

平成27年12月21日
薬生発1221第1号
20151209製局第1号
環保企発第1512211号

厚生労働省医薬・生活衛生局長

経済産業省製造産業局長

環境省総合環境政策局長

「新規化学物質等に係る試験の方法について」の一部改正について

「新規化学物質等に係る試験の方法について」（平成23年3月31日薬食発0331第7号厚生労働省医薬食品局長、平成23・03・29製局第5号経済産業省製造産業局長、環保企発第110331009号環境省総合環境政策局長連名通知）（以下「連名通知」という。）の一部を下記のとおり改正し、平成28年3月21日から施行する。

なお、平成28年3月20日以前に開始された試験であって、本改正前の連名通知に規定する試験の方法に基づき行われたものの取扱いについては、なお従前の例によることができるものとする。

記

- 1 別添<魚介類の体内における化学物質の濃縮度試験>を別紙1のとおり改める。
- 2 別添<1-オクタノールと水との間の分配係数測定試験>を別紙2のとおり改める。

- 3 別添<化学物質の慢性毒性試験、生殖能及び後世代に及ぼす影響に関する試験、催奇形性試験、変異原性試験、がん原性試験、生体内運命に関する試験及び薬理学的試験>の「VI 変異原性試験」中「2 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験」及び<哺乳類を用いる 28 日間の反復投与毒性試験、哺乳類を用いる 90 日間の反復投与毒性試験及び哺乳類を用いる反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験並びに細菌を用いる復帰突然変異試験、哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験及びマウスリンフォーマTK試験による変異原性試験>の「V 変異原性試験」中「2 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験」を別紙3のとおり改める。
- 4 別添<化学物質の慢性毒性試験、生殖能及び後世代に及ぼす影響に関する試験、催奇形性試験、変異原性試験、がん原性試験、生体内運命に関する試験及び薬理学的試験>の「VI 変異原性試験」中「3 げっ歯類を用いる小核試験」を別紙4のとおり改める。
- 5 別添〔様式2〕を別紙5のとおり改める。
- 6 別添〔様式3〕を別紙6のとおり改める。
- 7 別添〔様式8〕を別紙7のとおり改める。

＜魚介類の体内における化学物質の濃縮度試験＞

I：魚を用いた濃縮度試験（水暴露法）

I－I 適用範囲

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

I－II 用語

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

I－III 試験方法

1 試験の概要

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

2 試験に用いる装置及び材料

2－1 装置及び器具

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

2－2 試験用水

- (1) 試験用水とは、被験物質及び溶解補助剤（溶剤及び分散剤）を含まない試験用の水である。汚染されていない水質の水源から得られる天然水、脱塩素した水道水又は人工調製水（特定の栄養素を既知量添加した脱塩素した水道水）とし、選択した魚種がじ

じゅん化及び試験期間中に異常な外観や挙動を示さずに生存できる水質でなければならない。試験用水は、少なくとも pH、硬度、全粒子状物質濃度、全有機炭素（TOC⁽¹⁾）濃度を測定する。アンモニウム、亜硝酸及びアルカリ度についても測定することが望ましい。

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

2-3 試験魚

2-3-1 魚種を選択

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

2-3-2 蓄養及びじゅん化

- (1) 蓄養した魚群を試験水温で少なくとも 2 週間じゅん化させ、その間十分な餌を与える。じゅん化中の水及び餌は試験に使用するものと同じ種類のものとする。48 時間の観察期間に続いて、じゅん化期間中の死亡率を記録し、以下の基準に従い試験に使用する。

- ・ 7 日間で 10% を超える死亡率の場合：試験に使用しない。
- ・ 7 日間で 5% から 10% の死亡率の場合：さらに 7 日間延長してじゅん化する。次の 7 日間で 5% より高い死亡率になった場合には試験に使用しない。
- ・ 7 日間で 5% より低い死亡率の場合：試験に使用できる。

- (2) 試験に使用する魚に外観上、病気や異常がないことを確認する。病気の魚は試験に使用しない。試験開始前 2 週間あるいは試験期間中に病気などに対する処置はしない。

2-3-3 給餌

- (1) じゅん化及び試験期間中は、試験魚を健康な状態に保ち、かつ、体重を一定に維持するため、脂質や総蛋白質含量が既知の餌を適切な量与える。給餌量は魚種、試験条件

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

及び餌のカロリー値を考慮して設定し、じゅん化及び試験期間中に毎日餌を与える（例えば、コイの場合は魚体重の1-2%程度（湿重量））。給餌量は、急激な成長及び脂質含量の増加がないように設定し、各試験水槽から直近に採取した試験魚の体重から適宜、再計算する（週1回など）。

- (2) 給餌後30分から1時間以内に、試験水槽から食べ残しの餌及び糞便を吸い上げる。有機炭素の存在は、被験物質の生物学的利用能を制限する可能性があるため、試験期間を通して試験水槽を清掃し、有機炭素濃度を可能な限り低く保つ。

3 試験の実施

3-1 試験水

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

3-2 水質測定の頻度

試験期間中は、すべての試験水槽について、溶存酸素濃度、TOC濃度、試験水温及びpHを測定する。全硬度については、試験区（設定濃度が最も高い区の1水槽）及び対照区の水槽を測定する。溶存酸素濃度については、取込期間中は少なくとも3回（取込期間の開始時、中間時及び終了時）、排泄期間中は1週間に1回測定する。TOC濃度については、取込期間開始の24及び48時間前、取込期間中及び排泄期間中は1週間に1回測定する。試験温度は毎日1回、pHは取込期間及び排泄期間の開始時及び終了時、

全硬度は取込期間及び排泄期間に1回測定し記録する。試験温度については、少なくとも一つの試験水槽中で連続的にモニターすることが好ましい。

3-3 流量

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

3-4 試験魚の条件

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

3-5 試験水濃度

3-5-1 急性毒性試験の実施（LC₅₀測定）

本通知で定められた魚類毒性試験、JIS K0102-2013の71.で定められた方法又はOECDテストガイドライン203で定められた方法に準じて急性毒性試験を実施する。ただし、被験物質の最大無影響濃度（NOEC）のデータが得られている場合は実施しなくてもよい。

3-5-2 試験濃度の設定

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

(2) BCF の濃度依存性がないと予想される物質については、試験は 1 濃度区でよい場合がある。

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

3-6 照明及び試験温度

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

3-7 試験期間

3-7-1 取込期間

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

3-7-2 排泄期間

BCF_{SS} が 1000 以上の場合（ BCF_{SS} が得られなかった場合においては、個々の試験魚について分析を行った際は取込期間における最後の連続した 3 回の測定における BCF の平均値が 1000 以上の場合、試験魚を複数尾まとめて分析を行った際は取込期間における最後の連続した 4 回の測定における BCF の平均値が 1000 以上の場合）、又は BCF_{K} を算出する場合は、排泄期間を設ける。排泄期間は、試験魚中の被験物質濃度が十分に減少（例えば定常状態の 95% が消失）するまでの期間とすることが望ましい（試験法解説参照）。試験魚中の被験物質濃度が 95% 消失するまでの期間が通常取込期間の 2 倍

以上の場合、期間を短縮してもよい（例えば、試験魚中の被験物質濃度が定常状態の10%未満に減少するまでの期間とする）。ただし、取込及び排泄が1次速度式による1コンパートメントモデルより複雑なパターンを示す化学物質については、排泄速度定数を求めるために、より長い排泄期間を必要とする。排泄期間を延長する場合は、試験魚の成長が試験結果に影響する可能性を考慮する。

3-8 採取及び分析

3-8-1 分析方法

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

3-8-2 試験水の分析

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

3-8-3 試験魚の分析

- (1) 各試験魚の分析は、1試験区当たり最低4尾とし、個々の試験魚について実施する。ただし、個体ごとの分析が困難な場合には、各分析時における試験魚を複数尾まとめて分析する。その場合は、2群以上とすることが望ましい。
- (2) 取込期間中に少なくとも5回、試験魚を分析する。排泄期間を設定した場合には、排泄期間中に少なくとも4回、試験魚を分析する。排泄期間を開始する前に、試験魚を清浄な試験水槽に移す。特に、取込及び排泄が単純な1次速度式に従わないことが予想される場合は、正確な BCF の算出が困難であるため、両期間において、より高頻度の分

析が推奨される（試験法解説参照）。動物愛護の観点から最も適した方法で採取した試験魚を安楽死させ、体重及び全長を測定する。それぞれの個体の体重及び全長は、識別コードなどを付して、被験物質濃度（該当する場合は脂質含量も）の結果と整合させる。

- (3) 脂質含量は、少なくとも取込期間の開始時及び終了時、排泄期間終了時に測定しなければならない。脂質含量は、被験物質濃度測定と同一の試験魚を用いて測定するが、同一の試験魚を用いた測定が困難な場合は、上記3回の測定時に、少なくとも別途3尾を採取し測定する。対照区の試験魚において被験物質が顕著に検出されないことが明らかでない場合、対照区の試験魚は脂質含量のみ測定し、被験物質濃度は測定しなくてもよい。
- (4) BCF_{SS}が1000以上の場合、被験物質が主に脂質に蓄積しないと考えられる場合を除き、5%の脂質含量で標準化（湿重量に基づく）したBCF_{SS}（BCF_{SSL}）も報告する。
- (5) 試験に放射性同位元素を使って標識した化学物質を使用する場合、全標識化物（すなわち親化合物及び代謝物）として測定するか、あるいは、サンプルをクリーンアップして親化合物のみを測定する。親化合物に基づいてBCFを決定する場合は、主な代謝物を少なくとも取込期間の終了時に確認する。

3-8-4 試験魚の成長の測定

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

4 試験結果の算出

4-1 生物濃縮係数の算出

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

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

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

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

4-2 成長希釈補正と脂質含量の標準化

(1) 排泄期間中の試験魚の成長は、見かけ上、試験魚中の被験物質濃度を低下させ、排泄速度定数 (k_2) に大きな影響を与える。そのため、 BCF_K を求める場合には、 BCF_K と合わせて成長希釈補正した BCF_K (BCF_{Kg}) も報告する。成長希釈補正した排泄速度定数 (k_{2g}) は、通常、排泄速度定数 (k_2) から成長速度定数 (k_g) を差し引くことにより算出する。さらに、取込速度定数 (k_1) を成長希釈補正した排泄速度定数 (k_{2g}) で除することにより BCF_{Kg} を算出する。成長希釈補正の方法については、上記以外の方法も含めて試験法解説に示す。

(2) BCF_{SS} が 1000 以上の場合は、 BCF_K 又は BCF_{SS} と合わせて 5% の脂質含量で標準化した BCF_K (BCF_{KL}) 又は BCF_{SS} (BCF_{SSL}) も報告する (試験法解説参照)。また、 BCF_K を報告する場合には、成長希釈補正かつ 5% の脂質含量で標準化した BCF_K (BCF_{KgL}) も報告する。被験物質濃度及び脂質含量の測定を同一の魚を用いて実施した場合には、それぞれの試験魚中被験物質濃度をその魚の脂質含量を用いて標準化する。試験区及び対照区の試験魚の成長が同程度であれば、対照区の試験魚の脂質含量を用いて標準化してもよい。

5 試験の有効性

試験を有効なものとするために、次の条件を適用する。

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

6 結果のとりまとめ

試験の結果を様式 2 によりとりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

II：魚を用いた濃縮度試験（簡易水暴露法）

II－I 適用範囲

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

II－II 用語

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

II－III 試験方法

1 試験の概要

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

2 試験に用いる装置及び材料

I：魚を用いた濃縮度試験（水暴露法）と同様とする。

3 試験の実施

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

3－1 試験水の分析

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

3-2 試験魚の分析

次のとおり試験魚を分析し、試験魚中の被験物質濃度を測定する。

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

4 試験結果の算出

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5 試験の有効性

I：魚を用いた濃縮度試験（水暴露法）と同様とする。

6 結果のとりまとめ

試験の結果を様式2によりとりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

試験法解説

1. 定義及び単位

取込期間とは、魚が化学物質に暴露される期間である。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. 被験物質の水溶解度

被験物質の水溶解度は、以下の方法に従って測定した結果を入手する。濃縮度試験の報告書には測定結果、測定方法及び測定温度を記載する。なお、入手すべき被験物質の水溶解度の上限濃度は 100 mg/L とする。

- 2 濃度区での水暴露法を適用する場合は、OECD テストガイドライン 105 等の標準的な試験法を参考に実施した結果。
- 1 濃度区での水暴露法及び簡易水暴露法を適用する場合には、化学物質 GLP のほか何らかの GLP 基準の適合確認を受けた試験施設において OECD テストガイドライン 105 に定められた方法に準じて実施した結果。

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

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

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

4. 試験魚

4. 1 試験に使用可能な魚種（試験法「2-3-1 魚種の選択」）

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

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

4. 2 試験魚の蓄養及びじゅん化（試験法「2-3-2 蓄養及びじゅん化」）

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

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

5. 水暴露法を実施する上での注意点

5. 1 溶解補助剤（試験法「3-1 試験水」）

適切な濃度の原液を調製するために溶解補助剤を使用する場合は、最小限にする。

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

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

魚：メダカ 水温：25℃

HCO：ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油

5. 2 流量（試験法「3-3 流量」）

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

5. 3 試験濃度（試験法「3-5-2 試験濃度の設定」）

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

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

5. 4 $\log P_{OW} = 4$ である被験物質の理論的なサンプリングスケジュール例（試験法「3-8 採取及び分析」）

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

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

5. 5 成長の比較（試験法「3-8-4 試験魚の成長の測定」）

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

6. 試験結果の処理

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

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

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

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

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

又は

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

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

[式 A6.4]

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

[式 A6.5 (注³)]

W = 取込終了時/排泄開始時における平均魚体重 (g 湿重量)

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

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

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

C_w が一定の場合

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

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

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

又は

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

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

式 A6.7は、次のように書き換えられる。

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

又は

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

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

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

定常状態の 80% に到達する時間 (t_{80}) は、以下に示される。

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

又は

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6. 2 試験設計のための排泄期間の長さ予測 (試験法「排泄期間 3-7-2」)

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

排泄期間において、 C_w をゼロと仮定すると、以下の式で示される：

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

又は

$$C_f = C_{f0} \cdot e^{-k_2 t} \quad [\text{式 A6.17}]$$

上式で、 C_{f0} は排泄期間開始時の試験魚中被験物質濃度である。

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

50%排泄される時間 (t_{50}) は以下の式で示される :

$$\frac{C_t}{C_{t_0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

又は

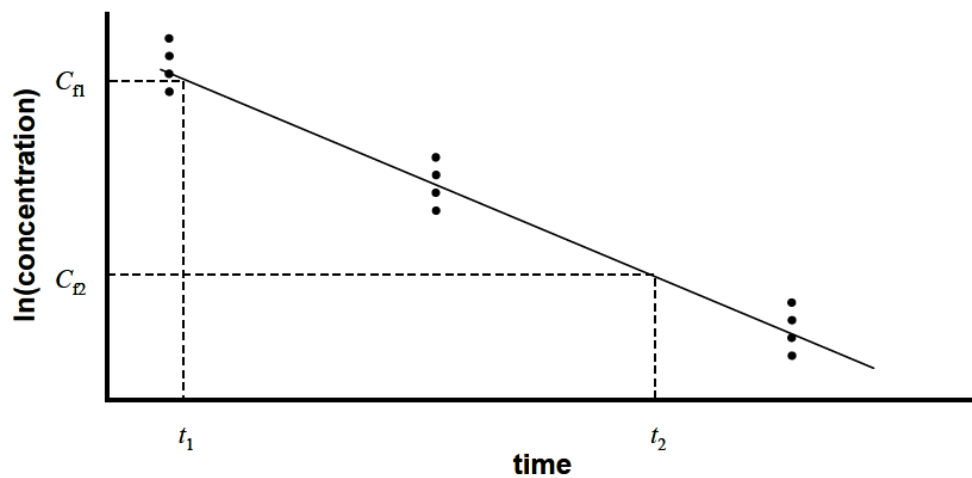
$$t_{50} = \frac{-\ln(0.50)}{k_2} = \frac{0.693}{k_2}$$

同様に、95%排泄される時間 (t_{95}) は以下の式で示される :

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

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

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



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

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

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

[式 A6.18]

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

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

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

6. 4 逐次フィッティング法 (Sequential method) : 取込速度定数 k_1 の決定 (試験法「4-1 生物濃縮係数の算出」)

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

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

上式で、 k_2 は6. 3「逐次法」において算出した値であり、 $C_f(t)$ 及び $C_w(t)$ はそれぞれ時間 t における試験魚中及び試験水中被験物質濃度である。

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

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

上式で、 k_2 は6. 3「逐次法」において算出した値であり、 C_f は排泄期間開始時の試験魚中被験物質濃度であり、 C_w は取込期間中の平均試験水中被験物質濃度である。ただし、この方法を用いた場合は、 k_1 の標準誤差あるいは信頼区間を得ることができない。

測定したサンプリングポイントのデータをプロットすることで、目視により k_1 及び k_2 の妥当性を判断できる。逐次フィッティング法による k_1 の値が適切ではないと判断された場合は、同時フィッティング法を用いて k_1 及び k_2 を算出すべきである（6. 5「同時フィッティング法」参照）。

6. 5 同時フィッティング法 (Simultaneous method) による取込速度定数及び排泄速度定数の決定 (試験法「4-1 生物濃縮係数の算出」)

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

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

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

上式で、 t_c = 取込期間終了時の時間

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

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

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

6. 6 速度論による BCF についての成長希釈補正（試験法「4-2（1）成長希釈補正と脂質含量の標準化」）

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

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

成長速度定数差引き法による成長希釈補正

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

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

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

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

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

被験物質質量に基づく成長希釈補正

「成長速度定数差引き法」の代替法として、以下の方法が使用可能である。

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

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

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

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

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

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

L = 脂質含量 (湿重量に基づく)

C_f = 試験魚中被験物質濃度 (mg/kg 湿重量)

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

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

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

BCF_{SSL} = 5%脂質含量で標準化した BCF_{SS}

BCF_{KL} = 5%脂質含量で標準化した BCF_K

L_n = 平均脂質含量 (湿重量に基づく)

BCF_{SS} = 定常状態における BCF

BCF_K = 速度論による BCF

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

7. II : 魚を用いた濃縮度試験 (簡易水暴露法)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- (注 1) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982) . Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1: 309-320.
- (注 2) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995) . Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined in vivo and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131: 130-135.
- (注 3) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993) . Nonlinear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. *SAR QSAR Environ. Res.* 1: 29-39.
- (注 4) Kristensen P. (1991) . Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute, Hørsholm, Denmark.
- (注 5) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009) . A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1168-1177.

- (注 6) OECD (2011) . QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.
- (注 7) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975) . Bioconcentration of 2,2',4,4' tetrachlorobiphenyl in rainbow trout as measured by an accelerated test. *T. Am. Fish. Soc.* 104: 785-792.
- (注 8) Ernst W. (1985) . Accumulation in aquatic organisms, in *Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals*, Sheeman, P., et al., Editors. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, USA: 243-255.
- (注 9) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977) . Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models. *Can. J. Chem. Eng.* 55: 614-622.
- (注 10) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988) . Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* 22: 701-707.
- (注 11) Konemann H. and van Leeuwen K. (1980) . Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six chlorobenzenes by guppies. *Chemosphere.* 9: 3-19.
- (注 12) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008) . Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2271-2280.
- (注 13) Hashizume N., Inoue Y., Murakami H., Ozaki H., Tanabe A., Suzuki Y., Yoshida T., Kikushima E. and Tsuji T. (2013) . Resampling the bioconcentration factors data from Japan's chemical substances control law database to simulate and evaluate the bioconcentration factors derived from minimized aqueous exposure tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 32: 406-409

<1-オクタノールと水との間の分配係数測定試験>

I 適用範囲及び試験方法

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

II 結果のまとめ

試験の結果を様式3によりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

2 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

2-1 目的

哺乳類培養細胞を用いて、被験物質の染色体構造異常の誘発性の有無を検索する。倍数体等が出現した場合には、それを記録する。

2-2 使用細胞

チャイニーズ・ハムスター線維芽細胞株（例えば CHL/IU、CHO）、ヒト末梢血リンパ球、若しくは、その他の初代、継代又は株細胞を用いる。試験に用いる細胞については、染色体数 (modal number)、マイコプラズマの汚染の有無、細胞周期などを調べる。

2-3 試験法

増殖期にある細胞を用い、最初に短時間処理法として代謝活性化による場合及びよらない場合について、3~6 時間被験物質で処理し、処理開始より約 1.5 細胞周期後に染色体標本作製する。短時間処理法の結果が陰性の場合には、次に代謝活性化によらない場合について 1.5 細胞周期の連続処理法による試験を実施する。被験物質によっては顕著な細胞周期の遅延が生じる場合がある。代謝活性化によらない場合には 1.5 細胞周期よりも長い連続処理が必要な場合があり、そのため必要に応じて確認試験を行う。

代謝活性化による場合には、適切な薬物代謝酵素誘導剤（例えばフェノバルビタールとβ-ナフトフラボンの併用等）で処理したげっ歯類（通常ラット）肝ホモジネートの 9,000×g 上清画分 (S9) に補酵素などを加えた S9mix を用いる。S9 の最終濃度は 1~10% の範囲内（通常 1~2%）とする。

2-4 被験物質の調製

被験物質を適切な溶媒に溶解又は適切な媒体に懸濁させる。被験物質が液体の場合には直接試験系に加えてもよい。被験物質が水溶性の場合は生理食塩水などを用いて溶解させ、水に不溶の場合はジメチルスルホキシド (DMSO) などを用いて溶解させる。必要に応じてカルボキシメチルセルロース (CMC) ナトリウムなどを用いて均一な懸濁液を調製する。

2-5 用量段階

適切な間隔（原則として公比 2）で 3 段階以上の染色体分析ができる用量を用いる。最高用量は、あらかじめ 2mg/mL、2μL/mL 又は 10mM のうちいずれか低い濃度を最高用量とし、細胞増殖抑制試験を行って設定することが望ましい。

細胞毒性の指標として、細胞株については相対的細胞集団倍加 (RPD)、又は相対的細胞数増加 (RICC) を、初代培養リンパ球については分裂指数 (MI) の相対値を用い、原則として、最高用量はこれらの指標において 50%以上 60%以下の細胞毒性を示す (RICC、RPD、MI が陰性対照の 50%以下 40%以上となる) 用量に設定する。

ただし、60%を超えた細胞毒性が認められる場合であっても、染色体の観察が十分

に可能であれば、その用量を最高用量とすることができる。50%以上の細胞毒性が認められない場合は2mg/mL、2 μ L/mL又は10mMのうちいずれか低い方を最高用量とする。50%以上の細胞毒性が認められず、処理終了時に被験物質の析出が認められた場合には、析出する用量を最高用量とすることができる。

2-6 対照

陰性対照として溶媒処理群を、陽性対照として適切な既知の染色体異常誘発物質による処理群を設ける。

2-7 プレート数

被験物質の各用量群、並びに陰性及び陽性対照群について、原則としてそれぞれ2枚のプレートを用いる。

2-8 染色体異常の観察

スライド標本はコード化し、処理条件がわからない状況で観察する。染色体構造異常については、各用量当たり少なくとも300個のよく広がった分裂中期細胞（染色体数がモード \pm 2）を計数する。なお、染色体異常を有する細胞が多数観察され、被験物質が明らかに陽性と判定される場合、分析する分裂中期細胞数を減らすことができる。

また、染色体構造異常を有する細胞を計数する。染色分体型及び染色体型の異常はそれぞれ別に記録し、さらに細分類（切断、交換）する。ギャップは他の異常と区別して記録するが、構造異常には含めない。ギャップは染色分体幅よりも狭い非染色性部位と定義する。染色体数的異常については、倍数体等の出現数を記録する。

2-9 結果の判定

原則として、次に掲げる全ての要件を満たすものと認められた場合に陽性と判定する。

- a) 少なくとも1つの試験濃度において、陰性対照と比較して統計学的に有意に増加していること。
- b) 適切な傾向検定において、用量依存性があること。
- c) 試験結果は、いずれも陰性対照の背景データの分布から外れていること。

明確に陽性又は陰性と結論づけられない場合には、適切な実験条件で確認試験を実施する。

2-10 結果の表示

短時間処理法又は連続処理法による試験における全てのプレートについて、染色体構造異常をもつ細胞数及びその出現頻度（%）並びに構造異常の種類別に細胞数を表示する。また、群ごとにプレートの平均値を表示する。ギャップは他の異常とは区別して記録するが、総異常頻度には含めない。倍数性や核内倍加の細胞が観察された場合はその割合（%）を表示する。

細胞増殖抑制試験並びに短時間処理法による試験及び連続処理法による試験における全てのプレートについて、処理群、陰性対照群及び陽性対照群の全てについて細胞

毒性を同時に測定、記録する。被験物質の析出が見られた場合には、その用量を明記する。

2-11 結果のまとめ

試験の結果は様式8によりまとめる。

(注)

細胞毒性評価のための計算式

分裂指数 (MI: Mitotic Index) :

$$\text{MI (\%)} = \frac{\text{分裂細胞の数}}{\text{計数した細胞の総数}} \times 100$$

相対的細胞数増加 (RICC: Relative Increase Cell Count) 又は相対的細胞集団倍加 (RPD: Relative Population Doubling) は、いずれも分裂した細胞集団の割合を考慮に入れたものとして用いられる。

$$\text{RICC (\%)} = \frac{\text{(処理した培養細胞における細胞数の増加 (終了時 - 開始時))}}{\text{(対照培養細胞における細胞数の増加 (終了時 - 開始時))}} \times 100$$

$$\text{RPD (\%)} = \frac{\text{(処理した培養細胞における細胞集団倍加)}}{\text{(対照培養細胞における細胞集団倍加)}} \times 100$$

細胞集団倍加 (PD: Population Doubling) = $[\log (\text{処理後の細胞数} \div \text{処理開始時の細胞数})] \div \log 2$

3 げっ歯類を用いる小核試験

3-1 動物及び観察細胞

若い成熟げっ歯類を用い、骨髄又は末梢血の幼若赤血球を観察対象とする。一般的にはマウス又はラットが用いられるが、ラットについては、骨髄を用いた場合に肥満細胞の顆粒による疑似小核の出現、末梢血を用いた場合に脾臓で小核を持つ赤血球が除去されることに注意し、より適切な観察方法を用いる。

3-2 動物の性及び数

1群、性あたり5匹以上とする。ただし、毒性に明らかな性差が見られない場合には、片性のみ（5匹以上）の使用で十分である。

3-3 被験物質の調製

被験物質が固体の場合には適切な溶媒に溶解又は媒体に懸濁させ、液体の場合には直接投与するか又は適切な溶媒で希釈して調製する^(注2)。被験物質が気体の場合には清浄な空気等を用いて希釈する。調製後の安定性が判明している場合には、安定な期間内に使用し、不明な場合には用時に調製する。

3-4 対照群

陰性対照^(注3)としては溶媒又は媒体を、陽性対照としては適切な既知小核誘発物質^(注4)を、それぞれ設定する^(注5)。

3-5 投与経路

強制経口投与を原則とする。ただし、特定の暴露経路（吸入暴露等）が想定される等、科学的な理由がある場合にはこの限りでない。

3-6 投与回数

単回又は反復投与とする。

3-7 用量段階

最高用量は、幼若赤血球の減少等、骨髄で細胞毒性が認められる用量、何らかの毒性兆候が認められる、若しくはそれ以上で致死が予想される用量又は技術的に投与可能な上限の用量とする^(注6)。また、毒性兆候が現れない場合の最高用量は、単回又は14日未満の反復投与については2,000mg/kg/日、14日以上長期反復投与については1,000mg/kg/日とする。なお、被験物質が気体の場合は、安全に暴露できる濃度を最高用量とする^(注7)。適切な間隔（公比2を原則とするが、公比4以下であればよい。）で3段階以上の用量を設定する。

3-8 標本作製時期

3-8-1 骨髄を用いる場合

単回投与では、投与後24～48時間の間に適切な間隔をおいて最低2回の標本作製時期を設定し、動物を屠殺、骨髄塗沫標本作製する^(注8)。連日の2回投与を行った場合には、最終投与後18～24時間の間に1回、標本作製を行う。連日の3回以上の投与を行った場合には、最終投与後24時間以内に1回、標本作製を行う^(注9)。

3-8-2 末梢血を用いる場合

単回投与では、投与後 36～72 時間の間に適切な間隔をおいて最低 2 回の採血時期を設定し、標本作製する^(注8)。連日の 2 回投与を行った場合には、最終投与後 36～48 時間の間に 1 回、標本作製を行う。連日の 3 回以上の投与を行った場合には、最終投与後 40 時間以内に 1 回、標本作製を行う^(注9)。

3-9 観察

観察前に、陰性対照及び陽性対照を含め、全てのスライド標本をコード化して、処理条件がわからない状況で観察を行う。個体当たり 4,000 個以上の幼若赤血球を観察して、小核を有する細胞の出現頻度を求める。また、骨髄細胞の増殖抑制の指標として、全赤血球に対する幼若赤血球の出現頻度を、個体当たり、骨髄を用いた場合には 500 個以上、末梢血を用いた場合には 2,000 個以上の赤血球を観察することにより求める。^(注10) ^(注11)

3-10 結果の表示

個体ごとに、観察した幼若赤血球に対する小核を有する細胞の出現頻度及び全赤血球に対する幼若赤血球の出現頻度を、表形式にて表示するとともに、群ごとの平均値についても表示する。

3-11 結果の判定

被験物質が十分な高用量まで適切に投与され、かつ陰性及び陽性対照群で期待どおりの結果が得られていることを前提とし、陰性対照群の背景データの利用を含め、適切な統計処理を用いることにより結果の判定を行う^(注12)。なお、両性を用いた場合の結果に明確な性差が認められなければ、両性のデータをまとめて統計処理を行ってもよい。明確に陰性又は陽性と判断できない場合には、統計的な有意性のみが判断基準ではないので、実験条件を考慮して再試験を実施し、最終的な判断をすることが望ましい。

3-12 結果の評価

いずれかの *in vitro* 試験で陽性結果が認められ、かつ本試験で陰性結果となった被験物質については、生体内運命に関する入手可能な知見等を利用して、判定結果を考察する。

(注2) 溶媒又は媒体については、被験物質と反応しないものを選択し、毒性を示さない用量で使用する。一般に、生理食塩液などの水系溶媒の使用が推奨される。

(注3) 末梢血を用いる短期試験 (1～3 回投与) の場合、投与前サンプルを陰性対照とすることができる。

(注4) 陽性対照物質の例

メタンスルホン酸メチル

メタンスルホン酸エチル

マイトマイシン C

シクロフォスファミド

トリエチレンメラミン

なお、投与用量としては、極端に高くはないが、明確な小核誘発性を示す用量が推奨される。

(注5) 試験施設が十分な習熟度を備えていることが示され、陽性対照の背景データの範囲が確立されている場合は、同時陽性対照群の代わりに適切な陽性対照標本を使用することができる。その場合、定期的に別途実施する陽性対照実験で作成され、保存された適切な標本を含める。

(注6) 媒体が水を主成分とする場合は 20mL/kg、それ以外では 10mL/kg を最大の投与液量とする。

(注7) 暴露可能な最大濃度あるいはミストとダストでは 5mg/L、ガスと蒸気では適切な酸素濃度 (19~21%) を維持でき、安全に暴露できる技術的に可能な最高濃度を用いる。

(注8) 単回投与の場合でも、予備試験によって標本作製時期を検討した結果、最も感受性の高い時期が確認され、陽性の結果が得られることが認められる場合、この時期 1 回のみを標本作製とすることができる。この場合の標本作製時期は、小核誘発頻度の最も顕著な上昇が認められる時期とする。

ただし、いずれの時期においても明白な小核誘発頻度の上昇が認められない場合には、骨髄を用いる場合は投与後 24~30 時間、末梢血を用いる場合は 36~48 時間を標本作製時期とする。

(注9) 陽性対照については適切な時期に 1 回、標本作製を行う。

(注10) 標本の染色は、骨髄標本に対しては、通常、アクリジン・オレンジ蛍光染色法又はギムザ染色法を用い、末梢血標本の場合には通常アクリジン・オレンジ超生体染色法を用いる。

(注11) 小核を有する赤血球の測定が可能な自動化システム (フローサイトメーター等) を用いて観察することもできる。

(注12) 被験物質が十分な高用量まで適切に投与され、かつ陰性及び陽性対照群で期待どおりの結果が得られた場合で、全ての処理群において陰性対照群との間に統計学的な有意差が認められない場合には、陰性と判定する。一方、小核を有する細胞数に統計学的な有意差があり、用量依存性があるか、又は結果に再現性がある場合に陽性と判定する。

[様式 2]

濃縮度試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質等の名称 (IUPAC 命名法による)			
別 名			
C A S 番 号			
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合 は、その製法の概要)			
分 子 量			
試験に供した新規 化学物質の純度 (%)			
試験に供した新規 化学物質のロット番号			
不 純 物 の 名 称 及 び 含 有 率			
蒸 気 圧			
対 水 溶 解 度	(測定法 :)		
1-オクタノール/水分配係数			
融 点			
沸 点			
常温における性状			
安 定 性			
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性

[備 考]

1. 物理化学的性状は、可能な限り記入すること。
2. 「蒸気圧」の欄には、被験物質の蒸気圧を記入すること。
3. 「安定性」の欄には、温度、光等に対する安定性を記入すること。
4. 「溶媒に対する溶解度等」の欄には、被験物質の溶媒に対する溶解度及びその溶媒中での安定性を記入すること。
5. 「対水溶解度」の欄にその測定法を記入すること。また、1 濃度区での水暴露法及び簡易水暴露法を適用する場合には、対水溶解度測定の結果報告書を添付すること。

2. 急性毒性試験

供試魚（学名）		
LC ₅₀ 又はNOEC	LC ₅₀ （ h r ）・NOEC	
助剤の使用	有 ・ 無	
助剤を使用した場合の名称及び濃度	名 称	濃度（mg/L）

[備 考]

1. LC₅₀又はNOECのいずれかにまるを付し、その値を記入すること。

3. 試験方法

試験方法		
供試魚（学名）		
脂 質 含 量 （%）	開始時：	終了時：
被験物質設定濃度 （μg/L）	第一濃度区	
	第二濃度区	
助 剤 の 使 用	有 ・ 無	
助剤を使用した場合の名称及び濃度	名 称	濃 度（μg/L）
		第一濃度区：
		第二濃度区：
		第一濃度区：
		第二濃度区：

[備 考]

1. 「試験方法」の欄には、用いた試験の種類（水暴露法・簡易水暴露法）を記入すること。
2. 1濃度区での水暴露法及び簡易水暴露法を適用する場合には、第二濃度区の欄に斜線を引くこと。

4. 試験結果

(1) 濃縮度試験の結果表

	取 込 期 間	日	日	日	日	日
第一濃度区	水中の被験物質濃度(単位)					
	魚体中の被験物質濃度(単位)					
	BCF					
第二濃度区	水中の被験物質濃度(単位)					
	魚体中の被験物質濃度(単位)					
	BCF					

[備 考]

1 濃度区での水暴露法及び簡易水暴露法を適用する場合には、該当しない欄に斜線を引くこと。

(2) 定常状態又は速度論によるBCF

		濃 縮 倍 率	
		第一濃度区	第二濃度区
水暴露法	$BCF_{SS} \cdot BCF$		
	BCF_{SSL}		
	BCF_K		
	BCF_{Kg}		
	BCF_{KL}		
	BCF_{KgL}		
簡易水暴露法	minimised BCF_{SS}		
	BCF_{Km}		
定常状態の確認方法		個別分析・まとめて分析	個別分析・まとめて分析

[備 考]

1. 定常状態の確認方法として、魚体分析は、個別分析又はまとめて分析のいずれかにまるを付すこと。
2. $BCF_{SS} \cdot BCF$ のほか、 BCF_{SSL} 、 BCF_K 、 BCF_{Kg} 、 BCF_{KL} 、 BCF_{KgL} の値がある場合は記入すること。
3. 適用した試験方法を踏まえ、該当しない欄に斜線を引くこと。

(3) 部位別のBCF及び半減期

部 位	第 一 濃 度 区	第 二 濃 度 区
頭 部		
内 臓		
外 皮		
可 食 部		

	第 一 濃 度 区	第 二 濃 度 区
排泄試験における半減期（日）		

[備 考]

BCFが1,000倍以上かつ5,000倍未満の場合は、(2)定常状態又は速度論によるBCFと併せて、必ず部位別のBCF及び排泄試験における半減期も記入すること。

5. 試験水及び魚体分析方法

(1) 試験水及び魚体分析フロー（手順について簡潔に記載してください。）

--

(2) 使用した分析機器の種類とその条件

--

6. 回収率（平均値）

水からの回収率	(%)	
魚体からの回収率	(%)	

7. 考察

*可能な限り、本試験結果の考察（本被験物質の蓄積性について）を記載してください。

8. その他

試験実施施設	名 称	
	所 在 地	電話 () FAX ()
試験責任者	職氏名	
	経験年数	
試験番号		
試験期間	年 月 日 から 年 月 日 まで	

[備 考]

1. 本様式への記載は、最終報告書より転記して作成すること。
2. 最終報告書と同じ試験番号を記入すること。
3. 本様式の作成責任者は、本様式の欄外に、所属及び氏名を記載すること。

[様式 3]

1-オクタノールと水との間の分配係数測定試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質等の名称 (IUPAC命名法による)			
別 名			
C A S 番 号			
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合 は、その製法の概要)			
分 子 量			
試験に供した新規 化学物質の純度 (%)			
試験に供した新規 化学物質のロット番号			
不 純 物 の 名 称 及 び 含 有 率			
蒸 気 圧			
対 水 溶 解 度			
1-オクタノール/水分配係数			
融 点			
沸 点			
常 温 に お け る 性 状			
安 定 性			
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性

[備 考] 物理化学的性状は、可能な限り記入すること。

1. 「蒸気圧」の欄には、被験物質の蒸気圧を記入すること。
2. 「安定性」の欄には、温度、光等に対する安定性を記入すること。
3. 「溶媒に対する溶解度等」の欄には、被験物質の溶媒に対する溶解度及びその溶媒中での安定性を記入すること。

2. 試験方法等

試験方法	OECDテストガイドライン107に定められた方法	OECDテストガイドライン117に定められた方法
解離定数	pKa ₁ = pKa ₂ =	pKa ₁ = pKa ₂ =
酸・塩基の区別		
温度 (°C)		
溶離液の名称及び組成		

[備考] 「溶離液の名称及び組成」の欄には、緩衝液を使用した場合は緩衝液の種類及びpHも記入すること。

3. 試験結果

3-1 OECDテストガイドライン107に定められた方法

(1) 分配係数測定結果

		Pow = Co/Cw				log Pow				
		測定値	平均値	全平均	標準偏差	測定値	平均値	全平均	標準偏差	最大差
測定条件-1	a									
	b									
測定条件-2	a									
	b									
測定条件-3	a									
	b									

(2) 水層のpH測定結果

		測定値	
			平均値
使用した水			
測定条件-1	a		
	b		
測定条件-2	a		
	b		
測定条件-3	a		
	b		

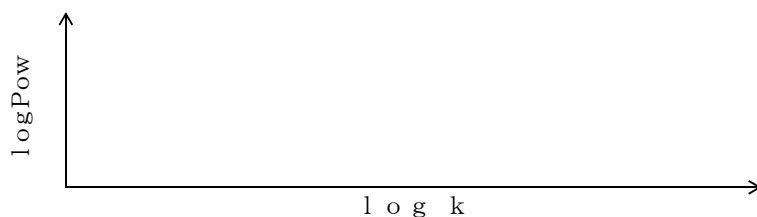
3-2 OECDテストガイドライン117に定められた方法

(1)測定結果

	測定物質名称	t_R	k	log k	logPow
標準物質	(デッドタイム測定用: t_0)		—	—	—
			—	—	
被験物質					

t_0 : Dead time(デッドタイム)(min)
 t_R : Retention time(保持時間)(min)
 k (保持係数) = $(t_R - t_0) / t_0$

(2)相関図及び回帰式(相関係数を含む)



[備考] 標準物質及び被験物質についてプロットすること。

(3)被験物質の分配係数

log Pow	
実 測 値	平 均 値

」

4. 考察

5. その他

試験実施施設	名 称	
	所 在 地	電話 () FAX ()
試験責任者	職氏名	
	経験年数	
試 験 番 号		
試 験 期 間	年 月 日 から 年 月 日 まで	

[備 考]

1. 本様式への記載は、最終報告書より転記して作成すること。
2. 最終報告書と同じ試験番号を記入すること。
3. 本様式の作成責任者は、本様式の欄外に、所属及び氏名を記載すること。

[様式 8]

哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質等の名称 (IUPAC命名法による)			
別 名			
C A S 番 号			
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合 は、その製法の概要)			
分 子 量			
試験に供した新規 化学物質の純度 (%)			
試験に供した新規 化学物質のロット番号			
不 純 物 の 名 称 及 び 含 有 率			
蒸 気 圧			
対 水 溶 解 度			
1-オクタノール/水分配係数			
融 点			
沸 点			
常 温 に お け る 性 状			
安 定 性			
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性

[備 考] 物理化学的性状は、可能な限り記入すること。

1. 「蒸気圧」の欄には、被験物質の蒸気圧を記入すること。
2. 「安定性」の欄には、温度、光等に対する安定性を記入すること。
3. 「溶媒に対する溶解度等」の欄には、被験物質の溶媒に対する溶解度及びその溶媒中での安定性を記入すること。

2. 細胞の種類－培養条件

細胞名		入手先	
種		入手年月日	年 月 日
培養液		製造元	
血清の種類と添加量	%	製造元 (Lot No.)	
細胞周期	h	凍結条件	
継代数		培養 条件	容器
染色体数	本		温度
(モード)			CO ₂ 濃度
備考			

3. S9mix

(1) S9の入手方法等 (該当する番号を○で囲み、必要事項を記入すること。)

自製・購入の別	1. 自製 2. 購入 (製造元)
製造年月日	年 月 日 製造
購入の場合のLot No.	
保存温度	℃

(2) S9の調製方法

使用動物		誘導物質	
種・系統		名称	
性		投与方法	
週令	週	投与期間及び投与量 (g / kg 体重)	
体重	g		

(3) S9 mix の組成

成分	S9 mix 1ml中の量	成分	S9 mix 1ml中の量
S9	ml	NADP	μmol
MgCl ₂	μmol	Na-リン酸緩衝液	μmol
KCl	μmol	その他 ()	μmol
グルコース-6-リン酸	μmol		

(4) S9 mix の処理条件 (該当する番号を○で囲み、必要事項を記入すること。)

1. プレート法		2. 浮遊細胞法		3. その他 ()	
S9量 (最終濃度)					%
S9蛋白量 (最終濃度)					mg/ml
処理時間					h
回復時間					h
備考					

4. 被験物質溶液の調製 (被験物質溶液の性状及び純度換算の有無は該当するものを○で囲むこと。)

使用溶媒	名称	製造元	Lot No.	グレード	純度 (%)
溶媒選択の理由					
被験物質溶液の性状	溶解	懸濁	その他 ()		
被験物質が難溶性の場合における懸濁等の方法					
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	時間	分	℃		
純度換算の有無	有		無		

5. 短時間処理法における試験

(1) 細胞増殖抑制試験の条件

		代謝活性化法によらない場合	代謝活性化法による場合
試験実施期間		年 月 日から 年 月 日	年 月 日から 年 月 日
培 養 器	形 状		
	大 き さ		
	培 養 液 量	ml/培養器	ml/培養器
	用量当たりの培養器数		
細 胞	播 種 細 胞 数	個/ml	個/ml
	前 培 養 日 数	日間	日間
処 理 条 件	被験物質溶液添加量	ml/培養器	ml/培養器
	S 9 m i x 添加量		ml/培養器
	S 9 の 最 終 濃 度		
	S 9 蛋 白 の 最 終 濃 度		
	処 理 時 間	h	h
	回 復 時 間	h	h
細胞増殖抑制 測定法			
備考			

(2) 細胞増殖抑制試験結果

代謝活性化法によらない場合 (- h)		代謝活性化法による場合 (- h)	
用量 (mg/ml)	細胞増殖率 (%)	用量 (mg/ml)	細胞増殖率 (%)

[備考] 括弧内には処理時間及び回復時間を記入すること。
細胞増殖率は溶媒処理群を100%とし、濃度の低い順に記録すること。

(3) 染色体異常試験の条件

		代謝活性化法によらない場合	代謝活性化法による場合
試験実施期間		年 月 日から 年 月 日	年 月 日から 年 月 日
培 養 器	形 状		
	大 き さ		
	培 養 液 量	ml/培養器	ml/培養器
	用量当たりの培養器数		
細 胞	播 種 細 胞 数	個/ml	個/ml
	前 培 養 日 数	日間	日間
処 理 条 件	被験物質溶液添加量	ml/培養器	ml/培養器
	S 9 m i x 添加量		ml/培養器
	S 9 の 最 終 濃 度		
	S 9 蛋 白 の 最 終 濃 度		
	処 理 時 間	h	h
	回 復 時 間	h	h
備考			

(4) 染色体異常試験結果 (別表1による。)

6. 連続処理法による試験 (短時間処理法による試験で陰性と判定された場合に試験を実施すること。)

(1) 細胞増殖抑制試験の条件

試験実施期間		年 月 日から 年 月 日	年 月 日から 年 月 日
培 養 器	形 状		
	大 き さ		
	培 養 液 量	ml/培養器	ml/培養器
	用量当たりの培養器数		
細 胞	播 種 細 胞 数	個/ml	個/ml
	前 培 養 日 数	日間	日間
処 理 条 件	被験物質溶液添加量	ml/培養器	ml/培養器
	処 理 時 間	h	h
	回 復 時 間	h	h
細胞増殖抑制 測定法			
備考			

(2) 細胞増殖抑制試験結果

(- h) 処理による場合		(- h) 処理による場合	
用量 (mg/ml)	細胞増殖率 (%)	用量 (mg/ml)	細胞増殖率 (%)

[備考] 括弧内には処理時間及び回復時間を記入すること。
 連続処理法は代謝活性化法によらない方法による。
 細胞増殖率は溶媒処理群を100%とし、濃度の低い順に記録すること。

(3) 染色体異常試験の条件

試験実施期間		年 月 日から 年 月 日	年 月 日から 年 月 日
培 養 器	形 状		
	大 き さ		
	培 養 液 量	ml/培養器	ml/培養器
	用量当たりの培養器数		
細 胞	播 種 細 胞 数	個/ml	個/ml
	前 培 養 日 数	日間	日間
処 理 条 件	被験物質溶液添加量	ml/培養器	ml/培養器
	処 理 時 間	h	h
	回 復 時 間	h	h
備考			

(4) 染色体異常試験結果 (別表2による。)

7. 結果の判定及び参考事項

(1) 結果の判定

判 定 (いずれかを○で囲むこと。)		陽 性		陰 性			
判定の理由							
D ₂₀ 値	構造異常	短時間処理法	-S9 mix	—	h 処理	mg/ml	
			+S9 mix	—	h 処理	mg/ml	
		連続処理法	/		—	h 処理	mg/ml
					—	h 処理	mg/ml
	数的異常	短時間処理法	-S9 mix	—	h 処理	mg/ml	
			+S9 mix	—	h 処理	mg/ml	
		連続処理法	/		—	h 処理	mg/ml
					—	h 処理	mg/ml

[備 考] D₂₀値は分裂中期像20%に異常を誘発させるために必要な被験物質の推定用量であり、陽性と判断した試験系列について、異常のタイプ別に記入すること。

(2) 参考事項

--	--

[備 考] 「参考事項」の欄には、試験結果に対する試験責任者の見解等を記入すること。

8. その他

試験実施施設	名 称	
	所 在 地	電話 () FAX ()
試験責任者	職 氏 名	
	経 験 年 数	
試験番号		
試験期間	年 月 日 から 年 月 日 まで	

[備 考]

1. 本様式への記載は、最終報告書より転記して記載すること。
2. 最終報告書と同じ試験番号を記載すること。
3. 本様式の作成責任者は、本様式の欄外に、所属及び氏名を記載すること。

別表1 染色体異常試験の結果（短時間処理法）

被験物質の名称

処理時間(h)	S9 mix	被験物質の用量 (mg/ml)	染色体構造異常の細胞数（出現頻度%）							ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	RPD/RICC/ MI (%)	染色体の数的異常の細胞数（出現頻度%）					
			観察細胞数	染色体切断	染色体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常細胞数 (%)				観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数 (%)		
—	—	陰性対照 ()																()
—	—																	()
—	—																	()
—	—																	()
—	—																	()
—	—																	()
—	—	陽性対照 ()																()
—	+	陰性対照 ()																()
—	+																	()
—	+																	()
—	+																	()
—	+																	()
—	+	陽性対照 ()																()

[備考]

1. 処理時間の欄には、処理時間—回復時間の順に記入すること。
2. 被験物質の用量は、低い方から順に記入すること。
3. 溶媒、陰性対照物質を括弧内に記入する。物質名を略称で記入した場合には、欄外にその名称を記入すること。
4. 各群のプレートごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入すること。
5. 被験物質の析出が認められた場合は、その用量に↑印を付すこと。
6. 細胞毒性のために染色体の観察が不能であった用量を表記する場合は、観察細胞数の欄にTOXを記入すること。
7. RPD/RICC/MIの欄には、相対的細胞集団倍加 (RPD:Relative Population Doubling)、相対的細胞数増加 (RICC:Relative Increase Cell Count)、分裂指数 (MI:Mitotic Index) のいずれかを記入すること。
8. 細胞増殖率の欄には、評価の参考となる場合があるため、相対的細胞数 (RCC:relative cell count) を記入すること。
9. その他の欄を用いる場合は、その内容を欄外に記載すること。

別表2 染色体異常試験の結果（連続処理法）

被験物質の名称

処理時間(h)	被験物質の用量(mg/ml)	染色体構造異常の細胞数(出現頻度%)							ギャップの出現数	細胞増殖率(%)	RPD/RICC/MI(%)	染色体の数的異常の細胞数(出現頻度%)			
		観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常細胞数(%)				観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数(%)
—	陰性対照()							()							()
—								()							()
—								()							()
—								()							()
—								()							()
—	陽性対照()							()							()
—	陰性対照()							()							()
—								()							()
—								()							()
—								()							()
—								()							()
—	陽性対照()							()							()

〔備考〕

1. 処理時間の欄には、処理時間—回復時間の順に記入すること。
2. 被験物質の用量は、低い方から順に記入すること。
3. 溶媒、陰性対照物質を括弧内に記入する。物質名を略称で記入した場合には、欄外にその名称を記入すること。
4. 各群のプレートごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入すること。
5. 被験物質の析出が認められた場合は、その用量に†印を付すこと。
6. 細胞毒性のために染色体の観察が不能であった用量を表記する場合は、観察細胞数の欄にT O Xを記入すること。
7. RPD/RICC/MIの欄には、相対的細胞集団倍加(RPD:Relative Population Doubling)、相対的細胞数増加(RICC:Relative Increase Cell Count)、分裂指数(MI:Mitotic Index)のいずれかを記入すること。
8. 細胞増殖率の欄には、評価の参考となる場合があるため、相対的細胞数(RCC:relative cell count)を記入すること。
9. その他の欄を用いる場合は、その内容を欄外に記載すること。