

別添

<微生物等による化学物質の分解度試験>

適用範囲

ここでは、微生物等による化学物質の分解度試験の標準となるべき方法について規定する。

用語

この試験法において使用する用語は、日本工業規格（以下「JIS」という。）において使用する用語の例による。

活性汚泥の調製

1 汚泥採集場所

全国的な地域分布を考慮の上、多種類の化学物質が消費、廃棄されるとみられる場所を中心に全国十カ所以上とする。

2 汚泥採集回数

年間4回とする。

3 汚泥採集方法

3 - 1 都市下水 下水処理場の返送汚泥 1L

3 - 2 河川、湖沼又は海 表層水 1L 及び大気と接触している波打際の表土 1L

4 調製

各所から集めた汚泥を一つの容器内で混合かくはんして静置したのち浮んだ異物を除去し、上澄液を No.2 ろ紙を用いてろ過する。ろ液の pH を水酸化ナトリウム又はりん酸で 7.0 ± 1.0 に調整し、培養槽に移してばっ気する。

5 培養

4によって得られた液のばっ気を約 30 分間止めたのち、全量の約 3 分の 1 量の上澄液を除去し、これと等量の 0.1% 合成下水^(注1)を加えて再びばっ気する。この操作を毎日 1 回繰り返す。培養温度は、 25 ± 2 とする。

(注1) 0.1% 合成下水

グルコース、ペプトン、りん酸二水素一カリウムおのおの 1g を水 1L に溶解し、水酸化ナトリウムで pH を 7.0 ± 1.0 に調整したもの

6 管理

培養段階での管理は、次の項目を点検し、所要の調製を行う。

6 - 1 上澄液の外観 活性汚泥の上澄液は透明であること。

6 - 2 活性汚泥の沈でん性 フロックが大きく、沈でん性がすぐれていること。

6 - 3 活性汚泥の生成状態 フロックの増加が認められない場合には 0.1% 合成下水の添加量又は添加回数を増やすこと。

6 - 4 pH 上澄液の pH は、 7.0 ± 1.0 であること。

- 6 - 5 温度 活性汚泥の培養温度は、 25 ± 2 であること。
- 6 - 6 通気量 上澄液と合成下水を交換する時点において、培養槽内の液中溶存酸素濃度が少なくとも 5mg/L 以上となるように十分通気すること。
- 6 - 7 活性汚泥の生物相 活性汚泥を顕微鏡（ $100 \sim 400$ 倍）で観察したとき、雲状のフロックとともに種々の原生動物が多数見られること。

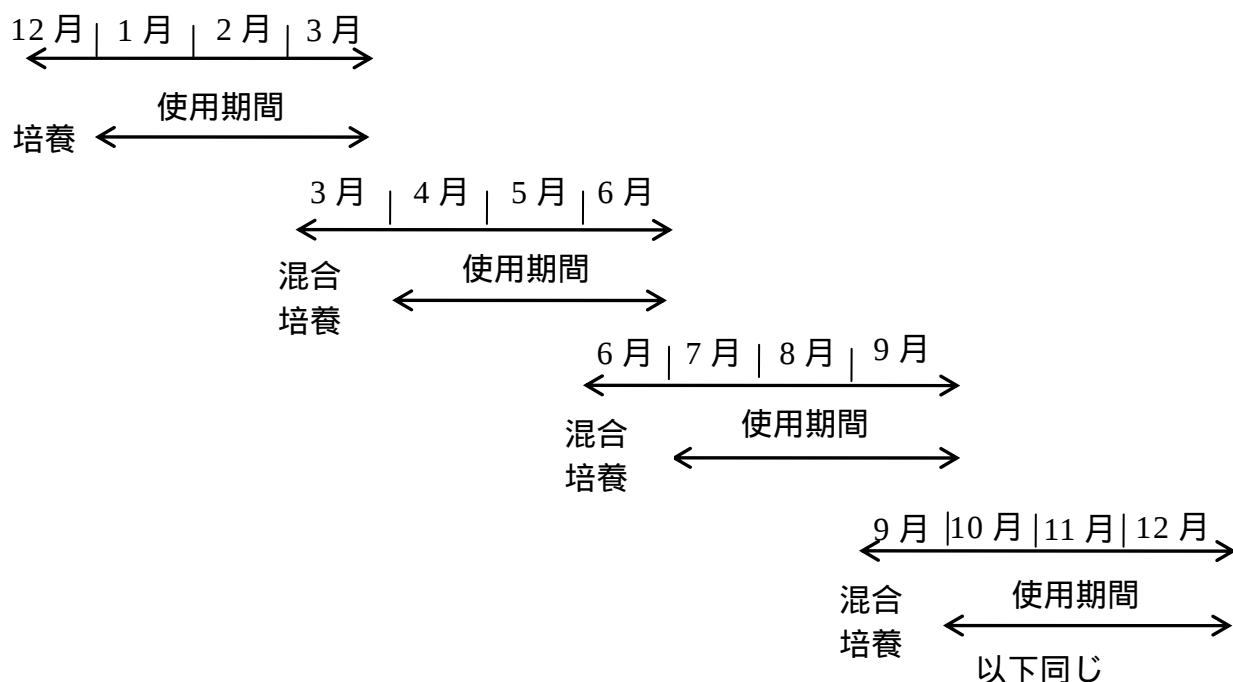
7 新旧活性汚泥の混合

新旧活性汚泥の均一性を保つため、現に試験に供している活性汚泥の上澄液のろ液と新たに採集してきた汚泥の上澄液のろ液との等量を混合し、培養する。

8 活性汚泥の活性度の点検

標準物質を用いて少なくとも 3 ヶ月に 1 回定期的に活性度を点検する。試験法は に準ずる。特に、新旧活性汚泥を混合したときは、旧活性汚泥との関連性に留意する。

[活性汚泥の調製と使用期間の例]



試験方法

1 分解度試験装置

閉鎖系酸素消費量測定装置

2 基礎培養基

JIS K0102-1998 の 21 で定められた組成の A 液、B 液、C 液及び D 液それぞれ 3 ml に水を加えて 1L とする。

3 被験物質の添加及び試験の準備

次の試験容器（各 300ml）を準備し、これらを試験温度に調整する。なお、被験物質が水に試験濃度まで溶解しない場合は、可能な限り微粉碎したものをうい、溶媒や乳化剤は使用し

ない。

- 3 - 1 水に被験物質が 100mg/L となるように添加したものを入れた試験容器 1 個
- 3 - 2 基礎培養基に被験物質が 100mg/L となるように添加したものを入れた試験容器 3 個
- 3 - 3 基礎培養基にアニリンが 100mg/L となるように添加したものを入れた試験容器 1 個
- 3 - 4 基礎培養基のみを入れた試験容器 1 個

4 活性汚泥の接種

3 - 2、3 - 3 及び 3 - 4 の試験容器に JIS K0102-1998 の 14.1 で定められた懸濁物質濃度が 30mg/L になるように活性汚泥を接種する。ただし、3 - 2 については必要な場合には接種の前に溶液の pH を 7.0 に調整する。なお、活性汚泥は合成下水を添加してから 18～24 時間後のものを使用する。

5 分解度試験の実施

遮光した条件のもとで 25 ± 1 で十分かきまぜながら一定期間^(注2)培養し、酸素消費量の変化を経時的に測定する。

一定期間培養した後、残留する被験物質と変化物を分析に供し、その量を測定する。被験物質が水に溶解する場合は、溶存有機炭素の残存量も測定する。

(注2) 通常は 28 日間とする。

6 試験結果の算出方法

6 - 1 試験条件の確認

試験終了時の被験物質の分解度の最大値と最小値の差が 20%未満であり、酸素消費量から求めた 3 - 3 のアニリンの分解度が 14 日後に 60%以上の場合は、この試験は有効とする。

6 - 2 酸素消費量から分解度 (%) を算出する方法

$$\text{分解度 (\%)} = \frac{\text{BOD} - \text{B}}{\text{TOD}} \times 100$$

BOD：被験物質の生物化学的酸素消費量 (測定値) (mg)

B：基礎培養基に活性汚泥を接種したものの酸素消費量 (測定値) (mg)

TOD：被験物質が完全に酸化された場合に必要とされる理論的酸素消費量 (計測値) (mg)

6 - 3 直接定量^(注3)から分解度 (%) を算出する方法

$$\text{分解度 (\%)} = \frac{S_B - S_A}{S_B} \times 100$$

S_A ：分解度試験終了後の被験物質の残留量 (測定値) (mg)

S_B ：水に被験物質のみを添加した空試験における被験物質の残留量 (測定値) (mg)

(注3) 直接定量による化学分析法

全有機炭素分析計を用いる場合

試験容器から試験液を適当量分取し、これを 3000G で 5 分間遠心分離又はろ過（0.45 μ m）し、その上澄液又はろ液から適当量を分取して全有機炭素分析計により残存する溶存有機炭素を定量する。

その他の分析計を用いる場合

試験容器内の内容物を被験物質等に適した溶剤により抽出、濃縮等適切な前処理を行った後分析機器等による定量分析を行う。この場合、原則として JIS に規定された分析法通則（ガスクロマトグラフ分析法、吸光光度分析法、質量分析法、原子吸光分析法等）に従い分析を行う。

結果のまとめ

試験の結果を様式 1 によりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

< 魚介類の体内における化学物質の濃縮度試験 >

適用範囲

ここでは、魚介類のうち特に魚類の体内における化学物質の濃縮度試験の標準となるべき方法について規定する。

用語

この試験法において使用する用語は、日本工業規格（以下「JIS」という。）において使用する用語の例による。

試験方法

1 被験物質の試験濃度の設定

次の方法により魚類の急性毒性試験を実施し、濃縮度試験における被験物質の試験濃度決定の参考とする。

1 - 1 供試魚

供試魚種は、ヒメダカ及びコイが推奨されるが、濃縮度試験に用いる魚種及び次の基本条件を考慮して他の魚種を用いてもよい。水温、餌、取扱い等、実験室内の飼育管理条件に適していること、及び大きさがそろい、健康であり、一度に多数得られること等である。病気又は外観や行動に異常のあるものは、供試魚としない。

1 - 2 急性毒性試験の実施（LC₅₀測定）

本通知で定められた魚類急性毒性試験、JIS K0102-1998の71.で定められた方法又はOECDテストガイドライン203で定められた方法に準じて急性毒性試験を実施する。

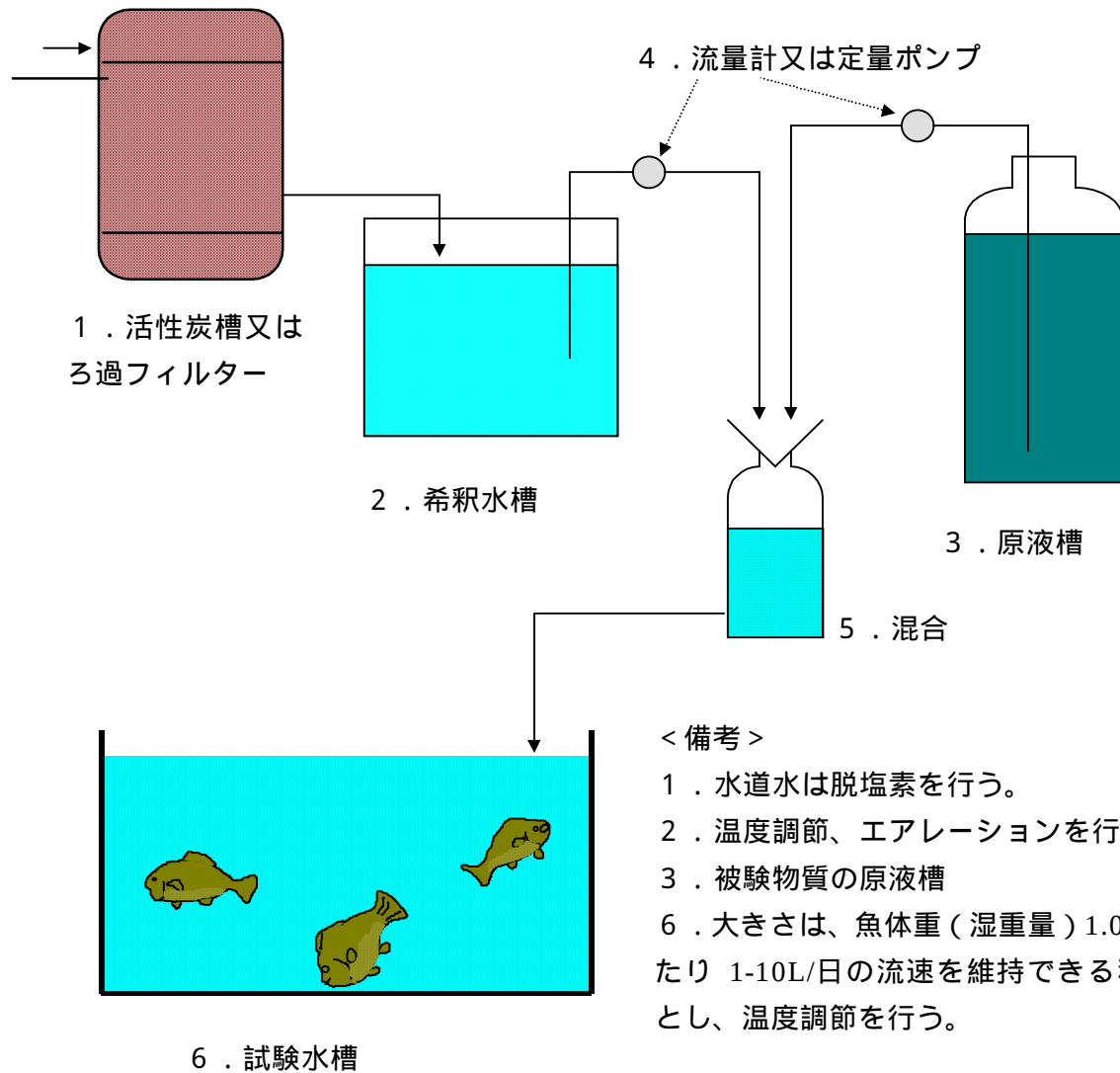
2 濃縮度試験の実施

この試験は、流水状態で行い、被験物質が魚体内に濃縮される度合いを調べる。

2 - 1 装置及び器具

2 - 1 - 1 装置

概要は次のとおりとする。



2 - 1 - 2 試験水槽

試験水槽は、ガラス製の清浄なものであって供試魚の試験飼育に支障のない容量のものとする。

2 - 1 - 3 その他の器具

通水又は被験物質の希釈のために用いる器具は、可能な限りガラス、テフロン®あるいはステンレススチール製の清浄なものとし、軟質プラスチック配管の使用は最小限とし、連結部等のやむを得ない箇所に限る。

2 - 2 供試魚

コイ又はヒメダカが推奨されるが付表 1 に示されている他の魚種を使用してもよい。その試験手順は適切な試験条件を設定し、これに適合させなければならない。この場合、魚種と試験方法の選択の根拠は報告すること。

各試験において、体重の最小値が最大値の2/3より小さくならないようにできるだけ均一な体重の魚を選ぶ。すべての魚は同じ年齢で同じ供給源の方がよい。

付表 1 試験に推奨される魚種

推奨される種類	試験温度の推奨される範囲 ()	試験生物の推奨される全長 (cm)
ゼブラフィッシュ (Zebra-fish) <i>Danio rerio</i> (コイ科)	20-25	3.0 ± 0.5
ファットヘッドミノー (Fathead minnow) <i>Pimephales promelas</i> (コイ科)	20-25	5.0 ± 2.0
コイ (Common carp) <i>Cyprinus carpio</i> (コイ科)	20-25	8.0 ± 4.0
ヒメダカ (Ricefish) <i>Oryzias latipes</i> (ヒメダカ科)	20-25	3.0 ± 2.0
グッピー (Guppy) <i>Poecilia reticulate</i> (カダヤシ科)	20-25	3.0 ± 1.0
ブルーギル (Bluegill) <i>Lepomis macrochirus</i> (サンフィッシュ科)	20-25	5.0 ± 2.0
ニジマス (Rainbow trout) <i>Oncorhynchus mykiss</i> (サケ科)	13-17	8.0 ± 4.0

2 - 3 蓄養及びじゅん化

供試魚は、適切な蓄養池で育養し、病魚、衰弱している魚又はその他の異常のある魚を除去する。その後に、必要に応じて薬浴及び投薬により外部及び内部の寄生性病原生物を駆除し、体調を整え、殺菌消毒後じゅん化槽へ移す。蓄養した魚群を48時間観察し、その後少なくとも2週間じゅん化する。その間、試験期間（2 - 5 - 5に示す）中に使用されるのと同じタイプの餌を十分に与え続ける。

48時間の観察期間に続いて、じゅん化期間中の死亡率を記録し、適用される基準を以下に示す。

- ・ じゅん化期間中の連続した7日間で全体の死亡率が10%を超えた場合、試験に使用しない。
- ・ じゅん化期間中の連続した7日間で全体の死亡率が5-10%の間の場合、7日間延長してじゅん化する。
- ・ じゅん化期間中の連続した7日間で全体の死亡率が5%より低い場合、試験に使用できる。もし、その後の7日間で全体の死亡率が5%より高くなった場合には試験に使用しない。

病気の魚は試験に使用しない。試験前2週間あるいは試験中、魚に対し薬浴等の処置はしない方がよい。

2 - 4 給餌

じゅん化及び試験期間中、魚を健全な状態に保ち、かつ、体重を維持するために十分な量の脂質や総蛋白質含量がわかっている適切な餌を与える。給餌量は1日に体重の約1-2%程度とし、じゅん化及び試験期間中に毎日餌を与える。試験期間中、水槽中の有機物濃度をできるだけ低く保つために、食べ残しの餌や排泄物は、1日1回程度取り除き、水槽をできるだけきれいにしておく。

2 - 5 試験の実施

2 - 5 - 1 試験用水

試験用水は汚染されていない均質な水質の水源から得られる天然水又は脱塩素した水道水とし、選択した魚種がじゅん化及び試験期間中に異常な外観や挙動を示さずに生存できる水質でなければならない。

2 - 5 - 2 被験物質溶液

適切な濃度の被験物質の原液を調製すること。原液は被験物質を試験用水中で単純に混合又は攪拌することで調製することが望ましい。溶剤又は分散剤（助剤）の使用は推奨できないが、適切な濃度の原液を調製するために使用してもよい。

使用可能な溶剤として、エタノール、メタノール、エチレングリコールモノメチルエーテル、エチレングリコールジメチルエーテル、ジメチルホルムアミド、トリエチレングリコール、ジメチルスルホキシドなどがある。

使用可能な分散剤として、Cremophor®RH40、Tween®80、NIKKOL®HCO-40などがある。生分解性のある試薬を用いる場合、バクテリアの増殖をもたらすので注意を払った

方がよい。

流水式試験では、試験水槽に被験物質の原液を連続的に供給、希釈するシステムが必要である。少なくとも1日に各試験水槽の5倍量の試験用水を流すことが好ましい。流水式が推奨されるが、流水式が不可能な場合（試験生物に有害な影響を与える場合）には、試験液を定期的に交換する半止水式を使用してもよい。

被験物質は放射性同位元素により標識してもよい。

2 - 5 - 3 試験濃度

流水条件下で、少なくとも2濃度区の被験物質に供試魚を暴露する。通常、被験物質濃度の高い方（又は最高濃度）を被験物質の LC_{50} 値（定められた暴露期間に供試魚の50%を死亡させる被験物質濃度）の約1/100以下となるように選択し、かつ、用いる分析法において分析が可能な限り低い2濃度区を設定する（一方は、他方の10倍の濃度）^{（注1）}。 LC_{50} 値の1/100という基準で設定した被験物質濃度が分析の検出下限から判断して測定が不可能であれば、10倍より小さい濃度比で行うか、放射性同位元素で標識した被験物質を使用してもよい。被験物質の水溶解度以上の濃度は使用しない方がよい。

助剤を使用する場合、その濃度は0.1 ml/Lを超えるべきではない。試験水中の有機炭素の全含有量に対する助剤の寄与を（被験物質と共に）把握しておく。しかしながら、そのような物質の使用を避けるよう努力する。

対照区は、助剤が供試魚に影響を与えないことが立証されていれば、試験用水のみの対照区又は使用した助剤を含んだ対照区を試験系に加えて実施する。もし立証されていなければ、両方の対照区を実施した方がよい。

（注1） 1 - 2 で求めた LC_{50} 値の1/100、1/1000、1/10000の濃度のうち分析が可能な限り低い方の2濃度区が参考となる。

2 - 5 - 4 試験温度及び照明

温度は、供試魚に適したものとし（付表1参照）、その変動は ± 2 未満とする。照光時間は12から16時間 / 日が推奨される。

2 - 5 - 5 試験期間

濃縮倍率を被験物質の水中濃度に対する魚体中濃度の比（ BCF_{ss} ）、あるいは取込速度定数に対する排泄速度定数の比（ BCF_K ）のいずれか、又は両方から算出するとして以下の期間を設定する。

(1) 取込期間

取込期間は、28日間又は定常状態に達するまでとする。もし28日間で定常状態に達しなければ、取込期間は追加測定を行いながら定常状態に達するまでか60日間かどちらか短い方まで期間を延長する。

48時間以上の測定間隔で連続した3回の測定における濃縮倍率の変動が20%以内の場合に定常状態に達したとみなす。（濃縮倍率が100未満の場合、濃縮倍率の変動が20%

以上であっても28日目には定常状態に達しているとみなしてもよい。)

(2) 排泄期間

濃縮倍率を BCF_K で求める場合、取込期間の終了後、排泄期間を設ける。排泄期間は取込期間に続いて被験物質を含まない清浄な水槽に供試魚を移し、開始する。

排泄期間は、定常状態における魚体中濃度の5%未満に到達するまでの期間とすることが望ましい。もしこの条件に到達するまでに必要とされる期間が長い場合は、半減期を求めることが可能な期間とする。

濃縮倍率を BCF_{SS} のみで算出する場合でも、 BCF_{SS} が1000以上の場合には排泄期間を設けることが望ましい。

2 - 5 - 6 操作

2 - 1 の装置及び器具を使用し、2 - 3 の判定に合格した供試魚を用いて2 - 5 - 1 ~ 5 の条件下で試験を実施する。

供試魚を試験水槽に移す前に、被験物質を設定濃度になるように加え、水槽中の試験液が十分に換水されてから、被験物質を定量するために、試験水槽から試験水を採取する(例えば取込試験を始める24時間前)。ただし、濃縮倍率を BCF_{SS} のみで算出する場合においては、供試魚を水槽に移した後に被験物質を徐々に加え、水槽中の試験水が十分に換水されてから試験水分析を実施してもよい。取込期間の間、試験の有効性についての基準(2 - 6 参照)に対応していることを確認するために、少なくとも供試魚の採取と同時に、給餌前に試験水槽から試験水を採取し、被験物質の濃度を測定する。排泄期間(排泄試験を実施する場合)においては、試験水分析は行わない。

なお、試験期間中は、供試魚の排泄物、水槽壁の汚れ等を1日1回程度除去する。

2 - 6 試験の有効性

試験を有効なものとするために、次の条件を適用する。

- ・ 温度変動は ± 2 未満であること。
- ・ 溶存酸素濃度は、飽和酸素濃度の通常60%以下にならないこと。
(揮発性物質用水槽などエアレーションができない場合には、流速を上げるなどの対策を講じ、溶存酸素濃度を維持する。そのために講じた対策を報告書に記述する。)
- ・ 流水式及び半止水式のいずれの場合も、水槽中の被験物質濃度の変動は、取込期間中の測定値の平均に対して $\pm 20\%$ 以内に保たれること。
(濃縮倍率が極めて高い場合には取込期間中の被験物質濃度の変動が大きくなる場合がある。この場合には、定常状態における被験物質濃度の変動が測定値の平均に対して $\pm 20\%$ 以内に保たれること。)
(揮発性物質の試験においては、気相を少なくした揮発性物質用水槽を使用するなどの適切な対応を行う。)
- ・ 死亡又は病気などの異常は、対照区及び試験区の魚において試験終了時に10%未満であること。試験が数週あるいは数ヶ月延長になった場合には、死亡又は異常は、対照区及び

試験区で1ヶ月間で5%未満かつ全期間で30%を超えないこと。

2 - 7 供試魚と試験水の分析

2 - 7 - 1 供試魚と試験水のサンプリングスケジュール

少なくとも取込期間中に5回、また排泄試験を実施する場合には排泄期間中に4回、供試魚を採取する（解説8参照）。必要であれば追加のサンプルを保存しておき（2 - 7 - 2参照）、一連の分析結果が、要求される精度のBCFを計算するのに不適切であることが判明したときにのみ、それらを分析する。

2 - 7 - 2 サンプリングとサンプルの前処理

分析のための試験水を、例えば試験水槽の中心から不活性チューブを通して吸い取り採取する。

各サンプリング時には各試験水槽から適切な数の魚（通常、最低4尾）を取り上げ、これらの体重を測る。

2 - 7 - 3 供試魚試料の分析

被験物質の濃度は個々の魚ごとに測定する。個体が小さくて個体ごとの分析が困難な場合には、各サンプリング時における個体をまとめて行ってもよい。この場合、2群以上とすることが望ましい。

試験の前後に供試魚と同一の条件で飼育した魚の脂質含量を測定する。可能ならそれぞれのサンプリング時における魚の脂質含量を測定する。試験ごと又は魚のロットごとに脂質含量を測定してもよい。

2 - 8 試験結果の算出方法及び報告

2 - 8 - 1 結果の処理法

取込期間における魚体中の被験物質濃度を時間に対して作図することにより、定常状態における BCF_{ss} は魚体中濃度（ C_f ）と水中濃度（ C_w ）を用いて以下の式から計算する。

$$BCF_{ss} = \frac{\text{定常状態における } C_f \text{ (平均)}}{\text{定常状態における } C_w \text{ (平均)}}$$

また、濃縮係数(BCF_K)は2つの1次式（取込曲線及び排泄曲線）の係数、 k_1/k_2 の比として決定される。排泄速度定数(k_2)は、通常、排泄曲線から決定する（すなわち、時間における魚体中の被験物質濃度の減少の図）。取込速度定数(k_1)は、そのとき与えられた k_2 と取込曲線から得られた C の値から計算する。

$$\text{BCF}_K = \frac{\text{取込速度定数}(k_1)}{\text{排泄速度定数}(k_2)}$$

2 - 9 結果のとりまとめ

試験の結果を様式 2 によりとりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

試験法解説

1 供試魚

魚種を選択するための重要な基準は、すぐに入手でき手ごろなサイズが得られ試験所で十分飼育できることである。他の基準としては、娯乐的、商業的、生態的な重要性だけでなく、毒性に対する感受性等も考慮する。推奨される魚種は付表1に示されている。他の種も使用してもよいが、その試験手順は選択した魚種に適切な試験条件を用意して適合させなければならない。この場合、魚種と試験方法の選択の根拠を報告する。

蓄養及びじゅん化において、試験温度と蓄養池の水温に差がある場合には次の(1)又は(2)の方法によりじゅん化水槽中でじゅん化し、この間に、エラや皮膚の損傷している供試魚あるいは衰弱していたり疾病にかかっている供試魚は除去する。なお、蓄養池及びじゅん化水槽は流水とすることが望ましい。

- (1) 試験温度が蓄養池の水温より高い場合は、蓄養池の水温より5℃以内高い温度で1日以上ならし、その後1日3℃以内ずつ順次昇温し、最終的に試験温度と同一温度で5-7日間飼育する。
- (2) 試験温度が蓄養池の水温より低い場合は、蓄養池の水温より3℃以内低い温度で1日以上ならし、その後1日2℃以内ずつ順次降温し、最終的に試験温度と同一温度で7-10日間飼育する。各サンプリング時に1濃度区あたり最低4尾のサンプルとなるような魚の尾数を選択する。

成魚を使用する場合、雄か雌かどちらかあるいは両方を使用するのかを報告する。

各試験において、体重の最小値が最大値の2/3より小さくならないように均一の体重の魚を選ぶ。ただし、魚の重さを直接測ることは困難なので目視により全長を観察し選別してもよい。すべての魚は同じ年齢で同じ供給源の方がよい。魚の体重や年齢は、時々BCF値に重要な影響を与えることがあるので、それらの詳細を正確に記録する。試験の前に予備的に魚の平均体重を測ることが推奨される。

2 試験用水

被験物質及び助剤を含まない試験に用いる水を試験用水と定義する。試験用水は、一般的に天然水が使用され、汚染されていないこと、均質であることなどが要求される。脱塩素した水道水でもよい。pHは6.0から8.5の範囲に保ち、かつ試験期間中の変動幅は±0.5の以内とする。

選択した魚種がじゅん化及び試験期間中に異常な外観や挙動を示さずに生存できる水質でなければならない。試験用水を採取し付表2に示す項目を確認することにより、試験用水が試験結果に不当に影響（被験物質の錯化による影響など）を与えないこと、又は魚の活動に有害な影響を与えないことを保証してもよい。水質が少なくとも1年以上一定であることが実証されているならば、測定の頻度を減らし、かつ、その間隔をあけることができる（例えば6ヶ月ごと）。

付表2の上限濃度についてはOECDテストガイドラインなどを参照するが、その濃度が実現

困難な場合は、使用する試験用水で供試魚が飼育可能なことをあらかじめ確認すること。

被験物質の魚体への取込を阻害するような有機物への被験物質の吸着を避けるために、試験用水中の全有機炭素（TOC）だけでなく天然粒子の含量もまた可能な限り低減する。必要ならば、試験用水を使用前にろ過してもよい。供試魚の排泄物や餌の残渣に由来する有機炭素含量は可能な限り低くする。

試験開始時に魚を加えることによる C_w 低下を最小限にするため、及び溶存酸素濃度の低下を避けるために、流速の尾数に対する比を高くする。流速は使用される魚種によって適切なものにする。各場合において、流速は魚体重（湿重量）1.0gあたり1-10L/日になることが標準的に推奨される。被験物質濃度変動を設定値の $\pm 20\%$ 以内で維持するため、及び溶存酸素濃度が飽和酸素濃度の60%以下とならないようにするために流速を大きくする。

付表2 測定しておくことが望ましい試験用水の水質項目

1	浮遊物質	2 1	遊離塩素
2	全有機炭素量	2 2	臭化物イオン
3	化学的酸素要求量（COD）	2 3	フッ素化合物
4	全リン	2 4	硫化物イオン
5	pH	2 5	アンモニウムイオン
6	大腸菌群	2 6	亜硝酸態チッ素
7	水銀	2 7	ヒ素
8	銅	2 8	陰イオン界面活性剤
9	カドミウム	2 9	セレン
1 0	亜鉛	3 0	蒸発残留物
1 1	鉛	3 1	電気伝導度
1 2	アルミニウム	3 2	全硬度（ CaCO_3 として）
1 3	ニッケル	3 3	アルカリ度
1 4	クロム	3 4	ナトリウム
1 5	マンガン	3 5	カリウム
1 6	スズ	3 6	カルシウム
1 7	銀	3 7	マグネシウム
1 8	コバルト	3 8	有機塩素系農薬
1 9	鉄	3 9	有機リン系農薬
2 0	シアン化合物		

3 被験物質溶液

流水式試験では、試験水槽に被験物質の原液を連続的に供給、希釈するシステムが要求される。少なくとも1日に各試験水槽の5倍量の試験用水を流すのが好ましい。流水式が奨励され

るが、流水式が不可能な場合（試験生物に有害な影響を与える場合）には、試験液を定期的に交換する半止水式を使用してもよい。

原液と試験用水の流速は、試験開始の48時間前と試験期間中は少なくとも毎日確認する。各試験水槽ごとの流速の測定と水槽間及び一つの水槽内で流速に20%以上の変動がないことを併せて確認する。

原液は被験物質を試験用水中で単純に混合又は攪拌することで調製することが望ましい。溶剤や分散剤（助剤）の使用は推奨できないが、適切な濃度の原液を調製するために使用してもよい。

付表 3

濃縮度試験に用いられる溶剤や分散剤の48時間LC₅₀値（mg/L、w/v）

溶 剤		分 散 剤	
メチルアルコール	16,200	HCO-10	5,300
エチルアルコール	12,000	HCO-20	>50,000
アセトン	11,200	HCO-40	>100,000
ジメチルホルムアミド	9,800	HCO-50	>100,000
ジメチルスルホキシド	33,000	HCO-100	>100,000
テトラヒドロフラン	3,800	Tween-40	2,800
1,4-ジオキサン	7,200	Tween-80	50,000
エチレングリコールジメチルエーテル	21,500	SPAN-85	1,000
エチレングリコールモノメチルエーテル	22,000		

魚：ヒメダカ 水温：25

HCO：ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油

4 試験水

試験用水に被験物質あるいは助剤を加えた水を試験水と定義する。試験期間中、試験水の水质を一定に保つ。試験水は少なくともpH、溶存酸素濃度、温度を測定する。

5 照明及び温度

照光時間は通常12から16時間であり、温度は供試魚に適したものとする。照明の種類と特徴を把握しておく。試験における照明条件下では被験物質の光分解の可能性があるので注意すること。人工的な光反応生成物の魚への暴露を避けるために適切な照明を使用する。場合によっては、290nmより低波長のUV照射を遮蔽する適切なフィルターを使用してもよい。

6 取込期間の長さの予測

排泄速度定数（ k_2 ）の見積り及び定常状態に対するある割合に達するために必要な時間は、 k_2 とオクタノール - 水間の分配係数(Pow)又は k_2 と対水溶解度(s)間の経験的な関係から試験

を開始する前に得ることができる。

例えば、以下の経験式^(注2) から k_2 (日⁻¹) の見積りを得ることができる。

$$\log_{10} k_2 = -0.414 \log_{10}(\text{Pow}) + 1.47 \quad (r^2 = 0.95) \quad [\text{式1}]$$

又は、Kristensenの式を用いる^(注3)。

もし分配係数(Pow)が未知の場合、被験物質の対水溶解度(s)から見積ることができる^(注4)。

$$\log_{10}(\text{Pow}) = -0.862 \log_{10}(s) + 0.710 \quad (r^2 = 0.994) \quad [\text{式2}]$$

ここで s = 対水溶解度(mol/L):(n=36)

これらの関係式はPow値が2から6.5の間にある化学物質に対してのみ適用される^(注5)。

定常状態に対して一定の割合に達する時間は、見積った k_2 を用いて、取込と排泄を記述する一般的な速度式 (1次の速度式) から得ることができる。

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_f$$

C_w が一定ならば

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{式3}]$$

定常状態に近づくと ($t \rightarrow \infty$)、式3は以下のように近似できる^(注6, 7)。

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w$$

すなわち

$$C_f / C_w = k_1 / k_2 = \text{BCF}$$

ここで $k_1 / k_2 \cdot C_w$ は定常状態における魚体中濃度 ($C_{f,s}$) に近づく。

式3は次のように書き換えられる。

$$C_f = C_{f,s} \cdot (1 - e^{-k_2 t})$$

すなわち

$$\frac{C_f}{C_{f,s}} = 1 - e^{-k_2 t}$$

[式4]

式1又は2を用いて k_2 を見積っておくと、式4を用いて、定常状態に対する一定の割合に達するまでの時間を予測することができる。

統計的な基準を満たしたデータ(BCF_K)を得るための統計的に最適な取込期間の長さは、時間に対してプロットされた魚体中の被験物質濃度の対数値の曲線において、その中間点、又は $1.6/k_2$ 、又は定常状態の80% ($3.0/k_2$ あるいは定常状態の90%以上は不可)に達するまでの期間である^(注8)。

定常状態の80%に達する時間は式4から

$$0.80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}}$$

すなわち

$$t_{80} = \frac{1.6}{k_2}$$

[式5]

同様に定常状態の95%に達する時間は次のようになる。

$$t_{95} = \frac{3.0}{k_2}$$

[式6]

例えば、logPow= 4 の被験物質に対する取込期間の長さ (up) は式1, 5及び6を用いると以下ようになる。

$$\begin{aligned} \log_{10} k_2 &= -0.414 \cdot (4) + 1.47 \\ k_2 &= 0.652 \text{ days}^{-1} \\ \text{up}(80 \text{ pct}) &= 1.6/0.652、すなわち 2.45 \text{ 日 (59時間)} \end{aligned}$$

又は

$$\text{up}(95 \text{ pct}) = 3.0/0.652、すなわち 4.60 \text{ 日 (110時間)}$$

同様に、 $s = 10^{-5} \text{ mol/L}$ ($\log(s) = -5.0$) の被験物質に対する取込期間の長さは式1, 2及び式5, 6を用いると以下ようになる。

$$\begin{aligned}\log_{10}(\text{Pow}) &= -0.862 \cdot (-5.0) + 0.710 = 5.02 \\ \log_{10} k_2 &= -0.414 \cdot (5.02) + 1.47 \\ k_2 &= 0.246 \text{ days}^{-1} \\ \text{up}(80 \text{ pct}) &= 1.6/0.246, \text{ すなわち } 6.5 \text{ 日 (156時間)}\end{aligned}$$

又は

$$\text{up}(95 \text{ pct}) = 3.0/0.246, \text{ すなわち } 12.2 \text{ 日 (293時間)}$$

あるいは、次式で定常状態に達するまでの時間を計算することができる^(注8)。

$$t_{eq} = 6.54 \times 10^{-3} \text{Pow} + 55.31 \text{ (hours)}$$

7 排泄期間の長さの予測

排泄期間は、定常状態の5%未満に到達するまでの期間とする。もし定常状態の5%未満に到達するまでに要求される時間が非現実的な程長ければ、排泄期間は通常の取込期間の2倍以上（すなわち56日間以上）か、又はより短い期間を用いる（例えば、被験物質濃度が定常状態の10%未満になるまで）。しかしながら、1次式に従う単純なモデルより複雑な取込と排泄のパターンを持っている物質には、消失速度定数を求めるために排泄期間をより長くしてもよい。ただし、その期間は、魚体中の被験物質濃度が分析の検出下限値以上である期間によって左右される。

体内濃度が初濃度に対して一定の割合まで減少するために必要な時間の予測は、取込と排泄を記述する一般的な関係式（1次の速度式）から得ることができる^(注3, 9)。

排泄期間中は、 C_w はゼロと仮定されるので、式は次のように省略できる。

$$\frac{dC_f}{dt} = -k_2 \cdot C_f$$

すなわち

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t}$$

ここで $C_{f,0}$ は排泄期間開始時の濃度である。

50%排泄は以下の式で表される時間(t_{50})に達成される。

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

すなわち

$$t_{50} = \frac{0.693}{k_2}$$

同様に、95%排泄は以下の時間(t_{95})に達成される。

$$t_{95} = \frac{3.0}{k_2}$$

もし取込期間で80%の取込 ($1.6/k_2$) 及び排泄期間で95%の消失 ($3.0/k_2$) を設定する場合、排泄期間は取込期間の約2倍になる。

以上の算出は、取込と排泄パターンが1次式に従うという仮定に基づくものであることに注意する。もし明らかに1次式に従わないならば、さらに複雑なモデルを用いるべきである(注²)。

(注2) Spacie A. and Hamelink J.L.: Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.*, **1**, 309-320 (1982).

(注3) Kristensen P.: Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute (1991).

(注4) Chiou C.T. and Schmedding D.W.: Partitioning of organic compounds in octanol-water systems. *Environ. Sci. Technol.* **16**(1), 4-10 (1982).

(注5) Hawker D.W. and Connell D.W.: Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* **22**(6), 701-707 (1988).

(注6) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B.: *Transactions of the American Fisheries Society*, **104** (4), 785-792 (1975).

(注7) Ernst W.: Accumulation in Aquatic Organisms. In: Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals. Ed. by Sheehman P., Korte F., Klein W. and Bourdeau P.H., 1985 SCOPE, John Wiley & Sons Ltd., New York, Part 4.4 pp 243-255 (1985).

(注8) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W.: Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models, *Can. J. Chem. Eng.*, **55**, 614-622 (1977).

(注9) Konemann H. and Van Leeuwen K.: Toxicokinetics in Fish: Accumulation and Elimination of Six Chlorobenzenes by Guppies. *Chemosphere*, **9**, 3-19 (1980).

供試魚を加える前と取込期間及び排泄期間の間、被験物質を定量するために試験水槽から試験水を採取する。少なくとも供試魚のサンプリングと同時に、給餌前に試験水を採取する。取込期間の間、試験の有効性についての基準（2 - 6 参照）に対応していることを確認するために被験物質の濃度を測定する。

少なくとも取込期間に5回、排泄期間に4回、供試魚を採取する。簡単な1次の排泄速度式で表されない場合等は、このサンプル数に基づいてBCFの正確な計算値を算出することは困難であるので、両期間中により高い頻度でサンプルを採取することを勧める（付表4 参照）。2 - 7 - 2 で記述しているように必要であれば追加のサンプルを保存しておき、一連の分析結果が、要求される精度のBCFを計算するのに不適切であることが判明したときにのみ、それら进行分析する。

BCF_K を求めるための妥当なサンプリングスケジュールの一例を付表4に示す。95%取込までの暴露時間を計算するために、Powの計算値を使って容易に他のスケジュールを定めることができる。

取込期間の間、定常状態に達するまでか、あるいは28日間のどちらか短い期間サンプリングを続ける。もし28日間以内に定常状態に達しない場合は、定常状態に達するまでか、あるいは60日間のどちらか短い期間サンプリングを続ける。

取込期間の終了後、被検物質を含まない清浄な水槽に供試魚を移して排泄試験を開始する。

付表 4

logP_{ow}=4である物質の生物濃縮試験のためのサンプリングスケジュールの理論的な例

魚サンプリング	サンプリング時間スケジュール		水サンプルの数	1回のサンプルの魚の尾数
	最低限必要なサンプリング日(日)	追加のサンプリング日(日)		
取込期間	-1 0		2* 2	45-80尾加える
1 回目	0.3	0.4	2 (2)	4 (4)
2 回目	0.6	0.9	2 (2)	4 (4)
3 回目	1.2	1.7	2 (2)	4 (4)
4 回目	2.4	3.3	2 (2)	4 (4)
5 回目	4.7		2	6
排泄期間				被験物質を含まない水に魚を移す
6 回目	5.0	5.3		4 (4)
7 回目	5.9	7.0		4 (4)
8 回目	9.3	11.2		4 (4)
9 回目	14.0	17.5		6 (4)

* 水槽容量の最低3倍量の試験水を流した後で水をサンプリングする。

カッコ内の数値は追加のサンプリングを行う際の(水または魚の)サンプル数である。

注: logP_{ow} が4.0のときの予備的に求めた k_2 の概算値は0.652 1/日である。

全試験期間は $3 \times \text{取込期間} = 3 \times 4.6 \text{ 日}$ 、すなわち14日間となる。

9 サンプルングとサンプルの前処理

分析のための試験水を、例えば試験水槽の中心から不活性チューブを通して吸い取り採取する。その際、試験水の汚れをろ過や遠心分離により取り除かないようにする。高い脂溶性物質 ($\log P_{ow} > 5$ の物質) の場合には、汚れに吸着した被験物質も魚に取り込まれる可能性があるため、代わりに可能な限り水槽を清浄に保つための処理を行う。

各サンプルング時には試験水槽から適切な数の魚 (通常、最低4尾) を取り上げる。採取した魚を水で素早く洗い、水をふき取り、動物愛護の観点から最も適切な方法で直ちに屠殺し、体重を測定する。また、1g未満の小さい魚を使用し、まとめて分析する際には、可能な場合には、個別に測定する。

分解又はその他の損失を防ぐために、また試験を続行しながら大まかな取込速度及び排泄速度を計算するために、サンプルング後、直ちに供試魚と試験水を分析するのが好ましい。即時の分析は、平衡に達したかどうかの決定の遅延も避けることができる。

直ちに分析ができない場合は、適切な方法でサンプルを保存する。試験開始前に個々の被験物質の適切な保存方法、保存期間、前処理などに関する情報を得ておく。

10 分析方法について

全体の手順は被験物質に用いられる分析法の正確さ、精度及び感度に支配されるので、化学分析の精度及び再現性を実験的に確認する。同様に試験水及び供試魚から被験物質の回収が特定の方法に対して十分であることも確認する。また被験物質が試験用水中で検出されないことをチェックする。必要ならば、回収試験と対照区のバックグラウンド値によって C_w 、 C_f を補正する。汚染や損失 (例えば、サンプルング装置への吸着) を最小にするような操作を通して供試魚と試験水サンプルを処理する。

試験において放射性同位元素を使って標識した物質が使われる場合、全標識化物 (すなわち親物質と代謝物) の分析が可能である。

11 供試魚試料の分析

被験物質の濃度は重量測定された個々の魚ごとに測定する。もし個体が小さくて個体ごとの分析が困難な場合には、各サンプルング時における試料をまとめて行ってもよい。もし統計的手法及び検出力が重要な問題であれば、要求されるサンプルング数、手法及び検出力に適応するための適切な魚の尾数 (通常、最低4尾) が、試験の中に含まれるようにする。各サンプルング時における試料をまとめて分析する場合には、あらかじめ2群以上に分けて分析することが望ましい。

BCFは、全湿重量の関数で表現する。高い脂溶性物質の場合は、脂質含量の関数で表現してもよい。可能ならそれぞれのサンプルング時における魚の脂質含量を決定する。適切な手法を脂質含量の決定に使用すること。当面用いる方法としては、クロロホルム/メタノール抽出の技法が標準法として推奨される^(注10)。脂質はしばしばクロマトグラフィーで分析する前に抽出物から取り除かれるので、可能ならば脂質の分析は被験物質の分析のための抽出物と同じもので行われた方がよい。実験の終了時における魚の脂質含量 (mg/kg湿重量) は、

開始時の±25%以内とする。脂質濃度の基準を湿重量から乾重量に変換する場合のために、試験魚の乾燥重量比率（乾燥重量 / 湿重量）も報告した方がよい。

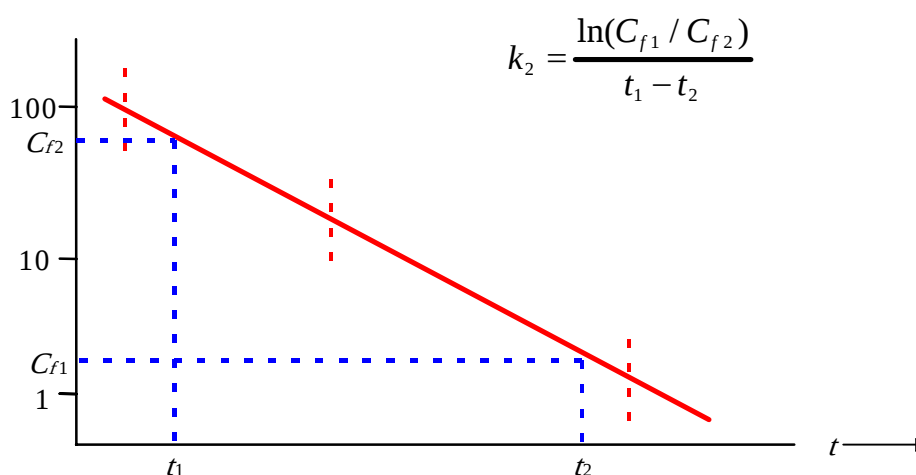
（注10） Gardner et al. : *Limnol. & Oceanogr.*, **30**, 1099-1105 (1995).

1.2 BCF_Kの算出方法

排泄期間中における魚体中濃度を片対数紙にプロットしたときの近似曲線が直線で示された場合、生物濃縮のデータが単純なモデルによつて的確に記述されることが合理的であると考えられる。（それらのポイントが直線により記述できない場合は、より複雑なモデルを使用すべきである。）

1.2 - 1 グラフによる排泄(消失)速度定数 k_2 決定のための方法

片対数グラフ上に、サンプリング時点でのそれぞれの魚体中被験物質濃度をプロットする。その直線の傾きが k_2 である。



直線からのはずれは、1次式よりもっと複雑な排泄のパターンを示している場合もあるので注意する。図による方法は、排泄が1次速度論からはずれている形式を解明するために利用できる。

1.2 - 2 グラフによる取込速度定数 k_1 決定のための方法

得られた k_2 から、次式より k_1 を計算する：

$$k_1 = \frac{C_f k_2}{C_w \times (1 - e^{-k_2 t})} \quad [\text{式1}]$$

C_f の数値は、対数濃度を時間に対してプロットして得られた取込曲線の中心点から読みとる。

1 2 - 3 コンピューターによる取込と排泄(消失)速度定数の計算方法

生物濃縮係数と k_1 及び k_2 の速度定数を得るためにより好まれる方法は、コンピューターによる非線形パラメータ推定法を用いることである。

それらのプログラムは、ひと組の連続した時間 - 濃度データから次のモデル式の k_1 及び k_2 を算出する：

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times (1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{式2}]$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times (e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t > t_c \quad [\text{式3}]$$

ここで t_c = 取込期間の終了時間。

このアプローチは、 k_1 及び k_2 の標準偏差の算出を併せて行う。

多くの場合 k_2 は相対的に高い精度で排泄曲線から求めることができる。同時に k_1 及び k_2 が算出される場合、強い相関が2つのパラメータ k_1 及び k_2 の間に存在するので、非線形回帰式を用いて、最初に排泄のデータだけから k_2 を計算し、その後を取込のデータから k_1 を計算することを勧める。

1 3 結果の解釈

試験液中の測定濃度が分析方法における検出下限に近いレベルである場合、結果は慎重に解釈すること。

生物濃縮データの精度がよければ、取込と消失（排泄）曲線は明瞭に描かれる。2濃度区間において取込 / 排泄の定数の変動は、20%より小さいこと。2濃度区間において観測された取込 / 排泄の速度が著しく相違する場合はこれを記録し、そして可能なら説明を行う。適切な計画に基づく試験の場合、BCFssの信頼限界は一般に±20%の範囲内に収まる。なお、濃縮倍率が高い場合は、部位別の濃縮倍率等を求めることが望ましい。

1 - オクタノールと水との間の分配係数測定試験

適用範囲及び試験方法

水に可溶で界面活性を有さない化学物質（有機金属化合物を除く。）の 1 - オクタノールと水との間の分配係数の測定は、原則として OECD テストガイドライン 107 若しくは日本工業規格 Z 7260 - 107（2000）「分配係数（1 - オクタノール/水）の測定 - フラスコ振とう法」又は OECD テストガイドライン 117 で定められた方法に準じて実施する。

結果のとりまとめ

試験の結果を様式 3 によりまとめ、最終報告書を添付するものとする。