

総説

農薬の水生毒性評価のための高次室内試験法

早川泰弘, 大石桂輔 翻訳^{*}
独)農林水産消費安全技術センター 農薬検査部

Alistair BA Boxall,^{1*} Colin D Brown¹ and Katie L Barrett²

¹Cranfield Centre for EcoChemistry, Cranfield University, Shardlow Hall, Shardlow, Derby DE72 2GN, UK

²Huntingdon Life Sciences, Alconbury, Huntingdon, Cambridgeshire PE17 5HS, UK

農薬の登録制度は、申請者に対し農薬の潜在的な生態リスクを段階的な方法で評価することを求めている。標準的な水生毒性試験が低次で用いられ、明確に定められた方法論が潜在的な環境リスクを評価するために利用可能となっている。低次の単一生物種の生態毒性試験の利用に伴う不確実性を説明するために評価過程で安全係数を取り入れている。低次評価において、ある物質が環境に対するリスクを引き起こすことが明らかになったときは、池型のメソコズム、人工的な小河川や野外モニタリング試験を利用した、さらに実環境に近い条件を用いることにより影響を評価できる。これらの方法は、より現実的な評価ではあるが、その結果を解釈するのは難しく、また他の系に外挿することには問題がある。最近、標準的な水生毒性試験と野外メソコズムの中間に位置付けられる実験的な方法により有用なデータが得られ、標準的な単一生物種試験に伴う不確実性を減らすのに役立つことが知られるようになってきた。しかし、どのような試験が利用でき、どのようにリスク評価過程に取り込めるかについて説明したガイダンスは限られている。この論文は、改良曝露試験、種感受性試験、個体群試験および高感受性成長段階試験を含む多数の高次室内試験手法をレビューしたものである。また、このような方法をどのようにリスク評価過程に取り込むかについての勧告も行っている。

Keywords : higher tier; risk assessment; aquatic; ecotoxicity; pesticides

1. はじめに

農薬の登録制度は、申請者に対し農薬の潜在的な生態リスクを段階的な方法で評価することを求めている。標準的な試験が低次で用いられ、明確に定められた方法論が潜在的な環境リスクを評価するために利用可能となっている（毒性/曝露比、リスク指数等）。より広範な環境を代表している低次の単一生物種試験では、①単一生物種室内試験で選定された生物の応答は自然系におけるより多数の一連の生物の応答と一致すること、②単一生物種試験で選択されたエンドポイントは他のいかなるレベルでの生物体

(organization) よりも高感受性であること、という要件を満たすことが必要である¹⁾。標準試験生物種は必ずしもこれらの要件に適合しないことから、不確実係数をリスク評価過程に取り入れている。このような評価を精密化するために、基本データセットを厳密に評価することが適当である。しかし、これらの評価によってある物質が環境に対するリスクを引き起こす可能性が明らかになったときは、より実環境に近い条件を用いることにより影響を決定できる。予備評価により生じた懸念に対応するため、池型のメソコズム²⁾、人工的な小河川^{3,4)}、野外モニタリング試験³⁾および実験用水路の使用⁵⁾を含む種々の方法が用いら

^{*}この翻訳は、Alistair BA Boxall, Colin D Brown and Katie L Barrett, Higher-tier laboratory methods for assessing the aquatic toxicity of pesticides. *Pest Management Science* 58 :637-648(online 2002), ©Society of Chemical Industry について、Society of Chemical Industry の代理人である John Wiley & Sons Ltd. の許諾を得て行ったものである。なお、翻訳文自体の責任は翻訳者に属する。

れてきた。これらの方法は農薬と界面活性剤に対して適用されており、(1) より高いレベルの生物体でのエンドポイント、(2) 生物種間の相互関係、(3) 間接的な効果の評価が可能であるということも含め、単一生物種試験を上回る数多くの利点をもっている。

しかし、モデルエコシステムによる方法には多くの限界が伴う。その最も大きなものは、試験結果の解釈および他の系に外挿することが難しいという点である。その理由としては、無影響濃度は試験濃度に依存すること、試験は異なった開始条件による異なった時期に実施されること、試験期間が異なること、感度が実験系によって異なること、および測定されたエンドポイントが常に一定である又は比較できるものではないことが挙げられる。試験に伴うバックグラウンド値が高い状態で変化することは、その試験の識別能力が低いことを意味する。さらに、自然条件をシミュレートし、基本的な生態学的特性と機能（すなわち異なった栄養段階、生物が新たな生息地を見つける可能性、エネルギー投入および栄養循環）の維持を確保するためには、試験系は十分大きく複雑なものにならざるを得ない⁶⁾。これは試験費用が高くなることを意味する。

標準的な水生毒性試験と野外試験・マイクロコズム試験の中間に位置する方法は、農薬のリスク評価に用いられる有用なデータを提供できる。これらの実験室レベルでの高次試験の目的には、次の内容が一つ以上含まれる。①不連続な曝露による影響を説明すること、②農薬に感受性の高い生物種の評価を改善すること、③感受性の高い成長段階および個体群 (population) に対する汚染物質の影響を評価すること、④生物、個体群および系 (system) が農薬に曝露した後の回復の可能性を決定すること、⑤生物群集 (biological communities) に対する化合物の間接的な影響を決定すること。主に過去5~10年の間に、高次室内試験の設計と応用に関して著しい進展があった。それゆえ、現状と将来の発展性についてここでレビューするのは時宜を得ている。

2. 現実的な曝露シナリオ

予備的な急性リスクに関するリスク判定法は、

一般的には標準的な生態毒性試験結果に対して初期環境中予測濃度 (PEC) を用いるというものである。しかし、環境への流入と化合物が環境中で消失していく速度は、用いられる標準的な生態毒性のエンドポイントとの関係に大きな影響を及ぼす。曝露シナリオ、消失および生物利用可能性 (bioavailability) の点で自然系と標準生態毒性試験との間の違いを説明するために多くの方法が提案されている。

2.1. 時間・事象 (Time-to-event) 分析

曝露濃度と曝露時間の両者により毒性物質の影響は決まる。しかし、毒性物質の影響を定量化する現在の主な方法は曝露濃度に焦点を当てるといものである (すなわち LC₅₀ の決定)。試験は一定期間を通して行われるので曝露期間の影響は無視できる。時間・事象 (TTE) 法は、曝露の程度と期間を考慮して化合物の毒性を判定するものである⁷⁾。TTE 法は毒性試験の初期の頃から用いられてきた。この方法は、曝露される個体の集団が時系列的な間隔をおいてある事象 (通常は死亡) が個別の個体で記録されるまで監視できるような試験設計となっている。結果のデータは、Kaplan-Meier 法、生命表法、準パラメトリック Cox 比例法および完全パラメトリックモデルを含む広範な方法を用いて解析される⁸⁾。それぞれの方法は、時間・事象を予測し、時間・事象に関する共変量 (曝露濃度等) 有意差検定を行うために用いることができる。

TTE 法の使用は、評価において曝露期間を明確に含んでいるが、通常のエンドポイント (LC₅₀ 等) を評価することも可能である。さらに、TTE の情報は一試験処理区当たりでより多くのデータが得られるため、統計学的な検定力が増し、共変量効果が測定できるので予測モデルに含めることができ、またその結果を直ちに生態学的、疫学および毒性学的なモデルに取り込むことができる。標準毒性試験による要約データはリスク評価過程において報告され使用されるのが一般的であるが、標準試験法 (OECD で推奨される試験法等) を使用するという事は、追加データが試験期間を通じて記録されていることを意味する。さらなる試験を行わずにこの追加データを TTE 評価に用いることができる場合が多い⁹⁾。

2.2. 変動的なパルス曝露試験

農薬による表面水の汚濁は、一般には飛散、地表流出および排水により起こり¹⁰⁾、消失が速い化合物については水生生物への曝露は短期間である。したがって標準試験で用いられるような連続曝露は、化合物の正しい生態毒性評価にはならず、生態毒性について過大評価および過小評価の両方をもたらす^{11,12)}。その理由として考えられるのは、(1) 生物は曝露中に蓄積した試験化合物を解毒又は清浄化することができること^{13,14)}、(2) 個体の耐性が誘導されること（最初のパルスが生き残った個体を馴化したり解毒酵素を誘導したりしてより強くすること）^{15,16)}、(3) 個体選抜が起きること（弱い個体は最初のパルスで存在しなくなり、より頑強な個体が選抜され、その後の曝露に対して明らかに反応が低下すること）、(4) 生態学的に回復すること（曝露の後、影響を受けた生物種の特性に応じて、影響を受けた個体群は回復したり回復しなかったりする）が挙げられる。

消失が速い化合物では農薬への曝露時間は非常に短くなるかもしれない。その短い時間での影響を決定するためには、様々な曝露間隔による試験の実施があり得る。例えば、*Gammarus pulex* (L) にラムダ-シハロトリンを 1, 3, 6, 12, 96 時間それぞれ曝露させた。曝露後に生物をきれいな水に移し 96 時間後にその影響を観察した。影響と曝露時間との間には非常に有意な関係が見られた。1 時間の曝露による影響濃度は、96 時間の曝

露による影響濃度の 18 倍であった（即ち毒性はより低かった）¹⁷⁾。類似の結果がピレスロイド系のシペルメトリンを用いた *Hyalella azteca* による試験でも得られた¹⁷⁾。

標準毒性試験により得られたデータは汚染物質に断続的に曝露したときの影響の初期評価に用いることができるが¹⁸⁾、用いられる方法は断続的に曝露されることによる毒性が同等の試験濃度で連続的に曝露させたことによる毒性と同一であると仮定している。この問題を解決するためには、断続的な曝露の影響が「慣行的に設計された (custom-designed) 」試験を用いることによっても評価できる。一定の幅のある生物（オタマジャクシ、トビケラ、ユスリカおよび魚類を含む）について一定の幅のある農薬（フェノキシカルブ、フェニトロチオン、テブフェノジド、クロルピリホスおよびフェンバレートを含む）のパルス曝露による影響を調べた多くの試験がある^{11,19,20)}。

通常は 2 つの方法が用いられている。止水系と流水系による試験である。止水系の改定試験は特に矩形パルス (square pulses) による曝露（即ち一定の期間中は一定の濃度に曝露）が生じる場合に有用である。この状態は現実の曝露が水流に支配される（例えば化学物質のパルスが速やかに小さな流れの中を流下する場合）と思われる場合に最も関係がある。水流による曝露系を用いることにより、パルスによる曝露についてゆるやかな濃度変化をより現実的にシミュレートすることが

表 1. 汚染物質の断続的曝露の影響を評価するメカニズムモデル

モデル	一般化モデル	入力データ
濃度×時間 ²²⁾	$A_m = C_w^y \cdot t_d$	$A_m = m\%$ 死亡率に対する種の固有定数 ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) $C_w =$ 水中の毒物濃度 ($\mu\text{g/L}$) $t_d =$ 死亡時間 ($m\%$ 死亡するのに必要な時間, h) $y =$ 次数
Mancini取り込み 浄化モデル ²³⁾	$dC_{soa}/dt = K_u C_w^y - K_{dep} \cdot C_{soa}$	$C_w =$ 水中の毒物濃度 ($\mu\text{g/L}$) $C_{soa} =$ 発現部位の毒物濃度 ($\mu\text{g/g}$) $K_u =$ 取り込み速度定数 (h^{-1}) $K_{dep} =$ 浄化速度定数 (h^{-1}) $t =$ 曝露時間 $y =$ 次数
Breck損傷修復モデル ¹⁴⁾	$\ln(M/(1-M)) = d[y \cdot \ln(C_w) + \ln\{(1 - e^{-K_{rep}t})/K_{rep}\} + \ln(K_{dam}/D_{L50})]$	$M =$ 観察された死亡率 $D = \ln(C_w)$ の関数としてのロジット反応の傾斜 $C_w =$ 水中の毒物濃度 ($\mu\text{g/L}$) $K_{dam} =$ 損傷速度定数 (h^{-1}) $K_{rep} =$ 修復速度定数 (h^{-1}) $D_{L50} = 50\%$ 致死損傷 $t =$ 曝露時間 $y =$ 次数

表 2. 水のみでの曝露試験に対する広範な修正により生じる観察された毒性の変化^{17,23,25,26}

化合物	試験種	水のみでの試験に対する毒性又はBCFの低減係数					
		散布ドリフトのシミュレーション	飛散と懸濁された底質のシミュレーション	水添加前の土壌への散布	懸濁された底質のシミュレーション	河床底質のシミュレーション (攪拌なし)	底質のシミュレーション (攪拌あり)
ラムダ-シハロリン	オオシジコ	3	40	175	-	120-140	81-280
グリホサート	オオシジコ	-	-	-	3.3	-	-
エスフェンバレート	オオシジコ	-	-	-	-	3.0	-
	ブルーキル	-	-	-	-	5.0	-
フェンバレート	<i>Limephilus lunatus</i>	-	-	-	10-100	-	-
	グラスシュリンブ	-	-	-	-	-	9700
ピリミカーブ	オシジコ(BCF)	-	-	-	-	0.7	-
イソプロツロン	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	-	-	-	-	-	2
除草剤1	<i>Selenastrum capricornutum</i>	-	-	-	-	>17	-
		-	-	-	-	>900	-
除草剤2	<i>Navicula pelliculosa</i>	-	-	-	-	>17	-
		-	-	-	-	>900	-

可能になる。この方法は除草剤の分解による *Selenastrum capricornutum* への影響をシミュレートするのに用いられた²¹⁾。親化合物および2つの主要代謝物がシミュレーションに用いられ、それぞれのパルスが自然環境における化合物の変化をシミュレートしている。パルス曝露実験により、生物の回復能力、農薬曝露による抵抗性の発達およびその他隠れた影響に関する情報が得られる。

パルス状に放出された汚染物質による曝露は、その強度と時間が非常に幅広くなる可能性がある。パルスによる負荷に関するすべてのシナリオを網羅する試験設計はない。従って、時間により変化する曝露に対する毒性を予測するために数理モデルが提案され試験されている(表1)。モノクロロアミンのニジマス (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) とコモンシャイナ (*common shiner, Notropis cornutus* Mitch) に対する影響の試験により、(濃度×時間) と Mancini 型モデルが LC₅₀ を ±50% の範囲内で予測できることが明らかになった²²⁾。Mancini モデルは長期間のパルス曝露の予測においてより能力を発揮する。

2.3. 消失過程の取り込み

化合物はいったん水環境に流入すると、その分布すなわち悪影響を起す可能性は、非生物的分解(加水分解、酸化、光分解等)、生物的分解(好気性および嫌気性分解) および底質と大気への分配を含む多くの要因に左右される。これらの過程の一つ以上を室内生態毒性試験に取り込むために多くの研究が行われてきた。シミュレートされたこれらの過程には、飛散(スプレードリフト)、

懸濁した底質の影響、地表流出により環境に流入した農薬の影響および河床底質の影響が含まれている(表2)^{17,24)}。

標準試験系に底質を添加することにより環境中で起こる分解や吸着の過程をシミュレートできる²⁷⁾。疎水性の合成ピレスロイドであるラムダ-シハロリン(logK_{ow}6.8)、エスフェンバレート(logK_{ow}6.22) およびフェンバレート(logK_{ow}5.0)を用いた試験で、試験系に土壌や底質が存在することにより農薬の観察された影響が大きく低下することが示された(表2)。この観察は、化合物が水相から底質相に移動することにより水相ではごくわずかな農薬(ラムダ-シハロリンで1%未満)しか作用しないという事実により説明できる²⁸⁾。表2のデータは、底質の添加は親水性の化合物であるイソプロツロン(logK_{ow}2.5)とピリミカーブ(logK_{ow}1.7)についてはあまり効果がなかったことを示している。

自然環境下では、水は不溶性又はコロイド状の有機物質(DOM)を含んでいる。そのような物質は、有機化合物との相互作用により生物利用可能性に影響を及ぼすことが示されている。というのは、自由度のある不溶性化合物だけが一般に生物に蓄積されると仮定されているからである。農薬、界面活性剤および多環式芳香性炭化水素を用いたこれまでの試験では、DOMの存在により蓄積性と毒性が低下することが示されている^{24,29-31)}。しかし、低濃度のDOMの存在下(10 mg/L以下)では生物蓄積性は高まる³²⁾。

自然状態でのDOMの濃度が生態毒性に及ぼす影響をシミュレートするため、野外で採取した水を使った試験も行われた³³⁾。様々な化合物の試験

表 3. ISO 標準培地を用いて得た EC₅₀ 値に対する 15 種類の自然水を用いた試験から得た EC₅₀ 値の比の平均値³³

	Log K _{ow}	<i>Raphidocelis</i>		ツボクサ	オオミズシロ
		<i>subcapitata</i> マイクロプレート	<i>subcapitata</i> <i>erlens</i>		
硫酸亜鉛	na	5.7	3	2.1	1.2
4-ニルフェノール	5.92	0.6	0.7	1.2	0.9
ホサロン	4.03	0.7	1.2	1.1	1.7
ペンタクロフェノール	5.12	2.7	2.1	1.2	3.1
2,4,5-トリクロアミン	3.45	1.9	2.2	2.1	1
平均		2.3	1.8	1.5	1.6

により、化学物質の見かけの毒性は自然水を用いた試験ではほんのわずかに低下した (表 3)³³。これは、実験で使用する水は必ずしも大きな不確実性をもたらす要因とはならないことを意味する。標準生態毒性試験は、通常は試験濃度が試験期間を通じて開始濃度の 80% 以上に維持するよう求めている。このことは、揮発性の化合物又は (加水分解等による) 非生物的に分解しやすい化合物では、試験系に覆いを付けること、流水系の試験系が必要であること又は試験溶液を定期的に交換することを意味している。それゆえ、非生物的分解過程が毒性に及ぼす影響は、試験溶液を交換しない止水系の曝露試験系を用いることにより容易に評価できる。

改変した曝露試験による結果は、トキシコキネティクスモデルと併せて非定常状態での毒性影響を評価するために用いることができる。PULSETOX のようなコンパートメント^{34,35}に基礎をおくモデルはコンパートメント間の毒性物質の動きを記述し、生理学に基礎をおくコード (code) は蓄積、除去および分布を記述し、FGETS と DEBtox のような生物エネルギーに基礎をおくモデルは生物のエネルギー要求の観点からの蓄積と損失を記述する^{36,37}。これらのモデルを適用するためには、生体での残留量と毒性的な影響に関する情報が必要となる。これは、生態毒性では無視されてきた領域であり、リスク評価過程に取り込めるようにするためにはさらなる研究が必要である。

3. 追加の生物種を用いた試験

すべての生物階級の中で汚染物質に「最も感受性の高い」ような生物種はいない³⁸⁻⁴⁰。化学物質に対する生物種の感受性は、「桁」の単位で異

なる³⁸⁻⁴¹。従って、水域環境に対する農薬のリスクの予備評価は、野外に存在し得る範囲の生物種と比較した場合の標準試験生物種の相対的感受性に関する不確実性を補うために 10 又は 100 という係数を導入している。このような不確実性を減らす一つの方法は、最も感受性の高いエンドポイントをもっと精度良く評価できるようにするため又は感受性分布を得るため、生物種を追加した試験を行うことである⁹。追加生物種の試験は、局所的 (site-specific) な分析に用いるためのより生態学的な情報を得ることができる。

3.1. 追加試験生物種の選定

追加試験生物種の選定のために多数の試験が提案されてきた。より適した方法は、試験物質の性質と類似の作用機作をもつ化合物に対するデータの利用可能性を含む多くの要因に依存する。特定の生物分類群に特有の作用機作をもたない化合物については、Aquatic Dialogue Group⁴²は試験生物種として少なくとも魚類 2 種類、無脊椎動物 1 種類および水生植物 1 種類 (macrophyte 又は藻類) プラスその他 4 種類を提案した。その他の 4 種類の試験生物種は、初期試験が終了した後に最も高い感受性を示したグループから選定すべきである⁴²。慢性試験を実施するときは、魚類 1 種類、無脊椎動物 1 種類および水生植物 1 種類が推奨されている。急性試験で特定された最も高感受性のグループからさらに追加生物種を選ぶべきである⁴²。既存物質と極めて類似した化合物について外挿する機会を見逃してはならない。例えば、生物種の感受性の範囲を明らかにするために必要な追加生物種の種類数は、類似の化合物のデータを基にすれば適切に減らすことができるかもしれない。

米国環境保護庁 (EPA)⁴³は、追加データには無脊椎動物の急性および慢性試験、底質毒性試

験、有根植物試験および両生類試験によるものを含めなければならないと勧告している。無脊椎動物の毒性試験の数と種類の増加は、潜在的な応答の幅に関する考察をある程度得ようとする試みを反映したものである。水生無脊椎動物に対する影響を評価する際には、一般的には単為生殖で寿命の短い甲殻類であるオオミジンコ (*Daphnia magna* Straus) を中心に行う。追加生物種を選ぶに当たっては次のことを考慮すべきである。(1) 寿命の長さが様々であること、(2) 生育段階が予測できない程度に長いことおよび変態段階が異なること、(3) ある生物種では不確定な成長があること、(4) 脂肪の蓄積について有意差があること⁴³。米国環境保護庁は、無脊椎動物の急性毒性試験の追加生物種としてはカワゲラと端脚目、慢性毒性試験は、橈脚類とユスリカ類を含む有性繁殖無脊椎動物に対する影響を把握できるものであることを提案している。両生類の急性試験は、両生類への影響を検討する必要性に応じて追加する。

個々の生物種の感受性は一義的には化合物の作用機作に依存し、同一の分類群(門又は綱)に属する生物種は、一般的には汚染物質に対して類似した方法で反応する⁴⁴。非極性の作用機作をもつ化学物質については生物種の感受性の変動は小さい。しかし、反応性の高い化合物や特殊な作用機作をもつ化合物ではその変動は $10^5 \sim 10^6$ 程度まで大きくなり得る。毒性発現の作用機作を理解することにより、感受性の高い生物や低い生物を特定しグループ分けすることが可能になる。これにより、高いリスクにさらされるグループに焦点を当てた試験戦略が可能になる⁹。例えば Cuppen ら⁴⁵は、殺菌剤のリスク評価の進んだ段階において非節足動物の大型無脊椎動物種を用いることを推奨している。これは、殺菌剤の水生生物に対する影響の幅は、カルベンダジムとペンタクロルフェノール(PCP)を用いて得られた結果に類似しているという仮定に基づいている。同様に、昆虫に関する試験は殺虫活性のある物質に対して推奨される。毒性発現の作用機作は、特に新規化合物についてはよくわかっていない場合が多いことに留意すべきである。農薬の作用機作は生物のグループ分けのための重要な要件であるが、生息地、繁殖様式およびライフサイクルも生物種の感受性に影響を及ぼすことがある。

最近の研究により^{46,47}、化学物質が藻類、原生動物、ワムシ、甲殻類および双翅目昆虫に及ぼす亜致死的影響や致死的影響を評価する一連の生態毒性試験の適切さが評価されている。その研究の目的は、リスク評価の過程で採用可能な試験を特定することにあった。リンデン、3,4-ジクロロアニリン、アトラジンおよび銅化合物を用いて行った、それらの試験による結果と流水および池型メソコズム試験による結果を比較すると、室内試験で得られた LOEC (low observed effect concentration) は、池型メソコズムと人工流水を用いて得られた結果と概ね類似していた(すなわち係数6の範囲内であった)ことがわかった。例外は3,4-ジクロロアニリンであり、池型メソコズムの方が感受性は200倍高かった。イソプロツロン⁴⁸を用いた類似の研究では、一定の範囲での単一生物種を用いた試験はマイクロコズム試験よりも厳しめな (conservative) 結果を生じることがわかった。

Campbell ら⁹は、特定の分類群に特有の作用機作をもつ化合物でなければ、水生生物の感受性分布をみるには最低8種類の生物種を用いて試験をすべきであると提案した。特定の生物グループが特に感受性が高いことが知られている場合には、追加する試験生物種は最も感受性の高いグループから選ぶべきである。しかし最も感受性が高いグループが魚類であるときは、それよりも少ない試験生物種でよく、おそらく5種類で十分である。これは動物福祉の観点からの理由であると共に、感受性分布が魚類では通常小さいためである。最低8種類の追加試験生物種(魚類では5種類)を用いることにより、最も感受性の高いエンドポイントについて良好な評価(すなわち1桁以内)が得られるだろう⁹。8種類の追加試験生物種の使用は、影響の判定に用いられる確率論的な方法も可能にする⁴²。

3.2. データの解析

室内生態毒性試験の目的の一つは、自然生態系に対する化学物質の潜在的影響を評価することにある。不確実係数を用いるよりも単一生物種試験から得られるデータの方が、回帰法又は分布モデル (distribution models) のいずれかを用いることにより野外条件に外挿可能となる⁴⁹。同様の一般的な原理に基づく様々な方法が利用可能であ

る（すなわち、実験による生態毒性データはある分布にあてはまると仮定している）が、ただし、それらが用いている統計的な分布は異なっている^{10,37,39,50-52}。

それらの方法からのアウトプットは次のものを含む。（1）当該生物種について規定された百分率に対する有害（ハザード）濃度（HCx。ここでxは規定された有害性の百分率を表す）^{51,53}，

（2）懸念レベル、すなわちその時点での生物の少なくとも95%に対し環境影響を引き起こすと予測されるレベル⁵⁴，（3）最終慢性値（final chronic values），すなわち3つの慢性値（最終慢性値、最終植物値（the final plant value）、最終残留値）の最小値から計算された、許容できない影響の閾値。最終慢性値は少なくとも8科（family）の生物における無影響濃度（NOECs）から決定される⁵⁵。この8という数の慢性試験（例えば無脊椎動物に対する慢性試験）が国際的に承認され利用可能となっているかについては問題がある。

単一生物種の分布法による結果は、複数種試験の結果と比較されている（表4）^{56,57}。ほとんどの場合、外挿することにより複数生物種試験によるNOECsよりも「安全な」値となり、作用機作に関連する不確実性（例えば試験生物種のグルー

プや曝露形態）を考慮すれば、野外の影響を予測できることを示している。それらの試験によって、生物種の数が多くなるほど複数生物種試験から導出されるNOECsと統計的手法により導出された「安全」値との差は小さくなることが示された。

広範な生物種の感受性の中のどの値が水生環境の保全に最も適しているかについては議論があるところである。Van den Brinkら⁵⁷は、急性L(E)C₅₀のデータに基づく5パーセンタイル値が、曝露される生物群集を保全する基準として一般的に適用可能なものであると提案している（試験生物種の数が多くなるほど生態系のNOECと5パーセンタイル値との差は小さくなる）。これにより5パーセンタイル値が許容された基準とされる一方、ピレスロイド系農薬⁶⁰とアトラジン¹⁰を用いた以前の試験では、10パーセンタイルの影響濃度が適当であると提案されている。

直近では、有害濃度を導出するためにブートストラッピング法（bootstrapping）を利用する研究がなされている⁶¹。この方法は、リサンプリングデータセット（例えば100回の観測値）を作出するために1つの有効成分について1つの生態毒性データセットを無作為抽出（復元抽出）する。得

表 4. 単一生物種試験の毒性データの外挿手法を用いて得られた結果と複数生物種試験により得られたNOEC値の比較^{46,56,57}

物質	MS NOEC	Aldenberg & Slob ⁵⁹		Wagner & Lokke ⁵³		SSD	USEPA ⁵⁴
		50%	95%	50%	95%	(方法未報告) ^a 95%	
リンデン	0.22	0.12		0.13			
ジクロロアノリン	1.0-12	120		120			0.067
アトラジン	<3.0-5	0.82-2.2	0.12	0.87-2.1	0.17		0.15
銅化合物	1.1	0.28		0.30			
イプロロロン	2					0.63	
アトラジン	20					13	
ジフルベンスロン	0.3					0.18	
クロルピリホス	0.1					0.044	
ジフルベンスロン	0.1	-	-	-	-		0.001
ハラチオン	0.1	0.013	0.00013	0.011	0.00023		0.002
アジンホスメチル	0.20-0.25	0.15	0.085	0.077	0.018	0.037	0.01
ハラチオンメチル	0.1	-	-	-	-		0.024
ベンタクロフェノール	20	3.2	0.53	2.6	0.66		0.32
1,2,4-トリクロロベンゼン	57	44	1.1	39	1.7		19
トリクロロエチレン	2.8	3100	65	3100	97		130
トリフルリン	0.5	-	-	-	-		0.2
ジクロロベニル	5	-	-	-	-		7.8
ヘルメリン	0.023	-	-	-	-		0.066
トキサフェン	>1.5	0.003	<0.0001	0.003	<0.0001		0.0025

^a種感受性分布

単位はすべてµg/L

られたデータセットを並べ5パーセンタイル値を選定し、HC₅とする。多数のHC₅の推定のためにリサンプリングは多数回行われる（例えば1万回）。その次にこれらを並べ、50%に相当する数値をHC₅の最良値とする。2.5%と95%における推定値は95%ブートストラップ信頼限界として用いられる。物質の作用機作と最も感受性の高い生物種に関する知見が考慮されていないので、信頼できるHC₅の推定には膨大なデータが必要となる。

3.3. 追加生物種試験の現時点での限界

追加試験生物種の利用によって有益なデータが得られる一方、標準生態毒性試験と比較する方法には多数の限界がある。それらには次のものがある。①解析結果ができる限り代表的なものになることを確実にするためには大量のデータが必要であること、②試験種の数と分類学的分布 (taxonomic distribution) について意見が分かれていること、③試験結果は直接比較できないこと、④テストガイドラインはわずかな試験生物種にしか適用できないこと、⑤生物は同一の感受性分布に属さない可能性がありこれを検定する合意された方法がないこと、⑥試験生物の生態および生理が十分にわかっていないため個体群への影響への外挿を困難にしていること。さらに、多くの生物種は室内飼育方法がなく、試験生物種を野外から採取する必要がある。このことは生物の齢と質は保証できないことを意味する⁶²⁾。野外から採取する生物は、可能ならば類似の毒性的作用機作をもつ被験物質や有効成分に曝露されていない汚染のない場所から採取すべきである。試験生物によっては年間を通して入手できない場合がある。従って、試験設計の際には、試験生物種は、年間を通して入手できる種にするか、いつでも選定できるように多種類の試験動物を利用できるようにすべきである。ある農薬に曝露される特定の生物種と生息地の割合を確認するための地理的情報システム (GIS) の使用も、追加試験種の特定の支援となる⁴³⁾。

4. 生物の回復性

回復性の評価は、藻類や高次植物であるウキウサ種 (*Lemna* sp) の低次毒性試験に組み込まれる

要素となることが多い。細胞分裂が可逆的に抑制されるか不可逆的に抑制されるかを確認するために、あらかじめ曝露させた細胞や葉状体を小分けしたものを農薬のない媒体 (media) に置く。ただし、この原理は、水生の植物、無脊椎動物および魚類にも適用拡大できる。回復試験の例はわずかではあるが、有機リン系農薬とカーバメート系農薬を含む農薬と、ミジンコ類、ユスリカ類およびブユについて報告されている。

回復の可能性は、曝露と曝露の間の時間および検討対象化合物の毒性作用機作によって決まる。例えば、カーバメート系農薬のユスリカに対する影響試験では、6時間以上の回復期間があれば毒性影響は低減することがわかった。これはおそらく回復期間におけるアセチルコリンエステラーゼの再活性化によるものである。これによりカーバメート系農薬はアセチルコリンエステラーゼの可逆的阻害剤であることが示された。有機リン系殺虫剤に曝露された生物ではこのような回復は見られなかったが、これは有機リン系殺虫剤が不可逆的阻害剤であるためと考えられる⁶³⁾。

5. 系の回復性

いったん系が汚染物質によって影響を受けると、その系の回復率は、残留汚染物質の持続性並びにその系やそれに近い系における生物の生態学的、生理学および生化学的性質によって決まる。

系の回復性を予測する方法の1つは、化合物の半減期、初期曝露濃度および種の5%に有害となる濃度に基づいている⁶⁵⁾。単回使用後一年以内に回復が必要となる場合には、化学物質の半減期は次の条件を満たすべきである。

$$T_{1/2} < \ln 2 / \ln \{C_0 / HC_5\}$$

$T_{1/2}$ が年単位で測定される場合、 C_0 は初期濃度、 HC_5 は生物種の5%に有害となる濃度である。完全な回復には農薬が消失することが必要だが、条件によっては消失だけでは不十分であり、生態の回復は化学物質の消失よりも遅れる可能性がある。その遅れは、避難場所へのアクセス性、(その化学物質に対する) 耐性をもつ生活段階にある

その生物の生存性およびコロニーが再形成できる無処理区域の存在を含む様々な要素に左右される。さらに、コロニー再形成能力は生息地の選択とライフサイクルに依存する。

影響を受けた系がコロニーを再形成できるかを定めるためにいくつかの実証実験が提案されている。これは特に、水域で短い間生息し毒性のある系から移動し得る、例えば魚類のような移動可能な生物に関するものである。実験の設計は、実験のはじめに試験生物を添加し、その後一定間隔ごとにさらに試験生物を添加していく構成になっている。類似の方法は高いコロニー再形成能力をもつ無脊椎動物種に対しても用いることができ、これはあらかじめ処理された系へ再導入させその後の生存と能力を監視するというものである。例えば、Craneら⁶⁶⁾はヨコエビに対するピリメホスメチルの毒性について調査した。0日目にビーカーに試験化合物を添加し、24時間後、4、8、12日後にヨコエビに対する毒性を評価した。死亡率は曝露から時間が経つにつれて概ね下がった。おそらく農薬の減衰の結果であると思われる。

大きな攪乱 (perturbation) の後の個体数の回復に影響を及ぼす要因は複雑である。1つの重要な要因は個々の生物種のライフサイクルである⁶⁷⁾。水生生物は再生と分散に関する特性の点で多様である。例えば、連続的に再生する生物種もあるし、一年のうちで断続的に再生する生物種もある。世代時間は数日 (ミジンコ等) から数年 (トンボ等) と様々である。コロニー再形成能力についても様々であり、多くの水生昆虫には羽をもつ成虫段階があるが、その他の生物類 (甲殻類、軟体動物等) のコロニー再形成は、より受動的分散形態 (風、水流、鳥による運搬等) に依存している。

6. 感受性の高い生育段階に関する試験

毒性に対する感受性は生物種によって異なることが知られているが、1つの生物の発達段階によっても異なる⁶⁸⁻⁷¹⁾。標準環境毒性試験は一般的に最も感受性の高いと思われる生後直後又は幼若段階に焦点を当てて行われる。しかし、特定の物質は標準試験では試験されない生育段階に

対して (例えば関連する成分の試験結果やその物質の作用機作に基づき) より強い毒性を示すことが知られている場合には、この生育段階における追加試験を行い、その結果としてより小さい不確実係数をリスク評価に導入することが適切になることもある。例えば、特定の毒物に対して成体の方が幼体よりも高い感受性を示す例がある。ミジンコ類の試験²⁰⁾では、クロルピリホスに対する感受性は幼体よりも成体の方が高いことが示された。この理由の1つとして考えられるのは、成体は濾過率が高く、餌の摂取とともに多くのクロルピリホスを摂取してしまうことである。Berrillら⁷²⁾は2週齢のオタマジャクシは新しくふ化したオタマジャクシよりもエンドスルファンに対して高い感受性を持つことを示した。その理由は、エンドスルファンはふ化後の筋神経系の発達に影響を及ぼすためである。異なる種類の化学物質の異なる摂取経路の重要性と生物の生理の両者を理解することにより生物種の感受性に関してこれらのタイプによる差を予測し、試験すべき最適の生育段階を特定することが可能になるかもしれない。生育段階の感受性試験は、特定の生物種によっては試験方法と培養方法がないので問題が生じるかもしれない。

7. 個体群レベルでの試験

標準毒性試験は一般的に最も感受性の高い生育段階で行われるので、個体群への影響を過大評価する結果になるかもしれない。ライフサイクルと個体群レベル試験は、水生生物の個体群に対する農薬の影響を評価する有用なツールになり得る。毒物に曝露されたときの個体群の構造は毒性影響を決める重要な要素となる可能性がある⁷³⁾。自然界における個体群では様々な生育段階が混在しているが、毒性試験は通常1つの発達段階から開始される。従って、毒性影響を評価する際には齢・生育段階の構造を考慮することが適切かもしれない。

モデリングの方法および実験的方法はいずれも個体群レベルの影響を決めるのに用いられる。室内試験は植物と無脊椎動物種⁹⁾を用いて行われ、限定された数の生育段階への影響を評価する単純な試験から、自然界の個体群の動態をシミュ

レートする複雑な多段階生育試験にまで及ぶ⁷⁴⁻⁷⁷⁾。このタイプの試験は、通常、比較的寿命の短い無脊椎動物、植物および魚類に限定されており、個体を隔離しなければ共食いしやすい生物群では利用できない。他の魚類を用いた実験は野外条件下で可能である^{78,79)}。

個体群レベル試験と単純毒性試験から得られたデータは、野外の個体群に対する化合物の影響をモデル化するのに使用できる⁸⁰⁻⁸³⁾。個体群モデルは、個体の有限集団の動態を時系列的に記述できるので生態学と漁業経営の中で広範囲に使用されてきた。これらの方法は、魚類^{84,85)}と無脊椎動物⁸⁶⁻⁸⁹⁾に対する使用に関してかなり発展している。モデルを用いることによって、室内試験の結果は様々なシナリオ⁹⁾を評価するために使用でき、短期間又は長期間の個体群構造の変化を特定するのに役立つ。

個体群モデルの適切な利用は、毒物がどのようにその生態に影響を及ぼすかに関する知見のみならず、検討対象の生物種の自然界における成長に対する理解が必要である。モデルの入力データには、生体成長速度、生理的な割合 (physiological rates)、繁殖力、個体群における様々な段階の生存率、およびこれらが試験物質に対してどのように変化するか等が含まれる⁹⁰⁾。さらに個体群密度への影響も重要である。

8. 農業の環境リスク評価における高次室内試験

高次試験は、一般的に低次評価において許容できないリスクが示された場合に実施される。実施される試験の正確な特性 (nature) は、低次試験の結果、物理的・化学的性質、対象成分の環境動態および使用パターンを含む多くの要因によって決まる。主な高次試験の種類概要と、それらの方法が現行の農業のリスク評価手法のどこに当てはまるかについて表5に示す。これらの方法による結果は、低次評価を精密化するため次の3つの試験に用いられる。(1) 小さな不確実係数を使用することの妥当性を示すための試験 (種感受性試験、生物回復試験、個体群レベル試験等)、

(2) リスク評価に用いられる影響濃度の増加の妥当性を示すための試験 (修正曝露試験 (modified exposure studies) 等)、(3) 確率論的な評価を実

施するための試験 (種感受性試験等)。複数の方法の組み合わせ (パルス曝露・消失試験と結合させた個体群試験の利用等) が適切であることもある。

高次室内試験法には標準毒性試験やメソコズム試験、野外試験を上回る多くの利点がある。これらの利点には次のものが含まれる。(1) エンドポイントと実環境曝露との関係がより深いこと、(2) 環境動態や曝露に関する「現実的な」測定値をリスク評価過程に組み込む余地を提供すること、(3) 環境への実際の影響を予測する際により高い信頼性を与えるはずであること、(4) 死亡、成長、行動等の特定のエンドポイントに対する影響を決定するための設計ができること、(5) リスクにさらされる可能性のある生物種をより明確に特定するため、また複数生物種試験の役に立てるために利用することが可能であること、(6) 試験結果が観察された影響 (作用機作、作用特性等) を説明するのに役立つ可能性があること、(7) 回復性が個体と個体群の両者について評価できること、(8) 複数種試験のようなデータの解釈に伴う複雑さがなく、(9) メソコズム試験と比較して、季節にそれほど依存せず実施でき、試験生物種を通常は入手しやすく、かつ試験系をコントロールしやすいこと、(10) 亜致死影響を明らかにできること。

しかしこれらの方法にも次のような限界がある。(1) 生物種間の相互作用に関する情報を得ることができないこと、(2) 標準単一生物種試験よりも結果の解釈と比較が難しいこと、(3) 標準単一生物種試験よりもコストがかかるかもしれないこと、(4) 標準化された高次手法がまだないこと、(5) 入手可能な生物種の質が常に保証されているわけではないこと。さらに、異なった試験設計とその結果との関係に関して現在多くの議論と意見の不一致が存在する。多くの不一致が存在する例として次のものが挙げられる。

(1) 追加生物種を用いて試験されるべき生物種の数について推奨されているのは10未満から30-40までと広範であること、(2) 確率論的リスク評価に用いたため選定される有害濃度レベルが5-10%となっていること、(3) 許容できる回復期間が異なっていること。

表 5. 高次毒性試験方法

試験の種類	試験の目的	可能な試験設計	データ解析	出力	長所/短所
追加生物種の試験	不確実係数の低減 又は 生物種の感受性分布の作成	広範な生物グループから多数の追加生物種(8種類で十分)を選定し試験 又は 作用機作が特定のグループに対して影響を示す化合物についてはそのグループの生物種について試験 又は 魚類が高感受性生物の場合は追加試験は5種類で可	不確実係数を一桁まで低減 又は 種の感受性分布を得るために統計的手法を使用	毒性曝露比(TER)や有害な濃度(HC ₅)の改定	高感受性生物種の特定 標準生物種よりも高い妥当性 毒性曝露比の精密化 確率論的リスク評価が可能 必要な試験生物種数に関する意見の不一致 用いられる不確実係数に関するガイダンスなし 個体群の保護に関する許容水準に関するガイダンスなし 追加生物種の標準試験法なし 野外から試験生物を採取する必要あり
時間・事象分析	標準試験期間よりも短期間での農業曝露による毒性影響の評価	標準毒性試験のデータを使用	想定される曝露期間と時間・事象データを比較	曝露期間が影響発現期間よりも短い場合は推定影響値を低減	より現実に近い生態毒性評価 「潜伏期間」に対応せず(すなわち初期曝露によりもたらされる影響のみ) 標準試験中での観察数では不十分となる可能性 推定影響値を低減する方法のガイダンスなし
短期間曝露試験	短期曝露による農薬の毒性影響の評価	野外で想定される曝露期間により試験を実施	標準毒性試験について統計的手法を使用	リスク判定に用いる影響測定値の改定	より現実に近い曝露評価 遅発性影響は考慮せず
パルス曝露試験	野外で生じ得るパルス曝露条件のシミュレート	必要に応じて、半止水系又は流水系	標準毒性試験について統計的手法・トキシコキネティックモデルを使用	リスク判定に用いる影響測定値の改定	より現実に近い曝露評価 生物の回復性を考慮可 多数の変動要因(パルスの継続時間、パルス間の時間、生物回復性)により影響されるので結果の解釈が困難
消失試験	消失過程が毒性に及ぼす影響の評価	通常は底質/水系を用いて実施。光分解(照明を用いた試験)、加水分解(流水系ではなく止水系による試験)及び揮発による影響を評価するための試験も実施可	標準毒性試験について統計的手法を使用	リスク判定に用いる影響測定方法の改定	より現実に近い曝露評価 代謝物の影響を考慮可 試験基質(matrices)の選定に関するガイドラインなし すべての生物種に適しているわけではない(藻類等) 光分解性と揮発性を評価する方法なし
自然の基質を用いた試験	自然条件下と室内系での生物利用可能性の差の説明	野外から採取した水試料を用いた毒性試験の実施	標準毒性試験について統計的手法を使用	リスク判定に用いる影響測定値の改定	自然条件下における生物利用可能性の評価 試験基質の選定に関するガイダンスなし
感受性が高い生育段階への影響	特定の生育段階が高感受性か否かの決定	多数の生物種に対して広範な方法が利用可	標準毒性試験について統計的手法を使用	高感受性の生育段階に対する毒性 →不確実係数の低減可	不確実係数の低減
個体群試験	長期間にわたって特定生物種の個体群に対して試験を実施	実験的方法とモデリング的方法が利用可	結果を解釈するために個体群モデリング手法を使用	より生態学的な関連性が高い影響評価 →不確実係数の低減可	回復性の効果を含む(耐性のある生物種の選定を含む) 生態をより代表した試験となる可能性
回復性試験	農薬曝露後の個体群の回復性の決定	農業に曝露させた生物を清浄な媒体に移し回復時間を決定		生物が回復するのに必要な時間の評価	魚類では実施困難 許容可能な回復期間についての意見の不一致

9. 結論

室内高次試験は、標準毒性試験と野外・半野外試験の中間に位置付けられる有用な試験となっている。このレビューでは、利用できる広範囲の高次試験が存在することとその試験方法の重要な部分の多く（すべてではないが）は現在作成中であることを明らかにした。融通の利くガイドラインが作成される必要がある。ただし、融通が利きすぎて異なる試験施設で得られた結果の比較ができなくなってしまう。今後5年間で、試験の方法論の発展面およびデータ解析とリスク評価の支援となるモデルの利用面で著しい進展がみられるだろう。

高次室内試験法に伴う最大の制約は妥当性検証に関することである。標準室内試験、高次室内試験およびメソコズム試験により得られたデータとリスク評価結果を比較するという一貫性があり体系的な方法によって、これらの方法の妥当性検証を行う必要がある。それによって、標準試験およびメソコズム試験と比較した室内高次試験の利点と限界に関する評価が可能になるであろう。

生物種に対する化学物質の生態毒性に関するデータセットは、化合物の作用機作に関する情報に基づきさらに検討すべきである。試験生物の選定に当たって、特定の作用機作に対して感受性の高い生物種のリストを作成することは極めて有益であろう。生物種の感受性分析を支援するために利用できる多くの試験法が北米で開発されており、また他の地域では登録申請の際に追加試験が要求されることもある。生物種の感受性分布から個体群への影響を評価する現在の方法は、すべての生物種が同等に重要であることを前提としている。これは明らかに事実とは異なっており、水生生態系において重要な生物種の特定について検討すべきである。それらの生物種には、経済的に重要な生物、キーストーン種又は特定の水系における美的観点から重要な生物種が含まれる。

謝辞

プロジェクトの実施中に有用な対話をして下さった Mike Collins 博士、Steve Norman 氏、この

原稿の初期の案に建設的なコメントを下さった Allen Burton 教授、Andy Girling 博士、Martin Streloke 博士に謝意を表す。なお、この研究は環境・運輸・地域省により助成されたものである。

引用文献

- 1) Crane M, Research needs for predictive multispecies tests in aquatic toxicology. *Hydrobiologia* **346**:149-155 (1997).
- 2) Giddings JM, Biever RC, Annunziato MF and Hosmer AJ, Effects of diazinon on large outdoor pond microcosms. *Environ Toxicol Chem* **15**:618-629 (1996).
- 3) Dyer SD and Belanger SE, Determination of the sensitivity of macroinvertebrates in stream mesocosms through field derived assessments. *Environ Toxicol Chem* **18**:2903-2907 (1999).
- 4) Kostel JA, Wang H, Amand ALS and Gray KA, Use of a novel laboratory stream system to study the ecological impact of PCB exposure in a periphytic biolayer. *Water Research* **33**:3735-3748 (1999).
- 5) Van Geest GJ, Zwaardemaker NG, Van Wijngaarden RPA and Cuppen JGM, Effects of a pulsed treatment with the herbicide afalon (active ingredient linuron) on macrophyte-dominated mesocosms. II. structural responses. *Environ Toxicol Chem* **18**:2866-2874 (1999).
- 6) Debus R, Fliedner A and Schafers C, An artificial stream mesocosm to simulate fate and effects of chemicals: technical data and initial experience with biocenosis. *Chemosphere* **32**:1813-1822 (1996).
- 7) Newman MC and McCloskey J, Time-to-event analysis of ecotoxicity data. *Ecotoxicology* **5**:187-196 (1996).
- 8) Hendley P and Giddings J, Draft report of the Aquatic Work-groups of ECOFRAM (Ecological Committee on FIFRA Risk Assessment)-Aqex_ecofram_Peer01_may499.doc (1999).
- 9) Campbell PJ, Arnold DJS, Brock TCM, Grandy NJ, Heger W, Heimbach F, Maund SJ and Streloke M,

- Guidance document on higher-tier aquatic risk assessment for pesticides(HARAP), SETAC-Europe, Brussels, 179p (1999).
- 10) Solomon KR, BakerD, Richard PR, Dixon KD, Klaine SJ, LaPoint TW, Kendall RJ, Weisskopf CP, Giddings JM, Giesy JP, Hall LW and Williams WM, Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. *Environ Toxicol Chem* **15**:31-76 (1996).
 - 11) Hosmer AJ, Warren LW and Ward TJ, Chronic toxicity of pulsed-dosed fenoxycarb to *Daphnia magna* exposed to environmentally realistic concentrations. *Environ Toxicol Chem* **17**:1860-1866 (1998).
 - 12) Hansen CR and Kawatski JA, Application of the 24h post-exposure observation to acute toxicity studies with invertebrates. *J Fish Res Boar Can* **33**:198-1201 (1976).
 - 13) Wright A, The use of recovery as a criterion for toxicity. *Bull Environ Contam Toxicol* **15**:747-749 (1976).
 - 14) Breck JE, Relationships among models for acute toxicity effects: applications to fluctuating concentrations. *Environ Toxicol Chem* **7**:75-778(1988)
 - 15) Parrot JL, Hodson PV, Servos MR, Huestis SL and Dixon DG, Relative potency of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans for inducing mixed-function oxygenase activity in rainbow trout. *Environ Toxicol Chem* **14**:1041-1050 (1995).
 - 16) Burnison BK, Hodson PV, Nuttley DJ and EferS, A bleached-kraft mill effluent fraction causing induction of a fish mixed function oxygenase enzyme. *Environ Toxicol Chem* **15**:1524-1531 (1996).
 - 17) Maund SJ, Hamer MJ, Warinton JS and Kedwards TJ, Aquatic ecotoxicology of the pyrethroid insecticide lamda-cyhalothrin: considerations for higher-tier aquatic risk assessment. *Pestic Sci* **54**:408-417 (1998).
 - 18) Handy RD, Intermittent exposure to aquatic pollutants: assess-ment, toxicity and sublethal responses in fish and invertebrates. Mini review: *Comp Biochem Physiol C* **107**:171-184 (1994).
 - 19) Pauli BD, Coulson DR and BerrillM, Sensitivity of amphibian embryos and tadpoles to Mimic 240 1v insecticide following single or double exposures. *Environ Toxicol Chem* **18**:2538-2544 (1999).
 - 20) Naddy RB, Johnson KA and Klaine SJ, Response of *daphnia magna* to pulsed exposures of chlorpyrifos. *Environ Toxicol Chem* **19**:423-431 (2000).
 - 21) GradeR, Gonzalez-ValeroJ, Hocht P and PfeifeV, A higher tier fow-through toxicity test with the green alga *Selenastrum capricornutum*. *Sci Total Environ* **247**:355-361 (2000).
 - 22) Meyer JS, Gulley DD, Goodrich MS, Szmania DC and Brooks AS, Modeling toxicity due to intermittent exposure of rainbow trout and common shiners to monochloroamine. *Environ Toxicol Chem* **14**:165-175 (1995).
 - 23) Mancini JL, A method for calculating effects, on aquatic organisms, of time-varying concentrations. *Water Res* **10**:1355-1362 (1983).
 - 24) Kusk KO, Bioavailability and effect of pirimicarb on *Daphnia magna* in a laboratory freshwater/sediment system. *Arch Environ Contam Toxicol* **31**:252-255 (1996).
 - 25) Clark JR, Goodman LR, Bothwick PW, Patrick JR, Cripe GM, Moody PM, Moore JC and Lores EM, Toxicity of pyrethroids to marine invertebrates and fish: a literature review and test results with sediment-sorbed chemicals. *Environ Toxicol Chem* **8**:393-401 (1989).
 - 26) Shillabeer N, Smyth DV and Tattersfeld L, Higher tier risk assessment of agrochemicals, incorporating sediment into algal test systems, in *Proc Brighton Crop Prot Conf-Pests and Diseases*, BCPC, Farnham, Surrey, UK, pp 359-364 (2000).
 - 27) Hamer MJ, Maund SJ and Hill IR, Laboratory methods for evaluating the impact of pesticides on water/sediment organisms, in *Prct Brighton Crop Prot Conf, Pests and Diseases*, BCPC, Farnham, Surrey, UK 2:487-496 (1992).
 - 28) Hamer MJ, Goggin UM, Muller K and Maund SJ, Bioavailability of lamda-cyhalothrin to *Chironomus riparius* in sediment-water and

- water-only systems. *Aquatic Ecosystem Health and Management* 2:403-412 (1999).
- 29) Black MC and McCarthy JF, Dissolved organic macromolecules reduce the uptake of hydrophobic organic contaminants by the gills of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Environ Toxicol Chem* 7:593-600 (1988).
 - 30) Kukkonen J and Oikari A, Bioavailability of organic pollutants in boreal waters with varying levels of dissolved organic material. *Water Res* 25:455-463 (1991).
 - 31) Weinstein JE and Oris JT, Humic acids reduce the bioaccumulation and photoinduced toxicity of fluoranthene to fish. *Environ Toxicol Chem* 18:2087-2094 (1999).
 - 32) Haitzer M, Hoss S, Traunspurger W and Steinberg C, Effects of dissolved organic matter (DOM) on the bioconcentration of organic chemicals in aquatic organisms: a review. *Chemosphere* 37:1335-1362 (1998).
 - 33) Isnard P, Vasseur P, Graff L, Narbonne JF, Clerandau C, Budzinski H, Augagneur S, Bastide J, Cambon JP, Cellier Pand Roman G, Comparing the ecotoxicity of chemicals in standard media and natural waters, Poster presented at the 3rd SETAC World Congress, 21-25 May, 2000, Brighton, UK (2000).
 - 34) Landrum PF, Lee H and Lydy MJ, Toxicokinetics in aquatic systems: model comparisons and use in hazard assessment. *Environ Toxicol Chem* 11:1709-1725 (1992).
 - 35) Hickie BE, McCarty LS and Dixon DG, A residue-based toxicokinetic model for pulse exposure toxicity in aquatic systems. *Environ Toxicol Chem* 14:2187-2197 (1995).
 - 36) Barber MC, Suarez LA and Lassiter RR, Bioconcentration of nonpolar organics by fish. *Environ Toxicol Chemistry* 7:545-558 (1988).
 - 37) Kooijman SALM and Bedaux JJM, *The analysis of aquatic toxicity data* (includes DEBtox, vers. 1.0), VU University Press, Amsterdam (1996).
 - 38) Cairns J, The myth of the most sensitive species. *Bio Science* 36:670-672 (1986).
 - 39) Slooff W, Van Oers JAM and DeZwart D, Margins of uncertainty in ecotoxicological hazard assessment. *Environ Toxicol Chem* 5:841-852 (1986).
 - 40) Slooff W and Canton JH, Comparison of the susceptibility of 11 freshwater species to 8 chemical compounds. 2. (semi) chronic toxicity tests. *Aquat Toxicol* 4:271-282 (1983).
 - 41) Blanck H, Wallin G and Wangberg SA, Species-dependent variation in algal sensitivity to chemical compounds. *Ecotoxicol Environ Safety* 8:339-341 (1984).
 - 42) Aquatic Dialogue Group, *Pesticide risk assessment and mitigation*, SETAC Press, Pensacola, FL (1994).
 - 43) USEPA, *Technical report of the implementation plan for probabilistic ecological assessments: aquatic systems*, USEPA, Duluth, MN (2000).
 - 44) Vaal MA, Van Leeuwen CJ, Hoekstra JA and Hermens JLM, Variation on sensitivity of aquatic species to toxicants: Practical consequences for effect assessment of chemical substances. *Environ Manag* 25:415-423 (2000).
 - 45) Cuppen JGM, Van den Brink PJ, Camps E, Uil KF and Brock TCM, Impact of the fungicide carbendazim in freshwater microcosms. 1. Water quality, breakdown of particulate organic matter and responses of macroinvertebrates. *Aquat Toxicol* 48:233-250 (2000).
 - 46) Girling AE, Pascoe D, Janssen CR, Peither A, Wenzel A, Schafer H, Neumeier B, Mitchell GC, Taylor EJ, Maund SJ, Lay JP, Juttner I, Crossland NO, Stephenson RR and Personne G, Development of methods for evaluating toxicity to freshwater ecosystems. *Ecotoxicol Environ Safety* 45:148-176 (2000).
 - 47) Pascoe D, Wenzel A, Janssen C, Girling AE, Juttner I, Fliedner A, Blockwell SJ, Maund SJ, Taylor EJ, Diedrich M, Persoone G, Verhelst P, Stephenson RR, Crossland NO, Mitchell GC, Pearson N, Tattersfeld L, Lay J-P, Peither A, Neumeier B and Velletti A-R, The development of toxicity tests for freshwater pollutants and their validation in stream and pond mesocosms. *Water Res* 34:2323-2329 (2000).
 - 48) Traunspurger W, Schafer H and Remde A, Comparative investigation on the effect of a

- herbicide on aquatic organisms in single species tests and aquatic microcosms. *Chemosphere* **33**:1129-1141 (1996).
- 49) Roman G, Isnard P and Jouany JM, Critical analysis of methods for assessment of predicted no-effect concentration. *Ecotoxicol Environ Safety* **43**:117-125 (1999).
- 50) Blanck H, Species dependent variation among aquatic organisms in their sensitivity to chemicals. *Ecol Bull* **36**:107-119 (1984).
- 51) Van Straalen NM and Denneman GAJ, Ecotoxicological evaluation of soil quality criteria. *Ecotoxicol Environ Safety* **18**:241-251 (1989).
- 52) Suter GW, Barnhouse LW, Breck JE, Gardner RH and O'Neill RV, Extrapolation from the laboratory to the field: how uncertain are you?, in *Aquatic toxicology and hazard assessment*, ed by Cardwell RD and Bahner RC, American Society for Testing of Materials, Philadelphia, Pa, pp 400-413(1985).
- 53) Wagner C and Lokke H, Estimation of ecotoxicological protection levels from NOEC toxicity data. *Water Res* **25**:1237-1242 (1991).
- 54) USEPA, *Estimating concern levels for concentrations of chemical substances in the environment*, Environmental Effects Branch, Health and Environmental Review Division, USEPA (1984).
- 55) Stephan CE, Mount DI, Hansen DJ, Gentile JH, Chapman GA and O'Neill R, *Guidelines for deriving numerical national water quality criteria for the protection of aquatic organisms and their uses*, USEPA, PB85-227049 (1985).
- 56) Okkerman PC, Plassche EJVD, Emans HJB and Canton JH, Validation of some extrapolation methods with toxicity data derived from multiple species experiments. *Ecotoxicol Environ Safety* **25**:341-359 (1993).
- 57) Van den Brink PJ, Posthuma L and Brock TCM, Verification of the SSD-concept: field relevance and implications for ecological risk assessment, Poster presented at the SETAC World Congress, Brighton, May 2000 (2000).
- 58) Schulz R and Liess M, Toxicity of aqueous-phase and suspended-particle-associated fenvalerate: chronic effects following pulse-dosed exposure of *Limnephilus lunatus* (trichoptera). *Environ Toxicol Chem* **20**:185-190 (2001).
- 59) Aldenberg T and Slob W, Confidence limits for hazardous concentrations based on logistically distributed NOEC toxicity data. *Ecotoxicol Environ Safety* **25**:48-63 (1993).
- 60) Giddings JM, *Aquatic mesocosm studies and field studies with pyrethroids: observed effects and their ecological significance*, Springborn Laboratories Report 97-6-7014 (1997).
- 61) Newman M, Ownby DR, Mezin LCA, Powell DC, Christensen TRL, Lerberg SB and Anderson BA, Applying species-sensitivity distributions in ecological risk assessment: assumptions of distribution type and sufficient numbers of species. *Environ Toxicol Chem* **19**:508-515 (2000).
- 62) Persoone G and Janssen CR, Freshwater invertebrate tests, in *Handbook of ecotoxicology* Vol 1, ed by Calow P, Blackwell Science Ltd, London, pp 51-65 (1993).
- 63) Kallander DB, Fisher SW and Lydy MJ, Recovery following pulsed exposure to organophosphorous and carbamate insecticides in the midge, *Chironomus riparius*. *Arch Environ Contam Toxicol* **33**:29-33 (1997).
- 64) Sanchez M, Ferrando MD, Sancho E and Andreu E, Assessment of the toxicity of a pesticide with a two generation reproduction test using *Daphnia magna*. *Comp Biochem Physiol C* **124**:247-252 (1999).
- 65) Van Straalen NM, Schobben JHM and Traas TP, The use of ecotoxicological risk assessment in deriving maximum acceptable half-lives of pesticides. *Pestic Sci* **34**:227-231 (1992).
- 66) Crane M, Attwood C, Sheahan D and Morris S, Toxicity and bioavailability of the organophosphorous insecticide pirimiphos methyl to the freshwater amphipod *Gammarus pulex* Lin laboratory and mesocosm systems. *Environ Toxicol Chem* **18**:1456-1461 (1999).
- 67) Sherratt TN, Roberts G, Williams P, Whitfield M, Biggs J, Shillabeer N and Maund SJ, A

- life-history approach to predicting the recovery of aquatic invertebrate populations after exposure to xenobiotic chemicals. *Environ Toxicol Chem* **18**:2512-2518 (1999).
- 68) Green DWJ, Williams KA and Pascoe D, The acute and chronic toxicity of cadmium to different life history stages of the freshwater crustacean *Asellus aquaticus* (L). *Arch Environ Contam Toxicol* **15**:465-471 (1986).
- 69) Shazili NAM and Pascoe D, Variable sensitivity of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) eggs and alevins to heavy metals. *Bull Environ Contam Toxicol* **36**:468-474 (1986).
- 70) Williams KA, Green DWJ, Pascoe D and Gower DE, The acute toxicity of cadmium to different larval stages of *Chironomus riparius* (diptera: chironomidae) and its ecological significance for pollution regulation. *Oecologia* **70**:362-366 (1986).
- 71) McCahon CP and Pascoe D, Cadmium toxicity to the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L) during the molt cycle. *Fresh water Biol* **19**:197-203 (1988).
- 72) Berrill M, Coulson D, McGillivray L and Pauli B, Toxicity of endosulfan to aquatic stages of anuran amphibians. *Environ Toxicol Chem* **17**:1738-1744 (1998).
- 73) Stark JD and Banken JAO, Importance of population structure at the time of toxicant exposure. *Ecotoxicol Environ Safety* **42**:282-287 (1999).
- 74) Maund SJ, Taylor EJ and Pascoe D, Population responses of the freshwater amphipod crustacean *Gammarus pulex* (L) to copper. *Freshwater Biol* **28**:29-36 (1992).
- 75) Taylor EJ, Blockwell SJ, Maund SJ and Pascoe D, Effects of lindane on the life cycle of the a freshwater invertebrate *Chironomus riparius* Meigen (Insecta: Diptera). *Arch Environ Contam Toxicol* **29**:145-150 (1992).
- 76) Chandler GT and Green AS, A 14-day harpacticoid copepod reproduction bioassay for laboratory and field contaminated muddy sediments, in *New techniques in aquatic toxicology*, ed by Ostrander G, Lewis Publishers, Boca Raton, pp 23-39 (1995).
- 77) Blockwell SJ, Maund SJ and Pascoe D, Effects of the organochlorine insecticide lindane (γ -C₆H₆Cl₆) on the population responses of the freshwater amphipod *Hyalella azteca*. *Environ Toxicol Chem* **18**:1264-1269 (1999).
- 78) Johnson PC, Kennedy JH, Morris RG and Hambleton FE, Fate and effects of cyfuthrin (pyrethroid insecticide) in pond mesocosms and concrete microcosms, in *Aquatic mesocosm studies in ecological risk assessment*, ed by Graney RL, Kennedy JH and Rodgers JH, Lewis Publishers, Michigan, pp 337-371 (1994).
- 79) Shaw JL, Maund SJ and Hill IR, Fathead minnow (*Pimephales promelas* Rafinesque) reproduction in outdoor microcosms: an assessment of the ecological effects of fish density. *Environ Toxicol Chem* **14**:1763-1772 (1995).
- 80) Hallam TG and Lassiter RR, Individual-based mathematical modelling approaches in ecotoxicology: a promising direction for aquatic population and community ecological risk assessment, in *Wildlife toxicology and population modelling*, ed by Kendall RJ and Lacher TE, Lewis Publishers, Boca Raton, pp 531-542 (1994).
- 81) Sibly RM, Effects of pollutants on individual life histories and population growth rates, in *Ecotoxicology: a hierarchical approach*, ed by Newman MC and Jagoe CH, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp 197-219 (1996).
- 82) Calow P, Sibly RM and Forbes VE, Risk assessment on the basis of simplified life history scenarios. *Environ Toxicol Chem* **16**:1983-1989 (1997).
- 83) Maund SJ, Sherratt TN, Stickland T, Biggs J, Williams N, Shillabeer N and Jepson P, Ecological considerations in risk assessment for pesticides in aquatic ecosystems. *Pestic Sci* **49**:185-190 (1997).
- 84) Barnhouse LW, Suter GW, Rosen AE and Beauchamp JJ, Estimating responses of fish populations to toxic contaminants. *Environ Toxicol Chem* **6**:811-824 (1987).
- 85) De Angelis D, Godbout LL and Shuter BJ, An individual-based approach to predicting

- density-dependent compensation in smallmouth bass populations. *Ecol Modelling* 57:91-115 (1991).
- 86) Kooijman SALM and Metz JAJ, On the dynamics of chemically stressed populations: the deduction of population consequences from effects on individuals. *Ecotoxicol Environ Safety* 8:254-274 (1984).
- 87) Gurney WSC, Mc Cauley E, Nisbet RM and Murdoch WW, The physiological ecology of Daphnia: a dynamic model of growth and reproduction. *Ecology* 71:716-732 (1990).
- 88) Acevedo MF, Waller WT, Smith DP, Poage DW and Mc Intyre PB, Modelling cladoceran population to stress with particular reference to sexual reproduction. *Nonlinear World* 2:97-129 (1995).
- 89) Roex EWM, Van Gestel CAM, Van Wezel AP and Van Straalen NM, Ratios between acute aquatic toxicity and effects on population growth rates in relation to toxicant mode of action. *Environ Toxicol Chem* 19:685-693 (2000).
- 90) USEPA, *Guidelines for ecological risk assessment*, USEPA Risk Assessment Forum, Washington, DC (1998).