

## 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（ $EC_{50}$ ）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（ $EC_{50}$  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<sup>1</sup>。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  $EC_{50}$  値と NOEC を求め、それぞれに係る ACR を算出した。

<sup>1</sup> 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  $EC_{50}$  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

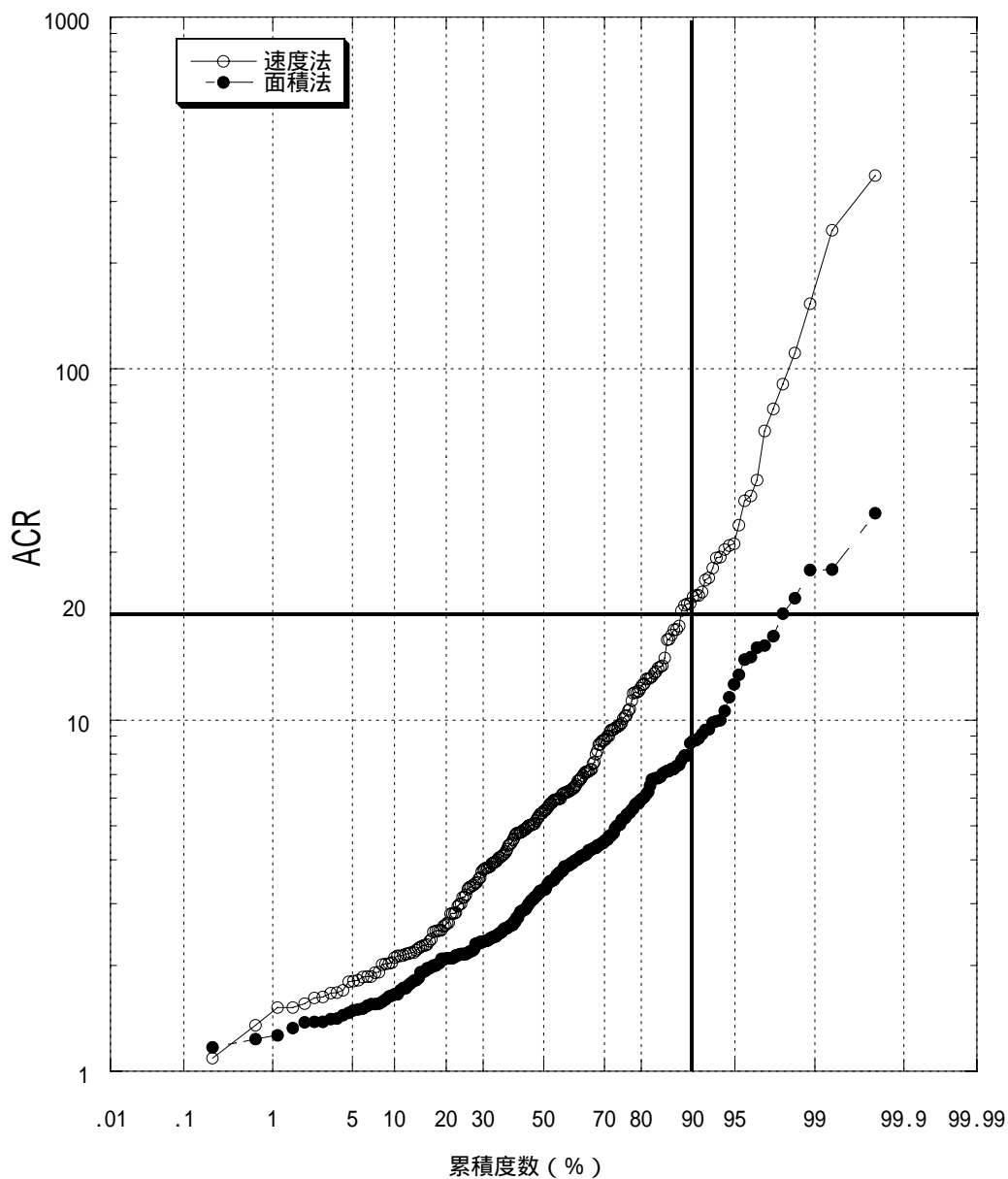


図 速度法と面積法による藻類の急性慢性毒性比（ACR）の累積度数分布

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 パーセンタイル値は約 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 パーセンタイル値は約 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（ $EC_{50}$ ）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>速度法に基づく <math>EC_{50}</math> 値</u> 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、 <u>概ね 2 mg/L 超</u> 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( $\mu$ )から毒性値を算出する方法である。傾き( $\mu$ )は式 4、各試験濃度区における生長阻害率  $I_\mu$  は式 5 から算出される。

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

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

$I_\mu$ : 速度法で求めた生長阻害率

$\mu_C$ : 対照区の生長速度;  $\mu_t$ : 各試験濃度区における生長速度

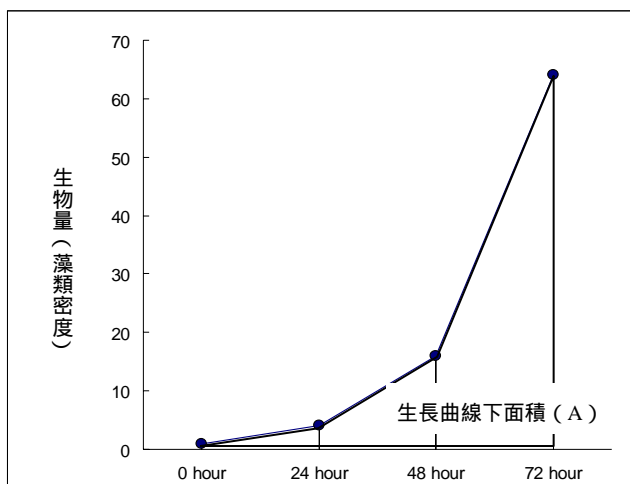


図1 生長曲線

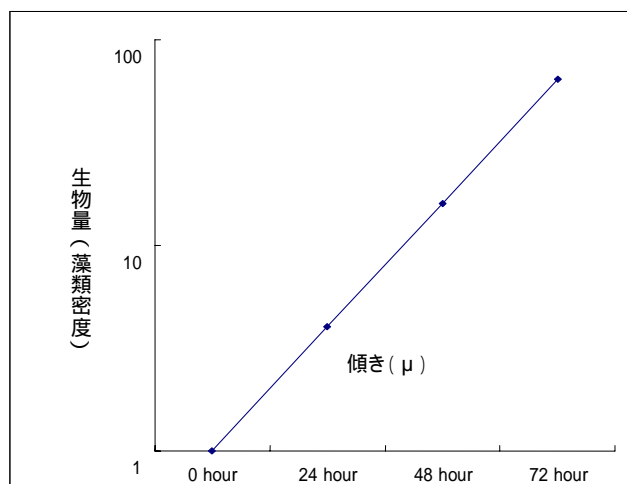


図2 生長曲線 (縦軸は対数)

## 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 $\mu$ (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。

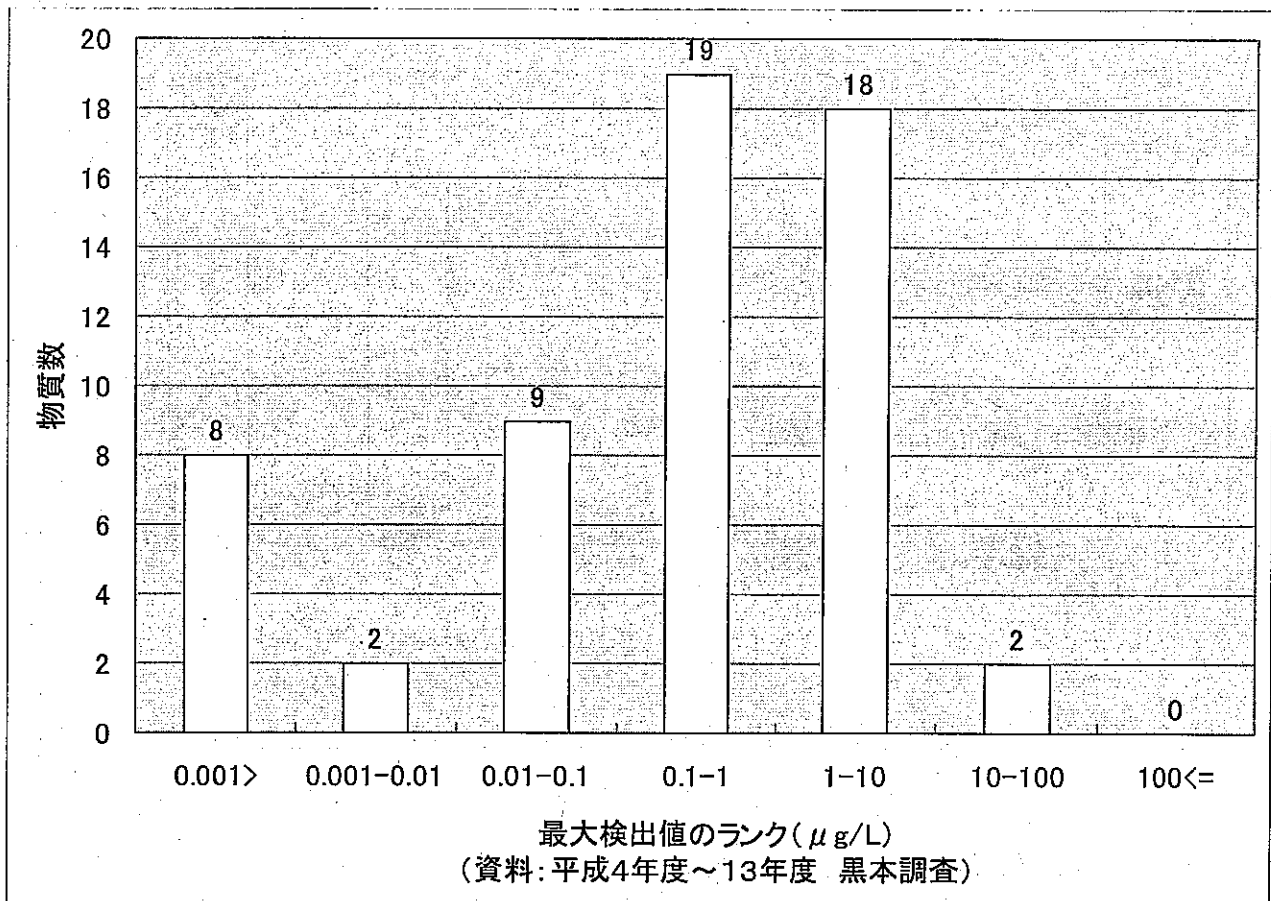


図1 化学物質環境汚染実態調査における最大検出値の頻度分布（平成4年度～13年度）

(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。

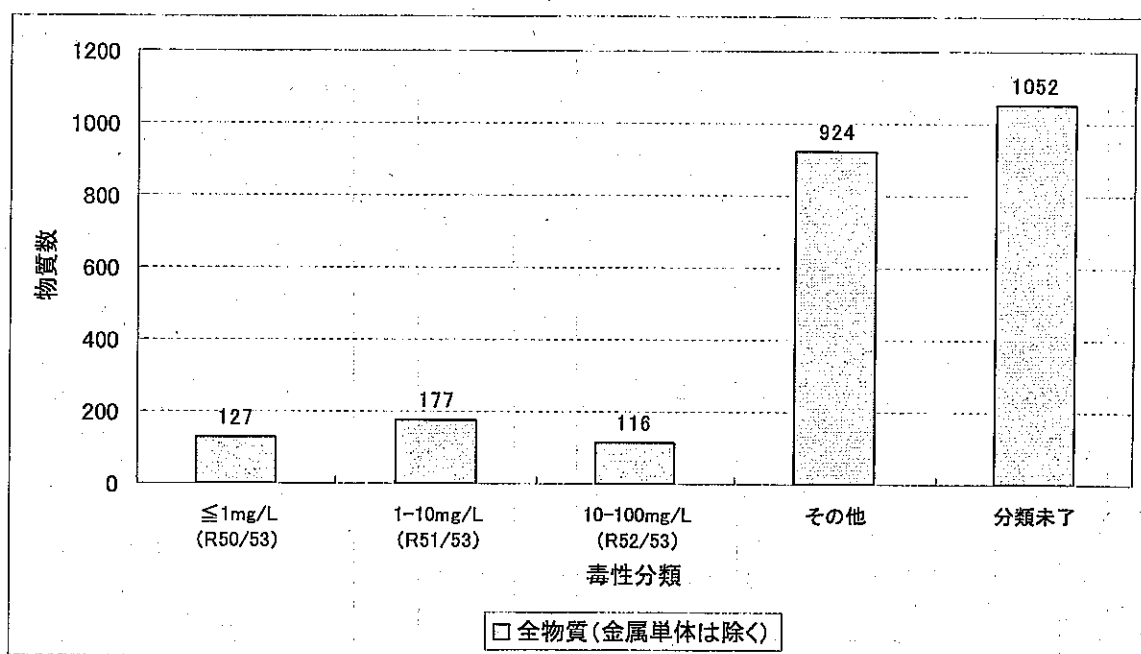


図2 EU ELINCS 第6次リストによる新規化学物質に関する水生生物への毒性値の分布

### (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）。

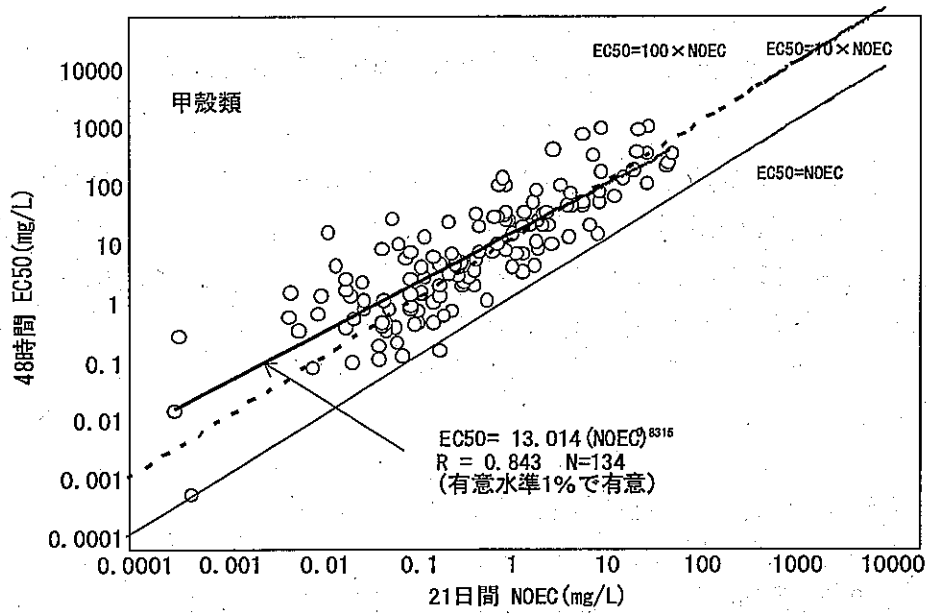


図1 甲殻類（ミジンコ）における急性毒性値と慢性毒性値の相関図  
（環境省 平成7～10年度 生態毒性試験結果より）

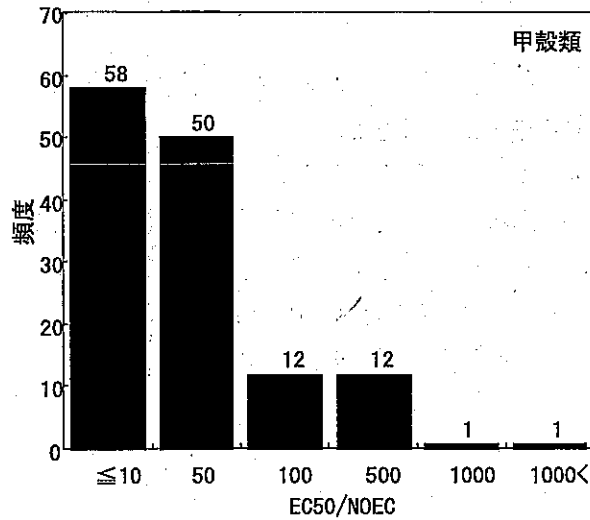


図2 甲殻類（ミジンコ）における急性慢性毒性比（ACR）の頻度分布  
（環境省 平成7～10年度 生態毒性試験結果より作成）

表1 急性慢性毒性比 ACR が 100 を超えていた物質一覧 (ミジンコ)

Cas	物質名	48 時間遊泳 阻害 (mg/L)	21 日間繁殖 阻害 (mg/L)	急性慢性 毒性比	物質分類
95-76-1	3,4-ジクロロアニリン	0.55	0.005	110	芳香族アミン類
141-43-5	モノエタノールアミン	97	0.85	114	脂肪族アミン類
96-23-1	1,3-ジクロロ-2-プロパノール	730	6.3	116	中性物質
106-49-0	p-トルイジン	1.3	0.011	118	芳香族アミン類
581-42-0	2,6-ジメチルナフタレン	2.5	0.02	125	中性物質
111-44-4	ビス(2-クロロエチル)エーテル	410	3.1	132	中性物質
86-30-6	N-ニトロソジフェニルアミン	10	0.075	133	脂肪族アミン類
11070-44-3	テトラヒドロメチル-1,3-イソ ベンゾフランジオン	130	0.94	138	中性物質
101-83-7	ジシクロヘキシルアミン	8	0.049	163	脂肪族アミン類
554-00-7	2,4-ジクロロアニリン	4.2	0.016	263	芳香族アミン類
99-88-7	4-イソプロピルアニリン	1.5	0.0051	294	芳香族アミン類
124-48-1	クロロジプロモメタン	27	0.063	429	中性物質
3380-34-5	トリクロサン	0.27	0.00034	794	フェノール類
95-53-4	o-トルイジン	16	0.013	1,231	芳香族アミン類

## 2 魚類の急性毒性と慢性毒性の比較

魚類の急性毒性と慢性毒性の比較については、田端らの報告<sup>1)</sup>では、胚から仔魚までの試験（初期生活段階試験）が慢性影響を見るのに有効な試験法であるとされており、OECD においても慢性毒性試験と位置付けられているところであることから、ここでは、魚類の急性毒性試験結果と初期生活段階試験結果とを比較した。

魚類については、環境省における魚類初期生活段階試験データが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うこととした。データは米国 EPA の水生生物毒性データベースである AQUIRE から抽出し、これら 2 種類の試験結果が収載されている 58 物質の試験結果を用いて検討を行った。

なお、本資料では、暴露時間、エンドポイント、影響内容等について、環境省の生態毒性試験や諸外国（米国、オランダ等）等での考え方等を踏まえて選定し、解析に供した。以下に、本資料で用いた急性毒性値ならびに慢性毒性値の選定基準を示した。

### [急性毒性値の選定基準]

- ① 影響の内容：魚類に対して、短期間で生存に阻害をもたらす影響を急性影響とする。
- ② 暴露期間（試験期間）：4 日間（96 時間）以内の（暴露期間を要する）試験。
- ③ 主なエンドポイントと影響内容：LC<sub>50</sub> (Median Lethal Concentration)

[慢性毒性値の選定基準]

- ① 影響の内容：胚・稚仔、発生初期の魚に対する生存・成長等に阻害を及ぼす影響を慢性影響とする。
- ② 暴露期間（試験期間）：胚から前期仔魚を含む 20 日以上の期間
- ③ 主なエンドポイントと影響内容：死亡に対する LOEC、NOEC、MATC

図 3 は対象物質において得られた魚類の急性毒性値と慢性毒性値を、生物学上同じ「属」に分類された種類で集計し、それぞれ最小値の相関図を作成したものである。図には甲殻類と同様、慢性毒性値の 1, 10, 100 倍値に該当する値の直線を参考として描画している。なお、図中のデータ数が物質数と異なっているが、これは同じ物質に関する異なる属の試験結果が含まれているためである。

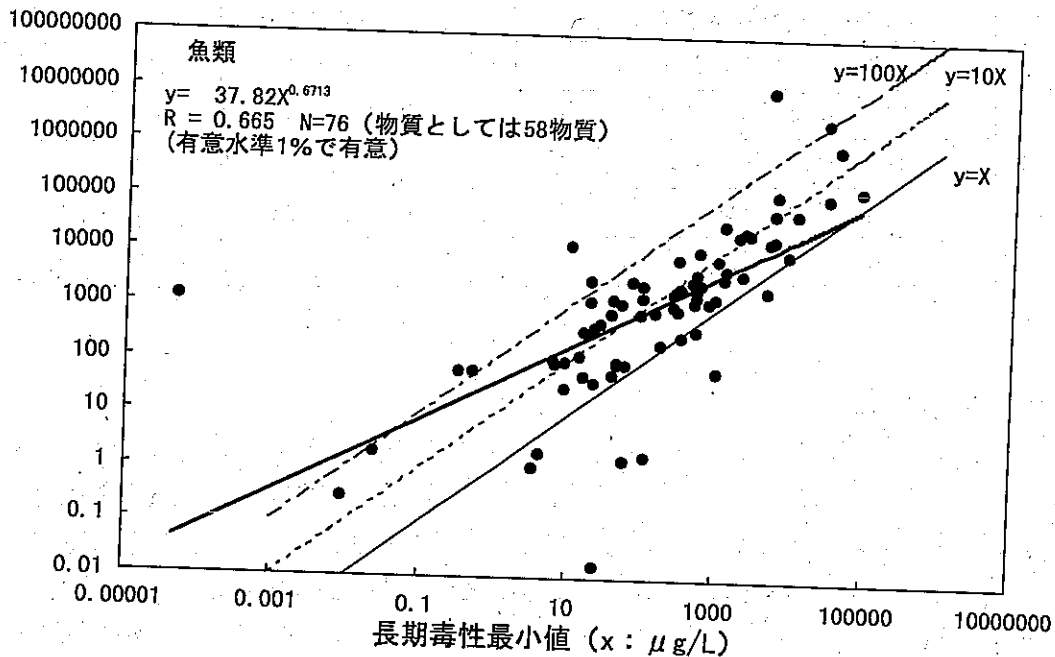


図 3 魚類（属別）における急性毒性値最小値と慢性毒性値最小値の相関図

図 3 に示すように、魚類の急性毒性値と慢性毒性値は相関係数  $r=0.665$ 、有意水準 1% で、有意な相関が得られた。また、急性毒性値と慢性毒性値の比、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 4)。なお、通常、急性毒性値は慢性毒性値に比して大きな値となるが、検討対象としたデータベースが大きく、多様なデータが存在することにより、5 物質は慢性毒性値が急性毒性値より大きくなっている。

頻度分布を見ると、ACR が 10 以下の物質は 35 物質で全体の約 60% を占めており、100 以下の物質でみると 52 物質で全体の約 90% に達する。ACR が 100 を超える物質は 6 物質 (2,4-キシレノール、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、アジンホスメチル、ジメチルホルムアミド、フェナントレン、硝酸カドミウム) であった。物質の種類と ACR が大きいことの関係については、本データのみからはわからない。

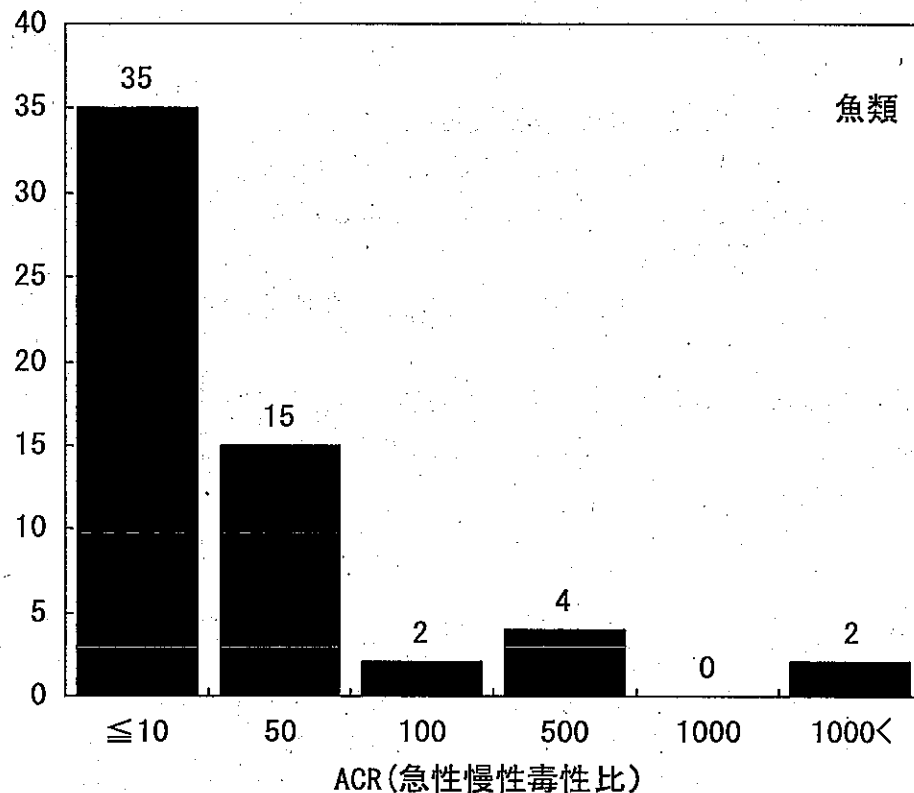


図4 魚類における急性慢性毒性比 (ACR) の頻度分布

### 3 藻類の半数生長阻害濃度 (EC<sub>50</sub>) と無影響濃度 (NOEC) の比較

藻類については、72時間の生長阻害試験で EC<sub>50</sub> と NOEC とを算出している。この試験は、期間的には短期であるが、藻類のライフサイクルを考えた場合には多世代にわたっての影響をみるものであり、急性毒性と慢性毒性の両方をみているとみなすことができる。このため、OECD では急性毒性試験と位置づけている一方で、リスク評価においてアセスメント係数を適用する場合には、EC<sub>50</sub> 値を急性毒性値として、NOEC を慢性毒性値として取り扱うことが多い。

藻類の EC<sub>50</sub> と NOEC とはこのように同じ試験から導き出されることから、相関が高いのは当然であるが、ここでは、どの程度の開きがあるかということについて主に解析することにする。

環境省では、緑藻類の *Selenastrum capricornutum* を用いて 72 時間の生長阻害試験を実施している。対象物質の濃度と藻類への影響は試験濃度区と対照区の細胞数の平均値を時間毎にプロットした生長曲線から検討するが、影響濃度の算出法としては生長曲線下の面積を算出して影響濃度を捉える手法 (面積法) と指数増殖している培養での平均的な比成長速度から求める手法 (速度法) とがあり、環境省の試験では、両手法により算出された影響濃度が報告されている。ここでは、一般的により精度がよいと評価されている面積法での結果を用いて、藻類の EC<sub>50</sub> と NOEC

を検討することとした。

藻類の検討においても甲殻類と同様に、両試験の毒性値が特定できる物質濃度が1000mg/L未満又は水溶解度を超えない145物質を対象とした。

藻類の72時間 $EC_{50}$ とNOECの相関図を対数表示で図5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、藻類の $EC_{50}$ とNOECは相関係数  $r=0.964$ 、有意水準1%で、有意な相関が得られた。

各物質の $EC_{50}$ とNOECの比（以下、 $EC_{50}/NOEC$ 比という）の頻度分布を図6に示した。

$EC_{50}/NOEC$ 比は1～10の頻度が133物質で全体の約92%を占めている。なお、10を超える物質は12物質で100以内に全てが含まれる。

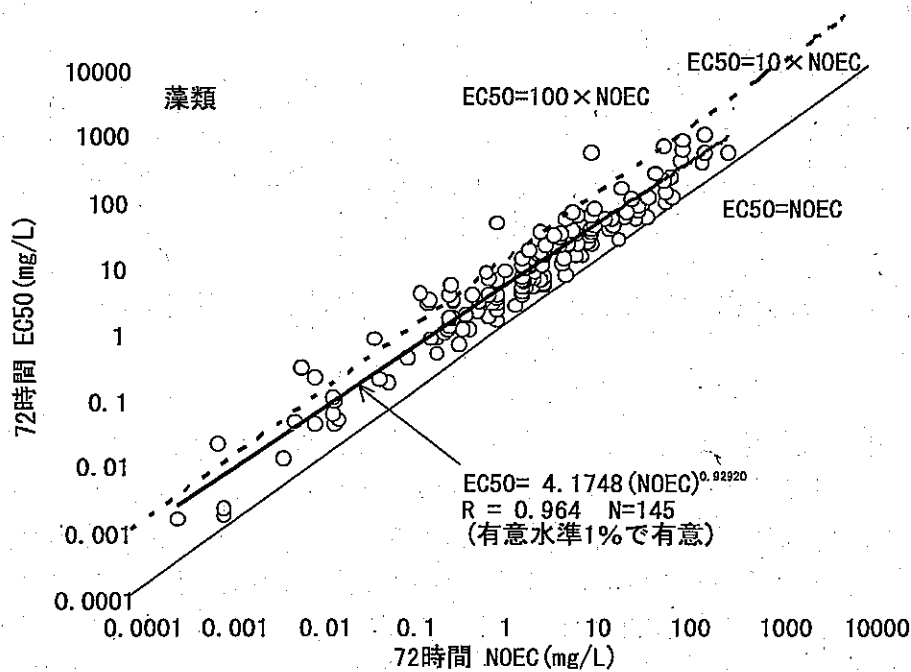


図5 藻類における72時間 $EC_{50}$ とNOECの相関図  
(環境省 平成7～10年度 生態毒性試験結果より)



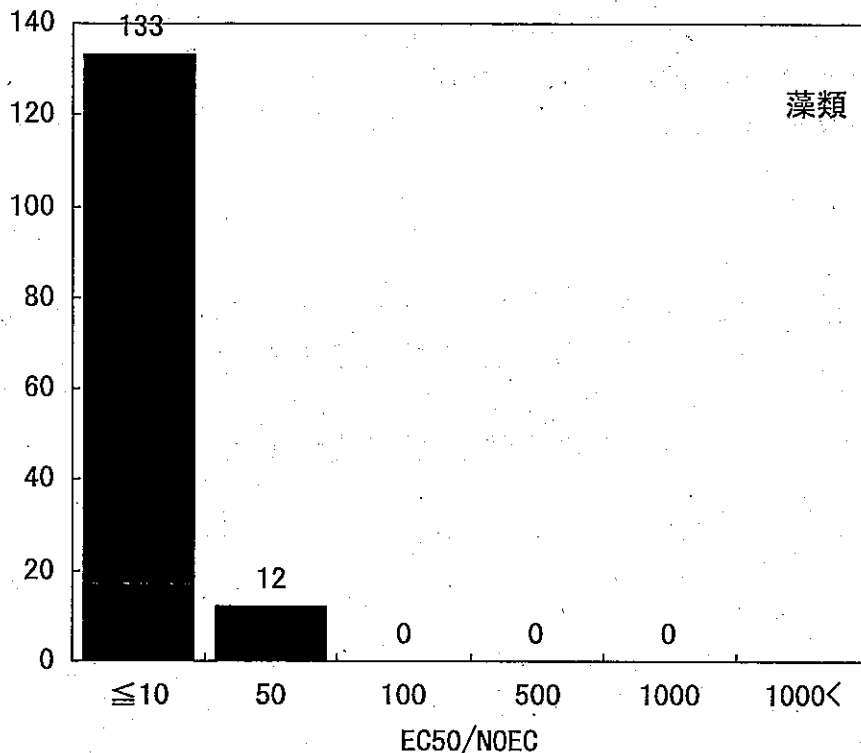


図6 藻類における EC<sub>50</sub>/NOEC 比の頻度分布  
(環境省 平成7~10年度 生態毒性試験結果より)

#### 4 既往の知見による急性毒性と慢性毒性の比較

若林 (2000)<sup>2)</sup> は、急性毒性と慢性毒性について、これまで報告されている知見をとりまとめており、それをもとに、急性毒性と慢性毒性、特にその比 (急性慢性毒性比) について整理した。

急性毒性と慢性毒性を比較した知見では、代表的なものとして、田端 (1979)、Kenega (1985)、Hegar (1995) 等が挙げられる。

田端は、水生生物に対する化学物質や金属類等の慢性毒性試験に関する内外の文献を集め、化学物質別の 48~96 時間 LC<sub>50</sub> と慢性影響限界濃度からアセスメント係数 (AF: ACR の逆数) を求め、32 の主要な物質の魚類に関する AF をほぼ 3 倍間隔で「0.1 群」から「0.001 もしくはそれ以下の群」の 5 群に分類している。

一方、Kenega は 84 の化学物質について、9 種の魚類と 2 種の甲殻類に対する急性毒性試験の LC<sub>50</sub> と慢性毒性試験 (全ライフサイクルとライフサイクルの一部) の MATC を文献から集め、生物種毎に 135 の化学物質の ACR を求めた。なお、ACR が複数ある場合は幾何平均している。その結果、ACR が 5 以下の物質が約 30%、10 以下のものが約 40%、25 以下のものが約 67%、125 以下のものが約 90%であった。

Hegar はドイツで新規化学物質、既存化学物質や農薬について、行政への申請時に出されたデータを基に、魚類とミジンコに対する ACR を求めており、新規化学物質約 50 についての ACR は魚類では 10 以下が 60%、10~100 が 20%であり、ミジンコ

では 10 以下が 44%、10~100 が 36%であり、ともに ACR は 100 以下が 80%を占めたとしている。また、既存化学物質 94 物質では、ミジンコについてのみ求められた値ではあるが、10 以下が 29%、10~100 が 53%で、100 以下で全体の 90 以上であったと報告している。

## 5 引用文献

- 1) 田端健二 (1986) 環境物質および処理排水の沿岸生態系への影響ならびに評価手法 4 化学物質、環境化学物質と沿岸生態系 水産学シリーズ 58、吉田多摩夫編、恒星社厚生閣：43-57.
- 2) 若林明子 (2000)：化学物質と生態毒性、(社) 産業環境管理協会

(案)

監視化学物質への該当性の判定等に係る試験方法及び判定基準

最終改正 平成18年\_\_月\_\_日

厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室  
経済産業省製造産業局化学物質管理課化学物質安全室  
環境省総合環境政策局環境保健部企画課化学物質審査室

化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律に基づく化学物質の審査に係る厚生労働省、経済産業省及び環境省の関係審議会を合同で開催するに当たり、第一種監視化学物質、第二種監視化学物質及び第三種監視化学物質への該当性の判定を行うために必要とされる試験の試験成績に係る現在の判定基準等について、下記のとおりとする。

下記の基準を基本としつつ、関係審議会における専門的知見に基づく意見を踏まえ、各監視化学物質への該当性の判定を行うこととする。

記

・試験方法

- (1) 新規化学物質及び既存化学物質が監視化学物質に該当するかどうかの判断は、当該新規化学物質及び既存化学物質について既に得られている知見の他、「新規化学物質に係る試験並びに第一種監視化学物質及び第二種監視化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める省令」第2条第1項から第3項まで及び第2条の2の規定による以下の試験の試験成績に基づき行うものとされている。

微生物等による化学物質の分解度試験(分解度試験)

魚介類の体内における化学物質の濃縮度試験(濃縮度試験)又は1-オクタノールと水との間の分配係数測定試験(Pow測定試験)

ほ乳類を用いる28日間の反復投与毒性試験(28日間反復投与毒性試験)又はほ乳類を用いる90日間の反復投与毒性試験(90日間反復投与毒性試験)

細菌を用いる復帰突然変異試験及びほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験又はマウスリンフォーマTK試験(変異原性試験)

(以下、及びを「スクリーニング毒性に関する試験」という。)

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(生態毒性試験)

- (2) これらの試験は、原則として「新規化学物質等に係る試験の方法について(平成15年11月21日薬食発第1121002号・平成15・11・13製局第2号・環企発第031121002号)」(以下「通知」という。)に沿って実施することとされているが、通知に定められていない試験方法(OECDテストガイドライン等)に基づく試験成績については、上記(1)の試験方法と同等の取扱いが可能である

と考えられ当該試験成績の信頼性が確保されていると認められる場合には、判定の際に用いることとしている。

・試験成績に係る判定基準

上記 ( 1 ) に掲げる試験の試験成績に基づき判定を行う場合には、原則として以下の基準によることとしている。

( 1 ) 分解度試験

良分解性

- ・ 3 つの試験容器のうち 2 つ以上で BOD による分解度が 60 % 以上であり、かつ 3 つの平均が 60 % 以上であること。
  - ：あわせて HPLC、GC 等の直接分析法により分解生成物が生成していないことが確認されること。
  - ：なお、通知で定められた試験方法による試験成績が上記の基準を満たさない場合であって、BOD 曲線等から試験終了後も引き続き生分解していることが示唆される場合 ( 上昇傾向等 ) には、OECD テストガイドライン 302 C による試験成績に基づいて判定を行うことができる。

難分解性

- ・ 良分解性でないこと。

( 2 ) 濃縮度試験又は Pow 測定試験

高濃縮性

- ・ 濃縮倍率が 5000 倍以上であること。

高濃縮性でない

以下のいずれかであること。

- ・ 濃縮倍率が 1000 倍未満であること
- ・ 1 - オクタノール / 水分配係数 ( Pow ) の対数が 3 . 5 未満であること。ただし、界面活性のある物質、分子量分布を有する混合物、有機金属化合物、純度の低い物質 ( HPLC 法を除く ) 及び無機化合物には適用しない。

濃縮倍率が 1000 倍以上、5000 倍未満の場合には、必要に応じ、以下の成績を考慮して高濃縮性かどうかを総合的に判断する。

- ・ 排泄試験
- ・ 部位別 ( 可食部 ) の濃縮倍率

なお、上記の判定に当たっては、原則として、定常状態における濃縮倍率を用いることとし、定常状態での数値が得られない場合には、総合的に判断をする。また、濃縮倍率に濃度依存性が認められる場合には、必要に応じてより低濃度区での試験を行い、その成績を踏まえ判断する。

( 3 ) スクリーニング毒性に関する試験

細菌を用いる復帰突然変異試験

a)陽性

- ・いずれかの試験系で溶媒対照の2倍を超えて復帰変異誘発コロニー数が増加し、その作用に再現性又は用量依存性が認められること。
- ・比活性値が概ね 1000rev/mg 以上である場合には、原則として、強い陽性と判断する。
- ・陽性の場合にあって、再現性や用量依存性に乏しい場合等には、原則として、軽微な陽性と判断する。

b)陰性

- ・陽性でないこと。

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験又はマウスリンフォーマ TK 試験

a) ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

[ 1 ] 陽性

- ・染色体異常を持つ細胞の出現率が陰性対照に比べ概ね 10% 以上であり、その作用に再現性又は用量依存性が認められること。
- ・ $D_{20}$  値が  $10^{-2}$ mg/ml 以下である場合には、原則として、強い陽性と判断する。
- ・陽性の場合にあって、再現性や用量依存性に乏しい場合等、又は概ね 50% あるいはそれ以上の細胞増殖阻害が起こる濃度でのみの陽性反応等は、原則として、軽微な陽性と判断する。

[ 2 ] 陰性

- ・陽性でないこと。

b) マウスリンフォーマ TK 試験

[ 1 ] 陽性

- ・いずれかの試験系で突然変異頻度が統計学的に有意な増加を示し、その作用に再現性又は用量依存性が認められること。
- ・いずれかの試験系で突然変異頻度が陰性対照の 4 倍、又は陰性対照より  $400 \times 10^{-6}$  を超えて増加している場合には、原則として、強い陽性と判断する。
- ・陽性の場合にあって、再現性や用量依存性に乏しい場合、若しくは突然変異頻度が陰性対照の 2 倍未満である場合等、又は概ね 80% あるいはそれ以上の細胞毒性が認められる濃度でのみの陽性反応等は、原則として、軽微な陽性と判断する。

[ 2 ] 陰性

- ・陽性でないこと。

28日間反復投与毒性試験（以下、OECD テストガイドライン 422 で定められた方法に準じて実施された試験を含む。）又は90日間反復投与毒性試験

a) NOEL 及び発現した毒性の程度から以下の3段階に分類する。

- [ 1 ] : ・ NOEL が概ね 25mg/kg/day 未満のもの（NOEL の推定根拠において非特異的な変化等、毒性学的に軽微な変化のみが発現した場合を除く。）
- ・ NOEL が概ね 25mg/kg/day 以上 250mg/kg/day 未満のものであって、NOEL の推定根拠又はその他の発現した毒性において、神経行動毒性や重篤な病理組織学的な変化等、毒性学的に重要な変化（回復期の影

響については、b) A又はBに該当するものとする。)が発現したものの。

[ 2 ] : NOEL が概ね 250mg/kg/day 未満のもの ( [ 1 ] に該当するものを除く。 )

[ 3 ] : NOEL が概ね 250mg/kg/day 以上のもの。

なお、90日間反復投与毒性試験においては、28日間反復投与毒性試験に比べて投与期間が長いこと等を考慮しつつ、判断することとする。

b) 回復試験中に見られる影響の程度から以下の3段階に分類する。なお、分類に当たっては、可逆性の程度、回復期における毒性の残存状況、遅発毒性の有無、組織学的変化に起因する生化学的な変化かどうか等を考慮する。

A : 回復試験期間内に回復しない病理組織学的な変化を生じさせるもの、又は遅発毒性を生じさせるもの

B : 回復試験期間内に回復しない生化学的な変化を生じさせるもの

C : 回復試験の期間において回復する、又は回復途上であることが示される可逆的变化

#### ( 4 ) 生態毒性試験

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3段階に分類する。(藻類生長阻害試験に基づく毒性値は、原則として速度法により算出したものを用いる。以下同じ。)

[ 1 ] : 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以下のもの。

[ 2 ] : 3種の試験結果から得られるL(E)C50値のいずれかが概ね1mg/l超、10mg/l以下のもの。( [ 1 ] に該当する場合を除く。 )

[ 3 ] : 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超のもの。

#### ( 5 ) 第一種監視化学物質の判定

既存化学物質について、( 1 ) が難分解性であり、( 2 ) が高濃縮性であると判断された場合であって、人及び高次捕食動物への長期毒性を有することがいずれも明らかでない場合には第一種監視化学物質として判定する。

#### ( 6 ) 第二種監視化学物質の判定

( 1 ) が難分解性であり、( 2 ) が高濃縮性ではないと判断された場合であって、( 3 ) の結果、次のいずれかに該当する場合には第二種監視化学物質として判定する。

28日間反復投与毒性試験又は90日間反復投与毒性試験(以下「反復投与毒性試験等」という。)において強い毒性が示唆されるもの

( ( 3 ) [ 1 ] に該当する場合 )

変異原性試験において強い陽性が示唆されるもの

( ( 3 ) 又は が強い陽性の場合 )

反復投与毒性試験等において中程度の毒性を示すとともに、変異原性試験で強い陽性ではないものの陽性であるもの

( ( 3 ) [ 2 ] に分類され、かつ、( 3 ) 又は が陽性(但し、軽微な陽性

である場合を除く。)の場合)

ただし、通知に規定する慢性毒性試験、生殖能及び後世代に及ぼす影響に関する試験、催奇形性試験、変異原性試験(小核試験等)、がん原性試験、生体内運命に関する試験、薬理学的試験又はこれらと試験の目的が合致している試験において、死亡、がん、長期にわたる障害、生殖能又は後世代の発生に及ぼす影響その他これらに準じて毒性学的に重要な影響が認められた知見がある場合には、必要に応じ、これらの試験成績を考慮して第二種監視化学物質に該当するか判定する。

#### (7) 第三種監視化学物質の判定

(1) が難分解性であり、第一種特定化学物質ではないと判断された場合、以下の[1][2]のいずれかにより第三種監視化学物質に該当する場合には、第三種監視化学物質として判定する。

[1] (4)の結果から以下のように判定する。

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以下である場合((4)[1]に該当する場合)には、第三種監視化学物質として判定する。

3種の試験結果から得られるL(E)C50値のいずれかが概ね1mg/l超、10mg/l以下である場合((4)[2]に該当する場合)には、以下のとおり判断する。なお、下記a)~c)に複数該当する場合であって、第三種監視化学物質に該当するかの判定が分かれた場合においては、第三種監視化学物質として判定する。

a) 魚類急性毒性試験の結果が該当する場合には、第三種監視化学物質として判定する。

b) ミジンコ急性遊泳障害試験の結果が該当する場合には、物質の化学構造等を考慮して個別に判断する。

c) 藻類生長障害試験の結果が該当する場合には、以下のように判定する原則として第三種監視化学物質とは判定しない。

( ) EC50の値が1mg/l超、2mg/l以下である場合には、第三種監視化学物質として判定する。

( ) EC50の値が2mg/l超、10mg/l以下である場合には、第三種監視化学物質として判定しない。

3種の試験結果から得られるL(E)C50値の最小値が概ね10mg/l超である場合((4)[3]に該当する場合)には、第三種監視化学物質とは判定しない。

[2] 「第三種監視化学物質に係る有害性調査のための試験の方法について(平成16年3月25日平成16・3・19製局第6号・環企発第040325004号)」に定める藻類生長障害試験、ミジンコ繁殖試験又は魚類初期生活段階毒性試験の試験結果において、少なくとも、NOECが0.1mg/l以下となる場合には第三種監視化学物質として判定する。また、これらの試験以外の水生生物に対する慢性毒性を示唆する試験結果が得られた場合には、個別に判断する。

なお、上記に基づき判定が困難な物質については、類似の物質の評価及び判定の例を参考にしつつ、安全側に立脚した観点から判定する。

・高分子フロースキームに基づく判定

高分子フロースキームに基づき判定を行う場合には、原則として以下の基準によることとしている。

(1) 以下の安定性試験の結果及び溶解性試験の結果に係る基準を満たす場合には、難分解性であり、かつ、高濃縮性ではないと判定する。

安定性試験

・重量変化の基準

：試験前後で変化がないこと（2%以下の変化は変化とは見なさない）。

・DOC 変化の基準

：試験前後で変化がないこと（5ppm 以下の変化は変化とは見なさない）。

・I R スペクトルの基準

：試験前後で変化がないこと。

・分子量変化の基準

：試験前後で変化がないこと。

溶解性試験

a) 以下の9種類の溶媒のいずれにも溶けない場合であって、特定の構造特性（架橋構造、高結晶性等）を有するか、又は酸・アルカリに不溶であること。

水、n-ヘキサン、n-ブタン、トルエン、1,2-ジクロロエタン、イソプロピルアルコール、テトラヒドロフラン(THF)、メチルイソブチルケトン(MIBK)、ジメチルホルムアミド(DMF)

b) 上記 a) 以外の場合は、分子量 1000 未満の成分含有量が 1 % 以下であること。

なお、上記 及び の基準を満たさない場合には、分解性試験、濃縮度試験、スクリーニング毒性に関する試験、生態毒性試験の試験成績に基づき判定を行う。

(2) ・(1) 及び の基準を満たす場合には、以下のとおり判定を行う。

a) 重金属を含まず、化学構造と長期毒性との関連性に関する知見等から判断して人への長期毒性を有することが示唆されない場合には、第二種監視化学物質に該当しないと判定する。

b) a) 以外の場合には、スクリーニング毒性に関する試験の試験成績に基づき第二種監視化学物質への該当性の判定を行う。

c) 以下のいずれかの場合には、第三種監視化学物質に該当しないと判定する。

( ) 重金属を含まず、水、酸及びアルカリに対する溶解性が確認されない場合であって、次のいずれかに該当する場合

・水への自己分散性\*が確認されない場合

・水への自己分散性が確認された場合であって、カチオン性を示さない場合

\* 分散剤を含まない条件下で分散する性状を有するもの

( ) 重金属を含まず、水、酸及びアルカリに対する溶解性が確認された場合にカチオン性を示さないものであって、化学構造と動植物への毒性との関連性に関する知見等から判断して、動植物の生息又は生育に支障を及ぼすおそれを有する



下線部分が挿入部分、取消線部分が削除部分を示す。

と示唆されない場合

d)c) 以外の場合には、生態毒性試験の試験成績に基づき第三種監視化学物質への該当性の判定を行う。

「監視化学物質（指定化学物質）への該当性の判定等に係る試験方法及び判定基準」の改正履歴

制定：平成15年4月18日

改正：平成16年4月30日（指定化学物質から監視化学物質への名称変更、生態毒性試験の追加、第一種監視化学物質及び第三種監視化学物質の判定基準の追加）

改正：平成16年6月18日（Pow測定試験における判定基準を3.0未満から3.5未満に変更及びPow測定試験における除外規定を追加）

改正：平成17年1月14日（高分子フロースキームに基づく第三種監視化学物質判定基準において水への自己分散性が確認された場合の基準を追加及びPow測定試験にHPLC法を採用したことに伴う変更を追記）

改正：平成17年6月24日（マウスリンフォーマTK試験、90日間反復投与毒性試験及び慢性毒性試験等の記載を追加）

改正：平成17年9月30日（第三種監視化学物質において3種生物における生態毒性試験の判定基準及び水生生物に対する慢性毒性における判定基準等の記載を追記）

改正：平成18年 月 日（第三種監視化学物質判定基準中の藻類生長阻害試験に関し、毒性値の計算に原則として速度法を用いることを追記及び判定基準を変更）