

表 8 魚類試験手法の種類と内容

項目	魚類急性毒性試験 (TG 203)	魚類の初期生活段階毒性試験 (TG 210)	魚類の胚・仔魚期における短期 毒性試験(TG 212)
試験期間	96 時間	孵化後 30 日 (メダカの場合およそ 38~40 日)	卵黄が吸収されるまで (ゼブラフィッシュの場合 9 日間)
生物数	少なくとも 7 尾/区	60 卵/各濃度区で 2 連	30 卵/濃度区で少なくとも 3 連
試験方式	止水式、半止水式(または流水式)	流水式(または半止水式)	半止水式(または流水式)
給餌	試験開始の 24 時間前まで、 3 回/週又は毎日	各成長段階に対し適切な飼料 を、適切な時期から与える	なし
観測・測定	死亡数 (24 時間毎 3 および 6 時間観測 することが望ましい))	孵化数と生存数(毎日)、 体形異常、行動阻害、 体長、体重	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	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	孵化率、生存率等 LOEC および NOEC	孵化率、生存率等 LOEC および NOEC

えることを避けるためにも適していると考えられる。

3. 1 各種魚類試験手法の特性

まず、魚類を用いた試験で代表的な手法の内容について、OECDのテストガイドラインをもとに、試験方法や条件などに関する主要な点について表 8 にまとめた。

ここから、受精卵から胚仔魚による短期毒性試験は試験方法として多くの有利な点があることが示された。

なお、OECDのテストガイドラインでは、TG203が急性毒性試験に対応する。TG210とTG212は、ともに受精卵から曝露させる試験手法であるが、TG210は孵

化後に長い観察期間を設定しているのに対して、TG212ではより短い観察期間となっている。

今回、検討の対象としたFETについては現段階では公認された手法とはなっていないため、基準となるプロトコルは出来ていないが、内容としてTG212と類似する点が多いことから、TG212の内容で、他の試験手法との比較を行った。

これらの条件をもとに、各試験手法が医薬品の生態評価における試験法として、適しているかどうかを検討した。なお、試験手法の適性評価の基準として、以下のように設定した。

表9 急性毒性試験と受精卵を用いた試験の適用性比較

	急性毒性試験 (TG203)	初期生活段階毒性試験 (TG210)	胚仔魚期短期毒性試験 (TG212)
試験時間	○ 最も短い	× 最も長い	△ 中間程度
生物数	○ 最も少ない	× 最も多い	△ 中間程度
試験方式	△ 止水式：濃度維持が課題	△ 流水式：使用薬量が多い	○ 半止水式：使用薬量も比較的少なくすむ
観測測定	△ 観察点は死亡のみ	○ 多くの観察点を持つ	○ 多くの観察点を持つ
結果算出	× 死亡率のLC50のみ	○ 孵化率等のLOECおよびNOEC, EC50	○ 孵化率等のLOECおよびNOEC, EC50

試験時間：労力，費用等の効率から短い方が良

供試生物数：動物愛護の観点から少ない方が良，また確立した生命体でないことも良

試験方式：供試物質の濃度維持と使用薬品の量や排水処理の観点から半止水式が良

給餌：供試物質の濃度維持や試験労力の点で不要の方が良

観測測定：観察者によって差が出ないようにシンプルな項目が良いが，評価に必要な項目は外さないことが必要

結果の算出：医薬品の特徴を反映し，種々の生体作用から評価できるように，できるだけ必要に応じて様々な指標を導出できると良

検討した結果を〔○：適，×：不適，△：部分的に適〕の3段階に分類し，それぞれの試験方法ごとに比較整理して表に示した。

3. 2 急性毒性試験結果との比較

今回の検討においては従来の急性毒性試験に相当する試験として，メダカの仔魚を用いた試験を一部の対象物質について並行して実施した。

ヒメダカ仔魚を用いた急性毒性試験は，通常の成魚を用いた試験とは異なり，孵化直後で卵黄からの栄養で生長する摂餌開始前の仔魚を使用するため，胚の段階と同様に確立した生命個体とはみなされず，動物愛護の視点に適している。また，体内器官も発育途上のため外的ストレスに対する抵抗力も弱く，敏感であることが期待できる。なお，試験期間は通常の急性毒性試験の96時間に対して，120時間（5日間）と長い試験期間となっている。結果を，表10にまとめて示す。

ここから，受精卵から胚・仔魚期を用いた試験では，通常の試験より毒物に敏感であると考えられる仔魚期を用いた急性毒性試験比べても感度は高いことが示された。ただし，どちらの試験においても，ジクロフェナクと比べてメフェナム酸の方が高い毒性を示すという大枠の傾向についての評価には齟齬が生じなかった。

表10 2種の魚類毒性試験による医薬品に対する結果の比較

(mg/L)	ヒメダカ仔魚急性毒性試験	ゼブラフィッシュ胚仔魚期短期毒性試験
ジクロフェナク	EC50 > 10	EC50 = 3.3 NOEC = 2.5
メフェナム酸	EC50 = 4.3	EC50 = 1.3 NOEC = 1.25

このことから、受精卵を用いた試験は、次のように評価できる。

1) 技術的観点

従来の急性毒性試験と同様の毒性発現の傾向を維持しつつ、より感度の高い試験として有効である可能性が示された。また、死亡のみを観察指標とする急性毒性試験と比べてより多くの観察点を持つことから、データのまとめ方によって、死亡率だけでなく、孵化率、繁殖率、奇形発生率、孵化遅延など多様な生体反応からの影響を評価できる点も利点としてあげられる。

また、医薬品をはじめとする環境中の存在量がわずかで急性毒性の発現がみられないレベルの微量物質による生態影響については、急性毒性試験ではその影響を正しく評価することは困難であるため、受精卵からの試験は慢性毒性に相当する指標を短期間に推定できる手法として有効である。

2) 生命倫理的観点

既に述べたように、受精卵を用いた試験では、供試生物として対象物質に曝露するものは、一個の独立した生命として確立していないと考えられる、受精卵や胚・仔魚の発育段階を利用するため、動物愛護の観点から、実験生物にできる限り苦痛を与えない実験を計画する際に有

用であると考えられる。

4. 生物試験における標準作業手順書への展開

今回の検討において、医薬品を対象とした生態影響評価を、化学物質の生態影響評価を行う既存の試験法を参考にしつつ試験的に実施した。

この結果、試験対象とした医薬品についての生態影響情報を得ることができた。そこで、これらの手法が、今後において医薬品の生態影響評価を行うための統一的な試験方法として利用できる可能性が示された。

そこで、より一般的な試験手順として汎用性を持たせた試験手法のたたき台とするため、今回行った試験の作業手順について0章に整理して示した。

今後、この手順に従った試験の例数を増やす中で、これらの手法における課題点を抽出し、修正を加えて標準作業手順書(案)としてまとめることを目指す。

E. 結論

本年度は、環境中に存在が確認された医薬品5種について生態毒性試験を行い、3種の生物群(藻類, 甲殻類, 魚類)に対する影響について把握した。この中で、対象とする医薬品によって毒性発現の度合いが生物種間で異なっており、それぞれ医薬品の生理機能への作用が様々であることがうかがわれた。このことから、医薬品が生態系へ与える影響について把握するためには、幅広い生物種(群)による毒性試験のデータを蓄積する必要があることが示唆された。

また、魚類試験については受精卵を用いた試験を適用することで、動物愛護の試験に配慮しつつ、より感度の良く医薬品の生態影響を把握することができる可能性が示された。

来年度は、本年度に引き続き水生生物試験法に関して医薬品で生態毒性試験を行う上での問題点について検討を行う。また、これまでに選定した医薬品に関する上記生物試験の結果と多摩川の下水処理場下流の実測値を基にした、模擬的なリスク評価を行う。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

学会発表

- 1) 三野美都里, 吉村奈緒子, 大久保博充, 田中靖子, 今村美雪, 小安純子, 大堀祐司, 齋藤穂高, 新野竜大, 鑓迫典久: *Ceriodaphnia dubia* および *Daphnia magna* を用いた繁殖試験による環境中医薬品等の生態影響評価, 第44回日本水環境学会年会(2010)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

(参考) 生物毒性試験実施作業手順

藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) 繁殖阻害試験法

1. 供試生物

1.1 試験種

試験には、単細胞緑藻類であるムレミカツキモ *Pseudokirchneriella subcapitata* (旧称 *Selenastrum capricornutum* Printz) を用いた。

試験に用いた *Pseudokirchneriella subcapitata* は独立行政法人国立環境研究所、微生物系統保存施設にて継代培養されている株 (NIES-35) を使用した。入手後の管理は独立行政法人国立環境研究所環境リスク研究棟において C 培地 (付表 A) を用いて無菌的に継代培養を行った。

本株の感受性は対照物質として重クロム酸カリウムを用いて確認した。重クロム酸カリウム (pH 7.8) に対する EC50 は、1.1538mg/L (95%信頼限界: 1.0695 < * < 1.2549) であった。

2. 試験の概要

本試験は、対象化学物質が藻類生長に与える影響を調べるために行った。

藻類の標準培地 (OECD 培地) 中で藻類を培養し、培地中に対象医薬品を添加した場合と添加しない場合との間で、増殖した細胞数にどのような変化が生じるか観察を行う。その細胞数の変化から増殖速度を計算し、曝露した医薬品濃度との関係から藻類生長への影響を評価する手法である。試験は OECD テストガイドライン TG201 および化審法の藻類試験法に準じて行った。

3. 供試個体を得るための培養方法

3.1 培地

次の組成の培地、OECD 培地 (付表 B) を用いる。

- ・塩化アンモニウム 15 mg/L
- ・塩化マグネシウム六水和物 12 mg/L
- ・塩化カルシウム二水和物 18 mg/L
- ・硫酸マグネシウム七水和物 15 mg/L
- ・リン酸二水素カリウム 1.6 mg/L
- ・塩化鉄 (III) 六水和物 0.064 mg/L
- ・エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 0.1 mg/L
- ・ホウ酸 0.185 mg/L
- ・塩化マンガン四水和物 0.415 mg/L
- ・塩化亜鉛 0.003 mg/L
- ・塩化コバルト六水和物 0.0015 mg/L
- ・塩化銅二水和物 0.00001 mg/L
- ・モリブデン酸二ナトリウム二水和物 0.007 mg/L
- ・炭酸水素ナトリウム 50 mg/L

これらを直接超純水（ミリQ水）添加した。ろ過滅菌は $0.22\mu\text{m}$ の孔径のフィルターを用いた。pHを測定し、必要ならばpH7.5～8.5の範囲にNaOHまたはHClで調整した。

3.2 前培養

試験には指数増殖期の藻類を用いる必要がある。維持培養中など、増殖を抑制されている藻類をそのまま試験条件に移すと、順調な増殖を開始するまでに遅延（タイムラグ）があり、正しい試験結果が得られない。そこで、試験を開始する前に、試験条件と同じ条件で2～4日間培養し、指数増殖期の藻類を得る。変形や異常な形態のものが出現した場合は使用しない。指数増殖に達するまでの前培養の期間や、添加する生物量は、使用する培養装置の温度や光強度、培地の容量などに依存する。したがって、あらかじめ前培養に使用する培養装置や条件で培養して生長曲線を描き、どの程度の生物量を添加すると、何日後に指数増殖期になり、どの程度の生物量が得られるかを調べておく必要がある。目安となる方法を以下に示した。

- ・ 250mLの三角フラスコに100mLの試験培地を入れる。
- ・ 滅菌したピペットを用いて、試験種が約5,000 cells/mLとなるように接種する。この際、加える藻類懸濁液は5mL以内になるようにする。
- ・ 振とう培養する（温度 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、照度約 $60\text{--}80\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、連続光）
- ・ 毎日細胞数を計数し、生物量が $0.5\text{--}1\times 10^6$ cells/mLに達した時点で本試験に供する。

なお、通常3日程度でこの濃度まで増殖するが、3日後に生物量が $0.5\text{--}1\times 10^6$ cells/mLに達しない場合は前培養の期間を1日程度延長するか、培養条件を変えて前培養をやり直す。

4. 試験方法

4.1 試験条件

以下の条件で試験を行った。但し、試験容器は滅菌したものを使用し、必要に応じてその他の器具の滅菌を行った。また、藻類の接種も無菌条件下で行った。

暴露方式：止水式、振とう培養（100rpm）

暴露期間：72時間

試験液量：100mL

連数：3容器/試験区、6容器/対照区

初期細胞濃度：前培養した藻類 5×10^3 cells/mL

試験温度： $23\pm 2^{\circ}\text{C}$

照明： $60\text{--}120\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$

pH：試験液のpHは7.8～8.0に調整した

4.2 試験容器、藻類培養試験装置および機器

試験容器：300mL容量ガラス製三角フラスコ（金属栓）

藻類培養試験装置：振とう培養器TB-30RLVS /高崎科学器械株式会社

光学顕微鏡 : システム生物顕微鏡 B×51 /OLYMPUS
粒子計数装置 : 粒子計数分析装置 CDA-500
粒子分布解析装置 : PDA-500 /Sysmex 株式会社
pH計 : pH METER, D-51 /HORIBA
照度計 : Light Meter LI-250
LI-COR Radiation Sensor LI190SA Quantum Sensor /LI-COR, Inc.

4.3 試験溶液の調製と濃度の設定

試験溶液は、対象物質を OECD 培地に溶解させることで作成した。また、試験濃度は、以下の基準で設定した。

最高濃度は、EC50 等の指標値の計算に十分な阻害が生じる濃度とした。なお、毒性が弱く十分な阻害を生じさせるために高濃度が必要となる場合には、「100mg/L」、または「対象物質の水溶解限度」を最大濃度とし、これ以上の濃度における試験は行わないこととした。

最低濃度は阻害率に対照区との有意差がなくなり、NOEC が算出できる濃度とした。

なお、希釈における公比は 2 で設定した。また、1 濃度区における繰り返し数は、3 連で実施した。

4.4 試験操作

前培養した藻類の細胞数を計数し、温度を $23 \pm 2^\circ\text{C}$ にした試験溶液中に細胞濃度が 5×10^3 cells/mL となるように、前培養液の一定量を試験溶液の入った容器に添加した。各試験容器を培養装置に設置し暴露を開始した。細胞濃度は各試験容器より試験溶液約 1mL を採取し、粒子計数装置を用いて計数した。また、異常があった時には試験終了時の細胞の形態観察を顕微鏡下で行った。

試験区における pH は、暴露終了時に測定した。暴露期間中、培養装置内の温度および照度を少なくとも 1 日 1 回測定した。

4.5 試験成立の条件

以下の条件を満たさない場合、試験を不成立とし、再試験を行った。

- ・ 対照区 (助剤対照区を含む) の生物量が暴露期間中に少なくとも 16 倍に増殖すること
- ・ 対照区の毎日の生長速度の変動係数 (助剤対照区の毎日の生長速度の変動係数を含む) が暴露期間を通じて 35% を超えないこと
- ・ 対照区の繰り返し間の生長速度の変動係数 (助剤対照区の繰り返し間の生長速度の変動係数を含む) が 7% を超えないこと

5. 統計処理

5.1 生長曲線

各試験濃度区と対照区の細胞濃度を暴露期間と被験物質濃度とともに表にした。試験区および対照区の細胞濃度の平均値を時間に対してプロットし、生長曲線を作成した。このとき、対照区の生長曲線が、暴露機関を通じて指数増殖期にあることを確認した。

被験物質濃度と影響の関係は 7.2 に述べる方法を用いて計算した。

5.2 生長阻害率の算出

生長速度の比較 (速度法)

対数増殖(指数生長)している培養での細胞濃度の平均の生長速度(μ)は次の式より算出した。

$$\mu_{i-j} = (\ln N_j - \ln N_i) / (t_j - t_i)$$

ここで、

μ_{i-j} : t_i 時から t_j 時までの期間の生長速度。通常日当たり ($d-1$) で表した。

N_i : t_i 時の実測細胞濃度 (cells/mL) 試験開始時 (t_0) の細胞濃度については設定値を用いた。

N_j : t_j 時の実測細胞濃度 (cells/mL)

t_i : 暴露開始後 i 回目に細胞濃度を測定した時間(d)

t_j : 暴露開始後 j 回目に細胞濃度を測定した時間(d)

EC50 を算出する場合は、暴露開始時から 72 時間後までの暴露期間を通じた生長速度を求めた。

試験の有効性を調べるためには、対照区の 1 日毎の生長速度を求め、毎日の生長速度の変動係数が暴露期間を通じて 35%を超えないことを確認した。

各試験濃度区における生長(速度)阻害率($I\mu$)は、対照区の生長速度の平均値(μ_c)と各試験濃度区での生長速度の平均値(μ_t)との間の差として次のように計算した。

$$I\mu = (\mu_c - \mu_t) / \mu_c \times 100$$

μ_c : 対照区の平均生長速度

μ_t : 各濃度区における平均生長速度

5.3 50%生長阻害濃度 (EC50) の算出

$I\mu$ または IA の値を被験物質濃度の対数に対してプロットした。

その回帰式等を用いて 50%阻害濃度を求めた。

5.4 最大無影響濃度 (NOEC)

統計的手法により対照区と比較して有意差の認められない最高試験濃度を最大無作用濃度 (NOEC) とした。

(付表 A) C 培地の組成および調製方法

以下の成分を精製水で 2L に定容とし pH を HCl または NaOH で 7.5 とする。

C 培地

	Stock Solution	C medium
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	10 mg/mL	30 mL
KNO ₃	10 mg/mL	20 mL
MgSO ₄ · 7H ₂ O	10 mg/mL	8 mL
β-グリセロリン酸ナトリウム	10 mg/mL	10 mL
チアミン	10 mg/mL	0.2 mL
ビタミン B12	100 μg/mL	0.2 mL
ビオチン	1 μg/mL	0.2 mL
PIVメタル	1 μg/mL	6 mL
Tris		1 g
DW		1930 mL

pH 調製

1N-HCl で
1N-NaOH で

7.5
4ml 以下

PIVメタル

	Stock Solution	PIVメタル
DW		965 mL
Na ₂ EDTA		1 g
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.5 g / 50mL	19.6 mL
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.5 g / 50mL	3.6 mL
Zn Cl ₂	0.5 g / 50mL	10 倍希釈 10.5 mL ①
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.5 g / 50mL	10 倍希釈 0.4 mL ②
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.5 g / 50mL	10 倍希釈 1.25 mL ②

①ZnCl₂ 0.5 g を 50mLDW 溶かすのだが、完全に溶けないので、塩酸（薄めていないもの）をパスツールピペットで1～2滴入れると完全に溶ける（透明になる）。これを1/10に希釈する（5 mL とって45 mLDW に溶かす）。

②0.5 g を 50mLDW に溶かす。これを1/10希釈する。

*PIVメタルは金属が過剰に入っているため、冷蔵庫の中で沈殿が生じる場合がある。その際は塩酸を少し加えると溶解する。

（付表 B） OECD 推奨培地の組成および調製方法

（OECD テストガイドライン 201, Alga, Growth Inhibition Test (1984)）

以下の成分を精製水で 1L に定容とする。pH は約 8 である。

OECD 培地

	Stock Solution	OECD medium	
		1L	2L
HBO ₃	100 μg/mL	1.85 mL	3.7 mL
MnCl ₂ · 4H ₂ O	100 μg/mL	4.15 mL	8.3 mL
ZnCl ₂	10 μg/mL	0.3 mL	0.6 mL
FeCl ₃ · 6H ₂ O	100 μg/mL	0.8 mL	1.6 mL
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	100 μg/mL	1 mL	2 mL
CoCl ₂ · 6H ₂ O	10 μg/mL	0.15 mL	0.3 mL
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	10 μg/mL	0.7 mL	1.4 mL
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0.1 μg/mL	0.1 mL	0.2 mL
CaCl ₂ · 2H ₂ O	10 mg/mL	1.8 mL	3.6 mL
NH ₄ Cl	10 mg/mL	1.5 mL	3 mL
KH ₂ PO ₄	1 mg/mL	1.6 mL	3.2 mL
NaHCO ₃	10 mg/mL	5 mL	10 mL
MgCl ₂ · 6H ₂ O	10 mg/mL	1.2 mL	2.4 mL
MgSO ₄ · 7H ₂ O	10 mg/mL	1.5 mL	3 mL
DW		980 mL	1960 mL

(977)

pH

約 8 になっているかどうかチェックする。

0.1N NaOH 1 滴半加えて 8.0 にあわせる。

OECD 培地の組成

Nutrient	Concentration (mg/L)
HBO ₃	0.185
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.415
ZnCl ₂	0.003
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.08
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	0.1
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.0015
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.007
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0.00001
CaCl ₂ · 2H ₂ O	18
NH ₄ Cl	15
KH ₂ PO ₄	1.6
NaHCO ₃	50
MgCl ₂ · 6H ₂ O	12
MgSO ₄ · 7H ₂ O	15
DW	980 mL

ニセネコゼミジンコを用いた亜急性毒性試験法

1. 供試生物種

Ceriodaphnia dubia の和名は「ニセネコゼミジンコ」であり、親虫は体長 0.9~1.0mm、仔虫は 0.1mm 程度の小型のミジンコである。今回の試験では、1994 年に US-EPA から分与してもらい独立行政法人・国立環境研究所にて継代飼育されている遺伝系統を、当施設甲殻類・水生昆虫試験室において飼育・繁殖させて使用した。ニセネコゼミジンコの寿命は約 3 週間であり、60 日以上生存するオオミジンコ (*Daphnia magna*) よりライフサイクルは短い。

2. 試験の概要

今回の試験で参考とした試験法は、カナダ環境省によるミジンコ亜急性毒性試験 “Test of Reproduction and Survival Using the Cladoceran *Ceriodaphnia dubia*” である (Environment Canada, 2007)。単為生殖で増殖するミジンコの特性をいかし、一定期間 (7-8 日) にメスが産む仔虫の数が、被験物質中で変化 (減少) することを影響の指標とする試験である。試験を安定して行うためには、コントロールにおける産仔数を試験間である程度一定に保つことが重要であり、そのためには餌の量、pH、温度、溶存酸素、硬度などの水の質を厳密に管理する必要がある。以下にミジンコの通常飼育方法、試験の準備、本試験の順に説明する。

3. 供試個体を得るための飼育方法

3. 1 飼育水

まず当施設の淡水処理装置で製造された「調温清浄濾過水」を $25 \pm 1^\circ\text{C}$ で一晩エアレーションしながら放置した。その後、溶存酸素量が 90% になるように再度エアレーションを行った。次に、pH を測定し、必要ならば pH 6.5~8.5 の範囲に NaOH または HCl で調整した。飼育開始当初の硬度は 220 mg/L (CaCO_3 として) であったが、日本の環境水は軟水であるため、徐々に硬度をさげて飼育し、試験開始時までには調温清浄濾過水の原水である水道水と同じ 80 mg/L 前後に馴化した。なお、調温清浄濾過水の水質は飼育・試験用水として適当であることを分析によって確認した。

3. 2 飼育方法

マスカルチャーの作製

最初に継代飼育および馴化のための集団飼育 (マスカルチャー) を準備した。試験に用いる少なくとも 3 週間前から 30~40 匹のミジンコを 500 mL ビーカーで飼育し、馴化を行った。

マスカルチャーは週に 3 回全換水し、換水時に仔虫は捨てた。生後 1 週間以上経過した成熟個体から生まれたメス仔虫を毎週あたらしい世代培養用の個体とし、継代を行った。試験を毎週定期的に開始するために、1 週間ずつ開始時期をずらしたマスカルチャーを用意した。

餌は YCT (Marinco Bioassay Laboratory, Inc., FL, USA) と単細胞緑藻クロレラ (*Chlorella vulgaris*, クロレラ工業株式会社より購入) を与えた。YCT は 30 mL あたり 100 μL 、クロレラは約 1.4×10^6 cells/mL の濃度に維持されるように毎日与えた。

以上の飼育培養は、甲殻類・水生昆虫試験室において、水温 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、明期 16 時間・暗期 8 時間の日長条件に設定したクロマトチャンバー内で行った。

換水時などミジンコを取り扱う場合には、1m L 容量の使い捨てガラスピペットの先端を切って直径 3 mm 程度に穴を広げ、切り口をバーナーで焼いてなめらかにしたものを使用した。ミジンコは空気に触れないように水と一緒に移動させつつ、水の持ち込みはできるだけ最小限にとどめるようにした。

3.3 供試個体の用意

試験には、生後 1 週間以上経過した成熟個体から 24 時間以内に生まれてきたメス仔虫を用いた。仔虫は生後 24 時間以内であり、かつ供試仔虫の成長のばらつきは 12 時間以内でなくてはならない。しかし実際上は 8 時間以内の仔虫を得ようとすると夜中に換水や試験を行わなくてはならないため、本試験では仔虫の大きさを目視で確認し、ある程度大きさをそろえることで対応した。

試験開始前日には、生後 1 週間以上経過した成熟個体のうち、育房内に発生途中の胚を持つ個体を選び出し、30 mL の調温清浄濾過水を満たした 50 mL ガラス製カップで、YCT (30 mL あたり 100 μL) と餌のクロレラを濃度が 1.4×10^6 cells/mL 程度になるように与えて、個別飼育を行った。翌日カップを調べて、仔虫を産出したカップのうち肉眼で仔虫の健康に異常が認められないものだけを試験に用いた。なお、試験に用いる仔虫を得るための親個体は、試験の繰り返しの数 (N=10) だけ用意した。

4. 試験方法及び条件等

4.1 試験条件

曝露方式： 半止水式 (週 3 回換水)

曝露期間： 7-8 日間

試験液量： 30mL/カップ

連 数： 10 カップ/濃度区

供試生物数： 10 個体/濃度区 (1 個体/カップ)

試験濃度： 公比 2, 6~7 濃度区 (対照区を含む)

試験温度： $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ (週一回測定)

溶存酸素濃度： 80%~99% (週 3 回測定)

サンプルの溶存酸素量が 40~100% の場合にはエアレーションは行わなかった。40% 未満の場合には 15~30 分間エアレーションをして溶存酸素量を 90~100% にしてから試験を行った。

pH： 6.5~8.5 pH の調整には 1N の HCl または NaOH を用いた。

硬度： 75-85 mg/L

照明： 室内光で、明期 16 時間、暗期 8 時間の日長条件

餌： 単細胞緑藻クロレラ

(*Chlorella vulgaris*, クロレラ工業株式会社より購入)

YCT (Marinco Bioassay Laboratory, Inc., FL, USA)

給餌量： クロレラは 1.4×10^6 cells/mL 程度の濃度になるように毎日給餌を行った。YCT は毎日 30 mL に対して 100 μL ずつ与えた。

試験容器： 50 mL ガラス製カップ

4. 2 環境測定機器

水 温 計：棒状標準温度計

pH/DO 計：HORIBA 社製 pH/DO メーター D-55

4. 3 試験装置

試験は全て当施設の甲殻類・水生昆虫試験室に設置した日本フリーザー株式会社製クロマトチェンバーMC-30SEF2 内で行った。

4. 4 試験操作

試験における同一濃度での繰り返し数は 10, 被験物質の希釈倍率は 2 とした。このとき、同じ親から産まれた同一腹仔の仔虫をすべての希釈段階に配置し、これを一群とした。その群を繰り返し数 (10) だけ用意した。

毎日ミジンコの生死観察と産まれた仔虫の計数を行い、観察結果を記録用紙に記入した。試験はコントロール群の試験個体の 60%あるいはそれ以上が 3 腹産んだ時点で終了し、最長でも試験期間は 8 日間とし、他の暴露区の産仔数も集計した。

4. 5 試験液の調製

飼育水に直接対象物質を溶解させて調製、あるいは助剤としてジメチルホルムアミド (DMF) を用いたストックソリューションを用意してから試験液の調製を行った。試験液はこのストックソリューションを 10000 倍に希釈し、助剤濃度が 0.01% (v/v) になるようにして調製した。

コントロールおよび試験水の希釈には飼育水を用いた。

4. 6 試験成立の条件

以下のいずれかに該当する場合には試験は不成立であったと見なした。

- ・コントロールの試験個体の死亡率が 20%を超える場合
- ・8 日間でコントロールの少なくとも 60%が 3 腹産んでいない場合
- ・コントロールにおける生存仔虫数が、最初の 3 腹で平均して 15 に満たない場合
- ・コントロールにおいて休眠卵生産が確認された場合

5. 統計処理

総産仔数は、まず一元配置の分散分析 (ANOVA) で実験処理効果の統計学的有意性を 5% のレベルで検定し、有意性が確認された場合にはさらに対照区あるいは助剤を用いた場合には助剤対照区と各濃度区との多重比較を Dunnett's test で行った。等分散性が満たされていないデータは対数変換を行い、変換によって等分散性が満たされれば分散分析を行った。変数変換によっても等分散性が満たされない場合にはノンパラメトリック検定を行った。これらの解析は解析ソフト JMP (Ver. 6.0.3, SAS Institute, Inc., Japan) を用いた。

また槐堀のデータについては産仔数が対照区の半数になる濃度 (EC50 値) の推定を行った。EC50 値は、まずサンプルの対数濃度に対する産仔数の変化の関係をロジスティック回帰モデルにあてはめ、得られた係数の推定値から算出した。統計ソフトは R (R Development Core Team, 2009) を用いた。

6. 引用文献

Environment Canada (2007) Biological Test Method: Test of Reproduction and Survival Using the Cladoceran *Ceriodaphnia dubia*. 74pp.

R Development Core Team. 2009. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, <http://www.R-project.org>

ゼブラフィッシュを用いた延長魚胚毒性試験法

1. 試験の概要

この試験では、受精直後の卵が胚を経て孵化し、卵黄を吸収して仔魚として生育するまでの過程（9日間）での生存および成長に、被験物質の存在がどのような影響（主に死亡率）を及ぼすか、という点を指標とした。

ここでは、OECDのテストガイドラインである「魚類の胚・仔魚期における短期毒性試験 (Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages [TG212])」、およびOECDのドラフトガイドラインとして提案されている「魚類胚毒性試験 (Fish Embryo Toxicity (FET) Test)」に準じつつ、一部を改変した手法を用いた。

この試験は、卵から胚・孵化・摂餌を開始するまでの成長という生活史の中の重要かつ複数の段階に対する影響を把握できることから、成長に長い時間が必要で世代交代を含めた慢性毒性試験の実施が困難である魚類への影響を検討する際に、慢性毒性に相当する指標を推定できる手法として有効と考えられる。

また、この試験の曝露期間における供試生物の発生は卵から胚の段階であることから、生物個体としては確立していない状態とみなされ、動物愛護の視点から実験によって必要以上に生物に苦痛を与えることを避けるためにも適していると考えられる。

2. 供試生物種

本試験においては、ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) を用いた。

この魚種は、OECDのテストガイドラインをはじめとする、魚類毒性試験の多くの標準法において指定または推奨生物種となっており、幅広く試験に用いられている。

今回の試験に使用したゼブラフィッシュは、独立行政法人国立環境研究所において、7世代以上継代飼育された個体を使用した。

このゼブラフィッシュは、卵から孵化するまでの期間が約4日間である。一方、魚類毒性試験に多く使用されている別の魚種であるメダカ (*Oryzias latipes*) は、卵から孵化まで8~10日を要する。このことから、ゼブラフィッシュは、卵から胚発生を経て摂餌前の仔魚に至るまでの段階に与える影響を、より短期間で把握することが出来るという利点がある。

3. 試験方法

3. 1 試験に用いる受精卵の採取

(1) 親魚の飼育条件

親魚の飼育は、温度が $25 \pm 1^\circ\text{C}$ に設定された室内に設置した約55 Lのガラス水槽中で行った。飼育に用いる水は、(独)国立環境研究所環境リスク研究棟の淡水処理装置で処理された“調温清浄濾過水 (以後「飼育水」)”を約300 mL/minの流速で連続して水槽内に注入・排水して流水式とした。

採卵に用いる親魚は、誕生後4~12ヶ月程度の個体を使用した。採卵前の期間は、オスとメスを別々の水槽に隔離し、1水槽あたりオス約30個体、メス約20個体の密度で飼育した。

(2) 受精卵の採取条件

① 親魚のペアリング

試験のために採卵する前日の17時前後に、オスとメスを同じ産卵用水槽中に移動させた。産卵用の水槽はガラス製で容量10 Lのものを3個用意し、沈降卵である事、及び親魚が食べるのを防ぐため、水槽の底には直径1~1.5 cmのガラスビーズを敷き詰めた。また、1水槽あたり個体数は、オス10個体前後、メス6個体前後とし、使用する水は上述の親魚の飼育と同じ飼育水を用いた。

その後、水槽全体を暗箱で覆い、暗条件として翌日まで静置した。

② 産卵の開始

採卵時には、前日に用意した水槽を覆っている暗箱を取り外し、明条件とすることが刺激となり産卵行動が開始される。この明条件への変化によって放卵・放精が行われ、その後1.5時間程度の中に、受精卵が得られた。

③ 採卵

放卵後、受精卵は水槽の底に敷き詰めたビーズの隙間に落ち込み、親魚からの接触を受けなくなる。放卵終了後、産卵用水槽から親魚を取り除き、水槽中のガラスビーズとともに、卵を目合い2 mm程度のステンレスネット上に移し、ネットを通過した卵を回収した。

(3) 受精卵の選別

回収した卵は、未受精卵を含むため、実体顕微鏡下で観察し受精卵を選別した。受精の判定は、卵の中が空洞や白濁していないこと、かつ細胞分裂による細胞塊が確認できること、形が球形でゆがみのないことなどに基づいて行った。

また選別された受精卵は、胚発生段階が原腸陥入完了前のものを試験に用いることから、産卵のために暗条件から明条件に変化させた後、4時間以内に試験水への曝露が開始されるように作業を行った。

3.2 曝露方法

(1) 試験溶液の調整

希釈系列における最高濃度は、EC50等の指標値の計算に十分な阻害が生じる濃度とした。なお、毒性が弱く十分な阻害を生じさせるために高濃度が必要となる場合には、「100 mg/L」、または「対象物質の水溶解限度」を最大濃度とし、これ以上の濃度における試験は行わないこととした。

最低濃度は阻害率に対照区との有意差がなくなり、NOECが算出できる濃度とした。なお、希釈における公比は2で設定した。

また、1濃度区における繰り返し数は、4とした。

サンプル水および希釈に用いる飼育水は、試験開始前に温水浴によって試験温度である $26 \pm 1^\circ\text{C}$ まで加温してから使用した。

(2) 曝露条件

曝露方式：半止水式（48時間毎換水）

曝露期間：9日間

曝露容器：ガラス製カップ（ $\Phi 50 \times 55$ mm）

試験液量：50 mL／カップ

連数：2カップ／濃度区

供試生物数：15個体／カップ

試験温度： $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$ （曝露装置のインキュベーターで調温）

pH : 6.5~8.5

溶存酸素濃度 : 溶存酸素濃度が酸素飽和度の60~100%の範囲 (およそ5mg/L以上)

照明 : 明期 : 暗期 = 16 : 8の長日条件

給餌 : なし

(3) 換水方法

換水は曝露容器中の試験水を、容量の約90%についてピペットで除去した後、新たに調整した試験水を追加することで行った。除去した供試後の水は、別容器に貯留して水質の測定を行った。

3.3 観察記録

(1) 観察・測定項目

① 生物

24時間毎に観察 [孵化, 死亡 (孵化前, 孵化後), その他 (形態異常, 行動異常等)]

② 水質

試験開始時および48時間毎の換水時に測定 [pH, 溶存酸素濃度, 水温]

(2) 観察測定方法

① 生物

生物の状態に関する観察においては、以下の点を主な視点として総合的に判断を行った。

卵の死亡判定指標 (器官形成前) [卵黄の白濁, 胚の萎縮]

(器官形成後) [心臓の拍動, 体の動き]

仔魚の死亡判定指標 [遊泳, ヒレの動き, 口の開閉, 心臓の拍動, 血流の有無, 体の白濁]

形態異常の判別 [発生停止, 眼球形成不全, 脊索異常, 水泡]

行動異常の判別 [体勢維持不能, 遊泳不能等]

② 水質

pH [ガラス電極法 (HORIBA社 D-55)]

溶存酸素濃度 [隔膜電極法 (HORIBA社 D-55)]

水温 [棒状標準温度計]

(3) 記録項目

上記の観察結果から、以下の点について記録を行った。

[生物] 死亡数, 生存卵数, 生存仔魚数

[水質] 曝露前のサンプル水の水質, 曝露後のサンプル水の水質

3.4 試験成立の条件

以下の条件に該当する場合は、試験は不成立であったとみなした。

- ・ 曝露開始1日目の生存卵数に対して、孵化した数が85%未満であった場合
- ・ 溶存酸素濃度が飽和酸素濃度の60%未満であった場合
- ・ 曝露装置内の温度が24.5~27.5℃の範囲を超えた場合

4. 生物影響指標の計算

生物影響の指標としては、以下の三点を対象とした。

- ・ 孵化率

- ・ 仔魚生存率
- ・ 繁殖率

4.1 孵化率

曝露した受精卵に対して孵化した仔魚の数（供試卵数と死亡卵数の差）の割合（％）として算出した。

4.2 仔魚生存率

孵化した仔魚の数に対して、9日目の試験終了に生存していた仔魚の数の割合（％）として算出した。

4.3 繁殖率

孵化率と仔魚生存率の積として割合（％）を算出した。

4.4 半数阻害濃度(EC50)の算出

繁殖率を試験濃度の対数値との関係としてプロットし、濃度依存的に関係が変化する部分の回帰式から繁殖率が50%となる濃度を求め、半数阻害濃度とした。

なお、繁殖率は各試験区の繁殖率（Bt）を対照区の繁殖率（Bc）で補正した値

$[Bt \div Bc \times 100]$ として計算した。

4.5 無影響濃度(NOEC)の算出

対照区と各濃度区と繁殖率についての多重比較をDunnett's testで行い、対照区と繁殖率に有意差がみられなくなる最高濃度をNOECとした。

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
分担研究報告書

水環境中の医薬品の存在実態調査及び環境影響評価ガイドラインの
各パラメーターの妥当性の検討

研究分担者 東京都健康安全研究センター 鈴木俊也

研究要旨

本研究で調査対象とした医薬品は OTC として汎用されている解熱鎮痛消炎剤や抗アレルギー薬、高血圧治療薬や糖尿病治療薬等の生活習慣病の治療薬、精神科用の医薬品、既に海外等で検出事例がある医薬品等合わせて 105 成分である。固相抽出-LC/MS 法及び-GC/MS 法による分析法について検討し、水環境中の濃度レベルを測定可能な方法を確立した。現在、検討中のガイドラインの第 I 相の各パラメーターの想定要素の値の妥当性を評価するために、ガイドラインより求めた予測値と下水処理場における実測値とを比較し、ガイドラインの第 I 相の想定要素の値が妥当であることが示唆された。水環境中の医薬品のリスク管理に必要な環境動態に関する情報を整理し、疎水性 (logPow)、水環境中の生分解性、光分解性、残留塩素との反応性を実験的に求めて整理した。

A. 研究目的

水環境中医薬品の存在実態を把握するために、水試料中の医薬品を固相抽出法により抽出・濃縮後、液体クロマトグラフ-質量分析計 (LC/MS) またはガスクロマトグラフ-質量分析計 (GC/MS) を用いて、数～数十 ng/L の濃度をスクリーニング可能な一斉分析法について検討した。

東京都多摩川の河川水は下水処理場の処理下水の割合が多いところでは約 5% にも及ぶことから、我が国の都市河川水の中で、医薬品が比較的高濃度に検出される河川水の一つであり、ガイドラインの適合性を検証するのに適したフィールドであると言える。そこで、多摩川流域において医薬品の主な排出源であるその

流域の下水処理場の流入下水中の医薬品の存在実態調査結果に基づき、検討中のガイドラインにおける各パラメーターの想定要素の値が妥当性の是非について検討した。

医薬品の水環境中動態を予測する上で、疎水性 (logPow) や環境水中での生分解、化学的分解及び光分解等の分解性に関する情報が必要不可欠であることから、それらのパラメーターを実験的に求めることとした。また、下水処理場では病原性微生物の環境水への混入を防止する観点から、河川への放流前に下水処理水を塩素処理等で消毒していることから、医薬品と残留塩素との反応性も調べた。