

(試験手順例)

ミジンコ急性遊泳阻害試験  
(平成15年11月版)



## はじめに

本書は平成16年4月1日より施行される「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）」改正法に基づく新規化学物質の届出に際して、試験データが要求される「ミジンコ急性遊泳阻害試験」について、推奨種であるオオミジンコ (*Daphnia magna*) を用いた際の標準的な試験手順例をまとめたものである。

ミジンコ急性遊泳阻害試験は、ミジンコを被験物質に48時間暴露し、遊泳阻害率を測定し、対照区の遊泳阻害率と比較することにより、ミジンコに対する被験物質の毒性を明らかにすることを目的とする。本試験において、遊泳阻害とは、試験容器をゆっくりと動かして刺激を加えた後も、ミジンコが15秒間に一度も泳がない状態をいう。

なお、本手順例は平成15年11月時点の情報に基づいてまとめたものであり、今後新たな知見が得られた場合には適宜見直しを行っていく性格のものである。



## 目次

第1節	被験物質の情報	1
1.1	名称、構造式および物理化学的性状	1
1.2	被験物質の保管方法および保管条件下での安定性	1
	(1) 保管方法	1
	(2) 被験物質の確認および保管条件下の安定性	1
第2節	試験生物	2
2.1	試験種	2
2.2	提供機関	2
2.3	試験に用いる幼体を得るための飼育方法	2
2.4	試験系の再現性	3
第3節	試験の準備	4
3.1	試験器具	4
	(1) 主な器具	4
	(2) 器具の素材・容量	4
	(3) ガラス器具の洗浄	4
3.2	試験機器	5
3.3	試験用水	6
第4節	試験溶液の調製と試験濃度の設定	6
4.1	試験溶液の調製	6
	(1) 試験用水に対する溶解性	6
	(2) 試験溶液調製法の決定	6
4.2	試験濃度の設定	7
	(1) 対照区・助剤対照区の設定	7
	(2) 予備試験	7
	(3) 試験濃度の設定	7
	(4) 記録	8
4.3	分散系での試験	8
第5節	試験条件	8
第6節	観察	9
第7節	被験物質濃度等の測定	9
7.1	被験物質濃度の測定	9
7.2	試験環境の測定	10
第8節	試験の有効性	10
第9節	試験結果の算出	10
9.1	毒性値の算出に用いる個別データの取り扱い	10
9.2	50%遊泳阻害濃度 (EC <sub>50</sub> ) の算出	10
(参考)	被験物質実測濃度の平均値の算出について	12
	(1) 止水式試験の場合	12
	(2) 半止水式試験の場合	12
	(3) 流水式試験の場合	12

文献・資料.....	13
(1) 基本とした資料.....	13
(2) 引用文献.....	13
(3) 参考文献・資料.....	13
別添 飼育水（人工調製水）の調製方法と試験用水の化学的條件.....	14
参考資料 試験結果のとりまとめに必要な表の例.....	17

## 第1節 被験物質の情報

### 1.1 名称、構造式および物理化学的性状

試験の実施方法を検討する上で参考とするため、以下に示す項目の情報をできるだけ集める。対水溶解度や蒸気圧の情報は試験溶液の調製や試験容器の選択といった試験実施の基礎的な部分に深く関係するので、重要である。

- ・新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)
- ・別名
- ・CAS 番号
- ・構造式又は示性式 (いずれも不明な場合は、その製法の概要)
- ・分子量
- ・試験に供した新規化学物質の純度 (%)
- ・試験に供した新規化学物質のロット番号
- ・不純物の名称及び含有率
- ・蒸気圧
- ・対水溶解度
- ・1-オクタール/水分配係数
- ・融点
- ・沸点
- ・常温における性状
- ・安定性
- ・溶媒に対する溶解度等

(留意点)

- ・出典 (供給者提供資料、文献名等) を明らかにすること。
- ・試験実施機関による測定値の場合は簡単な測定条件等 (対水溶解度の場合: 20℃、48 時間攪拌、HPLC 分析または目視判定等) を明らかにすること。

### 1.2 被験物質の保管方法および保管条件下での安定性

#### (1) 保管方法

被験物質の性状に合わせ保管する。必要に応じ、遮光保管または冷蔵庫、冷凍庫に保管する。

#### (2) 被験物質の確認および保管条件下の安定性

入手した被験物質についてスペクトル (赤外吸収スペクトル、マススペクトル、NMR スペクトル等) を測定し、被験物質の特性が認められることを確認する。試験終了時にも同様にスペクトルを測定し、試験開始前に測定したスペクトルとの比較により、保管時の安定性を確認する。

## 第2節 試験生物

### 2.1 試験種

試験には、オオミジンコ (*Daphnia magna*) の雌の幼体 (ふ化後 24 時間齢以内) を用いる。

本種は成体では体長 3mm を超し、植物食性のミジンコ属の中では最も大型の種類とされている<sup>1)</sup> (写真 2.1)。本種は池や小さな湖に生息するが、わが国には分布していない。大型で飼育しやすく、無脊椎動物の中では比較的毒性物質に敏感なことから、毒性試験の標準生物として各国で用いられている<sup>1)</sup>。

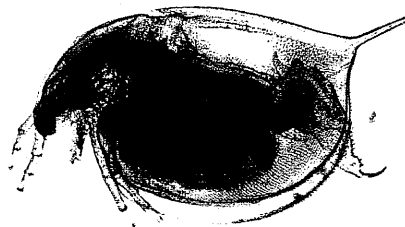


写真 2.1 *Daphnia magna* Straus

### 2.2 提供機関

*Daphnia magna* は現在世界各国の大学や試験機関に保存されている。

本種は、独立行政法人国立環境研究所より入手できる。なお、国立環境研究所より提供する *D. magna* は、US-EPA 起源の系統で継代飼育しているものである。

独立行政法人 国立環境研究所 環境研究基盤技術ラボラトリー

〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2

電話 : 029-850-2458 FAX : 029-850-2920

### 2.3 試験に用いる幼体を得るための飼育方法

各試験機関で飼育中のものから育房内に卵を抱えた肉眼的に健康かつ十分な大きさの雌成体を選別し、別に用意したビーカーに移す。翌日、産まれた幼体を供試ミジンコの親とし、次頁の条件で 2～4 週間飼育する。成熟し幼体を産むようになったら 1 週間に少なくとも 2 回以上幼体を除去する。2～4 週間後、暴露開始前日に育房内に卵を持つ雌成体を選別し、翌日 (24 時間以内)、孵化した幼体を試験に用いる。ただ



し、死亡個体の多いバッチ、休眠卵や雄が生じたバッチ、及び1回目の産仔までの期間の遅れ、体の変色等の飼育時に何らかのストレスを受けた兆候のあるミジンコは使用しない。また、初産幼体の使用は避けるよう努力する（通常、2週間飼育すれば3回は産仔するので初産幼体が含まれることは少ない）。同一の試験においては全て同じ系統のものをを用いる。親世代の飼育法、状態や日齢を報告書に記載する。

飼育条件は以下のとおり。

- ・飼育水：試験用水（3.3 参照）。試験に用いる試験用水で飼育する。
- ・飼育密度：10～50 頭/L 飼育水（ただし、成熟個体の場合は、25 頭以下/L とする）
- ・水温：18～22±1℃
- ・照明：室内光、16 時間明/8 時間暗
- ・餌：単細胞緑藻類（例：Chlorella.sp）。ただし、生きた藻類で藻類培養液を遠心操作により、飼育水に置換して用いる
- ・給餌量：目安としてミジンコ 1 頭当たり藻類を 0.1-0.2 mgC（有機炭素含量）/日（じゅん化時の飼育密度、成長度や繁殖量により前後する場合もある）。
- ・容器：500～1000mL のガラス製のビーカーを用い、試験容器と同様にゴミの混入等を防止するため、ラップ等により蓋をする。

## 2.4 試験系の再現性

定期的に（少なくとも、6ヶ月毎）基準物質（例：重クロム酸カリウム、試薬特級）に対する急性遊泳阻害試験を行う。試験結果は、試験系の再現性（ミジンコの感受性および試験系の安定性）についての検討に用いるとともに被験物質の試験報告の際に直近のデータを併せて記載する。表 2.1 に、参考として、環境省の生態影響試験委託事業における基準物質（重クロム酸カリウム）のミジンコに対する毒性値の例を示した。

表 2.1 重クロム酸カリウム（無水）に対するオオミジンコの急性遊泳阻害試験結果

機関	ミジンコ 48hr-EC <sub>50</sub> (mg/L) 重クロム酸カリウム(二クロム酸カリウム)				備考
	AVE	MIN	MAX	標準偏差	
A	0.75	0.57	1.02	0.166	n=11 (脱塩素水)
B	0.230	0.128	0.316	0.058	n=42 (M4)
C	0.58	0.32	0.94	0.169	n=10 (脱塩素水)
D	0.55	0.28	0.77	0.14	n=26 (脱塩素水)

資料) 環境省環境保健部環境リスク評価室より

## 第3節 試験の準備

### 3.1 試験器具

#### (1) 主な器具

試験に必要な主な器具を以下に示した。

- ・ビーカー
- ・メスフラスコ
- ・メスシリンダー
- ・ピペット
- ・マイクロピペット
- ・メンブレンフィルター（孔径：0.45  $\mu\text{m}$ 、0.22  $\mu\text{m}$ ）
- ・分注器

等

#### (2) 器具の素材・容量

試験や飼育に用いる器具（試験容器、ピペット、メスシリンダー等）等の試験溶液と接触する器具はすべてガラス製又は化学的に不活性な材質（例えば、フッ素樹脂製）のものを用いる。

試験容器は、通常 100mL 程度のビーカー等を用い、ゴミの混入や試験溶液の蒸散を防ぐため、蓋をする。また、被験物質が揮散しやすい物質の場合は、蓋付きの密閉容器を用いるなど、密閉系で試験を行う。溶存酸素濃度が低下する場合は十分な大きさの試験容器を用いる。試験に用いる試験液量について局長通知（平成 15 年 11 月 21 日付薬食発第 1121002 号、平成 15・11・13 製局第 2 号、環保企発第 031121002 号）では 1 頭当たり少なくとも 2mL の試験溶液を用いるとなっているが、ASTM の標準ガイド<sup>2)</sup>では、試験容器の大きさについて水平方向と深さは試験生物の 3 倍以上の容器が用いるべきで、試験溶液は少なくとも 50mm の深さが必要としている。

混入

#### (3) ガラス器具の洗浄

ビーカー、ピペット、シリンダー等、被験物質等がふれたガラス器具は洗浄する必要がある。ガラス容器の洗浄は次の点に留意して行う。なお、ミジンコや魚類等の試験法を対象とした ASTM 標準ガイド<sup>2)</sup>の例もあり、その内容も併せて示した。

他の材質の器具についても適切な手法で洗浄を行う。

##### ① ガラス器具を洗浄するための留意点

- ・無リン洗剤で洗浄
- ・剛毛ブラシを使って、ガラス製品の内壁に付いた物質を除去する
- ・水道水で十分すすぎ、適切な方法（例えば、金属やアルカリを取り除くために酸を用いる、あるいは有機化合物には有機溶媒を用いる）で洗浄する

- ・残っている被験物質を剛毛ブラシに無リン洗剤で洗い、最後に蒸留水、超純水または脱イオン水等で十分すすぐ
- ・ゴミの混入しない場所に保管する

## ② ASTM 標準ガイド<sup>2)</sup>

計測器、試験容器、ならびに原液や試験液の調製・保存等に用いた器具は、使用前に洗浄する。新品の器具は洗剤で洗った後、水→水混和性有機溶剤→水→酸（10%塩酸等）の順ですすぎ、更に脱イオン水・蒸留水・試験用水のいずれかで2回以上すすぐ。重クロム硫酸洗浄液は、有機溶剤及び酸のかわりに使用できるが、シリコーン接着剤を腐食させる。再度使用する器具は、試験が終了した直後に、以下の手順で洗浄する。

- ・容器を空にする。
- ・水ですすぎ。
- ・試験物質を取り除くのにふさわしい方法で洗浄する。（例えば金属やアルカリを酸で取り除く、有機化学物質を洗剤、有機溶媒、又は活性炭で取り除く）
- ・脱イオン水・蒸留水・希釈水のいずれかで2回以上すすぐ。

酸はしばしば水アカを取り除くのに使われる。200mg/Lの次亜塩素酸( $\text{ClO}^-$ )水溶液は有機物の除去や消毒に用いられる。（200mg/Lの次亜塩素酸水溶液は、6mLの家庭用液体塩素を1Lの水に加えて調製できる。しかし、次亜塩素酸は多くの水生生物に対して非常に有毒であり、容器などの素材の中には一度付着した場合に、除去が容易でないものもある。次亜塩素酸の除去には、チオ硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、又は亜硫酸水素ナトリウムに浸したり、蒸留水で20分間オートクレーブ処理をしたり、または洗浄もしくは消毒後使用するまで24時間以上放置することが有効である。次亜塩素酸塩を用いて洗浄・殺菌した機材は、餌を与えていない感受性の高い水生生物を用いた試験を最低1回行い、変色、異常行動、死亡等の影響が見られないことを証明できない限り使用してはならない。試験は48時間の止水式で次亜塩素酸を用いた器具と用いていない器具に希釈水を入れて行う。）計測器及び試験容器は使用する直前に希釈水ですすぎ。

## 3.2 試験機器

試験に必要な主な機器を以下に示した。

- ①飼育・試験関連装置：温度（ $\pm 1^\circ\text{C}$ 以下）、照明条件を一定に維持できる恒温室あるいは恒温槽（インキュベーター、ウォーターバス等）、エアポンプ（汚染された空気が流入しないように工夫すること）等
- ②試験用水、溶液の調製関連装置：化学天秤、オートクレーブ、スターラー、超音波洗浄機等

- ③環境測定装置：水温計、溶存酸素計（試験に適した機器）、pH計測器、温度管理に適切な器具等

### 3.3 試験用水

ミジンコの飼育及び試験に適した水ならば、天然水（表流水又は地下水）、脱塩素した水道水（水道水を活性炭処理し、残留塩素等を除去したもので、十分通気したもの）又は人工調製水（別添1項）のいずれを用いてもよい。また、試験用水は別添2項に示した条件を満たすものとする。脱塩素水道水を用いる場合は使用時に残留塩素の有無を確認する。人工調製水を使用する場合、その調製には特級又は分析用の試薬を用い、調製に用いる蒸留水又は脱イオン水の電気伝導度は $10\mu\text{S}/\text{cm}$ 以下とする。用いた試験用水に関しては、水道水及び天然水の場合は入手先及び前処理法を、人工調製水の場合は、組成を明記する。

ElendtM4、M7飼育水のようなキレート剤が含まれているものは、金属を含む物質の試験には使用しない。硬度は炭酸カルシウム濃度で $250\text{mg}/\text{L}$ 以下とし、pHは6~9とする。

人工調製水以外の試験用水を用いた場合は、試験用水の水質（例：水産用水基準に準じた測定項目等）を定期的に（少なくとも半年に1回）測定する（設備等の変更があった場合や水質の変化があった場合などは適宜測定する）。測定した結果は、報告書の付属資料などに記載する。

## 第4節 試験溶液の調製と試験濃度の設定

### 4.1 試験溶液の調製

#### (1) 試験用水に対する溶解性

被験物質の対水溶解度値を参考にしつつ、試験用水に対する溶解性を確認する。溶解性の判定は、 $100\text{mg}/\text{L}$ 以上であれば目視にて可とし、 $100\text{mg}/\text{L}$ 以下の場合は化学分析により溶解限度を求めておく。測定方法は、例えばフラスコ攪拌法とする。測定温度は試験温度とし、48時間攪拌後、静置し、上清液を遠心分離等によって不溶物を除去した後分析する。

#### (2) 試験溶液調製法の決定

試験溶液調製法は以下の事項を考慮して決定する。

- 試験濃度は原則として試験溶液に対する溶解限度以下に設定することとするが、 $100\text{mg}/\text{L}$ 以上の濃度で試験を行う必要はない。
- 試験溶液は、被験物質が水溶性の場合は、試験用水に溶解した濃厚な被験物質溶液

(原液)を試験用水と混合することにより、設定濃度の試験溶液を必要量調製する。

○被験物質が難水溶性の場合で、試験用水に添加し、機械的(攪拌、超音波処理等)に溶解させることが困難な場合や秤量等が困難な場合は、助剤としてジメチルホルムアミド、トリエチレングリコール、メタノール、アセトン、エタノール、メチルセロソルブ等の試験種に対する毒性が低く、被験物質の対水溶解度を増すことのない有機溶剤を必要最少量使用して原液を調製し、試験用水と混合することにより試験溶液を調製してもよい。なお、助剤濃度は最高でも100mg/L又は0.1mL/Lとし、各試験濃度区で一定濃度とする。

○暴露期間中における濃度維持の方法について検討する。

- ・吸着性のある被験物質の場合：物質が吸着しにくく、試験に影響を及ぼさない素材の試験容器を検討する。
- ・揮発性のある被験物質の場合：揮発による物質の消失を防ぐため、密閉系(完全密栓容器)での試験を検討する。

○なお、揮散性が疑われる場合は、気相部分を極力少なくして原液の調製や保管を行う。

## 4.2 試験濃度の設定

### (1) 対照区・助剤対照区の設定

対照区には被験物質を加えない試験用水を用いることとするが、試験溶液の調製に助剤を使用した場合には、対照区に加え、試験溶液の調製に用いた濃度と同じ濃度の助剤対照区を設ける。

### (2) 予備試験

本試験の実施に先立ち、第5節以下を参考に、公比10以下で原則として3~6段階の試験濃度区を設定した予備試験を行い、本試験に適切な濃度段階を決定する。EC<sub>50</sub>が試験上限濃度(100mg/L)又は試験溶液調製可能な最高濃度以上と予想される場合、予備試験はこの1濃度で行う場合もある。予備試験では連数を1~3連とし、48時間後に(必要に応じて24時間後も)遊泳阻害数を測定する。また、溶存酸素とpHも測定する。

### (3) 試験濃度の設定

本試験での濃度は、予備試験での48時間-EC<sub>50</sub>を含み、公比を原則1.3~2.2(50%阻害濃度近辺で公比を狭めるなどの変則公比を採用する場合もある)程度にとり、等比級数的に5段階以上の濃度を設定する。その際、可能な限り、ミジンコの遊泳を完全に阻害する濃度と、全く阻害しない濃度が各々1濃度、一部阻害する濃度が3濃度

含まれ、その内1つの濃度では阻害率50%程度となるようにする。予備試験の結果、試験上限濃度(100mg/L)又は試験溶液の調製可能な最高濃度で影響が認められなかった場合は、本試験ではその濃度のみの限度試験とするが、暴露終了時に遊泳阻害率が10%を超える場合、正規の試験を行う。限度試験である場合は、報告書に明記する。

#### (4) 記録

試験溶液の調製法及び調製後の状態(外観等)を記録しておく。また、原液について、使用時調製か保存原液かの別を記録し、保存原液を使用した場合には保存条件及び保存条件下での安定性についても記録する。

#### 4.3 分散系での試験

上記4.1で、溶解限度測定のために作成した飽和溶液中の被験物質の濃度が検出限界値未満であった場合で、予備試験の結果等から当該飽和溶液より低い濃度では $EC_{50}$ が得られないことが予想された場合には、そもそも被験物質が溶解しているものと判断することができないことから、分散系で試験を行う。試験濃度は分散可能な上限の濃度とするが、100mg/L以上の濃度で試験を行う必要はない。被験物質は、超音波や有機溶剤に溶かした濃厚原液を用いて分散させることとするが、被験物質が分散剤や乳化剤とともに使用されるものである場合には、助剤としてクレモフォールRH40、0.01%メチルセルロース、HCO-40等の試験種に対する毒性が低く、被験物質の対水溶解度を増すことのない分散剤を必要最小量使用して試験溶液を調製してもよい。なお、作成した飽和溶液中の被験物質の濃度が検出限界未満の場合であっても、当該飽和溶液より低い濃度で毒性が発現する場合には、被験物質は試験用水に溶解しているものとみなすことができる。

#### 第5節 試験条件

以下の条件で試験を行う。

- ・試験方式：試験は、止水式、半止水式又は流水式のいずれで行ってもよいが、被験物質の濃度が安定しない際には半止水式又は流水式で行うことが望ましい。可能な限り被験物質濃度が設定の±20%以内となるように努力する。
- ・暴露期間：48時間とする。
- ・連数：4以上(容器/1試験濃度区)
- ・試験生物数：20頭/試験濃度区(5頭/容器)
- ・試験温度：18~22℃の範囲で、例えば20℃一定に設定し、経時的および各試験容器間の変動は±1.0℃以内とする。
- ・溶存酸素濃度：使用する試験用水十分通気を行ったものを使用し、暴露期間中は通

気は行わない。暴露期間中の試験溶液の溶存酸素濃度は 3mg/L 以上を維持する。通常は飽和濃度の 60% 以上 (約 5mg/L 以上) となるが 60% 未満となった場合は報告書に理由を記載する。被験物質の影響などやむを得ない理由がある場合は、換水又はゆるやかな通気を行う。ただし、試験期間中の通気はミジンコの遊泳に影響を与える可能性があるため、行う場合には遊泳に影響を与えないよう必要最低限で行う。

- ・ pH：試験溶液の pH 調整は行わない。暴露期間中の pH は 6~9 とし、変動は 1.5 以内とする。pH が 6~9 の範囲でない場合、被験物質に起因するものであれば、この限りではないが、pH を被験物質添加前の試験用水の pH に調整して追加試験を行い、報告書にその理由を記載する。また、pH の変動が遊泳阻害の原因と予測される場合は、pH を中性に調整した追加試験を実施する。pH の調整は被験物質の濃度変化がなく、被験物質の化学反応又は沈殿が起こらないような方法で行い、塩酸又は水酸化ナトリウムを用いることが望ましい。
- ・ 照明：室内光、16 時間明/8 時間暗。光の強さと質は特に規定しない。通常の実験室の照明条件でよい。なお、被験物質が光に対して不安定な場合は暗条件でもよい。
- ・ 給餌：無給餌

## 第 6 節 観察

試験液の水温、溶存酸素濃度、pH、硬度を測定後、供試ミジンコを投入し、その時点を暴露開始時とする。先端が比較的広口のガラスピペットを用いて供試ミジンコを投入する。その際、試験液量に対して、ピペット内の飼育水は全量で 1% 以内を目安とする。

暴露開始後少なくとも 24、48 時間後にミジンコの遊泳阻害を観察する。この手順例では、「遊泳」をオオミジンコが第二触覚を使い、水中で自分の体を動かす、もしくは自立的に移動することをいい、遊泳阻害とは試験容器をゆっくりと動かしても 15 秒間観察している間、身体が浮かず、泳げない状態を指す。なお、遊泳阻害の他にも、行動や外見の異常が見られた場合には記録する。

## 第 7 節 被験物質濃度等の測定

### 7.1 被験物質濃度の測定

試験液中の被験物質濃度の分析は、当該試験に適切と判断された方法を用い、全試験濃度区について、止水式では暴露開始時 (0 時間) 及び終了時 (暴露開始 48 時間後)、半止水式では換水の前後 2 セット (24 時間毎に換水する場合には、暴露開始時 (0 時間)、24 時間目の換水前及び換水後、48 時間後の計 4 回) に測定する。流水式の場合は、試験期間中、試験条件が安定した状況においても、少なくとも 2 回は被験物質の濃度を測定すること。なお、分析法についてはサンプリング手法、前処理法、

計測法（検出限界および測定限界、回収率、検量線、測定チャート等）を記録し、報告すること。

## 7.2 試験環境の測定

対照区及び最高試験濃度区について暴露開始時及び終了時に溶存酸素濃度と pH を測定する。対照区の水温についても、少なくとも暴露開始時及び終了時に測定することとするが、試験水温の変動を監視するために、対照区又は周囲の大気等の温度を暴露期間中に継続して測定し、その変動について記録することが望ましい。

## 第8節 試験の有効性

以下の条件を満たさない場合、試験を不成立とし、再試験を行う。

- ・対照区において、ミジンコが 10% を超えて遊泳阻害されたり、水面に浮いたりしてはならないこと
- ・溶存酸素濃度は、暴露終了時において 3mg/L 以上であること

## 第9節 試験結果の算出

### 9.1 毒性値の算出に用いる個別データの取り扱い

結果の算出は、原則として被験物質の実測濃度の適切な平均値に基づいて行う。なお、平均値の算出は、濃度変動が分解等による減少と考えられる場合には幾何平均や時間加重平均を、分析誤差によるものと考えられる場合は算術平均により行う（（参考）を参照）。なお、同じ試験濃度区において、ある容器における遊泳阻害率等が異常値と判断され、かつその原因が明確な場合は母数から除いて遊泳阻害率を算出することができる。ただし、その内容は報告書に記載すること。

暴露期間中、被験物質濃度が初期濃度の±20%以内に保たれていたことが示されている場合には、初期濃度に基づいて結果の算出を行うことができる。また、分析が困難な物質や極めて不安定な物質で設定値を用いることに合理性がある場合はその旨報告書に記載し、設定値を採用してもよい。濃度減少が著しい場合は、予想しうる主な減少理由（例：揮発、加水分解、光分解等）を報告書に記載する。

各試験濃度区と対照区の遊泳阻害率を暴露期間と被験物質濃度とともに表にまとめる。

### 9.2 50%遊泳阻害濃度 (EC<sub>50</sub>) の算出

各試験濃度区と対照区の遊泳阻害率を暴露期間と被験物質濃度とともに表にまとめ、各試験濃度区に対する 24 時間及び 48 時間における遊泳阻害率をプロットする（例：



図 9.1)。次にプロビット法などの適切な統計手法を用い、95%信頼限界における回帰直線の傾き及び暴露期間 48 時間における  $EC_{50}$  を求める。

得られたデータが統計計算を行うのに不十分な場合で、全く遊泳阻害を起こさない最高試験濃度と 100%遊泳を阻害する最低試験濃度が隣接し、濃度比が 2 以下の場合は、両者の幾何平均を  $EC_{50}$  の近似値とみなす。

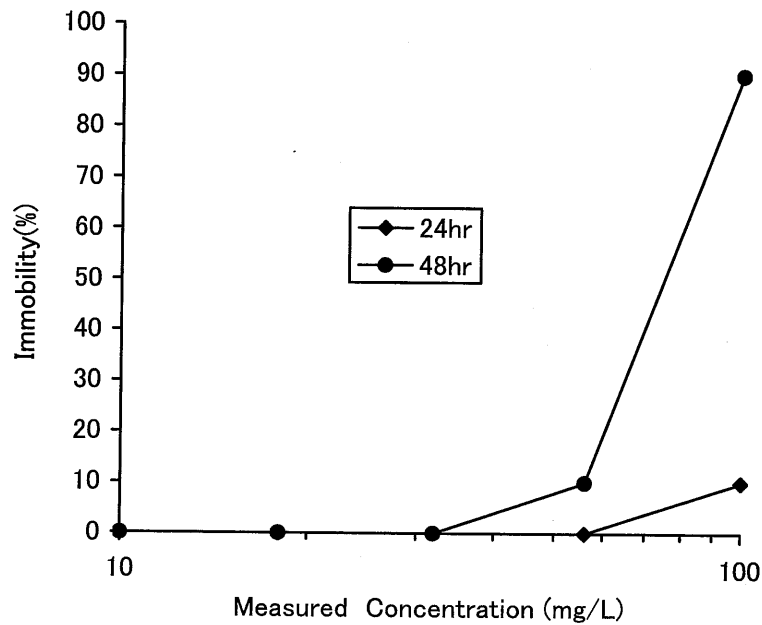


図 9.1 Concentration-Response (Immobility) Curve

出典) 住化テクノサービス (株) (2003) : 平成 14 年度生態影響試験実施事業報告、  
N、N-ジエチル-3-メチルベンズアミド

(参考) 被験物質実測濃度の平均値の算出について

(1) 止水式試験の場合

(以下に時間加重平均の方法を示すが、通常は幾何平均を用いる。)

$$\overline{mc} = \frac{\text{concA} - \text{concB}}{\ln(\text{concA}) - \ln(\text{concB})}$$

$\overline{mc}$  : 平均測定濃度

concA : 暴露開始時 (又は調製時) の測定濃度

concB : 暴露終了時の測定濃度

$\ln(\text{concA})$  : 暴露開始時 (又は調製時) の測定濃度の自然対数

$\ln(\text{concB})$  : 暴露終了時の測定濃度の自然対数

(2) 半止水式試験の場合

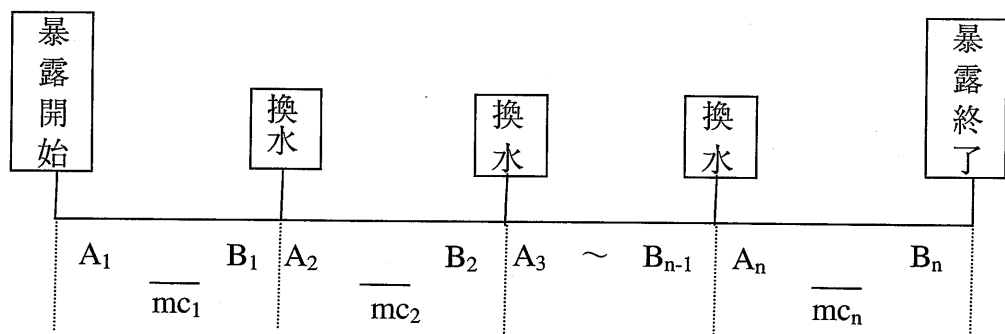
(以下に時間加重平均の方法を示す、ただし、測定 (換水) 間隔が同じ場合)

$$\overline{mc}_n = \frac{\text{concA}_n - \text{concB}_n}{\ln(\text{concA}_n) - \ln(\text{concB}_n)}$$

$\overline{mc}_n$  : 各暴露期間の平均測定濃度

concA<sub>n</sub> : 暴露開始時又は換水後の測定濃度

concB<sub>n</sub> : 暴露終了時又は換水前の測定濃度



上記で求めた各暴露期間の平均測定濃度を用い算術平均により算出する。

$$\overline{mc} = \frac{\overline{mc}_1 + \overline{mc}_2 + \dots + \overline{mc}_n}{n}$$

なお、測定間隔が異なる場合は、OECD テストガイドライン 211 を参照されたい。

(3) 流水式試験の場合

各測定濃度の算術平均により算出する。(暴露開始時及び暴露終了時のみ測定した場合は  $n=2$  とする。)

$$\bar{mc} = \frac{conc1 + conc2 + \dots + concn}{n}$$

conc n : 各時間の測定濃度

## 文献・資料

### (1) 基本とした資料

本書の作成に当たっては以下に示す環境省・OECD 等が公表している資料を基にした。

- ・厚生労働省・経済産業省・環境省 (2003) : 新規化学物質等に係る試験の方法について (平成15年11月21日薬食発第1121002号、平成15・11・13製局第2号、環保企発第031121002号) (抜粋), 化学物質の藻類生長阻害試験、ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験 V ミジンコ急性遊泳阻害試験
- ・OECD(2000) : OECD GUIDELINES FOR TESTING OF CHEMICALS REVISED PROPOSAL FOR UPDATING GUIDELINE 202, *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test:pp.12.

### (2) 引用文献

- 1) 花里孝幸 (2000) : ミジンコ その生態と湖沼環境問題, 名古屋大学出版会:pp.230.
- 2) American Society For Testing and Materials (2002) : Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. E 729- 96:pp.19.

### (3) 参考文献・資料

1) 引用文献以外のミジンコの毒性試験法については以下の知見も参考になる。

- ・American Society For Testing and Materials (1997) : Standard Guide for Conducting *Daphnia magna* Life-Cycle Toxicity Tests, E 1193 - 97-80:pp.19.
- ・ISO (1996) : Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test, ISO 6341:pp.14.
- ・OECD(1998) : OECD GUIDELINES FOR TESTING OF CHEMICALS *Daphnia magna* Reproduction Test (TG 211) :pp.21.
- ・茂岡忠義・斉藤穂高 (2003) : ミジンコ急性遊泳阻害試験—OECD 化学品テストガイドラインに準拠した試験方法—, 第3章動物プランクトン, 日本環境毒性学会編 生態影響試験ハンドブック—化学物質の環境リスク評価—, 朝倉書店:88-95.

2) 毒性値の統計解析手法については以下の知見が参考になる。

- ・American Society For Testing and Materials (2003) : Standard Practice for Statistical Analysis of Toxicity Tests Conducted Under ASTM Guidelines, E 1847 - 96:pp.10.

## 別添 飼育水（人工調製水）の調製方法と試験用水の化学的条件

### 1 飼育水

#### (1) ISO 試験水

##### (a) 塩化カルシウム溶液

塩化カルシウム二水和物 11.76g を希釈水に溶かし 1L とする。

##### (b) 硫酸マグネシウム溶液

硫酸マグネシウム七水和物 4.93g を希釈水に溶かし 1L とする。

##### (c) 炭酸水素ナトリウム溶液

炭酸水素ナトリウム 2.59g を希釈水に溶かし 1L とする。

##### (d) 塩化カリウム溶液

塩化カリウム 0.23g を希釈水に溶かし 1L とする。

(a) ~ (d) の溶液各々 25mL を混合し、希釈水で全量を 1L とする。

希釈水には適切な純水（例えば、イオン交換水、蒸留水又は逆浸透水）を用いることとする。希釈水の電導度は  $10\mu\text{S/cm}$  を越えてはならない。すべての試薬は分析用特級とする。

#### (2) Elendt M4 及び M7 飼育水

各飼育水は飼育水原液 I（微量成分）と飼育水原液 II（主成分）を希釈水（適切な純水、例えば、脱イオン水、蒸留水又は逆浸透水を用いる。）に加えて調製する。

##### ① 飼育水原液 I の調製

各物質の飼育水原液 I は、表 1 の上欄の物質毎にそれぞれ中欄に示した量を 1L の希釈水に添加し、溶解させて調製する。エチレンジアミン四酢酸鉄（II）溶液は、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム・二水和物と硫酸鉄（II）七水和物を別々に調製した後混合し、混合後すぐにオートクレーブにかけて調製する。

各物質の飼育水原液 I の調製した後、それぞれから表 1 の下欄に示す量を分取し、混合し、希釈水で全量を 1L とし、これを「飼育水原液 I 混合液」とする。

表 1 飼育水原液 I の構成物質と添加量等

飼育水原液 I (単物質)	水に添加する量 (単位： mg/L)	飼育水原液 I 混合液調製のための添加量			
		Elendt M4		Elendt M7	
		添加量 (mL/L)	最終希釈率*	添加量 (mL/L)	最終希釈率*
ホウ酸	57,190	1.0	20,000倍	0.25	80,000倍
塩化マンガン四水和物	7,210	1.0	20,000倍	0.25	80,000倍
塩化リチウム	6,120	1.0	20,000倍	0.25	80,000倍
塩化ルビジウム	1,420	1.0	20,000倍	0.25	80,000倍
塩化ストロンチウム六水和物	3,040	1.0	20,000倍	0.25	80,000倍
臭化ナトリウム	320	1.0	20,000倍	0.25	80,000倍

モリブデン酸二ナトリウム二水和物	1,260	1.0	20,000倍	0.25	80,000倍
塩化銅二水和物	335	1.0	20,000倍	0.25	80,000倍
塩化亜鉛	260	1.0	20,000倍	1.0	20,000倍
塩化コバルト六水和物	200	1.0	20,000倍	1.0	20,000倍
ヨウ化カリウム	65	1.0	20,000倍	1.0	20,000倍
亜セレン酸ナトリウム	43.8	1.0	20,000倍	1.0	20,000倍
メタバナジン酸アンモニウム	11.5	1.0	20,000倍	1.0	20,000倍
エチレンジアミン四酢酸(Ⅱ)溶液		20.0	1,000倍	5.0	4,000倍
エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物	5,000	—		—	
硫酸鉄(Ⅱ)七水和物	1,991	—		—	

\*最終希釈率：Elendt M4 又は M7 飼育水に対する飼育水原液 I の最終的な希釈率

### ②飼育水原液Ⅱの調製

飼育水原液Ⅰ混合液を除く各物質の飼育水原液Ⅱは、表2の上欄の物質毎にそれぞれ中欄に示した量を1Lの希釈水に添加し、溶解させて調製する。なお、混合ビタミン保存溶液は、調製後、少量ずつ凍結保存し、使用する直前に飼育水に加える。

### ③各飼育水の調製

各飼育水は、各物質の飼育水原液Ⅱから表2の下欄に示す量を分取し、混合し、希釈水で全量を1Lとして調製する。なお、各飼育水を調製するときには、塩類の沈殿を避けるために、500~800mL程度の希釈水に分取量の飼育水原液を加え、その後に希釈水を足して1Lに合わせる。

表2 飼育水原液Ⅱの構成物質と添加量等 (Elendt M4 及び M7 共通)

飼育水原液Ⅱ (主成分原液)	水に添加する量 (単位：mg/L)	飼育水(人工調製水) 調製のための添加量	
		Elendt M4及びM7	
		添加量*1 (mL/L)	最終希釈率 *2
飼育水原液Ⅰ混合液* *Elendt M4とM7で成分比率 が異なる事に注意	—	50	20倍
塩化カルシウム二水和物	293,800	1.0	1,000倍
硫酸マグネシウム七水和物	246,600	0.5	2,000倍
塩化カリウム	58,000	0.1	10,000倍
炭酸水素ナトリウム	64,800	1.0	1,000倍
ケイ酸二ナトリウム九水和物	50,000	0.2	5,000倍
硝酸ナトリウム	2,740	0.1	10,000倍

リン酸第一カリウム	1,430	0.1	10,000倍
リン酸第二カリウム	1,840	0.1	10,000倍
混合ビタミン保存溶液	—	0.1	10,000倍
塩酸チアミン	750		10,000倍
シアノコバラミン (B12)	10		10,000倍
ビオチン	7.5		10,000倍

\*1 添加量：Elendt M4 及び M7 飼育水を調製するための添加量 (mL/L)

\*2 最終希釈率：M4 又は M7 飼育水に対する飼育水原液Ⅱの最終的な希釈率

## 2 試験用水の化学的条件

物質名	濃度条件
粒子状物質	20 mg/L未満
全有機炭素	2 mg/L未満
非イオン化アンモニア	1 $\mu$ g/L未満
塩素	10 $\mu$ g/L未満
全有機リン系農薬	50 ng/L未満
全有機塩素系農薬及びPCB	50 ng/L未満
全有機塩素	25 ng/L未満

参考資料 試験結果のとりまとめに必要な表の例

ミジンコの遊泳阻害試験をとりまとめる際に必要な表を、例として以下に示した。

表1. *The Numbers of Immobile Daphnia (Percent Immobility)*

Nominal Concentration (mg/L)	Mean* Measured Concentration (mg/L)	Cumulative Numbers of Immobilized <i>Daphnia</i> (Percent Immobility)			
		24 Hours		48 Hours	
Control	—	0	( 0)	0	( 0)
10	9.9	0	( 0)	0	( 0)
18	18	0	( 0)	0	( 0)
32	33	0	( 0)	0	( 0)
56	57	0	( 0)	2	( 10)
100	99	2	( 10)	18	( 90)

\*: Geometric Mean

表2. *Measured Concentrations of Test Substance in Test Water (Static Condition)*

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)				Geometric Mean During 48 Hours (mg/L)
	0 Hour New	Percent of Nominal	48 Hours Old	Percent of Nominal	
Control	<0.1	—	<0.1	—	—
10	10	100	9.9	99	9.9
18	18	100	18	100	18
32	32	100	34	106	33
56	57	102	57	102	57
100	99	99	100	100	99

New: Freshly prepared test solutions

Old: Test solutions after 48 hours exposure

表3. pH Values (Static Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean* Measured Concentration (mg/L)	pH	
		0 Hour New	48 Hours Old
Control	—	8.0	8.0
10	9.9	8.0	8.0
18	18	8.0	8.0
32	33	8.0	8.0
56	57	8.0	8.0
100	99	8.0	8.0

\*: Geometric Mean

New : Freshly prepared test solutions      Old : Test solutions after 48 hours exposure

表4. Dissolved Oxygen Concentrations (Static Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean* Measured Concentration (mg/L)	Dissolved Oxygen Concentration (mg/L)	
		0 Hour New	48 Hours Old
Control	—	8.8	8.6
10	9.9	8.6	8.6
18	18	8.6	8.6
32	33	8.8	8.6
56	57	8.8	8.7
100	99	8.8	8.7

\*: Geometric Mean

New : Freshly prepared test solutions      Old : Test solutions after 48 hours exposure

表5. Temperature (Static Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean* Measured Concentration (mg/L)	Temperature (°C)		
		0 Hour New	24 Hours Old	48 Hours Old
Control	—	20.0	20.0	19.9
10	9.9	20.0	20.0	19.9
18	18	20.0	20.0	19.9
32	33	20.0	20.0	20.0
56	57	20.0	20.0	20.0
100	99	20.0	20.0	20.0

\*: Geometric Mean

New : Freshly prepared test solutions      Old : Test solutions after 24 and 48 hours exposure



付表 6. Total Hardness (as CaCO<sub>3</sub>) (Static Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean* Measured Concentration (mg/L)	Total Hardness (as CaCO <sub>3</sub> , mg/L)	
		0 Hour New	48 Hours Old
Control	—	240	240
10	9.9	250	240
18	18	250	240
32	33	240	240
56	57	240	240
100	99	240	240

\* : Geometric Mean

New : Freshly prepared test solutions      Old : Test solutions after 48 hours exposure

出典：住化テクノサービス（株）（2003）：平成 14 年度生態影響試験実施事業報告、  
N、N-ジエチル-3-メチルベンズアミド

