

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学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。非生物学的変換からは通常、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学的変換を含んでいることに注意しなければならない。天然水と純水間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のみ有意であること、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なものにしている、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ら中程度である（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、究極的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、一次的生分解だけで、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 Torång, 1999)、フラスコ振騰ダイアウェ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ェ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 ($1-100 \mu\text{g/L}$)。

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 (CO_2 および CH_4 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する
- (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／水マイクロコズム生分解性試験」である。底質および水を含むマイクロコズ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発展してきており、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。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なように思われる。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。貧栄養条件で生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が多い (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生育している。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 $\mu\text{g/l}$ 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 $10\mu\text{g/l}$ 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 (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、注意をはら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の間での分配プロセスと、n-オクタノールと水間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はらうべきである。

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、フラスコ振盪法および 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、フラスコ振盪法または 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 依存的である。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 依存的である。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 (ジョージア州アセセンス)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が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ため、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

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。

850.1010 Aquatic invertebrate acute toxicity, test, freshwater daphnids
850.1020 Gammarid acute toxicity test
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)

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 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

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

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。

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

附属書 9

附属資料VI

参考文献

1. 急性毒性

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., Guttmann, 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 Español 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/sarfinl1.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 CHESS 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