

2 - 1.OECD Guidance Document No.23

原文対応仮和訳

(注) 本仮和訳は、環境省からの受託調査の中で株式会社三菱化学安全科学研究所が作成したものである。

試験と評価に関する OECD 環境の健康と安全
出版シリーズ
No.23

試験困難物質および混合物の水生毒性試験に
関するガイダンス文書

環境理事会
経済協力開発機構
パリ
2000年9月

序文

試験困難物質および混合物の水生毒性試験に関するガイダンスは、OECD のテストガイドラインプログラム (TGP) およびリスク評価諮問機関 (RAAB) によって、必要度が高いという優先順位を与えられた。農薬試験に適したテストガイドラインおよびガイダンス文書の作成、改訂のための OECD 生態毒性対策委員会も試験困難物質の試験に関するガイダンス文書に高い優先順位を与えた。

OECD の試験困難物質および混合物の水生毒性試験に関するガイダンス文書の最初のドラフト案は、1998年4月2、3日にフランスのパリで行われた専門委員会を受けて、用意された。そして、1999年3月にテストガイドラインプログラムの各国コーディネーターを通して各国の専門家に配布された。12カ国 (オーストラリア、ベルギー、フランス、ドイツ、ハンガリー、イタリア、日本、オランダ、スウェーデン、スイス、イギリス、アメリカ) および産業界からコメントが寄せられた。改訂ドラフトは、2000年1月に各国コーディネーターに回覧され、承認が求められた。

改訂案の評価は高く、ガイダンス文書は、一般的には完全に承認された。しかし、デンマーク、ドイツ、オランダ、イギリス、アメリカがいくつかのコメントを追加した。文書は、これらの提案を考慮に入れてさらに改訂され、TGP の各国コーディネーターに提出され、最終的な承認が求められた。2000年5月の第

OECD Environmental Health and Safety Publications
Series on Testing and Assessment
No.23

Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of
Difficult Substances and Mixtures

Environment Directorate
Organization for Economic Co-operation and Development
Paris
September 2000

FOREWORD

Guidance for the aquatic toxicity testing and assessment of difficult substances and mixtures was identified as a high priority requirement by the National Co-ordinators of the Test Guidelines Programme (TGP) and the Risk Assessment Advisory Body (RAAB) of the OECD. The OECD Task Force on Ecotoxicology for priority setting in development and revision of Test Guidelines and Guidance documents appropriate for pesticides testing also gave high priority to the development of a guidance document for the testing of difficult substances.

The first draft proposal for an OECD guidance document on the aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures was prepared following a meeting of the Expert Panel on the 2nd and 3rd of April 1998 in Paris, France. It was circulated to National Experts for review in March 1999 through the National Co-ordinators of the Test Guidelines Programme. Comments were received from twelve countries (Australia, Belgium, France, Germany, Hungary, Italy, Japan, the Netherlands, Sweden, Switzerland, The United-Kingdom and the United States) and industry. A revised draft was circulated in January 2000 to National Co-ordinators for approval.

The revised proposal was well appreciated and the proposed guidance document was generally fully accepted. However, Denmark, Germany, the Netherlands, the United-Kingdom and the United-States made several additional comments. The document was again revised taking into account the amendments suggested and then submitted to National Co-ordinators of TGP for final

12 回各国コーディネーター会議では、この最終版が承認され、ドラフトガイダンス文書を合同会議に提出して機密扱いを解くことで合意がされた。化学品委員会と化学品、農薬、バイオテクノロジー作業部会の合同会議は、本文書の公開を勧告した。本文書は、OECD の事務局の責任で出版されているものである。

approval. In May 2000, the 12th National Co-ordinators Meeting approved this last version and agreed that the draft Guidance Document be submitted to the Joint Meeting for declassification. The Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on chemicals, Pesticides and Biotechnology recommended that this document be made public. It is being published on the responsibility of the Secretary General of the OECD.

内 容

ガイダンス文書中の重要な用語の解説

緒言

目的（範囲）

1. 被験物質の安定性の予備評価
 - 1.1 被験物質に関する既存データの調査
 - 1.2 予備安定性試験
2. 暴露方式の選定に関する一般的検討事項
3. 試験困難物質の飼育水の調製および暴露システム
 - 3.1 難水溶性物質
 - 3.1.1 予備実験
 - 3.1.2 飼育水調製法
 - 直接添加
 - 溶剤
 - 溶出装置
 - 分散および乳化
 - 3.1.3 流水式暴露システム
 - 3.1.4 金属および金属化合物試験の際の飼育および試験水に関する検討項目
 - 3.2 水溶解度限界において急性毒性のない物質
 - 3.3 低濃度で毒性を有する物質
 - 3.4 揮発性物質
 - 3.5 試験系内で分解する物質
 - 3.5.1 光分解
 - 3.5.2 加水分解
 - 3.5.3 酸化
 - 3.5.4 生分解
 - 3.6 吸着性物質
 - 3.7 錯体形成物質
 - 3.8 着色物質
 - 藻類試験
 - 植物試験
 - 無脊椎動物試験

TABLE OF CONTENTS

Glossary of important terms used in the Guidance Document

Introduction

Scope

1. Preliminary assessment of stability of test substance
 - 1.1 Review of existing data on the test substance
 - 1.2 Preliminary stability study
2. General considerations on selection of exposure regimes
3. Media preparation and exposure systems for difficult test substances
 - 3.1 Poorly water-soluble substances
 - 3.1.1 Preliminary experiment.
 - 3.1.2 Media preparation methods
 - Direct
 - Solvents
 - Generator systems
 - Dispersions and emulsions
 - 3.1.3 Flow-through exposure systems
 - 3.1.4 Culture and test media considerations when testing metals and metal compounds
 - 3.2 Substances that are not acutely toxic at the limit of their water solubility
 - 3.3 Substances toxic at low concentrations.
 - 3.4 Volatile substances.
 - 3.5 Substances that degrade in the test system
 - 3.5.1 Photolysis
 - 3.5.2 Hydrolysis
 - 3.5.3 Oxidation
 - 3.5.4 Biodegradation.
 - 3.6 Adsorbing substances
 - 3.7 Complexing substances
 - 3.8 Coloured substances
 - Algal tests
 - Plant tests
 - Invertebrate tests

3.9 疎水性物質	3.9 Hydrophobic substances
3.10 イオン性物質	3.10 Ionised substances
3.11 多成分混合物	3.11 Multi-component mixtures
完全溶解性	Fully soluble
部分溶解性	Partially soluble
3.12 調合品	3.12 Preparations
4. 暴露濃度分析のための試験水サンプリング	4. Sampling of test media for analysis of exposure concentrations
4.1 試験水分析のための採取スケジュール	4.1 Sampling schedules for analysis of test media
4.1.1 藻類生長阻害試験	4.1.1 Algal growth inhibition test
4.1.2 ウキクサ生長阻害試験	4.1.2 Lemna growth inhibition test
止水式	Static
半止水式	Semi-static
連続流水式	Continuous flow-through
4.1.3 ミジンコ急性遊泳阻害試験	4.1.3 Daphnia acute immobilisation test
4.1.4 ミジンコ繁殖試験	4.1.4 Daphnia reproduction test
半止水式	Semi-static
連続流水式	Continuous flow-through
4.1.5 魚類急性毒性試験	4.1.5 Fish acute toxicity test
止水式	Static
半止水式	Semi-static
連続流水式	Continuous flow-through
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, 魚類胚・仔魚期における短期毒性試験	4.1.6 Fish prolonged toxicity test, fish early-life stage toxicity test, fish juvenile growth toxicity and fish short-term toxicity on embryo and sac-fry stages
半止水式	Semi-static
連続流水式	Continuous flow-through
4.2 化学分析のための飼育水サンプル採取	4.2 Taking of media samples for chemical analysis
5. 試験結果の算出および表現法	5. Calculation and expression of test results
6. 参考文献	6. References
付録 1	Annex 1
物質の物理/化学的性質, 運命, 輸送および水生毒性予測のためのコンピュータプログラム	Computer programs for predicting physical/chemical properties, and fate, transport and aquatic toxicity of substances
付録 2	Annex 2
幾何平均暴露濃度の算出式	Formula for calculating geometric mean exposure concentration
付録 3	Annex 3
陽イオン物質の毒性緩和試験	Toxicity mitigation testing for cationic substances
付録 4	Annex 4
多価金属と錯体形成および/あるいはとキレート結合する物質の藻類毒性緩和試験	Toxicity mitigation testing with algae for chemicals which form complexes with and/or chelate polyvalent metals

付録 5

試験困難物質の水生毒性試験に関する専門委員会 / 検討委員会

Annex 5

Expert panel on aquatic toxicity testing of difficult substances / Peer review committee

文書中の重要な用語の解説⁽¹⁾ Glossary of important terms used in the Guidance Document⁽¹⁾

物質 ⁽²⁾ Substance ⁽²⁾	天然の状態または生産過程によって得られた化学元素とその化合物で、製品の安定性を保つために必要な添加物、使用された過程に由来する不純物を含むが、物質の安定性に影響を与えたり、組成を変えたりせずに分離できる溶剤は除く Chemical elements and their compounds in the natural state or obtained by any production process, including any additive necessary to preserve the stability of the product and any impurities deriving from the process used, but excluding any solvent which may be separated without affecting the stability of the substances or changing its composition.
混合物 ⁽²⁾ Mixture ⁽²⁾	化学反応を起こさない 2 つ以上の物質の混合物または溶液 Mixtures or solutions composed of two or more substances in which they do not react.
調合品 Preparation	意図的に物質を物理的混合すること Deliberate physical mixture of substances.
多成分物質 ⁽³⁾ Multi-component substances ⁽³⁾	溶解度や物理 / 化学的性状の異なる個々の物質が複雑に混ざり合った混合物。ほとんどの場合、一定範囲の長さ / 数の炭素鎖または置換度を持つ同族列の物質と特徴づけられる。これらの物質はよく“複合物”と呼ばれるが、本ガイダンス文書中では“多成分物質”と呼ぶ Mixtures comprising a complex mix of individual substances with different solubilities and physical-chemical properties. In most cases, they can be characterised as a homologous series of substances with a certain range of carbon chain length/number or degree of substitution. These materials are frequently referred to as “complex mixtures”. But, in this Guidance Document, these are referred to as “multi-component substances.
水溶解度 Water solubility	水相と純固（または液 / 気）相間で達成できる最大濃度あるいは熱力学平衡状態濃度。純水中の濃度を意味する The maximum attainable concentration or concentration at thermodynamic equilibrium between aqueous phase and solid (or liquid or gaseous) pure phase. Concentration in pure water is meant.
飽和濃度 Saturation concentration	試験条件下で達成できる被験物質の最大溶解濃度 The maximum dissolved concentration of a test substance that can be achieved under the test conditions.
難水溶性物質 Poorly (or sparingly) water-soluble substance	水溶解度の限界が 100mg/L 以下の物質 Substance with a limit of water solubility of <100 mg/l.
水混和性溶剤 Water-miscible solvent	保存溶液の調製や試験液の調製をしやすくするために被験物質を溶解することができる溶剤 A solvent in which a test substance can be dissolved to facilitate preparation of stock solutions and/or treatment of test media.

懸濁 Suspension	液体中に固体が安定に分散している状態 A stable dispersion of solid particles in a liquid
乳濁 Emulsion	液体中に液状の小滴が安定に分散している状態 A stable dispersion of liquid droplets in a liquid. (Note: both liquids are no miscible)
分散 / 乳化剤 Chemical dispersant / emulsifying agent	物質の懸濁 / 乳濁液の生成を促進する化学試剤 (例えば界面活性剤) A chemical reagent (e.g. surfactant) which aids in the production of a suspension / emulsion of a substance
臨界ミセル濃度 Critical micelle concentration	水中に遊離して溶解している界面活性物質の最大濃度 A maximum concentration of the freely solubilised surfactant in water.
安定暴露濃度 Stable exposure concentration	全暴露期間を通じて暴露濃度が設定値の 80 ~ 120% 以内にある状態 A condition in which the exposure concentration remains within 80-120% of nominal over the entire exposure period.
水性分画 Water-accommodated fraction (WAF)	溶解および / あるいは懸濁および / あるいは乳濁している多成分混合物の複合 体を含む水性分画 An aqueous fraction containing the dissolved and/or suspended and/or emulsified fraction of a multi-component substances or a mixture.
負荷率 Loading rate	WAF の調製の際に用いられる被験物質と水の比率 (mg/L) The ratio of test material to water (in mg/l) used in the preparation of a WAF.

- すべての用語およびそれに対する記述は、本ガイダンス文書の目的にのみ有効な定義とみなすべきである
 - 定義は、“段階 2 混合物の調和分類基準案”と題された文章(ENV/JM/HCL(99)11)から引用されているため、暫定的な定義と考えるべきである。
 - “水生環境に有害な化学物質の分類のための調和システム使用に関するガイダンス文書”(ENV/JM/HCL(2000)11)の第 1 章にある“多成分物質”(または“複合物”)の定義との整合性を考慮すべきである
- All terms and their descriptions should be considered as working definitions for the purpose of this Guidance Document only.
 - The definition is cited from a paper (ENV/JM/HCL(99)11), entitled “Step 2 Proposal for Harmonised Classification Criteria for Mixtures” and therefore considered as a provisional definition.
 - Consideration is given to the consistency with the definition of “multi-component substances” (or “complex substances”) in Chapter 1 of a draft “Guidance Document on the Use of the Harmonized System for the Classification of Chemicals which are Hazardous for the Aquatic Environment” (ENV/JM/HCL(2000)11).

緒言

試験困難物質および混合物の水生毒性試験と評価のためのガイダンスは、OECD のテストガイドラインプログラムの各国コーディネーターやリスク評価顧問団によって、率先して取り組むべき課題であるとされていた。そのため、関連のある文献を検討し、ガイダンス文書を作成する専門委員会が設立された。

このガイダンス文書のドラフトは、1998 年 4 月にパリで開催された第 2 回、第 3 回専門委

Introduction

Guidance for the aquatic toxicity testing and assessment of difficult substances and mixtures was identified as a high priority requirement by the National Co-ordinators of the Test Guidelines Programme and the Risk Assessment Advisory Body of the OECD. An Expert Panel was therefore established to review relevant literature and develop a guidance document.

The first draft guidance document was prepared following a meeting of the Expert Panel on the 2nd and 3rd of April 1998

員会の会合の後作成された（付録 5 参照）。グループは、英国環境省（DoE, 1996）、米国環境保護庁（US EPA, 1996）、国際標準化機構（ISO, 1996 と 1997）、欧州化学物質生態毒性及び毒性センター（ECETOC, 1996）、環境、健康と安全のための欧州石油会社組織（CONCAWE, 1992）そしてデンマーク水質研究所（VKI, 1998）によって出版された関連文書を審議した。

専門委員会のメンバーは、英国環境省が出版した“試験困難物質の水生毒性と試験”を OECD ガイダンス文書の基礎とするべきであるとの合意に達した。したがって、以下のテキストの大部分は英国環境省の文書が基になっているが、専門委員会およびその後の各国専門家の検討によって適宜修正および追加されたものである。

最初のドラフト文書は、1999 年 3 月にテストガイドラインプログラムの各国コーディネーターを通して各国の専門家に回覧された。改訂ドラフトは、2000 年 1 月に各国コーディネーターに提示され、承認が求められた。追加コメントが寄せられたため、改訂版が用意され、2000 年 4 月に各国コーディネーターに再提示され、承認が求められた。そして、2000 年 5 月の第 12 回各国コーディネーター会議で承認された。

目 的（範 囲）

この文書は、水生毒性を決定する目的で“試験を行なうのが困難”と分類される物質および混合物の試験に関するガイダンスである。ここに記載された内容は、表 1 にある OECD ガイドラインに掲載されている試験を対象としているが、その他の試験にも対応し得ると思われる。

ガイダンスは、“試験困難な”被験物質の試験を行ない、結果を出すことの実用面について記載している。困難とは、その物質および混合物が表 2 に記載されているような特性を有し、標準試験手法の改良や追加を必要とするということである。ガイダンスは、これら

in Paris, France (see Annex 5). The group considered relevant documents published by the United Kingdom Department of the Environment (DoE, 1996), the United States Environmental Protection Agency (US EPA, 1996a), the International Organization for Standardization (ISO, 1997), the European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC, 1996), the Oil Companies European Organisation for Environment, Health and Safety (CONCAWE, 1992) and the Danish Water Quality Institute (VKI, 1998).

The members of the Expert Panel agreed that the document “Guidance on the Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances” published by the UK Department of the Environment should form the basis for the OECD guidance document. The text of the Guidance Document is therefore based, to a large extent, on the UK document but with amendments and additions as considered appropriate by the Expert Panel and consequent review by national experts.

The first draft was circulated for review in March 1999 to national experts through the OECD National Co-ordinators of the Test Guidelines Programme. A revised draft was submitted to National Coordinators for approval in January 2000. Additional comments were received, therefore a revised version was prepared and again submitted to National Co-ordinators for approval in April 2000. It was approved at the 12th National Co-ordinators Meeting in May 2000.

Scope

This document provides guidance for the testing of substances, and mixtures, classed as “difficult to test” for the purposes of determining their aquatic toxicity. Whilst the guidance given is targeted towards tests described by the OECD Guidelines identified in Table 1 it may also be relevant to other tests.

The guidance relates to the practical aspects of carrying out valid tests with “difficult” test substances and mixtures and presenting the results. As such it considers those substances and mixtures with the properties described in Table 2 that require modifications or additions to standard testing procedures. Guidance herein does not extend to

物質の試験後の結果の解釈やその結果をクラス分けやリスク評価に利用することにまでは及んでいない。

ガイダンスは、優れた実践法を反映していると思われるが、同時に、いくつかの被験物質にはこの範囲から外れた特別な科学的、技術的問題があることも知っておく必要がある。また、試験結果がガイドライン範囲外で利用されるような場合は、このガイダンスは適用できないし適切でないかもしれないという認識を持つことも重要である。このような状況においては、適切な試験手順について確実に合意が得られ、それに従うよう、データの最終利用者と協議することも大切である。

この文書は次のような5つの独立したセクションに分けられている。

- 被験物質の予備的安定性評価を行なうためのガイダンス
- 暴露方式の選定についての一般的検討事項
- 飼育水調製や暴露システムの開発
- 分析のための試験水のサンプリング
- 試験結果の計算と報告

金属および金属化合物の試験に関する具体的なガイダンスは、難溶性金属、無機金属化合物および無機物の水生毒性試験についての OECD ワークショップのドラフト報告書 (OECD, 1995) にある。このワークショップでの推奨事項も適宜本文書に組み入れた。

OECD テストガイドライン 201 (微細藻類生長阻害試験) の改訂作業が進んでいることも、述べておかねばならない。藻類試験は特殊な試験領域を代表しており、伝統的な水生生物の生態毒性試験法とは多くの点で異なっているため、改訂されたテストガイドライン 201 が利用できるようになったら、藻類試験で試験困難物質の扱いに具体的なガイダンスが必要な場合は、参考にするべきである。

interpretation of results, after testing of these substances, or their use in classification and risk assessment.

The guidance is considered to reflect good practice but it is important to recognise that some test substances and mixtures will present specific scientific and technical issues that may fall outside its scope. It is also important to acknowledge that the guidance may not be applicable or appropriate where the test results are to be used for applications which fall outside the scope of the guidelines. Under such circumstances it is important to consult with the relevant end user of the data to ensure that appropriate testing procedures are agreed upon and followed.

This document is divided into five substantive sections covering:

- guidance for carrying out a preliminary assessment of test substance stability;
- general considerations on selection of exposure regimes;
- development of media preparation and exposure systems;
- sampling of test media for analysis, and
- calculating and reporting test results.

Specific guidance on testing of metals and metal compounds can be found in a draft report of an OECD Workshop on Aquatic Toxicity Testing of Sparingly Soluble Metals, Inorganic Metal Compounds and Minerals (OECD, 1995). Where appropriate, the recommendations made at the workshop have been incorporated into this document.

It should also be mentioned that revision of the OECD Test Guideline 201 (Micro-Algae, Growth Inhibition Test) has been underway. Since algal tests represent a special testing field and are different in many ways from the traditional ecotoxicological test methods for aquatic organisms, the updated OECD Test Guideline 201 should be consulted, once available, when specific guidance is needed for handling of difficult substances in algal tests.

表1 関係のあるOECDテストガイドライン

Table 1. Relevant OECD Ecotoxicity Test Guidelines

ガイドライン No. Guideline number	試験内容 Description of test
201	藻類生長阻害試験 Alga, growth inhibition test
202 (改訂ドラフト) (updated draft)	ミジンコ種急性遊泳阻害試験 Daphnia sp. acute immobilisation test
203	魚類急性毒性試験 Fish acute toxicity test
204	魚類延長毒性試験 Fish prolonged toxicity test
210	魚類初期生長段階毒性試験 Fish early life-stage toxicity test
211	オオミジンコ繁殖阻害試験 Daphnia magna reproduction test
212	魚類の胚・仔魚期における短期毒性試験 Fish, short-term toxicity test on embryo and sac-fry stages
215	幼魚生長試験 Fish juvenile growth test
219 (ドラフト) (draft)	水中添加法によるユスリカ底土 - 水生毒性試験 Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Water
ドラフト Draft	レムナ種(ウキクサ)生長阻害試験 Lemna sp. growth inhibition test

表2 試験“困難”物質の特性

Table 2. Properties of “difficult” substances and mixtures

特性 Property	試験困難な点 Nature of difficulty
難水溶性 Poorly water-soluble	要求される暴露濃度の達成と維持 暴露中の分析 • Achieving/maintaining required exposure concentrations • Analysing exposure
低濃度における毒性 Toxic at low concentrations	要求される暴露濃度の達成と維持 暴露中の分析 • Achieving/maintaining required exposure concentrations • Analysing exposure
揮発性 Volatile	暴露濃度の維持 • Maintaining exposure concentrations
光分解性 Photo-degradable	暴露濃度の維持 分解産物の毒性 • Maintaining exposure concentrations • Toxicity of breakdown products
加水分解による不安定性 Hydrolytically unstable	暴露濃度の維持 分解産物の毒性 • Maintaining exposure concentrations • Toxicity of breakdown products

易酸化性 Oxidizable	暴露濃度の達成，維持と測定 化学構造の変化又は分解産物による毒性 • Achieving, maintaining and measuring exposure concentrations • Toxicity of modified chemical structures or breakdown products
易腐食 / 変質性 Subject to corrosion/ transformation	暴露濃度の達成，維持と測定 • Achieving, maintaining and measuring exposure concentrations • Toxicity of breakdown products
コロイド Colloids	暴露濃度の達成，維持，測定 光の減弱 / 分散 • Achieving, maintaining and measuring exposure concentrations • Light attenuation/scatter
生分解性 Biodegradable	暴露濃度の維持 分解産物の毒性 • Maintaining exposure concentrations • Toxicity of breakdown products
吸着性 Adsorbing	暴露濃度の維持 暴露中の分析 • Maintaining exposure concentrations • Analysing exposure
錯体形成 Complexing	飼育水中の錯体 / 非錯体部分の区別 • Distinguishing complexed and non-complexed fractions in media • Depletion of nutrients in media
着色性 Coloured	光の減弱 • Light attenuation
疎水性 Hydrophobic	暴露濃度の維持 • Maintaining exposure concentrations
イオン化 Ionised	飼育水中のイオン化および非イオン化部分の区別 正確な暴露濃度の定義 • Distinguishing ionised and non-ionised fractions in media • Defining exact exposure concentrations
多成分物質および調合品 Multi-component substances and preparations	代表的な試験水の調製 正確な暴露濃度の定義 • Preparing representative test media • Defining exact exposure concentrations

1. 被験物質の安定性の予備評価

1. Preliminary assessment of stability of test substance

試験期間を通して被験物質の暴露濃度が明らかに低下する傾向にある場合は，飼育水の調製と暴露システムの改良が要求されるかもしれない。水生毒性試験のための OECD ガイドラインでは，20%の濃度低下であれば，濃度の低下を少なくする方策を考えなくても十分保証できると考えられている。したがって，試験条件下での被験物質の安定性を示すデータは，試験開始前に得られていた方がよい。これらのデータ源として可能性があるのは，

- 被験物質の物理的，化学的特性に関する既存データの調査

Modifications to media preparation and exposure systems may be required where exposure concentrations of a test substance are likely to decline significantly over the test period. In OECD guidelines for aquatic toxicity testing a decline in concentration of 20% is considered sufficient to warrant consideration of measures to reduce the decline. Data providing an indication of the stability of the test substance under the test conditions should therefore be obtained before commencing testing.

Two potential sources of these data are:

- review of existing data on the physical and chemical properties of the substance; and

- ・ 試験条件下で行われる予備安定性試験での測定データの二つである。
- ・ data determined from a preliminary stability study carried out under test conditions.

1.1 被験物質に関する既存データの調査

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は, 暴露濃度の低下を抑えるような飼育水の調製法や暴露方式を選定するのに役に立つ。一例としてこれらのパラメータの評価に有用なデータ一覧を表3に示す。この表には, 試験にあたって技術的な困難を呈するであろうことを示すいくつかの性状値が含まれている。

既存の参考情報源あるいは予測手法(コンピューターによる予測手法の例として付録1参照)を用いて一覧を作成する。その後, 標準的な試験水調製法や試験手順に関してこの一覧を検討し, 試験開始に先立って改良すべきところを修正する。

1.1 Review of existing data on the test substance

Data relating to the physical/chemical properties, fate, transport and environmental toxicity of a test substance will be of assistance in selecting a media preparation regime and exposure system which will control the decline in exposure concentration. An example of a data profile which might be useful to assess these parameters is given in Table 3. The table includes values for some of the properties which are likely to be indicative of presenting technical difficulties for testing.

Existing reference sources or predictive methods (see Annex 1 for examples of computer-based predictive methods) should be used to construct the profile. The profile can then be reviewed with respect to standard media preparation and testing procedures and modifications identified and implemented prior to commencement of testing.

表3 被験物質性状および飼育水調製と試験実施困難さの指標値のデータ一覧

Table 3. Data profile for review of test substance properties and indicator values of difficulties for media preparation and testing

性状 Property	指標値 ⁽¹⁾ Indicator value (1)
物理的状態: 液体, 固体, 気体 Physical state: liquid, solid, gas	-
組成情報と化学構造 Compositional information and chemical Structures	-
分子量 Molecular weight(s)	> 300g / mol ⁽²⁾
物質がイオン化するか? するとしたら, 解離定数(pKa)は? Is the substance ionisable? If yes, dissociation constant (pKa)?	-
n-オクタノール/水分配係数 (log Kow) n-Octanol/water partition coefficient (log Kow)	> 4
試験条件下での試験水への溶解度 Water solubility in test media under test conditions	< 100mg / L
25 における純水への溶解度 Water solubility in pure water at 25°C	< 100mg / L
臨界ミセル濃度 Critical micelle concentration	-

25 における蒸気圧 Vapour pressure at 25°C	-
ヘンリー定数 (H) Henry's Law Constant (H)	> 0.1 Pa · m ³ / mol
沸点 Boiling point	-
融点 Melting point	-
有機溶剤への溶解度 Solubility in organic solvents	-
界面活性剤 / 洗剤の場合は水中分散能 Water dispersibility for surfactants/detergents	-
錯体形成定数 Complexation constants	-
完全好気性生分解時間 Time for ultimate aerobic biodegradation	< 10 日 ⁽³⁾
1 次好気性生分解時間 Time for primary aerobic biodegradation	< 5 日 ⁽³⁾
土壌吸着係数 (log Koc) Soil adsorption coefficient (log Koc)	-
25 , pH7 における加水分解半減期 hr Hydrolysis half-life at 25°C and pH=7	< 24 時間 ⁽⁴⁾
魚における生物濃縮係数 (BCF) Fish bioconcentration factor (BCF)	> 500
水からの蒸発 (半減期): モデル河川, 湖 Volatilisation (half-lives) from water: model river and lake	-
下水 (廃水) 処理場での除去率 Sewage (wastewater) treatment plant removal percentage	-
光分解性 Photodegradability	290 ~ 600 nm の波長における光吸収 Absorbs light at wavelengths 290 - 600 nm
水生生物種に対する毒性 Toxicity to aquatic species	< 1mg / L
金属化合物の解離率と解離度 Dissolution rate and extent for metal compounds	-

- | | |
|---|--|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. 指標値は、試験困難物質を分類するための基準ではない。これらの物質が試験に際して技術的な困難を呈しやすいかどうかを示している。 2. 試験困難物質の多くは、分子量 > 300g/mol であることが、経験的に知られている。 3. この試験法は、それほど多くの物質について日常的に行われてはいない。 4. 値は、試験期間による。 | <ol style="list-style-type: none"> 1. Indicator values are not criteria of difficult-to-test substances. They indicate whether these substances are likely to present technical difficulties for testing. 2. Experience indicates that many difficult-to-test substances appear to have molecular weights > 300 g/mol. 3. This test is not routinely performed for many chemicals. The value depends on test duration. 4. The value depends on test duration. |
|---|--|

1.2 予備安定性試験

いくつかの物理的、化学的および生物的過程が、時間の経過とともに水中の被験物質の実質暴露濃度を相当低下させる(表2および後節参照)ことがあり得る。どの過程が低下の原因であるのかデータが全然ないか十分でない場合は、予備試験を行なうのが適切である。

そのような実験設計の例を図1に掲載した。被験物質溶液は、毒性試験下と同条件(予想されるなら曝気も含めて)下で調製する。ただし、試験生物は除外する。例外的な場合(3.1.2項“分散液および乳濁液”の項参照)にのみ、被験物質の安定した分散液および乳濁液が使用できる。

試験水のサンプルは0, 24時間後及び試験終了時に分析する。不安定性および吸着性物質では期間をより短くする。試験は飽和溶液を用いる必要はなく、被験物質濃度の測定が可能な程度含まれていればよい。

試験水中の被験物質濃度を分析する際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、処理および分析中の損失の可能性も考慮しなければならない。

分析前にサンプルを保存している場合は保存中の損失を評価する。

被験物質が非常に難溶性で通常の実験技術を用いても検出することができない場合は、実験者は安定性評価で利用できる全ての物理化学的データを駆使し、同時に専門家の判断をおおぐことが通常必要である。さらに、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であろうから、助剤無しの安定性を測定する必要はない。量的評価に例外的に特殊な被験物質(例えば放射性標識物質)を利用することも正当であろう。標識物質である¹⁴Cの同定は実験開始時と実験中に実証されなければならない。放射エネルギーが維持されていても、被験物質が溶液から消失し得ることに、留意する。

1.2 Preliminary stability study

A number of physical, chemical and biological processes can result in significant declines in actual exposure concentrations of a test substance in aqueous media over time (see Table 2 and later sections). Where data are absent or insufficient to identify the process responsible for the decline it may be appropriate to carry out a preliminary study for assessing the stability of the test substance.

An example of a design for such an experiment is given in Figure 1. Solutions of the test substance are prepared under conditions equivalent to those to be used in the toxicity test (including aeration if that is envisaged), but excluding test organisms. Stable dispersion and emulsions of the test substance can only be used in exceptional cases (see Section 3.1.2 on “Dispersions and emulsions”).

Samples of the test media are analysed at 0, 24 hours and at the end of the test or at a shorter period for unstable and adsorbing substances. A saturated solution need not be used for this test but it should contain a detectable concentration of the test substance.

A sufficiently sensitive analytical method is necessary for the analysis of the test substance in the test medium. The possibility of losses during sampling, sample treatment and analysis must be considered.

Where samples are stored before analysis, losses during sample storage should also be assessed.

If the test substance is so sparingly soluble that it cannot be detected using reasonable analytical techniques it will normally be necessary for the experimenter to use whatever physical-chemical data are available in conjunction with expert judgement in order to assess stability. Moreover, if a substance is so sparingly soluble that it cannot be detected, it is unlikely to be used in an aquatic toxicity test without a dispersant/solvent, and there would be no need to establish its stability without these. In exceptional circumstance it may be justified to use specialised techniques (e.g. radiolabelled test substance) in order to achieve quantitative assessments. The ¹⁴C identity of the radiolabelled substance should be verified at the beginning and during the study. It may be noteworthy to mention that even if the radioactivity level is maintained, test substance can still be lost from solution.

揮発性は、開放系と密閉系の容器間の試験液濃度を比較することで評価できる。同様に、試験水槽の表面への吸着性は試験液で予めコンディショニングしたものとそうでないものを比較することで評価できる。揮発による損失および容器への吸着を減らす方法は、3.4 および 3.6 節に記載されている。

試験水槽の表面への吸着性は、吸着を減らすように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）の濃度の比較試験で評価できる。試験水槽表面への分配を減らす方法は、3.6 節に記載されている。

試験水槽をコンディショニングしても、化学物質濃度の測定値の維持に大した影響がない場合は、損失の過程は光分解か生分解あるいは加水分解であることが多い。ただし、酸化による場合もある。光分解は、明暗条件下それぞれの分析結果を比較し判別できる。明条件下の方が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あるいは生分解がより重要な損失過程であると示唆される。これらの経路による損失を減らす方法は、3.5 節に概略が述べられている。

予備安定性試験の設計は、例えば有機餌への吸着のような暴露濃度を低下させる原因となる他の作用を考慮に入れるために、状況に適応させる必要がある。予備評価試験の設計と実行に関するさらなるガイダンスは、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) が発表した文書に見られる。予備安定性試験は、実験室内での試験に限定して意図されたものではない。

安定性が毒性試験に使用される濃度のみで問題となるのであれば、予備の毒性試験とともに予備の安定性試験を行う必要があるかもしれない。濃度が予めわかっていないこともあるし、試験水中の被験物質の安定性は濃度に

The significance of volatility can be assessed by comparing concentrations in open and closed vessels. Similarly, the significance of adsorption onto test vessel surfaces can be assessed by a comparative study of concentrations determined in vessels conditioned to reduce adsorption and in unconditioned vessels. Methods to reduce volatile losses and partitioning onto test vessels are described in Sections 3.4 and 3.6.

The significance of adsorption onto test vessel surfaces can be assessed by a comparative study of concentrations determined in closed vessels conditioned to reduce adsorption (see Part B of Figure 1) and in unconditioned closed vessels (see Part A of Figure 1). Methods to reduce partitioning onto test vessels are described in Sections 3.6.

If conditioning of test vessels has no appreciable impact on maintaining measured chemical concentrations, then it is most likely that the loss process is either photolysis, biodegradation or hydrolysis. However, it may also be due to oxidation. Photodegradation can be distinguished from a comparison of analysis of media held under conditions of light and darkness. Greater losses in the light point to photolysis whilst similar losses in both vessels suggest that hydrolysis or biodegradation are the more important loss processes. Methods to reduce losses by these routes are outlined in Section 3.5.

The design of the preliminary stability study may need to be tailored on a case-by-case basis to address other mechanisms responsible for reductions in exposure concentration, e.g. sorption onto organic food substances. Further guidance on the design and conduct of preliminary assessment studies can be found in documents published by the EC (EC, 1996b) and the US EPA (US EPA, 1996a); Nabholz (1991); Nabholz et al (1993); Auer et al. (1990); Lynch et al. (1994); Boethling and Nabholz (1997); and Newsome et al. (1996). The preliminary stability studies were not intended to be limited to laboratory studies.

It may be necessary to run the preliminary stability study alongside a preliminary assessment of toxicity, if stability is only of concern at concentrations that will be used in the toxicity test. Those concentrations may not be known beforehand and they may affect the stability of test

よって影響を受けることもあり得る。例えば、高濃度では、錯体形成が起こる可能性があたり、低濃度では高濃度より損失が（比例的に）大きいこともある。これらの問題を明らかにするためには、最低2つの濃度で予備安定性試験を行う必要があるだろう。

substances in the test media. For example, complexation may occur at higher concentrations and losses may be greater (proportionally) at low concentrations than at high concentrations. It may be necessary to carry out the preliminary study at least with two concentrations to identify these problems.

図 1 水生毒性試験水からの被験物質の損失過程を特定するための予備試験の設計

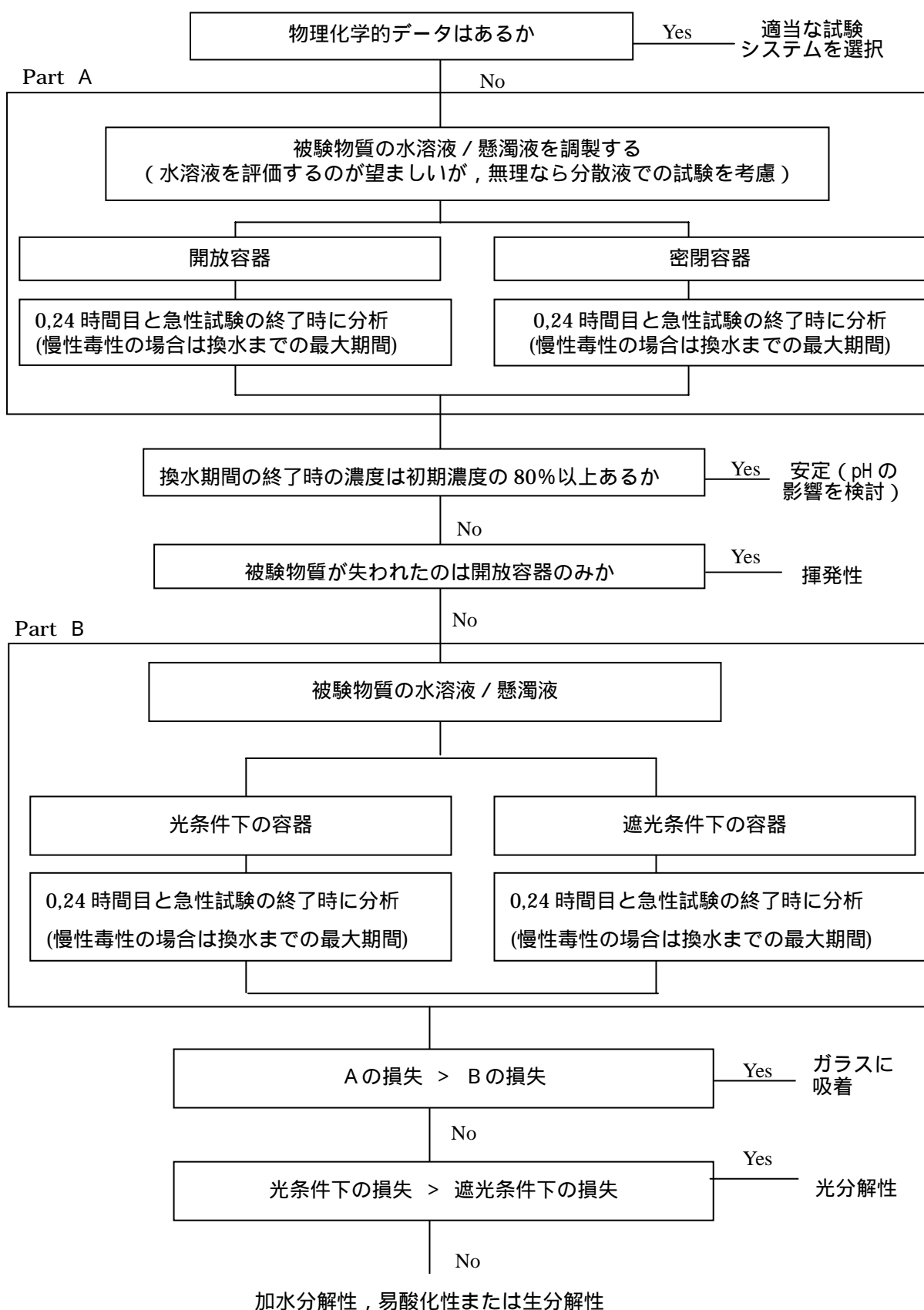
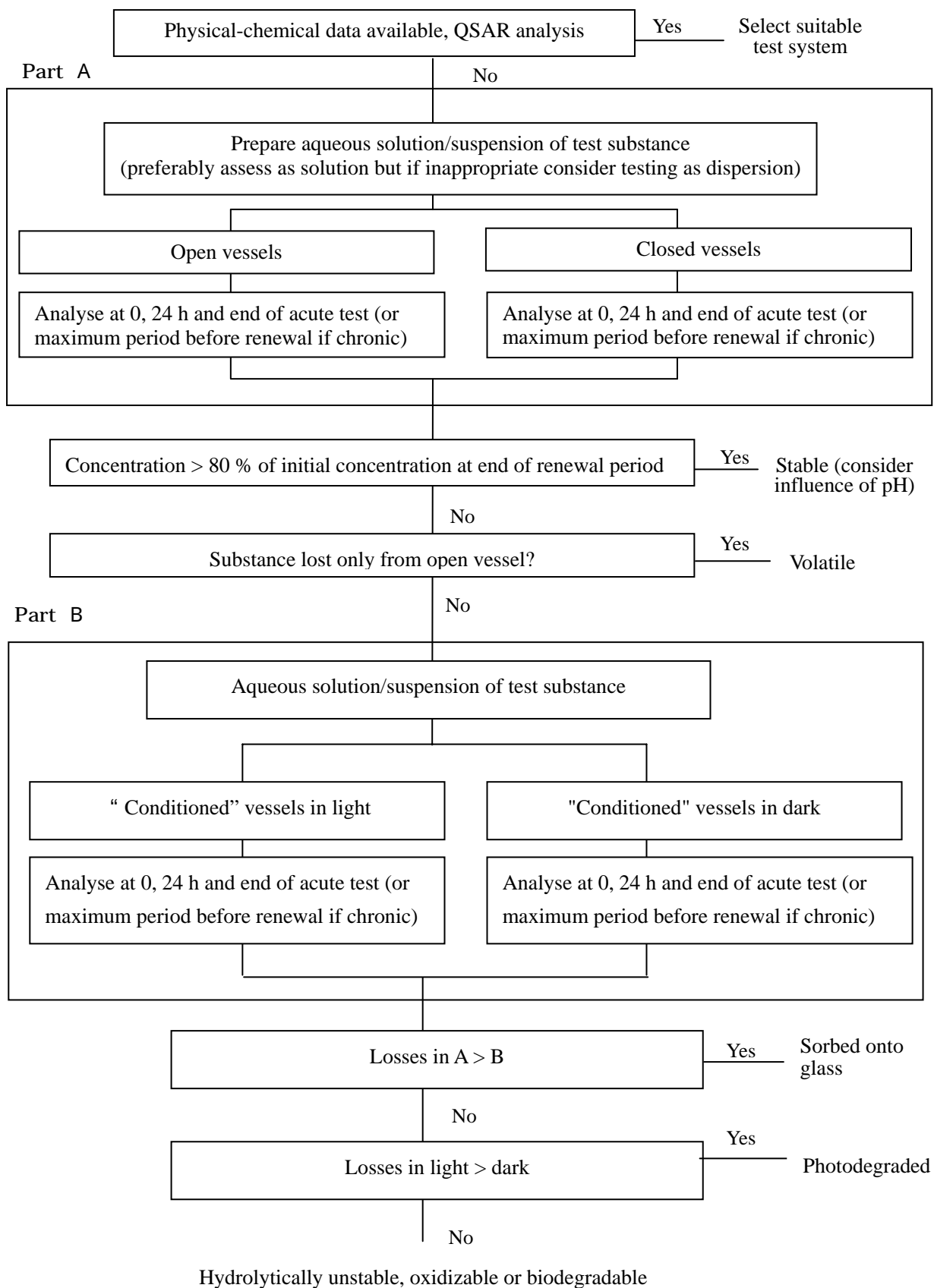


Figure 1. Design of a preliminary experiment for identifying process(es) responsible for loss of test substance from aquatic toxicity test media



2. 暴露方式選定のための一般的検討事項

水生毒性試験で利用される暴露方式の選定は、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/あるいは予備試験の結果により導き出される。予備試験は、実際の水生毒性試験と非常によく似た条件下で、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：

- ・ 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
- ・ 連続的な流水式換水 - 試験水は連続的に交換する

がある。

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違うので、暴露方式を決定する基準に関する決定的なガイダンスを与えることはできない。しかしながら、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% 以内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と予想されるような場合には、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ははっきりしない場合は、試験開始に先立って関係規制当局と協議するのがよい。

24 時間暴露後に試験溶液を交換する方法は、しばしば暴露濃度の維持を可能にする。しかも、この方法は比較的簡単な試験手順の修正である。半止水式でもっと頻繁に換水することは可能であるが、虚弱な試験生物、例えばミジンコに過剰な操作を加えることで、過度のストレスを与えてしまうことに注意しなくてはならない。断続的な流水式方式は、半止水式方式と比較して試験生物に与えるストレスを減らせるかもしれない。ミジンコの急性、慢性試験や魚

2. General considerations on selection of exposure regimes

The selection of the exposure regime to be used in aquatic toxicity tests should be guided by the time course of the experiment, the test species used, and the characteristics (e.g. physico-chemical properties) of the test substance and/or the results of a preliminary stability study. The latter is conducted to determine the likely fate and behaviour of the substance under very similar test conditions as those prevalent in the actual aquatic toxicity test. The exposure regime could be:

- Static, no replacement - the test medium is not replaced for the duration of the study;
- Semi-static replacement - the test medium is periodically replaced on a batch basis;
- Intermittent flow-through replacement - the test medium is replaced over set periods during the exposure; and
- Continuous flow-through replacement - the test medium is continually replaced.

Note: For some chemicals, especially crop protection products, pulsed or time-varying exposure designs have been developed.

It is not possible to give definitive guidance on criteria for deciding on exposure regime since requirements may vary between different regulatory authorities. However, a static exposure regime is likely to be appropriate if exposure concentrations can be expected to remain within 80-120% of nominal over the whole test period without renewal of the test media. Likewise, a semi-static or intermittent or continuous flow-through regime will probably be required where concentrations are unlikely to remain within 80-120% of nominal. Where uncertainty exists over the suitability of an exposure regime it is good practice to consult with the appropriate regulatory authority prior to commencement of the test.

Renewal of test solutions after 24 hours exposure will frequently allow exposure concentrations to be maintained and is a relatively simple modification to the test procedure. More frequent semi-static renewal is possible but care must be exercised not to excessively stress fragile test organisms, e.g. daphnids, by excessive handling. An intermittent flow-through regime may reduce the stress imposed on test organisms compared with a semi-static regime and systems for use in acute and chronic tests with daphnids and early life-stage tests with fish have been

を用いた初期生長段階試験に用いるシステムが Van Leeuwen ら (1986) によって言及されてきた。連続的流水方式は、通常、継続的に 24 時間換水する半止水式方式を用いても暴露濃度を維持できない場合に検討される。流水式試験システムについては特に 3.1.3 項および 3.4 節で述べられている。

半止水式換水や流水式方式では、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りにクリーニングすることが必要となりそうである。クリーニング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ことを強調しておく。

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、試験開始時に必要な暴露濃度に到達させることである。そして、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。

保存用水溶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そして物質の溶解度に対応して要求される試験濃度範囲などの要因によって決められる。安定で、目標値に近い濃度で被験物質が溶解している試験溶液を作るために最善を尽くすべきである。しかしながらいくつもの損失過程の結果として、実際の暴露濃度は設定濃度より相当低くなることもあり得るということを認識しておくべきである。したがって、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設定濃度を用いることも必要かもしれない。通常は、試験容器内に溶解していない被験物質が存在するのを避けるか最小限に抑える。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 つの例を参照）には、例外もあり得る。

試験開始に先立ち、必要な量の試験水の調製と要求される濃度の達成、維持ができることを確

referred to by Van Leeuwen et al. (1986). A continuous flow-through regime should generally be considered when a semi-static regime with renewal following each successive 24 hours exposure period is incapable of maintaining exposure concentrations. Flow-through test systems are discussed further in Section 3.1.3 and 3.4 in particular.

Semi-static renewal and flow-through regimes are likely to require frequent cleaning of the exposure systems to prevent the accumulation of organic debris and the development of excessive microbial populations. Care should be taken to minimize stress on test organisms caused by cleaning.

It should be stressed that flow-through systems cannot be used for algal testing.

3. Media preparation and exposure systems for difficult test substances

The objective in preparing test media should be to achieve the required exposure concentrations of dissolved test substance at the start of the test. These concentrations should then be maintained, where technically possible, throughout the test using either static, semi-static renewal or flow-through exposure regimes.

The method used for preparing aqueous stock or test solutions is dictated by factors such as the physical state of a test substance, its solubility in the test dilution water and the desired range of test concentrations relative to the solubility of the substance. All reasonable efforts should be made to achieve true test solutions containing dissolved concentrations of the test substance that are stable and close to target. However, it has to be recognised that actual exposure concentrations can be substantially lower than nominal concentrations as a consequence of a number of loss processes. Hence, while the target should be to achieve exposure concentrations up to the aqueous solubility of the test substance, it may be necessary to utilise higher nominal concentrations to achieve it. Visible non-solubilized test substance in the exposure vessels is generally to be avoided or minimized. Exceptions are possible when suitably justified (e.g. see two exceptions in Section 3.1.2 on “Dispersions and emulsions”).

The media preparation and exposure methods should be evaluated prior to commencing testing to ensure that the

認するために、試験水の調製と暴露の方法を評価する。その方法で、標準的な方法を用いて得られる結果に匹敵する結果が得られるということを立証するためには、参考物質を試験することも検討する。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 プロトコルが作成中であることも注目に値する。

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では、試験条件下で達成されうる最大溶解濃度(飽和濃度と定義される)とそれを達成するために要求される調製条件を決定するために、予備試験を検討した方がよい。予備試験の結果は、毒性試験における試験水調製法の根拠や正当性を提示し、試験の結果が評価されることに対する基準(試験条件下での水への溶解度)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。

被験物質の溶液は、最大溶解濃度を達成するために、理論的な水溶解度限界よりも高い設定濃度で調製してもよいが、溶解しなかった物質は、試験前に分離しておく。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、不溶な被験物質の試験水からの除去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見えないので、試験水が澄んでいるからといって真の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、大量の試験水にこの技術を適用するには実用的に困難かもしれない。指針として

required quantities of test medium can be produced and the required concentrations can be achieved and maintained. Consideration should also be given to testing a reference substance in order to establish that the methods achieve results comparable to those obtained using standard methods. Approval for non-standard methods should be sought from the appropriate regulatory authority and the methods should be fully described in the test report.

It may be noteworthy that for assisting classification of metals and metal compounds, an OECD protocol on transformation/dissolution of metals and metal compounds is currently being developed.

3.1 Poorly water-soluble substances

3.1.1 Preliminary experiment

A preliminary experiment should be considered for all studies with poorly water-soluble substances to determine the maximum dissolved concentration that can be achieved under test conditions, which is defined as the saturation concentration, and the preparation conditions that are required to achieve it. The results of the preliminary experiment will form a basis of and justification for the media preparation procedures adopted for the toxicity tests and a reference point (i.e. water solubility under test conditions) against which the test results can be evaluated. In view of its importance the preliminary experiment should be fully reported.

Solutions of test substance could be prepared at higher nominal concentrations than the theoretical water solubility limit to achieve the maximum dissolved concentration provided any nondissolved substance is separated before testing. This method is also useful to take into account soluble impurities.

The design of the preliminary experiment should take into account the possible need to remove non-dissolved test substance from the test medium. It should not be assumed that a clear test medium indicates a true solution since crystals, aggregates, micelles etc. cannot easily be detected by visual observation. Possible separation techniques include:

- Centrifugation - the preferred separation method but there may be practical difficulties in applying the technique to large volumes of test medium. As a guide,

は、10000～40000m.s⁻²で30分遠心分離すれば適切な分離ができるであろう。大半の遠心分離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ことに注意する。

・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0.45μm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。毒性残留物を有する試験溶液からの汚染リスクを軽減するには、フィルターを使用前に蒸留水で洗浄する。吸着は、事前に適切な濃度に調製した被験物質溶液で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。

分離技術の正当性または有効性については必ず試験報告書の中に記載する。分離技術は界面活性剤を含む溶液には適用できない。

難水溶性物質の溶解度の推定には、しばしば高度の不確かさが伴うということに留意すべきである。したがって、暴露濃度の上限を高い信頼度で特定することが不可能な場合も多い。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。

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つの方法が適用されている。ここでは、これらの方法について直接添加、水混和性溶剤、溶出装置、分散および乳化という包括的な用語で表す。実験室内で測定された物質の安定性は、試験系内とは大きく異なることがあるという事実があるので、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

centrifugation at 100,000 to 400,000 m.s⁻² for 30 minutes may achieve adequate separation. It should be noted that most centrifuge containers are made of various sorts of plastics which may adsorb the test substance, and that glass containers are more likely to break.

• Filtration through a membrane filter - less widely advocated because of the potential for losses due to adsorption onto the filter matrix. Filtration may represent the only practical option where large volumes of test media are required. Filter sizes of 0.22 to 0.45 μm may be suitable for achieving adequate separation. Filter matrix should be made of inert materials (i.e. chemically and physically non-reactive with testing compounds). Filters should be rinsed with high-purity water prior to use to reduce the risk of contamination of test solutions with toxic residues. Adsorption of the test substance may be reduced to insignificant levels by preconditioning filters with solutions of the test substance prepared at the appropriate test concentrations. Filtration under pressure is preferable to vacuum filtration due to potential losses by evaporation.

A justification for, or validation of, the separation technique should always be provided in the test report. Separation techniques should not be applied to surfactant solutions.

It should be noted that a high level of uncertainty is often associated with solubility estimates for poorly water-soluble substances. It is therefore often not possible to specify an upper exposure limit with a high degree of confidence. Exposure concentrations which exceed a “reported” water solubility should therefore not necessarily be considered invalid but reviewed on a case-by-case basis.

3.1.2 Media preparation methods

Four methods of test media preparation have been applied to poorly water-soluble substances. These methods are referred to here by the generic terms: direct addition, water-miscible solvents, generator systems and dispersions and emulsions. Care should be taken due to the fact that stability of a substance measured in the laboratory can differ greatly from that observed in the test system.

Direct addition

Direct addition, as the term implies, involves the bulk

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となっている。

- ・ 低エネルギー攪拌
- ・ 強力振とう
- ・ 混和
- ・ 均質化 / 高破砕混合
- ・ 超音波処理

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、もうほんの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、それだと特に少量の場合かなり熱くなり、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、被験物質や水に試験結果を損なうような変化を起こさないことを確認する必要がある。溶存酸素濃度が低下するかもしれないことにも気をつける。

直接添加法を用いるのは、達成すべき濃度が水溶解度の 50% 以下のときに限るよう推奨する。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ことは、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本質的にあやふやであるため、重量で直接添加することは難しいかもしれない。適量の難溶性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、実際上不可能であろう。一般的に、5~10mg 以下の量を十分な精度で計るのは不可能である。よって、設定濃度が 1mg/L 以下の試験溶液の調製は、希釈に 10L 以上の飼育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、適切に調製された保存溶液の Water Accommodated Fraction (WAF、

addition of a test substance to the water. It will usually be necessary to mix the substance with the water to ensure its dispersion through and solution in the water column. The effectiveness of direct addition is therefore very dependent upon using a mixing regime appropriate to properties of the substance such as viscosity and density. The following mixing techniques are identified below in increasing order of severity:

- low energy stirring;
- vigorous shaking;
- blending;
- homogenisation/high-shear mixing;
- ultrasonication.

For stirring, a 48-hour period might be considered reasonable to achieve maximum solubility, although a slightly higher concentration might be achieved by stirring for 6 weeks. A period of 30 minutes has been suggested for ultrasonication, but this could lead to considerable heating, particularly of small volumes, and potential consequences for stability.

Mild heating of the substance and water may also help to achieve more rapid solution of a test substance but care must be taken to ensure that this does not result in changes to either the test substance or the water which could compromise the outcome of the test. Attention should also be given to potential decrease of dissolved oxygen concentration.

It is recommended that use of direct addition should be limited to the cases when the concentrations to be reached are lower than 50% of the water solubility. However, direct addition by weighting may be difficult when testing a substance with very low solubility at low concentrations, because making a large volume of a very diluted solution may inherently be uncertain as regards whether or not microparticles may be present and thus included or not when using a small fraction of the solution. Although direct addition of a suitable volume of a poorly soluble test chemical is the preferred method, in practice it may be impossible for very toxic chemicals. In general, it is not possible to weigh out an amount less than 5-10 mg with a sufficient precision. The preparation of a test solution with a nominal concentration of less than 1 mg/litre will thus require more than 10 litres of the test medium for dispersion, and a test concentration of 0.1 mg/litre will similarly require more than 100 litres. It is not possible to

3.11 節参照)を連続的に希釈するのが、そのような毒性の強い化学物質に適用できる唯一の方法である。

溶剤

水混和性溶剤は、試験希釈水への添加や混合がしやすいような保存溶液を作るために一部の難溶性の物質を溶解させる媒体となる。特に、加水分解しやすい物質や粘性の高い物質には溶剤は有用である。しかしながら、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結果をもたらす可能性があるため、その使用は他に容認できる試験水調製法がない場合に限るべきである。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。溶剤の使用によって、1つあるいはそれ以上の成分が選択的に溶解することで毒性が影響されることがあるような混合物の場合は、溶剤は不適であることを強調しておく。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じである。

溶剤の選択は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の増殖をかなり促進し、その結果酸素が減少するという問題が生じることがあるのに注意すべきである。断続的あるいは連続的流水式方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継続的に攪拌しながら試験用希釈水に漸次添加する。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

handle such large volumes in practice. Therefore, serial dilution of the Water Accommodated Fraction (WAF, see Section 3.11) of a properly prepared stock solution may be the only applicable method for such very toxic chemicals.

Solvents

Water-miscible solvents provide a vehicle in which some poorly soluble substances can be dissolved to produce a stock solution which is more amenable to adding to, and mixing with, the test media. In particular, solvents could be helpful for hydrolytically unstable and highly viscous substances. However, because of the potential for interaction with the test substance resulting in an altered response in the test, their use should be restricted to situations where no other acceptable method of media preparation is available. If solvents are used, their effects on the test results, if any, need to be determined. It should be emphasised that solvents are not appropriate for mixtures where the use of the solvent can give preferential dissolution of one or more components and thereby affect the toxicity. This could also be true where the technical grade of a substance is tested and a toxic impurity dissolves preferentially.

The choice of solvent will be determined by the chemical properties of the substance. Solvents which have been found to be effective for aquatic toxicity testing include acetone, ethanol, methanol, tertiary-butyl alcohol, acetonitrile, dimethyl formamide and triethylene glycol. The physico-chemical properties and aquatic toxicity of a range of solvents have been reviewed by Tarr and Hutchinson (1992) and ECETOC (1996). It should be noted that the use of solvents such as acetone, ethanol and methanol can be problematic for static and semi-static systems due to substantial growth of bacteria in aquatic test systems and resulting depletion of oxygen. Caution should be exercised to avoid critical oxygen depletion in long term tests with intermittent or continuous flow-through regimes.

The recommended approach to media preparation is to prepare a concentrated stock solution of the test substance in the solvent. Measured quantities of the stock solution are then added gradually to the test dilution water whilst continuously mixing using an appropriate technique. The concentration of the solvent in the final test medium should not exceed the corresponding toxicity thresholds determined for the solvent under the test conditions. The suggested level is at least one order of magnitude below

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) が一般に利用される殆どの溶剤の妥当な最大使用濃度である。100mg/L という溶剤濃度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, 混合後飼育水から除去できる揮発性の溶剤 (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たり, また溶剤の毒性残留物が残ってしまったりする可能性があるため, この方法の適用性は制限されそうである。

水生毒性試験のための OECD ガイドラインでは, 流水式で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, またこの濃度の溶剤に暴露される生物の対照群を試験設計に入れることを要求している。

溶出装置

被験物質でコーティングした化学的に不活性な基質の中に水を通すことによって 難溶性純物質の水溶液を作ることができる。体積に対して表面積の割合が大きい基質(軽石またはガラスビーズのような)は, 表面に比較的大量の被験物質をコーティングすることができ, その上で被験物質が溶解できる大きな面を提供する。適当な基質を詰めたカラムを利用するシステムについては, Veith と Comstock (1975), Gingerich ら (1979) そして Phipps ら (1982) によって記述されている。カラムから流出した水溶液は, 直接あるいは一連の濃度区を作るために希釈して, 試験に使用できる。

半透過性メンブランディスク (例えば Empore™) による溶出装置は, カラムによるシステムの代替法となり, しかも生成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。上部空間に置いたディスクを利用するシステムは Ramos ら (1997) によって記述されている。

飽和溶液を作るためには, 試験水を繰り返し再

the appropriate no-observed effect concentration (NOEC) depending on the test species and the length/type of toxicity test or in any case below 100 mg/l (or 0.1ml/l). In practice, a concentration of 100 mg/l (or 0.1 ml/l) is a reasonable working maximum concentration for most of the commonly used solvents. It is unlikely that a solvent concentration of 100 mg/l will significantly alter the maximum dissolved concentration of the test substance which can be achieved in the medium.

The use of volatile solvents (n-hexane and petroleum ether) which can be stripped from the medium after mixing has also been referred to in ISO (1997). The potential for co-stripping of volatile test substance from, and the retention of toxic solvent residues in, the test medium are likely to restrict the applicability of this approach.

OECD guidelines for aquatic toxicity tests require that the concentration of the solvent must be the same in all treatments, where technically feasible in flow-through systems, and that the test design includes a control group of organisms which are exposed to this concentration.

Generator systems

Aqueous solutions of a poorly soluble pure substance can be produced by bringing water into contact with a chemically inert matrix which has been coated with the substance. A matrix with a high surface area to volume ratio (such as pumice or glass beads) allows a relatively large amount of test substance to be coated on the surface and provides a large area over which dissolving of the test substance can take place. Systems utilising columns packed with a suitable matrix have been described by Veith and Comstock (1975), Gingerich et al. (1979) and Phipps et al. (1982). The aqueous solution drawn off from the column can be used either directly for testing or diluted to produce a concentration series.

Generator systems based on semi-permeable membrane disks (e.g. Empore™) offer an alternative to column-based systems and have the advantage of ensuring that only dissolved material is present in the resulting test medium. A system which utilises a disk placed in the headspace has been described by Urrestarazu Ramos et al. (1997).

It may be necessary to re-circulate a test medium

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）による損失を補充するために再循環が必要となる。再利用の場合は、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。溶解度が違うと、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。

このルールには例外が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。

repeatedly through a column or disk in order to achieve a saturated solution. Where the test medium is recycled it may also be necessary to re-circulate in order to replenish losses due to sorption or bioaccumulation. The latter practice may result in complexation of the test substance with dissolved organic matter and measured total concentrations of the test substance exceeding the saturation concentration (Billington, 1988).

Generator systems are not considered appropriate for substances containing components or impurities which differ in their water solubility. Differences in water solubility will result in selective depletion of the more water soluble components from the column or disk matrix and their relative concentration in the water phase. Generator systems are also not suited to substances which are hydrolytically unstable since the composition of the derived test medium is likely to change over time. Another disadvantage of the generator column method is the difficulty in obtaining large volumes of solution which makes their use in flow-through systems problematic.

Dispersions and emulsions

The testing of aqueous dispersions and emulsions is not generally advocated for the following reasons:

- Effects observed in toxicity tests are generally best explained when considered in relation to exposure concentrations of dissolved test substance;
- The presence of non-dissolved material presents significant difficulties for the determination of exposure concentrations'; and
- Non dissolved material present in test media has the potential to exert physical effects on test organisms which are unrelated to toxicity.

There are two exceptions to this rule:

- Where there is a regulatory requirement, such as assessing oil dispersing agents, pesticides which are formulated for use as a dispersion or emulsion, and industrial chemicals which are emulsified for use and released as an emulsion, such as some polycationic polymers with a silicone polymer backbone. Guidance on the testing of substances in the presence of chemical dispersing or emulsifying agents is best sought from the appropriate regulatory authority;

・ 被験物質が、界面活性剤や洗剤のように本質的に水性の分散あるいは乳濁液を作る傾向にあるような場合。このような場合、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。

安定した分散、乳濁液は、水相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作ることができる時もある。物理的混合とともに適切な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に有効である。化学的分散剤や乳化剤の使用は、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。どんな分散や乳化の方法でも、毒性試験で用いる前には、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。

分散あるいは乳濁液は試験生物を入れる前に安定していなければならない。試験水中に一樣に分散していない過剰な被験物質があれば除去する。特別な試験プロトコルによって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又は乳濁液が維持できないようなら、半止水式換水方式を検討するべきである。

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、試験中に推定する。魚の鰓膜のブロック、ミジンコの封じ込み/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。重大な物理的影響があると考えられる場合は、試験生物と水層との接触は維持しながら、非溶解物質からは物理的に分離する方法を考慮するべきである（“疎水性物質”に関する3.9節参照）。

純粋な単一物質の分散あるいは乳濁液を用いる試験において、暴露濃度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

・ Where the test substance has an inherent tendency to form an aqueous dispersion or emulsion such as surfactants and detergents. The highest test concentration should either be 1000 mg active ingredients/litre or the dispersibility limit (i.e., the limit at which phase separation takes place), whichever is lower.

Stable dispersions or emulsions can sometimes be produced by the simple expedient of physically mixing the test substance with the aqueous phase. Appropriate solvents used in conjunction with physical mixing may also be effective, particularly where the test substance is a solid. The use of chemical dispersants or emulsifying agents is not generally advocated because of the potential for physical-chemical interactions influencing the apparent toxicity of the test substance. The potential for any method of dispersion or emulsification causing breakdown of the test substance should be checked before using it in the toxicity test.

A dispersion or emulsion should be stable before the test organisms are introduced. Any excess of test substance not uniformly distributed throughout the test medium should be removed. No attempt should be made to maintain test material in suspension, by for example stirring, except where this is required by specific test protocols. A semi-static replacement regime should be considered if a stable dispersion or emulsion cannot be maintained for the duration of the test.

The potential for non-dissolved test material to cause physical effects on the test organisms should be estimated during the test. Physical effects, such as the blocking of fish gill membranes, the encapsulation/entrapment of daphnids or the reduction of light intensity in the algal test, can lead to an overestimation of toxicity. Techniques for physically separating the test organisms from non-dissolved material, whilst maintaining contact with the water column, should be considered where physical effects are likely to be significant (see Section 3.9 on “Hydrophobic substances”).

In tests with dispersions or emulsions of pure single substances, exposure concentrations should be expressed in terms of the concentration of the test substance in solution, otherwise the toxicity may be underestimated. However, there are some exceptional cases. For example, where the pure substances are self-dispersing in water forming micelles, micro-dispersions and

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する処理を行なっ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、その物質の水中での分散度限界あるいは臨界ミセル濃度と比較されるべきである。

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、強力に攪拌してもなお、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。このような溶剤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の試験の際の飼育および試験水に関する検討項目

無脊椎動物、植物や藻類を用いた培養および試験のための水中には、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、生物の馴化歴によるため、生態学的に妥当な培養条件を使用する必要がある。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することが必要である。

3.2 水溶解度限界において急性毒性のない物質

macro-dispersions such as certain surfactants, some charged polymers, many aliphatic amines, exposure concentrations should be expressed in terms of the whole test substance dispersed in dilution water. It is therefore recommended to consult the regulatory authority to decide how exposure concentrations are to be expressed. Dissolved concentrations can be approximated by measurement following treatment to separate non-dissolved material from the aqueous phase (see Section 3.1.1).

Toxic effect concentrations for dispersions and emulsions should be compared with the dispersibility limit or the critical micelle concentration for a substance in water rather than with its water solubility limit.

3.1.3 Flow-through exposure systems

Substances which are solids at room temperature may take a significant amount of time to reach their solubility limit, even when added as a solution in a water-miscible solvent and subject to vigorous mixing. Consequently a flow-through system, using a solvent stock solution of the substance for dosing the medium, may not give sufficient time for the substance concentration to equilibrate. Under such circumstances it may be appropriate to prepare, in advance, sequential batches of test solution sufficient for a period of e.g. 24 hours or longer as necessary, which can be pumped directly into the test vessels. It should be noted that such solvent systems are not appropriate for metals.

3.1.4 Culture and test media - considerations when testing metals and metal compounds

Media specified for culturing and testing with invertebrates, plants and algae may contain concentrations of some essential elements, such as copper, zinc and nickel, that are only just sufficient to meet nutritional requirements. As nutritional requirements depend on the acclimatisation history of the organisms, ecologically relevant culture conditions need to be used. The composition of culture and test media may therefore require special consideration to ensure that test results correctly reflect the toxicity of metals and metal compounds.

3.2 Substances that are not acutely toxic at the limit of their water solubility

試験水中で達成される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その物質の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かねばならない。低くなるのが典型的である。また、規制目的のために行われる水溶解度の測定は通常蒸留水 (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。

It is important to recognise that the maximum achievable dissolved concentration of a substance in the test medium, i.e. saturation concentration, may not be the same as the water solubility of the substance as determined by, for example, OECD Guideline 105. Typically, the concentration will be less. It is also important to note that water solubility measurements made for regulatory purposes are usually made in distilled water (pH=6-9) and not test media (pH=7-8) and that differences in pH of the test media and distilled water may significantly affect the solubility, especially of ionised substances with a pKa between 5 and 9.

もし飽和濃度における物質の毒性を評価する必要があるなら、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。

If it is necessary to assess the toxicity of a substance at the saturation concentration, it is important to provide evidence that all reasonable efforts have been taken to achieve this. The evidence might include:

- ・ 飼育水の調製方法が溶液中の被験物質濃度を最大にすることが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)
- ・ 試験に用いられ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

- the report of a preliminary experiment demonstrating that the media preparation regime is sufficient to maximise the concentration of the test substance in solution (see Section 3.1 “Poorly water-soluble substances”);
- a description of the method of media preparation regime used for the test;
- a statement of the water solubility; and
- an assessment of saturation concentration.

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ということに注意しなければならない。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勧める。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。

An effect concentration can be measured only if it is equal to, or less than, the saturation concentration. If an effect cannot be detected in a test with a saturated solution the result should be reported as no toxic effects at saturation. It is important to note that an absence of acute toxic effects at the saturation concentration cannot be used as the basis for predicting no chronic toxicity at saturation or at lower concentrations. Where chemicals are predicted to have no acute toxic effects at saturation, it is recommended to consult the regulatory agency. Some regulatory authorities may prefer to omit acute toxicity tests and proceed straight to chronic toxicity testing.

3.3 低濃度で毒性を有する物質

3.3 Substances toxic at low concentrations

被験物質を少量添加する方法としては、保存溶液を連続的に希釈する。保存溶液は水あるいは適当な水混和性の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。

Serial dilution of stock solutions provides a mechanism for adding small quantities of test substance. Stock solutions may be prepared in water or a water-miscible solvent as appropriate (see Section 3.1). Effective mixing is essential to ensure that the test substance is uniformly dissolved throughout the test medium.

暴露濃度は、分析により確認され、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、影響を評価するベースとして幾何平均値を使用する。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。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 (vp) 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。

Exposure concentrations should ideally be confirmed and their stability demonstrated by analysis. The use of a radio-labelled test substance may enable very low concentrations to be analysed but this may lead to significant additional costs associated with its synthesis, handling and analysis. In the absence of a suitable analytical method for quantifying exposure, a semi-static renewal or flow-through regime may be necessary to ensure that exposure concentrations are in line with target values.

Where measured concentrations decline significantly over the exposure period, the geometric mean concentration should be used as the basis for assessing effects. However, it should be noted that several types of loss processes (e.g. precipitation) can occur very fast and new equilibrium conditions can be attained relatively quickly during the exposure. If this was the case, the median of the concentrations which are measured after the decline would be more appropriate as a surrogate for the mean exposure concentration. Where a measured concentration at the end of the exposure period is absent or where it indicates that the substance is not detected, the validity of the test should be reconfirmed. In order to calculate a mean exposure concentration, the final concentration may be taken as the limit of detection for the method if the substance is not detected. When the substance is detected but not quantified, it may be a good practice to use half of the limit of quantification. Since there may be various methods for determining that, the method selected to determine mean measured concentrations should be made explicit in the reporting of test results.

3.4 Volatile substances

The vapour pressure (vp) and Henry's law constant (H) of a substance are important parameters determining the potential for a substance to be lost to the atmosphere by evaporation.

Vapor pressure is a measure of the equilibrium between the condensed and vapor phases of a substance. Vapor pressure is relevant to aquatic toxicity testing where non-dissolved test substance on the surface of the medium is in contact with the atmosphere. Under this condition transfer to the vapor phase alters the equilibrium between the dissolved and non-dissolved phases and changes the composition of the medium. The significance of losses from the medium via this route can be calculated assuming

ideal gas behavior and the volume of a mole of substance at the temperature and pressure of the system.

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 (vp, Pa) を用いてその関係式から推定できる:

$$H = \frac{vp \times MWt}{S}$$

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よい。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

The Henry's law constant for a substance is a measure of its equilibrium between an ideal solution phase and the vapour phase. As such it is a measure of the potential for a substance to be lost from solution by evaporation. Molecular weight ($MWt, g/mol$), water solubility ($S, mg/l$) and vapour pressure (vp, Pa) can be used to estimate Henry's law constant ($H, Pa \cdot m^3/mol$) from the relationship:

As an approximation, if H is greater than $100 Pa \cdot m^3/mol$, more than 50% of the substance could be lost from the water phase in 3-4 hours (Mackay, 1992). However, other factors in the test system may affect the rate of loss, principally test vessel size and shape, depth and temperature of the medium and rate of aeration. The losses due to volatilisation may become significant for substances with Henry's law constants of $1-10 Pa \cdot m^3/mol$ under vigorous mixing conditions where the opportunity for water/air exchange is high.

Losses of volatile substances from test media during preparation and exposure can be minimised using relatively straightforward modifications to procedures. As a general rule vessels should be sealed during preparation and exposure and the headspace kept to a minimum. Likewise, test concentrations should, where possible, be prepared individually by addition of test substance directly to the test vessels rather than by dilution of a stock solution. Systems with zero headspace should be used where it is not possible to analyse exposure concentrations. Syringe pumps can be used to dispense concentrated solutions of volatile substances (in water miscible carrier solvents, if required) into sealed vessels. Samples collected for analysis should be placed in zero headspace vials.

A tiered approach, along the lines of the following, is suggested for selecting an appropriate exposure system:

1. Open system, no test medium renewal, analytically determined exposure concentrations;
2. Open system, static renewal of test media, analytically

- 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
- determined exposure concentrations;
3. Open system, flow-through medium replacement, analytically determined exposure concentrations;
 4. Closed semi-static renewal or continuous flow-through system, with or without headspace, analytically determined exposure concentrations; and
 5. Closed semi-static renewal or continuous flow-through system, no headspace, nominal exposure concentrations.

適切なシステムの選定にあたっては，できれば試験期間を通して分析的に定量できる被験物質濃度を維持することを目標にして決定する。

Selection of the appropriate system should be dictated, where possible, by the goal of maintaining analytically quantifiable test substance concentrations throughout the test.

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。そうでない場合に採用する方式は，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。

Ideally, the maximum exposure concentration should not exceed the water solubility of the substance. If it is not the case, the approaches adopted should be consistent with those described in Sections 3.1 and 3.11 dealing with “Dispersions and emulsions” and “Multi-component substances”, respectively.

以下のコメントは，個々の試験に関するものである。

The following comments relate to specific tests:

- ・ 魚類試験：魚類試験では，密閉した容器中の飼育水の溶存酸素量の減少が重大な影響を与えるかもしれない。したがって，溶存酸素量をガイドラインの値以内に維持するためには，推奨範囲内で小さいサイズの魚を用いたり，試験水の量を多くしたり，純酸素を通気し足り試験水の換水頻度を増やしたりすること（半止水式あるいは流水式で）を考慮すべきである。流水式試験の投与システムについては Mount と Brungs (1966) や Benville と Korn (1974) によって記述されている。
- ・ Fish tests: Depletion of dissolved oxygen from media in sealed vessels may be significant in fish tests. Consideration should therefore be given to using fish at the smaller end of the preferred size range, larger test volumes, aeration with pure oxygen or more frequent medium renewal (semi-static or flowthrough) in order to maintain oxygen concentrations within guideline values. When using pure oxygen, the pH of the test solutions should be monitored. Dosing systems for flow-through tests have been described by Mount and Brungs (1967) and Benville and Korn (1974).
- ・ ミジンコ繁殖試験：21 日間のミジンコ繁殖試験では，試験容器が開放される機会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。ミジンコ試験においては，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式暴露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。
- ・ Daphnia reproduction test: Removal of progeny and renewal of the test media should be undertaken at the same time in the 21-day Daphnia reproduction test to minimise the number of occasions when the test vessels are unsealed. Depletion of dissolved oxygen is not generally a factor in Daphnia tests providing test volumes are not too small and the test media are changed relatively frequently e.g. daily. Flow-through exposure systems for Daphnia chronic tests have been described in ASTM (1997), Diamantino et al. (1997), Sousa et al. (1995) and US EPA (1996b).

・ **藻類試験**：高揮発性物質を用いた藻類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。藻類生長阻害試験において密閉暴露方式を使用すると、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ことを考慮すべきである。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方式も考えられる。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、結果が今までの試験方法において得られたもの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う。試験結果は、対照物質とともに報告する。

3.5 試験システム内で分解する物質

予備評価試験については 1.2 節で概略を述べたが、水中での被験物質の安定性も考慮すべきである。もし物質が安定でないようなら、元となる親物質および/あるいは同定されていればその分解産物のいずれを試験に用いるべきかの判断は、試験下ならびに現実の状況下でのその物質の半減期の検討に基づかなければならない。以下の判定基準は、止水式または換水期間 24 時間の半止水式試験についての単なる指針として提案されたものである。

- ・ 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

・ **Algal test**: Algal tests with very volatile substances are technically very difficult to perform satisfactorily and may as a consequence yield results that are difficult to interpret and of limited relevance to real-world conditions. Guidance for algal growth inhibition tests has been given in ISO (1998). The use of a sealed exposure system in the algal growth inhibition test will result in culture growth being limited by CO₂ depletion and increasing pH. Consideration should therefore be given to reducing the inoculum cell density and adding additional sodium bicarbonate to the medium. Alternatively, a flow-through system capable of maintaining the supply of CO₂ whilst avoiding a headspace could be considered. Such a system has been developed by Tjeerdema and Singer (1991) but has yet to be described in an internationally or nationally agreed test guideline. Halling-Soerensen et al. (1996) have described a system for testing volatile substances which utilises a CO₂ enriched headspace and Mayer et al. (2000) described a system using completely closed flasks with no gas phase in which gaseous CO₂ is simply replaced with NaHCO₃ and pH is adjusted with HCL. Whatever system is adopted it is advisable to establish that acceptable control culture growth can be achieved before starting the test. A test with a reference substance should also be performed to confirm that the result is consistent with that obtained in a conventional test system. The test result should be reported with the reference substance.

3.5 Substances that degrade in the test system

The preliminary stability assessment study outlined in Section 1.2 should consider the stability of the test substance in water. If the substance is likely to be unstable, a decision to test the parent substance and/or its degradation products, if identified, should be based on a consideration of its half-life under test and real-world conditions. The following decision criteria are suggested only as a guide for static and semi-static tests with medium renewal times of 24 hours:

- ・ Half-life >3 days: test parent substance;
- ・ Half-life <3 days and >1 hour: consider on a case-by-case basis, and include possible testing of degradation products;
- ・ Half life <1 hour: test degradation products.

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又は半止水式換水試験でより顕著であ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において、換水間の24時間で物質の初期濃度の20%の損失が起こるのは、およそ3日の半減期と一致する。したがって、半減期が3日未満なら、結果的に24時間で暴露濃度を設定値以下に引き下げ、分解産物の蓄積もあり得るであろう。

分解産物と親物質の両方の試験は、目的と規制の要求による。

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ら、それは親物質が分解産物より強い毒性を持つということを示している。この場合は、たとえ暴露レベルをテストガイドラインに完全に従うために必要な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べきである。さらに、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、範囲設定のための予備試験あるいは(Q)SAR分析の結果、相当の毒性あるいは他の関連する性質(例えば、分解性が低いかまったくない)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その物質の半減期の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ける飼育水の換水法の選定には、物質の化学的安定性および

These criteria are based on the assumption that problems associated with maintaining exposure concentrations are often more noticeable in static and semi-static renewal tests compared with flow through tests. Loss of 20% of the initial concentration of a substance over a 24-hour period corresponds with a half-life of approximately 3 days. A half-life of <3 days is therefore likely to result in exposure concentrations decreasing to below target values and a possible build-up of degradation products over 24 hours.

Testing of both degradation products and parent compound depends on the objectives and regulatory requirements.

The results of a preliminary toxicity test in which test organisms are initially affected and then recover may indicate that the parent substance is more toxic than its degradation products. In this case the toxicity of the parent substance should be determined, even if exposure levels cannot be maintained to the extent necessary to comply absolutely with test guidelines. It should be noted that some regulations also require the toxicity of the parent substance to be determined.

Testing of degradation products will normally be required where the results of a preliminary range-finding experiment or a (Q)SAR analysis indicates that they have significant toxicities or other relevant properties (e.g. low or no degradability). The aquatic toxicity of degradation products may be determined by allowing the parent compound to degrade and then exposing the test organisms to the resulting media. Leaving a stock or test solution of the parent substance for a period equal to 6 half-lives of the substance will generally be sufficient to ensure that the medium contains only degradation products. The pH of the degraded solution should be neutralised to that of the control medium prior to testing.

Test results obtained for non-degraded and degraded solutions should initially be compared on the basis of the concentrations of the parent substance used in preparing the solutions. In this way the relative toxicity of the parent substance and degradation products can be assessed. Identification and quantification of the degradation products may subsequently be necessary to aid in interpreting test results.

The choice of medium replacement regime in fish tests with degradation products needs to take into account water

濃度の安定性と同様に水質も考慮する必要がある。分解産物の正体が明確に同定された場合は、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。分解産物の試験には、その濃度を測定するための分析方法が必要となる。これは、親物質の判定のために必要な方法とはまた別のものである。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、適切な方法で処理および/あるいは保存する。

流水式暴露システムを設計する際に役立つ水準として、“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を選ぶには、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。適当なシステムの選択は、試験期間を通じて分析により定量可能な被験物質濃度を維持するという目的に従うべきである。

3.5.1 光分解

魚やミジンコの短期急性試験において、光分解による化学物質の分解は、暗くした環境で必要なら赤色灯を用いることで減らすことができる(ISO, 1997)。また、光分解の原因となる光の波長を特定し、選択的にそれを除去することもできる場合がある。長期の慢性毒性試験では、完全な暗所で試験を行なうことは勧められない、というのも試験生物の通常の行動を攪乱することによってさらに多くのストレスを負荷する危険性があるからである。

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。

- ・ 最初の方法は、光合成に必要な波長を保持する一方、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ということに基づいている。ただし、ほとんどの場合、光分解の原因となる波長についての情報

quality considerations as well as chemical and concentration stability. Where the degradation products have been clearly identified it may be preferable to determine their toxicity separately. The testing of degradation products imposes a requirement for an analytical method to determine their concentration. This will be additional to the method required to determine the parent substance. Samples taken for analysis should be treated and/or stored in an appropriate manner to prevent further degradation prior to and during analysis.

A useful bench-mark when designing flow-through exposure systems is that, for a substance with a half-life of 4 hours, approximately 50% of the nominal concentration should be able to be maintained using a system with 6 volume renewals in 24 hours. A flow-through system which delivers more than 6 volume replacements in 24 hours will therefore be required when it is necessary to achieve concentrations which are closer to nominal.

It should be noted that when selecting exposure regime and test vessels for unstable substances, the tiered approach suggested for volatile substances (see Section 3.4) is applicable. Selection of the appropriate systems should be dictated by the goal of maintaining analytically quantifiable test substance concentrations throughout the test.

3.5.1 Photolysis

In short-term acute fish and Daphnia tests breakdown of chemical structures by photolysis may be reduced or prevented by working in a darkened environment and using red light where necessary (ISO, 1997). It may also be possible to identify and selectively eliminate the light wavelength(s) responsible for photolysis. For longer-term chronic tests it is not advisable to carry out tests in complete darkness because of the risk of imposing additional stress by disrupting normal behaviour.

In algal tests it may be possible to determine the toxicity of the parent substance using one of two approaches:

- The first approach is based on selective removal from the illumination source of light wavelengths responsible for photolysis whilst retaining those wavelengths necessary for photosynthesis. However, this is not often workable since in most cases information on the wavelengths that

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、暗所での暴露期とそれに続く照明期を用いる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、これらの方法には問題があることも述べておかなければならない。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されるべきである。それらの試験設計で考えねばならないことは、保存溶液の光分解の可能性を排除することと暴露容器内での分解度を最小限にする適切な流水率を選定することである。

3.5.2 加水分解

親物質の暴露濃度は、試験水の調製段階にかかる時間を最小限に保つことによって最大にするようにする。物質を試験水に直接添加し、しかも素早く溶解させる方法を組み合わせるのがよい。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、

are responsible for photolysis is not available. Although the UV spectrum may be available, the particular wavelengths causing degradation are unlikely to have been identified. It is also worth considering that, in the majority of cases, it is high energy wavelengths that give rise to photodegradation and these would not pass through borosilicate glass flasks. When considering such an approach it is important to recognise that algal tests should be performed at light saturation (about $100\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ for species of green algae). Increased illumination may be required to compensate for the reduction in photosynthetic light when filters are used to remove light wavelengths responsible for photolysis. Appropriate controls should be included in the experiment design to demonstrate that illumination conditions are capable of sustaining acceptable algal culture growth.

- The second approach involves carrying out the test using a dark exposure phase followed by an illuminated phase. In this case interpretation of the test result will only be straightforward if the parent substance is algicidal, since once illuminated the potential exists for both the parent substance and the degradation intermediates to exert their effect(s).

However, it should also be mentioned that these approaches have been questioned. Instead, performing an abiotic experiment and subsequently doing an algal test on the control, simply inoculating the abiotic control with algae as appropriate (or as in the test) has been proposed.

The use of flow-through exposure systems should also be considered for photo-degradable substances. Key considerations in their design include eliminating the potential for photo-degradation of stock solutions and selection of appropriate flow-through rates to limit the extent of degradation in the exposure vessels.

3.5.2 Hydrolysis

Exposure concentrations of the parent substance should be maximised by keeping duration of the media preparation stage to a minimum. Direct addition of the substance to the test medium combined with methods to achieve rapid dissolution are preferred. Where stock solutions are required, consideration should be given to preparing these

非反応性水混和性溶剤を用いて調製することを考えるべきである(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少数の物質(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と思われる。これらの物質は暴露容器に直接添加し、強力に混合する。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。もし強力に混合した後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安全に入れる。

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、試験許容範囲内でのこれらのパラメータの調整も適切であろう。加水分解速度に及ぼすpHの影響の大きさを測定し、その結果は(必要ならば)試験用の加水分解産物の生成の条件の特定に用いる。加水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

酸化は化学構造を分解し、その結果物質の毒性に影響を及ぼす非生物学的な変質作用である。また、水系システムにおいては、酸化は水生生物種の呼吸に利用される溶解酸素量を減少させる。“還元剤”という言葉は、酸化を受けやすい物質にあてはまる。

using non-reactive water-miscible solvents to minimise hydrolysis prior to dosing test vessels (see Section 3.1.2).

Flow-through exposure systems are not considered appropriate for the small number of substances which hydrolyse at high concentrations to form polymers (e.g. alkyloxysiloxanes and isocyanates) because of the potential for fouling of the test organisms and apparatus. These substances should be added directly to the exposure vessels, vigorously mixed. All test organisms need to be added as quickly and safely as possible after test substance addition within the time-scale required to maintain the health of the control organisms, for example, 10 minutes. If the substance is too insoluble to achieve a homogeneous dispersion after vigorous mixing, it should first be diluted in a non-reactive solvent and then added directly to the exposure vessels and mixed. Once again the organisms should be added as quickly and safely as possible.

Solutions of hydrolysis products of substances which polymerise should be prepared by adding the substance very slowly to a vessel which is part-filled with water and being stirred rapidly. Once the substance has been added, the vessel should be topped up with water to the required volume and stirred continuously for a period sufficient to ensure complete hydrolysis. This procedure should enable a solution of the hydrolysis products to be produced without the formation of polymers.

Temperature and pH can influence the rate of hydrolysis of some substances. Adjustment of these parameters, within the range permitted for the test, may therefore be appropriate in order to optimise exposure concentrations of the parent substance. The significance of pH for the rate of hydrolysis should be determined and the result used (if required) to identify conditions for producing hydrolysis products for testing. Testing of hydrolysis products should be performed at the normal test medium pH.

3.5.3 Oxidation

Oxidation is an abiotic transformation process which can result in breakdown of chemical structure and consequent effects on the toxicity of a substance. In aquatic systems oxidation also reduces the amount of dissolved oxygen which is available for respiration by aquatic species. The term “reducing agents” is applicable to substances which are subject to oxidation.

酸化は酸素を添加した飼育水中では防ぐことができない。それゆえ溶存酸素濃度の維持は、魚や無脊椎動物の試験にとって重要な考慮事項である。止水式、半止水式換水あるいは流水式の暴露方式のうちどれを選ぶかは、溶存酸素量を試験の許容範囲内に維持する必要性によって決まる。酸素濃度の維持は飼育水のエアレーション、試験水の増量および/あるいは収容する試験生物数を減らしたり試験水の換水率/頻度を増やすことによって促進される。流水式試験システムが適当であることが多い。被験物質の保存溶液は、試験水中に添加されるまでは無酸素状態（例えば窒素下）に保つ。

3.5.4 生分解

易生分解性試験物質は、水系試験システムにおいて一旦強力な細菌群が確立されると、分解されやすくなる。それゆえ暴露濃度の維持は、微生物群の著しい増殖を防ぐことにかかっている。

試験開始から試験期間中にわたり試験容器を徹底的に清潔にしておくことで、被験物質を分解することのできる細菌群の発育を遅らせ、制限することはできるが、防ぐことはできない。古い飼育水の移入は最小限にとどめ、試験容器を入念に清掃し、できれば換水時に滅菌することもまた重要である。抗生物質の使用は控える。どうしても使用しなければならない場合は、試験委託者および試験実施者はその正当性を明らかにしなければならない。試験設計には、抗生物質対照区も加える必要がある。

十分な量の換水を行い、高濃度保存溶液を窒素下で維持する流水式暴露方法は、好氣的生分解を防ぎ、分解物質の濃度を最小限にし、親物質の暴露濃度を維持するということが明らかにされている（Tolls ら、1997）。よい衛生状態を保てば、暴露システムの表面に細菌群が大量発生するのを防げるであろう。

溶存酸素濃度の維持には、特に魚類の試験では、注意を払うべきである。

Oxidation cannot be prevented in oxygenated aqueous media. Maintenance of dissolved oxygen concentration is therefore a key consideration for fish and invertebrate testing. Selection of a static, semistatic renewal or flow-through exposure regime should be guided by the need to maintain the dissolved oxygen concentration within the range permitted for the test. Maintenance of oxygen concentration may be facilitated by aeration of the medium, increasing the volume of test medium and/or reducing the test organism loading or increasing the rate/frequency of test medium renewal. Flow-through test systems may often be appropriate. Stock solutions of the test substance should be kept under anoxic conditions (e.g. under nitrogen) until introduced to the test medium.

3.5.4 Biodegradation

Readily biodegradable test substances are likely to be degraded in aquatic test systems once competent bacterial populations become established. Maintenance of exposure concentrations is therefore dependent upon preventing the development of significant microbial populations.

Strict test vessel hygiene, at the start and during the course of the test, will delay and limit but not prevent the development of populations of bacteria capable of degrading the test substance. It is also important that carryover of old test medium is kept to a minimum and that test vessels are thoroughly cleaned and, where possible, sterilised at medium renewals. Antibiotic use is to be avoided. When they must be used, this should be defended by the sponsor and the testing laboratory. An antibiotic control will also need to be added to the experimental design.

A flow-through exposure regime with sufficient volume renewal and a high concentration stock solution maintained under nitrogen has been shown to: prevent aerobic biodegradation, minimise the concentration of breakdown products and maintain exposure concentration of the parent substance (Tolls et al., 1997). Good hygiene procedures will also help to prevent the development of high bacterial populations on surfaces in the exposure system.

Care should also be taken to maintain dissolved oxygen concentrations, particularly in fish tests.

3.6 吸着性物質

殆どの場合、暴露システムの表面や有機物質への吸着は、被験物質濃度が比較的低い時（例えば <1mg/L）にのみ重要となる。損失の原因となる最もよく起こる吸着のメカニズムは以下のようなことである：

- ・物質と容器表面の水酸基との間の水素結合あるいはイオン結合を介しての試験容器（通常はガラス製）への吸着。ガラス表面は、界面活性剤のような陽イオン物質と結合できる、負に荷電した水酸基を提供する。塩橋（salt bridge）はCa²⁺やMg²⁺のような2価の陽イオン物質によって形成されるが、これもまた陰イオン性物質の結合の原因となる。
- ・藻類細胞のような負に荷電したの生物材料への吸着は、上記と同様のメカニズムで行われる。

物質の損失がテストガイドラインの遵守を損なうような場合は、吸着を減らすため以下のような方法を考慮すべきである。

- ・試験水量に対する表面積の割合を低くする。
- ・半止水式あるいは流水式試験では試験水の換水頻度や割合を増やす。
- ・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た暴露方式を構成する。
- ・暴露システムの構成において、高吸着性物質の利用を避ける（特に、ゴムとポリエチレンは、いかなる場合でも暴露システムの一部として使用してはならない）。
- ・被験物質溶液を用い、試験容器の事前コンディショニングを行なう。（注：容器のコンディショニングに用いる被験物質の濃度は試験濃度を超えてはならない、さもないと試験期間中に物質が脱着して暴露濃度が高くなってしまおうであろう。流水式では、吸着性の物質の試験であろうと、必ず被験物質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。）

3.6 Adsorbing substances

In most cases adsorption onto surfaces of exposure systems and onto organic material will only be important where relatively low concentrations of a substance are being tested (e.g. <1 mg/l). The most common adsorption mechanisms responsible for losses are as follows:

- adsorption to test vessels (typically made of glass) via hydrogen or ionic bonding between the substance and hydroxyl groups on the vessel surfaces. Glass surfaces offer negatively charged hydroxyl groups which can bind with cationic substances such as surfactants. Salt bridges, formed by divalent cationic substances, such as Ca²⁺ and Mg²⁺, may also be responsible for binding anionic substances;
- adsorption to negatively charged biological material, such as algal cells, by the same mechanisms described above.

The following approaches to reducing adsorption should be considered where losses of the substance are likely to compromise compliance with test guidelines:

- reducing the surface area to test medium volume ratio;
- increasing the frequency or rate of test medium renewal in semi-static and flow-through tests;
- construction of exposure systems using non-adsorptive materials such as polytetrafluoroethylene (PTFE);
- avoiding using highly adsorptive materials in the construction of exposure systems (in particular, rubber and polyethylene should never be used as part of exposure systems in any situation);
- pre-conditioning of test vessels using solutions of the test substance (N.B.: The concentration of the test substance used to condition a vessel should not exceed the test concentration appropriate to the vessel otherwise the substance may desorb during the test and increase the exposure concentration. It should be noted that any flow through regime should always be equilibrated with the test substance, regardless of adsorptive substance testing or not, and confirmed by the pre-test samples on e.g. two days at least.);

・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、試験容器の事前コンディショニングを行なう。(注:多くのシラン処理剤は毒性が高いので、容器が試験に用いられる前に残留物が除去されていることを確認するよう十分な注意が必要である。水で繰り返しすすいだりあるいは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すすいでもよい。)

・特殊な試験を行う場合を除き、急性試験での溶解有機炭素濃度(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

ガラスに吸着する物質は、通常、きわめて疎水性である。分析のためのサンプリングに用いる容器表面への被験物質の吸着による損失は、前もって容器を少量(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混和性溶剤で処理しておくことによって防ぐことができる。サンプリング容器のガラス表面への吸着よりは、溶剤相への分離の方がまだよい。

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、軽減できるかもしれない。

試験結果は一般的には測定された暴露濃度との相関で表す。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、それでもなお測定された暴露濃度で表すべきである。一部の規制に適合させるためには、溶解している有機炭素への吸着によってどこまで陽イオン物質の毒性が緩和され

・ pre-conditioning of test vessels using silanising agents (e.g. a 5% solution of dichlorodimethylsilane in chloroform or heptane) [N.B.: many silanising agents are highly toxic and great care should be taken to ensure that residues are removed from the vessels before they are used in a test. A regime of repeated rinsing with water or baking at 180oC for 2 hours has been recommended (ISO, 1997). Organic solvents such as methanol could also be used in the rinsing steps];

・ maintaining dissolved total organic carbon concentrations (other than that due to the test substance) in all tests at or below 2 mg/l, unless special studies are being conducted;

・ removing excess food from test vessels after feeding has finished;

・ feeding of fish a few hours before test medium renewal in semi-static tests; and

・ using semi-static or flow-through exposure regimes instead of a static one.

Substances which sorb onto glass are usually very hydrophobic. Adsorption losses of test substance onto the surfaces of vessels used for analysis sampling can be prevented by priming the vessel with a small volume (usually 10-20 ml when a 50 ml sample is taken) of a water-non miscible solvent, such as hexane. Partitioning into the solvent phase is favoured at the expense of sorption onto the glass surfaces of the sampling vessel.

The influence of sorption on algal biomass in algal toxicity tests may be mitigated by reducing the inoculated algae concentration and/or the test duration in order to reduce the final algal biomass.

Test results should generally be expressed relative to measured exposure concentrations. Although analysis methods for cationic substances are incapable of distinguishing between bound and free test substance results should, nonetheless, be expressed in terms of measured exposures. For some regulatory applications it may be necessary to determine the extent to which the

るかを測定することが必要とされる場合もある。この問題については付録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)や微量元素量の試験水中の利用能を低下させる。以下のもの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

物質の錯体形成度は、補錯体化剤の利用能やpHのような飼育水の他の性質による。添加された総設定濃度から溶解した被験物質濃度と錯体形成された被験物質濃度を算出するには、分化モデルが用いられる。

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が、標準手法に修正を加えたプロトコルはその利用を該当する規制当局によって許可、承認されねばならない。

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、金属錯体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

toxicity of a cationic substance is mitigated by adsorption to dissolved organic carbon. This topic is briefly addressed in Annex 3.

3.7 Complexing substances

Complexation may significantly affect the bio-availability and toxicity of a test substance. It may also reduce the availability in the test medium of salts (such as calcium and magnesium) and trace elements which are essential for supporting healthy test organisms. The following are examples of substances which may be involved in complexation:

- EDTA;
- Polyanionic polymers with carboxylic and phosphoric acids;
- Phosphonates; and
- Metals.

The extent to which a substance is complexed will depend upon the availability of co-complexing agents and other properties of the medium such as pH. Speciation models may be used to calculate the concentrations of dissolved and complexed test substance from the total nominal concentration added.

Data from tests in which complexation has been judged to have had a significant bearing on the result are likely to be of questionable value for classifying substances and for extrapolating to a predicted no effect concentration for risk assessment. The extent to which effects are a direct consequence of chemical toxicity or a secondary effect, resulting from for example complexation induced nutrient limitation, should be determined where possible. Compensatory adjustment to water quality parameters or the testing of an appropriate salt of the test substance help to achieve a valid test result but protocols incorporating modifications to standard procedures should be validated and approved for use by the appropriate regulatory authority.

The effects of metal complexing substances in algal growth inhibition tests are mainly caused by chelation of essential cations, which leads to growth limiting reductions in the concentration of uncomplexed physiologically active ions. Inhibition of algal growth by metal complexing agents is therefore a secondary effect, which cannot be attributed to substance specific inherent

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は付録4に書かれている。

暴露濃度を測定する上で、被験物質の錯体形成分画と錯体非形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、金属分画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形成モデル、例えばMINTEQ (Brown and Allison, 1987), WHAM (Tipping, 1994) and CHESS (Santore and Driscoll, 1995)は、金属イオンの錯体形成分画と錯体非形成分画を計算するために用いることができる。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の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真の毒性を判定するにあたって特有の問題が存在する。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

着色物質は光合成を活性化する光を吸収するので、藻類の生長を制限することがある。吸収は被験物質の濃度に比例し、その結果、化学的毒性によって引き起こされたものと区別するのが困難な生長阻害の結果をもたらしかねない。

toxic properties. The secondary effects can be eliminated by compensating for the deficit in the concentration of the essential ion(s). Guidance on toxicity mitigation testing with algae for chemicals which form complexes with and/or chelate polyvalent metals is given in Annex 4.

Analysis methods for quantifying exposure concentrations, which are capable of distinguishing between the complexed and non-complexed fractions of a test substance, may not always be available or economic. Where this is the case approval should be sought from the regulatory authority for expressing the test result in terms of nominal concentrations.

Complexation of metals to organic and inorganic ligands in test media and natural environments can be estimated from metal speciation models. Speciation models for metals, including pH, hardness, DOC, and inorganic substances such as MINTEQ (Brown and Allison, 1987), WHAM (Tipping, 1994) and CHESS (Santore and Driscoll, 1995) can be used to calculate the non-complexed and complexed fractions of the metal ions. Alternatively, the Biotic Ligand Model (BLM), allows for the calculation of the concentration of metal ion responsible for the toxic effect at the level of the organism. The BLM model has at present only been validated for a limited number of metals, organisms, and end-points (Santore and Di Toro, 1999). The models and formulae used for the characterisation of metal complexation in the media should always be clearly reported, allowing for their translation back to natural environments.

3.8 Coloured substances

The prime objective of aquatic toxicity tests is to determine the inherent toxicity of a substance. Coloured substances can present particular problems for determining true toxicity in algal tests and in tests with *Daphnia* sp. In fish tests, observation of behaviour and mortality of fish could also be difficult.

Algal tests

Coloured substances can absorb photosynthetically active light and hence limit growth of algal cultures. Absorption will be proportional to test substance concentration and as a consequence it can result in growth inhibition which is difficult to distinguish from inherent toxicity.

着色物質の藻類に対する本質的な毒性の判定に関しては、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）、その作業はこの分野で進みつつある（Justesen と Nyholm, 1998）。国際標準化機構（ISO, 1997）は毒性と光の吸収の結果起こる影響を区別するために以下のような一般的な方策を明らかにした。

- 光飽和以上における生長率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。
- 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被験物質液に相当する濃度の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。
- 暴露濃度群と逆の希釈度に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。

注：後者2つについては注意を払ったほうがよい。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より複雑に影響を受けるので疑わしい点がある。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。実際は、光路を短くし、光強度を増加し、ちょうどよい攪拌を維持することで行えるだろう（Justesen and Nyholm, 1998）。

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。

植物試験

浮遊性の植物ウキクサ (*Lemna* Sp.) を用いた試験は、試験水の光学的性質によって影響を受けないので、着色物質のためのさらなる選択肢

The need for clear guidance on how to determine the inherent toxicity of coloured substances to algae is widely recognised (EC, 1996a) and work is ongoing in this area (Justesen and Nyholm, 1998). The International Organization for Standardization (ISO, 1997) has identified the following general strategies for discriminating between effects resulting from toxicity and light absorption:

- testing at different light intensities, since the growth rate above light saturation is almost independent from the light intensity;
- reducing the light path by reducing the depth or the volume;
- measuring the reduction of cell proliferation in a control batch when the light previously passes through a liquid light transmission filter, e.g. a flat dish containing corresponding dilutions of the sample with the corresponding colour and layer thickness; and
- utilising a light transmission filter by preparing reciprocal dilutions to the exposure concentrations thus maintaining a common light path length (constant depth) and the spectral absorbance characteristics of the sample.

Note: Care should be taken with the approaches described in the last two bullets. Utilising external filters is questionable because the light conditions in the test flasks are affected by a coloured substance in a much more complicated way than with the external absorption method. Instead, it is better to change the incubation system to compensate for the internal light absorption, thereby minimising its effect. In practice, this can be done by shortening the light path, increasing the light intensity, and maintaining a good turbulence (Justesen and Nyholm, 1998).

Specific methods under development which incorporate some of the above features have been described by Memmert (1994) and Comber et al. (1995). There is, however, limited experience of their application and as a consequence they cannot be endorsed at this stage.

Plant tests

Testing with the floating plant, *Lemna* sp., may provide a further alternative for coloured substances since it is unaffected by the optical properties of the test medium. A

となり得る。この種を用いた生長阻害試験のための OECD テストガイドラインは現在準備中であるが、この試験が藻類生長阻害試験と同等と考えると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 ($\log K_{ow}$) 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にとっては、試験系の中で、試験生物 (バイオマス)、餌あるいは他の有機物中または表面に分配されるのは、潜在的に重要な損失作用である。オクタノール/水分配係数が大きいということは通常低い水溶解度と関連があり、したがって、分配による損失は疎水性物質にとってより重大なことと考えられる。

難水溶性物質の溶液調製方法については 3.1 節で論ぜられている。急性毒性試験に用いる飼育水における疎水性物質の暴露濃度を維持するための方策には以下のようなことが含まれている。

- 試験水量に対する試験生物量の割合を引き下げる (すなわち魚の試験では 1 g 未満/L) を利用する。
- 半止水式換水あるいは流水式の方式を用いる。
- 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

draft OECD Test Guideline for a growth inhibition test with this species has been developed but it still has to be established whether the test can be considered equivalent to the algal growth inhibition test.

Invertebrate tests

Observation of small invertebrate test organisms, such as *Daphnia* sp., can be difficult in highly coloured test media. Observations may be made easier by placing test vessels on a light box or transferring the contents of the test vessels to shallow containers for scoring.

3.9 Hydrophobic substances

Partitioning of test substances into or onto test organism biomass and onto food or other organic detritus in the test system is a potentially important loss mechanism for hydrophobic substances with high octanol/water partition coefficient ($\log K_{ow} > 4$) or bioconcentration factor (BCF > 500). High octanol/water partition coefficients are generally associated with low water solubility and hence losses due to partitioning are likely to be more significant for hydrophobic substances.

Methods of preparing solutions of poorly water-soluble substances have been discussed in Section 3.1. Strategies for maintaining exposure concentrations of hydrophobic substances in aquatic toxicity test media include:

- reducing the ratio of test organism biomass to test medium volume (i.e. the use of a ratio of < 1 g/l in fish tests);
- using a semi-static renewal or flow-through exposure regime;
- increasing the frequency or rate of test medium renewal in semi-static and flow-through tests;
- removing excess food and detritus;
- maintaining dissolved total organic carbon concentrations (other than that due to the test substance) in acute tests at or below 2 mg/l;
- feeding (e.g. of fish) a few hours before test medium renewal in semi-static tests; and

- ・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

疎水性物質を用いる藻類試験における暴露濃度の分析には、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であろう。分配が相当量あると思われる場合は、試験水から藻類細胞を分離した後の暴露濃度を定量するのが適切であろう。分離技術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。

試験水面に浮かんだ疎水性被験物質の被膜は、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閉じ込める。したがって、生物を入れる前に被膜を取り除くか、あるいはスクリーン、ケージ及び他の装置を用いて生物と接触するのを防がねばならない。ミジンコが表面に閉じ込められるのを防ぐ工夫については Dean と De Graeve (1986) によって記述されている。

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比較的小さな pH の変化で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。変化した解離平衡は次に物質の水溶解度や分配係数に、そしてそれと共にその生物利用能や測定可能な毒性にまでも有意に影響を及ぼす。それゆえ、試験を開始する前に適切な解離定数 (pK_a 値) を知っておく必要がある。

毒性試験の設計では、pH の調整が引き起こす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 pK_a が試験の通常の 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有する可能性を判定するためには予備試験を検討した方がよい。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。

- ・making the system surfaces saturated with the compound so that it does not 'plate' out.

Analyses of exposure concentrations in algal tests with hydrophobic substances may need to take account of the potential for partitioning of the test substance onto the algal biomass. Where partitioning is likely to be significant it may be appropriate to quantify exposure following separation of algal cells from the test medium. Separation techniques include centrifugation and filtration and both of these are subject to the comments made in Section 3.1.1.

A film of hydrophobic test substance floating on the surface of test media may physically trap small aquatic invertebrates, such as daphnids. It should therefore either be removed before introducing the test organisms or the organisms should be prevented from coming into contact with it using screens, cages or other suitable devices. A device for preventing surface trapping of daphnids has been described by Dean and De Graeve (1986).

It is advisable to consult Section 3.6, since there is much overlap between hydrophobic substances and adsorbing substances.

3.10 Ionised substances

Relatively small changes in pH can significantly alter the balance between the dissociated and non-dissociated forms of some organic acids and bases. Altered dissociation equilibrium may in turn significantly affect the water solubility and partition coefficient of the substance, and thus also its bioavailability and measurable toxicity. It is, therefore, essential that the relevant dissociation constants (pK_a values) are known prior to commencement of testing.

Design of the toxicity test should take into account the effects on dissociation equilibrium that adjustments to the pH may cause. A preliminary test, to determine the potential for differing toxicity of the two or more forms of the substance, should be considered where the pK_a for the test substance falls within the normal pH range of a test. The definitive test should be conducted at a pH consistent with the more toxic form of the substance whilst remaining within the range required to maintain the health of the control organisms.

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。

試験培養する藻類の生長は、 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”と呼ぶ。多成分物質の試験水の調製および/あるいは試験法は、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。

Where the substance itself causes a change to the pH of the test medium, the pH should be adjusted to lie within the specified range for the test using acid, alkali or other suitable buffer. It should be noted that the use of buffers can affect the result of the test - particularly for algae. Furthermore, this can cause sedimentation and/or degradation of the test substance. The suitability of any proposed buffer system should therefore be assessed prior to use in the definitive test. Adjustments to pH may be carried out in the stock solutions used to prepare the test media or in the media itself, as judged appropriate. In either case the procedure should be applied to all treatments, including the controls.

Growth of algal test cultures can cause increase of pH due to consumption of HCO_3^- ions. Maintenance of stable pH when testing an ionised substance is therefore important to ensure that the balance between dissociated and non-dissociated forms of the substance is maintained. Strategies for maintaining the concentration of HCO_3^- ions and therefore reducing pH shifts have been discussed in Section 3.4.

3.11 Multi-component substances

Mixtures comprising a complex mix of individual substances with different solubility and physical-chemical properties are frequently referred to as “complex mixtures”. In most cases, they can be characterized as a homologous series of substances with a certain range of carbon chain length/number or degree of substitution (e.g. petroleum). In this Guidance Document, these are referred to as “multi-component substances”. Different approaches to media preparation and/or testing are required for a multi-component substances depending on whether they are fully or partially soluble in the test media across a proposed range of test concentrations.

Fully soluble

Test methods consistent with those described for water-soluble substances are appropriate for mixtures comprising components which dissolve fully within the proposed range of test concentrations. Mixture components may, however, have individually properties (e.g. degradability, volatility etc.) that require steps to be taken to control losses.

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、実際的に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。

水生毒性のためのクラス分けに WAF の試験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そのデータを受け取る規制当局によって適当と認められるように、該当する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。定量の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)

Partially soluble

When multi-component substances is not fully soluble in water, it is important to seek to identify its components as far as practically possible and to examine the possibility of determining its toxicity using available information on its components. Only when the toxicity cannot be calculated, testing of the multi-component substances is considered.

The toxicity of complex multi-component substances, which are only partially soluble in water, can be determined by preparing water-accommodated fractions (WAFs) of them. The term water-accommodated fraction is applied to aqueous media containing only the fraction of multi-component substances that is dissolved and/or present as a stable dispersion and emulsion. Test data obtained with WAFs apply to the multi-component substances as an entity.

Using the data derived from the testing of WAFs for classifying for aquatic toxicity is referred to in the draft *Guidance Document on Use of the Harmonized System for the Classification of Chemicals which are Hazardous for the Aquatic Environment (OECD, 2000)*. It should be noted that applicability of WAFs depends on the objectives of regulatory authorities. When doing WAF testing, the appropriate regulatory authority should be consulted so that the data generated on WAFs are deemed appropriate by regulatory authority receiving the data. For example, in the cases where poorly soluble components in the multi-component substances are of concern, the WAF method is not adequate to determine the toxicity of such multi-component substances.

WAFs are prepared individually and not by serial dilution of a single stock WAF. Measured amounts of multi-component substances are added directly to water and mixed for a period of time sufficient to achieve an equilibrated concentration of dissolved and dispersed or emulsified components in the aqueous phase. Following cessation of mixing and a period of settling (to allow phase separation) the aqueous phase, i.e. the WAF, is drawn off for testing. The duration of the mixing and settling phases should normally be determined by carrying out a preliminary study.

Techniques such as turbidimetry and total organic carbon analysis may provide a useful indication of the progress of mixing and phase separation. Procedures for preparing WAFs of oil products and products such as creosote, have

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、それぞ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 の構成や粒子の大きさ、分散物質と非分散物質の割合に多大な影響を及ぼすことを認識することが重要である。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。同様に表面に被膜を形成する混合物分画は、表面で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、その WAF を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ために、“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られる混合物と飼育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。

been described by Girling (1989) and Tadokoro et al.(1991) respectively.

WAFs should be prepared by adding carefully measured amounts of the substance to the test medium and then applying appropriate mixing techniques. The presence of water-miscible solvents can modify the composition of a WAF and as a consequence they should not be used during preparation. The severity of the mixing regime should be guided by the desire to attain an equilibrated test medium as quickly as possible whilst avoiding, where possible, the formation of emulsions. Care should be taken due to the fact that some multi-component substances will have an innate tendency to form an emulsion or dispersion and will require to be tested as such (see Section 3.1.2).

It is important to recognize that the duration of mixing and energy input can have a marked influence on the composition, particle size and proportion of dispersed and non-dispersed test material in the WAF. Generator systems described in Section 3.1.2 are not appropriate media preparation methods for multi-component substances. The method used to prepare the WAF should therefore be fully described in the test report and evidence of its compositional stability over time provided.

Generally, any non-dissolved test material which has sedimented or precipitated out in the test vessels should be removed from the test media using, for example, a separating funnel. Similarly any fraction of the mixture forming a surface film should be decanted to prevent surface trapping. Where there is a need to retain an excess of the multi-component substances in the test vessels, steps should be taken to prevent trapping or fouling of test organisms (See section 3.9 on Hydrophobic substances).

Only a fraction of the total mass of multi-component substances responsible for the composition of a WAF may be present in the WAF. The loading rate has therefore been advocated for expressing exposures of mixtures that neither wholly dissolve nor completely form a stable dispersion or emulsion over the required test range (Girling et al.,1992). The loading is the mass to volume ratio of the mixture to medium used in the preparation of a WAF. WAFs may be thus considered analogous to the term “nominal concentration” used for typical test substances, with all the limitations inherent to that term.

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の変化を確認できる方法が必要である。これには赤外/紫外分光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。

Chemical specific analysis is required to demonstrate attainment of equilibrium in WAF preparation and stability during the test. Methods capable of identifying gross changes in the composition of WAFs with time are required. Infra-red or ultra-violet spectroscopy or total peak area have been used successfully for this purpose. Total organic carbon analysis may also be useful in monitoring any losses of test material from test media but the low sensitivity of the method (approximately 1mg/L) may limit its applicability.

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計的手法は、LC50、EC50、NOEC 値に用いるのものと同一である。

Effects concentrations in tests based upon WAFs can be calculated from (1) the loading rates and are identified as either LL50 or EL50 values and/or (2) the measured mass of test substance in the WAF and are identified as either LC50 or EC50 values. For example, some regulatory authorities in the United States require the latter approach so that an adequate risk assessment can be done for the test substance. LL50 or EL50 values are comparable to LC50 or EC50 values determined for pure substances tested within their solubility range. Similarly the NOEC (No Observable Effect Concentration) becomes the NOELR (No Observable Effect Loading Rate). The statistical methods used to determine LL50, EL50 and NOELR values are the same as those used to determine LC50, EC50 and NOEC values.

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

3.12 Preparations

Preparations are defined as a deliberate physical mixture of substances. Testing of preparations is only advocated in the following instances:

- where the toxicity of the preparation cannot be calculated from the toxicity of its component substances (N.B.: In this instance, consideration should first be given to determining the toxicity for any of the component substances for which data are lacking, so that the toxicity of the preparation can then be calculated);
- where data confirming the calculated toxicity are specifically requested; and
- where there is a regulatory requirement which is commonly the case for registration of pesticides and biocides.

調合品全体の試験が要求される場合は、前述し

Where testing of the preparation as a whole is required,

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いため、多成分混合物で明らかに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. 暴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

分析のために試験水のサンプルを採集するスケジュールは、しばしば試験ガイドライン中に含まれている。以下の推奨事項は、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。これらのスケジュールは純物質の溶解度の範囲内で行われる試験にのみ適応される。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暴露濃度を十分に表すことができない危険があるということに注意する。それゆえ一般的な原則としては、高頻度で全濃度のサンプリングを行なうスケジュール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、十分に確立されている方法を用いて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、

the approaches identified above for multi-component substances should be considered.

In general, alloys can be considered separately from other preparations due to their unique physical and chemical properties that differentiate them from simple mixtures of constituent elements. An alloy can be defined as a metallic material, homogeneous on a macroscopic scale, consisting of two or more elements so combined that they cannot be readily separated by mechanical means. Due to the decreased solubility or lack of solubility of many alloys, the approaches identified for multi-component substances are not appropriate. However, care should be taken due to the fact that some alloys such as powered brass show toxicity to aquatic organisms.

4. Sampling of test media for analysis of exposure concentrations

A detailed consideration of analysis techniques for use in aquatic toxicity tests is outside the scope of this document. Sections 4.1 and 4.2 are therefore limited to providing guidance on the design of sampling schedules and methods of sampling.

4.1 Sampling schedules for analysis of test media

Schedules for collecting samples of test media for analysis are often included in testing guidelines. The following recommendations are designed to supplement the information given in the guidelines and provide a lead where guidance is lacking.

Sampling schedules for analytical support to tests with algae, plants, daphnids and fish are outlined below. These schedules only apply to tests carried out within the solubility range of pure substances. It should be noted that for difficult substances there is a risk in analysing only the minimum number of samples that the exposure concentrations will be inadequately described. As a general rule it is therefore advisable, to schedule for sampling all concentrations at a higher frequency. Under some circumstances it may be possible to take additional samples and preserve them using fully validated methods. Analysis of the additional samples is only carried out if results from the minimum sample set provide insufficient data to adequately quantify exposure. It is recommended

十分に暴露濃度を定量するデータが得られなかった場合にのみ行なう。例えば、揮発による損失が予測されるような場合には、平均測定濃度を得るために、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。流水式の暴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ことにも注意する。

4.1.1 藻類生長阻害試験

暴露濃度の分析のために特別に調製した試験水は、試験に用いられる時と同じように、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、溶解被験物質の正確な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、試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。試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。

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% 以内にとどまらな

that mean measured concentrations be taken at the beginning of the test, and 24-hour intervals throughout the test in order to obtain the mean measured concentrations, where losses due to e.g. volatility are anticipated. It should also be noted that where the flow-through exposure system is selected, analytical samples should be taken at the beginning of the test to verify that the system is stable and operating correctly.

4.1.1 Algal growth inhibition test

Test media prepared specifically for analysis of exposure concentrations should be treated the same as those used for testing i.e. they should be inoculated with algae and incubated under test conditions. It may be necessary to subsequently separate algae from the medium or to analyse a series of test solutions incubated under test conditions but with no algae in order to obtain a correct determination of the dissolved test substance concentration (see Section 3.9). Since requirements may vary between different regulatory authorities, it is good practice to consult with the appropriate authority.

Analysis at the start and end of the test of a low and high test concentration and a concentration around the expected EC50 may be sufficient where it is likely that exposure concentrations will remain within 20% of nominal values. Analysis of all test concentrations at the start and end of the test is required where concentrations are unlikely to remain within 80-120% of nominal.

4.1.2 Lemna growth inhibition test

This test may be carried out using static, semi-static renewal or continuous flow-through exposure regimes.

Static

A static test is appropriate where exposure concentrations are expected to remain within 80-120% of nominal over the 7-day exposure period. Analysis of the highest and lowest test concentration and a concentration around the expected LC50 at the start and end of the exposure period is considered the minimum requirement.

Semi-static

A semi-static renewal regime is recommended where exposure can not be maintained within 80-120% of the

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

nominal values over the test duration (7 days). Analysis of the highest and lowest test concentrations and a concentration around the expected LC50 at the start and end of each renewal period is recommended. Renewing the test media on, at least, two occasions during the test (e.g. days 3 and 5), is considered the minimum requirement.

Continuous flow-through

A continuous flow-through regime may be preferred in some circumstances, e.g. where concentrations are expected to decline from nominal by more than 20% over 24 hours.

If, under flow-through conditions, measured concentrations are likely to remain within 80-120% of nominal then the highest and lowest test concentrations and a concentration around the expected LC50 should be analysed at the start, mid-way through and at the end of the test. If the concentrations are expected to decline by more than 20% then all the concentrations should be analysed at the start, mid-way through and at the end of the test.

4.1.3 Daphnia acute immobilisation test

Analysis of highest and lowest test concentrations and a concentration around the expected EC50 at the start and end (typically after 48 hours) of the exposure period may be sufficient where it is likely that exposure concentrations will remain within 80-120% of nominal values. Analysis of all test concentrations is required where concentrations are unlikely to remain within 80-120% of nominal.

Daphnia acute immobilisation test might be carried out using semi-static renewal or flow-through regimes, but these approaches are not prevalent due to practical and cost reasons. Renewal systems are not recommended in the OECD Test Guideline.

4.1.4 Daphnia reproduction test

This test may be carried out using semi-static renewal or continuous flow-through exposure regimes.

Semi-static

Where the concentration of the test substance is expected to remain within 80-120% of nominal, it is recommended that the highest and lowest concentrations and a

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% 以内にとどまらなる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

concentration around the expected NOEC/ECx are analysed when freshly prepared and immediately prior to renewal on one occasion during the first week and thereafter weekly during the test. Where the test concentrations are not expected to remain within 80-120% of nominal, it is necessary to either analyse all concentrations or consider a continuous flow-through test.

Continuous flow-through

Where the test substance concentrations are expected to remain within 80-120% of nominal, it is recommended that the highest and lowest test concentrations and a concentration around the expected NOEC/ECx are analysed three times during the first week and thereafter weekly during the test. Where the test concentrations are not expected to remain within 80-120% of nominal, all the concentrations should be analysed three times during the first week and thereafter weekly during the test.

4.1.5 Fish acute toxicity test

The test may be carried out using static, semi-static renewal or continuous flow-through exposure regimes.

Static

A static test is appropriate where exposure concentrations are expected to remain within 80-120% of nominal over the 96 hour exposure period. Analysis of the highest and lowest test concentration and a concentration around the expected LC50 at the start and end of the exposure period is considered the minimum requirement.

Semi-static

A semi-static renewal regime is recommended where exposure can be maintained within 80-120% of the nominal values by renewing the test media at 24 or 48 hour intervals. Analysis of the highest and lowest test concentrations and a concentration around the expected LC50 at the start and end of the first 24 or 48 hour renewal period is considered the minimum requirement.

Continuous flow-through

A continuous flow-through regime is recommended where concentrations are expected to decline from nominal by more than 20% over 24 hours.

If, under flow-through conditions, measured concentrations are likely to remain within 80-120% of nominal then the highest and lowest test concentrations

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。

もし、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

化学分析のための試験水のサンプリングはそれぞれのケース固有の問題であり、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不可能である。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

and a concentration around the expected LC50 should be analysed at the start, mid-way through and at the end of the test. If the concentrations are expected to decline by more than 20% then all the concentrations should be analysed at the start, mid-way through and at the end of the test.

4.1.6 Fish prolonged toxicity test, fish early-life stage toxicity test, fish juvenile growth toxicity and fish short-term toxicity on embryo and sac-fry stages

Fish prolonged toxicity test, fish early-life stage toxicity test, fish juvenile growth toxicity and fish short-term toxicity on embryo and sac-fry stages are classified into this category. These tests may be carried out using semi-static renewal or continuous flow-through exposure regimes.

Semi-static

A semi-static renewal regime is recommended where exposure can be kept to within 80-120% of the nominal values by renewing the test media at intervals. Analysis of the highest and lowest test concentrations and a concentration around the expected NOEC/ECx at the start and end of the first renewal period and thereafter at least weekly is considered the minimum requirement.

Continuous flow-through

A continuous flow-through regime is recommended where concentrations are expected to decline from nominal by more than 20% over 24 hours.

If, under flow-through conditions, measured concentrations are likely to remain within 80-120% of nominal then the highest and lowest test concentrations and a concentration around the expected NOEC/ECx should be analysed three times during the first week and thereafter at least at weekly intervals. If the concentrations are expected to decline by more than 20% then all the concentrations should be analysed three times during the first week and thereafter at least at weekly intervals.

4.2 Taking of media samples for chemical analysis

Sampling of test media for chemical analysis will be case specific and it is therefore not possible to give guidance which will be applicable in all cases. However, it is likely that it will be important to consider the following when developing a suitable method:

とが重要であろう：

- ・ 被験物質に特別な考慮を正当化する物理化学的性質があるか。前に試験に関する部分で論じ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暴露を測定するためには、どれくらいのサンプル量が要求されるのか。
 - ・ 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使用し、試験容器のどの部分からサンプルを採取すればよいのか。
 - ・ サンプル採取と分析の間の許容できる時間的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。
- Does the test substance have physical-chemical properties which warrant special consideration. The properties of difficult test substances discussed earlier in the context of testing may also be relevant to sampling and analysis?
 - What sample volume is required in order to measure exposure to the required level of accuracy and precision?
 - Will it be necessary to set up additional test vessels in order to obtain an adequate sample volume?
 - What method of sampling should be employed and where in the test vessels should samples be taken?
 - What time interval is acceptable between taking and analysing samples?
 - Do samples require immediate fixing or extraction into an organic solvent?
 - Is sample storage acceptable and if so are there special requirements?

サンプルの採取と保管方法の正当性は、それらが本試験に利用される前に立証されていなければならない。

Sample collection and storage methods should be validated before they are applied to a definitive test.

5 . 試験結果の算出と表現法

5. Calculation and expression of test results

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。：

The procedures described in Section 4 provide either nominal or measured exposure concentrations of pure substances which can be used to determine effects concentrations. The following general principles apply with respect to how these concentrations are to be used when calculating effect concentrations in accordance with test guidelines:

- ・ 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
- For static and semi-static and flow-through tests, where the concentrations remain within 80-120% of nominal, the effect concentrations can be expressed relative to nominal or measured concentrations;
 - For static and semi-static tests, where the concentrations do not remain within 80-120% of nominal, the effect

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、暴露中に比較的早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。

concentrations could be determined and expressed relative to the geometric mean of the measured concentrations. A formula for calculating the geometric mean is given in Annex 2;

- For flow-through tests, where the concentrations do not remain within 80-120% of nominal, the effects concentrations should be determined and expressed relative to the arithmetic mean concentration; and
- For tests with chemicals that cannot be quantified by analytical methods at the concentrations causing effects, the effect concentration can be expressed based on the nominal concentrations.

It should be noted that several types of loss processes can occur very fast and new equilibrium conditions can be attained relatively quickly during the exposure. If this is the case, the median of the concentrations which are measured after the decline would be more appropriate as a surrogate for the mean exposure concentration. Since there may be various methods for determining that, the method to determine mean measured concentrations should be made explicit in the reporting of test results (see Section 3.3).

It is generally recommended that all test results be expressed in terms of mean measured concentrations as far as possible. Some regulatory authorities invalidate, in certain regulatory context, toxicity data from tests conducted above the aqueous water solubility limits using nominal concentrations. It should also be noted that it is often useful to have both measured and nominal effect concentrations quoted.

Guidance on the conventions used for expressing exposure and determining effect concentrations in tests with multi-component substances is given in Section 3.11.

6 . 参考文献 References

- ASTM (1997). Standard guide for conducting *Daphnia magna* life cycle toxicity tests. Society for Testing and Materials, West Conshohocken, PA, Guideline E-1193-97.
- Auer, C.M., Nabholz, J.V., and Baetcke, K.P., 1990, Mode of Action and the Assessment of Chemical Hazards in the Presence of Limited Data: Use of Structure-Activity Relationships (SAR) under TSCA, Section 5., *Environmental Health Perspectives*, 87, 183-197.
- Benville, Jr., P.E. and Korn, S. (1974). A simple apparatus for metering volatile liquids into water. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 31(3), 367-368.
- Billington, J.W. (1988). Preparation of aqueous solutions of sparingly soluble organic substances: 1. Single component systems. *Environ. Toxicol. Chem.* 7, 117-124.
- Boethling, R.S. and Nabholz, J.V. (1997). Environmental assessment of polymers under the U.S. Toxic Substances Control Act, Chapter 10. Pages 187-234 in Hamilton, J.D. and Sutcliffe, R. (eds), *Ecological Assessment of Polymers: Strategies for Product Stewardship and Regulatory Programs*. Van Nostrand Reinhold, New York. 345 p.
- 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.
- Comber, M.H.I., Smyth, D.V. and Thompson, R.S. (1995). Assessment of the toxicity to algae of coloured substances. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 55, 922-928.
- CONCAWE (1992). Ecotoxicological testing of petroleum products: test methodology. Report No. 92/56, CONCAWE, Brussels.
- CONCAWE (1996). Environmental risk assessment of petroleum substances: the hydrocarbon block method. Report No. 96/52, CONCAWE, Brussels.
- Dean, J.H. and De Graeve, G.M. (1986). A screen device to eliminate "floaters" in *Daphnia magna* toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.*, 5, 1055-1057.
- Diamantino, T.C., Ribeiro, R., Gonalves, F. and Soares, A.M.V. (1997). METIER (Molecular Ecotoxicity Tests Incorporating Ecological Relevance) for difficult substances. 4. Test chambers for cladocerans in flow-through conditions. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16(6), 1234-1238.
- Department of Environment in the United Kingdom. (1996). Guidance on the aquatic toxicity testing of difficult substances. Published in May 1996 by the United Kingdom Department of the Environment, London.
- European Commission (1996a). Ad-hoc meeting of experts on algae growth inhibition test for coloured substances, Vienna, 30-31 January 1996. Report of the Working Group: Final Draft, 4 April 1996. European chemicals Bureau, Joint Research Centre, Ispra, Italy.
- European Commission(1996b). Technical Guidance Document in support of Commission Directive

96/67/EEC on risk assessment of new notified substances and Regulation (EC) No. 148/94 on risk assessment of existing substances Parts , , and). EC catalogue numbers CR-48-96-001,002,003,004-EN-C. Office for Official Publications of the European Community, 2 rue Mercier, L-2965 Luxembourg.

ECETOC – The European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals. (1996). Aquatic toxicity testing of sparingly soluble, volatile and unstable substances. ECETOC Monograph NO. 26, Brussels.

Gingerich, W.H., Seim, W.K. and Schonbrod, R.D. (1979). An apparatus for the continuous generation of stock solutions of hydrophobic chemicals. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 23, 8685-689.

Girling, A.E. (1989). Preparation of aqueous media for aquatic toxicity testing of oil-based products: a review of the published literature. *Chemosphere*, 19(10/11), 1635-1641.

Girling A.E., Markarian, R.K. and Bennett, D. (1992). Aquatic toxicity testing of oil products – some recommendations. *Chemosphere*, 24(10), 1469-1472.

Halling-Soerensen, B., Nyholm, N. and Baum, A. (1996). Algal-toxicity tests with volatile and hazardous compounds in air-tight test flasks with CO₂ enriched headspace. *Chemosphere*, 32, 1513-1526.

ISO - International Organization for Standardization. (1997). Water quality – Sampling – Part 16: Guidance on biotesting of samples. International Standard ISO 5667/16.

ISO – International Organization for Standardization (1998). Water quality – Guidance for algal growth inhibition tests with poorly soluble organic and inorganic solid materials, volatile compounds, heavy metals and waste water. International Standard ISO 14442.

Justensen, K. and Nyholm, N. (1998). Protocol for algal toxicity test with coloured substances – Initial study for the Commission of the European Communities. Contract No. 13781-1998-03 FIED ISP DK.

Lynch, D.G., Macek, G.J., Nabholz, J.V., Sherlock, S.M. and Wright, R. (1994). Ecological Risk Assessment Case Study: Assessing the Ecological Risks of New Chemical under the Toxic Substances Control Act. Pages 1-1 to 1-B4 (Section One) in: A Review of Ecological Assessment Case Studies From A Risk Assessment Perspective, Volume . Washington D.C.: Risk Assessment Forum, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Report No. EPA/630/R-94/003.

Mackay, D. (1992). Multimedia Environmental Models, Lewis Publishers.

Mayer, P., Nyholm, N., Verbrüggen, E.M.J., Hermens, J.L.M., Tolls, J. (2000). : An algal growth inhibition test in filled, closed bottles for volatile and sorptive materials, *Environmental Toxicology and Chemistry* (in press).

Memmert, U. (1994). Inhibition of algal growth caused by coloured substances. RCC Interim Report Project 460302, RCC Ltd., Switzerland.

- Mount, D.I. and Brungs, W.A. (1967). A simplified dosing apparatus for fish toxicology studies. *Water Res.*, 1, 21-30.
- Nabholz, J.V., (1991). Environmental hazard and risk assessment under the United States Toxic Substances Control Act., *The Science of the Total Environment*, 109/110,949-665.
- Nabholz, J.V., Miller, P. and Zeeman, M., (1993). "Environmental Risk Assessment of New Chemical Under the Toxic Substances Control Act (TSCA) Section Five", Environmental Toxicology and Risk Assessment, ASTM STP 1179, Wayne G. Landis, Jane S. Hughes and Michael A. Lewis, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 1993, 40-55.
- Newsome, L. D., Nabholz, J.V. and Kim, A. (1996). Designing Aquatically Safer Chemicals, Chapter 9. Pages 172-192 in : DeVito, S.C. and Garrett, R.L. (eds), Designing Safer Chemicals: Green Chemistry for Pollution Prevention. ACS Symposium Series No. 640. American Chemical Society, Washington, DC. 264 p.
- OECD (1995). Draft (November 1995) report of the OECD Workshop on Aquatic Toxicity Testing of Sparingly Soluble Metals, Inorganic Metal Compounds and Minerals. Ottawa, Canada, September 5-8, 1995.
- OECD (2000). Draft Guidance Document on the Use of the Harmonized System for the Classification of Chemicals which are Hazardous for the Aquatic Environment (April 2000), OECD, Paris.
- Phipps *et al.* (1982). Saturator system for generating toxic water solutions for aquatic bioassays. *Progressive Fish Culturist*. 44,(2),115-116.
- Ramos, E.U.,Wouter, H.J.V., Freidig, A., Verhaar, H.J.M. and Hermens, J.L.M. (1997). A novel approach for dissolving chemicals with low aqueous solubility: generator disk in the headspace. *Environ Toxicol. Chem.*, 16(11), 2229-2231.
- 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. . Application to fish and daphnia exposure to copper. *Environ. Toxicol. Chem.* Submitted.
- Sousa, J.V., McNamara, P.C., Putt, A.E.,Machado, M.W., Suprenant, D.C., Hamelink, J.L., Kent, D.J., Silberhorn, E.M. and Hobson, J.F. (1995). Effects of octamethylcyclotetra-siloxane (OMCTS) on freshwater and marine organisms. *Environ. Toxicol. Chem.*, 14(10), 1639-1647.
- Tadokoro, H., Maeda, M., Kawashima, Y., Kitano, M., Hwang, D. and Yoshida, T. (1991). Aquatic toxicity testing for multicomponent compounds with special reference to preparation of test solutions. *Ecotox. Environ. Saf.*, 21, 57-67.
- Tarr, A. L. and Hutchinson, T. H. (1992). A review of the use of solvents in aquatic toxicity testing. ICI Group Environmental Laboratory Report BL 4443/A.

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.

Tjeerdema, R.S. and Singer, M.M. (1991). Closed flow-through aquatic toxicity testing and microscopic organisms: not necessarily incompatible. *Mar. Poll. Bull.* 22(2), 59-61.

Tolls, J., Haller, M., de Graaf, I., Thijssen, M.A.T.C. and Sijim, D.T.H.M. (1997). Bioconcentration of LAS. Experimental determination and extrapolation to environmental mixtures. *Environ. Sci. Technol.*, 31, 3426-3431.

Urrestrandzu Ramos, E., Vaes, W.H.J., Verharr, H.J.M. and Hermens, J.L.M. (1997). A novel approach for dissolving chemicals with low aqueous solubility: generator disk in the head space. *Environ.Toxicol. Chem.*, 16(11), 2229-2231.

US EPA (1996a). 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. Available from http://www.epa.gov/docs/OPPTS_Harmonized/

US EPA (1996b). EPA Ecological effects test guidelines – OPPTS 850.1300: Daphnid Chronic Toxicity Test. Public Draft, EPA 712-C-96-120, United States Environmental Protection Agency. Available from http://www.epa.gov/docs/OPPTS_Harmonized/850_Ecological_Effects_Test_Guidelines/

Van Leeuwen, C.J.A., Espeldoorm, A. and Mol, F. (1986). Aquatic toxicological aspects of dithiocarbonates and related compounds. Embryo-larval studies with rainbow trout (*salmo gairdneri*). *Aquatic Tox.*, 9, 129-145.

Veith, G.D. and Comstock, Y.M. (1975). Apparatus for continuously saturating water with hydrophobic organic chemicals. *J. Fish. Res. Board Can.*, 32, 1849-1851.

VKI (1998). Handling of difficult organic substances in aquatic toxicity tests. Report to the Danish EPA, September, 1998. VKI, Denmark.

付録 1

Annex 1

物質の物理 / 化学的性質 , 運命 , 移動
および水生毒性を予測する
コンピュータプログラム

Computer programs for predicting physical/chemical
properties, and fate,
transport and aquatic toxicity of substances

以下のコンピュータプログラムは物質の物理 / 化学的性質 , 運命 , 移動および毒性を推定するために米国環境保護庁の汚染防止有害物質部 (Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances = OPPTS) が用いているものである。

The following computer programs are used by the Office of Pollution Prevention and Toxics (OPPT) of the United States Environmental Protection Agency for estimating physical/chemical properties, and fate, transport and toxicity of substances.

1. 物理 / 化学的性質 , 運命 , および移動 Physical/chemical properties, fate and transport

“ EPI ” (推定プログラムインターフェイス) “ EPI ” (Estimation Programs Interface)

入手先 (Available from) :

Syracuse Research Corp, 6225 Running Ridge Rd, N. Syracuse, N Y 13210, U.S.A., Tel: 315-452-3350, Fax: 315-426-3429, Email: howardp@syrrs.com, Internet: <http://esc.syrrs.com>. および

Peter Fisk Associates, 9 St. Swithins Road, Tankerton, Whitstable, Kent, CT5 2HT, U.K., Tel: 01227 273797, Fax: 01227 794982, Email: pfa@enterprise.net, Internet: <http://www.ecotoxchem.co.uk>

2. 水性毒性 Aquatic toxicity

“ ECOSAR ”

コンピュータプログラムとしての入手先 :

Available as a computer program with a user's manual and a technical support manual from:

J.V. Nabholz, RAD(7403), USEPA, 401 M St, SW, Washington, DC 20460-0001, Tel: 202-260-1271, Email: nabholz.joe@epamail.epa.gov, Internet: <http://www.epa.gov.opptintr/newchms/> および

P.H. Howard, Syracuse Research Corp. 6225 Running Ridge Rd, N. Syracuse, N Y 13210, U.S.A., Tel: 315-452-8417, Email: Howardp@syrrs.com. および

Peter Fisk Associates, 9 St. Swithins Road, Tankerton, Whitstable, Kent, CT5 2HT, U.K., tel: 01227 273797, fax: 01227 794982, email: pfa@enterprise.net, internet: <http://www.ecotoxchem.co.uk>

またはマニュアル - Clements, R.G. 編 , Nabholz, J.V. and Zeeman, M. (1966). Estimating toxicity of industrial chemicals to aquatic organisms using structure activity relationships. 2nd edition. 402 p. - としての入手先 :

New Chemicals Screening Branch, Risk Assessment Division (7403), Office of Pollution Prevention and Toxics, United States Environmental Protection Agency. EPA Report No. EPA-748-R-93-001. Washington, D.C. 20460-0001.

3. n-オクタノール - 水分配係数 (log Kow) n-Octanol-water partition coefficient (log Kow)

“ C log P ”

入手先 (Available from) :

Bio Byte Corporation, 201 W. Fourth St., Suite 204, Claremont, CA 91711-4707, USA, Tel: 909-624-5992, Fax: 909-624-1398, Email: clogp@biobyte.com, Internet: www.biobyte.com/~clogp/

“ KOWWIN ”

入手先 (Available from) :

Syracuse Research Corp, 6225 Running Ridge Rd, N. Syracuse, N Y 13210, U.S.A., Tel: 315-452-3350, Fax: 315-426-3429, Email: howardp@syrres.com, Internet: <http://esc.syrres.com>. および

Peter Fisk Associates, 9 St. Swithins Road, Tankerton, Whitstable, Kent, CT5 2HT, U.K., tel: 01227 273797, fax: 01227 794982, email: pfa@enterprise.net, internet: <http://www.ecotoxchem.co.uk>

“ AUTOLOGP ”

記載 (Described by) :

Devillers, J., Domine, D. and Karcher, W. (1995). SAR QSAR. *Environ. Res.*, 3, 301-306.

付録 2

幾何平均暴露濃度算出のための公式

以下の公式は試験期間中に 2 回以上濃度を測定した場合の幾何平均暴露濃度の算出を行なうものである：

$$\text{平均濃度} = \text{antilog} \left(\frac{1}{2} (t_n - t_1) \left(\log(\text{conc}_i) + \log(\text{conc}_{i+1}) \right) \cdot (t_{i+1} - t_i) \right)$$

t_1 = 開始時 < t_2 < t_n = 最終時
 conc_1 = 開始濃度, conc_2 , , conc_n = 最終濃度

Annex 2

Formula for calculating geometric mean exposure concentration

The following formula allows calculation of a geometric mean exposure concentration where concentrations have been determined on more than two occasions during a test.

$$\text{Mean concentration} = \text{antilog} \left(\frac{1}{2} (t_n - t_1) \left(\log(\text{conc}_i) + \log(\text{conc}_{i+1}) \right) \cdot (t_{i+1} - t_i) \right)$$

Where: t_1 = initial time < t_2 < t_n = final time
 conc_1 = initial concentration, conc_2 , , conc_n = final concentration

付録 3

Annex 3

陽イオン物質の毒性緩和試験

Toxicity mitigation testing for cationic substances

状況により、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程度を決定する必要がある。例えば、全有機炭素濃度が < 2 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。

Under some circumstances it may be required to determine the extent to which the toxicity of a substance is mitigated by adsorption to dissolved organic carbon. For example, where cationic substances show moderate to high aquatic toxicity in dilution water containing <2 mg/l total organic carbon. Toxicity mitigation testing is usually carried out with fish. Fish are least susceptible to physical effects resulting from clogging and/or coating of gills by precipitate formed by the reaction of the cationic substance with the anionically charged dissolved organic carbon. Mitigation testing has, however, also been successfully carried out with daphnids and green algae.

一旦、全有機炭素濃度が < 2 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 20mg/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 10mg/L）行なう。

Once the intrinsic toxicity of a cationic substance has been determined in dilution water containing less than 2.0 mg/l total organic carbon, the substance should be tested at least two more times with two different concentrations of dissolved humic acid. The first of these tests should be carried out at a humic acid concentration of 20 mg/l (or lower if a floc, precipitate, or a viscous mixture forms). The second test should be carried out with a reduced humic acid concentration, for example, 10 mg/l.

フミン酸を添加していない試験と 20mg/L 及び 10mg/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。

The concentration of total organic carbon should be measured in the controls of the test without added humic acid, the test with 20 mg/l humic acid and the test with 10 mg/l humic acid. TOC samples should be taken from the controls at the beginning of the toxicity tests and it is recommended that total organic carbon be measured three times in each of the three tests. The three measurements should be reported separately and with the mean value for each test.

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（EC50、LC50 値など）を回帰することによって決められる。

Toxicity mitigation is determined by regressing the effect concentrations determined in the test (EC50, LC50 values etc.) against the total organic carbon concentration.

付録 4

Annex 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

Toxicity mitigation testing with algae for chemicals
which form complexes with
and/or chelate polyvalent metals

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：

The requirements for algal toxicity testing in relation to risk assessment for substances which complex metals depend upon the water quality which is envisaged in the release scenario. The following testing scheme has been suggested by the US EPA:

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。
1. test chemical as it is in standard algal growth medium with a hardness in the range 15 to 24 mg/l as CaCO₃;
 2. test chemical as it is in modified algal growth medium with a hardness of approximately 150 mg/l as CaCO₃;
 3. test the chemical as the Ca salt in standard algal medium by adding an equivalent amount of Ca²⁺ to the stock solution; and
 4. test the chemical as the Ca salt in modified algal medium as for (2) above.

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。

Testing a substance as the Ca salt requires the addition of an equivalent of Ca²⁺ to the stock solution. A suitable procedure for preparing a calcium salt of a substance might be to add 1 g active ingredient of the substance to a 1 litre volumetric flask which is partly filled with water and being stirred continuously. An equivalent of Ca²⁺ is then added and stirred for at least one hour. The flask is then topped up to 1 litre with water and used to prepare test media. Precipitate and/or flocculant which forms in the stock solution should be maintained, to the extent possible, as a homogeneous dispersion during preparation of the test media and should not be removed by filtration or centrifugation.

付録 5

Annex 5

試験困難物質の毒性試験におけるエキスパートパネル
検討委員会のメンバー

Expert Panel on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances
Peer Review Committee

Estelle Bjornestad	VKI, Denmark
Norbert Bornatowicz	Seibersdorf Research Centre, Australia
Elaine Dorward-King	Rio Tinto plc, United Kingdom
Andrew Girling	Environmental consultant, United Kingdom
Marie-Helene Lamy	INERIS, France
Stuart Marshall	Unilever, United Kingdom
Vincent Nabholz	EPA/OPPT, United States
Margarethe Winther-Nielsen	VKI, Denmark
Joanne Parrot	Environment Canada, Canada
Erik van de Plassche	RIVM, the Netherlands
Hans-Juerguen Pluta	UBA, Germany
Helena Parkman	KemI, Sweden
Hans Rufli	Novartis, Switzerland
Leslie Touart	EPA/OPP, United States
Sabine Zok	Hoechst, Germany