NITE講座「化学物質に関するリスク評価とリスク管理の基礎知識」

2016年9月29日

第6回

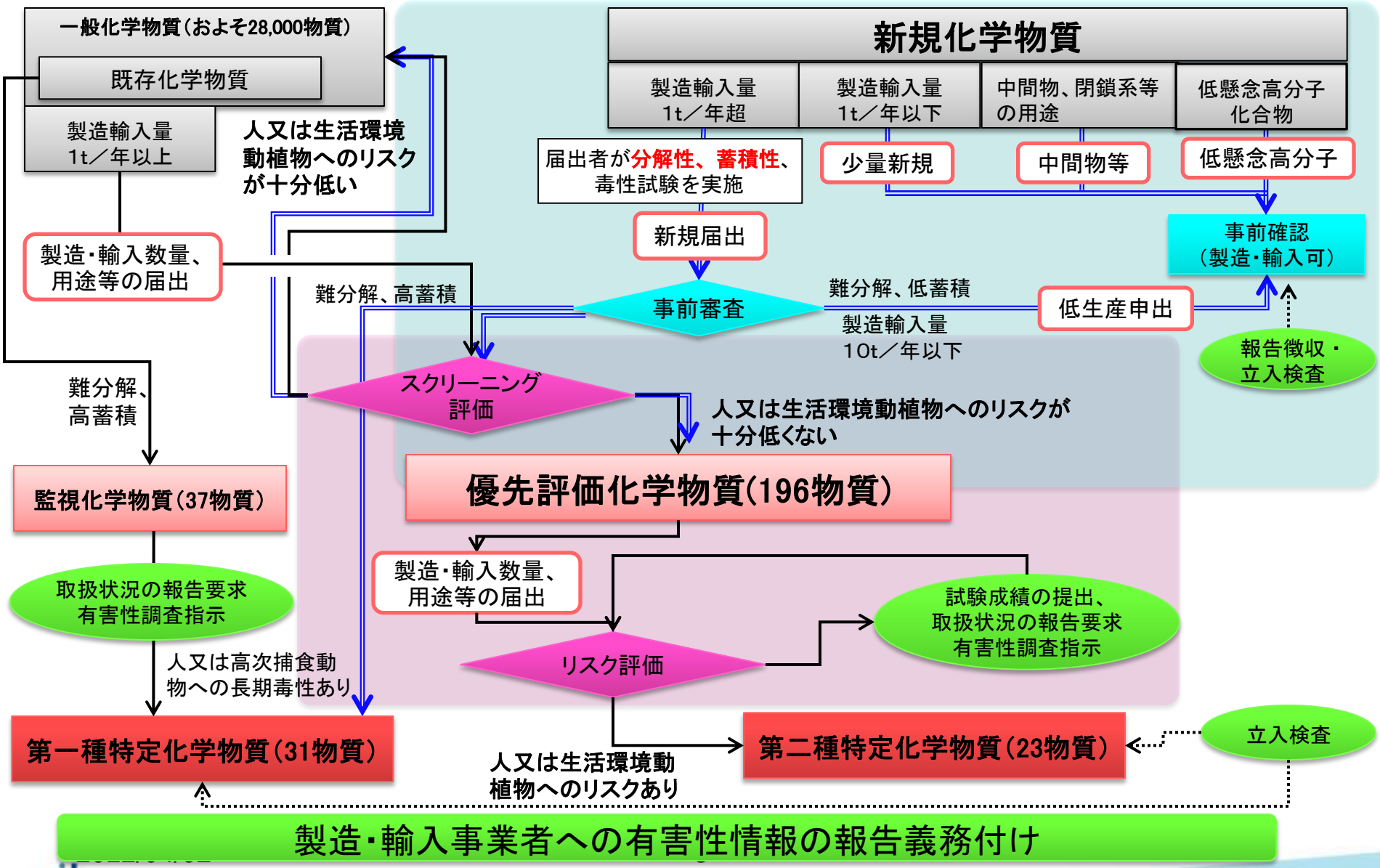
化審法における分解性及び蓄積性評価

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

講義内容

１　化審法の法体系
２　分解性・蓄積性評価に必要な知見
３　化審法TGとOECDTGの関係
４　試験の実施費用と期間について
５　分解度試験
６　蓄積度試験
７　分配係数試験
８　高分子フロースキーム
９　判定結果の公表

1　化審法の法体系


一般化学物質（およそ28,000物質）
既存化学物質
製造輸入量
1t／年以上
人又は生活環境動植物へのリスクが十分低い
製造・輸入数量、用途等の届出
新規化学物質
製造輸入量
1t／年超
製造輸入量
1t／年以下
中間物、閉鎖系等の用途
低懸念高分子化合物
届出者が分解性、蓄積性、毒性試験を実施
少量新規
中間物等
低懸念高分子
新規届出
事前確認
（製造・輸入可）
難分解、高蓄積
事前審査
難分解、低蓄積
製造輸入量
10t／年以下
低生産申出
報告徴収・立入検査
スクリーニング評価
人又は生活環境動植物へのリスクが十分低くない
難分解、高蓄積
監視化学物質（37物質）
優先評価化学物質(196物質)
取扱状況の報告要求
有害性調査指示
製造・輸入数量、用途等の届出
試験成績の提出、取扱状況の報告要求
有害性調査指示
リスク評価
人又は高次捕食動物への長期毒性あり
第一種特定化学物質（31物質）
人又は生活環境動植物へのリスクあり
第二種特定化学物質（23物質）
立入検査
製造・輸入事業者への有害性情報の報告義務付け

２　分解性・蓄積性評価に必要な知見

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（抜粋）

・新規化学物質の第４条第１項又は第２項の判定、及びいずれの号に該当するかどうかの判断は、当該新規化学物質及び既存化学物質について既に得られている知見の他、「新規化学物質に係る試験並びに優先評価化学物質及び監視化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める省令」第１条第１項第２号、第２項及び第３項の規定による以下の試験の試験成績に基づき行うものとされている。

①微生物等による化学物質の分解度試験（分解度試験）
②魚介類の体内における化学物質の濃縮度試験（濃縮度試験）又は１－オクタノールと水との間の分配係数測定試験（Pow 測定試験）

これらの試験は、原則として「新規化学物質等に係る試験の方法について（平成23年3月31日薬食発0331第7号・平成23・03・29製局第5号・環保企発第110331009号）」（以下「通知」という。）に沿って実施することとされているが、通知に定められていない試験方法（OECD テストガイドライン等）に基づく試験成績については、上記（1）の試験方法と同等の取扱いが可能であると考えられ当該試験成績の信頼性が確保されていると認められる場合には、判定の際に用いることとする。

なお、高分子フロースキームに基づき判定を行う場合には、物理化学的安定性及び酸・アルカリに対する溶解性試験及び水及び有機溶媒に対する溶解性試験の結果等から判断する。

3　化審法TGとOECDTGの関係

評価区分		試験方法（対応するOECDTG）		備考
分解性		微生物等による化学物質の分解度試験（TG301C）		TG302C（逆転法） TG301D（クローズドボトル法）
		水中安定性試験（無機化合物）		既知見通知
蓄積性（①か②のいずれか）		①1－オクタノールと水との間の分配係数測定試験（TG107又TG117）		LogPowが3.5未満の場合に審査に適用
		②魚介類の体内における化学物質の濃縮度試験（TG305）		
人健康影響	一般毒性試験→毒性のスクリーニング	ほ乳類を用いる28日間の反復投与毒性試験（TG407）		ほ乳類を用いる90日間の反復投与毒性試験（TG408）
	変異原性試験（突然変異を誘発する性質を評価する試験）→発がん性等のスクリーニング	細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames試験）（TG471）		
		染色体異常試験/変異原性試験（①か②のいずれか）	①ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験（TG473）	
			②マウスリンフォーマTK試験による変異原性試験（TG476）	
生態影響		藻類生長阻害試験（TG201）		
		ミジンコ急性遊泳阻害試験（TG202）		
		魚類急性毒性試験（TG203）		
高分子フロースキーム試験				既知見通知

●化審法新規化学物質の審査に使用する有害性試験結果は、「新規化学物質等に係る試験の方法について（3省局長通知）」に記載の試験方法に基づいて実施された試験結果であり、同試験は原則として「化学物質GLP*」に適合する試験施設で行われたものでなければならない。

＊GLP　化学物質に対する各種安全性試験成績の信頼性を確保することを目的とし、試験施設ごとに運営管理、試験設備、試験計画、内部監査体制、信頼性保証体制等に関するGLP基準への適合性を確認し、試験成績の信頼性を確保する制度

4　試験の実施費用と期間について

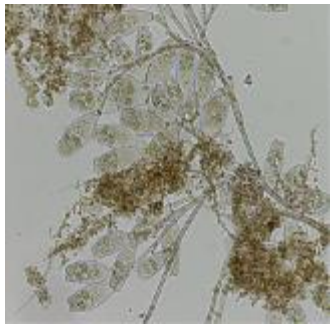
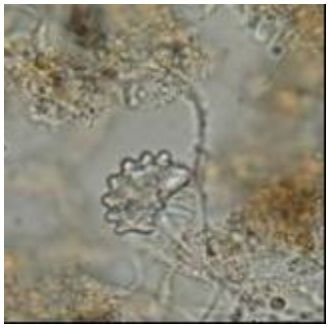
		費用（万円）	標準期間
分解度試験		140～200	60～120日
濃縮度試験		600～850	120～180日
分配係数試験		60～100	30～60日
変異原性試験	Ames試験	50～80	45～60日
	染色体異常試験	180～230	60～90日
28日間反復投与毒性試験		750～950	150～180日
魚類急性毒性試験		144～216	約90日
ミジンコ急性遊泳阻害試験		96～144	約90日
藻類生長阻害試験		120～180	約90日
高分子フロースキーム		200～300	約90日

※被験物質の性状により費用は変わることがある。　出典：産業構造審議会化学・バイオ部会化学物質政策基本問題小委員会、審議資料集（平成18年12月）

５　分解度試験

目的　化学物質が自然的作用による化学的変化を生じにくいものであるかどうか確認すること。

手法　生分解性を確認したい化学物質について環境中に存在する微生物の存在下で一定期間培養を行い、得られたBOD（生物学的酸素消費量）等の分析結果から、化学物質が生分解し易いか否かを確認する。
また、分解度試験の結果、新たな化学物質の生成の有無を確認する。

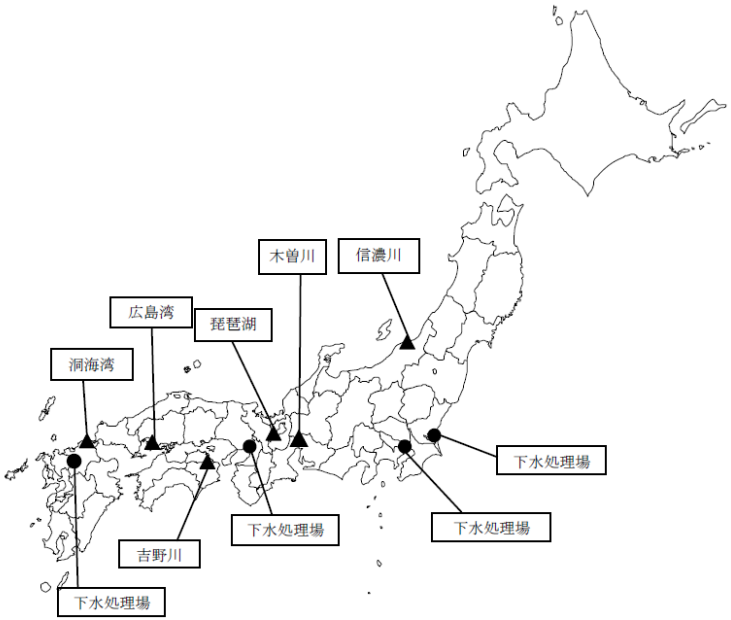
http://www.pref.ibaraki.jp/soshiki/doboku/kasumige/biseibutu.html

5　分解度試験

試験条件

培養条件	試験物質濃度	100mg/L
	微生物濃度	30mg/L
	培養温度	25±1℃
	培養期間	28日間
微生物	全国的な地域分布を考慮の上、多種類の化学物質が消費、廃棄されるとみられる場所を中心に全国10ヶ所*から年間4～6回種汚泥を採取して混合し、合成下水で培養した「活性汚泥」（一般財団法人化学物質評価研究機構にて調製） *都市下水 下水処理場の返送汚泥、河川、湖沼又は海 表層水及び大気と接触している波打際の表土1L	
試験液	水中安定性区	1点
	生分解区	3点
	基礎呼吸区	1点
	対照区（対照物質：アニリン）	1点
測定（分析）	BOD（生物学的酸素消費量）測定	
	DOC分析（水に可溶な場合）	
	試験物質及び分解生成物の定量分析（HPLC,LC/MS,GC,GC/MSなど）	

汚泥の採取場所



http://www.meti.go.jp/meti_lib/report/2014fy/E004405.pdf

5　分解度試験

活性汚泥の調製・培養・採取

種汚泥（10ヶ所）

・等量混合
・ろ過（No.2ろ紙　保留粒径5μm）

ろ液

前回のロットの化審法汚泥

・ろ過（No.2ろ紙）

ろ液

・等量混合
・毎日、1/3量の上澄みを廃棄し、
　等量の0.1%合成下水を添加
・28日間培養

化審法汚泥

<u>培養条件</u>

温度：25±2℃
pH：6～8
溶存酸素濃度：≧5mg/L

<u>合成下水</u>

グルコース、ペプトン及びりん酸二水素一カリウム各1gを水1Lに溶解し、水酸化ナトリウムでpHを7.0±1に調整したもの

５　分解度試験

無機培地（基礎培養基）の調製

微生物が正常な生分解性を得るために、以下の塩類を水に溶解させた無機培地（基礎培養基）を調製し、試験液として用いる。

<u>緩衝能を得る無機塩類</u>

りん酸水素二カリウム
りん酸二水素カリウム
りん酸水素二ナトリウム
塩化アンモニウム

<u>微生物のミネラル分となる無機塩類</u>

硫酸マグネシウム
塩化カルシウム
塩化鉄（Ⅲ）

5　分解度試験

試験液の調製

	生分解区	対照区	基礎呼吸区	水中安定性区
点数	3点	1点	1点	1点
成分	基礎培養基＋ 活性汚泥＋ 被験物質	基礎培養基＋ 活性汚泥＋ アニリン	基礎培養基＋ 活性汚泥	精製水＋ 被験物質
試験物質濃度	100mg/L	100mg/L （アニリン）	－	100mg/L
微生物（活性汚泥）濃度	30mg/L	30mg/L	30mg/L	－

・試験物質は試験液に直接添加するか、高濃度の水溶液として添加する。
・水に試験濃度まで溶解しない場合は、可能な限り微粉砕したものを用いる。（溶媒や乳化剤は使用しない）
・対照区では、活性汚泥の分解活性をアニリン（良分解性）を用いて評価する。
・基礎呼吸区では、活性汚泥自身の呼吸に必要な酸素量を測定する。
・水中安定性区では、被験物質の水中での挙動（加水分解や重合等）を確認する。

5　分解度試験

生物学的酸素要求量(BOD)

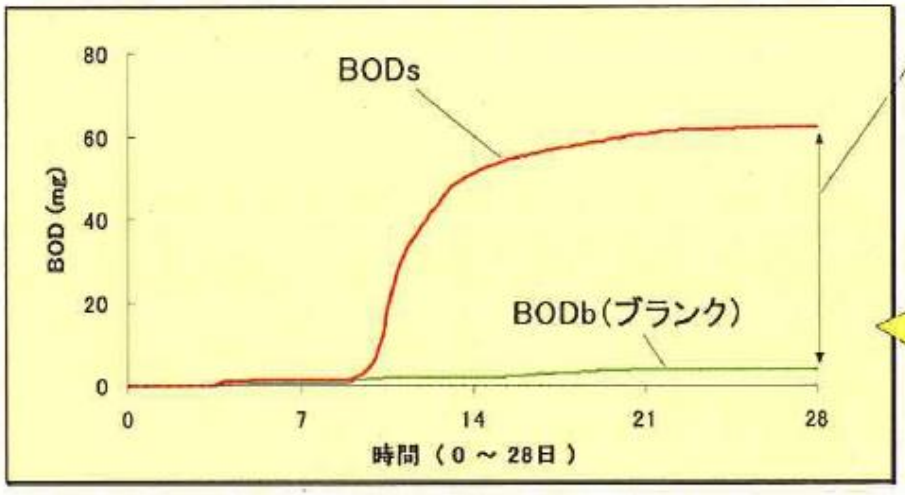
- 微生物が被験物質を好気的に分解・代謝する際に消費する酸素量
- 閉鎖系酸素消費量測定装置(クーロメーター)により経時的に測定

最終的にBOD分解度を算出し，分解の程度を評価します。

BOD分解度(%)＝

$$\frac{\text{被験物質の酸素消費量(BODs)} - \text{汚泥基礎呼吸系(ブランク)の酸素消費量(BODb)}}{\text{理論的酸素要求量(ThOD)}} \times 100$$

この差＝被験物質の分解に消費したBOD(mg)



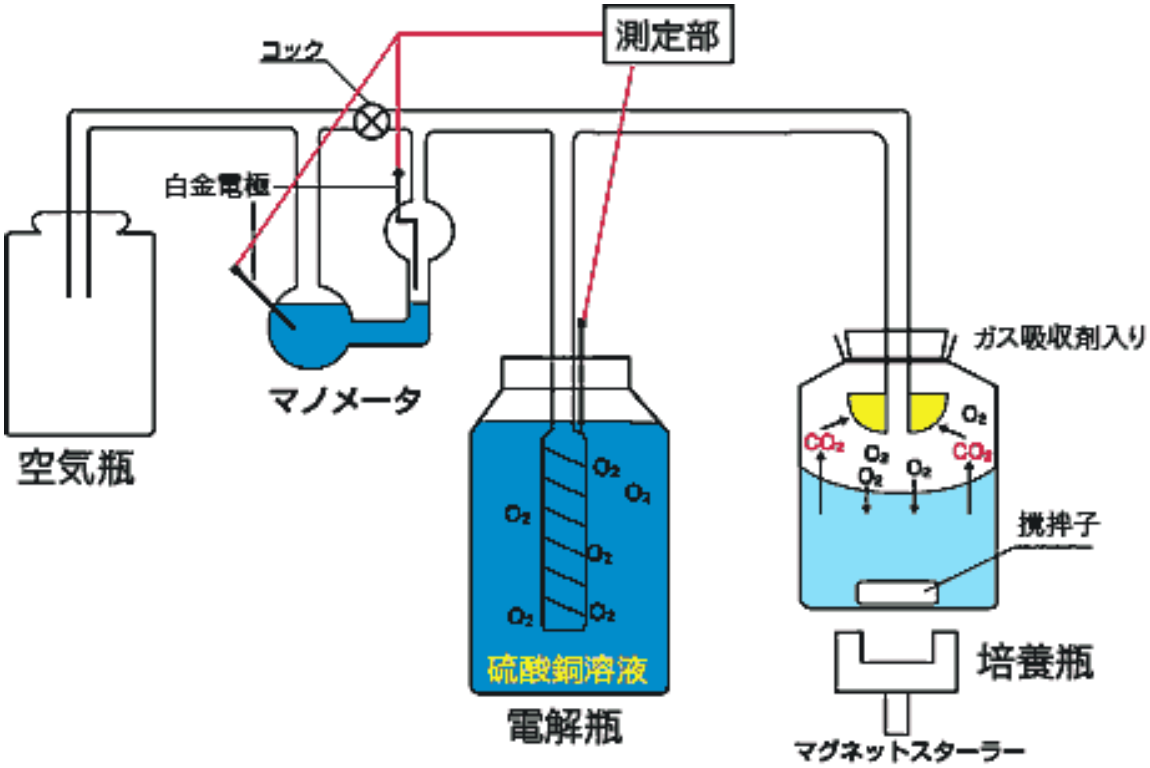
BODs = 62 mg
BODb = 2 mg
ThOD = 80 mg の場合

(62 − 2) ÷ 80 × 100 = 75

BOD分解度
= 75 % と算出されます

5　分解度試験

BOD測定装置の原理



http://www.koei-techno.co.jp/PS/anzen/bunkai/b4.html

http://www.jfrl.or.jp/item/other/other8.html

5　分解度試験

培養終了後の分析

●DOC分析
（試験物質が水に溶解する場合）
DOC分解度を算出し、試験物質の完全生分解の程度について確認する。
DOC分解度（%）＝（DOCw－DOCs）／DOCw×100
DOCw：水中安定性区のDOC残留量（mgC）
DOCs：生分解区のDOC残留量（mgC）

●試験物質分析（HPLC,LC/MS,GC,GC/MSなど）
試験物質分解度を算出し、試験物質の一次生分解の程度について確認する。
試験物質分解度（%）＝（S_B－S_A）／S_A×100
S_A：分解度試験終了後の被験物質の残留量（測定値）（mg）
S_B：水に被験物質のみを添加した空試験における被験物質の残留量（測定値）（mg）

５　分解度試験

試験の有効性

以下の条件を満たす場合に、試験は有効とみなす。

①アニリン（対照物質）の培養7日後、14日後のBOD分解度が40％及び65％以上である。
　→微生物が十分に活性を有している。

②試験液間（生分解区　n＝3）で、試験終了時（培養28日後）の分解度の最大値と最小値の差が20％未満である。

①の条件を満たさない場合は培養を中止し、新たな試験液で再培養する。

５　分解度試験

判定基準

良分解性

3つの試験容器のうち2つ以上でBOD による分解度が60%以上であり、かつ3つの平均が60%以上であること。

:あわせてHPLC、GC 等の直接分析法により分解生成物が生成していないことが確認されること。

:なお、通知で定められた試験方法による試験成績が上記の基準を満たさない場合であって、BOD 曲線等から試験終了後も引き続き生分解していることが示唆される場合（上昇傾向等）には、OECD テストガイドライン302C による試験成績に基づいて判定を行うことができる。

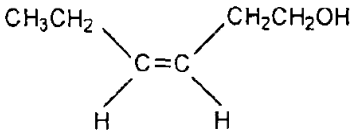
難分解性

良分解性でないこと。

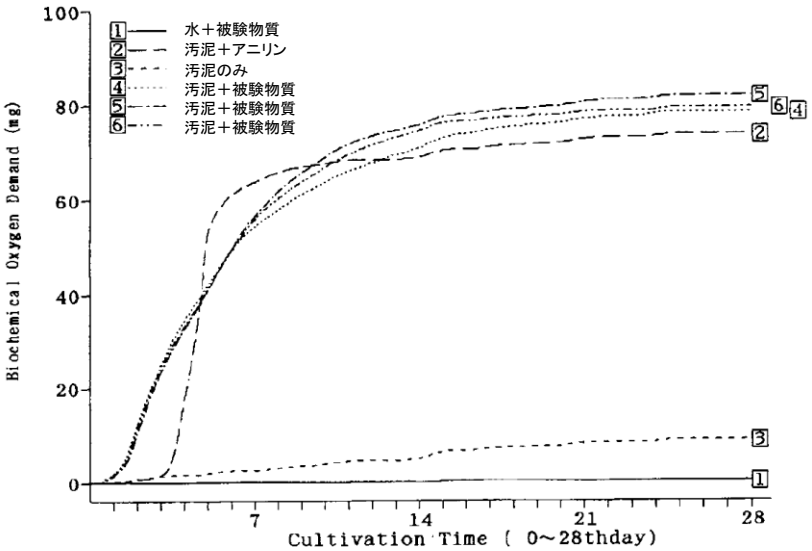
5　分解度試験

判定事例1

cis－3－ヘキセン－1－オール
官報公示整理番号　2－2393
既存化学物質安全性点検結果



	分　解　度　（%）			
	4	5	6	平　均
ＢＯＤによる結果	８５	８９	８６	８７
ＴＯＣによる結果	９７	９７	９７	９７
ＧＣによる結果	１００	１００	１００	１００



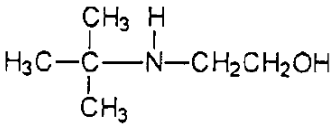
BOD分解度60%以上
DOC分解度60%以上
試験物質分解度60%以上

判定：良分解性

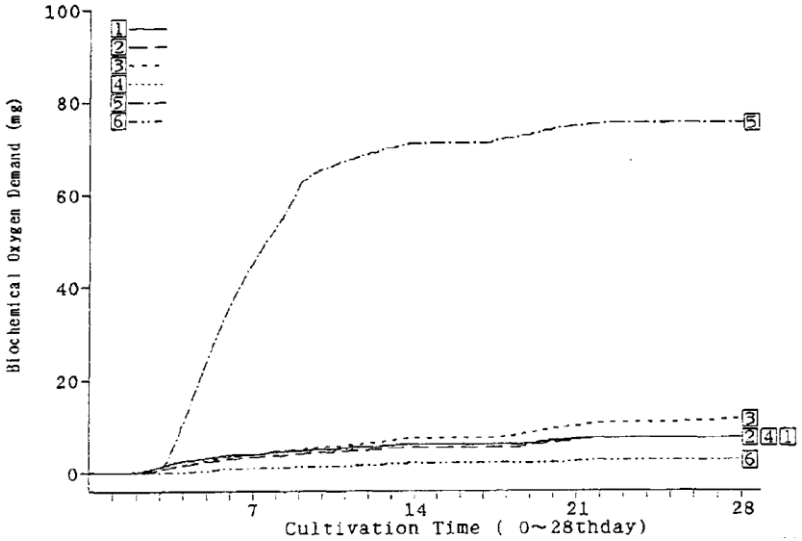
5　分解度試験

判定事例2

N－*tert*－ブチルエタノールアミン
官報公示整理番号　2－295
既存化学物質安全性点検結果



	分　解　度　（%）			
	2	3	4	平　均
ＢＯＤによる結果	0	5	0	2
ＴＯＣによる結果	0	0	0	0
ＨＰＬＣによる結果	0	0	0	0



判定：難分解性（後続試験の実施*）

*1%以上の分解生成物の残留が確認された場合は、分解生成物についても後続試験の対象となる。

その他の分解度試験

TG302C（逆転法）

化審法分解度試験の試験結果が「良分解性」に該当しなかったとしても、
培養終了時に引き続き生分解していることが示唆される場合、
逆転法の試験成績に基づいて判定を行うことができる。
下表の条件以外は化審法分解度試験（OECD TG301C）とほぼ同様な生分解性試験である。

	化審法分解度試験（OECDTG301C）	OECDTG302C
試験物質濃度	100mg/L	30mg/L
微生物（活性汚泥）濃度	30mg/L	100mg/L

OECDTG301Cと逆の条件

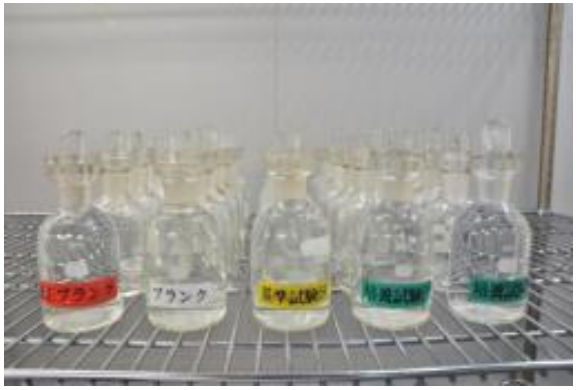
ただし、対照区のみは、化審法分解度試験（TG301C）と同様な対照物質及び微生物濃度である（目的が、微生物の活性確認であるため）。

その他の分解度試験

TG301D（クローズドボトル法）

通常の分解度試験の実施が困難な「ガス状物質」や「高揮発性物質」の生分解性を評価する際にはクローズドボトル法の試験結果により審査をすることが可能。

		TG301D	化審法分解度試験（TG301C）
培養条件	試験物質濃度	2～5mg/L	100mg/L
	微生物濃度	1Lに対し0.05～5mL	30mg/L
	培養温度	20±1℃	25±1℃
	培養期間	28日	
微生物		二次放流水 表層水	活性汚泥
試験液	水中安定性区	10点以上	1点
	生分解区	10点以上	3点
	基礎呼吸区	10点以上	1点
	対照区 （対照物質）	6点（安息香酸ナトリウム）	1点（アニリン）
測定（分析）項目	BOD測定	1週間毎に手動測定	連続的に自動測定
	DOC分析	無し	有り（水に可溶な場合）
	試験物質の定量分析	有り	有り



http://www.jfrl.or.jp/item/other/other8.html

５　分解度試験

OECD TG301Dの特徴

●密閉した容器内で培養するため、培養終了時に溶存酸素濃度が低くなりすぎず正常なBODが得られるように、試験物質濃度を設定する。（通常は2～5mg/L）

●BOD測定装置を用いることができないため、容器内の溶存酸素濃度（DO）を１週間毎（計5回）に手動で測定し、BODを算出する。（DO測定用の試験液を用意する）

●易生分解試験の中で、OECDTG301Dは試験物質に対する微生物の割合が最も低い（化審法分解度試験に比べ、１／５～１／１０程度）ので、分解力が最も低いといわれている。

５　分解度試験

試験の有効性

以下の条件を満たす場合に、試験は有効とみなす。

①安息香酸ナトリウム（対照物質）の培養14日後のBOD分解度が60％以上である。
　→微生物が十分に活性を有している。
②試験液間（生分解区　n＝3）で、試験終了時（培養28日後）の分解度の最大値と最小値の差が20％未満である。
③培養終了時（28日後）に基礎呼吸区のBODが1.5mgO_2/L以下である。
　→試験液の調製方法及びDO測定方法に問題がない。
④全ての試験液においてDOが＞0.5mg/Lである。
　→微生物が生育するために十分な酸素が存在する。

②以外の条件を満たさない場合は培養を中止し、新たな試験液で再培養する。

化学物質の評価手法に関する調査・検討

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）*」

分解性の評価手法に関して、以下の2つの課題について検討が行われた。

①OECDテストガイドライン301F導入検討
平成26年度同事業*に引き続き試験条件、試験結果の取扱い及び判定基準について検討がなされた。

②微量生成した分解生成物の取扱いの検討
微量生成した変化物の評価に関する論点や考え方を整理した上で、現行の化審法における1%以上の変化物を後続試験の対象とする運用に対する合理化策等について検討がなされた。

*平成27年度報告書　http://www.meti.go.jp/meti_lib/report/2016fy/000181.pdf
平成26年度報告書　http://www.meti.go.jp/meti_lib/report/2015fy/000310.pdf

OECDテストガイドライン301F導入検討

TG301F（案）と現行TG301Cの試験条件（概要）の比較

		TG301F	化審法分解度試験（TG301C）
培養条件	試験物質濃度	100mg/L	
	微生物濃度	≦30mL	30mg/L
	培養温度	22±2℃	25±1℃
	培養期間	28日	
微生物		活性汚泥（主として家庭排水を処理する下水処理場のもの）	活性汚泥
試験液	水中安定性区	任意の個数	1点
	生分解区	2点以上	3点
	基礎呼吸区	2点以上	1点
	対照区（対照物質）	1点（アニリン、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム）	1点（アニリン）
測定（分析）項目	BOD測定	連続的に自動測定	
	DOC分析	有り（水に可溶な場合）	
	試験物質の定量分析	有り	

OECDテストガイドライン301F導入検討

TG301Fの試験結果の取扱い（案）

・化審法の運用上、化審法TG301F とTG301C の試験結果は同等に取り扱う。

・結果が異なる化審法TG301F とTG301Cの報告書が化審法申請時に提出された場合は、「良分解性」と判定可能な試験結果を基に判定する。

・化審法の運用上、生分解性を評価する試験法として化審法TG301FとTG301Cのいずれかを選択可能となった場合、その選択は申請者または試験機関が行う。

OECDテストガイドライン301F導入検討

TG301Fの判定基準（案）

①良分解性

・BOD による分解度の平均値が 60%以上であり、かつ分解度の最大と最小の差が20%未満であること。あわせて HPLC、GC 等の直接分析法により分解生成物が生成していないことが確認されること。

：上記の基準を満たさない場合であって、被験物質濃度30 mg/L の試験容器もしくは補助物質を添加した試験容器が追加された場合は、これらの試験容器のBOD による分解度の平均値が60%以上かつ分解度の最大と最小の差が 20%未満であり、あわせて分解生成物が残留していないことが確認されること。

：なお、通知で定められた試験方法による試験成績が以上の基準を満たさない場合であっても、BOD 曲線の形状（試験終了時における上昇傾向）、BOD 測定以外の分析結果、分解生成物の構造及び追加の試験容器の結果等を考慮して総合的に判定を行うことができる。

②難分解性

・良分解性でないこと。

５　分解度試験

OECDテストガイドライン301F導入検討

今後の課題

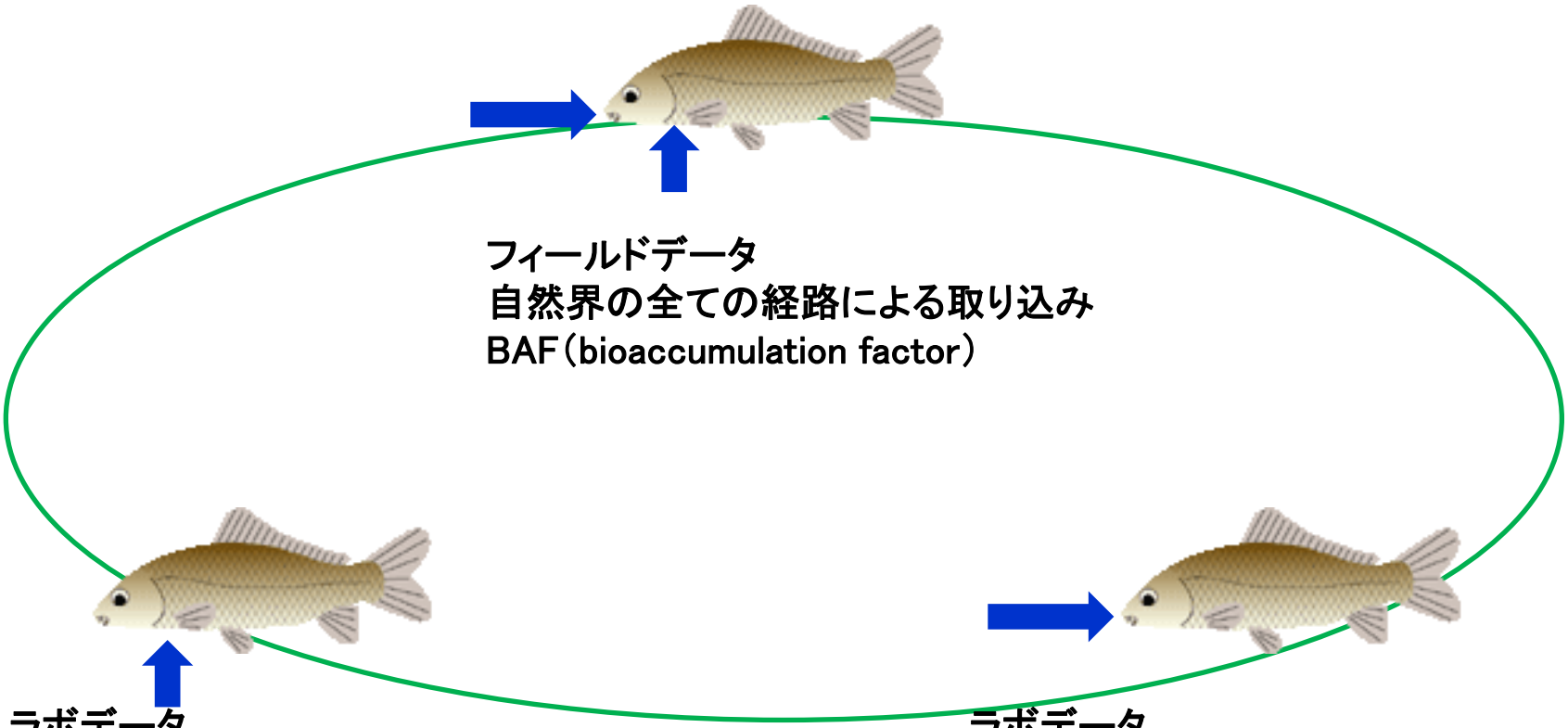
・検討された試験法案及び判定基準案は、現行のTG301Cと異なる点も多いため、現行の試験法及び判定基準についても検討を見直す必要がある。
・TG301Fの国内での試験実績について、導入後には知見を積み上げる必要がある。
・現行のTG301Cの試験法では、生分解区の試験液は3点であるのに対し、TG301Fの試験法案では、基本は2点であり、試験結果の不確実性が増す懸念があるため、追加の検討をすべきである。

↓

引き続き、導入に向けて、検討が行われている。

6　濃縮度試験

生物濃縮性に係る知見



フィールドデータ
自然界の全ての経路による取り込み
BAF（bioaccumulation factor）

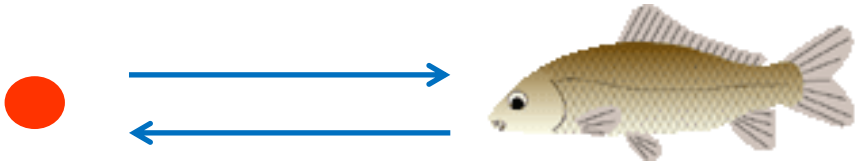
ラボデータ
えらや体表を通じての直接的取り込み
BCF（bioconcentration factor）
水暴露法
化審法濃縮度試験・OECDTG305

ラボデータ
餌の摂取による間接的取り込み
BMF（biomagnification factor）
餌料投与法
OECDTG305に新たに追加された試験方法

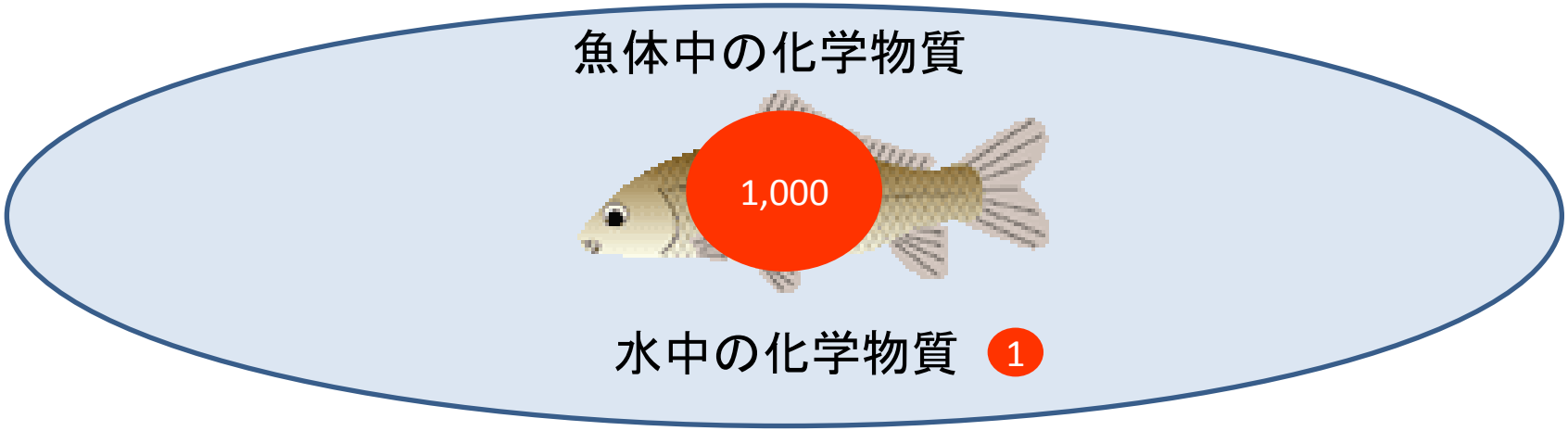
6　濃縮度試験

生物濃縮とは

周辺の水からえらや体表から直接化学物質が取り込まれ、
魚体への取り込み速度が魚体からの排泄速度を上回った場合に濃縮する



★生物濃縮係数（BCF）＝1,000倍とは？



1ppbの水中濃度→1,000ppbの魚体中濃度

6　濃縮度試験

化審法テストガイドラインでは2種類の濃縮度試験が規定されている。

・水暴露法

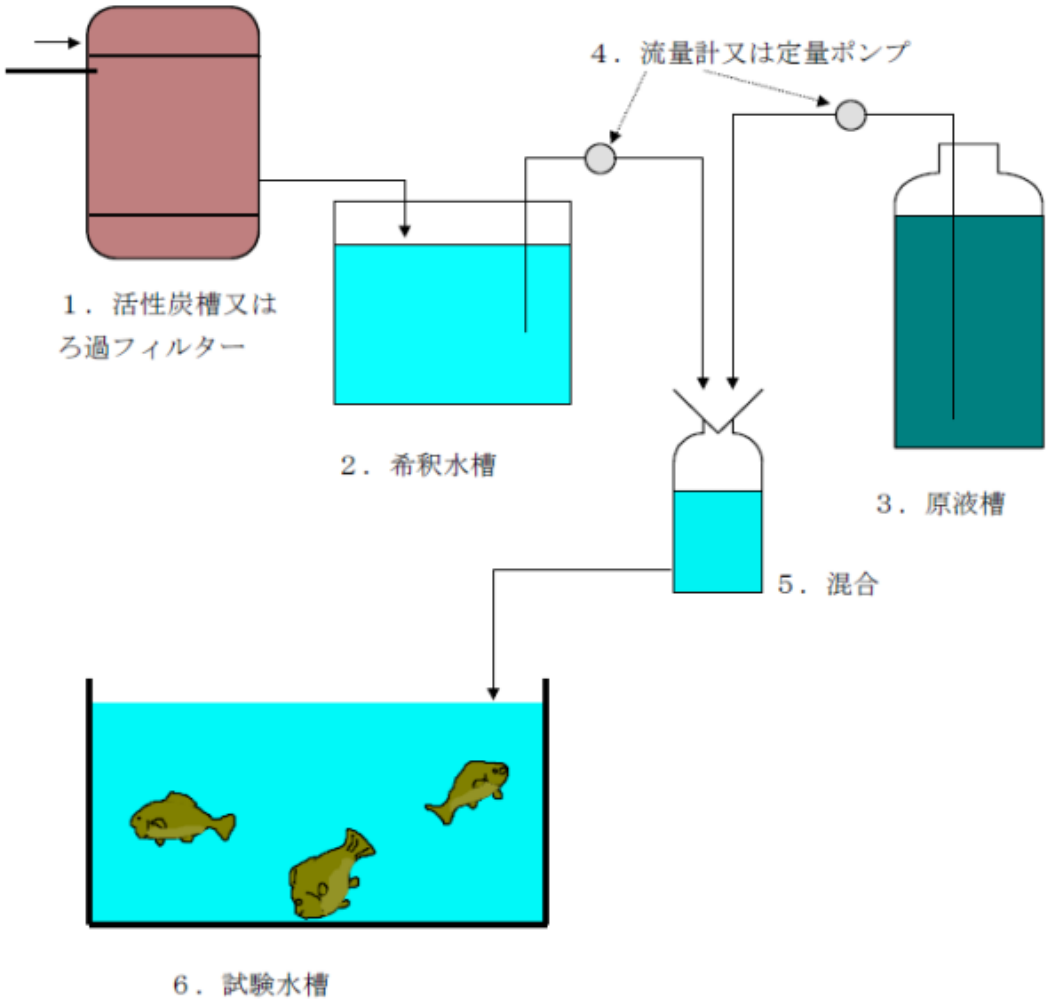
　化学物質が溶解した試験水に試験魚を暴露して、試験水及び試験魚中における化学物質濃度を測定し、生物濃縮係数（BCF）を算出する。

・簡易水暴露法

　生物数及び分析数を削減した簡易的な水暴露法

6　濃縮度試験

濃縮度試験系のイメージ



6　濃縮度試験

水暴露法

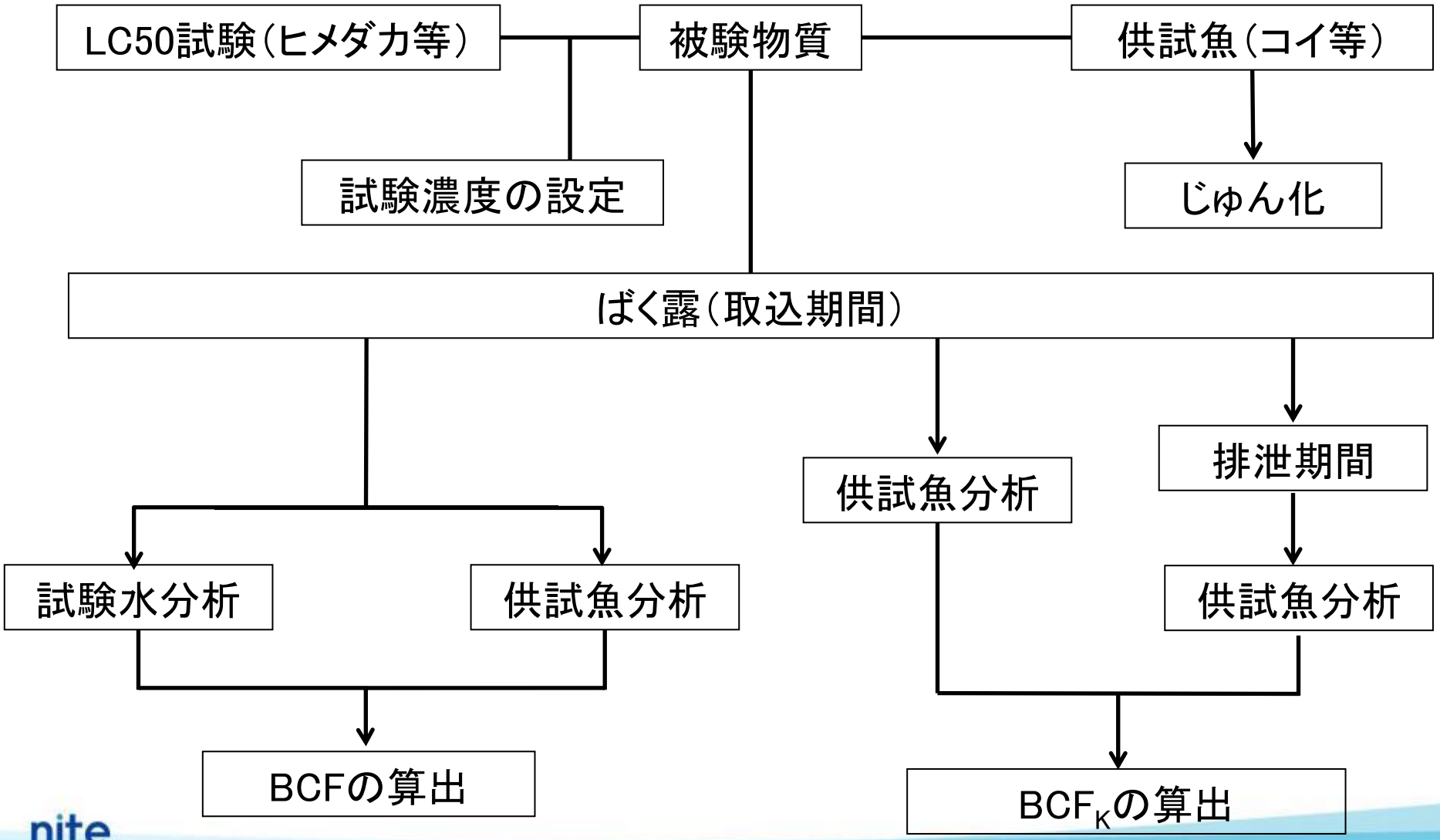
・魚類体内への水（経鰓）を介した化学物質の取込及び蓄積を評価する方法。

・化学物質が溶解した試験水に試験魚を暴露して、試験水及び試験魚中における化学物質濃度を測定し、定常状態における生物濃縮係数（BCF_{SS}）を算出する。

・必要に応じて、上記の取込期間に加えて、取込期間終了後の試験魚を化学物質が含まれない試験水に移動し排泄期間を設ける。
この場合、取込・排泄の両期間を通して速度論による生物濃縮係数（BCF_K）を算出することができる。

6　濃縮度試験

水暴露法のフロー概要



6　濃縮度試験

試験用水

・被験物質及び溶解補助剤（溶剤及び分散剤）を含まない試験用の水。
汚染されていない水質の水源から得られる天然水、脱塩素した水道水又は人工調製水（特定の栄養素を既知量添加した脱塩素した水道水）とし、選択した魚種がじゅん化及び試験期間中に異常な外観や挙動を示さずに生存できる水質でなければならない。

・試験用水は、少なくともpH、硬度、全粒子状物質濃度、全有機炭素（TOC）濃度を測定する。アンモニウム、亜硝酸及びアルカリ度についても測定することが望ましい。

・試験期間中、試験用水の水質を一定に保つ。
試験開始時のpHは6.0から8.5までの範囲とし、試験期間中の変動幅は±0.5以内とする。

6　濃縮度試験

魚種の選択

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

蓄養及びじゅん化

・蓄養した魚群を試験水温で少なくとも2週間じゅん化させ、その間十分な餌を与える。じゅん化中の水及び餌は試験に使用するものと同じ種類のものとする。
・48時間の観察期間に続いて、じゅん化期間中の死亡率を記録し、以下の基準に従い試験に使用する。
・7日間で10%を超える死亡率の場合：試験に使用しない。
・7日間で5%から10%の死亡率の場合：さらに7日間延長してじゅん化する。次の7日間で5%より高い死亡率になった場合には試験に使用しない。
・7日間で5%より低い死亡率の場合：試験に使用できる。
・試験に使用する魚に外観上、病気や異常がないことを確認する。病気の魚は試験に使用しない。

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

6　濃縮度試験

被験物質の水溶解度

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

・2濃度区での水暴露法を適用する場合は、OECDテストガイドライン105等の標準的な試験法を参考に実施した結果である必要がある。

・1濃度区での水暴露法及び簡易水暴露法を適用する場合には、化学物質GLPのほか何らかのGLP基準の適合確認を受けた試験施設においてOECDテストガイドライン105に定められた方法に準じて実施した結果である必要がある。

6　濃縮度試験

試験水

・試験水とは、試験用水に被験物質や溶解補助剤を加えた水である。

・溶解補助剤を使用する場合は最小限にする。また、それらの臨界ミセル濃度を超えてはならない。使用可能な溶剤及び分散剤は、下表参照。試験水中の溶解補助剤濃度は、すべての試験区及び対照区において同一とし、かつ溶解補助剤が試験魚に毒性影響を与えないようにする。
溶解補助剤の最高濃度は、100 mg/L（又は0.1 mL/L）。

・試験期間を通して、試験水中のTOC濃度は10 mg/L（±20%）以下とする（被験物質及び溶解補助剤由来の有機炭素濃度を除く）。

・試験水中の被験物質濃度は、溶解補助剤の使用に関わらず、水溶解度以上の濃度は使用しない方が良い。

・試験水槽中の被験物質濃度を維持するには、試験水槽に試験原液を連続的に供給・希釈する流水式システムが有効。少なくとも1日に試験水槽容量の5倍量の試験水を流すことが好ましい。

6　濃縮度試験

試験水

使用が認められている溶解補助剤

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

6　濃縮度試験

試験水濃度

急性毒性試験の実施（LC_{50}測定）

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

試験濃度の設定

・試験は原則、2濃度区で実施。

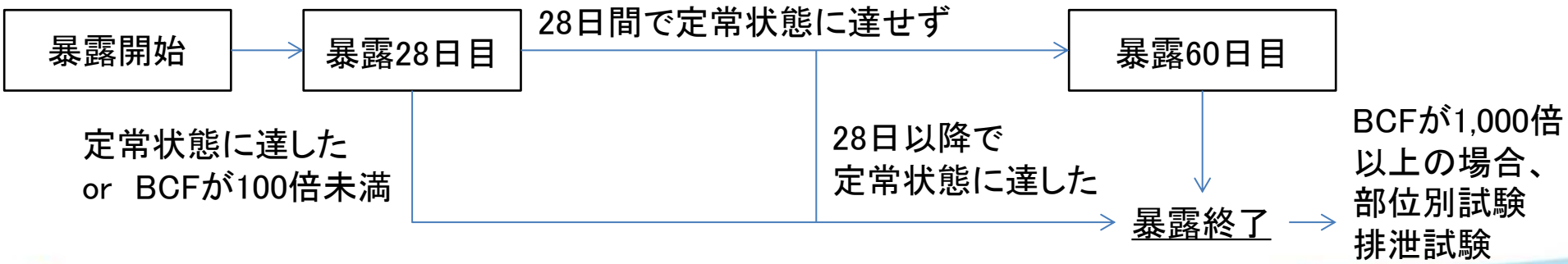
・第1濃度区の試験濃度の設定は、被験物質の急性毒性値（LC_{50}値）の1%以下もしくはNOEC以下とし、技術的に可能な限り低くする。試験水の分析における被験物質の定量下限濃度より、少なくとも10倍程度高い濃度を目安とする。
第2濃度区は、第1濃度区より10倍低い濃度とする。試験濃度も被験物質の水溶解度を超えないように注意。

・BCFの濃度依存性がないと予想される物質については、試験は1濃度区でよい場合がある。一連の試験に加えて、試験用水のみの対照区又は試験原液に溶解補助剤を用いる場合は溶解補助剤のみを含む対照区を設定する。

6　濃縮度試験

取込期間

・試験魚中の被験物質濃度が取込期間の早い段階で定常状態に達することが確認される場合を除き、28日間とする。
・試験魚中の被験物質濃度が少なくとも2日間の間隔をおいて採取したサンプルについて、連続した3回の被験物質濃度の分析結果が±20%以内の場合は定常状態に達したと判断する。ただし、試験魚を複数尾まとめて分析する場合には、少なくとも連続した4回の試験魚分析で定常状態を判断する。
・28日間で定常状態に達しない場合、定常状態に達するまで又は60日間のどちらか短い方まで取込期間を延長し、定常状態におけるBCF（BCF_{SS}）を算出する。
・BCFが100倍未満の場合は、試験魚中の被験物質濃度の変動が20%を超えても、28日後には定常状態に達しているとみなしてよい。



6　濃縮度試験

取込期間

・排泄試験を実施した場合は、速度論によるBCF（BCF_K）を算出する。
28日後に明らかに被験物質の取込が確認されない場合は、排泄試験を実施せずに試験を終了できる。

・BCF_{SS}が1,000倍以上の場合、あるいは、BCF_{SS}が得られなかった場合においては、個々の試験魚について分析を行った際は取込期間における最後の連続した3回の測定におけるBCFの平均値が1,000倍以上の場合、試験魚を複数尾まとめて分析を行った際は取込期間における最後の連続した4回の測定におけるBCFの平均値が1,000倍以上の場合には、部位別試験を実施する。

・部位については、頭部、内臓、外皮（鰓及び消化管を含む）及び可食部（頭部、内臓、外皮を除くその他の部位）の4部位に分けて実施し、それぞれの部位における被験物質濃度とBCFを報告する。

6　濃縮度試験

排泄期間

・BCF_{SS}が1,000倍以上の場合、あるいは、BCF_{SS}が得られなかった場合においては、個々の試験魚について分析を行った際は取込期間における最後の連続した3回の測定におけるBCFの平均値が1,000倍以上の場合、試験魚を複数尾まとめて分析を行った際は取込期間における最後の連続した4回の測定におけるBCFの平均値が1,000倍以上の場合、又はBCF_Kを算出する場合は、排泄期間を設ける。

・排泄期間は、試験魚中の被験物質濃度が十分に減少（例えば定常状態の95%が消失）するまでの期間とすることが望ましい（試験法解説参照）。
試験魚中の被験物質濃度が95%消失するまでの期間が通常の取込期間の2倍以上の場合は、期間を短縮してもよい（例えば、試験魚中の被験物質濃度が定常状態の10%未満に減少するまでの期間とする）。

6　濃縮度試験

試験水の分析

・被験物質濃度の決定のために、取込期間開始前及び取込期間中に試験水を分析する。また、排泄期間を設定した場合は、排泄期間中にも試験水を分析する。
試験水の分析は給餌前に試験魚の分析と同時に行う。
ただし、排泄期間開始時の試験水分析において、被験物質が検出されないことが確認できる場合は、その後の排泄期間における試験区及び対照区の試験水の分析を省略してもよい。

・試験水は、例えば試験水槽の中心から不活性チューブなどを通して吸い取り分析する。このとき、通常、試験水の汚れをろ過や遠心分離により取り除かない。
これらを分離する場合は、その分離技術の根拠又は妥当性を報告する。
特に、高疎水性化学物質（すなわちlog Pow＞5の化学物質）については、
フィルターの材料又は遠心分離の容器への吸着が起こるため、このような処理を行わない。代わりに、可能な限り試験水槽を清浄に保つための処置を行う。
また、取込期間及び排泄期間にTOC濃度を測定する。

6　濃縮度試験

試験魚の分析

・各試験魚の分析は、1試験区当たり最低4尾とし、個々の試験魚について実施する。
ただし、個体ごとの分析が困難な場合には、各分析時における試験魚を複数尾まとめて分析する。その場合は、2群以上とすることが望ましい。

・ 取込期間中に少なくとも5回、試験魚を分析する。排泄期間を設定した場合には、排泄期間中に少なくとも4回、試験魚を分析する。排泄期間を開始する前に、試験魚を清浄な試験水槽に移す。特に、取込及び排泄が単純な1次速度式に従わないことが予想される場合は、正確なBCFの算出が困難であるため、両期間において、より高頻度の分析が推奨される。
動物愛護の観点から最も適した方法で採取した試験魚を安楽死させ、体重及び全長を測定する。
それぞれの個体の体重及び全長は、識別コードなどを付して、被験物質濃度（該当する場合は脂質含量も）の結果と整合させる。

6　濃縮度試験

試験魚の分析

・脂質含量は、少なくとも取込期間の開始時及び終了時、排泄期間終了時に測定しなければならない。脂質含量は、被験物質濃度測定と同一の試験魚を用いて測定するが、同一の試験魚を用いた測定が困難な場合は、上記3回の測定時に、少なくとも別途3尾を採取し測定する。対照区の試験魚において被験物質が顕著に検出されないことが明らかな場合、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。

・BCF_{SS}が1,000倍以上の場合は、被験物質が主に脂質に蓄積しないと考えられる場合を除き、5%の脂質含量で標準化（湿重量に基づく）したBCF_{SS}（BCF_{SSL}）も報告する。

6　濃縮度試験

試験魚の成長の測定

・試験水槽に搬入する前の試験魚から取込期間開始時に5から10尾採取し、
個別に体重及び全長を測定する。

・これらの試験魚は、取込期間開始前の被験物質濃度及び脂質含量の測定に用いることができる。試験期間中に採取した試験魚の体重及び全長は、被験物質濃度又は脂質含量の測定前に記録する。

・これらの測定値から、試験区及び対照区の魚体重及び全長を推定する。
試験区及び対照区における魚の平均成長率の顕著な差は、化学物質の毒性影響を示唆する。

6　濃縮度試験

生物濃縮係数の算出

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

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

また、速度論による生物濃縮係数（BCF_K）を以下の式から算出する。

BCF_K＝k1／k2

k1(取込速度定数):取込期間中の、試験魚の生体内及び表面（又は特定の組織）における被験物質濃度の増加率として定義される数値

k2(排泄速度定数)：排泄期間における試験魚（又は特定の組織）の被験物質濃度の低下率として定義される数値

6　濃縮度試験

成長希釈補正と脂質含量の標準化

・ 排泄期間中の試験魚の成長は、見かけ上、試験魚中の被験物質濃度を低下させ、排泄速度定数（k_2）に大きな影響を与える。そのため、BCF_Kを求める場合には、BCF_Kと合わせて成長希釈補正したBCF_K（BCF_{Kg}）も報告する。

・成長希釈補正した排泄速度定数（k_{2g}）は、通常、排泄速度定数（k_2）から成長速度定数（k_g）を差し引くことにより算出する。さらに、取込速度定数（k_1）を成長希釈補正した排泄速度定数（k_{2g}）で除することによりBCF_{Kg}を算出する。

・ BCF_{SS} が1000以上の場合は、BCF_K又はBCF_{SS}と合わせて5%の脂質含量で標準化したBCF_K（BCF_{KL}）又はBCF_{SS}（BCF_{SSL}）も報告する。また、BCF_Kを報告する場合には、成長希釈補正かつ5%の脂質含量で標準化したBCF_K（BCF_{KgL}）も報告する。

・被験物質濃度及び脂質含量の測定を同一の魚を用いて実施した場合には、それぞれの試験魚中被験物質濃度をその魚の脂質含量を用いて標準化する。
試験区及び対照区の試験魚の成長が同程度であれば、対照区の試験魚の脂質含量を用いて標準化してもよい。

6　濃縮度試験

試験の有効性

・温度変動は±2℃未満であること（試験水温の大きな変動は試験生物へのストレスのほか、取込及び排泄に関する生物学的パラメータに影響する）。

・溶存酸素濃度は飽和酸素濃度の60%以下にならないこと。

・試験水中の被験物質濃度の変動は、取込期間中の測定値の平均に対して±20%以内に保たれること。

・死亡又は病気などの異常は、試験区及び対照区の試験魚において試験終了時に10%未満であること。試験が数週あるいは数か月延長になった場合には、死亡又は異常は、試験区及び対照区で1か月間に5%未満かつ全期間で30%を超えないこと。

6　濃縮度試験

簡易水暴露法

適用範囲：非極性物質で濃度依存性がないと予想される物質かつ
取込及び排泄が1次速度式に従うもの

試験の概要：試験魚中の化学物質濃度の測定を
4回（取込期間に2回、排泄期間に2回）に削減し、
速度による生物濃縮係数（BCF_{Km}）及び
定常状態における生物濃縮係数（minimised BCF_{SS}）を
算出する。

試験に用いる装置等：水暴露法と同じ

6　濃縮度試験

試験水の分析

・被験物質濃度の決定のために、取込期間開始前に
少なくとも1回と取込期間中に少なくとも5回（そのうち2回は試験魚の分析と同時）、試験水を分析する。

・排泄期間中は週1回とする。
排泄期間開始時の試験水分析において、被験物質が検出されないことが確認できる場合は、その後の排泄期間における試験区及び対照区の試験水の分析を省略してもよい。

6　濃縮度試験

試験魚の分析

・各試験魚の分析は、1試験区当たり最低4尾とし、個々の試験魚について実施する。ただし、個体ごとの分析が困難な場合には、各分析時における試験魚を複数尾まとめて分析する。その場合は、2群以上とすることが望ましい。

・取込期間の分析は、取込期間の中間及び終了時（終了時は排泄期間開始時に相当する）とする（例えば、取込期間の14及び28日後）。排泄期間の分析は、排泄期間の中間及び終了時（被験物質濃度が最高濃度の10%未満となることが望ましいが、少なくとも被験物質の排泄半減期が算出できるまで）とする（例えば、排泄期間の7及び14日後）。排泄が早いと予想される場合、試験魚中の被験物質濃度が定量下限未満とならないようにする。

6　濃縮度試験

試験結果の算出

取込終了時(t1)の試験魚中の被験物質濃度(C_{f1})及び
排泄終了時(t2)の試験魚中の被験物質濃度(C_{f2})を用いて、
式1に従い排泄速度定数(k2)を算出する。

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

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

$$k_1 = \frac{C_f \cdot k_2}{C_w\left(1 - e^{-k_2 t}\right)} \qquad \text{式2}$$

6　濃縮度試験

試験結果の算出

取込速度定数（k1）と排泄速度定数（k2）の比を用いて、式3に従い簡易水暴露法における速度論による生物濃縮係数（BCF_{Km}）を算出する。

$$BCF_{Km} = \frac{k_1}{k_2} \qquad \text{式3}$$

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

$$\text{minimised BCFss} = \frac{C_{f-minSS}}{C_{w-\mathrm{minSS}}} \qquad \text{式4}$$

6　濃縮度試験

判定基準

①高濃縮性　BCFが5,000倍以上

②総合的に判断（排泄試験及び部位別試験）の結果
BCFが1,000倍以上5,000倍未満

・部位別試験：頭部、外皮、内臓、可食部などへの
体内分布の程度を確認

・排泄試験：被験物質を含まない水に移して代謝、
排泄の程度を確認

③高濃縮性でない　BCFが1,000倍未満

6　濃縮度試験

各試験結果の新規化学物質審査での取り扱い

①1濃度区水暴露法

被験物質の濃度が対水溶解度の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可能。

②簡易水暴露法

被験物質の濃度が水溶解度の1/10以下で実施された簡易水暴露法濃縮度試験の結果が、以下のいずれの項目も満たすものであることであった場合には、その結果から高濃縮性でないと判定可能 。

- 試験水濃度及び魚体中濃度が定量下限値の10倍以上
- 取り込み及び排泄が一次速度式に従っている
- BCFKm≧Minimised BCF_{SS}
- BCFKm＜200倍

BCFKmが200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ない。

6　濃縮度試験

各試験結果の新規化学物質審査での取り扱い

①、②に共通する制限事項

1)対水溶解度の測定は、GLP試験施設でOECDTG105に準じて実施されたものに限る。

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。

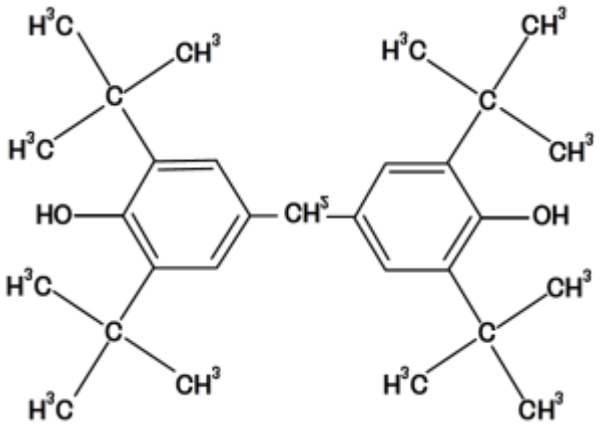
3)以下の化学物質は本ルールの対象とはしないこととする。
・無機化合物及び有機金属化合物（Na、Mg、K、Ca等以外の金属を含有するものに限る。）
・界面活性作用を有すると考えられる化学物質
・パーフルオロアルキル基を有する化学物質

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。（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。）

6　濃縮度試験

判定事例1

2，2′，6，6′ーテトラーtertーブチルー4，4’ーメチレンジフェノール
監視化学物質（4－39）



判定：高濃縮性

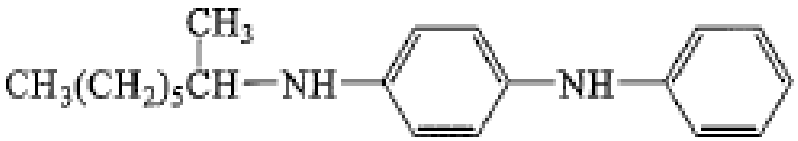
定常状態における濃縮倍率	第1濃度区	4600倍
	第2濃度区	9200倍
定常状態における濃縮倍率（平均脂質含量で補正）		
	第2濃度区	9000倍
排泄半減期	第1濃度区	19日
	第2濃度区	28日

各部位における濃縮倍率

濃度区	部 位	濃縮倍率
1	外 皮	1300 4800
	頭 部	12000 12000
	内 臓	17000 13000
	可食部	11000 12000
2	外 皮	15000 10000
	頭 部	35000 40000
	内 臓	32000 28000
	可食部	38000 33000

判定事例2

Ｎ－オクタン－２－イル－N′－フェニル－１，４－フェニレンジアミン
既存化学物質（３－１３６）



定常状態における濃縮倍率

濃度区	定常状態における濃縮倍率
1	1500 倍
2	1700 倍

排泄半減期

濃度区	排泄半減期
1	2.4 日
2	3.4 日

各部位における濃縮倍率

濃度区	部 位	濃縮倍率
1	外 皮	2700 1200
	頭 部	3400 1900
	内 臓	8100 3800
	可食部	1400 880
2	外 皮	1200 1700
	頭 部	1600 2000
	内 臓	2900 5800
	可食部	820 1000

判定：高濃縮性でない

6　濃縮度試験

※参考※
OECDTG305の改正（2012年10月2日）

目的：水溶解度が極めて低い物質の蓄積性を評価できる試験法及び動物愛護の観点から試験魚の数を減らした試験法を導入すること。

改正OECDTG305の構成
①305-I: Aqueous Exposure Bioconcentration Fish Test（水暴露法）
②305-II: Minimised Aqueous Exposure Fish Test
　（生物数及び分析数を削減した簡易水暴露法）
③305-III: Dietary Exposure Bioaccumulation Fish Test
　（化学物質を餌に添加し経口摂取させる餌料投与法）

※ガイダンスドキュメントはOECDで作成中

6　濃縮度試験

OECDTG305-Ⅲの試験条件概要

暴露方法	経口（餌）
試験濃度区	試験区：1区 対照区：1区
試験期間	取込期間：7～14日 排泄期間：半減期が得られるまで
分析項目	試験飼料（被験物質及び脂質） 試験魚（被験物質及び脂質）
試験魚 　サンプリングポイント	取込期間：1回 排泄期間：4～6回
試験魚 　サンプリング数	5～10尾
エンドポイント	BMF、BMF_L

6　濃縮度試験

OECDTG305-Ⅲ（餌料投与法）の化審法への導入の検討

・HCBでリングテストを実施した結果、試験機関ごと、あるいは試験ごとに、生体蓄積係数（BMF）及び脂質含量補正した生体蓄積係数（BMF_L）の測定値は大きくばらつき再現性が得られなかった。
・すべての試験機関においてBMF_L は1 を下回り、
HCB の生物蓄積性を適切に評価できていないことが示唆された。

TG305餌料投与法の試験の信頼性を向上させるために、
経済産業省にて、試験法としての課題を整理し、その解決策を検討中

参考文献：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）報告書」
http://www.meti.go.jp/meti_lib/report/2013fy/E003453.pdf

7　分配係数試験

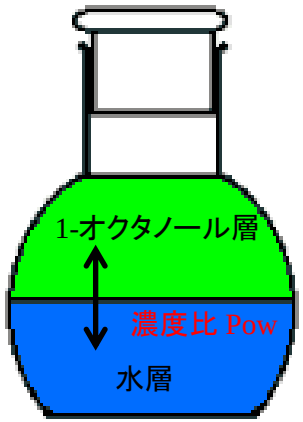
●分配係数とは

・水と油のように混じり合わない2つの液体を同じ容器に入れ、化学物質を添加して振とうすると、両液体中の濃度比は添加量にかかわらず、一定になる。
・この濃度比を化学物質の分配係数という。
・分配係数とは化学物質の疎水性（又は新油性）の尺度となる。

●分配係数の表し方

・2つの液体が水と1−オクタノールの場合、Powと表す。
通常、対数値（Log Pow）として取り扱う。

LogPow =Log (Co/Cw)
Co:1−オクタノール層中の被験物質濃度（mg/L）
Cw:水層中の被験物質濃度(mg/L)

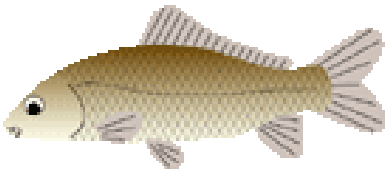


7　分配係数試験

●濃縮性のスクリーニング

・分配係数（logPow）と魚体への濃縮倍率（BCF）の間に相関がある。
・logPow＞3.5（上記相関でBCF数百倍）の場合、濃縮性が疑われる。
　→濃縮度試験が求められる。

被験物質（水中）
↕ 分配
被験物質（魚体中）



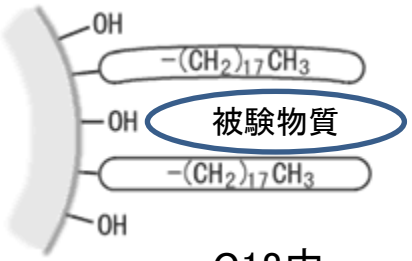
http://www.ginganet.org/mari/fish/Cypriniformes.html#koi

7　分配係数試験

●分配係数の測定方法

①フラスコ振とう法・・・OECD TG107
被験物質を1-オクタノールと水の2つの溶媒層中に加えて十分混合した後、2層に分離する。
各層中の被験物質濃度を測定し、濃度比から分配係数Powを算出する。

②HPLC法・・・OECD TG117
アルキル基（C18など）を固定相としたHPLCカラムに注入された化学物質は、カラム内を移動するとき移動相（溶媒相）と炭化水素固定相との間に分配される。極性が高い物質が先、極性が低い物質が後に溶出する。



C18中　　水中

7　分配係数試験

①フラスコ振とう法

・測定範囲：logPow=－２～４
logPow=（Co／Cw）　測定上限は水層濃度の分析感度に依存する。

・対象物質：非解離状態の物質
（強酸、両性物質、界面活性剤等は不適）　→　濃縮度試験の実施

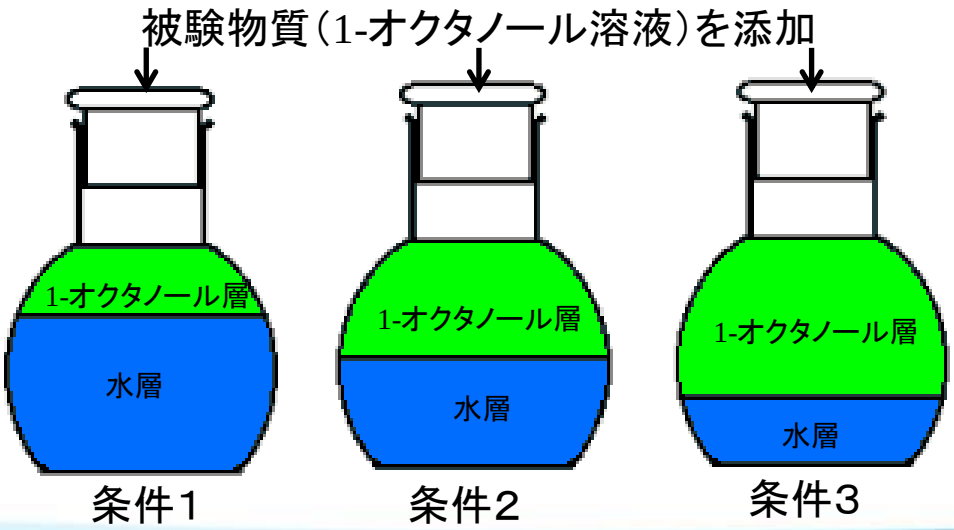
・試験溶媒：水又は緩衝液*（解離性物質の場合）と1－オクタノールを混合した後、
２４時間振とうし、互いに飽和した溶媒を調製する。
すなわち、
1）1－オクタノールが飽和した水
2）水が飽和した1－オクタノール
を用いて試験を実施する。

*解離性物質に適用する場合、酸性物質に対しては、解離定数より1以下のpHの緩衝液、塩基性物質には解離定数よりも1以上のpHの緩衝液を用いて生成した非解離性物質を測定する。

7　分配係数試験

試験操作

1）試験液（3容積比）を調製する。
　容積比として使用される物質量は次の要因を考慮して選択する。
　　・予備試験で予測した分配係数の予測値
　　・分析法で要求された各相中の試験物質の最低濃度
　　・それぞれの相中の最大濃度は0.01mol/Lを超えないこと
2）振とう（5分間、垂直方向に回転）する。
3）遠心分離により、水層とオクタノール層を分離する。
4）水層、オクタノール層の被験物質濃度をHPLC等で測定する。
5）各層の被験物質濃度の比より、分配係数を算出する。



例）3容積比：1／2、1／1、2／1で分配

7　分配係数試験

②HPLC法

・測定範囲：logPow=0～6

・対象物質：非解離状態の物質
（強酸、両性物質、界面活性剤等は不適）　→　LogDの分配係数試験
or 濃縮度試験の実施

・HPLCカラム：アルキル基（C8、C18等）をシリカに結合した固定相を充填したもの。

・標準物質：基本的にOECD　TG117に定められた60物質から選択する。
被験物質と構造式が似たものを選択する。

⇒HPLC法のメリット
・不純物による影響がない
・混合物の評価が可能
・フラスコ振とう法より簡便

7　分配係数試験

logPowの算出

被験物質のPowは被験物質ピークの保持時間から、次式で保持係数（ｋ）を求め、

$k=(t_R-t_0)/t_0$　t_R：被験物質の保持時間

t_0：デッドタイム（溶媒分子がカラムを通過する時間）

得られたkを次式に代入して求める。

$\log Pow = a \times \log k + b$

a:直線回帰式の傾き

b:直線回帰式の切片

上の式は、標準物質のlogPowを、標準物質の保持係数の対数に対して直線回帰分析を行うことによって得られる。

7　分配係数試験

判定基準

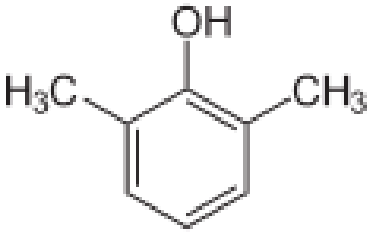
・高濃縮性でない
LogPowが3.5未満である。
ただし、界面活性のある物質、分子量分布を有する混合物、有機金属化合物、純度の低い物質（HPLC 法を除く）及び無機化合物には適用しない。

→LogPowが3.5以上であるものについては、濃縮度試験の実施が求められ、濃縮度試験の結果から濃縮性を評価する。

7　分配係数試験

判定事例1　（フラスコ振とう法）

2，6－キシレノール（官報公示整理番号3－521）
既存化学物質安全性試験結果（OECD　TG107）



（単位　mL）

	測定条件-1	測定条件-2	測定条件-3
水飽和1-オクタノール層	5	10	20
1-オクタノール飽和水層	30	25	15

		$Pow = \frac{Co}{Cw}$	log Pow 測定値	平均値	全平均
測定条件-1	a	2.13×10^2	2.33	2.33	2.33
	b	2.15×10^2	2.33		
測定条件-2	a	2.13×10^2	2.33	2.33	標準偏差＝0.00
	b	2.12×10^2	2.33		
測定条件-3	a	2.11×10^2	2.32	2.32	最大差＝0.01
	b	2.11×10^2	2.32		

振とう条件
- 回転数及び時間　回転数　20回/分、時間　5分間
- 試験温度　25℃

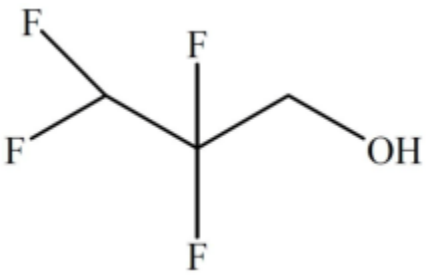
定量分析
- 試験装置　高速液体クロマトグラフ
  溶離液：アセトニトリル／水(1/1　V/V)
- 試験温度　25±1℃
- カラム　ODSカラム

判定：高濃縮性でない

7　分配係数試験

判定事例2　（HPLC法）

2，2，3，3－テトラフルオロ－1－プロパノール（官報公示整理番号2－284）
既存化学物質安全性試験結果（OECD　TG117）



試験条件
　試験装置　高速液体クロマトグラフ
　　溶離液：メタノール／精製水（pH5.7）(1/1 v/v)
　試験温度　25±1℃
　カラム　　ODSカラム

判定：高濃縮性でない

測定結果

	測定物質名称	t_R	k	log k	log Pow
標準物質	チオ尿素（デッドタイム測定用: t_0）	2.02	Average t_0 = 2.02		
		2.02			
	2-ブタノン	3.02	0.495	-0.305	0.3
		3.02	0.495	-0.305	0.3
	アニリン	3.68	0.822	-0.085	0.9
		3.68	0.822	-0.085	0.9
	ベンジルアルコール	4.30	1.129	0.053	1.1
		4.30	1.129	0.053	1.1
	4-メチルベンジルアルコール	6.82	2.376	0.376	1.6
		6.82	2.376	0.376	1.6
	ニトロベンゼン	10.03	3.965	0.598	1.9
		10.03	3.965	0.598	1.9
	アニソール	14.85	6.351	0.803	2.1
		14.85	6.351	0.803	2.1
被験物質	1-Propanol, 2,2,3,3-tetrafluoro-	3.22	0.594	-0.226	0.6
		3.22	0.594	-0.226	0.6

t_0 ： Dead time （デッドタイム） (min)

t_R ： Retention time （保持時間） (min)

k（保持係数）＝ $(t_R - t_0) / t_0$

測定条件における回帰直線の回帰式

$\log Pow = 1.573 \times \log k + 0.939$

被験物質の分配係数

log Pow		
測定値		平均値
0.6	0.6	0.6

7　分配係数試験

イオン性を有する有機化合物の蓄積性評価

- 強酸、強アルカリなどのイオン性を有する化合物は、水中では水和することによってエネルギー的に安定化しているため、水相から生体膜相に移動しにくく、一般的に生物濃縮されにくいと考えられている。
- また、生物蓄積性に関するlogPow試験は、非解離状態で行うこととされている。しかし、強いイオン性の化学物質は非解離状態でlogPowを測定できないことが多い。
- 他方、EUではpH7（及び5～9の間）で測定した見かけのlogPow（logD）による評価が推奨されている。

- 既存化学物質及び新規化学物質データを解析し、イオン性を有する化合物とその他の化合物で濃縮度（BCF）の比較を行った結果、イオン性を有する化合物（パーフルオロ酸を除く。）は、他の化合物よりも生物濃縮されにくいことを確認。
- 更に、イオン性化合物のBCFとlogDとの関係について評価したところ、必ずしも強くはないが一定の相関関係が認められた。

7　分配係数試験

イオン性を有する有機化合物の蓄積性評価（平成26年6月30日 に導入）

非解離状態におけるlogPowを測定することが困難なスルホン酸、カルボン酸、両性イオン化合物、4級アミンなどのイオン性化合物について、中性付近（pH＝7付近）で測定した見かけのオクタノール／水分配係数（logD）が2．5未満の場合は、高濃縮性でないと判定できることとする。

なお、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構造の一部に有する化合物には本ルールは適用しない。

（注1）「非解離状態におけるlogPowを測定することが困難なイオン性化合物」とは、原則として、酸であればpKa＜3、塩基であればpKa＞11のものとする。

（注2）慎重を期すため、本ルールをいきなり判定基準として位置づけるのではなく、事例を重ねつつ適用範囲等に問題がないことを確認することとする。
そのため、当面は事前に事務局に相談することを必須とし、生物蓄積性に広い知見を有する審議会委員（数名）と事務局において、構造式やpKaなどの情報から相談された化学物質が本ルールの適用対象として問題ないかどうか判断することとする。

（注3）判定基準におけるlogPowの取扱と同様に、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。

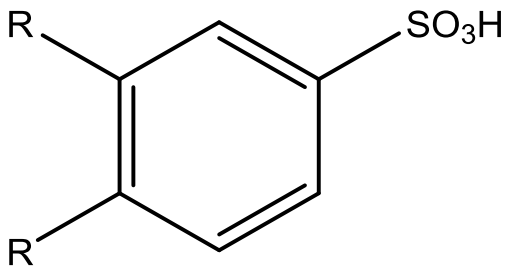
7　分配係数試験

本ルールのポイント

いままで、非解離状態におけるlogPowを測定することが困難なイオン性を有する化合物（カルボン酸、スルホン酸など）は、濃縮度試験が行われていた。

→logD<2.5を蓄積性の指標として用いることにより、濃縮度試験を行わずに蓄積性を判定できる化審法新規化学物質の範囲が広がった。

LogD　適用可能なケース



上記の化合物は、イメージであり、
実際に申請された新規化学物質ではありません。

スルホン酸基を有しているため非解離状態でLogPowを測定することが困難。

LogD測定

試験法：OECDTG 117、HPLC法
解離性：pKa＝2
溶離液：メタノール／水（pH7）
LogD平均：0.8（0.9、0.7）

判定：高濃縮性でない

８　高分子フロースキーム

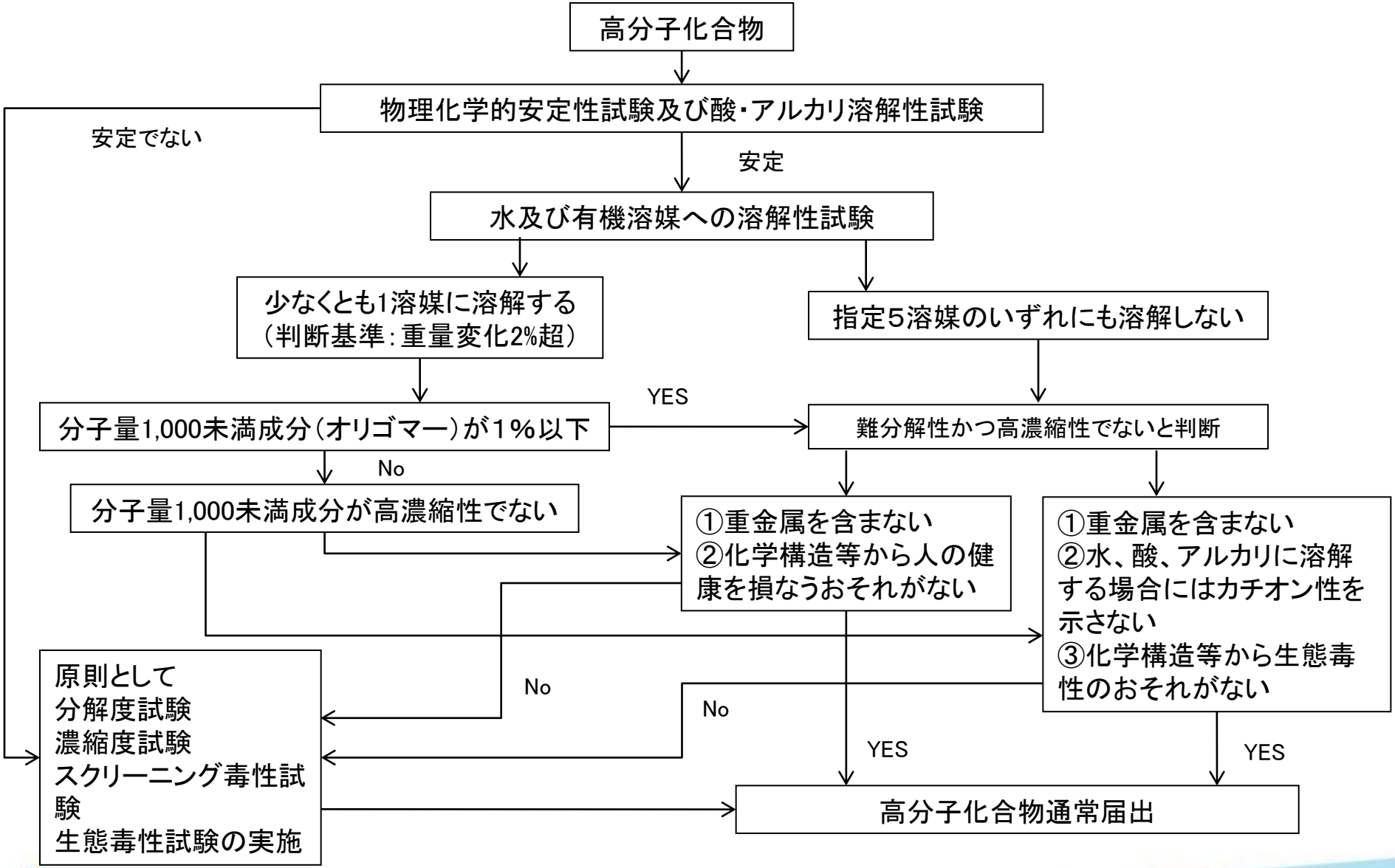
・昭和62年（1987）に制定。
・化審法新規化学物質届出試験の一つ。
・化審法の既知見通知に試験方法が記載されている。
・高分子化合物の安全性を簡易的に評価するために制定された試験。

高分子化合物とは
・1種類以上の単量体単位の連鎖により生成する分子の集合から構成されていること。
・3連鎖以上の分子の合計重量が全体の50%以上を占め、かつ同一分子量の分子の合計重量が全体の50%未満であること。
・数平均分子量が1,000以上であること。

・分子量分布測定、安定性試験及び溶解性試験から構成されており、
生分解性及び濃縮性を簡易的に評価することが可能。
安定性試験・・・自然環境での安定性（分解度試験に相当）
溶解性試験・・・濃縮度試験に相当
分子量分布測定・・・生体膜を通過する低分子量（分子量1,000未満）の成分が1%未満であるかの確認。（溶解性が確認された場合に実施）
※平均分子量が最も小さいものを被験物質とする

・人健康影響及び生態毒性については、
高分子化合物中の官能基及び水溶解性等により判断される。

8　高分子フロースキーム



８　高分子フロースキーム

●物理化学的安定性及び酸・アルカリに対する溶解性試験法

(1)被験物質の粒度
　60メッシュから80メッシュまでを目安とすること。

(2) 試験液のpH
　経済協力開発機構（OECD）における試験法ガイドライン（OECD理事会決定［C(81)30最終別添１］）111「pHの関数としての加水分解」に採用されている
　pH1.2、4.0、7.0及び9.0とする。なお、加水分解が可能な側鎖が存在する場合には
　直接分析等を行い物理化学的安定性を確認すること。

(3) 試験温度　40±２℃

(4) 光　室内光

(5) 空気　試験液をかくはんすることにより空気との接触を図ること。

(6) 試験期間　２週間とすること。ただし、pH1.2については24時間とする。

８　高分子フロースキーム

(7) 被験物質の試験濃度
1,000mg／Lとすること。ただし、被験物質の性質により試験が困難な場合には
試験濃度を100mg／Lから10,000mg／Lまでの範囲において変更することができる。

(8) 連数（繰り返し）　２連

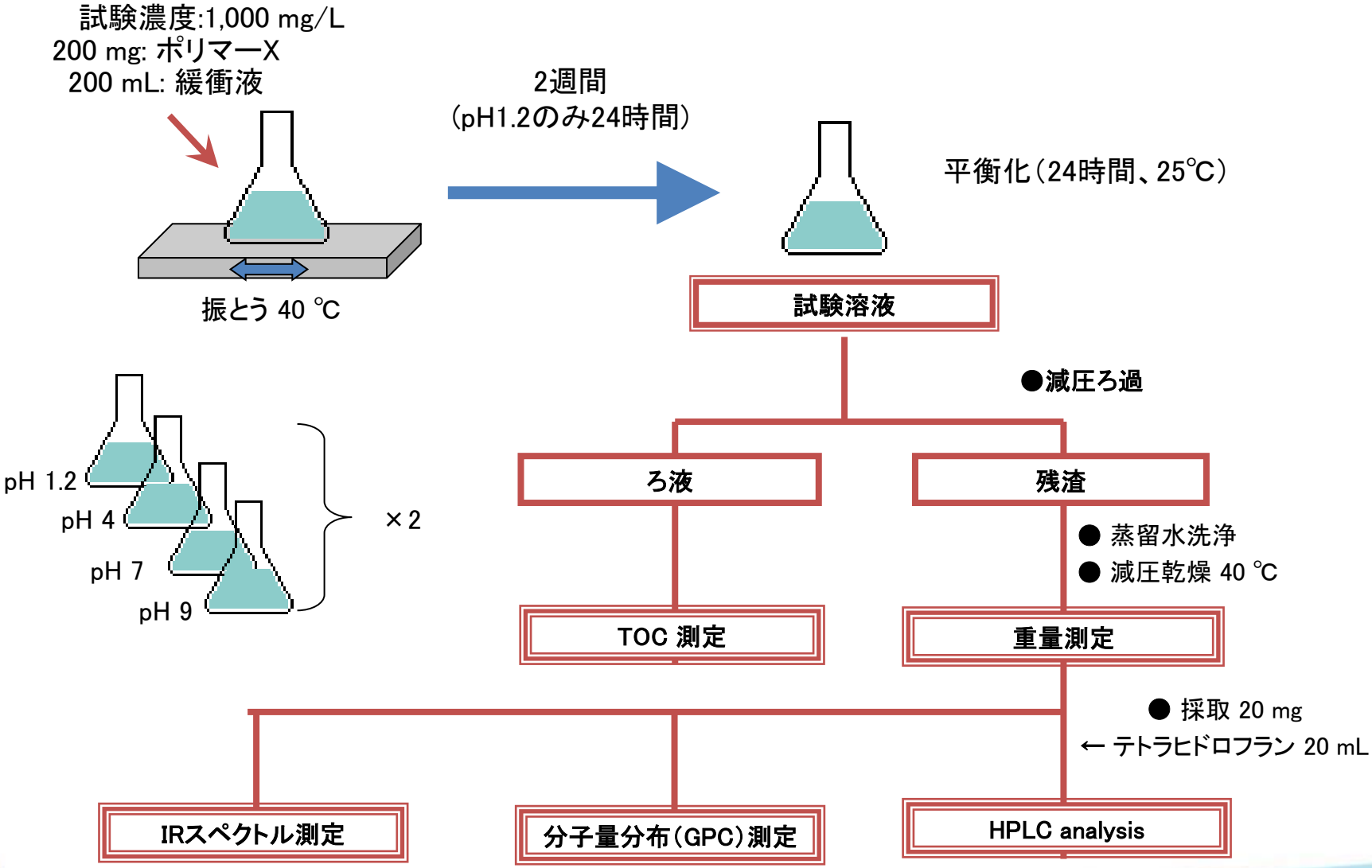
(9) 分析
試験開始時及び終了時に重量、 溶存有機炭素濃度（以下「DOC」という。）、
IRスペクトル、分子量分布について分析し、化学的変化の有無を調べるものとすること。
なお、やむを得ない理由がある場合は、この限りでない。

判定基準

重量：試験前後で2%を超える重量変化がないこと。
DOC：試験前後で5mg/Lを超えるDOC変化がないこと。
IRスペクトル：試験前後でIRスペクトルの変化がないこと。
分子量変化：試験前後で分子量の変化がないこと。

8　高分子フロースキーム

●物理化学的安定性及び酸・アルカリに対する溶解性試験法



８　高分子フロースキーム

●水及び有機溶媒に対する溶解性試験法

(1)試験溶媒
　① 水
　② ｎ－オクタノール及びｎ－ヘプタン（脂肪への親和性の指標）
　③ テトラヒドロフラン（以下「THF」という。）及びジメチルホルムアミド（以下「DMF」という。）
　(注)DMFに代えて、ジメチルスルホキシド（以下「DMSO」という。）又は
　　１－メチル－２－ピロリドン（以下「NMP」という。）を使用することができる。

(2)試験温度　35℃から40℃までとすること。

(3) 試験時間　１時間かくはんすること。

(4) 平衡　25±２℃にて24時間平衡状態を保つこと。

(5) 被験物質の試験濃度　2,000mg／L

(6) 粒度　60メッシュから80メッシュまでを目安とすること。

(7) 連数（繰り返し）　２連

8　高分子フロースキーム

(8) かくはん
溶媒との接触を図るため、緩やかに常時かくはん又は振とうを行うものとすること。

(9) 分析
試験液をフィルターでろ過した後、残試料を恒量化して重量変化を調べる。
膨潤や容器への付着等の被験物質の性質によりろ過法が使用できない場合には、
他の方法により残試料と試験液を分離することができる。
残試料の重量分析が困難な場合には、分離した試験液を乾固して溶解した分の
重量分析を行うことができる。水についてはDOCの分析を併せて行う。

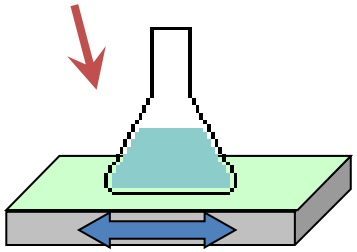
(10) 溶解性の判断
不溶については、原則として水及び4種類の有機溶媒に対して不溶であることを
確認すること。また、水及び4種類の有機溶媒のうち1種に溶解したと判断される場合は、
少なくとも水に対する溶解性データを備えること。

判定基準

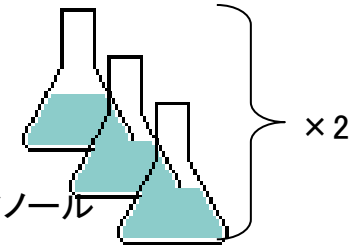
重量：試験前後で2%を超える重量変化がないこと。
　　2%を超えた場合は、分子量1,000未満成分の含有率の測定が必要。

8　高分子フロースキーム

試験濃度:2,000 mg/L
400 mg ポリマー X
200 mL 溶媒 又は 水

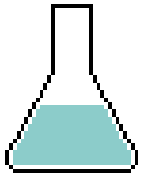


振とう（35−40 ℃）

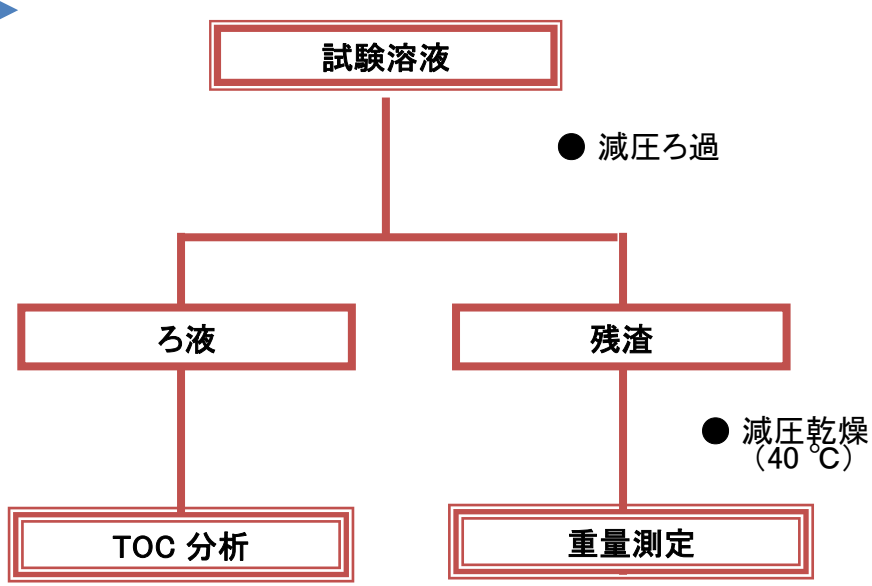


テトラヒドロフラン/ジメチルホルムアミド

1 時間



平衡化（ 24時間、25 ℃）



8　高分子フロースキーム

●分子量分布測定

(1)溶離液

溶離液は次のいずれかの汎用の溶離液とする。被験物質が汎用の溶離液に溶解しない場合には、可能な限り②の特殊な溶離液についても検討する。

日本工業規格（JIS K 7252）に定める温度で溶解しない場合はo－ジクロロベンゼン（以下「ODCB」という。）、トルエン、DMF又は水を用いて加熱溶解試験を行うことができる。

① 汎用の溶離液　THF、クロロホルム、ジクロロメタン、DMF、水（緩衝液も含む）等

② 特殊な溶離液　1，1，1，3，3，3－ヘキサフルオロ－2－プロパノール（HFIP）、1，2，4－トリクロロベンゼン（TCB）、ODCB、トルエン、1，2－ジクロロエタン、NMP、m－クレゾール、ベンゼン、DMSO、テトラクロロエチレン、2－クロロフェノール、トリフルオロエタノール等

(2)分子量換算方法　被験物質に応じて次の方法から選択すること。

① 単分散分子量標準試料を用いる方法
（標準試料として、ポリエチレンオキサイド、ポリスチレン等を用いること。）

② 多分散分子量標準試料を用いる方法
数平均、重量平均又はZ平均分子量が絶対法（膜浸透圧法、光散乱法、超遠心法等）で測定されたもののうち1～2種を用いること。

③ 伸長鎖長による方法

④ 流体力学的容積による方法

⑤ SEC－粘度検出器法

⑥ SEC－LS法

8　高分子フロースキーム

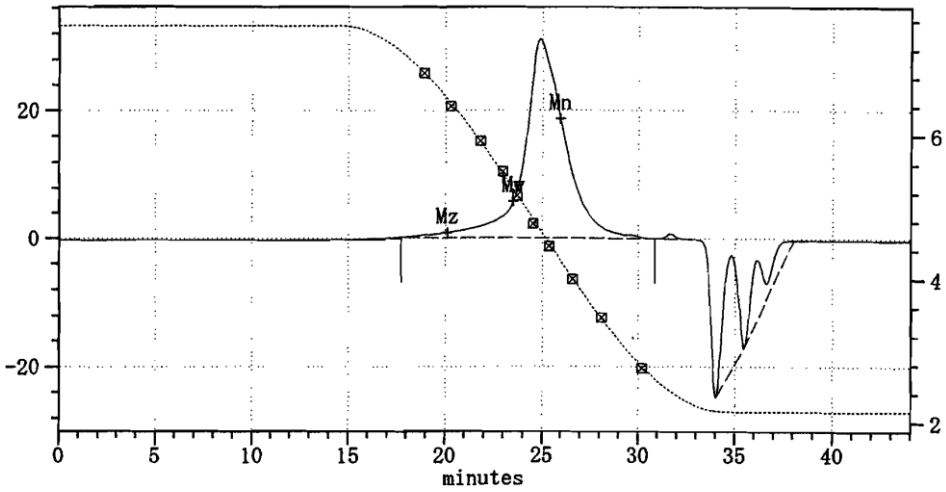
(3) 安定性　ベースラインが直線的であること。
(4) 検出器応答感度
応答感度の分子量依存性がないこと(依存性がある場合は補正する)。
(5) 分離
高分子化合物のピークに他のピーク(添加物、溶媒中の不純物等)が重ならないようにすること。ただし、ピークの分離が技術的に困難な場合であって、単量体及びオリゴマーを含む全分子量領域に相当する点までを分子量の計算範囲とするときは、この限りでない。この場合において、ピークが明確に添加物又は溶媒中の不純物等によるものと識別できる場合は、当該ピークを除外して計算することができる。
(6) 低分子領域のベースラインの引き方
ベースラインの安定性がよい2枚のチャートについて計算し、平均値を求めること。
(7) データ処理
SEC法及びその他の測定方法により得られたデータから数平均分子量(Mn)、重量平均分子量(Mw)、Z平均分子量(Mz)、分散度(Mw／Mn)及び分子量1,000未満成分の含有率を求めること。

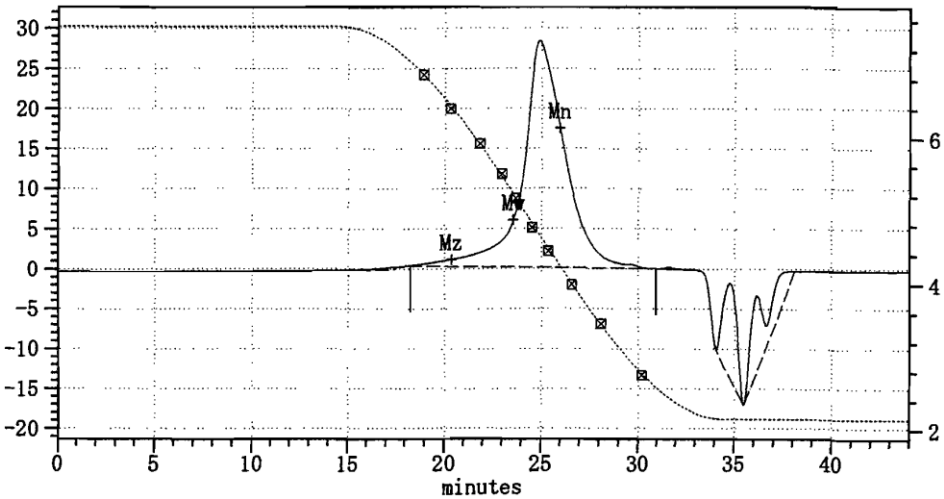
判定基準

分子量1,000未満成分：1%以下であること。
1%を超えた場合は、生体内に蓄積されやすいものでないことが示唆されるものであること。→原則、分子量1,000未満成分について濃縮度試験の実施。

8　高分子フロースキーム

●ゲル浸透クロマトグラフ（GPC）測定結果のチャート及び算出結果の例





数平均分子量(Mn)	1.76×10^4 , 1.77×10^4
重量平均分子量(Mw)	1.62×10^5 , 1.63×10^5
分子量1,000未満成分含有率 (%)	0.578 , 0.531

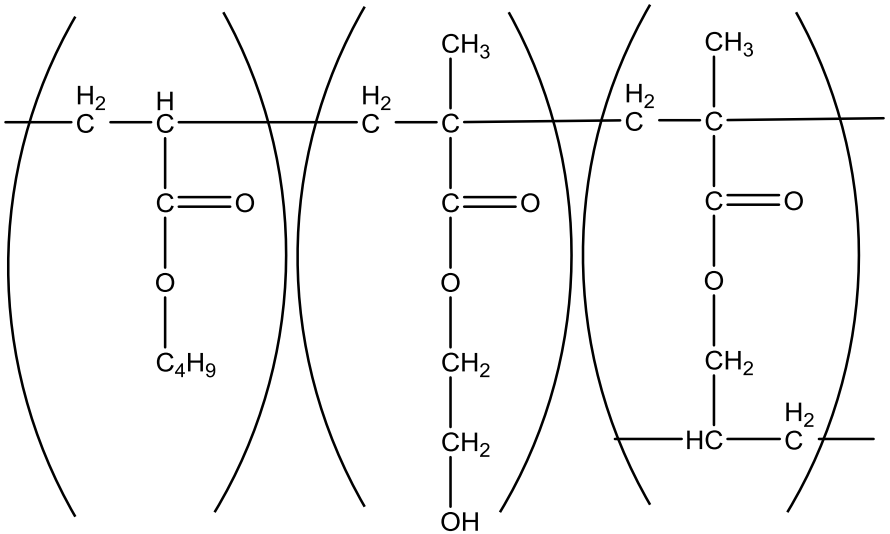
分子量1,000未満成分が1%以下である

８　高分子フロースキーム

●ケース１（溶媒に不溶なポリマー）

ポリマーAはpH1.2、4、7、9で安定であった
重量変化　2%以下
DOC変化　5ppm以下
IRスペクトル　顕著な変化は認められなかった
溶解性試験　水、ｎ－オクタノール、ｎ－ヘプタン、THF 、DMFに溶解しなかった
分子量分布　溶媒に溶解しないため、測定不要

例



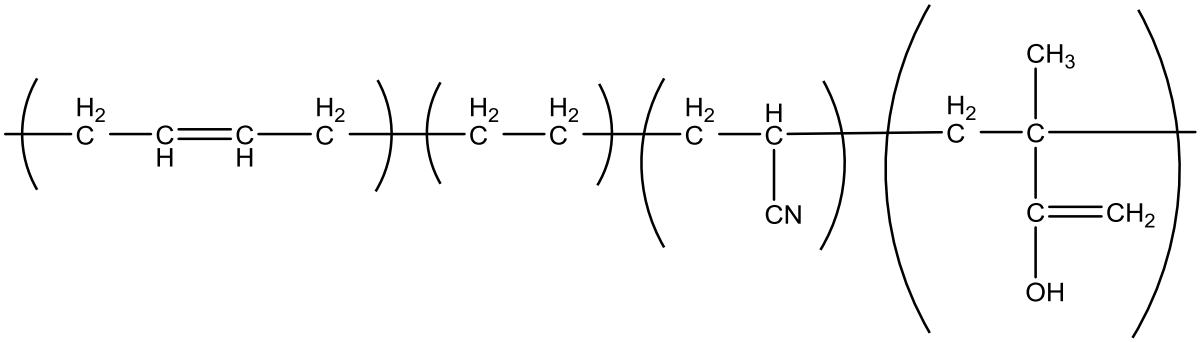
官報公示整理番号　6-2117
官報公示名称　アリル＝メタクリラート・ブチル＝アクリラート・２－ヒドロキシエチル＝メタクリラート共重合物
（数平均分子量が1，000以上であり水、脂溶性溶媒、汎用溶媒、酸及びアルカリに不溶であるものに限る。）

８　高分子フロースキーム

●ケース２（溶媒に溶解するポリマー）

ポリマーBはpH1.2、4、7、9で安定であった
重量変化　2%以下
DOC変化　5ppm以下
IRスペクトル　顕著な変化は認められなかった
分子量分布　顕著な変化は認められなかった
溶解性試験　水には不溶であったが、THFに2%以上溶解した
分子量1,000未満成分の含有率が1%以下であった

例



官報公示整理番号　6-2120
官報公示名称　アクリロニトリル・１，３－ブタジエン・メタクリル酸共重合物の部分水素添加物
（水、酸及びアルカリに不溶であり分子量１，０００未満の成分の含有率が１％以下であるものに限る。）

８　高分子フロースキーム

●ケース３（溶媒に溶解するポリマーであって、分子量1,000未満成分が1%を超える場合）

ポリマーCはpH1.2、4、7、9で安定であった
重量変化　2%以下
DOC変化　5ppm以下
IRスペクトル　顕著な変化は認められなかった
分子量分布　顕著な変化は認められなかった
溶解性試験　水には不溶であったが、THFに2%以上溶解した
分子量1,000未満成分の含有率が1.5%であった
濃縮度試験　分子量1,000未満成分の蓄積性が高濃縮性でない

●ケース４（溶媒に溶解性するポリマーであって、緩衝塩と反応を起こす場合）

ポリマーDはpH1.2、4、7、9で安定であった
重量変化　2%以下
DOC変化　5ppm以下
IRスペクトル　pH9.0において新たなピークが認められたが、
塩酸洗浄により緩衝塩が解離し、ピークは消失した
分子量分布　顕著な変化は認められなかった
溶解性試験　水には不溶であったが、THFに2%以上溶解した
分子量1,000未満成分の含有率が1%以下であった

9　判定結果の公表

名称が公示された新規化学物質の判定結果一覧を経済産業省のHPから公表してます。また、J-CHECKから新規化学物質の審査シートを公表してます。

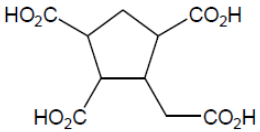
平成27年7月30日付けの厚生労働省・経済産業省・環境省告示第四号によって名称を公示した化学物質について、その判定結果（分解性及び蓄積性）を以下の通り公表します。

通し番号	官報整理番号	判定結果	
		分解性	蓄積性
7052	(4)－1963	難分解性	高濃縮性でない
7053	(3)－4645	難分解性	高濃縮性でない
7054	(7)－3307	難分解性	高濃縮性でない
7055	(7)－3308	難分解性	高濃縮性でない
7056	(6)－3369	難分解性	高濃縮性でない
7057	(6)－3370	難分解性	高濃縮性でない
7058	(6)－3371	難分解性	高濃縮性でない
7059	(7)－3309	難分解性	高濃縮性でない
7060	(6)－3372	難分解性	高濃縮性でない
7061	(6)－3373	難分解性	高濃縮性でない
7062	(7)－3310	難分解性	高濃縮性でない
7063	(6)－3374	難分解性	高濃縮性でない
7064	(7)－3311	難分解性	高濃縮性でない
7065	(6)－3375	難分解性	高濃縮性でない
7066	(7)－3312	難分解性	高濃縮性でない
7067	(7)－3313	難分解性	高濃縮性でない
7068	(7)－3314	難分解性	高濃縮性でない
7069	(6)－3376	難分解性	高濃縮性でない
7070	(7)－3315	難分解性	高濃縮性でない
7071	(6)－3377	難分解性	高濃縮性でない

経済産業省のHP

http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/kasinhou/information/bulletin_shiro.html

新規化学物質審査シート

官報公示整理番号	3-4645
判定結果	人健康影響　第二種監視化学物質相当でない 生 態 影 響　第三種監視化学物質相当でない
名称 構造式等	名　称：３－（カルボキシメチル）シクロペンタン－１，２，４－トリカルボン酸 
溶解度	水：≦6.8×10⁵ mg/L アセトン：8.0×10⁴mg/L DMSO：1.7×10⁵ mg/L
分解性	**難分解性** 分解度試験（化審法テストガイドライン、OECD テストガイドライン 301C：28 日間） ＢＯＤによる平均分解度：０％（-5, -2, -5）（基礎呼吸区 3.7 mg、汚泥区平均 2.5 mg） ＤＯＣによる平均分解度：１％（1, -3, 1） HPLC による平均分解度：０％（0, -1, 0） pH 調整：有
蓄積性	**高濃縮性でない** 分配係数試験（OECDテストガイドライン107、フラスコ振とう法） 解離性：有（pKa_1=3.26） 溶離液：pH 2.2 温　度：23±1 ℃ 試験条件１　LogPow：-0.752（-0.735、-0.769） 試験条件２　LogPow：-0.826（-0.836、-0.816） 試験条件３　LogPow：-0.990（-0.965、-1.014） 全 平 均　LogPow：-0.86

J-CHECK

http://www.safe.nite.go.jp/jcheck/search.action?request_locale=ja

御清聴ありがとうございました。