海生研研報，第15号，41－62，2012
Rep. Mar. Ecol. Res. Inst., No. 15, 41-62, 2012

**総　説**

# 海産生物を用いた毒性試験法および化学物質の有害性評価手法に関する近年の動向

眞道　幸司

# A Review of Toxicity Tests for Marine Organisms and Improvement of the Ecological Hazard Assessment Process for Chemical Substances

Koji Shindo*

**要約**：海産生物を用いた毒性試験法の指針作成に関する国内外での動向，および漁場環境への影響が懸念される化学物質の有害性に関する研究の動向を既往の文献資料に基づいて概説し，海域生態系保全のための化学物質影響評価に寄与する知見を整理した。
概要は以下の通りであった。
１．海外での毒性試験法開発の動向を見ると，海産生物に対する急性および慢性毒性試験法が海域生態系の多種多様な生物種を用いて提案され，その多くが公定法として標準化されている。一方，日本国内では，試験生物となり得る海産生物種の検討が進められているが，日本周辺の海域生態系や多様性に即した実用的な毒性試験法が未だ公定法として標準化されていない。
２．生物・生態学的手法を用いたエンドポイントの検討および毒性の作用様式による分類や構造活性相関による毒性の推定手法の導入によって，化学物質の有害性評価手法の精緻化が進められている。
３．個体の生死での評価だけでなく，個体の生殖能力への影響や生物種が集団として存続できる可能性に与える影響を評価対象にした有害性評価手法の必要性が指摘されている。

**キーワード**：海産生物，生態影響試験，公定法，エンドポイント，有害性評価

**Abstract**: This paper reviews published data on the development of toxicity tests for marine organisms and on the improvement of the ecological hazard assessment process for chemical substances.
The results can be summarized as follows:
1. Various scientific efforts have resulted in toxicity tests based on the response of marine organisms. Some of these test protocols have been standardized by governmental agencies and international organizations. However, in Japan there is no standardized test protocol for domestic marine organisms yet.
2. Novel endpoints to identify toxicity derived from a new bioassay or ecotoxicological method have been reported. Practical toxicological predictions based on the mode-of-action of toxic chemicals or structure-activity relationships of toxicity are available. These innovations enhance the reliability of the ecological hazard assessment process for chemicals.
3. More recent ecotoxicological hazard assessments for chemicals focus on the effects at the population level rather than on acute toxicity at the individual level.

**Key words**: marine organisms, toxicity test, standard methods, test guidelines, endpoint, hazard assessment.

---

（2011年７月８日受付，2012年１月19日受理）
* 財団法人海洋生物環境研究所　実証試験場（〒945-0017 新潟県柏崎市荒浜 4-7-17）
E-mail: shindo@kaiseiken.or.jp

## 目　次

はじめに……………………………………… 42
1．海産生物を用いた毒性試験法に関する国内外での動向…………………………………… 43
1）国外における動向……………………… 43
(1)経済協力開発機構 …………………… 43
(2)国際標準化機構 ……………………… 44
(3)米国環境保護庁 ……………………… 44
(4)米国材料試験協会 …………………… 44
(5)欧州連合 ……………………………… 45
(6)その他の機関 ………………………… 45
2）日本国内における動向………………… 45
(1)環境(庁)省 …………………………… 45
(2)水産庁 ………………………………… 46
(3)日本工業規格 ………………………… 46
2．化学物質の有害性評価手法に関する近年の動向 47
1）新規な試験生物や評価基準の検討………… 47
(1)新規な試験生物の検討 ……………… 47
(2)新規な評価基準の検討 ……………… 50
①体内物質の動態および細胞，組織あるいは器官レベルでの検討 ………………… 51
②個体レベルでの検討 ………………… 52
ⅰ）個体の行動に対する暴露影響の定量化 52
ⅱ）生理活性阻害，内分泌撹乱作用に対する生物検定法の開発 ………………… 52
ⅲ）従来の公定試験法のエンドポイントを簡便化する試み …………………… 53
③個体群レベルでの評価における判定基準の検討 ……………………………… 53
2）毒性の作用様式による分類や構造活性相関による化学物質の有害性評価手法の精緻化…… 55
3．海産生物を用いた生態毒性試験および多様な水産生物を用いた漁場環境モニタリングに基づく化学物質管理の必要性……………………… 56
引用文献……………………………………… 58

## はじめに

海産生物に対する化学物質の有害性に関するデータは，水生生物の保全に係る水質環境基準および水産用水基準の基準値設定といった化学物質管理における根拠になるとともに，様々な海洋汚染における環境影響評価および生態リスク評価に欠くことのできない情報となっている。特に，化学物質の影響評価が化学物質固有の危険性・有害性と環境への排出量および生物への暴露量との双方を考慮したリスクベースに移行した現状では，化学物質が水域生態系に生息する生物に対して長期的な毒性を示さないと予測される予測無影響濃度(Predicted No Effect Concentration : PNEC)と，環境中に残留が予想される予測環境濃度(Predicted Environmental Concentration : PEC)との比較によって化学物質影響のリスクが評価される。PNECの導出において急性毒性値あるいは慢性毒性値を求める必要があるため，試験生物を用いた毒性試験が化学物質影響のリスク評価に必要不可欠となっている。

しかし，国際的な影響力を持つ毒性試験指針である経済協力開発機構(OECD)テストガイドラインや，それに準じて日本国内で現在実施されている環境省の生態毒性試験は淡水生物を試験対象とした公定法である。淡水魚と海産魚の間で化学物質に対する感受性が必ずしも一致しない(Leung *et al.*, 2001)，広塩性生物を用いた界面活性剤などの数種の化学物質に対する毒性試験において急性毒性値が塩分に伴って変化した(若林，2003a)との報告が見られ，化学物質の海産生物への影響を評価するためには，海産生物を用いた毒性試験を実施するべきではないかとの指摘がある(角埜，2005)。また，淡水生物を試験対象とした公定法は，海域における化学物質の生態毒性評価に単純に適用できるものではないと考えられている(柏田・岡村，2005)。

近年，漁網防汚剤，船底塗料等に含まれる殺生物剤，油流出事故等の海洋汚染問題や海洋における生物多様性への関心の高まりを契機として，海域生態系に対する化学物質の影響評価の重要性が指摘されている(角埜，2005)。また，環境省(2011)では，海域が陸域から流入する各種の化学物質の終着場であることから，海産の魚介類はそれらの影響を受けやすい環境に生息していると考えている。一方，水産庁(2010)では，海域に生息する魚介類を持続的に利用する水産業を発展させるために，海域における化学物質の有害性評価を踏まえ，漁場環境を保全することが重要な課題となっている。

本稿では，海産生物を用いた毒性試験法の指針作成の国内外での動向，および漁場環境への影響が懸念される化学物質の有害性に関する研究の動向を既往の文献資料に基づいて概説し，海域生態

系における化学物質管理の体系化に寄与する知見を整理した。

なお，本稿の作成に際して引用した文献資料は，科学雑誌データベース，Current Contents（Agriculture，Environmental Science分野：米国ISI社）およびScience Direct（米国Elsevier社）から「海産生物，生態影響試験，公定法，エンドポイント，有害性評価」，ならびにそれらの英語訳等を検索キーワードに用い，2010年４月から2011年３月までに入手できた過去10年程度の資料である。また，国内外における化学物質の有害性評価手法や毒性試験の公定法に関する知見は，国内外の政府関連機関や公的研究機関が公表する資料を科学雑誌データベースおよびインターネット検索エンジンを用いて検索し，入手できた2011年３月現在の策定状況に基づいた。

**１．海産生物を用いた毒性試験法に関する国内外での動向**

生物に対する化学物質の毒性試験法は，OECDのテストガイドライン，国際標準化機構（ISO）および米国材料試験協会（ASTM International）が定めた試験法，米国環境保護局（U.S.EPA）やカナダ環境省などの各国政府が関係省庁で取りまとめた試験法が知られている。これらの多くが公定法もしくはそれに準ずる試験法となっており，試験の方法，条件および推奨する生物種などが詳細に記載されている。

資料を入手できた試験法のうち，試験生物として海産生物種を用いた毒性試験法を第１表に示した。

**１）国外における動向**

**(1)経済協力開発機構**

OECDでは，化学物質の毒性試験法として「Guidelines for the Testing of Chemicals」が策定されている（OECD iLibraryホームページ；http://www.oecd-ilibrary.org/）。しかし，このテストガイドラインは加盟国間での化学物質の自由貿易に際して化学物質の性状を共通の方法で評価し，物

**本報文に記載される略号一覧**

| 略称 | 正式名称，語句 | 初出ページ |
|---|---|---|
| ASTM International | 米国材料試験協会（American Society For Testing and Materials） | 43 |
| BCF | 生物濃縮係数（Bioconcentration Factor） | 56 |
| ISO | 国際標準化機構（International Organization for Standardization） | 43 |
| Kow | 水-オクタノール分配係数 | 56 |
| $LC_{50}$ | 半数致死濃度（Median lethal concentration） | 45 |
| NOEC | 無影響濃度（No Observed Effect Concentration） | 46 |
| OECD | 経済協力開発機構（Organization for Economic Co-operation and Development） | 42 |
| OPPTS | U.S.EPAの策定する毒性試験につけられるテストガイドライン番号の頭文字 | 44 |
| PEC | 予測環境濃度（Predicted Environmental Concentration） | 42 |
| PNEC | 予測無影響濃度（Predicted No Effect Concentration） | 42 |
| QSAR | 定量的構造活性相関（Quantitative Structure-Activity Relationship） | 55 |
| REACH | 化学物質の登録，安全評価，認可および制限に関する欧州議会・理事会規則（Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals） | 45 |
| TG | OECDの策定する毒性試験につけられるテストガイドライン番号の頭文字 | 44 |
| TSCA | 米国有害物質規制法（Toxic Substances Control Act Chemical Substance Inventory） | 44 |
| U.S.EPA | 米国環境保護庁（United States Environmental Protection Agency） | 43 |

性情報を共有するために策定された手法であったため，策定当初は海産生物を試験対象に想定していなかった。

現行のテストガイドラインでは，TG203：魚類急性毒性試験，TG204：魚類延長毒性試験のように，「推奨する試験生物は淡水産であるが海産魚の使用を制限しない」と記載されるもの（1992年７月17日更新），TG212：魚類の胚・仔魚期における短期毒性試験のように，「推奨する試験生物は淡水産であるが，可能な海産魚として*Menidia peninsulae*（タイドウォーターシルバーサイド），*Clupea harengus*（タイセイヨウニシン），*Gadus morhua*（タイセイヨウダラ），*Cyprinodon variegatus*（シープスヘッドミノー）」を記載するもの（1998年９月21日更新）がある。また，TG210：魚類の初期生活段階毒性試験のように，「推奨する試験生物として海産種にシープスヘッドミノーおよび*Menidia*属を記載するが，他の海産魚種を制限していない（1992年７月17日更新）」と記載が変更されているものもある（第１表）。

現在のところ，海産植物プランクトンを用いた試験法は策定されていない。また，甲殻類に対する毒性試験の策定において，海産カイアシ類の*Acartia tonsa* を試験生物とした変態阻害，繁殖阻害および幼生の成長阻害を指標とした試験が検討されている。

### (2) 国際標準化機構

ISOでは，化学物質に汚染された環境試料を評価するための試験法のうち，生物学的な手法として「ISO Standard TC147 Water quality SC５ Biological methods」が策定されている（ISO Products ISO Standardホームページ；http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc.htm）。現在のところ，珪藻 *Skeletonema costatum*[*1] を推奨種とする藻類生長阻害試験（ISO 10253），海産カイアシ類*A. tonsa* を試験生物とした急性毒性試験（ISO 14669）および海洋性発光細菌 *Vibrio fischeri* を用いた急性毒性試験（ISO 11348－３ Microtox® Test）が策定されている（第１表）。しかし，海産魚類を用いた試験法は策定されていない。

### (3) 米国環境保護庁

U.S.EPAでは，有害物質規制法（TSCA）および汚染防止法に基づく化学物質管理での有害性評価のため，化学物質の生態毒性試験法「Ecological Effects Test Guideline OPPTS 850」を策定している（U.S.EPA OCSPP テストガイドラインホームページ；http://www.epa.gov/ocspp/pubs/frs/home/draftguidelines.htm）。OPPTS 850[*2] には，珪藻 *S. costatum*を用いた海産藻類成長阻害試験（OPPTS 850.5400），海産アミ類の*Mysidopsis bahia*（OPPTS 850.1035, OPPTS 850.1350），端脚類４種（OPPTS 850.1740）およびクルマエビ属３種（OPPTS 850.1045）を推奨種とした甲殻類に対する毒性試験，シープスヘッドミノー，アトランティックシルバーサイド，タイドウォーターシルバーサイドを推奨種とした魚類毒性試験（OPPTS 850.1075, OPPTS 850.1400, OPPTS 850.1500）が策定されている（第１表）。また，*Crassostrea gigas*（マガキ）のウンボ期幼生に対する急性毒性試験OPPTS 850.1025），マガキ，*Crassostrea virginica*（アメリカガキ），*Mercenaria mercenaria*（ホンビノスガイ）あるいは*Mytilus edulis*（ヨーロッパイガイ複合種[*3]）の受精卵を用いた二枚貝胚発生急性毒性試験（OPPTS 850.1055）などの二枚貝類に対する毒性試験法を掲載している（第１表）。さらに，生態リスク評価におけるエンドポイントとして近年注目されている個体群レベルの毒性影響[次章２)-（２）に記載]に対するメソコズム試験法（OPPTS 850.1950）を提案している。

### (4) 米国材料試験協会

ASTM Internationalでは，民間・非営利の国際標準化・規格設定機関として試験法規格「ASTM Historical Standard」を定めており，化学物質に汚染された環境試料を評価するための生物学的な試験法を策定している（American Society for Testing and Materials International ホームページ；http://www.astm.org/Standard/index.shtml）。Environmental Toxicology Standards[*4] では，海産の

---

*1：試験法が作成された当時，*Skeletonema costatum*として分類されてきたが，現在，いくつかの種に分けるべきとの議論がある。

*2：OPPTS 850はすべて，U.S.EPA OCSPP テストガイドラインホームページにて閲覧および入手が可能であり，各試験法の詳細は，ダウンロードした資料に基づいた。

*3：試験法が作成された当時，*Mytilus edulis*をムラサキイガイとしたが，現在はヨーロッパイガイと分類され，さらに，いくつかの種に分けるべきとの議論がある。

*4：Environmental Toxicicology Standardsはすべて，ASTM International ホームページにて有償入手が可能であり，各試験法の詳細は，ダウンロードした資料に基づいた。

植物プランクトン，甲殻類，魚類だけでなく，海藻類，二枚貝類，多毛類，ウニ類などの毒性試験法を掲載しており，現在のところ，海産生物に対する急性および慢性毒性試験法を最も網羅的に提案している（第１表）。また，底質汚染に対する底生生物毒性試験（ASTM E1611-00）の提案や慢性毒性試験の実施規模の簡略化を意図した試験法（ASTM E2317-04）の提案なども特徴的である。

### ⑸欧州連合

欧州連合（EU）では，化学物質の登録，安全評価，認可および制限に関する欧州議会・理事会規則（Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals : REACH）に基づく化学物質管理において，化学物質の有害性評価のために当該化学物質の環境に対する有害性データの提出を義務づけている（ECHA，2009）。生態毒性に関する試験法はOECDテストガイドラインやASTM Historical Standardに準拠するが，試験における推奨種を引用した試験法に対して限定する場合が多い。海産生物を推奨生物として記載する試験は，魚類の胚・仔魚期における短期毒性試験（2001/59/EEC C.15 Fish）と底性生物を用いた底質毒性評価試験の２つの試験法のみとなっている（第１表）。2001/59/EEC C.15 Fish では，OECD TG212に準拠し，推奨種は淡水産であるが，海産魚としてタイドウォーターシルバーサイド，タイセイヨウニシン，タイセイヨウダラ，シープスヘッドミノーの計４種を可能としている。底質毒性評価試験では，海産端脚類５種を用いた底質毒性試験（ASTM E1367-03e１），海産および汽水性多毛環形動物を用いた底質毒性試験（ASTM E1611-00）を承認し，採用している（第１表）。また，EUでは，REACH規則の実験動物福祉の観点に基づき，動物実験の実施を極力避けるため，他国の公定法に基づいた信頼性の確保できる既存データを有効活用し，やむを得ない場合は系統学的に下位の生物の使用を検討するという考え方（例えば，魚類→甲殻類→バクテリアと検討）で有害性評価が進められている。さらに，EUはOECDに対してTG203魚類急性毒性試験における実施条件の追加を提案し，藻類と甲殻類の生物試験結果を踏まえて，魚類の毒性試験を藻類と甲殻類の半数致死濃度（$LC_{50}$）以下の設定でのみ実施するかどうかを決定するという試験魚の使用削減スキームの採用や魚類受精卵を用いた急性毒性試験（The Fish Embryo Test）へTG203を代替えすることを働きかけている（OECD, 2010）。

### ⑹その他の機関

カナダ環境省では，海洋性発光細菌 *V. fischeri* を用いた急性毒性試験（Biological Test Method EPS １/RM/24），底質埋在性端脚類を用いた底質毒性試験（同 EPS１/RM/26），棘皮動物の *Strongylocentrotus purpuratus*（アメリカムラサキウニ）や*Dendraster excentricus*（カシパンの一種）などウニ類５種の胚発生における亜急性毒性試験（同 EPS１/RM/27），スピオ科多毛類 *Polydora cornuta* を用いた汚染底質の生残成長阻害試験（同 EPS１/RM/41）が策定されている（Environmental Canada ホームページ）。

また，OSPAR協定（Convention for the Protection of the Marine Environment of the North-East Atlantic）では，加盟国の沿岸域での海洋環境モニタリングにおいて，海産生物を用いた毒性試験［ⅰ.シープスヘッドミノーを用いた毒性試験，ⅱ.底生のヨコエビ亜目（*Corophium volutator*）を用いた毒性試験，ⅲ.ヨコエビ亜目（*Corophium sp.*）を用いた底質毒性試験等］が生物検定法として用いられている（OSPAR Commission，2006）。

## ２）日本国内における動向

### ⑴環境（庁）省

日本国内では，化学物質審査規制法に盛り込まれた生態系に配慮した化学物質管理に際して，藻類，動物プランクトンおよび魚類を用いた毒性試験の結果から算出したPNECを用いて化学物質の生態リスクを評価する「生態毒性試験」が環境省の主導で行われてきた。今のところ，公定法として標準化された生態毒性試験における試験生物種は淡水生物に限られるが，試験結果に基づく物質自体の使用禁止や使用制限などを通じて海洋への流入が制御される効果が期待されている（楠井，2005）。一方，水生生物の保全に係る水質環境基準値の導出に際して求められる毒性データには，信頼性の保証された試験法を用いた毒性試験の結果が不可欠である。しかし，海産生物に対する化学物質の毒性データは淡水生物に比べ，極端に少ない状況にある（楠井，2005）。これは，海産生物を用いた毒性試験法が国内で標準化されていないことも一因であるため，国立環境研究所化学物質環境リスク研究センターが設置した「海生生物テ

ストガイドライン検討会」は，海産魚類（マダイ *Pagrus major* の後期仔魚もしくは体長30±10mm程度までの稚魚）および海産エビ類（クルマエビ *Marsupenaeus japonicus* のポストラーバ期幼生以後の段階で全長30±10mm程度までの個体）の急性毒性試験法[案]を2005年11月に公表し，水生生物の保全に係る環境基準値の導出にこの２つの毒性試験を用いることを提案している（国立環境研究所化学物質環境リスク研究センター 海生生物テストガイドライン検討会，2005）。現在，中央環境審議会水環境部会では，水生生物保全環境基準専門委員会において，海生生物テストガイドライン検討会が提案した海産魚類および海産エビ類を用いた急性毒性試験法を含め，国内の海域および汽水域に生息し，漁獲・放流あるいは養殖の対象となっている魚介類やその餌生物について，生物種と試験手法とを精査することによって，海産生物を用いた国内での標準試験法となるテストガイドラインの整備が検討されている（中央環境審議会水環境部会 水生生物保全環境基準専門委員会，2011）。

### (2) 水産庁

水産庁では，漁場環境の保全と持続的な水産魚介類の利用を目的に，1980年代後半から海産魚を対象とした毒性試験法の開発事業を進め，日本の沿岸域に生息する海産生物を対象とした急性毒性試験法やリスク評価に必要な慢性毒性値および無影響濃度（No Observed Effect Concentration：NOEC）導出のための標準試験法となる手法を検討してきた。例えば，これには，海産動物プランクトンの急性毒性試験法開発（堀ら，2001）がある。最新の海産生物毒性試験指針は2010年３月に取りまとめられ（水産庁，2010），急性毒性試験法として（ｉ）植物プランクトンに対する生長阻害試験，（ⅱ）シオダマリミジンコ *Tigriopus japonicus* 幼生を用いた遊泳阻害試験，（ⅲ）スジエビモドキ *Paraemon serrifer* あるいはアシナガモエビモドキ *Heptacarpus futilirostris* のゾエア期幼生を用いた遊泳阻害試験，（ⅳ）クルマエビ *Marsupenaeus japonicus*，アシナガモエビモドキ等の稚エビに対する急性毒性試験，（ｖ）マダイあるいはシロギス *Sillago japonica* の稚魚に対する急性毒性試験を記している（第１表）。また，慢性毒性試験法として（ｉ）シオダマリミジンコを用いた繁殖阻害試験，（ⅱ）マミチョグ *Fundulus heteroclitus* に対する初期生活段階毒性試験，（ⅲ）マミチョグ未成熟魚を用いた成熟・再生産阻害試験，（ⅳ）ジャワメダカ *Oryzias javanicus* あるいはマミチョグの受精卵魚類全生活環毒性試験を記している（第１表）。この指針では，日本国内で入手が可能で，飼育と繁殖が比較的容易な海産生物種を用い，OECDテストガイドラインが提唱する淡水生物の３分類群（藻類，甲殻類，魚類）に相当する海産生物を対象とした急性および慢性毒性試験法が取りまとめられている。また，検討段階では，クロアワビ *Haliotis discus discus* およびアコヤガイ *Pinctada fucata martensii* の稚貝や海産魚の餌生物となる多毛類（イシイソゴカイ *Perinereis nuntia vallata*）を用いた急性毒性試験および初期生活段階に絞った短期間の毒性試験についても言及されている（水産庁，2008）。

### (3) 日本工業規格

日本工業規格では，工場排水試験法（JIS K0102）に「魚類による急性毒性試験」を掲載している。これは，工場排水の放流水域における生物への影響を予測するために必要な基礎データを得ることを目的としており，有害な排水が放出された場合に顕著な影響が予想される高次栄養段階の魚類を対象にした試験法となっている（並木，1982）。試験に推奨される海産魚として，入手と飼育管理の容易なハゼ類（種名記載なし），クサフグ *Takifugu niphobles*，メジナ *Girella punctata* あるいはボラ *Mugil cephalus* の幼魚およびアミメハギ *Rudarius ercodes* が明記されている。

以上，この章では海産生物を用いた毒性試験法の指針作成の国内外での動向を取りまとめた。海外での生態毒性試験開発の動向を見ると，

①海産生物に対する急性および慢性毒性試験法が海洋生態系に生息する生物で網羅的に提案され，その多くが公定法として標準化されている

②急性毒性（個体の生死）という個体レベルでの影響評価だけでなく，個体群（population）および個体の生殖能への影響評価の重要性が重視される傾向にある

③動物愛護および３Rs理念（**R**eduction：実験動物の使用を減らす，**R**efinement：実験動物の苦痛や痛みを減らし，取扱いを向上させる試験への改善，**R**eplacement：既存の動物実験から，動物を使用しない試験，あるいは遺伝系統学的に

下位の生物を使用する試験への変更)の観点から，魚類稚魚・成魚を用いた毒性試験の代替法を開発する
という特徴が見られる。

一方，日本国内での生態毒性試験法開発の動向を見ると，海産生物に対する毒性データの蓄積が求められ，海産生物を用いた公定法を国内で標準化する検討が進められている。しかし，化学物質に対する感受性や応答が高く，国内の海域に生息するもしくは国内で入手が可能な生物種であり，飼育管理がし易く,学会や社会での認知度が高い，といった条件を充足する海産生物種が試験生物として未だ標準化されていない状況にある。

また，国外では試験法として標準化されている底質毒性試験や個体群レベルの毒性影響評価手法の確立，慢性毒性試験の実施規模の簡略化を意図した試験法の整備，および実験動物福祉の観点等について，海外から国際的な整合性を求められる可能性がある。

## ２．化学物質の有害性評価手法に関する近年の動向

### １)新規な試験生物や評価基準の検討

多数の化学物質による生態影響を評価・管理するためには，特定の化学物質を物理化学的に測定する従来の手法だけでなく，生物・生態学的手法に基づき，生物応答を捉える生物検定法(いわゆるバイオアッセイ)や毒性試験の進展が不可欠であると考えられている(須藤，2008)。化学物質の有害性評価の精緻化に関して，生物・生態学的手法の視点から，新たな試験生物としての海産生物の選定や新たな評価基準としてのエンドポイント[*5]の検討について，以下に知見をまとめた。

#### (1)新規な試験生物の検討

水生生物への影響評価を少数の生物種の組み合わせで簡便に行うためには，試験生物種の選定において，(ⅰ)食物連鎖上のつながりがある，(ⅱ)相互に分類学的隔たりがある，(ⅲ)化学物質に対する感受性や応答が高い，(ⅳ)入手と飼育管理がし易い，(ⅴ)学会や社会での認知度が高い，等の必要条件が挙げられる(浦野，2008)。また，環境省では，「水生生物の保全に係る水質環境基準値」の導出に必要な海産生物テストガイドラインの整備において，OECDテストガイドラインに倣い，生態系の機能に着目して生物種を分類し，その中で取扱いがしやすく，かつ感受性や応答が比較的高いものを供試生物種として選定するとしている。また，できるだけ安定した毒性試験結果を得るために，試験生物の安定的な供給体制を整備する必要があるとしている(中央環境審議会水環境部会 水生生物保全環境基準専門委員会，2011)。

日本周辺の海域に生息し，国内で入手が可能な生物種であり，飼育管理がし易く，試験生物となり得る海産生物種を検討した既往知見は以下の５例であった。

柏田・持田(2005)は，有機リン系殺虫剤７種に対する毒性試験に際して，海産養殖における餌生物として汎用性の高い動物プランクトン *Brachionus plicatilis*(シオミズツボワムシ複合種[*6])を用い，200日以上の長期暴露による個体密度の変化，薬物耐性および代謝能力の変化を調べ，試験生物としての適用性を確認した。

小山ら(2009)は，六価クロム，亜鉛，アンモニア，ダイアジノン，ノニルフェノールに対する毒性試験に際して，海産ヨコエビ *Hyale barbicornis*(フサゲモクズ)の仔虫および成体を用いて化学物質５種に対する感受性や応答を成長段階毎に評価し，海産甲殻類を用いた毒性試験法としての標準化を検討した。

小林(2005)は，日本の沿岸域に生息するウニを用いて汚染海水の有害性を評価する生物検定法を考案した。ムラサキウニ，バフンウニ，シラヒゲウニ，ナガウニおよびガンガゼに感受性の種間差は認められないが，生活環での各発生段階では感受性の差が見られ，生殖細胞形成をエンドポイントとした場合に多くの化学物質について感受性が高いことを明らかにしている。また，ウニの種類を変えることで，１年中，実験を行うことができるという利点がある。この成果は，棘皮動物の胚に対する急性毒性試験[ASTM E1563-98(2004)]にも採用されている。

伊藤ら(2006)は，銅，ビスフェノールAおよびノニルフェノールに対する毒性試験に際して，海産自由生活性線虫 *Prochromadorella* sp.１を用いて

*5：毒性学において,エンドポイントは「影響の有無の評価基準として用いる観察あるいは測定可能な応答や反応」を意味している。
*6：著者は*Brachionus plicatilis*を単一種として”シオミズツボワムシ”と記している。現在，複数の種に分けるべきとの議論があり，筆者が“シオミズツボワムシ複合種”に改めた。

## 第１表　海産生物を用いた毒性試験法の現状

| 名称 | | OECD | ISO | U.S.EPA | ASTM | EU | 日本国内 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Guidelines for the Testing of Chemicals | TC147 Water quality SC5 Biological methods | Ecological Effects Test Guideline OPPTS 850 | ASTM Historical Standard | REACH Test Guidance | 環境省<br>水生生物の保全に係る水質環境基準の導出 | 水産庁<br>海産生物毒性試験指針 | 日本工業規格<br>工場排水<br>試験法<br>JIS K0102 |
| 試験法 | 藻類を対象 | | ［急］ISO 10253 Algal Growth Inhibition Test (*Skeletonema costatum*[*1]または*Phaeodactylum tricornutum*) | ［急］850.5400 Algal Toxicity, Tiers I and II (*Skeletonema costatum*[*1]) | ［急］E1218-97a Static 96h Toxicity Tests with Microalgae（海産微細藻類96時間生長阻害試験） | | （ISO10253 に準拠した藻類生長阻害試験として珪藻*Skeletonema costatum*[*1]を用いた手法を検討中） | ［急］生長阻害試験（珪藻 *Skeletonema costatum*[*1]とするが，他種も複数種選択するのが望ましい[*2]） | |
| 試験法 | 甲殻類を対象 | ・Development and reproduction test（*Acartia tonsa*）を検討中<br>・Larval development test（*Acartia tonsa*）を検討中 | Draftとして［急］ISO 14669 Acute toxicity to the crustacean, static test & semi-static Test（*Acartia tonsa*）が提案され，検討中 | ・［急］850.1035 Mysid Acute Toxicity Test（*Mysidopsis bahia*）<br>・［慢］850.1350 Mysid Chronic Toxicity Test（*Mysidopsis bahia*）<br>・［急］850.1045 Penaeid Acute Toxicity Test（クルマエビ属3種[*3]）<br>・［急］850.1740 Whole sediment acute toxicity Test for marine invertebrates.（海産端脚類4種[*4]） | ・［急］E1463-92(98) Static and Flow-Through Acute Toxicity Tests with Mysids<br>・［慢］E1191-03 Life-Cycle Toxicity Tests with Saltwater Mysids<br>・［急］E1367-99 10-day Static Sediment Toxicity Tests with Marine and Estuarine Amphipods（端脚類5種[*5]による底質毒性試験）<br>・［慢］E2317-04 Microplate-Based Life-Cycle Toxicity Tests with a Marine Meiobenthic Copepod（マイクロプレートでの小規模全生活環毒性試験: *Amphiascus tenuiremis*） | （底質毒性評価試験においてASTM E1367-03e1を承認している） | ・［急］海産エビ類急性毒性試験（クルマエビのポストラーバ期あるいはミシス期を用いた手法を提案）<br>・（ISO 14669に準拠した餌生物に対する海産動物プランクトン急性毒性試験法としてシオダマリミジンコの使用を検討中） | ・［急］遊泳阻害試験（シオダマリミジンコ）<br>・［慢］繁殖阻害試験（シオダマリミジンコ）<br>・［急］稚エビ急性毒性試験（クルマエビ，アシナガモエビモドキ，スジエビモドキ）<br>・［急］エビ類ゾエア幼生遊泳阻害試験（スジエビモドキ，アシナガモエビモドキ） | |
| | | OECD | ISO | U.S.EPA | ASTM | EU | 環境省 | 水産庁 | 日本工業規格 |
| 試験法 | 魚類を対象 | ・［急］TG203魚類急性毒性試験（推奨種は淡水産であるが，海産魚を制限していない）<br>・［急］TG204魚類延長毒性試験（推奨種は淡水産であるが，海産魚を制限していない）<br>・［慢］TG210魚類の初期生活段階毒性試験（推奨種はシープスヘッドミノーであるが，*Menidia*属も可。また，他の海産魚種を制限していない）<br>・TG212魚類の胚・仔魚期における短期毒性試験（推奨種は淡水産であるが，可能な海産魚を記載[*6]） | | ・［急］850.1075 Fish Acute Toxicity Test, Freshwater and Marine Fishes（シープスヘッドミノー，アトランティックシルバーサイド，タイドウォーターシルバーサイド）<br>・［慢］850.1400 Fish Early-Life Stage Toxicity Test（推奨種はシープスヘッドミノーであるが，*Menidia*属3種でも可。）<br>・［慢］850.1500 Fish life cycle Toxicity Test（河口域のみを想定し，推奨種はシープスヘッドミノー） | ・［急］E729-96 (2002) Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes,（無給餌の2-8日間急性毒性試験）<br>・［急］E1192-97 (2003) Acute Toxicity Tests on Aqueous Ambient Samples and Effluents with Fishes,（環境水および排水に対する急性毒性試験）<br>・［慢］E1241-98 (2004) Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes（魚類初期生活段階毒性試験） | 2001/59/EEC C.15 Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry stages（OECD TG212に準拠し，推奨種は淡水産であるが，海産魚4種[*6]も可能） | ［急］海産魚類急性毒性試験（マダイ仔魚あるいは稚魚を用いた手法を提案） | ・［急］魚類急性毒性試験（マダイあるいはシロギスの稚魚）<br>・［慢］初期生活段階毒性試験（マミチョグの受精卵）<br>・［慢］成熟／再生産阻害試験（マミチョグの未成熟魚）<br>・［慢］全生活環毒性試験（ジャワメダカあるいはマミチョグの受精卵） | 魚類に対する急性毒性試験（ハゼ類，クサフグ，メジナあるいはボラの幼魚，アミメハギ） |

**第１表（つづき）**

| | | OECD | ISO | U.S.EPA | ASTM | EU | 環境省 | 水産庁 | 日本工業規格 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 試験法 | その他の生物を対象 | | ［急］ISO 11348-3 海洋性発光細菌の急性毒性試験 Microtox® Test,（*Vibrio fischeri*） | ・［急］850.1025 カキ急性毒性試験（セイヨウカキのウンボ幼生）<br>・［急］850.1055 二枚貝胚発生急性毒性試験（推奨種はセイヨウカキであるが，マガキ，ホンビノスガイ，ヨーロッパイガイ複合種も可能と記載）<br>・850.1950 Field Testing for Aquatic Organisms（メソコズムを用いた野外での毒性実験） | ・［急］E724-98 Acute Toxicity Tests Starting with Embryos of four Saltwater Bivalve Molluscs（推奨種は二枚貝4種*7）<br>・［急］E1440-91（2004）Acute Toxicity Test with the Rotifer *Brachionus*（シオミズツボワムシ）<br>・1498-92（1998）Sexual Reproduction Tests with Seaweeds（海藻生殖発芽試験）<br>・E1562-00 Acute, Chronic, and Life-Cycle Aquatic Toxicity Tests with *Polychaetous Annelids*（多毛類の急性，慢性およびライフサイクル水質毒性試験）<br>・［急］E1563-98（2004）Acute Toxicity Tests with Echinoid Embryos（棘皮動物の胚に対する急性毒性試験：ウニ５種*8）<br>・E1611-00 Sediment Toxicity Tests with Marine and Estuarine *Polychaetous Annelids*（海産および汽水性多毛環形動物による底質毒性試験：*Neanthes*属の2種を推奨） | （底質毒性評価試験においてASTM E1611-00を承認している） | （魚介類の餌生物，汽水域の生物について，生物種と試験手法を検討中） | | |
| 出典 | | OECD | ISO | U.S.EPA | ASTM | EU | 環境省 | 水産庁 | 日本工業規格 |
| | | Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems（OECD iLibraryホームページ） | TC147 Water quality SC5 Biological methods（ISO Products ISO Standard ホームページ; ISO, 1995; ISO, 1999） | U.S.EPA Draft OCSPP Test Guidelines ホームページ | American Society for Testing and Materials International ホームページ | Directive 92/69/EEC.（ECB, 1992）<br>Directive 2001/59/EEC.（ECB, 2001）<br>REACH Test guideline（ECHA, 2009） | 中央環境審議会水環境部会水生生物保全環境基準専門委員会（2011）<br>国立環境研究所化学物質環境リスク研究センター 海生生物テストガイドライン検討会（2005） | 海産生物毒性試験指針（水産庁，2010） | 工場排水試験法（並木，1982） |

※2011年3月31日までの情報と入手資料に基づいて作成した。

［急］：急性毒性試験，［慢］：慢性毒性試験

*1：試験法が作成された当時，*Skeletonema costatum*として分類されてきたが，現在，いくつかの種に分けるべきとの議論がある。
*2：他に，*Dunaliella teriolecta, Thalassiosira pseudonana, Phaeodactylum tricornutum, Heterosigma akashiwo, Pavlova lutheri, Isochrysis galbana, Prorocentrum minimum*の７種を推奨している。
*3：*Penaeus aztecus*，*P.duorarum* または，*P.setiferus*の3種
*4：*Ampelisca abdita, Eohaustorius estuarius, Rhepoxynius abronius, Leptocheirus plumulosus* の4種
*5：ヒサシソコエビ科端脚類，ウシロマエソコエビ，スガメソコエビ科端脚類，ニホンドロソコエビ，河口端脚類*Leptocheirus plumulosus*の5種
*6：他に，*Menidia peninsulae*（タイドウォーターシルバーサイド），*Clupea harengus*（タイセイヨウニシン），*Gadus morhua*（タイセイヨウダラ），*Cyprinodon variegatus*（シープスヘッドミノー）が可能との記載あり。
*7：*Crassostrea gigas*（マガキ），*Crassostrea virginica*（アメリカガキ），*Mercenaria mercenaria*（ホンビノスガイ），*Mytilus edulis*（ヨーロッパイガイ複合種）の4種
*8：*Arbacia punctulata*，*Strongylocentrotus droebachiensis*，*S. purpuratus*，*S. droebachiensis*，*Dendraster excentricus* の5種

体長および世代交代に要する時間をエンドポイントにした慢性毒性を評価し，毒性試験法としての標準化を検討した。

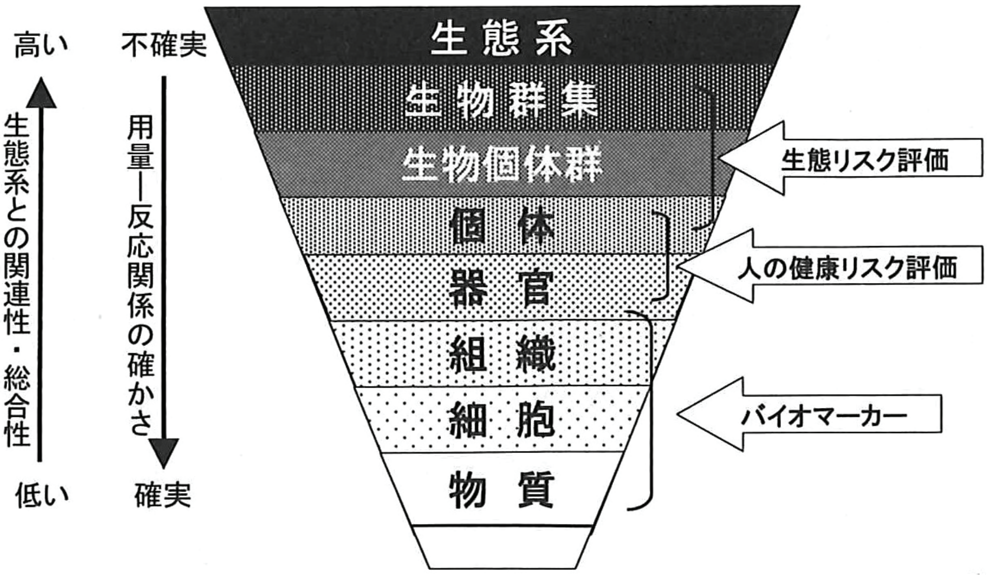
佐合ら(2004)は，ホルムアルデヒドの海産生物に対する急性毒性と水域生態系への影響評価を行うため，珪藻*S. costatum*を用いた植物プランクトン生長阻害試験，シオダマリミジンコを用いた遊泳阻害試験およびシロギス稚魚を用いた魚類急性毒性試験をそれぞれ実施し，ホルムアルデヒドの淡水産生物および海産生物に対する毒性の差異の解明，PNECの推定およびPEC/PNEC比によるリスク評価を行った。既往の淡水産生物との間に$LC_{50}$値，PNECの有意な差異は認められず，PEC/PNEC比は1以下であり，環境中に残留が予想されるホルムアルデヒド濃度は予測無影響濃度に比べて低いことが報告されていた。

### (2) 新規な評価基準の検討

U.S.EPAが提案し，現在広く用いられている生態リスク評価の枠組みでは，多様な生態系の中でリスクを受ける対象も多様なため，影響評価項目となるエンドポイントの選定，および汚染源がどのようにエンドポイントに対して影響を与えるかの記述が重要なプロセスの一つとなっている(U.S.EPA，1998)。

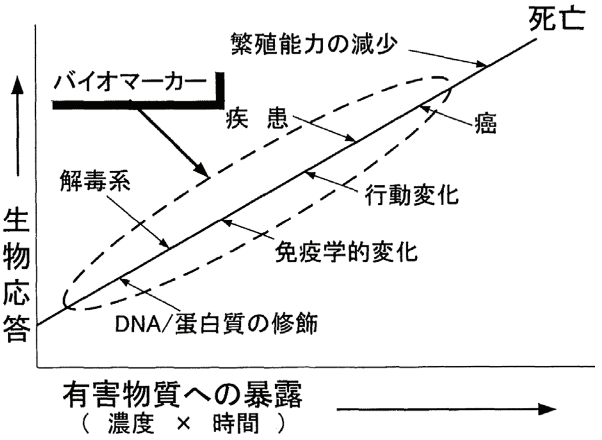
Pastorok and Akçakaya (2002)は生態リスク評価におけるエンドポイントの階層性を示し，エンドポイントと評価手法との適合性および階層ごとの不確実性の度合いを考察している(第1図)。化学物質の生態系に対するリスクを評価する際には，生態系そのものに対して評価することが最も望ましいが，多種多様な生物が複雑な相互関係を持つ生態系への影響を評価することは容易でない。そのため，より簡便に評価できるエンドポイントと評価手法がこれまで選択され，発展してきた(益永，2008)。

生物検定法で利用される体内物質の存在や動態，細胞，組織あるいは器官レベルの応答は，化学物質の暴露影響も鋭敏に，かつ比較的確実な因果関係で捉える事ができる場合が多い。例えば，人為的ストレスあるいは化学物質への暴露によって示される生化学的あるいは細胞学的に測定可能な応答はバイオマーカーと呼ばれ，明確な悪影響が顕在化していない時点での初期暴露を把握する指標，生物学的な毒性を早期に捉える予防的警報として有効である(楠井，2005)と考えられてきた。しかし，体内物質の動態変化やバイオマーカーは，特定の化学物質に対して必ずしも特異的ではなく，生体が恒常性を維持するための正常な応答による変動の場合もあり，有害性の有無を判断する際に課題が残されている(仲山，2006)。一方，器官あるいは個体レベルの応答や観察結果では，物質の動態，細胞，組織あるいは器官レベルの応答に比べ明確に有害な影響を評価できるので，現在採用されている毒性試験の多くが個体レベルでの毒性評価を実施し，化学物質管理に貢献してい




**第1図**　生態リスク評価におけるエンドポイントの階層性

［Pastorok and Akçakaya (2002)の原図を益永(2008)が日本語訳し，一部を加筆修正した］




第２図　生物応答の規模と有害化学物質への暴露量の関連性

［Shugart et al.(1992)の原図を楠井(2005)が日本語訳し，一部を加筆修正した］

る。

さらに近年，個体群がある地域に生存し続けることが重要であるとの判断から，生態系サービスの維持を目的に，生物種が集団として存続できる可能性や種の多様性に与える影響を評価の対象として，生態系や種の持続が不可能なほどの暴露は許容しないという考え方に基づいた個体群レベルの有害性評価についての研究が増えつつある。

細胞，組織あるいは器官のレベルから個体レベルまでの生物応答と有害化学物質への暴露量の関連を概念図に示した(第２図;楠井，2005)。以下，生態リスク評価におけるエンドポイントの階層性に従って，近年の動向をまとめた。

### ①体内物質の動態および細胞，組織あるいは器官レベルでの検討

生体外からの異物の侵入に対して生体が示す分子レベルから組織の形態レベルまでの様々な反応はバイオマーカーとして捉えられており，柏田(2006)は，化学物質，特に農薬の生態リスク評価に用いられる事例を紹介している。生物の発育や再生産への影響に対する物質レベルのエンドポイントとして，生体内でのタンパク質の生理学的応答を網羅的に捉える生体分子解析技術をプロテオミクス(Proteomics)といい，生体内代謝系での代謝物の生理学的応答を網羅的に捉える手法をメタボロミクス(Metabolomics)という(岩橋，2008)。また，生体内でのDNAまたはRNAの発現を網羅的に捉えるゲノミクス(Genomics)という手法も試みられている。宇野ら(2008)はPAHsに暴露した魚類の血清中代謝物の変動をメタボロミクスで解析し，新しい網羅的なエンドポイントの可能性を示唆した。新野ら(2008)は，淡水産単細胞緑藻 *Pseudokirchneriella subcapitata*（旧 名 *Selenastrum capricornutum*）に対する除草剤の藻類生長阻害試験を行い，従来の$LC_{50}$算出とメタボロミクス解析の相似性を解析した。安住(2008)はマイクロアレイを用い，トリブチルスズ化合物(TBT)に暴露したホヤの体内での遺伝子発現の変動を解析し，影響評価を試みている。また，マイクロアレイ技術は既知の化学物質による応答を基に，未知の化学物質あるいは毒性が疑われる化学物質の影響評価にも有用であると考えられている(仲山，2006)。しかし，これらOmics(オミクス)技術は生体内での生理学的応答を網羅的に捉えることができる一方で,多くの場合,ある一つの異物(化学物質など)と明確な因果関係を持つ特異的な発現様式を特定できていない(岩橋，2008)など，課題も指摘されている。

細胞レベルのエンドポイントとして，血液性状や遺伝的因子が報告されている。ゲノムテクノロジーに基づいてDNA/ゲノムレベルでの差異や遺伝子発現の差異や変動をエンドポイントとする報告も見られ，これらの応用が長期毒性予測手法として期待されている(安住，2008)。また，チトクロームP450などの薬物代謝酵素の誘導に関わるmRNA，DNAおよびタンパク質の発現では，特定の化学物質への暴露によって濃度依存的に発現量が増加する等の知見が得られており，それらの誘導量や発現プロファイルが暴露に対するエンドポイントになると期待されている(仲山，2006)。しかし，環境を汚染している化学物質は多種多様であり,作用機構の異なる化学物質が混在するため,毒性発現が複雑化しており，特定の因子だけを測定しても遺伝的要因と環境因子の相関性を明確にできない場合も多く(柏田，2006)，これが遺伝的因子を用いた手法の課題となっている。現在のところ，データを蓄積すべき段階にある(仲山，2006)，と考えられている。

角埜・小山(2004)は，マダイを用いて，カドミウム，TBTおよびナフタレンの毒性試験を行い，赤血球数，ヘマトクリット値，血色素量および平均赤血球容積などの血液性状を指標として汚染物質の影響評価を検討した。８週間の暴露による慢性的な影響のエンドポイントとしてヘマトクリット値が適していること，成長をエンドポイントと

した場合と有為な差異が認められないことを明らかにし，血液性状を指標とした毒性試験法が全生活環毒性試験および初期生活段階毒性試験の代替え可能な試験法として期待できると報告している。

組織レベルのエンドポイントでは，メダカを用いてエストロジェン様およびアンドロジェン様作用物質の影響について精巣卵および卵巣内精子形成の有無，あるいは再生産能力の阻害を指標にして評価する試みが報告されている（林ら，2003）。

**②個体レベルでの検討**

個体レベルでの評価におけるエンドポイントの検討では，個体の行動に対する暴露影響の定量化，医薬品等による生理活性阻害の定量化，内分泌撹乱作用に対する生物検定法の開発，および従来の公定試験法のエンドポイントを簡便化する試み等が進められている。

**ⅰ）個体の行動に対する暴露影響の定量化**

コンピュータの技術進歩によって客観的で高度な画像処理および動画解析が可能となり，個体の行動に対する暴露影響の定量化では，（ⅰ）摂食・ろ過速度の変化，（ⅱ）遊泳速度・運動量の変化，（ⅲ）行動パターン・走光性等の変化，忌避行動，（ⅳ）二枚貝が化学物質の暴露を回避するために殻を閉じる行動，（ⅴ）群れ行動，摂餌行動，繁殖行動の変化等が報告されている（菅谷，2006；大嶋ら，2006）。U.S.EPAの生態毒性データーベースを用いて，無脊椎動物の行動変化をエンドポイントとする毒性データを検索した菅谷（2006）によると，多毛類，甲殻類，二枚貝類，巻貝類およびヒトデ類を含む93種の行動変化に関する毒性データが登録されていた。これらの個体の行動変化をエンドポイントとする利点は，(a)致死濃度以下で現れる亜致死影響の指標であること，(b)計測が検体に非接触で可能なこと等が考えられている。また，補食，被補食，繁殖，敵からの逃避などの個体が示す行動は，生態系内で他者との関係を持ちながら存在する個体が生存を確保する上で不可欠な能力であって，実験室での生死が生態学的な個体の死と一致していないとの視点もある（大嶋ら，2006）。これは，行動が不全になると，生態学的には死に至ったに等しいという「Ecological Death」の概念であり，生態毒性評価に必要な視点であると考えられている（大嶋ら，2006；Scott and Sloman，2004）。

しかし，逃避行動で運動量が増加する場合や体内での生理的作用によって行動が抑制される場合など，平常と暴露時の異常を質的に区別できなければ有害性を評価できない問題点が指摘されている。また，化学物質に対する応答が暴露濃度に依存して連続的に変化するとは限らないことが行動変化の定量化を困難にしている（菅谷，2006）。一方で，行動パターンを動的に解析する手法によって，行動影響の定量化を試みる研究も報告されている（Kwak *et al.*，2002；Shimizu *et al.*，2002）。

**ⅱ）生理活性阻害，内分泌撹乱作用に対する生物検定法の開発**

生物に対する生理活性が強く，意図的に散布される「農薬」は農薬取締法で管理され，食品中への残留基準や水質汚濁に係る農薬登録保留基準に基づいて影響評価が行われている。一方，微量でも生理活性を持ち，意図的に人や畜水産物に投与される「医薬品および動物用医薬品」は薬事法で管理されているが，薬効と安全性のみが評価の対象であり，これまで環境への影響が考慮されることは少なかった。近年，日本国内の水環境中においても，人用および動物用医薬品に由来し，生理活性を持つ微量化学物質の存在が明らかになりつつあり（清野ら，2004），水環境や下水道における医薬品等の汚染実態，分解性や除去特性などの環境中での挙動，生態影響に関する調査研究が進められている（山本，2006）。また，海産生物に対する内分泌撹乱作用の影響実態については，すでに多くの知見が報告されている（山田，2006）。

以上のように，医薬品に由来する化学物質や内分泌撹乱作用を有する物質による環境汚染が明らかにされるに伴って，その有害性評価が求められるようになった。しかし，生理活性阻害，ホルモン様活性あるいは内分泌撹乱作用に対する化学物質の有害性評価は，既存のテストガイドラインや公定法では想定されていない。

現在，EU，米国およびOECDでは，これらの生理活性阻害あるいは内分泌撹乱作用を有する化学物質の管理において，国際条約との整合性をとりつつ，環境影響評価の追加検討や国際標準化を重視したリスクベースの有害性評価への移行が検討されている。ここでは，化学物質の生理活性阻害および内分泌撹乱作用に対する個体レベルでの有害性評価を目的とした生物検定法の国内外での開

発動向を以下にまとめた。

すでに，EUおよび米国では，EU指令(2001/83/EU)もしくは米連邦規制(21CFR part25)によって医薬品の環境影響評価が義務づけられている(新野・斉藤，2009)。その手法や手順は欧州医薬品庁(European Medicine Agency)および米国食品医薬品庁(U.S.Food and Drug Administration)のガイドラインに記載されており，(ⅰ)医薬品の環境中濃度を予測する，(ⅱ)OECDテストガイドラインに従った藻類生長阻害試験，ミジンコ繁殖阻害試験および魚類初期生活段階毒性試験を実施することにより生物への無影響濃度を予測する，(ⅲ)環境中濃度と生物への無影響濃度を比較してリスクを評価する，という基本構成を持っている(U.S.Food and Drug Administration，1998；EMEA，2006)。しかし，医薬品類は微量で強い生理活性を持ち，生理活性やエストロジェン活性などが有害性評価の対象となるため，個体の生死を判定基準とする従来の急性毒性試験の結果だけでは有害性の評価できないと考えられ，ライフサイクル全体や成長段階を考慮した生物検定法や慢性毒性的なエンドポイントを検討して行く必要があると指摘されている(新野・斉藤，2009)。また，多くの医薬品では，環境中での挙動に未だ不明な点が多く，紫外線分解などによる分解産物の存在も想定される。特に，動物用医薬品の環境影響評価を困難にしている要因の一つに，動物用医薬品が環境中に放出される前に投与した動物の体内を経由するため，動物用医薬品の有効成分自体だけでなく投与後の代謝物あるいは分解産物を考慮しなければならないことがあげられている(遠藤，2003)。

一方，日本国内では，動物用医薬品に関して，「動物用医薬品の承認審査資料の調和に関する国際協力(International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products：VICH)」への参画によって，EU，米国および日本に共通の環境毒性・環境影響評価方法を確立するための討議が行われている段階である(遠藤，2003)。しかし，人用の医薬品に由来する化学物質に関しては，毒性評価や化学物質管理に関する国内の動向を報告した文献は見当たらない。

内分泌撹乱作用を有する物質については，OECDにおいてテストガイドラインの開発が進められている。既に，メダカ等を推奨種とした魚類短期間繁殖アッセイ(TG229)，バイオマーカー検出系の確立しているメダカ等を推奨種とした化学物質の魚類に対するエストロゲン活性，アンドロジェン活性，アロマターゼ阻害作用を調べるための21日間スクリーニング試験(TG230)および幼若ホルモン様作用の検出を追加するオオミジンコ繁殖影響試験(TG211)の改訂(Annex 7)が承認されたほか，無脊椎動物，両生類および魚類を用いたパーシャルライフサイクル試験やフルライフサイクル試験の開発が進められている。一方，日本国内では，環境省の施策方針「EXTEND2010」に従って，試験評価手法の確立と野生生物に対する影響評価の実施が進められている(環境省，2010)。また，日本は環境省を通じてOECDでのテストガイドライン開発に参画しており，新たな試験法や評価手法の提案や毒性試験の結果を提供するなどの国際的な協力を行っている(環境省，2010)。

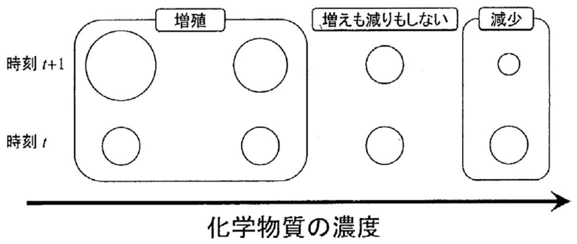
### ⅲ)従来の公定試験法のエンドポイントを簡便化する試み

金子ら(2000)は，OECD TG201やU.S.EPA OPPTS 850.5400に準拠した藻類生長阻害試験における毒性評価を迅速に行うために，簡便に測定が可能な酸素発生速度をエンドポイントとして評価し，簡便で迅速な藻類毒性試験法としての標準化を検討した。特殊な機器や手法を必要とせず，従来の公定法に比べ短時間に結果を得られることから，化学物質汚染の一次スクリーニング手法への導入が期待されている。

### ③個体群レベルでの評価における判定基準の検討

化学物質による生物への影響は，遺伝子，細胞，組織などのミクロなレベルから個体，個体群，生態系などのマクロなレベルまで，いくつかのレベルで捉える事ができるが，現在のOECDテストガイドラインやそれに準拠した環境省の生態リスク評価は，個体の生存可能性や繁殖が評価の対象であり，単一の化学物質の影響を少数の生物種で詳細に調べる方向(個体レベルの評価)に発展してきた(加茂ら，2009)。個体レベルの評価では，死亡率，繁殖率，成長阻害などの個体に現れる影響からPNECを推定し，PECと比較評価される。

一方，化学物質の利用による生態系への有害な影響をある程度は許容するが，生態系や種の持続が不可能なほどの暴露は許容しないという考え方に基づいて，生物種が集団として存続できる可能




**第３図**　個体群レベルの化学物質影響の概念図
（原典：加茂ら，2009）

性や種の多様性に与える影響を評価対象にした「個体群レベルの評価」についての研究が増えつつある。一例に，生物種が集団として存続する可能性に化学物質が与える影響評価手法として，個体群サイズの増減は個体数の増減速度の速い遅いおよびその正負符号で表すことができ，個体数増減速度が個体の繁殖率と死亡率の均衡で決まるため，生物に対する影響の総合的な指標となりうるという考え方がある（第３図；加茂ら，2009）。ある生物種の個体数増減の速度を毒性試験によって求め，毒性データと数理モデルを用いて単位時間あたりに個体数が増減しない濃度として無影響濃度を推定し，予測環境中濃度と比較評価することで，個体群レベルの評価を試みる事例が報告されている（Lin *et al.*,2005；Meng *et al.*,2006）。

また，U.S.EPA（1998）では，個体群レベルの生態リスク評価でのエンドポイントとして，複数種の毒性データから統計的に算出した「５%の種の地域個体群が存続できなくなること」が既に用いられている。

一般的に，よりミクロなレベルで化学物質による生物への影響を捉える場合ほど，評価試験の実施は容易で繰り返すことが可能になるため，不確実性を減らすことができる。一方，個体群レベルの評価では，実施が困難で影響の定量化などに課題が残っており，研究報告事例が少ないために結果の再現性や信頼度について大きな不確実性を伴うのが現状である。独立行政法人産業技術総合研究所で行われた重金属５種の生態リスク評価の結果（中西ら,2006;中西ら,2007;中西・恒見,2008;中西・小野,2008;中西ら,2008）では，個体レベルの評価結果（NOECに基づく５%の種に対して何らかの個体影響が見られると推定される濃度とPNECの比較）と個体群レベルの評価（毒性データから統計的に算出した５%の種の地域個体群が存続できなくなると推定される濃度とPNECの比較）に何らかの関係性を見い出すことはできなかった（第２表）。

また，個体レベルのリスクは個体群レベルのリスクより低い濃度で現れる場合が多く，化学物質に対する感受性や応答が高い一部の生物種に与えられた影響は，生物間の相互作用を介して個体群レベルあるいは群集レベルに影響を与えることになる。そのため，不確実性の少ない個体レベルの影響と個体群レベルの影響に関係性を見い出して外挿し，個体群レベルのリスクを推定することを安易にはできないとの報告も見られる（Forbes *et al.*, 2001;Stark *et al.*, 2004）。

中西ら（2008）は，現在の化学物質管理政策では，対象とする化学物質に対し最も強く影響を受ける種を選定し，リスクが懸念される濃度の推定を行い，その濃度以下に環境中の濃度を制御しようとする考え方（濃度の管理）が支配的で，対策が有効に作用して生態系がどの程度回復するか，回復量は投資に見合うものであるかどうかはほとんど考慮されてないと指摘している。また，生態リスク評価は，個体，個体群，生態系といった，いくつかの生態学的な階層レベルから捉えるべきであり，個体レベルでいかなる影響も見られない無影響濃度や個体群レベルで個体数の増減速度が０となる濃度をプロットした「種の感受性分布」を作成して，個体レベルでの評価と個体群レベルでの評価の双方から感受性の異なる95%の種が保護できる許容濃度を推定する管理方法を新規に提案し

**第２表**　重金属５種の個体レベルと個体群レベルの生態リスク評価結果

| 物　質 | 個体レベルでのリスク | 個体群レベルでのリスク |
|---|---|---|
| 鉛 *1 | あり | 懸念するレベルにはない |
| カドミウム *2 | あり | ないとは言えない |
| ニッケル *3 | あり | 懸念するレベルにはない |
| クロム（VI） *4 | 懸念する状況ではない | 評価せず |
| 亜鉛 *5 | あり | あり |

**個体レベルでのリスク**：５%の種に対して何らかの個体影響が見られると推定される状況，**個体群レベルでのリスク**：５%の種の地域個体群が存続できなくなると推定される状況
**出典**　*1: 中西ら（2006），*2: 中西ら（2007），*3: 中西・恒見（2008），*4: 中西・小野（2008），*5: 中西ら（2008）

ている。

中央環境審議会水環境部会(2010)では，今後，亜鉛のみならず他の物質についても水生生物保全に関わる水質環境基準の設定を計画しており，水質環境基準値の設定に際して，魚介類およびその餌生物の個体群レベルでの存続に対する影響の防止を目的とした基準値を算定することを明らかにしている。

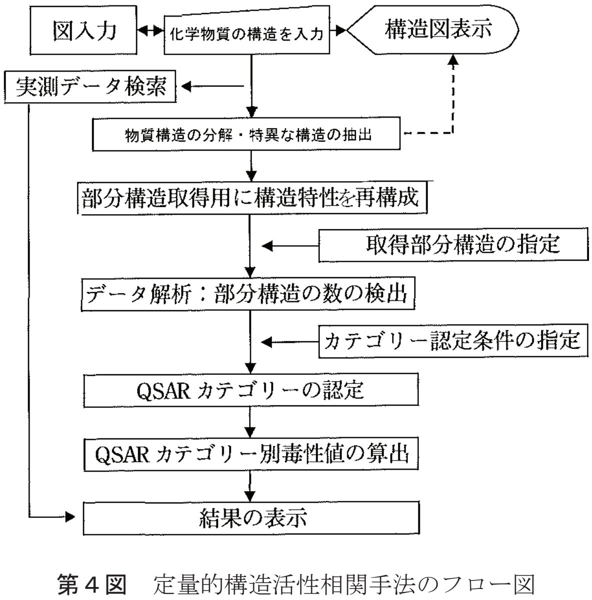
**2）毒性の作用様式による分類や構造活性相関による化学物質の有害性評価手法の精緻化**

化学物質の生体に対する毒性発現は，生体組織と化学物質との相互作用であり，その相互作用は３様式に分類されると考えられている。３つの相互作用とは，(a)生体膜と化学物質との非特異的相互作用，(b)タンパク質活性基と化学物質との相互作用，(c)特異的受容体部位と化学物質との相互作用，であると考えられている(後藤・高松，2008)。また，Bradbury *et al.*(1990)やMcKim *et al.* (1987) は，化学物質とその作用様式との関係を，魚類への11の生理学的測定項目による急性毒性に基づいて分類している。その結果では，化学物質が，作用様式に基づいて，(ⅰ)麻酔作用非極性物質，(ⅱ)麻酔作用極性物質，(ⅲ)呼吸不全作用物質，(ⅳ)呼吸組織刺激作用物質，(ⅴ)アセチルコリンエステラーゼ阻害作用物質，(ⅵ)膜Na+チャンネルの制御を阻害するピレスロイド系殺虫剤様物質，(ⅶ)神経系のClイオン調整を阻害するシクロジエン系殺虫剤様物質，(ⅷ)全身の感覚器官の感覚を過敏にさせるストリキニン様物質の８タイプに分類できると報告している。化学物質の基本構造が類似すると，生体組織と化学物質との相互作用や作用様式も類似すると考えられており，構造の類似性を利用した毒性の推測が行われてきた。

近年，欧米では，有害性を評価すべき化学物質が数千種という膨大な数になっているにもかかわらず試験を実施できる機関が限られる状況が生じ，既存の毒性データを活用し，化学物質の有害性試験データの不足を補うための手段が求められていた。また，実験動物福祉の面から生物を用いた毒性試験実施の軽減が求められている。このような背景から，OECDを中心に定量的構造活性相関(Quantitative Structure-Activity Relationship：QSAR)を利用した化学物質の有害性やリスクの推定手法の重要性が認識されるようになっている(吉岡，2008)。現在，構造活性相関手法は，化学物質の有害性試験データの不足を補い，化学物質のリスク評価を効率的に行う手段の一つとして位置づけられ，各国の化学物質管理に取り入れられており，詳細な試験が必要とされる有害性の高い物質を抽出するための迅速なスクリーニング法として検討すべき化学物質の優先順位付けや分類に役立てられている。

構造活性相関とは，化学物質の構造および構造によって決まる物理化学的性質と化学物質の生理活性との相関性を捉える手法であり，薬学における生理活性の解明などに利用されてきた。特に，化学物質の構造および物理化学的性質と生理活性との相関性あるいは関連性の度合いを定量的に捉える場合は「定量的構造活性相関」として区別している(若林，2003b)。定量的構造活性相関では，特異的な部分構造の有無やその存在数を入力することによって，化学物質の構造や特定の官能基の存在と有害性との関係を既存のデータに基づいて予測することができ，既存の物質，新規の物質を問わず，毒性試験を行わずとも，化学物質の有害性を推測することができる(第４図)。

現在，U.S.EPAではEcological Structure Activity Relationships (ECOSAR)とよばれるQSARを用いた生態毒性推定プログラムが実施されている(U.S.EPA，2011)。ECOSARでは，淡水の緑藻類，ミジンコおよび魚類に対するすべての化学物質の急性毒性および慢性毒性を予測することが可能で




**第４図**　定量的構造活性相関手法のフロー図

[吉岡(2008)の原図に筆者が加筆し，一部の表記(※)を変更した；※SMILESの分解→物質構造の分解]

あるとされており，TSCAでの規制対象物質の85%について実際の毒性試験の結果とQSAR予測値が一致することが示されている(若林，2003b)。ECOSARによって，TSCAの対象となる既存化学物質(8,234物質)の規制に際して必要となる有害性の予測データの整備が行われ，約95%が７つの化学物質群（中性有機化合物，エステル類，酸，アミン類，フェノール類，アルデヒド類，アニリン類）に分類されるとともに，生態毒性が高いと予測された数百の化学物質が抽出されている(若林，2003b)。

EUでは，REACH原則に基づく化学物質管理において，U.S.EPAの開発したECOSARを利用しており，生態リスク評価におけるQSARの利用について，「魚，ミジンコ，藻類への毒性において一定の条件内で利用可能であり，データの評価，追加試験が必要かどうか，どのような追加試験を行うかといった意思決定過程での補完などに用いることができる」としている。また，ミジンコおよび魚類に対する化学物質の急性毒性および慢性毒性の予測結果に従って化学物質の有害性をカテゴリー分類するプログラムが導入されている(European Commission，1996)。

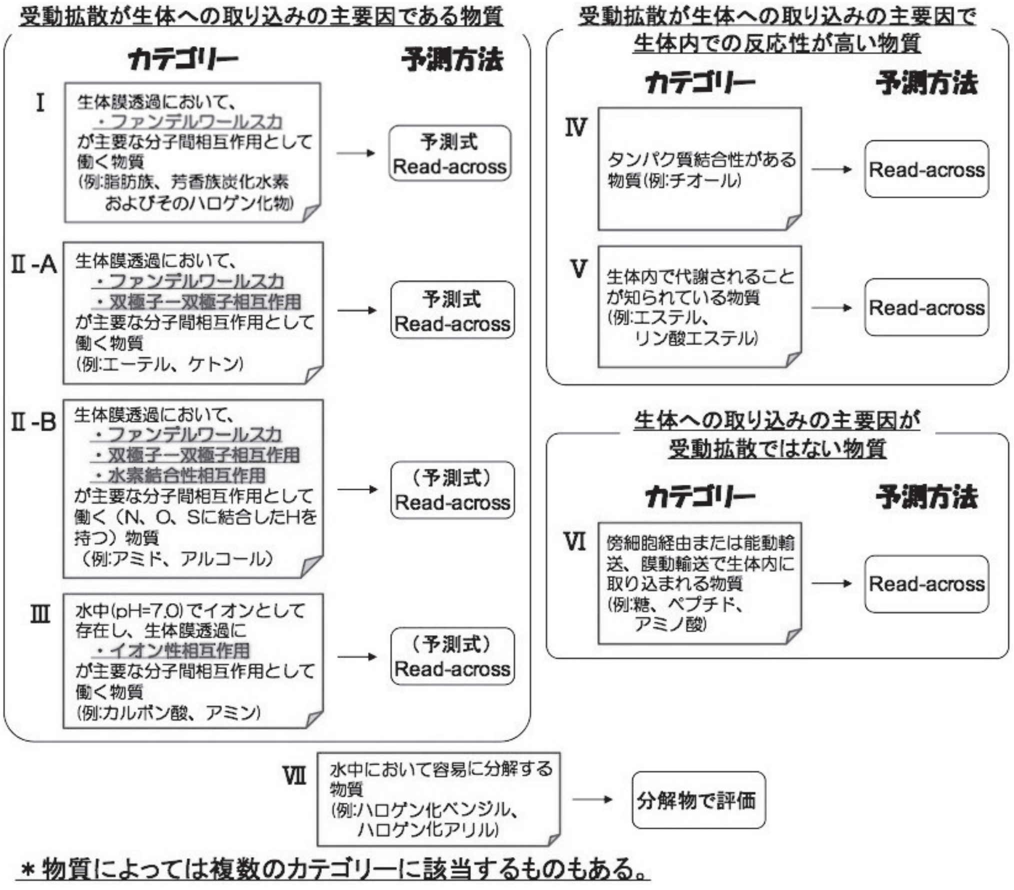
一方，経済産業省では，化学物質総合評価管理プログラムの一環として既存化学物質安全性点検事業を実施し，化学物質の分解性や蓄積性を推定するQSARプログラム「化学物質特性予測システム」を開発しており，化学物質の生体膜透過におけるメカニズム(受動拡散，能動輸送など)および生体内における反応性(タンパク質結合性，代謝反応)の違いに基づく構造活性相関手法によって化学物質の魚類における生物濃縮性の予測が行われている(独立行政法人製品評価技術基盤機構 化学物質管理センター，2009)。予測手法には，水－オクタノール分配係数(Kow)と生物濃縮係数(Bioconcntration Factor：BCF)が既知な物質によるKow値とBCF値の相関式を用いて予測対象物質のBCFを推定する方法(予測式)，KowとBCFが既知な物質と予測対象物質との間の分子構造および物理化学的性状の類似性から，予測対象物質を類縁物質(分子構造，物理化学的性状が類似する物質)のカテゴリーに分類し，類縁物質のBCFの平均値を用いて予測対象物質のBCFを類推する方法(Read-across法)があり，この取り組みによって，既存化学物質に指定されている物質の約30%の生物濃縮性やBCFが推定され，８カテゴリーに分類された(第５図：独立行政法人製品評価技術基盤機構，2010)。また，環境省では，急性毒性試験をミジンコに対して実施した346物質，メダカに対して実施した272物質およびU.S.EPAのファットヘッドミノーに対する580物質それぞれの毒性データに基づいて生態毒性を予測するシステム(KAshinhou Tool for Ecotoxicity：KATE)を開発し，毒性部分構造と管能基の組み合わせに基づいた化学物質の生態毒性(魚類急性毒性試験の半数致死濃度およびミジンコ遊泳阻害試験の半数影響濃度)の予測が行われている(吉岡，2008)。今後，藻類プログラムの追加や作用機序との対応づけによる信頼性の向上が検討されている。

QSARは費用や手間のかかる生態毒性試験を実施する代わりに，物理化学的な性状に関する既存のデータを用いて，既存あるいは新規の物質を問わず，化学物質の水生生物に対する毒性を推定できる手段である。しかし，QSARは化学物質の生物に対する作用機序や毒性発現の作用様式に基づく既知の関連性を利用して毒性を推定する手法であるため，限られた関連づけに従って解析され，毒性発現の多様な作用機序や作用様式をすべて網羅することはできない。特に，農薬や医薬品などの特異な生理活性を持つ化学物質については，毒性の予測において，実際の毒性試験の結果とQSAR予測値に大きな差異が生じる懸念が指摘されている(若林，2003b)。また，海産生物に対する生態毒性の予測を可能にするQSARプログラムは現在のところ，開発されていない。現在，各国でQSARによる予測手法の汎用性や信頼性の評価と精緻化が進められている。

## ３．海産生物を用いた生態毒性試験および多様な水産生物を用いた漁場環境モニタリングに基づく化学物質管理の必要性

本報告では，海産生物を用いた毒性試験法に関する国内外での動向および化学物質の有害性評価手法の精緻化について，既往の文献資料に基づいて概説し，海域生態系保全のための化学物質影響評価に寄与する知見を整理した。

海産生物を用いた毒性試験法の確立に関しては，海産生物に対する毒性試験データの蓄積，感受性や応答が鋭敏な試験生物の選定や評価基準の精緻化，慢性毒性試験法の簡便化・迅速化等が日本国内における課題となっている。また，国際的な整合性をとりつつ，日本周辺の海洋生態系や多




**予測方法**

**(i)予測式を用いた推定**

KowとBCFが既知な物質のデータで作成したlogPowを記述子とした予測式をを用いて生物濃縮性の最大値(logBCFmax)を算出し，「予測対象物質の生物濃縮性はlogBCFmax未満である」と仮定して，予測対象物質の生物濃縮性を定性的に予測する。

**(ii)Read-across法による物質群の類推**

KowとBCFが既知な物質と予測対象物質との間の分子構造および物理化学的性状の類似性から，予測対象物質を類縁物質(分子構造，物理化学的性状が類似する物質)のカテゴリーに分類し，類縁物質のBCFの平均値から予測対象物質のBCFを推定する。なお，予測対象物質の生物濃縮性は，類似物質か２物質以上ある場合は定量的に，１物質の場合は定性的に予測される。

**第５図**　生物濃縮性におけるカテゴリー分類の実施例

(原典：独立行政法人製品評価技術基盤機構 化学物質管理センター，2009)

様性に即して，汎用的かつ実用的な毒性試験法として普及させる必要があると考えられる。

化学物質の有害性評価に関しては，生物・生態学的手法を用いた新規なエンドポイントの検討，毒性の作用様式による分類や構造活性相関による毒性の推測手法の導入等によって評価手法の高度化が国内外で進められている。また，個体の生死による評価だけでなく，個体の生殖能力への影響や生物種が集団として存続できる可能性に与える影響を評価対象にした有害性評価手法の必要性が欧米を中心に指摘され，評価手法の検討が進められている。

日本における第三次生物多様性国家戦略では，生物多様性を損なう要因の一つとして，「化学物質の生態系に対する毒性影響の恐れ」を指摘している。一方，化学物質による汚染を未然に防止して生物多様性に配慮した水産施策を実施するためには，漁場となる海域における有害な化学物質の

存在の有無と化学物質が生態系に与える毒性影響を把握し，影響の度合いを評価する必要がある。

しかし，これまでに我が国で行われてきた生態毒性試験や海域におけるモニタリング調査には，水産資源に対する影響や持続可能な漁業生産の維持という観点から漁場環境をどの程度の水準に保つべきかという水産業の立場での視点が乏しい。特に，多種多様な水産生物を含む海産生物に対する生態毒性試験や漁場となる多様な海域環境を想定したモニタリング調査に関する知見が不足している。海域の生態系は陸水域以上に複雑な系であり，生物の多様性も富んでいることから，従来の藻類，甲殻類，魚類等の限られた生物種を用いた生態毒性試験だけでなく，水産業上重要な軟体動物や海藻類など，他の動植物群による試験法についても確立することが必要と考えられる。また，沿岸，沖合，内湾あるいは干潟などの多様な漁場環境に生息する多種多様な水産生物から海域の類型毎に数種を選び，それらの生物種を用いたモニタリング手法を開発することによって，各種の化学物質が海域生態系に与える様々な毒性影響を海域の類型毎に把握・評価することが可能になると考えられる。

海産生物を用いた生態毒性試験を充実させ，多様な海域での水産生物を用いたモニタリング調査に基づいて漁場環境の化学物質管理を体系化することは，科学的な影響実態の把握と影響予測を可能にし，漁場環境の有害化学物質による汚染を未然に防止して生物多様性に配慮した水産施策の実施に資するものであり，「多様な漁場環境の保全」や「持続可能な漁業生産の維持」に貢献するものと考えられる。

## 謝　辞

本稿をご校閲くださった，東京大学名誉教授 日野明徳博士，財団法人海洋生物環境研究所顧問 城戸勝利博士，同理事 清野通康博士，木下秀明博士に深謝いたします。本稿は，水産庁委託事業「平成22年度漁場環境・生物多様性保全総合対策委託事業(漁場環境化学物質影響総合評価事業)」の一環として実施したものであり，関係各位に謝意を表します。

## 引用文献

American Society for Testing and Materials International ホームページ. ASTM Historical Standard. http://www.astm.org/Standards/environmental-toxicology-standards.html#E47.01.(2010年12月１日ダウンロードで入手)

安住 薫 (2008). ホヤを用いた海洋汚染化学物質の新規影響評価系. 環境毒性学会誌, **11**, 95−98.

Bradbury, S., Henry, T. and Carlson R. (1990). Fish acute toxicity syndromes in the development of mechanism specific QSARs. Karcher W, Devillers J (ed.), Practical applications of quantitative structure-activity relationships (QSARs) in environmental chemistry and toxicology. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, p295-315.

中央環境審議会水環境部会 (2010). 第24回議事水生生物保全環境基準専門委員会資料２－２ 水生生物の保全に係る水質環境基準の項目追加等に係る検討内容について. http://www.env.go.jp/council/09water/y090-24/mat02_２.pdf. (2010年12月 1 日ダウンロードで入手)

中央環境審議会水環境部会 水生生物保全環境基準専門委員会 (2011). 資料６－１ 水生生物保全に係る環境基準等設定の考え方の見直しについて. http://www.env.go.jp/council/09water/y094-08/mat06_１.pdf. (2011年３月１日ダウンロードで入手)

独立行政法人製品評価技術基盤機構 化学物質管理センター (2009). カテゴリーアプローチによる生物濃縮性予測に関する報告書. 36p, http://www.safe.nite.go.jp/kasinn/qsar/qsar_pdf/category_approach%５B２A%５D.pdf. (2010年12月14日ダウンロードで入手)

独立行政法人製品評価技術基盤機構 (2010). カテコリーアフローチによる化学物質の魚類における生物濃縮性予測手法に関する報告書(カテコリーII-A)の公表について.http://www.safe.nite.go.jp/kasinn/qsar/qsar_pdf/category２A_gaiyou.pdf. (2010年12月14日ダウンロードで入手)

Environmental Canada. Biological Test Method

Series. http://www.ec.gc.ca/faunescience-wildlifescience/default.asp?lang=En&n=０BB80E７B-１.（2011年３月１日ダウンロードで入手）

遠藤裕子（2003）. 動物用医薬品の環境影響評価. 動物抗菌会報，**25**，１-11.

ECHA（European Chemicals Agency）（2009）. REACH Test guideline. http://guidance.echa.europa.eu/guidance_en.htm.（2010年12月 １ 日ダウンロードで入手）

ECB（European Chemicals Bureau）（1992）. Commission Directive 92/69/EEC. http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31992L0069:EN:HTML.（2010年12月１日ダウンロードで入手）

ECB（European Chemicals Bureau）（2001）. Commission Directive 2001/59/EEC. http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2001:225:0001:0333:EN:PDF.（2010年12月１日ダウンロードで入手）

European Commission（1996）. Technical Guidance Document in Support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for New Notified Substances and Commission Regulation（EC）No 1488/94 on Risk Assessment for Existing Substances. http://ecb.jrc.ec.europa.eu/documents/TECHNICAL_GUIDANCE_DOCUMENT/tgdpart２_２ed.pdf.（2010年12月１日ダウンロードで入手）

EMEA（European Medicine Agency）（2006）. Guideline on the Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use. EMEA/CHMP/SWP/4447/00.

Forbes, V., Calow, P. and Sibly, R.（2001）. Are Current Species extrapolation models a good basis for ecological risk assessment? *Environ. Toxicol. Chem*., **20**, 442-447.

後藤幹保・高松みつ子（2008）. エコトキシコロジー研究の方法論と展開について -1970年代のSCOPE，SGOMSECの会議からREACHに至る流れを振り返り，今後を展望する-. 環境毒性学会誌, **11**, 41-50.

林 彬勒・萩野 哲・籠島通夫・芦田昭二・岩松鷹司・東海明宏・吉田喜久雄・米澤義堯・冨永衛・中西準子（2003）. メダカ（*Oryzias latipes*）精巣卵の定量的検出のための新手法（小片化法）. 水環境学会誌，**26**，725-730

掘 英夫・立石晶浩・山田 久（2001）. 海産動物プランクトンによる有害物質急性毒性試験法の開発. 環境毒性学会誌，**４**, 73-86.

ISO Products ISO Standardホームページ. ISO Standard TC147 Water quality SC５ Biological methods. http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_tc_browse.htm?commid=52972.（2010年12月 １ 日ダウンロードで入手）

ISO（1995）. Water quality. Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricornutum*. International Standards Organization, Geneva, ISO 10253，８ pp.

ISO（1999）. Water quality. Determination of acute lethal toxicity to marine copepods（*Copepoda, Crustacea*）. International Standards Organization, Geneva, ISO 14669, 16pp.

伊藤 靖・大嶋雄治・磯部貞佑・Elnabris, K.・島崎洋平・本城凡夫（2006）. 海産自由生活性線虫 *Prochromadorella* sp.１ の生涯試験を用いた銅，ビスフェノールAおよびノニルフェノールの毒性評価. 環境毒性学会誌，**９**, 23-29.

岩橋 均（2008）. 環境オミクスの現状と将来. 環境毒性学会誌，**11**，57-61.

角埜 彰（2005）. 海産魚を用いた毒性試験. 環境科学会誌，**18**，131-136.

角埜 彰・小山 次朗（2004）. マダイの血液性状を指標とした汚染物質の影響評価. 環境毒性学会誌，**７**, 81-95.

加茂将史・対馬孝治・内藤 航（2009）. 化学物質の生態リスク順応的管理による新たな管理手法の提案. 環境科学会誌，**22**，219-225.

金子栄廣・竹内英樹・平山公明（2000）. 酸素発生速度に基づく迅速な藻類毒性試験. 環境科学会誌，**３**，３-９.

環境省（2010）. 化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応 ― EXTEND 2010 ― 平成22年７月. http://www.env.go.jp/chemi/end/extend2010/ extend2010_full.pdf.（2010年12月１日ダウンロードで入手）

環境省（2011）. 海洋生物多様性保全戦略　平成23年３月. http://www.env.go.jp/nature/biodic/kaiyo-hozen/senryaku/honbun.pdf.（2011年３月29

日ダウンロードで入手)
柏田祥策 (2006). 魚類を用いた農薬環境科学の最前線. 環境毒性学会誌, **9**, 69-80.
柏田祥策・持田和男 (2005). シオミズツボワムシに対する農薬暴露影響. 環境科学会誌, **18**, 127-128.
柏田祥策・岡村秀雄 (2005). 海生生物を用いたバイオアッセイと海洋生態系保全のあり方. 環境科学会誌, **18**, 145-154.
清野敦子・古荘早苗・益永茂樹 (2004). わが国の水環境中における人用・動物用医薬品の存在. 水環境学会誌, **27**, 685-691.
小林直正 (2005). ウニを用いた海水汚染のバイオアッセイ. 環境科学会誌, **18**, 155-167.
国立環境研究所化学物質環境リスク研究センター海生生物テストガイドライン検討会(2005). 海産魚類及び海産エビ類の急性毒性試験法 (案) (第1版). 138-153
小山次朗・土寄大地・宇野誠一 (2009). 海産ヨコエビによる生態毒性試験. 第15回バイオアッセイ研究会・日本環境毒性学会合同研究発表会, 2009年10月3日, 東京, 講演要旨集 2B-8, p64.
楠井隆史 (2005). バイオアッセイと海洋環境管理. 環境科学会誌, **18**, 169-177.
Kwak, I., Chon, T., Kang, H., Chung, N., Kim, J., Koh, S., Lee, S. and Kim, Y. (2002). Pattern Recognition of the movement tracks of Medaka (Oryzias latipes) in response to sub-lethal treatments of insecticide by using artificial neural networks. *Environ. Pollut*., **120**, 671-681
Leung, K., Morritt, D., Wheeler, J. Whitehouse, P., Sorokim, N., Toy, R., Holt, M. and Crane, M. (2001). Can saltwater toxicity be predicted from freshwater data ? *Mar. Poll. Bull*., **42**, 1007-1013.
Lin, B., Tokai, A. and Nakanishi, J. (2005). Approaches for Establishing Predicted-No-Effect-Concentrations for Population-Level Ecological Risk Assessment in the Context of Chemical Substances Management. *Environ. Sci. Technol*., **39**, 4833-4840.
McKim, J., Bradbury, S. and Niemi, G. (1987). Fish acute toxicity syndromes and their use in the QSAR approach to hazard assessment. *Environ. Health. Perspect*., **71**, 171-186.
益永茂樹 (2008). 生態リスク評価の枠組み. 化学物質と環境, **91**, 1-3.
Meng, Y., Lin, B., Tomonaga, M. and Nakanishi, J. (2006). Simulation of the population-level effect of 4-nonylphenol on the wild Japanese medaka *(Oryzias latipes)*. *Ecol. Modell*., **197**, 350-360
中西準子・蒲生昌志・小野恭子・宮本健一 (2007).「詳細リスク評価書シリーズ13 カドミウム」(新エネルギー・産業技術総合開発機構, 産総研化学物質リスク管理研究センター共編), 丸善株式会社, 東京, 240pp.
中西準子・小林憲弘・内藤 航 (2006).「詳細リスク評価書シリーズ9 鉛」(新エネルギー・産業技術総合開発機構, 産総研化学物質リスク管理研究センター共編), 丸善株式会社, 東京, 200pp.
中西準子・恒見清孝 (2008).「詳細リスク評価書シリーズ19 ニッケル」(新エネルギー・産業技術総合開発機構, 産総研化学物質リスク管理研究センター共編), 丸善株式会社, 東京, 300p
中西準子・小野恭子 (2008).「詳細リスク評価書シリーズ21 六価クロム」(新エネルギー・産業技術総合開発機構, 産総研化学物質リスク管理研究センター共編), 丸善株式会社, 東京, 300pp.
中西準子・内藤 航・加茂将史 (2008).「詳細リスク評価書シリーズ20 亜鉛」(新エネルギー・産業技術総合開発機構, 産総研化学物質リスク管理研究センター共編), 丸善株式会社, 東京, 280pp.
仲山 慶 (2006). トキシコゲノミクスによるPOPs等有害化学物質の生態影響評価. 環境毒性学会誌, **9**, 81-86.
並木 博 (1982). 魚類による急性毒性試験.「詳解工場排水試験方法」(日本規格協会編), 日本規格協会, 東京, pp451-455.
新野竜大・原田智隆・北條俊章・山田正二郎・大西一寿・佐藤保夫・斉藤穂高 (2008). 化学物質の作用機序を評価するための緑藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) のメタボローム解析. 環境毒性学会誌, **11**, 83-89.
新野竜大・斉藤穂高 (2009). 化学物質管理と生態影響試験. 水環境学会誌, **32**, 17-21.
OECD iLibraryホームページ. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2: Effects on

Biotic Systems. ISSN: 2074-5761, http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-2-effects-on-biotic-systems_20745761.（2010年12月１日ダウンロードで入手）

OECD.（1992）. TG203 Fish, acute toxicity test. Organization for Economic Co-operation and Development, Paris, Test Guideline Series No.203, 9p

OECD.（1992）. Fish, early-life stage toxicity test. Organization for Economic Co-operation and Development, Paris, Test Guideline Series No. 210, 18p.

OECD.（2010）. Project 2.23: The Threshold Approach for Acute Fish Toxicity Testing, OECD Work Plan for the Test Guideline Programme（July 2010 Edition）. http://www.oecd.org/dataoecd/54/29/46034089.pdf.（2010年12月１日ダウンロードで入手）

大嶋雄治・仲山 慶・K. Joon・島崎洋平・本城凡夫（2006）. 生態リスク評価と行動影響評価.「化学物質の生態リスク評価と規制—農薬編—」（畠山成久編），株式会社アイピーシー，東京，pp.167-174.

OSPAR Commission（2006）. OSPAR Protocols on Methods for the Testing of Chemicals Used in the Offshore Oil Industry. http://www.ospar.org/documents/dbase/publications/p00237_protocols%20fish%20toxicity%20testing%20_2006%20update_.pdf.（2010年12月１日ダウンロードで入手）

Pastorok, R. and Akçakaya, H.（2002）. Chapter 16: Chemical Effects on Populations. *In* "Ecological Modeling in Risk Assessment: Chemical Effects on Populations, Ecosystems, and Landscapes"（eds. Pastorok, R.A., Bartell, S.M., Ferson, S. and Ginzburg, L.R.）, Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, pp.215-217.

佐合宏隆・穏田友子・藤野仁美・時松靖之（2004）. ホルムアルデヒドの海産生物に対する急性毒性と水域生態系への影響評価，環境毒性学会誌，**7**, 11-22.

Scott, G. and Sloman, K.（2004）. The effects of environmental pollutants on complex fish behavior: Integrating behavioral and physiological indicators of toxicity. *Aquat. Toxicol.*, **68**, 369-392

Shimizu, N., Ogino, C., Kawanishi, T. and Hayashi, Y.（2002）. Fractal analysis of *Daphnia* motion for acute toxicity bioassay. *Environ. Toxicol.*, 17, 441-448.

Shugart, L., McCarthy, J. and Halbrook, R.（1992）. Biological Markers of Environmental and Ecological Contamination: An Overview. *Risk Analysis*, **12**, 353-360.

Stark, J., Banks, J. and Vargas, R.（2004）. How risky is risk assessment: The role that life history strategies play in susceptibility of species to stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101** 732-736.

須藤隆一（2008）. 生態系に配慮した化学物質管理制度の現状と方向. 化学物質と環境，**90**, 13-16.

水産庁（2008）. 海産生物再生産影響評価技術高度化事業総合報告書 海産生物毒性試験指針（平成19年度版）. 水産庁増殖推進部，180p.

水産庁（2010）. 海産生物毒性試験指針. 水産庁増殖推進部，160p.

菅谷 芳雄（2006）. 化学物質による行動変化.「化学物質の生態リスク評価と規制—農薬編—」（畠山成久編），株式会社アイピーシー，東京，pp.162-166.

宇野誠一・國師恵美子・小山次朗（2008）. 魚類血漿を用いた有害化学物質の１H-NMRメタボロミクス影響評価. 環境毒性学会誌，**11**, 63-67.

浦野紘平（2008）. 排水管理のための生物影響試験・診断方法. 化学物質と環境，**91**, 10-12.

U.S.EPA.（1996）. US-EPA850.1350 Mysid Chronic Toxicity Test. Ecological Effects Test Guideline *OPPTS 850.1350,* EPA 712-C-96-120 Public Draft, United States Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington DC, 10pp.

U.S.EPA.（1998）. Guidelines for Ecological risk assessment. EPA/630/R-95/002F, United States Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington DC, 180pp.

U.S.EPA.（2011）. METHODOLOGY DOCUMENT

for the ECOlogical Structure-Activity Relationship Model (ECOSAR) Class Program, United States Environmental Protection Agency, Office of Pollution Prevention and Toxics, Washington DC, 42pp.

U.S.EPA OCSPP Test Guidelines ホームページ. Draft OCSPP Test Guidelines. http://www.epa.gov/ocspp/pubs/frs/home/draftguidelines.htm.（2010年12月１日ダウンロードで入手）

U.S.Food and Drug Administration (1998). Guidance for Industry: Environmental Assessment of Human Drug and Biologics Applications. U.S.FDA, CDER, CBER, 39pp. http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070561.pdf（2009年12月１日ダウンロードで入手）

若林明子 (2003a). 試験時の水質変化と毒性.「化学物質と生態毒性（改訂版）」（若林明子編著），社団法人産業環境管理協会，東京，pp.52-86.

若林明子 (2003b). 構造活性相関.「化学物質と生態毒性（改訂版）」（若林明子編著），社団法人産業環境管理協会，東京，pp.117-141.

山田 久 (2006). 環境ホルモン問題の経緯 １.汚染実態と水生生物影響の概要.「環境ホルモン–水産生物に対する影響実態と作用機構」（環境ホルモン–水産生物に対する影響実態と作用機構」編集委員会編），恒星社厚生閣，東京，pp.１-18.

山本敦子 (2006). 医薬品由来物質による環境汚染と影響の実態. 化学物質と環境, **75**, ７-９.

吉岡義正 (2008). QSAR用プラットフォーム (PAS) 作成のノウハウ -１ SMILES式からの要素の抽出-. 環境毒性学会誌, **11**, 33-40.