

藻類生長阻害試験法改定に伴う第三種監視化学物質の判定基準の見直しについて

1. 背景

(1) 現行の試験法と判定基準設定の経緯

現行の化学物質審査規制法に基づく藻類生長阻害試験法（化審法 TG）においては、改訂前の OECD テストガイドライン 201（TG201）に従い、毒性値を面積法及び速度法で求めることとされている（両法の概要については別紙 1 参照）。

また、現行の藻類の急性毒性値に関する第三種監視化学物質の判定基準は、面積法で求めた半数影響濃度（EC₅₀）と無影響濃度（NOEC）より算出した急性慢性毒性比（以下「ACR」という。）に関する検討結果（別紙 2。「生態毒性の急性毒性値と慢性毒性値の比較」平成 16 年 1 月 30 日開催三省合同審議会参考資料）に基づき設定されている。

この中では、環境庁が平成 7～10 年度に実施した藻類試験データから面積法により算出された毒性値を用い、解析対象とした 145 物質のうち約 92%の物質（133 物質）の ACR が 10 以下となることが示されている。

(2) 再検討の必要性

資料 2 - 1 及び 2 - 2 のとおり、今般、TG201 の改訂に伴い化審法 TG についても適宜修正することが必要となっている。当該修正では、急性毒性値（EC₅₀ 値）の算出方法について、TG201 の改訂に従い、従来利用可能であった面積法を廃止し、速度法を基本とすることとなる。一方、上述のとおり現在の第三種監視化学物質の判定基準は、面積法により算出された毒性値に基づき設定されているため、新たに速度法を前提として判定基準を再検討する必要がある。

2. 今回の検討に使用したデータ

前回の検討においては平成 7～10 年度に実施された試験データを用いたが、その後得られている試験データ（環境省及び旧環境庁が平成 7～15 年度に実施したもの）も含め、計 225 物質を用いて改めて検討を行った¹。検討に当たっては、各物質について面積法及び速度法の両方に基づく EC₅₀ 値と NOEC を求め、それぞれに係る ACR を算出した。

¹ なお、0-72 時間の速度法による毒性値が算出されていない場合は、生データに基づき半数影響濃度 EC₅₀ 及び無影響濃度 NOEC を算出した。また、限度試験等のため毒性値が確定できないもの等信頼性の低いデータを除いている。

3. 速度法と面積法による急性毒性、慢性毒性及び急性慢性毒性比 (ACR)

速度法及び面積法により求められた毒性値の平均は以下のとおりである。

	0-72 時間 速度法	0-72 時間 面積法
EC50(算術平均値)	62.4	35.5
EC50(幾何平均値)	7.25	4.49
NOEC(算術平均値)	15.2	12.4
NOEC(幾何平均値)	1.17	1.25

速度法及び面積法により算出した藻類の ACR を比較すると表のとおりとなる。また、両者の累積度数分布は図のとおりとなる。

表 速度法及び面積法により算出した藻類の急性慢性毒性比 (ACR) の比較

統計量	0-72 時間 速度法	0-72 時間 面積法
算術平均値	12.62	4.64
幾何平均値	6.21	3.58
50 パーセンタイル値	5.44	3.29
90 パーセンタイル値	22.44	8.74

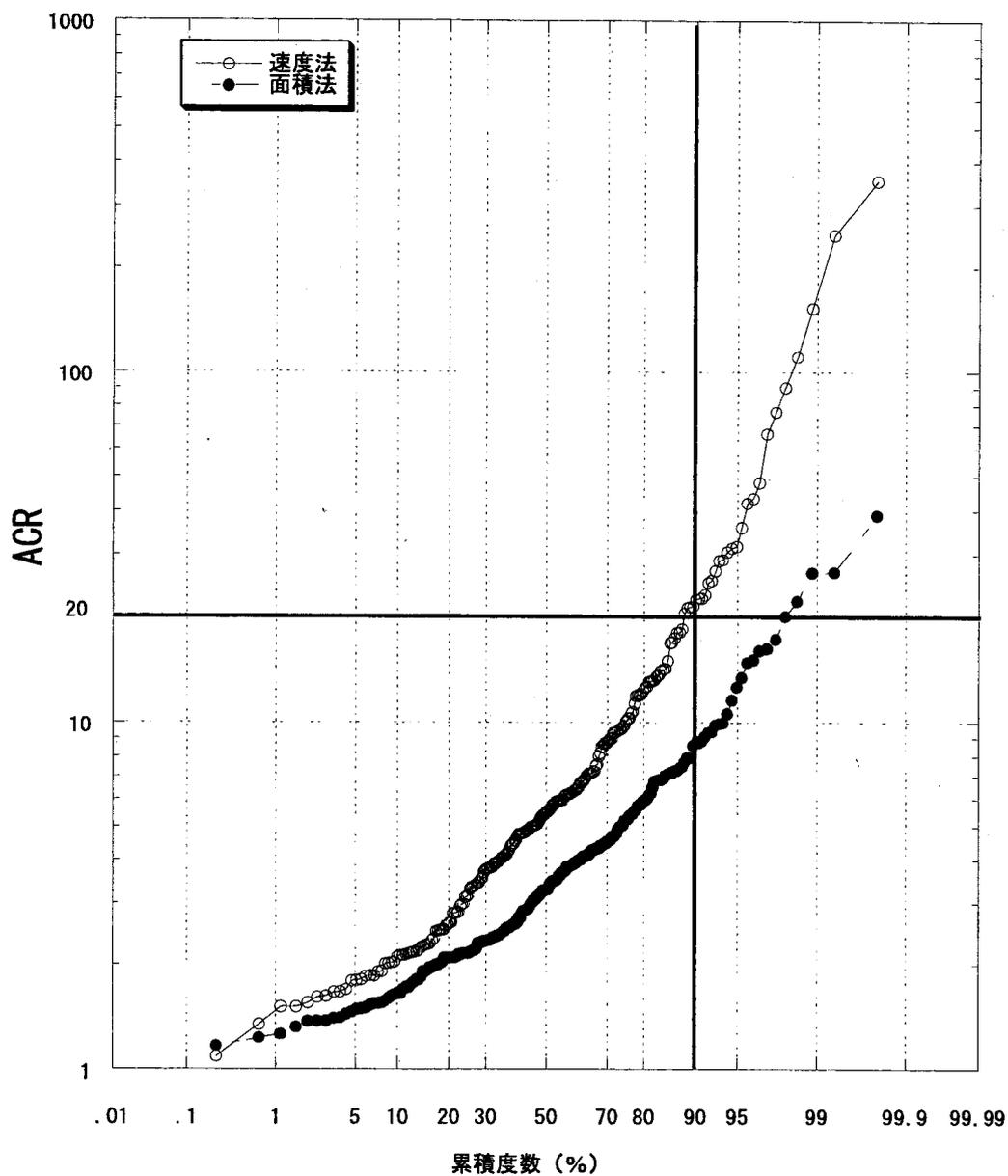


図 速度法と面積法による藻類の急性慢性毒性比 (ACR) の累積度数分布

面積法により算出した ACR の算術平均値が 4.6、幾何平均値が 3.6 であり、90 パーセントイル値は約 10 となったのに対し、速度法により算出した ACR では算術平均値が 13、幾何平均値が 6.2、90 パーセントイル値は約 20 となった。

以上のように面積法により算出された ACR と速度法により算出された ACR では異なる傾向を示すことから、藻類の急性毒性値に基づく第三種監視化学物質の判定基準は、速度法を前提として改定する必要があると考えられる。

4. 判定基準（案）

以上のとおり、速度法に基づく藻類の急性毒性（EC₅₀）と慢性毒性（NOEC）の比（ACR）は概ね 20 以下（物質によってはそれ以上の場合もある）である。

現行の判定基準の考え方と同様に、少なくとも慢性毒性値である NOEC が 0.1 以下となる可能性がある物質を第三種監視化学物質に指定しておく必要があるとの考え方から、判定基準として以下のとおりとすることが適当と考えられる。

現 行	改 定 案
藻類の試験結果から得られる EC ₅₀ 値が、概ね 1 mg/L 以下であれば第三種監視化学物質と判定し、 概ね 1 mg/L 超であれば第三種監視化学物質とは判定しない。	藻類の試験結果から得られる <u>速度法</u> に基づく EC ₅₀ 値が、 概ね 2 mg/L 以下であれば第三種監視化学物質と判定し、 概ね 2 mg/L 超であれば第三種監視化学物質とは判定しない。

これを踏まえた判定基準の改定案は別紙 3 のとおり。

なお、過去に行われた試験成績で、面積法に基づく急性毒性値のみが示されており、かつ速度法に基づく急性毒性値の算出が困難な場合があれば、面積法に基づく急性毒性値をこれまでの判定の考え方に照らして第三種監視化学物質の該当性について判断することとする。

OECD テストガイドライン 201 (藻類生長阻害試験) における
面積法と速度法について

1. 藻類生長阻害試験の毒性値の算出方法について

現行の OECD テストガイドライン 201 (1984 年 6 月 7 日採択、以下「TG201」という。)では、化学物質濃度と藻類の生長に対する影響との関係を決定するため、面積法と速度法の 2 つの方法を規定している。

藻類生長阻害試験では、指数増殖期の藻類で試験を行うことから、その生長は指数増殖モデルで近似できる。

$$dN/dt = \mu N \quad (\text{式 1})$$

(1) 面積法(areas under the growth curves)

面積法は図 1 に示す生長曲線下の面積(A) から毒性値を算出する方法である。面積(A)は式 2、各試験濃度区における生長阻害率 I_A は式 3 から算出される。

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \dots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1}) \quad (\text{式 2})$$

$$I_A = \frac{A_C - A_t}{A_C} \times 100 \quad (\text{式 3})$$

N_i : t_i 時の実測細胞濃度; t_i : 時間 (日); I_A : 面積法で求めた生長阻害率

A_C : 対照区の生長曲線下の面積; A_t : 各試験濃度区における生長曲線下の面積

(2) 速度法(growth rates)

速度法は図 2 に示す生長曲線の傾き(μ)から毒性値を算出する方法である。傾き(μ)は式 4、各試験濃度区における生長阻害率 I_μ は式 5 から算出される。

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln N_j - \ln N_i}{t_j - t_i} \quad (\text{式 4})$$

$$I_\mu = \frac{\mu_C - \mu_t}{\mu_C} \times 100 \quad (\text{式 5})$$

I_μ : 速度法で求めた生長阻害率

μ_C : 対照区の生長速度; μ_t : 各試験濃度区における生長速度

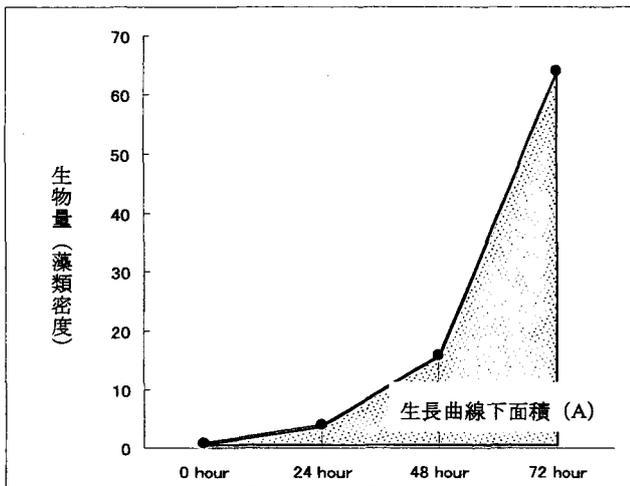


図1 生長曲線①

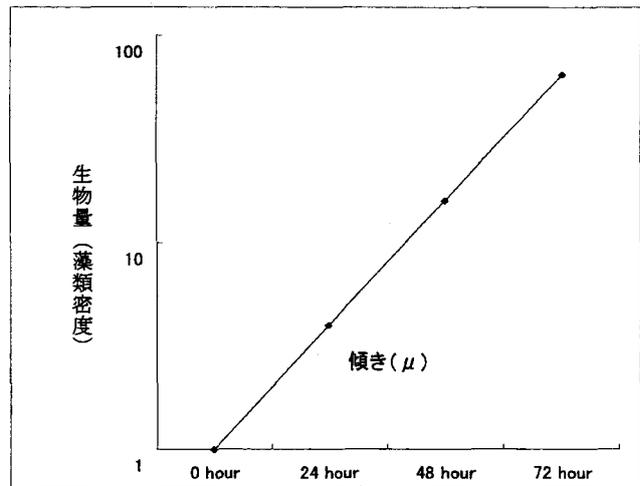


図2 生長曲線② (縦軸は対数)

2. 面積法と速度法の比較

速度法は、指数増殖モデル (式1) に直接対応する生長曲線の傾き μ (式4) から生長阻害率を求めるものであり、面積法では生長曲線下の面積 A (式2) から生長阻害率を求めるものである。当初、速度法に比べ面積法の方が物質の性状、試験条件等によらず安定的な影響濃度が得られると認識されていた。

しかし、面積法は指数増殖モデルとは数学的に関係のない生長曲線下の面積 A (式2) から生長阻害率を求めるものであり、毒性値が試験期間、対照区の生長速度の大小および阻害率-濃度の回帰式の傾きの大小に依存するなどの問題があることが明らかとなった。

そのため、OECD では平成16年5月のナショナルコーディネーター会合において、指数関数的に増殖する生物に対する毒性評価のための反応変数としては生長速度が科学的に妥当であることから速度法を採用し、面積法は採用しないとする考え方を盛り込んだ藻類生長阻害試験に係る改定ドラフトについて議論のうえ合意がなされ、さらに同年11月には同案が化学品合同会合で合意されている。

なお、面積法より得られる毒性値は、速度法から求めたものより小さい値を示す傾向がある。

第三種監視化学物質の判定の考え方について (案)

(第三種監視化学物質の判定の考え方 (案))

難分解性かつ高濃縮性でないとは判定された物質については、藻類生長阻害試験、ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験の結果から以下のように判断する。

- 3種の試験結果から得られるL(E)C50値の最小値が概ね1mg/l以下である場合には、原則として第三種監視化学物質と判定する。
- 3種の試験結果から得られるL(E)C50値の最小値が概ね1mg/l超・10mg/l以下である場合には、物質の化学構造、生物種の特性等を考慮して個別に判断する。
- 3種の試験結果から得られるL(E)C50値の最小値が概ね10mg/l超である場合には、原則として第三種監視化学物質とは判定しない。

(参考) 判定基準の考え方

1. 上記3試験で得られる結果により、生態系への何らかの影響を及ぼす可能性が示唆される化学物質を特定し、第三種監視化学物質への指定を行うこととなるが、この場合、試験結果は急性毒性値であると同時に慢性毒性の推定も可能な値であり、化審法の規制内容を考慮すれば、急性毒性値そのものに加え、推定される慢性毒性の強さも考慮に入れる必要がある。
2. これまでの試験結果を解析した結果(審議会資料(参考資料1)参照)によれば、急性毒性(L(E)C50)と慢性毒性(NOEC)との比(ACR)は、生物種によって異なり、概ね以下のとおりである。
 - 魚類については平均で約10、概ね100以下(ただし物質の構造との関係は不明)
 - ミジンコについては、平均で約10、概ね100以下(脂肪族、芳香族アミンなど特定の構造を持つ物質についてACRが大きい)
 - 藻類については平均で約4、概ね10以下(物質によってはそれ以上の場合もある)
3. 第三種監視化学物質については、第二種特定化学物質の候補物質を適切にカバーする必要がある。二種の判定基準は現時点では未定であるが、少なくとも慢性毒性値であるNOECが0.1mg/l以下となる可能性がある物質は第三種監視化学物質に指定しておく必要があると考えられる(※)。このため、
(※) このことは、第二種特定化学物質に係る慢性毒性の要件を直ちに0.1mg/l以下と定めることを意味するものではない。

- 3種の試験結果から得られるL(E)C50値の最小値が概ね1mg/l以下である場合には、原則として第三種監視化学物質と判定するとともに、概ね10mg/l超である場合には、原則として第三種監視化学物質とは判定しない。

- 3種の試験結果から得られるL(E)C50値の最小値が概ね1mg/l超・10mg/l以下である場合には、上記の生物種ごとの特性を考慮すれば、概ね以下のような判断が可能と考えられる。
 - ① 魚類の試験結果が当該範囲 (1mg/L~10mg/L) である場合には、魚類への毒性については物質の構造によらずACRが概ね100以下であることから、第三種監視化学物質と判定。
 - ② ミジンコの試験結果が当該範囲 (1mg/L~10mg/L) である場合には、物質の構造式を見てACRが大きいかどうかを考慮してケースバイケースで判定。
 - ③ 藻類の試験結果が当該範囲 (1mg/L~10mg/L) である場合には、原則として第三種監視化学物質とは判定しない。ただし、物質の構造等からACRが10より大きいことが予測される場合には、第三種監視化学物質と判定することもありうる。

- 4. なお、最初の審査において何らかの慢性毒性試験結果 (藻類生長阻害試験で得られるNOECも含む) が添付されていた場合には、第三種監視化学物質が急性毒性・慢性毒性を区別して判定するものではないことを考慮し、急性毒性試験結果と併せて判定を行う。

(参考1) 黒本調査結果による化学物質の水質からの検出結果

環境省では昭和49年度より化学物質環境汚染実態調査（いわゆる黒本調査）を実施している。平成4年度～13年度の最近10年間の調査結果では、水質については290物質について一般環境（発生源近傍を含まない）において調査がなされ、そのうち58物質が検出されている。検出された物質について、これまでの最大検出値の頻度分布を図1に示す。

これを見ると、最大検出値が $10\mu\text{g/L}$ を超える物質はわずか2物質であり、ほとんどの物質については環境中濃度が $10\mu\text{g/L}$ を超えることはない。したがって、PNEC（予測無影響濃度）が $10\mu\text{g/L}$ を超える物質についてはリスク削減が必要になるケースはほとんど想定できず、化審法に基づき監視を行う必要性は低いものと考えられる。なお、 $\text{PNEC}=10\mu\text{g/L}$ は $\text{NOEC}=100\mu\text{g/L}=0.1\text{mg/L}$ に相当する。

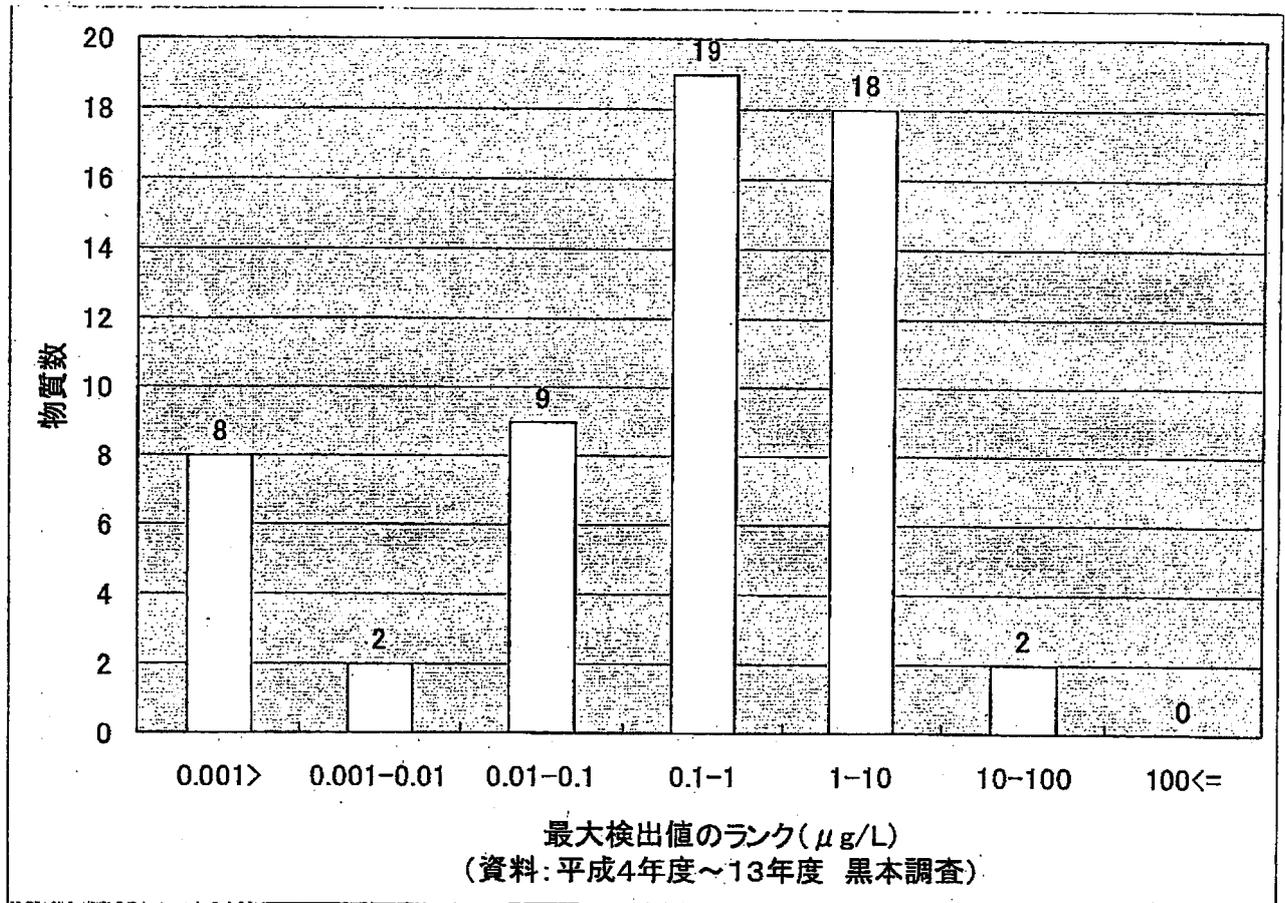


図1 化学物質環境汚染実態調査における最大検出値の頻度分布（平成4年度～13年度）

(参考2) EUの新規化学物質の分類結果

EUでは、上述の危険な物質の分類、包装、表示に関する理事会指令（Council Directive 67/548/EEC）により、新規化学物質については届出を求めている。新規化学物質として届け出られた物質はELINCS（欧州届出化学物質リスト）として取りまとめられており、逐次更新されてきている。ELINCSはこれまでに第5次リスト（1990年6月15日分までの届出を取りまとめたもの。1461物質掲載。）まで発出されており、さらに現在第6次リストの案（EU加盟国と欧州化学品局ECBが1998年6月30日までの届出を取りまとめたもの。2396物

質掲載。)が公表されている。第6次の案については、近いうちに正式なリストとして公表されるものと考えられるため、ここでは、第6次リストの案について整理を行った。

ELINCSでは、欧州共同体レベルで了承されている分類についてのみ、リストに分類情報を記載している。事業者より届け出られたデータから毒性と分類される場合であって、まだ欧州共同体レベルで分類が了承されていないものには、分類欄に印が付されている。第6次リストにより、新規の化学物質であって、欧州共同体により分類がなされているもの1344物質のうち、水生生物への毒性値が1mg/l以下と分類されたものは127物質(9%)、1mg/lから10mg/lであるものは177物質(13%)であり、本資料の考え方によれば第三種監視化学物質に判定される物質は全体の9~22%の間となる。なお、平成13~14年に届出があった新規化学物質446物質のうち、指定化学物質(第二種監視化学物質)に判定されたものは96物質(22%)となっている。

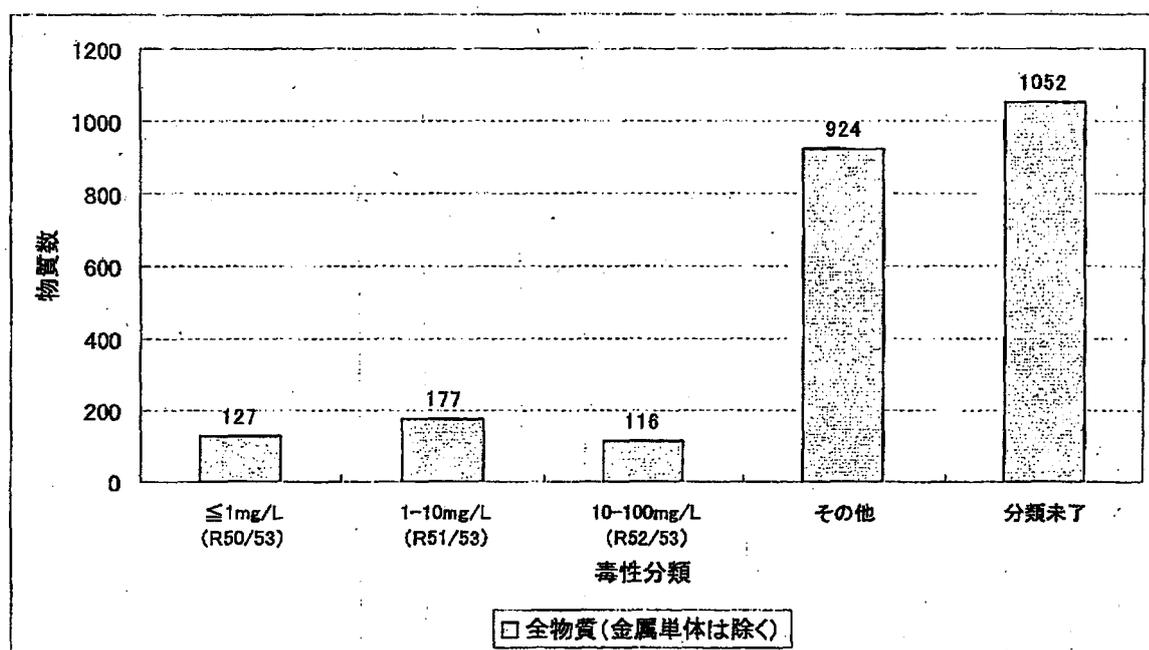


図2 EU ELINCS 第6次リストによる新規化学物質に関する水生生物への毒性値の分布

(参考3) 環境省生態リスク初期評価の結果

環境省リスク評価室が平成15年1月までに公表した化学物質の環境リスク初期評価の結果では、生態リスクの観点からA.相対的にリスクが高い可能性があり「詳細な評価を行う候補」として22物質、B.リスクはAより低いと考えられるが「関連情報の収集が必要」として14物質を選定している。

これら36物質のうち、本資料の考え方によれば第三種監視化学物質に該当する毒性を有するものは30物質(87%)であり、大部分をカバーしていることがわかる。

生態毒性の急性毒性値と慢性毒性値の比較

本資料では、生態毒性試験の3点ベースセットである甲殻類（ミジンコ）、魚類、藻類について、それぞれの試験における急性毒性値と慢性毒性値の比較を行った。ここでは、甲殻類と藻類については、環境省において平成7～10年度に実施した生態毒性試験結果を用いた。魚類については、環境省における慢性毒性試験（魚類の初期生活段階試験）データは現時点で十分得られていないため、既往の知見によるデータを基に検討を行った。

1 甲殻類（ミジンコ）の急性毒性と慢性毒性の比較

環境省の生態毒性試験では、甲殻類（ミジンコ）の *Daphnia magna* を用いた急性毒性試験（48時間遊泳阻害試験）と慢性毒性試験（21日間繁殖試験）を実施している。ここでは、これらの試験結果を用いて、甲殻類における急性毒性値（48時間 EC_{50} ）と慢性毒性値（21日 $NOEC$ ）の相関を検討した。

環境省では、平成7～10年度までに186物質での試験を実施している。ここでは、両方のエンドポイントの値が特定できる EC_{50} と $NOEC$ （物質濃度）が1000mg/L未満又は水溶解度を越えない134物質を対象として比較を行った。

甲殻類の急性毒性と慢性毒性の相関図を図1に示した。図中には $NOEC$ の1、10倍に相当する線も参考として併せて示した。

図から明らかなように、甲殻類の急性毒性と慢性毒性は相関係数 $r=0.843$ 、有意水準1%で、有意な相関が得られた。ただ、急性毒性と慢性毒性の比には、物質によるバラツキがみられる。そこで、急性毒性と慢性毒性の比、いわゆる急性慢性毒性比（ ACR ：Acute Chronic Ratio）を算出し、頻度分布図を作成した（図2）。

ACR が1～10のものは58物質で全体の約43%を占めて最も多く、100倍を下回っているものは全体の約90%（120物質）を占める。 ACR が100倍以上の物質は14あり、脂肪族及び芳香族アミン類が多い（表1）。

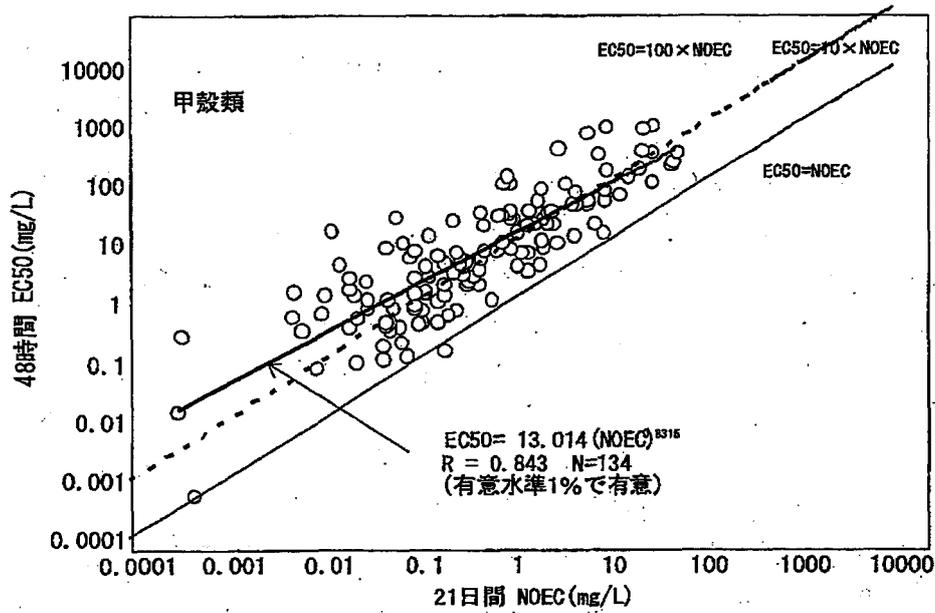


図1 甲殻類（ミジンコ）における急性毒性値と慢性毒性値の相関図
 （環境省 平成7～10年度 生態毒性試験結果より）

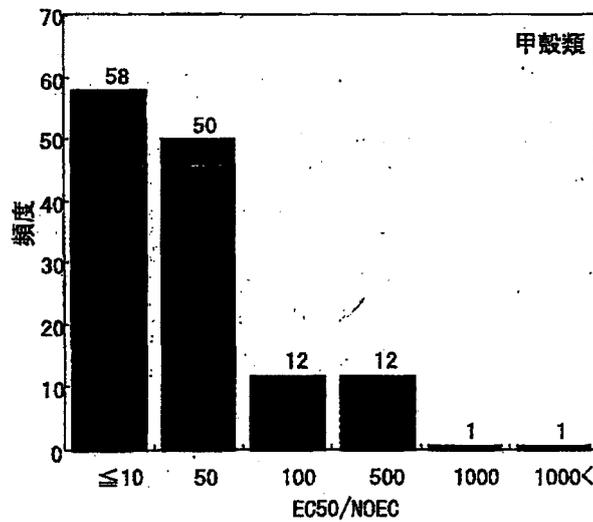


図2 甲殻類（ミジンコ）における急性慢性毒性比（ACR）の頻度分布
 （環境省 平成7～10年度 生態毒性試験結果より作成）