

生態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実施に係る 技術的事項

平成20年11月26日（水）（東京）

平成20年12月 9日（火）（大阪）

(株)三菱化学安全科学研究所

セミナー内容

- 試験困難物質とは
- これまでの検討報告概要
- 用語の定義 WAFとは
- 難水溶性多成分モデル物質の水性画分
(WAF)調製検討
- 試験手順マニュアル(WAFの調製方法)案

試験困難物質とは

標準的な水生生物毒性試験手法に
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



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)
吸着性
低濃度毒性

濃度維持
試験液調製
水溶解度測定
微量分析

コロイド状性
着色性

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

解離性

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

OECD ガイダンスドキュメント No23

Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures

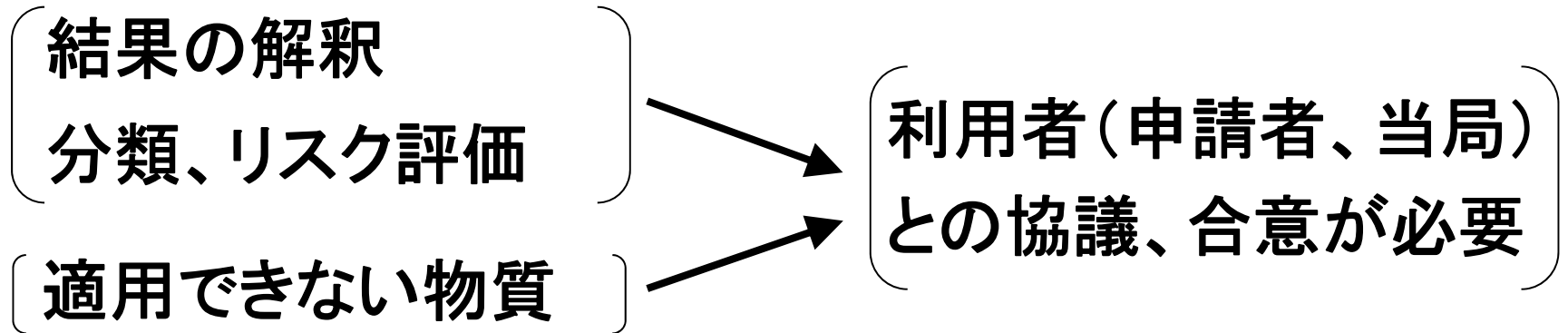
(試験困難物質および混合物の水生生物試験
に関するガイダンス文書)

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。

しかし



**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**



これまでの検討報告概要

(難水溶性物質対応)

平成14年度
～15年度

8種化学物質のミジンコ毒性に及ぼす助剤(溶剤, 分散剤)使用の影響

p-ペンチルフェノール, 2-メチルナフタレン, 2,3,4,6-テトラクロロフェノール,
m-キシレン, 2-セチルベンゾ[b]チオフェン, 3-クロロ-4-フルオロニトロベンゼン,
p-クロトルエン, 4-エチル-1,1ビフェニル

平成17年度

異なる4つの性状を有する難水溶性物質を用いた条件の異なるWAF (WSF) 調製法(攪拌方法・攪拌時間・静置時間・フィルター・硬度等)の検討

固体・浮遊性: アセナフチレン

固体・沈降性: ビフェニル

液体・比重<1: *n*-ウンデカン

液体・比重>1: 1,2,4-トリクロロベンゼン

用語の定義

(1) 難水溶性物質 (Poorly (or sparingly) water-soluble substance)

溶解度が $<100\text{mg/L}$ の物質

(2) 混合物 (Mixture)

化学反応を起こさない2つ以上の物質の混合物または溶液

(3) 多成分物質 (Multi-component substances)

溶解度や物理／化学的性状の異なる個々の物質が複雑に混ざり合った混合物を示し、ほとんどの場合、一定範囲の長さ／数の炭素鎖または置換度を持つ同族列の物質と特徴づけられる。

(4) 水性画分 (WAF, Water-accommodated fraction)

被験物質が溶解状態もしくは安定な分散（乳濁）状態、または両者が混在する状態で存在している水性画分。乳濁状態や微粒子状態の被験物質が含まれていることもある。混合物および多成分物質の場合にのみ適用することができ、単一物質の場合には適用しない。

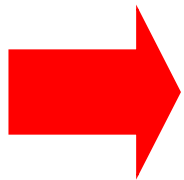
(5) 負荷率 (Loading rate)

WAFの調製の際に用いられる被験物質と水の重量対容積比 (mg/L) 。溶解させる前に被験物質と水を混合する濃度である。

W A F とは？

Water-accommodated fractions (WAFs)

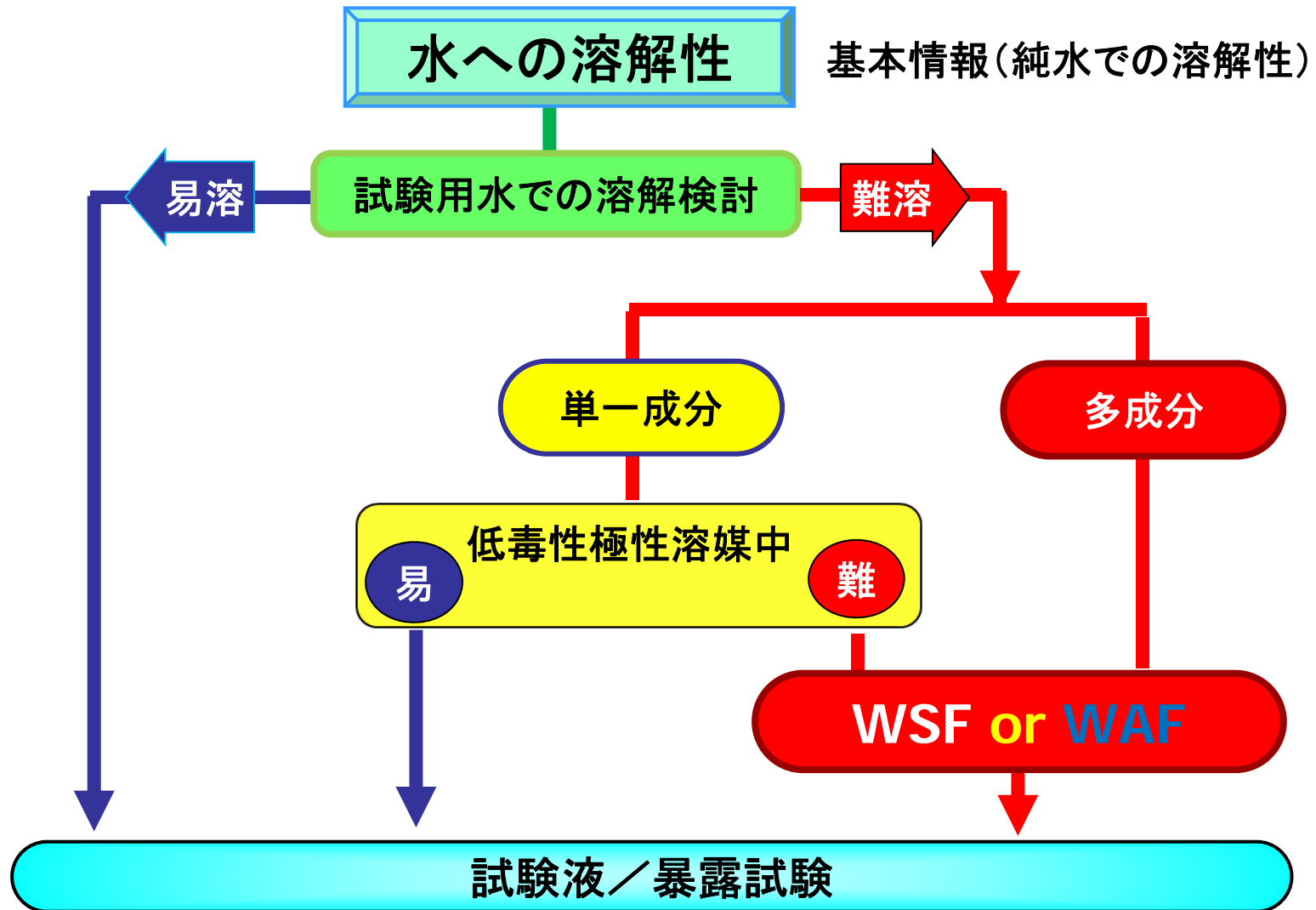
多成分物質の構成成分または物質の一部が溶解および安定に分散,または乳濁して存在している水相画分のこと。



溶解のみならず安定な分散液も含む

Water-soluble Fractions (WSFs)とは違う

一般的な試験液調製法の流れ



難水溶性多成分モデル物質の水性画分 (WAF)調製検討

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)

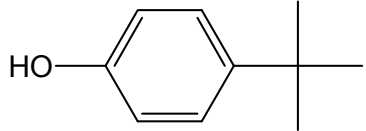
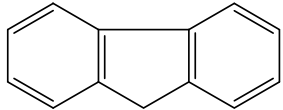
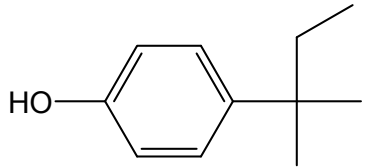
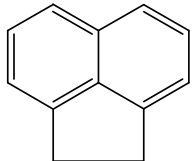
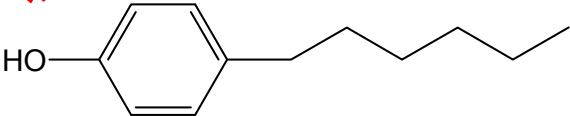
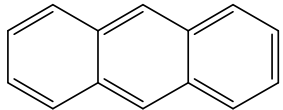
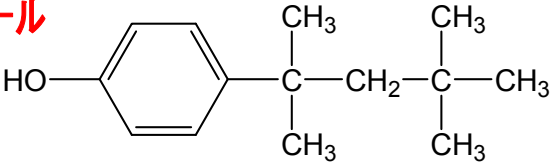
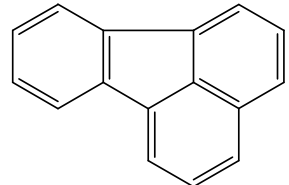
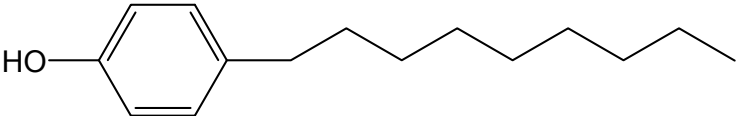
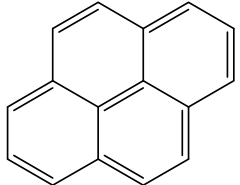
直接添加法と段階希釈法によるWAF比較

- ・濃度組成の変化
- ・生態毒性の違い

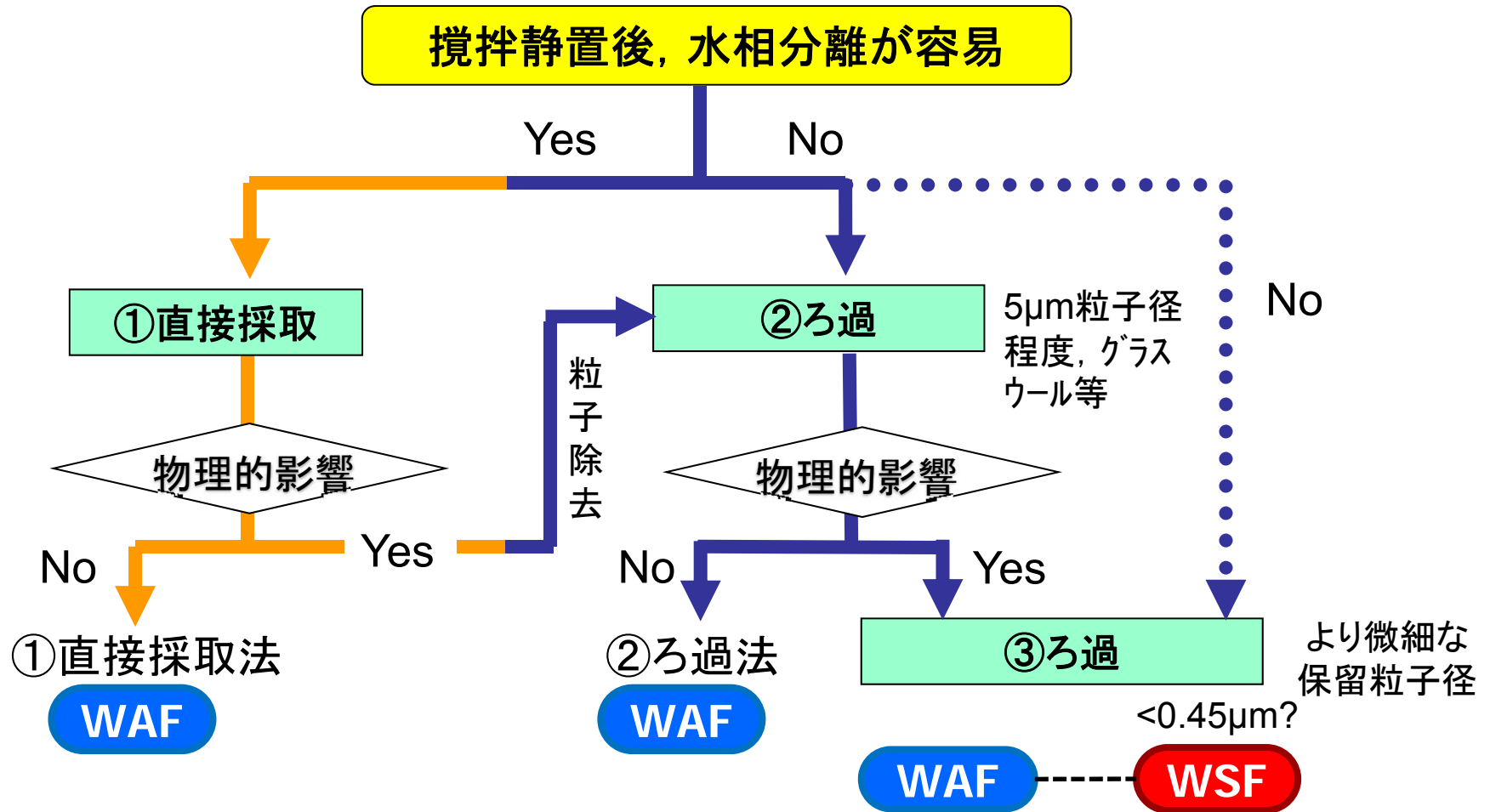
18年度 難水溶性の多成分物質／混合物の

WAF調製法 一般化できないか？

難水溶性多成分物質モデル物質

アルキルフェノール類	多環芳香族
<p><i>p-t</i>-ブチルフェノール (BP)</p> 	<p>フルオレン (FRE)</p> 
<p><i>p-t</i>-ペンチルフェノール (PP)</p> 	<p>アセナフテン (ACE)</p> 
<p><i>p-n</i>-ヘキシルフェノール (HP)</p> 	<p>アントラセン (ANT)</p> 
<p><i>p-t</i>-オクチルフェノール (OP)</p> 	<p>フルオランテン (FRA)</p> 
<p><i>p-n</i>-ノニルフェノール (NP)</p> 	<p>ピレン (PYR)</p> 

WAF と WSF の関係



化学物質性状, 溶解性, 濃度レベル, 安定性, 生物影響等の要因を考慮の上, 適宜選択。

WAFは希釈をしてはならない？

(部分的溶解をする多成分物質)

負荷率

100 mg/L

WAF

成分A 70 mg/L

採取or
ろ過

A 50 mg/L

成分B 30 mg/L

B 1 mg/L

10倍希釈

~~A 5 mg/L~~

~~B 0.1 mg/L~~

負荷率

10 mg/L

WAF

成分A 7 mg/L

採取or
ろ過

A 7 mg/L

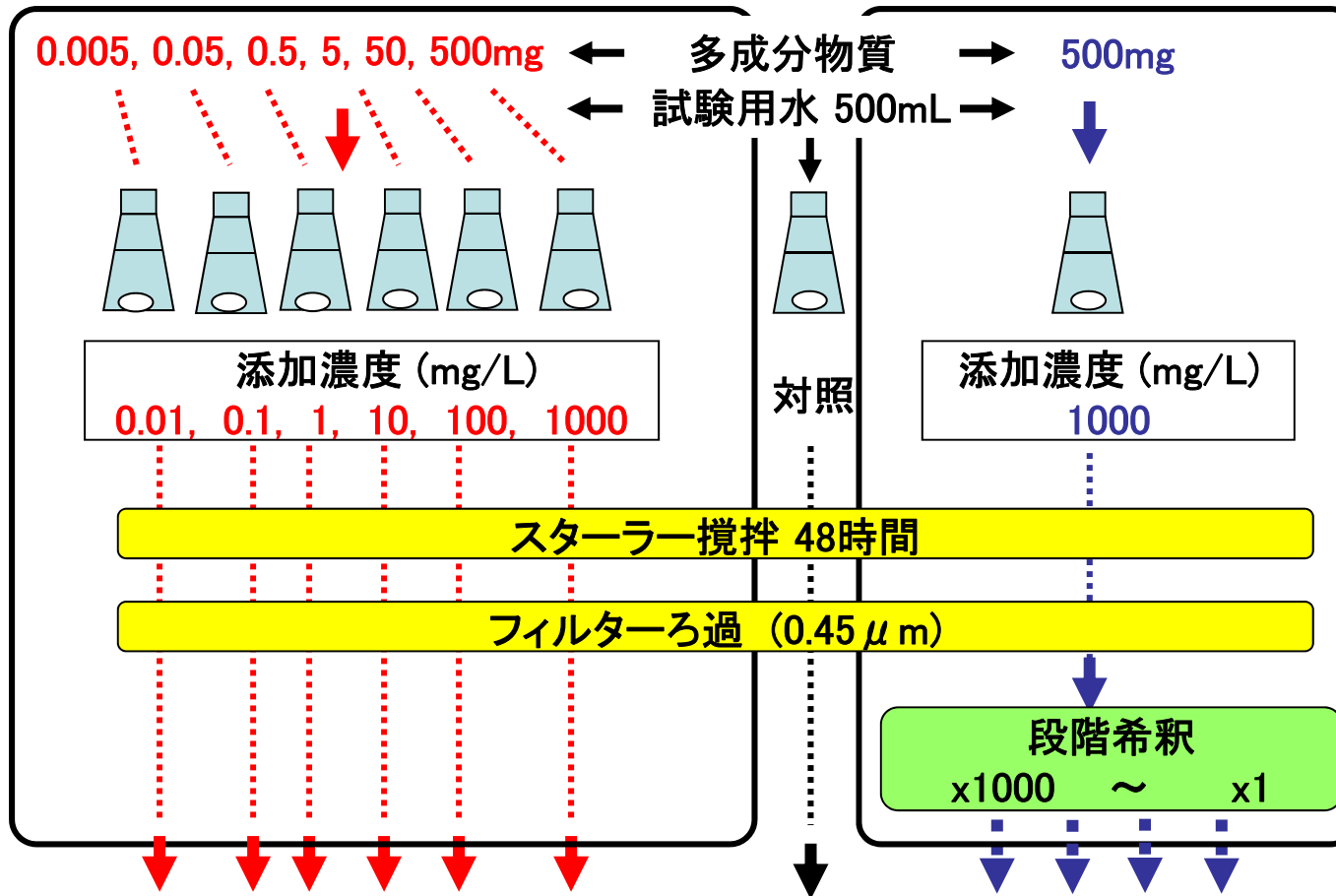
成分B 3 mg/L

B 1 mg/L

検討実験 調製法概要フロー

個別添加法

希釈法



試験用水:

1/5 Elendt M4
(硬度50mg/L)

攪拌条件:

- ・密閉ガラス容器
- ・遮光
- ・20°C

WSFに近い

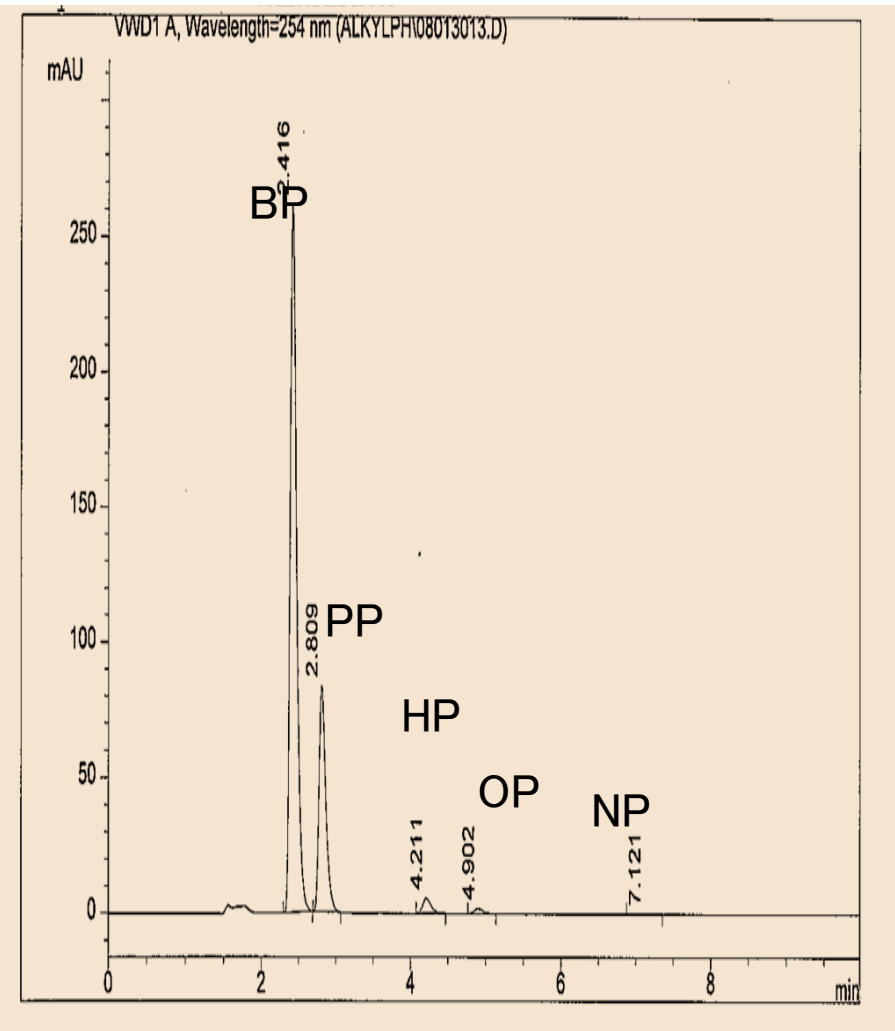
1. 機器分析による濃度分析 (0, 48 hr安定性, 成分毎分析)
2. ミジンコ急性遊泳阻害試験 (48時間)

物質個々(10物質)の溶解度は別途, 同条件で測定する

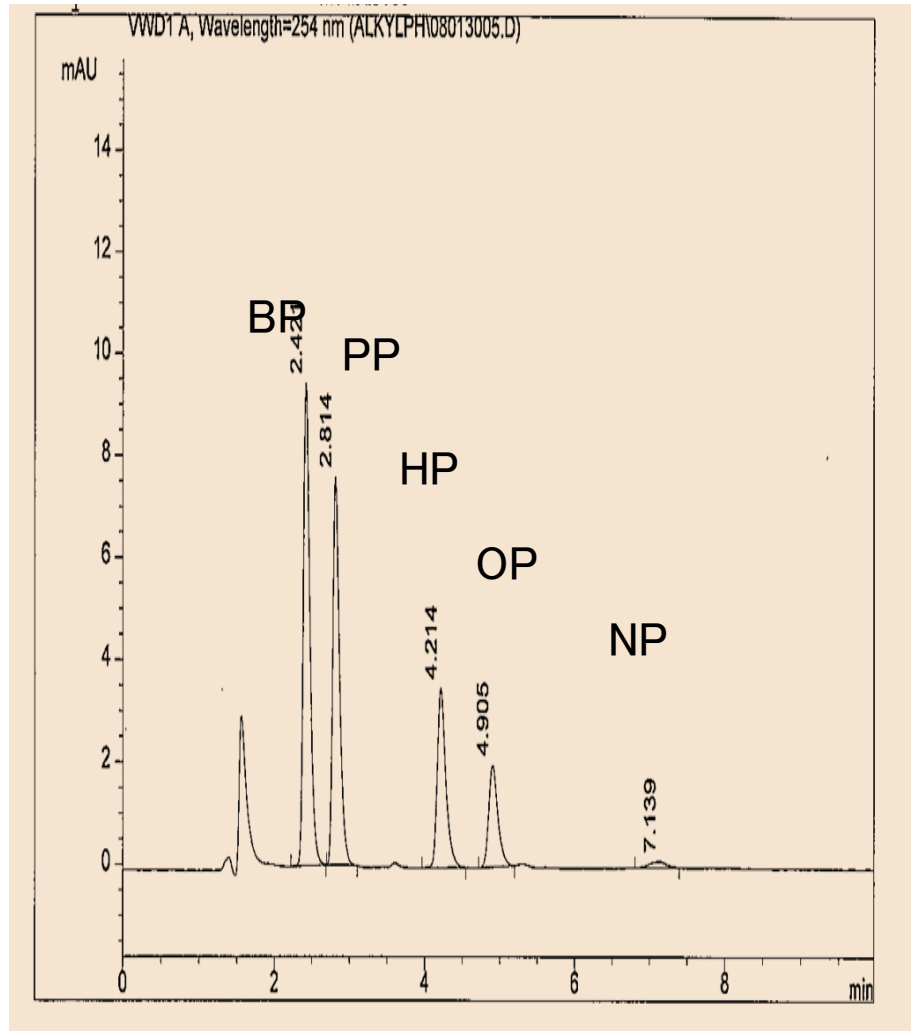
アルキルフェノール類

WAFの代表的なクロマトグラム

個別添加法、1000 mg/L

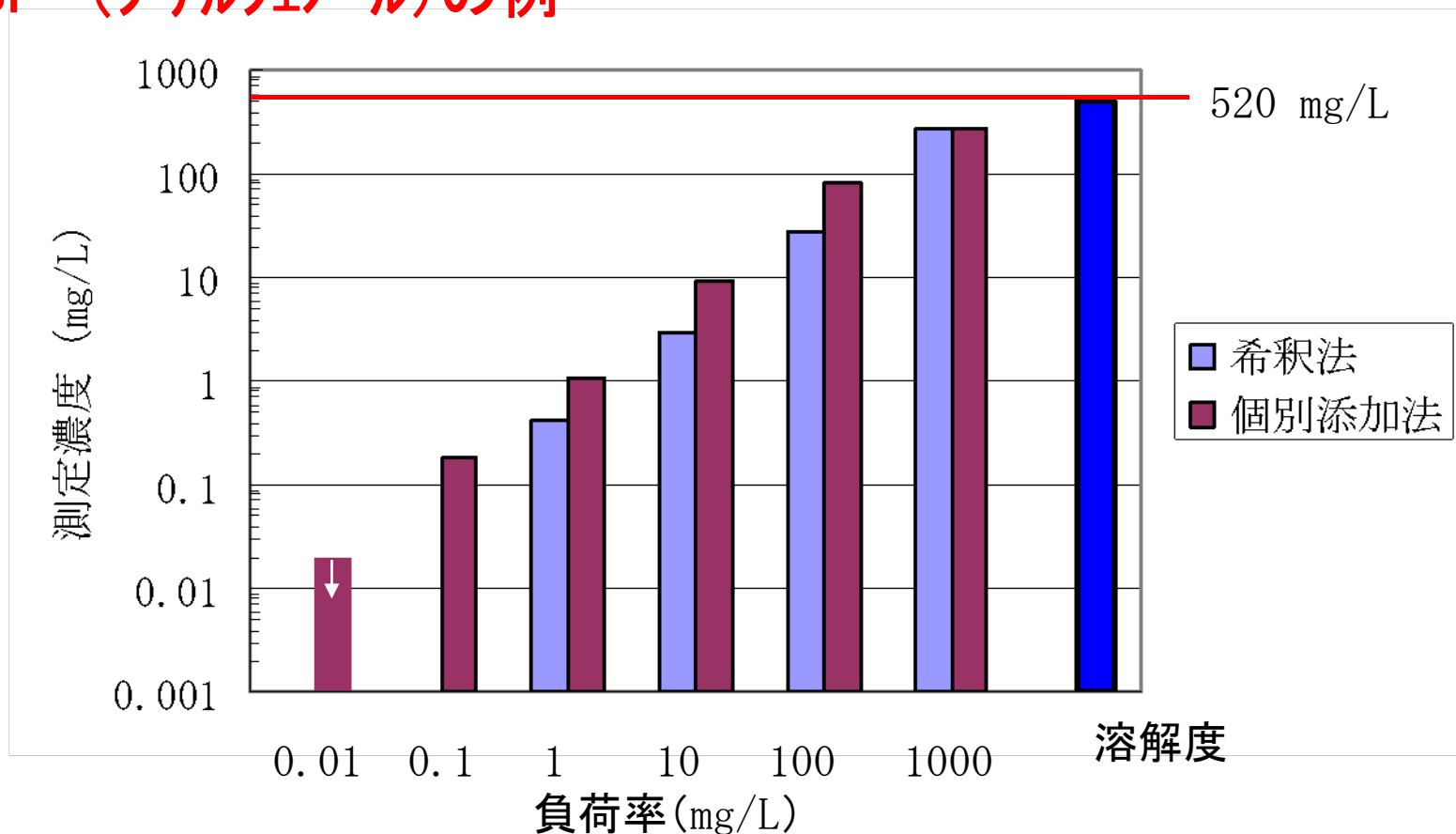


個別添加法、10 mg/L



アルキルフェノール類 WAF中の測定濃度

BP (ブチルフェノール) の例



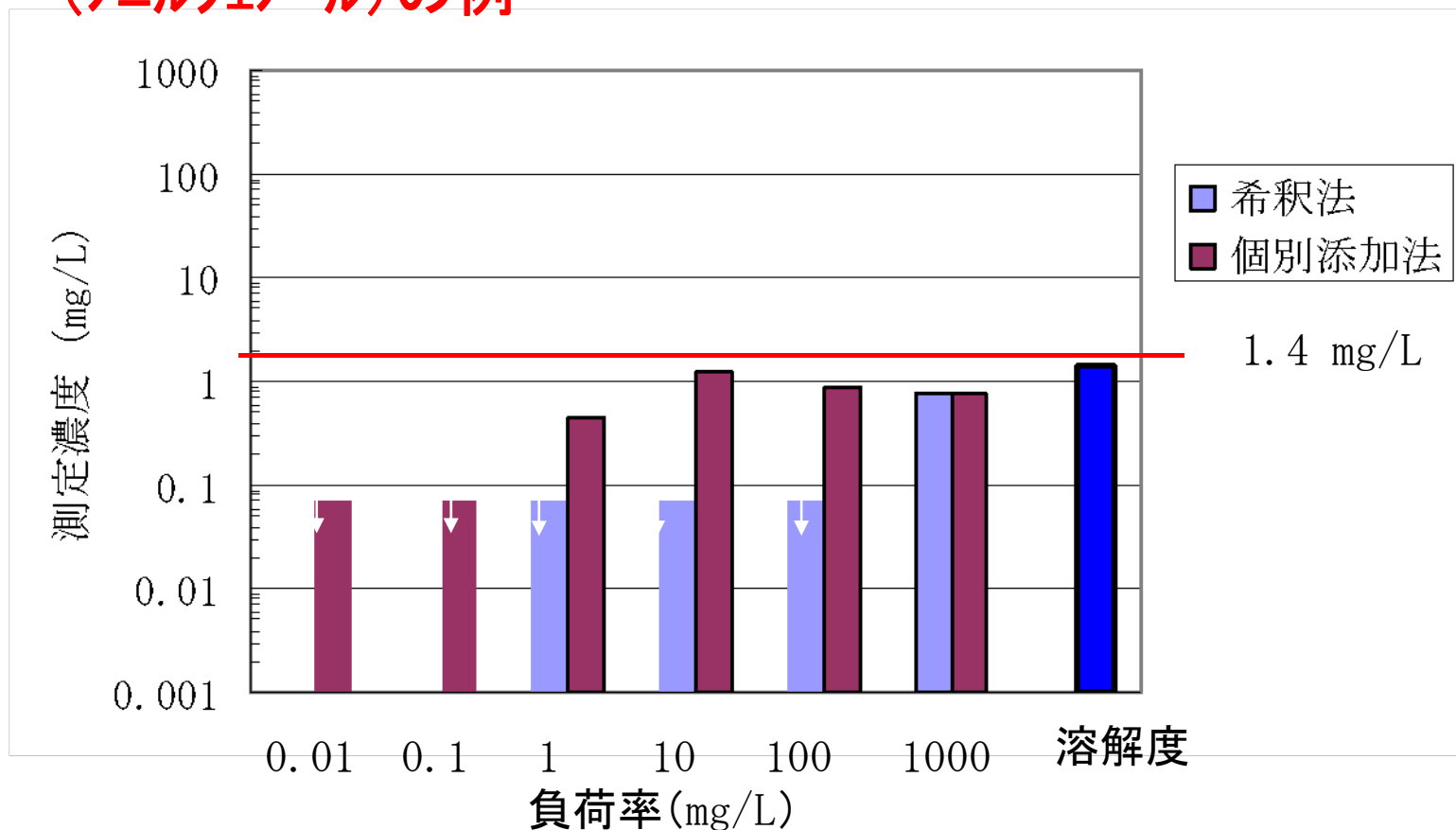
測定濃度 : 平均測定濃度

溶解度 : 1/5 Elendt M4への溶解度

↓ : 検出限界未満

アルキルフェノール類 WAF中の測定濃度

NP（ノニルフェノール）の例



測定濃度： 平均測定濃度

溶解度： 1/5 Elendt M4への溶解度

↓： 検出限界未満

表1-1 希釈法と個別添加法で調製したWAF中の**アルキルフェノール類**の実測濃度とミジンコへの影響

			平均測定濃度 (mg/L)					合計	ミジンコ 48hr 阻害率(%)
			BP	PP	HP	OP	NP		
負 荷 率 (mg/L)	0.01	希釈	--	--	--	--	--	--	--
		個別添加	<0.02	<0.02	<0.03	<0.03	<0.07	--	0
	0.1	希釈	--	--	--	--	--	--	--
		個別添加	0.18	0.10	0.06	<0.03	<0.07	0.34	100
	1	希釈	0.42	0.11	<0.03	<0.03	<0.07	0.53	0
		個別添加	1.06	0.92	0.76	0.82	0.43	3.99	100
	10	希釈	2.89	1.03	0.08	0.06	<0.07	4.06	100
		個別添加	9.41	9.05	6.49	4.77	1.23	30.95	100
	100	希釈	26.9	10.2	0.98	0.50	<0.07	38.58	100
		個別添加	81.7	62.0	12.7	6.55	0.87	163.82	100
	1000	希釈	271	102	10.0	4.72	0.77	388.49	100
		個別添加	271	101	10.1	4.67	0.77	387.54	100
1/5 Elendt M4への 溶解度 (mg/L)			520	190	22	9.7	1.4	743.10	--

表1-2 希釈法と個別添加法で調製したWAF中の**多環芳香族**の実測濃度とミジンコへの影響

			平均測定濃度 (mg/L)						ミジンコ 48hr 阻害率(%)
			F R E	A C E	A N T	F R A	P Y R	合計	
負 荷 率 (mg/L)	0.01	希釈	--	--	--	--	--	--	--
		個別添加	<0.0015	<0.0027	0.00012	<0.00002	<0.00002	0.00012	0
	0.1	希釈	--	--	--	--	--	--	--
		個別添加	0.034	0.014	0.00874	0.00483	0.00851	0.0701	0
	1	希釈	0.0015	0.0027	0.00003	0.00003	0.00002	0.0043	0
		個別添加	0.341	0.428	0.0231	0.0148	0.0155	0.8224	100
	10	希釈	0.007	0.026	0.00014	0.00031	0.00020	0.0337	0
		個別添加	0.934	2.14	0.0170	0.0223	0.0193	3.1326	100
	100	希釈	0.095	0.270	0.00140	0.00313	0.00206	0.3716	25
		個別添加	0.964	2.06	0.0160	0.0302	0.0212	3.0914	100
	1000	希釈	1.21	2.30	0.0141	0.0325	0.0216	3.5782	100
		個別添加	1.21	2.30	0.0141	0.0325	0.0216	3.5782	100
1/5 Elendt M4への溶解度 (mg/L)			0.50	1.9	0.00080	0.0038	0.000096	2.40	--

今回の検討結果 まとめ

- 希釈法と個別添加法の間には、WAF中の測定濃度に明らかな違いが生じた。
- 希釈法では希釈倍率通りの測定濃度が、個別添加法では負荷率と水溶解度に則した濃度が得られた。
- ミジンコへの毒性影響は、測定濃度を反映した結果となった。

以上の結果より、部分的溶解成分を有する多成分物質のWAFの調製方法には、希釈法は適せず、個別添加法を選択すべきである。

WAF調製法手順マニュアル(案)

事前確認

- ・スターラー攪拌強度：一定（水面から渦底まで水深1/3程度）
- ・エマルジョンや微粒子を形成しやすい物質は適宜検討実施
- ・飽和溶液までの攪拌時間（時間<48時間，事前検討により変更可）
- ・適切な分析法の開発
 - ①主成分、意味のある成分の分析（GC，LC等）
 - ②全有機炭素（TOC）濃度測定等；微量分析や生物を暴露した水には適さない。
- ・検出限界以下の場合，検討結果，負荷率および検出限界値を報告。

注意事項

- ・被験物質の均一性
- ・負荷率ごとに個別にWAFを調製する。
- ・溶剤の使用を避ける。秤量困難等の理由で溶剤使用がやむを得ない場合はWAFに溶剤が残らないようにする。

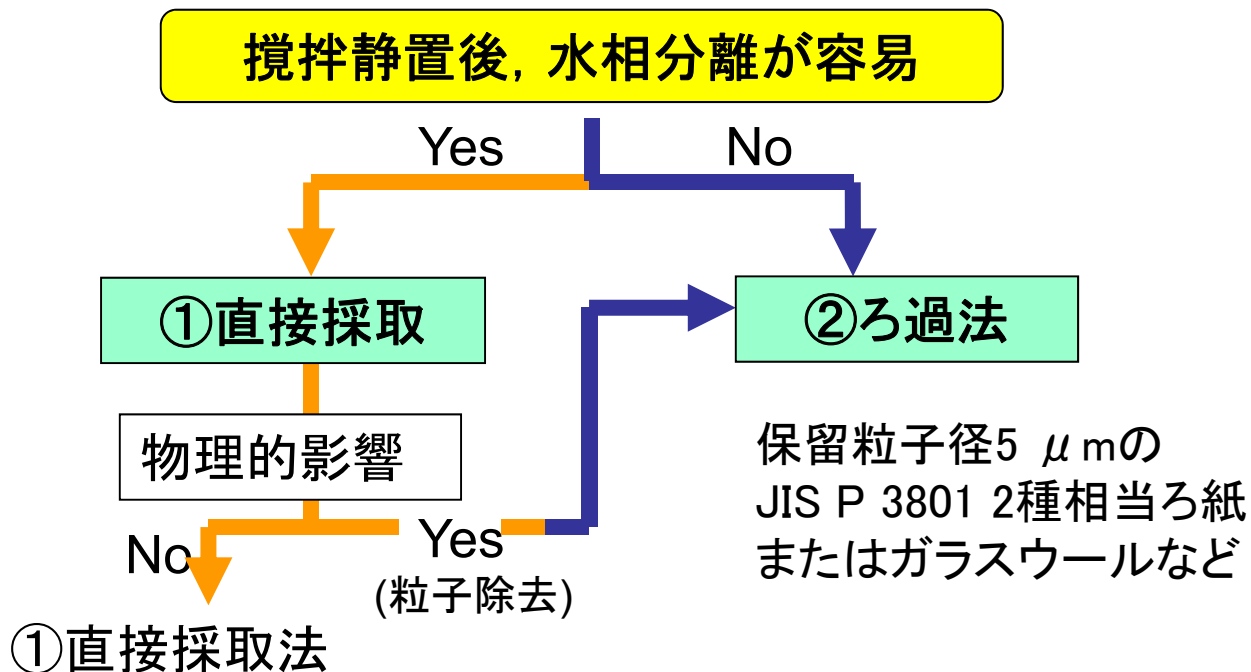
W A F 調製法 (1)

- (1) 被験物質と水を混合し、飽和溶液の状態に達するまで攪拌する。ただし、調製中に溶存酸素濃度、pH、温度等の水生生物に適した水質（各試験ガイドライン参照）が変化しないためには攪拌時間は短い方がよく、48時間以内を目安とする。

WAF調製法 (2)

(2) 攪拌後の試料を静置し，水相を直接採取しWAFとするか，ろ過により懸濁物質を取り除きWAFとする。

予備試験： 直接採取法とろ過法の選択



WAF調製法 (3)

- (3) 水相を採取しWAFとする場合は、攪拌後の試料を数時間(例えば4時間)静置する。被験物質は性状により浮遊、沈殿または懸濁状態となり、透明な水相(例えば中層)を採取できる場合に、この水相を必要量採取する。

W A F 調製法 (4)

(4) ろ過を行う場合は、保留粒子径 $5\ \mu\text{m}$ のJIS P 3801 2種に相当するろ紙(例:アドバンテックNo.2およびワットマンNo.2)やガラスウール等を用いる。減圧ろ過による被験物質の消散や、吸着等による被験物質の消失の可能性があるため、生物に対して物理的影響がないのであればより目の細かいメンブレンフィルター(孔径 $0.45\ \mu\text{m}$ 等)を用いる必要はない。

注: (1)~(4)の一連の操作は対照区も試験区同様に処理

報告書作成の際の留意点

- (1) WAF調製の選定理由(難水溶性, 多成分物質・混合物)
- (2) 調製法
負荷率, 被験物質重量, 水量, 容器形状, 容器材質, 試験用水, 温度, 攪拌時間および強度, 容器密閉の程度(容器の上部空間等), 安定性 等
- (3) WAFの外観(色調, 沈殿物の有無, 浮遊物の有無, 凝集の有無およびその状態等)
- (4) 影響濃度の表記

負荷率で表記した毒性値

LL50 (半数致死負荷率)

EL50 (半数阻害負荷率)

NOELR (最大無影響負荷率)

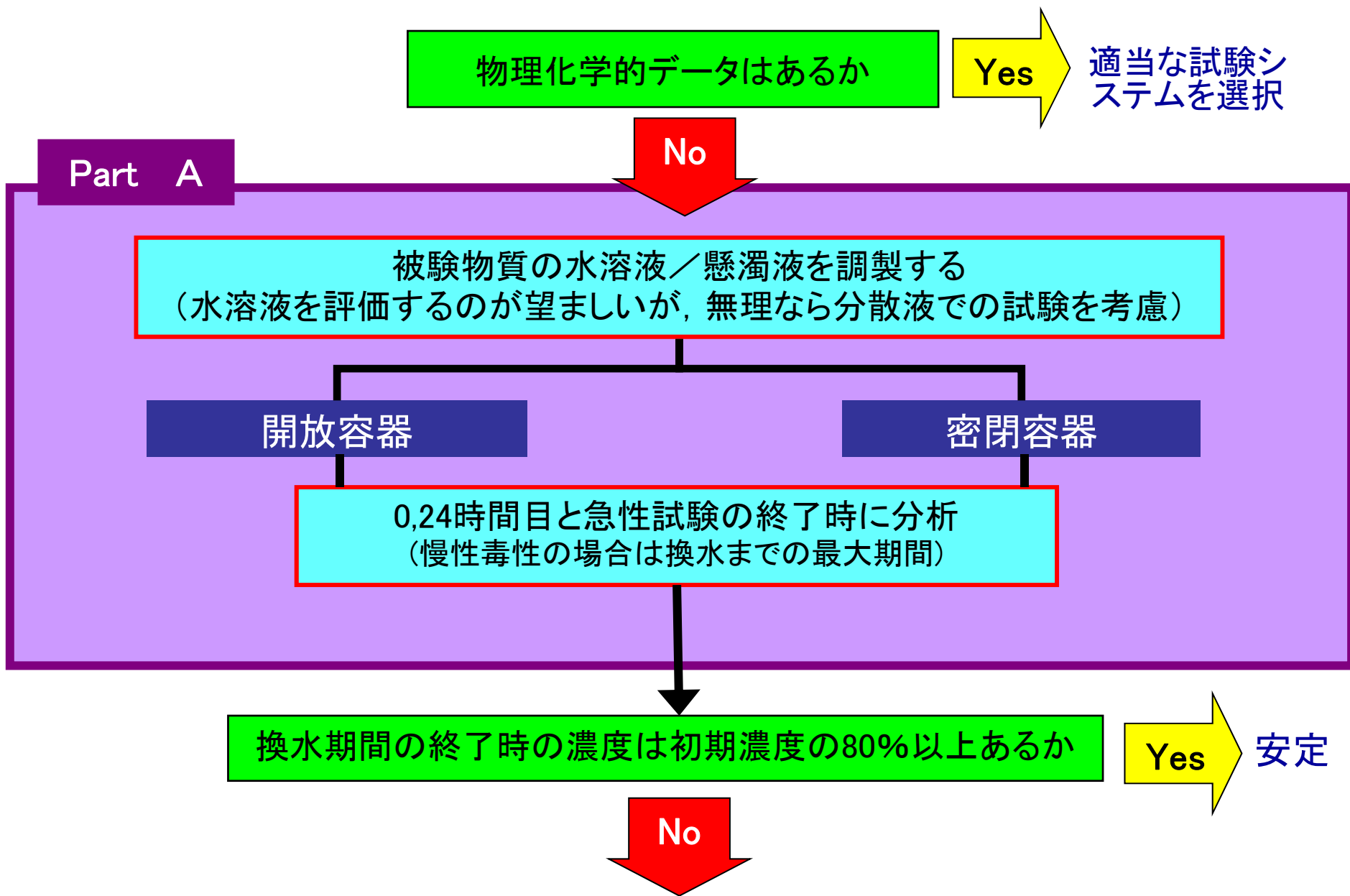
実測濃度で表記した毒性値

LC50 (半数致死濃度)

EC50 (半数阻害濃度)

NOEC (最大無影響濃度)

付録



No

被験物質が失われたのは開放容器のみか

Yes

揮発性

No

Part B

被験物質の水溶液／懸濁液（被験物質で前処理した密閉容器）

光条件下の容器

遮光条件下の容器

0,24時間目と急性試験の終了時に分析
(慢性毒性の場合は換水までの最大期間)

Part Aの損失

>

Part Bの損失

Yes

吸着性

No

光条件下の損失 > 遮光条件下の損失

Yes

光分解性

No

加水分解性, 易酸化性, 生分解性