質は評価結果を下に下記の4グループに分類される。(表2)

- X: 海洋資源または人の健康に重大な危険をもたらし、海洋環境中への排出を禁止することが正当化される有害液体物質
- Y: 海洋資源または人の健康に危険をもたらし、海洋環境中への排出を禁止する ことが正当化される有害液体物質
- Z: 海洋資源または人の健康に軽微な危険をもたらし、海洋環境中への排出を禁止することが正当化される有害液体物質
- OS: 海洋資源、人間の健康、快適性または海洋のその他の適法な利用を損なうことはないと考えられるため、X 類, Y 類または Z 類以外に分類されることが認められている物質

同時に、有害物質を運搬するタンカーの構造なども評価結果に基づいて決められる。

表 2 有害液体物質分類ガイドライン

rule	カラム A1	カラム A2	カラム B1	カラム B2	カラム D3	カラム E2	分類
	生物蓄積	生分解性	急性毒性	慢性毒性	長期健康	海洋野生生	
	性				影響	物および底	
						生生物に対	
						する影響	
1			≧5				
2	≧4		4				
3		NR	4				X
4	≧4	NR			CMRTNI		
5			4				
6			3				
7			2				
8	≧4	NR		0 でない			
9				≧1			
10						無機物質で	Y
						ない場合 F	
						またはS	
11					CMRTNI		
12	規則 1 から 11 および 13 のクライテリアに適合しない物質						${f Z}$
13	A1 欄が≦2 であると判定される全ての物質、A2 欄 R,D3 欄が空欄 E2 欄が Fp						
	および S (有機物でない場合) でない、および GESAMP ハザードプロファイ						os
	ルのその他全ての欄が 0 (ゼロ)						

3 危険物輸送専門委員会における危険性・有害性評価

個品輸送に関する評価は、国連危険物輸送勧告(Orange Book)に従って行い、 化学品を 9 つのクラスに分類している。現在、この分類は、陸海空に関する国 際輸送においては共通する分類となっている。

勧告における分類は以下の通りである。

- ・クラス1 火薬類(爆発性物質及び物品) mass explosion hazard を持つ非常に危険なものから非常に不活性な物質ま での6区分
- ・クラス 2 高圧ガス 引火性、非引火性で無毒及び有毒高圧ガスの 3 区分
- ・クラス3 引火性液体
- ・クラス4 可燃性固体、自然発火性物質及び禁水性物質 可燃性固体・自己反応性物質・固体減感性火薬、自己発火性物質及び水に接 して引火性ガスを発生する物質の3区分
- ・クラス5 酸化性物質及び有機過酸化物
- ・クラス6 毒物及び感染性病原物質

有毒な物質とは飲み込み、吸引あるいは皮膚への接触によって死亡叉は重大な影響を受ける物質で、経口、皮膚及び吸引毒性試験結果から3つの区分に分ける。ちなみに、経口毒性ではLD50値が5.0mg/kg以下が区分1、50mg/kg以下が区分2、300mg/kgが区分3とされている。

感染性病原物質とは病原体を持つことが知られている物質である。

- ・クラス7 放射性物質
- ・クラス8 腐食性物質
- ・クラス9 有害性物質(クラス1~8に該当しない物質)

このクラスには、以下の物質が含まれる。他のクラスではカバー出来ない環境に有害な物質で、水生生物に対する有害性によって区分する。急性区分1は魚、甲殻類又は藻類への急性毒性値が1mg/1以下の物質である。慢性毒性区分1は急性毒性区分1で易分解性でなく及び/又は1ogPowが4以上と蓄積性が高い(BCF<500は除く)、区分2は急性毒性値が10mg/1以下で易分解性でなく及び/又は1ogPowが4以上と蓄積性が高い(BCF<500は除く)物質である。更に、発熱性物質もこのクラスに含まれる。

個品として輸送される比較的輸送頻度の高い危険性や有害性の高い化学品は 勧告の中にリストアップされている。

危険物とされた化学品に関しては安全に輸送するため、その分類、危険の程度、輸送手段、輸送区間、地域などに応じた輸送要件を策定する必要がある。主な安全輸送要件には次の項目が含まれる。①容器包装、②表示、標札など、③輸送書類、④輸送中の取り扱い、⑤輸送機器の構造・設備。

4 GHS における評価

4.1 目的

GHS とは、世界的に統一されたルールに従って化学品を危険性や有害性ごとに分類し、その情報を一目で分かるような表示や安全データシートで提供しようとするものである。日本を含め各国は、国連勧告を受けて、今後、化学品の分類や表示を適切に行っていくよう努力することが求められている。

以下の 2 項目について世界的に調和することにより、化学品の危険性や有害性が各国の機関や国民に理解されやすくなり、各地域の状況に応じた適切な対策を実施することが出来、結果として人の健康と環境の保護が強化されることになる等の効果が期待できる。また、化学品の国際貿易が広く行われているが、安全や使用、輸送及び廃棄を確実に行うことが出来る。

- 1) 化学物質及び混合物を、物理化学的危険性、健康に対する有害性及び環境に対する有害性の各項目について、その危険性や有害性の強さに応じた区分のいずれかに分類するかを判定するための基準を調和させる。
- 2) 絵表示等のラベル表示(図 1) や安全データシート(SDS) による危険性 や有害性に関する情報伝達に関する事項を調和させる。物質の危険有害性の強 さに応じて、注意喚起語、危険性や有害性情報や注意書きを統一する。



図1 GHSで使用すべき有害性の標準シンボル

4.2 分類

分類は、原則として、天然、人工の別を問わず、化学元素、化合物及びそれらの混合物に固有な性質に由来する危険性や有害性に基づいて行う。ここで、混合物とは、複数の物質で構成される反応を起こさない混合物または溶液を言い、区分の分類では 1%以上含む物質について考慮する。

検討の段階で以下の3つの原則が確認されている。

1) GHS は全ての危険・有害な化学品に適用される。ラベルなどの適用方法は、製品の種類やライフサイクルの段階によって異なってもよい。対象者は、

消費者、現場労働者、輸送担当者及び緊急時対応職員が含まれる。

- 2) 区分のためには、国際的に認められた科学的原則に従って実施される試験を利用できるため、統一的な試験方法の開発や新たな追加試験は必要ない。
 - 3) 試験結果だけでなく、疫学データや臨床試験結果も考慮されるべきである。

4.2.1 物理化学的危険性の分類

分類項目としては以下の 16 項目がある。各項目について当該化学品が該当するかどうか、その危険性がどの程度であるかを判断し、ラベル表示に記載すると同時に安全データシート (SDS) に記載する。

① 火薬類、②引火性/可燃性ガス、③引火性エアゾール、④酸化性ガス類、⑤ 高圧ガス、⑥引火性液体、⑦可燃性固体、⑧自己反応性物質、⑨自然発火性液 体、⑩自然発火性固体、⑪自己発熱性物質、⑫水反応/禁水性物質、⑬酸化性液 体、⑭酸化性固体、⑮有機過酸化物、⑯金属腐食性物質

4.2.2 健康に対する有害性の分類

① 急性毒性

急性毒性は、物質の経口又は経皮からの単回投与、あるいは 24 時間以内の複数投与ないしは 4 時間の吸入曝露によって起こる有害な影響をいう。何らかの急性毒性が予想される場合には、その推定値(ATE)により 5 つの区分に分類される。区分 1、2 及び 3 は危険のラベルが、 4 と 5 は警告とラベルが付される。ちなみに、経口毒性値は区分 1 が 5、同 2 が 50、同 3 が 300、同 4 が 2000、同 5 が 5000mg/kg 以下とされている。

② 皮膚腐食性/刺激性

皮膚腐食性とは皮膚に対する不可逆的な損傷を生じさせることで、試験物質の4時間以内の曝露で、表皮を貫通して真皮にいたる明らかな壊死である。皮膚刺激性とは、試験物質の4時間以内の曝露で、皮膚に対する可逆的な損傷を生じさせることである。腐食性がある場合には腐食性物質として区分1に分類され、危険がラベル表示される。強い刺激性がある場合には区分2に弱い刺激性がある場合には区分3に分類され、警告がラベル表示される。

③ 眼に対する重篤な損傷性/眼刺激性

重篤な損傷性は、眼の表面に試験物質を付着させることによる眼の組織損傷の生成、あるいは重篤な視力低下で、付着後 21 日以内に完全に治癒しないものをいう。刺激性は、同じ試験で生じる眼の変化で、付着後 21 日以内に完全に治癒するものをいう。重篤な損傷を与える物質は区分 1 に分類され、危険がラベル表示される。刺激性のある物質は区分 2 に分類され、警告がラベル表示される。

④ 呼吸器感作性または皮膚感作性

呼吸器感作性物質とは、物質の吸入後気道過敏性を誘発する物質で、皮膚感作性物質とは、皮膚が物質との接触でアレルギー反応を誘発する物質である。 呼吸器感作性とされた物質は区分1に分類され危険がラベル表示される。また、 皮膚感作性とされた物質は同じく区分1に分類され警告がラベル表示される。

⑤ 生殖細胞変異原性

生殖細胞変異原性物質は主にヒトでの次世代に受け継がれる可能性のある変異原性を誘発すると思われる物質である。一方、in vitro での変異原性/遺伝毒性、および in vivo での哺乳類体細胞を用いた試験も、この有害性クラスの中で

分類する際に考慮される。生殖細胞変異原性物質とされた場合には区分 1 に分類され、危険がラベル表示される。生殖細胞変異原性物質の疑いがある場合には区分 2 に分類され警告がラベルされる。

⑥ 発ガン性

発がん性物質とは、がんを誘発するか、またはその発生率を増加させる化学物質を意味する。動物を用いて適切に実施された実験研究で良性および悪性腫瘍を誘発した物質もまた、腫瘍形成のメカニズムが人には関係しないとする強力な証拠がない限りは、人に対する発がん性物質として推定されるかまたはその疑いがあると考えられる。人に対する発がん性が知られているあるいはおそらく発がん性がある場合には区分1に分類され、危険がラベル表示される。人に対する発がん性が疑われる場合には区分2に分類され警告がラベルされる。

⑦ 生殖毒性

生殖毒性には、雌雄の成体の生殖機能および受精能力に対する悪影響に加えて、子の発生毒性も含まれる。遺伝子要因に基づく子への遺伝的影響の誘発については、⑤の生殖細胞変異原性で分類する。人に対する生殖毒性が知られているあるいはあると考えられる物質の場合には区分 1 に分類され、危険がラベル表示される。人に対する生殖毒性が疑われる場合には区分 2 に分類され警告がラベルされる。

⑧ 特定標的臟器/全身毒性(単回曝露)

単回曝露で起こる特異的な非致死性の特定標的臓器/全身毒性を生ずる物質を分類する方法を規定する。可逆的と不可逆的、あるいは急性および遅発性で、かつ、①から⑦で明確に扱われていない特定標的臓器や全身の機能を損ないうるすべての重大な単回曝露による健康への影響がこれに含まれる。人に重大な毒性を示した物質、または実験動物での試験に基づき単回曝露によって人に重大な毒性を示す可能性があると考えられる物質の場合には区分1に分類され、危険がラベル表示される。動物実験で人の健康に有害影響を与える可能性があると考えられる物質の場合には区分2に分類され警告がラベルされる。単回暴露によって麻酔作用または気道刺激性を与える可能性がある場合には区分3分類され警告がラベルされる。

⑨ 特定標的臟器/全身毒性(反復曝露)

反復曝露によって起こる®で記載した内容の影響を生じる物質をその程度に 応じて、単回曝露と同様に区分1と区分2に分類し表示する。

⑩ 吸引性呼吸器有害性

人に吸引性呼吸器有害性をもつ物質を分類する。ある種の炭化水素、テレビン油およびパイン油のように、人に関する信頼でき、有効な証拠か、実際の経験があるか、または、40℃で測定した場合の動粘性率が20.5 mm2/s 以下の炭化水素の場合には区分1に分類され危険がラベルされる。動物実験、ならびに専門家の判定に基づき懸念される証拠はあり、かつ40℃で測定した場合の動粘性率が14 mm2/s以下の物質の場合には区分2に分類され警告がラベルされる。

4.2.3 水生環境有害性

GHSにおいて用いられる基本的要素は、水生生物への急性毒性、生物蓄積性、生物的または非生物的分解性および水生生物への慢性毒性である。本クラスの区分は、表3に示したように3つの急性毒性分類区分と4つの慢性毒性分類

区分で構成されている。急性毒性および慢性毒性の分類区分は独立して適用される。急性毒性区分1~3 に分類するための判定基準は、急性毒性試験データのみに基づいて定義される。慢性毒性区分に分類するための判定基準は、毒性データと環境運命データを組み合わせて求める。

表3 GHSの水生環境有害性物質の分類スキーム

急性 区分	・魚類、甲殻類、藻類 への急性毒性試験結 果	慢性 区分	・魚類、甲殻類、藻類 への急性毒性試験結果 ・魚類、ミジンコ及び 藻類への慢性毒性試験 結果	・分解性	• 蓄積性
区分1	いずれかが≦1 mg/l	区分1	同左	易分解性でな い	logPow≧4 但しBDF<500
区分2	いずれかが≦10mg/l	区分2	同左 但し、慢性毒性試験結 果が>1 mg/l は除く	同上	同上
区分3	เงร้ากว่าภั≦100mg/l	区分3	同左 但し、慢性毒性試験結 果が>1 mg/l は除く	同上	同上
		区分 4 ^{注 1}	水溶性が低く、水溶解 度以下で急性毒性の報 告がない	同上	logPow≥4

^{注1} BCF<1、慢性毒性試験結果が>1 mg/l、易分解性である場合には分類されない

上記の区分分類に用いられる試験データは以下の通りである。

急性毒性試験データは通常、魚類の96 時間LC50 (TG203 またはこれに相当する試験)、甲殻類の48 時間EC50 (TG202 またはこれに相当する試験)または藻類の72 時間もしくは96 時間EC50 (TG201 またはこれに相当する試験)により決定される。これらの3種の生物種を用いることにより全ての水生生物を代表するとみなしているが、例えばLemna (アオウキクサ)等その他の生物種に関するデータも、試験方法が適切なものであれば、考慮されることもある。

生物蓄積性は通常、TG107 または117 により求められオクタノール/水分配係数 (log Pow) を用いる。この値が生物蓄積性の潜在的な可能性を示しているのに対して、実験的に求められた生物濃縮係数 (BCF) はより適切な尺度を与えるものであり、入手できればBCF の方を採用する。BCF はTG305 により求める。 環境中での分解は生物的分解と非生物的分解 (例えば加水分解) とがある。 具

環境中での分解は生物的分解と非生物的分解(例えば加水分解)とがある。易生分解性はTG301(A-F)にあるOECD の生分解性試験で急速分解性とされるレベルは、ほとんどの環境中での急速分解性の指標とみなすことができる。これらは淡水系での試験であるが、海水を用いるTG306 による試験結果も採用できる。こうしたデータがない場合には、BOD(5 日間)/COD 比が0.5 より大きいことで判断する。加水分解などの非生物的分解も易分解性を判定する際に考慮できる。

慢性毒性試験データとしては、TG210 (魚類初期生活段階毒性試験) または211 (オオミジンコ繁殖阻害試験) および201 (藻類生長阻害試験) によって得られたデータは採用できる。その他、有効性が確認され、国際的に容認された試験

も採用できる。無影響濃度NOECまたは相当するx%致死(影響)濃度L(E)Cx を採用する。

混合物の評価の場合には濃度1%(w/w)以上存在する成分を用いる。しかし、 1%未満でも水生生物への毒性が高いなど分類に影響を与えることが予想される 成分は評価に用いる。

ラベルには、急性区分1、慢性区分1及び2について、シンボルマーク魚と枯れ木を、注意喚起語としては前2者に警告を記す。

5 ラベル表示

GHSの目的の1つに物質の危険性や有害性に応じて注意喚起後、危険有害性や 注意書きを統一して示すことにある。(図2)

GHSにおける表示の準備のための手順は以下の通りである。

- ① ラベル要素 (シンボル、注意喚起後、危険有害性情報) の割り当て
- ② シンボルの記載(炎、円上の炎、爆弾の爆発、腐食性、ガスボンベ、どく ろ、感嘆符、環境、健康有害性)
- ③ 危険有害性の絵表示(1つの頂点で正立させた正方形中に記載)の記載、 追加的な安全情報(例:危険有害性クラス)及び様式を含む輸送の絵表示 を規定
- ④ 注意喚起語(危険、警告)
- ⑤ 危険有害性情報(各危険有害性クラス及び区分の判定基準に割り当てられた文言で、当該製品の性質と該当する場合にはその程度を示す)
- ⑥ 注意書き及び絵表示(当該製品による被害を防止し、または最小にするための推奨措置の文言あるいは絵表示)
- ⑦ 製品及び供給者の特定
- ⑧ 複数の危険有害性及び危険有害性に関する情報の優先順位(例:どくろを 適用する場合には感嘆符を使用しない)
- ⑨ GHSラベル要素の配置方法(全ての危険有害性情報をラベル上に一緒に配置)
- ⑩ ラベルに関する特別な取り決め



図2 ラベル表示例

参考文献

- 1) GESAMP: The Revised GESAMP Hazard Evaluation Procedure for Chemical Substances Carried by Ships (2002)
- 2) UN: Recommendations on the Transport of Dangerous Goods (2005)
- 3) 環境省ホームページ: http://www.env.go.jp/
- 4) 若林明子: 化学物質と生態毒性、丸善(2004)

【第2部】生態毒性試験法に関する技術的事項

化学物質審査規制法に基づく藻類生長阻害試験法の改正内容について

平成19年1月19日 環境省環境保健部化学物質審査室 独立行政法人 国立環境研究所環境リスク研究センター

1. 概要

化学物質審査規制法(化審法)に基づく新規化学物質の生態毒性に係る試験法は、経済協力開発機構(OECD)で定められた試験法ガイドラインを踏まえ、3省合同審議会¹における検討結果に基づき、「新規化学物質等に係る試験の方法について」²(以下「試験法通知」という。)をもって示しているところである。

平成15年11月21日付け試験法通知で示された藻類生長阻害試験法 3 (以下「化審法TG」という。)は、平成15年の化審法改正当時の最新情報であった、OECD テストガイドライン201 4 (以下「TG201」という。)の改訂案(平成14年6月版)を基に作成されたものである。

その後 OECD において TG201 改訂の作業が進められた結果、平成16年11月の化学品合同会合において改訂内容について加盟国の同意が得られ、平成18年3月23日付けで理事会承認され、平成18年7月5日付けで改訂版 TG201 が発行された。OECD テストガイドラインは、OECD 条約に基づく理事会決定であり、条約の加盟国は同ガイドラインに沿った対応が求められるため、今後は改訂版 TG201 に従った試験法が国際的なスタンダードとなっていくこととなる。この改訂版 TG201 と現行の化審法 TG を比較すると一部内容の相違があるため、今回改訂を踏まえ化審法 TG を適宜修正した試験法(別添2、以下「改正化審法 TG」という。)をとりまとめ、平成18年11月20日付けで通知・施行した。

また、改正化審法 TG を踏まえて、国立環境研究所環境リスク研究センターで公表している「藻類、ミジンコ及び魚類の急性毒性に対する試験手順例」(平成15年11月版)を改正した。(別添4)

なお、その修正内容のうち最も大きなポイントである半数影響濃度(EC50)の算出方法の変更(「面積法」の廃止)に応じて、平成18年7月21日付けで第三種監視化学物質の判定基準についても見直しが行われている(別添5参照)。

¹ 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及び中央環境審議会環境保健部会化学物質小委員会

² 厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長及び環境省総合環境政策局長通知(平成 15年11月21日薬食発第1121002号、平成15・11・13製局第2号、環保企発第031121002号)

³ 試験法通知の別添「IV 藻類生長阻害試験」

⁴ OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS PROPOSAL FOR UPDATING GUIDELINE 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test。なお、TG201 自体は 1984 年制定。

2. 検討経過

平成18年 7月 5日 OECD 藻類生長阻害試験法(TG201) 改訂版発行

平成18年 7月21日 3省合同審議会において藻類生長阻害試験法(化審法 TG)の改正 案取りまとめ

第三種監視化学物質に係る判定基準改正

平成18年 9月 8日 化審法 TG 改正案に関する意見募集 (パブリックコメント) 実施 ~10月10日

平成18年10月27日 3省合同審議会においてパブリックコメント実施結果を踏まえた 化審法 TG 改正案の一部修正案取りまとめ

平成18年11月20日 改正化審法TGを通知・施行

3. 改正目的及び改正内容

化審法 TG の改正は、改訂版 TG201 を踏まえ、以下の目的で行われた。

- (1) 改訂版 TG201 において、毒性の強さの指標である EC50 の算出方法中の「面積法」が 廃止されたこと(別添1)を踏まえ、化審法 TG においても「面積法」を廃止するこ ととし、関連の記述を削除すること。
- (2) 藻類の学名の変更に伴う記述の変更等、改訂版 TG201 においてなされた変更に対応して、化審法 TG において記載の変更を行うこと。
- (3) その他、記述の明確化等、必要な変更を行うこと。

改正後の藻類生長阻害試験法を別添2に示す。また、化審法 TG 及び改訂版 TG201 の比較を 別添3に示す。改正化審法 TG は、パブリックコメントによる意見募集の結果を踏まえ、平成 18年11月20日付けで通知・施行された。なお、経過措置として平成18年11月20日 に既に開始されている試験については、改正前の化審法 TG によることができるとされた。

また、改正化審法 TG を踏まえて、国立環境研究所環境リスク研究センターで公表している「藻類、ミジンコ及び魚類の急性毒性に対する試験手順例」(平成15年11月版)中の「(試験手順例) 藻類生長阻害試験」を別添4のとおり改正した。

4. その他

化審法 TG の改正の検討において、藻類生長阻害試験法における半数影響濃度(EC50)の算出方法の変更(「面積法」の廃止)に合わせ、「速度法」に基づく EC50 と最大無影響濃度(NOEC)の関係を踏まえて、第三種監視化学物質への該当性に係る判断基準のうち藻類生長阻害試験の結果の取扱いについても検討が行われた。その結果、平成18年7月21日付けで第三種監視化学物質の判定基準について見直しが行われている(別添5参照)。

(別添1)

OECD テストガイドライン 201 (藻類生長阻害試験) における 面積法と速度法について

1. 藻類生長阻害試験の毒性値の算出方法について

1984年に採択された OECD テストガイドライン 201 (1984年6月7日採択、以下「TG201」という。)では、化学物質濃度と藻類の生長に対する影響との関係を決定するため、面積法と速度法の2つの方法を規定していた。

藻類生長阻害試験では、指数増殖期の藻類で試験を行うことから、その生長は指数増殖 モデルで近似できる.

$$dN/dt = \mu N \tag{式 1}$$

(1) 面積法(areas under the growth curves)

面積法は図 1 に示す生長曲線下の面積(A) から毒性値を算出する方法である。面積(A)は式 2、各試験濃度区における生長阻害率 I_A は式 3 から算出される。

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \dots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1}) \quad (\vec{x} \ 2)$$

$$I_A = \frac{A_C - A_t}{A_C} \times 100 \quad (\vec{x} \ 3)$$

Ni: t_i時の実測細胞濃度; t_i: 時間(日); I_A: 面積法で求めた生長阻害率

Ac: 対照区の生長曲線下の面積; At: 各試験濃度区における生長曲線下の面積

(2) 速度法(growth rates)

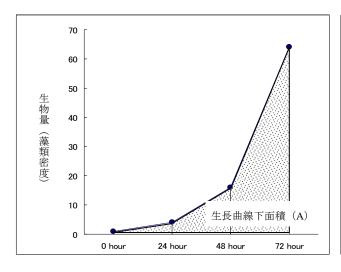
速度法は図 2 に示す生長曲線の傾き(μ)から毒性値を算出する方法である。傾き(μ)は式 4、各試験濃度区における生長阻害率 I_{μ} は式 5 から算出される。

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln N_j - \ln N_i}{t_j - t_i} \qquad (\not \exists \downarrow 4)$$

$$I_{\mu} = \frac{\mu_C - \mu_t}{\mu_C} \times 100 \qquad (\text{$\not\equiv$} 5)$$

I..: 速度法で求めた生長阻害率

μc: 対照区の生長速度; μt: 各試験濃度区における生長速度



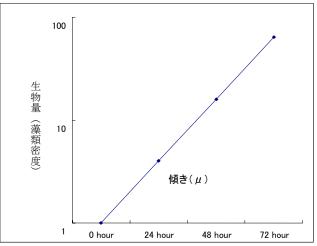


図1 生長曲線①

図2 生長曲線② (縦軸は対数)

2. 面積法と速度法の比較

速度法は、指数増殖モデル(式 1)に直接対応する生長曲線の傾き μ (式 4)から生長阻害率を求めるものであり、面積法では生長曲線下の面積 A(式 2)から生長阻害率を求めるものである。当初、速度法に比べ面積法の方が物質の性状、試験条件等によらず安定的な影響濃度が得られると認識されていた。

しかし、面積法は指数増殖モデルとは数学的に関係のない生長曲線下の面積 A (式 2) から生長阻害率を求めるものであり、毒性値が試験期間、対照区の生長速度の大小および阻害率ー濃度の回帰式の傾きの大小に依存するなどの問題があることが明らかとなった。

そのため、OECDでは平成 16 年 5 月のナショナルコーディネーター会合において、指数 関数的に増殖する生物に対する毒性評価のための反応変数としては生長速度が科学的に妥当であることから速度法を採用し、面積法は採用しないとする考え方を盛り込んだ藻類生長阻害試験に係る改訂ドラフトについて議論のうえ合意がなされ、さらに同年 11 月には同案が化学品合同会合で合意された。これを踏まえ、平成 18 年 7 月に面積法の廃止を含む改訂 TG201 が発行された。

なお、面積法より得られる毒性値は、速度法から求めたものより小さい値を示す傾向が ある。

IV 藻類生長阻害試験

目的

本試験は、指数増殖期の藻類を被験物質に暴露し、対照区に対する生長阻害率を測定することにより、藻類の生長に対する被験物質の毒性を明らかにすることを目的とする。なお、本試験において生長とは暴露期間中の生物量の増加をいう。

1 供試生物

Pseudokirchneriella subcapitata (旧名 Selenastrum capricornutum) が推奨されるが、 Desmodesmus subspicatus (旧名 Scenedesmus subspicatus) など、他の種を用いてもよい。 なお、これらの2種以外の種を使用する場合には、暴露期間中、指数増殖期が維持されることが 確認されていなければならない。

2 試験容器及び機器

本試験では次に示す試験容器及び機器を用いる。

2-1 試験容器

試験容器等、試験溶液と接触する器具はすべてガラス製又は化学的に不活性な材質でできたものを用いる。試験容器は、空気に接する面が十分確保できるものを用いる。例えば、100mLの容量の試験溶液には250mLの三角フラスコが適している。

被験物質が揮散しやすい物質の場合は、密栓付フラスコを使用するなど適切な対応を行う。

2-2 培養装置

培養は、温度、照明条件を一定に維持できる培養器又は培養室において行う。

2-3 生物量計測装置

生物量の計測は、例えば、粒子計数装置、顕微鏡下での血球計算盤の使用、蛍光光度計、 分光光度計又は比色計を用いて行う。なお、分光光度計を使用して低濃度の細胞濃度を測定す る場合は、少なくとも 4 cmの光路長のセルを使用する。

3 培地

次の組成の培地又はこれと同程度の組成の培地が推奨される。

- 塩化アンモニウム 15 mg/L
- 塩化マグネシウム六水和物 12 mg/L
- ・ 塩化カルシウム二水和物 18 mg/L
- ・ 硫酸マグネシウム七水和物 15 mg/L
- リン酸二水素カリウム 1.6 mg/L
- · 塩化鉄 (Ⅲ) 六水和物 0.064 mg/L
- ・ エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 0.1 mg/L
- · ホウ酸 0.185 mg/L

- ・ 塩化マンガン四水和物 0.415 mg/L
- · 塩化亜鉛 0.003 mg/L
- ・ 塩化コバルト六水和物 0.0015 mg/L
- · 塩化銅二水和物 0.00001 mg/L
- ・ モリブデン酸二ナトリウム二水和物 0.007 mg/L
- 炭酸水素ナトリウム 50 mg/L
 この培地は大気との平衡状態で pH は 8.1 となる。

4 前培養

藻類を試験条件にじゅん化させ、試験に用いる指数増殖期の藻類を得るため、暴露開始前に2 ~4日間、試験と同条件で前培養を行う。前培養液に接種する藻類の生物量を調整し、暴露開始時に指数増殖期になるようにする。

5 試験溶液

各濃度の試験溶液の調製は、必要量の被験物質を培地で直接溶解するか、あるいは、 適切な濃度の被験物質の原液を調製し、原液を培地で希釈することにより行う。この他、 試験溶液の調製に関しては、Ⅲ 総則の2 試験溶液の調製によるものとする。

6 試験条件

6-1 暴露期間

原則として72時間とする。

6-2 初期生物量

試験での初期生物量は、藻類が暴露期間中指数関数的な増殖を維持できるように十分低くする。乾燥重量が 0.5mg/L を超えないように設定する。例えば、Pseudokirchneriella subcapitata では $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ cells/mL、Desmodesmus subspicatus では $2 \sim 5 \times 10^3$ cells/mL とすることが推奨される。他の種を使う時は乾燥重量で同程度となるようにする。

6-3 試験濃度

少なくとも 5 濃度区を等比級数的にとる。この濃度範囲で、 $0 \sim 75\%$ の生長阻害を起こす範囲が含まれることが望ましい。なお、100 mg/L 以上の濃度で試験を行う必要はない。別に対照区をおく。やむを得ず助剤を使用した場合は、対照区に加え助剤対照区を設ける。

6-4 連数(繰り返し)

各試験濃度区について3連とする。対照区については6連(助剤対照区を設けている場合には、対照区については3連、助剤対照区については6連)で試験を実施することが望ましい。

6-5 培養方法

- ・ 温度 21~24℃の範囲内で設定し、培養器又は培養室内の変動は±2℃以内とする。
- ・ 照明 60-120µE/m²/s(白色又は昼光色の蛍光灯を用い、連続的かつ均一に照射する。)
- ・ 培養方法 振とう培養(被験物質が揮発性でない場合は、試験容器は通気性のよい蓋を

用いる。暴露期間中、藻類は懸濁状態にしておく必要がある。)

7 被験物質への暴露の開始

各試験容器に、6-2に基づき設定した生物量になるように前培養した藻類を接種して暴露を開始する。

8 生物量の測定

各試験容器の生物量は、少なくとも暴露開始後 24、48 及び 72 時間後に測定する。滅菌した培地を粒子計測装置のバックグラウンドや分光光度計等のブランクとして用いる。

9 被験物質濃度等の測定

9-1 被験物質濃度の測定

被験物質の濃度は、少なくとも最低及び最高試験濃度区並びに予測される EC50 付近の試験濃度区について暴露開始時及び終了時に測定することとする。また、暴露期間中に設定濃度より 20%以上低下することが予測される場合は、すべての試験濃度区について暴露開始時及び終了時に測定することが望ましい。さらに、揮発性あるいは吸着性の強い物質など、暴露期間中に著しく濃度が低下することが予測されるものについては、暴露期間中 24 時間間隔で分析を追加することが望ましい。

9-2 試験環境の測定

試験溶液のpH を暴露開始時及び終了時に測定する。暴露期間中、対照区(助剤対照区を含む。)のpH は通常の場合、1.5以上変動してはならない。

10 限度試験

100mg/L 又は水溶解限度のより低い方の濃度で被験物質が毒性を示さないことが予想される場合等には、この濃度で限度試験を行い、NOEC 等がこの濃度より大きいことを示すことができる。前述の試験条件および有効性の基準は、限度試験にも適用するが、試験の連数は 2 倍に増やすこととする。対照区(助剤対照区を設けている場合には助剤対照区)と試験濃度区の生長速度等の平均値を比較するために、 t 検定等の統計解析を行う。

11 試験の有効性

Pseudokirchneriella subcapitata 及び Desmodesmus subspicatus では、次の条件が満た される場合、試験は有効とみなされる。

- ・ 対照区(助剤対照区を含む。)の生物量が暴露期間中に少なくとも16倍に増殖すること。
- ・ 対照区の毎日の生長速度の変動係数(助剤対照区の毎日の生長速度の変動係数を含む。) が暴露期間を通じて 35%を超えないこと。
- ・ 対照区の繰り返し間の生長速度の変動係数(助剤対照区の繰り返し間の生長速度の変動係数を含む。)が 7%を超えないこと。

12 結果の算出方法

12-1 結果の取扱い

結果の算出は、原則として被験物質の実測濃度の適切な平均値に基づいて行う。暴露期間中、被験物質濃度が設定濃度または初期実測濃度の±20%以内に保たれていたことが証明できる場合には、設定濃度または初期実測濃度に基づいて結果の算出を行うことができる。

各試験濃度区と対照区(助剤対照区を含む。)の生物量を暴露期間と被験物質濃度とともに表にする。各試験濃度区の生物量の平均値と対照区の生物量の平均値(助剤対照区の生物量の平均値を含む。)を時間に対してプロットし、生長曲線を描く。このとき、対照区(助剤対照区を含む。)の生長曲線が、暴露期間を通じて指数増殖期にあることを確認する。

被験物質濃度と影響の関係は、12-2に示す方法を用いて計算する。

12-2 生長速度の比較

指数関数的に増殖しているときの生長速度は次のようにして計算される。

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_i - t_i}$$

ここで、

 $\mu_{ij} = t_i$ 時から t_i 時までの期間の生長速度。通常、日当たり (d^1) で表す。

 $X_i = t_i$ 時の生物量。試験開始時(t_i)の生物量については設定値を用いる。

 $X_i = t_i$ 時の生物量。

ti =暴露開始後i回目に生物量を測定した時間(d)

 t_i = 暴露開始後 i 回目に生物量を測定した時間 (d)

EC50 を算出する場合は、暴露開始時から 72 時間後までの暴露期間を通じた生長速度を求める。

なお、生長速度は、生物量の対数を時間に対してプロットし、その回帰直線の傾き から導くこともできる。

各試験濃度区における生長(速度)阻害率(I_{μ})は、対照区(助剤対照区を設けている場合には助剤対照区)の生長速度の平均値(μ_{μ})と各試験濃度区での生長速度の平均値(μ_{μ})との間の差として次のように計算する。

$$I_{\mu} = \frac{\mu_c - \mu_T}{\mu_c} \times 100$$

12-3 毒性値の算出

 I_{μ} の値を被験物質濃度の対数に対してプロットする。その回帰式等を用いて 50%阻害濃度を求める。 I_{μ} より導かれた EC_{50} は ErC_{50} と表す。

また、対照区(助剤対照区を設けている場合には助剤対照区)と各試験濃度区の μ $_{0.94}$ の値について、分散分析と多重比較を行い、NOEC を求める。

13 結果のまとめ

試験の結果は様式7によりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

[様式7]

藻類生長阻害試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質等の名称			
(IUPAC命名法による)			
別名			
C A S 番 号			
構造式又は示性式			
(いずれも不明な場合は、			
その製法の概要)			
分 子 量			
試験に供した新規			
化学物質の純度(%)			
試験に供した新規			
化学物質のロット番号			
不 純 物 の 名 称			
及び含有率			
蒸 気 圧			
対 水 溶 解 度			
1-オクタノール/水分配係数			
融点			
沸点			
常温における性状			
安 定 性			
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性

- [備 考]物理化学的性状は、可能な限り記入すること。
 - 1.「蒸気圧」の欄には、被験物質の蒸気圧を記入すること。
 - 2.「安定性」の欄には、温度、光等に対する安定性を記入すること。
 - 3.「溶媒に対する溶解度等」の欄には、被験物質の溶媒に対する溶解度及びその溶媒中での安定性を記入すること。

2. 試験溶液の被験物質濃度の分析方法

項目	方 法
分析方法	
前処理法	
定量条件	

- 1.「分析方法」の欄には、実測した分析法を具体的に記入すること。
- 2.「前処理法」の欄には、分析を行う前に実施した処理の概要を記入すること。藻類においては細胞の分離手法を明記すること。
- 3.「定量条件」の欄には、分析に用いた機器や温度・溶離液等の分析の条件を記入する こと。

3. 試験材料及び方法

		項 目	内容
		試験方法	
試験生物		種(学名・株名)	
		入手先	
		対照物質への感受性	
		(EC_{50})	
		(対照物質名)	
前培養		前培養の期間	
		培地名	
		環境条件(水温、光強度)	
試験条件		試験容器	
		培地名	
		暴露期間	年 月 日~年 月 日
		試験濃度(設定値)	(公比
		初期生物量	cells/m
	連数	試験濃度区	
		対照区	
		試験溶液量	
		助剤の有無	
	助剤	種類	
		濃度	
		助剤対照区の連数	
		培養方式(振とう培養、	
		静置培養、連続培養等)	
		水温又は培養温度	
		照明 (光強度・時間等)	
結果の算出		速度法	
方法			

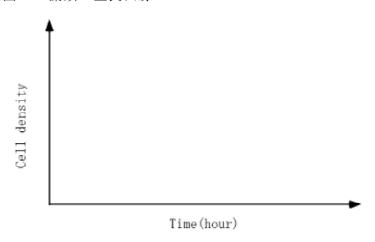
- 1.「対照物質への感受性」の欄には、試験生物の感受性検定の結果を記入(対照物質を明記した上でEC50を記入)すること。
- 2.「試験濃度(設定値)」の欄には、試験に用いた被験物質の濃度をすべて掲げ、その公比も記入すること。
- 3.「試験条件」の「試験容器」の欄には、材質及び容量を記入すること。なお、被験物質 が揮発性を有する場合は「密閉の有無」を記載すること。
- 4.「結果の算出方法」の欄には、毒性値 $(EC_{50}$ 及びNOEC)の算出に用いた統計解析手法 (例えば、probit法、ANOVA等)を記入すること。

4. 試験結果及び考察

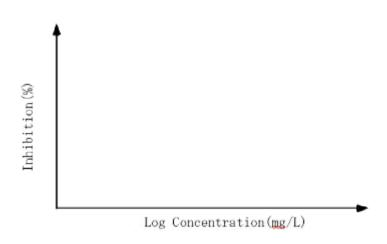
項目	内容
毒性値	$0-72hErC_{50}=mg/L$
	NOEC(速度法)= mg/L
試験濃度	1.設定值 2.実測値
考察及び	
特記事項	

- 1.「試験濃度」の欄には、毒性値 (EC_{50} 及びNOEC)を算出するために用いた濃度が「設定値」か、あるいは「実測値」かを明記すること。
- 2. 「考察及び特記事項」の欄には、被験物質の物理的化学的特性を踏まえて、毒性値の特 徴や試験の有効性に関して考察すること。また、試験における異常な事項や本試験法か ら逸脱した事項等については、試験結果への影響等を記載すること。
- 5 . 藻類の生長曲線及び濃度-生長阻害率曲線 暴露期間中の①生長曲線(例図1)及び②各試験濃度での生長阻害率を示した図(例図2)を添付すること。

例図1 藻類の生長曲線



例図2 藻類の濃度-生長阻害率曲線(生長速度)



6. その他

<u> </u>															
試験実施施	設	名			称										
		所	在		地					電記	į	()	
										FAX	X.	()	
試験責任	者	職	氏		名										
		経	験	年	数										
試 験 番	号						•								
試 験 期	間		年	Ē	月	日	から	年	. ,	月	日	ま、	で		

- 1. 本様式への記載は、最終報告書より転記して作成すること。
- 2. 最終報告書と同じ試験番号を記入すること。
- 3. 本様式の作成責任者は、本様式の欄外に、所属及び氏名を記載すること。

改正前の化審法 TG と改訂版 OECDTG の主要な相違点と改正化審法 TG の改正内容の比較表

項目	(旧)化審法 TG	改訂版 OECDTG201	改正化審法 TG	コメント等
目的等		ANNEX 1		
	細胞濃度(培地 1mL 当たりの細胞	Biomass is the dry weight of living	生物量	OECDTG201 に合わせて修正
	の数)	matter present in a population		
		expressed in terms of a given volume;		
		e.g., mg algae/liter 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.		
供試生物	1	ANNEX 2	1	
	Pseudokirchneriella subcapitata (旧名	Green algae	Pseudokirchneriella subcapitata (旧名	Scenedesmus subspicatus は旧名であ
	Selenastrum capricornutum) が推奨さ	· Pseudokirchneriella subcapitata	Selenastrum capricornutum) が推奨さ	るため、正しい種名に変更。
	れるが、Scenedesmus subspicatusなど、	(formerly known as Selenastrum	れるが、Desmodesmus subspicatus	珪藻 (Diatoms)、ラン藻 2 種
	他の種を用いてもよい。	capricornutum)	(旧名 Scenedesmus subspicatus) な	(Cyanobacteria) については、「他の
		·Desmodesmus subspicatus	ど、他の種を用いてもよい。	種を用いてもよい。」から読み取れる
		(formerly known as Scenedesmus		ため、追記はしない。

項目	(旧)化審法 TG	改訂版 OECDTG201	改正化審法 TG	コメント等
		subspicatus) Diatoms · Navicula pelliculosa, Cyanobacteria · Anabaena flos-aquae, · Synechococcus leopoliensis,		注)珪藻、ラン藻については、現在 日本では評価不可。緑藻との違い等 も含め、早急な検討が必要である。
培地	次の組成の培地又はこれと同程度の組成の培地が推奨される。 (OECD 培地のみの記載)	Two alternative growth media, the OECD and the AAP medium, are recommended.	3 変更なし	OECD 培地が「推奨される」のであって AAP 培地等他の培地を用いても構わない。但し、OECD 培地は、AAP 培地と比較して①被験物質とのインターラクションが少なく、②buffer作用のあるNaHCO3が多く含まれ(APP:15mg/L、OECD:50mg/L)密閉系での試験がしやすいことから、化審法ではOECD培地のみの記載とする。
	リン酸水素二カリウム 1.6 mg/L 塩化鉄 (Ⅲ) 六水和物 0.08 mg/L	KH ₂ PO ₄ 1.60 mg/L FeCl ₃ •6(H ₂ O) 0.0640 mg/L	リン酸二水素カリウム 1.6 mg/L 塩化鉄 (Ⅲ) 六水和物 0.064 mg/L	OECDTG201 に合わせて修正

項目	(旧)化審法 TG	改訂版 OECDTG201	改正化審法 TG	コメント等
	これらを混合の上、塩酸又は水酸化ナトリウム水溶液を用いて pHを 8.3 に調整し、滅菌する。	The pH of the medium is obtained at equilibrium between the carbonate system of the medium and the partial pressure of CO_2 in atmospheric air. An approximate relationship between pH at 25 °C and the molar bicarbonate concentration is: $pH_{eq} = 11.30 + log[HCO_3]$ (中略) and with 50 mg NaHCO ₃ /L, $pH_{eq} = 8.1$ (OECD medium).	この培地は大気との平衡状態で pH は 8.1 となる。	OECDTG201 に合わせて修正注)pH 調整に塩酸や水酸化ナトリウム水溶液は使用してはならない。
前培養	4 指数増殖期の前培養液	ensure that the algae are in the exponential growth phase	4 指数増殖期の <mark>藻類</mark>	より適切な語句に修正
	暴露開始前に2~3日間以上、試験 と同条件で前培養を行う。	an inoculum culture in the test medium is prepared 2-4 days before start of the test.	暴露開始前に 2~4 日間、試験と同 条件で前培養を行う。	OECDTG201 に合わせて修正
暴露期間	6-1 72時間以上とする。	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.	6-1 原則として 72 時間とする。	OECDTG201 に合わせて修正。暴露 期間が短い又は長いものについて も、試験の有効性(11)を満た していれば問題ない。

項目	(旧)化審法 TG	改訂版 OECDTG201	改正化審法 TG	コメント等
初期細胞	6 - 2	21	6 - 2	
濃度	Pseudokirchneriella subcapitataでは	The following initial cell	<i>Pseudokirchneriella subcapitataでは</i>	初期細胞濃度の推奨値は標準的な
	$5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ cells/mLとするこ	concentrations are recommended:	$5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4 \text{cells/mL}$	細胞重量を基に算出された値であ
	とが推奨される。	Pseudokirchneriella subcapitata:	Desmodesmus subspicatus では 2 \sim	り目安である. 厳密には
		$5x10^3 - 10^4$ cells/ml	5×10³cells/mLとすることが推奨さ	OECDTG201 で藻類乾燥重量
		Desmodesmus subspicatus	れる。	0.5mg/L を超えてはならないと規
		2-5x10 ³ cells/ml		程されている.
		Navicula pelliculosa 10 ⁴ cells/ml		供試生物に2種記載があるため、
		Anabaena flos-aquae 10 ⁴ cells/ml		Desmodesmus subspicatus の濃度を
		Synechococcus leopoliensis		追加。珪藻、ラン藻2種について
		$5x10^4 - 10^5$ cells/ml		は、記載しない。
試験濃度	6-3	22	6 – 3	
	0~90%の生長阻害を起こす範囲が	The concentration series should	0~75%の生長阻害を起こす範囲が	化審法に基づく判定では NOEC を
	含まれることが望ましい。	preferably cover the range causing	含まれることが望ましい。	求める必要があるため、「5」は採
		5-75 % inhibition of algal growth rate.		用せず、「0」のままとする。「75」
				は OECDTG201 に合わせて修正。
連数	6 - 4	23	6 - 4	
	対照区については6連で	The number of control replicates	対照区については6連(助剤対照	語句を補足
		must be at least three, and ideally	区を設けている場合には、対照区	
		should be twice the number of	については3連、助剤対照区につ	
		replicates used for each test	いては6連)で	
		concentration.		

項目	(旧)化審法 TG	改訂版 OECDTG201	改正化審法 TG	コメント等
被験物質	9 - 1	37	9 - 1	
濃度の測	暴露期間中に初期濃度より 20%以	it is likely that exposure	暴露期間中に設定濃度より 20%以	改正前の化審法 TG において
定	上低下することが予測される場合	concentrations will vary less than	上低下することが予測される場合	TG201 と異なっていた箇所の修正
	は、	20% from nominal values during the	は、	
		test.		
限度試験	1 0	42	1 0	
	生長の平均値	The response variables in the control	生長速度等の平均値	語句を補足
		and treatment group may be analysed		
		using a statistical test to compare		
		means, e.g. a Student's t-test.		
試験の	1 1	11	1 1	
有効性	次の条件が満たされる場合、試験	For the test to be valid, the following	Pseudokirchneriella subcapitata 及び	珪藻、ラン藻2種の信頼性につい
	は有効とみなされる。	performance criteria should be met:	Desmodesmus subspicatus では、次の	ては検討が必要。
			条件が満たされる場合、試験は有	
			効とみなされる。	
	対照区の		対照区(助剤対照区を含む。)の	語句を補足。

項目	(旧)化審法 TG	改訂版 OECDTG201	改正化審法 TG	コメント等
	Pseudokirchneriella subcapitata で	The biomass in the control cultures	対照区(助剤対照区を含む。)の生	一つ上の項目に種名を入れたので
	は、対照区の細胞数が暴露期間中	should have increased exponentially	物量が暴露期間中に少なくとも 16	ここでは種名は削除。
	に少なくとも 16 倍に増殖するこ	by a factor of at least 16 within the	倍に増殖すること。	
	と。	72-hour test period.		
				NO 104 0 5 NEW 194
		The test period may be shortened to at		注) 48h の試験であっても、指数増
		least 48 h to maintain unlimited,		殖をしており、16 倍に到達してい
		exponential growth during the test as		れば試験は有効である。
		long as the minimum multiplication		
		factor of 16 is reached.		
	対照区の繰り返し間の生長速度の	The coefficient of variation of average	対照区の繰り返し間の生長速度の	語句の補足及び OECDTG201 に合
	変動係数が15%を超えないこと。	specific growth rates during the whole	変動係数(助剤対照区の繰り返し	わせて修正
		test period in replicate control cultures	間の生長速度の変動係数を含む。)	
		must not exceed 7% in tests with	が 7%を超えないこと。	
		Pseudokirchneriella subcapitata and		
		Desmodesmus subspicatus.		
結果の	1 2	46	1 2	
算出方法	面積法と速度法の両方を用いて計	(速度法と収量法の記載あり。)	面積法に関する記載をすべて削	面積法での毒性値の算出は科学的
	算することが望ましい。	(a)Average specific growth rate: this	除。	に正しくないことから、面積法に
		response variable is calculated on the		関する記載は削除。
		basis of the logarithmic increase of		収量法(Yield)については、アメ
		biomass during the test period,		リカでの法律運用のために入れら
		expressed per day		れた方法であるため、化審法では

項目	(旧)化審法 TG	改訂版 OECDTG201	改正化審法 TG	コメント等
		(b) Yield: this response variable is the biomass at the end of the test minus the starting biomass.		採用しない。なお、アメリカでは 速度法と収量法の両方が提出され る。
結果の取	12-1	39	12-1	
扱い	初期濃度の±20%以内に保たれていたことが証明できる場合には、初期濃度に基づいて結果の算出を行うことができる。	If there is evidence that the concentration of the substance being tested has been satisfactorily maintained within \pm 20 % of the nominal or measured initial concentration throughout the test, analysis of the results can be based on nominal or measured initial values.	20%以内に保たれていたことが証明できる場合には、設定濃度または初期実測濃度に基づいて結果の	正しい語句に修正
生長速度	1 2 - 2	48	1 2 - 2	
の比較	$\mu_{i-j} = \frac{\ln N_j - \ln N_i}{t_j - t_i}$	$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i}$	$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i}$	OECDTG201 に合わせて修正
	試験の有効性を調べるためには、 対照区の1日ごとの生長速度を求め、毎日の生長速度の変動係数が 暴露期間を通じて35%を超えない ことを確認する。		削除	11と重複しているため削除

(別添4) (試験手順例)

藻類生長阻害試験 (平成18年11月版)

はじめに

本書は平成16年4月1日より施行される「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律(化審法)」改正法に基づく新規化学物質の届出に際して、試験データが要求される「藻類生長阻害試験」について、推奨種である淡水産単細胞緑藻類 Pseudokirchneriella subcapitata を用いた際の標準的な試験手順例をまとめたものである。

藻類生長阻害試験は、指数増殖期の藻類を被験物質に暴露し、対照区に対する生長阻害率を測定することにより、藻類の生長に対する被験物質の毒性を明らかにすることを目的として行う。 本試験において生長とは暴露期間中の生物量の増加をいう。

なお、本手順例は平成 18 年 11 月時点の情報に基づいてまとめたものであり、今後新たな知見が得られた場合には適宜見直しを行っていく性格のものである。

改正履歴

作成: 平成 15 年 11 月

改正: 平成 18 年 11 月 (厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長及び環境省総合環境政策局長通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」の改定(平成 18 年 11 月 20 日)に伴い、毒性値の算出方法、培地の組成等の変更)

目次

第1節	被験物質の情報	1
	1.1 名称、構造式および物理化学的性状	1
	1.2 被験物質の保管方法および保管条件下での安定性	1
	(1)保管方法	1
	(2)被験物質の確認および保管条件下の安定性	1
第2節	試験生物	2
	2.1 試験種	2
	2.2 提供機関	2
	2.3 藻類の維持	3
	2.4 試験系の再現性	3
第3節	試験の準備	4
	3.1 試験器具	4
	(1) 主な器具	4
	(2) 器具の素材・容量	4
	(3) ガラス器具の洗浄	4
	3.2 試験機器	5
	3.3 培地	5
第4節	前培養	6
第5節	試験溶液の調製と試験濃度の設定	6
	5.1 試験溶液の調製	6
	(1) 培地に対する溶解性	6
	(2) 試験溶液調製法の決定	7
	5.2 試験濃度の設定	7
	(1) 対照区・助剤対照区の設定	7
	(2) 予備試験	7
	(3) 試験濃度の設定	8
	(4) 記録	8
	5.3 分散系での試験	8
第6節	試験条件	8
第7節	生物量の測定	9
第8節	被験物質濃度等の測定	10
	8.1 被験物質濃度の測定	10
	8.2 試験環境の測定	11
第9節	試験の有効性	11
第 10 質	5 試験結果の算出	
	10.1 生長速度の比較(速度法)	13
	10.2 毒性値の算出	
	(1)50%生長阻害濃度(EC ₅₀)の算出	14
	(2) 最大無作用濃度(NOEC)	15

文献・資料	15
(1) 基本とした資料	
(2)引用文献	
(3) 参考文献・資料	
参考資料 試験結果のとりまとめに必要な表の例	

第1節 被験物質の情報

1.1 名称、構造式および物理化学的性状

試験の実施方法を検討する上で参考とするため、以下に示す項目の情報をできるだけ集める。特に、対水溶解度や蒸気圧の情報は試験溶液の調製や試験容器の選択といった試験実施の基礎的な部分に深く関係するので、重要である。

- ・新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)
- 別名
- · CAS番号
- ・構造式又は示性式(いずれも不明な場合は、その製法の概要)
- 分子量
- ・試験に供した新規化学物質の純度(%)
- ・試験に供した新規化学物質のロット番号
- 不純物の名称及び含有率
- 蒸気圧
- 対水溶解度
- 1-オクタノール/水分配係数
- 融点
- 沸点
- ・常温における性状
- 安定性
- ・溶媒に対する溶解度等

(留意点)

- ・出典(供給者提供資料、文献名等)を明らかにすること。
- ・試験実施機関による測定値の場合は簡単な測定条件等(対水溶解度の場合:20℃、48時間攪拌、HPLC分析または目視判定等)を明らかにすること。

1.2 被験物質の保管方法および保管条件下での安定性

(1) 保管方法

被験物質の性状に合わせ保管する。必要に応じ、遮光保管または冷蔵庫、冷凍庫に保管する。

(2) 被験物質の確認および保管条件下の安定性

入手した被験物質についてスペクトル(赤外吸収スペクトル、マススペクトル、N MRスペクトル等)を測定し、被験物質の特性が認められることを確認する。試験終了時にも同様にスペクトルを測定し、試験開始前に測定したスペクトルとの比較により、保管時の安定性を確認する。

第2節 試験生物

2.1 試験種

本試験では、淡水産単細胞緑藻類である $Pseudokirchneriella\ subcapitata\ (Korshikov)$ F.Hindák を用いる。本種は、単細胞であること、細胞が計測する上で適当なサイズであること、培養株の維持が容易であることなどから藻類の生長阻害試験には最も適当な藻類種といえる。これまで $Selenastrum\ capricornutum\$ として知られ、多くの藻類増殖試験や生長阻害試験に用いられてきた培養株は、形態的特徴から $P.\ subcapitata\$ が正しい種名とされ、 $OECD\$ テストガイドライン 201 藻類生長阻害試験(2006.3 採択)でもこの種名が使われている。

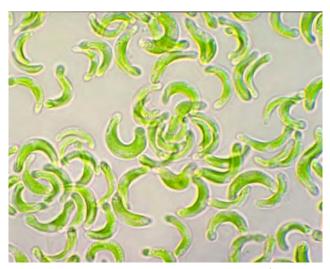


写真 2.1 Pseudokirchneriella subcapitata (Korshikov) F. Hindák

2.2 提供機関

Pseudokirchneriella subcapitata の培養株は現在世界各国の保存機関に保存されている。わが国では、独立行政法人国立環境研究所 微生物系統保存施設より提供されているほか、米国タイプカルチャーコレクション、ドイツのゲッチンゲン大学藻類保存施設からも購入できる。

(a)独立行政法人 国立環境研究所 微生物系統保存施設

〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2

電話: 029-850-2556 FAX: 029-850-2587

電子メール: mcc@nies.go.jp

ホームページ: http://www.nies.go.jp/biology/mcc/home_j.htm

(b)American Type Culture Collection (ATCC)

国内正規販売代理店 ホームページ:

http://www.summitpharma.co.jp/japanese/service/ATCC.html

(c) ドイツ ゲッチンゲン大学藻類保存施設

ホームページ: http://www.user.gwdg.de/~epsag/phykologia/epsag.html

2.3 藻類の維持

試験期間中とは異なり、栄養塩の豊富な培地を用いる方が藻類を容易に長期間維持することができる(例; C培地、ブリストル培地など)¹⁾。20-25℃で、試験条件程度(60µmol/m²/s)の光強度で十分増殖させた後、これより弱い光強度の場所に移すと比較的長期間植え継ぎせずに維持することができる。この場合植え継ぎは数ヶ月毎で十分である。維持培養の場合は、12時間ごとの明暗周期をつけてもよいので、直射日光のあたらない明るい室内に置いても差し支えない。しかし、頻繁に生長阻害試験を実施する場合など、試験条件に近い光条件で培養することにより、前培養で指数増殖期の藻類を得やすくなる。

2.4 試験系の再現性

無菌培養株を使用する場合は、定期的に(少なくとも、6ヶ月毎)細菌の有無を検査して無菌状態であることを確認する必要がある。

試験の再現性を保証するため、基準物質(重クロム酸カリウム、試薬特級)による 生長阻害試験を行い、供試藻類の感受性に変化がないことを調べる。なお、基準物質 検定の結果は記録しておく。表 2.1 に、参考として、環境省の生態影響試験事業にお ける基準物質(重クロム酸カリウム)の藻類に対する毒性値の例を示した。

表 2.1 重クロム酸カリウム (無水) に対するPseudokirchneriella subcapitata の生長阻害試験結果^{※1}

	藻類 72hr−ErC ₅₀ ^{※2} (mg/L)						
試験施設名	重クロム酸カリウム(二クロム酸カリウム)						
	AVE	MIN	MAX	標準偏差	試験回数		
А	1.1	0.72	1.5	0.2	n=25		
В	0.93	0.84	1.1	0.08	n=6		
С	0.95	0.85	1.1	0.079	n=8		
D	0.83	0.69	0.94	0.099	n=13		
E	1.0	0.96	1.1	0.11	n=2		

※1化学物質 GLP (動植物毒性試験) 適合試験施設から提供頂いたデータを記載

※2 ErC₅₀ 速度法による半数影響濃度

第3節 試験の準備

3.1 試験器具

(1) 主な器具

試験に必要な器具を以下に示した。

- 三角フラスコ
- ・メスフラスコ
- ・メスシリンダー
- ・シリコン栓
- ・ピペット
- ・マイクロピペット
- ・メンブレンフィルター (孔径: 0.45μm、0.22μm)
- 分注器

等

(2) 器具の素材・容量

試験や前培養には、藻類に十分な光が供給されるよう、透明なガラス製容器を用いる。通常 250-300mL の三角フラスコを用いるが、被験物質の分析に大量の試験溶液を必要とする場合には 500mL のフラスコを用いる。250-300mL の三角フラスコを用いる場合、試験溶液量は 100mL とする。通気性のあるシリコン栓を用いるが、被験物質が揮散しやすい物質の場合等、必要に応じてガラス共栓フラスコを用いた密閉条件で試験を行う。

また、被験物質が着色性で試験の際に供試藻類に光が十分に供給されないことが予想される場合は、扁平フラスコや容量の大きな三角フラスコを使用する等、試験溶液の厚みを減らし、光が十分供給される工夫が必要である。また、光の減衰が藻類の生長に及ぼす影響を事前に調べておくことが望ましい²⁾。なお、被験物質が藻類に対して毒性があり、かつ毒性と光減衰の影響を分けて評価する必要がある場合には、OECDテストガイドラインおよびOECDガイダンスドキュメントNo.23 が引用している文献を参照すべきである。

(3) ガラス器具の洗浄

三角フラスコ、ピペット、シリンダー等、試験物質や培地に用いた物質等がふれたガラス器具は洗浄する必要がある。ガラス器具の洗浄は以下の点に留意して行う。なお、試験前に行う容器や器具の洗浄方法としてASTMの標準ガイド³⁾で示されている事例も参考となる。

他の材質の器具についても同様の洗浄を行う。

- ①無リン洗剤で洗浄
- ②剛毛ブラシを使って、ガラス製品の内壁に付いた物質を除去する
- ③水道水で十分すすぎ、適切な方法(例えば、金属やアルカリを取り除くために酸を用いる、あるいは有機化合物には有機溶媒を用いる)で洗浄する
- ④最後に蒸留水、超純水等で十分すすぐ
- ⑤ゴミの混入しない場所に保管する

3.2 試験機器

試験に必要な主な機器を以下に示した。

- ①培養に用いる装置:温度、照明条件を一定に維持できる培養器又は培養室、化学 天秤、ろ過装置、遠心分離器、振とう器(100 rpmを超える速度が制御できる回 転式あるいは振動式振とう培養器³⁾)、オートクレーブ 等
- ②試験溶液の調製に用いる装置:スターラー、超音波洗浄機 等
- ③藻類の観察又は生物量の計測装置:光学顕微鏡(100~400 倍³⁾)、粒子計数装置 あるいは血球計算盤、吸光光度計、分光光度計 等
- ④環境測定装置:温度計、pHメーター、光量子計、照度計 等

3.3 培地

次の組成の培地を用いる。

- ・塩化アンモニウム 15 mg/L
- ・塩化マグネシウム六水和物 12 mg/L
- ・塩化カルシウム二水和物 18 mg/L
- ・硫酸マグネシウム七水和物 15 mg/L
- ・リン酸二水素カリウム 1.6 mg/L
- · 塩化鉄 (Ⅲ) 六水和物 0.064 mg/L
- ・エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 0.1 mg/L
- ・ホウ酸 0.185 mg/L
- ・塩化マンガン四水和物 0.415 mg/L
- ・塩化亜鉛 0.003 mg/L
- ・塩化コバルト六水和物 0.0015 mg/L
- · 塩化銅二水和物 0.00001 mg/L
- ・モリブデン酸二ナトリウム二水和物 0.007 mg/L
- ・炭酸水素ナトリウム 50 mg/L

これらのうち、比較的多量に加える成分は直接超純水(ミリQ水)などに添加するが、微量成分は濃厚溶液を作成し、適当量加える。大気と平衡状態であれば、pHは8.1となる。平衡になっていない場合は、エアレーションや撹拌等を行う。pH調

整に塩酸や水酸化ナトリウム水溶液は使用してはならない。

ろ過滅菌の場合は 0.22μm 程度の孔径のフィルターを用いる。オートクレーブによる滅菌より、ろ過滅菌の方が沈殿物形成などの可能性が少ないため、推奨される。

米国環境保護庁 AAP-培地など、同程度の組成をもつ培地を使用することもできる。

第4節 前培養

試験には指数増殖期の藻類を用いる必要がある。維持培養中など、増殖を抑制されている藻類をそのまま試験条件に移すと、順調な増殖を開始するまでに遅延(ラグ)があり、正しい試験結果が得られない。そこで、試験を開始する前に、試験条件と同じ条件で2~4日間培養し、指数増殖期の藻類を得る。変形や異常な形態のものが出現した場合は使用しない。

指数増殖に達するまでの前培養の期間や、添加する生物量は、使用する培養装置の 温度や光強度、培地の容量などに依存する。したがって、あらかじめ前培養に使用する培養装置や条件で培養して生長曲線を描き、どの程度の生物量を添加すると、何日 後に指数増殖期になり、どの程度の生物量が得られるかを調べておく必要がある。目 安となる方法を以下に示した。

- ・250mL の三角フラスコに 100mL の試験培地を入れる。
- ・滅菌したピペットを用いて、試験種が約 25,000 cells/mL となるように接種する。この際、加える藻類懸濁液は 5mL 以内になるようにする。
- ・振とう培養する(温度 23±2℃、照度約 60-80µmol/m²/s、連続光)
- ・毎日細胞数を計数し、生物量が 0.5- 1×10^6 cells/mLに達した時点で本試験に供する。 なお、通常 3 日程度でこの濃度まで増殖するが、3 日後に生物量が 0.5- 1×10^6 cells/mL に達しない場合は前培養の期間を 1 日程度延長するか、培養条件を変えて前培養を やり直す。

第5節 試験溶液の調製と試験濃度の設定

5.1 試験溶液の調製

(1) 培地に対する溶解性

被験物質の対水溶解度値を参考にしつつ、培地に対する溶解性を確認する。溶解性の判定は、100mg/L以上であれば目視にて可とし、100mg/L以下の場合は化学分析により溶解限度を求めておく。測定方法は、例えばフラスコ攪拌法とする。測定温度は試験温度とし、48時間攪拌後、静置し、上清液から遠心分離等によって不溶物を除去した後分析する。

(2) 試験溶液調製法の決定

試験溶液調製法は以下の事項を考慮して決定する。

- ○試験濃度は原則として培地に対する溶解限度以下に設定することとするが、 100mg/L以上の濃度で試験を行う必要はない。
- ○試験溶液は、被験物質が水溶性の場合は、培地に溶解した濃厚な被験物質溶液(原液)を培地と混合することにより、設定濃度の試験溶液を必要量調製する。
- ○被験物質が難水溶性の場合で、培地に添加し、機械的(攪拌、超音波処理等)に溶解させることが困難な場合や秤量等が困難な場合は、助剤としてジメチルホルムアミド、トリエチレングリコール、メタノール、アセトン、エタノール、メチルセロソルブ等の試験種に対する毒性が低く、被験物質の対水溶解度を増すことのない有機溶剤を必要最少量使用して原液を調製し、培地と混合することにより試験溶液を調製してもよい。なお、助剤濃度は最高でも100mg/L 又は0.1mL/Lとし、各試験濃度区で一定濃度とする。
- ○暴露期間中における濃度維持の方法について検討する。
 - ・吸着性のある被験物質の場合:物質が吸着しにくく、藻類の生長に影響を及ぼさない素材の試験容器を検討する。また、藻類への吸着を極力減らすため、初期細胞濃度を 0.5×10⁴ cells/mLと低めに設定してもよい。
 - ・揮発性のある被験物質の場合:揮発による物質の消失を防ぐため、密閉系(共 栓付三角フラスコ等を使用)で試験を行う。なお、密閉系での試験の場合は、 対照区の生物量が初期密度の少なくとも16倍になっていれば、試験期間は48 時間に短縮してもよい。
- ○試験条件下での被験物質の安定性を確認するためには、藻類を入れない区を設ける ことが被験物質の濃度減少の理由を明らかにする上で推奨される。

5.2 試験濃度の設定

(1) 対照区・助剤対照区の設定

対照区には被験物質が含まれない培地を用いることとするが、試験溶液の調製に助剤を使用した場合には、対照区に加え、試験溶液の調製に用いた濃度と同じ濃度の助剤を加えた助剤対照区を設ける。

(2) 予備試験

本試験の実施に先立ち、第6節以下を参考に、公比10以下で原則として3~6段階の試験濃度区を設定した予備試験を行い、本試験に適用する濃度を決定する。NOECが試験上限濃度(100mg/L)又は試験溶液調製可能な最高濃度以上と予想される場合、予備試験はこの1濃度で行う場合もある。予備試験では連数を1~3連とし、72時間後に(必要に応じて24、48時間後も)藻類密度を測定する。

(3) 試験濃度の設定

本試験での被験物質濃度は、予備試験での72時間-EC₅₀値を含み、公比を1.3~2.2 (50%阻害濃度近辺で公比を狭めるなどの変則公比を採用する場合もある)程度にとり、等比級数的に5段階以上の濃度を設定する。その際、可能な限り、藻類の生長を75%程度阻害する濃度と、全く阻害しない濃度が各々1濃度、一部阻害する濃度が3濃度含まれるようにする。

予備試験の結果、試験上限濃度(100mg/L)又は試験溶液を調製可能な最高濃度で 影響が認められなかった場合は、本試験ではその濃度のみの限度試験とする。また、 報告書には限度試験であることを明記する。

(4) 記録

試験溶液の調製法及び調製後の状態(外観等)を記録しておく。また、原液について、使用時調製か保存原液かの別を記録し、保存原液を使用した場合には保存条件及び保存条件下での安定性についても記録する。

5.3 分散系での試験

上記 5.1 で、溶解限度測定のために作成した飽和溶液中の被験物質の濃度が検出限界値未満であった場合で、予備試験の結果等から当該飽和溶液より低い濃度ではEC50が得られないことが予想された場合には、そもそも被験物質が溶解しているものと判断することができないことから、分散系で試験を行う。試験濃度は分散可能な上限の濃度とするが、100mg/L以上の濃度で試験を行う必要はない。被験物質は、超音波や有機溶剤に溶かした濃厚原液を用いて分散させることとするが、被験物質が分散剤や乳化剤とともに使用されるものである場合には、助剤としてクレモフォールRH40、0.01%メチルセルロース、HCO-40等の試験種に対する毒性が低く、被験物質の対水溶解度を増すことのない分散剤を必要最少量使用して試験溶液を調製してもよい。なお、作成した飽和溶液中の被験物質の濃度が検出限界未満の場合であっても、当該飽和溶液より低い濃度で毒性が発現する場合には、被験物質は培地に溶解しており、その溶解した被験物質による毒性が発現したものとみなすことができる。

被験物質が混合物の場合、または試験条件で分解し混合物となる場合など、被験物質そのものの溶解濃度を測定できない場合には、添加濃度 (Loading rate)での毒性値を算出する場合がある。この場合は EC50 に代わって EL50、NOEC に代わって NOELR などの略号で区別する。

第6節 試験条件

以下の条件で試験を行う。藻類の接種は、無菌室やクリーンベンチなど無菌的な条件で行う。

・培養方式:非揮発性物質;開放系(通気性のよいシリコン栓) 揮発性物質;密閉系(共栓フラスコなどの密栓容器) 原則として振とう培養(100rpm)

(揮発性が高く、振とうにより被験物質濃度が減少しやすい場合は、静置培養を行う こともある。ただし、その際でも1日に2回程度フラスコを振とうする。)

- ・暴露期間:原則として72時間(ただし、第9節「試験の有効性」をすべて満たしていれば短期間の試験や長期間の試験でもよい。)
- ・試験液量:100 mL/容器(250~300mLの三角フラスコの場合)
- ・連数:3容器/暴露区、6容器/対照区(助剤対照区を設けている場合には、対照 区については3容器、助剤対照区については6容器)、なお、限度試験の場合は暴露 区、対照区ともに6連以上とする。
- ・生物量:初期生物量が乾燥重量で 0.5mg/L を超えないように設定する。ただし藻類 への吸着性の高い試験物質の場合は少なくしてもよい。
- ·試験温度:21-24±2 ℃
- ・照明: 白色又は昼光色の蛍光灯を用い、フラスコ液面付近の光強度が 60-120µmol/m²/s になるよう連続かつ均一に照射する。

すべての試験容器が均一に照射されることを確認するため、あらかじめ試験容器を設置する培養器内の照度分布を測定しておく。また、試験期間中、定期的にフラスコの位置を入れ替えるなどの工夫も必要である。

光強度で照度単位luxからエネルギー単位 $\mu mol/m^2/s$ へはおよその換算が可能で、その換算係数は、蛍光灯メーカーなどから得ることが可能な場合がある。文献値は白色蛍光灯で 0.016、インターネット情報では白色又は昼光色の場合、それぞれ 0.013 及び 0.014 である。換算係数は蛍光灯の波長分布に依存するので製品により異なるため、光量子計での測定が推奨される。

予備試験の結果、対照区(又は助剤対照区)の pH の変動が 1.5 以上と予想される場合は、以下の操作を行うことにより、変動を小さくすることができる。なお、通常の試験では、pH の変動は 0.5 以下に抑えられる。

- ・揮発性物質でない場合は、振とう培養の回転数を増してCO2の交換を促進する。
- ・初期細胞濃度を低くすることによってCO₂の要求を減じる。

第7節 生物量の測定

各試験容器を培養装置に設置し試験を開始する。その後、24、48 および 72 時間に、すべての試験容器について生物量を測定する。通常は対照区における生物量が 72 時間の培養で 100 倍以上となる。なお、生物量は直接計測する事が困難であるため、細胞数、細胞容積(総体積)、クロロフィル濃度を測定してもよい。細胞数の計測には粒子計数装置を用いて行うのが簡便である。ただし、生物量以外の測定値を用いる場

合には当該測定値と生物量の関係を明らかにしておく。

藻類の変形等異常を確認するため、生物量の測定時に各試験溶液を少量スライドグラスにとり、100~400倍の光学顕微鏡下で観察し、異常が見られた場合には記録する。

第8節 被験物質濃度等の測定

8.1 被験物質濃度の測定

被験物質の濃度は、少なくとも最低及び最高試験濃度区並びに予測されるEC₅₀付近の試験濃度区について暴露開始時及び終了時に測定する。また、暴露期間中に設定濃度より20%以上変動することが予測される場合は、すべての試験濃度区について暴露開始時及び終了時に測定する。さらに、揮発性あるいは分解性の物質など、暴露期間中に著しく濃度が低下することが予測されるものについては、暴露期間中24時間間隔の分析を追加する。分析の感度、条件等により、試料が多量に必要な場合は、別に試験容器を作り、試験と同量の藻類を接種し、同様の条件で培養したものを用いる。

分析は、各試験濃度区について各濃度区から1容器、もしくは各連から一定量を採取した後混合した試験液を分析する。

(注意) 試験終了時の到達藻類濃度が同一濃度区の他の容器に比べて有意に低い、もしくは高いと判断された場合には、個々の容器の被験物質濃度を測定すべきである。各濃度から1容器、もしくは、混合したサンプルを分析してよいのは、各繰り返し間に差がないと判断された場合だけである。もし、差が生じていた場合にはすべての容器の濃度を測定する事が望ましい。

分析の前には、サンプルを遠心分離し、藻類を除去してから行う。

なお、分析法についてはサンプリング手法、前処理法、計測法(検出限界および測 定限界、回収率、検量線、測定チャート等)を記録し、報告すること。

事前に被験物質の試験条件での安定性を確認し、十分な証拠がある場合には下記の濃度区を適用する。化審法では一律に全濃度区で試験開始時と終了時の測定が必要である。

例:	設定濃度	100	mg/L	100 mg/L	100 mg/L
	初期実測濃度	90	mg/L	75 mg/L	85 mg/L
	試験終了時実測濃度	85	mg/L	79 mg/L	60 mg/L
	評価に用いる濃度	90, or 10	0 mg/L	75 mg/L	71 mg/L
		(より確か	らしい値)	(初期実測)	(幾何平均)

なお、被験物質濃度が著しく減少する場合には、試験困難物質として本ガイドラインの外、OECD ガイダンスドキュメント No.23 に従う。

8.2 試験環境の測定

暴露期間中、培養装置内の温度、光強度を少なくとも1日1回測定する。

試験溶液の pH を試験開始時及び終了時に測定する。少なくとも、試験終了時の pH は、すべての容器について測定することが望ましい。暴露期間中、対照区(助剤対照区を含む。)の pH は通常の場合、1.5 以上変動しない。

第9節 試験の有効性

Pseudokirchneriella subcapitata 及び *Desmodesmus subspicatus* では、以下の条件を満たさない場合、試験を不成立とし、再試験を行う。

- ・ 対照区(助剤対照区を含む)の生物量が暴露期間中に少なくとも 16 倍に増殖すること
- ・ 対照区の毎日の生長速度の変動係数(助剤対照区の毎日の生長速度の変動係数 を含む)が暴露期間を通じて35%を超えないこと
- ・ 対照区の繰り返し間の生長速度の変動係数(助剤対照区の繰り返し間の生長速度の変動係数を含む)が7%を超えないこと

日間変動係数および繰り返し間変動係数の算出例

藻類密度				平均 生長速 度	区間生長速度			
0h	24h	48h	72h	0-72h	0-24h	24-48h	48-72h	CV
0.5	4.35	32.1	80.3	1.69	2.16	2.00	0.92	0.40
0.5	4.36	29.4	83.9	1.71	2.17	1.91	1.05	0.34
0.5	3.99	30.4	86.4	1.72	2.08	2.03	1.04	0.34
0.5	3.83	36.55	107	1.79	2.04	2.26	1.07	0.35
0.5	4.11	31.35	91.6	1.74	2.11	2.03	1.07	0.33
0.5	3.57	27.35	90.7	1.73	1.97	2.04	1.20	0.27
		平均	匀 值	1.73	区間変動係数(平均)		34%	

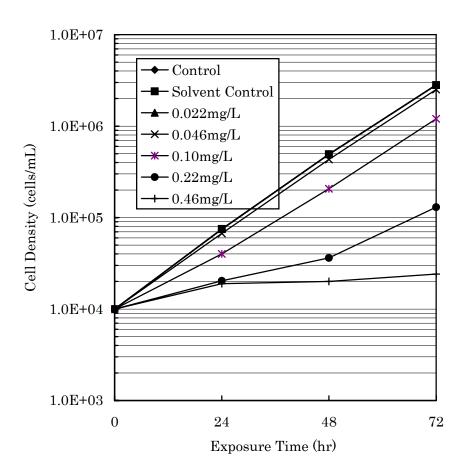
標準偏差 0.03 繰り返し間変動係数 2% ・pHの変動は試験の妥当性の基準とはなっていないが、被験物質が金属化合物、または試験液中で部分的にイオン化する物質(特にpKa値が試験水のpHに近い場合)ではpHの違いが毒性の強弱に関わるため、可能な限り一定にすることが求められる。

第10節 試験結果の算出

結果の算出は、原則として被験物質の実測濃度の適切な平均値に基づいて行う。平均値の算出は、濃度変動が分解等による減少と考えられる場合には幾何平均や時間加重平均を、分析誤差によるものと考えられる場合は算術平均により行う。

暴露期間中、被験物質濃度が設定濃度または初期実測濃度の±20%以内に保たれていなかった場合は、暴露期間中の測定濃度の幾何平均を用いて結果の算出を行う。また、分析が困難な物質や極めて不安定な物質で設定値を用いることに合理性がある場合はその旨を報告書に記載し、設定値を採用してもよい。予想される主な減少理由 (例:揮発、加水分解、光分解等)を報告書に記載する。

各試験濃度区と対照区(助剤対照区を含む。)の生物量を暴露期間と被験物質濃度とともに表にする。各試験濃度区と対照区(助剤対照区を含む。)について、生物量の繰り返しの間の平均値を時間に対してプロットし、生長曲線を描く(図 10.1)。このとき、対照区(助剤対照区を含む。)の生長曲線が、暴露期間を通じて指数増殖期にあることを確認する。



🗵 10.1 Algal Growth Curve of Pseudokirchneriella subcapitata

出典)住化テクノサービス株式会社(2001): 平成 12 年度生態影響試験最終報告書, (5H-Dibenzo[a,d]cyclohepten-5-one)

被験物質濃度と影響の関係は、10.1 に示す速度法を用いて計算する。なお、限度試験の場合には、対照区(助剤対照区を設けている場合には助剤対照区)と試験濃度区の生長の平均値を比較するために、t検定等の統計解析を行う。

10.1 生長速度の比較(速度法)

指数関数的に増殖しているときの生長速度は、各々の試験容器について次のようにして計算される。

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i}$$

ここで、

 $\mu_{i,j} = t_i$ 時から t_i 時までの期間の生長速度。通常、日当たり (d^{-1}) で表す。

X_i =t_i時の生物量。試験開始時(t₀)の生物量については設定値を用いる。

 $X_i = t_i$ 時の生物量。

t_i =暴露開始後i回目に生物量を測定した時間(d)

t_i =暴露開始後j回目に生物量を測定した時間(d)

 EC_{50} を算出する場合は、暴露開始時から 72 時間後までの暴露期間を通じた生長速度を求める。なお、生長速度は、生物量の対数を時間に対してプロットし、その回帰直線の傾きから導くこともできる。

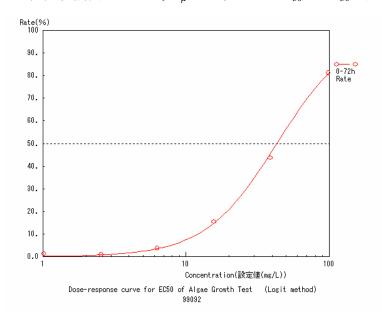
各試験濃度区における生長(速度)阻害率 (I_{μ}) は、対照区(助剤対照区を設けている場合には助剤対照区)の生長速度の平均値(μ_c)と各試験濃度区での生長速度の平均値(μ_T)との間の差として次のように計算する。

$$I_{\mu} = \frac{\mu_c - \mu_T}{\mu_c} \times 100$$

10.2 毒性値の算出

(1)50%生長阻害濃度(EC₅₀)の算出

 I_{μ} の値を被験物質濃度の対数に対してプロットする(例:図 10.2)。その回帰式等を用いて 50%生長阻害濃度を求める。 I_{μ} より導かれた EC_{50} は ErC_{50} と表す。



出典:(財) 化学物質評価研究機構(2004): 平成 15 年度生態影響試験最終報告書(m-ニトロアニリン) の結果を基に作成

(2) 最大無作用濃度(NOEC)

統計的手法*により対照区(助剤対照区を設けている場合には助剤対照区)と比較して有意差の認められない最高試験濃度を最大無作用濃度(NOEC)とする。速度法により求めた場合はNOEC(速度法 0-72hr)と記載する。

*例: 多群の比較; Bartlett の等分散検定、一元配置分散分析 (ANOVA)、Dunnett

または Williams の多重比較検定

2 群の比較; F 検定および Student の t 検定を用いる。

文献・資料

(1) 基本とした資料

本書の作成に当たっては以下の資料を基にした。

- ・ 厚生労働省・経済産業省・環境省(2003):新規化学物質等に係る試験の方法について(平成15年11月21日 薬食発第1121002号、平成15・11・13製局第2号、環保企発第031121002号)」化学物質の藻類生長阻害試験、ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験 IV 藻類生長阻害試験
- 厚生労働省・経済産業省・環境省(2006):「新規化学物質等に係る試験の方法について」の一部改正について(平成18年11月20日 薬食発第1120001号、平成18・11・13製局第2号、環保企発第061120001号)
- OECD (2006): OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS PROPOSAL FOR UPDATING GUIDELINE 201, Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test:pp.25.

(2) 引用文献

- 1) 笠井文絵(2003): 藻類 第2章藻類・ウキクサ・陸生植物, 日本環境毒性学会 編 生態影響試験ハンドブックー化学物質の環境リスク評価ー,朝倉書店:26-37.
- 2) ISO (1999): Water Quality—Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waste water, ISO 14442:pp.14.
- 3) American Society For Testing and Materials (1997): Standard Guide for Conducting Static 96-h Toxicity Tests with Microalga1,E 1218 –97a:pp.14.

(3)参考文献・資料

- 1)種名の変更については以下の知見が参考になる。
- J.W.G. Lund(2003): http://windermere.ceh.ac.uk/fritsch/Features.htm
- Nygaard, G., Komarek, J., Kristiansen, J. & Skulberg, O.M. 1986. Taxonomic designations

of the bioassay alga NIVA-CHL-1 ("Selenastrum capricornutum") and some related strains. Opera Botanica 90:5-46

- 2) 引用文献以外の藻類の培養、藻類生長阻害試験については以下の知見が参考になる。
- American Society For Testing and Materials (1998): Standard Practice for Algal Growth Potential testing with *Selenastrum capricornutum*, D 3978 –80:pp.5.
- Environmental Canada(1992):Biological Test Method: Growth Inhibition Test Using the Freshwater Alga *Selenastrum capricornutum*, Report EPS 1/RM/25:pp.41.
- ISO (1989): Water Quality-Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*, ISO 8692:pp.6.
- ・ 茂岡忠義(2003): 藻類生長阻害試験-OECD 化学品テストガイドラインに準拠した試験方法-, 第2章藻類・ウキクサ・陸生植物, 日本環境毒性学会編 生態影響試験ハンドブックー化学物質の環境リスク評価-,朝倉書店:38-43.
- 西澤一俊・千原光雄編(1974):藻類研究法、共立出版:pp.754.
 - 3) 試験困難物質の試験については以下の知見が参考になる。
- · OECD(2000): OECD SERIES ON TESTING AND ASSESSMENT Number 23,
- GUIDANCE DOCUMENT ON AQUATIC TOXICITY TESTING OF DIFFICULT SUBSTANCES AND MIXTURES
 - 4) 毒性値の統計解析手法については以下の知見が参考になる。
- American Society For Testing and Materials (2003): Standard Practice for Statistical Analysis of Toxicity Tests Conducted Under ASTM Guidelines, E 1847 –96:pp.10.
- OECD(2006): OECD SERIES ON TESTING AND ASSESSMENT Number 54, CURRENT APPROACHES IN THE STATISTICAL GUIDANCE TO APPLICATION -ANNEXES

参考資料 試験結果のとりまとめに必要な表の例

藻類の生長阻害試験をとりまとめる際に必要な表を、例として以下に示した。

表 1. Cell Densities of Pseudokirchneriella subcapitata during the 72-Hour Exposure

Nominal Con (Measured Co			Cell Density	y (cells/mL)	
(mg/L)	Vessel No.	0 Hour	24 Hours	48 Hours	72 Hours
	1	10000	63920	407600	2433000
	2	10000	63340	401900	2394600
Control	3	10000	66720	418600	2370600
	Average	10000	64660	409367	2399400
	SD	0	1807	8489	31476
	1	10000	63780	436700	2731000
10	2	10000	64900	457700	2962000
(10)	3	10000	65520	461500	2809600
	Average	10000	64733	451967	2834200
	SD	0	882	13357	117448
	1	10000	61860	432400	2774600
18	2	10000	61300	434400	2643200
(18)	3	10000	62720	433400	2734000
	Average	10000	61960	433400	2717267
	SD	0	715	1000	67279
	1	10000	56900	404400	2437200
32	2	10000	57360	398200	2551800
(32)	3	10000	59300	404000	2571400
	Average	10000	57853	402200	2520133
	SD	0	1274	3470	72488
	1	10000	48700	297000	1920000
56	2	10000	49440	308200	1904000
(56)	3	10000	47200	284000	1873000
	Average	10000	48447	296400	1899000
	SD	0	1141	12111	23896
	1	10000	27560	83400	335500
100	2	10000	26540	85400	321100
(100)	3	10000	27380	91200	354800
	Average	10000	27160	86667	337133
	SD	0	544	4051	16909

SD: Standard Deviation

表 2 Percent Growth Inhibition of Pseudokirchneriella subcapitata

	on (MeanaMeasured	Grow	th Rate
Con	nc.)		Inhibition
	Vessel	Rate	(%)*1
(mg/L)	No.	μ (0-72)	Ι μ (0-72)
,	1	1.6930	7 (3 3)
Control	2	1.7076	
	3	1.7176	
	4	1.7887	
	5	1.7367	
	6	1.7334	
	Average	1.7295	0.00
	SD	0.0332	
	1	1.7933	
0.22	2	1.7183	
(-)	3	1.7038	
	Average	1.7385	-0.52
	SD	0.0480	
	1	1.7694	
0.46	2	1.7339	
(0.34)	3	1.7108	
	Average	1.7380	-0.50NS
	SD	0.0295	
	1	1.6952	
1.0	2	1.6770	
(0.72)	3	1.6740	
	Average	1.6821	2.74NS
	SD	0.0115	
	1	1.3164	
2.2	2	1.0809	
(1.63)	3	0.9776	
	Average	1.1250	34.95**
	SD	0.1737	
	1	0.3526	
4.6	2	0.3640	
(3.40)	3	0.5325	
	Average	0.4163	75.93**
	SD	0.1007	
	1	0.3595	

10	2	0.2718	
(7.57)	3	0.2918	
	Average	0.3077	82.21**
	SD	0.0459	

表 3. Measured Concentrations of the Test Substance in Test Water

Nominal	Measured Concentration (mg/L)				
Concentration (mg/L)	0 Hour	0 Hour Percent of Nominal		Percent of Nominal	
Control	< 0.1	_	< 0.1	_	
10	10	100	10	100	
18	18	100	18	100	
32	32	100	33	103	
56	56	100	58	104	
100	100	100	100	100	

表 4. pH Values

Nominal Concentration	Measured Concentration at 0 Hr	Vessel No.	p	H
(mg/L)	(mg/L)	NO.	0 Hour	72 Hours
Control	-	1	7.7	9.9
10	10	1	7.7	9.7
18	18	1	7.8	9.9
32	32	1	7.8	9.3
56	56	1	7.8	8.8
100	100	1	7.7	8.0

表 5. Daily Temperature, Light Intensity and Revolution in the Incubation Chamber

Exposure Period (Hours)	Temperature (°C)	Light Intensity (lx)	Revolution (rpm)
0	23.1	4200~4600	100
24	22.9	4300~4600	100
48	22.9	4100~4400	100
72	22.8	4100~4400	100
Range	22.8~23.1	4100~4600	100

出典)表 1、3~5:住化テクノサービス(株)(2003): 平成 14 年度生態影響試験最終報告書(N,N-ジエチル-3-メチルベンズアミド)

表 2: (株) クレハ分析センター (2005): 平成 16 年度生態影響試験最終報告書 (3,4-ジクロロニトロベンゼン) 一部改定

藻類生長阻害試験法改定に伴う第三種監視化学物質の判定基準の変更点

旧	新
藻類の試験結果から得られるEC50値が、	藻類の試験結果から得られる <u>速度法に基づく</u>
	<u>EC₅₀値</u> が、
概ね1mg/L以下であれば第三種監視化学	概ね2mg/L以下であれば第三種監視化学物質
物質と判定し、	と判定し、
概ね1mg/L超であれば第三種監視化学物	概ね2mg/L超であれば第三種監視化学物質と
質とは判定しない。	は判定しない。

化学物質審査規制法に基づく 藻類生長阻害試験法の改正内容について

-OECDテストガイドライン201改訂版-

独立行政法人 国立環境研究所

環境リスク研究センター

菅谷 芳雄

OECD藻類生長阻害試験

1981 テストガイドライン 201 採択

1984 同 改訂

1997 同 改訂提案 採択

Norway (lead country)

1998-1999 Expert Group meeting

(2000 ガイダンスドキュメント23 承認)

2000 11月ドラフトTG 発表・回覧

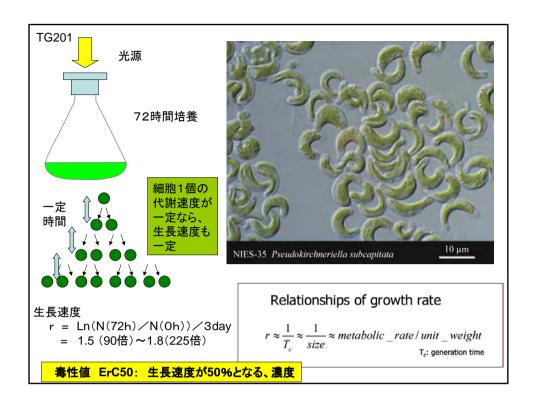
2001 各国コメント、AUG問題

2002 改訂ドラフト 発表・回覧

2003 WNT15(合意されず)

Expert meeting → 最終ドラフト

2004 WNT16承認2006 テストガイドライン201改訂採択



改訂テストガイドライン201

概要 ◎ 適用生物種の拡大

Pseudokirchneriella subcapitata 分類学上
Desmodesmus subspicatus 分類学上
Navicula pelliculosa 新規
Anabaena flos-aquae 新規
Synechococcus leopoliensis 新規

- ◎ GHSとの整合生長速度法を「科学的に正しい」
- がイダンスドキュメント*との整合GD23 試験困難物質GD54 統計処理
 - * on the OECD's W WW site (http://www.oecd.org/ehs/)

試験手順はどう変わるか

妥当性クライテリア

- 1) 平均生長速度
 - O. 92 /day (= 3日間で16倍)
- 2) 対照区における区間(1日当たり) 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
 - ※ 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?

指数増殖期の維持

- ●Lag phase をなくす
- ●試験の短縮 48時間暴露

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

変動係数の計算例

藻類密度			平均 生長速度	区間生長速度				
0 h	24 h	48 h	72h	0-72h	0-24h	24-48h	48-72h	CV
0.5	4. 35	32. 1	80. 3	1. 69	2. 16	2.00	0. 92	0.4
0.5	4. 36	29. 4	83. 9	1. 71	2. 17	1. 91	1. 05	0.34
0.5	3. 99	30. 4	86. 4	1. 72	2. 08	2. 03	1. 04	0.34
0.5	3. 83	36. 55	107	1. 79	2. 04	2. 26	1. 07	0.35
0.5	4. 11	31. 35	91.6	1. 74	2. 11	2. 03	1. 07	0. 33
0.5	3. 57	27. 35	90. 7	1. 73	1. 97	2.04	1. 20	0. 27

平均値

1.73

0.03

日間変動係数(平均)

34 %

標準偏差

繰り返し間変動係数

2 %

最終報告書でのデータの取りまとめ方

化審法TG/テストガイドラインでは、最終報告書に記載する事項を指定している ただし、重要度には強弱あり・・・・

毒性値そのものに 関係する要素

毒性値で政策判断を するため重要.

【判定基準との比較】

毒性発現に関係する要素

ある物質では 試験環境により、毒性発現 は異なる

【特に試験困難物質】

試験の信頼性に 関係する要素

Validである事を示し. 行政(規制)判断の 根拠となる.

重点事項は、目的・物性により異なる

50

毒性値の大小を決める要素: 濃度 - 反応(率)曲線

> モデル(算出方法)の選択 単回帰,プロビット法・・・・

実測平均値/初期実測値/設定値

毒性発現に関係する要素 水温, pH, 水の硬度, TOC, 曝露時間

> 条件により被験物質の毒性作用(量・質) が異なる場合がある

毒性値の信頼性を決める要素 暴露の安定性(適切な曝露方式) 被験物質以外の影響の排除 再現性(確認できるデータ) 試験の再生産性(記録)

データの相互承認に係る規定 ガイドライン(試験法) GLP(内部評価と適合確認)

その他の変更

- 1) 不安定な被験物質濃度は、毎日測定することを推奨
- 2) pHの変動を抑えることと、その手段
- 4
 4
 4
 4
 5
 6
 7
 8
 9
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
- 4) 参照物質として、3.5-Dichlorophenol
- 5) 試験の適用範囲と試験困難物質の試験法(文献紹介)

被験物質濃度の確認

- 1) 原則として、全ての濃度区の被験物質濃度を実測
- 2) 試験終了時の > 設定濃度の80% 設定濃度 被験物質濃度 > 初期実測濃度の80% 初期実測濃度
- - * 測定頻度を多くして、減衰曲線から推定曝露濃度の算出
- 4) 繰り返し間の変動(藻類生長・試験条件:pH・・・・)が大きい場合
 - ** 説明のために被験物質濃度を個別測定する事も考慮する.
- * (Para.38) should be based on geometric mean concentration during exposure or on models describing the decline of the concentration

(Para.40) adsorption to the increasing algal biomass does not mean that it is lost from he test system

「真の毒性」と「物理・化学的影響」

酸性物質·塩基性物質

急性毒性試験法では、→ TG201では被験物質の影響でpHが変化

区別しない

しても、調整しない、

慢性毒性試験では → 環境の緩衝作用

区別する

低レベル曝露を問題にするため、pHを調整



化審法TGでは、pH調整しないが、真の毒性と区別されて いれば、考慮する (着色性物質も同じ).

牛熊影響に関する化学物質審査規制/試験法セミナー

試験困難物質の試験・評価方法 に係る検討状況 (難水溶性物質の試験法に関する検討の状況)

2007年1月19日

㈱三菱化学安全科学研究所

試験困難物質

試験困難物質とは

標準的な水生(生態)毒性試験手法に 改良や追加を必要とするような物質 (考え方や評価も含む)



極めて手間のかかる 面倒なもの



試験困難物質

化学物質特性と試験実施困難性との関連

難水溶性 (疎水性) 着 低濃度毒性

濃度維持 試験液調製 水溶解度測定 微量分析

コロイド状 色 性

光量減衰抑制 毒性解釈 (特に藻類)

揮発•揮散性

濃度維持

揮散防止

錯体形成

必須無機成分 濃度の解釈

光分解性 加水分解性 酸化性 腐食/変質性 生 分 解 性

濃度維持 水溶解度測定 分析(親子?) 毒性解釈 雑菌増殖防止

解 性品 龤

濃度の定義 pH変動 毒性解釈

多成分物質。

濃度の定義 試験液調製 微量分析

試験困難物質

OECD ガイダンスドキュメント No23

Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures

(試験困難物質および混合物の水生生物試験 に関するガイダンス文書)

2000年5月 最終版承認(9月作成)



水生生物の生態毒性試験において一般に困難と言 われる物質の実用面で有効な試験のあり方を記載。

試験困難物質

しかし

結果の解釈 分類、リスク評価

適用できない物質

利用者(申請者、当局) との協議、合意が必要

試験の実施方法や結果の解釈に 困難や混乱を起こし易い



難水溶性物質

平成17年度の検討は?

困難な性状の中で難水溶性物質に特化

それでも課題山積

微量分析 水溶解度測定

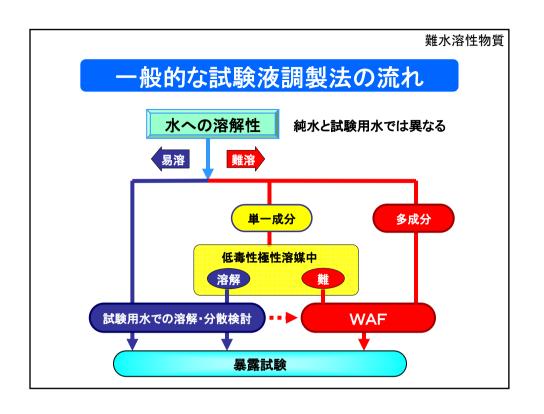
試験液調製

濃度維持 多成分の扱い 結果の解釈



試験液調製方法 一般化できないか?





難水溶性物質

WAF(法)とは?

Water-accommodated fractions (WAFs)

多成分物質の構成成分または物質の一部 が溶解および安定に分散,または乳濁して存 在している水相分画のこと。



溶解のみならず安定な分散液も含む Water Soluble Fractions (WSFs)とは違う

平成17年度の検討内容と結果

目的:

WAF調製の基準とすべき手順の提案

方法:

異なる性状の難水溶性の単一物質4物質 条件の異なるWAF調製法

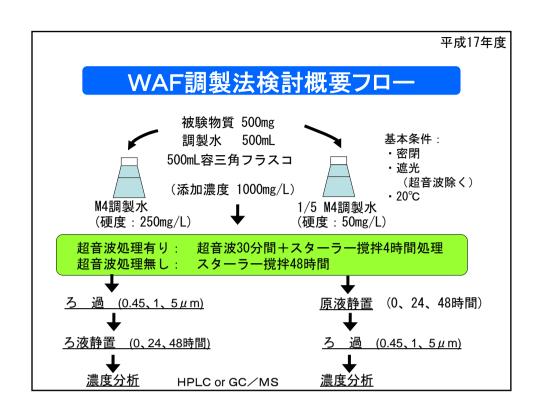
- 撹拌方法 撹拌時間
- 静置時間フィルター等

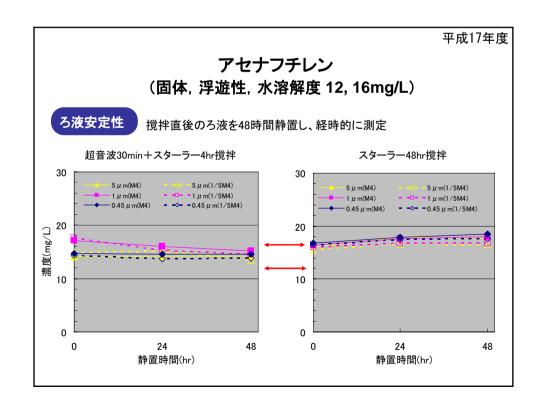
平成17年度

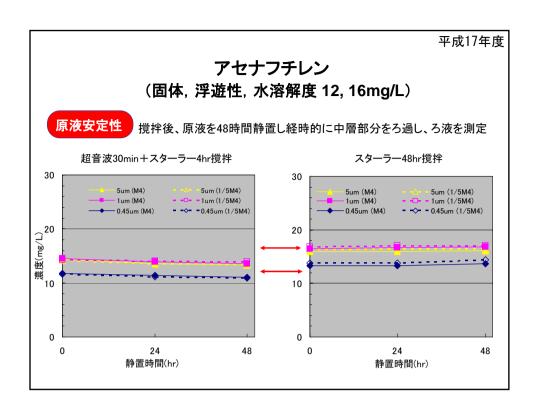
検討物質

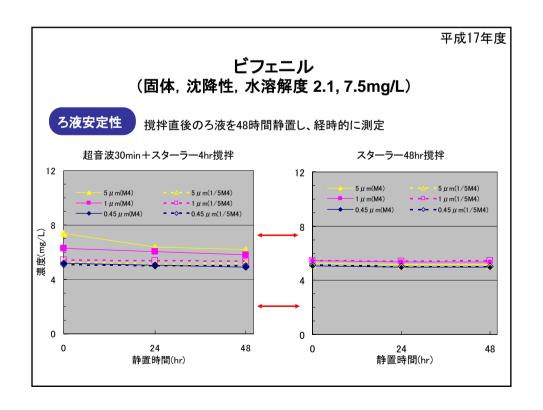
化合物名	構造式	水溶解度 (文献値)	水溶解度 (安科研)
アセナフチレン 固体 浮遊性		16 mg/L *1 (20°C)	12 mg/L (20°C)
ビフェニル 固体 沈降性		7.5 mg/L *2 (25°C)	2.1 mg/L (20°C)
n-ウンデカン 液体 比重く1	~~~~	0.044 mg/L *3 0.0044 mg/L *4 (25 °C)	0.024 mg/L (20°C)
1,2,4-トリクロロベンゼン 液体 比重>1	CI	38 mg/L *1 (25°C)	18 mg/L (20°C)

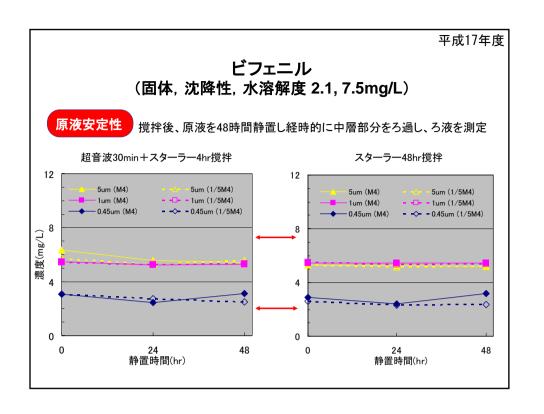
- $\mathbf{*1}$ Lide, D.R, (ed), CRC Handbook of Chemistry and Physics 84th Edition
- *2 化学物質安全性 (ハザード) 評価シート 98-17 *3 Mackay D, Shiu WY: J Phys Chem Ref Data 10: 1175-99 (1982) ←HSDBより *4 YALKOWSKY, SH & DANNENFELSER, RM (1992) ←U. S. EPAのEPI Suiteより

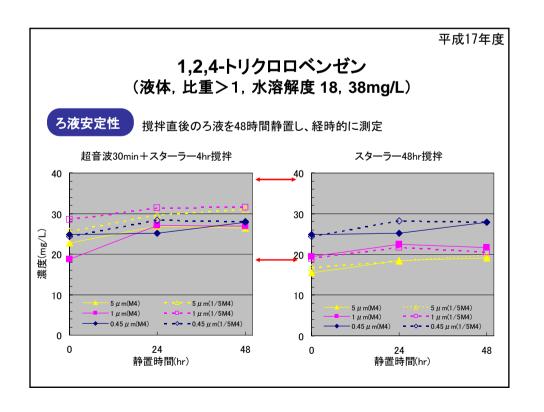


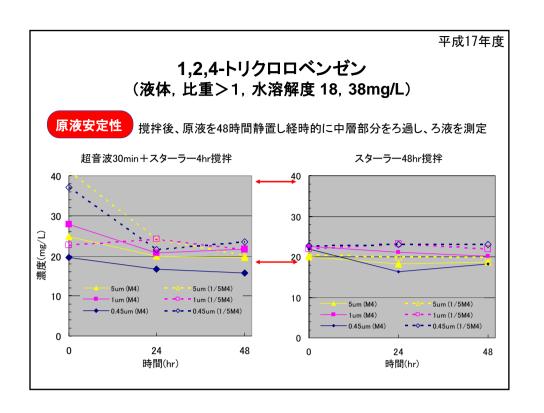


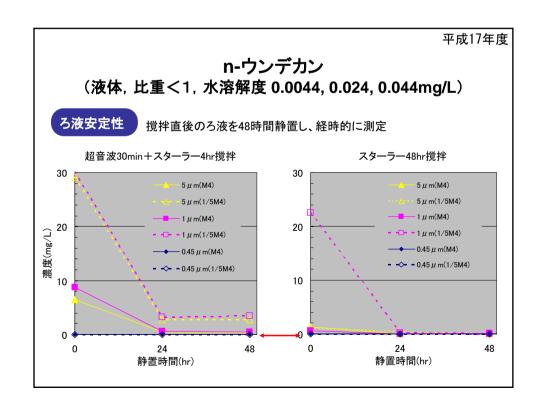


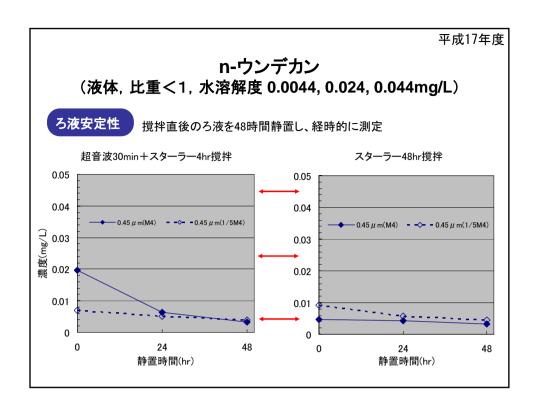


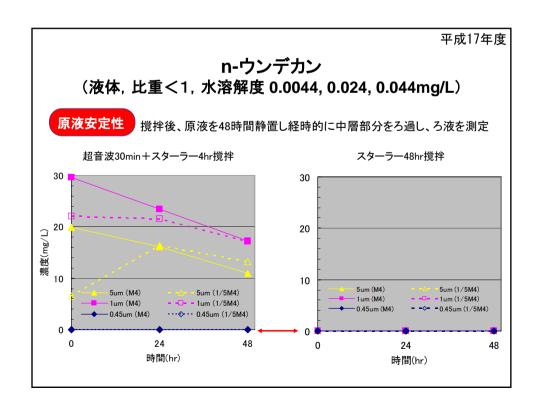


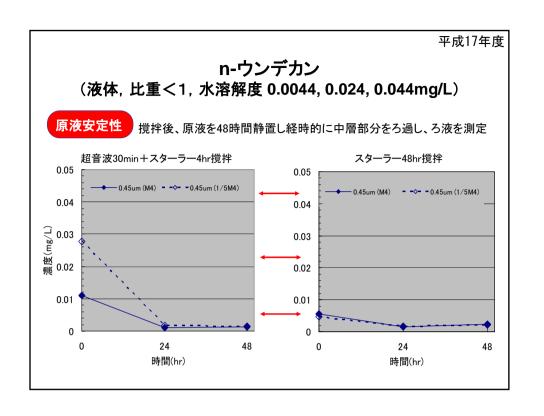


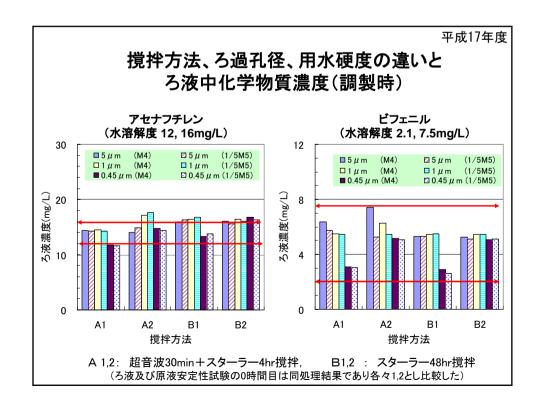


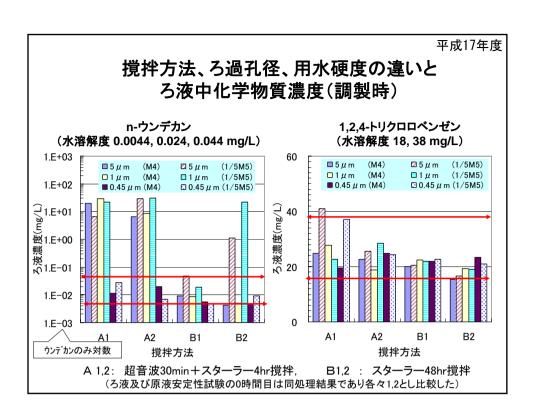












結 果(1)

・硬度の違いによる差

少なくとも今回の4物質では硬度の差による著 しい濃度差は認められなかった。

・超音波処理の有無による差

液体 2 物質は超音波処理を加えることで溶解又は分散性が高まる傾向。特にウンデカンは、 $0.45 \sim 5 \mu m$ の微粒子が増、溶解度よりも $3 \pi m$ 大戸程度高い濃度のろ液も得た。

結 果(2)

・保留粒子径の違いによる差

 0.45μ mによるろ液が概して最小濃度,静置による変化も少(撹拌方法に依存しない)。

・静置による安定性

水溶解度以上の高濃度となったウンデカン $(1~5 \mu m 5 \oplus 0)$ のろ液を除き、比較的安定。

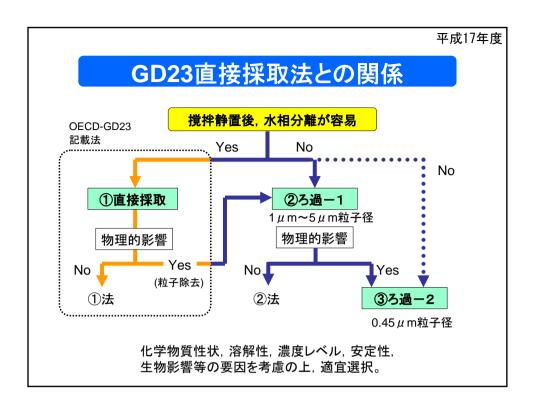
ウンデカンは比重小、故に、微粒子化したものが上部へ移行し濃度勾配形成か。

平成17年度

WAF調製: 手順例(案)

撹拌方法	①スターラー48時間 又は ②超音波0.5時間+スターラー4時間
	・エマルジョンや微粒子を形成しやすい液体物質は 特に理由がなければ①推奨 ・撹拌時間は確認がとれていれば変更可
フィルター 孔径	基本は0.45μm(前処理:1,5μm使用可)分析困難物質は生物影響がなければ 1,5μm使用可
素材	・吸着しない素材を選択
(遠心分離)	確認の上使用可(平成17年度検討範囲外)
静置	溶解度近辺ならば基本は調製時使用 溶解度を大きく超えるような場合は静置後の安定確認 (不溶分の目視確認必要)

注: 対照区も試験区同様処理



今後の検討課題

WAF調製の適用拡大

- ・多成分物質(モデル物質=検討中)
- •多成分物質(既存物質=検討中)

直接添加法と段階希釈法によるWAF比較

- 濃度組成の変化
- ・生態毒性の違い

事前検討事項

フィルター種類によるろ液中濃度比較

平成17年度

実験条件

被験物質: ビフェニル

添加濃度: 1g/1000mL (M4調製水)

搅拌方法: 超音波処理30分

+ スターラー処理4時間

静 置: 約5分

ろ 過: 各種フィルター (n=3)

濃度分析: HPLC法

フィルター種類

孔径	メーカー	種類	材質
0.45	ミリポア	MF-ミリポアHA	セルロース混合エステル系
μ m	ミリポア	HVLP	ポリビニリデンジフロライド
1	アドバンテック	GA-100	何れもガラス繊維
μm*	Whatman	GF/B	
5	アドバンテック	No.2	何れも定性ろ紙
μ m *	Whatman	2	(JIS P3801 2種相当)

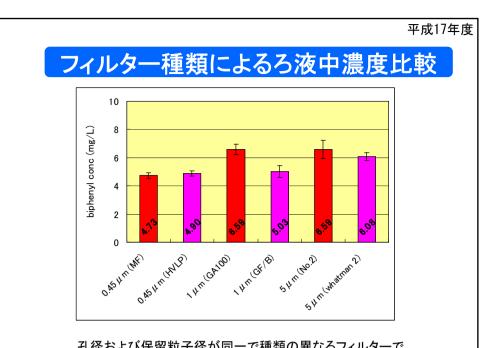
*:保留粒子径

平成17年度

フィルター種類によるろ液中濃度比較

71 公文	7.05		測定値	平均値	標準偏差	変動
孔径	フィルター	n	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(%)
		1	4.83			
	MF	2	4.48	4.73	0.215	4.55
0.45		3	4.87			
μm	и m	1	4.97			
,	HVLP	2	4.70	4.90	0.180	3.67
		3	5.04			
		1	6.40			
	GA-100	2	7.04	6.59	0.391	5.93
1μ m		3	6.33			
*		1	4.89		0.414	8.23
	GF/B	2	4.71	5.03		
		3	5.50			
		1	5.85			
	No.2	2	7.11	6.59	0.657	9.97
$5 \mu \text{ m}$		3	6.80			
*		1	6.22			
	Whatman 2	2	5.77	6.08	0.272	4.47
		3	6.26			

ビフェニル水溶解度 2.1mg/L, 7.5mg/L





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

問題点

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

目標

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

手順

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

現行魚類の毒性症状についての記載(1) 化審法試験法通知(平成15年11月21日3省局長通知)

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

現行魚類の毒性症状についての記載 (2) 藻類、ミジンコ及び魚類の急性毒性に対する試験手順 例(平成15年11月版、国立環境研究所) (一部分略)

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

現行魚類の毒性症状についての記載 (3) 環境省生態毒性試験 (平成18年度既存化学物質等生態 毒性試験実施事業仕様書)

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

EPAの表記法 (参考)

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

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

つづき

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

遊泳 停止 不安定 旋回 アメンボ行 逆さ遊泳 傾泳 呼吸 速い 乗い 不規則 停空 (募弊

各試験施設のアンケート結果の記載例 (抜粋)

- > 行動が停止した場合
 - 遊泳不能、不活発、横転、反転、遊泳行動異常、 着底、異常遊泳、無活動、活動(度)低下、うつびせ、完全平衡喪失、嗜眠状態、仮死
- > 行動が異常の場合
 - 旋回、スパイラル遊泳、コークスクリュー遊泳、 回転、狂奔、平衡失調、方向不定遊泳、異常遊泳、興奮、過敏
- 体色が変化した場合
 - 明色化、暗色化、体色の変化、体色黒化、体色 淡化、白化、暗化、変色、該当無し

語句の統一の考え方

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

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

分類		記載事項 症状の定義(案)				
A	死亡・重篤	死亡	観察可能な動き (例えば鰓蓋の動きなど) がなく、尾柄部に触れて反応がない状態。			
		遊泳不能	観蓋のみが動いているが、遊泳等の運動が停止、または極度の異常を示している状態。これまでの仮死、横臥、横転等が相当する。			
В	異常	遊泳異常	正常ではない遊泳行動を示す状態。以下の症状が含まれる。			
			・ 表層遊泳(表層で遊泳。鼻上げ等を含む。)			
P			平衡失調(平衡感覚が失われており、背泳、スパイラル遊泳(鉛直方向)、コークスクリュー遊泳(水平方向)等をしている)			
			- 方向不定遊泳(方向感覚がなく遊泳方向が定まらない。)			
a . 188			・ 過活発(活動量が増加している、興奮、狂奔等)			
	i i		・ 不活発(活動量が低下している) ・ 痙攣			
	7	外見異常	正常ではない外見を示す状態。①表面に関する異常と②形態に関する異常の 2つに分類する。			
		①表面異常	・ 体色変化(明化・暗化) ・ 出血(内出血を含む)			
			・ びらん(ただれる) ・ 館腐れ			
			- 立鱗(鱗が逆立つ) - 脱鱗			
			· 粘液異常(粘液過剰分泌、粘液凝固等)			
		②形態異常	・ 背曲がり ・ 骨折 ・ 眼球異常(眼球突出等)			
		呼吸異常	正常ではない、鰓蓋の動きを示す状態。増加または減少がある。			
С	正常	なし	遊泳行動及び外見に異常がみられない状態。			

最終報告書の記載方法(案)

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

最終報告書の記載方法 (例)

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

今後の予定

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

