

3 藻類、ミジンコ及び魚類の急性毒性に対する試験手順例

(平成 15 年 11 月版)

(1) 藻類生長阻害試験	(95)
(2) ミジンコ急性遊泳阻害試験	(119)
(3) 魚類急性毒性試験	(145)

(試験手順例)

藻類生長阻害試験
(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「藻類生長阻害試験」について、推奨種である淡水産単細胞緑藻類 *Pseudokirchneriella subcapitata* 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。

藻類生長阻害試験は、指数増殖期の藻類を被験物質に暴露し、対照区に対する生長阻害率を測定することにより、藻類の生長に対する被験物質の毒性を明らかにすることを目的として行う。本試験において生長とは暴露期間中の細胞濃度（培地 1mL 当たりの細胞の数）の増加をいう。

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	藻類の維持.....	3
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	培地.....	5
第4節	前培養.....	6
第5節	試験溶液の調製と試験濃度の設定.....	6
5.1	試験溶液の調製.....	6
	(1) 培地に対する溶解性.....	6
	(2) 試験溶液調製法の決定.....	6
5.2	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
5.3	分散系での試験.....	8
第6節	試験条件.....	8
第7節	細胞濃度の測定.....	9
第8節	被験物質濃度等の測定.....	9
8.1	被験物質濃度の測定.....	9
8.2	試験環境の測定.....	10
第9節	試験の有効性.....	10
第10節	試験結果の算出.....	10
10.1	生長速度の比較(速度法).....	11
10.2	生長曲線下の面積の比較(面積法).....	12
10.3	毒性値の算出.....	13
	(1) 50%生長阻害濃度(EC ₅₀)の算出.....	13
	(2) 最大無作用濃度(NOEC).....	13
文献・資料	14
	(1) 基本とした資料.....	14
	(2) 引用文献.....	14

(3) 参考文献・資料.....	14
参考資料 試験結果のとりまとめに必要な表の例.....	16

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。特に、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-オクタノール/水分配係数
- ・融点
- ・沸点
- ・常温における性状
- ・安定性
- ・溶媒に対する溶解度等

(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

本試験では、淡水産単細胞緑藻類である *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) F.Hindák を用いる。本種は、単細胞であること、細胞が計測する上で適当なサイズであること、培養株の維持が容易であることなどから藻類の生長阻害試験には最も適当な藻類種といえる。これまで *Selenastrum capricornutum* として知られ、多くの藻類増殖試験や生長阻害試験に用いられてきた培養株は、形態的特徴から *P. subcapitata* が正しい種名とされ、OECD の藻類生長阻害試験の改訂案（現在検討中）でもこの種名が使われている。

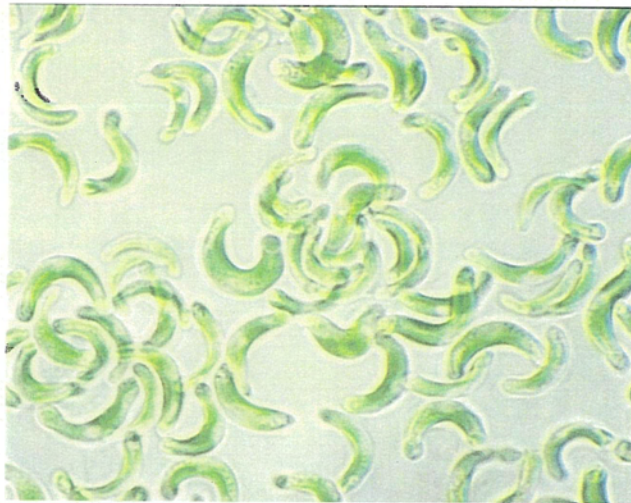


写真 2.1 *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov)F.Hindák

2.2 提供機関

Pseudokirchneriella subcapitata の培養株は現在世界各国の保存機関に保存されている。わが国では、独立行政法人国立環境研究所 微生物系統保存施設より提供されているほか、米国タイプカルチャーコレクション、ドイツのゲッチンゲン大学藻類保存施設からも購入できる。

(a)独立行政法人 国立環境研究所 微生物系統保存施設

〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2

電話：0298-50-2556 FAX：0298-50-2587

電子メール：mcc@nies.go.jp

ホームページ：http://www.nies.go.jp/biology/mcc/home_j.htm

(b) American Type Culture Collection (ATCC)

国内正規販売代理店 ホームページ:

http://www.summitpharma.co.jp/japanese/index_j.html

(c) ドイツ ゲッチンゲン大学藻類保存施設

ホームページ: <http://wwwuser.gwdg.de/~epsag/phykologia/epsag.html>

2.3 藻類の維持

試験期間中とは異なり、栄養塩の豊富な培地を用いる方が藻体を容易に長期間維持することができる(例; C培地、ブリストル培地など)¹⁾。20-25℃で、試験条件程度(60 μ mol/m²/s)の光強度で十分増殖させた後、これより弱い光強度の場所に移すと比較的長期間植え継ぎせずに維持することができる。この場合植え継ぎは数ヶ月毎で十分である。維持培養の場合は、12時間ごとの明暗周期をつけてもよいので、直射日光のあたらない明るい室内に置いても差し支えない。しかし、頻繁に生長阻害試験を実施する場合など、試験条件に近い光条件で培養することにより、前培養で指数増殖期の細胞を得やすくなる。

2.4 試験系の再現性

無菌培養株を使用する場合は、定期的に(少なくとも、6ヶ月毎)細菌の有無を検査して無菌状態であることを確認する必要がある。

試験の再現性を保証するため、基準物質(重クロム酸カリウム、試薬特級)による生長阻害試験を行い、供試藻類の感受性に変化がないことを調べる。なお、基準物質検定の結果は記録しておく。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)の藻類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 *Pseudokirchneriella subcapitata* の生長阻害試験結果

試験機関	藻類 72hr-EbC ₅₀ * (mg/L) 重クロム酸カリウム(ニクロム酸カリウム)				
	AVE	MIN	MAX	標準偏差	備考
A	0.433	0.285	0.543	0.077	n=13
B	0.375	0.289	0.487	0.048	n=29
C	0.470	0.420	0.560	0.041	n=11
D	0.450	0.410	0.540	0.053	n=6

*: EbC₅₀ 生長曲線下における面積の比較により求めた半数影響濃度資料) 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

試験に必要な器具を以下に示した。

- ・三角フラスコ
- ・メスフラスコ
- ・メスシリンダー
- ・シリコン栓
- ・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 μm 、0.22 μm ）
- ・分注器

等

(2) 器具の素材・容量

試験や前培養には、藻類に十分な光が供給されるよう、透明なガラス製容器を用いる。通常 250-300mL の三角フラスコを用いるが、被験物質の分析に大量の試験溶液を必要とする場合には 500mL のフラスコを用いる。250-300mL の三角フラスコを用いる場合、試験溶液量は 100mL とする。また、大気中からのゴミ等の混入を防ぐため、通気性のあるシリコン栓を用いるが、被験物質が揮散しやすい物質の場合はガラス製の蓋で密閉する。

また、被験物質が着色したものであり、試験の際に供試藻類に光が十分に供給されないことが予想される場合は、扁平フラスコや容量の大きな三角フラスコを使用する等、試験溶液の厚みを減らし、光が十分供給される工夫が必要である。また、着色による光の遮断が藻類に及ぼす影響を事前に調べておくことが望ましい²⁾。

(3) ガラス器具の洗浄

三角フラスコ、ピペット、シリンダー等、試験物質や培地に用いた物質等がふれたガラス器具は洗浄する必要がある。ガラス器具の洗浄は以下の点に留意して行う。なお、試験前に行う容器や器具の洗浄方法として ASTM の標準ガイド³⁾ で示されている事例も参考となる。

他の材質の器具についても同様の洗浄を行う。

- ①無リン洗剤で洗浄
- ②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
- ③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

- ④最後に蒸留水、超純水等で十分すすぐ
- ⑤ゴミの混入しない場所に保管する

3.2 試験機器

試験に必要な主な機器を以下に示した。

- ①培養に用いる装置：温度、照明条件を一定に維持できる培養器又は培養室、化学天秤、ろ過装置、遠心分離器、振とう器（100r/min を超える速度が制御できる回転式あるいは振動式振とう培養器³⁾）、オートクレーブ 等
- ②試験溶液の調製に用いる装置：スターラー、超音波洗浄機 等
- ③細胞の観察又は細胞濃度の計数装置：光学顕微鏡（100～400 倍³⁾）、粒子計数装置あるいは血球計数板、吸光光度計、分光光度計 等
- ④環境測定装置：温度計、pH メーター、光度計 等

3.3 培地

次の組成の培地を用いる。

- ・塩化アンモニウム 15 mg/L
- ・塩化マグネシウム六水和物 12 mg/L
- ・塩化カルシウム二水和物 18 mg/L
- ・硫酸マグネシウム七水和物 15 mg/L
- ・リン酸水素二カリウム 1.6 mg/L
- ・塩化鉄（Ⅲ）六水和物 0.08 mg/L
- ・エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 0.1 mg/L
- ・ホウ酸 0.185 mg/L
- ・塩化マンガン四水和物 0.415 mg/L
- ・塩化亜鉛 0.003 mg/L
- ・塩化コバルト六水和物 0.0015 mg/L
- ・塩化銅二水和物 0.00001 mg/L
- ・モリブデン酸二ナトリウム二水和物 0.007 mg/L
- ・炭酸水素ナトリウム 50 mg/L

これらのうち、比較的多量に加える成分は直接超純水（ミリQ水）などに添加するが、微量成分は濃厚溶液を作成し、適当量加える。スターラーで混合し、塩酸又は水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH を 8 程度に調整し、滅菌する。ろ過滅菌の場合は 0.22 μm 程度の孔径のフィルターを用いる。オートクレーブによる滅菌より、ろ過滅菌の方が沈殿物形成などの可能性が少ないため、推奨される。米国環境保護庁 AAP-培地など、同程度の組成をもつ培地を使用することもできる。

第4節 前培養

試験には指数増殖期の細胞を用いる必要がある。維持培養中など、増殖を抑制されている細胞をそのまま試験条件に移すと、順調な増殖を開始するまでに遅延（ラグ）があり、正しい試験結果が得られない。そこで、試験を開始する前に、試験条件と同じ条件で藻体を2～3日間以上培養し、指数増殖期の細胞を得る。変形や異常な細胞が出現した場合は使用しない。

指数増殖に達するまでの前培養の期間や、添加する細胞数は、使用する培養装置の温度や光強度、培地の容量などに依存する。したがって、あらかじめ前培養に使用する培養装置や条件で培養して生長曲線を描き、どの程度の細胞数を添加すると、何日後に指数増殖期になり、どの程度の細胞濃度が得られるかを調べておく必要がある。目安となる方法を以下に示した。

- ・ 250mLの三角フラスコに100mLの試験培地を入れる。
- ・ 滅菌したピペットを用いて、試験種が約25,000 cells/mLとなるように接種する。この際、加える藻類懸濁液は5mL以内になるようにする。
- ・ 振とう培養する（温度 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、照度約 $60\text{--}80\ \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、連続光）
- ・ 毎日細胞数を計数し、細胞濃度が $0.5\text{--}1\times 10^6$ cells/mLに達した時点で本試験に供する。なお、通常3日程度でこの濃度まで増殖するが、3日後に細胞濃度が $0.5\text{--}1\times 10^6$ cells/mLに達しない場合は前培養の期間を1日程度延長するか、培養条件を変えて前培養をやり直す。

第5節 試験溶液の調製と試験濃度の設定

5.1 試験溶液の調製

(1) 培地に対する溶解性

被験物質の対水溶解度値を参考にしつつ、培地に対する溶解性を確認する。溶解性の判定は、100mg/L以上であれば目視にて可とし、100mg/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、上清液から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培地に対する溶解限度以下に設定することとするが、100mg/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、培地に溶解した濃厚な被験物質溶液（原液）を培地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、培地に添加し、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小量使用して原液を調製し、培地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、藻類の生長に影響を及ぼさない素材の試験容器を検討する。また、藻類への吸着を極力減らすため、初期細胞濃度を 0.5×10^4 cells/mL と低めに設定してもよい。
 - ・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。

5.2 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が含まれない培地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6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。NOEC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、72時間後に（必要に応じて24、48時間後も）細胞濃度を測定する。また、pHを測定する。

(3) 試験濃度の設定

本試験での濃度は、予備試験での72時間-EC₅₀値を含み、公比を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、藻類の生長を90%以上阻害する濃度と、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）又は試験溶液を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。また、報告書には限度試験であることを明記する。

(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。

5.3 分散系での試験

上記5.1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、被験物質は培地に溶解しているものとみなすことができる。

第6節 試験条件

以下の条件で試験を行う。藻類の接種は、無菌室やクリーンベンチなど無菌的な条件で行う

- ・培養方式：非揮発性物質；開放系（通気性のよいシリコン栓）
揮発性物質；密閉系（共栓フラスコなどの完全密栓容器）
原則として振とう培養（100rpm）
（揮発性が高く、振とうにより被験物質濃度が減少しやすい場合は、静置培養を行うこともある。ただし、その際でも1日に2回程度フラスコを振とうする。）
- ・暴露期間：72時間
- ・試験液量：100 mL／容器（250～300mLの三角フラスコの場合）
- ・連数：3容器／試験濃度区、6容器／対照区（助剤対照区も同様）、なお、限度試験の場合は2倍の連数とする。
- ・初期細胞濃度： 1×10^4 cells/mLで、乾燥重量が0.5mg/Lを超えないように設定する。
ただし吸着性の高い試験物質の場合は 0.5×10^4 cells/mLとする場合もある。
- ・試験温度：21-24±2℃

- ・照明：白色又は昼光色の蛍光灯を用い、フラスコ液面付近の光強度が $60-120 \mu \text{mol/m}^2/\text{s}$ になるよう連続照射する。

すべての試験容器が均一に照射されることを確認するため、あらかじめ試験容器を設置する培養器内の照度分布を測定しておく。また、試験期間中、定期的にフラスコの位置を入れ替えるなどの工夫も必要である。

lux から $\mu \text{mol/m}^2/\text{s}$ へのおよその換算計数は、蛍光灯メーカーなどから得ることが可能な場合がある。文献値は白色蛍光灯で 0.016、インターネット情報では白色又は昼光色の場合、それぞれ 0.013 及び 0.014 である。

予備試験の結果、pH の変動が 1.5 以上と予想される場合は、初期細胞濃度を小さくする、振とう培養の振動数を上げる、容器の容量を大きくして空気と接触しやすいようにする（空気がよく溶けるようにする）などの操作を行う。

第 7 節 細胞濃度の測定

各試験容器を培養装置に設置し試験を開始する。その後、24、48 および 72 時間に、全ての試験容器について細胞濃度を測定する。通常は対照区における細胞濃度が 72 時間の培養で 40 倍以上となる。なお、細胞濃度の測定は、粒子計数装置を用いて行うのが簡便である。

細胞の変形等異常を確認するため、細胞濃度の測定時に各試験溶液を少量スライドグラスにとり、100~400 倍の光学顕微鏡下で観察し、異常が見られた場合には記録する。

第 8 節 被験物質濃度等の測定

8.1 被験物質濃度の測定

被験物質の濃度は、少なくとも最低及び最高試験濃度区並びに予測される EC_{50} 付近の試験濃度区について暴露開始時及び終了時に測定する。また、暴露期間中に初期濃度より 20% 以上低下することが予測される場合は、すべての試験濃度区について暴露開始時及び終了時に測定する。さらに、揮発性あるいは分解性の強い物質など、暴露期間中に著しく濃度が低下することが予測されるものについては、暴露期間中 24 時間間隔で分析を追加する。分析の感度、条件等により、試料が多量に必要な場合は、別に試験容器をつくり、試験と同様の細胞濃度の藻類を接種し、同様の条件で培養したものをを用いる。

分析は、各試験濃度区について各連から採取し、混合した試験液を遠心分離し、藻体を除去してから行う。

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。

8.2 試験環境の測定

暴露期間中、培養装置内の温度、照度を少なくとも1日1回測定する。

試験溶液のpHを試験開始時及び終了時に測定する。少なくとも、試験終了時のpHは、すべての容器について測定することが望ましい。揮発性物質でない場合は、振とう培養の回転数を増してCO₂の交換を促進したり、初期細胞濃度を低くすることによってCO₂の要求を減じることにより、試験期間中、対照区のpHが1.5以上変動しないようにできる。

第9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。

- ・対照区の細胞数が試験期間中に少なくとも16倍に増殖すること
- ・対照区の毎日の生長速度の変動係数が試験期間を通じて35%を超えないこと。
- ・対照区の繰り返し間の生長速度の変動係数が15%を超えないこと

第10節 試験結果の算出

結果の算出は、原則として被験物質の実測濃度の平均値に基づいて行う。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。

暴露期間中、被験物質濃度が初期濃度（設定濃度又は実測濃度）の±20%以内に保たれていなかった場合は、暴露期間中の測定濃度の時間加重平均を用いて結果の算出を行う。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を報告書に記載し、設定値を採用してもよい。予想される主な減少理由（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細胞濃度を暴露期間と被験物質濃度とともに表にする。各試験濃度区と対照区について、細胞濃度の繰り返し間の平均値を時間に対してプロットし、生長曲線を描く（図10.1）。このとき、対照区の生長曲線が、暴露期間を通じて指数増殖期にあることを確認する。

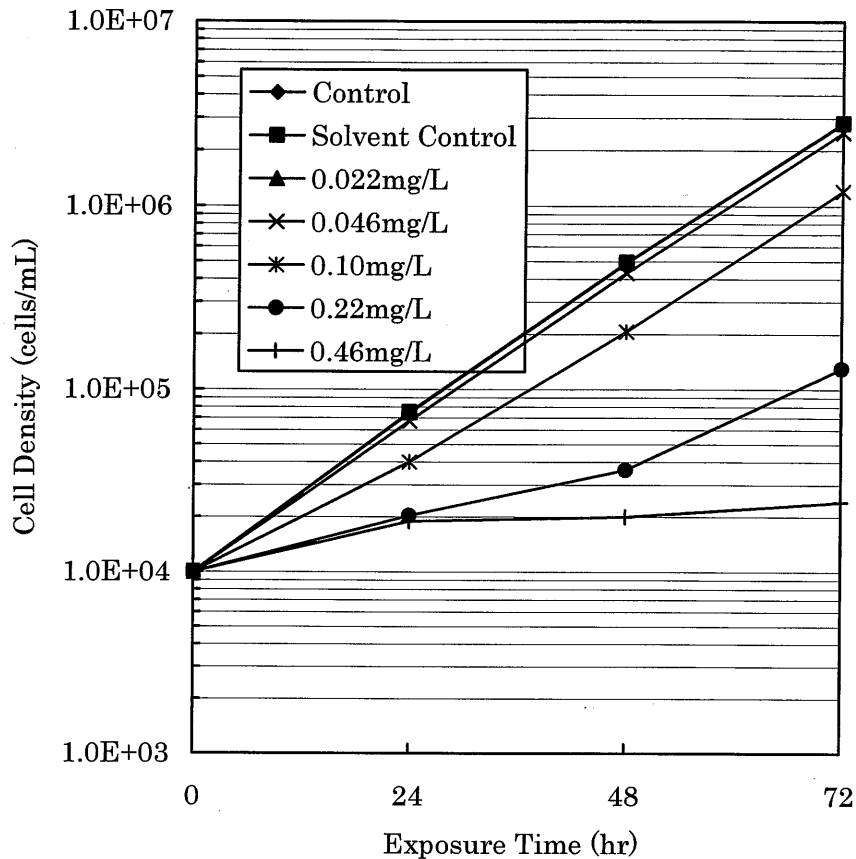


図 10.1 Algal Growth Curve of *Selenastrum capricornutum*

出典) 住化テクノサービス株式会社(2001):平成 12 年度生態影響試験実施事業報告, 5H-Dibenzo[a, d]cyclohepten-5-one

被験物質濃度と影響の関係は、10.1 及び 10.2 に示す両方の方法を用いて計算する。なお、限度試験の場合には、対照区と試験濃度区の生長の平均値を比較するために、t 検定等の統計解析を行う。

10.1 生長速度の比較 (速度法)

指数関数的に増殖しているときの生長速度は、各々の試験容器について次のようにして計算される。

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln N_j - \ln N_i}{t_j - t_i}$$

ここで、

μ_{ij} = t_i 時から t_j 時までの期間の生長速度。通常、日当たり (d^{-1}) で表す。

N_i = t_i 時の実測細胞濃度 (cells/mL)。試験開始時(t_0)の細胞濃度については設定値を用いる。

N_j = t_j 時の実測細胞濃度 (cells/mL)

t_i = 暴露開始後 i 回目に細胞濃度を測定した時間 (d)

t_j = 暴露開始後 j 回目に細胞濃度を測定した時間 (d)

EC₅₀を算出する場合は、暴露開始時から72時間後までの暴露期間を通じた生長速度を求める。試験の有効性を調べるためには、対照区の1日ごとの生長速度を求め、毎日の生長速度の変動係数が暴露期間を通じて35%を超えないことを確認する。

なお、生長速度は、実測細胞濃度の対数を時間に対してプロットし、その回帰直線の傾きから導くこともできる。

各試験濃度区における生長(速度)阻害率(I_μ)は、対照区の生長速度の平均値(μ_c)と各試験濃度区での生長速度の平均値(μ_T)との間の差として次のように計算する。

$$I_\mu = \frac{\mu_c - \mu_T}{\mu_c} \times 100$$

10.2 生長曲線下の面積の比較(面積法)

生長曲線の下での面積は、各々の試験容器について次の式に従って計算される。

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

ここで、

A = 面積

N_0 = 暴露開始時(t_0)の設定細胞濃度 (cells/mL)

N_1 = t_1 時の実測細胞濃度 (cells/mL)

N_n = t_n 時の実測細胞濃度 (cells/mL)

t_1 = 暴露開始後最初に細胞濃度を測定した時間

t_n = 暴露開始後 n 回目に細胞濃度を測定した時間

各試験濃度区における生長阻害率(I_A)は、対照区の生長曲線下の面積の平均値(A_c)と各試験濃度区での生長曲線下の面積の平均値(A_t)との間の差として次のようにして計算する。

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

10.3 毒性値の算出

(1) 50%生長阻害濃度 (EC_{50}) の算出

I_{μ} 又は I_A の値を被験物質濃度の対数に対してプロットする (例: 図 10.2)。その回帰式等を用いて 50% 阻害濃度を求める。 I_{μ} より導かれた EC_{50} は ErC_{50} 、 I_A より導かれた EC_{50} は EbC_{50} と表す。なお、生長速度での小さな変化は生物量にすると大きな変化になることから、 EbC_{50} と ErC_{50} は数値として比較できるものではない。

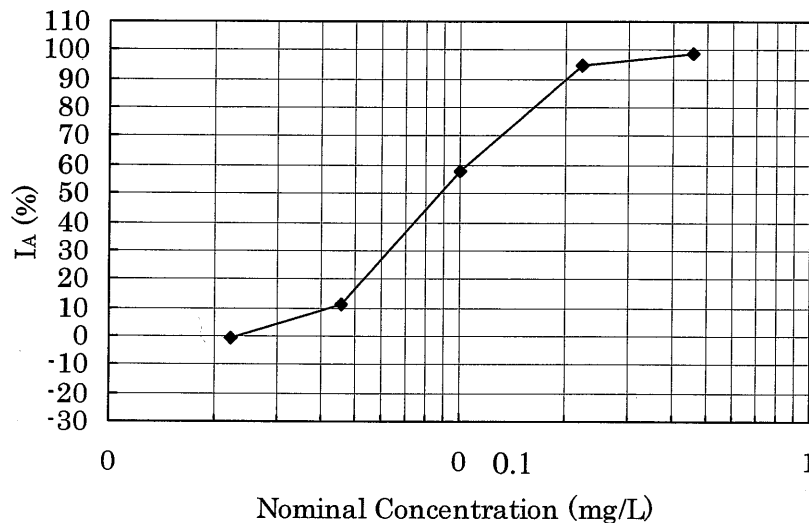


図 10.2 Concentration-Inhibition Curve Based on I_A Values Calculated from the Area under the Growth Curves

出典) 住化テクノサービス株式会社(2001):平成12年度生態影響試験実施事業報告, 5H-Dibenzo[a, d]cyclohepten-5-one

(2) 最大無作用濃度 (NOEC)

統計的手法*により対照区 (または助剤対照区) と比較して有意差の認められない最高試験濃度を最大無作用濃度 (NOEC) とする。その際、速度法により求めた場合は NOEC (速度法 0-72hr)、面積法により求めた場合は NOEC (面積法 0-72hr) と記載する。

*例: 多群の比較; Bartlett の等分散検定、一元配置分散分析 (ANOVA)、Dunnett または Williams の多重比較検定

2群の比較; F 検定および Student の t 検定を用いる。

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、環境省と 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 IV 藻類生長阻害試験
- ・ OECD (2002) : OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS PROPOSAL FOR UPDATING GUIDELINE 201, Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test: pp.21.

(2) 引用文献

- 1) 笠井文絵 (2003) : 藻類 第 2 章藻類・ウキクサ・陸生植物, 日本環境毒性学会編 生態影響試験ハンドブックー化学物質の環境リスク評価ー, 朝倉書店:26-37.
- 2) ISO (1999) : Water Quality—Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waste water, ISO 14442:pp.14.
- 3) American Society For Testing and Materials (1997) : Standard Guide for Conducting Static 96-h Toxicity Tests with Microalgal, E 1218 - 97a:pp.14.

(3) 参考文献・資料

- 1) 種名の変更については以下の知見が参考になる。
 - ・ J.W.G. Lund(2003) :
<http://windermere.ceh.ac.uk/fritsch/Features.htm>
 - ・ Nygaard, G., Komarek, J., Kristiansen, J. & Skulberg, O.M. 1986. Taxonomic designations of the bioassay alga NIVA-CHL-1 ("*Selenastrum capricornutum*") and some related strains. Opera Botanica 90:5-46
- 2) 引用文献以外の藻類の培養、藻類生長阻害試験については以下の知見が参考になる。
 - ・ American Society For Testing and Materials (1998) : Standard Practice for Algal Growth Potential testing with *Selenastrum capricornutum*, D 3978 - 80:pp.5.
 - ・ Environmental Canada(1992):Biological Test Method: Growth Inhibition Test Using the Freshwater Alga *Selenastrum capricornutum*, Report EPS 1/RM/25:pp.41.
 - ・ ISO (1989) : Water Quality—Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*, ISO 8692:pp.6.
 - ・ 茂岡忠義 (2003) : 藻類生長阻害試験—OECD 化学品テストガイドラインに準拠した試験方法—, 第 2 章藻類・ウキクサ・陸生植物, 日本環境毒性学会編 生態影響試験ハンドブックー化学物質の環境リスク評価ー, 朝倉書店:38-43.
 - ・ 西澤一俊・千原光雄編(1974) : 藻類研究法、共立出版:pp.754.

3) 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.

参考資料 試験結果のとりまとめに必要な表の例

藻類の生長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. *Cell Densities of Selenastrum capricornutum during the 72-Hour Exposure*

Nominal Concentration (Measured Conc. at 0 Hr)		Cell Density (cells/mL)			
(mg/L)	Vessel No.	0 Hour	24 Hours	48 Hours	72 Hours
Control	1	10000	63920	407600	2433000
	2	10000	63340	401900	2394600
	3	10000	66720	418600	2370600
	Average	10000	64660	409367	2399400
	SD	0	1807	8489	31476
10 (10)	1	10000	63780	436700	2731000
	2	10000	64900	457700	2962000
	3	10000	65520	461500	2809600
	Average	10000	64733	451967	2834200
	SD	0	882	13357	117448
18 (18)	1	10000	61860	432400	2774600
	2	10000	61300	434400	2643200
	3	10000	62720	433400	2734000
	Average	10000	61960	433400	2717267
	SD	0	715	1000	67279
32 (32)	1	10000	56900	404400	2437200
	2	10000	57360	398200	2551800
	3	10000	59300	404000	2571400
	Average	10000	57853	402200	2520133
	SD	0	1274	3470	72488
56 (56)	1	10000	48700	297000	1920000
	2	10000	49440	308200	1904000
	3	10000	47200	284000	1873000
	Average	10000	48447	296400	1899000
	SD	0	1141	12111	23896
100 (100)	1	10000	27560	83400	335500
	2	10000	26540	85400	321100
	3	10000	27380	91200	354800
	Average	10000	27160	86667	337133
	SD	0	544	4051	16909

SD: Standard Deviation

表2 Percent Growth Inhibition of *Selenastrum capricornutum*

Nominal Conc. (Measured Conc. at 0Hr)		Area under the growth curves		Growth Rate			
mg/L	No.	Area	Inhibition (%) ^{*1}	Rate	Inhibition (%) ^{*1}	Rate	Inhibition (%) ^{*1}
		A(0-72h)	I A(0-72h)	μ (24-48h)	I m(24-48h)	μ (24-72h)	I m(24-72h)
Control	1	11240000		0.0676		0.0498	
	2	14442000		0.0686		0.0491	
	3	13640000		0.0670		0.0481	
	Averag SD	13107000 1666000	-	0.0677 0.0008	-	0.0490 0.0009	-
Solvent cont.	1	15234000		0.0725		0.0477	
	2	13348000		0.0750		0.0507	
	3	13991000		0.0715		0.0481	
	Averag SD	14191000 959000	-	0.0730 0.0018	-	0.0488 0.0016	-
0.100 (0.0782)	1	16081000		0.0660		0.0440	
	2	15846000		0.0655		0.0426	
	3	13499000		0.0709		0.0477	
	Averag SD	15142000 1428000	-6.7	0.0675 0.0030	7.5	0.0448 0.0026	8.2
0.210 (0.157)	1	15299000		0.0690		0.0444	
	2	13765000		0.0717		0.0476	
	3	13974000		0.0677		0.0447	
	Averag SD	14346000 832000	-1.1	0.0695 0.0020	4.8	0.0456 0.0018	6.6
0.450 (0.337)	1	9716000		0.0629		0.0453	
	2	8665000		0.0622		0.0497	
	3	10021000		0.0579		0.0434	
	Averag SD	9467000 711000	33.3**	0.0610 0.0027	16.4**	0.0461 0.0032	5.5
0.950 (0.740)	1	1736000		0.0364		0.0284	
	2	2048000		0.0323		0.0282	
	3	1712000		0.0353		0.0279	
	Averag SD	1832000 187000	87.1**	0.0347 0.0021	52.5**	0.0282 0.0003	42.2**
2.00 (1.58)	1	330000		-0.0019		-0.0001	
	2	347000		0.0036		-0.0006	
	3	388000		-0.0015		-0.0006	
	Averag SD	355000 30000	97.5**	0.0001 0.0031	99.9**	-0.0004 0.0003	100.8**

*1 Values are the percent inhibition relative to the solvent control.

SD Standard deviation

* Indicates a significant difference ($\alpha=0.05$) from the solvent control.
(There was no sign in this test.)** Indicates a significant difference ($\alpha=0.01$) from the solvent control.

表3. Measured Concentrations of the Test Substance in Test Water

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)			
	0 Hour	Percent of Nominal	72 Hours	Percent of Nominal
Control	<0.1	—	<0.1	—
10	10	100	10	100
18	18	100	18	100
32	32	100	33	103
56	56	100	58	104
100	100	100	100	100

表4. pH Values

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration at 0 Hr (mg/L)	Vessel No.	pH	
			0 Hour	72 Hours
Control	-	1	7.7	9.9
10	10	1	7.7	9.7
18	18	1	7.8	9.9
32	32	1	7.8	9.3
56	56	1	7.8	8.8
100	100	1	7.7	8.0

表5. Daily Temperature, Light Intensity and Revolution in the Incubation Chamber

Exposure Period (Hours)	Temperature (°C)	Light Intensity (lx)	Revolution (rpm)
0	23.1	4200~4600	100
24	22.9	4300~4600	100
48	22.9	4100~4400	100
72	22.8	4100~4400	100
Range	22.8~23.1	4100~4600	100

出典：

表1、3～5：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

表2：（株）三菱化学安全科学研究所（2001）：平成12年度生態影響試験実施事業報告，1,3-ジメチルナフタレン

(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 ₅₀) 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¹⁾ (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¹⁾。

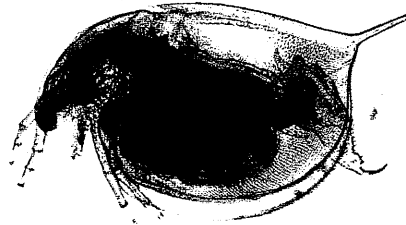


写真 2.1 *Daphnia magna* Straus

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：029-850-2900

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、別に用意したピーカーに移す。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 ₅₀ (mg/L) 重クロム酸カリウム(ニクロム酸カリウム)				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 μ m、0.22 μ 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²⁾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²⁾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²⁾

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(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。EC₅₀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-EC₅₀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

試験液の水溫、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 (EC₅₀) 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。

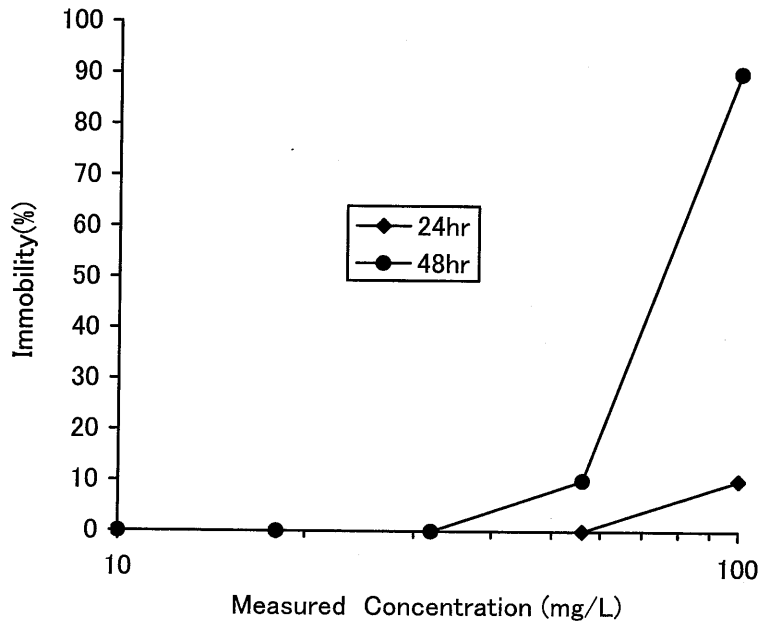


図 9.1 Concentration-Response (Immobility) Curve

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

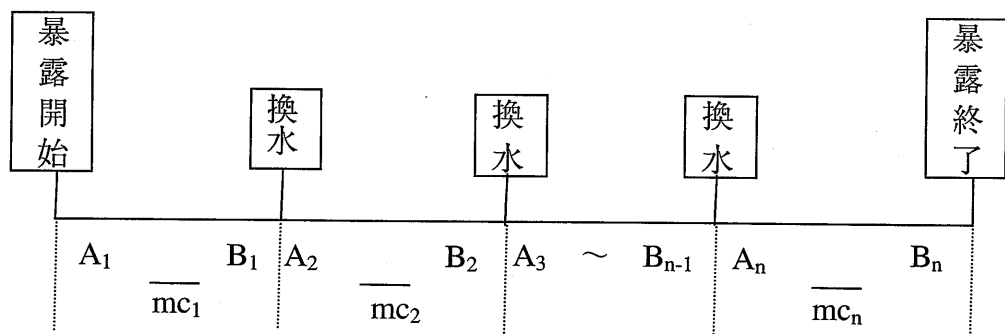
(以下に時間加重平均の方法を示す、ただし、測定 (換水) 間隔が同じ場合)

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

\overline{mc}_n : 各暴露期間の平均測定濃度

concA_n : 暴露開始時又は換水後の測定濃度

concB_n : 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 μ g/L未満
塩素	10 μ 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 CaCO₃) (Static Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean* Measured Concentration (mg/L)	Total Hardness (as CaCO ₃ , 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

(試験手順例)

魚類急性毒性試験
(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「魚類急性毒性試験」について、推奨種であるヒメダカ（メダカ：*Oryzias latipes*）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。

魚類急性毒性試験では、魚類を被験物質に96時間暴露し、死亡率を測定することにより、魚類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。

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	じゅん化	3
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	7
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	8
	(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	10
7.1	被験物質濃度の測定	10
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%死亡濃度 (LC ₅₀) の算出	11
(参考)	被験物質実測濃度の平均値の算出について	12
	(1) 半止水式試験の場合	12
	(2) 流水式試験の場合	12
文献・資料		12
	(1) 基本とした資料	12
	(2) 引用文献	13

(3) 参考文献・資料.....	13
別添 OECD 試験水（人工調整水）の調製方法と試験水の化学的条件..	14
参考資料 試験結果のとりまとめに必要な表の例.....	15

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、ヒメダカ（メダカ：*Oryzias latipes*）の稚魚期以降の外見上正常な魚（全長約3cm）を用いる。

本種は、トウゴロウイワシ目メダカ科に属し、北海道を除く日本列島、朝鮮半島、台湾、中国などの小川、水流のゆるやかな河川などの淡水域、時には潮溜などの汽水域にも生息している¹⁾。メダカは昔は肥料や食用に利用されていたが、現在では大型魚の餌生物、あるいは実験動物として広い領域にわたって活用されている¹⁾。実験動物としてのメダカの長所としては、①淡水魚の養殖魚者から容易に手に入り、飼育維持費も他の淡水魚に比べて安いこと、②小型魚のため、実験室の狭い所でも飼育でき、溜まり水でよく、至適温度領域が広いこと、③条件がよければ毎日産卵することなどが挙げられている¹⁾。なお、ヒメダカは野生のメダカから観賞用あるいは大型魚の餌に用いるために改良されたもので、体色が野生のメダカに比べて赤みを帯びている。



写真2.1 *Oryzias latipes* (Temminck and Schlegel)

2.2 提供機関

ヒメダカは、独立行政法人 国立環境研究所において、継代飼育しているものを提供する予定であるが、入手先、または飼育方法等が明確であれば、他の業者から購入することもできる。

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：029-850-2900

2.3 じゅん化

すべての供試魚を、少なくとも試験に使用する12日前に入手し、じゅん化しなければならない。48時間の観察期間に続いて、暴露開始前に少なくとも7日間試験で使用する水質の水で以下の条件下においてじゅん化する。じゅん化期間中の環境条件は試験条件と同条件（光周期、水質、温度等）とし、餌はブラインシュリンプあるいは市販のテトラミン等を与える。なお、観察期間以降は薬浴は行わない。

- ・照明 一日当たり12～16時間
- ・温度 21～25℃（ヒメダカの適温）
- ・酸素濃度 飽和酸素濃度の少なくとも80%
- ・給餌 暴露開始の24時間前まで、週当たり3回又は毎日

じゅん化期間中の死亡率を記録し、供試魚に以下の基準を適用する。

- ・じゅん化期間中の連続した7日間で全体の死亡率が10%を超えた場合、試験に使用しない。
- ・じゅん化期間中の連続した7日間で全体の死亡率が5～10%の間の場合、7日間延長してじゅん化する。
- ・じゅん化期間中の連続した7日間で全体の死亡率が5%より低い場合、試験に使用できる。

2.4 試験系の再現性

試験生物は定期的に（少なくとも、6ヶ月毎）基準物質（例：硫酸銅（Ⅱ）（無水）、試薬特級）による急性毒性試験を行う。試験結果は、試験系の再現性（ヒメダカの感受性及び試験系の安定性）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事業における基準物質（硫酸銅（Ⅱ）無水）のヒメダカに対する毒性値の例を示した。

表2.1 硫酸銅（Ⅱ）（無水）に対する *Oryzias latipes* の急性毒性試験結果

機関	魚類 96hr-LC ₅₀ (mg/L)				備考
	AVE	MIN	MAX	標準偏差	
A	0.93	0.44	1.50	0.287	n=24 無水物換算
B	0.583	0.273	1.278	0.363	n=25 水和→無水物換算
C	0.49	0.32	0.90	0.22	n=27 無水物換算
D	0.45	0.20	0.73	0.207	n=6 硬度=37.0 (H12・as CaCO ₃)

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
 - ・メスシリンダー
 - ・メスフラスコ
 - ・ガラス棒
 - ・ピペット
 - ・マイクロピペット
 - ・メンブレンフィルター (孔径 $0.45\mu\text{m}$ 、 $0.22\mu\text{m}$)
- 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) でできたものを用いる。

試験容器は、原則として1~5L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、ゆるく蓋をする。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か、水面を覆うなど、密閉系で試験を行うこととし、溶存酸素不足を防ぐために十分な大きさの試験容器を用いる。試験容器の大きさは、試験方式 (半止水式又は流水式) により異なるが、全長約3cmのメダカを用いて試験容器当たり7尾で試験を行う場合、2Lの試験溶液の入る3L以上の容器が必要となる。また、ASTMの標準ガイド²⁾では水平方向と深さは試験生物の3倍以上の容器を用いるべきで、0.5g以下の魚には50mmの深さの試験溶液が必要としている。

なお、試験に用いるまでの間の飼育には例えば45~60cmガラス製水槽を用い、安定した状態を保てるように、白色板等で外部と遮蔽することもよい。

(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²⁾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²⁾

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(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次に示した。

- ①飼育関連装置：温度（±1℃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）、エアープンプ（汚染された空気が流入しないように工夫すること）等。なお、飼育については常温でも可能。
- 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

ヒメダカ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、充分通気したもの）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。全硬度は炭酸カルシウム濃度 $10\sim 250\text{mg}/\text{L}$ で、 $\text{pH}6.0\sim 8.5$ の水が望ましい。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。

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、100mg/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。LC₀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、96時間後に（必要に応じて24時間、48時間、72時間後も）死亡魚数を測定する。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96時間-LC₅₀を含み、公比を原則1.3~2.2(50%死亡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、ヒメダカを死に至らしめる濃度と、全く死なない濃度が各々1濃度、一部の魚が死ぬ濃度が3濃度含まれるようにする。予備試験の結果、試験上限濃度(100mg/L)又は試験溶液を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、暴露終了時まで1尾以上の死亡が観察された場合、正規の試験を行う。限度試験の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LC₅₀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、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流水式で行うこと。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：96 時間とする。
- ・連数：1 容器／濃度試験区
- ・収容量：半止水式では最高密度で 1.0 魚体 g/L（約 3cm のヒメダカでは 1L 当たり 3～4 尾に相当）が推奨される。流水式ならもっと多く収容できる。
- ・供試魚の数：各試験濃度区及び対照区で少なくとも 7 尾の供試魚を用いる。
- ・試験温度：21～25℃の範囲で、例えば 23℃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：暴露期間中、通気は行わないが、試験溶液中の溶存酸素濃度は飽和濃度の 60%以上（約 5mg/L 以上）を確保する。被験物質の顕著な消失がなければばっ気を行ってもよい。
- ・pH：試験溶液の pH 調整は行わない。暴露期間中の pH は 6～8.5 とし、変動は 1.0 以内とする。pH が 6～8.5 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 の変動が魚が死亡した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：室内光で 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
- ・かく乱：魚の行動を変化させるようなかく乱は避ける。

第 6 節 観察

暴露開始後少なくとも 24、48、72、96 時間後に魚の様子を観察する。観察可能な動き（例えば、鰓蓋の動きなど）がなく、尾柄部に触れて反応がない場合には魚は死亡しているとみなす。観察時に死亡魚を発見した場合は、水質の悪化が起こらないよう速やかに取り除き、また死亡率を記録する。暴露開始後、3 時間と 6 時間後にも観察することが望ましい。平衡、遊泳行動、呼吸機能、体色などに異常が観察された場合や、亜致死的な影響が観察された場合は具体的に記録しておく。死亡の他にも、行動や外見の異常が見られた場合には記録する。一般的に記載する症例と定義を以下に示す*。その他特異的症例（背曲がり、出血、体色変化、粘液の分泌、平衡失調、立鱗等）については、観察された場合に別途具体的にその旨を記載する。

* 一般的症例と定義

- ・異常呼吸：対照区の魚と比較して鰓蓋の動きが異なるもの。
- ・異常遊泳：明らかに対照区の魚と異なる遊泳をしたもの。動作の緩慢、過敏、痙攣、反転、鼻上げ等。
- ・遊泳不能：底部または水面で動いてはいるものの、水中を遊泳することが不可能なもの。横転、仮死を含む。

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、半止水式では、換水の前後2セット（24時間おきに換水する場合、例えば、暴露開始時（0時間）、24時間目の換水直前、72時間目の換水直後、暴露終了時（96時間後））に測定する。また、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

試験環境（水温、溶存酸素濃度とpH）の測定は、被験物質の分析時に併せて行う。例えば、流水式では暴露開始時及び終了時、また、半止水式では7.1項に示した被験物質の分析時に測定する。なお、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

次の条件が満たされない場合、試験を不成立とし、再試験を行う。

- ・対照区の死亡率が暴露終了時に10%(供試魚数が10尾より少ない場合は1尾)を超えないこと
- ・溶存酸素濃度が暴露期間中少なくとも飽和酸素濃度の60%を維持していること
- ・被験物質の濃度が暴露期間中十分維持されていることが明らかであること。

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）。

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、予想する主な減少理由（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死亡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%死亡濃度 (LC₅₀) の算出

各試験濃度区と対照区の死亡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、48 時間、72 時間及び 96 時間における死亡率をプロットする（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、暴露期間 96 時間における LC₅₀（95%信頼限界）等を求める。

得られたデータが統計計算を行うのに不十分な場合で、全く死亡を起こさない最高試験濃度と 100%死亡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 LC₅₀ の近似値とみなす。

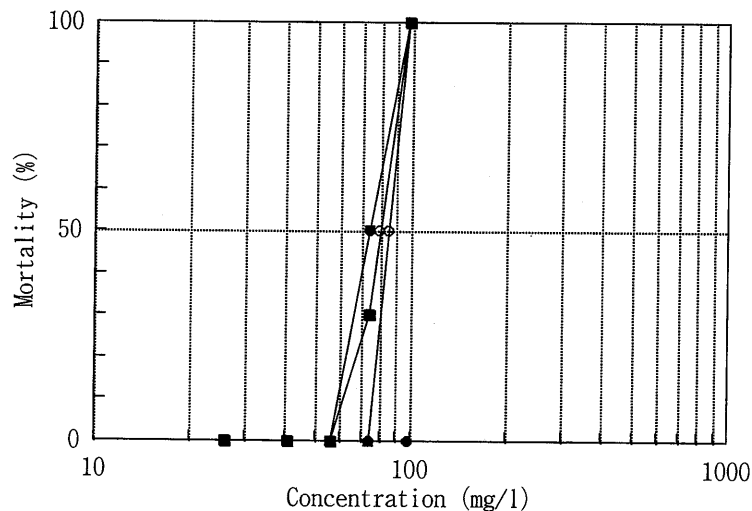


Figure 5.1. Concentration-Mortality Curve

◆ 24 hr. ▲ 48 hr. ■ 72 hr. ▼ 96 hr. ○ LC50

図 9.1 Concentration-Mortality Curve

出典) (財) 日本食品分析センター (2003) : 平成 14 年度生態影響試験実施事業報告、一エチレンジアミン四酢酸一

(参考) 被験物質実測濃度の平均値の算出について

(1) 半止水式試験の場合

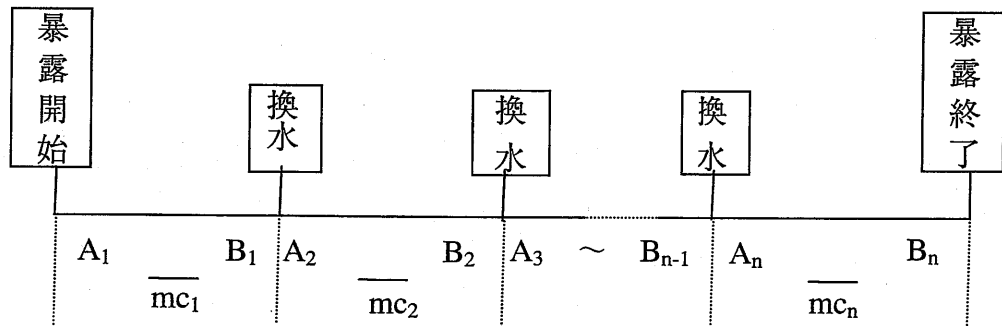
(以下に時間加重平均の方法を示す、ただし、測定(換水)間隔が同じ場合)

$$\overline{mc}_n = \frac{\text{conc}A_n - \text{conc}B_n}{\ln(\text{conc}A_n) - \ln(\text{conc}B_n)}$$

\overline{mc}_n : 各暴露期間の平均測定濃度

$\text{conc}A_n$: 暴露開始時又は換水後の測定濃度

$\text{conc}B_n$: 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。

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

(2) 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。)

$$\overline{mc} = \frac{\text{conc}1 + \text{conc}2 + \dots + \text{conc}n}{n}$$

$\text{conc} n$: 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 VI 魚類急性毒性試験

- ・ OECD (1992) : OECD GUIDELINE FOR TESTING OF , Fish, Acute Toxicity Test (TG 203):pp.9.

(2) 引用文献

- 1) 岩松鷹司 (1998) : メダカ学全書, 大学教育出版:pp.360.
- 2) American Society For Testing and Materials (2002) : Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians1, E 729 - 96:pp.19.

(3) 参考文献・資料

- 1) 引用文献以外の魚類の毒性試験法については以下の知見も参考になる。
 - ・ ISO (1996) : Water quality - Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, ' Cyprinidae)] -Part 2: Semi-static method, ISO 7346-2:pp.11.
 - ・ ISO (1996) : Water quality - Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, ' Cyprinidae)] -Part 3: Flow-through method, ISO 7346-3:pp.11.
 - ・ 茂岡忠義・佐藤保夫 (2003) : 魚類急性毒性および延長毒性試験—OECD 化学品テストガイドラインに準拠した試験方法—, 第5章脊椎動物, 日本環境毒性学会編 生態影響試験ハンドブッカー—化学物質の環境リスク評価—, 朝倉書店:256-262.
- 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 OECD 試験水（人工調整水）の調製方法と試験水の化学的条件

(1) OECD (ISO6341-1982) 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 を脱イオン水に溶かし 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 を脱イオン水に溶かし 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 を脱イオン水に溶かし 1L とする。

(d) 塩化カリウム溶液

塩化カリウム 0.23g を脱イオン水に溶かし 1L とする。

(a) ~ (d) の溶液各々 25mL を脱イオン水に混合し、全量を 1 L とする。この溶液のカルシウムイオンとマグネシウムイオンの量の和は、2.5mmol/L である。また、カルシウムとマグネシウムイオンの比は 4 : 1 であり、ナトリウムとカリウムイオンの比は 10 : 1 である。

脱イオン水の電導度は $10 \mu\text{S/cm}$ を越えてはならない。すべての試薬は分析用特級とする。

調製した人工調整水は、溶存酸素が飽和に達するまでばっ気し、使用前までばっ気をせずに約 2 日間貯蔵する。

(2) 試験水の化学的条件

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 $\mu\text{g/L}$ 未満
塩素	10 $\mu\text{g/L}$ 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

ヒメダカの急性毒性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 Measured Concentration of the Test Substance in the Test Water
(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration, mg/L				Mean ^a Measured Concentration (mg/L)
	0 Hour new	Percent of Nominal	24 Hours old	Percent of Nominal	
Control	< 0.009	—	< 0.009	—	—
0.10	0.100 (0.015)	100	< 0.009 (0.075)	—	0.030
0.18	0.182 (0.019)	101	< 0.009 (0.148)	—	0.040
0.32	0.337 (0.021)	105	< 0.009 (0.275)	—	0.055
0.56	0.556 (0.031)	99	< 0.009 (0.473)	—	0.071
1.0	1.02 (0.040)	102	< 0.009 (0.831)	—	0.096
1.8	1.86 (0.061)	103	0.080 (1.58)	4	0.386
3.2	3.36 (0.089)	105	0.906 (1.47)	28	1.74

a: Geometric mean
 new: Freshly prepared test solutions
 old: Test solutions after 24 hours exposure
 (): Crotonic acid(mg/L)

表2. The Numbers of Dead Fish (Percent Mortality)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Cumulative Mortality (Percent Mortality)			
		24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
Control	—	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
0.10	0.030	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
0.18	0.040	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
0.32	0.055	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
0.56	0.071	1 (10)	1 (10)	1 (10)	1 (10)
1.0	0.096	3 (30)	4 (40)	4 (40)	7 (70)
1.8	0.386	7 (70)	10 (100)	10 (100)	10 (100)
3.2	1.74	10 (100)	10 (100)	10 (100)	10 (100)

a: Geometric mean

表3. Calculated LC_{50} Values

Exposure Period (Hours)	LC_{50} (mg/L)	95 % Confidence Limits (mg/L)			Statistical Method
24	0.216	0.141	~	0.410	Probit
48	0.114	0.090	~	1.10	Probit
72	0.115	0.090	~	1.10	Probit
96	0.072	0.069	~	0.074	Probit

出典：株式会社クレハ分析センター（2003）：平成 14 年度生態影響試験実施事業報告、
 ークロトンアルデヒドー