

生態毒性試験実施にあたっての 留意点



平成27年度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 国立環境研究所環境リスク研究センター

参照物質試験の必要性和頻度について



急性毒性試験（藻類、ミジンコ、魚類）報告書に参照物質試験結果は必須ですか？また実施頻度とタイミングは？

- 化学物質GLP 別添5「対照物質を用いて毒性試験を実施し、その結果を背景値（平均及び標準偏差）とともに記録し、かつ、保管すること。」の規定により動植物試験では参照物質の試験を要求されている。
- OECD試験ガイドライン、藻類生長阻害試験、ミジンコ遊泳阻害試験では参照物質試験を要求され実施は必須であるが、魚類急性毒性試験ではその規定がないので、必須ではない。
- その頻度とタイミングは、別添5の規定により、定期的もしくは試験毎に行うことが要求される。ただし、少なくとも年2回の実施が望ましいとされる。
- GLP監査・査察では、藻類及びミジンコ試験において、定期的もしくは試験毎に参照物質試験が実施がされているか（SOPの作成も必須）、当該ラボのSOPに従って実施されているか確認される。



参照物質試験への追加コメント



REFERENCE SUBSTANCES OECD-TG 202 より

5. A reference substance may be tested for EC50 as a means of assuring that the test conditions are reliable. Toxicants used in international ring-tests (1)(5) are recommended for this purpose¹ Test(s) with a reference substance should be done preferably every month and at least twice a year.

「試験条件（試験環境が良好であるか）の確認するため」

- 試験系（狭い意味では、生物試験系＝試験生物、つまり用いた生物の感受性のチェック）ではない。感受性チェックなら陽性対照区で、基準値がある範囲にあることを示す。
- もし、参照物質試験の結果が、背景データから有意に乖離した場合…試験手順全体の再チェックが必要となる。通常試験が可能かどうかは、試験責任者が判断（必要なら再度の参照物質試験の実施）



被験物質の同一性・安定性確認



- 化学物質管理のための試験法では、届出物質と試験物質の同一性、試験期間中の安定性、さらに試験条件下における安定性の確認が必要とされています。
 - 標準的な試験法を用いた研究論文の知見を届出やリスク評価に用いる場合でも、届出物質と被験物質の同一性を示す情報が欠落しているため利用できない場合があります。
 - 同一性の確認には一般的には赤外線吸収スペクトル測定（IR法）が行われてきた。
 - IR法のメリット：スペクトル情報のデータベースが利用できること、測定が比較的簡易であるため普及している。
 - 試験委託者から被験物質が提供される（工業用原体を被験物質とする）ことが多くその場合は、同一性は問題ない（安定性は別）。その場合は、原体のロット番号、分析証明、物質情報などを入手しておくことが推奨される。
- 

被験物質の同一性・安定性確認（続き）



IR等の測定自体は、非GLPで実施することは適切か？

- 被験物質の受入れ～試験終了までの期間の安定であったことを示す必要がある。
- IR測定のメリット：前述に加え、多様な被験物質に適用できること。ただし、単純な物質であれば分析による濃度測定結果を利用できる場合もある。
- 同一性、安定性の確認は、ラボの判断で取りうる最良の方法・手順で行うことが求められ、GLP適合確認では、SOPがあるか、SOPに規定される機器が整備されているか、適切に利用されているかチェックします。
- もし、測定を外注する場合にもその手順を示すSOPが必要となります。



藻類のTOC測定、水質分析はGLP で実施すべきか？



- 希釈水が純水から作成される人工調製水ではなく、自然水（脱塩素上水を含む）の場合には、定期的な水質チェックが求められる。水質分析を多くのラボが外注して環境測定計量士に委託していることは、GLP上は問題ない。
 - 試験施設は、使用する希釈水が試験法で規定する適合する水質であることの確認と記録の保管が求められる。
 - 藻類量の把握はミジンコの飼育、繁殖試験の餌量の適正化に必要な情報である。ただし藻類のTOC分析を試験毎に実施すること、またはGLP適用で実施することは必須ではない。分析を外注すること、TOC以外の機器で「有機炭素量」を求めることは許容される。
 - GLP上では、ラボはSOPを作成してそれに従うことが求められる。
- 

藻類のNOECの算出に用いる検定法の使い分け



- どの濃度区で有意な差があるかを決定するための手法はいくつかありそれぞれの検出力と制限があるので、データのタイプによって手法と手順を検討する必要がある。その選択には専門家のアドバイスが推奨される。
- 一般的に、藻類のNOECの決定に使われる検討法では、t-検定（2群）＜Dunnett多重比較検定＜Williams 多重比較検定がある。検出力は上記の順に高くなく。ただし、Williams 多重比較検定は、3群以上で単純な濃度反応関係があることが前提である。
- 多重比較では、群数（濃度区）が多いほど検出力が減少することを考慮すること。
- 等分散性検定には、Bartlett法Levene法があるが、後者は正規分布以外であっても使用できる特徴を有している。

藻類生長阻害試験TG201の改訂(2006)



1984年改定版と2006年改訂(2013年修正)版では、生長速度の式が異なるがどうしてか？

- 長速度を示す式が
1984年版
2006年版

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_1}{t_n - t_1}$$
$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} \text{ (day}^{-1}\text{)}$$

に変更されました。

- N(細胞数) から X(生物量) への変更ですが、生長を生物量の増加とする生物学的な解釈に従ったものです。そこには生長速度が生物の代謝速度と比例関係にある、つまり、化学物質の毒性は代謝の阻害と捉える、そのために生長速度を毒性の反応変数に選んだ・・・とのメッセージが込められています。
- そこから、試験手順の変更も必要になっています。



魚類急性試験における濃度分析頻度

試験魚が死亡した濃度区の分析回数は2セットでなくとも許容されるか？

- 試験法では「半止水式試験の場合は、換水直後と次の換水の直前を1セットとして、少なくとも2セット測定を行うことが望ましい。」としているが、例えば全数死亡した場合は、必ずしも2セットではなく1セットでも許容される。
- 2セットは、魚が生残している場合の要求であり、分析の頻度とタイミングは試験責任者が適宜判断し、科学的に妥当であることが必要である。



QAの最終報告書監査とSDの最終報告書承認の順序

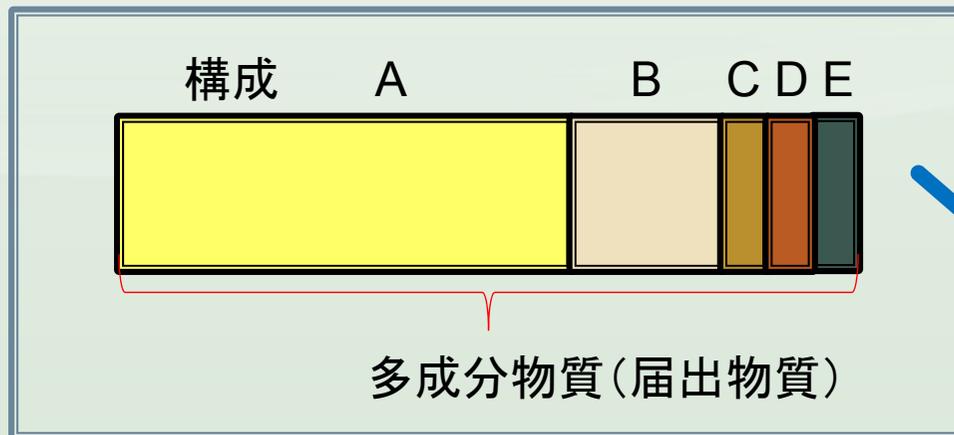


- 試験責任者の責務：(7) 最終報告書に日付を記し署名又は押印し、 . . .
 - 信頼性保証部門の担当者の責務：(5)最終報告書を監査し . . . (7) 信頼性保証書を作成、署名又は押印し、最終報告書に添付する . . .
 - 信頼性保証書の添付：最終報告書には、以下の事項を列挙した信頼性保証部門の担当者により署名又は押印された信頼性保証書を添付すること。
- 信頼性保証書の作成日と最終報告書承認日の順序は不定であるが、化学物質GLP上は、ほぼ同日であれば問題ない。



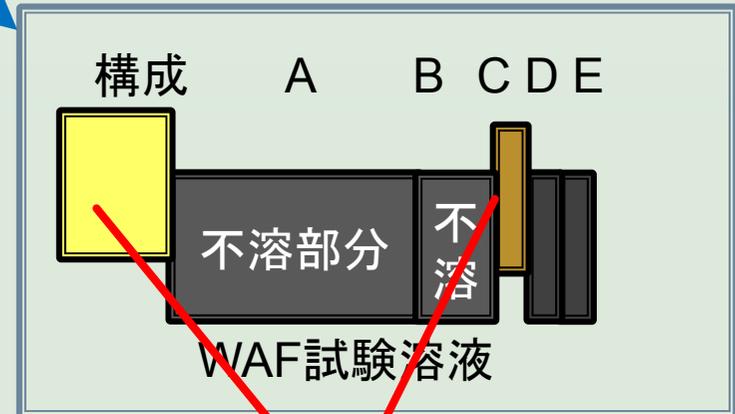
WAF試験の毒性値利用の問題

WAF試験では、添加濃度（Loading rate）と実測濃度（TOC etc）の両方の毒性値が求められるのは？



多成分であり、成分は難水溶性でかつ幅がある物質の試験では、WAFやWSFで調製した試験溶液の試験が妥当。

100mg/L（添加濃度）



WAF (Water accommodate fraction)
水になじむ物質のみ水中に存在し試験に用いた生物に曝露される。ただし、その組成は不明。

50%以上の生物に影響（致死・遊泳阻害・生長阻害）があれば・・・
E(L)C50 < 100 mg/L
EC50 < 1 mg TOC/L

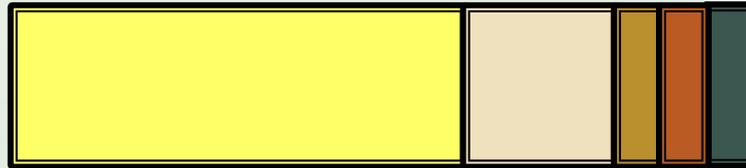
曝露されるのはこの分画
TOC濃度 & A

WAF試験の曝露



被験物質

構成 A B C D E



直接添加

100mg/L

WS=10mg/L

WS=50 mg/L

50mg/L

WS=100 mg/L

25mg/L

・各成分の水溶解度は異なる。

・溶解度が高い物質は全て溶けているために、添加しただけ、曝露される。

・水溶解度が低い物質は、どの濃度区でも曝露されない。

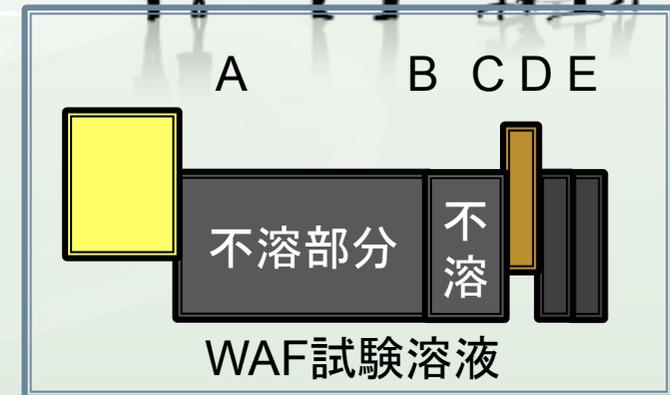


WAF試験の毒性値(続き)

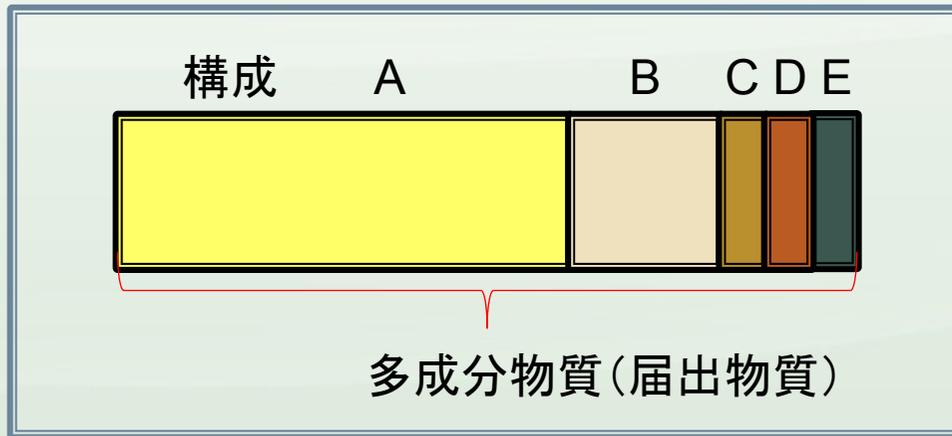


ワーストケースでの判断

- 成分A~Eが実測できるなら
検出できた中のある成分に全ての毒性の原因がある。
成分Aと成分Cのどちらかが毒性のある。
 $EC50 = Conc.A$ もしくは $=Conc.C$
: PECの最大値は、製造輸入量 × 成分AorCの組成(%)
から算出か？
- どの成分かは不明であるが、被験物質濃度(TOC)は測定できるなら
: $EC50 = Conc\ mg\ TOC$
- 物質量をまったく測定できないなら
: $ELL50 = 添加濃度$ で毒性値を算出
実際の曝露濃度は不明、どの成分が毒性を発現しているか不明
最も量が少ない成分(デフォルトは1%?)が毒性を発現したとして...
成分ご毎に有害性を判断するなら $ELL50 \div 100$ から判断

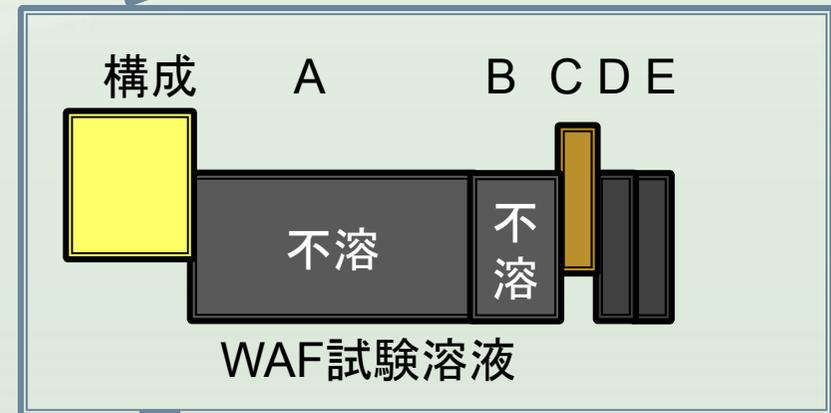


多成分物質の曝露濃度とPEC

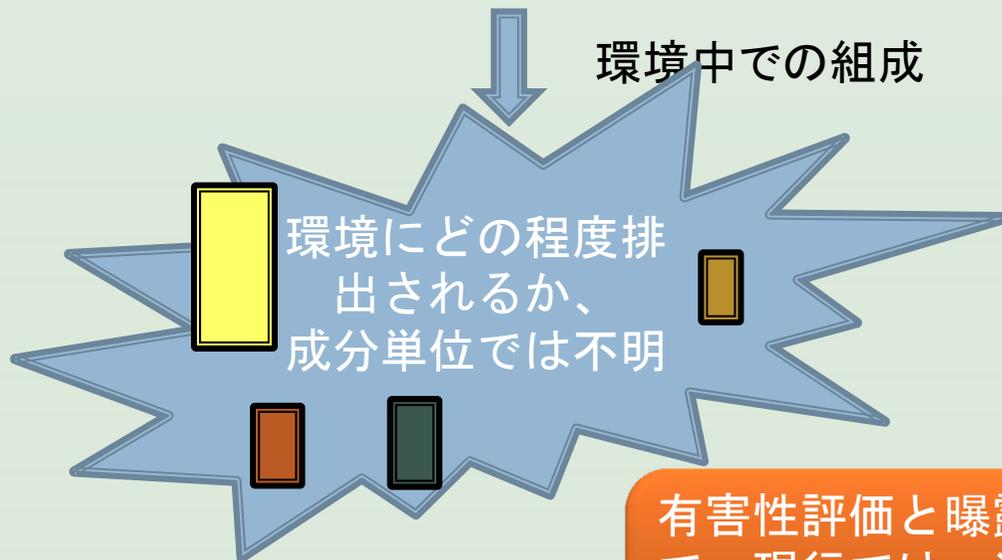


(例)WAFでは、成分AとCのみ
含まれる(組成も濃度も不明)

有害性評価が可能?



どの成分がどの程度の毒性を有する
かは不明(分析結果の情報量による)



有害性評価と曝露評価の整合が必要
で、現行では、添加濃度とTOC(物質濃度)
による毒性値の両方を提出して欲しい。

