

# 第一回生態影響試験チャレンジテストの結果

## Part1;排水の生物応答試験

国立研究開発法人国立環境研究所  
環境リスク・健康研究センター  
生態毒性標準拠点

○鑑迫典久、阿部良子

# 謝辞

年度末のお忙しいところ、タイトなスケジュールの中で、しかも無償でチャレンジテストに参加して頂いた皆様に心から感謝の意を表します。

スライドのご提供をお願いした先生方につきましては、皆さま快くご提供くださり、心からお礼を申し上げます。

## 参加研究機関の皆様

(株)愛研 石神様,  
いであ(株) 澤井様,  
(株)イワキ 水越様、是枝様  
(株)エスコ 吉田様

エヌエス環境(株) 齋藤様,  
(株)LSIメディアエンス 山口様

**一般財団法人化学物質評価研究機構** 吉川様

(株)環境総合リサーチ 水野様,  
(株)神鋼環境ソリューション 藤原様  
(株)日曹分析センター 今村様

浜松ホトニクス(株) 勝又様,  
(株)日吉 松田様, 瑞輝科学生物(株) 小柳様,  
他匿名1社

国研開) 水産研究・教育機構 瀬戸内海区水産研究所 隠塚様,

国研開) 農業・食品産業技術総合研究機構 農業環境変動研究センター 永井様,

国研開) 国環研 環境リスク・健康C 曝露影響計測研究室 中島様,

国研開) 国環研 環境リスク・健康C リスク評価科学事業連携オフィス 生態毒性標準拠点員皆様

国研開) 国環研 環境リスク・健康C 生態毒性研究室 渡部様、山本様

公) 食品農医薬品安全性評価センター 大石様,

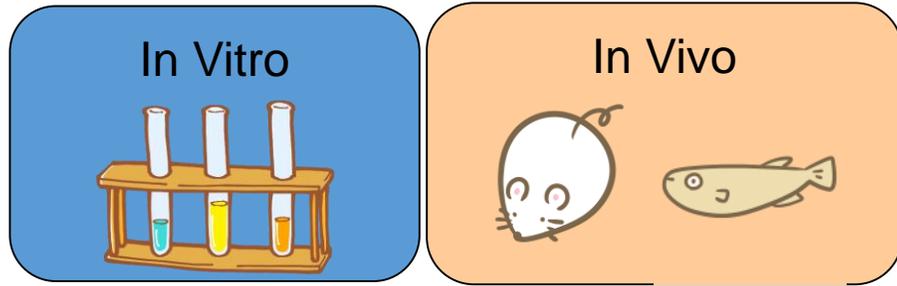
岡山大学大学院 田村様, 鹿児島大学 宇野様, 北九州大学 門上様, 富山県立大学 楠井様

**福岡県保健環境研究所** 古関様, 和歌山県環境衛生研究センター 梶本様,

名古屋市環境科学調査センター 長谷川様

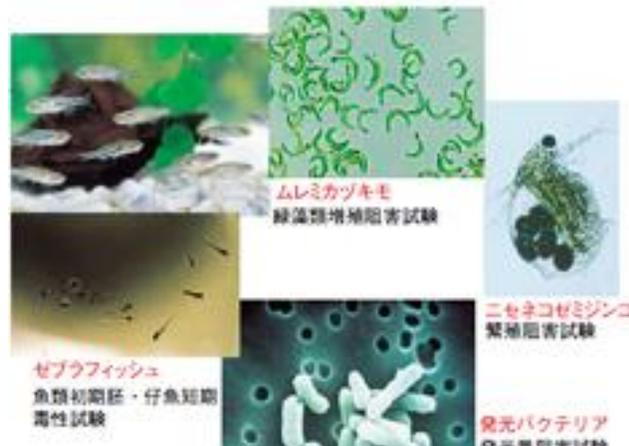
# ▶ 背景と目的

生態影響試験  
化学物質の影響を評価する



事業場排水の総合的なリスク評価・管理を行うため生態影響試験が諸外国で導入・活用

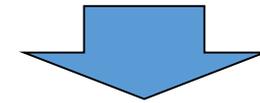
日本の環境省でもその活用を検討中



チャレンジテスト;

・“生物応答を用いた排水管理手法“に用いられている試験のバリデーション

・上記WET手法以外で、化学物質群の複合的な影響を検出・評価する生態影響試験として国内でどのような手法が使われており、何が有効か？



模擬排水を使ったリングテスト

ラボ間の比較 (Part1)  
試験法の比較 (Part2)

# ▶ 試験スケジュールと参加機関

参加者募集

• 平成29年2月6日～2月28日  
15時まで

参加者確定

• 3月上旬

試験排水

• 3月中旬

調製と配布

試験実施

• 排水到着から5月8日までの適  
当な時期

試験結果

• 5月8日必着

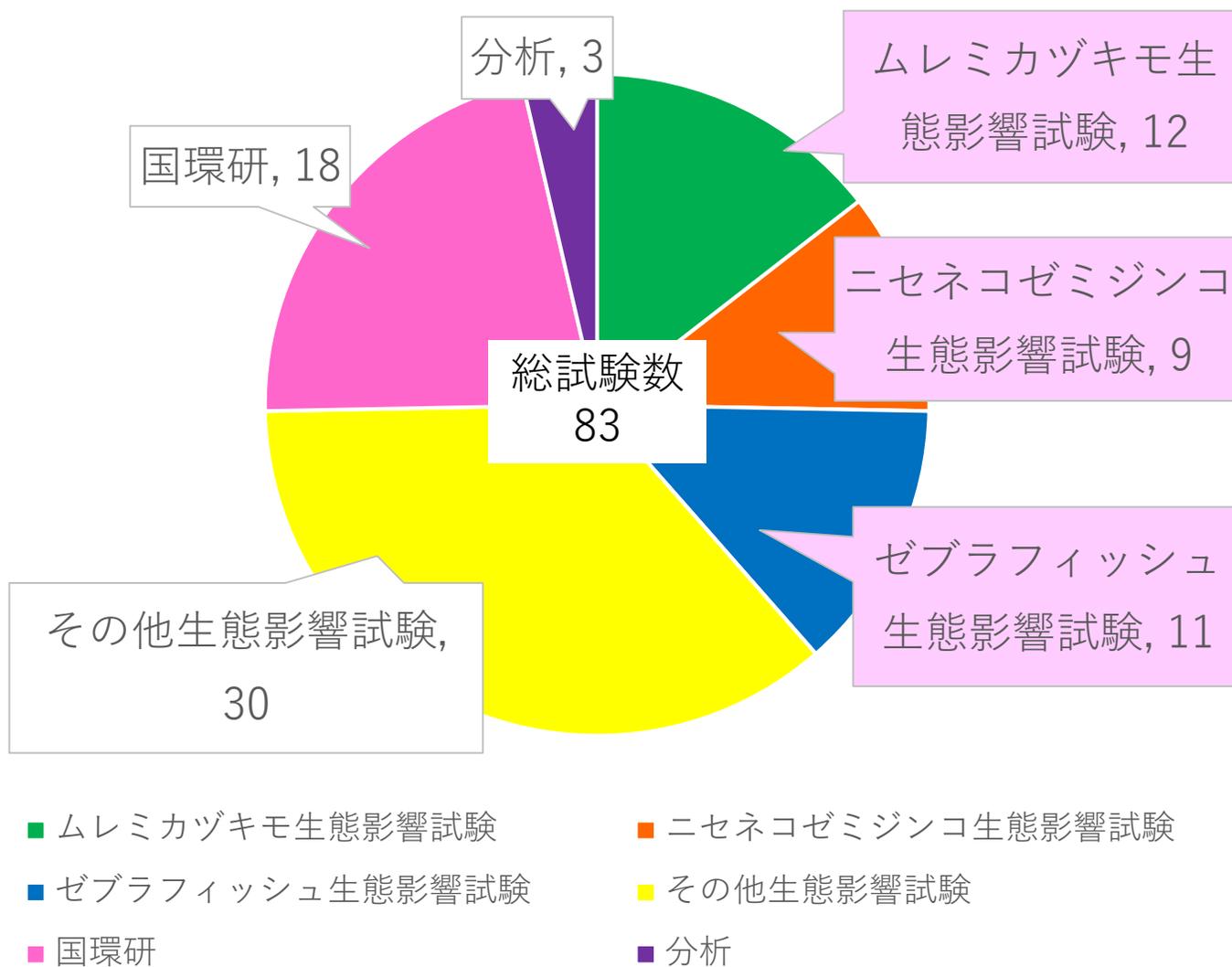
データ送付

試験結果

• 第26回環境化学討論会

発表

民間企業 (GLP)	公的機関・大学 (国環研含む)	地環研	総参加機関
14(4)	10	3	27



## ▶ 模擬排水の調製

- 実際の数種類の事業場から排水を提供していただき、適当な比率で混合した。
- 荒いフィルターで濾過後、4°Cでしばらく保存し(1か月程度)、毒性を安定化させた。
- 試薬を添加し、さらに毒性を調節 (Part2で明らかにする) した。その後 NIESで予備試験を行なった。
- 各ラボに必要な量を梱包・送付し、試験を依頼
- NIESで並行して本試験を行い、各ラボと比較可能なデータを得た。NIESの予備試験と本試験でほぼ差がなく、安定であることを確認した。

母体は実排水の混合。ほぼ排水基準を満たしている。添加薬剤有。シーズニングさせており、比較的安定な毒性を示す。

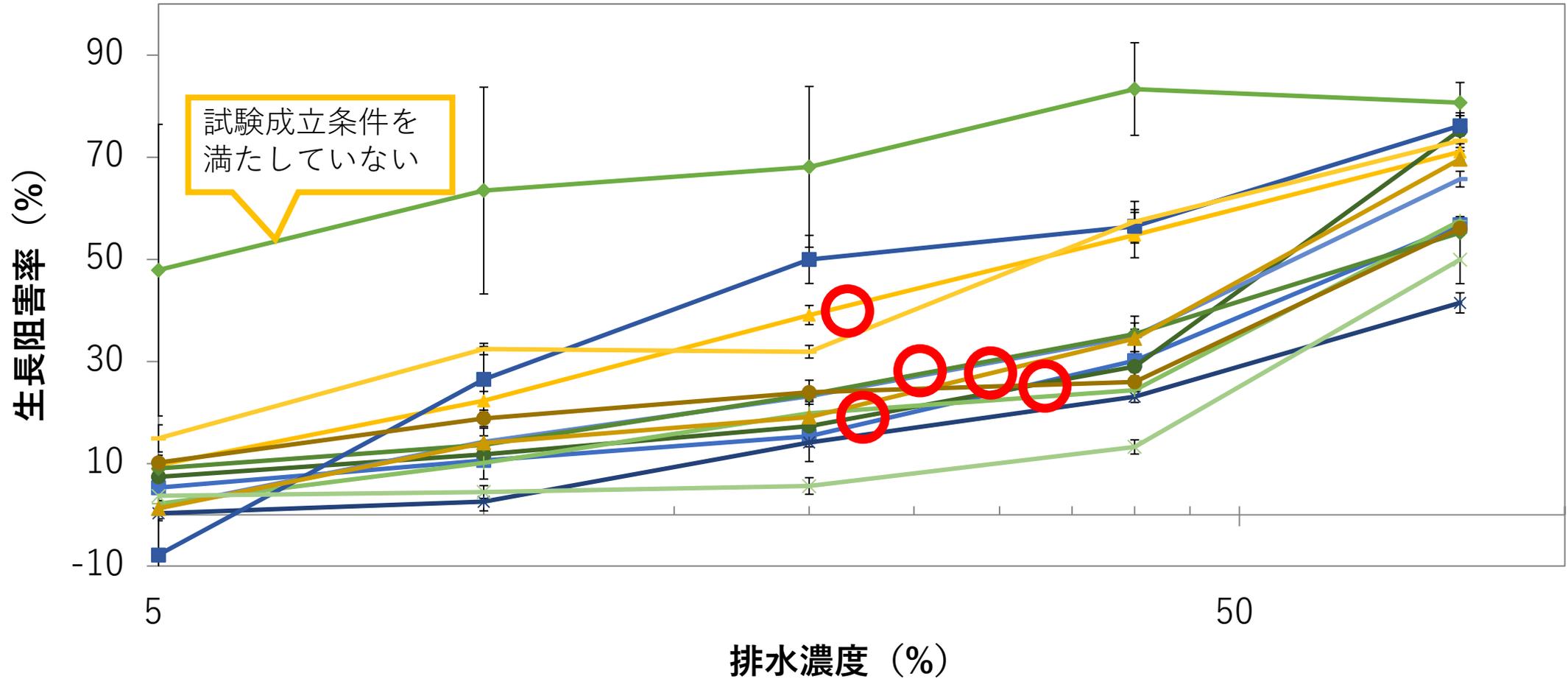
# ▶ 生物応答を用いた排水管理に使われる3種の試験の条件

試験条件	OECD TG201	Environment Canada EPS1/RM/21	OECD TG212
供試生物	ムレミカヅキモ ( <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> )	ニセネコゼミジンコ ( <i>Ceriodaphnia dubia</i> )	ゼブラフィッシュ ( <i>Danio rerio</i> )
ばく露方式	止水式, 連続振とう100 rpm	半止水式	半止水式
試験期間	72時間	最大8日間	ふ化日+5日間 (8日間)
水温 (°C)	23 ± 2°C	25 ± 1°C	26 ± 1°C
光条件	60-120 μmol/m <sup>2</sup> /s 白色蛍光, 連続光	室内光レベル, 白色蛍光, 16時間明: 8時間暗	室内光レベル, 白色蛍光, 16時間明: 8時間暗
試験用水 (対照区)	OECD藻類培地	活性炭ろ過水道水	活性炭ろ過水道水
試験容器	300 mL容ガラス製三角フラスコ	50 mL容ガラス製カップ	80 mL容ガラス製カップ
試料量/容器	100 mL	15 mL	50 mL
生物数/容器	5000 cells/mL	1個体	15個体 (最低10個体)
繰り返し	6連 (対照区) 3連 (濃度区)	10連	4連
濃度区	5濃度区 (排水濃度80, 40%, 20%, 10%, 5%, 2.5%)	7濃度区 (排水濃度80%, 40%, 20%, 10%, 5%)	7濃度区 (排水濃度80%, 40%, 20%, 10%, 5%, 2.5%, 1.25%)
供試生物の齢	2-4日前培養した 指数増殖期の細胞	生後24時間以内の幼体	受精後4時間以内の受精卵
給餌	なし	毎日1頭あたりクロレラ溶液0.05mL, YCT 0.05mL	なし
換水	なし	隔日	隔日
エンドポイント	生長速度	産仔数, 供試個体の死亡率	ふ化率, ふ化後生存率, 生存指標

# 藻類増殖阻害試験の結果

13ラボ参加、うち4 GLPラボ

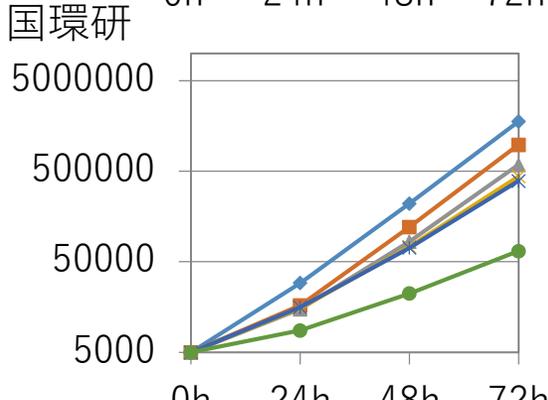
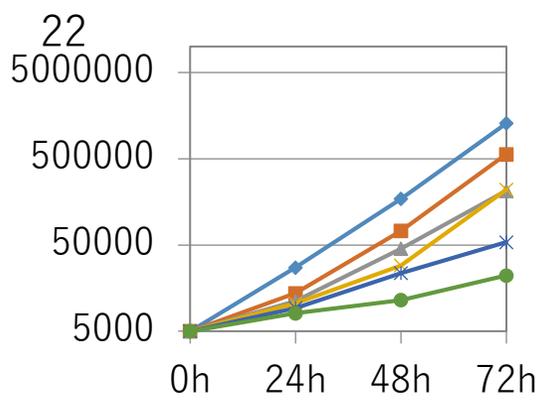
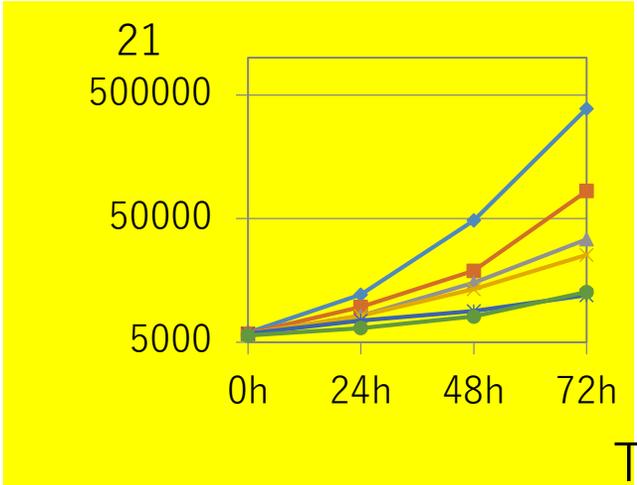
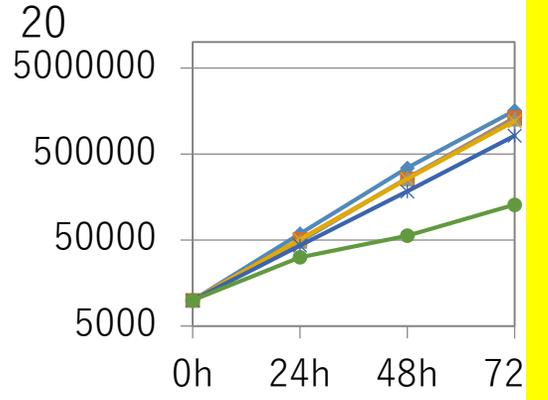
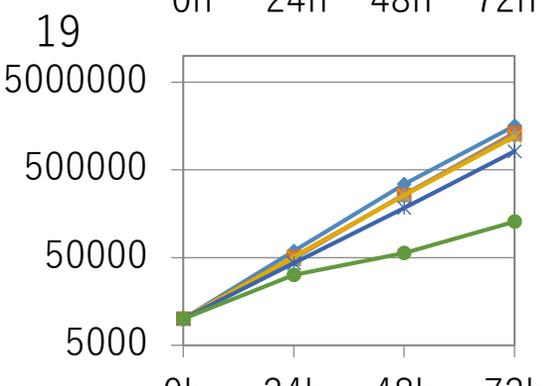
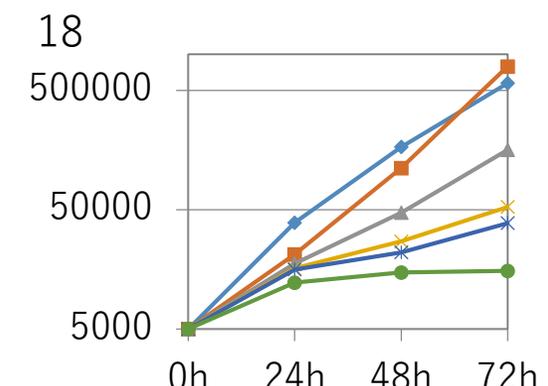
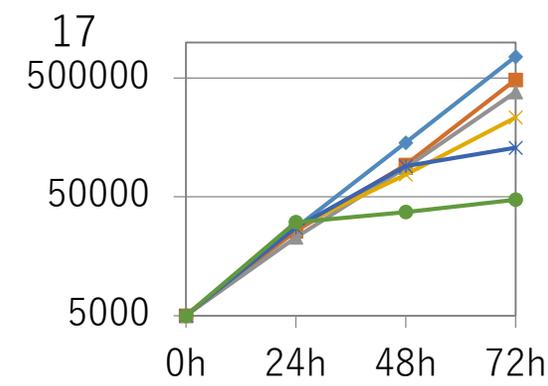
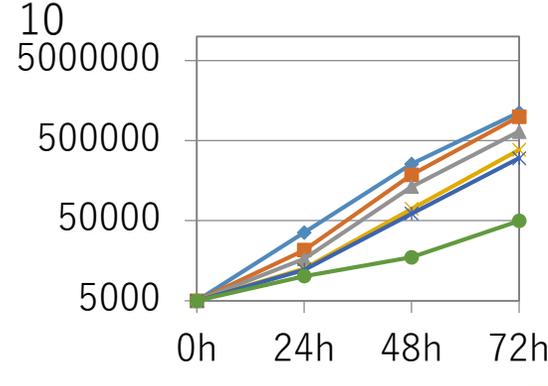
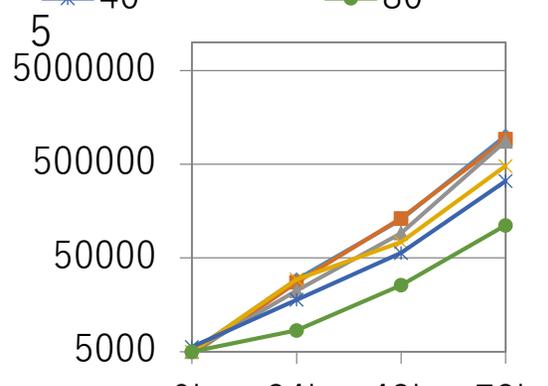
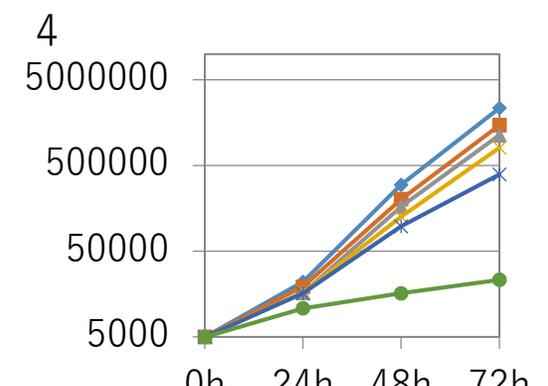
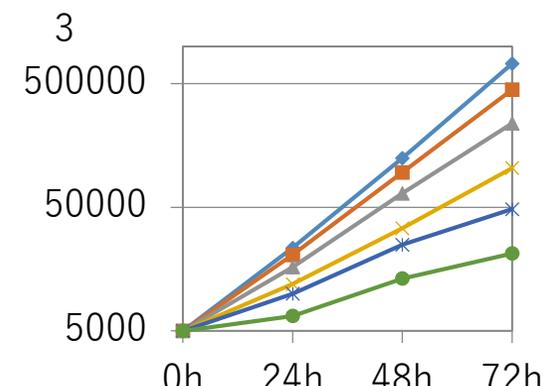
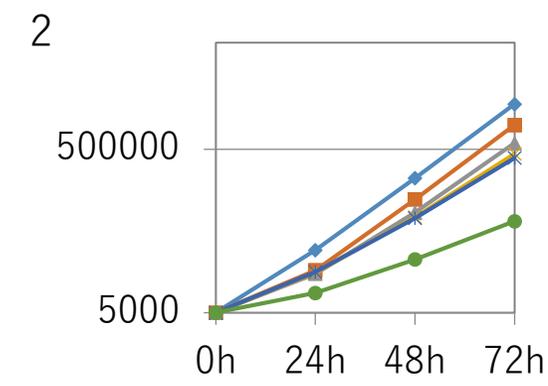
■ 2   ▲ 3   ● 4   \* 5   — 6   + 10   ◆ 17   ■ 18   ▲ 19   × 20   ◆ 21   — 22   ● 27



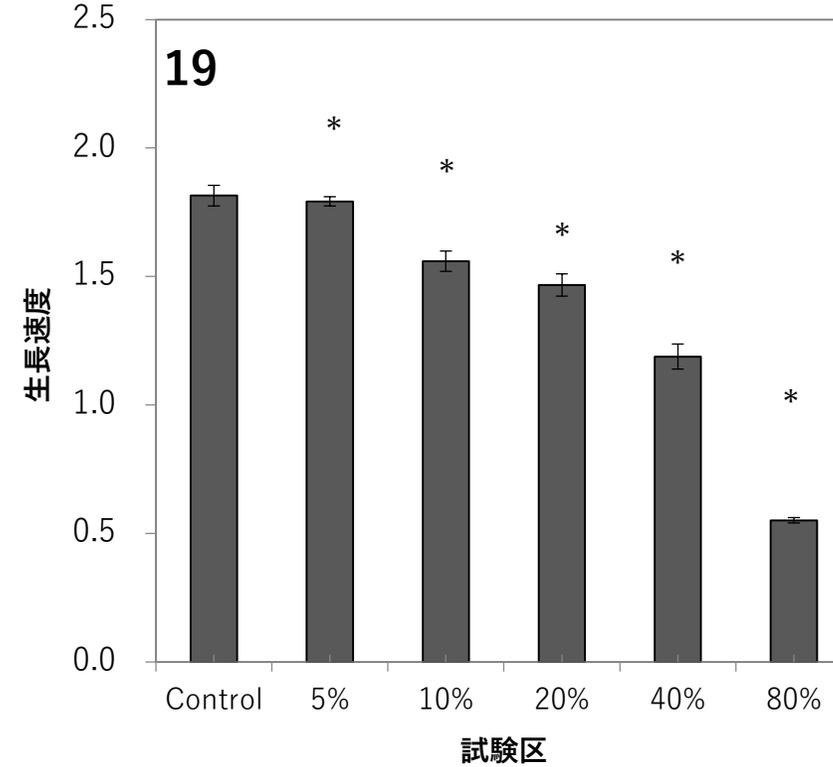
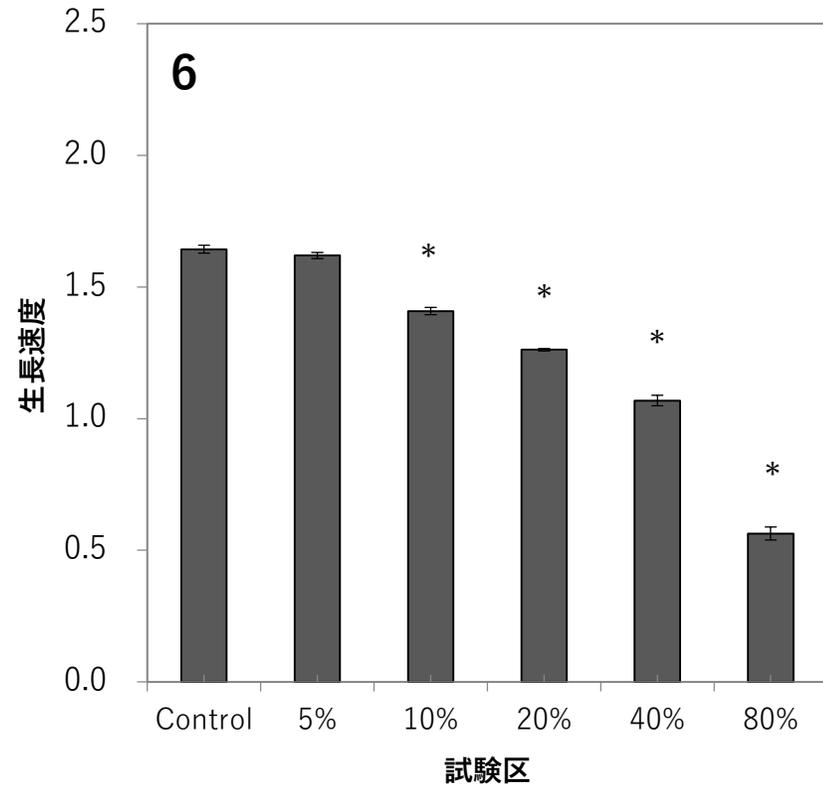
試験成立条件

- 対照区における区間成長速度の区間平均CVが<35%
- 増殖倍率が>16倍
- 平均成長速度のCVが<7%

# 細胞濃度グラフ



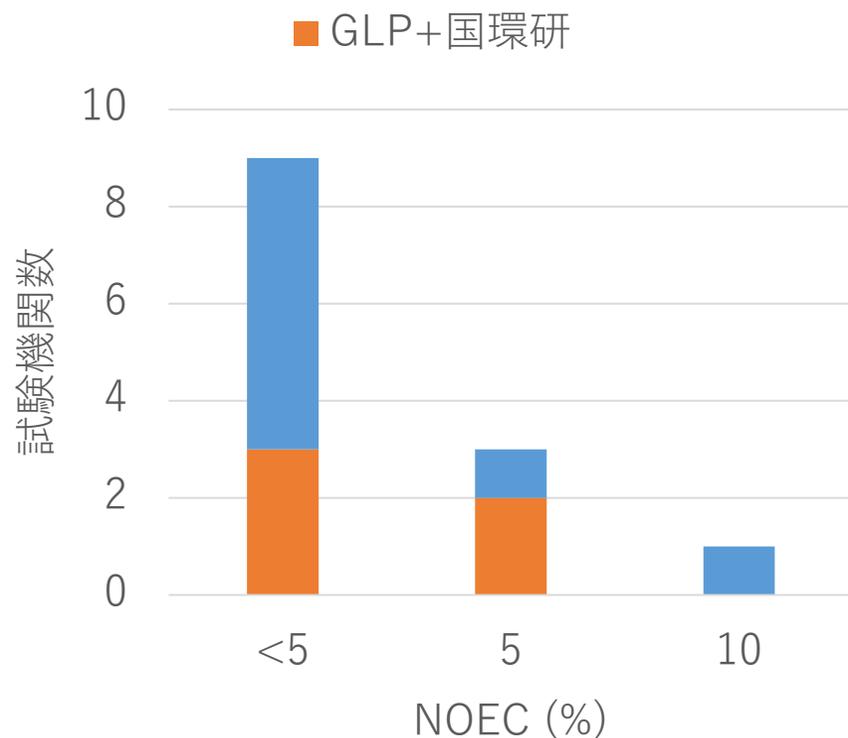
Time(h)



上記2つのラボのNOECは2倍違うが、EC10、EC50はほぼ同じ。

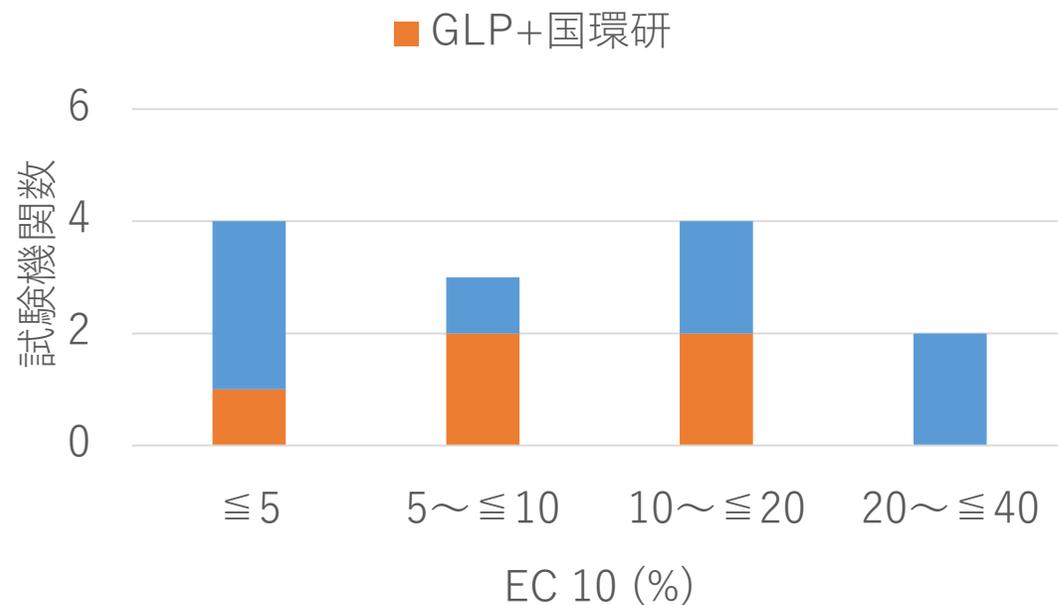
ラボの評価をNOECのCVなどで機械的に比較するのは間違いではないか。

# 藻類(ムレミカツキモ)繁殖阻害試験 OECD TG201



EC10が20%を超えていたラボは2つあった。

半数以上のラボで排水濃度5%で有意差が付いた。排水濃度10% (10倍希釈) で生物影響の無い排水を目標とした場合、本模擬排水は、1ラボ以外は全て影響ありと検出できていた。

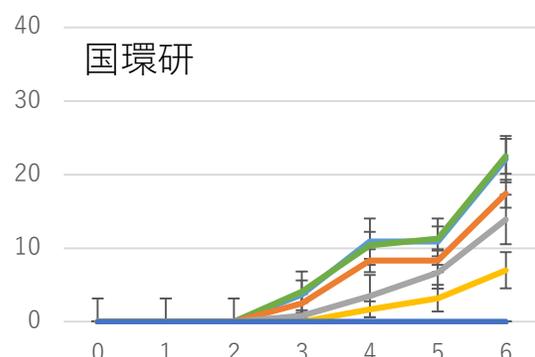
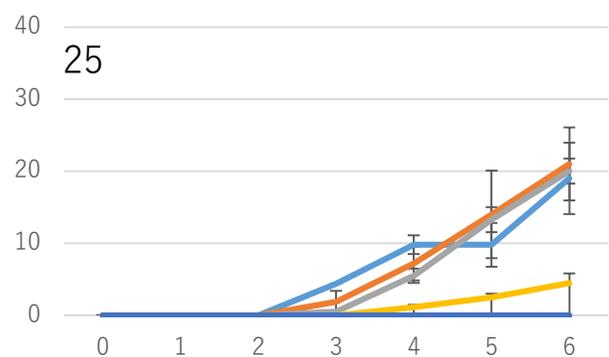
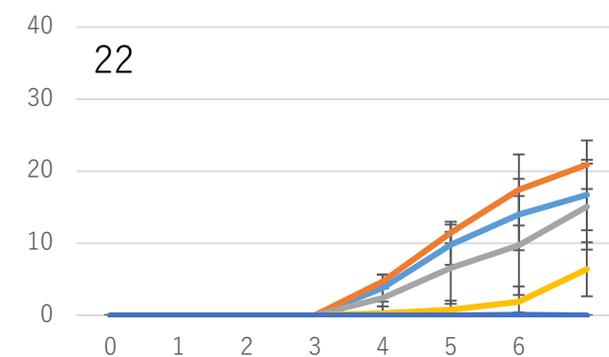
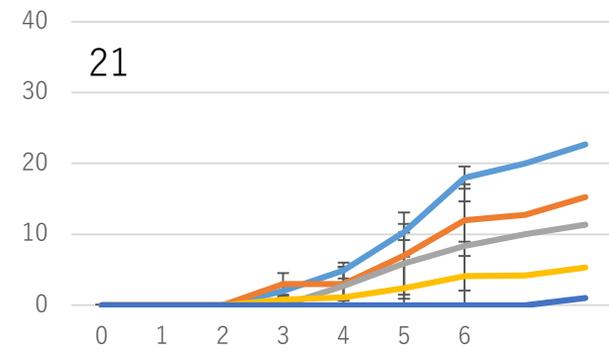
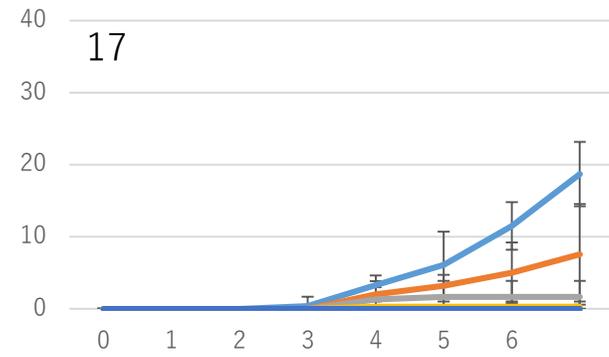
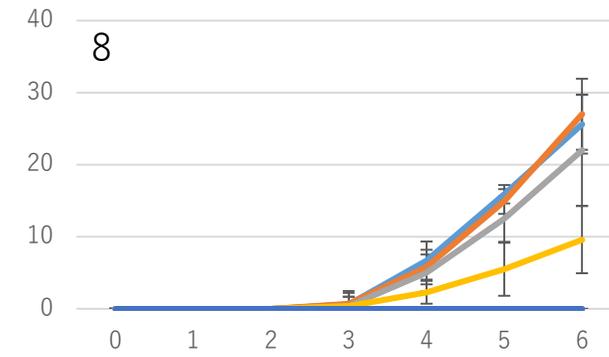
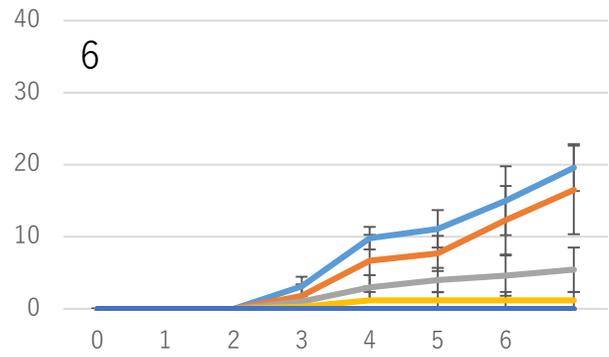
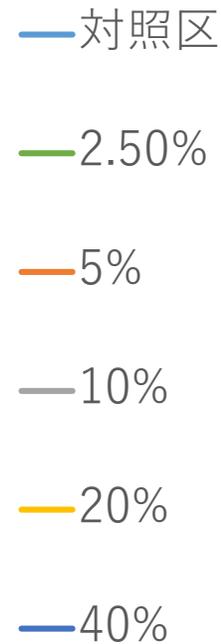
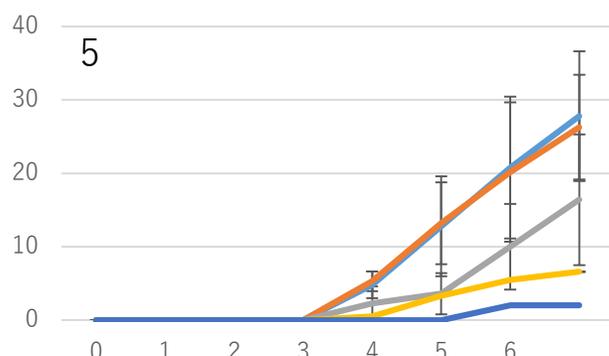
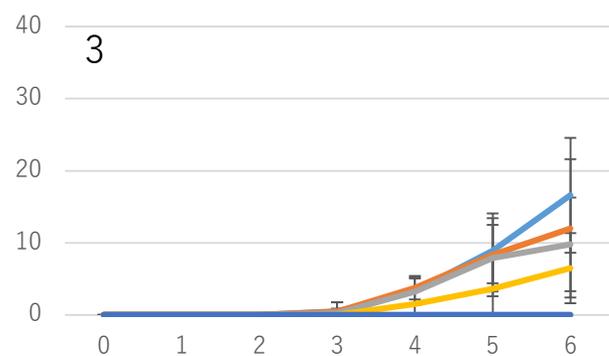
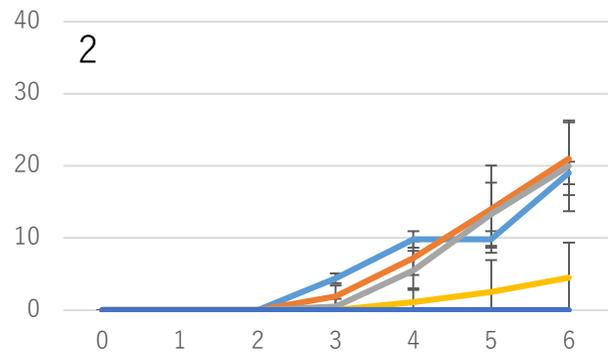


# ニセネコゼミジンコ繁殖阻害試験の結果

10ラボ参加、うち3GLPラボ

# 結果：日数毎の産仔数

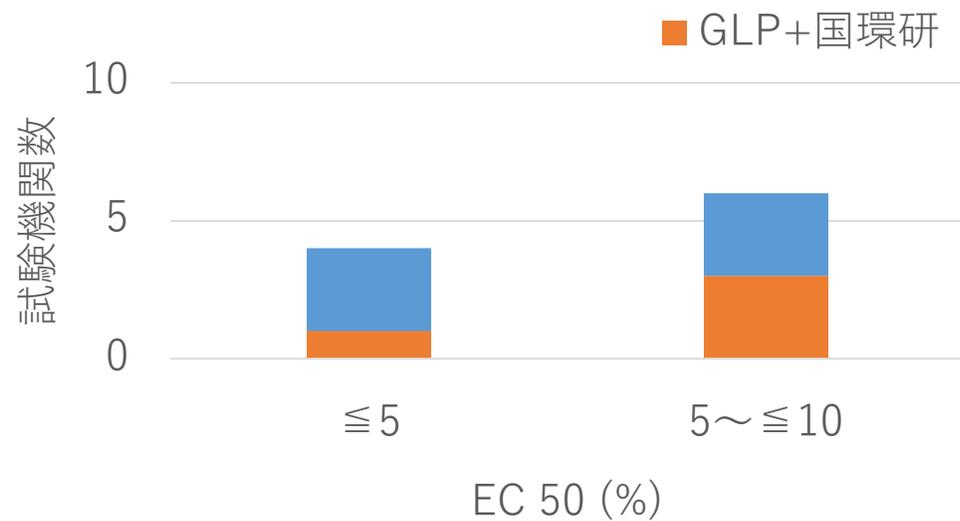
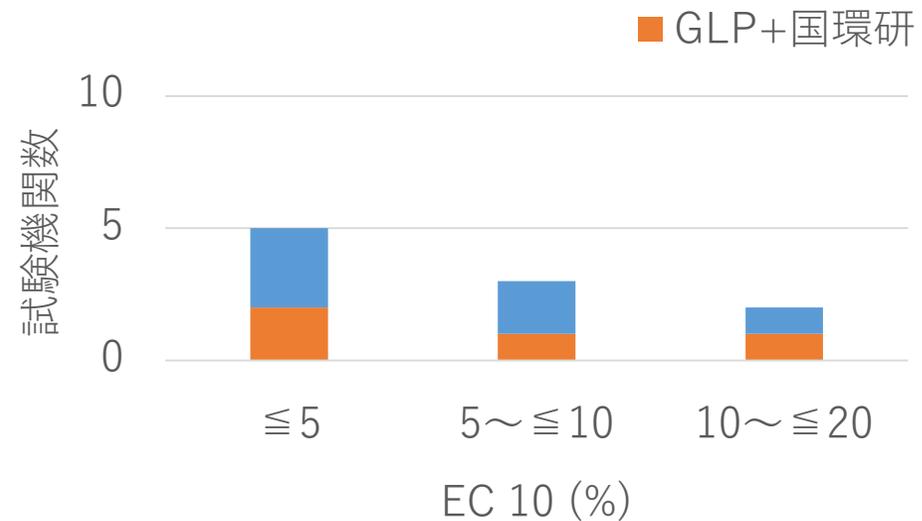
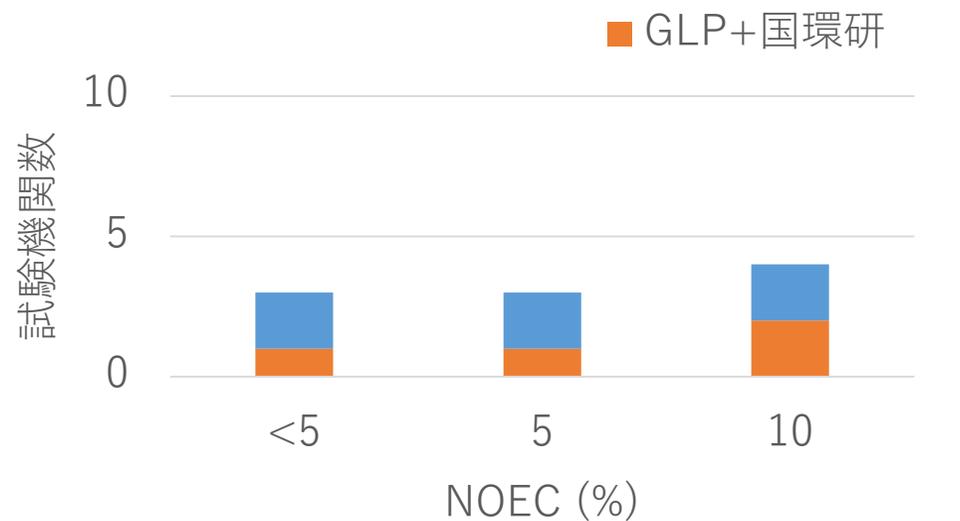
総産仔数



日数



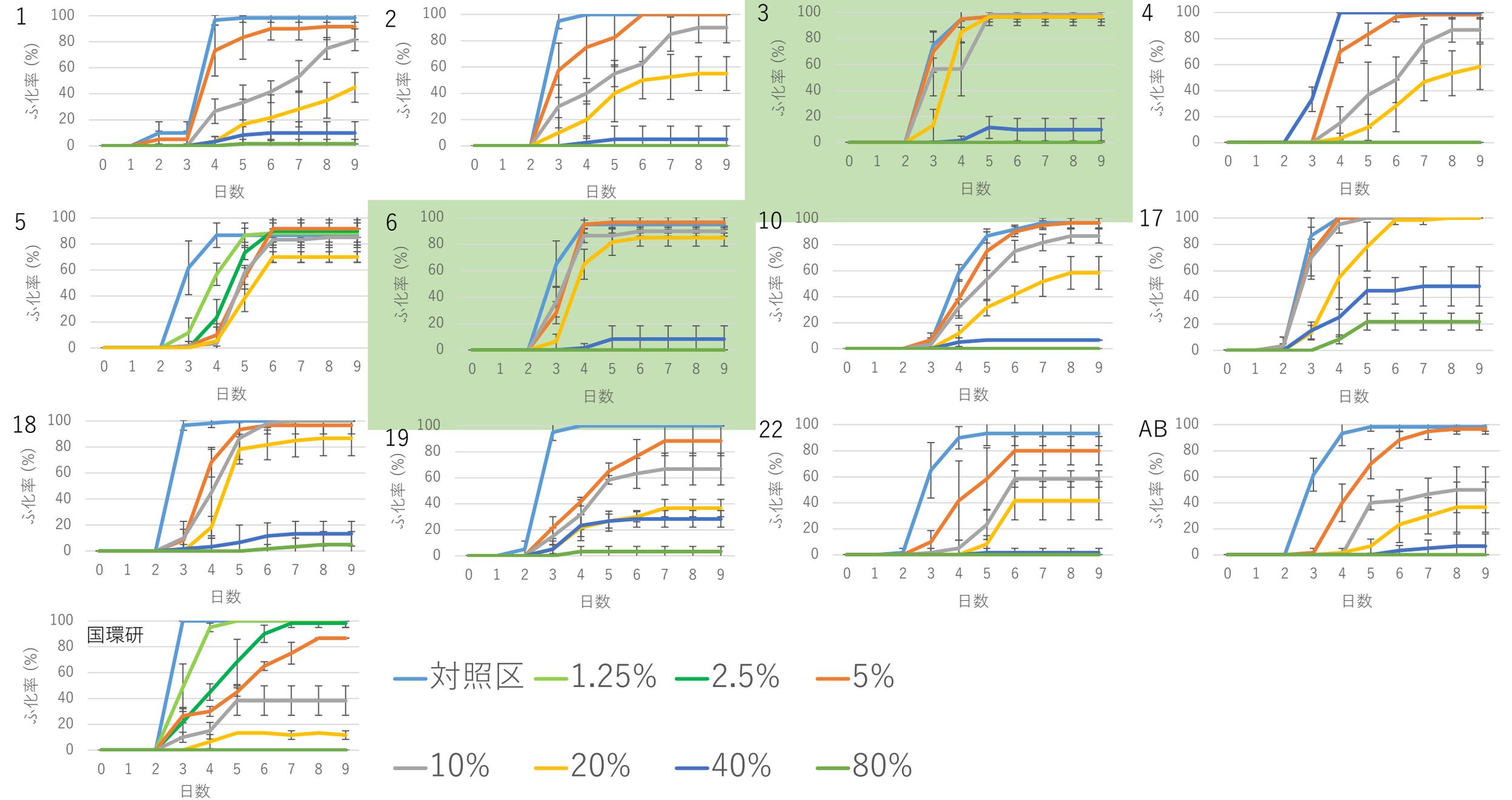
# ミジンコ繁殖阻害試験の試験機関の分布



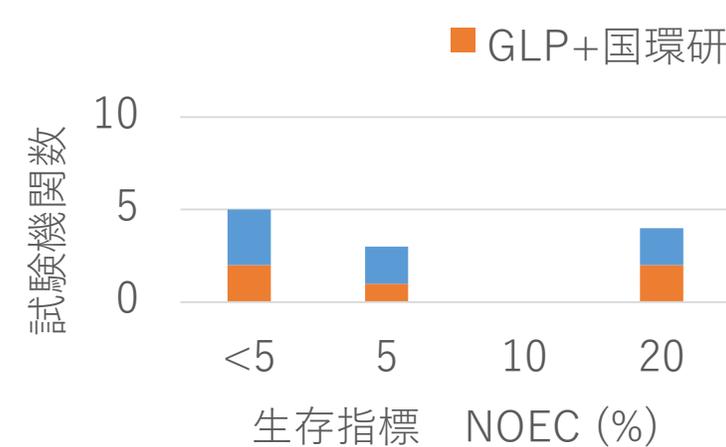
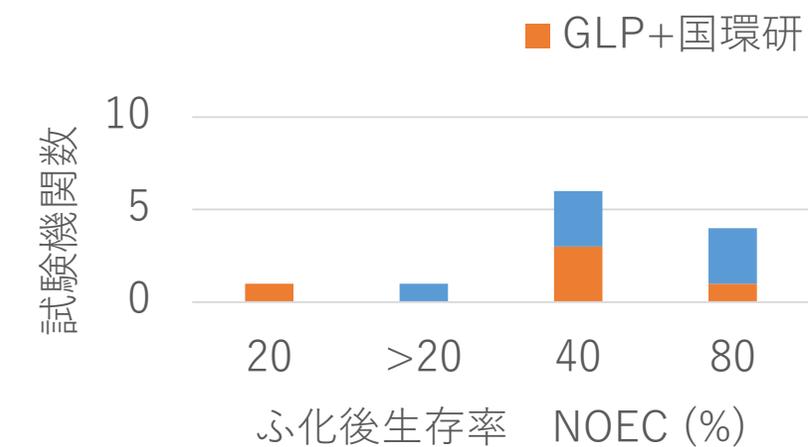
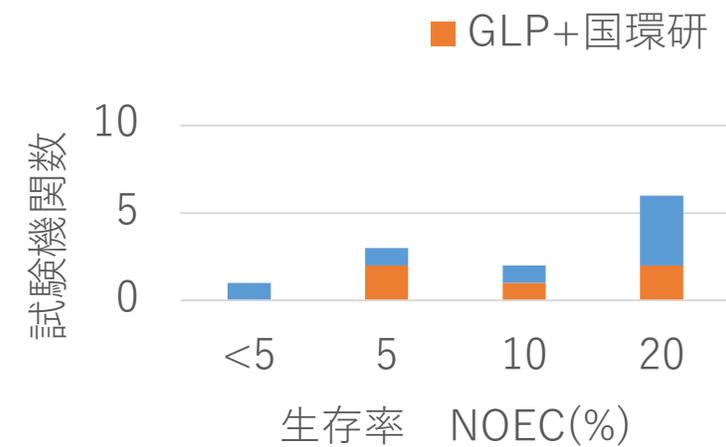
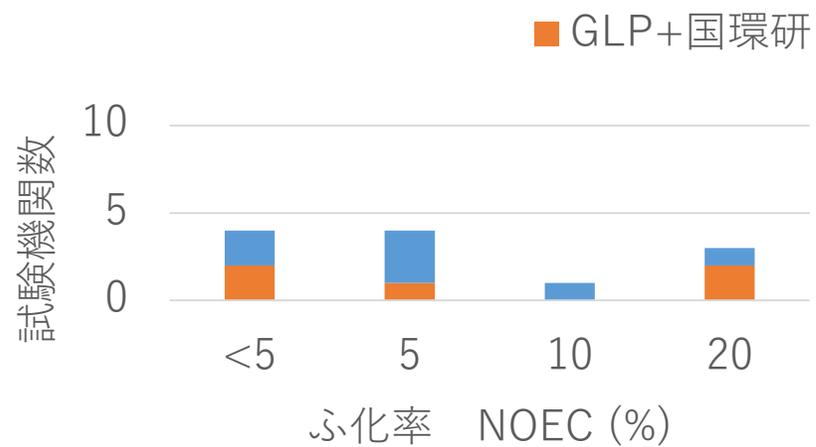
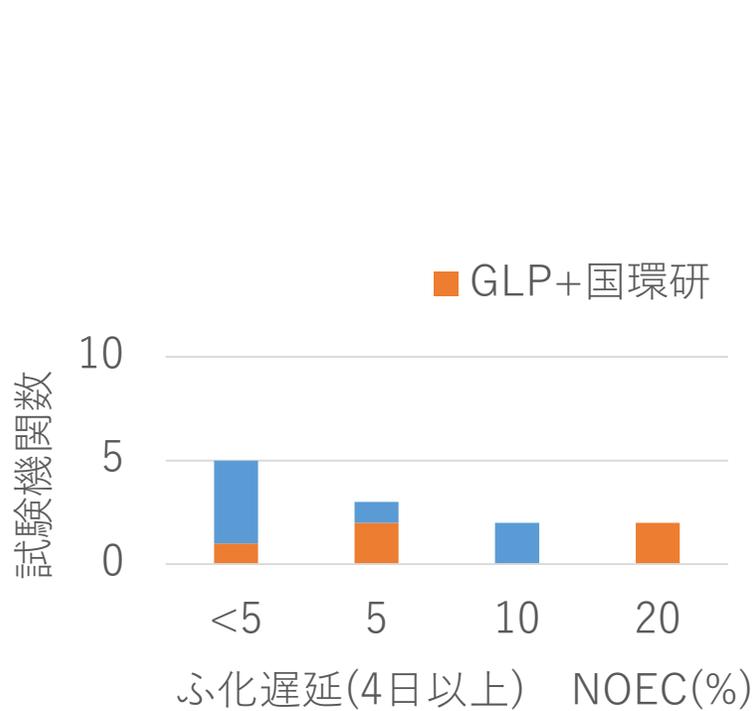
# 魚類(ゼブラフィッシュ) 胚仔魚毒性試験

12ラボ参加、うち4GIPラボ

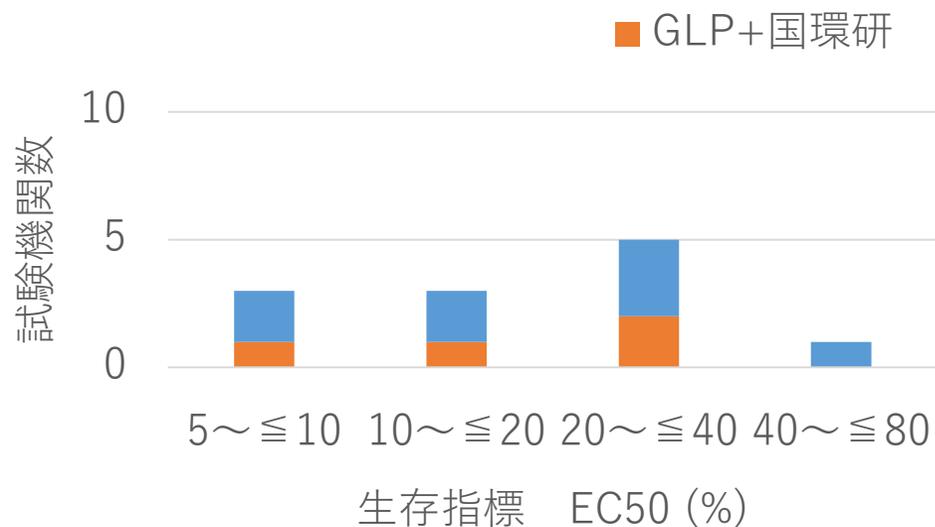
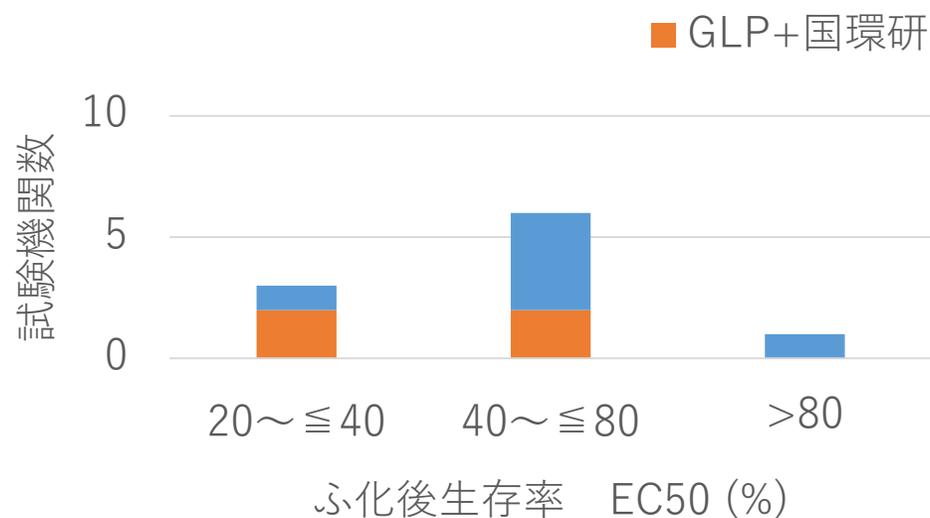
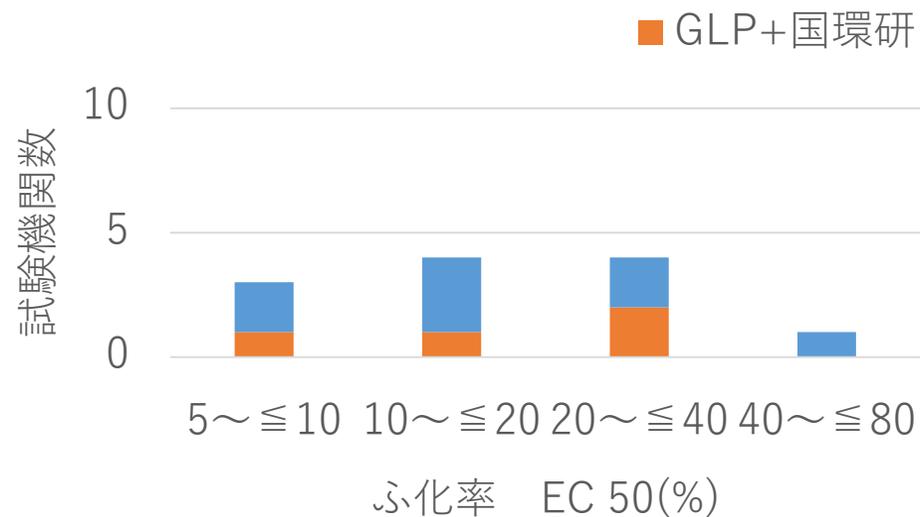
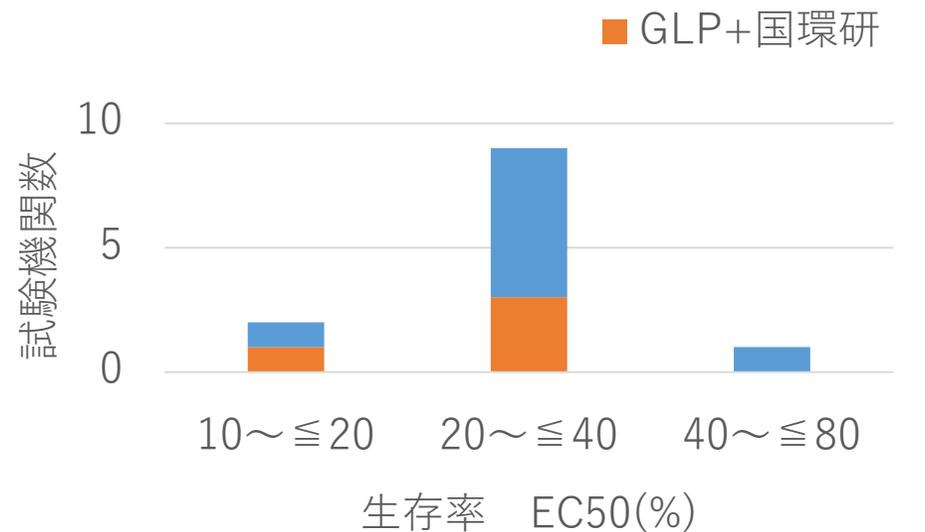
# 孵化率と孵化日数



# 魚類(ゼブラフィッシュ) 胚仔魚毒性試験

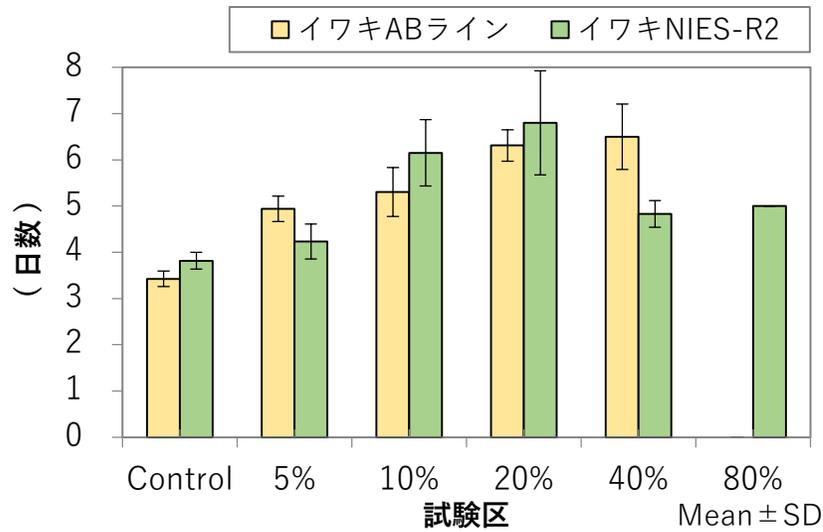


# 魚類(ゼブラフィッシュ) EC50

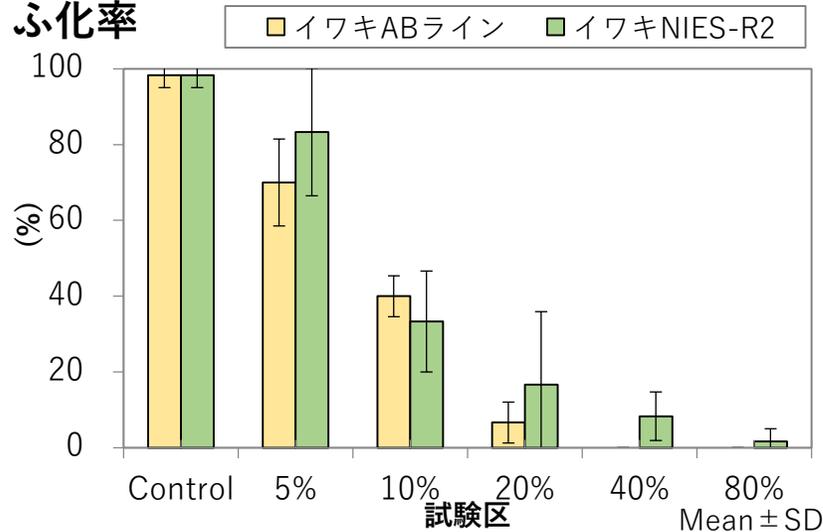


# ゼブラフィッシュ系統差比較 (株式会社イワキ) ゼブラフィッシュの系統差の違い

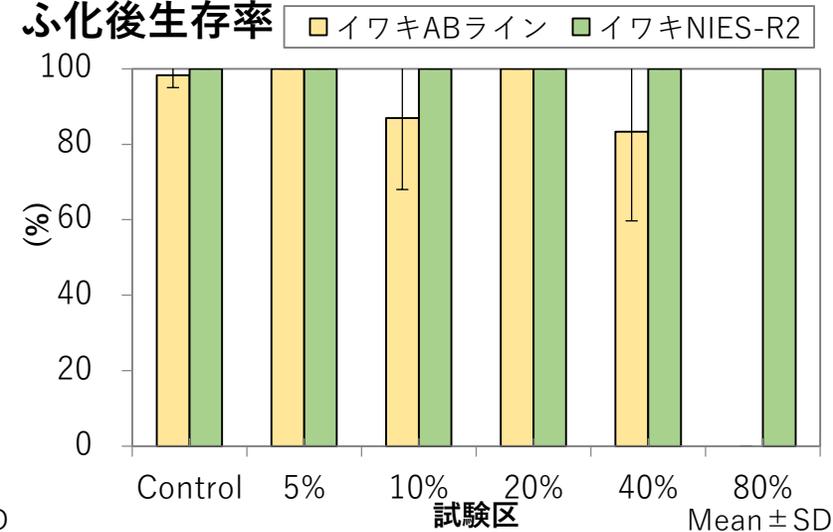
## 平均ふ化日数



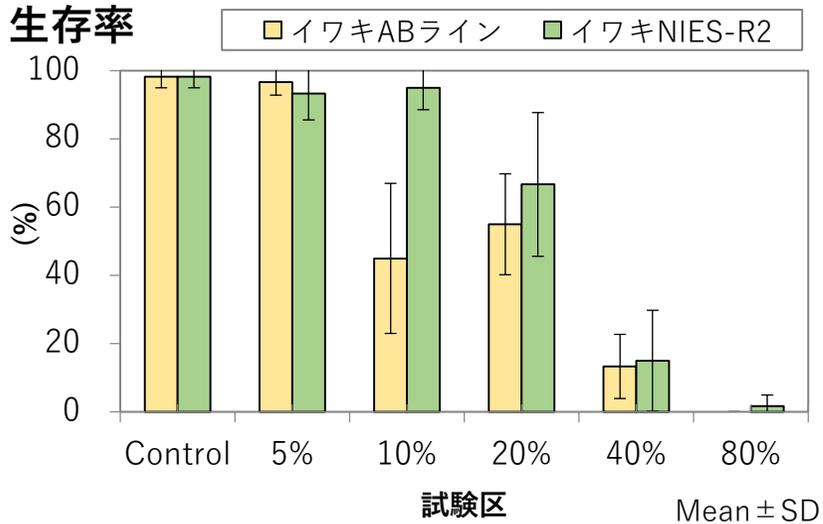
## ふ化率



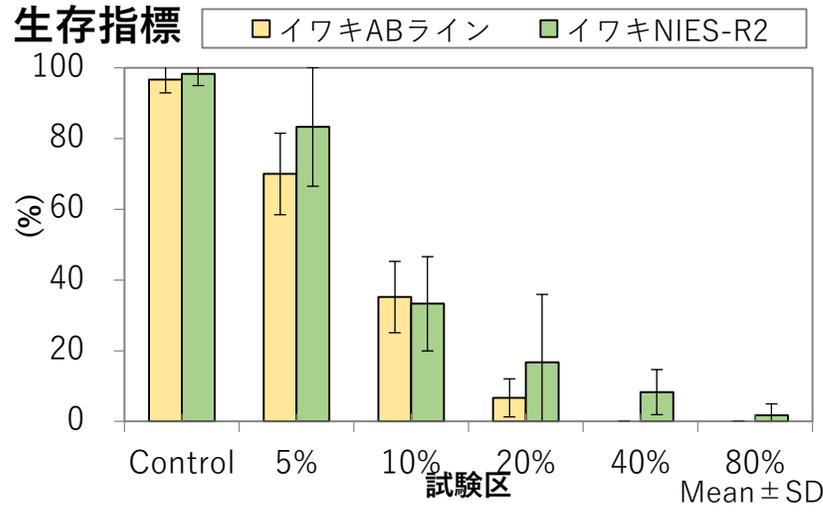
## ふ化後生存率



## 生存率



## 生存指標



試験機関	ふ化日	ばく露終了日	生存率	ふ化率	ふ化後生存率	生存指標	TU = 100/NOEC C
NIES-R2	3.82	9	20	5	80	5	20
ABライン	3.43	8	5	<5	40	<5	>20

まとめ

試験機関	NOEC (%)			TU		
	藻類	ミジンコ	魚類	藻類	ミジンコ	魚類
1			5			20
2	<5	10	5	>20	10	20
3	<5	10	20	>20	10	5
4	<5		<5	>20		>20
5	10	5	2.5	10	20	40
6	5	5	20	20	20	5
8		10			10	
10	<5		5	>20		20
17	<5	<5	20	>20	>20	5
18	5		20	20		5
19	5		<5	20		>20
20	<5			>20		
21	<5	5		>20	20	
22	<5	10	<5	>20	10	>20
25		<5			>20	
国環研	<5	2.5	1.25	>20	40	80

# まとめと考察

- 今回の試みは、参加ラボの優劣を競うものではない。真値は存在しないので、どのラボのデータが正しいとは言い難いが、試験法ごとにある程度の範囲内に結果は集約していることが分かった。
- 生物試験を排水管理に使っていく上では、ある程度の変動幅・不確実性を考慮したシステム作りが必要である。（例えば複数回の試験から判断する、複数ラボで試験するなど）
- 有害化学物質の存在を検出するためには、ある程度のスキルが必要である。
- 将来、スキルの確認（許認可）手段の一つとして、今回のようなブラインドテストの有効性が示唆された。