

## IV. ユスリカを用いた底質毒性試験法

### 1. OECDテストガイドラインの経緯

ユスリカを用いた底質毒性試験法については、新たなガイドラインの策定が1996年に開催されたOECDテストガイドラインに関するナショナルコーディネーター会合（WNT）で採択された。専門家グループの手によるドラフトガイドライン案が1998年のWNTに提出され、ここでの議論を踏まえた最初のドラフトが1999年に各国に配布されており、その後数次にわたりドラフトの改訂が行われた。日本からは国産種であるセスジユスリカ（*Chironomus yoshimatsui*）を推奨種に含める提案等を行ったほか、2002年5月のWNTでも国内での検討結果を踏まえて試験条件に関する改訂の提案を行った。これを受けてワーキングドラフトが2002年12月に各国に回覧され、さらに統計解析法等の変更された後、2003年5月のWNTで最終ドラフトが承認され、OECD内部手続きを経て2004年4月にOECD理事会で採択されている。

このガイドラインは、化学物質の暴露シナリオに応じて底質添加法（TG218）と水質添加法（TG219）が独立した試験法として策定された。底質添加法ではユスリカ幼虫を容器に入れる前に底質と被験物質を混合するのに対して、水質添加法ではユスリカ幼虫を容器に入れた1日後に被験物質を上層水に添加する方法を採用している点が異なるが、これ以外の部分では両手法は同じである。

### 2. 底質毒性試験法の概要

本試験法は化学物質の底生生物への生態影響を評価するための試験で、人工底質と上層水の入った系において、ユスリカ属の1令幼虫が羽化するまでの約2～4週間の間化学物質に暴露させ、対照区に対する相対羽化率、羽化までに要する平均時間（変態速度）または生長速度等から50%阻害濃度および無影響濃度を求めるものである。以下にOECDテストガイドラインにおける試験法の概要を示す。

#### (1) 実験生物

本試験法で使用する種はユスリカ（*Chironomus*）属に分類されるもので、生物学的によく研究されている種であればどの種を用いてもよい。*C. riparius*と*C. tentans*の2種は既に十分な試験データが存在し適当であることが確かめられ、*C. yoshimatsui*は生物学的・毒性学的研究が進められていることから、これら3種が推奨されている。試験に用いるのは原則としてふ化直後の幼虫であり、そのためには実験室で飼育されている系統を用いることが望ましい。

#### (2) 人工底質の調整

試験には原則として人工底質を使用することとされており、ガイドラインではその組成と調整法を定めている。組成は以下のとおりであり、試験容器に調整した人工底質を入れた後に、上層水を加える。

モスピート	4～5%	人工底質の最終有機炭素濃度は2% (±0.5%) 混合の前48時間は蒸留水に漬けて攪拌する。
カオリン (陶土)	20 %	カオリナイト30%以上
石英砂	75～76 %	粒径50～200 mmの重量比が50%以上
炭酸カルシウム	0.05～0.1%	適量を加えてpH 7.0±0.5に調節する。

### (3) 容器

直径8cmの(円)柱状の不活性の材質(ガラス製)、容量600 mlの容器を用いる。容器に底から15mmの厚さで底質を入れ、その4倍容積の上層水が入り、さらにその上に羽化個体のための空間が必要である。

### (4) 試験デザイン

被検物質濃度の公比、1濃度区当たりの繰り返し数及び濃度区の数設定は、表に示すように試験の目的に応じて異なる。試験のエンドポイントは羽化数や羽化率であるが、被検物質が不安定で長期の試験に耐えられないなどの場合は幼虫の生死、成長とする。

試験目的	濃度区	繰り返し	公比
ECx	6	3 以上	2 未満
LOEC/NOEC	6	4 以上	3未満
限度試験	2	6 以上	-

上の表で濃度区の数是对照区を含む数である。

なお、限度試験 (limit test) は予備試験で被検物質の毒性が低いと判断された場合に行う試験で、ある濃度で対照区と差があるか否かを確かめる試験を意味している。各試験とも、1容器当たり使用するユスリカ幼虫は20個体とし、*C. tentans* はやや個体が大きいのので個体数を減じることとしている。また、試験の目的である50%影響濃度や無影響濃度を可能な限り正確に求めることが要求されており、濃度区の数、繰り返し数及び公比の設定は、被検物質のユスリカに対する影響の概略を予備試験で確認した上で行うことが必要である。

#### (5) 疎水性被験物質の試験手順

テストガイドライン218（底質添加法）においては、被験物質の物理化学的性状で被験物質の添加方法・餌が異なる。 $\log K_{ow}$ （オクタノール／水分配係数）値が5以下の場合には上記の人工底質に混合する方法をとり、餌としては適当な魚類用餌料を毎日～2日毎に幼虫密度に合わせて加える。一方、 $\log K_{ow}$ が5を超える物質の場合は、人工底質に植物粉末を0.5%重量を人工底質調整時に加え餌とする。つまり餌を含めて被験物質を吸着させてユスリカ幼虫に暴露を行う。

### 3. 試験法の検討

平成13年度から3年間にわたり、OECDの提案するドラフトテストガイドラインの検討を行った。

#### (1) OECDドラフトテストガイドライン底質試験法の妥当性の検討

1999年に発表されたドラフトは各国からのコメントを受けて2000年および2001年2月に改訂されており、13年度はこのドラフトに基づく試験法を検討した。特に、日本から提案したセスジユスリカを用いた場合、試験妥当性クライテリアである対照区での羽化率60%を超えるかどうかを確認した。ここで行った検討結果から、

- ① セスジユスリカを使用する場合は、試験水温は25℃まで可能であること、
- ② 妥当性クライテリアである対照区での羽化率は70%とすること

が明らかとなったため、ドラフトガイドラインへの反映に向けてOECDに提案を行った。さらに14年度には

- ③ 通気量・通気管の位置と溶存酸素濃度の関係、
- ④ アンモニア濃度と餌量の関係、

について検討を行うとともに、 $\log K_{ow}$ が5より大きな物質についての試験法については別に検討を加える必要があったため、

- ⑤ イラクサに代わる植物粉末を餌としたセスジユスリカの羽化率について調べ、ホウレンソウその他の植物でも良好な結果が得られることが明らかになった。これらの結果についてもOECDドラフトガイドラインに反映されるように、試験手順に関するコメントを提出した。

#### (2) 国内リングテストの実施

平成14年度には国立環境研究所が作成した「OECDドラフトテストガイドライン218に基づく標準操作手順試案」に従い、ピレンを被験物質として国内3試験機関の参加によりリングテストを行った。いずれの試験機関も妥当性クライテリアを満足していたが、得られた毒性値は試験機関で幅のあるものであり、より厳密な試験条件の規定が必要であると判断された。

平成15年度には、前年同様に国立環境研究所が「OECDドラフトテストガイドライン218における難水溶性物質の試験手順書」を作成し、logKowが5より大きいペンタクロロフェノール（PCP）を被験物質とし、すべての試験材料を統一的に国内4試験機関に配布してリングテストを行った。

これら2回のリングテストの成果は同試験法の詳細な試験手順の検討と試験結果の評価に重要な基礎資料となった。また試験を行った試験機関においては標準操作手順の作成のための基礎資料となり、下記の底質毒性試験法の試験操作部分の記述内容に反映された。今後は同試験のGLP（優良試験所基準）査察の際の評価項目の検討に使用される。具体的には次の諸点である。

- ① 同試験の設定水温は試験および毒性値に大きく影響することなく、同試験は水温20-25℃の範囲で行われるべきである。
- ② pH調整のための塩化カルシウム添加によって上層水の硬度の極端な上昇を招く事はなく、人工底質の調整時にpH調整を行うことは有効な手段である。
- ③ カビの発生により上層水pHは低下するとともに毒性値に影響するため、試験においてはカビの発生は極力防止することが必要である。
- ④ LogKowが5以下であってもこれに近い場合は餌料を含めて汚染して行う暴露方式の方が安定した試験結果が得られ、しかも毒性は強く顕れる事があるため、LogKow値4以上にあつては、暴露方式を再検討すべきである。
- ⑤ 試験に直接用いる生物（ユスリカの卵塊）を輸送することは試験結果に影響を及ぼすおそれが否定できないので今後輸送方法を含めて検討すべきである。

#### 4. 化審法におけるユスリカを用いた底質毒性試験法

化審法においては平成16年3月25日付で第三種監視化学物質に係る有害性の調査のための試験の方法についての別添で「ユスリカの生息又は生育に及ぼす影響に関する試験の方法（底質添加によるユスリカ毒性試験）」を定めており、この試験は、「第三種監視化学物質の環境における残留の状況からみて経済産業大臣及び環境大臣が特に必要があると認める生活環境動植物の生息又は生育に及ぼす影響」を評価するために「第三種監視化学物質について既に得られているその組成、性状等に関する知見に基づいて、その第三種監視化学物質が環境中において底質に分布し残留しやすいものであつて、かつ、その第三種監視化学物質による底質の汚染により底質中の生活環境動植物の生息又は生育に係る被害を生ずるおそれがあると見込まれる場合に」実施することとされている。

ここで定めた試験法は推奨生物種を日本産のセスジユスリカとしつつもOECDテストガイドライン218に基づくものである。なお、化審法ではすでに底質汚染が明らかな場合に試験の実施を求めるため底質添加法のみを定めている。