

OECD における生態影響試験法及び GLP 基準

1. OECD テストガイドラインについて

OECD（経済協力開発機構）は、加盟国における経済の持続的成長、自由かつ多角的な貿易を主目的として、1960年に設立された国際機関であり、現在30の先進諸国が加盟している。

OECDでは、化学物質の安全についての取組を進めており、その1つとして、化学物質の有害性を評価するための試験法を「テストガイドライン」として作成している。そのうち、生態系への影響に関するテストガイドライン(TG)については、2001年10月現在、17項目が承認されており、さらにドラフトガイドラインとして、8つ(TG 202及び208の改訂版を含む)が提案されている。

- ・ TG 201 藻類生長阻害試験（改訂版、1984年6月承認）
- ・ TG 202 ミジンコ類急性遊泳阻害試験および繁殖試験（改訂版、1984年4月承認）
（TG 202 ミジンコ類急性遊泳阻害試験として改訂中。2000年10月ドラフト）
- ・ TG 203 魚類急性毒性試験（改訂版、1992年7月承認）
- ・ TG 204 魚類延長毒性試験：14日間（1984年4月承認）
- ・ TG 205 鳥類摂餌毒性試験（1984年4月承認）
- ・ TG 206 鳥類繁殖試験（1984年4月承認）
- ・ TG 207 ミミズ急性毒性試験（1984年4月承認）
- ・ TG 208 陸生植物生長試験（1984年4月承認：改訂中 2000年7月ドラフト）
- ・ TG 209 活性汚泥呼吸阻害試験（1984年4月承認）
- ・ TG 210 魚類の初期生活段階毒性試験（1992年7月承認）
- ・ TG 211 ミジンコ繁殖試験（改訂版、1998年9月承認）
- ・ TG 212 魚類の胚・仔魚期における短期毒性試験（1998年9月承認）
- ・ TG 213 ミツバチ急性経口毒性試験（1998年9月承認）
- ・ TG 214 ミツバチ急性接触毒性試験（1998年9月承認）
- ・ TG 215 魚類稚魚成長毒性試験（1998年9月承認）
- ・ TG 216 土壌微生物窒素無機化試験（1998年9月承認）
- ・ TG 217 土壌微生物炭素無機化試験（1998年9月承認）
- ・ TG 218 底質によるユスリカ毒性試験（ドラフト）（2001年2月）
- ・ TG 219 水質によるユスリカ毒性試験（ドラフト）（2001年2月）
- ・ TG 220 ヒメミズ科繁殖試験（ドラフト）（2000年3月）
- ・ TG 221 ウキクサ生長阻害試験（ドラフト）（2000年10月）

- ・ TG ウズラに対する鳥類繁殖毒性試験（ドラフト）（2000年4月）
- ・ TG ミミズに対する繁殖毒性試験（ドラフト）（2000年1月）

承認されているテストガイドライン及びドラフトとして公表されている試験方法の中で、水生生態系の食物連鎖の各段階を考慮したものとして多く用いられている「藻類」、「甲殻類(ミジンコ)」、「魚類」を用いた試験法はそれぞれについて概要を示し、それ以外の生物に係るものについては一覧表に整理した。

2. 生態影響試験方法の概要

(1) 藻類

藻類に対するテストガイドラインである TG 201 は、緑藻類の生長阻害に関する試験である。一般には感受性が高い *Selenastrum capricornutum* がよく使用されている。

表 1 に試験方法等の概略を示す。

表 1 藻類生長阻害試験 (TG 201)

項目	方法および条件
生物種	<i>Selenastrum capricornutum</i> <i>Scenedesmus subspicatus</i> <i>Chlorella vulgaris</i>
試験期間	72 時間
試験濃度	等比級数で少なくとも 5 濃度区と対照区、助剤を用いた場合には助剤対照区を設置
連数	各濃度区 3 連(できれば対照区の 2 倍)
初期細胞濃度	約 10^4 cells/mL(<i>Selenastrum capricornutum</i> 、 <i>Scenedesmus subspicatus</i>) その他の種を用いるときは現存量で同程度
助剤	有機溶剤、界面活性剤、分散剤それぞれ 100mg/L を超えない
培養条件	振盪、攪拌、曝気下で無菌培養
試験温度	21 ~ 25 ± 2
照明	400 ~ 700nm のスペクトル幅で連続的に均一照射 0.72×10^{20} photons/m ² s の光量
観測または測定	生物量または細胞数(試験開始後 24、48、72 時間) 温度(試験前後) pH(試験前後) 被験物質濃度(実測してもよい)
結果の算出	生長曲線 EC50 NOEC

(2) 甲殻類(ミジンコ)

甲殻類に対するテストガイドラインとしては、TG 202 および TG 211 がある。TG 202 はミジンコ類の遊泳阻害と繁殖影響の両方に関して 1984 年に承認されたものであるが、繁殖影響に関する部分が独立して 1998 年に TG 211 が策定、承認され、事実上 TG 202

は遊泳阻害のみの試験方法に関するガイドラインとなった。現在、TG 202 の改定作業がおこなわれており、ドラフトが提案されている。また、TG 211 の繁殖試験は、改定前のTG 202 の繁殖試験部分を改良したものであり、主な改良点は、

- 1) 生物種は *Daphnia magna* とする
- 2) 試験期間は 21 日とする
- 3) 半止水式試験において、各濃度区における試験生物数を、少なくとも 40 頭を 10 頭ずつ 4 群に分けて試験を行う
- 4) 試験環境と栄養状態を重視する

となっている。表 2 にミジンコ類の遊泳阻害試験、表 3 に繁殖試験の概略を示した。

表 2 ミジンコ類急性遊泳阻害試験 (TG 202)

項目	方法および条件
生物種	<i>Daphnia magna</i> 生後 24 時間未満 他種を用いることも可能
試験媒体	天然水 (表層水又は地下水) または調整水、脱塩素水道水 pH 6 ~ 9 (NaCl, NaOH で調整) 硬度 140 ~ 250mg/L(CaCO ₃)
試験期間	48 時間
試験濃度	等比級数的に公比 1.5 ~ 2.2 の範囲で 3.2 を超えない、5 段階の濃度を設定。助剤を用いた場合には助剤対照区を設定
連数	各濃度区 4 連
生物数	少なくとも 20 頭/各濃度区
助剤	溶剤、乳化剤、分散剤それぞれ 100mg/L を超えない
試験温度	18 ~ 22 ± 1
照明	16 時間暗、8 時間明を推奨、全て暗条件でも可
観測または測定	行動、静止、異常行動及び外見の変化も観察 (24 時間及び 48 時間) 対照区の水温、気温を試験中、少なくとも試験開始および終了時に測定。DO、水温、pH(試験前後) 被験物質濃度 (少なくとも試験前後を推奨)
結果の算出	24 時間と 48 時間での 50% 遊泳阻害濃度 (EC50)

表3 ミジンコ類繁殖試験 (TG 211)

項目	方法および条件
生物種	Daphnia magna 生後 24 時間未満 他の種を用いることも可能
試験媒体	天然水または調整水
試験方式	半止水式(少なくとも 1 週間に 3 回)または流水式
試験期間	21 日 (対照区で F1 世代の第 3 腹仔が産まれるまで、 通常 14 日以上 21 日以内)
試験濃度	等比級数的 (公比 3.2 を超えない) 少なくとも 5 濃 度区
生物数	半止水式 (少なくとも 10 頭/濃度区) 流水式 (40 頭/濃度区)
助剤	有機溶剤 (i.e. 0.1ml/L) 分散剤 (0.1ml/L)
試験温度	18 ~ 22 ± 2
照明	16 時間明、8 時間暗の周期 (光強度 : 15 ~ 20 μ E/m ² s を超えない)
給餌	毎日(緑藻類)
観測または 測定	親ミジンコの生死と状態 産仔数とその状態 放出卵の有無 DO、水温、硬度、pH (少なくとも週に 1 回) 供試物質濃度
結果の算出	NOEC 可能なら 1, 2, 4, 7, 14 日及び終了時の EC ₅₀ (遊泳阻害 および繁殖に関する)を算出

(3) 魚類

魚類に対するテストガイドラインとしては、TG 203、TG 204、TG 210、TG 212 および TG 215 がある。TG 204 の延長毒性試験は、TG 203 よりさらに長い観察期間と付加情報が必要である場合に用いられる。

TG 210 の初期生活段階毒性試験は、受精卵から稚魚へ成長するまで被験物質を連続的に曝露する手法であり、ライフサイクルを通して行うため、慢性的な影響を捉えることができる。試験では、濃度区と対照区での供試生物の状態 (ふ化率、生存率等) を比較し、LOEC (Lowest Observed Effect Concentration : 最小影響濃度) 及び NOEC (No Observed Effect Concentration : 無影響濃度) を求める。

TG 212 の胚・仔魚期における短期毒性試験は、受精卵から仔魚へ成長するまで曝露する短期試験である。この試験は TG 210 に置き換えることはできないが、濃度区と対照区での供試生物の状態を明らかにできることに加え、TG 210 や慢性毒性試験のスクリーニングテストとして用いられ、試験生物種も節約することができるなど、貴重な情報を提供できる試験方法とされている。

表 4 ~ 8 に各試験方法等の概略を示す。

表4 魚類急性毒性試験 (TG 203)

項目	方法および条件
生物種	ゼブラフィッシュ、ファットヘッドミノー、コイ、ヒメダカ、グッピー、ブルーギル、ニジマス、他の種を用いることも可能
試験媒体	天然水、調整水、または飲料水(必要なら脱塩したもの)
試験期間	96時間
試験濃度	等比級数(最大公比2.2)で少なくとも5濃度区と対照区
生物数	少なくとも7尾/区
試験方式	止水式、半止水式または流水式
助剤の使用	有機溶剤、乳化剤、分散剤、それぞれ100mg/Lを超えない
生物密度	止水式および半止水式では魚体重1.0g/L以下 流水式ではさらに高密度可
試験温度	魚種により異なる。
照明	12~16時間 照明/日
給餌	試験開始の24時間前まで、3回/週又は毎日
観測または測定	死亡数(24時間毎(3および6時間も観測することが望ましい)) 水温、DO、およびpH(1回/日) (24時間毎) 供試物質濃度
結果の算出	96時間での50%死亡濃度(LC50) 0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度

表5 魚類延長毒性試験 (TG 204)

項目	方法および条件
生物種	ゼブラフィッシュ、ファットヘッドミノー、コイ、ヒメダカ、グッピー、ブルーギル、ニジマス、他の種を用いることも可能
試験媒体	天然水、調整水、または飲料水(脱塩したもの)
試験期間	14日(1~2週間延長可)
試験濃度	死亡やその他の影響濃度とNOECとを求められるように設定
生物数	各濃度区および対照区に対し最低10尾
試験方式	半止水式または流水式
助剤の使用	有機溶剤、乳化剤、分散剤は100mg/Lを超えないようにする
生物密度	半止水式では1.0g/L以下、流水式では更に高密度可
試験温度	魚種により異なる
照明	12~16時間明周期
給餌	数回/日(直ちに摂食する量)。1回/日(一定量(例えば乾燥重量の2%))
観測または測定	死亡数(1回/日)、外形異常、行動障害、摂餌、体長、体重 pH、DO、水温(2回/週)
結果の算出	NOEC

表6 魚類の初期生活段階毒性試験 (TG 210)

項目	方法および条件
生物種	淡水：ニジマス、ファットヘッドミノー、ゼブラフィッシュ、ヒメダカ 海水：シーブスヘッドミノー その他の種を用いることも可能
試験期間	対照区における全ての魚が摂餌できるまで
試験濃度	公比 3.2 を超えないで 5 濃度区以上と対照区、助剤を用いた場合には助剤対照区を設置
生物数	60 卵/各濃度区で 2 連
試験方式	流水式または半止水式
助剤の使用	なるべく避ける。溶剤・分散剤は 0.1mL/L 以内
試験温度	魚種により異なる。
照明	魚種により異なる。
給餌	各成長段階に対し適切な飼料を、適切な時期から与える。
観測または測定	孵化数と生存数(毎日) 体形異常 行動阻害 体長 体重
結果の算出	LOEC および NOEC

表7 魚類の胚・仔魚期における短期毒性試験 (TG 212)

項目	方法および条件
生物種	ゼブラフィッシュ、ファットヘッドミノー、コイ、ヒメダカ、ニジマス、他の種を用いることも可能
試験方式	半止水式または流水式
試験期間	全稚魚の卵黄が吸収されるまで、あるいはコントロールが餓死するまで、魚種により異なる。
試験濃度	公比 3.2 を超えないで 5 濃度区以上と対照区、助剤を用いた場合には助剤対照区を設置
生物数	30 卵/濃度区で少なくとも 3 連
助剤	なるべく避ける。溶剤・分散剤は 0.1mL/L 以内
試験温度	魚種により異なる。
照明	魚種により異なる。
観測または測定	孵化数と生存数(毎日)、体形異常、行動阻害、体長、体重、 DO(換水前後または 1 回/週(半止水式)) pH(換水前後(半止水式)、 1 回/週(流水式)) 硬度(1 回)、水温(毎日)
結果の算出	LOEC および NOEC

表 8 魚類稚魚成長毒性試験 (TG 215)

項目	方法および条件
生物種	ニジマス。その他ゼブラフィッシュ、ヒメダカを用いることも可能
試験媒体	天然水または調製水
試験期間	28 日以上
試験濃度	5 濃度区 (最大値は溶解度)
生物数	適数
試験方式	流水式 (不可能な場合は半止水式または止水式で水を交換)
助剤の使用	なるべく避ける。溶剤・分散剤は 0.1mL/L 以内
生物密度	少なくとも 7 尾/各濃度区
試験温度	魚種により異なる
照明	12 ~ 16 時間 照明/日
給餌	体重の 2%、試験中は体重の 4%
観測または測定	異常 (脳溢血、変色) 特異的行動。体重の増減 DO(試験中) pH(試験中) 硬度 (各試験一回) アルカリ度 (各試験一回) 水温 (試験中)
結果の算出	EC ₅₀ 、LOEC、NOEC

(4) その他の生物

食物連鎖で重要な、藻類、甲殻類、魚類に属する生物の試験が国際的によく用いられているが、地球上にはその他多くの種類の生物が生息しており、上記 3 種の生物以外についての試験についても必要に応じ検討する必要がある、OECD においてテストガイドラインが策定されている。

1) ミミズ (Earthworm)

ミミズに対するテストガイドラインは TG 207、TG 220 (ドラフト) とドラフト (番号なし) のガイドラインが策定されている。TG 207 では、急性毒性について濾紙接触毒性試験と人工土壌試験の 2 法が記載されている。濾紙接触毒性試験は、簡易な方法で再現性が良く、土壌中におけるミミズの毒性を明らかにするためのスクリーニングに有用な試験法である。人工土壌試験は、自然界での曝露を反映した毒性データを与える。

表 9 にミミズの試験方法等の概略を示す。

2) ユスリカ (Chironomid)

ユスリカに対するテストガイドライン (ドラフト) は、「BBA (1995)¹」等を基に TG 218、TG 219 の 2 種類が作成されている。1998 年 5 月にドラフトが提出され、現時点では 2001

¹ BBA(1995): Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin .

年 2 月に改訂されたものが最新である。供試物質を、TG 218 では人工底質に、TG 219 では水に投入して成長阻害等を観測し、EC50、LOEC、NOEC 等を求めるものである。表 10 に試験方法等の概略を示す。

3) ウキクサ (Lemna sp.)

ウキクサに対するテストガイドライン(ドラフト)は、ASTM (1991)²や米国環境保護庁等におけるテストガイドラインを基に作成し、2000 年 10 月 TG 221 として作成されている。7 日間における成長阻害等を観測し、EC50、LOEC、NOEC を求めるものである。

表 11 に試験方法等の概略を示す。

4) 鳥類など、その他の生物の試験方法

鳥類(TG 205、TG 206、ウズラに関するドラフト)、陸生植物(TG 208)、活性汚泥(TG 209)、ミツバチ(TG 213、TG 214)、土壤微生物窒素無機化試験(TG 216)、土壤微生物炭素無機化試験(TG 217)について、その試験方法の概略を項目別に表 12~16 に整理した。

² ASTM – American Society for Testing and Materials.(1991): Standards Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E1415-91:10 pp.

表9 ミミズの生態影響試験方法

試験名	ミミズ急性毒性試験 (濾紙接触毒性試験)(TG 207)	ミミズ急性毒性試験 (人工土壌毒性試験)(TG 207)	ヒメミミズ科繁殖試験 (TG 220:ドラフト)	ミミズに対する繁殖毒性試験 (ドラフト)
項目	方法および条件		方法および条件	方法および条件
生物種	Eisenia foetida (Michaelsen:シマミミズ)を推奨	Eisenia foetida (Michaelsen:シマミミズ)等	ヒメミミズ (Enchytraeus albidus) または他の Enchytraeus 属の種も可	ミミズ (Eisenia fetida fetida または Eisenia fetida andrei)
試験媒体	被験物質溶液で湿らせた濾紙	人工土壌 750g(被験物質を含む)	人工土壌 [10%のミズゴケから成る泥炭、20%のカオリン粘土、約 0.3-1.0%の炭酸カルシウム(pHを 6.0±0.5 に調整)、約 69%の工業砂]	人工土壌 [10%のミズゴケから成る泥炭、20%のカオリン粘土、約 0.3-1.0%の炭酸カルシウム(pHを 6.0±0.5 に調整)、70%の工業ケイ砂]
試験期間	48時間(72時間まで可)	14日	成体・幼生曝露期間 21日間	成体・幼生曝露期間 4週間
試験濃度	等比級数で5濃度区以上	等比級数で5濃度区以上	NOEC: 等比級数で最低5濃度区(公比1.8を超えない)、対照区、助剤対照区 EC _x : 12濃度区(各濃度2連)、対照区、助剤対照区 NOEC・EC _x : 等比級数で8濃度区(公比1.8を超えない)、対照区、助剤対照区	NOEC: 等比級数で最低5濃度区(公比1.8を超えない)、対照区、助剤対照区 EC _x : 12濃度区(各濃度2連)、対照区、助剤対照区 NOEC・EC _x の算出: 等比級数で8濃度区(公比1.8を超えない)、対照区、助剤対照区
助剤	溶解度が1,000mg/L以下で有機溶剤	分散剤、乳化剤、有機溶剤	揮発性溶剤(アセトン等)	揮発性溶剤(アセトン等)
生物密度	1匹/瓶を10連以上。20連推奨	10匹/瓶を4連	10成体/容器(容積0.20-0.25L、直径約6cmのガラスのビンにガラスまたはポリエチレンの蓋をする)	10成体/容器(容積約1.2L、底面積約200cm ² 、人工土壌500-600g)
試験温度	20±2	20±2	20±2	20±2
照明	暗黒下	連続照射(400~800ルクス)	16時間明(400~800ルクス) 8時間暗	16時間明(400~800ルクス) 8時間暗
給餌	記載なし	記載なし	ヒメミミズの維持が可能であれば何でも良い。	ミミズの維持が可能であれば何でも良い。
観測または測定	死亡数	死亡率(7日と14日目) 異常行動と病的変化(7日目)	生存している成体の数(21日目) 異常行動(土にもぐることができない等)ならびに外形的変化(傷がある等)が見られた成体の数(21日目) 幼生の数(6週間後)	生存している成体の数および体重(28日目) 異常行動(土にもぐることができない等)ならびに外形的変化(傷がある等)が見られた成体の数(28日目) 幼生の数(8週間後)
結果の算出	各濃度区の阻害率、LC ₅₀	各濃度区の阻害率、LC ₅₀	NOECおよびEC _x (繁殖がx%減少)	NOECおよびEC _x (繁殖がx%減少)

表 10 ユスリカ毒性試験 (TG 218・TG 219、ドラフト)

項目	方法および条件
生物種	<i>Chironomus riparius</i> , <i>C. yoshimatsu</i> , <i>C. tentans</i> , <i>C. sp.</i>
成長段階	1 齢幼虫
試験媒体	天然水 (表層水、地下水) 調整水、脱塩素水道水 人工堆積物、天然堆積物
試験期間	20-28 日 (<i>C. riparius</i> , <i>C. yoshimatsu</i>) 28-65 日 (<i>C. tentans</i>)
試験濃度	少なくとも 5 濃区 [3 連 (EC _x) 4 連 (NOEC)] 対照区 助剤対照区
試験方式	止水式を推奨 半止水式、流水式も可
助剤	有機溶剤、各容器に 10g のケイ砂を混合
生物密度	少なくとも 10 匹/各濃度区
試験温度	20 ± 2 (<i>C. riparius</i> , <i>C. yoshimatsu</i>) 23 ± 2 (<i>C. tentans</i>)
照明	16 時間明周期 (500 ~ 1,000 ルクス)
給餌	毎日または 3 回以上/週
観測または測定	羽化にかかった日数および羽化総数 行動障害 供試物質濃度 (試験前後) 生長と死亡 (試験開始、10 日後)
結果の算出	羽化率、EC ₅₀ 、LOEC、NOEC

表 11 ウキクサ生長阻害試験 (TG 221、ドラフト)

項目	方法および条件
生物種	<i>Lemna gibba</i> , <i>Lemna minor</i>
試験媒体	脱イオン水
試験方式	止水式または半止水式
試験期間	7 日
試験濃度	等比級数(公比 3.2 を超えない)で少なくとも 5 濃度区と対照区
助剤	有機溶剤、分散剤を 100mg/L 以下
試験温度	24 ± 2
照明	400 ~ 700nm のスペクトル幅で連続的に均一照射 85 ~ 125 μ E/m ² s 6,500 ~ 10,000 ルクス
観測または測定	葉およびコロニー数(試験前後および 3 日毎) 葉の大きさ、葉の様子(壊死や退緑) 根の長さ、乾燥重量 pH(止水式: 試験前後、半止水式: 換水毎)、供試物質濃度
結果の算出	対照区における倍加時間 (Td) 成長率 EC _x 、LOEC、NOEC

表 12 鳥類の生態試験方法

試験名	鳥類摂餌毒性試験 (TG 205)	鳥類繁殖試験 (TG 206)	ウズラに対する鳥類繁殖毒性試験 (ドラフト)
項目	方法及び条件	方法及び条件	方法および条件
生物種	1 種又はそれ以上の種を用いる。推奨される鳥類は、マガモ、コリンウズラ、ハト、ウズラ、コウライキジ、シャコ。	1 種又はそれ以上の種を用いる。推奨される鳥類は、マガモ、コリンウズラ、ウズラ	ウズラまたはコリンウズラ
試験媒体	餌料	餌料	経口 (餌または物質によっては飲料水)
試験方式	供試物質均一に分散させた餌料を 5 日間与え、さらに供試物質を含まない餌料を最低 3 日間与える。	給餌 (20 週以上)	水・餌は適宜、餌量は体重の 2% の量を超えない 1 日 1 回以下、週 1 回以上給餌
試験期間	8~21 日間	卵：10 週間収集 親鳥：14 日飼育	親鳥暴露試験期間 6 週間 卵孵化期間(ウズラ：17-18 日間、コリンウズラ：24-25 日間) 雛鳥飼育期間 14 日間
試験濃度	5 濃度区と 2 対照区	親鳥：3 濃度区と対照区 (最高濃度：1000ppm) 雛鳥：供試物質を含まない	等比級数的に最低 3 濃度区と対照区
生物数	10 羽/濃度区	1 つがい/鳥カゴ(1 連) 1 オス 2 メス/鳥カゴ(12 連) 1 オス 3 メス/鳥カゴ(8 連)	1 つがい/鳥かご
助剤	供試物質の毒性を変化させない水、コーンオイル又は他の助剤。餌料重量の 2% 以下。	供試物質の毒性を変化させない水、コーンオイル又は他の助剤。餌料重量の 2% 以下。	アセトン
試験温度	マガモ、コウライキジは 22~32、コリンウズラ、ウズラ、シャコは 25~32、ハトは 18~22。(温度は日令により異なる)	親鳥は 22±5。貯留、孵卵、孵化、若鶏等は種類による。	1 週令 35-38、2 週令 30-35 3-4 週令 23-27、4 週令以上 16-27、湿度 40-80%
照明	記載なし	親鳥：試験開始後 8 週間は 7~8 時間明/日、それ以降 16~18 時間明/日、雛鳥：日周に基づき	16 または 17 時間 明 (最低 10 ルクス) 7 または 8 時間 暗
給餌	親鳥：試験物質を含んだ餌料を与えつづける 雛鳥：試験物質を含まない餌料を与える	親鳥：試験物質を含んだ餌料を与えつづける 雛鳥：試験物質を含まない餌料を与える	親鳥：試験物質を含んだ餌料を与えつづける 雛鳥：試験物質を含まない餌料を与える
観測又は測定	中毒症状及び他の異常な挙動：処理 1 日目に 2 度、以降毎日 1 回 死亡：処理 1 日目に 2 度、以降毎日 1 回 体重：処理 0, 5, 8 日目及び試験終了日 (8 日を超過した場合) 摂餌量：0~5 日、5~8 日及び 8~試験終了日 (延長した場合)	死亡及び中毒症状：毎日 親鳥の体重：摂食機関の最初、産卵の開始前及び試験終了時 若鶏の体重：14 日令 親鳥の摂餌量：試験期間中 1 又は 2 週毎 若鶏の摂餌量：孵化後第 1 週及び第 2 週 肉眼的病理検査：全ての親鳥	親鳥の健康・病理状態 (少なくとも毎日) 親鳥の摂餌量 (少なくとも 1 回/週) 親鳥の体重 (予備試験開始時、試験開始時、試験終了時) 親鳥の肝臓・脾臓・精巢の重量 (死亡後または試験終了時に殺した後) 親鳥の産卵状態 (予備試験前) 卵数、傷・異常のある卵数、殻の強度および厚さ 有精卵・無精卵および胚の発育・死亡 孵化 2 日前または 4 日前の発育・死亡 雛鳥の健康・毒性・異常・死亡状態 (毎日) 体重 (孵化時、孵化 14 日後) 14 日間生存率
結果の算出	半数致死濃度 (LC ₅₀) LC50 5000ppm のときは、NOEC	NOEC (無影響濃度) 及び統計的に有意な影響濃度)	全ての健康および繁殖の要因についての NOEC (mg/kg 餌/日および mg/kg 体重/日の平均・範囲)

表 13 陸生植物生長試験 (TG 208,1984 年 4 月承認文書)

項目	方法および条件
生物種	下記の 3 部門からそれぞれ少なくとも 1 つを選択し、最低 3 種を用いる。
試験媒体	土壌 (0.5 cm 未満は除去し、炭素含量は 1.5% を越えてはならない。細かい粒子 (20 μm) 以下は 10 ~ 20% 含有しなければならない。PH は 5.0 ~ 7.5 の範囲でなければならない。
試験方式	ポット実験
試験期間	コントロールの苗 50% が発芽してから 14 日後に終了する。
試験濃度	1 つのコントロールと 3 濃度区で、少なくとも 4 連。
生物数	各区に少なくとも 5 つの種子
試験温度	正常な成長を維持するのに適切
照明	正常な成長を維持するのに適切
給餌	必要に応じて植物に水を与える。
観測または測定	苗の発芽を観察。コントロールで苗の 50% が発芽してから、少なくとも 2 週間後に植物を刈り取り、重量を測定 (湿重量又は 70 における乾燥重量)
結果の計算	発芽数より、発芽に及ぼす影響を LC50、重量より成長に及ぼす影響を EC50 で表す。

注 1

部門	供試種	
1	ホソムギ ryegrass	Lolium perenne
	イネ rice	Oryza sativa
	カラスムギ oat	Avena sativa
	コムギ wheat	Triticum aestivum
	モロコシ sorghum	Sorghum bicolor
	2	マスタード mustard
アブラナ rape		Brassica napus
ハツカダイコン radish		Raphanus sativus
カブラ turnip		Brassica rapa
ハクサイ Chinese cabbage		Brassica campestris var. chinensis
3	ヤハズエンドウ vetch	Vicia sativa
	ブドウ mung bean	Phaseolus aureus
	アカツメクサ red clover	Trifolium pratense
	コロハ fenugreek	Trifolium ornithopodioides
	レタス lettuce	Lactuca sativa
	コショウソウ cress	Lepidium sativum

表 14 活性汚泥呼吸阻害試験 (TG 209)

項目	方法および条件
生物種	下水処理場の活性汚泥
試験媒体	水
試験方式	バッチ式
試験期間	30分又は3時間、その間曝気を行う。
試験濃度	少なくとも5濃度で行う。公比は3.2を超えない。
生物数	懸濁固体濃度 4g/L(±10%)
試験温度	20±2
給餌	合成下水栄養(成分は注1)
観測または測定	供試物質の各濃度の30分又は3時間(接触後)の酸素消費量を測定
結果の計算	供試物質の阻害効果(対照区の平均呼吸率)、 各試験濃度での阻害パーセント EC ₅₀ (95%信頼限界)

注1	ペプトン	16g	
	肉エキス	11g	
	尿素	3g	
	NaCl	10.7g	
	CaCl ₂ ・2H ₂ O	0.4g	
	MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.2g	
	K ₂ HPO ₄	2.8g	を1Lの水に溶解し、調整。

表 15 ミツバチ毒性試験 (TG 213、TG 214)

試験	ミツバチ急性経口毒性試験 (TG 213)	ミツバチ急性接触毒性試験 (TG 214)
項目	方法および条件	方法および条件
生物種	働きバチの若い成虫 同種	働きバチの若い成虫 同種
試験媒体	水 (ショ糖 50%を含む)	水溶性の高いものは水、低いものは有機溶媒 (アセトンを推奨)
試験方式	50%ショ糖液に試験物質を入れた試験水を 100~200 μ L 供試生物に投与。	1 μ L の対象試験物質を含んだ溶液を胸部背面につける。
試験期間	48 時間 (ただし、24 時間で死亡率 10% 以上の場合、試験時間は最大 96 時間までとする、またコントロールの死亡率 10% を越えない)	48 時間 (ただし、24 時間で死亡率 10% 以上の場合、試験時間は最大 96 時間までとする、またコントロールの死亡率 10% を越えない)
試験濃度	等比級数 (2.2 倍を超えない) 5 段階の濃度を設定	等比級数 (2.2 倍を超えない) 5 段階の濃度を設定
生物数	10 個体 / 容器、最低 3 連以上でエンドポイントと 95% 信頼区間の統計解析ができる試験区数	10 個体 / 容器、最低 3 連以上でエンドポイントと 95% 信頼区間の統計解析ができる試験区数
助剤	試験物質が難溶性の場合、乳化剤、分散剤 (1% を越えない) を使用	湿潤剤 (水を使用する際)
試験温度	25 \pm 2 、湿度 50~70%	25 \pm 2 、湿度 50~70%
照明	明所	明所
給餌	給餌する (500g/L ショ糖水溶液)	給餌する (500g/L ショ糖水溶液)
観測または測定	各グループに対する試験水・給餌の摂取率を測定。 試験開始後 4 時間、24 時間 (後 24 時間毎) に死亡率を記録。 試験中の行動を観察	試験開始後 4 時間、24 時間 (後 24 時間毎) に死亡率を記録。 試験中の行動を観察
結果の計算	LD ₅₀ および 95% 信頼限界 死亡率の解析は統計処理を用いる 作用容量曲線は観察時間におけるものをプロットしてその傾きから LD ₅₀ および 95% 信頼限界を求める。	LD ₅₀ および 95% 信頼限界 死亡率の解析は統計処理を用いる 作用容量曲線は観察時間におけるものをプロットしてその傾きから LD ₅₀ および 95% 信頼限界を求める。

表 16 土壤微生物に対する試験方法 (TG 216、TG 217)

試験	土壤微生物窒素無機化試験 (TG 216)	土壤微生物炭素無機化試験 (TG 217)
項目	方法及び条件	方法及び条件
生物種	土壤微生物	土壤微生物
試験媒体	土壤	土壤
試験方式	土壤サンプルに供試物質を添加して、暗所で好氣的に培養	土壤サンプルに供試物質を添加して、暗所で好氣的に培養
試験期間	28 日間 (供試物質が農薬の場合、窒素形質転換率の差が対照区と比べて 25%より大きい場合は 25%以下になるまで試験を継続 (最大 100 日))	28 日間 (供試物質が農薬の場合、二酸化炭素量又は酸素消費量の差が対照区と比べて 25%より大きい場合は 25%以下になるまで試験を継続 (最大 100 日))
試験濃度	農薬：少なくとも 2 濃度 (最大 PEC 濃度及びその 5 倍の濃度) と対照区。 農薬以外：少なくとも 5 濃度及び対照区。	農薬：少なくとも 2 濃度 (最大 PEC 濃度及びその 5 倍の濃度) と対照区。 農薬以外：少なくとも 5 濃度及び対照区。
溶剤	水 (水溶性の物質の場合) 又は、細かいケイ砂 (粒子径 0.1-0.5mm)、アセトン、クロロホルム等、水以外の溶剤は使用不可。	水 (水溶性の物質の場合) 又は、細かいケイ砂 (粒子径 0.1-0.5mm)、アセトン、クロロホルム等、水以外の溶剤は使用不可。
試験温度	20 ± 2	20 ± 2
照明	暗所	暗所
観測又は測定	農薬：0, 7, 14, 28 日。28 日以降は 14 日おきに窒素を分析。 農薬以外：0 及び 28 日に窒素を分析。必要と思われる場合は 7 日目にも分析。	農薬：0, 7, 14, 28 日。28 日以降は 14 日おきにグルコース誘導呼吸率を分析。 農薬以外：0 及び 28 日にグルコース誘導呼吸率を分析。必要と思われる場合は 7 日目にも分析。
結果の算出	農薬：28 日以降の対照区と最低濃度区における窒素無機化率の差が 25%以下の場合は、長期影響がないと評価される。 農薬以外：EC ₅₀ , EC ₂₅ または EC ₁₀ を用いて評価。	農薬：28 日以降の対照区と最低濃度区における二酸化炭素量又は酸素消費量の差が 25%以下の場合は、長期影響がないと評価される。 農薬以外：EC ₅₀ , EC ₂₅ または EC ₁₀ を用いて評価。

(5) 参考文献

- ・ OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS

(<http://www1.oecd.org/ehs/test/Biotic.htm>)

- ・ OECD (1999): Environmental Health & Safty News, No.9.

・ 鈴木基之、内藤英雄編 (1998): バイオアッセイ水環境のリスク管理, 講談社サイエンティフィック

- ・ (財)化学品検査協会 (1985): OECD 化学品テストガイドライン, 第一法規出版

- ・ 若林明子 (2000): 化学物質の生態毒性、(社)産業環境管理協会

3 . OECD における GLP 活動の概要

GLP (Good Laboratory Practice : 優良試験所基準) は、当初医薬品の分野で、新医薬品の申請に使用された動物実験のデータに虚偽や重大な誤りがあることが発見されたことがきっかけとなり、各種安全性試験の成績の信頼性を確保するための手段として米国食品医薬品局 (FDA) において策定された。OECD においても、化学品の安全性試験データの OECD 加盟各国間における相互受理の実効性を担保する観点から、試験施設の基準の必要性がうたわれ、1979 年以降、OECD 化学品規制特別プログラムの中に GLP 検討のための専門委員会が設置されており、約 2 年間の検討を経て、OECD 優良試験所基準 (案)(OECD-GLP) が策定された。この基準案は、1981 年の OECD 理事会において化学品評価におけるデータ相互受理 (MAD : Mutual Acceptance of Data:) に関する決定及び OECD テストガイドラインとともに採択され、同時に各国がこの OECD-GLP を使用すべきことが勧告された。

さらに、GLP の導入に関して、1983 年の OECD 理事会においてその推進の方策及び各国間における相互認証に関する勧告がなされた。この勧告は、二重試験の排除、試験施設の効率的利用及び試験動物の減少による経費節減が必要であること、各国の試験施設認証手続きが共通的性格を有する場合に相互認証の基盤となり得ること、国際的に調和した認証手続きに基づく相互認証により試験データの相互受理が著しく安易になり得ること等を勧告し、試験施設の GLP への適合性に関する各国の認証手続きのあり方、認証手続きに関する技術的・行政的な事項について討議する場としてフォーラムの開催等を規定している。

これを受け、我が国の化審法においても、1984 年 3 月に GLP 制度が 3 省庁の局長通知 (新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める省令第 4 条に規定する試験施設について) という形で導入されている。最近では、1997 年の OECD-GLP の改正を受け、同局長通知についても 2000 年 (平成 12 年) 3 月に改正を行ったところである。

4 . OECD-GLP 制度の概要

GLP 制度は、試験施設毎に運営管理、試験設備、試験計画、内部監査体制、信頼性保証体制、試験結果等をチェックし試験成績の信頼性の確保を図る制度であり、OECD においては加盟国の共通の規範としてより直接に利用できることを可能とするため、1997 年 11 月に従来の OECD-GLP を改正したところである。改正 GLP の概要について以下に示す。

(1) 試験施設の組織と職員

試験施設運営管理者、試験責任者、試験主任、試験担当職員のそれぞれの職務事項を規定している。試験施設運営管理者は、GLP 原則が試験施設内で適用されていることを確認することとされ、GLP には試験施設運営管理者が実行すべき最小限の事項について記述されている。試験責任者は、試験の全般的な実施と最終報告書に責任を有する者とされ、GLP には試験責任者が有すべき責任事項について記述されている。試験主任は、委任された試験段階に関連する GLP 原則に従って実施することを確認すべきこととされている。試験担当職員は、該当する GLP 原則の条項を熟知することや、標準操作手引書 (SOP) で与えられている指示に従うことと等に留意すべきとされている。

(2) 信頼性保証プログラム

試験施設は、GLP 原則に従って試験が実施されることを保証するため、文書化した信頼性保証プログラムを持たなければならないこととされ、運営管理者が信頼性保証職員を指定することとされている。また、信頼性保証職員は保証すべき試験の実施には参加できないこととされている。GLP には、信頼性保証職員の職務事項について規定されている。

(3) 施設

試験施設は試験の信頼性を損なうような障害を最小にし、試験の要求に適合するにふさわしい広さ、構造、配置を有することとされており、異なった業務についても各々の試験が適切に実施できるように、適切な分離を図った試験施設の設計が必要とされている。GLP には、試験系の施設、被験物質及び対象物質の取扱い施設、資料保管施設、廃棄物処理に関する留意事項について規定されている。

(4) 機器・材料・試薬

機器、装置の適正な配置、定期的な検査、校正等の必要性や、試薬等の適正な保管の必要性等について規定されている。

(5) 試験系

物理的・化学的試験系については、試験系の完全性を確保するべきとされている。生

物学的試験系についても、データの優良性を確保するための配慮が必要とされ、本 GLP にはその留意事項について詳細に規定されている。

(6) 被験物質及び対象物質

被験物質及び対象物質について、受領、取扱い、サンプリング、保管に関し規定されている。また、被験物質及び対象物質の特性を含めた識別が明確になされる必要性等について規定されている。

(7) 標準操作手順書

試験施設は、その試験施設で得られるデータの優良性と完全性を確保するために、試験施設運営管理者によって承認された標準操作手順書(SOP)を文書化して作成し、試験施設の各部署または区域においては、そこで実施する試験業務に関する SOP をいつでも利用できるようにしておくべきとされている。GLP には SOP を作成すべき最小限の範囲について示されている。

(8) 試験の実施

各試験に先立って、試験計画書を作成することとされ、試験責任者の承認と信頼性保証担当者による GLP 準拠の確認がなされる必要があるとされている。GLP には試験計画書に盛り込むべき内容について、最小限の事項について示されている。

試験は、試験計画書に沿って実施することとされ、試験の実施に伴い得られるデータの記録に関することについて規定されている。

(9) 試験結果の報告

試験ごとに最終報告書を作成することとされ、データの正当性に対して責任をとることを示すために試験責任者による署名、日付の記入等が必要である旨示されている。GLP には最終報告書に記述すべき最小限の事項について示されている。

(10) 記録と試資料の保管と保存

該当する規制当局によって定められた期間に保管施設に保存すべき記録と試資料について示されている。