

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

化審法での試験困難生態毒性試験は？



新規申請の際に提出する生態毒性試験結果の中で、いわゆる試験困難物質に相当する試験はどのようなものですか？

- **OECD**試験ガイドラインが示す標準的な試験手順では試験困難な物質を「試験困難物質」といい、特別にガイダンス文書（**GD23**）を公表しています。
- 環境省は化審法で要求する動植物試験については、化審法試験法の他に試験困難物質は**GD23**の指示するところによるとしてきました。化審法の新規化学物質の審査に供される試験困難物質としては多成分物質が多く、**WAF**、**WSF**で試験溶液を調製して試験を実施する例が多い傾向にありました。
- また、化審法独自の「化学物質ベース」の届出という考え方から、
 - ①届出物質と変化物が分離できない、
 - ②変化物の構造が決定できない、などの理由から、試験実施前に事前に事務局（環境省）に問い合わせる例（いわゆる「相談案件」など）が多いようです。

藻類生長阻害試験の試験溶液調製の考え方



濃度測定ができない場合、WSF（水溶性分画）で調製するがろ過フィルターへの吸着の影響が懸念される。
ろ過を省略できるか？

- 試験法上は、無菌培養での試験を前提にはしています。被験物質の生分解性を考慮すれば、望ましくは無菌的な操作が求められます。
- 試験の成立の条件は、試験の妥当性クライテリアを満たすことですので、被験物質の濃度変動が小さいことに加え妥当性クライテリアを満たすのであれば、質問にある通り「ろ過」を省略できると言えます。
- ただし、その場合でも、他の生物（細菌・原生動物・・・）の量は可能な限り抑えたいので、試験溶液調製過程で、そのための手順を加えたり、手順を入れ替えたりの工夫は必要となるでしょう。



急毒・蓄積試験へのゼブラフィッシュの利 用は問題あるか？



ゼブラフィッシュは、**TG203**で推奨魚種の1つとなっている。化審法の魚類急性毒性試験および魚類蓄積性試験に利用できるかと考えるが、推奨されるか？

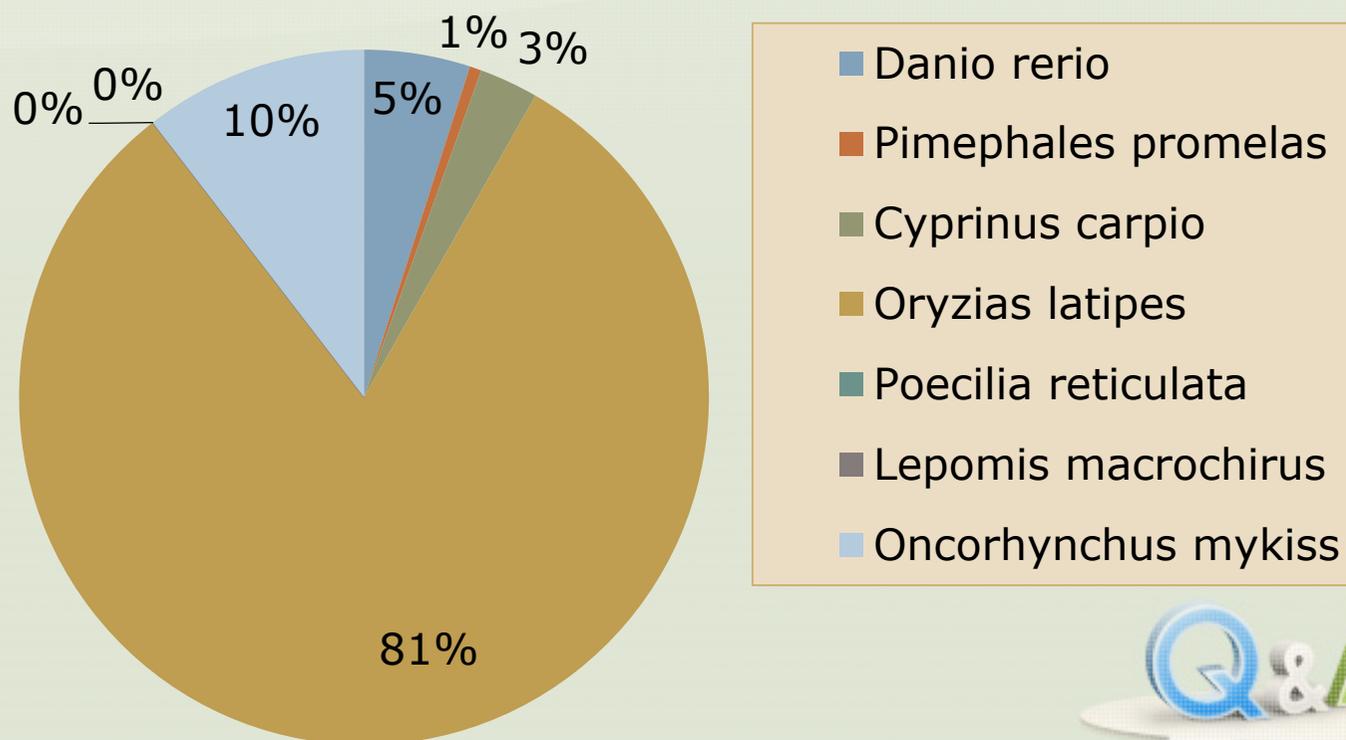
- ゼブラフィッシュを用いることに、化審法試験法はなんの制約も設けていません。魚類急性毒性試験では、**OECD-TG**の規定に従い、ゼブラフィッシュを推奨魚種に掲げています。
- ただし、環境省は、生態毒性試験に用いる生物は、その系統や起源まで管理するよう求め、再現性のよい試験実施が望ましいと考えています。
- ただし、魚類蓄積性試験の魚種については担当の経済産業省にお問い合わせ下さい。



(参考) 魚類急性毒性試験の魚種



平成23年～平成25年に新規化学物質の審査に供された182件の魚類急性毒性試験において、約8割に供試生物としてメダカ (*Oryzias latipes*) が使用されていたが、一部の試験ではゼブラフィッシュ (*Danio rerio*)、ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) 等が使用されていた。



OECDガイダンス文書No.23 「試験困難物質」



試験困難物質については、これまでも本文書（**GD23**）を根拠に試験手順を決定してきましたが、発行後すでに**10年以上**を経過していますが、今後とも有効とみてよいのでしょうか？

- **GD23**は**2000年12月**に発行されましたので、すでに**15年**になろうとしています。しかしながら、その文書の改訂については**OECD-試験ガイドラインプログラム**の中ではまったく話題になっていません。
- また、本書を基に作成された、国連**GHS**分類マニュアルの付属書が発行されていますが、内容の変更はありませんでしたので、その価値はまだ有効であると思っています。
- ただし、**GD23**発行後に、**OECD**試験ガイドラインのいくつかは改訂になり（**TG201,202,210,211**）、改訂の際に**GD23**の内容が、ガイドラインに取り入れられたものがあります。
- その他、**GD23**発行後の発表された、試験困難物質の生態毒性試験の手順の改良をテーマにした科学論文を根拠に手順を変更することは許容されます。ただし、その場合も事前協議で、具体的な届出物質の試験困難性に対して変更手順が妥当であることを確認する必要があります。

藻類生長阻害試験TG201の改訂(2006)



2006年改訂(2013年修正)版では「データの扱い方」について詳細な規定を設けていますが、化審法のGLP試験でも標準手順に取り入れるべきでしょうか？

- **TG201(2006)**は、パラ43~45をデータの取扱いに宛てています。少なくとも下記の点は、最終報告書に反映させた方がよい。

それぞれのパラの内容は

パラ43：藻類量の単位は「生長」を表すものであればよい。

パラ44：①試験結果を表形式にまとめ

②少なくとも片対数グラフにすべてのデータを図示する。

パラ45：①図から対照区では指数増殖しているか確認

②データに異常はないか、繰り返し間に異常値は混ざっていないかを確認し、「外れ値」は取り除く。

OECD TG 201(2006)より



DATA AND REPORTING

Plotting growth curves

43. The biomass in the test vessels may be expressed in units of the surrogate parameter used for measurement (e.g. cell number, fluorescence).

44. **Tabulate** the estimated biomass concentration in test cultures and controls together with the concentrations of test material and the times of measurement, recorded with a resolution of at least whole hours, to produce plots of growth curves. Both logarithmic scales and linear scales can be useful at this first stage, but logarithmic scales are mandatory and generally give a better presentation of variations in growth pattern during the test period. Note that exponential growth produces a straight line when plotted on a logarithmic scale, and inclination of the line (slope) indicates the specific growth rate.



OECD TG 201(2006)より



45. Using the plots, **examine** ^① whether control cultures grow exponentially at the expected rate throughout the test. ^② Examine all data points and the appearance of the graphs critically and ^③ **check** raw data and procedures for possible errors.

Check in particular any data point that seems to deviate by a systematic error. If it is obvious that procedural mistakes can be identified and/or considered highly likely, the specific data point is marked as an ^④ outlier and not included in

subsequent statistical analysis. (A zero algal concentration in one out of two or three replicate vessels may indicate the vessel was not inoculated correctly, or was improperly cleaned). ^⑤ State reasons for rejection of a data point as an outlier clearly in the test report. Accepted reasons are only (rare) procedural mistakes and not just bad precision. **Statistical procedures for outlier identification are**

of limited use for this type of problem and cannot replace expert judgement. Outliers (marked as such) should preferably be retained among the

data points shown in any subsequent graphical or tabular data presentation. 9



Data and Reporting



【目的】

OECD TG 201 (2006)パラグラフ 4 3 ~ 4 5で、毒性値計算前の確認作業を要求している。

そのため、信頼性の高い試験報告書の作成する観点から、要求事項について詳細にみてみることにする。



パラ 4 3 : 計算に用いるのは？



- 43. 試験容器中の生物量は、測定に用いた代替パラメーター単位（細胞数、蛍光光度）で表すことができる。

【要求事項】

生物量と用いたパラメーター間の換算が要求される。

例えば、細胞数で生物量を代替するには、試験を通して、平均細胞径／重量が一定でなければならない。



パラ 4 4 : 対数で生長曲線を描く



- 生長曲線をプロットするために、試験（処理）区と対照区の推定生物量濃度を試験物質濃度と測定時間とともに表にまとめる。
- 最初の段階では対数目盛および通常目盛の両方を描くのは良いが、対数目盛は必須であり、試験期間中の生長パターンの変動を示すのに適している。

【要求事項】

表形式にまとめ、対数目盛の生長曲線をプロットした図を作成すること。



パラ 4 5 : データ確認作業



- 生長曲線のプロットから、対照区で試験期間を通じて、期待された指数生長であったかどうか調べる。

【要求事項】

生長は正常で、妥当であったか確認する。

- すべてのデータ（ポイント）とグラフの形状を詳細に調べ、生データや手順にエラーの可能性がないかチェックする。
- 特定のデータポイントが系統誤差と見なせる程に乖離しているかチェックする。

【要求事項】

エラーの可能性がないか確認する。



パラ 4 5 : データの確認 (続き)



- もし、手順上の過ちであることが明らか、もしくはその可能性が高いのであれば、その特定のデータポイントを「外れ値」と見なして、毒性値算出データには含めない。

【要求事項】

毒性値計算に使用しなかったデータがあれば その理由も明確に記述する。

【留意点】

統計的手段で「外れ値」と判定されたとしてもそれだけで、除外はしない。



試験結果の報告項目

試験容器毎、測定時間毎の生物量



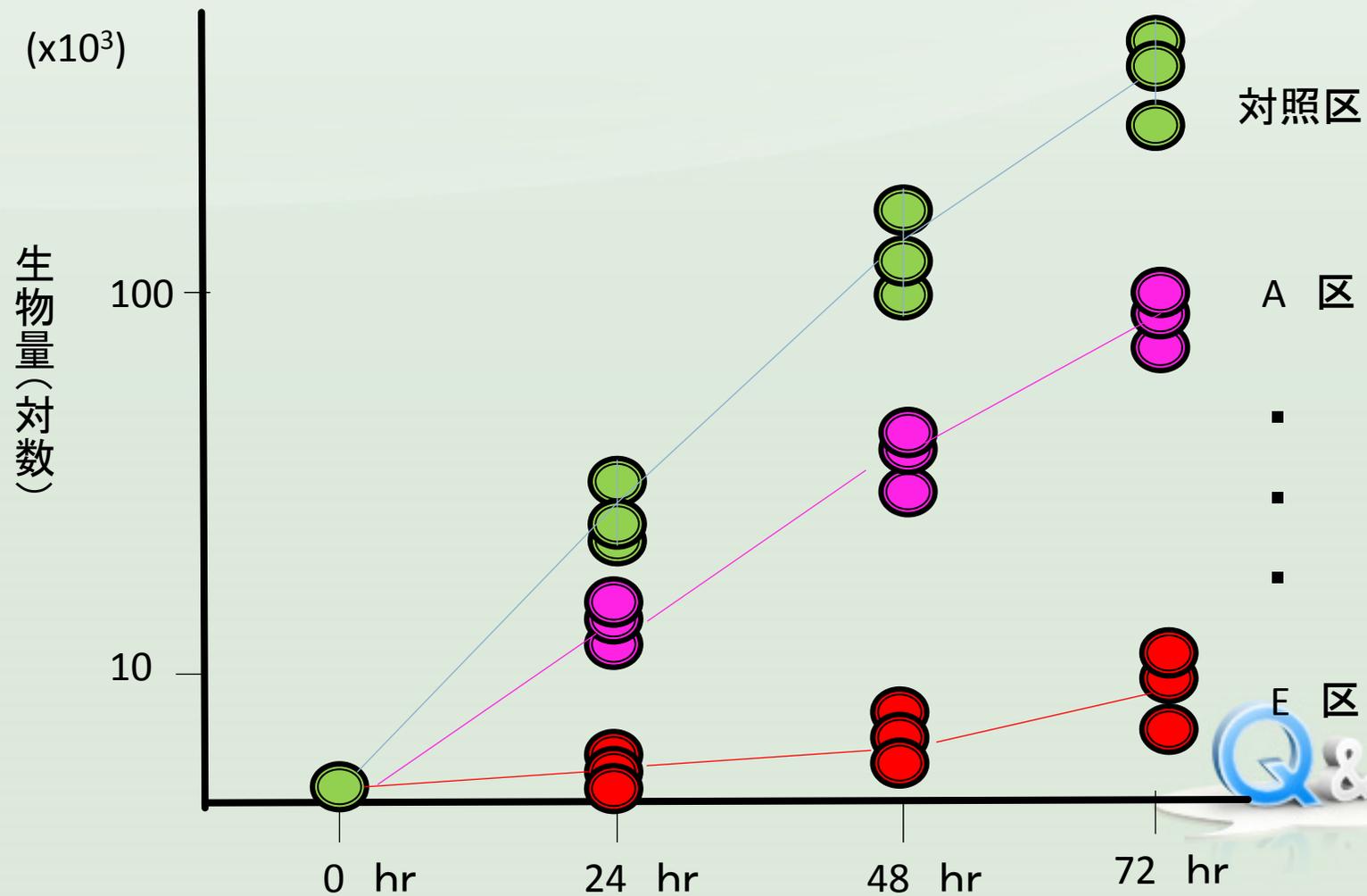
容器	設定	実測	生物量(x 10 ³)				平均成長速度			
			0 hr	24 hr	48 hr	72 hr	全区間	平均	S.D.	阻害率
Cont1	0	n.d.	5	25	130	580	1.58			
Cont2	0	n.d.	5	20	125	520	1.55			
Cont3	0	n.d.	5	28	135	680	1.64			
Cont4	0	n.d.	5	30	164	689	1.64			
Cont5	0	n.d.	5	23	109	490	1.53			
Cont6	0	n.d.	5	29	140	712	1.65	1.60	0.053	
A1	10	9.8	5	30	131	670	1.63			-0.02
A2	10	10.2	5			585	1.59			0.01
A3	10	10.4	5				1.55	1.59	0.0407	0.03
B1	20	22.1	5			540	1.56			0.02
B2	20	19.8	5	22	110	570	1.58			0.01
B3	20	20.2	5	25	125	580	1.58	1.57	0.0124	0.01
C1	40	37.1	5	19	80	220	1.26			0.21
C2	40	42.3	5	23	84	245	1.30			0.19
C3	40	39.0	5	17	68	290	1.35	1.30	0.0464	0.15
D1	80	102	5	10	26	70	0.88			0.45
D2	80	79.1	5	16	47	89	0.96			0.40
D3	80	81.6	5	9	21	58	0.82	0.89	0.0715	0.49
E1	160	152	5	6	10	18	0.43			0.73
E2	160	157	5	9	13	25	0.54			0.66
E3	160	149	5	7	15	22	0.49	0.49	0.0552	0.69

容器毎に
阻害率を示す

容器毎または、混合

試験結果の報告項目

生長曲線（生物量－時間）



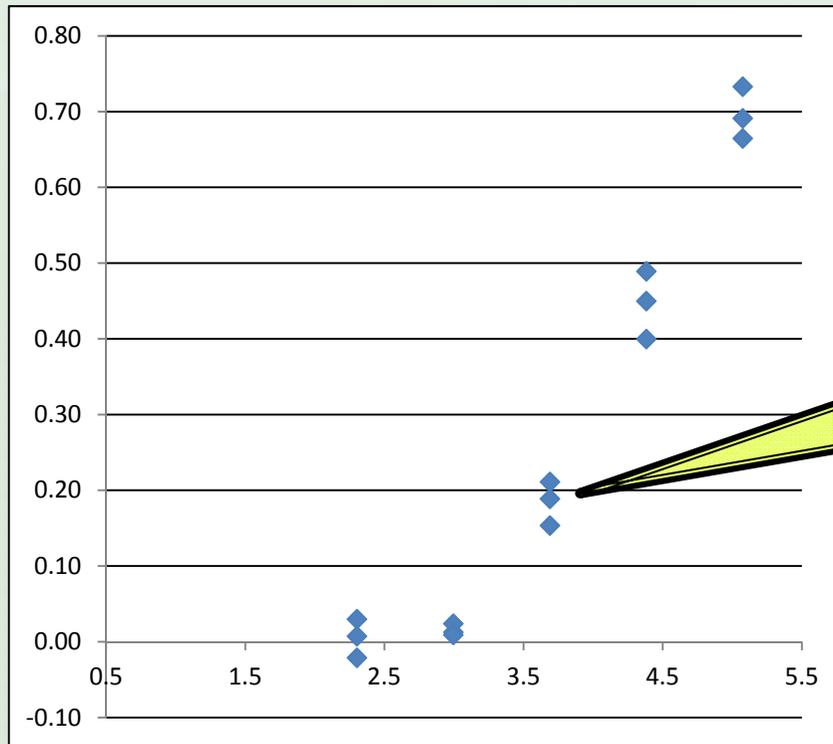
試験結果の報告項目



反応変数: 生長速度

反応変数としては、
生長速度、収量（もしくはAUG）
がありそれぞれ作成

生長
阻害率



濃度(対数)

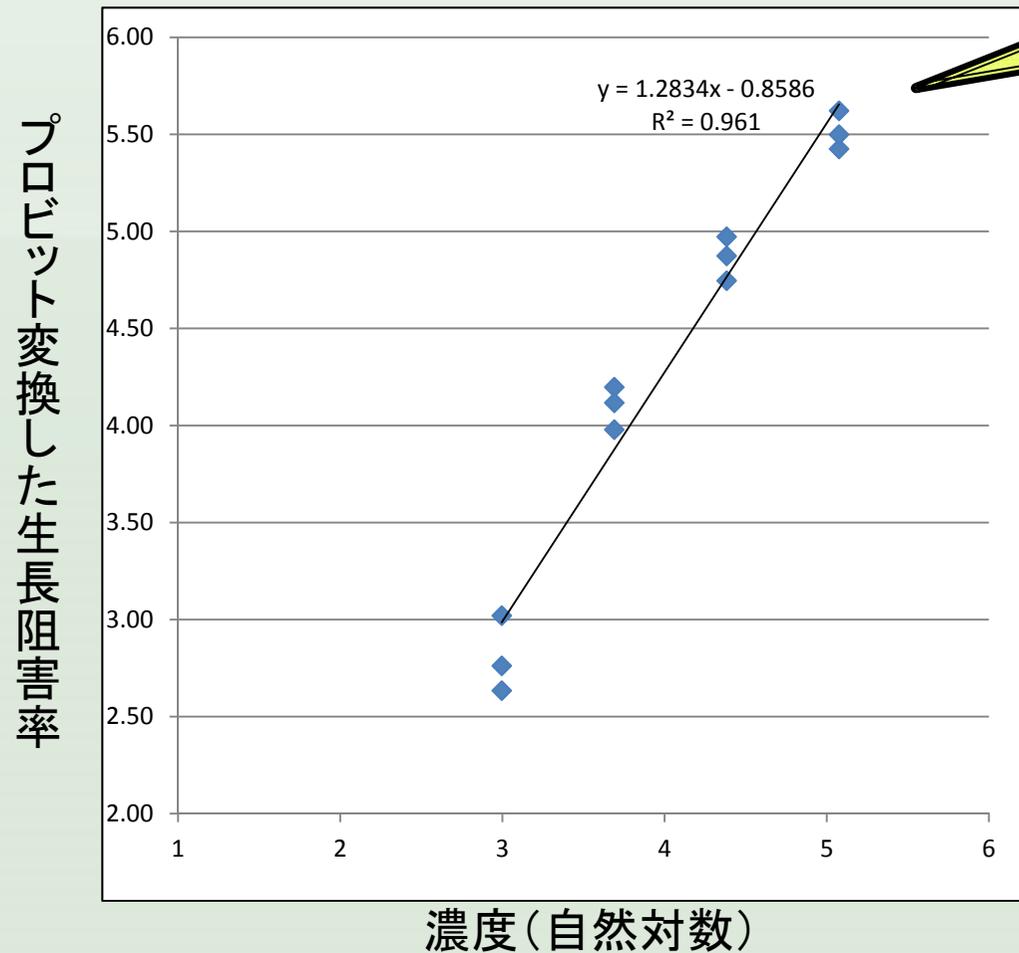
すべてのデータ（繰り返しのデータ）を表示

Q&A

毒性値の算出



この回帰式から、
EC50を推定する



左の例は、
生長阻害率をプロビット変換
後、最小自乗法



「基準物質による試験」はGLP適用？



藻類、ミジンコ、魚類急性毒性試験では、ラボは少なくとも6ヶ月に1回、基準物質による試験を要求されています。この試験も「GLP適用で実施する必要があるか？」

- 基準物質による定期的な試験は、当該試験の信頼性を担保する上で重要なデータとなっておりますので、その実施の手順、試験結果、記録の管理など、当該試験データと同程度の扱い（標準操作手順に従うこと）が必要です。
- ただし試験実施に対する信頼性保証の査察方法は、通常の試験のように「試験ベース」である必要はなく、ルーチンワークであることから「プロセスベース」で実施することが適当と考えられます。

（補足）海外のラボで動物愛護を理由に魚類急性毒性試験のための基準物質の試験を実施しない宣言しているラボがあります。環境省も化学物質GLPの担当部署として責任ある検討が必要となるでしょう。

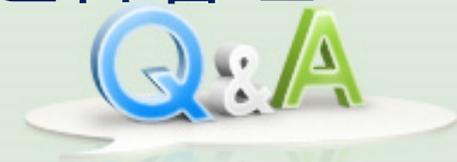


餌藻類のTOC分析は



GLP遵守管理か？

- 試験成績に直接関与する試験操作は、試験の信頼性を担保するために、GLP下の管理が必要です。餌のTOCを知ることは、オオミジンコ繁殖試験の餌量の管理には有用ではありますが、OECD-TG-211は、測定を義務とは規定していません。
- ラボの自主的な判断で、試験の信頼性を確保する上で重要となればGLP適合管理が適当です。



藻類試験のNOEC決定手順？



- 個別試験のデータ処理や毒性値決定については、基本的には試験責任者が専門家として判断・決定することになっています。この原則は化審法でも同じです。
- 藻類試験については、OECD-TG201（2006）でデータ処理や統計処理を含め試験法の基本的な手順を規定していますが、統計手法を限定してはいません。また、OECDから生物試験における統計処理の解説文書（GD54）でもある統計手順を推奨するのではなく例を示しているのです。





ご静聴ありがとうございました。

ここからは、会場からのご質問をお聞きする時間です。

OECDのHP

テストガイドライン:

<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicalsandrelateddocuments.htm>

試験と評価に関するガイダンス文書

<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/seriesontestingandassessmentadoptedguidanceandreviewdocuments.htm>

優良試験所基準 (GLP)

<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/goodlaboratorypracticeglp.htm>

