

1. 被験物質の安定性の予備評価

水生生態毒性試験のための OECD ガイドラインでは、水中の被験物質の濃度低下が設定より 20%以内であれば、濃度低下を抑制する策を考えなくても十分保証できると考えている。しかし、実験期間中、被験物質の濃度が明らかに低下する傾向にある場合は、試験水の調製と暴露方式に改良を加える必要がある。そのためには試験条件下における被験物質の安定性を示すデータを事前に得ていた方がよい。まずは、物理的、化学的特性に関するデータを極力調べることで、次ぎに試験条件下における安定性を調べるための予備試験を実施することが必要であるとしている。

1.1 被験物質に関する既存データの調査

暴露濃度の低下を抑制するための試験水調製法や暴露方式を選定するためには、被験物質の物理 / 化学的性状、運命、移動及び環境毒性に関するデータを事前に調査しておくことが有用である。その一例として必要なパラメータの一覧を表 3 に示しており、表中の数値は試験困難が予測される値が示されている。

既存の情報や予測手法（コンピューターによる予測手法の例として原文の付録 1 参照）を用いて一覧表を作成する。そして、この一覧表を考慮にいれながら、実験開始に先立って標準的な試験水調製法や試験手順に関して改良すべきところを修正するとしている。

1.2 予備安定性試験

様々な物理的、化学的および生物的過程（原文の表 2 および後節参照）が、水中の被験物質濃度を低下させる要因となり得る。どの過程が減少の原因であるのかデータが十分でない場合は、予備試験を行なうのが適切である。予備実験の設計例が原文の図 1 に示してある。以下、流れに沿って説明する。

- ・被験物質溶液は、生態毒性実験条件下と同条件下（曝気もあれば含めて）で調製し、試験生物は除外する。
- ・被験物質の分散液および乳濁液の使用も例外としてあげられており（3.1.2 項 “分散液および乳濁液” の項参照）、その場合も同条件下で安定性を調べる。
- ・試験水は 0、24 時間後及び実験終了時に分析する。不安定であったり、吸着する物質では期間を短くする。
- ・この段階では必ずしも飽和溶液を用いる必要はなく、濃度測定が可能な程度でよい。
- ・濃度測定には十分な感度を持つ分析法が必要である。サンプルの採取、処理および分析における損失も考慮に入れる。
- ・サンプルを保存する場合は保存中の損失を評価する。
- ・非常に難溶性で通常の分析技術を用いても検出することができない場合は、安定性評価で利用できる全ての物理化学的データと、専門家の判断が必要であるとしている。
- ・極端に難溶性で検出できない場合は、分散剤または溶剤を使用しないと水生毒性試験が行えないため、助剤無しの安定性を測定する必要はない。

- ・放射性標識物質などの特殊な被験物質の利用も可能である。その場合 ^{14}C 標識の被験物質は実験開始時と実験中に同定する。放射エネルギーが維持されていても、溶液中の被験物質が損失する可能性には留意する。
- ・揮発性は、開放系と密閉系の容器間の濃度を比較することで評価できる。3.4 節参照。
- ・試験水槽内面への吸着性は試験液で予めコンディショニングした密閉水槽(図1の Part B 参照)とそうでない密閉水槽(図1の Part A 参照)を比較し評価できる。3.6 節参照
- ・水槽をコンディショニングしても、化学物質濃度の維持に大した影響がなく、損失する場合は、光分解、生分解、加水分解、酸化による損失の可能性がある。
- ・光分解は、明暗条件下の両分析結果を比較し判別できる。明条件下の損失が大きい場合は光分解が、両方の損失が変わらない場合は加水分解、生分解が要因として大きいと考えられる。損失を減らす方法は、3.5 節に概略が述べられている。

安定性を予備的に調べる実験設計は、例えば餌への吸着のように、暴露濃度を低下させる原因となる他の因子も考慮に入れ、状況に応じて対応する必要がある。予備試験の設計と実行に関する指針として、EC (EC, 1996b); US EPA – Office of Pesticide Programs' (US EPA, 1996a); Nabholz(1991); Auer ら(1990); Lynch ら(1994); Boethling, Nabholz(1997), Newsome ら(1996)が発表した文書を紹介している。また、予備試験は、実験室内での実験に限定して意図されたものではないとしている。

実際の毒性試験の濃度でのみ安定性が問題となるのであれば、生態毒性の予備試験とともに安定性の予備試験を行うことが必要になる。濃度が予めわかっていなかったり、試験水中の被験物質の安定性は濃度によって異なることもあり得る。例えば、高濃度での錯体形成の可能性や、低濃度では高濃度より損失が(比例的に)大きい場合もある。これらの問題を明らかにするためには、最低2つの濃度で安定性試験を行う必要が生じるかもしれないとしている。

2. 暴露方式選定のための一般的検討事項

暴露方式の選定は、実験期間、試験生物種、被験物質の特性(例えば、物理・化学的性質)および/あるいは予備的な安定性試験の結果により判断される。予備試験は、実際の水生毒性試験と似た条件下で、本試験で予想される被験物質の運命や動態を判別するために行う。暴露方式としては以下の4つがある。

- ・ 止水式、換水無し - 試験水は試験期間を通じて交換しない
- ・ 半止水式換水 - 試験水は定期的に全量交換する
- ・ 断続的な流水式換水 - 試験水は暴露中の一定間隔で交換する
- ・ 連続的流水式換水 - 試験水は連続的に交換する

注：一部の化学物質、特に作物保護製剤については、間欠的または時間変動的な暴露設計も開発されている。

規制当局によって要求事項が異なるので、暴露方式の選定に関する指針をここでは提示していない。しかし、試験水を交換せずに暴露濃度を全試験期間通して設定値の 80% ~ 120% に維持できると予想されるのなら、止水式暴露方式が適切と思われる。同様に、濃度がそれ以上変動するような場合には、半止水式または断続的あるいは連続的な流水式が要求されることもある。暴露方式が妥当かどうか明確でない場合は、試験開始に先立って規制当局と協議するのがよい。

半止水式では 24 時間毎の換水が濃度を維持しやすく、比較的簡単に試験手順を加えればよい。もっと頻繁に換水することも可能だが、ミジンコなどの虚弱な生物は過剰な操作により、ストレス過剰にならないように注意する。半止水式と比較して断続的に行う流水式は生物に与えるストレスを削減できるかもしれない。Van Leeuwen ら (1986) は、ミジンコの急性試験や慢性試験、魚類の初期生活段階試験に使用するシステムを言及している。24 時間換水する半止水式を用いても暴露濃度を維持できない場合は、通常、連続的流水式を検討する。(流水式システムについては 3.1.3 項および 3.4 節に記載)

半止水式や流水式では、有機物の堆積や微生物群の過剰繁殖を防ぐために暴露システムを頻繁に洗浄することが必要となる場合もある。その際は洗浄が試験生物に与えるストレスを最小限に抑えるよう、注意を払う。

流水式は、藻類の試験には使用できない。

3 . 試験困難物質の試験水の調製および暴露システム

試験水調製の目的は、被験物質を溶解し、開始時に必要な暴露濃度に到達させることである。技術的に可能ならば、止水式、半止水式換水あるいは流水式のいずれかの暴露方式を用いて、試験中を通してこれらの濃度を維持する。

保存液あるいは試験溶液の調製方法は、被験物質の物理的状態、試験用希釈水への溶解度、試験濃度範囲などによって決められる。目標に近い濃度でかつ安定な被験物質溶液を調製できるように最善を尽くすべきだが、濃度損失の要因となる様々な過程もあり、実際の暴露濃度は設定濃度より相当低くなることもある。目標は被験物質の水溶解度までの暴露濃度を達成することであるが、それを達成するためにはより高い濃度設定が必要かもしれない。通常は、試験容器内の被験物質の溶解残分はないようにするか、それが最小になるようにするが、適当な理由がある場合 (例えば、3.1.2 項の “分散液と乳濁液” の項の 2 例を参照) には、例外もあり得る。

必要量の試験水を調製し、目標濃度の達成とその維持を確認するためには、実験開始に先立ち、調製法と暴露方法を評価する。選んだ方法が、標準的方法での結果と同等であることを立証するためには、参考物質での試験も考慮に入れる。非標準的な方法を用いる場合は、関係規制当局の承認を得、その方法について試験報告書に十分に記載する。

金属および金属化合物を分類するのに役立つため、金属および金属化合物の変化 / 分解に関する OECD プロトコルを作成中とのことである。

3.1 難水溶性物質

3.1.1 予備実験

難水溶性物質を扱う全ての試験において、試験条件下での最大溶解濃度（飽和濃度と定義される）とその調製条件を決める際には、予備試験をした方がよい。予備試験の結果は、毒性試験における試験水調製法の決定根拠となり、試験条件下での水溶解度はすなわち試験結果を評価する際の参考点となりうる。その重要性に鑑み、予備試験の結果は全て報告されるべきである。

被験物質溶液は、最大溶解濃度の達成のために、理論的な水溶解度限界よりも高い濃度で調製してもよいが、溶解しなかった物質は試験前に分離する。この方法は、溶解性不純物を考慮するのにも有用である。

予備実験の設計には、不溶な被験物質を試験水から除去することを考慮しなくてはならない。結晶や粒子、ミセルなどは肉眼で観察しただけでは容易に観察できないため、試験水が澄んでいるからといって完全な溶液であるとは限らない。次のような分離技術が考えられる。

・遠心分離 - 望ましい分離方法ではあるが、大量の試験水を遠心分離することは実用的に困難かもしれない。目安としては、 $10000 \sim 40000 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$ で 30 分遠心分離すれば適切な分離が可能かもしれない。大半の遠心分離用の容器は各種プラスチック製で、被験物質を吸着する可能性があり、ガラス製容器は破損しやすいので注意する。

・メンブランフィルターろ過 - フィルターへの吸着による損失の可能性があるので遠心分離ほど広くは提唱されていない。大量の試験水が要求される場合には、実用的な選択肢がろ過しかないこともある。十分な分離を行なうには、孔径 0.22 から $0.45 \mu\text{m}$ のフィルターが適切であろう。フィルターの基盤は、不活性物質（被験物質と化学的、物理的に反応を起こさない物質）であった方がよい。溶液中の毒性物質が残留し、汚染している可能性もあるので、フィルターを使用前に蒸留水で洗浄する。吸着は、適切な濃度に調製した被験物質溶液で事前にフィルターを前処理しておくことで、かなり抑制できるかもしれない。揮発による損失の可能性があるので、真空よりも加圧下でのろ過が望ましい。

用いた分離技術については、その正当性または有効性を必ず試験報告書の中に記載する。これらの分離技術は界面活性剤を含む溶液には適用できない。

難水溶性物質の水溶解度測定は、測定自体が難しい場合が多く、その値には不確さを伴う場合もある。暴露濃度が信頼性の高い上限濃度であるかを特定するのが不可能な場合もある。そのため、暴露濃度が“報告されている”水への溶解度を超えていても、必ずしも無効というわけではないが、個別の検討を要するとしている。

3.1.2 飼育水調製法

難水溶性の物質に対する試験水の調製には、4つの方法が用いられてきた。ここには、直接添加、水混和性溶剤、溶出装置、分散および乳化という一般的な用語で表されている。

実験室内で測定した安定性は、試験系内とは大きく異なる場合があることについても注意を要する。

直接添加

直接添加とは、文字どおり水に被験物質をそのまま添加するという意味である。通常は、物質が確実に水層中に分散し溶解するように、水と物質を混合することが必要である。それゆえ直接添加の効果は、粘度や密度といった物質の性質にあった適切な混合方式を利用しているかどうかによって決まる。以下に挙げる混合技術は、下に行くほど強度を増すものである。実際によく使用する汎用機器の名称と方法を矢印で示した。

- ・ 低エネルギー攪拌 スターラーなどによる低速攪拌
- ・ 強力振とう 振とう機などによる激しい振とう
- ・ 混和 ブレンダーなどによる攪拌
- ・ 均質化 / 高破碎混合 高速回転ホモジナイザー / ミキサーなどによる攪拌
- ・ 超音波処理 超音波発振機の溶液中への浸漬 / 超音波洗浄機内への容器浸浴

攪拌では、最大溶解度に達する時間として 48 時間が妥当であると考えられるが、6 週間攪拌すれば、もう少し高い濃度が得られるかもしれない。

超音波処理は 30 分でいいのではないかとされているが、少量の場合特に、溶液が熱くなり、安定性に影響を及ぼす可能性がある。

被験物質と水を穏やかに加熱することで、被験物質溶液をより速く作れることもあるが、試験結果を損なうような変化が被験物質や水に起こらないことに注意が必要である。

長時間攪拌したり、超音波処理をして温度が上昇すると、溶解度は増すかもしれないが、逆に溶存酸素濃度が低下するので気をつけた方がよいだろう。

直接添加法を用いるのは、設定濃度が水溶解度の 50% 以下のときに限るよう推奨している。ただし、非常に溶解度の低い物質を低濃度で試験する場合、非常に薄い溶液を大量に作る必要がある。少量の溶液を用いたときにその中に微細な粒子が含まれているかどうかは本質的に曖昧であるため、重量で直接添加することは難しい。

適量の被験物質を直接添加するのが、望ましい方法ではあるが、毒性の強い物質に対しては、実際上不可能である。一般的に、5~10mg 以下の量を十分な精度で計るのは困難で、設定濃度が 1mg/L 以下の試験溶液の調製は、希釈に 10L 以上の水を必要とすることになり、0.1mg/L の試験溶液では、100L 以上必要になる。そのように大量を扱うのは、実用的には不可能である。したがって、適切に調製した保存溶液の Water Accommodated Fraction (WAF, 3.11 節参照) を連続的に希釈するのが、毒性の強い物質に適用できる唯一の方法であろう。

溶剤

水混和性溶剤は、一部の難溶性の物質を溶解させるための媒体であり、試験希釈水への添加や混合をしやすくするための保存溶液用の媒体となる。特に、加水分解しやすい物質や粘性の高い物質に有用である。しかしながら、その使用は、被験物質との相互作用によ

って、試験時に別の反応を起こす可能性があるため、他に容認できる試験水調製法がない場合に限った方がよい。溶剤を使用する場合は、試験結果に対する影響があればそれについて、明らかにする必要がある、溶剤が混合物中の1つあるいはそれ以上の成分を選択的に溶解し毒性に影響を及ぼすことがあるような場合は、溶剤の使用は不適であると強調している。被験物質の原体の試験で、毒性のある不純物が選択的に溶解する場合も同様である。

溶剤の選択は被験物質の化学的性質によって決まる。水生毒性試験に有効であると分かっている溶剤には、アセトン、エタノール、メタノール、t-ブチルアルコール、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド、トリエチレングリコールがある。一連の溶剤の物理化学的性質と水生毒性については、Tarr と Hutchinson (1992) および ECETOC (1996) によって検討されている。

アセトン、エタノール、メタノールの使用は止水式および半止水式システムにおいて細菌が増殖し、酸素の減少が生じることがあるので注意すべきである。断続的あるいは連続的流水式で行なう長期試験では致命的な酸素欠乏が起こらないように気をつける。

試験水調製には、溶剤を用いて被験物質の濃縮保存溶液を調製しておくことが推奨される。その後、一定量の保存溶液を適切な方法で攪拌しながら試験用希釈水に順次添加する。最終試験水中の溶剤濃度は、試験条件下で溶剤のために決められた毒性許容範囲を超えてはならない。試験生物種および毒性試験の期間/種類によって異なるが、最大無影響濃度 (NOEC) より最低1桁低い濃度、あるいはいかなる場合でも 100mg/L (または 0.1ml/L) 以下が勧められるレベルである。実際には、100mg/L (または 0.1ml/L) が一般に使用されている殆どの溶剤の最大濃度として妥当である。溶剤濃度 100mg/L は試験水中の被験物質の最大溶解濃度を著しく変化させることはなさそうである。

ISO (1997) では、混合後、水から除去可能な揮発性溶剤 (n-ヘキサンや石油エーテル) の利用についても言及している。揮発性被験物質が試験水から同時に除去されてしまったり、また溶剤が毒性のある残留物となったりする可能性があるため、この方法の適用は限られそうである。

水生生態毒性試験のための OECD ガイドラインでは、流水式でも技術的に可能であれば、全ての処理区において溶剤濃度が同じでなくてはならないことと、また同濃度の溶剤対照群を設け、生物を暴露させることが必要としている。

溶出装置

化学的に不活性な基質に被験物質をコーティングし、そこに水を通すことによって、難溶性物質が溶出し、水溶液を調製することができる。基質としては体積に対して表面積の割合が大きいもの (例えば軽石またはガラスビーズのようなもの) がよく、より多くの被験物質をコーティングすることができ、かつ被験物質を溶解させる面が大きくなる。基質を詰めたカラムを利用する方法については、Veith と Comstock (1975)、Gingerich ら (1979) そして Phipps ら (1982) によって報告されている。カラムから流出した水溶液を、直接あるいは一連の濃度区を作るために希釈して、試験に使用する。

半透過性メンブランダディスク（例えば Empore™）による溶出装置は，上記のカラム方式の代替法として使え，また，調製された試験水中には確実に溶解した物質のみが存在しているという利点がある。上部空間に設置したディスクを利用する方法は Ramos ら（1997）によって報告されている。

飽和溶液を作るためには，試験水を繰り返し再循環させて，カラムあるいはディスクを通す必要があるかもしれない。試験水を再度利用する場合にもまた，吸着や生物濃縮（生物蓄積）による損失を補うために再循環が必要となる。試験水を再度利用する場合は，溶解している有機物と被験物質が錯体を形成した結果，被験物質の測定総濃度が飽和濃度を超えることがある（Billington, 1988）。

複数の成分から成る物質や不純物を含む物質で，それらの溶解度が異なるものには，溶出装置は適していないと考えられる。溶解度が違えば，水溶性の高い成分が選択的にカラムあるいはディスクのマトリクスから奪われ，その結果水相におけるその物質の相対濃度が上がる結果となる。また，加水分解されやすい物質についても，得られた試験水の組成が時間の経過とともに変化しやすいので，溶出装置は適していない。溶出装置のもう 1 つの欠点は，大量の溶液を得ることが難しいことで，そのため，流水式で使用するには問題がある。

分散液と乳濁液

水に分散したり乳化したりする試験は，以下の理由で一般的には認められていない。

- ・ 毒性試験で観察される影響は，一般的には試験液中に溶解している被験物質の暴露濃度との関係で考察するのが最もわかりやすい。
- ・ 非溶解物質の存在は，暴露濃度の決定を著しく困難にする。
- ・ 試験水中に非溶解物質があると，試験生物に毒性とは関係ない物理的影響を与える可能性がある。

この規定には例外が 2 つある：

- ・ 分散あるいは乳化した状態で物質の毒性を決めるという規制当局の要求がある場合 - すなわち油分散剤，分散液または乳濁液として使用するよう処方されている農薬，シリコンポリマーの骨格を持つ一部の多荷陽イオンポリマーのように乳化し，乳濁液として放出される工業用薬品などの評価を行なうような場合。分散剤あるいは乳化剤の存在下での試験についてのガイダンスについては，該当する規制当局に問い合わせるのがよい。
- ・ 被験物質が，界面活性剤や洗剤のように本質的に水溶性の分散液あるいは乳濁液であるような場合。このような場合の最高試験暴露濃度は 1000mg 有効成分/L あるいは分散限界（相分離が行われる限界値）のどちらか低い方とする。

水と被験物質を物理的に混合するという単純だが適切な方法で，安定した分散，乳濁液を作ることができる時もある。物理的混合とともに溶剤を利用することもまた効果的で，特に被験物質が固体の時などは一旦溶剤に溶解させてから混合すれば有効である。分散剤

や乳化剤を使用すると、物理化学的相互作用によって被験物質の見かけの毒性に影響を及ぼす可能性があるため、通常は認められていない。どのような分散や乳化の方法を採用したとしても、毒性試験前には、被験物質の分解を引き起こす可能性がないかどうかチェックする。

試験生物の投入前において、分散液あるいは乳濁液は安定していなければならない。分散していない過剰な被験物質があれば除去する。試験計画書で特別に必要とされている場合以外は、例えば攪拌等によって被験物質を懸濁状態に保とうとしてはならない。試験期間を通して安定した分散液または乳濁液が維持できないようなら、半止水式を検討すべきである。

溶解していない被験物質が実験中に生物に物理的影響を与える可能性については、予測しておいた方がよい。魚の鰓膜への吸着、ミジンコの封入/閉じ込め、あるいは藻類試験における照明強度の低下のような物理的影響は、毒性を過剰推定することになり兼ねない。物理的影響が重大であると考えられる場合は、試験生物と水相との接触は維持しながら、非溶解物質からは生物を物理的に隔離する方法を検討すべきである（“疎水性物質”に関する3.9節参照）。

純粋な単一物質の分散液あるいは乳濁液を用いる試験においては、溶液中の被験物質の濃度で表わされるべきで、そうでないと毒性が過小評価されてしまうかもしれない。ただし、例外的な場合がある。例えば、ある種の界面活性剤や一部の荷電ポリマー、多くの脂肪族アミンのように、純粋な物質が水中でミセルや微小の分散液または大粒の分散液を作る自己分散型である場合、暴露濃度は希釈水に分散している被験物質の総量で表す。よって、暴露濃度をどう表すかについては、規制当局に相談することを勧める。溶解濃度は、水相から非溶解物質を分離処理した後の測定で近似値を知ることができる（3.1.1項参照）。

分散液あるいは乳濁液の毒性影響濃度は被験物質の溶解度限界ではなく、その物質の水相中の分散限界あるいは臨界ミセル濃度と比較した方がよい。

3.1.3 流水式暴露システム

室温で固体の物質は、水混和性溶剤に溶解したものを添加し、強力で攪拌してもなお、溶解度限界に到達するのに非常に時間がかかることがある。そのため、飼育水への添加に溶剤保存液を用いた流水式では、被験物質濃度が平衡に達するまでに十分な時間がない。このような場合には、一連の容器に24時間あるいは必要ならそれ以上の時間おいた試験溶液を事前に準備しておき、それらを各試験容器に直接ポンプで送り込むことのできるようにするのがよい。このような方式は金属類には適さないことに気をつけておいた方がよい。

3.1.4 金属および金属化合物を試験する際の飼育および試験水に関する検討項目

無脊椎動物や植物、藻類の飼育・培養および試験に用いる水の中には、栄養的に必要な銅、亜鉛、ニッケルなどのいくつかの必須成分が含まれている。栄養所要量は、生物の馴化歴に依存するため、生態学的に妥当な培養条件が必要である。したがって、試験結果が

金属や金属化合物の毒性を正しく反映していることを確認するため、培地および試験水の組成を特に考慮に入れる必要がある。

3.2 水溶解度限界において急性毒性のない物質

試験水中での被験物質の最大溶解度、つまり飽和濃度は、例えば OECD ガイドライン 105 によって定められているような本質的な水溶解度とは異なることがあるということを認識しておく必要がある。低くなるのが通例である。規制目的のために測定される水溶解度は通常、蒸留水 (pH = 6~9) におけるものであり、試験水 (pH = 7~8) におけるものではないということ、試験水と蒸留水の pH の差は溶解度に影響し、特に pKa5~9 のイオン性物質に影響することにも注意すべきである。

飽和濃度における物質の毒性を評価する場合は、この濃度を達成するために最善を尽くしたという証拠を提供することが重要である。この証拠には以下のようなことが含まれる。

- ・ 試験水の調製方法が被験物質濃度を最大にできるということを実証する予備実験の報告 (3.1 節 “難水溶性の物質” 参照)
- ・ 試験に用いる飼育水調製方法の記載
- ・ 水溶解度の明記
- ・ 飽和濃度の評価

影響濃度は、飽和濃度と同じかそれより低い場合にのみ測定できる。もし飽和溶液を用いた試験で影響が認められなかったら、飽和において毒性はないという結果が報告される。ただし、飽和濃度で急性毒性影響がなかったからといって、飽和あるいはそれより低い濃度で慢性影響がないと予測する根拠として用いることはできない。飽和濃度で化学物質の急性毒性影響がないと予測される場合は、当局に相談することを推奨している。時には急性毒性試験を省略して直接慢性毒性試験に進む方が望ましいこともある。

3.3 低濃度で毒性を有する物質

被験物質を少量添加するためには、保存溶液を連続的に希釈する方法がある。保存溶液は水あるいは適当な水混和性溶剤を用いて調製する (3.1 節参照)。被験物質を確実に試験水中に均等に溶解させるには、効果的な混合が欠かせない。

暴露濃度は分析により確認し、安定性が実証できるのが理想である。放射性物質で標識した被験物質を使用すれば、極低濃度の分析も可能となるが、その合成、取り扱い、分析には相当の追加費用がかかる。暴露量を測る適当な分析法がない場合は、暴露濃度が確実に設定値と一致するように、半止水式換水あるいは流水式の方式を採用する必要があるだろう。

暴露期間を通して測定濃度が著しく低下した場合は、基本的に幾何平均値で影響を評価する。ただし、暴露中にいくつかの損失過程 (例、沈殿) が非常に速やかに起こり、比較的早く平衡状態に達することがある。この場合には、低下後に測定された濃度の中央値の

方が、平均値よりも適切であろう。暴露期間の終わりにおける測定濃度がない場合や被験物質が検出されなかった場合は、試験の有効性を再確認しなければならない。平均暴露濃度算出には、物質が検出されなかった場合は測定法の検出限界を最終濃度とする。物質が検出されたが定量されなかった場合は、測定法の定量限界値の半分とするのがよいだろう。測定濃度の平均値を決定する方法はいろいろあるので、選択した方法を試験結果の報告の中に明記する。

3.4 揮発性物質

物質の蒸気圧 (v_p) やヘンリー定数 (H) は蒸発によって物質が大気中に奪われる可能性を決定する重要なパラメータである。

蒸気圧とは、物質の凝縮相と蒸気相間の平衡の単位である。蒸気圧が水生毒性試験と関連を持つのは、試験水表面の非溶解被験物質が大気と接している場合である。この状態で、被験物質が蒸気相へ移行すると、溶解相と非溶解相間の平衡が変化し、水の組成が変わる。このルートでの被験物質の水からの損失の程度は、理想気体の性質と系の温度と圧力における物質のモル容量を想定し算出することができる。

ある物質のヘンリー定数とは、理想的溶液相と蒸気相間の平衡の単位である。つまりそれは、物質が蒸発によって溶液から失われる可能性の単位である。ヘンリー定数は分子量 (MWt , g/mol), 溶解度 (S , mg/L), 蒸気圧 (v_p , Pa) を用いてその関係式から推定できる。

概算だが、仮に H が $100 Pa \cdot m^3/mol$ より大きければ、物質の 50% 以上が 3~4 時間で水相から失われ得る (Mackay, 1992)。しかし、試験システムにおいて、主として試験容器の大きさや形、深さ、飼育水の温度、エアレーション率などの他の因子が損失率に影響を与え得る。ヘンリー定数が $1 \sim 10 Pa \cdot m^3/mol$ の物質では、水/空気の交換度が高い強力攪拌状態で、揮発による重大な損失が起こり得る。

試験水の調製時や暴露期間中の揮発性物質の損失は、実験方法に比較的簡単な改良を加えることで最小限にとどめられる。一般的には、調製および暴露中は試験容器を密閉し、容器の上部空間を最小限に保つことである。同様に、試験濃度は、できれば保存溶液を希釈するより試験容器に直接被験物質を添加して個々に調製する方が良い。暴露濃度の分析が不可能な場合は、上部空間のないシステムを利用する。密閉した容器に揮発性物質 (必要なら、水混和性溶剤に溶解した) の濃縮溶液を分注するためには、シリンジポンプを利用してよい。分析のために集められたサンプルは上部空間のないバイアルに入れる。

適切な暴露システムの選定のために、以下の手順に沿った段階的アプローチを勧める。

1. 開放システム, 換水なし, 暴露濃度は分析で測定
2. 開放システム, 半止水式換水, 暴露濃度は分析で測定
3. 開放システム, 流水式換水, 暴露濃度は分析で測定
4. 密閉システム, 半止水式換水または連続的流水式, 上部空間あり/なし, 暴露濃度は分

析で測定

5. 密閉システム，半止水式換水または連続的流水式，上部空間なし，暴露濃度は設定値

システムの選定にあたっては，できれば，実験期間を通して被験物質を分析的に定量でき，濃度が維持できることを目標に決定する。

理想としては，最大暴露濃度は物質の水溶解度を超えないようにする。それ以外では，3.1 節“分散，乳濁液”および 3.11 節“多成分物質”の記載事項と合致しなければならない。

個々の試験に関して以下のようなコメントが記載されている。

- ・ **魚類試験**： 密閉容器では水中の溶存酸素量が減少する。溶存酸素量をガイドラインの推奨値内に維持するためには，魚のサイズも推奨範囲内で小さいものを用いたり，試験水量の増加，純酸素の通気，換水頻度の増加（半止水式あるいは流水式）などを考慮すべきである。流水式試験の投与システムが Mount と Brungs(1966) や Benville と Korn(1974) によって報告されている。
- ・ **ミジンコ繁殖試験**： 21 日間のミジンコ繁殖試験では，試験容器の開放回数を最少限にするため，産仔の除去と試験水の換水を同時に行なわなければならない。試験容器の大きさが十分で，試験水を比較的頻繁に，例えば毎日交換していれば，溶存酸素量の減少は一般的には問題にならない。ミジンコ慢性試験のための流水システムについては，ASTM (1997), Diamantino ら (1997), Sousa ら (1995) あるいは US EPA (1996b) などの文献中に記述されている。
- ・ **藻類試験**： 高揮発性物質の藻類生長阻害試験を完璧に実施することは技術的に非常に困難で，そのため得られた結果は解釈が難しく，現実の状況にあまり即しているとも言えない。藻類生長阻害試験に関するガイダンスを ISO(1998) が示している。この試験において密閉方式を使用すると，CO₂ の減少や pH の上昇で生長が限界に達してしまう結果となる。したがって，接種細胞密度を下げたり，試験水にさらに炭酸ナトリウムを添加するなど考慮に入れるべきである。代わりに，上部空間をなくしつつ CO₂ の供給を維持することができる流水式も考えられる。このような方法は，Tjeerdema と Singer (1991) によって開発されたが，国際的にあるいは各国で合意されたテストガイドラインの中にはまだ記載されていない。Halling - Soerensen ら (1996) は，CO₂ を充填した上部空間を用いた揮発性物質の試験システム，Mayer ら (2000) は，完全に密封し気相をなくし，代わりに炭酸水素ナトリウムを加え塩酸で pH 調整するという方式について記述している。どのような方式が採用されようと，試験開始前に対照となる藻類の生長が許容範囲に達していることが必要である。また，結果が従来法の結果と一致することを確認するために，対照物質を用いた試験を行い，同時に報告する方がよい。

3.5 試験システム内で分解する物質

被験物質が不安定な場合は、元となる親物質か、同定されていれば分解産物か、または両方を試験に用いるのか、これら判断の一つに、試験条件下ならびに実場面でのその物質の半減期に基づく方法がある。以下の判断基準は、止水式または換水期間 24 時間の半止水式試験について、単なる指針として提案したものである。

- ・半減期 >3 日 - 親物質を試験する。
- ・1 時間 < 半減期 < 3 日 - 個別に検討し、分解産物の試験の可能性も含む
- ・半減期 < 1 時間 - 分解産物を試験する

これらの基準は、“暴露濃度の維持に関する問題は、流水式試験よりも止水式または半止水式試験で顕在化することが多い”という仮定に基づいている。止水式あるいは半止水式試験では、調製後 24 時間で初期濃度が 20% 損失すれば、半減期は約 3 日となる。したがって、半減期が 3 日未満と短くなれば、結果的に 24 時間で暴露濃度が許容以下まで低下し、分解産物が蓄積する可能性が生じる。

分解産物と親物質の両物質での試験は、目的と規制による。

予備毒性試験で、試験生物が初期に影響を受け、その後回復するという結果が出た場合は、親物質が分解産物より強い毒性を持つことを示している。その場合は、たとえ暴露濃度がガイドライン推奨範囲に維持することができなくとも、親物質の毒性を判定する方がよい。規制によっては親物質の毒性の判定が必要とされていることにも留意する。

分解産物の試験は、通常は、予備試験あるいは(Q)SAR 分析の結果、相当の毒性があるまたは他の関連する性質（例えば、分解性が低いか、分解性が全くない）を持つことを示した場合にのみ必要とされる。分解産物の水生毒性は、親化合物を分解させ、その後、その分解産物を含む飼育水で試験生物を暴露することによって測定できる。一般的には、親物質の保存溶液または試験溶液を半減期の 6 倍の期間放置すれば、飼育水には分解産物しか含まれていないのはほぼ確実である。分解物質溶液の pH は試験前に対照飼育水の pH と同じに中和しなければならない。

非分解および分解溶液から得られた結果は、まず溶液調製に用いた親物質の濃度を基に比較する。この方法で、親物質と分解産物の相対的毒性を評価できる。次に、試験結果の解釈をしやすくするため、分解産物の同定と定量が必要となるかもしれない。

分解産物を用いた魚類試験においては、物質の化学的安定性および濃度の安定性と同様に水質も考慮して、換水法を選定する必要がある。分解産物が同定された場合は、それらの毒性を別に測定する方が望ましいかも知れない。分解産物の試験では、その濃度を測定するための分析方法が必要で、親物質の分析方法とは異なる場合もあろう。分析に用いるサンプルは、分析前および分析中に分解がさらに進むのを防ぐために、適切な方法で保存した方がよい（適宜、前処理が必要）。

流水式システムを設計する際に役立つ基準として、“半減期 4 時間の物質は 24 時間で 6 倍量の換水を行なうシステムを用いれば設定濃度のおよそ 50% を維持することができる”というものがある。したがって、設定濃度に近い濃度を維持する必要がある場合は、24 時間で 6 倍以上の換水を行なう流水式システムが必要となる。

不安定物質の暴露方式および試験容器の選定は、揮発性物質について示した段階的アプローチ（3.4節参照）が適用できる。分析により定量し被験物質濃度を維持できるような適切なシステムを選択するべきであろう。

3.5.1 光分解

魚やミジンコの短期急性試験における化学物質の光分解は、暗くした環境で必要なら赤色灯を用いることで減らせる（ISO, 1997）。光分解の原因となる波長を特定し、選択的に除去できる場合もある。長期の慢性毒性試験中、完全な暗所で試験を行なうことは生物の通常の行動を攪乱し別のストレスを与える可能性があるため勧められない。

藻類試験では次の2つのうち、1つの方法を用いて親物質の毒性を決めることができる。

- ・ 光合成に必要な波長を保持しながら、光分解の原因となる光の波長を光源から選択的に除去する方法である。ただし、多くの場合、原因となる波長についての情報はないので、この方法は使えないことが多い。UV スペクトルはあっても、分解を引き起こす特定の波長が特定されていることはまずない。また、ほとんどの場合、光分解を起こすのは高エネルギーの波長で、そのような波長はホウケイ酸ガラス製のフラスコを通過しないことも考慮に値する。この方法を検討する場合、藻類の試験は十分な光（緑藻種に対してはおよそ $100 \mu\text{E} / \text{m}^2 / \text{s}$ ）の下で行なわれなければならないということを認識しておくことが必要である。光分解の原因となる波長を除去するためにフィルターを用いる時は、光合成に必要な光の減少分を補正するために照度を高める必要がある。照度条件が容認できる藻類の生長を維持できるということを証明するために、試験設計には適切な対照群が含まれていなければならない。
- ・ 2つ目の方法は、暴露を暗所で行い、引き続き照明下で試験を行なうことである。この場合、試験結果の解釈は、親物質に殺藻作用があるかどうかという直接的なもののみとなる。なぜなら、一旦光を照射すると、親物質と分解中間物質の両者が影響を及ぼす可能性があるからである。

しかし、これらの方法にも問題はある。代わりに、非生物実験を行い、続けて、対照区で藻類試験を行う、つまり、非生物対照区に藻類を適宜（または試験と同様に）接種するという試験法が提案されている。

光分解性物質については、流水式システムの利用も考慮に入れることができる。この場合、保存溶液の光分解を抑制することと暴露容器内での分解を最小にする適切な流水率を選定することが必要である。

3.5.2 加水分解

親物質の暴露濃度を最大にするには、試験水の調製時間を最小限にするようにする。物質を試験水に直接添加し、素早く溶解させる方法を組み合わせる。保存溶液が必要な場合は、試験容器に添加する前の加水分解を最小限にするために、非反応性水混和性溶剤を用いて調製する（3.1.2項）。

高濃度で加水分解を起こし、ポリマーを形成する物質（例えばアルキルオキシジルオキサンやイソシアネート）については、試験生物や器具に絡み付く可能性があるため、流水式暴露システムは適切でない。これらの物質は暴露容器に直接添加し、強力で混合する。試験生物は、被験物質の添加後、対照生物の健康を維持するのに必要な時間、例えば10分以内にできるだけすばやく安全に入れる。もし強力で混合した後でも均一に分散するほど物質が溶解しない場合は、まず非反応性溶剤中で希釈し、その後暴露容器に直接添加して混合する。この場合も、試験生物はできるだけすばやく丁寧に入れる。

ポリマーを形成する物質の加水分解産物の溶液を調製するには、容器に水を途中まで入れ、急速に攪拌しながら、非常にゆっくりと物質を添加する。いったん物質を添加したら必要量まで水を補充して加水分解が完全に行なわれたことが確認できるまで続けて攪拌する。この手法によって、ポリマーを形成することなく加水分解産物の溶液を作ることができる。

温度や pH が物質の加水分解速度に影響を及ぼすこともある。そのため、親物質の暴露濃度を最適にするためには、これらのパラメータを許容範囲内で調整することもある。加水分解速度に及ぼす pH 影響の大きさを測定し、その結果を考慮し（必要ならば）試験時の分解産物生成条件を特定する。分解産物の試験は通常の試験水の pH で行なう。

3.5.3 酸化

酸化を受けやすい物質は“還元剤”に相当し、その分解は非生物学的な変化であり、結果、毒性に影響を及ぼす可能性がある。また、水中での酸化により水中の溶存酸素量が減少し、水生生物にとって必要な酸素濃度の低下を引き起こす。酸化は酸素が存在する水中では防衛できず、酸素を除去すれば酸化を抑制できるが、魚や無脊椎動物などは生息できない。

暴露方式の選定も溶存酸素量を試験の許容範囲内に維持できるかによって決まる。酸素濃度は、エアレーション、試験水の増量、生物密度の削減、換水頻度の増加によって、維持可能である。ここでは流水式が適当であることが多いとしている。酸化防止も目的であり、エアレーションは通常考え難いので、問題が親化合物である場合などは、流水式が妥当と思われる。その場合の保存溶液は、試験水中に添加されるまでは無酸素状態（例えば窒素封入など）として酸化を防止する。この他にも低温保存なども考えられよう。

3.5.4 生分解

易生分解性物質は、試験システムにおいて一旦、当該物質の分解菌が発生すると、分解が促進され、暴露濃度の維持は微生物群の増殖を抑制するか否かにかかっている。暴露開始から暴露期間中にわたり容器を清潔にしておくことで、分解細菌群の増殖を制限することはできるが、完全防衛は不可能である。ここでは以下のようなことを推奨している。

- ・水の換水などでは古い飼育水の移入は最小限とする。
- ・試験容器を入念に清掃する。できれば換水時に滅菌することも重要である。
- ・抗生物質の使用は控える。使用する場合は、試験委託者および試験実施者はその正当性を明らかにする。試験設計には抗生物質対照区も加える。

- ・十分な量の換水を行う。

その他に、好氣的生分解を防ぎ親物質の暴露濃度を維持する暴露方式として、高濃度の保存溶液を窒素下で維持した流水式をあげている。また、衛生状態を保てば、暴露システムの表面に細菌群が大量発生するのは防げる。無菌状態で実施することは現実的ではないため、衛生状態を保つには頻繁な洗浄を行うことと理解できる。分解微生物の増殖により溶存酸素濃度が低下する場合もあるので、特に魚類の試験では注意が必要である。また、半止水では、生物の移し替えなどでも一旦、新しい試験水を通してから移し替えるなどすれば抑制効果はあると思われる。

3.6 吸着性物質

暴露システム（装置、管、容器など）の表面（内壁）や水中の有機物質への吸着は、通常は被験物質濃度が低い時（例えば $< 1\text{mg/L}$ ）に起こりやすい。吸着のメカニズムとして以下の点をあげている。

- ・容器（通常はガラス製）表面の水酸基との水素結合あるいはイオン結合。これらを介して被験物質と容器が吸着。ガラス表面は負に荷電した水酸基を出し、例えば、陽イオン界面活性剤のような物質と結合する。
- ・ Ca^{2+} や Mg^{2+} のような2価の陽イオン物質によって塩橋（salt bridge）が形成されるが、これは陰イオン性物質と結合する。
- ・藻類細胞のような負に荷電した生物材料は、上記と同様のメカニズムで吸着を誘導する。

吸着を減らすために検討すべき項目として以下のような方法がある。

- ・試験水量に対する表面積の割合の低下。
- ・半止水式あるいは流水式試験における換水頻度の増加。
- ・ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）等の非吸着性材質を用いる。
- ・高吸着性材質の使用を避ける（特に、ゴムとポリエチレンは使用しないこと）。
- ・被験物質溶液による容器のコンディショニングを事前に実施（注：コンディショニング時の被験物質濃度は試験濃度を超えないこと。暴露期間中に物質が脱着して暴露濃度が高くなってしまふことがある。流水式では濃度が平衡状態に達していることを、例えば最低2日間の事前運転で確認する。）
- ・シラン処理剤（例えばクロロホルムあるいはヘプタンに溶解したジクロロジメチルシランの5%溶液）を用い、試験容器を事前にコンディショニングする。（注：シラン処理剤の多くは毒性が高いので、使用前に残留物が除去されていることを確認するよう十分に注意する。水で繰り返し濯ぐ、あるいは2時間180℃で焼く方法が推奨されている（ISO, 1997）。メタノールのような有機溶剤で濯いでもよい。）
- ・特殊な試験を行う場合を除き、急性試験での溶存有機炭素濃度（被験物質に由来する以外の）は、 2mg/L 以下に維持する。

- ・ 給餌後は試験容器から余分な餌を取り除く。
- ・ 半止水式試験では、給餌は試験水の換水の数時間前に行なう。
- ・ 止水式の代わりに半止水式あるいは流水式の暴露方式を用いる

ガラスに吸着するような物質は、通常は極めて疎水性であるので、分析のサンプリング用容器は、前もって少量（50ml のサンプルを摂取する場合、通常 10～20ml）の例えばヘキサンのような非水溶性溶剤で処理しておけば、被験物質はガラス壁よりも溶剤相へ分離しやすいので、物質の吸着を防ぐことができる。

藻類毒性試験での藻体への吸着影響は、接種時の藻類濃度を下げるか、暴露時間を短くするなどして藻体量を減らすことにより、軽減できる。

試験結果は通常、測定濃度で表す。陽イオン物質の分析方法では、被験物質が結合型か遊離型かを区別することはできないが、それでも測定濃度で表す。一部の規制に適合させるためには、溶存有機炭素への吸着によって陽イオン物質の毒性緩和作用を調べることが必要とされる場合もある。この点については付録 3 で簡潔に触れている。

3.7 錯体形成物質

錯体形成は被験物質の生物学的利用能及び毒性に重大な影響を与える。それはまた、試験生物を健康に維持するのに不可欠な塩類（カルシウム塩やマグネシウム塩のような）や微量元素量を低下させる可能性がある。以下は錯体形成に関わる物質の例である。

- ・ EDTA
- ・ カルボン酸とリン酸を持つ陰イオン系ポリマー
- ・ リン酸塩
- ・ 金属

物質の錯体形成の程度は、補錯体化剤の利用能や pH のような水中の特性に依存する。設定濃度から溶解している被験物質濃度と錯体形成している被験物質濃度を算出するには、分化モデルを用いることになる。

錯体形成が結果に重大な影響を与えたと判断された場合、そこから得られたデータが、物質の分類やリスク評価のための予測影響濃度を推定する際に、意味を持つのかどうかは疑問である。化学物質による毒性が直接得られたものなのか、あるいは例えば錯体形成によって起こった栄養欠乏による二次的影響であるのか、その程度を可能であれば判定すべきであろう。水質パラメータを補正的に調整するか、あるいは適当な被験物質の塩があればそれを試験に用いるなどすれば、有効な試験結果を得るための手助けとなる。ただし、標準手法に修正を加える場合には、プロトコルに関して該当する規制当局によって許可、承認を受ける必要がある。

藻類生長阻害試験における金属錯体物質の影響は、主に必須陽イオンがキレート形成し、錯体未形成の生理的活性イオン濃度が減少し生長を制限することによって起こる。したが

って、金属錯化剤による藻類生長阻害は二次的影響であり、物質固有の本質的毒性によるものではない。二次的影響は、必須イオン濃度の不足分を補えば除去することができる。多価金属と錯体および/あるいはキレートを形成する化学物質の藻類に対する毒性緩和試験に関するガイダンスを付録4に示している。

暴露濃度を測定する上で、被験物質の錯体形成成分画と錯体非形成成分画との区別ができる分析方法がなかったり、経済的でなかったりすることがある。このような場合は、試験結果を設定濃度に換算して表わすことに関して、規制当局の承認を得た方がよい。

試験水および自然環境中の有機・無機リガンドに対する金属錯体形成は、金属分化モデルにより推定できる。pH, 硬度, DOC, 無機物質などを含んだ金属分化モデル, 例えば MINTEQA (Brown and Allison, 1987), WHAM (Tipping, 1994) および CHESS (Santore and Driscoll, 1995)などは、金属イオンの錯体形成成分画と錯体非形成成分画を計算するためのモデルであると紹介している。一方、生物リガンドモデル(BLM)は生物レベルでの毒性影響を調べるための金属イオン濃度計算用モデルである。BLMは現在、僅かな金属、生物、指標について有効性を確認中である(Santore and Di Toro, 1999)。媒体中での金属錯体形成の特長を調べるモデルや公式は、自然環境に立脚した時でも解釈が可能なように常に明確に報告されるのが望ましい。

3.8 着色物質

水生毒性試験の主な目的は、物質の本質的な毒性を判定することである。着色物質には、藻類試験やミジンコを用いた試験で本質的な毒性を判定するにあたって特有の問題が発生する。また、魚類試験では、魚の行動や死亡の観察がしにくくなる。

藻類試験

着色物質は光を吸収するため、藻類の光合成活性および生長を抑制する可能性がある。吸収量は被験物質濃度に比例し、その結果、被験物質の本質的毒性による影響との区別が困難となる。

着色物質の藻類に対する毒性を本質的に判定するには、明確なガイダンスが必要であることが広く認識されており(EC, 1996a), その作業が進みつつある(Justesen と Nyholm, 1998)。国際標準化機構(ISO, 1997)は本質的な毒性と光減衰による影響を区別するために以下のような一般的な方策を提示した。

- ・ 生長率は光飽和量以上では光強度とはほとんど無関係なので、強度を変えて試験を行なう。着色物質により光が減衰されても、それ以上照射すればよいという考えがある。
- ・ 試験液の深さまたは液量を減らすことによって光路を短縮する。
- ・ 対照群において、例えば色や層の厚さが試験液の濃度に相当する液を入れたシャーレ様の液体光透過フィルターに光をあらかじめ通し、細胞増殖の減少を測定する。
- ・ 暴露濃度群と反対に希釈調製した光透過フィルターを用いて、全濃度の光路長が同じ(一定)になるようにし、サンプルのスペクトル吸収特性を維持する。

なお、後者2つについては注意書きがあり、外部フィルターの使用は、外部吸収法を用いるよりも試験容器内の光条件が着色物質によって複雑に影響を受けるので疑わしい点があるとしている。代わりに内部光吸収を補う培養系に変え、影響を減じるとよいとし、実際は、光路を短くし、光強度を増加し、適度な攪拌を維持することで行えるだろう(Justesen and Nyholm, 1998)としている。

上記の特色のいくつかを取り入れて開発中の Memmert (1994) と Comber ら (1995) の具体的な方法も報告されているが、適用実績が限られており、現段階では承認することはできない。

注にもあるように、光路を短くし、光強度を増加し、適度な攪拌を行い、条件を決定するのがよいと思われる。その際にガイドラインで推奨されている光条件の範囲から外れる場合があれば、関係当局と相談し、進めていくことが必要と思われる。

植物試験

浮遊性の植物ウキクサ (Lemna Sp.) を用いた試験は、水中からの光照射がなくても試験には問題ないので、着色物質の藻類試験の選択肢となり得る。レムナ種を用いた生長阻害試験は OECD テストガイドラインで現在準備中であるが、藻類生長阻害試験と同等と考えてよいとはまだ認められていない。

無脊椎動物試験

ミジンコのような小さな無脊椎試験生物の観察は、着色が濃い試験水中では難しい。試験容器をライトボックスの上に載せたり、試験容器の中身を数えるときは浅い容器に移すと観察しやすくなる。

3.9 疎水性物質

オクタノール/水分配係数 (log Kow) が 4 以上であったり生物濃縮係数 (BCF) が 500 より大きい疎水性物質は、試験系の中で、試験生物 (バイオマス) や餌あるいは他の有機物に分配されやすく、損失も大きい。通常、log Kow が大きいことは水溶解度が低いことと関連しており、分配は重要な損失過程である。

難水溶性物質の試験水調製法については 3.1 節で論ぜられている。急性毒性試験に用いる試験水中の疎水性物質の濃度を維持する策には以下のようなことが示されている。

- ・試験水量に対する試験生物量の割合を下げる (魚の試験では 1g 未満/L)
- ・半止水式あるいは流水式を用いる。
- ・半止水式および流水式では、換水頻度や換水率を増やす
- ・過剰の餌や有機堆積物を除去する。
- ・急性試験では、溶解総炭素量濃度 (被験物質由来のもの以外) を 2mg/L 以下に抑える
- ・半止水式試験では、給餌 (例えば魚の) を換水の数時間前に行う

- ・物質がシステムの表面に貼りつかないように表面を物質で飽和させておく

藻類試験での濃度分析は、被験物質が藻体（バイオマス）に分配される可能性を考慮に入れる必要がある。相当量の分配が予想される場合は、試験水から藻類を分離後、暴露濃度を定量するのが適切であろう。分離には遠心分離やろ過があるが、どちらも 3.1.1 項で述べたような条件がつく。

水面に浮かんだ疎水性物質の被膜は、例えばミジンコのような小さな水生無脊椎動物を物理的に封入してしまう。したがって、試験生物を入れる前に被膜を取り除くか、あるいは生物と接触しないような策を講じねばならない。防ぐ方法については Dean と De Graeve（1986）によって報告されている。

疎水性物質と吸着性物質では多くの類似点があるので、3.6 項を参照のこと。

3.10 イオン性物質

有機酸及び塩基の中には pH 変化を比較的少なくしても解離型と非解離型のバランスが著しく変わってしまうものがある。解離平衡の変化は、水溶解度や分配係数、そして生物利用能や毒性にまで有意な影響を及ぼす。それゆえ、実験を開始する前に適切な解離定数（pKa 値）を知っておく必要がある。

毒性試験の設計では、pH 調整による解離平衡への影響を考慮しなければならない。被験物質の pKa が通常の pH 範囲内にある場合で、被験物質が 2 つあるいはそれ以上の型で異なった毒性を持つかの可能性を判定するためには予備試験をした方がよい。本試験は、対照区の生物の健康が維持される範囲内で、毒性の高い方の化学形態を生じる pH で行なうべきであろう。

物質自体が試験水の pH を変化させてしまう場合は、酸やアルカリその他の適当な緩衝剤を用いて試験の指定範囲内に pH を収めるように調整する。緩衝剤の利用は試験結果 - 特に藻類の試験結果に影響を与える可能性があることを注意した方がよい。さらに、被験物質の沈殿および / あるいは分解も起こるかもしれない。使用する緩衝系は、いずれも本試験で用いる前にその適性を評価すべきであろう。pH の調整は、試験水調製用の保存溶液で行なうか、あるいは試験水そのもので行なうか、適当と判断される方を選ぶ。いずれにせよ、対照区も含め全ての処理区に適用すべきであろう。

藻類の生長は、 HCO_3 イオンの消費によって pH の変化を引き起こすことがある。そのため、イオン化した物質を試験する際に安定した pH を維持することは、物質の解離型と非解離型の平衡が維持されていることを確認するために重要である。 HCO_3 イオン濃度の維持とそれによって pH の変動を抑える方策については 3.4 節で述べられている。

3.11 多成分物質

異なった溶解度と物理化学的性質を持つ個々の成分の複合物からなる混合物は、しばし

ば“複合混合物”と呼ばれる。それらはほとんどの場合、一定範囲の長さ/数の炭素鎖または置換基を持つ同族の物質（例、石油）と特徴づけられる。本ガイダンス文書では、これらを“多成分物質”と呼んでいる。多成分物質の試験水の調製および/あるいは試験方法は、設定試験濃度範囲において試験水に完全にあるいは部分的に溶解するかによって異なったアプローチが要求される。

完全溶解性

設定試験濃度範囲内で十分に溶解する成分から成る混合物には、水溶性物質について記載された試験方法が適切である。しかし混合成分にはそれぞれの性質（例えば分解性、揮発性など）があり、損失を抑えるための処置が必要となる。

部分的溶解性

多成分物質が完全には水に溶解しない場合、可能な限りその成分を特定し、それについて入手できる情報を用いて毒性を決定できる可能性を探ることが重要である。毒性が算出できない場合にのみ、多成分物質の試験を行うことを検討する。

水に一部分しか溶解しない多成分物質の毒性は、混合物のWAF（水に溶解した分画）を調製することによって判定することができる。WAFというのは、溶解している多成分物質の分画のみを含む水分画、および/あるいは安定した分散液または乳濁液として存在する水分画、に対して適用される言葉である。WAFを用いて得られたデータは実体として混合物に適用される。

水生毒性のための分類にWAFのデータを使用することに関しては、水生環境に有害な物質および混合物の分類のガイダンス文書（OECD, 2000）で言及している。WAFが適用できるかは、規制当局の目的次第であり、注意した方がよい。WAFで試験を行う場合、WAFから得られたデータが規制当局によって適当と認められるように、当該規制当局と協議する。例えば、多成分混合物中の難溶性の成分が懸念されている場合には、WAF法はそのような多成分物質の毒性を決定する方法としてはふさわしくない。

WAFは同一の保存WAFから連続的に希釈して調製するのではなく、個別に調製する。定量した多成分物質を直接水に添加し、水相において溶解及び分散あるいは乳濁化する成分が平衡濃度に到達するまで十分時間をかけて混合する。混合が終了したら静置し（相を分離するために）、水相すなわちWAFを試験のために抜き取る。混合と静置の持続時間は、通常予備試験を行なって決定する。

濁度測定や全有機炭素分析などの技術は混合と相分離の状態を知る上で有用である。石油製品やクレオソートのような製品のWAF調製法はGirling(1989)やTadokoroら(1991)によって各々記述されている。

WAFは定量した物質を試験水に注意深く添加し、適切な混合技術を用いることによって調製する。水混和性溶剤はWAFの組成を変えるので、調製期間中は利用しない方がよい。混合強度は、なるべく乳濁液を作らずに、しかもできるだけ素早く平衡化した試験水が得られるような条件を決めた方がよい。多成分混合物の中には本質的に分散あるいは乳濁液に

なるような傾向を持つものがあり、それはそれとして試験する必要があることに注意する（3.1.2項の“分散及び乳濁液”を参照）。

混合時間と強度が、WAFの構成、粒子の大きさ、分散物質と非分散物質の割合に影響を及ぼすことを認識しておくことが重要である。3.1.2節で述べられている溶出装置は、多成分物質の試験水調製法としては適当でない。WAF調製に用いた方法については、試験報告書の中に十分に記載し、その構成成分の経時的安定性が実証されなければならない。

一般的には、試験容器中に沈殿、凝集する不溶の被験物質があれば、例えば分離漏斗などを用いて試験水から除去した方がよい。同様に水面に被膜を形成する分画は、生物の封じ込めを防ぐために別の容器にそっと移す。試験容器中に過剰量の混合物を保持しておく必要がある場合は、試験生物を封じ込めたり、絡み付いたりするのを防ぐ手段を講じる（3.9節“疎水性物質”参照）。

WAFには、構成する多成分物質総量の一部だけが存在していることもある。それゆえ、要求される試験濃度範囲で十分に溶解していない、または、安定した分散・乳濁状態が完全に形成されていない混合物による暴露を表わすのに、“負荷率”が提唱されている（Girlingら、1992）。負荷率とは、一つのWAFを調製する時に用いる混合物と水の重量対容積比のことである。よって、WAFとは典型的な被験物質に対して用いられる“設定濃度”という用語とこの語に固有の制約も含めて類義語であると考えてよい。

WAF調製時の平衡到達および試験中の安定を実証するために、個々の化学物質の分析をする必要がある。構成成分の大まかな経時変化を確認できる方法が必要である。これには赤外/紫外スペクトル分析あるいは総ピーク面積法などが用いられている。全有機炭素分析もまた試験水からの被験物質損失をモニターするのに有用だが、この方法は感度が低く（約1mg/L）、適用制限があろう。

WAFを基にした試験の影響濃度は、(1)負荷率から算出され、LL50あるいはEL50として表される、および/あるいは、(2)WAF中の被験物質の測定値から算出され、LC50あるいはEC50値として表される。例えば、米国の規制当局は、被験物質の適切なリスク評価ができるように、後者の方法を要求している。LL50またはEL50値は、溶解度の範囲内で試験された純物質のLC50またはEC50値に相当する。同様に、NOEC(最大無影響濃度)は、NOELR(最大無影響負荷率)となる。LL50、EL50、NOELR値を決定するために用いる統計的手法は、LC50、EC50、NOEC値に用いるのと同じである。

3.12 調合品

調合品とは、物質を意図的に物理的に混合したものと定義されている。調合品の試験は以下のような場合にのみ行なわれる。

- ・各成分物質の毒性から調合品の毒性を算出できない場合。この場合は、調合品の毒性を算出できるようにするために、まずデータのない成分があればその物質の毒性を測定することを考える。
- ・算出された毒性を裏付ける具体的なデータが要求される場合。

- ・殺虫剤や殺生物剤の登録の際によくあるように、規制当局の要求がある場合

調合品全体の試験が要求される場合は、前述した多成分混合物のための試験方法を検討する。

一般的に、合金は、その独特の物理的および化学的性質が構成元素の単純な混合物とは異なっているため、他の調合品とは別に考えてよい。合金とは、顕微鏡レベルで均一な金属性物質で、2つ以上の物質が、機械的手段では分離することができない方法で結合してできている。多くの合金は溶解度が低いかまったくなく、多成分混合物で示したような方法は適さない。しかし、強化真鍮のような一部の合金が、水生生物に対し毒性を示すことは注意を要する。

4. 曝露濃度分析のための試験水サンプリング

水生毒性試験において利用する分析技術についての詳細な考察は、この文書の範疇ではない。それゆえ 4.1 および 4.2 節はサンプリングのスケジュールや方法を設計する際の指針を提供しているにとどまっている

4.1 試験水分析のためのサンプリングスケジュール

分析用試験水のサンプルを採集するスケジュールは、試験ガイドラインにも頻繁に記載されている。以下の事項は、ガイドラインに記載されている情報の補足および指針がないものについて指示を与えるために設計されたものである。

藻類、植物、ミジンコおよび魚類の試験における分析的な裏付けのためのサンプリングスケジュールについて、以下にその概要を記載する。これらは純物質の溶解度の範囲内で行われる試験にのみ対応している。試験困難物質では最小限のサンプル数のみで分析すると曝露濃度を十分に表すことができない危険がある。それゆえ一般的には、高頻度でかつ全濃度をサンプリングする予定を組むことが望ましい。場合によっては、サンプルを多目に採って、保存方法を十分に確立した上で、それらを保存してもよい。追加サンプルの分析は、最小限のサンプル数で（分析を）行なった結果、曝露濃度を評価するデータが十分に得られなかった場合に行なう。例えば、揮発による損失が予測されるような場合には、0時間目と試験中を通じ24時間毎の平均測定濃度を取ることを推奨する。流水式の曝露システムを選択した場合は、システムが安定しており、正常に作動していることを実証するために、試験開始時に分析用サンプルを採取しなければならない。

4.1.1 藻類生長阻害試験

濃度分析のために特別に調製した試験水は、試験と同じように、すなわち藻類を接種し、試験条件下でインキュベートして処理する。その後、被験物質濃度を決定するために飼育水から藻類を分離することが必要となる（3.9 節参照）かもしれない。規制当局によって、要求が異なることがあるので、規制当局に相談するのがよい。

暴露濃度が設定値の 80～120%以内にとどまっているような場合は、実験開始時および終了時に最高、最低と予測 EC50 付近の試験濃度を分析すれば十分である。実験開始時と終了時における全試験濃度の分析は、濃度が設定値の 80～120%以内にとどまっていないような場合に必要となる。試験困難物質の場合は、結局は全試験濃度の分析を実施することになる可能性が高いと思われる。

4.1.2 レムナ（ウキクサ）生長阻害試験

この試験は、止水式、半止水式あるいは流水式の暴露方式で行うことができる。

止水式

止水式は、7 日間の暴露期間を通して暴露濃度が設定値の 80～120%以内にとどまると予測される場合に適する。少なくとも、試験開始および終了時における最高、最低および予測 LC50 付近の試験濃度の分析が必要であると考えられる。

半止水式

半止水式は、試験期間（7 日間）を通して暴露濃度が設定値の 80～120%以内にとどまれないと予測される場合に推奨される。各換水期間の開始および終了時における最高、最低および予測 LC50 付近の試験濃度の分析が推奨される。試験中最低 2 回（例えば 3 日目と 5 日目）の換水を行う必要があると考えられる。

連続流水式

例えば、濃度が 24 時間で 20%以上低下すると予測されるような場合には、流水式が望ましいかもしれない。

流水式の条件下で、濃度が設定値の 80～120%以内にとどまりそうなら、試験開始、中間および終了時に最高、最低および予測 LC50 付近の試験濃度を分析する。濃度が 20%以上低下すると予測されるようであれば、試験開始、中間および終了時にすべての濃度を分析する。

4.1.3 ミジンコ急性遊泳阻害試験

暴露濃度が設定値の 80～120%以内にとどまっているような場合は、暴露期間の開始および終了時（通常 48 時間後）における最高、最低と予測 EC50 付近の試験濃度の分析で十分である。全試験濃度の分析は、濃度が設定値の 80～120%以内にとどまっていないような場合に必要となる。

ミジンコ急性遊泳阻害試験は、半止水式あるいは流水式でも行うことができるが、実用性および費用の面から、一般的ではない。OECD テストガイドラインでは、換水システムを推奨していない。

4.1.4 ミジンコ繁殖試験

この試験は、半止水式換水または連続流水式の暴露方式を用いて行われる。

半止水式

被験物質濃度が設定値の 80～120%以内にとどまると予測される場合は、試験期間中最初の週は新調製時と換水直前に、そしてその後は毎週 1 回、最高・最低と予測 NOEC / ECX 付近の試験濃度の分析を行なうことが推奨される。試験濃度が設定値の 80～120%以内にとどまらないと予測される場合は、全濃度の分析を行なうかあるいは流水式試験を用いることを検討する必要がある。

連続流水式

被験物質濃度が設定値の 80～120%以内にとどまると予測される場合は、試験期間中最初の週は 3 回、その後は毎週 1 回最高、最低と予測 NOEC / ECX 付近の試験濃度の分析を行なうことが推奨される。試験濃度が設定値の 80～120%以内にとどまらないと予測される場合は、試験期間中最初の週は 3 回、その後は毎週 1 回全ての濃度を分析する。

4.1.5 魚類急性毒性試験

この試験は止水式、半止水式換水あるいは連続的流水式暴露方法を用いて行われる。

止水式

止水式試験は、96 時間の暴露期間中、暴露濃度が設定値の 80～120%以内にとどまると予測される場合に適する。少なくとも、暴露期間の開始および終了時における最高、最低と予測 LC50 付近の試験濃度の分析が必要であると考えられる。

半止水式

半止水式換水方法は、試験水を 24 時間あるいは 48 時間間隔で換水することによって設定値の 80～120%以内に暴露濃度を維持することができる場合に推奨される。最初の 24 または 48 時間の換水期間の始めと終わりにおける最高・最低濃度及び予測 LC50 付近の濃度の分析が最小限必要であると考えられる。

連続流水式

連続流水式方式は 24 時間以上経過すると設定値の 20%以上濃度が低下してしまいそうな場合に推奨される。

流水式条件下で、測定濃度が設定値の 80～120%以内にとどまると思われる場合は、試験の開始時、中間および終了時における最高、最低と予測 LC50 付近の試験濃度を分析すればよい。また、濃度が 20%以上低下すると予測されるなら、試験の開始時、中間そして終了時における全濃度を分析する。

4.1.6 魚類延長毒性試験，魚類初期生長段階試験，幼魚生長試験，魚の胚・仔魚期にお

ける毒性試験

魚類延長毒性試験，魚類初期生長段階試験，幼魚生長試験，魚の胚・仔魚期における毒性試験が，このカテゴリーに分類される。これらの試験は半止水式換水あるいは連続的流水式の暴露方式を用いて行われる。

半止水式

半止水式換水方式は，試験水を一定期間毎に換水することによって暴露濃度を設定値の 80～120%以内に維持できるような場合に推奨される。最初の換水期の始めと終わり，それ以降は少なくとも毎週，最高，最低と予測 NOEC / ECX 付近の試験濃度の分析が最小限必要であると考えられる。

連続流水式

連続流水式方法は 24 時間以上経過すると濃度が設定値の 20%以上低下してしまうと予測されるような場合に推奨される。

流水式条件下で，測定濃度が設定値の 80～120%以内にとどまると思われる場合は，最初の週は 3 回，その後は少なくとも週 1 回の間隔で最高，最低と予測 NOEC / ECX 付近の試験濃度を分析しなければならない。濃度が設定値の 20%以上低下すると予測される場合は，最初の週は 3 回，それ以降は週 1 回の間隔で全ての濃度を分析する。

4.2 化学分析のための飼育水サンプル採取

化学分析用の試験水のサンプリングはそれぞれの固有の問題であり，それゆえ全てのケースに適用できる指針を与えることはできない。しかしながら，適切な方法を開発するためには以下のようなことを考慮することが重要であろう。

- ・ 特別に配慮するような物理化学的性質をもっているか。前述した試験困難物質の性質はサンプリングや分析にも当てはまるかもしれない。
- ・ 必要な精度および正確さで測定するためには，どれくらいのサンプル量が必要か。
- ・ 適切なサンプル量を得るために追加の試験容器を用意することが必要か。
- ・ どのようなサンプリング方法を選択し，どこの部分からサンプルを採取するのか。
- ・ サンプル採取時と分析時の間で許容できる間隔はどれくらいか。
- ・ サンプルは即時に固定あるいは有機溶剤で抽出する必要があるのか。
- ・ サンプルの保管は容認できるか，またもしそうなら特別な必要条件があるのか。

サンプルの採取と保管方法の正当性は，本試験で利用される前に立証されていないならぬ。

5 . 試験結果の算出と表現法

4章に記載されている手順により得られた、被験物質の設定濃度あるいは測定濃度のどちらかによって影響濃度を決定することができる。以下に、テストガイドラインに従って影響濃度を算出する際、どのようにこれらの濃度が用いられるかについての一般的原則を示した。

- ・ 止水式、半止水式及び流水式試験で濃度が設定値の80～120%以内にとどまる場合は、影響濃度は設定値あるいは測定濃度を用いて表わすことができる。
- ・ 止水式及び半止水式で濃度が設定値の80～120%以内にとどまらない場合は、影響濃度は測定濃度の幾何学平均を用いて決定し、表わす。幾何学平均を算出するための公式は付録2に記載されている。
- ・ 流水式で濃度が設定値の80～120%以内にとどまらない場合は、影響濃度は算術平均濃度を用いて決定し、表わす。
- ・ 影響を及ぼす濃度において、分析的方法では定量できない物質の試験では、影響濃度は、設定濃度で表してもよい。

数種の損失過程は非常に速やかに起こり、暴露中に比較的速く新しい平衡状態に達することがあるのに注意しなければならない。この場合には、低下後に測定された濃度の中央値の方が、平均値よりも適切であろう。これにはいろいろな方法があるかもしれないので、平均測定濃度を決定する方法については、試験結果の報告の際、明らかにしなければならない(3.3節参照)。

一般的には、試験結果は、なるべくすべて平均測定濃度で表すことを推奨する。一部の規制当局では、ある種の規制目的において、水溶解度限界以上で設定濃度を用いた毒性データを無効としている。測定値と設定値の両方を引用すると役に立つことが多いことにも留意する。

混合物を用いた試験において暴露を表現したり、影響濃度を決定したりするために用いられる慣例に関する指針は3.11節に記載されている。

付録 3

陽イオン物質の毒性緩和試験

溶存有機炭素への吸着によって物質の毒性が緩和されることがあるが、状況により、その程度を決定する必要がある。例えば、全有機炭素濃度が $< 2 \text{ mg/L}$ の希釈水中において、陽イオン物質が、中～高程度の毒性を示しているような場合である。毒性緩和試験は通常魚を用いて行なわれる。陽イオン物質と負に荷電した溶存有機炭素との反応によって形成された沈殿物によって鰓が詰まったり、覆われたりすることによって起こる物理的影響に魚はあまり敏感でない。しかしながら、緩和試験は、またミジンコや緑藻類では上首尾に行われている。

一旦、全有機炭素濃度が $< 2 \text{ mg/L}$ の希釈水中において陽イオン物質固有の毒性が判定されたら、 2 濃度のフミン酸（腐植酸）溶液で少なくとも 2 回以上試験を行なう。これらの試験のうち、最初の試験は 20 mg/L （または、綿状の凝集塊や沈殿物、粘着性の混合物が形成された場合はそれより低い濃度）のフミン酸濃度で行なわなければならない。2 回目の試験は腐植酸濃度を下げて（例えば 10 mg/L ）行なう。

フミン酸を添加していない試験と 20 mg/L 及び 10 mg/L のフミン酸を用いた試験の試験対照区において、全有機炭素濃度を測定する。全有機炭素のサンプルは毒性試験開始時に対照区から採取し、全有機炭素量は 3 種の試験でそれぞれ 3 回ずつ測定することが推奨される。3 回の測定値は、各試験の平均値とともに別々に報告する。

毒性緩和は全有機炭素濃度に対して試験で測定された影響濃度（ EC_{50} 、 LC_{50} 値など）を回帰することによって決められる。

付録 4

多価の金属と錯体および / あるいはキレート結合する化学物質の 藻類毒性緩和試験

金属錯体を形成する物質のリスク評価に関連した藻類毒性試験の必須条件は、放出シナリオで連想しうる水質に依存している。以下の試験計画は、米国環境保護庁（US EPA）によって提案されたものである：

1. CaCO₃ として 15 ~ 24mg / L の範囲の硬度の標準藻類培地中で、試験する。
2. CaCO₃ としておよそ 150mg / L の硬度を持つ改良藻類培地中で、試験する。
3. 保存溶液に当量の Ca²⁺ を添加することによって、化学物質の Ca 塩を作り、標準藻類培地中で試験する。
4. 上記（ 2 ）と同様の改良藻類培地中で、化学物質の Ca 塩で試験する。

Ca 塩のかたちで物質を試験するためには、保存溶液に当量の Ca²⁺ を添加することが必要である。物質の Ca 塩を調製する時の適切な手法としては、途中まで水を満たした 1 リットルの定容フラスコ中に有効成分 1 g を添加し、攪拌を続ける。その後当量の Ca²⁺ を添加して少なくとも 1 時間攪拌する。さらに水を継ぎ足してフラスコ中の溶液を 1 リットルに合わせ、調製試験水として用いる。保存溶液中の沈殿および / あるいは凝集物質は、試験水調製時にはなるべく均質な分散液として保持し、ろ過や遠心分離などの方法で除去したりしない。