

< 微生物等による化学物質の分解度試験 >

: 微生物による化学物質の分解度試験 (301C 相当)

- 適用範囲

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

- 用語

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

- 活性汚泥の調製

1 汚泥採集場所

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

2 汚泥採集回数

年間 4 ~ 6 回とする。

3 汚泥採集方法

3 - 1 都市下水 下水処理場の返送汚泥 1L

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

4 調製

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

5 培養

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

(注1) 0.1% 合成下水

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

6 管理

培養段階での管理は、次の項目を点検し、所要の調製を行う。

6 - 1 上澄液の外観 活性汚泥の上澄液は透明であること。

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

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

6 - 4 pH 上澄液の pH は、 7.0 ± 1.0 であること。

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

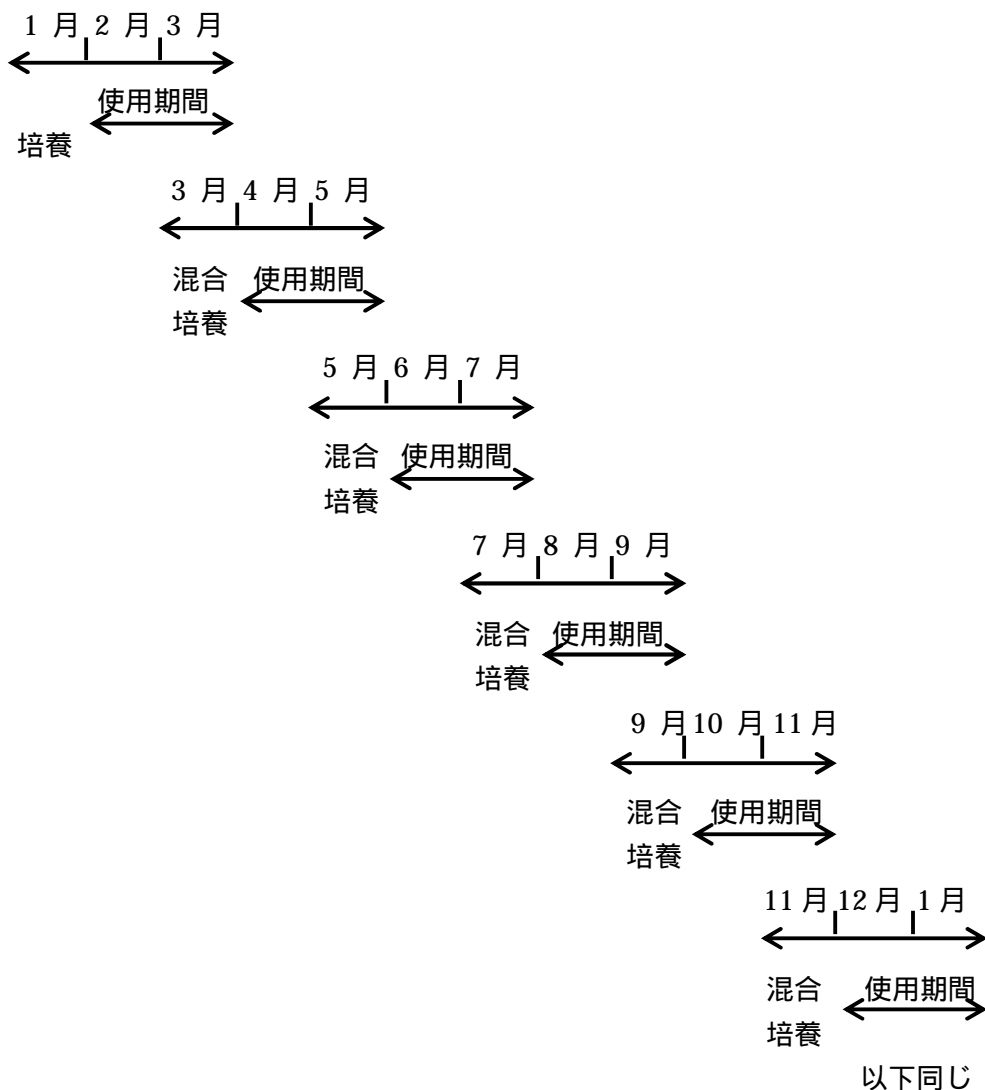
7 新旧活性汚泥の混合

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

8 活性汚泥の活性度の点検

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

[活性汚泥の調製と使用期間の例（年間 6 回採集の場合）]



- 試験方法

1 分解度試験装置

閉鎖系酸素消費量測定装置

2 基礎培養基

JIS K0102-2016 の 21 で定められた組成の A 液、B 液、C 液及び D 液それぞれ 3 ml に水を加えて 1L とする。

3 被験物質の添加及び試験の準備

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

3 - 1 水に被験物質が 100mg/L となるように添加したものを入れた試験容器 1 個

3 - 2 基礎培養基に被験物質が 100mg/L となるように添加したものを入れた試験容器 3 個

3 - 3 基礎培養基にアニリンが 100mg/L となるように添加したものを入れた試験容器 1 個

3 - 4 基礎培養基のみを入れた試験容器 1 個

4 活性汚泥の接種

3 - 2、3 - 3 及び 3 - 4 の試験容器に JIS K0102-2016 の 14.1 で定められた懸濁物質濃度が 30mg/L になるように活性汚泥を接種する。ただし、3 - 2 については必要な場合には接種の前に溶液の pH を 7.0 に調整する。なお、活性汚泥は合成下水を添加してから 18~24 時間後のものを使用する。

5 分解度試験の実施

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

一定期間培養した後、残留する被験物質と変化物を分析に供し、その量を測定する。被験物質が水に溶解する場合は、溶存有機炭素の残存量も測定する。また、試験液の pH を測定する。
(注2) 通常は 28 日間とする。

6 試験結果の算出方法

6 - 1 試験条件の確認

試験終了時の被験物質の分解度の最大値と最小値の差が 20% 未満であり、酸素消費量から求めた - の 3 - 3 のアニリンの分解度が 7 日後に 40% を超えかつ 14 日後に 65% を超えるときは、この試験は有効とする。

6 - 2 酸素消費量から分解度 (%) を算出する方法

$$\text{分解度 (\%)} = \frac{\text{BOD} - \text{B}}{\text{TOD}^{(\text{注}3)}} \times 100$$

BOD：被験物質の生物化学的酸素消費量（測定値）(mg)

B：基礎培養基に活性汚泥を接種したものの酸素消費量（測定値）(mg)

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

（注3）窒素を含む被験物質が分解した場合、硝化の程度に応じた TOD を算出する。

6 - 3 直接定量^(注4)から分解度(%)を算出する方法

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

S_A：分解度試験終了後の被験物質の残留量（測定値）(mg)

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

（注4）直接定量による化学分析法

全有機炭素分析計を用いる場合

試験容器から試験液を適量分取し、これを約 40,000m/s² で 15 分間遠心分離又はろ過（0.45 μm）し、その上澄液又はろ液から適量を分取して全有機炭素分析計により残存する溶存有機炭素を定量する。

その他の分析計を用いる場合

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

- 結果のまとめ

試験の結果を様式 1 によりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

: 微生物による化学物質の分解度試験 (301F 相当)

- 適用範囲

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

- 用語

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

- 植種源 (微生物源)

地方自治体が管轄する主として家庭排水を処理する下水処理場の好氣的反応槽 (出口付近) の活性汚泥又は返送汚泥を用いる。下水処理場より汚泥を採取後、必要に応じてふるい等を用いて大きな粒子を除去し、試験に使用するまで好氣的条件を維持する。採取当日に汚泥を使用しない場合は、約 22 で好氣的条件を維持し、採取後 7 日間使用してよい。なお、被験物質、基準物質 (アニリン、酢酸ナトリウム又は安息香酸ナトリウム) 及びその他の化学物質を用いてじゅん化してはならない。

- 試験方法

1 分解度試験装置

酸素消費量測定装置

2 基礎培養基

以下に示した A 液、B 液、C 液及び D 液を調製する。A 液 10 mL、B 液 1 mL、C 液 1 mL 及び D 液 1 mL に水を加えて 1 L とし、これを基礎培養基とする。

A 液 :

りん酸二水素カリウム (KH_2PO_4) 8.50 g
りん酸水素二カリウム (K_2HPO_4) 21.75 g
りん酸水素二ナトリウム二水和物 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 33.40 g
又はリン酸水素二ナトリウム十二水和物 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 67.21 g
塩化アンモニウム (NH_4Cl) 0.50 g
上記を水に溶解させ 1 L とする。また、pH を 7.4 に調整する。

B 液 :

塩化カルシウム (CaCl_2) 27.50g
又は塩化カルシウム二水和物 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 36.40 g
上記を水に溶解させ 1 L とする。

C 液 :

硫酸マグネシウム七水和物 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 22.50 g
上記を水に溶解させ 1 L とする。

D 液 :

塩化鉄 (III) 六水和物 ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.25 g
上記を水に溶解させ 1 L とする。なお、本液は使用する直前に調製する。

3 被験物質の添加及び試験の準備

3 - 1 ~ 3 - 3 の試験容器（例：各 300 ml）を準備し、これらを試験温度に調整する。被験物質が固体で水に試験濃度まで溶解しない場合は、可能な限り微粉碎等を実施したものをを用いる。

必要に応じて 3 - 4 ~ 3 - 9 の試験容器を追加してよい。微生物への阻害性がある被験物質については、微生物への阻害を低減する目的で低濃度での分解性を評価する 3 - 5 を追加してよいが、その妥当性（被験物質に微生物への阻害性があること等）を 3 - 6 の試験容器によって示すこと。また、難水溶性物質については、試験液中における被験物質と微生物の接触を改善する目的で補助物質（溶媒、乳化剤又は担体）を使用した 3 - 7 ~ 3 - 9 を追加してよいが、その妥当性（補助物質に生分解性や微生物への阻害性がないこと等）を示すこと。

- 3 - 1 基礎培養基に被験物質が 100 mg/L となるように添加したものを入れた試験容器 少なくとも 2 個
- 3 - 2 基礎培養基に基準物質（アニリン、酢酸ナトリウム又は安息香酸ナトリウム）が 100 mg/L となるように添加したものを入れた試験容器 1 個
- 3 - 3 基礎培養基のみを入れた試験容器 2 個

< 非生物的影響を確認する場合 >

- 3 - 4 精製水に被験物質が 100 mg/L となるように添加したものを入れた試験容器 任意の個数

< 微生物への阻害性がある被験物質に対して低濃度における分解性を確認する場合 >

- 3 - 5 基礎培養基に被験物質が 30 mg/L となるように添加したものを入れた試験容器 少なくとも 2 個
- 3 - 6 基礎培養基に被験物質（100 mg/L となる量）及び基準物質（100 mg/L となる量）を添加したものを入れた試験容器 任意の個数

< 難水溶性物質に対して補助物質を使用する場合 >

- 3 - 7 基礎培養基に被験物質（100 mg/L となる量）及び補助物質（適切な量）を添加したものを入れた試験容器 少なくとも 2 個
- 3 - 8 基礎培養基に基準物質（100 mg/L となる量）及び補助物質（適切な量）を添加したものを入れた試験容器 1 個
- 3 - 9 基礎培養基に補助物質（適切な量）を添加したものを入れた試験容器 2 個

4 植種源の接種

3 - 1 ~ 3 - 3 の試験容器に JIS K0102-2016 の 14.1 で定められた懸濁物質濃度が 30 mg/L となるように植種源を接種する。ただし、3 - 1 については必要な場合には接種の前に溶液の pH を 7.4 ± 0.2 に調整する。

試験容器を追加する場合は 3 - 5 ~ 3 - 9 にも同様に植種源を接種する。ただし、3 - 5 ~ 3 - 9 については必要な場合には接種の前に溶液の pH を 7.4 ± 0.2 に調整する。

5 分解度試験の実施

遮光した条件のもとで 22 ± 1 で十分かくはんしながら一定期間^(注5)培養し、酸素消費量の変化を経時的に測定する。

一定期間培養した後、残留する被験物質と変化物を分析に供し、その量を測定する。被験物

質が水に溶解する場合は、溶存有機炭素の残存量も測定する。ただし、3 - 6の試験容器については、残留する被験物質と変化物及び溶存有機炭素の残存量の測定は不要である。また、試験液の pH を測定する。

(注5) 通常は 28 日間とする。

6 試験結果の算出方法

6 - 1 試験条件の確認

試験終了時において、 - の 3 - 1 の分解度の最大値と最小値の差が 20%未滿、 - の 3 - 3 の酸素消費量が 60 mg/L 以下、さらに酸素消費量から求めた - の 3 - 2 の基準物質の分解度が 14 日後までに 60%に達するときは、この試験は有効とする。

6 - 2 酸素消費量から分解度 (%) を算出する方法

$$\text{分解度 (\%)} = (\text{BOD} - \text{B}) / \text{TOD}^{(\text{注}6)} \times 100$$

BOD：被験物質の生物化学的酸素消費量 (測定値)(mg)

B：基礎培養基に活性汚泥を接種したものの酸素消費量 (測定値)(mg)

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

(注6) 窒素を含む被験物質が分解した場合、硝化の程度に応じた TOD を算出する。

6 - 3 直接定量^(注7)から分解度 (%) を算出する方法

$$\text{分解度 (\%)} = (\text{B} - \text{A}) / \text{B} \times 100$$

A：分解度試験終了後の被験物質の残留量 (測定値)(mg)

B：被験物質の添加量 (理論値)(mg)

(注7) 直接定量による化学分析法

全有機炭素分析計を用いる場合

試験容器から試験液を適量分取し、これを約 40,000m/s² で 15 分間遠心分離又はろ過 (0.45 μm) し、その上澄液又はろ液から適量を分取して全有機炭素分析計により残存する溶存有機炭素を定量する。

その他の分析計を用いる場合

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

6 - 4 備考

- の 6 - 2 において酸素消費量から分解度を算出する際、必要に応じて 10%に達した時から 10 日間 (10-d window) 以内に 60%に達するか否かを確認してもよい。

- 結果のまとめ

試験の結果を様式 1 によりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

< 魚介類の体内における化学物質の濃縮度試験 >

: 魚を用いた濃縮度試験（水暴露法）

- 適用範囲

ここでは、魚介類のうち特に水（経鰓）を介した魚類の体内における化学物質の濃縮性を評価する試験の標準となるべき方法について規定する。魚を用いた生物濃縮度試験については、原則、本試験法を用いる。

- 用語

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

- 試験方法

1 試験の概要

本試験法は、魚類体内への水（経鰓）を介した化学物質の取込及び蓄積を評価する方法である。本試験では、化学物質が溶解した試験水に試験魚を暴露して、試験水及び試験魚中における化学物質濃度を測定し、定常状態における生物濃縮係数（ BCF_{SS} ）を算出する。また、必要に応じて、上記の取込期間に加えて、取込期間終了後の試験魚を化学物質が含まれない試験水に移動し排泄期間を設ける。この場合には、取込・排泄の両期間を通して速度論による生物濃縮係数（ BCF_K ）を算出することができる。

2 試験に用いる装置及び材料

2 - 1 装置及び器具

すべての装置及び材料は、溶解、吸着、あるいは浸出により試験魚に有害な影響を与えないものを用いる。試験水槽は、化学的に不活性な材料で、流量に応じた適切な容量の角型あるいは円筒形とする。テフロン、ステンレススチール又はガラス配管を使用し、軟質プラスチック配管の使用は最小限とし、やむを得ない箇所に限る。合成ピレスロイド類のように高い吸着性を有する被験物質には、シラン処理ガラスが必要な場合もある。

2 - 2 試験用水

- (1) 試験用水とは、被験物質及び溶解補助剤（溶剤及び分散剤）を含まない試験用の水である。汚染されていない水質の水源から得られる天然水、脱塩素した水道水又は人工

調製水（特定の栄養素を既知量添加した脱塩素した水道水）とし、選択した魚種がじゅん化及び試験期間中に異常な外観や挙動を示さずに生存できる水質でなければならない。試験用水は、少なくとも pH、硬度、全粒子状物質濃度、全有機炭素（TOC⁽¹⁾）濃度を測定する。アンモニウム、亜硝酸及びアルカリ度についても測定することが望ましい。

- (2) 試験期間中、試験用水の水質を一定に保つ。試験開始時の pH は 6.0 から 8.5 までの範囲とし、試験期間中の変動幅は ± 0.5 以内とする。試験用水が試験結果に影響（例えば、被験物質の錯体形成による影響）を与えないようにする。試験魚の活動に有害な影響を与えないことを保証するために、定期的（少なくとも試験開始時及び終了時）に試験用水を採取し、重金属類、主要なアニオン類及びカチオン類、農薬、TOC、全粒子状物質の濃度等を測定する（試験法解説参照）。試験用水の水質が一定であることが確認できれば、測定頻度を 3 か月ごとなどにしてもよい。さらに、1 年間以上にわたって一定であると示される場合は、測定頻度を 6 か月ごとなどにしてもよい。試験用水中の TOC だけでなく天然粒子の含量も可能な限り低減する。必要に応じて、試験用水を使用前にろ過する。また、試験魚の排泄物及び残餌による有機炭素量を可能な限り小さくする。

2 - 3 試験魚

2 - 3 - 1 魚種を選択

コイ又はメダカ（ヒメダカ）が推奨されるが、試験法解説に示す他の魚種を使用してもよい。

2 - 3 - 2 蓄養及びじゅん化

- (1) 蓄養した魚群を試験水温で少なくとも 2 週間じゅん化させ、その間十分な餌を与える。じゅん化中の水及び餌は試験に使用するものと同じ種類のものとする。48 時間の観察期間に続いて、じゅん化期間中の死亡率を記録し、以下の基準に従い試験に使用する。
- ・ 7 日間で 10% を超える死亡率の場合：試験に使用しない。
 - ・ 7 日間で 5% から 10% の死亡率の場合：さらに 7 日間延長してじゅん化する。次の 7 日間で 5% より高い死亡率になった場合には試験に使用しない。
 - ・ 7 日間で 5% より低い死亡率の場合：試験に使用できる。
- (2) 試験に使用する魚に外観上、病気や異常がないことを確認する。病気の魚は試験に使用しない。試験開始前 2 週間あるいは試験期間中に病気などに対する処置はしない。

(1) 全有機炭素（TOC）には、粒子状有機炭素（POC）及び溶存有機炭素（DOC）が含まれる（TOC = POC + DOC）。

2 - 3 - 3 給餌

- (1) じゅん化及び試験期間中は、試験魚を健康な状態に保ち、かつ、体重を一定に維持するため、脂質や総蛋白質含量が既知の餌を適切な量与える。給餌量は魚種、試験条件及び餌のカロリー値を考慮して設定し、じゅん化及び試験期間中に毎日餌を与える（例えば、コイの場合は魚体重の 1-2% 程度（湿重量））。給餌量は、急激な成長及び脂質含量の増加がないように設定し、各試験水槽から直近に採取した試験魚の体重から適宜、再計算する（週 1 回など）。
- (2) 給餌後 30 分から 1 時間以内に、試験水槽から食べ残しの餌及び糞便を吸い上げる。有機炭素の存在は、被験物質の生物学的利用能を制限する可能性があるため、試験期間を通して試験水槽を清掃し、有機炭素濃度を可能な限り低く保つ。

3 試験の実施

3 - 1 試験水

- (1) 試験水とは、試験用水に被験物質や溶解補助剤を加えた水である。試験原液は、被験物質を試験用水に単純に混合又は攪拌し調製することが望ましい。溶解補助剤を使用する場合は最小限にする。また、それらの臨界ミセル濃度を超えてはならない。使用可能な溶剤としては、アセトン、エタノール、メタノール、*N,N*-ジメチルホルムアミド、トリエチレングリコールなどがある。使用可能な分散剤としては、Tween[®]80、メチルセルロース 0.01%、NIKKOL[®]HCO-40 などがある。試験水中の溶解補助剤濃度は、すべての試験区及び対照区において同一とし、かつ溶解補助剤が試験魚に毒性影響を与えないようにする。溶解補助剤の最高濃度は、100 mg/L（又は 0.1 mL/L）とする。試験水における有機炭素の総量に対する溶解補助剤及び被験物質の割合を把握する。試験期間を通して、試験水中の TOC 濃度は 10 mg/L（±20%）以下とする（被験物質及び溶解補助剤由来の有機炭素濃度を除く）。試験水中の被験物質濃度は、溶解補助剤の使用に関わらず、水溶解度以上の濃度は使用しない方がよい。生分解性のある溶解補助剤を用いる場合、バクテリアの増殖をもたらすので注意が必要である。
- (2) 試験水槽中の被験物質濃度を維持するには、試験水槽に試験原液を連続的に供給・希釈する流水式システムが有効である。少なくとも 1 日に試験水槽容量の 5 倍量の試験水を流すことが好ましい。流水式による試験が推奨されるが、流水式が不可能であり、有効性基準を満たす場合は、半止水式による試験を実施してもよい。試験原液及び試験用水の流量を、試験開始の 48 時間前と試験期間中に毎日確認する。各試験水槽の流量の変動及び試験水槽間の流量の差異は 20% 以内とする。
- (3) 試験水中被験物質濃度について、流水式による試験において試験原液交換前後で濃度変動が認められる場合や、半止水式による試験において換水前後で濃度変動が認められる場合は、OECD テストガイドライン 211 の付属書 6 の手順に従って、時間加重平均（TWA；Time Weighted Average）により試験水中被験物質濃度（ C_w ）を算出してもよい。

3 - 2 水質測定の種類

試験期間中は、すべての試験水槽について、溶存酸素濃度、TOC 濃度、試験水温及び pH を測定する。全硬度については、試験区（設定濃度が最も高い区の 1 水槽）及び対照区の水槽を測定する。溶存酸素濃度については、取込期間中は少なくとも 3 回（取込期間の開始時、中間時及び終了時）、排泄期間中は 1 週間に 1 回測定する。TOC 濃度については、取込期間開始の 24 及び 48 時間前、取込期間中及び排泄期間中は 1 週間に 1 回測定する。試験温度は毎日 1 回、pH は取込期間及び排泄期間の開始時及び終了時、全硬度は取込期間及び排泄期間に 1 回測定し記録する。試験温度については、少なくとも一つの試験水槽中で連続的にモニターすることが好ましい。

3 - 3 流量

取込期間開始時の試験魚の搬入による試験水中の被験物質濃度の低下を最小限にし、かつ、溶存酸素濃度の低下を避けるため、試験魚尾数に応じて、試験水の流量を調整する。流量は使用する魚種によって調整する。通常、流量は魚体重（湿重量）1.0 g 当たり 1-10 L/日 が推奨される。

3 - 4 試験魚の条件

各試験区において、試験開始時の魚体重の最小値は最大値の 2/3 以上であること。同じ年齢で同じ供給源の魚を用いる。魚の年齢及び体重が BCF に大きく影響する可能性があるため、これらの詳細を記録する。試験開始時の平均魚体重を推定するため、試験開始直前にじゅん化中の予備魚の体重を測定することが推奨される。

3 - 5 試験水濃度

3 - 5 - 1 急性毒性試験の実施（LC₅₀測定）

本通知で定められた魚類毒性試験、JIS K0102-2016 の 71. で定められた方法又は OECD テストガイドライン 203 で定められた方法に準じて急性毒性試験を実施する。ただし、被験物質の最大無影響濃度（NOEC）のデータが得られている場合は実施しなくてもよい。

3 - 5 - 2 試験濃度の設定

(1) 試験は少なくとも 2 濃度区で実施する。第 1 濃度区の試験濃度の設定は、被験物質の急性毒性値（LC₅₀ 値）の 1% 以下もしくは NOEC 以下とし、技術的に可能な限り低くする。試験水の分析における被験物質の定量下限濃度より、少なくとも 10 倍程度高い濃度を目安とする。第 2 濃度区は、第 1 濃度区より 10 倍低い濃度とする。ただし、毒性及び分析感度から、これが不可能であれば、10 倍より小さい濃度比で行うか、放射性同位元素を使って標識した被験物質（高純度、例えば > 98%）を使用してよい。いずれの試験濃度も被験物質の水溶解度を超えないように注意する。

(2) BCFの濃度依存性がないと予想される試験条件においては、試験は1濃度区でよい場合がある。1濃度区での水暴露法を適用する場合は、試験濃度を試験用水に対する被験物質の溶解度の10分の1以下に設定すること。ただし、無機化合物、有機金属化合物、界面活性作用を有する物質、トリフルオロメチル基若しくはテトラフルオロエチレン基を有する物質又は構造不明な複雑な反応生成物若しくは成分が不定の混合物等については、上記の設定濃度であっても濃度依存性を示す可能性が否定できないため、1濃度区での水暴露法は適さない。また、蛋白質と結合する可能性が高い物質（溶媒抽出で魚体から回収されない等）についても、濃度依存性を示す可能性が否定できないため、1濃度区での水暴露法は適さない。

一連の試験に加えて、試験用水のみの対照区又は試験原液に溶解補助剤を用いる場合は溶解補助剤のみを含む対照区を設定する。

3 - 6 照明及び試験温度

照明時間は通常12から16時間とする。照明の種類及び特性を把握しておく。試験における照明条件下では被験物質が光分解する可能性があるため注意する。人工的な光反応生成物の試験魚への暴露を避けるために適切な照明を使用する。場合によっては、290 nmより低波長のUV照射を遮蔽する適切なフィルターを使用する。試験温度は試験魚の推奨試験温度とし、その変動は ± 2 未満とする。

3 - 7 試験期間

3 - 7 - 1 取込期間

取込期間は、試験魚中の被験物質濃度が取込期間の早い段階で定常状態（試験法解説参照）に達することが確認される場合を除き、28日間とする。試験魚中の被験物質濃度が少なくとも2日間の間隔を置いて採取したサンプルについて、連続した3回の被験物質濃度の分析結果が $\pm 20\%$ 以内の場合は定常状態に達したと判断する。ただし、試験魚を複数尾まとめて分析する場合には、少なくとも連続した4回の試験魚分析で定常状態を判断する。28日間で定常状態に達しない場合、定常状態に達するまで又は60日間のどちらか短い方まで取込期間を延長し、定常状態におけるBCF（ BCF_{SS} 、試験法解説参照）を算出する。BCFが100 L/kg未満の場合は、試験魚中の被験物質濃度の変動が20%を超えても、28日後には定常状態に達しているとみなしてよい。排泄試験を実施した場合は、速度論によるBCF（ BCF_K 、試験法解説参照）を算出する。28日後に明らかに被験物質の取込が確認されない場合は、試験を終了できる。 BCF_{SS} が1000 L/kg以上の場合（ BCF_{SS} が得られなかった場合においては、個々の試験魚について分析を行った際は取込期間における最後の連続した3回の測定におけるBCFの平均値が1000 L/kg以上の場合、試験魚を複数尾まとめて分析を行った際は取込期間における最後の連続した4回の測定におけるBCFの平均値が1000 L/kg以上の場合）には、部位別試験を実施する。部位については、頭部、内臓、外皮（鰓及び消化管を含む）及び可食部（頭部、内臓、外皮を除くその他の部位）の4部位に分けて実施し、それぞれの部位における被験物質濃度とBCFを報告する。

3 - 7 - 2 排泄期間

BCF_{SS} が 1000 L/kg 以上の場合 (BCF_{SS} が得られなかった場合においては、個々の試験魚について分析を行った際は取込期間における最後の連続した 3 回の測定における BCF の平均値が 1000 L/kg 以上の場合、試験魚を複数尾まとめて分析を行った際は取込期間における最後の連続した 4 回の測定における BCF の平均値が 1000 L/kg 以上の場合)、又は BCF_K を算出する場合は、排泄期間を設ける。排泄期間は、試験魚中の被験物質濃度が十分に減少 (例えば定常状態の 95% が消失) するまでの期間とすることが望ましい (試験法解説参照)。試験魚中の被験物質濃度が 95% 消失するまでの期間が通常取込期間の 2 倍以上の場合は、期間を短縮してもよい (例えば、試験魚中の被験物質濃度が定常状態の 10% 未満に減少するまでの期間とする)。ただし、取込及び排泄が 1 次速度式による 1 コンパートメントモデルより複雑なパターンを示す化学物質については、排泄速度定数を求めるために、より長い排泄期間を必要とする。排泄期間を延長する場合は、試験魚の成長が試験結果に影響する可能性を考慮する。

3 - 8 採取及び分析

3 - 8 - 1 分析方法

- (1) 分析方法については、化学分析の正確さ、精度及び再現性、さらには試験水及び試験魚からの被験物質の回収が十分であることを実験的に確認する。また、被験物質が試験用水中で検出されないことを確認する。必要な場合、回収値と対照区のバックグラウンド値によって、試験で得られた試験水及び試験魚における被験物質濃度値を補正する。試験水及び試験魚の採取を行う際は、被験物質の汚染及び損失 (例えば、採取装置への吸着) を最小限にする。
- (2) 被験物質の分解などを防止するために、採取後、直ちに試験魚と試験水を分析する。速やかに分析できない場合は、サンプルを適当な方法で保存する。被験物質について、適切な保存方法、保存期間及び前処理などに関する情報を試験開始前に得る。

3 - 8 - 2 試験水の分析

- (1) 被験物質濃度の決定のために、取込期間開始前及び取込期間中に試験水を分析する。また、排泄期間を設定した場合は、排泄期間中にも試験水を分析する。試験水の分析は給餌前に試験魚の分析と同時に行う。ただし、排泄期間開始時の試験水分析において、被験物質が検出されないことが確認できる場合は、その後の排泄期間における試験区及び対照区の試験水の分析を省略してもよい。
- (2) 試験水は、例えば試験水槽の中心から不活性チューブなどを通して吸い取り分析する。このとき、通常、試験水の汚れをろ過や遠心分離により取り除かない。これらを分離する場合は、その分離技術の根拠又は妥当性を報告する。特に高疎水性化学物質 (すなわち $\log P_{ow} > 5$ の化学物質) については、フィルター material 又は遠心分離の容器への吸着が起こるため、このような処理を行わない。代わりに、可能な限り試験水槽を清浄に保つための処置を行う。また、取込期間及び排泄期間に TOC 濃度を測定する。

3 - 8 - 3 試験魚の分析

- (1) 各試験魚の分析は、1試験区当たり最低4尾とし、個々の試験魚について実施する。ただし、個体ごとの分析が困難な場合には、各分析時における試験魚を複数尾まとめて分析する。その場合は、2群以上とすることが望ましい。
- (2) 取込期間中に少なくとも5回、試験魚を分析する。排泄期間を設定した場合には、排泄期間中に少なくとも4回、試験魚を分析する。排泄期間を開始する前に、試験魚を清浄な試験水槽に移す。特に、取込及び排泄が単純な1次速度式に従わないことが予想される場合は、正確なBCFの算出が困難であるため、両期間において、より高頻度の分析が推奨される（試験法解説参照）。動物愛護の観点から最も適した方法で採取した試験魚を安楽死させ、体重及び全長を測定する。それぞれの個体の体重及び全長は、識別コードなどを付して、被験物質濃度（該当する場合は脂質含量も）の結果と整合させる。
- (3) 脂質含量は、少なくとも取込期間の開始時及び終了時、排泄期間終了時に測定しなければならない。脂質含量は、被験物質濃度測定と同一の試験魚を用いて測定するが、同一の試験魚を用いた測定が困難な場合は、上記3回の測定時に、少なくとも別途3尾を採取し測定する。対照区の試験魚において被験物質が顕著に検出されないことが明らかな場合、対照区の試験魚は脂質含量のみ測定し、被験物質濃度は測定しなくてもよい。
- (4) BCF_{SS}が1000 L/kg以上の場合は、被験物質が主に脂質に蓄積しないと考えられる場合を除き、5%の脂質含量で標準化（湿重量に基づく）したBCF_{SS}（BCF_{SSL}）も報告する。
- (5) 試験に放射性同位元素を使って標識した化学物質を使用する場合、全標識化物（すなわち親化合物及び代謝物）として測定するか、あるいは、サンプルをクリーンアップして親化合物のみを測定する。親化合物に基づいてBCFを決定する場合は、主な代謝物を少なくとも取込期間の終了時に確認する。

3 - 8 - 4 試験魚の成長の測定

試験水槽に搬入する前の試験魚から取込期間開始時に5から10尾採取し、個別に体重及び全長を測定する。これらの試験魚は、取込期間開始前の被験物質濃度及び脂質含量の測定に用いることができる。試験期間中に採取した試験魚の体重及び全長は、被験物質濃度又は脂質含量の測定前に記録する。これらの測定値から、試験区及び対照区の魚体重及び全長を推定する。試験区及び対照区における魚の平均成長率の顕著な差は、化学物質の毒性影響を示唆する。

4 試験結果の算出

4 - 1 生物濃縮係数の算出

取込期間における試験魚中（又は特定の組織）の被験物質濃度（ C_f ）を時間に対してプロットし、取込曲線を得る。その曲線が平衡に達した場合、以下の式から定常状態におけるBCF（BCF_{SS}）を算出する。

$$BCF_{SS} = \frac{\text{定常状態における試験魚中の平均被験物質濃度}}{\text{定常状態における試験水中の平均被験物質濃度}}$$

また、速度論による生物濃縮係数（ BCF_K ）を以下の式から算出する。なお、 k_1 及び k_2 の算出法は試験法解説に示す。

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

4 - 2 成長希釈補正と脂質含量の標準化

- (1) 排泄期間中の試験魚の成長は、見かけ上、試験魚中の被験物質濃度を低下させ、排泄速度定数（ k_2 ）に大きな影響を与える。そのため、 BCF_K を求める場合には、 BCF_K と合わせて成長希釈補正した BCF_K （ BCF_{Kg} ）も報告する。成長希釈補正した排泄速度定数（ k_{2g} ）は、通常、排泄速度定数（ k_2 ）から成長速度定数（ k_g ）を差し引くことにより算出する。さらに、取込速度定数（ k_1 ）を成長希釈補正した排泄速度定数（ k_{2g} ）で除することにより BCF_{Kg} を算出する。成長希釈補正の方法については、上記以外の方法も含めて試験法解説に示す。
- (2) BCF_{SS} が 1000 L/kg 以上の場合は、 BCF_K 又は BCF_{SS} と合わせて 5% の脂質含量で標準化した BCF_K （ BCF_{KL} ）又は BCF_{SS} （ BCF_{SSL} ）も報告する（試験法解説参照）。また、 BCF_K を報告する場合には、成長希釈補正かつ 5% の脂質含量で標準化した BCF_K （ BCF_{KgL} ）も報告する。被験物質濃度及び脂質含量の測定を同一の魚を用いて実施した場合には、それぞれの試験魚中被験物質濃度をその魚の脂質含量を用いて標準化する。試験区及び対照区の試験魚の成長が同程度であれば、対照区の試験魚の脂質含量を用いて標準化してもよい。

5 試験の有効性

試験を有効なものとするために、次の条件を適用する。

- ・ 温度変動は $\pm 2^\circ\text{C}$ 未満であること（試験水温の大きな変動は試験生物へのストレスのほか、取込及び排泄に関する生物学的パラメータに影響する）。
- ・ 溶存酸素濃度は飽和酸素濃度の 60% 以下にならないこと。
- ・ 試験水中の被験物質濃度の変動は、取込期間中の測定値の平均に対して $\pm 20\%$ 以内に保たれること。
（濃縮倍率が極めて高い場合には取込期間中の被験物質濃度の変動が大きくなる場合がある。この場合には、定常状態における被験物質濃度の変動は測定値の平均に対して $\pm 20\%$ 以内に保たれること。）
- ・ 死亡又は病気などの異常は、試験区及び対照区の試験魚において試験終了時に 10% 未満であること。試験が数週あるいは数か月延長になった場合には、死亡又は異常は、試験区及び対照区で 1 か月間に 5% 未満かつ全期間で 30% を超えないこと。

6 結果のとりまとめ

試験の結果を様式 2 - 1 によりとりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

: 魚を用いた濃縮度試験（簡易水暴露法）

- 適用範囲

ここでは、魚介類のうち特に水（経鰓）を介した魚類の体内における化学物質の簡易な濃縮度試験の標準となるべき方法について規定する。この方法は、濃度依存性がないと予想される物質かつ取込及び排泄が1次速度式に従うもののみ適用すべきである。

- 用語

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

- 試験方法

1 試験の概要

本試験法は、魚類体内への水（経鰓）を介した化学物質の取込及び蓄積を評価する試験である。試験は、魚を用いた濃縮度試験（水暴露法）に準拠するが、試験魚中の化学物質濃度の測定を4回（取込期間に2回、排泄期間に2回）に削減し、速度論による生物濃縮係数（ BCF_{Km} ）及び定常状態における生物濃縮係数（ $minimised\ BCF_{SS}$ ）を算出する。

2 試験に用いる装置及び材料

: 魚を用いた濃縮度試験（水暴露法）と同様とする。

3 試験の実施

: 魚を用いた濃縮度試験（水暴露法）と同様とする。ただし、採取スケジュール及び計算方法は次のとおりとする。

3 - 1 試験水の分析

被験物質濃度の決定のために、取込期間開始前に少なくとも1回と取込期間中に少なくとも5回（そのうち2回は試験魚の分析と同時）、試験水を分析する。さらに、排泄期間中は週1回とする。排泄期間開始時の試験水分析において、被験物質が検出されないことが確認できる場合は、その後の排泄期間における試験区及び対照区の試験水の分析を省略してもよい。

3 - 2 試験魚の分析

次のとおり試験魚を分析し、試験魚中の被験物質濃度を測定する。

- ・ 各試験魚の分析は、1試験区当たり最低4尾とし、個々の試験魚について実施する。ただし、個体ごとの分析が困難な場合には、各分析時における試験魚を複数尾まとめて分析する。その場合は、2群以上とすることが望ましい。
- ・ 取込期間の分析は、取込期間の中間及び終了時（終了時は排泄期間開始時に相当する）とする（例えば、取込期間の14及び28日後）。
- ・ 排泄期間の分析は、排泄期間の中間及び終了時（被験物質濃度が最高濃度の10%未満となることが望ましいが、少なくとも被験物質の排泄半減期が算出できるまで）とする（例えば、排泄期間の7及び14日後）。排泄が早いと予想される場合、試験魚中の被験物質濃度が定量下限未満とならないようにする。

4 試験結果の算出

取込終了時（ t_1 ）の試験魚中の被験物質濃度（ C_{f1} ）及び排泄終了時（ t_2 ）の試験魚中の被験物質濃度（ C_{f2} ）を用いて、式1に従い排泄速度定数（ k_2 ）を算出する。

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}) - \ln(C_{f2})}{t_2 - t_1} \quad \text{[式 1]}$$

得られた排泄速度定数（ k_2 ）、取込期間における試験水中の平均被験物質濃度（ C_w ）及び取込期間終了時（ t_1 ）の試験魚中の被験物質濃度（ C_{f1} ）を用いて、式2に従い取込速度定数（ k_1 ）を算出する。

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

さらに、取込速度定数（ k_1 ）と排泄速度定数（ k_2 ）の比を用いて、式3に従い簡易水暴露法における速度論による生物濃縮係数（ BCF_{km} ）を算出する。

$$BCF_{km} = \frac{k_1}{k_2} \quad \text{[式 3]}$$

取込期間中に定常状態に達したと仮定して、試験水中の被験物質濃度（ $C_{w-minSS}$ 、mg/L）と取込期間の終了時の試験魚中の被験物質濃度（ $C_{f-minSS}$ 、mg/kg 湿重量）を用いて、式4に従い簡易水暴露法における定常状態による生物濃縮係数（minimised BCF_{SS} ）を算出する。

$$\text{minimised } BCF_{SS} = \frac{C_{f-minSS}}{C_{w-minSS}} \quad \text{[式 4]}$$

脂質含量の測定、成長希釈補正は : 魚を用いた濃縮度試験（水暴露法）と同様とする。

5 試験の有効性

: 魚を用いた濃縮度試験（水暴露法）と同様とする。

6 結果のとりまとめ

試験の結果を様式 2 - 1 によりとりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

: 魚を用いた濃縮度試験（餌料投与法）

- 適用範囲

ここでは、魚介類のうち特に餌を介した魚類の体内における化学物質の濃縮性を評価する試験の標準となるべき方法について規定する。本試験は水溶解度が 0.01 mg/L 未満、かつ log Pow が 5 を超える被験物質に適用できることとする。なお、水溶解度は実測値とするが、log Pow は(Q)SAR 等による推定値でもよい。また、水暴露法において試験水中濃度の維持が困難である物質、あるいは試験魚中の被験物質の定量下限値から算出可能な生物濃縮係数（BCF）が 1000 L/kg 程度を超える物質は、水暴露法の実施が困難であるため餌料投与法を実施してもよいが、試験開始前に当局に相談すること。

なお、構造不明な複雑な反応生成物又は成分が不定の混合物等には、原則として本試験を適用しないこととする。

- 用語

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

- 試験方法

1 試験の概要

本試験法は、魚類体内への餌を介した化学物質の取込及び排泄を評価する試験である。試験は取込及び排泄の 2 つの期間からなり、取込期間では化学物質を混合した餌料を試験魚に給餌し、その後、排泄期間において化学物質を含まない餌料を給餌する。試験の両期間を通して、試験餌料及び試験魚中における化学物質濃度を測定し、経口生物濃縮係数（BMF、試験法解説参照）を算出する。BMF として、速度論による経口生物濃縮係数（ BMF_K ）及び取込期間終了時における経口生物濃縮係数（BMF）のいずれか又は両方を算出する。

2 試験に用いる装置及び材料

2 - 1 装置及び器具

すべての装置及び器具は、：魚を用いた濃縮度試験（水暴露法）に記載したものと同様のものとする。試験水槽に十分な量の試験用水を供給する流水式又は半止水式システムを使用し、その流量を記録する。

2 - 2 試験用水

試験用水は、：魚を用いた濃縮度試験（水暴露法）に記載したものと同様のものとする。

2 - 3 試験魚

2 - 3 - 1 魚種を選択

：魚を用いた濃縮度試験（水暴露法）に規定された魚種が使用可能である。試験魚は、推奨されるサイズのもの（試験法解説参照）を使用し、個体ごとの分析が可能なサイズが好ましい。

2 - 3 - 2 蓄養及びじゅん化

試験実施前のじゅん化条件、さらにじゅん化中の死亡率及び疾病の許容範囲は、：魚を用いた濃縮度試験（水暴露法）と同様とする。

2 - 3 - 3 餌料

餌料とは、被験物質及び媒体（有機溶剤又はオイル）を含まない餌である。少なくとも蛋白質及び脂質含量が既知である市販の魚の餌料（浮遊性又はゆっくり沈降するペレット状あるいはクランブル状の餌料）が推奨される。餌料は、摂餌効率を高めるため、均一な大きさの餌料とし、試験開始時の試験魚に合わせて適当なサイズに調製する。餌料のサイズは、排泄期間開始時に試験魚の成長に合わせて調製してもよい。適切な市販餌料の組成の一例を試験法解説に示す。試験区及び対照区の餌料の脂質含量は、取込期間開始前及び取込期間の終了時に測定する。餌料の栄養素、水分、繊維及び灰分などの情報を試験報告書に記載する。

3 試験の実施

3 - 1 試験餌料

(1)試験餌料とは、餌料に被験物質及び媒体を添加したものである。被験物質の物理化学的性状及び溶解度に基づき、下記の方法を参考に餌料に添加する（試験法解説参照）。被験物質を餌料に添加する場合は、試験餌料中の均一性を確保する。餌料への添加方法及び手順は試験報告書に記載する。

- ・ 被験物質がトリグリセリド類に可溶でかつ安定である場合、餌料と混合する前に被験物質を少量のオイル（魚油又は食用植物油）に溶解する。この場合、餌料の本来の脂質含量を考慮し、オイル量は最小限とする。
- ・ 適当な有機溶剤（ヘキサン、アセトン及びテトラヒドロフラン等の揮発性を有する溶剤）に溶解して餌料と混合した後、添加した溶媒を留去することにより、試験餌料中の被験物質の分散及び均一性を確保する（有機溶剤の留去により被験物質の結

晶化が生じ、被験物質の生物学的利用能が低下する可能性がある)。また、有機溶剤の添加により餌料中の成分(例えば、脂質又は蛋白質)が抽出され、餌料中の成分の均一性に影響を与える可能性があるため、有機溶剤の添加量は最小限とする。

- ・非粘ちよう性の液体の被験物質は直接餌料に添加し、均一性及び良好な同化を促すために良く混合する。

- (2) 取込期間中及び排泄期間中に、栄養的に等価な餌料、又は試験餌料を試験区及び対照区に給餌する。被験物質の添加媒体としてオイル又は有機溶剤を使用した場合は、対照区の試験餌料についても試験区と等量の媒体(被験物質を含まない)を添加する。被験物質を添加した試験餌料は、試験餌料中の被験物質が安定に維持される条件下で保管し、その方法を報告する。

3 - 2 給餌

- (1) じゅん化期間中及び排泄期間中は餌料を、取込期間中は試験餌料(ただし、対照区には、被験物質を添加していない試験餌料)を、一定の給餌量(例えば、コイの場合は魚体重の1-2%程度(湿重量))で給餌する。流水式の条件下で試験を実施する場合は、魚が摂餌している間は流水を一時停止する。給餌量は、試験魚の急速な成長及び脂質含量の大幅な増加を回避するように設定する。試験中に設定した実際の給餌量は記録する。試験開始時の給餌は、試験開始前のじゅん化した魚群の測定体重に基づき設定する。給餌量は、試験中の成長を考慮して、各採取時の試験魚体重(湿重量)に基づいて調整する。試験区及び対照区水槽における魚の体重及び体長は各採取時に採取した魚から推定する(試験区及び対照区水槽に残った魚の体重及び体長を測定してはならない)。試験期間を通して一定の給餌量を維持することが重要である。
- (2) 試験魚が餌料及び試験餌料をすべて摂餌していることを確認する。給餌量は、試験魚が1日1回の給餌において餌料及び試験餌料をすべて摂餌するように設定する。餌料及び試験餌料が一貫して摂餌されずに残る場合、投与を分割してもよい。例えば、1日1回を1日2回に分ける場合、2回目の給餌は一定間隔で行い、試験魚の採取までに可能な限り時間を空けるようにする。
- (3) 被験物質が試験餌料から水中に分散し、試験魚が水中の被験物質に暴露されることを回避するために、給餌後1時間以内、好ましくは30分以内に試験区及び対照区の水槽から残餌及び糞便をすべて除去する。溶解した物質をすべて吸着させるために、活性炭フィルターで水を連続的に清浄するシステムを使用できる。流水式システムは、餌料粒子及び溶解した物質を速やかに除去するのに有用である⁽²⁾。

3 - 3 水質測定の頻度

：魚を用いた濃縮度試験(水暴露法)と同様とする。ただし、TOC濃度は試験用水の特性把握の一部として試験開始前のみ測定すればよい。

-
- (2) 試験魚からの排泄又は餌料からの溶出の結果、試験水中に被験物質が存在することを完全には回避できない可能性がある。したがって、取込期間の終了時に水中の被験物質濃度を測定することは、一つの対策であり、特に半止水式を用いる場合、水暴露が生じているか確認するのに有用である。

3 - 4 流量

適当な溶存酸素濃度を維持し、試験動物へのストレスを軽減するため、試験魚尾数に応じて、試験用水の流量を調整する。通常、流量は魚体重（湿重量）の 1.0 g あたり 1-10 L/日 が推奨される。

3 - 5 試験魚の条件

試験開始時の魚体重の最小値は最大値の 2/3 以上であること。同じ年齢で同じ供給源の魚を用いる。

試験魚数は採取回数及びそのときの尾数を考慮して決定する。試験魚の尾数を含む採取スケジュールの一例を試験法解説に示す。

3 - 6 試験餌料濃度

試験は、原則 1 濃度区で実施する。同時に、被験物質を添加していない餌料を給餌する対照区を設定する。試験濃度の設定は、分析感度（排泄期間中の魚体中被験物質濃度が取込期間終了時の魚体中被験物質濃度の 10% 未満まで測定できる）、被験物質の毒性（既知なら最大無影響濃度（NOEC））及び忌避行動を考慮して選択する。これまでの知見から、1-1000 µg/g の範囲の被験物質濃度は、特定の毒性メカニズムを示さない化学物質について実用的な範囲となる。試験魚が試験餌料を適切に摂餌していること及び試験結果が妥当であることを確認するため、当面、試験区及び対照区の試験餌料に BCF 及び BMF が既知である基準物質⁽³⁾を添加し、被験物質と同様の方法で BMF を算出することを推奨する。

3 - 7 照明及び試験温度

: 魚を用いた濃縮度試験（水暴露法）と同様とする。

3 - 8 試験期間

3 - 8 - 1 取込期間

取込期間は通常 7 - 14 日間とする。実験開始は、試験餌料を最初に給餌した時点とする。実験日のカウントは、給餌した時点から次の給餌の直前まで（例えば、1 時間前）を 1 日とする。取込期間は被験物質及び媒体を添加していない餌料を最初に給餌する直前（例えば 1 時間前）までとする。排泄期間中に少なくとも 10% までの魚体中被験物質濃度の低下を測定できるように、分析感度を考慮して、魚体中被験物質濃度が十分に高いことを確認する。また、試験魚中における被験物質の蓄積挙動を確認するために、取込期間を延長し（最長 28 日間）、追加の分析を実施してもよい。

(3) 基準物質の例を試験法解説に示す。これらの例に加え、今後、知見が蓄積され適切な物質が明らかになった場合、それらも基準物質として使用してもよい。

3 - 8 - 2 排泄期間

- (1)原則、排泄期間は28日間とし、試験魚からの被験物質の排泄の程度をさらに確認する必要がある場合には、期間を延長する。排泄期間の開始は試験魚に被験物質及び媒体を添加していない餌料を給餌した時点とする。排泄初期（例えば7日後又は14日後）における試験魚中の被験物質濃度が定量下限未満の場合、以降の分析を中止し、試験を終了してもよい。排泄期間終了時に半減期が得られない場合にも、実施した排泄試験の結果から経口生物濃縮係数（BMF）を算出する。
- (2)取込期間を10日間以上実施した試験において、取込期間終了時におけるBMFが0.007未満であって、次の及びを満たす場合は試験を終了できる。

試験の有効性の条件を満たす。

取込の欠如が試験設計の問題（例えば、試験餌料調製上の不具合による生物学的利用能の低下、分析感度の欠如、魚が試験餌料を食べない等）によるものでない。

3 - 9 分析

分析においては、：魚を用いた濃縮度試験（水暴露法）に記載された事項に準拠する。

3 - 9 - 1 試験餌料の分析

試験区及び対照区の試験餌料については、少なくとも取込期間開始前及び終了時に、それぞれ被験物質濃度及び脂質含量を3点以上測定する。

放射性同位元素を使って標識した材料を試験する場合は、：魚を用いた濃縮度試験（水暴露法）に準拠して試験餌料を分析する。

3 - 9 - 2 試験魚の分析

- (1)試験魚の分析は、試験区及び対照区から5 - 10尾を採取し、個々の試験魚について実施する。ただし、個体ごとの分析が困難な場合には、各分析時における試験魚を複数尾まとめて分析する。その場合は、2群以上とすることが望ましい。試験魚の採取は、同一時間（給餌時間を目安にする）に実施する。試験魚の消化管内に試験餌料が残っていると試験魚の被験物質濃度の測定に影響を与えるため、次回の給餌直前（例えば1時間前）に採取する。残餌が疑われる場合は、消化管を除去し、別々に分析することが望ましい。消化管内の残餌の有無については、予備検討において確認してもよい。
- (2)試験区及び対照区において、取込期間の終了時及び排泄期間中に4回から6回（例えば1、3、7、14及び28日）、試験魚を分析する。また、詳細な組織ごとの濃縮性の確認が必要な場合、部位別試験を実施する。部位については、頭部、内臓、外皮（鰓を含む）、消化管及び可食部（頭部、内臓、外皮及び消化管を除くその他の部位）の5部位に分けて実施し、それぞれの部位における被験物質濃度とBMFを報告する。対照区の試験魚については被験物質濃度が排泄期間開始時に不検出の場合、排泄期間終了時に2 - 3尾の対照区の魚について分析を行えば十分である。すべての分析時におい

て、採取した試験魚を動物愛護の観点から最も適した方法で安楽死させた後、体重及び全長を個別に測定する（試験区及び対照区から同数の試験魚が採取されるようにする）。それぞれの個体の体重及び全長は、識別コードなどを付して、被験物質濃度（及び該当する場合は脂質含量）の結果と整合させる。

- (3)放射性同位元素を使って標識した材料を試験する場合は、：魚を用いた濃縮度試験（水暴露法）の試験水分析を試験餌料分析に置き替えて、3 - 5 - 2 試験濃度の設定（1）に記載された事項に準拠する。
- (4)試験区及び対照区における試験魚の脂質含量は、各採取時に測定することが好ましいが、少なくとも取込期間開始時及び終了時並びに排泄期間終了時に測定する。取込期間開始時の脂質含量は3 - 9 - 3 試験魚の成長の測定において採取した試験魚を用いてもよい。脂質含量は、被験物質濃度測定に用いた試験魚と同一の魚について測定する。測定できない場合、別途採取した試験魚について測定する。対照区の試験魚において被験物質が顕著に検出されないことが明らかな場合、対照区の試験魚は脂質含量のみ測定し、被験物質濃度は測定しなくてもよい。脂質含量の定量化の方法は、試験報告書に記載する。

3 - 9 - 3 試験魚体重の測定

成長速度定数 (k_g) を算出するために、3 - 9 - 2 試験魚の分析において採取した試験魚の体重（湿重量）を測定する。実験開始時の魚体重として、試験餌料を初めて給餌する直前に、少なくとも試験期間中の試験魚分析時と同数（5 - 10尾）の試験魚を採取し、魚体重を測定する。

4 試験結果の算出

4 - 1 経口生物濃縮係数の算出

排泄期間中の試験魚中被験物質濃度 (C_f) の自然対数と排泄期間との関係を最小二乗法により計算し、その直線の傾きを排泄速度定数 (k_2)、切片を排泄期間開始時における試験魚中の被験物質濃度 (mg/kg、外挿値 $C_{0,d}$) とする。これらの値、給餌量 (I)、取込期間の長さ (t) 及び試験餌料中の被験物質濃度 (C_{food}) を用いて、式5に従い生体内吸収効率 (α) を算出する。

$$\alpha = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{\text{food}}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \quad [\text{式5}]$$

さらに、給餌量 (I)、生体内吸収効率 (α) 及び排泄速度定数 (k_2) を用いて、式6に従いBMF_kを算出する。

$$\text{BMF}_k = \frac{I \cdot \alpha}{k_2} \quad [\text{式6}]$$

また、取込期間終了時におけるBMFを以下の式から算出する。定常に達したと推定される場合は以下の式からBMF_{ss}を算出できる。

取込期間終了時における試験魚中の平均被験物質濃度

$$\text{BMF} = \frac{\text{試験魚中の平均被験物質濃度}}{\text{試験餌料中の平均被験物質濃度}}$$

4 - 2 成長希釈及び脂質含量補正

- (1) 排泄期間中の試験魚の成長は、試験魚中の被験物質濃度を低下させ、排泄速度定数 (k_2) に大きな影響を与える。そのため、 BMF_K を算出する場合には、合わせて成長希釈補正した BMF_K (BMF_{Kg}) も報告する。成長希釈補正した排泄速度定数 (k_{2g}) は、通常、排泄速度定数 (k_2) から成長速度定数 (k_g) を差し引くことにより算出する。さらに、式 6 において成長希釈補正した排泄速度定数 (k_{2g}) を用いて、成長希釈補正した BMF_K (BMF_{Kg}) を算出する。成長希釈補正の方法については、上記以外の方法も含めて試験法解説 6.6 に示す。
- (2) BMF は、被験物質がほとんど脂質に蓄積されないことが明確な場合を除き、試験魚及び試験餌料の脂質含量を用いて補正する⁽⁴⁾。採取したすべての試験魚に関して脂質含量の測定を実施していない場合、平均脂質含量 (w/w) を算出する。試験魚の平均脂質含量を試験餌料の平均脂質含量で割り脂質含量補正係数 (L_c) を算出する。取込期間終了時における BMF 、 BMF_K 及び BMF_{Kg} を脂質含量補正係数で割り、脂質含量補正した取込期間終了時における BMF (BMF_L)、 BMF_K (BMF_{KL}) 及び BMF_{Kg} (BMF_{KgL}) を算出する。
- (3) 各採取時において被験物質及び脂質含量の測定を同一の試験魚で実施した場合、脂質含量補正した被験物質濃度データを時間軸に対してプロットし、脂質含量補正した $C_{0,d}$ 及び k_2 を得る。生体内吸収効率 (α) は、脂質含量補正した給餌量 (I_{lipid}) 及び脂質含量補正した試験餌料中の被験物質濃度 ($C_{\text{food-lipid}}$) を用いて算出する (試験法解説参照)。これらの値を用いて BMF_{KgL} を算出する (脂質含量及び成長希釈補正した BMF の算出には、試験魚の湿重量ではなく脂質含量当たりの成長速度定数を用いて補正する)。

5 試験の有効性

試験を有効なものとするために、次の条件を適用する。

- ・ 温度変動は $\pm 2^\circ\text{C}$ 未満であること。
- ・ 溶存酸素濃度は飽和酸素濃度の 60% 以下にならないこと。
- ・ 試験区の試験餌料中における被験物質濃度 (少なくとも各 3 点測定) について、取込期間の開始前の平均値と終了時の平均値との変動が $\pm 20\%$ 以内であること。
- ・ 試験区の試験餌料中における被験物質濃度 (少なくとも各 3 点測定) について、取込期間の開始前の試料間の変動が平均値の $\pm 15\%$ 以内であること。

(4) この手法は水暴露法とは手順が異なり餌料投与法に限定される。したがって、誤解防止のために「標準化」ではなく「補正」が使われている。

- ・ 対照区の試験餌料又は試験魚中の被験物質濃度は、試験区と比較して検出されない又は定量下限未満であること。
- ・ 死亡又は病気などの異常は、試験区及び対照区の試験魚において試験終了時に10%未満であること。試験が数週あるいは数か月延長になった場合には、死亡又は異常が、試験区及び対照区で1か月間に5%未満かつ全期間で30%を超えないこと。

6 結果のとりまとめ

試験の結果を様式2 - 2によりとりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

試験法解説

1. 定義及び単位

取込期間とは、魚が化学物質に暴露される期間である。

排泄期間とは、魚体内に取り込まれた化学物質が、排泄あるいは代謝により減少する過程（半減期）を調べるための期間である。

取込速度定数 (k_1) とは、取込期間中の、試験魚の生体内及び表面（又は特定の組織）における被験物質濃度の増加率として定義される数値である (k_1 は L/kg/day で表される)。

排泄速度定数 ; depuration rate constant (k_2) とは、排泄期間における試験魚（又は特定の組織）の被験物質濃度の低下率として定義される数値である (k_2 は day⁻¹ で表される)。

定常状態とは、取込期間に少なくとも 2 日間の間隔をおいて採取した試験魚の被験物質濃度 (C_f) のうち、連続した 3 回の C_f の分析結果が $\pm 20\%$ 以内であり、かつ 1 回目と 3 回目の分析において C_f に顕著な増加がない状態をいう。試験魚を複数尾まとめて分析する場合には、連続した 4 回以上の C_f の分析結果が $\pm 20\%$ 以内である必要がある。取込が遅い化学物質については、7 日間の間隔で採取することがより適当である。

生物濃縮係数 (BCF ; bioconcentration factor) とは、濃縮度試験の取込期間中の各時間における試験魚の生体内及び表面又は特定の組織における被験物質濃度 (C_f , mg/kg 湿重量) を周囲の水中の被験物質濃度 (C_w , mg/L) で除したものである (BCF は L/kg で表される)。

定常状態における生物濃縮係数 (BCF_{SS} ; steady-state bioconcentration factor) とは、定常状態における試験魚中被験物質濃度 (C_f , mg/kg 湿重量) を定常状態における試験水中被験物質濃度 (C_w , mg/L) で除したものである。

脂質含量標準化した定常状態における BCF (BCF_{SSL} ; lipid normalised steady-state bioconcentration factor) とは、5% の脂質含量で標準化した BCF_{SS} である。

速度論による生物濃縮係数 (BCF_K ; kinetic bioconcentration factor) とは、取込速度定数 k_1 と排泄速度定数 k_2 の比 (k_1/k_2) である。本来、試験魚への化学物質の取込及び排泄が一次速度式に従う場合、この値は理論的に BCF_{SS} と等しくなる。しかし、試験魚中の化学物質濃度が定常状態に達していない場合、あるいは BCF_K について成長希釈補正を行った場合は、BCF_{SS} と乖離が生じる可能性がある。

成長希釈補正した速度論による BCF (BCF_{Kg} ; growth corrected kinetic bioconcentration factor) とは、試験期間中の試験魚の成長希釈補正した BCF_K である。

脂質含量標準化した速度論による BCF (BCF_{KL} ; lipid normalised kinetic bioconcentration factor) とは、5% の脂質含量で標準化した BCF_K である。

脂質含量標準化及び成長希釈補正した速度論による BCF (BCF_{KgL} ; lipid normalised, growth corrected kinetic bioconcentration factor) とは、5% の脂質含量で標準化し、かつ試験期間中の試験魚の成長希釈補正した BCF_K である。

オクタノール-水分配係数 (P_{ow} ; octanol-water partition coefficient) とは、平衡状態での 1-オクタノール及び水に対する化学物質の溶解度の比 (OECD テストガイドライン 107、117、123) である。 K_{ow} と表記されることも多い。

溶存有機炭素 (DOC; dissolved organic carbon) とは、試験水中に溶解している有機物質に由来する炭素である。

粒子状有機炭素 (POC; particulate organic carbon) とは、試験水中に懸濁している有機物質に由来する炭素である。

全有機炭素 (TOC; total organic carbon) とは、試験水中に溶解及び懸濁している有機物質に由来する炭素である。

UVCB 物質 (chemical substances of Unknown or Variable composition, Complex reaction products and Biological materials) とは、組成が未知か又は不定な構成要素を持つ物質、複雑な反応生成物又は生体物質である。

経口生物濃縮係数 (BMF; biomagnification factor) とは、捕食動物の餌 (又は食物) 中の化学物質濃度に対する捕食動物中の化学物質の濃度の比である。本試験方法で得られる BMF は、餌を介した化学物質の濃縮であり、OECD テストガイドライン 305 では、環境中で得られる BMF (水及び餌を介した化学物質の濃縮) と区別するため、dietary BMF と定義している。

取込期間終了時における経口生物濃縮係数 (BMF) とは、取込期間終了時における試験魚中の化学物質濃度 (C_{fish} , mg/kg 湿重量) を試験餌料中の化学物質濃度 (C_{food} , mg/kg) で除したものである。なお、OECD テストガイドライン 305 では、取込期間において定常状態に達したと推定された BMF を、定常状態における経口生物濃縮係数 (BMF_{SS}; indicative steady-state BMF) と定義している。

速度論による経口生物濃縮係数 (BMF_K; kinetic biomagnification factor) とは、生体内吸収効率 (α) と給餌量 (I) の積と排泄速度定数 (k_2) の比 ($I \times \alpha / k_2$) である。

生体内吸収効率 (α) とは、消化管から生体内に吸収された化学物質の相対量の測定値である (α は無次元であるが、比ではなくパーセントで表されることが多い)。

給餌量 (I) とは、推定される平均の全試験魚体重に対して、各試験魚が 1 日に摂取した試験餌料の量 (g food/g fish/day) である。

成長希釈補正した速度論による経口生物濃縮係数 (BMF_{Kg}; growth corrected kinetic biomagnification factor) とは、試験期間中の試験魚の成長希釈を補正した BMF_K である。

脂質含量補正した速度論による経口生物濃縮係数 (BMF_{KL}; lipid corrected kinetic biomagnification factor) とは、脂質含量補正係数 (L_c) で除した BMF_K である。

脂質含量補正係数 (L_c) とは、試験魚の平均脂質含量を試験餌料の平均脂質含量で除したものである。

脂質含量及び成長希釈補正した速度論による経口生物濃縮係数 (BMF_{KgL}; lipid-corrected growth-corrected kinetic BMF) とは、脂質補正係数 (L_c) で除した BMF_{Kg} である。

2 . 被験物質の水溶解度

被験物質の水溶解度は、OECD テストガイドライン 105 等の標準的な試験法を参考に実施した結果を入手する。濃縮度試験の報告書には測定結果、測定方法及び測定温度を記載する。なお、入手すべき被験物質の水溶解度の上限濃度は 100 mg/L とする。

3. 測定することが望ましい試験用水の水質項目（試験法「2 - 2 試験用水」）

試験用水における各測定項目の上限濃度については OECD テストガイドラインなどを参照するが、その濃度が実現困難な場合は、使用する試験用水で供試魚が飼育可能なことをあらかじめ確認すること。

物質
pH
硬度
全粒子状物質
全有機炭素
アンモニウム
亜硝酸
アルカリ度
非イオン性アンモニア
残留塩素
全有機リン系殺虫剤
全有機塩素系殺虫剤及びポリ塩化ビフェニル
全有機塩素
アルミニウム
ヒ素
クロム
コバルト
銅
鉄
鉛
ニッケル
亜鉛
カドミウム
水銀
銀
カルシウム
マグネシウム
ナトリウム
カリウム
塩化物イオン
硫酸イオン

4 . 試験魚

4 . 1 試験に使用可能な魚種 (試験法「 2 - 3 - 1 魚種の選択」)

試験に使用可能な魚種、推奨する試験温度及び全長 [頭部の先端 (吻端) から尾の先端 (尾端) までの長さ] は以下のとおりである。なお、コイ又はメダカが推奨されるが、その他の魚種を使用する場合は、魚種の選択根拠を報告する。

魚種	試験温度の推奨範囲 (°C)	試験生物の推奨全長 (cm)
コイ (Common carp) <i>Cyprinus carpio</i> (コイ科)	20 - 25	8.0 ± 4.0
メダカ (Ricefish) <i>Oryzias latipes</i> (メダカ科)	20 - 25	4.0 ± 1.0
ゼブラフィッシュ (Zebra-fish) <i>Danio rerio</i> (コイ科)	20 - 25	3.0 ± 0.5
ファットヘッドミノー (Fathead minnow) <i>Pimephales promelas</i> (コイ科)	20 - 25	5.0 ± 2.0
グッピー (Guppy) <i>Poecilia reticulata</i> (カダヤシ科)	20 - 25	3.0 ± 1.0
ブルーギル (Bluegill) <i>Lepomis macrochirus</i> (サンフィッシュ科)	20 - 25	5.0 ± 2.0
ニジマス (Rainbow trout) <i>Oncorhynchus mykiss</i> (サケ科)	13 - 17	8.0 ± 4.0
イトヨ (Three-spined stickleback) <i>Gasterosteus aculeatus</i> (トゲウオ科)	18 - 20	3.0 ± 1.0

4.2 試験魚の蓄養及びじゅん化（試験法「2-3-2 蓄養及びじゅん化」）

蓄養及びじゅん化において、試験温度と蓄養池の水温に差がある場合には、例えば次の(1)又は(2)の方法によりじゅん化水槽中でじゅん化することができる。じゅん化の間に、エラや皮膚の損傷している試験魚あるいは衰弱していたり疾病にかかっている試験魚は除去する。また、試験期間中に脂質含量の極端な変化が生じないように給餌量等を調整する。なお、蓄養池及びじゅん化水槽は流水とすることが望ましい。

- (1) 試験温度が蓄養池の水温より高い場合は、蓄養池の水温より5℃以内高い温度で1日以上ならし、その後1日3℃以内ずつ順次昇温し、最終的に試験温度と同一温度で5-7日間飼育する。
- (2) 試験温度が蓄養池の水温より低い場合は、蓄養池の水温より3℃以内低い温度で1日以上ならし、その後1日2℃以内ずつ順次降温し、最終的に試験温度と同一温度で7-10日間飼育する。

5. 水暴露法を実施する上での注意点

5.1 溶解補助剤（試験法「3-1 試験水」）

適切な濃度の原液を調製するために溶解補助剤を使用する場合は、最小限にする。

濃縮度試験に用いられる主な溶解補助剤の48時間LC₅₀値（mg/L、w/v）

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

魚：メダカ 水温：25

HCO：ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油

5.2 流量（試験法「3-3 流量」）

通常、流量は魚体重（湿重量）1.0 g 当たり 1-10 L/day が推奨される。ただし、被験物質濃度を±20%以内で維持することができ、かつ溶存酸素濃度が飽和酸素濃度の60%を超える場合には、推奨流量よりも下げてもよい。

5.3 試験濃度（試験法「3-5-2 試験濃度の設定」）

被験物質の魚体内への取込は設定した試験濃度によっては制限される場合がある（BCFの濃度依存性）。そのような場合、取込が制限されないことを確認するために、少なくとも2濃度区、場合によっては3濃度区以上で試験を実施する必要がある。第1濃度区の試験濃度の設定は、被験物質の急性毒性値（LC₅₀値）の1%以下もしくは最大無影響濃度（NOEC）以下とし、技術的に可能な限り低くする。分析方法による試験水中における定量下限濃度より、少なくとも10倍程度高い濃度を目安とする。第2濃度区は、第1濃度区より10倍低い濃度とする。ただし、毒性及び分析感度から、これが不可能であれば、10倍より小さい濃度比で行うか、放射性同位元素を使って標識した被験物質（高純度、例えば>98%）を使用してもよい。また、水溶解度付近の試験濃度で実施せざるを得ない被験物質でも、設定濃度の信頼性を担保できるように、少なくとも2濃度区での試験が推奨される。

UVCB物質のような多成分物質については、評価対象成分が水溶解度以下になるように試験濃度を設定すればよい。

5.4 $\log P_{OW} = 4$ である被験物質の理論的なサンプリングスケジュール例（試験法「3-8 採取及び分析」）

採取	サンプリングスケジュール		水試料数	魚試料数 ⁽¹⁾
	最低限必要な頻度（日）	追加のサンプリング（日）		
取込期間前				
1	-1 0		1-2 ⁽³⁾	4 ⁽⁴⁾ (3 ⁽⁶⁾)
取込期間				
2	0.3	0.4	1-2	4
3	0.6	0.9	1-2	4
4	1.2	1.7	1-2	4
5	2.4	3.3	1-2	4
6	4.7		1-2	4-8 ⁽⁵⁾ (3 ⁽⁶⁾)
排泄期間を設ける場合				被験物質を含まない 水に魚を移動
7	5.0	5.3	1-2	4
8	5.9	7.0	1-2 ⁽⁷⁾	4
9	9.3	11.2	1-2 ⁽⁷⁾	4
10	14.0	17.5	1-2 ⁽⁷⁾	4-8 ⁽⁵⁾ (3 ⁽⁶⁾)

- (1) 括弧内の値は、追加で採取する場合の試料数である。
- (2) $\log P_{OW}$ が 4.0 のとき k_2 の推定値は 0.652 day^{-1} である。試験の総期間は、 $3 \times t_{SS} = 3 \times 4.6$ 日すなわち 14 日間に設定される。 t_{SS} （定常状態到達時間）の推定については「6. BCFの算出法」参照。
- (3) 少なくとも、水槽容量の 3 倍の水が供給された後に水を採取する。
- (4) これらの魚は蓄養群から採取する。
- (5) 高い精度でのカーブフィッティングや代謝物の知見が必要な場合は、より多くの試験魚を採取する必要があるが、取込期間及び排泄期間の終了時に、特に多くの試験魚を採取した方がよい。
- (6) 試験開始時、取込期間終了時及び排泄期間終了時に、被験物質濃度測定用として採取した魚と同一の魚を脂質含量測定に使用できない場合は、追加で少なくとも 3 尾の脂質含量測定用の試験魚を採取する。その場合、試験区の魚ではなく対照区の 3 尾を脂質含量測定に用いてもよい。
- (7) 排泄期間開始時の試験水分析において、被験物質が検出されないことが確認できる場合は、その後の排泄期間における試験水中の被験物質を測定しなくてもよい。

5.5 成長の比較（試験法「3-8-4 試験魚の成長の測定」）

試験区及び対照区における魚の成長速度定数を算出し、試験区と対照区の成長の差を統計的手法（例えば t 検定、又は試験濃度が複数の場合は F 検定）によって確認する。試験区と対照区の成長に有意な差が認められる場合は、試験の信頼性と完全性に与える影響を考察することが望ましい。

6 . 試験結果の処理

6 . 1 試験設計のための取込期間の長さ予測（試験法 「取込期間 3 - 7 - 1」）

排泄速度定数 (k_2) と $n1$ -オクタノール/水分配係数 (P_{OW})、取込速度定数 (k_1) と BCF との経験的な関係を用いることで、試験実施前に k_2 及び試験魚中被験物質濃度が定常状態の $X\%$ に達する時間 t_x を推定することができる。ただし、これらの式は取込及び排泄が 1 次速度式に従う場合にのみ適用される。明らかに 1 次速度式に従わない場合は、これらの予測は有効ではない。X と t_x の関係は以下の式で示される。

$$\frac{X}{100} = 1 - e^{-k_2 t_x} \quad [\text{式 A6.1}]$$

k_2 (day^{-1}) の推定値はいくつかの方法で得ることができる。例えば、以下の経験式を用いることができる。：

$$\log k_2 = 1.47 - 0.414 \log P_{OW} \quad (r^2=0.95) \quad [\text{式 A6.2}^{(\text{注}1)}]$$

又は

$$k_2 = \frac{k_1}{\text{BCF}} \quad [\text{式 A6.3}]$$

$\log P_{OW}$ が 3 を超える化学物質の場合は、上式で、 $k_1 = 520 \cdot W^{-0.32}$ ($r^2=0.85$)

[式 A6.4]

$$\text{及び BCF} = 10^{(0.910 \log K_{OW} - 1.975 \log(6.8 \cdot 10^{-7} K_{OW} + 1) - 0.786)} \quad (r^2=0.90)$$

[式 A6.5^(注3)]

W = 取込終了時 / 排泄開始時における平均魚体重 (g 湿重量)

その他、 k_2 を推定する方法として「注 4」がある。例えば、代謝が早いと考えられる場合には、複雑なモデルを用いて k_2 を推定した方がよい場合もある^(注5、6)。ただし、モデルが複雑になるほど、予測結果の解釈にいつそう注意を払わなければならない。したがって、推定結果の取り扱いについては、被験物質の構造及び他の関連情報（例えば予備試験結果）と比較しつつ、慎重に判断すべきである。

定常状態に対し一定の割合に達するのに必要な時間は、取込及び排泄を記述する一般的な速度式（1 次速度式）に k_2 推定値を代入することにより算出することができる。しかしながら、試験期間中の成長が著しい場合は、6 . 6 「速度論による BCF についての成長希釈補正」に記載する成長希釈補正した排泄速度定数 (k_{2g}) を用いて算出する方が適切である。

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_w - k_2 C_f \quad [\text{式 A6.6}]$$

C_w が一定の場合

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{式 A6.7}]$$

定常状態に近づくと ($t \rightarrow \infty$)、式 A6.7 は以下のように省略できる (注7、8)。

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \quad [\text{式 A6.8}]$$

又は

$$\frac{C_f}{C_w} = \frac{k_1}{k_2} = \text{BCF} \quad [\text{式 A6.9}]$$

すなわち、 $\text{BCF} \times C_w$ は、定常状態における試験魚中被験物質濃度 (C_{f-SS}) の近似値である。

式 A6.7 は、次のように書き換えられる。

$$C_f = C_{f-SS} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{式 A6.10}]$$

又は

$$\frac{C_f}{C_{f-SS}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad [\text{式 A6.11}]$$

式 A6.2 又は式 A6.3 を用いて k_2 を事前に推定し、式 A6.11 に代入することで、 t_x を予測することができる。

蓄積が定常状態の 95% を超える場合は、 BCF_{SS} の算出が可能となる。 BCF_K を算出するための統計的に最適な取込期間として、試験魚中被験物質濃度が定常状態の 50% ($0.69/k_2$) に達する期間が少なくとも必要である (注9)。

定常状態の 80% に到達する時間 (t_{80}) は、以下に示される。

$$0.80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \quad [\text{式 A6.12}]$$

又は

$$t_{80} = \frac{-\ln(0.20)}{k_2} = \frac{1.6}{k_2} \quad [\text{式 A6.13}]$$

同様に、定常状態の 95% に到達する時間 (t_{95}) は、以下に示される。

$$t_{95} = \frac{-\ln(0.05)}{k_2} = \frac{3.0}{k_2} \quad [\text{式 A6.14}]$$

例えば、 $\log P_{OW} = 4$ である被験物質の t_{80} 又は t_{95} は (式 A6.2、式 A6.13、及び式 A6.14 を用いて)、以下に示される：

$$\log k_2 = 1.47 - 0.414 \cdot 4$$

$$k_2 = 0.652 \text{ day}^{-1}$$

$$t_{80} = \frac{1.6}{0.652} = 2.45 \text{ days (59 hours)}$$

$$t_{95} = \frac{3.0}{0.652} = 4.60 \text{ days (110 hours)}$$

代わりに、以下の式を用いて、定常状態に達するまでの時間 (t_{eSS}) を算出できる
(注10)。

$$t_{\text{eSS}} = 6.54 \cdot 10^{-3} \cdot P_{\text{OW}} + 55.31 \text{ (hours)} \quad [\text{式 A6.15}]$$

$\log P_{\text{OW}} = 4$ である被験物質の結果は以下に示される：

$$t_{\text{eSS}} = 6.54 \cdot 10^{-3} \cdot 10^4 + 55.31 = 121 \text{ hours}$$

6.2 試験設計のための排泄期間の長さ予測 (試験法「排泄期間 3 - 7 - 2」)

取込及び排泄を記述した一般的な数式を用いることで、試験魚中被験物質濃度が排泄期間の初期濃度に対して一定の割合まで減少するのに必要な時間を予測することができる。ただし、これらの式は取込及び排泄が1次速度式に従う場合にのみ適用される。明らかに1次速度式に従わない場合は、これらの予測は有効ではない。(式 A6.6 参照)
(注11)。

排泄期間において、 C_w をゼロと仮定すると、以下の式で示される：

$$\frac{dC_f}{dt} = -k_2 C_f \quad [\text{式 A6.16}]$$

又は

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t} \quad [\text{式 A6.17}]$$

上式で、 $C_{f,0}$ は排泄期間開始時の試験魚中被験物質濃度である。

式 A6.2 又は式 A6.3 を用いて k_2 を事前に推定し、式 A6.17 に代入することで、Y% 排泄される時間 t_Y を予測することができる。

50%排泄される時間 (t_{50}) は以下の式で示される :

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

又は

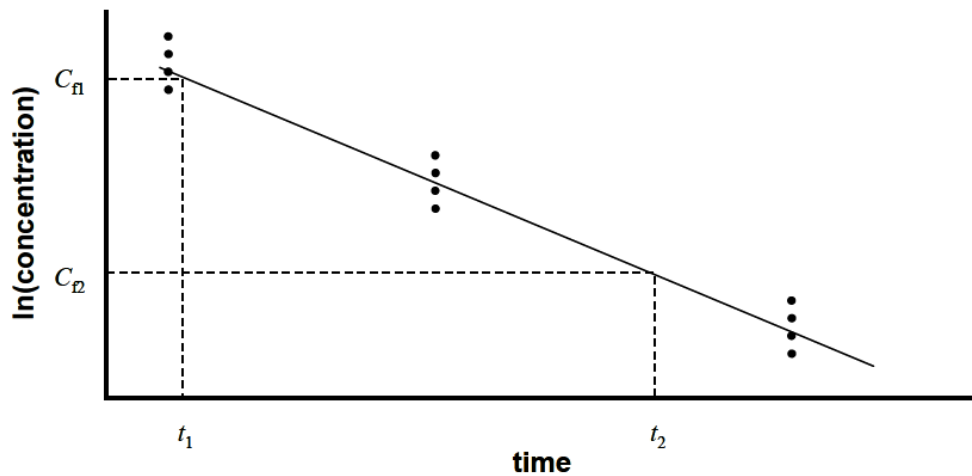
$$t_{50} = \frac{-\ln(0.50)}{k_2} = \frac{0.693}{k_2}$$

同様に、95%排泄される時間 (t_{95}) は以下の式で示される :

$$t_{95} = \frac{-\ln(0.05)}{k_2} = \frac{3.0}{k_2}$$

6. 3 逐次法 (Sequential method) : 排泄速度定数 k_2 の決定 (試験法「生物濃縮係数の算出4-1」)

排泄期間中の試験魚中被験物質濃度 (自然対数) が時間軸に対して直線上にプロットされる (排泄が1次速度式に従う) 場合、 k_2 は単純な二つのコンパートメント/二つのパラメータのモデルにより、説明が可能である。



k_2 が直線上にプロットされない場合は、排泄が1次速度式より複雑なパターンである可能性が示唆される。1次速度式から外れる場合の排泄のパターンは、図式解法により明らかにすることができる可能性がある。

複数のサンプリングポイントから k_2 を算出するためには、縦軸に \ln (濃度)、横軸に時間を取り直線回帰を実施する。その結果得られる回帰直線の傾きが排泄速度定数 k_2 である。切片からは、排泄期間開始時における試験魚中被験物質濃度の平均値 ($C_{0,d}$; 取込期間終了時の試験魚中被験物質濃度の平均値に等しいが誤差範囲を含む) が算出可能である。

$$C_{0,d} = e^{\text{intercept}}$$

[式 A6.18]

k_2 を算出するためのサンプリングポイントが2つしかない場合（簡易水暴露法の排泄期間開始時（すなわち取込期間終了時）及び終了時）は、各サンプリングポイントにおける平均濃度を下式に代入する。

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}) - \ln(C_{f2})}{t_2 - t_1} \quad [\text{式 A6.19}]$$

上式で、 $\ln(C_{f1})$ 及び $\ln(C_{f2})$ は、それぞれ時間 t_1 及び t_2 における試験魚中被験物質濃度の自然対数であり、 t_2 及び t_1 は2つのサンプリングポイントの排泄開始時からの時間である。ただし、この方法を用いた場合は、 k_2 の標準誤差あるいは信頼区間を得ることができない。

6.4 逐次フィッティング法（Sequential method）：取込速度定数 k_1 の決定（試験法「4-1 生物濃縮係数の算出」）

取込期間中における一連の連続した時間-濃度データから k_1 を算出することができる。その場合、コンピュータプログラムを用いて、データを以下のモデルにフィッティングさせる。

$$C_f(t) = C_w(t) \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{式 A6.20}]$$

上式で、 k_2 は6.3「逐次法」において算出した値であり、 $C_f(t)$ 及び $C_w(t)$ はそれぞれ時間 t における試験魚中及び試験水中被験物質濃度である。

k_1 を算出するためのサンプリングポイントが2つしかない場合（簡易水暴露法の排泄期間開始時（すなわち取込期間終了時）及び終了時）は、下式を用いる。

$$k_1 = \frac{C_f \cdot k_2}{C_w (1 - e^{-k_2 t})} \quad [\text{式 A6.21}]$$

上式で、 k_2 は6.3「逐次法」において算出した値であり、 C_f は排泄期間開始時の試験魚中被験物質濃度であり、 C_w は取込期間中の平均試験水中被験物質濃度である。ただし、この方法を用いた場合は、 k_1 の標準誤差あるいは信頼区間を得ることができない。

測定したサンプリングポイントのデータをプロットすることで、目視により k_1 及び k_2 の妥当性を判断できる。逐次フィッティング法による k_1 の値が適切ではないと判断された場合は、同時フィッティング法を用いて k_1 及び k_2 を算出すべきである（6.5「同時フィッティング法」参照）。

6.5 同時フィッティング法（Simultaneous method）による取込速度定数及び排泄速度定数の決定（試験法「4-1 生物濃縮係数の算出」）

コンピュータプログラムを用いて、一連の連続した時間-濃度データ及び下記のモデル式より k_1 及び k_2 を算出することができる。

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{式 A6.22}]$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t > t_c \quad [\text{式 A6.23}]$$

上式で、 t_c = 取込期間終了時の時間

この手法は、 k_1 及び k_2 の標準誤差を直接算出できる。式 A6.22 及び式 A6.23 における k_1/k_2 を BCF に置き換えることで、BCF の標準誤差及び 95% 信頼区間も推定可能である。このことは、試験魚中被験物質濃度の対数変換の有無による BCF 算出結果の差異を比較する際に特に有用である。

同時フィッティング法で k_1 及び k_2 を算出する場合、 k_1 と k_2 の間には強い相関関係が存在する。また、ほとんどの場合、 k_2 は、排泄曲線から比較的高い精度で算出可能であることから、まず、逐次フィッティング法を用いて k_1 及び k_2 を算出することが推奨される。逐次フィッティング法で k_1 及び k_2 を算出する場合には、両方について同様なデータの取り扱いをする（試験魚中被験物質濃度を自然対数変換する / しない）ことが推奨される。測定したサンプリングポイントのデータをプロットすることで、得られた曲線の妥当性を目視により判断する。逐次フィッティング法により得られた k_1 が妥当でないと判断される場合は、同時フィッティング法を用いて k_1 及び k_2 を算出する。再度、得られた曲線の妥当性を目視により判断し、 k_1 、 k_2 及び BCF について、逐次フィッティング法で得られた結果と比較する。

いずれの方法も妥当ではないと判断された場合には、1 次速度式に従っていない可能性があり、より複雑な他のモデルを採用すべきである。妥当性の判断を難しくする最も一般的な要因の一つとして、試験期間中の試験魚の成長が挙げられる。

6.6 速度論による BCF についての成長希釈補正（試験法「4 - 2（1）成長希釈補正と脂質含量の標準化」）

化学物質の取込及び排泄が 1 次速度式に従う場合に適用する。1 次速度式に従わない場合は、被験物質量を基にした手法（mass based approach）を用いることが推奨される。

成長に伴う希釈を補正するための本方法は、精度が悪い場合や適切に補正できない場合がある（例えば、成長が早い魚を用いて排泄が非常に遅い化学物質について試験を実施した場合、成長補正した排泄速度定数（ k_{2g} ）に必要な 2 つの速度定数（ k_2 及び k_g ）の誤差も大きくなり、 k_{2g} は非常に小さくなる可能性がある。そのような場合には、被験物質量を基にした代替法を用いてもよい。なお、BCF_{SS} も成長による影響を受けるが、現在のところ、BCF_{SS} を成長希釈補正するための適切な方法はない。

成長速度定数差引き法による成長希釈補正

標準的な方法として、全ての個々の体重データを自然対数に変換し、試験区と対照区に分けて、 $\ln(\text{魚体重})$ 又は $\ln(1/\text{魚体重})$ を時間(日)に対してプロットする。この処理を取込及び排泄期間のデータについて別々に実施する。成長に伴う希釈補正に用いる成長速度定数(k_g)は、一般に試験期間全体の体重データを使用することが望ましいが、取込及び排泄期間における2つの成長速度定数の間に統計的に有意な差がある場合には、排泄期間における速度定数を使用し、報告する。

成長速度定数(k_g)を排泄速度定数(k_2)から差し引いて、成長補正した排泄速度定数(k_{2g})を算出する。

$$k_{2g} = k_2 - k_g \quad [\text{式 A6.24}]$$

取込速度定数を成長補正した排泄速度定数で除することで、成長補正した速度論によるBCF(BCF_{K_g})を算出する。

$$\text{BCF}_{K_g} = \frac{k_1}{k_{2g}} \quad [\text{式 A6.25}]$$

被験物質濃度に基づく成長希釈補正

「成長速度定数差引き法」の代替法として、以下の方法が使用可能である。

- 排泄期間の試験魚中被験物質濃度(すなわち、魚の単位質量あたりの被験物質濃度)を試験魚中の被験物質濃度に変換する。
- $\ln(\text{被験物質濃度})$ を時間(排泄期間)に対してプロットし、その傾きから排泄速度定数を算出する。
- ただし、 k_1 を算出する際には6.3「逐次法」及び6.5「同時フィッティング法」に記載された方法を用い、試験魚中被験物質濃度から算出する通常の k_2 を使用することに注意する。

6.7 5%脂質含量での標準化(試験法「4-2(2)成長希釈補正と脂質含量の標準化」)

BCF_{SS} が1000 L/kg以上の場合、被験物質がほとんど脂質に蓄積されないことが明確な場合を除き、5%脂質含量(湿重量に基づく)に対するBCF(BCF_K 又は BCF_{SS})を報告すべきである。魚の濃度データ又はBCFは5%脂質含量(湿重量に基づく)あたりの値に標準化する必要がある。

脂質含量の測定にはクロロホルム/メタノール抽出法及びSmedes法の2種類を推奨する。他の方法を用いる場合は、推奨する2種類と同程度の抽出効率及び精度が得られることを事前に確認する。なお、脂質含量は、被験物質濃度測定に用いた試験魚と同一の魚について測定することが望ましい。

$$C_{f,L} = \frac{0.05}{L} \cdot C_f \quad [\text{式 A6.26}]$$

$C_{f,L}$ = 5%脂質含量で標準化した試験魚中被験物質濃度 (mg/kg 湿重量)

L = 脂質含量 (湿重量に基づく)

C_f = 試験魚中被験物質濃度 (mg/kg 湿重量)

すべてのサンプリングポイントにおいて、被験物質分析及び脂質含量測定を同一の魚を用いて実施した場合を除いて、 BCF_{SS} については、試験区の取込期間終了時の平均値を使用する。 BCF_K の標準化は脂質含量の平均値を用いて実施する。ただし、脂質含量が取込期間又は排泄期間中に大きく変化した場合等は、その旨と合わせて適切な値を用いて脂質含量で標準化した BCF を報告する。

$$BCF_{SSL} = \frac{0.05}{L_n} \cdot BCF_{SS} \quad [\text{式 A6.27}]$$

$$BCF_{KL} = \frac{0.05}{L_n} \cdot BCF_K \quad [\text{式 A6.28}]$$

BCF_{SSL} = 5%脂質含量で標準化した BCF_{SS}

BCF_{KL} = 5%脂質含量で標準化した BCF_K

L_n = 平均脂質含量 (湿重量に基づく)

BCF_{SS} = 定常状態における BCF

BCF_K = 速度論による BCF

すべてのサンプリングポイントにおいて、被験物質分析及び脂質含量測定を同一の魚を用いて実施した場合には、それぞれの試験魚中被験物質濃度をその魚の脂質含量を用いて標準化する。

7. : 魚を用いた濃縮度試験（簡易水暴露法）

この手法の原理は、水暴露法における生物濃縮係数は、試験魚中被験物質濃度と試験水中被験物質濃度の比から BCF_{SS} として算出できるが、取込速度定数 k_1 と排泄速度定数 k_2 の比から BCF_K としても算出できることに基づくものである。

試験魚中被験物質濃度 (C_{f1}) の測定を取込期間終了時 (t_1) に実施し、その後、排泄期間中のある時間 (t_2) に試験魚中被験物質濃度 (C_{f2}) を再度測定することにより、「6. BCFの算出法」の式 A6.19 を用いて排泄速度定数 (k_2) が算出可能である。

取込速度定数 k_1 は、「6. BCFの算出法」の式 A6.20 を用いて算出することができる（この式で、 C_f は C_{f1} 、 t は t_1 とする）^(注12、13)。したがって、簡易水暴露法における速度論による生物濃縮係数 (BCF_{Km}) は、以下のとおりになる。

$$BCF_{Km} = \frac{k_1}{k_2} \quad \text{[式 A7.1]}$$

可能であれば、試験魚中被験物質濃度や BCF_{Km} は、「6. BCFの算出法」に記載のように、成長希釈補正を実施すべきである。

BCF_{Km} の結果の妥当性を評価する際に必要な minimised BCF_{SS} は、取込期間終了時に定常状態に達したと仮定して算出される BCF であり、: 魚を用いた濃縮度試験（水暴露法）で規定する BCF_{SS} とは異なることに注意が必要である。

$$\text{minimised } BCF_{SS} = \frac{C_{f-\text{minSS}}}{C_{w-\text{minSS}}} \quad \text{[式 A7.2]}$$

$C_{f-\text{minSS}}$ = 取込期間終了時に定常状態に達したと仮定した場合の試験魚中被験物質濃度 (mg/kg 湿重量)

$C_{w-\text{minSS}}$ = 取込期間終了時に定常状態に達したと仮定した場合の試験水中被験物質濃度 (mg/L)

8. : 魚を用いた濃縮度試験（餌料投与法）

8. 1 適切な餌料の成分量の例（試験法「2 - 3 - 3 餌料」）

主な成分	餌料
粗蛋白質	55.0%
粗脂肪	10～15%程度
粗繊維	2.0%
水分	12%
灰分	8%

8. 2 餌料への添加技術の例（試験法「3 - 1 試験餌料」）

一般的ポイント

- 対照区の試験餌料は、被験物質を含まないことを除き、被験物質を添加した試験餌料と厳密に同一の方法で調製すべきである。
- 試験餌料の被験物質濃度をチェックするため、サンプルから3連で適切な方法で被験物質を抽出し、抽出物中の被験物質濃度又は放射能測定を実施すべきである。被験物質の分析感度を考慮し、最小限の量の餌料を分析することが望ましい。サンプル間のバラツキが小さく分析回収率が高く(>85%)なるようにするべきである（取込期間の開始前に採取した3連のサンプル中被験物質濃度は、平均値から±15%を超えて変動してはならない）。
- 餌料投与法中の試験餌料の被験物質濃度決定のため、少なくとも各3連のサンプルを取込期間の0日目及び終了時に採取して分析する。

液体試料の餌料の調製（例）

餌料に添加する被験物質設定濃度は、例えば500 µg 被験物質/g 餌料とする。ガラス瓶又はナスフラスコに適切な量の被験物質と既知量の餌料を添加する。餌料量は、取込期間に十分な量とすべきである（試験魚の成長による給餌量の増加を考慮する）。餌料/被験物質の混合物は、一晩混合すべきである（例えばロトラックミキサーを用いて、又はナスフラスコを用いる場合は回転により）。被験物質を添加した餌料は、試験終了まで餌料中の被験物質の安定性を維持する条件下で（例えば冷蔵）保管すべきである。

コーンオイル又は魚油による餌料の調製（例）

固形の被験物質は、必要に応じて乳鉢等で粉碎して微粉にする。液状の被験物質は、コーンオイル又は魚油に直接加えることができる。被験物質は、既知量（例えば5 - 15 mL）のコーンオイル又は魚油に溶解する。被験物質を添加したオイルを適当な大きさのナスフラスコに移す。このオイルの調製に使用した容器を、少量のオイルで2回洗浄し、これらをナスフラスコに加えることで溶解した被験物質を確実に移す。オイル内で

の完全な溶解/分散を確実にするため（又は試験において複数の被験物質が使用される場合）、マイクロスターラーを加え、フラスコに栓をし、混合物を高速で一晩攪拌する。試験に適当な量の餌料を添加し、ナスフラスコの内容物を少なくとも 30 分間、好ましくは一晩連続回転によって混合する。被験物質を添加した餌料は、使用まで餌料中の被験物質を安定に保存できる条件下（例えば冷蔵）で保管すべきである。

有機溶媒による餌料の調製（例）

投与量に適した量の被験物質を適当量の有機溶媒（例えばシクロヘキサン又はアセトン、ただし添加される餌料の量に応じ必要な場合にはより多量）に溶解する。この溶液の一定量又はすべてのいずれかを、試験に必要とされる投与濃度に適した餌料と混合する。餌料/被験物質混合物は、ステンレススチール製の混合容器中で混合可能であり、容器中の添加された餌料は、試験室のドラフト内に放置、溶媒を十分に蒸発させる、あるいはナスフラスコ内で連続回転によって混合する。余分な溶媒は、必要に応じて空気又は窒素パージにより留去することが可能である。溶媒が除去される際に被験物質が結晶化しないように注意しなければならない。被験物質を添加した餌料は、使用まで餌料中の被験物質を安定に保存できる条件下（例えば冷蔵）で保管すべきである。

8.3 10日間の取込期間及び42日間の排泄期間に従う理論的なサンプリングスケジュールの例（試験法「3-9 分析」）

採取	サンプリングスケジュール		餌試料数	魚試料数	
	各期間の日数	追加の魚サンプルの有無		試験区	対照区
取込期間					
1	0	可能性あり (1)(2)	3-試験区 3-対照区 ⁽¹⁾	0	5-10 (8-13) ⁽²⁾
1A ⁽³⁾	1-3			5-10	5-10
2	10	あり ⁽⁴⁾	3-試験区 3-対照区 ⁽¹⁾	10-15 ⁽⁴⁾ (13-18) ⁽⁵⁾	5-10 (8-13) ⁽⁵⁾
排泄期間					
3	1	あり ⁽⁴⁾		10-15 ⁽⁴⁾	5-10
4	2			5-10	5-10
5	4			5-10	5-10
6	7	あり ⁽⁴⁾		10-15 ⁽⁴⁾	5-10
7	14			5-10	5-10
8	28			5-10	5-10
9	42	あり ⁽⁴⁾		10-15 ⁽⁴⁾ (13-18) ⁽⁵⁾	5-10 (8-13) ⁽⁵⁾
合計				59-120 (63-126) ^(4,5)	50-110 (56-116) ^(4,5)

- (1) 被験物質濃度及び脂質含量について、対照区及び試験区から3試料を分析する。
(2) 取込開始時にできる限り近い時期にじゅん化水槽から採取する；取込開始時には少なくとも3尾の魚を脂質含量測定用に採取する。
(3) 取込期間初期に採取することにより生体内吸収効率の算出が可能となり、排泄期間のデータから算出される被験物質の生体内吸収効率と比較できる（任意）。
(4) 組織別分析のために、追加で5尾の魚を採取することができる。
(5) 取込開始時、取込期間終了時及び排泄期間終了時に、被験物質濃度測定用として採取した魚と同一の魚を使用できない場合、追加で少なくとも3尾を脂質含量測定用に採取する。多くの場合、対照区の3尾の魚が脂質含量測定用のみに使用できる。

期間及び採取における注意点：取込期間は、被験物質を添加した試験餌料の最初の給餌を行った時点で開始となる。各実験日は、ある回の給餌から24時間後の次の給餌の直前までである。最初の採取（上表の1）は、最初の給餌の直前（例えば1時間前）に実施されるべきである。試験中の採取は、理想的には次の日の給餌の直前に実施されるべきである（例えば、取込10日後の試験魚の採取は、取込10日後の給餌の約23時間後）。取込期間は、被験物質を添加していない餌料の給餌直前に終了し、その時点から

排泄期間が開始される（試験区の魚は、最後の被験物質を添加した餌料の給餌 24 時間後まで試験餌料を消化している可能性が高い）。このため、取込終了時の採取は、被験物質を添加していない餌料の最初の給餌の直前に実施すべきであり、かつ排泄期間最初の採取は、被験物質を添加していない餌料の最初の給餌の約 23 時間後におこなうべきである。

8.4 生体内吸収効率及び経口生物濃縮係数の算出（試験法「4-1 経口生物濃縮係数の算出」）

生体内吸収効率を算出するために、まず排泄速度定数を試験法解説 6.3 に従って排泄期間中の試験魚中平均被験物質濃度を用いて推定する（「sequential 法」すなわち標準的な線形回帰を用いて実施する）。給餌量 I 及び取込期間 t は、試験の既知のパラメータである。試験餌料における被験物質の平均濃度 C_{food} は、試験における測定変数である。排泄期間開始時における試験魚中被験物質濃度の外挿値 $C_{0,d}$ は、通常は \ln （濃度）と排泄日数のプロットの切片から算出される。

被験物質の生体内吸収効率（ α 、消化管からの被験物質の吸収）は、以下のように算出される。

$$\alpha = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{\text{food}}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \quad [\text{式 A8.1}]$$

$C_{0,d}$ = 排泄期間開始時における試験魚中被験物質濃度の外挿値（mg/kg）

k_2 = 試験法解説 6.3 の式に従って算出された、（成長希釈補正されていない）排泄速度定数（/日）

I = 給餌量（g 餌料/g 魚/日）

C_{food} = 試験餌料中被験物質濃度（mg/kg 餌料）

t = 取込期間（日）

ただし、算出に用いる給餌量 I は、正確な生体内吸収効率 α を求めるために、試験魚の成長について補正しなければならない可能性がある。取込期間中に試験魚が著しく成長する試験において、取込期間の適切な給餌量は設定した給餌量より低くなり、結果として“実際の”生体内吸収効率より高い値が得られる（注意； I は式 A8.1 と式 A8.4 の間において、事実上相殺されるため、これは BMF の算出自体に重要ではない）。成長に伴う希釈について補正した平均給餌量 I_g はいくつかの方法で算出可能であるが、直接的で厳密な算出方法は成長速度定数（ k_g ）を用いて取込期間中の各サンプリング時における試験魚の体重を推定する方法である。すなわち；

$$W_{f(t)} = W_{f,0} \times e^{k_g t} \quad [\text{式 A8.2}]$$

$W_{f(t)}$ = 取込日 t における平均試験魚体重

$W_{f,0}$ = 試験開始時の平均試験魚体重

このようにして（少なくとも）取込期間最終日の試験魚の平均体重（ $W_{f,\text{end-of-uptake}}$ ）は、推定可能である。給餌量は $W_{f,0}$ に基づいて設定されているため、取込期間の各実験日における適切な給餌量は、これら二つの体重を用いて算出可能である。取込期間中に

急速な成長が認められる場合、 I の代わりに成長希釈補正した給餌量 I_g (g 餌料/g 魚/日) を以下のように算出する。

$$I_g = \frac{I \times W_{f0}}{W_{f \text{ end-of-uptake}}} \quad [\text{式 A8.3}]$$

生体内吸収効率が得られると、それに給餌量 I (又は I_g 、 α の算出に用いた場合) を乗じ、総排泄速度定数 k_2 で除することにより、 BMF_K を算出できる。

$$\text{BMF}_K = \frac{I \times \alpha}{k_2} \quad [\text{式 A8.4}]$$

成長希釈補正した経口生物濃縮係数も成長希釈補正した排泄速度定数 (試験法解説 6.6 に従い算出される) を用いて、同様に算出すべきである。 α の算出に I_g を用いた場合、ここでも I の代わりに I_g を用いなければならない。

$$\text{BMF}_{Kg} = \frac{I \times \alpha}{k_{2g}} \quad [\text{式A8.5}]$$

α = 生体内吸収効率 (消化管からの被験物質の吸収)

k_2 = 試験法解説 6.3 の式に従って算出された、(成長希釈補正していない) 排泄速度定数 (/日)

k_{2g} = 成長希釈補正した排泄速度定数 (/日)

I = 給餌量 (g 餌料/g 魚/日)

成長希釈補正した排泄半減期 ($t_{1/2}$) は、以下のように算出される。

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{k_{2g}} \quad [\text{式 A8.6}]$$

取込期間において直線的に被験物質が取り込まれる期間に組織中の被験物質濃度を測定した場合、下記のように被験物質の生体内吸収効率 (α) を推定することも可能である。

$$= \frac{C_{\text{fish}}(t)}{I \times C_{\text{food}} \times t} \quad [\text{式 A8.7}]$$

$C_{\text{fish}}(t)$ = 時間 t における試験魚中被験物質濃度 (mg/kg 湿重量)

8.5 脂質含量補正 (試験法「4-2 成長希釈及び脂質含量補正」)

すべてのサンプリングにおいて被験物質分析したものと同一の試験魚について脂質含量が測定されていれば、個々の被験物質濃度を脂質含量で補正すべきであり、 \ln (脂質含量補正濃度) を排泄期間 (日) に対してプロットすると、 $C_{0,d}$ 及び k_2 が得られる。脂質含量あたりの C_{food} を用いて、脂質含量あたりの生体内吸収効率 (式 A8.1) の算出が可能である (すなわち C_{food} に餌料の平均脂質含量を乗ずる)。式 A8.4 及び式 A8.5 を用いて計算することで、脂質含量補正 (成長希釈補正) した BMF を直接求めることができる。

あるいは、試験魚及び試験餌料における試験区及び対照区の平均脂質含量 (w/w) を算出する (試験餌料及び対照区の試験魚については、通常、取込開始時及び終了時に測定する。試験区の試験魚については、通常、取込終了時の測定データのみから算出する)。試験によっては、試験魚の脂質含量が大幅に増大することがあり、そのような場合、取込終了時及び排泄終了時での脂質含量の測定値より算出した試験魚の脂質含量平均値を使用することがより適切である。一般に、試験区のデータのみを用いてそれぞれの脂質含量を算出すべきである。

脂質含量補正係数 (L_c) は、以下のように算出される。

$$L_c = \frac{L_{\text{fish}}}{L_{\text{food}}} \quad [\text{式 A8.8}]$$

L_{fish} 及び L_{food} は、それぞれ試験魚及び試験餌料における平均脂質含量である。

脂質含量補正係数は、脂質含量補正した経口生物濃縮係数 (BMF_L) の算出に用いられる。

$$\text{BMF}_L = \frac{\text{BMF}}{L_c} \quad [\text{式 A8.9}]$$

8.6 取込期間終了時における試験魚中被験物質濃度の実測値 ($C_{0,m}$) と排泄期間開始時における試験魚中被験物質濃度の外挿値 ($C_{0,d}$) との差の評価

取込期間終了時における試験魚中被験物質濃度の実測値 ($C_{0,m}$) 及び排泄期間開始時における試験魚中被験物質濃度の外挿値 ($C_{0,d}$) を比較する。それらが非常に近似している場合には、排泄パラメータの算出に使用した 1 次速度モデルを裏付けることになる。

試験によっては、外挿値 ($C_{0,d}$) と、実測値 ($C_{0,m}$) との間に著しい差がある場合がある。 $C_{0,d}$ が $C_{0,m}$ よりはるかに低い ($C_{0,d} \ll C_{0,m}$) 場合、この違いは、消化管内に未消化の試験餌料が存在することを示唆している可能性がある。これは、取込期間終了時に追加の (全量の試験魚) サンプルを保管していれば、消化管を解剖し部位別試験を実施することにより実験的に確認は可能である。あるいは、排泄期間の線形回帰に適用する際に、排泄の最初のサンプリングが統計的に有効な棄却検定により不適当と示されるなら、 k_2 算出のために線形回帰を実施する際に、排泄の最初のサンプリングを除外することが適当である。そのような場合、もし線形回帰における不確かさが大幅に低減し、かつ排泄期間に 1 次速度が認められたことが明らかなら、得られた $C_{0,d}$ 及び k_2 の値を生体内吸収効率の算出に用いることは適切である。この場合には、報告書において十分に正当性を説明しなければならない。排泄期間において、被験物質の排泄が 1 次速度に従わない可能性もある。

$C_{0,d}$ が測定値よりはるかに高い ($C_{0,d} \gg C_{0,m}$) 場合には、その被験物質が非常に急速に排泄された (すなわち、排泄期間の非常に早期のサンプリングで、分析方法の定量下限に近づいた、試験法解説 8.7 参照)、排泄期間に 1 次速度からの逸脱があった、 k_2 及び $C_{0,d}$ を算出するための線形回帰が不適である、あるいはいくつかのサンプリングにおいて、測定した被験物質濃度に問題があったことを示している可能性がある。そのような場合、線形回帰プロットを、測定した試料が定量下限にある、又は定量下限付近であるという証拠や、棄却及び明らかな曲率 (1 次速度に従わないことを示唆する) の証拠が

ないかを精査し、報告書で説明する。推定された値を改善するための線形回帰の再評価についても記載し説明すべきである。

8.7 非常に急速に排泄される被験物質についてのガイダンス

いくつかの被験物質は排泄期間の非常に早い時期（すなわち、排泄の2日目のサンプリング以降）に被験物質が事実上測定不能になるために、信頼できる0時濃度 $C_{0,d}$ 及び k_2 が算出できないことがある。このような状況は、ベンゾ[a]ピレンを用いて実施されたリングテストでも認められ、バリデーション報告書に文書化されている。このような場合、線形回帰を実施しても信頼性が低く、 $C_{0,d}$ が非現実的に高い予測値になり、生体内吸収効率は1よりはるかに大きくなる。このような場合、高めに見積もった k_2 の推定値と高めに見積もった BMF（"upper bound" BMF）を算出することが可能である。

最初の「不検出」濃度（定量下限として設定した濃度）を含む排泄期間の被験物質濃度が測定できたデータポイントを用いて、線形回帰（時間に対して自然対数変換された濃度を用いる）を作成することにより、 k_2 の推定値が得られる。場合によって、2つのデータポイント（例えば、排泄のサンプリング日、1日目及び2日目）のみ算出可能な場合があり、その場合には、試験法解説 6.3 の式 A6.19 を用いて k_2 を推定することが可能である。 $C_{0,d}$ が試験で得られる数値よりはるかに大きいと明らかに推定される場合、この k_2 の推定値は式 A8.1 に従い、式中の $C_{0,d}$ の値を実測による0時濃度（ $C_{0,m}$ ）で置き換え、生体内吸収効率の推定に使用可能である。もし $C_{0,m}$ が測定不能であったなら、試験魚の組織における検出下限値を用いるべきである。こうして得られる α の値が1を超えるなら、「最悪のケース」として生体内吸収効率は1と仮定する。

高めに見積もった BMF は、式 A8.4 を用いて推定でき、" (<<) 値"として記載するべきである。例えば、給餌量を試験魚体重の3%において排泄半減期が3日未満の場合、「最悪のケース」として $\alpha=1$ と仮定した場合、 BMF_K は約 0.13 未満となる。推定の目的及びそもそもこの値が保守的であることを考慮すると、成長に伴う希釈又は試験魚や餌料の脂質含量で補正する必要はない。

8.8 基準物質の例（試験法「3-6 試験餌料濃度」）

餌料投与法に使用する基準物質の例として、以下の物質が挙げられる（注14、15、16）。

被験物質	水溶解度*1	log K _{ow} *2	BCF	取込期間 終了時に おける BMF	BMF _{Kg}	BMF _{KgL}
デカヒドロナフ タレン (CAS: 91-17- 8)	0.889 mg/L (文献値、 25)	4.20 (推定 値)	1800 (<i>cis</i> 体) 1900 (<i>trans</i> 体) (第2濃 度区 56日後の 平均値)	0.0893 (<i>cis</i> 体) 0.109 (<i>trans</i> 体) (10日 後)	0.112 (<i>cis</i> 体) 0.137 (<i>trans</i> 体)	0.301 (<i>cis</i> 体) 0.369 (<i>trans</i> 体)
エチルシクロヘ キサン (CAS: 1678- 91-7)	6.3 mg/L (文献値、 20)	4.56 (実測 値)	2100 (第2濃 度区 56日後の 平均値)	0.0162 (10日 後)	0.0172	0.0512
2,4-ジクロロ フェニル-4'- ニトロフェニ ルエーテル (CAS: 1836- 75-5)	1 mg/L (文献値、 22)	4.64 (文献 値)	3400 (第2濃 度区 70日後の 平均値)	0.0517 (10日 後)	0.0622	0.179
<i>o</i> -テルフェニル (CAS: 84-15- 1)	1.24 mg/L (文献値、 25)	5.52 (推定 値)	1400 (第2濃 度区の BCF _{ss})	0.0343 (13日 後)	0.0370	0.0912
メトキシクロル (CAS: 72-43- 5)	0.1 mg/L (文献値、 25)	5.08 (文献 値)	620 (第2濃 度区の BCF _{ss})	0.0128 (13日 後)	0.0138	0.0340
<i>N,N'</i> -ジ-2-ナ フチル- <i>p</i> - フェニレンジ アミン (CAS: 93-46- 9)	0.001446 mg/L (推定値)	6.39 (推定 値)	1100 (第2濃 度区の BCF _{ss})	0.0206 (10日 後)	0.0252	0.0802

*1 Wskowwin v. 1.42 (US Environmental Protection Agency, USA)より算出。文献値がある場合は文献値を、文献値がない場合は、推定値を示す。

*2 Kowwin v. 1.68 (US Environmental Protection Agency, USA)より算出。文献値がある場合は文献値を、文献値がない場合は、推定値を示す。

- (注1) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1: 309-320.
- (注2) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995). Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined in vivo and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131: 130-135.
- (注3) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993). Nonlinear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. *SAR QSAR Environ. Res.* 1: 29-39.
- (注4) Kristensen P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute, Hørsholm, Denmark.
- (注5) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009). A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1168-1177.
- (注6) OECD (2011). QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.
- (注7) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975). Bioconcentration of 2,2',4,4' tetrachlorobiphenyl in rainbow trout as measured by an accelerated test. *T. Am. Fish. Soc.* 104: 785-792.
- (注8) Ernst W. (1985). Accumulation in aquatic organisms, in *Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals*, Sheeman, P., et al., Editors. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, USA: 243-255.
- (注9) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977). Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models. *Can. J. Chem. Eng.* 55: 614-622.
- (注10) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* 22: 701-707.
- (注11) Konemann H. and van Leeuwen K. (1980). Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six chlorobenzenes by guppies. *Chemosphere.* 9: 3-19.
- (注12) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008). Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2271-2280.
- (注13) Hashizume N., Inoue Y., Murakami H., Ozaki H., Tanabe A., Suzuki Y., Yoshida T., Kikushima E. and Tsuji T. (2013). Resampling the bioconcentration factors data from Japan's chemical substances control law database to simulate and evaluate the bioconcentration factors derived from minimized aqueous exposure tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 32: 406-409
- (注14) Inoue Y., Hashizume N., Kikushima E., Otsuka M. (2011). Comparison of nitrofen uptake via water and food and its distribution in tissue of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 87 (3): 287.

- (注 15) Inoue Y., Hashizume N., Yoshida T., Murakami H., Suzuki Y., Koga Y., Takeshige R., Kikushima E., Yakata N., Otsuka M. (2012). Comparison of the Bioconcentration and Biomagnification Factors for Poorly-Water-Soluble Chemicals using Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 63 (2):241-248
- (注 16) Hashizume N., Tanabe A., Inoue Y., Sawada T., Murakami H., Suzuki Y., Sumi S., Tsubokura Y., Yoshida T., Ajimi S., Tsuji T., Furukawa K. (2014). Prediction of the bioconcentration factor in common carp (*Cyprinus carpio* L.) using data from the dietary exposure bioaccumulation fish test. Environ. Toxicol. Chem. 33 (6): 1406-1414

< 1-オクタノールと水との間の分配係数測定試験 >

適用範囲及び試験方法

水に可溶で界面活性を有さない化学物質（有機金属化合物を除く。）の 1-オクタノールと水との間の分配係数の測定は、原則として OECD テストガイドライン 107 又は OECD テストガイドライン 117 で定められた方法に準じて実施する。

結果のまとめ

試験の結果を様式 3 によりまとめ、最終報告書を添付するものとする。