

(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。

(148)

## 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 觀察	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）の調製方法と試験用水の化学的条件 ..	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
- ・C A S 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

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<sup>1)</sup>。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<sup>1)</sup>。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<sup>1)</sup>。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

〒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 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 時間の観察期間に統いて、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°C (ヒメダカの適温)
- ・ 酸素濃度 鮑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 <sub>50</sub> (mg/L)				
	AVE	MIN	MAX	標準偏差	備考
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 <sub>3</sub> )

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<sup>2)</sup>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<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。
- ・水ですぐ。
- ・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・希釀水のいずれかで2回以上すぐ。

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<sup>-</sup>)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釀水を入れて行う。）計測器及び試験容器は使用する直前に希釀水ですぐ。

### 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。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  $10\sim250\text{mg/L}$  で、pH  $6.0\sim8.5$  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、 $100\text{mg/L}$  以上であれば目視にて可とし、 $100\text{mg/L}$  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。 $LC_0$   
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-LC<sub>50</sub>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、全く死がない濃度が各々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、暴露終了時までに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LC<sub>50</sub>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少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°C の範囲で、例えば 23°C 一定に設定し、経時的および各試験容器間の変動は ±1.0°C 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氣を行ってもよい。
- ・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く乱は避ける。

## 第 6 節 觀察

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尾より少ないと場合は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 ( $LC_{50}$ ) 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 時間ににおける  $LC_{50}$  (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  $LC_{50}$  の近似値とみなす。

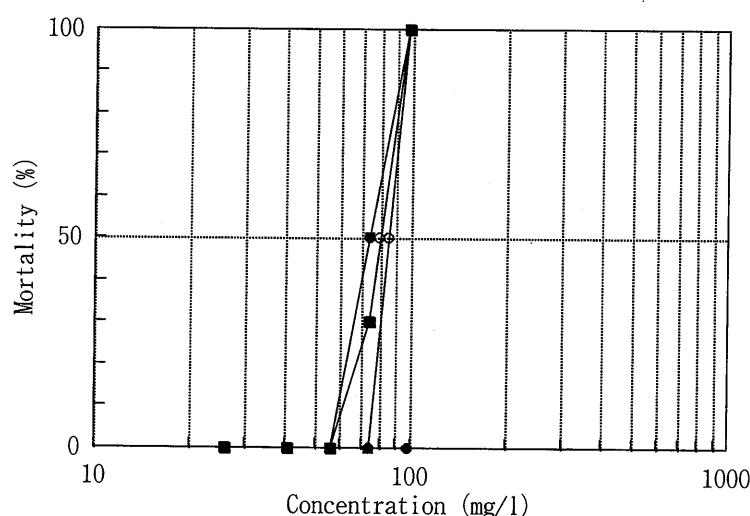


Figure 5.1. Concentration-Mortality Curve

◆ 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、－エチレンジアミン四酢酸－

(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

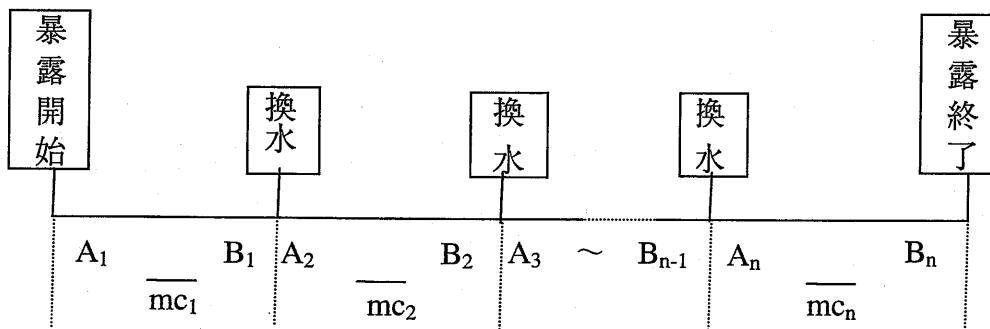
(以下に時間加重平均の方法を示す、ただし、測定(換水)間隔が同じ場合)

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

$\overline{mc}_n$  : 各暴露期間の平均測定濃度

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。

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

(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。)

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

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 1 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 Amphibiansl, 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ク—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）の調製方法と試験用水の化学的条件

## (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  $10 \mu\text{S}/\text{cm}$  を越えてはならない。すべての試薬は分析用特級とする。

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

## (2) 試験用水の化学的条件

物質名	濃度条件
粒子状物質	2.0 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 $\mu\text{g}/\text{L}$ 未満
塩素	10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 未満
全有機リン系農薬	5.0 ng/L未満
全有機塩素系農薬及びPCB	5.0 ng/L未満
全有機塩素	2.5 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)	0 Hour new	Measured Concentration, mg/L	Percent of Nominal	24 Hours old	Percent of Nominal	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)
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 <sup>a</sup> 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 ( 0 )
0.10	0.030	0 ( 0 )	0 ( 0 )	0 ( 0 )	0 ( 0 )	0 ( 0 )
0.18	0.040	0 ( 0 )	0 ( 0 )	0 ( 0 )	0 ( 0 )	0 ( 0 )
0.32	0.055	0 ( 0 )	0 ( 0 )	0 ( 0 )	0 ( 0 )	0 ( 0 )
0.56	0.071	1 ( 10 )	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<sub>50</sub> Values

Exposure Period (Hours)	LC <sub>50</sub> (mg/L)	95 % Confidence Limits (mg/L)		Statistical Method
24	0.216	0.141	~	0.410
48	0.114	0.090	~	1.10
72	0.115	0.090	~	1.10
96	0.072	0.069	~	0.074

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、一クロトンアルデヒドー