ISSN 0386-5878
土木研究所資料第3921号

土 木 研 究 所 資 料

環境毒性学における単一種試験の適用と解釈に関する指針文書

平成16年2月

独立行政法人　土木研究所
水循環研究グループ

Copyright © (2004) by P.W.R.I.

All rights reserved. No part of this book may be reproduced by any means, nor transmitted, nor translated into a machine language without the written permission of the Chief Executive of P.W.R.I.

この報告書は、独立行政法人土木研究所理事長の承認を得て刊行したものである。したがって、本報告書の全部又は一部の転載、複製は、独立行政法人土木研究所理事長の文書による承認を得ずしてこれを行ってはならない。

土木研究所資料
第3921号2004年2月

環境毒性学における単一種試験の適用と解釈に関する指針文書

富山県立大学短期大学部環境システム工学科　楠井隆史
土木研究所水循環研究グループ　田中宏明
国立保健医療科学院水道工学部　浅見真理
神戸大学海事科学部海事技術システム学講座　岡村秀雄
富山県立大学短期大学部環境システム工学科　奥川光治
岡山大学環境理工学部環境デザイン工学科　小野芳朗
国立環境研究所循環型社会形成推進・廃棄物研究センター　毛利紫乃
土木研究所水循環研究グループ　山下尚之
国立環境研究所循環型社会形成推進・廃棄物研究センター　山田正人

要　旨

本書はカナダ環境庁が環境保全のための生態毒性試験（バイオアッセイ）の利用とその解釈に関するガイドラインを提供するために、環境毒性学に関する最新知見をまとめて1999年に出版された。カナダは漁業資源を保護するため、1971年に漁業法の中でいち早くバイオアッセイ（ニジマス急性毒性試験）を排水規制に取り入れた。わが国においても近年、環境リスクへの関心が高まる中、環境中の化学物質の挙動と影響を把握するためにバイオアッセイが用いられ、貴重な知見が得られている。こうした成果を水環境の管理に活用し、さらにバイオアッセイを環境管理の一手法として適用する上で、本書に含まれるカナダや諸外国での長年にわたる経験は貴重な示唆を与えてくれる。室内実験結果の野外への外挿の方法、試験方法の精度保証、結果の解釈、試験結果を修飾因子、混合排水の毒性成分の同定など豊富な内容が盛り込まれている。さらに水環境にとどまらず、土壌・底質への適用についても言及されており、わが国での土壌・底質汚染への適用を考慮する上で参考になる。環境毒性学に関する話題についても適切な総説が随所に盛り込まれており、関連文献の少ないわが国において貴重な資料となる。

キーワード：カナダ環境庁，生態毒性試験，バイオアッセイ

目　次

略語と化学式の一覧表---- 1
用語解説---- 3

第1章　はじめに---- 13
1.1　本指針文書の目的と適用範囲 ---- 13
1.2　三種類の技術における毒性試験---- 14
1.3　単一種試験とその有効性---- 17
1.4　毒性学的アプローチの利点と限界---- 17
1.5　単一種試験への支持---- 20

第2章　環境毒性学の基本概念---- 22
2.1　用語---- 22
2.2　試験系共通の特徴と設計---- 23
2.3　試験で使用する生物---- 26
2.3.1　供試生物種の望ましい特徴---- 26
2.3.2　供試生物の感受性---- 27
2.3.3　現地に関連した生物種の選択---- 28
2.4　被験物質---- 29
2.5　濃度と影響からのエンドポイントの推定---- 30
2.5.1　二値的試験---- 31
2.5.2　定量的試験における阻害濃度の推定---- 33
2.5.3　定量的試験における無影響濃度推定---- 34
2.6　試験の精度と試験所間の変動---- 36

第3章　試験方法と信頼性保証---- 39
3.1　毒性試験における信頼性保証 ---- 39
3.1.1　関連する試験所操作の国際標準---- 40
3.2　試験方法---- 41
3.2.1　カナダ環境省の試験方法の標準様式 ---- 42
3.2.2　基準毒性物質---- 43
3.2.3　他の方法の評価---- 46
3.3　試験報告書---- 47
3.3.1　優良試験報告のためのカナダ環境省の様式 ---- 47

3.3.2 試験の信頼性評価のための報告書の利用 48

第4章 毒性データの解釈 50
4.1 野外における検証 50
4.1.1 自然水域における検証 51
4.1.2 メソコズムにおける検証 54
4.1.3 文献レヴュー 55
4.1.4 検証調査の設計 55
4.2 毒性試験結果の外挿 57
4.2.1 適用係数 58
4.2.2 急性-慢性比 59
4.2.3 広範なデータベースに基づく係数 60
4.2.4 統計学的外挿 61
4.2.5 外挿法の比較 63
4.3 毒性単位と毒性放出 64
4.3.1 毒性単位の概念 64
4.3.2 毒性単位と混合物の影響 66
4.3.3 毒性の負荷量 67
4.4 weight-of-evidence アプローチ 69
4.4.1 底質三要素法 70
4.5 毒性指標 73
4.6 構造活性相関 74
4.6.1 構造活性相関の種類 75
4.6.2 麻酔性と非麻酔性モデル 76
4.6.3 構造活性相関の利用 78
4.7 毒性同定と削減 80
4.8 スウェーデンにおける廃水特徴化 83
4.9 面倒な結果 84
4.9.1 データセット中の潜在的異常 84
4.9.2 試験結果の問題の扱い方 88
4.10 廃水の毒性 90
4.10.1 廃水の監視 90
4.10.2 水質予測と毒性影響の制御 91
4.10.3 損傷した水界生態系の回復 95

4.11 底質の毒性---- 97
4.11.1 全底質試験---- 98
4.11.2 間隙水または抽出物の試験---- 102
4.11.3 総有機炭素による正規化---- 104
4.11.4 酸揮発性硫化物による正規化---- 105
4.12 土壌の毒性---- 107
4.12.1 全土壌試験---- 108
4.12.2 参照土壌の選択---- 109
4.12.3 土壌抽出物の試験---- 111
4.13 物質の毒性---- 112
4.13.1 厄介な特性を有する物質の試験---- 112
4.14 表流水の毒性---- 114
4.14.1 受水域水の室内試験---- 115
4.14.2 現場試験---- 115
4.14.3 混合層外での亜致死毒性---- 116
4.15 毒性を修飾する条件---- 117
4.15.1 非生物的修飾因子---- 117
4.15.2 生物的修飾因子---- 124

第5章 毒性データの応用---- 128
5.1 廃水の制御---- 128
5.2 環境影響モニタリングにおける亜致死毒性データ---- 130
5.2.1 試験結果の検証---- 132
5.2.2 亜致死毒性試験エンドポイントの集計---- 133
5.2.3 廃水水質の経時変化の監視---- 133
5.2.4 受水環境で起こりうる影響の推定---- 135
5.2.5 多重排出者による影響の解析---- 138
5.2.6 毒性試験結果の境モニタリングへの統合---- 139
5.2.7 混合層---- 140
5.3 海洋における浚渫・処分のための底質の毒性評価---- 142
5.3.1 カナダの取り組み---- 142
5.3.2 参照底質---- 144
5.3.3 廃棄底質の毒性評価---- 146
5.3.4 処分地の毒性モニタリング---- 148

5.4 環境アセスメント---------- 150
5.4.1 一般的過程---------- 150
5.4.2 毒性試験---------- 153
5.4.3 毒性情報の一般への提示---------- 153
5.5 汚染された土地のアセスメントと修復---------- 154
5.5.1 生態リスク評価 ---------- 155
5.5.2 汚染地評価のための毒性試験---------- 157
5.5.3 現場修復のための毒性試験 ---------- 160
5.5.4 汚染底質修復のための生物学的指針---------- 161
5.5.5 不確実性の許容---------- 163
5.6 環境質指針値 の開発---------- 164
5.6.1 背景---------- 164
5.6.2 水質指針値---------- 165
5.6.3 底質指針値---------- 169
5.6.4 土壌質指針値---------- 171
5.6.5 環境質目標値の開発---------- 173
5.7 新規物質のアセスメントと規制---------- 176
5.7.1 データの必要条件---------- 176
5.7.2 環境毒性のデータの解釈 ---------- 177
5.7.3 毒性の概略の信頼性の立証 ---------- 179
5.7.4 今後の研究の必要性の決定---------- 182
5.7.5 要注意濃度の外挿 ---------- 183
5.8 カナダ環境保護法における優先物質の評価 ---------- 185
5.8.1 背景---------- 185
5.8.2 環境評価 ---------- 185
5.8.3 影響の特徴化のための一般的推奨事項 ---------- 187
5.8.4 影響特徴化に用いられるデータの型---------- 187
5.8.5 臨界毒性値の導出---------- 188
5.8.6 対象となる生物相と環境コンパートメントの型---------- 189
5.9 消費財の評価---------- 191
5.9.1 製品評価における毒性試験---------- 192

第6章 新たな課題---------- 194
6.1 遺伝子毒性---------- 194

6.1.1 DNA/RNA 損傷評価試験---------- 195
6.1.2 催奇形性---------- 197
6.1.3 腫瘍調査---------- 197
6.2 小規模試験---------- 197
6.2.1 利用可能な試験例---------- 199
6.3 マイクロコズムとメソコズムによる試験---------- 201
6.3.1 マイクロコズム試験---------- 202
6.3.2 メソコズム試験---------- 203
6.4 体内負荷---------- 205
6.5 混合機能酸化酵素---------- 207
6.6 内分泌攪乱性物質---------- 209
6.7 連続オンラインバイオモニタリング---------- 210

参考文献---------- 214

付録A 指針開発のプロジェクト運営委員会のメンバー---------- 247
付録B セントローレンス河行動計画の廃水試験事業で用いられたPEEPとCHIMIOTOX試験
---------- 248
付録C 環境計画における予測ツールとしての毒性試験の例---------- 252
付録D 廃水プルームにおける亜致死的影響の潜在的影響域予測の計算例---------- 256

略語と化学式の一覧表

AETE.. Aquatic Effects Technology Evaluation Program 水界影響技術評価プログラム

AHH... aryl hydrocarbon hydroxylase アリル炭化水素水酸化酵素

APHA.. American Public Health Association アメリカ公衆衛生協会

ASTM.. American Society for Testing and Material アメリカ試験材料協会

AVS... acid-volatile sulphide 酸揮発性硫化物

BOD... biochemical oxygen demand 生物化学的酸素要求量

CAEAL. Canadian Association for Environmental Analytical Laboratories Inc. カナダ環境分析試験所協会

$CaCO_3$.. Calcium carbonate 炭酸カルシウム

CCREM. Canadian Council of Resource and Environmental Ministries カナダ資源・環境閣僚会議

CCME.. Canadian Council of Ministries of Environment カナダ環境閣僚会議

CEC... cation exchange capacity 陽イオン交換能

CEPA.. Canadian Environmental Protection Act カナダ環境保護法

COD... chemical oxygen demand 化学的酸素要求量

CV.... coefficient of variation 変動係数

d..... day(s) 日

DFO... Department of Fisheries and Oceans 漁業海洋省

DNCC.. 4,6-dinitoro-orthocresol 4,6－ジニトロクレゾール

DO.... dissolved oxygen 溶存酸素

DOC... dissolved organic carbon 溶解性有機炭素

DOM... dissolved organic matter 溶解性有機物

EA.... environmental assessment 環境アセスメント（評価）

K_{oc}..... organic carbon partition coefficient 有機炭素分配係数

K_{ow}..... octanol-water partition coefficient オクタノール-水分配係数

L..... litre(s) リットル

LC50... median lethal concentration 半数致死濃度

LOEC... lowest-observed-effect concentration 最低影響濃度

LTU.... lethal toxic unit 致死毒性単位

MFO.... mixed-function oxidase(s) 混合機能酸化酵素

mg..... milligram(s) ミリグラム

MISA... Municipal Industrial Strategy for Abatement [Ontario] 公共産業削減戦略 [オンタリオ州]

mol/L.. moles per litre 一リットル当りのモル濃度

mw..... molecular weight 分子量

NCSRP.. National Contaminated Sites Remediation Program 国家汚染地修復計画

NOEC... no-observed-effect concentration 無影響濃度

OECD... Organization for Economic Co-operation and Development 経済共同開発組織

PAH.... polycyclic aromatic hydrocarbon(s) 多環芳香族

PCB.... polychlorinated biphenyls(s) 多塩素化ビフェニル

PCPA... Pest Control Products Act 衛生害虫駆除製品法

PEEP... Potential Ecological Effects Probe 潜在的生態影響プローブ

pH..... acid/base reaction of an aqueous solution ペーハー

p-NT... para-nitorotoluene パラニトロトルエン

QA/QC.. Quality Assurance/Quality Control 信頼性（品質）保証/信頼性（品質）管理

ECOD.. 7-ethoxycoumarin *o*-de-ethylase
エトキシクマリン脱エチル化酵素

ECP... Environmental Choice Program
環境選択プログラム

EC50.. median effective concentration
半数影響濃度

EDTA.. ethylene diamine tetra-acetic acid
エチレンジアミン四酢酸

EEC... European Economic Community
ヨーロッパ経済共同体

EEM... Environmental Effect Monitoring
環境影響モニタリング

Eh.... oxidation-reduction(redox) potential
酸化還元電位

EPS... Environmental Protection Service
環境保護部門（事業）

ERA... Ecological Risk Assessment
生態リスク評価

EROD.. ethoxyresorufin o-de-ethylase
エトキシレゾルフィンO-脱エチル酵素

FeS... iron monosulphide 硫化鉄

g..... gram(s) グラム

GLP... Good Laboratory Practice
優良試験所基準

h..... hour(s) 時間

HPLC.. high-pressure liquid chromatography
高圧液体クロマトグラフィー

IC.... inhibiting concentration 阻害濃度

IJC... International Joint Commission
国際共同委員会

IR.... infrared 赤外

ISO... International Organization for Standardization 国際標準化機構

Kg.... kilogram(s) キログラム

QSAR... quantitative structure-activity relationship(s) 定量的構造活性相関

r..... correlation coefficiant 相関係数

s..... second(s) 秒

SAR.... structure-activity relationship(s)
構造活性相関

SD..... standard deviation 標準偏差

SLTU... sublethal toxic units
亜致死毒性単位

t..... tonne トン

TDS.... total dissolved solids
全溶解性固形物

TEF.... toxicity emission factor
毒性排出係数

TIE.... toxicity identification evaluation
毒性同定評価

TOC.... total organic carbon 全有機炭素

TOEC... threshold-observed-effect concentration 閾値影響濃度

TRE.... toxicity reduction evaluation
毒性削減評価

TU..... toxic unit(s) 毒性単位

USEPA.. United States Environmental Protection Agency 米国環境保護庁

UV..... ultraviolet 紫外線

2,4-D.. 2,4-dichlorophenoxyactic acid

2,4-DCA 2,4-dichloroacetic acid
2,4-ジニトロ酢酸

>..... greater than より大きい

<..... less than 未満

≥..... greater than or equal to 以上

≤..... less than or equal to 以下

%..... per cent パーセント

用　語　解　説

文法的用語

"Can"は「.....は可能である」を意味する

"May"は「.....は許容される」を意味する

"Might"は何かが存在または生ずる可能性を示す

"Must"は絶対的な要件を示すために用いる

"Should"は特定の条件または手順が推奨され、可能であれば合致すべきである事を述べる場合に用いる

専門用語

Accreditation：認証

環境分析機関が特定の試験を実施する能力があると公式に認証されること。公的認証は、特に立ち入り調査によって判定される、実験施設の能力と業績の評価に基づく。

Acute：　急性

供試生物の寿命に比較して短期間内（分、時間または数日）

Acute toxicity：急性毒性

被験物質への短期間内（通常は数日）で供試生物に生ずる悪性影響（致死または亜致死）

Battery of tests：　試験バッテリー

異なる生物を用いた数種類の毒性試験の組合せ。多様な種類の供試生物を意味する（例えば、細菌、藻類、甲殻類の試験）

Bioaccumulation：生物蓄積

すべての環境源からの摂取の結果生ずる生物へのある物質の正味の蓄積

Bioassa：バイオアッセイ

生物または生体系の反応により測定される物質の強度・影響力の試験。標準的な医薬品分野での利用では、バイオアッセイは、ある調合薬または薬剤の未知の影響力を、標準的な調合薬の既知の影響力と比較して、評価する。*毒性試験*（参照）は環境分野の研究のためのより特定された好まれる用語である。

Bioconcentration：生物濃縮

ある物質の周囲の環境媒体から生物への、培地中濃度よりも高い濃度への正味の蓄積。水生生物の場合、生物濃縮は周囲の水溶液の直接的な摂取の結果生ずる。

Biomagnification：食物連鎖による蓄積

二つ以上の栄養段階レベルを通して食物を通じて蓄積による排泄し難い物質の組織内濃度の増加。（一つだけの栄養段階を通じての増加、例えば、生物から次の栄養段階の消費者という組み合わせ、は一部の他の機関では*二次的中毒 secondary poisoning*と命名されてきたが、この用語は実際の中毒の兆候がない濃度の増加を示す場合には誤った選択になるであろう。

Chemical：化学物質

本書では、土壌、底質、水に関連して、混合、堆積、見出される可能性のある元素、化合物、調合剤、混合物

Chronic： 慢性

通常、生物の寿命のかなりの割合、例えば10%以上、比較的長期の暴露期間に発生する事象

Chronic toxicity：慢性毒性

代謝、成長、繁殖または生存能力の変化に関連した長期的な影響

Compliance：遵守

政府の規制または認可の交付要件への合致

Contaminant：汚染物質

直接的または間接的な人間の活動により、自然系に存在または増加して存在する外来物質。この用語は、通常、低濃度に存在しており、悪い生物影響を示さなかった物質に対して適用されてきた。様々なグループが特定の意味でこの用語を用いており、一部の国内的、国際的定義または規制では特定の意味を持つ。

Control: 対照（区）

試験において、試験対象となる特定の条件を除き、結果に影響を与える可能性のあるすべての因子を同一にした処理群。毒性試験においては、対照は暴露処理群のすべての条件を模倣し、被験物質を含んではいけない。対照は、希釈水の質や供試生物の健康や取扱のような基礎的条件に由来する毒性を検査するために用いられる。*対照*は*陰性対照*と同義である。*陽性対照*を参照せよ。

Control sediment：対照底質

対照底質は、供試生物を採取した場所から採取または、標準組成に合致するように調合された清浄な底質。飼育した生物の場合、対照は培養に用いた底質と同じ底質試料である。この底質は被験物質を含んでいてはならない。カナダ環境省試験法は対照底質の影響は、ある特定の決められた程度を超過してはならない事を要求している。

Criteria：判定基準（クライテリア）

カナダでは、判定基準は、水利用の推奨基準の導出のために評価された科学データと定義されている（CCREM、1987により水質に適用）。単数形は"criterion"。*環境質指針*を参照(読者は、アメリカのような一部の他の地域からの文献や専門家による一般的な利用では、判定基準は以下で述べる指針の意味で用いられることに注意しなくてはならない。例えば、ランド（1995）は水質判定基準を「もし超過しなければ、生物、群集、決められた水利用または水質を充分な安全性を持って保全する、水中の化学物質または他の成分の濃度の、科学的判断に基づく推定値」と定義。

Critical body burden(CBB)：臨界体内負荷

生物への悪影響に関連した、ある生物の組織中の物質の最小濃度。この言葉は特に、優先物質に当てはまる。

Critical toxicity value(CTV)：臨界毒性値

IC25 のように低毒性影響の定量的表現。この表現は、優先物質のカナダのアセスメントにおいて用い

られる。

Culture：培養

名詞としては、健康な供試生物を供給するために定められたかつ制御された条件下で飼育された生物の系統。動詞としては、生物飼育の手順を実施すること。

Depuration：排泄

能動または受動過程の結果として生物からある物質が損失を生ずること

EC50：半数影響濃度

供試生物の 50%にある定義された毒性影響を生ずると推定される水（mg/L）、または土壌または底質（mg/kg）中の物質の濃度。多くの場合、EC50 と 95%信頼限界は、決められた暴露期間後に、様々な試験濃度で影響を受けた生物の百分率を解析して統計的に導かれる。暴露期間は特定されなければならない（例えば 72 時間）。EC50 は、致死または亜致死のような、ニ値的な影響を記述し、定量的な影響には適用されない（*IC_P*参照）。

Ecological risk：生態リスク

ヒト以外の生物への*リスク*（参照.）を同定、定量し、これらのリスクの受容度を決定する過程。

Ecotoxicology：生態毒性学

環境毒性学（参照.）と同じ一般的な意味をもつ。

Effluent：廃水

環境に排出される液体廃棄物（例、産業、公共）。

Elutriate：溶出液、浸出水

固形物（例、土壌、選鉱くず、掘削泥、浚渫廃棄物）に水を加え、混合物を振盪し、その後、遠心分離またはろ過、またはその上澄みから得られる水溶液。

Endpoint：エンドポイント、 影響判定点

試験の結果を特徴付ける測定値または値（LC50,EC50,IC25 など）。また、試験終了を区分することを意図する影響を示す生物の反応を意味する。環境アセスメント、特にカナダ優先物質の場合、影響判定点は通常、*アセスメント影響判定点*範囲内の他の意味を持つ；これは、有害影響のリスクを考慮する生物の種、属、部門を意味する。*受容体*を参照。

Environmental toxicology：環境毒性学

同様の一般的な定義を持つ*毒性学*（参照）の一分野。しかし、ヒトを生態系の一部として除外せず、生態系、自然群集や野生生物種を対象としている。

Flow-thorough：流水式

新鮮な溶液を一定量流入するか、頻繁に間欠的に流入して、試験容器中の検水が連続的に更新される試験系。

Geometric mean：幾何平均

対数を基に算出した繰返し測定値の平均値。代数平均の場合のように極端な値が平均値に影響を与えないという長所がある。幾何平均は"n"の値の積の根として算出でき、"n"の値の対数の平均の

antilogarithm として算出できる。

Good laboratory Practice：優良試験所基準

実験施設内での試験設計、データの採取、科学的・技術的調査の実施について取り決めた一連の基準。基準はOECDにより公布される。

Graded effects ：段階的影響

quantitative effects 参照。

Guideline ： 指針

quality guideline 参照。

Hazard：有害性

化学物質に潜在的に毒性のある濃度で暴露することにより生ずる可能性のある悪影響の可能性。

Hazard assessment：有害性アセスメント

リスクアセスメントの初期の部分。どの生物構成分が毒性濃度に潜在的に暴露し、どのように影響を受ける可能性があるかを定義する。

ICp：特定の影響の百分率阻害濃度

対照と比較し特定の%(p)の阻害を生ずる被験物質の濃度の点推定値。試験期間の終了時の、各個体の産仔数、寸法などの定量的な生物測定値を用いる。

Interstitial water：間隙水

底質粒子間の間隙を占める、底質内の未攪乱状態の水。底質から抽出されたら、もう間隙水とは呼べない。(*Porewater*（参照）がより一般に間隙水を意味する用語であるが、底質から抽出後も同じ水を意味する)

K_{ow}：オクタノール-水分配係数

オクタノール-水系における溶解度の比率。高い比率は生物蓄積性の大きいことを示す。しばしば P_{ow} が用いられる。

LC50：半数致死濃度

50%の供試生物に対して致死的であると推定される水または土壌または底質中の物質の濃度。

Leachate：浸出水

土壌または固形廃棄物を通過した水または廃水。

Lethal：致死的

直接的作用により死亡を引き起こす。死亡は通常、運動または他の活動など視覚的な兆候の終焉と定義される。

Life-cycle test：生活環試験

少なくとも第1世代のある生活段階から次世代の同じ生活段階まで生物を観察する試験。

LOEC：最小影響濃度

対照に比較して、供試生物に統計的に有意な影響が認められる被験物質の最小濃度。

LT50：半数死亡時間

被験物質のある濃度で供試生物の 50%に致死的であると推定される暴露時間。一連の濃度における死亡率を連続的に観察して各濃度の LT50 の推定が可能となり、しばしば意味深い*毒性曲線*（参照）を提供する。生物の各集団の繰返し観察のため、LC50 に用いる通常の統計的な手法は有効ではない。

MATC：最大許容濃度

おもにアメリカで用いられる用語。様々な方法に定義されるが、現在、一般には本書中で推奨されている用語、*TOEC*の同義とみなされている。

Material：物質

あるものが構成される*物質*（参照）または物質群。多少とも均一な特性を有する成分。底質、土壌、表流水も成分に成りうる。通常は、物質は数種類または多数の物質または化学物質を含む。

Narcosis：麻酔

毒性作用の非特異的様式。多くの有機化学物質により生ずる細胞活動の一般的攪乱。この用語はまた、動物に見られる影響、一般には昏迷または無感覚の状態と平衡または運動の損失を表す。

Negative control：陰性対照（*対照*を参照）

NOEC：無影響濃度

対照に比べ、供試生物に統計的に有意な影響が認められない被験物質の最高濃度。

Nonpolar：非極性

分子内の負電荷と正電荷の中心が同じで、電気的に対称の分子を含む物質。通常、これは、原子間の中間点にある電子を分子の構成原子が共有しているからである。ベンゼンや四塩化炭素のような非極性溶媒は、水に溶解しない硫黄、リン、またはワックスのような同様に非極性または共有結合物質を溶解する。*極性*を参照せよ。

Objective：目標値（環境質指針値を参照）

Pelagic：漂泳生物（ペラゴス）

自由遊泳性または自由浮遊性の水生生物。また、開放水域環境または、通常は、海の表層と底層の間の水塊を意味する。

PMTC：予測最小毒性物質濃度

廃水の環境影響を監視するためにカナダ環境省で開発された用語。95%の信頼限界で推定される、これ以下では、5%の試料しか悪性の亜致死影響を示さないが期待される、放流先域中での廃水濃度として定義される。

P_{oct}：オクタノール-水分配係数（K_{ow}参照）

Polar：極性

極性物質は、相対的な電子分布を反映して分子の一方の端は正で他方は負と、電荷的に対称ではない分子を有する物質。水は、分子が双極子をもっているために非極性溶剤である。つまり、分子中の構成元素（水素と酸素）が対称に配置しているため分子中の正電荷と負電荷の中心が同じ場所になく、一方の端が正で他方が負になる傾向がある。したがって、水は、溶液中でイオンになるまたはイオンを精製する酸、塩基、塩に対して良好な用材となる。極性溶剤としては、水は、*非極性*（参照）のベンゼンや四

塩化炭素のような液体とほとんど完全に混ざり合わない。

Pollutant：汚染物質

汚染（参照）を引き起こす、または、充分な量、環境中に放出されると汚染を引き起こす物質またはエネルギーの形態。（*contaminant* を参照）

Pollution：汚染

生物またはヒトの環境の利用に対して有害な検出可能な変化を引き起こす程、充分な量の物質または熱のようなエネルギーの形態を環境の構成因子に添加すること。一部の国家または国際機関では、適切な文脈では尊重されるべき汚染の公式の定義を持っている。

Porewater：間隙水

底質粒子間の空隙を占める水をさす一般的な用語。間隙水の量は、重量で湿底質当たりの百分率で表される。間隙水は底質から抽出することが可能で、必要があれば毒性を試験することが出来る（Interstitial water は底質中の乱さない状態での水；引抜いた場合には、もう interstitial water とは呼ばない）。

Positive control：陽性対照

対照毒性物質を用いた毒性試験。被験物質を評価する時に生物の感受性とその化学物質に対する実験室の得られた結果の精度を検査するために用いられる。

Priority Substance：優先物質

カナダ環境保護法の要求により、カナダ環境・保健省の優先物質リストに含まれる物質。優先物質は毒性があるか、または軽減が必要であるかを決定するための検討を行なわなければならない。

Probit：プロビット

分布の標準偏差に基づいて表現した、正規分布の平均からの逸脱の単位。LC50 または EC50 を推定時には、濃度の対数の関数としての百分率の影響を、正規分布のシグモイド曲線を直線化する場合に用いられる。プロビット解析は、正規耐性分布のパラメーター、つまり EC50 を推定するために最尤度法を用いる過程である。現代的な用法では、プロビット解析が、何らかの内在する耐性の分布（例、二項、ロジスティック）において、最尤度による推定値を表すのにしばしば用いられる。

Protocol：プロトコル、実施要綱

試験または実験の一連の明快な手順。当事者間で公式に合意され、書類で明確に述べられている。

Quality Assurance (QA)：信頼性保証（品質保証）

科学的、技術的作業の結果の正確さと精度を規定することを意図した実験施設内でのプログラム。適切な手順の選択、試料採取、限界の選択、結果の評価、*信頼性管理*（参照）、人員の資質と訓練を含む。

Quality Control(QC)：信頼性管理（品質管理）

信頼性保証のプログラムの中の特定の活動から構成される。標準化、校正、繰返し、対照試料、データの信頼限界の統計的推定を含む。

Quality Guideline：環境質指針値

現地の生物または特定の水利用の保全のために推奨される数値濃度または記述的宣言に基づく科学的な指針。土壌指針、水質指針などがありうる。目標値は、特定の場所に適用される指針であるというこ

とを除けば同じ定義である。一部の州では水質目標値のリストを持っており、これは“公式に望ましい状態”を反映している。環境質基準は、政府の段階で強制力を持つ環境制御法において認められている目標である。

Quantal effects：二値的影響

毒性試験において、各供試生物が示すか（反応するか）または示さない（反応しない）影響。例えば、ある動物は、子供を生むかまたは生まないか。*定量的影響*を参照。

Quantitative effect：定量的影響

毒性試験において、数値尺度で連続的変数として測定される影響。*Graded* は本文脈では同じ意味。*quantanl*参照。

Rearing ：飼育

供試生物を野生から採取し、毒性試験に適切な寸法、年齢、重量まで、または健康な子孫を産むまで実験室内で維持すること。

Receiving water：受水域

廃水または汚染物質が放出された、または、排出されようとしている（例えば、汚染の点源からの上流）表流水（例えば、渓流、河川または湖）。意図する意味を示すために更に詳細な記述が提示されなければならない。

Receptor：受容体

環境アセスメント、特に、生態リスクアセスメントで用いられ、ある特定の場所または状態で考慮している毒性物質により影響を受ける可能性のある生態系の要素（例えば捕食性鳥類）を意味する。*受容体特徴化*は、これらの要素を特定するように試みることである。

Reference sediment：参照底質

関心があり検討しようとしている化学物質汚染の特定発生源の影響の無いように選択された底質であるという以外は、被験底質と非常に類似した特性（例えば、粒径、有機成分）を有する野外で採取した底質。被験底質が採取された調査地点の近くの場所からしばしば採取され、検討される汚染以外の他の汚染の影響を受ける可能性がある。

Reference soil：参照土壌

関心があり検討しようとしている化学物質汚染の特定発生源の影響の無いように選択された土壌であるという以外は、被験土壌とできるだけ非常に似た特性（例えば、組織、構造、ｐH、有機成分）を有する野外で採取した土壌。被験土壌が採取された調査地点の近くの場所からしばしば採取され、検討される汚染以外の他の汚染の影響を受ける可能性がある。試験におけるマトリックスの影響を表すために用いられ、対照や被験土壌の希釈列を作成したりする場合に用いられる。

Reference toxicant： 基準毒性物質

被験物質で得られた毒性データの信頼性を確証する為に被験物質の感受性を測定するために用いられる標準化学物質。多くの場合、対照毒性物質での試験は、被験物質を評価する際の生物の感受性と、その化学物質について実験施設で得た結果の正確さを評価するのに用いられる。

Remediation：修復

ヒトの健康または環境への損傷を防止、最小化、または緩和するための汚染地の管理。修復には、直接的物理的作用（例えば、毒性物質の除去、破壊、封じ込め）や制度的制御（例えばゾーニング指示または命令）を含む。

Replicate ： 繰り返し，連（数）

対照としての希釈水または試験溶液の一濃度区のどちらかに決められた数の生物を含んだ一つの試験容器。対照と5濃度を含む毒性試験で、繰り返しを3連用いた場合、18の試験容器を用いる。各濃度区と対照で、3連の試験容器または繰り返しがある。繰り返しは、独立した試験単位でなければならないので、一つ試験容器しから他の試験容器に、生物または被験物質を移し変えると、繰り返しに基づく統計解析を無効にする恐れがある。

Resuspended sediment：再浮遊底質

水と激しく混合し、沈殿させた底質。

Risk：リスク

悪影響が生じそうな可能性または見込み。

Risk assessment：リスクアセスメント（*生態リスクアセスメント*参照）

Safe ： 安全

多くの定義がありうる。ここでは、引用符と一緒に用いられた場合には、無限に長い暴露期間生物に暴露しても何らかの亜致死的危害を生じないほど低い、毒性物質または廃棄物質の濃度を表す。このような"安全"濃度はしたがって、若干、仮説的で、定まった推定法の数学的手法はないが、毒性影響と関連した濃度よりは低いであろう。

Salinity：塩分

従来、g/kgまたは千分率（‰）で表現される、一定体積中での溶解性塩の総量の測定値。現在では、密度または伝導度の標準的な関係から経験的に測定され、結果は単位を伴わず、"塩分32"(APHA, et al., 1995)と表現される。

Sediment：底質、底泥

水塊の底質に輸送され、または堆積した天然の粒子状物質。この用語は、実験的に調整された底質を表すのにも用いられる。この言葉は採取または調整後、最小限の人為的操作を施した全、生の底質をさす。溶離液または再懸濁汚泥のような底質の状態または派生物は指さない。特別の強調が必要な場合以外は、*全底質*と書く必要はない。沈殿して底質となった物質は再び水中で再混合される可能性があり、この場合には、*懸濁底質*と呼ばれる。

Sediment elutriate：底質溶離（溶出）液（*溶離液*参照）

Serial dilution： 連続希釈列

100、50、25、12.5%のように、低濃度から一定の倍率（希釈）で異なる一連の試験濃度。このような希釈列は、ある廃水または貯蔵溶液を連続的に希釈することにより得ることが出来る。

Soil：土壌

採取または調整後、最小限の人為的操作を施した全、生の成分をさす。溶離液または浸出液のような状態または派生物は指さない。特別の強調が必要な場合以外は、*全土壌*と書く必要はない。

Soil elutriate：土壌溶離液（*elutriate* 参照）

Spiking：スパイク（添加）

底質へ既知量の化学物質または他の物質を添加すること。物質は通常、清浄または対照底質に添加されるが、しばしば汚染底質にも添加される。添加後、底質は徹底的に混合される。添加物質が被験底質の場合、カナダ環境省の文章では、これは spiking と呼ばず、希釈または単に addition と呼ぶ。

Standard：標準（*環境質指針*参照）

Static：止水、静置

試験溶液または被験底質上層の水を試験中に更新しない毒性試験

Static-renewal： 半止水、 静置更新

試験溶液または被験底質上層の水を試験中に周期的に更新する毒性試験。通常は 24 時間未満毎の最初に更新する。同義語に「更新 renewal」、「回分更新 batch replacement」、「半静置 semi-static」。

Sublethal：亜致死

生物に有害であるが、試験期間内では直接的に致死を引き起こすより下のレベル。

Substance：物質

特定の種類の素材。Substance という言葉は *material* という言葉より狭い範囲を指し、特定の化学物質または元素を指すことがある。

Suspended sediment：懸濁性底質

水または、水中で浮遊している粒子と、混合された底質（またはその一部）。

TOEC：閾値影響濃度

NOEC と LOEC の間にあり、一つのエンドポイントをもつために、二つの濃度の幾何平均と推定される。

Toxic：毒性

毒性のある。毒性物質は十分量が適切な場所にあれば生体に悪影響を起こす可能性がある。Toxic は形容詞、副詞にもなるが、名詞として用いてはならない。*Toxicant* が正しい名詞である（2.1 参照）

Toxicant：毒性物質

毒性のある物質

Toxic emission factor(TEF)：毒性放出係数

ある廃水について廃水を発生する工程から単位製品（例えば、紙１トン）を製造するのに生ずる*毒性放出速度*（参照）

Toxic emission rate(TER)： 毒性放出速度

排水量を乗じたある廃水の毒性の強度。廃水の毒性単位を排水量（m^3/d）で乗じる。

Toxic unit：毒性単位

溶液中の物質または廃水の毒性強度の表現。強度は毒性の標準的エンドポイントの分数で表す。例えば、

溶液中の化学物質の致死毒性単位は、水中の化学物質の実濃度をその化学物質の LC50 で除して表される。亜致死毒性単位は、亜致死エンドポイント（例えば IC25）を分母として用いて算出できる。廃水の毒性単位は、100%（未希釈の廃水の強度）を百分率で表した実測毒性エンドポイントで除して算出できる（例.LC50 が 10%の廃水は 10 毒性単位をもつ）。毒性の増加とともにその数値が増加するため、毒性単位は概念的には便利である。

Toxicity： 毒性

生物に悪影響を引き起こすある物質の固有の潜在力又は能力。

Toxicity curve：毒性曲線

両対数目盛りに、暴露時間と試験の連続的なエンドポイントをプロットしたグラフ（例えば logLC50 対 log 暴露時間）。この曲線は試験期間中に毒性の閾値に到達するかどうか、つまり、どの毒性化学物質にとっても重要な知見である濃度の時間依存性漸近線、を示唆する事ができる。多くの亜致死試験は影響の明確な観察結果は試験の最後にしか得られないため、毒性曲線は通常、致死影響を用いる。

Toxicity identification evaluation(TIE)：毒性同定評価

混合物中のどの物質が毒性の原因であるかを発見する系統的な調査法。様々な物理化学的前処理（例えば、ｐH 調整、ろ過、曝気）の後に毒性試験を行う：この結果が作用する毒性物質の種類の手がかりとなる。

Toxicity test：毒性試験

ある決められた条件下で選択された生物集団へのある物質の影響の測定法。環境毒性試験は通常、特定の濃度またはそのままでの、化学物質、液体廃棄物、受水域水、底質、土壌へ暴露後、影響の発現した生物の割合（*quantal*）、発現した影響の強度（*graded or quantitative*）を測定。

Toxicity reduction evaluation：毒性削減評価

毒性同定評価（参照）と類似しているが、どの廃水処理が毒性を削減するのに最も効果的であるかを示すことを意図している。

Toxicology：毒性学

物質または条件による毒性を研究する科学の一分野。様々な学問領域、実験手法の分野、分子または生態系など様々なレベルの調査についての利用に制限はない。応用毒性学は通常、化学物質または他の作因の安全性の限界を定義する目標がある（*環境毒性学*参照）。

Warning limit： 警戒限界

基準毒性物質の試験のエンドポイントの過去の幾何平均から、対数ベースで算出した標準偏差のプラスマイナス 2 倍。

Warning chart： 警戒チャート

基準毒性物質のエンドポイントの経時的変化を追跡するのに用いるグラフ。試験の期日を横軸に影響濃度を縦軸に対数目盛りでプロットする。（図 2 参照）

Whole soil： 全土壌（*土壌*参照）

Whole sediment：全底質（*底質*参照）

第1章　はじめに

概　要

- この文書は全生物毒性試験を解釈するための指針あり、カナダ環境省によって出版された試験法に焦点を絞る。
- 野外における化学分析と生物調査の結果を総合的に解釈することが重要である。毒性試験と化学計測は管理目的あるいは監視目的のために用いられる、または、自然界における影響を予測するために用いられる。生物調査は予測的ではないが、影響があるかどうかを最終的に判断する根拠となる。
- 毒性試験は毒性を測定するための唯一の方法である。それ自身では毒性を生じる物質を同定できないことが主な欠点である。
- 工場廃水を管理するために毒性試験をパイオニア的に利用してきたカナダでは、毒性試験は顕著な利点を示してきた。このような試験は、今では国際機関によって広く支持されている。

1.1　本指針文書の目的と範囲

毒性試験は環境保護においてますます重要となっており、カナダ環境省は試験の利用に関する標準的方法、信頼性保証、ガイダンスを提供している。ここでは、実験室での毒性試験結果の解釈法に関するガイダンス、また一般的な方法として試験の実験計画法、およびこれらを環境保護プログラムに取込むための方法に関するガイダンスについて述べる。

ガイダンスは全般的に毒性試験と関係があるが、特にカナダ環境省の標準的方法が強調されている(EC, 1990a-f; 1992a-f; 1997a, b; 1998; 1999)。同様に、カナダ環境省の国内プログラムのための特別なガイダンスがあるが、毒性試験からの結果を生態学的に理解する一般的なガイダンスでもある。ガイダンスは毒性データを工業界自身が評価するために彼らに有益であるよう、また、そのようなデータが政府プログラムに如何に適合するかを見極めるよう作られている。毒性試験の基本原理を理解することが望まれるが、このガイダンス書類は経験の異なる利用者に対して実務的に利便があるよう作られている。

まずここでは、単一種を用いた試験を取り上げ、汚染された土壌、底質、水、廃水だけでなく、それらに含まれる個別化学物質の毒性の測定について述べる。この書類では、標準的試験法に関するレポートと試料の採取、基準毒性物質、統計解析に関するガイダンス書類に関して述べる(EC, 1990d; 1994c; 1995a in prep., a)。環境評価プログラムにおける毒性試験の利用について、それらの幅広いプログラム（実験結果の野外での検証、環境インパクト評価、等）を説明しながら、一般論を述べる。政府プログラムにおける毒性試験の利用については、そのプログラムの説明の中で述べる（5 章)。緒論として、毒性試験の潜在的な利用可能性として、生物蓄積、生化学・生理学的変化（バイオマーカー)、免疫反応、腫瘍発生、メソコズム研究、監視技術といったいくつかの一般的トピックスを述べる。いくつかの技術は今なお開発途上にある（6 章)。

毒性試験には多くの適用例があるが、ここでは規制（管理）を目的とした適用に注目する。毒性試験は水圏や陸圏生態系にすでに存在している毒性物質の影響を評価することができる。試験は、新規の市販化学物

質の評価や環境保全のための指針や目標を設定するために必須である。毒性試験を化学分析と併用することにより、廃水や汚染土壌、底質、産廃浸出水のような複雑な組成の混合物中の有害物質を同定する事ができる。毒性試験は化学分析の効率を高めることができるので、コストの削減につながる (Sergy, 1987; Wren et al., 1993)。はじめに、毒性試験の役割 (1.2、1.3 章) と基本的概念と用語 (2 章) を始めとした一般的事項を述べる。信頼性保証および異なる試験法の比較は3章で取り上げる。4章では一般的なデータの解釈を論じ、水・底質・土壌のための特別な試験を述べる。5章では、次に示すカナダ環境省における毒性試験の役割を述べる。

1．廃水監視プログラム
2．環境影響監視プログラム
3．海洋投棄・底質浚渫・監視
4．環境有害性評価
5．国内汚染地浄化プログラム
6．環境質指針の開発
7．新規物質届出管理
8．優先物質の環境評価
9．環境選択プログラム

情報源　カナダ環境省によって出版されている試験法のそれぞれの書類は、試験法や供試生物種、詳細についての参考文献に関するバックグラウンド情報を含んでいる。新しい方法や改良された方法は、すべての技術的・科学的分野でそうであるように、環境毒性学分野においても常に改善されている。初期に行われた開発は、本稿の参考文献に掲載されている科学論文誌に掲載されている。研究者にはそのような論文誌を参照することを勧める。

有用な指針の主要な情報源は多くの場合、本、主要な報告書、コンパクトディスクから入手可能になりつつある。研究者は本のレビューセクションや出版社からの環境関連リストを追跡するとこによって、これらを知ることができる。いくつかの本や主要な総説はこの文書の適当な章で述べられている。次に、いくつかの重要な参考文献を述べる。環境毒性学の一般的な観点は、Landis and Yu (1998) やHoffman et al. (1995) による本に、より詳細な水生毒性学における手法は Ostrander (1997)によって述べられている。毒性物質についての知見はしばしばほ乳類への影響に向けられて編集されているが、成書 (Wexler, 1998)や CD(ATSDR, 1998)は実験所の図書として有益な情報を提供する。カナダ人編集者によるハンドブックでは、水生生物に及ぼす毒物の影響(Ramamoorthy and Baddaloo, 1995)と齧歯類やほ乳動物への影響(Ramamoorthy, 1996)を分冊として出版している。OECD(1995a)は水生毒性評価のための指針文書を提供し、広範囲を網羅して多くの有益な方法を述べているが、いくつかのセクションは簡略化されすぎていたり、どこで開発されたか不明な独特な実施例を無批判のまま受け入れている。

1.2　3種類の技術における毒性試験

毒性試験は、化学分析や生物群集調査の代わりをすることはできない。逆に、毒性試験の重要性は化学分析や生物学的野外測定と関連させることにより最も良く理解される。これらの３つのアプローチは、それぞれがお互いの力を強めあう(Sergy, 1987)。排出を規制するために毒性試験を採用して管理を行ってきた経験から、毒性試験を従来の化学分析と結びつける重要性が強調されている(Blaise, et al., 1985; Hunt et al., 1992; Klemm et al., 1990; OECD, 1987)。そこで、排出および受容環境における(a)毒性試験、(b)野外バイオモニタリング、(c)従来の化学分析の相互補完的な利用に関して説明する。

これら３技術は異なった役割を持っている。Munkittrick and McCarty(1995)は毒性試験を含む特別な技術を採用するための理論、種々のアプローチが本来有しているジレンマ、そして生態毒性学研究で時に明らかである混乱について概説している。

「毒性試験」が廃水や底質、土壌のような試料に実施される場合には、毒性の限界が明確であれば管理目的で使用される。また、試料を試験して受容環境で予測される毒性の程度を計算することによって、予測目的でも使用されうる。すべての環境要因がその試験に含まれることを示す場合には、廃水に対して実際の流水中での毒性試験（すなわち、プリューム中においた籠に閉じ込めた魚）が用いられる。通常は濃縮された廃水や他の汚染源を試験し、受容環境において予測される毒性を計算するために希釈倍率を用いることがより効果的である。

「化学分析」は、種々の用途で使用されうる。まず、廃水中にある特定の物質が存在することが明らかであれば管理目的である。次に、その廃水から実環境中で予想される濃度を計算することによって予測目的である。３つ目は、実環境における結果を検証するモニタリングのために使用されうる。２番目と３番目の化学分析の目的は、水・底質・土壌のための質的指針と比較することによって達成される。

受水域あるいは受容環境の媒体中における**「生物調査」**の重要性は明らかである。このような調査は生態系が影響を受けているかどうかを調べるために最終的な方法である。その使用は”事後”審査のためであるが、生物調査は毒性試験のように悪影響を予防するための予測的方法を提供できない。

管理ツールとしての化学分析は、産業や都市廃水の質を評価するための伝統的な方法として、長い間使われている。濃度の制限が廃棄物中のある物質のために設定されたり、あるいは負荷の制限を適用することができる（廃水中の濃度に廃水量を乗じる)。カナダ政府は紙・パルプ工場の最近の規制において、両タイプの制限を用いた。例えば、ダイオキシンには最大濃度を指定し、懸濁物質には最大の負荷量（生産されたパルプのトン当たり１日当たりのキログラム）とした(EC, 1992h; DFO, 1992)。そのような制限は、今までは、廃水処理施設の「最適処理」能力、あるいは「BAT (best available treatment), BATEA (best available treatment economically achievable)」などに頼ってきた。このような制限は、廃水処理工学における良い実施例を示しており、立地条件や受水域環境における希釈の有効量に関わらず、同種の産業には同じ質の廃水を要求する[1]。

---

[1] PCBやダイオキシンのような危険で残留性が高く、生物蓄積性の高い毒性物質に対しては、排出負荷の絶対量を制限することが行われる。これらは食物連鎖において蓄積し、長距離を移動し（極域生態系にまで)、数十年、あるいは百年単位で問題を引き起こし続けるかも知れない。そこで、生産量と排出量の制御が必要となる。排出直後に行なわれる希釈は適切でないし、廃水中の実際の濃度も重要な因子ではなく、排出された

「環境質指針値」とは、汚染評価と制御のための伝統的にずっと使われてきたもうひとつのアプローチであり、“最適処理“戦略とは全く異なる。指針値は、ある個別物質の有意な悪影響がないと判断される最大環境濃度を定義する。水、底質、土壌の指針を開発するための方法は 5.6 章で述べる。この指針は、環境中で監視されるべき質的標準（すなわち、法的限界）あるいは質的目標（法に準ずる目標値）を設定するために用いられる。監視は遡及的であるが、指針は受容環境で混合した後に目標値を満足させる排出の閾値を計算することにより、予測的、予防的、あるいは規制を目的として用いられる。水質指針は、米国では 1970 年代には広範にほぼ独占的に使用されたが、カナダの各州では質的目標値が使用されてきた。例えば、オンタリオ州では４半世紀の間、指針と目標値を出版しており、今なお改訂している(OWRC, 1970)。水質に対して分かりやすく国際的に使用されるカナダ指針のセットがあるが、カナダ環境省は水質の目標値をあまり利用してこなかった(CCREM, 1987)。土壌と底質の質的目標値は、汚染サイトでしばしば用いられている(CCME, 1996a)。

化学物質に基づいたアプローチにはいくつかの主な利点がある。化学測定は迅速であり、いくつかは安価であり、効果的に制御あるいは監視をすることができる。いったん有害物質が同定されると、それらの排出を削減あるいはなくすための試みが行われる。

化学的アプローチには、次のようにいくつかの限界がある。

- 定期的な試料採取では、突発的な流出のようにめったにはないが放流先の生態系には基本的に重要であるかもしれないピーク排出を見逃す恐れがある。
- 最も重要な化学物質が何であるか分からなければ、試験を行うことができない。
- 個々の化学成分に基づくのみでは、複雑な組成の廃水の危険度を予測することが困難である(Sergy, 1987; Hunt et al., 1992)。
- いくつかの有機化合物は測定すること自体が困難である。表流水中で容易に同定できる物質の割合は全有機炭素量の 10%以下である(Galassi et al., 1992)。
- ある物質の総量が測定されても、生物に利用される割合はわからない。
- 毒性学的データが不十分であれば、測定濃度の重要性は不確実である。
- 複雑な組成の廃水中では数多くの物質を測定するために、あるいは個別化学物質（ダイオキシン）を測定するために、費用が高くなる。全ての物質を測定することは実用的でなく、いくつかの化学物質は測定できないかも知れない。

「生物学的質的目標値」とは、化学的目標値と同じように開発され、用いられる。この目標値は USEPA ではこの十年間、効果的に用いられ(USEPA, 1984a)、ずっと強調されている(USEPA, 1991a)。明らかな目標は、受水域に亜致死的影響がないことであり、廃水を用いて亜致死試験を実施し、受水域での毒性の程度を計算する。英国河川協会(United Kingdom National Rivers Authority)は河川水質を監視するためだけでなく、質的指針や目標値として生物指標の利用を提案している(5.5.4 章)。

毒性物質の重量/量が重要である。温度や酸素要求量のような廃水の普遍的、あるいは“自然な”特性に対しては、利用可能な希釈が制御過程において一定の役割を担うことができる。これらの特性は生物蓄積性や残留性物質であるということと関係ないし、環境中の自然過程によって安定化されるものである。

1.3　単一種試験とその有効性

汚染物質の毒性は、実験室や野外において１種、数種、あるいは多種の生物種を用いた多くの方法で測定することができる。カナダ環境省が出版している標準的試験法は淡水、海水、陸域の生物相からの個々の生物種を対象とし、致死的、亜致死的評価の両方を含む。単一種を用いた試験は、経済性、正確さ、繰返し回数の点から、標準化するにあたって実用上の利点を持っており、一般に直接的である。

単一種試験は、生存や生長、繁殖といった生態学的に意味のあるエンドポイントを含んでおり、野外における潜在的毒性影響を推定するために使用できる。実験室試験から予測される影響を、複雑な廃水を含む実際の流れの中での影響と比較すると、一般的に理解できる結果が得られるか、あるいは予測されるよりもいくぶん弱い影響が野外では認められる（4.1.1参照、Sprague, 1997)。

生物内部のまたは多種生物を用いるより複雑な多くの試験は、汚染物質の排出を評価するためには意味があり、有益であるかも知れない。これらは６章で述べられ、いくつかは特別な役割としては有用であるものの、ほとんどの試験が一般的目的の試験としては方法や結果の解釈に困難を伴うことが示されている。そのようなアプローチの一例を次に示す。

生態系の機能における変化を測定することは、汚染物質を評価するために広範囲で意味のあるアプローチのように聞こえる。効果的な環境保全とは、個々の生物種だけでなく、生態系全体そして一次生産や分解、栄養循環のような過程までも包含しなければならない。したがって、一次生産や土壌の呼吸のような試験は、単一種を用いた試験に基づいた外挿よりも優れているかもしれない。しかし、過程（機能）を指向した多数の試験は研究者の社会では有効である一方で、多くはまだ開発途上であったり、標準化されていない。さらに、少なくとも水圏生態系においては、種レベルの試験は呼吸や生産のような生態系機能よりもストレスに対して通常、より鋭敏な指標である(Schindler, 1987)。生物群集には機能過多や回復力があるために、生態系は鋭敏な種を犠牲にして必要な機能を維持することによりストレスに反応する[2]。機能が減少し始める群集は、その種組成に対して既に相当なダメージを受けており、種の交代や他のメカニズムによってストレスをそらせるための能力を使い果たしている。鋭敏な種や個体群は、生態系の機能が毒性影響を示すよりももっと低い濃度で毒性影響を示す。つまり、単一種試験こそが早期の治療あるいは予防に役立つ。

1.4　毒性学的アプローチの利点と限界

生物試験は毒性を評価するための唯一の方法であり、化学分析では予測することはできても毒性を測定することはできないので、表－１の**利点１**が最も重要な点である。しかし、生物試験は影響を及ぼす物質を同

---

[2]例えば、同じような食餌幅の捕食者がいくつかいれば、分解や一次生産のような機能は多くの種の寄与を反映することとなる。毒性や他の環境条件によって、どのような部門でも数種類がいなくなると、それを補償するように残った種の数や活性を増加させる。捕食やある機能の回転速度の程度は殆ど変化しないかも知れない(Cairns, 1983)。一次および二次生産は、最も極端な環境悪化を除いて極めて安定である(Reice and Wohlenberg, 1993)。毒性学的エンドポイントとして生態系機能を用いることは活発に研究されている領域であり、水圏生態系のトピックについてはCairns et al. (1992), Reice and Wohlenberg (1993)がまとめている。

定できないことから、**限界１**が最も大きな欠点である。このようにコインの両面であることは、生物と化学両方のアプローチを相互補完的に用いることが重要であることを示している。毒性同定過程でこの両者を使うことにより、もし目標として掲げられていれば、毒性成分を同定することができる[3]。**利点２**は１の特別な場合である。適切に実施された生物試験は、それがたとえ“正体不明の汚染物質”（2.6 節の精度と正確さの考察を参照）であっても、毒性をいつも正確に測定する。

利点３は、生物に及ぼす潜在的影響の早期兆候を得るられるという強い魅力であり、そのため予防的な対策が可能となる。そのような予測に基づき、個体群に及ぼす実際の影響を評価するために野外調査を実施したり、毒性の原因物質を見つけるために化学測定を試みることができる。この利点は、結果を得るためにやや時間がかかる、例えば魚類試験では４日間を要する[4]、といった**限界２**によっていくぶん制限される。化学試験は、いくつかの毒性物質や条件を、迅速に、高頻度で、安価に測定できたり、連続的・自動的に監視できる（低酸素、pH, ある毒性物質）。

利点４は、毒性試験が複雑な廃水中の種々の毒性物質の全影響に対する総合的な回答を出してくれることである。混合物の毒性影響を予測するためには化学的方法があるが、それらは予測的であり、放流先環境における実際の毒性を予測するものではない（Broderius, 1991; Christensen and Chen, 1991; Sprague, 1992）。

利点５は、生きている生物に対する有害性の観点から表される結果が、一般市民に対して、化学データよりもより信頼性があり、理解されやすいことである(Sergy, 1987)。**限界７**は、“毒性”の発見があまりにも単純な方法で使われれば誤った結論を導き、希釈効果や緩和因子を見逃してしまう。

利点６は、単一種試験は化学分析よりもずっと安価であることを示す。しかし、いくつかの毒性試験は経費がかかる。例えば、個体群や群集、生態系を調べる調査では多くの異なった単一種試験、多種のマイクロコズム、メソコズムが必要となる。これらの試験は必要である場合にのみ用いられるべきである（Sergy, 1987）。それゆえ、試験が選択される前に、試験の目的や予期される情報の種類が十分に理解されなければならない

限界３は真実であり、実験室ではほんの２，３種が用いられるのみである。たとえわずかの割合でも、自然群集にいる種を試験する試みは、極めて高価であり論理的に非常に意味がある。標準種あるいは代用種は、他の特徴の内、感度の点から慎重に選択されており、それらが自然界において鋭敏な種を代表することを実質的に仮定している。この仮定は実験室試験の野外検証において一般的に支持される（4.1 章）。そこで、限界３は多様な生物種（魚類、甲殻類、藻類、細菌）が使用される限りにおいては、あまり大きな問題ではない。

限界４と５もまた真実である。室内試験は自然環境のストレス要因を含まないし、環境の自然変動を模倣しない。試験は正当な理由をもって標準化される。生物は、毒性の過誤や過大評価に寄与する低溶存酸素や急激な温度変化のような他のストレス要因と交絡影響のないよう、最適環境のもとで試験される。試験は、

---

[3]研究者は時として毒性物質を同定することを望んでいないことがある；適切な行動をとるためには毒性があるかないかを知るだけで十分である。複雑な工場廃水は数千の潜在的毒性物質を含むことがあり、それら全てを同定したり、個々の物質の毒性に対する寄与（パルプ工場廃水）を定量することは殆ど不可能である

[4]限界２は条件付きである。新しい多くの毒性試験は迅速であり、いくつかは30分間ほどで結果が得られる（微生物、原生動物、ウニ類、ワムシなどを用いた現代的な試験）

毒性物質以外の全ての変動要因を制御することにより、正当な実験設計の原理に基づいている。付随する変

表—1　毒性試験の利点と限界

利　点
1．　致死あるいは亜致死影響を直接推定できる。慢性試験によって毒性物質の長期影響を推定できる。
2．　毒性物質が未知であり、化学的に同定されなくとも、また毒性学的データがなくても、毒性を測定できる。
3．　環境に対する潜在的な悪影響を早期に警告または予測できる。
4．　毒性物質の混合物の影響を説明できる。化学的に複雑な組成の廃水は、単一の一般汚染物質として評価できる。
5．　産業界や社会に対して、試験結果をより迅速に分かりやすく、信頼性高く、説得することができる。
6．　通常は化学分析より廉価である。毒性試験は、汚染物質のマトリックスの複雑さが増すにつれて化学分析より費用効率が上がる。
限　界
1．　毒性を生じる物質を同定できない（化学／生物毒性同定法により可能ではある）。
2．　単純な化学分析に比較すると、伝統的な試験は比較的時間を要する。一方、新しい試験は極めて迅速である。
3．　生態系を構成する多くの種の内、ほんの数種類しか試験されない。
4．　供試生物は、野外に存在する他のストレス因子（温度、水流、捕食者、感染病媒介動物）に暴露されない。逆に言えば、供試生物は自然に存在している、自然の吸着、解毒、その他の毒性緩和機構からの利益を受けない。生物は有害物質を避ける機会を持たない。
5．　自然環境の多様性を代表しない。
6．　通常は、化学物質の生物蓄積や残留を直接的には測定しないが、貝類や他の生物を用いることにより毒性と生物蓄積を結びつける方法はある。
7．　結果をあまりに単純に使うと、社会や規制者を誤った方向に導く可能性がある。

動要因（温度、水の種類）は一定で良好な状態にあり、有害物質は一連の決められた濃度で変化する。もし必要であれば、一連の固定された付随条件（異なる固定値のpHや温度）が加えられる。濃度を固定することによって、効果的な方法で結果の解釈や明瞭な解析を行うことができ、濃度が変動したり幅をもって環境条件が変化する現実世界への予測に使用できる。加えて、異なる種に及ぼす一連の試験を行うことにより、情報量や予測の有用性が大きく増加する。

限界6は、毒性試験は通常、毒物の迅速な生物利用性のみを測定することを示す。毒性試験は化学物質の生物蓄積性や残留の程度を測定できないので、そのためには別の方法が用いられる（Klemm et al., 1990）。（水や土壌、底質の質的指針の開発や生態学リスクアセスメントにおいては、その過程に生物蓄積性のための別のデータが含まれる。）同様に、環境に排出後の廃水は毒性が変化するので、排出前の廃水に関する毒性試験からは排出後の化学的・物理的な変化を説明することはできない(Sergy, 1987)。このようなことは、影

響を受けた受水域の水や土壌、底質の毒性を直接試験することにより、少なくとも部分的にあるいは別に解決できる。

毒性試験の精度は、化学試験の精度と通常は同じであるので、表１のトピックとしては掲載されない。最近、致死と亜致死試験の両方について、実験室内および実験室間で比較したところ、通常の変動係数は30-50%の範囲にあった。この変動は許容範囲にあり、化学測定、特に検出限界付近の有機物質や無機物質の変動と同程度である。

１．５　単一種試験への支持

カナダは毒性試験を規制目的として使用した初期の指導者であった。一部の州、アルバータ州およびオンタリオ州では1950年代に毒性試験を管理目的で使用し始めた。カナダ環境省は25年前に、新たなパプル工場からの廃水はニジマスに対して毒性がないことを要求する規制と指針を施行した(EC, 1971, 1972)[5]。

その６年後、B.C. ResearchのT.E. Howardは「他のどの国も、許容廃水水質の生物学的クライテリアを工業が満足することを要求していない」こと、「そのような基準の存在が新設の紙・パルプ工場に二次処理施設を組み入れることを要求してきた」ことを述べた(Howard, 1978)。カナダ環境省は一連の単一種試験をうまく使用すれば、環境保護を改善できると結論づけた (Sergy, 1987)。

政府、企業、国際機関は数十年にわたり、野外における潜在的毒性影響を予測するために多くの単一種毒性試験を採用しており、特にこの10年間、顕著な努力が払われてきた。オンタリオ州は、廃水を管理する主要なプログラム (MISA; Municipal and Industrial Strategy for Abatement) に毒性試験を組み入れた(Bonsor et al., 1988)。単一種試験 (致死、亜致死) は1980年代半ばにはUSEPAの管理戦略の一部分となり、今や、排出認可を承諾するために汎用されている(Wall and Hanmer, 1987; USEPA, 1991a; 1994a)。単一種を用いた規制目的の毒性試験は、イギリスを含む西ヨーロッパ全土で使用されている(Hunt et al., 1992)。

アメリカ試験材料協会(American Society for Testing and Materials)は環境毒性学のための多くの標準法を開発してきた。例えば、魚類や他の水生動物を用いた試験は1980年に完成し、今なお用いられている(ASTM, 1997b)。同じようにISO(International Orgaization for Standardization)は、1980年代初頭から標準試験法を出版している。もうひとつの活発な機関はOECD(Organization for Economic Co-opreration and Development)であり、カナダもメンバーである。OECDは、毒性物質の排出を同定、定量化、制御するためには、化学的及び生態学的測定と共に、毒性試験がメンバー国で使用されるべき科学的に調和のとれた方法であると結論づけている(OECD, 1987)。ワーキンググループは多くの標準的生物試験法を出版してきた(OECD, 1992j)。OECDは産業化学物質を試験するための標準化されたアプローチおよび一連の試験を開発することに努力してきた。広範囲にわたる試験を対象として概要コメントおよび評価表を提供してきたワーキンググループの初期の試みは、膨大な報告書にまとめられている(OECD, 1998b)。その報告書がこの時点においてカナ

---

[5] この規制と指針では、監視のための多くの長所を持つ簡単な試験を概説した。法的目的のための確定試験では、65%の廃水中でニジマスが80%以上生存することを要求した。試験水は連続流水式で、数連で実験することが推奨された。生存率が80%以下の場合にはその廃水は”毒性”があるとし、カナダ漁業法の33項に基づいてその排出を違反とした。監視試験の代替法は静置試験で、試験水を毎日交換することが推奨された。

ダ人研究者に対して特定の指針をほとんど提供していないことが、開発のこの段階での複雑さから伺われる。EEC(European Economic Community)も生態毒性試験を施行し始めている(EEC, 1992a, b)。これらの例は廃水試験から引用されているが、化学および毒性試験を統合して用いることの有用性は、土壌や淡水底質あるいは海水底質にも同様にあてはまる(Wren et al., 1993; ASTM, 1997a)。

カナダ政府は「人工で、残留性があり、生物蓄積性で、毒性のある化学物質を実質的に環境から除くため」の政策を提案している(EC, 1994a)[6]。化学物質が多量に、あるいは「環境に対して直ちにあるいは長期にわたって有害影響を及ぼす、またはその可能性がある」条件の下で環境に入れば、その物質には毒性があると考える(EC, 1994a)。生物試験はその政策を満足させるために明らかに必要である。毒性試験は、既に、漁業法、カナダ環境保護法(CEPA)、危険製品輸送法、有害生物防除製品法、およびカナダ州政府の他法で必要とされている。

[6] 明瞭かつ適切に、政策はこのような問題を引き起こす人工有機化合物、例えばPCB、残留性農薬や毒性のあるダイオキシン類を対象としている。

第２章　環境毒性学の基本概念

本章では、極めて重要な毒性試験の専門用語と概念をいくつか解説し、用語解説とともに利用できる。いくつか示されている参考文献は、カナダ環境省が出版した標準試験法であり、それぞれ適切な原理的予備知識が述べられている。生態毒性学のより広範囲の情報はPetrocelli とRand (1985)とRand(1995)の成書から入手することができる；初期の文献が基本的な情報についてはより有効であろう。

２．１　用語

概　要

- 毒性とは、ある物質が生物に有害な影響を引き起こす固有の能力である。毒性は、致死または亜致死（例えば、成長への影響）をもたらし、急性か慢性のどちらかに区分される。
- 全ての試験は、生物、媒体、そしてエンドポイントで特徴付けられる。それぞれの要素は、試験系をつくるのに十分注意されるべき多くの選択肢がある。一つの試験系は、多重または単一濃度、止水または更新があり、一つか二つの対照と、名目上または実測の濃度列を有する。

カナダ環境省が出版する試験方法では、毒性を*生きている生物に有害な影響を引き起こす物質の固有の潜在力または能力*と定義している。カナダ環境保護法 (CEPA, 1988)第１１節では、毒性物質を「ある物質の環境中に入る、または入るかもしれない量、濃度、状態が、(a)環境に急性または慢性の有害な影響を持つ、または持つかもしれない、(b)人間の生命が依存する環境に危険性を与える、または与えるかもしれない、(c)人間の生命または健康に危険性を与えるまたは与えるかもしれないときに、その物質は毒性がある。」と定義する(EC and HWC, 1993)。

有害な（有毒な）影響は、生物の死（致死毒性）、または成長の阻害のようないくつかの亜致死影響を含む。それぞれの毒性試験は、試験の*エンドポイント*と呼ばれる有害な影響を、一つまたはそれ以上測定するように設計されている。*急性*毒性は、生物の寿命に比例して、数分間、数時間、数日間の短期曝露中、または曝露後、急速に起こる。*慢性*毒性は、通常生物の寿命の１０％かそれ以上である、より長い曝露期間の後、顕在化する。例えば、魚や水中無脊椎動物へ最も一般に使われる急性曝露は４日間で、もし生物の寿命が通常の２年間だとすると、慢性暴露は２ヶ月かそれ以上の期間になるだろう[7]。

---

[7]急性や慢性は相対的な用語である。異なる種間では、寿命の期間は広くさまざまなので、ある生物への急性曝露は他のものにとっては慢性曝露であるかもしれない。例えば、維管束植物にとっての４日間の急性曝露は、バクテリアや藻類にとっては慢性であるだけでなく、それらの何世代の期間にあたるかもしれない。水性毒性学についての報告書や出版物を読むときは、一部の著者は明らかに「急性」と「致死」は同じ意味だと考え、一方で他の著者は誤って「亜致死」を意味して「慢性」と書くということを、知っておかなければならない。この混乱は、多くのよく知られた急性毒性試験はエンドポイントとして致死を使うため、また慢性試験はほとんど常に亜致死毒性を測定するために起こるように思われる。あいにく、そのような誤解は広くゆきわたっており、アメリカ合衆国環境保護庁の出版物(例、Klemm *et al.*, 1990)の中にさえあり、環境毒性学の出版物に不確実性を与える。そのような専門用語は正しく使うよ

死は、最も一般的に測定される急性影響である。慢性致死は、時々測定されるが、ほとんどの慢性試験は、繁殖阻害のようなより微妙な影響を測定する。成長阻害や新陳代謝の変化のような、亜致死影響の多くは、慢性か、急性曝露かどちらかで測定できる。誘引もしくは忌避反応や、ストレス反応を表す急性生物化学変化は、従来の致死試験で死を引き起こさない濃度で、数分間か、数時間、数日間の短期間中または期間後で測定できる。最も完全な毒性試験は、*ライフサイクル*の慢性曝露で、その中で生物は、例えば成体から生殖細胞を通じて、受精、子の成長、そして再び成体というような一世代を通して被験物質に曝露される。

そのような試験では、繁殖の成功、成長、組織異常や生理学上の変化のような、亜致死影響の範囲を観察できる。実用性と簡潔さのため、多くの亜致死試験はライフサイクルの中で特定の感受性の高い段階、特に成長段階（例えば、ニジマスの初期成長段階である７日間、３０日間、または７０日間の試験選択（EC, 1998））を使って比較的短い曝露としてまとめられている。

毒性試験は時として、生物学的試験や*バイオアッセイ*と呼ばれる。なぜなら、物質の活性や強さを測定するために生物を使うためである。しかし、全ての毒性試験がバイオアッセイである一方、一部のバイオアッセイは毒性試験ではない(Chapman, 1989a)。より明確な用語「*毒性試験*」は、全てのカナダ環境省試験法の標準専門用語である。本書では、「毒性試験」は特にことわらない限り、実験室内における単一種の生物を用いた試験を指す。

２．２　試験系共通の特徴と設計

全ての環境毒性試験は、生物、媒体、エンドポイントという３つの要素を持つ。ほとんど主要な生物の集団は、今は標準試験方法によって示されている。すなわちバクテリア、原生動物類、線虫、藻類、維管束植物、昆虫、そして他の節足動物、軟体動物、環形動物、両生動物、そして魚である（第２章３参照)。媒体は、淡水または海水、土壌や汚泥からの水溶性抽出物、水生底質や陸生土壌である（第２章４)。エンドポイントは、試験物質によって引き起こされる影響と、試験物質の欠如は別として、理想的な状態にした*対照*生物の中で検出される（もしくは検出されない）影響とを比較して評価される。定義によって毒性物質が有害であるとしても、ある物質の濃度が低いと、場合によっては成長やその他の生物学的な機能を刺激することがありうる。つまり標準的な毒性影響が観察されなくとも、物質は生物学的に活性があることを指す。

試験物質を希釈するための媒体は、通常、試験方法に規定されている。普通、媒体は、室内培養を維持するために、実験で使用する水、またはきれいな土壌や底質、もしくは生物に適していると知られる人工的につくられた媒体である。もし毒性がｐH、水の硬度、微粒子への吸着によって変わり、生物への利用性を変えるとしたら、また底質の粒径が生物に影響を及ぼすとしたら、希釈媒体（水、底質や土壌）は、実質的に結果を大いに変化させるであろう（第４章１５参照)。それゆえに、希釈は、あらか

うに注意するべきである。「亜急性」や「亜慢性」のような専門用語もまた文献では見られるが、依然として厳密な意味はなく、それらの使用を避けるのが最善であるだろう。

じめ試験を準備する情報を正しく理解して、慎重に選ばれなければならない。特定の場所での影響を予測することを目的とした試験は、その環境から採取した希釈媒体、例えば排水の排出口の上流から水や底質をもってくるか、影響のない対照となる場所からもってくる必要がある[8]。

エンドポイントは試験の２つの主要種類で異なる。一般的によく用いられる*多重濃度試験*では、選択した種の決められた個体数をいくつかの試験容器でそれぞれ曝露する。容器には、試験物質の一連の濃度列が、通常は幾何級数的に（すなわち対数列で）[9]準備される。曝露は決められた一定条件と固定された時間を用いる。対照や希釈に用いられる水、土壌そして底質は、阻害影響が試験生物に及ばないことがわかっている場所から採取されなければならない。

結果は、試験物質の毒性の強さや度合いを定量的に推定するために用いることができる。その推定とは、半数致死濃度（以下 LC50）や半数影響濃度（以下 EC50）、半数阻害濃度(以下 IC25)のような*濃度*を定義する。

これに替わる*単一濃度試験*では、その単一濃度で観察される影響が、対照の結果と比較される。エンドポイントは、単純に毒性の有無で表し、毒性の強さの量的な推定ではない。そのような試験は、通常簡単で経済的で明確な規制となる試験となるように注意深く設計され、それゆえ時々pass/fail ○×試験と呼ばれる。それらは、しばしば排水や汚染された土壌や底質の全サンプルを使用する。

対照（しばしば*陰性対照*と呼ばれる）は、全種類の毒性試験で影響判定点を決定するための主要な因子である。なぜなら、それらは試験物質がない場合の生物学的機能の基準を与えるからである。対照はまた、実験における品質の一般的なモニターとして働く。例えば、急な温度変化、操作ミス、また気づかれない病気は、毒性物質がなくても死を引き起こすかもしれない。同様に、ミミズを培養するには酸が強すぎる、または湿潤すぎる土壌は、毒性物質を添加しなくても死や成長阻害を引き起こすだろう。標準毒性試験は全て、試験が有効な場合の陰性対照での生物学的影響の最大許容レベルの判定基準を有している（第３章参照）。いくつかの底質試験では、２つの対照を実施することがよくある。１つは試験底質が集められた場所からの汚染されていないサンプル（対照底泥）、そしてもう１つは試験生物が採取された場所の底質か標準実験用底質である。

しばしば*陽性対照*と呼ばれる基準毒性物質を用いた試験は、生物の性能の変化を検出し、また試験の

---

[8]同様に、対照は、産業工程の一部を流れる水かもしれないし、同じ水が試験溶液の希釈をつくるために用いられるかもしれない。まれな状況で、ひょっとすると清澄な実験水で希釈された「*対照*」上流水と下流水の両方で濃度列が作成できるし、その影響の厳格さが両者で比較されるだろう。

[9]濃度の対数列では、等間隔による濃度列でつくったものよりも、各々の濃度が大きい。試験濃度範囲にまたがる等間隔の濃度設定は、感覚的にバランスがいい試験として通常よく用いられる。その一方で、いくつかの単純な例の中に不適切な算術増加が見られる。一つは、算術的に、1,2,3,4 そして 5mg/L と濃度列をつくることである。しかしながら誰も 1001, 1002, 1003, 1004 そして 1005mg/L と設定しようとしない。なぜならばこのような濃度の増加は微小な変化であるからだ。割合についての疑問の一つに、低濃度試験に類似した濃度列を 1000, 2000, 3000 などのように高濃度試験に与える。理屈は単純で、限られた濃度列中の割合の変化に適用されている。1 から 2mg/L への変化は２倍である、そして 100%の増加である。一方、4 から 5mg/L はたった 25%の刺激の増加である。従って、試験は、1,2,4,8,16mg/L のように、それぞれの濃度がその試験生物が一つ前の低い濃度よりも２倍量を曝露されるように、幾何級数的または対数的な濃度列を用いて行う。

正確さを評価する方法を表す。基準毒性物質は純粋な化学製品、通常、金属（例えば亜鉛）や単純な有機化合物（例えばフェノール）であり、試験生物への毒性が十分に記録されたものである。基準毒性物質を用いた複数濃度試験は、正常な範囲外での影響を検出するために使われる。異常な影響は、その生物体への変化、すなわち悪い健康状態、もしくは対照化学物質の毒性を修飾した媒体の変化の証拠としてみなされるだろう。陽性対照も陰性対照も試験の正確さを評価するために必要であり、その評価の条件は、全てのカナダ環境省試験方法や、ガイドラインマニュアルから得られる(EC, 1990d; 1995a)。

毒性試験は、被験物質の更新の種類によって分類することができる。*止水式*試験では、生物は、別々の容器（例えば、ビーカー、バケツ、水槽）の中で１つまたはそれ以上の濃度区の試験試料に曝露される。*流水式*試験は流体に用いることができる。つまり、試験の期間中、それぞれの容器では多かれ少なかれ連続的に溶液が更新される。*回分式*試験は、通常毎日、回分式に溶液の一部または全部を更新する、折衷法である。それは、水溶性試験での溶液の交換も含み、陸生試験での底質や混合土壌を用いた試験における上層水の場合も含む。どの方法が試験のために規定されても、カナダ環境省から出版された試験方法は、あらゆる毒性試験の有効性の要件を与える[10]。

試験容器中の毒性物質物の濃度は、「添加された」もしくは（希釈計算からの）*設定された*ものであり、また試験容器の内容物を代表する一部の試料から直接化学分析をして得られた*実測*濃度である。

これは、毒性試験を２つのクラスに分類する１つの方法であり、どちらのクラスが与えられたどの試験に適用するかは明らかにすべきである[11]。

---

[10] それぞれの試験方法は特有の利点と不利点をもち、それぞれの方法は十分にまたは不十分に計画されうる。静置試験は、物理学的または生物学的な分解、大気中への揮散、または試験生物による同化、そして容器壁への吸着を通じて毒性物質濃度の低下をより受けやすい。時々、大きな生物を試験するとき、必要な試験物質の量（や十分な大きさの水槽）を得にくいが、妥協すると、その量が試験を意味の無いものに変えるかもしれない。静置または静置—更新試験は、水生底質を試験するために選択する方法であり、廃水排出の重要で便利な監視方法であり、それゆえ、よく使用される。流水式試験は、純粋な化学物質や揮発性物質の研究段階の調査に特に有効である。言い換えると、それらは、土壌や底質、また堆積したり装置を閉塞させたりする一部の流体には使用することができない。試験溶液の量や流入量は、注意深く計算されなければならないし、そうでなければ流水式試験は本質的に止水式試験になる可能性がある。経験に基づくと、流入量はある時間内で95%の分子交換が達成するときの量の3倍に等しくならなければいけない。静置—更新試験では、溶液の交換は、不当に試験生物を侵害することや、結果に影響を与えるかもしれないことを除いた、いくつかの場合では、実行が難しくなりうる。

[11]廃水や底質などの複雑な混合物を試験する場合、試験物質のある成分を濃度チェックのために化学的に測定することも可能であるが、選択の余地はなく名目上の設定濃度を使用する。化学物質を試験する場合には、設定濃度は劣っており、生物が曝露されている濃度を全く非現実的に表す可能性がある。もし濃度の化学的測定ができるならば、それはエンドポイント（LC50やIC25など）を算定するのに使用されるべきであり、名目上または設定濃度は除外することができる。化学分析を行なう際には、使用された化学的な測定方法や特定の測定法の正確さや精度の評価を実施されなければならない。

２．３　試験で使用する生物

概　要

- 標準試験種は、その実験室の状況に適応できるよう選ばれ、また環境中で感受性の高い種の代表でもある。より多くの試験は、適当な時間内で繁殖試験ができ、適当に短い生活周期をもつ、より小さな生物を利用するようになってきた。
- 標準種を用いる試験は不変の基礎をもつ情報を提供する。
- 生物種と試験は、関心のある生態系に関連のある毒性学的情報が得られるように選ばれるべきである。
- 一連の標準化された方法と関連した生物の組み合わせ（以下バッテリー）を使って、様々な種類の生物を試験する事が最初に優先される。それ以外では、場所特有の情報が必要なときに、適当な現地の種が使うことができるが、それと平行して標準種を用いた試験も行うべきである。

毒性試験の日常のプログラムで使用される標準種の数は限られているが、今は広範囲の生物の*種類*を代表している。１つか２つの感受性の高い標準種は、潜在性汚染物質の常時監視に使うことができる一方、様々な種類の生物を用いたバッテリーは、新しい化学物質や潜在性汚染物質の発生源の初期調査に最適である。室内実験に適した種に制限のあることが、利用可能な種のリストをある範囲に限定している一方で、習慣的に広く流通している数少ない標準試験種の使用は、様々な物質の毒性を比較するのに望ましい。

２．３．１　供試生物種の望ましい特徴

室内試験のための生物はたくさんの特徴を有するべきである。彼らは室内で比較的簡単に扱いやすく飼育・培養され、また健康状態を維持されるべきである。生物は試験中容易に数えられ、はっきりと定義された、測定しうるエンドポイントを示すべきである。

慢性試験では、繁殖影響を適当に短期の試験に含むことができるために、短く単純なライフサイクルをもつ動物を使用する傾向が強い。ミジンコであるニセネコゼミジンコ *Ceriodaphnia dubia* やオオミジンコ *Daphnia magnana* は広く試験に使用される。なぜならばそれらはそれぞれ数日、また約一週間で成熟し繁殖するからである。無性生殖的に産まれる、それらの仔を数えるのは簡単である。試験において有性生殖しないことは、それが一つの交絡要因として取り除かれるが、内分泌物撹乱などいくつかの生殖影響の評価を不可能にしている。

試験種や近縁種が、カナダにおいて一般的で広く分布している場合は、試験結果はおそらく、ほとんどの人々により適切だと見えるだろう。科学的また技術的観点から、種は一般的であるか、また現地の種である必要はない（第２章３.２参照）。現地の種への感受性が類似しているべきであるが、魚や甲殻類などの集団の中に、広範囲な類似性が存在しており、そのため代替生物を用いても妥当性がある。重要なのは、それぞれの試験種が実験室内で信頼でき、感受性の高い性能を発揮すべきであることで、試

験計画で生物の豊富な多様性を含めることも重要である。試験種を選択するときにそれらの要因は両方満足されるべきである。選択された種が現地の生息地で見つかる感受性の高い種を代表できない疑いがあれば、現地の代表種をもまた試験すべきだろう。

試験生物の3つの由来は、室内培養、飼育、現地採集である。*培養された*種は、多くの世代（例えばファトヘッドミノーfathead minnows）を通じて室内で、また商業的（例えばlesser duckweedやレタス）に常に培養されている。培養された種は、通常、生物供給所、大学の培養種コレクションや政府機関で得ることができる。それらはしばしばたった1つかごく少数のクローンしか代表しないので、遺伝的な変動がほとんどない(Soares *et al.*, 1992)。そのことは、利点（結果の少ない変動）であり欠点（野生種をあまり代表していない）でもある。*飼育した*生物は、自然から若いものを採集したことと適正な大きさ、年齢、また試験で用いるために健康な子孫が産まれるまで室内で培養したことを暗に意味する。最後に、長大な時間をかけて室内で培養する必要なしに野生生物を採集することは、いくつかの試験には申し分ないかもしれない。カナダ環境省は、トビウオと海産種または汽水種の端脚類（ヨコエビ目）の急性毒性試験と、ウニやカシパンの受精の成否による亜致死試験に現地採集生物を使用している。現地採集はまた、特定固有種を試験することが重要なときにも使用されるかもしれない。生物は、試験に使用する前に、温度、塩分また明るさの適切な状態に順応させるべきである。

２．３．２　供試生物種の感受性

毒性試験の主な前提の一つは実験室内で有害な影響なしと示される濃度は、感受性の高い種も低い種も含めた自然の生物群集を保護するということであるため、一連の毒性物質への感受性は試験種の主要な特質といえる。ここ数十年にわたって、実験室内で使用するために感受性の高い種へ変更していく傾向があり、かなりの作業量は、毒性物質の様々な種類への感受性を比較することになった(LeBlanc, 1984; Schimmel et al., 1989)。

室内実験用に感受性の高い標準種を選ぶことは重要である一方、与えられる集団（例えば魚類）のほとんどの生物間で、感受性の違いは大きくないかもしれない。本当に大きな感受性の相違は、集団間（例えば魚類と甲殻類での、甲殻類と細菌での差）で見られる。その上、特定の集団が、全種類の毒性物質に最も感受性が高いことはない。無脊椎動物、藻類、そして他の生物（個体と同様に集団として）の間で、魚類間よりもさらにたくさんの感受性の差が見られるという、多くの証拠がある[12]。それゆえに、

---

[12]類似した生物集団*内*の感受性の変動は大きくなく、魚類はよく研究された集団の例として取りあげることができる。多くの毒性物質の場合毒性物質、特に一般的な作用機序を示す物質の場合、魚類の異なる種による耐性の変化は、しばしば5倍以内、多くとも10倍以内である。それは多いと考えられるかもしれないが、実際は、魚類の単一種の実験室内及び実験室間で示される試験結果の差とだいたい同じである（Sprague, 1985参照）。様々な魚類の類似した感受性の1つの例として、少なくとも4つ作用機序をもつ10種の有機化学物質が、Thurstonらによって魚類6種への致死試験が行われた(1985)。化学物質の内9種は、最も高い耐性の種のLC50と最も感受性の高い種のLC50と比は、1.5から4.6までの低い値を示した。10番目の化学物質（殺虫剤のPermethrin）では、金魚が最も感受性の高い種よりも77倍耐性があり、かなりの相違であるが以下に述べる生物の種類間の差に比較するとそれほど大きくはな

化学物質の毒性の十分な予備試験は、魚類のような1つの集団の様々な種よりもむしろ、異なった栄養段階や分類学上の集団から様々な生物を含むべきである。そのような毒性試験のバッテリーを用いることは、「新しい」毒性物質を評価するために重要である。またそれは、都市下水や産業廃水、汚染された底質や土壌などの複雑な混合物を評価するためにも重要である。なぜなら異なる種類の生物は、試験物質の毒性物質と全く異なる区分の毒性物質に影響されるかもしれないからである(van Straalen and Denneman, 1991; USEPA, 1991b)。

毒性試験バッテリーを使用する原則は、水質指針値を導く勧告の中で広く認められている(Stephan *et al.*, 1985; Giesy and Hoke, 1989)。一部の機関や個人は、生態毒性学的評価に、異なる門や栄養段階から少なくとも3種の生物が必要であると結論を下してきた(USEPA, 1991a; OECD, 1992b; EC and HWC, 1993)。藻類1種、無脊椎動物1種、魚類1種からなるバッテリーは、産業廃水や都市下水には合衆国環境保護庁によって(USEPA, 1991a)、パルプ製紙産業の環境影響モニタリングにはカナダ環境省によって(EC, 1997c)推奨されている。大量のデータの比較から、Sloofらは、魚、甲殻類、緑藻で毒性をスクリーニングすると、しばしば毒性の最大値を示すことができず、そして感受性を増加させるために珪藻*Microcystis aeruginosa*もまたスクリーニングに入れるべきだという結論を下した。

一旦、ある物質の毒性が試験バッテリーにより確立されると、将来のどんなモニタリング計画も単一種を用いた試験に戻ることができる。これは調査作業での最も感受性の高い生物かもしれないが、そうである必要はない。標準的で十分な感受性をもつどんな種でも、生物群集の最も感受性の高い要素集団を保護するために設定された規準を用いて、モニタリングに用いることができる。例えば、ニジマスは、他のモニタリング計画から近縁種のデータや広範囲のデータがあるので、使用することができる。

2．3．3　現地に関連した生物種の選択

ある毒性試験のために種を選択する際、2種類の異なる影響が存在するかもしれないが、それらは完

い。「最も感受性の高い」または「最も耐性のある」魚類が存在するというはっきりした根拠はない。金魚は10回の比較のうち3回、カダヤシとブルーギルでは2回、ナマズとニジマスでは1回、そしてファトヘッドミノーでは9回の比較で最も耐性があった。同様に、Fogelsと Spragueは、small tropical flagfishとゼブラフィッシュは、通常の実験室間及び実験室内の差と比較して、致死耐性ではニジマスとそれほど大きな差はないと結論を下した(1977)。Irwinは、精油廃棄物の中で57種の魚を試験し、最も感受性の高い種（gizzard shad）と最も低い種（グッピー）の間でたった5倍の差しか示されないことがわかった(1965)。[魚類間の主な異常な感受性の差は、有機リン酸殺虫剤に対して4倍から900倍の範囲である(Pickering *et al.*, 1962)。]
集団間での感受性の差の方がより大きいということには、多くの根拠があり、例としては先に述べた無脊椎動物、藻類、他の生物や魚類間での比較があげられるだろう。Stephanは、淡水と海水両方で、8から45種類の様々な生物に21種類の化学物質の急性致死を比較した(1982)。彼は全部で最大LC50値／最小のLC50値の比を38事例得た。すなわち13事例が1000より大きく、15事例以上が100より大きかった。LeBlanc(1984)と Schimmel ら (1989)は、魚類、無脊椎動物、そして藻類の様々な金属、有機化学物質そして産業廃水への感受性を比較した。影響は一般に同じ被験物質で、2から3オーダー異なった。異なる物質群に対しては、生物間における感受性のオーダーは同じ傾向にあった。魚類が有機物やアンモニアにより感受性が高い傾向があった一方、甲殻類は金属に対して感受性が高い傾向にあるが、ほとんどの殺虫剤には比較的抵抗力を示した

全に対立するわけではない。標準種を用いて試験することは重要であるが、その種は意義のある情報を提供するために、その注目している生態系と関連づけられるべきである。しかしながら、ほとんどのルーチンワークで毒性試験を使用するときには、必ずしもその生態系に現存する種でなくても、標準種でも適切であろう。標準法に推薦される種は、感受性を含めた特性のために選ばれてきた。そしてそれらは、自身に類似した環境中の種を代表することが多い(USEPA, 1991a)。言うならば魚類の１つの種と別の種との感受性の差はいくつかあるだろうが、本当に大きな差は、生物の異なる種類の間にあるだろう（第２章３の２）。したがって、現地の種でないが、一般的に適正な魚類を用いた試験によって、現地の状況を評価することは問題ないとは思うが、様々な生物を用いて初期の試験を行うことは重要である。

以下のどちらかというと極端な例にあるように、明らかに関係のない種は使うべきではない。

1．　全く異なる環境に見られる種（例えば淡水の底質の影響を試験するのに、海洋性端脚類を用いる）
2．　分類学的にまた生理学的に離れ過ぎていて、結果を引き出すことが出来ない種（例えば、動物への毒性を評価するのに植物を用いる）
3．　変則的な代謝要件をもつ種
4．　異なる経路や異なる程度で毒性物質を曝露されうる種（例えば、底質毒性を評価するのに遠洋の魚類を用いる）

淡水中の毒性を評価するために海洋性細菌を用いた発光試験に対して、妥当か否かの議論がなされてきた。これはもっともなことではあるが、実質的に考えると、より便利な方法がないために、微小生態系の生物による試験を省くよりは試験バッテリーの中に細菌を含める方がよいということだろう。

汚染された土地を評価する、または現地の水質基準を設定するような、場所特有の情報が必要なときは、現地種は、標準種に代用することが可能である。もし生態学的に、また経済的に現地種を用いた試験が重要なとき、特に毒性物質の感受性が高いためにリスクが高いとき、もしくはそのライフサイクルが曝露を増加させるときは、現地種を用いた試験は当然のことである。いくつかの潜在的な困難は考慮しなければならない。現地種は、実験装置の中で健康を維持されるべきであり、室内では対照物質を使うことでその適用性を調べられるべきである。標準種を用いた並列試験は行うべきである。ありがたいことに、適切な現地種を使うべきかどうかの疑問は、より多くの標準試験が新しい種を用いて開発されるにつれて、たいして重要ではなくなりつつある。この分野における開発は極めて活発である。

２．４　被験物質

廃水、汚染土壌や底質のような*環境試料*の試験は、*個別の化学物質*試験と区別すべきである。環境試料の毒性は 50%致死のような定義された影響を生み出すために必要な物質の濃度（百分率）を推定する代わりに、しばしば試料そのままでの影響が評価される。その中に含まれる毒性物質の濃度や影響を生む原因さえもいまだ知られていないかもしれない。反対に、個別化学物質の試験は、試験濃度列を決

定するために、濃度（例えば mg/L や mg/kg）による毒性の推定値を得るために、予備試験を必ず実施する。個別化学物質の試験は、理論的には、化学物質が溶解しようが微粒子に吸着しようが、もしくはミセル状になろうが、それを含有する試験媒体の能力限界まで必要な濃度で使用することができる。しかしながら、環境試料の場合には、濃度の上限は試料そのままの濃度である。もしそのままで何の影響も持っていないなら、その試料は毒性なしとみなされる。

土壌や底質の試験は、水生試験よりも発展していないが、現在急速に前進している(Wren *et al.*, 1993)。汚染された土壌や底質のような固形媒体の試験は、しばしば100%の試料を使った単一濃度試験で行われる。ある目的のために、清浄な土壌や底質に、化学物質の濃度列やその混合物が添加される(EC, 1996a; USEPA, 1994d)。固形媒体から抽出された水試料も試験の対象となる。*浸出水*は、土壌や固形廃棄物の相を浸透してきた液体であり、またその固形物はその環境中に存在する。*溶出液*は、室内で、土壌または半土壌物質に水を加えて振ってから、得られた液体を遠心分離し、ろ過し、上澄みを取ってつくられた水溶液である。*間隙水*は、底質中の微粒子間の間隙に通常存在する水であり、それを遠心分離し、圧搾し、ろ過することによって分離することが可能である(EC, 1994c)。

土壌や底質の試料では、抽出物間の相互作用が大きいため、潜在毒性物質の濃度は浸出水よりも、少ない量の溶出液の方が高い。技術に関連する差異は決してささいなものではなく、試験方法は発展し続けている。カナダ環境省や他のところで認可された最近の技術を遵守すべきである。水の抽出物は、一度得られると、様々な標準的水生試験方法を使って試験することができる。

２．５　濃度と影響からのエンドポイントの推定

概　要

- 二値的試験では、各生物は影響を示すか、示さないかのどちらかである。生物への影響の中央値、LC50、もしくはEC50（用語解説参照）での影響を引き起こす濃度をエンドポイントという。
- 二値的エンドポイントは、低い影響から高い影響までの範囲全てにフィットする線から推定される。通常は濃度の対数で示された影響のプロビットである。最も優れた精度は、普通は半数効果で得られる。
- 定量試験では、それぞれの生物が定量的影響、例えば成長サイズや産卵数などを示すことができる。
- 好ましい定量的エンドポイントは、濃度影響曲線上の点推定値、阻害濃度（以下ICp）、通常はIC25である。ICpとその信頼限界を推定するための改良法が必要である。その他のエンドポイントは、無影響濃度（以下NOEC）、最小影響濃度（以下LOEC）、及び閾値影響濃度（以下TOEC）がある。これらは、それらの値が試験の設計や質に影響されるので、あまり望ましくない。

生態毒性学では、通常、生物を取りまく水や土壌や他の媒体中の毒性物質濃度に特別な関心がある。投与量が全てであるような古典的な哺乳類の毒性学とは違って、生物中の毒性物質の*投与量*はしばしば不明であり、それは摂食、注入、吸入または他の方法で与えられる。

毒性試験のエンドポイントを決定するための統計学的方法のガイドラインは、カナダ環境省が出版するそれぞれの試験方法、または統計学のガイドラインマニュアルで得られる(EC, in prep., a)。

2.5.1 二値的（quantal）試験

図１は濃度影響曲線(または、濃度反応曲線)の例として水生生物の毒性試験の結果を表す。 図１は、試験溶液の濃度により生物学的効果の強度を示す致死率試験を表している。 これは、各生物への効果または投与量を示す二値的試験(all-or-none)である。試験された濃度はパーセント尺度の中央付近で幾つかの部分的効果を生むはずである。なぜなら、そのような値が 50%効果に近いエンドポイントを評価する際に最少の変動と最も多くの価値か「重み」を有するためである。また、低濃度で効果がまったく現れないところから、高濃度で効果が完全に現れるまでの範囲の、効果の著しい勾配があるべきである。それらの極低・高パーセントの効果は線に合致する重みを減少させることになるが、それらの点は線を固定し、信頼限界を計算する際に重要な勾配を確立するのに役立つだろう。

半数効果は、二値的試験のエンドポイントとして、最大の精度を有している。 身近な例が、半数致

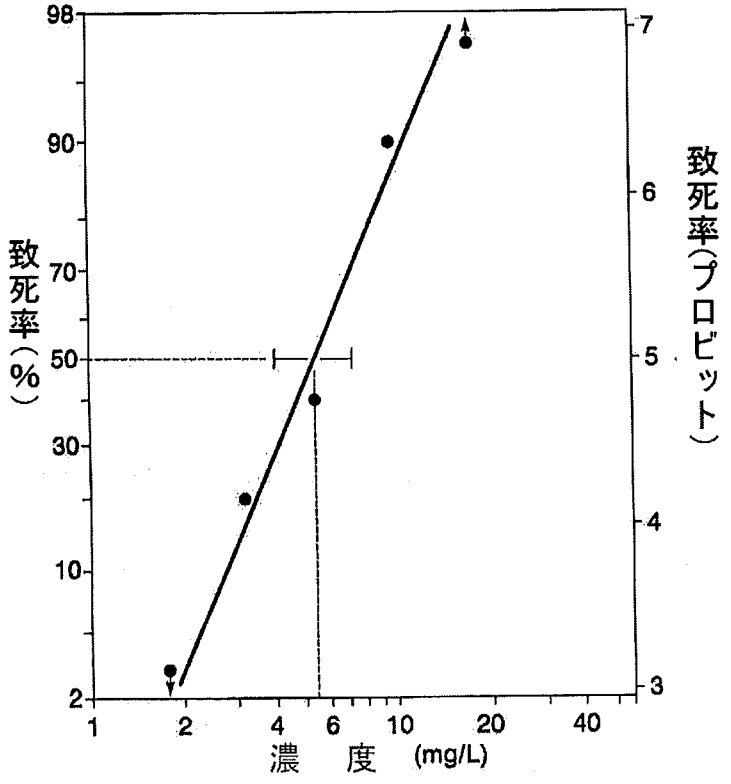


図１　対数―プロビット紙上にプロットした致死試験の結果

直線をデータに当てはめた。50%の影響から直線ひき、当てはめた直線との交点から垂線を下して図解的に LC50 は約 5.5 mg/L と推定される。コンピュータによるプロビット解析により LC50 が 5.6 mg/L と確認され、50%影響に水平の棒で示したような９５%信頼限界が推定された。

死濃度(LC50)と半数影響濃度(EC50)である。供試生物の半数がエンドポイント(C)より低濃度で効果を示す。生物の残り半数は、より高濃度で効果を示すのみであるだろう。LC50s と EC50s はいつも試験継続時間に関連づけられる(例えば、96-h LC50)[13]。 また、EC50 に関しては、表にまとめられた特定の効果について述べられなければならない。

二値的実験では、エンドポイントは影響データ(図 1)に線を当てはめることによって、推定される。LC50 は目で当てはめた線を直接読むことで推定可能である(図 1 参照)。正式には、通常推定値は「プロビット解析」、あるいは試験で生じたすべてのデータ使用する別の専門的な直線当てはめ手法が用いられる。従って、図 1 で示されるような線を「プロビット線」と呼ぶ。濃度影響関係の数学的モデルは、関連する誤差項について説明してエンドポイントの精度を推定し、通常 LC50(または、EC50)の 95%信頼限界として表される。

個体数のいかなる割合(例えば、LC25、EC10)の致死または影響濃度の計算に関しては数学的な障害は何もない。しかしながら、最大精度は半数効果に関連しているため、値が 50%からより離れるとき、供試生物の数を急激に増加させることが、与えられた数値の精度を維持するのに必要であるだろう。従って、一般的に LC50 と EC50 は異なる毒性物質の効果を説明し比較するのに最も正確な二値的エンドポイントとして使用される。

図 1 は濃度が対数、または幾何尺度で表示されている。試験(2..2 章)を実行するために対数列の濃度列を採用したので、分析ではその尺度を捨てずに、適切に使用を続ける。プロビット解析の計算は対数濃度を使用する。実際、対数は「実数」の値である。算術値が図 1 上に対数より算術値が理解しやすい人々の利便性のために示されている。同じ原則は試験から得られたエンドポイントにも適用される。EC50 は実際には対数値であるが、毒性試験からのエンドポイントの理解の容易さのために多くの研究者は算術値に変換している。エンドポイント間の平均化または有意差の統計的検定など、ある毒性試験から得られたエンドポイントのいかなる算術的操作においても、「変換された」算術値ではなく、対数値を用いて行なわなければならない(例えば、3.2.2)[14]。

曝露時間はすべての環境毒性試験の重要な要素である、そして二値試験も例外ではない。急性致死率試

---

[13] EC50 の用語は致死影響または二値的亜致死影響(例えば、ミジンコが死亡したか、または泳ぎ続けられなくなる)に適用する。それは、EC50 が濃度であるということを忘れてはならず、それに関連する毒性試験の化学物質の濃度単位を有している。また、用語として機能している名詞は「濃度」を意味している。したがって、人が重複して「濃度値」と書く以上に「EC50 値」と書く必要はない。

[14]残念ながら濃度を対数で計算するという原則に従わないことは、共通である。毒性のエンドポイントを計算するための多くのコンピュータ・プログラムは、算術値を採り入れるのが必要であり、それらを対数に変換しない。それは IC25 か EC50 の推定値を変換することである。研究者は適切な推定のために対数のようなプログラムに濃度を入れなければならない。同様に、対数の平均の代わりである、数個の EC50s の平均は算術による「変換」の平均としてしばしば誤って計算される。そのような手法が正しくないのを例証するために、濃度を対数に戻す変換、または何らかの同等な数学的手法を必要とする、幾何平均がこの件に使用される。対数スケールの濃度を使用しないことが EC50 などの初期エンドポイントの推定を制限することは無い。環境毒性学の分野を進歩させるのを意図した精巧なデータモデルでなければ誤りが時々見られる。そのような基本的な誤りは、一般的結論が疑わしいことを意味しており、再検討されるべきである(Baird ら、1996)。

験よりもたらされた図1で示される結果からは、一連の異なる曝露時間では、異なるプロビットラインが得られる結果が予想される。短時間の曝露の場合には、0-100%の死亡率を内包するために、より高濃度を必要とするだろう。また長時間の曝露では低濃度で十分であると予想されるだろう。しかしながら、急性試験には、急性影響が最大となる曝露時間がしばしば存在する。言い換えれば、曝露時間を延長しても、急性影響の大きさは増加しないであろう。様々な曝露時間のEC50sの時系列分析が非常に意義深い場合がある。これはしばしば急性効果の「閾値」濃度、おそらく供試生物の無期限に長い曝露に扱うことができる濃度を示している。そのような*初期のEC50*、または*時間に依存しないEC50*が明確に役立つ重要なエンドポイントである。時系列分析を毒性試験の統計分析のワークショップ(OECD、1998a)では推奨しており、その他の詳細は5.7.3章で議ずる。

2.5.2 定量的試験における阻害濃度の推定

この種類の試験は生物群が重み付け、または彼らが産む子孫の数などの、亜致死変数への等級付けされた試験濃度の効果を測定している。

望ましいエンドポイントは（*特定の影響の）百分率阻害濃度(ICp)*である。 それは対照[15]と比べて、関心のある生物学的機能の特定のパーセントの減少を引き起こすと評価された毒性物質濃度である。値は「p」に対して選択され、通常カナダの環境庁の試験において25%で、IC25が指標となる。(25%の影響の減少は大きく感じるが、通常、2.5.3 で説明されるように無影響濃度で見られる場合の減少と同じ一般的なオーダーのものである。) 例えば、毒性試験の対照区の生物が 1000 個の卵を産むならば、研究者はIC25について計算するのに750個の産卵を関連させるような推定濃度を結果として使用するだろう。別の例として、藻類*Selenatrum capricornutum*の成長試験では、エンドポイントは「成長阻害」のIC50 である。すなわち、対照区より藻類の細胞濃度が 50%少ないということである。この推定は、本来到達する個体数(すなわち、試験容器の中に存在する藻類の細胞濃度)に基づいて、IC50として評価されている。

ICpは、成長や繁殖などの連続的に測定できる生物学的変数を有する短期・長期亜致死試験で毒性を表現するのに使用されている。ICp は試験データの線形モデルにおける点推定値であるので、EC50 のように、試験の使用に選択される濃度であると、それらと別のいかなる値でも仮定することができる。(試

---

[15] このエンドポイントはEC50と交換可能でない。ICpを測定するのに適当な定量試験では、それぞれの生物や生物群は、産卵数などの生理的機能が連続的に変化する。陰性対照以下に減少することがエンドポイントである。EC50は、個体が産卵を行うか、行わないかのような二値形式にデータを織り込むことによって、そのような試験から評価されるかもしれない。 明らかに、多くの情報が二値処理で失われるだろう。 テストの種類の正確な印象あるレポートによって伝えられるように、 2種類のテストの区別はエンドポイントに使用される名前で維持されるべきである。あるヨーロッパと米国の方法はIC50の計算の概説で、誤ってEC50と呼んでいるが、藻類とバクテリアの方法で一般に行われている慣習といってよい。残念ながら、OECDは標準法である正式な文書でなければ、それらの多くを誤りと見なす為、その結果、新しい研究者達を混乱させている。

験で使用された濃度であるにすぎない*NOEC/LOEC*の議論に関しては 2.5.3 を参照) 別の利点としてはICp によって推定誤差について計算することができるということがあげられる。推定されたICp 値におけるシステム化の誤差も、変数の応答や不十分な実験計画、または不正確な手順によって引き起こされることはないであろう。そのような欠点があればより広い信頼限界のみに反映されるだろう。

ICp の利点にもかかわらず、特にIC10 などの“p”の下限値の推定のため、ノンパラメトリックな線形外挿法による現行の推定法は改良されるべきである。そのICp は、線を濃度とパーセント効果の完全な関係に合わせることによっては推定されず、p 値の各々上下にある2 つの測点の間を外挿することで得られる。その点で、推定はテストからの情報の多くを利用できないがために、より潜在的な変化を受け入れる。より良いパラメトリックか非パラメトリックな方法が開発され、立証されれば、それらを採用するべきである。

2.5.3 定量的試験における無影響濃度の推定

*帰無仮説アプローチ*は定量的な亜致死データを分析する全く異なった方法である。定量的な測定はICp と同じスタイルでなされ、例えば、各濃度時における生物のサイズを測定する。毒性物質の濃度により実測された変数(サイズ)と、対照で測定したサイズが有意に異なってはいないという仮説が採用される。統計的有意差で規定されたレベル、通常 5%の仮説を検定するために標準な数学的検定が行われる。仮説の反証が挙げられれば、数学的検定はどの濃度が対照とかなり異なった効果をもたらしたか、そしてどれがもたらさなかったかを認識するために続けられる。

*最小影響濃度(LOEC)*は試験された濃度区中で生物学的影響(例えば、対照より有意に低い低サイズとなる)が観測された最低濃度である。無影響濃度(NOEC)は有害な影響が観測されなかった最高濃度(例えば、コントロールと同じサイズになる)である。それは常に次の LOEC の後の希釈列で最も低い濃度である。

*閾値影響濃度(TOEC)*は、毒性を記述するのに二つの値より一つの値のほうが便利であるという理由により、NOEC と LOEC の幾何平均として計算される。TOEC はその名前から示唆されるように、毒性影響が“ちょうど引き起こされる”限界、または濃度の評価であることを意図している[16]。

---

[16]以前のカナダ環境省の試験方法は、この幾何平均を「閾値影響濃度」にちなんで TEC と名づけている。特定の作業に与えられた実験の見かけのもしくは推定された閾値とは対照的に TEC が「真の」閾値を意味する確立した名称があるので、それは恐らく不適切な言葉使いの選択であった。例えば NEC は実際に観察された NOEC と区別されるようにどんな影響も引き起こさない「真の」濃度を意味するのに環境毒性学で使用されている。ここでは、頭字語は閾値見かけ影響濃度 threshfold-oberved-effect-concentration を意味する TOEC に変えられるべきであること推奨している。

用語*最大許容毒性物質濃度(MATC)*は亜致死ライフサイクル試験に過去数年間の実証的なエンドポイントとして使用されている。 多くの著者が、NOEC の用語を、NOEC と LOEC の幾何平均、または NOEC と LOEC の範囲を意味するのに紛らわしく使用した。 最近の論文では、NOEC と LOEC を特定の用語

その濃度にはどんな「実際の」影響も無いことを意味するかのように NOEC を解釈する試みがあるが、それは必ずしも正確ではない。常に実験の作業によって制限される統計分析によって検出されないNOEC の実際の、または「真の」影響はあるだろう。したがって、実験の設計と作業に従って、重要でなかった真の影響の大きさは異なるだろう。極端な例証をあげると、ある実験においては NOEC が生物へ 5%の影響を表すかもしれないし、別の実験で、NOEC は 50%の影響を表すかもしれない。研究報告書(Suter ら、1987)によると利用可能な魚類のデータセットの分析から評価すると、対照と比較して、NOEC では実際の挙動の平均が減少することが観察されている。

成魚生存率	22%減少
産卵数	42%減少
孵化率	12%減少
幼魚生存率	19%減少
体重	20%減少

最近では亜致死試験[17]のエンドポイントとしてNOEC/LOEC の組み合わせから離れる傾向にある。主要な批判は 3 つから成る。一つ目は、NOEC と LOEC の可能値は研究者によって偶然選ばれた濃度に制限されるということである。言い換えれば、NOEC と LOEC は ICp のような推定値ではないということである。2 番目に、統計的な意味の試験から、LOEC と NOEC として現れる特定の濃度は、前にも述べたように実験の設計と作業によって大いに左右される。ほんのわずかな生物を使用して、不十分な設計または方法によって引き起こされたかもしれない変動の大きい試験は、多くの応答と生物による変動のの少ない試験と比較して比較的高い NOEC と LOEC の値が推定されてしまうことである。3 番目に、点推定の方法のように、エンドポイントに関する信頼限界を推定する方法が何もないことである。濃度影

として使用する代わりに MATC を捨てる傾向がある。用語 MATC は使用されなくなって、「許容できる」という単語の使用は実験の計算されたエンドポイントよりむしろ人間の判断を取り入れた精度判定基準に適しているのであろう。

[17] この話題に関する出版物には一般的な一致がある。 出版物は NOEC/LOEC のテクニックの不足を注目していて、どのような推定であれ試験状態の下で観察できる最小の差異についての記述を付記することを奨励している。 一般に ICp のような線形モデルは、現在の分析方法に欠陥があるという認識の下では推奨される。暫定的な提案は他の分析テクニックに関してしばしばなされるが、これらは未開発な状態である。帰無仮説に基づくそれらの代わりの線形モデルへの動きは Stephan、Rogers(1985)、および Suter ら(1987)から始まった。他の論文として Bruce、Versteeg(1992)、Hoekstra、Van Ewijk(1993)、および Suter(1997)がある。主に科学者によってオランダで行われたワークショップはヨーロッパにおける分析実験の標準法に影響を及ぼすのを目的としていた(Noppert ら、1994)。OECD 自身は Pack(1993)に研究を委任した。Pack は NOEC に基づく方法からより離れ線形モデルによる点推定値に向かって方向を推奨した。同じ推奨は毒性データの統計分析の OECD(1998a)ワークショップから来ている。米国の主要なワークショップは ICp や EC50(Chapmam ら、1996)などの点推定値を使用についての多くの議論を低供し同様の利便性の根拠についてあげている。

響曲線の貴重な情報は使用されていない(例えば、勾配)。実際に、一貫した濃度影響曲線が欠如していても、しばしばNOECとLOECが計算されるが、そうだとすれば、計算された値の有用性は疑わしい。

従って、カナダ環境省から発行された試験方法に従う研究者にとって、ICpが有効かつ適当であるときは、影響を評価する第一の方法としての使用が推奨されている。次善の方法としてNOEC/LOECのテクニックを使用することも可能である。 また、ＩCp の推定に改良された方法が利用で競うになったり、線形モデルに基づく他の方法が開発されそうな場合、研究者は新しい開発に追いついていくべきである。 統計的手法の新しい指針文書はエンドポイントの推定に関する追加情報を含んでいる(EC、準備中.a)。

2.6 試験の精度と試験所間の変動

概　要

- 基準物質の使用は何らかの信頼性を与えるが、ある毒性試験の正確さを測定することはできない。
- 試験所内の精度はしばしば 20-40%である。試験所間の精度は変動係数で 30－50%に反映していると予想することができる。それは毒性学や化学分析の他分野の結果と同様である。

カナダ環境省は米国とヨーロッパの規格を利用する他の組織のように標準試験法を発行するため、正確度と精度の必要性を規定した。現代の水生亜致死試験はそれらの変化に満足できる。変動係数はしばしば 20-40%の間の範囲である。これは水中における毒性物質の化学的測定に関して見られるのと同様の変動である。

毒性試験の*正確度*を測定することができない。正確度は真の値への試験結果の近似を意味する。化学的測定と異なって、2回目の毒性試験以外に物質の本当の毒性を測定する単独の方法はなく、またその場合、正確度は1番目か2番目の試験のどちらに関しても知ることはできないだろう。

したがって、各試験が特定の条件下(希釈水の種類、供試生物の丈夫さ、サイズ、季節など)で行われた正確な結果を示していると仮定されなければならない。明らかに、どのような修飾条件に活性があるかによって幅をもった正確な答えが決まってくるであろう。おそらく、修飾因子が、毒性試験の結果における試験所内と試験所間の両者の変動の大部分を説明するであろう。毒性試験において、すべての観測された変動が精度、または単に「正確度」ではなく、通常*「精度」*として、あるいは単に「変動」として分類されている。

毒性試験の正確度を測定することへの、最も早い方法は基準毒性物質を使用することである。その結果は試験所における明白な変化を研究者に知らせることができる(3.2.2)。もっとも、基準毒性物質の試験にも未知数が残っているので、正確度を測定することはできない。また、変動する修飾因子(例えば、季節)が、興味がある毒性物質(例えば、金属鉱業廃棄物)と同様に基準毒性物質(例えば、フェノール)の作用に影響を及ぼすかというのも、未知である。

精度は同じ方法で繰り返し測定された互いに相対的な近似の測定値である。毒性試験において、通常、

ある試験施設内で繰り返して実施された同じ毒性試験の測定値は精度の基準としてみなされる。5つの海洋亜致死試験による研究(Morrison ら、1989)は、良い生物学的試験は化学的測定で見られる同様の精度があるという結論の典型である。水生試験のために予想され得るのとほぼ同様の良い精度が、25 回の2年以上にわたる銅とニジマスを用いた試験から発表された。それは274-381 μg/L という1.4倍の範囲のLC50sと9%の変動係数であった(Dixon と Sprague、1981a)。

*試験所間の変動*は実用的な関心事である。 いくつかの主要な研究によれば異なった試験施設から得た1つの物質と1つの水生種の毒性エンドポイントをまとめると、その推定値で5倍、時に10倍の差を持つという(Sprague、1985)。この変動の一部が希釈水の種類などの修飾因子によって説明されるが、あまり変動しないのが望ましい。Chapman(1995)は、試験施設間の結果においてはおおよその2倍の範囲が許容できる限界であると考えている。

最近のいくつかの水生毒性の試験所間の研究では、報告された変動係数(CVs)は、13-<60%の間で変化したが、ほとんど30-50 %の範囲にあった[18]。

比較のために、30%の変動係数は最低と最高のエンドポイント間が4倍の場合に対応するだろう(例えば、LC50の平均が10mg/Lであるならば、範囲は5-20mg/Lである)。

水生毒性試験は他の種類の毒性学、またはほとんどの化学分析における変動と同様であると考えることができる。例えば、ネズミを用いた薬剤試験では、Henig(1979)は結果における7倍の変動を指摘しており、その変動はネズミの収納法の変化により引き起こされた可能性があった。淡水のUSEPA評価基

---

[18]幼生のファトヘッドミノーを用いた7日間試験の変動を米国の試験所10ヶ所で評価した(API、1988)。良好な一致が得られ、実験所間の変動係数(標準偏差を平均値で除した値)は、幼生生存率に基づくと13%、重量に基づくと52%という結果が得られた。異なった実験所で得られた141個の排水でのファトヘッドミノーの試験の比較では、比較した82%がCV <40%である一方、75%のケースではCV <30%を示した(Rue ら、1988)。同じ実験結果の編集の結果、46個の排水の実験施設内での試験において、排水のほとんどすべて(89%)がCV が30%以下であった。サンフランシスコ地区の9つの実験所における幼生のファトヘッドミノーを用いた亜致死試験の別の比較は 31%の変動係数を報告した（Anderson と Norberg-King、1991)。Pacific mysid crustaceanを用いた7日間試験に関しては、実験所間のLC50sのCVは7%であり、成長では19%があった(Hunt ら,1997)。実験所間では、LC50sのCVは14%、成長に対しては15%と比較的低い値であった(すなわち、良い精度)。毒性試験の変動に関する他の評価でも同様の結論に達した(Buikema ら、1982 ; Nebeker、1982 ; Qureshi ら、1982 ; Grothe と Kimerle、1985 ; Pickering、1988 ; USEPA、1991a)。

5つのカナダの実験所がナダ環境庁の端脚類 *Hyalella azteca*(EC、1997b)を用いた14日間の静置毒性試験で4個の野外収集底質試料の調査を行った。様々な実験所による平均生存率のCVsは3.6-19.6%、成長では28.4-48.8%の範囲であった。同様の実験所間の比較は、ユスリカ *Chironmus riparius*(EC、1997a)の10日間生存・成長試験で行われた。生存率のCVsは2.1-25.1%、成長率は7.7-27.4%の範囲であった(Milani ら、1996)。

同様の研究が、9～11の米国の実験所において米国の底質試験(Burton ら、1996)を用いて実施された。死亡率に関して、総合的なCVは *Hyalella* で39%、ユスリカ *Chironomus tentans* で14%、ユスリカの成長でCVは14%であった。基準毒性物質を底質のない水だけで試験した場合、CVは各々16%、20%を示した。著者は、これらの試験方法には「実験所間の比較において比較的低い変動と許容できる水準の精度」を有すると結論を下した。

準と同じ濃度における126の優先汚染物質の化学分析のCVはほとんどすべての測定値(90%)が<70%と、半分に関するケースが<40%であり、生物学的CVsと同様である(Rueら、1988)。また、USEPA(1991a)は、化学検出限界近くにおける有機また無機化学物質について化学的、生物学的な精度が完全に同等であると結論を下している。

もちろん生物学的データが環境化学の測定値と同様であるかもしれないが、実験所間においてより少ない変化であるのが望まれる。総合的な環境事情では、実験所間の変化が小さければ小さいほど、結果はより重要となる。水生試験の変動の原因の総合的な検討とどの変数が変動を改善するための努力をするに値するという点に関してはBurtonら(1996)とAusley(1996)によって示されている。病原性微生物への感染は、明らかに可能性のある原因であり、ファトヘッドミノーを用いた試験(Kazosら、1997)で記録されている。

これらの評価より2,3の示唆が得られる。(1) 現時点では、変動の主要な部分には明白な説明がないので、毒性エンドポイントを完全な値として解釈してはいけない。(2) ある特定の種のEC50sかIC25sの測定値のリストから環境基準指針値か規制基準を導くのが望ましい場合、最も低い値を取り上げそれを毒性の推定値として用いることはきわめて不合理になる。リスト中の最高値と同程度の異常な外れ値がある可能性がある。種の幾何学的平均値が通常、よりましな推定値であり、このような平均化が、現在、水質指針値(Stephanら、1985)の導出の標準となっている。

ある物質の個々の毒性試験からの*信頼限界*は、その物質のLC50の総合的な濃度範囲の何らかの種類であるとして解釈を間違えてはいけない。その時の状態により、それらは与えられた生物群によるある特定の試験の変動の区間推定値であるにすぎない。

第３章　試験方法と信頼性保証

概　要

- 信頼性保証(QA)は試験所で実施された仕事における適切な信頼性管理を確実にするように設計された管理と操作作業のシステムである。
- 通常の操作における日常的な検査と較正を含む信頼性管理はQAの一部である。
- QAに関するプログラムは、試験実施施設のために開発されたカナダ認証プログラムにより、次第に公式なものとなってきた。

本章では試験結果の信頼性を評価するための方法について述べる。データの信頼性は*品質保証(QA)*や*品質管理(QC)*についての試験所の熟練度によって示される品質と同義である（訳者注：本書では適宜、「品質保証」、「品質管理」を「信頼性保証」、「信頼性管理」と訳している）。生物の健康状態などいくつかの構成要素が試験結果に大きな直接的影響を与え得るが、試験所の一般的な操作手順は結果に対して間接的な影響を与えるかもしれない。

QAプログラムは、データの信頼性を改良または維持する手段が適切であり、データの不確実性の限界が既知であることを保証する(Sergy、1987)。*品質保証は適切な品質管理を確実にするように設計された管理と操作作業の総合システムとして定義されている。*QAの目的は完全で、正確で、代表的で、比較可能なデータを提供することである。信頼性管理は、QAの構成要素であり、試験所の中で産み出される良質なデータを確実にするために通常の操作(毒性試験など)に定期的な検査と手順を含むシステムである。

信頼性保証と管理手段はすべての毒性試験に固有である。操作の厳密な適用は標準的な生物実験を区別する重要な要因である。QAに関する情報は結果が実際に、そのような標準試験から得られるかどうか判断するのを可能にする。信頼性保証は、何らかの操作上の評価基準を満たさない試験、または通常ではない、または疑わしい結果の試験を特定する際にその重要性を発揮する。試験がユニークであるならば(それを繰り返す機会がない)、その信頼性を評価するのにQA情報を使用することができる。

ここでは試料収集におけるQAについては議論しないが、カナダ環境省の試験法文書では水質試料、EC(1994c)、Mudroch、およびAzcue(1995)での底質試料について述べられている。*統計分析のための指針は毒性試験のエンドポイント決定のための統計手法に関する指針文書*(ECのprep.a)に記載されるだろう。

3.1 毒性試験における信頼性保証

ほとんどの毒性試験部門の利用者は、試験施設で生成された報告中の直接関係のある情報だけを見ている。集約的にQAと名づけられた試験所の多くの他の側面が、報告された結果に影響を及ぼす可能性がある。そのような基礎的情報は、結果を解釈する際の手助けとして要求に応じて入手可能であるべきである。

毒性試験のQAプログラムは試験所のその日その日の操作と、供試生物の入手源と健康状態、実行方法、人材育成、試料収集、取り扱い、処分、試験のコーディネーション、データ収集のための手順、

分析、および報告を含むだろう。試験所の文書化された標準操作手順書は、すべてのQAプログラムの主要な構成要素である。

QAプランの2番目の構成要素はQCの実施である。信頼性管理は、データの質を計測する手順を内包し、標準化、較正、複写、対照、基準物質、分配試料、試験所間へ検査プログラムへの参加、および同様の活動を含んでいる。信頼性管理はデータ品質の直接量的な測定値に提供し、試験系の機能を適切にモニターする。

現場査察(または、監査)は、QAプログラムの妥当性を評価することができて、通常、認証プログラムの主要な構成要素である。監査は試験所が有効な結果を産み出す能力についての正式な検証である。それは、本章での言及された個人の能力、すべての施設、手順、文書化、を含んでおり、試験所のシステムの信頼性について調査し、試験所が特定のレベルの性能を満たすことを要求する。正式な監査では、試験施設は最初に、監査役に情報を提出する。｛例えば、信頼性管理マニュアルか標準業務手順書(SOP)｝。次に、通常現場での査察を行い、情報について確認する。そして、性能に関して事前に定義された評価基準に従って、施設は評定される。欠陥が特定され、奨励または要求される改良点が挙げられる。指導文書は特定の試験のチェックリストについて完備されており、生物試験所の監査に利用可能である(Klemmら、1990; EC、1993a)。試験結果の利用者が潜在的「供給者」となる試験所の監査を希望する場合、強力な構成要素は、正式、または、非公式の査察であるべきである。

証明と認証は試験所の資格の認可に関して2通りの手段を提供する。証明は施設が特定の試験を行うことができるという承認であり、通常、試料の試験に関する文書の提出または又は成績により行なわれる。認証は、より厳密な評価であり、しばしば試験の成績だけでなく査察を含んでいる。証明を受けかつ認証を受けた試験所から受け取った結果でさえ、利用者はデータの質を評価した方がよいであろう。監督官庁は通常、利用者が情報が確実に有効であるかどうかの責任を負っていると考えている。

環境分析試験所カナダ協会 The Canada Association Environmental Analytical Laboratories(CAEAL)は第三者、非政府組織の認証機関である。それはカナダにおける毒性試験所を信任するためのプログラムを有している、その種の1番目の機関である。認証への参加は性能の試験、試験所について2年毎の監査を必要とする。1994年以来、カナダ環境省によって発行された3つの毒性試験に関する認証は利用可能である。ニジマスとオオミジンコの急性致死試験、および液相の発光細菌試験。1998年までには、CAEALは14の毒性試験の認証を提供した。

3.1.1 関連する試験所操作に関する国際標準

優良試験所操作 Good Laboratory Practice (GLP)は元々、経済協力開発機構(OECD)によって開発されたQAに関するプログラムである。それは、新製品、特に商業用の化学物質および殺虫剤、の登録のための試験することを企図している。GLPガイドラインはOECD加盟国によって承認されたが、すべての国がGLP規則を制定しているわけではない。ガイドラインは特定の調査の実施と報告に関する要件について述べている。通常、GLP調査におけるQAのレベルは信頼度が高いデータを保障するための必

要条件を満たしているだろう。カナダ環境保護法は、新規物質の登録時の毒性試験が GLP(EC と HWC、1993)[19]の OECD 規格へ適合することを要求している。

国際標準化機構(ISO)のもとで、"ISO 9000"とまとめて呼ばれる一連の QA 規格がカナダの製造業とサービス業に広く使用されるようになっている。この規格はますます毒性試験所に関連するようになるかもしれない。それらは製品とサービスを設計して、生産して、導入して、点検して、パッケージングして、売り出すのに使用される方法を含んでいる。5 つの規格の区分がある。

9000　選択と使用のためのガイドライン

9001　設計、開発、生産、導入、および整備点検における QA

9002　生産と導入における QA

9003　最終検査と試験における QA

9004　品質管理と品質システム要素

ISO 9000 の下で認証された会社を規定するためには、二次供給者も ISO によって認証されていなければならない。「供給」試験所に関しては、必要な規格は ISO/IEC のガイド 25(「較正と試験所の能力のための一般要件」)で概説されている。試験結果を供給すると、ガイド 25 の必要条件を満たす試験所は ISO 9002 の要件を満たす。

CAEAL はサイト査定の間、ISO のカナダの認証機関であるカナダ標準協議会の権威の下、ISO ガイド 25 に準拠している。最近、カナダ規格協会は、カナダの試験所(CAN/CSA-Z753、「環境分析試験所の能力の要件」)を認証するために規格を発行した。これはカナダ標準協議会と CAEAL に適用された。環境試料を試験して、環境モニタリングのための設備を較正する試験所にとって CAN/CSA-Z753 基準は ISO 9000 の要件、ISO/IEC のガイド 25、および他の国家、すなわち国際的な信頼性規格を統合している。基準は、認証を与える政府機関のためだけでなく、環境分析試験所の内部監査用にも設計してある。

3.2　試験方法

概　要

- 方法の文書は以下の話題を包含するべきである。(1)原理と適用に関する序論。(2)供試生物、供給源、培養または飼育、健康状態。(3)一般的な試験設計と繰り返し数、曝露の詳細、試験容器、体積、および密度。(4)特殊な試料の変更方法。(5)試料の調整。(6)試験の観測結果と測定値。(7)結果の分析。(8)対照、基準毒性物質における反応、その他許容できる評価基準。(9)報告の要件。
- 別の方法を用いるのが望ましい場合、上に記載された各項目についてその手順を検討することによって、その妥当性を評価することができるだろう。

---

[19] EC と HWC(1993)は OECD 刊行物の根幹を与えている。OECD には GLP の構成要素に関する 8 つの分野の刊行物がある(OECD、1992e-i; 1993b、c; 1994)。米国では、EPA が連邦政府の殺虫剤、殺菌剤、殺鼠剤法(USEPA、1989d)、および有害物質規制法(USEPA、1989e)を持っている。前者の法律は毒性学的な健康関連のほとんど哺乳類の研究を含んでおり、後者は健康と環境研究の両方をカバーしている。GLP プログラムは 1978 年に米食品医薬品局によって発行された最初の GLP 規則から発展させている。

・ 基準毒性物質の試験結果は、一連の警戒チャートを表示し続けるべきである。すべての計算に対数濃度を使用して、警戒限界は平均から標準偏差の2倍として計算されるべきである。

本章ではカナダ環境省の方法に例示される標準試験法の構成要素を列挙している。信頼性保証の手法として基準物質に焦点を合わせ、異なる方法と比較するための枠組みで終わる。

毒性試験法は数多くあるが、完全に標準化されたものは稀である。標準試験法は全ての手順と施設を徹底して文書化し、数多くの共通した特徴を有する。（3.2.1 と 3.2.3）。ISO、OECD 及び北米のアメリカ試験材料協会 ASTM（American Society for Testing and Methods）によって国際的な方法が開発されてきた。カナダ環境省の水と底質に関する試験法は一つの標準法であり、一つの試験を記述するための例を示している。その方法は、カナダ中の多くの毒性学者の実践と討議の中で構築されてきた。

3.2.1 カナダ環境省の試験方法の標準様式

カナダ環境省によって発行されたそれぞれの試験方法による目次は、探している試験方法に関する情報を与えてくれる。また、他の試験方法を評価するチェックリストとしても使用することができる。以下の6つの項目が順に記述されている。

- 序論
- 供試生物
- 試験系と設備
- 一般的な方法
- 特殊な方法
- 報告要件

用語集は関連用語を定義している。序論は、合理的な、既存の同様な方法の総覧、そして供試種の分類、分布、および生態学的妥当性を含む一般的な情報を提供する。試験の適用と限界も示されている。カナダ環境省の事務所の住所が巻末の付録に記載されている。

次の章(供試微生物)は供試生物種に当てられている。それは生物の利用可能な供給源と、順応性、給餌、温度、照明、光周期、および水質を含む状態について述べている。この情報を表にまとめ、信頼性保証のための状態保持に関するチェックリストがある。

生物の健康状態の評価基準は指定されている。例えば、試験の前週の間、ニジマスの死亡率は2%未満でなければならない。再現性を含むかなり複雑な評価基準がいくつかの試験で適用されている(例えば、ニセネコゼミジンコ)。これらの評価基準は有効な結果を与えてくれる比較的ストレスを受けていない生物を特定することを意図している。

試験系と設備に関する章は試験系の基本的な要件を定義している。　設計は、変動を減少させ、毒性物質以外のストレスを最小にするのを目的としている。通常、試験中の物理化学的状態は、生物の培養または保持時の条件と同様にしている。指定される項目中には実験室内の位置、スペースの量、容器の種類、照明(タイプと光周期)、温度、および希釈水の水質を含んでいる。

一般的な試験方法は各文書(Universal Procedures)で説明されている。絶対要件(有効な試験のためにそれをしなければならない)と優先手順(それをすべきである)とに区別される。初期のセットアップは希釈溶液、対照、および処理系の選択を伴う。そして、実際の試験は順番に説明される。特殊な試験条件は前のパラグラフ、生物の状態、もしあるならば給餌、物理化学的測定値(例えば、温度、気体への溶解度、および曝気量、pH、電導度、アンモニア)、影響の観測、持続時間、エンドポイント、有効性のための評価基準、および基準物質を含んでいる(3.2.2 を参照)。条件は表にまとめられており、試験作業の修正を評価するためにチェックリストとして役立つ。方法はエンドポイントについて計算することも指定している。統計的手法におけるより詳細な指導は別の文書(EC の prep.a)に含まれている。

水生試験の場合、通常、化学物質、排水、溶出物、浸出水、地下水、受水域の試験のために、別の章で一般的な試験手順の適用とその変法がのべられている。操作上、またこれらの試料を試験する上で必要な追加情報も試験の有効性の評価基準の変更点と共に提供されている。

底質試験も一般形式に従っている。どのように試料を採取し、取り扱うかという特定の指針があり、一般にこれらは水試料より複雑で手間のかかる操作である。

特定の方法は、2つの主要なグループに分けられる。一つは野外で採取された底質や同様な固体を試験するための方法、二つめは底質に含まれる化学物質の試験方法である。

各試験方法の最終章(報告要件)では、(a)ある報告書のための最小限の要件について、(b)最低5年間の一般的報告書に含まれなければならないか、またはファイル上に保存されなければならない追加情報について、概説した(3.3.1 を参照)。その後の付録は補足、または背景の詳細について述べている。通常、ここには生物種とその環境の必要事項、従前の他の実験方法や結果の解析手順の詳細などに関する有益な情報を含んでいる。

3.2.2　基準毒性物質

カナダ環境省によって発行されたあらゆる毒性試験方法が一般的手順の最後の部分で1つ以上の基準物質(表 2)の使用を推奨している。基準物質は QA プログラムの重要な部分としてここでは考察する。

基準物質は試験所内での実験方法の結果の精度を測定するのに使用される標準化学物質である。それは試験所が一貫して、正確な結果を得ることができるかどうか決定し、試験系の機能チェックを提供するツールである。また、基準物質は供試物質を用いた結果の基礎として生物の感度を測定することができる。水生生物試験(EC、1990d)、底質や他の固体(EC、1995a)に関する基準物質を用いたカナカナダ指針文書は入手が可能である。

多くの水生生物試験に関して、カナダ環境省は、無機の基準物質として亜鉛を、有機物としてフェノールを指定している(表 2)。これらの2つの毒性物質は、2に示されるように一部の生物種、媒体(底質と土壌)、またはエンドポイント(亜致死)の場合は、他の物質で補足するか、または取り替えられる。8つの主たる評価基準が適切な基準物質を選択する際に使用された。既存の使用例、純粋な形態での入手可能性、溶解度、溶液中における安定性、保存中の安定性、分析の容易さ、試験所の水質における標準的な変動に対しての安定した毒性、および異常な供試生物を検出する能力である(EC、1990d)。

表２　カナダ環境省試験法で用いられる基準毒性物質のまとめ

供試生物	試験法番号	参照毒性物質		
		亜鉛	フェノール	その他*
細　菌				
Photobacterium phsphreum (現在、*Vivbrio fisheri*)	1/RM/24	有	有	$K_2Cr_2O_7$
植　物				
Selenastrum capricornutum	1/RM/25	有	有	NaCl
Lemna minor	1/RM/37	無	無	$K_2Cr_2O_7$、K_2CrO_4,KCl
無脊椎動物				
Daphnia spp.	1/RM/11	有	無	NaCl, $K_2Cr_2O_7$
ニセネコゼミジンコ	1/RM/21	有	有	NaCl
海洋性ウニ/カシパン	1/RM/27	無	無	$CuSO_4$,$CuCl_2$
海洋性端脚類	1/RM/26	無	無	Cu, Cd, $C_{16}H_{10}$
Hydella azteca	1/RM/33	無	無	$CuSO_4$,$CdCl_2$, NaCl,KCl
Chironomus spp.	1/RM/32	無	無	$CuSO_4$,$CdCl_2$, NaCl,KCl
脊椎動物				
ニジマス	1/RM/9	有	有	無ゆ
Threespine stickback	1/RM/10	有	有	無
Fatohead minnow	1/RM/22	有	有	NaCl
サケ科の魚	1/RM/8	有	有	無

＊　：Cd-カドミウム、Cu-銅、$CuSO_4$—硫酸銅、$CdCl_2$,—塩化カドミウム、$C_{16}H_{10}$—フルオランテン、KCl—塩化カリウム、K_2CrO_4—クロム酸カリウム、$K_2Cr_2O_7$—重クロム酸カリウム、NaCl,—塩化ナトリウム

最後の評価基準を有効に利用することができるデータはなかった。追加の潜在基準物質を評価するのに他の評価基準を使用することができるであろう。

参照試験は、生物の飼育集団または集団内、あるいは集団間のどのような変化をも検出するほど頻繁に実施されるべきである。警戒チャートは、何らかの変化も追跡するのに使用される(図2)。自家培養される生物に関しては、通常、毎月の試験をおこなうことが適切である。集団で供給される生物は、最初に受理した時、飼育期間の間、それらが毒性試験にすべて使用される直前のそれぞれに試験されるべきである。僅かな試験のため生物の小さな集団が野外で採取されるか、または購入される場合は、各試験の時に同時に、基準物質を用いるべきである。また、日常的には実施しない試験の場合には参照試験を同時に実施すべきである。一部のモニタリングまたは規制のためのプログラムには、参照試験の頻度について特別な要求がある可能性がある。

基準物質の現在のデータは警戒チャート(図2)の時間軸に沿って記入される。また、図で示されているのは、時間的な幾何平均と、計算で対数濃度を使用した標準偏差の２倍として平均から計算された95%信頼限界の*警戒限界*である[20]。新しい結果は表２の限界と比較する。計算と半対数紙への記入は

[20]幾何級数の試験濃度があるべきである(2.2)。結果のすべての解析で、対数濃度を使用し続けるべきである。EC50sとIC25sの真の値は対数であるが、エンドポイントだけは通例、算術値に変換されるほうが多くの人々には理解しやすいということである(2.5.1を参照)。

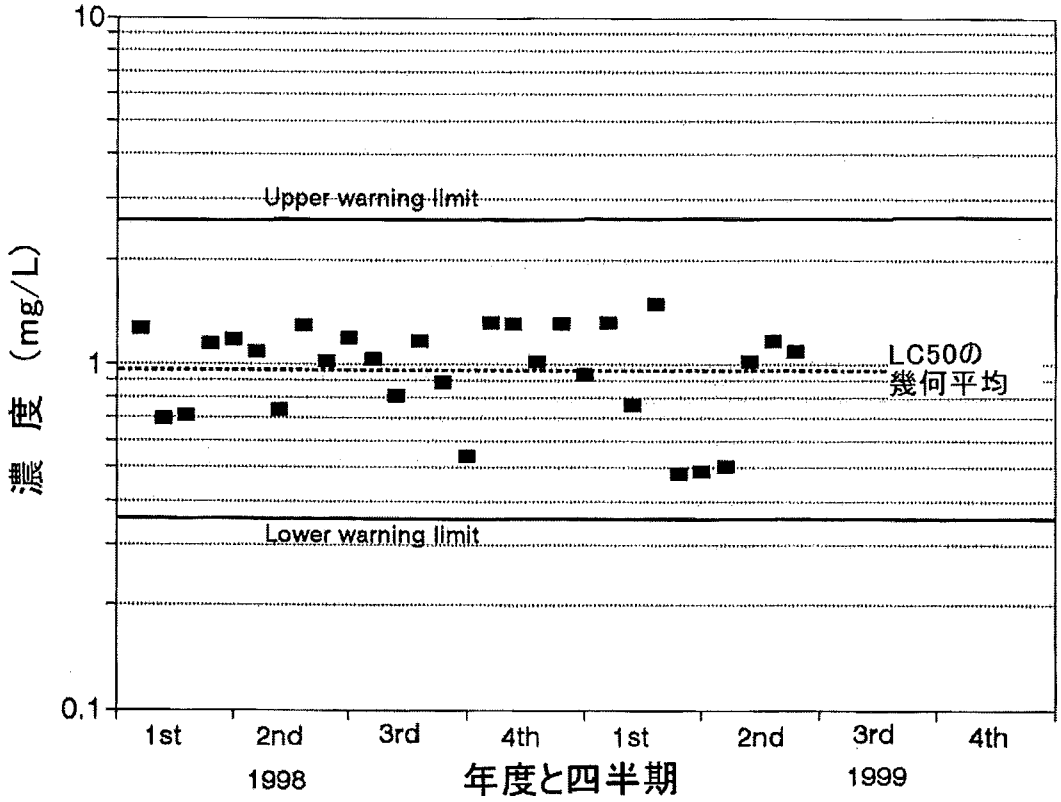


図2 基準物質と試験の警戒チャート

警戒限界は半数致死濃度の経時的な平均から標準偏差の２倍である（すべての計算は対数濃度で行う）。この図はある実験施設試の比較的規則正しいパターンを示しており、すべてのLC50が警戒限界の範囲内である。

手で行うか、コンピュータにより表計算プログラムで計算をして、その後にエンドポイントと限界を再記入することもできる。

平均的に、20回のエンドポイントで1回は偶然に95%限界の範囲外になることがあるだろう。1つの施設で同じ希釈水を用いて繰り返し行った試験では、許容範囲と考えられる±30%の変動係数を達成するべきであろう[21](EC、1990d)。基準物質の結果が警戒限界の範囲外になるならば、その試験所は調査を行い原因（群）を特定するべきである。結果の不正確な計算のように簡単なことかもしれないし、または、ストレスを受けた生物集団が異常な結果をもたらすといった深刻な場合もありうる。

警戒限界の巾(span)は明らかに重要である。より狭い限界巾は試験所によって得られた結果の、より少ない変動を意味する。従って、試験所の警戒チャートから期間にわたる精度を判断することはでき

従って、基準物質の対照チャートでは、LC50は対数の平均として見なされる、そして標準偏差は対数のLC50sの1セットから同様に得られる。

[21]変動係数は標準偏差を平均で除した値である。±3×標準偏差は、99%の信頼限界として警戒チャートに表され、管理限界と呼ばれる。管理限界の外におけるLC50は即時調査の引き金となるべきである。その結果が100の試験のうち偶然1つに予想されるのであればこそである

るが、限界のどのような特定の巾も毒性学的な作業を満足してきたとはみなすことはできないであろう。

3.2.3 他の方法の評価

ある与えられた種のための方法には選択の余地がある。ニジマスを用いた96時間致死率試験の方法はカナダ環境省、ブリティッシュコロンビア州、アルバータ州、オンタリオ州、合衆国環境保護庁、ASTM、APHA他、およびOECDによって発行されている。別の方法を使用するか、または2つの目的のために同じ試験を使用する理由があるかもしれない(例えばカナダ環境省によって発行された方法に準拠して行われる試験は地方の規制を満足するのに使用される可能性がある)。代替法を使用する場合、一部の試料、または基準物質でのおこなった両方の方法で実用的な比較を使用することができるであろう。比較的簡単な“書類”上での比較は方法の類似性と違いを評価することができる。

発行されて容易に利用可能な方法はどんな毒性試験においても第一の構成要素である。方法は、毒性試験の訓練を受けた誰もが、試験を繰り返し、結果を解析し、結果の有効性を決定できるくらい詳細に明示されるべきである。

文書化された方法が満足なものであるならば、次の段階は比較のために手順上の項目を記載することである。理想を言えば、カナダ環境省のものを以外の毒性試験法は以下の基本的な要素を含むべきである。

1. 試験の原理について概説する序論とその限界と適用の簡略な説明
2. 供試生物種、供給源、培養および飼育状態、および健康の評価基準に関する情報
3. 曝露状態、試験容器、負荷密度、および繁殖を含む試験設計の詳細
4. 試料を準備するための説明
5. 試験期間中に実施する観測の頻度と種類
6. 結果を解析するための手順
7. 対照の反応の限界と試験結果の許容性についての他の評価基準

2つの種が一連の毒性物質に対して相対的に同じ感度を有すると期待することはできないが、上で記載された項目は異なった試験種の方法を評価するのに使用されるかもしれない。方法の比較に重要な意味がある場合、適した環境毒性学者がレビューを作成すべきである。

カナダ環境省(EC、1994d)は汚染箇所を評価するための環境毒性試験法を評価する*特定の、そして、組織化された方法*を提案した。絶対に不可欠であると考えられる3つの評価基準に従って、各試験は最初に、格付けされた。

1. 容易に利用可能な出版されている方法
2. 指定された基準物質
3. 許容できる結果の評価基準

必須の評価基準を満たした試験は次に12の二次的であるが望ましい属性について評価を受けた。

1. 生物の種の同定
2. 測定できるエンドポイント
3. 生物の定義された属性(齢、重量、サイズ)
4. 生物と繰り返しの数
5. 観測の頻度
6. 試験液の体積
7. 試験容器の体積
8. 試験液の収集、保存、および準備
9. 生物の培養と取り扱い
10. 試験間の環境条件
11. 希釈液と栄養液
12. 統計解析の方法

そして、重みスコアが割り当てられた(EC、1994d)。すべての必須の評価基準を満たして、妥当な項目で88%より大きい得点をえた場合には、試験は完全であると考えられた。栄養段階、再現性、野外での実証、およびカナダの環境への適応性を含めた他の情報が再検討された。試験が不可欠の評価基準を満たしたが、88%未満であれば、それはプロトタイプであるとみなされた。また、その区分には不可欠の評価基準を満たさないが、88%以上で得点される試験も含んでいる。不可欠の評価基準を満たさず、さらに88%未満の得点を得た他の試験は開発中であると分類された。

3.3 試験報告書

概 要

- 毒性試験に関する報告書は以下の情報を含むべきである。(1)試料の種類と収集、移送、および保管に関する情報。(2)試験方法、設計、および条件の記述。(3)標準試験法からの逸脱について。(4)対照を含む試験間の観測結果。(5)結果の図表を用いた表現。(6)それらの計算に用いたエンドポイントと統計的処理。(7)試験実施施設、実験者、および試験日時の情報。(8)基準物質のデータ。
- その報告書から試験の信頼性を評価するのは、主にこれらの項目に関して完全かつ満足できるように含まれているかどうかを点検する問題である。

試験報告書は結果を明確で完全なスタイルで提供しなければならない。しかしながら、報告書は利用者により試験が正しく行われて、結果が信頼できるかどうかを決めることができるように、試験設計と状態について説明しなければならない。

3.3.1 優良試験報告書のためのカナダ環境省の様式

カナダ環境省によって発行されたそれぞれの試験方法の最終章ではデータを報告するのに適した枠組みを提供している。通常、以下の情報は必要最小限のものである。

1. 試料の種類、採取地点、日時、採取者、および追加観測(例えば、色、臭気、密度)
2. 試料を移送する手順、受領日時と受領者、またその時の試料の状態、その後の保管および準備方法
3. 簡単な方法の説明か発行された文書の参照
4. 基本的な設計や条件(温度、照明、光周期、曝気など)、および希釈液/対照液の水に関する情報
5. 標準試験法からの逸脱（変更）
6. 試験期間中の観測と測定
7. 結果の図表を用いた表現
8. 関連したエンドポイントと統計的処理
9. 試験設備の名称と位置、試験日時、および試験実施者の名前
10. 基準物質と警戒チャートの最新データ

一般に、追加情報は試験所で入手可能である。ほとんどの施設が試験の間、測定値を記録するのにベンチシートを使用する。そして必要なら、検証における第一歩はすべてのデータがシートから報告書まで正しく複写されことを確認することである。一般的なQA手順は定期的な報告書(例えば、保存培養に関する情報、設備の較正、人材育成)に含まれていないだろう。必要な場合には、これらは施設の監査の時に入手できるであろう。カナダ環境省プログラムは、この情報が少なくとも5年間ファイルで保存することを要求している。

3.3.2 試験の信頼性評価のための報告書の利用

以下の手順は、報告書を再検討して、結果の有効性を評価するために推奨される。査定は、試験が適切に文書化された方法に基づいていることを要件とする。

1. 報告書の完全性を確保する。
2. 有効性の必要条件を満たしているか点検する。
3. 指定された条件や手順からの逸脱、および試験所による説明などを点検する。
4. 計算によって得られたエンドポイントと元の観測値を比較する。
5. 信頼性保証を裏付ける情報を点検する。

報告書が完全であることを確認することが第一歩である(3.3.1のリスト参照)。

第2段階は試験の有効性について事前に定義された評価基準、特に対照群の性能を満たしているのかをチェックすることである。非有効性の珍しいケースでは、結果がまだ入手できる場合に有効性を決定するためにデータの包括的な見直しが必要である。

次の段階は実験方法に逸脱（変更）についてチェックすることである。報告書は、どんな逸脱についても記述し、説明を提供するべきである。前章において言及した手順の項目がチェックされるべきである。それぞれの項目はカナダ環境省の方法で明確に記載されている。“must"（絶対、必須）要件

からの逸脱はえてして結果を説得力の無いものにするであろう；“should"（推奨）手順からの逸脱はそうではないだろうが判断をしなければならない。何か条件もしくは測定値が欠けているか、またはおかしい場合には、明確にするために試験所に連絡をとるべきである。試験データの受取人は試験への不当な影響がなかった場合にだけ、結果を受理すべきである[22]。

そして、計算されたエンドポイントはデータと比較されるべきである。最良の方法は図表で表すか概算をしてエンドポイントを近似し、報告された値と比較することである。妥当な程度に合致しない場合は、発散の原因を求められなければならない。不確実性が残るならば、試験所に連絡をとるべきである。誤差はデータの複写で発生することもある。

最終手段は報告書に残っているQA情報を再検討することである。これは試験条件と生物に関する情報を含むべきである。最近の参考試験が警戒限界外になっている場合、これは報告書に述べられたに違いなくて、試験所職員が変動の原因を捜し求め始めているはずである。

[22]試験結果を無効にする問題がほとんどの試験所に時折生じる。指定された時間に結果を提供するという法的か規制上の必要性があり、報告書が欠けるという相当の不利に対して、データギャップの危険を減少させるためは2つの試験所に試料を分割して試験することが可能であろう。

第４章　　毒性データの解釈

実験室での試験による毒性の推定値は種や特別の試験条件に拘束される。明らかに，これらは環境での影響の直接的な測定値ではなく，むしろ毒性物質の有害な潜在的影響を予測するものである。本章では野外への予測をするために，毒性試験の結果の解釈における疑問について述べる。 4.1節から 4.9節では多くの毒性試験の適用の実際について取り扱い，4.10節から4.13節では，とくに，廃水，底質，土壌と個別化学物質について取り扱う。

実験室において，毒性は，正確な結果を確実にするため，通常注意深く標準化された条件下で測定される。これは，例えば，揮発性や生物分解性といった物質の特性の測定と同様である。よい科学的手法は温度，光，酸素といった変数が制御された条件下での標準化された実験室内での測定を規定している。したがって，その関係式は条件が変動する自然界での事象を予測するのに使うことができる。そのプロセスは他の技術的な予測と類似している。例えば，蒸発速度に関する一連の標準化された測定は変化する温度と分圧下における実世界での速度を予測することができる。

室内試験は自然での影響をどれほどうまく予測できるのであろうか？ 4.1節ではこの疑問について述べた研究のいくつかをレビューする。

4.1　野外での検証

概　要

- 単一種による室内試験を，生物群集における影響と比較して検証する多くの試みがなされてきた。それらのほとんどは概略的な比較であり，いくつかは科学的に厳密な野外での検証であった。
- ひとつのすぐれた検証例では自然の生物群集に影響のある，あるいは影響のない43の排水に関する毒性試験で，88%の一致が認められた。USEPA による8つの周到な研究は解析方法の問題点が指摘された。しかし，再解析の結果、全般的に一致した。野外で影響を示す他の比較例においてもたいてい同じように一致した。
- 制御された多くの研究事例では毒性試験結果と人工水路あるいはメソコズムの生物群集への影響とは一致した。
- 文献レビューにおいても排水に対する単一種試験と生物群集レベルの影響との間の一致が概して認められた。

単一種毒性試験が生物群集に対する影響をたいてい予測できることを示すために実施された研究は多数あった。そのような比較研究はある種の困難を克服しなければならない。実水域において容易に予見できる厄介な問題として１つ以上の活性な汚染物質の存在と変動があるだろう。

生態学的観点からしてよりいっそう大きなリスクは個体群又は生物群集というようなより高次あるいは広い統合レベルにおいて生起するかもしれないことを予測するため，１レベルの生物学的統合（す

なわち，毒性試験における種レベル）において得られた知見を使用していることである。例えば，実験室での個別のミジンコの繁殖は野生における甲殻類の個体群に生起することを必ずしも予測しないだろう。

機能している群集における影響の同時比較研究により，単一種による室内試験の予測値を評価する科学的研究はしばしば，肯定的な確認を意味せずに*検証または野外での検証*と名づけられている。たいていの検証は概して相関を示しており，毒性試験における影響と生物群集における影響との間の強い一致の傾向を示している。

文献上で入手可能な検証の研究は科学的な厳密さにおいて異なっている。検証の研究を設計または評価する際の重要な特性は4.1.4 節で要約されている。

4.1.1　自然水域における検証

１つのすぐれた実験はオハイオ州の小河川で２年間銅を一定濃度にし，野生の魚と閉じこめた魚，他の生物相について評価した（Gecklerら，1976）。河岸の実験室においてファットヘッドミノウを使った生活環試験は無脊椎動物の個体群研究において，また，河川中のケージにおける魚の行動において良好な一致を，すなわち，良好な検証を示した。予測しなかった大きな驚きは，しかし，閉じ込められていない野生の魚が下流への強い忌避反応を，生理学的影響を起こす濃度より低い濃度で示したことである。したがって，単一種による毒性試験が，河川において，与えられた銅濃度で優先する生理学的影響と一致し，予測できるものであったことをこの実験は示した。室内試験は忌避反応のため生態系全体への影響を予測できなかった。

オハイオ州の実験からいくつかの教訓を学ぶことができる。第一に，実験室での試験における予測は試験濃度を準備するのに上流の河川水を使用することにより大いに改善されたことである。実は，標準の水を使用した実験室での試験は，河川水中に存在する金属結合物質が欠如しているため，うまく予測できなかった。第二に，排水のモニタリングによる予測が正しいかどうかチェックするため，受水域における定期的な野外調査が必要なよい理由があることである。第三に，銅に対する忌避または選好反応に関する室内試験を実施し，河川における魚の忌避反応を予測できたかもしれないことである。このようなアプローチは他(Spragueら，1965)で役に立つ結果を示している。忌避/選好試験は毒性調査の別の部分として常に行なわれるべきであることが推奨されてきた。それは行動と生理学的反応が全く異なりうるからである(Sprague，1981)。

カナダにおける野外評価のすぐれた例は酸生成鉱石があり排水が問題となるニューブルンズウィック塩基金属鉱山に対して実施された。４種の亜致死毒性試験の結果が底生無脊椎動物への影響および魚類の個体数，健康状態と比較された。各毒性試験（ニセネコゼミジンコ，セラナストラム，アオウキクサ，ファットヘッドミノウ）と野外で観察された影響との間に強い，統計学的相関があった（AETE，1998a）。

1980年代に米国環境保護庁によって研究された8つの計画的な検証はかなり良好な一致を示した。研究目的はファットヘッドミノウの幼魚とニセネコゼミジンコを用いた7日間亜致死毒性試験がアメリカ

合衆国の様々な地方の汚染された受水域において 観察された条件とよく一致するかどうかを検討することであった。通常，毒性試験は排水と受水域の水（”周辺試験”）のサンプルに対してなされた。水質化学，魚類，大型無脊椎動物，ペリフィトンとプランクトンに関する標準的な野外調査が排水プルーム濃度を確認するための水界地理学的な調査と同時に行なわれた。
その受水域は以下のとおりであった：

- 農業地域の小河川
- 石油精製，肥料工場，下水処理場の影響を受けるオクラホマ州の農業地域の小河川
- 多数の廃水を受けるコネチカット州の１河川とウエストバージニア州の２河川
- 都市下水と精製所の廃水を受けるオハイオ州の河川
- 都市下水と３つのコークス工場の廃水を受けるアラバマ州の河川
- ボルチモア付近の入江（Mounts，1984，1985，1986，a，b，c，Mount and Norberg-King，1985，1986，Norberg-King and Mount，1986）

環境保護庁の比較と解析の手法は厳密に評価された。しかし，権威のある相関分析を用いた再評価では亜致死毒性試験と野外調査における影響との間に妥当な相関が認められた。手法が毒性試験か生物調査であろうと，多くの場合、明らかに同じ結論が導き出されるだろう。MarcusとMcdonald(1992）はその研究を批判し，再解析し，そして環境水の毒性を測定に使われた「ニセネコゼミジンコと7日間のファットヘッドミノウの（亜致死）試験は環境水の毒性が支配的な影響を与えている河川水中の生物群集構造について有用な情報を提供することができる」と記述した。

別の再解析によると，最も有用な変数は毒性試験ではニセネコゼミジンコによる新生仔の産出，ファッドミノウの幼生の乾燥重量，そして，野外調査では魚類と無脊椎動物の種の数であった（Dicksonら，1992）。その解析は「環境水の毒性と河川中での影響の間に統計的に有意な関係が存在すること」，そして「環境水の毒性と河川中での生物学的応答との間の関係は強いこと」を実証した。

ケンタッキー川における質の高い研究では，排水に曝露されたファツトヘッドミノウの幼生を用いた8日間の試験結果と野外調査との間のすぐれた相関が認められた。(Birgeら，1989)。幼生試験では36%の濃度では影響が無視できることが示され，そして，野外調査でも一致し，33%の河川水濃度で魚類と無脊椎動物に有意な影響がないことが示された。廃水濃度が53%のある地点では魚類への影響は認められなかったが，無脊椎動物は対照値の30種，３4種に対し，22種にすぎなかった。また，多様性指数が清水では3.3，3.7に対して，2.5にすぎなかった。他の河川（”環境水”）における毒性試験では大型無脊椎動物の調査ですぐれた相関を示した（多様性指数0.93，種数0.96）。

北ノースカロライナ州では，Eaglesonら(1990)はかなり客観的な方法で43 の排水とその受水域の水を評価した。排水の毒性はニセネコゼミジンコによる7日間試験で測定され，低流量時にTOEC計算値が受水域において越えるかどうかについて影響が予測された。水域において観察される影響は対照地点と影響を受けた地点の大型無脊椎動物の分類群分布における統計的有意差によって判定された。予測と野

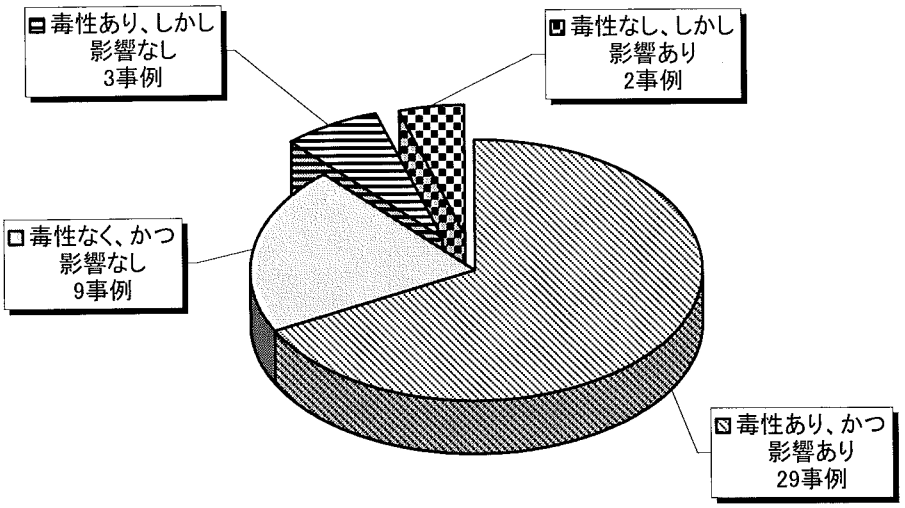


図３　排水の毒性試験による予測と受水域の生物群集に観測された影響との一致。データはノースカロライナ州の43河川に関するものである（Eeaglesonらによるデータ，1990）。円グラフの２つの大きな部分は一致を示しているのに対し，上部の引き離された２つの小さな部分は観測状態と予測状態の不一致を示している。

外の観測との全体的な一致は88%であり，図３のような分布であった。

バージニア州の研究者はニセネコゼミジンコの繁殖への影響に対して閾値が1.7%の排水であることを見い出した。それは大型無脊椎動物の野外調査に対して閾値が2.0%の影響であるのと一致した（Pontasehら，1989）。

コロラド州の鉱山からの金属に関する研究では不一致が認められた。実験室における亜致死試験の既往のデータ(DaviesとWoodling，1980)によると，影響がないと期待されるTOEC以下の濃度で河川中のアサケ科魚類の数が減少した。魚類による現場試験と野外での知見とは一致した。

海洋系に排出される廃水の毒性と比較して，海洋系での生態学的影響の研究はほとんどないように思われる。(SchimmelとThursby，1996)。しかしながら底質の現場毒性試験との比較がいくらかなされている。海洋の底生無脊椎動物の群集が、いくつかの排水（主要な汚染源は銅製錬所，パルプ工場，化学工場と豪雨排水である）を受ける湾の43地点の底質に関する室内毒性試験と比較された。毒性試験は細菌発光阻害，カキ幼生異常と端脚類の生存について観測され，中程度に，あるいは，激しく変化を受けた無脊椎動物生物群集と良好な対応を示した　（３種の試験すべてで60%以上）。いずれの観測結果も底質中の既知の汚染物質の濃度と対応した。３種の毒性試験での影響は主要な汚染源からの距離とともに減少したが，主要な底生生物群の量は同じ空間的勾配で増加した（Beckerら，1990）。

以上のように，野外における生物群集の研究と室内における単一種試験との間には有意な一致が認められる。不一致を示す研究（例えば，図３）があるが，不一致は「実験室と野外の評価の俗説」に関するPowerとMcCarty(1997)の批判の正当な理由とするほど十分ではない。今までの検証の試みにおける主

要な弱点は本来の相関の欠如にあるのではなく，研究者によって採用された方法，すなわち予測を可能とする厳格な試験というより一般的な，または主観的な比較を使用している方法にあると思われる(4.1.4節参照)。

4.1.2　メソコズムにおける検証

一部の検証は野外の人工水路の生物群集を使用してきた。ミネソタ州にある米国環境保護庁の研究所には延長520mの8つの人工水路があり，繰り返しが可能である。近くのミシシッピ川からの自然水が水路には流れている。野外水路でのよい検証例はペンタクロロフェノールへの12週間曝露である。(Zischkeら，1983)。室内試験で30日間平均濃度として48　μg/lは保護的であろうと推定された(Stephanら，1985) 。それは河川での研究とかなり一致していた。その濃度では，水路において大型無脊椎動物に影響は認められなかった。魚類の繁殖は影響を受けなかったが，成長における若干の減少と幼魚の漂流の増加があった。

CrosslaudとMitchell(1992) は石油化学工場から排出された塩素化エーテルの混合物を試験するためイギリスにおいて人工水路を使用した。室内亜致死試験はオオミジンコの成長に対して1.0　mg/lという単一種のNOECを示した。水路において，もっとも鋭敏な影響は甲殻類のヨコエビ*Gammarus pulex*の接触行動に対するNOEC 0.44 mg/lであった。2.4倍の差異は十分な一致と見なすべきである。オレゴン州においても同様に，死亡，成長，繁殖能力に関する5種の亜致死単一種室内試験は実験室の人工水路における「・・・河川生物群集に影響を与えるジフルベンズロンの濃度を十分予測した。」(HansenとGarton，1982)。影響は５ヶ月間の投与の間，生物量と多様性で判断された。殺虫剤は多くの昆虫と甲殻類を，実験室における影響濃度と同様の濃度で減少させたり，絶滅させた。また，分解者と敏感な底生藻類を，直接的に、あるいは捕食者を減少させることによって間接的にも影響を与え，その結果、耐性のある藻類のみが繁茂した。

いくつかの検証が，池のメソコムスあるいは池の隔離水塊を使って試みられてきた。農薬アトラジンが8種の藻類に対して試験され，室内実験と「野外」の間の良好な一致が認められた。100～155 μg/lの濃度で，光合成，呼吸，藻類量の50%阻害が，単一種室内試験，ミクロコズム，また，実験地においても認められた。(Larsenら，1986)。オハイオ州の池の隔離水塊における生物群集はニセネコゼミジンコ７日間亜致死室内試験による予測より銅に対してより敏感であった(MooreとWinner，1989)。隔離水塊におけるミジンコと大型無脊椎動物の健康状態は正確に予測されたが，藻類，輪虫，数種の橈脚類copepod の個体数は少なかった。*Daphnia pulex* を用いた殺虫剤クロロピリフォスの試験は（そのミジンコの個体数への影響に対する）控えめだがかなり正確な予測をした。従来の室内試験における*D. pulex*の繁殖に対するEC50は0.18 μg/lであったが，実験室における単一種個体数に対するEC50は0.25 μg/lと同程度であり，また，メソコズムとして用いられた水路内の隔離水塊における個体数に対して0.34 μg/lで、それは従来の試験の２倍以内であった(van der HoevenとGerritsen，1997)。複数実験施設プログラムでは室内亜致死試験と銅，リンデン，アトラジン，3，4-ジクロロアニリンに対する人工水路池の隔離水塊での知見が比較検討された。室内実験の亜致死閾値は3つの毒性物質に対しては野外の生

物群集を保護するとされたが，ジクロロアニリンは室内実験における最小閾値の1/10で影響を与えた。

メソコズムに関する詳細な議論は6.3.2節を参照せよ。

4.1.3 文献レビュー

野外での検証に関するいくつかのレビューが最近出版された。Slooffら(1986)は単一種と多種試験との相関をとり，亜致死の効果に対する結論は信頼できるとした。彼らは多種または「生態系試験は単一種試験で得られる結果と劇的に異なる結果を導いていない」と結論づけた。彼らは亜致死効果に対する予測式を次のように計算した。

NOEC(生態系)=0.63+0.85log[NOEC(単一種)](r=0.85)

広範な文献レビューにおいて，Emansら(1991)は信頼できる17の比較を見い出した。多種の研究によるNOECと類似種に関する単一種試験とが統計解析により比較された。その関係は線形であり，著者は「生物が感度において野外と実験室の条件下で異なっていると信ずる理由はないように思われる」と結論づけた。彼らはまた「単一種の毒性データを水界生態系の”安全”な値を得るために用いることができる」とした[23]。

4.1.1節と4.1.2節で述べた検証を含む別のレビューが同様の結論に到達した。オリジナルな著者による63の個別の比較のうち，排水に関する亜致死試験による53の予測が生物群集で見いだされた影響と一致した。84%の一致率である(Sprague, 1997)。表層水に関する毒性試験（”周辺環境ambientの試験”）を行なった，13の野外研究の同一の比較に関するより限られたレビューでも84%の一致が認められた(Parkhurst, 1996)。水環境における検証の原理，方法，限界がClementとKiffney(1996)，Barbours(1996)により連載で完全にレビューされている。

4.1.4 検証調査の設計

野外における検証研究，あるいは，メソコズムのような模倣された生物群集の設計に関する指針を扱った出版物がある。指針の主要項目は，また，現在の研究を評価するのに使うことができる。Sanders(1985)は実験室の毒性試験を科学的に検証するための実験の設計について優れた，一般的な忠告をしている。Cairns(1986i1988a)はそのような実験について3つの望ましい段階を表にしている。OECD(1992b)はワークショップからの推奨として良好な原則を提供している。勧告の一覧表がSprague(1995)で述べられており，次の重要な要点は，その一覧表 とSanders(1985)からのものである。

多様な科学的方法が野外での検証に使われているが，２つの重要なカテゴリーに区別できる。

- *野外での評価*において相関の程度は実験室における単一種毒性試験の結果と受水域の生物群集の質の観測との間で決定することができる。文献において多くの場合「野外検証」はこのカテゴリーであ

[23] Emansら(1991)において述べられた方法により，実験室における単一種試験で決定されたNOECから下方に外挿して「安全」な，濃度は推定された。その「安全」な濃度の推定値は多種試験における影響または無影響と関連した濃度と比較された。ここで用いられている「安全」の意味は用語解説で説明されている

る。相関の程度は一般的で，しばしば主観的な比較で評価される。

- *科学的な野外での検証*においては，作業の設計がより高度に厳格でなければならない。すなわち，形式上科学的な実験でなければならない。毒性試験が生物群集への影響を予測できるかどうかを決定する。

科学的な野外での検証はあらかじめ許容できる基準をもった科学的方法を使用するため，毒性試験の予測は野外での結果と一致もしくは不一致となるであろう。そのような検証における重要な段階は，次のとおり，一部は異なった順序または重複して実施されるかもしれない。形式上科学的な要素がぬけて場合は、実験は科学的野外検証というより野外評価と考えられるだろう。その手順は7段階として記述できる。

1. **毒性試験の確認**。これは試験が意図されたとおり，今日の標準的な試験手順で問題なく操作されていることの確認を単純に意味する。
   最も重要な特徴は毒性試験のための希釈水が当該受水域の「上流」から採取されるべきであることである。このためたいていは培養水水質の変更が必要である。それは調査地点現場の水を対照として導入される水質の変化により，試験生物が受けるストレスのレベルを下げるためである。たとえば，培養水のpHと硬度は現場の水の値に調整されるだろう。

2. **現場の選択**。現場はまさに科学的な結果を示さなければならない。均衡のとれた水生生物の群集でなければならないし，正確に，比較的簡単に試料が採取でき，比較可能な対象地域でなければならない。
   排水は自然の状態で比較的一定であるべきであり，有毒成分が既知で，化学分析により測定可能であれば役に立つであろう。排水は毒性試験において影響を引き起こし，受水域の生物群集に観測可能な影響を引き起こさなければならない。理想的には受水域における影響が段階的で，森林や農業のような外部からの排水が最小であるべきである。

3. **既存の記録の調査**。調査地点に関する有用な背景情報，特に物理的，化学的，生物学的情報。

4. **初期の予備試験とサンプリング計画**。その研究における主要な変数は実行可能性を評価されるべきである。予備サンプリングが排水の毒性の大きさと変化，受水域の水量，生物学的群集の構成に関して要求されるかもしれない。

5. **予備的なモデリング／デザイン／解析**。これは項目1から4と調整して実施される。

6. **詳細な検証計画の設計**。化学的な方法の手順が正式に設定されるべきである。(a)仮説の明確化（例

えば，「受水域の生物群集は亜致死毒性試験におけるIC25より大きな排水濃度において有害な影響を受けるだろう」）。(b)仮説を検定する最も簡潔で，可能な実験の計画。(c)結果を判断するのに使われる判断基準の適用（例えば，下硫の水生生物群集におけるどのような観察結果が有意な，有害な影響として考慮されるのか。）統計学的検定計画が前もって策定されねばならない。精度の程度，したがって，繰り返し数（連数）が決められねばならない。検定がなされる前の感度解析が不確定な結果を避けることに役立つかもしれない。この手法は汚染の研究では一般的ではなく，そのプロセスに精通し，モデリング可能な人材が必要である。

7. **プログラムの実行**。受水域に流達する排水または拡散汚染源の試料が採取される。試験が実行され，結果が解析され，仮説が受け入れられるか棄却される。結果が報告される。

4.2　毒性試験結果の外挿

概　要

- 外挿は限られた毒性試験やたぶんいくつかの亜致死試験，唯一の致死試験の結果から亜致死効果の閾値を予測するのによく使われる。外挿方法は簡潔なものから複雑なものまであり，それは利用可能なデータや不確実性の許容誤差に依存している。
- 適用係数は水生生物群集における亜致死効果の閾値を推定するためにLC50に適用される乗数である。経験から得られた共通の値は非残留性かつ非蓄積性物質に対して，いつでもどこでも96h LC50の1/10，混合後の24h平均濃度として1/20以下である。蓄積性のある毒性物質に対してはLC50の1/20と1/100である。
- 急性-慢性比(ACR)は本質的に適用係数の逆数である。それは急性のLC50の観測値と亜致死閾値の観測値の比として得られる。さらに意味のある比を求めるために数種の試験を組み合わせてもよい。ACRは現在、普通に使われており，1以上の比となるので便利である。一旦決定されると，ACRは異なった状況における未知の亜致死閾値を予測するのに慎重に使われるかもしれない。
- もっと完全な毒性データが利用できるなら，外挿は種の感受性の分布に数学的に適合する関数に基づくことができる。”環境上関心のあるレベル”(≈ NOEC)は適合する分布の，ある百分率（たいてい95%）に対応する化学物質濃度である。
- 2，3のデータポイントに基づいて環境における許容濃度を予測する単純な方法はたいてい満足のいくものであり，もっと複雑な方法により得られる濃度を近似する。

観測された毒性と表流水における生物群集への悪影響との間の合理的な相関(4.1節)のため，毒性試験はしばしば生態系における無作用濃度を予測するのに使われる。外挿は単純なものから複雑なものまである。

4.2.1　適用係数

適用係数はもともと1950年代に水質汚濁分野で定義され，1以下の値であり，”受水域における水生生物に悪影響のない濃度”を予測するのに急性のLC50に乗じられた(HendersonとTarzwell，1957)。例えば，適用係数1/10または0.1は最初オハイオ渓谷の48hLC50の乗数として示された(ALAC/ORSANCO，1955)[24]。

適用係数が1950年代に提案されたとき，水生生物に対する亜致死閾値の実験推定値はほとんどなく，閾値を決定するための実験はやっかいで，めったに試みられなかった。生物群集の生物に影響を与えない，いくつかの化学物質と排水の濃度に関して，野外調査で多少証拠が得られた。少ない情報が与えられた種と排水に対する合理的な適用係数を推定するのに使用された。そして，同じ係数(比)が排水の潜在力が変化してもあるいは修飾条件に変化（例えば，結合・解毒剤）があっても有効であると仮定された。LC50の迅速な決定が新規の排水あるいは条件の変更に対してなされ，亜致死効果を認識できない環境濃度を予測するため，適用係数が乗ぜられた[25]。

適用係数は観測されていないか確かめるのが困難な次のような変数を補正するよう意図された；(1)受水域における観測された，急性のLC50と亜致死の無作用濃度との間の差異；(2)受水域の生物群集における他の生物のより大きな感受性；(3)当該排水の検出されていない変化；(4)試験方法の欠除(Henderson，1957，HendersonとTarzwell，1957)。

まず，科学的直感からするとかなり大きな授与量を含む適用係数に数値が割り当てられた。次第に，適用係数を使った結果が観察され，そして亜致死の実験が改良され，割り当てられた値が標準化される傾向を示した(Spragueが総説，1957)

1964までに，次の値が真の無作用濃度が未知(NTAC，1968)の毒性物質から水生生物を保護するためにアメリカで基準化された。次の適用係数が同じように，長年，オンタリオ州において使われた(OWRC，1970，OMOE，1984)。

- 受水域の水と混合した後、非残留性か非蓄積性の物質の濃度はいつでもどこでも96hLC50の1/10を越えない。
- このような物質の24時間平均濃度は混合後LC50の1/20を越えない。
- 難分解性または蓄積性の毒性物質の濃度は前述した条件下でLC50の1/20か1/100を越えない。

---

[24]適用係数も急性-慢性比も安全係数として設計されておらず，そのように考えるべきではない。両者はLC50と亜致死毒性をちょうど引き起こさない濃度との間の比の現実的な（すなわち≈ 亜致死閾値，または，≈ NOEC）代表として意図されている。安全係数は水生生物の既知の，あるいは推定された感受性に対して安全のための余裕を与えるだろう(Stephanら，1985)。適用係数は**水生生物群集**の現実的な閾値（観測は困難）を**1ないし2，3の種**の致死濃度（観測はより簡単で迅速）から予測することが望まれた。

[25]適用係数は一定の情報がない場合の現実的な必要性から他の種，あるいは他の排水に対する LC50に適用された。例えば，石油精製工場の排水に対する適用係数が0.1なら，それは他の精製工場の排水，そしてたぶん他の産業排水へ適用されるだろう。具体例を見よう。軟水におけるサケ科に対する亜鉛のLC50を0.5 mg/l，そして野外と実験室ではNOEC 0.05 mg/lが示されているとする。適用係数は0.05÷0.5=0.1または1/10である。今，硬水におけるサケ科のLC50が亜鉛 4 mg/lとすると，亜致死閾値は4×0.1=0.4mg/lと予測される。

一定の「全目的用」適用係数が無差別に使われるのは推奨されなかった。と言うよりむしろそれは与えられた状況で利用できる情報により加減された。しかし，科学者と技術者が水質汚濁問題に取り組むとき，具体的な情報が欠如している場合、適用係数は有効な経験的目安を提供した。それらは主にに産業排水による潜在的な生態系への損傷の評価，あるいは毒性学上の調査がほとんどなされていない新規化学物質に対して水質目標を見積もることを目的としていた。

適用係数は現代の方法でも引き続き見られる。そして実のところ，初期の値は最近の亜致死の研究としばしばかなり一致しているようである。例えば，カナダの基準はCCMEの標準方法を使用する亜致死の研究が十分でないなら適用係数を使用することを限定的に支持する(CCME, 1991b)(5.6節を見よ)。CCMEの値は非残留性物質に対して0.05，難分解性（そしてたぶん生物蓄積性）毒性物質に対して0.01である。すなわち，24h平均値に対する伝統的な限定値が以前一覧表にされた。CCMEはこれらの値がいくつかの州（オンタリオ，マントバ，サスカチェワン，ブリティッシュ・コロンビア）と国際共同委員会（IJC）で受け入れられてきたことを論評している。CCME(1991b)は係数はその目的のために計画された研究から選択されねばならないと述べている。

前述したことに基づいて，係数は単一種または単一の毒性物質に関する仕事から思慮深く他へ移されてきたように思われる。しかし，それはCCMEによって特に述べられていないし，いくつかの中から最も適切な係数を選択することに関して特定の方向もない。適用係数の最近の値は4.2.2，4.2.3，4.2.4でも考察される。

最近の文献の中には，適用係数の意味を曲げて前述した伝統的な意味と全く異なる特別な状況を示すものとするものもある。その語句に出くわした読者は著者の意味するところを吟味した方が良い。

4.2.2　急性-慢性比

これは本質的に適用係数と同じである。すなわち，数値は単に適用係数の逆数である。したがって，急性-慢性比(ACR)は致死と亜致死の毒性影響[26]を及ぼす化学物質濃度の比である。この語句は近年好まれている。なぜなら，LC50を割り，亜致死のTOECを見積もるため整数を使っているからである。ほとんどの人は適用係数に使われる1より小さい少数より整数の大きさの方が把握しやすい。

ACRという語句は，与えられた種と毒性物質に対して，LC50と亜致死閾値の両者が実際に観測されているときによく使用される。それに従い，他の類似の産業排水に対して，または，注意して他の種に対して異なった（修正された）環境条件下のTOECを予測するために，適用係数と同じように予測目的で計

[26]この語句はかなり正確な言葉を使って始まったが，残念なことに誤記されるようになった。亜致死試験は慢性（”長期間”）を意味する生涯曝露から急性（”迅速”）を意味する初期生活段階の曝露に変化した。ACRは致死と亜致死のエンドポイントの比（例えば，LC50割るIC25）であるとされた。致死試験は，はっきり言うと，ほとんどいつも急性であるが最近の亜致死試験の多くも急性である。例えばファトヘッドミノウの初期生活段階による7日亜致死試験はその魚の生存期間と比較して明らかに急性である。もっと極端な例は何年もの生存期間を持ったウニの精子を使って亜致死毒性を評価する２０分間曝露であろう。”慢性”の思慮のない誤用は北米の水関係の毒性学者の間で続いている。急性-慢性比という語句は十分確立されているのでここでは少し広義で使われるだろう。

算された比は用いられるだろう。

多くの物質と毒性試験の経験から広範囲の一般化として，急性-慢性比10が一般的に適用可能と考えられている。それは直接的な観測値が欠如しているときに，産業排水と普通の化学物質に使われる控え目な概算値である(USEPA, 1991a;OECD, 1992b)。この値は毒性物質の最大濃度に対して4.2.1節で述べた値と同一であるが，水域における平均濃度に対して与えられる20という値より制限が少ない。

同じ種に対して，いくつかの致死試験の結果が利用可能なら，結論を述べるため幾何平均が用いられるべきである[27]。同様に，幾何平均により，同じエンドポイントを持ついくつかの亜致死試験の結果を述べるべきである(USEPA, 1991a;OECD, 1992b)。もし，１つの致死効果（例えば，繁殖に対するIC25）が他（例えば，生長に対するIC25）より低いなら，低い方の濃度がACRの計算に使われるだろう。急性致死データがいくつかの類似種（例えば，種々の魚）に対して利用可能で，亜致死データはそのうちの１種のみ利用可能なら，その種に対する急性-慢性比は他の種に対する急性データに適用できるだろう(OECD, 1992b)。

4.2.3 広範なデータベースに基づく係数

特定の化学物質や排水を評価する場合，致死及び亜致死毒性に関する適切なデータの組み合わせがよく入手可能である。環境中における影響の閾値を推定するため，多様な情報に用いられる一般的な係数を定式化する試みがなされてきた。これらの係数を提案するグループは予測閾値が何を示しているか述べるのに注意深く，たいていそれらを”潜在的有害濃度”，*懸念レベル*(OECD, 1992b)，あるいは*保護レベル*(WagnerとLøkke, 1991)というような名前で呼んでいる。これらの係数は望ましくない濃度の目安とするのに役立つが，もちろん毒性学上の，あるいは環境上の直接的な証拠の補助となるものであろう。

数ヶ国の毒性学者のワーキンググループは次の係数が毒性学的な小データに対してよく機能すると結論づけた(OECD, 1992b)。これらの係数は”環境上の懸念”のレベルに外挿されている。

利用可能な情報	外挿係数
１種または２種のデータセットにおける急性LC50かEC50の最小値	1000
少なくとも１種の藻類，甲殻類，魚類からなるデータセットにおける急性LC50，EC50、またはIC50の最小値	100
少なくともLC50，EC50のIC50における亜致死NOECの最小値	10

[27]幾何平均は単にそれらの値の対数の平均値の真数（またはn個の値の積のn乗根）である。この役に立つ平均値は結果が密集して，均等に分布している集合に対して，算術平均値と類似であろう。しかし，間違いかもしれない極端に大きな値があっても影響はより少ない。実際，LC50のようなエンドポイントの対数値は”真”の代表値としてみなされるべきである。なぜなら，エンドポイントが試験で使われた対数濃度から対数として計算されているからである。LC50（または他のエンドポイント）は利便性と多くの人に理解しやすいように慣例上算術値に返還される。それは数学的手続きで使用される前に対数に戻されるべきである。

これらの外挿係数は，情報の根拠が改善され，毒性推定の不確実性が減少すると小さくなる。化学構造に基づく推定(QSARs)が実験的に決定されるエンドポイントに代って，有毒性評価において使用できる(BKH Engineers, 1990;OECD, 1992b)。これらの値は後のガイダンス文書(OECD 1995a)である６節でも魚食性の鳥類と哺乳類になされた毒性試験から外挿された類似の係数とともに与えられる。OECD文書(1992b;1995a)は係数10に対して”慢性NOEC”という用語を使っているが，4.2.2節で考察したようにそれは明らかに”亜致死”を意図している。なぜなら，その文書は短期間亜致死試験について言及しているからである。

外挿係数に基づく評価は工業用化学物質の製造，輸入，加工，使用，あるいは処分による生物の不合理なリスクの予防を所掌している米国環境保護庁の汚染防止毒性物質局（原文のままの訳）により使用されているものとよく似ている。この合衆国の事務所は次の表に示すように新規化学物質に対する懸念レベルを設定するのに”アセスメント係数”を用いている(Zeeman, 1995)。（そのカテゴリーを記述する言葉は明快さと正確さが少し変化してきている。）

化学物質または類似物に関する利用可能なデータ	アセスメント係数
限定（例えば，構造活性相関から推定された単一の急性LC50のみ）	1000
毒性に対する基礎データ（例えば，魚類とミジンコの急性LC50，藻類のIC50）	100
亜致死毒性の閾値	10
野外試験	1

類似の係数が化学物質の予備的な有害性評価に，USEPA(1984b)により採用されてきた。当時，EPAは外挿係数100を使用するために５つの急性毒性試験の結果を必要とした。そして最も感受性の強い亜致死データが３つの種（魚類，無脊椎動物，植物）から使用されるなら，排水に対して単に３という係数を推奨した。

4.2.4　統計学的外挿

もっと完全な毒性データが利用できるなら，外挿手法は多様な種の感受性の分布に基づくことができる。これらの手法は頻度分布データへの因数の適合を含んでいる。環境上の懸念レベルは適合した分布のある百分率（たいてい95%）に対応した化学物質濃度である。分布に基づく方法は生態系における種が与えられた毒性物質への感受性に対して近似的に対数正規分布，すなわち，いくつかの感受性の強い種，多くのある程度感受性のある種，いくつかの耐性の強い種という分布をもっていると仮定している。少なくとも８つの種に対する信頼できるエンドポイントがこれらの方法の適用には必要とされる(OECD, 1992b)。そして偏りを避けるため，それらが分類学的にも生態学的にも異なったグループを代表していなければならない。外挿に関するワークショップ(OECD, 1992b)では利用できる方法が比較さ

れた。Chapmanら(1998)は生態学的リスクアセメントに特別に言及して外挿方法のレビューを行なった。

最も簡単な外挿方法は規制として使用される水質基準を得るためにUSEPAで開発された(Stephanら, 1985)。その方法は曝露された属の95%を保護するよう設計されており，少なくとも８つの動物の科，１つの植物，そして適切なケースでは生物濃縮係数と他のデータから成る毒性データの入力を必要としている[28]。与えられた種に対する毒性のエンドポイントはすべて幾何平均を計算するために使われ，それらは次いで各属に対する幾何平均を計算するために使われる。属の平均値は等級づけられ，４つの最低値が対数三角分布（対数正規分布の簡単な近似）を仮定して５番目の百分位数に最も近い化学濃度を計算するために使われる。計算式はStephanら(1985)とOECD(1992b)で与えられている。

USEPAの外挿方法は４つの最低毒性値のみを使用しており，そのため仮定された分布の上部からの控えめな偏差は計算を混乱させはしない。ある値”より大きい”とみなされるエンドポイント（すなわち，高濃度で無作用である）は分布に含まれうる。５番目の百分位数から得られる懸念レベルはほとんどの種がほとんどの時間保護されるよう意図されている。これは生態系における属の95%を保護することが，通常，生態系の健康を維持するという仮定を形にしたものである。EPAは，しかしながら，生態学的か，経済的か，社会的に重要な種が危機に瀕している場合は，より厳格な基準が開発されるべきであることを推奨する。

数学的にもっと複雑な外挿方法は対数論理分布(log-logistic distribution)に基づいている(Kooijman, 1987)。その手法は最も感受性の強い種に対して慢性の致死濃度の中央値を予測するため，ある与えられた毒性物質に関する一連の慢性のLC50を用いている。これはその種が感受性に関して生物群集内でランダムに分布しているということを仮定している。推定された”懸念レベル”には生物群集における最も感受性の強い種に対する慢性のLC50より低いという具体的な蓋然性がある。Kooijmanの方法は慢性のLC50を推定し，そしてそこでは最も感受性の強い種において50%の個体が結局は懸念レベルで死亡し，たぶん，より感受性の低い種ではより少数が死亡することが予測される可能性がある。

Kooijmanの懸念レベルは信頼限界（たいてい95%）を持っている。それはモデルのパラメータが不正確に推定されている確率を表しており，より感受性の強い種で生起する真の確率が具体的に記述されたそれとは異なっていることを示している。

Kooijmanのアプローチは土壌質の基準に適用されてきており(van Straalen and Denneman, 1991)，その方法の変法が存在する(Aldenberg and Slob, 1991;Wagner and Løkke, 1991)。これらすべての方法は，懸念レベルをLC50の幾可平均として，または，対数論理分布か対数正規分布の推定された５番目の百分位数から得られた外挿係数で割ったLOECの幾何平均として計算している。これらの方法はUSEPAのアプローチと，最も感受性の強い種を保護するのではなく，生物群集における生物の95%を保護する

[28] USEPAの方法はかなり複雑であるが，いい仮定に基づいている。記述された手順は致死（”急性”）試験に従われている。この手順は最大１時間の曝露に対する基準を計算する。もし，８つの適切な動物の科に対して亜致死（”慢性”）データが利用できるなら，それらは同じ方法で最大４日間の平均濃度を計算するために急性-慢性比から得られる。植物や生物蓄積，”その他”に対して推定された基準が低いなら，それは８つの動物の科から得られる基準より優先されるだろう。１時間と４日間の選択はその文書で取り扱われている。

という目標を適用する点で似ている。カナダの研究者は特別の用語とそこで作られた頭字語を適切に避けているが，これらの方法のわかりやすい記述と要約がガイダンス文書(OECD, 1995a)の第５節に与えられている。

4.2.5　外挿法の比較

複雑さにおいて相違があるにもかかわらず，4.2.4節で述べられた外挿は類似の結果をもたらす傾向がある。相違は，３種を用いた急性毒性に単なる適用係数100（表３，第１欄）を用いた方法とUSEPAの方法による推定値（第４欄）とを比較するとき，８つの化学物質のうち６つに対して，３倍の範囲内である。表３において比較されているすべての方法に対して推定値のほとんど（56のうち51）はお互いに同じオーダーの範囲であった。

NOECが一定の外挿係数で，または，AldenbergとSlob(1991，第５欄)の方法で予測されたとき（表３の第１欄から第３欄）NOECの予測値のほとんどは，マイクロコスムにおける生物群集か種に対して実際に観察される影響と比較して，１～100倍程度低かった(Okkermanら，1990)。両者の方法は，それゆえ，実際に認められるより大きな毒性を予測したので，それらは明らかに亜致死効果の閾値に対して保護的な推定値をもたらした。

表３　種々の方法による８つの化学物質の懸念レベルの外挿の比較(OECD, 1992b)。最初の３つの欄は通例の外挿係数を示している。第１，２欄の３つの種は藻類，ミジンコ，魚類である。第４欄(Stephanら，1985)は50%の信頼レベルで適用されているので，95番目の百分位数の最もよい推定値は過大，過小推定値である可能性が等しい。第５欄はAldenbergとSlob(1991)によるもので，50%の信頼レベルで適用されており，第６欄は95%の信頼性で適用されている。そのため，95番目の百分位数を超過する可能性はたった5%である。第７欄はWagnerとLφkke(1991)による方法である。

化学物質	1.　最低LC50またはEC50，３種/100	2.最低NOEC，同じ３種/10	3.　最低NOEC，11種/10	4.USEPA，対数三角分布，95ﾊﾟｰｾﾝﾀｲﾙ値，50%の信頼	5.　対数論理分布，50%信頼	6.　対数論理分布，95%信頼	7.　対数正規分布，95%信頼
$K_2Cr_2O_7$	0.01	0.01	0.01	0.085	0.71	0.010	0.013
NaBr	100	1	1.0	5.4	4.1	0.21	0.29
TPBS	0.16	0.1	0.032	0.27	0.27	0.042	0.052
2,4-DCA	0.013	0.0032	0.0032	0.019	0.064	0.0082	0.010
p-NT	0.075	0.1	0.032	0.19	0.45	0.10	0.12
DNOC	0.018	0.01	0.0032	0.019	0.031	0.0028	0.0037
ｼﾞﾒﾄｴｰﾄ	0.029	0.0032	0.0032	0.019	0.018	0.00036	0.00057
PCP	0.0047	0.0032	0.00032	0.0023	0.0043	0.00033	0.00045

15の比較のうち3つの場合だけ，固定の外挿係数が実測の閾値をかなり過大または過小に推定していた。固定の外挿は限られたデータで用いることができるが，分布に基づく方法ではできない(Okkermanら)。

結論は次のとおりである。致死または亜致死に関する小数の代表的な結果から得られた環境上懸念のあるレベルはより完全な確率分布から得られたレベルの妥当な近似値である（表３）。それらは，データセットが後者のアプローチに対して不十分であるとき，一定の信頼性を持って使うことができる。

4.3　毒性単位と毒性放出

概　要

- **毒性単位(TU)**は排水または物質濃度の毒性の程度を観察されたエンドポイントの分数として表す。
- 毒性単位はその大きさが毒性と対応するので便利である。これは，毒性が減少すると増加するLC50のような毒性のエンドポイントが持っている概念的なむずかしさを克服している。毒性単位は排水プリュームの計算に有効である。
- **致死毒性単位(LTU)**は特定の毒性物質の実測の，または，支配的な濃度を閾値のLC50で除した値である。(例えば，河川における観測濃度をLC50で除した値)。普通パーセント濃度として観測される排水に対して，LTUはその排水のLC50で除して100%として計算される。
- **亜致死毒性単位(SLTU)**は支配的濃度を，IC25か亜致死の閾値を表している類似のエンドポイントで除して計算される。
- 毒性単位は無次元であり，相互に加えうる。そのため，いくつかの化学物質または排水の混合物の毒性を予測する基礎となりうる。しかしながら，LTUとSLTUは一緒にできない。
- 排出された毒性の量はTUと流量m^3/dを乗じた値として定義された**毒性放出速度(TER)**で測定できる。TERは受水域の生物群集への影響を支配する。
- **毒性放出係数(TEF)**はTERを工場の生産速度で割って得られる[すなわち，TEF=TUX(流量m^3/生産速度t)]。TEFは環境影響すべてを測定しないが，産業内そして産業間の公正な比較にとって有効なものである。

化学物質または排水の毒性がより強くなると，LC50やその他のエンドポイントは数値的により小さくなる。致死的な影響のみ考慮されるなら場合は、

$$毒性=\frac{1}{LC50}$$

このような関係にあるため、希釈または混合物の潜在的な作用のような計算に試験のエンドポイント(LC50,IC25など)を使用することが、実用的に，そして直観的には困難である。

4.3.1　毒性単位の概念

実験室から環境への毒性の外挿は，毒性データを取り扱うときより実用的でもある毒性単位を計算することにより，簡単にできる(4.5節)。USEPA(1991a)は，技術指針文書において，定量化または排水の毒性のモデル化，毒性に基づいた水質基準の具体化における最初のステップとして毒性単位を使うことを推奨している。

致死毒性単位(LTU)は，ここ数10年で発展させられてきたように(Sprague(1970)がレビューしている)，特定の毒性物質の支配的な(実際の)濃度を初期致死濃度で除したモノである。(96時間LC50のような近似値が，LC50閾値または時間非依存LC50とも呼ばれる初期LC50の推定値として，その分母に使われる。)

排水の毒性強度を特徴づけるため，分子の"実際の濃度"は100%であろう。なぜなら，最大強度の排水が扱われるからである。そして，

$$\text{致死毒性単位 (LTU)} = \frac{100\%}{LC50(\%)}$$

その公式によって，排水Aが"ちょうど致死"(すなわち，LC50が100%である)ならば，LTUが1．0に等しくなるであろう(値は無次元である)[29]。排水Bが5%のLCであるならば，LTUは100/5=20であろう。排水Bが排水Aより20倍毒性が強いことは容易に認識される。

化学物質を扱うとき，他の濃度単位が使われる。化学物質の濃度が排水中で10 mg/Lであるなら，それは致死毒性単位の計算式の分子で使われる"実際の"濃度であろう。化学物質がある特定の種に対して2 mg/LのLC50を持っているなら，それは分母であり，毒性強度は10/2=5 LTUとなろう。毒性単位は1.0よりずっと大きいので，強い致死効果が予期されるだろう。LTU値はまた，ちょうど毒性のあるレベルとなるのに必要な希釈，このケースでは5倍希釈を示している。1.0以下の値は非致死を予測するだろう。

亜致死毒性単位は亜致死毒性試験のエンドポイントを分母として使って同様に定義できる。よって，排水に対して，

$$\text{亜致死毒性単位 (SLTU)} = \frac{100\%}{IC25(\%)}$$

SLTUの計算と使用はLTUに対して概説したのと同様である。化学物質に対して，分数の分子も分母も単位はmg/Lであるかもしれない，または，μg/Lであるかもしれない。分子は当該物質の実際の濃度，たぶん，表層水における測定値であろう。分母はIC25，または，たぶんTOECのような亜致死効果の閾値また閾値に近い値の，実験室での決定値であろう。表層水がある毒性物質を10 μg/L含んでおり，魚類を用いた亜致死試験にたいするIC25が2 μg/Lであるならば，SLTUは10/2=5に等しく，水域においてかなり大きい亜致死効果があると考えられる。

LTUとSLTUは2つの異なった測定単位であり，計算において一緒にすることはできない。汚染にたいする最近の関心では，亜致死毒性単位により興味が持たれるだろう。米国ではこの2つをたいてい"急性"と"慢性"の毒性単位と呼んでいるが専門用語は時々間違っているものである。

他の特徴も述べなければならない。個別の物質に対して分子においても分母においても同じであるなら，どんな化学的な濃度単位も使うことができる。一旦，TU値が得られたなら，それは無次元であるので異なる化学的単位を

---

[29]排水に対して，致死毒性単位<1.0を計算するのは可能ではない。なぜなら，LC50>100%，すなわち，最大強度の排水より大きいLC50を測定するのは不可能だからである。環境中の化学物質は毒性単位<1.0となりうる。なぜなら，LC50を実験室で測定でき，環境中濃度は通常それよりずっと小さいからである。

使って得られたTU値と比較することができる。TU推定値は，しかしながら，試験生物や使われたエンドポイントにより変化すると思われる。したがって生物とエンドポイントは特定のプロジェクト内で標準化され，報告されるべきである。

4.3.2　毒性単位と混合物の影響

混合物の毒性は，TUが無次元であるので，各成分のTUの合計として表現できる。例えば，1化学物質の5つのTUと他の化学物質の3つのTUを含む混合物は全部で8つTUを含んでいる。混合物のTUの合計値が近似的に1.0TUに等しいなら，混合物は計算の基礎として使われた毒性影響(例えば，LC50)を与えると考えられる。1より小さいなら，影響はそれに応じて小さくなり，1より大きいなら，より強い影響が予測される。

毒性単位による混合物の毒性の予測は個々の化学物質の影響が相加的であるという仮定に基づいている。その仮定は水性毒性に関する十分な，亜致死の研究によって判断すると，保守的な近似のように思われる。類似の作用形態を持つ多くの化学物質は近似的に相加的ないし，統合した影響の半分程度を示す半相加的である。異なった形態を持つそれらの化学物質は個々の毒性の半分程度に寄与すると思われる(Broderius(1991)がレビュー;Christensen and Chen,1991)。

例を示そう。ドイツの研究者が類似の作用を持つ5ないし25の有機物質の混合物の，ミジンコの繁殖への影響について試験をした(Hermensら,1984a)。混合物は1.5ないし2のSLTUで影響を示した。すなわち，個々の物質は混合物において，その潜在的影響の1/2ないし2/3を保持していると思われた。25の物質の混合物における複合的な作用は各物質が個々の影響のある濃度の1/17程度存在するときでさえ強かった(1.5 SLTU)。最近の研究では殺虫剤の混合物における相加性に近い例が室内試験(Baileyら,1997)，人工水路(CarderとHoagland,1998)と河川(ShigehisとShiraishi, 1998) において提供され続けている。

類似の結果が数種類の化学構造と作用形態を含む混合物に対して得られた。14種の物質の混合物はミジンコの繁殖に1.9 SLTUで影響した(Hermensら，1984b) 。各毒性物質はそれぞれの有効濃度の1/7程度存在するとき，その毒性の半分程度，混合物の作用に明らかに寄与した。

毒性単位は，正確な組成が不明な排水の複合的な毒性を予測したり，評価したりするのに使うことができる。前述したように，パーセント濃度が計算に使われるだろう。受水域において予期される生物学的影響の空間的範囲と大きさを，混合した流れ中の濃度で予期される個別の影響の合計に基づいて予測することができる。致死レベルにおけるいくつかの研究は排水の相加性を示しているが，残念なことに亜致死レベルの排水に関する文献はほとんどない。受水域の生物群集の保護を考慮すると，亜致死の場合がよりいっそう興味のあるところであろう。

混合物中の化学物質の弱い複合作用に関する水性毒性学の例がいくつかあり，独立的な作用の例でさえある。相加的影響以上は拮抗的影響(ある毒性物質が他の毒性物質の予期される個別の影響を減少させる)と同じように，比較的まれである。混合物の毒性を評価する他のモデルがいくつかある。それはたいていもっと複雑か作用形態に関する特定の知識を必要とする(ChristensenとChen(1991)においてレビューされている)。

毒性単位と類似の方法が"塩素化ダイオキシンとフラン"(ポリ塩化ジベンゾ-p-ダイオキシンとポリ塩化ジベンゾフラン)の混合物の毒性を評価するのに一般的に受け入れられている手法の中に認められる。ダイオキシンとフランには120の異性体がある。異性体の混合物の毒性は最も毒性の強い異性体，2,3,7,8-四塩化ジベンゾ-p-ダイオキシン

(2378-TCDD)の量に換算して評価される。すなわち，与えられた化学物質の量(または濃度)は等価の2378-TCDDに換算する付加的係数をもった毒性濃度で表される。その計算は基本的に与えられた異性体の量に2378-TCDDのEC50を乗じ，その異性体のEC50で除すことにより行なわれる。それは毒性単位に使われている計算と同じであるが，2378-TCDDを標準単位として用いるという複雑さをもっている。実際には，各異性体に対する係数が出版されており(NATO,1988)，異性体の与えられた量を基礎単位に直接換算することが可能である。120の異性体の相加性を仮定することは毒性学において標準的なことである。異性体は構造において類似しており，類似の毒性作用を持っているが，その類似性はそれにもかかわらず環境毒性学において毒性単位の概念を用いることを奨励している。

4.3.3 毒性の負荷量

受水域の環境に対する排水の重要性は排水量を考えると毒性のある濃度だけではなく毒性物質の総量にも依存する。異なる水量と毒性の排水流は次式(カリフォルニア,1992)で定義される毒性放出速度(TER)の視点から合理的に比較することができる。

毒性放出速度=TU×(流量m^3/d)

排水をTERとして表すことは本質的に含まれている毒性物質に対して排水の体積を標準化する。このツールは1つの水域に対して種々の産業が寄与している，または1つの産業内において種々の水路が寄与している毒性物質の相対量を評価するのに役立つ。TERはまた(従来の毒性試験に付け加えて)工程水の排水の削減のような排水の変化を評価する有効な2番目の方法を提供する。毒性試験によれば排水がさらに悪化するように思えるかもしれないが，TERでは毒性物質の負荷量の減少を示す場合もある[30]。

毒性放出の概念のさらなる改良により，生産の視点，例えば生産された商品1トンあたりの毒性物質量を表すことで種々の産業の工程間を比較することが可能となる。

毒性放出係数=TU×(流量m^3/パルプt)

TEFの概念は不自然ではない;最近の規制はある伝統的な汚染物質の物理化学的限界を設定するため，"技術に基づいたアプローチ"を使っている。カナダの紙パルプ産業の規制は，例えば，BOD放出を生産物1トンあたり7.5 kgに制限している。TEFは生産量の単位を組み入れることにより類似のアプローチをとっている[31]。TEFは異なる工程を用いている工場を比較するのに公平な方法である。なぜなら，それは工場の規模と水使用効率の係数を修正

---

[30]水の保全に望ましい，水使用を4倍減少させる技術を考慮した鉱業の操業を考えよう。また，毒性物質の排出を2倍減少させる新しい工程を考えよう。改良にもかかわらず，濃度に基づいた排水の毒性は2倍になるだろう。それは非致死から致死へ変化させるかもしれない。環境上，排水中の毒性物質の濃度の増加より負荷量の減少に着目することが合理的であるだろう。

[31] ある工場のTEFが100とすると，より適切なのは"100m^3/d のLTU(またはSLTU)"かもしれないが，TERの単位は慣習上"100m^3/d"と表現されるだろう。このことを考える簡単な方法はその工場が毎日"ちょうど致死的"な排水を100m^3排出しているとすることである。実際の排水はLTU=10の排水10m^3/dかもしれないし，LTU=2の排水50m^3/dかもしれない。同様により正しくは"生産物1トンあたりのLTUm^3"と示されるが，TEFは慣習上"m^3/t"として表現される。

TERは1日あたりの排水量を取り扱っており，その産業が製造している商品または生産物の量は無視している。逆に，TEFは何らかの単位で表した商品生産量に基づいているが，"1日あたり"というような時間の単位を無視している。しかしながら，1日あたりの商品生産量がわかっているなら，TERからTEFに，また逆に換算することができる。製紙工場がTER=200,000 m^3/dであり，1日あたり1,000トンの紙を生産しているなら，TEFは200,000/1,000=200 m^3/tとなるであろう。

して毒性物質量を表現しているからである。TEFは，また，生産や工程に変化があっても，長年にわたる1つの操作における排水を比較することができる。

TERとTEFの計算は工場，特に紙パルプ工場内で，どの工程が最も毒性に寄与しているのかを発見するために使われてきた。Scroggins(1986)はオンタリオのクラフト漂白工場内の重要な汚染源を評価することができた(洗浄とスクリーニング，蓄熱と送風機と漂白工場からの排水)。連邦政府の生物学者はTEFを紙パルプ工場において使用することを提案し(Wilson et al,1975)，そして，産業界はTERとTEFを政府報告あるいは内部報告において時々使ってきた(例えば，Naish, 1975;Beak, 1979;Fahmy and Schiefer, 1980)。

最後の例は，工場の操業において毒性濃度と毒性負荷量の両方を考慮することの有効性についてである。LC50, LTU, TER, TEFのデータが類似の規模と操業の，オンタリオの2ヶ所の紙パルプ工場からの1987の排水に対して与えられている(Spragueら,1991;付録A)。

	A工場	B工場
LC50, %排水	29	10
生産量 トン／日	284	269
排水量, m^3/d	3,359	11,928
排水量, m^3/生産量トン	12	44
致死毒性単位	3.4	10
毒性放出率, m^3/d	11,420	119,280
毒性放出係数, m^3/t	41	440

LC50とTUからは，B工場の排水の毒性はA工場のおよそ3倍である。しかしながら，TERとTEFの計算はB工場が受水域におよそ10倍の毒性物質を，そして生産された紙1トンあたりおよそ10倍放出していることを示している。このケースでは，工場が同規模なので，TERとTEFは2工場間で類似の比率を示している。この2つの量は必ずしも類似ではなく，時には2つの異なったメッセージを伝えるかもしれない。

4.4 Weight-of-evidence（科学的根拠の重要性による）アプローチ

概　説

- 三種類の基本的な調査技術（化学分析、毒性試験、生物相調査）の利用すると、環境影響の科学的根拠の重要性による（weight- of-evidence）解釈が可能となる。ある生態系の悪影響の事例は、これら3種類の技術の証拠の共同した証拠に基づいている。
- これは、可能な試験すべてを計画ごとに適用すべきということを意味するわけではない；各試験は独自の目的と役割がある。化学分析と毒性試験は環境での影響を予測するのに用いられるが、生物相調査は信頼すべき監査結果を提供する。したがって、三種の調査結果は同等の意義があるわけではない。
- 底質三要素法（triad）はこの三種類の技術の利用と解釈を一定の形として与えている。影響のパターンは環境影響の特性を示している（表4）。

環境汚染に関する現代の技術文書では、weight-of –evidence 法は、単に全ての情報源、特に三種類の技術、(a)毒性試験、(b)化学分析、(c)野外での生物調査の三本柱、からの情報の利用を意味する。これらの三種類の方法は両立可能で、同時に用いることにより、毒性物質の存在、強度、特性と影響について、単独の方法を用いるよりも、多くのことを明らかにすることができる（1.2）。各手法は、表流水、底質、または土壌の環境汚染への理解を確認し、拡大するのに役立つ。

同時に、何とかして明快な状況が出現するだろうという期待をもって、三種の手法の結果を盲目的にまとめあげてはならない。Munkittrich and McCarty(1995)は警告している：「weight of evidence 法では、しばしば、科学的な適用性や有効性について厳密に吟味しないまま、広範な反応に対して同様の比重をおいている」。各手法はその機能が異なり、適切と思われる特定の目的の場合に用いるべきである。各手法の役割は1.2節で概説したが、ここでも簡潔に繰り返す。

- 毒性試験は、化学物質、廃水、表流水、底質、または土壌の試料により毒性影響が生ずるかどうかを知らせる。試験自体では、毒性物質の本性を決定することはできない。
- 化学分析は、何が毒性の原因らしいかということと、その濃度を特定できる。毒性影響があるかどうかを予測することができるが、毒性の証明を与えることはできない。
- 放流先環境での生物相調査は、生息する群集への影響があったかどうかについて確認の監査を提供する（底生生物のモニタリング法に関する優れた紹介が Hallawell(1978），Merritt and Cummins(1984)、またはRosenberg and Resh(1993)らにより述べられている。技術指針文書（EC、1997e）が紙パルプ産業についてのカナダ環境省のモニタリング計画の方法と必要な試料について概説している)。

他の方法の三本柱は、以下の分類法に示されており、利用可能は技術の目的を示すのに役立つ（1.2節とSprague、1991)。

- (a)廃水水質の試験。　この方法は、優良な工業操適用された何らかの目標と試験結果を比較することである。例えば、魚類の致死なし、範囲x.x-y.yのｐH制御など。この知見は必ずしも放流先の環境の質とは何の直接的関係もないが、優良工業操作に合致する排出者を特定することができる。

・ (b)放流先水域、土壌または底泥の質の試験。二番目の方法は環境質の指針値に適合しているかどうか決定するために、直接的な化学分析または毒性試験を用いることである。(実際には、測定は廃水について行い、希釈後の環境中での濃度を計算により推定する)。比較のために用いられる指針値は科学者の最良の判定結果のみであり、単一種毒性試験は群集での影響から異なる可能性があるため、この方法は予測的手法である。それにもかかわらず、放流先媒体の直接的試験は強力な方法である。カナダにおいては今までは比較的無視されてきたが、底泥の化学分析と毒性試験は、現在、非常に用いられるようになってきた。

・ (c)放流先群集の生物相調査。この三番目の方法は、実際の生物群集での影響、無影響の予測を確認するための、重要な確実な証拠を提供する。

地域の状況に応じて、この方法のどれか一つを最初に用いてよい。ある場合には、生物相の野外調査が計画を開始するには最も論理的な方法であるかもしれない一調査で放流の影響が認められなかったら、化学分析や毒性試験を行なう意味はないかもしれない。おそらく、何らかの調査を開始する経済的な方法は、化学分析または毒性試験を利用することであろう。

毒性調査に化学的、生物的技術を併用した特に優れた例は、毒性同定手法である (TIE、4．7節参照)。

4.4.1 底質三要素法

毒性、生物モニタリングと環境化学分析の相補的な利用は、水、土壌、底泥に同様によく適用されているが、底泥に関しては底泥三要素法(triad)として公式化されてきた(Chapman, 1986; 1990; 1996)。

底質三要素法では、現場は、(a) 底生無脊椎動物モニタリング、(b)環境化学分析、(c)全底泥、間隙水、溶出水または抽出液への一連の毒性試験、により調査される。結果は、近傍の対照地点の測定値と比較される。ある汚染箇所の結果は、対照地点と試験地点の測定値の比、「対照比」ratio-to-reference,

表4　底質三要素法による影響の解釈(Chapmanら, 1992)

汚染	毒性	群集の変化	考えられる結論
+	+	+	汚染によって引き起こされた環境変化の強い証拠
—	—	—	汚染によって引き起こされた環境変化がないという強い証拠
+	—	—	汚染物質の生物利用可能性がない
—	+	—	環境悪化を引き起こす可能性のある測定されていない化学物質または条件が存在
—	—	+	群集の変化は毒性化学物質に由来しない
+	+	—	毒性化学物質が生態系にストレスを与えつつある
—	+	+	測定されていない毒性化学物質が環境変化を引き起こしている
+	—	+	化学物質が生物利用可能性がないか、変化は毒性化学物質に起因しない

参照地点の条件より有意に異なっている場合、影響が陽性に示されている。相違がない場合、陰性と示す。

として集計することが可能である。この比率は、信頼限界を含んだ三軸グラフとして表示することが可能である（Alden, 1992; Canfield ら、1994)。代替法として、データをゼロ（対照地点）から100（最汚染箇所）まで調整し、この目盛りの三角座標に表示することが可能である（図４)。他の例は、Chapman(1986)と Chapman ら（1987;1991）により示されている。

底質三要素法を解釈し適用する方法は比較的簡易である程度、主観的である。三種の各分類の影響の個別の計算から、指標としての影響の表現から、その能力と理解の不足についての批判がある。Green ら（1993）は、相互関係を考慮し、どのような影響が生じているのかをより良く理解するために、コメントを述べ、多変量解析の様々な方法を提示した。彼らは、多変量解析なしには、汚染影響により自然の環境勾配を撹乱する重要性があり、「誤った結論に達する可能性がある」ことを指摘した。三要素法のデータを解釈する方法は改良されつつあり、Chapman(1996)は、比較的単純な三角図表より、多変量による解析と表示の利点の例を示した。

底質三本柱の三つの面のは、常に、同様に結果が現われるわけでなく、それは、さらに調査が必要な複雑な状況を示している可能性がある。グラフの異なる軸は非常に異なった内容であり、異なる目的と感受性を持っているため、グラフの軸は同等のものではない。

表４は底質三要素の反応の異なる組み合わせを解釈するのを助けるであろう。同様の解釈はいかなる媒体（水、底泥、土壌）でも有用であろう。

三箇所のカナダの鉱山付近の汚染底泥の評価は底質三要素に基づく解釈的な方法の長所を示している。底泥の化学的特性と毒性間、化学的特性と底生生物群集間、底泥毒性と底生生物群集間の相関が定量化されている。底泥毒性評価では主成分分析と主成分変数をもちいた多重相関係数を用いている。二つの鉱山では、全三種の比較において相関は有意であった。底泥毒性は金属よ利用可能性に密接に関連しているように見えるが、底生生物群集は生息空間の物理的変化を部分的に反映しているようである。三番目の鉱山では三種の成分間の相関は弱い。解析の結果、底泥での金属濃度の増加は底生無脊椎動物に容易に利用されない、または、ことを示唆している。（AETE、1998a)。

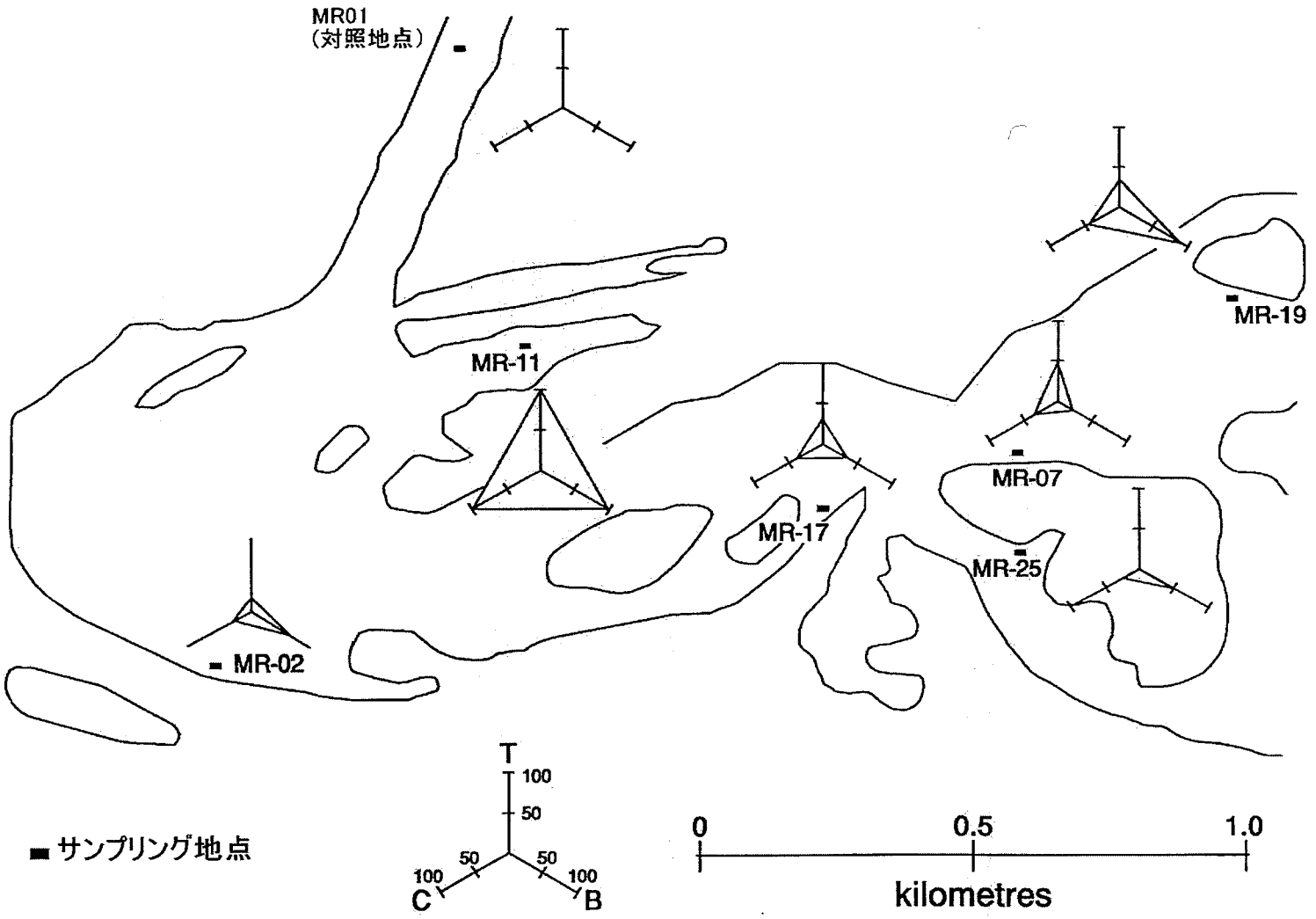


図４　金属汚染された底質へ適用された底質三要素法から結果を記述するための３軸ダイヤグラムの利用(Canfield ら、1994)

T,C,B は毒性、化学、生物調査を表す。軸は０（対照地点）から 100（最悪実測値）までを目盛りが付けられている。

- 72 -

4.5 毒性指標

概　要

- 毒性指標は、試料の毒性を評価する単一の数値として数種の異なる毒性試験の結果を表現する。
- 毒性指標を考案するための一定の法則は確立していないが、設計の決定は試験の一つまたはそれ以上の試験の側面を強調するであろう。
- どのような種類の毒性指標であれ、情報が一部失われているため、注意深く用いるべきである。

物理的化学的測定値にのみ基づく水質指標は数十年にわたり利用可能であった、例えば、Inhaber(1975)らがカナダに対して提唱した計画。通常、指標は、認められた水質指針値との比較により各変数（例. pH, または金属濃度）のスコアを与えるため。各々のスコアは、統合されて、全水質の簡易な測定値として用いる、合計または平均の指標となる。

化学的指標は、個々の値は容易に把握できるため、強い説得力を持ち続ける。しかし、これらはしばしば当てにならない。一つの指標が、一般的な汚染の合理的な評価を提供する数個の程度の測定値を含む可能性があるが（Prati ら、1971）、ある場合には重要な毒性物質を含んでいないために、失敗する可能性がある[32]。

多様な生物的、物理化学的測定値を統合した毒性指標の利用も同様の説得力があるが、このような指標は一般的でない。カナダではPEEP指標が毒性を統合している（以下の本文と付録Bを参照）。他のカナダでの統合指標は、毒性と生化学的試験の結果と、水と底泥の細菌計測値を併合している；セントジョン川で用いられた（Dutka ら、1988）。提唱されているスクリーニング法は、環境中への放出量、残留性、生物蓄積性、人間を含む生物への毒性を指標に組み入れて総括的な環境影響を算出しようと試みている（Swanson ら、1997）。

毒性指標の先駆的なものとしては、毒性の強度に応じた環境試料または有害箇所の等級づけに試験結果を利用することである。等級付けはしばしば最も毒性のある廃水や汚染現場への対策の優先度を決定する。数種の試験で測定された毒性が異なるランクを示す場合、試料の等級付けは複雑となる。複数の反応を一つの毒性指標にまとめることは一つの数字で有害性を表現することになる。

毒性指標の立案にあたって定まった規則はなかったが、幾つかの考慮すべき一般的事項を以下に示す。

毒性エンドポイントの合計または平均の基づく総合指標は最も容易に思いつく。広範な生物を含むためには亜致死試験の結果を急性致死試験と統合することが望ましい。これらのどれかの区分への故意による偏りは、選択され用いられた試験の種類や数、または、一つの区分に乗ずる重み付け係数により、組み込まれる可能性がある。

---

[32] Prati らの総合指標(1971) はｐH、,酸素、BOD、COD、過マンガン酸消費量、浮遊性固形物、硝酸イオン、塩素イオン、マンガン、ABS界面活性剤、CCEなどを含む。この場合、PAHs、PCBs, 塩素化ダイオキシンのような、広範囲な微量有害毒性物質の評価を失敗する可能性がある。総合指標に含まれるそれの変数の主要な変化を伴わなずにカナダでしばしば見出される、銅や亜鉛による汚染の評価にさえ、失敗する可能性がある。

毒性エンドポイントが最初に毒性単位（Toxicity Unit, TU）に変換されていた場合、容易に指標を作成できる。数値は試料の化学的特性値の合計することができる（第4.3.2節）。他の方法としては観察された影響の強度に基づき序数尺度（例. 0~10）に結果を分類する方法がある。この方法はより主観的であるが、少なくとも、ある時点でデータを評価する専門家の判断を組み入れる。等級尺度は、有害と同様、有益にもなりうる指標にどのような種類の環境測定値をも含むことが可能である。

指標を考案する際、成分の重み付けに関して二つの決断をしなければならない。第一は、どのエンドポイント（例、特定種の試験）をより重要とみなすか、したがって、より多く重み付けをするかという点である。二番目は、毒性反応の範囲（例、毒性を示した試験の数）を影響の強度（一つまたはそれ以上の種への影響度）より重要と考えるか、あるいは逆に考えるかどうかという決断である。

PEEP 指標は産業排水の等級付けのためにセントローレンス河行動計画において開発され、現在用いられている（Constan ら、1993）。4種の毒性試験が用いられている：藻類生長阻害、遺伝毒性のためのSOSクロモテスト、細菌発光阻害とニセネコゼミジンコ *Ceriodaphnia* 亜致死試験。一部の試験は試料の曝気前後に用いられ、一部の試験は二つのエンドポイントを与えるため、最終的には１０のエンドポイントが結合される。毒性評価の結果は、生物学的影響を引き起こす可能性、を一つの数字で表すために、排水量と統合される。指標は通常、０から１０までになり、その完全な手法は付録Bに示す。PEEP指標は、意図的に、亜致死毒性を重視し、数種のへの毒性を一種への強い毒性よりも重大であるとみなした（Blaise ら、1985）。指標は、ブリティッシュコロンビア州でのフレイザー河行動計画の一部分に取り入れられ、フレイザー河の場合は簡易版が有効んは可能性があるということを示唆した。

ChimiotoxはPEEP指標の仲間としてセントローレンス河行動計画のために開発された別の評価システムである。毒性は実際には測定されていないので、ここでいう毒性指標ではない。公共、産業廃水の化学的特長と既知の毒性情報が、廃水の潜在的環境損傷による評価に用いられる。各化学成分の日負荷量に毒性因子を乗じ、毒性負荷量の合計により評価する（付録B参照）。

一つの要約値を計算するに当って情報が失われているため、毒性指標は注意して用いる必要がある。疑わしい結果や指標をゆがめる可能性のある例外的なエンドポイントについて各試験の結果を精査すべきである。

4.6 構造活性相関

概　要

- 構造活性相関（SARs）は物理的、化学的特性値に基づき有機化合物の毒性を予測する。
- 定性的SARsは類似構造を有する別の化合物と比較して毒性の近似値を予測する。
- 定量的構造活性相関（QSARs）は、同類の化合物内間で毒性エンドポイントと物理化学的特性値を関連付ける回帰式である。多くのQSARsはオクタノール一水分配係数（Kow）に基づく。
- 異なる分類の化合物に対しては異なるQSARsが必要である。
- SARsは新規化学物質の利用の評価の一手段として利用されている。

多くの毒性化学物質は、細胞内で有害作用を引き起こすためには、環境から生物へ移動しなければな

らない。両過程は化学物質の元素組成と構造に依存している。したがって、有機化学物質の毒性は活性構造相関（SARs）によりその物理化学的特性値から予測することができる。SAR は多様な用途に用いられている。

- **新規市販化学物質の影響予測。**新規化学物質の生産、輸入、利用は、カナダ、アメリカやヨーロッパにおいては規制を受ける。SAR s は再調査中に毒性の程度を推定する役割がある。
- **優先度の設定。**で生産されている数万の有機化学物質のうち、大部分はおそらく毒性が強くないが、同時に、多くは十分な毒性評価がされていない。は試験の優先度のために化学物質を評価するのに用いることができる。
- **予備的な水質指針値の開発。**SARs は毒性情報が不足している場合、表流水の毒性影響のもっともらしい閾値を推定するのに用いることができる。
- **欠落している毒性データの迅速な推定。**試験を実施する時間がない場合（例、化学物質の漏出事故）、SARs は迅速に毒性を推定することができる。
- **試験を指導。**SARs による毒性の予測は、試験の効率を向上、または、必要な試験の数を減少させる可能性がある。試験濃度の最適範囲を選択できる可能性がある。特定の商業目的のために数種の化学物質の候補がある場合、SARs は毒性の少ない物質を示唆して、費用のかかるスクリーニング試験の必要性を減らすことができる。SARs がある化学物質の LC_{50} がその溶解度以上であることを示し、その結果、亜致死試験に努力を向ける場合もある。実測された毒性が予測よりかなり大きい場合、試験の異常な条件について精査、あるいは SAR の適切性に関して検討しなければならない。

4.6.1 構造活性相関の種類

定性的 SARs は最も簡易な手法である。未試験の化合物の毒性を他の類似の化合物と比較して予測することができる。例えば、ある特定のグループの試験済みのアルコール類が 100 mg/L 以上で魚類に対して毒性がある場合、構造が類似した新規のアルコールは予測では同じ範囲の毒性がある可能性がある。通常の物理化学的特性値が毒性と相関していない場合は、未試験化学物質に最も近い類似物または、同じ特性を有する二つの類似物を、毒性の予測に用いることができる（Nabholz ら、1993）。

定性的 SARs（しばしば read-across 推定と呼ばれる）は、毒性試験が不必要になるほどおそらく毒性が低い思われる化合物を排除するのに有効であろう。逆の応用としては、おそらく毒性のある化合物の同定がある。しかし、比較的僅かな構造上の変化が毒性に大きな影響を与える可能性があるため、毒性化合物間の効能予測には信頼性がない。定性的構造活性相関による予測は、長鎖の高分子に（メチル基のような）単量体の一単位を付加または除去するというような、他の化合物とほんの僅かしか異なっていない化学物質に最も限定される。

QSARs はある種類の有機化合物の物理化学的特性と毒性エンドポイントを関連付けた回帰式である。エンドポイントは急性の LC50s, または亜致死の IC50s、EC50s、NOECs である。物理化学的特性値は多様で、疎水的特性、誘電率またはイオン化ポテンシャルのような電気的記述因子 descriptor、モル体積や総表面積のような立体特性、を含む（OECD、1992a）。

定量的構造活性相関は、大きなデータベースがあり、生物利用可能性を定量することは比較的簡単であるため、水生生物に関しては広範囲に開発されてきた。古典的な経口または吸入による投与に基づき、定量的構造活性相関は陸生の野生生物にも開発されてきた。底泥や土壌への定量的構造活性相関も、水生生物の QSARs に用いられたのと同じ原則に従い、開発されつつある（Van Gestel and Ma, 1993）。

QSARs での回帰法では、単純なあるいは多重回帰式が LC50 または他のエンドポイントをある種類の化学物質（例、フェノール類）の物理化学的特性値の関数として記述する。理想的には、毒性は同一条件での一つの種と一つのエンドポイントとして測定されるが、常に達成可能であるとは限らない。毒性は、分子量の影響を排除するために mol/L で表現され、直線性を達成するためにエンドポイントは対数変換される。最小二乗法のような通常の統計手法が用いられる。

QSARs を開発する二番目の方法は、最も基本的な親化合物の基本的は毒性への寄与を用い、次に、多数の化合物の多重回帰分析から決定された各置換基(NH_2,CH_3,OH など)の寄与を加える。これは 105 のベンゼン誘導体について行なわれた（Hall ら、1989）。

断然、での一般的化学記述子 descriptor は一部の有機化学物質については有効であるが、無機物質では有効ではない。これは、生物による蓄積しようとする化合物の傾向の有力な予測者であるオクタノール一水分配係数（または P_{oct}）である。K_{ow}は、水（極性溶媒）と比較したオクタノール（無極性溶媒）中でのある化学物質の平衡分配を表す。したがって、K_{ow}は水中に残存しないで細胞膜に脂質に分配される化学物質の傾向を述べている。大きな K_{ow}をもつ疎水性化合物は組織中の脂質や脂肪に移動する傾向があり、そこで蓄積し、毒性を生ずる（Bertelsen ら、1998）。分配係数は一般に、対数尺度で表現され、生物学的に活性のある有機物質の多くは-5 から＋６であり、＋８以上の場合もある。これ以上の考察は第 6.4 節で述べる。

物理化学的寄与因子や作用機序の異なる種類の化学物質に対しては、異なる QSARs が必要である。毒性学の理論において、作用機序は強固な基礎であるが、しばしば完全には解明されていない（OECD, 1992a）。現在、認められている作用機序の一部には麻酔作用、エネルギー代謝への干渉（呼吸脱共役）、神経系への干渉（アセチルコリンエステラーゼ阻害）、や呼吸刺激などがある（McKim ら、1987）。

4.6.2　麻酔性と非麻酔性モデル

麻酔剤は毒性有機化学物質の中で最大の種類であり、QSARs が最も精力的に開発されている。麻酔作用とは有機化合物による一般的な生理学的反応の減衰と定義されている。可逆的であり、特定の元素（例、塩素）や化学構造（例、ベンゼン環）により生じない基礎的な影響とみなされている（OECD, 1992a）。この非特異性のため、K_{ow}だけが外部濃度による毒性の予測因子として十分であるか[33]。原則的には、どのような有機化合物であろうと、麻酔剤として作用する可能性があるが、その種類には

[33]関係は、麻酔された生物内の麻酔剤のモル濃度が全ての麻酔剤で同様であることを予測している。これは毒性を予測する上で、非常に有益な特長である。この特徴のため、麻酔剤のほとんど相加的な共同作用をしめす(McCarty ら、1992 ; McCarty and Mackay, 1993 ; 6.4 節参照)。

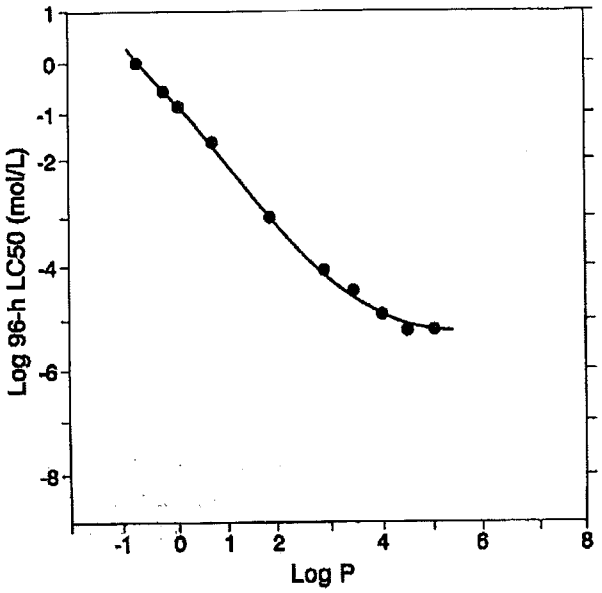


図５　脂肪族アルコール類の定量的活性構造相関（QSAR）

ファトヘッドミノーの 96-h LC50 がオクタノール―水分配係数（P）と関連づけられている。Veith ら（1983）より修正。

脂肪族と芳香族の炭化水素、塩素化炭化水素、アルコール、エーテル、ケトン、弱酸と塩基、一部の脂肪族ニトロ化合物が含れる（Veith ら、1983）。OECD（1995a）は、麻酔作用のある化学物質をはじめとして、その作用に応じて 5 種類の化学物質の解説とリストを提供し、さらにそのような化学物質の QSAR の数値表もしめしている。

麻酔作用のある化学物質の QSAR s の例は；

$$\log 1/C = A \log K_{ow} + B$$

この時、C は LC_{50} または他のエンドポイント、A と B は直線関係の定数。

一連のアルコール類についての優れた QSAR s の明快で単純な例が、図５に示されている。

魚類についての麻酔作用の他の例は表５に示されており、式を見ると類似性と相違が認められる。A の値は通常、1 付近で、B の値は致死の場合、1.0～1.5、亜致死エンドポイントの場合、2.0 である（OECD、1992a； Bol ら、1993a；1993b）。

多くの他の一覧表が入手できるが、最も目立つのは 40 種類の化学物質（例、界面活性剤で 4 種類）に対する 100 通りの SARs を含むコンピュータディスクの ECOSAR プログラムである（USEPA, 1994c）。

土壌生物の場合、QSAR s は脂質―水分配係数を用いて開発されている（Van Gestel and Ma, 1993）。もう一度、これは、メチル水銀のような一部の金属―有機複合体を含む、有機化学物質に有用な特性である。水中同様、毒性化学物質は溶液（土壌間隙水中）から生物に侵入することを仮定している。土壌粒子と結合または土壌溶液へ移動しようとする傾向は、また、K_{ow}（4.11.3 節参照）の関数である。同

表５　一部の種類の化学物質の定量的構造活性相関（QSARs）の例

エンドポイント	式
中性有機物	
96-h LC50, 淡水魚	$\log LC50 = -0.94 \log K_{ow} + 0.94[\log(0.000068 K_{ow})+1]-1.25$
14-d LC50, 淡水魚	$\log (1/LC50) = 0.871 \log K_{ow} - 4.87$
96-h LC50, 海産魚	$\log (1/LC50) = 0.73 \log K_{ow} - 3.69$
48-h LC50, ミジンコ	$\log (1/LC50) = 0.91 \log K_{ow} - 4.72$
96-h LC50, アミ	$\log (1/LC50) = 1.25 \log K_{ow} - 4.83$
16-d LC50, ミジンコ	$\log (1/LC50) = 0.64 \log K_{ow} - 3.27$
16-d EC50, ミジンコ	$\log (1/EC50) = 0.72 \log K_{ow} - 3.05$
3-h EC50, 緑藻	$\log (1/EC50) = 8.865 - 1.0446 \log K_{ow}$
アルデヒド	
96-h LC50, 淡水魚	$\log LC50 = 0.4487 \log K_{ow} - 3.314$
アニリン	
14-d LC50, 淡水魚	$\log (1/LC50) = 0.988 \log K_{ow} - 4.02$
カーバメート	
48-h NOEC, ウニ	$\log NOEC = 3.509 - 0.7174 \log K_{ow}$
エステル	
96-h LC50, 淡水魚	$\log LC50 = -0.535 \log K_{ow} - 2.75$
リン酸エステル、	
96-h LC50, 淡水魚	$\log LC50 = 2.9305 - 0.5178 \log K_{ow}$
塩素化フェノール	
96-h LC50, 淡水魚	$\log (1/LC50) = 0.75 \log K_{ow} - 3.51$ [at pH 6.1]
96-h LC50, 淡水魚	$\log (1/LC50) = 0.58 \log K_{ow} - 3.20$ [at pH 7.3]
96-h LC50, 淡水魚	$\log (1/LC50) = 0.46 \log K_{ow} - 3.04$ [at pH 7.8]
置換したフェノール	
96-h LC50, 淡水魚	$\log (1/LC50) = 0.73 \log K_{ow} - 0.61$ [at pH 6.0]
96-h LC50, 淡水魚	$\log (1/LC50) = 0.61 \log K_{ow} - 0.38$ [at pH 7.0]

様の原則が底泥中の化学物質にもあてはまる。

特定の毒性作用機序を通じて作用する化学物質は、麻酔剤より断然、毒性が強い。それは麻酔作用のために開発されたQSARsからの逸脱として認められ、「過剰毒性」と呼ばれるこの偏りはより特異的なQSARの開発が必要であることを示している。

非麻酔性化学物質のQSARsはあまり開発されていないが、現在の関係式は一般的な作用機序よりもむしろ、一般に化学物質の同族体に基づいている。オランダでは有害性評価のために非麻酔性物質を4種類に分けている；フェノール化合物；反応性化学物質；特異的作用化学物質；その他未分類。最初の二つの分類は、外挿係数により閾値が予測される。特異的作用および未分類化学物質の予測はなされていない（Verhaarら、1992）。

4.6.3　構造活性相関の利用

カナダでは、新規化学物質はカナダ環境保護法（CEPA）により規制される。CEPAにおける新規物質届出規制では新規化学物質の毒性データの提供を要求している。適切な場合には、実験データの代わ

りに、SAR s を用いてることもできる（5.7 節参照）。

ヨーロッパでは、ヨーロッパ共同体委員会（EEC）で新規化学物質の有害性評価に SAR s が用いられるようになってきた（Bol ら、1993a）。オランダが EEC を代表として最も進んでおり、環境質クライテリアの設定の補助として SARs を利用している（Verhaar ら,1992 ; Bol ら、1993a）。

アメリカでは、アメリカ環境保護局（USEPA）は上市前の新規化学物質の審査が 90 日に限定されており、1979 年以来、約 26000 の化学物質を審査してきた。水生毒性を迅速に予測するために QSARs が日常的に用いられている（Zeeman により批評された計画、1995）。USEPA は 1981 年以来、審査する新規化学物資のために QSARs を開発し、100 種類の化学物質のために約 300 ものを開発し、その多くは K_{ow} と分子量に基づく。多くの QSARs はコンピュータディスクとして入手可能である（USEPA, 1994c）。

精度の共通の目標は、QSARs の予測が室内実験の結果の一桁以内に適合することである。Nabholz ら（1993）は予測が 462 物質の 920 のエンドポイントの 85%に適合していることを見出した ; 予測の９％では毒性を過大評価し、６％では過小評価。EEC が 130 の有機化合物に対して USEPA の QSARs を試験した ; 魚での予測の 77%が試験結果に 5 倍以内で適合しており、ミジンコについては 67%が同様に一致していた（USEPA and EEC, 1993）。

特定の適用についての最良の QSAR を決定するためには有機化学に基づく専門家の判断が要求される。化学物質を適切な分類へ割り振ることが QSARs の利用における最大の不確実性の原因の一つである（OECD,1992a ; USEPA and EEC, 1993）。メニュー形式のコンピュータプログラム ESCOR ですら毒性学と有機化学の専門知識が必要である（USEPA , 1994）。各化学物質の種類内のエンドポイント毎に実証された広範なデータに基づく一つの QSAR を確立していこうという風潮があり、そのうちに全ての毒性評価に用いられるであろう。

QSAR は非常に活発な研究分野である。非常に優れたかつ学問的な総説が Lipnick（1995）により最近出され、若干初期の総説は Tosato ら（1990）のものがあり、シンポジウムの一連の論文が Elzerman(1992)により編集されている。

4.7 毒性同定と削減

概　要

- 毒性同定評価（Toxicity Identification Evaluation, TIE）ではある混合物中の毒性成分を同定する。第Ⅰ段階では、試料に物理的化学的操作を施して化学的成分を分画する。操作前後に毒性試験を行なうと毒性成分を含む画分を見分けることができ、第Ⅱ段階の化学分析を化学分析に進むことができる。第Ⅲ段階では、先行した二つの段階の結果を様々な方法で検討する。
- 可能な操作には、曝気、濾過、金属のキレート化、酸化剤還元、ｐＨ調整と固相抽出などがある。方法の基本は、支配的な毒性物質を除去した後、他の毒性物質を探索することである。一般的な手法を特定の試料に適用すべきである。
- ＴＩＥはどのような媒体にも適用できるが、土壌と底泥の方法は開発段階にある。
- 毒性同定評価（Toxicity Reduction Evaluation, TRE）は類似しているが、廃水処理のための適切な方法を見出すことを主眼においている。

化学的試験と毒性試験の両者を用いて、混合物中の毒性成分を系統的に分離、同定するための、一連の公定法がアメリカで開発された（USEPA、1989a;1989b;1991c;d;1996 ）。この一連の方法は現在では広範に用いられており、冗長で文法的にはあやふやな構文であるが、毒性同定評価（Toxicity Identification Evaluation, TIE）という名前が通常、用いられている。この方法は、工場廃水、表流水、底泥間隙水または有害廃棄物浸出水であれ、どのような複雑な混合物にも有効である（Norberg-King ら、1991 ; Kszos ら、1992)。公共下水への優れた適用例は Ankley and Burkhard(1992)により示された。

試料に、論理的に組み合わされた一連の物理的、化学的操作を行い、操作前後の毒性の強度から毒性成分の画分を見出し、化学分析の参考とする。化学分析は毒性を示した画分にのみ、また、見出された可能性のある種類の化学物質についてのみ行なわれるため、毒性物質の同定は効率的である。それにもかかわらず、カナダのコンサルティング会社は、完全な TIE は時には非常に時間を費やしかつ高価になる可能性があり、曖昧な結果が出てきて、実際、毒性物質が同定できない可能性があることを警告している。

標準的な TIE は三段階から構成されている。第Ⅰ段階（初期特徴化）では、、曝気、ｐＨ調整、固相抽出（有機媒体に画分が結合し、メタノールで溶出）などを含む一連の単純な操作（図６の中央から下方向へ)。各操作の後、画分の毒性を単純な試験で測定し、元の毒性と比較する。方法の各段階は、可能性のある一群の毒性成分を明らかに処理または除去するものでなければならない。

毒性の原因物質が第Ⅰ段階の第一段の操作で明らかにならなかった場合は、構成成分の状態、溶解度、または化学反応性を変化させるために、酸性（pH３、図６の左側）またはアルカリ性（pH10、右側)、にした試料で分画を繰り返す。

第Ⅰ段階は毒性成分の性格を示唆する（例、金属または有機物)。第Ⅱ段階（同定）は存在する毒性成分を同定するために、適切な化学測定と毒性試験を適用する。第Ⅲ段階（確認）では先の二つの段階の知見を確証する。第Ⅲ段階では、元の毒性が再現されるかどうかを確認するために、を適切な濃度の同定した毒性物質を加えて、毒性単位解析または添加実験のような、一つまたは複数の手法を用いる。

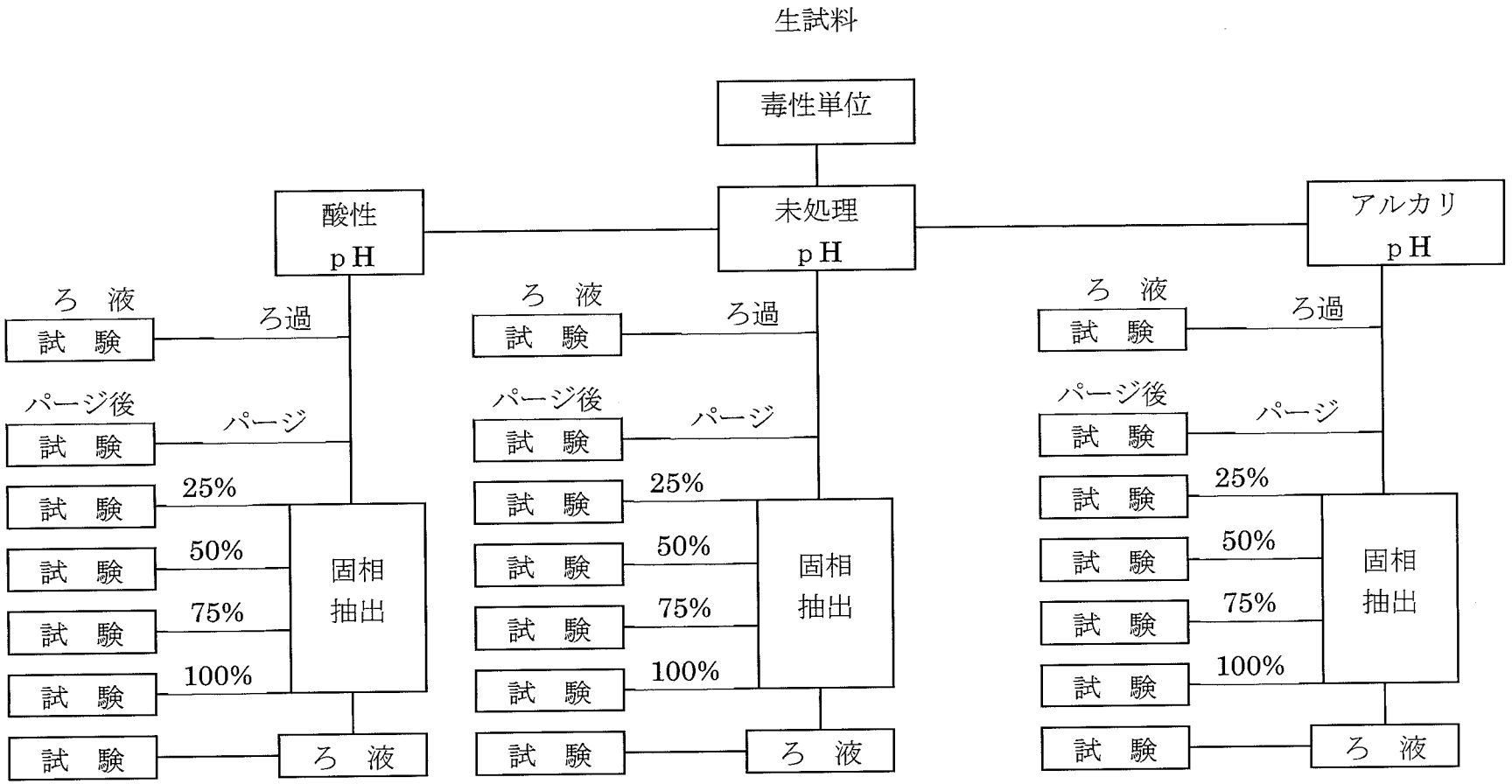


図６　毒性同定評価の第一段階での操作手順

- 81 -

生試料の特徴は毒性単位で示される。第Ⅰ段階の第Ⅰ段は図の真中（未処理）に従う。結果が確定的でない場合、第Ⅱは酸またはアルカリで行なう。

感受性と少量の試料しか必要としないという二点は、TIEs の供試生物と方法を選択する重要な判断基準となる。異なる化学物質への耐性は生物種によって変化するため、初期試験では少なくとも二種以上の生物を用いるべきである（Kszos ら、1992）。少量の試料しか必要としない試験はどれでも容認できるが、ニセネコゼミジンコとファトヘッドミノーが用いられる。正確さより毒性の存在と相対的な強度の方が重要であるため、第Ⅰ段階では、簡素化した多重濃度試験または 100%スクリーニング試験が用いられる（Ankley and Burkhard, 1992）。確定毒性試験は第Ⅲ段階で利用される。

TIE を実施する第一段階は、調査対象とする試料に一貫した毒性が存在するかどうかを確認することである。変動する排水の場合は、おそらく数回評価を行なうことになる。効果的な TIE には三つの主要要素がある。第一に、試料の性質に応じて一般的手法を適用するという柔軟性である[34]。 第二に、各分画または化学処理操作の前後で毒性を測定しなければならないという点である。三番目は、廃水には数種類の毒性物質が含まれているため、主な方策は優先する毒性物質を可能な限り除去し、残存する毒性物質の影響を調べて毒性成分を同定することである。

もともと急性致死試験に用いられていたが、亜致死毒性試験も現在では TIE の一部として一般に用いられている。そのような評価では急性亜致死試験のように合理化された改善法を用いることができる（例、EC の削除された版、1992a,b,c,d）。公共下水の TIE が、暴露と培養で 40 分しか要しないウニとカシパンの孵化試験で実施された（Bailey ら、1995）。第Ⅰ段階での亜致死試験手順（TIEs）（USEPA, 1991d）は致死試験の TIEs と同じであり、第Ⅱ、第Ⅲ段階も致死試験と同じである。海水の場合の手法には致死と亜致死試験の両者が含まれている（USEPA,1996）。

TIE を用いる方法は土壌や底泥を含む汚染箇所の評価に有効である。底泥の場合、急性致死試験を用いた暫定的 TIE がある（USEPA and ACOE, 1994）。底泥へのある方法は間隙水を抽出して廃水に用いる方法を適用している（Ankley ら、1990）。別の方法では、一部の汚染物質の生物利用可能性を減少させるために酸化したりキレート剤（ミョウバン、酸化鉄、石灰）を添加し全底泥を処理した後、毒性を再試験する（Krantzberg and Boyd, 1992）。

---

[34] 操作の種類と順序は経験または試料の知識に応じて調整すべきである。非常に毒性のある成分を含有している場合、効果的な第一段階はその成分を除去することである。そのような柔軟な方法は、Jop ら（1991）による化学プラントからの廃水の事例で述べられている。圧力濾過で浮遊性固形物を除去した後、試料を窒素でパージして揮発性物質を追い出した。主要な毒性成分と疑われていたアンモニアは、パージした試料を陽イオン樹脂、活性炭、またはアンモニアに結合する特異的な粘土などを通過して除去された。アンモニアのない画分は依然として毒性があり、有機物と結合する XAD 樹脂を通過させた後、アセトンとクロロフォルムで溶出した。毒性のある有機画分をさらに分画し（酸、アルカリ、と中性）、最も毒性の高い中性画分は液体クロマトグラフィーにより 17 種類の有機物に分画された。画分の化学分析により、毒性に関連した成分が明らかとなり、アンモニアと有機物質[2-(4-オルフォルニル)－チオゾール）]が観察された毒性の原因であることが示唆された。

Ankley and Schubauer- Berigan(1995)は底泥調査の TIE のための方法の現状について総説を述べている。

土壌については多くの研究が行なわれてきたが、今もって、認められた方法はない。初期の方法では、ミミズをまたは種子発芽により全土壌を試験し、次に水または有機溶媒で潜在的な毒性物質を抽出し、固相と液相を再試験し、さらに分離を行なう。

毒性同定評価（TRE）は、効率的に毒性を除去する廃水処理の種類により関連している。TRE は TIE の後、または独立して行なれることもある。公共下水と産業廃水の方法が入手可能である（USEPA, 1988a, b)。

4.8 スウェーデンにおける廃水の特徴化

概　要

- 産業廃水と公共下水を特徴化するスウェーデンの方法では潜在的な環境影響を評価するために、統合された生物的試験と化学分析のバッテリーを用いる。試験は影響の種類、生物蓄積性、残留性を見極めるように立案されている。
- 試験の三段階は有用であり、各段階はより詳細で複雑なレベルの分析に対応しており、前段階の結果から得られた手がかりに基づく。

化学的プロファイル（輪郭）を作成されるのと同様の方法で、毒性プロファイルを作成して、廃水の潜在的環境影響を特徴化するために、毒性試験を用いることができる。スウェーデンの方法では、産業廃水と公共下水を評価するために、生物学的試験と化学分析を統合したバッテリーを用いて、これを実施している（SNV,1990)。

その目的の一つは、毒性物質の種類を同定であるので、ある面では、この手法は前節で述べた毒性同定のアメリカの方法と類似している。その他の面では、二つの方法は異なっている。アメリカの方法は特に問題のある廃水を対象としているため、効果的な廃水処理が立案することができる。スウェーデンの計画は、問題を予知し回避するために未知または既知の廃水を特徴化することをより指向している。

スウェーデンの特徴化では生物影響を測定し、毒性の程度、生物分解性への抵抗、生物蓄積性を評価するために、その次に化学的試験を行なってもよい。試験には三段階あり、さらに調査が必要であるという結果が出た場合には、調査は次のより詳細なレベルに進む。

第 I 段階は廃水の初期スクリーニングであり、標準的な化学分析と生物試験の決められたバッテリーを用いる。毒性試験は通常、魚類の LC50、甲殻類の LC50 または EC50、藻類の生長/繁殖試験と含む。分解性は、明らかに金属には不向きであるが、有機化合物に有効な方法である、標準的な化学的または生物化学的酸素要求量により評価する。同様に、有機化合物の生物蓄積性は薄相クロマトグラフィー（TLC）で判断した抽出物の親油性により推定する。一部の標準的化学分析は一般的な毒性物質に関して廃水を特徴化する。

第 II 段階はより感受性の高い試験を用い、希釈後の廃水の影響を評価することを目的とする。亜致死毒性試験は、仔魚の成長・生存試験、甲殻類と藻類の繁殖試験、生理学的エンドポイントまたは遺伝毒性などを含む。段階 I で観察された毒性の特性に応じて、これらの試験の一つまたは二つを選択する。推定される問題に応じて、より高度な化学分析を行なう。

第Ⅲ段階は、観察された生物影響と同定された化学成分の間の因果関係を実証することを目指す。前段階の結果に応じて用いる方法は異なる。生物学的試験としては、ゲージに入れた、または野外の生物の形態的、生理学的変化の測定などがある。生物蓄積性も現場の魚類で測定する。排出認可を認めるべきかまたは更新すべきか、その認可にどのような規制をかけるべきか、などを判断するために、特に有機化合物の場合は、毒性学的データとともに、生分解性、生物蓄積性、科学組成に関する情報をまとめなければならない（SNV、1990）。全過程は、科学的調査の原則を踏まえて、努力の論理的な進歩と関連のある情報の蓄積を目指している。

4.9 面倒な結果

概　要

- 毒性試験の異常なデータは以下の一つ以上原因に起因する：低濃度での刺激；狭くて段階的または逆の濃度影響分布；高い変動；繰り返し試験内での低い変動；処理レベルの不適切な範囲；一定でない濃度；データの紛失；操作者の誤り。
- 以下の手順が、試験結果の系統的に検討に推奨される。特に、矛盾の多いデータの試験の場合。(1)報告の完全性を保障する。（2）影響の濃度への関係を見直す。(3) 補完する試験情報を見直す。(4)精度保証の情報を見直す。(5)供試物質と条件に関する知見の合理性を評価する。

毒性試験では若干の固有の変動のある生物または生体系を用いており、したがって、その試験結果は、たとえ厳密な品質保証の手順に従ったとしても、典型的な濃度―反応曲線からしばしば異なる場合がありうる。試験方法を述べている文書は通常、試験の有効性の判断基準と必要とされる正確さ（3.2、3.3 参照）を特定しているが、異常な結果は判断基準に適合する試験から生ずる可能性がある。本節では、異常な結果の例と挙げ、それらを扱う一般的な指針を提供する。同様の問題は液状排水の 3000 の毒性試験の調査（WSDOE、1998）、アメリカやワシントン州で用いられている手法でも明白である（WSDOE、1997）。

不規則なデータの統計解析についての詳細な勧告はここでは述べないが、調査者は毒性学に詳しい統計学者、同僚に相談するか、Newman（1995）のような適切な統計の教科書またはカナダ環境省の指針文書（EC、準備中ａ）を参照すると良い。

4.9.1　データセット中の潜在的異常

本節は亜致死効果を考慮する；致死試験での毒性曲線の変動は、4.9.1 と 5.6.３で述べる。対照に比べて成長の阻害や他の同様の影響が認められる亜致死試験の 4 種類の異常例を図７に示す。実験はＩＣ25 を推定するために計画された。各図での実線はほとんど変動のない理想的な結果を示している。

刺激または増大（恒常性）：供試物質は低濃度で若干、刺激効果がある（図 7A）。これは亜致死試験ではまれなことではなく、原因はほとんど明らかでない（Stebbing の総説、1982）。解析での完全に満足できる解決策はない。IC25 を推定するために単純に直線を当てはめれば、

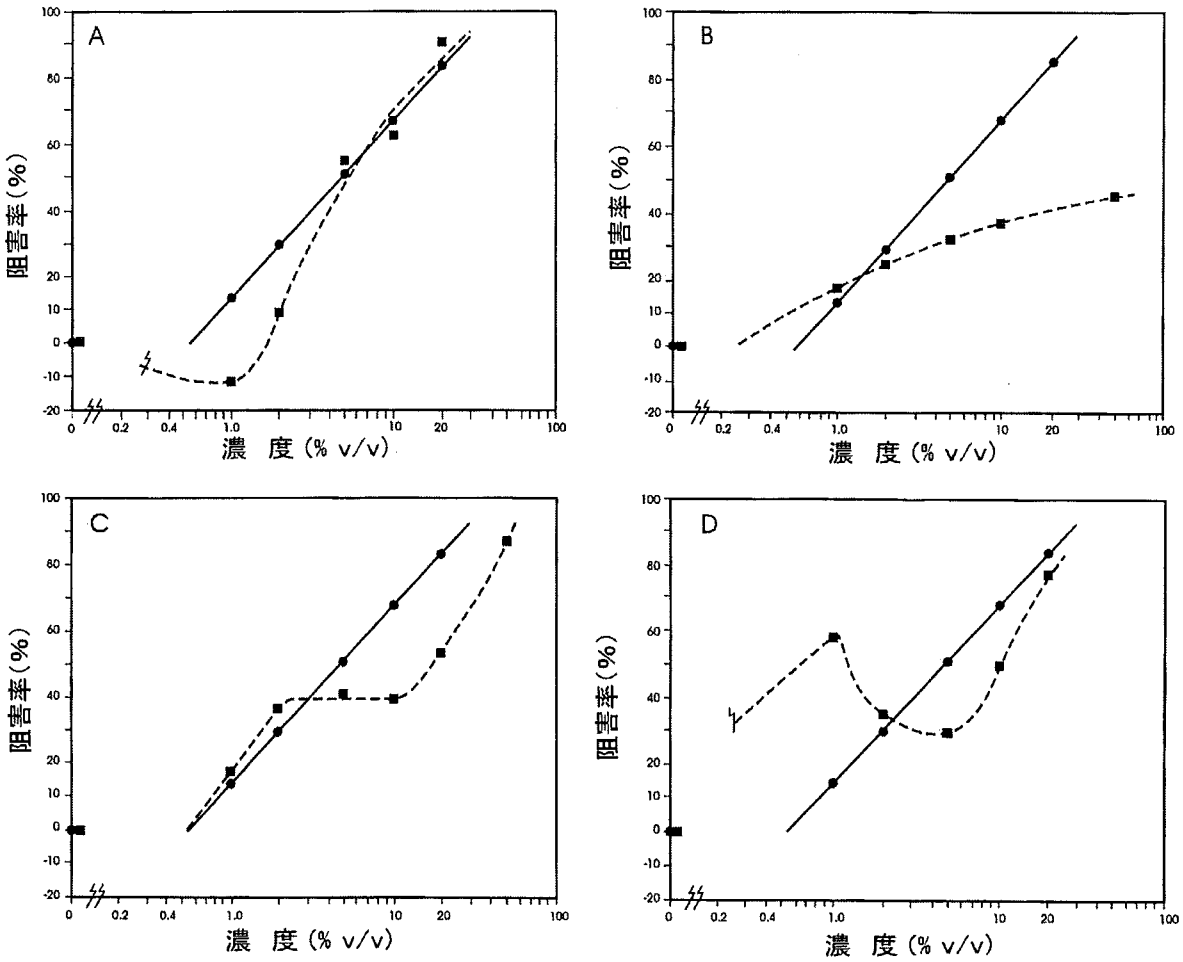


図7　異常な濃度—影響曲線　成長など一部の亜致死反応の阻害を、理想化した直線的反応を実線と丸で示している。A：低濃度で刺激、B:浅い影響曲線、C:二種類の作用様式を示す二相反応、D:逆転した影響曲線

恒常性がない場合に比べ、明らかに高い値を与える。一般の市販コンピュータプログラムを用いてIC_{25}を推定すると、プログラムが対照の反応を高い値に調整するため、低い値が算出される（試料がｙほり毒性が高いとみなされる)。NOEC(対照と有意差がない)の推定値は、反応（例えば、成長）の刺激と抑制の相互作用により上方に影響を受ける可能性がある。恒常性を補正する標準法はなく、このような結果を扱う通常の方法は解析の未修飾法を用いて続行することである。あるいは、変則的な低濃度の結果（刺激効果のある結果）を省くことも可能である。数種の低濃度での強度の恒常性の場合、毒性エンドポイントの結果を得るための結果の解析はできない可能性がある。

影響と濃度の狭い関係：効果の明らかな変化を引き出すために非常に大きな濃度の変化が必要な場合以外は、関係において根本的な不規則はない（図７B)。このような知見は異常かもしれない。図Ｂに示した例の解析のための正規の方法を適用しても構わないが、報告書で異常な用量—反応部分と算出されたエンドポイントの疑わしい値について注意を喚起すべき

である。

二相または段階的影響：図 7C に示した仮説的な結果は毒性影響に二つのモードまたは機構があることを示唆している。低濃度領域では通常の用量—反応パターンが認められるが、この作用機序では半数の生物は影響を受けないよう思われる。高濃度領域で二番目の作用機序が機能し、高濃度で正常に現われる二番目の用量—反応関係が開始した。これはきわめて異常な知見であるが、生ずることがあり、報告書で注意を払うべきである。両方の作用機序で毒性の推定値を求めることは可能であるが、亜致死試験では低濃度領域が重要であろう。

このような試験は十分に低い試験濃度を含んでいない可能性があり、全濃度で影響が対照と異なる。試験濃度で隠されている場合、IC25 が算出できても、NOEC が算出できない。

濃度と逆の影響の関係：毒性が最小濃度から中程度領域にかけて減少し、その後多少とも正常な方法で増加する（図７D)。個々の供試生物の反応に非常に変動があり、各濃度毎にわずかな生物しかいない場合には、これは偶然におきることはほとんどない。

しかし、このような逆のパターンがおこりうる原因としては、濃度範囲にわたって化学物質の状態に勾配があり、供試試料と希釈水の基本的な化学的性質に相違が生ずる。たとえば、ｐH は多くの化学物質の毒性に影響を与え、特に、総アンモニアの魚への毒性に強い影響を与える。イオン化したアンモニア（NH_4^+）は塩基側のｐH で解離して非イオンアンモニア（NH_3）となる。非イオン化したアンモニアは魚に対して非常に毒性があるが、アンモニアイオンはほとんど毒性がない。図７D の例は、高濃度の総アンモニアを含む排水の可能性があり、排水が若干酸性のため、多くがアンモニアイオンとして存在している。実験室の緩衝能のあるアルカリ性希釈液はｐH に影響を与え、低濃度では非イオンのアンモニアが割合を増加させ、大きな毒性を生じさせる。カナダ環境省の実験室が遭遇した他の例は、炭酸カルシウムで処理されて非常に硬度の高い鉱山廃水であった。硬度の非常に低い実験室内水で試験希釈列を作成した場合、低濃度では軟水となり、排水からの金属が非常に有毒となるため、逆の曲線得られることがある。

高い変動：試験結果の高い変動は、解釈時に問題があるが、かならずしも異例だとは考えられない。変動係数が予期される 20-30%より大きい場合、NOEC のようなエンドポイントの解析は曖昧となる。実際、非常に大きい NOEC が変動の大きい試験で生じるのが大きな問題となっており、エンドポイントは、濃度とともに影響が直線的に変化するという証拠と合致しなくなる。この場合は、エンドポイントとして ICｐまたは ECｐを用いるのが適しており、かつ、データをより代表するであろう。

繰り返し群間で低い変動：低い変動はあまり一般的な問題でないが、非常に均一な供試生物、試験実施に熟練しているか、または、一部、偶然でおきる。対照や各処理区での変動が通常の 20%よりずっと小さい。NOEC が変動解析と多重範囲検定で推定される場合、ある処理区（濃度区）が対照に比べ異常にまた予期せぬパターンで有意に異なることがある。最も良い解決策は、ＩＣｐのような回帰型の解析を用いることである。

不適切な濃度範囲：これと、以下の三種の障害は、データの異常ではなく、通常、実験室での操作により引き起こされる障害である。選択した濃度列は、試験終了時には、関心のあるエンドポイントをその中に含むべきである。多くの亜致死試験では、エンドポイントより

おおきく、かつ、より小さい、濃度列が要求され、そうでなければ、エンドポイントは算出できず、試験は無効となる。試験で不適切な濃度範囲を設定するというのはよくある問題である。これは、試験実施前の、しばしばエンドポイントの値に対する不正確な予測、狭すぎる、または高すぎたり低すぎたりする濃度範囲の選択などにより起こる。明らかな改善策は、予備的に濃度範囲決定試験を行なうことである。別の改善策は相対的に広範囲の濃度列を用いることである。隣り合う濃度間の幅はエンドポイントに関連する不確実性を増加するかもしれないが、少なくとも、「x%よりおおきい」または「ｙ％より小さい」とのべる報告でなく、推定値が得られるであろう。

変動する濃度：、毒性成分は揮発し、分解し、試験容器へ吸着し、または、多くの理由により安定でなくなる。その結果、試験中に濃度が変化する。これは実際おこるが、認識されない[35]。濃度の減少（または増加）は、図７で示したのと同様の、不一致のデータまたは異常な分布を引き起こす。問題は、試験方法の全ての正しい操作に従い、最小限の要求事項以上を行なうことにより最小限にすることができる。供試物質の性質に関する知識はこれらの問題を回避するために非常に役立つ（結果を解釈するのにも）。

データの欠如：実証試験でも、操作の誤りによる繰り返しのデータの欠如したり、一つ以上の繰り返しのデータの偶発的な紛失がおきることがある。実験を繰り返すことができない場合、唯一の解決策は欠如した情報を必要としない解析法に変更することである。回帰やＩＣｐのように、傾向を利用する方法が有効であろう。

操作者の誤り：異常な結果は、供試生物や試験条件ではなく、しばしば、情報を収集した人間に起因することがある。これは通常、書き換え時またはコンピュータに値を入力する時の誤りを含む。「データ入力と計算の誤りが現在、実験室で最もありふれたミスである」ワシントン州への報告書より（WSDOE、1998）。他の誤りは、統計的手法の不適切な利用、または、単に問題を認識しデータを処理する訓練と経験の不足である。個人による解釈の相違もまた不一致を生み出す。改善策は、品質保証と品質制御の優良操作を提供し、それに従うことである。

対照の問題：対照での容認できない反応もよくある障害である。そのような反応は問題があることを意味しており、無視したり問題を回避することはできない。カナダ環境省のような多くの試験法では、対照の判定基準が満たされなければ、試験は無効とみなされ、唯一許容されるその後の行動は、新しい試料または、新規に調整した供試物質で試験をすることで

---

[35]排水や汚染底質・土壌の毒性試験の多くは毒性物質の濃度実測を要求しない。実際、測定できる代表的な物質がないかもしれないし、何を測定してよいかわからないかもしれない。したがって、多くの場合、試験中に毒性物質の濃度が変化していることを示す証拠はない。証拠がないということが毒性物質の濃度が安定であったことを意味しない。もし、エンドポイントの計算に対照の反応を組み込んだ他種の試験で、通常の用量―濃度曲線により対照の影響を伴う場合、エンドポイントの計算に対照の反応を組み込んだ他種の試験で、最小処理レベルのデータが対照の代替として慎重に用いることができる可能性がある。一部の試験では、高濃度列との統計的比較のために低濃度処理群のデータを合併することが適切な場合もある。こうした処置のいずれかは、特定のパターンの結果、または他の試験の対照の状態に関する類似した情報におり支持されなければならないだろう。毒性のおおよそのエンドポイントを提供するためにこのような戦略は、一般指針としてのみ有効であろう。

ある。

時折、データを、一般的な方向に適した近似的な結果を提供するのに注意して用いなければならない。一部の計数的エンドポイント（LC50,EC50）は直接的な計算に対照を含まないので、通常の方法によりエンドポイントを計算するのに障害がない。それにもかかわらず、対照に影響を与える因子はなんでも、おそらく、供試濃度列にも作用しており、その結果、毒性物質の影響の結果を交絡させる。これらの計数的試験の対照の影響を校正する完全に満足できる方法はない（EC,準備中、a)。もし、対照の反応をエンドポイントの計算に組み込む他の種類の試験で、対照の影響がなければ通常の用量—影響曲線になる場合は、裁量によって最小濃度区のデータを対照の代わりに用いることもできるであろう。一部の試験では、低濃度区のデータを高濃度区のデータと統計的比較を行って一緒にすることも適切かもしれない。これらの方策のいずれかは、特定のパターンの結果または、同時に行った他の試験の成績の情報によって支持されなければならない。毒性のエンドポイントの近似値を与えるこれらの戦略は一般的な指針としてみ有用であることを強調しなければならない。

4.9.2 試験結果の問題の扱い方

以下の５段階が、一揃いの結果を検討し、異常な結果を検出する一般的枠組みとして推奨される。この方法は有効、無効な試験に適用されるが、この議論は得の述べない限り、有効であることを仮定する。

1. **報告が完全であることを確実にする。**報告書に求められる情報はカナダ環境省で刊行された各生物学的試験法の第８または９節で特定されており、同種の情報は標準化されていない新規の試験でも当然、期待される可能性がある。認められた方法からのどのような変更や異常なデータについてのコメントは含まれなければならない。
2. **濃度—影響データを見直す。**基本的な元の観察結果はどの報告書にも記載されていなければならないし、精査されなければならない。濃度と影響の関係をチェックする最も簡単な方法はブラフにすることである；報告書にグラフが含まれていない場合、描かなければならない[36]。図７に示したような異常は、算出されたエンドポイントのデータの分布からの逸脱同様、明らかになるであろう。
3. **裏付ける測定値を見直す。**用量—反応データから問題が明らかな場合は、物理化学的、または他のバックグランドデータを精査しなければならない。目的は、試験方法または生じうる誤りに関する何らかの異常を書き留めることである。一部の試験法文書は報告すべき観察事項を特定している（例。多くのカナダ環境省の方法では、供試生物の異常な挙動、または試験溶液の外観の変化に関する記録)。確かに、試験法からのどのような逸脱も報告されなければならない。物理的、化学的測定値は、逸脱した結果を解釈するために特に有用である。異なる日、処理群についての物理化学的測定値に一貫したパターンがなければならない。
4. **品質保証情報を見直す**（第３節)。カナダ環境省試験法では信頼できる情報を特定している。供試生物の維持または飼育条件と参照毒性物質の利用に関する事項が特に重要である。

5．　**物質の結果と条件の合理性を検討する。**最終段階は供試物質の特性と用いた手法から明らかにされた情報の観点から結果を評価することである。これには供試物質の今までの結果、同じまたは追加した部室で同時期に行なわれた他の結果、または同じ生物で実施した他の結果を含む。

これらの５段階は、単に、誤りを訂正、または、他の解析法を用いることにより、異常なデータの値を解釈したり、増加させる方法を示す。データの見直しは、結果が信頼できない場合、その結果を棄却することをためらうべきでないことを示しているのかもしれない。

4.10 廃水の毒性

カナダなどでは廃水の毒性試験が通常、用いられている。本文書では、廃水とはパイプまたは水路を通じて表層の水域に排出される、家庭、公共または産業系の廃水である。多くの場合、廃水水質は漁業法の規定によって国により制御されている。しかし、州の法令または政策もまた廃水を規制するために毒性を用いている。Grothe グロースら（1996）により編集された本は、廃水の毒性試験に関する多面的な総説、特にアメリカで実施されている方法を紹介している。

水生毒性試験の方法は、もともと廃水を評価するために開発され、現在、底泥間隙水または土壌や固形物質の抽出物を含む、実際上どのような起源の液体にも適用されている。「廃水」は本節では廃水、浸出水、溶離液を含む；後ニ者については、4.11.2 で特に取り上げる。

廃水毒性試験は、特定の毒性物質が未知の場合でも、廃棄物を評価、比較、規制するための整然とした基礎を与えた。試験は、個別の化学成分の全影響を統合し、他の場合には、問題を発見し修復する際の化学分析を補完する。放流先水域での廃水毒性の混合、希釈、消失は、単一の化学成分の場合同様、放流先水域でモデル化または測定ができる。（4.10.2 参照）

廃水の組成は常に変動し、毒性の度合いも変化する。多くの廃水規定は、採水頻度（例、毎週、毎月、四半期）、採取方法、時には採水量まで指定している。条件が指定されていない場合は、変動の量と質を考慮し、廃水の潜在的な影響の代表的な測定値を得ることを採水計画の目標にしなければ。グラブサンプル（多少とも同じに採水）は廃水水質の・断片・瞬時値瞬間値を示し、予備アセスメント、遵守監査、漏出事故中の抜き取り検査には充分である。コンポジットサンプルは経時的に採取した一連の瞬間的な試料を代表し、変動をならしたものである。24 時間コンポジットサンプルが、産業廃水・下水、予測可能な短時間の豪雨排水や他の発生源から排出のためにしばしば、用いられる。

供試種は、必ずしも廃水を放出する水域に棲息する必要はない。標準種は、地点間の比較可能なデータを提供し、自生生物群集の感受性の高い代替種として選ばれる。

4.10.1 廃水の監視

概　要

- 単一種毒性試験による廃水のモニタリングの合理的根拠は明らかに延べられなければならないし、供試種、モニタリング頻度や合否基準が適切であるか保証するために、定期的に再評価しなければならない。
- 毒性試験に不合格の場合は、最初の試験結果を確認またはその正当性を疑うために直ちに 2 回目の試験を追加しなければならない。もし結果が異なれば、二つの試料の化学的分析結果を比較し、品質制御、工場の操業、他の記録のデータを吟味せよ。

廃水毒性は以下の理由の 1 つのために監視する必要がある；(1)廃水基準への遵守の評価、(2)その廃水または多数の廃水の複合により、放流先水域への場所特異的な影響の予測、(3)廃水中に含まれる多様な成分の複合的毒性影響の定量、(4)操業工程の変化または防止技術による改善効果の評価。モニタリングの合理的根拠は明瞭にされなければならないし、適切な戦略と方法を保証するために周期的に再評価

しなければならない。

規制への遵守のために廃水を検査する場合、多くの慎重な環境管理者は、毒性試験が不合格の場合、直ちに次の試験を実施するであろう。確かな情報を得ることにより、問題が一定か一時的な不運または誤差によるものかを示すことができる。アルバータ州の一部のパルプ工場では、試験結果が規制要件を達成することを意図して、日常的に二重の試料を採取し、二つの試験機関に試料を1つずつ送付している。幾つかの理由により、連続的または複数実施した試験が一致しない可能性がある；毒性物質の変則的な瞬間的発生；廃水処理系での一時的な阻害または短絡流；試料採取、取扱い、貯蔵、試験での問題。

毒性期間と非毒性期間の化学分析値が入手可能か、または、試料が貯蔵してある場合、短期の毒性の発生を特定の運転条件にまでさかのぼることが可能である。

毒性試験への合否の記録はデータの品質保証と品質制御の情報、統計解析の結果、他の関連事項のために検討しなければならない。試験機関間の相違は、異なる希釈水による修飾作用（第4章15節参照）、供試生物の入手源の相違などに起因する可能性がある。参照毒性物質の結果はこれらの原因による相違を明らかにする可能性がある。警報チャートは特定の試験が、正常な標準の効率の範囲で実施されたかどうかを示すのに役立つ。

ある試料または多くの試料が遵守試験に不合格の場合、改善策をとるのが妥当である。産業施設の場合、政府の規制当局への迅速な報告、工程や下水系統などの施設内の検査、採水装置への一時的な廃水の導入、毒性物質の同定手法の開始などが含まれる（第4章7節）。

4.10.2　水質予測と毒性影響の制御

概　要

- 水質指針は表流水質を判断するために用いられる。指針は化学物質の濃度または毒性の程度に関する宣言である。
- アメリカ環境庁は廃水と特定毒性物質の致死、亜致死試験に基づく放流先水域水質の限界？のための特異的かつ詳細な手法を開発した。毒性試験は、廃水のスクリーニング試験、廃水基準の設定、常に規制遵守を適用するために用いられる。
- アメリカ環境保護庁は、表流水クライテリアとして、1日以上超過せず、三年に1度以上超過しない、致死毒性単位として0.3を提唱した。２番目に提唱した判定基準として、4日以上または三年毎にしばしば超過しないことを推奨している。
- アメリカ環境保護庁は単純物質収支式で、毒性物質の河川中濃度を推定した。規制遵守は、10年に一回の頻度で生ずる7日間平均低流量の極値で毒性クライテリアに合致することを要求している。毒性の変動は、実測毒性値から予測される亜致死毒性単位の99%タイル値をもとに算出され包み込まれるべきである。計算は見かけ上、廃水の日流量の中央値を用いてなされる。上流からの亜致死毒性の影響はこの計算には含まれない。
- 環境保護庁は米国の各州の特権なので、混合相の大きさを特定しない。カナダでは、ケベック州、アルバータ州、ブリティッシュコロンビア州で、混合相のための最大寸法を持っている。
- 指針は、表流水の規制基準を導出する情報を提供できる。これは、最大化学物質濃度であってり、亜致死閾値濃度の何分の一であったりする。
- 放流先での試料の毒性を監視する代わりに、廃水を試験し、水域での予想される影響を計算で算出できる。廃水の監視は、簡易性、迅速性、精度の点で長所がある。
- オーストラリアの紙パルプ工場への提唱されている規制には、化学物質と生物的な基準と、500mの混合相の外では亜致死毒性が認められないことが提唱されている。

放流先水域と底質の質を判断するために化学的、物理的指針値は十分確立されている（例、CCREM, 1987; OMOE, 1991)。水生生物のための掲載されている指針値を、生物群集を維持する水塊の適性を予測するのにもちいることができる。環境中の実測値が指針値を超過した場合、群集に対して悪影響を与える可能性がある。

同様に、毒性試験は受水域の水質を判定するのに利用することができる。これは直接、表流水の試験をすることにより実施できる（いわゆる周辺環境試験)。港湾の底からの底質試料の毒性試験や、河川中に魚をゲージに入れて放置するのが（現場試験になる)、その例であろう。毒性の質的指針値は、通常は、ある特定の試験で、“成長又は繁殖への亜致死的影響が認められない”などのように、単純で直截的である。

化学的または毒性の指針値を用いるのが、環境汚染の評価または規制における主要な方策である[37]。しかし、廃水の排出を扱うときは、実際に放流先環境自体を採水したり測定したりして水質指針値を適用する必要はない。廃水を測定し、環境中で予想される状況を算出し、希釈を考慮して、指針値を適用することができる。廃水の測定は、一般により迅速、かつ簡易に、また、毒性物質の濃度も高いためより確定的に実施できる。もちろん、放流先の水試料の試験または野外調査を実施して予測された影響を定期的に確かめることが望ましい。

汚染制御のための規制は化学的または生物学的質指針値の両者から導くことができる。例えば、規制では「放流先水域での銅の平均濃度がx.x μg/Lを超過してはならず、常時はどの地点でも最大濃度がy.y μg/Lを超過してはならないこと」を要求することができる。同様の方法で、規制で「致死毒性が排出区域直近で生じてはならず、亜致死毒性は混合層の境界を超えて存在してはならない」と述べることも可能である。供試生物、試験方法、混合層のサイズがされる必要がある。廃水モニタリング計画を策定するための幾つかの勧告が、注意深く計画されたワシントン州のプログラム（WSDOE, 1997 ）とその後に行なわれる試験結果と水路で観察された生態学的損傷の詳細な検討（WSDOE, 1997）から得られる。効率を上げるための勧告の一つは、廃水に対して、簡易、迅速かつ安価な毒性試験を用い、しかも、頻繁に実施することである。

このモニタリングまたは規制シナリオでは、毒性試験が相対的に直截的である。廃水に関連している場合、ミジンコの繁殖のような標準試験を用いて亜致死毒性を測定でき、IC25 の推定値が得られる。環境中で希釈後の予想濃度がIC25より大きい場合、そのときは明らかに、環境中で亜致死的影響が予想される。困難な点は、利用可能な希釈率の正確な推定値と混合のパターンを得ることである。様々なモデルを利用することができる。例えば、河の場合、利用可能な希釈率はしばしば、10 年に1回の頻度で期待される最低平均流量に基づく（次の節参照)。コンピューターモデルも補助的に用いることができるが(一部はUSEPA、1991a に掲載)、混合層は一般に野外調査により決定される。ワシントン州は、廃水から放流先水域水、いわゆる“環境水試験”、まで毒性試験を移動しながら多く、または、全

---

[37] 1.2節や4.4節で述べたように、モニタリング又は規制の戦略は大きく三種類の方策に分けることができる：(1)廃水基準、最良利用可能技術に基づく方法、（2）放流先環境に適用される質的指針値、これは本章

て実施することにより、希釈予測の困難を最小限にすることを提唱している(WSDOE, 1998)。しかし、廃水を直接試験することは、（a）廃水濃度についての正確な知識、と（b）、希釈のために毒性反応が得られなくなる毒性の寄与を見逃さないための最大毒性影響、が得られるという強力な利点がある。

放流先水質の簡単な規制基準の例としては、オーストラリアの漂白クラフトパルプ工場向けに提案された一連の規制がある（Australia、1989)。基準は、直径500mで設定された海洋混合層の末端で、水または底質に対して設定されている。物理化学的基準としては、塩素酸塩、有機塩素化合物（AOX,EOX)、塩素化フェノール類、溶存酸素、懸濁性固形物質、臭気などがある。混合層末端で、魚、無脊椎動物、潜掘性生物に対して亜致死毒性が存在しないことを示さねばならない；　この場合、廃水で水生毒性試験を行い、混合層の外部での希釈を計算する。他の例としては、毒性のある廃水を規制するために米国で開発されたより正式で複雑な方法があり、次節で紹介する。

米国の水中毒性の規制

アメリカ環境庁（1991a）は廃水毒性を規制するために、非常に公式的な毒性の使用法を開発した。この方法は、"水質に基づく毒性物質の制御"と呼ばれ、米国水清浄法により公式化されている。環境庁は、廃水基準を設定し、場所特異的条件を考慮した一貫した方法で、遵守を強制させるために、毒性試験を用いた。水質は、数値による化学物質濃度基準と、記述的な毒性基準の両者で定義され、両者のパラメーターのセットは同じものとみなされている。広義の毒性によるアプローチには以下のものを含む。

1. 放流先水域の急性致死毒性の基準
2. 放流先水域の亜致死暴露の基準
3. 基準逸脱の頻度と持続時間の制限
4. 廃水の水質変動の処理法の手順

米国環境保護庁のアプローチの第1段階は、すべての毒性測定値を致死または亜致死毒性谷に変換することである（LTU または SLTU、4.3.1 参照)。結果は化学物質濃度に類似した単位で表現される。排水は、廃水量に、LTU または SLTU を乗ずることにより毒性負荷量を定義することが出きる(4.3.3)。河川に放出する場合は、放流先水域中濃度は単純な物質収支計算により推定できる：

$$C_d=[(C_u\times Q_u)+(C_e\times Q_e)]／Q_d$$

この場合、

C_d=下流の毒性濃度（TU）

Q_d＝下流流量（m^3/s）

C_u＝上流の毒性濃度（TU）

Q_u＝上流流量（m^3/s）

C_e＝廃水の毒性濃度（TU）

Q_e＝廃水量（m^3/s）

で述べられているテーマ、（3）満足すべき条件が優勢的であるかどうかの決定的な監査としての生物調査。

次に、計算した放流先水域中の濃度を提唱されているクライテリア 1.0SLTU と 0.3LTU と比較することが出来る[38]。0.3LTU という値は、実質的にすべての生物への急性致死影響を減少させようとするものである。0.3LTU という分数は放流先水域では測定できず、そのもの自体は、分析検出限界に類似したものである。しかし、廃水で実測されたもっと大きい濃度から希釈により算出されるので、合理的に取り扱うことが出来る。

米国環境保護庁（1991a）は、致死毒性クライテリア（0.3LTU）が 1 日以上長く超過することなく、3 年に 1 回以上、超過しない場合、水生生物は十分保護される。この提案は、4.10.3 節で述べた攪乱された生態系の見かけの回復に基づく。同様に、1.0SLTU という亜致死クライテリアの場合、3 年以上の再起期間内に最大 4 日間の持続期間が提唱されている。

EPA のアプローチは、水の unindirectional flow のため、単純と見なすことが出来る河川系を用いて以下のように記述することが出来る。同様の原則が湖沼や海洋系に適用されるが、希釈が複雑であり、直接測定する必要があるかもしれない；"上流"の水は、廃水濃度がバックグランド以上に増加していない水塊のどの部分にもなりうる（詳細は、USEPA,1991a）。

河川の場合、最も簡単な方法は、先の方程式の各変数に、定常状態の設計値を用いることである。毒性影響が最も悪化する低河川流量が用いられる。代替案の一つは、1Q10 と 7Q10 として知られる流量を用いることである。1Q10 は、10 年間に一回発生する最小の 1 日低流量で、7Q10 は 10 年間に 1 回超過することが予想される 7 日間平均流量である。毒性が 7 Q10 で要件（0.3LTU 以下、または 1.0SLTU 以下）を丁度満たす時、3 年毎に約 1 回の基準違反があるであろう（つまり、EPA が提唱する最大頻度）[39]。

多くのは廃水の変動する毒性は、方程式では定常状態計算とみなすべきである。毒性の場合、最悪の事例の値が用いられる。毒性試験の既存の値を用いて、LTU と SLTU の 99%タイル値を算出する。EPA はこの計算をするために、逐次マニュアルを提供している。

二つの変数は、USEPA の技術支援文書(1991a)では十分記述されていない。一つは、廃水流量の変動である。指針文書は、中央値を用いるべきであると示唆しているが、その合理的根拠についてはほとんど述べていない。USEPA 地域Ⅷ（1994）では、亜致死毒性を評価する場合には平均日流量を、致死毒性を評価する場合には最大日流量を用いることを推奨している。

十分に定義されていない 2 番目の変数は、直接測定することがほとんど不可能である重要な項目、バックグランドの河川濃度である。上流からの毒性は、特に、廃水プルームが重複する、複数の廃水が存

---

[38] 米国技術支援文書（USEPA,1991a）では、亜致死毒性単位は"慢性" TU、致死影響の毒性単位は"急性"TU と命名されている。

[39] より現実的だが、複雑な方法は、連続したデータのセットを用いて、方程式の各変数を定義し、河川下流中濃度の連続データセットを計算することである。これは、時系列シミュレーションまたは濃度の頻度分布を算出するために真の値を並べかえるためにコンピューターを用いることで叶である。算出した下流排水濃度の時系列または頻度分布は、違反の許容頻度と比較することができる。定常状態法は確固とした結果を生じないので、このようなより複雑な解析を用いることも叶である。

在する場合、存在する可能性がある。上流の毒性が下流の毒性に寄与している考えられる場合、廃水試験に上流の水を希釈水として用いることができる。こうすることにより、上流の毒性と毒性修飾因子（4.15 節）の作用を考慮することができる。上流の水を希釈水として用いた場合、上流の毒性の影響が既に廃水毒性試験の結果に含まれているので、バックグランド毒性（方程式中の C_u）をゼロとして、ある試料水の毒性試験の結果を直接、計算に用いることができる。毒性のある上流の河川水で下流の廃水の希釈試験を実施することは、全毒性が下流の廃水の寄与にされてしまい、上流の廃水への寄与がなくなるため、必ずしも満足できるわけではない。上流の河川水に過剰に毒性がある場合には、上流の河川水と廃水を別々に試験を行い、別の毒性単位を用いて計算と比較を行うことが可能である。

その中では、毒性クライテリアを超過する混合層の大きさは USEPA（1991a）によっては特定されていない。混合層は各州により決定される。USEPA 地域Ⅷ（1994）は、混合層の default 政策を発行した：(1) 致死クライテリアは各廃水間の端で満たさなければならない：(2)亜致死クライテリアは河川の設計低流量の 10%、または、湖・貯水池の場合は 4：1、で希釈後満たさなければならない。

有害排水のカナダでの規制

カナダでは、アメリカ環境保護庁の公式的な複雑さはなく、一部では放流先水域の亜致死毒性の制限に用いられている。漁業法における規制では、魚類または魚の生息地の実質的な損失がない事を要求しており、亜致死が許容される混合層の規定はない。紙パルプ産業（5.2.4）の環境影響モニタリングのカナダプログラムでは、プリュームの地図化が要求されている。地図化する値は、USEPA 地域Ⅷ（1994）よりもかなり低い、1%廃水濃度または IC25 の 0.1 である。ブリティッシュコロンビア州では、パルプ工場に対しては、100m の混合層を定義し、その範囲内では水質指針値を超過する可能性もある初期希釈層と表現している（汚染制御局、1977）。ケベック州では 1980 年から許容できる混合層という独特の定義を用いており、これについては 5.2.7 節の「混合層」を述べられている。アルバータ州は、USEPA システムからその要素の一部を引用しているがより柔軟な方法を実施している（AEP,1995）。アルバータ州は 30m の小さな層（プリューム）を認めており、その中では特定の急性の水域指針（特定の化学物質濃度）を超過する可能性も有る。その周囲の層では、慢性水域指針を超過する可能性、つまり、4 日以上暴露された場合、水生生物が亜致死的影響を受ける可能性がある。他の水利用や、水域全体を保全するために、多数の制限が適用されている（5.2.7 節参照）。

4.10.3 損傷を受けた水界生態系の回復

概　要

- 水界生態系の長期的な健康状態は、時折、厳しい汚染に見舞われても、汚染の発生の間に十分な時間が有れば、維持される可能性がある。
- 少なくとも、損傷を受けた半分の川では、2 年間の間に、魚類の種と数がかなり回復した。しかし、同じ期間に、無脊椎動物はより順調に回復し、調査した事例の 70%においてはほとんど完全に回復した。より、厳しくまたは複数の攪乱因子、残留性の生物濃縮性有害物質、長寿命の種、または、再移植のための隠れ場所がない場合、より長期の回復期間が必要となる。

突発的な有害流出が放流先水域で重度の損傷を引き起こす場合、回復の速度は、攪乱の種類・程度、持続期間、影響を受ける生物種のライフサイクルの長さ、再移植の可能性などに依存する。淡水の生物群集の解析方法はあるが、見たところ他の種類の群集の解析方法はない。

ほとんど有害化学物質により影響を受けた 49 事例の総説では（USEPA、1991a)、多くの河川系では魚類集団は、2 年間で短期間の攪乱からある程度の回復を示した。67%のシステムで、魚類の半分の種類が再出現し、52%では集団がもとの半分まで回復した。底生生物群集では若干早い回復を示した。2 年間に、多くの無脊椎動物群集は種の多様性（71%の群集)、総密度（75%)、総生物量（71%）で以前のレベルまで回復した（Detenbeck ら、1992)。

化学物質漏出に関するある研究では水生無脊椎動物の集団は 1 年以内に回復した（Heckman,1983 ; Van Urk ら、1993)。殺虫剤が散布された小川では無脊椎動物の集団密度が 90%減少したが、最初の 1 年に急速に回復し、2 年目には回復が完了した（Wallace ら、1991)。落ち葉くずの処理という無脊椎動物が媒介する重要な生態学的過程は、2 年間で、ほとんど予備処理段階に到達したと見積もられている。

前述の事例では、2 年間で回復が容易に検出されたが、多くの事例では回復がはっきりは完全ではない。非常に重度の攪乱、短い期間につづけ生ずる様々な攪乱、生物蓄積性の有害物質、魚の長寿命種の回復の場合、実質的な回復には、2 年以上の期間が必要であろう（Barnthouse ら、1990 ; USEPA、1991a)。回復が再移植後の繁殖に依存したり、ダム又は他の障害が移動を阻む場合には、回復が遅くなる可能性がある（Detenbeck ら、1992)。隠れ家または影響を受けていない上流または下流域がある場合、再移植による回復は 1 年以内に起きる可能性がある。

他の研究でも同様の回復速度を示している。強度の塩素漏出により攪乱された小河川では、藻類、無脊椎動物、縄張り行動しない魚の場合、再移植は 1 年未満で起きた（Heckman,1983)。しかし、Northern pike は一年程度の損失を受け、自生の縄張り種となるためには少なくとも 2、3 年要すると予測された。再移植が起きない場合、サケ科の魚類の集団の重度の攪乱は、回復に少なく 5 年以上要する。生存した幼魚が性的に成熟するまで繁殖が生じないためである（Detenbeck ら、1992 ; Curtis、1990)。ライン川での大きな農薬漏出事故の後、底生無脊椎動物の回復は、種の世代交代時間に依存していた。1 年間に多数の世代をもつ、Chironomid midge ユスリカ、は 2、3 ヶ月で回復したが、一部のトビケラの場合、6 ヶ月を要し、トビケラのある特定の種では、1 年を要した（Van Urk ら、1993)。

群集の型も回復時間に大きな影響がある。河川源流部では不安定で周期的な自然の攪乱があるため、急速な回復に適用できる生物相を支持する傾向にある。大きな湖や緩やかな河川のようなより、定常的な系では、攪乱に対して耐性が少なく、攪乱の後ゆっくり回復する大型の長寿命の種を支える傾向がある（Detenbeck ら、1992)。逆説的であるが、頻繁に攪乱される系は有害な排出から回復するのに大きな能力を持つことができる（Van Urk ら、1993)。

有害物質の種類も回復時間に大きな影響がある。残留性があり、生物蓄積性のある有害物質（例えば、水銀、カドミウム、残留性農薬）が生態系に重度に負荷された場合には、明らかに、完全に回復するには、数年または数十年かかる。水塊の種類や水の交換速度も清浄化の時間を決定する上で重要な役割を

果たす。カナダ北方の条件では、殺虫剤DDTを散布して生ずる有害代謝物がサケ科の魚類の生息する河川からなくなり、清浄なシステムの濃度に近づくのにまる10年を要した（Sprague ら、1971）。回帰する成魚のサケへの影響は、5年以上を経てようやく識別できなくなった（Elson, 1966;1974）。

米国環境保護庁（1991a）は、放流先水域の環境が"十分"(完全ではないが)に保全されている場合、毒性に基づく廃水基準が、平均で、3年毎に1回以上超えてはならない事を推奨している。この頻度は、現在までの研究から判断して、一部の事例では合理的な目標かもしれないが、特定の場所と特定の生態系の場合には、長い間隔が必要であろう。

4.11 底質の毒性

多くの水生毒性物質は疎水性で底質、または、最終的には底質として沈殿する懸濁性固形物の表面に吸着する傾向がある。底生底質は、重金属や不溶性の有機、無機化合物を蓄積する溜まり場となる傾向がある（Giesy ら、1990 ; Alden,1992）。都市や工業施設近くの河川、湖沼、汽水域、沿岸海洋環境の底質は高濃度の汚染物質を含んでいることがある（例、Krantzberg and Boyd, 1992;Tay ら、1992）。このような底質は、特に、撹拌された場合には、水質や生物の汚染源となる可能性がある（Chapman, 1989b; Giesy and Hoke, 1989）。

より直接的には、底質の毒性物は、昆虫、蠕虫、軟体動物や底生魚などの底生生物に危害を与える可能性があり、こうした生物に対する損傷は生態系の機能へ重要な影響を与える可能性がある。一部の事例では、底質の毒性物質は水中の濃度より重要な場合がある。コロラド州の渓流では見かけ上、生物相に影響は見られないがセレン酸が一貫して水質基準を超えており、慢性的なセレン毒性が底質濃度と食物連鎖への移行による食物摂取に支配されていたことが明らかにされた（Canton and Van Derveer, 1997）。

底質は、一つの場所の周辺でさえ、その構造と組成は変化する傾向にある。粒子形状、寸法、有機成分などの特性の物理化学的相違は毒性物質の生物利用可能性と毒性の程度に大きな影響を与える可能性がある。これらの相違は底質の毒性試験を解釈する場合、留意しなくてはならず、適切な対照を設定するのは特に、困難である。

底質の毒性試験で適切な試験法と生物を選択するための合理的根拠について、Giesy and Hoke (1989)、Lamberson ら（1992）によってレヴューされた。Burton（1992）は試験法と野外評価について総説をだした。底質の金属による生態リスクの評価の技術的側面については、Ankley ら（1996）らの概観から始まる一連の15論文で議論された。特にリスクアセスメントに関連して、底質毒性の試験に関する全分野の批判的評価がワークショップの要旨集として出された（Ingersoll ら、1997）。水と底質間の相互作用と底質を汚染している汚染物質に関する背景が72論文の編集物として出されており、それら論文では物理的過程、栄養塩循環、金属種に強調点がおかれている。

最近まで、底質の採取、取扱、輸送、貯蔵、資料調整に関する標準化がほとんどなされてこなかった。こうした状態は指針文書により緩和された（EC, 1994c）。この文書では、生物試験に先立つ手法、化学

物質特徴化、研究と規制の手法の相違について概観している。

通常用いる試験　カナダ環境省は、底質毒性を試験する標準法を数種類持っている。海洋や汽水域の生息地の場合には、10 日間試験ではヨコエビ類の致死を測定し(EC, 1992e)、14 日試験では多毛類 *Polydora cornuta* の致死と成長を評価する(EC, 準備中、b)。14 日間の暴露では淡水ヨコエビ類、*Hjyalella azteca* の致死と成長の評価を用い、この試験は汽水条件でも用いることができる（EC, 1997 b）。淡水底質はユスリカ幼生の致死と成長の 10 日間試験を用いて評価することが出きる（EC, 1997a）。これらの試験のすべては他で用いられている方法と類似している。実験装置や技術の詳細については常に改良が続けられている。例えば、試験容器内の上層の水の交換は、比較的簡易（Leppanen and Maier, 1998）または、複雑（Wall ら, 1998）な仕掛けを用いて労力を減らすことができる。

新しい底質試験は、生活環または少なくとも慢性暴露での、繁殖を含む亜致死的影響を重要視している。このような試験は海産（Emery ら、1997）または淡水産ヨコエビ類（Ingersoll ら、1998）の 28 日間試験を用いて実施できる。生活環暴露で、約 65 日間で淡水産ユスリカの繁殖の成否を測定することが出来る（Silbley ら、1996 ; Benoit ら, 1997）。Lee and Tay(1998)は、環境影響評価のために、どのように細菌活性で底質が評価できるかをしめした ; Roy(1998)は底質試験がどのようにこの重要なグループの生物を含むように拡大できるか(すべきか)を指摘した。実験室内で飼育できる小型の多毛類が、カナダ大西洋・太平洋沿岸に適した試験生物として開発中である（Pocklington and Doe 1998）。

4.11.1　全底質試験

概　要

- 全底質試験が底質堆積物の毒性状況を検討するために通常用いられる。
- 全底質での多重濃度試験は供試底質を対照底質に添加することで実施できる ; 手法は完全には標準化されていない。化学物質を対照底質に添加して用いることもできる。
- 底質は自然の毒性を有する場合もある。アンモニアがもっとも一般的な原因であるが、硫化水素や酸素不足も毒性の原因となりうる。
- 対照底質が品質保証のために用いられ、供試生物に対して毒性がないことがわかっており、天然のものでも人工的なものでも良い。
- 参照底質は、人為的な汚染が少なく、供試底質の物理化学的特性と出来る限り類似すべきである。
- 参照底質を選択する場合、粒径がもっとも重要な変数である。有機成分も重要であり、粘土と有機物の定性的特性も次に考慮しなければならない。
- 理想的には、参照底質は、比較可能な特性の可能性を改善するために、汚染箇所の範囲外で供試汚泥の場所の近傍で採取すべきである。供試底質の物理的、化学的試験を実施する前に、野外調査中に、試料特性を釣り合わせるのは問題が生ずる可能性がある。一つの解決策としては、供試試料の特性を含む一連の対象底質を採取することで、別の方法としては対象底質として用いることができる対照底質を調合することである。
- 対照底質と参照底質への生物学的反応の比較は天然由来または予想しない汚染に由来する毒性を明らかにするかもしれない。

全底質試験は、通常、野外から採取した底質試料の質を精査するために用いられる。もっとも直接的な試験では、分画していない底質試料（間隙水を抽出したり、粒径で分離したりして分割していない試

料）に生物を暴露する。試験は、致死百分率などの百分率の影響のエンドポイントを用いる。試験には通常、港湾の底質の汚染地域と比汚染地域を地図化するための 100%全底質も含む。あるいは、段階的な底質濃度で試験される（"Spiking"参照）。どちらの試験においても完全に解釈を行うためには、対照底質（清浄であることが既知）と参照底質（自然由来で、相対的に清浄と考えられる。以下の本文を参照）の両者を含む必要がある。

自然毒性　底質試料の毒性は、高濃度の天然の毒性物質が存在する可能性があるため、必ずしも人為汚染の指標であるとは限らない。したがって、参照底質は毒性試験の結果を解釈するために重要であり、その結果は注意深く吟味されなくてはならない。供試底質の化学物質の特徴は、最もありふれた天然毒性物質を除外するために十分であるかもしれないが、参照毒性試験を同時に実施すれば自然または人為毒性物質の相対的寄与を推定するのに役立つ可能性がある。

アンモニアはもっともありふれた自然毒性物質であり、活発に分解している有機質に富む底質に見出される（Ankley ら, 1990; Burton, 1991; OECD, 1992c）。Sarda and Burton(1995)は底質中のアンモニアが暖かい月には増加し、同一地点でもかなりの空間的変動があることを明らかにした。アンモニア濃度の測定自体もなかなか難しい場合がある。この著者らは、抽出で採取した間隙水試料に比べ、エックマン採泥器またはコア採泥器で採取した試料で高濃度のアンモニアを見出している。一週間以上、間隙水を保存した場合にも濃度の変化が認められている。

自然由来のアンモニア毒性は人為汚染を試験する底質試料中に存在する可能性があり、結果を惑わせる。あるベルギーの河川では、アンモニアが唯一またはほとんどの毒性の原因であり（Van Sp0rang and Janssen, 1997）、一連の合衆国東部の 322 の海洋底質の場合、アンモニアが唯一の毒性原因である事例が 18%までの可能性があった。底質のアンモニア毒性は Tay ら(1998)により総説がだされ、浚渫底質の海洋投棄の規制決定の背景毒性に大きな影響を与えることを指摘した。彼らは調査者は結果にアンモニア毒性を含めるか、曝気などの他の方法によりアンモニアの問題を除去するかどうかを決定すべきであると結論付けている。どちらの場合も、調査者はアンモニアや他の自然毒性の寄与を理解すべきである。

硫化水素も底質の外部毒性の一般的な原因である(Jacobs ら、1992;Knezovich ら, 1996;4.11.2 参照)。有機質に富む底質の分解に嫌気状態は生物に有害になる可能性があり、このような嫌気状態は、実際、底質の表層下ではほとんど標準的である(Krantzberg and Boyd, 1992）。シアンは問題になる可能性がある。嫌気的分解から生ずる他の有害副生成物も知られており、未分解の植物の防御物質ですら、毒性に寄与する可能性がある。

Spiking（添加）　LC50 または EC50 を推定するのが望ましい場合は、複数の濃度列を作成しなければならない。これは、対照底質の一部に関心のある化学物質を適量添加するか、適量の汚染された試験底質を添加することで実施できる。化学物質をキャリヤー溶媒（有機溶媒）中または水溶液（金属）中に加え、様々な方法で攪拌する（EC, 1995a）。添加底質の詳細な指針がカナダ環境省指針文書で述べられ

ている（EC, 1995a）。実験室内で添加した底質は最近汚染された典型的な底質とみなされる。汚染の歴史の長い底質は有害物質の分子が底質粒子表層に強固に結合している（Burton, 1992）

毒性物質を添加は、見かけの毒性の原因を同定するための道具として用いることができるかもしれない。例えば、ニューヨーク付近の底質の」試験では底質のダイオキシン汚染が毒性の原因である可能性が示唆された。しかし、ダイオキシンを対照底質に添加すると、どの濃度でも毒性を示さなかったことから、他の原因を探索すべきであることを示唆している（Barber ら、1998）。

汚染供試底質を希釈する技術はまだ、標準化されておらず、均一で代表的な混合物を作成するため多くの困難がある。例えば、底質の物理的構造は、対照底質と混合すると乱される可能性があり、または、対照底質では粒径や化学的結合特性のような重要な因子が供試底質と異なる可能性がある。したがって、二種類の底質を混合すると物理化学的特性を変化させ、毒性試験の知見を惑わせる可能性がある[38][39][40]。

前述したように標準化されず困難があるため、供試底質を他の“清浄”な底質で希釈する方法の選択にあたっては、裁量の余地がある。しかし、“清浄”な底質の最良の選択法は人工的な対照底質を調合し、供試底質の有機成分、粒径の範囲、寸法の特性を模すことである。調合した対照底質を選択することは、淡水端脚類（ヨコエビ目）、ユスリカ、海産多毛類による底質試験に関するカナダ環境省の方法文書の情報により指示されている（EC, 1995a;b;準備中,b）。粒径や科学物質の活性に影響を与える特性が類似している場合にのみ、供試試料と同じ地域から採取した未汚染底質（つまり対照底質）は有用であろう。

対照底質　これは供試生物に直接的な化学物質による影響がないことが分かっている、決められた組成と成分を有する自然の底質または人工的に調合した底質である。しばしば、対照底質は供試生物の飼育に用いられる（Burton, 1992）。対照底質は底質の毒性試験の品質保証の不可欠な要素である（EC, 1995a）。物理化学的特性（例えば粒径または有機成分）の異なる数種類の対照底質を用いると、汚染物質と関連のない特性によって生ずる対照での何らかの影響と供試試料での生物学的影響（毒性物質または物理化学的特性に起因）を比較することができる。対照と参照底質（以下の文章を参照）の生物学的反応を比較すれば、対象底質が未検出の汚染物質または天然に存在する化学物質に起因する化学毒性を有しているかを明らかにするか、あるいは、異なる物理化学的特性による影響を区別することができる。

参照底質　これは供試底質の近くで、汚染域の外側で採取すべきである。参照底質は清浄であることとされている。参照底質は、調査地域の現場の範囲内で実際的に達成できる限り供試底質と類似の物理化学的特性を有するように選択する。適合させるべき主要な特性は、粒径分布、有機成分、間隙水の塩分

---

[38]供試底質への清浄な底質の添加は、水の試験での単純な希釈列を同じではない。清浄な底質は供試底質から毒性物質を吸収する新たな活性表面を提供し、二種類の底質の単純な割合から推定される異常に生物利用可能性を減少させる（Burton, 1992）。吸収能が低く、生物利用可能性を減ずる可能性が低いため、清浄な砂が試験に用いられてきた（例えばTay ら、1992）。しかし、砂は多重濃度試験で、中間の濃度で最も毒性が低くなるというU字型反応曲線を生ずる（DeWitt ら、1988；Nelson ら、1993）。

濃度の類似性である。調査者は、TOC（全有機炭素）はしばしば汚染地域では高濃度であるため、参照と供試底質でTOC濃度をあわせることが困難であると報告している。

底質中では、粒子の寸法（粒径）が毒性物質の移動性と挙動に影響を与える。有機物質と金属は、細粒の方がより体積あたりの表面積が大きく、表面電荷が大きいため、粗い砂や砂利よりも、細かいシルトや粘土により容易に結合する。細かい底質には、粘土、金属酸化物、硫化物、有機物の塊などがある（Lamberson ら、1992）。細かい底質の割合が増加すると底質の Microtox 試験での見かけの毒性を大幅に増加させる(Tay ら、1998)。また、粒径は、供試生物として用いる底生無脊椎動物の主要な生息因子となりうる。生存は、汚染物質が存在しない場合でも、不適切な粒径の底質で低くなりうる(DeWitt ら、1988 ; Becker ら、1990)。密度の濃い底質は、潜掘、管状建設 tubebuilding、または、摂餌に影響があるが、荒い底質は支持となる基盤、食物を供給せず、管状の巣の作成ができない(Nelson ら、1993)。これらの影響は、もし生物が潜掘しなければ、毒性を減ずるが、二次的なストレスを与える場合には、毒性を増加する(Lamberson ら、1992)。無脊椎動物について簡単な一般化はできないが、Tay らは(1998)は異なる等脚類を用いた底質試験で、一部の種は粒径による大きな影響を示したが、残りの種ではほとんど、または、まったく影響を示さなかったという知見を述べている。

間隙率 porosity は、底質の中や間に水を通過させる底質のすき間の網目の程度である。間隙率は粒径分布により決定されるが、重力のため底質の深度とともに減少する。間隙率は底質の水保有能力を支配する一因子であり、間隙水の水質を成立させる。より間隙の多い底質は多量の間隙水を含むが、希釈のため体積あたりの毒性は小さくなる傾向がある。間隙に富む底質は上層水からより迅速に下方に酸素が移動し、無酸素層から毒性物質（主にアンモニア）がより上方に移動しやすくする。また、間隙は潜掘生物の生息地嗜好性に影響を与える。

対照底質での有機炭素と粒径の標準化は他の寄与因子を安定化させる広範な影響がある。有機物の含有量（全有機炭素 TOC で測定）は、底質が金属、有機物質、天然毒性物質と化合する能力を大きく決定する。したがって、TOC で正規化すると、化合能力の相違を補正することできる(4.11.3)。同様に、多くの物理的、化学的寄与因子は、粒径と相関する傾向があり、粒径が標準化された場合には、より比較可能となる。

参照底質が供試底質の近傍または同じ場所から採取された場合、供試底質とより類似していると思われる。例えば、ある市の下流で河畔に近い河川底質を試験する場合、適切な参照底質は、隣接する中流より、環境影響が異なる同じ河岸の都市の上流側になるであろう。海洋投棄地域の場合、参照底質は、同じ湾、砂、港湾または入江の清浄な場所、または必要な場合は近傍の類似の湾入部から、採取すべきである。試料は、おおよそ同じ深さ、底質への主な影響（例えば海流、河川流入）が同じ関係の場所から採取すべきである。汽水域での場所の選択においては結果を混乱させるような間隙水の塩分濃度の相違は避けるべきである。一部の調査者は最初に、供試底質を採取し、その後、検査のための試料採取を行い、参照底質となる可能性のある３または４種類の底質を採取する。これらの底質は実験室で毒性と化学的特性を調べ、もっとも適切なものを試験計画のために選択する。

参照底質の採取での実際的困難とそれへの対処法は 5.3.2 で述べる。

適切な参照底質が得られない場合は、供試底質に適合するように対照底質のTOCと粒径を調合することもできる。しかし、この代替案は、調合を決定する前に、調合を決める前に供試底質の物理化学的評価が必要である。Hamr ら(1994)はカナダ環境省毒性試験に関連した人工参照底質の調合について研究した。知見が増えるに従い、底質の物理化学的毒性から、生物群集への様々な質に適した正確な予測が可能になる見込みがある。“参照条件”(Day ら、1996)に関するそのような知識は毒性試験の適切な参照底質を定義するのを助けるべきである（5.5.4参照）。

4.11.2 間隙水または抽出物の試験

概　要

- 全底質の全水溶性汚染物質の毒性とほぼ等価であることがしばしば見出されているので、底質からの間隙水の毒性は有用な測定値である。この経験的な観察結果は、固相と間隙水間の非極性有機汚染物質の分配に関する研究から予測からも支持される。
- 実際の状況をより反映しているので、全底質毒性試験は専門家に好まれる傾向がある。これは、ひとつには、間隙水試験では、通常は無酸素状態（有害な硫化物濃度を低下または減少させる過程）の可能性のある間隙水に酸素を送り込み、金属を非毒性種から毒性種に変化させるからである。
- 底質の有機溶媒による抽出物を用いる試験は底質の毒性を過剰評価する傾向があり、探索的な研究や毒性成分の性質の同定にはもっとも有効である。

実験室では、二種類の有用な液体試料が底質から作成が可能である。

1．底質の物理的処理、通常は遠心分離と濾過、により採取した間隙水試料

2．非水溶液抽出物は非極性溶媒を添加し、結合した汚染物質を溶媒に移行させるように振盪して調整される。溶媒は水生毒性試験の助剤として用いるか、蒸発により除去することができる(Schiewe ら、1985)[39]。

有機成分や金属が同じ濃度の異なる底質は、生物利用可能性に影響のある化学物質と異なる程度に結合している為、異なる毒性程度を有する可能性がある（Di Toro ら, 1990; Giesy ら、1990）。底生生物の場合、重要な例外はあるとしても[40]、一部の化学物質の主要な暴露経路は、固相よりむしろ間隙水である（Di Toro ら、1991）。間隙水中の化学物質は、ある種の固体成分、特に有機炭素への親和性により主に決定される。したがって、分配平衡は底質粒子に吸収された化学物質と溶解して間隙水中に利用可能な形態として存在する化学物質間に成立する。

---

[39]例としては、マイクロトックス液相発光細菌試験の試料調整のため底質から抽出するために、非極性溶媒がしばしば用いられる(Ankkey ら, 1989;Tay ら, 1992;Jacobs ら, 1992;Ho and Quinn, 1993)

[40]疎水性有機化合物と一部の金属は、強固に粒子に結合し、粒子への暴露が生物にとって重要となる。例えば、消化管に底質を通過させて摂餌する底生生物は、おもに摂取した粒子からベンゾ[a]ピレンとヘキサクロロビフェニルを蓄積する（Kukkonen and Landrum, 1995）。他の研究者の例は間隙水または浸出水よりも全底質でより大きな生物利用可能性を示す事ができる（Harkey ら、1994）。一部の堆積物摂取動物の場合、消化管からの摂取は間隙水から外皮を通じて摂取するより、消化管からの摂取のほうがもっと重要な可能性がある；20～30倍のフルオランテンが海洋性多毛類Capitellaの消化管を通

分配平衡は、総濃度は非常に異なっても、ある毒性物質の化学活性量が水相と固相で等しくなった時に成立する。Di Toro ら（1991）は分配平衡について網羅的な総説をだした。数値的手法の最も理解し易い記述はOECDにより提出された（1995a, 9章）。

したがって、間隙水中濃度は底質内での分配挙動を示す（Ankley ら、1991a）。当然、間隙水の毒性が全底質の毒性をしばしば、代表することになる。これが常に真実であれば、多濃度の試験が容易に実施でき、また、希望する場合には、よく分かっている水生毒性試験（例えば、非常に標準化されたミジンコやファトヘッドミノー試験）が用いる事が出来る為、試験実施に際して利点となるであろう。Carr(1998)は間隙水を用いた試験の利点と、試験実施に適した生物と実際的な課題について論評した。

しかしながら、間隙水試験を全底質毒性の推定値として用いるのを不十分とさせる他の要因があり、両面での疑問が以下の本文で述べられる。現在、底質毒性の評価をする者は、おそらく間隙水と全底質の試験の両者を用いるべきであろう。

間隙水試験が有効でありかつ全底質毒性を代表する可能性があるという点に関して部分的な合意がある。一部の例外があるにしろ(Giesy ら、1990)、間隙水試験は若干底質毒性を過大評価する可能性がある（Sasson-Brickson and Burton, 1991; Ankley ら、1991b）。現場または実験室で間隙水を採取する詳細な指針はカナダ環境省（1994c）や底質のためのカナダ環境省試験法（EC, 1992e;EC,1997a,b; 準備中, b）で提供されている。

間隙水試験の明らかな有効性にも関わらず、全底質試験の代替となるという点に関して専門家間での合意は無い様である。この点に関係する理由の１つは、底質表層下での通常の無酸素条件と硫化水素の存在である。細菌による硫酸還元の結果、底質の間隙水には硫化水素（H_2S）や硫化水素イオン（HS）を含む可能性がある；pH7 以下では前者、pH7 以上では後者が優先である。両者とも、間隙水の抽出や試験中に、曝気や酸化により容易に 1-2 日で消失する。したがって、これらの毒性は間隙水試験には反映されない。未攪乱の底質の場合、硫化物は、硫化金属や多硫化錯体を生成して金属を解毒する傾向がある；解毒化される金属には銅、カドミウム、水銀、鉛、亜鉛がある。酸化により、金属はその形態を変化し間隙水試験により毒性を示す（Wang, 1998;4. 11. 4参照）。

土壌の試験に浸出水が用いられるが、底質試験には適さず、カナダ環境省もその利用を推奨していない。

溶媒抽出物は間隙水より毒性が強い傾向にあるが（例えばTay ら、1992）、環境における潜在的な影響と関連付ける事がより困難である。溶媒は、生物活性の低い粒子に結合した毒性物質を移動でき、溶媒自体の毒性が試験結果を捻じ曲げる可能性がある（4.12.3, 4.13.1 参照）。同じ底質の見かけの毒性は用いる溶媒により変化し（HO and Quinn, 1993）,硫黄のような天然の毒性物質は人為起源の汚染物質と一緒に抽出される可能性がある（Jacobs ら、1992）。溶媒抽出は、潜在な汚染底質の位置を確認する予備調査や、底質に存在する毒性物質の同定を試みる場合に有効である（4.7 参照）。

じて摂取される（Forbes ら, 1998）

4.11.3　総有機炭素による正規化

概　要
・　間隙水中に溶解し生物に利用可能な有機化学物質の濃度は、*Koc*× *f oc* で推定できる。このとき、*Koc* は有機炭素の分配係数、 *f oc* は底質における有機炭素の割合である。 ・　この式は、潜在的な影響を比較するために、有機炭素の異なる底質中の毒性濃度を標準化するために用いることができる。関係はまだ、よく証明されていないが、異なる吸収能をもつ異なる種類の有機炭素が毒性の標準化の改良を制限する可能性がある。

固相と水相間の分配が明らかに、底質中の多くのは有機化合物と金属の生物利用可能性を決定する。総有機炭素（TOC）は非極性（中性）化合物の分配に影響を与える底質の主な特性である（Di　Toro ら，1991 ）。フミン酸、フルボ酸が底質中の有機物の大部分を占め、TOC がその濃度の指標である。これらの多環有機酸は、結合すると安定で化学的に不活性で、多くの場合、生物学的にも不活性な化合物を形成する、疎水性多環有機化合物に対して高い親和性を有している。

一般に、底質中の TOC 成分が増加すると、底質中のどの化学物質でも、有機成分と結合し、生物学的に利用可能でなくなる割合が増加するであろう。したがって、同じ量の汚染物質を含有する異なる底質は TOC 濃度に応じて非常に異なる毒性を示す（Nebeker ら、1989）。従って、TOC は生物学的活性の潜在性に応じて汚染物質の濃度を標準化するために利用することができる（Di　Toro ら，1991 ）。

底質中の炭素化合物の有機成分の親和性は、有機炭素分配係数（*Koc*）で測定される、疎水性により決定される。*Koc* の値はオクタノール水分配係数(*Kow*) を用いた回帰式から予測可能であり（４．６）、実用的には二つの値は底質に関しては等価である（Di　Toro ら，1991 ）。底質中の総化学物質に対する溶存態で生物学的に利用可能な化学物質の割合は、*Koc*× *f oc* で推定できる。このとき、*f oc* は底質における有機炭素の割合である（間隙水濃度にはコロイド状フミン酸に結合した一部の化学物質濃度を含むが、これは分配係数には該当しない）。

底質中の毒性物質の場合、間隙水で利用可能な推定濃度は生物影響を予測するのに適切な基礎とならなければならない。多くの化学種と中性有機成分の場合、底質毒性試験における急性致死影響は底質 TOC で標準化すると、底質毒性試験での急性致死は標準水生試験の値に非常に近い濃度で生ずる（Di Toro ら，1991 ）。TOC に基づく平衡分配は、水質基準から底質基準を確立するための方法として提唱されている（Di　Toro ら，1991 ）。

この合理的根拠は、適切に見えるが、おそらく過剰に単純化しすぎである。すべての有機炭素は、有機毒性物質の吸収が等しいことはない。炭素による標準化は底質間の相違を必ずしも説明せず、総化学物質測定により得られた結果以上に、毒性の予測を大幅に改善する可能性はないかもしれない(Landrum and Faust, 1995; Kukkonen and Landrum, 1996)。これ以上の解明は現在の研究に期待される。
同様に、金属も底質の有機炭素へ分配される。Mahony ら（1996）はこの点を研究し、銅と鉛の関連が理論モデルに従うことを示した。しかしながら、カドミウムの測定された活性は理論的な結合能に従わず、説明はできない。

4.11.4 酸揮発性硫化物による正規化

概　要

・ある種の金属（Cd, Cu, Ni, Pb と Zn）は底質中の硫黄と結合して、利用可能ではなくなる。固相と底質間隙水間のこの分配は酸揮発性硫化物を測定することにより多くの底質で評価することができる。底質中の金属：硫黄のモル比が１未満の場合は、金属の毒性影響は現れないであろう

底質固相と間隙水間の一部の金属の分配は固相中の酸揮発性硫化物（AVS）を測定して推定が可能である（Di Toro ら, 1990;Carlson ら,1991）。AVS は底質中の固相硫黄の一部分であり、ほとんどは冷たい酸で抽出可能な硫化鉄である。他の陽イオン金属は不溶性の硫化物を生成するために FeS の鉄と取って代わることができ、生成した硫化物は固相に残留して生物学的に利用可能ではない。硫化亜鉛の複合物は理論的に予測されるように、それが置換した硫化鉄より安定である（Liver ら,1996）。これらの硫化物では金属：硫黄のモル比は１：１であり、一端、金属：硫黄モル比が１.０に上昇すると、AVS は金属イオンを水相から除去しない。金属測定値は簡易的に同時抽出金属（SEM）として記述されるが、モル比は SEM:AVS で示される。もし割合が１以下の場合、金属は毒性影響を引き起こすほど利用可能でないことが予想される。検討例では、毒性単位法により底質中の全金属が評価も併用した場合、この系で 99%の精度で毒性の不足、79%の精度で毒性の底質を予測した(Hansen ら, 1996)。予測法はより長期間の亜致死影響にも有効である（Sibley ら, 1996）。底質からの二価金属の生物蓄積は通常 AVS/SEM 比から予測可能である、らで VS 故意は用派が予測できるが、しばしば例外がある。研究の進展により金属の生物蓄積と毒性の予測における AVS の有効性は改善された（Ankley, 1996; Berry ら、1996）；底質の金属に関連する研究者は最新の出版物にたどる事をすすめる。

理論的には、硫化物が FeS より溶解性が小さい陽イオン金属は、不溶性の金属硫化物を生成するために、底質中 AVS 中の Fe と置換するであろう。実際には、この関係には幾つかの限界がある。

- 現在、カドミウム、銅、ニッケル、鉛と亜鉛のみが、AVS によって生物利用可能性が取り除くことができる金属に含まれる（砒素、クロム、銀とスジ銀は AVS により同様の解毒効果を示す可能性がある（Di Toro ら、1990）.
- SEM:AVS>1 の時、金属が生物に利用可能となるという保障はない；他の要因が作用する可能性がある[4143]。
- 非常に低濃度の SEM または AVS では予測的とみなすべきではない。明らかに、AVS は意味を持つためには操作上の検出限界以上であるべきである。Di Toro ら（1990）は AVS＜１μmol/g の酸化された底質では関係が重要でないことを示した。
- 測定可能であるが低濃度の SEM と AVS は、比率同様、SEM と AVS の絶対値を考慮すべきことしめした。相対的に低濃度の AVS で若干大きい SEM の場合、同じ比率で高い濃度の同じ用に考えるべきで

41低 AVS 濃度では、他の組成、特に鉄やマンガンの酸化物同様、フミン酸やフルボ酸（TOC）が金属の分配に重要な影響を与える可能性がある（Di Toro, 1991;Fu ら, 1992 ）。

ない。

実験的な観察によると、ほとんど常に、SEM/AVS 比が 1 未満の場合、5 種類の金属、カドミウム、銅、ニッケル、鉛と亜鉛では毒性が見られない（もちろん、存在する他の物質が一定の底質毒性を生ずる可能性もある）。比よりも差（SEM—AVS）を用いた方が、結合能力や生物への影響をより考察できる可能性がある（Hansen ら、1996）。その場合には、ゼロ以下の値は無毒性を意味する。

淡水湖では、底質 AVS レベルは季節的に変化し、夏季成層の無酸素状態期では湖の深部では最大濃度になる（Howard and Evans, 1993 ）。このような変動は、野外プログラムにおいて評価をする場合、季節的な影響を考慮する重要性を示している。また、試験のために研究室へ運搬した試料の野外での特性を保つことがどれほど重要かを示している。AVS は酸化底質では変化しやすく、底質の採取、輸送、AVS 抽出時も嫌気性条件を維持するように留意すべきである（間隙水試験の際に供試生物に適切な酸素については、4.12.2 で考察する）。

4.12　土壌の毒性

概　要

- 土壌の毒性試験は相対的に新しい。陸生生態系は独特の特徴を有し、水界生態系から単純に外挿して解釈することができない。
- 土壌の物理的構造と化学的な性質が試験結果に大いに影響する。適切なコントロールと陽性対照が正確な解釈にはきわめて重要である。
- 土壌は、土、水、空気という三つの主要な媒体を含む。様々な汚染物質はこの媒体に残留し、生体に到達し影響を与える経路として一つまたはそれ以上の媒体を利用する。

毒性物質は、突発的（漏出）または計画的（農薬散布）のいずれかで、廃棄物の処分、大気降下や直接散布により土壌に入る。工業目的で用いられた土地は、通常、金属、PAHｓ、揮発性有機物や他の有機化合物により汚染される（Disappa and Loehr, 1991）。広範囲の低レベルの汚染もまた、車からの油漏出やタイヤ磨耗、土壌と直接接した侵食性、浸出性、腐食性物質の貯蔵など偏在する発生源などから生ずる。金属や疎水性化合物は、土壌粒子に結合する傾向があり、一旦、結合すると、有機化合物はしばしば、生物学的分解に対して抵抗を示す。生物活性のある地層以下に移動すれば、揮発性有機物ですら、長年、土壌中に滞留することができる。従って、土壌は汚染物質の実質的な蓄積の場 sink となり、撹乱された場合には、浸出や流出により汚染源となる可能性がある。

陸上生態系は、土壌が支持基盤となっているため、汚染土壌により深刻な影響を受ける可能性がある。食物連鎖は最終的には植物の成長に依存しており、植物は土壌を停留、水と栄養として依存している。毒性物質はまた、土壌に生息する無脊椎動物や微生物への直接的な脅威となり、分解や栄養塩循環などの重要な過程を阻害する。

漏出による汚染は地下水へ移動する可能性があり、汚染の速度と方向は、水または土壌粒子への化学物質の親和性、地下水の容量と主要な流量に依存する。土壌中を通過するつれ、物質は薄められる傾向がある。従って、地表面での大量の急性暴露は地下水中、おそらく、下り勾配の水域中でもでは慢性亜致死濃度となるであろう。

土壌の毒性試験は比較的新しい分野であり、排水、水、底質の試験に比し、方法や解釈についても開発が少ない。土壌と水界底質（4.1.1）の試験は多くの共通点があるが、陸生生態系はまったく別のものであり、解釈上の方法は水界生態系から外挿することはできない。カナダ環境省は汚染土壌の試験方法について包括的なまとめと比較について出版物をだしている（EC, 1996a）。ヨーロッパからの包括的な情報は無脊椎動物を用いた土壌の亜致死毒性試験のハンドブックとして出版されている（Løkke and van Gestel, 1998）。そのハンドブックの第一部では土壌試験の方法の背景を述べ、第二部では試験方法と生物について記述し考察を行なっている。ミミズを用いた試験のワークショップの要旨集がSheppard ら(1998)により出版されている。

土壌の物理的構造と化学的性質が毒性試験の結果に大いに影響する。土壌の生物は三種類の相から毒性物質に暴露される：間隙の蒸気；間隙水；土壌粒子自体。土壌構造と相の性質は場所により非常に変化するため、これらの相からの毒性物質への経路に関する知識は、影響を解釈し予測する場合に、明ら

かに重要である。このような知見は金属については、例えば、水生毒性データと適切な固—液分配係数を用いて収集されつつある。それは、暗示的に、以下のことを仮定している；(a)間隙水中のある金属の濃度は毒性学的には重要な因子であり、(b)間隙水と固相中の濃度間には化学平衡がある（Janssen ら, 1997a, b）。土壌生物への金属蓄積は土壌—間隙水間の分配係数と同じ特性に支配されいるため、この仮定は合理的なようである（Janssen ら, 1997b）。銅と鉛では、Sauvé ら(1998)が汚染土壌中の化学種に基づく回帰式により間隙水中の自由金属活性度の推定について論評している。次に、自由金属活性度は毒性に関連しており、土壌基準の判定基準の導出の方法に道をあけている。

土壌毒性試験の結果の解釈は、適切な対照と陽性対照試験により非常に助けられる。結果を環境へ外挿するためには注意する必要があり、指針が Sloof ら(1986)により与えられている。

最終的な複雑さは汚染物質の生物分解が土壌試験において特に重要であるという点である。土壌での分解性評価と、環境評価を含む方法が、人工重合体の分類用に開発され、重合体に関するハンドブックの数章で記述されている(Hamilton and Sutcliffe, 1997)。

4.12.1　全土壌試験

概　要

- 対照土壌は供試生物に毒性がないことが分かっている自然又は人工の土壌で、これを用いることが品質保証の要素となる。参照土壌は供試土壌と類似の物理化学的特性を有し、人為起源の汚染がないと選択された天然の土壌である。対照と参照土壌との比較により、望ましくない土壌構造や未検出の汚染のような天然に由来するストレスを明らかにすることができる。
- 毒性土壌試験の一連の濃度列は対照土壌、しばしば、人工土壌と希釈することにより作成することができる。
- 関心のある土壌中の既知毒性物質の効力は、土壌の一部に物質を投入して、毒性を調べることにより試験することができる

土壌での最も簡単で直接的な毒性試験では、供試生物を主に未撹乱の全土壌に暴露する。全土壌試験は一般に、土壌毒性の総合的評価を目的として、野外で採取した試料のスクリーニング試験のために用いられる。このような試験はミミズの成長と生存、種子発芽と出現を測定する。毒性は通常、一定期間後のミミズの生存率、体重損失の平均百分率または新芽を出した種子の百分率などで表現される。

全土壌試験は対照と参照土壌の両者の結果と比較することで最良に実施できる。参照土壌は供試土壌と物理的、化学的毒性が類似しているが、明らかな人為汚染はなく、通常は、汚染場所の近くで採取される（4.12.2参照）。

対照土壌は明瞭な組成と一貫した質を有する天然または人工的土壌であり、供試生物への直接的な化学物質の毒性がないことが知られている。しばしば、人工的であり、組成は試験法に特定されている。対照試験は、見かけ上の毒性に寄与する可能性のある、健康状態の悪い供試生物または質の悪い希釈水などのバックグランド源に起因する生物影響があるかどうかを示す。このような“ベースライン”影響を示すことにより、対照土壌は品質管理の目的に役立つ。対照土壌と参照土壌の知見を比較することにより、対照土壌が未検出の汚染または天然由来の化学物質に起因する化学毒性を有しているかどうかが

判明する。

多重濃度試験　100%土壌での反応百分率の代わりに定量的な影響判定点（LC50, EC50 など）を推定するために、全土壌の濃度列が必要である。例えば、有害廃棄物汚染地における様々な汚染の程度を地図化するためには望ましい。供試土壌を希釈するのには方法的な問題点がありうる。土壌の物理的構造は希釈土壌と攪拌することにより撹乱される可能性があり、希釈土壌は粒径、化学的結合力や他の重要な特性が異なるかもしれない。従って、全土壌を希釈するのは土壌マトリックスの物理化学的特性を変化させる可能性があり、その後の毒性試験の結果を混同させる可能性がある。二つの改善策がとられる；(a) 人工土壌、(b)液体抽出物（4.12.3 参照）。

人工土壌（例えば調合された対照土壌）はしばしば、多重濃度試験で用いられる。それは、試験培地の役割をし、土壌の種類の影響から毒性物質の影響を分離することを可能とする。標準希釈列は異なる毒性試験の結果間の比較可能性を促進する。供試土壌の物理的特性が希釈により変化する場合は、変化の特性を記述すべきである。

多くの人工土壌は典型的な砂質ロームに似せており、植物と無脊椎動物の健康をもたらすような物理化学的特性を創出するために、砂、粘土、泥炭の混合物から構成される。より単純な培地も使われてきた。例えば、純粋な砂は、種子に基盤のみを与えるためだけに必要で、化学物質と結合する吸収表面が相対的に少ないため、種子発芽試験には十分間に合う（Baud-Grasset ら、1993）。標準土壌を使用すると、環境中の異なる土壌型へ結果を外挿するｋ９おとがより困難となる。カナダでは、標準砂質ロームは、森林や凍土地帯のような関心の対象となる地域型すべてを代表しない可能性がある。

参照土壌は、供試試料の近い組み合わせとして、カナダの場合は希釈においては利点がある可能性がある。非常に適合した組み合わせが、有害廃棄物染場所での予測に非常に重要でのあるかもしれない。

毒性化学物質または物質が既知の場合、特定の土壌におけるその作用は全土壌の一連の試料に様々な濃度添加することにより検討することができる。毒性試験のために、多重濃度列はこのようにして、作成することもできる。徹底的に攪拌すると土壌粒子と物質が結合するか反応することができる。化学物質を添加したこのような試験は、土壌に比較的最近流入してきた化学物質の毒性を反映している。長期的には、表面に結合した分子はより強固に結合して、生物学的に利用されにくくなり、毒性が少ない。このような試験では、毒性有機物質は通常、キャリヤー溶媒、金属は水溶液で添加される。

4.12.2　参照土壌の選択

概　要

- 参照土壌は供試試料の近傍で、汚染箇所の外側から採取されなければならない。それはできるだけ供試土壌に類似、特に、層状態（粒径）、空隙度（空洞）、有機物と陽イオン交換能、すべきである。
- 参照土壌は供試土壌と同じ order(例えばチェルノーゼム) と Great group(例えば黒褐色チェルノーゼム)に由来すべきである。かれらは同じ水平起源で同じ程度の撹乱を受けていなければならない。

参照土壌はできるだけ供試土壌と同じ物理的化学的特性を持つべきである。もっとも重要な類似性は、層状態（粒径）、空隙（空洞）、有機物、陽イオン交換能と水平起源である。土壌科学の教科書は土壌の特性について詳しい情報を提供してくれる（Foth and Turk, 1972;Brady, 1974）。土壌の構造はその他の特性、土地特有の生物の健康状態、毒性物質の活性を支配する。粗く粒子の大きい土壌は、急速に排水し、栄養成分が低く、極性化合物やイオンを結合する能力が低い。逆に、細かいシルトや粘土に富む土壌は空隙が少なく、水分を保持する能力が大きく、栄養塩や有機物などを含む帯電した物質を結合する能力が高い。粘土成分に富む土壌は排水が遅く、潜掘する生物には緻密すぎる。

土壌の空隙度はその層状態 texture と密接に関連がある。空隙度は土壌粒子間の空隙の粒径と内部の連結のことを指し、層状態、圧密状態と潜掘動物や植物の根のような生物圧により決定される。空隙は、土壌中の水分に応じて水又は空気で満たされている。野外の能力では（つまり、重力排水が終了した時の土壌の水分）、粗い土壌では細かい層状態をもつ土壌より水分が低い。空隙の多い土壌は迅速に排水し汚染物質の移動も早い。層状態／空隙はミミズのような生物の潜掘能力や植物の根の浸透能力に大きな影響を与える。

粘土は一部の毒性物質を結合する。負電荷を有する粒子は、陽イオン交換能（CEC）で測定される交換場所の密度に応じて、陽イオンを結合することができる。これは農業にとって重要であるが、金属や極性物質の結合にも影響を与える。粘土の種類や成分も CEC に影響を与える。多層を成すスメクタイト粘土は単純なカオリン粘土より高く強固な結合の有しており、極性物質の利用可能性を低下さす。

有機物は、単位重量当り、粘土に比し大きな結合能力をもち、土壌による極性、非極性物質の両者との結合の重要な要素である。疎水性有機化合物は粒子状有機物と強固に結合し非常に低い生物利用可能性を示す。有機成分はまた、土壌生物の変わりやすい重要な生息地であり、ｐＨや微生物活性などの他の特徴に影響を与える。農業土壌の有機成分は重量で２％未満であるが（肥やし土を除く）、未撹乱の牧場や森林土壌は２０－３０％までになることがある。

明瞭な水平層（horizons）は、下方への溶出と頂部での剥奪により土壌中で自然に発達する。構造と化学的挙動は水平層間で非常に異なる可能性があるため、同じ水平層から参照試料と供試試料を採取することが重要である。多くの土壌毒性試験は、表層（A）水平層に関係しているが、B または C 水平層がより深部の汚染に関連している可能性もある。

カナダにおける土壌分類は Order（例えばチェルノーゼム）と Great Group（例えば暗褐色リェルノーゼム）に関連する（Agriculture Canada, 1987）。参照土壌は、最小限要件として、供試土壌とおなじ Order でなければならない。できる限り近くで採取する場合、同じ Great Group に属する可能性がある。対照土壌は同じ程度の撹乱を受けていなければならない（例えば農業土壌は未撹乱の森林または放牧地と対にすべきではない）。汚染が広範囲であり参照土壌を現場から離れたところで採取せざるを得ない場合、供試試料と Great Group, 水平層、撹乱の程度が合致していれば、参照土壌は十分比較可能である。

4.12.3　土壌抽出物の試験

概　要

- 浸出液には土壌中のほとんどの水溶性物質が含まれ、ゆっくり移動する一部の汚染物質は含まれない可能性がある。
- 溶出液は地下水に流入する可能性のある物質の真のプリュームの適切で代表的なものとみなすことができる。
- 溶媒抽出物はある土壌試料中の毒性汚染物質の総量を推定するのに用いられてきたが、その仮説の有効性は明らかではない。
- 陸生の植物と無脊椎動物を用いる全土壌試験は、依然として環境有害性の最良の基準である。

土壌の液体抽出物が毒性試験に用いることができれば明らかに幾つかの方法論上の利点がある。第一に、交絡要因なしに抽出物の多重濃度試験ができる。第二に、よく知っている標準的水生毒性試験を用いることができる。しかし、厳密に言えば水生生物から得られた結果を土壌生物の生態学的重要性を理解するのに用いることの困難さゆえに、この点は疑問の余地のある利点である。水生毒性試験を用いる合理的根拠は、再び地表に出て水界生態系に入る可能性のある地下水に起因する危害を評価することが望ましい場合、より説得力があるであろう（5.5.2）。液体土壌抽出物の毒性は一般に、有効で迅速な診断結果を与える細菌発光または他の細菌試験で評価される。苗木根伸張に基づく試験もまた適切であろう。

土壌から抽出される液体試料の主な三種類が毒性試験に用いられる。

1．攪拌せず重力により土壌カラムを通過する水により浸出水
2．溶解性で緩やかに結合している成分を得るために決められた量の土壌と水（通常は一グラムの土壌当り 4 mL の水）を混合し攪拌して得られる溶出液。次に、遠心分離と濾過または静置により固形物を除く（Donnelly ら、1991）。
3．結合した汚染物質の大部分を得るために、メタノール、塩化メチレン、ジメチルスルホオキシドなどの非極性溶媒を用いて、混合した非水溶性抽出物。溶媒は毒性試験のキャリヤー溶媒として用いられるか、またはそうでなければ蒸発する。抽出物は通常、細菌発光または同様の細菌試験で試験をする（Donnelly ら、1991）。

土壌の採取と抽出物の調整法に関する詳細な指針がカナダ環境省により提供されている（EC, 1996a）。土壌からの様々な種類の液体抽出物に関する文献は、不一致が多く、かつ混乱させられる傾向があるため、カナダ環境省の勧告は有益である（1996a）。

浸出液は他の抽出方法よりより多くの水溶性物質を集めるが、水塊の濃度勾配に沿って緩やかに移動する可能性のある一部の中程度に疎水性物質を得ることができないかもしれない。Dasappa and Loehr（1991）は溶出液が地下水へ流入する可能性のある物質のプリュームとしてより代表的であるとみなした。溶出液はまた、すべての毒性物質を抽出することはできない可能性がある。例えば、溶出液での根伸張は全土壌での初が試験に比べ現場毒性の指標としては感受性が低い（Baud-Gasset ら, 1993）。

粒子に結合した多くの化学物質は植物の根や土壌生物に利用可能とおもわれるため、溶媒抽出物は、土壌試料中の毒性汚染物質の総量を推定するため用いられる（Donnelly ら、1991）。異なる溶媒は汚

染物質の抽出量や抽出する部分が異なるが、どの成分が生物利用可能であるかわ不明である。全土壌の毒性と環境影響の間に良好な相関が確立されるまで、溶媒抽出物の毒性試験の結果の解釈には注意が必要である。全土壌の試験は環境への危害の最良の指標とみなすべきである。

4.13　物質の毒性

概　要

- ほとんどの物質はカナダ環境省やその他の標準法で直接的に試験することができる。
- 一部の化学物質は試験を実施や結果の意味を解釈するのが困難である。水生毒性試験を実施するのが困難な化学物質の特性には低溶解性、揮発性、不安定性、吸収、急速な生物蓄積性や色などがある。
- 困難な特性を有する物質の毒性試験を解釈するためには、第一段階で、試験方法が、その問題ある特性、結果へのおこり得る影響、結果の信頼性に対して十分であるかどうかを決定すべきである。更なる段階では、問題ある特性が実際の環境暴露においてどのような影響を与えるかについて評価する。

一部の物質は試験を実施するのが困難な特性を有する。調査者はこれらの特性が試験結果に与える影響について知っておくべきで有り、次のような議論が伴う。評価することが困難な一連の物質の啓蒙的なさらにより完全な処理法は Hamilton and Sutcliffe(1997)の高分子に関する本により述べられている。この偏在する種類の物質は、数分野の名前を挙げるだけでも、農業、食品加工、採鉱、輸送、廃水処理などの分野で使用されている。高分子の生態系評価は、その多くがほとんど溶解せず、反応性が少ないため、困難な場合があり、本の一章で環境側面とこれらの複合物質の特別なサブクラスについて取り扱っている。

4.13.1　厄介な特性を有する物質の試験

毒性試験を実施するのが困難な化学物質の特性には低溶解性、揮発性、不安定性、吸収傾向、急速な生物蓄積性や色などがある(Whitehouse and Mallet, 1993)。

毒性が溶解度限界以上である場合、化合物はその溶解度限では毒性が無いと単純に宣言できるかもしれない。または、非極性溶媒（例えばメタノール、アセトン）に溶解し、供試水と混合することにより、疎水性化学物質の溶解性は増加するかもしれない。異なる種類の化学物質に対する溶剤は標準試験法の文書で推奨される。溶剤のみに起因する毒性を説明するために溶剤対照が用いられるが、全体の方法としては幾分、満足できるものではない。溶剤は対照では毒性への寄与は少ないかもしれないが、化学物質の毒性効果と協働して試験結果をゆがめる可能性がある。疎水性化合物の毒性は溶剤の存在により大きく変化する可能性があり、溶剤と一緒に変化することがある（Calleja and Persoone, 1993）。エンドポイントの注意深い解釈が溶剤を用いた試験では求められる。

水中にある疎水性の液状の化合物を試験する場合、溶剤の代替法として、乳化により水中に供試物質を分散させる方法がある。これは油性物質に特に適した方法である。試験方法については、Girling らの総説（1992）があり、最近ではカナダ環境省の研究者（Blenkinsopp ら、1996）による総説がある。

不安定な乳化液は小滴が合体するのを防ぐために絶えず掻き混ぜる必要があり、ミジンコのような小さな生物の試験の場合には厄介である。同じように攪拌した対照を準備しなければならない。このような試験の結果を評価するためには、乳化がどの程度、良好に継続したかを示すために、完全かつ代表的な化学分析値と、試験方法に関する詳細な情報が必要である。

試験容器中の濃度が急激に低下した場合、揮発性物質の毒性は容易に過小される。設定濃度でなく試験槽での実測濃度に基づき計算を行なわなければならない。ヘッドスペースを最小限にした密閉系が推奨されるが、長期間暴露の場合、技術的には特に困難である。関心の対象となる毒性物質で可能な場合は、交換速度の高い流下式試験が良い方法である。揮発性化合物の場合は土壌試験においても問題であり、適した方法は目下、開発中である。

化学的に不安定な物質は揮発と同様の影響を与える（毒性を過小評価し、エンドポイントを過大評価する）。試験の有効性を落とさないでこの問題の解決する方法は、実際にはない。例えば、不飽和脂肪酸は高濃度では魚類に急性致死的であるが、この酸は急速に分解するため止水式試験で正確な LC50 を決定することはできない（Leach and Thakore, 1977）.

他の一部の範疇の化学物質も同様の問題がある。疎水性化合物は試験容器のような表面に吸着するため、生物の暴露濃度が低下する。急速な生物蓄積も同様の影響を生ずる。このような物資の試験の場合、適当な間隔で試験水中で実測した濃度を用いなければならない。ガラス容器は一般に毒性物質を吸収する傾向が小さい。

着色や濁りは、光の発生や吸収を測定する、細菌蛍光試験や藻類生長試験のような試験では、実際に留意すべき事項になる。対照を用いた補正がしばしば試みられる。そのような試験の結果を解釈するためには、試験水の測定の詳細が必要である。

これらの問題を含む試験結果を解釈する第一歩は、試験方法が問題のある特性を適切に考慮したか、どの程度、結果が影響を受けたか、どの程度結果が信頼できるか、を判断することである。次に、その特性が現実の受水環境で暴露にどのように影響をしたかを評価することである。例えば、揮発性の高い物質の漏出は、観察可能な毒性を引き起こすほど長期間の暴露を生じない可能性がある。しかし、同様の揮発性物質の継続して排出すれば、有害レベルに達する可能性がある。特に、氷の下に排出された場合には。疎水性物質は、分配により、水相から迅速になくなり、底質に長期間の有害性を与える可能性がある。特に、その物質に残留性と生物蓄積性がある場合には。

4.14　表流水の毒性

概　要

- 表流水試料の毒性を測定したり、受水環境自体を試験することは、明確でかつ有用な試験の適用である。（底質と土壌の試験は、本書の他の節で述べられているが、大部分は、この機能に役立つために計画されている）
- 表流水の試験は、汚染調査の「科学的根拠の重要性に基づく（Weight-of-evidence）」アプローチにおいて、他の方法を補完、または匹敵する可能性がある。試験は、毒性の寄与因子を評価するために、生物学的調査と同様に、排水毒性、水質、希釈の測定の相関を検討することができる。
- 放流先水域の水の毒性を試験することは急性毒性を有する排水、漏出、農薬散布などの影響（または無影響）を示すのに特に用いられる。
- 混合相を超えて、毒性が存在しないことを要求するという考え方は、過去 10 年間に幅広く受け入れられてきた。
- 放流先水域の水の試験は、カナダ環境省の文章に述べられているように、通常の方法を用いる。

実験室内または実際の放流先水域で、表流水の毒性を測定することは、多くの場合、有効な試験の個別の分類である。この試験は表流水の毒性学的状態の正確な評価を提供することができる。試験は、特定箇所から採取した試料を実験室内で試験することができるし、特定の場所にかごに入れた生物を暴露することもできる（現場試験）。[底質や土壌の試験では、このような受水環境の試験は通常の目的である；野外で試料を採取し実験室で試験を行なう（4.11,4.12 参照）

表流水で試験を実施し、結果を応用する技術は、特に、珍しいものではない。カナダ環境省標準水生試験方法を利用することができ、これらの多くは放流先水域を評価する特定事柄の説明を含んでいる（EC, 1990a, b,c; EC, 1992a, b,c ,d; EC, 1998）。カナダの環境モニタリングにおけるサンプリング法、暴露技術、環境水や現場試験の役割は技術指針文書に記述されてきた（EC,1997e、C の間違いか）。その文書は汽水や沿岸域での排水プリュームの採水方法などを含む、広範で有用な勧告を提供している。

表流水の試験は、それ自体として、または、実証的アプローチの他の手法と一緒に用いることができる。毒性試験は、問題が存在するかまた、さらに調査する必要があるか、と確かめるために診査法として、実験室内での毒性または水質試験結果から予測された問題が実際に自然に存在するかどうかを検討するという、実証手段として用いるにことができる。この点では、表流水の毒性試験は自生群集の生物学的調査の利用と若干、類似した機能を果たす。より高度の生物学的統合性に焦点をあてているため、群集調査は最も強力な手法であるが、毒性試験は通常、より経済的な手法である。

表流水の毒性試験は、特定目的のために、他の手法と一緒に利用することができる。そのような併用計画を企画し結果を解釈する方法は、大部分は、自明である。そのような併用の事例として以下のようなものがある。

- *一連の地点におけるある排水または化学物質の推定濃度と表流水（または現場）の毒性試験の結果を関連付ける。*排水または化学物質が環境に悪影響を及ぼしているかどうかを示す、最も直接的かつ説得力のある方法の一つである。例えば、毒性単位を用いて算出する USEPA の予測法（4.10.2 参照）より、ずっと直截的でかつ、おそらく説得的である。
- *表流水中の修飾因子が排水または化学物質の毒性を変化させたかどうかを検討する。*表流水は、有

機物分子と結合して毒性が減少したり、pHや硬度などが変化して毒性が増加する可能性がある。調査者は、既知の関係式や修正条件を模した実験室内試験、上流の水試料を用いて、そのような修飾を予想しようと試みる。しかし、放流先水域の試料水の試験は、単純で、直接的で確定的な結果を与える。

- *自生群集に認められる影響を放流先水域水の毒性と関連付ける。*この試験により、毒性がその影響を説明するか、生息地破壊のような他の要因の見掛け、apparent fore であるかどうかを決定することができる。

4.14.1　受水域水の室内試験

ある地域の毒性を評価するために、毒性が予測される地点から表流水の試料を採取し、室内で試験することができる。表流水が致死を示すことは現在では珍しいが、表流水試験は漏出や農薬散布計画の激しさを評価する明解な方法である。一般に現代のような低いレベルの汚染を評価するためには、試験には比較的新しい迅速亜致死試験を利用することができる。亜致死影響の迅速な測定が望ましい場合、または実験室への試料の輸送費用を減らすために少量の試料が望ましい場合、無脊椎動物を用いた亜致死試験は特に便利である。

実験室での試料の試験は現場試験（例、ゲージに入れた魚）に比較して幾つかの利点がある。温度や類似の毒性などの標準条件を維持することができる。必要な場合には、表流水の異なる濃度を試験することにより、時間ではなく濃度に基づく優れた影響のエンドポイントをえることができる。実験室への試料の輸送費用は、実験室での標準試験実施の倹約の努力と、野外のゲージに入れた生物の点検のための付加的な旅費が不要なことにより、埋め合わせることができる。

亜致死環境水試験は室内毒性試験の実証のために野外調査において USEPA により用いられた手段の一つである（4.1.1）。これらの多くは表流水試料を用いて室内で実施された。アメリカの目的のための表流水試験の指針は、米国環境保護庁（１９９１a）により発表されている。

4.14.2　現場試験

かごに入れた魚は、排出者から急性致死毒性の存在を示すのに伝統的に用いられてきた。このような試験を強力な正当化する根拠は、供試生物に損傷を与える場合、非常に説得力がある点である。また、試験は様々な汚染の程度を変動の累積効果を示す；一回しか採取されなかった試料により排出のピークが見逃されることもない。

現場毒性試験の良い例はプリンスエドワード島で行なわれたジャガイモ畑の殺菌剤処理の調査である（Ernst ら、1991）。様々な魚や自生の無脊椎動物が散布に暴露された池の中のメッシュ籠に入れられた。トゲウオと water boatmen でかなりの致死が生じた。試験は、水質、生物相調査、殺菌剤自体の室内毒性試験を含めた総合的調査の一環であった。ケージに入れた生物への影響は散布が水生生物へ副次的影響を与えるという確たる証拠を示した。

ケージに入れた貝はしばしば、水の汚染状況の現場モニターとして用いられ、優れた方法の例がSalazar and Salazar(1996)によって示された。二枚貝は、給餌や他の世話なしに、数週間または数ヶ月の間、一定の場所に放置することができる。汚染物質の生物蓄積の実測値は、暴露期間における汚染の一般的程度や種類の優れた評価を提供する。生存や成長も亜致死毒性試験として評価することができる。

現場試験の結果の解釈に当たっては二つの特に留意すべき点がある。これらは、表流水を実験室内で試験する場合には必ずしも当てはまらない。第一に、試験は一つの濃度、つまり、表流水そのままの濃度（100%）、しか含まないという点。試験結果は、ある一定の影響を与えるのに必要な時間、影響の程度（%）、または試料に毒性があったかなかったかという定性的評価として表現することができる。

二番目に重要な留意点は、表流水の現場暴露では、毒性物質や修飾条件の濃度の変動を含む可能性があるという点である。変動の程度を知っておくことが望ましく、毒性物質が既知または排水の電動度など、一部の特徴が定義できる場合には、化学分析による測定を実施することができる。

4.14.3　混合層外での亜致死毒性

放流先水域で亜致死毒性が存在しないことを公然と、または言外に要求することは排水放出規制の近年の方法において見られる。ケベック州では、１９８０年から、混合層を超えて亜致死毒性が見られないことを要求されている。混合層の外部で亜致死毒性が生じないことを公然と要求することが1980年台半ばからアメリカにおいても見られてきた（USEPA,1984a; 1991a)。アルバータ州では明記した混合層を要件とすること確立し、それを超えた水域では、慢性暴露による亜致死的影響から保護するための化学物質の指針値に適合しなければならない（AEP,1995; Section 5.2.7)。

紙パルプ排水の環境影響モニタリング（EEM）のカナダでの要件では、この概念が暗黙の前提として取り入れられている。表流水中の排水プリュームの定義する方法の一つは、一連の限定された毒性試験で0.1 IC25 にまで毒性が減少する等濃度線である。非常に低い毒性のため、等濃度線は実際の表流水試料を試験に適用して位置を決めることができないからである。排水の毒性試験行い、野外調査で決定して希釈を計算して決定することができる。亜致死毒性に関するプリュームの決定という特殊な適用例は5.2.4で述べる。

4.15　毒性を修飾する条件

概　要

- 周囲の条件と生物的要因が自然界での毒性物質の影響を修飾する可能性がある。
- 水環境での毒性に影響を与える主要な物理化学的実体は、温度、pH，光、硬度、塩分濃度、溶解性・浮遊性有機物、溶存酸素がある。
- 底質の場合、水系で述べた変数に加えて、粒径分布、多孔性、酸化還元状態、粘土や有機物の物理的性質などが重要な変数である。
- 土壌の場合、特別な修飾因子としては、土壌の種類、粘土の種類、粒径分布、水分と排水条件、有機成分と種類、陽イオン交換能、自然由来の毒性物質がある。
- 重要な生物学的修飾因子としては生物の挙動、ライフサイクル、体の寸法、栄養状態、適応状態、種間の相互作用、多重ストレス要因の可能性などを含む

物質、排水、底質または土壌の毒性は、様々な環境条件や生物自身の特性により、修飾される可能性がある。室内毒性試験の場合、これらの修飾因子は、通常、供試生物にとって望ましい程度に、制御されかつ標準化されている。しかし、自然界ではその程度は、しばしば、理想的でなく、変動が大きい。試験結果を自然界に外挿する場合、修飾因子がどのように毒性を変化させる可能性があるかを考慮しなければならない。

修飾因子は、広範には、物理化学的条件（温度、硬度など）、または生物学的特性（例、種、年齢、挙動、種間相互作用）に分類することができる。修飾因子に関する多くの情報は水生毒性に関するものである。一般原則は土壌や底質の毒性に適用できるが、これらの半固体状の生息環境に関する特別の項目が述べられる。アメリカでは、室内実験の知見と比較した野外試験での日生物学的主食因子による水生毒性試験の相違を、「水―影響比（water-effect ratio）」として記述しており、これは必要と思われない専門用語の例である。

4.15.1　非生物学的修飾因子

概　要

- 高い温度はしばしば毒性を強めるが、一般化はできない。光は毒性物質を分解するが、一部の PAH では高い毒性を誘発する。
- 特に金属や、非極性で未解離の形態のほうが毒性の強いアンモニアや他のイオン性物質の場合、水素イオン濃度はおそらく、最も重要な物理化学的修飾因子である。酸化還元電位は、物質の毒性のある形態がしばしば還元条件（無酸素状態）で優勢な底質の場合、重要である。
- 硬度の高い水は多くの金属の毒性を減少させる。塩分濃度に順応して生息する生物の場合、塩分濃度は毒性に対する一般的影響はほとんどない。一部の物質に対しては、溶解状または浮遊状、または底質や土壌の成分として存在する有機物は、毒性を吸収または減少させる。
- 水分は土壌中での過程を支配する重要な特性である。低溶存酸素濃度は水や底質中での毒性を激化させる。

温　度：高い環境の温度が毒性を増加させ、影響より低い濃度、またはある一定の濃度でより短時間に影響が現われる可能性がある（Roch and Maly, 1979）。毒性物質と細胞成分の化学反応の速度が高い温度で増加するため、これが予測される。冷血動物では、代謝速度は温度とともに増加し、温度増加と

ともに細胞膜を通じての化学物質との輸送速度が増加する傾向がある。代謝速度が増加すると酸素に需要が増加し、魚では鰓を通過する水量が増加し、その結果、毒性物質の摂取速度も増加する。

しかし、高い温度での高い毒性は一般的でなく、実際には高い温度の下または上に起因する毒性の多くの例がある。一人の総説者は、毒性物質の短期致死毒性に対して、温度は大きな影響を与える可能性があるが、長期的な致死、亜致死の閾値に関しては、通常、温度の影響は2倍未満であり、どちらの側にも影響する可能性がある（Sprague, 1985）。

温度の上昇に伴って底質からの金属の蓄積速度が増加するか、減少するかに関しては、文献では多様な知見がある。適度の温度変化に対しては代謝調整機能が部分的に補正することができるが、化学物質が摂取される以上により迅速に体内から取り除かれる（depuration）場合、より高い温度で毒性が減少する可能性がある（Dixon and Hilton, 1985;Green ら,1988; McGeachy and Dixon, 1990）。
土壌の場合、最高温度（夏）、最低温度（冬）と最も大きな温度変化は表層で生ずる。20～30cm の深度では、ほんのわずかな日周期があるが、それ以上の深さでは季節変化は減少し、温度は年平均大気温度に近くなる。

温度は水中で多くの化学的過程に影響を与える可能性がある。毒性のある未解離の形態からより毒性の少ないイオンにイオン性の化合物を変化させる可能性がある。温度の影響は pH の影響に比べると小さい傾向にあるが、アンモニア、シアンと一部の有機酸、塩基では大きい。高温では、水が酸素や二酸化炭素を溶解する能力がかなり減少する。海面レベルの淡水は 0℃で 14mg/L 以上の溶存酸素を保持できるが、30℃では 8mg/L 未満である。温度が増加すると、揮発性成分は溶液から抜け、大気により迅速に移行する。

水素イオン濃度：溶液のpHはおそらく毒性を修飾する単独の最も重要な物理化学的因子である。溶解性イオン性化合物の場合、pHが解離やイオン化状態に直接影響するので特に重要である。非極性化合物は脂質や生物組織に蓄積する傾向があり、その結果、より溶解性あるイオンの形態より毒性が強い。

アンモニアはpHにより毒性が変化する物質の極端な例である。溶液中では非解離アンモニア(NH_3)またはアンモニアイオン（NH_4^+）として存在する。表6で示したように、中性のpH ではアンモニアは相対的に低毒性で存在し、pH10 または高温ではほとんど非解離態アンモニアとなり、それはより毒性があると考えられる。毒性は Alabaster and Lloyd(1980)または Russo(1985)らの情報を用いた化学分析から推定できる。

同様のpHに依存した毒性はイオン化する他の化合物へ拡張できる。塩基（例、有機性塩基物質）はアルカリ性水でより毒性が強まる。樹脂酸、シアン化水素や硫化水素のような酸性物質は酸性水でより毒性が強まる。pH の強度が化学物質の解離しようとする化学物質の傾向に影響を与える。pH の毒性に対する影響が異なる殺虫剤についてはDoe ら（1988）が述べている。

金属は数多くの化学的形態を示すため、金属の毒性に対する pHの影響は、しばしば、複雑である。幅広く一般化すると、溶解性金イオンは主要な毒性種であり、pHが増加するとより生物学的活性が高まる（Cusimano ら,1986; Peterson ら、1984）。しかし、酸素や、水酸基（OH^-）、炭酸塩（CO_3^{2-}）と

表６　蒸留水中の未解離アンモニアの百分率(APHA ら、1995)

温度	特定pHにおける未解離の百分率(%)								
(℃)	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5	10.0
5	0.01	0.04	0.11	0.40	1.1	3.6	10	27	54
10	0.02	0.06	0.18	0.57	1.8	5.4	15	36	64
15	0.03	0.08	0.26	0.83	2.6	7.7	21	45	72
20	0.04	0.12	0.37	1.2	3.7	11	28	55	80
25	0.05	0.17	0.51	1.7	5.1	14	35	63	84
30	0.07	0.23	0.70	2.3	7.0	19	43	70	88

比較的不溶性の化合物を生成し、生物学的利用可能性が減少し毒性が低下するため、総合的な毒性は、一般に、アルカリ性溶液で減少する（Howarth and Sprague, 1985; Stumm and Morgan, 1981; Bradley and Sprague, 1985; Campbell and Stokes の総説、1985）。

pH の相違は室内実験の結果を解釈する上で大きな困難を生ずる。日常的に試験されている多くの排水にはｐＨの影響を受けやすい毒性物質を含有しており、４日間の毒性試験中または試験溶液の更新時にｐＨが変化するため、化学的に不安定である。供試液の曝気は溶解性二酸化炭素、弱酸を追い出してしまうため、ｐＨを増加させる可能性がある（Abernethy and Westlake, 1991）。毒性が変化する可能性があり、試験溶液のｐＨが放流先水域のｐＨよりかなり異なっている場合には、室内試験で得られた知見の妥当性は限定されたものになる。

一部の排水は非常に酸性であったりアルカリ性である場合があり、現行のカナダでの最終試験ではpH の調整は行なわないことになっている（EC, 1990e;f）。試験のｐＨは放流先水域からかなり異なり、または、さらに供試生物にとって望ましくない可能性がある。一旦、排出・混合されると、排水が流量の大部分を占めない限り、放流先水域のｐＨが優勢となる。ｐＨにおけるこのような相違の意味する内容については現在、科学者と行政の間で議論の的となっているが、試験結果を解釈する者は室内と野外のｐＨの相違の効果を常に考慮すべきである。

底質の場合、ｐＨは独特の方法で毒性を修飾する可能性がある。ｐＨは、多くの有機化合物（フェノールなど）を含め、極性化合物の解離を主に支配するため、溶液中や固相中の有機物との結合する傾向に顕著な影響を与える可能性があり、その結果、生物利用可能性を顕著に減少させる。ｐＨが低下するに伴い、特にｐＨが７未満では、陽イオン性金属は固相から間隙水に放出される。アンモニアは底質中や底質からの抽出液には一般に存在し、しばしば毒性に寄与する；ｐＨの修飾作用は底質試験の場合もあてはまる。

土壌の場合、極性化合物と栄養塩の結合に同様の影響があるため、ｐＨはそれらの化合物の移動性や生物利用可能性を修飾する。大部分の表層土壌は、有機酸のため、若干、強い酸性にある。土壌のｐＨは、一般に、水―土壌の懸濁液（スラリー）で測定されるため、土壌粒子周囲の間隙水 interstitial water の微妙なｐＨ勾配を覆い隠してしまう。その結果、毒性物質の動力学は、全土壌ｐＨから予測されるものから若干異なったものになる可能性があり、後者の方法は土壌の反応の広範囲な指標としてのみ利用

されるべきである。

酸化還元電位：この特性は通常レドックス（redox）電位と呼ばれ、底質での重要な毒性修飾因子である。この指標は、酸化的または還元的反応のどちらかが支配的である程度を記述する。

非常に酸化された状態では（Eh が正）、有機物の分解により酸素が消費され有機化合物の完全分解が可能である。アンモニアや第一鉄イオン（Fe^{2+}）のような還元された物質は迅速に硝酸イオンや不溶性の第二鉄イオン（Fe^{3+}）に酸化される。無酸素条件では（Eh が負）、有機物分解は不完全で、しばしば酸性副産物を生成し、窒素が溶解性アンモニアとして残留し、還元態の金属が蓄積する。酸素が戻ってくると、金属は、鉄やマンガンの水酸化物と共沈して溶液から除去される(Krantzberg and Boyd, 1992)。

乱されていない底質は、一般的に、酸化された表面から深度とともに次第に還元されるという急激な Eh 勾配を示す。これは酸素の底質への拡散が遅いため、特に、底質が細粒または肥えている（分解のための高い酸素消費）場合、に生じる。底生生物は掘削 burrowing によって勾配を弱める。これらの勾配は大部分の採取法により壊され、均一にするために室内で行なう混合操作により試料中のレドックスレベルが等しくなる（Burton, 1991）。

光：照度により調整されるおおくの生物学的影響は毒性試験で重要である。多くの挙動や生理学的活動は、照度や波長により影響をうけるため、毒性試験でのこれらの測定値は試験中またはそれ以前の照度条件の影響をうける(Buikema and Benfield, 1979)。垂直移動、掘削、または摂餌行動では光を手がかりに利用する可能性があり、おそらく、生物を毒性物質の影響下へまたは圏外へ導く。植物の場合、生命維持や成長の制御における光の重要性は非常に重要である。

多くの有機化合物（例えば塩素化フェノール）は光のもとで不安定（光分解 photolytic）であり、光酸化の物理的過程を通じて分解する可能性がある。したがって、照明の強度は毒性試験で重要となる場合がある。強烈な太陽光と清浄で浅い水は光分解に好都合で、深く、濁ったまたは非常に着色した水は光分解を減少させる。

光活性化は、一部の有機物、特に PAH s（例、アントラセン、フルオランテン、ピレン）で生ずる。紫外線はその毒性を増加させ、ある場合には、一桁以上（by orders of magnitude）も増加させ，金属シアン化錯体の毒性に影響を与える可能性がある。このような物質が存在する場合には、毒性を評価する際に、明らかに、室内実験での照明の種類は重要になる可能性がある。おおくの標準的毒性試験の手引書では、通常、自然光を模するために、照明の強度や波長を特定している。しかし、広範なスペクトルを含む、または、昼光ランプなどの人工灯では、紫外線領域では自然光とおおきく異なる。この相違が非常に重要になる場合がある。ある状況（例、油漏出）で PAH 毒性が関心事である場合、照明の影響に関する近年の知見を適用するのが適切であり、水生・底質毒性学のこの分野は急速に変化している[44]。

---

[44]多環芳香族炭化水素（PAH）のアントラセンはその溶解度の範囲内（<35μg/L）では毒性がない。しかし、紫外線の存在下で暴露した場合、アントラセンは非常に毒性が高くなり、ブルーギルの 96-h LC50

淡水の硬度：硬度は、炭酸カルシウム濃度（mg/L）に換算した、カルシウムとマグネシウム濃度の合計として定義される（APHA ら、1995）。（歴史的には、硬度はナトリウム石鹸として沈殿する全陽イオン濃度と大雑把に呼ばれていた）。大部分の淡水では、カルシウムとマグネシウムが水中の主要な陽イオンであるため、全溶解性固形物（ＴＤＳ、濾過試料を蒸発乾固した後に残留する溶質の質量）が硬度と非常に相関がある。

金属の毒性は軟水で大きく、硬度が増加するにつれて急激に減少する。不溶性の炭酸塩を形成し（ＰＨの項を参照）、また、カルシウムとマグネシウムイオンは生物の表面膜で金属イオンと競合し、金属の生物利用可能性は減少する。硬度の影響は二桁になるほど大きく、致死、亜致死影響の両者にあてはまる。軟水では急性致死効果のある金属濃度でも、硬水中では、亜致死または無影響しか生じない可能性がある（図８）。多くの工場排水、家庭廃水、埋立地からの浸出水、地下水では、溶解性塩濃度と硬度は高く、金属の潜在的毒性影響を隠蔽する可能性がある。このような廃水が放流先水域で軟水と混合した場合、金属が希釈されて毒性が減少する一方、硬度の希釈により毒性が上昇する。試験結果の解釈にあたっては、そのバランスに然るべき考慮をはらわなければならない。

金属の水生毒性の変化は、非生物学的条件がいかに重要であるかを示す最も顕著な例を提供する。硬度による修飾効果は、水中のｐH,アルカリ度、有機結合剤による修飾に伴われる。一般に、溶解性金属は最も生物に利用可能な物質であるが、溶存態または生物利用可能な形態に関しては不明な点がまだある。このような複雑な状況は、環境基準を設定する際に、非常な困難をもたらし、規制のための基準を設定するのに最も適切な根拠は依然として疑わしい。これらすべてのの科学的、行政的難問は、知見や、金属種と水中動物の鰓表面からの摂取のコンピュータモデルのような深遠な手法を用いた規制のような新手法の現状に詳しい専門家集団によって、叙述されるであろう(Bergman and Dorward-King、１９９７)。出版物は金属毒性と非生物的条件の影響に関心をもつ者に有益であろう。

塩分：塩分は元々は一定体積の溶液中の溶解性塩の総質量の測定値をさしていた。今日では、通常、密度または電導度の標準的関係から実験的に測定される。結果は無次元であるが（APHA ら,1979）、多くの人々はg/kg またはパーミリ（‰）と思っている。海洋の平均塩分濃度は35 であるが、沿岸海水の値はしばしば28から32であり、これらの値が海洋生物の毒性試験の代表的な塩分濃度として用いられる。

海洋生物によるカナダ環境省の毒性試験法は、淡水が主である試料の試験をする場合の塩分の処理については一貫している。供試生物が馴致したレベルにまで試験時の塩分濃度をあわせるために、過剰塩分塩水を用いて調整を行なう。この方針は、以下の情報によって支持される適切な方針である。

それぞれの独自の環境で試験した場合、海洋生物は、淡水生物の同類とほぼ同じ耐性がある。多くの毒性物質の場合、塩分自体は毒性を大きくは変化させないようである；重要な問題は、生物が海性、淡

は８ μg/L になる（Oris and Giesy, 1985）。12種の一般的なPAHのうち６種が光誘導により毒性が高まり（Oris and Giesy, 1987）、高くなった毒性は魚類と無脊椎物動物の数種にまで影響する（Hall and Oris, 1991; McCloskey and Oris,1991）。光誘導毒性は、紫外線を吸収する溶解性有機物により減少する（Oris ら, 1990）

水性、または汽水性であるか、そればその生物の望ましい環境で試験をされたかどうかという点である。したがって、塩分に関連する解釈は、供試生物が、適していない塩分濃度からストレスを受けていないか、あるいは新たな塩分濃度への馴致の過程にあるかどうかという点に焦点を絞るべきである。

海水と淡水の条件間の類似性の特定の事例は、pHが同じで、試験水に馴致している場合は、紙パルプ廃水が、coho salmonに対して淡水と海水で同じ程度の毒性があるという知見である(McLeayら、1979)。Klapow and Lewis(1979)は16種の汚染物質のデータについて広範にレビューを行い、海産・汽水生物は淡水生物と同じ、耐性の分布を持っていることを示した。彼らは毒性に対する塩分の影響は、もっと重要な因子によりおおい隠されていると結論した。アメリカ環境保護局(1978)も同様の結論に達した。

毒性の類似性が先に述べられたが、淡水の化学物質の水質ガイドライン値（CCREM,1987）は海洋生態系について設けられていないし、そのような利用は試みられていない。カナダは,海水と汽水の質の一般的変数としての暫定指針をもっているが（CCREM,1987;付録２２）、これらの中には毒性化学物質は含まれていない。海水と汽水の底質の暫定ガイドラインはあり（EC,1995ｃ）、ブリティッシュコロンビア州はブラード入江の海水・汽水区域の水、底質の目標値を持っている。

対照的に、生物が元々の塩分濃度の領域から抜け出した場合、汚染物質の毒性が変化することが予想される。淡水生物が塩分濃度の高い水域へ移動した場合、一般的には多くの汚染物質の毒性は、生物の等張点の最小値、通常は海水の強度の約三分の一、にまで減少する。見かけ上は、生物は、そのよな塩分濃度で、浸透圧的に“最も快適”であり、毒性影響に対してより耐性がある。さらに高い塩分濃度では、塩分ストレスが加わることから予想されるように、毒性が増加する。実際、生物は塩分濃度が減少すると、毒性に対する耐性を失うようにみえ、おそらくは浸透圧のストレスによる。汽水種にたいする毒性物質の影響は、その生物の通常の塩分濃度範囲、馴致の度合いなどを基に、関連する生物種ごとに解釈される。一般化の例は、Sprague（1985）により述べられている。

生物は、望ましい範囲を超える塩分濃度から、容易に毒性試験でストレスを受ける。これは、ある生物を用いて、淡水性の排水を様々な希釈列で試験をした場合に、おきる。塩分が塩水で適切に調整されていない場合、高濃度の廃水は、塩分不足により次第にストレスを増加していく；つまり、供試生物の反応は、単に毒性物質の影響ではなく、部分的には塩分の影響の結果である。このような問題は、塩分濃度の変化が関与する毒性試験の結果を解釈する場合に、気をつける必要がある。良い試験を行なうためには、各濃度毎（または一部の信頼できる推定値毎）に塩分濃度を測定し、その生物の適切な範囲と比較を行なう。総塩分濃度に加え、海水中の個々のイオンの高濃度、低濃度は、室内での試験するアミ類へ悪影響を与える可能性がある（Douglas and Horme, 1997）。

海水または汽水の底質の毒性試験についても、同じ一般的注釈があてはまる。望ましい範囲外の塩分濃度に生物を暴露するのは、毒性試験としては正しくない。試験での塩分濃度は、例えば、底質または間隙水の希釈列を用いる場合など、適用される技術に応じて変化する。はっきりしないがより起こりうる問題は、供試底質内での間隙水と試験水槽に添加された上層水の塩分濃度の相違である。間隙水の塩分濃度は、(a)採取前の野外条件、(b)試験への試料の準備操作、(c)間隙水と上層水間の試験中の交換の容易さ（粒径、多孔性など）、により影響を受ける。例えば、淡水または汽水域から採取した底質で

狭塩性の潜掘性端脚類に試験をした場合、間隙水中の塩分濃度が適切でないため、毒性試験で擬陽性の結果がでる場合がある。実験者は、供試生物にとって塩分濃度が適切であり、暴露の各相で公正であることを保障しなければならない。底質試験の結果は解釈するものは、適切な塩分濃度が用いられていたかどうかをチェックしなければならない。

溶存性有機物と懸濁物質：天然の有機物は、化学的、物理的複合体を形成し、生物利用可能性を減少させることにより、金属や疎水性物質の毒性を減少させる。多くの淡水は約 0.5-2.5mg/L の溶存性有機物（DOM、溶存性有機炭素 DOC として測定される）を含む。この範囲の真ん中程度の相対的に色のついていない水でも大体は金属や殺虫剤の毒性を減少させる[45][45]。湿地帯や沼地帯からの排水は、安定した多環性のフミン酸・フルボ酸から主に構成される 50-70mg/L の DOM を含んでおり（Day,1991; Ortega and Benson, 1992）、多くのカナダの表流水に特有の茶褐色の色を与えている。

懸濁性有機物質もまた、金属や有機化合物と効果的に結合し、高濃度では、顕著に毒性を減少させる（例、セントローレンス河入江；Gagnon ら、1992）。（DOM は多くの表流水で有機物のより重要な構成物である）。懸濁性無機粒子は、毒性と考慮する影響に応じて、生物リ床の U 性や毒性に様々な影響を与える。高濃度の無機懸濁性固形物は疎水性毒性物質を吸収し、その摂取と毒性を減少させる（Pratt ら、1990; Schrap and Opperhuizen, 1990）。しかし、懸濁性粒子は水相に毒性物質を保持し、濾過摂取者のような生物に対しては毒性物質をより利用可能とする。しばしば、汚染底質の撹乱は水相の生物による毒性物質の摂取を増加させる（Seelye ら、1982）。懸濁性固形物濃度が供試水中で増加した場合、供試生物への直接的ストレスが増加することになる。

水分：これは土壌の全過程に影響をあたえる重要な因子である。水は、摂取が重要であるミミズのような生物を除き、植物や土壌生物の主要な毒性物質の摂取経路である。水分の欠乏は旱魃期の植物のストレスの原因となる。水分か多すぎると、望ましくない水分を避けてしばしば垂直移動する土壌無脊椎動物に影響を与える。ミミズは、水がしみこんだ土壌では死亡する。

溶存酸素：溶存酸素（DO）が低下すると魚類への毒性が増加することは、アンモニア（Llod,1961; Thurston ら、1981）、金属（Voyer ら、1975）、紙パルプ排水（Alderdice and Brett, 1957; Hicks and DeWitt, 1971）と天然植物毒素（Kulakkattolickal and Kramer, 1987）など広範な物質で繰り返し観察されている。この影響は急性と慢性毒性にあてはまり、穏やかな DO の減少ですら実質的に毒性を増加させる。

毒性と低酸素ストレスの間には相互的な相互作用がある。多くの排水、特に紙パルプ排水は生物化学

---

[45]疎水性化学物質（高いオクタノール一水分配係数 Kow を有する）は生体組織に蓄積し（4.6 参照）、DOM のフミン酸・フルボ酸と安定した複合物を形成する。複合化した化学物質は遊離の化学物質に比べ、より水溶性があり、生物学的利用可能性が低い。高濃度の DOM は劇的に多くの疎水性有機化合物や金属の毒性を緩和する（Stachhouse and Benson, 1988; Gardner and Gunn, 1989; Day, 1991）。

的酸素要求量（BOD）が高く、放流先水域で局地的な DO 欠乏を生ずることがある。このような環境下では、排水の本当の毒性は、標準的室内試験では、特に試料が試験中曝気されていた場合には、過小評価される可能性がある。

生理学的なレベルでは、毒性物質への暴露は概して魚類の呼吸速度を増加させ、亜鉛や紙パルプ排水の樹脂酸のような鰓の機能を妨害する毒性物質では相互作用は特に強くなる（Hicks and DeWitt, 1971）。一つの可能性のある結果として、毒性物質が酸素輸送を阻害し、鰓の洗浄 irrigation の増加を招き、その結果、汚染された水がより多く鰓を通過して毒性物質の摂取が加速されるというフィードバック状態が生ずる（Lloyd, 1961; Birtwell, 1989）。あるいは、鰓の損傷が酸素摂取を阻害する結果、全体的または部分的な酸素不足によりが亜致死または致死効果が生ずる。

毒性試験の結果を環境へ外挿する場合、低 DO による毒性増加を考慮するのが重要な特定の状況がある。夏季の成層した生産性の高い湖の深水層や、冬季の氷で覆われた湖や河川では、酸素はしばしば低い。底質や底質に近い水層では遊離した酸素は低いか存在しない。水生植物が繁茂した狭い水域ではしばしば夜間に溶存酸素が低下する。

4.15.2　生物学的修飾因子

概　要

- 毒性物質に暴露された生物の挙動は、特に、忌避反応が代わりに生じて、生理学的損傷と同様に深刻な場合は、重要である。
- 植物と動物の初期生活段階は通常、最も感受性の高い段階を含んでおり、それが、毒性試験に用いられる主な理由である。それとは別に、体の寸法が毒性物質への耐性に対して予期せぬ変動する役割を果たす。
- 貧しい栄養状態は毒性影響を増加させる。毒性物質への順応は一般に、耐性の 2 倍または 3 倍程度の増加するという穏やかな影響をもたらす。
- ストレスの原因が多重にある場合、それが天然起源であれ人為的起源であれ、生物内で合併して、すべての原因に対して感受性が高くなる可能性がある。ストレス要因には、高温のような自然の悪条件や、浚渫や毒性物質の存在のような人間活動を含む。

挙動：忌避反応を考慮しないとしばしば、環境汚染を評価する際に、大きな誤りを犯す。標準毒性試験の動物は、一定の暴露条件に閉じ込められているが、野外では、魚類の多くの種は排水プリュームから自由に泳いで逃げることができ、多くの無脊椎動物は河川で下流側に散らばっていくことができる。この古典的な例は、魚類の挙動を無視したため、標準的室内試験で生態系の全体の影響の予測に失敗した、Greckler らの野外実証実験（1976）である[その河川では、魚類はやや汚染された河川の広範な区間を避けたのでそこでは産卵しなかった（4.1.1 参照）]。

しかし、魚類はしばしば排水プリュームに引き寄せられる。一般的な知見は、冬季に魚は暖かい排水に集まってくる。明らかこのような行動は、魚自身を排水中の毒性物質の有害な濃度に暴露し、排水プリュームから離れたとき急速な温度変化と一緒に亜致死毒性のようなストレス因子の合併を引き起こす。魚は水質に非常に敏感であり、化学的な誘引により排水プリュームに引き寄せられる可能性がある。このような現象がおきた場合、ほとんど記録されていないが、室内実験で、甲殻類が見かけ上、石油製

品に誘引されたり（Atena and Stein, 1974; Percy, 1977 ）、“生理学的な罠”により、魚が低濃度の紙パルプ排水に誘引され、高濃度では忌避を示したり、低濃度の塩素では忌避を示し、高濃度では見かけ上の誘引している（Sprague 、and Drury, 1969）。

これらの挙動の影響があるため事例は、常に、室内での二種類の毒性評価として実施される： (a)生理学的損傷のための標準試験；(b)忌避反応と誘引を検討するために時に実施される挙動試験。汚染された地域を評価する者は行動反応に関する入手可能な知見を少なくとも、見直しておくべきである。この話題は代役とされ、既存の発行物は主に魚類の忌避行動を扱っている。

さらに、通常の日間、季節間、または生活段階で移動する生物、室内での一貫した暴露と異なり、排水への不規則な暴露を生ずる。例えば、回遊をする魚種はある季節の間は、汚染地域にいない可能性がある。

無脊椎動物は一般に定住性であるが、毒性物質への暴露と影響はその挙動に影響を与える同時に、挙動が影響を与える。軟底質の生物は、潜掘により毒性排水の到来より逃げる可能性があるが、おそらく、摂餌などの他の機能を犠牲にする。逆に、通常、潜掘している一部の生物は毒性試験に用いられ、潜掘の拒否反応が、供試底質の、亜致死影響を示す。多くの底生昆虫は、ライフサイクルの一部を、水の外ですごし、その時期は毒性物質の影響を受けない。流水中では、汚染物質のピークは底生無脊椎動物が下流へ逃げたり漂流するのを誘導し、その結果、局地的な集団が枯渇することがある。

ライフサイクル：毒性物質への感受性は生物の生活段階によって変化する。多くの生物では、配偶子と非常に若い段階が最も感受性が高く、例えば、新たに孵化した幼生は、新たに発芽した種子、繁殖段階にある藻類などである。環境毒性学は、”最も感受性の高い生活段階”を含む短期亜致死試験を開発するためにこの特性を利用しており、この問題点は明らかである。それは、繁殖段階を保護する必要性同様、環境汚染の評価に生活段階を考慮する重要性を強調している。甲殻類や水生昆虫は脱皮直後に特に感受性が高く（Wajsbrot ら、1990）、おそらく、新しく石灰質化し甲皮が水の流入を許すためである（Buikema and Benfield, 1979）。

年内での毒性影響の変化もまた、動物プランクトンの金属への感受性の季節パターンのように（Borgmann ら、1980）、認められている。時には、生物を望ましくない時期の間、維持し、毒性物質を含む外部条件に対して非常に耐性のあるシスト（耐久卵）のような耐性段階がある。

体の寸法：小さい水生変温動物は、大きな動物に比し、毒性物質に感受性が高いことは誰でも予想できる。小さい生物の大きな（表面積/体積）比が単位体重あたりに相対的に大きな毒性物質の流入をゆるす。この予測される体の大きさの影響は、しばしば、実際、魚や、時には無脊椎動物で観察される[cladocerans クラドセラケ目は Winner(1981)と Lazorchask and Waller(1993), 端脚類は Naylor ら（1990）]。

上述の一般化以外の例外も多数あるが、魚においては、体の寸法の影響は無秩序である。例として銅に対する耐性があり、同じ実験室で試験をすると、マンボウは体のサイズともに予想されるように耐性

が増加するが、マスでは変化しなかった（Anderson and Spear,1980 ）。他の実験室では、マスは体の寸法とともに体制が増加した（Howarth and Sprague, 1978）。１～50g のマスは体の寸法と殺虫剤ペルメスリンとの耐性の増加に直接的な相関が認められたが、50～200 g ではそれ以上の変化は認められなかった（Kumaragura and Beamish, 1981）。1kg を超える親マスは他の体長または成長段階よりアンモニアに対して感受性が高い（USEPA,1985a）。

毒性の知見を解釈する場合、体長の影響の可能性を考慮すべきである。

栄養状態：生物の栄養状態は、毒性に対して正または負の影響を与える。栄養欠乏を蒙っている空腹または飢えている動物、または植物は既に、ストレスを受けており、栄養が十分な生物に比較して、毒性物質に戦うのに利用できる代謝能力の余地が少ない（Dixon and Hilton, 1985; Holdway ら、1987; Cripe ら、1989）。

逆に、良好な栄養状態は魚の毒性物質に対する耐性をしばしば増加させることができる。餌の中のタンパク質が高いと LC50 が、殺虫剤クロルデンの場合６倍増加し（Mehrle ら、1977）、銅の場合、２倍増加した（Dixon and Hilton, 1981）。多量のビタミン C はタキソフェンの慢性閾値を４倍まで増加した（Mehrle ら、1978）。

順　応：亜致死濃度の毒性物質に数日または数週間暴露された生物は代謝的に順応し、その毒性物質に対する耐性を増加する。この現象は、ここでは順応 *adaptation* とよぶ。観察されている多くの増加は,LC50 の 2-3 程度の増加であり、環境条件を評価する上でそれほど重要でないかもしれない。

金属（Dixon and Sprague, 1981a; Orr ら、1986; Hobson and Birge, 1989）、または、殺虫剤（Holdway ら、1987）に暴露した魚類で、何度も順応が観察されている。金属への暴露は、金属と結合し、その損傷を減らす、見かけ上の防護機構である、体内でのメタロチオネインを増加を引き起こす（Dixon and Sprague, 1981b）。亜鉛で汚染された渓流の淡水性甲殻類は、汚染されていない生息地に住む同種の生物に比し、亜鉛や低ｐH に対して感受性が低い（Naylor ら、1990）。

鉛に暴露したマスでは順応が認められず、二回目の暴露に対してより感受性が高くなっていた（Tang and Garside, 1987）。これは、鉛が残留性のある生物蓄積性毒性物質であり、体内からゆっくりとしか除去されないためと予想される。除草剤アトラジンへの順応は一部の藻類で認められたが他では認められなかった（Hersh and Crumpton,1989）。５週間、パラチオンに暴露した魚では順応が見られなかった（Baas and Sprague,1986）。

多重ストレス要因：.亜致死濃度のドック製物質に暴露すると環境中の生物に対してストレスを与え、これは、低酸素、温度過剰、食物不足、捕食、疾病または栄養アンバランスなどで生ずるストレスと類似している。これらのストレスは、集団に対して累積的影響を与える。例えば、低 DO 環境の魚、栄養欠乏の植物または動物は、毒性物質の影響を受けやすい。漁獲のような人間による利用もまた、生存個体にストレスを与え、毒性物質の影響が過剰となる（Barnthouse ら、1990）

逆に、毒性物質（毒性ストレス）への亜致死濃度の暴露は、他のストレス因子に対する生物の抵抗能力を減少させる。例えば、金属への亜致死濃度暴露が、魚の熱への耐性を減少させる（Carrier and Beitinger,1988）。

底質の場合、底質が疎水性汚染物質の複合的混合物を蓄積するため、多重発生源からの毒性物質の少量の寄与が特に重要となる（Chapman and Fink,1984 ）。底質を潜掘または摂取する動物は、捕食者や水相から食物を濾過摂取する種に比べ、底質由来の汚染物質により直接的に暴露される（Lambersonら、1992）。上層水の生産性が高い場合、周期的または半永久的な無酸素状態が付加的なストレス要因となりうる。

工業利用により汚染された土壌は、多様な有機、無機毒性物質を含む傾向がある。さらに、土壌は植物の成長を阻害する天然物を一般に含んでいる。多くの植物や菌類は競合者の成長を阻害する阻害物質（多感作用物質）を分泌する。これらの化合物の大部分は置換したフェノール類、テルペン類である（Harbone,1982）。他の殺生物または殺虫化合物は落ち葉や他の植物残物から漏出し、生物叢または土壌無脊椎動物の成長や代謝機能を阻害する（つまり、非標的効果）。不完全なまたは不健全な植生で抑制された土壌のある風景の地域は、毒性問題を示唆、または原因が不適切な物理的条件（例、侵食、締め固め）の可能性がある。

毒性物質を含む多重環境ストレス要因の累積的影響は、究極的には自然界の集団の成否を決定する。したがって、毒性試験の結果を野外に外挿する場合、自然や漁獲や浚渫のような人為の両者を含む、すべての環境ストレス要因の複合した影響を考慮しなければならない。

第５章　毒性データの利用

本章ではカナダ環境省で行われている事業での毒性データの利用について議論する。第３章と第４章で述べた原則の多くが事業に用いられているが、毒性データの利用形態は各事業の目的に応じて若干異なる。

この章ではまず、廃棄物を放出した影響を直接特定するタイプの事業で用いられている毒性試験を概説する。

- 産業廃水における規制毒性試験（5.1 節）
- 産業廃水の環境影響モニタリング［Environmental Effects Monitoring］（5.2 節）
- 浚渫物や廃棄物の海洋投棄（5.5 節）
- 新規産業が生ずる廃水の環境アセスメント（5.4 節）
-

次に、カナダ環境省の特定事業での毒性試験の利用をまとめる。

- 汚染サイト［Contaminated Sites］の評価と修復（5.5 節）
- 環境質ガイドラインの開発手法（5.6 節）
- CEPA に基づく新規化学物質の有害性評価（5.7 節）
- 優先化学物質［Priority Substances］の環境アセスメント（5.8 節）
- 環境にやさしいお買いものプログラム［Environmental Choice Program］における消費財の評価（5.9 節）

５．１　廃水の制御

概　要

- カナダは毒性試験を規制ツールとして廃水に用いた最初の国の一つである。
- 1992 年の製紙業に対する新法は、管理事業の一つの柱として、廃水への致死毒性試験の使用を継続した。
- 結果がそもそも分かりやすいことが、毒性試験を規制モニタリングで使えるツールにしている。

カナダは廃水を規制する方法として早くから致死毒性試験を用いてきた。1970 年代には、新設の製紙工場から生ずる廃水がニジマスを死に至らしめてはならない、という法律とガイドラインがあった（EC, 1971; 1972）。連邦法とガイドラインはモニタリングに適した簡単な毒性試験について概説していた。決定試験では、当時の最新式の廃水処理を想定し、65%濃度の廃水中で 80%以上のニジマスが生存することを求めた。生存したニジマスが 80%未満であると、廃水は“毒性がある”と見なされ、カナ

ダ漁業法33条より放流が差し止められた。

毒性の許容限界で定義される製紙工場への規制は、手続きが簡便であり、ほぼ成功した。数年後、「産業が廃水の許容水質の生物学的なクライテリアを満足することを求めた国は他に無く」、また、「このような基準の存在は新しい製紙工場が二次処理設備を設置することを促した」と述べられた（Howard, 1978）。いくつかの州、特にアルバータ州とオンタリオ州も、1950年代までに、非公式な規制目的で毒性試験を用いた。

1992年に制定された製紙工場に対する新しい連邦法は、バイオアセスメントの適用に拍車をかけた。毒性基準と化学物質基準が法律の要であり、規制値は優秀かつ最新の二次処理の性能に合わせて定められた。製紙廃水は、1993年末を期限として、ニジマスならびにミジンコ［*Daphnia*］に対して致死性が無いことが求められた。無希釈の廃水に４日間暴露してニジマスの死亡率が 50%より大きくなると不履行となる。よって、試験頻度を（月一回から週一回へ）増やす必要があり、また、濃度列を用いた試験でLC50を評価しなければならない。

［プログラムでは最大生物化学的酸素要求量7.5 kg/ton-生産物、最大懸濁物質11.25 kg/tonも求めている。これら化学項目についてはここでは議論しない。さらに、受水環境における大規模な生物学・化学モニタリング事業も存在する（5.2節を参照）］

1992年の法律導入後、カナダの製紙工場からの廃水には大きな改善がみられた。1990年代中頃までに、ほぼ全てのカナダの製紙工場は、二次処理設備を設置したか、もしくは設置計画を立てた。1994ー5年から2年間、二次処理をしている52の製紙工場でモニタリング事業を遂行し、2/3の工場で廃水が致死毒性を有するという事例が一度も生じなかった（Kovacs and O'Connor, 1996）。この事業は、金属鉱業等の他の産業分野に規制をかける基礎となった。

廃水に対する毒性試験プログラムの技術上の利点は明らかである。

- 比較的早期に結果が得られる
- 比較的安価である
- 工場や市民が理解しやすい決定的な結果が得られる。
- 問題が生じた場合に素早く対応できる
- 非致死性の廃水という政府の目標を推進する

廃水に対する毒性試験は、決定的かつ明解な結果が得られるため、違反した業者を起訴する主な手段となっている。

廃水試験事業の技術上の欠点は主に、廃水の毒性と受水域生態系の損傷の間に特定の関係をみつけられないことである。この関係は廃水と受水域の容積比、水の交換率、拡散の速さ等の要因によっても左右されるだろう。これらの観点は、環境影響を評価する規制事業の他のところで取り扱われる。

５．２　環境影響モニタリングにおける亜致死毒性データ

概　要

- 製紙業と金属鉱業の環境影響モニタリング（EEM）に関する規定では、魚類、無脊椎動物ならびに植物を用いた廃水の亜致死毒性試験が求められている。
- 合格／不合格の基準は存在しないが、試験結果は化学分析や受水域の調査結果と組み合わせて、あらゆる影響の可能性と廃水管理の成否の評価に用いられる。
- 亜致死毒性試験で得られたデータは、利用前に正当であると確認されなければならない。EEM プログラムでは各標準試験法に関する規定の他に、正当性や報告の規定がある。
- 亜致死毒性試験は、ある廃水水質の経時変化をうまく説明することができる。
- 3 年間で、EEM プログラムは、所定の試験種と廃水に対して、4ー6 の亜致死毒性エンドポイントと、比較的少数の変動性を評価する試験群を提示する予定である。受水域の廃水プルームで観察された濃度との比較で、エンドポイントを特徴づける単一の値が選択される。所定の種ならびに場所での単一の値は、以下の 3 つの方法のうち 1 つを用いて選ばれる。

1．試験群から最も小さい IC25（または EC25）を選ぶ。この選択は試験群が 10 以上のエンドポイントを有する場合にのみ勧められる。
2．3 つ以上の IC25 の幾何平均を用いる。
3．以上のエンドポイントから、廃水の予測最小毒性濃度［Predicted Minimum Toxic Concentration］（PMTC）を統計学的に算出する。95%の信頼限界で 5%の試料だけが PMTC よりも毒性が高いとする。

- 選ばれた亜致死毒性の代表値を、「影響予測域［zone of potential effect］」として、観察されたプルームの等濃度線に外挿する。
- 複合する廃水の相対的な重要性は、廃水と水域から得た試料の亜致死毒性試験結果に規定の方法を適用して評価できる。

カナダで最初の公式な環境影響モニタリング（EEM）事業は、カナダ漁業法の製紙廃水規定［Pulp and Paper Liquid Effluent Regulations］に基づき行われた。二回目は、改正金属鉱業廃水［Metal Mining Effluent］規定に基づき、2001 年中に開始される予定である。EEM を用いる規制上の目的は、廃水を受け入れる水域で、魚類の個体群や生息域また漁業資源の利用が保護されるかどうかを評価することである。EEM の結果は、廃水に対する亜致死毒性試験を含むひと揃いの相補的なツールを用いて、“weight-of-evidence”アプローチにより解釈される。特定の技術指導書が製紙業、金属鉱業 EEM 事業の両方で作成されており（EC, 2000b, c）、事業の参加者による意見を求めている。

製紙業に対する事業では、最終放流水に対する年 2 回、3 種類の致死毒性試験を求めている。試験終了後 90 日以内に政府へデータが報告され、3 年毎に現場モニタリングの結果と組み合わせて解析する（EC, 2000a）。金属鉱業に対して提案されている EEM はより現場に合わせたもので、階層化されてお

り、3年周期固定では運用しない。最初の3年間で亜致死毒性試験バッテリーによる6組のデータが求められる。最初の3年間が過ぎた後では、金属鉱業EEM事業に基づき、年に1回の放流水モニタリングで、亜致死毒性試験が引き続き求められるだろう。受水域での影響の可能性と現場の混合特性によって、放流水または放流水に曝露された表面水試料に対する追加の亜致死毒性試験が、鉱業事業者より将来のEEM研究計画の中で勧告されるか、利害関係者による議論を経て地域当局により要求されるだろう。

亜致死毒性試験は以下のEEMの他の構成要素を補完する：(a) 廃水、受水域、底質ならびに魚組織の化学分析値、(b) 養殖または土着生物の受水域ケージでの飼育、(c) 水域に生息する生物（例えば大型植物、底生無脊椎動物、魚類）の調査。EEMの中では廃水または受水域での亜致死毒性試験は以下の目的で用いる。

1．工場でのプロセス変更や廃水処理による放流水水質の経時変化の測定
2．受水域で起こりうる影響の評価
3．廃水が複数存在する場合、それぞれの点源また非点源が、受水環境で観察される全ての影響に与える相対的な寄与の評価

カナダEEM事業では最終放流水または受水域試料に対する亜致死毒性試験を求めている。ここでは3ないし4つの試験法バッテリーを用いることが多い：(1) 魚類の初期発生、(2) 無脊椎動物の繁殖、(3) 水生植物の成長／増殖。受水域が淡水域であるか、河口域／海域であるかによって試験法や試験種が選択される（表7）。

表7　環境影響モニタリングで認められている亜致死毒性試験

試験法の名称	受水域環境	試験種	公認試験法
魚類の初期発生	海域／河口域	インランドシルバーサイドまたはトプスメルト（いずれもトウゴロイワシ科）	USEPA, 1994a USEPA, 1995
	淡水域	ファットヘッドミノウまたはサケ科の魚*	EC, 1992b または EC, 1998
無脊椎動物の繁殖	海域／河口域	ウニ	EC, 1992f
	淡水域	*Ceriodaphnia dubia*（ミジンコ）	EC, 1992a
水生植物への毒性	海域／河口域	*Champia parvula*（海藻）	USEPA, 1994a
	淡水域	*Selenastrum capriconinutum*（藻類）または *Lemna minor*（ウキクサ）	EC, 1992d または EC, 1999

*ロッキー山脈より西方ではファットヘッドミノウは土着種ではないため、EC(1998)に従ってサケ科の魚を用いなければならない。

５．２．１　試験結果の検証

亜致死毒性試験の結果は、用いる目的に係わらず、まず規制対象の工場が、自身の試験所が正当なデータを生み出していることと、報告に必要事項が全て記載されていることを保証しなければならない。EEM の規定では、製紙業に対する技術指導文書（EC, 2000a, b）で議論されているように、試料を集める現場作業員と試験を実施する試験所の両方が、品質保証と品質管理（QA/QC）の手続きに従わなければならない。これらの手法は、試験法の限界と自然生物の変動性以内に、妥当性と精度を最適化する。

QA/QC で問題があると、試験結果が却下され、新しい試料の採取と試験が求められることになる。データが受理された後で、試験所の従業員と政府の規制担当者のどちらかで問題が特定されると以上の事態となる。実験毒性学に関する産業界／政府専門化作業グループ［Expert Working Group on Laboratory Toxicology］は、製紙業に対する環境モニタリング事業の第一期から亜致死毒性に関するデータをレビューしてきた。データの質に関する問題が多数認められたため、次のような QA/QC の履行を規定の改定時（EC, 2000a, 1997c）に取り入れることを勧告した。

- 亜致死毒性試験は、手法を記述した文書にある妥当性のクライテリアに合致していなければ、新しい試料で繰り返さなければならない。
- 放流水試料は採取から 3 日以内に試験しなければならない。それができなければ採取し直す必要がある。
- 報告は試験法で要求されている最低レベルに合わせなければならない。
- 結果は、品質保証のチェックのため、試験終了後、90 日以内に報告しなければならない。
- 試験のエンドポイントとして「未満」という報告は認められない。
- 少なくとも 1 つの試験濃度が報告されたエンドポイントより高いか低くなくてはならない。
- 陽性対照物質を用いた試験を排水に対する試験の 30 日以内に行わなくてはならない。
- 陽性対照物質を用いた試験は排水に対する試験と同じ条件で行わなくてはならない。

これら QA/QC に関する要求事項は、製紙業 EEM 事業プログラムの第二期以降に、民間の試験所から有効でかつ質の高い毒性試験が確実にもたらされることを目指している。

よって、試験生物の健康に関するクライテリアに適合していない、試料に対して不適切な前処理操作を行った、試験中に必要なモニタリングを行っていない、エンドポイントの計算に間違った方法を用いたなど、試験を行う上での必須事項が一つでも欠けていると、データは無効であると申告される。

製紙業 EEM 事業で提出する毒性データには、材料、方法ならびに各試験の計算過程を併記しなければならない。最小限の報告事項は、カナダ環境省より発行されている各毒性試験法文書の第 8 章または第 9 章に詳述されている。例として *Ceriodaphnia* 試験における最小報告事項の骨子を表 8 に示した。USEPA 法（1991b ならびに 1995）での一般報告事項は EPA 文書の第 10 章にあるが、カナダ環境省ではこれらの方法を EEM で用いる際の最小報告事項を（独自に）設定している。品質保証と試験法の構成要素を報告する最小事項をまとめたチェックリストが用意されている。チェックリストは、規制を受け

ている工場の従業員と、政府の規制担当者の両者による試験情報の評価を助けるためのものであり、カナダ環境省のEEMウェブサイト（www.ec.gc.ca/eem）よりインターネット経由で入手可能である。

試験所は、製紙業や金属鉱業と亜致死毒性試験の実施を契約するようになったときに認定されるべきと勧告されている。認定は、カナダ環境分析協会（CAEAL）、ケベック州環境省（MEQ）または同レベルの認定を授与できる機関を通じて、カナダ規格審査会によって行われる。これらの機関は国際標準化機構（ISO）の認定規格に従っている。このような品質保証レベルは試験所を選定する必須条件である（EC, 2000a, 1997c）。

5．2．2　亜致死毒性試験エンドポイントの集計

EEMの各サンプリング期間で全ての試験種（植物、無脊椎動物、魚類）について有効な試験結果が入手可能となる。IC25（サケ科胚試験ではEC25）が各試験報告書より抽出できる。放流水が淡水亜致死毒性試験において25%の亜致死性阻害または影響を引き起こさなければ、IC25/EC25は計算できず、エンドポイントは100%より大きい濃度で報告される。汽水／海水試験では、過塩水を加えるため最大濃度が65%となり、最大濃度で25%未満の阻害を示す試験では67%より大きいIC25が報告される。

ある濃度での死亡がIC25/EC25の計算を妨げるだろう。例えば、32%濃度では影響（死亡、成長または繁殖）が計測されず、56%で全滅したとしよう。56%濃度では成長や繁殖の阻害を評価することが不可能であり、IC25/EC25を計算することが難しい。このようにIC25/EC25が計算できない場合、試験結果は影響が無い最大濃度より大きい、この事例では「32%より大きい」と推定される。

亜致死毒性データの検証と集計の次には解釈が来る。結果の利用と解釈についての手引きは5.2.3項から5.2.5項にあり、EEMにおける亜致死毒性データの３つの基本的な利用について述べる。

5．2．3　廃水水質の経時変化の監視

亜致死毒性エンドポイントを用いて、時点が異なる放流水水質を比較できる。この比較には、EEMサイクル間の比較、ある地点での繰り返しモニタリングデータの比較、また類似した工場が有する傾向の評価等があるだろう。比較には個々のIC25データや、各試験種におけるIC25の幾何平均（GM-IC25またはGM-EC25）を用いる。IC25の幾何平均を計算する場合、25%の亜致死毒性阻害を引き起こさない試験については、計算上は100%をエンドポイントとする[46]。

ある傾向を特定する作業において亜致死毒性試験が威力を発揮することが、製紙業EEMの第一期で得られたデータからわかる。1992年と1996年の間に、カナダの多くの製紙工場は廃水処理系を改良または新設した。新設または改良された処理系が稼働し始めると、放流水の亜致死毒性が低下する事例が多く見られた（EC, 1997c）。カナダの二次処理を行っている工場全てから得られた結果と、一次処理だけを行っている工場のデータを分けてみると、二次処理の実施により毒性が減ずることがはっきりとわ

---

[46] この操作は評価されようとしている工場にバイアスをかけているようにもみえるが、それは間違いである。100%という値を与えると、ほとんどの場合、仮想のIC25が他のIC25測定値に接近し、標準偏差を減ずることになる。

かる。この差は*Ceriodaphnia*、*Selenastrum*、ファットヘッドミノウ、ならびにインランドシルバーサイドを用いた亜致死毒性で認められた。放流水の水質改善を検出するという亜致死毒性試験の能力は、EEMプログラムの第一期のデータの解釈において重要である（EC, 1997c）。

表８　*Ceriodaphnia dubia*を用いた亜致死毒性試験のEEMでの最小報告事項

放流水
－試料の種類（例えば全放流水、最終放流水）
－試料のラベル／コードの情報
－試験所に到着するまでの試料の温度
－試料採取日；試験所に届いた日付と時間

試験生物
－種：入手先
－試験開始時の年齢
－試験生物の試験に用いる以前の通常ではない外見、行動ならびに処理

健康クライテリア
－試験7日前の各培養基／繁殖体における産仔群の平均死亡率
－試験7日前の各培養基／繁殖体における成体あたりの幼生の平均生存数
－各産子群からの幼生の産出数
－培養基／繁殖体における休眠胚

試験条件と施設
－試験法
－subsampleやmultiple sampleを用いた場合、それぞれの試験を行った日付または日数
－試験の開始日ならび完了日
－試験容器の仕様（大きさ、形、材質）
－試験者
－試験生物を試験容器に加える前に検液に行った前曝気量（行った場合）
－前曝気時間
－試験生物を曝露している間の曝気量と時間（行った場合）
－試料のpH調整法（行った場合）
－試料のろ過法ならびに硬度の調整法（行った場合）
－対照／希釈水の種類と入手先
－対照／希釈水に加えた全ての化学物質の種類と入手先
－検液の濃度
－各試験容器に入れた試験溶液の容積と深さ
－濃度当たりの検液数
－検液当たりの生物数
－試料の使用直前の溶存酸素ならびにpH
－検液と対照の温度、溶存酸素ならびにpH
－試験におけるあらゆる異常、試験法からの逸脱、問題、改善策

結果
－各検液、各観察時点におけるミジンコ第一世代の平均死亡率
－各検液、各観察時点におけるミジンコ第一世代の平均新生仔数
－LC50（と95%信頼限界）；用いた統計値の表示
－繁殖に対するIC25（と95%信頼限界）；用いた統計値の表示
－陽性対照試験の結果と有効期間

５．２．４　受水環境で起こりうる影響の推定

亜致死毒性試験の結果は、受水域で影響が生じうる領域の予測にも使える。室内で行った一連の亜致死毒性試験から唯一の予測が得られることが望ましい。潜在影響ゾーンを比較する目的で、複数試験結果を代表する濃度の選び方として、次の３つの方法が提言されている。

- ある工場の放流水で行われた亜致死毒性試験で最も小さいIC25を用いる。
- ある工場の放流水で得られた亜致死毒性IC25の幾何平均を用いる。
- 統計学的に計算した予測最小毒性濃度（PMTC）を用いる。

最小IC25。最初の選択肢は、(a)試験群で最小のIC25またはEC25と、(b)放流水が受水域に混合する地点のプルームで予測される濃度を単純に比較するものである。このアプローチの良いところの一つは、各試験のエンドポイントが、同じ放流水から得られた連続的な結果のひとつとして評価できること、すなわち放流水水質の時間変動が判ることである。しかし、代表性の無い異常値を最小のエンドポイントとして用いないための注意がいる。もしこれを許すと、粗末で過度に保守的な潜在影響ゾーンをもたらす。したがって、このアプローチを選ぶ場合には、試験の有効性を確認することが必須となる。有効な試験に必要な全ての事項に少なくとも合致、できればそれを上回るべきであり、エンドポイントは狭い95%の信頼区間内にあるべきである。この選択肢は、試験所に亜致死毒性試験バッテリーの10組以上の結果があり、試験が現在の工程と廃水処理を反映している時に勧められる。

製紙業EEMの第一期では、たった4回の採水しか求めておらず、試験件数が不十分であったことが問題としてあり、これがIC25とプルーム濃度の比較を制限していた。4つのデータポイントでは製紙廃水の水質変動をうまく代表できず、最小のIC25を満足ゆくように取り出すことができなかった。EEMの第二期では、ほとんどの製紙工場で、3種の試験生物について、それぞれ6セットの亜致死毒性試験が行われる予定である。第一期で得られた4セットの亜致死毒性試験結果も、放流水水質が大きく変化していなければこれに加わるだろう。よって全試験数は10に増えるが、結果の普通の変動を考えると未だかなり件数が少ない。もっと数多くの試験を行えば、ある結果は10の試験で求めた最小の毒性よりも小さい毒性を示すだろうし、またその逆も然りである。多くの工場では、第一期の後半で二次処理が設置されたため、第二期における6組の試験結果は現在の廃水処理のレベルの提示には使えるだろう。

少ない（すなわち10未満の）試験結果を部分的に補うために、２つの洗練されたアプローチを用いることができる。ひとつは、ある試験期間で得られたIC25の幾何平均をとる方法である。もうひとつは、利用可能なエンドポイントを、同じ条件で放流水を繰り返し試験して得られると予想される最小のIC25を計算する、統計学的な方法である。亜致死毒性試験の結果を特徴づける、これら数学的手法には、各放流地点で少なくとも3つのIC25（サケ科胚試験ではEC25）が必要である。詳細は以下に述べる。

幾何平均。この統計値は、放流地点における規定の試験種のエンドポイントの代表として用いることが

できる。幾何平均は試験種の全ての IC25（サケ科胚試験では EC25）を用いて計算する[47]。エンドポイントの対数を用いて標準偏差を計算することもできる。結果の真数をとり、標準偏差の算術値を報告する。この方法はあるセットに 3 つ以上のエンドポイントがあれば計算できる。

PMTC。ある試験群で IC25（または EC25）値の数が 10 以下の場合、より多数の試験件数で得られるだろう最小の IC25 を、利用可能なエンドポイントを用いて、統計学的な手法で予測する。この評価値は*予測最小毒性濃度（PMTC）*と呼ばれ、95%の信頼限界で 5%の試料が有害な亜致死毒性影響をもたらす放流水の濃度と定義される。または、PMTC は、95%の信頼限界で少なくとも 95%の個体の IC25 が上回る（毒性が小さい）、IC25 の評価値である。この手法は個体群が対数分布をするという仮定で標準確率関係に従う。また、USEPA（1991a）を改良したものであり以降に詳述する。一つの試験群で 3 つ以上のエンドポイントを用いる。

PMTC を計算するためには、先の方法で幾何平均と対数標準偏差を計算する。95%の信頼限界の補償係数を補足 D の表 D2 より得る。平均、標準偏差ならびに補償係数を次の事例で示す PMTC の計算に用いる。この評価値は放流水の水質変動と試験結果の数に影響される。より堅実な値が欲しい場合には、信頼限界 99%の補償係数を表 D2 から求めて計算に用いる。

Selenastrum 試験での計算例が補足 D にある。この例では製紙廃水の 4 回の試験結果、15、17、25 ならびに 30%（表 D1）の IC25 より、PMTC 値 3.7%が得られている。表 D2 では、適切な補償係数を IC25 の測定数で選ぶ。この例では、測定数が 4 であるから補償係数が 5.369 となる。補償係数を対数標準偏差と掛け合わせ、その積を対数幾何平均より差し引く。その差の真数が PMTC 値となる。計算例でみたように、統計値は放流水の亜致死毒性の変動の大きさを考慮しており、データ数が少ないため、*Selenastrum* の PMTC は測定された最小の IC25 よりも小さく（すなわち毒性が大きく）なっている。繰り返すと、この PMTC は *Selenastrum* に対する最大の致死毒性の評価値であり、この発生源の放流水で採取された試料で時間的に 5%の割合で達するまたは超過する（すなわちさらに毒性が強くなる）と予想される。

第一期のデータレビューにおいて、ほとんどのカナダの製紙工場で PMTC を計算した。一次処理しか行っていない工場では放流水の毒性に大きな変動があり、結果として小さい PMTC 値を示した。毒性試験件数が少ないこと（わずか 3 または 4 つのデータポイント）も PMTC の低下の原因となった。一次処理のみを備えた工場の中には、平均 IC25 と PMTC に 6 桁の差があるところもあった。二次処理を備えた工場では平均 IC25 と PMTC は 3 桁の差であることが多かった。データポイント数の増えたことも大きく影響したが、より進んだ廃水処理が平均 IC25 と PMTC の差を縮めた主な原因であった。製紙業 EEM の第一期のデータレビューにおいて、あまりに小さい PMTC は、環境影響を考えるグループにより、非現実的であるとして却下された。しかし、評価値は統計学的には正しく、これを正当化する

---

[47] 幾何平均は n 個の数値の相乗の n 乗根である。EEM の第二期では、6 つの IC25 値の相乗の 6 乗根である。または、6 つの IC25 の対数を加え、合計を 6 で割った値の真数が幾何平均である。各 IC25 の対数は標準偏差の計算にも使える。また、自然対数を一連の計算に用いることもできる。

ためには、毒性試験の件数を多くするか、毒性の測定値の変動をより小さくすることが明らかに必要であったという、潜在的な不備が指摘された。

カナダで得られた成果を、アメリカの二次処理を備えた9つの製紙工場で行ったより詳細な試験結果と比較した。*Ceriodaphnia* に対する亜致死毒性データは、第一期のデータレビューで、実験室毒性学に関するカナダ産業界／政府専門作業委員会が入手した。アメリカの各製紙工場は9から15のIC25データを持っている。アメリカの各製紙工場の平均IC25とPMTCを計算したところ、その差は1桁以下であった。この一致はおそらく：(1)アメリカの各製紙工場は廃水水質が比較的安定しており；(2) *Ceriodaphnia* 試験が専門の試験所で行われ；(3)各製紙工場で比較的多数の試験結果が利用可能であったためと考えられる。カナダの製紙工場は第二期が終わると各亜致死毒性試験について10のIC25データを持つ予定であり、その時点で、PMTCが上昇し、幾何平均IC25に近づくという、アメリカと同じ傾向を示すようになるだろう。

実験室毒性学に関する専門作業委員会は、製紙業EEMにおいてPMTCを潜在影響ゾーンの評価に利用する際の二つの問題を取り上げた。

データの正規性と少ない標本数。 PMTCの評価に用いる補償係数は、データがほぼ正規分布していることを仮定している。アメリカの製紙工場の *Ceriodaphnia* データを解析しようと試みたが、データ群には正規分布かどうか調べるのに十分な値が含まれていなかった。作業グループに助言した統計学者は、データの正規性はこの状況で問題になりにくく、PMTCが小さくなる原因は標本数が小さい（第一期では最大で4）ことであるという感触を示した。

変動要因。 主に二つの変動要因がPMTCに影響する。それは、(a)試験系の応答の変化と製紙工場での工程の変更、処理系の変更、ならびに季節的な(b)放流水の水質の変化である。試験系による変動は試験生物の応答または手法の変化に起因する。製紙業EEMの第一期では、一定の品質基準が亜致死毒性試験では果たせず、試験を行った試験所で用いられた品質保証レベルに過度の柔軟性が許されたことが明らかである。第二期では、公的な試験法の改訂とEEMでの要求事項の変更により内部品質管理レベルが定義された。カナダ環境省より、製紙工場は外部プログラム（例えばCAEALやMEQ）から亜致死毒性試験の認可を受けた試験所のみと契約すべきという、強い勧告が示された。これらの状況の変化は試験所内での変動の管理を支援する。専門作業委員会は、また、PMTCの評価において、工程や廃水処理に大きな変更があった後に得られたIC25は分けて、変更前のIC25とは一緒すべきでないことを勧告した。

専門作業委員会は、廃水処理技術者より、カナダの製紙工場における放流水水質の季節変動に関するアドバイスを求め、処理系がよく管理されていれば夏と冬の水質の変化は小さいというコンセンサスが得られた（EC, 1997c）。

試験結果とプルームの比較。 製紙業EEMでは、各製紙工場は受水域へ排出される廃水プルームを図示

し、1%濃度まで減少する地点を示さなければならない。プルームは、河川では低水時、湖沼、河口域ならびに海洋では混合が少ない極限時において、現場観測やモデルによりマッピングする。放流水プルームのマッピングは、受水域で予想される濃度と放流水で測定された亜致死毒性を比較する直接的な方法である。

比較に用いる毒性クライテリアは、以前に示した三つの値、すなわち最小実測 IC25、幾何平均 IC25、または PMTC のうち一つを用いて求める。どの濃度を使っても、ある特定の生物種で、ある特定の影響が認められる領域の境界を示す。したがって、「潜在影響ゾーン」は、選定された亜致死影響クライテリアを超過する濃度のプルーム領域と定義される。各試験種について、潜在影響ゾーンは、放流水の1%濃度の等濃度線で定義されるプルーム領域より大小があっても、放流水プルームダイアグラムへマッピングできる（補足 D を参照）。

５．２．５　多重排出者による影響の解析

亜致死毒性の評価は、多数の産業／生活廃水が、点源または非点源（例えば埋立地浸出水、樹皮集積場の表面流出、酸性岩石排水）のどちらであっても、受水域の水生生物へ与える影響の相対的な大きさを解析する助けとなる。観察された環境影響への各廃水の寄与は、亜致死毒性、放流量、受水域での拡散のデータを用いて評価できる。複数の廃水プルームが重なっている場合には、排出源の毒性への寄与を識別するのがやっかいである。現場での曝露域の近くの表流水の試料を用いて試験を行えば、発生源の毒性への寄与を併せて評価できる。

USEPA（1991a）は、排水が複数存在する場合に、廃水毎の毒性への寄与を分ける方法として、次のような方法を提言している。

1．　各排出源から採取した試料に亜致死毒性試験バッテリーを適用する。試験希釈列と対照、または汚染されていない現場水を用いる標準試験を行う。ここでは各廃水の絶対的な致死毒性を評価する。毒性が変動することが判明している廃水については、変動の大きさを評価するため、試料採取と試験を繰り返す。

2．　希釈と対照のため排出地点の上流で直接試料水を採取して用い、河川への各放流水について同時に亜致死毒性試験バッテリーを行う。湖沼と河口域では、廃水から直接影響を受ける領域の外側の水を対照／希釈水として採取し、同時に試験バッテリーを行う。品質保証の基準として、標準の非汚染水を用いて、別個かつ同時に対照試験を行なわなければならない。

対照／希釈水の「上流」の採取場所は、他の排出源や毒性物質の発生源で既に汚染されているかもしれない。よって、上流の希釈水が、調べようとしている廃水の濃度列や対照において、成長や繁殖に有意な影響を与えることがある。この試験の目的は受水域の全毒性に対する各廃水の相対的な寄与を評価することにあるから、得られた結果は無効とはならない。

次の段階で、廃水の相対的な寄与は、受け入れている水域から採取した試料に亜致死毒性試験を適用

して確定する（「アンビエント」試験と呼ぶ）。これは以下の事項の役に立つ：

a. ある放流水が受水域に混合した後に計測可能な毒性を呈するかどうかを確認する
b. 関与する全ての発生源に由来する毒性の受水域での持続性を評価する。
c. 全ての点源ならびに非点源が混合した複合毒性を、受水域への全体影響として評価することにより確定できる。

複数の発生源に由来する廃水や毒性物質を受け入れている表流水試料は概略的に、理想的には、低流量時などの最悪の時点で試験すべきである。少なくとも、試料の採取はできるだけ短期間（1～2 日）行う必要がある。廃水の毒性が変動する場合、採水と試験を繰り返して行うことが望ましい。複数の発生源の毒性評価に関する以上の指導は、USEPA の複合廃水毒性試験プログラム［Complex Effluent Toxicity Testing Program］で行われた 8 つのサイトでの検討に基づいている（Mount and Norberg-King, 1985, 1986; Mount et al., 1984; 1985; 1986a, b, c; Norberg-King and Mount, 1986）。このプログラムの成果は、研究レビューと再解析、ならびに独自の批評（Sprague, 1997）によって、カナダ金属鉱業と水系影響技術評価［Aquatic Effects Technology Evaluation］（AETE）事業に、有用な知見をもたらした。

複数の放流水や他の発生源から流入する亜致死毒性を比較するもう一つの方法として、毒性放出率［Toxic Emission Rate］（TER）または毒性放出係数［Toxic Emission Factor］（TEF）の算出がある。これらの解析では相対負荷量、すなわち放流された物質の容量とその毒性の大きさを評価する。TER=(致死毒性単位)×(放流量)という式を用いて、容量と毒性の強さが異なる廃水を合理的に比較する。この改良版では工業製品の生産量当たりの毒性負荷量を考え、TEF=(致死毒性単位)×(放流量)/(工場の生産量)という式を用いる。これらの概念は 4.3.3 に詳述している。この毒性負荷量という概念を完全なものにするためには、受水域での放流水の拡散を考えなければならない。

５．２．６　毒性試験結果の環境モニタリングへの統合

あらゆる EEM プログラムでは、放流水や受水域の致死毒性データに関する外挿された結果と、生物調査、化学分析から得られた全ての情報群を考慮しなければならない。あらゆる単一の手法は相反する情報を生み出す可能性がある。

亜致死毒性データを用いて「潜在影響ゾーン」を描く際に検討すべきこれまで述べていないポイントをいくつか示す。

1．　*バックグラウンドの毒性。*以上の記述では上流側が毒性に有意に影響しないことを想定しているところもあった。プルームが重なり合っていて、あらゆる解釈で複合影響を考えることが適当なときには、この仮定は間違っている。廃水が混じり合っていたり、プルームが重なり合っていたりする場合には、5.2.5 項の指導に従うべきである。

2．　*受水域の種類。*受水域の pH、硬度、DOC 等の特性が、実験室の水を用いた試験と比べて放

流水の毒性を増減させることがある。金属鉱業の調査では、このような人為的改変の影響を緩和する方法として、EEM の技術指導文書にあるように、上流や対照地点で汚染されていない水を採取し、対照水や希釈水として用いる代替法がある。このアプローチは水系影響技術評価事業で検討された（AETE, 1997; 1998b)。汚染されていない地点の水を使用することには、そこに至る道路が無いなど、採水のための費用という面で限界がある。製紙業 EEM で、受水域の水質は製紙業放流水に含まれる有機毒性物質の活性に大きくは影響しないため、致死毒性試験に現場の水を用いることは専門作業委員会より不適切とされた（EC, 1997c)。

3．　*プルームの不確実性。*希釈率の計算が困難または不正確であったり、混合層の位置が変動したりする場合がある。この場合生息する生物相は、レベルが不確実または変化する曝露を受けることになる。

4．　*種差。*試験生物の感受性が現場の生物より高いときには、試験所で評価した影響の可能性が受水域では観察されないことがある。

毒性試験と化学・生物調査結果の比較では、受水環境の性質、位置ならびに変化の大きさを考慮する必要がある。少なくとも、観察された影響は、放流水プルームの流向と空間的に対応しており、また排水口から離れるにつれ大きさが減ずるはずである[48]。水域での希釈が生ずることも明らかである。ある地点での放流水を原因とする生物学的な影響は、少なくとも放流水で評価された強度におおよそ対応しているはずである。放流水への曝露の結果として起こりうる生物学的影響は、放流水プルームが最小 IC25 以下に減少する地点より、遙か彼方には広がらないはずである。亜致死毒性の予測結果は、底生無脊椎動物のような二次生物の観察結果とよく一致しているようである[49]。底生無脊椎動物群集の調査結果とのかなり良好な関係は、太平洋域の 17 カ所の製紙工場における第一期 EEM で得られたデータからも明らかである。海域での研究 12 件の全てで、亜致死毒性試験データが底生動物群集への影響の有無を正しく予測していた。淡水域での研究では、全 4 件のうち 1 件で、底生動物群集での影響が観察されず、毒性試験が底生動物群集への影響を正しく予測できなかった。亜致死毒性と調査で捕獲された成魚の健康指標の間には強い関係が無かった。それはおそらく、捕獲量が不十分で、製紙工場排水への曝露を確定できなかったためと考えられる（Parker and Smith, 1997)。

5．2．7　混合層

潜在影響ゾーンを図化した後には、亜致死影響の「許容」ゾーンが問題となる。カナダでは、連邦漁業法による混合層の設定が現状で困難であるため、国が作成した許容混合層に関する手引きは存在しな

---

[48] このような一般化には例外がある。例えば、毒性物質を含有する固形物は下流に輸送された後に堆積し、そこで影響が大きい地点を形成する。

[49] 亜致死毒性試験の結果と、放流水を受けている水生生物群集で観察された影響を比較した 63 件の研究のレビューで、53 件が一致し、10 件が不一致であり、全体の一致率は 84%であった（Sprague, 1997)。過去の放流がある程度の木繊維や樹皮の堆積域を形成していると、生息域の変化が潜在影響ゾーンを決める支配的な因子となるため、製紙工場ではこのような関係が強くない。

い。しかし、各州では独自の政策をとり、定義できる。ほとんどの州のガイダンスでは慢性影響と急性影響を区別していないが、EEM では亜致死（慢性）影響を特化して取り扱っている。

ブリティッシュコロンビア州は製紙工場の混合層を、水質指針値を超過する初期希釈ゾーンとしている（Pollution Control Board, 1997）。すなわち、その領域では限られた領域で亜致死影響が支配的となることが許容されている。ブリティッシュコロンビア汚染防止協議会［Pollution Control Board］は州の環境省の後援の下で機能している。初期希釈ゾーンは水平方向に 100m まで拡張するが、幅は水体の 50%を越えないと定義されている。湖沼、河口域、海域、マルチポート排水の場合には 100m という距離は全方向に適用されるが、河川では排出点から下流方向に当てはめる。

ケベック州では 1980 年より混合層の大きさを制限し、ゾーンの端で亜致死毒性が無いことを求めている。このような毒性基準値を設けることは、カナダの各州の専権事項である。この毒性基準とケベック州で適用されている以下の大きさの基準は、比較的小規模な水体を保護すると共に、セントローレンス川のような希釈の大きい大河川を汚染物質の大きな負荷から守るものである。EEM の結果を解析する際にもこの基準が考慮されるだろう。

- 長さ<300m
- 幅は川幅の半分未満で、最大 50m
- 最大希釈率 1:100（すなわちゾーン境界は 1%濃度まで減衰したところと定義される）

アルバータ州は、流入［in-stream］ガイドラインに基づく 2 段階の混合層を設定している。化学物質濃度リストはアルバータ州環境保護局の手順書にある（AEP, 1995）。化学物質ガイドラインにはアルバータ州から発行された値（AEP, 1978）と USEPA の“Gold Book”（1986）の値が引用されている。急性毒性ガイドラインは、1 日の平均濃度に基づき、水生生物を短期的な致死毒性影響から保護すること、また、慢性毒性ガイドラインは、4 日間の平均濃度に基づき、亜致死毒性影響からの保護することを目指している。水域全体での他の用途を保全するため（例えば、混合層は遠洋生物を殺したり、通行を妨げたりしてはならず、飲用水の取水に影響してはならず、生物濃縮性の物質による問題を引き起こしてはならない）、達成されなければならない混合層の大きさについて、流量との関係と一般的な制限を示した包括的なリストが存在する。また、以下のような混合層の大きさに関する絶対的な最大値が特記されている。

- 急性毒性ガイドラインを超過する領域は全方向で 30m を越えてはならない。
- 慢性毒性ガイドラインを超過する周囲のプルームは、川幅方向に低流量時における川幅の半分、または流れ方向で低流量時における川幅の 10 倍の長さまでとする。

次の 2 つの概要は、USEPA Region VIII（1994）より発行された「亜致死毒性混合層」に関するガイドラインを説明したものである。

・ 流水（河川または水路）：亜致死毒性混合層の幅は低流量時における河川横断面の半分、長さは低流量時における川幅の 10 倍までとする。
・ 止水（湖沼または貯水池）：亜致死毒性混合層は半径 60m または湖沼表面積の 5%のうち小さい方とする。

USEPA Region VIII の定義をカナダで用いるにはいくらか検討が必要である。例えば、大河川で巨大な混合層を避けるために、ケベック州の最大 300m のような、絶対的な長さの限界値を加える必要がある。沿岸海域はおそらくアメリカのガイドラインの第 2 項に含まれ、制限値は半径 60m である。

5．3　海洋における浚渫・処分のための底質の毒性評価

概　要

・ 海洋への非有害物質の投棄はカナダ環境保護法［Canadian Environmental Protection Act］（CEPA）に規定されている。
・ カナダでは、投棄する物質は、最初に化学分析でスクリーニングし、次に必要ならば、毒性試験バッテリーで評価するという手続きをとる。
・ モニタリングでは、正式な手順に基づいた同様の試験を段階的に用いる。
・ 毒性試験は参照底質についても行う。ある参照底質の使用の可否は、主に粒径と全有機炭素が類似していること、毒性が無いことで判断される。しかし正確な選定は困難であり、手順書に選定や結果の解釈の手がかりが示されている。
・ 底質に対する毒性試験の相対的な感度は：細菌の発光（固相または抽出）≧ウニの受精＞端脚類の死亡＞細菌の発光（間隙水）＝多毛類の成長と生存となる。種によって感度が異なるが、底生端脚類に対する急性死亡率は、一般に実際の環境条件のよい指標となる、感度が高い試験である。

5．3．1　カナダの取り組み

カナダ環境保護法（CEPA）Part IV は許可という方法で海洋投棄を規制している。海洋投棄は、不活性で、有害ではなく、かつ汚染されていない物質について、環境にとって好ましく現実的な代替案である場合のみ許される（CEPA, 1988）。運河や港湾からの浚渫物が最も普通の廃棄物である。他には肥料として利用できない漁業廃棄物や飼料、金属くず、古い容器がある。投棄海域は許可条件を遵守するため、また海域の選択が環境保護に好ましかったかどうか事後評価するため監視される。

カナダの方法は 1972 年のロンドン条約に基づいている。ロンドン条約は、廃棄物の海洋投棄に伴う汚染を制御するための、70 以上の国による国際合意である（IMO, 1990; また EC, 1993b; 1995b にもまとめられている）。カナダは条約の廃棄物評価枠組み［Waste Assessment Framework］を用いて海洋投棄

する廃棄物を評価している。この枠組みは、予防的アプローチ、代替案の完全な検討、廃棄物の特徴付け、ならびに投棄の可否の判断への科学的な手続きの使用を提唱している（図 9; EC, 1995b)。定義された化学物質のスクリーニング基準を超過した場合、許可申請の一部として廃棄物の特徴付けに毒性試験を用いる。許可という判断は、レビューにより導かれた影響仮説を確認するモニタリングにおいて事後評価され (EC, 1993c)、このモニタリングの一部として毒性試験が用いられる。モニタリングの結果は、各種の予測手法や許可発行とその条件の将来の改訂のため、海域選定にフィードバックされる (図 9)。

海洋投棄する廃棄物の**特徴付けと評価**のため、カナダの段階的アプローチでは化学分析と底質の毒性試験を用いる（EC, 1993b)。化学分析項目には、PAH 類、PCB 類、金属類、ダイオキシン類があり、スクリーニングレベルを越えた物質を含有する廃棄物には毒性試験が要求される。5 つの生物試験バッテリーは、発光性細菌試験、10 日間端脚類生存試験、ムラサキウニまたはタコノマクラの受精試験、(EC, 1992c, e, f)、多毛類の生存・生長試験（EC, in prep., b)、ならびに**生物濃縮試験**（USEPA, 1993）である。これらの試験は全て、合否判定試験であり、廃棄物の希釈は行わない（EC, 1993b)。

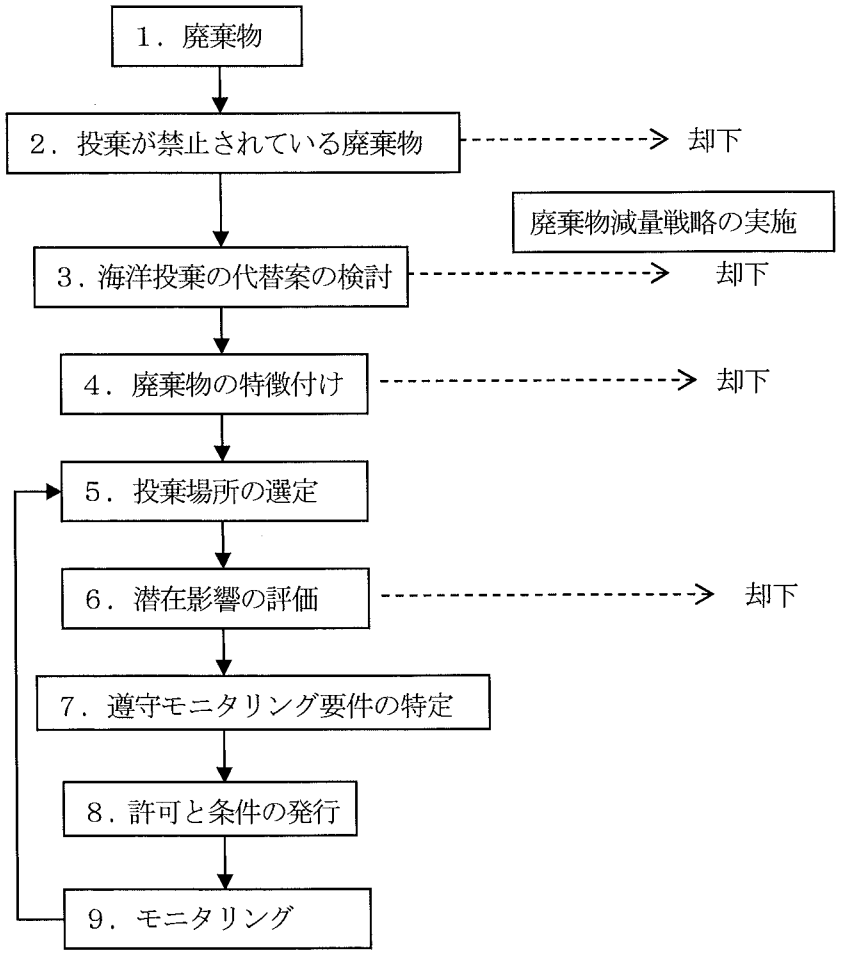


図 9　海洋投棄のための廃棄物評価枠組み
ロンドン条約 1972 により提示されたアプローチ（IMO, 1990）を簡略化した。
Chevrire and Porebski（1993）より。

カナダのモニタリングアプローチは暫定海洋投棄モニタリングガイドライン[Monitoring Guideline for Ocean Disposal]（EC, 1993c）と、関連する生物モニタリングガイドライン［Biological Monitoring Guidelines］(EC, 1994b) ならびに暫定データ解析ガイドライン（EC, 1996b,c）に概説されている。これは、(a)底質の化学的性状、(b)底質の毒性試験、(c)底生動物群集調査から成る段階的アプローチである（図 10)。続けて、現場に固有の影響仮説に対応するか、または以前の底質の評価がきっかけとなって、現地での生物調査が行われる。

投棄場所における底質の評価とモニタリングでは、試料を採取するほとんどの方法が、基盤の垂直勾配を多少とも攪乱するという困難さがある（EC, 1994c)。毒性試験の前処理で試料を混合してふるいにかけると、垂直勾配は完全に破壊される。この攪乱は毒性物質の生物利用可能性を決める物理化学的特性を改変する。最も重要な垂直勾配は、酸化還元状態である。この勾配はしばしば急激であり、酸素が下方へ拡散するよりも早く分解によって消費されることが原因である（Burton, 1991)。他の化学物質組成の勾配は酸化還元電位に準じている（4.51.1 項参照)。また、底質は粒子の堆積による物理的な勾配も形成し、不等沈降、流れならびに動物の活動によりこれは再構成される。

したがって、室内試験で測定された毒性は投棄直後の底質に対応している。投棄された底質で時間をかけて形成される勾配によって、毒性が増減する。データを評価する際には、このような手法上の限界を心に留めておく必要がある。

５．３．２　参照底質

この項では、海洋投棄されるものでは浚渫物が最も一般的であるので、他の物質を用いた試験ではなく底質を用いた試験に限定して述べる。底質の試験結果は、コントロールとなる底質や参照となる底質と有意差を比べる必要がある[50]。4.4 節では底質毒性試験の解析について議論する。また Ingersoll (1995) による概説がある。

参照底質を採取する場所の選定は 4.1.1.1 項で説明する。試験する底質があった場所の近くで、特性が似ているが汚染されていない底質の場所を選ぶのは難しい場合がある。例えば、汚染された細かい底質の粒子は流れや乱れのない領域に沈降し、近くの汚染されてない領域は流れが速く（よって粒径が小さい底質は沈降できず)、粒子が粗くなるだろう。

もう一つのきわめて現実的な難しさとして、野外における試料採取（そしておそらく毒性試験）は、

---

[50]試験結果をコントロール、参照のどちらと比較をするかは、プログラムの目的や構成によって決まるところがある。様々な理由で両方と比較するのが望ましい場合もある。コントロールとする底質は生物を採取した場所から採取するか、生物の培養／繁殖に用いた底質を用いる。コントロールとの比較は、それが汚染されておらず、結果として試験生物が健康である場合に有益である。

参照とする底質は、試験する底質の近くで汚染の影響範囲の外の地点で採取するのが普通であり、汚されていないと仮定する。参照底質は、現場で採取した底質で海洋または河口域の端脚類の試験を行うときには、比較のため必ず用いる（EC, 1992e)。粒径のような因子が試験する底質と類似していると考えられることが参照底質を用いる根拠である。毒性物質の影響と混同しないように、生物への影響のような因子が除かれている、またはできるだけ抑えられていることが望ましい。

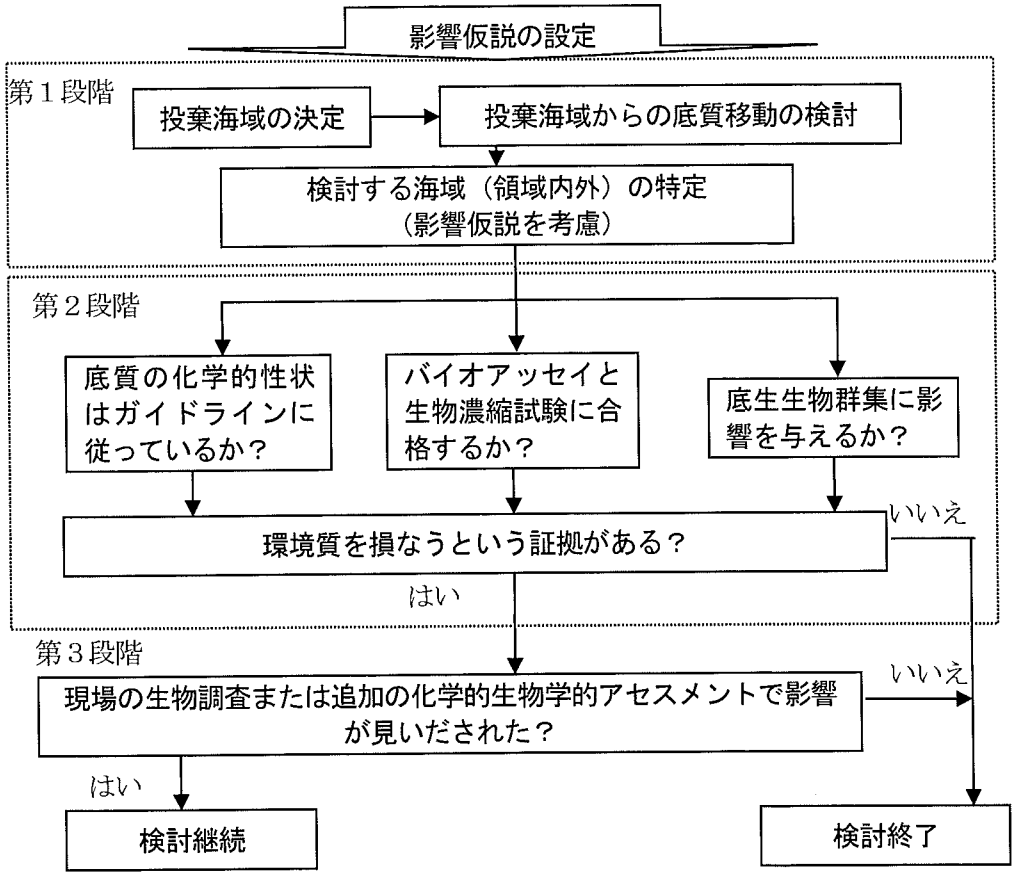


図 10　カナダにおける廃棄物の投棄における海域のモニタリング

３段階の手続きを示した。Chevrier and Topping (1998)による。

参照底質を選ぶ目安となる物理化学分析が終わる前に完了してしまうことがある。採取者は現場の既知の特性に合った底質を採取し、明らかに不適な試料を排除すべきである。採取者は、また、試験する底質の粒径分布内にある参照試料を複数採取するのがよい。参照底質のうち一つが良い適合を示すだろう；もし全てを試験すれば、粒径に起因する生物への影響が、各参照底質間の差として明らかになるだろう。

同じような底質が近くに無いか、全てが汚染されていることがある。この場合には、(1)同じような条件の（例えば岸沿いの離れた場所にあるもう一つの入り江）場であり、(2)試料の粒径や全有機炭素（TOC）が似ていて固有の毒性が無ければ、近くの沿岸域で採取した底質を用いることができる。細粒（<63 μm）の割合に注意を払う必要がある。この大きさの粒子は、最も汚染物質と結合しやすく、また、底生生物の生息域としての適性を決める重要な因子である。粒径分布が適していないと、試験生物は計測可能なストレス応答をみせる。非極性の有機化学物質の生物利用可能性は、全有機炭素よりも粒径に支配されるところが大きい（4.11.3 項参照）。

参照底質はアンモニアによって毒性を示すことがある。アンモニアは、特に富栄養化した水域やTOCが高い水域で、底質中に最もありふれた自然の毒物である（Sarda and Burton, 1995）。硫化物も底質中でよくみられる自然の毒物である（Knezovich et al., 1996）。塩類濃度や酸化還元電位のような因子が重要

になることは少ないが、太平洋岸のフィヨルドのような特定の場所では重要となる（4.11.1 および 4.15.1 項参照）。参照底質が研究者の気付かない毒性物質を含んでいることもある。試験する底質の毒性は、ある場合は既知の人為的な汚染物質に起因し、またある場合は、参照底質にも存在する自然の毒物に起因するから、これはジレンマである。

参照底質に毒性があると判った場合、カナダの現在の海洋投棄試験法では、コントロール底質の結果を用いる。端脚類の試験では、参照底質による死亡率がコントロール試験より 20%大きく、差が統計学的に有意であるときには参照底質の試験結果は用いない。（試験した底質の毒性を示すクライテリアは 5.3.3 項にある）。

試験では条件を満たした参照底質を入手することが望ましく、これを行う最も便利な方法は、（先に示したように）よさそうな場所で多くの試料を採取することである。この方法は、参照底質に問題があると予想されるときには、確実に遂行すべきである。これは、予期できない困難さがある場合に、全てのプログラムで好ましい予防的アプローチである。後で現場に戻って適当な参照底質を見つけるよりも、調査時に場所を追加して集めたほうが経済的であることが多い。この方法には次の２つのステップがある。

1．　適当と考えられる複数の場所から複数の参照底質を集める。以前に示したように、各試料について、試験する底質との類似性（粒径、有機物含量、その他簡単にわかる性状）をとるため、採取時に一般的な特徴を調べる。適当な参照底質が複数集まるまで続ける。

2．　実験室で粒径、有機炭素、硫化物ならびに発光性細菌試験による毒性を測定し、参照として適性がある底質を予備的にふるい分ける。最も適していると考えられる底質を一つ以上選ぶ。

重要な投棄場所で行われる事業では、参照底質の毒性に関するより詳細な検討が求められることがある。この場合、毒性特定法（TIE、4.7 項）をいくつか適用して毒性物質を特定するのがよいだろう。例えば、参照底質におけるアンモニア毒性の寄与は、それを解毒するゼオライトの添加で検討または確認できるだろう（Besser et al., 1998）。このような詳細な検討には時間と費用がかかる。しかし、プログラムの他の作業や、より適した参照底質を探す労力と比べれば、この方が有利であるかもしれない。

５．３．３　廃棄底質の毒性評価

カナダ環境保護法（CEPA）の現在の解釈では、毒性試験バッテリーは、廃棄物が海洋投棄によって「早期に有害となる」ことを証明するために用いる（EC, 1994f）。底質に対する試験では、端脚類（EC, 1992e）、ウニ（EC, 1992f）、発光性細菌（EC, 1992c）、軟体動物 *Macoma* sp.を用いた生物濃縮試験（USEPA, 1993）を用いる。海洋投棄しようとする廃棄物に規制またはガイドラインレベルを超過する物質が含まれている場合、毒性試験結果は決定的な役割を果たす（EC, 1994f）。廃棄物が 4 つ全ての生物試験に合格すると、開水面へ投棄できると見なされる。端脚類に急性致死性がないが、亜致死毒性試験と生物濃縮試験の一つに不合格であると、キャッピングの併用か、閉水域へ投棄が許可される。廃棄物が端脚類

の急性致死毒性試験か、他の試験の２つ以上に不合格であると、海洋への投棄は許可されない。

カナダでは、海洋投棄に適しているかどうかを判断する暫定的な毒性試験の合否判定基準を定めている（EC, 1996b）。端脚類の試験では種によってクライテリアが若干異なる。*Amphiporeia virginiana* では、死亡率が 50%より大きく、参照底質での死亡率が≦30%であるとき、底質に毒性があると。*Eohaustorius washingtonianus* では、それぞれ＞45%ならびに≦20%が対応する。*E. estuarius* と *Rhepoxynius abronius* ではほぼ同じだが、それぞれ＞40%ならびに≦20%と若干異なる。発光性細菌（Microtox®固相試験）では、5 分間の曝露で 50%の発光阻害が＜1000mg/kg で生じたときに、底質に毒性があると見なす。ウニ試験では、陰性対照試験と比べて、受精に少なくとも 25%の統計学的に有意な減少が見られたときに、その検体には毒性があると見なす。ウニ試験では間隙水と陰性対照水を比較する。軟体動物への生物濃縮試験では、試験する底質に曝露させた生物に参照底質に曝露させたものと比べて、「組織濃度に統計学的に有意な差がある」、ことがクライテリアである（EC, 1994f, 1996b; Chevrier and Topping, 1998）。

ある廃棄物が海洋投棄に適していると指定される前にその証拠固めをするため、一つの毒性試験ではなくバッテリーを用いる。ある廃棄物試料で毒性試験の結果が全て等しくないこともあるだろう。しかし、種によって感度が異なり、同じ毒性物質に対する応答は必ずしも同じではないから、そのような結果は矛盾していない。むしろ、この文書全体で強調するように、種によって感度が違うから試験バッテリーを用いるのである（2.3 節参照）。

以降では、底質の毒性試験用の種で見られる感度の違いをいくつか例示する。感度は毒性試験で重要な３つの性質の１つに過ぎないことを忘れてはならない。２つ目の性質は試験の精度であり、第３章に関係する品質管理についての記述がある。第３の性質は正確さであり、毒性試験では直接評価することはできないが、より複雑な生態系で得られた知見との比較や、4.1 項に示したような検証で判断できる。

複数の底質毒性試験結果のばらつきの例として、ハリファックス港の７地点で行われた４回の毒性試験を取り上げる（Tay et al., 1992）。固相ならびに溶媒抽出を用いた場合には、４つの試験法のうち発光性細菌試験が最も感度がよかった。この方法では、比較的きれいな参照地点を含めて、事実上全地点で毒性を検出した。これは、この試験法が自然因子に応答することを示唆している。間隙水の細菌試験では毒性を検出した地点が少なくなったが、この方法は水溶性物質の毒性の優れた評価法であった。太平洋産の端脚類 *Rhepoxynius abronius* の生存ならびに再潜掘率が次に感度の良い方法であった。なお、この生物種は底質に穴を掘る。大西洋産の端脚類 *Corophium volutator* は少数の試料にのみ報答した。これはおそらくこの生物が管を形成するため、底質との直接の接触が少ないためである。多毛類（*Neanthes* sp.）幼生の生存とバイオマスに基づく試験の感度が最も低く、ほとんどの地点で毒性を示さなかった。

同様の結果が、ニューブランズウィック州セントジョン港の投棄サイトの８つの底質で報告されている（Tay et al., 1993）。固相発光性細菌試験がここでも最も感度の良い試験で、間隙水を用いた細菌試験と多毛類試験では陽性の結果が少なくなった。埋在性［infaunal］端脚類 *Amphiporeia vieginiana* と *R. abronius* の結果は似ているが、ウニ（*Lytechinus pictus*）の受精試験がこれらの端脚類試験よりも感度が高かった。タンパ湾の底質では、ウニの受精試験が５つの試験法のうち最も感度が高かった（Carr et al., 1996）。

以上の結果を考えると、海洋投棄用の底質試験法として提案された毒性試験の感度の順位は以下のようになる；発光性細菌（固相または溶媒抽出）≧ウニ受精＞端脚類死亡＞発光性細菌（間隙水）＝多毛類の成長と生存（Tay et al., 1992; 1993）。固相を用いた試験では埋在性端脚類、特に *R. abronius* を用いた急性致死毒性試験がよく使われており、感度がよく、信頼性があり、ほとんどの沿岸域で利用できるだろう。しかし、端脚類試験では、種差が大きいため、種の選択が重要である（Thursby and Schlekat 1993）。あらゆる種類の試験でばらつきが問題となることがあるが、端脚類を用いた試験結果は比較的一定しており、結果の利用の際、適正な統計学的検定ができる（Anderson et al., 1998）。

端脚類試験は全体として有用であるが、カナダでは、海洋投棄の適性を決める全てのプログラムで、先に述べたように５つの底質試験を用いなければならない（EC, 1994f）。全ての検討では、公的か私的かには係わらず、多様な試験法のバッテリーの使用という原則に従う必要がある。例えば、ハリファックス港で行った *R. abronius* 試験の結果は、50%だけが固相発光性細菌試験の結果と一致した。したがって、他の試験法で確認されていないある試験法による結果を全面的にあてにするのはおろかである。端脚類試験は粒径の影響を受けるからそもそもバイアスがかかっている。例えば、カリフォルニアで行った *R. abronius* 試験では試料に高い感度を示し、精度が比較的高かったが、結果は粒径等の底質の性状と最も強い相関を示した（Long et al., 1990）。同様にアラスカ沿岸で数百回行われた非汚染底質の *R. abronius* 試験では、生存に粒子サイズが重要な役割を果たすことが示された（Pillard et al., 1993）。固相発光性細菌試験も試験する底質の粒径に感度が高いことが解っている（Benton et al., 1995）。いくつかの海洋生物（特に端脚類）で粒径への耐性が明らかになっている；試験法を記述した文書や文献（DeWitt et al., 1988;1989）に指針がある。

端脚類の種差も大きい。Long et al.（1990）がカリフォルニアで行った研究で、*Ampelisca abdita* は *R. abronius* に比べて底質試料への感度が良く、様々な因子の中で、毒性化学物質の濃度のみと高い相関を示した。

毒性試験の質をチェックする方法は全てのカナダ環境省の試験法に、またここでは第３章に概説されている。

５．３．４　処分地の毒性モニタリング

投棄現場のモニタリングは、廃棄物評価枠組みにおいて、あらゆる海洋投棄を管理するため不可欠である。モニタリングは、投棄申請時の検討で用いられた仮定や予測が、環境保全において正当かつ十分であったかどうかを確認するものである（EC, 1993c; 1995b）。許可を発行したということは、廃棄物が環境に重大な悪影響を与えないという仮説を立てたということになる。基本的な仮説は、投棄された底質が投棄場所付近の生物群集を大きく変えないことである。投棄場所の条件は、許可発行の評価フェーズでの基準や指針に基づき、化学ならびに毒性データの解析により決定されるだろう。解釈はできるだけ時空間的な対照データとの比較で行わなければならない。また、決定では、評価しようとする場の外側また境界での分散可能性といった他の因子も考慮しなければならない。

5.3.2 ならびに 5.3.3 項で示した情報をモニタリング試験を解析する際にも考慮する必要がある。影響

仮説の解析では、廃棄物アセスメントと同じ種を用いることが助けとなる（5.3.1 項）。試験法バッテリーの利用が基本であり、現在のカナダのやり方では、許可申請の検討で用いられた試験から、少なくとも３つの試験を用いる。標準試験法にあれば、地域に関係する種を選択する。投棄地点と生物的な条件を比べるために、補助として参照地点を検討すべきである。

5.4 環境アセスメント

概　要

- 環境評価（EA）とは，特定のプロジェクトあるいは開発による自然環境への影響に関する科学的な予測である。これには，代替案に関する一般国民の意思決定，予測した仮説を検定するためのプロジェクトの事後監視，そしてさらに緩和策を加えたり予測を改善したりするためのフィードバックが含まれる。
- 以前は無視されていた要素として，何もしないことを含むあらゆる代替案の考慮，追跡評価，予測との比較，が含まれる。
- 毒性試験は，その予測的な側面から，EAでの使用に非常に適している。
- 公聴会において，環境に関する情報を提示する技術専門家は，それが意思決定過程に有益であるかどうかを，明確かつ説得的に行わなければならない。

本章では，環境評価における主な要素の一般的な概要を示す。その後，範囲を狭めて，毒性試験がその体系にどのように適合するかを考察する。

環境評価（EA）あるいは環境影響評価（EIA）は，提案されているプロジェクトが自然環境と人間の利益にどのような影響を与えるかを予測するために用いられる。これには，代替案の検討，悪影響を回避または軽減（緩和）・修復するための処置が含まれる。この過程には，プロジェクトを推進するかどうかの正式な決定と，保護目標が達成されたかどうかをチェックするための事後的な監視が含まれる必要がある。生態リスク評価はこれに類似する過程であるが，科学的・技術的な問題に限定され，リスク評価はEAの科学的な構成要素になっている場合がある。リスク評価については5.5.1に述べる。国家レベルでは，EAは1994年布告のカナダ環境評価法の下に，カナダ環境評価局が監督を行う。この法律は，所定のプロジェクトに対する一回だけの評価の原則と，予測の正確さおよび緩和策の効果をチェックするための追跡調査に関する規定を含んでおり，EAの統一な基礎を形成している。州当局は，様々な法的根拠によってEAを実施している。

5.4.1 一般的過程

EAの第一段階は，データ収集と予測の過程である。意思決定過程がそれに続き，その後にプログラムを監視して前の段階へのフィードバックを行う（図11）。

優れたEAは，そのいくつかの特徴において，科学的な方法に類似している。それは，それを成し遂げるための計画と，（それを行わないという代替案を含む）代替案の決定に始まる。代替手段の考えられうる影響について，最初の作業上の仮説が立てられる（図11，項目1，2，3）。次に，必要とされる追加的なバックグラウンド情報を集めるため，いくつかのプログラムが計画される。また，修正された，または第二の仮説を策定するための段階が存在する（項目5）。考えられうる影響についての結論が，再調査に関して提示される（項目8）。プロジェクトが進行した後は，結論として，仮説と予測の有効性がチェックされることになる（項目4及び15）。調査結果が不満足なものである場合には，プロジェクトの緩和策のための再循環過程，仮説の作り替え，そしてさらなる監視が行われる（項目7）。

重要だがしばしば無視されるのが，広範な代替案の考慮である。プロジェクトのスポンサーは，一つの望ましい選択肢しか持っていない場合があり，それは経済的な見地による決定である。しかし，通常は産業プロセスを設計したり，あるいは住宅開発を計画したりするための別の方法が存在しており，それらを考慮する必要がある。費用効果の分析は，EAの第一段階およびその他の段階で当然の前提とされている。また，何もしないという代替案は，常に考慮されるべきである。廃水を排出しないこと，あるいは殺虫剤を散布しないことの経済的およびその他の影響は？　修正処置を全く行わないことの影響は？このような何もしないという代替案は，代替案と修復処置の利益を比較するための基準として役立つ。

その原則が数十年間にわたって強調されてきたにも関わらず（レオポルド他，1971年；SCOPE，1975年），あらゆる代替案を考慮しないことは，EAにおいてよくある誤りである。初期の環境評価法（オンタリオ州，1975年）は，過程の9つの基本的なステップのうち，6つのステップで代替案を強調していた。代替案の考慮は，何か（何かの建設）を実施する場合や，あるいは化学薬品を使用したり変更したりする場合には，特に重要である[51]。

基礎調査及び天然資源調査は，予測を行うと共に，仮説の確認や反証を挙げるため，要求される情報を提供するよう注意深く計画されるべきである。『可能な限りすべての情報』を収集するように計画されているプログラムは，目標を見失い，開発プロジェクトに関する重要な疑問に答えられない可能性がある。

緩和処置（図11；項目7）は，小川の沈泥に対する防壁のような小規模なものから，他の場所へのプロジェクト全体の移動のような大規模なものにまで及ぶ場合がある。

EAは公共の過程であって（項目9），環境問題が明確に理解可能であり，明らかに信頼することができ，説得力のあることが大切である。公聴会において技術的な専門知識を効果的に提示することに関する提言は，5.4.3に述べる。

社会経済上の利益と効果は常にプロジェクトの重大な要件であるが，一般に、環境研究者は，それらの要素を予測やプログラムに含めるべきではない。環境研究者はその努力を生態学的影響に集中し，専門知識の外に逸脱しないほうがよい。生態系あるいは生態系の構成要素に経済的な価値を付けようとする試みは，成功する可能性が低い。生態系における1本の木の重要性は，経済学者の費用効果

---

[51]代替案の話題については，SCOPE（1980年）によく記述されている。

「代替案の検討は，リスク評価のプロセスの中心になる。化学物質の有害性の管理において，代替案のリスクと利益は不確実であることが多いために，代替案の評価は特に困難である。最近の決定では，禁止された製品の穴を必然的に埋めることになる『代用品のリスク』がより明確に考慮されている。したがって，人間の健康に対してアスベストと同様の影響をもつグラスファイバーのような代用品のリスクは，全体的な評価の一部となるべきことを，アスベスト産業の支持者および反対者が等しく議論することになる。同時に，アスベストが使用されない場合の繊維等による死亡の増加と，アスベスト使用による健康被害とそれに起因する死亡増加とが，比較される必要がある。この考察は，さらに進んで放射線保護に関する一般原則となる：*国民は放射線から保護されなければならないが，それが結果として回避される放射線よりも有害性の高い代用品を生じてはならない*（BEIR，1973年）。

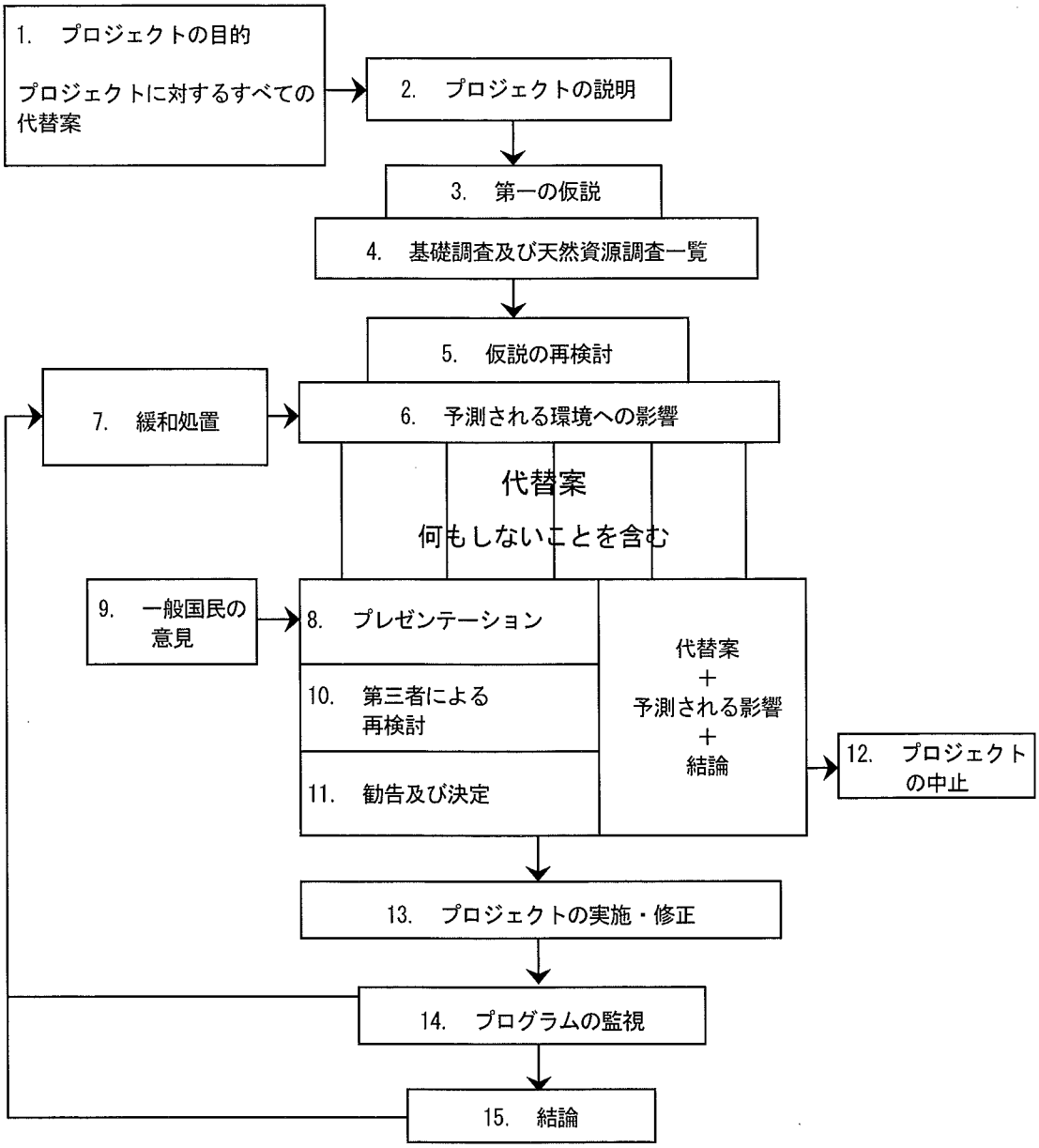


図 11 環境アセスメントの一般的なモデル
この図には，様々な出典による手順と概要が組み込まれている。

分析が環境に適用されるなら，そこから切り出された材木の価格に還元されてしまうだろう。生態系の保護を絶対的な要求と見なすほうが的確であり効果的である。

追跡監視は，水域生態系に関する環境評価には不可欠である（ラーキン，1984 年）。予測が正しくない場合もあり，予期せぬ環境の損傷を発見するための努力が必要である。もし，予期せぬ環境の損傷が発見された場合には，EA の再検討の過程が必要である（図 11）。環境に対する影響の判定基準は，予測と対応する決定的な量的限界（例えば，廃水の混合域の外側で植生の生長が影響を受けない確率が 95%など）を定義しなければならない。次に挙げる三つの次元に関する影響が測定され，比較されるべ

きである：(1)空間的（例えば，発見された有害な影響はどの程度離れているか？）；(2)時間的（毒性の発現はいつ，どのくらいの期間発生したか？）；(3)強度（影響はどのくらい強いか？）。影響を判定するための基準は，フィールドワークが開始される前に確立される必要があり，環境に対する影響の仮説を容認または否認するために客観的な統計的方法を使用すべきである。

カナダにおける EA について，いくつかの出版物が入手可能である。ビーンランズ及びデュンカー（1983 年）による批評では，堅実な科学的実践と生態学的原理を取り入れることが強調されている。ラマムーシー及びバダルー（1990 年）による著作では，環境毒性学が強調されている。

5.4.2 毒性試験

毒性試験は，周囲の土壌や水中へと排出される廃棄物を生じるプロジェクトについて，その EA に非常に適している。毒性試験は予測的なものであり，生態学的なダメージの科学的予測を可能にする。プロジェクトの完成後，それが生態学調査によるデータと結び付けられ，予測した仮説を検証する。現場における試験が有効な場合がある（4.14.1）。

環境に排出される可能性のある化学物質の種類と量がわかっている場合には，文献から得られた毒性値を予測に使用することが可能であり，その物質の毒性をテストすることもできる。廃水の影響を，その成分からシミュレートすることも可能である。プロジェクトが既存のものに類似している場合には，その毒性が最初の近似値を与える。処理または緩和プロセスのベンチスケール試験を評価することが可能である。本書にすでに述べた一般原則は，特に 4.2 に関連して，実験室から現場における予測に適用される。

１シーズンまたは１連の状況（例えば少ない水量）が最悪の状況として特定されうる場合には，影響の予測にその状況を採用することができる。また，最悪の場合の頻度を考慮すべきである。現場検証のための毒性試験は，通常は EA の予測段階におけるのと同じ種と方法を使用する必要がある。

5.4.3 毒性情報の一般への提示

一般国民の認識と意見は，EA に関して役割を持っていることから，環境及び毒性に関する情報は，一般国民に対して明確かつ有用な形で提示される必要がある。リスクの伝達については，文献から入手できるが（USNRC，1989 年；ライス，1989 年；カスパーソン及びシュタレン，1991 年），以下の提案により，ある程度の方向付けが与えられる。

- 情報を明確かつ平易に提示する。重要な情報は理解しやすい表またはグラフで，一つの表に一種類の情報だけを示す。地図上に重ねられた毒性データは非常に効果的な場合がある。本文の要約と包括的なデータの表も，それを望む人々が利用できなければならない。
- 技術的な専門用語や接頭語を避ける。その多くは，理解可能な言葉で表現することができる。例えば，「ニジマスの 96 時間の LC50」は「平均的なマスにとって致命的」と言い換えられる。
- 言葉によっては日常的な用法で感情的な意味が加わる場合があり，例えば『毒性』がそうである。

それはしばしば『有毒』や『危険』とほぼ同義と見なされている。そのようないくつかの用語は，『生物学的影響』や『成長速度の低下』のような，感情的な付加の少ない言葉に言い換えをすることができる。他方，不快な事実をはぐらかしている印象を与える可能性のある婉曲語法は避ける。毒性ということと，それがどのように測定されるのかを定義するのがよいだろう。あらゆるものが潜在的に毒であり「投与量によって毒になる」というパラケルススの記述を，日常的な用語で表現する。例えば，オレンジジュースで魚のマスを殺せるというような日常的な例が有効である。

- 一般国民の理解は，通常は専門家のそれとは異なり，技術的な詳細よりも広い範囲を気にかける場合がある。まず，生態系の保全に関する一般的な情報を示し，その後に要求に応じて詳細を明らかにする。
- 実例の提示には説得力がある可能性がある。固有種の調査，環境化学物質，毒性学及び別の場所における実例の情報を整理する。
- 結論は簡潔かつ私情を交えずに提示し，データがそれぞれの結論をどのように支持しているのかを説明する。事実に基づく結論を，予測や仮説と区別する。反対の証拠のほうが価値がないと考えられる理由を説明する。
- 技術的・科学的な結論と環境の因果関係についての意見に留意する。プロジェクトについて社会的な意見を表明しなければならない場合には，それらは技術的な問題の後に残し，個人的な意見として述べることを明確にする。
- 聴衆の上位者のように振る舞うことを避ける。多くの人々が何らかの問題についての専門家であり，多くの人々がその問題について合理的な決定をする能力を持っている。政府あるいは産業側の語り手が『見くびっている』と人々が感じたなら，それは語り手と提示されている情報に対する反感を生じる可能性が高い。

5.5 汚染された土地のアセスメントと修復

概　要

- カナダには，カナダ環境閣僚会議が作成した全国汚染地点修復プログラム（NCSRP）がある。詳細なガイドラインは，閣僚会議から公表されている。
- **生態リスク評価**（ERA）が，特にNCSRPに関する予測手段として広く利用されている。いくつかの文書が，これについて詳細な検討を加えている。**(1)受容体の特徴化**は，毒性物質の影響を受ける可能性のある生態系の構成要素を明らかにする。**(2)有害性アセスメント**は，物質の毒性の潜在力を評価する。**(3)曝露アセスメント**は，生物が受ける可能性のある曝露量を推定する。**(4)リスクの特徴化**は，前に述べた3つの推定を組み合わせて，現実の影響の確率と大きさを推定する。
- 現場における最初の評価において，現場の構成要素に関する毒性を評価するため，標準的な試験を実施することができる。化学的測定及び生物学的調査と共に，段階的なアプローチをとることが推奨される。
- 現場の修復の際，毒性試験の最大の役割は，作業が無事終了したかどうか判断することと，その永続性を監視することである。
- 生物学的な環境指針値が，BEASTと呼ばれる手順で，五大湖及びカナダにおける他の部分の底泥について作成されている。生物の生息場所に関する物理化学特性から，汚染されていない状態での大型無脊椎動物の群集や，底泥の潜在的な毒性を予測することができる。それらの予測を観測値と

比較して，汚染の影響が明白であるかどうかを見る。英国河川局は，河川の水質について生物学的目標を設定することによって，もう一段階進めることを計画している。
- 不確実性は，修復を検討する場合，そのあらゆる段階に内在している。それぞれの段階において，安全側の選択をすることにより，その不確実性を許容することができるものの，それが『過度に安全な』結論を導く可能性もある。これを避ける１つの方法は，最もありそうなシナリオと確率論的な結果の範囲を統計的に予測する確率論的モデリングである。

カナダ環境閣僚会議（CCME）は，カナダにおける優先度の高い汚染地域，特に『見捨てられた』地点の特定・評価及び修復に対して，全国的に一貫性のあるアプローチを促進するために，1989 年に全国汚染地点修復プログラム（NCSRP）を策定した。その目標は，修復技術と現場の評価・修復の科学的な手段を開発・実証することである。

現場の修復目標は，毒性物質の濃度あるいは生物学的利用可能性を人間の健康と自然系にとって許容可能だと考えられるレベルまで低下させることである。この仕事の主たる部分は，質的な目標の設定である。NCSRP においては，この目標は問題となっている特定の地点において，重大な影響を生じないと考えられる化学物質濃度である。汚染された地点に関する暫定的な環境指針値が，緊急的な必要性に対処するために採択された（CCME，1991 年 a）。土壌に関する指針値については，5.6.4 に述べる。

NCSRP では，毒性についての情報は，一般に次の 3 つの方法で利用されている。(1)毒性データは，環境指針値を定めるための基礎になる（5.6 を参照）。NCSRP のために定められた暫定的な指針値（CCME，1991 年 a）は，地域的な背景を考慮して特定の地点に適合するようにしてあり，後に現場の評価と監視に直接用いられる。(2)毒性情報は，生態リスク評価に用いられる（5.5.1 及び 5.5.2 を参照）。(3)毒性試験は，修復前・修復中および修復後の現場の調査と監視に直接利用することが可能である（EC，1996 年 a）。

正式な指針文書は，NCSRP から入手できる。環境指針値（CCME，1991 年 a）；土地の分類のためのシステム（CCME，1992 年）；試料採取と分析（CCME，1993 年 b，c）；土壌の質の指針値を得るための計画案（CCME，1996 年 a），及び推奨される土壌質指針値（CCME，1997 年 a）。カナダ環境省は，淡水・底泥及び土壌の毒性試験の方法について，特に汚染された現場に関連して検討している（EC，1994 年 e）。

5.5.1 生態リスク評価

『生態リスク評価』（ERA）は，NCSRP に利用できる手段の一つである[52]。この節では，NCSRP の

[52]現場を評価し修復プログラムを作成するための他の主な手段としては，化学物質濃度として定められる規制と環境指針を用いることである。判定基準に従うか，あるいはリスクに基づくアプローチを用いるかという決定は，対象となる現場について行われる（EC，1994 年 e に述べられている）。比較的単純な状況では，判定基準を用いる方法で十分であり，リスク評価を行う必要はない。判定基準に基づく方法についての手順は，理解が困難ではないので，ここには特に説明しない。環境指針に基づく一般的なアプローチは 5.6 に述べる。リスク評価は，人間の健康と生態学的な面の両方があり得る。ここでは，生態学的なアプローチが中心になる。

ためのリスク評価に，環境毒性学がどのように適用されるかに焦点を合わせる。ERA は多くの注目を集めるようになっており，その手法は主なカナダの文書に記されている（CCME，1996 年 a，d，e；1997 年 a；EC，1994 年 e；1996 年 a；ゴーデ他，1995 年）。ERA の目的は，現状では，人間の健康に関連して，生態系とその構成要素に対する有害物質の潜在的な悪影響を評価することである。現場の修復に関する ERA の最終的な目標は，第一にその物質による環境に対するリスクの程度と性質を評価すること，第二に修復のために最も有効な戦略と目標を決定することである（CCME，1996 年 d）。

汚染された土地におけるリスク評価のアプローチには，次の 4 つの部分がある。その第一段階が『問題の定式化』であり，それはリスク評価に特有の段階というよりは，むしろ標準的な，あらゆる調査に要求される第一段階であると考えられる。

1. 『受容体の特性化』は，現場で毒性物質による影響を受ける可能性のある生態系の構成要素（受容体，例えば捕食性の鳥）を明らかにすることを目的とする。
2. 『有害性アセスメント』は，本質的に問題となっている物質に関する危険度の評価である。この段階は，その物質によって生じる可能性がある悪影響のタイプと大きさを評価する。この段階は，一般にその物質について入手可能な情報の調査，有害性の本質の確認，濃度・反応の関係の定式化からなり，汚染された媒体の毒性試験を含む場合もある。
3. 『曝露アセスメント』は，生物が，受ける可能性のある曝露量を推定する。この過程は，現場における毒性物質濃度と生物との接触に基づく，予測的なものになる可能性がある。これには，それぞれの毒性物質と種についての潜在的な曝露の経路，生物の生活環，そして季節的な移動の考慮が含まれる。この推定は，曝露する生物の体内負荷または生物化学的・生理学的指標を調査するという，遡及的なものになる可能性もある。
4. 『リスクの特性化』は，曝露アセスメントと有害性アセスメントを組み合わせることにより，生物に対する現実の影響の確率と大きさを推定する過程である（EC，1994 年 e）。リスクの特性化すなわち ERA の最終的な結果は，現場の様々な部分における影響リスクに関する記述，あるいは影響の確率と大きさの推定である。

生態リスク評価は，環境毒性学者にとって複雑かつ重要な主題である。ここでそれを十分に取り扱うことはできないため，特定の内容については読者には他の文書を参照することを勧める。カナダ環境省によって，包括的な紹介が行われている（EC，1994 年 e）。CCME とカナダ環境省は，特に汚染された地点に対する評価の方法と枠組みの設定を積極的に行ってきた（CCME，1996 年 a，d，e；1997 年 a；EC，1994 年 e；1996 年 a；ゴーデ他，1995 年）。USEPA（1998 年）は，米国の内外に強い影響力を持つ文書において，評価実施のための指針を定式化している。有効な方法と論評が，他からも発表されている（USEPA，1989 年 c；サター，1993 年；カラブレーゼ及びボールドウィン，1993 年）。サター（1997 年）による簡潔な一章は，プロセスの理解に役立つ。『Environmental Toxicology and Chemistry』の記事である，ブレットハウアー（1992 年）の序文とバーンズ他（1994 年）による 2 つ

の論文に，アプローチが説明されている。政策の問題は，ペイイスター及びデイ（1998 年）により編集されたワークショップの議事録に記述されている。チャップマン他（1998 年）は，関連のある安全性の要素を強調して ERA を再検討している。特に湿地のリスク評価に関する本には，重要な動植物の生息地に関するいくつかの事例研究が含まれている（ルイス他，1999 年）。OECD（1995 年 b）のワークショップによる報告は，手続のマニュアルではないが，主として欧州の専門家の合意範囲と，さらに調査が必要な領域を概説している。その簡潔な説明は，ERA に詳しくない技術者に過程を説明することを意図しており，専門家でない人々またはグループに配布するためには便利であろう。

研究者は，ERA に内在する一定の仮説，基本的な事実であるとは考えられない仮説が存在することに留意する必要がある。実際，パワー及びマッカーシー（1997 年）は，そのいくつかを「虚偽」あるいは「架空のもの」と呼び，特に以下の点に言及している。(1)結果が生物群集を保護することになるという仮説により，最も敏感な種についてのデータに基づいて評価を行うという原則；(2)慢性的・亜致死的な試験結果のデータの変動；(3)室内実験から自然の生物群集への妥当な外挿への疑問（4.1 を参照）。

ERA は，前の段落に引用した総説に記述されているように，明確な段階を備えた正式の手続である。読者は，1990 年代の環境に関する文献における，この用語の非常に不正確な使用に注意すべきである。不運なことに，報告書，出版された論文，そして会議のタイトルに『リスク評価』という言葉の『便乗』的な使用が行われていたようである。報告書が完全な ERA を説明している場合もあるが，その代わりに毒性試験，数学モデルの抽象的な展開，あるいは旧式の生物学的調査さえ記述している（それらすべてが ERA の一部だという可能性はあるが，それら自体が ERA を構成することはない）。時には『リスク評価』が，近年あまり使用されなくなっている用語である環境（影響）評価に近いプロセスを記述するために用いられている。ERA をその段階として含んではいるものの，環境評価はより広範な一連の手続である（5.4）。『リスク評価』という言葉は特定の手続を示すものであり，その使用は完全な手続が取られる場合に限定されるべきである。

いくつかの関連した議論に言及することができる。『リスク管理』は，通常は ERA に続く意思決定の過程である。特に修復について，どのような処置が取られるべきかという考察において，リスク管理は技術的な実行可能性，経済的要因，社会的・技術的・法的制約のような他の要因を包括したものでなければならない（サター，1995 年）。これは環境評価の一部であり（5.4），代替案を含む場合には『リスク・便益評価』になる可能性がある。代替案あるいは選択肢の問題は，修復については 5.3.3 で言及しており，その重要性は 5.4.1 において強調されている。

5.5.2　汚染地評価のための毒性試験

現場における汚染の程度を調査する試験には，しばしば段階的なアプローチが用いられる。第一段階では既存の情報（文献，調査等）を利用するが，毒性が存在するかどうかを判定するため，そして汚染された領域の境界を判定するために，スクリーニングテストが用いられる場合がある。カナダ環境省は，この段階に単純・急性・致死性または亜致死性の試験を推奨している（EC，1994 年 e）。

第二段階では，高い毒性の領域（『ホットスポット』）の輪郭を描き，あるいは濃度－反応の関係を得

るためにより詳細な試験が用いられる場合がある。この段階には，敏感な急性試験と亜致死性試験による決定論的な試験が含まれる。濃度－反応の情報はERAの有害性評価の段階で重要なため，決定を行う第二の試験は複数の濃度のものとなる場合があり，この試験によってLC50，EC50，IC25等を決定する。

毒性試験は，現場と汚染の歴史的な知識から，土壌・間隙水・地上水または地下水について行われる。試験のプログラムは，曝露の経路に一致するように定められる。土壌の毒性は，溶出または抽出水と水中の生物（例えばミジンコ）によって評価されるが，地上水または地下水の汚染の問題がない限り，土壌中の生物（例えばミミズまたは陸生植物）を用いるほうがよい。

いくつかの異なる毒性試験を行うことが，汚染された現場では推奨される。理論的根拠は2.3に述べたが，重大な点は異なる毒性物質が異なる種に影響を与えるのかということである。少なくとも3つの種が用いられるべきであり，カナダ環境省は一般によく知られている試験を推奨している（表9）。

カナダ環境省（EC, 1996年a）は，標準的な生物種や方法から始めることを勧めてはいないが，NCSRPは国のプログラムであり，一般的な試験であれば比較データの恩恵を受けることができる。しかしながら，種子発芽試験のような局地的な種についての追加的な試験が，現場固有の情報を提供する場合がある。同様に，時には温度，pH値，土壌の含水量を変更して追加試験を行うことが啓示をもたらす場合がある。これにより，化学物質汚染に関係のない生物のストレスを防ぎ，毒性と現場における変数との間の相関関係を明らかにすることができる。

地下水の毒性試験は，地下水が地上の生物相から大きく離れている場合には特別な考慮が必要である。地下水が地表の層へ移動するか，泉または浸出して現れている場合には，土壌や基盤を通って移動するにつれて，pH，アルカリ度，イオン平衡が大きく変化する場合がある。物質は，その親和力によって選択的に吸収または脱着される可能性がある。その結果，地表に現れた地下水の化学的なプロフィールは，深部で採取されたサンプルとは非常に異なっている場合がある。

毒性に関する情報は，化学的な研究及び生物学的な調査と統合したときに，最も効果的に利用することができる（1.2，4.4）。化学的プロフィールと毒性試験の組み合わせによって，作用する毒性物質を明らかにすることができるが，それは重要な段階である。生物学的利用可能性が，特に土壌や底泥中の粒子への分配によって，広範に変化するためである（4.12.2及び4.11.3を参照のこと）。複数の汚染物質が存在する場合には，化学物質を添加した土壌による毒性試験が，それぞれの寄与を特定するために役立つ。毒性を特定するための手順も効果的な場合がある（TIE，4.7）。

生物群集の現場におけるモニタリング比較は，実験室で測定した毒性の影響が予想通り環境に及ぶかどうかを示し，あらゆる局地的な修正の要因を実証する。この実地と実験室のデータの比較は，実際にERAにおける曝露アセスメントの一部であり，カナダ環境省はこの毒性試験の利用方法をさらに詳細に概説している（EC，1996年a）[53]。

---

[53]生物相の実地調査の役割はここでは詳細に論じていないものの，強力な事例をERAにおいて利用することができる。カーンズ及びマコーミック（1992年）は，予測的アプローチを補完するものとして

ERA が使用される場合，有害性評価の重要な段階は，閾値影響濃度（TOEC，これに関連して『ベンチマーク』と呼ばれる場合がある）を推定するために，毒性物質の濃度－反応の関係を決定することである。あるいは，この閾値が急性と慢性の割合を用いて推定される場合がある。推定された閾値と環境指針値を比較することにより，指針値自体は無影響濃度の推定値であることから，主な毒性物質が同定されたかどうかが分かる。

表 9　全国汚染地点修復プログラムに対して推奨された毒性試験（EC，1996 年 a からやや修正）

媒体	生物	エンドポイント	タイプ	出典
土壌	レタスとラディッシュの種子（*Lactuca sativa, Raphanus sativa*）	種の発芽と苗の出現	亜致死性，急性	グリーン他，1989 年
	ミミズ（*Eisenia andrei*）	死亡	致死性，急性	グリーン他，1989 年
	藻類（*Selenastrum capricornutum*）	成長の阻害	亜致死性，慢性	EC，1992 年 d
淡水の底泥	端脚類（*Hyalella azteca*）	死亡	致死性及び亜致死性，慢性	ASTM，1997 年 a
		性的成熟		
	ユスリカ（*Chironomus tentans*）	死亡	致死性，慢性	ベダール他，1992 年
	カゲロウ（*Hexagenia* spp.）	死亡	致死性，急性	ベダール他，1992 年
	藻類（*Selenastrum capricornutum*）	成長の阻害	慢性，亜致死性	EC，1992 年 d
淡水	バクテリア（*Vibrio fischrei*，以前は *Photobacterium phosphoreum*）	発光の阻害	急性，亜致死性	EC，1992 年 c
	藻類（*Selenastrum capricornutum*）	成長の阻害	慢性，亜致死性	EC，1992 年 d
	枝角類（*Daphnia magna, D. pulex*）（*Ceriodaphnia dubia*）	死亡または死亡と生殖	急性または慢性，致死性及び亜致死性	EC，1990 年 c；1992 年 a
	ニジマス（*Onchorynchus mykiss*）	稚魚の死亡	急性，致死性	EC，1990 年 a
	ヒメハヤ（*Pimephales promelas*）	死亡と幼生の成長	急性，亜致死性	EC，1992 年 b

の『トップダウン』の遡及的アプローチのメリットを示している。彼らは過去の汚染の問題について理解されている実例，例えば予測的な ERA が農薬の蓄積によって鳥の卵の殻が非常に薄くなることを予言できなかったことに言及している。

ERA の最終段階は，有害性アセスメント（毒性情報に由来する）を曝露アセスメントと結合させ，現場のリスクの特性化を行うものである。リスクの特性化を行うためには，最も被害を受ける生態系の構成要素と，主要な毒性物質及び経路を明らかにしなければならない。特性化によって，修復の緊急性や，他の地点と比較した場合の優先性について，現場の等級付けを行うための情報が提供される。

5.5.3 現場修復のための毒性試験

修復のために用いられる代替案については，常に様々なことを考慮しなければならないが，その場合，リスク評価が選択肢の決定に役に立つ（SCOPE，1975 年；1980 年）。修復は，車両交通，土壌の掘削，井戸掘り，障壁の建設，あるいは栄養・キレート剤等の添加のような，ある程度のマイナス面を含むことになる。このようなマイナス面が何らかの生態学上の有害性を生じ，毒性物質の経路を変化させる場合がある。場合によっては，修復のリスクのほうが，現場をそのままにしておくリスクよりも大きい場合がある（例えば，底泥が汚染されている港など）。代替案の考慮については，環境アセスメントに関して 5.4.1 に言及されている。

修復を進めるという決定がなされた場合，その進行を監視するために毒性試験を利用することができる。アセスメントの際に決定された毒性反応の閾値が目標となる。毒性試験によって，化学物質に関する目標達成や，現場における毒性の除去を確認することが可能となるが，この手法は化学物質が混在しており予測が困難な場合，特に有用である。並行するデータにより，毒性の低下と毒性に寄与すると考えられる物質の濃度低下とを関連づけることができる。そのような関連が見られない場合には，誤った汚染物質に焦点を合わせて修復を行っている可能性がある。その場合，それ以上の浄化費用を負担する前に，目標の再評価を行うべきである。

修復の最後に，リスクが許容できるレベルまで低下したことを確認するため，現場を化学物質レベル，毒性，そして生物群集について，もう一度徹底的に調査すべきである。確認のテストは，理想的には毒性に関するバッテリー試験を用いるべきであるが，単純な状況では，前段階で最も敏感なことが示された試験を用いることで十分な場合もある。マイヤー他（1997 年）は，PCB の除去処理が行われた現場に関する修復の達成を評価するための，土壌毒性試験の利用例を提示している。彼らはミミズによる 2 つの試験，すなわち死亡率を測定する 14 日テストと生殖を測定する 21 日テストを行っている。また，種子の発芽と根の伸びをレタスとカラスムギについて評価し，遺伝毒性（後期異常型）については，タマネギを用いて行っている。

カナダ環境省は，2 ラウンドの確認試験を推奨している（EC，1996 年 a）。第一ラウンドは修復の完成直後であり，前述の目的で行う。長期にわたる第二ラウンドは，汚染物質の満足なレベルが持続しているかどうかをチェックする。監視を開始する前に，長期的な監視目標が明確に確立されていなければならず，管理のきっかけとなる明確な決定基準を含んでいなければならない。そのような基準がなければ，修復後の監視は終わりのない無意味なものになる可能性がある（EC，1996 年 a）。カナダにおける石油・ガス施設での修復基準に関連して，毒性試験適用のための指導マニュアルが入手可能である（ゴルダー，1996 年）。

5.5.4 汚染底質修復のための生物学的指針

化学的・生物学的な2つの並行したアプローチが，オンタリオ州において汚染された底泥を評価するために使用されている。同州は，水中の底質について化学的な指針値を定めている（パーソー他，1992年）。生物学的なアプローチでは，カナダ環境省（オンタリオ地区）の研究員たちが，水域の底生生物群集の分析と底泥の毒性試験とを結び付けたシステムを開発した（レイノルドソン他，1995年）。底泥のベントス評価法（BEAST法）は，カナダ五大湖地方沿岸の底泥について，指針値を定めることを意図している。レイノルドソン他（1995年）は，五大湖のカナダ側における，「問題となるエリア」の底泥修復目標を確立することを考えている。このシステムは，「生物の生息状況及び水質因子と多変量解析を用いて，現場における底生無脊椎動物の群集構造を予測できることを実証した」（デイ他，1996年）。

BEAST法では，汚染されていない地点の底生無脊椎動物群集の構造と，底質及び水質を記述する変数とを関連させた，多変量の統計手法を用いる。その方法は，『対象となる地点がきれいな場合の』，潜在的な無脊椎動物の群集を予測するために使用される。こうして予測された群集構造が，実際に観察されたものと比較される。

同じ方法は，物理化学的な変数と関連して，汚染されていない底泥に関する毒性の発見に用いることができる。底泥の状態が，無脊椎動物群集または毒性についての予測から逸脱していれば汚染が疑われる。このようにして，現場固有の生物学的な目標について，生息地の物理化学特性に基づいて定めることができ，明白な人為改変による環境悪化についての情報を得ることもできる。

ミシガン湖と他の五大湖カナダ側沿岸における，346ヶ所の基準地点に関するデータベースが整理されており，これは主として次の3種類の情報を含む。

1. 底生無脊椎動物の群集構造。
2. 生息地に関する重要な変数。
3. 底生無脊椎動物の4つの種（*Hyalella azteca, Chironomus riparius, Hexagenia* spp.及び *Tubifex*）が示す，同じ地点の底泥に対する応答性。水やその他の物理的な影響ではなく，観察された影響の原因は底泥であることを確認するための毒性試験が含まれる。

96ヶ所の基準点についての結果が入手可能であり，現在も試料の採取計画が続けられている（レイノルドソン他，1995年）。また，27ヶ所の非汚染地域の変数が分析に含まれている。それらは底泥の性質（例えば主要な構成要素，粒径，有機物）や，現場の属性（例えば深さや水の化学的性質）を示すものである。

96ヶ所の地点における結果から，きれいな水の底生生物群集の構造と，毒性試験の反応を予測するモデルが作成されている。生物群集の構造は，水深，底泥タイプ，アルカリ度，そして栄養状態から非常によく予測される。このモデルは，現場の87%を5つの等級のいずれかに分類することに成功した。毒性試験の応答性については予測は容易ではなく，最良のモデルでもアルカリ度，主なイオン，栄養塩

類，有機物含有量，粒径及び深さ等の19もの変数を含んでいた。毒性モデルは，現場の70%を正しく分類できた。

このBEAST法の有効性は，問題となるエリアであったヒューロン湖のジョージア湾のコリングウッド港における修復評価によって実証された。オンタリオ州の指針値（パーソー他，1992年）によれば，この港は金属（銅，亜鉛，鉛，砒素及び鉄）によってかなり汚染されており，底泥の除去が考えられていた。港内の25地点の多くでBEASTにより予測された群集構成を実際に観察されたものと比較した結果，重大な損傷は示されなかった。金属濃度が非常に高い沿岸部の数ヶ所を除く多くの地点で，観測された毒性はきれいな地点における値の範囲内にあった。要するに，BEAST法は内港の数ヶ所の重点領域を除いて，費用のかかる浚渫が不要なことを示した（レイノルドソン他，1995年）。

BEAST法の技術は，試料採取計画が完了すれば適用できる。この手法には明らかなメリットがあるが，いくつかの限界もある。それは労力が大きく，ノンパラメトリック統計手法の条件を満たすために，大規模なデータベースを必要とする。また，このモデルは基準となる地点で測定された変数の範囲外には適用することができず，季節変化と年々の変化の影響については不確実である。

英国の生物指針のシステム　英国において開発された技術は，カナダのBEAST法の先駆的なものだった。英国のシステムはガイドラインを作成するために毒性データを使用しないが，生物のガイドラインについての有益な実例を提供する。英国の研究者たちは，生息地の物理化学的測定（勾配，速度，基盤，水の鉱物含有量等；ライト他，1984年；モス他，1987年；アーミテージ他，1987年）に基づいて，きれいな水域の大型無脊椎動物相を予測する方法を開発した。所定の河川における物理化学的測定の結果は，きれいな水域の生物群集を高い信頼性で予測するために，コンピュータモデル（RIVPACS）に入力される。

英国は，底生無脊椎動物の生物学的調査の結果に基づいて，水質汚染の生物指数も開発した。数十年を経て，生物指数は簡素化・単純化されて利用しやすくなった。予測のためのコンピュータプログラムは，イングランドおよびウェールズの河川水質の責任者である国家河川局（NRA）によって，生物指数とともにまとめられた（NRA，1991年）。

NRAは，水質管理の3つの面について，化学的な水質の目標と並行して生物学的システムの利用に向かって進んでいる。第一に，河川は部分的には生物指数に基づき，また部分的には化学的指針値やバクテリアの指針値に基づいた水質により分類されている。第二に，選択された生物指数の値は，河川の水質目標として用いられている。最後に，モニタリングにおいて得られた指数は，水質目標を遵守していることをチェックするために用いられている。

英国当局は，生物的・化学的なアプローチが河川の分類に一致しない場合，『生物学的最優先』を手続に組み込むことにより，システムをよりいっそう前進させた。生物の情報は，優先されることになる。現実の情報について試験を行った場合，化学的な水質目標に基づく分類と比較して，生物学的最優先は河川の分類を向上するのに大きな効果があった（NRA，1991年）。

5.5.5 不確実性の許容

現場におけるアセスメントと修復プロセスの各段階について，推定に関連する不確実性を考慮しなければならない。不確実性は，リスクの概念自体の中にも存在する（サター，1990年）。様々なアセスメント手法による結果の矛盾は避けられない（バートマスター他，1991年）。

毒性試験の実施において考えられる不確実性の第一の原因は，器具，測定，試験手順，そして解析の不正確さと非精密性から生じる。それは化学分析のような他の試験の不確実性と同様に，制御可能なエラーを意味し，可能な限り減少させるべきである。LC50のようなエンドポイントについての不確実性は95%の信頼限界で示され，すべての毒性試験に含まれるものである。結果が環境影響の判断材料とされる場合にも，試験方法の変化による不確実性をなくすことはできない。

不確実性の第二の原因は，自然の過程におけるランダムな変化であり，これは排除することができず，情報の処理における変数として処理されねばならない。

不確実性はERAの不可欠な構成要素であるから，有害性あるいは曝露量の正しくない推定が，リスクが高いか低いかの誤った推定を生じる可能性がある。リスクを過小評価することは，現場とその生態系に重大な結果を引き起こす可能性がある。通常のアプローチでは，例えばいくつかの値がある場合には，毒性の閾値の低い推定値を選択することによって，より安全側の値を採用する。

さらに優れた解決法は，確率モデルを採用することによってリスクを明確に組み込むことである。ERAの各段階における結果は，それぞれ確からしさが推定されている確率として表現される。このアイディアの最も洗練された型としては，無作為選択を利用する推計学的なシミュレーションモデルがある。インプットデータは固定された値ではなく，フィールドと実験室データに基づく分布である。モデルが実行されれば，インプットされたそれぞれの変数についての確率の範囲から一つの値を無作為に選択する。このシミュレーションが，多数回繰り返される。アウトプットされたすべての推定値が，可能性のある結果の確率分布となり，これが最もありそうな出来事と発生する可能性の範囲を示す。

確率的方法の利点はいくつかある。それぞれのデータの不確実性が考慮され，生態系リスクのより現実的な推定が与えられる。確率論的なシミュレーションは，可能性のある結果とそれぞれの確率についてのレポートを出力し，それは現場管理にとって有益となる。パラメータを固定したアプローチに内在する，過小評価の傾向が避けられる。このモデルでは，インプットされたどのパラメータが，アウトプットに最大の変化をもたらすかについて，分析を行うことができる（感度分析）。試料採取と分析については，より重要な項目に努力を向けることによって，さらに効果的に実施することができる。

この議論はERAを中心にしているが，いくつかの原則はもっと質的なアセスメントにも適用される。不確実性を許容するための最良のアプローチは，異なる方法を用いて同じ変数を測定し，複数の方法によって，確認された値に最大の信頼性を与えることである。本書にしばしば言及されているように，それを行う一つの方法は毒性の結果を，生物学調査や環境化学的情報と比較することである。生態リスク評価における不確実性の問題に関する他の情報については，EC（1994年e），サター（1990年；1993年）及び不確実性についてのワークショップの会議録（ウォーレン＝ヒックス及びムーア，1998年）を参照のこと。

5.6 環境質指針値の開発

概　要

- カナダ環境閣僚会議（CCME）は，環境の質についての指針値を定める責任を負っている。州及び地方の指針値も存在する。
- 所定の物質についてのカナダの指針値は，通常はあらゆる種類及び生活段階の生物を無期限の曝露から保護する，最大濃度である。通常はある化学物質の全体濃度が用いられるが，ある程度の確実さで可能ならば化学物質の形態を特定する場合もある。
- 水生生物のための水質指針値を決定するために，文献からの情報は，そのデータの許容性に関して格付けされる。完全な指針値を得るためには，少なくとも魚について3つ，無脊椎動物について2つ，植物について1つの生物に対する毒性推定値と，それ以外いくつかの物理化学的及び生物学的情報が必要とされる。この指針値は，カナダに生息する生物種に対するLOECの最小値の十分の一である。
- 農業に使用される灌漑用水の場合，農薬については水中の，他の化学物質については土壌中の濃度を用いて，作物に対する毒性の長期的な研究より，指針値は得られる。(a)穀類，干し草及び牧草(b)他の作物，についての指針値を得るためには，TOEC値の最小値に，係数0.1を掛ける。
- 底泥に関する暫定的な指針値について，データ解析とスクリーニングには，毒性が示される20の試験と，示されない20の試験が要求される。そのデータ値の分布が，指針値を計算するために用いられる。不確実性の高いデータについては，安全係数が使用される場合がある。完全な指針値には，底泥のタイプを毒性の結果に関連づける多くの情報を必要とする。このアプローチは『科学的根拠の重要度』または添加による底泥試験のいずれかであり得るが，添加した試験の日常的な使用が標準的な方法となろうとしている。
- 暫定的な土壌指針値は，全国汚染地点修復プログラムの要求を満たすために，既存の他の指針値から編集されたものである。現在は土壌指針値を得るためのプロトコールがあり，それは一般的なCCMEのパターンと合致している。それぞれの物質について，農業，住宅及び公園，商業，工業という土地利用の4つのカテゴリーに対する個別の指針値が得られている。
- 環境の質の目標は，その土地だけの種，季節変化，長期的な影響，他の要因によるストレスを考慮して，指針値から得られる。

環境保護のために定められる制限には，明確な形式が存在する。

- 『指針値』は，土壌・底泥または水の計画的な利用法に対応し維持するために推奨される，科学的な基礎をもつ限界濃度，あるいは宣言である。（米国及びいくつかの欧州の機関では，『指針値』の意味で『基準値』が用いられる。）
- 『目標値』は，立地特有の条件を考慮に入れ，特定の場所における土壌・底泥または水の指定された利用を保護し維持するための設定を除いては，指針値と同じに定義できる。一部の州は水質目標値のリストを設定しており，これは『公的に望ましい状態』を反映している。
- 『基準値』は，政府レベルで強制力をもつことを除いては，目標値と同様である。

5.6.1 背景

国の環境質指針値を定めることは，カナダ環境閣僚会議（CCME）とその前任であるカナダ資源環境閣僚会議（CCREM）の責任である。水生生物の保護と，農業（灌漑及び家畜への水の供給）・飲料・産業及びレクリエーションと美観のための水の利用に関する国の指針値が公布されている（CCREM,

1987年；CCME，1998年)。ダイオキシン類とフラン類に関する指針値の草案とともに，生物の組織内への残留指針値を定めたプロトコールが存在する（CCME，1996年c；1997年b)。土壌，汚染された現場，底泥について，指針値を得るためのプロトコールが作成されているが（CCME，1995年；1996年a)，一方で，暫定的または決定的な指針値を用いることができる（CCME，1991年a；1997年a；EC，1995年c)。

州は，水（例えばAEP，1978年；OMOE，1984年；B.C. MELP，1998年）または底泥（パーソー他，1992年）についての環境質指針値または目標を定めている。国際合同委員会（IJC）やプレーリー諸州水会議（PPWB）のような他の機関は，指針値または目標を持っている。カナダの諸機関のアプローチは，テイラー（1989年）により論評されている。

国の指針値は，国内の非常に多様な生物群と生態系に生物学的な悪影響を生じない，毒性物質濃度の安全側の推定を示したものである。それらは環境中の適当な物理化学的条件についての指針値を提供しており，いくつかの方法で利用することができる。調査において，指針値は，環境の条件が満足できるものであるかどうかを判断するために利用できる。監視または規制の目的では，目標または基準値を得るための基礎情報として役立つ。それらは，予測計算のために特に有用である（1.2，4.4)。例えば，指針値の限度を超えるかどうかを予測するために，測定された廃水中の毒性物質濃度を，希釈を見込んで推測することができる。設計段階では，指針値が満たされるかどうかを知るため，推定される廃水の特性を，受水域に対する影響を推定する場合の基礎とすることができる。

本章では，CCMEが環境質指針値を定めるために，毒性データをどのように利用しているかについての概略を示す。水・底泥及び土壌の質についての指針値を得るために用意されている手順について述べる。

5.6.2 水質指針値

ここでは，水生植物と作物（灌漑用水）の保護の指針値について論じる。水生植物の保護の指針値を作成するためのプロトコールは，CCREM（1987年）と，改良を加えた最新版（CCME，1991年b）に示されている。

水生生物については，プロトコールは次に示す4つの基本原則の下に作成される。

1. 大型水生生物の主要なグループは，データが入手可能であれば考慮される（藻類，大型水生植物，無脊椎動物，魚類，両生類)。データが少ない場合でも，指針値がないよりは暫定的な指針値がある方が好ましい。
2. 指針値は，あらゆる形態と段階の水生生物を無期限の曝露の下で保護することを想定したレベルで定められる。この指針値は，それが管理によって実現可能かどうかは考慮せず，科学的な基礎を基にして得られる。
3. 多くの水質項目については，単一の最大値が国の指針値として推奨される。
4. 指針値は，通常は濾過されていないサンプル中に含まれる化学物質の全体濃度に対してのものであ

る。毒性がある化学種に確実に割り当てられ，分析技術が日常的に明瞭にその化学種を確認できる場合にだけ，全体濃度のなかのある化学種にのみ適用される。

カナダの水質指針値を得るためのプロトコールには，次の 4 つの段階がある（図 12)。(他の媒体中の指針値を作成する方法にも，類似の段階がある。)

a. 再調査中の化学物質に関する物理・化学特性，環境濃度，運命と作用，生物濃縮の可能性，急性・慢性の毒性，遺伝毒性についての情報と，他の機関からの情報を入手するため，文献の検索を行う。環境データは，水域における化学物質の主な経路と運命を明らかにするために十分でなければならない。

b. 毒性（表 10）と環境中の運命に関するデータについては，最低限の要求が満たされなければならない。暫定的な指針値については，その要求が満たされないデータから得ることもできる。正当な科学的な理由がある場合には，例外が許容される場合があり，例えば信頼できる急性対慢性の割合は，亜致死性テストで代用することができる。また，環境中における化学物質の主要な経路と運命が明らかにされなければならない。

c. それぞれの毒性に関するレポートは，『一次』(標準の方法を用いた信頼できる流水式試験と測定された毒性物質濃度)，『二次』(修正された方法を用いたものを含む，信頼できる止水試験）または『許容外』に分類される。最低限のデータセットとしては，指針値を導出するためには，完全でありかつ一次の試験からなっていなければならない。一次または二次試験のデータは，暫定的な指針値のために用いられる可能性もある。

d. カナダ特有の種についての亜致死性及び慢性影響の研究による最低の LOEC を，0.1 倍することにより最終的な指針値が得られる。0.1 をかけることは安全係数の適用を意味し，試験されていない種との間の感受性の相違，そして環境に対する影響を推定することが考慮されている。適用できる亜致死性及び慢性のデータが入手できない場合には，一次試験の急性 LC50 または EC50 の最小値を急性対慢性の割合で割ることによって，それがうまくいかない場合には，普遍的な適用係数をかけることによって，指針値は得られる。この適用係数は非残留性の化学物質（水中の半減期＜8 週間）では 0.05，残留性の化学物質では 0.01 である。(急性対慢性の割合及び適用係数については 4.2.1，4.2.2 を参照のこと。)

灌漑用水について，カナダのプロトコールは，作物を成長の全シーズンにわたる反復的な水の使用から保護することを意図している（CCME，1993 年 a)。このプロトコールは，水生生物のところで概説したものと類似しており，作物のために修正されたものである。指針値は，次の 2 つの主要な情報に基づいている：(1)リットル／ヘクタール・年単位の最大灌漑率；(2)作物の感受性ーヘクタール当りの活性成分キログラム〔kg(a.i.)/ha〕で表される農薬の許容適用率，および工業用・その他の化学物質の許容土壌中濃度〔mg/kg〕として測定される。

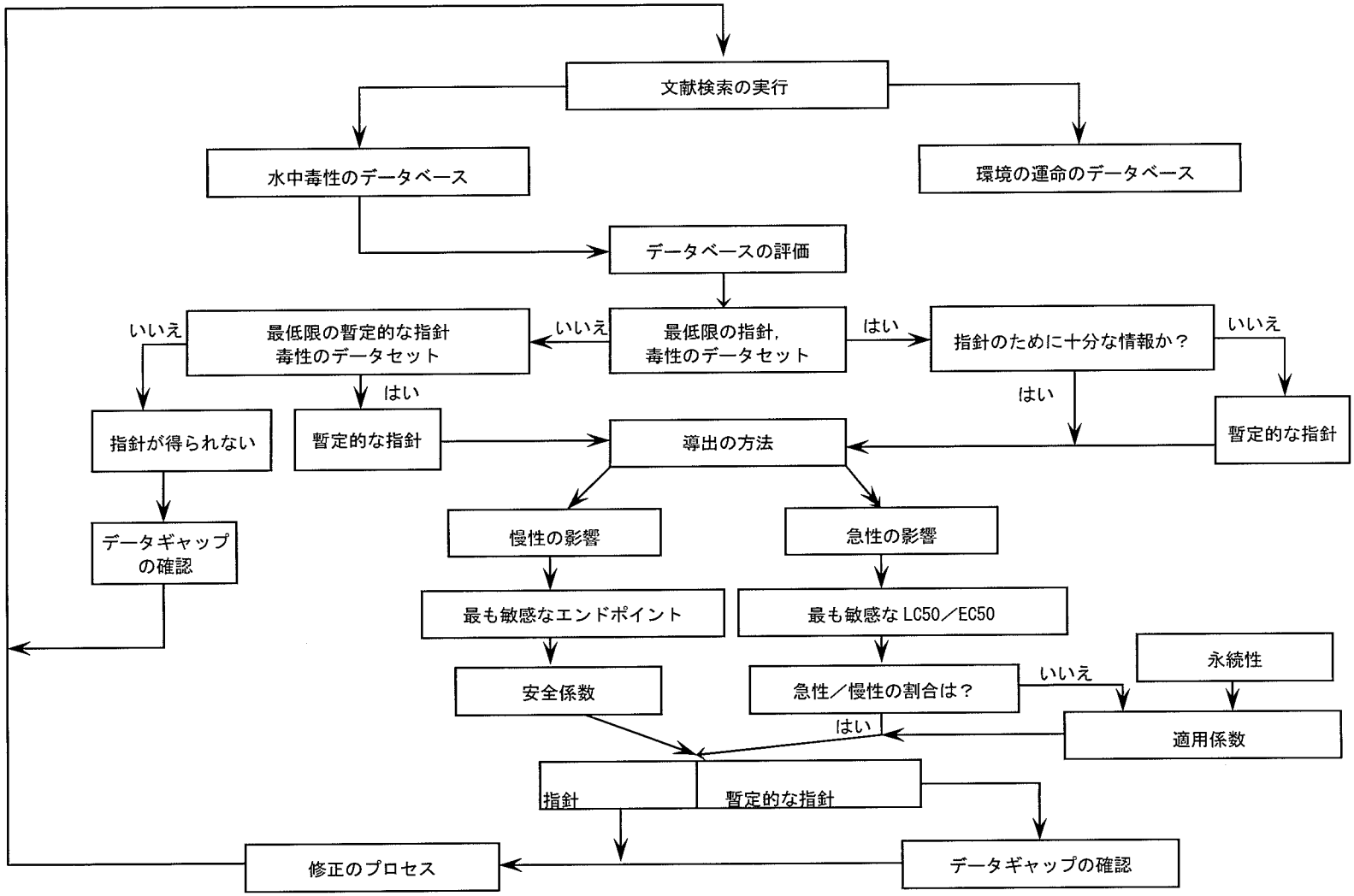


図 12　水生生物保護の水質指針値を得るためのカナダ環境閣僚会議のプロトコール（CCME, 1991 年 b より）

- 167 -

表 10　カナダの水生生物についての水質指針値を得るために要求される最低限の毒性試験（CCME, 1991 年 b より）

1. 淡水の指針値	
魚類	・少なくとも 1 つの冷たい水の種（マス等）と 1 つの暖かい水の種（ヒメハヤ等）を含む，北米に定住する 3 つ以上の淡水の種についての少なくとも 3 つの研究 ・これらの研究のうち，2 つ以上が慢性*の研究でなければならない
無脊椎動物	・異なる等級の 2 つ以上の無脊椎動物についての少なくとも 2 つの慢性*の研究，うち 1 つは北米に定住するプランクトンの種（ミジンコ等）
植物	・北米に定住する淡水の維管束植物または藻類についての少なくとも 1 つの研究 ・非常に植物に有害な化学物質については，対象外の淡水植物または藻類についての 4 つの急性または慢性の研究
2. 暫定的な淡水の指針値	
魚類	・2 つ以上の魚類についての少なくとも 2 つの急性または慢性の研究，うち 1 つは北米に定住する冷たい水の種（マス等）
無脊椎動物	・異なる等級の 2 つ以上の無脊椎動物についての少なくとも 2 つの急性または慢性の研究，うち 1 つは北米に定住するプランクトンの種（ミジンコ等）
3. 海洋の指針値	
魚類	・2 つ以上の慢性の*研究を含む，3 つ以上の温帯の海洋の魚類についての少なくとも 3 つの研究
無脊椎動物	・異なる等級の 2 つ以上の温帯の海洋の無脊椎動物についての少なくとも 2 つの慢性*の研究
植物	・温帯の海洋の維管束植物または海洋の藻類についての少なくとも 1 つの研究
4. 暫定的な海洋の指針値	
魚類	・2 つ以上の海洋の魚類についての少なくとも 2 つの急性または慢性の研究，うち 1 つは温帯の種
無脊椎動物	・異なる等級の 2 つ以上の海洋の種についての少なくとも 2 つの急性または慢性の研究，うち 1 つは温帯の種

* CCME のこれらの要求において，『慢性的』という言葉は，亜致死的な影響の観察を伴う全生活環または部分的な生活環の研究を表すために使用されている。

灌漑についての指針値は，できれば灌漑用水の長期的な研究により，カナダに生育する敏感な作物についての曝露－応答データから得られる。この方法では，TOEC に 0.1 をかけることによって，種についての最大許容毒性物質濃度（SMATC）を計算する。灌漑用水を用いた研究が少ない場合には，他の慢性的な研究による TOEC を 0.1 倍して，農薬についての『許容適用率』（キログラム／ヘクタール），もしくは他の化学物質についての『許容土壌濃度』（ミリグラム／キログラム）を得る。これらは，作物の全生長期間にわたって悪影響を引き起こさないレベルの推定値である。SMATC をマイクログラム／リットル単位で得るためには，農薬についての許容可能な適用率を，カナダにおける作物の最大年間灌漑率で割る。他の化学物質については，許容土壌濃度に，根の深

さまでの土壌1ヘクタールあたりの推定重量をかけ，それを最大年間灌漑率で割ってSMATCを得る。

どのように得られたとしても，所定の化学物質について，入手できるすべてのSMATCは2つのグループに分かれる。穀物，干し草及び牧草についてのもの；その他の作物についてのものである。灌漑用水の水質指針値は，各々のグループについて最低のSMATCを選択することによって得られる。

5.6.3 底質指針値

底質指針値を得るためのいくつかの方法には，それぞれ長所と短所があり，これらは世界中から底質に関する評価の集積を行ったマクドナルド他（1992 年）により，包括的な評価がなされている。いくつかの手法が，チャップマン（1989 年 b）及びパーソー他（1992 年）によっても再検討されている。

カナダにおける底質指針値の手順（CCME，1995 年；スミス他，1996 年 a）は，2つの手法を相補的に使用する：米国において『全米の現状と傾向プログラム』（ロング及びモーガン，1990 年）のために作成された『科学的根拠の重要度』に関するアプローチ，そしてスパイク添加した底泥による毒性試験である。理想的には，底泥指針値は底泥へのスパイク添加試験からの，詳細な濃度・反応の関係から得られる（4.11.1 を参照）。それは，修正の要因と敏感な生活段階の管理も可能にする。スパイク添加した底泥から，指針値を得るためのプロトコールが作成されているが（CCME，1995 年），そのような試験のための方法が標準化されておらず，またデータが限られているために，現在すぐに利用されるようになることはないであろう。それらの不確実性の問題が解決されるまでは，全米の現状と傾向プログラムによるアプローチの修正版が使用されるだろう。これは，様々な化学及び生物学のデータ，すなわち分配平衡，他機関による評価値，スパイクを添加した底泥毒性試験，そして実地研究の評価を含む（CCME，1995 年）。底泥中の化学物質の閾値影響濃度が計算され，底質指針値または暫定的な指針値として推奨される。

底泥の指針値を得るための4つの指導的な原則は，水のものと類似しており，最初の2つは実質的に同一である（5.6.2；項目1及び2を参照）。第一の原則は，データが入手可能であれば，あらゆる種類の生物が考慮されるというものである。第二は，指針値はあらゆる種類と段階の生物を保護することを想定しているというものである。三番目に，指針値は一般的には，乾燥重量に基づいて，底泥表層中に含有される物質の全体濃度を参照するが，修正要因の影響が分かっている場合には（例えば，全有機炭素が無極性の有機物質の毒性を変化させる），指針値は適当に修正される。第四の原則は，指針値が新たな科学的情報に照らして，定期的に再検討・再修正される，というこ

とを繰り返す。

底泥の指針値についてのプロトコールも，水に関するものと等しい。以下の順序に従って，海洋と淡水の指針値がそれぞれ作成されている（CCME，1995 年）。

a. 水の指針値と同様に（5.6.2，項目 a），物理化学的特性・運命・毒性についての情報を入手するために，文献の検索を行う。
b. 水と同様に（5.6.2，項目 b），毒性学上のデータを評価する。
c. その物質に適用できるあらゆる北米でのデータを集め，濃度の低い順に分類して表を作成する。表のそれぞれの行は，測定された化学物質濃度，場所，分析のタイプまたは手法，試験期間，測定されたエンドポイント，テストした種と生活段階，関連する生物学的影響が観察されたか，そして研究の参照からなる。入手可能なら，底泥とその直上水の特性についてのデータも要約する。
d. 毒性と環境中の運命に関するデータについては，最低限の要求が満たされなければならず，満たされない場合には，そのプロセスは停止する。暫定的な底泥指針値を得るためには，毒性についてのデータが，生物学的影響に関連する最低 20 の項目と，それ以外の 20 項目を含んでいなければならない。暫定的な指針値から完全な指針値を得るためには，暫定的な指針値を，特定タイプの底泥や，底泥およびその直上水の特性と結び付けるために，十分な情報が利用できなければならない。暫定的な指針値を得るためには，入手可能なデータによって一定の他のプロセスを利用することができるが，その場合も生物学的影響が優先される。
e. 暫定的な底質指針値について，データに対する最低限の要求が満たされている場合には，『影響』データの低濃度側 15 パーセント濃度と，『影響なし』データの 50 パーセント濃度の幾何平均として，閾値影響レベルが計算される。閾値影響レベルは，それ以下では生物学的な影響がほぼ観察されない濃度として設定される。
f. 不確実性が閾値影響レベルと関連する場合には，安全係数が適用されることがある。係数を選択するための理論的根拠と，それに関連する不確実性は，CCME（1995 年）に規定されている。他の場合には，閾値影響レベルは暫定的な底質指針値として推奨される。

スミス他（1996 年 a）は，技術データの収集方法の背景と，それらの利用の理論的根拠を提供している。それぞれの化学物質について蓄積されたデータの分析により，前述の閾値影響レベル（TEL）と，それ以上では悪影響が生じると予想された推定影響レベル（PEL）が得られる。9 種類の金属，13 種類の PAH，すべての PCB，7 種類の農薬と 1 種類のフタル酸エステルを含む，海洋底泥中に含まれる 31 物質に関して，化学物質データは，TEL 及び PEL の計算を助けている。

淡水域の底泥については，8種類の金属，6種類のPAH，すべてのタイプのPCB，8種類の農薬について，計算が行われている。TELは，暫定的な底質指針値の草案として用いられている。

すべての化学物質の指針値について同様に，これらは毒性の予測でしかない。スミス他（1996年a）は，「指針値については，カナダ全土の様々な場所における実地調査によって評価されるべきである」としており，それらは毒性試験のような他の補足的な手段と共に用いられるべきであり，また指針値は，局地的な管理要因を考慮しなければ，現場の目標として直接に役立たない，と指摘している。（同じデータセット内に関する）評価では，TELが比較的優れた信頼性をもち，TELよりも低い濃度での悪影響の発生率が，10%未満であることを示している（スミス他，1996年b）。金属，PAH及び2種類の農薬については，PELは信頼性が低く，PELよりも高い濃度のとき，半分以上の場合に悪影響が見られなかった。他の3種類の農薬については，PELの信頼性は高く，高い濃度の場合，約70～85%で悪影響が観察されている（上記引用文中）。オコナー他（1998年）は，「これらの化学物質に基づく指針値は，底泥の毒性を反映していることを疑う理論的な理由が存在する」という命題から，米国全土におけるいくつかの場所の底泥について，毒性と化学的特性を比較した。彼らのデータの比較は，有望な結論を提供しているが，彼らは，指針値が「毒性の指標としてだけ用いられるべきではない」ということを推奨している。彼らは，「大量な化学物質に基づく指針値が，さらなる分析に対して有用なきっかけを与えることができる…」と考え，多数のデータを用いた最新の分析に対応するよう助言している。

5.6.4　土壌質指針値

土壌についての指針値は，汚染された地点に対する活動と密接に関連して発展し，関連情報は5.5に述べられている。暫定的な指標は，全国汚染地点修復プログラム（CCME，1991年a）による緊急の必要性に対処するために採用された。これらは，いろいろなカナダの機関における既存の指針値から編集されている。有機物質についての暫定的な指針値は，主として分析上の検出限界に基づいているが，一方，無機物質については，主としてバックグラウンドの濃度に基づいている。暫定的な指針値は，その支えとなる科学的根拠を欠いており，陸生生物に関する毒性学データに基づくプロトコールが有効になった場合，暫定指針値は，生物影響に基づく指針値によって，取って代わられると考えられる。

作成されたプロトコール（CCME，1996年a）は，土地利用の4つのカテゴリー（農業，住宅／公園用地，商業及び工業）について，指針値を得るための理論的根拠と手順を提供している。環境および人間の健康に関する指針値が並行して作成されており，2つのうちの低い方が最終的な土壌質指針値として選択される。人間の健康に関する評価は生態毒性学上のデータには依存しておらず，ここではこれ以上論じないが，プロトコールには詳細に述べられている。

影響に基づく土壌質指針値は，人間の健康または自然の群集のいずれかに対して，悪影響が予想されない濃度を示している。特定された土地利用についての指針値との比較により，よりいっそうの調査や修復の必要性と，よりいっそうの処置の規模や緊急性が示される。土壌質指針値は，他の指針値と同様，所定の場所または現場における目標値の基礎を与える。技術的およびその他の理由により，修復が実行可能ではない場合，指針値は，人間の健康と環境を保護するための土地利用制限の必要性や，その他の管理の選択肢について，指導を与えることとなる。

土壌は複雑な，様々な成分からなる媒体である。微生物から脊椎動物まで多様な生物が，直接的な接触，間隙水，土壌または汚染された食糧の摂取，汚染されたガスの吸入など，多数の経路によって土壌中の毒物に曝露される可能性がある。土壌の質について，指針値を得るための手順では，土壌の複雑性を考慮している。それはまた，CCME によって開発された標準法にも従っており，水について概説したものと類似している（5.6.2）。

・水について列挙したのと同様，他機関からの情報を含めて，毒物の物理化学的特性と毒性に関する情報を入手するため，文献レビューを行う。
・あらゆる毒性学上の報告は，使用する前に科学的信頼性について評価し，試験のデザイン，手順または分析が不適切である場合や，それらの要素を評価するための情報が不十分な場合には，適切ではないものと見なされる。
・指針値を得るための 3 つの方法に関して，少なくとも次のようなデータが要求される：好ましいものは『科学的根拠の重要性』を使用する；2 つめは LOEC に基づく，3 つめは『半数影響値』を使用する。これらの方法の選択は，毒性データのタイプと量に依存する。一般的には，少なくとも陸生無脊椎動物と陸生植物に対する毒性に関するデータが要求される。微生物過程の保護を確実にするために，土壌への接触回数は，微生物による栄養及びエネルギー循環の評価の際に考慮される。農業による土地利用については，家畜や野生生物による食物および土壌の摂取を考慮して，土壌質指針値が決定される。

地下水保護のチェックは，人間が使用可能な地下水質を維持するために必要な土壌の質を明らかにする。地下水中の有機物質の濃度は，一般的に土壌中の有機質レベルと，その有機質に結合する化合物の性質に依存する分配平衡関係によって決定される。この平衡関係は，有機物質に関する指針値決定のために考慮される。

指針値の導出には，次のような四通りの土地利用について，重要な曝露体と曝露の経路を考慮する（表 11）。

農業の土地利用については，指針値は作物を栽培し家畜を産するという主要な活動を保護する。定住もしくは移動する野生生物や自生している植物についても，農業用地を使用する可能性があるため，保護がなされなければならない。

住宅／公園用地のカテゴリーは，主として人間の住宅建設またはレクリエーションのために指定される。それはキャンプ場を含む場合もあるが，一般的に国立公園または州立公園は含まれない。

商業の土地利用は，住宅に隣接した条件（地元のガソリンスタンド等）から工業活動にほぼ等しいもの（倉庫等）にまでわたる。CCME は商業用地を，管理された区域（栽培された芝生，花壇等）を含むが，自然の区域（森等）は含まないものとして説明している。商業地において予測される生物は，住宅／公園用地のものに類似するが，土地利用としては同程度の生態学的機能を維持することは必要としない。

工業の土地利用については，その活動は農業及び住宅／公園用地の利用におけるものと，同程度には生物の保護は考慮しないものと想定される。しかしながら，CCME は，工業用地が生態学的活動の維持を怠り，汚染レベルの高い場所となることを推奨してはいない。工業の土地使用について，土壌質指針値が作成されているが，保護のレベルは低い。

5.6.5 環境質目標値の開発

国の指針値は広範に指導を与えているが，特定の現場または地域における水，底泥あるいは土壌質の保護には，それぞれの現場特有の目標が必要である。そのような目標は，広範な指針値に焦点を合わせながら，局所的な条件に合わせて修正を行う場合がある。また，経済的・社会的な要因も組み込まれる場合がある。カナダにおいては，目標を導出するための指導が，水質指針値について与えられており（CCREM，1987 年），また，米国では政策（UESPA，1984 年 a）および特定の手順（UESPA, 1994 年 e）について記述がなされている。ヴァリエラ及びウィットフィールド（1988 年）が，このことについて簡潔に再検討している。

自生種は，環境の質の目標を導出する際に考慮される最初の要因であろう。USEPA（1994 年 d）は，計算を行う場合に，自生種の代わりに毒性データを用いることによって，局所的な水質指針値を得るための手順を規定している。EPA の指針値では，種の 95%を保護することを想定しており，最も敏感な 5%の種を保護しようとした場合には，さらに厳しい目標値が必要となる可能性がある。例えば，USEPA の方法では，コロラド川のアンモニアについての目標を得るために，アンモニアに高い感受性をもつ小型魚類のジョニー・ダーターが使用されたが，事前にアンモニア耐性の試験

はなされていなかった（ニンモ他，1989 年）。

表 11　土地利用の 4 つのカテゴリーについての土壌の質の判定基準を得る上で考慮される曝露の経路と生態学的な受容体（CCME，1996 年 b）

	土地利用			
曝露の経路	農業	住宅／公園用地	商業	工業
土壌の接触	土壌の栄養循環プロセス 土壌無脊椎動物 作物／植物 家畜／野生生物	土壌の栄養循環プロセス 土壌無脊椎動物 植物 野生生物	土壌の栄養循環プロセス 土壌無脊椎動物 植物 野生生物	土壌の栄養循環プロセス 土壌無脊椎動物 植物 野生生物
土壌と食物の摂取	草食動物			

水の物理化学的特性は，対象とする物質の生物学的利用可能性や毒性に影響する可能性がある。一つの実例は，金属が有機物質と結合している場合における，水中金属の毒性低下であろう。（その場所の水が非常な軟水である場合には金属の毒性の上昇が生じる可能性があるが，その効果は最新の判定基準では考慮に入れられている。）

季節変化も，質的な目標設定において考慮すべき問題である。金属と結合した有機物のように，毒性反応を和らげる変数が変動する可能性がある。重要な生物種や，その生活段階の季節的な変動もあり得る。目標値の季節的な調節はあまり行われるべきではなく，必ず慎重に行うことが勧められる。移動・繁殖の季節や，敏感な生活段階の間は，目標値を厳しくすることを考慮する。魚の繁殖シーズンの終了といった理由で，設定目標値を緩和することは，生態学的な危険が伴う。

目標値の季節的な修正の一例として，CCREM の指針値（1987 年）をアンモニアの総量について修正した，ブリティッシュコロンビア州フラットヘッド川のアンモニア目標値の設定がある（マクドナルド他，1987 年）。この目標値では，(1)マウンテン・ホワイトフィッシュのアンモニアに対する敏感さ，(2)感受性に関する生活環の相違と，産卵及び養育期の保護，(3)流量・温度及び pH の季節的な相違，を考慮しており，すべてがアンモニアの毒性と魚への曝露に影響する。結果としての目標値は，それぞれの月に固有であり，ホワイトフィッシュ，およびその他すべての敏感な種の，適切な保護を確実にしている。

毒性物質のバックグラウンドレベルは，考慮されるべきもう一つの要因であるが，それによって目標値が引き上げられることはない。歴史的な人間の干渉によって作られた，汚染のバックグラウンドレベルは，指針値を修正するための要因として用いるべきではない。カナダの指針よりも，より良い状態を保っている水・底泥または土壌の質は，低下させるべきではないことは，CCME の方

針でもある（CCME，1991年b，1993年a)。一定の低いレベルの物質に曝露された群集は，それに適応する傾向があり，そのような生物は，耐性があるように見えるかもしれないが，すべての毒性物質に対する曝露において，そのような適応を生じるわけではなく，その現象は考慮すべきではない（4.15.2を参照のこと)。

一部の低濃度物質の**累積的影響**は，長い曝露の後に初めて明らかになる場合がある〔例えば，水底に棲んでいる底泥中PAHに曝露された魚の病変(ヴァリエラ及びウィットフィールド，1988年)〕。そのような物質については，環境の質の目標は，瞬間の最大値に加えて，長期間にわたって満たされるべき値を指定する必要がある。国の指針値は，いくつかの物質については，そのような慢性的影響値について，指定を行っている。

その他のストレスの要因が，常に考慮されるべきである。これには他の毒性化学物質，あるいは極端な天候，撹乱，刈入れ，または病気が含まれる場合がある。複数の毒性物質の存在は，土壌及び底泥中では，例外というよりはむしろ通例であり，疎水性の化学物質や粒子に結合した化学物質は蓄積する傾向がある。毒性物質の種類分布が分かっている地点では，追加的な曝露の可能性を考慮して，目標に余分の許容量を組み込むこともできる。減少しつつある生物や，人間の干渉によるストレスまたは他のストレス（捕食，病気，寄生，競争）の徴候を示している生物についても，指針値値よりも厳しい安全性の限界値が正当化される場合がある。

5.7 新規物質の評価と規制

概　要

- 環境影響のリスクの概容を管理するため、「新規物質」を利用する前に行政的な評価を行う。
- カナダの規制では、毒性、残留性と生物蓄積性を予測するため必要な物理化学特性の情報と同様に、１～３種の水生生物による急性毒性試験が義務づけられている。
- 構造活性相関から予測された値と直接的な毒性試験の比較、毒性曲線、GLP（Good Laboratory Practices）と標準方法の適用に基づき、毒性データの質と有用性を評価する。
- 新規物質の環境影響を評価するために、更に必要なデータの種類を決定するためにクライテリアを活用するが、専門家の評価結果も大きな役割を果たすべきである。
- 評価のうち、確定的な環境リスク評価は一部分である。毒性情報は、環境中の非亜致死的影響（no-sublethal-effect）濃度を予測するために用いられる（**要注意濃度-concern concentration**）。**予測環境濃度**はその後に予測し、安全域を求めるためにその２つの濃度を比較する。
- 実験上の急性致死濃度の結果から要注意濃度を外挿する場合の、急性から慢性の毒性の比率としては、10 が主に用いられる。環境の条件は実際の毒性を模すことがある。

カナダ及び他の OECD 諸国（米国、欧米、日本及びオーストラリア）において、上市前の新規物質は、生態系とヒトへの健康影響の観点から規制評価を実施しなければならない。問題のある物質を市場に導入し環境に拡散する前に同定し、環境影響のリスクを事前に適正に管理することが目的である。

カナダの国内物質リストに挙げられていない物質は、カナダでは「新規」物質として取り扱う。新規物質は、CEPA（Canadian Environmental Protection Act、CEPA、カナダ環境保護法）の下で規制を行っている。カナダにおける新規の高分子（新規物質の一つのカテゴリーとして）の規則指導例は、Matheson and Atkinson(1997)によりまとめられている。他の国での取り組みについては同じ本の他の章で記述されている。(Hamilton and Sutcliffe、1997)

規則では、カナダで製造される全ての新しい物質の試験データを含む情報を特定しなければならない。行政上の細項目と規則と必要事項の行政的な記述については、カナダ環境保護法の新規物質届け出規則に準拠した、新規物質の届出、試験ガイドライン：化学物質と高分子（EC and HWC, 1993)を参照されたい。

5.7.1　データの必要条件

注意事項に必要とされる環境変数の全体のリストは望ましい試験方法とともに表 12 に示されている。生態系への影響の評価方法には、通常従来からある哺乳類の試験（齧歯類の試験のような）は含まれていない。カナダ健康局（Health Canada）が、これらのデータをヒトの健康影響の観点から評価する。毒性試験の最低限の組み合わせは、魚類またはミジンコの急性毒性試験および一定条件下での藻類を含むものである。(表 12、セクション a）

ある物理化学特性もリストに挙げられている。(表 12、セクションｃ，ｄ）環境中の物質の運命や挙動を予測するのに用いられている。また、製造過程や、生産量、使用状況、環境での挙動および親企業の情報など通常得ることが可能なその他の関係する情報を全て記述しなければならない。

5.7.2　環境毒性のデータの解釈

新規物質の生態毒性データの評価において、規制当局は限られた毒性情報を用いて、効果的にリスク評価予測を行わなければならない。評価においては毒性のみならず、環境中での化学的な運命予測や残留性、生物蓄積性を予測する分離過程等を考慮に入れなければならない。

物質本来の毒性（*Inherent toxicity*）は、物質の特性により不変の性質を持つ。Inherent は、辞書上では不活性（innate）で内在的（intrinsic）という意味で使われる。毒性は環境の質として、ICx（x%が影響を受ける濃度）または基準／ガイドラインのようなベンチマークとなる毒性値、相対的な値で示される。

毒性に加えて、*Hazard*（危険）は暴露（条件）に左右される。生態毒性においては、危険予測は潜在的に毒性のある濃度における化学物質の器官への潜在的な暴露量を考慮しなければならない。危険予測するための特殊な場合は、物質と条件設定が適切であれば、毒性物質の*摂取量*を*暴露量*に置き換える。

新規化学物質の危険を評価する第一段階は、*要注意濃度*を設定できる毒性のプロファイルを作成することである。次に*予測環境濃度*を要注意濃度と比較する。(Nabholz et al., 1993)　この方法は生態系のリスク評価における危険等価（quotient）法の原理（Suter, 1993; Calabrese and Baldwin, 1993）や、水質管理の目的を決定する過程と同等のものである。(5.6.5 節)

新規物質の評価は、限られた毒性情報に従って行うことになるが、要注意濃度の予測においては、信頼区間が広くなる（図 13)。評価の初期段階においては、環境濃度予測もまた、幅がある。情報量が多くなるにつれて、信頼区間が狭まる（図 13)。

予測環境濃度より要注意濃度が高い場合は、より安全側となる。生体リスクの観点からは、危険等価（Hazard Quotient）（予測環境濃度と要注意濃度の比）との結合の値が安全率になる。情報基盤が整うと信頼区間が狭まるため、予測安全率は向上する。(図 13 の右側)

情報の組み合わせが不適切で、予測環境濃度と要注意濃度の差が明確にできない場合は、信頼できる予測範囲を設定することができない（図 13 の左側、「非信頼限界域」’ Zone of non-confidence’)。

新規化学物質の毒性情報を解釈するにあたって、図 13 に示されたケースに配慮することは重要である。真の値の間に予測値があることを理解すること自体が試みである。真の値は、より精密に予測することは可能になるが、「正確に決定する」ということはできない。毒性情報と要注意濃度の蓋然性をチェックするための方法を次節以降に示す。

表 12　カナダ環境保護法（CEPA）に基づく新規物質の届出に必要な物理、化学及び毒性情報

必要な情報	試験方法
a. 毒性試験（化学物質とポリマー）	
魚類の急性致死試験	OECD ガイドライン 203 またはカナダ環境省法
ミジンコへの急性毒性試験	OECD ガイドライン 202 またはカナダ環境省法
藻類毒性試験（ポリマー）	カナダ環境省法または米国 EPA(1994a)
生物分解性	OECD301
b. ほ乳類の毒性試験（化学物質とポリマー）	
ほ乳類の急性毒性試験	OECD ガイドライン 401, 402, 403
皮膚刺激性	OECD ガイドライン 404
皮膚感受性	OECD ガイドライン 406
反復投与毒性	OECD ガイドライン 407, 410, 412
変異源性	OECD ガイドライン 471, 473, 474, 475
c. 物理化学試験（化学物質）	
融点	OECD ガイドライン 102
沸点	OECD ガイドライン 103
密度	OECD ガイドライン 109
蒸気圧	OECD ガイドライン 104
水溶解度	OECD ガイドライン 105
オクタノール／水分配係数	OECD ガイドライン 107
IR、UV、質量、NMR スペクトル	適切な方法
解離定数	OECD ガイドライン 112
吸着脱離（スクリーニング）	OECD ガイドライン 106
pH による加水分解性（初期試験）	OECD ガイドライン 111
分子サイズ	OECD ガイドライン 110
脂肪溶解性	OECD ガイドライン 116
d. 物理化学試験（ポリマー）	
分子量平均数	届出のガイドライン（付属資料 6）
残留物（分子量 500 未満、1000 未満）	(EC and HWC, 1993)
水溶解度	
pH による加水分解性	
UV スペクトル	
n-オクタノール溶解度	

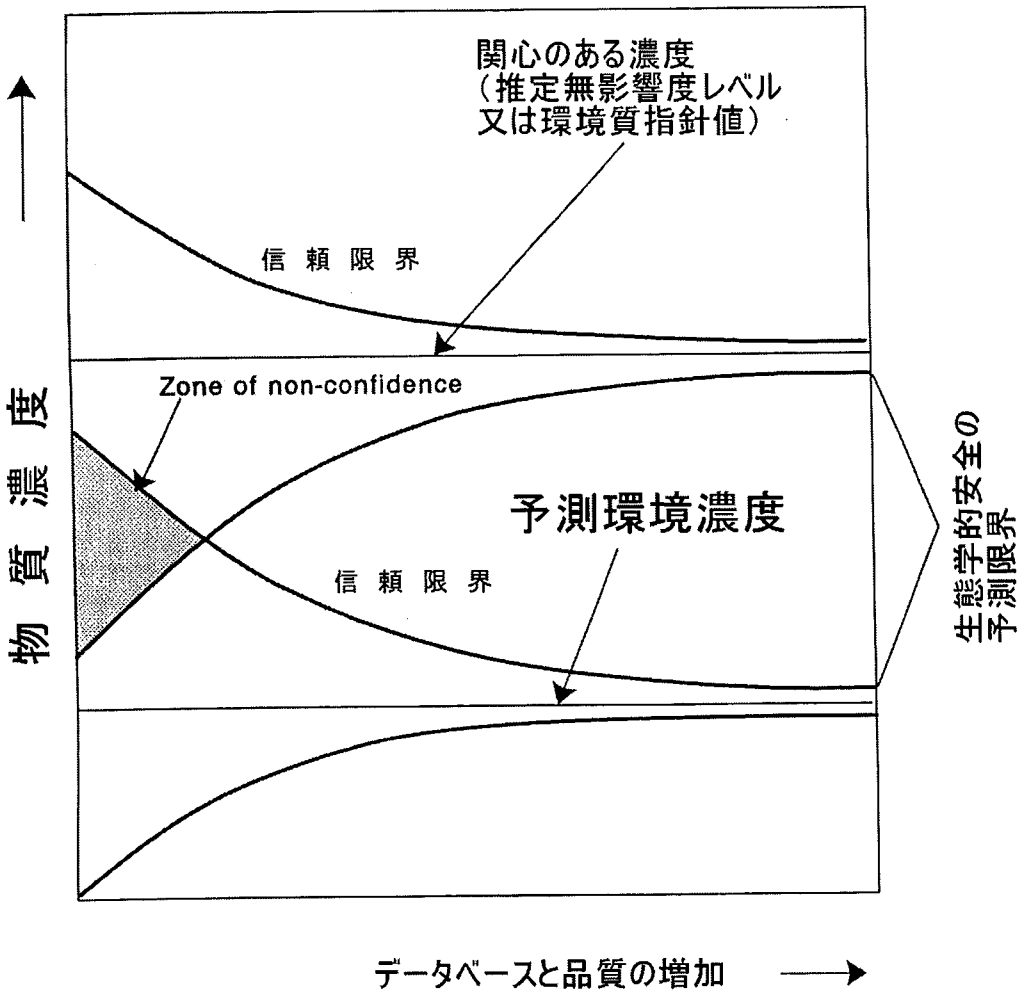


図 13　連続的なリスクアセスメント手法と予測された安全限界

この図は、基盤となる情報の量と質が増加するにつれて、要注意濃度と予測環境濃度の信頼限界が狭くなることを示している。要注意濃度は、実験的に無作用濃度、ICx、または、安全係数を考慮した環境質指針値から導出される。Cairns et al.(1978)から一部変更。

5.7.3　毒性の概略の信頼性の立証

カナダ政府の通知のスキームでは、毒性の特徴付けのために、環境毒性について３種の試験を行わなければならない。加えて、QSAR のデータも補足情報として予測に用いられる。評価者は、報告されたデータの品質が十分か確認を行う。評価者は、もし、データが適切であれば、評価者は、問題物質の自然環境中の、要注意濃度に実験結果を、外挿することが出来る。この節以降では、データの質を吟味する手法について述べる。

１．毒性試験の手法

CEPA の新規物質規制の下に提出されるデータの提出を思わないうは、GLP に関する OECD 原則、OECD

の試験方法又は他の許容可能な方法を遵守しなければならない。毒性試験は、標準化と実験施設の認証の計画に関する近年の努力を考えると、GLP に準拠する必要がある。GLP に適合しないときは、評価者は、試験の方法の詳細を審査し、実験結果が毒性評価のアセスメントのために信頼できるかどうか評価する必要がある。

個々の毒性試験の信頼性を確立するための、(GLP 以外の) 最も適切な達成度に基づく判定基準は、OECD の試験方法中 (例、EC, 1990d) や、カナダ環境省の出版物 (EC, 1990a, c; 1992d)、ガイダンス報告書 (EC, 1990d) 中に示されている。クライテリアは7つの主な分野に分けることができると考えられる。(Smrchek et al., 1993; 第3章参照)

1. 実験条件、方法
2. 水質
3. 試験時の濃度
4. 対照試験とクライテリア
5. エンドポイント
6. 用量反応関係
7. データ解析

試験の妥当性を評価する場合には、専門家により判断されなければならない。評価者は標準方法の変更がどの程度許容できるか判断しなくてはならないが、ある違反については他の項目より重点を置かれるべきこともあろう。例えば、実験時の温度が一時的に多少設定範囲からずれても試験全体の質にはあまり影響しないが、試験全体を通じて温度管理が不適切であると毒性物質の取り込み温度やストレスの増加に繋がるため、許容できない。

幾つかのキーとなるクライテリアについては、変更できない。供試物質の生物利用可能性に深刻に影響する変化は許されない。(実測してない) 設定濃度に基づく試験は、通常、許容することができない。実際の暴露濃度が間違って表現され、誤ったエンドポイントを導く可能性があるからである。人為的なエラーや装置の不備、物理化学的な特性により設定濃度からの偏りが生じる。混合物については設定された濃度の希釈が確実に行われているか確認するために特定の成分の計測を行う必要がある。揮発性物質や加水分解などにより変化する場合は、濃度計測は必須である。溶存性有機物や鉄などの外因性物質と結合しやすい化学物質の場合は、毒性物質の溶存態や生物利用性な形態を計測できる化学試験の方法を確立しなければならない。

2. 毒性の時間依存性

水生生物の急性致死試験において最も意味があるエンドポイントは、初期 LC50 すなわち、時間非依存性または閾値致死濃度である。急性の致死機能が本質的に停止するため、この LC50 は暴露時間により変化しない。(Fry, 1947) 初期 LC50 が得られるかどうかは、毒性曲線を精査することにより決定できる。(図 14) 現時点ではこのような試みは少ないが、利点があり、毒性試験の統計学的分析に関する国際ワークショップにおいても強くこのような時系列分析が薦められている (OECD, 1998a)。96 時間 LC50

は、通常大変有用で妥当な値と報告されており、多くの物質について、初期 LC50 濃度に近い値である。(Sprague, 1969) しかし、吸収が遅い物質の場合には、急性毒性の範疇を明確とするためにより長い時間が必要となる場合もある。(6.4 節)

急性致死試験は、GLP に準拠して行われていても過小評価となる場合がある。試験結果は、暴露期間の最後まで致死率が継続するかどうかを精査しなければならない。より長期の暴露により増加した致死率は、LC50 を低下させ、要注意濃度を低下させるからである。

例えば、図 14 では、毒性物質 A の場合、致死率は 96 時間までは漸近した後致死率の低下は停止し、LC50 が収束するように見え、96 時間 LC50 が、初期 LC50 の予測値、有効なエンドポイントとなる。しかし、毒性物質 B の場合は LC50 が漸近せず低下し続け、暴露時間が長くなっているように見られる。従って、96 時間 LC50 は、急性致死作用を過小評価することになる。このような差異は毒性物質への反応性によるものであり、新規物質の毒性情報を確立するために大変重要である。毒性曲線を把握し解釈できるように急性試験をデザインすることが望ましい。

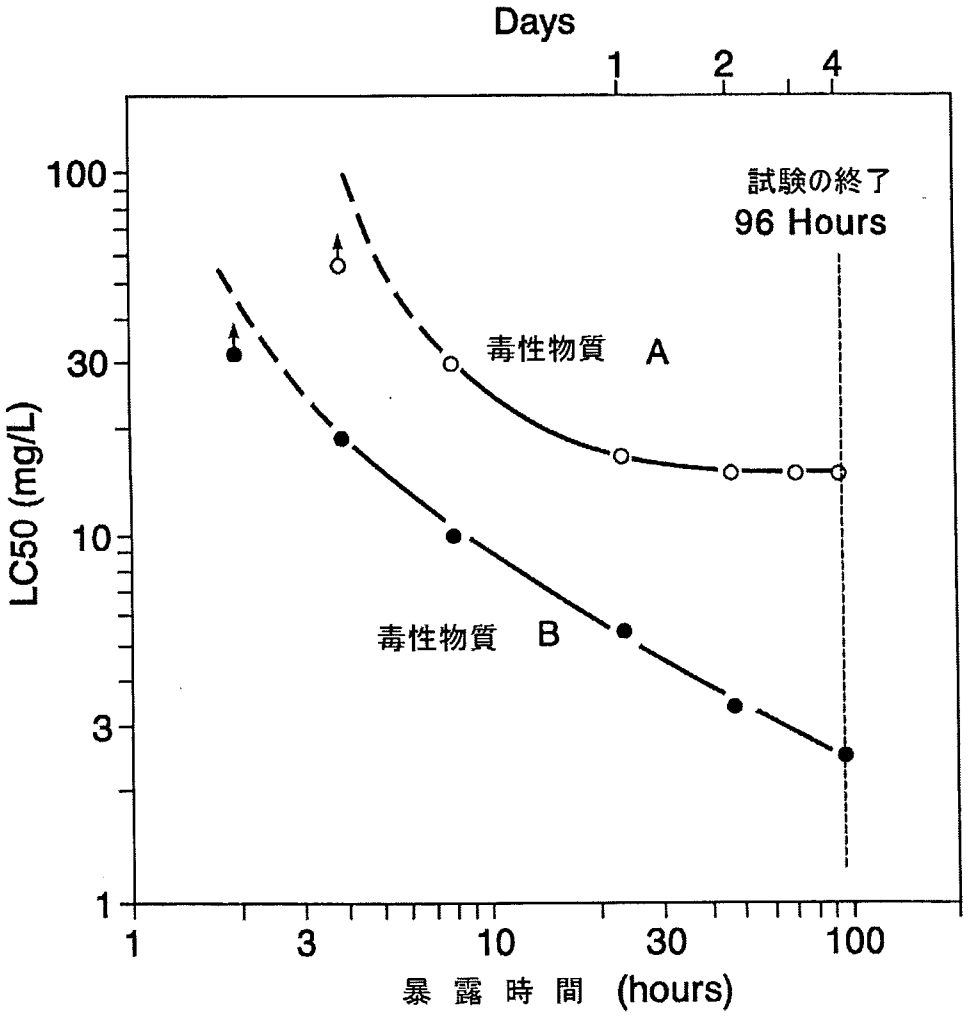


図１４　二種類の仮想的な毒性物質の毒性曲線

連続暴露時間で観察された致死率の LC50 データに、目視で近似曲線を引いたものである。

(Sprague, 1985 から引用)

3. QSAR からの予測の信頼性

QSAR (4.6.1 節参照) は、、新規物質の評価において、より必要な情報を提供できる可能性がある。CEPA では、QSAR は毒性試験の結果を補強するため又は、毒性試験を補完するために提出される。米国では、QSAR は、毒性物質管理法 (Toxic Substances Control Act) の下で、新規物質の評価により重きをおかれているが、歴史的に新規物質の初期毒性試験の必須項目とはなっていない。

OECD(1992a)は、新規物質の毒性予測 (セクション 4.6 節) に QSAR を用いる際の信頼性の判定クライテリアを示し、推奨している。OECD は QSAR において、類似の構造や作用機構を持つ化学物質により作成された QSAR への適用が可能か否かを最も重要視している。

毒性の予測における信頼性に関しても、報告する必要がある(元の QSAR に関する決定係数(r^2)など)。様々なコンピュータプログラムから QSAR を用いた毒性予測が行われるが、通常は同時に信頼性に関する記述がある (例、USEPA, 1994c)

4. 相互チェックのための QSAR と毒性計測

QSAR においては、毒性試験の結果の間接的評価を行うことができる。例えば、評価者は、計測された LC50 が QSAR に沿っているかまたは異常値であるかどうか評価することができる。一致していれば、双方の結果の客観的な信頼性が増すが、評価者は、計測された LC50 が QSAR からはずれた値である場合は、注意しなければならない。LC50 の値同士がばらつくことについては、暴露時間が過度に短いことや設定濃度が異なることなどが理由と考えられる。

毒性の計測値と QSAR 予測値が両方とも妥当と考えられるにも拘わらず大きく異なる場合は、その物質には、QSAR の予測の基礎とは別の特別な作用機序があることを示している。明確な違いがある場合は、結果が明確である LC50 の結果と矛盾することになるため、QSAR による予測に疑義があることになる。

5.7.4 今後の研究の必要性の決定

専門家による判定は環境中濃度が順当な信頼性をもって予測できるかどうかの検討においても役割を果たす。既存の毒性データが妥当と考えられた場合は、次の問題は、それらのデータが環境濃度レベルを導出するのに十分か、追加の研究が必要かを判断することである。毒性のきわめて高い物質の判定には、毒性の低い物質に比べてより多くの情報が必要だからである。

この過程を標準化するためには、決定クライテリアは、米国、ドイツ及び国際機関等により整備されている。(Walker, 1990;Greim et al., 1993; OECD, 1993a) これらの方法においては、毒性情報のみならず、環境中での難分解性や生物蓄積性などにも基づいて定められる。これは、CEPA の生態圏危険評価の原理においても同様である。最低限の情報しかなく、毒性が高く、難分解性で生物蓄積性が高い物質は、一層の検討を行わなければならない。そのため、一層の毒性情報が必要か決定するために、異

なる機関が様々な特殊なクライテリアを用いている。通常初期段階では、CEPA で要求されるのと同じ、急性毒性データが必要である。

5.7.5　要注意濃度の外挿

新規物質について実験室の一連（profile）の毒性データが承認されると、評価者はそれらのデータから、環境中の要注意濃度を導出しなければならない。その方法は、小さなデータベースでの適しているため、急性毒性と慢性毒性の比（ACR）を用いることに限られる。(ACR, またはその逆数、適用係数、4.2.1 または 4.2.2 節参照)。分布法は、より大規模のデータセットが必要である（4.2.4 節)。

通常のアプローチは、致死濃度を安全係数 10 で割り、亜急性毒性の要注意濃度を得ている。(Nabholz et al., 1993) その方法は、分配法の結果を比べることによって、ある程度正しいかどうか知ることができる。(OECD, 1992b) Calabrase and Baldwin(1993)は、取り込みの遅い物質について、急性致死毒性試験では、内部定常状態は、得ることが難しく、ACR の係数は 10 以上がより適当と指摘している。致死と亜致死的な影響において、作用機序が異なるため、画一的な ACR を用いることは適当ではない。例えば、アニリンは、ACR が明らかに大きく(OECD, 1992b)、常に QSAR から大きく外れている(OECD, 1992a)。

図 15 は、実験室のデータから、現場への外挿が、どのように非常に大きめの安全域を生み出すか、または、十分な保全が困難かを示したものである。図の左側は、仮説的な要注意濃度（実験結果から導かれた値）が、予測環境濃度に近いことを示している。しかし、現場においては、物質と錯体を作り毒性が低下し、生物利用可能性が低下するため、最終的な結果は真の安全域が増加する。図 15 の右側は、逆の場合である、高い安全域を予測していても、現場の状況により毒性が強化され、安全域が逓減する。図中の例は、複数の物質や、ストレスが同時に作用し（相乗的、必ずしも相加的以上に働くとは限らない)。例えば、重金属の場合に、軟水では毒性が増加するような場合である。

結論としては、多くの経験的な事実が、水生生物に対する急性致死毒性に外挿係数の 10 をかけた値は、環境中の亜急性毒性の安全側の閾値となる場合が多く、一般的には信頼できることを示している（4.2.1、4.2.2、4.1 節)。しかしながら、新規に評価する物質の毒性を増加又は低減させるて、ACR を大きくまたは小さくする要因が存在する可能性はある。

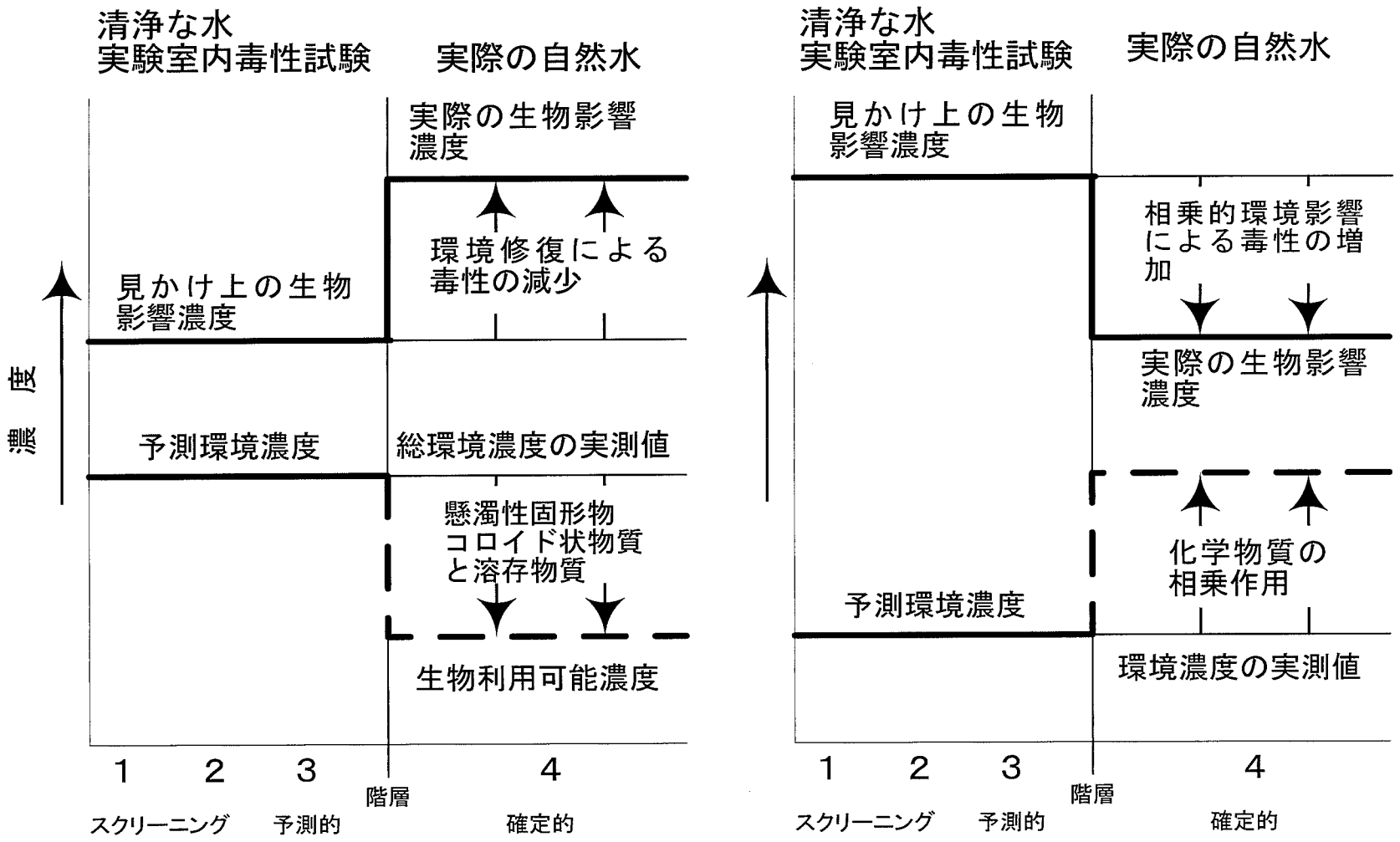


図１５　野外に実在する条件により安全の予測限界が修飾されるという仮説的状況

左図では、毒性を緩和する表流水の要因により室内実験での毒性から予測される比較的小さい限界が実際には大きくなる。右図では、対象となる汚染物質が他の環境汚染物質や環境ストレスと一致して作用するため、比較的大きな予測範囲をもつ安全限界が実際には小さくなってしまう。Cairnsら（1978）を修正。

- 184 -

5.8 カナダ環境保護法における優先物質の評価

概　要

- 優先物質リストにある物質は、CEPA 法セクション 11 に定められた「毒性」を持つか否か評価されなければならない。
- カナダ環境省は環境影響評価を行い、カナダ健康省は、ヒトへの健康リスク評価行う。
- 環境影響評価は、１）問題の定式化、２）物質の侵入、暴露と影響の解析、３）リスクの同定の 3 段階により行われる。
- 影響の特定はそれぞれの生物に対する毒性の閾値を決定する（エンドポイントの評価）これらの値は、リスク特定に用いられ、無影響値を算出するために用いられる。また、その値を予想曝露と比較して CEPA 法における「毒性」があるかどうか決定する。
- 影響の特性は、単一および複数種の毒性試験結果、現場調査、平衡分配、QSAR 等の項目の一部又はすべての科学的根拠の重要性(a weight-of-evidence)を考慮して決められる。
- 影響の特性は、環境中での物質の分配に基づき、遠洋、底性、地下水、地表面の生物を含む生態系への悪影響を考慮する。
- 不確実な範囲は、リスク同定の際に、明らかにされる必要がある

5.8.1 背景

CEPA のセクション１２では、環境健康省が優先物質リストを更新し公布しなければならないことを定めている。リストに掲載された物質については、CEPA のセクション１１の定義に従い、「毒性」があるかどうかの評価が行われる。

この章(Part)の目的として、以下のいずれかにより環境中に大量にまたは高濃度で入るまたは入る可能性がある場合は毒性があると考える。

(a)環境に短期的または長期的に悪影響を及ぼすまたは及ぼす可能性がある

(b)ヒトの生活が依存する環境に対して危害を及ぼすまたはその可能性がある

(c)カナダ国内において、ヒトの生活または健康に危害を及ぼすまたはその恐れがある。

「有毒」物質と判断されると、州（province)、産業及び一般国民からの協力を得、連邦政府が定める（可能な）影響低減化方策が必要となるリスク管理段階に入る。

5.8.2 環境評価

環境評価は非常に複雑である。環境評価においては、物質により、直接または、生態系システム全体や機能のかく乱の結果から間接的に影響を受ける、非常に数多くの種の保護を考慮しなければならない。優先物質プログラムに従って環境評価を行うために、ガイダンスマニュアルがある。(EC, 1997f)。本報

告書の5.4および5.5.1では、環境評価及び生態系リスク評価について論じている。

優先物質の環境評価は、1）問題の定式化、2）物質の侵入、暴露と影響の解析、3）リスクの特定の3段階により行われる。段階的なアプローチにおいて、効果的な意思決定に必要な改良の段階に進むための評価の一助となる。第1段階では非常に安全側に、及び第2段階では安全側で曝露と影響の予測を行い、環境に悪影響を起こしやすい物質か否かを決定する。第3段階では、一点の予測というよりむしろ、曝露と影響の分布を評価する。このような段階的なアプローチについては前述のリスク特性で示す。自然起源の物質については特別な解析を行う。

問題の定式化

経路の解析と、感受性の高い生物（受容体）の同定を行う。これは、曝露のリスクの高い生物ことであり、*評価のエンドポイント*となるものである。毒性データは、*評価のエンドポイント*について必ずしも得られるわけではないので、計測のエンドポイントを代替として用いる。計測エンドポイントは、近縁種の実験室における毒性試験または野外調査を行うことにより得られる。生態系での物質の挙動と起こりうる影響について概念的なモデルを作る。環境影響を評価するために必要なデータの不足部分は、問題の定式化の段階で分かる。

解析段階は、侵入、曝露、影響の特徴化の3段階からなる。侵入の特徴化は、カナダの環境に入る天然と人為起源、場所および、物質量を決定することである。侵入の特徴化は、物質のライフサイクルの全段階を考慮する。侵入の特徴化から集められた情報は、将来の問題の明確化に用いられる。そしてその情報が曝露の特徴化と、リスク管理段階の対策手法の立案に用いられる。曝露の特徴化の目的は、推測曝露値（EEV）または、評価のエンドポイントに対する曝露の分布を定めることである。野生生物にとっては曝露は一日摂取量または環境中濃度または組織中残留濃度で表現される。自然起源の物質については、対象地域の自然濃度を推測することが必要である。影響の特徴化の目的は、限界毒性値(CTV)または、それぞれのエンドポイントの影響の分布を決定することである。CTVは、毒性が低い物質の定量的な表現で、例えばIC25に相当するものである。影響を決定するために、単一又は多種の毒性試験、野外研究または限界体負荷が用いられる。成層圏のオゾン分解物質、地上のオゾン生成及び地球温暖化の優先物質の潜在的な影響は影響特徴化の段階で検討されるが、これらの影響は環境毒性とは直接関係はないため個々での議論は行わない。

リスクの特徴化　優先物質の環境評価の第三段階においては段階的なふるいわけを行う。第1段階では、EEVを最悪の場合を想定して推測無影響値（estimated no-effects value, ENEV）で割った値を用いる。最悪の場合のEEVは、カナダの環境中における最高濃度または推測濃度を用いる。評価エンドポイントに悪影響を引き起こす確率が極めて低い値を推測するための値を出す場合のENEVは、CTVを係数で割って算出する。もし、EEV/ENEVが1より小さかったらその物質はCEPA１１条において「毒性」がある

とは考えられない。その値が１より大きかった場合は、２段階目に入る。第２段階では、曝露と影響の解析を行い、第１段階より十分安全側で「実際的」な比を計算する、第２段階の値が１より小さければ、その物質は毒性があるとはみなされない。比が１以上であれば、評価は第３段階に進む。第３段階では曝露と影響の分布を、自然環境中の可能な効果を受けて何が起こるかの具体的な実像を得る。第３段階の評価で、評価エンドポイントを起こしやすい物質と考えられた場合は、「毒性」物質とみなされる。自然起源の物質については、特別な解析が行われる。この解析は自然のバックグラウンドを考慮に入れて行われる。また、天然のバックグラウンド濃度と天然の含有濃度の高い地域での生物が通常獲得する耐性の増加の可能性を考慮する。

5.8.3　影響の特徴化のための般的推奨事項

毒性試験においては、種の感受性の違いに対する不確実性を最小限にするために、カナダ国産または関係が深い種を用いなければならない。同様に、試験においては、カナダの環境条件で実施される必要がある。毒性影響の強さと分布、その物質に特別感受性の高い集団、群、生態系システムを把握するために、幅広い対象範囲の毒性データが必要である。物質への慢性的な暴露の可能性が有る場合は、ＣＴＶの導出に当たり、生涯のライフサイクル研究による結果を用いることが望ましい。そのようなデータがない場合は、ライフサイクルの一部の研究結果から、最も感受性の高い発達段階のデータを用いる、(OECD, 1993d)急性毒性試験の結果のみが入手可能な場合は、LC50、EC50、急性亜致死濃度 IC25 といったCTV算出の基礎として急性毒性試験の結果を用いる。

CTV導出のためには、許容できる質のデータのみを用いるために、毒試験結果は、精査されなければならない（第 3.1 節に品質保証に関する事項を記載)。可能な限り、毒性試験結果は、EC、USEPA または OECD 等の機関により標準化された試験方法を用いる必要がある。他の試験方法を用いる場合は、試験手順を十分詳細に記述し、結果の信頼性を評価する必要がある。許容できる研究がない場合は、研究を行って、必要な毒性データを獲得することになる。

毒性試験結果の不確実性の起源についても明らかにしなければならない。リスクの特徴化における要因の選択や不確実性分析において、このような不確実性は十分考慮しなければならない。

5.8.4　影響の特徴化に用いられるデータの型

通常 CTV 値は、単一種の毒性試験の結果から導出される。影響の特徴付けのために価値ある情報は、野外試験や多種試験（マイクロコズムやメソコズム)、体内負荷臨界値、構造活性相関（QSAR)、平衡係数の予測等から明らかになる。可能な場合は、これらの内、複数の方法を用いて、結果の「科学的根拠の重要性」（weight-of-evidence）アプローチによりリスクの推測を行う（4.4 節を参照）

単一種毒性試験は、（水、堆積物、土壌といった）特定の媒体中の物質の毒性を決定するには、特定の試験条件下において、非常に優れている。しかし、単一種毒性試験は、毒性と様々な化学物質の移行や分離過程を同時に研究しての統合することを考慮したものではない。自然環境中の潜在的な影響を特定する毒性試験の有用性は、結果を直接自然環境中に外挿することが出来るか、また、試験の再現性が

高いかによって変動する。(Cairns, 1992)

マイクロコズムやメソコズムを用いた野外試験と多種生物試験は、自然環境を一層模した条件で毒性影響を調べるのに用いられる、それらは、種間の相互作用により生じる二次的な結果を明らかにすることができる（OECD, 1995a、及び本書の 4.1、6.3 節）野外試験は、実験室の試験では、直接の因果関係実証が困難な混合物や排水の環境影響を評価するには特別有用である。しかし、野外や多種試験は、欠点もある。構成種が安定するまでに長い期間を要し、また一般的に、単一種の毒性試験よりも費用がかかる（USEPA, 1992a） 自然界の種の構成は維持することが困難で、試験対象の毒性物質への暴露と関わりなく絶滅したり変化することがある、(Buikema and Voshell, 1993) 地域間の差や対象区域内の環境の自然変動、不特定なストレス、対象地域の生物の移動等により毒性物質の影響を比較することが困難となる。(OECD, 1995b)

体内負荷限界値 (Critical Body Burden、CBB) は、生物体内の悪影響を引き起こす、最小組織濃度である。CBB は、生物利用可能性と生物濃縮性を考慮する際に生じる問題なく、体内負荷を直接測ることができるため、急性毒性試験のエンドポイントとして有益である。入手が可能な場合は、CBB は野外試験で得られた組織残留量や体内負荷の試験結果と比較する必要がある。このようなデータは、「科学的根拠の重要性」手法においてリスク評価の基礎や、他の明確な影響を指示するデータとして用いることができる。有機物質の CBB は、水中生物の神経性毒性と関連付けがなされており、このような概念を他の毒性発現経路について一般的に取り入れられるためには、一層研究が進められなければならない。(McCarty and Mackey, 1993, 本書 6.4 節参照)

構造活性相関（QSAR、本書 4.6 節）は、実測データがない化学物質の影響を予測するのに用いることが出来る。QSAR は、物質の物理化学特性や構造により異なる発現機序毎の物質群毎に開発されている。QSAR は、特定のグループの物質のみに適用可能である。QSAR は、問題の把握を行う中で、実測データとの関連性を補強したり、追加試験の必要性を決定したり、または、特定の CTV の選択に結果の重み付けの一部として利用するなど一時的な毒性の推測に応用できる。

平衡分配 (Equilibrium Partitioning, EqP) 手法は、疎水性、非極性、非イオン性の有機物質について、遊泳性の生物のデータを用いて底生生物や土壌に生息する生物への毒性を推測するのに用いるものである。(Di Toro et al, 1991, van de Plassche and Bockting, 1993)。物質の Kow と土壌媒体の含有有機炭素量が分かれば、水と土壌層の有機炭素と現場の生態系の間で化学平衡が成立すると仮定し計算される。また、汚染された媒体に生息する生物は遊泳性の生物と同等の感受性を持っていると仮定する。しかし、これらの仮定の不確実性があるため、手法の有用性はしばしば制限される。EqP から導出された影響値は、問題の定式化の段階でスクリーニング値として、あるいは、特定の CTV の選択するための「化学的根拠の重要性」アプローチの一部として利用するなどことができるであろう。

5.8.5 臨界毒性値の導出

CTV は、優先順位として、IC25（またはより低い濃度で十分信頼性のあるデータがある場合は IC10 等も可能。）、IC25 が利用できない場合には、最低作用濃度（LOEL）、または、IC25 や LC50 が利用できない場合は、影響濃度 LC50 等の形式となる。

試験上の仮説により NOEC/LOEC を導出するよりは、IC25 のように、数点で構成される推測値により CTV を推測することは、非常に有利である。この利点は、2.5.2 節及び 2.5.3 節において記述されている。また、多くの研究者に指摘されている。(Stephan and Rogers, 1985, Pack, 1993, Suter, 1996)

仮説の検定によって得られたエンドポイントの短所は、LOEL が試験時に選ばれた濃度の範囲に限られるという点である。LOEC は、例えば、ある試験では５％、他の試験では 50%以上の影響を示す濃度であるなど、必ずしも試験毎の影響レベルに対応していない。生存率や成長率が大きく減少しても統計的に有意でない場合もあるため、実験計画や手法が未熟であると、毒性を間違って低く見積もることがある。線の傾きのような用量反応曲線から、有益な情報は、試験の仮説の中には含まれない。最終的な欠点は、LOEL においては、信頼区間が導出できないことがある。

一方で、点推定(Point Estimates) 法は、適用範囲の全ての濃度について適用することが出来る。実験計画や手法が未熟な場合は、信頼区間が広くなるが、ICp の推測の強さには影響しない。点推定においては、ロジスティック、プロビット、または多段階といった用量反応モデルを定める必要がある。影響の予測を行うのに望ましいデータを得るために、回帰分析モデルを用いるのも優れた方法である。

以下の点は、CTV を導出するための、指針の要約である。（詳細は EC, 1997 参照）これらのどのアプローチや手法に対しても、評価者は、仮説と限界を理解し確認しなければならない。

・CTV を導出するために用いられた毒性実験データについては、信頼区間のある用量反応曲線を推測しなければならない

・推測された用量反応曲線の ICp の p 値は、内挿で推測される場合以外は 25 よりも低くてはならない。(Moore and Caux, 1997)

・一般的に、非線型回帰分析の方が、加重線形回帰解析より望ましい。濃度や用量は、特別な理由がない限り、log10 に変換して用いる。モデルの適切性は、統計的に適合性を確認し、適合しない場合（$p<0.05$）は、結果を用いることは出来ない。

・LOEL、NOEL を CTV として使う場合は、繰り返しの回数、変動、α、β、投与間隔のデータをそろえなければならない。一般的に、CTV の導出に当たっては、LOEL の方が NOEL より望ましく、TOEC は CTV の導出に用いることが出来ない。

5.8.6　対象となる生物相と環境コンパートメントの型

水生生態系の物質を評価する際に、外洋生態系のデータのほとんどは、単一種の毒性試験から導出さ

れている。このような生物の場合は、特別に多くの標準化試験方法が開発されている（3.2.1節参照）多種試験の結果及び野外試験についても、自然及び近自然状態での外洋生態系の直接、間接的な影響の特徴付けに有用である。水生環境の物質が生物に取り込まれる形態の濃度を決定することが難しい場合は、CBBを用いた手法で特に関連性が高い。

淡水、海洋及び干潟堆積物については、物質の毒性重要度を評価する方法が種々開発されている。(VKI and RIVM, 1995, 4.11 節参照)　土壌に添加した毒性試験においては、暴露される生物と添加濃度の因果関係を個々の化学物質や混合物に対して確立する。そのような添加試験結果がない場合は、結果の蓋然性手法を用いて、土壌中の物質濃度と生態系への悪影響の関係づけを行う。このような関係は、汚染物質の混合物を含む汚染土壌を実験室の試験と結びつけに基づくことができる。CCME(1995)は、Long(1992)、Long and Morgan (1990)、Long and MacDonald(1992)の研究に基づき、このような関連付け手法の検討を行っている。他の関連付け手法の形式としては、影響閾値(Apparent effects threshold, AET)手法もある。土壌の質及び化学物質および生物学的反応の情報を収集することである（USEPA, 1992c)　底生生物の群自体を評価する方法として、汚染地域と参照地域の生物相を調査する方法がある。(Diaz, 1992、La Point and Fairshild, 1992、Persaud et al 1992、Persaud et al., 1992、Reynoldson and Zarull, 1993、Reynoldson et al, 1995)。(5.8.4に記載されている内容では、EqP手法（5.8.4節）は、底生土壌相が有機炭素として0.2%以上の場合用いることができる。

地下水は生物学的に別種の群を含んでいる。細菌、原虫、ミクロおよびマクロ無脊椎動物類、特にcopepods および両生類である。(Botosaneanu, 1986、Danielopol, 1992、Marmonier et al., 1993) 地下水中の生物に対しては、毒性物質の試験方法が定められておらず細菌のミネラル化と地下水中の無脊椎動物類による毒性試験における影響の記述に限られている。(Notenboom et al., 1994)　地下水の毒性データが入手できない場合は、表流水の甲殻類が類似生物の機能に対するCTVを求めるのに用いられる（Notenboom et al., 1994、4.12.3節)

土壌生態系は、評価目的においては、植物、微生物、無脊椎動物類など生涯のうちごく一部分土壌中ですごす生物が含まれている。哺乳類や潮流、爬虫類、および両生類は、野生生物として別に試験で評価できる（次段落を参照）土壌生態系中の生物に対する影響評価については、単一種や多種毒性試験や野外試験を含むいろいろな方法がある。ミミズおよび土壌中の植物に対する毒性影響をはかる方法は開発されており（OECD, 1993, USEPA, 1985b, 4.12節参照)、生物管理国際学会においては土壌中の昆虫への影響評価を行う標準的手法がある。土壌中の生物は捕食、皮膚吸収または大気、粒子状物質の呼吸により毒性物質を吸収する。また、植物は根や葉から毒性物質を吸収する。従って、毒性試験の結果の関連性を決定する際には、物質を土壌相から分離し、生態系中の生息環境を考慮する必要がある。主に土壌中の含水中の物質に曝露する土壌生物の毒性データが不足している場合には、水生生物の毒性試験結果を用いることができる（VKI, 1994)

評価目的のためには、’野生生物’は野生の哺乳類、鳥類、両生類および爬虫類である必要がある。カナダ環境局は、マルチメディア（複数の媒体）の中で野生生物用の物質の一日摂取量を推測するモデルを開発している。因果関係が明確な場合は、野外試験はCTVを導出するにはより望ましい。野外試験

の結果が入手できない場合は、実験室のデータを用いることができ、様々な方法が、Hoffman et al., 1995がレビューを行っている。哺乳類野生毒物の評価は、人への影響を評価する実験室のデータが非常に用いられている（Hodgson and Levi, 1987）。また、米国EPAもミンク（*Mustela vison*）およびヨーロピアンフェレット（*Mustela putorius furo*）に対する試験方法を持っている。鳥類への試験方法は急性、短期接触、慢性生殖毒性、胚毒性／催奇形性、行動およびフィールド志向のものである。両生類については、標準的な試験方法はない。

野生生物については、生殖期および発達期毒性および生存率の低下のデータが必要である。直接的に集団への影響を関連付けることができるからである。内分泌かく乱作用、遺伝毒性、免疫力低下といった生化学的、または身体的不安は、野生生物の集団に重大な影響を与える。カナダ環境局の野生生物サービスは、これらの問題に対応するワーキンググループを作っている。直接的な毒性に加えて、環境評価は環境評価においては、行動様式の変化や食物の減少、生息域の現象といった間接的な影響も考慮しなければならない。

5.9 消費財の評価

概　要

- カナダ環境省の環境選択（Environmental Choice ™）プログラムは、消費者が環境影響が小さい生産品を選ぶことができるように開発された。また、環境にやさしい事業を企業内でも実践できるようにデザインされている。
- 生産品のカテゴリーにランク付けを行うことは、商品のライフサイクルを精査し採点を行う。その製品を作るのに使ったエネルギー、材料、生産時の廃棄物の質と量、廃棄における影響である。
- 毒性試験は、採点の一つの要素である。商品の試験または、工程を作るに必要な事項によっても試験が行われる。（例えば次の商品など）
- 一連の水生生物の組み合わせを用いて、一般的な目的における洗剤の致死および亜致死濃度が決まっている。現実的な試験濃度は、通常から過剰な使用量までを踏まえる。
- 衛生紙用品を生産する工場においては、製品はカナダ排水規制により規制されている。工場は、魚に対する亜致死毒性を含む様々な影響で、採点される。結果は、例えば、製品当たりの排水量と生産量の積、毒性排出係数（Toxicity Emission Factor, TEF）として表される。

カナダ環境省が作成したEnvironmental Choice ™プログラム(ECP)の目的は、環境に優しい家庭用品のガイドラインを確立することにある。ガイドラインを満たす製品は、公的にEcoLogoラベル貼付により識別でき、同種の商品に比べ環境に優しいことがわかる。このプログラムは、全ての商品の環境影響を調べることが困難な消費者に、環境影響が小さい商品を選ぶ機会を与えるものである。

このプログラムは、生産側に対しても市場原理を利用した製造工程改善の刺激を与えものである。ECPにおいては、生産過程で使われるエネルギーと材料、廃棄物量と質、使用中の廃棄など、商品のライフ

サイクルを全て考慮する。ガイドラインにおいては、一つ、またはふたつの領域についてクライテリアを設けている。他の事例では、クライテリアは関連する領域のそれぞれに設けられ、それぞれに点数付けを行い、負荷点（load point）とよばれるトータルスコアを算出する。クライテリアは、環境パフォーマンスの上位20%に入る製品が入るように作られている。クライテリアを満たす商品は、包装に、楓の葉の形の三羽の交差する鳩のデザインされたEcoLogo ™を付けることが出来る。

最も広範囲なクライテリアは、衛生紙関連商品である。ガイドラインは、トイレットペーパー、ペーパータオル、顔用ティッシュ、及びテーブルナフキンにまで及ぶ。点数付けシステムにおいては、排水の毒性、そのCOD、エネルギー消費、天然資源の利用、及び固形廃棄物の再生を考慮している。

一般用洗剤、紙製品、海洋２サイクルエンジンオイル、チェーンソー潤滑油等の毒性試験の結果は、ECPに基づき数段階に区分して行われた。次節でECPの毒性の一般的な利用方法を説明する。

5.9.1　製品評価における毒性試験

商品評価に用いる毒性試験結果は、商品の公平性や製造工程を十分吟味して慎重に用いられなければならない。一般的に２つの毒性試験が用いられる。洗剤等商品そのものを評価対象とする場合と、パルプや紙などの生産時に工場からでた排水等を評価対象とする場合である。ECPのために毒性情報を集約することは、毒性指標（Toxicity Index、4.5節）を作成することと同じ問題が出る。対象となる物質の、致死性または亜致死毒性を考慮すべきか、異なる試験の結果について相対的な重み付けを行うことができるか、排出される毒性物質全体を評価できるか、毒性の生ずる頻度と期間を考慮するかどうかという点である。

General Purpose Cleaners:一般用洗剤

洗剤の点数付けを行うための毒性試験は、基本的に第２章に示された原理に従うものである。特に、標準的方法を引用し、異なる生物分類及び栄養段階（種・目）レベルの３種またはそれ以上の種の試験の組み合わせに基づく評価を行う（例えば、細菌または藻類、無脊椎動物及び魚類）。致死及び亜致死エンドポイントを含む。致死は明らかに損失であり、洗剤は性質として、成長段階における長期的な亜致死的影響や生殖器形成や生殖率、その他健康に影響を与える。標準法のうち、７日間 *Ceriodaphnia* 試験のような試験は、致死及び亜致死エンドポイントの両方を一つの試験で評価することが出来る。

洗剤の毒性については、個々の添加物と、使い方に示された量または希釈を用いて洗剤総体の毒性試験を行う。総体の毒性レベルは、カナダ環境省セントローレンスセンターで実施された10種類の代表的製品のデータに基づく（Bermingham ら、1995）。

濃度が非常に高い場合はどのような物質でも毒性を示すので、試験濃度は妥当なものでなければならない。また、環境中で起こりえない濃度で実験することも望ましくない。濃度が非常に高いのは、流出事故の場合であるが、そのような事態は、通常時間が短く、局地的である。洗剤の毒性試験は、通常の

家庭または機関の通常の使用形態の濃度範囲で実施される。製品の使用書から算出することができる製品の通常の希釈濃度と過剰な高濃度への配慮を範囲に含める。

衛生紙製品　衛生紙製品のECPの下では、排水の毒性は、パルプ工場にとってクライテリアの一つである。手順においては、(1)連邦の排水規制に合致しない工場は、急性毒性のない場合でも、自動的にECPは不適合である、(2)資格のある工場は、非致死性の排水を流しているため、亜致死毒性により評価する。亜致死試験は、淡水域に排出する工場は、ノロマヤナギバエ（fathead minnows）により評価し、海水域や鹹水域に排出する工場は、内陸性トウゴロイワシ（silversides）により評価を行う。カナダの工場は、既に年４回排水について試験を行うことを定めているので（5.2節）、追加の試験を求めるものではない。

他の亜致死性試験は、連邦規則の下では、パルプ・製紙排水の通常モニタリングの一部である（5.2節）が、ECPには含まれていない。この他の、環境モニタリングの初期段階でのデータは、将来の紙生産プログラムに反映させたり、他の紙のプログラムの見直しに有用な可能性がある。

紙生産評価のプログラムでは、全ての毒性データは、同等に重み付けされる。エンドポイントは、亜致死毒性単位に変換される（4.3.1節）　環境に入る毒性物質の量は、検討事項の鍵となる。プログラムにおいては、McCubbin and Folke(1993)における記述を参考に、明確に排水の量を考慮する。排水毒性は、4.3.3節で論じられた標準的な毒性放出係数（Toxicity Emission Factor, TEF）により表現される。亜致死のエンドポイントに基づくものである。

$$TEF = (100/NOEC) \times (\text{排水量 } m^3 / \text{物質量 t})$$

工場の大きさにより標準化された、排水量m^3あたりの亜致死毒性物質の量により順位付けがなされる。それは、工場が排水量を減らし、排水中の濃度が上がることにより罰則が生じないように配慮するためである。例えば、工場Aにおいて、工場Bより毒性が２倍高い排水を出す（IC25となる排水の濃度%により計測するとする）と、工場Aにおいては生産品あたり水量が工場Bの半分である場合、TEFで同じランクとなる。生産品の量に対して毒性物質の排出量が同じである場合は、同等でなくてはならないためである。

生態毒性学の科学は進展し続けており、この章は研究レベルで検討されている幾つかの話題について簡単に述べる。将来的に、これら話題の成果は毒性作用機序と、見かけ上の変動の原因の説明となるものもあるだろう。その他に、日常意的な使用のための有用な新しい試験を示す課題もあるであろう。監視や調査のツールを提示する話題もある。これはこの著書の範疇から外れるものの、環境毒性学者にとって興味深いものである。事例は水生生物、特に魚を対象としたものがほとんどである。あいにく他の棲息生物と生物グループに関しての進展を扱う事ができなかった。それぞれの話題は簡単に総説されている。示唆が示されるものもあり、興味を持った読者のために出典が提供されている。

6.1　遺伝子毒性

概　説

- 通例、実験室内試験として2方法と現場調査として1方法が遺伝子的損傷性の原因となる物質の毒性を評価するのに使用された。
- 微生物試験は被検物質と遺伝物質（DNAまたはRNA）の相互作用を測定する。ミュータトックス試験とSOSクロモテストは迅速、簡便であり、環境研究での遺伝子毒性物質のスクリーニングに適している。しかしながらこれらの試験は必ずしも、複合生物における発がん性を予期するものではない。
- 催奇性についての試験は、魚類の受精と同時に開始した1ないし2週間の曝露で、孵化直後の奇形の発生を測定できる。これらの個体生物試験は、致命的な遺伝的損傷を個体レベルで測定する故に、環境で実際的な意義がある。
- 野生底棲魚類の腫瘍発生に関する奇形発生は、遺伝的影響の現場調査に有用な手段である。腫瘍は簡単に認識できるが、多くの生物学的、環境的影響要素が交絡要因となるため結果の解釈は困難である。

遺伝子毒性は生体の遺伝物質に対する損傷性を擁する物質の毒性である。致死率、再生産不能、遺伝性の変異、催奇形性（出生または孵化障害）、または発がん性（腫瘍生長、またはより前駆的な新生物性病変[55]として示すことが可能である。幾つかの短期実験室試験が現在使用可能で、特定の物質の遺伝子毒性ポテンシャルに関する関心がある場合のスクリーニングの使用に適している。

遺伝子と分子生物学の急速な進展を環境毒性の評価に関係させることが可能であり、またすべきである。環境遺伝子毒性学の背景と基礎はShugart（1995）によって実験数例とともに総説されている。背景の他の有益な総説はワークショップ関係者（Anderson *et al.*,1994）により、カナダ政府への報告書（Anderson *et al.*,1998）の中で準備されている。これらの文献は、どのようにそれらが微細な影響を記録、解説可能か、ま

[55] 「腫瘍（Tumour）」は、ウイルス作因によるものもある、多くの種類の内的外的な増殖、ならびに発がん過程によらない良性の増殖を含意する一般的用語である。新生物病変は、未分化の細胞型への先祖返りの兆候を示す代替細胞の集積である。細胞は急速かつ侵食的な増殖を受ける。毒性化学物質に起因する場合であれば、その増殖は毒性物質を除いた後も継続する。

たどのようにそれらが生態影響に対して予防的方法において使用される可能性があるかの使用可能な研究アプローチを討論している。遺伝子損傷と繁殖の成否への生態影響の関連に関する幾つかの特定の事例は、Anderson と Wild (1994) により述べられている。一例を挙げると、彼らは、1998 年末までに DNA 全量が完全に記述され、その 959 の細胞が構造と機能において理解されている生物である線虫による試験を記述している。45mM 濃度のある有機性毒性物質曝露がこれら線虫から成長可能な子孫の減少を引き起こすのに必要であった。そしてさらに 0.5mM の低濃度において遺伝性の遺伝子変化を引き起こした。

遺伝子毒性の試験は、とくに研究レベルでは非常に重要になりうる。しかしそれらは必ずしも、毒性評価、監視のすべてのプログラムに組み込まれる必要はない。この種の毒性にかなりの関心が集まっているが、おそらくは食品と大気中の汚染物質からのヒトへの遺伝的影響について一般国民が関心を持った結果としてであろう。この観点から、市民の過剰反応のあった事例がでてくる可能性がある。遺伝子毒性試験分野の中心人物のひとり、ブルース・エームス博士は相対リスクについて述べ、著述し、その中で、「・・・合成殺虫剤、その他の微量の合成化学物質ならびに工業汚染物質の可食部残存物は、重大な発がんリスクとなりそうではない・・・ (Ames,1966)」と宣言している。環境毒性学は、毒性の様式といった相対的な危険性と適当な試験がそれぞれの状況に応じて選定されるべきことに関し、幅広いながらもバランスの取れた見解を保たねばならない。

DNA/RNA に対する損傷を測定する試験、催奇形性、そして腫瘍の調査の 3 つの方法を以下に考察する。

6.1.1 DNA/RNA 損傷評価試験

この手法は被検物質と微生物または単離した真核細胞 (核を持つ高等生物細胞) 中の遺伝物質 (DNA または RNA) の相互作用を測定する。細菌を使用して、幾つかのスクリーニング試験が開発されてきた。そのもっとも有名で汎用されているものは**Ames 試験**である (Ames *et al.*,1975; Maron and Ames,1983)。それはヒスチジンアミノ酸の合成能力が欠損するように変異させたネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) の無毒性の株を使用している。したがってこれはヒスチジンを含む培地上のみで培養可能である。変異原性の被検物質は細菌細胞がヒスチジン産生可能な株に復帰する原因となり、復帰変異菌がヒスチジンを含まない培地上で細菌コロニーとなる。

Ames 試験は簡単で安価かつかなり迅速である (L'Haridon *et al.*,1993)。報じられているところでは陽性試験は、動物実験での新生物的病変とよく相関しているが、物質の相対的毒性は複合生物に対する毒性といつもよく相関するわけではない。複合生物における発がんとの関連、適合性は、試験系へのラット肝ホモジネートの添加によって増加する可能性がある。特定の PAH 類中にあるように、多くの潜在的変異原性物質が一部の肝酵素により活性体の変異原に変換される。このように、改良 Ames 試験は、変異原を産生する生物的変換を組み込んであり、複合生物での器官内での過程をよりよく反映している。

ミュータトックス試験は、正常には生物発光する細菌 *Vibrio fischeri* の暗変異を利用する。遺伝子毒性物質への曝露により変異が引き起こされ、光産生を回復するバクテリアがある。ルミノメータによる光の放出の測定で遺伝子毒性の算出ができる。測定システムは発光細菌を使用した毒性試験で使用されたものと同様で、同じ会社によって提供されている (Microbics,1993)。

SOS-クロモテストは市販入手可能である。細菌においてSOSは、細菌内のDNA損傷を修復する誘導酵素系を意味する（Walker, 1984）。クロモテストは大腸菌（*Eschrichia coli*）の酵素βガラクトシダーゼがSOS蛋白を産生する遺伝子に融合されている遺伝子組み換え株を使用する。この酵素は通常はSOS修復機構に無関係である。従って、細菌がSOS修復機構を発現させる遺伝子損傷を被った場合、βガラクトシダーゼも生産され、比色計で測定可能である（Quillardet *et al.*,1982;1985）。同時に行う細胞代謝の測定はアルカリフォスファターゼ活性に基づいており、これも比色計で測定可能である。これは細胞致死性を推定するので、あらゆる遺伝子毒性効果とも区別可能である。この試験はこのように2つの別個のエンドポイント、供試物質の遺伝子毒性を測定（βガラクトシダーゼの生産）、もう1つは毒性を測定（アルカリフォスファターゼ活性）、を提供する。

SOS-クロモテストとミュータトックス試験は両者とも環境研究における遺伝子毒性の便利なスクリーニングテストである。両者とも単純であり、数時間しかかからず、少ない試料で、簡単に定量可能である。72穴マイクロプレートを使用する事によって、SOSクロモテストにて多くの試料を処理することが可能である。両者とも間接変異原の検出にはラット肝ホモジネートを添加する試験が可能であり、Legaultら（1994）による比較研究において、環境研究のために、もっと長くかかるAmes試験に比べて両者とも有望な評価を得ている。

使用者が発色を正確に判定するのが難しく、比色分析プレートリーダーによる測定が適切と感じる場合もある。SOSクロモテストはセントローレンス河の水と底質の遺伝子毒性物質の調査に使用された（Langevin *et al.*, 1992）。SOSクロモテストの使用はWhiteとCote'（1998）により、徹底的に総説され、彼らはこの試験の半自動化法が、水系の遺伝子毒性有機汚染物の発生源や挙動に関する一般的な結果が求められている試料の試験に効果的であると結論づけている。

3つのマイクロ試験は全ていくつかの限界がある。遺伝子毒性物質の濃度はしばしば低いために、環境試料の濃縮が多くの場合必要となる。これらの試験で複合生物での発がん性を予期できるものはなく、遺伝子毒性を持つ物質を検出するスクリーニング試験として意図されている。なぜなら複合生物は変異が発現するのを妨げる防御の多くの階層を備えており、SOSクロモテストによる陽性反応（βガラクトシダーゼの産生）は単に遺伝子損傷を示すものであり、これは変異を示さない可能性がある。Ames試験とミュータトックスの陽性反応は遺伝性の変異が起こったことを示す。

いくつかの環境変異原のスクリーニング試験は様々な多細胞生物組織の分離細胞での遺伝的異常に基づくものである。**姉妹染色体交換試験（The Sister Chromatid Exchange Test）**は異なった染色体異常の頻度を供試物質の濃度の関数として数える事ができる。同様な試験が魚の細胞の分裂中の染色体異常を検索する（Kocan *et al.*, 1982）。塩基対交換の多くの生化学プローブが開発され、それらはShugartらによって総説されている（1992）。

遺伝子毒性の短期試験の多くは魚類胚のような多細胞組織を使用する（Herbert and Hansen, 1998）。あるクラスの遺伝子毒性物質は魚類ならびに両生類の細胞分裂（有糸分裂）中のDNA複製を撹乱し、赤血球中に小核の発生につながる。例えば、ある試験法は、試験溶液を新しくするまでフラスコ中で幼生イモリを12日間曝露する。試験区と対照区の動物の血液塗布標本にて1000赤血球当たりの小核の発生が計数される

(Jaylet *et al.*,1986; L'Haridon *et al.*, 1993)。両生類における遺伝子毒性試験の総説がFerrierら（1998）により提供されている。無脊椎動物、特に海産性無脊椎動物に対するDNA損傷は多くの手法で評価可能である。特に、分裂後期の異常の試験は多毛類ならびにウニで行われ、無脊椎動物での繁殖の成否が遺伝子毒性との関係において評価された（Anderson and Wild,1994; Hose,1994)。

6.1.2 催奇形性

この第2の研究手法は、新生もしくは新しく孵化した動物の形態異常（terata）の発生を計測する（Hawkins*et al.*により総説,1995)。方法は従来の単一種の毒性試験と類似している。例えば、ファットヘッドミノーの受精卵は、致死率と形態学的奇形（四肢、尾などの欠落、正常な紡錘状の身体形の欠落、ならびに活動不能; USEPA,1994b）の総計の頻度の測定をしながら孵化後4日まで曝露可能である。

同様の試験が日本メダカの胚ならびに幼生の奇形を測定する。これらは、簡単に胚が観察できる大きな半透明の卵をもつ、グッピーと同じくらいの大きさの、きわめて毒性物質に対し感受性の高い熱帯性の魚である。発生と孵化の間、卵は二週間まで曝露可能であり、機能障害、心臓の奇形、浮き袋の膨張の欠損ならびにその他の発生の変則が、生存と同じように観察される（Shi and Faustman,1989;Maety *et al.*,1991)。こういった生体個体の試験は、催奇形性の効果が発がん性と関係づけられないとしても、環境への明白な関連性がある。これらの種の成体は実験室内慢性毒性試験に使用されている。

6.1.3 腫瘍調査

第3のアプローチは悪性新生物の病変または動物の野生集団の中での発生奇形の調査である。これは毒性試験ではないが、室内実験からの予測をチェックできる生物学的調査の手段として簡単に述べる価値がある。底質に生息する魚類の肝臓腫瘍はもっとも一般的に利用され、例えば合衆国西海岸沿いの場所で英国シタビラメならびに近縁種がPAHによる底質汚染の指標として利用されている（Krahn *et al.*,1984; 1986; Malins *et al.*,1984; Overstreet,1987; Stein *et al.*,1992)。この腫瘍の指標はひどく汚染されている場所にてより大きい傾向があるが、多くの例外があり、PAHの測定濃度と関係が見られないかもしれない可能性がある。茶色カジカの皮膚と肝臓の悪性新生物の病変が、底質がPAHに汚染されているナイアガラ河の支流に観察されている（Black,1983)。

悪性新生物の病変とその他の組織病理学上の変化は、野外での遺伝子毒性影響の魅力的なバイオマーカーである。これらは簡単に識別され、きわめて感度が高いように見受けられる。しかしながら、その他の多くの影響要素は、悪性新生物の検出と発生の判断を混同させる可能性がある（遺伝子毒性の兆候でない腫瘍、もしくは単に年齢、食餌、季節によるものまたは繁殖周期；Benson and Di Giullo,1992)。土地の地域性の魚類ですら移動傾向があり、発生と底質の毒性物質の関係を低下させる事になる（Krahn *et al.*,1986)。総説がMix（1986)、HarshbargerとClark（1990）により提供されている。

6.2 小規模試験

概　説

・小規模試験は細菌、単細胞藻類、アオウキクサ、ワムシならびに他の小植物と動物を使用する。一般的に、培養が容易で、試験の感受性は、より大きな生物に匹敵する。
・主な利点は試料が少量であることである。排水の試験での採取、搬出、保存に関する費用と労力はさらに縮小可能である。実験室設備はさらに小さくできる。小規模試験は大型の敏感な試験動物の必要を減らすことになる。その利用は、生態系における影響のより正しい理解のために試験生物の適用範囲を拡大する。
・優れた小規模試験は、迅速、単純、再現性が良く安価で、あまりスペースと時間を必要としない。生物のライフサイクルは短期間であり、故に安価な慢性毒性ならびに、または亜致死毒性試験が利用可能である。それらは大規模なスクリーニングプログラムに有用である。
・小規模試験の中には即時使用、購入可能なキットに集約されたものもある。それらは生物の培養が不要で実施は簡単である。自動化の可能な試験もある。品質管理の手法が不足している可能性がある。

毒性試験において、非常に小さい生物を使用することに少なくとも４つの優れた理由がある。第一に、主な作業上の問題の一部である、いくつかの従来の試験で必要とされる大量のサンプル量の取り扱いに関する問題を軽減させる。これにより、費用、サンプリング労力、輸送、保存と取り扱い、ならびに実験室スペースと容器サイズが低減する。しばしば観察者はこれらの問題、最適試料量より少ない量で試験を実行してしまたいという誘惑に屈する問題に直面する。それにより結果の精密さが疑わしいものとなり、試験の質は低下する。

非常に小さな生物に移行する第二の明白な有利点は、魚類と複雑で明らかに鋭敏な他の生物での試験を減らす。この要因はだんだん理解されつつある。

第三の有利点は、例えば魚類に限らない幅広い範囲のタイプの野生の生物の試験の奨励である。生物の全てのカテゴリーとタイプは生態系の機能に重要であり、例えば、生態集団の長期維持に分解性細菌は鍵となる生物である可能性が高い。ある細菌はまた、集団の中で最も感度の高い生物の一つでもあり得る。こういった生物の小規模試験は結果の精度を上げる繰り返しを簡単に実行することができる。小さな生物を使う第四の利点はそれらが比較的短い生活環を持ち、故に時間単位ないし数日の曝露で慢性試験が完了する、なわち慢性亜致死影響の直接的な（従ってより正確な）見積もりが可能なことである。

その結果として、新しい試験においてより低階級の生物を使用する強い傾向がある。単細胞藻類、細菌、原生動物、小ワムシ、回虫ならびにさらに小さい生物は迅速に繁殖し極端に少量の培地で培養できる。うまく行った小規模試験は再試験しやすく、安価である傾向があり、繰り返し数を増やすことができる。これらはしばしば多くの試料を一時に処理可能であり、故に大量のサンプルのスクリーニング試験に有用である（Blaise *et al.*,1988; Dutka *et al.*,1988）。市販利用可能なキットに梱包されているものもある。これらは培養がほとんど無し、もしくは培養無しで携帯性により優れており、何ら専門技術無しで使用できるほど簡単である（Snell and Persoone *et al.*,1989a,b）。小規模試験はまた、測定者の費用と労力を削減しうる自動測定器に任せることができる利点がある。たとえば、マイクロトックス試験の様々な自動化された改造型が市販で入手可能である（Qureshi *et al.*,1998; 6.7 節）。

欠陥として考えられるのは、いくつかは比較的新しい手法であるため、質の保証と制御の方法が無いこと

が考えられる。観察者はこの欠点の可能性を考えなければならない。

小規模試験の最も完全な説明と評価はWallsら（1998）によって編集された著書の中に示され、初期の包括的な総説が入手可能である（Bitton and Dutka,1986; Dutka and Bitton,1986）。もっと専門的な総説はとしては、Environment Canadaによる有害性評価とモニタリングにおけるこれらの試験の有用性について議論するBlaiseら（1988）によるものや、New Brunswick、St. John 河の水と底質についての小規模試験のバッテリーの性能について比較したDutkaら（1988）によるものがある。

以前より知られていることであるが、多様な生物を使用した試験の推奨の流れがある一方、ほとんどいつもそれぞれの試験では一種の生物を使用したものである。こういった試験の結果が実際の集団での影響の程度を予測するというかなり優れた証拠があるが、Cairnsら（1998）は正確な予測であるという完全な保証は無いと指摘している。実際の生態系での種間の相互作用への影響のよりよい予測手段として小規模の集団の試験に関する説得力のある例を作った。微生物の集団を使用した試験が今や単一種試験と同じくらい安価に実行可能であると指摘している。実験の有効性の確認において、こういった試験は良い記録、74%の事例において生態系損害（もしくは損害の無さ）を総括して示していた。Cairnsら（1998）はその経済的、操作上の妥当性にもかかわらず幅広い使用へ小規模試験が失敗した理由を次のように推測している。「ハゲタカやラッコ」といったポピュラーな象徴に比較してこれらつまらない生物のカリスマ性が欠如している。この指摘は生態系の分類学上の構成要素よりも、ニジマスを使った試験が法的目的で引き続き強調されている点で確かだと感じられる。

6.2.1 利用可能な試験の例

この節はカナダで一般的に利用されている、もしくはルーチン使用されはじめている試験の幾つかに言及する。このような試験に関する大著（Wells *et al.*,1998）の調べることにより確認されるであろうものとして、他の利用可能な小規模試験の多くのそして様々な選択肢がある。研究者にとって興味深いであろうその本に記載されている他の手法には、生化学段階の試験もあり、イムノアッセイ（Dankwardt *et al.*,1998）、サブミトコンドリア粒子（Read *et al.*,1998）、アセチルコリンステラーゼ（Obst *et al.*,1998）といった酵素、さらに様々な生物からの組織培養による試験（Muller and Muler,1998; Denizeau,1998; Durand *et al.*,1998）が含まれている。この本はまた、様々な生物：細菌、藻類、原生動物、無脊椎動物ならびに脊椎動物に章の多くの節をあてている。

日常的に使用されている2つの小規模試験は、細菌発光試験（EC,1992c）と淡水藻類（*Selenastrum capricornutum*;EC,1992d;Blaise *et al.*,1998）の生長阻害試験のマイクロプレート版である。発光試験は細菌 *Vibrio fischeri*（以前は *Photobacterium phosphoreum*）を使用し、通常はマイクロトックス試験を利用したものであり、その開発と最適化はQureshiら（1998）とJohnson（1998）により記述されている。藻類試験の変法は開発が続けられており、市販入手可能なもののひとつは固定化藻類を備えているため、実験室での藻類培養液の保持が不要である（Persoone,1998a）。一般的な小規模の遺伝子毒性試験は6.1節に示される。

他の分野の小規模試験が使用可能、または開発中であり、多くが亜致死のエンドポイントの利点を備えている。ATP-TOX システム（Xu and Dutka,1987;Xu,1998）と藻類 ATP 毒性物質スクリーニング試験（Blaise *et al.*,1984）は、細胞増殖阻害と酵素活性に基づく類似の試験である。それらは細菌または緑藻の培地中の酵素 ATP の生産を測定する。ATP は、ルシフェリンールシフェラーゼ系（蛍の発光の酵素系）における発光により、対照との比として測定される。このようにそれは生物数、従って初期からの細胞増率を測定している。

トキシークロモテストは、細菌 *Escherischa coli* の誘導酵素β－ガラクトシダーゼの生成を測定する上で SOS-クロモテスト（6.1.1 節）に類似した水系の迅速試験である。ストレスを受けた培養細菌はβ－ガラクトシダーゼの既知の誘導因子と酵素基質を与えられ、そののちマイクロプレートウェルにて被検物質に曝露される。毒性物質はストレスからの細菌の回復を妨害し、β－ガラクトシダーゼ合成を減少させ、基質と結合した発色物質による色の変化がないことで検出される。SOS-クロモテストの利用と同様、精度の向上のために比色分析プレートリーダーが推奨される。

タムノトックスキット F とオオミジンコ IQ 試験は市販入手可能な 2 つの小規模試験であり、いろいろな鉱山廃棄物にもっとも敏感であることがカナダ政府と鉱業産業会の AETE プログラムで行われたアセスメントで証明されている（Pollutech,1996）。タムノトックスキット F はマルチウェル試験プレートで行われる 24 時間致死試験であり、小エビ（*Thamnocephalus platyurus*）の初期幼生段階を使用する。便利なことに、生物は休眠卵（シスト）で保存され、試験のための幼生を得るのに 24 時間培養されるため、実験室での保存培養液の保持の必要がない。この試験の結果はオオミジンコを使用した標準致死試験と 0.884 から 0.92 の良好な相関係数を示し、同一試験者による陽性対照物質の一連の試験にて 13.5%の変動係数が得られた（Persoone,1998b）。この試験と、同様な試験に対する背景と理論的根拠も Persoone（上記引用論文）により提供されている。IQ 試験は飢餓状態にした幼若オオミジンコを使用する。規定濃度の基質メチルウンベリフェニル—β—D—ガラクトサイド（MUF-galactoside）を加えた試験濃度にこれらが振り分けられる。生存ミジンコが基質を摂取、酵素的に加水分解し、蛍光を発する 4-メチルウンベリフェノンを生成する（Lee and Tay,1998 に手順記載）。加水分解の不全が毒性応答と見なされる。ミジンコは、蛍光発光（すなわち生存）もしくは発光無しに区分され、半数影響濃度が算出される。この試験は執筆時点では科学論文にあまり記載されておらず、鉱山廃棄物に対する性能が Pollutech（1996）により評価され、市販入手可能となった（Aqua Survey Inc.,Flemington,N.J.,USA）。**Ceriofast™**試験は、1 時間曝露のミジンコ（Ceriodaphnia dubia）の採餌の抑制を測定し、結果は、C.dubia の標準 48 時間試験と良く相関した（Jung and Bitton,1997）。

有望な**多種藻類試験（multi-species algal test）**は 5 種の藻類を 96 穴マイクロプレートにて 2 日もしくは 3 日同時曝露するものである。成長と再生産が、専用の機器を使用した蛍光のほぼ瞬間的な測定により細胞数として算定される。5 種の使用は多様な範疇の物質に素晴らしい感度を示す（SRC,1995a）。

淡水性もしくは海産性ワムシの 24 時間半数致死濃度を測定する単純な試験がヨーロッパで広く行われており、ミジンコと同等の感度を示している（Persoone *et al.*,1989;Snell and Persoone,1989a,b）。生物は休眠シストとして保存可能であり、飼育が不要である。それらは温度変化により孵化し、活性のある孵化幼生が試験される。**大きな水生細菌**（Spirillum volutans）が 2 時間曝露後の遊泳阻害の評価する他の試験に使用

される。遊泳能は通常、細菌の両極にある、観察可能な鞭毛束の回転により決定される。

6.3 マイクロコズムとメソコズムによる試験

概 説

- 真のマイクロコズム（実験生態系）は多様な種を含むのみでなく生態系の挙動を反映もするものである。マイクロコズムは実験室内のフラスコ、箱または水槽で保持可能であり、交絡要因となる環境変数を制御出来るものである。
- マイクロコズムを使用した毒性試験は意義深いものとなりうる。なぜなら、被検化学物質の挙動ならびに移送を再現するため、複数の種、それらの相互作用ならびに代謝産物の毒性を試験できる。
- マイクロコズム試験は時には単一種試験より感度が良いが、通常は類似のものである。個体数変動や種間相互作用がこの試験の感度を鈍らせる可能性がある。
- マイクロコズムは変動しやすいため、繰り返しが難しい。ルーチン試験のための標準的方法はいまだ開発されていない。マイクロコズム試験は単一種試験より場所、時間、費用そして専門的技術を必要とするものである。
- メソコズム（隔離水系）は有用な研究手段であるが、これらの大きな閉鎖系を利用した試験は監視の日常的な使用には、高価で時間がかかりすぎる。
- 水系のメソコズムは、新しい水と化学物質を供給し続けることで、構造物中で人工的な水流、または数百メートルの水路の自然の水流を再循環しうる。そういったメソコズムは比較的安定しており、複製に成功しやすく単一種試験結果の有効性の確認に有用であった。
- 陸地の区画、池、海洋での袋状の閉鎖系もしくは小さな湖もメソコズムできる。静的な水系メソコズムは繰り返しを行うと、幅広い変動を示す可能性がある。またそれら（通常）減少していく試験濃度の意味のある解析もいまだ疑問が残る。

多種集団を使用した毒性試験は、種間相互作用と結果として起こる二次的影響に対処するのを目的とする。それらは、制御された実験室試験から、自然界での汚染物質の影響へのより有効な予測を提供するべきである。残念なことに信頼性、簡便さならびに経済性のすべてを兼ね備えて日常的に使用に適するまで達していない。

「マイクロコズム」という用語は小世界もしくは生態系を含蓄し、実際に実験室または半自然条件下で保持された単純化された生物群集である。マイクロコズムは比較的小規模である。水系マイクロコズムは最大で3ないし4Lの容積で、10種以下の小甲殻類を含む微生物種を保持しているものである。（$15m^3$ほどの大きい戸外水系マイクロコズムの定義もある。）通常、集団全体は実験室内フラスコ、またはコンテナで保持される。メソコズムは水槽サイズからの数十メートル四方の陸地、池の分割区、または池そのものまでの幅がある。

6.3.1　マイクロコズム試験

制御された小集団を使用した試験は意義ある毒性評価に理想的と思えるが、現在のところ研究段階に主として使用されている。マイクロコズムは、労力と費用量ならびに小集団における挙動の不均一さの故に日常的使用での役割を得るにはほど遠い。

Cairns（1985）、Buikema と Voshell（1995）、Graney *et al.*（1995）によってマイクロコズムによる毒性試験の情報、ならびに Kimball と Levin（1985）によって複数種による試験の情報が提供されている。自然界への結果の適用性のクライテリアが Ausmus と O'Nell（1978、主に土壌系について）議論され、様々な論文が Levin と Kimball（1984）によって編集されている。土壌コアマイクロコズムの指針が利用可能である（Van Voris *et al.*, 1985;ASTM,1997a）。

定義　これらの試験システムは、多種試験、マイクロエコシステム、またはマイクロコズムと様々に呼ばれている。技術的には、数種の生物種が同時に毒性物質に曝露されるどのようなシステムも多種生物試験である（Cairns,1985）。真の意味でのマイクロコズムは自然の生態系を単純化した類似環境であり、生態系の栄養レベル、構成と挙動を反映するよう設計されているが、交絡因子となる環境変数を制御するために実験室内に設置される（Kersting,1984; Taylor and Parkinson,1988）。マイクロコズムは主要な生態系プロセスを組み入れ、個体数変動ならびに集団相互関係を行わせるものでなければならない（Van Voris ら,1985）。実際にはこれらの必要条件は理解されないまま、それ故にほとんどの多種生物系がマイクロコズムと称されている。

様々な種類のマイクロコズムが水系、土壌系の毒性試験のために開発されてきた。水系システムは、湖、湿地帯、ないし河川を模倣する止水、循環水、ときに流水系を含む。海洋のマイクロコズムはあまり一般的ではない。土壌系のマイクロコズムは水と底質または環境中から通常採取された土壌を入れた容器（フラスコ、水槽、箱）からなる。生物は現場から自然の集団として、または選別した種を導入することによって加えられる。土壌コアに基づくマイクロコズムはもともと完全な種類の生物を含んでいる（ASTEM,1997a）。石を敷いたトレーが流れの中に置かれ、30 日間無脊椎動物のコロニー生成をさせる。それから実験室内での循環流へ移す（Clements ら,1988; Pontasch ら,1989）。殺虫剤の試験のためのある標準的なマイクロコズム（Tuub,1985）は特殊な底質と栄養塩を加えた水、10 種の藻類、ワムシ、原生動物、ならびに 3 種の小甲殻類（*Daphnia,Hyalella azteca*, 種子エビ *Cypridosis*）で構成される。

毒性物質の添加法に関して幅広い裁量の余地がある。低レベルの慢性濃度、高い濃度の 1 回投与、または数回投与などが可能である。エンドポイントは濃度または種の生物量、種の群（たとえば土壌無脊椎動物）ならびに集団構成（種数、類似度指数、被捕食者と捕食者の関係、ならびに違った群の比率または支配種のその他の測定）の変化を含む。複雑なマイクロコズムではそれらの変数はそれぞれの栄養レベル、分類上の群または在来種（たとえば水と底質）毎に測定可能である。群集レベルの推移は特に 1 次ならびに 2 次生産、分解、群集の代謝と同様、ときに容易に測定できる（Buikema and Voshell,1993）。表流水試料中の固有の微生物群集は、迅速かつ安価であると主張される実験室内試験にて 95 の異なった炭素源を酸化する能力を評価された（Lehman ら,1997）。

利点と欠点　マイクロコズム試験は単一種試験に対し潜在的有利点を多く持っているかもしれない。多くの種に対する直接的な毒性に加え、マイクロコズムは、ある種の行動、移送、毒性物質の運命、代謝物から発生するどのような毒性をも評価することができる。それらは制御され、操作され、再現されうる。適度に現実に似せたマイクロコズムが自然の包括的生態系の反応を模倣可能である（Buikema and Voshell,1993）、そして、結果の自然への適用可能性は、現実的模型、特に種相互間の相互関係次第である。

毒性物質への感受性は、マイクロコズムが特に高いとは見受けられないし、日常的使用への導入はややためらわれる。群集構成への影響はときに単一種試験での最も感度の高い結果よりはかなり低いレベルに観察されている（Dewey,1986; Pontasch *et al.*,1989）。しかしながら、一種以上のより感度の高い種が存在することを考慮すると、マイクロコズムのより高い感度は予想されるよりしばしば少ない（Kooijman,1985）。単一種試験から予測される影響の閾値と、マイクロコズム試験より観察される閾値の間の数少ない比較により単一種法の応用可能性を一般的に裏付けている（Pontasch *et al.*,1989; 4..1.2 節参照）。感度があがらない原因となる最も重要な因子は、個体への毒性が常には集団への毒性に反映されていないことや、また集団の相互影響が群集レベルの応答をさらに弱める傾向があることなどである。藻類全体の生物量といった一群の変数のみを測定するマイクロコズムの研究もあり、このため種への影響を排除することにより感度が低くなる（Kooijman,1985）。

負の面としてはマイクロコズムは単一種試験よりずっと多くの場所、時間、費用ならびに技術を必要とする（Mothes-Wagner *et al.*,1992）。マイクロコズム試験の最も大きな問題の一つは、繰り返しの系においてすらひとつひとつのマイクロコズム毎に複雑な微少構成生物が変化するが為に、追試の結果をえることの困難性である。特に長期試験では、毒性物質に係わらすに、群集構成における死滅や変化を避けることはしばしば不可能である（Buikema and Voshell,1993）。しばしば棲息場所の多様性の欠如によって作り出される、容積（edge effect）、ならびに容器（Wall effect）に対する境界の割合の多さといったスケールの問題もある（Giesy and Allred,1985）。たとえば、１容器につき１頭の捕食者とは、自然界に比較して非常に高い密度を示し、避難所がなければ被捕食者は根絶することになるかも知れない。追試結果を得ることが困難なため毒性に関連する差違は隠されがちである（Kersting,1984）。標準化された人工的な群集は変化しづらい（Gieay and Allred,1985）が、標準化によって起こった地域的問題に対する現実性を制限する（Pontasch *et al.*,1989）。

どのマイクロコズムまたは複数種の試験も精度（データの再現性）と正確さ（実際との結果の合致）の妥協を示す。マイクロコズムは自然界の生態系のモデルであり、さらに単純化を必要とする（Giesy and Allred,1985）。自然界の生態系でのマイクロコズムの結果の真実性の確認の必要性が強調されている（Cairns,1986; 1988）。しかしながらそれは困難であり、確証の評価基準はいまだ明らかではない（Buikema and Voshell,1993）。

6.3.2　メソコズム試験

メソコズム試験は、まず間違いなく日常的試験法ではなく研究ツールとしてその役割を果たしていくであろう。なぜならそれらの操業規模ならびに週、月ないししばしば年間にわたる試験期間を要するからである。

しかしながら一つには単一種試験の真実性を示す上でのメソコズムの優れた性能の故にここで一部の総説を行う。メソコズムは水系の研究かなり広く使用されており、土壌研究には比較的展開されていない。水系のメソコズムに関する詳細な総説はGraneyら（1994; 1995）により著されており、適用事例は4..1.2節にある。

定義　小規模の水系メソコズムの例は実験室内で動かされる6m台の循環人工水流であろう。それらは小さいながら、微生物、藻類、無脊椎生物ならびに少数の魚類を含む完全で現実的な集団を試験できる（Warren and Davis,1971）。

ほとんどの水系メソコズムは戸外のものであり、ある程度周辺自然環境から移植が許容されている場合がある。淡水の毒性試験での非常に成功した設計は、戸外にて並行列で、自然の土台に人工水流を利用したものである。ミネソタ州モンティチエロの施設では、水路の流れは現状に近いサイズ（浅瀬では1.4m、たまりでは広くなる）であり、再現可能であり、新しい水の一定の流れにより定常濃度に投与できる（Zische *et al.*,1983; Cairns,1985）。少数の魚類が棲息場所を見つけ、半自然の条件下にて生き残り、成長、繁殖を行うことが数ヶ月の実験期間中に観察される。集団の他の構成要員は標準的な調査方法もしくは人工の土台のブロックを取りのけることによって評価可能である。

水系の研究者の数グループが、毒性物質を一部の囲い中に添加して、プラスチックバッグまたは水底まで張った「陸水の柵囲い」中の大容量の湖または海水の研究を行った。魚類は通常除外され、他の生物は標準的手法によって測定された。区画包囲は理屈にかなった研究法であるが、他のタイプの閉鎖系のマイクロコズムやメソコズムと同様の問題点を確かに抱えている。いわゆるメソコズムと呼ぶことのできるある操作された群集の極端な例として、小さな湖に化学物質が添加され、実験システムとして使用されてきた。ちょうどそれは、カナダ漁業局によりある環境毒性実験が行われてている、北西オンタリオの実験湖区域のように（Schindler,1987）。

利点と欠点　水系のメソコズムでは、上に述べたように戸外での人工水流が比較的効果的である。それらの自然に近い集団は安定した傾向を示し、再現も比較的成功しやすいものであった。水系メソコズムの毒性学への最も大きな貢献の一つは水質指針値を確立するための基礎としての単一種試験の真実性の確認試験での利用であった。この場合もまた、戸外での人工水流がこの点で生産的であり、単一種試験の確からしさの確認に適したものであった（4..1.2節参照）。

メソコズムの最も大きな欠点の一つは費用がかかることである。一夏、半ダースの人員を要する1実験は相対的に高価である。

実験室内、戸外での水流水路における再現性は常には深刻な問題ではないが、多くの止水系では問題となる。マイクロコズムでは、隔離された池の集団は不安定になりがちで、複製系の特性は様々に変動するであろうし、その理由ははっきりしない。一年のあいだ幾分同様の構成集団パターンを発達させてきた20mの12の池が違った構成の集団をもっており、再現試験として使用不可能であったという一例が見られる（Rosenzweig and Buikema,1994）。自然または人工池の一部を閉鎖することでより制御ならびに再現が可

能になる。止水水系メソコズムの研究の他の共通の困難点は、通常毒性物質が一度のみ添加されるために定常濃度が保てないことである。毒性物質の濃度の低下は通常の実験室での試験と比較にならず、曝露期間において混沌としているために意義のある形での説明が難しい。封鎖タイプのシステムでは濃度を一定に保つことは困難であるが不可能ではない（Kuioer,1981）。

6.4 体内負荷

概　説

- 魚類に対する中性麻酔性物質の致死影響は、水中化学物質濃度に関係なく、そのようなすべての有機化学物質の総体内負荷が 2－6 mmol/kg に達したときに起こる。
- その他の化学物質のグループに関しては臨界体内負荷に関する総括的な資料は未だ得られていない。また、魚類以外の生物グループに関してのモデルも現在不完全である。

水系の毒性試験のエンドポイントは通常、体外の培養液の濃度から示される。これは規制の観点から道理にかなったことである。水中濃度は日常的なモニタリングによって測定され、処理により管理可能であるのは排水ならびに他の廃棄物中の濃度であるからである。しかし、応答が観察されるか否かを決定するのは、生体中の毒性作用の場での濃度または毒性物質量（真の用量）であり、外部の濃度とは関係がない（McCarty,1991）。作用部位での毒性物質量は測定が困難で、また作用部位ですら判らないため、妥当な代替法は、個体全体の毒性物質の残存量の測定である。体内の用量―作用関係は毒性作用のダイナミクスをより正確に説明し、特に物質の混合体の毒性といった事柄によりよい科学的予測を可能とするかも知れない（McCarty,1991）。

中性麻酔性化学物質[56]の魚類への毒性作用が生体内での臨界濃度に達したときに起こる事は明らかである（McCarty,1991; McCarty ら,1992; McCarty andMackay,1993）。このことは何度も試験され、ある物質がどの程度簡単に物質が生体へ入り込むかを見積もった係数である、オクタノール－水分配係数（log Kow）に基づく回帰式（QSARs）から毒性は容易に予測可能である（4.6 節参照）。2-6mmol/kg の範囲の臨界体内負荷が致死試験における瀕死状態の供試魚の場合に試算され（McCarty,1991）、公表された測定がその予測を裏付けている。概算致死体内負荷は、5 桁の幅を超える LC50 を持つ物質に関しても高々3 ないし 4 倍しか変動しない（McCarty,1991; McCarty ら,1992）。

亜致死毒性に関し、QSAR の示す臨界体内負荷は大まかには急性致死毒性のそれより 1/10 の筈であるが、いままでのところ、実証が少なくこの予測を試すことができない（McCarty andMackay,1993）。理論的には、同様の法則を他の毒性作用の様式にも適用すべきである。臨界体内負荷は、異なった作用機序をもつ化学物質では非常に異なっているかもしれないが、グループ内では同様であるはずである。McCary と Mackay（1993）は、有機物質に関し、毒性挙動の既知の 8 クラスそれぞれに対し魚類の臨界体内負荷を過去のデータを基に見積もった。彼らの解析は毒性作用の異なるクラスに対し、明確な体内負荷を示したが、データに

---

[56] これらはヒトが使用する違法薬物でなく、細胞の一般機能を阻害ならびに破壊する非特異的作用を有する有機物について言及したものである。

2-3 桁の幅があるクラスもあった。

麻酔性有機化学物質のグループの他に、物質の一般的なカテゴリーに体内負荷の手法が適用可能になる以前にさらに研究が必要である。たとえば金属は独自の作用様式を持つ傾向があり、故にそれらは様々な臨界体内負荷を持つ場合があり、おそらくは、微量栄養元素であるもの（たとえば銅）に対するものとそうではない金属（たとえば鉛）では全く違うであろう（McCarty ahn Mackay,1993)。しかしながら臨界体内負荷量の概念は個々の金属に対しては観察と一致している。たとえば長く考えられてきたことであるが、硬水の反応が水生生物に対する金属の毒性の低下をおこす原因は陽イオン硬度が金属の生体への膜透過を遅くし故に組織内での蓄積を遅らせ減少させることである。Borgman ら（1991）の実験はこの見解を支持する。淡水性甲殻類（*Hyalella azteca*）へのカドミウムの亜致死の臨界体内負荷はたった 2 倍変化した一方、水中での毒性を示す濃度は水の硬度により 10 倍、吸着性の底質の添加により 1000 倍変化した。キレート化合物が毒性を示すのに必要である水溶態カドミウムを 35 倍増加させた場合、臨界体内負荷はたかだか 16%の変化であった。しかしマスに対するヒ素の臨界体内負荷は、おそらくは金属の支配的形態が温度によって変化するために、温度依存性であるなど、図式は単純ではないだろう（McGeachy and Dixon,1990)。

食餌による毒性物質蓄積が臨界体内負荷へ到達する経路といったような、関連した筋道の研究が進められている。魚類に対し定量されたものもあるが、全体では関係は明らかではない（Fisk *et al.*,1998)。化学分析による組織中の測定を試みるよりも、混合物中の化学物質の体内負荷予測に関して成功例がある。利点は予測的手法は低濃度のために、組織の直接の化学物質測定で検出できないような物質も考慮に入れることができることである。この手法は混合物質を疎水性相へ生物濃縮をさせ、その相中の濃度を高度の化学分析手法により測定する。著者らは「これら推定総体内負荷を用いることにより、特定の作用様式を有する化学物質の総括的基礎毒性への寄与を含め、基礎毒性影響が予測可能である」と結論している（Van Loon *et al.*,1997)。

魚類における卵と幼生に関する研究は、Kow より予測されるよりも幾分多くの PAHs と PCBs の摂取を示しており、オクタノールは有効であるが、魚類脂肪組織をあらわすには理想的ではないことを示唆している（Petersen and Kristennsen,1998)。引き続く研究は関連が改善しうることを示している。麻酔性物質 I 類（ブタノール、キシレンのような不活性麻酔性物質）麻酔性物質 II 類（脂肪族ならびに芳香族アミンならびにフェノールのような極性麻酔性物質）といった化学物質に関して致死濃度と致死体内負荷との間に違いが見られてきた。水と、オクタノールの替わりとして、膜代替物 L-α-dimyristoyl phosphatidylcholin 間の配分係数に QSAR を基準化することによって解決可能である（Vaes *et al.*1998)。作用様式が研究の焦点となってきた。Russom ら（1997）はファットヘッドミノーの致死反応の様式を化学物質の構造と特性と関連づける手法を開発するために、毒性学分野からのさまざまな情報を組み合わせた。彼らはおよそ 600 の物質を 8 つの毒性挙動カテゴリーに分類した。麻酔性物質の 3 グループ、酸化的リン酸化脱共役剤、呼吸阻害剤、親電子反応物/前親電子反応物、アセチルコリンエステレーゼ阻害剤ならびに中枢神経系鎮静剤である。化学物質構造をありそうな毒性反応と関連させ、可能であれば QSAR と対応させるコンピュータに基づくシステムが開発された。

他の生物に関する文献はここで完全に概観することはできないが多様なテーマを示す例がある。しばしば焦点は魚類における臨界体内負荷の考え方とは異なるものの、ときに類似している。ミミズの臨界体内負荷

のデータは 2 種のクロロベンゼンが魚類の測定データと一致していることを示している（Belfroid *et al.*,1993）。ミミズでのペンタクロロフェノールの生体残存量は毒性の修飾因子の影響を評価するために応用された（Fitzgerald *et al.*,1996）。励みとなる結果が、底質中に棲息する端脚類のフルオランテン（多環芳香族炭化水素）の臨界体内負荷において得られた。臨界負荷は一般的に魚類の範囲と類似しており、およそ 1 から若干 6mol/g 組織を越えるものであった。

緑色植物の土壌からの摂取量は分子接続性指数と称される QSAR によりうまく記述できた。これは分子の大きさ、分枝、分子容積、表面積に関係したものである。予測は、オクタノール－水またはオクタノール－大気係数に基づくものよりも幾分優れていた（Dowdy and Mckone,1997）。しばしば組織内のみの残存に比較して、たとえば残留除草剤の大気蓄積の評価でのバイオモニタリング指標植物など、植物「表面」への残存が強調される（Felsot *et al.*,1996）。殺虫剤に関しては特別な食物連鎖モデル（Kenaga モノグラム）が植物への殺虫剤残存の推算の道具として USEPA によって考案された（Fletcher *et al.*1994）。このモデルにはそれら植物を摂食した動物の殺虫剤摂取の推定の関数もある（Pfleeger *et al.*,1996）。

ここ数十年の長期にわたり脊椎動物では、毒性物質の組織中濃度が多くの研究対象として受け入れられてきた。しかしながら一般的に物質のクラスに対する何らかの予測モデルよりも毒性物質毎のベースに基づくものである。オンタリオの蛙が有機塩素化合物の残留物の蓄積について研究されてきた（Russell *et al.*,1995）。淡水性の亀の組織中残留物が、化学物質と放射性物質汚染のモニタリングの意味で評価された（Meyers-Schone *et al.*,1993）。

鳥類の組織中の汚染物質、特に卵中では多くの研究において、現れた毒性影響と関係がある。たとえば 5 大湖の二重カンムリ鵜の卵の致死がポリ塩素化ビフェニルの残存量と関係がある例がある。食物連鎖摂取もまた鳥類で研究されている（Forsyth *et al.*,1994）。

6.5 混合機能酸化酵素

概　説

- Mixed-function oxidases 混合機能酸化酵素（MFOs)は、多くの天然ならびに人工物質を解毒する動物の酵素である。
- PAH、PCB もしくは石油製品に汚染された場所で魚類中の MFO レベルの増加が示されている。
- 魚類における MFO 誘導の強さは種、季節、性、年齢、温度、食餌、特に繁殖の状態によって影響され、その影響はときに汚染の影響を隠してしまうほど強いものである。
- MFO 酵素の誘導は誘導剤への魚類の曝露を意味し、魚類の健康への意義は不明である。

多くの生体は混合機能酸素添加酵素MFOsとして知られる膜酵素によって親油性物質の解毒を行っている。それらは毒性物質を排泄可能な水溶性の形態へ変換する触媒作用を示す（Addison,1984）[57]。自然界では、

---

[57] MFOs は最終酸化物としてイオン含有のヘム蛋白、シトクローム P-450（吸光度のピークの波長での通称）と関連がある（Payne *et al.*,1987）。

MFOsはステロイド、ビタミンならびにある種の胆汁酸の代謝機能を示す。誘導性ーその活性が汚染物質の存在中で増加する故に、それらは生物指標として有用である[58]。MFOs は多くの様々な組織に見いだされるが、脊椎動物では肝臓に濃縮される。Hodson ら（1998）は排水評価における MFO の使用について信頼でき完全な総説を示した。

魚類ではMFO システムは比較的狭い範囲の物質で誘導される。誘導されたMFOs はPAHs、PCBs または石油製品で汚染された様々な場所（Addison,1984; Payne *et al.*,1987）または油を投与された実験室水槽にて示されている（例えば.,Payne,1978; Payne and Fancey,1982)。パルプ工場、都市下水処理場、雨水配水管からの排水は弱い誘導物質の可能性がある（Payne *et al.*,1987; Andersson *et al.*, 1988; Hodson *et al.*, 1991)。特に誘導は、過去塩素によって強度に漂白しているパルプ工場からの排水のダイオキシンならびに他の物質によるものであった（Ahokas *et al.*,1994)。製紙プロセスでの発生原は蒸解液、黒液ならびに漂白の第１段階からの排水が含まれ（Hodson *et al.*,1997）排水の二次処理はMFO の誘導を低減もしくは消失することができる（Martel and Kovacs,1997)。ある工場では、MFO の誘導原因が二つのジュウバビオン、バルサムモミ材の天然成分である事がわかった（Martel *et al.*,1997)。反応はポリクロロジベンゾダイオキシンの見かけの毒性強度の評価に使用された（Parrott and Hodson,1995)。魚類と汚染物質の生物学的利用可能性の状態を考慮すると、理論上MFO はの誘導は環境汚染レベルに比例する。

魚類の健康状態に対する MFO 誘導の意義はわかっていない（Payne *et al.*,1987; Kleinow *et al.*,1987; Hodson *et al.*,1991)。一方、高率のMFO 活性は、毒性物質の急速な消去による汚染物質への耐性の増加となる（Stegeman and Kloepper-Sams,1987)。また他方、PAH の解毒は発がん物質として知られる代謝物を生成しうる。MFO 誘導と魚類健康状態との関係についての研究で、一部の事例で相関関係を示しているものもある（Spies and Rice,1988）が、他の研究ではそうではない（Stegeman *et al.*,1988）鳥類によるMFOs の生成に関する疑問は生化学的な馴化と順応とのどちらに見なすべきなのかと言うことである（Fossi *et al.*,1991)。

現時点で、MFO 誘導はPAHs、PCBs ならびにある種の排水への曝露の早期警戒として役にたつ可能性があり、たとえばセントローレンス河でのチョウザメの試験によるものなど、問題を検出するための予備的道具として使用されてきた（Rousseaux *et al.*,1995)。早期警戒のために、変動をカバーするため他のバイオマーカーと組み合わせた場合、MFOs の測定は最も効果的である（Payne *et al.*,1987; Jiminez *et al.*,1990; Stein *et al.*,1992)。実験室内試験または調査において有用と考えられる非破壊的方法は、胎生魚類の浮き袋の蛍光測定である。EROD の基質エトキシレゾルフィンは、これは試験水へ添加され、適当な毒性物質の存在下で蛍光を発し、ふさわしい精度で測定可能である（Nacci *et al.*,1998)。

魚類においてMFO の基礎的変動がありこれは生理学的要因、環境要因の変動によるものである。種、季

---

[58] NFOs の酵素反応は代謝物の蓄積により測定可能である。肝臓のモノオキシダーゼ活性は通常、酵素の抽出ならびにベンゾピレンなど、前もって反応を起こすことが知られている基質を添加することにより測定される。代謝産物の蓄積率はその後測定される。試験で使用される基質に従って３つの機能的に判っている酵素が日常的に測定される（Stegeman *et al.*,1988)。１．(AHH) ２．(EROD) ３．(ECOD) である。時にシトクローム P-450 量がMFO 試験に使用されるが酵素活性よりも感度は低い（Payne *et al.*,1987)。

節、性、魚齢、温度ならびに摂食状態すべてがMFOに影響する可能性があり、時には場所の差違を覆い隠すほど大きなものである（Hodson *et al.*,1991; Kleinow *et al.*,1987）。繁殖の状態はMFOに影響を与える最も重要な生物学的要因である（Hodson *et al.*,1991）。また清浄な場所において、MFOには顕著な季節変動もある。低温条件はNFOの誘導を遅らせ、押さえる傾向がある。しばしば繁殖周期と相互に関係があるものの、摂食状況はMFOの応答を緩やかにする可能性もある（Jiminez and Burtis,1988; Ankley and Reinert,1988）。

MFO活性の基礎的変動のため、汚染場所でのMFO誘導もまた変動しており、影響の勾配を区別することは難しい可能性がある。文献が豊富にあるにかかわらず、底質汚染の幅にMFO活性が関係あることを示す実験は少ない（Payne *et al.*,1987; Stegeman *et al.*,1988; Addison and Edwards,1988に事例）。変動ならびに応答が非線形であるがためにしばしばあいまいであるが、誘導物質の環境レベルとMFO活性の間の関係が見えてくる。

良い結果を得るために変動同様に重要なことは、生物の対照集団の選定である。なぜならMFO活性は生物の曝露ならびに対照集団の差違で評価されるからである。比較対照集団の選定にはかなりの注意が払われねばならないが、ときに完全には実行できない。同一場所でもMFO活性への環境影響があるため（前段落）、歴史的な比較を行う際には注意を払わなければならない。

魚類の研究がこの節で概説されたが、他の生物についてもMFOに関係して同様の応答をする。実験室でのマウス培養細胞はあるMFO（EROD エトキシレゾルフィンオルトジエチレーゼ）の鋭敏な応答を示し、パルプ工場排水の様々な要素に対して感度良いバイオアッセイを提供した（Koistinen *et al.*,1995）。MFOsの測定はイガイ（Sole *et al.*,1995）からホシムクドリ（Trust *et al.*,1994）といった鳥類、ならびに人的影響をうけた環境中に棲息するカモメ（Fossi *et al.*,1991）まで、他の多くの生物で行われている。

6.6 内分泌撹乱性物質

概　説

- 魚類の繁殖生理の阻害は、1980年代と1990年代初頭のカナダの漂白クラフトパルプ工場付近の研究により明白である。より最近の、いろいろな場所の研究は単純な因果関係より複雑な状況を示唆している。
- 他の野生生物種でも性的異常が記述されており、一時の事例では有機塩素化合物汚染と明白もしくは外見上、関係のある事例が記述されている。
- 他の事例としては、有機錫と腹足類、シアン化物と魚に関係する内分泌撹乱がある。
- この話題は幅広い公衆ならびに科学界の関心を受け、総説や書籍が利用可能である。

野生生物への繁殖生化学への影響は、1990年代の生態毒性学の主要な論点になりつつある。ある種の化学物質の作用によるこの種の影響は、パルプ工場での排水成分が見かけ上、水生生物への影響の原因になっている故に、カナダで特に関心が高い。1980年代のバルト海で行われたスウェーデンの研究はパルプ漂白工場付近での魚類への繁殖影響を示唆している（Sodergren,1987; Sodergren *et al.*,1988）。北部オンタリオの工場で1988に始まった研究は、曝露された魚が結果として生殖行動と炭水化物代謝の異常を伴う、テストス

テロンとエストラジオールを含む血清ステロイドのレベルが減少していることを指摘している（McMaster *et al.*,1991;Munkittric *et al.*,1991）。魚の成長は対照地区の魚より遅く、成熟はより遅く、より小さい生殖腺、雄での第二次性徴の減少、雌での十分なサイズの卵の発達の欠失その他の明らかな影響がある。その後、同様の影響がカナダの他の場所でも立証されている（総説 Kovacs *et al.*,1996）。

工場排水に曝露された魚の成熟能に関する影響が見かけ上なく、卵孵化率、または孵化幼生の大きさに無影響といった、予期されない発見もあった（McMaster *et al.*,1992）。さらに、漂白クラフト工場の二次処理設備が生殖ステロイドのレベルも改善せず、工場操業を 2 週間停止しても改善しなかった（Munkittric *et al.*,1992）。他の工場の研究で二次処理がなんら確実な除去もしめさなかった（Servos *et al.*,1992）。ケベック河の研究では調査者は魚類の生殖腺への影響は見たところ漂白クラフト工場の排水への曝露からというより、自然の原因の結果であるという結論に達した（Gagnon *et al.*,1994）。

明らかに毒性学的全体像は複雑である。とりわけカナダに於いて多くの研究が記述された 1990 年代半ばまでの発見の示唆に富んだ総説が Kovacs ら（1996）により示されている。工場排水が魚類の生殖ステロイドの合成能力を低下させる証拠資料とともに研究は継続されている（McMaster *et al.*,1996）。この影響の原因物質を同定が試みられ、パルプ工業で使用される木材の自然成分が活性を示すという一部の示唆が得られている。魚類の実際的な内分泌生理学の総説は Arcand-Hoy と Benson（1998）により提供されている。

同時並行で多種生物の研究が行われている。カナダでは、大アオサギと鷺の生殖能が衰退したのは、他のさまざまな原因がある可能性があるものの、多塩素化ジベンゾダイオキシンならびに・もしくは他の漂白クラフト排水の要素と関係があるかもしれない（Elliott *et al.*,1989;Elloptt and Norstrom,1998）。おそらくもっとも判りやすい例は、フロリダ州のアポプカ湖のアリゲーターの生殖発達への全体的影響であった。それは見たところ有機塩素化合物のかなりの汚染の結果と見られる（Guillette *et al.*,1996）。哺乳動物と他の野生生物での内分泌攪乱性のメカニズムと影響に関する総説が利用可能である（Gray *et al.*,1998; Camphbell and Hutchinson,1998）。

1994 年頃から、内分泌攪乱の話題は広い社会的ならびに科学的関心を得た。有機塩素化合物以外の物質がこの現象と関連づけられ、最も知られている例の一つは、船舶の防汚塗料中のトリブチル化合物の使用に関連する海洋性腹足類の雄性化であった（Matthiessen and Gibbs,1998 により総説）。シアン化物への曝露後の魚類中での影響が注目された（Ruby *et al.*,1993）。多くの出版物が出された。汚染物質のステロイド様反応のメカニズム（Gillesby and Zacharewaki,1998）ならびにそういった活性化学物質の検出の検索法（Ankley *et al.*,1998）に関する総説が入手可能である。数冊の書籍も入手可能である。Keith（1997）は 67 の既知ならびに疑いのある内分泌攪乱物質の特性を著述している。人体中でのメカニズム（Nav,1998）は野生哺乳類の環境毒性学と関連がある可能性がある。Kendall ら（1998）は哺乳類、鳥類ならびに魚類を含む野生生物に焦点をあて、Rolland ら（1997）は特に魚類を扱っている。

影響のこの範疇に関する知識は未だ完全から遠いが、これらの知見は環境への廃棄化学物質の投入の低減させるために大きな力となった。

6.7 連続的オンラインバイオモニタリング

概　説

・排水の連続的な物理化学的ないしバイオモニタリングは、廃棄物質の予期せぬ到来に対して時間遅れ無く、受水域への損害回避が可能な形で操作者に警戒を促すことができる。

・ほとんどのオンラインのバイオモニタリングは魚類の呼吸行動を利用する。しかし他のエンドポイントも利用または試用されている。

・バイオモニタリングシステムは洗練された電子機器を必要とし、時系列データの統計学的解析は標準化されておらず、困難である。生物の反応は日周の時間、季節または物理的状況により変動する。

・オンラインバイオモニタリングは産業界の一部では利用されている。

化学分析と毒性試験のためのサンプリングにより排水は日常的に監視される。しかしながら、試験結果は数日間入手できない可能性があるが、その間排出における何らかの予期せぬピークを停止させるにも手遅れとなる。数時間継続もしくは数日すら継続する毒性増加現象が通常の採水計画では見落とされる可能性がある。連続的監視は定期的採水の限界をいくつか克服しうる。オンライン物理化学測定（例えばpH、伝導率、ある種の化学物質）はほぼ連続的にサンプリング可能であり、排水の特性に逸脱があった時、警告を発することができる。受水系への排水の重大な漏出がおこる前に是正措置をとれる可能性がある。通常、生物学的エンドポイントが相補的な利点があるように、連続的バイオモニタリングシステムも同様に機能しうる。

連続的バイオモニタリングシステムでは、排水流の一部を供試生物が飼育されている貯留槽に導入する。生物の健康は行動のある側面または生理的活性により判定され、電気的に連続監視される。水質の悪化は、コンピュータによる分析で、非常に迅速に検出可能な挙動や活性の変化として信号で伝えられ、警告が発せられることが可能である。これは楽観的な筋書きであり、多くのバイオモニタリングシステムは成功の度合いを様々に設計されている。

今までのところ、オンラインバイオモニタリングのほとんどは魚類を利用している。もっとも頻出のエンドポイントは呼吸に関係する魚体の動き、特に鰓の換水速度と「咳」である（Carlson and Drummond,1978; Thompson *et al.*,1982; Fisher *et al.*,1983; Westlake *et al.*,1983; van der Schalie,1986）負荷の指標として、鰓の開閉速度ならびに咳の頻度の増加が長い間観察されてきた（Thomson *et al.*,1982 の引用参照）。

藻類（Van Hoof *et al.*,1992; Pandard *et al.*,1993）、底生無脊椎動物（Coler *et al.*,1988）を含む多くの他の生物が使用されているが、これらのシステムのほとんどの部分は未だ実験的である。細菌のオンラインシステムは発光試験の自動化版を使用している（Microbics,1992; Qureshi *et al.*,1998）。ある型ではコンピュータにより制御された操作機が凍結乾燥された培養液を復帰させ、試料を抽出、混合、さらに発光の測定のためのフォトメータのキュベットへ移す。コンピュータがデータを解析、発光の低下時にアラームを鳴らすようプログラムすることも可能である。このシステムは厳密には連続的ではないが、時間単位での試験を行う。使用されている他の応答、生物は以下の議論にて言及される。

鋭敏な電気的センサーの発明はバイオモニタリングシステムに革命をもたらした（Pandard *et al.*,1993）。鰓の開閉は、魚の咽頭部分の筋肉の収縮により発生した瞬間的生物学的電気信号を検知するための水槽壁の

電気的負荷により測定可能である。解析のために、信号はコンピュータに増幅され、積算され、蓄積される。Cairns ら（1980）は,このようなシステムを詳細に記述し、さらにずっと高度化されたセンサーとソフトウェアが今日では使用可能である（Isom,1991 の文献参照）。溶存酸素濃度の変化を検知することによって（Pandard *et al.*,1993）、もしくは藻類細胞内での電子授受過程で還元される酸化反応特異性受容体により、バイオセンサーは藻類の光合成速度を測定可能である（Rawson *et al.*,1987）。ワムシの呼吸吸収は、生物を固定したセル前後の溶存酸素濃度の連続的比較によって測定可能である（Coler *et al.*,188）。しかし、これらの手法の多くはルーチン使用にはまだ開発されておらず、魚類に適用可能であるかの議論の余地がある。

全ての連続的バイオモニタリングシステムには難しい点がある。それらは、洗練されたモニタリングと記録の装置を必要とする。魚は給餌され、水槽は清掃され、死亡、病体、不健康体の生物体は取り除かれ、補給されねばらない。遊泳や摂食活動による「雑音」は鰓の開閉信号を不明瞭にする可能性がある。日周の時間、季節、または物理的状態により変化する活性と応答の閾値に対し、システムをプログラムする必要もある。環境的に重要を見なされるべき応答の大きさが決定されねばならない。標準的試験での毒性影響によってモニタリングシステムでの反応の何らかの校正を必要である。

これらのシステムにおいて良い設計の最も重要な部分は、感度とノイズもしくは偽警告のバランスを見つけることである（Cairns *et al*,1980）。これは統計とマネージメントの問題の両者である。2 つのアプローチが使用されている。(1) 魚の 1 群が排水中で飼育されており、常に更新される履歴のベースラインから応答が逸脱する時にストレスが示唆される。(2) 魚類の試験区群が排水中で飼育、対照区は清浄な水源水で飼育される場合。一定の時間の２つのグループの比較により影響が検出される。両手法で、魚類は個体の相互作用の混乱を避けるために個別に収容される。

統計学的解析は１群システムに対しては複雑である。なぜならそれぞれの魚を続いて測定することが独立していないからである。単純な対応法は、毒性負荷がないと推定されるしばらくのあいだ、平均値と分散のベースラインを設定し、単純なパラメータ解析を使用して監視データとこれを比較する[59]。時間軸解析は、定期的にベースラインを更新することが奨励されるが、不運にして、時間軸データの統計解析は標準化されず、通常変動する（Thompson *et al.*,1982; Westlake *et al.*,1983; Hayward *et al.*,1988）。2 群の手法は単純で、パラメータを使用しない、試験区と対照区の応答の比較を可能にする。また、バックグラウンドの「雑音」を考慮可能である。なぜなら、給餌やヒトによる撹乱によりもたらされる変動が２つのグループで共有されるからである（Hayward *et al.*,1988）。不利な点は、呼吸その他の機能に影響する温度、溶存酸素、もしくは固形物の点で排水と対照水の差がしばしばあるからである（Hayward *et al.*,1988）。

連続的監視システムは産業分野での応用がある[60]。表流水を移動実験室の貯留槽に分岐することにより、こ

---

[59]事実上、統計学的処理で単純なものはほとんどない。負荷がかけられた場合、魚の個体間での変動が増加しやすいため、分散の利用すら困難である。Hayward ら（1988）は負荷応答の計測として、平均値の増加より、変動の増加を使用する提案すらおこなっている。

[60] もっとも初期のカナダの例はおそらくオンタリオの Oakville のものであった。1950 年代には Cities Service 石油精製所の最終排水が、オフィスビルの玄関にある魚の水槽を通過した。それらの魚は通り過ぎ

れらは受水域の監視にも使用されうる。こういった移動システムに特化したアメリカには、魚や他の生物の行動を利用し、排水と表流水の影響を評価するコンサルト会社がある（もしくはあった)。

る人々により「モニター」された。

参考文献

Abernethy, S.G. and G.F. Westlake, 1991. Guidelines for pH adjustment of effluent samples for toxicity identification and reduction evaluations. Ontario Ministry of Environment, Water Resources Branch, Toronto, Ont.

Addison, R.F., 1984. p. 52-60, In: *Contaminant effects on fisheries.* V.W. Cairns, P.V. Hodson, and J.O. Nriagu (eds.), John Wiley & Sons, New York, N.Y.

Addison, R.F. and A.J. Edwards, 1988. Hepatic microsomal mono-oxygenase activity in flounder *Platichthys flesus* from polluted sites in Langesundfjord and from mesocosms experimentally dosed with diesel oil and copper. *Mar. Ecol. Prog. Ser., 46:*51–54.

AEP (Alberta Environmental Protection), 1978. Interim Alberta surface water quality guidelines. Alberta Environmental Protection, Edmonton, Alta.

———. 1995. Water quality based effluent limits procedures manual. Alberta Environmental Protection, Environmental Regulatory Service, Edmonton, Alta.

AETE (Aquatic Effects Technology Evaluation), 1997. Toxicity assessment of mining effluents using up-stream or reference site waters and test organism acclimation techniques. Completed for AETE program by ESG International Ltd., Ottawa, Ont., Dec. 1997.

———. 1998a. Summary of cost-effectiveness evaluation of aquatic effects monitoring technologies applied in the 1997 AETE field evaluation program. Completed for AETE by Beak International Inc. and Golder Associates Ltd., Ottawa, Ont., Sept. 1998.

———. 1998b. Addition tool evaluations: Evaluation of receiving water as dilution water in effluent toxicity testing. Completed for AETE program by Beak International Inc., Ottawa, Ont., Sept. 1998.

Agriculture Canada, 1987. *The Canadian system of soil classification.* 2nd ed. Pub. No. 1646, Agriculture Canada, Research Branch, Expert Committee on Soil Survey, Ottawa, Ont.

Ahokas, J.T., D.A. Holdway, S.E. Brennan, R.W. Goudey, and H.B. Bibrowska, 1994. MFO activity in carp *(Cyprinus carpio)* exposed to treated pulp and paper mill effluent in Lake Coleman, Victoria, Australia, in relation to AOX, EOX and muscle PCDD/PCDF. *Environ. Toxicol. Chem., 13:*41–50.

Alabaster, J.S. and R. Lloyd (eds.), 1980. *Water quality criteria for freshwater fish.* Butterworths, London and Woburn, Mass.

ALAC/ORSANCO (Aquatic Life Advisory Committee of the Ohio River Valley Water Sanitation Commission), 1955. Aquatic life water quality criteria. First progress report. *Sewage Indust. Wastes, 27:*321–331.

Alden, R.W. III, 1992. Uncertainty and sediment quality assessments: I. Confidence limits for the triad. *Environ. Toxicol. Chem., 11:*637–644.

Aldenberg, T. and W. Slob, 1991. Confidence limits for hazardous concentrations based on logistically distributed NOEC data. RIVM Rept nr. 719102002. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiene [National Inst. of Public Health and Environmental Protection], Bilthoven, The Netherlands.

Alderdice, D.F. and J.R. Brett, 1957. Some effects of kraft mill effluent on young Pacific salmon. *J. Fish. Res. Board Can., 14:*783–795.

Ames, B.N., 1996. The causes of aging and cancer: The misinterpretation of animal cancer tests. *Human Ecol. Risk Assess., 2:* 6–9.

Ames, B.N., J. McCann, and E. Yamaski, 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with *Salmonella*/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutation Res., 31:* 347–364.

Anderson, P.D. and P.A. Spear, 1980. Copper pharmacokinetics in fish gills. II. Body size relationships for accumulation and tolerance. *Water Res., 14:*1107–1111.

Anderson, S.L. and T.J. Norberg-King, 1991. Letter to the editor. Precision of short-term chronic toxicity tests in the real world. *Environ. Toxicol. Chem., 10:*143–145.

Anderson, S.L. and G.C. Wild, 1994. Linking genotoxic responses and reproductive success in ecotoxicology. *Environ. Health Perspect, 102 (Suppl. 12):*9–12.

Anderson, S., W. Sadinski, L. Shugart, P. Brussard, M. Depledge, T. Ford, J. Hose, J. Stegeman, W. Suk, I. Wirgin, and G. Wogan, 1994. Genetic and molecular ecotoxicology: a research framework. *Environ. Health Perspect., 102 (Suppl. 12):*3–8.

Anderson, S., N. Belfiore, and F. Harrison, 1998. Genotoxic effects in aquatic organisms: Methodologies, field-related applications, and the role of genetic diversity. Rept to Atomic Energy Control Board and Environment Canada, August 1998.

Andersson, T., L. Forlin, J. Hardig, and A. Larsson, 1988. Physiological disturbances in fish living in coastal water polluted with bleached kraft pulp mill effluent. *Can. J. Fish. Aquat. Sci., 45:*1525–1536.

Ankley, G.T., 1996. Evaluation of metal/acid-volatile sulfide relationships in the prediction of metal bioaccumulation by benthic macroinvertebrates. *Environ. Toxicol. Chem., 15:*2138–2146.

Ankley, G.T. and L.P. Burkhard, 1992. Identification of surfactants as toxicants in a primary effluent. *Environ. Toxicol. Chem., 11:*1235–1248.

Ankley, G.T. and R.E. Reinert, 1988. Effects of commercial versus synthetic diets on hepatic xenobiotic-metabolizing enzymes in channel catfish. *Mar. Environ. Res., 24:*41–44.

Ankley, G.T. and M.K. Schubauer-Berigan, 1995. Background and overview of current sediment toxicity identification evaluation procedures. *J. Aquat. Ecosystem Health, 4:*133–149.

Ankley, G.T., R.A. Hoke, J.P. Giesy, and P.V. Winger, 1989. Evaluation of the toxicity of marine sediments and dredge spoils with the Microtox® bioassay. *Chemosphere , 18:*2069–2075.

Ankley, G.T., A. Katko, and J.W. Arthur, 1990. Identification of ammonia as an important sediment-associated toxicant in the lower Fox River and Green Bay, Wisconsin. *Environ. Toxicol. Chem., 9:*313–322.

Ankley, G.T., G.L. Phipps, E.N. Leonard, D.A. Benoit, V.R. Mattson, P.A. Kosian, A.M. Cotter, J.R. Dierkes, D.J. Hansen, and J.D. Mahony, 1991a. Acid-volatile sulphide as a factor mediating cadmium and nickel bioavailability in contaminated sediments. *Environ. Toxicol. Chem., 10:*1299–1308.

Ankley, G.T., M.K. Schubauer-Berigan, and J.R. Dierkes, 1991b. Predicting the toxicity of bulk sediments to aquatic organisms with aqueous test fractions: pore water vs. elutriate. *Environ. Toxicol. Chem., 10:*1359–1366.

Ankley, G.T., D.M. Di Toro, D.J. Hansen, and W.J. Berry, 1996. Assessing the ecological risk of metals in sediments. *Environ. Toxicol. Chem., 15:*2053–2055.

Ankley, G., E. Mihaich, R. Stahl, D. Tillitt, T. Colborn, S. McMaster, R. Miller, J. Bantle, P. Campbell, N. Denslow, R. Dickerson, L. Folmar, M. Fry, J. Giesy, L. E. Gray, P. Guiney, T. Hutchinson, S. Kennedy, V. Kramer, G. LeBlanc, M. Mayes, A. Nimrod, R. Patino, R. Peterson, R. Purdy, R. Ringer, P. Thomas, L. Touart, G. Van Der Kraak, and T. Zacharewski, 1998. Overview of a workshop on screening methods for detecting potential (anti-) estrogenic/androgenic chemicals in wildlife. *Environ. Toxicol. Chem., 17:*68–87.

APHA, AWWA, WEF (Amer. Public Health Assoc., Amer. Water Works Assoc., and Water Environment Federation), 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater. 19th ed., APHA, Washington, D.C.

API (American Petroleum Institute), 1988. Fathead minnow 7-day test: Round robin study. Intra- and interlaboratory study to determine the reproducibility of the 7-day fathead minnow larval survival and growth test. API Pub. No. 4468. Amer. Petroleum Inst., Health & Environ. Sci. Dept, Washington, D.C.

Arcand-Hoy, L.D. and W.H. Benson, 1998. Fish reproduction: An ecologically relevant indicator of endocrine disruption. *Environ. Toxicol. Chem., 17:*49–57.

Armitage, P.D., R.J.M. Gunn, M.T. Furse, J.F. Wright, and D. Moss, 1987. The use of prediction to assess macroinvertebrate response to river regulation. *Hydrobiologia, 144:*25–32.

ASTM (American Society for Testing and Materials), 1997a. Annual book of ASTM standards. Section 11, Water and environmental technology, vol. 11.5: Biological effects and environmental fate; biotechnology; pesticides. ASTM, Philadelphia, Pa.

———. 1997b. Standard guide for conducting acute toxicity tests with fishes, macroinvertebrates, and amphibians. Annual Book of Standards, Section II, Water and Environmental Technology, Volume 11.05, ASTM Designation E 729-96, p. 220–240, ASTM, Philadelphia, Pa.

Atema, J. and L.S. Stein, 1974. Effects of crude oil in the feeding behaviour of the lobster, *Homarus americanus. Environ. Pollut., 6:*77–88.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 1998. CRCnetBASE™ 1999. CRC Press LLC, Boca Raton, Fla.

Ausmus, B.S. and E.G. O'Neill, 1978. Comparison of carbon dynamics of three microcosm substrates. *Soil Biol. Biochem., 10:*425–430.

Ausley, L.W., 1996. Effluent toxicity testing variability. p. 157–171, In: *Whole effluent toxicity testing: An evaluation of methods and prediction of receiving system impacts.* D.R. Grothe, K.L. Dickson, and D.K. Reed-Judkins (eds.). Soc. Environ. Toxicol. Chem., SETAC Spec. Pub. Series, SETAC Press, Pensacola, Fla.

Australia, 1989. Pulp and paper industry package. Commonwealth of Australia, Departments of Industry, Technology and Commerce; Arts, Sport, the Environment, Tourism and Territories; Primary Industries and Energy; and Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. Canberra, Australia, 76 p.

Bailey, H.C., J.L. Miller, M.J. Miller, and B.S. Dhaliwal, 1995. Application of toxicity identification procedures to the echinoderm fertilization assay to identify toxicity in a municipal effluent. *Environ. Toxicol. Chem., 14:*2181–2186.

Bailey, H.C., J.L. Miller, M.J. Miller, L.C. Wiborg, L. Deanovic, and T. Shed, 1997. Joint acute toxicity of Diazinon and Chlorpyrifos to *Ceriodaphnia dubia. Environ. Toxicol. Chem., 16:*2304–2308.

Baird, R.B., R. Berger, and J. Gully, 1996. Improvements in point estimation methods and application to controlling aquatic toxicity test reliability. p. 103–130, In: *Whole effluent toxicity testing: An evaluation of methods and prediction of receiving system impacts.* D.R. Grothe, K.L. Dickson, and D.K. Reed-Judkins (eds.). Soc. Environ. Toxicol. Chem., SETAC Special Pub. Series, SETAC Press, Pensacola, Fla.

Banas, W.P. and J.B. Sprague, 1986. Absence of acclimation to Parathion by rainbow trout during sublethal exposure. *Water Res., 20:*1229–1232.

Barber, T.R., D.J. Chappie, D.J. Duda, P.C. Fuchsman, and B.L. Finley, 1998. Using a spiked sediment bioassay to establish a no-effect concentration for dioxin exposure to the amphipod *Ampelisca abdita. Environ. Toxicol. Chem., 17:*420–424.

Barbour, M.T., J.M. Diamond, and C.O. Yoder, 1996. Biological assessment strategies: applications and limitations. p. 245–270, In: *Whole effluent toxicity testing: An evaluation of methods and prediction of receiving system impacts.* D.R Grothe, K.L. Dickson, and D.K. Reed-Judkins (eds.). Soc. Environ. Toxicol. Chem., SETAC Special Pub. Series, SETAC Press, Pensacola, Fla.

Barnthouse, L.W., G.W. Suter II, and A.E. Rosen, 1990. Risks of toxic contaminants to exploited fish populations: influence of life history, data uncertainty and exploitation intensity. *Environ. Toxicol. Chem., 9:*297–311.

Baud-Grasset, F., S. Baud-Grasset, and S.I. Safferman, 1993. Evaluation of the bioremediation of a contaminated soil with phytotoxicity tests. *Chemosphere, 26:*1365–1374.

B.C. MELP (British Columbia Ministry of Environment, Lands and Parks), 1998. British Columbia water quality guidelines (criteria): 1998 edition. B.C. MELP, Water Management Branch, Water Quality Section, Victoria, B.C. 30 p.

Beak (Beak Consultants Ltd.), 1979. Toxicity of effluents from sulphite pulping operations practicing recovery and biological treatment. Economic and Tech. Rev. Rept No. EPS 3-WP-79-9, Environment Canada, Environ. Prot. Service, Water Pollut. Control Dir., Ottawa, Ont. 51 p.

Beanlands, G.E. and P.N. Duinker, 1983. An ecological framework for environmental impact assessment in Canada. Inst. Resource and Environ. Studies, Dalhousie Univ., Halifax, and Canadian Federal Environmental Review Office, Hull, Quebec. 132 p.

Becker, D.S., G.R. Bilyard, and T.C. Ginn, 1990. Comparisons between sediment bioassays and alterations of benthic macroinvertebrate assemblages at a marine superfund site: Commencement Bay, Washington. *Environ. Toxicol. Chem., 9:*669–685.

Bedard, D., A. Haydon, and D. Persaud, 1992. Ontario Ministry of the Environment laboratory sediment biological testing protocol. PIBS 2067E, Log 92-2309-074, OMOE, Water Resources Br., Rexdale, Ont., 26 p.

BEIR (Biological Effects of Ionizing Radiation), 1973. Biological effects of ionizing radiation report. *Bull. Atomic Scientists, March:*47–49.

Belfroid, A., W. Seinen, K. van Gestel, and J. Hermens, 1993. The acute toxicity of chlorobenzenes for earthworms *(Eisenia andrei)* in different exposure systems. *Chemosphere, 26:*2265–2277.

Benoit, D.A., P.K. Sibley, J.L. Juenemann, and G.T. Ankley, 1997. *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sediments. *Environ. Toxicol. Chem., 16:*1165–1176.

Benson, W.H. and R.T. Di Giullo, 1992. Biomarkers in hazard assessment of contaminated sediments. p. 241–265,

In: *Sediment toxicity assessment.* G.A. Burton, Jr. (ed.), Lewis Pub., Boca Raton, Fla.

Benton, M.J., M.L. Malott, S.S. Knight, C.M. Cooper, and W.H. Benson, 1995. Influence of sediment composition on apparent toxicity in a solid-phase test using bioluminescent bacteria. *Environ. Toxicol. Chem., 14:* 411–414.

Bergman, H.L. and E.J. Dorward-King, 1997. Reassessment of metals criteria for aquatic life protection. (Proc. of the Pellston Workshop) Soc. Environ. Toxicol. Chem., SETAC Special Pub. Series, SETAC Press, Pensacola, Fla.

Bermingham, N., C. Blaise, and G. Costan, 1995. Use of microscale aquatic toxicity tests to set "green standards" for general purpose cleaners. *Proc. 22nd Ann. Aquatic Toxicity Workshop*, St. Andrews, N.B., Oct. 1-5, 1995.

Berry, W.J., D.J. Hansen, J.D. Mahony, D.L. Robson, D.M. Di Toro, B.P. Shipley, B. Rogers, J.M. Corbin, and W.S. Boothman, 1996. Predicting the toxicity of metal-spiked laboratory sediments using acid-volatile sulfide and interstitial water normalizations. *Environ. Toxicol. Chem., 15:*2067–2079.

Bertelsen, S.L., A.D. Hoffman, C.A. Gallinat, C.M. Elonen, and J.W. Nichols, 1998. Evaluation of log K_{ow} and tissue lipid content as predictors of chemical partitioning to fish tissues. *Environ. Toxicol. Chem., 17:* 1447–1455.

Besser, J.M., C.G. Ingersoll, E.N. Leonard, and D.R. Mount, 1998. Effect of zeolite on toxicity of ammonia in freshwater sediments: implication for toxicity identification evaluation procedures. *Environ. Toxicol. Chem., 17:* 2310–2317.

Birge, W.J., J.A. Black, T.M. Short, and A.G. Westerman, 1989. A comparative ecological and toxicological investigation of a secondary wastewater treatment plant effluent and its receiving stream. *Environ. Toxicol. Chem. 8:* 437–450.

Birtwell, I.K., 1989. Comments on sensitivity of salmonids to reduced levels of dissolved oxygen and to pulp mill pollution in Neroutsos Inlet, British Columbia. *Canadian Tech. Rept Fish. Aquat Sci.,* 1695, 27 p.

Bitton, G. and B.J. Dutka, 1986. *Toxicity testing using microorganisms. Vol. 1.* CRC Press, Boca Raton, Fla.

BKH (Bongaerts, Kuyper, & Huiswaard Consulting) Engineers, 1990. Ecotoxicological effects assessment: Extrapolation from single species toxicity data. Prepared for the Netherlands Ministry of Housing, Physical Planning and Environment, The Hague, The Netherlands. 97 p.

Black, J., 1983. Field and laboratory studies of environmental carcinogenesis in Niagara River fish. *J. Great Lakes Res. 9:*326–334.

Blaise, C., R. Legault, N., Bermingham, R. van Coillie, and P. Vasseur, 1984. Microtest mesurant l'inhibition de la croissance des algues (CI50) par le dosage de l'ATP. *Sci. Tech. Eau, 17:*245–250.

Blaise, C., N. Bermingham, and R. Van Coillie, 1985. The integrated ecotoxicological approach to assessment of ecotoxicity. *Water Quality Bull., 10 (1):*3–10, 60–61.

Blaise, C., G. Sergy, P. Wells, N. Bermingham, and R. Van Coillie, 1988. Biological testing--development, application, and trends in Canadian Environmental Protection laboratories. *Toxicity Assess., 8:* 385–406.

Blaise, C., J.-F. Férard, and P. Vasseur, 1998. Microplate toxicity tests with microalgae: A review. p. 269–288, In: 1998. *Microscale testing in aquatic toxicology. Advances, techniques, and practice.* Wells, P.G., K. Lee, and C. Blaise (eds.), CRC Press, Boca Raton, Fla.

Blenkinsopp, S., P. Boileau, D. Kyle, G. Sergy, and M. Fingas, 1996. How to prepare water accommodated fractions from petroleum hydrocarbons for use in aquatic toxicity testing -- the basics. *Proc. of 19th AMOP Meeting,* June 12-14, 1996, Vol. 1:515–528, Calgary, Alberta.

Bol, J., H.J.M. Verhaar, C.J. van Leeuwen, and J.L.M. Hermens, 1993a. Predictions of the aquatic toxicity of high-production-volume-chemicals. Part A: Introduction and methodology. The Netherlands Ministerie van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer, Diretoraat-Generaal Milieubeheer, nr. 1993/9a, 11 p. + encl.

———. 1993b. Predictions of the aquatic toxicity of high-production-volume-chemicals. Part B: prediction. The Netherlands Ministerie van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer, Diretoraat-Generaal Milieubeheer, nr. 1993/9b, 125 p.

Bonsor, N., N. McCubbin, and J.B. Sprague, 1988. Kraft mill effluents in Ontario. Prepared for Ontario Ministry of Environment, Pulp and Paper Sector of MISA, Technical Advisory Committee, Toronto, Ont.

Borgmann, U., R. Cove, and C. Loveridge, 1980. Effect of metals on the biomass production kinetics of freshwater copepods. *Can. J. Fish. Aquat. Sci., 37:*567–575.

Borgmann, U., W.P. Norwood, and I.M. Babirad, 1991. Relationship between chronic toxicity and bioaccumulation of cadmium in *Hyalella azteca*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci., 48:*1055–1060.

Botosaneanu, L. (ed.), 1986. Stygofauna mundi. A faunistic, distributional, and ecological synthesis of the world fauna inhabiting subterranean waters (including the marine interstitial). E.J. Brill/Dr. W. Backhuys, Leiden, the Netherlands.

Bradley, R.W. and J.B. Sprague, 1985. The influence of pH, water hardness, and alkalinity on the acute lethality of zinc to rainbow trout *(Salmo gairdneri)*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci., 42:* 731–736.

Brady, N.C., 1974. *The nature and properties of soils.* 8th ed. MacMillan Pub. Co., New York, N.Y. 639 p.

Bretthauer, E.W., 1992. The challenge of ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem., 11:*1661–1662.

Broderius, S.J., 1991. Modeling the joint toxicity of xenobiotics to aquatic organisms: basic concepts and approaches. p. 107–127, In: Aquatic toxicology and risk assessment: 14th vol. M.A. Mayes and M.G. Barron (eds.), ASTM STP 1124, Amer. Soc. Testing and Materials, Philadelphia, Pa.

Bruce, R.D. and D.J. Versteeg, 1992. A statistical procedure for modeling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem., 11:*1485–1494.

Buikema, A.L. Jr. and E.F. Benfield, 1979. Use of macroinvertebrate life history information in toxicity tests. *J. Fish. Res. Board Can., 36:*321–328.

Buikema, A.L. Jr. and J.R. Voshell Jr., 1993. Toxicity studies using freshwater benthic macroinvertebrates. p. 344–398, In: *Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates.* D.M. Rosenberg and V.H. Resh (eds.), Chapman & Hall, New York, N.Y.

Buikema, A.L. Jr., B.R. Niederlehner, and J. Cairns Jr., 1982. Biological monitoring, Part IV -- toxicity testing. *Water Res., 16:*239–262.

Burmaster, D.E., C.A. Menzie, and J.S. Freshman, 1991. Assessment of methods for estimating aquatic hazards at superfund-type sites: a cautionary tale. *Environ. Toxicol. Chem., 10:*827–842.

Burns, L.A., C.G. Ingersoll, and G.A. Pascoe, 1994. Ecological risk assessment: Application of new approaches and uncertainty analysis. *Environ. Toxicol. Chem., 13:*1873–1874.

Burton, G.A. Jr., 1991. Assessing the toxicity of freshwater sediments. *Environ. Toxicol. Chem., 10:*1587–1628.

———. (ed.), 1992. *Sediment toxicity assessment.* Lewis Pub., Boca Raton, Fla.

Burton, G.A. Jr., T.J. Norberg-King, C.G. Ingersoll, G.T. Ankley, P.V. Winger, J. Kubitz, J.M. Lazorchak, M.E. Smith, E. Greer, F.J. Dwyer, D.J. Call, K.E. Day, P. Kennedy, and M. Stinson, 1996. Interlaboratory study of precision: *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* freshwater sediment toxicity assays. *Environ. Toxicol. Chem., 15:*1335–1342.

Cairns, J. Jr., 1983. Are single species toxicity tests alone adequate for estimating environmental hazard? *Hydrobiologia, 100:*47–57.

———. (ed.), 1985. *Multispecies toxicity testing.* Pergamon Press, New York, N.Y.

———. 1986. What is meant by validation of predictions based on laboratory toxicity tests? *Hydrobiologia, 137:* 271–278.

———. 1988a. What constitutes field validation of predictions based on laboratory evidence? p. 361–368, In: *Aquatic toxicology and hazard assessment: 10th vol.* W.J. Adams, G.A. Chapman, and W.G. Landis (eds.), Amer. Soc. Testing and Materials, Philadelphia, Pa., ASTM STP 971.

———. 1992. The threshold problem in ecotoxicology. *Ecotoxicology, 1:*3-16.

Cairns, J. Jr. and P.V. McCormick, 1992. Developing an ecosystem-based capability for ecological risk assessments. *The Environ. Professional, 14:*186–196.

Cairns, J., K.L. Dickson, and A.W. Maki, 1978. Summary and conclusions. p. 191–197, In: *Estimating the hazard of chemical substances to aquatic life.* J. Cairns, K.L. Dickson, and A.W. Maki (eds.), Amer. Soc. Testing and Materials, Philadelphia, Pa., ASTM STP 657.

Cairns, J. Jr., K.W. Thompson, J.D. Landers Jr., M.T. McKee, and A.C. Hendricks, 1980. Suitability of some freshwater and marine fishes for use with a minicomputer interfaced biological monitoring system. *Water Resour. Bull., 16:*421–427.

Cairns, J. Jr., B.R. Niederlehner, and E.P. Smith, 1992. The emergence of functional attributes as endpoints in

ecotoxicology. p. 111–128, In: *Sediment toxicity assessment.* G.A. Burton, Jr. (ed.), Lewis Pub., Boca Raton, Fla.

Cairns, J. Jr., B.R. Niederlehner, and E.P. Smith, 1998. Correspondence of a microscale toxicity test to responses to toxicants in natural systems. p. 539–547, In: 1998. *Microscale testing in aquatic toxicology. Advances, techniques, and practice.* P.G. Wells, K. Lee, and C. Blaise (eds.), CRC Press, Boca Raton, Fla.

Calabrese, E.J. and L.A. Baldwin, 1993. *Performing ecological risk assessments.* Lewis Pub., Ann Arbor, Mich., 288 p.

California, 1972. Water quality control plan for ocean waters of California. State of California, The Resources Agency, State Water Resources Control Board, Sacramento, California. Unnumbered rept.

Calleja, M.C. and G. Persoone, 1993. The influence of solvents on the acute toxicity of some lipophilic chemicals to aquatic invertebrates. *Chemosphere, 26:*2007–2022.

Campbell, P.G.C. and P.M. Stokes, 1985. Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. *Can. J. Fish. Aquat. Sci., 42:*2034–2049.

Campbell, P.M., and T.H. Hutchinson, 1998. Wildlife and endocrine disrupters: requirements for hazard identification. *Environ. Toxicol. Chem., 17:*127–135.

Canfield, T.J., N.E. Kemble, W.G. Brumbaugh, F.J. Dwyer, C.G. Ingersoll, and J.F. Fairchild, 1994. Use of benthic invertebrate community structure and the sediment quality triad to evaluate metal contaminated sediment in the Upper Clark Fork River, Montana. *Environ. Toxicol. Chem., 13:*199–2012.

Canton, S.P., and W.D. Van Derveer, 1997. Selenium toxicity to aquatic life: an argument for sediment-based water quality criteria. *Environ. Toxicol. Chem., 16:*1255–1259.

Carder, J.P., and K.D. Hoagland, 1998. Combined effects of Alachlor and Atrazine on benthic algal communities in artificial streams. *Environ. Toxicol. Chem. 17:*1415–1420.

Carlson, R.W. and R.A. Drummond, 1978. Fish cough response -- a method for evaluating quality of treated complex effluents. *Water Res., 12:*1–6.

Carlson, A.R., G.L. Phipps, V.R. Mattson, P.A. Kosian, and A.M. Cotter, 1991. The role of acid-volatile sulphide in determining cadmium bioavailability and toxicity in freshwater sediments. *Environ. Toxicol. Chem., 10:*1309–1320.

Carr, R.S., 1998. Marine and estuarine porewater toxicity testing. p. 5232–5238, In: 1998. *Microscale testing in aquatic toxicology. Advances, techniques, and practice.* P.G. Wells, K. Lee, and C. Blaise (eds.), CRC Press, Boca Raton, Fla.

Carr, R.S., E.R. Long, H.I. Windom, D.C. Chapman, G. Thursby, G.M. Sloane, and D.A. Wolfe, 1996. Sediment quality assessment studies of Tampa Bay, Florida. *Environ. Toxicol. Chem., 15:*1218–1231.

Carrier, R. and T.L. Beitinger, 1988. Reduction in thermal tolerance of *Notropis lutrensis* and *Pimephales promelas* exposed to cadmium. *Water Res., 22:*511–515.

CCME (Canadian Council of Ministers of the Environment), 1991a. Interim Canadian environmental quality criteria for contaminated sites. Rept CCME EPC-CS34, CCME, Subcommittee on Environmental Quality Criteria for Contaminated Sites, Winnipeg, Man. 20 p.

———. 1991b. Appendix IX. A protocol for the derivation of water quality guidelines for the protection of aquatic life. (April 1991). In: Canadian water quality guidelines, Canadian Council of Resource and Environment Ministers. 1987. Prepared by the Task Force on Water Quality Guidelines. [Reprinted in CCME 1998].

———. 1992. National classification system for contaminated sites. Rept no. CCME EPC-CS39E. Prepared by the CCME Subcommittee on Classification of Contaminated Sites, CCME, Winnipeg, Man.,54 p.

———. 1993a. Appendix XV. Canadian water quality guidelines. Updates (October 1993). Protocols for deriving water quality guidelines for the protection of agricultural water uses. In: Canadian water quality guidelines. CCREM. 1987. Prepared by the Task Force on Water Quality Guidelines. 18 p.

———. 1993b. Guidance manual on sampling, analysis, and data management for contaminated sites. Volume I: main report. Rept no. CCME-EPC-NCS-62E, CCME, Winnipeg, Man., 71 p.

———. 1993c. Guidance manual on sampling, analysis, and data management for contaminated sites. Volume II: analytical method summaries. Rept no. CCME-EPC-NCS-66E. CCME, Winnipeg, Man.,171 p.

———. 1995. Protocol for the derivation of Canadian sediment quality guidelines for the protection of aquatic life.

Rept CCME EPC-98E. CCME, Task Group on Water Quality Guidelines, Ottawa, Ont. 38 p.

———. 1996a. Guidance manual for developing site-specific soil quality remediation objectives for contaminated sites in Canada. Unnumbered rept., CCME, Subcommittee on Environmental Quality Criteria for Contaminated Sites. Winnipeg, Man. 50 p.

———. 1996b. A protocol for the derivation of environmental and human health soil quality guidelines. Unnumbered rept., CCME Subcommittee on Environmental Quality Criteria for Contaminated Sites, Winnipeg, Man. 169 p.

———. 1996c. Canadian environmental quality guidelines for dioxins and furans. CCME Task Group on Water Quality Guidelines, Ottawa. Final draft.

———. 1996d. A framework for ecological risk assessment. General guidance. Unnumbered rept, CCME, Subcommittee on Environmental Quality Criteria for Contaminated Sites, Winnipeg, Man. 50 p.

———. 1996e. A framework for ecological risk assessment. Technical appendices. Unnumbered rept., CCME, Subcommittee on Environmental Quality Criteria for Contaminated Sites, Winnipeg, Man. 140 p.

———. 1997a. Recommended Canadian soil quality guidelines. Unnumbered rept., CCME, Subcommittee on Environmental Quality Criteria for Contaminated Sites. Winnipeg, Man. 185 p.

———. 1997b. Protocol for the derivation of Canadian tissue residue guidelines for the protection of wildlife that consume aquatic biota. CCME Task Group on Water Quality Guidelines, Ottawa.

———. 1998. Canadian environmental quality guidelines, Canadian Council of Ministers of the Environment, Winnipeg, Man.

CCREM (Canadian Council of Resource and Environment Ministers), 1987. Canadian water quality guidelines. Prepared by the Task Group on Water Quality Guidelines, Ottawa, Ont.

CEPA (Canadian Environmental Protection Act), 1988. Interim guidance for the application of rapidly rendered harmless (RRH) and trace contaminants. Canadian Environmental Protection Act, R.S., c. 16 (4th Supp.), Subsection 71(3).

Chapman, G.A., B.S. Anderson, A.J. Bailer, R.B. Baird, R. Berger, D.T. Burton, D.L. Denton, W.L. Goodfellow Jr., M.A. Heber, L.L. McDonald, T.J. Norberg-King, P.J. Ruffier, 1996. Methods and appropriate endpoints, discussion synopsis. p. 51–82, In: *Whole effluent toxicity testing: an evaluation of methods and prediction of receiving system impacts.* D.R. Grothe, K.L. Dickson, and D.K. Reed-Judkins (eds.). Soc. Environ. Toxicol. Chem., SETAC Special Pub. Series, SETAC Press, Pensacola, Fla.

Chapman, P.M, 1986. Sediment quality criteria from the sediment quality triad: An example. *Environ. Toxicol. Chem., 5:*957–964.

———. 1989a. A bioassay by any other name might not smell the same. *Environ. Toxicol. Chem., 8:*557.

———. 1989b. Review. Current approaches to developing sediment quality criteria. *Environ. Toxicol. Chem., 8:* 589–599.

———. 1990. The sediment quality triad approach to determining pollution-induced degradation. *Science Total Environ., 97/98:*815–825.

———. 1995. Ecotoxicology and pollution -- Key issues. *Marine Pollution Bull., 31:*167–177.

———. 1996. Presentation and interpretation of sediment quality triad data. *Ecotoxicology, 5:*327–339.

Chapman, P.M. and R. Fink, 1984. Effects of Puget Sound sediments and their elutriates on the life cycle of *Capitella capitata. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 33:*451–459.

Chapman, P.M., R.N. Dexter, and E.R. Long, 1987. Synoptic measures of sediment contamination, toxicity and infaunal community structure (the sediment quality triad) in San Francisco Bay. *Mar. Ecol. Prog. Ser., 37:*75–96.

Chapman, P.M., E.A. Power, R.N. Dexter, and H.B. Anderson, 1991. Evaluation of effects associated with an oil platform, using the sediment quality triad. *Environ. Toxicol. Chem., 10:*407–424.

Chapman, P.M., E.A. Power, and G.A. Burton Jr., 1992. Integrative assessments in aquatic ecosystems. p. 313–340, In: *1992. Sediment toxicity assessment.* G.A. Burton, Jr. (ed.), Lewis Pub., Boca Raton, Fla.

Chapman, P.M., A. Fairbrother, and D. Brown, 1998. A critical evaluation of safety (uncertainty) factors for ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem., 17:*99–108.

Chevrier, A. and L. Porebski, 1993. Development of marine bioassays for use in pollution prevention -- An example: Ocean disposal. *Symp. on Environ. Effects Monitoring (EEM),* Quebec (Quebec), October 1993.

Chevrier, A. and P. Topping, 1998. National guidelines for monitoring dredged and excavated material at ocean disposal sites. Unnumbered rept, Dec. 1998. Environment Canada, Marine Environ. Div., Disposal at Sea Program, Ottawa.

Christensen, E.R. and C-Y Chen, 1991. Modeling of combined toxic effects of chemicals. *Toxic Substances J., 11:*1–63.

Clements, W.H. and P.M. Kiffney, 1996. Validation of whole effluent toxicity tests: Integrated studies using field assessments, microcosms, and mesocosms. p. 229–244, In: Whole effluent toxicity testing: an evaluation of methods and prediction of receiving system impacts. D.R. Grothe, K.L. Dickson, and D.K. Reed-Judkins (eds). Soc. Environ. Toxicol. Chem., SETAC Special Pub. Series, SETAC Press, Pensacola, Fla.

Clements, W.H., D.S. Cherry, and J. Cairns Jr., 1988. Structural alterations in aquatic insect communities exposed to copper in laboratory streams. *Environ. Toxicol. Chem., 7:*715–722.

Coler, R.A., M.S. Coler, and P.T. Kostecki, 1988. Tubificid behaviour as a stress indicator. *Water Res., 22:*263–267.

Costan, G., N. Bermingham, C. Blaise, and J.F. Ferard, 1993. Potential Ecotoxic Effects Probe (PEEP): A novel index to assess and compare the toxic potential of industrial effluents. *Environ. Toxicol. Water Qual., 8:*115–140.

Cripe, G.M., A. Ingley-Guezou, L.R. Goodman, and J. Forester, 1989. Effect of food availability on the acute toxicity of four chemicals to *Mysidopsis bahia* (Mysidacea) in static exposures. *Environ. Toxicol. Chem., 8:*333–338.

Crossland, N.O. and G.C. Mitchell, 1992. Use of outdoor artificial streams to determine threshold toxicity concentrations for a petrochemical effluent. *Environ. Toxicol. Chem., 11:*49–59.

Curtis, G.L, 1990. Recovery of offshore lake trout *(Salvelinus namaycush)* population in eastern Lake Superior. *J. Great Lakes Res., 16:*7–15.

Cusimano, R.F., D.F. Brakke, and G.A. Chapman, 1986. Effects of pH on the toxicities of cadmium, copper, and zinc to steelhead trout *(Salmo gairdneri). Can. J. Fish. Aquat. Sci., 43:*1497–1503.

Danielopol, D.L., 1992. New perspective in ecological research of groundwater organisms. p. 15–22, In: Proc. First International Conference on Ground Water Ecology, April 26-29, 1992, J.A. Stanford and J.J. Simons (eds.), Tampa, Fla.

Dankwardt, A., S. Pullen, and B. Hock, 1998. Immunoassays: applications for the aquatic environment. p. 13–29, In: 1998. *Microscale testing in aquatic toxicology. Advances, techniques, and practice.* P.G. Wells, K. Lee, and C. Blaise (eds.), CRC Press, Boca Raton, Fla.

Dasappa, S.M. and R. Loehr, 1991. Toxicity reduction in contaminated soil bioremediation processes. *Water Res., 25:*1121–1130.

Davies, P.H. and J.D. Woodling, 1980. Importance of laboratory-derived metal toxicity results in predicting in-stream response of resident salmonids. p. 281–299, In: *Aquatic toxicology.* ASTM STP 707. J.G. Eaton, P.R. Parrish, and A.C. Hendricks (eds.), ASTM, Philadelphia Pa.

Day, K.E., 1991. Effects of dissolved organic carbon on accumulation and acute toxicity of fenvalerate, deltamethrin and cyhalothrin to *Daphnia magna* (Straus). *Environ. Toxicol. Chem., 10:*91–101.

Day, K., T. Reynoldson, and D. Rosenberg, 1996. The reference condition: Implications for biomonitoring of water and sediment quality in Canada. Soc. Environ. Toxicol. Chemistry, Pensacola, Fla., *SETAC News, Nov. 1996:*15–16.

Denizeau, F., 1998. The use of fish cells in the toxicological evaluation of environmental contaminants. p. 113–128, In: *1998. Microscale testing in aquatic toxicology. Advances, techniques, and practice.* P.G., Wells, K. Lee, and C. Blaise (eds.), CRC Press, Boca Raton, Fla.

de Peyster, A. and K. Day, 1998. Ecological risk assessment: A meeting of policy and science. Soc. Environ. Toxicol. Chem., SETAC Press, Pensacola, Fla., 225 p.

Detenbeck, N.E., P.W. DeVore, G.J. Niemi, and A. Lima, 1992. Recovery of temperate-stream fish communities from disturbance: A review of case studies and synthesis of theory. *Environ. Manage., 16:*33–53.

Dewey, S.L., 1986. Effects of the herbicide atrazine on aquatic insect community structure and emergence. *Ecology, 67:*148–162.

DeWitt, T.H., G.R. Ditsworth, and R.C. Swartz, 1988. Effects of natural sediment features on survival of the phoxocephalid amphipod *Rheopoxynius abronius*. *Mar. Environ. Res., 25:*99–124.

Dewitt, T.H., R.C. Swartz, and J.O. Lamberson, 1989. Measuring the acute toxicity of estuarine sediments. *Environ. Toxicol. Chem. 8:*1035–1048.

DFO (Department of Fisheries and Oceans), 1992. Fisheries Act. Pulp and paper effluent regulations. Canada Gazette Part II, Vol. 126, No. 11, May 7, 1992, p. 1967–2006.

Diaz, R.J., 1992. Ecosystem assessment using estuarine and marine benthic community structure. p. 67–85, In: *Sediment toxicity assessment.* G.A. Burton (ed.), Lewis Publishers, Boca Raton, Fla.

Dickson, K.L., W.T. Waller, J.H. Kennedy, and L.P. Ammann, 1992. Assessing the relationship between ambient toxicity and instream biological response. *Environ. Toxicol. Chem., 11:*1307–1322.

Di Toro, D.M., J.D. Mahony, D.J. Hansen, K.J. Scott, M.B. Hicks, S.M. Mayr, and M.S. Redmond, 1990. Toxicity of cadmium in sediments: The role of acid volatile sulfide. *Environ. Toxicol. Chem., 9:*1487–1502.

Di Toro, D.M., C.S. Zarba, D.J. Hansen, W.J. Berry, R.C. Swartz, C.E. Cowan, S.P. Pavlou, H.E. Allen, N.A. Thomas, and P.R. Paquin, 1991. Technical basis for establishing sediment quality criteria for nonionic organic chemicals by using equilibrium partitioning. *Environ. Toxicol. Chem., 10:*1541–1586.

Dixon, D.G. and J.W. Hilton, 1981. Influence of available dietary carbohydrate content on tolerance of waterborne copper by rainbow trout. *J. Fish. Biol., 19:*509–517.

———. 1985. Effects of available dietary carbohydrate and water temperature on the chronic toxicity of waterborne copper to rainbow trout *(Salmo gairdneri). Can. J. Fish. Aquat. Sci., 42:*1007–1013.

Dixon, D.G. and J.B. Sprague, 1981a. Acclimation to copper by rainbow trout *(Salmo gairdneri)* -- A modifying factor in toxicity. *Can. J. Fish. Aquat. Sci., 38:*880–888.

———. 1981b. Copper bioaccumulation and hepatoprotein synthesis during acclimation to copper by juvenile rainbow trout. *Aquatic Toxicol., 1:*69–81.

Dixon, W.J. and F.J. Massey Jr., 1969. *Introduction to statistical analysis.* 3rd ed., McGraw-Hill, New York.

Doe, K.G., W.R. Ernst, W.R. Parker, G.R.J. Julien, and P.A. Hennigar, 1988. Influence of pH on the acute lethality of fenitrothion, 2,4-D and aminocarb and some pH-altered sublethal effects of aminocarb on rainbow trout *(Salmo gairdneri). Can. J. Fish. Aquat. Sci., 45:*287–293.

Douglas, W.S. and M.T. Horne, 1997. The interactive effects of essential ions and salinity on the survival of *Mysidopsis bahia* in 96-h acute toxicity tests of effluents discharged to marine and estuarine receiving waters. *Environ. Toxicol. Chem., 16:*1996–2001.

Donnelly, K.C., K.W. Brown, C.S. Anderson, and J.C. Thomas, 1991. Bacterial mutagenicity and acute toxicity of solvent and aqueous extracts of soil samples from an abandoned chemical manufacturing site. *Environ. Toxicol. Chem., 10:*1123–1131.

Dowdy, D.L. and T.E. McKone, 1997. Predicting plant uptake of organic chemicals from soil or air using octanol/water and octanol/air partition ratios and a molecular connectivity index. *Environ. Toxicol. Chem., 16:*2448–2456.

Durand, M.J., V. Cruciani, S. Alexandre, J.C. Hoflack, H. Bessi, C. Blaise, and P. Vasseur, 1998. *In vitro* assays for detection of nongenotoxic carcinogens. p. 129–140, In: 1998. Microscale testing in aquatic toxicology. Advances, techniques, and practice. P.G. Wells, K. Lee, and C. Blaise (eds.), CRC Press, Boca Raton, Fla.

Dutka, B.J. and G. Bitton, 1986. *Toxicity testing using microorganisms. Vol. 2.* CRC Press, Boca Raton, Fla.

Dutka, B.J., K. Jones, K.K. Kwan, H. Bailey, and R. McInnis, 1988. Use of microbial and toxicant screening tests for priority site selection of degraded areas in water bodies. *Water Res., 22:*503–510.

Eagleson, K.W., D.L. Lenat, L.W. Ausley, and F.B. Winborne, 1990. Comparison of measured instream biological responses with responses predicted using the *Ceriodaphnia dubia* chronic toxicity test. *Environ. Toxicol. Chem., 9:* 1019–1028.

EC (Environment Canada), 1971. Pulp and paper effluent regulations. Regulations, Codes and Protocols Rept 1, Environment Canada, Environmental Protection Service, Ottawa, Ont. 7 p.

———. 1972. Guidelines for the pulp and paper effluent regulations. Regulations, Codes and Protocols Rept 2, Environment Canada, Environmental Protection Service, Ottawa, Ont. 21 p.

———1990a. Biological test method: Acute lethality test using rainbow trout. EPS 1/RM/9, Environment Canada, Environmental Protection Service, Ottawa, Ont.

———. 1990b. Biological test method: Acute lethality test using threespine stickleback. EPS 1/RM/10, Environment Canada, Environmental Protection Service, Ottawa, Ont.

———. 1990c. Biological test method: Acute lethality test using *Daphnia* sp. EPS 1/RM/11, Environment Canada, Environmental Protection Service, Ottawa, Ont.

——— 1990d. Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants, EPS 1/RM/12, Environment Canada, Environmental Protection Service, Ottawa, Ont.

———. 1990e. Reference method for determining acute lethality of effluents to rainbow trout. EPS 1/RM/13, Environment Canada. Environmental Protection Service, Ottawa, Ont.

———. 1990f. Reference method for determining acute lethality of effluents to *Daphnia magna*. EPS 1/RM/14, Environment Canada, Environmental Protection Service, Ottawa, Ont.

———. 1992a. Biological test method: Test of reproduction and survival using the cladoceran *Ceriodaphnia dubia*. EPS 1/RM/21, Environment Canada, Environmental Protection Service, Ottawa, Ont.

———. 1992b. Biological test method: Test of larval growth and survival using fathead minnows. Rept EPS 1/RM/22, Environment Canada, Environmental Protection Service, Ottawa, Ont.

———. 1992c. Biological test method: Toxicity test using luminescent bacteria *Photobacterium phosphoreum*. EPS 1/RM/24, Environment Canada, Environmental Protection Service, Ottawa, Ont.

———. 1992d. Biological test method: Growth inhibition test using the freshwater alga *Selenastrum capricornutum*. Rept EPS 1/RM/25, Environment Canada, Environmental Protection Service, Ottawa, Ont.

———. 1992e. Biological test method: Acute test for sediment toxicity using marine or estuarine amphipods. EPS 1/RM/26, Environment Canada, Environmental Protection service, Ottawa, Ont.

———. 1992f. Biological test method: Fertilization assay using echinoids (sea urchins and sand dollars). EPS 1/RM/27. Environment Cnaada, Environmental Protection service, Ottawa, Ont.

———. 1992g. Fertilization assay with echinoids: Interlaboratory evaluation of test options. Environment Canada, Conservation and Protection, Technology Development Branch, Ottawa, Ont. Unpub. Rept. 45 p. + app.

———. 1992h. Pulp and paper mill effluent chlorinated dioxins and furans regulations. Canada Gazette, Part II, Vol. 126, No. 11, May 20, 1992, p. 1940–1954.

———. 1993a. Canadian toxicological testing laboratory accreditation program. Program description. Environment Canada, Environ. Technol. Advancement Dir., Ottawa, Ont. 26 p.

———. 1993b. A discussion paper on ocean disposal. Environment Canada, Environ. Prot., Marine Environ. Div., Ottawa, Ont. 22 p.

———. 1993c. Interim monitoring guidelines for ocean disposal. Environment Canada, Environmental Protection, Marine Environ. Div., Ottawa, Ont. 34 p.

———. 1994a. Towards a toxic substances management policy for Canada. A discussion document for consultation purposes. Environment Canada, Ottawa, Ont. Sept. 1994, 23 + 29 p.

———. 1994b. Biological monitoring guidelines. Addendum to the interim monitoring guidelines for ocean disposal. Environment Canada, Environmental Protection, Marine Environ. Div., Ottawa, Ont. 6 p.

———. 1994c. Guidance document for the collection and preparation of sediment for physicochemical characterization and biological testing. EPS 1/RM/29, Environment Canada, Environ. Protection Service, Ottawa, Ont.

———. 1994d. A review of whole organism bioassays for assessing the quality of soil, freshwater sediment, and fresh water in Canada. Sc. Ser. Rept no. 198, Prepared by C. Keddy, J.C. Greene, and M.A. Bonnell for Environment Canada, Evaluation and Interpretation Branch, Ottawa, Ont. 185 p.

———. 1994e. A framework for ecological risk assessment at contaminated sites in Canada: Review and recommendations. Sc. Ser. no. 199, Prepared by C. Gaudet, EVS Environment Consultants, and ESSA Environmental and Social Systems Analysts for Environment Canada,

Ecosystem Conservation Directorate, Evaluation and Interpretation Branch, Ottawa, Ont., 108 p.

———. 1994f. Interim guidance for the application of rapidly rendered harmless and trace contaminants. Unpublished document, November 1994, Environment Canada, Marine Environment Div., Ottawa, Ont. 6 p.

———. 1995a. Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. EPS 1/RM/30, Environment Canada, Environmental Protection Service, Ottawa, Ont.

———. 1995b. Users guide to the application form for ocean disposal. EPS 1/MA/1, Environment Canada, Environmental Protection Service, Marine Environment Div., Ottawa, Ont.

———. 1995c. Interim sediment quality guidelines. Environment Canada, Guidelines Division, Evaluation and Interpretation Branch, Ottawa, Ont.

———. 1996a. Application of recommended whole organism bioassays in the assessment of contaminated sites in Canada. Prepared by C. Keddy, J.C. Greene, and M.A. Bonnell for Environment Canada, Evaluation and Interpretation Branch, Ottawa, Ont.

———. 1996b. 1996 national compendium monitoring at ocean disposal sites in Canada. Unnumbered rept, Environment Canada, Marine Environment Div., Ottawa, Ont., 36 p.

———. 1996c. Interim data interpretation guidelines for monitoring at ocean disposal sites. Unnumbered rept., Environment Canada, Marine Environment Div., Ottawa, Ont., 2 p.

———. 1997a. Biological test method. Test for growth and survival in sediment using larvae of freshwater midges *(Chironomus tentans* or *Chironomus riparius)*. EPS 1/RM/32, Environment Canada, Environment Protection Service, Ottawa, Ont.

———. 1997b. Biological test method. Test for growth and survival in sediment using the freshwater amphipod *Hyalella azteca*. EPS 1/RM/33, Environment Canada, Environment Protection Service, Ottawa, Ont.

———. 1997c. Toxicology Expert Working Group report. EEM/1997/5, Environment Canada, Ottawa, Ont.

———. 1997d. Environmental assessments of priority substances under the Canadian Environmental Protection Act. Guidance Manual Version 1.0. EC, EPS/2/CC/3E, Environment Canada, Commercial Chemicals Evaluation Branch, Chemicals Evaluation Division, Ottawa, Ont.

———. 1998. Biological test method: toxicity tests using early life stages of rainbow trout. Second edition. EPS 1/RM/28, Environment Canada, Environment Protection Service, Ottawa, Ont.

———. 1999. Biological test method: Test for measuring the inhibition of growth using the freshwater macrophyte *Lemna minor*. EPS 1/RM/37, Environment Canada, Environment Protection Service, Ottawa, Ont.

———. 2000a. Pulp and paper aquatic environmental effects monitoring requirements. EEM/2000/1, Annex 1. Environment Canada, Ottawa, Ont.

———. 2000b. Pulp and paper technical guidance for aquatic environmental effects monitoring. EEM/2000/2, Environment Canada, Ottawa, Ont.

———. in prep., a. Guidance document on statistical methods for estimating endpoints of toxicity tests. Rept EPS 1/RM/??, Environment Canada, Environ. Protection Service, Ottawa, Ont.

———. in prep., b. Biological test method. Test for growth and survival in sediment using marine or estuarine polychaete worms. EPS 1/RM/??, Environment Canada, Environment Protection Service, Ottawa, Ont.

EC and HWC (Environment Canada and Health and Welfare Canada), 1993. Guidelines for the notification and testing of new substances: Chemicals and polymers. Pursuant to the New Substances Notification Regulations of *Canadian Environmental Protection Act*. Environment Canada, Conservation and Protection, and Health and Welfare Canada, Health Protection Branch, Ottawa, Ont., 220 p.

EEC (European Economic Community), 1992a. Development and validation of methods for evaluating chronic toxicity to freshwater ecosystems. Final report (summary). EEC, Environ. Res. Programme, Assessment of Risk Associated with Chemicals (Ecotoxicology). Brussels.

———. 1992b. Part C: Methods for the determination of ecotoxicity. Official Journal of the European Communities L 383 A, *Vol. 35*:163–235.

Eisenhart, C., M.W. Hastay, and W.A. Wallis, 1947. *Techniques of statistical analysis*. McGraw-Hill, New York.

Elliot, J.E., R.W. Butler, R.J. Norstrom, and P.E. Whitehead, 1989. Environmental contaminants and reproductive

success of great blue herons *Ardea herodias* in British Columbia, 1986–87. *Environ. Pollut., 59*:91–114.

Elliot, J.E. and R.J. Norstrom, 1998. Chlorinated hydrocarbon contaminants and productivity of bald eagle populations on the Pacific coast of Canada. *Environ. Toxicol. Chem., 17:*1142–1153.

Elson, P.F., 1966. Impact on salmon of spraying insecticide over forests. Advances in Water Pollut. Res., *Proc. 3rd Internat. Conf., Munich, 1966, 1:*55–74.

———. 1974. Impact of recent economic growth and industrial development on the ecology of Northwest Miramichi Atlantic salmon *(Salmo salar). J. Fish. Res. Board Can., 31:*521–544.

Elzerman, A. (ed.), 1992. Structure-activity relationships for environmental applications. *Environ. Toxicol. Chem. 11:*885–992.

Emans, H.J.B., E.J. v.d. Plassche, J.H. Canton, P.C. Okkerman, and P.M. Sparenburg, 1991. Validation of some extrapolation methods used for effect assessment. *Environ. Toxicol. Chem., 12:*2139–2154.

Emery, V.L. Jr., D.W. Moore, B.R. Gray, B.M. Duke, A.B. Gibson, R.B. Wright, and J.D. Farrar, 1997. Development of a chronic sublethal sediment bioassay using the estuarine amphipod *Leptocheirus plumulosus* (Shoemaker). *Environ. Toxicol. Chem., 16:*1912–1920.

Ernst, W., K. Doe, P. Jonah, J. Young, G. Julien, and P. Hennigar, 1991. The toxicity of chlorothalonil to aquatic fauna and the impact of its operational use on a pond ecosystem. *Arch. Environ. Contam. Toxicol., 21:*1–9.

Evans, R.D., J.R. Wisniewski, and J. Wisniewski (eds.), 1997. The interactions between sediments and water. *Proceedings of the 7th Internat. Sympos. Kluwer Acad. Pub.*, Norwell, Mass., 739 p.

Fahmy, F.K. and K. Schiefer, 1980. Application of the toxic contributions concept to multi-stream effluents. *Proc. Internat. sympos. on principles for interpretation of results of testing procedures in ecotoxicology,* Sept. 30–Oct. 2, 1980, Valbonne, France. [Commission of the European Communities, Rept EUR 7549, p. 453–462.]

Felsot, A.S., M.A. Bhatti, G.I. Mink, and G. Reisenauer, 1996. Biomonitoring with sentinel plants to assess exposure of nontarget crops to atmospheric deposition of herbicide residues. *Environ. Toxicol. Chem., 15:*452–459.

Ferrier, V., L. Gauthier, C. Zoll-Moreux, and J. L'Haridon, 1998. Genotoxicity tests in amphibians -- A review. p. 507–519, In: 1998. *Microscale testing in aquatic toxicology. Advances, techniques, and practice.* Wells, P.G., K. Lee, and C. Blaise (eds.), CRC Press, Boca Raton, Fla.

Fisher, J.W., R.A. Dilego, M.E. Putnam, J.M. Livingston, and D.L. Geiger, 1983. Biological monitoring of bluegill activity. *Water Resour. Bull., 19:*211–215.

Fisk, A.T., R.J. Norstrom, C.D. Cymbalisty, and D.C.G. Muir, 1998. Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: Bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. *Environ. Toxicol. Chem., 17:* 951–961.

Fitzgerald, D.G., K.A. Warner, R.P. Lanno, and D.G. Dixon, 1996. Assessing the effects of modifying factors on pentachlorophenol toxicity to earthworms: Applications of body residues. *Environ. Toxicol. Chem., 15:*2299–2304.

Fletcher, J.S., J.E. Nellessen, and T.G. Pfleeger, 1994. Literature review and evaluation of the EPA food-chain (Kenaga) nomogram, an instrument for estimating pesticide residues on plants. *Environ. Toxicol. Chem., 13:*1383–1392

Fogels, A. and J.B. Sprague, 1977. Comparative short-term tolerance of zebrafish, flagfish and rainbow trout to five poisons including reference toxicants. *Water Res., 11:*811–817.

Forbes, T.L., V.E. Forbes, A. Giessing, R. Hansen, and L.K. Kure, 1998. Relative role of pore water versus ingested sediment in bioavailability of organic contaminants in marine sediments. *Environ. Toxicol. Chem., 17:*2453–2462.

Forsyth, D.J., C.F. Hinks, and N.D. Westcott, 1994. Feeding by clay-colored sparrows on grasshoppers and toxicity of carbofuran residues. *Environ. Toxicol. Chem., 13:*781–788.

Fossi, M.C., C. Leonzio, and S. Focardi, 1991. Modulation of mixed-function oxidase activity in black-headed gulls living in anthropic environments: biochemical acclimatization or adaptation? *Environ. Toxicol. Chem., 10:*1179–1188.

Foth, H.D. and L.M. Turk, 1972. *Fundamentals of soil science.* 5th ed. John Wiley & Sons, New York, N.Y. 454 p.

Fry, F.E.J., 1947. *Effects of the environment on animal activity.* Univ. Toronto Studies, Biol. Series no. 55, Pub. Ont. Fish. Res. Lab. 68: 62 p.

Fu, G., H.E. Allen, and Y. Cao, 1992. The importance of humic acids to proton and cadmium binding in sediments. *Environ. Toxicol. Chem., 11:*1363–1372.

Gagnon, C., M. Arnac, and J-R. Brindle, 1992. Sorption interactions between trace metals (Cd and Ni) and phenolic substances on suspended clay minerals. *Water Res., 26:*1067–1072.

Gagnon, M.M., J.J. Dodson, P.V. Hodson, G. Van Der Kraak, and J.H. Carey, 1994. Seasonal effects of bleached kraft mill effluent on reproductive parameters of white sucker *(Catostomus commersoni)* populations of the St. Maurice River, Quebec, Canada. *Can. J. Fish. Aquat. Sci., 51:*337–347.

Galassi, S., L. Guzzella, M. Mingazzini, L. Viganò, S. Capri, and S. Sora, 1992. Toxicological and chemical characterization of organic micropollutants in River Po waters (Italy). *Water Res., 26:*19–27.

Gardner, M. and A. Gunn, 1989. The effect of natural ligands on trace metal partitioning. *Chemosphere, 19:*1251–1259.

Gaudet, C.L., D.A. Milne, M.P. Wong, and T.G.E. Nason, 1995. A framework for ecological risk assessment at contaminated sites in Canada. Part II. Recommendations. *Human and Ecol. Risk Assessment, 1:*207–230.

Geckler, J.R., W.B. Horning, T.M. Neiheisel, Q.H, Pickering, E.L. Robinson, and C.E. Stephan, 1976. Validity of laboratory tests for predicting copper toxicity in streams. USEPA, Ecol. Res. Ser., EPA-600/3-76-116. Washington, D.C.

Giesy, J.P. and P.M. Allred, 1985. *Replicability of aquatic multispecies test systems.* p. 187–247, In: *Multispecies toxicity testing.* Cairns, J. Jr. (ed.), Pergamon Press, New York, N.Y.

Giesy, J.P. and R.A. Hoke, 1989. Freshwater sediment toxicity bioassessment: rationale for species selection and test design. *J. Great Lakes Res., 15:*539–569.

Giesy, J.P., C.J. Rosiu, and R.L. Graney, 1990. Benthic invertebrate bioassays with toxic sediment and pore water. *Environ. Toxicol. Chem., 9:*233–248.

Gillesby, B.E. and T.R. Zacharewski, 1998. Exoestrogens: Mechanisms of action and strategies for identification and assessment. *Environ. Toxicol. Chem., 17:*3–14.

Girling, A.E., R.K. Markarian, and D. Bennett, 1992. Aquatic toxicity testing of oil products -- Some recommendations. *Chemosphere, 24:*1469–1472.

Golder [Golder Associates Ltd.], 1996. Guidance manual for the use of toxicity assessment to develop site specific remediation criteria for oil and gas facilities. Golder Assoc. Ltd., Calgary. Report prepared for Canad. Assoc. of Petroleum Producers, Calgary, Alta.

Graney, R.L., J.P. Giesy, and J.R. Clark, 1995. Field studies. p. 257–305, In: *Fundamentals of aquatic toxicology.* 2nd ed. G.M. Rand (ed.), Taylor and Francis, Washington, D.C.

Graney, R.L., J.H. Kennedy, and J.H. Rodgers, 1994. Aquatic mesocosm studies in ecological risk assessment. Spec. Pub. Soc. Environ. Toxicol Chem., Lewis Pub., Boca Raton, Fla. 736 p.

Gray, L.E. Jr., J. Ostby, C. Wolf, C. Lambright, and W. Kelce, 1998. The value of mechanistic studies in laboratory animals for the prediction of reproductive effects in wildlife: endocrine effects on mammalian sexual differentiation. *Environ. Toxicol. Chem., 17:*109–118.

Green, D.W.J., K.A. Williams, D.R.L. Hughes, G.A.R. Shaik, and D. Pascoe, 1988. Toxicity of phenol to *Asellus aquaticus* (L.) -- Effects of temperature and episodic exposure. *Water Res., 22:*225–231.

Green, R.H., J.M. Boyd, and J.S. Macdonald, 1993. Relating sets of variables in environmental studies: The sediment quality triad as a paradigm. *Environmetrics, 4:*439–457.

Greene, J.C., C.L. Bartels, W.J. Warren-Hicks, B.R. Parkhurst, G.L. Linder, S.A. Peterson, and W.E. Miller, 1989. Protocols for short term toxicity screening of hazardous waste sites. USEPA, EPA-3/88/029.

Greim, H., J. Ahler, R. Bias, B. Broecker, A.O. Gamer, H.-P. Gelbke, W.G. Haltrich, H.-J. Klimisch, I. Mangelsdorf, N. Schön, G. Stropp, R. Vogel, G. Welter, and E. Bayer, 1993. Priority setting for the evaluation of existing chemicals; the approach of the German advisory committee on existing chemicals of environmental relevance (BUA). *Chemosphere, 26:*1653–1666.

Grothe, D. and R. Kimerle, 1985. Inter- and intra-laboratory variability in *Daphnia magna.* Effluent toxicity results. *Environ. Toxicol. Chem., 4:*189–192.

Grothe, D.R., K.L. Dickson, and D.K. Reed-Judkins (eds.), 1996. Whole effluent toxicity testing: an evaluation of methods and prediction of receiving system impacts. Soc. Environ. Toxicol. Chem., SETAC Special Pub. Series, SETAC Press, Pensacola, Fla. 346 p.

Guillette, L.J. Jr., D.B. Pickford, D.A. Crain, A.A. Rooney, and H.F. Percival, 1996. Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment. *Gen. Comp. Endocrinol., 101:*680–688.

Hall, A.T. and J.T. Oris, 1991. Anthracene reduces reproductive potential and is maternally transferred during long-term exposure in fathead minnows. *Aquatic Toxicol., 19:*249–264.

Hall, L.H., E.L. Maynard, and L.B. Kier, 1989. Structure-activity relationship studies on the toxicity of benzene derivatives: III. Predictions and extension to new substituents. *Environ. Toxicol. Chem., 8:*431–436.

Hamilton, J.D., and R. Sutcliffe, 1997. *Ecological assessment of polymers. Strategies for product stewardship and regulatory programs.* Van Nostrand Reinhold, Toronto. 345 p.

Hamr, P., R.S. Kirby, P. Gillis, and K.E. Day, 1994. Development of methodologies for whole-sediment toxicity tests with benthic invertebrates. (a) Optimum age for initiation and duration of the *Hyalella azteca* survival and growth test. (b) Formulation of artificial sediment(s) for use in reference toxicity tests with benthic invertebrates. Unpub. Rept. Environment Canada, Conservation and Protection, Technology Development Directorate, Ottawa, Ont. 28 p. + Tables and Figures.

Hansen, D.J., W.J. Berry, J.D. Mahony, W.S. Boothman, D.M. Di Toro, D.L.Robson, G.T. Ankley, D. Ma, Q. Yan, and C.E. Pesch, 1996. Predicting the toxicity of metal-contaminated field sediments using interstitial concentration of metals and acid-volatile sulfide normalizations. *Environ. Toxicol. Chem., 15:*2080–2094.

Hansen, S.R. and R.R. Garton, 1982. Ability of standard toxicity tests to predict the effects of the insecticide diflubenzuron on laboratory stream communities. *Can. J. Fish. Aquat. Sci., 39:*1273–1288.

Harborne, J.B., 1982. *Introduction to ecological biochemistry.* Academic Press, New York, N.Y.

Harkey, G.A., P.F. Landrum, and S.J. Klaine, 1994. Comparison of whole-sediment, elutriate and pore-water exposures for use in assessing sediment-associated organic contaminants in bioassays. *Environ. Toxicol. Chem., 13:*1315–1329.

Harshbarger, J.C. and J.B. Clark, 1990. Epizootiology of neoplasms in bony fish of North America. *Science Tot. Environ., 94:*1–32.

Hawkins, W.E., W.W. Walker, and R.M. Overstreet, 1995. Carcinogenicity tests using aquarium fish. p. 421–446, In: *Fundamentals of aquatic toxicology.* 2nd ed. G.M. Rand (ed.), Taylor and Francis, Washington, D.C.

Hayward, R.S., N.G. Reichenbach, L.A. Dickson, and T.J. Wildoner Jr., 1988. Variability among bluegill ventilatory rates for effluent toxicity biomonitoring. *Water Res., 22:*1311–1315.

Heckman, C.W., 1983. The recovery of the biotic community in a lotic freshwater habitat after extensive destruction by chlorine. *Int. Revue ges. Hydrobiol., 68:*207–226.

Hellawell, J.M., 1978. *Biological surveillance of rivers. A biological monitoring handbook.* Water Research Centre, Elder Way, Stevenage, Herts., SG1 1TH, England. 332 p.

Henderson, C., 1957. Application factors to be applied to bioassays for the safe disposal of toxic wastes. p. 31–37, In: *Biological problems in water pollution. Trans. seminar on biological problems in water pollution,* C.M. Tarzwell (ed.), R.A. Taft Sanitary Engng Center, Cincinnati, Ohio, Apr. 23-27, 1956. U.S. Public Health Service, Dept Health, Education, and Welfare, Cincinnati, Ohio.

Henderson, C. and C.M. Tarzwell, 1957. Bio-assays for control of industrial effluents. *Sewage Indust. Wastes, 29:*1002–1017.

Henig, R.M., 1979. Animal experimentation: the battle lines soften. *Bioscience, 29:*145–148, 195–196.

Herbert, A, and P.-D. Hansen, 1998. Genotoxicity in fish embryos. p. 491–505, In: 1998. *Microscale testing in aquatic toxicology. Advances, techniques, and practice.* Wells, P.G., K. Lee, and C. Blaise (eds.), CRC Press, Boca Raton, Fla.

Hermens, J., H. Canton, P. Janssen, and R. De Jong, 1984a. Quantitative structure-activity relationships and toxicity studies of mixtures of chemicals with anaesthetic potency: acute lethal and sublethal toxicity to *Daphnia magna. Aquatic Toxicol., 5:*143–154.

Hermens, J., H. Canton, N. Steyger and R. Wegman, 1984b. Joint effects of a mixture of 14 chemicals on mortality and inhibition of reproduction of *Daphnia magna. Aquatic Toxicol., 5:*315–322.

Hersh, C.M. and W.G. Crumpton, 1989. Atrazine tolerance of algae isolated from two agricultural streams. *Environ. Toxicol. Chem., 8:*327–332.

Hicks, D.B. and J.W. DeWitt, 1971. Effects of dissolved oxygen on kraft pulp mill effluent toxicity. *Water Res., 5:* 693–701.

Ho, K.T.Y and J.G. Quinn, 1993. Physical and chemical parameters of sediment extraction and fractionation that influence toxicity, as evaluated by Microtox. *Environ. Toxicol. Chem., 12:*615–625.

Hobson, J.F. and W.J. Birge, 1989. Acclimation-induced changes in toxicity and induction of metallothionein-like proteins in the fathead minnow following sublethal exposure to zinc. *Environ. Toxicol. Chem., 8:*157–169.

Hodgson, E. and P.A. Levi, 1987. *A textbook of modern toxicology.* Elsevier Science Publishing Co., Inc. New York. 365 p.

Hodson, P.V., P.J. Kloepper-Sams, K.R. Munkittrick, W.L. Lockhart, D.A. Metner, P.L. Luxon, I.R. Smith, M.M. Gagnon, M. Servos, and J.F. Payne, 1991. Protocols for measuring mixed function oxygenases of fish liver. *Can. Tech. Rept Fish. Aquat. Sci., 1829,* 51 p.

Hodson, P.V., M.K. Maj, S. Efler, B.K. Burnison, A.R.P. van Heiningen, R. Girard, and J.H. Carey, 1997. MFO induction in fish by spent cooking liquors from kraft pulp mills. *Environ. Toxicol. Chem., 16:*908–916.

Hodson, P.V., J. Sherry, and J. Parrott, 1998. Bioassays to measure MFO inducers in effluents. p. 53–76, In: 1998. *Microscale testing in aquatic toxicology. Advances, techniques, and practice.* Wells, P.G., K. Lee, and C. Blaise (eds.), CRC Press, Boca Raton, Fla.

Hoekstra, J.A. and P.H. Van Ewijk, 1993. Alternatives for the no-observed-effect level. *Environ. Toxicol. Chem., 12:*187–194.

Hoffman, D.J., B.A. Rattner, G.A. Burton Jr, and J. Cairns Jr., 1995. *Handbook of ecotoxicology.* Lewis Publishers, Boca Raton, Fla. 768 p.

Holdway, D.A., E.J. Kempe, and D.G. Dixon, 1987. Acute toxicity of methoxychlor to larval white sucker *(Catostomus commersoni)* as modified by age, food availability, and egg preexposure. *Can. J. Fish. Aquat. Sci., 44:* 227–232.

Holloran, M.F., R.F. Willes, M.J. Palmiere, and D.G. Wilson, 1992. Estimating effluent toxicity from molecular-chlorine-gas-free bleaching in terms of toxicity equivalence. *Wat. Poll. Res. J. Can., 27:*539–559.

Hose, J.E., 1994. Large-scale genotoxicity assessments in the marine environment. *Environ. Health Perspect., 102 (Suppl. 12):*29–32.

Howard, D.E. and R. D. Evans, 1993. Acid-volatile sulphide (AVS) in a seasonally anoxic mesotrophic lake: seasonal and spatial changes in sediment AVS. *Environ. Toxicol. Chem., 12:*1051–1057.

Howard, T.E., 1978. Toxicity standards as modifiers of industrial operations. p. 58–62, In: *Proc. Fifth Annual Aquatic Toxicity Workshop,* Nov. 7-9, 1978, Hamilton, Ont. Canada, *Fish. Mar. Serv., Tech. Rept no. 862.*

Howarth, R.S. and J.B. Sprague, 1978. Copper lethality to rainbow trout in waters of various hardness and pH. *Water Res., 12:*455–462.

Hunt, D.T.E., I. Johnson, and R. Milne, 1992. The control and monitoring of discharges by biological techniques. *J. Inst. Water Environ. Management, 6:*269–277.

Hunt, J.W., B.S. Anderson, S.L. Turpen, M.A. Englund, and W. Piekarski, 1997. Precision and sensitivity of a 7-day growth and survival toxicity test using the west coast marine mysid crustacean *Holmesimysis costata. Environ. Toxicol. Chem., 16:*824–834.

Ikemoto, Y., K. Motoba, T. Suzuki, and M. Uchida, 1992. Quantitative structure-activity relationships of nonspecific and specific toxicants in several organism species. *Environ. Toxicol. Chem., 11:*931–940.

IMO (International Maritime Organization), 1990. *Intergovernmental Conference on the Convention on the Dumping of Wastes at Sea,* London, 30 October–13 November 1972. Final Act of the Conference with attachments including the Convention on the Prevention of Marine Pollution by Dumping of Wastes and Other Matter. IMO, London. 1982 ed., reprinted 1990.

Ingersoll, C.G., 1995. Sediment tests. p. 231–255, In: *Fundamentals of aquatic toxicology.* 2nd ed. G.M. Rand (ed.), Taylor and Francis, Washington, D.C.

Ingersoll, C.G., T. Dillon, and G.R. Biddinger (eds.), 1997. Ecological risk assessment of contaminated sediments. Soc. Environ. Toxicol. Chem., SETAC Special Pub. Series, SETAC Press, Pensacola, Fla. 389 p.

Ingersoll, C.G., E.L. Brunson, F.J. Dwyer, D.K. Hardesty, and N.E. Kemble, 1998. Use of sublethal endpoints in sediment

toxicity tests with the amphipod *Hyalella azteca*. *Environ. Toxicol. Chem., 17:*1508–1523.

Inhaber, H., 1975. An approach to a water quality index for Canada. *Water Res., 9:*821–833.

Irwin, W.H., 1965. Fifty-seven species of fish in oil-refinery waste bioassay. *Trans. 30th North Amer. Wildl. Natural Resource Conf., 30:*89–99.

Isom, B.G., 1991. Biomonitoring. *Res. J. Water Pollut. Control Fed., 63:*746–748.

Jacobs, M.W., J.J. Delfino, and G. Bitton, 1992. The toxicity of sulphur to Microtox from acetonitrile extracts of contaminated sediments. *Environ. Toxicol. Chem., 11:*1137–1143.

Janssen, R.P.T., W.J.G.M. Peijnenburg, L. Posthuma, and M.A.G.T. Van Den Hoop, 1997a. Equilibrium partitioning of heavy metals in Dutch field soils. I. Relationship between metal partition coefficients and soil characteristics. *Environ. Toxicol. Chem., 16:*2470–2478.

Janssen, R.P.T., L. Posthuma, R. Baerselman, H.A. Den Hollander, R.P.M. Van Veen, and W.J.G.M. Peijnenburg, 1997b. Equilibrium partitioning of heavy metals in Dutch field soils. II. Prediction of metal accumulation in earthworms. *Environ. Toxicol. Chem., 16:*2479–2488.

Jaylet, A., P. Deparis, V. Ferrier, S. Grinfeld, and R. Siboulet, 1986. A new micronucleus test using peripheral blood erythrocytes of the newt *Pleurodeles waltl* to detect mutagens in fresh-water pollution. *Mutat. Res., 164:*245–257.

Jiminez, B.D. and L.S. Burtis, 1988. Response of the mixed-function oxidase system to toxicant dose, food and acclimation temperature in bluegill sunfish. *Mar. Environ. Res., 24:*45–49.

Jiminez, B.D., A. Oikari, S.M. Adams, D.E. Hinton, and J.F. McCarthy, 1990. Hepatic enzymes as biomarkers: Interpreting the effects of environmental, physiological and toxicological variables. p. 123–142, In: *Biomarkers of environmental contamination.* J.F. McCarthy, and L.R. Shugart (eds.), Lewis Pub., Boca Raton, Fla.

Johnson, B.T., 1998. Microtox® toxicity test system -- new developments and applications. p. 201–218, In: 1998. *Microscale testing in aquatic toxicology. Advances, techniques, and practice.* P.G. Wells, K. Lee, and C. Blaise (eds.), CRC Press, Boca Raton, Fla.

Jop, K.M., T.Z. Kendall, A.M. Askew, and R.B. Foster, 1991. Use of fractionation procedures and extensive chemical analysis for toxicity identification of a chemical plant effluent. *Environ. Toxicol. Chem., 10:*981–990.

Jung, K. and G. Bitton, 1997. Use of Ceriofast™ for monitoring the toxicity of industrial effluents: Comparison with the 48-h acute *Ceriodaphnia* toxicity test and Microtox®. *Environ. Toxicol. Chem., 16:*2264–2267.

Kasperson, R.E. and P.J.M. Stallen (eds.), 1991. *Communicating risks to the public. International perspectives.* Kluwer Academic Pub., Dordrecht, the Netherlands, 481 p.

Keith, L.H., 1997. *Environmental endocrine disruptors.* John Wiley & Sons, New York, N.Y.

Kendall, R., R. Dickerson, J. Giesy, and W. Suk (eds.), 1998. Principles and processes for evaluating endocrine disruption in wildlife. Soc. Environ. Toxicol. Chem., SETAC Press, Pensacola, Fla., 515 p.

Kersting, K., 1984. Development and use of an aquatic micro-ecosystem as a test system for toxic substances. Properties of an aquatic micro-ecosystem IV. *Int. Revue ges. Hydrobiol., 69:*567–607.

Kimball, K.D. and S.A. Levin, 1985. Limitations of laboratory bioassays: The need for ecosystem-level testing. *Bioscience, 35:*165–171.

Klapow, L.A. and R.H. Lewis, 1979. Analysis of toxicity data for California marine water quality standards. *J. Water Pollut. Control Fed., 51:*2054–2070.

Kleinow, K.M., M.J. Melancon, and J.J. Lech, 1987. Biotransformation and induction: Implications for toxicity, bioaccumulation and monitoring of environmental xenobiotics in fish. *Environ. Health Perspect., 71:*105–119.

Klemm, D.J., L.B. Lobring, and W.H. Horning, 1990. Manual for the evaluation of laboratories performing aquatic toxicity tests. USEPA, Environmental Monitoring Systems Laboratory -- Cincinnati, Cincinnati, Ohio, EPA/600/4-90-031. 109 p.

Knezovich, J.P., D.J. Steichen, J.A. Jelinski, and S.L. Anderson, 1996. Sulfide tolerance of four marine species used to evaluate sediment and porewater toxicity. *Bull Env. Contam. Toxicol., 57:*450–457.

Kocan, R.M., M.L. Landolt, and K.M. Sabo, 1982. Anaphase aberrations: A measure of genotoxicity in mutagen-treated fish cells. *Envir. Mutag., 4:*181–189.

Kooijman, S.A.L.M., 1985. Toxicity at population level. p. 143–165, In: *Multispecies toxicity testing.* Cairns, J. Jr. (ed.), Pergamon Press, New York, N.Y.

———. 1987. A safety factor for LC50 values allowing for differences in sensitivity among species. *Water Res., 21:*269–276.

Koistinen, J., M. Soimasuo, K. Tukia, A. Oikari, A. Blankenship, and J.P. Giesy, 1998. Induction of EROD activity in Hepa-1 mouse hepatoma cells and estrogenicity in MCF-7 human breast cancer cells by extracts of pulp mill effluents, sludge, and sediment exposed to effluents. *Environ. Toxicol. Chem., 17:*1499–1507.

Kovacs, T. and B. O'Connor, 1996. Insights for toxicity-free pulp and paper mill effluents. Pulp and Paper Res. Inst. Canada, Pointe Claire (Quebec). Misc. Report MR 331, 26 p.

Kovacs, T.G., P.H. Martel, R.H. Voss, P.E. Wrist, and R.F. Willes, 1993. Aquatic toxicity equivalency factors for chlorinated phenolic compounds present in pulp mill effluents. *Environ. Toxicol. Chem., 12:*281–289.

Kovacs, T.G., R.H. Voss, S.R. Megraw, and P.H. Martel, 1996. Perspectives on the potential of pulp and paper mill effluents to affect the reproductive capacity of fish: A review of Canadian field studies. Pulp and Paper Res. Inst. of Canada, Pointe-Claire (Quebec), Misc. Rept MR 332, 41 p.

Krahn, M.M., M.S. Myers, D.G. Burrows, and D.C. Malins, 1984. Determination of metabolites of xenobiotics in the bile of fish from polluted waterways. *Xenobiotica, 14:*633–646.

Krahn, M.M., L.D. Rhodes, M.S. Myers, L.K. Moore, W.D. MacLeod Jr., and D.C. Malins, 1986. Associations between metabolites of aromatic hydrocarbons in bile and the occurrence of hepatic lesions in English sole *(Parophrys vetulus)* from Puget Sound, Washington. *Arch. Environ. Contam. Toxicol., 15:*61–67.

Krantzberg, G. and D. Boyd, 1992. The biological significance of contaminants in sediment from Hamilton harbour, Lake Ontario. *Environ. Toxicol. Chem., 11:*1527–1540.

Kszos, L.A., A.J. Stewart and P.A. Taylor, 1992. An evaluation of nickel toxicity to *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia magna* in a contaminated stream and in laboratory tests. *Environ. Toxicol. Chem., 11:*1001–1012.

Kszos, L.A., A.J. Stewart, and J.R. Sumner, 1997. Evidence that variability in ambient fathead minnow short-term chronic tests is due to pathogenic infection. *Environ. Toxicol. Chem., 16:*351–356.

Kuiper, J., 1981. Fate and effects of cadmium in marine plankton communities in experimental enclosures. *Marine Ecol. Progr. Ser., 6:*161–174.

Kukkonen, J, and P.F. Landrum, 1995. Measuring assimilation efficiencies for sediment-bound PAH and PCB congeners by benthic organisms. *Aquat. Toxicol. 32:*7—92. Errata, 1996. *Aquatic Toxicol., 34:*86.

———. 1996. Distribution of organic carbon and organic zenobiotics among different particle size fractions in sediments. *Chemosphere, 32:*1063–1076.

Kulakkattolickal, A.T. and D.L. Kramer, 1987. Effect of surface access and oxygen concentration on the toxicity of *Croton tiglium* (Euphorbiaceae) seed extract to *Brachydanio rerio* (Cyprinidae). *Can. J. Fish. Aquat. Sci., 44:*1358–1361.

Kumaraguru, A.K. and F.W.H. Beamish, 1981. Lethal toxicity of Permethrin (NRDC-143) to rainbow trout, *Salmo gairdneri*, in relation to body weight and water temperature. *Water Res., 15:*503–505.

Lamberson, J.O., T.H. DeWitt, and R.C. Swartz, 1992. Assessment of sediment toxicity to marine benthos. p. 183–287, In: 1992. *Sediment toxicity assessment.* G.A. Burton, Jr. (ed.), Lewis Pub., Boca Raton, Fla.

Landis, W.G., and M.-H. Yu, 1998. *Introduction to environmental toxicology.* 2nd ed. Lewis Pub., Boca Raton, Fla. 400 p.

Landrum, P.F. and W.R. Faust, 1995. The role of sediment composition on the bioavailability of laboratory-dosed sediment-associated organic contaminants to the amphipod *Diporeia spp. Chem. Speciat. Bioavail. 6:85–92.*

Langevin, R., J.B. Rasmussen, H. Sloterdijk, and C. Blaise, 1992. Genotoxicity in water and sediment extracts from the St Lawrence River system, using the SOS Chromotest. *Water Res., 26:*419–429.

La Point, T.W., and J.F. Fairchild, 1992. Evaluation of sediment contaminant toxicity: the use of freshwater community structure. p. 87–110, In: *Sediment toxicity assessment.* G.A. Burton (ed.), Lewis Publishers. Boca Raton, Fla.

Larkin, P.A., 1984. A commentary on environmental impact assessment for large projects affecting lakes and streams. *Can. J. Fish. Aquat. Sci., 41:*1121–1127.

Larsen, D.P., F. deNoyelles, F. Stay, and T. Shiroyama, 1986. Comparisons of single species, microcosm and experimental pond responses to atrazine exposure. *Environ. Toxicol. Chem., 5:*179–190.

Lazorchak, J.M. and W.T. Waller, 1993. The relationship of total copper 48-h LC50s to *Daphnia magna* dry weight. *Environ. Toxicol. Chem., 12:*903–912.

Leach, J.M. and A.N. Thakore, 1977. Compounds toxic to fish in pulp mill waste streams. *Prog. Water Tech., 9:* 787–798.

LeBlanc, G.A., 1984. Interspecies relationships in acute toxicity of chemicals to aquatic organisms. *Environ. Toxicol. Chem., 3:*47–60.

Lee, K. and K.L. Tay, 1998. Measurement of microbial exoenzyme activity in sediments for environmental impact assessment. p. 219–236, In: 1998. *Microscale testing in aquatic toxicology. Advances, techniques, and practice.* P.G. Wells, K. Lee, and C. Blaise (eds.), CRC Press, Boca Raton, Fla.

Legault, G. and M. Villeneuve, 1992. Chimiotox: results of a chemo-toxic evaluation of the industrial plants targeted under the St. Lawrence Action Plan. Volume 1. L'Equipe d'intervention St. Laurent, Montréal, Québec. 20 p.

Legault, R., C. Blaise, D. Rokosh, and R. Chong-Kit, 1994. Comparative assessment of the SOS Chromotest kit and the Mutatox test with the *Salmonella* Plate Incorporation (Ames Test) and fluctuation tests for screening genotoxic agents. *Environ. Toxicol. and Water Qual., 9:*45–47.

Lehman, R.M., F.S. Colwell, and J.L. Garland, 1997. Physiological profiling of indigenous aquatic microbial communities to determine toxic effects of metals. *Environ. Toxicol. Chem., 16:*2232–2241.

Leiss, W. (ed.), 1989. *Prospects and problems in risk communication.* Univ. Waterloo Press, Waterloo, Ont., 216 p.

Leopold, L.B., F.E. Clarke, B.B. Hanshaw, and J.R. Balsley, 1971. A procedure for evaluating environmental impact. U.S. Geological Survey, Washington, D.C., Circular 645.

Leppanen, C.J. and K.J. Maier, 1998. An inexpensive and efficient modular water-renewal system for bulk sediment toxicity testing. *Environ. Toxicol. Chem., 17:*969–971.

Levin, S.A. and K.D. Kimball (eds.), 1984. New perspectives in ecotoxicology. (Various papers included) *Environ. Management, 8:*375–442.

Lewis, M.A., R.L. Powell, M.K. Nelson, M.G. Henry, S.J. Klaine, G.W. Dickson, and F.L. Mayer, 1999. Ecotoxicology and risk assessment for wetlands. Soc. Environ. Toxicol. Chem., SETAC Press, Pensacola, Fla.

L'Haridon, J., M. Fernandez, V. Ferrier, and J. Bellan, 1993. Evaluation of the genotoxicity of *N*-Nitrosoatrazine, *N*-Nitrosodiethanolamine and their precursors *in vivo* using the newt micronucleus test. *Water Res., 27:*855–862.

Liber, K., D.J. Call, T.P. Markee, K.L. Schmude, M.D. Balcer, F.W. Whiteman, and G.T. Ankley, 1996. Effects of acid-volatile sulfide on zinc bioavailability and toxicity to benthic macroinvertebrates: a spiked-sediment field experiment. *Environ. Toxicol. Chem., 15:*2113–2125.

Lipnick, R.L., 1995. Structure-activity relationships. p. 609–655, In: *Fundamentals of aquatic toxicology.* 2nd ed. G.M. Rand (ed.), Taylor and Francis, Washington, D.C.

Lloyd, R., 1961. Effect of dissolved oxygen concentrations on the toxicity of several poisons to rainbow trout *(Salmo gairdnerii* Richardson). *J. Exp. Biol., 38:*447–455.

Løkke, H., and C.A.M. van Gestel (eds.), 1998. *Handbook of soil invertebrate toxicity tests.* John Wiley & Sons Ltd., New York, New York, 281 p.

Long, E.R., 1992. Ranges in chemical concentrations in sediments associated with adverse biological effects. *Mar. Poll. Bull., 24:*38–45.

Long, E.R. and D.D. MacDonald, 1992. National status and trends program approach. p. 1–18, In: *Sediment classification methods compendium.* USEPA, Washington, D.C, EPA 823-R-92-006.

Long, E.R. and L.G. Morgan, 1990. The potential for biological effects of sediment-sorbed contaminants tested in the National Status and Trends Program. Nat. Oceanic and Atmospheric Admin., Tech. Memorandum NOS OMA 52. Seattle, Wash., 175 p. + app.

Long, E.R., M.F. Buchman, S.M. Bay, R.J. Breteler, R.S. Carr, P.M. Chapman, J.E. Hose, A.L. Lissner, J. Scott, and D.A. Wolfe, 1990. Comparative evaluation of five toxicity tests with sediments from San Francisco Bay and Tomales Bay, California. *Environ. Toxicol. Chem,. 9:*1193–1214.

Luoma, S.N. and J.L. Carter, 1993. Understanding the toxicity of contaminants in sediments: beyond the bioassay-based paradigm. *Environ. Toxicol. Chem., 12:*793–796.

MacDonald, D.D., L.E. Fidler, and D. Valiela, 1987. Site specific water quality criteria for fish and aquatic life in the Canadian portion of the Flathead River basin. Nitrate, nitrite and ammonia. Unnum. rept, Environment Canada, Conservation and Protection, Inland Waters and Lands, Pacific and Yukon Region. Vancouver, B.C. 127 p.

MacDonald, D.D., S.L. Smith, M.P. Wong, and P. Murdoch, 1992. The development of Canadian marine environmental quality guidelines. Prepared for the Interdepartmental Working Group on Marine Environmental Quality Guidelines and the Canadian Council of Ministers of the Environment. Environment Canada, Ottawa, Ont., 50 p. + app.

Mahony, J.D., D.M. Di Toro, A.M. Gonzalez, M. Curto, M. Dilg, L.D. De Rosa, and L.A. Sparrow, 1996. Partitioning of metals to sediment organic carbon. *Environ. Toxicol. Chem., 15:*2187–2197.

Malins, D.C., B.B. McCain, D.W. Brown, S. Chan, M.S. Myers, J.T. Landahl, P.G. Prohaska, A.J. Friedman, L.D. Rhodes, D.G. Burrows, W.D. Gronlund, and H.O. Hodgins, 1984. Chemical pollutants in sediments and diseases of bottom-dwelling fish in Puget Sound, Washington. *Envir. Sci. Tech., 18:*705–713.

Marcus, M.D. and L.L. McDonald, 1992. Evaluating the statistical bases for relating receiving water impacts to effluent and ambient toxicities. *Environ. Toxicol. Chem., 11:*1389–1402.

Marmonier, P., P. Vervier, J. Gibert, and M-J. Dole-Olivier, 1993. Biodiversity in groundwaters. *TREE, 8:*392–395.

Maron, D.M. and Ames, B.N, 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res., 113:* 173–215.

Martel, P. and T. Kovacs, 1997. A comparison of the potential of primary- and secondary-treated pulp and paper mill effluents to induce mixed function oxygenase (MFO) activity in fish. *Wat. Res., 31:*1482–1488.

Martel, P.H., T.G. Kovacs, B.I. O'Connor, and R.H. Voss, 1997. Source and identity of compounds in a thermomechanical pulp mill effluent inducing hepatic mixed-function oxygenase activity in fish. *Environ. Toxicol. Chem., 16:*2375–2383.

Marty, G.D., S. Wetzlich, J.M. Nunez, A. Craigmill, and D.E. Hinton, 1991. Fish-based biomonitoring to determine toxic characteristics of complex chemical mixtures: documentation of bioremediation at a pesticide disposal site. *Aquat. Tox., 19:*329–340.

Matheson, Robert A. and A.J. Atkinson, 1997. Regulation of new polymers in Canada. p. 235–253, In: *Ecological assessment of polymers. Strategies for product stewardship and regulatory programs.* J.D. Hamilton and R. Sutcliffe (eds.), Van Nostrand Reinhold, Toronto, Ont.

Matthiessen, P. and P.E. Gibbs, 1998. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environ. Toxicol. Chem., 17:*37–43.

Mayer, F.L., P.M. Mehrle, and P.L. Crutcher, 1978. Interactions of toxaphene and vitamin C in channel catfish. *Trans. Amer. Fish. Soc., 107:*326–333.

McCarty, L.S., 1991. Toxicant body residues: implications for aquatic bioassays with some organic chemicals. p. 183–192, In: *Aquatic toxicology and risk assessment.* 14th vol. M.A. Mayes and M.G. Barron (eds.), Amer. Soc. for Testing and Materials, Philadelphia, Pa., ASTM STP 1124.

McCarty, L.S. and D. Mackay, 1993. Enhanced ecotoxicological modeling and assessment: Body residues and modes of toxic action. *Environ. Science Technol., 27:*171–1727.

McCarty, L.S., D. Mackay, A.D. Smith, G.W. Ozburn, and D.G. Dixon, 1992. Residue-based interpretation of toxicity and bioconcentration QSARs from aquatic bioassays: neutral narcotic agents. *Environ. Toxicol. Chem., 11:* 917–930.

McCloskey, J.T. and J.T. Oris, 1991. Effect of water temperature and dissolved oxygen concentration on the photo-induced toxicity of anthracene to juvenile bluegill sunfish *(Lepomis macrochirus). Aquatic Toxicol., 21:*145–156.

McCubbin, N. and J. Folke, 1993. Environmental Choice Program guidelines for pulp and paper products. Briefing notes for pulp and paper products. Prepared for Environment Canada and Forestry Canada, Environmental Choice Program, Ottawa, Ont., 140 p.

McGeachy, S.M. and D.G. Dixon, 1990. Effect of temperature on the chronic toxicity of arsenate to rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss). Can. J. Fish. Aquat. Sci., 47:*2228–2234.

McKim, J.M., S.P. Bradbury, and G.J. Niemi, 1987. Fish acute toxicity syndromes and their use in the QSAR

approach to hazard assessment. *Environ. Health Perspect., 71:*171–186.

McLeay, D.J., C.C. Walden, and J.R. Munro, 1979. Effect of pH on toxicity of kraft pulp and paper mill effluent to salmonid fish in fresh and seawater. *Water Res., 13:*249–254.

McMaster, M.E., G.J. Van Der Kraak, C.B. Portt, K.R. Munkittrick, P.K. Sibley, I.R. Smith, and D.G. Dixon, 1991. Changes in hepatic mixed-function oxygenase (MFO) activity, plasma steroid levels and age at maturity of a white sucker *(Catostomus commersoni)* population exposed to bleached kraft pulp mill effluent. *Aquatic Toxicol., 21:*199–218.

McMaster, M.E., C.B. Portt, K.R. Munkittrick, and D.G. Dixon, 1992. Milt characteristics, reproductive performance, and larval survival and development of white sucker exposed to bleached kraft mill effluent. *Ecotoxicol. Environ. Safety, 23:*103–117.

McMaster, M.E., G.J. Van Der Kraak, and K.R. Munkittrick, 1996. Exposure to bleached kraft pulp mill effluent reduces the steroid biosynthetic capacity of white sucker ovarian follicles. *Comp. Biochem. Physiol., C 112:*169–178.

Mehrle, P.M., F.L. Mayer, and W.W. Johnson, 1977. Diet quality in fish toxicology: effects on acute and chronic toxicity. p. 269–280, In: F.L. Mayer and J.L. Hamelink (eds.), Aquatic toxicology and hazard evaluation. ASTM STP 634. Amer. Soc. for Testing and Materials, Philadelphia, Pa.

Meier, J.R., L.W. Chang, S. Jacobs, J. Torsella, M.C. Meckes, and M.K. Smith, 1997. Use of plant and earthworm bioassays to evaluate remediation of soil from a site contaminated with polychlorinated biphenyls. *Environ. Toxicol. Chem., 16:*928–938.

MENVIC [Ministère de l'environnement], 1990. Cahier des critères de qualité de l'eau. Québec, Ministère de l'environnement, Québec (Québec).

Merritt, R.W. and K.W. Cummins, 1984. *An introduction to the aquatic insects of North America.* 2nd ed. Kendall-Hunt Pub. Co., Dubuque, Iowa.

Meyers-Schöne, L., L.R. Shugart, J.J. Beauchamp, and B.T. Walton, 1993. Comparison of two freshwater turtle species as monitors of radionuclide and chemical contamination: DNA damage and residue analysis. *Environ. Toxicol. Chem., 12:*1487–1496.

Microbics, 1992. *The Microtox on-line toxicity test system.* Microbics Corporation, Carlsbad, Calif., 4 p.

———. 1993. Mutatox™ manual. Microbics Corp., Carlsbad, Calif., 22 p.

Milani, D., K.E. Day, D.J. McLeay, and R.S. Kirby, 1996. Recent intra- and interlaboratory studies related to the development and standardization of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* or midge larvae *(Chironomus riparius).* National Water Res. Inst. Technical Rept, Environment Canada, Method Development and Application Section, Ottawa, Ont., unnumbered.

Mix, M.D., 1986. Cancerous diseases in aquatic animals and their association with environmental pollutants: a critical review of the literature. *Mar. Fish. Rev., 20:*1–141.

Moore, D.R.J. and P.-Y. Caux, 1997. Estimating low toxic effects. Environ. *Toxicol. Chem., 16:*794–801.

Moore, D.W., T.S. Bridges, B.R. Gray, and B.M. Duke, 1997. Risk of ammonia toxicity during sediment bioassays with the estuarine amphipod *Leptocheirus plumulosus. Environ. Toxicol. Chem., 16:*1020–1027.

Moore, M.V. and R.W. Winner, 1989. Relative sensitivity of *Ceriodaphnia dubia* laboratory tests and pond communities of zooplankton and benthos to chronic copper stress. *Aquatic Toxicol., 15:*311–330.

Morrison, G.E., E. Torrelo, R. Comeleo, R. Walsh, A. Kuhn, R. Burgess, M. Tagliabue, and W. Greene, 1989. Intralaboratory precision of saltwater short-term chronic toxicity tests. *J. Water Pollut. Control. Fed., 61:*1707–1710.

Moss, D., M.T. Furse, J.F. Wright, and P.D. Armitage, 1987. The prediction of the macroinvertebrate fauna of unpolluted running-water sites in Great Britain using environmental data. *Freshwat. Biol., 17:*41–52.

Mothes-Wagner, U., H.K. Reitze, and K-A. Seitz, 1992. Terrestrial multispecies toxicity testing. 1. Description of the multispecies assemblage. *Chemosphere, 24:*1653–1667.

Mount, D.I. and T.J. Norberg-King (eds.), 1985. Validity of effluent and ambient toxicity tests for predicting biological impact, Scippo Creek, Circleville, Ohio. USEPA, Environ. Res. Lab., Duluth, Minn., and Permits Div., Washington, D.C. EPA/600/3-85/044.

———. 1986. Validity of effluent and ambient toxicity tests for predicting biological impact, Kanawha River,

Charleston, West Virginia. USEPA, Environ. Res. Lab., Duluth, Minn., and Permits Div., Washington, D.C. EPA/600/3-86/006.

Mount, D.I., N.A. Thomas, T.J. Norberg, M.T. Barbour, T.H. Roush, and W.F. Brandes, 1984. Effluent and ambient toxicity testing and instream community response on the Ottawa River, Lima, Ohio. USEPA, Permits Div., Washington, D.C., and Environ. Res. Lab., Duluth, Minn. EPA-600/3-84-080.

Mount, D.I., A.E. Steen, and T.J. Norberg-King (eds.), 1985. Validity of effluent and ambient toxicity testing for predicting biological impact on Five Mile Creek, Birmingham, Alabama. USEPA, Environ. Res. Lab., Duluth, Minn., and Permits Div., Washington, D.C. EPA/600/8-85/015.

———. 1986a. Validity of effluent and ambient toxicity tests for predicting biological impact, Naugatuck River, Waterbury, Connecticut. USEPA, Environ. Res. Lab., Duluth, Minn., and Permits Div., Washington, D.C. EPA/600/8-86/005.

———. 1986b. Validity of effluent and ambient toxicity tests for predicting biological impact, Back River, Baltimore Harbor, Maryland. USEPA, Environ. Res. Lab., Duluth, Minn. and Permits Div., Washington D.C. Rept EPA/600/8-86/001.

———. 1986c. Validity of ambient toxicity tests for predicting biological impact, Ohio River, near Wheeling, West Virginia. USEPA, Environ. Res. Lab., Duluth, Minn., and Permits Div., Washington, D.C. EPA/600/3-85/071.

Mudroch, A. and J.M. Azcue, 1995. *Manual of aquatic sediment sampling.* Lewis Pub., Boca Raton, Fla. 240 p.

Müller, W.E.G. and I.M. Müller, 1998. Sponge cells and tissue as biological monitors of aquatic pollution. p. 97–112, In: 1998. *Microscale testing in aquatic toxicology. Advances, techniques, and practice.* P.G. Wells, K. Lee, and C. Blaise (eds.) CRC Press, Boca Raton, Fla.

Munkittrick, K.R. and L.S. McCarty, 1995. An integrated approach to aquatic ecosystem health: Top-down, bottom-up or middle-out? *J. Aquat.Ecosystem Health, 4:*77–90.

Munkittrick, K.R., C.B. Portt, G.J. Van Der Kraak, I.R. Smith, and D.A. Rokosh, 1991. Impact of bleached kraft mill effluent on population characteristics, liver MFO activity, and serum steroid levels of a Lake Superior white sucker *(Catostomus commersoni)* population. *Can. J. Fish. Aquat. Sci., 48:*1371–1380.

Munkittrick, K.R., G.J. Van Der Kraak, M.E. McMaster, and C.B. Portt, 1992. Response of hepatic MFO activity and plasma sex steroids to secondary treatment of bleached kraft pulp mill effluent and mill shutdown. *Environ. Toxicol. Chem., 11:*1427–1439.

Nabholz, J.V., R.G. Clements, M.G. Zeeman, K.C. Osborn, and R. Wedge, 1993. Validation of structure activity relationships used by the USEPA's Office of Pollution Prevention and Toxics for the environmental hazard assessment of industrial chemicals. p. 571–590, In: Environmental toxicology and risk assessment. 2nd vol. J.W. Gorsuch, F.J. Dwyer, C.G. Ingersoll, and T.W. LaPoint (eds.), Amer. Soc. Testing and Materials, Philadelphia, Pa., ASTM STP 1216.

Nacci, D., L. Coiro, A. Kuhn, D. Champlin, W. Munns Jr., J. Specker, and K. Cooper, 1998. Nondestructive indicator of ethoxyresorufin-*o*-deethylase activity in embryonic fish. *Environ. Toxicol. Chem., 17:*2481–2486.

Naish, V.A., 1975. Red Rock toxicity study. Domtar Research Centre, Senneville, Quebec, Res. Rept, Proj. 73-6107-12, Rept No. 2, 16 p.

NATO (North Atlantic Treaty Organization), 1988. Pilot study on international information exchange on dioxins and related compounds. North Atlantic Treaty Organization, Committee on the Challenges of Modern Society, Brussells, Rept no. 177.

Naylor, C., L. Pindar, and P. Callow, 1990. Inter- and intraspecific variation in sensitivity to toxins; the effects of acidity and zinc on the freshwater crustaceans *Asellus aquaticus* (L.) and *Gammarus pulex* (L.). *Water Res., 24:* 757–762.

Naz, R.K. (ed.), 1998. *Endocrine disruptors. Effects on male and female reproductive systems.* CRC Press, Boca Raton, Fla., 352 p.

Nebeker, A.V., 1982. Evaluation of a *Daphnia magna* renewal life-cycle test method with silver and endosulfan. *Water Res., 16:*739–744.

Nebeker, A.V., G.S. Schuytema, W.L. Griffis, J.A. Barbitta, and L.A. Carey, 1989. Effect of sediment organic carbon on survival of *Hyalella azteca* exposed to DDT and endrin. *Environ. Toxicol. Chem., 8:*705–718.

Nelson, M.K., P.F. Landrum, G.A. Burton Jr., S.J. Klaine, E.A. Crecelius, T.D. Byl, D.C. Gossiaux, V.N. Tsymbal, L. Cleveland, C.G. Ingersoll, and G. Sasson-Brickson, 1993. Toxicity of contaminated sediments in dilution series with control sediments. *Chemosphere, 27:*1789–1812.

Newman, M.C., 1995. *Quantitative methods in aquatic ecotoxicology.* Lewis Pub., Boca Raton, Fla.

Nimmo, D.W.R., D. Link, L.P. Parrish, G.J. Rodriguez, W. Wuerthele, and P.H. Davies, 1989. Comparison of on-site and laboratory toxicity tests: derivation of site-specific criteria for un-ionized ammonia in a Colorado transitional stream. *Environ. Toxicol. Chem., 8:*1177–1189.

Noppert, F., N. van der Hoeven, and A. Leopold (eds.), 1994. How to measure no effect. Towards a new measure of chronic toxicity in ecotoxicology. Workshop Rept, The Hague, The Netherlands, Sept. 9, 1994. The Netherlands Working Group on Statistics and Ecotoxicology. [Copies: BKH Consulting Engineers, P.O. box 5094, 2600 GB, Delft, The Netherlands, att. F. Noppert.]

Norberg-King, T.J. and D.I. Mount (eds.), 1986. Validity of effluent and ambient toxicity tests for predicting biological impact, Skeleton Creek, Enid, Oklahoma. USEPA, Environ. Res. Lab., Duluth, Minn. EPA/600/8-86/002.

Norberg-King, T.J., E.J. Durhan, and G.T. Ankley, 1991. Application of toxicity identification procedures to the ambient waters of the Colusa Basin Drain, California. *Environ. Toxicol. Chem., 10:*891–900.

Notenboom, J., S. Plénet, and M.-J. Turquin, 1994. Groundwater contamination and its impact on groundwater animals. p. 477–504, In: J. Gibert, D.L. Danielopol, and J.A. Stanford (eds.), Groundwater ecology. Academic Press, Toronto, Ont.

NRA (National Rivers Authority), 1991. Proposals for statutory water quality objectives. Report of the National Rivers Authority. National Rivers Authority, Rivers House, Waterside Drive, Aztec West, Almondsbury, Bristol BS12 4UD, United Kingdom. NRA Water Quality Series No. 5, 99 p.

NTAC (National Technical Advisory Committee), 1968. Water quality criteria. Report of the National Technical Advisory Committee to the Secretary of the Interior. U.S. Federal Water Pollution Control Admin., Washington, D.C. 234 p.

Obst, U., A. Wessler, and M. Wiegand-Rosinus, 1998. p. 77–94, In: *1998. Microscale testing in aquatic toxicology. Advances, techniques, and practice.* P.G. Wells, K. Lee, and C. Blaise (eds.), CRC Press, Boca Raton, Fla.

O'Connor, T.P., K.D. Daskalakis, J.L. Hyland, J.F. Paul, and J.K. Summers, 1998. Comparisons of sediment toxicity with predictions based on chemical guidelines. *Environ. Toxicol. Chem., 17:*468–471.

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), 1987. Utilisation des tests biologiques pour l'evaluation et le contrôle de la pollution de l'eau. OECD, Paris, Monographies sur l'Environnement, No. 11, 76 p.

———. 1992a. Report of the OECD workshop on quantitative structure-activity relationships (QSARS) in aquatic effects assessment. OECD, Paris, OECD Environment Monographs No. 58, OCDE/GD(92)168, 95 p.

———. 1992b. Report of the OECD workshop on the extrapolation of laboratory aquatic toxicity data to the real environment. OECD, Paris, OECD Environment Monographs No. 59. OCDE/GD(92)169, 43 p.

———. 1992c. Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD, Paris, OECD Environment Monographs No. 60., OCDE/GD(92)170, 56 p.

———. 1992d. OECD guidelines for testing of chemicals. Section 2: effects on biotic systems. Summary of considerations in the report from the OECD expert group on ecotoxicology. Subsections: Methods 201–210. OECD, Paris.

———1992e. The OECD principles of good laboratory practice. Environment Monograph no. 45. OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring, No. 1. OECD, Paris, OCDE/GD(92)32.

———. 1992f. Guidance for GLP monitoring authorities. Guides for compliance monitoring procedures for good laboratory practice. Environment Monograph no. 46. OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring, No. 2. OECD, Paris, OCDE/GD(92)33.

———. 1992g. Guidance for GLP monitoring authorities. Guidance for the conduct of laboratory inspections and study audits. Environment Monograph no. 47. OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring, No. 3. OECD, Paris, OCDE/GD(92)34.

———. 1992h. GLP consensus document. Quality assurance and GLP. Environment Monograph no. 48. OECD Series

on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring, No. 4. OECD, Paris, OCDE/GD(92)35.

———. 1992i. GLP consensus document. Compliance of laboratory suppliers with GLP principles. Environment Monograph no. 49. OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring, No. 5. OECD, Paris, OCDE/GD(92)36.

———. 1992j. OECD guideline for testing of chemicals. Fish, acute toxicity test. OECD, Paris. Adopted by the Council, 17th July 1992, 13 p.

———. 1993a. Technical guidance documents in support of the risk assessment directive. (93/67/EEC) for substances notified in accordance with the requirements of Council Directive 67/548/EEC. Chapter 11. OECD, Paris. 51 p.

———. 1993b. GLP consensus document. The application of the GLP principles to short-term studies. Environment Monograph no. 73. OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring, No. 7. OECD, Paris, OCDE/GD(93)104.

———. 1993c. GLP consensus document. The role and responsibilities of the study director in GLP studies. Environment Monograph no. 74. OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring, No. 8. OECD, Paris, OCDE/GD(93)105.

———. 1993d. OECD guidelines for the testing of chemicals. Volume 2. OECD, Paris.

———. 1994. GLP consensus document. The application of the GLP principles to field studies. Environment Monograph no. 50. OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring, No. 6. OECD, Paris, OCDE/GD(92)37.

———. 1995a. Guidance document for aquatic effects assessment. OECD, Paris. Environment Monographs No. 92, 116 p.

———. 1995b. Report of the OECD workshop on environmental hazard/risk assessment. OECD, Paris. Environment Monographs No. 105, 96 p.

———. 1998a. Report of the OECD workshop on statistical analysis of aquatic toxicity data. OECD, Paris. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 10, 133 p.

———. 1998b. Detailed review paper on aquatic testing methods for pesticides and industrial chemicals. Part 1: report. Part 2: annexes. OECD, Paris. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 11, 260 + 303 p.

Okkerman, P.C., E.J. Plassche, C.J. Roghair, and J.H. Canton, 1990. Validation of some extrapolation methods with toxicity data derived from multiple species experiments. Presented at *OECD Workshop on Ecotoxicological Effects Assessment,* Arlington, Va. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiene [National Inst. of Public Health and Environmental Protection], Bilthoven, the Netherlands, 14 p. + app.

OMOE (Ontario Ministry of the Environment), 1984. Water management. Goals, policies, objectives and implementation procedures of the Ministry of the Environment. Ont. Min. Environ., Toronto, Ont., Nov. 1978, revised May 1984. 70 p.

———. 1991. Ontario's water quality objective development process. Ont. Min. Environ., Aquatic Criteria Development Committee, Toronto, Ont., 67 p.

Ontario, 1975. The environmental assessment act, 1975. Statutes of Ontario, 1975, Chapt. 69.

Oris, J.T. and J.P. Giesy Jr., 1985. The photoenhanced toxicity of anthracene to juvenile sunfish *(Lepomis* spp.). *Aquatic Toxicol., 6:*133–146.

———. 1987. The photo-induced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to larvae of the fathead minnow. *Chemosphere, 16:*1395–1404.

Oris, J.T., A.T. Hall, and J.D. Tylka, 1990. Humic acids reduce the photo-induced toxicity of anthracene to fish and *Daphnia. Environ. Toxicol. Chem., 9:*575–583.

Orr, P.L., R.W. Bradley, J.B. Sprague, and N.J. Hutchinson, 1986. Acclimation-induced change in toxicity of aluminum to rainbow trout *(Salmo gairdneri). Can. J. Fish. Aquat. Sci., 43:*243–246.

Ortego, L.S. and W.H. Benson, 1992. Effects of dissolved humic material on the toxicity of selected pyrethroid insecticides. *Environ. Toxicol. Chem., 11:*261–266.

Ostrander, G., 1997. *Techniques in aquatic toxicology.* Lewis Pub., Boca Raton, Fla. 704 p.

Overstreet, R.M., 1987. Aquatic pollution problems, southwestern U.S. coasts: Histopathological indicators. *Aquat. Toxicol., 11:*213–239.

OWRC (Ontario Water Resources Commission), 1970. Guidelines and criteria for water quality management in Ontario. OWRC, Toronto, Ont. 26 p.

Pack, S., 1993. A review of statistical data analysis and experimental design in OECD aquatic toxicology test guidelines. Shell Research Ltd., Sittingbourne Research Centre, Sittingbourne, Kent, U.K. 42. p.

Pandard, P., P. Vasseur, and D.M. Rawson, 1993. Comparison of two types of sensors using eukaryotic algae to monitor pollution of aquatic systems. *Water Res., 27:*427–431.

Parker, W.R. and N.A. Smith, 1997. A synopsis of the first cycle of the pulp and paper mill environmental effects monitoring program in the Atlantic Region. EPS-5-AR-99-2, Environment Canada, Environ. Prot. Branch, Atlantic Region, Surveillance, Halifax, N.S., 45 p.

Parkhurst, B.R., 1996. Predicting receiving system impacts from effluent toxicity. p. 309–321, In: *Whole effluent toxicity testing: An evaluation of methods and prediction of receiving system impacts.* D.R. Grothe, K.L. Dickson, and D.K. Reed-Judkins (eds.), Soc. Environ. Toxicol. Chem., SETAC Special Pub. Series, SETAC Press, Pensacola, Fla.

Parrott, J.L. and P.V. Hodson, 1995. Relative potency of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans for inducing mixed-function oxygenase activity in rainbow trout. *Environ. Toxicol. Chem., 14:*104—1050.

Payne, J.F., 1978. Mixed function oxidases in marine organisms in relation to petroleum hydrocarbon metabolism and detection. *Mar. Pollut. Bull., 8:*112–116.

Payne, J.F. and L.L. Fancey, 1982. Effect of long-term exposure to petroleum on mixed-function oxygenases in fish: further support for use of the enzyme system in biological monitoring. *Chemosphere, 11:*207–213.

Payne, J.F., L.L. Fancey, A.D. Rahimtula, and E.L. Porter, 1987. Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. *Comp. Biochem. Physiol., 86C:*233–245.

Percy, J.A., 1977. Responses of arctic marine benthic crustaceans to sediments contaminated with crude oil. *Environ. Pollut., 13:*1–10.

Persaud, D., R. Jaagumagi, and A. Hayton, 1992. Guidelines for the protection and management of aquatic sediment quality in Ontario. PIBS 1962, Log 92-2309- 067, Ontario Min. of Environment, Water Resources Branch, Toronto, Ont., 26 p.

Persoone, G., 1998a. Development and first validation of a "stock-culture free" algal microbiotest: The Algaltoxkit. p. 311–320, In: *1998. Microscale testing in aquatic toxicology. Advances, techniques, and practice.* P.G. Wells, K. Lee, and C. Blaise (eds.), CRC Press, Boca Raton, Fla.

———. 1998b. Development and validation of toxkit microbiotests with invertebrates, in particular crustaceans. p. 437–449, In: 1998. *Microscale testing in aquatic toxicology. Advances, techniques, and practice.* P.G., Wells, K. Lee, and C. Blaise (eds.), CRC Press, Boca Raton, Fla.

Persoone, G., A. Van de Vel, M. Van Steertegem, and B. De Nayer, 1989. Predictive value of laboratory tests with aquatic invertebrates: influence of experimental conditions. *Aquat. Toxicol., 14:*149–166.

Petersen, G.I. and P. Kristensen, 1998. Bioaccumulation of lipophilic substances in fish early life stages. *Environ. Toxicol. Chem.., 17:*1385–1395.

Peterson, H.G., F.P. Healey and R. Wagemann, 1984. Metal toxicity to algae: A highly pH dependent phenomenon. *Can. J. Fish. Aquat. Sci., 41:*974–979.

Pfleeger, T.G., A. Fong, R. Hayes, H. Ratsch, and C. Wickliff, 1996. Field evaluation of the EPA (Kenaga) nomogram, a method for estimating wildlife exposure to pesticide residues on plants. *Environ. Toxicol. Chem., 15:* 535–543.

Pickering, Q.H., 1988. Evaluation and comparison of two short-term fathead minnow tests for estimating chronic toxicity. *Water Res., 22:*883–893.

Pickering, Q.H., C. Henderson, and A.E. Lemke, 1962. The toxicity of organic phosphorus insecticides to different species of warmwater fishes. *Trans. Amer. Fish. Soc., 91:*75–184.

Pigeon, B., 1992. The Chemiotox index: a toxic waste indicator. Methodology applied to the 50 priority industrial plants under the St. Lawrence Action Plan. Prepared for L'Equipe d'intervention Saint-Laurent, Montréal, Québec, by BPC Environnement, 32 p.

Pillard, D.A., W.A. Stubblefield, and C. McPherson, 1993. An evaluation of sediment grain size as a confounding factor in assessing toxicity in shoreline sediment samples. *Fourteenth Ann. Meeting of Soc. Environ. Toxicol. Chem.,* Houston, Texas. Abstract 337.

Pocklington, P., and K.G. Doe, 1998. Development of a Canadian marine toxicity test for whole sediments using cultured spionid polychaetes. p. 395–407, In: *1998. Microscale testing in aquatic toxicology. Advances, techniques, and practice*. P.G. Wells, K. Lee, and C. Blaise (eds.), CRC Press, Boca Raton, Fla.

Pollutech [Pollutech Enviroquatics Ltd.], 1996. Comparison of results from alternative acute toxicity tests with rainbow trout for selected mine effluents. Unnumbered AETE Report, April, 1996, Mining Association of Canada, and Natural Resources Canada, Canada Centre for Mineral and Energy Technol., Aquatic Effects Technol. Eval. Program, Ottawa, Ont.

Pollution Control Board, 1977 [reprinted 1989]. Pollution control objectives for the forest products industry of British Columbia. British Columbia Ministry of the Environment, Victoria, B.C.

Pontasch, K.W., B.R. Niederlehner, and J. Cairns Jr., 1989. Comparisons of single-species, microcosm and field responses to a complex effluent. *Environ. Toxicol. Chem., 8:*521–532.

Power, M. and L.S. McCarty, 1997. Fallacies in ecological risk assessment practices. *Environ. Sci. Technol./News 331:*370A–375A.

Prati, L., R. Pavanello, and F. Pesarin, 1971. Assessment of surface water quality by a single index of pollution. *Water Res., 5:*741–751.

Pratt, J.R., N.J. Bowers, and J. Cairns Jr., 1990. Effect of sediment on estimates of diquat toxicity in laboratory microcosms. *Water Res., 24:*51–57.

Quillardet, P., O. Huisman, R. D'Ari, and M. Hofnung, 1982. SOS Chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 79:*5971–5975.

Quillardet, P., C. de Bellecombe, and M. Hofnung, 1985. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: validation study with 83 compounds. *Mutat. Res., 147:*79–95.

Qureshi, A.D., K.W. Flood, S.R. Thompson, S.M. Junhurst, C.S. Inniss, and D.A. Rokosh, 1982. Comparison of a luminescent bacterial test with other bioassays for determining toxicity of pure compounds and complex effluents. p. 179–195, In: *Aquatic toxicology hazard assessment.* 5th conf. ASTM STP 766, J.G. Pearson *et al.* (eds.), Amer. Soc. for Testing and Materials, Philadelphia, Pa.

Qureshi, A.A., A.A.Bulich, and D.L. Isenberg, 1998. Microtox® toxicity test systems -- where they stand today. p. 185–199, In: *1998. Microscale testing in aquatic toxicology. Advances, techniques, and practice.* Wells, P.G., K. Lee, and C. Blaise (eds.), CRC Press, Boca Raton, Fla.

Ramamoorthy, S., 1996. *Handbook of chemical toxicity profiles of biological species. Vol. 2, Avian and mammalian species.* Lewis Pub., Boca Raton, Fla. 416 p.

Ramamoorthy, S. and E. Baddaloo, 1990. *Evaluation of environmental data for regulatory and impact assessment.* Elsevier, Amsterdam. 466 p.

———. 1995. *Handbook of chemical toxicity profiles of biological species. Vol. 1, Aquatic species.* Lewis Pub., Boca Raton, Fla. 400 p.

Rand, G.M. (ed.), 1995. *Fundamentals of aquatic toxicology. 2nd ed.* Taylor and Francis, Washington, D.C. 1125 p.

Rand, G.M. and S.R. Petrocelli (eds.), 1985. *Fundamentals of aquatic toxicology.* Hemisphere Pub., Washington, D.C.

Rawson, D.M., A.J. Willmer, and M.C. Cardosi, 1987. The development of a whole cell biosensor for on line screening of herbicide pollution of surface waters. *Toxic. Assess., 2:*325–340. [Cited through Pandard *et al.*, 1993].

Read, H.W., J.M Harkin, and K.E. Gustavson, 1998. Environmental applications with submitochondrial particles. p. 31–52, In: *1998. Microscale testing in aquatic toxicology. Advances, techniques, and practice.* P.G. Wells, K. Lee, and C. Blaise (eds.), CRC Press, Boca Raton, Fla.

Reice, S.R. and M. Wohlenberg, 1993. Monitoring freshwater benthic macroinvertebrates and benthic processes: measures for assessment of ecosystem health. p. *287–304, In: Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates.* D.M. Rosenberg and V.H. Resh (eds.), Chapman & Hall, New York, N.Y.

Reynoldson, T.B. and M.A. Zarull, 1993. An approach to the development of biological sediment guidelines. p. 177–200, In: *Ecological integrity and the management of ecosystems.* S. Woodley, J. Kay, and G. Francis (eds.), St. Lucie Press, Delray Beach, Fla.

Reynoldson, T.B., K.E. Day, and R.H. Norris, 1995. Biological guidelines for freshwater sediments based on

Benthic Assessment of SedimenT (the *BEAST*). *Austral. J. Ecol., 20:*198–219.

Roch, M. and E.J. Maly, 1979. Relationship of cadmium-induced hypocalcemia with mortality in rainbow trout *(Salmo gairdneri)* and the influence of temperature on toxicity. *J. Fish. Res. Board Can., 36:*1297–1303.

Rolland, R.M., M. Gilbertson, and R.E. Peterson (eds.), 1997. Chemically induced alteration in functional development and reproduction of fishes. Soc. Environ. Toxicol. Chem., SETAC Press, Pensacola, Fla., 224 p.

Rosenberg, D.M. and V.H. Resh (eds.), 1993. *Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates.* Chapman & Hall, New York, N.Y.

Rosenzweig, M.S. and A.L. Buikema Jr., 1994. Phytoplankton colonization and seasonal succession in new experimental ponds. *Environ. Toxicol. Chem., 13:*599–605.

Ross, P., 1998. Role of microbiotests in contaminated sediment assessment batteries. p. 549–556, In: *1998. Microscale testing in aquatic toxicology. Advances, techniques, and practice.* P.G. Wells, K. Lee, and C. Blaise (eds.), CRC Press, Boca Raton, Fla.

Rousseaux, C.G., A. Branchaud, and P.A. Spear, 1995. Evaluation of liver histopathology and EROD activity in St. Lawrence Lake sturgeon *(Acipenser fulvescens)* in comparison with a reference population. *Environ. Toxicol. Chem., 14:*843–850.

Ruby, S.M., D.R. Idler, and S.Y. Peng, 1993. Plasma vitellogenin, 17ß-estradiol, T_3 and T_4 levels in sexually maturing rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* following sublethal HCN exposure. *Aquat. Toxicol., 26:*91–102.

Rue, W.J., J.A. Fava, and D.R. Grothe, 1988. A review of inter- and intralaboratory effluent toxicity test method variability. p. 190–203, In: Aquatic toxicology and hazard evaluation. 10th vol. W.J. Adams, G.A. Chapman, and W.G. Landis (eds.), Amer. Soc. Testing and Materials, Philadelphia, Pa., ASTM STP 971.

Russell, R.W., S.J. Hecnar, and G.D. Haffner 1995. Organochlorine pesticide residues in southern Ontario spring peepers. *Environ. Toxicol. Chem., 14:*815–818.

Russo, R.C., 1985. Ammonia, nitrite, and nitrate. p. 455–471, In: *Fundamentals of aquatic toxicology. Methods and applications.* G.M. Rand and S.E. Petrocelli (eds.), Hemisphere Pub. Corp., Washington, D.C.

Russom, C.L., S.P. Bradbury, S.J. Broderius, D.E. Hammermeister, and R.A. Drummond, 1997. Predicting modes of toxic action from chemical structure: acute toxicity in the fathead minnow *(Pimephales promelas). Environ. Toxicol. Chem., 16:*948–967.

Salazar, M.H. and S.M. Salazar, 1996. Mussels as bioindicators: effects of TBT on survival, bioaccumulation, and growth under natural conditions. p. 305–330, In: *Organotin.* M.A. Champ and P.F. Seligman (eds.), Chapman & Hall, London.

Sanders, W.M., 1985. Field validation. p. 601–618, In: *Fundamentals of aquatic toxicology. Methods and applications.* G.M. Rand and S.E. Petrocelli (eds.), Hemisphere Pub. Corp., Washington, D.C.

Sarda, N. and G.A. Burton Jr., 1995. Ammonia variation in sediments: Spatial, temporal and method-related effects. *Environ. Toxicol. Chem., 14:*1499–1506.

Sasson-Brickson, G. and G.A. Burton Jr., 1991. In situ and laboratory sediment toxicity testing with *Ceriodaphnia dubia. Environ. Toxicol. Chem., 10:*201–207.

Sauvé, S., A. Dumestre, M. McBride, and W. Hendershot, 1998. Derivation of soil quality criteria using predicted chemical speciation of Pb^{2+} and Cu^{2+}. *Environ. Toxicol. Chem., 17:*1481–1489.

Schiewe, M.H., E.G. Hawk, D.I. Actor, and M.M. Krahn, 1985. Use of a bacterial luminescence assay to assay toxicity of contaminated marine sediments. *Can. J. Fish. Aquat. Sci., 42:*1244–1248.

Schimmel, S.C. and G.B. Thursby, 1996. Predicting receiving system impacts from effluent toxicity: a marine perspective. p. 322–330, In: *Whole effluent toxicity testing: An evaluation of methods and prediction of receiving system impacts.* Grothe, D.R., K.L. Dickson, and D.K. Reed-Judkins (eds.). Soc. Environ. Toxicol. Chem., SETAC Special Pub. Series, SETAC Press, Pensacola, Fla.

Schimmel, S.C., G.E. Morrison, and M.A. Heber, 1989. Marine complex effluent toxicity program: test sensitivity, repeatability and relevance to receiving water toxicity. *Environ. Toxicol. Chem., 8:*739–746.

Schindler, D.W., 1987. Detecting ecosystem responses to anthropogenic stress. *Can. J. Fish. Aquat. Sci. 44 (Suppl. 1):*6–25.

Schrap, S.M. and A. Opperhuizen, 1990. Relationship between bioavailability and hydrophobicity: reduction of the uptake of organic chemicals by fish due to the sorption on particles. *Environ. Toxicol. Chem., 9:*715–724.

SCOPE (Scient. Committee on Problems of the Environment), 1975. Environmental impact assessment: principles and procedures. Internat. Counc. Scient. Unions, Scient. Committee on Problems of the Environ. (SCOPE), Paris. Scope Rept 5, 173 p.

———. 1980. Environmental risk assessment. (A.V. Whyte and I. Burton, eds.) Internat. Counc. Scient. Unions, Scient. Committee on Problems of the Environ. (SCOPE), Paris. Scope Rept 15, 157 p. John Wiley & Sons, New York.

Scroggins, R.P., 1986. In-plant toxicity balances for a bleached kraft pulp mill. *Pulp and Paper Canada, 87 (9):* T344–348.

Seelye, J.G., R.J. Hesselberg, and M.J. Mac, 1982. Accumulation by fish of contaminants released from dredged sediments. *Environ. Sci. Technol., 16:*459–464.

Sergy, G.A., 1987. Recommendations on aquatic biological tests and procedures for environmental protection, C & P DOE. Environment Canada, Environmental Protection, Technology Development and Technical Services Branch, Edmonton, Alberta. 102 p. + app.

Servos, M., J. Carey, M. Ferguson, G. Van Der Kraak, H. Ferguson, J. Parrott, K. Gorman, and R. Cowling, 1992. Impact of a modernized bleached kraft mill on white sucker populations in the Spanish River, Ontario. *Water Pollut. Res. J. Can., 27:*423–437.

SETAC (Soc. Environ. Toxicol. Chem.), 1997. Ecological risk assessment. Soc. Environ. Toxicol. Chem., Pensacola, Fla., SETAC Tech. Issue Paper, 4 p.

Sheppard, S., J. Bembridge, M. Holmstrup, and L. Posthuma, 1998. Advances in earthworm ecotoxicology. Soc. Environ. Toxicol. Chem., SETAC Press, Pensacola, Fla., 442 p.

Shi, M. and E.M. Faustman, 1989. Development and characterization of a morphological scoring system for medaka *(Oryzias latipes)* embryo culture. *Aquat. Toxicol., 15:*127–140.

Shigehisa, H. and H. Shiraishi, 1998. Biomonitoring with shrimp to detect seasonal change in river water toxicity. *Environ. Toxicol. Chem., 17:*687–694.

Shugart, L.R., 1995. Environmental genotoxicology. p. 405–419, In: *Fundamentals of aquatic toxicology. 2nd ed.* G.M. Rand (ed.), Taylor and Francis, Washington, D.C.

Shugart, R., J. Bickham, G. Jackim, G. McMahon, W. Ridley, J. Stein, and S. Steinert, 1992. DNA alterations. p. 125–153, In: *Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress.* R.J. Huggett, R.A. Kimerle, P.M. Mehrle Jr., and H.L. Bergman (eds.), Lewis Pub., Boca Raton, Fla.

Sibley, P.K., G.T. Ankley, A.M. Cotter, and E.N. Leonard, 1996. Predicting chronic toxicity of sediments spiked with zinc: an evaluation of the acid-volatile sulfide model using a life-cycle test with the midge *Chironomus tentans. Environ. Toxicol. Chem., 15:*2102–2112.

Slooff, W., J.H. Canton, and J.L.M. Hermens, 1983. Comparison of the susceptibility of 22 freshwater species to 15 chemical compounds. I. (Sub)acute toxicity tests. *Aquat. Toxicol., 4:*113–128.

Slooff, W., J.A.M. van Oers, and D. de Zwart, 1986. Margins of uncertainty in ecotoxicological hazard assessment. *Environ. Toxicol. Chem., 5:*841–852.

Smith, S.L., D.D. MacDonald, K.A. Keenleyside, and C.L. Gaudet, 1996a. The development and implementation of Canadian sediment quality guidelines. p. 233–249, In: *Developments and progress in sediment quality assessment: Rationale, challenges, techniques and strategies.* M. Munawar, and G. Dave (eds.). Ecovision World Monograph Series. SPB Academic Publishing, Amsterdam, the Netherlands.

Smith, S.L., D.D. MacDonald, K.A. Keenleyside, C.G. Ingersoll, and L.J. Field, 1996b. A preliminary evaluation of sediment quality assessment values for freshwater ecosystems. *J. Great Lakes Res., 22:*624–638.

Smrchek, S., R. Clements, R. Morcock, and W. Robert, 1993. Assessing biological hazard under TSCA: Methods and evaluation of data. p. 22–39, In: *Environmental toxicology and risk assessment.* W. Landis, J. Hughes, and M. Lewis (eds.), Amer. Soc. for Testing and Materials, Philadelphia, Pa., ASTM STP 1179.

Snell, T.W. and G. Persoone, 1989a. Acute toxicity bioassays using rotifers. I. A test for brackish and marine environments with *Brachionus plicatilis. Aquat. Toxicol., 14:*65–80.

Snell, T.W. and G. Persoone, 1989b. Acute toxicity bioassays using rotifers. II. A freshwater test with *Brachionus rubens. Aquat. Toxicol., 14:*81–92.

SNV (Swedish Naturvårdsverket), 1990. Biological -- chemical characterisation of industrial waste water. Application when granting permits and exercising supervisory authority for activities harmful to the

environment. Naturvårdsverket (Swedish Environmental Protection Agency), S-171 85 Solna, Sweden. 102 p. [ISBN 91-620-1071-9]

Soares, A.M.V.M., D.J. Baird, and P. Calow, 1992. Interclonal variation in the performance of *Daphnia magna* Straus in chronic bioassays. *Environ. Toxicol. Chem., 11:*1477–1484.

Södergren, A., 1987. Biological effects of effluents from pulp mills -- preliminary results from the Swedish Environment/Cellulose project. *Paperi ja Puu, 69:*422–426.

Södergren, A., B.-E. Bengtsson, P. Jonsson, S. Lagergren, L. Larsson, M. Olsson and L. Renberg, 1988. Summary of results from the Swedish project Environment/Cellulose. *Water Sci. Technol., 20:*49–60.

Solé, M., C. Porte, and J. Albaigés, 1995. Seasonal variation in the mixed-function oxygenase system and antioxidant enzymes of the mussel *Mytilus galloprovincialis. Environ. Toxicol. Chem., 14:*157–164.

Spear, P.A. and R.C. Pierce, 1979. Copper in the aquatic environment: chemistry, distribution and toxicology. National Research Council of Canada, Environ. Secretariat, Rept no. NRCC 16454.

Spies, R.B. and D.W. Rice Jr., 1988. Effects of organic contaminants on reproduction of the starry flounder *Platichthys stellatus* in San Francisco Bay. II. Reproductive success of fish captures in San Francisco Bay and spawned in the laboratory. *Marine Biol., 98:*191–200.

Sprague, J.B., 1969. Measurement of pollutant toxicity to fish -- I. Bioassay methods for acute toxicity. *Water Res. 3:*793–821.

———. 1970. Measurement of pollutant toxicity to fish. II. Utilizing and applying bioassay results. *Water Res., 4:* 3–32.

———1971. Measurement of pollutant toxicity to fish -- III. Sublethal effects and "safe" concentrations. *Water Res., 5:*245–266.

———. 1981. Ethologists are environmental drop-outs. Abstract. Proc. 2nd Biennial Symposium on Ethology and Behavioural Ecology of Fishes, Normal, Ill., Oct. 19-22, 1979. *Environ. Biol. Fishes, 6:*138.

———. 1985. Factors that modify toxicity. p. 124–163, In: *Fundamentals of aquatic toxicology. Methods and applications.* G.M. Rand and S.E. Petrocelli (eds.), Hemisphere Pub. Corp., Washington, D.C.

———. 1991. Environmentally desirable approaches for regulating effluents from pulp mills. *Water Sci. Technol,. 3/4:*361–271.

———. 1992. Concepts for developing Canadian water quality guidelines for effluents from bleached pulp mills. Prepared for Environment Canada, Ecosystem Sciences and Evaluation Directorate, Eco-Health Branch, Guidelines Div., Hull, Quebec. 129 p.

———. 1995. Planning a field validation program. Chapt. 3 in Review of methods for sublethal aquatic toxicity tests relevant to the Canadian metal-mining industry, and design of field validation programs. Prepared for Natural Resources Canada, Canada Centre for Mineral and Energy Technology, Aquatic Effects Technol. Eval. Progr. [AETE], Ottawa, Ont. by Sprague Associates Ltd., Salt Spring Island, B.C., 110 p.

———. 1997. Review of methods for sublethal aquatic toxicity tests relevant to the Canadian metal-mining industry. Natural Resources Canada, Canada Centre for Mineral and Energy Technology, Aquatic Effects Technol. Eval. Progr. [AETE], Ottawa, Ont. AETE Project 1.2.1: 102 p.

Sprague, J.B. and D.E. Drury, 1969. Avoidance reactions of salmonid fish to representative pollutants. p. 169–179 In: *Advances in Water Pollution Research. Proc. Fourth Internat. Conf., Prague, Vol. 1.* S.H. Jenkins (ed.), Pergamon Press, London.

Sprague, J.B., P.F. Elson, and R.L. Saunders, 1965. Sublethal copper-zinc pollution in a salmon river -- a field and laboratory study. *Internat. J. Air Water Pollution, 9:*531–543.

Sprague, J.B., P.F. Elson, and J.R. Duffy, 1971. Decrease in DDT residues in young salmon after forest spraying in New Brunswick. *Environ. Pollut., 1:*191–203.

Sprague, J.B., N. McCubbin, and N. Bonsor [Expert Committee on Pollution from Non-Kraft Pulp and Paper Mills], 1991. Effluents from non-kraft pulp and paper mills in Ontario. Report for Technical Advisory Committee, Pulp and Paper Sector of MISA, Ontario Min. of Environment, Toronto, Ont., 426 p.

SRC (Saskatchewan Research Council) 1995a. Development of aquatic plant bioassays for rapid screening and interpretive risk assessments of metal mining wastewaters. SRC, Tech. Univ. Denmark, and Univ. Saskatchewan, Regina, Sask. SRC Pub. E-2100-2-C-95, 191 p.

Stackhouse, R.A. and W.H. Benson, 1988. The influence of humic acid on the toxicity and bioavailability of selected trace metals. *Aquatic Toxicol., 13:*99–108.

Stebbing, A.R.D., 1982. Hormesis -- the stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Sci. Total Envir., 22:* 213–234.

Stegeman, J.J. and P.J. Kloepper-Sams, 1987. Cytochrome P-450 isozymes and mono-oxygenase activity in aquatic animals. *Environ. Health Perspect., 71:*87–95.

Stegeman, J.J., B.R. Woodin, and A. Boksoyr, 1988. Apparent cytochrome P-450 induction as an indication of exposure to environmental chemicals in the flounder *Platichthys flesus. Mar. Ecol. Prog. Ser., 46:*55–60.

Stein, J.E., T.K. Collier, W.L. Reichert, E. Casillas, T. Hom, and U. Varanasi, 1992. Bioindicators of contaminant exposure and sublethal effects: Studies with benthic fish in Puget Sound, Washington. *Environ. Toxicol. Chem., 11:* 701–714.

Stephan, C.E., 1982. Increasing the usefulness of acute toxicity tests. p. 69–81, In: *Aquatic toxicology and hazard assessment: fifth conference.* J.G. Pearson, R.B. Foster, and W.E. Bishop (eds.), Amer. Soc. Testing and Materials, Philadelphia, Pa. ASTM STP No. 766.

Stephan, C.E. and J.W. Rogers, 1985. Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. p. 328–338, In: *Aquatic toxicology and hazard assessment. 8th symp.* R.C. Bahner and D.J. Hansen (eds.), American Soc. Testing and Materials, Philadelphia, Pa., ASTM STP 891.

Stephan, C.E., D.I. Mount, D.J. Hanson, J.H. Gentile, G.A. Chapman, and W.A. Brungs, 1985. Guidelines for deriving numeric national water quality criteria for the protection of aquatic organisms and their uses. USEPA, Duluth, Minn. Natl Tech. Inform. Service, PB85-227049.

Stumm, W. and J.J. Morgan, 1981. *Aquatic chemistry. An introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters. Second ed.* John Wiley & Sons, New York, N.Y.

Suter, G.W. II, 1990. Uncertainty in environmental risk assessment. p. 203–230, In: *Acting under uncertainty: Multidisciplinary conceptions.* G.M. von Furstenberg (ed.), Kluwer Academic Pub., Boston. Mass.

———. (ed.), 1993. *Ecological risk assessment.* Lewis Pub., Boca Raton, Fla. 538 p.

———. 1995. Introduction to ecological risk assessment for aquatic toxic effects. p. 803–816, In: *Fundamentals of aquatic toxicology. 2nd ed.* G.M. Rand (ed.), Taylor and Francis, Washington, D.C.

———. 1996. Abuse of hypothesis testing statistics in ecological risk assessment. *Human and Ecol. Risk Assess., 2:*331–347.

———. 1997. Overview of the ecological risk assessment framework. p. 1–6, In: *Ecological risk assessment of contaminated sediments.* C.G. Ingersoll, T. Dillon, and G.R. Biddinger (eds.). Soc. Environ. Toxicol. Chem., SETAC Special Pub. Series, SETAC Press, Pensacola, Fla.

Suter, G.W. II, A.E. Rosen, E. Linder, and D.F. Parkhurst, 1987. Endpoints for responses of fish to chronic toxic exposures. *Environ. Toxicol. Chem., 6:*793–809.

Swanson, M.B., G.A. Davis, L.E. Kincaid, T.W. Schultz, J.E. Bartmess, S.L. Jones, and E.L. George, 1997. A screening method for ranking and scoring chemicals by potential human health and environmental impacts. *Environ. Toxicol. Chem., 16:*372–383.

Tang, Y. and E.T. Garside, 1987. Preexposure and subsequent resistance to lead in yearling brook trout, *Salvelinus fontinalis. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 44:*1089–1091.

Taub, F.B., 1985. Toward interlaboratory (round-robin) testing of a standardized aquatic microcosm. p. 165–186, In: *Multispecies toxicity testing.* Cairns, J. Jr. (ed.), Pergamon Press, New York, N.Y.

Tay, K.-L., K.G. Doe, S.J. Wade, D.A. Vaughan, R.E. Berrigan, and M.J. Moore, 1992. Sediment bioassessment in Halifax harbour. *Environ. Toxicol. Chem., 11:*1567–1582.

Tay, K.L., K.G. Doe, A.J. MacDonald, S.J. Wade, J.D.A. Vaughan, A.L. Huybers, K. Lee, and R. Larocque, 1993. Application of sediment bioassays for the environmental assessment of ocean dumping sites. *Proc. 20th Ann. Aquatic Toxicity Workshop,* Quebec (Quebec), November, 1993. p. 48-49.

Tay, K.L., K.G. Doe, A.J. MacDonald, and K. Lee, 1998. The influence of particle size, ammonia, and sulfide on toxicity of dredged materials for ocean disposal. p. 559–574, In: *1998. Microscale testing in aquatic toxicology. Advances, techniques, and practice.* P.G. Wells, K. Lee, and C. Blaise (eds.), CRC Press, Boca Raton, Fla.

Taylor, B.R. and D. Parkinson, 1988. A new microcosm approach to litter decomposition studies. *Can. J. Bot., 66:*1933–1939.

Taylor, M.C. (ed.), 1989. *Proceedings of a workshop on the development and use of water quality objectives.* Halifax, N.S., Sept. 19-21, 1989. Canadian Council of Ministers of the Environment, Task Force for Water Quality Guidelines, 175 p.

Thompson, K.W., M.L. Deaton, R.V. Foutz, J. Cairns Jr., and A.C. Hendricks, 1982. Application of time-series intervention analysis to fish ventilatory response data. *Can. J. Fish. Aquat. Sci., 39:*518–521.

Thursby, G.B. and C.E. Schlekat, 1993. Statistical analysis of 10-day solid phase toxicity data for amphipods. Fourteenth Ann. Meeting of Soc. Environ. Toxicol. Chem., Houston, Texas. Abstract 339.

Thurston, R.V., G.R. Phillips, R.C. Russo, and S.M. Hinkins, 1981. Increased toxicity of ammonia to rainbow trout *(Salmo gairdneri)* resulting from reduced concentrations of dissolved oxygen. *Can. J. Fish. Aquat. Sci., 38:*983–988.

Thurston, R.V., T.A. Gilfoil, E.L. Meyn, R.K. Zajdel, T.I. Aoki, and G.D. Veith, 1985. Comparative toxicity of ten organic chemicals to ten common aquatic species. *Water Res., 9:*1145–1155.

Tosato, M.L., S. Marchini, L. Passerini, A. Pino, L. Eriksson, F. Lindgren, S. Hellberg, J. Jonsson, M. Sjöström, B. Skagerberg, and S. Wold, 1990. QSARs based on statistical design and their use for identifying chemicals for further biological testing. *Environ. Toxicol. Chem., 9:*265–277.

Trust, K.A., A. Fairbrother, and M.J. Hooper, 1994. Effects of 7, 12-dimethylbenz[*a*]anthracene on immune function and mixed-function oxygenase activity in the European starling. *Environ. Toxicol. Chem., 13:*821–830.

USEPA (United States Environmental Protection Agency), 1978. Water quality criteria. *U.S. Fed. Register, 43(97):*21506–21518.

———. 1984a. Development of water quality-based permit limitations for toxic pollutants; national policy. U.S. *Federal Register, 49(*48): 9016–9019, Friday, March 9, 1984.

———. 1984b. Estimating "concern levels" for concentrations of chemical substances in the environment. USEPA, Environmental Effects Branch, Health and Environmental Review Div., 43 p.

———. 1985a. Ambient aquatic life water quality criteria for ammonia -- 1984. EPA/440/5-85-001. USEPA, Office of Water, Regulations and Stand., Washington, D.C.

———. 1985b. Toxic Substances Control Act test guidelines; final rules. *U.S. Federal Register, 50:*39252–39516, Sept. 27, 1985.

———. 1986. Quality criteria for water 1986. EPA 440/5-86-001. USEPA, Office of Water, Regulations and Standards, Washington, D.C.

———. 1988a. Toxicity reduction evaluation protocol for municipal wastewater treatment plants. EPA/600/2-88/062. USEPA, Office of Research and Development, Risk Reduction Engineering Lab., Cincinnati, Ohio.

———. 1988b. Generalized methodology for conducting industrial toxicity reduction evaluations. EPA/600/2-88/070. USEPA, Office of Research and Development, Risk Reduction Engineering Lab., Cincinnati, Ohio.

———. 1989a. Methods for aquatic toxicity identification evaluations. Phase II. Toxicity identification procedures. EPA/600/3-88/035. USEPA, Office of Research and Development, Environmental Research Laboratory, Duluth, Minn.

———. 1989b. Methods for aquatic toxicity identification evaluations. Phase III. Toxicity confirmation procedures. EPA/600/3-88/036. USEPA, Office of Research and Development, Environmental Research Laboratory, Duluth, Minn.

———. 1989c. Ecological assessment of hazardous waste sites: a field and laboratory reference document. W. Warren-Hicks, B.R. Parkhurst, and S.S. Baker (eds.), Prepared by Kilkelly Environmental Associates. EPA/600/3-89/013. USEPA,

———. 1989d. Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act (FIFRA): good laboratory practice standards; final rule. 40 CFR Part 160. *U.S. Federal Register, IV,* August 17, 1989. 34 p.

———. 1989e. Amended good laboratory practices (TSCA). *U.S. Federal Register,* August 17, 1989.

———. 1991a. Technical support document for water quality-based toxics control. EPA/505/2-90-001. USEPA, Office of Water, Washington, D.C.

———. 1991b. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms. 2nd ed. EPA 600/4-91-003. USEPA, Environmental Monitoring Systems Laboratory -- Cincinnati, Ohio.

———. 1991c. Methods for aquatic toxicity identification evaluations. Phase I. Toxicity characterization procedures. EPA/600/6-91/003. USEPA, Office of Research and Development, Environmental Research Laboratory, Duluth, Minn.

———. 1991d. Toxicity identification evaluation: characterization of chronically toxic effluents, phase I. EPA/600/6-91/005. USEPA, Office of Research and Development, Environmental Research Laboratory, Duluth, Minn.

———. 1992a. Application of microcosms for assessing the risk of microbial biotechnology products. In:EPA workshop report. EPA/600/R-92/066. C.R. Cripe, P.H. Pritchard, and A.M. Stern (eds.), USEPA, Washington, D.C.

———. 1992b. Framework for ecological risk assessment. Risk Assessment Forum. EPA/630/R-92/001. USEPA, Washington, D.C.

———. 1992c. Sediment classification methods compendium. EPA 823-R-92-006. USEPA, Office of Water, Washington, D.C.

———. 1993. Guidance manual: bedded sediment bioaccumulation tests. EPA/600/R-93/183. USEPA, Office of Research and Development, Washington, D.C.

———. 1994a. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluent and receiving waters to marine and estuarine organisms. 2nd. ed. EPA/600/4-91/003., USEPA, Cincinnati, Ohio.

———. 1994b. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. 3rd ed. EPA 600/4-91-002. USEPA, Environmental Monitoring Systems Laboratory, Cincinnati, Ohio.

———. 1994c. ECOSAR. A computer program for estimating the ecotoxicity of industrial chemicals based

on structure activity relationships. User's guide. Rept no. 748-R-93-002, USEPA, Office Pollut. Prevention and Toxics, Washington, D.C., 22 p. and computer disc.

———. 1994d. Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. EPA 600/R-94/024, USEPA, Duluth, Minn., 32 p.

———. 1994e. Water quality standards handbook: second edition. EPA/823-B-94-005a. USEPA, Office of Water, Washington, D.C.

———. 1995. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to west coast marine and estuarine organisms. EPA 600/R-95/136, G.A. Chapman, D.L. Denton, and J.M. Lazorchak (eds.), USEPA, Office of Research and Development, Washington, D.C. 661 p.

———. 1996. Marine toxicity identification evaluation (TIE): Phase I, guidance document. EPA/600/R-96/054. USEPA, Cincinnati, Ohio.

———. 1998. Guidelines for ecological risk assessment. EPA/630/R-95/002Fa. USEPA, Risk Assessment Forum, Washington, D.C. [Available as NTIS pub. no. PB98-117849 or from http://www.epa.gov/ncea/]

USEPA Region VIII (United States Environmental Protection Agency), 1994. Mixing zones and dilution policy. USEPA Region VIII, Water Management Div., Denver, Colo. 38 p + app.

USEPA and ACOE (United States Environmental Protection Agency and U.S. Army Corps of Engineers), 1994. Evaluation of dredged material proposed for discharge in waters of the U.S. USEPA, Offices of Water and Science & Technology, and U.S. Army Corps of Engineers, Washington, D.C., 161 p. + app.

USEPA and EEC (United States Environmental Protection Agency and European Economic Community), 1993. USEPA/EEC joint project on the evaluation of (quantitative) structure-activity relationships. (Draft final report). USEPA, Washington, D.C., 55 p. + app.

USNRC (United States National Research Council), 1989. Improving risk communication. National Academy Press, Washington, D.C., 332 p.

Vaes, W.H.J., E.U. Ramos, H.J.M. Verhaar, and J.L.M. Hermens, 1998. Acute toxicity of nonpolar versus polar narcosis: Is there a difference? *Environ. Toxicol. Chem., 17:*1380–1384.

Valiela, D. and P.H. Whitfield, 1988. Designing site-specific water quality objectives and monitoring. *Water Pollut. Res. J. Can., 23:*510–519.

van de Plassche, E.J., and G.J. Bockting, 1993. Towards integrated environmental quality objectives for several

volatile compounds. Report no. 679101-011, National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, The Netherlands, 78 p.

van der Hoeven, N. and A.A.M. Gerritsen, 1997. Effects of Chlorpyrifos on individuals and populations of *Daphnia pulex* in the laboratory and field. *Environ. Toxicol. Chem., 16:*2438–2447.

van der Schalie, W.H., 1986. Can biological monitoring early warning systems be useful in detecting toxic materials in water? p. 107–121, In: Aquatic toxicology and risk assessment. 9th vol., ASTM STP 921. T.M. Poston and R. Purdy (eds.), Amer. Soc. for Testing and Materials, Philadelphia, Pa.

Van Gestel, C.A.M. and W.- C. Ma, 1993. Development of QSAR's in soil ecotoxicology: Earthworm toxicity and soil sorption of chlorophenols, chlorobenzenes and chloroanilines. *Water Air Soil Pollut., 69:*265–276.

van Hoof, F.M., E.G. de Johghe, M.G. Briers, P.D. Hansen, H.J. Pluta, D.M. Rawson, and A.J. Wilmer, 1992. The evaluation of bacterial biosensors for screening of water pollutants. *Environ. Toxicol. Water Qual., 7:*19–33.

Van Loon, W.M.G.M., M.E. Verwoerd, F.G. Wijnker, C.J. van Leeuwen, P. van Duyn, C. Van de Guchte, and J.L.M. Hermens, 1997. Estimating total body residues and baseline toxicity of complex organic mixtures in effluents and surface waters. *Environ. Toxicol. Chem., 16:*1358–1366.

Van Sprang, P.A., and C.R. Janssen, 1997. Identification and confirmation of ammonia toxicity in contaminated

sediments using a modified toxicity identification evaluation approach. *Environ. Toxicol. Chem., 16:*2501–2507.

van Straalen, N.M. and C.A.J. Denneman, 1991. Ecotoxicological evaluation of soil quality criteria. *Ecotox. Environ. Saf., 18:*241–251.

Van Urk, G., F. Kerkum, and C.J. Van Leeuwen, 1993. Insects and insecticides in the Lower Rhine. *Water Res., 27:*205–213.

Van Voris, P., D.A. Tolle, M.F. Arthur, and J. Chesson, 1985. Terrestrial microcosms: Applications, validation and cost-benefit analysis. p. 117–142, In: *Multispecies toxicity testing*. J. Cairns Jr. (ed.), Pergamon Press, New York, N.Y.

Veith, G.D., D.L. DeFoe, and B.V. Bergstedt, 1979. Measuring and estimating the bioconcentration factor of chemicals in fish. *J. Fish. Res. Board. Can., 36:*1040–1048.

Veith, G.D., D.J. Call, and L.T. Brooke, 1983. Structure - toxicity relationships for the fathead minnow, *Pimephales promelas*: narcotic industrial chemicals. *Can. J. Fish. Aquat. Sci., 40:*743–748.

Verhaar, H.J.M., C.J. van Leewen, and J.L.M. Hermens, 1992. Classifying environmental pollutants. 1: structure-activity relationships for prediction of aquatic toxicity. *Chemosphere, 25:*471–491.

VKI (Water Quality Institute), 1994. Discussion paper regarding guidance for terrestrial effects assessment. Draft final report, prepared for the Organisation for Economic Cooperation and Development. VKI, Water Quality Institute, Denmark. 63 p.

VKI and RIVM (Water Quality Institute and Institute of Public Health and Environmental Protection), 1995. Aquatic testing methods for pesticides and industrial chemicals. Review. Annex, draft final report, prepared for National Co-ordination of the OECD Test Guidelines Programme, Paris. VKI, Water Quality Institute, Denmark, and Institute of Public Health and Environmental Protection, the Netherlands, 332 p.

Voyer, R.A., P.O. Yevich, and C.A. Barszcz, 1975. Histological and toxicological responses of the mummichog *Fundulus heteroclitus* (L.) to combinations of levels of cadmium and dissolved oxygen in a freshwater. *Water Res., 9:*1069–1074.

Wagner, C. and H. Lϕkke, 1991. Estimation of ecotoxicological protection levels from NOEC toxicity data. *Water Res., 25:*1237–1242.

Wajsbrot, N., A. Gasith, M.D. Krom, and T.M. Samocha, 1990. Effect of dissolved oxygen and the molt stage on the acute toxicity of ammonia to juvenile green tiger prawn *Penaeus semisulcatus*. *Environ. Toxicol. Chem,. 9:*497–504.

Walker, G.C., 1984. Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *E. coli*. *Microb. Rev., 48:*60–93.

Walker, J.D., 1990. Chemical fate, bioconcentration, and environmental effects testing: proposed testing and decision criteria. *Tox. Assess., 5:*103–134.

Wall, T.M. and R.W. Hanmer, 1987. Biological testing to control toxic water pollutants. *J. Water Pollut. Control Fed., 59:*7–12.

Wall, V.D., J. London, J.E. Warren, R. Gossett, M.D. Wenholz, and S.J. Klaine, 1998. Development of a continuous-flow renewal system for sediment toxicity testing. *Environ. Toxicol. Chem., 17:*1159–1164.

Wallace, J.B., T.F. Cuffney, J.R. Webster, G.J. Lugthart, K. Chung, and B.S. Goldowitz, 1991. Export of fine organic particles from headwater streams: Effects of season, extreme discharges, and invertebrate manipulation. *Limnol. Oceanogr., 36:*670–682.

Wang, F., 1998. Porewater toxicity testing: does it make sense? Soc. Environ. Toxicol. Chemistry, Pensacola, Fla. *SETAC News, 18 (5):*23–24

Warren, C.E. and G.E. Davis, 1971. Laboratory stream research: Objectives, possibilities, and constraints. *Annual Rev. Ecol. Systematics, 2:*111–144.

Warren-Hicks, W.J., and D.R.J. Moore (eds), 1998. Uncertainty analysis in ecological risk assessment. Soc. Environ. Toxicol. Chem., SETAC Press, Pensacola, Fla., 314 p.

WSDOE (Washington State Department of Ecology), 1997. Laboratory guidance and whole effluent toxicity test review criteria. Pub. no. WQ-R-95-80, revised March 1997, WSDOE, Water Quality Program, Olympia, Wash., 62 p.

———. 1998. Whole effluent toxicity (WET) program evaluation. Pub. no. 98-03, WSDOE, Water Quality Program, Olympia, Wash., 31 p.

Wells, P.G., K. Lee, and C. Blaise (eds), 1998. *Microscale testing in aquatic toxicology. Advances, techniques, and practice.* CRC Press, Boca Raton, Fla.

Westlake, G.F., J.B. Sprague, and I.T. Brown, 1983. Sublethal effects of treated liquid effluent from a petroleum refinery. IV. Respiratory movements and coughing of rainbow trout. *Aquat. Toxicology, 4:*317–325.

Wexler, P (ed.), 1998. *Encyclopedia of toxicology.* Academic Press, New York, N.Y.

White, P.A., and C. Côté, 1998. Investigating the sources and fate of genotoxic substances in aquatic ecosystems with the SOS Chromotest. p. 607–630, In: *1998. Microscale testing in aquatic toxicology. Advances, techniques, and practice.* P.G. Wells, K. Lee, and C. Blaise (eds.), CRC Press, Boca Raton, Fla.

Whitehouse, P. and M. Mallet, 1993. Aquatic toxicity testing for notification of new substances. An advisory document on dealing with 'difficult' substances. U.K. Dept. of the Environment, Chemical Notification Unit, Rept No. CP 722, 34 p. [Publications Unit, P.O. Box 16, Marlow, Buckinghamshire, U.K.]

Wilson, R.C.H., R.H. Cook, and E. Pessah, 1975. Practical application of the toxicity emission rate concept in a survey of Maritime pulp and paper mills. Presented at *Can. Pulp and Paper Assoc. Tech. Section Conf.,* Sept. 1975, Vancouver, B.C., p. 33–38.

Winner, R.W., 1981. A comparison of body length, brood size and longevity as indices of chronic copper and zinc stresses in *Daphnia magna. Environ. Pollut., (A)26:*33–37.

Wren, C.D., G.L. Stephenson, and R.P. Lanno, 1993. Using earthworms during biological testing for soil quality. *Environ. Science. Engng.,* September 1993, 26–27.

Wright, J.F., D. Moss, P.D. Armitage, and M.T. Furse, 1984. A preliminary classification of running-water sites in Great Britain based on macro-invertebrate species and the prediction of community type using environmental data. *Freshwat. Biol., 14:*221–256.

Xu, H.H., 1998. ATP-TOX system -- a review. p. 153–159, In: *1998. Microscale testing in aquatic toxicology. Advances, techniques, and practice.* P.G. Wells, K. Lee, and C. Blaise (eds.), CRC Press, Boca Raton, Fla.

Xu, H. and B.R. Dutka, 1987. ATP-TOX system -- a rapid, sensitive bacterial toxicity screening system based on the determination of ATP. *Toxic. Assess., 2:*149–166. [Cited through Dutka *et al.*, 1988].

Zeeman, M.G., 1995. Ecotoxicity testing and estimation methods developed under section 5 of the Toxic Substances Control Act (TSCA). p. 703–715, In: *Fundamentals of aquatic toxicology. 2nd ed.* G.M. Rand (ed.), Taylor and Francis, Washington, D.C.

Zischke, J.A., J.W. Arthur, R.O. Hermanutz, S.F. Hedtke, and J.C. Helgen, 1983. Effects of pentachlorophenol on invertebrates and fish in outdoor experimental channels. *Aquatic Toxicol., 7:*37–58.

付録 A

環境毒性データの解釈と利用に関する指針マニュアルの開発の計画運営委員会のメンバー

（1997 年 9 月現在）

Robert Backer
Environmental Assessment Branch
Environmental Conservation Service
Environmental Canada
Hull, Quebec

Norman Bermingham
Centre St.Laurent
Environmental Canada
Hull, Quebec

Philippa M.Cureton
Commercial Chemicals Evaluation Branch
Environmental Protection Service
Environmental Canada
Hull, Quebec

Marie-Louise Geadah
National Office of Pollution Prevention
Environmental Protection Service
Environmental Canada
Hull, Quebec

Karen Keenleyside
Evaluation and Interpretation Branch
Environmental Conservation Service
Environmental Canada
Hull, Quebec

Ian MacKenzie
Standards and Approvals Division
Alberta Environmental Protection
Edmonton, Alberta

Jennifer A. Miller
Method Development and Application Section
Environmental Technology Centre
Gloucester, Ontario

James M.Osborne
Marine Environmental Division
Hazardous Waste Branch
Environmental Protection Service
Environmental Canada
Hull, Quebec

W. Roy Parker
Atlantic Region
Environmental Protection Service
Environmental Canada
Dartmouth, Nova Scotia

Richard P. Scroggins
Method Development and Application Section
Environmental Technology Centre
Gloucester, Ontario

Rob Stevens
Phs/Chem. Science Directorate
Fisheries and Oceans Canada
Gloucester, Ontario

Roger Sutcliffe
New Susbstance Division
Commercial Chemicals Evaluation Branch
Environmental Protection Service
Environmental Canada
Hull, Quebec

付録B

セントローレンス河行動計画の廃水試験事業で用いられたPEEPとCHIMIOTOX試験

セントローレンス行動計画は、セントローレンス川の浄化、回復、保全、保存を目的とした5年間の連邦-州事業である。セントローレンス川はケベック州の最も工業化された地域を流れ、数多くの工業廃水を受け入れている。これら廃水は量、化学的性状、ならびに毒性が多様である。事業の主な目的の一つは、セントローレンス川とサグネー川流域の50の主要な工場において、液状毒性廃棄物を1993年までに90%削減することであった（Coasten et al., 1993）。

計画の第一期では、（1）汚染の大きな発生源を特定し、（2）主な工場からの毒物の放出を削減し、（3）廃水水質に対する生物学および化学的な基準を設定することを目指した。これを達成するためには、100を越える毒性物質を含む50の複雑な工業廃水の毒性と化学組成を比較する手段が必要であった。理想的には、

（1）　化学分析の結果を比較ならびに総合化し、
（2）　(a) 業種（例えば、製紙業、治金業等）、(b) 工場群、(c) 汚染物質の種類という条件を評価し、(d) 50工場全体の比較が行え、
（3）　工場の改善による毒性物質放流削減を評価する

ようなものが望ましい。

二つの数量化ツールが考案された。PEEPは廃水中の毒性を計測する指標である；また、Chimiotoxは廃水で予測される毒性を化学組成より見積もる指標である。これらのツールは特定の地域に合わせて作られているが、他の地域への適合性を調べる価値はある。また、あらゆる毒性指標は、細部が欠損している情報の断片を強化するものであることを心に留めておくべきである。さらに、Chimiotoxは化学に基づいており、毒性を予測するが計測するものではない。

生態影響予測プローブ（PEEP）

PEEP指標は、L'Equipe d'intervention Saint-Laurentによって開発され、50の工業廃水を河川への影響可能性で順位づける。PEEP指標は、総合的で、費用効果が高く、高感度な廃水毒性の指標を意図した。PEEPによる順位付けには二つの目的がある。

（1）　河川に最大の影響を与える廃水の発生源を絞り込む
（2）　改善後の廃水のモニタリングを効率的に行う

PEEPでは四つの小規模毒性試験の結果を組み合わせる。セントローレンス川への廃水の評価ではう

まく機能したようである（Legault and Villeneuve, 1992; Costan et al., 1993）。

指標は、(1) 致死ならびに亜致死毒性、(2) 遺伝子毒性、(3) 栄養レベルの幅を取り込むように選ばれた、次の四つの小規模小型スクリーニング試験の結果に基づく。

（１） *Selenastrum capriconutum* による藻類増殖試験（EC , 1992d）

（２） *Escherichia coli* による SOS-クロモテスト（Quillardet et al., 1982; 1985; Section 6.1）

（３） *Vibrio fischeri*（前の *Photobacterium phosphoreum* による生物発光試験（EC, 1992c）

（４） *Ceriodaphnia dubia* による生存・繁殖試験

PEEP に使うため、廃水を最初に四つ全ての毒性試験で評価する。

次に 1L の廃水を、好気性生物処理を模擬したプロセスに供する。ここでは、中程度の微生物分解に対する毒性の残留性を測定するため培養するが、揮発性成分は失われる（Costan et al., 1993）。生物分解は次のように進める。1L の廃水に(1) $MgSO_4$、$CaCl_2$、$FeCl_2$ を含む濃縮栄養液と(2) NH_4Cl を含む pH 7.2 のリン酸緩衝液を加える。次に市販の種菌 5%を植種し、穏やかに一定量で曝気しながら、室温・暗所で 5 日間培養する。

培養後に四つの毒性試験のうち比較的高価な *Ceriodaphnia* 試験を除く三つを行う。

全ての試験結果は観察された影響の閾値濃度（threshold concentrations for observed effect, TOEC）として報告し、ICp または EC_{50} が求められなくても、PEEP 指標に入力する。TOEC を毒性単位（TU＝100 / TOEC、4.3.1 項参照）に変換する。PEEP は生物分解前後の TU の合計であり、次式で計算する。

$$p = \log_{10}\left[1 + n\left(\frac{\sum_{i=1}^{n} T_i}{N}\right)Q\right]$$

この時、 P＝PEEP 値

n＝ 毒性応答を示すエンドポイントの数

N＝ 毒性エンドポイントの最大数

T_i＝ 生物分解前後の各試験の毒性単位

Q＝ 流量（m3/h）

Ceriodaphnia と SOS-クロモテストにそれぞれ二つのエンドポイントがあるため、四つの試験で六つのエンドポイントが得られる。生物分解後には *Cheriodaphnia* を除いて四つのエンドポイントであるため、N は 10 となる。PEEP 式は各エンドポイントの TU を合計し、N で割ることにより、廃水の「平均毒性単位」を求める。毒性応答の幅を表すため n を乗じ、河川に流入する時間当たりの全毒性単位数を計算

するため流出量を乗ずる（≈TEF、4.3.3 項参照）。結果は対数で表す（1 を加えるのは単にログが確実に計算できるようにするためである）。この尺度では、通常値は 0 と 10 の間に収まる（Costan et al., 1993）。よって、PEEP は七つの毒性試験の結果を単一の指標を得るために、一つの数字にかみ砕くものであり、個別試験より得られる詳細な情報は失われる。

この方法は柔軟性があるように設計されており、一つ以上の値を除いたり、他の試験結果と置き換えたりしても、PEEP 値は計算できる。（他の試験を用いた指標は厳密には比較できない。）それぞれの産業から得た PEEP 値は、全て毒性に基づくため、比較可能である。また、排水量を用いることは、環境の撹乱を考えるのに都合がよい。もう一つの指標である Chimiotox は化学分析値に基づいており、相補的である。

Chimiotox

Cimiotox は廃水に含まれる物質の物理化学的特徴を表すものである。物質を既知の毒性で重みづけし、環境影響の可能性という共通項を提供することを目的としている。毒性荷重ファクター（F_{tox}）は次式で計算する（Pigeon, 1992）。

$$F_{tox_i} = \frac{1mg/L}{MSC_i mg/L}$$

この時、 F_{toxi} = 物質 i の毒性荷重ファクター

1 mg/L = 任意の対照

MSC_i = 基質 i の最も厳しい水質基準（ガイドライン）

各物質の Chimiotox 単位（UC）は毒性荷重ファクターと汚染負荷を乗じて求める。

$$UC_i = Load_i \times F_{tox_i}$$

この時 UC_i = 物質 i の Chimiotox 単位

$Load_i$ = 放流された物質の量（kg/d）

F_{toxi} = 物質 i の毒性荷重ファクター

次に、廃水に含まれる各物質の Chimiotox 単位を、次式を用いて廃水の Chimiotox 指標（IC）にまとめる。必要ならば、同じ式を業種や物質群、地域の全体を考えて、複数の廃水や物質の結果を総合するために用いることができる。

$$IC = \sum_{i}^{n} UC_i$$

この時、 IC = ある廃水の Chimiotox 指標

UC_i = ある物質の Chimiotox 指標

n = 物質数

Chimiotox モデルで用いる毒性荷重によって、廃水の物理化学的性状から様々なことを予測することができる。

- 異なる廃水の性状を比較する
- 主な毒性物質を特定する
- データベースの編集のため結果を単一の値に結合する
- 毒性廃棄物の状況の全体像を得る

毒性係数という概念は新しいのもではない。汚染物の相対的な毒性係数を導く方法は、毒性単位を導く方法、またポリ塩化ダイオキシン類とフラン類に対して国際的に用いられている方法とも同様である（4.5.2 項）Chimiotox 単位は、最初に無次元で物質の毒性を表す毒性荷重係数を計算し、次に排出負荷を合体するという 2 段階で、毒性放出係数（4.3.3 項）と類似の値となる。

セントローレンス川行動計画では、毒性を人の健康と水生生物への長期的な影響で重みづけた。したがって、用途あるいは保全すべき環境に対して各物質の質のガイドラインを決める、ひとつ以上の公定書（compedia）を取り入れる必要があった。選ばれたガイドラインはケベック州環境省による Cahier des critéres de qualité de l'eau である（MENVIC, 1990）。Chimiotox では通常 2 組のクライテリアが用いられる。

(1) 水生生物の汚染

(2) 水生生物の慢性毒性

最初のクライテリアは、水生生物が曝露され、人が水生生物を消費する場合に健康に有害なレベルまでの生物濃縮を起さない物質の水中濃度である。二つ目のクライテリアは無期限の曝露で水生生物に悪影響を及ぼさない物質の水中濃度である。ある物質に対して二つのガイドラインのうち、より厳しいほうを毒性荷重ファクターの計算に用いた。（実際には、クライテリアは水生生物への急性毒性と浄水処理する原水を考慮しているが、ほぼ全てにおいて、先に示した二つに比べて厳しくない）。

付録 C

環境計画における予測ツールとしての毒性試験の事例

アルバータパシフィックパルプ工場は北アルバータに位置し、処理廃水を Athabasca 川へ放流している。この工場は混合硬質木材 80%混合軟質木材 20%を使用している。1990 年 3 月、長々しい公聴会の後、国と地方の連合環境審査員団は、当初の提案通り、工場は建設されるべきではないと結論づけた。主たる理由は河川への、特に有機塩素化合物を含む排水放流であった。後に、アルバータパシフィックは、漂白の 100%に過酸化塩素を使用することにより有機塩素化合物の生成を最小化する工場を提案した。

改善された工場の環境影響アセスメント（EIA）の一部として、会社は処理排水が水生生物に無害であろう事を示そうと努めた。事前評価は研究室（Holloran *et al.*,1992）でなされ、下記 4 項目に要約される。

・工程と予想される排水を模擬するよう計画されたベンチスケール製紙ならびに漂白試験。
・毒性物質特定のためのベンチスケールの排水の化学分析。
・試験からの排水の毒性試験
・化学物質に由来する毒性予測

毒性成分のモデル化により、評価からの様々な結果に信頼性を加えた。

・試験は新プロセスが有機塩素化合物総量を低減すること、化学物質成分の毒性関与がより低下することを示した。
・総体での毒性は従来の塩素を使った漂白工程によるものよりも低減、排水は急性致死毒性を示さないと予測された。
・生物酸化中の分解速度は毒性を示すと考えられる化学物質に適用され、二次処理後、亜致死毒性を示さないことが予測された。

複合成分の毒性は「毒性等量」によりモデル化され、それぞれの化学物質に係数を割り当て、その既知の毒性に基づいて標準毒性物質に比較される。それは、toxicity equivalency factors 毒性等量係数を塩素化ダイオキシンならびにフランの各異性体に割り当てる際に使用される国際的に認められた手法（4.3.2 節）と同様であり、本質的には Chimiotox で使用される「毒性重み付け係数」（付録 B）と同じ、毒性単位の考え方の一変法である（4.3.1 節）。

ベンチスケール漂白試験と排水の化学特性解析

試験は漂白の各工程からの廃水を生成するよう意図されており、それゆえその毒性と化学組成を測定可能であるようになっていた。硬質木材と軟質木材の供給割合が適用された。試験より、パルプ製品風

乾トン（Adt）あたりの毒性物質の負荷推定量を提示した。想定される水利用と再利用を反映するように同時に行われた漂白工場の排水が混合され、たとえば各要素の濃度は、設計工場排水量 46Adt を使用して未処理の総工場廃水に対応する濃度に変換された。二次処理の効果はフェノール類、樹脂酸、脂肪酸の想定除去効率に基づいて見積もられた。（効率は他所の実験に基づいて算出された。硬質木材について操業された場合、樹脂酸は廃棄物の構成として想定されていないと言うことに言及が必要である。）

廃水は、支配的な個々の塩素化、非塩素化フェノール、樹脂酸（存在すれば）、ならびに脂肪酸、多くの製紙工場廃水における典型的な毒性物質に関して化学的に特徴付けされた。提案された工程による試験は、硬質木材と軟質木材について従来の工法と漂白法を使用した二つの手法と比較された。

測定された毒性

5 つのパイロットプラント排水は *Ceriodaphnia dubia*（EC,1992a）の亜致死毒性に関して試験された。これらの試験では疑似漂白工場の排水は提案された工場排水への寄与を反映するよう希釈された。

軟質木材の 3 つの試験実験で測定された TOEC は 1 値、20.2%排水濃度にて統計学的妥当性と示された。硬質木材の 2 つの実験では毒性は 40.5%濃度で現された。従って亜急性毒性を消失させるために求められる受河川での希釈は硬質木材では 5 倍、軟質木材では 2.5 倍となろう。

含有化学物質の予測複合毒性

試験排水の主たる含有化学物質は毒性等量のため、係数を割り当てられた。係数は化学物質物質の既知の毒性との比較により得られた。その毒性とはそのクラスではもっとも毒性が大きい物質の、たとえばダイオキシンやフランに適用された TEQ 法（Section4.3.2）によって得られたものである。

後に発表されたペンタクロロフェノールを基とする Kovacs（1993）らの報告に基づき、物質の最初のカテゴリー、塩素化フェノールに関して毒性等量係数が割り当てられた。いくつかの QSAR[1]に基づく推定について、亜致死毒性影響の文献が毒性係数の割り当てに使用されてきた。たとえば、ある物質がペンタクロロフェノールの 1/4 の毒性を持つとすると、それは 0.25 の毒性係数を割り当てられる。Holloran ら（1992）はこの第 1 のカテゴリ（塩素化フェノール）にある非塩素化化合物群（フェノール、クレゾール、guaiacol、カテコール、ならびに veratrol）を 0.001 の毒性係数をそれぞれ割り当て

---

[1] Kovacs（1993）らはペンタクロロフェノールを最も毒性の高い基準とし、その他の塩素数のフェノール類の毒性を見積もった。他のペンタクロロフェノール類 1.0、テトラクロロ 0.48、トリクロロ 0.23、ジクロロ 0.11、モノクロロ 0.05 であった。これらの毒性係数はすでにカナダ水質ガイドライン（CCREM,1987）から公表されている値と一般的に合致するものであった。カナダガイドラインはフェノールの 5 つのカテゴリーの塩素化の度合いに濃度（μg/L）を割り当てている。もし Kovacs ら（1993）の行ったのと同じ方法で再計算された場合、対応する 5 係数は 1.0、0.5、0.028、0.4、0.1 となる。テトラクロロフェノールに関し Kovacs らの係数と CCREM のそれの間には完全な一致がある一方、他の組み合わせは 2、4、8 の係数で異なっている。概略での一致は良いが、大きな差違の理由付けの試験が適切であろう。

ることによって付け加えた。

第 2 のカテゴリー、9 つの樹脂酸に対し Kovacs（1993）らは最も毒性の強い物質、イソピマリン（isopimaric）酸の 1.0 に比較しておよそ 0.2 から 0.75 の係数を当てた。10 の脂肪酸、第 3 のカテゴリーには最も毒性の強い物質、塩素化ステアリン酸の 1.0 に比較して 10 すべてに同じ値をふった。樹脂ならびに脂肪酸のデーターベースは詳しく記載されていない。

毒性等量、つまり単位のない「毒性」を得るために試行実験排水中の様々な物質の濃度はその係数により積算された。Holloran ら（1992）は化学物質の 3 つのクラスそれぞれの中で毒性を加算したが、クラス間の毒性は足し合わせなかった。毒性単位においてと同様、その合計が 1.0 もしくはそれ以上となった場合、毒性が表れる。すべての試行実験で、3 つのカテゴリーそれぞれの合計は急性致死毒性の見地からは比較的低かった。ある試行ではフェノールに対する 0.35、他の試行では樹脂酸に対する 0.25 の値が最も高い値であった。これら独立した 3 つのカテゴリーは 1.0 より十分低いことより、これらの物質が寄与する急性致死毒性は想定されなかった。

亜致死毒性に関して、予測は 5 つの試行実験の排水での測定と比較可能である。Holloran ら（1992）は亜致死毒性の基礎に外挿された致死毒性と同様に計算した。しかしやはり化学物質の 3 つのカテゴリーからの寄与は足し合わせなかった。

それを加算することならびにそれぞれの試行実験に対し総毒性等量値を得ることによってさらに有用な図を得ることが可能である[2]。そのようにすると、5 つの廃水の測定された毒性は、平均で、個々の毒性を加算したものの 2.1 倍の毒性であった。IC50 として観察された/予測された個々の値は 20/23%、20/35%、20/61%、40/82%ならびに 40/>100%、つまり予測された毒性の 1.1、1.7、2.0、2.6 ならびに 3.0 倍の割合の毒性であった。水系の毒性と化学分析における通常の変動（2.6; Sprague,1985）ならびに仕事の調査的性質を考えると、相関関係はかなり妥当なものである。

廃水の影響の予測

すでに述べたように、一つの結論として、廃水の二次処理無しであっても急性致死影響がないであろうことが言える。*Ceriodaphnia* 毒性試験から判断されるように、明らかに未処理の廃水には亜致死影響があるであろう。

亜致死毒性の除去に対する二次生物処理の効果は、クロロフェノール、樹脂酸、脂肪酸の予測される除去効率に基づく物質収支によって見積もられた。分析は図 C-1 に示される。これは、IC50 が 100%（すなわち亜致死毒性無し）に対応する廃水濃度の達成に必要な除去効率を示している。IC50 は同じ濃度に達するのに必要な廃水希釈の関数としてプロットされている。硬質木材と軟質木材の廃水は別々に示されている。クロロフェノールならびに樹脂、脂肪酸に対する除去効率の予測される幅も示してあ

---

[2] フェノール、樹脂酸ならびに脂肪酸の寄与の合計は単純加算よりも幾分より複雑であった。それぞれのカテゴリーで対照物質の相対毒性のために妥当な加重係数が求められていた。Hollan ら（1992）により使用されてきた 0.2 よりも 0.1 の慢性/急性比は妥当であった（Bonsor *et al.*,1988; 4.2.1,4.2.2 節）。

る。

両方の廃水の種類に対し予測除去効率は廃水の亜致死毒性を消失させるのに必要な効率よりも幾分大きい。従って工場廃水は二次処理後、クロロフェノールならびに樹脂、脂肪酸由来の亜致死毒性を示さないと予測された。

ベンチスケールの演習は、非常に複雑ながらも、毒性制御を目指した計画の試みの一例を示した。こういった演習が、事故後の修復が非常に高価であるようなある特定の場所での工場操業の計画上での誤りの回避の助けになるかも知れない。

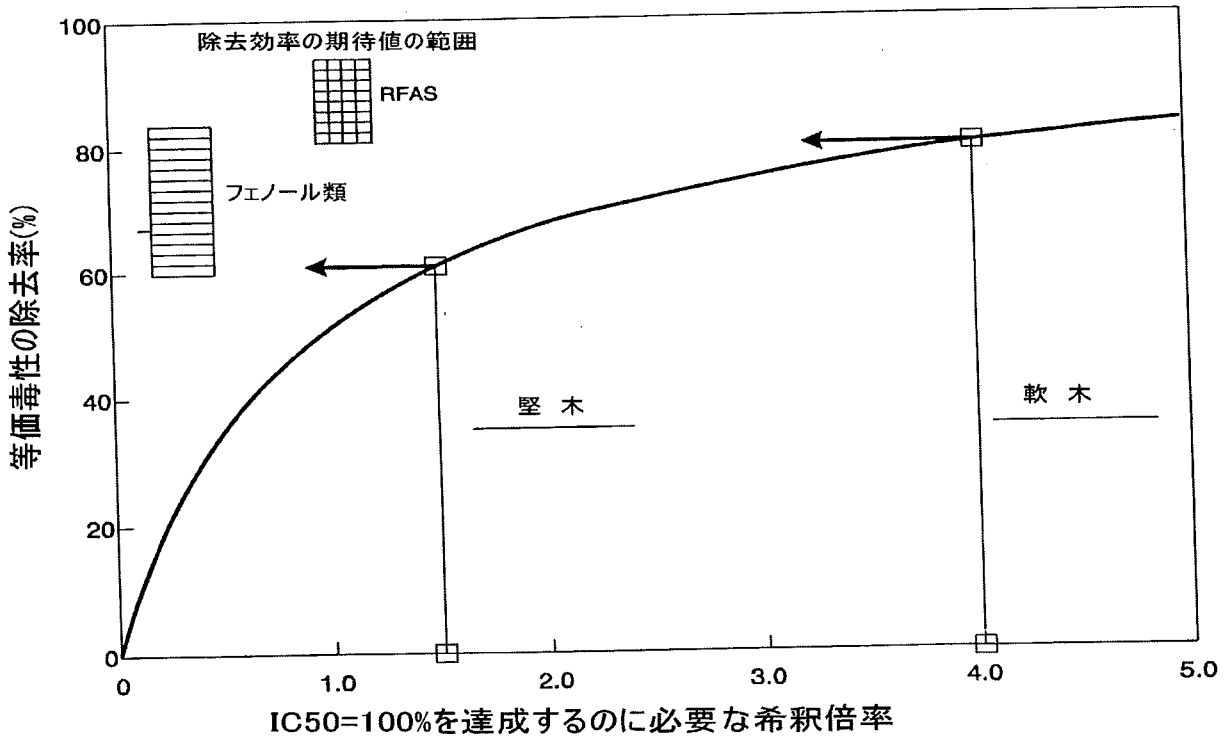


図 C-1　亜致死無影響の達成に必要とされる概算希釈率と二次廃水処理による毒性物質の除去効率

RFA は樹脂ならびに脂肪酸を示す。横軸はベンチスケール実験からの廃水の毒性試験に基づいた、亜致死無影響の達成に必要な希釈倍率をしめす。

付録 D

廃水プルームにおける亜致死的影響の潜在的影響域予測の計算例

工場は小河川に処理廃水を放流する。拡散部輪郭描写（Plume delineation）研究は、低速河川水流では、1%の廃水等値線はおよそ 1250×250m、10%の廃水等値線は 50m 位の幅で水中拡散器から下流へ 250m くらい広がるものであると示している（図 D-1 上側）。湖沼への放出の同様のシナリオが図 D-1 下部に示される。

排水の毒性試験の計算例を表 D-1 に示す。*Selenastrum*、ニセネコゼミジンコならびにファットヘッドミノーの 3 生物種それぞれに 4 つの IC25 の 4 つの見積もりがあった。試料 A と C のファットヘッドミノー の IC25 は 100 以下と報告された。4 つの IC50 に基づき、対数平均と標準偏差が 3 種それぞれに計算された。4 試料の補正係数が表 D-2 より得られた。95%信頼区間では補正係数は 5.369 である。下記に示される計算により、それぞれの種に対し予測最小毒性濃度 Predicted Minimum Toxic Concentration（PMTC）が見積もられ、これはおよそ 5%の毒性試験で起こると予測される濃度である。推奨統計学的手法はここで扱われる観察数、EEM の第 2 サイクルの終わりまでの 4 から 10 までのデータ数にふさわしいものである。

表 D-1　計算例

生物種	IC 25, % 排水				幾何平均 (g.m.)	対数 g.m.	対数標準偏差
	A	B	C	D			
セレナストルム	15	17	25	30	20.9	1.3204	0.1408
セリオダフニア	21	92	33	61	44.4	1.6476	0.2837
ファットヘッドミノー	>100	60	>100	72	81.1	1.9089	0.11008

注記：ファットヘッドミノーにおいて IC25 が 100%以上の場合 100%として計算。すべての IC25 が 100 以下の場合対数標準偏差が 0 となり、PMTC は 100%である。

Selenastrum での計算

95%信頼区間で、測定 IC50 の n=4 値に対し表 D-2 からの補正係数（*k*）は 5.369 である。

log PMTC = (logarithm of g.m.) - *ks*

= 1.324 – 5.369*0.1408

= 0.5643

PMTC = $10^{0.5643}$

= 3.67%

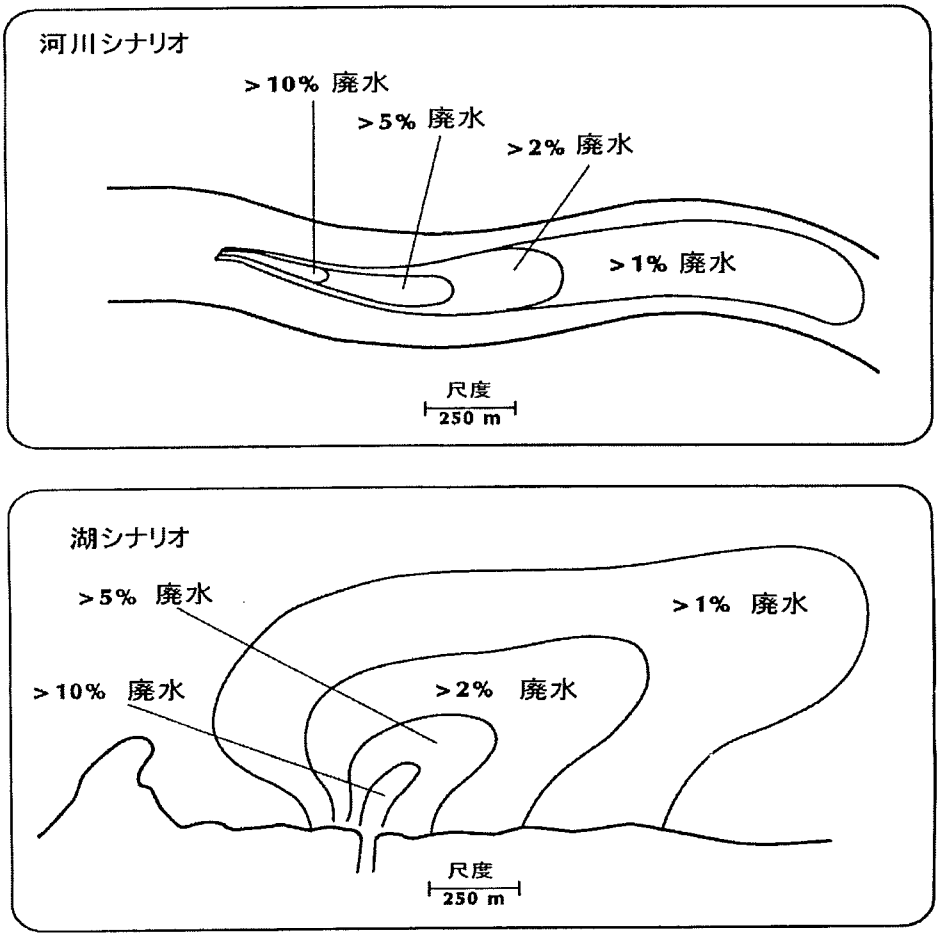


図 D-1　河川ならびに湖沼における拡散輪郭描写の例を示すダイヤグラム

この例では、PMTC の概算値は *Selenastrum* の測定された 4 値の IC50 の最低値よりもかなり低く、亜致死影響の可能性のあるゾーンを見積もるための伝統的な値として使用されることになる。この統計学的手法を PMTC の概算に使用することによって、少なくとも 4 つの亜致死試験、すなわち失敗無しの試験を完了する主要な動機が示されるであろう。3 試験のみでは図 D-2 からの補正係数はさらに非常に大きくなり、2 試験のみでは係数は莫大になる。しかし、仮に、最初の 2 サイクルからの 8 試験のように、もっと毒性試験が行われた場合補正係数はかなり小さくなり、測定 IC50 の平均値と PMTC のギャップは狭くなる。たとえば *Selenastrum* 8 試験は同じ対数平均と標準偏差を示し、PMTC は 7.6% であり、実際に測定された最小値にずっと近くなる。

PMTC マッピング

PMTC は *Ceriodaphnia* で 1.3%、 *Selenastrum* で 3.7%、ファットヘッドミノーで 21%であり、これは河川または湖沼で亜致死毒性影響を持つゾーンが *Ceriodaphnia* に対し最も大きく、ファットヘッドミノーに小さいことを示している。様々な試験の結果とより大きな標準偏差より最も小さい PMTC は *Ceriodaphnia* に対する値である。

亜致死影響を示すゾーンの大きさは、D-2 に示される拡散エリアの地図上に PMTC 等値線を配置することで示される。*Ceriodaphnia* への最大影響のゾーンは長さおよそ 1500m、*Selenastrum* へのゾーンは長さおよそ 720m 幅 150m となる。ファットヘッドミノーへの影響予測ゾーンは長さおよそ 100m 幅 40m に限られる。ファットヘッドミノーのみに対する亜致死影響予測ゾーンはケベックの混合ゾーンに定義された限界内に収まる。

表 D-2　集団の 95%下限に関する補正係数（Eisenhart *et al.*,1947 より ; Dixon and Massey,1969 からも討論とともに利用可能）

n	Confidence Level		n	Confidence Level	
	95%	99%		95%	99%
2	32.019	160.193	15	2.480	2.945
3	8.380	18.930	16	2.437	2.872
4	5.369	9.398	17	2.400	2.808
5	4.275	6.612	18	2.366	2.753
6	3.712	5.337	19	2.337	2.703
7	3.369	4.613	20	2.310	2.659
8	3.136	4.147	25	2.208	2.494
9	2.967	3.822	30	2.140	2.385
10	2.839	3.582	40	2.052	2.247
11	2.737	3.397	50	1.996	2.162
12	2.655	3.250	60	1.958	2.103
13	2.587	3.130	75	1.917	2.042
14	2.529	3.029	100	1.874	1.977

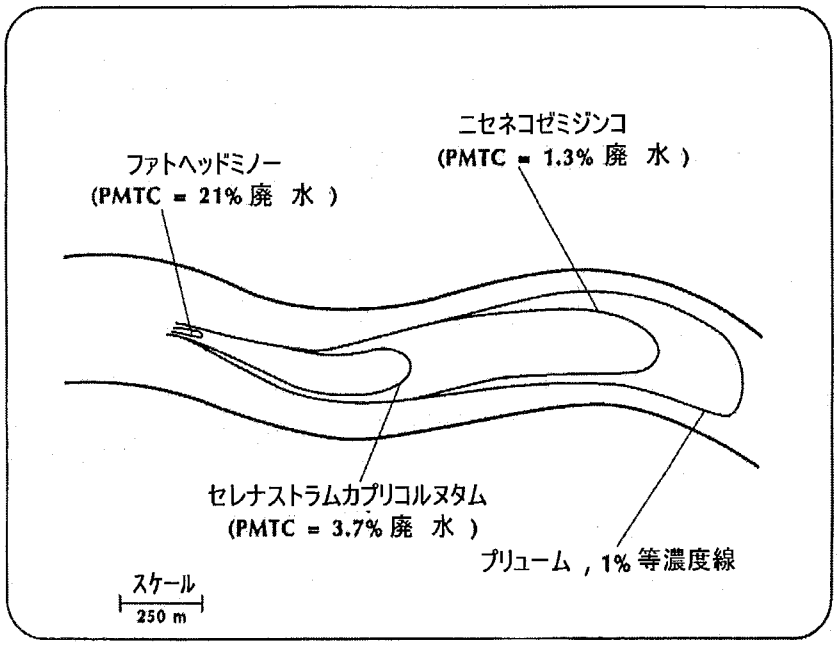


図 D-2　図 D-1 の上図からの河川の拡散部にプロットした、3 種の試験生物に対する予測最小毒性濃度（PMTC）の等値線