

平成28年度経済産業省委託事業化学物質安全対策
(蓄積性の評価手法に関する調査・検討)

報 告 書

平成29年3月

一般財団法人化学物質評価研究機構

目 次

事業の目的	(i)
事業の概要	(i)
1 背景及び目的	1
2 検討方法	1
2.1 一濃度区での水暴露法及び簡易水暴露法に関する調査・検討	1
2.2 餌料投与法に関する調査・検討	2
2.3 TG 305 ガイダンスドキュメントの作成作業への参加	2
2.4 OECD における生物蓄積性の評価手法に関する動向調査	2
2.5 有識者による委員会における検討	3
3. 検討内容及び結果	5
3.1 一濃度区での水暴露法及び簡易水暴露法に関する調査・検討	5
3.2 餌料投与法に関する調査・検討	12
3.3 TG 305 ガイダンスドキュメントの作成作業への参加	20
3.4 OECD における生物蓄積性の評価手法に関する動向調査	23
3.5 新規 OECD テストガイドラインに関する情報収集	24
4 まとめ	25
5 別添資料	26
引用文献	27
付録 化学物質の蓄積性評価手法に関する検討委員会関連資料		
平成 28 年度化学物質の蓄積性評価手法に関する検討委員会委員及び関係者名簿	付 1	
平成 28 年度第 1 回化学物質の蓄積性評価手法に関する検討委員会議事概要	付 2-1	
平成 28 年度第 2 回化学物質の蓄積性評価手法に関する検討委員会議事概要	付 3-1	
平成 28 年度第 3 回化学物質の蓄積性評価手法に関する検討委員会議事概要	付 4-1	

事業の目的

化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（以下、「化審法」という。）では、同法第 3 条に基づき届け出られた新規化学物質について、その有害性を基に規制の必要性を審査している。この審査に当たっては、化学物質固有の性状を適正かつ効率的に評価できることが必要である。

本事業では、化学物質の生物蓄積性評価に関して、化学物質の性状を適正かつ効率的に評価するための新たな手法について調査・検討し、化審法の審査への取込の可能性を検討した。

事業の概要

化審法では化学物質の生物蓄積性について、OECD テストガイドライン 305（以下、「TG 305」という。）に準拠した試験方法を規定し、判定基準を用いて新規化学物質の審査を実施している。TG 305 は平成 24 年に改正され、①水暴露法における試験濃度を一濃度区でも可能とすること（以下、「一濃度区での水暴露法」という。）、②簡易な水暴露法を適用すること（以下、「簡易水暴露法」という。）、③難水溶性物質について餌料投与法を適用することとされた。本事業では新規化学物質の審査項目の一つである生物蓄積性について、TG 305 改正の動向を踏まえ、適正かつ効率的に評価するための新たな手法について調査し、化審法の審査への取込の可能性を検討することを目的とし、下記の項目について調査・検討を実施した。

(1) 一濃度区での水暴露法及び簡易水暴露法に関する調査・検討

化審法 Q&A「新規化学物質に関する審査及び規制等について」の No.44（以下、「化審法 Q&A」という。）の内容を踏まえ、経済産業省と協議の上、一濃度区での水暴露法及び簡易水暴露法の適用条件及び試験結果の取扱いについて検討した。検討結果について、下記(5)の委員会において議論し、その合意事項を取りまとめた。さらに委員会における合意事項を踏まえ、一濃度区での水暴露法を反映させた試験方法改正原案及び化審法判定基準の改正原案を作成した。なお、簡易水暴露法については、日本国内の 6 つの GLP 試験機関（濃縮度試験実施機関）を対象に経済産業省が実施した調査の結果、国内において実際に活用される可能性は低いと考えられたことから、これまでどおり化審法 Q&A に準ずることとし、本事業において判定基準等は検討しないこととされた。

(2) 餌料投与法に関する調査・検討

化審法における餌料投与法の活用を想定し、平成 19 年度から平成 27 年度の経済

産業省委託事業で得られた餌料投与法に関する検討結果等を踏まえ、経済産業省と協議の上、餌料投与法の選択基準、試験方法改正原案及び試験結果の取扱いについて検討した。検討結果については、下記(5)の委員会において議論し、その合意事項を取りまとめた。さらに委員会における合意事項を踏まえ、餌料投与法の化審法濃縮度試験方法改正原案及び化審法判定基準の改正原案を作成した。

(3) TG 305 ガイダンスドキュメントの作成作業への参加

TG 305 に関する試験実施者や利用者向けの解説書であるガイダンスドキュメント（以下、「GD」という。）の作成が OECD において進められている。本調査では、平成 28 年 12 月に開催された TG 305 GD 草案に関する会合に参加し、GD 第二次草案に対する日本からのコメント及び餌料投与法に関する日本の検討結果を GD 第三次草案に適宜反映させた。

(4) OECD における生物蓄積性の評価手法に関する動向調査

欧州の化学物質管理制度である REACH (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of CHEMicals) における TG 305 の活用状況を調査するために、一濃度区での水暴露法、簡易水暴露法及び餌料投与法の活用状況等について ECHA (European Chemicals Agency) の関係者から収集した。また、第 29 回 OECD WNT (Working Group of the National Co-ordinators of the Test Guidelines Programme : OECD テストガイドライン作業部会) 会合における生物蓄積性評価に関する議事内容について調査を実施した。

(5) 有識者による委員会における検討

経済産業省及び本機構が事務局を務め、有識者 6 名（大学・研究機関：4 名、民間企業：2 名）による委員会を 3 回開催し、上記(1)及び(2)項の検討結果について議論した。委員会に関する資料を付録として添付した。

1. 背景及び目的

化審法では、同法第 3 条に基づき事業者から届け出られた新規化学物質について、その有害性を基に規制の必要性が審査されている。本審査に当たっては、化学物質固有の性状を適正かつ効率的に評価できることが必要である。

化学物質の生物蓄積性については、OECD において TG 305 が規定されているため、化審法では TG 305 に準拠した試験方法を規定し、判定基準を用いて新規化学物質の審査を実施している。TG 305 は平成 24 年に改正され、①水暴露法における試験濃度を一濃度区でも可能とすること（以下、「一濃度区での水暴露法」という。）、②簡易な水暴露法を適用すること（以下、「簡易水暴露法」という。）、③難水溶性物質について餌料投与法を適用することとされた。また、現在、TG 305 に関する試験実施者や利用者向けの解説書であるガイダンスドキュメント（GD）の作成が OECD において進められている。

これらの動きを受けて化審法では、平成 27 年 12 月 21 日に「新規化学物質等に係る試験の方法について」を一部改正して、「魚介類の体内における化学物質の濃縮度試験」（以下、「試験方法」という。）において、一濃度区での水暴露法及び簡易水暴露法を規定する等、TG 305 の改正を順次導入してきた。一方、化審法の新規化学物質審査で用いる判定基準〔「新規化学物質の判定及び監視化学物質への該当性の判定等に係る試験方法及び判定基準」（平成 23 年 4 月 22 日）〕（以下、「化審法判定基準」という。）には、これらの試験で得られた試験結果の取扱いについて明記されていない。また、餌料投与法については、平成 25 年度経済産業省委託事業化学物質安全対策（化学物質の試験法開発等）（以下、「平成 25 年度委託事業」という。）において、化審法への導入の可否が検討されたが、同事業で実施された国内リングテストの結果、試験結果の再現性等に疑義が生じたため、引き続き検討が必要であると判断された。

そこで、新規化学物質の審査項目の一つである生物蓄積性について、TG 305 改正の動向を踏まえ、適正かつ効率的に評価するための新たな手法について調査し、化審法の審査への取込の可能性を検討することを目的とし、「一濃度区での水暴露法及び簡易水暴露法に関する調査・検討」、「餌料投与法に関する調査・検討」、「TG 305 ガイダンスドキュメントの作成作業への参加」及び「OECD における生物蓄積性の評価手法に関する動向調査」の 4 項目について実施した。

2. 検討方法

2.1 一濃度区での水暴露法及び簡易水暴露法に関する調査・検討

平成 27 年度の化審法の試験方法改正により、新規化学物質審査で用いる濃縮度試験において、条件によっては一濃度区での水暴露法及び簡易水暴露法を適用することとした。しかしながら、これらの試験をどのような条件の下で認めるか、試験結果をどのように評価するかについては詳細を整理できていない。例えば、適用範囲として、一濃度区での水暴露法及び簡易水暴露法では「濃度依存性がないと予想される物質」、簡易水暴露法では

「取込及び排泄が一次速度式に従う物質」と規定されているが、試験適用物質と判断するために必要な根拠データ（知見）等は定められていない。また、TG 305に基づいて実施された一濃度区での水暴露法及び簡易水暴露法に関する取扱いは化審法 Q&A において規定されたが、化審法判定基準には、これらの試験で得られた試験結果の取扱いについて明記されていない。

そこで、化審法 Q&A を踏まえ、経済産業省と協議の上、一濃度区での水暴露法及び簡易水暴露法の適用条件及びその試験結果の取扱いについて検討した。検討結果について、下記 2.5 項の委員会において議論し、その合意事項を取りまとめた。さらに委員会における合意事項を踏まえ、水暴露法の試験方法改正原案及び化審法判定基準の改正原案を作成した。

2.2 餌料投与法に関する調査・検討

平成 24 年の改正により、TG 305 に餌料投与法が採用されたが、本試験をどのような条件の下で認めるか、試験結果を用いてどのように蓄積性を評価するかについては明確な基準がないため、化審法の試験方法として採用することが困難となっている。

そこで、化審法における餌料投与法の活用を想定し、平成 19 年度から平成 27 年度に実施された経済産業省委託事業で得られた餌料投与法に関する検討結果等を踏まえて、経済産業省と協議の上、餌料投与法の選択基準、試験方法改正原案及び試験結果の取扱いについて検討した。検討結果について 2.5 項の委員会において議論を実施し、その合意事項を取りまとめた。さらに委員会における合意事項を踏まえ、餌料投与法の試験方法改正原案及び化審法判定基準の改正原案を作成した。

2.3 TG 305 ガイダンスドキュメントの作成作業への参加

現在、TG 305 に関する試験実施者や利用者向けの解説書である GD の作成が OECD において進められている。平成 26 年 6 月に開催された OECD 専門家会合での協議結果を踏まえて作成された第二次草案について、平成 28 年 5～7 月に Commenting Round（意見収集）が行われ、日本からも意見が提出された。

本調査では、GD の内容を化審法の試験方法や審査基準等に反映させていくことを念頭に、化審法の新規化学物質審査における蓄積性判定の現状やこれまでに得られている餌料投与法を中心とした濃縮度試験に関する検討結果を GD に適切に反映させるために、OECD 事務局及びリード国と調整を行った。

2.4 OECD における生物蓄積性の評価手法に関する動向調査

欧州の化学物質管理制度である REACH における TG 305 の活用状況を調査するために、一濃度区での水暴露法、簡易水暴露法及び餌料投与法に関する情報を ECHA の関係者から

収集した。得られた情報については、上記 2.1 及び 2.2 の議論において適宜活用した。また、TG 305 以外の生物蓄積性評価法に関するガイドライン化について調査するために、平成 29 年 4 月 25～28 日に開催される予定である第 29 回 OECD WNT 会合の議事内容について確認した。また、平成 18 年より国際生命科学研究機構・保健環境科学研究所 (ILSI-HESI) が中心となって開発が進められているニジマス肝 S9 試験及びニジマス肝細胞試験について、関係者にテストガイドライン化の進捗を確認した。

2.5 有識者による委員会における検討

経済産業省及び本機構が事務局を務め、有識者 6 名（大学・研究機関：4 名、民間企業：2 名）による委員会を 3 回開催し、2.1 及び 2.2 項の検討結果について議論した。委員名簿を表 1、全 3 回の委員会の概要を表 2 に示す。

なお、試験方法改正原案及び化審法判定基準の改正原案の作成にあたっては、委員会における議論に加えて、メール・電話等により委員に意見を求め、適宜原案に反映させた。

表1 化学物質の蓄積性評価手法に関する検討委員会 委員名簿

氏名	所属
宇野 誠一	鹿児島大学 水産学部 海洋資源環境教育研究センター 准教授
○大嶋 雄治	九州大学大学院 農学研究院 教授
河野 久美子	国立研究開発法人水産研究・教育機構 瀬戸内海区水産研究所 環境保全研究センター 化学物質グループ 主任研究員
高月 峰夫	早稲田大学 ナノ理工学研究機構 規範科学総合研究所 客員教授
宮田 知代子	住友化学株式会社 生物環境科学研究所 化学品評価グループ 主任研究員
茂理 保平	富士フイルム株式会社 CSR推進部 環境・品質マネジメント部 安全性評価センター

○：委員長

(敬称略、五十音順、平成29年3月時点)

表2 化学物質の蓄積性評価手法に関する検討委員会 概要

委員会	開催日時・場所	内容
第1回	平成28年10月26日 14:00～17:15 一般財団法人化学物質評価 研究機構 本部大会議室	1. 事業目的及び試験概要について 2. 一濃度区での水暴露法、簡易水暴露法に関する 課題の整理 3. 餌料投与法に関するこれまでの経緯の整理
第2回	平成28年12月7日 14:00～17:20 一般財団法人化学物質評価 研究機構 本部大会議室	1. 一濃度区での水暴露法、簡易水暴露法の適用条 件及び試験結果の取扱いに関する議論 2. 餌料投与法の適用条件及び試験結果の取扱いに 関する議論 3. 水溶解度測定方法に関する議論
第3回	平成29年2月2日 14:00～17:35 一般財団法人化学物質評価 研究機構 本部大会議室	1. 一濃度区での水暴露法、簡易水暴露法の適用条 件及び試験結果の取扱いに関する議論 2. 餌料投与法の適用条件及び試験結果の取扱いに 関する議論 3. 本委員会における結論

3. 検討内容及び結果

3.1 一濃度区での水暴露法及び簡易水暴露法に関する調査・検討

3.1.1 一濃度区での水暴露法

(1) 化審法 Q&A における一濃度区での水暴露法

化審法 Q&A においては、TG 305 に基づいて実施された一濃度区での水暴露法の取り扱いについて下記のとおり記載されている。本内容は、平成 25 年度経済産業省委託事業化学物質安全対策等（化学物質の試験方法開発等）（以下、「平成 25 年度委託事業」という。）において、経済産業省が作成した原案をもとに、有識者による委員会で挙げられた意見を踏まえて作成されたものである（参考資料 1）。

<化審法 Q&A（抜粋）>

被験物質の濃度がその対水溶解度の 1/10 以下で実施された 1 濃度区濃縮度試験の結果、定常状態における生物濃縮係数（BCF）が 500 倍未満であった場合には、その 1 濃度区だけの結果から高濃縮性でないと判定できることとしています。BCF が 500 倍以上であった場合には、その試験結果から判定することはできません。2 濃度区での濃縮度試験の結果などが必要となります。

（注 1）対水溶解度の測定については、GLP 基準に適合する試験施設において 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されたものに限ることとする。

（注 2）被験物質の濃度は、LC50 の 1/100 以下又は NOEC 以下であって、分析が可能なできる限り低い濃度を設定する。

（注 3）以下の化学物質は本ルールの対象とはしないこととする。

- ・無機化合物及び有機金属化合物（Na、Mg、K、Ca 等以外の金属を含有するものに限る。）
- ・界面活性作用を有すると考えられる化学物質
- ・パーフルオロアルキル基を有する化学物質

（注 4）多成分の混合物は、原則として本ルールの対象とはしないこととする。（対水溶解度が適切に測定され、それを踏まえて被験物質の濃度が適当なものであり、定常状態における BCF が 500 L/kg 未満であることが明確に示されている場合を除く。）

(2) 提案内容

一濃度区での水暴露法の適用条件及び判定基準案について、経済産業省と協議の上、委員会へ下記のとおり提案した。検討においては、TG 305 及び TG 305 GD 草案における一濃度区での水暴露法及び簡易水暴露法の記載（参考資料 2）を参考にした。

＜一濃度区での水暴露法の適用条件案＞

下記要件を現行の水暴露法に関する試験方法に反映させる。

以下の要件を満たす場合、原則、濃度依存性がない試験条件として取扱い、一濃度区での水暴露法を適用できることとする。

要件 1) 無機化合物、有機金属化合物、界面活性作用を有する物質、パーフルオロアルキル基を有する物質及び UVCBs（Substances of Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological Materials、構造不明若しくは変動する化学物質、複雑な反応生成物及び生物材料化学物質）に該当する物質ではない化学物質であること

要件 2) 試験濃度が被験物質の水溶解度の 10 分の 1 以下であること

＜一濃度区での水暴露法における判定基準案＞

現行の化審法判定基準（下記）は修正せず、二濃度区での水暴露法と同じ判定基準とする。

①高濃縮性

- ・濃縮倍率が 5,000 倍以上であること。

②高濃縮性でない

以下のいずれかであること。

- ・濃縮倍率が 1,000 倍未満であること
- ・1-オクタノール/水分配係数（Pow）の常用対数が 3.5 未満であること。ただし、界面活性のある物質、分子量分布を有する混合物、有機金属化合物、純度の低い物質（HPLC 法を除く）及び無機化合物には適用しない。

③濃縮倍率が 1,000 倍以上、5,000 倍未満の場合には、必要に応じ、以下の成績を考慮して高濃縮性かどうかを総合的に判断する。

- ・排泄試験
- ・部位別（可食部）の濃縮倍率

上記の判定に当たっては、原則として、定常状態における濃縮倍率を用いることとし、定常状態での数値が得られない場合には、総合的に判断をする。また、濃縮倍率に濃度依存性が認められる場合には、必要に応じてより低濃度区での試験を行い、その成績を踏まえ判断する。

(3) 提案根拠

<一濃度区での水暴露法の適用条件案>

① 要件 1) に関する根拠

化審法 Q&A では「多成分の混合物は原則として対象としない」とされているが、構造が明らかな混合物については、一濃度区での水暴露法が適用可能であると考えられる。そこで、適用範囲を明確にするために UVCBs とする。

② 要件 2) に関する根拠

平成 25 年度に実施された独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) による解析結果 (非公開) を踏まえると、要件 1) に該当しない化学物質で水溶解度の 1/10 以下の条件であれば濃度依存性を示さないと考えられることから、化審法 Q&A のとおりとした。

なお、本提案については、水溶解度の測定値の信頼性が担保されていることが前提となるが、二濃度区での水暴露法の報告書において、明らかに信頼性に乏しい測定値が報告されている事例があるとの指摘がある。水溶解度測定方法に関しては、試験機関において現状どのような考え方にに基づき測定法 (フラスコ法又はカラム溶出法) を選択し、どのような条件、機器等で測定を実施しているか等の調査を行った上で、運用において何らかの規定を追加する必要があると思われる。

<一濃度区での水暴露法における判定基準案>

REACH における一濃度区での水暴露法の活用状況等を考慮すると、「BCF が 500 L/kg 以上であった場合には、その試験結果 (一濃度区での水暴露法) から判定することはできない」とすることは、日本独自の基準であり国際整合性の観点において必ずしも適切とは言えない。また、高濃縮性の判定基準と混同し誤解を招くおそれがある。今後、水溶解度の値の妥当性をより厳しく審査する運用とすること [(5) 本事業における合意事項参照]、また BCF が 1000 L/kg を超える総合判定の領域においては専門家判断により、必要に応じて濃度依存性に関する根拠データを求めることが可能であることから、二濃度区での水暴露法における判定基準と同じとする。

(4) 委員より出された主な意見

<一濃度区での水暴露法の適用条件>

① 要件 1) に関する意見

- ・界面活性作用を有する物質の明確な定義は設けず、必要に応じて試験機関は事前に事業者へ用途等を確認しておくとする意見が挙げられた。
- ・タンパク結合物質を適用除外とする意見が挙げられた。一方で、タンパク結合物質はその蓄積メカニズムが複雑であり、定義を明確にすることが困難であるとする意見が

挙げられた。

- ・その他、一濃度区での水暴露法の適用対象外とする候補物質は挙げられなかった。

② 要件 2) に関する意見

- ・日本国内の 6 つの GLP 試験機関（濃縮度試験実施機関）を対象に経済産業省が実施した「濃縮度試験における水溶解度測定方法に関する調査」の調査結果（参考資料 3）を踏まえると、測定法（フラスコ法又はカラム溶出法）の選択基準や測定条件まで規定することは現実的ではないため、基本的に OECD テストガイドライン 105 に定められた方法に準じて測定されていれば問題ないとする意見が挙げられた。
- ・ただし、一濃度区での水暴露法において水溶解度測定値の信頼性の確保は極めて重要であるため、測定データに加えて測定条件等を記述した報告書の提出を求め、測定データの妥当性を判断できる運用が望ましいとする意見が挙げられた。
- ・水溶解度測定に使用する水と水暴露法に使用する試験用水とでは、被験物質の溶解性が異なると考えられる。一濃度区での水暴露法を適用する場合は、試験用水に対する溶解度を測定すべきであるとする意見が挙げられた。なお、二濃度区での水暴露法では、二濃度区の結果から濃度依存性の有無を確認できるため、必ずしも試験用水である必要はないとの補足がなされた。

<一濃度区での水暴露法における判定基準案>

- ・平成 25 年度委託事業では、低濃縮性が想定される化学物質について一濃度区での水暴露法を適用する方針でまとめられた（BCF 500 L/kg 未満に適用）。本委員会での提案内容は、二濃度区での水暴露法と同様に高濃縮性の判定を可能とする提案となっているため、慎重に議論すべきであるとの意見が挙げられた。
- ・現行の化審法判定基準において、高濃縮性であるか否かを総合的に判断する領域が BCF 1000～5000 L/kg に設定されていることを一つの根拠として、一濃度区での水暴露法の適用範囲を BCF 1000 L/kg 未満にしようとする意見が挙げられた。
- ・一濃度区での水暴露法により得られた試験結果（BCF）によっては、濃度依存性がないことを示す予備試験結果の提出が必要であるとする意見が挙げられた。
- ・要件 1) で適用除外物質が提案されているものの、その根拠（平成 25 年度に NITE が実施した解析結果）は過去に実施された化学物質の試験結果に基づくものである。今後届出される新規化学物質では、新たな化学特性を有する可能性があることから、上記の知見から外れる物質がないという保証はない。よって、一濃度区での水暴露法における判定では、濃度依存性がないことを示す明確な根拠が必要であるとする意見が挙げられた。
- ・以上の意見を踏まえ、BCF 1000～5000 L/kg の総合判定の領域では濃度依存性に関

する知見の提出を必須とし、総合判断の材料としてはどうかとの意見が挙げられた。

(5) 本事業における合意事項

3.1.1(1)から(4)を踏まえ、本事業における合意事項を下記に示した。

<一濃度区での水暴露法の試験方法改正原案（資料1参照）>

BCFの濃度依存性がないことが予想される試験条件においては、試験は1濃度区でよい場合がある。1濃度区での水暴露法を適用する場合は、試験濃度を試験用水に対する被験物質の溶解度の10分の1以下に設定すること。ただし、無機化合物、有機金属化合物、界面活性作用を有する物質、トリフルオロメチル基又はテトラフルオロエチレン基を有する物質及び構造不明な複雑な反応生成物、あるいは成分が変動する混合物等については、上記の設定濃度であっても濃度依存性を示す可能性は否定できないため、1濃度区での水暴露法は適さない。

(解説)

- ・タンパク結合物質を適用除外とする原案が提示されたが、タンパク結合物質はその蓄積メカニズムが複雑であり、定義を明確にすることが困難であることから適用対象外の物質とはしないこととされた。
- ・「パーフルオロアルキル基を有する物質」は、より幅広いフッ素化合物を網羅させるために、「トリフルオロメチル基又はテトラフルオロエチレン基を有する物質」に修正した。
- ・「UVCBs」については、該当する化学物質を明確にするために、「構造不明な複雑な反応生成物、あるいは成分が変動する混合物等」に修正した。
- ・水暴露法における水溶解度測定法に関する留意事項として以下の点が挙げられた。
 - i) 基本的に一濃度区と二濃度区とで異なる水溶解度測定法を検討する必要はない。ただし、測定に用いる水については一濃度区のみ試験用水の使用に限定される。
 - ii) 水溶解度測定法はOECD TG 105を準拠し、その報告書（前処理、分析方法、結果の詳細、試験方法からの変更点等）を別途提出する。
 - iii) 被験物質の水溶解度の値ではなく、その特性や前処理の容易さからフラスコ法、又はカラム溶出法を選択する。なお、一濃度区での水暴露法の場合において、試験用水に対してカラム溶出法を適用することが困難な場合がある。

<化審法判定基準の改正原案（資料 2 参照）>

①高濃縮性

- ・生物濃縮係数が 5000 L/kg 以上であること。

②高濃縮性でない

以下のいずれかであること。

- ・生物濃縮係数が 1000 L/kg 未満であること。
- ・1-オクタノール/水分配係数 (Pow) の常用対数が 3.5 未満であること。ただし、界面活性のある物質、分子量分布を有する混合物、有機金属化合物、純度の低い物質 (HPLC 法を除く) 及び無機化合物には適用しない。

③生物濃縮係数が 1000 L/kg 以上、5000 L/kg 未満の場合には、必要に応じ、以下の成績又は知見を考慮して高濃縮性かどうかを総合的に判断する。

- ・排泄試験
- ・部位別（可食部）の生物濃縮係数
- ・濃度依存性に関する知見

上記の判定に当たっては、①及び②の場合においては、原則として、定常状態における生物濃縮係数を用いることとする。③の場合においては定常状態におけるその他のエンドポイント (BCF_{SSL}、BCF_K、BCF_{KL}、BCF_{Kg} 及び BCF_{KgL}) を含めて判断する。また、生物濃縮係数に濃度依存性が懸念される場合には、必要に応じてより低濃度区での試験を行い、その成績を踏まえ判断する。

注 1) ①の場合において、定常状態における生物濃縮係数が得られない場合には、総合的に判断する。

注 2) ③の場合において、脂質に濃縮されないことが明確な場合、脂質標準化は行わない (BCF_{SS}、BCF_K 及び BCF_{Kg} を含めて評価する)。

注 3) 部位別試験の結果については、BCF_L (5%の脂質含量で標準化した値) ではなく BCF を用いて評価する。

下線部 (.....) : 一濃度区での水暴露法に関連して加筆修正された部分

(解説)

- ・一濃度区での水暴露法の試験結果により高濃縮性であるか否かを判定することを想定し、BCF が 1000~5000 L/kg の領域では、部位別・排泄試験の結果に加えて濃度依存性に関する知見 (二濃度区での予備試験結果、類似物質の試験結果等) を考慮して総合的に判断すること、また BCF に濃度依存性が懸念される場合において、必要に応じてより低濃度区での試験結果を踏まえて判断することを明記することとされた。
- ・高濃縮性の総合判断に用いるエンドポイント、用語、単位等について、現行の試験方法と整合していない部分について修正を加えた。

- ・脂質に濃縮されないことが明確な場合、また部位別試験の結果については、脂質標準化を行わないことを注 2) 及び注 3) に追加した。

3.1.2 簡易水暴露法

日本国内の 6 つの GLP 試験機関（濃縮度試験実施機関）を対象に経済産業省が実施した「簡易水暴露法に関する調査」の調査結果（参考資料 4）より、化審法申請用として簡易水暴露法を実施した試験機関はないことが明らかとなった。また、簡易水暴露法は排泄期間を設ける必要があること、適用範囲や試験結果の妥当性は試験を実施しないと判明しないことから、今後、本試験を積極的に実施しないとする回答が複数あった。さらに、REACH では特に蓄積性の高い化学物質については、簡易水暴露法の結果のみでの評価は行わないことが確認された（3.4 項参照）。したがって、本事業において簡易水暴露法の運用方法を協議する必要性は低いと考えられることから、簡易水暴露法については現行の化審法 Q&A に準ずることとし、化審法判定基準は作成しないことを提案し、委員会で合意が得られた。

3.2 餌料投与法に関する調査・検討

3.2.1 餌料投与法の選択基準

(1) 提案内容

TG 305 では、水暴露法及び餌料投与法の選択基準は示されておらず、水暴露法の実施が困難な化学物質に餌料投与法を適用することが推奨されている。しかしながら、この考え方では、最初に水暴露法の検討が必要となり、最終的に餌料投与法を選択する場合には、水暴露法のみを実施する場合と比較して検討時間及び費用の増加が懸念される。その解決策として、水暴露法による検討は実施せず、化学物質の物理化学的性状、環境動態等を考慮した試験方法選択基準を採用することも一案と考えられる。

上記観点を踏まえ、経済産業省と協議の上、下記の選択基準案を委員会に提案した。
<餌料投与法の選択基準案>

餌料投与法は下記の 1)又は 2)の条件に該当する被験物質に適用できることとする。

ただし、分子量分布を有する混合物及び反応生成物は、原則として本ルールの対象とはしないこととする。

1) 水溶解度が 0.01 mg/L 未満、かつ log Pow が 5 を超える被験物質

2) 水暴露法の実施が困難である被験物質^{注)}

注) 試験水中濃度の維持が困難である物質、あるいは試験魚中の被験物質の定量下限値から算出可能な BCF が 1000 L/kg を超える物質等は、水暴露法の実施が困難であるため餌料投与法を実施してもよい。ただし、試験開始前に相談案件として審議会に諮ること。

(2) 提案根拠

TG 305 では「水溶解度が 0.01-0.1 mg/L 未満、かつ log Pow が 5 を超える物質」は、水暴露法の実施が困難である可能性が高いと記載されていることから、餌料投与法の実施が適当と考えられる。また、試験水中濃度の維持が困難である物質、あるいは試験魚中の被験物質の定量下限値から算出可能な BCF が 1000 L/kg を超える物質等についても、水暴露法の実施が困難であることから、餌料投与法の実施が適当と考えられる。

(3) 委員より出された主な意見

- ・現時点では餌料投与法における高濃縮性の判定基準が定まっていないため、上記の選択基準を議論するのは時期尚早であるとの意見が挙げられた。
- ・水暴露法の実施が困難な難水溶性物質への対応が課題となっているため、当面、明らかに高濃縮性でないと考えられる化学物質に限定して餌料投与法を活用する意見が挙げられた。
- ・分子量分布を有する混合物及び反応生成物を UVCBs に変更する意見が挙げられた。

- ・ log Pow の値は推計値でよいとする意見が挙げられた。

(4) 本事業における合意事項

3.2.1(1)から(3)を踏まえ、本事業における合意事項を下記に示した。

< 餌料投与法の選択基準案 (資料 3 参照) >

本試験は水溶解度が 0.01 mg/L 未満、かつ log Pow が 5 を超える被験物質に適用できることとする。なお、水溶解度は実測値とするが、log Pow は計算値でもよい。また、水暴露法において試験水中濃度の維持が困難である物質、あるいは試験魚中の被験物質の定量下限値から算出可能な生物濃縮係数 (BCF) が 1000 L/kg 程度を超える物質は、水暴露法の実施が困難であるため餌料投与法を実施してもよいが、試験開始前に当局に相談すること。

なお、構造不明な複雑な反応生成物、あるいは成分が変動する混合物等には、原則として本試験を適用しないこととする。

(解説)

- ・ 水暴露法の実施が困難な難水溶性物質への対応が課題となっているため、当面、明らかに高濃縮性でないと考えられる化学物質に限定して餌料投与法を活用することとされた。
- ・ log Pow の値は推計値でよいこととされた。
- ・ 「UVCBs」は、該当する化学物質を明確にするために、「構造不明な複雑な反応生成物、あるいは成分が変動する混合物等」に修正した。

3.2.2 餌料投与法の試験方法

(1) 提案内容

餌料投与法の試験方法については、平成 25 年度委託事業において作成された原案（参考資料 5）の一部を修正するとともに、その解説部分については、TG 305 の ANNEX を和訳し、現行の水暴露法の解説部分を参考にして原案を作成した。事務局で作成した原案について、基本的には委員会とは別途に書面により委員に意見を求めた上で、適宜、最終原案（資料 3 及び 4）に反映させた。

ただし、以下の 1) 及び 2) については、試験成績の信頼性及び再現性を確保するために重要と考えられるため、経済産業省と協議の上、委員会における協議事項とした。

<餌料投与法の試験方法に追加する事項案>

TG 305 に記載された試験条件に加え、下記の事項を満たすこととする。

- 1) 試験餌料中の脂質含量は 10～15%程度であること。
- 2) 基準物質を試験区及び対照区の試験餌料に添加し、両試験区の取込期間終了時における試験魚中の基準物質濃度を比較することにより摂餌を確認する（基準物質の排泄試験は実施せず、生体蓄積係数（BMF）は求めない）。

(2) 提案根拠

平成 27 年度委託事業において、餌料投与法における試験結果の再現性を確保するための検討が行われた。その結果、試験餌料の脂質含量の違いによって、脂質含量及び成長希釈補正した BMF (BMF_{Kg/L}) の値が変動する可能性が示された。したがって、試験餌料の脂質含量を統一し、既報の餌料投与法において最も試験実績が多い脂質含量 10～15%程度の試験餌料とすることが適当と考えられる。

また、餌料投与法は試験魚が試験餌料を適切に摂餌したこと（被験物質が取込まれたこと）を前提に被験物質の蓄積性を評価する試験である。3.2.1 のとおり明らかに高濃縮性ではない化学物質に限定して餌料投与法を導入する場合、試験魚中の被験物質が不検出となることも想定されることから、試験魚の適切な摂餌を確認（証明）することが必要である。TG 305 では、餌料投与法において基準物質の使用が認められており、基準物質を試験区及び対照区の試験餌料に添加し、両試験区の取込期間終了時における試験魚中の基準物質濃度を比較することにより摂餌を確認することが適当と考えられる。

(3) 委員より出された主な意見

- ・試験魚が試験餌料を適切に摂餌したことを確認する方法として、試験区及び対照区の試験餌料に基準物質を添加することが適当とする意見が挙げられた。
- ・試験区及び対照区の試験魚中における基準物質濃度の比較によって、適切な摂餌を確認することについては、十分な知見がないことから具体的な数値を設定しないこと

が適当であるとする意見が挙げられた。なお、参考として平成 27 年度委託事業において実施された試験では、取込期間終了時（10 日後）における試験魚（コイ）中のヘキサクロロベンゼン（HCB）濃度の変動係数は、17～24%（n=5）であることが事務局より報告された。

- ・基準物質の BMF を算出し、被験物質の BMF と比較することにより、被験物質の蓄積性を評価する意見が挙げられた（3.2.3 参照）。
- ・基準物質について水暴露法との比較を考慮した場合、BCF 及び BMF が既知である化学物質を添加することが適当とされ、井上ら（2011 及び 2012）及び橋爪ら（2014）の報告に示された蓄積性が既知である 9 物質の中から高濃縮性でない化学物質を例示する意見が挙げられた。

(4) 本事業における合意事項

3.2.2(1)から(3)を踏まえ、本事業における合意事項を下記に示した。

< 餌料投与法の試験方法に追加する事項案（資料 3 及び 4 参照） >

TG 305 に記載された試験条件に加え、下記の事項を満たすこととする。

- 1) 試験餌料中の脂質含量は 10～15%程度であること。
- 2) 試験魚が試験餌料を適切に摂餌していること及び試験結果が妥当であることを確認するため、当面、試験区及び対照区の試験餌料に BCF 及び BMF が既知である基準物質を添加し、被験物質と同様の方法で BMF を算出する。

(解説)

- ・基準物質についても BMF を算出し、被験物質の BMF と比較することにより、被験物質の蓄積性を評価することが可能とされた。なお、基準物質の例を餌料投与法に関する試験方法改正原案（解説部分）に示した（資料 4 参照）。
- ・試験区及び対照区の試験魚中における基準物質濃度の比較によって、適切な摂餌を確認することについては、十分な知見がないことから具体的な数値を設定しないことが適当とされた。

3.2.3 餌料投与法の判定基準

(1) 提案内容

餌料投与法の判定基準については、経済産業省と協議の上、明らかに高濃縮性ではないと判定可能な原案を下記のとおり作成し、委員会に提案した。

<餌料投与法に関する化審法判定基準の改正原案>

成長希釈補正した速度論による生体蓄積係数（ BMF_{Kg} ）が 0.007 未満の場合は高濃縮性ではないと判定する。なお、 BMF_{Kg} が 0.007 以上の場合は、部位別の蓄積性及び BCF が既知である基準物質の試験結果（BMF）等を考慮して総合的に判断する。

注）取込期間終了時に試験魚中から被験物質が検出されない、若しくは排泄期間中に試験魚中から被験物質が検出されない場合は、取込期間終了時における生体蓄積係数（BMF）が 0.007 未満のときに高濃縮性ではないと判定する。

(2) 提案根拠

平成 27 年度委託事業において、TG 305 で推奨されているエンドポイントである脂質含量及び成長希釈補正した BMF（ BMF_{KgL} ）は、試験餌料の脂質含量の違いによって値が変動する可能性が示されたため、成長希釈補正した BMF（ BMF_{Kg} ）をエンドポイントとする提案とした。 BMF_{Kg} の数値については、下記の事項を考慮して決定した。

また、蓄積性が低い化学物質に餌料投与法を適用することから、取込期間終了時における生体蓄積係数（BMF）を、「取込期間終了時における試験魚中の平均被験物質濃度／試験餌料中の平均被験物質濃度」と定義し、取込期間終了時における BMF が 0.007 未満のときに高濃縮性ではないと判定する。

< BMF_{Kg} の数値の根拠>

- ・井上ら（2012）の報告に示された試験魚の脂質含量を 5% に標準化した BCF（ BCF_L ）及び BMF_{KgL} の相関解析結果を再解析し、 BCF_L 及び BMF_{Kg} の相関式を求めた。

$$\log (BCF_L) = 0.879 \log (BMF_{Kg}) + 4.556, r^2 = 0.871 \dots \text{式(1)}$$

- ・ BCF_L 1000 L/kg を高濃縮性でないと仮定した場合、式(1)より BMF_{Kg} は 0.017 と算出される。
- ・平成 19～27 年度経済産業省委託事業において、本機構で実施したコイを用いた HCB における BMF_{Kg} の 5% 及び 95% 信頼区間値の比は 2.4 である。③で算出した BMF_{Kg} 0.017 に安全係数（2.4）を考慮すると、 BMF_{Kg} は 0.007（ $=0.017 / 2.4$ ）となる。

(3) 委員より出された主な意見

- ・A 委員より、Arnot ら（2003 及び 2015）のマスバランスモデルを解析し、取込 10 日後における BMF（ BMF_{10day} ）が 0.0005 未満のときに高濃縮性ではないと判定する提案

がされた（下記参照）。

- ・事務局案及び A 委員案の数値に乖離がみられるが、A 委員案の k_G に対する安全係数 100 を 10 に変更した場合、 BMF_{10day} は 0.005 となる。 BMF_{10day} 0.005 は代謝による減衰がない ($k_M = 0$) 数値であることを考慮すると、事務局案の BMF_{k_G} 0.007 未満は適当であるとする意見が挙げられた。
- ・ BMF 0.007 は、被験物質が明らかに高濃縮性でないと評価できる基準であることから、試験魚からの被験物質の検出可否にかかわらず、取込期間終了時における BMF が 0.007 未満の場合には、高濃縮性ではないと判定してもよいとする意見が挙げられた。
- ・3.2.2 に記載のとおり、試験方法改正原案として「試験区及び対照区の試験餌料に BCF 及び BMF が既知である基準物質を添加し、被験物質と同様の方法で BMF を算出することとし、 BMF_{k_G} が 0.007 以上の場合は、被験物質及び基準物質の BMF を総合判断の材料とする意見が挙げられた。
- ・試験魚の消化管内に試験餌料が残った場合、試験魚の被験物質濃度の測定に影響を与えるため、部位別試験において消化管を個別に分析することは被験物質の蓄積性評価に有用であるとする意見が挙げられた。
- ・部位別試験は必須とはせずに、事業者が必要に応じて実施する方が望ましいとする意見が挙げられた。

< A 委員案の提案根拠 >

- ・Arnot ら（2003 及び 2015）のマスバランスモデルでは、 BMF は下記のとおり示される。

$$BMF = k_D / (k_2 + k_E + k_G + k_M) \quad \dots \text{式(2)}$$

k_D : 餌からの取込、 k_2 : 鰓からの排出、 k_E : 糞尿として排泄、 k_G : 成長による希釈、 k_M : 代謝による減衰

- ・定常状態における脂質含量補正した BMF (BMF_L) が 1 未満である場合に高濃縮性でないと仮定する。
- ・式(2)より、 $\log Pow$ が約 5.4 から 9.7 の範囲の化学物質において BMF_L が 1 を超える。また、定常状態に達するまでの時間は $\log Pow$ が約 9.7 の化学物質が最も遅い。
- ・ $\log Pow$ が約 9.7 の化学物質について、取込期間 28 日後における BMF_L を保守的な条件 (k_G に対する安全係数 100、 $k_M = 0$) で算出すると、 $BMF_{28dayL} = 0.004$ となる（取込期間 10 日後、脂質含量補正なしに換算すると、 $BMF_{10day} = 0.0005$ ）。

(4) 委員会における合意事項

3.2.3(1)から(3)を踏まえ、本事業における合意事項を下記に示した。

< 餌料投与法に関する化審法判定基準の改正原案（資料 2 参照） >

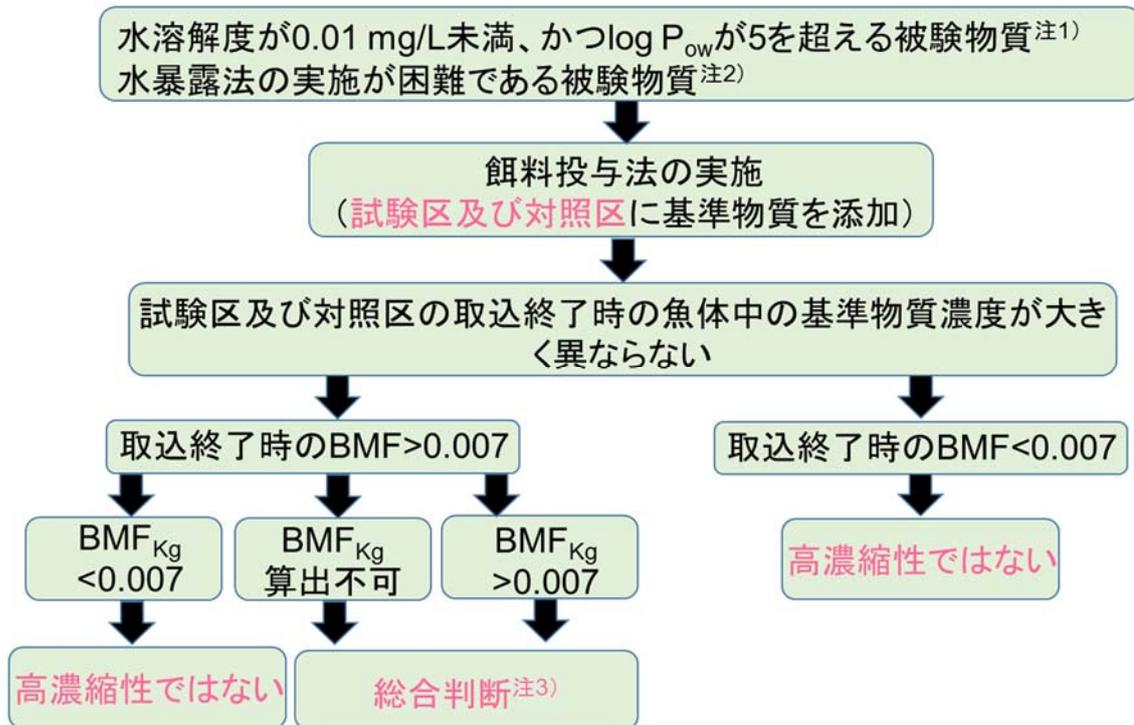
餌料投与法における成長希釈補正した速度論による生体蓄積係数（ BMF_{Kg} ）、又は取込期間を 10 日間以上実施した試験において取込期間終了時における BMF が 0.007 未満の場合は、高濃縮性ではないと判定する。0.007 以上の場合は、その他のエンドポイント（ BMF_K 、 BMF_{KL} 及び BMF_{KgL} ）、部位別（可食部）の生体蓄積係数、基準物質の試験結果等を考慮して総合的に判断する。餌料投与法に関しては、引き続き知見を収集し、必要に応じて、今後、見直しすることとする。

（解説）

- BMF_{Kg} が 0.007 未満の場合は高濃縮性ではないと判定することとされた。
- BMF 0.007 は、被験物質が明らかに高濃縮性でないと評価できる基準であることから、試験魚からの被験物質の検出可否にかかわらず、取込期間を 10 日間以上実施した試験において取込期間終了時における BMF （＝取込期間終了時における試験魚中の平均被験物質濃度／試験餌料中の平均被験物質濃度）が 0.007 未満の場合は、高濃縮性ではないと判定することとされた。
- BMF 0.007 以上の場合に用いるその他のエンドポイントは、餌料投与法に関する試験方法改正原案（試験法部分）（資料 3）に記載されたエンドポイントと整合させた。
- 部位別試験については、水暴露法に関する判定基準原案と整合させるために、部位別（可食部）の生体蓄積係数とした。

3.2.4 餌料投与法の運用案

3.2.1 から 3.2.3 を踏まえ、餌料投与法の運用案を下記のとおりまとめた。



注 1) 事業者が水暴露法、あるいは餌料投与法の実施を選択してよい。

注 2) 水暴露法において試験水中濃度の維持が困難である物質、あるいは試験魚中の被験物質の定量下限値から算出可能な BCF が 1000 L/kg 程度を超える物質は、水暴露法の実施が困難であるため餌料投与法を実施してもよいが、試験開始前に当局に相談すること。

注 3) その他のエンドポイント (BMF_K、BMF_{KL}及び BMF_{KgL})、部位別 (可食部) の生体蓄積係数、基準物質の試験結果等を考慮して総合的に判断する。

なお、構造不明な複雑な反応生成物、あるいは成分が変動する混合物等には、原則として本試験を適用しないこととする。

3.3 TG 305 ガイダンスドキュメントの作成作業への参加

3.3.1 OECD 事務局会合への参加

平成 28 年 12 月 1 日（木）～12 月 2 日（金）に TG 305 GD の作成を担当しているリード国のメンバーを中心に、GD 第三次草案作成に関する会合が行われた。GD の内容を化審法の試験方法や審査基準等に反映させていくこと等を目的に下記のとおり会合に参加した。

期 日： 平成 28 年 12 月 1 日（木）～12 月 2 日（金）
会合名： Secretariat's consultation for the drafting and revision of the Guidance Document supporting TG 305（新 TG 305 の OECD ガイダンスドキュメント作成に関する事務局会合）
場 所： OECD 本部（フランス パリ）
参加者： Ms. Anne Gourmelon 経済協力開発機構
Mr. Ian Doyle イングランド環境庁
Ms Caren Rauert ドイツ連邦環境庁
Dr. Eric Bleeker オランダ国立公衆健康環境研究所
井上義之 一般財団法人化学物質評価研究機構
橋爪直樹 一般財団法人化学物質評価研究機構
目 的： ①日本から提出した GD 第二次草案に対するコメントを適切に反映させること
②餌料投与法に関する日本の検討状況について紹介し、GD に適切に反映させること

(1) 会合の協議内容

① ガイダンスドキュメントに対するコメント

平成 26 年 4 月に OECD 事務局より提示された GD 第二次草案に対して、平成 28 年 5～7 月に Commenting Round（意見収集）が行われた。本意見収集において、日本からは表 3 に示す 6 つのコメントを提案した。

日本から提出したコメントについては、リード国のメンバーと協議を実施し、提案どおり GD 第三次草案に反映された。ただし、5 つ目のコメントについては、「In many cases, the kinetic BCF will be the preferred measure of bioconcentration in the aqueous exposure test, but whenever possible, the both BCF_K and BCF_{SS} should be determined and reported.」と記載される予定である。「In many cases」の意図については、 BCF_K は排泄に関する情報が得られること、試験魚の成長希釈補正した BCF を算出できること及び BMF についても kinetic を原則としていること等から、上記の記載を提案したいとリード国のメンバーから説明がなされた。

表3 GD 第二次草案に対して日本から提出したコメント

第二次草案に対するコメント	
1	<p>Please use the word “kinetic BCF” or “BCF_K” instead of “BCF” in descriptions specifically for a kinetic BCF, for example, descriptions in sections 3.1, 3.3, 3.4, paragraphs 92, 139, and ANNEX 2.</p> <p>(“kinetic BCF”、又は“BCF_K”と記載する箇所において、“BCF”の用語が使用されていたことから、修正することを提案した。)</p>
2	<p>In paragraph 55, please delete the last sentence starting with “Nevertheless” since the Government of Japan is now fundamentally considering the regulatory threshold for experimental results obtained by the minimised aqueous exposure fish test.</p> <p>(日本における簡易水暴露法の取扱い等が記載されていたため、削除することを提案した。)</p>
3	<p>Please replace the URL in footnote 1, page 13 and footnote 16, page 70: http://www.safe.nite.go.jp/english/db.html should read http://www.safe.nite.go.jp/jcheck/top.action?request_locale=en.</p> <p>(化審法データベースの URL が誤っていたことから、修正することを提案した。)</p>
4	<p>Please delete paragraph 74 because of the biased and incorrect description “inherently imprecise and does not use all data generated in the experiment”. Japanese delegation cannot accept such description regarding the BCF_{SS}.</p> <p>(BCF_{SS} が BCF_K と比較して、エンドポイントとして劣ると読み取れる記載であることから、該当する文章を削除することを提案した。)</p>
5	<p>The first sentence of paragraph 91 should read “The kinetic BCF is, in some cases, the preferred measure of bioconcentration in the aqueous exposure test.” TG 305 does not express such unconditional preference to the kinetic BCF (see paragraphs 17, 18 and 20 of TG 305).</p> <p>(BCF_{SS} が BCF_K と比較して、エンドポイントとして劣ると読み取れる記載であることから、該当する文章を削除することを提案した。)</p>
6	<p>In paragraph 287, line 7, “(steady state BCFs would tend to be lower)” should read “(steady state BCFs would tend to be lower than kinetic BCFs)”.</p> <p>(英文の記載が適当でないため、修正することを提案した。)</p>

② 餌料投与法に関する日本の検討状況について

餌料投与法に関する日本の検討状況について紹介した。

- ・平成24年に実施された餌料投与法の国内リングテストにおいて、コイを用いた HCB における BMF_{KgL} は全ての試験機関において 1 を下回り、試験機関によって最大 7 倍程度異なった。
- ・HCB について試験条件が異なる複数の餌料投与法を実施した結果、HCB の BMF_{KgL} は試験条件によって異なった。
- ・HCB の BMF_{KgL} が試験条件によって異なる要因は、 BMF_{KgL} の算出に試験餌料の脂質含量を用いて BMF_{Kg} を補正しているためと考えられた。
- ・新たなエンドポイントとして、 BMF_{Kg} を試験魚の脂質含量のみで標準化した 5% lipid BMF_{Kg} を提案した。

上記提案に対して議論した結果、下記の点について合意された。

- ・日本の検討結果及び提案（5% lipid BMF_{Kg} ）について、GD に記載する。
- ・試験餌料の脂質含量の違いによって、 BMF_{KgL} の値が変動する可能性があることについて、GD に記載する。
- ・GD では餌料に過剰のオイルを添加しないことと記載されているが、「オイル添加により脂質含量を調整した試験餌料」あるいは「オイル未添加の試験餌料」を用いた試験において、試験餌料中の脂質含量が同程度である場合、それぞれの BMF_{KgL} の値に大きな違いが認められないことを GD に記載する。

(2) ガイダンスドキュメント発行までの流れ

TG 305 GD は表 4 に示すとおり、平成 29 年夏頃に正式発行される見込みである。

表 4 ガイダンスドキュメント発行までの流れ

時期	内容
平成 28 年 12 月下旬	本会合を踏まえた GD 第三次草案の OECD 加盟各国の専門家への提示
平成 28 年 12 月下旬 ～平成 29 年 1 月上旬	OECD 加盟各国による 2 回目の Commenting round
平成 29 年 3 月	Commenting round の結果を踏まえた GD 草案の OECD WNT への提出
平成 29 年 4 月	第 29 回 OECD WNT 会合における GD 草案に関する協議及び了承
平成 29 年夏頃	OECD 理事会における GD 草案の承認をもって GD の正式発行

3.4 OECDにおける生物蓄積性の評価手法に関する動向調査

3.4.1 一濃度区での水暴露法、簡易水暴露法及び餌料投与法に関する情報収集について

TG 305 における一濃度区での水暴露法、簡易水暴露法及び餌料投与法を化審法において活用することを想定し、欧州の化学物質管理制度である REACH における活用状況等について情報収集した。ECHA の関係者に下記の内容についてヒアリングを実施し回答を得た。REACH の基本的な考え方として、登録者が試験データ等に対して責任を負うことから、登録者が OECD テストガイドライン等に従って試験を実施し、試験結果の妥当性等を含めて報告する点が化審法とは大きく異なる点である。今回得られた回答は、概ねその考え方に基づく内容であったが、あくまでヒアリングを実施した ECHA 関係者の個人的な見解が示されたものである点に留意が必要である。

表 5 (1/2) 一濃度区での水暴露法、簡易水暴露法及び餌料投与法に関する情報収集

調査内容	回答
<p><一濃度区での水暴露法></p> <ul style="list-style-type: none"> ・一濃度区の水暴露法の結果を既に受け入れているか。 ・既に受け入れている場合、濃度依存性がないことをどのように確認するか。 ・既に受け入れている場合、B 又は vB に分類する際の BCF の値はいくつか。 	<p>一濃度区での水暴露法の試験結果は既に受け入れており、登録者が試験結果の妥当性について証明している。濃度依存性の有無については、テストガイドライン等を参考に登録者が確認している。判定基準は、REACH 附属書 XIII に記載された数値 (B : BCF 2000、vB : 5000) を用いている。</p>
<p><簡易水暴露法></p> <ul style="list-style-type: none"> ・簡易水暴露法の結果を既に受け入れているか。既に受け入れている場合、B 又は vB に分類する際の BCF の値はいくつか。 ・簡易水暴露法の結果を用いる場合に特に要求される事項はあるか。 	<p>簡易水暴露法が weight of evidence の一部として使用された例はあるかもしれない。蓄積性の評価に活用する場合は、REACH 附属書 XIII に記載された数値 (B : BCF 2000、vB : 5000) を用いるが、簡易水暴露法の結果単独では生物蓄積性評価に使用されないと考えている。</p> <p>また、特に要求する事項はないと考える。REACH は蓄積性の評価を要求しており、特定の試験結果を要求しているわけではない。</p>

表 5 (2/2) 一濃度区での水暴露法、簡易水暴露法及び餌料投与法に関する情報収集

調査内容	回答
<p><餌料投与法></p> <ul style="list-style-type: none"> ・餌料投与法の結果を既に受け入れているか。 ・どの BMF (BMF_{SS}, BMF_{Kg}, BMF_{KgL}) が蓄積性評価に用いられているか。また、脂質含量補正した BMF (例えば BMF_{KgL}) を要求するか。 ・B 又は vB に分類する際の BMF の値はいくつか。 ・特定の組織 (可食部又は非可食部) のデータを要求するか。 ・排泄期間を必要としない特殊なケース (レポート) はあるか。 	<p>既に餌料投与法の試験結果は受け入れており、通常、BMF が 1 を超える場合は vB を示す化学物質として評価している。しかしながら、BMF が 1 未満の場合は vB を示さない化学物質としては評価していない。また、BMF の数値のみを用いた蓄積性評価は実施しておらず、その他の情報を含めて weight of evidence により評価している。</p> <p>また、餌料投与法は定常状態に達していない可能性があるため、BMF_{SS} は通常評価に使用していない。BMF_{KgL} が報告されるパラメーターとして望ましい。</p> <p>特定の組織 (可食部又は非可食部) のデータは、特別なケースでは追加情報を要求する可能性がある。</p> <p>取込期間中に化学物質の取り込みが認められる場合は、排泄試験の実施を要求している。動物愛護の観点から、取り込みがないことが予想される物質については、排泄期間は不要な場合もあると考える。</p>

3.5 新規 OECD テストガイドラインに関する情報収集

平成 29 年 4 月 25～28 日に第 29 回 OECD WNT 会合の議事内容について確認した。その結果、本会合において生物蓄積性評価に関して挙げられている主な議題は、TG 305 GD の承認のみであった。

また、平成 18 年より ILSI-HESI が中心となって開発が進められているニジマス肝 S9 試験及びニジマス肝細胞試験について、OECD におけるテストガイドライン化の進捗を確認した。現在、米国及び欧州 (EU) がリード国となり、それぞれの試験のテストガイドライン草案の作成作業が行われており、OECD 加盟各国による Commenting round が 2～3 回行われた後、平成 30 年に開催される第 30 回 OECD WNT 会合において承認されることを目標としている。テストガイドラインには、ガイダンスドキュメントの他、平成 26～27 年に行われたリングテストの報告書が添付される予定である。

4. まとめ

本事業では、化学物質の生物蓄積性評価に関して、化学物質の性状を適正かつ効率的に評価するための新たな手法について調査・検討し、化審法の審査への取込の可能性を検討した。本事業で得られた成果のまとめを下記に記す。

(1) 一濃度区での水暴露法

一濃度区での水暴露法における適用条件、試験結果の取扱い等について検討を行い、一濃度区水暴露法に関する化審法濃縮度試験方法改正原案（新旧条文対照表）（資料 1）及び生物蓄積性に関する化審法判定基準の改正原案（新旧条文対照表）（資料 2）を取りまとめた。

(2) 簡易水暴露法

簡易水暴露法に関する試験機関への調査結果等を踏まえて、今後、国内において実際に活用される可能性は低いと考えられたことから、これまでどおり化審法 Q&A に準ずることとし、本事業において判定基準等は検討しないこととされた。

(3) 餌料投与法

餌料投与法における適用条件、試験結果の取扱い等について検討を行い、餌料投与法に関する化審法濃縮度試験方法改正原案（試験法部分）（資料 3）、餌料投与法に関する化審法濃縮度試験方法改正原案（解説部分）（資料 4）及び生物蓄積性に関する化審法判定基準の改正原案（新旧条文対照表）（資料 2）を取りまとめた。

(4) TG 305 ガイダンスドキュメントの作成作業への参加

TG 305 GD に関する会合に参加し、GD 第二次草案に対する日本からのコメント及び餌料投与法に関する日本の検討結果を GD 第三次草案に適宜反映させた。

(5) OECD における生物蓄積性の評価手法に関する動向調査

REACH における一濃度区での水暴露法、簡易水暴露法及び餌料投与法の活用状況等について情報を得た。また、第 29 回 OECD WNT 会合における生物蓄積性評価に関する議事内容について調査を実施した。

5. 別添資料

資料 1 一濃度区水暴露法に関する化審法濃縮度試験方法改正原案（新旧条文対照表）

資料 2 生物蓄積性に関する化審法判定基準の改正原案（新旧条文対照表）

資料 3 餌料投与法に関する化審法濃縮度試験方法改正原案（試験法部分）

資料 4 餌料投与法に関する化審法濃縮度試験方法改正原案（解説部分）

参考資料 1 平成 25 年度委託事業の委員会における議論の要約

参考資料 2 TG305 及び TG 305 ガイダンスドキュメント草案の抜粋

参考資料 3 濃縮度試験における水溶解度測定方法に関する調査（平成 28 年 11 月）
の調査結果

参考資料 4 簡易水暴露法に関する調査（平成 28 年 11 月）の調査結果

参考資料 5 餌料投与法に関する化審法濃縮度試験方法改正原案（平成 25 年度版）

引用文献

- 1) Arnot JA. and Gobas FAPC. (2003) A generic QSAR for assessing the bioaccumulation potential of organic chemicals in aquatic food webs. *QSAR Comb. Sci.* 22:337–345
- 2) Arnot JA. and Cristina LQ. (2015) Development and evaluation of a database of dietary bioaccumulation test data for organic chemicals in fish. *Environ. Sci. & technol.* 49.8 (2015): 4783–4796.
- 3) European Parliament. 2006. Regulation (EC) 1907/2006 of the European Parliament and of the council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) 793/93 and Commission Regulation (EC) 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. *Official Journal of the European Union* 30.12.2006. L 396/1- 849.
- 4) Hashizume N., et al. (2014) Prediction of the bioconcentration factor in common carp (*Cyprinus carpio* L.) using data from the dietary exposure bioaccumulation fish test. *Environ. Toxicol. Chem.* 33:1406–1414.
- 5) Inoue Y., et al. (2011) Comparison of nitrofen uptake via water and food and its distribution in tissue of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 87:287–291.
- 6) Inoue Y., et al. (2012) Comparison of bioconcentration and biomagnification factors for poorly water-soluble chemicals using common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 63:241–248.
- 7) Organization for Economic Cooperation and Development. (2012) OECD guidelines for testing of chemicals, guideline 305, Bioaccumulation in fish: Aqueous and dietary exposure. Paris, France.
- 8) Organization for Economic Cooperation and Development. (2016) Guidance Document to OECD TG 305 2nd Draft (unpublished document)
- 9) Organization for Economic Cooperation and Development. (2016) Guidance Document to OECD TG 305 3rd Draft (unpublished document)
- 10) 一般財団法人化学物質評価研究機構 (2008) 平成19年度化学物質安全確保・国際規制対策推進等 化学物質の試験方法開発等
- 11) 一般財団法人化学物質評価研究機構 (2009) 平成20年度化学物質安全確保・国際規制対策推進等 化学物質の試験方法開発等

- 12) 一般財団法人化学物質評価研究機構（2010）平成21年度化学物質安全確保・国際規制対策推進等 化学物質の試験方法開発等
- 13) 一般財団法人化学物質評価研究機構（2011）平成22年度化学物質安全確保・国際規制対策推進等 化学物質の試験方法開発等
- 14) 一般財団法人化学物質評価研究機構（2012）平成23年度化学物質安全確保・国際規制対策推進等 化学物質の試験方法開発等
- 15) 一般財団法人化学物質評価研究機構（2013）平成24年度環境対応技術開発等 化学物質の試験方法開発等
- 16) 一般財団法人化学物質評価研究機構（2014）平成25年度化学物質安全対策等 化学物質の試験方法開発等
- 17) 一般財団法人化学物質評価研究機構（2015）平成26年度経済産業省委託事業化学物質安全対策 化学物質の評価手法に関する調査・検討
- 18) 一般財団法人化学物質評価研究機構（2016）平成27年度経済産業省委託事業化学物質安全対策（化学物質の評価手法に関する調査・検討）

資料1 一濃度区水暴露法に関する化審法濃縮度試験方法改正原案（新旧条文対照表）

新（改正原案）	旧（現行）
<p>3-5-2 試験濃度の設定</p> <p>(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。</p> <p>(2) BCFの濃度依存性がないと予想される<u>試験条件においては</u>、試験は1濃度区でよい場合がある。<u>1濃度区での水暴露法を適用する場合は、試験濃度を試験用水に対する被験物質の溶解度の10分の1以下に設定すること。ただし、無機化合物、有機金属化合物、界面活性作用を有する物質、トリフルオロメチル基又はテトラフルオロエチレン基を有する物質及び構造不明な複雑な反応生成物、あるいは成分が変動する混合物等については、上記の設定濃度であっても濃度依存性を示す可能性は否定できないため、1濃度区での水暴露法は適さない。</u></p>	<p>3-5-2 試験濃度の設定</p> <p>(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。</p> <p>(2) BCFの濃度依存性がないと予想される<u>物質については</u>、試験は1濃度区でよい場合がある。</p>

資料2 生物蓄積性に関する化審法判定基準の改正原案（新旧条文対照表）（1/2）

新（改正原案）	旧（現行）
<p>II. 試験成績に係る判定基準</p> <p style="text-align: center;">（中略）</p> <p>（2）濃縮度試験又はPow測定試験</p> <p>①高濃縮性</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ <u>生物濃縮係数が5,000 L/kg以上であること。</u> <p>②高濃縮性でない</p> <p>以下のいずれかであること。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ <u>生物濃縮係数が1,000 L/kg未満であること。</u> ・ 1-オクタノール/水分配係数（Pow）の常用対数が3.5未満であること。ただし、界面活性のある物質、分子量分布を有する混合物、有機金属化合物、純度の低い物質（HPLC法を除く）及び無機化合物には適用しない。 <p>③<u>生物濃縮係数が1,000 L/kg以上、5,000 L/kg未満の場合には、必要に応じ、以下の成績又は知見を考慮して高濃縮性かどうかを総合的に判断する。</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 排泄試験 ・ 部位別（可食部）の<u>生物濃縮係数</u> ・ <u>濃度依存性に関する知見</u> <p>上記の判定に当たっては、<u>①及び②の場合においては、原則として、定常状態における生物濃縮係数を用いることとする。③の場合においては定常状態におけるその他のエンドポイント（BCF_{SSL}、BCF_K、</u></p>	<p>II. 試験成績に係る判定基準</p> <p style="text-align: center;">（中略）</p> <p>（2）濃縮度試験又はPow測定試験</p> <p>①高濃縮性</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ <u>濃縮倍率が5,000倍以上であること。</u> <p>②高濃縮性でない</p> <p>以下のいずれかであること。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ <u>濃縮倍率が1,000倍未満であること</u> ・ 1-オクタノール/水分配係数（Pow）の常用対数が3.5未満であること。ただし、界面活性のある物質、分子量分布を有する混合物、有機金属化合物、純度の低い物質（HPLC法を除く）及び無機化合物には適用しない。 <p>③<u>濃縮倍率が1,000倍以上、5,000倍未満の場合には、必要に応じ、以下の成績を考慮して高濃縮性かどうかを総合的に判断する。</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 排泄試験 ・ 部位別（可食部）の<u>濃縮倍率</u> <p>上記の判定に当たっては、原則として、<u>定常状態における濃縮倍率を用いることとし、定常状態での数値が得られない場合には、総合的に判断をする。また、濃縮倍率に濃度依存性が認められる場合には、</u></p>

資料2 生物蓄積性に関する化審法判定基準の改正原案（新旧条文対照表）（2/2）

<p><u>BCF_{KL}、BCF_{Kg}及びBCF_{KgL}）を含めて判断する。また、生物濃縮係数に濃度依存性が懸念される場合には、必要に応じてより低濃度区での試験を行い、その成績を踏まえ判断する。</u></p> <p><u>注1）①の場合において、定常状態における生物濃縮係数が得られない場合には、総合的に判断する。</u></p> <p><u>注2）③の場合において、脂質に濃縮されないことが明確な場合、脂質標準化は行わない（BCF_{SS}、BCF_K及びBCF_{Kg}を含めて評価する）。</u></p> <p><u>注3）部位別試験の結果については、BCF_L（5%の脂質含量で標準化した値）ではなくBCFを用いて評価する。</u></p> <p><u>餌料投与法における成長希釈補正した速度論による生体蓄積係数（BMF_{Kg}）、又は取込期間を10日間以上実施した試験において取込期間終了時におけるBMFが0.007未満の場合は、高濃縮性ではないと判定する。0.007以上の場合は、その他のエンドポイント（BMF_K、BMF_{KL}及びBMF_{KgL}）、部位別（可食部）の生体蓄積係数、基準物質の試験結果等を考慮して総合的に判断する。餌料投与法に関しては、引き続き知見を収集し、必要に応じて、今後、見直しすることとする。</u></p> <p>なお、魚介類の体内における濃縮性その他生物の体内の蓄積性に関する知見がある場合には、必要に応じ、これらの知見を考慮して判定する。</p>	<p><u>必要に応じてより低濃度区での試験を行い、その成績を踏まえ判断する。</u></p> <p>なお、魚介類の体内における濃縮性その他生物の体内の蓄積性に関する知見がある場合には、必要に応じ、これらの知見を考慮して判定する。</p>
--	---

資料3 餌料投与法に関する化審法濃縮度試験方法改正原案（試験法部分） (1/8)

III: 魚を用いた濃縮度試験（餌料投与法）

III- I 適用範囲

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

なお、構造不明な複雑な反応生成物、或いは成分が変動する混合物等には、原則として本試験を適用しないこととする。

III- 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。

III- III 試験方法

1 試験の概要

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

2 試験に用いる装置及び材料

2-1 装置及び器具

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

資料3 餌料投与法に関する化審法濃縮度試験方法改正原案（試験法部分） (2/8)

2-2 試験用水

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

2-3 試験魚

2-3-1 魚種を選択

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

2-3-2 蓄養及びじゅん化

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

2-3-3 餌料

餌料とは、被験物質及び媒体（有機溶剤又はオイル）を含まない餌である。少なくともたんぱく質及び脂質含量が既知である市販の魚の餌料（浮遊性又はゆっくり沈降するペレット状あるいはクランブル状の餌料）が推奨される。餌料は、摂餌効率を高めるため、均一な大きさのペレットとし、試験開始時の試験魚に合わせて適当なサイズに調製する（例えば、全長が3-7 cmの試験魚にはペレットの直径がおよそ0.60-0.85 mm、全長が6-12 cmの試験魚にはおよそ0.85-1.2 mmが好ましい）。ペレットのサイズは、排泄期間開始時に試験魚の成長に合わせて調製してもよい。適切な市販餌料の組成の一例を試験法解説に示す。試験区及び対照区の餌料の脂質含量は、取込期間開始前及び取込期間の終了時に測定する。餌料の栄養素、水分、繊維及び灰分などの情報を試験報告書に記載する。

3 試験の実施

3-1 試験餌料

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

- ・ 被験物質がトリグリセリド類に可溶でかつ安定である場合、餌料と混合する前に被験物質を少量のオイル（魚油又は食用植物油）に溶解する。この場合、餌料の本来の脂質含量を考慮し、オイル量は最小限とする。

資料3 餌料投与法に関する化審法濃縮度試験方法改正原案（試験法部分） (3/8)

- ・ 適当な有機溶剤（ヘキサン、アセトン及びテトラヒドロフラン等の揮発性を有する溶剤）に溶解して餌料に添加する。混合した後、添加した溶媒を留去する。試験餌料中の被験物質の分散及び均一性を確保する。さらに、被験物質の生物学的利用能が損なわれないようにする。
 - ・ 非粘稠性の液体の被験物質は直接餌料に添加し、均一性及び良好な同化を促すために良く混合する。
- (2) 取込期間中及び排泄期間中に、栄養的に等価な餌料、又は試験餌料を試験区及び対照区に給餌する。被験物質の添加媒体としてオイル又は有機溶剤を使用した場合は、対照区の試験餌料についても試験区と等量の媒体（被験物質を含まない）を添加する。被験物質を添加した試験餌料は、試験餌料中の被験物質が安定に維持される条件下で保管し、その方法を報告する。

3-2 給餌

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

3-3 水質測定の頻度

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

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

資料3 餌料投与法に関する化審法濃縮度試験方法改正原案（試験法部分） (4/8)

3-4 流量

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

3-5 試験魚の条件

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

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

3-6 試験餌料濃度

試験は、原則1濃度区で実施する。同時に、被験物質を添加していない試験餌料を給餌する対照区を設定する。試験濃度の設定は、分析感度（排泄期間中の魚体中被験物質濃度が取込期間終了時の魚体中被験物質濃度の10%未満まで測定できる）、被験物質の毒性（既知なら最大無影響濃度（NOEC））及び忌避行動を考慮して選択する。これまでの知見から、1-1000 µg/gの範囲の被験物質濃度は、特定の毒性メカニズムを示さない化学物質について実用的な範囲となる。試験魚が試験餌料を適切に摂餌していること及び試験結果が妥当であることを確認するため、当面、試験区及び対照区の試験餌料にBCF及びBMFが既知である基準物質⁽²⁾を添加し、被験物質と同様の方法でBMFを算出することを推奨する。

3-7 照明及び試験温度

I：魚を用いた濃縮度試験（水暴露法）と同様とする。

3-8 試験期間

3-8-1 取込期間

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

(2) 基準物質の例を試験法解説に示す。今後、知見が蓄積され適切な物質が明らかになった場合は、基準物質として使用しても良い。

資料3 餌料投与法に関する化審法濃縮度試験方法改正原案（試験法部分） (5/8)

3-8-2 排泄期間

(1) 原則、排泄期間は28日間とし、試験魚からの被験物質の排泄の程度をさらに確認する必要がある場合には、期間を延長する。排泄期間の開始は試験魚に被験物質及び媒体を添加していない餌料を給餌した時点とする。排泄初期（例えば7日後又は14日後）における試験魚中の被験物質濃度が定量下限未満の場合、以降の分析を中止し、試験を終了してもよい。排泄期間終了時に半減期が得られない場合にも、それまでの結果から生体蓄積係数（dietary BMF）を算出する。

(2) 取込期間を10日間以上実施した試験において、取込期間終了時におけるBMFが0.007未満であって、次の①及び②を満たす場合は試験を終了できる。

① 試験有効性基準を満たす。

② 取込の欠如が試験設計の問題（例えば、取込期間が十分でない、試験餌料調製上の不具合による生物学的利用能の低下、分析感度の欠如及び魚が試験餌料を食べない等）によるものでない。

3-9 分析

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

3-9-1 試験餌料の分析

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

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

3-9-2 試験魚の分析

(1) 試験魚の分析は、試験区及び対照区から5-10尾を採取し、個々の試験魚について実施する。ただし、個体ごとの分析が困難な場合には、各分析時における試験魚を複数尾まとめて分析する。その場合は、2群以上とすることが望ましい。試験魚の採取は、同一時間（給餌時間を目安にする）に実施する。試験魚の消化管内に試験餌料が残っていると試験魚の被験物質濃度の測定に影響を与えるため、次回の給餌直前（例えば1時間前）に採取する。残餌が疑われる場合は、消化管を除去し、別々に分析することが望ましい。消化管内の残餌の有無については、予備検討において確認してもよい。

(2) 試験区及び対照区において、取込期間の終了時及び排泄期間中に4回から6回（例えば1、3、7、14及び28日）、試験魚を分析する。また、詳細な組織中の蓄積量の確認が必要な場合、部位別試験を実施する。部位については、頭部、内臓、外皮（鰓を含む）、消化管及び可食部（頭部、内臓、外皮及び消化管を除くその他の部位）の5部位に分けて実施し、それぞれの部位における被験物質濃度とBMFを報告する。対照区の試験魚については被験物質濃度が排泄期間開始時に不検出の場合、排泄期間終了時に2-3尾の対照区の魚について分析を行えば十分である。すべての分析時において、採取した試験魚を動物愛護の観点から最も適した方法で安楽死させた後、体重及び全長を

資料3 餌料投与法に関する化審法濃縮度試験方法改正原案（試験法部分） (6/8)

個別に測定する（試験区及び対照区から同数の試験魚が採取されるようにする）。それぞれの個体の体重及び全長は、識別コードなどを付して、被験物質濃度（及び該当する場合は脂質含量）の結果と整合させる。

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

3-9-3 試験魚体重の測定

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

4 試験結果の算出

4-1 生体蓄積係数の算出

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

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

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

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

また、取込期間終了時における BMF を以下の式から算出する。

資料3 餌料投与法に関する化審法濃縮度試験方法改正原案（試験法部分） (7/8)

$$\text{BMF} = \frac{\text{取込期間終了時における試験魚中の平均被験物質濃度}}{\text{試験餌料中の平均被験物質濃度}}$$

4-2 成長希釈及び脂質含量補正

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

5 試験の有効性

試験を有効なものとするために、次の条件を適用する。

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

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

資料3 餌料投与法に関する化審法濃縮度試験方法改正原案（試験法部分） (8/8)

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

資料 4 餌料投与方法に関する化審法濃縮度試験方法改正原案（解説部分） (1/10)

本資料は、「魚介類の体内における化学物質の濃縮度試験」（平成 27 年 12 月 21 日）の「試験法解説」部分に追加することを想定した原案である。本資料の「1. 定義及び単位」は、現行の「試験法解説の 1. 定義及び単位」に追加する項目である。本資料の「8. III: 魚を用いた濃縮度試験（餌料投与方法）」は、現行の「試験法解説の 7. II: 魚を用いた濃縮度試験（簡易水暴露法）」の後に追加する項目である。

1. 定義及び単位

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

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

速度論による生体蓄積係数（ BMF_K ; kinetic biomagnification factor）とは、生体内吸収効率（ α ）と給餌量（ I ）の積と排泄速度定数（ k_2 ）の比（ $I \times \alpha / k_2$ ）である。

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

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

成長希釈補正した速度論による生体蓄積係数（ BMF_{K_g} ; growth corrected kinetic biomagnification factor）とは、試験期間中の試験魚の成長希釈を補正した BMF_K である。

脂質含量補正した速度論による生体蓄積係数（ BMF_{K_L} ; lipid corrected kinetic biomagnification factor）とは、脂質含量補正係数（ L_c ）で除した BMF_K である。

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

脂質含量及び成長希釈補正した速度論による生体蓄積係数（ $\text{BMF}_{K_{gL}}$; lipid-corrected growth-corrected kinetic BMF）とは、脂質補正係数（ L_c ）で除した BMF_{K_g} である。

資料 4 餌料投与法に関する化審法濃縮度試験方法改正原案（解説部分） (2/10)

8. III:魚を用いた濃縮度試験（餌料投与法）

8. 1 適切な餌料の成分量の例（試験法「2-3-3 餌料」）

主な成分	餌料
粗タンパク質	≥ 53%
粗脂肪	10～15%程度
粗繊維	≤ 1.0%
水分	≤ 10%
灰分	≤ 15%

8. 2 餌料への添加技術の例（試験法「3-1 試験餌料」）

一般的ポイント

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

液体試料の餌料の調製

餌料に添加する被験物質設定濃度は、例えば 500 µg 被験物質/g 餌料とする。ガラス瓶又はナスフラスコに適切な量の被験物質と既知量の餌料を添加する。餌料量は、取込期間に十分な量とすべきである（試験魚の成長による給餌量の増加を考慮する）。餌料/被験物質の混合物は、一晚混合すべきである（例えばロトラックミキサーを用いて、又はナスフラスコを用いる場合は回転により）。被験物質を添加した餌料は、使用まで餌料中の被験物質の安定性を維持する条件下で（例えば冷蔵）保管すべきである。

コーンオイル或いは魚油による餌料の調製

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

資料 4 餌料投与方法に関する化審法濃縮度試験方法改正原案（解説部分） (3/10)

場合)、フラスコに栓をしマイクロスターラーを加えて、混合物を急速で一晩攪拌する。試験に適当な量の餌料（通常はペレット状）を添加し、ナスフラスコの内容物を少なくとも 30 分間、好ましくは一晩連続回転によって混合する。被験物質を添加した餌料は、使用まで餌料中の被験物質を安定に保存できる条件下（例えば冷蔵）で保管すべきである。

有機溶媒による餌料の調製

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

資料 4 餌料投与方法に関する化審法濃縮度試験方法改正原案（解説部分）
(4/10)

8. 3 10 日間の取込期間及び 42 日間の排泄期間に従う理論的なサンプリングスケジュールの例（試験法「3-9 分析」）

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

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

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

資料 4 餌料投与法に関する化審法濃縮度試験方法改正原案（解説部分） (5/10)

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

8. 4 生体内吸収効率及び生体蓄積係数の算出（試験法「4-1 生体蓄積係数の算出」）

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

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

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

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

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

I = 給餌量 (g 餌料/g 魚/日)

C_{food} = 試験餌料中被験物質濃度 (mg/kg 餌料)

t = 取込期間 (日)

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

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

$W_{f(t)}$ = 取込日 t における平均試験魚体重

$W_{f(0)}$ = 試験開始時の平均試験魚体重

資料 4 餌料投与法に関する化審法濃縮度試験方法改正原案（解説部分）
(6/10)

このようにして（少なくとも）取込期間最終日の試験魚の平均体重（ $W_{f, \text{end-of-uptake}}$ ）は、推定可能である。給餌量は W_{f0} に基づいて設定されているため、取込期間の各実験日における適切な給餌量は、これら二つの体重を用いて算出可能である。取込期間中に急速な成長が認められる場合、 I の代わりに成長希釈補正した給餌量 I_g （g 餌料/g 魚/日）を以下のように算出する。

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

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

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

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

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

α = 生体内吸収効率（消化管からの被験物質の吸収）

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

k_{2g} = 成長希釈補正した排泄速度定数（/日）

I = 給餌量（g 餌料/g 魚/日）

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

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

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

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

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

資料 4 餌料投与法に関する化審法濃縮度試験方法改正原案（解説部分） (7/10)

8. 5 脂質含量補正（試験法「4-2 成長希釈及び脂質含量補正」）

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

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

脂質含量補正係数（ L_c ）は、以下のように算出される。

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

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

脂質含量補正係数は、脂質含量補正した生体蓄積係数（ BMF_L ）の算出に用いられる。

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

8. 6 取込期間終了時における試験魚中被験物質濃度の実測値（ $C_{0,m}$ ）と排泄期間開始時における試験魚中被験物質濃度の外挿値（ $C_{0,d}$ ）との差の評価

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

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

資料 4 餌料投与法に関する化審法濃縮度試験方法改正原案（解説部分） (8/10)

内吸収効率の算出に用いることは適切である。この場合には、報告書において十分に正当性を説明しなければならない。排泄期間において、被験物質の排泄が1次速度に従わない可能性もある。

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

8. 7 非常に急速に排泄される被験物質についてのガイダンス

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

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

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

資料4 餌料投与法に関する化審法濃縮度試験方法改正原案（解説部分）
 (9/10)

8.8 基準物質の例（試験法「3-6 試験餌料濃度」）

餌料投与法に使用する基準物質の例として、以下の物質が挙げられる（注1、2、3）。

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

資料 4 餌料投与法に関する化審法濃縮度試験方法改正原案（解説部分）
(10/10)

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

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

(注 1) Inoue Y., Hashizume N., Kikushima E., Otsuka M. (2011). Comparison of nitrofen uptake via water and food and its distribution in tissue of common carp, *Cyprinus carpio* L. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 87 (3): 287.

(注 2) Inoue Y., Hashizume N., Yoshida T., Murakami H., Suzuki Y., Koga Y., Takeshige R., Kikushima E., Yakata N., Otsuka M. (2012). Comparison of the Bioconcentration and Biomagnification Factors for Poorly-Water-Soluble Chemicals using Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 63 (2):241-248

(注 3) Hashizume N., Tanabe A., Inoue Y., Sawada T., Murakami H., Suzuki Y., Sumi S., Tsubokura Y., Yoshida T., Ajimi S., Tsuji T., Furukawa K. (2014). Prediction of the bioconcentration factor in common carp (*Cyprinus carpio* L.) using data from the dietary exposure bioaccumulation fish test. Environ. Toxicol. Chem. 33 (6): 1406-1414

参考資料 1 平成 25 年度委託事業の委員会における議論の要約 (1/3)

	平成 25 年度における原案	平成 25 年度における議論要約	化審法 Q&A 抜粋
①	<p>被験物質の濃度が対水溶解度の 1/10 以下で実施された試験により得られた結果が、BCF<500 であった場合には、その 1 濃度区だけの結果から高濃縮性でないと判定できることとする。</p>	<p><水溶解度について></p> <ul style="list-style-type: none"> ・「Arnot ら (2006)」により、水溶解度の測定値は、測定誤差等を考慮しても測定値の 1/5 以下であれば、真の水溶解度以下になっていると見解が示されている。 ・分析精度等を考慮して安全係数 10 とし、被験物質の濃度は水溶解度の 1/10 以下とする。 <p><BCF の基準について></p> <ul style="list-style-type: none"> ・高濃縮性とする基準が BCF\geq5000 であることから、BCF<500 が妥当である。定常状態における BCF<500 であっても、BCF が 500 を超えてばらつきが大きい場合等は、エキスパートジャッジする。適用する BCF としては BCF_{ss}<500 とする。 	<p>被験物質の濃度がその対水溶解度の 1/10 以下で実施された 1 濃度区濃縮度試験の結果、定常状態における BCF が 500 倍未満であった場合には、その 1 濃度区だけの結果から高濃縮性でないと判定できることとしています。BCF が 500 倍以上であった場合には、その試験結果から判定することはできません。2 濃度区での濃縮度試験の結果などが必要となります。</p>
②	<p>当面の間、1 濃度区での試験を行う場合には、試験開始前に試験の条件等について相談案件として審議会に諮ることとする。</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・適用基準があることから、全てのケースについて事前相談は実施しなくてもよい。疑義がある案件についてのみ、事前相談を実施すればよい。 	<p>削除</p>

参考資料 1 平成 25 年度委託事業の委員会における議論の要約 (2/3)

	平成 25 年度における原案	平成 25 年度における議論要約	化審法 Q&A 抜粋
③	対水溶解度については、化審法濃縮度試験の試験施設において OECD テストガイドライン 105 に定められた方法に準じて測定されたものに限ることとする。	<ul style="list-style-type: none"> 水溶解度の測定については、化審法濃縮度試験の試験施設ということであり、GLP 施設に限定されるのか。 経済産業省が確認した濃縮度試験を実施している試験施設という意味である。 	(注 1) 対水溶解度の測定については、GLP 基準に適合する試験施設において 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されたものに限ることとする。
④	被験物質の濃度は、LC50 の 1/100 以下であって、分析が可能なできる限り低い濃度を設定する。	<ul style="list-style-type: none"> 試験法には、LC50 の 1/100 以下もしくは無影響濃度 (NOEC) 以下としている。試験法と合わせて NOEC についても追記が必要である。 	(注 2) 被験物質の濃度は、LC50 の 1/100 以下又は NOEC 以下であって、分析が可能なできる限り低い濃度を設定する。
⑤	<p>以下の化学物質は本ルールの対象とはしないこととする。(これらに該当するかどうかについては、事前相談の段階で判断する。)</p> <ul style="list-style-type: none"> 無機化合物及び有機金属化合物 (Na、Mg、K、Ca 以外の金属を含有するものに限る。) 界面活性作用を有すると考えられる化学物質 炭素数 7 以上のパーフルオロアルキル基を有する化学物質 	<ul style="list-style-type: none"> パーフルオロアルカンの場合に C7 以上とする根拠がないのであれば、当面はパーフルオロであればすべて例外とすべきである。 危険な物質については、例外とすることによい。知見が得られた際に改定するほうがよいと考えるため、C7 の記載を削除し、知見が得られた際に見直す。 例外の金属種については、試験通知に記載されている金属を同様に除外する案を提示されたが、アルカリ金属、アルカリ土類金属を含ませるために、「等」を入れる。 	<p>(注 3) 以下の化学物質は本ルールの対象とはしないこととする。</p> <ul style="list-style-type: none"> 無機化合物及び有機金属化合物 (Na、Mg、K、Ca 等以外の金属を含有するものに限る。) 界面活性作用を有すると考えられる化学物質 パーフルオロアルキル基を有する化学物質

参考資料 1 平成 25 年度委託事業の委員会における議論の要約 (3/3)

	平成 25 年度における原案	平成 25 年度における議論要約	化審法 Q&A 抜粋
⑥	記載なし	<ul style="list-style-type: none"> ・混合物や反応生成物については、水溶解度が定義できないことから適用できないと考える。 ・代表成分が特定できており、構造的に全体を代表している成分の水溶解度が得られている場合は、実施可能と考える。 ・極めて水に溶解する物質については、代表成分の水溶解度から判断できるが、溶解性が低い物質については水溶解度を測定することは難しい。そのような物質は、1 濃度区等の適用から除外してはどうか。多成分系については、事前相談になるのではないか。 	<p>(注 4) 多成分の混合物は、原則として本ルールの対象とはしないこととする。(対水溶解度が適切に測定され、それを踏まえて被験物質の濃度が適当なものであり、定常状態における BCF が 500 L/kg 未満であることが明確に示されている場合を除く。)</p>

参考資料 2 TG 305 及び TG 305 ガイダンスドキュメント草案の抜粋 (1/3)

項目	TG 305 (抜粋)
試験濃度について	<p>パラ 49</p> <p>The test was originally designed for non-polar organic substances. For this type of substance, the exposure of fish to a single concentration is expected to be sufficient, as no concentration effects are expected, although two concentrations may be required for the relevant regulatory framework. If substances outside this domain are tested, or other indications of possible concentration dependence are known, the test should be run with two or more concentrations. If only one concentration is tested, justification for the use of one concentration should be given (cf. paragraph 79). Also, the tested concentration should be as low as is practical or technically possible (i.e. not close to the solubility limit).</p> <p>この試験は、本来、非極性の有機化学物質のために設計されている。この種の化学物質については、濃度依存性がないと予想されるため、魚への被験物質の暴露は 1 濃度区で十分であると予測されるが、規制の枠組みにおいては 2 濃度区が要求されることもある。この種類以外の化学物質を試験する場合、又は濃度依存性の兆候が認められる場合、2 濃度区又はそれ以上の濃度区で試験を実施しなければならない。1 濃度区のみで実施する場合には、1 濃度区のみでの実施の正当性を報告しなければならない（パラグラフ 79 参照）。また、試験濃度は実施上、もしくは技術的に可能な限り低くすべきである（すなわち、水溶解度付近ではない）。</p> <p>パラ 50</p> <p>In some cases it can be anticipated that the bioconcentration of a substance is dependent on the water concentration (e.g. for metals, where the uptake in fish may be at least partly regulated). In such a case it is necessary that at least two, but preferably more, concentrations are tested (cf. paragraph 49) which are environmentally relevant. Also for substances where the concentrations tested have to be near the solubility limit for practical reasons, testing at least two concentrations is recommended, because this can give insight into the reliability of the exposure concentrations. The choice of the test concentrations should incorporate the environmentally realistic concentration as well as the concentration that is relevant to the purpose of the specific assessment.</p> <p>いくつかのケースとして、化学物質の生物濃縮は試験水中の被験物質濃度に依存することがある（例えば、金属化合物の魚への取り込みは少なくとも一部は制限されている）。そのような場合、実環境に基づき少なくとも 2 濃度区での試験、好ましくはそれ以上の濃度区で試験することが必要である（パラグラフ 49 参照）。また、実施上の理由から、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、暴露濃度の信頼性を考察できるように、少なくとも 2 濃度区での試験が推奨される。設定濃度の決定は、実環境に即した設定濃度さらには特定の評価目的に合わせた濃度にすべきである。</p>

参考資料 2 TG 305 及び TG 305 ガイダンスドキュメント草案の抜粋 (2/3)

項目	TG 305 GD 第三次草案 (抜粋)
(1) 水暴露法 (305-I) 免除や水暴露法 (305-I) 二濃度区試験の実施	<p>パラ 60</p> <p>Possible concentration dependence: Even though the BCF for hydrophobic organic compounds is not generally considered to be concentration dependent, differences in BCF values between two exposure concentrations could arise where the (organic) chemical in question requires metabolism before it can be eliminated. Saturation of the metabolic mechanisms in the fish could result in dramatic increases in the BCF value when the exposure concentration is increased. Conversely, BCF values at intermediate concentrations might decrease if a certain body burden is required before relevant metabolic pathways start to operate.</p> <p>濃度依存性の可能性：疎水性有機化合物の BCF は一般的に濃度に依存しないと考えられているが、2 濃度区間の BCF の相違は、(有機) 化学物質の排泄において代謝が寄与する場合に生じることがある。試験魚における代謝の飽和が生じる場合、試験濃度の上昇に伴い、BCF が劇的に上昇することがある。反対に、関連する代謝に誘導が必要とされる場合、BCF が低下する可能性がある。</p> <p>パラ 60</p> <p>Bioavailability of test substance: Testing at concentrations near or above the solubility limit of the test substance in the test water, or adsorption of part of the test substance to organic matter in the test chamber will lead to an underestimation of the BCF due to reduced bioavailability of the test substance (cf. chapter 2.2). In this case, a second, lower test concentration is a useful check on the result.</p> <p>被験物質の生物学的利用能：試験濃度が水溶解度付近又はそれ以上の場合、あるいは水槽中の有機物に被験物質の一部が吸着する場合、被験物質の生物学的利用能の低下により、BCF の過小評価につながる (2.2 参照)。この場合、さらに低い濃度を設定して試験を実施する事が結果の確認に有効である。</p> <p>パラ 62</p> <p>Conduct of a full study at two concentrations if there is any evidence of possible concentration dependence, or if it cannot be excluded.</p> <p>濃度依存性の可能性がある場合、又はその可能性を排除できない場合、2 濃度区の本試験 (水暴露法 (305-I)) を実施する。</p> <p>パラ 62</p> <p>Conduct of a minimised test at two concentrations as a pilot study for determining the need for testing at two test concentrations in a subsequent definitive test.</p> <p>本試験において 2 濃度区試験の必要性を決定するため、予備試験として 2 濃度区の簡易水暴露法を実施する。</p> <p>Should the result of one concentration of a two (or more) concentration minimized BCF test where the MPD is $\geq 50\%$ fall into the relevant margin (depending on OECD country criteria, e.g. 1,400 to 2,700 for the 2,000 criterion (18)), a full bioconcentration test with two or more concentrations should be performed.</p> <p>MPD が 50%以上である 2 濃度区 (又はそれ以上) の簡易水暴露法において、そのうちの 1 濃度区の結果が妥当な (OECD 加盟国の基準 (例えば 2000 に対して 1400~2700) によって決まる) マージンに入れば、2 又はそれ以上の濃度区で本試験 (水暴露法 (305-I)) を実施すべきである。</p> <p>For minimised tests with two concentrations that demonstrate a concentration dependence (i.e. where the MPD is $\geq 50\%$) but both BCF_{km} are very low (e.g. <10 and <100 L/kg), then conduct of a definitive test should not normally be necessary, depending on the requirements of the relevant regulatory authority (cf. (1), para 94 and 95).</p> <p>2 濃度区の簡易水暴露法において、濃度依存性が認められる (すなわち MPD が 50%以上) もの、BCF_{km} が非常に低い (例えば 10 や 100 L/kg 未満) 場合は、規制当局の要求に従い、本試験の実施は通常、必要とはならないだろう (TG305 パラ 94、95 参照)。</p>

参考資料 2 TG 305 及び TG 305 ガイダンスドキュメント草案の抜粋 (3/3)

項目	TG305 GD 第三次草案 (抜粋)
(2)一濃度区試験の適用物質	<p>パラ 62</p> <p>The test substance is a moderately hydrophobic organic compound. Driven by diffusion, hydrophobic organic compounds would generally accumulate in lipids. For other groups of substances with other possible ways of uptake, e.g. ionisable substances or metals, not enough may be known to exclude a potential concentration dependence.</p> <p>被験物質が中度の疎水性有機化合物である。疎水性有機化合物は拡散によって一般的に脂質に蓄積する。イオン性の化合物や金属のようにその他のメカニズムにより取り込まれる化合物群は濃度依存性の可能性を除外する十分な知見がない。</p>
(3)一濃度区試験の適用試験条件	<p>パラ 62</p> <p>Testing is done clearly within the water solubility of the test substance</p> <p>明らかに水溶解度以下の濃度で試験が実施されている。</p> <p>TOC and DOC in the test chamber is measured regularly and fully reported, and remain clearly within the permissible limits (cf. (1), para 30)</p> <p>水槽中の TOC 及び DOC が定期的に測定・報告され、数値が明らかに許容範囲内である (TG 305 パラ 30 参照)。</p>

参考資料 3 濃縮度試験における水溶解度測定方法に関する調査（平成 28 年 11 月）の調査結果（1/7）

設問 1 濃縮度試験のための水溶解度を測定する際、フラスコ法とカラム溶出法を使い分けていますか？

はいの場合、どのような基準で選択していますか？

いいえの場合、どちらの方法で測定していますか？また、その測定方法を採用する理由は何ですか？

試験機関	回答
A	<p>はい</p> <p>10 mg/L 以上はフラスコ法</p> <p>10 mg/L 以下はカラム溶出法（スポンサーの指示でフラスコ法の場合もあり）</p>
B	<p>はい</p> <p>10 mg/L 以上はフラスコ法</p> <p>10 mg/L 以下はカラム溶出法</p>
C	<p>はい</p> <p>10 mg/L 以上はフラスコ法</p> <p>10 mg/L 以下はカラム溶出法</p>
D	<p>いいえ</p> <p>原則、フラスコ法</p> <p>現状の化審法では 2 濃度区で濃縮度試験を実施しており、濃縮度試験に用いる水溶解度はあくまで設定濃度の 1 つの目安と考えている。</p> <p>なお、液体物質で分散している（遠心分離において分離不可能である）場合等、カラム溶出法を検討するようにしている。</p> <p>水溶解度の値によって、フラスコ法とカラム溶出法を使い分けることはない。</p>
E	<p>はい</p> <p>基本的にフラスコ法</p> <p>以下の場合にはカラム溶出法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・フラスコ法で水溶解度測定が上手く実施できない場合（前処理において不溶分を上手く除去できない等） ・濃縮度試験で一濃度区水暴露法や簡易水暴露法を実施したい場合 ・水溶解度測定を物化性状試験として依頼された場合 <p>OECD TG 105 は単一成分で水溶解度がある程度算出される場合が想定されていると考えており、化審法の濃縮度試験を実施するに当たっては、水溶解度が極端に低い物質、反応生成物や高分子化合物も対象となるため、OECD TG 105 を単純に適用することは困難であると考えられるため、溶解度 10 mg/L で測定法を分けていない。</p>
F	<p>はい</p> <p>10 mg/L 以上はフラスコ法</p> <p>10 mg/L 以下はカラム溶出法</p>

参考資料 3 濃縮度試験における水溶解度測定方法に関する調査（平成 28 年 11 月）の調査結果（2/7）

設問 2 被験物質の溶解性に応じて、採用する前処理法（濃縮操作など）、分析機器の種類はどのように選択していますか。溶解性ごとにご記入ください。

試験機関	回答				
	10 mg/L 以上	10 mg/L 未満	0.01 mg/L 以上	0.01 mg/L 未満	その他
A	—	—	—	—	<ul style="list-style-type: none"> 被験物質に十分な UV 吸収があれば HPLC、揮発性があれば GC-MS、それ以外は LC-MS を選択 水溶解度が非常に低い場合、LC-MS から LC-MS/MS あるいは最新型 LC-MS/MS を検討 それでも感度不足の場合に濃縮操作を検討
B	—	—	—	—	<ul style="list-style-type: none"> はじめに HPLC や GC を選択、比較的簡易な前処理（数倍～数十倍濃縮、抽出等）でこれら機器での分析可否を確認し、感度不足であればより高感度（LC/MS 等）な分析機器の選択及び前処理の再検討を実施
C	直接または希釈して HPLC 等により測定	溶媒抽出の後、濃縮操作等により GC、HPLC またはその MS を用いて測定	—	—	—
D	直接分析、または溶媒等で希釈して LC-MS/MS または GC-MS で分析	50 mL 以上採取して液-液抽出又は固相抽出等の濃縮操作を実施して LC-MS/MS または GC-MS で分析	—	—	—
E	—	—	—	—	<ul style="list-style-type: none"> 分析機器は被験物質の特性（検出感度）に応じて選択 検出されないときは濃縮操作を行う
F	—	—	HPLC により測定	LC/MS により測定 検出できない場合は凍結乾燥等による濃縮操作を実施	—

参考資料 3 濃縮度試験における水溶解度測定方法に関する調査（平成 28 年 11 月）の調査結果（3/7）

設問 3 例えば、フラスコ法において水溶解度実測値が定量下限未満の場合があったとします。この場合、実測値を得るため新たな前処理（試験水量を増やす）或いはカラム溶出法を検討することがありますか？
はいの場合、その検討時間はどれくらいですか？

試験機関	回答
A	はい 溶解度が十分な感度で得られるまで検討
B	はい フラスコ法の前処理再検討の場合は 10 時間程度 フラスコ法への変更検討の場合は 20 時間程度
C	はい 1 週間程度
D	いいえ
E	はい 新たな前処理（濃縮操作の確立）の場合は約 2 日間 カラム溶出法への変更の場合は約 3～5 日間
F	はい カラム溶出法を検討 検討時間は 2、3 週間程度

参考資料 3 濃縮度試験における水溶解度測定方法に関する調査（平成 28 年 11 月）の調査結果（4/7）

設問 4 水溶解度測定において、OECD TG 105 と整合していない箇所はありますか？

はいの場合、OECD TG 105 と整合していない箇所及びその操作を追加/削減する理由をご記入ください。

試験機関	回答
A	<p>はい</p> <p>フラスコ法： TG 105 のフラスコ法に準じて簡易的に水溶解度を求めるケースがある。例) 被験物質を脱塩素水道水/イオン交換水に分散させ一定温度で数日間経過後、0.45 μm フィルターでろ過したろ液中の被験物質濃度を水溶解度と見做す（総試験期間の短縮等のため）</p>
B	<p>いいえ</p>
C	<p>はい</p> <p>フラスコ法： ① 過飽和試験水の調製方法：30℃で1～3日攪拌または浸とう⇒30℃・30分、その後5分浸とう（操作の短縮化のため） ② 20℃で24時間平衡化⇒25℃で48時間平衡化（参考文献を参考に変更） ③ 過飽和試験水から飽和水（透明な液）の分離⇒フィルターろ過（操作の簡便化のため、液体の場合は遠心分離） ④ pH測定なし（溶解度の低下が懸念されるため）</p> <p>カラム溶出法： pH測定なし（溶解度の低下が懸念されるため）</p>
D	<p>はい</p> <p>フラスコ法： フィルター（PTFE 孔径 0.45 μm）ろ過 攪拌時間は1日のみ （現状の化審法では2濃度区で濃縮度試験を実施しており、濃縮度試験に用いる水溶解度はあくまで設定濃度の1つの目安と考えているため）</p> <p>カラム溶出法： 流速は0.4mL/minのみ（理由はフラスコ法と同様）</p>
E	<p>はい</p> <p>フラスコ法： ① 攪拌温度：30℃⇒50℃で約1時間静置→スターラーで5分間攪拌→24℃で3日間攪拌（30℃で攪拌はあくまでも例であり、試験温度以上の温度で水に溶解させると認識しているため。より高い温度で実施することで、攪拌時間を短くするため） ② 試験温度：20℃⇒24℃（濃縮度試験実施温度に合わせるため） ③ 平衡時間：24時間⇒規定なし（試験温度で攪拌しているため） ④ 前処理：遠心分離⇒遠心分離もしくはフィルターろ過（遠心分離では除去しきれない不溶分があるため） ⑤ pH測定なし（水溶解度の算出に必要なファクターではないため） ⑥ 有効性基準：15%未満（経時的にn=3）⇒基準なし（基準は必要だが、溶解度が低い場合はこの基準を満たすことが困難なため）</p> <p>カラム溶出法： 現在 SOP 作成中のため特になし</p>
F	<p>いいえ</p>

参考資料 3 濃縮度試験における水溶解度測定方法に関する調査（平成 28 年 11 月）の調査結果（5/7）

設問 5 得られた水溶解度測定結果が、物質の物理化学性状から真の水溶解度から乖離していると感じることがありますか？この場合、こういった対応をとっていますか？

試験機関	回答
A	<p>感じることはない</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 稀に、被験物質が水に溶けていないが、0.45 μm フィルターを通る微粒子として分散している状態のケースがあるが、特段の対応はとらずに、必要に応じて報告書にて考察。
B	<p>感じることはない</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 例えば非常に水溶解度が低く、超高感度測定で測定値が得られた場合、その値の信頼性がどれくらいのものであるかについて気になることがある。
C	<ul style="list-style-type: none"> ・ 水溶解度の測定は、本試験の前に、予備試験を実施している。 ・ QSAR の結果や、当所の知見（構造類似の実験データ）を参考にして、予備試験結果がかけ離れている場合には、より慎重に進め、得られた本試験での結果のバラツキがなければ採用。バラツキがある場合には、再試験を実施。
D	<ul style="list-style-type: none"> ・ フラスコ法：水中でのサンプルの状態により得られた結果が高いと思われる場合は再度、前処理を実施。 ・ カラム溶出法：水溶解度が低く（ppt オーダー）、ガラスへ吸着していると考えられる場合、真値より低い結果であると考えられるため、捕集した容器ごと溶媒で抽出。
E	<ul style="list-style-type: none"> ・ POW の推計値から推測して水溶解度が高い場合や、極端に水溶解度が低くてバラついた場合、真の水溶解度から乖離していることを疑い、再測定を実施。 ・ 流水式での予備試験を実施し、BCF に濃度依存性が確認された場合に真の水溶解度から乖離していると推測し、さらに試験濃度を下げて予備試験を実施。
F	<p>感じることはない</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ サンプル間での値のバラツキが大きく安定した測定値を得るのが困難な物質の場合は、サンプリングを延長して行う、条件を再検討する等の対応を実施。

参考資料 3 濃縮度試験における水溶解度測定方法に関する調査（平成 28 年 11 月）の調査結果（6/7）

設問 6 濃縮度試験のための水溶解度の測定方法として、どのような方法が適当であると考えていますか？

また、濃縮度試験を一濃度区または二濃度区で実施する際、水溶解度の測定方法としてどのような使い分けをするのが適当であると考えますか？

試験機関	回答
A	<ul style="list-style-type: none"> ・基本的に OECD TG 105 に従う。 ・ただし、蒸留水ではなく試験用水を用いる方がよい。 ・測定方法の使い分けは不要。
B	<ul style="list-style-type: none"> ・基本的に OECD TG 105 に従う。 ・測定方法の使い分けについても TG 105 準拠でよい。
C	<ul style="list-style-type: none"> ・濃縮度試験のための対水溶解度測定においては、飽和水の調製が妥当であると考えられた場合、フラスコ法でよい。 ・濃縮度試験を一濃度区で実施する場合も、水溶解度が適切に求められていると判断されることが基準であり、より安全性を考慮して第二濃度区での試験となると考える。 ・試験方法の使い分けをすることは判断基準として別の難しさを感じる。
D	<ul style="list-style-type: none"> ・二濃度区：測定方法（フラスコ法・カラム溶出法）の規定は設けない。ただし、物質の性状によってはカラム溶出法を採用すること。特に難水溶性物質の濃縮度試験は MS 等の高感度分析機器を用いて、可能な限り低濃度で試験を実施すること。 ・一濃度区：測定方法（フラスコ法・カラム溶出法）の規定は設けない。ただし、物質の性状によってはカラム溶出法を採用すること。濃縮度報告書とは別に詳細な水溶解度測定の報告書を提出すること。また、水溶解度測定値が妥当であったという基準を設けること（ばらつき等）。特に難水溶性物質の試験は MS 等の高感度分析機器を用いて、可能な限り低濃度で試験を実施すること。例えば、BCF が 1000 程度の物質は異なる濃度での予備試験を実施し、必要に応じて補足データとすること。また、設定濃度が水溶解度の 10 分の 1 以下にならない場合は、濃度依存性の懸念を科学的に証明（解消）できないため二濃度区とすること。 <p>*濃度依存性が懸念される物質（例えば BCF 1000 程度）は、予備試験を慎重に実施して、GLP 試験としては濃度依存性のない設定濃度（さらには BCF 結果）を提出しているのが現状である。一濃度区では申請時に例えば過去の類似物等からその試験結果に疑義が生じる場合が想定される。このような場合、判定の根拠として別の濃度の予備試験結果が必須と考える。</p>
E	<ul style="list-style-type: none"> ・化審法の濃縮度試験実施に当たっては、OECD TG 105 を完全に満たす必要はない。例えば、10 mg/L 以上の水溶解度は目視で溶解の判断が可能な時が多く、10 mg/L で試験法を使い分ける必要はない。 ・化審法ガイドラインの記載（一濃度区法ではガイドラインに準じた水溶解度を算出、二濃度区法ではガイドラインを参考とした水溶解度を算出）が適当である。
F	<ul style="list-style-type: none"> ・基本的に OECD TG 105 に従う。 ・しかし、被験物質によってはカラム溶出法で再現性のある値が得られない場合があり（例えばオイル状の物質等）、これらの物質については水溶解度にかかわらずフラスコ法の採用を考慮すべき。

参考資料 3 濃縮度試験における水溶解度測定方法に関する調査（平成 28 年 11 月）の調査結果（7/7）

設問 7 その他、濃縮度試験のための水溶解度の測定方法（フラスコ法とカラム溶出法）について、現状や課題等を含め、何かご意見等がございましたら、自由にご記入ください。

試験機関	回答
A	<ul style="list-style-type: none"> ・ LC-MS/MS の感度が向上しており、非常に低濃度でも濃縮せずに分析できるようになったことから省力化を実感している。
B	<ul style="list-style-type: none"> ・ 特に最近の被験物質においては、水溶解度が比較的高い（フラスコ法が適応できるレベル）のものは稀で、ほとんどがカラム溶出法+高感度測定となっており、測定値の信頼性がどれほどあるのかが気になる。 ・ したがって、濃縮度試験における試験水濃度の設定基準として水溶解度値以下であることを厳格に規定することにあまり意味がないのではないか。 <p>（あくまで個人的な意見）</p>
C	<ul style="list-style-type: none"> ・ 極めて低い水溶解度測定において、一度過飽和にするフラスコ法とカラム溶出法では測定値において、フラスコ法の値がより高く出る傾向はある（微量粒子の影響）。 ・ しかし、予備試験による適切な試験物質の添加等を考慮すれば、カラム溶出法と近い値になるとする文献もあることから、混合物の場合等では特に慎重な選択（10 mg/L 以上か以下かでの線引き）も検討してはどうか。 ・ 難水溶性の場合、正確な回収率をもとめることが困難であり、過小評価する可能性がある（添加回収試験で、溶媒に溶かした添加標準を加え、回収率を求める操作）。
D	<ul style="list-style-type: none"> ・ カラム溶出法の場合、物質によってはプラトーに達する確認を含めると最低でも 2~3 週間かかる。さらに、水溶解度が低く、分析する前に前処理が必要であるとき、例えば、1 L 試験水を捕集するとき、流速 0.4 mL/min では 1 サンプル 42 時間（5 サンプルで 9 日間）、流速 0.2 mL/min では 1 サンプル 84 時間（5 サンプルで 18 日間）の時間を要する。つまり、前処理方法も含めると 1 か月以上の時間を要する。 ・ このような現状を踏まえると、濃縮度試験に用いる水溶解度の測定法としてカラム溶出法は煩雑であり、この場合、フラスコ法で目安の数値を出して、「二濃度区での試験」を実施した方が適切であると考え（カラム溶出法で実施しても、結局測定値が低い（或いは結果が得られない）ことから、設定濃度が 10 分の 1 以下をクリアできない可能性がある）。 ・ また、濃縮度試験（BCF 試験）において、水溶解度がさらに重要視される中、分析機器として MS を所有（使用）することは必要条件と考える。 ・ 濃縮度試験の中で水溶解度を測定するのではなく、別試験（項目）として申請に必要なデータとして要求するのも一案である。濃縮度試験そのものが、煩雑な試験と捉えられる傾向にある。
E	<ul style="list-style-type: none"> ・ 今まで主にフラスコ法で水溶解度を算出しているが、カラム溶出法は、測定時間が長く作業量も多いため費用が高くなり、事業者への負担が大きくなる。よって、フラスコ法で測定可能な物質は出来るだけフラスコ法で実施している。 ・ 反応生成物や高分子化合物を測定することが多く、物性値として水溶解度を求められない物質が多い。 ・ 水溶解度が低い場合、何回再測定しても結果にバラツキが出やすい傾向にあることが課題。 ・ 水溶解度が検出限界未満になった場合など、水溶解度以下で濃縮度試験が実施出来ない場合があることが課題。 ・ 水にも有機溶媒にも難溶な物質や、揮発性物質等はカラム溶出法が適用できないため、水溶解度が求められないと考えている。 ・ 化審法ガイドラインに記載されている OECD TG に「準じた方法」と「参考にした方法」の記載が不明瞭であると感じている。 ・ 以上のことを踏まえ、OECD TG 105 では適用不可能な物質があることから、化審法用に水溶解度測定ガイドラインの作成、見直しを希望。
F	<ul style="list-style-type: none"> ・ 再現性を得るのが困難な物質や値のばらつきが大きい物質等、OECD TG 105 に定められているばらつきの基準におさまりにくい物質があることを考慮してほしい。 ・ また、溶解度が非常に低く濃縮操作を行っても検出できない場合や、濃縮操作を行うことでバラツキの程度が大きくなる要因となること、カラム溶出法で液体の物質を測定できないことが課題。

参考資料 4 簡易水暴露法に関する調査（平成 28 年 11 月）の調査結果

設問 1 これまでに事業者から簡易水暴露法の相談（提案）はありましたか？

はいの場合、化審法申請を目的に簡易水暴露法を実施しましたか？

試験機関	回答
A	いいえ
B	いいえ
C	はい 試験は実施していない
D	いいえ
E	はい 試験は実施していない
F	いいえ

設問 2 試験機関として簡易水暴露法による化審法申請について積極的に実施したいと考えますか？

はいの場合、その理由は何ですか？

いいえの場合、その理由は何ですか？

試験機関	回答
A	いいえ ・サンプル数が減って分析面で省力化になるが、飼育期間などの飼育面で省力化にならず、想定外の実験結果が得られた場合など総試験期間が長期化する可能性があるため、従来通りの 2 濃度区水暴露法がよい。ただし、濃縮倍率が 200 倍以下であることを確認する場合の試験方法として簡易水暴露法は有効。
B	いいえ ・簡易水暴露法の適応範囲が、 ① 濃度依存性がないと予想される物質であること ② 取込及び排泄が 1 次速度式に従うこと であり、被験物質がこの条件を満足するか否かを判定するためには、2 濃度区で排泄試験込みの濃縮度試験を実施しなければならず、仮に非 GLP 試験で可であったとしても二度手間の感は否めない。ならば最初から 2 濃度区の GLP 試験を実施する方が、短期間、低コストで試験データを取得できると考えられ、試験機関としては、試験委託者に積極的に勧めることが難しい（試験機関としては試験委託者からの要望がある場合は、前向きに考える。試験委託者が①及び②の情報を何らかの形で取得済みである等、コストや時間を短縮できる場合は除く）。
C	いいえ ・現在、濃度依存性に関する確たる基準が設けられていないことから申請する際、不安があるため。
D	いいえ ・簡易水暴露法は取込みと排泄試験からなるが、排泄試験が終了しないと結果が得られないため、申請用試験としても推奨できないため。
E	いいえ ・取込期間が少なくとも 28 日間必要であり、さらに排泄試験が必須のため、試験期間の短縮にならない。 ・BCF が検出限界未満の物質は排泄試験が実施出来ず、簡易水暴露法は実施出来ないため、適用物質の範囲が狭い。 ・本試験を実施し判定基準（案）から外れた場合に、通常の試験法に戻る（再試験になる）リスクがある。 ・濃度依存性の確認のため適切な予備試験が必要になる。その結果、検討期間が長くなり、費用面にも反映されるため、事業者にとって利点がないと考えている。
F	いいえ ・簡易水暴露法の実績が少ないため。 ・試験条件検討にかかる時間は従来の方法と変わらず、検討期間の短縮は望めないため。

III: 魚を用いた濃縮度試験（餌料投与法）

I 適用範囲

ここでは、魚介類のうち特に餌（経口）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。

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。

III 試験方法

1 試験の概要

本試験法は、魚類体内への餌（経口）を介した化学物質の取り込み及び蓄積を評価する試験である。試験は取り込み及び排泄の 2 つの期間からなり、取込期間では、化学物質を混合した餌料を試験魚に給餌し、その後、排泄期間において化学物質が含まれない餌料を給餌する。試験の両期間を通して、試験餌料及び試験魚中における化学物質濃度を測定し、生体蓄積係数（dietary BMF）を算出する。dietary BMF は、速度論による生体蓄積係数（ BMF_K ）及び定常状態における生体蓄積係数（ BMF_{SS} ）のいずれか又は両方を算出する。

2 試験に用いる装置及び材料

2-1 装置及び器具

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

2-2 試験用水

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

参考資料 5 餌料投与法に関する化審法濃縮度試験方法改正原案（平成 25 年度版） (2/7)

2-3 試験魚

2-3-1 魚種を選択

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

2-3-2 蓄養及びじゅん化

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

2-3-3 餌料

餌料とは、被験物質及び媒体（有機溶剤又はオイル）を含まない餌である。少なくともたんぱく質及び脂質含量が既知である市販の魚の餌料（浮遊性又はゆっくり沈降するペレット状あるいはクランブル状の餌料）が推奨される。餌料は、摂餌効率を高めるため、均一な大きさのペレットとし、試験開始時の試験魚に合わせて適当なサイズに調整する（例えば、全長が 3 - 7 cm の試験魚にはペレットの直径がおよそ 0.60 - 0.85 mm、全長が 6 - 12 cm の試験魚にはおよそ 0.85 - 1.2 mm が好ましい）。ペレットのサイズは、排泄期間開始時に試験魚の成長に合わせて調整してもよい。適切な市販餌料の組成の一例を試験法解説に示す。試験区及び対照区の餌料の脂質含量は、取込期間開始前及び取込期間の終了時に測定する。餌料の栄養素、水分、繊維及び灰分等の情報を試験報告書に記載する。

3 試験の実施

3-1 試験餌料

(1) 試験餌料とは、餌料に被験物質及び媒体を添加したものである。被験物質の物理化学的性状及び水溶解度に基づき、下記の方法を参考に餌料に添加する（試験法解説参照）。被験物質を餌料に添加する場合は、試験餌料中の均一性を確保する。

- ・ 被験物質がトリグリセリド類に可溶でかつ安定である場合、餌料と混合する前に、被験物質を少量のオイル（魚油又は食用植物油）に溶解する。この場合、餌料の本来の脂質含量を考慮し、オイル量は最小限とする。
- ・ 適当な有機溶剤に溶解して餌料に添加する。混合した後、添加した溶媒を留去する。試験餌料中の被験物質の分散及び均一性を確保する。さらに、被験物質の生物学的利用能が損なわれないようにする。
- ・ 非粘稠性の液体の被験物質は直接餌料に添加する。

(2) 取込期間中及び排泄期間中に、栄養的に等価な餌料を試験区及び対照区に給餌する。被験物質の添加媒体としてオイル又は有機溶剤を使用した場合は、対照区の餌料につい

参考資料 5 餌料投与法に関する化審法濃縮度試験方法改正原案（平成 25 年度版） (3/7)

ては試験区と等量の媒体を添加する（被験物質を含まない）。被験物質を添加した餌料は、餌料中の被験物質が安定に維持される条件下で保管し、その方法を報告する。

3-2 給餌

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

3-3 水質測定の種類

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

3-4 流量

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

3-5 試験魚の条件

試験開始時の魚体重の最小値が最大値の 2/3 以上とする。同じ年齢で同じ供給源の魚を用いる。

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

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

参考資料 5 餌料投与法に関する化審法濃縮度試験方法改正原案（平成 25 年度版） (4/7)

3-6 試験餌料濃度

試験は、原則 1 濃度区で実施する。同時に、被験物質を添加していない餌料を給餌する対照区を設定する。試験濃度の設定は、分析感度（試験魚中の被験物質濃度が取込期間終了時の 10%未満まで測定できる）、被験物質の毒性（既知なら最大無影響濃度（NOEC））、忌避行動を考慮して選択する。

3-7 照明及び試験温度

I：魚を用いた濃縮度試験（水暴露法）と同様とする。

3-8 試験期間

3-8-1 取込期間

取込期間は通常 7-14 日間とする。試験開始は、試験餌料を最初に給餌した時点とする。実験日のカウントは、給餌した時点から次の給餌の直前まで（例えば、1 時間前）を 1 日とする。取込期間は被験物質及び媒体を添加していない餌料を最初に給餌する直前（例えば 1 時間前）までとする。また、被験物質の取込挙動を確認するために、取込期間を延長し（最長 28 日間）、追加の分析を実施してもよい。

3-8-2 排泄期間

(1) 原則、排泄期間は最大 28 日間とし、試験魚からの被験物質の排泄の程度をさらに確認する必要がある場合には、期間を延長する。排泄期間の開始は試験魚に被験物質及び媒体を添加していない餌料を給餌した時点とする。排泄初期（例えば 7 日後又は 14 日後）における試験魚中の被験物質濃度が定量下限未満の場合、以降の分析を中止し、試験を終了してもよい。排泄期間終了時に半減期が得られない場合にもそれまでの結果から生体蓄積係数（BMF_K）を算出する。

(2) 取込期間終了時（あるいは、排泄期間の 1 回目又は 2 回目の分析）における試験魚中の被験物質濃度が定量下限未満であって、次の①及び②を満たす場合は試験を終了できる。

①試験有効性基準が満たされている。

②取り込みの欠如が試験設計の問題（例えば、取込期間が十分でない、試験餌料調製上の不具合による生物学的利用能の低下、分析感度の欠如、魚が試験餌料を食べない等）によるものでない。

3-9 分析

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

参考資料 5 餌料投与法に関する化審法濃縮度試験方法改正原案（平成 25 年度版） (5/7)

3-9-1 試験餌料の分析

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

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

3-9-2 試験魚の分析

- (1) 各試験魚の分析は、試験区及び対照区から 5 - 10 尾とし、通常、個々の試験魚について実施する。ただし、個体ごとの分析が困難な場合には、各分析時における試験魚を複数尾まとめて分析する。その場合は、2 群以上とすることが望ましい。試験魚の採取は、同一時間（給餌時間を目安にする）に実施する。試験魚の消化管内に試験餌料が残っていると試験魚の被験物質濃度の測定に影響を与えるため、次の給餌直前（例えば 1 時間前）に採取する。
- (2) 試験区及び対照区において、取込期間の終了時及び排泄期間中に 4 回から 6 回（例えば 1、3、7、14 及び 28 日）、試験魚を分析する。また、詳細な組織中の蓄積量の確認が必要と判断された場合は、例えば、可食部及び非可食部の被験物質濃度を任意の時点で測定する。対照区の魚における被験物質濃度が排泄期間開始時に不検出の場合は、排泄終了時に 2 - 3 尾の対照区の魚について分析を行えば十分である。すべての分析時において、採取した試験魚を動物愛護の観点から最も適した方法で安楽死させた後、体重及び全長を個別に測定する（試験区及び対照区から同数の試験魚が採取されるようにする）。それぞれの個体の体重及び全長は、識別コード等を付して、被験物質濃度（及び該当する場合は脂質含量）の結果と整合させる。
- (3) 放射性同位元素を使って標識した材料を試験する場合は、I：魚を用いた濃縮度試験（水暴露法）の試験水分析を試験餌料分析に置き替えて、3-5-2 試験濃度の設定(1)に記載された事項に準拠する。
- (4) 試験魚の脂質含量は、各採取時に測定することが好ましいが、少なくとも取込期間開始時及び終了時並びに排泄期間終了時に測定する。脂質含量は、被験物質濃度測定に用いた試験魚と同一の魚について測定する。測定できない場合、別途採取した試験魚について測定する。

3-9-3 試験魚の成長の測定

試験餌料を初めて給餌する直前（例えば 1 時間前）に、少なくとも試験期間中と同数の試験魚を採取し、個別に体重及び全長を測定する。これらは試験開始日（0 日後）の試験魚とし、取込期間開始前の脂質含量測定に用いることができる。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。

4 試験結果の算出

4-1 生体蓄積係数の算出

排泄期間中の試験魚中被験物質濃度 (C_f) の自然対数と排泄期間の最小二乗線形相関式を計算し、その直線の傾きを排泄速度定数 (k_2)、切片を取込期間終了時における試験魚中の被験物質濃度 (mg/kg、外挿値 $C_{0,d}$) とする。これらの値、給餌量 (I)、取込期間の長さ (t) 及び試験餌料中の被験物質濃度 (C_{food}) を用いて、式 5 に従い生体内吸収効率 (α) を算出する。

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

さらに、給餌量 (I)、生体内吸収効率 (α) 及び排泄速度定数 (k_2) を用いて、式 6 に従い餌料投与法における速度論による BMF_K を算出する。

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

また、取込期間における試験魚中の被験物質濃度 (C_f) が定常状態に達していることが示唆される場合、以下の式から定常状態における dietary BMF (BMF_{SS}) を算出する。

$$BMF_{SS} = \frac{\text{取込期間終了時における試験魚中の被験物質濃度 } (C_K, \text{ 平均})}{\text{試験餌料中の被験物質濃度 } (C_{food}, \text{ 平均})}$$

4-2 成長希釈及び脂質含量補正

- (1) 排泄期間中の試験魚の成長は、試験魚中の被験物質濃度を低下させ、排泄速度定数 (k_2) に大きな影響を与える。そのため、排泄期間を設け BMF_K を算出する場合には、合わせて成長希釈補正した BMF_K (BMF_{Kg}) も報告する。成長希釈補正した排泄速度定数 (k_{2g}) は、通常、排泄速度定数 (k_2) から成長速度定数 (k_g) を差し引くことにより算出する。さらに、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 dietary BMF 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) dietary BMF は、被験物質がほとんど脂質に蓄積されないことが明確な場合を除き、試験魚及び試験餌料の脂質含量を用いて補正する⁽²⁾。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補正する。採取したすべての試験魚に関して脂質含量の測定を実施していない場合、試験魚及び対照区における平均脂質含量 (w/w) を算出する。試験魚の平

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

参考資料 5 餌料投与法に関する化審法濃縮度試験方法改正原案（平成 25 年度版） (7/7)

均脂質含量を試験餌料の平均脂質含量で割り脂質補正係数 (L_c) を算出する。dietary BMF を脂質補正係数で割り、脂質含量補正した dietary BMF (BMF_L) を算出する。

- (3) 各採取時において被験物質及び脂質含量の測定を同一の試験魚で実施した場合、脂質含量補正した被験物質濃度データを時間軸に対してプロットし、脂質含量補正した $C_{0,d}$ 及び k_2 を得る。生体内吸収効率 (α) は、脂質含量補正した給餌量 (I_{lipid}) 及び脂質含量補正した試験餌料中の被験物質濃度 ($C_{food-lipid}$) を用いて算出する（試験法解説参照）。これらの値を用いて dietary BMF を算出する（脂質含量及び成長希釈補正した dietary BMF の算出には、試験魚の湿重量ではなく脂質含量当たりの成長速度定数を用いて補正する）。

5 試験の有効性

試験を有効なものとするために、次の条件を適用する。

- ・ 温度変動は $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 未満であること。
- ・ 溶存酸素濃度は飽和酸素濃度の 60% 以下にならないこと。
- ・ 試験区の餌料中における被験物質濃度（少なくとも各 3 点測定）について、取込期間の開始前と終了時の変動が平均値の $\pm 20\%$ 以内であること。
- ・ 試験区の餌料中における被験物質濃度（少なくとも各 3 点測定）について、取込期間の開始前の試料間の変動が平均値の $\pm 15\%$ 以内であること。
- ・ 対照区の餌料又は試験魚中の被験物質濃度は、試験区と比較して検出されない又は微量（定量下限未満）であること。
- ・ 死亡又は病気等の異常は、試験区及び対照区の試験魚において試験終了時に 10% 未満であること。試験が数週あるいは数か月延長になった場合には、死亡又は異常が、試験区及び対照区で 1 か月間に 5% 未満かつ全期間で 30% を超えないこと。

平成 28 年度 化学物質の蓄積性評価手法に関する検討委員会
委員及び関係者名簿

<委員>

氏名	所属
宇野 誠一	鹿児島大学 水産学部 海洋資源環境教育研究センター 准教授
大嶋 雄治	九州大学大学院 農学研究院 教授
河野 久美子	国立研究開発法人水産研究・教育機構 瀬戸内海区水産研究所 環境保全研究センター 化学物質グループ 主任研究員
高月 峰夫	早稲田大学 ナノ理工学研究機構 規範科学総合研究所 客員教授
宮田 知代子	住友化学株式会社 生物環境科学研究所 化学品評価グループ 主任研究員
茂理 保平	富士フイルム株式会社 CSR 推進部 環境・品質マネジメント部 安全性評価センター

<経済産業省>

氏名	所属
飛驒 俊秀	経済産業省 化学物質管理課 化学物質安全室 室長
宮地 佳子	経済産業省 化学物質管理課 化学物質安全室 企画官
山名 真司	経済産業省 化学物質管理課 化学物質安全室 係長
箱嶋 美咲	経済産業省 化学物質管理課 化学物質安全室 係長

<独立行政法人 製品評価技術基盤機構>

氏名	所属
山口 渉	独立行政法人 製品評価技術基盤機構 化学物質管理センター安全審査課
櫛谷 知史	独立行政法人 製品評価技術基盤機構 化学物質管理センター安全審査課

平成 28 年度第 1 回「化学物質の蓄積性評価手法に関する検討委員会」議事概要

日 時：平成 28 年 10 月 26 日（水）14:00～17:15

場 所：一般財団法人化学物質評価研究機構 本部大会議室

議事次第：

1. 開会

2. 御挨拶

経済産業省製造産業局化学物質管理課 化学物質安全室長 飛驒 俊秀様

3. 委員紹介

4. 議題

1) 事業目的及び試験概要

2) 一濃度区での水暴露法、簡易水暴露法による試験結果の取扱いの検討

3) 餌料投与法を化審法に導入することの可能性に関する調査・検討

4) その他

5. 閉会

<配布資料>

資料 1：事業目的及び試験概要

資料 2：一濃度区での水暴露法、簡易水暴露法による試験結果の取扱いの検討

資料 3：餌料投与法を化審法に導入することの可能性に関する調査・検討

<配布資料（参考資料）>

参考資料 1：新規化学物質等に係る試験の方法について（濃縮度試験法抜粋）

参考資料 2：化審法 Q&A 「新規化学物質に関する審査及び規制等について」（No.44）

参考資料 3：化審法濃縮度試験方法改正原案（餌料投与法）

参考資料 4：OECD TG 305 日本語訳（仮訳）

議事概要：

1. 事業目的及び試験概要

事務局より配布資料に沿って説明を行った。

2. 一濃度区での水暴露法、簡易水暴露法による試験結果の取扱いの検討

事務局より配布資料に沿って説明を行った。

1) 一濃度区での水暴露法

- ・一濃度区での水暴露法においては、水溶解度の測定値の信頼性が重要であり、濃縮度試験を実施する日本国内の6つのGLP試験機関に対して、水溶解度測定に関する現状の調査を行うことが提案された。調査は第1回委員会及び第2回委員会間に実施し、第1回委員会では水溶解度の測定値の信頼性が担保されていることが前提で一濃度区での水暴露法の適用条件に関する議論が行われた。
- ・「無機化合物及び有機金属化合物、界面活性作用を有する物質、パーフルオロアルキル基」ではない化学物質は濃度依存性がないものとして、一濃度区での水暴露法を適用してよいという方針であれば一濃度区での水暴露法を使用しやすい。
- ・過去に濃度依存性について解析したデータがあるため、濃度依存性を示すようなパーフルオロアルキル基や界面活性作用のある物質以外は、原則として一濃度区での水暴露法が適用可能である。
- ・試験濃度が水溶解度の10分の1以下であれば、本試験とは別の濃度で実施した予備試験の結果は不要と考える。
- ・試験濃度が水溶解度の10分の1以下であれば濃度依存性がないとされるが、そもそも審査に提出される水溶解度の信頼性が疑わしい場合がある。水溶解度が正確に測定されていることが重要である。
- ・本試験とは別の濃度で実施した予備試験の結果を要求しないのであれば、正確な水溶解度測定結果を要求する。
- ・予備試験は二濃度区ではなく、本試験とは異なる一濃度区で行えば濃度依存性を確認できる。
- ・本試験とは別の濃度で実施した予備試験の結果は、濃度依存性の確認としては有用だが、予備試験を本試験に近い試験条件で行わないと濃度依存性の有無を確認できない場合があるため実用的ではない。
- ・基本的に本試験は水溶解度よりも可能な限り低濃度で実施することが望ましいため、その場合、予備試験の濃度が本試験より高くなってしまう。予備試験では、低濃度での試験により安定性等も確認したいためその兼ね合いが難しい。
- ・本試験とは別の濃度で実施した予備試験の結果を要求する場合は予備試験の期間、分析回数等を明確にする必要がある。

- ・一濃度区での水暴露法を適用できる水溶解度の基準値や濃度依存性の数値の定義が明確ではない。
- ・「濃度依存性がないと予想される物質」は「濃度依存性がない条件で行われた試験」とした方がよい。
- ・水溶解度以下の濃度で二濃度区での水暴露法を実施した試験においては、両濃度区の BCF の乖離が 2 倍以下であったという解析結果に基づいている。BCF_{ss} が 1000～2500 L/kg の場合は部位別・排泄試験が必要である。BCF_{ss} >2500 L/kg の場合は別の濃度区が必要である。
- ・一方、一濃度区での水暴露法で実施し、BCF_{ss} >2500 L/kg となった場合、追加の濃度区は一濃度区で実施した濃度区の 10 倍高い濃度で実施すると考える。本来は、より低濃度の試験が濃縮性評価に適した試験条件であるため違和感がある。二濃度区での水暴露法の「第 2 濃度区に相当する濃度」で一濃度区での水暴露法を実施しているため、一濃度区での水暴露法で濃縮性の評価が可能である。
- ・1000 L/kg を超える BCF が得られた場合に濃縮性の懸念を抱くのであれば、1000 L/kg を基準とした方が試験法を選択する上で整理しやすい。一方、BCF が 2500 L/kg を超えても過剰な低濃度での試験が要求されないのであれば、2500 L/kg という基準でもよい。
- ・BCF_{ss} <2500 L/kg では安全係数が 2 となり、判定するうえで危険と考える。
- ・個体間のバラツキがある場合、BCF が 2500 L/kg 以内であれば濃度依存性はないかもしれないが、バラツキが 2 倍以内で、BCF が 5000 L/kg を超えないと言い切れるのか疑問である。
- ・1000 L/kg を基準に部位別・排泄試験の実施を判断するのであれば、1000 L/kg という基準は妥当である。2500 L/kg はリスクが高いと感じる。
- ・試験機関としては、2500 L/kg という結果が得られた場合、届出が受理されるか不明確であるため、二濃度区での水暴露法を検討すると思われる。
- ・BCF が 1000 L/kg を超えるようであれば、二濃度区での水暴露法を実施してもらいたい。1000 L/kg を超えると濃縮性が高いというイメージがある。
- ・BCF が 1 点だけばらついたために BCF_{ss} が得られなかったが、それ以外は定常状態に達しているケースもある。そのようなケースで一濃度区での水暴露法が適用できないというのは厳しいと感じる。BCF の基準は BCF_{ss} ではなく、例えば最後 4 回の BCF の平均値ということにはできないか。
- ・極大値や取込最終日など複数の解釈ができるため、混乱する。BCF_{ss} を基準にするのが妥当である。
- ・「多成分の混合物は原則として対象としない」とされているため、反応生成物のような UVCBs には適用が困難である。「多成分の混合物」という表現を見直す必要はないか。

2) 簡易水暴露法

- ・「濃縮度試験における水溶解度測定方法に関する調査」(2. 1) 参照) と合わせて、濃縮度試験を実施する日本国内の 6 つの GLP 試験機関に対して簡易水暴露法に関する調査を実施し、調査結果を踏まえて第 2 回委員会で議論されることとなった。

3. 餌料投与法を化審法に導入することの可能性に関する調査・検討

事務局より配布資料に沿って説明を行った。

- ・餌料投与法の選択基準として、「水溶解度が○未満で log Pow が○以上の化学物質」という案を提案されているが、本提案に従えば、高濃縮が予測される化学物質に餌料投与法を適用することになる。高濃縮が予測される化学物質の判定に、再現性が乏しい試験方法(餌料投与法)の結果を用いることは難しいと考える。データを蓄積してから餌料投与法を評価に使うのはどうか。
- ・水に溶解しない化学物質について水暴露法を実施すること自体に矛盾があると感じる。餌料投与法である程度の合理的な判断基準を示せるのであれば、事業者が餌料投与法を選択してもよいとする運用での導入は可能であると考えます。
- ・極めて水に溶けにくい化学物質は餌料投与法が適していると一般的には言われている。現状の化審法では難水溶性物質について、無理やりでも水暴露法を実施しているが、餌料投与法を導入した方がよいと考える。
- ・試験餌料の脂質含量と BMF に相関がないことに関しては当然と感じる。水暴露法において水質について細かく規定しているように、餌料投与法についても餌の組成について規定を設けてもよいのではないかと考える。
- ・実環境での化学物質の挙動を考慮すると、BMF から BCF に換算するのは理屈に合わないと感じており、BMF は独自の基準があつてよいと考える。
- ・BMF の基準として、BCF 5000 L/kg 付近に相当する数値を提案するには、データが不十分と考える。例えば、試験魚から一切検出されない程度のかかなり保守的な基準を設定し、餌料投与法を導入した方がよいのではないかと考える。

4. その他

第2回委員会は、平成28年12月7日に開催予定である。

以 上

平成 28 年度第 2 回「化学物質の蓄積性評価手法に関する検討委員会」議事概要

日 時：平成 28 年 12 月 7 日（水）14:00～17:20

場 所：一般財団法人化学物質評価研究機構 本部大会議室

議事次第：

1. 開会
2. 議題
 - 1) 一濃度区での水暴露法、簡易水暴露法による試験結果の取扱いの検討
 - 2) 餌料投与法を化審法に導入することの可能性に関する調査・検討
3. その他
4. 閉会

<配布資料>

資料 1：一濃度区での水暴露法、簡易水暴露法による試験結果の取扱いの検討

資料 1（別添資料 1）：簡易水暴露法に関する調査結果

資料 1（別添資料 2）：第 1 回検討委員会で挙げられた主要な意見

資料 1（別添資料 3）：濃縮度試験における水溶解度測定に関する調査結果

資料 2：餌料投与法を化審法に導入することの可能性に関する調査・検討

資料 2（別添資料 1）：化審法濃縮度試験方法改正原案（試験法部分）

資料 2（別添資料 2）：化審法濃縮度試験方法改正原案（試験法解説部分）

資料 2（別添資料 3）：餌料投与法の判定基準について

資料 3：餌料投与法による低蓄積性の判断基準案（A 委員提出資料）

資料 4：第 1 回検討委員会 議事録（委員限り）

<配布資料（参考資料）>

参考資料 1：新規化学物質等に係る試験の方法について（濃縮度試験法抜粋）

参考資料 2：新規化学物質の判定及び監視化学物質への該当性の判定等に係る試験方法及び判定基準

参考資料 3：化審法 Q&A「新規化学物質に関する審査及び規制等について」

参考資料 4：OECD TG 305 日本語訳（仮訳）

参考資料 5：餌料投与法に関する平成 25 年度及び 27 年度委託事業の概要

参考資料 6：餌料投与法の試験結果の取扱いについて

議事概要：

1. 一濃度区での水暴露法、簡易水暴露法による試験結果の取扱いの検討

事務局より配布資料に沿って説明を行った。

1) 一濃度区での水暴露法

- ・一濃度区での水暴露法における適用条件案に記載された「界面活性作用を有する物質」については、明確な定義は設けず、必要に応じて事前に試験機関が事業者に用途等を確認しておくことでよいのではないか。
- ・一濃度区での水暴露法の適用除外として提案された「分子量分布を有する混合物及び反応生成物」の記載は、UVCBs (Substances of Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological Materials；構造不明若しくは変動する化学物質、複雑な反応生成物及び生物材料化学物質) とするとはどうか。
- ・タンパク結合物質を適用除外とする案が提示されたが、タンパク結合物質はその蓄積メカニズムが複雑であり、定義を明確にすることが困難であることから適用対象外の物質とはしないことでよいのではないか。
- ・判定基準を一濃度区での水暴露法は BCF 2500 L/kg、二濃度区での水暴露法が BCF 5000 L/kg と分ける理由がないと考え、一濃度区での水暴露法についても BCF 5000 L/kg という案を提案した。
- ・科学的にある程度の信頼性があり、一濃度区での水暴露法を選択しているにもかかわらず、二濃度区での水暴露法の BCF 5000 L/kg という基準を一濃度区での水暴露法においては 2500 L/kg とするのは疑問がある。一濃度区での水暴露法の結果の信頼性が科学的根拠に基づいて疑われる場合に指摘される方が納得できる。
- ・一濃度区での水暴露法の適用範囲を $BCF_{ss} < 1000$ L/kg とした場合、濃度依存性がない範囲で試験を実施しているという前提を否定する基準となる。一濃度区での水暴露法についても BCF 5000 L/kg を判定基準とする案が妥当と考える。
- ・一濃度区での水暴露法、二濃度区での水暴露法に関わらず判定基準は BCF 5000 L/kg とし、追加の濃度区の必要性は一濃度区での水暴露法の結果から専門家が判断すればよい。
- ・一濃度区での水暴露法で BCF が 1000 L/kg を超えた時点で審議会に諮り、必要に応じて二濃度区目を要求される方が効率的である。
- ・高濃度区が必要な場合、一濃度区での水暴露法の適用範囲を $BCF_{ss} < 1000$ L/kg とする案には意味があるが、一濃度区での水暴露法はそもそも濃度依存性がないという理由から実施しているため、二濃度区目として高濃度区を設定する事は意味がない。
- ・判定基準は BCF 5000 L/kg とし、現在の判定基準に試験条件の信頼性を盛り込むと、注意喚起となり、予備試験結果から二濃度区での水暴露法を実施するという選択肢ができる。判定基準に試験条件の信頼性を入れ、審議会で判断するのがよい。

- ・一濃度区での水暴露法の適用基準は日本独自の基準であり、国際動向から乖離している。国内で取得したデータを海外で使用する場合に困る場合があると考ええる。判定基準は BCF 5000 L/kg とし、一濃度区での水暴露法の適用基準はガイダンスドキュメントの第三次草案に有用な記載があればそれを考慮すべきである。
- ・平成 25 年度の委員会では、一濃度区での水暴露法は明らかに蓄積性がない物質について試験を簡便にするという目的であると認識していたが、現在の議論はそこから大きく飛躍してしまっている。二濃度区での水暴露法は濃度が異なるだけではなく、2 回試験を実施して安心感を得ている側面もある。一濃度区での水暴露法で高濃縮性判定まで行うのであれば、データの信頼性の確保を現在の二濃度区での水暴露法よりも更に厳密にしないと不安は否めない。
- ・例えば検出限界が非常に高い（例えば BCF 2500 L/kg）場合、二濃度区での水暴露法であれば許容したこともあるが、このような物質を一濃度区での水暴露法で申請する場合は非常に厳しい条件を課さないと判断が困難になる。
- ・テストガイドラインには一濃度区での水暴露法で実施した場合はその正当性を報告しなければならないと記載されている。その妥当性が二濃度区での水暴露法の予備試験結果等のデータとなる。一濃度区での水暴露法の成立要件を考えるべきである。
- ・来年 7 月発行予定のガイダンスドキュメントの案には二濃度区での水暴露法が推奨される場合や、一濃度区での水暴露法でもよい場合といった様々なケースが記載されているため、本委員会で決定した事項がガイダンスドキュメントと矛盾していないことを確認してから化審法運用を開始した方がよい。
- ・本委員会で議論している一濃度区での水暴露法の適用基準を根拠に一濃度区での水暴露法が妥当であるという議論は海外では通じない可能性がある。適用基準については、ガイダンスドキュメントに合わせてさらに議論する必要がある。
- ・一濃度区での水暴露法の判定基準と適用基準（運用基準）は切り離して議論すべきである。

2) 簡易水暴露法

- ・濃縮度試験を実施する日本国内の 6 つの GLP 試験機関の調査結果から、化審法申請用として簡易水暴露法を実施した試験機関はなかった。また、簡易水暴露法は排泄期間を設ける必要があること、適用範囲や試験結果の妥当性は試験を実施しないと判明しないことから、今後、本試験を積極的に実施しないと回答があった。さらに、平成 28 年 12 月に実施した海外動向調査においても簡易水暴露法の実施例が少ないことが明らかとなった。したがって、本事業において簡易水暴露法の運用方法を協議する必要性は低いと考えられることから、簡易水暴露法の適用については個別に対応することとし、判定基準については現行の基準に準ずる。

2. 餌料投与法を化審法に導入することの可能性に関する調査・検討

事務局より配布資料に沿って説明を行った。

- ・適用除外として提案されている「分子量分布を有する混合物及び反応生成物」は UVCBs に変更してはどうか。
- ・適用基準として水溶解度及び log Pow を用いることは適当と考える。
- ・適用基準として水溶解度及び log Pow を設けない場合、水暴露法の実施が困難という説明のための試験を実施する必要が生じるためラボとしては手間になってしまうと考える。
- ・適用基準は「水溶解度が 0.01 mg/L 未満、若しくは log Pow が 5 を超え、又は水暴露法の実施が困難な被験物質」が適当と考える。
- ・試験餌料中の脂質含量を 10～15%程度で統一することは適当と考える。
- ・基準物質との混合暴露については、データの保証の観点から重要と考える。しかし、どの程度取り込まれればよいという基準は、現時点では、規定できないと考える。
- ・試験区及び対照区の餌料に基準物質を入れ、両者の取り込みを比較すればよいと考える。
- ・高濃縮性の化学物質を基準物質として、基準物質及び被験物質の蓄積性を比較してはどうか。
- ・基準物質として提案された物質には、餌料投与法の適用基準に当てはまらない化学物質が複数入っているため、それらの物質は除外してはどうか。また、代謝が早い物質、例えば log Pow に対して蓄積性が低い物質についても、基準物質としては不適当と考える。
- ・提案した保守的な数値で運用し、今後データが蓄積されてきたときに、基準を見直してもよいのではないか。
- ・定常状態における生体蓄積係数 (BMF_{ss}) を、取込期間終了時における生体蓄積係数 (BMF) に修正した方がよいのではないか。
- ・試験餌料に蓄積性が既知である基準物質を添加し、被験物質と基準物質の BMF を比較することで蓄積性を評価してはどうか。

3. その他

第3回委員会は、平成29年2月2日に開催予定である。餌料投与法の試験法案と解説案は議論の時間を確保できなかったため、メールによるコメントを委員にお願いする。

以 上

平成 28 年度第 3 回「化学物質の蓄積性評価手法に関する検討委員会」議事概要

日 時：平成 29 年 2 月 2 日（木）14:00～17:35

場 所：一般財団法人化学物質評価研究機構 本部大会議室

議事次第：

1. 開会
2. 議題
 - 1) 一濃度区での水暴露法、簡易水暴露法による試験結果の取扱いの検討
 - 2) 餌料投与法を化審法に導入することの可能性に関する調査・検討
3. その他

<配布資料>

- 資料 1：一濃度区での水暴露法、簡易水暴露法による試験結果の取扱いの検討
資料 1（別添資料 1）：第 2 回検討委員会で挙げられた主要な意見（BCF の判定基準について）
資料 1（別添資料 2）：水暴露法の適用条件等に関連する OECD TG 305 の記載
資料 2：餌料投与法を化審法に導入することの可能性に関する調査・検討
資料 2（別添資料 1）：化審法濃縮度試験方法改正原案（試験法部分）
委員コメント対応修正案
資料 2（別添資料 2）：化審法濃縮度試験方法改正原案（試験法解説部分）
委員コメント対応修正案
資料 2（別添資料 3）：餌料投与法の判定基準について
資料 3：第 2 回検討委員会 議事録（委員限り）

<配布資料（参考資料）>

- 参考資料 1：新規化学物質等に係る試験の方法について（濃縮度試験法抜粋）
参考資料 2：新規化学物質の判定及び監視化学物質への該当性の判定等に係る試験方法及び判定基準
参考資料 3：化審法 Q&A「新規化学物質に関する審査及び規制等について」
参考資料 4：OECD TG 305 日本語訳（仮訳）
参考資料 5：餌料投与法に関する平成 25 年度及び 27 年度委託事業の概要（第 1 回検討委員会資料）
参考資料 6：餌料投与法の試験結果の取扱いについて（第 1 回検討委員会資料）
参考資料 7：OECD TG 305 ガイダンスドキュメント草案（第 3 稿）（原文）
参考資料 8：餌料投与法の判定基準について（第 2 回検討委員会資料）

議事概要：

1. 一濃度区での水暴露法、簡易水暴露法による試験結果の取扱いの検討

事務局より配布資料に沿って説明を行った。

1) 一濃度区での水暴露法

- ・水溶解度測定に使用する水と試験水では被験物質の溶解性は異なると考えられるため、試験濃度が試験用水に対する溶解度以下になっていることを確認すべきである。
- ・TG 305 には水溶解度という記載しかないため、試験水に対する溶解度に強制すると、海外のデータが使用できなくなる懸念がある。
- ・テストガイドラインを変更することはできないため、試験結果を受け入れる運用の条件として「試験濃度が被験物質の試験用水に対する溶解度の 10 分の 1 以下であること」とすればよいのではないか。
- ・TG 305 には試験濃度が水溶解度以下であることが有効性として記載されているが、試験用水中における被験物質の水溶解度を超えないように注意するとも記載されているため、試験用水に対する水溶解度を測定することは妥当と考えられる。
- ・被験物質濃度の均一性や濃度維持は飼育水を使わないと担保できない。二濃度区での水暴露法の場合は濃度区が 2 つあるため、試験水中の被験物質濃度の変動に関する有効性基準（試験水中の被験物質濃度の変動は平均の±20%以内）を満たさない場合でも許容した部分もあったが、一濃度区での水暴露法ではその基準も厳格にして運用しなければならない。
- ・有効性基準は既に規定されているため、新たな基準を追加することは困難である。有効性基準を満たさない場合は、濃度依存性がないことを試験機関が示すべきである。
- ・水溶解度測定用の水の種類によって測定値に差が生じることを考慮して、そのマージンを水溶解度の 10 分の 1 以下とするのであれば、試験用水で測定した水溶解度に対しても、その基準を適用することは厳しいのではないか。
- ・海水であろうと、試験水であろうと媒体が変わるだけであって、マージンを変える必要はないため、水溶解度の 10 分の 1 以下という考えは残すべきである。
- ・二濃度区での水暴露法における水溶解度測定は通常の試験用水で測定する必要はなく、その値から設定した試験濃度で濃度区間の差がなければ問題はないと考える。また、測定方法はフラスコ法とカラム溶出法、どちらを選択してもよい。
- ・試験の簡便化という方向性は理解しているが、濃度依存性がないということについて科学的な根拠が乏しい。水溶解度の 10 分の 1 以下であれば濃度依存性が絶対になくなるのか。
- ・一濃度区での水暴露法は、簡便化されているため、スクリーニング的な位置づけになることは理解している。したがって、BCF が 1000 L/kg を超えるような物質はそのメカニズムを考慮して、蓄積性判定を下すというプロセスに異論はない。その上で、明らか

に蓄積性が低い物質に関しては一濃度区に簡便化してもよいのではないかと。蓄積性の懸念が高い物質については現行の運用で実施してもらいたい。

- ・一濃度区での水暴露法の運用を変更するのは時期尚早である。一濃度区での水暴露法を実施する場合には、水溶解度の10分の1以下であることを考慮すると、魚体中濃度はかなり低い濃度で定量しなければならないことが想定されるが、極端な話だと、検出限界値が判定基準に近いところで判断しなければならないケースも出てくると思われる。現状ではその検出限界の設定方法が試験機関間で統一されておらず、測定者の主観で設定している場合や検量線が原点を通過していないにも関わらず、一点検量で定量している場合がある。そのような現状では、例えば、検出限界がBCF 4000 L/kg以下という値でも、5000 L/kgを超えていないから高濃縮ではないという判定をさせられてしまうことになるため、非常に危険なことではないかと考えている。
- ・定量限界の設定方法の統一は方針として理解できるが、分析機器を統一する必要があるが、現実的には困難であると思われる。しかし、定量下限値の算出方法を一定の基準に合わせるということを試験機関に促していくことは一案である。
- ・水溶解度測定の正確さがどこまで担保されているかわからない状態で運用するのであれば、ある程度保険をかけて、当面はスクリーニング的な運用をして、例えば、分析精度の問題や水溶解度の測定の部分がクリアされてきた時点で、一濃度区、二濃度区と同じ基準を考えるとという方向にしなければ、不安な要素がかなり多く残る。
- ・一濃度区での水暴露法は、無機化合物、有機金属化合物、界面活性作用を有する物質、パーフルオロアルキル基を有する物質及びUVCBsに該当する物質ではない化学物質に適用するとしているが、性状が未知である新規物質の審査に既知見を当てはめる考え方は矛盾を感じる。これまでの知見はあくまで知見であり、その知見から外れる物質がないという保証はない。判定するには濃度依存性がないという根拠データが必要である。
- ・判定基準は一濃度区での水暴露法についてもこのままとし、BCF 1000～5000 L/kgについては、部位別・排泄試験は当然課した上で、総合的に判断するということがよいのではないかと。
- ・判定基準には濃度依存性という言葉があるが、一濃度区での水暴露法ではその有無を確認できないのではないかと。濃度依存性の可能性があるということが一濃度区での水暴露法において一番問題となる箇所である。
- ・大多数のデータにおいて、濃度依存性が認められていないことも事実である。BCFが1000 L/kgを超える場合は必ずしも二濃度区での水暴露法を実施するという基準は設けず、例えば、濃度依存性がないことの証明を要求する可能性があるかと記載してはどうか。この記載であれば、例えば、過去の試験の中から類似物質を検索し、メカニズムが同様であるから問題ないとするような証明の仕組みもあると考えられる。類似物質がない場合は、試験を実施しないと濃度依存性がないことは証明できないだろう。したが

って、BCF が 1000 L/kg を超える場合は濃度依存性の有無も含めた総合判断になると、柔軟性を持たせたような運用をすれば、合理的に濃度依存性に関する証明ができるのではないか。

- ・補足説明における「今後、知見の蓄積がされ、濃度依存性が懸念される物質群が判明した場合には」という記載は、今後も二濃度区での水暴露法が行われるため、そこで知見を蓄積するという意味である。
- ・現行の判定基準では「濃縮倍率に濃度依存性が認められる場合には、必要に応じてより低濃度区での試験を行い、その成績を踏まえ判断する。」となっているが、一濃度区での水暴露法を想定した場合、「濃度依存性の疑いが認められる場合」というのは、試験機関がそのような知見を持っているときにその確認がとれた場合となる。
- ・現行の判定基準は二濃度区での水暴露法を前提に規定されているので、このまま一濃度区での水暴露法にも適用すると矛盾が生じる。この部分を修正しないと混乱が生じる。
- ・「濃度依存性の懸念がある場合」と修正すればよいのではないか。
- ・一濃度区での水暴露法の運用の改正は来年度内を想定している。

2) 簡易水暴露法

第2回委員会において対応方針が合意されたため、議論は行われなかった。

2. 餌料投与法を化審法に導入することの可能性に関する調査・検討

事務局より配布資料に沿って説明を行った。

- ・通常は水暴露法の実施が困難であると判断した後に餌料投与法を実施するため、水溶解度は実測値があり、log Pow は計算値しかない。したがって、水溶解度は実測値、log Pow は計算値で良いのではないか。
- ・疎水性が高い化学物質については、log Pow の計算値の信頼性は低いが、log Pow が 5 を超えるかを見極める目的であれば、計算値でも十分な信頼性があると考えられる。
- ・UVCBs には餌料投与法は適用できないと記載されているが、UVCBs は疎水性が高いため、水暴露法の実施が難しい場合も想定される。したがって、一概に餌料投与法が UVCBs には全て適用できないとはせず、UVCBs の組成や性質を考慮した上で試験法を選択してもよいのではないか。
- ・水暴露法の膜透過における分子量 800 という閾値が、餌料投与法の腸管からの吸収にも適用可能であるかは不明である。したがって、どの成分を餌料投与法の評価対象とするかという基準の策定が困難であるため、原則として UVCBs は対象外としている。
- ・試験選択基準案には、「原則として」という文言を入れてはどうか。
- ・試験法案へのコメントに対する回答として、金魚又は鯛用の餌料の使用実績があると記載されているが、海産魚と淡水魚は栄養要求のパターンが異なるため、魚の健康状態への懸念があり、注意すべきである。

- ・餌料投与法の国内リングテストの報告書によると、5つの試験機関の中で、脂質含量10%の餌を使っている試験機関が1つあるが、その他の4試験機関は3~6%程度の餌料を使用している。脂質含量が10~15%程度の餌料では、どこの試験機関も実績のない餌料で試験を実施することになり、適切に魚の脂質含量や成長を維持できるか懸念がある。
- ・TG 305の中で餌料の脂質含量が15%と記載されており、これまでCERIが実施した多くの試験においても餌料の脂質含量が15%である。これまでの知見と整合性を考慮して、10~15%程度に統一することが適切ではないか。
- ・国内リングテストが実施された際、餌料の脂質含量が低いために微細結晶化のように通常の腸管からの取り込みとは異なるメカニズムで蓄積が起こっているのではないかと推測がされている。したがって、餌料投与法を実施する場合は餌料の脂質含量をある程度高めにするのが重要と理解している。また、餌料の脂質含量が蓄積に大きく影響しないということだが、 BMF_{KgL} を計算する際は餌料の脂質含量を用いなければならない。つまり、本来は影響を受けないはずなのに餌料の脂質含量で値が変わってしまうということが起こるため、餌料の脂質含量は可能な限り統一すべきである。
- ・TG 305には基準物質を必ず添加するとは記載されていないので、基準物質を毎回添加することを必須にすると、海外取得したデータは化審法で受け入れられなくなる懸念がある。現在、判定基準案が0.007未満となっているので、仮に実測でこの数値を守るのであれば基準物質を入れる必要はないと考えているが、魚から検出されなければ適切に摂餌したという担保がとれないため、その場合に限り、何らかの基準物質を入れるという選択肢を設けるのは一案である。
- ・TG 305には、毎回ではないものの基準物質を用いて試験結果の妥当性を確認する記載がある。
- ・試験機関は餌料投与法の経験が少ないことも考慮して、「当面は」とすれば、必須ではないが、実績を積む間の一時的な措置となり、海外のデータの受け入れが可能となるのではないか。
- ・基準物質と比較してBMFが低ければ結果として問題ないとするのも一案であり、その場合、定常状態に達する時間は不明であるため、最後まで試験を実施して、基準物質の BMF_{Kg} と比較することになる。
- ・基準物質の例として提案するのであれば、BMFが既知の物質であることが望ましい。o-テルフェニルだけでは選択の余地が無く、GC/MSでしか分析ができないため、メトキシクロルと*N,N*-ジ-2-ナフチル-*p*-フェニレンジアミンも候補としたらよいのではないか。
- ・餌料投与法の適用条件として、水溶解度が0.01mg/L未満かつlog Powが5を超えるとしているが、基準物質については候補が少ないため、その基準を適用しなくてもよいのではないか。

- ・摂餌の確認であれば被験物質と基準物質の構造が類似している必要はない。
- ・あまりにも水溶解度が高い物質や log Pow が低い物質は、水中に溶出してしまい、鰓から取り込まれる可能性があるため除外すべきである。水溶解度は一定の基準を設けるべきではないか。
- ・第2回委員会において挙げられた物質の中から優先的に3~4物質を候補とすればよいのではないか。

3. その他

一濃度区での水暴露法については、判定基準の見直し案を経済産業省と作成し、委員に連絡する。餌料投与法の試験法案及び判定基準案については、第3回委員会の議論の内容を踏まえて再度修正し、委員に連絡する。

以 上

二次利用不可リスト

報告書の題名 平成 28 年度経済産業
省委託事業化学物質安全対策
(蓄積性の評価手法に関する調査・検
討) 報告書

委託事業名 平成 28 年度化学物質
安全対策 (蓄積性の評価手法に関する
調査・検討)

受注事業者名 一般財団法人化学物質
評価研究機構

頁	図表番号	タイトル
27	-	Arnot JA., and Gobas FAPC. (2003) A generic QSAR for assessing the bioaccumulation potential of organic chemicals in aquatic food webs. QSAR Comb. Sci. 22:337-345
27	-	Arnot JA., and Cristina LQ. (2015) Development and evaluation of a database of dietary bioaccumulation test data for organic chemicals in fish. Environ. Sci. & technol. 49.8 (2015): 4783-4796.
27	-	European Parliament. 2006. Regulation (EC) 1907/2006 of the European Parliament and of the council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) 793/93 and Commission Regulation (EC) 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. Official Journal of the European Union 30.12.2006. L 396/1- 849.
27	-	Hashizume et al. (2014) Prediction of the bioconcentration factor in common carp (cyprinus carpio L.) using data from the dietary exposure bioaccumulation fish test. Environ. Toxicol. Chem. 33:1406-1414.
27	-	Inoue et al. (2011) Comparison of nitrofen uptake via water and food and its distribution in tissue of common carp, Cyprinus carpio L. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 87:287-291
27	-	Inoue et al. (2012) Comparison of bioconcentration and biomagnification factors for poorly water-soluble chemicals using common carp (Cyprinus carpio L.). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 63:241-248.
27	-	Organization for Economic Cooperation and Development. (2012) OECD guidelines for testing of chemicals, guideline 305, Bioaccumulation in fish: Aqueous and dietary exposure. Paris, France.

(様式 2)

27	-	Organization for Economic Cooperation and Development. (2016) Guidance Document to OECD TG 305 2nd Draft (unpublished document)
27	-	Organization for Economic Cooperation and Development. (2016) Guidance Document to OECD TG 305 3rd Draft (unpublished document)