

廿七、OECD 對有關化學品之水中生態毒性試驗計畫

北 野 大

日本化學品檢查協會技術管理部

1. 前 言

經濟協力開發機構 (OECD) 是由西方先進國家中二十四個工業國所組成的國際機構，本部在巴黎。自 1970 年代後期開始，OECD 對化學品的安全性，積極投入很大的心血。其目的如下四點：(1)保護人類健康和自然環境免於化學品的不良作用。(2)排除化學品在交易上之非關稅障礙。(3)減少會員國對控制化學品之經濟和管理上負擔。(4)加強國際間化學品的資訊交換。而達成上述目的之具體成果如下：(1)化學品上市前的必要最小安全性評價項目 (MPD) 之作成。(2)出版 OECD 化學品檢驗手冊。(3)作成了 OECD 優良試驗 (GLP) 的基準。(4) OECD 資料解釋指針的完成。

如表一所示，化學品出貨前的最小安全性評價項目包含了物質的鑑定、生產、用途和廢棄，此外尚包含物理化學的性質、急性毒性資料、反復投與資料、變異原性資料、生態毒性資料和分解性、濃縮性資料等。其中生態毒性資料尚包含了魚類、水蚤和藻類等三種生物。化學品安全性評價上之物理化學性質，需具有下列四種特性之描述：(1)物質鑑定的指標，如光譜、融點等。(2)生物試驗條件之指標，如對水之溶解度和蒸氣壓等。(3)環境中化學品分佈之指標，如蒸汽壓，對水之溶解度和吸脫著係數。(4)生物活性的預測（構造與活性之相關），由分配數係預測魚毒性和濃縮性。

目前 OECD 化學品試驗指導手冊中所示之項目如表二所示。可分為物理化學性質、生態毒性、分解與濃縮和健康影響等四項，合計共出版了 78 種指導方法。這些指導方法隨著科學的進步，都會定期予以更新。

生物毒性指導方法除了 MPD 之三項目外，尚有對魚類長期的毒性、對鳥類之毒性、對蚯蚓的毒性和對高等植物之毒性。本論文僅就對水中生態影響之指導方法，對其現況及 OECD 目前正在檢討之事項加以說明之。

2. OECD 對生態毒性試驗的理念

化學物質對生態系的影響，主要指對構成生態系的種種生物量之構造，和對食物鏈中某項機能的影響而言。當進行對生態系影響的評估時，常會面臨生態系的多樣性和複雜性的難題，生態系中自然循環的主要部份為生物能量生產到消費的過程，這也是生態系中最主要的一環。由此觀點，使用食物鏈中不同位置上的生物，進行有害性的評價，這是第一次影響評價的基本理念。

其次，生態系尚包含了大氣、陸上和水系等環境圈的物質，各環境圈對污染物質相對係數皆不同，因此由污染物質的分佈和棲息生物數為對象來決定其環境圈。

另外，生態毒性與傳統的哺乳動物毒性最大的差異在於：哺乳動物毒性試驗為對個體有害性之觀察，但生態毒性則為對個個生物組成的生物羣之有害性觀察。

理想的生態毒性試驗為對各種生物進行長期的毒性試驗，但從技術及經濟面來考量似乎是不可能的。因此對所有化學物質首先均進行簡單的試驗，由此結果，針對較具危險性的物質再對多種生物作

Table 1. Data components for, and provisions for flexible application of, the OECD minimum pre-marketing set of data

1. Data components for the OECD minimum pre-marketing set of data

Chemical identification data

Name according to agreed international nomenclature, e.g. UIPAC; Other names; Structural formula; CAS-number; Spectra ("finger-print spectra" from purified and technical grade product); Degree of purity of technical grade product; Known impurities, and their percentage by weight; Essential (for the purposes of marketing) additives and stabilisers and their percentage by weight.

Production/Use/Disposal data

Estimated production, tons/year; Intended uses; Suggested disposal methods; Expected mode of transportation.

Recommended precautions and emergency measures

Analytical methods

Physical/Chemical data

Melting point; Boiling point; Density; Vapour pressure; Water solubility; Partition coefficient; Hydrolysis*; Spectra; Adsorption-Desorption*; Dissociation constant; Particle size*.

Acute toxicity data

Acute oral toxicity; Acute dermal toxicity; Acute inhalation toxicity; Skin irritation; Skin sensitisation; Eye irritation.

Repeated dose toxicity data

14-28 days; repeated doses.

Mutagenicity data

Ecotoxicity data

Fish LC₅₀—at least 96 hours exposure; *Daphnia*—reproduction 14 days; *Alga*—growth inhibition 4 days.

Degradation/Accumulation data

Biodegradation : screening phase biodegradability data (readily biodegradable).

Bioaccumulation : screening-phase bioaccumulation data (partitioning coefficient, *n*-octanol/water, fat solubility, water solubility, biodegradability).

2. Provisions for flexible application of the OECD minimum pre-marketing set of data

The member countries further note that:

- (1) Due regard may be given, on a case-by-case basis, to the scientific and economic factors that may influence the need for and scope of testing;
 - (2) Member countries may omit or substitute certain tests or ask for them in a later stage of initial assessment, as long as they can justify their course of action.
-

* Only the screening part to be done for base set.

Table 2. OECD guidelines for testing of chemicals

Physical-Chemical properties	302 B Modified Zahn-Wellens Test
101 UV-VIS Absorption Spectra	302 C Modified MITI Test (II)
102 Melting Point/Melting Range	Simulation test
103 Boiling Point/Boiling Range	303 A Aerobic Sewage Treatment: Coupled Units Test
104 Vapour Pressure Curve	Biodegradability in soil
105 Water Solubility	304 A Inherent Biodegradability Test in Soil
106 Adsorption/Desorption	Bioaccumulation
107 Partition Coefficient (<i>n</i> -octanol/water)	305 A Sequential Static Fish Test
108 Complex Formation Ability in Water	305 B Semi-static Fish Test
109 Density of Liquids and Solids	305 C Degree of Bioconcentration in Fish
110 Particle Size Distribution/Fibre Length and Diameter Distributions	305 D Static Fish Test
111 Hydrolysis as a Function of pH	305 E Flow-through Fish Test
112 Dissociation Constants in Water	Health effects
113 Screening Test for Thermal Stability and Stability in Air	Short-term toxicology
114 Viscosity of Liquids	401 Acute Oral Toxicity
115 Surface Tension of Aqueous Solutions	402 Acute Dermal Toxicity
116 Fat Solubility of Solid and Liquid Substances	403 Acute Inhalation Toxicity
Effects on biotic systems	404 Acute Dermal Irritation/Corrosion
201 Alga, Growth Inhibition Test	405 Acute Eye Irritation/Corrosion
202 <i>Daphnia</i> sp. Acute Immobilisation Test and Reproduction Test	406 Skin Sensitisation
203 Fish, Acute Toxicity Test	407 Repeated Dose Oral Toxicity—Rodent: 28/14-day
204 Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-day Study	408 Subchronic Oral Toxicity—Rodent: 90-day
205 Avian Dietary Toxicity Test	409 Subchronic Oral Toxicity—Non-rodent: 90-day
206 Avian Reproduction Test	410 Repeated Dose Dermal Toxicity: 21/28-day
207 Earthworm, Acute Toxicity Tests	411 Subchronic Dermal Toxicity: 90-day
208 Terrestrial Plants, Growth Test	412 Repeated Dose Inhalation Toxicity: 28/14-day
209 Activated Sludge, Respiration Inhibi- tion Test	413 Subchronic Inhalation Toxicity: 90-day
Degradation and accumulation	414 Teratogenicity
Ready biodegradability	415 One-generation Reproduction Toxicity
301 A Modified AFNOR Test	416 Two-generation Reproduction Toxicity
301 B Modified Sturm Test	417 Toxicokinetics
301 C Modified MITI Test (I)	418 Acute Delayed Neurotoxicity of Organophosphorus Substances
301 D Closed Bottle Test	419 Subchronic Delayed Neurotoxicity of Organophosphorus Substances: 90-day
301 E Modified OECD Screening Test	
Inherent biodegradability	
302 A Modified SCAS Test	

Table 2. (Continued)

Long-term toxicology	477 Sex-linked Recessive Lethal Test in <i>Drosophila melanogaster</i>
451 Carcinogenicity Studies	478 Rodent Dominant Lethal Test
452 Chronic Toxicity Studies	479 <i>In vitro</i> Sister Chromatid Exchange Assay in Mammalian Cells
453 Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies	480 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Gene Mutation Assay
Genetic toxicology	481 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Mitotic Recombination Assay
471 <i>Salmonella typhimurium</i> , Reverse Mutation Assay	482 DNA Damage and Repair, Unscheduled DNA Synthesis in Mammalian Cells <i>in vitro</i>
472 <i>Escherichia coli</i> , Reverse Mutation Assay	483 Mammalian Germ Cell Cytogenetic Assay
473 <i>In vitro</i> Mammalian Cytogenetic Test	484 Mouse Spot Test
474 Micronucleus Test	485 Mouse Heritable Translocation Assay
475 <i>In vivo</i> Mammalian Bone Marrow Cytogenetic Test—Chromosomal Analysis	
476 <i>In vitro</i> Mammalian Cell Gene Mutation Test	

Table 3. Step system of ecotoxicity tests in european community

Test species	Test item	Level 0	Level 1	Level 2
Fish	Acute toxicity (LC ₅₀)	○		
	Long term toxicity (at least 14 days)		○	
	Long term toxicity (including reproduction)			○
<i>Daphnia</i>	Acute toxicity (LC ₅₀)	○		
	Reproduction (21 days)		○	
Alga	Growth inhibition		○	
Higher plant	Toxicity		○	
Earth worm	Toxicity		○	
Bird	(When BCF is larger than 100)			○
Other species	(If necessary)			○

更長期的試驗。首先選定基礎層面的試驗，此試驗須可評價化學物質對環境的影響，且可反映生態系的機能，同時對影響生物的基本因素如生化、生長、繁殖和行動等，可明顯地表現出來，另外亦要考慮取得的方便性和實驗室的飼育簡單化性。並且至少選擇3種試驗指導方法進行。

另為參考起見，茲列出歐洲共同體（EC）對生態毒性試驗的階梯系統（如表三所示），可知越高層次的生態毒性試驗，越需要使用多種生物體，試驗時間亦要更長期。

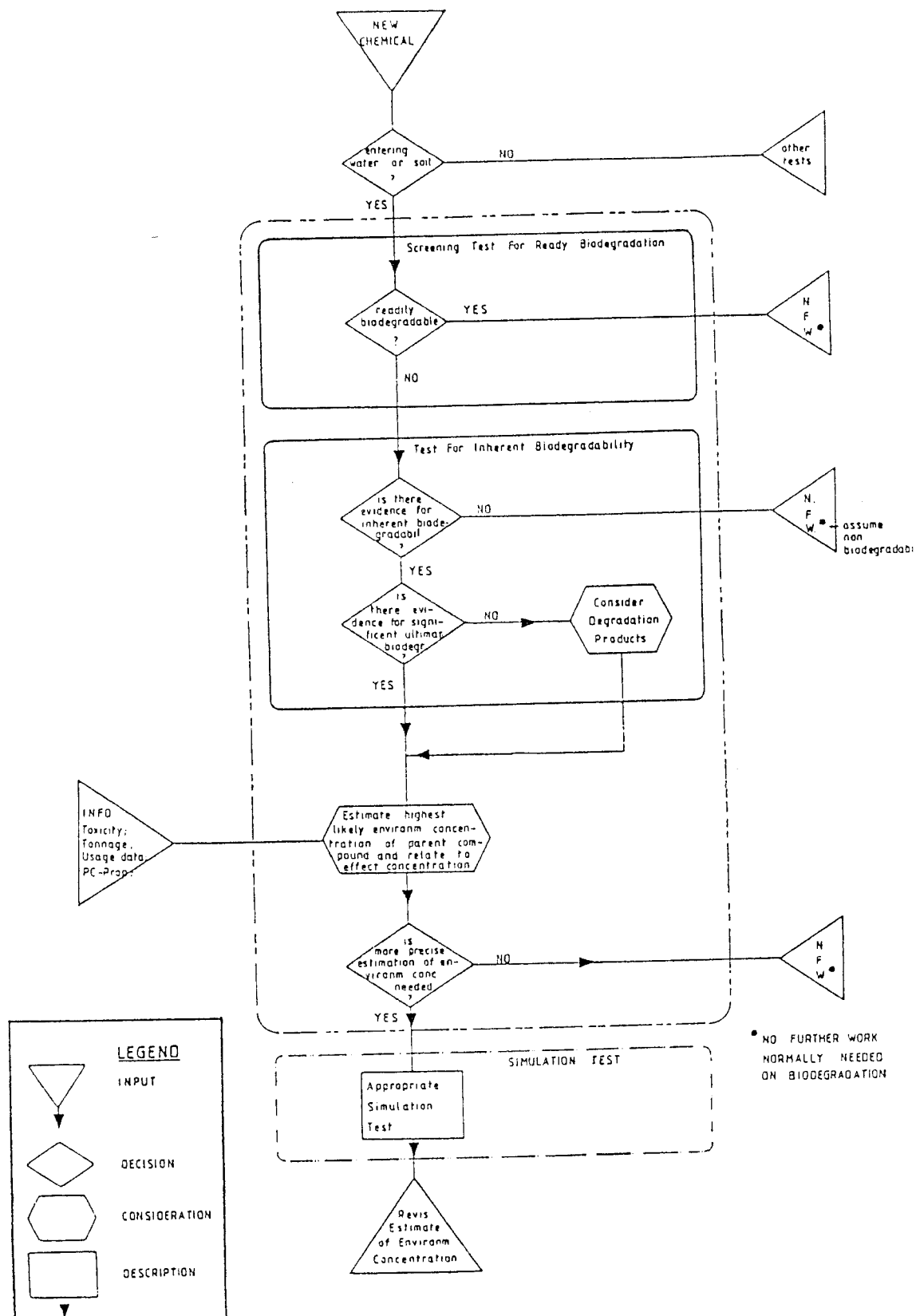


Fig. 1. Flow scheme for biodegradation testing in water.

3. OECD 對化學和環境影響評估的理念

化學品對環境的影響係由其本身毒性和其曝露量來決定，即 $\text{Hazard} = f(\text{Exposure} \times \text{Effect})$ 。本文僅由 MPD 項目中有關曝露之項目，以及生分解和濃縮性測定法，及有關影響項目之三種 MPD 生態毒性試驗法，及對其他水中生物之試驗法等加以說明。

3.1 生分解試驗

OECD 將生分解試驗分成易分解性、本質分解性和擬態性階段之試驗，並依順序加以試驗（圖一）。

易分解性試驗之共通條件如下：(1) 在好氣性條件下測其生分解性。(2) 不可將微生物濃度稀釋，或事先以供試物質加以馴化。(3) 以供試物質為唯一碳素源。(4) 採用溶存有機酸和生化需氧量等非特異分析法來評價化學物質的完全分解性。

現在，OECD 在作業上有五種易分解性試驗法，這五種方法的目的為分解力的強度並非完全相同及基礎培養基的組成具共通性。

其次，除了上述試驗指導方法外，丹麥正提出使用海水作為微生物源，添加無機營養鹽以評價生分解性的方法。OECD 則預定於今年中正式採用此種方法，作為擬態試驗的檢測方法。

3.2 濃縮性試驗

現在，OECD 對於濃縮性試驗有五種指導方法，這些方法的共通事項如下：(1) 供試生物都是使用魚類。(2) 將供試化學物質溶解或分散於水中，評價化學物質通過魚鰓或上皮組織之濃縮性。(3) 以濃縮倍數來評價濃縮性，即 BCF (Bioconcentration factor) 等於魚體濃度 (C_f) 除以水中濃度 (C_w)。或等於攝取速率 (k_1) 除以排泄速度 (k_2)。有關濃縮性試驗的裝置如圖二所示，其使用的魚種則主要為淡水魚。

另外，現在 OECD 計畫將五種指導方法合併為一種，同時生物種除魚以外，其他的水中生物特別如貝類等亦被考慮使用，另測定供試生物的脂質含量做為參考，亦正被探討開發中。其次，陸上生

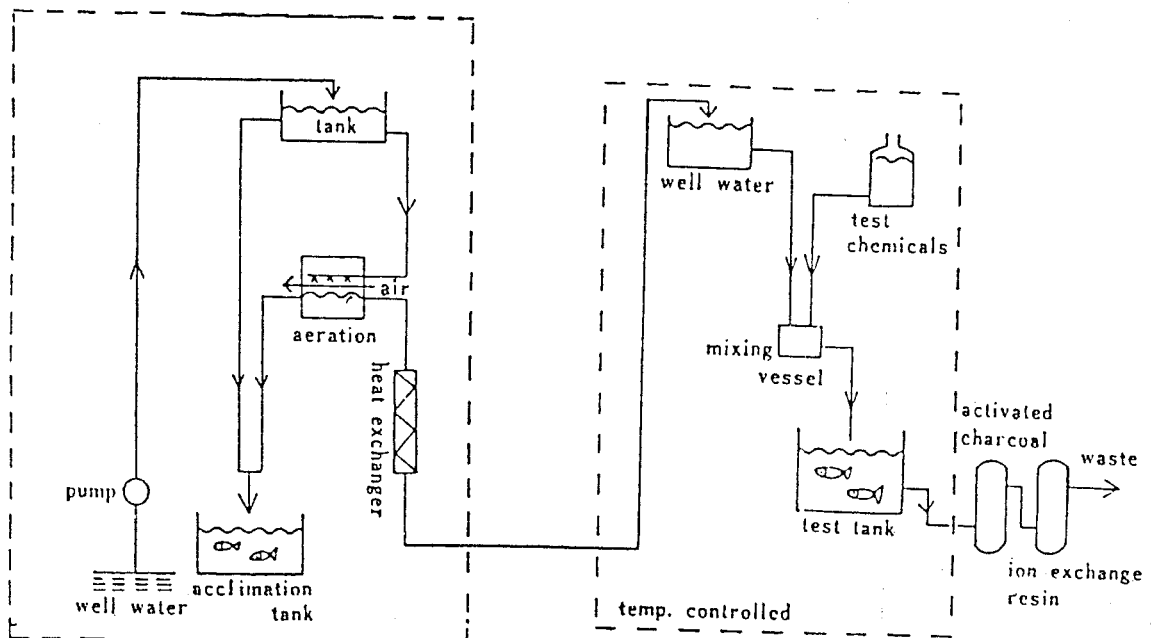


Fig. 2. Bioaccumulation test system.

物一般較水中生物對物質的代謝能力強。由魚濃縮性的結果做為對陸上生物濃縮性之篩選工作，而開發陸上生物做為生物濃縮性的指導方法，目前還未被探討。但是對海產魚的濃縮性則依據淡水魚的結果和脂質含量而定，目前尚待進一步確認。

3.3 生態毒性試驗

3.3.1 對魚類的急性毒性

試驗條件為試驗期間須維持有限的必須條件，且以半止水或流水式進行之。當試驗物質濃度下降了 20% 以上時，其 LC_{50} 須以實測濃度表示。而且調配試液之助劑濃度不得超過 100 mg/l，魚類之尾數一羣至少要 10 尾，推薦魚種如表四所示。

但目前受保護動物的觀點影響下，魚羣的尾數可降為 7~10 尾，試驗化學物質的濃度亦以 100 mg/l 為上限濃度。這些變更將會在本年度中實施。

3.3.2 魚類延長毒性試驗

調配供試物質或不同濃度之試驗液，將魚類曝露在試驗液中 14 天，或延長為 1~2 週，觀察魚類的死亡或死亡以外的症狀，如外觀、行動變化和成長影響等。再以此結果推算其死亡濃度和對魚類之影響濃度。其使用之推薦魚種如表四所示。

以這種試驗法取代魚類之急性毒性試驗法，更可獲知詳細之毒性情報。一般魚類的毒性試驗可區分為由急性至調查成長和繁殖之長期試驗。而本方法則難於歸類為何種階段。一般致死和生長為明確的指標，以其他症狀做為指標來推算化學物質之作用濃度和無作用濃度雖然有用，但通常難以實施。其理由有二：其一為症狀緩和，很難決定對生態系有何有害性。其二為以其症狀做為評估判定時甚為困難所致。所以最近可見的將來，本方法之評估可能仍以成長做為指標。

3.3.3 魚類稚仔魚期試驗 (FELST)

本方法尚在檢討中，為將魚類受精卵放入含有不同濃度化學物質之試驗水中，觀察其發生、孵化和成長、試驗期間為稚魚期至可自由攝餌期為止。

本方法觀察影響評價的項目有發生中有無異常、孵化率、孵化時間、孵化後生存率、成長及型態和行動是否有異常等。

上述之觀察須與對照區比較，即可換算出無影響之最大濃度和有影響之最小濃度，因而求出毒物

Table 4. Recommended species

Recommended species	Recommended test temperature (range in °C)	Recommended total length of test fish in cm*
<i>Brachydanio rerio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Zebra-fish	21~25	2.0±1.0
<i>Pimephales promelas</i> (Teleostei, Cyprinidae) Fathead minnow	21~25	2.0±1.0
<i>Cyprinus carpio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linné 1758) Common carp	20~24	3.0±1.0
<i>Oryzias latipes</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Schlegel 1850) Red killifish	21~25	2.0±1.0
<i>Poecilia reticulata</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Guppy	21~25	2.0±1.0
<i>Lepomis macrochirus</i> (Teleostei, Centrarchidae) (Linné 1758) Bluegill	21~25	2.0±1.0
<i>Salmo gairdneri</i> (Teleostei, Salmonidae) (Richardson 1836) Rainbow trout	13~17	5.0±1.0

Table 5. Test results under "full life cycle test" and "FELST"

Toxicant	Species	MATC ($\mu\text{g/l}$)	Estimated MATC ($\mu\text{g/l}$)
Metals			
1. Cadmium	Fathead minnow	37.0-57.0	37.0-57.0
2. Cadmium	Bluegill	31.0-80.0	31.0-80.0
* 3. Cadmium	Flagfish	4.1-8.1	8.1-16.0
4. Cadmium	Flagfish	7.4-16.9	7.4-16.9
5. Cadmium	Flagfish	3.0-6.5	3.0-6.5
6. Cadmium	Flagfish	3.4-7.3	3.4-7.3
7. Cadmium	Brook trout	1.7-3.4	1.7-3.4
8. Copper	Fathead minnow	10.6-18.4	10.6-18.4
9. Copper	Brook trout	9.5-17.4	9.5-17.4
10. Copper	Brook trout	9.5-17.4	9.5-17.4
11. Copper	Bluegill	21.0-40.0	21.0-40.0
12. Chromium	Fathead minnow	1,000.0-3,950.0	1,000.0-3,950.0
13. Chromium	Brook trout	200.0-350.0	200.0-350.0
14. Lead	Brook trout	58.0-119.0	58.0-119.0
*15. Lead	Flagfish	31.3-62.5	62.5-125.0
16. Nickel	Fathead minnow	380.0-730.0	380.0-730.0
17. Zinc	Fathead minnow	30.0-180.0	30.0-180.0
*18. Zinc	Flagfish	26.0-51.0	51.0-85.0
*19. Zinc	Flagfish	75.0-139.0	139.0-267.0
20. Zinc	Brook trout	532.0-1,368.0	532.0-1,368.0
21. Zinc	Fathead minnow	78.0-145.0	78.0-145.0
Tri-metal			
22. Mixture	Fathead minnow		
Zinc†		27.3-42.3	27.3-42.3
Cadmium†		3.9-7.1	3.9-7.1
Copper		5.3-6.7	5.3-6.7
Organo-metallics			
*23. Methylmercury	Fathead minnow	0.07-0.13	0.13-0.23
24. Methylmercury	Flagfish	0.17-0.33	0.17-0.33
25. Methylmercury	Brook trout	0.29-0.93	0.29-0.93
Halogens			
26. Chlorine	Fathead minnow	14.0-42.0	14.0-42.0
*27. Chloramine	Fathead minnow	16.0-43.0	43.0-108.0
28. Fluoride	Fathead minnow	6,800.0-13,600.0	6,800.0-13,600.0
PCBs			
29. PCB-1254	Fathead minnow	1.8-4.6	1.8-4.6
30. PCB-1242	Fathead minnow	5.4-15.0	5.4-15.0
31. PCB-1248	Fathead minnow	1.1-3.0	1.1-4.4
32. PCB-1260	Fathead minnow	2.1-4.0	2.1-4.0
Pesticides			
*33. Atrazine	Brook trout	60.0-120.0	120.0-240.0

Table 5. (Continued)

Toxicant	Species	MATC ($\mu\text{g/l}$)	Estimated MATC ($\mu\text{g/l}$)
34. Captan	Fathead minnow	16.5-39.5	16.5-39.5
35. Carbaryl	Fathead minnow	210.0-680.0	210.0-680.0
36. Diazinon	Flagfish	54.0-88.0	54.0-88.0
37. Diazinon	Fathead minnow	6.8-13.5	6.8-13.5
38. Diazinon	Brook trout	<0.80	<0.80
39. Endrin	Flagfish	0.22-0.30	0.22-0.30
*40. Guthion®	Fathead minnow	0.33-0.51	0.7-1.8
*41. Lindane	Fathead minnow	9.1-34.5	No effect
42. Malathion	Flagfish	8.6-10.9	8.6-10.9
43. Acrolein	Fathead minnow	11.4-41.7	11.4-41.7
44. Heptachlor	Fathead minnow	0.86-1.84	0.86-1.84
45. Endosulfan	Fathead minnow	0.20-0.40	0.20-0.40
*46. Trifluralin	Fathead minnow	1.95-5.1	5.1-8.2
47. Toxaphene	Brook trout	<0.039	<0.039
Sewage			
48. Nondisinfected	Fathead minnow	25-50%	25-50%
49. Chlorinated	Fathead minnow	7-14%	7-14%
50. Dechlorinated	Fathead minnow	50-100%	50-100%
51. Chlorobrominated	Fathead minnow	50-100%	50-100%
Other			
52. Linear alkylate sulfonate	Fathead minnow	630.0-1,200.0	630.0-1,200.0
53. pH	Fathead minnow	6.6-5.9 (pH)	6.6-5.9 (pH)
54. pH	Brook trout	6.5-6.1 (pH)	6.5-6.1 (pH)
55. NTA	Fathead minnow	54,000.0-114,000.0	54,000.0-114,000.0
56. Oxygen	Fathead minnow	5.01-4.02 (mg/l)	5.01-4.02 (mg/l)

之最大容許濃度 (MATC: Maximum Acceptable Toxicant Concentration)，由此結果可預測；若毒物濃度在最大容許濃度以下時，則該試驗魚種經長期暴露也不會有不良之影響。Mackim 曾利用此方法檢測數十種毒物，其結果如表五所示。利用本方法，有 80% 精確率可評價毒物之長期毒性。本方法的試驗期間，可分為兩種方式，其一為至投餌開始為止，其二為孵化後一週間之 FELST 為止。這兩種指導方法，相信在不久的將來將被 OECD 採用做為指導方法。

3.3.4 藻類生長阻害試驗

使用 *Chlorella* 等綠藻，在至少五種成等比級數之毒物濃度試驗液中培養 72 小時。將試驗濃度區和對照區之細胞濃度和測定時間、毒物濃度以表格列出，即可由試驗濃度區和對照區的細胞數平均值，對時間作圖即可描出其生長曲線。其次，為了決定濃度和影響的關係，另由生長曲線以下之面積或是生長速度來計算，並比較對照區之生長或是生長率，以求出減少 50% 之供試物質濃度。

3.3.5 水螅繁殖試驗

將水螅 (*Daphnia Magna*) 放入數種濃度的供試物質溶液中，期間通常為 2 週以上，即至少有 3 胎的產仔暴露其中，觀察項目有死亡率、最初產仔之時期、產仔數和中毒症狀等，並與對照區者相

比較。由死亡率、繁殖率和其他有影響之項目，觀察求出實驗組與對照組無意義差之最高試驗濃度和有意義差之最低試驗濃度。

3.4 環境影響評價

如前所述，化學品之環境影響評價須有環境化學品之濃度預測，和對環境生物之無作用濃度。1989年 OECD 對前者之種種方法已出版了手冊。從單純之稀釋模型至組合種種指標，再由計算機計算之多重介質模型 (multi media model) 均有。

關於後者，通常由實驗室得到單一種之急性毒性資料，再來預測在自然界之無作用濃度，目前則使用一種應用係數 (Application factor)。此數值因研究者不同而異，約為 100~1,000。OECD 自 1990 年開始，在有害性評價之計畫中，對此點亦重新加以檢討中。

4. 結 論

OECD 現在仍在召集各國之專家，以從事指導方法之開發，並對解釋既得資料之有害性評價方法進行探討。其主要目的乃在針對化學品安全性的事前審查，以及以大多數化學物質為對象所進行試驗之費用和期間的縮短，其次受到保育動物的影響亦甚大。

OECD 的既有成果，其利用面不僅加盟國可享受到，開發中國家和東方的國家也都可加以利用，希望大家今後能多關心 OECD。(黃登福譯)