

生態毒性試験実施にあたって の留意点



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

化審法ではEC_xは採用されない？

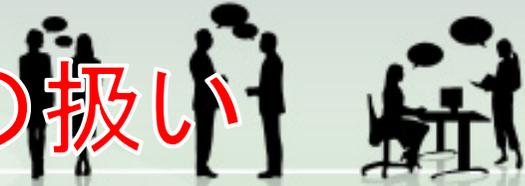


最近採択されるOECD試験ガイドラインでは、NOECを求めるとともにEC_xを算出する例が多くなっています。化審法ではEC_xを併用することはありませんか、またはXは何%ですか？

- OECD試験ガイドライン201, 218, さらに210, 211の改訂版はEC_x (X%影響濃度でNOEC値相当として利用する) も求める試験法です。
- NOECとEC_xを求める試験デザイン (曝露濃度や各濃度区の繰り返し数) は異なります。
- 化審法では、NOEC値を求めています。リスク評価のための既存情報としてEC10も利用しています。



GLP試験における、外れ値の扱い



生態影響試験の結果、ある試験の1つの数値が極端に他の繰り返しの数値と異なる場合に、どのように判断するのか？
棄却は妥当でしょうか？

- 繰り返しのある試験手順が規定されていますので（NOEC値を求める場合は必須）繰り返し間で著しく異なる結果がでることがあります。
- 曝露条件や試験操作に原因がある場合は、その点を明らかにして対処してください。
- 原因が明らかではない場合で、適切な統計検定で棄却できる場合は、試験責任者の判断で棄却することは許容されます。



ミジンコ繁殖試験での 産まれた異常個体の扱い



TG211の試験で、孵化していない卵で産まれたり、死亡ではないが、遊泳できない個体で産まれる場合があるが、その扱いは毒性影響とみてよい？

曝露濃度に依存して増加する現象の場合は被験物質の影響と推定されるので、死んでいなくとも正常に遊泳する個体とは区別すべきである（正常個体だけを産仔数とする）。

子ミジンコは産まれた直後から試験溶液中の被験物質に曝露されるが、親ミジンコ世代も同様に曝露を受け影響が出ていたはずであり、その濃度で現れる子ミジンコへの多少の影響は、（その後正常に繁殖できるのであれば）無視できる程度の異常であるかもしれない。

【結論】判断に迷う場合には、正常個体のみを産仔数とした場合と、軽度の異常は考えず生存個体を産仔に数えた場合の2通り産仔数があつてよい。その場合は、毒性値も2組だした上で、どちらが妥当であるか試験責任者の判断を示すこと。



ミジンコ繁殖試験で毎日の試験溶液交換は必須か？



水溶解度付近の試験では、不溶物の物理的な影響を排除する一方、濃度維持のため半止水式曝露試験を行うが、毎日の換水が求められるのか？

- 換水は少なからずミジンコにストレスを与えるので、作業の手順には工夫が必要です。工程を見直し、それでも週3回程度換水の場合と比べてストレスのため悪影響がでる場合は、必ずしも毎日の換水に固執する必要はありません。
- 毎日換水の悪影響が見られないとするラボもある（系統や試験環境条件の差は考慮）。



Elendt の培地組成 . . .



211(Annex2)では $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 1260 \text{ mg/L}$
202(Annex3)では $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 1230 \text{ mg/L}$
どちらが正しいのでしょうか？

- 原著論文から判断してTG211の値が正しいようです。

Elendt(1990)では、Mo の濃度は 0.025 mg/L

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (分子量) = 241.95

モリブデン (原子量) = 95.96

M4培地Stock sol. I 希釈倍率 20000

$0.025 * 241.95 / 95.96 * 20000 = 1260.7$



藻類生長速度の日間変動係数の妥当性クライテリア



藻類生長阻害試験で妥当性基準の1つ日間変動係数35%以下で、この変動係数の算出方法は？

- 化審法ガイドラインでは「対照区の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。」としている。OECD試験ガイドラインでは、繰り返し（ $n=6$ ）毎に日間変動係数を求め、それをさらに平均をとった平均変動係数が35%を超えないことと規定している。



日間変動係数の算出(例)



藻類密度				平均 生長速度	区間生長速度			
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	日間変動係数 (平均)			34 %
標準偏差				0.03				
繰返間の変動係数(CV値)				2 %				

短期試験の場合の被験物質サンプルの保管（化学物質GLP）



化審法の新規化学物質審査の際に求められるGLP試験では、被験物質の試料保管の義務はあるのでしょうか？

- 急性試験（藻類・ミジンコ・魚類）の各試験法においては、OECD-GLP原則やガイダンス文書の規定により被験物質の保管は必須ではありません。
- 保管した被験物質は、後に不純物の存在、多成分物質の場合は構成比、分子量分布の確認のために使用される可能性があるが、すべての試験で必要となるものではない（管理当局の意見を参考にスポンサーが判断）。



Pooled controlは利用できるか？



OECD-TG 211（改訂版）では、条件を満たせば“**Pooled control**”を利用してもよいとしているが、どのように理解すればよいのか？

59. To determine significant differences between the controls (control and solvent or dispersant control), the replicates of each control can be tested as described for the limit test. If these tests do not detect significant differences, **all control and solvent control replicates may be pooled**. Otherwise all treatments should be compared with the solvent control.

- OECDガイダンス文書No.54(2006)では、陰性対照区と助剤対照区間に有意な差がないとの判定でも、同じであることの証明ではないので慎重に対処すべき（科学的判断）。
- 判断が普遍的・統一的であるべき（行政的判断）



最終報告書のまとめに当たって



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。

【**妥当な科学的判断**】

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。

