

附属書 9

水生環境有害性に関する手引き

附属書 9
水生環境有害性に関する手引き

目次

	頁
A9.1 序	463
A9.2 調和された分類スキーム	467
A9.2.1 適用範囲	467
A9.2.2 分類区分および分類基準	467
A9.2.3 根拠	467
A9.2.4 適用	468
A9.2.5 データの利用可能性	469
A9.2.6 データの品質	469
A9.3 水生毒性	471
A9.3.1 序	471
A9.3.2 試験の説明	471
A9.3.3 水生毒性の概念	473
A9.3.4 証拠の重み	475
A9.3.5 試験困難な物質	475
A9.3.6 データの質の解釈	480
A9.4 分解性	481
A9.4.1 序	481
A9.4.2 分解性データの解釈	481
A9.4.3 解釈についての一般的な問題	486
A9.4.4 判定スキーム	488
A9.5 生物蓄積性	490
A9.5.1 序	490
A9.5.2 生物濃縮性データの解釈	490
A9.5.3 BCF および K_{ow} 値に関して特別な注意が必要な化学品クラス	494
A9.5.4 矛盾するデータおよびデータの欠如	496
A9.5.5 判定スキーム	496
A9.6 QSAR の使用	497
A9.6.1 経緯	497
A9.6.2 有害性の過小評価を起こす実験技術上の誤差	498
A9.6.3 QSAR モデル化の課題	498
A9.6.4 水生環境有害性分類への QSAR の使用	499
A9.7 金属および金属化合物の分類	503
A9.7.1 序	503
A9.7.2 分類への水生毒性データおよび溶解度データの適用	504
A9.7.3 環境における変換に関する評価	506
A9.7.4 生物蓄積性	506
A9.7.5 金属および金属化合物に関する分類基準の適用	507
付属資料 I 有機物質の分解性の測定	513
付属資料 II 水生環境中の分解性に影響する因子	519
付属資料 III 有機物質の BCF および K_{ow} 測定のための実験法および推定法の基本原理	523
付属資料 IV 有機物質の生物濃縮性に対する体外および体内要因の影響	529
付属資料 V テストガイドライン (試験指針)	531
付属資料 VI 参考文献	535

附属書9 水生環境への有害性に関する手引き¹

A9.1 序

A9.1.1 水生環境に有害な物質を特定するための判定基準のセットを開発するにあたり、環境に対する有害性を正しく定義するのに必要となる詳細な事項は、何らかの適切な手引きを必要とするであろう複合システムとなることが合意された。したがって、本文書の目的は以下の二つである；

- (a) このシステムがどのように機能するかについての説明と手引きを提供すること
- (b) 分類基準を適用する際に用いられるデータの解釈に対する手引きを提供すること

A9.1.2 有害性分類スキームは、本来有する特性を介した水生環境への危険性を有するような化学物質を特定することを目的として開発された。ここでは水生環境とは、淡水および海洋中の生態系、ならびにそこに生息する生物体と解釈される。ほとんどの物質について、入手できるデータの大部分はこの環境コンパートメントを扱っている。この定義は、適用範囲に水中底質、あるいは水中食物連鎖の頂点にある高位の生物がまだ含まれていないため、選択された判定基準である程度はカバーされているとはいえ、限界がある。

A9.1.3 適用範囲の点で限界はあるものの、このコンパートメントは多くの有害物質を最終的に受け入れる環境である点で無防備なものであり、そこに住む生物は高感受性であると広く理解されている。さらに、環境有害性の特定を追求するどのようなシステムでも、種または個体群中のそれぞれの個体に対するよりは、むしろ生態系に対するより広範な影響という意味での影響を特定することを追求せねばならないことから、このコンパートメントは複雑でもある。以下の各節に詳しく説明されるように、化学物質の有害性について最も適切に説明できる特定の性質の限定されたデータセットが選択されている。すなわち、水生毒性、分解性の欠如、および潜在的な、または実際の生物蓄積性である。これらのデータを水生有害性の判定の手段として選択する根拠については、A9.2節に詳述する。

A9.1.4 この段階では、判定基準の適用もまた化学物質に限定される。物質という用語は広範囲な化学品に対して用いられ、その化学品の多くは、柔軟性のない判定基準にもとづいた分類システムに対して困難な課題をもたらすものである。このため、以降の各節は、こうした課題に対して、使用経験と明確な科学的根拠にもとづいてどのように対処できるかについての、いくつかの手引きを与えるものである。調和された判定基準は決まった構造をもつ物質を分類するのに最も容易に適用できる（1.2節の定義を参照のこと）が、この区分の対象となる物質が「複合混合物」とされる場合もしばしばある。ほとんどの例では、こうした物質は炭素鎖の長さ/置換基の数または置換度が一定の範囲内にある一連の同族物質として特徴づけることができる。水生生物に対する本質的有害性、生物蓄積性および分解性を評価するためのデータが得られるように、試験のための特別な方法論が開発されている。こうした特性については別々の節で、より具体的な指針が示されている。本指針の目的にそって、こうした物質は「複合物」または「多成分物質」と呼ばれる。

A9.1.5 これらの各性質（すなわち、水生毒性、分解性、生物蓄積性）は専門家にとっても、解釈上複雑な問題を提起することがある。国際的に合意されたテストガイドラインが存在し、いかなる新規データにも採用されることになっているが、分類に使用できるデータの多くはこうした標準試験に従って作成されていないことがある。たとえ標準試験法が採用されていても、たとえば複合物、加水分解性不安定

¹ OECD Environment, Health and safety Publications, Series on Testing and Assessment, No 27, Environment directorate, Organization for economic Co-operation and Development, April 2001.

物質、ポリマー等のように、結果を分類スキームの範囲内で使用しなければならない場合に、解釈上複雑な問題を提起する物質もある。したがって、標準の、ならびに標準でない試験生物種、海水および淡水、様々な試験期間と多様なエンドポイントを採用したデータが入手できる。分解データには生物学的なものもあれば非生物学的なものもあり、環境との関連性も違うことがある。多くの有機化合物では、生物蓄積性はオクタノール/水分配係数で示すことができる。しかし、この生物蓄積性はその他多くの要因に影響されるので、こうした要因についても考慮することが必要となる。

A9.1.6 世界調和システムの明確な目標は、判定基準の共通セットに合意した上で、いったん分類されたら、その分類が世界的に受け入れられるように共通のデータセットも使用されるべきであるということである。これを実現させるためには、まず判定基準を適用するのに使用できるデータのタイプおよび質についての共通の理解、それゆえデータを判定基準に対して評価する場合の共通の解釈がなければならない。この理由により、判定基準の論理的基礎についての共通の理解およびデータ解釈への共通のアプローチが達成できるようなやり方で、判定基準を展開し説明することを追求する、透明性のある手引きの作成が必要であると感じられるようになった。「化学品の全領域」に調和システムを適用する場合、製造業者や供給業者自身による分類、すなわち必ずしも常に行政の監視を受けるとは限らないが、国境を越えて適用される分類に依存することが大きいので、こうした手引きは特に重要である。したがって本手引きは、読者に多くの重要な領域について情報を提供し、その結果として一貫性のあるやり方での分類に導き、真に調和された自律的なシステムを確立することを求めている。

A9.1.7 第一に、本手引きは判定基準に関する詳細な説明、選択された判定基準の論理的根拠、およびこのスキームが実際どのように機能するかについての概観を示す (A9.2 節)。この節では、データの一般的な入手源、信頼性の判定基準を適用する必要性、データセットが不完全な場合、またはデータセットが大きくて分類が多義的になる場合の分類の方法、およびその他一般的に遭遇する分類上の問題について述べる。

A9.1.8 第二に、本手引きは、非標準的なデータの使用を含めて、利用できるデータベースから得られるデータの解釈、および個々の性質に適用される特別な信頼性の判定基準について、詳細な専門的助言を示す。「試験困難物質」、すなわち標準的な試験法が適用されないか、または解釈上の困難を生じる物質におけるデータ解釈の問題について説明がなされ、適切な解決法についての助言が示される。本システムは、可能な限り、入手できる最も良い既存データおよび規制目的のために必要なデータに依存するので、試験よりむしろデータ解釈の方に重点がおかれる。核となる三つの特性、すなわち水生毒性 (A9.3 節)、分解性 (A9.4 節)、および生物蓄積性 (A9.5 節) は個別に取り扱う。

A9.1.9 解釈上の問題の範囲は広大となる可能性があり、その結果、つねに解釈は分類を担当する者の能力と専門知識に依存することになる。しかし、共通に起こる困難な問題をいくつか特定して、信頼できる一貫性のある結果を達成する手助けとなる、受け入れられる専門的判断を選び出す手引きを示すことは可能である。こうした困難な問題は以下に述べる、部分的に重複したいくつかの課題に分類できる。

- (a) 現行の試験手順をいくつかのタイプの物質に適用する際の困難
- (b) こうした「試験困難な」物質とその他の物質から得られたデータを解釈する際の困難
- (c) 広範囲な情報源から得られた多様なデータセットの解釈における困難

A9.1.10 有機物の多くについては、適切な OECD ガイドラインと分類基準を適用すれば、試験とデータ解釈に問題は何も起こらない。しかし、試験される物質のタイプによって性格づけられる、いくつかの典型的な解釈上の問題が存在する。これらは一般に「試験困難物質」と呼ばれている。

- (a) 難溶性の物質：これらの物質は、溶液の調製、濃度の維持および水生毒性試験中の濃度の維持と確認に問題を生じるため試験が困難である。その上、こうした物質について入手されるデータの多くは、水に対する溶解度を超える濃度の「溶液」を用いて作成されてきており、その結果、分類のための真の $L(E)C_{50}$ を決定する際に解釈上の大きな問題となる。水およびオクタノール中の溶解度が低く、分析方法の感度が十分でないことが加わる場合には、分配挙動の解釈もまた問題である。水に対する溶解度は測定が難しく、また単に検出限界より小さいと記録されていることも多く、水生毒性と生物蓄積性のいずれの試験でも解釈上の問題を起こす。生分解性の試験では、溶解度が低いと生物学的利用性が低くなり、予測される生分解速度より低くなることもある。したがって特別な試験方法または採用する手順の選択が極めて重要となり得る。
- (b) 不安定な物質：試験系内で速やかに分解（または反応）する物質もまた、試験上および解釈上の問題を生じる。正しい方法論が使われているか、試験されたのはその物質なのかまたは分解/反応生成物であるか、および得られたデータは親物質の分類に適しているかを判定する必要がある。
- (c) 揮発性物質：開放系で用いた場合に試験上の問題を生じることが明らかな物質は、暴露濃度を適切に維持して評価すべきである。方法によっては生分解性試験中の被験物質の濃度低下が避けられず、結果が誤って解釈されてしまうこともある。
- (d) 複合的または多成分物質：たとえば炭化水素混合物等の物質は、溶解して均一な溶液にできないことが多く、また多成分であるために濃度測定が不可能となる。したがって、水和性の分画 (WAFS) の水生毒性試験から得られたデータを使用すること、およびそうしたデータを分類スキームに利用することを検討する必要がある。混合物の各成分の挙動が異なる場合、生分解性、生物蓄積性、分配特性、および水に対する溶解性はいずれも解釈上の問題を生じる。
- (e) ポリマー：これらの物質は広範囲な分子量域を有し、その一部分しか水に溶けないことが多い。水に可溶な分画を測定する特殊な方法が使え、試験データを分類基準と対応させて解釈する際には、これらのデータを使用する必要がある。
- (f) 無機化合物および金属：媒体と相互作用しうる物質は、 pH や水の硬度等の要因によって、一定範囲の水生毒性を生じうる。あるレベルでは有益となるような必須元素の試験からも解釈上困難な問題が生じる。金属および無機金属化合物では、有機化合物に適用されるような分解性の概念は限定された意味、または無意味である。同様に、生物蓄積性データも注意して扱う必要がある。
- (g) 界面活性物質：これらの物質はエマルジョンを形成することがあり、注意を払って溶液を調製しても、その生物学的利用性を確認することは困難である。ミセルが形成されると、外見上「溶液」が調製された時にも、生物学的に利用できる分画を過大に推定する結果になる。これは、水溶性、分配係数、生物蓄積性および水生毒性試験のそれぞれで解釈上重大な問題となる。
- (h) 解離性物質：これらは、媒体中の対イオンのレベルによって、イオン化の程度が変化しうる。たとえば酸および塩基は、 pH によって著しく異なる分配特性を示す。

(i) 着色物質：これらは入射光を遮断するので、藻類/水生植物の試験では問題を生じる。

(j) 不純物：製造バッチ間で、含有率（%）や化学的特性が異なる不純物を含む物質もある。こうした不純物の毒性と水に対する溶解度のいずれかまたは両方が親物質のそれより大きい場合、解釈上の問題が生じ、毒性データに無視できない影響を及ぼす可能性がある。

A9.1.11 これらは、データの妥当性の確立、データの解釈、およびデータを分類スキームに適用する際に遭遇するいくつかの問題の代表例となる。これらの問題、および関連する事項をどう扱うかについての詳しい手引きを、以下の各節で述べる。水生毒性に関するデータの解釈については A9.3 節で扱う。この節は、上述の「試験困難物質」で遭遇する特別な解釈上の問題を扱っており、分類スキームにおいて、いつどのようにデータを使用できるかについての助言も与えている。さらに、用いる試験データの全般的な説明およびそのようなデータの作成に適した試験の方法論も扱っている。

A9.1.12 広範囲に及ぶ分解性データが入手可能であり、これらは急速分解性の判定基準に従って解釈されなければならない。このため、標準的でない試験法で得られたデータをどのように用いるかについての手引きが必要とされる。たとえば半減期が与えられた場合、あるいは一次分解、土壌中での分解速度などのデータの扱い方、ならびにそれらを水中での分解に外挿することの適切さ、および環境中での分解速度についての手引きがある。分類基準と関連して分解性を評価するための推定方法についての簡単な説明も含まれている。その手引きは A9.4 節に示す。

A9.1.13 生物蓄積のポテンシャルを測定できる方法は A9.5 節に記述される。この節では、分配係数の判定基準と生物濃縮係数（BCF）の関係を説明し、既存データの解釈に関する手引き、すなわち実験データが入手できない場合に QSAR を利用して分配係数を推定する方法を示し、そして特に試験困難な物質について上記で特定された問題を扱う。高分子量物質の取扱いで遭遇する問題についても述べる。

A9.1.14 QSAR を使用することについての一般的な問題、すなわち関心のある三つの特性それぞれについて、QSAR がいつどのように利用できるかを述べた節も含まれている。一般的なアプローチとして、実験データが入手できる場合には、QSAR データよりも実験データの方を使用すべきであることは広く受け入れられている。このため、QSAR データの利用は信頼できるデータが得られない場合のみに限られる。しかしすべての物質が QSAR による推定の利用に適しているというわけではなく、本手引きの A9.6 節でこの問題について取りあげる。

A9.1.15 最後に、金属および金属化合物の分類に関連する特殊な問題に一節が割かれている。明らかにこのような化合物については、生分解性およびオクタノール/水分配係数といった多くの特定の判定基準は適用できないが、分解による崩壊がないという原則や、生物蓄積は重要なコンセプトとして残される。したがって別のアプローチを適用する必要がある。金属および金属化合物は媒体との相互作用を受け、その媒体は金属イオンの溶解度や、水相との分配、および水相に存在する金属イオンの種類に影響する。水相で毒性が問題となるのは、一般に溶解している金属イオンである。物質と媒体との相互作用はイオンレベルを、ひいては毒性を増加することもあれば減少することもある。このため、金属イオンがその物質から生成されて水に溶け出すかどうか、もしそうなら、金属イオンは問題を生じるほど速やかに形成されるかどうかを検討することが必要である。このタイプの試験での結果を解釈するためのスキームは A9.7 節に示されている。

A9.1.16 本手引きは、広く多様な状況において判定基準をどのように適用するかに関する有用な助言を与えてはいるが、それでも単なる手引きに過ぎない。分類の際に生じるあらゆる状況を網羅することは望めない。したがって、これはシステムの基本的な原則、たとえばリスクベースよりも有害性ベースをまた確定された判定基準の一部について説明しているにすぎない、変更の可能性のある文書とみなさなければならない。さらに本手引きは、見かけでは確定している判定基準でも広く多様な非標準的状況に、適用できるようにする解釈を含んだ、スキームを使用する上で蓄積された経験の貯蔵所でもある。

A9.2 調和された分類スキーム

A9.2.1 適用範囲

EUの供給および使用システム、カナダおよび米国の殺虫剤システム、GESAMP 有害性評価手順、IMO 海洋汚染物質に関するスキーム、欧州道路鉄道輸送スキーム (RID/ADR) および米国陸上輸送等、既存の有害性分類システムを考慮して判定基準が策定された。これらのシステムには、化学物質の供給およびそれに続く使用、化学物質の海上輸送、ならびに道路および鉄道による化学物質輸送が含まれている。したがって、調和された判定基準はこれらすべてのシステムに共通のやり方で、危険有害性をもつ化学品を特定することを意図している。すべての異なった分野（輸送、供給および使用）についてのニーズを取り扱うために、2種類の異なったクラス、すなわち3つの区分から構成される急性クラス、および4つの区分から構成される慢性クラスを作成する必要がある。急性分類区分クラスは、包装された物品を考える場合には通常は使用しない2種類の急性有害性区分（急性区分2および3）についての規定を定めている。ばら積みで輸送される物質の場合、想定される量が大量であるために独自に生じてくる規制上の多くの決定がある。そうした状況では、たとえば使用する船舶のタイプについて決定が求められる場合、すべての急性毒性区分および慢性毒性区分を考慮することが重要であると考えられる。以下の各節でこうした有害性区分を定義するのに用いられる判定基準について詳しく説明する。

A9.2.2 分類区分および分類基準

急性および慢性水生毒性の有害性区分とそれに関連する判定基準は、4.1 章の 4.1.2.2、および図 4.1.1 に規定されている。

A9.2.3 根拠

A9.2.3.1 分類のための調和システムは、水生生物に対する本質的な有害性は、物質の急性毒性および慢性またはより長期の毒性の両方によって表されることを認めており、その相対的な重要性は、関係する特定の規制制度によって決まる。急性有害性と慢性有害性とは区別することができるので、有害性区分は、特定された有害性のレベルにおいて段階を示している両方の特性について定義される。慢性区分1と特定された有害性が慢性区分2によるものより重大であるのは明らかである。急性有害性と慢性有害性は明らかに異なったタイプの有害性を代表しているため、その相対的な重大さについて比較することはできない。物質の分類のためには両方の有害性クラスを独立に適用して、すべての規制システムの根拠を確立すべきである。

A9.2.3.2 判定基準によって定義された主要な有害性クラスは、慢性有害可能性に大きく関係している。これは環境中での化学物質に関する最優先の関心事を反映している。すなわち生じた影響は通常は致死レベル以下で、たとえば繁殖に対する影響、および長期暴露により生じる影響なのである。特に包装された物品については環境への放出が量的に限られるので、慢性有害性が主要な関心事であると認識されている一方、慢性毒性データは作成に経費がかかり、一般にほとんどの物質で容易には入手されないことも認めなければならない。他方、急性毒性データは容易に入手できることが多く、または高度に標準化されたプロトコールによって作成することができる。したがって、急性有害性も慢性有害性も定義する上で、中心的特性として利用されているのは急性毒性なのである。それでも、慢性毒性データが入手できる場合には、適切な有害性区分を定義するのに、これらを利用することが可能であると認識されている。こうしたデータを用いて特定の判定基準を策定することは、今後本スキームを発展させる上で極めて優先度が高い。

A9.2.3.3 急性毒性値それ自体は、有害性を立証するために単独かつ直接に使用しては、十分に正確な慢性毒性予測とはならないと認識されているが、生物蓄積性（すなわち $\log K_{ow} \geq 4$ 、ただし $BCF < 500$ でない場合）または長期暴露の可能性（すなわち急速分解性がない）のいずれかと組み合わせれば、分類の目的では適切な代用として使用できると考えられている。急性毒性を示し、有意な程度で生物蓄積性のある物質は、通常はかなりの低濃度で慢性毒性を示す。急性/慢性の比率を正確に予測するのが困難なので、この代用データは一般的に慎重な考え方に基づくものである。同様に、速やかに分解しない

物質には、長期暴露が生じる可能性が高くなり、この場合もまた、長期毒性が十分に考えられることになる。したがって、たとえば以下の判定基準に適合するなら、慢性区分1が指定されるべきである。

- (a) 適切な水生生物種に対する L(E)C₅₀ が 1mg/l 以下、かつ生物蓄積の可能性がある ($\log K_{ow} \geq 4$ ただし BCF < 500 でない)。
- (b) 適切な水生生物種に対する L(E)C₅₀ が 1mg/l 以下、かつ急速分解性がないこと。

A9.2.3.4 適切な生物種の急性毒性、急速分解性の欠如、および生物蓄積性についての正確な定義はそれぞれ A9.3 節、A9.4 節、ならびに A9.5 節で説明する。

A9.2.3.5 難溶性の物質は通常、水に対する溶解度が 1mg/l 未満の物質であるとみなされているが、これらの物質のなかに、溶解する限界濃度で実施された毒性試験で、急性毒性が発現しないものがある。しかし、こうした物質が BCF \geq 500、または BCF データがない場合に $\log K_{ow} \geq 4$ (生物蓄積性の可能性を示唆している) であり、さらにその物質が急速分解性ではない場合、慢性区分4という安全ネットの分類が適用される。このようなタイプの物質では、短期試験における暴露期間では短すぎて、試験生物種の体内で物質が定常状態濃度に到達しないことがある。このため、短期(急性)試験で急性毒性が認められなかったとしても、特に分解性が低いと水生環境中では暴露期間が延長されることになるので、急速分解性がなく生物蓄積性のある物質が慢性作用を生じる可能性を考える必要がある。

A9.2.3.6 急性水生毒性を決定する際に、水系生態系に存在しているすべての生物種を試験することは不可能である。したがって、ある範囲の栄養段階と分類群ごとに、代表する生物種が選ばれる。選択された分類群、すなわち魚類、甲殻類、および水生植物はほとんどの有害性プロフィールで「基本セット」になっており、有害性を十分に有効に表現するための最少のデータセットとなっている。入手された毒性値のうち最低の値が通常、有害性区分の決定に用いられる。環境中には広範囲な生物種が存在していることを考えれば、これら3種類の試験では不十分な代用データにしかなり得ず、したがって慎重を期すという意味で、最低値を有害性区分の決定に採用している。これを実施するにあたり、生物種の感受性の範囲は数種のオーダーにわたる可能性があること、したがってこれらの生物種より感受性が高い種も低い種も、環境中に存在していることは認識されている。このため、データが少ない場合には、試験した中で最も感受性の高い生物種を用いることで、慎重ではあるが受け入れられる有害性の定義が得られる。毒性の最低値を分類の根拠に用いることが適切でないかもしれない状況もある。これが該当するのは、たとえば大量のデータセットが入手されている場合等、通常よりも正確に感受性分布を決定できる場合である。このような大量のデータセットは相応の注意を払って評価すべきである。

A9.2.4 適用

A9.2.4.1 一般論として、ある物質を分類すべきかどうかを決定するには、以下のデータ項目について適切なデータベース、およびその他のデータ源を検索しなければならない。

- (a) 水に対する溶解性
- (b) オクタノール/水分配係数 ($\log K_{ow}$)
- (c) 魚類における生物濃縮係数 (BCF)
- (d) 急性水生毒性 (L(E)C₅₀)
- (e) 慢性水生毒性 (NOEC)
- (f) 入手された分解性データ (特に易生分解性の証拠)
- (g) 水中での安定性データ

水に対する溶解度および水中での安定性のデータは、判定基準では直接には用いられていないが、これらは他の特性のデータ解釈において貴重な参考データとなるので重要である (A9.1.11 節参照)。

A9.2.4.2 分類のためには、まず始めに入手された水生毒性データをレビューすべきである。入手されたすべてのデータを考慮して、分類に必要な品質基準に適合するデータを選択することが必要となる。国際的に標準化された方法において要求される品質基準に適合するデータが入手されていない場合には、分類が可能かどうかを決定するために、入手されているすべてのデータを検証する必要がある。データから溶解度の高い物質について急性水生毒性が $L(E)C_{50} > 100\text{mg/l}$ であることが示されたならば、その物質は有害であるとは分類されない。試験では影響が認められず、このため水生毒性が水に対する溶解値より大きい値と記録される、すなわちその試験媒体中での水に対する溶解度の範囲内では急性毒性はないとされるケースも多い。そのような場合に、試験媒体中での水に対する溶解度が 1mg/l 以上であれば、分類を適用する必要はない。

A9.2.4.3 水生毒性データの最低値が 100mg/l 以下の場合、第一にその毒性が該当するのはどの有害性区分であるかを決定し、次に慢性クラスまたは急性クラスを適用すべきかどうかについて判定する必要がある。これは単に、分配係数 $\log K_{ow}$ および分解に関して入手されたデータを検討することで達成できる。もし、 $\log K_{ow} \geq 4$ であるか、またはその物質は急速分解性がないと考えられるならば、適切な慢性有害性および対応する急性有害性区分が別々に適用される。ただし、 $\log K_{ow}$ は生物蓄積の可能性について最も容易に入手できる指標ではあるものの、実験的に求められた BCF の方が望ましいことに注意すべきである。 BCF が入手されているなら、分配係数でなくこちらを用いるべきである。そのような状況では、 $BCF \geq 500$ ということは適切な慢性有害性クラスに分類するのに十分な程度の生物蓄積性を示す。もしその物質が急速分解性で、かつ生物蓄積性が低い ($BCF < 500$ 、または BCF がなければ $\log K_{ow} < 4$) ならば、慢性有害性区分に指定すべきではなく、急性有害性区分だけを適用すればよい (A9.2.1 参照)。

A9.2.4.4 難溶性の物質、すなわち一般に試験媒体中での水に対する溶解度が 1mg/l 未満である物質で、水生毒性が認められていない物質については、慢性区分 4 を適用する必要があるかを判定するためにさらに検討を加えるべきである。たとえば、もしその物質が急速分解性でなく、かつ生物蓄積の可能性がある ($BCF \geq 500$ 、または BCF がなければ $\log K_{ow} \geq 4$) ならば、慢性区分 4 を適用すべきである。

A9.2.5 データの利用可能性

ある物質の分類に使用されるデータは、規制の目的に必要なデータ、および関連文献から導き出すことができるが、適切な出発点として利用できる国際的に認められた数々のデータベースも存在している。こうしたデータベースの品質や包括性には大きな差があり、どのデータベースでも単独では分類を行うのに必要な情報がすべて揃うわけではない。水生毒性を専門としているデータベースもあれば、環境運命に詳しいデータベースもある。化学品供給業者には、入手できるデータの規模と信頼性を判定するために必要な調査や確認をし、適切な有害性区分の指定にそのデータを用いる義務がある。

A9.2.6 データの品質

A9.2.6.1 入手されたデータの正確な使い方については、関連する節で説明するが、一般的な規則として、標準的な国際ガイドラインおよび GLP に準拠して作成されたデータは、他の種類のデータよりも望ましいとされている。しかし同様に、入手された最良のデータに基づいても分類できることを十分に認識することも重要である。したがって、上に述べた品質基準を満たすデータが入手できない時であっても、用いるデータが無効であると考えられない限り、分類をすることが可能である。このプロセスを支援するために、品質の得点付けガイドが策定されており、多くの場で広く用いられている。得点付けガイドは一般に以下の分類を充足している。

- (a) 公的データ源から得られたデータで、 EU 水質モニタリング、 $USEPA$ クライテリアなど、規制所管官庁により有用性を確認済みのもの。これらのデータは、分類の目的には有効であるとみなすことができる。しかし、これらが唯一の利用できるデータであると考えべきではなく、さらに関連報告書の日付に十分注意を払う必要がある。新たに入手できるデータがまだ考慮されていないこともある。

- (b) 国際的に承認されたガイドライン（例：OECD テストガイドライン）またはそれと同等の品質の国内ガイドラインから得られたデータ。以降の各節に掲げられたデータ解釈上の問題があることを留意事項として、こうしたデータを分類に用いることができる。
- (c) 上に述べたガイドラインに厳密には従っていないが、一般に容認された科学的な原則および手順に従っているデータ、または発表前に校閲されているデータ。こうしたデータについて、実験の詳細がすべて記録されていない場合、有効性の判定には何らかの判断が必要かもしれない。通常、こうしたデータは、分類スキームの中で用いられてもよい。
- (d) 標準的なガイドラインから著しく逸脱した、または信頼性がないと思われる試験手順により求めたデータは、分類に用いるべきではない。
- (e) QSAR データ。QSAR の使用状況および有効性については、関連の各節で議論する。
- (f) ハンドブック、総説、引用等のように、データの品質を直接には評価できない二次的な情報源から求めたデータ。データ品質(a)、(b)および(c)からのデータが入手できない場合に、こうしたデータが使えるかどうかを判断するため精査すべきである。こうしたデータは、その品質が評価できる程度に詳細である必要がある。これらのデータを分類目的に受け入れることが可能かどうかを判断するには、データ品質に影響しているかも知れない試験中の問題および報告された結果の有意性について、特定された有害性のレベルに関し、十分な考慮を払うべきである（A9.3.6.2.3を参照）。

A9.2.6.2 分類は不完全な毒性データセットに基づいてなされることもある。たとえば3つの栄養段階すべてについてのデータが入手できない場合である。このようなケースでは、分類は「暫定的」であるとみなされ、入手される追加情報の入手が必要になる。一般に、入手されたすべてのデータが、分類を決定する前に考慮される必要がある。品質の良いデータが入手できない場合には、より品質の劣るデータでも考慮する必要がある。そのような状況では、真の有害性レベルについての判断がなされる必要がある。たとえば、特定の生物種または分類群に関して良品のデータが入手されている場合、同じ種または分類群について得られるかもしれない、他の品質の劣るデータに優先して、そうしたデータを採用すべきである。しかし、栄養段階すべてについての基礎的なデータセットに、必ずしも良品のデータが揃っているとは限らない。良品のデータが入手されていない栄養段階については、品質が劣るデータを検討することが必要となろう。しかし、こうしたデータを考慮するには、有効な結果に達する可能性に影響したと思われる問題についても考える必要がある。たとえば、加水分解性の不安定な化学物質のデータなど、試験の詳細および実験の設計が、その有用性の評価に決定的になるデータもある。そうした問題については、A9.3節でさらに説明する。

A9.2.6.3 通常、有害性の特定、ひいては分類は、対象の物質を試験して直接得られた情報をもとになされるであろう。しかし、このことが試験に困難を生じ、または結果が常識にそぐわないこともある。たとえば、保存びんの中では安定であっても、水と混合すると速やかに（またはゆっくりと）反応して、もとの化学物質とは異なる性質の分解生成物を生じさせる物質もある。この場合、分解が速やかであるなら、実際に試験されたのは分解生成物であるため、入手されたデータは分解生成物の有害性を特定することもしばしばある。こうしたデータが通常の方法で親物質を分類するのに用いられることもありうる。しかし、分解がより遅い場合、親物質を試験することが可能であり、有害性データが正常なやり方で作成される。遅れて起こる分解は、急性ないし慢性の有害性区分を適用すべきかを定める際に考慮される。しかし、試験された物質が分解して、より有害な生成物を生じることも起こり得る。こうした場合には、親物質の分類では分解生成物の有害性、および通常的环境条件で分解生成物が形成される速度を十分に考慮しなければならない。

A9.3 水生毒性

A9.3.1 序

物質の水生環境に対する有害性を特定する基礎は、その物質の水生毒性である。分類は、魚類、甲殻類、および藻類/水生植物の毒性データを入手することに基づいている。こうした分類群は、有害性を特定するための水中動物相および植物相の代表として、広く受け入れられている。規制所管官庁や化学企業がこれを受け入れているので、こうした特定の分類群に関するデータは見つけられる可能性が高い。分解性および生物蓄積性についての挙動に関するその他の情報は、水生有害性をよりよく描写するのに利用される。この節では、生態毒性に関する適切な試験について説明し、データを評価し試験結果の組み合わせを分類に用いるいくつかの基本概念を示し、分類の困難な物質を扱う手法をまとめ、データ品質の解釈について簡単な考察を加える。

A9.3.2 試験の説明

A9.3.2.1 本調和システムで物質を分類する目的では、淡水生物種と海水生物種の毒性データは同等とみなすことができる。イオン化する有機化合物や有機金属化合物等、ある種の物質では淡水環境と海洋環境では現れる毒性が異なることも指摘しておかなければならない。分類の目的は水生環境の有害性を記述することなので、最も高い毒性が示された結果が選ばなければならない。

A9.3.2.2 健康および環境に対する有害性を判定するための GHS 判定基準は、中立の試験方法であるが、他方、科学的に正当であり、対象のエンドポイントについての既存システムについて先に述べた国際的な手順および判定基準に従って正当性が確認され、かつ相互に受け入れられるデータを作成できるなら、異なる手法も許容されるべきである。システム案 (OECD 1998) では以下のようにされている。

「急性毒性は通常、魚類 1 種での 96 時間 LC_{50} 値 (OECD テストガイドライン 203 または同等のもの)、甲殻類 1 種での 48 時間 EC_{50} 値 (OECD テストガイドライン 202 または同等のもの) または藻類 1 種での 72 時間または 96 時間 EC_{50} 値 (OECD テストガイドライン 201 または同等のもの) により決定される。こうした生物種はすべての水生生物種の代表であるとみなされるが、ウキクサ *Lemna* 等、その他の種に関するデータも、試験方法が妥当なものであれば、考慮されることもある。」

慢性試験では長時間続く暴露が行われる。その期間は水生生物種の繁殖周期に応じて、数日間から 1 年間、またはそれ以上に至る。慢性試験は、成長、生存、繁殖および発育に関する特定のエンドポイントを評価するように実施してもよい。

「慢性毒性データは、急性データに比べて入手し難く、試験手順の範囲もそれほど標準化されていない。OECD テストガイドライン 210 (魚類の初期生活段階毒性試験)、202 Part 2 または 211 (ミジンコの繁殖試験) および 201 (藻類生長阻害試験) に従って得られたデータは受け入れられる。他の、正当性が確認され、国際的に受け入れられている試験も使用できよう。NOEC または同等の $L(E)Cx$ を用いるべきである。」

A9.3.2.3 分類の例として引用した OECD ガイドラインには、改正されているものや更新が予定されているものもあることを指摘しておかなければならない。こうした改正により試験条件がわずかながら変更されることもある。したがって、分類のための調和された判定基準を策定した専門家グループは、試験期間について、あるいは使用生物種についてさえも、ある程度の柔軟性を持たせるよう試みた。

A9.3.2.4 魚類、甲殻類、および藻類を用いた、受け入れられる試験を実施するためのガイドラインは多くの資料に見出される (OECD, 1999; EPA, 1996; ASTM, 1999; ISO EU)。OECD モノグラフ No.11 工業用化学品および駆除剤の水生毒性試験に関する詳細レビュー文書は、広範囲な試験法の優れた集大成であり、また試験指針の資料である。この文書はまた、適切な試験方法論の情報源でもある。

A9.3.2.5 魚類を用いた試験

A9.3.2.5.1 急性試験

急性試験は一般に、体重 0.1–5g の大きさの幼稚仔を用いて 96 時間の試験期間で実施される。こうした試験で観察するエンドポイントは死亡率である。このサイズより大きい魚または 96 時間より短い試験期間では、一般的に感度が落ちる。しかし、幼稚仔で 96 時間の受け入れられるデータが入手できない場合、またはこれら魚のサイズまたは試験期間が異なる試験結果が、より有害性の高い区分における分類に影響する際には、分類のためにこれらの結果を採用することもできよう。分類には、OECD テストガイドライン 203 (魚類 96 時間 LC₅₀) またはこれと同等のガイドラインに従った試験を採用すべきである。

A9.3.2.5.2 慢性試験

魚類を用いた慢性試験または長期試験は、受精卵、胚、幼稚仔または繁殖行動の認められる成魚で開始できる。OECD テストガイドライン 210 (魚類の初期生活段階毒性試験)、魚類ライフサイクル試験 (US EPA 850.1500) またはこれらと同等の試験法が分類スキームで用いられる。試験期間は試験の目的により大きく異なる (7 日程度から 200 日以上に至るまで)。観察するエンドポイントとしては、孵化率、成長 (体長および体重変化)、産卵数、および生存率がある。技術的には OECD ガイドライン 210 (魚類の初期生活段階毒性試験) は「慢性」試験ではなく、感受性の高いライフステージにおける亜慢性試験である。この試験は慢性毒性の予測指標として広く受け入れられており、本調和システムでは分類の目的のためにこのようなものとして採用されている。魚類初期生活段階毒性データは、魚類ライフサイクル試験や魚類繁殖試験よりはるかに多く入手できる。

A9.3.2.6 甲殻類を用いた試験

A9.3.2.6.1 急性試験

甲殻類を用いた試験は、一般に第一齢幼体 (訳者注: 孵化後 24 時間以内のもの) から開始する。ミジンコ類の場合には、48 時間の試験期間が採用されている。その他の甲殻類、たとえばアミやその他の種類では、96 時間が基準である。観察するエンドポイントは死亡率、または死亡率の代用としての遊泳阻害である。遊泳阻害とは、軽い刺激に対する無応答として定義されている。OECD テストガイドライン 202 Part 1 (ミジンコ急性試験) または US EPA OPPTS 850.1035 (アミ類急性毒性試験) あるいはこれらと同等のガイドラインを分類に用いるべきである。

A9.3.2.6.2 慢性試験

甲殻類を用いた慢性試験もまた、一般に第一齢幼体から開始し、成熟期および繁殖期まで継続される。ミジンコ類の場合、成熟および 3 回の産仔には 21 日間で十分である。アミでは 28 日必要である。観察するエンドポイントとして、最初の産仔までの期間、雌 1 頭あたりの産仔数、成長および生存率がある。OECD テストガイドライン 202 Part 2 (訳者注: 現行ではテストガイドライン 211) (ミジンコの繁殖試験) または US EPA OPPTS 850.1035 (アミ類慢性毒性試験) あるいはこれらと同等のガイドラインを分類スキームに用いるべきである。

A9.3.2.7 藻類/植物を用いた試験

A9.3.2.7.1 藻類を用いた試験

藻類を栄養添加培地中で培養して被験物質に暴露する。OECD テストガイドライン 201 (藻類生長阻害試験) と同等の試験を用いるべきである。標準的な試験方法では、試験期間中 (通常は 3–4 日間) の指数増殖を確認するために、植種原の細胞濃度を採用している。

藻類試験は短期試験であり、その試験からは急性・慢性の両方のエンドポイントが得られるものの、本調和システムで分類に用いられるのは急性 EC₅₀ だけである。この試験で観察するエンドポイントとして望ましいのは藻類生長速度阻害である。この理由は、生長速度阻害は試験のデザインに依存しないのに対し、バイオマス法は試験生物種の生長速度や、試験期間やその他の試験のデザインの内容にも依

存するためである。エンドポイントがバイオマスの減少のみ、または特定されないで報告されている場合は、この値は同等のエンドポイントとして解釈される場合がある。

A9.3.2.7.2 大型水生植物を用いた試験

水生毒性試験に最も多く用いられる維管束植物はウキクサ (*Lemna gibba* および *Lemna minor*) である。ウキクサ試験は短期試験であり、急性および亜慢性のエンドポイントが与えられるが、本調和システムでの分類には急性 EC₅₀ のみが使用される。この試験は 14 日間以内であり、藻類に用いるのと同様な栄養添加培地中で実施されるが、栄養強度が増加されることもある。観察するエンドポイントは生じた葉状体の数の変化に基づいている。Lemna に関する OECD テストガイドライン (作成中 (訳者注: テストガイドライン 221)) および US EPA 850.4400 (水生植物毒性試験、Lemna) を用いるべきである。

A9.3.3 水生毒性の概念

この節では、分類の際の急性毒性および慢性毒性の使用について、また暴露方式、藻類毒性試験および QSAR の利用についての特別な考察について取りあげる。水生毒性の概念についてさらに詳しい議論としては、Rand (1996) を参照できる。

A9.3.3.1 急性毒性

A9.3.3.1.1 分類の目的において急性毒性は、短期暴露で生物種に有害性のある物質の本来の性質である。急性毒性は一般に、試験生物種の 50% に対して致死的である濃度 (LC₅₀) として、試験生物種の 50% に測定可能な有害作用を及ぼす濃度として (例えば、ミジンコの遊泳阻害)、または対照 (未処置) 生物の反応と比べて試験 (処置群) 生物の反応 (例: 藻類の生長速度) が 50% 低下する濃度として表現される。

A9.3.3.1.2 急性毒性が 1ppm (1mg/l) 以下であると判定された物質は、一般的に非常に強い毒性であると認められている。こうした物質の取扱、使用、または環境中への放出は高度の有害性をもたらし、またこうした物質は慢性または急性区分 1 に分類されている。十進法による毒性区分の帯域が、急性区分 1 より上の急性毒性区分用として受け入れられている。すなわち、急性毒性が 1-10ppm (1-10mg/l) として測定された物質は急性毒性区分 2 に、10-100ppm (1-100mg/l) として測定された物質は急性毒性区分 3 に、および 100ppm を超える物質は実質的に毒性はないとみなされる。

A9.3.3.2 慢性毒性

A9.3.3.2.1 分類の目的において慢性毒性は、生物種のライフサイクルに関連して決定された暴露期間中に、物質がその生物種に有害作用を及ぼす潜在的または実際の特性をいう。こうした慢性作用には通常、一連の亜致死的なエンドポイントが含まれており、一般に無影響濃度 (NOEC) または同等の影響濃度 (EC_x) として表される。観察するエンドポイントとして典型的なものには、生存、成長、または繁殖がある。慢性毒性の暴露期間は、測定するエンドポイントおよび用いる生物種によって広く異なる。

A9.3.3.2.2 慢性毒性データは、分野によっては急性データより一般的でないため、分類スキーム用として、急性毒性、分解性の欠如、または潜在的あるいは実測の生物蓄積性を適切に組み合わせることによって慢性毒性の可能性を特定する。こうしたデータが存在し、かつ長期 NOEC > 1mg/l である場合には、急性データにもとづく分類を適用するかを判定する際に、長期データを考慮してもよい。この関係から、以下の一般的アプローチを用いるべきである。慢性毒性物質から除外するためには、区分の決定の際に用いたすべての分類群 (生物) について NOEC 値が慢性毒性区分から除外するのに適したものであることを示されねばならない。これは多くの場合、急性毒性で最も感受性が高いとされた生物種に対する長期 NOEC > 1mg/l であることを示せば達成される。したがって、もし分類が魚類急性 LC₅₀ に基づいて適用されていたならば、無脊椎動物を用いた毒性試験から得た長期 NOEC を用いてこの分類を解除することは一般に可能ではない。このような例では、NOEC 値は通常、おなじ魚種または同等以上の高感受性をもつ魚種を用いた長期試験から得られた値であることが必要であろう。同様に、複数の分類群に対する急性毒性をもとに物質を分類しているならば、それぞれの分類群で NOEC > 1mg/l であることを示す必要があろう。

物質を慢性区分4に分類する場合には、NOECが対象物質の水に対する溶解度より大きいことを証明すれば十分である。

A9.3.3.2.3 藻類/Lemnaを用いる試験は、物質を分類からはずすことには使用できない。その理由は(1)藻類およびウキクサを用いた試験は長期試験ではない、(2)慢性毒性と急性毒性との比が一般に狭い、および(3)エンドポイントが他の生物におけるエンドポイントよりも一貫性がある、ということである。

ただし、単一の藻類/水生植物試験で認められた急性毒性(L(E)C₅₀)だけによって分類を割り当てているが、他の藻類を用いた試験があり、この分類群での慢性毒性(NOEC)は1mg/lを超えるという証拠が得られている場合には、この証拠を用いて分類からはずすことを考えてもよい。現時点では、標準化された慢性毒性試験法がまだ開発されていないため、このようなアプローチを水生植物に応用することはできない。

A9.3.3.2.4 GHSには、それより以下では物質が慢性毒性であると分類されるような、特定の慢性毒性値を含めることを意図しているが、判定基準がまだ設定されていない。

A9.3.3.3 暴露方式

急性および慢性の両方の試験、および淡水と塩水の両方の媒体に、4種類の暴露条件が採用されている。すなわち、止水、止水-交換(半止水)、再循環、および流水である。どの種類の試験を採用するかは、被験物質の性質、試験期間、試験生物種、および規制所管官庁による要求項目による。

A9.3.3.4 藻類試験用の培地

藻類を用いる試験は、栄養添加培地中で実施されるが、ある種の一般的成分、すなわちEDTAまたはその他のキレート剤の使用について注意を払う必要がある。有機化合物の毒性を試験する場合、微量のEDTA等のキレート剤が培地中の複合微量成分として必要である。これを加えないと、藻類の生長は著しく阻害され、試験の有用性が損なわれる。しかしキレート剤は、金属被験物質の見かけの毒性を低下させることがある。したがって金属化合物の場合には、高濃度のキレート剤を加えた試験結果、または鉄に対して化学量論的に過剰なキレート剤を加えた試験結果を厳密に評価しなければならない。フリーのキレート剤、特にEDTAのような強力なキレート剤は重金属の毒性を著しく低下させるかもしれない。しかしながら、培地に鉄が不足している場合には、藻類の生長は鉄で制限されることになり、したがって、鉄およびEDTAのない、あるいは減少させた試験の結果は注意して扱わなければならない。

A9.3.3.5 QSARの利用

分類を目的とし、なおかつ実験データが無い場合には、非電解性、非親電子性、また非反応性の物質であるならば、魚類、ミジンコ、および藻類に対する急性毒性を予測するのに、QSARに頼ることが可能である(QSARの利用に関するA9.6節参照)。有機リン化合物等の物質の場合には問題が残る。これらは、体内レセプターと相互作用をし、または細胞内タンパク質とスルフヒドリル結合を形成できる官能基等、特殊なメカニズムにより作用する。基本的な麻酔メカニズムで作用する化学物質については、信頼できるQSARが導かれている。こうした化学物質とは、たとえば炭化水素、アルコール、ケトン、およびある種の脂肪族塩素化炭化水素など、低反応性の非電解質であり、これらはその生物学的作用をその分配係数の関数として生じる。有機化学物質ならば何でも、麻酔作用を生じることができる。しかし、化学物質が電解質であったり、または麻酔以外のメカニズムが導かれる特殊な官能基を含んでいるならば、分配係数のみによる毒性の算定をすると、毒性を著しく過小評価することになる。親化合物の急性水生毒性に関するQSARは、毒性のある代謝物または分解物が急性試験の期間よりもずっと後になって生成する場合には、これら代謝物または分解物の作用を予測するには利用できない。

A9.3.4 証拠の重み

A9.3.4.1 分類の基本的な基盤として最高品質のデータを用いるべきである。一次のデータ源に基づいて分類するのが望ましい。試験条件が明瞭かつ完全に表現されていることが不可欠である。

A9.3.4.2 一つの分類群について複数の試験結果が入手されたならば、どれが最も高感度であり高品質であるかの決定をせねばならない。GLP 試験の代わりに非 GLP でもより高感度の所見の得られている試験を採用することについては、ケースバイケースで判断しなければならない。標準的でない、または非 GLP の指針に従って実施された試験から得られた結果が強毒性を示唆している場合には、その結果を分類に使用できるべきであるが、こうした試験が、無視できる毒性を示した場合には、より注意深い検討が必要となろう。試験が困難な物質から得られる結果は、見かけ上、真の毒性より弱い毒性を示すこともあれば、強い毒性を示すこともある。こうしたケースでの分類には専門家の判断が必要であろう。

A9.3.4.3 同一の分類群について複数の受け入れられる試験結果が入手された場合、一般に、最も高感度の結果 (L(E)C₅₀ 値または NOEC 値が最低値の結果) を分類に採用する。しかし、これはケースバイケースで扱わなければならない。同一生物種についてより大きなデータセット (4 個以上の数) が入手されたときは、毒性値の幾何平均値をその生物種を代表する毒性値として用いてもよい。平均値を推定する際、分類群が同一でも異なった種の試験や、または異なったライフステージで行われた試験、あるいは条件または試験期間が異なる試験を組み合わせることは望ましくない。

A9.3.5 試験困難な物質

A9.3.5.1 妥当な水生毒性試験は、ガイドラインで勧告されている試験条件下において被験物質が水媒体中で溶解することを必要とする。さらに、試験期間を通じて、生物学的に利用できる暴露濃度が維持されなければならない。ある種の物質は水系での試験が困難であり、そうした物質の試験を支援するための指針が作成されている (DoE 1996; ECETOC 1996; US EPA 1996)。OECD は現在、試験困難な物質および混合物の水生毒性試験に関する指針 (OECD, 2000) の最終案を検討中 (訳者注: ガイダンスドキュメント 23 として採択済み) である。この資料は試験困難な物質のタイプ、およびこうした物質を用いた試験から妥当な結論を確保するのに必要な手順に関する情報の、よい情報源である。

A9.3.5.2 それにもかかわらず、今日において最良と考えられている方法論には従っていないが、分類基準に適用するのに適した情報を得ることのできる試験方法論を用いたと思われる多くの試験データが存在している。そうしたデータを解釈するには特別の手引きが必要であるが、最終的にはデータの妥当性判定に専門家の判断を用いなければならない。こうした試験困難な物質とは、溶解度が低い、揮発性である、または光変換、加水分解、酸化、あるいは生物学的分解等のプロセスにより速やかな分解を受ける物質である。藻類を試験する場合、着色物質は細胞成長に必要な光を弱めて、試験のエンドポイントに干渉することもある。同様に、溶解度以上の濁った分散状態で試験された物質は、誤った毒性の測定を起こすことがある。水相に被験物質を加える場合、粒子状物質または金属等の固体では問題が生じることがある。石油の蒸留分画も添加時に問題を生じることがあり、また L(E)C₅₀ 値を決定するための適切な濃度を設定する際に解釈上困難な問題を生じる。「試験困難な物質および混合物の水生毒性試験に関する指針」原案は、試験上困難を生じる可能性の高い多くのタイプの物質について、より一般的な特性を説明している。

- (a) **安定性**: 被験物質の濃度が設定濃度の 80% より低くなると予測される場合は、試験を有効とするためには、被験物質を液交換するような暴露方式が求められる。半止水または流水条件が望ましい。このため藻類の試験については、標準的ガイドラインが一般に止水条件で実施されるので、特有の問題が生じる。甲殻類および魚類では別の暴露方式も可能であるが、国際的に了承されたガイドラインに記載されている止水条件での試験が実施されることが多い。これらの試験において、あるレベルの分解、その他の関連因子も許容しなければならない。毒性濃度の計算には適切な考慮を払わねばならない。こうしたことの取扱いについてのアプローチを A9.3.5.6 に示す。分解が起こる場合には、試験で記録された毒性に対する分解生成物の毒性の影響も考慮することが重要である。そのデータを分類に使用できるかどうかについては、専門家の判断が必要であろう。

- (b) **分解**：化合物が試験条件下で壊れる、または分解する場合は、既知の、あるいは想定される分解生成物の考察も含めて、分類のための毒性計算に専門家の判断が必要である。親物質およびすべての有毒分解物の濃度測定が望ましい。分解物に比較的毒性がないことが予測されるならば、親物質の濃度を維持するため、試験液を交換する暴露方式が望ましい。
- (c) **飽和**：単一成分の物質に関しては、溶解度以下の濃度範囲で測定された毒性反応のみから分類すべきであり、溶解度を超える物質負荷に基づくべきでない。水への溶解度を超えた濃度において毒性を示すデータが入手されることがしばしばあり、こうしたデータは妥当でないと考えられることが多いが、何らかの解釈も可能である。これらの問題は一般に、溶解度の低い物質の試験にあてはまり、こうしたデータをどう解釈するかについての手引きは A9.3.5.7 に記載する（「試験困難な物質および混合物の水生毒性試験に関する手引き」も参照のこと）。
- (d) **試験媒体の変動**：試験困難な物質が確実に溶解するよう特別な手段が必要であろう。試験媒体を変えると見かけの毒性が増加または減少し、これによって被験物質の分類レベルも変わる可能性があるため、このような手段は、試験媒体を著しく変更しないようなものとするべきである。
- (e) **複合物質**：本分類スキームの対象となる物質の多くは、現実的には混合物であるが、この場合暴露濃度の測定が困難であり、また測定が不可能な場合もある。石油蒸留画分、ポリマー、不純物を多く含む物質等は、毒性濃度の測定が困難であり、検証も不可能なので、特有の問題が生じる。典型的な試験手順はしばしば「水可溶性画分 (WSF)」または「水和画分 (WAF)」の生成に依存しており、データは添加率で報告されている。こうしたデータを分類基準に用いてもよからう。

A9.3.5.3 有機化合物の分類では、試験濃度を安定にし、分析して測定してあることが望ましい。濃度が測定されている方が望ましいが、ある状況において設定濃度だけが妥当なデータとして入手されている場合は、設定濃度に基づいて分類する場合もある。物質が実質的に分解し、または水相から消失する可能性がある場合は、データ解釈には注意が必要であり、もし妥当かつ可能であるならば、試験中の毒物の消失分を考慮して分類すべきである。その他に、金属が特有の問題を提起するが、これについては別に述べる。表 A9.3.1 に、試験困難物質のいくつかの性質、およびその分類との関連性についてまとめた。

A9.3.5.4 ほとんどの試験困難な状況において、実際の試験濃度は、設定上の、または期待される試験濃度より低くなる傾向がある。試験困難な物質の毒性値 (L(E)C₅₀) が 1mg/l より低いと見積もられた場合、急性区分 1（および適合する場合には慢性区分 1）の分類が保証されたと確信してよい。しかし、毒性推定値が 1mg/l を超える場合には、その毒性推定値は毒性を過小に示している傾向がある。そのような状況で、試験困難な物質での試験結果を分類に用いることができるかを決定するには、専門家の判断が必要である。毒性の推定値が 1mg/l より大きく、かつ試験濃度が測定されていない場合で、試験の困難さの性格が実際の試験濃度に大きく影響していると考えられる場合には、相当の注意を払ってその試験を分類に用いるべきである。

A9.3.5.5 以下の各項では、こうした解釈上の問題について詳しい手引きを示している。解釈を行うにあたっては、これはあくまでも手引きであり、厳密かつ固定的な法則を適用できないことを念頭に置くべきである。試験の困難さの性質の多くは、試験にその妥当性を判定するに十分な情報があるか、また分類基準を適用するのに用いられるように毒性レベルを決定できるかどうか、その両方の判定に専門家の判断が必ず必要であることを意味している。

A9.3.5.6 不安定な物質

A9.3.5.6.1 試験手順は、被験物質が試験媒体中で不安定であることの影響を最小限に抑えるよう適用するのが理想であるが、現実には、ある種の試験では、試験期間を通じて濃度を維持することはほとんど不可能なことである。一般にそのような不安定さの原因は、酸化、加水分解、光分解および生分解である。光分解や生分解は比較的コントロールが容易であるが、多くの既存の試験法ではこうしたコントロールがなされていないことがしばしばである。それにもかかわらず、ある種の試験、特に魚類を用いた急性および慢性毒性試験では、不安定による損失を最小限に抑えるよう暴露方式が選べるようになっており、またこのことは試験データの妥当性を決定する際に考慮されるべきである。

A9.3.5.6.2 試験中の暴露レベルの決定に不安定さが一つの要因となっている場合、データの解釈に不可欠な前提条件は、試験期間を通じて適切な複数の時点で測定された暴露濃度があることである。少なくとも試験開始時と終了時に濃度測定の実験値が得られていないならば、正当な解釈ができず、その試験は分類目的には妥当でないと考えるべきである。分析データが入手された場合には、以下のようないくつかの実用規則が解釈上の手引きとして考えられる。

- (a) 試験開始時および終了時の測定値がある場合（ミジンコ急性試験および藻類急性試験では標準の要件）、分類の目的では、 $L(E)C_{50}$ 値を開始時および終了時の各濃度の幾何平均に基づいて計算してよい。試験終了時の濃度が分析上の検出限界より低い場合、濃度は検出限界の半分であると考える。
- (b) 試験媒体交換期間の開始時と終了時の測定値がある場合（半止水条件での試験で入手される）、更新期間ごとの幾何平均を計算し、そのデータから全暴露期間にわたる平均暴露量を算出すべきである。
- (c) 毒性が分解生成物に帰属でき、その生成物の濃度が既知である場合、分類のための $L(E)C_{50}$ は、分解生成物濃度の幾何平均値に基づいて計算してから、親物質に逆算してもよい。
- (d) 同様の原則が慢性毒性試験での測定値にも適用できよう。

A9.3.5.7 難溶性の物質

A9.3.5.7.1 難溶性の物質は、一般に水に対する溶解度が 1mg/l 未満の物質であるとされているが、これらの物質は試験媒体に難溶であることが多く、予測される低い濃度では、しばしば溶解濃度は測定困難であることが示される。多くの物質では試験媒体中の真の溶解度は知られず、純水中で検出限界以下であるとして記録されることが多い。にもかかわらず、そうした物質でも毒性を示すことがあり、毒性が認められなかった場合には、その結果が分類のために妥当であるとみなせるかの判断がなされなければならない。判断は慎重側に寄せるべきで、有害性を過小評価することがあってはならない。

A9.3.5.7.2 理想的には、適切な溶解技術を採用し、水に対する溶解度の範囲内で濃度を正確に測定した試験を採用すべきである。そのような試験データが入手できれば、他のデータより優先して用いるべきである。しかし、以前のデータを考慮する場合などは特に、毒性レベルが水に対する溶解度より上で記録されている物質や、溶解度が分析方法の検出限界より下で記録されている場合等が普通に見られる。したがって、この両者の状況では、測定されたデータから実際の暴露濃度を検証することはできない。分類するのに、そのようなデータしか入手できない場合には、一般的な手引きとして以下のような実用的な規則が考えられる。

- (a) 急性毒性が水に対する溶解度より上の濃度で記録されている場合、分類目的での $L(E)C_{50}$ は水に対する溶解度の測定値以下であると考えてよい。その場合、慢性区分 1 または急性区分 1 の各区分を適用すべきであると思われる。この決定をする際、溶けなかった過剰の物質が試験生物体に物理的な影響を及ぼした可能性に十分注意を払うべきである。

そのことが観察された影響の原因であると思われた場合には、その試験は分類のためには妥当でないとみなすべきである。

- (b) 水に対する溶解度より高い値のレベルでの急性毒性の記録がない場合、分類のための $L(E)C_{50}$ は水に対する溶解度測定値より大きいとみなしてよい。その場合、慢性区分4を指定すべきかどうかについて検討すべきである。その物質は急性毒性を示さないという判定をする際には、最大の溶解濃度を達成するのに用いた手段について十分な配慮がなされるべきである。その手段が適切であるとみなせない場合には、その試験は分類目的には妥当でないと考えらるべきである。
- (c) 水に対する溶解度がその分析法の検出限界より低く、かつ急性毒性が記録されている場合には、分類のための $L(E)C_{50}$ は分析の検出限界より小さいとみなしてよい。毒性が記録されていない場合には、分類のための $L(E)C_{50}$ は水に対する溶解度より大きいとみなしてよい。上述の品質判定基準には十分な考慮を払うべきである。
- (d) 慢性毒性データが入手された場合には、同じ一般則を適用すべきである。原則として、水に対する溶解度で、または 1mg/l より上の濃度で、影響が認められないデータのみを考慮する必要がある。この場合にも、濃度測定の考察によってこうしたデータの妥当性を確認できないならば、最高溶解濃度の達成に用いた手段が適切なものであるか検討しなければならない。

A9.3.5.8 濃度低下に関与するその他の要因

その他にも多くの要因が、濃度低下に関与している可能性があり、正しい試験の設計により回避できる要因もあるが、こうした要因が関与したデータを解釈しなければならない場合がしばしばある。

- (a) 沈殿：これはさまざまな理由によって、試験中に生じることがある。見かけ上粒子が見えなくとも、物質が実際には溶解しておらず、試験中に凝集して沈殿する、というのが一般的な説明である。この場合、分類のための $L(E)C_{50}$ は試験終了時の濃度に基づくと考えてよい。同様に、媒体との反応により沈殿が生じることもある。このことについては、上述の不安定さのところで考察した。
- (b) 吸着：これはたとえば $\log K_{ow}$ 値の大きい物質等、吸着性の高い物質で起こる。これが起こるときは濃度低下が通常速やかであり、暴露は試験終了時の濃度で最もよく記述できる。
- (c) 生物蓄積：物質が試験生物体内に蓄積することで濃度低下が起こることがある。水に対する溶解度が低く、それに関連して $\log K_{ow}$ が高い場合には特に重要であろう。分類のための $L(E)C_{50}$ は、試験の開始時濃度および終了時濃度の幾何平均値から計算してもよいであろう。

A9.3.5.9 試験媒体の変動

A9.3.5.9.1 強酸および強塩基は pH を変化させるので、有毒であるように思われるかもしれない。しかし一般に、水系での pH 変化は試験媒体の緩衝システムによって阻止されるのが普通である。塩についてのデータが得られていないならば、その塩は一般に陽イオンまたは陰イオンと同じ様に、すなわち最も厳しい分類がなされたイオンと同じに、分類される。作用濃度がイオン種のうち1種類だけに関係しているならば、その塩の分類では、作用濃度に分子量の比 ($MW_{\text{salt}}/MW_{\text{ion}}$) を掛けて補正することで、分子量の差を考慮に加えるべきである。

A9.3.5.9.2 ポリマーは一般に水系では利用性はない。分散性ポリマーその他の高分子量物質は、試験系を攪乱して酸素取り込みを妨害し、機械的または二次的な影響を生じる。これらの物質のデータを検討する際には、このような要因を考慮する必要がある。しかし、ポリマーの多くは複合物質のように挙動し、原体ポリマーから浸出するかなり分子量の低い画分を有する。これについては、以下に考察する。

A9.3.5.10 複合物質

A9.3.5.10.1 複合物質は、しばしば同族の系列である一定範囲の化学構造で特徴づけられるが、水に対する溶解度、その他の物理化学的性質は広範囲にわたる。水に添加すると、溶解した部分と溶解していない部分の間で平衡に達するが、これは物質の負荷量によって決定される。この理由により、このような複合物質は通常 WSF または WAF として試験され、L(E)C₅₀ は添加濃度または設定濃度をもとに記録される。溶解部分はそれ自身が各成分の複雑な混合物なので、分析上に補助的に用いるデータは入手できないことが多い。この毒性パラメータは時に致死添加濃度に関連した LL₅₀ で表される。WSF または WAF から得られるこの添加レベルは、直接分類基準に用いてもよい。

A9.3.5.10.2 ポリマーは特別な種類の複合物質の代表であり、ポリマーの種類および溶解/分散挙動についての考察が必要である。ポリマーは、変化せずそのままの形で溶解することもあれば（真の溶解度は粒子サイズに関係している）、分散することや、または低分子量画分で構成される部分が溶液となることもある。最後のケースでは、ポリマーの試験は、低分子量物質が原体ポリマーから浸出する可能性、およびこの浸出物が毒性かどうかの試験となる。したがって、ポリマー添加量がそれによって生じる浸出物の特性を最も適切に決定し、これによって毒性はこの添加量に関連づけられる点で、複合混合物の場合と同じように考えることができる。

表 A9.3.1 試験困難な物質の分類

特性	困難さの内容	分類のための妥当性
水に対する溶解度が低い	求められる暴露濃度の達成/維持。 暴露濃度の分析。	見かけ上の溶解度より上の濃度で毒性反応が認められている場合には、影響が化学的な毒性によるものか、または物理的影響によるものかを確認するのに専門家の判断が求められる。影響は認められない場合には、完全な飽和溶解度が達成されていることを示す必要がある。
低濃度で毒性	求められる暴露濃度の達成/維持。暴露濃度の分析。	毒性値が 1mg/l 未満である場合にこれに分類される
揮発性	暴露濃度の維持 および測定。	信頼のおける濃度測定をもとに分類すること。
光分解性	暴露濃度の維持。 分解生成物の毒性。	分類には専門家の判断が必要であり、測定濃度をもとに分類すること。主要な分解生成物の毒性を判定すること。
加水分解性で不安定	暴露濃度の維持。分解生成物の毒性。分解半減期を試験で採用している暴露方式と比較すること。	分類には専門家の判断が必要であり、測定濃度をもとに分類すること。また主要な分解生成物の毒性を取り上げる必要性あり。
酸化性	暴露濃度の達成、維持および測定。化学構造の変化した物質、または分解生成物の毒性。分解半減期を試験で採用している暴露方式と比較すること。	分類には専門家の判断が必要であり、測定濃度をもとに分類すること。また主要な分解生成物の毒性を取り上げる必要性あり。
腐食/変換を受ける (金属/金属化合物について)	暴露濃度の達成、維持および測定。 水相からの分配の半減期と試験で採用している暴露方式の比較。	分類には専門家の判断が必要であり、測定濃度をもとに分類すること。また主要な分解生成物の毒性を取り上げる必要性あり。

特性	困難さの内容	分類のための妥当性
生分解性	暴露濃度の維持。分解生成物の毒性。分解の半減期と試験で採用している暴露方式の比較。	分類には専門家の判断が必要であり、測定濃度をもとに分類すること。また主要な分解生成物の毒性を取りあげる必要性あり。
吸着性	暴露濃度の維持。暴露濃度の分析。被験物質の利用可能性の減少による毒性の低下。	分類は利用性のある物質の測定濃度をもとに行うこと。
キレート化	媒体中のキレート化画分およびキレート化していない部分の区別。	分類は生物学的利用性のある物質の生長阻害をもとに行うこと。
着色	光の減衰（藻類では問題）	分類では、毒性作用を、光量の減衰による生長阻害と区別しなければならない。
疎水性	暴露濃度を一定に維持すること。	分類では測定濃度を用いること。
イオン化	暴露濃度の維持。分解生成物の毒性。分解半減期と試験に用いた暴露方式の比較。	分類には専門家の判断が必要であり、測定濃度をもとに分類すること。また主要な分解生成物の毒性を取りあげる必要性あり。
多成分物質	代表的な試験バッチの調製。	複合混合物と同一として考慮すべきである。

A9.3.6 データの質の解釈

A9.3.6.1 標準化

水生生物を用いた毒性試験の結果に影響を及ぼす要因は多い。たとえば、試験水の性質、実験の設計、被験物質の化学的性質、および試験生物種の生物学的性質等がある。したがって、水生毒性試験を実施する際には標準化された試験手順を採用して、こうした非本質的な変動の影響を減らすことが重要である。試験を標準化する、またこれらの標準を国際的に調和させる目的は、試験の変動性を減少させ、試験結果の正確性、再現性および一貫性を改善することである。

A9.3.6.2 データの序列

A9.3.6.2.1 分類は、高品質の一次データに基づくべきである。OECD テストガイドラインまたはそれと同等のもの、および優良試験所実施基準（GLP）に従ったデータが最も望ましい。標準的な試験生物種を用いて実施された国際的に調和された試験法から得られるデータの方が望ましいが、広く承認されている国際的または国内の試験方法またはそれと同等の方法、たとえば ISO または ASTM で規定された方法で実施された試験の結果もまた使用してもよい。承認されたガイドラインに従っているようでも、GLP への対応に欠けている試験から得られたデータも、適切な GLP データが無い場合には使用してよい。

A9.3.6.2.2 Pedersen ら（1995）はデータ品質を得点付けするシステムを提案しているが、これは例えば US-EPA の AQUIRE データベースに使用されているような、その他多くの現用システムと互換性がある。データの品質についての考察は Mensink ら（1995）も参照のこと。Pedersen らが報告しているデータ品質得点付けシステムは信頼性ランキングスキームを含んでいるが、これは本調和スキームに従って分類する際に用いるモデルとなり得る。Pedersen の述べている最初の三段階のデータは、優先データに関するものである。

A9.3.6.2.3 本調和スキームのもとでの分類のためのデータは、一次情報源から得られているべきである。しかし、多くの国家や規制所管官庁は、世界的に調和されたスキームにより分類を実施するので、分類では国家所管官庁および専門家パネルのレビューを採用する余地を持たせるべきである。ただしこのレビューは一次データ源にもとづいている必要がある。こうしたレビューには、証拠の重みおよびなされる分類決定のために、十分に詳述された試験条件の要約を含むべきである。たとえば一次データの入手が可能な GESAMP 等の、実績の認められたグループによって作成されたレビューを用いることもできよう。

A9.3.6.2.4 実験に基づいた試験データが無い場合には、水生毒性に関する定量的構造活性相関（QSAR）を用いてもよい。試験データが有効である場合には、常に QSAR より優先される。

A9.4 分解性

A9.4.1 序

A9.4.1.1 分解性は、化学物質の環境に対する潜在的有害性を決定する、重要な本質的特性の一つである。非分解性物質は環境中に残留し、結果として生物相に対する長期的な有害作用の可能性を有している。反対に、分解性の物質は、下水、污水处理施設、または環境中で除去されるであろう。

化学物質の分類は主に物質の本来の性質に基づいて行われる。しかし分解の程度は、分子本来の抵抗性だけでなく、物質を受け入れる環境コンパートメントの実際の条件、たとえば酸化還元電位、pH、適切な微生物の存在、物質の濃度、および他の基質の存在と濃度に依存する。したがって、水生有害性を分類する観点から分解性について解釈するには、その物質本来の特性と環境中で優先する状態とを比較考慮して、長期的な有害影響の可能性に関する結論を導く、詳細な判定基準が必要である。この節の目的は、有機物質の分解性に関するデータを解釈するための手引きを提示することである。この手引きは、水生環境における分解に関する上述の見地の分析に基づいている。この手引きをもとに、既存の分解性データを物質の分類目的に使用するための、詳細な判定スキームが提案されている。本手引きに含まれる分解性データのタイプは、易生分解性データ、水中、底質中および土壌中での物質変換に関するシミュレーションデータ、BOD₅/COD データ、ならびに水生環境における急速分解性を評価する技術である。さらに、嫌氣的分解性、本質的生分解性、下水処理施設シミュレーション試験データ、加水分解や光分解等の非生物的物質変換データ、揮発等の除去プロセス、また最後には野外研究やモニタリング調査から得られたデータについても考察している。

A9.4.1.2 分解という用語は 4.1 章に、有機分子がより小さい分子に、最終的には二酸化炭素、水および塩類に分解すること、と定義されている。無機化合物および金属については、有機化合物に適用される分解性の概念は、その意味が限られるか、または意味をもたない。むしろ物質は、通常的环境プロセスで変換されて、毒性分子種の生物学的利用性を増加させることもあれば、低下させることもある。したがってこの節では、有機物質および有機金属のみを扱う。水相からの環境中への分配については A9.7 節で述べる。

A9.4.1.3 物質の分解性に関するデータは、標準化された試験によって、またはその他の研究から入手されるし、分子構造から推定できることもある。こうした分解性データを分類の目的で解釈するには、試験データの詳しい評価が必要とされることが多い。手引きについてはこの節に示し、さらに詳しいことは、利用できる方法について（付属資料 A9.I）、および水生環境での分解に影響する要因について（付属資料 A9.II）説明している二つの付属資料に見出すことができる。

A9.4.2 分解性データの解釈

A9.4.2.1 急速分解性

化学物質の水生有害性の分類は通常、それらの物質の環境特性に関する既存データをもとに行われる。分類を促進することを主な目的として試験データが提供されることはまれにしかない。広範囲に及ぶデータが揃っていても、分類基準に必ずしも直接適合するわけではないことがほとんどである。結果的に、既存の試験データを水生有害性の分類と関係付けて解釈することに関する手引きが必要とされる。調和された判定基準にもとづいて、分解データを解釈するための手引きが、下記のように水生環境における「急速分解性」という表現によりあらわされる 3 種類のデータについて作成された（A9.1.8, A9.1.9, A9.1.2.3.1 から A9.1.2.3.3 ならびに 4.1 章 4.1.2.10.3 を参照）。

A9.4.2.2 易生分解性

A9.4.2.2.1 易生分解性については、OECD テストガイドライン No.301 (OECD, 1992)に定義されている。標準的な OECD の易生分解性試験または同様な試験での易生分解性とされるレベルよりも高いレベルで分解する有機化合物はすべて易生分解性であり、したがって急速分解性でもあるとみなされるべきである。しかし文献にある試験データの多くは、その試験が易生分解性試験の要件を満たしていることを証明するために評価されるべきすべての条件を、特定しているとは限らない。したがって、データを分類の目的で使用する前に、その有意性に関して専門家による判断が必要とされる。しかし、被験物質の易生分解性について結論づける前に、少なくとも下記のパラメータについて考慮すべきである。

A9.4.2.2.2 被験物質の濃度

OECD の易生分解性試験では比較的高い被験物質濃度が用いられている (2–100mg/l)。しかし多くの物質は、このように高い試験濃度では植種源に対して毒性となり、より低い非毒性濃度条件では速やかに分解するのに、この試験では分解性が低くなることがある。微生物を用いる毒性試験 (例えば OECD テストガイドライン 209 活性汚泥呼吸阻害試験、ISO 9509 硝化阻害試験、または ISO 11348 発光バクテリア阻害試験) で被験物質の毒性を実証してもよい。ある物質について、阻害が易分解性でないことの理由となっていると思われる場合には、可能なら被験物質について、より低い無毒性濃度を採用した試験の結果を採用するべきである。環境的に現実に近い微生物相と被験物質を現実的な非毒性低濃度で用いた、河川水分解試験ができるなら一般に望ましいとされるが、上に述べたような低濃度試験の結果を、ケースバイケースで、急速分解性の分類基準に関して考慮することもできよう。

A9.4.2.2.3 試験期間 (時間ウィンドウ)

調和された判定基準には、易生分解性試験すべてについて、10 日間以内に易生分解性とされるレベルを達成するという一般的要件が含まれている。これは、MITI I 試験 (OECD テストガイドライン 301C) 以外の OECD 易生分解性試験 (OECD テストガイドライン 301) に 10 日間の時間ウィンドウが適用されるということと一致していない。クローズドボトル試験 (OECD テストガイドライン 301D) では、10 日後に測定されなかった時には、かわりに 14 日間の時間ウィンドウを採用してもよい。さらに、生分解性試験に関して限られた情報しか入手できないことが多い。したがって、実用的なアプローチとして、10 日間の試験で情報が得られない場合には、28 日後に達成された分解率 (%) を易生分解性評価に直接採用することもある。ただし、このことは既存の試験データ、および 10 日間のウィンドウが適用されない試験で得られたデータに対してのみ、受け入れられるべきである。

A9.4.2.3 BOD₅/COD

5 日間生化学的酸素要求量 (BOD₅) に関する情報は、他に分解性に関する測定データが得られていない場合にのみ、分類の目的で使用されよう。このように易生分解性試験や、水生環境中での分解性に関するシミュレーション試験から得られるデータの方が優先される。BOD₅ 試験は伝統的な生分解性試験であり、現在では易生分解性試験によって、とって替わられている。したがって、BOD₅ 試験は今日、物質の易生分解性を評価するために実施するべきではない。しかし、他に分解性データが入手できない場合には、古い試験データが用いられることもある。化学構造がわかっている物質については理論的酸素要求量 (ThOD) を計算でき、この数値の方を化学的酸素要求量 (COD) の代わりに用いるべきである。

A9.4.2.4 その他説得力ある科学的証拠

A9.4.2.4.1 水生環境での急速分解性は、4.1 章 4.1.2.10.3 (a) および (b) で参照される以外のデータによって証明されることもある。そのデータは、生分解性および/または非生分解性のデータでありうる。一次分解に関するデータは、分解生成物が水生環境に対して有害であると分類されない、すなわちこれらが分類基準を満たさないことを、証明できる場合にのみ使用できる。

A9.4.2.4.2 4.1章 4.1.2.10.3の判定基準(c)を満たすには、その物質が水生環境において28日以内70%より高いレベルで分解する必要がある。ほとんどの水生環境では物質濃度が低いことが多いので合理的なことであるが、一次の反応速度を推定すると、分解速度は28日間の間、比較的一定になる。これは、ほとんどの水生環境では物質の濃度が低いことを考えれば合理的である。したがって、分解に関する要件は、平均の分解速度定数 $k > -(\ln 0.3 - \ln 1)/28 = 0.043/\text{day}$ で満たされる。これは分解の半減期 $t_{1/2} < \ln 2/0.043 = 16$ 日に相当する。

A9.4.2.4.3 さらに、分解プロセスは温度に依存するため、環境中での分解を推定するには、このパラメータも考慮すべきである。環境の面から見て現実に即した温度を採用した試験から得られたデータを評価に用いるべきである。さまざまな温度で実施された試験から得られたデータを比較する必要がある場合、伝統的な Q10 アプローチを用いてもよい。すなわち、温度が 10°C 低下する毎に分解速度を半分にするのである。

A9.4.2.4.4 データがこの判定基準を満たしているかの評価は、ケースバイケースで、専門家の判断で行うべきである。水生環境における急速分解性を証明するのに用いられる可能性のある多様なタイプのデータを解釈するための手引きを下記に示す。一般に、水中での生分解シミュレーション試験から得られたデータだけが直接適用できると考えられている。しかし、他の環境コンパートメントから得られたシミュレーション試験データも同様に考慮してもよいが、そのようなデータは一般に、使用する前により多くの科学的な判断が必要となる。

A9.4.2.4.5 水中シミュレーション試験

水中シミュレーション試験は実験室内で実施される試験であるが、環境条件をシミュレートし、自然サンプルを植種原として用いる。水中シミュレーション試験の結果は、河川での現実に近い環境条件をシミュレートしている場合、すなわち以下のような場合には直接、分類のために採用してよい。

- (a) 物質濃度が一般的な水生環境に対して現実的である（数 $\mu\text{g/l}$ の範囲にあることが多い）、
- (b) 関連した水生環境からの植種原を用いている、
- (c) 植種原の濃度が現実的である（1mlあたり生菌数 $10^3 - 10^6$ 個）、
- (d) 温度が現実的である（例えば、5°C - 25°C）、および
- (e) 究極の分解まで測定されている（すなわち、無機化度、または生分解経路全体での個々の分解度の測定）。

こうした条件下で28日間に少なくとも70%分解される物質、すなわち半減期が16日間より短い物質は急速分解性であると考えられる。

A9.4.2.4.6 野外調査

実験室でのシミュレーション試験に匹敵するものは、野外調査、あるいはメソコスムでの実験である。そのような研究では、環境中または環境閉鎖系における化学物質の運命または影響が調査されることもある。こうした実験から得られた運命データが、急速分解性の可能性を評価するのに用いられることもある。しかしそれは、究極分解することが実証できる必要があるため、困難なことが多い。このことは、非分解性中間体は生じないことを示す物質収支を作成し、他のプロセス、たとえば底質への吸着や水生環境からの揮発によって、水系システムから除去される分を考慮すれば証拠付けできるかもしれない。

A9.4.2.4.7 モニタリングデータ

モニタリングデータは、水生環境からの汚染物の除去を示すかもしれない。しかし、こうしたデータを分類の目的で使用することは非常に難しい。使用する前に、以下の観点で検討すべきである。

- (a) この除去は分解の結果なのか、あるいは、希釈、コンパートメント間の分配（吸着、揮発）等、他のプロセスの結果であるのか？
- (b) 非分解性中間体が生成することはないか？

究極分解の結果である除去が、急速分解性の判断基準を満たすことを証明できる場合のみ、こうしたデータを分類の目的で使用するのを考慮すべきである。一般に、モニタリングデータは、水生環境中の難分解性または急速分解性を証明する裏付け証拠としてのみ用いるべきである。

A9.4.2.4.8 本質的生分解性試験

本質的生分解性に関する試験（OECD テストガイドライン 302）で 70%以上の分解をする物質は、究極生分解性の可能性がある。しかし、こうした試験では最適条件を採用しているため、本質的に生分解性のある物質でも、環境中で急速分解性があるとは推論できない。本質的生分解性試験で最適条件を使用すれば、微生物の馴化が誘発され、自然環境に比べて生分解性が向上する。したがって一般に、陽性結果が得られても、環境中での急速分解性の証拠と解釈すべきでない²。

A9.4.2.4.9 下水処理施設シミュレーション試験

下水処理施設（STP）内の条件をシミュレートする試験（例えば OECD テストガイドライン 303）から得られた結果は、水生環境中での分解を評価するには使用できない。その主な理由は、STP における微生物相は環境中の生物相とは著しく異なっていること、基質組成にかなりの違いがあること、および廃水中に存在する速やかに無機化される有機物が共代謝によって被験物質の分解を促進すること、である。

A9.4.2.4.10 土壌および底質中の分解データ

非吸着性の物質（すなわち非親油性物質）は、程度に多少差はあるものの、土壌中と表層水中とで同様の分解度が見られると主張されてきた。親油性物質では、吸着による部分的な不動化のために、水中より土壌中の方が一般に分解度が低いと予想される。このため、土壌中シミュレーション試験で、ある物質が急速分解性であることが認められた場合、水生環境でも急速分解性である可能性がきわめて高い。したがって、土壌中での急速分解性が実験的に測定されることは、以下の場合には、表層水中での急速分解性の十分な証拠となると提案されている。

- (a) 土壌微生物の事前の暴露（事前の馴化）を行わなかった、
- (b) 試験した物質の濃度は環境的に現実的に即したものである。
- (c) その物質は 28 日間以内に半減期 16 日未満（分解速度定数 $>0.043 \text{ day}^{-1}$ に相当）で究極分解に至る。

² 慢性区分 4 に関する OECD 判定基準にそった分解性の解釈について、環境有害性分類に関する EU の作業班が検討しているが、それは本質的生分解性試験によるある種のデータを、分類基準を満たしていても、ケースバイケースで分類しないという根拠に使用できるかどうかということである。

関連した本質的生分解性試験には Zahn Wellen 試験 (OECD TG 302 B) と MITI II 試験 (OECD TG 302 C) がある。使用条件は以下のとおりである。

- (a) 事前に暴露した（適応した）微生物を用いてはならない。
- (b) それぞれの試験において、適応時間は限られるべきであり、試験の指標は無機化であり、合格レベルおよびそれに到達する時間はそれぞれ以下のようである。
 - (i) MITI II 合格レベル $>60\%$ (14 日以内)
 - (ii) Zahn Wellen 試験 $>70\%$ (14 日以内)

底質中における好氣的条件下での分解に関するデータについても、同様な論拠が有効であると考えられている。

A9.4.2.4.11 嫌氣的分解性データ

嫌氣的分解に関するデータは、ある物質を急速分解性であるとみなすべきかを決定するには使用できない。一般に水生環境は、その中に水生有害性分類に採用されているような水生生物種が生活している、好氣的コンパートメントであるとみなされているからである。

A9.4.2.4.12 加水分解

加水分解に関するデータ（例：OECD テストガイドライン 111）は、pH4-pH9 の範囲内で測定された半減期 $t_{1/2}$ の最高値が 16 日より短い場合にものみ、分類において考慮できよう。しかし、加水分解は究極分解ではなく、様々な分解中間生成物が形成され、その中には分解が遅いものもあろう。生成された加水分解生成物が、水生環境に有害であるとする分類基準を満たさないと満足に証明できる場合にも、加水分解試験のデータを考慮できる。

ある物質が急速に加水分解されるならば（例えば $t_{1/2} < 2,3$ 日）、このプロセスは生分解性試験で測定される分解の一部となる。加水分解は生分解における物質変換の初期プロセスでありうる。

A9.4.2.4.13 光化学的分解

光化学的分解に関する情報（例えば OECD, 1997）を分類の目的で使用するのには難しい。水生環境での実際の光化学的分解度は、局所条件（例えば水深、懸濁固体、濁度）に依存し、分解生成物の有害性は通常わからない。光化学的分解をもとに徹底した評価のための十分な情報が得られることは、おそらく極めて稀である。

A9.4.2.4.14 分解の推定

A9.4.2.4.14.1 加水分解の半減期を概算で予測するために、ある種の QSAR が開発されているが、これは実験データが全く入手できない場合にのみ考慮されるべきである。しかし、加水分解は究極分解を考慮していないので（この節の「加水分解」参照）、加水分解の半減期は、細心の注意を払ってのみ、分類に関して使用できる。さらに、これまでに考案された QSAR はその適用性にはやや限界があり、限られた数の化合物群についてしか加水分解ポテンシャルを予測できない。たとえば、HYDROWIN（バージョン 1.67、Syracuse Research Corporation）という QSAR プログラムは、分子構造が（正確に）決定された既存 EU 化学物質の 1/5 未満の物質しか加水分解ポテンシャルを推測できない。（Niemelae 2000）

A9.4.2.4.14.2 一般に、有機物質の生分解度を推定する定量的評価法（QSAR）はまだ、急速分解性を予測するには精度が不十分である。しかし、こうした方法により得られた結果は、ある物質が急速分解性でないことを予測するのに使ってもよい。たとえば、生分解確率プログラム（例：BIOWIN バージョン 3.67、Syracuse Research Corporation）で、線形あるいは非線形の方法で推定された確率が 0.5 未満である場合、その物質は急速分解性ではないとみなされるべきである（OECD, 1994; Pedersen ら、1995 および Langenberg ら、1996）。さらに、たとえば構造が類似している物質の分解データが入手された場合は、専門家の判断に加えてその他の(Q)SAR 法を用いることもできるが、その判断は細心の注意を払って行うべきである。一般に、有用な分解データが入手できない場合に、デフォルトの分類を適用するよりも、物質が急速分解性ではないという QSAR による予測の方が、分類のためにはよりよい考証であると考えられている。

A9.4.2.4.15 揮発

化学物質が水生環境から揮発によって除去されることもある。揮発の本質的なポテンシャルは、その物質のヘンリー定数（H）により決定される。水生環境からの揮発は、問題となっている特定の水系の環境条件、たとえば水深、（風速および水流量に依存する）ガス交換係数、および水本体の層構造などに高度に依存している。揮発は水相からの物質除去の一例でしかないので、物質の水生有害性の分類に関する分解評価に、ヘンリー定数を使用することはできない。しかし、たとえば環境温度で気体であるような物質については、この観点でさらに検討されてもよい（Pedersen ら、1995 も参照のこと）。

A9.4.2.5 分解データが入手できない場合

分解性に関する有用なデータが入手されていない場合 — 実験による測定データか、推定データかにかかわらず — その物質は急速分解性ではないとみなすべきである。

A9.4.3 解釈についての一般的な問題

A9.4.3.1 複雑な物質

化学物質を水生環境に対して有害であると分類するための、調和された判定基準は単一の物質に焦点を合わせている。ある種の本質的な複合物質は、多成分物質である。これらの典型的なものは自然起源であるが、時には考慮に加える必要がある。鉱物油または植物材料から生成または抽出された物質がその例である。こうした複雑な物質は、規制の場合には通常、単一物質とみなされる。ほとんどの場合、これらは炭素鎖の長さまたは置換度が一定範囲内にある類似物質群として定義されている。そのような場合、分解性が大きく異なることは予想されず、分解度は、その複合物質についての諸試験で確定される。ただ一つ例外は分解に境界線が見出される場合で、なぜならこの場合、個々の物質のあるものは急速に分解し、他のものは急速には分解しないからである。その場合、複合物質に含まれる個々の成分の分解性をより詳しく評価する必要がある。それほど急速分解性をもたない成分がその複合物質の相当部分を占める場合（例えば 20%以上、または有害成分の場合はより低い含量）には、その物質は急速分解性ではないとみなされるべきである。

A9.4.3.2 物質の適用性

A9.4.3.2.1 環境中で有機物質の分解が起こるのは、水系コンパートメント中か、または土壌あるいは底質の水相中においてである。もちろん加水分解には水の存在が必要である。微生物の活動性は、水の存在に依存する。さらに、生分解には微生物が物質と直接接触する必要がある。したがって、微生物を取り巻いている水相中での物質の溶解は、バクテリアや菌類および基質と接触する、最も直接的な方法である。

A9.4.3.2.2 化学物質の分解性を調べるための現行の標準的な方法は、易溶解性の被験物質のために開発されている。しかし、有機物質の多くは水に僅かしか溶解しない。標準的な試験では被験物質濃度として 2–100mg/l が要求されるので、水への溶解度が低い物質については十分な利用性が満たされていないことがある。連続的に混合を続ける、または暴露時間を延長する試験、あるいは水に対する溶解度よりも低い物質濃度が採用されている特殊な設計の試験法ならば、僅かにしか溶解しない化合物にも適用できるかもしれない。

A9.4.3.3 28 日より短い試験期間

A9.4.3.3.1 基準（例えば MITI, 1992）に規定された 28 日間以前に終了した試験で分解が報告されることもある。もちろん、こうしたデータも、易生分解性とされるレベル以上の分解が達成されているならば、直接、適用できる。分解レベルがそれより低い場合には、その結果は注意して解釈しなければならない。

一つの可能性は、試験期間が短すぎたということ、そして 28 日の生分解性試験でなら、おそらく化学物質の構造が分解されていたであろう、ということである。短期間で本質的な分解が起こるならば、そうした状況は $BOD_5/COD \geq 0.5$ という判定基準、または 10 日間の時間ウィンドウ内での分解に関する要件と比較できよう。そのような場合には、以下のいずれかの条件が合えば、物質は易分解性（したがって、急速分解性）であるとみなしてもよい。

(a) 究極生分解性が 5 日間で 50%を超える、または

(b) この期間中の究極分解の速度定数が 0.1 day^{-1} （半減期 7 日間に相当）より大きい。

A9.4.3.3.2 こうした判定基準は、試験が 28 日以前に、かつ易生分解性とされるレベルに達する前に終了されても、速やかな無機化が起こったのだということを確認するために提案されている。易生分解性とされる規定されたレベルに従っていない試験データの解釈は、細心の注意を払ってなさなければならない。易生分解性とされるレベルより低い生分解性となったのは、その物質の部分分解によるものであり、完全な無機化によるものでないかどうかを検討することが不可欠である。観察された生分解性について、部分分解が可能性のある解釈であるなら、その物質は易生分解性であるとみなすべきではない。

A9.4.3.4 一次生分解

一部の試験においては、例えば被験物質に特異的な、または被験物質を含む物質集団に特異的な化学分析によって分解を追跡するような、親化合物の消失（すなわち、一次分解）のみを測定する。一次生分解性に関するデータは、生じた分解生成物が水生環境に対して有害であるとする分類基準に適合しないことが十分に証明できる場合にのみ、急速分解性の証拠に使用してよい。

A9.4.3.5 スクリーニング試験での矛盾する結果

A9.4.3.5.1 同一の物質に関して多くの分解データが入手されている状況では、結果が矛盾する可能性が生じる。一般に、ある物質について 1 種類の適切な生分解性試験を何回か実施して得られた結果が矛盾していた場合、「証拠の重みアプローチ」による解釈ができる。これはすなわち、ある物質に対して易生分解性試験で陽性（すなわち、易生分解性とされるレベルよりも高い分解性）と陰性の両方の結果が得られたならば、その物質の易生分解性を判定するのに、品質が最も高く、記録証拠が最も適切なデータを使用すべきであることを意味している。しかし、たとえ陰性結果も得られていたとしても、科学的品質が良好で試験条件がよく記録されている、すなわち事前に暴露されていない（非馴化の）植種原を使用することも含めて、ガイドラインの判定基準が充足されているならば、易生分解性試験における陽性結果の方が有意であると考えられることもできる。様々なスクリーニング方法のどれ一つとして、すべてのタイプの物質を試験するのには適してない。ある特定の物質に適していない試験手順を用いて得られた結果は、採用を判定する前に、注意して評価すべきである。

A9.4.3.5.2 このように、スクリーニング試験から得られた矛盾した生分解性データを説明する、以下のような多くの要因がある。

(a) 植種原

(b) 被験物質の毒性

(c) 試験条件

(d) 被験物質の溶解度

(e) 被験物質の揮発

A9.4.3.5.3 被験物質の分解に植種原がどの程度適しているかは、能力のある分解者の存在と量に依存する。植種原がその被験物質に暴露されたことのある環境から採取されている場合、その植種原が馴化しているかもしれない、そのことは、暴露されていない環境から採取した植種原より分解能力が大きいことで証拠立てられる。植種原は可能な限り非暴露環境から採取しなければならないが、物質が普遍的・大

量に使用されていて、広くまたはある程度継続的に放出されている場合には、非暴露環境からの採取は困難であるか、または不可能である。結果が矛盾しているならば、その微生物集団の馴化度の違いが原因となっているかどうかを明らかにするために、植種原の起源を確認すべきである。

A9.4.3.5.4 先に述べたように、多くの物質は、易生分解性試験での比較的高い試験濃度で、植種原に対して毒性または阻害作用を示す。特に修正 MITI (I) 試験 (OECD テストガイドライン 301C) およびマノメータ呼吸測定試験 (OECD テストガイドライン 301F) では高い濃度 (100mg/l) が規定されている。最も低い試験濃度はクローズドボトル試験 (OECD テストガイドライン 301D) で規定されており、ここでは 2–10mg/l が用いられる。毒性作用の影響の可能性については、易生分解性試験に毒性対照を加えること、または試験濃度を微生物に対する毒性試験データと比較することで評価できよう。たとえば呼吸阻害試験 (OECD テストガイドライン 209)、硝化阻害試験 (ISO 9509)、またはその他の微生物毒性試験が使用できなければ、生物発光阻害試験 (ISO 11348) がある。矛盾する結果が見出された場合、その原因が被験物質の毒性であるかもしれない。その物質が環境的に現実性のある濃度で阻害しないならば、スクリーニング試験で測定した分解の最高値を分類の根拠として用いてよい。その場合にシミュレーション試験データが入手されているならば、こうしたデータを考慮することは特に重要である。なぜなら、そうしたデータならば、その物質が阻害を示さない低濃度が採用されているため、環境的に現実性のある条件下での、その物質の生分解半減期をより高い信頼性をもって示すことができるからである。

A9.4.3.5.5 被験物質の溶解度が試験で用いる濃度より低い場合、このパラメータは測定された実際の分解性に対して限定要因であるかもしれない。そのような場合、被験物質の濃度が最も低い試験、すなわち、クローズドボトル試験 (OECD テストガイドライン 301D) であることが多いが、その結果が優先されるべきである。一般に、溶解度が低い物質の生分解性を試験するには、DOC ダイアウエイ試験 (OECD テストガイドライン 301A) および修正 OECD スクリーニング試験 (OECD テストガイドライン 301E) は適切でない (例えば OECD テストガイドライン 301)。

A9.4.3.5.6 揮発性物質は、クローズドボトル試験 (OECD テストガイドライン 301D)、MITI (I) 試験 (OECD テストガイドライン 301C) およびマノメータ呼吸測定試験 (OECD テストガイドライン 301F) など、閉鎖系の試験系でのみ試験すべきである。その他の試験法による結果の評価には注意が必要であり、かつ、そうした結果は、たとえば物質収支推定値により、被験物質の移動が揮発によるものでないことを実証できる場合にのみ考慮すべきである。

A9.4.3.6 シミュレーション試験データにおける変動

ある種の優先度の高い化学物質については、多くのシミュレーション試験データが入手できよう。そうしたデータは、土壌、底質または表層水のような環境媒体中における一連の半減期を与えていることがしばしばある。同一の物質で実施されたシミュレーション試験で求められた半減期が異なっていることが観察された場合には、試験条件の違いが反映されていると考えられるが、そうした条件はいずれも環境的に適切なものである。分類には、証拠の重みアプローチを採用し、かつ採用した試験法がどの程度環境条件に関して現実的でありかつ関連性があるかを考慮して、そのような研究から得られた一連の半減期測定値のうち、大きい数値の方から適切な半減期を選択すべきである。一般に、水生環境中における急速分解性の評価に関しては、河川水のシミュレーション試験データの方が、水中の底質または土壌中でのシミュレーション試験データよりも望ましいとされる。

A9.4.4 判定スキーム

水生環境における急速分解性に関する判定、および水生環境に対して有害な化学物質の分類を促進するための一般的な手引きとして、下記の判定スキームが使用できよう。

以下の項目のうち、少なくとも一つを満たさなければ、物質は急速分解性ではないと考えられる。

- (a) その物質が、28 日間の易生分解性試験において、易生分解性であると証明される。入手された試験データから評価できる場合には、生分解開始から 10 日以内に試験の易生分解性とされるレベル（DOC 除去率 70%または理論的酸素要求量 60%）が達成される。それが可能でなければ、この易生分解性とされるレベルをできれば 14 日間の時間ウィンドウ以内、または試験終了後に評価すべきである。
- (b) 物質が表層水中のシミュレーション試験³で、半減期<16 日（28 日以内に 70%より高い分解に相当する）で究極分解されることが証明される。
- (c) 物質が水生環境中において半減期<16 日（28 日以内に 70%より高い分解に相当する）で初期段階の分解を受け（生分解ないし非生物分解によって）、かつ分解生成物は水生環境に対して有害であるという分類基準を充足しないことが証明できる。

上述のデータが入手できない場合、以下の判定基準のいずれかが立証されれば、急速分解性と認めてよい。

- (d) 底質中または土壌中のシミュレーション試験³で、物質が半減期<16 日（28 日以内に 70%より高い分解に相当する）で究極分解されることが証明できる。
- (e) BOD₅および COD データしか入手できない場合、BOD₅/COD 比が 0.5 以上である。さらに半減期が 7 日間未満であれば、28 日間より短い期間で行う易生分解性試験にも同様な基準が適用される。

上述のどのタイプのデータも入手できないならば、その物質は急速分解性ではないとみなすべきである。この決定は、以下の判定基準のいずれかを満たすことで支持される。

- (i) 本質的生分解性試験で、その物質が本質的に分解性でないと認められる。
- (ii) 科学的に有意な QSAR、たとえば Biodegradation Probability Program、によって、その物質がゆっくり生分解されると予測され、急速分解性のスコアが（線形ないし非線形のモデルで）0.5 未満である。
- (iii) 間接的証拠、たとえば構造的に類似した物質による知見から、その物質が急速分解性ではないと思われる。
- (iv) 分解性に関するその他のデータが入手できない。

³ シミュレーション試験は、低濃度の化学物質、現実的な温度さらに事前にその化学物質に暴露されていない環境中の微生物群を採用するなど、現実の環境条件を反映していなくてはならない。

A9.5 生物蓄積性

A9.5.1 序

A9.5.1.1 生物蓄積は、環境への潜在的有害性を決定する、化学物質本来の重要な特性の一つである。物質の生体内への生物蓄積それ自体は有害ではないが、生物濃縮および生物蓄積は、身体への負荷をもたらす、その結果、毒性影響が導かれたり、あるいは導かれなかったりする。化学物質の人の健康および環境への影響のための調和された統合有害性分類システム (OECD, 1998) では、「生物蓄積の可能性」という用語が与えられている。しかし生物濃縮と生物蓄積とは区別すべきである。ここでは、生物濃縮とは、水系での暴露による生物体内での物質の取り込み、変換および排泄のネットと定義されているのに対し、生物蓄積はすべての経路 (すなわち、空気、水、堆積物/土壌、および食物) の暴露を包含している。最後に、食物連鎖による生物濃縮 (biomagnification) は、栄養連鎖が高位であるほど生物の体内濃度が高くなるような、食物連鎖による物質の蓄積および移動と定義されている (European Commission, 1996)。ほとんどの有機物質では、水系からの取り込み (生物濃縮) が、支配的な取り込み経路であると信じられている。また、調和された分類基準は、生物濃縮係数 (またはオクタノール/水分配係数) を生物蓄積性の可能性の尺度として用いている。こうした理由により、今回の手引きは、生物濃縮性のみについて考察し、食物またはその他の経路による取り込みについては議論しない。

A9.5.1.2 化学物質の分類は、主にその本来の性質に基づいている。しかし生物濃縮の程度は、生物学的利用可能な程度、被験生物の生理学的状態、暴露濃度の定常的維持、暴露期間の長さ、被験生物の体内における代謝、および体内からの排泄等の要因によっても影響される。したがって化学物質を分類する上で、生物濃縮性について解釈するには、物質本来の特性の評価と共に、生物濃縮係数 (BCF) を測定した実験条件の評価も必要である。指針に基づいて、分類のために生物濃縮データまたは $\log K_{ow}$ を適用するための判定スキームが開発されている。本節では有機化合物および有機金属を中心として論じる。金属の生物蓄積についても、A9.7 節で検討する。

A9.5.1.3 物質の生物濃縮性に関するデータは、標準的な試験から得られることもあれば、その分子構造から推定されることもある。分類を目的としたこれら生物濃縮性データの解釈には、試験データの詳細な評価がしばしば必要となる。この評価を容易にするために、二つの付属資料を加える。これらの付属資料は、採用できる試験方法について (附属書 9 付属資料 III)、および生物濃縮性に影響する要因について (附属書 9 付属資料 IV) 述べる。最後に、生物濃縮性および K_{ow} を測定するための標準的な実験方法のリスト (附属書 9 付属資料 V) および参考文献リスト (附属書 9 付属資料 VI) を添付する。

A9.5.2 生物濃縮性データの解釈

A9.5.2.1 化学物質の環境有害性分類は通常、その物質の環境特性に関する既存のデータに基づいている。分類を速やかに行うことを主な目的とした試験データは、稀にしか作成されない。広範な試験データが入手されることがしばしばあるが、それらは必ずしも分類判断基準に適合しない。したがって、有害性分類との関連で既存の試験データを解釈することについて手引きが必要になる。

A9.5.2.2 有機物質の生物濃縮性は、生物濃縮性実験によって実験的に測定できる。実験では、BCF は定常状態における水中濃度に対する生物体内濃度として測定されるか、または取り込み速度定数 (k_1) および排泄速度定数 (k_2) から推定される (OECD 305, 1996)。一般に、有機物質が生物濃縮する可能性は、主にその物質の親油性に関係している。親油性の尺度は n-オクタノール/水分配係数 (K_{ow}) であり、親油性の非イオン性有機物質において、生物体内で代謝または生物変換がわずかしか進行しない物質では、 K_{ow} は生物濃縮係数と関連づけられている。したがって K_{ow} 値は、 $\log BCF$ と $\log K_{ow}$ の間の経験的な関係に基づいて、有機物質の生物濃縮の推定にしばしば用いられる。ほとんどの有機物質に対しては、 K_{ow} 算出のための推定方法が利用できる。

このため、ある物質の生物濃縮性に関するデータは、(1) 実験的に測定する、(2) 実験的に測定された K_{ow} 値から推定する、または(3) 定量的構造活性相関 (QSAR) を用いて導かれた K_{ow} 値から推定する、ことによって求められる。こうしたデータの解釈に関する手引きについて、各化学物質族の評価に関する手引きと共に以下に示すが、これには特別の注意が必要である。

A9.5.2.3 生物濃縮係数 (BCF)

A9.5.2.3.1 生物濃縮係数は生物体内と、定常状態における周囲の媒体、この場合は水中との化学物質の濃度比 (重量ベース) として定義される。したがって BCF は定常状態における濃度測定値として、実験的に導くことができる。しかし BCF は取り込みと排泄の一次反応速度定数の比としても計算でき、この方法でならば平衡状態を必要としない。

A9.5.2.3.2 魚類での生物濃縮を実験的に測定する各種のテストガイドラインが作成され採用されているが、最も一般的に適用されているのは OECD テストガイドライン (OECD 305, 1996) である。

A9.5.2.3.3 実験から導かれた高品質の BCF 値は、分類目的には最も望ましいとされ、その他の代替データ、たとえば K_{ow} 値等より優先される。

A9.5.2.3.4 高品質データとは、適用された試験法に関する有意性判定基準が満たされており、そしてそのことが記述されている、たとえば暴露濃度、酸素および温度に関する変数が一定に維持されていること、および定常状態に到達したことの記載がある、等として定義されている。的確な説明が記載され (例えば優良試験所規準 (GLP) による)、有意性判定基準が満たされていると確認できるなら、その実験は高品質の試験であるとみなされる。さらに、水中および魚組織中の化学物質とその代謝物を定量するために、適切な分析法を用いなくてはならない (詳細は付属資料 III 第 1 節参照)。

A9.5.2.3.5 低品質の、または品質が不明な BCF 値は、誤った、低すぎる値を与えるかもしれない。たとえば、魚および水中の被験物質の濃度測定値を適用しても、測定までの暴露時間が短すぎ、定常状態にまだ達していない場合がある (OECD 306 (1996) 平衡達成時間の推定について、を参照)。したがって、このようなデータは使用前に注意して評価し、代わりに K_{ow} を採用することも検討すべきである。

A9.5.2.3.6 魚類についての BCF 値がない場合には、他の種の BCF 値に関する高品質データを用いてもよい (例えばムラサキイガイ、カキ、ホタテガイについて測定された BCF 値 (ASTM E 1022-94))。微細藻類の BCF 報告値は注意して使用すべきである。

A9.5.2.3.7 たとえば $\log K_{ow}$ 値が 6 より大きいような、高度に親油性の物質では、実験的に求めた BCF 値は $\log K_{ow}$ が大きいほど低くなる傾向がある。このような非線形性の概念的な説明は、主として、膜の浸透速度の減少、または体内脂質の大きな分子に対する溶解性の低下と関連づけられている。このようにして、生物体内ではこれらの物質の生物学的利用可能性および取り込みの低下が起こるであろう。別の原因として、平衡に達しなかった、水相中の有機物に吸着したために生物学的利用可能性が低下した、および分析誤差等、実験技術上の要因が考えられる。このため、親油性が高い物質の BCF 値に関する実験データを評価する際は、親油性が低い方の物質より不確実性レベルはるかに高いので、特に注意が必要である。

A9.5.2.3.8 異なった試験生物種における BCF

A9.5.2.3.8.1 分類に用いられる BCF 値は、全身についての測定に基づいている。すでに述べたように、分類に最適なデータとは、小型魚類を用いる OECD 305 試験法、またはこれと同等の国際的な方法によって導かれた BCF 値である。小型種では大型種よりも体重に対する鰓表面積の比が大きいいため、大型種より小型種の方が早く定常状態に到達する。このため、BCF 報告値が定常状態における魚および水中の測定濃度のみをもとに決定されているときには、生物濃縮研究に用いられる生物 (魚類) のサイズは、取り込み段階に要する時間との関係で非常に重要である。

したがって、たとえばサケの成魚等、大型魚類を生物濃縮試験に使っているときには、取り込み期間が十分に長く、定常状態が達成されているかどうか、または動力学的な取り込み速度定数が正確に決定できるような一定の状態にあるかを評価すべきである。

A9.5.2.3.8.2 さらに、分類に既存データを用いる場合には、何か他の魚種または他の水生生物種（例えばアサリ）から、および魚のいろいろな臓器について、BCF 値が求められていることがある。そこで、こうしたデータを相互に、また判定基準と比較するための、何らかの共通の基盤または標準化が必要となるであろう。魚あるいは他の水生生物の体内脂質含量と、BCF 測定値の間には密接な関係があることが認められている。したがって、異なった魚種の間で BCF 値を比較する場合、または特定臓器についての BCF 値を全身の BCF 値に換算する場合、BCF 値を共通の脂質含量に対して表現することが一般的なアプローチである。もし例えば、文献中に全身の BCF 値または特定臓器の BCF が示されているならば、その魚種中または臓器の相対的な脂質含量（試験動物種の代表的な脂質含量に関する文献/テストガイドライン参照のこと）を用いて、脂質含量%に対する BCF 値を算出することが第一段階である。第二段階では、共通のデフォルト脂質含量を想定して、典型的な水生動物種（すなわち小型魚種）の全身の BCF を計算する。デフォルト値 5%は、OECD 305 (1966) で採用されている小型魚種の平均脂質含量を代表していることから、この数値が最も多く用いられている (Pedersen ら、1995)。

A9.5.2.3.8.3 一般に、この共通の脂質含量に対して表記された BCF の最高有効値を用いて、調和された分類基準の BCF 500 というカットオフ値と関連させて、湿体重量あたりの BCF 値を決定する。(4.1 章、図 4.1.1 を参照のこと)

A9.5.2.3.9 放射性標識物質の使用

A9.5.2.3.9.1 放射性標識された被験物質を使用すれば、水および魚サンプルの分析が容易になる。しかし、特有の分析法を組み合わせなければ、総放射能測定値は親化合物だけでなく、考えられる代謝生成物、および有機分子として魚組織中に取り込まれた、考えられる代謝をうけた炭素の存在を反映している可能性がある。したがって、放射性標識された被験物質を用いて決定された BCF 値は、通常、過大評価されている。

A9.5.2.3.9.2 放射性標識物質を用いる場合、分子の安定な部分が標識されることが最も多いが、このことが BCF 測定値に代謝物の BCF が含まれる理由である。物質によっては、代謝物が最も毒性が強く、生物濃縮性が最も高いこともある。したがって、水生有害性（生物濃縮性も含めて）を解釈するには、親物質だけでなく、代謝物の測定も重要になることがある。

A9.5.2.3.9.3 放射性標識物質を用いる実験では、しばしば、魚の胆嚢に高い放射性標識濃度が見出される。これは、肝臓内での生物学的変換、およびその後の胆嚢中への代謝物の排泄によって起こると解釈されている (Comotto ら、1979; Wakabayashi ら、1987; Goodrich ら、1991; Toshima ら、1992)。魚が摂餌しないと、胆嚢内容物は腸内に排出されず、胆嚢内に高濃度の代謝物が蓄積されることがある。したがって、BCF 測定値に給餌方法が大きく影響することがある。文献には、放射性標識化合物を用いており、そして魚に給餌していない多くの試験が見られる。結果的に高濃度の放射性物質が胆嚢内に検出される。こうした試験では、ほとんどの例で生物濃縮が過大に推定されている。したがって、放射性標識化合物が用いた実験を評価する際は、給餌方式についても評価することが不可欠である。

A9.5.2.3.9.4 残留放射能の点から BCF が 1000 以上と記録されているならば、定常状態で魚組織中の合計残留放射能の 10%以上を占めている分解生成物を同定および定量することが、たとえば殺虫剤などについて、OECD テストガイドライン 305 (1996) では強く勧告されている。代謝物の同定も定量も可能でないならば、生物濃縮性の評価は放射性標識 BCF 測定値にもとづいて行うべきである。生物蓄積性の高い物質 (BCF \geq 500) について、親化合物についての BCF、および放射性測定値による BCF だけが入手された場合は、分類に関しては後者を採用すべきである。

A9.5.2.4 オクタノール/水分配係数 (K_{ow})

A9.5.2.4.1 有機物質では、実験から求められた高品質の K_{ow} 値、またはレビューにおいて評価され「推奨値」として指定された数値が、その他の K_{ow} 測定よりも望ましい。高品質の実験データが入手できない場合には、 $\log K_{ow}$ のための有効性評価済みの構造活性相関 (QSAR) を分類プロセスに使用してもよい。こうした有効性評価済み QSAR は、その適用性がよく確かめられている化学物質にのみ限定されているならば、合意済みの判定基準に対して変更することなく使用してよい。たとえば強酸や強塩基のような物質、溶出液と反応する物質や、界面活性作用のある物質では、QSAR により推定された K_{ow} 値、または n-オクタノールと水とに対する個別の溶解性をもとにした推定値が、分析による K_{ow} の測定のかわりに与えられるべきである (EEC A.8., 1992; OECD 117, 1989)。解離性物質ではイオン化していない形態 (遊離酸または遊離塩基) について、遊離酸については pK より低い、および遊離塩基については pK より高い pH の適切な緩衝液を用いてのみ、測定を行うべきである。

A9.5.2.4.2 K_{ow} の実験的測定

K_{ow} 値を実験的に測定するには、たとえばフラスコ振騰法や HPLC 等、いくつかの異なった試験法が、標準のガイドラインに記載されている。たとえば OECD テストガイドライン 107 (1995), OECD テストガイドライン 117 (1989), EEC A.8 (1992), EPA-OTS (1982), EPA-FIFRA (1982), ASTM (1993), pH 測定法 (作成中の OECD テストガイドライン) 等がある。フラスコ振騰法は $\log K_{ow}$ が -2 ~ 4 の範囲内になる場合に推奨される。フラスコ振騰法は、水および n-オクタノールに可溶性、本質的に純粋な物質にのみ適用される。水中溶解速度が遅い、高度に親油性の物質には、低速攪拌法を用いて得られたデータの方が、一般により信頼性が高い。さらに、フラスコ振騰法の実験では、微小滴の生成に伴う実験的な困難があるが、これは、オクタノールおよび被験物質が低速で攪拌された反応容器内で平衡に達する低速攪拌法によって、ある程度まで克服できる。低速攪拌法 (作成中の OECD テストガイドライン) を用いることで、 $\log K_{ow}$ が 8.2 までの化合物の K_{ow} を、正確かつ精密に測定できる (OECD Guideline 案, 1998)。フラスコ振騰法と同様に、低速攪拌法は水および n-オクタノールに可溶性本質的に純粋な物質にのみ適用される。HPLC 法は分析カラムを用いる方法であり、 $\log K_{ow}$ 値が 0 から 6 の範囲内となる場合に推奨される。HPLC 法の方がフラスコ振騰法に比べて、被験物質中の不純物の存在による影響を受けにくい。Log K_{ow} を測定する方法には他にジェネレータ・カラム法 (USEPA, 1985) がある。

実験的な K_{ow} の測定は、たとえば極めて水溶性の高い物質や極めて親油性の物質および界面活性剤など、必ずしも可能というわけではないため、QSAR により導いた K_{ow} を採用してもよい。

A9.5.2.4.3 QSAR を用いた $\log K_{ow}$ の決定

K_{ow} の推定値が見出された場合には、それを推定した方法を考慮する必要がある。 K_{ow} の推定のために、数々の QSAR が考案され、また現在でも開発されている。実験的に導いたデータが入手できないならば、市販されている 4 種の PC プログラム (CLOGP, LOGKOW (KOWWIN), AUTOLOGP, SPARC) がリスク評価に多く用いられている。CLOGP, LOGKOW および AUTOLOGP は、置換基の寄与を加算に基づいているのに対し、SPARC はより基本的な化学構造のアルゴリズムを基盤としている。SPARC のみが一般的な方法で、無機化合物または有機金属化合物に採用できる。界面活性物質、錯体形成化合物および混合物の $\log K_{ow}$ 推定には、特別な方法が必要である。QSAR 推定法の有意性評価に関する US EPA/EC 合同プロジェクトでは CLOGP が推奨されている (US EPA/EC 1993)。Pedersen ら (1995) は、CLOGP および LOGKOW プログラムを、その信頼性、市販されていること、および使用上の簡便さの理由から、分類目的に推奨している。分類の目的には以下の推定法が推奨されている (表 A9.5.1)。

表 A9.5.1 K_{ow} 推定に推奨されている QSAR

モデル	$\log K_{ow}$ の範囲	使用できる物質
CLOGP	$\log K_{ow} < 0 - \log K_{ow} > 9^a$	このプログラムは、C, H, N, O, ハロゲン, P または S を含む有機化合物の $\log K_{ow}$ を計算する。
LOGKOW (KOWWIN)	$-4 < \log K_{ow} < 8^b$	このプログラムは C, H, N, O, ハロゲン, Si, P, Se, Li, Na, K または Hg を含む有機化合物の $\log K_{ow}$ を計算する。界面活性物質 (例: アルコールエトキシレート)、染料および解離物質にもこのプログラムで予測できるものもある。
AUTOLOGP	$\log K_{ow} > 5$	このプログラムは C, H, N, O, ハロゲン, P および S を含む有機化合物の $\log K_{ow}$ を計算する。AUTOLOGP の適用性を拡張するために改良が行われている。
SPARC	$\log K_{ow} > 5$ の物質では、KOWWIN および CLOGP よりも優れた結果が得られる。	SPARC は観察データから得られた知識に由来する決定論的モデルというよりむしろ化学的な熱力学原理にもとづいたメカニズムモデルである。このため、SPARC は QSAR を用いる他のモデル (すなわち KOWWIN, CLOGP, AUTOLOGP) とは、トレーニング用の化学物質セットについては $\log K_{ow}$ 測定データが必要でないという点で異なっている。無機化合物や有機金属化合物に一般的な方法で適用できるのは、SPARC だけである。

a Niemelae は実験的に求められた $\log K_{ow}$ 値と推定値を比較する有意性評価研究を行い、 $\log K_{ow}$ の範囲が 0 以下から 9 以上までの多数の有機化合物の $\log K_{ow}$ について、このプログラムが正確に予測することを確認した ($n=501, r^2=0.967$) (TemaNord 1995: 581)

b $\log K_{ow}$ 推定値を実験値に対して分散プロットし、13058 物質について検討したところ (Syracuse Research Corporation, 1999)、LOGKOW は $\log K_{ow}$ が -4 から 8 の範囲にある化合物について有効であると評価されている。

A9.5.3 BCF および K_{ow} 値に関して特別な注意が必要な化学品クラス

A9.5.3.1 BCF の決定または測定を困難にする可能性のある特定の物理化学的性質がある。こうした物質には、その生物濃縮性が当該物質の他の物理化学的性質とは一貫しないようなものもある。たとえば立体障害や物理化学的なパラメータの記述を不適切にするもの、またはたとえば界面活性等のように $\log K_{ow}$ の測定と使用の両方を不適切にしてしまうようなものがある。

A9.5.3.2 試験困難な物質

A9.5.3.2.1 化学物質には、水系システムでの試験が困難なものもあり、こうした物質の試験を支援するために手引きが作成されている (DoE, 1996, ECETOC, 1996 および US EPA, 1996)。OECD は現在、試験困難な物質の水中試験用の指針最終案を作成中である (OECD, 2000)。この OECD 資料は、試験困難なタイプの物質の生物濃縮試験にとっても、またこれらの物質の試験から有意な結論が得られるようにするために必要なステップについても、適切な情報源である。試験困難な物質は、溶解性が低いか、揮発性であるか、または光変換や加水分解、酸化または生分解等のプロセスのために急速分解性をもつ。

A9.5.3.2.2 有機化合物の生物濃縮には、その物質が脂質に可溶であり、水中に存在し、そして魚の鰓を通過して移動可能であることが要件となる。したがって、こうした存在および移動可能性を変化させるような物質の性質は、予測値と比べて、物質の実際の生物濃縮を変化させる。たとえば、易生分解性の物質は、水環境中には短時間しか存在しない。同様に、揮発および加水分解は濃度を低下させ、また物質が生物濃縮に利用される時間を短縮させる。物質の実際の暴露濃度を低下させる可能性のあるさらに重要なパラメータは、一般に粒子状物質ないし表面への吸着である。生物体内で速やかに変換され、このために予測されるよりも低い BCF 値を導くことが示された物質もたくさんある。ミセルまたは凝集体を形成

する物質は、単純な物理化学的特性から予測されるよりも生物濃縮の程度が低くなるであろう。分散剤を使用することによって形成されたミセル内に含まれている疎水性物質にも、このことがあてはまる。したがって、生物蓄積の試験に分散剤を用いることは望ましくない。

A9.5.3.2.3 一般に、試験困難な物質には、親物質に基づいた BCF および K_{ow} の測定値が、生物濃縮性を決定するために不可欠である。さらに、求められた BCF 値の有意性評価には、被験物質濃度の正しい記録が不可欠である。

A9.5.3.3 溶解性の低い物質および複合物質

溶解性の低い物質には特別の注意が必要である。こうした物質の溶解性は検出限界より低いと記録されていることが多く、生物濃縮性を解釈する際に問題となる。こうした物質では、生物濃縮性は $\log K_{ow}$ の実験による測定または $\log K_{ow}$ の QSAR 推定に基づくべきである。

多成分物質が水に完全には溶解しない場合、混合物の成分を実際的に可能な限り同定し、その成分について入手された情報を用いて、生物濃縮性が決定できる可能性を検討するよう試みるのが重要である。生物蓄積性のある成分がその複合物質のかなりの部分（例えば 20%以上、有害成分ではより低い含量）を占めるときには、その複合物質は生物蓄積性であるとみなされるべきである。

A9.5.3.4 分子量の大きい物質

ある分子量を超えると、物質が生物濃縮する可能性は減少する。これはおそらく、物質が鰓膜を通過する際の立体障害によるものと思われる。分子量のカットオフ限界として 700 が適用できるのではないかと提案されている（例えば European Commission, 1996）。しかし、このカットオフ値は批判の対象になっており、間接的な水の影響の可能性のある物質を考慮から除外して、別のカットオフ値 1000 が提案されている（CSTEE, 1999）。一般に巨大分子については、その想定される代謝物または環境中での分解生成物の生物濃縮性を考慮すべきである。したがって、巨大分子量分子の生物濃縮性に関するデータは、評価に注意が必要であり、親化合物、および想定される代謝物ならびに環境中での分解生成物の両方について完全に有効であると考えられる場合にのみ、そのデータを用いるべきである。

A9.5.3.5 界面活性剤

A9.5.3.5.1 界面活性剤は、親油性部分（最も多いのはアルキル鎖）と親水性部分（極性の頭部基）から構成されている。頭部基の電荷により、界面活性剤は陰イオン、陽イオン、非イオン、および両性の界面活性剤に細分化される。頭部基は多様であるため、界面活性剤は構造的に多様な群に属する物質であり、化学構造よりむしろ界面活性性によって定義される。したがって、界面活性剤の生物蓄積性は、界面活性剤全体としてでなく、異なった小分類（陰イオン性、陽イオン性、非イオン性、または両性）に関して考慮すべきである。界面活性物質はエマルジョンを形成することもあり、その場合には生物学的利用可能性を確かめることは困難である。ミセルが形成されると、外見上溶液となっても、生物学的に利用可能な部分に変化する可能性があり、生物蓄積性の解釈上の問題が生じる。

A9.5.3.5.2 実験的に求めた生物濃縮係数

界面活性剤に対する BCF 測定値から、BCF はアルキル鎖が長いほど増加し、また頭部基のついている部位、ならびに他の構造的特徴に依存することが示されている。

A9.5.3.5.3 オクタノール/水分配係数 (K_{ow})

界面活性剤のオクタノール/水分配係数は、エマルジョンが形成されるため、フラスコ振騰法や低速攪拌法では測定できない。さらに、界面活性剤分子は水相中で殆ど例外なくイオンとしてのみ存在するが、それに対して、オクタノール中に溶解するには対イオンとペアを作らねばならない。したがって、

K_{ow} を実験的に測定しても、イオン性界面活性剤の分配の特性を記述するわけではない (Tolls, 1998)。その一方で、陰イオン性および非イオン性界面活性物質は、親油性が高いほど生物濃縮性も高いことが示されている (Tolls, 1998)。Tolls (1998) は、ある界面活性剤については、LOGKOW を用いて推定した $\log K_{ow}$ 値で生物蓄積性を表すことができるが、他の界面活性剤では、この $\log K_{ow}$ 推定値に Roberts (1989) の方法を用いて「補正」が必要であることを示した。これらの結果は、 $\log K_{ow}$ 推定値と生物濃縮の関係についてのデータ品質は、関係している界面活性剤の種類や特定のタイプに依存することを示している。したがって、 $\log K_{ow}$ にもとづいた生物濃縮性の分類は注意して用いるべきである。

A9.5.4 矛盾するデータおよびデータの欠如

A9.5.4.1 矛盾する BCF データ

同一の物質に対して多数の BCF データが入手された状況では、矛盾する結果が生じる可能性がある。一般に、ある適切な生物濃縮性試験で何回か試験されて、同一物質について、適切な生物濃縮性試験で何回か試験が行われ、矛盾する結果が得られた場合は「証拠の重みアプローチ」によって解釈すべきである。これはすなわち、ある物質について、500 以上と 500 未満の両方の BCF データが、実験による測定で得られている場合には、最高の品質かつ記録資料が揃っているデータを、その物質の生物濃縮性判定に用いるべきであることを意味している。それでも差がある場合、たとえば異なった魚種について高品質の BCF 値が入手されている場合には、一般には分類の根拠として有効な値のうち最も高いものを用いるべきである。

同一生物種の同一ライフステージに関して、より大きなデータセット (4 件以上の数値) が入手された場合には、その種を代表する BCF 値として、BCF 値の相乗平均を使用してもよい。

A9.5.4.2 矛盾する $\log K_{ow}$ データ

同一の物質に対して複数の $\log K_{ow}$ データが入手された状況では、矛盾する結果が生じる可能性がある。ある物質に対して 4 以上と 4 未満の両方の $\log K_{ow}$ 値が得られたならば、その物質の生物濃縮性の決定には最高品質かつ記録が最適であるデータを採用すべきである。それでも違いがあるならば、一般に有効な値のうち最高のものを優先すべきである。このような状況では、QSAR で推定された $\log K_{ow}$ 値を、ガイダンスとして用いることもできよう。

A9.5.4.3 専門家の判断

BCF や $\log K_{ow}$ の実験データも、 $\log K_{ow}$ の予測データも入手できないならば、水系環境中での生物濃縮性は専門家の判断で評価されることもある。これは、その分子の構造を、生物濃縮または $\log K_{ow}$ の実験データまたは K_{ow} 予測値が入手できた別の物質の構造と比較することに基づくであろう。

A9.5.5 判定スキーム

A9.5.5.1 上述の考察と結論をもとに、物質が水生生物中に生物濃縮性があるかどうかの判定を容易にする、一つの判定スキームが考案された。

A9.5.5.2 分類目的のためには、高品質の実験による BCF 値が究極的に望ましいものである。低品質の、または不確かな品質の BCF 値は、たとえば暴露期間が短すぎて定常状態に達しなかったなどの理由で、誤った、あるいは低すぎる値をあたえる可能性があるため、 $\log K_{ow}$ に関するデータが入手されれば、このような BCF データを使用すべきでない。魚類の BCF が入手できないならば、別の種 (例えばイガイ) に関する高品質の BCF データを採用してもよい。

A9.5.5.3 有機物質では、実験から導かれた高品質の K_{ow} 値、あるいは排泄によって評価され「推奨値」として指定された数値が望ましい。高品質の実験データが入手できないならば、 $\log K_{ow}$ として、有意性評価された構造活性相関 (QSAR) を分類のために用いることもできる。こうした有意性評価された QSAR は、その適用性が十分に判定されている化学物質に限るなら、分類基準に関して修正することなく使用できよう。

強酸、強塩基、金属錯体、および界面活性物質等の物質では、 K_{ow} の分析測定のかわりに、QSARによる K_{ow} の推定値、またはn-オクタノールならびに水に対する個々の溶解度に基づいた推定値を求めるべきである。

A9.5.5.4 データが入手されたが、有意性評価がなされていないならば、専門家の判断を採用すべきである。

A9.5.5.5 したがって、物質に水生生物における生物濃縮性があるかどうかは、以下のスキームに従って判定できる。

- (a) 有効/高品質な実験から得られた BCF 値 → あり
 - (i) $BCF \geq 500$: その物質には生物濃縮の可能性はある
 - (ii) $BCF < 500$: その物質には生物濃縮の可能性はない
- (b) 有効/高品質な実験から得られた BCF 値 → なし
有効/高品質な実験から得られた $\log K_{ow}$ 値 → あり
 - (ii) $\log K_{ow} \geq 4$: その物質には生物濃縮の可能性はある
 - (iii) $\log K_{ow} < 4$: その物質には生物濃縮の可能性はない
- (c) 有効/高品質な実験から得られた BCF 値 → なし
有効/高品質な実験から得られた $\log K_{ow}$ 値 → なし
 $\log K_{ow}$ 値の推定に有意性の評価された QSAR を使用 → 使用可
 - (iii) $\log K_{ow} \geq 4$: その物質には生物濃縮の可能性はある
 - (iv) $\log K_{ow} < 4$: その物質には生物濃縮の可能性はない

A9.6 QSAR の使用

A9.6.1 経緯

A9.6.1.1 水生毒性分野における定量的構造活性相関 (QSAR) は、チューリッヒの Overton (Lipnick, 1986) およびマールブルグの Meyer (Lipnick, 1989a) の研究にまで遡ることができる。彼らは、物質がオタマジャクシおよび小型魚類に麻酔作用を及ぼす効力が、オリーブオイルと水の間で測定した分配係数と直接比例していることを示した。Overton は 1901 年に著したモノグラフ "Studien über die Narkose (麻酔に関する研究)" で、このような相関性は、生物体内の何らかの分子的な部位において標準モル濃度またはモル容積で生じている毒性を反映していると主張した (Lipnick, 1991a)。さらに、取り込みが水からなのか気体吸入によるのかに関係なく、このことは多様な生物に対して同一濃度または容積に相当すると結論づけた。この相関性は麻酔学分野では Meyer-Overton 理論として知られるようになった。

A9.6.1.2 ポモナ大学の Corwin Hansch および共同研究者らは、n-オクタノール/水を標準的な分配システムとして使用することを提案し、そしてこの分配係数は化学構造から直接推定できる、加算的かつ構造的な性質であることを発見した。さらに、試験結果の統計解析を前提として、QSAR を導くために回帰分析が利用できることを見出した。このアプローチを用いて、これらの研究者らは 1972 年に、 $\log (1/C) = A \log K_{ow} + B$ の形をとった 137 の QSAR モデルを報告した。この場合 K_{ow} は n-オクタノール/水分配係数、C は非電解質かつ非反応性の単純な有機化合物が、動物の全身、臓器、細胞、場合によっては純粋な酵素に及ぼす影響に対する、標準的な生物反応を生じる化学物質のモル濃度である。これらの公式のうち 5 つは 5 種類の単純な一価アルコールの毒性を 5 種類の魚類と関連づけたもので、ほぼ同一の勾配および切片を有し、Könemann によって 1981 年に発見されたものと実質上、一致している。後者は Hansch の先行研究を知らなかったように思われる。Könemann らは、このような単純な非反応性が

つ非電解性の物質はすべて、魚類を用いた急性毒性試験では麻酔薬のメカニズムで作用して、最小のまたはベースラインの毒性となることを示した (Lipnick, 1989b)。

A9.6.2 有害性の過小評価を起こす実験技術上の誤差

A9.6.2.1 それ以外の非電解性の物質は、こうした QSAR で予測されるよりも毒性が高いことはあるが、試験の技術的な誤差を除けば、毒性が低くなることはない。こうした試験の技術的な誤差としては、実験中に揮発しがちな炭化水素等の化合物、あるいは急性の試験期間では、水相（水槽中の試験溶液）中の濃度と、麻酔作用を起こす体内の疎水性部位との間に定常状態の平衡的な分配を達成するのに適していない、非常に親水性の高い化合物、などから得られたデータがある。このような単純な非反応性かつ非電解性の物質の $\log K_{ow}$ と $\log C$ の QSAR プロットは、試験期間中にこうした平衡に達している限りは線形の関係を示す。この点を超えると、双線形の関係が観察され、最も毒性の高い物質は平衡が達成された $\log K_{ow}$ が最高となる物質である (Lipnick, 1995)。

A9.6.2.2 試験の際のもう一つの問題とは、水溶解性によるカットオフによって起こるものである。影響を生じるのに必要な毒性濃度が、その化合物の水溶解度より高いと、水に飽和していたとしても、何の影響も観察されないであろう。予測される毒性濃度が水溶解度に近い化合物もまた、試験期間が平衡的な分配が達成するのに十分でないときは、影響は見られないであろう。界面活性剤についても、臨界ミセル濃度より高い濃度で毒性が予測されるなら、同様なカットオフが観察される。こうした化合物は、個別に試験した場合にはこれらの条件下で毒性が認められないこともあるが、混合物の毒性に対する寄与はなお存在している。 $\log K_{ow}$ 値が同じ化合物でも、水に対する溶解性の差は、融点に関連する融合エンタルピーの違いを反映する。融点は、結晶格子の安定度を反映するものであり、分子間水素結合、コンホメーションの柔軟性の欠如、および対称性によって左右される。化合物は対称的であるほど、融点は高くなる (Lipnick, 1990)。

A9.6.3 QSAR モデル化の課題

A9.6.3.1 適切な QSAR を選択するという事は、そのモデルが、未試験の化学物質の毒性または生物活性について、信頼できる予測値を与えるということの意味している。一般的に言えば、対象物質に構造が類似している化学物質の厳密に定義されたセットから QSAR が導かれているのでなければ、化学構造の複雑さが増すほど信頼性は低下する。厳密に定義された化学物質群から導かれた QSAR モデルは、医薬品の開発に一般的に採用されており、たとえば、新しいリード化合物が見つかり、活性の最適化（および毒性の低下）をさせるため、僅かな構造の修正を行いたい場合に用いられる。全体的に、その目標は外挿よりむしろ内挿による推定を行うことである。

A9.6.3.2 たとえば、エタノール、*n*-ブタノール、*n*-ヘキサノール、および *n*-ノナノールについて、ファットヘッドミノールを用いた 96 時間の LC50 試験データが揃っているならば、*n*-プロパノールおよび *n*-ペンタノールについて、このエンドポイントの毒性値を、ある程度の信頼度をもって予測できる。反対にメタノールでは、試験されたどの物質よりも炭素原子数が少なく、外挿となるので、予測の信頼性は劣ることになる。実際、このような同族体グループにおける最初のメンバー物質の挙動は、一般的に最も変則的であり、その系列の他のメンバー物質からのデータを用いて予測すべきではない。分岐型アルコールの毒性でさえ、問題とされるエンドポイントによっては、不合理な外挿になる。こうした外挿結果は、親化合物の性質に反して、特定のエンドポイントに対する毒性が代謝物の生成に関与する程度に応じて、さらに信頼性が低くなる。また、毒性が特定の受容体結合メカニズムに介在されている場合、化学構造がわずかに変化しただけで、劇的な作用が観察されることもある。

A9.6.3.3 こうした予測結果の有意性を究極的に支配するのは、ある特定の生物学的なエンドポイントについて QSAR を導き出すのに用いられた化合物群が、共通の分子機構によってどの程度まで作用しているか、である。多くの、そして恐らくほとんどの例で、QSAR はこうした機構モデルを示すことはなく、単に相関的なモデルを示すだけである。真に有意な機構モデルは、共通の分子機構により作用する、一連の化学物質群から導かれるはずであり、問題となっている機構の一段階または複数段階に直接関連している 1 個または複数のパラメータを用いた公式に適合するはずである。このようなパラメータまたは特性はより一般的には分子的ディスクリプターとして知られている。また、こうした共通に使用される分子的ディスクリプターの多くは、直接の物理的な解釈がない場合もあることを留意しておくことも重要である。相関モデルについては、こうした限界を考えると、データの統計的適合性が機構モデルよりも劣るように思われる。機構は完全には把握されていなくてもよいが、このアプローチにおいて信頼性をもてるだけの十分な情報がわかっていることもある。相関モデルの場合、各モデルが定義される厳密

さが増すほど、その予測の信頼性も増す。たとえばアクリレート等の求電子物質のカテゴリーを指定すれば、この範囲内では反応性の程度が同様であり、「新規」物質について、 $\log K_{ow}$ パラメータのみにもとづいたモデルを用いて毒性の推定が可能である。

A9.6.3.4 一例として、水酸基と共役している二重結合または三重結合を含む一級および二級アルコール（すなわちアリルまたはプロパギルアルコール）は、対応する飽和化合物に関する QSAR に対して予測されるよりも毒性が高い。このような挙動は、至る所に存在する酵素であるアルコールデヒドロゲナーゼによる代謝活性化によって、対応する α , β -不飽和アルデヒドおよびケトンに代謝され、これがミカエル型のアクセプター機構により求電子物質として作用するという求電子物質前駆体機構によるものとされている (Veith ら, 1989)。アルコールデヒドロゲナーゼ阻害物質が存在すると、これらの化合物は他のアルコール類と同様に挙動し、機構による仮説と一致して、過剰な毒性を示さない。

A9.6.3.5 こうした一連の類似化合物から外れると、状況は一気に、さらに複雑化する。たとえば、単純なベンゼン誘導体を考えてみる。クロロベンゼン類は一連の類似化合物と同様であるとみなしてよい。3 種類のジクロロベンゼン異性体の毒性にはそれほど大きな違いがあるとは思われないため、これら異性体のうち一つに関する試験データをもとにしたクロロベンゼン類に関する QSAR は妥当であるように思われる。ベンゼン環に他の官能基が置換された場合はどうか？ 脂肪族アルコールとは異なり、水酸基をベンゼン環に付加するとフェノールが生成されて、もはや中性ではなく、結果的に生じる負の電荷が共鳴により安定化することにより、イオン化性のある酸性化合物となる。この理由で、フェノールは真の麻酔薬として作用しない。フェノールに電子吸引性の置換基（例えば塩素原子）を付加すると、こうした化合物は酸化的リン酸化の脱共役剤として作用する化合物となる（例えば除草剤のジノセブ）。アルデヒド基を置換すると、こうした化合物は、リジンの ϵ -アミノ基のような、アミノ基と反応してシッフ塩基付加物を生成するので、求電子機構により毒性が増加する。同様にベンジルクロライドは、求電子物質としてスルフヒドリル基と共有結合付加物を生成する。試験していない化合物の予測を試みる際には、これらの、ならびに他の多くの官能基の化学的反応性と、それらの間の相互作用について注意深く検討すべきであり、これらを化学文献から証拠揃えする努力を払わねばならない (Lipnick, 1991b)。

A9.6.3.6 予測を行うのに QSAR を用いるには限界があことから、まだ試験していない化合物自体について何らかの機構についての情報が入手されていない限り、試験の代替手段としてよりも、試験優先順位設定の手段として採用するのが最善である。実際、環境放出および環境暴露が分かっているにもかかわらず予測が不可能であるということ自体が、試験を実施する、あるいは判定が必要な化学物質クラスについて新しい QSAR を開発するきっかけとなるであろう。こうしたデータセットからの統計解析、たとえば回帰分析等によって、QSAR モデルを導くことができる。最も一般的に採用されている分子的指標である $\log K_{ow}$ を、最初の企てとして試みてもよい。

A9.6.3.7 反対に、メカニズムに基づいた QSAR モデルの導出には、分子機構、およびどのようなパラメータがこうした作用を適切にモデル化できるか、の理解または作業仮説が必要である。これは、分子機構ではなく、生物学的/生理学的反応と関連づけられた、作用機序に関する仮説とは違うことを留意しておくことが重要である。

A9.6.4 水生環境有害性分類への QSAR の使用

A9.6.4.1 水生環境に関する分類の目的には、以下のような物質本来の特性が関係する。

- (a) n -オクタノール/水分配係数 $\log K_{ow}$
- (b) 生物濃縮係数 BCF
- (c) 分解性—非生物学的および生物的分解
- (d) 魚類、ミジンコおよび藻類に対する急性水生毒性
- (e) 魚類およびミジンコに対する長期毒性

A9.6.4.2 試験データが有効であり、QSAR は分類のためのデータの欠損を補うのに用いられるという前提で、常に試験データの方が QSAR による予測より優先される。利用できる QSAR の信頼性および適用範囲は多様であるので、これらエンドポイントそれぞれの予測にさまざまな制限が適用される。それにもかかわらず、試験された化合物が、ある QSAR モデルの予測のための有用性にある程度信頼できるような化学物質のクラスまたは構造タイプ（上記参照）に属しているならば、この予測結果を実験データと比較してみる価値がある。これは、測定データ中の実験技術上の誤差（揮発、平衡に達するのに不十分な試験期間、水溶解度によるカットオフ）を検出するのに、このようなアプローチを用いることは珍しいことではないからである。実験技術上の誤差の多くは物質を実際の毒性より低く分類してしまう原因となる。

A9.6.4.3 2種類以上の QSAR が適用できるか、またはそう思われる場合には、予測データを実測データと（上述のように）比較すると同じように、さまざまなモデルの予測を比較することは有用である。それらのモデル間に相違がなければ、その結果は予測の有意性を高めることになる。もちろんこれは、すべてのモデルが類似した化合物のデータと統計的方法を用いて開発されたことも意味している。他方、予測値が全く違っていたならば、結果についてさらに検証する必要がある。用いたモデルのいずれも有効な予測値を与えなかった可能性も常にある。第一段階として、各予測モデルを導いた化学物質の構造および特性を検証して、こうしたモデルは、予測が必要とされる構造および特性の両方に関して類似している化学物質をもとに作成されているかどうかを判定しなければならない。あるデータセットに、そのモデルの導出に用いられた適切な類似物質が含まれていれば、モデルの予測値に対してその化合物のデータベース中の測定値を検証すべきである。結果がモデル全体に十分適合するのであれば、それが最も信頼できるモデルであると思われる。また、そのような類似物質に関する試験データが含まれているモデルがないならば、問題の化学物質を試験することが推奨される。

A9.6.4.4 米国 EPA は最近ウェブサイト「HPV チャレンジプログラムにおける化学物質カテゴリーの策定」というドラフト文書を提示し、「…米国 HPV リストにあるすべての化学物質のスクリーニング情報データセット (SIDS) を自主的に編纂し…化学物質の物理化学的性質、環境運命、および人と環境に対する影響の初期評価に必要な基礎的スクリーニングデータを[提供する]」ために、化学物質区分を用いることを提案している (US EPA 1999)。このリストは「毒性物質管理法の 1990 年インベントリー更新規則 (IUR) のために報告された約 2,800 種の HPV 化学物質」からなっている。

A9.6.4.5 提案されている一つのアプローチは「…科学的に正当であるならば…密接な関連性のある化学物質を、個々の化学物質として試験するよりも、グループとして、または区分として考えることである。この区分によるアプローチでは、SIDS のエンドポイントごとにあらゆる化学物質を試験する必要はない。」というものである。こうした限定的な試験が適正であると判断されるのは「…最終データセットは、理想的には区分に含まれる物質間の内挿「ここに強調を付言」により、まだ試験していないエンドポイントの評価を可能にするものでなければならない」ことが前提となっている。こうした区分を定義し、データを作成するプロセスが提案のなかで説明されている。

A9.6.4.6 検討されている第二の、それほどデータにたよらないアプローチ (US EPA, 2000a) は「…より詳しく特性化されている化学物質（「類似物質」）に密接に関連した単一化学物質に SAR 原則を適用することである。提案されている第三のアプローチは、「…生態毒性値を作成する SAR にもとづくコンピュータプログラムである、ECOSAR (US EPA, 2000b) に用いられている[のと類似している]…個々の化学物質[に対する]…類似物質によるアプローチと区分によるアプローチの組み合わせ…」を用いる方法である。この資料ではまた、米国 EPA 新規化学物質プログラム内での SAR 使用の経緯、およびこうした SAR アプローチのためにどのようにデータを収集し解析するかについて詳述している。

A9.6.4.7 北欧閣僚会議は「環境有害性分類」と題する報告書を発行した (Pederson ら, 1995)。これはデータ収集および解釈に関する情報と共に、「水に対する溶解性および急性水生毒性の QSAR 推定」という題の節 (5.2.8) も記載されている。この節では、 $\log K_{ow}$ も含めた物理化学的性質の推定についても論じている。分類目的のためには、先の OECD ガイドライン (OECD, 1995) に引用されているように、「最少の急性水生毒性」予測のための推定方法が推奨されており、これは、「アルコール、ケトン、エーテル、ハロゲン化アルキルおよびハロゲン化アリーール等、中性の、非反応性・非イオン化性の有機化合物…、および芳香族炭化水素、ハロゲン化された芳香族および脂肪族炭化水素、ならびにスルフィドやジスルフィドにも用いることが可能である」。この北欧の文書には、これらの方法のいくつかをコンピュータで利用するためのディスクも含まれている。

A9.6.4.8 欧州化学物質生態毒性および毒性センター (ECETOC) は「化学物質の環境運命および影響の評価における QSAR」と題する報告書を発行している。これは QSAR を「…データの有意性の確認、または優先順位の設定、リスク評価および分類のためにデータの欠落を補充する」ために用いることについて述べている (ECETOC, 1998)。環境運命および水生毒性予測のための QSAR の説明がされている。この報告書は「…対象となっている [エンドポイント] のための一貫性のあるデータセットが…十分に定義された化学構造の範囲 (ドメイン) [が必要であり] …それから訓練用セットを開発する」と述べている。この文書はまた、機構に基づいたモデルの長所、QSAR 開発における統計解析の使用、および「かけ離れたデータ」をどう評価するかについて論じている。

A9.6.4.9 *n*-オクタノール/水分配係数 (K_{ow})

A9.6.4.9.1 化学構造から直接 $\log K_{ow}$ を計算するために、CLOGP (US EPA, 1999)、LOGKOW (US EPA, 2000a)、および SPARC (US EPA, 2000b) 等のコンピュータ化された方法が利用できる。CLOGP および LOGKOW は官能基の関与を加算する方法であるのに対し、SPARC はより基礎的な化学構造アルゴリズムに基づいている。水中で加水分解またはその他の反応を受ける可能性のある化合物について計算値を使用する際には注意が必要である。こうした変化は、このような反応性化学物質に関する水生毒性試験データを解釈する際に考慮されなければならない。無機化合物および有機金属化合物には、SPARC だけが一般的な方法で採用できる。界面活性物質、キレート形成化合物、および混合物の $\log K_{ow}$ または水生毒性を推定するには、特別な方法が必要である。

A9.6.4.9.2 ペンタクロロフェノールおよび類似化合物については、イオン化および非イオン化 (中性) の両方の形態について $\log K_{ow}$ 値を計算できる。こうした数値は特定の反応性分子 (例えばベンゾトリクロリド) について計算できる可能性もあるが、反応性およびその後の加水分解についても考慮する必要がある。また、こうしたイオン化するフェノールについては、 pK_a が第二のパラメータである。有機金属化合物の $\log K_{ow}$ 値を計算するのに特定のモデルを用いることができるが、こうした化合物のあるものは、実際には水中でイオン対として存在しているものもあるので、注意して使用する必要がある。

A9.6.4.9.3 極めて親油性の高い化合物では、 $\log K_{ow}$ 6 から 6.5 までの測定はフラスコ振騰法で行えるが、低速攪拌法を用いれば $\log K_{ow}$ を約 8 まで拡大できる (Bruijn ら, 1989)。これらの方法で測定できる範囲を越えて外挿する際にも、計算が有用であると考えられる。もちろん、毒性等に関する QSAR モデルが $\log K_{ow}$ 値の低い化学物質にもとづいているならば、予測それ自体も外挿となることに留意しておく必要がある。実際、生物濃縮性については、数値が高いときには $\log K_{ow}$ との関係が非線形になることが知られている。 $\log K_{ow}$ 値の低い化合物では、官能基の関与の考え方も適用できるが、そうした物質、特に $\log K_{ow}$ 値がマイナスの物質では、親油性部位への分配が起ったとしても、僅かであり、Overton が述べているように、これらの物質は浸透圧作用によって毒性を生じるため、有害性分類目的にはそれほど有用ではない (Lipnick, 1986)。

A9.6.4.10 生物濃縮係数 BCF

A9.6.4.10.1 実験的に測定された BCF が入手されたなら、これらの数値を分類に用いるべきである。生物濃縮試験の測定は、純粋サンプルを用いて、水に対する溶解度の範囲内の試験濃度で、また水中濃度と魚組織中濃度の平衡が定常状態を達成するのに十分な試験期間で実施しなければならない。さらに、期間を延長して生物濃縮試験をすると、 $\log K_{ow}$ との相関性は水平となり、最終的には減少する。環境条件下では、親油性の高い化学物質の生物濃縮は食物ならびに水からの取り込みの組み合わせによって起こり、 $\log K_{ow} \approx 6$ で食物からの取り込みに切り替わる。そうでなければ、 $\log K_{ow}$ 値は QSAR モデルと共に、有機化合物の生物濃縮性を予測するパラメータとして用いることができる。こうした QSAR からのずれは、化学物質が魚体内で代謝される程度の差を反映している傾向がある。したがって、フタレート等の化学物質は、この理由によって生物濃縮が予測されるより著しく低くなることもある。さらに、BCF 予

測値を、放射性化合物を用いた BCF 値と比較するには注意が必要である。なぜなら、こうして検出された組織中濃度は、親化合物と代謝物の混合、また共有結合した親化合物または代謝物の分も含んでいることあるからである。

A9.6.4.10.2 実験による log K_{ow} を最も優先して使用すべきである。しかし、旧来のフラスコ振騰法では 5.5 以上の値は信頼できず、多くの場合、計算値の平均値を使用するか、または低速攪拌法で測定し直した方がよい (Bruijn ら, 1989)。測定データの精度に、理にかなった疑いがあるなら、log K_{ow} 計算値を使用すべきである。

A9.6.4.11 分解性 — 非生物的分解および生分解

水相中の非生物的分解についての QSAR は、特定の化学物質群およびメカニズムについての厳密に定義された線形自由エネルギー関係 (LFER) である。たとえば、こうした LFER は、芳香環にいろいろな置換基を有する塩化ベンジルの加水分解に利用できる。こうした厳密に定義された LFER モデルは、必要なパラメータが問題の置換基について入手できるなら、非常に信頼性が高くなる。光分解、すなわち UV により生じた反応性分子種との反応は、大気コンパートメントについて推定値から外挿できることもある。こうした非生物のプロセスは通常は有機化合物の完全分解までには至らないが、しばしば重要な開始点であり、また律速でありうる。生分解性を計算するための QSAR は、化合物に固有のもの (OECD, 1995) であるか、または BIODEG 等の官能基関与モデルのいずれかである (Hansch と Leo, 1995; Meylan と Howard, 1995; Hilal ら, 1994; Howard ら, 1992; Boethling ら, 1994; Howard と Meylan 1992; Loonen ら, 1999)。有意性の評価された化合物クラス固有のモデルは適用範囲が極めて限られているのに対し、官能基関与モデルの適用範囲はより広い可能性がある。しかし、モデルとなる下部構造を含む化合物に限定されている。有意性評価研究から、現在利用できる官能基関与モデルによる生物分解性予測は「易生分解性でない」ことの予測に用いられること (Pederson ら, 1996; Langenberg ら, 1996; US EPA, 1993)、したがって、水生有害性分類上「急速分解性でない」ことと関連づけられることが示唆されている。

A9.6.4.12 魚、ミジンコおよび藻類に対する急性水生毒性

非反応性かつ非電解質の有機化合物の急性水生毒性 (ベースライン毒性) は、その log K_{ow} 値から極めて高いレベルの信頼性をもって予測できるが、ただし求電子、前求電子、または特殊な機能をもつ官能基 (上記参照) の存在が検出されなかったことが前提である。こうした特殊な毒性物質については、適切な QSAR を予測的な方法で選択しなければならないという問題が残る。これは、関連性のある作用機序を特定するための直接で簡単な判定基準がまだないので、適切なモデルを選択するために、専門家の経験的判断を用いる必要があるからである。したがって、もし適切でない QSAR が採用されると、予測値に何桁もの誤差が生じ、ベースライン毒性の場合には、毒性が高い方よりむしろ低い方に予測されることになる。

A9.6.4.13 魚およびミジンコに対する長期毒性

魚およびミジンコに対する慢性毒性の計算値を、急性毒性実験データに基づいた分類を否定するのに用いてはならない。魚およびミジンコに対する長期毒性を計算するのに利用できる有意性判定済みのモデルは少ししかない。これらのモデルは、log K_{ow} 相関関係のみに基づいており、その適用性は非反応性、非電解質の有機化合物に限られ、また、長期暴露条件下で特殊な作用機序をもつ化学物質には適していない。信頼できる慢性毒性値の推定は、慢性毒性機構を非特異的なものと特異的なもの間で正しく区別することに依存している。さもないと、予測された毒性は何桁も誤る可能性がある。多くの化合物では慢性試験で得られた過剰毒性⁴が急性試験での過剰毒性と相関している場合があるものの、必ずしもそれが該当しない場合もあることに、注意しなければならない。

⁴ 過剰毒性、 $T_e = (\text{ベースライン毒性予測値}) / \text{毒性実測値}$ 。

A9.7 金属および金属化合物の分類

A9.7.1 序

A9.7.1.1 化学物質を分類するための調和システムは有害性に基づくシステムであり、有害性を特定する根拠は物質の水生毒性、ならびに分解性および生物蓄積作用についての情報である(OECD 1998)。本文書は、ある物質が水相中に溶解している際の、その物質に伴う有害性のみを扱っているため、これに由来する暴露は、当該物質の水への溶解度と、水生環境中の生物種における当該物質の生物学的利用能によって制限される。したがって、金属および金属化合物に関する有害性分類スキームも、金属および金属化合物が利用されうる(すなわち例えば $M\cdot NO_3$ として存在する場合の M^+ のように、溶存金属イオンとして存在する)場合に示される有害性に限定され、食物中の金属のように、水相中には溶解していないが、なお生物学的に利用されうるであろう金属および金属化合物に対する暴露を考慮に入れるものではない。本節では、毒性を持つ、または有機物であって生物蓄積性もしくは残留性の有害性を持つ可能性のある金属化合物の非金属イオン(例えば CN^-)は考慮しない。このような金属化合物については、その非金属イオンの有害性についても検討しなければならない。

A9.7.1.2 金属またはその化合物を添加した後、溶液中に存在する金属イオンのレベルは、その溶出の程度すなわち水への溶解度と、媒体との相互作用によって水に溶解しうる形態への変化を起こす程度という主に2種類の過程によって決定される。本手引きの目的に照らして「変化」と呼ぶ、この後者の過程が起こる速度とその程度は、様々な化合物および金属自体の間で大きく異なることがあり、適切な有害性クラスを決定するにあたって重要な要素となる。変換に関するデータが入手できた場合、分類決定においてはそれを考慮に入れるべきである。この速度を測定するためのプロトコールは附属書 10 に記載されている。

A9.7.1.3 一般的に言って、物質が溶解する速度が、その本質的な毒性の決定に関係するとは考えられていない。しかし、金属および多くの難溶性の無機金属化合物に関しては、通常の溶解技術によって溶解を達成させることが非常に難しいので、溶解と変化の2つの過程は区別しにくくなる。したがって、化合物が十分に難溶性であって、可溶化させる通常の試みによって溶解するレベルが、入手された $L(E)C_{50}$ を超えない場合に考慮しなければならないのは、変化の速度および程度である。この変化は多くの要因によって影響されるが、その中で無視できないものは媒体の pH 値、水硬度、温度などの性質であろう。これらの性質に加えて、試験を行った微粒子の粒径や比表面積、媒体に対して暴露された時間、そして言うまでもなく媒体内における当該物質の容積または表面積負荷など、他の要素もまたすべて、水中に溶解された金属イオンのレベルを決めるのに役割を果たす。したがって一般に、附属書 10 にある標準プロトコールに従って行われた変化のデータのみが、分類の目的に対して信頼できると考えられる。

A9.7.1.4 このプロトコールは、溶解したイオンのレベルが、添加される物質の負荷に直接関係付けられるように、主要な変動要因を標準化することを目的にしている。分類に適した有害性クラスを決定するのに使用できるのは、得られた $L(E)C_{50}$ に相当する金属イオンのレベルを達成させる、この負荷レベルである。この試験方法については附属書 10 に詳述されている。この試験プロトコールによるデータを使用するにあたって適用される戦略、およびこの戦略を機能させる上で必要となるデータの要件について後に述べる。

A9.7.1.5 易溶性および難溶性の金属および金属化合物の分類を検討するにあたっては、数多くの要素について理解しなければならない。第 4.1 章で定義したように、「分解」という用語は有機分子の分解を意味するものである。無機化合物および金属については、有機化合物について考慮され、用いられている分解性の概念が意味をなさず、あるいは限定的な意味しか持たないことは明らかである。むしろ、物質は通常的环境過程によって、有毒物質種の生物学的利用可能性を増加または減少させるように変化させられる可能性がある。同様に、 $\log K_{ow}$ もまた蓄積性の尺度と考えることはできない。それにもかかわらず、物質または有毒な代謝物/反応生成物が速やかに環境から消失せず、および/または生物蓄積するという考え方は、有機物質に対してと同様に、金属および金属化合物にも当てはまることである。

A9.7.1.6 可溶性の形態への分化は、pH 値、水硬度、およびその他の変動要因によって影響を受け、多少とも毒性を持つ特別な形態の金属イオンを生成することがある。それに加えて、金属イオンは数多くの作用（例えば無機物化や分配）によって水相において利用不可能な形態に変換される可能性もある。時にこれらの過程が慢性毒性の分類評価における分解と同じ位、速やかに起こることもある。しかし、水相から他の環境媒体への金属イオンの分配は、必ずしも生物学的に利用できなくなったことを意味するわけではなく、またこの金属が恒久的に利用できなくなったことを意味するものでもない。

A9.7.1.7 水相からの金属イオンの分配の程度、または金属がより毒性の低い、もしくは無毒性の形態に転換された、あるいは転換されうる程度に関する情報は、十分に広範囲な、環境上ありうる条件全体に対しては、入手できないことがしばしばあるので、したがって分類の助けとするために数多くの仮定を置くことが必要となろう。こうした仮定は、入手されたデータが他のように示している場合には、変更してよい。第一に、金属イオンは、一度水に導入されると、水相から速やかには分配されず、したがってこれらの化合物は判定基準に適合しない、と仮定すべきである。この背景にあるのは、金属の分化は起こりうるが、その分化種は環境上ありうる条件下で利用可能である、という前提である。前述のように、このことは常に成り立つわけではないので、28 日の試験期間において生物学的利用可能性の変化を示唆する証拠が得られた場合は、慎重に検討すべきである。金属および無機金属化合物の生物蓄積は複雑な過程であり、生物蓄積性データは注意して使用すべきである。生物蓄積性の判定基準を適用する際は、入手されたすべてのデータを十分に考慮して、ケースバイケースで判断する必要がある。

A9.7.1.8 慎重なアプローチの例となるもう 1 つの前提条件は、特定の金属化合物について、測定されたあるいは計算された溶解度データが存在しない際、当該物質が $L(E)C_{50}$ のレベルで毒性を引き起こす十分な溶解度を有し、したがって他の可溶性塩類と同じ様に分類することができる、という仮定である。これもまた明らかに必ずしも当てはまらない場合があるので、適切な溶解度データを得ることが賢明であろう。

A9.7.1.9 本節では、金属および金属化合物を扱う。本手引きの中では、金属および金属化合物は次のように特徴付けられており、したがって有機金属は本節の範囲外にある。

- (a) 元素の状態 M^0 では水に溶解しないが、利用能のある形態に変化する金属。これはすなわち、元素状態の金属が水または希薄な水性電解質と反応して、溶解性の陽イオン性もしくは陰イオン性の生成物を形成し、その過程で金属が中性ないしゼロ酸化の状態から、より酸化数の高い状態へ酸化もしくは変化されることを意味する。
- (b) 酸化物や硫化物などの単純な金属化合物においては、この金属は既に酸化された状態で存在し、したがってそうした金属が水性媒体に導入されても、さらに金属の酸化が起こることは考えられない。

しかし、酸化状態に変化は起こらなくとも、媒体との相互作用によってより可溶性の形態が得られる可能性はある。難溶性の金属化合物は、その溶解度積を計算でき、かつ溶解によって少量の利用できる形態を生じる化合物と考えることができる。しかし、例えば水酸化アルミニウムのように、変化/溶解試験の過程で析出する金属化合物の溶解度積など、数多くの要因によって最終的な溶解濃度が影響されることを認識すべきである。

A9.7.2 分類への水生毒性データおよび溶解度データの適用

A9.7.2.1 水生毒性データの解釈

A9.7.2.1.1 承認されたプロトコールに従って実施された水生毒性試験は、通常、分類の目的に対して有意なデータとして受け入れられるべきである。分類を目的とした水生毒性データポイントの評価に共通する一般的な問題については、A9.3 章もまた参照すべきである。

A9.7.2.1.2 金属の錯体形成と分化

A9.7.2.1.2.1 溶液中における特定金属の毒性は、主に（しかし、厳密に限定されずに）溶存する自由金属イオンのレベルによって決定されるように思われる。アルカリ度、イオン強度、pH 値を含む非生物的要素は、(i) 水中における金属の化学種に影響する（したがってその利用可能性に影響する）こと、および (ii) 利用される金属の生物組織による取り込みと結合に影響することの二つの方法で、金属の毒性に影響する。

A9.7.2.1.2.2 金属の分化が重要な場合には、毒性を引き起こす可能性が強いものも含め、金属の様々な形態の濃度をモデル化することが可能であろう。試験物質の錯化および非錯化フラクションを区別して暴露濃度を定量するための分析法は、常に利用できるわけではない、もしくは経済的でないであろう。

A9.7.2.1.2.3 試験媒体中および自然環境中における、金属の有機および無機配位子への錯体化は、金属の分化モデルから見積もることができる。MINTEQA (Brown と Allison, 1987), WHAM (Tipping, 1994) 並びに CHESS (Santore と Driscoll, 1995) などの pH 値、硬度、DOC、および無機物質を含む、金属の分化モデルは、金属イオンの非錯化および錯化フラクションを算定するのに使用できる。またその代わりに、生物学的配位子モデル (BLM) を用いて、生物レベルにおける毒性影響の原因となる金属イオン濃度を算定することもできる。この BLM モデルは現在のところ、ある限られた金属、生物、およびエンドポイントについてのみ、有意性が確認されている (Santore と Di Toro, 1999)。媒体内における金属錯体形成の特性分析に用いられたモデルおよび算定式に関しては、自然環境に戻して検討できるような形で、常に明確に記録、報告を行うべきである (OECD, 2000)。

A9.7.2.2 溶解度データの解釈

A9.7.2.2.1 溶解度に関して入手されたデータについて考察する場合、その正当性、および金属化合物の有害性の特定に向けた適用性を評価すべきである。特に、データが作られた時の pH 値は判っていないなければならない。

A9.7.2.2.2 既存データの評価

既存データは次の 3 種類のうちいずれかの形になる。すなわち、一部の十分に研究された金属に関しては、種々の無機金属化合物について溶解度積または溶解度データが存在するであろう。また、溶解度と pH 値との関係が知られている可能性もある。しかし、多くの金属または金属化合物に関しては、入手できる情報が、例えば、難溶性である、などの記述的なものでしかないことがありうる。不幸にして、このような記述的な表現に対する溶解度の範囲についての（一貫性のある）手引きは非常に少ないように思われる。こうした情報が入手できる唯一の情報である場合、変化/溶解プロトコール（附属書 10）を用いて溶解度データをとる必要があると思われる。

A9.7.2.2.3 金属化合物の溶解度を評価するためのスクリーニングテスト

溶解度データがない場合、変化/溶解プロトコール（附属書 10）に述べるように、金属化合物について、24 時間の高負荷試験に基づいて溶解度を評価する、単純な「スクリーニングテスト」を用いることができる。スクリーニングテストの役割は、可溶性形態との区別が困難なように、溶解または速やかな変化を受け、したがって溶存イオン濃度に基づいて分類されるような金属化合物を特定することにある。変化/溶解プロトコールに詳述されているスクリーニングテストによるデータが入手できる場合は、試験された pH 範囲における溶解度の最大値を用いるべきである。pH 範囲の全域についてデータが入手できない場合は、その最大溶解度が適切な熱力学的分化モデルまたはその他の適切な手法によって得られたものかを確認すべきである (A9.7.2.1.2.3 を参照)。この試験が金属化合物のみを対象にしていることを念頭に置くべきである。

A9.7.2.2.4 金属および金属化合物の溶解度を評価するためのフルテスト

この分析方法の最初の手順は、スクリーニング試験の場合と同様、分析を行うべき pH 値の評価である。通常、フルテストは溶液中における溶解した金属イオンの濃度が最大になる pH 値で実施すべきである。その場合、pH 値はスクリーニング試験と同様の手引きに従って選ばれる。

フルテストによるデータに基づき、3種類の負荷量(1 mg/l の「低負荷」、10 mg/l の「中負荷」、および 100mg/l の「高負荷」)それぞれについて、7 日後の溶液中の金属イオン濃度を算定することができる。試験の目的が物質の長期的な有害性の評価である場合、低負荷の試験は適切な pH 値で 28 日間まで延長することができる。

A9.7.2.3 水生毒性データと溶解度データの比較

物質を分類すべきか否かの決定は、水生毒性データと溶解度データを比較することによって行われる。溶解濃度が L(E)C₅₀ を超える場合、それが入手された唯一のデータであれば、毒性および溶解度データが同一の pH 値におけるものであるか否かに関係なく、その物質は分類を行うべきである。全 pH 値域にわたって溶解濃度が L(E)C₅₀ を超えることがないことを示す他の溶解度データが入手できる場合は、当該の物質をその可溶性形態について分類すべきではない。このことは、環境毒性試験または適切な生物学的利用可能性影響度モデルによる追加データの利用も含んでいる。

A9.7.3 環境における変化に関する評価

A9.7.3.1 環境における、ある金属物質から同じ金属の別の化学種への変化は、有機化合物に適用されるような分解に基づくものではなく、毒性のある化学種の利用可能性および生物学的利用可能性を増減させる可能性があるものである。しかし、自然に起こる地球化学的な過程の結果として、金属イオンは水相から分配しうるものである。水相滞留時間や、水-底質界面でのプロセス(沈積および再可動化)についてのデータはかなりあるが、まだ意味のあるデータベースに統合されてはいない。しかしながら、上記 A9.7.1 で述べた原則および前提を用いることで、この手法を分類に取り入れることは可能であろう。

A9.7.3.2 このような評価の手引きを示すことは非常に困難であり、通常はケースバイケースのアプローチにおいて対処すべきものであろう。しかし、以下の事項は考慮できる。

- (a) 利用可能性を持たない形態への種分化。ただし、逆方向の変化が起こる可能性も考慮しなければならない。
- (b) 対象の金属化合物の溶解性よりも大幅に溶解性が低い金属化合物への変化

ある程度の慎重さが求められる。A9.7.1.5 および A9.7.1.6 を参照。

A9.7.4 生物蓄積性

A9.7.4.1 log K_{ow} は、非極性有機物などあるタイプの有機化合物については、BCF の良好な予測尺度となるが、これはもちろん、無機金属化合物などの無機物質には当てはまらない。

A9.7.4.2 金属の取り込みおよび排泄速度のメカニズムは非常に複雑かつ多様であり、現在のところこれを記述する一般的なモデルはない。かわりに、分類基準に従った金属の生物蓄積性を、専門家の判断に基づいて、ケースバイケースで評価すべきである。

A9.7.4.3 生物濃縮係数 BCF は生物蓄積性の尺度であるが、金属および非有機金属化合物について測定された BCF の値を解釈するには、多くの複雑な要素がある。ある金属および無機金属化合物に関しては、水中濃度と、ある水生生物における BCF との関係が逆相関なので、生物濃縮性データは慎重に使用しなければならない。このこ

とは、特に生物学的に必須の金属に当てはまることである。生物学的に必須の金属は、その金属を必須としている生体内で能動的に制御される。生体の栄養的な要求度が環境濃度より高い場合もあるので、この能動的な制御の結果として BCF の値は高くなり、BCF と水中における当該金属濃度には逆相関の関係になる。環境における濃度が低い場合には、栄養面での必要性を満たすために金属を取り込む自然な結果として BCF の値が高くなることが予想され、この事例においては正常な現象とみなすことができる。加えて、生体内の濃度が生体によって制御されていれば、測定された BCF の値は外部の濃度が上昇するにつれて低下することになる。外部の濃度が非常に高くなって一定の限界値を超えるか、または制御メカニズムを圧倒するようになると、これは当該の生体に危害を及ぼすものとなる。また、金属が、ある生物にとっては必須であっても、他の生物には必須でない場合がある。したがって、金属が必須でない場合、または必須金属の生物蓄積度が栄養レベルを超える場合には、生物蓄積性および環境上の問題について特に配慮すべきである。

A9.7.5 金属および金属化合物に関する分類基準の適用

A9.7.5.1 金属および金属化合物に関する分類戦略の概要

A9.7.5.1.1 金属および金属化合物の分類のためのスキームについては、以下の記述並びに図 A9.7.1 の総括図を参照されたい。このスキームには、データを分類目的で使用するための、いくつかの段階がある。新たなデータを生成することは本分類スキームの趣旨ではない。有意なデータがない場合は、入手できたすべてのデータを活用し、専門家の判断を仰ぐ必要がある。

以下の各節において L(E)C₅₀ に関する言及は、金属または金属化合物のクラスを選択する際に用いるデータポイントへの言及を意味する。

A9.7.5.1.2 金属化合物の L(E)C₅₀ データについて考慮する場合には、分類の根拠として用いられるデータポイントを、分類すべき金属化合物分子の重量で表すようにすることが重要である。これは分子量補正として知られる作業である。したがって、大半のデータは例えば金属 mg/l のように表されるが、この値は次のように、対応する金属化合物の重量に対応して調整を行う必要がある。

$$\text{金属化合物の L(E)C}_{50} = \text{金属の L(E)C}_{50} \times (\text{金属化合物の分子量} / \text{金属の原子量})$$

NOEC データもまた、対応する金属化合物の重量に対応するように補正する必要がある。

A9.7.5.2 金属の分類戦略

A9.7.5.2.1 対象となる金属イオンの L(E)C₅₀ が 100mg/l より大きい場合、当該の金属については分類スキームの中でさらに考慮する必要はない。

A9.7.5.2.2 対象となる金属イオンの L(E)C₅₀ が 100mg/l 以下である場合、そのイオンが当該金属から生成される速度と程度について入手されたデータを考慮しなければならない。そうしたデータは、有意かつ有益なものであって、変化/溶解プロトコール（附属書 10）を用いて生成されるべきである。

A9.7.5.2.3 こうしたデータが入手できない場合、すなわち金属イオンへの変化が起こらないことを示す十分な有効性を持つ明確なデータが存在しない場合は、これらの可溶性形態に関する既知の分類可能な毒性が十分に懸念を生じうるものと考えられるので、安全側の分類(慢性区分 4)を適用すべきである。

A9.7.5.2.4 溶解プロトコールによるデータが入手できる場合は、以下に示す規則に従ってその結果を、分類を助けるために使用すべきである。

A9.7.5.2.4.1 7日間の変化試験

7日間(またはこれより短期間)の試験後における溶存金属イオン濃度が $L(E)C_{50}$ の値を超える場合、金属のためのデフォルトの分類を次の分類で置き換える。

- (a) 低負荷率における溶存金属イオン濃度が $L(E)C_{50}$ 以上であれば、急性区分1に分類する。水相からの速やかな分配および生物蓄積性の欠如の双方について証拠が存在しなければ、慢性区分1にも分類する。
- (b) 中負荷率における溶存金属イオン濃度が $L(E)C_{50}$ 以上であれば、急性区分2に分類する。水相からの速やかな分配および生物蓄積性の欠如の双方について証拠が存在しなければ、慢性区分2にも分類する。
- (c) 高負荷率における溶存金属イオン濃度が $L(E)C_{50}$ 以上であれば、急性区分3に分類する。水相からの速やかな分配および生物蓄積性の欠如の双方に関する証拠が存在しなければ、慢性区分3にも分類する。

A9.7.5.2.4.2 28日間の変化試験

A9.7.5.2.4.1 に述べた手順で慢性区分1への分類を行う結果になれば、この金属は追加情報の如何に関係なく分類されることになるので、それ以上の評価は必要ない。

この他のすべての事例において、変化/溶解試験によって分類を訂正すべきことを示す追加データが生成されるかもしれない。慢性区分2、3または4に分類された物質について、低負荷率における合計28日間の試験後の溶存金属イオン濃度が長期のNOEC以下の値であれば、その分類結果は撤回される。

A9.7.5.3 金属化合物の分類戦略

A9.7.5.3.1 対象となる金属イオンの $L(E)C_{50}$ が 100mg/l を超える場合、当該の金属化合物については分類スキームの中でさらに考慮する必要はない。

A9.7.5.3.2 溶解度 $\geq L(E)C_{50}$ であれば、可溶性イオンに基づいて分類を行う。

A9.7.5.3.2.1 水溶解度(例えば24時間の溶解度スクリーニング試験などで測定された値、または例えば溶解度積などから見積られた値)が溶存金属イオンの $L(E)C_{50}$ 以上であるようなすべての金属化合物は、易溶性の金属化合物とみなされる。溶解度が測定される際の条件は急性毒性試験の条件と大幅に異なることがあるので、溶解度が急性毒性値に近い化合物については注意を払うべきである。こうした場合には、溶解度スクリーニング試験の結果が優先される。

A9.7.5.3.2.2 易溶性金属化合物は、 $L(E)C_{50}$ (必要なら分子量に対する補正をする)に基づいて以下のように分類される。

- (a) 溶存金属イオンの $L(E)C_{50}$ が 1mg/l 以下であれば、急性区分1に分類する。水相からの速やかな分配および生物蓄積性の欠如の双方について証拠が存在しなければ、慢性区分1にも分類する。
- (b) 溶存金属イオンの $L(E)C_{50}$ が 1mg/l より大きく 10mg/l 以下であれば、急性区分2に分類する。水相からの速やかな分配および生物蓄積性の欠如の双方について証拠が存在しなければ、慢性区分2にも分類する。
- (c) 溶存金属イオンの $L(E)C_{50}$ が 10mg/l より大きく 100mg/l 以下であれば、急性区分3に分類する。水相からの速やかな分配および生物蓄積性の欠如の双方について証拠が存在しなければ、慢性区分3にも分類する。

A9.7.5.3.3 溶解度 $<L(E)C_{50}$, であれば、デフォルトの慢性区分4に分類する。

A9.7.5.3.3.1 分類基準において、難溶性金属化合物は、既知の溶解度（例えば24時間の溶解度スクリーニング試験などで測定された値、または例えば溶解度積などから見積られた値）が可溶性金属イオンの $L(E)C_{50}$ 未満であるような化合物と定義される。難溶性金属化合物の可溶性形態金属の $L(E)C_{50}$ が 100 mg/l 以下であって、かつ当該の物質を難溶性物質であるとみなしうる場合は、デフォルトの安全側の分類(慢性区分4)を適用すべきである。

A9.7.5.3.3.2 7日間の変化試験

デフォルトの安全側の分類に分類された難溶性金属化合物については、7日間の変化/溶解試験から入手できる追加情報も使用することができる。こうしたデータは、低、中、高負荷率における変化レベルも含むべきである。

7日間(またはこれより短期間)の試験後における溶存金属イオン濃度が $L(E)C_{50}$ の値を超える場合、金属のためのデフォルト分類を次の分類で置き換える。

- (a) 低負荷率における溶存金属イオン濃度が $L(E)C_{50}$ 以上であれば、急性区分1に分類する。水相からの速やかな分配および生物蓄積性の欠如の双方について証拠が存在しなければ、慢性区分1にも分類する。
- (b) 中負荷率における溶存金属イオン濃度が $L(E)C_{50}$ 以上であれば、急性区分2に分類する。水相からの速やかな分配および生物蓄積性の欠如の双方について証拠が存在しなければ、慢性区分2にも分類する。
- (c) 高負荷率における溶存金属イオン濃度が $L(E)C_{50}$ 以上であれば、急性区分3に分類する。水相からの速やかな分配および生物蓄積性の欠如の双方について証拠が存在しなければ、慢性区分3にも分類する。

A9.7.5.3.3.3 28日間の変化試験

A9.7.5.3.3.2 に述べた手順で慢性区分1へ分類される結果になったときは、この金属は追加情報の如何に関係なく分類されることになるため、それ以上の評価は必要ない。

この他のすべての事例において、28日間の変化/溶解試験によって分類を訂正すべきことを示す追加データが生成されるかもしれない。慢性区分2、3または4に分類された物質について、低負荷率における合計28日間の試験後の溶存金属イオン濃度が長期のNOEC以下の値であれば、その分類結果は撤回される。

A9.7.5.4 粒子径と表面積

A9.7.5.4.1 試験物質の粒子径または表面積における変動が、一定の時間ウィンドウ内に放出される金属イオンのレベルに著しい変化を引き起こす可能性があることから、粒子径、なかんずく表面積は決定的なパラメータである。したがって、負荷レベルのみに基づく相対的な分類が行えるように、変化試験のために粒子径または表面積は一定とされる。一般に、生成された分類データは、変化の程度を判定するのに、市販されている最も粒子径の小さな試料を用いている。特別な金属粉について生成されたデータは塊状形態の分類に適さないとみなされる場合がある。例えば、試験粉末が構造的に別の物質（たとえば別の結晶構造）であることが明らかな場合、または試験粉末が特別な工程によって得られたものであって、塊状の金属からは生成できないような場合、この塊状物質の分類は、データが入手できるなら、より代表的な粒子径もしくは表面積を持つ物質の試験データに基づくことができる。この物質の粉末は、粉末に関して生成されたデータに基づいて別個に分類されることになろう。しかし、通常的环境においては、同一の金属について二つを超える分類案が示されることは予想されない。

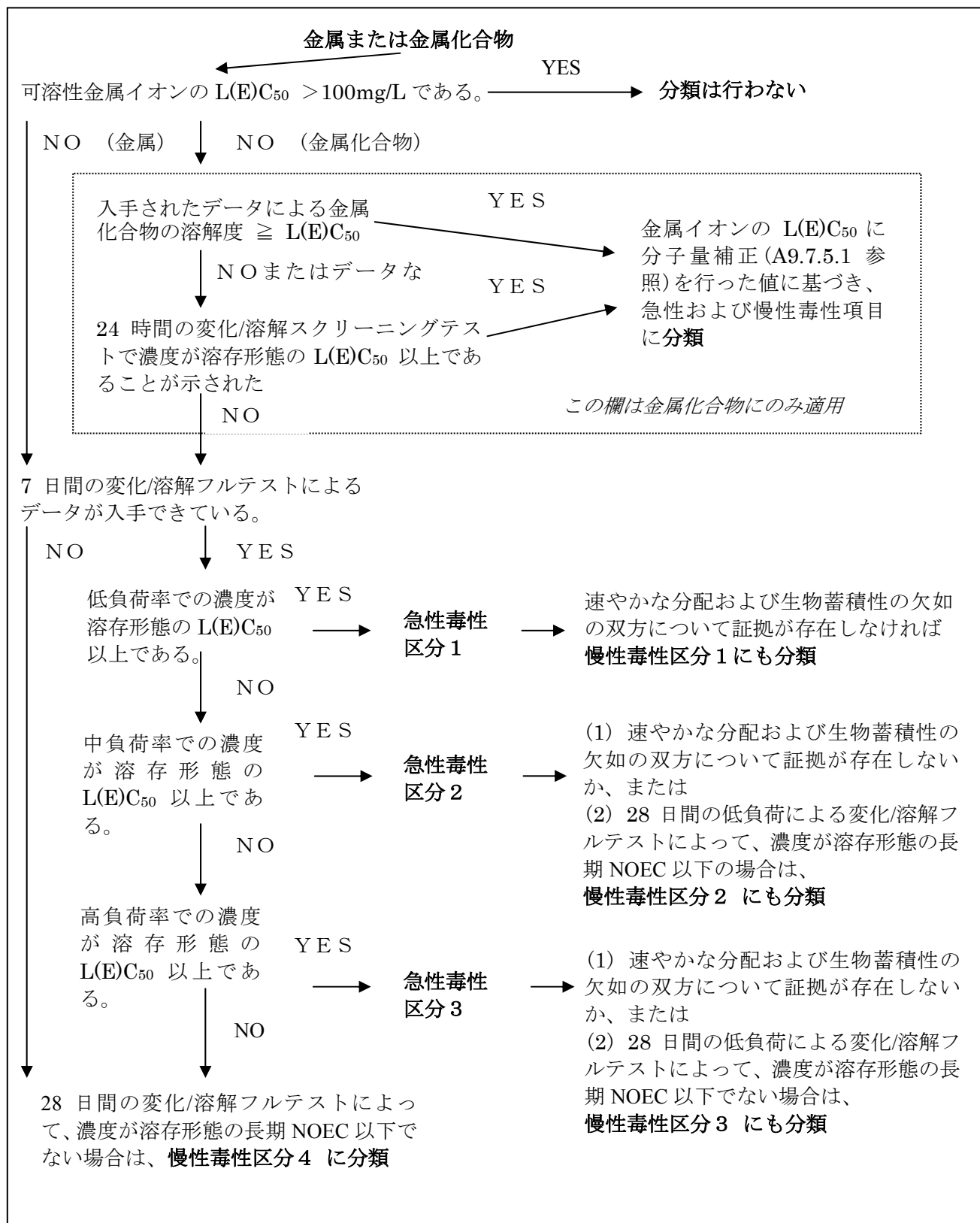
A9.7.5.4.2 粒子径がデフォルトの直径 1mm を下回る金属は、ケースバイケースで試験されてもよい。たとえば、別個の生産技術によって生産された金属粉や、金属粉が塊状形態よりも高い溶解度（または反応性）を示し、その結果より厳しい区分への分類になる場合である。

A9.7.5.4.3 次の表に示すように、試験を行う粒子径は評価対象となる物質によって異なる。

種別	粒子径	備考
金属化合物	市販通常製品のうち最小	最大 1 mm
金属 - 粉末	市販通常製品のうち最小	様々な結晶/形態上の性質がある場合には、別個のデータを考慮する必要も考えられる。
金属 - 塊状	1 mm	十分な正当性があれば、デフォルト値を変更することができる。

A9.7.5.4.4 一部の形態の金属に関しては、変化/溶解プロトコール(OECD 2001)を用いて、指定された時間間隔後の金属イオン濃度を、試験される形態の表面積負荷の関数として、相関を得ることが可能であろう。そのような場合、Skeaff ら(2000)が提案している臨界表面積の考え方(付録 VI 第 5 部「金属および金属化合物」参照)を用いて、様々な粒子径を持つ金属の溶存金属イオン濃度レベルを見積ることが可能となるであろう。すなわち、この相関性および適切な毒性データとの連結によって、媒体に L(E)C₅₀ を与える物質の臨界表面積を特定し、次に有害性の同定に用いられる低、中、高負荷値にこの臨界表面積を変化することが可能となる。この手法は分類には通常用いられないが、ラベル表示および川下製品における決定に際して有効な情報を提供するかもしれない。

図 A9.7.1: 金属および金属化合物の分類手順



附属書 9

附属資料 I

有機物質の分解性の測定

1. 有機物質は、非生物的または生物的プロセスのいずれか、あるいはその組み合わせによって分解される。分解性を測定するための数多くの標準的手順、または試験が使用できる。これら試験法のうちいくつかの一般原則について下記に説明する。分解性試験法についての包括的なレビューを提示する意図ではなく、水生有害性分類に関連して、手法を並べたものに過ぎない。

2. 非生物分解

2.1 非生物分解は、化学的変換と光化学変換を含んでいる。非生物変換からは通常、別の有機化合物が生成されるが、完全な無機化を起こすことはない (Schwarzenbach ら, 1993)。化学変換は、光および生物体の介在なしに起こる変換であると定義されているが、光化学変換には光が必要である。

2.2 水生環境に関連した化学変換プロセスの例として、加水分解、求核置換反応、脱離反応、酸化および還元反応がある (Schwarzenbach ら, 1993)。これらのうちで加水分解は、最も重要であると見なされる場合が多く、また国際的なテストガイドラインが一般的に利用できる唯一の化学変換である。化学物質の非生物分解試験は一般的に、標準化された条件下での変換速度の測定という形で行われる。

2.3 加水分解

2.3.1 加水分解は、求核物質 H_2O または OH^- と化学物質との反応であり、化学物質の (離脱) グループが OH 基と交換される。化合物の多く、特に酸誘導体は加水分解を受けやすい。加水分解は生物的にも非生物的にもおこなわれるが、試験に関しては非生物加水分解のみが考慮される。加水分解は異なった pH、すなわち中性、酸性または塩基触媒の加水分解で、異なったメカニズムが起こり、加水分解速度は pH にきわめて依存している。

2.3.2 現時点では、非生物加水分解を評価するのに、一般に利用できるガイドラインは、OECD テストガイドライン 111 「pH の関数としての加水分解」 (OPPTS 835.2110 に該当する) および OPPTS 835.2130 「pH および温度の関数としての加水分解」の 2 種類である。OECD テストガイドライン 111 では、純粋な緩衝液中において pH を変えた場合の全体的な加水分解速度を測定する。この試験は二段階、すなわち加水分解速度が未知である物質について実施する予備試験、および加水分解的に不安定なことがわかっている化学物質および予備試験で急速な加水分解が認められた物質について実施する、より詳しい試験とに分けられる。予備試験では、環境中で通常見られる pH (pH4, 7 および 9) 範囲にした、温度 50°C の緩衝液中で、化学物質の濃度を 5 日間後に測定する。その化学物質の濃度が 10% 未満に低下したら、加水分解的に安定であると見なすが、そうでない場合には詳しい試験を実施する。詳しい試験段階では、3 種類の pH (4, 7 および 9) 条件において、その化学物質濃度を時間の関数として測定し、全体的な加水分解速度を測定する。加水分解速度は各種温度条件で測定し、環境的に関連性のある温度に内挿または外挿できるようにする。OPPTS835.2130 試験は実験のデザインでは OECD テストガイドライン 111 にほぼ同一であるが、データ処理に主な違いがある。

2.3.3 試験で測定される加水分解定数は、加水分解以外にも、所定の試験条件下で生じる光を伴わないその他すべての非生物変換を含んでいることに注意しなければならない。天然水と純水の間での加水分解速度には良好な一致が認められている (OPPTS 835.2110)。

2.4 光分解

2.4.1 現時点では、水中での光分解に関する OECD ガイドラインはないが、水中での直接光分解に関する手引き書はある (OECD, 1997)。この手引き書は、予定されているガイドラインの基礎となると考えられている。この手引き書で定められている定義によれば、水中での化合物の光変換は、一次または二次の光変換の形をとっており、一次の光変換 (光分解) はさらに、直接光分解および間接光分解に分けられる。直接光変換 (光分解) は、化学物質が光を吸収し、その直接の結果として変換を受ける場合をいう。間接光変換とは、別の励起された分子種がエネルギーや電子または水素原子をその化学物質に移動させ、これによって変換を誘発する場合である (増感光分解)。二次の光変換とは、化学物質と反応性の短命な分子種、たとえば励起されたフミン酸、フルボ酸または硝酸塩等の励起分子種の反応により、光の存在下で生成されたヒドロキシラジカルや過酸化ラジカルまたは一重項酸素等の分子種との間に化学反応が生じる場合である。

2.4.2 水中の化学物質の光変換に関して、現在利用できるガイドラインは OPPTS 835.2210「日光による水中での直接光分解速度」および OPPTS 835.5270「間接光分解スクリーニング試験」だけである。OPPTS 835.2210 試験は段階的アプローチを採用している。第 1 段階では、モル吸収率測定値から最大の直接光分解速度定数 (最小半減期) を算出する。第 2 段階には二つのフェーズがある。フェーズ 1 では、化学物質を日光で光分解し、およそその速度定数を得る。フェーズ 2 では、その化学物質が実際に暴露された光の強度を測定するアクチノメータを用いて、より正確な速度定数を測定する。測定したパラメータから、温度および緯度が異なる場合の実際の直接光分解速度が計算できる。この分解速度が適用できるのは、水の最上部の層、たとえば一番上の 50cm 以内で、水が純水かつ空気が飽和している場合のみであるが、このような状態は環境中では実現しないことは明らかである。しかし、自然界の水系およびその他の関連要因を組み入れたコンピュータプログラムを用いれば、この結果を他の環境条件にも拡張できる。

2.4.3 OPPTS 835.5270 スクリーニング試験は、フミン系物質を含む水の中での化学物質の間接光分解に関するものである。この試験の原理とは、自然の日光にさらされた自然水系では、光変換速度の測定値には直接および間接両方の光変換が含まれるが、純水中では直接の光変換しか起こらない、ということである。したがって、純水中の直接光分解速度と、自然水系中の総合的な光分解の差は、附属書 8 の手引きに定められた定義によれば、間接光分解と二次光分解の合計である。この試験法を実際に応用するには、市販されているフミン系物質を用いて、自然水系を模した合成腐植水を作成する。間接光変換速度の測定値は、それが測定された季節と緯度にもみ有意であること、およびその結果を他の緯度や季節に換算することは不可能であることに注意が必要である。

3. 生分解性

3.1 試験法の簡単な説明だけを下記に示す。詳しい情報は、包括的な「生分解性試験に関する詳細レビュー文書」 (OECD, 1995) を参照されたい。

3.2 易生分解性

3.2.1 有機物質の易生分解性を測定する標準的試験法が、OECD (OECD テストガイドライン 301A-F)、EU (C.4 テスト)、OPPTS (835.3110) および ISO (9408, 9439, 10707) 等、多くの機関により開発されている。

3.2.2 易生分解性試験は厳格な試験であり、生分解および馴化が生じる機会が限定されている。このような仕様を確実にものにしていく、基礎的な試験条件は次のものである。

- (a) 被験物質濃度が高い (2–100mg/l) こと
- (b) 被験物質だけが炭素およびエネルギーの供給源であること

- (c) 植種源の濃度は低いか中程度である（生菌数 10^4 – 10^8 個/mL）こと
- (d) 植種源の事前の馴化を許さないこと
- (e) 分解が生じる時間ウィンドウは 10 日間であり、試験期間は 28 日（MITI I 法（OECD テストガイドライン 301C）を除いて）とすること
- (f) 試験温度は $<25^{\circ}\text{C}$ のこと、および
- (g) 合格レベルは 70%（DOC 除去）または 60%（酸素要求量または CO_2 発生量）で、完全な無機化が認められること（被験物質の残存炭素は、成長しているバイオマスに取り込まれたと考えられる）

3.2.3 こうした易生分解性試験の一つでの陽性結果は、その物質が環境中で急速分解性であることを示す（OECD テストガイドライン）。

3.2.4 従来からの BOD_5 試験（例えば EU C.5 テスト）によって、物質が易生分解性であるかどうかを示されることもある。この試験では、5 日間の相対的生化的酸素要求量を理論的酸素要求量（ThOD）と比較するか、または ThOD が利用できない場合には化学的酸素要求量（COD）と比較する。この試験は 5 日間で完了するので、提案された有害性分類基準で定められている 50% という合格レベルは、易生分解性試験の合格レベルより低い。

3.2.5 海水中の生分解性スクリーニング試験（OECD テストガイドライン 306）は、易生分解性試験の海水条件に対応するとみなしてよい。OECD テストガイドライン 306 の合格レベル（すなわち DOC 除去が $>70\%$ または理論的酸素要求量が $>60\%$ ）に達する物質は、易生分解性であるとみなしてよい。なぜなら分解性は通常、海水中では、淡水での分解性試験より低くなるからである。

3.3 本質的生分解性

3.3.1 本質的生分解性試験は、ある物質に生分解の可能性があるかどうかを評価するよう設計されている。こうした試験の例として、OECD テストガイドライン 302A-C の各試験、EU C.9 および C.12 の各試験、および ASTM E 1625-94 試験等がある。

3.3.2 本質的生分解性の評価を目的とした基本的な試験の条件は以下のものである。

- (a) 試験期間中に馴化させるよう、被験物質の植種源に対する長い暴露時間
- (b) 高い微生物濃度
- (c) 好適な物質/バイオマスの比率

3.3.3 本質的生分解性試験での陽性結果は、その物質が環境中で無限には存続しないことを意味するが、速かで完全な生分解を推論することはできない。結果から 70% を超える無機化が示された場合、究極の生分解の可能性を意味し、20% を超える分解は本質的な一次生分解を示す。また 20% 以下の分解は、その物質は難分解性であることを意味している。したがって、陰性の結果は、非生分解性（難分解性）と考えるべきであることを意味している（OECD テストガイドライン）。

3.3.4 本質的生分解性試験の多くは、被験物質の消失のみを測定する。このような結果は、一次の生分解だけで、総合的な無機化は示されない。したがって、多少にかかわらず、難分解性の分解生成物が生成している可能性もある。物質の一次生分解は、環境中における本質的生分解性を示すものではない。

3.3.5 OECD の各本質的生分解性試験は、そのアプローチの点で極めて違いが大きく、特に MITI II 試験（OECD テストガイドライン 302C）は、相当する MITI I 易生分解性試験（OECD テストガイドライン 301C）より 3 倍程度高いだけの植種源濃度を採用している。また、Zahn-Wellens 試験（OECD テストガイドライン 302B）は、比較的「弱い」本質的生分解性試験である。しかし、こうした試験で

認められる分解性は易生分解性試験で認められる分解性よりそれほど強くはないにもかかわらず、その結果は易生分解性試験および水生環境における条件に外挿することはできない。

3.4 水系シミュレーション試験

3.4.1 シミュレーション試験は、ある水生環境における分解をシミュレートしようと試みる。水生環境における分解のシミュレーションのための標準的な試験法の例としては、ISO/DS14952「表層水または表層水/底質懸濁物のフラスコ振騰バッチテスト」(Nyholm と Toräng, 1999)、フラスコ振騰ダイアウエイ試験法による生分解性の ASTM E 1279-89(95)試験、および同様な OPPTS 835.3170 試験が挙げられる。これらの試験法は河川ダイアウエイ試験として参照されることが多い。

3.4.2 水生環境の条件をシミュレートできるようにする試験の特徴は以下のものである。

- (a) 自然水（および底質）サンプルを植種源として使用 および
- (b) 一次反応の分解速度になるような低い被験物質濃度（1–100 μ g/l）。

3.4.3 放射性標識された被験物質の使用は、本質的分解の測定を容易にするので、推奨されている。化学分析によって、被験物質の除去だけを測定すると、初期の分解だけしか測定されない。分解の動力学的観察から、分解の速度定数を導き出すことができる。被験物質濃度が低いので、一次反応の分解速度が優先すると推定できる。

3.4.4 試験はまた、底質コンパートメント中の条件をシミュレートして、自然界の底質を用いて実施してもよい。さらに、サンプルを滅菌することによって、試験条件下における非生物分解も測定できる。

3.5 STP シミュレーション試験

下水処理施設（STP）における分解性をシミュレートする試験もある。たとえば OECD テストガイドライン 303A “Coupled Unit” 試験、ISO 11733 「活性汚泥シミュレーション試験」、EU C.10 試験等がある。最近になって、低濃度の有機汚染物質を用いる、新しいシミュレーション試験が提案された (Nyholm ら, 1996)。

3.6 嫌氣的分解性

3.6.1 嫌氣的生分解性のための試験法は、被験物質が嫌氣的条件化で生分解を受ける本来の可能性を測定する。こうした試験法の例は、ISO 11734:1995(E)試験、ASTM E 1196-92 試験、および OPPTS 835.3400 試験等である。

3.6.2 嫌氣的分解性は、8週間までの試験期間で、下に示すような試験条件で測定される。

- (a) 酸素の存在しない状態（初期は純粋な窒素雰囲気）で密閉容器内での試験実施
- (b) 消化された汚泥の使用
- (c) 試験温度 35°C および
- (d) ヘッドスペースのガス圧を測定（CO₂および CH₄ の生成）

3.6.3 本質的生分解はガスの生成によって判定される。しかし、親化合物の残存量を測定して初期段階の分解も測定できる。

3.7 土壌および底質中の分解

3.7.1 化学物質の多くは最終的に土壌または底質コンパートメントに行き着くので、こうした環境中における物質の分解性評価が重要かもしれない。標準的な方法として、土壌中の本質的生分解性に関する OECD テストガイドライン 304A 試験があり、これは OPPTS 835.3300 試験に相当する。

3.7.2 土壌中の本質的な分解性が測定できるようにする特殊な試験の特徴は以下のものである。

- (a) 自然界から得た土壌サンプルを、追加の植種源なしで使用
- (b) 放射性標識された被験物質を用いる、および
- (c) 放射性標識された二酸化炭素の生成量を測定する。

3.7.3 底質中の生分解を測定するための標準的な方法は、OPPTS 835.3180「底質/水マイクロゾム生分解性試験」である。底質および水を含むマイクロゾムを試験地点から採取し、その系に被験物質を加える。親化合物の消失（すなわち初期段階の分解）、そして可能であれば代謝物の出現、あるいは本質的生分解の測定を行ってもよい。

3.7.4 現在、土壌中における (OECD テストガイドライン, 1999a)、および水中底質系における (OECD テストガイドライン 1999b) それぞれの好気的および嫌気的変換について、2つの新しい OECD ガイドライン案が作成されつつある。実験は、被験物質の現実的な濃度を含む、環境的に現実に近い条件下での、被験物質変換速度、および変換生成物の物質種、ならびに生成と減少の各速度を測定するために行なわれる。被験物質の変換の測定に採用する分析方法に依存して、完全な無機化、あるいは初期段階の分解のいずれかが測定される。

3.8 生分解性推定の方法

3.8.1 近年になって、化学物質の環境特性を推定する可能性が進展してきており、その中で、有機物質の生分解性を予測する方法も開発された (例えば Syracuse Research Corporation の Biodegradability Probability Program, BIOWIN)。方法についてのレビューは OECD (1993) および Langenberg ら (1996) によって行われた。そのレビューによれば、基の寄与を見る方法が最も成功しているように思われる。そのうちでも、Biodegradability Probability Program (BIOWIN) は適用範囲が広いように思われる。このプログラムでは、環境微生物の混合集団の存在下で、生分解が遅いか速いかを定性的に推定する。このプログラムの応用範囲については、US EPA/EC による (Q)SAR 評価に関する合同プロジェクト (OECD, 1994) および Pedersen ら (1995) が評価している。この後者について下記に簡略に述べる。

3.8.2 実験的に測定された生分解性データの有意性確認のためのセットを MITI (1992) のデータから選び出したが、正確な分解データが入手されていない物質や、上述のプログラムの開発にすでに使用されている物質は除外した。このようにして有意性確認用セットは 304 物質から構成された。これらの物質の生分解性について、プログラムの (最も信頼性が高い) 非線形推定モジュールを用いて推定し、結果を測定データと比較した。162 種の物質が「速やかに」分解すると予測されたが、MITI I 試験では、41 種 (25%) だけが実際に易分解性であった。142 種は「ゆっくり」分解すると予測されたが、MITI I 試験で実際に急速分解性でないとされたのは 138 種 (97%) であった。したがって、このプログラムは、分解実験データが得られず、かつプログラムによる推定が、その物質は「ゆっくりと」分解されるとなる場合にのみ、有害性分類に使用できると結論づけられた。そうした場合、物質は速かな分解性ではないとみなすことができる。

3.8.3 EU に届け出された新規物質についての、実験データおよび QSAR データを使用した、(Q)SAR の評価に関する US EPA/EC 合同プロジェクトでも、同様な結論が得られた。易生分解性試験で実験的に試験された 115 の新規物質について、QSAR 予測を解析したものに基づいて評価した。この解析に含まれた物質のうち、9 種だけが易生分解性であった。採用された QSAR の方法については、US EPA/

EC 合同プロジェクトの最終報告書 (OECD, 1994) でも十分には記述されていないが、予測のほとんどは、後になって **Biodegradation Probability Program (BIOWIN)** に組み込まれた方法によって行われた可能性が高い。

3.8.4 EU TGD (EC, 1996)においても、**Biodegradation Probability Program** を用いた、生分解性の推定は控えめに使うのみとすることが推奨されている。すなわち、このプログラムで速かな生分解性が予測される場合、その結果を考慮に加えるべきではなく、反対に生分解性が遅いと予測されたならば、考慮してもよい (EC, 1996)。

3.8.5 したがって、**Biodegradation Probability Program** の結果を控えめに使うことは、分解性に関する実験データが入手できない多数の物質のいくつかについて生分解性を評価する必要を満たすかもしれない。

附属書 9

附属資料 II

水生環境中の分解性に影響する因子

1. 序

1.1 OECD の分類基準は、水生環境に対する有害性のみを考慮している。しかし、有害性分類は主に、環境中の条件に類似していることは極めて稀なような実験室条件で、試験を実施して作成されたデータに基づいている。したがって、水生環境での有害性の予測のために、実験室での試験データの解釈を考えるべきである。

1.2 有機物質の生分解性に関する試験結果の解釈は、OECD 生分解性試験に関する詳細レビュー文書 (OECD, 1995) で検討されている。

1.3 環境中の状態は、標準化された試験系における条件とは特徴的に非常に異なっているので、実験室での試験から得られた分解性データを環境に外挿することを困難にしている。差異の中でも、以下の要因は分解性に著しい影響を及ぼす。

- (a) 生物体に関連した要因 (分解能力をもつ微生物の存在)
- (b) 物質に関連した要因 (物質濃度および他の基質の存在) および
- (c) 環境関連要因 (物理化学的条件、栄養分の存在、物質の生物学的利用性)

これらの各点について、以下にさらに議論する。

2. 分解能力をもつ微生物の存在

2.1 水生環境における生分解は、分解能力のある微生物が十分な数で存在することに依存している。自然界の微生物集団はきわめて多様なバイオマスで構成されており、「新規」物質が十分高濃度で導入されると、バイオマスはその物質を分解するよう馴化することもある。多くの場合、微生物集団の馴化は、本来その物質を分解する能力を有する特定の分解者の増殖によって起こる。しかし、酵素の誘導、遺伝物質の交換および毒性に対する耐性の獲得等、その他のプロセスもかかわることがある。

2.2 馴化は「ラグ (遅れ)」相で起こる。これは暴露開始から著しい分解が開始されるまでの時間である。ラグ相の長さが、分解能力の高い分解者が最初から存在しているかどうかには依存することは明らかのように思われる。このことはまた微生物集団の経緯、すなわち集団が以前にその物質に暴露されたかどうか、に依存する。これはすなわち、人工物質が使用され、何年間も至るところで放出されていると、分解能力の高い分解者が見つかる可能性が高くなることを意味している。これが特にあてはまるのは、たとえば生物学的な下水処理施設等からの排出を受けている環境である。汚染されていない水系から得た植種源を用いる試験に比べて、汚染された水系から植種源を得ている試験の方が、分解結果により一貫性が見られることが多い (OECD, 1995; Nyholm と Ingerslev, 1997)。

2.3 水生環境での馴化性が、実験室における試験での馴化性と比較できるかを決定するいくつかの要因がある。そうした要因のうち、馴化性が依存するのは下記のような要因である。

- (a) バイオマス中の分解能力の高い分解者の初期の数 (%および数)
- (b) 固着するための表面の存在

(c) 基質の濃度および利用性 および

(d) 他の基質の存在

2.4 ラグ相の長さは、分解能力の高い分解者の初期の数および有毒な物質の場合には、これら分解者の生存および回復に依存する。標準的な易生分解性試験では、植種源は下水処理施設から採取されている。ここでは汚染物質の負荷量が一般に環境中より多いので、分解能力の高い分解者の比率および数は、より汚染されていない水生環境中に比べて大きいであろう。しかし、水生環境では分解能力の高い分解者の初期の数が、実験室での試験より小さいので、ラグ相が水生環境でどの程度長くなるかを推定するのは困難である。

2.5 長期間にわたる場合には、分解能力の高い分解者は、適切な基質が十分な濃度で存在していれば増殖するので、その初期濃度は重要ではない。しかし、短期間での分解性を問題にする場合は、分解能力のある微生物の初期濃度を考慮する必要がある (Scow, 1982)。

2.6 フロック、凝集物および付着した微生物が存在することによっても、たとえば微生物共同体による微生物ニッチの形成等により、馴化が増強される。このことは、下水処理施設、底質あるいは土壌中など多様な環境における馴化能力を考える場合には重要である。しかし、易生分解性試験および水生環境中の微生物の総数は、ほぼ同じ桁数である (易生分解性試験では生菌数は 10^4 – 10^8 個/l、表層水中では 10^3 – 10^6 個/l またはそれ以上) (Scow, 1982)。

2.7 環境条件への外挿を考える場合、貧栄養環境と富栄養環境を区別することは有益であろう。貧栄養条件で成育している微生物は、低濃度 (mgC/L 程度) の有機基質を無機化することができ、通常は富栄養条件にある生物体より基質に対する親和性は大きい、成長速度は低く発生回数は多い (OECD, 1995)。さらに貧栄養微生物は濃度が 1mg/l を超える化学物質を分解することができず、高濃度では抑制されることさえある。これとは反対に富栄養微生物は、無機化の開始前に高濃度の基質を必要とし、貧栄養微生物よりも高濃度で成育している。このように、水生環境における分解の低い閾値は、その微生物集団が貧栄養集団か富栄養集団かに依存する。しかし、貧栄養微生物と富栄養微生物とが異なった種であるか、またそれぞれに貧栄養的な生活方法と富栄養的な生活方法しかないのかは不明である (OECD, 1995)。ほとんどの汚染物質は廃水の放出によって直接水生環境に到達し、したがって受け入れる環境はほとんどが富栄養となる。

2.8 上述の議論から、高度に暴露されている環境、すなわち連続的に物質を受け入れている環境 (生産量の低い化学物質よりも生産量の大きい化学物質で、より多く起こる) において、分解能力の高い分解者の存在する機会が最高となると結論づけてよいだろう。こうした環境は富栄養となることが多く、したがって、分解が始まる前に比較的高濃度の物質が必要となることもある。その一方で、清潔な水系では分解能力の高い微生物種、特に生産量の低い化学物質として、まれにしか放出されない化学物質を分解する能力のある微生物種が欠乏しているであろう。

3. 基質関連要因

3.1 被験物質の濃度

3.1.1 ほとんどの実験室での試験で、被験物質は、水生環境で予測される数 μ g/l 域の濃度に比べて、極めて高濃度 (2–100mg/l) で添加される。一般に、基質が約 10μ g/l という閾値より低い濃度で存在するときは、微生物の増殖が支持されず、維持のためのエネルギー要求量さえ満たされない (OECD, 1995)。このように低い閾値レベルの理由は、酵素的反応を開始する十分な刺激が足りないためであると思われる。

る (Scow, 1982)。これは一般に水生環境での多くの物質の濃度が、分解性微生物の初期の基質にかろうじてなりえるレベルでしか存在していないことを意味している。

3.1.2 さらに、分解の反応速度は、Monod の式における飽和定数 (K_s) と物質濃度 (S_0) に依存する。飽和定数は、最大比増殖速度の 50% の比増殖速度となる基質濃度である。飽和定数よりはるかに低い基質濃度は、ほとんどの水生環境では普通の状況であるが、この状態では分解は一次反応またはロジスティック速度論で説明できる (OECD, 1995)。微生物密度が低い (10^3 – 10^5 個/ml) 状態が優先的である場合 (例えば貧栄養水系)、集団はさらに低い速度で増殖するが、これはロジスティック速度論で典型的なものである。微生物密度がそれより高い場合 (例えば富栄養水系) には、細胞増殖を支えられるほど基質濃度は高くなく、一次反応速度論が適用される、すなわち、分解速度は物質濃度に比例する。実際には、データの不確実性のために、この二つの種類の分解速度論を区別することは不可能であろう (OECD, 1995)。

3.1.3 まとめとして、低濃度 (すなわち $10 \mu\text{g/l}$ 以下) の物質は、おそらく水生環境中で主要な基質として分解されることはないと思われる。濃度がそれより高ければ、易分解性物質はほぼ物質濃度に比例した分解速度で、環境中の主要物質として分解されると思われる。二次基質としての物質の分解については以下で述べる。

3.2 その他の基質の存在

3.2.1 標準的な試験では、被験物質はその微生物に対して単一の基質として添加されるが、環境中では、他の基質が多数存在している。自然水系では、溶存有機炭素濃度は、しばしば 1 – 10mgC/l の範囲で、すなわち汚染物質よりも 1000 倍高い濃度で検出される。しかし、こうした有機炭素の多くは比較的難分解性であり、岸辺から遠いほど難分解性物質の比率が高くなる。

3.2.2 自然水系のバクテリアは、藻類の浸出液を主な栄養源としている。こうした浸出液は速かに無機化され (数分間以内)、自然界の微生物集団には高い分解能力があることを実証している。したがって、微生物群が自然水系中の多様な基質を争奪するので、微生物間に淘汰圧が生じ、速やかに無機化される基質を栄養源にできる日和見微生物種が増殖し、より特殊化した微生物種の増殖は抑えられる。種々の人工物質を分解する能力のある微生物を単離した経験は、こうした微生物はしばしば比較的ゆっくりと増殖し、より増殖の速いバクテリアとの競合のなかで、複雑な炭素源で生存していることを示している。環境中に分解能力を有する微生物が存在している場合、ある人工基質が連続的に放出されて、環境中濃度がその増殖を支えるのに十分になれば、その数は増加するであろう。しかし、水生環境中の有機汚染物質の多くは低い濃度で存在し、二次基質として分解されるだけで、増殖を支えていないであろう。

3.2.3 他方、速やかに無機化される物質が高濃度で存在すれば、共代謝により人工分子の初期変換を促進することがある。そして共代謝された物質は、さらなる分解、および無機化を受けやすくなる。このように他の基質の存在が、物質が分解される可能性を高めることもある。

3.2.4 したがって、自然界の水系中に多様な基質が存在しており、そのなかには速やかに無機化される基質もあることが、一方では微量の汚染物質を分解する能力を有する微生物の増殖を阻害する場合がある、他方、こうした存在は、初期の共代謝によって分解を促進し、次いで、さらに無機化しやすくする場合もある、と結論づけられる。自然条件下でのこれらのプロセスの相対的な重要性は、環境条件および物質の両者によって異なり、一般則はまだ確立できていない。

4. 環境関連要因

4.1 環境についての各要因は、特定の分解プロセスより、むしろ一般的な微生物活動をコントロールしている。しかし、この影響の重要性は、生態系や微生物種の違いによって異なっている (Scow, 1982)。

4.2 酸化還元ポテンシャル

分解性に影響する環境関連要因として最も重要なものの一つは、おそらく酸素の存在であると思われる。酸素含量およびそれに関連して、酸化還元ポテンシャルが、水相中、底質上層部中、および下水処理施設の各部分に存在している好氣的生物、および底質中や下水処理施設の各部分に存在している嫌氣的生物など、水生環境中における多様な種類の微生物の存在を決定している。ほとんどの水相中では、好氣的条件が優先しており、生分解性の予測は好氣的試験の結果に基づくべきである。しかし、ある水生環境では、富栄養化および生成した有機物の腐植のために、一年のある期間、酸素含量が極めて低くなることもありうる。こうした期間中は、好氣的生物は化学物質を分解できないが、もしその物質が嫌氣的条件下で分解されうるならば、嫌氣的プロセスがとってかわることもある。

4.3 温度

もう一つ重要なパラメータは温度である。ほとんどの実験試験 (標準の好氣的易生分解性試験) は 20–25°C で実施されるが、嫌氣的試験は、汚泥リアクター内の条件をより適切に模している、35°C で行われることもある。環境中では、微生物活動は 0°C 以下から 100°C の温度範囲で見出される。しかし、最適温度は多分 10–30°C の範囲内にあり、おおまかにいえば、この範囲内で温度が 10°C 上昇するごとに分解速度は倍増する (de Henau, 1993)。この最適温度範囲の外では、分解者の活動は急激に低下するが、ある特殊化した微生物種 (好熱細菌および好冷細菌) は繁殖する。実験条件から外挿する場合、年間のほとんどの期間、氷で覆われており、冬期には分解がほとんど、またはまったく期待されないような水生環境もあることを考慮すべきである。

4.4 pH

環境中で見られる、ほぼすべての pH 域で、活性のある微生物が見いだせる。しかし、細菌集団としては、弱アルカリ性の状態が活動に最も適しており、最適 pH 範囲は 6–8 である。5 より低い pH では、細菌の代謝活性は著しく低下する。真菌類集団にとっては、弱酸性の状態の方が活動に適切であり、最適 pH 範囲は 5–6 である (Scow, 1982)。したがって、微生物の分解活動にとって最適なものは、おそらく pH 5–8 の範囲であり、これは水生環境で最も多く見られる pH 範囲である。

4.5 栄養塩の存在

微生物の増殖には無機栄養塩 (窒素およびリン) の存在がしばしば必要になる。しかし、微生物の増殖は基質によって限定されることが多いので、水生環境で無機栄養塩類が活性の限定要因となることは稀である。しかし、栄養塩類の存在は一次生産者の増殖そして、また無機化されやすい浸出物の利用性に影響する。

附属書 9

附属資料 III

有機物質の BCF および K_{ow} 測定のための実験法および推定法の基本原理

1. 生物濃縮係数 (BCF)

1.1 定義

生物濃縮係数は、定常状態における化学物質の生物体内濃度と周囲の媒体、この場合には水中の濃度の比と定義されている。BCF は定常状態において直接、実験的に測定でき、また定常状態である必要なしに、取り込みと排出の一次速度定数の比から計算できる。

1.2 BCF の実験による測定のための適切な方法

1.2.1 魚類における生物濃縮の実験的測定のために種々のテストガイドラインが作成され、採用されている。最も一般的に適用されているのは、OECD テストガイドライン (OECD 305, 1996) および ASTM 標準ガイド (ASTM E 1022-94) である。OECD 305 (1996) は改訂され、その前の版である OECD 305A-E (1981) から差し替えられた。流水試験法 (OECD 305, 1996) が望ましいが、半止水試験法 (ASTM E 1022-94) も認められている。ただし、死亡率および試験条件の維持に関する有意性判定基準が充足されていることを前提とする。親油性物質 ($\log K_{ow} > 3$) では、流水法の方が望ましい。

1.2.2 OECD 305 および ASTM ガイドラインの原則は同様ではあるが、記載されている実験条件は、特に以下の点で異なっている。

- (a) 試験水の供給方法 (止水、半止水、または流水)
- (b) 排泄試験を実施する必要性
- (c) BCF 算出の数学的方法
- (d) サンプル回数：水中濃度の測定回数および魚サンプル数
- (e) 魚の脂質含量測定の必要性
- (f) 取り込み相の最少時間

1.2.3 一般に、この試験法は二つの段階からなっている。すなわち、暴露 (取り込み) 段階と暴露後 (排泄) 段階である。取り込み段階では、1 種類の魚種の各群を、最低 2 種類の濃度の被験物質に暴露する。28 日以内に定常状態に達しなければ、28 日の暴露期間が必要とされている。定常状態に達するのに必要な時間は、 $K_{ow} - k_2$ 相関をもとに設定してもよい (例えば $\log k_2 = 1.47 - 0.41 \log K_{ow}$ (Spacie と Hamelink, 1982)、または $\log k_2 = 1.69 - 0.53 \log K_{ow}$ (Gobas ら, 1989))。したがって、たとえば 95% 定常状態に予測される時間 (d) は $-\ln(1 - 0.95) / k_2$ によって計算してもよいが、ただし生物濃縮が一次反応速度論に従うことが前提である。排泄段階では、被験物質を含まない媒体中に魚を移す。試験の両段階を通じて、魚体中の被験物質濃度を追跡する。BCF は魚湿体重の関数として表わされる。有機物質の多くについて、生物濃縮性と親油性の間に有意な関係があり、さらに、試験魚体内の脂質含量とそれらの物質の生物濃縮実測値にも、同様な関係がある。したがって、親油性の高い物質について試験結果を変動させる、このような原因を軽減するために、生物濃縮は、体重の他に脂質含量に関連

させて表記すべきである (OECD 305 (1996), ECETOC (1995))。ここで示したガイドラインは、生物濃縮は一次反応プロセス (1 コンパートメントモデル) によって、したがって $BCF=k_1/k_2$ (k_1 : 一次取り込み速度、 k_2 : 一次排泄速度 (対数線形近似による)) で近似できるという仮定に基づいている。排泄が二段階速度論に従う場合、すなわち二つの顕著に異なる排泄速度が見られる場合は、 k_1/k_2 という近似は BCF を著しく低く推定することになる。二次反応速度論が示されたら、BCF は C_{Fish}/C_{Water} の関係から推定してよいが、これは魚-水系で「定常状態」に達していることを前提とする。

1.2.4 サンプル調製および保存の詳細と共に、試験溶液中および生物試料中の物質を定量するために、精度、正確性および感度がわかっている適切な分析方法が利用できなければならない。これらがなければ、正しい BCF の決定は不可能である。放射性標識された被験物質を用いれば、水および魚サンプルの分析を容易にできる。しかし、特異的な分析法と組み合わせなければ、全放射能の測定は潜在的に、親化合物、可能性のある代謝物、および有機分子として魚組織内に組み入れられた、可能性のある代謝された炭素の存在を反映している。真の BCF を決定するためには、親物質を可能性のある代謝物から明確に区別することが不可欠である。放射性標識された物質を試験に用いるならば、全放射能レベル (すなわち親化合物と代謝物) を分析することも可能であるし、または親化合物を別個に分析できるようサンプルを精製してもよい。

1.2.5 $\log K_{ow}$ が 6 より大きい範囲では、 $\log K_{ow}$ が増加するほど測定された BCF データが小さくなる傾向がある。このような非線形の概念的な説明は、生物変換、膜透過速度の低下、あるいは巨大分子の体内脂質への溶解性の低下等によるものとされている。その他の要因として、平衡に達していなかった、水相中の有機物への吸着による生物学的利用性の低下、ならびに分析誤差などの実験技術上の誤りが考えられる。さらに、 $\log K_{ow}$ が 6 より大きい物質の BCF についての実験データを評価する際は、 $\log K_{ow}$ が 6 より低い物質について決定された BCF 値より、不確実性レベルがはるかに高くなるので、注意を払わなければならない。

2. $\log K_{ow}$

2.1 定義と一般的考察

2.1.1 n-オクタノール/水分配係数の対数值 ($\log K_{ow}$) は、物質の親油性の指標である。このことから、 $\log K_{ow}$ は環境中運命の評価において重要なパラメータである。たとえば土壌、底質への吸着および生物体内への生物蓄積等、多くの分配プロセスが $\log K_{ow}$ により影響される。

2.1.2 生物濃縮と $\log K_{ow}$ の関係の根拠は、魚体内の脂質相と水との分配プロセスと、n-オクタノールと水との分配プロセスとの類似である。 K_{ow} を用いる理由は、魚組織中にある脂質の満足できる代用物となるオクタノールの能力から生じている。 $\log K_{ow}$ と、タラ肝油およびトリオレインへの物質の溶解性との間には、高度に有意な関係が存在している (Niimi, 1991)。トリオレインは、淡水魚の脂質に見出される、最も存在量の多いトリアシルグリセロールの 1 つである (Henderson と Tocher, 1987)。

2.1.3 n-オクタノール/水分配係数 (K_{ow}) の測定は、EU 圏内で新規物質または優先既存物質の届け出のために提出しなければならない基本データセットの必要条件である。たとえば極めて水溶性の高い物質や極めて親油性の高い物質などの場合、実験による K_{ow} の測定は必ずしも可能ではないので、QSAR から求めた K_{ow} を採用してもよい。しかし、実験による測定が可能ではない物質 (たとえば界面活性剤等) に QSAR を用いるには細心の注意を払うべきである。

2.2 実験による K_{ow} 値決定のための適切な方法

2.2.1 K_{ow} の実験による測定には、フラスコ振騰法および HPLC 法という 2 つの異なった方法が、例えば OECD 107 (1995)、OECD 117 (1983)、EEC A.8. (1992)、EPA-OTS (1982)、EPA-FIFRA (1982)、ASTM (1993) 等の標準ガイドラインに記載されている。標準ガイドラインにしたがって、フラスコ振騰法または HPLC 法を採用して得られたデータだけが推奨されるわけではない。極めて親油性が高い物質は、水に対する溶解が遅いので、低速攪拌法を用いて得られたデータの方が一般に信頼性が高い (De Bruijn ら, 1989; Tolls と Sijm, 1993; OECD draft Guideline, 1998)。低速攪拌法は現在、OECD 最終ガイドラインを策定するためのリングテストが行われている。

2.2.2 フラスコ振騰法

この方法の基本原理は、2つの異なった相、すなわち水および *n*-オクタノールの中での物質の溶解性を測定することである。分配係数を測定するためには、この系すべての相互作用している成分間の平衡が達成されて、その後でこれら二相中に溶解している物質の濃度を測定しなければならない。フラスコ振騰法は、 $\log K_{ow}$ 値が-2 から 4 の範囲にある場合に適用できる (OECD 107, 1995)。フラスコ振騰法は、水および *n*-オクタノール中に溶解する基本的に純粋な物質にのみ適用され、20-25°C の範囲内の一定温度 ($\pm 1^\circ\text{C}$) において実施しなければならない。

2.2.3 HPLC 法

HPLC 法は、長鎖の炭化水素 (例: C8, C18) がシリカに化学的に結合している、市販されている固定相を充填した分析カラムでおこなわれる。こうしたカラムに注入された物質は、液体の移動相と炭化水素固定相間の分配度の違いによって、異なった速度でカラム上を移動する。HPLC 法は、強酸および強塩基、金属錯体、界面活性物質、あるいは溶出液と反応する物質には適用できない。HPLC 法は $\log K_{ow}$ 値が 0-6 の範囲にある場合に適用できる (OECD 117, 1989)。HPLC 法の方がフラスコ振騰法よりも被験物質中の不純物の存在に対する影響が少ない。

2.2.4 低速攪拌法

低速攪拌法では、 $\log K_{ow}$ が 8.2 までの化合物の K_{ow} を正確かつ精密に測定できる (De Bruijn ら, 1989)。親油性の高い化合物では、フラスコ振騰法では実験上の誤差 (微小滴の形成) を生じる傾向があり、また HPLC 法では K_{ow} 値の推定値を得るために検量範囲を超えて K_{ow} を外挿する必要がある。

分配係数を決定するためには、水、*n*-オクタノールおよび被験物質が相互に平衡に達して、その後この二相中の被験物質濃度が測定される。フラスコ振騰法での微小滴形成による実験上の困難さは、低速攪拌法では水、オクタノールおよび被験物質がゆるやかに攪拌されるリアクター内で平衡に達するので、ある程度克服される。攪拌によりオクタノールおよび水の間には多少の層流が生じ、微小滴が形成されることなく、二相間の物質の交換が行われる。

2.2.5 ジェネレータカラム法

$\log K_{ow}$ 測定のためのもう一つの、非常に汎用性の高い方法は、ジェネレータカラム法である。この方法では、オクタノール相と水相間で物質を分配させるのにジェネレータカラムが用いられる。カラムには固体担体が充填され、一定濃度の被験物質を加えた *n*-オクタノールで飽和されている。被験物質は、オクタノール飽和されたジェネレータカラムから、水を用いて溶出される。カラム内にある水溶液は、オクタノール相から水相に分配された被験物質の平衡濃度を表している。ジェネレータカラム法がフラスコ振騰法より基本的に優れている点は、前者はマイクロエマルジョンの生成が完全に防止されていることである。したがって、この方法は $\log K_{ow}$ が 4.5 より低い物質と同様に、 $\log K_{ow}$ が 4.5 を超える物質での K_{ow} の測定に特に有用である (Doucette と Andren, 1987 および 1988, Shiu ら, 1988)。ジェネレータカラム法の欠点は、精巧な装置が必要なことである。ジェネレータカラム法の詳しい説明は” Toxic Substances Control Act Test Guidelines” (USEPA 1985) に示されている。

2.3 $\log K_{ow}$ 決定のための QSAR の使用 (A8.6 「QSAR の使用」も参照のこと)

2.3.1 K_{ow} を推定するために、多数の QSAR が開発され、また現在も開発され続けている。一般的に用いられている方法は、フラグメント定数に基づいている。このフラグメントによるアプローチは、与えられた分子について、個々の分子フラグメントの親油性を単純に加算することに基づいている。リスクア

セスメントに関する欧州委員会の技術指針 (European Commission, 1996) パートIIIでは、実験的に求められたデータがない場合に、3種類の市販されているPCプログラムが推奨されている。

2.3.2 CLOGP (Daylight Chemical Information Systems, 1995) は最初、ドラッグデザインのために開発された。このモデルはHanschとLeoの計算法 (HanschとLeo, 1979) をもとにしている。このプログラムは、C、H、N、O、ハロゲン、PまたはSを含む有機化合物の $\log K_{ow}$ を計算する。塩類および形式電荷のある化合物の $\log K_{ow}$ は計算できない(ただしニトロ化合物および窒素酸化物を除く)。フェノール、アミン、あるいはカルボン酸などのイオン化する物質の $\log K_{ow}$ 計算結果は、中性またはイオン化していない形態を表しており、pH依存性である。一般的にこのプログラムでは、 $\log K_{ow}$ が0-5の範囲で、明確な推定値が得られる (European Commission, 1996, part III)。しかし、Niemelä (1993) が実験的に測定した $\log K_{ow}$ 値を、推定値と比較しておこなった有意性評価研究では、このプログラムは多数の有機化合物の $\log K_{ow}$ を、0以下から9以上という $\log K_{ow}$ 範囲で正確に推定することが示された ($n=501$, $r^2=0.967$)。7000種以上の物質の同様な有意性評価研究では、CLOGPプログラム(PC version 3.32, EPA version 1.2)の結果は $r^2=0.89$, $s.d.=0.58$, および $n=7221$ であった。これらの有意性は、CLOGPプログラムが、実験データが入手できない場合に、信頼できる $\log K_{ow}$ の推定に用いられることを示している。キレート化合物および界面活性剤では、CLOGPプログラムの信頼性には限界があるとされている (OECD, 1993)。しかし、非イオン系界面活性物質 (LAS) については、調整されたCLOGP値を推定するための補正方法が提案されている (Roberts, 1989)。

2.3.3 LOGKOW または KOWWIN (Syracuse Research Corporation) は、構造フラグメントと補正係数を採用している。このプログラムは、C、H、N、O、ハロゲン、Si、P、Se、Li、Na、K または Hg を含む、有機化合物の $\log K_{ow}$ を計算する。(窒素酸化物やニトロ化合物のような) 形式電荷を有する化合物の $\log K_{ow}$ も計算できる。フェノール、アミン、カルボン酸などのイオン化する物質の $\log K_{ow}$ 計算結果は、中性または非イオン化された形態を表しており、したがってpH依存性である。ある種の界面活性物質 (例えばアルコールエトキシレート (Tolls, 1998))、染料および解離物質は、LOGKOWプログラムで予測されよう (Pedersenら, 1995)。一般に、このプログラムは0-9の $\log K_{ow}$ 域で明確な予測値を与える (TemaNord 1995: 581)。CLOGPプログラムと同様に、LOGKOWプログラムも有意性が確認されており(表2)、信頼性、市販で入手できること、および使用の簡便さの理由で、分類目的に推奨されている。

2.3.4 AUTOLOGP (Devillersら, 1995) は、文献から収集された800種類の有機化学物質をまとめた、不均一なデータセットから導かれた。このプログラムは、C、H、N、O、ハロゲン、P および S を含む有機化学物質の $\log K_{ow}$ 値を計算する。塩の $\log K_{ow}$ 値は計算できない。また、ニトロ化合物を除いて、形式電荷を有する化合物には $\log K_{ow}$ が計算できないものもある。フェノール、アミン、カルボン酸などのイオン化する物質の $\log K_{ow}$ 値を計算できるが、pHへの依存性については注意が必要である。AUTOLOGPの適用性を拡大するための改良作業が進行中である。現在入手されている情報によれば、AUTOLOGPは特に非常に親油性の高い物質 ($\log K_{ow}>5$) で、正確な数値が得られる (European Commission, 1996)。

2.3.5 SPARC. SPARCモデルは、まだジョージア州アセンズにあるEPAの環境研究所で開発中であり、公に利用できるようになっていない。SPARCは観察データから得られた知識に基づいた決定論的モデルというより、むしろ化学熱力学の原理に基づいたメカニズムモデルである。したがって、SPARCは、QSARを用いるモデル(すなわち、KOWWIN、LOGP)と違って、化学物質の訓練用セットには $\log K_{ow}$ の測定値を必要としない。EPAは要請があれば、このモデルをCAS番号のリストで稼働させることもある。SPARCは $\log K_{ow}$ 値が5より大きい化合物では、KOWWINおよびCLOGPより優れた結果を与える。無機化合物または有機金属化合物に一般的なやり方で採用できるのはSPARCだけである。

本附属書の表1に、フラグメント化の方法論に基づいた $\log K_{ow}$ 推定方法の概要を示した。 $\log K_{ow}$ の推定法は他にもあるが、これらはケースバイケースのみで使用されるべきで、また適切な科学的根拠をつけてのみ使用されるべきである。

表 1. フラグメント化の方法論に基づいた log K_{ow} 推定方法の概要 (Howard と Meylan, 1997)

方法	方法論	統計
CLOGP Hansch & Leo (1979), CLOGP Daylight (1995)	フラグメント+補正係数	合計 n=8942, r ² =0.917, sd=0.482 バリデーション : n=501, r ² =0.967 バリデーション : n=7221, r ² =0.89 sd=0.58
LOGKOW (KOWWIN) Meylan & Howard (1995), SRC	140 フラグメント 260 補正係数	キャリブレーション : n=2430, r ² =0.981, sd.=0.219, me=0.327 バリデーション : n=8855, r ² =0.95, sd=0.427, me=0.327
AUTOLOGP Devillers ら(1995)	Rekker & Manhold (1992)による 66 の原子および置換基の関与	キャリブレーション : n=800, r ² =0.96, sd =0.387
SPARC EPA (ジョージア州アセンズ)により開発中	基本的な化学物質構造アルゴリズムに基づいている	訓練用セットの化学物質に log K _{ow} 測定値は必要ない
Rekker & De Kort (1979)	フラグメント+補正係数	キャリブレーション : n=1054, r ² =0.99 バリデーション : n=20, r ² =0.917, sd=0.53, me=40
Niemi ら(1992)	MCI	キャリブレーション : n=2039, r ² =0.77 バリデーション : n=2039, r ² =0.49
Klopman ら(1994)	98 フラグメント+補正係数	キャリブレーション : n=1993, r ² =0.928, sd=0.3817
Suzuki & Kudo (1990)	424 フラグメント	合計 : n=1686, me=0.35, バリデーション : n=221, me=0.49
Ghose ら(1988) ATOMLOGP	110 フラグメント	キャリブレーション : n=830, r ² =0.93, sd=0.47 バリデーション : n=125, r ² =0.87, sd=0.52
Bodor & Huang (1992)	分子軌道法	キャリブレーション : n=302, r ² =0.96, sd=0.31, me=0.24 バリデーション : n=128, sd=0.38
Broto ら(1984) ProLogP	110 フラグメント	キャリブレーション : n=1868, me=計算値 0.4

附属書 9

附属資料IV

有機物質の生物濃縮性に対する体外および体内要因の影響

1. 取り込みに影響する要因

親油性化合物の取り込み速度は、主に生物体の大きさの関数である (Sijm と Linde, 1995)。分子サイズ等の外部要因、生物学的利用性に影響する要因、および各種の環境要因も、取り込み速度に非常に重要である。

1.1 生物体の大きさ

大きい魚体の方が体重に対する鰓表面積の比が相対的に小さいので、小型魚に比べて大型魚の方がより低い取り込み速度定数 (k_1) が予測される (Sijm と Linde, 1995; Opperhuizen と Sijm, 1990)。魚による物質の取り込みは、鰓を通過する水流、鰓表皮における水性拡散層を通しての拡散、鰓表皮を通る浸透、鰓の血流量、および血液成分の結合力によっても支配される (ECETOC, 1995)。

1.2 分子サイズ

イオン化された物質は、水相中の pH が物質取り込みに影響するので、膜を容易に透過することはない。かなりの断面積を持つ物質 (Opperhuizen ら, 1985; Anliker ら, 1988)、または鎖長の長い (>4.3nm) 化合物 (Opperhuizen, 1986) では、膜透過性が失われると予測されている。分子のサイズによって膜透過性が失われると、取り込みは完全に失われる結果になる。生物濃縮に対する分子量の影響は、その物質の拡散係数への影響で、取り込み速度定数が減少することによる (Gobas ら, 1986)。

1.3 利用性

物質が生物体内に生物蓄積できるためには、それが水中に存在して、魚の鰓を通じた移動のための利用性をもつことが必要である。自然界および実験の両方の条件下で、この利用性に影響する要因は、BCF の予測値と比べて、実際の生物濃縮を変化させる。生物濃縮試験中には魚に給餌するので、かなり高濃度の溶解している、および粒子状の有機物が予測され、これが、実際に鰓を通して直接取り込まれる化学物質のフラクションを減少させる。McCarthy と Jimenez (1985) は、溶解している腐植物質に親油物質が吸着することが、物質の利用性を低下させ、物質の親油性の大きいほど利用性が低下することを示した (Shrap と Opperhuizen, 1990)。さらに、溶解している、または粒子状の有機物質または表面に対する吸着は、一般に BCF (およびその他の物理化学的性質) の測定を妨害する場合があります、このため BCF の決定および適切な解釈を困難にする。魚における生物濃縮は、水中にある化学物質の利用できるフラクションに直接関係しているので、親油性の高い物質の場合には、被験物質が利用性をもつ濃度を、取り込み期間中、比較的狭い範囲内に維持することが必要である。

易生分解性の物質は試験水中に短期間しか存在せず、したがって、このような物質の生物濃縮性は有意でないかもしれない。同様に、揮発および加水分解は、物質濃度を低下させ、物質が生物濃縮のための利用性をもつ時間を短縮させるであろう。

1.4 環境因子

生物の生理学的特性に影響する環境パラメータもまた、物質の取り込みを左右する。たとえば、水中の酸素含量が低下すると、魚は呼吸需要を満たせるよう、より多量の水を鰓から通過させなければならない (McKim と Goeden, 1982)。ただし、Opperhuizen と Schrap (1987) が指摘したように、種依存

性がある。さらに、親油性物質の取り込み速度定数に、温度が影響することも示されている (Sijm ら, 1993) が、温度変化について一貫性のある影響を見出さなかった研究者もある (Black ら, 1991)。

2. 排泄速度に影響する要因

排泄速度は、主に生物体の大きさ、脂質含量、その生物体の生物変換プロセスおよび被験物質の親油性の関数である。

2.1 生物体の大きさ

取り込み速度と同様に、排泄速度も生物体の大きさに依存する。小型生物 (例えば幼魚) の方が大型生物より鰓表面積の体重に対する比が大きいので、未成熟/成熟段階の魚よりも、幼生段階の魚の方が、定常状態に、ひいては「毒性用量平衡」に早く到達することが示された (Peterson と Kristensen, 1998)。定常状態に達するのに必要な時間は k_2 に依存するので、生物濃縮試験に用いる魚のサイズは、定常状態を達成するのに必要な時間に重要な関係を持っている。

2.2 脂質含量

分配の関係から定常状態において、脂質含量の多い生物は、脂質の少ない生物よりも高濃度の親油性物質を蓄積する傾向がある。したがって、身体に対する負荷はしばしば、ウナギのような「脂肪の多い」魚の方が、タラのような「脂肪の少ない」魚より大きい。さらに、脂質「プール」が親油性の高い物質の貯蔵場所として作用することもある。絶食またはその他の生理学的変化が脂質バランスを変化させ、こうした物質を放出させて、遅発的な影響が出る結果になることもある。

2.3 代謝

2.3.1 一般に、代謝または生物体内変換は、親化合物をより水溶性の高い代謝物への変換に導く。その結果、より親水性の高い代謝物が親化合物よりも容易に身体から排泄されるであろう。化合物の化学構造が変化した場合、その化合物の多くの性質も変化する。結果的に代謝物は生物体内で、組織内分布、生物蓄積性、難分解性、および排泄経路と排泄速度の点で違った挙動をすることになる。生物変換はまた、化合物の毒性を変化させることもある。こうした毒性の変化は、生物体にとって有益であることもあれば有害となることもある。生物変換は、生物体内の濃度が、毒性反応が現れる程度に高くなるのを防止することもある (解毒)。ただし、たとえばベンゾ (a) ピレンで知られているように、親化合物よりも毒性の高い代謝物が形成されることもある (生体内活性化)。

2.3.2 陸生生物は進化した生物変換システムを備えており、このシステムは一般に水生環境に棲息する生物よりも優れている。この違いの理由は、鰓呼吸生物では化合物を比較的容易に、水中に排泄できるので、異物質の生物変換がそれほど重要ではないという事実によるものと思われる (Van Dem Berg ら, 1995)。水生生物における生物変換の能力に関しては、異物の生物変換能力は一般に、軟体動物 < 甲殻類 < 魚類の順で増加する (Wofford ら, 1981)。

3. 物質の親油性

魚では、 k_2 (排泄速度定数) と $\log K_{ow}$ (または BCF) の間に負の線形関係が何人かの研究者により示されている (例えば Spacie と Hamelink, 1982; Gobas ら, 1989; Petersen と Kristensen, 1998) が、 k_1 (取り込み速度定数) の方が多少、物質の親油性との関連性が低い (Connel, 1990)。したがって、結果として得られる BCF は一般的に物質の親油性が高いほど大きくなる、すなわち強い代謝を受けない物質では、 $\log BCF$ と $\log K_{ow}$ に相関性がある。

附属書 9

附属資料 V

テストガイドライン

1. 言及されているガイドラインのほとんどは、これらを発行している団体の編纂文書に示されている。主な参照文書は以下の通り。

- (a) EC guidelines: European Commission (1996). Classification, Packaging and Labelling of Dangerous Substances in the European Union. Part 2 – Testing Methods. European Commission. 1997. ISBN92-828-0076-8.
(ホームページ : <http://ecb.ei.jrc.it/testing-methods/>) ;
- (b) ISO guidelines: 各国の標準化機構、あるいは国際標準化機構 (ISO) から入手できる。
(ホームページ : <http://www.iso.ch/>)
- (c) OECD guidelines for the testing of chemicals. OECD, Paris, 1993. 定期的に更新。
(ホームページ : <http://www.oecd.org/ehs/test/testlist.htm>)。
- (d) OPPTS guidelines:
US-EPA のホームページ (<http://www.epa.gov/opptsfrs/home/guidelin.htm>) および
(http://www.epa.gov/OPPTS_Harmonized/850_Ecological_Effects_Test_Guidelines/Drafts)
- (e) ASTM: ASTM のホームページ : <http://www.astm.org>。 ” standards ” でさらに検索できる。

2. 水性毒性に関するテストガイドライン¹

OECD Test Guideline 201 (1984) Alga, Growth Inhibition Test
OECD Test Guideline 202 (1984) Daphnia sp. Acute Immobilisation Test and Reproduction Test
OECD Test Guideline 203 (1992) Fish, Acute Toxicity Test
OECD Test Guideline 204 (1984) Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-Day Study
OECD Test Guideline 210 (1992) Fish, Early-Life Stage Toxicity Test
OECD Test Guideline 211 (1998) Daphnia magna Reproduction Test
OECD Test Guideline 212 (1998) Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages
OECD Test Guideline 215 (2000) Fish, Juvenile Growth Test
OECD Test Guideline 221 (編集集中) *Lemna* sp. Growth inhibition test
EC C.1: Acute Toxicity for Fish (1992)
EC C.2: Acute Toxicity for Daphnia (1992)
EC C.3: Algal Inhibition Test (1992)
EC C.14: Fish Juvenile Growth Test (2001)
EC C.15: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages (2001)
EC C.20: Daphnia Magna Reproduction Test (2001)

OPPTS Testing Guidelines for Environmental Effects (850 Series Public Drafts):

850.1000 Special consideration for conducting aquatic laboratory studies
850.1000 Special consideration for conducting aquatic laboratory studies
850.1010 Aquatic invertebrate acute toxicity, test, freshwater daphnids
850.1010 Aquatic invertebrate acute toxicity, test, freshwater daphnids
850.1020 Gammarid acute toxicity test

¹ 以下のリストは2000年9月時点のものであり、新しいガイドラインの採用、あるいはその原案の推敲に応じて、定期的に更新する必要がある。

850.1020 Gammarid acute toxicity test
850.1035 Mysid acute toxicity test
850.1035 Mysid acute toxicity test
850.1045 Penaeid acute toxicity test
850.1045 Penaeid acute toxicity test
850.1075 Fish acute toxicity test, freshwater and marine
850.1075 Fish acute toxicity test, freshwater and marine
850.1300 Daphnid chronic toxicity test
850.1300 Daphnid chronic toxicity test
850.1350 Mysid chronic toxicity test
850.1350 Mysid chronic toxicity test
850.1400 Fish early-life stage toxicity test
850.1400 Fish early-life stage toxicity test
850.1500 Fish life cycle toxicity
850.1500 Fish life cycle toxicity
850.1730 Fish BCF
850.1730 Fish BCF
850.4400 Aquatic plant toxicity test using Lemna spp. Tiers I and II
850.4400 Aquatic plant toxicity test using Lemna spp. Tiers I and II
850.4450 Aquatic plants field study, Tier III
850.4450 Aquatic plants field study, Tier III
850.5400 Algal toxicity, Tiers I and II
850.5400 Algal toxicity, Tiers I and II

3. 生物のおよび非生物的分解に関するテストガイドライン²

ASTM E 1196-92

ASTM E 1279-89 (95) Standard test method for biodegradation by a shake-flask die-away method

ASTM E 1625-94 Standard test method for determining biodegradability of organic chemicals in semi-continuous activated sludge (SCAS)

EC C.4. Determination of ready degradability. Directive 67/548/EEC, Annex V. (1992)

EC C.5. Degradation: biochemical oxygen demand. Directive 67/548/EEC, Annex V. (1992)

EC C.7. Degradation: abiotic degradation: hydrolysis as a function of pH. Directive 67/548/EEC, Annex V. (1992)

EC C.9. Biodegradation: Zahn-Wellens test. Directive 67/548/EEC, Annex V. (1988)

EC C.10. Biodegradation: Activated sludge simulation tests. Directive 67/548/EEC, Annex V. (1998)

EC C.11 Biodegradation: Activated sludge respiration inhibition test. Directive 67/548/EEC, Annex V. (1988)

EC C.12. Biodegradation: Modified SCAS test. Directive 67/548/EEC, Annex V.(1998)

ISO 9408 (1991). Water quality – Evaluation in an aqueous medium of the “ultimate” biodegradability of organic compounds – Method by determining the oxygen demand in a closed respirometer

² 以下のリストは2000年9月時点のものであり、新しいガイドラインの採用、あるいはその原案の推敲に応じて、定期的に更新する必要がある。

ISO 9439 (1990). Water quality – Evaluation in an aqueous medium of the “ultimate” biodegradability of organic compounds – Method by analysis of released carbon dioxide

ISO 9509 (1996). Water quality – Method for assessing the inhibition of nitrification of activated sludge micro-organisms by chemicals and wastewaters.

ISO 9887 (1992). Water quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds in an aqueous medium – Semicontinuous activated sludge method (SCAS)

ISO 9888 (1991). Water quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds in an aqueous medium – Static test (Zahn-Wellens method)

ISO 10707 (1994). Water quality – Evaluation in an aqueous medium of the “ultimate” biodegradability of organic compounds – Method by analysis of biochemical oxygen demand (closed bottle test)

ISO 11348 (1997). Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test)

ISO 11733 (1994). Water quality – Evaluation of the elimination and biodegradability of organic compounds in an aqueous medium – Activated sludge simulation test

ISO 11734 (1995). Water quality – Evaluation of the “ultimate” anaerobic biodegradability of organic compounds in digested sludge – Method by measurement of the biogas production

ISO/DIS 14592 (1999). Water quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in water. Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions (22.11.1999)

OECD Test Guideline 111 (1981). Hydrolysis as a function of pH. OECD guidelines for testing of chemicals

OECD Test Guideline 209 (1984). Activated sludge, respiration inhibition test. OECD guidelines for testing of chemicals

OECD Test Guideline 301 (1992). Ready biodegradability. OECD guidelines for testing of chemicals

OECD Test Guideline 302A (1981). Inherent biodegradability: Modified SCAS. OECD guidelines for testing of chemicals

OECD Test Guideline 302B (1992). Zahn-Wellens/EMPA test. OECD guidelines for testing of chemicals

OECD Test Guideline 302C (1981). Inherent Biodegradability. Modified MITI test (II). OECD guidelines for testing of chemicals

OECD Test Guideline 303A (1981). Simulation test –aerobic sewage treatment: Coupled units test. OECD guidelines for testing of chemicals. 1999年のドラフトが入手可能

OECD Test Guideline 304A (1981). Inherent biodegradability in soil. OECD guidelines for testing of chemicals

OECD Test Guideline 306 (1992). Biodegradability in seawater. OECD guidelines for testing of chemicals

OECD (1998b). Aerobic and anaerobic transformation in aquatic sediment systems. 1999年12月に新ガイドラインのドラフト提案。

OECD (1999). Aerobic and anaerobic transformation in soil. 1999年10月に新ガイドラインのドラフト最終提案。

OECD (2000). Simulation test – Aerobic Transformation in Surface Water. 2000年5月に新ガイドラインのドラフト提案。

OPPTS 835.2110 Hydrolysis as a function of pH

OPPTS 835.2130 Hydrolysis as a function of pH and temperature

OPPTS 835.2210 Direct photolysis rate in water by sunlight
OPPTS 835.3110 Ready biodegradability
OPPTS 835.3170 Shake flask die-away test
OPPTS 835.3180 Sediment/water microcosm biodegradability test
OPPTS 835.3200 Zahn-Wellens/EMPA test
OPPTS 835.3210 Modified SCAS test
OPPTS 835.3300 Soil biodegradation
OPPTS 835.3400 Anaerobic biodegradability of organic chemicals
OPPTS 835.5270 Indirect photolysis screening test: Sunlight photolysis in waters containing dissolved humic substances

4. 生物蓄積に関するテストガイドライン³

ASTM, 1993. ASTM Standards on Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation. Sponsored by ASTM Committee E-47 on Biological Effects and Environmental Fate. American Society for Testing and Materials. 1916 Race Street, Philadelphia, PA 19103. ASTM PCN: 03-547093-16., ISBN 0-8032-1778-7

ASTM 1022-94. 1997. Standard Guide for Conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Molluscs. American Society for Testing and Materials

EEC, 1988 & 1992. EC A.8. Partition coefficient. Annex V (Directive 67/548/EEC). Methods for determination of physico-chemical properties, toxicity and ecotoxicity

EC, 1998. EC.C.13 Bioconcentration: Flow-through Fish Test

EPA-OTS, 1982. Guidelines and support documents for environmental effects testing. Chemical fate test guidelines and support documents. United States Environmental Protection Agency. Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, D.C. 20960. EPA 560/6-82-002. (1982年8月および更新版)。および Code of Federal Regulations も参照。Protection of the Environment Part 790 から最後まで。1993年7月1日改訂。これらのテストガイドラインの最新改訂版についての ONLINE 情報: US National Technical Information System

EPA-FIFRA, 1982. The Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act. Pesticide Assessment Guidelines, subdivision N: chemistry: Environmental fate, and subdivision E, J & L: Hazard Evaluation. Office of Pesticide Programs. US Environmental Protection Agency, Washington D.C. (1982 および更新版)。これらのテストガイドラインの最新改訂版についての ONLINE 情報: US National Technical Information System

OECD Test Guideline 107, 1995. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method

OECD Test Guideline 117, 1989. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Partition Coefficient (n-octanol/water), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method

OECD Test Guideline 305, 1996. Bioconcentration: Flow-through Fish Test. OECD Guidelines for Testing of Chemicals

OECD Test Guideline 305 A-E, 1981. Bioaccumulation: OECD Guidelines for Testing of Chemicals

OECD draft Test Guideline, 1998. Partition Coefficient n-Octanol/Water Pow. Slow-stirring method for highly hydrophobic chemicals. Draft proposal for an OECD Guidelines for Testing of Chemicals

³ 以下のリストは2000年9月時点のものであり、新しいガイドラインの採用、あるいはその原案の推敲に応じて、定期的に更新する必要がある。

附属書 9
附属資料VI
参考文献

1. 水生毒性

- APHA 1992. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th edition. American Public Health Association, Washington, DC
- ASTM 1999. Annual Book of ASTM standards, Vol. 11.04. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA
- DoE 1996. Guidance on the Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances. United Kingdom Department of the Environment, London
- ECETOC 1996. Aquatic Toxicity Testing of Sparingly Soluble, Volatile and Unstable Substances. ECETOC Monograph No. 26, ECETOC, Brussels
- Lewis, M. A. 1995. Algae and vascular plant tests. In: Rand, G. M. (ed.) 1995. Fundamentals of Aquatic Toxicology, Second Edition. Taylor & Francis, Washington, DC. pp. 135-169
- Mensink, B. J. W. G., M. Montforts, L. Wijkhuizen-Maslankiewicz, H. Tibosch, and J.B.H.J. Linders 1995. Manual for Summarising and Evaluating the Environmental Aspects of Pesticides. Report No. 679101022 RIVM, Bilthoven, The Netherlands
- OECD 1998. Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances. OECD, Paris. <http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>
- OECD 1999. Guidelines for Testing of Chemicals. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris
- OECD 2000. Revised Draft Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, OECD, Paris
- Pedersen, F., H. Tyle, J. R. Niemeldi, B. Guttman, L. Lander, and A. Wedebrand 1995. Environmental Hazard Classification – data collection and interpretation guide. TemaNord 1995:581
- US EPA 1996. Ecological Effects Test Guidelines – OPPTS 850.1000. Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies. Public Draft, EPA 712-C-96-113. United States Environmental Protection Agency. http://www.epa.gov/docs/OPTS_Harmonized/
- OECD Monograph 11, Detailed Review Paper on Aquatic Toxicity Testing for Industrial Chemicals and Pesticides
- Rand, Gary M., Fundamentals of Aquatic toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment

2. 生物的分解および非生物的分解

- Boesten J.J.T.I. & A.M.A. van der Linden (1991). Modeling the influence of sorption and transformation on pesticide leaching and persistence. *J. Environ. Qual.* 20, 425-435
- Boethling R.S., P.H. Howard, J.A. Beauman & M.E. Larosche (1995). Factors for intermedia extrapolation in biodegradability assessment. *Chemosphere* 30(4), 741-752
- de Henau H. (1993). Biodegradation. In: P. Calow. Handbook of Ecotoxicology, vol. I. Blackwell Scientific Publications, London. Chapter 18, pp. 355-377
- EC (1996). Technical guidance documents in support of the Commission Directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and the Commission Regulation (EC) No. 1488/94 on risk assessment for existing substances. European Commission, Ispra
- ECETOC (1998): QSARs in the Assessment of the Environmental Fate and Effects of Chemicals, Technical report No. 74. Brussels, June 1998
- Federle T.W., S.D. Gasior & B.A. Nuck (1997). Extrapolating mineralisation rates from the ready CO₂ screening test to activated sludge, river water, and soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 127-134

- Langenberg J.H., W.J.G.M. Peijnenburg & E. Rorije (1996). On the usefulness and reliability of existing QSBRs for risk assessment and priority setting. *SAR and QSAR in Environmental Research* 5, 1-16
- Loonen H., F. Lindgren, B. Hansen & W. Karcher (1996). Prediction of biodegradability from chemical structure. In: Peijnenburg W.J.G.M. & J. Damborsky (eds.). *Biodegradability Prediction*. Kluwer Academic Publishers
- MITI (1992). Biodegradation and bioaccumulation data on existing data based on the CSCL Japan. Japan chemical industry, Ecology-toxicology & information center. ISBN 4-89074-101-1
- Niemelä J (2000). Personal communication to OECD Environment Directorate, 20 March 2000
- Nyholm N., U.T. Berg & F. Ingerslev (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Danish EPA, Environmental Report No. 337
- Nyholm N. & F. Ingerslev (1997). Kinetic biodegradation tests with low test substance concentrations: Shake flask test with surface water and short term rate measurement in activated sludge. In: Hales S.G. (ed.). *Biodegradation Kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making*. From the SETAC-Europe Workshop. Port-Sunlight. September 1996. pp. 101-115. SETAC-Europe, Brussels
- Nyholm N. & L. Toräng (1999). Report of 1998/1999 Ring-test: Shake flask batch test with surface water or surface water / sediment suspensions. ISO/CD 14592-1 Water Quality- Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations, ISO/TC 147/ SC5/WG4 Biodegradability
- OECD (1993). *Structure-Activity Relationships for Biodegradation*. OECD Environment Monographs No. 68. Paris 1993
- OECD (1994): "US EPA/EC Joint Project on the Evaluation of (Quantitative) Structure Activity Relationships." OECD Environment Monograph No. 88. Paris
- OECD (1995). Detailed Review Paper on Biodegradability Testing. OECD Environmental Monograph No. 98. Paris
- OECD (1997). Guidance document on direct phototransformation of chemical in water. OECD/GD(97)21. Paris
- OECD (1998). Harmonized integrated hazard classification system for human health and environmental effects of chemical substances. Paris. <http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>
- Pedersen F., H. Tyle, J. R. Niemelä, B. Guttmann, L. Lander & A. Wedebrand (1995). Environmental Hazard Classification – data collection and interpretation guide for substances to be evaluated for classification as dangerous for the environment. Nordic Council of Ministers. 2nd edition. TemaNord 1995:581, 166 pp
- Schwarzenbach R.P., P.M. Gschwend & D.M. Imboden (1993). *Environmental organic chemistry* 1st ed. John Wiley & Sons, Inc. New York
- Scow K.M. (1982). Rate of biodegradation. In: Lyman W.J., W.F. Reehl & D.H. Rosenblatt (1982): *Handbook of Chemical Property Estimation Methods Environmental Behaviour of Organic Compounds*. American Chemical Society. Washington DC (ISBN 0-8412-1761-0). Chapter 9
- Struijs J. & R. van den Berg (1995). Standardized biodegradability tests: Extrapolation to aerobic environments. *Wat. Res.* 29(1), 255-262
- Syracuse Research Corporation. Biodegradation Probability Program (BIOWIN). Syracuse. N.Y. <http://esc.syrres.com/~esc1/biodeg.htm>
- Westermann P., B.K. Ahring & R.A. Mah (1989). Temperature compensation in *Methanosarcina barkeri* by modulation of hydrogen and acetate affinity. *Applied and Environmental Microbiology* 55(5), 1262-1266

3. 生物蓄積性

- Anliker, R., Moser, P., Poppinger, D. 1988. Bioaccumulation of dyestuffs and organic pigments in fish. Relationships to hydrophobicity and steric factors. *Chem.* 17(8):1631-1644
- Bintein, S.; Devillers, J. and Karcher, W. 1993. Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. *SAR and QSAR in Environmental Research*. Vol.1.pp.29-39
- Black, M.C., Millsap, D.S., McCarthy, J.F. 1991. Effects of acute temperature change on respiration and toxicant uptake by rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson). *Physiol. Zool.* 64:145-168
- Bodor, N., Huang, M.J. 1992. *J. Pharm. Sci.* 81:272-281
- Broto, P., Moreau, G., Vandycke, C. 1984. *Eur. J. Med. Chem.* 19:71-78
- Chiou, T. 1985. Partition coefficients of organic compounds in lipid-water systems and correlations with fish bioconcentration factors. *Environ. Sci. Technol* 19:57-62
- CLOGP. 1995. Daylight Chemical Information Systems, Inf. Sys. Inc. Irvine, Ca
- CSTEE (1999): DG XXIV Scientific Committee for Toxicity and Ecotoxicity and the Environment Opinion on revised proposal for a list of Priority substances in the context of the water framework directive (COMMs Procedure) prepared by the Fraunhofer-Institute, Germany,. Final report opinion adopted at the 11th CSTEE plenary meeting on 28th of September 1999
- Comotto, R.M., Kimerle, R.A., Swisher, R.D. 1979. Bioconcentration and metabolism of linear alkylbenzenesulfonate by Daphnids and Fathead minnows. L.L.Marking, R.A. Kimerle, Eds., *Aquatic Toxicology* (ASTM, 1979), vol. ASTM STP 667
- Connell, D.W., Hawker, D.W. 1988. Use of polynomial expressions to describe the bioconcentration of hydrophobic chemicals by fish. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 16:242-257
- Connell, D.W. 1990. Bioaccumulation of xenobiotic compounds, Florida: CRC Press, Inc. pp.1-213
- De Bruijn, J., Busser, F., Seinen, W. & Hermens, J. 1989. Determination of octanol/water partition coefficients with the "slow stirring" method. *Environ. Toxicol. Chem.* 8:499-512
- Devillers, J., Bintein, S., Domine, D. 1996. Comparison of BCF models based on log P. *Chemosphere* 33(6):1047-1065
- DoE, 1996. Guidance on the aquatic toxicity testing of difficult substance. Unites Kingdom Department of the Environment, London
- Doucette, W.J., Andren, A.W. 1987. Correlation of octanol/water partition coefficients and total molecular surface area for highly hydrophobic aromatic compounds. *Environ. Sci. Technol.*, 21, pages 821-824
- Doucette, W.J., Andren, A.W. 1988. Estimation of octanol/water partition coefficients: evaluation of six methods for highly hydrophobic aromatic compounds. *Chemosphere*, 17, pages 345-359
- Driscoll, S.K., McElroy, A.E. 1996. Bioaccumulation and metabolism of benzo(a)pyrene in three species of polychaete worms. *Environ. Toxicol. Chem.* 15(8):1401-1410
- ECETOC, 1995. The role of bioaccumulation in environmental risk assessment: The aquatic environment and related food webs, Brussels, Belgium
- ECEOOC, 1996. Aquatic toxicity testing of sparingly soluble, volatile and unstable substances. ECETOC Monograph No. 26, ECETOC, Brussels
- European Commission, 1996. Technical Guidance Document in support of Commission Directive 93/96/EEC on Risk Assessment for new notified substances and Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for Existing Substances. Brussels
- Ghose, A.K., Protchet, A., Crippen, G.M. 1988. *J. Computational Chem.* 9:80-90
- Gobas, F.A.P.C., Opperhuizen, A., Hutzinger, O. 1986. Bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish: Relationship with membrane permeation. *Environ. Toxicol. Chem.* 5:637-646

- Gobas, F.A.P.C., Clark, K.E., Shiu, W.Y., Mackay, D. 1989. Bioconcentration of polybrominated benzenes and biphenyls and related superhydrophobic chemicals in fish: Role of bioavailability and elimination into feces. *Environ. Toxicol. Chem.* 8:231-245
- Goodrich, M.S., Melancon, M.J., Davis, R.A., Lech J.J. 1991. The toxicity, bioaccumulation, metabolism, and elimination of dioctyl sodium sulfosuccinate DSS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Water Res.* 25: 119-124
- Hansch, C., Leo, A. 1979. Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology. Wiley, New York, NY, 1979
- Henderson, R.J., Tocher, D.R. 1987. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Prog. Lipid. Res.* 26:281-347
- Howard, P.H. and Meyland, W.M., 1997. Prediction of physical properties transport and degradation for environmental fate and exposure assessments, QSAR in environmental science VII. Eds. Chen, F. and Schüürmann, G. pp. 185-205
- Kimerle, R.A., Swisher, R.D., Schroeder-Comotto, R.M. 1975. Surfactant structure and aquatic toxicity, Symposium on Structure-Activity correlations in Studies on Toxicity and Bioconcentration with Aquatic Organisms, Burlington, Ontario, Canada, pp. 22-35
- Klopman, G., Li, J.Y., Wang, S., Dimayuga, M. 1994. Computer automated log P calculations based on an extended group contribution approach. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 34:752-781
- Knezovich, J.P., Lawton, M.P., Inoue, L.S. 1989. Bioaccumulation and tissue distribution of a quaternary ammonium surfactant in three aquatic species. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 42:87-93
- Knezovich, J.P., Inoue, L.S. 1993. The influence of sediment and colloidal material on the bioavailability of a quaternary ammonium surfactant. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 26:253-264
- Kristensen, P. 1991. Bioconcentration in fish: Comparison of BCFs derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute
- Mackay, D. 1982. Correlation of bioconcentration factors. *Environ. Sci. Technol.* 16:274-278
- McCarthy, J.F., Jimenez, B.D. 1985. Reduction in bioavailability to bluegills of polycyclic aromatic hydrocarbons bound to dissolved humic material. *Environ. Toxicol. Chem.* 4:511-521
- McKim, J.M., Goeden, H.M. 1982. A direct measure of the uptake efficiency of a xenobiotic chemical across the gill of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) under normoxic and hypoxic conditions. *Comp. Biochem. Physiol.* 72C:65-74
- Meylan, W.M. and Howard, P.H., 1995. Atom/Fragment Contribution Methods for Estimating Octanol-Water Partition Coefficients. *J.Pharm.Sci.* 84, 83
- Niemelä, J.R. 1993. QTOXIN-program (ver 2.0). Danish Environmental Protection Agency
- Niemi, G.J., Basak, S.C., Veith, G.D., Grunwald, G. *Environ. Toxicol. Chem.* 11:893-900
- Niimi, A.J. 1991. Solubility of organic chemicals in octanol, triolin and cod liver oil and relationships between solubility and partition coefficients. *Wat. Res.* 25:1515-1521
- OECD, 1993. Application of structure activity relationships to the estimation of properties important in exposure assessment. OECD Environment Directorate. Environment Monograph No. 67
- OECD, 1998. Harmonized integrated hazard classification system for human health and environmental effects of chemical substances. As endorsed by the 28th joint meeting of the chemicals committee and the working party on chemicals in November 1998
- OECD, 2000. Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, OECD, Paris
- Opperhuizen, A., Van der Velde, E.W., Gobas, F.A.P.C., Liem, A.K.D., Van der Steen, J.M.D., Hutzinger, O. 1985. Relationship between bioconcentration in fish and steric factors of hydrophobic chemicals. *Chemosphere* 14:1871-1896

- Opperhuizen, A. 1986. Bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish. In: Poston T.M., Purdy, R. (eds), Aquatic Toxicology and Environmental Fate : Ninth Volume, ASTM STP 921. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, 304-315
- Opperhuizen, A., Schrap, S.M. 1987. Relationship between aqueous oxygen concentration and uptake and elimination rates during bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish. Environ. Toxicol. Chemosphere 6:335-342
- Opperhuizen, A., Sijm, D.T.H.M. 1990. Bioaccumulation and biotransformation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in fish. Environ. Toxicol. Chem. 9:175-186
- Pedersen, F., Tyle, H., Niemelä, J.R., Guttman, B., Lander, L. and Wedebrand, A., 1995. Environmental Hazard Classification – data collection and interpretation guide (2nd edition). TemaNord 1995:581
- Petersen, G.I., Kristensen, P. 1998. Bioaccumulation of lipophilic substances in fish early life stages. Environ. Toxicol. Chem. 17(7):1385-1395
- Rekker, R.F., de Kort, H.M. 1979. The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1000 data point set. Eur. J. Med. Chem. – Chim. Ther. 14:479-488
- Roberts, D.W. 1989. Aquatic toxicity of linear alkyl benzene sulphonates (LAS) – a QSAR analysis. Comunicaciones Presentadas a las Jornadas del Comité Espanol de la Detergencia, 20 (1989) 35-43. Also in J.E. Turner, M.W. England, T.W. Schultz and N.J. Kwaak (eds.) QSAR 88. Proc. Third International Workshop on Qualitative Structure-Activity Relationships in Environmental Toxicology, 22-26 May 1988, Knoxville, Tennessee, pp. 91-98. Available from the National Technical Information Service, US Dept. of Commerce, Springfield, VA
- Schrap, S.M., Opperhuizen, A. 1990. Relationship between bioavailability and hydrophobicity: reduction of the uptake of organic chemicals by fish due to the sorption of particles. Environ. Toxicol. Chem. 9:715-724
- Shiu, W.Y., Doucette, W., Gobas, F.A.P.C., Andren, A., Mackay, D. 1988. Physical-chemical properties of chlorinated dibenzo-p-dioxins. Environ. Sci. Technol. 22: pages 651-658
- Sijm, D.T.H.M., van der Linde, A. 1995. Size-dependent bioconcentration kinetics of hydrophobic organic chemicals in fish based on diffusive mass transfer and allometric relationships. Environ. Sci. Technol. 29:2769-2777
- Sijm, D.T.H.M., Pärt, P., Opperhuizen, A. 1993. The influence of temperature on the uptake rate constants of hydrophobic compounds determined by the isolated perfused gill of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol. 25:1-14
- Spacie, A., Hamelink, J.L. 1982. Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1:309-320
- Suzuki, T., Kudo, Y.J. 1990. J. Computer-Aided Molecular Design 4:155-198
- Syracuse Research Corporation, 1999. http://esc_plaza.syrres.com/interkow/logkow.htm
- Tas, J.W., Seinen, W., Opperhuizen, A. 1991. Lethal body burden of triphenyltin chloride in fish: Preliminary results. Comp. Biochem. Physiol. 100C(1/2):59-60
- Tolls J. & Sijm, D.T.H.M., 1993. Bioconcentration of surfactants, RITOX, the Netherlands (9. Nov. 1993). Procter and Gamble Report (ed.: M.Stalmans)
- Tolls, J. 1998. Bioconcentration of surfactants. Ph.D. Thesis. Utrecht University, Utrecht, The Netherlands
- Toshima, S., Moriya, T., Yoshimura, K. 1992. Effects of polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate on the acute toxicity of linear alkylbenzenesulfonate (C₁₂-LAS) to fish. Ecotoxicol. Environ. Safety 24: 26-36
- USEPA 1985. U.S. Environmental Protection Agency. Office of Toxic Substances. Toxic Substances Control Act Test Guidelines. 50 FR 39252
- US EPA/EC, 1993. US EPA/EC Joint Project on the Evaluation of (Quantitative) Structure Activity Relationships

US EPA, 1996. Ecological effects test guidelines – OPPTS 850.1000. Special considerations for conducting aquatic laboratory studies. Public Draft, EPA712-C-96-113. United States Environmental Protection Agency. http://www.epa.gov/docs/OPTS_harmonized/

Van Den Berg, M., Van De Meet, D., Peijnenburg, W.J.G.M., Sijm, D.T.H.M., Struijs, J., Tas, J.W. 1995. Transport, accumulation and transformation processes. In: Risk Assessment of Chemicals: An Introduction. van Leeuwen, C.J., Hermens, J.L.M. (eds). Dordrecht, NL. Kluwer Academic Publishers, 37-102

Wakabayashi, M., Kikuchi, M., Sato, A. Yoshida, T. 1987. Bioconcentration of alcohol ethoxylates in carp (*Cyprinus carpio*), *Ecotoxicol. Environ. Safety* 13, 148-163

Wofford, H.W., C.D. Wilsey, G.S. Neff, C.S. Giam & J.M. Neff (1981): Bioaccumulation and metabolism of phthalate esters by oysters, brown shrimp and sheepshead minnows. *Ecotox. Environ. Safety* 5:202-210, 1981

4. QSAR に関する参考文献

Boethling, R.S., Howard, P.H., Meylan, W.M. Stiteler, W.M., Beauman, J.A., and Tirado, N. (1994). Group contribution method for predicting probability and rate of aerobic biodegradation. *Envir. Sci. Technol.*, 28, 459-465

De Bruijn, J, Busser, F., Seinen, W., and Hermens, J. (1989), Determination of octanol/water partition coefficients for hydrophobic organic chemicals with the “slow-stirring method,” *Environ. Toxicol. Chem.*, 8, 499-512

ECETOC (1998), QSARs in the Assessment of the Environmental Fate and Effects of Chemicals, Technical report No 74

Hansch, C. and A. Leo (1995), *Exploring QSAR*, American Chemical Society

Hilal, S. H., L. A. Carreira and S. W. Karickhoff (1994), *Quantitative Treatments of Solute/solvent Interactions, Theoretical and Computational Chemistry, Vol. 1*, 291-353, Elsevier Science

Howard, P.H., Boethling, R.S, Stiteler, W.M., Meylan, W.M., Hueber, A.E., Beaumen, J.A. and Larosche, M.E.(1992). Predictive model for aerobic biodegradation developed from a file of evaluated biodegradation data. *Envir. Toxicol. Chem.* 11, 593-603

Howard, P. And Meylan, W.M. (1992). Biodegradation Probability Program, Version 3, Syracuse Research Corp., NY

Langenberg, J.H., Peijnenburg, W.J.G.M. and Rorije, E. (1996). On the usefulness and reliability of existing QSARs for risk assessment and priority setting. *SAR QSAR Environ. Res.*, 5, 1-16

R.L. Lipnick (1986). Charles Ernest Overton: Narcosis studies and a contribution to general pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.*, 7, 161-164

R.L. Lipnick (1989a). Hans Horst Meyer and the lipid theory of narcosis, *Trends Pharmacol. Sci.*, 10 (7) July, 265-269; Erratum: 11 (1) Jan (1990), p. 44

R.L. Lipnick (1989b). Narcosis, electrophile, and proelectrophile toxicity mechanisms. Application of SAR and QSAR. *Environ. Toxicol. Chem.*, 8, 1-12

R.L. Lipnick (1990). Narcosis: Fundamental and Baseline Toxicity Mechanism for Nonelectrolyte Organic Chemicals. In: W. Karcher and J. Devillers (eds.) *Practical Applications of Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) in Environmental Chemistry and Toxicology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 129-144

R.L. Lipnick (ed.) (1991a). *Charles Ernest Overton: Studies of Narcosis and a Contribution to General Pharmacology*, Chapman and Hall, London, and Wood Library-Museum of Anesthesiology

R.L. Lipnick (1991b). Outliers: their origin and use in the classification of molecular mechanisms of toxicity, *Sci. Tot. Environ.*, 109/110 131-153

R.L. Lipnick (1995). Structure-Activity Relationships. In: Fundamentals of Aquatic Toxicology, 2nd edition, (G.R. Rand, ed.), Taylor & Francis, London, 609-655

Loonen, H., Lindgren, F., Hansen, B., Karcher, W., Niemela, J., Hiromatsu, K., Takatsuki, M., Peijnenburg, W., Rorije, E., and Struijs, J. (1999). Prediction of biodegradability from chemical structure: modeling of ready biodegradation test data. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18, 1763-1768

Meylan, W. M. and P. H. Howard (1995), *J. Pharm. Sci.*, 84, 83-92

OECD (1993), Structure-Activity Relationships for Biodegradation. OECD Environment Monograph No. 68 OECD, Paris, France

OECD (1995). Environment Monographs No. 92. Guidance Document for Aquatic Effects Assessment. OECD, Paris

F. Pedersen, H. Tyle, J. R. Niemelä, B. Guttmann, L. Lander, and A. Wedebrand (1995), Environmental Hazard Classification: Data Collection and Interpretation Guide for Substances to be Evaluated for Classification as Dangerous for the Environment, 2nd Edition, TemaNord 1995:581, Nordic Council of Ministers, Copenhagen, January

US EPA (1999) Development of Chemical Categories in the HPV Challenge Program, <http://www.epa.gov/chemrtk/categuid.htm>

US EPA (2000a), The Use of Structure-Activity Relationships (SAR) in the High Production Volume Chemicals Challenge Program, <http://www.epa.gov/chemrtk/sarfin1.htm>

US EPA (2000b), ECOSAR, <http://www.epa.gov/oppt/newchems/21ecosar.htm>

US EPA/EC (1993): US EPA Joint Project on the Evaluation of (Quantitative) Structure Activity Relationships, Commission of European Communities, Final Report, July

G.D. Veith, R.L. Lipnick, and C.L. Russom (1989). The toxicity of acetylenic alcohols to the fathead minnow, *Pimephales promelas*. Narcosis and proelectrophile activation. *Xenobiotica*, 19(5), 555-565

5. 金属および金属化合物

Brown, D.S. and Allison, J.D. (1987). MINTEQA1 Equilibrium Metal Speciation Model: A user's manual. Athens, Georgia, USEPA Environmental Research Laboratory, Office of Research and Development

OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, <http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>

OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures

OECD (2001). Guidance Document on Transformation/Dissolution of Metals and Metals Compounds in Aqueous Media

Santore, R.C. and Driscoll, C.T. (1995). The CHESSE Model for Calculating Chemical Equilibria in Soils and Solutions, Chemical Equilibrium and Reaction Models. The Soil Society of America, American Society of Agronomy

Santore, R.C. and Di Toro, D.M. et al (1999). A biotic ligand model of the acute toxicity of metals. II. Application to fish and daphnia exposure to copper. *Environ. Tox. Chem.* Submitted

Skeaff, J., Delbeke, K., Van Assche, F. and Conard, B. (2000) A critical surface area concept for acute hazard classification of relatively insoluble metal-containing powders in aquatic environments. *Environ. Tox. Chem.* 19:1681-1691

Tipping, E. (1994). WHAM – A computer equilibrium model and computer code for waters, sediments, and soils incorporating discrete site/electrostatic model of ion-binding by humic substances. *Computers and Geoscience* 20 (6): 073-1023

