

< 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 >

適用範囲

ここでは、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の標準となるべき方法について規定する。

定義

この試験法において使用する用語は、次に掲げた定義による。

1 試験方式

- ・ 止水式試験 試験容器中の試験溶液を、暴露期間中、交換しないで行う試験をいう。
- ・ 半止水式試験 試験容器中の試験溶液を、ある期間（例えば、24 時間）経過ごとにバッチ式に交換して行う試験をいう。
- ・ 流水式試験 試験容器中の試験溶液を、自動的に絶えず交換し、交換した液は排水して行う試験をいう。

2 エンドポイント

- ・ LC₅₀ ある特定期間内（記載しなければならない。）に供試生物の 50% を死亡させたと算定される試験溶液中の被験物質濃度をいう。
- ・ EC_x ある特定期間内（記載しなければならない。）に供試生物の生長、遊泳、繁殖等を x% 減少させたと算定される試験溶液中の被験物質濃度をいう。
- ・ LOEC 暴露期間中に、対照区と比較して、被験物質が供試生物の繁殖等に統計的に有意な影響（ $p < 0.05$ ）を与えていると観察される最低の試験濃度をいう。
LOEC より高濃度な全ての試験濃度区では、LOEC で観察されるのと同様以上の有害な影響が観察されなければならない。これらの条件が満たされない場合は、どのようにして LOEC や NOEC を選択したかの十分な説明がなされなければならない。
- ・ NOEC LOEC より一段階下の試験濃度で、対照区と比較したとき、暴露期間中に統計的に有意な影響（ $p < 0.05$ ）を与えない最高の試験濃度をいう。

3 その他

- ・ 閾値濃度（Threshold Concentration） 既存で信頼できる藻類又は急性無脊椎動物（例えばミジンコ）毒性試験データの最小 EC₅₀ 値をいう（No. 126 SHORT GUIDANCE ON THE THRESHOLD APPROACH FOR ACUTE FISH TOXICITY OECD, 2010（以下「OECD, 2010」という。）。）
- ・ 全長 魚の正中線に沿って吻端から尾びれの先端までの直線的長さをいう。
- ・ UVCB 物質（chemical substances of Unknown or Variable composition, Complex reaction products and Biological materials） 組成が未知か又は不定な構成要素を持つ物質、複雑な反応生成物又は生体物質をいう。
- ・ (Q)SAR モデル 物質の化学構造や物性から生物活性を予測する構造活性相関（(Quantitative) Structure-Activity Relationship）モデルをいう。
- ・ カテゴリーアプローチ 有害性が類似又は規則的なパターンを示す構造の類似した物質群をグループ化して評価を行う方法をいう。
- ・ リードアクロス（read-across） 試験データがない化学物質の安全性を類似物質の試験データから推定する手法をいう。
- ・ トレンドアナリシス推定値 観測された測定値の時系列を踏まえて傾向分析して推定した値をいう。

- ・レンジファインディングテスト 暴露濃度の水準を決めるための予備試験をいう。

総則

1 試験実施に当たっての基本的考え方

藻類、ミジンコ又は魚類を用いた試験は、培地又は試験用水（以下「培地等」という。）を通じて供試生物を被験物質に暴露させ、その毒性を明らかにすることを目的とするものであり、原則として被験物質を培地等に溶解させて実施するものである。そのため、試験の実施に当たり、被験物質の試験条件下での培地等への溶解性を確認する必要がある。また、試験溶液中の被験物質を定量するための信頼性のある分析法が必要である。

また、試験は暴露期間中可能な限り一定条件を維持して行われるべきである。例えば、被験物質の濃度については、暴露期間中、初期濃度（設定濃度又は暴露開始時の実測濃度をいう。以下同じ。）の少なくとも80%を維持できることが望ましい。各被験物質ごとの試験条件の検討に当たっては、構造式、純度、水及び光に対する安定性、解離定数（ pK_a ）、オクタノール水分係数（ P_{ow} ）、蒸気圧及び微生物等による分解度に関する情報をできるだけ収集する。被験物質は蒸気圧が大きい場合には暴露期間中に損失することが考えられることから、損失の有無の指標となるヘンリー定数を求めておくことが望ましい。ヘンリー定数は溶解度と蒸気圧から計算により求めることができる。

2 試験溶液の調製

各濃度の試験溶液の調製は、必要量の被験物質を培地等で直接溶解するか、あるいは、適切な濃度の被験物質の原液を調製し、原液を培地等で希釈することにより行う。被験物質の原液は助剤を使用せずに調製することが望ましいが、被験物質を直接水又は培地等に溶解して原液を調製することが困難な場合には、超音波等の機械的な分散によるか、あるいは、低毒性の有機溶剤等の助剤（溶剤又は分散剤をいう。以下同じ。）を使用してもよい。ただし、原則として界面活性作用のある分散剤は使用しないこととし、試験濃度は被験物質の試験条件下での培地等への溶解度（以下「溶解限度」という。）以下に設定することとする。

助剤を使用した場合は、試験濃度区で使用した助剤と同じ濃度の助剤対照区を追加して設けなければならない。また、助剤の濃度は100mg/Lを超えてはならない。なお、助剤の濃度は、原則として全試験濃度区で一定とする。試験結果の評価においては、試験の結果は被験物質そのものと助剤との複合作用による可能性があることに留意しなければならない。

3 難水溶性物質の扱い

被験物質が水に溶けにくい場合であっても、原則として分散剤は使用せず、試験濃度は被験物質の溶解限度以下に設定することとする。ただし、被験物質の培地等への溶解度が極端に低く、通常の測定法では溶解限度を求めることができない場合であっても、溶解限度以下の濃度では LC_{50} 等の毒性値は求めることができない場合には、分散系で試験を行うこととする。当該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、分散剤を使用して試験を行ってもよい。

試験の結果、被験物質の培地等への溶解又は分散可能な上限濃度以下の濃度では LC_{50} 等の毒性値は求められないと結論づけるためには、被験物質を培地等に可能な限り溶解又は分散させる手段を講じた上で、被験物質の培地等への溶解又は分散可能な上限の濃度の値を測定しておくことが必要である。

なお、難水溶性物質の扱いについては、OECD ガイダンス文書（Guidance document on aqueous-phase aquatic toxicity testing of difficult test chemicals, Series on Testing and Assessment No. 23 second edition, 2019, OECD, 以下「OECD ガイダンス文書 No.23」という。）も参照して対応すること。

藻類生長阻害試験

目的

本試験は、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する。なお、本試験において生長とは暴露期間中の生物量の増加をいう。

1 供試生物

Pseudokirchneriella subcapitata (旧名 *Selenastrum capricornutum*) が推奨されるが、*Desmodesmus subspicatus* (旧名 *Scenedesmus subspicatus*) など、他の種を用いてもよい。なお、これらの2種以外の種を使用する場合には、暴露期間中、指数増殖期が維持されることが確認されていなければならない。

2 試験容器及び機器

本試験では次に示す試験容器及び機器を用いる。

2 - 1 試験容器

試験容器等、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でできたものを用いる。試験容器は、空気に接する面が十分確保できるものを用いる。例えば、100mLの容量の試験溶液には250mLの三角フラスコが適している。

被験物質が揮散しやすい物質の場合は、密栓付フラスコを使用するなど適切な対応を行う。

2 - 2 培養装置

培養は、温度、照明条件を一定に維持できる培養器又は培養室において行う。

2 - 3 生物量計測装置

生物量の計測は、例えば、粒子計数装置、顕微鏡下での血球計算盤の使用、蛍光光度計、分光光度計又は比色計を用いて行う。なお、分光光度計を使用して低濃度の細胞濃度を測定する場合は、少なくとも4cmの光路長のセルを使用する。

3 培地

次の組成の培地又はこれと同程度の組成の培地が推奨される。

- ・ 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
- ・ リン酸二水素カリウム 1.6 mg/L
- ・ 塩化鉄()六水和物 0.064 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

この培地は大気との平衡状態で pH は 8.1 となる。

4 前培養

藻類を試験条件にじゅん化させ、試験に用いる指数増殖期の藻類を得るため、暴露開始前に 2 ~ 4 日間、試験と同条件で前培養を行う。前培養液に接種する藻類の生物量を調整し、暴露開始時に指数増殖期になるようにする。

5 試験溶液

各濃度の試験溶液の調製は、必要量の被験物質を培地で直接溶解するか、あるいは、適切な濃度の被験物質の原液を調製し、原液を培地で希釈することにより行う。この他、試験溶液の調製に関しては、総則の 2 試験溶液の調製によるものとする。

6 試験条件

6 - 1 暴露期間

原則として 72 時間とする。

6 - 2 初期生物量

試験での初期生物量は、藻類が暴露期間中指数関数的な増殖を維持できるように十分低くする。乾燥重量が 0.5mg/L を超えないように設定する。例えば、*Pseudokirchneriella subcapitata* では $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ cells/mL、*Desmodesmus subspicatus* では $2 \sim 5 \times 10^3$ cells/mL とすることが推奨される。他の種を使う時は乾燥重量で同程度となるようにする。

6 - 3 試験濃度

少なくとも 5 濃度区を等比級数的にとる。この濃度範囲で、0 ~ 75% の生長阻害を起こす範囲が含まれることが望ましい。なお、100mg/L 以上の濃度で試験を行う必要はない。

別に対照区をおく。やむを得ず助剤を使用した場合は、対照区に加え助剤対照区を設ける。

6 - 4 連数 (繰返し)

各試験濃度区について 3 連とする。対照区については 6 連 (助剤対照区を設けている場合には、対照区については 3 連、助剤対照区については 6 連) で試験を実施することが望ましい。

6 - 5 培養方法

- ・ 温度 21 ~ 24 の範囲内で設定し、培養器又は培養室内の変動は ± 2 以内とする。
- ・ 照明 60-120 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (白色又は昼光色の蛍光灯を用い、連続的かつ均一に照射する。)
- ・ 培養方法 振とう培養 (被験物質が揮発性でない場合は、試験容器は通気性のよい蓋を用いる。暴露期間中、藻類は懸濁状態にしておく必要がある。)

7 被験物質への暴露の開始

各試験容器に、6 - 2に基づき設定した生物量になるように前培養した藻類を接種して暴露を開始する。

8 生物量の測定

各試験容器の生物量は、少なくとも暴露開始後 24、48 及び 72 時間後に測定する。滅菌した培地を粒子計測装置のバックグラウンドや分光光度計等のブランクとして用いる。

9 被験物質濃度等の測定

9 - 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こととする。また、暴露期間中に設定濃度より 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ことが望ましい。さらに、揮発性あるいは吸着性の強い物質など、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ことが望ましい。

9 - 2 試験環境の測定

試験溶液の pH を暴露開始時及び終了時に測定する。暴露期間中、対照区（助剤対照区を含む。）の pH は通常の場合、1.5 以上変動してはならない。

10 限度試験

100mg/L 又は水溶解限度のより低い方の濃度で被験物質が毒性を示さないことが予想される場合等には、この濃度で限度試験を行い、NOEC 等がこの濃度より大きいことを示すことができる。前述の試験条件および有効性の基準は、限度試験にも適用するが、試験の連数は 2 倍に増やすこととする。対照区（助剤対照区を設けている場合には助剤対照区）と試験濃度区の生長速度等の平均値を比較するために、t 検定等の統計解析を行う。

11 試験の有効性

Pseudokirchneriella subcapitata 及び *Desmodesmus subspicatus* では、次の条件が満たされる場合、試験は有効とみなされる。

- ・ 対照区（助剤対照区を含む。）の生物量が暴露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(助剤対照区の毎日の生長速度の変動係数を含む。)が暴露期間を通じて 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(助剤対照区の繰り返し間の生長速度の変動係数を含む。)が 7%を超えないこと。

12 結果の算出方法

1 2 - 1 結果の取扱い

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。暴露期間中、被験物質濃度が設定濃度または初期実測濃度の ± 20%以内に保たれていたことが証明できる場合には、設定濃度または初期実測濃度に基づいて結果の算出を行うことができる。

各試験濃度区と対照区(助剤対照区を含む。)の生物量を暴露期間と被験物質濃度とともに表にする。各試験濃度区の生物量の平均値と対照区の生物量の平均値(助剤対照区の生物量の平均値を含む。)を時間に対してプロットし、生長曲線を描く。このとき、対照区(助剤対照区を含む。)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。

被験物質濃度と影響の関係は、1 2 - 2 に示す方法を用いて計算する。

1 2 - 2 生長速度の比較

指数関数的に増殖しているときの生長速度は次のようにして計算される。

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i}$$

ここで、

μ_{i-j} = 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。

X_i = t_i 時の生物量。試験開始時(t_0)の生物量については設定値を用いる。

X_j = t_j 時の生物量。

t_i = 暴露開始後 i 回目に生物量を測定した時間(d)

t_j = 暴露開始後 j 回目に生物量を測定した時間(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。

なお、生長速度は、生物量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(助剤対照区を設けている場合には助剤対照区)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_r)との間の差として次のように計算する。

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

1 2 - 3 毒性値の算出

I_μ の値を被験物質濃度の対数に対してプロットする。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EC₅₀はErC₅₀と表す。

また、対照区(助剤対照区を設けている場合には助剤対照区)と各試験濃度区の μ_{0-3d}

の値について、分散分析と多重比較を行い、NOEC を求める。

1 3 結果のまとめ

試験の結果は様式 9 によりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

ミジンコ急性遊泳阻害試験

目的

本試験は、ミジンコを被験物質に 48 時間暴露し、対照区に対する遊泳阻害率を測定することにより、ミジンコの遊泳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、本試験において、遊泳阻害とはミジンコが試験容器を穏やかに動かしても 15 秒間泳げない状態をいう。

1 供試生物

オオミジンコ (*Daphnia magna*) が推奨されるが、*Daphnia pulex* など、他の *Daphnia* 属の種を用いてもよい。

供試ミジンコは、暴露開始時に 24 時間齢未満のものを用いる。また、ばらつきを減らすため、親ミジンコの 1 回目の産仔によるものは使用しない。供試ミジンコは、健康に飼育された親世代（例えば、高死亡率、雄及び抱卵嚢の出現、1 回目の産仔までの期間の遅延、変色等の飼育時に何らかのストレスを受けた兆候がないもの）から得られたものを用い、また、すべて同じ系統のものを用いることとする。

供試ミジンコを得るための親世代のミジンコは、試験条件（光・温度・水）と同じ条件下で飼育されなければならない。もし、試験に用いる水が通常のみジンコを飼育する際に用いられるものと異なる場合は、暴露開始前にじゅん化期間を設けるとよい。じゅん化させるには、暴露開始前に最低 48 時間、ミジンコを試験温度の試験用水で飼育し、生まれた子ミジンコを試験に用いるようにする。

2 試験容器及び機器

本試験では次に示す試験容器及び機器を用いる。

2 - 1 試験容器

試験容器等、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でできたものを用いる。水の蒸発及び試験溶液へのほこりの混入を防ぐため、試験容器は緩く蓋をする。

被験物質が揮散しやすい物質の場合は、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。

2 - 2 器具

本試験には、溶存酸素計（少量のサンプルで溶存酸素濃度を計測できる微小電極や他の適した器具）、pH 計測器、温度管理に適切な器具等を用いる。

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）、脱塩素した水道水又は人工調製水（例：付表 1）のいずれを用いてもよい。また、試験用水は付表 2 の条件を満たすものとする。

ElendtM4、M7 飼育水のようなキレート剤が含まれている水は、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 250mg/L 以下とし、pH は 6 ~ 9 とする。

試験用水は、試験に使用する前にばっ気を行う。

4 試験溶液

各濃度の試験溶液の調製は、必要量の被験物質を試験用水で直接溶解するか、あるいは、適切な濃度の被験物質の原液を調製し、原液を試験用水で希釈することにより行う。この他、試験溶液の調製に関

しては、 総則の2 試験溶液の調製によるものとする。

試験は pH を調整せずに行う。pH が 6 ~ 9 の範囲でない場合、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することが望ましい。この 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う。pH 調整には塩酸又は水酸化ナトリウムを用いることが望ましい。

5 試験条件

5 - 1 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。

5 - 2 暴露期間

48 時間とする。

5 - 3 収容量と供試数

- ・収容量 1 頭当り少なくとも 2ml の試験溶液を用いる。
- ・供試数 各試験濃度区及び対照区で少なくとも 20 頭を使用する。この場合、各 5 頭ずつ 4 連に分けることが望ましい。

5 - 4 試験濃度

少なくとも 5 濃度区を等比級数的にとる。公比は 2.2 を超えないことが望ましい。最高試験濃度区では、100%の遊泳阻害が起こることが望ましいが、100mg/L 以上の濃度で試験を行う必要はない。最低試験濃度区では影響が観察されないことが望ましい。

別に対照区をおく。やむを得ず助剤を使用した場合は、対照区に加え助剤対照区を設ける。

5 - 5 飼育方法

- ・照明 明暗周期を 16 : 8 時間に設定することが望ましい。被験物質が光に対して不安定な場合は暗条件でもよい。
- ・温度 18 ~ 22 の範囲内に設定し、各試験容器間の変動は ± 1.0 以内とする。
- ・溶存酸素濃度 3mg/L を下回ってはならない。暴露期間中は、原則としてばっ気は行わない。
- ・給餌 行わない。

6 被験物質への暴露の開始

各試験容器に、5 - 3 で設定した供試数のミジンコを移して暴露を開始する。

7 観察

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。ミジンコが試験容器を穏やかに動かしても 15 秒間泳げない場合、遊泳阻害されたとみなす。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。

8 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ことが望ましい。さらに、揮発性あるいは吸着性の強い物質など、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 時間隔で分析を追加することが望ましい。

半止水式試験の場合は、換水直後と次の換水の直前を 1 セットとして、少なくとも 2 セット測定を行うことが望ましい。

8 - 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。また、暴露期間中、pH は通常の場合 1.5 以上変動してはならない。

9 限度試験

100mg/L 又は水溶解限度のより低い方の濃度で被験物質が遊泳阻害を示さないことが予想される場合等には、この濃度で限度試験を行い、EC₅₀ がこの濃度より大きいことを示すことができる。限度試験は 20 頭のみジンコ（5 頭ずつ 4 群に分けることが望ましい。）を用い、対照区においても同数を用いる。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。また、異常な行動が観察された場合は記録する。

10 試験の有効性

次の条件が満たされる場合、試験は有効とみなされる。

- ・対照区において、みジンコが 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。

11 結果の算出方法

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。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証明できる場合には、初期濃度に基づいて結果の算出を行うことができる。

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とともに、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。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 EC₅₀ 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、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の幾何平均を EC₅₀ の近似値とみなす。

12 結果のまとめ

試験の結果は様式 10 によりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

付表1 人工調製水

(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 μ 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（微量成分）と飼育水原液（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。

飼育水原液 の調製

各物質の飼育水原液 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（ ）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（ ）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 を調製した後、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 混合液」とする。

表1 飼育水原液 の構成物質と添加量等

飼育水原液 (単物質)	水に添加する量 (単位： mg/L)	飼育水原液 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	1,260	1.0	20,000 倍	0.25	80,000 倍

二水和物					
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 () 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 () 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 の最終的な希釈率

飼育水原液 の調製

飼育水原液 混合液を除く各物質の飼育水原液 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。

各飼育水の調製

各飼育水は、各物質の飼育水原液 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 の構成物質と添加量等 (Elendt M4 及び M7 共通)

飼育水原液 (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 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	1840	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 の最終的な希釈率

付表 2 試験用水の化学的條件

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

魚類急性毒性試験

目的

本試験は、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。

1 供試生物

メダカ（ミナミメダカ）が推奨されるが、例えば付表 1 に示す魚種などを使用してもよい。魚は良好な健康状態にあり、外見上の奇形があってはならない。また、各試験に使用する魚は同一供給源と個体群に由来した性分化していない同一齢（同一採卵日からふ化したバッチや同一週齢の様に同一齢と定義できる群）で、できる限り均一な大きさの幼魚を用いること。付表 1 の推奨魚種の場合、全長は推奨される全長の範囲にあること。なお、野生の個体からの魚の使用は可能な限り避けること。

付表 1 推奨される供試魚種の全長と試験の条件

魚種	推奨試験温度 ()	塩分濃度 (‰)	硬度 (mg/L CaCO ₃)	試験魚の推奨全長 (cm)
<i>Danio rerio</i> ゼブラフィッシュ	21-25	<0.2	40-250 <180 を推奨	1.0-2.0
<i>Pimephales promelas</i> ファットヘッドミノー	21-25	<0.2	40-250 <180 を推奨	1.0-3.0
<i>Cyprinus carpio</i> コイ	20-24	<0.2	40-250 <180 を推奨	2.0-4.0
<i>Oryzias latipes</i> メダカ（ミナミメダカ）	23-27	<0.2	40-250 <180 を推奨	1.0-2.0
<i>Poecilia reticulata</i> グッピー	21-25	<0.2	40-250 <180 を推奨	1.0-2.0
<i>Lepomis macrochirus</i> ブルーギル	21-25	<0.2	40-250 <180 を推奨	1.0-3.0
<i>Oncorhynchus mykiss</i> ニジマス	10-14	<0.2	40-250 <180 を推奨	3.0-6.0
<i>Gasterosteus aculeatus</i> イトヨ	13-19	0-35	40-7,500	1.0-2.0
<i>Cyprinodon variegatus</i> シープヘッドミノー	23-27	15-35	3,000-7,500	1.0-2.0
<i>Dicentrarchus labrax</i> ヨーロッパアンシーバス	18-22	15-35	3,000-7,500	4.0-8.0
<i>Pagrus major</i> マダイ	18-22	30-35	5,000-7,500	2.0-4.0

2 試験容器及び機器

本試験では次に示す試験容器及び機器を用いる。

2 - 1 試験容器

試験容器等、試験溶液と接触する器具は全てガラス製又は化学的に不活性な材質でできたものを用いる。シリコン樹脂の器具については、被験物質を吸着することから、試験溶液と接触する部分への使用は最小にすること。試験容器は、推奨収容量に対し適切な大きさのものを用いる。水の蒸発及び試験溶液へのほこりの混入を防ぐため、試験容器は緩く蓋をする。

被験物質が揮散しやすい物質の場合は、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。

2 - 2 器具

本試験には、以下の器具又は装置を適切に用いる。

- ・酸素濃度計
- ・pH 計
- ・照度計
- ・水の硬度を測定する装置
- ・適切な温度制御を行う装置
- ・全有機炭素（TOC）濃度及び / 又は化学的酸素要求量（COD）を測定する装置
- ・試験溶液中の被験物質濃度を測定する装置
- ・溶存酸素濃度を維持する装置

3 試験用水

淡水魚の場合、魚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）、脱塩素した水道水又は人工調製水（注参照）のいずれを用いてもよい。汽水魚又は海水魚の場合、海水よりも、脱イオン水又は蒸留水に市販の海塩（Instant Ocean® Sea Salt、Red Sea Salt®又は同等品）を加えることで調製した再構成水を用いることが望ましい。全硬度は炭酸カルシウム濃度で付表 1 に記載した範囲、pH は 6.0 ~ 8.5 の水が望ましい。人工調製水の調製に用いる試薬は分析用の特級であり、脱イオン水及び蒸留水の電導度は 10 µS/cm を超えてはならない。天然水を使用する場合には、OECD テストガイドライン 203 のパラグラフ 15 に定められている方法に準じて実施すること。

試験用水は半年ごとに分析を行うこと。分析は専門の分析機関に委託することが可能である。付表 2 に記載された水質の基準を満たした試験水は試験に適しているが、基準を満たせない場合でも、魚の飼育に影響を及ぼさないことを、飼育時やじゅん化期間における死亡率等により判断できるものは試験用水として使用しても差し支えない。

付表 2 試験水の水質

パラメーター	最大濃度
SS	5 mg/L
全有機炭素（TOC）	2 mg/L
非イオン化アンモニア（NH ₃ ）	1 µg/L
硝酸イオン（NO ₃ ⁻ ）	<9 mg/L
残留塩素	10 µg/L
全有機リン系農薬	50 ng/L
全有機塩素系農薬 + PCB	50 ng/L
全有機塩素	25 ng/L
アルミニウム（Al）	1 µg/L
ヒ素（As）	1 µg/L
クロム（Cr）	1 µg/L
コバルト（Co）	1 µg/L
銅（Cu）	1 µg/L
鉄（Fe）	1 µg/L
鉛（Pb）	1 µg/L
ニッケル（Ni）	1 µg/L
亜鉛（Zn）	1 µg/L

カドミウム (Cd)	100 ng/L
水銀 (Hg)	100 ng/L
銀 (Ag)	100 ng/L
化学的酸素要求量 (COD)	5 mg/L

4 じゅん化

全ての供試魚を、少なくとも試験に使用する 9 日前に入手し、じゅん化しなければならない。48 時間の新たな生育環境への移行期間に続いて、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。なお、新たな生育環境への移行期間以降の薬浴は行わないことが望ましい。

- ・照明 一日当たり 12～16 時間
- ・温度 供試魚種の適温 (付表 1 参照)
- ・酸素濃度 飽和酸素濃度の少なくとも 80%
- ・給餌 暴露開始の 24～48 時間前まで、3 回/週又は毎日給餌する。給餌量については、飽食になるまで与えても良いが、魚種によっては過度の給餌により付表 1 の全長を超えることがあるので注意すること。余剰な餌やフン等の老廃物が溜まらない様に除去すること。

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。2 回目のじゅん化期間の死亡率が 5% 以上の場合は、そのバッチは試験に使用しない。
- ・じゅん化期間中の連続した 7 日間で全体の死亡率が 5% より低い場合、試験に使用できる。

5 試験溶液

各濃度の試験溶液の調製は、必要量の被験物質を試験用水で直接溶解するか、あるいは、適切な濃度の被験物質の原液を調製し、原液を試験用水で希釈することにより行う。この他、試験溶液の調製に関しては、総則の 2 試験溶液の調製によるものとする。

試験は pH の調整をせずに行う。被験物質を添加後、試験溶液の pH に顕著な変化が認められる場合、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することが望ましい。この 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う。pH 調整には塩酸又は水酸化ナトリウムを用いることが望ましい。助剤を使用する場合は、OECD ガイダンス文書 No.23 で推奨されている低毒性溶媒 (アセトン、エタノール、メタノール、ターシャリーブチルアルコール、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、トリエチレングリコール) のみを使用し、毒性が不明な溶媒は使用しないこと。なお、ジメチルホルムアミド及びジメチルスルホキシドは、人に対する健康影響と安全性の観点から、その使用については考慮すべきである。また、アセトニトリル等は藻類生長阻害試験において生長促進作用を有する場合もあることに留意すること。

6 試験条件

6 - 1 試験方式

試験は流水式又は半止水式で行うことが望ましい。また、被験物質の濃度が安定しない際には流水式を用いることが望ましい。

6 - 2 暴露期間

96 時間とする。

6 - 3 収容量と供試魚の数

- ・収容量 止水式及び半止水式では最高密度で 0.8 魚体 g/L が推奨される。流水式の場合、推奨される最大収容密度は、24 時間あたり 0.5 g 魚体湿重量/L である (例: 10L 容量の水槽を用い、流量は 24 時間で 5 倍量とすると、24 時間で合計 50 L が水槽を通過する。収容する魚の合計体重が 25 g

の場合、これは24時間で50L当たり25gとなり、24時間で0.5g/Lに相当する)。また常に収容密度は5g/Lを超えないことが推奨される。

- ・ 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。

6 - 4 試験濃度

試験濃度範囲の選択には、例えば適切な(Q)SARモデルによる適用ドメイン内での推定値、カテゴリーアプローチによるリードアクロスやトレンドアナリシス推定値、魚類胚試験や培養細胞を使用した試験等他の試験法によるデータ等、全ての情報源を使用することができる。そのようなデータが利用できない場合や十分な信頼性が得られない場合は、同じ種の魚を使用したレンジファインディングテストを検討する必要がある。この場合、藻類及びミジンコの試験から得られた閾値濃度(OECD, 2010)を使用して、濃度範囲の設定を行うことができる。

試験濃度範囲の設定においては、少なくとも5濃度区を等比級数的にとる。公比は2.2を超えないことが望ましい。最高試験濃度区では、全ての魚に致死影響が起こることが望ましいが、100mg/L以上の濃度で試験を行う必要はない。最低試験濃度区では影響が観察されないことが望ましい。なお、0%の死亡率を引き起こす最大濃度又は100%の死亡率を引き起こす最小濃度での試験の実施は必須ではない。

6 - 5 対照区

別に対照区をおく。やむを得ず助剤を使用した場合は、対照区に加え助剤対照区を設ける。ただし、当局の了解が得られる場合、助剤対照区のみの実施で評価することができる。

6 - 6 試験中の暴露環境

- ・ 温度 供試魚の適温(付表1参照)で、 ± 2 の範囲内で一定に保つ。
- ・ 照明 一日当たり12~16時間、光強度が $10-20 \mu E/m^2/s$ 、540-1000 lux 又は50-100 ft^c (実験室レベル)でなければならない。
- ・ 溶存酸素濃度 飽和酸素濃度の60%を下回ってはならない。被験物質の顕著な消失が確認できなければ大丈夫を行ってもよい。
- ・ 給餌 行わない。
- ・ かく乱 過度の振動や騒音などの魚の行動を変化させるようなかく乱要因は回避又は可能な限り軽減すること。

6 - 7 魚の測定

暴露開始前に、試験に使用する魚と同一の飼育容器より少なくとも10尾の魚について個別に湿重量と全長を測定する。測定に使用された魚を試験に使用しないこと。これらの魚の全長測定を試験開始の8日以上前に実施した場合、暴露終了時に、付表1に示す推奨魚種のサイズ要件を満たしていることを確認するために再度魚の全長を測定する必要がある。全長の測定は写真を使用することができる。湿重量は、例えば飼育水を入れ、事前に計量した飼育水入り容器の中に生きた魚を入れ、重量増加分を湿重量とみなす。

6 - 8 魚の人道的殺処分

暴露終了後、生き残った魚を別の試験に用いてはならない。生き残った魚に対して殺処分を行う場合は、深い麻酔、迅速な中枢の破壊等を用いてよい。また、OECD テストガイドライン 203 のパラグラフ 28 に定められた方法に準じて実施してもよい。

7 被験物質への暴露の開始

各試験容器に、6 - 3に基づき設定した供試数のじゅん化された魚を移して暴露を開始する。

8 観察

暴露開始後24時間以内に少なくとも2回の観察を実施し、観察の間隔は少なくとも3時間とすることが望ましい。(例えば、0 - 1日は暴露開始の 2 ± 0.5 時間後、 5 ± 1 時間後、 24 ± 2 時間後に観察する。)また、2 - 4日は2回/日魚の様子を観察する(観察時間については様式11の4.各観察時間に

おける観察された症例の記録を参照しても良い。) 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。観察時に死亡魚を取り除き死亡率を記録する。また付表3に記述された異常が観察された場合は記録しておく。付表3に当てはまらない魚種特有の観察される症状についても記録しておく。

付表3 観察される症状例

症状分類	症状名	症状の定義
平行喪失	バランス喪失	バランスを失う、上下・水平感覚を失う、頭部を上又は下に向けた体勢
	浮力喪失	着底・横転するか表面に浮上
遊泳及び行動異常	不活発・嗜眠	自発運動の低下、刺激への反応が鈍った状態、嗜眠状態
	過活発	自発運動の上昇、刺激等により不定方向への激しい動き
	異常な遊泳方法	背泳、スパイラル(らせん運動)、コークスクリュー(ドリル状の回転運動)遊泳 これらの症例は多くの場合、複合的に観察
	けいれん	遊泳中に筋肉が強く収縮することで起こるビクツとした動き
	硬直	ヒレがたたまれて硬直して遊泳不能
	鼻上げ	水面に口を出す呼吸異常行動
	着底	水槽の底面に腹部をつけ遊泳不能
	孤立	集団と離れた行動
	密集	密な状態で集団を形成
呼吸機能異常	過呼吸	呼吸頻度の増加と頻繁な開口と鰓蓋を開く行動
	低呼吸	呼吸頻度と鰓蓋を開く行動の低下
	深呼吸・飲み込み	大きく口を膨らませて水を吸い込む、あるいは水面での呼吸行動、及び過度な逆洗(coughing)運動
その他	体色変化	脱色、白化、鮮明化等
	眼球突出	眼窩の腫れによる眼球の突出
	浮腫	腹部の膨張とそれに伴う鱗の突出と腹部の亀裂
	出血	皮下出血等
	曲り	骨折などによる背骨の曲り等
	攻撃性	他の個体を追い回すなどの異常行動
	糞便異常	異常な糞便状況(偽糞、排泄行動の増加等)

9 被験物質濃度等の測定

9 - 1 被験物質濃度の測定

被験物質の濃度は、原則として少なくとも最低及び最高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、全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ことが望ましい。さらに、揮発性あるいは吸着性の強い物質など、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ことが望ましい。

半止水式試験の場合は、換水直後と次の換水の直前を1セットとして、少なくとも2セット測定を行うことが望ましい。

9 - 2 試験環境の測定

pH、溶存酸素濃度、水温、塩分濃度は少なくとも毎日1回測定する。また、硬度(安定性が実証さ

れない場合)及び TOC は希釈水での暴露開始時に測定する。

1 0 限度試験

100mg/L 又は水溶解限度のより低い方の濃度で被験物質が致死を示さないことが予想される場合等には、この濃度で限度試験を行い、LC₅₀ がその濃度より大きいことを示すことができる。限度試験には少なくとも 7 尾を用い、対照区においても同数を用いる。目視可能な異常が確認された場合は記録する。暴露終了時まで死亡が観察された場合、正規の試験を行う。

1 1 試験の有効性

次の条件が満たされる場合、試験は有効とみなされる。

- ・対照区の死亡率が暴露終了時に 10% (10 尾より少ない数を使った場合は 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。

1 2 結果の算出方法

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。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証明できる場合には、初期濃度に基づいて結果の算出を行うことができる。

各試験濃度区と対照区の累積死亡率を暴露期間と被験物質濃度とともに表にする。対数正規確率紙に各試験濃度区に対する各暴露期間における累積死亡率をプロットする。次にプロビット法などの適切な統計手法を用い、回帰直線の傾き、暴露期間 96 時間における LC₅₀ 及び 95% 信頼限界を算出する。さらに、各観察時毎の LC₅₀ 及び 95% 信頼限界を算出することが望ましい。

得られたデータが 100% あるいは 0% 死亡のみを示す場合は、全く死亡を起こさない最高試験濃度と 100% 死亡を起こす最低試験濃度の幾何平均を LC₅₀ の近似値とみなす。

1 3 結果のまとめ

試験の結果は様式 11 によりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

注 人工調製水

OECD (ISO6341-1982) の組成

(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 µS/cm を越えてはならない。全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ばっ気し、使用前までばっ気をせずに約 2 日間貯蔵する。