生態毒性試験実施にあたっての留意点

2024年 2月19日　Web-セミナー

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　国立研究開発法人国立環境研究所

新規OECD-GLPガイダンス文書

No.17（アドバイザリー文書：コンピューティング）
の補遺１.GLPとクラウドコンピューティング

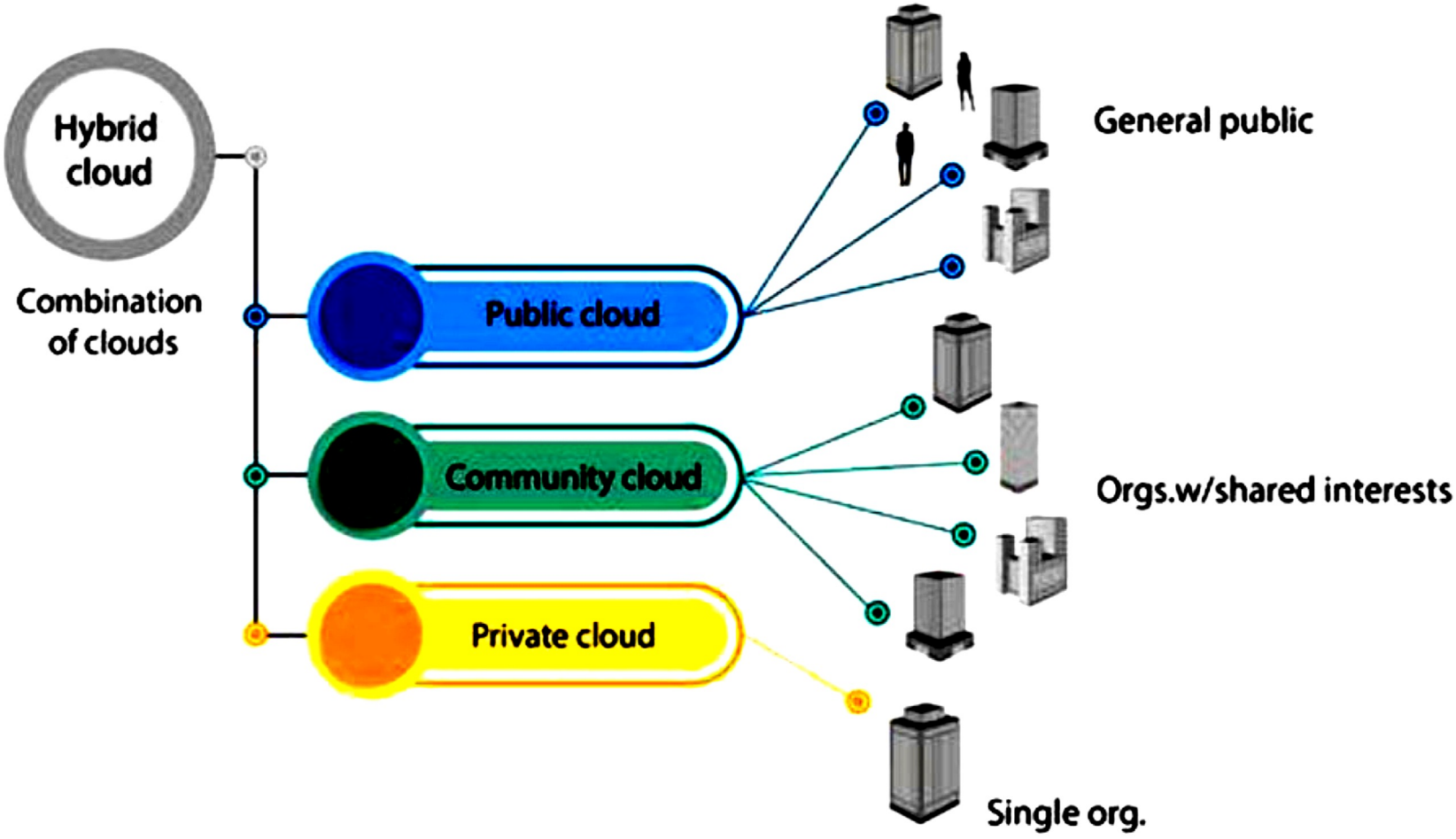
2023年6月　OECD-GLPガイダンス文書No.17（コンピューティング）の補足文書として、クラウド・コンピューティングに関する文書が発表された。

本文書は、コンピューターシステムに関するガイダンス（NO.17）に加えて、近年利用されるようになったクラウドコンピューティング技術の利用について、解説するため。

なお、リード国はベルギーとフランス（医薬品）であった。

多様なクラウドの利用

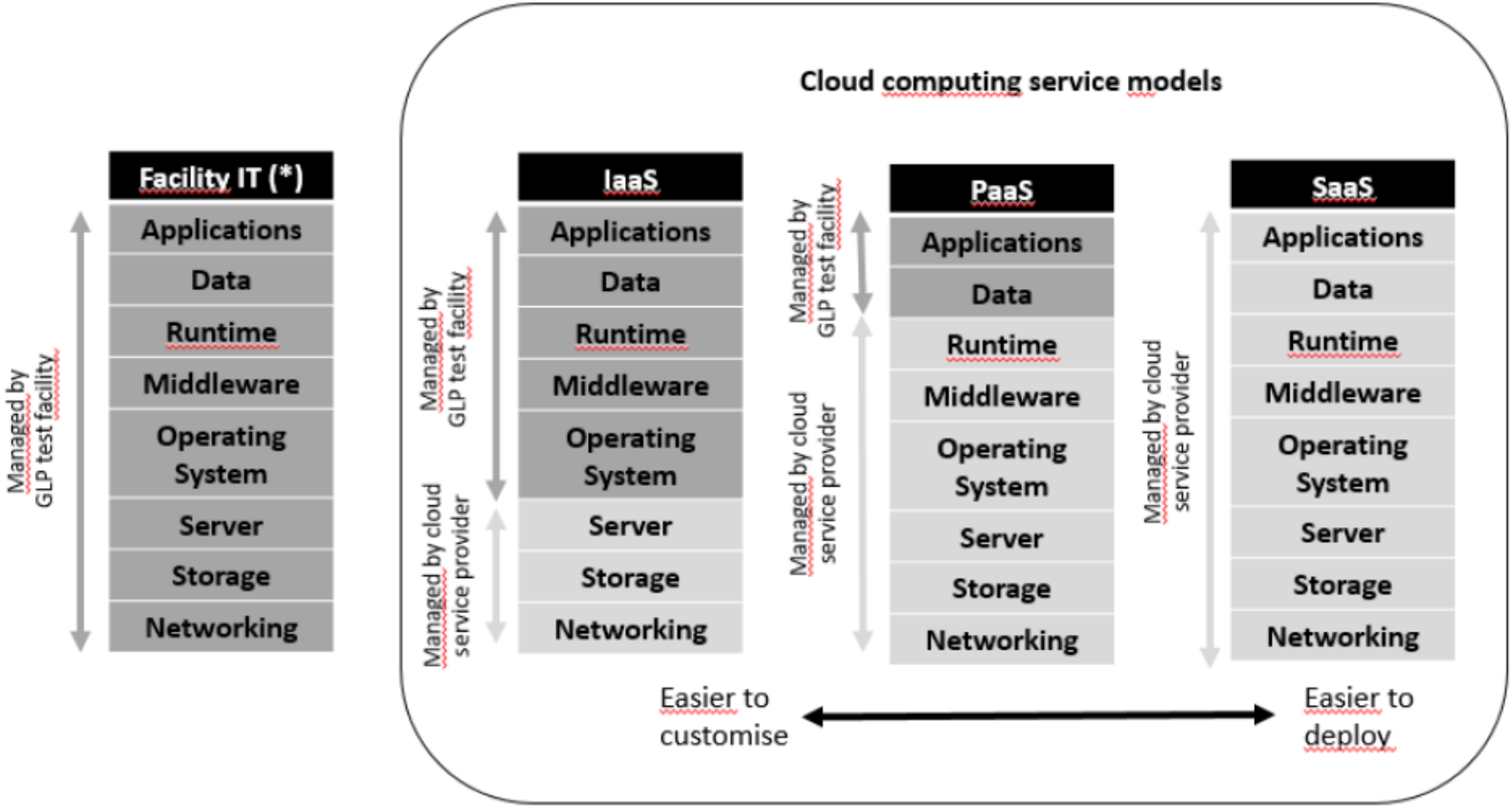
Figure 2. Cloud computing deployment models



Source: FSI Insights on policy implementation No. 13, Regulating and supervising the clouds: emerging prudential approaches for insurance companies (Crisanto et al., 2018[7]).

クラウドサービスの利用範囲

Figure 3. Shared management of the main components of a cloud computing service between the GLP test facility and the cloud service provider



(*) Facility IT: means test facility IT systems without any use of cloud solutions.

OECD-GLP の最新情報

OECD　現地査察（On-site evaluations）の実施状況

２０２３年には、日本を含む７か国のGLP査察機関に対する現地査察が実施された。この査察は、１０年に1回、それぞれの国のGLP適合モニタリング機関（CMA）が、OECD加盟国（MAD参加国を含む）の査察チームにより評価を受ける制度である。日本は複数のCMAがあるが、今回は化審法（工業用化学物質）の査察機関に対して実施された。

2023年には外に、Malaysia, Australia, Finland, Greece, Netherlands and Belgiumの現地査察があった。

2024年にも5つのCMAの現地査察が行われる予定である。

試験困難物質・揮発性物質の生態毒性試験の留意点

試験困難性の確認

(1) 被験物質の取り扱い

常温で気体　or　液体　or　固体

高いヘンリー定数（溶液から揮散する）

(2) 試験暴露濃度の維持

試験終了時にどれくらい残存するか？

(3) 藻類試験は止水式・・・

・密閉系

・ヘッドスペース

・サンプル採取

揮発性物質の生態毒性試験

(1) 取り扱い上の留意点

被験物質が常温で気体・液体・個体

試験責任者は以下の判断し、試験計画を立案する

評価対象物質が常温で気体

- 人健康に有害か？

  →試験は困難（代替物質よる試験を検討）

  →作業者の暴露を最小化

- 評価物質は水に溶ける（被験物質を水溶液とする）

揮発性物質の生態毒性試験

（２）　試験暴露濃度の維持
試験終了時にどれくらい残存するか？

「揮散性」物質の試験手順の予備的検討（一例：私見）

①　止水式条件で、試験終了時の濃度が８０％以上
→　通常試験手順

②　８０％未満なら
→　密閉系による暴露で揮散を抑制する
→　半止水式・流水式を検討

③　藻類試験では、１日当たり残存率８０％
３日間で５０％以上残存する条件をめざす

※　この対応案は私見による一例です。

揮発性物質の生態毒性試験

（３）　藻類試験で推奨される密閉系での試験手順
（OECD-ガイダンス文書No.23より）

Ａ）限定された二酸化炭素量への対応

→　初期藻類密度（接種）を減らす

→　光強度を減らす（増殖速度を制限）

Ｂ）試験物質の濃度維持のための手順

→　ヘッドスペースを減らす

→　ヘッドスペースなし

→　セプタム付き栓の利用

サンプリング時のロスをなくす

引用された研究事例

- 揮散性物質を安定してばく露する手法として、密閉系（ヘッドスペースなし）の試験が有効である。
- 藻類試験では、光合成（炭酸同化作用）によるCO_2消費のため、時間の経過（生物量の増加）に伴いｐＨの上昇、生長速度の鈍化（毒性による増殖阻害影響と区別できない）が起こり、試験の妥当性に関わる。
- そのため、密閉系での試験手順としていくつかの特別な方法が試されている。

文献で推奨の試験手順

- 試験期間を48時間とする。（Kühn & Pattard, 1990;　OECD, 2006)
- 大きな密閉容器を用いてヘッドスペースを十分にとる（Galassi & Vighi, 1981)
- 試験期間中の増殖を抑えて、一定の生長速度を維持する。

  開始時の藻類密度を低くする。

  光強度を低くして、生長速度を抑える。
- 緩衝剤を用いｐＨを安定させる
- 通常より多い0.4%の重炭酸ナトリウムを用いる(Herman et al., 1990)。
- 試験途中のサンプリングは密閉状態を維持しつつ行う（Brack W & Rottler H, 1994)。

四塩化炭素のTG201試験

Brack & Rottler (1994)

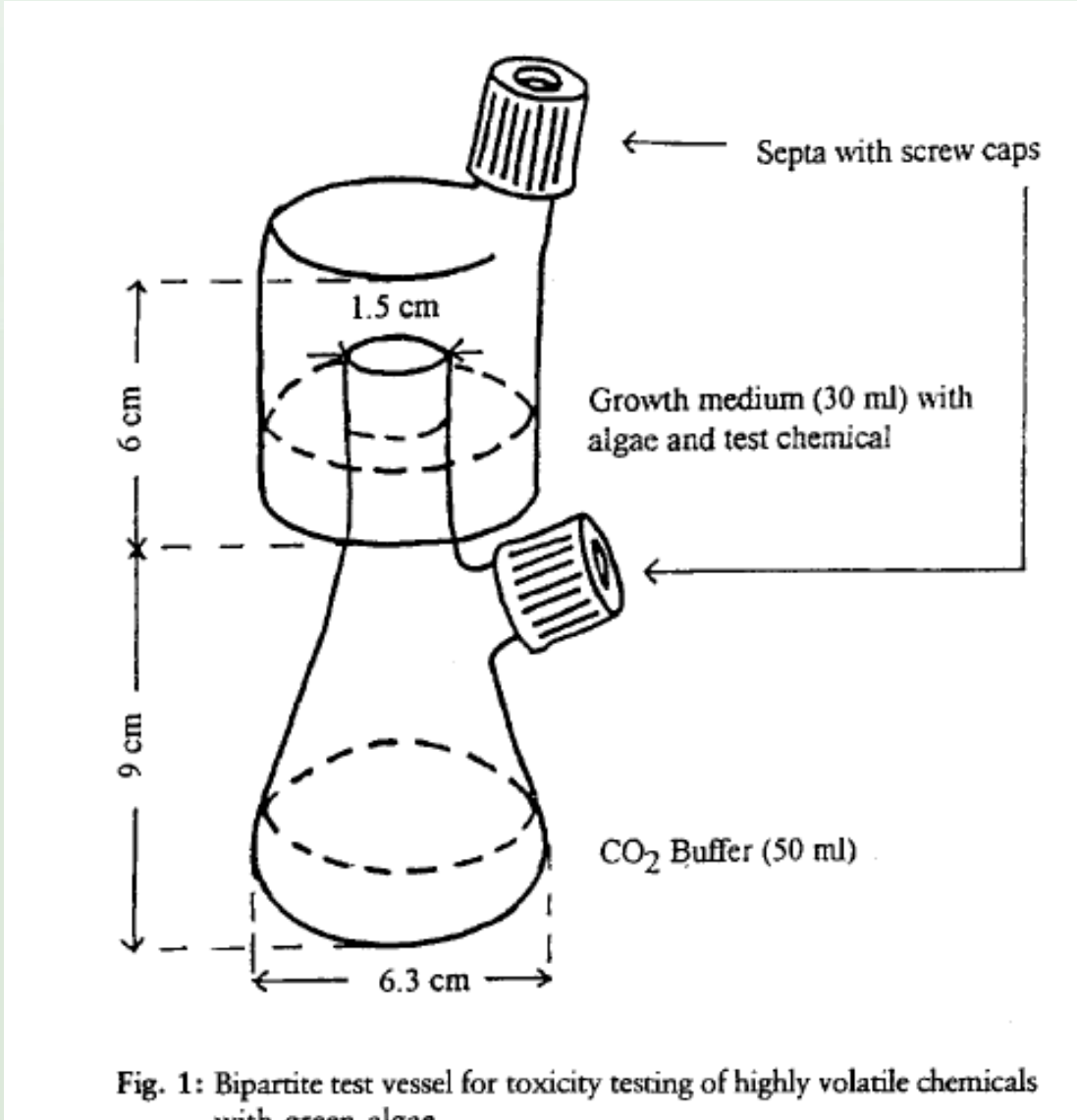


Fig. 1: Bipartite test vessel for toxicity testing of highly volatile chemicals with green algae

曝露の安定性（ヘッドスペースなし）

Nominal Concentration (mg/L)	Measured in non-inoculated solutions Initial (mg/L)	Final (mg/L)	Final/Initial %
0(T)	< DL	< DL	-
5	2.21	2.21	100
8.5	3.35	3.56	106.3
14.6	6.88	7.32	106.4
25	14.0	13.9	99.3
42.7	24.9	23.7	95.2
73.1	47.0	48.9	104
125	114	117	102.6

（CoCAM1に提出された「四塩化炭素」Dossierドラフト文書より）

（1）設定値と初期実測値は異なる（操作途中での減損は顕著で避けられない）
（2）密閉を保っていれば、0hと72hでは、実測値に差がない

→ ヘッドスペースなし・密閉条件では、ばく露濃度は安定する

CO2源として重炭酸ナトリムを多量添加＋pH緩衝剤を使用する手順

重曹 mg/L	指数増殖が期待できる時間	到達密度	pH	ヘッドスペース
100	48時間 開始 0.5～1×10^4 cell/ml	48時間で１６倍以上 72時間で６０倍程度	72時間で上昇顕著	あり
400	72時間 開始 10,000 cell/ml	72時間で127倍	0.1M/L-HEPES注 7.33-7.81	なし

(注)IUPAC 名 ： 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
別名 HEPES 分子式 $C_8H_{18}N_2O_4S$ 分子量 238.30 CAS登録番号 [7365-45-9]

標準法から乖離した手順の懸念点

疑問点

1. 大量の重曹, 緩衝剤(HEPES)添加が毒性を緩和しないか？
2. pHの上昇により毒性が緩和するのは一部の物質であり、一般的にはpHの上昇は許容できるのではないか？
3. 藻類量測定の精度が上がり、開始時の藻類密度の低減が可能となったので、少なくとも、48時間試験は従来の密閉式手順で可能で、72時間試験は必要ない？

揮散性物質の試験手順 まとめ

1. 次の場合には密閉系試験手順が推奨される。
   (1)揮散が主要因で濃度が減少する
   (2) 作業者の健康に悪影響を与えないとは言えない。

2. 開始時の藻類密度を減じるなどの手順を用いてもなお、TG201(2006, 2011)の試験の妥当性基準を満足しない場合で、その原因が密閉系であることが原因の場合は、許容する条件の下で試験期間を48時間まで短縮してよい。

3. 密閉系であるが、それでも濃度が減少する場合は、ヘッドスペースなしの手順の採用を検討する
   ※代替/追加法として、セプタム付きのキャップの使用を検討してもよい

4. 密閉系試験では溶存二酸化炭素の不足でpHの上昇（1.5以上）が見られるが、そのことから直ちに当該試験を妥当でないとは見なさない。
   ただし、被験物質が解離性物質である場合、より毒性の高いpHの範囲であったことを確認するは重要であり、試験の妥当性は個別に判断される。

5. 重炭酸ナトリウムの高濃度（初期濃度50mg/Lを越える）使用、緩衝剤の使用は、毒性を緩和しない範囲でのみ認められる。

ご静聴ありがとうございました。
ここからは、ご質問の時間です。

OECD本部サイト　優良試験所基準（GLP）関連ページ
http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/good-laboratory-practiceglp.htm