



愛研技術通信

掲 示 板

○（特集）「第1回生態影響試験チャレンジテスト」結果報告

技術通信第128号で紹介しました、国立研究開発法人 国立環境研究所主催の「第1回生態影響試験チャレンジテスト」の結果が平成29年6月7日の環境化学討論会で公表されました。本号ではこの試験の結果を報告します。なお、環境化学討論会での発表資料は「一般財団法人 セタックジャパン」のホームページ(<http://setac-ea.org/>)で公開されています。

【開催の趣旨】

今回のチャレンジテストでは環境省から提案されている生物応答を用いた排水管理手法の生態影響試験法（WET試験）に限らず、OECD、ISOなどに記載された既存の試験法、インビボのみならずインビトロ試験、さらにはオリジナルな試験法を対象として、それぞれの機関が得意とする生物試験を利用して共通のサンプル（模擬事業所排水）について試験を行い、その結果を総合的に比較することによって、複合化学物質の評価に適した試験法の洗い出しとそれらの適用妥当性を検証するとともに、将来取り組むべき課題の抽出に役立てていくことを目的としています。

試験機関間、試験方法間の優劣を競うことは目的ではなく、より良い水環境の保全を目指すために複数の化学物質の影響を知る評価手法の1つとして、生態影響試験の普及啓発に資することも目的としています。

弊社もゼブラフィッシュを用いる「胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験」と「藻類（ムレミカヅキモ）を用いる生長阻害試験」に参加しました。

第1回生態影響試験チャレンジテスト参加者募集のご案内

募集期間	平成29年2月6日（月）～2月28日（火）15時まで
参加要件	本チャレンジテストに参加資格は特にありません。 個人、民間、公的機関を問わず、 幅広く参加者を募集いたします。 希望により、試験機関名の公表・非公表に対処します。
募集予定 件数	20件程度 (応募者多数の場合には抽選になります)
主催	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
協力	一般社団法人セタックジャパン



【 試験の目的 】

第一回生態影響試験チャレンジテストでは、以下の2点を検討します。

1. 試験機関間の生物応答試験結果の再現性、変動幅を測る。
2. 様々な種類の生物応答試験の適用性比較を行う。

【 試験参加機関 】

試験参加機関は民間機関が14機関、公的機関及び大学が10機関、地方の環境研究所が3機関、合計27機関が参加しました。

「藻類（ムレミカヅキモ）を用いる生長阻害試験」に参加した機関が12、「甲殻類（ニセネコゼミジンコ）を用いる繁殖試験」に参加した機関が9、「胚・仔魚期の魚類（ゼブラフィッシュ）を用いる短期毒性試験」に参加した機関が11、その他の生態影響試験に参加した機関が16で実施した試験は30種類です。国立研究開発法人 国立環境研究所も試験に参加し、3種類のWET試験のほか18種類の生態影響試験を実施しました。化学分析で参加した機関も3機関あり、化学分析結果と生態影響試験結果の比較による考察も行われています。

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

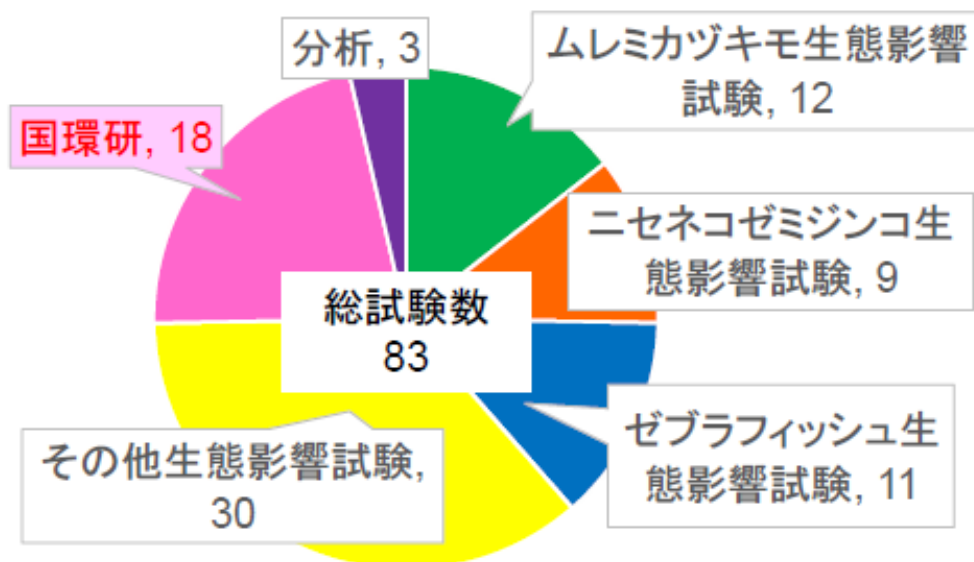


図 1. 試験参加機関と総試験数

【 模擬事業所排水の概要 】

模擬事業所排水試料は複数の実際の事業所排水を適当な比率で混合し、1ヶ月程度冷暗所で保存し毒性を安定化させたものに3種類の試薬を添加して毒性を調整したものです。添加した試薬は、除草剤の1種である「シマジン」、エポキシ樹脂等の原料であり環境ホルモンの1種でもある「ビスフェノールA」、殺菌剤の1種である「cymoxanil (シモキサニル)」です。「cymoxanil (シモキサニル)」の生態影響として魚類の卵に対し「ふ化遅延」を起こす作用があることが知られています。

化学分析で参加した大学の分析によれば、添加した試料のほかに生態毒性を有している物質として、医薬品や染料の原料である3-ニトロアニソール及び4-ニトロアニソールが検出されました。その他にも多くの化学物質が検出されました。分析結果の一部を表1,2に示します。

並行して分析した排水基準項目は、銅の濃度がやや高いものの排水基準を超過する項目は無い試料でした。

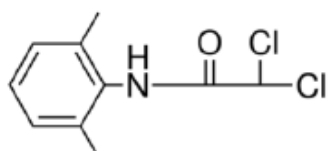
表 1. 機器分析で明らかになった化学物質

水生生物に毒性を発現する可能性がある
濃度で検出されたのは**4物質**

検出物質	検出濃度 全分析結果		測定機器
	ug/L	ug/L	
3-&4-ニトロアニソール	680	678, 686	GC/MS
シマジン	180	184, 182	GC/MS
ビスフェノールA	440	473, 415	GC/MS
Cymoxanil	150	160, 144, 149, 134	LC /QTOF-MS

その他:

2,2-Dichloro-N-phenylacetamide → **大きなピーク**



2-クロロアニリン, 3.2 ug/L,
N-フェニル-アセトアミド, 52 ug/L,
フルトラニル, 0.038 ug/Lなど

表 2. 排水基準項目の分析結果 (生活環境項目)

計量項目(その他の項目)	単位	計量結果	許容限度	
水素イオン濃度(19.8°C)	pH	7.4	5.8以上8.6以下	
生物化学的酸素要求量	mg/L	76	160	
化学的酸素要求量	mg/L	52	160	
浮遊物質量	mg/L	12	200	
窒素含有量	mg/L	8.7	120	
リン含有量	mg/L	0.04	16	
ノルマルヘキサン抽出物含有量	鉱油類	mg/L	<1	5
	動植物油脂類	mg/L	1.3	30
フェノール類	mg/L	0.037	5	
銅及びその化合物	mg/L	0.82	3	
亜鉛及びその化合物	mg/L	0.02	2	
鉄及びその化合物(溶解性)	mg/L	0.03	10	
マンガン及びその化合物(溶解性)	mg/L	<0.01	10	
クロム及びその化合物	mg/L	<0.01	2	
大腸菌群数	個/cm ³	0	3000	

【 WET 試験結果の概要 】

WET 試験の試験結果の概要を表 3. に示します。なお、弊社の試験機関番号は 4 番です。

「藻類を用いる生長阻害試験」では 1 機関、「甲殻類を用いる繁殖試験」では 4 機関、「胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験」では 4 機関が「毒性なし」(TU \leq 10) の評価をしましたが、生物試験であることを考慮すれば、試験法ごとにある程度の範囲内に試験結果は集約しているといえます。また、「胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験」では「cymoxanil (シモキサニル)」の影響と考えられる「ふ化遅延」が認められました。

弊社の報告した毒性評価は国立環境研究所と一致した結果であり、参加機関の多数とも一致していました。生物試験は試験結果にある程度の変動幅がありますが、妥当な試験結果を報告できたと考えられます。

表 3. WET 試験結果一覧表

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	1.25	10	20	80
6	5	5	10	20	20	10
8		10			10	
10	<5		5	>20		20
17	<5	<5	10	>20	>20	10
18	5		10	20		10
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

愛研

注 1 NOEC (最大の無影響濃度) : 各影響指標について、対照区と比較して統計学的に有意な低下が認められた最も低い試験濃度が LOEC (最小影響濃度)、その一つ下の試験濃度が NOEC (最大無影響濃度)。

注 2 TU (Toxic Unit) : NOEC の逆数をとったもので、放流先で毒性影響が見られなくなるために必要な希釈倍率。TU が 10 を超える場合改善の必要ありと評価されることが想定されている。これは、放流先で約 10 倍に希釈されるという想定のもと、排水基準が水質環境基準の 10 倍に設定されていることに倣っている。

注 3 国立環境研究所が実施した「甲殻類を用いる繁殖試験」及び試験機関 5 及び国立環境研究所が実施した「胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験」は希釈倍率を 1.25 倍から開始しているため (公定法では 5 倍希釈から)、「NOEC」が他機関より低く「TU」は高くまで表記されている。

【 各種生態毒性試験の結果 】

WET 試験以外の生態毒性試験結果を表 4. に示します。

試験方法は化学物質の毒性評価に用いられている OECD テストガイドラインに従った試験 (TG202、ヒメダカの試験)、海産生物を用いた試験 (シオダマリミジンコ、ジャワメダカ等)、藻類を試薬化した迅速・簡便な試験 (藻類遅延発光)、発光細菌を用いた試験 (Microtox 試験) などです。

一つの試料を、これほど多くの試験方法で試験を行うことは世界的にも珍しいことだそうです。

WET試験と同じようにTU>10の場合「毒性あり」と評価されます。一部の試験方法で毒性が検出されませんでした。生物試験では、工場排水のような試料の試験には適さない試験がある可能性があります。

表 4. WET 以外の生態毒性試験結果 (国立環境研究所以外の試験結果)

試験機関		NOE C (%)	TU	EC50(%)	EC10(%)
3	Microtox	N.D	N.D	>80	N.C
6	クロロフィル蛍光量	5	20	>80	22.3
8	シオダマリミジンコノープリウス期変態日数	40	2.5	>80	>80
8	シオダマリミジンコペポッド期産仔数	40	2.5	54.4	N.C
11	オオミジンコ急性毒性試験(TG202)	N.D	N.D	>80	74.0
12	藻類遅延発光	<5	>20	23.5	3.0
12	藻類遅延発光	<5	>20	N.C	N.C
12	藻類遅延発光	<5	>20	N.C	N.C
13	藻類遅延発光	<5	>20	23.7	7.0
15	オオミジンコ急性毒性試験(TG202)	N.D	N.D	>80	>80
16	ホソタマミジンコ遊泳阻害試験	N.D	N.D	>80	26.5
16	ヨコエビ急性毒性試験	N.D	N.D	>80	60.2
16	ゼブラフィッシュ胚期急性試験 ※	N.D	N.D	>80	>80
19	オオミジンコ急性毒性試験(TG202)	N.D	N.D	>80	>80
19	藻類遅延発光	<5	>20	5.2	0.5
20	ヒメダカ	>80	<1.25	>80	73.1
20	藻類遅延発光	<5	>20	35.0	3.7
23	キートセロス マリンアートSF-1	10	10	57.5	N.C
23	キートセロス Lyman and Fleming	N.D	N.D	N.D	N.D
23	スケレトネマ マリンアートSF-1	10	10	56.5	N.C
23	スケレトネマ Lyman and Fleming	N.D	N.D	N.D	N.D
23	シオダマリミジンコ マリンアートSF-1	N.D	N.D	N.D	N.D
23	シオダマリミジンコ Lyman and Fleming	N.D	N.D	N.D	N.D
24	ヒメダカ	4.13	24.2	>80	<5
24	ジャワメダカ①27°C8時間	<4.1 3	>24.2	17.1	<4.13
24	ジャワメダカ②5日間人工海水	4.13	24.2	19.8	4.35
24	ジャワメダカ③排水暴露後人工海水	8.25	12.1	45.4	16.0
26	Pseudokirchneriella subcapitata NIES-35	N.C	N.C	>80	14.5
26	Navicula pelliculosa UTEX-B673	N.C	N.C	>80	43.1

N.D: No data、 N.C: No calculation、※ふ化遅延あり

【 国立環境研究所の生態毒性試験の結果 】

今回の試験を主催した国立環境研究所では、WET 試験のほか各種の生態毒性試験を実施しています。生態毒性キットを用いて（ホウネンエビ亜致死毒性試験（RAPIDTOXKIT F）等）排水試料に対する簡易試験法の試験の適合性を検証しているのが特徴です。

表. 5 WET 以外の生態毒性試験結果（国立環境研究所の試験結果）

試験法	EC50	EC10	NOEC (%)	TU
ヨコエビ急性毒性試験	>80	>80	80	1.25
OECD TG203 (100%のみの限度試験)	N.D	N.D	N.D	N.D
メダカピテロジェニンアッセイ	N.D	N.D	N.D	N.D
海産藻類生長阻害試験	60.8	9.75	<5	>20
藻類遅延発光法(ムレミガヅキモ)	19.5	3.5	<5	>20
藻類遅延発光法(海産ラン藻)	25.9	8.4	10	10
Microtox試験	>80	>80	>80	<1.25
ホウネンエビ亜致死毒性試験 (RAPIDTOXKIT F)	<80	<80	<80	>1.25
ホウネンエビ急性毒性試験 (THAMONOTOXKIT F)	N.D	N.D	N.D	N.D
ツボワムシ急性毒性試験 (Acute ROTOXKIT F)	<5	<5	<5	>20
ツボワムシ短期慢性毒性試験 (Short-chronic ROTOXKIT F)	N.D	N.D	N.D	N.D
繊毛虫慢性毒性試験 (Chronic PROTOXKIT F)	N.D	N.D	N.D	N.D
カイミジンコ亜慢性毒性試験	N.D	N.D	N.D	N.D
海産珪藻類生長阻害試験 (MARINE ALGALTOXKIT)	>80	>80	10	10
シオミズツボワムシ急性毒性試験 (Acute ROTOXKIT M)	18.8	7.98	N.D	N.D

【 試験結果の考察 】

- ・今回の試みは、参加試験機関の優劣を競うものではありません。どの試験機関のデータが正しいとは言い難いですが、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りました。
- ・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と思われます。
- ・有害化学物質の存在を検出するためには、ある程度の技術が必要であり、将来、技術の確認（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されました。

- ・今回の模擬排水は排水基準を満たしていましたが、生態毒性を有している排水でした。生物試験は生態毒性を検出できる利点がありますが、その物質の特定はできません。化学分析と生態毒性試験を組み合わせることにより、新たな環境懸念物質の検出が明らかになる可能性が示されました。

【 今後の愛研での WET の取組 】

昨年にお客様からご提供いただいた排水試料を用いて「胚・仔魚期の魚類（ゼブラフィッシュ）を用いる短期毒性試験」を行い、その結果を「平成 28 年度 第 24 回日環境協・環境セミナー全国大会 in 岐阜 by 長良川」で発表しました。今回の「第 1 回生態影響試験チャレンジテスト」の結果から現在行っている試験方法の妥当性が確認できたと考えられます。

国立環境研究所は「チャレンジテスト」を今後も開催したいとの意向があります。次回は今回参加しなかった「甲殻類（ニセネコゼミジンコ）を用いる繁殖試験」に参加するなど、技術の研鑽に努めていきます。



編集後記

6月25日の朝食を食べようとしていた時、テレビから緊急地震速報が流れてきました。身構えていたところ、「ドン」と突き上げるような震れがありましたが、大きな震れではなくほっとしました。この地震は長野県の御嶽山付近を震源とするマグニチュード 5.6 の地震でした。この地方では昭和 59 年 9 月にも大きな地震（長野県西部地震）があり、大規模ながけ崩れが発生し多くの犠牲者が出ました。旅館の半分が土砂で押し流された映像などに衝撃を受けた記憶があります。幸い今回の地震ではそこまでの大きな被害は無かったようです。

(A.K)



株式会社 愛 研

(<http://www.ai-ken.co.jp>)

本 社 〒463-0037 名古屋市守山区天子田 2-710

電話(052)771-2717 FAX(052)771-2641

半田営業所 〒475-0088 半田市花田町 2-65

電話(0569)28-4738 FAX(0569)28-4749