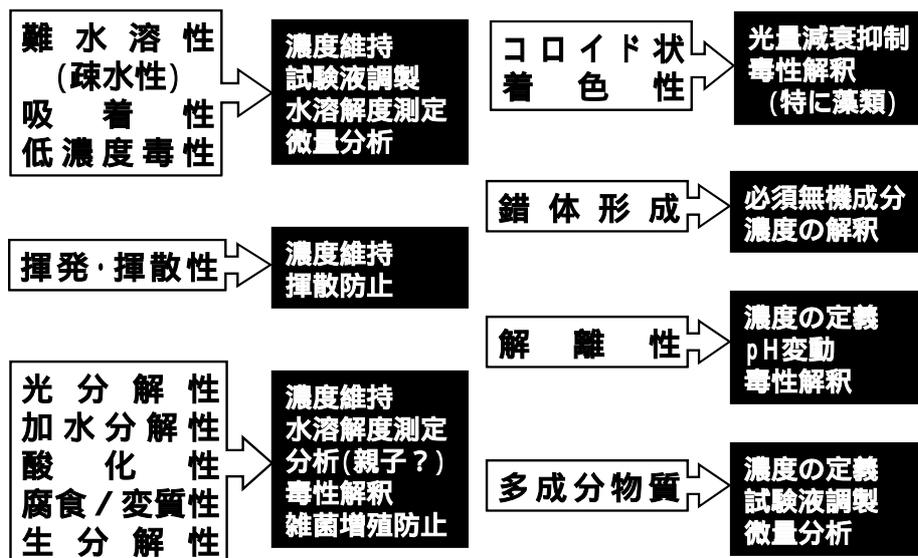


“試験困難”とは、被験物質が下記の図1のような特性を持ち、白抜き枠内のような試験実施面での困難を伴う可能性があり、標準的な生態毒性試験手法に改良や追加を必要とするということを意味している。

図1 被験物質特性と試験実施困難性との関連



水生生態毒性試験に関わる各種試験ガイドラインでは、暴露期間中、水中の被験物質濃度の変動が設定より 20%以内であれば、濃度維持は十分であると考えている。濃度が明らかに低下する傾向にある場合は、その原因を調べ、試験水の調製と暴露方式に改良を加えるなどして、極力濃度維持に努めるよう求めている。また、試験水濃度に関する規定としては、例外を除き当該被験物質の水溶解度を超えての暴露は認められていない。

## 1 被験物質に関する情報調査

暴露濃度の低下を抑制する方法を選定するためには、被験物質の物理/化学的性状、運命および環境毒性に関する情報を事前に調査しておくことが有用である。次頁の表1のような情報を得ていれば、試験の難易度がある程度予測され、その後の試験設計(試験水の調製、濃度の維持、分析法開発、試験手順、暴露方式の決定・改良など)に有用である。情報が十分でない場合は、試験条件下における安定性を調べるために予備試験を実施すべきである。

表1 被験物質特性と試験実施困難性との関連

被験物質性状	試験実施困難性との関連
外観等の状態： 液体，固体，気体，色調	<ul style="list-style-type: none"> <li>・調製・保管などの取扱い方，安定性・外観変化などの指標となる。</li> <li>・着色物質などは試験下で光量を減衰する可能性もあり光合成を必要とする藻類などの試験では，本質的な毒性を評価し難いことにもなる。</li> </ul>
化学構造 純度 組成	<ul style="list-style-type: none"> <li>・低純度で多成分であるほど，個々の物性が増え困難さが増幅する可能性がある。</li> <li>・試験液の調製，分析，毒性評価などにも影響がでる。</li> <li>・構造類似物質が既知見としてあれば，困難度が予測できる可能性あり。</li> </ul>
分子量	<ul style="list-style-type: none"> <li>・溶解性，生体膜透過性／濃縮性，分析の難易度などに関連する。</li> <li>・一般に，試験困難物質は <math>&gt; 300\text{g/mol}</math> が多いと言われるが，それ以下でも困難なものはある（揮発性，分解性など）。</li> </ul>
n-オクタノール／水 分配係数（log Kow）	<ul style="list-style-type: none"> <li>・溶解性，生体膜透過性／濃縮性などに関連する。</li> <li>・高いほど水に難溶である。</li> <li>・<math>&gt; 4</math> では試験水の調製・濃度維持などが困難となる。</li> </ul>
水への溶解度	<ul style="list-style-type: none"> <li>・溶解度が <math>&lt; 100\text{mg/L}</math> では濃度が低くなる程，試験水の調製は容易でない。</li> <li>・試験条件下では他に塩などの溶解成分があるため，溶解性は低くなる場合が多い。</li> </ul>
有機溶剤への溶解度	<ul style="list-style-type: none"> <li>・水混和性溶剤を使用せざるを得ない難水溶性物質などは，それら溶媒への溶解性が高く，安定である方がよい。</li> <li>・被験物質の中には溶剤にも溶けにくい物質があり，試験水濃度が極めて低くなる場合もある。</li> </ul>
臨界ミセル濃度	<ul style="list-style-type: none"> <li>・界面活性剤などは，ミセル濃度前後で毒性作用が異なる可能性がある。</li> </ul>
蒸気圧と ヘンリー定数（H）	<ul style="list-style-type: none"> <li>・蒸気圧とヘンリー定数は比例関係にあり，一般に高い程，揮発性は高い。</li> <li>・<math>H &gt; 0.1\text{ Pa}\cdot\text{m}^3/\text{mol}</math> では揮発性を考慮し設計した方がよい。</li> </ul>
沸点	<ul style="list-style-type: none"> <li>・一般に低い程，揮発性は高い。</li> <li>・但し，沸点が高くても昇華性があれば揮散する。</li> <li>・また，同沸点であっても水溶解度は高い方が揮発しにくい。</li> </ul>
融点	<ul style="list-style-type: none"> <li>・常温近く（試験温度近辺）で，液体であるか固体であるかによって，調製操作に差異が生じる。</li> <li>・界面活性作用のある分散剤と被験物質を混合する場合は，液体の方が調製ステップは少なくて済む。但し，分散剤を助剤として使用することは原則認められていない。</li> </ul>

表1 (続き)

被験物質性状	試験実施困難性との関連
水生生物種に対する毒性	<ul style="list-style-type: none"> <li>・「毒性が強い=低濃度」であるため、通常は濃度維持が困難となる場合が多い。</li> <li>・分析も微量であるほど開発に時間を要し、場合によっては不可能な場合もある。</li> </ul>
好気性生分解性	<ul style="list-style-type: none"> <li>・試験条件や濃度などにより分解の程度・時間などが異なる場合があるため、濃度維持が困難となる場合がある。</li> <li>・生分解試験で生分解性が低い結果であったとしても、生態影響試験条件下で生分解を起こさないとは限らず、その逆も起こりうる。</li> <li>・分解物は同定できないこともある。</li> </ul>
光分解性	<ul style="list-style-type: none"> <li>・藻類の生長阻害試験では光量が規定されており、しかも連続照射であるため、通常は光分解を抑制することは困難である。その場合、分解物との複合影響は避けられない。</li> <li>・但し、特殊な波長で分解することが分かっている、その波長を制御できれば分解が抑制できる可能性はある。その場合、藻類の生長に影響がないことが前提となる。</li> </ul>
加水分解性 25℃, pH7での半減期 hr	<ul style="list-style-type: none"> <li>・半減期が短い程、分解しやすいが、試験条件や濃度などにより分解の程度・時間などが異なる場合がある。</li> <li>・分解物は同定できない場合もある。</li> <li>・水に溶解した後に加水分解するため、正しい水溶解度は求められない。</li> <li>・分解後、酸が生成する場合など pH が変化する場合がある。</li> </ul>
解離性：解離定数(pKa)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・溶解性、pH、化学形態変化などに関連している。</li> <li>・生物にとっては至適 pH があるので注意する。</li> </ul>
錯体形成定数	<ul style="list-style-type: none"> <li>・水中の化学形態の変化に伴い毒性が変化する可能性がある。</li> <li>・生物にとっての必須成分が減少する場合もある。</li> </ul>
金属化合物の解離度	<ul style="list-style-type: none"> <li>・水中の化学形態の変化に伴い毒性も変化する可能性がある。</li> <li>・分析上、分別が困難な場合が多い。</li> </ul>
有害性、強毒性、異臭性、爆発性など	<ul style="list-style-type: none"> <li>・排気や廃棄などを含めた実験操作全体に特別な注意を要するため、取扱上の困難性が増す。</li> <li>・情報が少ない場合などは、取扱上、無接触・無暴露に努める必要がある。</li> </ul>

## 2 試験条件下における安定性を調べるための予備試験

### (1) 分析法の検討

水に高い濃度で溶ける物質は溶解性を目視で確認できるが、微量レベル 1~10mg/L 以下の溶解状態は目視での確認が容易ではない。したがって、難水溶性物質の水溶解度は測定する必要がある。また、ガイドラインや申請の要件として暴露濃度分析が要求されている場合は被験物質の分析法を事前に検討しなければならない。以下に分析法確立に当たって必要な条件について述べる。

#### 定量手法の選定

被験物質の性状等から必要な感度等を考慮し適切な定量手段を選定する。一般には以下の機器分析が行われている。有機化合物の定量手段の例としてはガスクロマトグラフ(GC)、高速液体クロマトグラフ(HPLC)、ガスクロマトグラフ質量分析装置(GC-MS)、高速液体クロマトグラフ質量分析装置(LC-MS)等が、また、無機化合物の場合は原子吸光分析装置(AAS)や誘導結合プラズマ質量分析装置(ICP-MS)等があげられる。

#### 試験水中の検出限界(定量限界)

通常の機器分析を考慮した場合、最初の目標として 0.1mg/L 程度を基準とする。試験水への溶解度および予備の毒性試験結果からさらに高感度を必要とする場合もあり、その場合はさらに低濃度で検討する。

最低濃度区の 1/10 以下の濃度が定量できるような分析法を確立するのが望ましいが S/N 比の数倍程度を検出限界とすることもある。

#### 試験水からの添加回収率

原則として 80%程度は維持したい。回収率がこの基準に達しない場合は、数回繰り返した回収率の再現性がよければ可としてもよいが、低い理由がわかれば記載した方がよい。

### (2) 純水中あるいは試験水中の水溶解度の評価および測定

文献、データベース等で被験物質の信頼に足る水溶解度の値が得られない場合でも、化学構造から推察して化学的に安定で容易に溶解しそうな物質(例:水溶性の官能基を持つなど)は、分析的手法によらずに目視による簡易的な方法により溶解度を測定してもよい。一般に 100mg/L 以上ならば目視確認は可能であろう(物質により 10mg/L でも可能な場合もある)。

難水溶性の場合はまずは純水で 20 での水溶解度を測定する。すなわち、被験物質を純水中に入れ 24 時間以上スターラー等を用いて攪拌し飽和に達した後、遠心分離またはフィルター濾過(0.45 μm か 0.22 μm)後、分析し溶解度を測定する。最初から、純水ではなく、各生物の試験用水(至適温度内)への水溶解度を測定してもよい。測定回数(n)は、測

定変動が予想されるので最低3つは欲しい（難水溶性物質の水溶解度測定は操作上の精度管理が難しい場合も多い）。

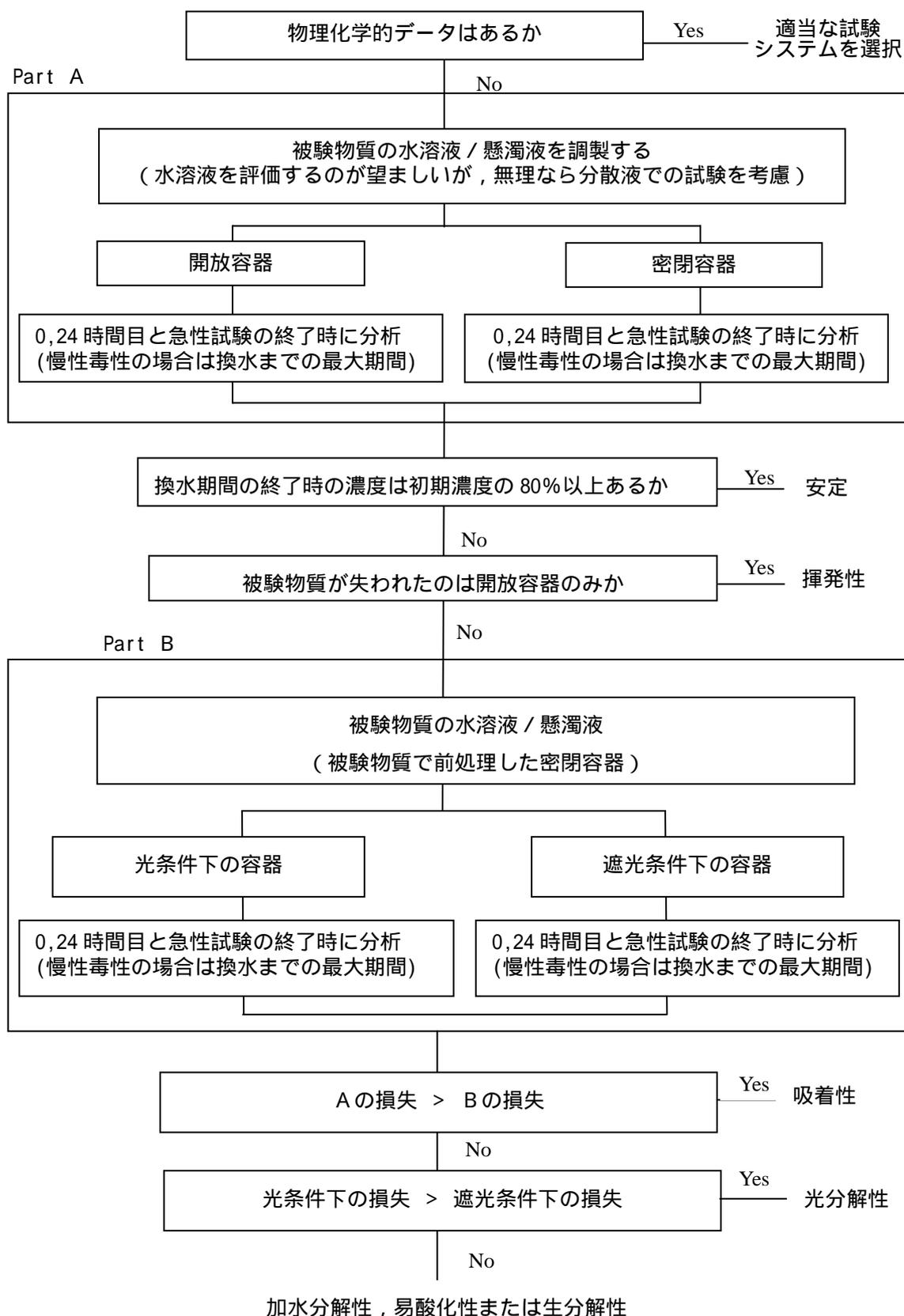
なお、加水分解性、酸化性物質等の水中で分解する物質の溶解度は正確には測定できない。難水溶性物質でも水に溶けると加水分解するものもある。そのような場合において得られた数値には、その旨を記載する。分解などの損失過程を特定する方法は事項に示したフローを参考されたい。

### (3) 試験条件下における安定性

次頁の図2は、試験水からの被験物質の損失原因を特定するための試験設計を示している。このように予備的に損失原因を調べ、適切な暴露システムを選択する必要がある。まずは水中での挙動が十分予測しうる物理化学的な情報があれば（または物理化学的な情報が十分でなくても、類似物質での知見等があれば）、損失原因究明のステップを省くことは可能であろう。そうでなければこのフローに従って実施すれば損失原因が明確になる。いずれにせよ、水中濃度の維持（初期値の80%程度）が極力可能な暴露システムを選択するためには、安定性を事前に検討しておく必要がある。

溶液の調製方法や濃度の高低によって安定性が異なることも多い。損失要因が複数ある場合などは、特に変化の割合が異なる。したがって、必要に応じて目標とする試験濃度の最高・最低濃度の2濃度で調べることが必要である。

図2 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設計



### 3 難水溶性物質，疎水性物質

以下に記載する試験水の調製方法は、「4 揮発性物質」以降のその他性状を持つ物質についても同様である。「4 揮発性物質」以降の物質については特殊事項のみ記載した。

#### 3.1 試験水の調製方法の種類

試験水の調製方法には、大きく以下の4つの方法がある。しかし、(3)カラム溶出法は試験水の必要量が多ければ装置が大がかりになり、また、(4)分散・乳化法は界面活性作用のある分散剤の使用が、現在、原則認められていないため、中心は(1)直接添加法、(2)水混和性溶剤法になるかと思われる。

- (1)直接添加法
- (2)助剤として水混和性溶剤を用いる方法
- (3)カラム溶出法
- (4)分散および乳化法

#### 3.2 混合方式

上記(3)のカラム溶出法を除けば、その他は水との混合が必要であり、以下に主な混合方式をあげた。攪拌の程度、装置により強度は異なるが、一般に下に行くほど強度は増す。

- (1)スターラーなどによる攪拌
- (2)振とう機などによる振とう
- (3)ブレンダーなどによる攪拌
- (4)高速回転ホモジナイザー / ミキサーなどによる攪拌
- (5)超音波発振機の溶液中への浸漬 / 超音波洗浄機内への容器浸浴

#### 3.3 混合時間

最大溶解度に達する時間は、混合法や物質の性状により異なるが、暴露開始前にあまり長い時間を要して調製することは物質の安定性や実施の困難性から考え、妥当な方法とは言えない。したがって、スターラー等による低速攪拌でも最大48時間攪拌すればよいと考えられる。

超音波処理は、長くても30分～1時間程度とする。時間をかけると溶液が熱くなったり、溶存酸素濃度が低下することもあるので、そのまま試験水とすることができない場合もある。推奨される試験温度や溶存酸素濃度に戻す工夫が必要である。また、長時間、超音波処理したり、混合した場合や加温した場合は、試験用水や培地中の成分組成が変化する場合もあるので、対照区も同様に処理する必要がある。

何れにせよ調製によって、被験物質や水に試験結果を損なうような物理化学的な変化(分解、温度変化、成分変化など)や生物学的な変化(無菌でない状態で長時間調製をした結果、肉眼では判断しがたい菌数増加など)が起こらないことに注意が必要である。

### 3.4 直接添加法

溶解度の低い物質や毒性が強い物質で、低濃度溶液を調製しなければならない場合は、非常に薄い溶液を大量に作る必要がある。5～10mg 以下の少量を精度よく計るのは難しく、10mg 計ったとしても、設定濃度が 0.1mg/L の試験水では水を 100L 以上必要とし実用的でない。

したがって、直接添加法では、調製に必要とする攪拌、ろ過、遠心などの各操作、秤量精度などを考えると、試験水量 10 L、被験物質秤量 10mg、被験物質濃度 1mg/L が限界濃度ではないかと思われる。分析が可能であるならば調製時の再現性は確認しておく必要がある。

飽和試験水を調製し不溶解分を除いた液、例えば「10 多成分物質」に記載した WAF を調製し、保存溶液とし、これを連続的に希釈してもよい。

### 3.5 水混和性溶剤を用いる方法

水混和性溶剤に被験物質を溶解させたものを保存溶液として、試験用水へ添加し混合すれば比較的容易に速く試験水が調製できる。特に、加水分解しやすい物質、粘性の高い物質、水溶解度が低く直接添加法の適用が困難な場合に有用である。ただし、被験物質との相互作用によって、試験時に別の反応を起こす可能性があるため、用いた場合の試験液の安定性を事前に確認する必要がある。

一般によく用いられ、OECD ガイダンスドキュメント 23 にも記載されている溶剤は、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である。最終試験水中の溶剤濃度は、100mg/L (または 0.1ml/L) 以下である。

この中でアセトン、エタノール、メタノールなどは細菌増殖の源となりやすく止水式および半止水式システムにおいては、酸素の減少に注意した方がよい。流水式で行なう場合でも長期間実施する試験では水槽等の洗浄を行わないと微生物が繁殖する。その他の溶剤でも多かれ少なかれ細菌による分解は起こりうるため、水質には留意しておくべきである。

溶剤を助剤として用いた場合は、全ての処理区において溶剤濃度を同じとし、同濃度の溶剤対照区を設ける必要がある。

### 3.6 カラム溶出法

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

カラム溶出法は、難溶性物質に適用するためのものであるが、大量の溶液を得ることが難しく、また溶出装置が必要であるため、実用的ではないのが欠点である。また、単一成分や安定な物質でないと適用が難しい（多成分物質や分解性物質には不適）。

### 3.7 分散および乳化法

難水溶性物質の場合、界面活性作用のある分散剤や乳化剤を使用すると試験水の調製が容易になることが多いが、使用すると、物理化学的相互作用によって被験物質の見かけの毒性に影響を及ぼす可能性があるため、通常は認められない。ただし、例外規定として、以下のような場合がある。

- (1) 分散あるいは乳化した状態で放出される可能性がある物質
- (2) 被験物質が、界面活性剤や洗剤のような場合
- (3) 毒性決定に関係当局から許可を得た場合

(1)は、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価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を想定している。(2)は被験物質そのものが界面活性作用を持つものである。

一方、分散剤や乳化剤の使用が被験物質の本質的毒性に影響を及ぼしたとする実証データは少なく科学的証拠は十分といえない。したがって、(3)は当該被験物質において分散剤の使用が当該試験結果に影響を及ぼす可能性が少ないというデータを示した場合においてのみ許可するという例外である。その場合、使用してもよい分散剤は、Cremophor RH40、Tween 80、メチレンセルロース 0.01%、HCO-40 に限る。

分散や乳化による不溶物質が実験中に生物に物理的影響を与える可能性はある。魚の鰓膜への吸着、ミジンコへの影響などの物理的影響は、毒性を過剰推定することになり兼ねないので、極力、非溶解物質は除去した方がよい。

### 3.8 分析困難物質

暴露濃度を測る適当な分析法がない場合は、測定できない根拠があれば、設定濃度でよいが、十分検討した旨を報告する。

### 3.9 測定濃度の算出方法

暴露期間を通して濃度が著しく低下した場合は、基本的に幾何平均値や時間荷重平均を算出する。ただし、暴露中に非常に速やかに損失が起こり、平衡状態に達した場合には、低下後に測定された濃度の平均値の方が適切な場合もある。

暴露期間終了時で測定できない場合や検出されなかった場合は、試験の有効性を再確認する。物質が検出されなかった場合の平均暴露濃度の算出には、検出限界を最終濃度とする。選択した方法を試験結果の報告の中に明記する。

分解物が生成しその毒性が無視できないと判断される場合は、測定濃度の表記も複雑になる。分解物濃度が定量または推定できれば同時にその濃度も報告する。

#### 4 揮発性物質

試験容器の大きさや形、深さ、温度、エアレーション率などの環境因子が損失率に影響を与え得る。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。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も構わない。分析用のサンプルは上部空間のない容器に保管する。

密閉状態では水中の溶存酸素量が減少するので、魚類やミジンコ類ではガイドラインの推奨値内に維持するために、生物密度の削減、試験水量の増加、換水頻度の増加（半止水式あるいは流水式）などで対応する。

藻類生長阻害試験で濃度を少しでも維持するためには、密閉した方式で実施せざるを得ないが、CO<sub>2</sub> を供給するために上部空間を設ける必要がある。例えば 500mL 容の共栓付の三角フラスコなどに 100mL の試験液を入れ上部に空間を設けて、最上部を完全に密閉する。ただし、密閉していたとしても濃度を完全に維持することは技術的に不可能である。また、阻害影響が少ないほど藻類が生長するため、密閉で実施すると CO<sub>2</sub> の供給ができず pH が上昇しやすくなるとともに、生長が限界に達するのが速くなるため、初期細胞濃度を下げたり、攪拌せず静置して培養するなどの対応が必要となる場合もある。

上部空間を設けず完全に密閉する方法として、予め試験水に重炭酸ナトリウム溶液などを添加しておくなどが考えられるが、この場合には十分検討をした上で、実施する。

#### 5 試験条件下で分解する物質（光分解、加水分解、酸化、生分解など）

被験物質が分解する場合は、調製後 24 時間で初期濃度が 20% 損失すれば、半減期は約 3 日と推察される。半減期が 3 日以上ならば 24 時間で換水すれば少なくとも 80% の濃度は維持されると考えてよい。したがって、以下の表を目安として試験条件下ならびに実場面での半減期に応じて、親物質で実施するか分解物で実施するかを判断する。ただし、藻類生長阻害試験では試験水交換ができないため、親と分解物が複雑に共存した状態での試験となる。

	半減期 ( $t_{1/2}$ )	主な暴露物質	事前相談
1	3 日	親物質	-
2	1 時間 < $t_{1/2}$ < 3 日	個別検討（親、分解物、共存）	要
3	1 時間	分解物	要

主として分解物が入手できる場合を除き、分解物で生態毒性試験をする場合は、親化合物

物を分解させた試験水に試験生物を暴露することによって実施してもよい。親物質の保存溶液または試験水を半減期の 6 倍の時間放置すれば、一般に分解物の試験と言える。流水式の場合、半減期 4 時間の物質は 24 時間で 6 倍量の換水を行えば設定濃度のおよそ 50% を維持することができる。

分解する際に分解物の性状により溶液の pH が変化し、供試生物の至適 pH を外れる場合がある。中和する方法もあるが、中和することで分解の程度が変化してしまうなど解釈が複雑となるので、原則として中和しないでそのまま試験を実施する。

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、適切な方法で保存する。

結果は、親物質の濃度を基に比較する。ただし、暴露中に検出限界以下となることもある。分解物の同定と定量が可能ならば報告するが、困難な場合が多い。

### 5.1 光分解

魚やミジンコの急性試験では、暗くしたり赤色灯を用いたり試験容器を遮光したりすれば光分解を抑制できる。または、光分解の原因となる波長を特定し、選択的に除去できる場合もある。長期の慢性毒性試験では、完全な暗所で試験を行なうことは生物へストレスを与える可能性があるが、背景データがあれば暗所で実施してもよい。

藻類生長阻害試験では遮光フィルターの利用なども報告されているが、確立した方法はない。試験水の交換ができず、光を遮断できない試験のため、親と光分解物が複雑に共存した状態で実施するのが一般的である。

親物質と光分解物の相対毒性を調べる必要があるのであれば、親物質と光分解物の試験水を別々に用意し、一定期間遮光条件で藻類を暴露した後に、藻体を分離し、次に照明下で物質を含まない培地中で回復性の程度を確認することも可能である。

### 5.2 加水分解

試験水の調製は分解を最小限にするように速やかに行う。物質を試験水に直接添加し、素早く溶解させる方法を組み合わせる。保存溶液が必要な場合は、非反応性水混和性溶剤を用いて調製する。加水分解が速く、分解物で試験を実施する場合はこの限りではない。

### 5.3 酸化

水中での酸化による溶存酸素量の減少に気をつける。溶存酸素量の減少があった場合は、エアレーション、試験水の増量、生物密度の削減、換水頻度の増加などで対応できる。保存溶液は、試験水中に添加されるまでは酸素除去(例えば窒素封入など)、低温保存に努め、酸化を防止する。

### 5.4 生分解(ここでは微生物分解)

藻類生長阻害試験のように無菌下で実施しているものを除き、生態毒性試験での完全無菌化は現実的でないし、抗生物質の使用も認められていない。したがって、水槽内において一旦、当該物質の分解菌が発生すると、分解が促進され、被験物質濃度維持が困難となる場合がある（水が清澄なことも多く分解菌の発生は一般には肉眼で判別できない）。微生物群の増殖を抑制するには、以下のようなことを推奨する。

- (1) 水の換水などでは古い飼育水の移入は最小限とする。
- (2) 試験容器を入念に清掃する。できれば換水時に滅菌することも重要である。
- (3) 換水時に生物を移動する場合は、一旦同濃度の試験水に通してから移動すれば、抑制効果がある。
- (4) 十分な量の換水を行う。

## 6 吸着性物質

通常は被験物質濃度が低い時（例えば  $< 1\text{mg/L}$ ）に吸着は起こりやすい。吸着を減らすための方法を以下に示す。

- (1) 試験水量に対する表面積率の低い容器を使用する。
- (2) 換水頻度を増加する。
- (3) ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）等の非吸着性材質を用いる。
- (4) 吸着性材質は使用しない（特に、ゴムとポリエチレンは使用しないこと）。
- (5) 被験物質溶液による容器のコンディショニングを事前に実施する。流水式では濃度が平衡状態に達していることを、事前運転で確認する。
- (6) 試験用水中の溶存有機炭素濃度（被験物質に由来するものは除く）は、 $2\text{mg/L}$  以下とする。

分析用のサンプリング容器は、前もって適切な溶剤を入れておくなどすれば、物質の吸着を防ぐことができる。

藻類毒性試験での藻体への吸着影響は、接種時の藻類濃度（推奨範囲内）を下げることで、軽減できる。

試験結果は通常、測定濃度で表す。

## 7 錯体形成物質

錯体形成は被験物質自体の生物学的利用能を変化させ毒性に重大な影響を与える可能性がある。さらに、錯体形成により、試験生物にとって必要な塩類（カルシウム塩やマグネシウム塩のような）や微量元素量が低下する可能性がある。以下は錯体形成に係る物質例である。

- (1) EDTA
- (2) カルボン酸とリン酸を持つ陰イオン系ポリマー
- (3) リン酸塩

#### (4) 金属

したがって、錯体が形成された状態で毒性評価した場合、被験物質による直接影響なのか、あるいは錯体形成によって起こった例えば栄養欠乏による二次的影響であるのか、それを判別するには、追加実験が必要となる。毒性が無ければ（例  $EC_{50} > 100\text{mg/L}$ ）、追加実験は必要ない。毒性が現れた場合には本質的毒性であるのかどうかを調べるには、塩濃度などを調整するか、あるいは被験物質の塩があればそれを試験に用いるなどすれば、有用な情報が得られる可能性がある。

暴露濃度の測定上、錯体形成分画と錯体非形成分画を区別できる分析方法がなかったり、困難である場合が多い。このような場合は、得られた分析値がどのような形態であるのかを可能であれば報告し、そうでなくても錯体形成の可能性を報告する。

### 8 着色物質

ミジンコや魚類の試験では行動や死亡の観察がしにくくなることがあるが、暴露ができないということにはならない。

藻類生長阻害試験の場合、着色物質は光を吸収するため、光合成活性および生長を抑制する可能性がある。生態毒性試験の主な目的が物質の本質的な毒性を判定することにあるとすれば、光量が減衰することによる影響は本質的ではない。しかし、光の吸収の程度は被験物質の種類や濃度に依存するため、本質的毒性による影響との区別は極めて困難となる。したがって、まずは標準的な試験を実施して（光量減衰も加味された）影響の有無を調べ、その後本質的毒性を追求する必要があるのかを考察した方が現実的である。必要性が生じた場合には以下に示すような追加実験が考えられる。

- (1) 生長率は光飽和量以上では光強度とはほとんど無関係なので、強度を変えて試験を行なう。着色物質により光が減衰されても、それ以上照射する方法がある。
- (2) 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。
- (3) 対照群において、例えば色や層の厚さが試験液の濃度に相当する液を入れたシャーレ様の液体光透過フィルターに光をあらかじめ通し、細胞増殖の減少を測定する。
- (4) 暴露濃度群と反対に希釈調製した光透過フィルターを用いて、全濃度の光路長が同じ（一定）になるようにし、サンプルのスペクトル吸収特性を維持する。
- (5) 回復試験を実施する。

### 9 イオン性物質

解離平衡の変化は、水溶解度や分配係数、そして生物利用能や毒性にまで有意な影響を及ぼす。それゆえ、解離定数（ $pK_a$  値）は実験を開始する前の有用な知見となる。実際上は、被験物質の種類や濃度に依存して、試験水の pH が変化し、供試生物の適正 pH 範囲を超える場合もあるが、まずは試験は pH 調整を行わず実施する。必要であれば、追加して酸やアルカリその他の適当な緩衝剤を用いて試験の推奨範囲内に pH を調整してもよい。

## 10 多成分物質

水に難溶な多成分物質の試験水としては、Water Accommodated Fraction ; WAF (水適性分画) を調製する。

単一成分で構成されていない被験物質 (多成分物質や非水溶性のポリマーなど) の WAF は段階希釈せず個別に調製する。これらを直接水に添加し、溶解および分散成分が平衡に到達するまで十分時間 (24 時間) をかけて混合する。混合が終了したら 12~24 時間静置し、水相を抜き取り WAF とする。沈殿、凝集する不溶の被験物質があれば、例えば分離ロートなどを用いて除去する。無菌性が必要な場合は、0.45 μm 以下のフィルターで過が必要である。意図的に混合成分を保持しておく必要がある場合は、試験生物に物理的影響を与えないようにする。

水に難溶な多成分物質の WAF 中には、多成分物質の一部だけが存在していることが多い。それゆえ、溶解または良好に分散していない成分による暴露を含めて表わすものとして、“負荷率”がある。負荷率とは、WAF を調製する時に用いる多成分物質重量と水の重量対容積比のことである。したがって、WAF の “負荷率” とは通常用いる “設定濃度” と類義語である。

WAF 中の個々の化学物質について分析が可能ならば実施するが、困難な場合は、構成成分の大まかな経時変化を確認できる方法として、濁度や全有機炭素濃度 (TOC) 等の測定が有用である。検出限界以下の場合には、実施した分析検討結果を報告し、負荷率と検出限界値を採用してよい。ただし、濁度や TOC の場合、生物を暴露した試験水の分析には適さないので、別に試験水だけの容器を試験と同条件下におく必要がある。

調製方法および安定性については、試験報告書の中に詳細に記載する。

WAF を基にした試験の影響濃度は、

- (1) 負荷率から算出した LL50 あるいは EL50
- (2) WAF 中の被験物質の測定値から算出した LC50 あるいは EC50

として表す。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。

## 11 試験水分析のためのサンプリングスケジュール

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。したがって、頻度を増やし全濃度をサンプリングする予定を組むことが望ましい。サンプルも多めに採取し、保存方法を十分に確立した上で保存してもよい。最小限のサンプル数で (分析を) 行なった結果、暴露濃度を評価するデータが十分に得られなかった場合に保管サンプルの分析を行なう。例えば、揮発による損失が予測されるような場合には、0 時間目と試験中を通じ 24 時間毎の平均測定濃度を取ることを推奨する。流水式を選択した場合は、作動状況確認用に暴露開始前に分析する。

## 12 試験結果の算出

影響濃度は設定濃度あるいは測定濃度のいずれかによって決定するが、両者を併記した方がよい場合もある。以下に、影響濃度を算出する際の一般的原則を示した。

- ・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、測定濃度のいずれを用いてもよい。ただし、減少傾向がある場合や調製時の測定濃度が低い場合などは測定値で表す。
- ・止水式および半止水式で濃度が設定値の 80～120%以内にとどまらない場合は、影響濃度は測定濃度の幾何平均を用いる。
- ・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を用いる。
- ・分析的に定量できない物質の試験では、関係当局と相談した上で影響濃度は設定濃度で表してもよい。