

付屬資料1-2 ヨコエビ(US EPA OPPTS 850. 1020 仮訳)

**生態影響試験ガイドライン**

OPPTS 850.1020

**ヨコエビ類急性毒性試験**

“ 公開草案 ”

## 緒言

このガイドラインは、米国環境庁の予防・農薬・毒物局によって開発されてきたテストガイドラインシリーズの一つであり、農薬と毒物の試験において使用するため、及び連邦条例に基くレビューに対して当局に提出されなければならない試験データをつくるためのものである。

予防・農薬・毒物局(OPPTS)は、汚染予防と毒物局(OPPT)及び国内技術情報サービス(NTIS)で出版されている農薬プログラム部局(OPP)の連邦条例規定(CFR)の垂章R、1章、表題40にあるテストガイダンスと要求及び経済協力開発機構(OECD)によって公開されているガイドラインを融合させた調和プロセスを通してこのガイドラインを開発してきた。

これらのガイドラインを一連のOPPTSガイドラインに調和する目的は、US環境保護庁の要求データを毒物規制法(15 U.S.C. 2601)と連邦殺虫殺菌殺鼠剤法(7 U.S.C. 136, *et seq.*)に満たすために行わなければならない試験手法間の相違を最小限にするためである。

公開草案のアクセス情報：省略

コメント提出方法：省略

最終ガイドライン公開：省略

(a) 範囲

(1) 適用性

このガイドラインは、連邦殺虫殺菌殺鼠剤法(FIFRA)(7 U.S.C136, *et seq.*)及び毒物規制法(TSCA)(15 USC 2601)の両方の試験要求を満たすように意図されている。

(2) 背景

この調和されたOPPTSテストガイドラインの開発に用いられた原資料は「40 CFR 795.120ヨコエビ類急性毒性試験」である。

(b) 目的

このガイドラインは、環境影響試験規定に基づいて化学物質及び混合物の急性毒性に関するデータを得るために用いられる。このガイドラインは、ヨコエビ類に対する化学物質の急性毒性に関するデータを作るための試験について記述したものである。この試験からの得られたデータは化学物質の水生生物に対する有害性を評価することに用いられるだろう。

(c) 定義

TSCA3節及び40 CFR 792優良試験書規範での定義はこのテストガイドラインに適用する。以下の定義もこのガイドラインに適用する：

**死亡**は、軽い刺激に対して試験生物の反応がないことを意味する。

**流水**は、試験水槽あるいは蓄養や順化水槽を循環なしで試験液あるいは試験用水が連続的あるいは間欠的に通過することを意味する。

**LC50**は、半数致死濃度、つまりある特定暴露期間(記述されるべき)内に試験生物群の50%を死亡させる空気あるいは水中のある化学物質の濃度であることを意味する。

**収容量**は、試験水槽中あるいは24時間内に水槽を通過する試験液量(リットル)に対するヨコエビの生物量(湿重量g)の割合を意味する。

**助剤**は、試験物質を試験用水に導入しやすくするために併用される物質(例、アセトン)を意味する。

**止水システム**は、試験液が試験期間中に交換されない試験水槽を意味する。

(d) 試験手法

(1) 試験の概要

試験の準備では、適切な量の試験用水を試験水槽に満たす。流水式試験を行う場合、各水槽を通る試験用水の流れを必要な速度に調整する。止水式試験では、試験物質を各試験水槽に加える。流水式試験では、各試験水槽中の試験物質の期待濃度を達成したり、維持するように試験物質を加える速度を調整する。試験は、試験条件に順化されたヨコエビを無作為に試験水槽に投入して開始する。試験中定期的に試験水槽中のヨコエビを観察する；死亡したヨコエビは取り上げ、観察された事項を記録する。試験水槽中の溶存酸素濃度、pH、温度及び試験物質濃度のある特定間隔で測定する。試験中に得られたデータから濃度反応曲線とその試験物質に対するLC50値を求める。

## (2) 予備(濃度範囲予測)試験

- (i) 予備試験は、本試験で用いる濃度範囲を決定するために行われる。
- (ii) ヨコエビは一連の広い試験物質濃度範囲(例、1, 10, 100 mg/Lなど)に暴露され、通常止水条件で行われる。
- (iii) 少なくとも5個体のヨコエビを試験物質の各濃度に96時間暴露する。本試験における濃度を決定するのに適切なデータがより短時間で得ることができる場合には、その暴露期間を短くしても良い。試験物質の設定濃度でも容認されるかもしれない。

## (3) 本試験

- (i) 本試験の目的は、24, 48, 72, 及び96時間LC50値及び濃度反応曲線を決定することである。
- (ii) 濃度当たり少なくとも20個体のヨコエビを1.5～2.0の公比からなる一連の幾何級数的に選択した5段階以上の試験物質濃度(例、2, 4, 8, 16, 32, 64 mg/L)に暴露する。試験生物が暴露される濃度の範囲と数は、96時間において50%を超え100%未満の死亡率になる濃度を少なくとも1つ含み、0%を超え50%未満を引き起こす濃度を1つ含むようにする。同数のヨコエビを2つあるいはそれ以上の水槽中に入れる。できれば、助剤の使用は避ける。助剤を使用しなければならない場合、試験用水のみの対照区と同様に、処理区で用いられた最高助剤濃度の助剤対照区を試験する。助剤は、毒性がなく、試験物質の毒性に影響を与えないようなものとする。助剤濃度は0.1 mL/Lを超えないようにする。
- (iii) いずれの試験も同一の個体群あるいは培養容器からのヨコエビを用いている対照区を含む。対照区は、試験物質が水槽に加えられていないということを除いて、同一の試験用水、条件及び手法で暴露する。
- (iv) 試験液の溶存酸素濃度、温度及びpHは、対照区、最高、最低及び中央試験濃度

の各反復中の少なくとも1つにおいて試験開始時、24、48、72及び96時間に測定する。

- (v) 試験期間は96時間である。対照区で10%を超える生物が試験中に死亡する場合その試験は容認されない。
- (vi) 死亡に加え、いかなる異常行動や外観も報告しなければならない。
- (vii) ヨコエビは試験水槽に無作為に割り振る。試験水槽は、試験区域内で無作為あるいは設置による何らかの変動があるかどうかを決定するために適切な統計学的解析が行えるような方法で配置する。
- (viii) ヨコエビは、試験物質が添加された後に試験水槽に導入する。
- (ix) 化合物の溶解性に関しての観察を記録する。担当者は、水面の膜、沈殿、あるいは試験水槽壁への付着物質の出現を記録する。

#### (4) 分析的測定

##### (i) 水質測定

試験用水の硬度、酸度、アルカリ度、pH、電気伝導度、TOC、あるいは(COD、及び粒状物質を各本試験の開始時に測定する。これらの値の月間変動は10%未満で、pHは0.4未満の変動とする。

##### (ii) 試験物質の測定のための試料採取

試験物質濃度を測定するための各試料は、試験水槽の上部、底部及び壁の間の中央部で採取する。試料は、表層の浮きかすや底や側から剥がれた物質を含んではならない。試料は即座に分析あるいは処理し、微生物分解、光分解、化学反応、揮発、あるいは吸着による試験物質の損失を最小限にするような方法で貯蔵する。

##### (iii) 試験物質の測定

(A) 止水式試験に対しては、溶存した試験物質濃度(それは0.45ミクロンのフィルターを通る)を各試験水槽で少なくとも試験開始時(ヨコエビが入られる前の0時間)及び試験終了時に測定する。流水式試験では、期間中、溶存した試験物質濃度を各試験水槽で少なくとも0時間と96時間、及び試験物質の供給システムに異常が観察された時は常に少なくとも1水槽で測定しなければならない。

(B) 試料中の試験物質の量を測定するために用いられる分析手法を試験開始前に検証しなければならない。これは、試験用水と各試験水槽に入れられるのと同数のヨコエビを含む水槽から取られた3つの水試料の各々に既知量の試験物質を添加することによって行われる。これら試料中の試験物質の名目上濃度は試験に用いられる濃度範囲に及ぶようにする。

分析手法の検証は、試験を開始する前に少なくとも2つの異なった日に行うようにする。

- (C) もし試験物質の分解生成物のようなものが正あるいは負の干渉を与え、そのような分解生成物が試験中に試験水槽に存在していないことが示されないなら、その分析手法は容認されない。
- (D) 試験水槽の反復間において、測定濃度は20%を超えて変動すべきではない。試験期間中、測定されたいずれの水槽中の試験物質濃度も0時に測定された濃度から $\pm 30\%$ を超えて変動すべきではない。
- (E) 全てのLC50値の計算や濃度反応曲線の描写には溶存試験物質の平均測定濃度を用いる。

#### (e) 本試験に対する試験条件

##### (1) 生物種

##### (i) 選択

- (A) 端脚類、*Gammarus fasciatus*、*G. pseudolimnaeus*、及び*G. lacustris*がこの試験に適用される。
- (B) ヨコエビは研究室で培養したり、野外から採集することができる。採集する場合、試験開始前に少なくとも14日間研究室内で維持するようにする。
- (C) ある特定の試験に用いるヨコエビは同様の年齢及び大きさで構成し、同一の供給源や培養群からのものとする。

##### (ii) 順化

蓄養水が試験用水と同一の供給源由来でない場合、試験用水への順化は48時間にわたって徐々に行う。その後、ヨコエビを試験前に試験用水で少なくとも7日間維持する。いかなる水温の変化も1日当り2℃を超えないようにする。ヨコエビを試験前に試験温度で少なくとも7日間維持する。

##### (iii) 世話と取扱い

ヨコエビを試験に用いられる環境条件と同様な条件下で試験用水において飼育する。生物はできるだけ取扱わないようにする。取扱いが必要な場合、できるだけ優しく、注意深く、速やかに行うようにする。飼育や順化中には、ストレスや死亡の兆候に対して注意深くヨコエビを観察する。

##### (iv) 給餌

生物には試験中給餌しない。飼育、蓄養、及び順化中には、カエデ、ポプラ、カバノキのような落葉性の葉を飼育及び蓄養容器中の底に幾層にも覆うように十分な量で設置する。これらの葉は水槽に入れる前に流水システムで少なくとも30日間熟成させる。

これらの葉が食べ尽くされる時、より多くの熟成葉を加えるようにする。

## (2) 施設

### (i) 装置

(A)この試験を実施するために必要な施設は：

- (1) ヨコエビを飼育、順化及び試験するための容器
- (2) 流水条件下で葉を熟成するための容器
- (3) 飼育、順化及び試験期間中の水温を制御及び維持するための機械
- (4) 粒子分をろ過して除去、気泡を除去、あるいは試験用水を通気するための装置
- (5) 15～30分間の過渡期をもつ16時間明-8時間暗期を供給するための装置

(B) 施設は十分に換気し、試験生物に影響を与えるかもしれない煙や妨害物がないようにする。

(C) 試験水槽は、蒸散により試験液や試験水の損失を抑制するためやほこりや他の粒子分の溶液への混入を最小限にするため、緩くカバーをする。

### (ii) 構成材料

原液、試験液、あるいは試験用水に接触する構成材料や装置は、試験結果を変えるほどの量で水溶液に溶出したり溶けたりする物質を含まないようにする。原液や試験液に接触する材料や装置は試験物質の吸着を最小限にするように選択する。できるだけ、ガラス、ステンレス鋼、及びフッ素系プラスチックを用いるようにする。コンクリート、ファイバーグラス、あるいはプラスチック(例、PVC)は蓄養水槽、順化水槽、及び水供給装置に用いてもよいが、使用前には十分にコンディショニングしておくようにする。鋳鉄パイプを淡水供給系に用いる場合、コロイド状鉄が試験用水中に溶出してくるかもしれないので、錆び粒子を除去するためにストレーナーやフィルターを用いるようにする。ゴム、銅、真鍮、亜鉛メッキされた金属、及び鉛は試験用水、原液、あるいは試験液と接触しないようにする。

### (iii) 試験物質の供給装置

流水式試験では、試験物質を試験水槽に供給するために、希釈装置、定量ポンプあるいはその他の適切な装置を用いる。用いる装置は各試験前には調整する。試験物質供給装置については、試験中では1日に2回確認を行うのが一般的な操作である。24時間当りの供給量は試験水槽の少なくとも5倍量に相当するようにする。試験中では、流量が試験水槽間で10%を超えて変動しないようにする。

### (iv) 試験水槽

試験水槽には少なくとも1Lの試験液を入れるようにする。ステンレス鋼製試験水槽は溶接されたもので、はんだ付けされていないものとする。ガラス製水槽は透明なシリコン

接着剤を用いて接着させる。水槽の内側にはできるだけ少量の接着剤しか残らないようにする。曲げて作ったステンレス鋼スクリーンのような基板をヨコエビを覆うために各試験水槽の底に置く。

(v) 試験系の洗浄

試験物質供給装置と試験水槽は各試験前に洗浄する。洗剤で洗い、清水、無農薬アセトン、清水、及び5%硝酸ですすぎ、続いて2回以上試験用水で換水する。

(vi) 試験用水

- (A) ヨコエビが飼育、順化及び試験期間の間ストレス兆候を示さず、蓄養、順化、及び試験の期間中にその水の中で生存するなら、清浄な表層水あるいは地下水、人工調製水、あるいは脱塩素した水道水は試験用水として容認できる。試験用水の水質は、硬度、酸度、アルカリ度、電気伝導度、TOCあるいはCOD、及び粒状物質における月間変動が10%を超えない程度に十分に安定であることとする。PHは0.4の範囲内で安定でなければならない。さらに、年に少なくとも2回測定され、以下の表の仕様を満たすべきである。

物質	最大濃度
粒状物質	20 mg/L
全有機炭素(TOC)、 あるいは化学的酸素要求(COD)	2 mg/L、 あるいは5 mg/L
ホウ素、フッ素	100 µg/L
非解離アンモニア	1 µg/L
アルミニウム、砒素、クロム、コバルト、銅、鉄、鉛、ニッケル、亜鉛	1 µg/L
残留塩素	3 µg/L
カドミウム、水銀、銀	100 ng/L
全有機リン系農薬類	50 ng/L
全有機塩素系農薬類及び： ポリ塩化ビフェニル類(PCBs)、 あるいは有機塩素	50 ng/L、 あるいは25 ng/L

- (B) 試験用水が地下水あるいは表層水源由来である場合、電気伝導度及び全有機炭素濃度(TOC)または化学的酸素要求量(COD)を測定する。人工調製水は試験グレードからなる化学物質の特定量を脱イオン水あるいは蒸留水に添加して調製することができる。電気伝導度が1 µmho/cm未満のガラス蒸留または炭素ろ過された脱イオン水は人工調製水を作るための希釈水として容認される。

- (C) 試験用水中のDO濃度は飽和濃度の90と100%の間とする。必要なら、試験用水は試験物質の添加前に通気して良い。全ての人工調製水は使用前に通気する。

### (3) 試験のパラメータ

試験中における環境パラメータは以下に示すように維持されなければならない：

- (i)  $18 \pm 1$  の水温
- (ii) 飽和濃度の60～105%の溶存酸素濃度
- (iii) 試験水槽に収容するヨコエビの数は、試験結果に影響するほど多くてはいけない。1L当り10個体のヨコエビが止水式試験に対する収容レベルとして推奨される。流水式試験に対する収容要件は試験用水の流水率に依存して変わる。収容量は、溶存酸素濃度を推奨レベル以下に下げないようにする。
- (iv) 16時間明-8時間暗

### (f) 報告

スポンサーは毒性を示唆あるいは予測する試験によって得られた全てのデータをEPAに提出する。さらに、その試験報告書には以下の情報を含むようにするが、必ずしも限定するものではない：

- (1) 試験を行う施設の名称と住所及び試験の開始と終了期日
- (2) 承認された試験計画書に述べられた目的と手法、試験計画書草案における変更を含む
- (3) データの解析に用いた統計学的手法
- (4) 試験物質に関する名称、CAS番号あるいはコード番号、供給源、ロットあるいはバッチ番号、効力、純度、及び組成、あるいはその他の適切な特性
- (5) 試験条件下での試験物質の安定性
- (6) 以下のような用いた手法の叙述
  - (i) 試験用水の供給源、化学的特性(例、硬度、pHなど)及び前処理法の叙述
  - (ii) 試験物質供給装置、試験水槽、水槽での試験液の深さと水量、試験を開始した方法(例、試験物質の添加法)、収容量、照明、流水率の叙述
  - (iii) 測定及び観察の頻度と方法
- (7) 用いた生物の学術名、体重、長さ、供給源、履歴、及び順化の手法と餌
- (8) 試験濃度、ヨコエビの数と試験濃度当りの反復数。報告される結果には以下の事項を含む：
  - (i) 溶存酸素濃度、pH及び温度の測定結果

- (ii) 助剤を用いた場合、助剤の名称と供給源、原液の試験物質の設定濃度、試験液における最高助剤濃度及び水と助剤中の溶解性の記述
  - (iii) 試験開始直前及びその後の全てのサンプリング時での各試験水槽における試験物質の測定濃度
  - (iv) 各観察時の各試験水槽における試験生物の生死数、生物の死亡率、異常な影響が認められた試験生物数
  - (v) 48、72及び96-h LC50及びその95%信頼限界。十分なデータが得られた場合、24-h LC50。
  - (vi) もし得られるなら、無影響濃度(死亡、異常行動及び生理学的影響が認められない試験最高濃度)
  - (vii) 水質及び試験物質濃度に関する全ての化学分析における方法とデータ、検証方法と試薬ブランクを含む
- (9) データの質あるいは完全性に影響したかもしれない全ての環境条件の叙述
  - (10) 試験委託者、試験責任者、主試験担当者の名前、その他の科学者あるいは専門家の名前、試験に係った全ての管理者の名前
  - (11) データに関して行われた変換、計算、演算の記述、データの要約と解析、解析によって引き出された結論に関する陳述。データの解析結果には計算したLC50値、95%信頼限界、変換された濃度反応直線の傾き、適合度検定の結果(例、 $X^2$ 検定)を含む
  - (12) 試験に係った各科学者あるいはその他の専門家によって作成された署名と日付入りの報告書、そこには試験施設あるいは試験委託者の要求あるいは指示でデータ発生が終了した後に試験からデータあるいは標本の解析や評価を行った者を含む
  - (13) 全ての標本、生データ、および最終報告書を保管する場所
  - (14) 信頼性保証部門によって作成及び著名された陳述書