

生物を用いた水環境の評価・管理（改善）手法の  
技術的事項に関する現時点の整理

関係資料集

<目次>

- 参考1 国内外での生物応答（生態毒性）試験法の利用状況等
- 参考2 平成28年度パイロット事業の試験データを用いた急性毒性と慢性毒性の検出率比較
- 参考3 水生生物保全環境基準に関する中央環境審議会答申の関連記述（抜粋）
- 参考4 諸外国におけるWET試験の活用等に関する事例
- 参考5 短期慢性毒性試験法案の試験精度について
- 参考6 環境基準と排水基準の関係



## 国内外での生物応答（生態毒性）試験法の利用状況等

## 1. 国内外で主に用いられている淡水生物に係る生物応答試験

## (1) 慢性毒性試験

淡水生物に係る慢性毒性試験について、国内及び海外（主として米国、カナダ、ドイツ）で用いられている主な生物応答試験の概要として、

- ・対象としている毒性
- ・根拠となる法制度や規格等
- ・試験の期間
- ・試験実施中の測定、試験結果の算出・評価等
- ・試験条件等

を、試験生物種（藻類、無脊椎動物、魚類）毎に整理した。

また、水生生物保全環境基準を含めた国内及び諸外国における生態毒性試験に関連する法制度等においては、OECD テストガイドラインとして作成された急性毒性試験法（及びそれにより得られた結果）が考慮・利用されていることが少なくないことから、同ガイドラインの急性毒性試験法についても情報整理の対象とした。（別添 1）

## (2) 急性毒性試験

淡水生物に係る急性毒性試験について、(1) の慢性毒性試験に関する整理に準じて情報整理を行った。（別添 2）

なお、様々な既存の急性毒性試験法（又はこれらをベースにした試験法）を事業場排水に対して用いた場合にどのような技術的課題があるかについては、専門的な見地からの議論が必要と考えられる。

## 2. 国内外における海産生物を用いた生物応答試験に関する取組の事例

## (1) 国内での研究等の事例

国内では、海産生物を用いた生態毒性試験が実施されている事例は淡水生物の場合に比べて少ない。これまでに行政等が行った研究、検討等の取組事例としては以下、がある。なお、この他、4. に示す船舶バラスト水管理条約の枠組みの下で、海産生物に係る生物応答試験が国内で実施されている事例がある。

## 国立環境研究所における海産魚類及び海産エビ類の急性毒性試験法案

水生生物保全環境基準は、水生生物の保全に係る環境基準の設定について（答申）」（平成 15 年 9 月中央環境審議会）を受けて平成 15 年 11 月に初めて設定された。こうした環境基準の設定には化学物質の淡水・海水中の水生生物に対する影響に関する知見が必要だが、淡水生物については OECD テストガイドラインとして国際的に

認定された試験法が存在するものの、海産生物についてはこうした試験法が策定されていないという状況があった。

こうした状況を踏まえ、環境省からの依頼を受けた国立環境研究所（化学物質環境リスク研究センター（当時））では、海産魚類と海産エビ類を対象とする急性毒性試験法の検討を行い、試験法案をとりまとめ、平成 17 年 11 月に公表している。（別添 3）

#### 水産庁の海産生物毒性指針

水産庁では、平成 22 年 3 月に「海産生物毒性試験指針」を作成している。同指針では、5 種の海産生物に係る急性毒性試験法（藻類 1 種、無脊椎動物 3 種（ミジンコ 1 種、エビ類 2 種）、魚類 1 種）と、4 種の海産生物に係る慢性毒性試験法（無脊椎動物 1 種（ミジンコ）、魚類 3 種）を提案している。（別添 4）

#### （2）諸外国等で用いられている海産生物に係る生物応答試験 / WET 試験の例

WET 試験を排水管理に係る制度の一環として導入している諸外国の中には、海産生物を用いた WET 試験を淡水生物に係る試験とともに導入している国がある。また、OCED テストガイドライン等の国際機関が作成した生態毒性試験法の中にも、海産生物を用いる（ことができる）ものがある。（下記 ~ 、詳細は別添 5）

なお、事業場排水以外の排水を対象とした試験としては、4 . に示す船舶バラスト水管理条約の枠組みの下で行われる生物応答試験がある。

#### 米国環境保護庁（US EPA）が定める

- ・ WET 試験（水質浄化法の枠組み）（別添 6）
- ・ 有害物質規制法（Toxic Substances Control Act : TSCA）等の化学物質管理制度の下で用いられているテストガイドライン（Office of Chemical Safety and Pollution Prevention（OCSSP（旧 OPPTS））等が作成）

#### 米国材料試験協会（ASTM）規格における生物応答試験

#### カナダ環境省（Environmental Canada）が定める WET 試験

#### 英国環境庁（Environment Agency）が Direct Toxicity Assessment（DTA）において作成している試験法

#### OECD テストガイドライン

#### 国際標準化機構（ISO）規格

#### 北東大西洋の海洋環境保護に関する条約<sup>1</sup>の下で作成された試験法

<sup>1</sup> 北東大西洋沿岸 15 カ国と EU が参加。実施機関は OSPAR Commission。

### 3. 公共用水域を対象に生物応答試験を実施した研究等の事例

#### (1) 文献調査の対象・収集方法

公共用水域を対象にした生物応答試験については、排水を対象としたものに比べ、実施事例が相対的に少ないと考えられた。このため、平成 28 年度の環境省の文献調査に際しては、国内外の研究等の文献を幅広くカバーしていると考えられる民間のデータベース<sup>2</sup>を利用し、1981 年以降の文献を対象に、「バイオアッセイ」、「公共用水域」等の基本用語を用いたキーワード検索を行うことで、網羅的な調査を試みた。

この平成 28 年度調査では、このようにして収集した文献のうち、その題名、抄録(概要)の内容等から具体的に内容を調査すべきと考えられる文献をピックアップし、さらにそのうち、研究等の内容が本件検討と関連すると考えられ、かつ一定の具体的内容を含むものについて、生物応答試験の実施方法等の概要を整理した。

#### (2) 調査結果( 事務局における暫定的な整理。今後精査が必要。)

##### 抽出文献数

上記方法により抽出された文献数は、「生物応答を利用した排水管理手法の活用について」(平成 27 年 11 月、生物応答を利用した水環境管理手法に関する検討会)において言及(引用)された公共用水域を対象とした生物応答試験に係る 5 件の研究事例の文献(別添 8)の他、30 件あった。(別添 7)

##### 抽出された研究等の事例において用いられた生物応答試験の種類等

##### ・国内/海外の別

30 件の文献のうち、国内の文献が 23 件、海外の文献が 7 件あった。

##### ・対象水域

河川が 29 件、湖沼が 1 件だった。(海域は 0 件)

##### ・生物応答試験において使用された試験法

##### (試験対象毒性)

30 件中、急性毒性試験が 24 件、慢性毒性試験が 10 件、その他(細菌等を用いた試験)が 7 件あった(重複あり)。また、少なくとも 9 件で、試験水中の化学物質濃度を高めるための濃縮をしてから試験を実施していた(一部の試験のみで実施している場合を含む)。

##### (試験生物種等)

藻類を用いたものが 21 件、無脊椎動物(主にミジンコ)を用いたものが 19 件、

<sup>2</sup> データベースとしては、J Dream (<http://jdream3.com/>) を用いた。

魚類を用いたものが 11 件あった(重複あり)。また、2 種以上の(2 つ以上の栄養段階にある)生物種を用いているものは 30 件中 16 件だった。

生態影響の原因、試験実施時の課題等について

30 件中、27 件で原因不明を含めて生態影響の検出又はその原因への言及があった。

ただし、各事例において用いられている試験法の再現性や信頼性、試験結果の妥当性等については、生物応答試験等に関する専門的な検証を経なければ評価が困難であり、現時点では評価が行えていない。また、このため、公共用水域を対象として生物応答試験を実施する場合の技術的な課題等についても、現時点では整理することが困難であった。

#### 4 . 船舶バラスト水規制管理条約における生物応答( W E T ) 試験について( 詳細は別添 9 )

事業場排水に係るものではないが、船舶から排水されるバラスト水を介した有害水生生物等の国際的な移動の防止、最終化、最終的には除去することにより、海洋環境保護、生物多様性保持等を図ることを目的に、国際海事機関( IMO )においては、平成 16 年( 2004 年)に船舶バラスト水規制管理条約( 以下「条約」という。)が作成されている。

正式名称：2004 年の船舶バラスト水及び沈殿物の規制及び管理のための国際条約

我が国は、条約の枠組みを国内法に取り入れるため、平成 26 年に海洋汚染等防止法の一部を改正する等の所要の法整備を行い、同年 10 月に IMO に対し条約への加入書を寄託し、条約を締結している。なお、条約は、既に発効要件を満たし、平成 29 年 9 月に発効。

条約の枠組みの下では、船舶からの有害なバラスト水の排出が禁止されており、条約の対象となる一定の船舶においては、締約各国の当局が審査を行い、IMO が承認したバラスト水処理設備( 条約の排出基準を満たせる処理装置)を条約発効後は搭載することが義務化。

上記の有害バラスト水処理設備の審査・型式承認は、IMO が作成するガイドラインを考慮して行うこととされており、当該ガイドラインにおいては、申請者は、処理後のバラスト水の生態毒性について、複数の試験生物種( 魚類、無脊椎動物及び植物( 藻類) ) に関して急性・慢性両方の毒性試験を実施することとされている。なお、試験生物種は、淡水生物と海産生物のいずれかとされており、急性・慢性毒性試験法とも OECD テストガイドライン等に定められた試験法が推奨されている。)

国内外で主に用いられている淡水生物に係る慢性毒性試験

別添1

1. 藻類に係る主な慢性毒性試験の概要

生物種	番号	国内/海外	試験対象毒性等		根拠法制度・規格等	制度等での位置付け	試験期間	測定、結果の算出・評価等 <sup>*1</sup>		
			毒性試験	成長段階				観測または測定	結果の算出	試験の有効性
ムレミカヅキモ ( <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> 、旧名 <i>Selenastrum capricornutum</i> ) (緑藻)	①	国内	藻類生長阻害試験	指数増殖期	化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律(化審法)	新規化学物質での審査での推奨種	72時間	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。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EC50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。 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。	生長速度に対する半数影響濃度(ErC50)及び無影響濃度(NOEC)	・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
	②	国内	藻類生長阻害試験	指数増殖期	農薬取締法	水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準の設定における対象生物(必須)	72時間	(1)生物量の測定 個々の試験容器中の生物量は、暴露開始後24時間間隔で暴露終了時まで測定する。また、外見の異常が見られた場合には記録する。 (2)被験物質濃度の測定 ①原体を被験物質として用いた場合には、各試験濃度区ごとに被験物質の濃度を少なくとも暴露開始時及び終了時に測定する。 ②被験物質濃度区ごとに各容器から試験液を等量採取して混合し、測定用試料に供する。繰り返し間に差がないと予想される場合には、1容器から採取してもよい。 (3)環境条件の測定 ①各試験区(試験濃度区、対照区)について、試験培地の水温及びpHを測定する。 ②測定は、少なくとも暴露開始時及び終了時に行う。	生長速度に対する半数生長阻害濃度(ErC50)及び無影響濃度(NOEC)	(1)対照区の生物量は、試験開始72時間後において、試験開始時における生物量の16倍以上に増加していなければならない。 (2)対照区において、各繰り返し毎に各日(0~1日、1~2日、2~3日)について求めた生長速度の変動係数を算出する。これらの変動係数の平均値が35%を超えてはならない。 (3)対照区において、各繰り返し毎に試験期間中(0~3日)の平均生長速度を求め、その変動係数が7%を超えてはならない。
	③	国内・海外(OECD)	Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test 藻類生長阻害試験	指数増殖期	経済協力開発機構(Organisation for Economic Co-operation and Development: OECD)テストガイドライン201(2011)		72時間	生物量:毎日測定 pH:試験開始時、終了時、1.5以上変動してはならない。 被験物質の濃度:試験開始時とばく露状態を捉えるために測定 設定値から20%未満の場合は、EC50付近の試験濃度、初期濃度と最終濃度を測定すること 濃度が設定の80-120%以内に残留しない場合、初期濃度と最終濃度をすべての濃度区で行うことが望ましい。揮発性物質、不安定な試験物質あるいは強く吸着する試験物質については、暴露期間中の24時間間隔で追加のサンプリングを行うことが望ましい。	藻類の生長に対する試験物質の影響を測定すること。 生長阻害は2つの反応変数による。 ①平均生長速度:1日当たりの値をday <sup>-1</sup> に該当する。推奨種の生長速度は通常この値より高いが、生長速度が遅く種類に基づき算出 ②収量:最終的な生物量から初期の生物量を差し引いた値 これらの値は比較できない。 平均生長速度から、x%阻害、例えば50%の阻害を引き起こす濃度、ErCx(例えばErC50)として表現。 最低観察影響濃度(LOEC)および無影響濃度(NOEC)は、統計的に測定	・対照区の生物量は、試験開始72時間後において、試験開始時における生物量の16倍以上に増加していなければならない。これは、0.92 day <sup>-1</sup> に該当する。推奨種の生長速度は通常この値より高いが、生長速度が遅く種類については、16倍以上でなければならない。その場合、16倍を満足するため、試験機関を延長すべきである。16倍に達しており、また、指数関数的な生長を維持するため、試験期間を48時間にしてもよい。
	④	海外(米国)	Standard Guide for Conducting Static 96-h Toxicity Tests with Microalgae 微細藻類を用いた96時間の止水式毒性試験を行うための標準ガイド		ASTM 1218-97		96時間	細胞数またはクロロフィルaを測定する。 →IC50の計算の際、 現存量に基づく場合→試験終了時に生物量を測定。 生長率もしくは生長曲線の面積に基づく場合→試験期間中毎日測定。 pH:試験開始時・終了時に測定(コントロール、最高、中間、最低濃度区)。 室内温度:一時間おきに測定、もしくは毎日最高温度と最低温度を測定。 光フルエンス率:試験前に測定。 被験物質濃度:試験開始と終了後に測定。	IC50及びIC10/20	対照区の細胞数が、試験開始時の16倍以上に増加していること。
イカダモ属( <i>Desmodesmus subspicatus</i> 、旧名 <i>Scenedesmus subspicatus</i> ) (緑藻)	⑤	国内	藻類生長阻害試験	指数増殖期	化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律(化審法)	新規化学物質での評価に用いてもよい	72時間	①と同じ	①と同じ	①と同じ
	⑥	国内	藻類生長阻害試験	指数増殖期	農薬取締法	水産動植物登録保留基準策定において、培養及び試験に都合がよく、試験の妥当性を満たす場合は用いてもよい	72時間	②と同じ	②と同じ	②と同じ
	⑦	国内・海外(OECD)	Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test 藻類生長阻害試験	指数増殖期	OECD TG201		72時間	③と同じ	③と同じ	③と同じ
	⑧	海外(米国)	微細藻類を用いた96時間の止水式毒性試験を行うための標準ガイド		ASTM 1218-97		96時間	④と同じ	④と同じ	④と同じ

\*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

生物種	番号	国内/海外	その他試験実施に係る技術的条件等 <sup>*1</sup>								
			試験方式	試験媒体	助剤の使用	試験濃度	生物数/密度	給餌	連数	試験温度	照明
ムレミカヅキモ ( <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> 、旧名 <i>Selenastrum capricornutum</i> ) (緑藻)	①	国内	止水式	OECD培地(OECDテストガイドライン201 Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test(2006))又はAAP(AGP)培地(U.S.EPA:Alga Assay Procedure:Bottle Test, National Environmental Research Center, Corvallis, Oregon(1971))を用いることが望ましい。	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。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。	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。	乾燥重量が0.5mg/Lを超えないように設定する。 $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ cells/mL	-	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。	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	60-120mE/m <sup>2</sup> /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。)
	②	国内	止水式	同上	難水溶性原体の場合、以下のいずれかの方法により試験培地を調整する。 ア 被験物質を有機溶剤等の助剤に溶かした試験原液を用いて試験培地を調整する。 この場合、助剤は、試験生物に対して毒性が弱く使用濃度で供試生物に対して有害性が認められず、かつ、被験物質の性質を変えないものを用いる。 助剤の試験液中濃度は、原則として全試験濃度区で一定とし、100mg/L(又は0.1ml/L)を超えないことが望ましい。	① 等比級数的に少なくとも5濃度区を設ける。 ② 試験濃度及び濃度公比は、予備試験の結果から定める。公比は3.2を超えないことが望ましい。 ③ 濃度範囲には、供試藻類の生長が75%以上阻害される濃度と全く阻害されない濃度を少なくともそれぞれ1濃度ずつ、藻類の生長が一部阻害される濃度が少なくとも2濃度含まれることが望ましい。	初期生物量は0.5mg/Lを超えないものとし、試験培地の初期細胞濃度は、 $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ cells/mlが適当である。	-	各試験濃度区は3連以上とし、対照区(助剤を使用した場合は、助剤対照区)については試験濃度区の2倍の連数が望ましい。	設定温度は21~24℃とし、暴露期間中の変動範囲は±2℃以内とする。	連続的に均一照射することとし、液面付近で波長400~700nmの測定範囲で60~120 μE/m <sup>2</sup> /s(4440~8880lux)程度の照度が望ましい。
	③	国内・海外(OECD)	止水式	同上		・試験濃度及び濃度公比は、予備試験の結果から定める。公比は3.2を超えないことが望ましい。 ・等比級数的に少なくとも5濃度区を設ける。 ・濃度範囲には、供試藻類の生長が75%以上阻害される濃度と全く阻害されない濃度を少なくともそれぞれ1濃度ずつ、藻類の生長が一部阻害される濃度が少なくとも2濃度含まれることが望ましい。	$5 \times 10^3 \sim 10^4$ cells/mL	-	対照区(助剤対照区)少なくとも3連とするが、理想的には濃度区の2倍(6連)であること、濃度区3連	21-24℃±2℃で維持	連続照明、一定の蛍光性を有する照明。coolwhiteかdaylightタイプ。 種類により強度は異なる。±15%を維持すること。 ・緑藻類の推奨種: 60-120 μE・m <sup>2</sup> ・s <sup>-1</sup> (coolwhiteで4440-8880 luxに相当)
	④	海外(米国)	止水式	濾過、脱イオン水、または蒸留水に相当量の成分を加える。試験目的に応じて、天然水を用いることができる。	試験生物に影響を与えない、最小限の量に抑える。 有機溶剤の濃度は0.5mL/L以下	24±2℃	最初に接種する細胞密度。 Selenastrum capricornutum 及びその他の緑藻類: $1-2 \times 10^4$ cells/mL Navicula pelliculosa: $1-2 \times 10^4$ cells/mL Microcystis aeruginosa: $5 \times 10^4$ cells/mL Anabaena flos-aquae: $1-2 \times 10^4$ cells/mL Saltwater Species: $1-2 \times 10^4$ cells/mL	-		24±2℃	白色蛍光灯による連続照明。 淡水珪藻及び緑藻の推奨種: $60 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (4300lm/m <sup>2</sup> ) 淡水藍藻の推奨種: $30 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (2150lm/m <sup>2</sup> )
イカダモ属( <i>Desmodesmus subspicatus</i> 、旧名 <i>Scenedesmus subspicatus</i> ) (緑藻)	⑤	国内	①と同じ	①と同じ	①と同じ	①と同じ	$2 \sim 5 \times 10^3$ cells/mL	-	①と同じ	①と同じ	①と同じ
	⑥	国内	②と同じ	②と同じ	②と同じ	②と同じ	初期生物量は0.5mg/Lを超えない。細胞数に関する具体的な記載なし	-	②と同じ	②と同じ	②と同じ
	⑦	国内・海外(OECD)	③と同じ	③と同じ	③と同じ	③と同じ	初期生物量は0.5mg/Lを超えない。 $2 \sim 5 \times 10^3$ cells/mL	-	③と同じ	③と同じ	③と同じ
	⑧	海外(米国)	④と同じ	④と同じ	④と同じ	④と同じ	④と同じ	-	④と同じ	④と同じ	④と同じ

\*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。



生物種	番号	国内/ 海外	試験対象毒性等		根拠法制度・規格等	制度等での位置付け	試験期間	測定、結果の算出・評価等 <sup>*1</sup>		
			毒性試験	成長段階				観測または測定	結果の算出	試験の有効性
フナガタケイソウ属 ( <i>Navicula pelliculosa</i> ) (珪藻)	⑨	国内・海外 (OECD)	Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test 藻類生長阻害試験	指数増殖期	OECD TG201		72時間	③と同じ	③と同じ	③と同じ
アナベナ属 ( <i>Anabaena flos-aquae</i> ) (藍藻)	⑩	国内・海外 (OECD)	Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test 藻類生長阻害試験	指数増殖期	OECD TG201		72時間	③と同じ	③と同じ	③と同じ
シネコックス属 ( <i>Synechococcus leopoliensis</i> ) (藍藻)	⑪	国内・海外 (OECD)	Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test 藻類生長阻害試験	指数増殖期	OECD TG201		72時間	③と同じ	③と同じ	③と同じ
クロレラ属 ( <i>Chlorella vulgaris</i> ) (緑藻)	⑫	海外 (米国)	微細藻類を用いた96時間の止水式毒性試験を行うための標準ガイド		ASTM 1218-97		96時間	④と同じ	④と同じ	④と同じ
ミクロキスチス属 ( <i>Microcystis aeruginosa</i> ) (藍藻)	⑬									
アナベナ属 ( <i>Anabaena flos-aquae</i> ) (藍藻)	⑭									
フナガタケイソウ属 ( <i>Navicula pelliculosa</i> ) (珪藻)	⑮									

\*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

生物種	番号	国内/ 海外	その他試験実施に係る技術的条件等*1									
			試験方式	試験媒体	助剤の使用	試験濃度	生物数/密度	給餌	連数	試験温度	照明	
フナガタケイソウ属 ( <i>Navicula pelliculosa</i> ) (珪藻)	⑨	国内・海外 (OEC D)	③と同じ	③と同じ	③と同じ	③と同じ	③と同じ	初期生物量は0.5mg/Lを超えない。 10 <sup>4</sup> cells/mL	-	③と同じ	③と同じ	連続照明、一定の蛍光性を有する照明。coolwhiteかdaylightタイプ。種類により強度は異なる。±15%を維持すること。
アナベナ属 ( <i>Anabaena flos-aquae</i> ) (藍藻)	⑩	国内・海外 (OEC D)	③と同じ	③と同じ	③と同じ	③と同じ	③と同じ	初期生物量は0.5mg/Lを超えない。 10 <sup>4</sup> cells/mL	-	③と同じ	③と同じ	光強度が高い場合に阻害を受ける種類: 平均40-60 μE・m <sup>2</sup> ・s <sup>-1</sup>
シネコックス属 ( <i>Synechococcus leopoliensis</i> ) (藍藻)	⑪	国内・海外 (OEC D)	③と同じ	③と同じ	③と同じ	③と同じ	③と同じ	初期生物量は0.5mg/Lを超えない。 5 × 10 <sup>4</sup> ~ 10 <sup>5</sup> cells/mL	-	③と同じ	③と同じ	連続照明、一定の蛍光性を有する照明。coolwhiteかdaylightタイプ。種類により強度は異なる。±15%を維持すること。
クロレラ属 ( <i>Chlorella vulgaris</i> ) (緑藻)	⑫	海外 (米国)	④と同じ	④と同じ	④と同じ	④と同じ	④と同じ	④と同じ	-	④と同じ	④と同じ	④と同じ
ミクロキスチス属 ( <i>Microcystis aeruginosa</i> ) (藍藻)	⑬											
アナベナ属 ( <i>Anabaena flos-aquae</i> ) (藍藻)	⑭											
フナガタケイソウ属 ( <i>Navicula pelliculosa</i> ) (珪藻)	⑮											

\*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

2. 無脊椎動物に係る主な慢性毒性試験の概要

生物種	番号	国内/海外	試験対象毒性等		根拠法制度・規格等	制度等での位置付け	試験期間	測定、結果の算出・評価等*1		
			毒性試験	成長段階				観測または測定	結果の算出	試験の有効性
オオミジンコ ( <i>Daphnia magna</i> ) ②に準ずる	①	国内	ミジンコの繁殖に及ぼす影響に関する試験 (ミジンコ繁殖試験) ※原則として OECD テストガイドライン211 で定められた方法に準じて実施。	ふ化後24時間未満	化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律 (化審法)	新規化学物質の審査における推奨種(必須)	21日間	②と同じ	②と同じ	②と同じ
<i>Daphnia magna</i> Strausを用いる。他のクローンが妥当性基準を満たすのであれば、採用可能。また、他のミジンコも同様。	②	国内・海外 (OECD)	Daphnia magna Reproduction Test	ふ化後24時間未満(最初の産仔は用いない)	経済協力開発機構 (Organisation for Economic Co-operation and Development: OECD) テストガイドライン210(2012)	化審法では、当該試験法に準拠することとされている。	21日間	(1) 観察 ・産仔された仔虫は速やかに除去し、異常な卵/仔や死亡した仔虫は係数すること ・死亡した親の数は毎日記録するか、頻りに計数されるべき ・試験後に親の長さを測定することが望ましい ・その他、最初の産仔数、親1頭当たりの仔虫のサイズと数、異常な仔虫の数、雄仔虫又は卵皮膜の数、内因性の増加率等 (2) 親の死亡の取り扱い ・ばく露期間中に親が死亡した場合は、それが濃度反応によるものかを考慮すべき ・死亡が濃度反応に従わない場合は、その連は結果から除外されるべき。 ・濃度反応に従った死亡の場合、親の死亡は被験物質の影響によるものとして、試験結果から除外すべきではない (2) 分析及び測定頻度 <被験物質濃度の測定> ① 試験期間中、等間隔で測定すること ② 半止水式では、被験物質濃度は設定濃度の±20%範囲内が要求される ○ 設定濃度の±20%を維持できないと判断された場合は、換水前後に全ての濃度区での測定が必要 ○ 設定濃度の±20%を維持できないが初期濃度の80-120%であることが証明される場合は、最低及び最高濃度区での週2又は3回測定に減らすことができる ③ 流水式では、半止水式での対応に準ずるが、試験濃度の安定性を確認するために、最初の週のサンプリング頻度を増やす(例えば、3セット)ことが望ましい。希釈水や被験物質の流量は毎日測定すること。 <環境条件の測定> ① 各試験区における試験液の水温、溶存酸素濃度、pH、硬度を、対照区と最高濃度区で、少なくとも週1回、換水前後に測定すること <分析結果> ① 試験期間中の試験物質濃度が設定濃度や初期濃度の±20%に維持されるこという証拠がある場合は、設定値や初期濃度に基づくことができる ② 設定濃度や初期濃度の±20%を超える場合は、分析結果は時間加重平均値で算出されるべき	繁殖影響 ECx NOEC/LOEC	対照区において、次の基準に対応しなければならない。 ① 親ミジンコ(雌のミジンコ)の死亡は試験終了時に20%を超過してはならない。 ② テストの終わりに生き残っている親ミジンコにつき産出された、平均生残産仔数は、60個体超であること 注) 妥当性基準(20%)は、テスト濃度の各々と同様に対照区の群発的な親の死亡にも用いる
	③	国内	15. ミジンコ類繁殖試験	ふ化後24時間未満(初産の幼体は用いない。)	農業取締法	水産動植物の被害防止に係る農業登録保留基準の設定における対象生物	21日間	(1) 供試生物の一般状態の観察 ・親ミジンコの生死を計数し、死亡個体は取り除く。これは毎日行うことが望ましいが、少なくとも48時間毎に行わなければならない。親ミジンコの大きさや状態、育房内の卵の有無、墮胎卵及び休眠卵の有無等を定期的に観察し、記録することが望ましい。 ・産出幼体については生存数を計数し、死亡幼体の有無及び肉眼的に判定した状態を記録する。これは毎日行うことが望ましいが、少なくとも週に3回は行わなければならない。計数及び観察後の幼体は取り除き、継続して飼育する必要はない。 (2) 被験物質濃度の測定 ① 測定用試料は、それぞれの試験濃度区各試験液から等量を取り、混和後、測定用試料に供することが望ましいが、予備試験等の結果から各試験液の均一性が確認できれば、例えば各試験濃度区1つの容器から採取して測定用試料とすることができる。 ② 測定用試料は試験液の中層から採取する。被験物質の一部が沈殿している場合や表層に浮いている場合であっても原則として撈拌は行わない。 ③ 半止水式の場合は、全ての試験濃度区について測定する。ただし、暴露開始時の被験物質濃度が継続されて安定である(すなわち、暴露開始濃度の80~120%の範囲内)ことを示す十分な証拠がある試験の場合、2回目以降の被験物質濃度の測定は、最高濃度区及び最低濃度区だけに減らすことができる。測定は、少なくとも1週間に1回程度の頻度で換水前及び換水後に行うこと。 ④ 流水式の場合は、半止水式のサンプリング方法に準じて行うが、被験物質の安定性確認のために第1週目の測定回数を増やす(例えば3回/週)ことは、有益である。 (3) 環境条件の測定 ① 各試験区における試験液の水温、溶存酸素濃度、硬度及びpHを測定することが望ましいが、少なくとも水温は対照区、それ以外は対照区及び最高濃度区で測定する。 ② 測定は、少なくとも1週間に1回程度の頻度で行う。	繁殖影響 ECx NOEC/LOEC	親ミジンコ1頭当たりの平均累積産仔数が60頭以上の種を用いる

生物種	番号	国内/海外	その他試験実施に係る技術的条件等*1								
			試験方式	試験媒体	助剤の使用	試験濃度	生物数/密度	給餌	連数	試験温度等	照明
オオミジンコ ( <i>Daphnia magna</i> )	①	国内	②と同じ	②と同じ	②と同じ	②と同じ	②と同じ	②と同じ	②と同じ	②と同じ	②と同じ
	③	国内・海外 (OECD)	半止水式: 少なくとも週に3回換水すること 流水式	・不確定の添加物を含んでいる培地が使用される場合、これらの添加物を明示すること。 ・藻類添加前の培地のTOCのレベルは2mg/l未満であることが推奨される。 ・オオミジンコの長期培養に適している培地は、Elendt M4およびM7であるが、これらは金属とのキレート作用を有するEDTA(エチレンジアミン④酢酸)を含んでいるため、金属を対象とした試験では推奨しない。他のキレート剤を含む試験も同様。その場合はASTMが推奨している様な代替培地を用いる。	・可能な限り、溶剤あるいは分散剤は利用しない。 ・助剤の使用はガイダンス文書23に従う。 ・適切な溶剤としては、例えばアセトン、エタノール、メタノール、ジメチルホルムアミドおよびトリエチレングリコールおよび、分散剤としては例えばCremophor RH40、メチルセルロース0.01%およびHCO-40が挙げられる ・助剤濃度は、0.1mL/Lを超えないこと	・少なくとも5濃度区を等比級数的にとる。公比は3.2を超えないことが望ましい。5濃度区以下に設定する場合は妥当性を証明すること。 ・溶解度以上の濃度区を設定しないこと。 ・濃度区の設定には以下を考慮すること ・OECDを算出する場合は、信頼できるECxを算出するため、有効な濃度レベルとすること、内挿で算出できるようにすること ・ONOE/LOEOを算出する場合、対照区との有意差を考慮して最低濃度区は低く、最高濃度区は高く設定すること ・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。	・半止水式試験では、各試験濃度区及び対照区で少なくとも10頭を使用する。流水式試験では40頭の試験生物を4連に分けて試験。試験生物数はそれより少なくともよく、また、20頭用いる場合は、頭数を2つ以上の連に分けて用いる(例えば、5頭4連)。 ・オオミジンコやそれに類似した他のミジンコの場合、1頭当たり通常50-100mLの試験溶液を用いる。ただし、ニセネコゼミジンコ ( <i>Ceriodaphnia dubia</i> ) の場合は、それより少なくともよい。	・半止水式の場合は毎日行われるべきであり、少なくとも週3回給餌されること。 ・親動物の飼料は、以下の藻類を1種以上用いること: クロレラ ( <i>Chlorella</i> sp.)、ムレミカツキモ ( <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> ) および <i>Desmodesmus subspicatus</i> ・給餌量は、有機炭素(C)の量に基づくべきであり、オオミジンコでは、0.1~0.2mgのC/頭/日であれば試験の妥当性基準を満たすのに十分である	半止水式: 10頭(少なくとも対照区での環境条件で順化された個体) 流水式: 40頭(10頭×4連) なお、試験生物数は上記より少なくともよい。その場合は、2連以上で20頭(例えば、4連で各5頭)の試験生物の使用が推奨される。	水温: 18 ~ 22°Cの範囲内に設定し、各試験容器間の変動は± 1.0°C以内とする。 pH: 6~9の範囲で、試験期間中は1.5以上変動しないこと 溶存酸素: 試験期間を通して3mg/L以上であること。 曝気しないこと。 硬度: 140mg/L(CaCO3として)以上が推奨	暗周期を16時間、試験容器表面で光強度15-20 μE.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> (1000-1500lux)の白色光を用いることが推奨される。
	③	国内	半止水式又は流水式	・人工調製水としては、OECDテストガイドライン211 <i>Daphnia magna</i> Reproduction Test(1998)ではElendt M4 またはM7 を提案している。 ・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特級の試薬を用い、調製に用いる蒸留水又は脱イオン水の電気伝導度は10 μScm <sup>-1</sup> 以下とする。 ・用いた希釈水に関しては、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。	・現在一般的に用いられている助剤としては、N,N-ジメチルホルムアミド、トリエチレングリコール、アセトン、エタノール、メタノール、硬化ヒマシ油等がある。 ・助剤は2種類以上を組み合わせ使用してもよいが、その場合は、用いた助剤の試験液中濃度は原則として全試験濃度区で一定とし、100mg/L(又は0.1ml/L)を超えないことが望ましい。	・通常、濃度公比は公比1.3 ~ 3.2で行う。 ・急性遊泳阻害試験の結果を参考にする場合、当該急性遊泳阻害試験のEC50を最高濃度、EC50の100分の1を最低濃度の目安とするといふ。	・各試験区での個体数は多い方が望ましいが、少なくとも10頭を使用すること。 ・必要に応じて観察が可能な個体数に分割する。各試験区で10頭ずつ使用した場合、1頭ずつ個別の容器に分割することが望ましい。なお、OECDテストガイドライン211 <i>Daphnia magna</i> Reproduction Test(1998)では、半止水式では10頭(10頭別々の容器で試験)を使用し、流水式では40頭(10頭×4グループ)又はそれ以下の場合、例えば20頭(10頭×2グループ若しくは5頭×4グループ)を提案している。	<親ミジンコの飼育> ・親ミジンコには、餌としてクロレラなどの単細胞緑藻類等を与える。給餌量は有機炭素量で、0.1 ~ 0.2mgC/ミジンコ/日程度とする。 <給餌> 餌は、培養したクロレラなどの単細胞緑藻類等を与える。給餌量は親ミジンコが必要とする有機炭素量を基本とし、0.1 ~ 0.2mgC/ミジンコ/日程度とする。給餌は毎日行うことが望ましい。	1連	全硬度は10 ~ 250mgCaCO3 /Lで、pH6.0 ~ 9.0の水が望ましい。	照度は約1200ルクスを超えないことを目安とする。OECDテストガイドライン211 <i>Daphnia magna</i> Reproduction Test(1998)では光強度は15-20 μE.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> を超えないこととされているが、測定の簡便さ等から目安となる照度を示す。光の質は特に規定しない。

④	海外(米国)	Standard Guide for Conducting Daphnia magna Life-Cycle Toxicity Tests (オオミジンコライフサイクル試験)	24時間齢未満	ASTM 1193-97		21日間	<p style="text-align: center;"><b>TABLE 1 Experimental Design</b></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Design Parameter</th> <th style="text-align: center;">Renewal Test</th> <th style="text-align: center;">Flow-Through Test</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Number of test concentrations</td> <td style="text-align: center;">≥5</td> <td style="text-align: center;">≥5</td> </tr> <tr> <td>Control</td> <td style="text-align: center;">Yes</td> <td style="text-align: center;">Yes</td> </tr> <tr> <td>Solvent control</td> <td style="text-align: center;">If appropriate</td> <td style="text-align: center;">If appropriate</td> </tr> <tr> <td>Number of chambers</td> <td style="text-align: center;">At least 4</td> <td style="text-align: center;">At least 4</td> </tr> <tr> <td>Minimum number of daphnids/treatment</td> <td style="text-align: center;">10 (individual daphnid/ chamber) 20 (multiple daphnids/ chamber)</td> <td style="text-align: center;">10 (individual daphnid/ chamber) 20 (multiple daphnids/ chamber)</td> </tr> <tr> <td>Number of daphnids/test chamber</td> <td style="text-align: center;">At least 1</td> <td style="text-align: center;">At least 5</td> </tr> <tr> <td>Feeding</td> <td style="text-align: center;">Once daily</td> <td style="text-align: center;">2 to 3 times daily (or continuous)</td> </tr> <tr> <td>Renewal of test solution</td> <td style="text-align: center;">At least 3 times/week</td> <td style="text-align: center;">At least 1 volume replacement/day</td> </tr> <tr> <td>Temperature</td> <td style="text-align: center;">20°C</td> <td style="text-align: center;">20°C</td> </tr> <tr> <td>Water chemistry</td> <td style="text-align: center;">New solutions at each renewal, old solutions after longest time hour interval</td> <td style="text-align: center;">Initially and at least weekly thereafter</td> </tr> <tr> <td>Analytical confirmation of test material</td> <td style="text-align: center;">Initially and at least weekly thereafter, old solutions at least once during the study</td> <td style="text-align: center;">Initially and at least weekly thereafter</td> </tr> </tbody> </table>	Design Parameter	Renewal Test	Flow-Through Test	Number of test concentrations	≥5	≥5	Control	Yes	Yes	Solvent control	If appropriate	If appropriate	Number of chambers	At least 4	At least 4	Minimum number of daphnids/treatment	10 (individual daphnid/ chamber) 20 (multiple daphnids/ chamber)	10 (individual daphnid/ chamber) 20 (multiple daphnids/ chamber)	Number of daphnids/test chamber	At least 1	At least 5	Feeding	Once daily	2 to 3 times daily (or continuous)	Renewal of test solution	At least 3 times/week	At least 1 volume replacement/day	Temperature	20°C	20°C	Water chemistry	New solutions at each renewal, old solutions after longest time hour interval	Initially and at least weekly thereafter	Analytical confirmation of test material	Initially and at least weekly thereafter, old solutions at least once during the study	Initially and at least weekly thereafter	生活環全体への被験物質の影響	<ul style="list-style-type: none"> <li>・試験生物は10頭/濃度区、4連未満</li> <li>・試験生物は24時間例未満、少なくとも2産仔以上</li> <li>・試験期間21日間</li> <li>・対照区の第1世代の死亡は30%未満</li> <li>・21日間に60頭以上産仔すること</li> <li>・対照区では卵皮膜ができないこと</li> <li>・試験区での温度、DO測定すること</li> <li>・濃度区での平均DOは3.0ml/L以上であること(あるいは、いずれの測定値も1.5mg/Lを下回らないこと)</li> <li>・平均水温は18-22°Cの範囲内であること(いずれの水温も17°C未満、23°C超にはならないこと)</li> </ul>
Design Parameter	Renewal Test	Flow-Through Test																																											
Number of test concentrations	≥5	≥5																																											
Control	Yes	Yes																																											
Solvent control	If appropriate	If appropriate																																											
Number of chambers	At least 4	At least 4																																											
Minimum number of daphnids/treatment	10 (individual daphnid/ chamber) 20 (multiple daphnids/ chamber)	10 (individual daphnid/ chamber) 20 (multiple daphnids/ chamber)																																											
Number of daphnids/test chamber	At least 1	At least 5																																											
Feeding	Once daily	2 to 3 times daily (or continuous)																																											
Renewal of test solution	At least 3 times/week	At least 1 volume replacement/day																																											
Temperature	20°C	20°C																																											
Water chemistry	New solutions at each renewal, old solutions after longest time hour interval	Initially and at least weekly thereafter																																											
Analytical confirmation of test material	Initially and at least weekly thereafter, old solutions at least once during the study	Initially and at least weekly thereafter																																											

\*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

④	海外(米国)	半止水式(少なくとも週3回換水) 流水式(少なくとも4回/日交換)	<p>&lt;希釈水&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・全有機体炭素(TOC)および粒子状物質の両方の濃度は5mg/L未満であるべき</li> <li>・井戸水は河川表流水より望ましい</li> <li>・塩素が除去された希釈水は推奨されない</li> <li>・以下の項目は、毎年少なくとも2度測定されるべき <ul style="list-style-type: none"> <li>硬度、アルカリ度、伝導性、pH、粒子状物質、TOC、有機リン系農薬、ポリクロロビフェニル(PCB)、塩素化されたフェノキシ除草剤、アンモニア、シアン化物、硫化物、塩化物、臭化物、フッ化物、ヨウ化物、硝酸塩、リン酸塩、硫酸塩、カルシウム、マグネシウム、ナトリウム、カリウム、アルミニウム、ヒ素、ベリリウム、ホウ素、カドミウム、クロム、(銅、鉄、鉛、マンガ、水銀、モリブデン、ニッケル、セレン、銀および亜鉛)</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・希釈水以外の溶剤が使用される場合、被験液でのその濃度は最小限に抑えられるべきであり、D.magnaの生存、増殖あるいは生殖に影響しないこと</li> <li>・ジメチルホルムアミドおよびトリエチレングリコールは、原液の準備により有機溶媒である</li> <li>・メタノール、エタノールおよびアセトンのような他の水混和性有機溶媒も、キャリアーとして使用されてもよい。しかし、それらは、微生物の不適当な増殖を促す可能性がある。また、アセトンは全く揮発性である。</li> <li>・有機溶媒が使用される場合、その濃度は0.1 mL/Lを超過するべきではない</li> </ul> <p>被験物質の毒性に影響するかもしれないので、界面活性剤は原液の準備の中で使用されるべきではない</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・被験物質は、試薬レベルが望ましい、試験前に主要な成分、不純物を調べるべき</li> <li>・希釈係数0.5で、5濃度区、慢性毒性の評価が難しい場合は、6又は7濃度区が望ましい</li> <li>・対照区は精度を高めるため、必要に応じて増やす</li> </ul>	少なくとも10頭/濃度区を用いる(4連×5頭 20頭でもよい)	試験前の飼育期間中にはマス用餌料、イースト、アルファルファ、また藻類(Ankistrodesmus convolutus、Ankistrodesmus falcatus、Chlorella vulgaris、Chlamydomonas reinhardtii、またRaphidocelis subcapitata、Selenastrum capricornutum)の混合液	1連	DO:飽和度で100%、 3mg/L以上 水温20°C	光強度600lxあるいは1 w/m <sup>2</sup> のフルエンス率 明暗周期 16時間明: 8時間暗
---	--------	--------------------------------------	---	--	--	---------------------------------	---	----	-----------------------------------	---

\*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

生物種	番号	国内/ 海外	試験対象毒性等		根拠法制度・規格等	制度等での位置付け	試験期間	測定、結果の算出・評価等*1		
			毒性試験	成長段階				観測または測定	結果の算出	試験の有効性
オオミジンコ(Daphnia magna)	⑤	海外(米 国)	Water quality - Determination of long term toxicity of substances to Daphnia magnaStraus (Cladocera, Crustacea) (オオミジンコの長期毒 性の決定)	24時間齢未満 (3世代以上飼 育された親から 第2～5産仔さ れた仔虫)	ISO10706		21日間	試験生物: ・死亡、卵皮膜、雄の出現を記録すること  環境条件: ・光強度を報告すること ・水温、DO、硬度、pHを試験開始時、換水前後、終了時の対照区と最高濃度区で毎週測 定すること  被験物質の測定 ・被験物質は試験開始時と終了時に測定し、また、安定性に準じて測定頻度を増やすこと ・半止水式:設定濃度の80-120%の場合は、換水前後に最低濃度区と最高濃度区で測 定、維持されない場合は全ての濃度区で少なくとも毎週測定すること。 ・実測濃度が±20%を維持できない場合は、時間加重平均値を用いること	繁殖影響 ECx NOEC/LOEC ・実測濃度が±20%を 維持できない場合は、 時間加重平均値を用 いること	・試験終了時の成体又は雄は20%以 下 ・対照区での生残産仔数は60頭以上 ・対照区での1日当たりの産仔数の変 動係数は20%未満
	⑥	海外(欧 州連合)	C.20 Daphnia Magna reproduction test(オオ ミジンコ繁殖試験) This Reproduction toxicity test method is a replicate of the OECD TG 211 (1998). ※OECD試験法に準じ ているが、1998版のた め、②と異なる部分の み記載。	24時間齢未満			21日間	・試験を通して生残している親の産仔数により評価	②と同じ	②と同じ

\*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

生物種	番号	国内/ 海外	その他試験実施に係る技術的条件等 <sup>*1</sup>								
			試験方式	試験媒体	助剤の使用	試験濃度	生物数/密度	給餌	連数	試験温度	照明
オオミジンコ(Daphnia magna)	⑤	海外(米 国)	半止水式(少なくとも週3回換水、はじめの換水後の濃度が設定濃度の80%下回る場合は、換水頻度を増す或いは流水式にすること) 流水式	<培地> a) OECD M4およびM7メディア b) ASTM調整水 <条件> ・溶存酸素濃度が95%の飽和に達して、pHが安定するまで、希釈水が通気されたも ・必要に応じて、水酸化ナトリウム(NaOH)溶液あるいは塩酸(HCl)により、pH8.0±0.5に調整 このように準備された希釈水は、使用前にさらに通気されないもの ・藻類の追加の前のTOCは5mg/l未満 ・キレート化が化合物の毒性を縮小するかもしれないので、金属を含んでいる化合物をテストする場合、EDTA(例えばM4とM7)を含んでいる希釈水の使用は推奨されない。	・溶剤が使用される場合、原液中の溶剤の濃度は、最高濃度区で濃度が0.1ml/lを超えないこと ・有機溶媒の使用は回避されるべき それらがアセトン、エタノール、メタノール、ジメチルホルムアミド、トリエチレングリコールあるいはCremophor RH40のような分散剤のような要求された有機溶媒である場合、メチルセルロース0.1%およびHCO-40は適切に濃縮原液を生産するために使用されてもよい。 それらは、0.1ml/lの濃度のD.magnaに有毒ではありません。	・助剤を用いた場合は、助剤対照区を追加すること ・少なくとも5濃度区、公比は3.2を超えないこと	半止水式では少なくとも10頭の試験生物が必要	・Chlorella spp. Pseudokirchneriella subcapitata (formally known as Selenastrum capricornutum) or Scenedesmus subspicatus. ・1日当たり0.1-0.2mgC/頭を給餌		・水温18-22℃±2℃ ・DOは3mg/L以上 ・pH6-9の範囲で、試験期間中1.54以上変動しない ・硬度140mg/L (CaCO3として)	・明暗周期: 16時間明、8時間暗 ・光強度600-800lux、1200luxは超えない
	⑥	海外(欧 州連合)	②と同じ	②と同じ	②と同じ	②と同じ	②と同じ	②と同じ	②と同じ	②と同じ	②と同じ

\*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。



3. 魚類に係る主な慢性毒性試験の概要

生物種	番号	国内/海外	試験対象毒性等		根拠法制度・規格等	制度等での位置付け	試験期間	測定、結果の算出・評価等 <sup>*1</sup>		
			毒性試験	成長段階(推奨全長cm)				観測または測定	結果の算出	試験の有効性
ゼブラフィッシュ ( <i>Brachydanio rerio</i> ) ファットヘッドミノー ( <i>Pimephales promelas</i> ) メダカ ( <i>Oryzias latipes</i> ) ニジマス ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	①	国内	魚類の初期生活段階における生息又は生育に及ぼす影響に関する試験 (魚類初期生活段階毒性試験) ※原則としてOECDテストガイドライン210で定められた方法に準じて実施。	受精卵	化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律(化審法)	新規化学物質の審査における推奨種、メダカは必須	②と同じ	②と同じ	②と同じ	②と同じ
	②	国内・海外(OECD)	Fish, Early-life Stage Toxicity Test (魚類成長段階試験)	受精卵	経済協力開発機構 (Organisation for Economic Co-operation and Development: OECD) テストガイドライン210(2013)		ゼブラフィッシュ: ふ化後30日間 ファットヘッドミノー: 試験開始後32日間(ふ化後28日間) メダカ: ふ化後30日間 ニジマス: 対照区の魚体が自由遊泳した後2週間(又はふ化後60日間)	<p>&lt;観察&gt; 胚の発生段階: 被験物質に曝露を始めるときの胚の発生段階はできるだけ正確に確認する。これは適切に保存し、透明にした卵の代表試料を用いて行うことができる。ふ化と生存: ふ化と生存に関する観察は少なくとも1日1回行い、その数を記録する。死亡した胚、仔魚及び稚魚は分解が早く、他の魚の活動によって壊される場合もあるため、観察後できるだけ早く取り除く。死亡した個体を取り除くときは近くにある非常に繊細で感受性が高い卵・仔魚を突いたり物理的な打撃を与えないように特に注意する。死亡の判断基準は成長段階によって異なる: 外観の異常: 体形の異常な仔魚や魚の数を試験期間と異常の性質に応じて、適切な間隔で記録する。異常な胚と仔魚は自然発生的に起こり、いくつかの生物種では対照区で数% オーダーになることに注意が必要である。異常な生物は死亡したときにだけ試験容器から取り除く。 異常な行動: 例えば、過度の鰓の換水、同調しない遊泳、非定期的な休止及び非定期的な摂食行動のような異常はその試験期間に対して適切な間隔で記録する。これらの影響は定量化が困難であるが、観察した場合は死亡データの解釈、推奨される期間以上に曝露期間を延長することを決定する上で参考となる。 体重: 試験終了時にすべての生存魚は体重を測定しなければならない。個体別の体重が望ましいが、魚が特に小さい場合、試験容器毎に群で体重を測定してもよい。乾燥重量(60°Cで24時間)が湿重量(体表水を拭き取ったもの)より望ましい。 体長: 試験終了時に、個体の長さの測定が推奨される; 標準体長、尾又体長あるいは全長を用いてもよい。しかし、尾鰭が腐っていたりただれている場合は標準体長を使う。</p> <p>&lt;被験物質の測定&gt; ・試験期間中、被験物質の濃度を一定間隔で調べ、有効基準に適合しているかを確認。 ・少なくとも5回の測定が必要である。 ・測定値が設定値の80-120%を満たさない場合は、流水式での分析結果については算術平均する等の措置が必要である。半止水式の場合は幾何平均する。</p> <p>&lt;環境条件の測定&gt; ・試験期間中、溶存酸素、pH、温度はすべての容器で少なくとも毎週測定する ・塩分と硬度は試験開始時と終了時に測定する ・温度は少なくとも一つの容器で連続的に監視することが望ましい。</p>	致死および垂致死的な影響を算定し、対照区の値と比較することにより最小影響濃度を求め、それによって無作用濃度を決定する。または、回帰モデルを用いて、X% (例えば10% 或いは20%) の影響濃度 (ECx/10/20%) を求める。	<p>・試験期間を通じて、溶存酸素濃度は空気飽和濃度の60%を超えない値と比較することにより最小影響濃度を求め、それによって無作用濃度を決定する。または、回帰モデルを用いて、影響濃度 (ECx) を求める。</p> <p>・試験を通じて、水温は常に試験水槽間あるいは連続した日の間で±1.5°C以上違ってはならず、その試験魚種に決められた温度範囲内とする。</p> <p>・対照区及び助剤対照区を設けた場合、そこでの全期間中の受精卵の生存率は付録2に定めた限界値がそれ以上でなければならない。</p> <p>・被験物質は分析すること</p>
ニジマス ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) ゼブラフィッシュ ( <i>Brachydanio rerio</i> ) コイ ( <i>Cyprinus carpio</i> ) メダカ ( <i>Oryzias latipes</i> ) ファットヘッドミノー ( <i>Pimephales promelas</i> ) 以上、推奨種(ここでは推奨種のみ)の条件等を記載)	③	国内・海外(OECD)	Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages (魚類胚・仔魚期短期毒性試験)	受精卵(可能であれば、受精後30分以内、少なくとも受精後8時間以内)	経済協力開発機構 (Organisation for Economic Co-operation and Development: OECD) テストガイドライン212(1998)		ニジマス胚30-65日、仔魚25-30日 ゼブラフィッシュ胚3-5日、仔魚8-10日 コイ胚5日、仔魚>4日 メダカ胚8-11日、仔魚4-8日 ファットヘッドミノー胚4-5日、仔魚5日	<p>&lt;観察&gt; 胚の発生段階: 被験物質に曝露を始めるときの胚の発生段階はできるだけ正確に確認する。これは適切に保存し、透明にした卵の代表試料を用いて行うことができる。ふ化と生存: ふ化と生存に関する観察は少なくとも1日1回行い、その数を記録する。死亡した胚、仔魚及び停止欠如等、仔魚=呼吸運動の停止、不動、刺激に対する無反応等 外観の異常: 体形の異常な仔魚や魚の数を試験期間と異常の性質に応じて、適切な間隔で記録する。異常な胚と仔魚は自然発生的に起こり、いくつかの生物種では対照区で数% オーダーになることに注意が必要である。異常な生物は死亡したときにだけ試験容器から取り除く。 異常な行動: 例えば、過度の鰓の換水、同調しない遊泳、非定期的な休止及び非定期的な摂食行動のような異常はその試験期間に対して適切な間隔で記録する。これらの影響は定量化が困難であるが、観察した場合は死亡データの解釈、推奨される期間以上に曝露期間を延長することを決定する上で参考となる。 体重: 試験終了時にすべての生存魚は体重を測定しなければならない。乾燥重量(60°Cで24時間)が湿重量(体表水を拭き取ったもの)より望ましい。対照区の変動係数は&lt;20%。 体長: 試験終了時に、個体の長さの測定が推奨される; 標準体長、尾又体長あるいは全長を用いてもよい。しかし、尾鰭が腐っていたりただれている場合は標準体長を使う。対照区の変動係数は&lt;20%。 &lt;被験物質の測定&gt; ・試験期間中、被験物質の濃度を一定間隔で調べ、有効基準に適合しているかを確認。 ・少なくとも3回の測定が必要である。試験が7日間の場合は毎日測定すること。それ以上の場合で濃度が安定していることを確かめるため、頻度を増すことが望ましい。 ・設定値の20%以内と証明された場合は、設定値または初期実測値から毒性値を算出することが可能。 &lt;環境条件の測定&gt; ・試験期間中、溶存酸素、pH、温度はすべての容器で測定する ・塩分と硬度は、少なくとも対照区、1濃度区、最高濃度区で測定すること。 ・DOと塩分は試験開始時、試験中、試験終了時の3回は測定すること。 ・半止水式では、換水前後あるいは週1回にDOを測定することが望ましい。 ・pHは半止水式では試験開始時・終了時、換水前後、流水式では少なくとも週1回測定すべき。 ・温度は少なくとも一つの容器で連続的に監視すること。</p>	垂致死的な影響を算定し、対照区の値と比較することにより最小影響濃度を求め、それによって無作用濃度を決定する。または、回帰モデルを用いて、影響濃度 (ECx) を求める。	<p>・対照区の生残率等が以下を満足すること ニジマス ふ化66%仔魚70% ゼブラフィッシュふ化80%仔魚90% コイふ化80%仔魚75% メダカふ化80%仔魚80% ファットヘッドミノーふ化60%仔魚70% ・酸素飽和度が60-100% ・水温の変動は±1.5°C</p>

\*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

生物種	番号	国内/海外	その他試験実施に係る技術的条件等									
			試験方式	試験媒体	助剤の使用	試験濃度	生物数/密度	給餌	連数	試験温度(°C)	照明	
ゼブラフィッシュ(Brachydanio rerio) ファットヘッドミノー(Pimephales promelas) メダカ(Oryzias latipes) ニジマス(Oncorhynchus mykiss)	①	国内	②と同じ	②と同じ	②と同じ	②と同じ	②と同じ	②と同じ	②と同じ	②と同じ	②と同じ	②と同じ
	③	国内・海外(OECD)	流水式が望ましいが、半止水式でもよい 流水式:試験期間中、保存溶液と希釈水の流量を一定間隔で調べ、試験期間を通じて10%以上の変動がないようにする。	試験生物種の対照区の生存率が上げられ、どのような水でも試験用水として適している。 水質は試験期間中一定に保つ。希釈水を定期的に採取し、分析し、試験結果に影響しない(例えば被験物質の錯体形成によるもの)あるいは群の蓄養に有害な影響を及ぼさないものであることを確認する。重金属(例えば、Ca、Mg、Na、K、Cl、SO4)、農薬、全有機炭素と試験物質の測定を行う。 例えば希釈水の水質が比較的变化することが明らか場合は、頻繁に測定すること	・原液は、機械的手段(例えば攪拌や超音波処理)の使用により、準備されているべき ・溶解助剤は推奨できないが、用いる場合は助剤対照区を設定すること ・助剤の濃度は100µL/L未満であること	・5濃度の被験物質区が必要で、公比は通常3.2を超えない ・急性毒性試験におけるLC50値と曝露期間との関係の曲線を参考にして、試験濃度範囲を決める ・5濃度より少ない試験区数で行う場合は正当な理由が必要である ・96時間LC50値あるいは10mg/Lのどちらか低い方の比較物質濃度以上で試験する必要はない	・試験開始時の受精卵は統計上の要求を満たすのに十分な数とする。 ・卵は処理区の間で無作為に配分し、各試験濃度では最低80個の卵を用い、少なくとも4連の試験水槽に均等に分割する。 ・流水式試験については、24時間当たり0.5g/Lを超えず、そして常に5g/Lを超えない収容密度が推奨される	・餌料と給餌は極めて重要であり、各成長段階に対し適切な餌料を、適切な時期から、正常な成長の維持に十分な料を与えることが必須である ・餌は飽食量を与えるが、残餌はできるだけ少なくする ・残餌や糞は必要な頻度で除去し、排泄物が蓄積しないようにする	・胚期:4連	ゼブラフィッシュ:26±1.5 ファットヘッドミノー:25±1.5 メダカ:25±2 ニジマス:10±1.5	照明時間と水温はその試験生物種に適したものとする	
ニジマス(Oncorhynchus mykiss) ゼブラフィッシュ(Brachydanio rerio) コイ(Cyprinus carpio) メダカ(Oryzias latipes) ファットヘッドミノー(Pimephales promelas) 以上、推奨種(ここでは推奨種のみ)の条件等を記載)	③	国内・海外(OECD)	半止水式 流水式	試験生物種の対照区の生存率が上げられ、どのような水でも試験用水として適している。 水質は試験期間中一定に保つ。試験結果に影響しないことを確認するため、希釈水を定期的に採取し、分析すること。 重金属(例えば、Cu、Pb、Zn、Cd、N)や主たるイオン(例えば、Ca、Mg、Na、K、Cl、SO4)、農薬、全有機炭素と試験物質の測定を行う。例えば3ヶ月毎。 希釈水の水質が1年以上変化しないのであれば、希釈水の測定を6ヶ月ごととすることができる。	・原液は、機械的手段(例えば攪拌や超音波処理)の使用により、準備されているべき ・可能な限り溶剤や分散剤は使用しないこと ・ただし、必要な場合の溶剤の例としては、アセトン、エタノール、メタノール、ジメチルホルムアミド、トリエチレングリコール等がある。分散剤の例としては、Cremophor RH40、Tween 80、methylcellulose 0.01%とHCO-40が挙げられる。	・5濃度の被験物質区が必要で、公比は通常3.2を超えない ・急性毒性試験におけるLC50値と曝露期間との関係の曲線を参考にして、試験濃度範囲を決める ・5濃度より少ない試験区数で行う場合は正当な理由が必要である ・96時間LC50値あるいは10mg/Lのどちらか低い方の比較物質濃度以上で試験する必要はない	・試験開始時の受精卵は統計上の要求を満たすのに十分な数とする。 ・卵は処理区の間で無作為に配分し、各試験濃度では最低30個の卵を用い、少なくとも3連の試験水槽に均等に分割する。 ・流水式試験については、24時間当たり0.5g/Lを超えず、そして常に5g/Lを超えない収容密度が推奨される	・給餌なし(開口前に試験は終了)	・3連	ニジマス胚10±1°C、仔魚12±1°C ゼブラフィッシュ25±1°C コイ21-25°C メダカ胚24±1°C、仔魚23±2°C ファットヘッドミノー25±2°C	ニジマス暗黒状態 ゼブラフィッシュ 照明時間:12-16時間 コイ照明時間:12-16時間 メダカ照明時間:12-16時間 ファットヘッドミノー照明時間:16時間	

\*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

生物種	番号	国内/海外	試験対象毒性等		根拠法制度・規格等	制度等での位置付け	試験期間	測定、結果の算出・評価等*1		
			毒性試験	成長段階(推奨全長cm)				観測または測定	結果の算出	試験の有効性
ゼブラフィッシュ( <i>Brachydanio rerio</i> )	④	海外(米国)	Water quality - Determination of toxicity to embryos and larvae of freshwater fish - Semi-static method (水質 淡水魚の胚及び幼生への毒性測定-半止水式)	受精卵 1時間以内に産卵した個体を集め、採卵からさらに2~3時間後に試験を開始する(2~3時間齢)	ISO 12890		標準的ばく露期間は10日間であるが、14日まで延長してもよい。	・試験開始時(0日目):対照区/濃度区のDOとpH、水温を測定 ・ふ化は通常2~4日後に起こるため、ふ化時間への影響をみるため、2~4日目の午前/午後に胚とふ化数を観察	致死又は影響濃度 ECx NOEC/LOEC	・対照区のDOが26°Cで70-110%飽和度であること ・換水がpH7.5±0.2であること ・温度は26±2°Cに維持されていること ・対照区の胚は24時間後に70%以上生残していること ・対照区のふ化までの日数(中央値)が2~4日であること ・10日後の対照区の生残稚仔が90%を超えていること ・試験を延長した場合、対照区が生残日数の中央値が12~16日であること
①サケ類等 サケ類( <i>Oncorhynchus sp.</i> ) マス類( <i>Salmo sp.</i> ) イワナ類( <i>Salvelinus sp.</i> ) ②ノーザンパイク( <i>Esox lucius</i> ) ③ファットヘッドミノー( <i>Pimephales promelas</i> ) ④white sucker ( <i>Catostomus commersoni</i> ) ⑤アメリカナマズ属( <i>Ictalurus punctatus</i> )	⑤	海外(米国)	Standard guide for conducting early life-stage toxicity tests with fishes (魚類初期生活段階試験の標準的なガイド)	受精卵	ASTME1241		①サケ類等: 少なくともスイムアップ後30日 ②ノーザンパイク: 32日間 ③ファットヘッドミノー: 少なくとも28日間 ④white sucker: 32日間 ⑤アメリカナマズ属: 32日間	・被験物質は設定値の±30%以内 <観察> ・未受精、死亡胚(心拍等により)を計数 ・死亡個体は計数され、除去 ・ふ化魚を計数し、死亡個体(突くなどして判定)は除去 <水質> 希釈水が使用される場合、その硬度、アルカリ度、伝導性およびpHは、テストの始めおよび終わり、および毎週測定 DOは試験はじめ、終了時、毎週測定(60%未満の場合は適切に措置すること) 非イオンアンモニア、粒子状物質TOC(又はCOD)は毎週測定することが望ましい 温度は毎日測定 <被験物質> 被験物質濃度は全濃度区で頻繁に測定すること 不純物がある場合はそれを測定することが望ましい	生残と成長に対する NOEC/LOEC	・試験容器はすべて同一であること ・処理が不作為であること ・試験生物の成長段階が適切なこと ・生残と成長に関するデータが得られること ・温度、DOが測定されていること ・DOは60-100%の範囲であること 等
ニジマス( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	⑥	海外(カナダ)	Biological Test Method: Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout)(ニジマス初期生活段階試験)	3段階に分けた試験 ①胚試験(E試験) ②胚-仔魚試験(EA試験) ③胚-仔魚-稚魚試験(EAF試験)	EPS1/RM/28		①E試験:受精後7日間 ②EA試験:対照区の胚が半数ふ化した後7日間 ③EAF試験:対照区が生残個体が半数スイムアップ後、30日間		生残と成長に対する EC50/EC25等	①E試験:対照区が生残30%超 ②EA試験:対照区が生残35%超 ③EAF試験:スイムアップ50%時の対照区が生残40%超

\*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

生物種	番号	国内/海外	その他試験実施に係る技術的条件等								
			試験方式	試験媒体	助剤の使用	試験濃度	生物数/密度	給餌	連数	試験温度(°C)	照明
ゼブラフィッシュ(Brachydanio rerio)	④	海外(米国)	半止水式	希釈には高純度の水を採用 電気伝導度は18MΩ/cmを超えないこと この後に塩を加えて希釈水を調製 pH7.5±0.2、硬度100±10mg/L(CaCO3として) 排水を用いた場合に直ちに試験ができない際には不活性プラスチック容器に少量分取し、凍結保存(-20°C)する pHが7.5±0.2範囲外の場合は7.5±0.2に調製する	水溶解度が低い物質の場合は、超音波や毒性の低い溶剤の使用など適切な方法で調製 溶媒濃度は最終試験溶液中で0.1mL/Lを超えないこと 助剤を用いた場合、助剤対照区を設定すること	被験物質は試薬級 対照区及び少なくとも6濃度区、上位2濃度区は対照区と有意差を有すること 濃度区は等比級数となるように設定 遅延型の毒性を有すると疑われる場合は、より低い濃度を設定	各容器15胚×4容器 24時間後に生残胚を10胚に減らし、新たな容器に移す		胚期:4連(対照区)、2連(濃度区)	26±2°C	通常の照明 12/12h、14/10h、 16/8hの明暗周期
①サケ類等 サケ類(Oncorhynchus sp.) マス類(Salmo sp.) イワナ類(Salvelinus sp.) ②ノーザンパイク(Esox lucius) ③ファットヘッドミノー(Pimephales promelas) ④white sucker (Catostomus commersoni) ⑤アメリカナマズ属(Ictalurus punctatus)	⑤	海外(米国)	流水式(流量は毎日午前/午後に確認、流量の変動は10%未満)	希釈水は試験生物の生残に影響を及ぼさないものを用いること 硬度変動は5mg/L未満又は10%未満 TOC及び粒子状物質は5mg/L未満のものを用いる 塩素化した水、脱塩素水は用いないこと	・希釈水以外の溶剤が使用される場合、被験液でのその濃度は最小限に抑えられるべきであり、それが供試生物の生存あるいは増殖のいずれかに影響しないように十分に低い濃度であるべき ・トリエチレングリコールは多くの場合原液の準備により有機溶媒である ・メタノール、エタノールおよびアセトンのような他のwatermiscibleな有機溶媒も使用されてよい。しかし、それらは、微生物の不適当な増殖を促すかもしれない ・有機溶媒が使用される場合、それは試薬gradeであるべきで、その濃度は0.1 mL/Lを超過すべきではない ・助剤を用いる場合は助剤対照区を設定すること	被験物質は試薬が望ましい 主要な生物や不純物に関する情報を集めること 試験生物の生残又は成長への影響しない 最高濃度を得るために設定する。 急性毒性試験結果を参考に設定(例外を除いてACRは5程度) 少なくとも5濃度区(希釈係数0.5)、慢性毒性が明らかでない場合は6又は7濃度区が望ましい		餌生物: brine shrimp nauplii等		変動は3°C以内 ①サケ類等:10°C ②ノーザンパイク:15±1°C ③ファットヘッドミノー:25°C ④white sucker:15°C ⑤アメリカナマズ属:25°C	
ニジマス(Oncorhynchus mykiss)	⑥	海外(カナダ)	半止水式 流水式	<希釈水> 汚染されていない井戸水または河川水、 脱塩素水道水 pH:6.5-8.5 硬度:15-150mg/L(CaCO3)		対照区と最低5濃度区(等比級数、公比2推奨)	①胚試験(E試験):120胚以上 ②胚-仔魚試験(EA試験)・胚-仔魚-稚魚試験(EAF試験):120-320胚/濃度区	①E/EA試験:無給餌 ②EAF試験:1日当たり体重の4%を給餌	3連以上	14±1°C	16±1時間明、8±1暗 100-500lux

\*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

国内外で主に用いられている淡水生物に係る急性毒性試験

別添2

1. 藻類に係る主な急性毒性試験の概要

生物種	番号	国内/海外	試験対象毒性等		根拠法制度・規格等	制度等での位置付け	試験期間	測定、結果の算出・評価等 <sup>*1</sup>		
			毒性試験	成長段階				観測または測定	結果の算出	試験の有効性
ムレミカツキモ ( <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> 、旧名 <i>Selenastrum capricornutum</i> ) (緑藻)	①	国内	藻類生長阻害試験	指数増殖期	化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律(化審法)	新規化学物質での審査での推奨種	72時間	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。被験物質の濃度は、少なくとも最低及び最高試験濃度並びに予測されるEC50 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。 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。	生長速度に対する半数影響濃度(ErC50)及び無影響濃度(NOEC)	・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
	②	国内	藻類生長阻害試験	指数増殖期	農薬取締法	水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準の設定における対象生物(必須)	72時間	(1)生物量の測定 個々の試験容器中の生物量は、暴露開始後24時間間隔で暴露終了時まで測定する。また、外見の異常が見られた場合には記録する。 (2)被験物質濃度の測定 ① 原体を被験物質として用いた場合には、各試験濃度区ごとに被験物質の濃度を少なくとも暴露開始時及び終了時に測定する。 ② 被験物質濃度区ごとに各容器から試験液を等量採取して混合し、測定用試料に供する。繰り返し間に差がないと予想される場合には、1容器から採取してもよい。 (3)環境条件の測定 ① 各試験区(試験濃度区、対照区)について、試験培地の水温及びpHを測定する。 ② 測定は、少なくとも暴露開始時及び終了時に行う。	生長速度に対する半数生長阻害濃度(ErC50)及び無影響濃度(NOEC)	(1)対照区の生物量は、試験開始72時間後において、試験開始時における生物量の16倍以上に増加していなければならない。 (2)対照区において、各繰り返し毎に各日(0~1日、1~2日、2~3日)について求めた生長速度の変動係数を算出する。これらの変動係数の平均値が35%を超えてはならない。 (3)対照区において、各繰り返し毎に試験期間中(0~3日)の平均生長速度を求め、その変動係数が7%を超えてはならない。
	③	国内・海外(OECD)	Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test 藻類生長阻害試験	指数増殖期	経済協力開発機構(Organisation for Economic Co-operation and Development: OECD)テストガイド ライン201(2011)		72時間	生物量: 毎日測定 pH: 試験開始時、終了時。1.5 以上変動してはならない。 被験物質の濃度: 試験開始時とばく露状態を捉えるために測定 設定値から20%未満の場合は、EC50付近の試験濃度、初期濃度と最終濃度を測定すること 濃度が設定の80-120%以内に残らない場合、初期濃度と最終濃度をすべての濃度区で行うことが望ましい。揮発性物質、不安定な試験物質あるいは強く吸着する試験物質については、暴露期間中の24時間間隔で追加のサンプリングを行うことが望ましい。	藻類の生長に対する試験物質の影響を測定すること。 生長阻害は2つの反応変数による。 ①平均生長速度: 1日当たりの値を以て表現、試験期間での生長の対数増加に基づき算出 ②収量: 最終的な生物量から初期の生物量を差し引いた値 これらの値は比較できない。 平均生長速度から、x%阻害、例えば50%の阻害を引き起こす濃度、ErCx(例えばErC50)として表現。 最低観察影響濃度(LOEC)および無影響濃度(NOEC)は、統計的に測定	・対照区の生物量は、試験開始72時間後において、試験開始時における生物量の16倍以上に増加していなければならない。これは、0.92 day <sup>-1</sup> に該当する。推奨種の生長速度は通常この値より高いが、生長速度が遅く種類については、16倍以上でなければならない。その場合、16倍を満足するため、試験期間を延長すべきである。16倍に達しており、また、指数関数的な生長を維持するため、試験期間を48時間にしてもよい。
	④	海外(米国)	Standard Guide for Conducting Static 96-h Toxicity Tests with Microalgae 微細藻類を用いた96時間の止水式毒性試験を行うための標準ガイド		ASTM 1218-97		96時間	細胞数またはクロロフィルaを測定する。 →IC50の計算の際、 現存量に基づく場合→試験終了時に生物量を測定。 生長率もしくは生長曲線の面積に基づく場合→試験期間中毎日測定。 pH: 試験開始時・終了時に測定(コントロール、最高、中間、最低濃度区)。 室内温度: 一時間おきに測定、もしくは毎日最高温度と最低温度を測定。 光フルエンス率: 試験前に測定。 被験物質濃度: 試験開始と終了後に測定。	IC50	対照区の細胞数が、試験開始時の16倍以上に増加していること。
イカダモ属( <i>Desmodesmus subspicatus</i> 、旧名 <i>Scenedesmus subspicatus</i> ) (緑藻)	⑤	国内	藻類生長阻害試験	指数増殖期	化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律(化審法)	新規化学物質での評価に用いてもよい	72時間	①と同じ	①と同じ	①と同じ
	⑥	国内	藻類生長阻害試験	指数増殖期	農薬取締法	水産動植物登録保留基準策定において、培養及び試験に都合がよく、試験の妥当性を満たす場合は用いてもよい	72時間	②と同じ	②と同じ	②と同じ
	⑦	国内・海外(OECD)	Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test 藻類生長阻害試験	指数増殖期	OECD TG201		72時間	③と同じ	③と同じ	③と同じ
	⑧	海外(米国)	微細藻類を用いた96時間の止水式毒性試験を行うための標準ガイド		ASTM 1218-97		96時間	④と同じ	④と同じ	④と同じ

\*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

生物種	番号	国内/海外	その他試験実施に係る技術的条件等 <sup>*1</sup>								
			試験方式	試験媒体	助剤の使用	試験濃度	生物数/密度	給餌	連数	試験温度	照明
ムレミカヅキモ ( <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> 、旧名 <i>Selenastrum capricornutum</i> ) (緑藻)	①	国内	止水式	OECD培地(OECDテストガイドライン 201 Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test(2006))又はAAP(AGP)培地(U.S.EPA:Alga Assay Procedure:Bottle Test, National Environmental Research Center, Corvallis, Oregon(1971))を用いることが望ましい。	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。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。	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。	乾燥重量が0.5mg/Lを超えないように設定する。 $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ cells/mL	-	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。	21~24°Cの範囲内で設定し、培養器又は培養室内の変動は±2°C以内とする	60-120mE/m <sup>2</sup> /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。)
	②	国内	止水式	同上	難水溶性原体の場合、以下のいずれかの方法により試験培地を調整する。 ア 被験物質を有機溶剤等の助剤に溶かした試験原液を用いて試験培地を調整する。 この場合、助剤は、試験生物に対して毒性が弱く使用濃度で供試生物に対して有害性が認められず、かつ、被験物質の性質を変えないものを用いる。 助剤の試験液中濃度は、原則として全試験濃度区で一定とし、100mg/L(又は0.1ml/L)を超えないことが望ましい。	① 等比級数的に少なくとも5濃度区を設ける。 ② 試験濃度及び濃度公比は、予備試験の結果から定める。公比は3.2を超えないことが望ましい。 ③ 濃度範囲には、供試藻類の生長が75%以上阻害される濃度と全く阻害されない濃度を少なくともそれぞれ1濃度ずつ、藻類の生長が一部阻害される濃度が少なくとも2濃度含まれることが望ましい。	初期生物量は0.5mg/Lを超えないものとし、試験培地の初期細胞濃度は、 $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ cells/mlが適当である。	-	各試験濃度区は3連以上とし、対照区(助剤を使用した場合は、助剤対照区)については試験濃度区の2倍の連数が望ましい。	設定温度は21~24°Cとし、暴露期間中の変動範囲は±2°C以内とする。	連続的に均一照射することとし、液面付近で波長400~700nmの測定範囲で60~120 μE/m <sup>2</sup> /s(4440~8880lux)程度の照度が望ましい。
	③	国内・海外(OECD)	止水式	同上		・試験濃度及び濃度公比は、予備試験の結果から定める。公比は3.2を超えないことが望ましい。 ・濃度範囲には、供試藻類の生長が75%以上阻害される濃度と全く阻害されない濃度を少なくともそれぞれ1濃度ずつ、藻類の生長が一部阻害される濃度が少なくとも2濃度含まれることが望ましい。	$5 \times 10^3 - 10^4$ cells/mL	-	対照区(助剤対照区)少なくとも3連とするが、理想的には濃度区の2倍(6連)であること、濃度区3連	21-24°C±2°Cで維持	連続照明、一定の蛍光性を有する照明。coolwhiteかdaylightタイプ。 種類により強度は異なる。±15%を維持すること。 ・緑藻類の推奨種: 60-120 μE・m <sup>2</sup> ・s <sup>-1</sup> (coolwhiteで4440-8880 luxに相当)
	④	海外(米国)	止水式	濾過、脱イオン水、または蒸留水に相当量の成分を加える。試験目的に応じて、天然水を用いることができる。	試験生物に影響を与えない、最小限の量に抑える。 有機溶剤の濃度は0.5mL/L以下	24±2°C	最初に植種する細胞密度。 <i>Selenastrum capricornutum</i> 及びその他の緑藻類: $1-2 \times 10^4$ cells/mL <i>Navicula pelliculosa</i> : $1-2 \times 10^4$ cells/mL <i>Microcystis aeruginosa</i> : $5 \times 10^4$ cells/mL <i>Anabaena flos-aquae</i> : $1-2 \times 10^4$ cells/mL Saltwater Species: $1-2 \times 10^4$ cells/mL	-		24±2°C	白色蛍光灯による連続照明。 淡水珪藻及び緑藻の推奨種: $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (4300lm/m <sup>2</sup> ) 淡水藍藻の推奨種: $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (2150lm/m <sup>2</sup> )
イカダモ属( <i>Desmodesmus subspicatus</i> 、旧名 <i>Scenedesmus subspicatus</i> ) (緑藻)	⑤	国内	①と同じ	①と同じ	①と同じ	①と同じ	2~5×10 <sup>3</sup> cells/mL	-	①と同じ	①と同じ	①と同じ
	⑥	国内	②と同じ	②と同じ	②と同じ	②と同じ	初期生物量は0.5mg/Lを超えない。細胞数に関する具体的な記載なし	-	②と同じ	②と同じ	②と同じ
	⑦	国内・海外(OECD)	③と同じ	③と同じ	③と同じ	③と同じ	初期生物量は0.5mg/Lを超えない。 $2 \sim 5 \times 10^3$ cells/mL	-	③と同じ	③と同じ	③と同じ
	⑧	海外(米国)	④と同じ	④と同じ	④と同じ	④と同じ	④と同じ	-	④と同じ	④と同じ	④と同じ

\*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

生物種	番号	国内/海外	試験対象毒性等		根拠法制度・規格等	制度等での位置付け	試験期間	測定、結果の算出・評価等 <sup>*1</sup>		
			毒性試験	成長段階				観測または測定	結果の算出	試験の有効性
フナガタケイソウ属 ( <i>Navicula pelliculosa</i> ) (珪藻)	⑨	国内・海外 (OEC D)	Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test 藻類生長阻害試験	指数増殖期	OECD TG201		72時間	③と同じ	③と同じ	③と同じ
アナベナ属 ( <i>Anabaena flos-aquae</i> ) (藍藻)	⑩	国内・海外 (OEC D)	Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test 藻類生長阻害試験	指数増殖期	OECD TG201		72時間	③と同じ	③と同じ	③と同じ
シネコックス属 ( <i>Synechococcus leopoliensis</i> ) (藍藻)	⑪	国内・海外 (OEC D)	Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test 藻類生長阻害試験	指数増殖期	OECD TG201		72時間	③と同じ	③と同じ	③と同じ
クロレラ属 ( <i>Chlorella vulgaris</i> ) (緑藻)	⑫	海外 (米国)	微細藻類を用いた96時間の止水式毒性試験を行うための標準ガイド		ASTM 1218-97		96時間	④と同じ	④と同じ	④と同じ
ミクロキスチス属 ( <i>Microcystis aeruginosa</i> ) (藍藻)	⑬									
アナベナ属 ( <i>Anabaena flos-aquae</i> ) (藍藻)	⑭									
フナガタケイソウ属 ( <i>Navicula pelliculosa</i> ) (珪藻)	⑮									

\*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

生物種	番号	国内/ 海外	その他試験実施に係る技術的条件等*1									
			試験方式	試験媒体	助剤の使用	試験濃度	生物数/密度	給餌	連数	試験温度	照明	
フナガタケイソウ属 ( <i>Navicula pelliculosa</i> ) (珪藻)	⑨	国内・海外 (OEC D)	③と同じ	③と同じ	③と同じ	③と同じ	③と同じ	初期生物量は0.5mg/Lを超えない。 10 <sup>4</sup> cells/mL	-	③と同じ	③と同じ	連続照明、一定の蛍光性を有する照明。coolwhiteかdaylightタイプ。種類により強度は異なる。±15%を維持すること。
アナベナ属 ( <i>Anabaena flos-aquae</i> ) (藍藻)	⑩	国内・海外 (OEC D)	③と同じ	③と同じ	③と同じ	③と同じ	③と同じ	初期生物量は0.5mg/Lを超えない。 10 <sup>4</sup> cells/mL	-	③と同じ	③と同じ	光強度が高い場合に阻害を受ける種類: 平均40-60 μE・m <sup>2</sup> ・s <sup>-1</sup>
シネコックス属 ( <i>Synechococcus leopoliensis</i> ) (藍藻)	⑪	国内・海外 (OEC D)	③と同じ	③と同じ	③と同じ	③と同じ	③と同じ	初期生物量は0.5mg/Lを超えない。 5 × 10 <sup>4</sup> ~ 10 <sup>5</sup> cells/mL	-	③と同じ	③と同じ	連続照明、一定の蛍光性を有する照明。coolwhiteかdaylightタイプ。種類により強度は異なる。±15%を維持すること。
クロレラ属 ( <i>Chlorella vulgaris</i> ) (緑藻)	⑫	海外 (米国)	④と同じ	④と同じ	④と同じ	④と同じ	④と同じ	④と同じ	-	④と同じ	④と同じ	④と同じ
ミクロキスチス属 ( <i>Microcystis aeruginosa</i> ) (藍藻)	⑬											
アナベナ属 ( <i>Anabaena flos-aquae</i> ) (藍藻)	⑭											
フナガタケイソウ属 ( <i>Navicula pelliculosa</i> ) (珪藻)	⑮											

\*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。



2. 無脊椎動物に係る主な急性毒性試験の概要

生物種	番号	国内/海外	試験対象毒性等		根拠法制度・規格等	制度等での位置付け	試験期間	測定、結果の算出・評価等 <sup>*1</sup>		
			毒性試験	成長段階				観測または測定	結果の算出	試験の有効性
オオミジンコ ( <i>Daphnia magna</i> )	①	国内	ミジンコ類に対する急性遊泳阻害試験	ふ化後24時間未満	化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律(化審法)	新規化学物質の審査における推奨種(必須)	48時間	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。 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。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。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。	暴露期間48時間における遊泳阻害に対する半数影響濃度( EC50 )	・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。
	②	国内	ミジンコ類急性遊泳阻害試験	生後24時間未満	農薬取締法	水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準の設定における対象生物(必須)	48時間	(1) 供試生物の一般状態の観察 暴露開始24時間後及び48時間後における遊泳阻害の有無について観察し記録する。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。 (2) 被験物質濃度の測定 ① 原体を被験物質として用いた場合には、各試験濃度区における被験物質の濃度を少なくとも暴露開始時、暴露終了時、換水前及び換水後に測定する。 ② 被験物質濃度は、暴露期間中、設定濃度の80%以上であることが望ましい。 (3) 環境条件の測定 ① 試験に先立って希釈水の品質を確認する。 ② 各試験区における試験液の水温、溶存酸素濃度及びpHを少なくとも暴露開始時、暴露終了時、換水前及び換水後に測定する。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。	半数遊泳阻害濃度( EC50 )	(1) 暴露期間中において対照区の遊泳阻害率が10%を超えてはならない。 (2) 暴露期間中において10%を超える対照区のミジンコが脱色、水面に浮いているなどの異常な症状、行動を示してはならない。 (3) 溶存酸素濃度は暴露終了時において、3mg/L以上でなければならない。
	③	国内・海外(OECD)	Daphnia sp., Acute Immobilisation Test	ふ化後24時間未満	経済協力開発機構(Organisation for Economic Co-operation and Development: OECD)テストガイドライン201(2011)		48時間	・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。 ・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。 ・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。 ・pH範囲は6-9とし、これから逸脱する場合は、pHを調整する試験を実施することが望ましい。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。	遊泳阻害に対する半数影響濃度( EC50 )	・対照区において、ミジンコが10%を超えて遊泳阻害されてはならないこと(10パーセント以上の個体が遊泳阻害あるいは疾病あるいはストレス(例えば変色、水の表面でトラップするよう異常な挙動)を示す場合)。 ・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。
	④	海外(米国)	DAPHNIA PULEX AND D. MAGNA ACUTE TOXICITY TESTS(ミジンコ及びオオミジンコ急性毒性試験)	24時間齢未満	米国 水質浄法(Clean Water Act: CWA)402条NPDES	事業場排水等排出認可	24,48,96時間(利用可能な方式)	【採水、試験容器】 ○サンプリング及び保持容器 排水: 採集時期の36時間内で最初に採取されるグラブ又は混合サンプル 排出先水域水: 同上 ○サンプル容量 1L ○試験容器の大きさ 30mL(推奨される最小サイズ) ○試験容量 15mL(推奨される最低容量) 【生物観察等】 ○不安定な水泳、反応の損失、変色、過度の粘液産生、呼吸亢進、不透明な眼球、背曲がり、出血、脱皮および共食いのような、外観および行動を毎日記録 ○試験開始後早い時間に死亡を確認すること、また、死亡個体は速やかに除去すること 【試験環境の測定】 ○止水式 ・最低最高濃度区、希釈水で試験開始時と試験原液調製時、試験終了時にpH、塩分、導電率、残留塩素の合計を測定する。 ・DO、pH、水温はすべての濃度区で毎日測定 ・対照区、最高濃度区では試験開始時と換水時に全アルカリと全硬度の測定が推奨 ○流水式 ・最高濃度区でpH、塩分、導電率、全アルカリ、全硬度、残留塩素合計を測定 ・DOと水温は対照区と全ての濃度区で毎日測定	排水: 死亡 排出先水域水: 死亡	対照区の生残率が90%を超えること

\*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

生物種	番号	国内/ 海外	その他試験実施に係る技術的条件等*1								
			試験方式	試験媒体	助剤の使用	試験濃度	生物数/密度	給餌	連数	試験温度	照明
オオミジンコ ( <i>Daphnia magna</i> )	①	国内	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。	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のいずれを用いてもよい。	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。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。	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。	各試験濃度区及び対照区で少なくとも20頭を使用する。1頭当たり少なくとも2mlの試験溶液を用いる。	なし	各5頭ずつ4連に分けることが望ましい。	8～22℃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。	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。
	②	国内	止水式、半止水式又は流水式により試験を行う。	① 試験に用いる水は、有害物質等試験の妨げになるものを含まず、飼育に用いた水と同じ供給源のもので、ミジンコが良好に生存し、繁殖できる水質であることが確認されているものを用いる。 ② 脱塩素水道水、天然水又は人工調製水を用いる。 ③ 使用前には十分に暴気するとともに、温度調節を行う。 ④ Elendt M4、M7培地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。	難水溶性原体の場合、以下のいずれかの方法により試験培地を調整する。 ア 被験物質を有機溶剤等の助剤に溶かした試験原液を用いて試験培地を調整する。 この場合、助剤は、試験生物に対して毒性が弱く使用濃度で供試生物に対して有害性が認められず、かつ、被験物質の性質を変えないものを用いる。 助剤の試験液中濃度は、原則として全試験濃度区で一定とし、100mg/L(又は0.1ml/L)を超えないことが望ましい。	ア等比級数的に少なくとも5濃度区を設ける。公比は2.2を超えないことが望ましい。イ試験濃度及び濃度公比は、予備試験の結果から定める。 ウ濃度範囲には、供試生物のすべてを遊泳阻害する濃度と全く遊泳阻害しない濃度が少なくともそれぞれ1濃度、一部を遊泳阻害する濃度が少なくとも2濃度含まれることが望ましい。	試験区ごとに少なくとも20頭の供試生物を使用する。ミジンコ1頭当たり5ml以上とする。	なし	各5頭ずつ4連に分けることが望ましい。	設定温度は20℃とし、試験期間中の変動範囲は±1℃以内とする。	16時間明期が望ましい。
	③	国内・海外(OECD)	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。	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のいずれを用いてもよい。	・可能な限り、溶剤、乳化剤あるいは分散剤は利用しない。 ・助剤の使用はガイダンス文書23に従う。	・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。 ・試験物質濃度は溶解度を超えるべきではない。	各試験濃度区及び対照区で少なくとも20頭を使用する。1頭当たり少なくとも2mlの試験溶液を用いる。	なし	各5頭ずつ4連に分けることが望ましい。	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。	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。
	④	海外(米国)	止水式、半止水式、流水式(利用可能な方式)(換水する場合は)48時間後換水	事業場排水又は排出先公共用水		排水:5濃度区+対照区 排出先水域水:100%河川水、対照区 希釈系列 排水:希釈率0.5以上 排出先水域水:なし、あるいは希釈率0.5以上	供試生物数/濃度区:20頭/濃度区(排水及び排出先水域水) 供試生物数/試験容器:5頭/容器(排水及び排出先水域水)	試験前の飼育期間中にはマス用餌料(yeast-cerophyl-trout-chow:YTC)と緑藻(Selenastrum)を給餌すること、新たに産出した仔虫は、試験前に最低2時間餌料をとるようにすべきである。換水の前、2時間はYTCと緑藻をそれぞれ0.1mLづつ加えること。	連数/濃度区:4連/濃度区(排水及び排出先水域水)	20±1℃、25℃±1℃(推奨) 試験温度の変動は試験期間中3℃を上回らないこと(すなわち、最大温度-最低温度の差が3℃を超えないこと)	光質 研究所で通常用いている光質 光強度 10-20 μE/m2/s (50-100 ft-c)通常用いているレベル 明暗周期 16時間 明:8時間暗

\*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

生物種	番号	国内/ 海外	試験対象毒性等		根拠法制度・規格等	制度等での位置付け	試験期間	測定、結果の算出・評価等 <sup>*1</sup>		
			毒性試験	成長段階				観測または測定	結果の算出	試験の有効性
オオミジンコ(Daphnia magna)	⑤	海外(米 国)	Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. (魚、大型無脊椎動 物、両生類を用いた試 験物質における急性 毒性試験を行うための 標準的なガイド)		ASTME729		48時間	試験生物: 実験開始後24時間おきに観察。 毒性に時間依存が見られる場合は実験開始後3,6,12,24時間で観察、その後一日に2回実 験終了まで観察するのが望ましい。 ミジンコやアミの幼体のような小さい有機体をのぞいて、試験前に代表的なグループの有 機体と、試験後のコントロールで生き残ったものの重量をはかる。 ミジンコ、アミは乾燥重量(60°Cで72~96時間乾燥)、それ以外の有機体は余分な水分を拭 き取った湿重量。  水質: ・止水式 硬度、アルカリ度、EC、pH (Ca、Mg、Na、K、Cl、硫酸測定できれば望ましい)(淡水) 塩分、pH (海水)。 アンモニア、粒子状物質、全溶解ガス、TOC(淡水の場合はCOD)(淡水海水、測定できれ ば望ましい)。 DO(試験開始前と終了後。48時間おきにコントロール、最高、中間、最低濃度区)。 pH(試験開始前と終了後。コントロール、最高、中間、最低濃度区)。  ・流水式 水質が一定の場合、30日置きに一回、もしくは試験前に測定。そうでない場合は毎日測 定。 硬度、アルカリ度、EC、pH (Ca、Mg、Na、K、Cl、硫酸測定できれば望ましい)(淡水) 塩分、pH (海水)。 アンモニア、粒子状物質、全溶解ガス、TOC(淡水の場合はCOD)(淡水海水、測定できれ ば望ましい)。 DO(試験開始前と終了後。48時間おきにコントロール、最高、中間、最低濃度区)。 pH(試験開始前と終了後。コントロール、最高、中間、最低濃度区)。	LC50,EC50	LC50,EC50を計算するにおいて、ばく 露された生物に対し処理区は63%より も影響を及ぼしていること、及び対照 区は37%以上影響を及ぼさないこと。
	⑥	海外(カ ナダ)	Biological Test Method: Acute Lethality Test Using Daphnia spp(ミジンコ 遊泳阻害試験)	24時間齢未満	・製紙パルプ排水規 制(PPER) ・金属鉱業排水規 制(MMER)	事業場排水	48時間	○希釈水のDO飽和度は90-100%、試験中は通気しない。 ○pH6.0-8.5 ○水温、DO、pHは試験開始時と終了時にすべての濃度区で測定、伝導率は少なくとも開 始時に測定、硬度も評価に用いられる ○150又は250mL容器、密度15mL/1頭を超えない ○死亡及び異常行動(遊泳影響、致死、回旋運動、水面遊泳等)を最低、試験開始時と終 了時に観察	半数致死濃度(LC50)	対照区での死亡と異常行動が10%を 超える場合は無効
	⑦	海外(ドイ ツ)	Determining the tolerance of Daphnia to the toxicity of waste water by way of a dilution series (L30)(ミジンコ遊泳阻 害試験)	2-26時間齢 (24時間以内に 2回選別)	ドイツの法令(Waste Water Ordinance)	事業場排水	24時間	○pH7.0±0.2 ○試験溶液20mL/容器50mL	遊泳阻害に対する半 数影響濃度(EC50) (緩やかに攪拌し遊泳 できない個体を計数)	対照区で遊泳阻害が1頭より多かつた 場合は試験は無効

\*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

生物種	番号	国内/ 海外	その他試験実施に係る技術的条件等*1								
			試験方式	試験媒体	助剤の使用	試験濃度	生物数/密度	給餌	連数	試験温度	照明
オオミジンコ(Daphnia magna)	⑤	海外(米 国)	止水式、半止水式、流水式。(半止水式、流水式が一般的に望ましい)	天然水、人工水 ・淡水:硬度範囲は5mg/L以下、もしくは平均の10%以下の高い方いずれか。	試験生物に影響を与えない、最小限の量に抑える。 有機溶剤の濃度は0.5mL/L以下	等比級数的(希釈係数0.6)に5濃度区以上と対照区。 ・止水式、半止水式:試験開始直前に少なくともコントロール、最高、中間、最低濃度区を測定。 ・流水式:少なくとも試験開始前に全ての区を測定。試験期間中にコントロール以外の区(特にLC50、EC50、IC50も近い濃度区)を少なくとも一回は追加測定。	・止水式及び半止水式:0.8g/L以下(表水温17°C以下の種)、0.5g/L以下(高水温の種) ・流水式:1g/L/day以下で常時10g/L以下(水温17°C以下の種)、0.5g/L/day以下または5g/L以下(高水温の種) ・藻類を入れない場合:1個/L/h以下(二枚貝軟体動物)。	急性試験中、もしくは試験前は可能な限り餌を与えない。共食いが起きる種は最低限の給餌(隔離などの処置ができない場合)。		Daphnids, Daphnia magna, D. pulex, D. pulicaria, 20°C Ceriodaphnia dubia 25°C Amphipods, Gammarus lacustris, G. fasciatus, 17°C G. pseudolimnaeus 17°C Crayfish, Orconectes sp., Cambarus sp., 17, 22°C Procambarus sp., 17, 22°C Pacifastacus leniusculus 17°C Stoneflies, Pteronarcys sp. 12°C Mayflies, Baetis sp., Ephemerella sp. 17°C Hexagenia limbata, H. bilineata 22°C Midges, Chironomus sp. 22°C Snails, Physa integra, P. heterostropha, Amnicola limosa, Aplexa hypnorum 22°C Planaria, Dugesia tigrina 22°C	16時間の照明、8時間の暗期が望ましい。
	⑥	海外(カナダ)	止水式	事業場排水		対照区と100%事業場排水又は排出先水域水	10頭/濃度区	無給餌		20±2°C	400-800lux 16±1時間明、8±1時間暗
	⑦	海外(ドイツ)	止水式	事業場排水		希釈系列は排水と希釈水の容量により調製される。例えば希釈水の容量が0.1,2,3,5の場合は、希釈率(G)は1,2,3,4,6となる。 下記表は希釈系列と結果を併記した例である。	5頭/容器(ビーカー)		2容器	20±2°C	

Table 2.

Parts by volume Waste water	Dilution water	Dilution factor, G	Number of Daphnia incapable of swim- ming after 24 h
1	0	1	10
1	1	2	10
1	2	3	9
1	3	4	8
1	5	6	6
1	7	8	5
1	11	12	2
1	15	16	0
1	23	24	0
1	31	32	0

In this example, the G<sub>D</sub> value is 16.

\*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

生物種	番号	国内/海外	試験対象毒性等		根拠法制度・規格等	制度等での位置付け	試験期間	測定、結果の算出・評価等 <sup>*1</sup>		
			毒性試験	成長段階				観測または測定	結果の算出	試験の有効性
ミジンコ( <i>Daphnia pulex</i> )、ニセネコゼミジンコ( <i>Ceriodaphnia dubia</i> )など、他のミジンコ( <i>Daphnia</i> )属	⑧	国内	ミジンコ類に対する急性遊泳阻害試験	ふ化後24時間未満	化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律(化審法) ※化審法試験はDaphnia属に限定	新規化学物質の審査で使用可能な種類(任意)	48時間	①と同じ	①と同じ	①と同じ
( <i>Daphnia pulex</i> )	⑨	海外(米国)	○ CERIODAPHNIA DUBIA ACUTE TOXICITY TESTS(ニセネコゼミジンコ急性毒性試験) ○ DAPHNIA PULEX AND D. MAGNA ACUTE TOXICITY TESTS(ミジンコ及びオオミジンコ急性毒性試験)	24時間齢未満	米国 水質浄法(Clean Water Act: CWA)402条NPDES	事業場排水等排出認可	24,48,96時間(利用可能な方式)	【採水、試験容器】 ○ サンプルング及び保持容器 排水:採集時期の36時間内で最初に採取されるグラブ又は混合サンプル 排出先水域水:同上 ○ サンプル容量 1L ○ 試験容器の大きさ 30mL(推奨される最小サイズ) ○ 試験容量 15mL(推奨される最低容量) 【生物観察等】 ○ 不安定な水泳、反応の損失、変色、過度の粘液産生、呼吸亢進、不透明な眼球、背曲がり、出血、脱皮および共食のような、外観および行動を毎日記録 ○ 試験開始後早い時間に死亡を確認すること、また、死亡個体は速やかに除去すること 【試験環境の測定】 ○ 止水式 ・最低最高濃度区、希釈水で試験開始時と試験原液調製時、試験終了時にpH、塩分、導電率、残留塩素の合計を測定する。 ・DO、pH、水温はすべての濃度区で毎日測定 ・対照区、最高濃度区では試験開始時と換水時に全アルカリと全硬度の測定が推奨 ○ 流水式 ・最高濃度区でpH、塩分、導電率、全アルカリ、全硬度、残留塩素合計を測定 ・DOと水温は対照区と全ての濃度区で毎日測定	排水:死亡 排出先水域水:死亡	対照区の生残率が90%を超えること
( <i>Daphnia pulex</i> )	⑩	海外(カナダ)	Biological Test Method: Acute Lethality Test Using <i>Daphnia</i> spp(ミジンコ遊泳阻害試験)	24時間齢未満	・製紙パルプ排水規制(PPER) ・金属鉱業排水規制(MMER)	事業場排水	48時間	○ 希釈水のDO飽和度は90-100%、試験中は通気しない。 ○ pH6.0-8.5 ○ 水温、DO、pHは試験開始時と終了時にすべての濃度区で測定、伝導率は少なくとも開始時に測定、硬度も評価に用いられる ○ 150又は250mL容器、密度15mL/l頭を超えない ○ 死亡及び異常行動(遊泳影響、致死、回旋運動、水面遊泳等)を最低、試験開始時と終了時に観察	半数致死濃度(LC50)	対照区での死亡と異常行動が10%を超える場合は無効
	⑪	海外(米国)	魚、大型無脊椎動物、両生類を用いた試験物質における急性毒性試験を行うための標準的なガイド		ASTME729		48時間	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ
ミナミヌマエビ( <i>Neocaridina denticulata</i> )又はヌカエビ( <i>Paratya compressa improvisa</i> )	⑫	国内	ヌマエビ・ヌカエビ急性毒性試験	成体と形態的に異なる段階のもので未抱卵の個体を用いる。	農薬取締法	水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準の設定における対象生物(任意)	96時間	(1) 供試生物の一般状態の観察 暴露開始後、少なくとも24、48、72及び96時間後に供試生物の一般状態を観察し、記録する。死亡個体は速やかに試験液から取り除く。また、観察時に脱皮が確認された場合は記録するとともに殻を試験液から取り除く。 (2) 被験物質濃度の測定 ① 各試験濃度区における被験物質の濃度は少なくとも暴露開始時、48時間後、暴露終了時、換水前及び換水後に測定する。 ② 被験物質濃度は、暴露期間中、設定濃度の80%以上であることが望ましい。 (3) 環境条件の測定 ① 試験に先立って、希釈水の品質を確認する。 ② 各試験区における試験液の水温、溶存酸素濃度及びpHを少なくとも暴露開始時、暴露終了時、換水前及び換水後に測定する。	半数致死濃度(LC50)	(1) 暴露終了時において対照区の死亡率が10%を超えてはならない。 (2) 溶存酸素濃度は暴露期間中、飽和濃度の60%以上でなければならない。
淡水産の端脚目を用いる。ヨコエビ属( <i>Gammarus fasciatus</i> 、 <i>G. pseudolimnaeus</i> 、 <i>G. lacustris</i> )及びヨコエビ科( <i>Hyalella azteca</i> )	⑬	国内	ヨコエビ急性毒性試験	成体と形態的に異なる段階のもので未抱卵の個体を用いる。	農薬取締法	水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準の設定における対象生物(任意)	96時間	(1) 供試生物の一般状態の観察 暴露開始後、少なくとも24、48、72及び96時間後に供試生物の一般状態を観察し、記録する。死亡個体は速やかに試験液から取り除く。また、観察時に脱皮が確認された場合は記録するとともに殻を試験液から取り除く。 (2) 被験物質濃度の測定 ① 各試験濃度区における被験物質の濃度は少なくとも暴露開始時、48時間後、暴露終了時、換水前及び換水後に測定する。 ② 被験物質濃度は、暴露期間中、設定濃度の80%以上であることが望ましい。 (3) 環境条件の測定 ① 試験に先立って、希釈水の品質を確認する。 ② 各試験区における試験液の水温、溶存酸素濃度及びpHを少なくとも暴露開始時、暴露終了時、換水前及び換水後に測定する。	半数致死濃度(LC50)	(1) 暴露終了時において対照区の死亡率が10%を超えてはならない。 (2) 溶存酸素濃度は暴露期間中、飽和濃度の60%以上でなければならない。

\*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

生物種	番号	国内/ 海外	その他試験実施に係る技術的条件等*1								
			試験方式	試験媒体	助剤の使用	試験濃度	生物数/密度	給餌	連数	試験温度	照明
ミジンコ ( <i>Daphnia pulex</i> )、ニセネコゼミジンコ ( <i>Daphnia</i> ) 属	⑧	国内	①と同じ	①と同じ	①と同じ	①と同じ	①と同じ	①と同じ	①と同じ	①と同じ	①と同じ
( <i>Daphnia pulex</i> )	④⑨	海外(米国)	止水式、半止水式、流水式(利用可能な方式)(換水する場合は)48時間後換水	事業場排水又は排出先公共用水		排水:5濃度区+対照区 排出先水域水:100%河川水、対照区 希釈系列 排水:希釈率0.5以上 排出先水域水:なし、あるいは希釈率0.5以上	供試生物数/濃度区:20頭/濃度区(排水及び排出先水域水) 供試生物数/試験容器:5頭/容器(排水及び排出先水域水)	試験前の飼育期間中にはマス用餌料(yeast-cerophyl-trout-chow:YTC)と緑藻( <i>Selenastrum</i> )を給餌すること、新たに産出した仔虫は、試験前に最低2時間餌料をとるようにすべきである。換水の前、2時間はYTCと緑藻をそれぞれ0.1mLづつ加えること。	連数/濃度区:4連/濃度区(排水及び排出先水域水)	20±1°C、25°C±1°C(推奨) 試験温度の変動は試験期間中3°Cを上回らないこと(すなわち、最大温度-最低温度の差が3°Cを超えないこと)	光質 研究所で通常用いている光質 光強度 10-20 μE/m <sup>2</sup> /s (50-100 ft-c)通常用いているレベル 明暗周期 16時間明:8時間暗
( <i>Daphnia pulex</i> )	⑥	海外(カナダ)	止水式	事業場排水		対照区と100%事業場排水又は排出先水域水	10頭/濃度区	無給餌		20±2°C	400-800lux 16±1時間明、8±1時間暗
	⑩	海外(米国)	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ
ミナミヌマエビ ( <i>Neocaridina denticulata</i> ) 又はヌカエビ ( <i>Paratya compressa improvisa</i> )	⑪	国内	止水式、半止水式又は流水式により試験を行う。	① 試験に用いる水は、有害物質等試験の妨げになるものを含まず、飼育に用いた水と同じ供給源のもので、供試生物が良好に生存又は成育ができる水質であることが確認されているものを用いる。 ② 脱塩素水道水、天然水又は人工調製水を用いる。	(2) 難水溶性物質の場合には、被験物質を機械的な手法により分散して試験液又は試験原液を調製するか、有機溶媒、乳化剤、分散剤等の助剤を用いて試験原液を調製する。助剤は試験生物に対して毒性が弱く、使用濃度で供試生物に対して有害性が認められず、かつ、被験物質の性質を変えないものを用いる。 (3) 助剤の試験液中濃度は、原則として全試験濃度区で一定とし、100mg/L(又は0.1ml/L)を超えないことが望ましい。	ア等比較数的に少なくとも5濃度区を設ける。 イ試験濃度及び濃度公比は、予備試験の結果から定める。 ウ濃度範囲には、供試生物のすべてが死亡する濃度と全く死亡しない濃度が少なくともそれぞれ1濃度、一部が死亡する濃度については、少なくとも2濃度含まれることが望ましい。	試験区ごとに、少なくとも10匹以上使用する。	なし	20~24°Cの範囲で22°Cを標準とする。試験期間中の変動範囲は設定温度の±1°C以内とすることが望ましい。	12~16時間明期が望ましい。	
淡水産の端脚目を用いる。 ヨコエビ属 ( <i>Gammarus fasciatus</i> , <i>G. pseudolimnaeus</i> , <i>G. lacustris</i> ) 及び ヨコエビ科 ( <i>Hyalella azteca</i> )	⑫	国内	止水式、半止水式又は流水式により試験を行う。	① 試験に用いる水は、有害物質等試験の妨げになるものを含まず、飼育に用いた水と同じ供給源のもので、供試生物が良好に生存又は成育ができる水質であることが確認されているものを用いる。 ② 脱塩素水道水、天然水又は人工調製水を用いる。	(2) 難水溶性物質の場合には、被験物質を機械的な手法により分散して試験液又は試験原液を調製するか、有機溶媒、乳化剤、分散剤等の助剤を用いて試験原液を調製する。助剤は試験生物に対して毒性が弱く、使用濃度で供試生物に対して有害性が認められず、かつ、被験物質の性質を変えないものを用いる。 (3) 助剤の試験液中濃度は、原則として全試験濃度区で一定とし、100mg/L(又は0.1ml/L)を超えないことが望ましい。	ア等比較数的に少なくとも5濃度区を設ける。 イ試験濃度及び濃度公比は、予備試験の結果から定める。 ウ濃度範囲には、供試生物のすべてが死亡する濃度と全く死亡しない濃度が少なくともそれぞれ1濃度、一部が死亡する濃度については、少なくとも2濃度含まれることが望ましい。	試験区ごとに、少なくとも20匹以上使用する。	なし	18~23°Cを標準とするが、供試生物種に応じてその生育適温とすることができる。試験期間中の変動範囲は設定温度の±1°C以内とすることが望ましい。	12~16時間明期が望ましい。	

\*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

生物種	番号	国内/ 海外	試験対象毒性等		根拠法制度・規格等	制度等での位置付け	試験期間	測定、結果の算出・評価等 <sup>*1</sup>		
			毒性試験	成長段階				観測または測定	結果の算出	試験の有効性
端脚類(ヨコエビ属 <i>Gammarus lacustris</i> , <i>G. fasciatus</i> , <i>G. pseudolimnaeus</i> ) ザリガニ類(アメリカザリガニ科 <i>Orconectes</i> sp., <i>Cambarus</i> sp., アメリカザリガニ属 <i>Procambarus</i> sp., ウチダザリガニ <i>Pacifastacus leniusculus</i> )	⑭	海外(米 国)	魚、大型無脊椎動物、両生類を用いた試験物質における急性毒性試験を行うための標準的なガイド		ASTME729		96時間以上	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ
ドブスリカ( <i>Chironomus riparius</i> )、セスジスリカ( <i>C.yoshimatsui</i> )又は <i>C.dilutus</i> のいずれか	⑮	国内	ユスリカ幼虫急性遊泳阻害試験	1 齢幼虫	農薬取締法	水産動植物登録保留基準策定での対象生物(一部必須※) ※ 特定の農薬(新規に登録申請する殺虫剤及び既に登録されているニコチン性アセチルコリン受容体又はGABA受容体に作用する殺虫剤(ネライストキシン系殺虫剤を除く。))については、本試験が必要。	48時間	(1) 供試生物の一般状態の観察 暴露開始後24時間後及び48時間後における遊泳阻害の有無について観察し記録する。 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。 (2) 被験物質濃度の測定 ① 各試験濃度区における被験物質の濃度を少なくとも暴露開始時、暴露終了時又は換水前に測定する。 ② 被験物質濃度は、暴露期間中、設定濃度の80%以上であることが望ましい。 (3) 環境条件の測定 ① 試験に先立って希釈水の水质を確認する。 ② 各試験区における試験液の水温、溶存酸素濃度及びpHを少なくとも暴露開始時、暴露終了時、換水前及び換水後に測定する。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。	遊泳阻害に対する半数影響濃度(EC50)	(1) 暴露終了時において対照区の遊泳阻害率が15%を超えてはならない。 (2) 溶存酸素濃度は暴露期間中、3mg/L以上でなければならない。
ユスリカ類(ユスリカ属 <i>Chironomus</i> sp.)	⑯	海外(米 国)	魚、大型無脊椎動物、両生類を用いた試験物質における急性毒性試験を行うための標準的なガイド		ASTME729		96時間以上	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ
カワゲラ類(カワゲラ目 <i>Pteronarcys</i> sp.)	⑰									
カゲロウ類(コカゲロウ属 <i>Baetis</i> sp., マダラカゲロウ属 <i>Ephemerella</i> sp., モンカゲロウ科 <i>Hexagenia limbata</i> , <i>H. bilineata</i> )	⑱									
巻貝類(サカマキガイ属 <i>Physa integra</i> , <i>P. heterostropha</i> , ヤマトツボ属 <i>Amnicola limosa</i> , ホタルヒダリマキガイ <i>Aplexa hypnorum</i> )	⑲									
ウズムシ類(扁形動物)(アメリカナミウズムシ <i>Dugesia tigrina</i> )	⑳									

\*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

生物種	番号	国内/ 海外	その他試験実施に係る技術的条件等*1								
			試験方式	試験媒体	助剤の使用	試験濃度	生物数/密度	給餌	連数	試験温度	照明
端脚類(ヨコエビ属 <i>Gammarus lacustris</i> , <i>G. fasciatus</i> , <i>G. pseudolimnaeus</i> ) ザリガニ類(アメリカザリガニ科 <i>Orconectes</i> sp., <i>Cambarus</i> sp., アメリカザリガニ属 <i>Procambarus</i> sp., ウチダザリガニ <i>Pacifastacus leniusculus</i> )	⑬	海外(米 国)	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ
ドブユスリカ ( <i>Chironomus riparius</i> )、セスジユスリカ ( <i>C.yoshimatsui</i> ) 又は <i>C.dilutus</i> のいずれか	⑭	国内	止水式、半止水式 又は流水式により 試験を行う。	① 試験に用いる水は、有害物質 等試験の妨げになるものを含ま ず、飼育に用いた水と同じ供給源 のもので、ユスリカが良好に生存 できる水質であることが確認され ているものを用いる。 ② 脱塩素水道水、天然水又は人 工調製水を用いる。	助剤の試験液中濃度は、原則とし て全試験濃度区で一定とし、 100mg/L(又は0.1ml/L)を超えな いことが望ましい。	ア 等比級数的に少なくとも5濃度区を設ける。 公比は2.2を超えないことが望ましい。 イ 試験濃度及び濃度公比は、予備試験の結果 から定める。 ウ 濃度範囲には、供試生物の全てを遊泳阻害 する濃度と全く遊泳阻害しない濃度が少なくとも それぞれ1濃度、一部を遊泳阻害する濃度が少 なくとも2濃度含まれることが望ましい。	試験区ごとに少なくとも20個体の 幼虫を使用する。 幼虫1個体当たり2 ml以上とす る。	なし	各5個体ずつ4連 に分けることが望 ましい。	設定温度は <i>C.riparius</i> では18~22 °C、 <i>C.yoshimatsui</i> 及び <i>C.dilutus</i> では23~25 °C とし、試験期間中の変動範囲は±1 °C以 内とする。	16時間明期が望ま しい。
ユスリカ類(ユスリカ属 <i>Chironomus</i> sp.)	⑮	海外(米 国)	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ
カワゲラ類(カワゲラ目 <i>Pteronarcys</i> sp.)	⑯		⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ
カゲロウ類(コカゲロウ属 <i>Baetis</i> sp., マダラカゲロウ属 <i>Ephemerella</i> sp., モンカゲロウ科 <i>Hexagenia</i> <i>limbata</i> , <i>H. bilineata</i> )	⑰		⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ
巻貝類(サカマキガイ属 <i>Physa</i> <i>integra</i> , <i>P. heterostropha</i> , ヤマトツボ 貝属 <i>Amnicola limosa</i> , ホタルヒダリ マキガイ <i>Aplexa hypnorum</i> )	⑱		⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ
ウズムシ類(扁形動物)(アメリカ ナミウズムシ <i>Dugesia tigrina</i> )	⑲		⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ

\*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。



3. 魚類に係る主な急性毒性試験の概要

生物種	番号	国内/海外	試験対象毒性等		根拠法制度・規格等	制度等での位置付け	試験期間	測定、結果の算出・評価等 <sup>*1</sup>		
			毒性試験	成長段階(推奨全長cm)				観測または測定	結果の算出	試験の有効性
ゼブラフィッシュ ( <i>Brachydanio rerio</i> ) ファットヘッドミノー ( <i>Pimephales promelas</i> ) コイ ( <i>Cyprinus carpio</i> ) メダカ ( <i>Oryzias latipes</i> ) グッピー ( <i>Poecilia reticulata</i> ) ブルーギル ( <i>Lepomis macrochirus</i> ) ニジマス ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	①	国内	魚類に対する急性毒性試験	ゼブラフィッシュ 2.0±1.0 ファットヘッドミノー 2.0±1.0 コイ 4.0±1.0 メダカ 2.0±1.0 グッピー 2.0±1.0 ブルーギル 2.0±1.0 ニジマス 15.0±1.0	化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律(化審法)	新規化学物質の審査における推奨種、メダカは必須	96時間	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。 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、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。 pH、溶存酸素濃度、水温は少なくとも毎日1回測定する。	死亡に対する半数致死濃度(LC50)	・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。
	②	国内	魚類急性毒性試験	ゼブラフィッシュ 2.0±1.0 ファットヘッドミノー 2.0±1.0 コイ 3.0±1.0 メダカ 2.3±1.0 グッピー 2.0±1.0 ブルーギル 2.0±1.0 ニジマス 15.0±1.0	農薬取締法	水産動植物登録保留基準策定での対象生物、コイ又はメダカを用いた試験が必須である。	96時間	(1) 供試魚の一般状態の観察 暴露開始後、少なくとも24、48、72及び96時間後に供試魚の一般状態を観察し、記録する。死亡魚は速やかに試験系から取り除く。また、観察された異常は記録する。 (2) 被験物質濃度の測定 ① 原体を被験物質として用いた場合には、各試験濃度区における被験物質の濃度を少なくとも暴露開始時、48時間後、暴露終了時、換水前及び換水後に測定する。 ② 被験物質濃度は、暴露期間中、設定濃度の80%以上であることが望ましい。 (3) 環境条件の測定 ① 試験に先立って希釈水のpHを確認する。 ② 各試験区における試験液の水温、溶存酸素濃度及びpHを少なくとも暴露開始時、暴露終了時、換水前及び換水後に測定する。	死亡に対する半数致死濃度(LC50)	(1) 暴露終了時において対照区の死亡率が10%を超えてはならない。ただし、10尾より少ない数を用いた場合は死亡が1尾を超えてはならない。 (2) 溶存酸素濃度は暴露期間中、飽和濃度の60%以上でなければならない。
	③	国内・海外(OECD)	Fish, Acute Toxicity Test (CD)	ゼブラフィッシュ 2.0±1.0 ファットヘッドミノー 2.0±1.0 コイ 3.0±1.0 メダカ 2.0±1.0 グッピー 2.0±1.0 ブルーギル 2.0±1.0 ニジマス 15.0±1.0	経済協力開発機構 (Organisation for Economic Co-operation and Development: OECD) テストガイドライン201(2011)		96時間	・少なくとも24、48、72および96時間後に観察すること ・鰓運動がない場合、尾部を触れても反応しない場合は死亡とみなす ・死亡個体は除去する ・試験開始後3時間後、6時間後にも観察することが望ましい ・重篤な症状(平衡感覚の損失、異常遊泳、呼吸機能、体色等)も記録すること ・pH、DO、温度は毎日測定すること ・pH調整は行わない	死亡に対する半数致死濃度(LC50)	・各暴露期間の累積死亡率は対数確率紙で算出される。 ・ばく露期間での毒性値、95%CI値を適切な統計処理により求める
ファットヘッドミノー ( <i>Pimephales promelas</i> ) ニジマス ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) カワマス ( <i>Salvelinus fontinalis</i> )	④	海外(米国)	FATHEAD MINNOW, PIMEPHALES PROMELAS, ACUTE TOXICITY TESTS RAINBOW TROUT, ONCORHYNCHUS MYKISS, AND BROOK TROUT, SALVELINUS FONTINALIS, ACUTE TOXICITY TESTS	○ファットヘッドミノー: 1-14日齢; その24時間以下の範囲であること ○ニジマス: 15-30日齢(卵黄吸収後30日) ○カワマス: 30-60日齢	米国 水質浄法 (Clean Water Act: CWA) 402条 NPDES	事業場排水等排出認可	24,48,96時間 (利用可能な方式)	【採水、試験容器】 ○サンプリング及び保持容器 排水: 採集時期の36時間内で最初に採取されるグラブ又は混合サンプル 排出先水域水: 同上 ○ファットヘッドミノー ・サンプル容量2L ・試験容器の大きさ 250mL (推奨される最小サイズ) ・試験容量 200mL (推奨される最低容量) ○ニジマス・カワマス ・サンプル容量20L(排水)、40L(排出先水域水) ・試験容器の大きさ: 5L ・試験容量: 4L (推奨される最低容量) 【生物観察等】 ○不安定な水泳、反応の損失、変色、過度の粘液産生、呼吸亢進、不透明な眼球、背曲がり、出血、脱皮および共食いのような、外観および行動を毎日記録 ○試験開始後早い時間に死亡を確認すること、また、死亡個体は速やかに除去すること 【試験環境の測定】 ○溶存酸素濃度: ファットヘッドミノー4.0mg/L、ニジマスとカワマスは6.0mg/Lを下回らない限り曝気しない、1分間に100気泡以上は超えないようにすること ○止水式 ・最低最高濃度区、希釈水で試験開始時と試験原液調製時、試験終了時にpH、塩分、導電率、残留塩素の合計を測定する。 ・DO、pH、水温はすべての濃度区で毎日測定 ・対照区、最高濃度区では試験開始時と換水時に全アルカリと全硬度の測定が推奨 ○流水式 ・最高濃度区でpH、塩分、導電率、全アルカリ、全硬度、残留塩素合計を測定 ・DOと水温は対照区と全ての濃度区で毎日測定	排水: 死亡 排出先水域水: 死亡	対照区の生残率が90%を超えること

\*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

生物種	番号	国内/海外	その他試験実施に係る技術的条件等								
			試験方式	試験媒体	助剤の使用	試験濃度	生物数/密度	給餌	連数	試験温度(°C)	照明
ゼブラフィッシュ( <i>Brachydanio rerio</i> ) ファットヘッドミノー( <i>Pimephales promelas</i> ) コイ( <i>Cyprinus carpio</i> ) メダカ( <i>Oryzias latipes</i> ) グッピー( <i>Poecilia reticulata</i> ) ブルーギル( <i>Lepomis macrochirus</i> ) ニジマス( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	①	国内	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。	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。全硬度は炭酸カルシウム濃度 10~250mg/Lで、pH6.0 ~8.5の水が望ましい。	・可能な限り、溶剤、乳化剤あるいは分散剤は利用しない。 ・助剤の使用はガイダンス文書23に従う。	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、すべ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。	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。半止水式では最高密度で1.0魚体g/Lが推奨される。流水式ならもっと多く収容できる。	なし	1連	ゼブラフィッシュ 21-25 ファットヘッドミノー 21-25 コイ 20-24 メダカ 21-25 グッピー 21-25 ブルーギル 21-25 ニジマス 13-17 2°Cの範囲内で一定に保つ	一日当たり12~16時間
	②	国内	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。	①試験に用いる水は、有害物質等試験の妨げになるものを含まず、飼育に用いた水と同じ供給源のもので、魚が良好に生存又は成長ができる水質であることが確認されているものを用いる。 ② 脱塩素水道水、天然水又は人工調製水を用いる。	助剤の試験液中濃度は、原則として全試験濃度区で一定とし、100mg/L(又は0.1ml/L)を超えないことが望ましい。	ア等比級数的に少なくとも5濃度区を設ける。イ試験濃度及び濃度公比は、予備試験の結果から定める。公比は2.2を超えないことが望ましい。 ウ濃度範囲には、供試魚のすべてが死亡する濃度と全く死亡しない濃度が少なくともそれぞれ1濃度、一部が死亡する濃度については、少なくとも2濃度含まれることが望ましい	試験区ごとに、少なくとも7尾使用する。半止水式では最高密度で1.0魚体g/Lが推奨される。流水式ならもっと多く収容できる。① 止水式及び半止水式による試験では、供試魚1g当たり1リットル以上の試験液量が必要である。② 流水式試験では、さらに高い収容密度で試験を行うことができる。	なし	1連	ゼブラフィッシュ 21-25 ファットヘッドミノー 21-25 コイ 20-24 メダカ 21-25 グッピー 21-25 ブルーギル 21-25 ニジマス 13-17 変動範囲は±2°C以内とする。	12~16時間明期とする
	③	国内・海外(OECD)	止水式と半止水式試験では最大1.0g魚体/Lが推奨される。流水式ではより多くの生物が可能	清浄な自然水又は調製水、飲料水も利用可能。硬度は10~250mg/LCaCO3としてpHは6.0-8.5の範囲 調製水は分析試薬級の試薬を使用し、10 μ S <sub>cm</sub> -1以下の脱イオン水又は蒸留水を用いること	必要に応じて魚類への毒性が低い、有機溶媒、乳化剤あるいは分散剤を用いてもよい。その場合は助剤対照区を設定すること。 有機溶媒、乳化剤あるいは分散剤の濃度は100mg/lを超過するべきではない	・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。 ・試験設定のための予備試験を行うことにより設定できる。	少なくとも7尾を使用する	試験開始24時間前から試験期間中は行わない。		ゼブラフィッシュ 21-25 ファットヘッドミノー 21-25 コイ 20-24 メダカ 21-25 グッピー 21-25 ブルーギル 21-25 ニジマス 13-17 ±2°C範囲内であること。	明暗周期を16:8時間に設定すること。
ファットヘッドミノー( <i>Pimephales promelas</i> ) ニジマス( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) カワマス( <i>Salvelinus fontinalis</i> )	④	海外(米国)	止水式、半止水式、流水式(利用可能な方式) (換水する場合は)48時間後換水	事業場排水又は排出先公共用水		排水:5濃度区+対照区 排出先水域水:100%河川水、対照区 希釈系列 排水:希釈率0.5以上 排出先水域水:なし、あるいは希釈率0.5以上	供試生物数/濃度区:20個体/濃度区(排水) 供試生物数/濃度区:40個体/濃度区(排出先水域水) 供試生物数/試験容器:10個体/容器(排水及び排出先水域水)	ファットヘッドミノー:試験前の飼育時はフラインシュリンプのノープリウス幼生を利用できるようにすること、換水前2時間は0.2mLのフラインシュリンプのノープリウス幼生濃縮液を追加すること ニジマス・カワマス:無給餌	連数/濃度区:2連/濃度区(排水) 連数/濃度区:4連/濃度区(排出先水域水)	ファットヘッドミノー:20±1°C、25°C±1°C(推奨) ニジマス・カワマス:12 ±1°C(推奨) 試験温度の変動は試験期間中3°Cを上回らないこと(すなわち、最大温度-最低温度の差が3°Cを超えないこと)	光質 研究所で通常用いている光質 光強度 10-20 μE/m <sup>2</sup> /s (50-100 ft-c)通常用いているレベル 明暗周期 16時間明:8時間暗

\*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

生物種	番号	国内/海外	試験対象毒性等		根拠法制度・規格等	制度等での位置付け	試験期間	測定、結果の算出・評価等*1		
			毒性試験	成長段階(推奨全長cm)				観測または測定	結果の算出	試験の有効性
ギンザケ ( <i>Oncorhynchus kisutch</i> ) ニジマス ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) カワマス ( <i>Salvelinus fontinalis</i> ) キンギョ ( <i>Carassius auratus</i> ) ファットヘッドミノ ( <i>Pimephales promelas</i> ) アメリカナマス属 ( <i>Ictalurus punctatus</i> ) ブルーギル ( <i>Lepomis macrochirus</i> ) ブルーギル属 ( <i>Lepomis cyanellus</i> )	⑤	海外(米国)	Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. (魚、大型無脊椎動物、両生類を用いた試験物質における急性毒性試験を行うための標準的なガイド)		ASTME729		2-8日間(種によって異なる) 止水式は96時間以内。 半止水式、流水式は96時間以上。 ・8日間飢餓の影響をあまり受けないものは、96時間以降で毒性の影響があるかどうか観察する。	試験生物: 実験開始後24時間おきに観察。 毒性に時間依存が見られる場合は実験開始後3.6,12,24時間で観察、その後一日に2回実験終了まで観察するのが望ましい。 ミジンコやアミの幼体のような小さい有機体をのぞいて、試験前に代表的なグループの有機体と、試験後のコントロールで生き残ったものの重量をはかる。 ミジンコ、アミは乾燥重量(60℃で72~96時間乾燥)、それ以外の有機体は余分な水分を拭き取った湿重量。 水質: ・止水式 硬度、アルカリ度、EC、pH (Ca、Mg、Na、K、Cl、硫酸測定できれば望ましい)(淡水) 塩分、pH (海水)。 アンモニア、粒子状物質、全溶解ガス、TOC(淡水の場合はCOD)(淡水海水、測定できれば望ましい)。 DO(試験開始前と終了後。48時間おきにコントロール、最高、中間、最低濃度区)。 pH(試験開始前と終了後。コントロール、最高、中間、最低濃度区)。 ・流水式 水質が一定の場合、30日置きに一回、もしくは試験前に測定。そうでない場合は毎日測定。 硬度、アルカリ度、EC、pH (Ca、Mg、Na、K、Cl、硫酸測定できれば望ましい)(淡水) 塩分、pH (海水)。 アンモニア、粒子状物質、全溶解ガス、TOC(淡水の場合はCOD)(淡水海水、測定できれば望ましい)。 DO(試験開始前と終了後。48時間おきにコントロール、最高、中間、最低濃度区)。 pH(試験開始前と終了後。コントロール、最高、中間、最低濃度区)。		LC50 EC50を計算するにおいて、ばく露された生物に対し処理区は63%よりも影響を及ぼしていること、及び対照区は37%以上影響を及ぼさないこと。
ニジマス ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	⑥	海外(カナダ)	Biological Test Method: Reference Method for Determining Acute Lethality of Effluents to Rainbow Trout(ニジマス急性毒性試験)	平均体重0.3-2.5g(同一試験で用いる魚体の最小から最大の長さが2倍以内)	・製紙パルプ排水規制(PPER) ・金属鉱業排水規制(MMER)	事業場排水	96時間	○試験中6.5±1mL/minで通気、最高濃度区で飽和度70-100% ○pH調整はしないが、pHが5.5-8.5を外れる場合は、調整する。pH調整したサンプルとしないサンプルではしないサンプルの結果を用いる。 ○DO、pH、水温は対照区と各濃度区で試験的試験終了時に測定 ○生物の観察は可能であれば、各容器につき、少なくとも24、48、72、96時間に行う。 ○試験魚の尾叉長を試験終了時に測定し、平均尾叉長を記録集計する。 ○試験魚の体重を試験終了時に測定し、平均体重を記録集計する。この結果は有効性基準となる重量範囲と比較する。 ○生残魚数を試験終了時に計数する。	死亡に対する半数致死濃度(LC50)	対照区の魚体の10%以上が死亡するか異常/ストレス的な行動をとった場合は有効ではない
ゼブラフィッシュ ( <i>Brachydanio rerio</i> )	⑦	海外(ドイツ)	Determination of the effect of nonacute toxicity of waste water on the development of fish eggs(魚類胚試験)DIN 38415-T 6	受精卵	ドイツの法令(Waste Water Ordinance)	事業場排水	48時間	○試験容器: 2.5-5.0mlの底面が平らな容器 ○pH: 7±0.2 ○受精卵の選別: 40卵/100mLペトリ皿を用いて選別し、受精卵をマルチウエルに移す ○生物観察 ・凝固した胚の数 ・体節の発達状態 ・卵黄からの尾部の分離 ・心拍の有無 ○致死の判定は、より詳細にはふ化の有無でより判断できる。 48時間暴露後26℃では72~96時間後にふ化 ○死亡の判定: 48時間時に、胚の凝固、体節の未発達、尾部が卵黄から分離していない、心拍を検知できなければ、死亡と見なせるであろう。	生残に対する半数影響濃度(EC50)	○少なくとも試験終了時の対照区の胚生残率が90%であること ○毎日実施されるポジティブコントロール(3,4-ジクロロアニリン3.7mg/Lを用いた、供試卵数10個)の死亡は10%を超えること

\*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

生物種	番号	国内/ 海外	その他試験実施に係る技術的条件等								
			試験方式	試験媒体	助剤の使用	試験濃度	生物数/密度	給餌	連数	試験温度(°C)	照明
ギンザケ ( <i>Oncorhynchus kisutch</i> ) ニジマス ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) カワマス ( <i>Salvelinus fontinalis</i> ) キンギョ ( <i>Carassius auratus</i> ) ファットヘッドミノー ( <i>Pimephales promelas</i> ) アメリカナマス属 ( <i>Ictalurus punctatus</i> ) ブルーギル ( <i>Lepomis macrochirus</i> ) ブルーギル属 ( <i>Lepomis cyanellus</i> )	⑤	海外(米 国)	止水式、半止水式、流水式。(半止水式、流水式が一般的に望ましい)	天然水、人工水 ・淡水:硬度範囲は5mg/L以下、もしくは平均の10%以下の高い方いずれか。	試験生物に影響を与えない、最小限の量に抑える。 有機溶剤の濃度は0.5mL/L以下	等比級数的(希釈係数0.6)に5濃度区以上と対照区。 ・止水式、半止水式:試験開始直前に少なくともコントロール、最高、中間、最低濃度区を測定。 ・流水式:少なくとも試験開始前に全ての区を測定。試験期間中にコントロール以外の区(特にLC50、EC50、IC50も近い濃度区)を少なくとも一回は追加測定。	・止水式及び半止水式:0.8g/L以下(表水温17°C以下の種)、0.5g/L以下(高水温の種) ・流水式:1g/L/day以下で常時10g/L以下(水温17°C以下の種)、0.5g/L/day以下または5g/L以下(高水温の種) ・藻類を入れない場合:1個/L/h以下(二枚貝軟体動物)。	急性試験中、もしくは試験前は可能な限り餌を与えない。共食いが起きる種は最低限の給餌(隔離などの処置ができない場合)。		Coho salmon, <i>Oncorhynchus kisutch</i> 12°C Rainbow trout, <i>Oncorhynchus mykiss</i> 12°C Brook trout, <i>Salvelinus fontinalis</i> 12°C Goldfish, <i>Carassius auratus</i> 17, 22°C Fathead minnow, <i>Pimephales promelas</i> 25°C Channel catfish, <i>Ictalurus punctatus</i> 17, 22°C Bluegill, <i>Lepomis macrochirus</i> 17, 22°C Green sunfish, <i>Lepomis cyanellus</i> 17, 22°C	16時間の照明、8時間の暗期が望ましい。
ニジマス ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	⑥	海外(カナ ダ)	止水式	事業場排水		対照区と100%未満の排水濃度区	○0.5g魚体/Lを超えないこと ○10尾/濃度区	無給餌	2連以上	15±1°C	16±1時間明、8±1暗
ゼブラフィッシュ ( <i>Brachydanio rerio</i> )	⑦	海外(ド イツ)		事業場排水 希釈水はDIN EN ISO7346-3での標準希釈水		希釈系列は排水と希釈水の容量により調製される。例えば希釈水の容量が0,1,2,3,5の場合は、希釈率(G)は1,2,3,4,6となる。	○2mLの試験溶液に少なくとも10個の受精卵			26±1°C	16時間明8時間暗 又は12時間明暗

\*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

## 海産魚類及び海産エビ類の急性毒性試験法（案）の公開について

平成15年9月に中央環境審議会より「水生生物の保全に係る環境基準の設定について(答申)」がなされ、同年11月にはこれを受けて初めて水生生物保全を目的とする環境基準が亜鉛について告示されました。このような環境基準の設定には化学物質の淡水及び海水中の水生生物に対する影響に関する知見が必要ですが、淡水生物についてはOECDテストガイドラインとして国際的に認知された試験法が存在するものの、海産生物についてはこれに対応する試験法は策定されていません。

このような状況を踏まえ、環境省から依頼を受け、国立環境研究所化学物質環境リスク研究センターでは、「海生生物テストガイドライン検討会」（座長：若林明子淑徳大学教授）を設置し、海産魚類と海産エビ類を対象とする急性毒性試験法の検討を行ってきました。この中で、海産生物に関する米国ASTM（American Society for Testing and Materials）の標準試験法や独立行政法人水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所による検討の成果をもとに、淡水生物に関するOECDテストガイドライン等を参考としながら試験法（案）を構成し、16年度には3機関においてこれを検証するための試験（リングテスト）を行ってきたところです。

この検証試験の成果を反映させることにより、同検討会により「海産魚類及び海産エビ類の急性毒性試験法（案）（第1版）」がとりまとめられ、関係者の了解の下で当センターより公開することとなりました。わが国では海産生物を用いた試験の実績がまだあまりありませんが、今後さまざまな機関で種々の条件の下で試験が行われ、その経験が蓄積されていくことにより、今回とりまとめた試験法の改善が図られることが期待されます。

別添1 海産魚類及び海産エビ類の急性毒性試験法（案）（第1版）

別添2 海生生物ガイドライン検討会名簿

## &lt;海産魚類及び海産エビ類の急性毒性試験法（案）（第1版）&gt;

平成 17 年 11 月

## .適用範囲

ここでは、化学物質の海産魚類急性毒性試験及び海産エビ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

- ・半止水式試験とは、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。
- ・流水式試験とは、試験容器中の試験溶液を、自動的に絶えず交換し、交換液は排水して行う試験をいう。
- ・ $LC_{50}$ とは、このガイドラインでは半数致死濃度を示す。すなわち、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。

## .総則

## 1.試験実施に当たっての基本的な考え方

海産魚類又は海産エビ類を用いた試験は、試験溶液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希釈水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希釈水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。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（ $pK_a$ ）、オクタノール水分分配係数（ $Pow$ ）、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（助剤の使用）

各濃度の試験溶液の調製は、必要量の被験物質を希釈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、原液を希釈水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希釈水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、界面活性作用のある分散剤は、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を除いて、原則として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希釈水への溶解度（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。

## 海産魚類急性毒性試験

### 1 目的

本試験は、海産魚類を被験物質に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。

### 2 供試生物

マダイが推奨されるが、他の魚種を用いてもよい。ただし、推奨種以外を用いる場合には、その種を用いた理由を明記するとともに、「12 試験の有効性」に掲げた項目を満足しなければならない。マダイは飼育が容易であり、又周年広く入手できるものである。供試生物は病気や寄生虫を抑制した状態で繁殖・飼育している養魚場等から健康な魚体を入手したものをを用いることが望ましい。輸送による死亡率が10%を超える群は用いない。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の全長と体長を測定し、大きさはできるだけ均一であることが望ましい。また、取扱いには十分留意し、網等を用いて作業を行う。

表 1

推奨種	推奨試験 温度	推奨試験 塩分	試験魚の 推奨体長 <sup>(1)</sup>
<i>Pagrus major</i> Japanese red sea bream マダイ	20±1	32±2	30±10mm程度 の稚魚

(1)上記で奨励した大きさ以外の魚を用いる場合は、その旨を理由とともに報告すること。

### 3 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。

#### 3 - 1 試験容器

試験溶液と接触する試験容器等の器具はすべてガラス製又はテフロン製等不活性な材質でできたものを用いる。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。

### 3 - 2 機器

本試験には、塩分計、溶存酸素計、温度調節のための適切な器具及び分析に必要な装置を用いる。

## 4 希釈水

魚の飼育及び試験に適した水ならば、天然海水又は人工海水（付録1）のいずれを用いてもよいが、天然海水中には供試生物に影響を及ぼす寄生虫や被験物質の毒性を変化させる化学物質等が含まれている可能性も考えられるため、10 $\mu$ m以下のフィルターでろ過した後、活性炭による処理を行うこと。なお、キレ-ト剤を含む人工海水は金属を含む物質の試験には使用しない。

希釈水には次の基準を適用する。

- ・試験魚が死亡あるいは異常な行動を引き起こさないこと。
- ・塩分が10%以上変動しないこと、塩分の調整には人工海水や脱塩素水道水を用いてもよい。
- ・全有機炭素量（TOC）が5mg/Lを超えないこと。
- ・pH値が6.0～8.5の範囲であること。
- ・飽和酸素濃度の80%以上であることが望ましい。

試験に用いる天然海水は、少なくとも半年に1回、次に示す項目を測定する。また、採水した地点の近傍に環境基準点がある場合はその値を利用できる。人工海水の調製には原則として伝導度が10 $\mu$ S/cmを超えない脱イオン水又は蒸留水を用いるべきであるが、活性炭で処理した脱塩素水道水又は地下水でも代用できるとし、以下の項目の存在状況について水質分析を行うこととする。

一般項目：pH、粒子状物質、全有機炭素量（TOC）、塩分あるいは塩素イオン濃度  
有害性関連項目：有機リン系農薬、有機塩素（有機塩素系農薬とPCBs）、クロロフェノキシ系除草剤、アンモニア、シアン化物、硫化物、臭化物、フッ化物、ヨウ化物、硝酸塩、リン酸塩、硫酸塩、カルシウム、マグネシウム、カリウム、アルミニウム、ヒ素、ベリリウム、ホウ素、カドミウム、クロム、コバルト、銅、鉄、鉛、マンガン、水銀、モリブデン、ニッケル、セレン、銀、亜鉛。

## 5 じゅん化

すべての供試魚は、暴露開始前に少なくとも7日間、試験で使用する希釈水で以下の条件下においてじゅん化する。じゅん化期間前に発病した個体群は原則として用いない。

- ・じゅん化方式 じゅん化は試験と同様の条件（生息密度、流水式・半止水式等）で行うことが望ましい。じゅん化期間中は給餌の頻度・種類等を考慮し、飼育水水質を悪化させないようにする。
- ・照明 一日当たり12～16時間、なお、光分解の可能性のある被験物質を供する場合



は、濃度の低下を踏まえて照度、明暗周期を設定する。

- ・ 温度 供試魚の適温(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時間前まで、週当たり3回以上体重の2～4%程度を目安とする。
- ・ 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。
- ・ 発病した個体群は試験に用いない。

## 6 試験溶液

### 6 - 1 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希釈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、原液を希釈水で希釈することにより行う。被験物質が海水に溶けにくい場合は、総則( 2 )に掲げた考え方に従って、助剤等を用いて原液を調製する。また、助剤を使用した場合には、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。

### 6 - 2 pHの調整

試験はpHの調整をせずに行う。ただし、被験物質を添加後、試験溶液のpHが6.0～8.5の範囲から逸脱する場合には、pHを被験物質添加前の希釈水の値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の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。

## 7 試験条件

### 7 - 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。

### 7 - 2 暴露期間

96時間が望ましい。

### 7 - 3 収容量と供試魚の数

- ・ 収容量 半止水式では0.3g/L未満が推奨される。流水式であれば多くすることができる。
- ・ 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。

### 7 - 4 試験濃度

少なくとも5濃度区を等比級数的にとる。濃度の設定には予備的な試験を実施し、公比2.2を超えないで設定することが望ましい。最高試験濃度区では、すべ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。

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。

#### 7 - 5 飼育方法

- ・温度 供試魚の適温(表1参照)で、 $20 \pm 1$  の範囲内で一定に保つ。
- ・照明 一日当たり12~16時間、なお、光分解の可能性のある被験物質を供する場合は、濃度の低下を踏まえて照度、明暗周期を設定する。
- ・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なければエアレーションを行ってもよい。
- ・給餌 給餌は行わない。
- ・かく乱 魚の行動を著しく変化させるようなかく乱は避ける。

#### 8 被験物質への暴露の開始

各試験容器に、7 - 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。

#### 9 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、鰓蓋の動き等)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。死亡魚は速やかに取り除き死亡率を記録する。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、体色等に異常が観察された場合は記録しておく。

#### 10 被験物質濃度等の測定

##### 10 - 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、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。

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。

##### 10 - 2 試験環境の測定

水温、塩分、pH、溶存酸素濃度は少なくとも毎日1回測定する。なお、半止水式では、pHは換水の前後に測定することが望ましい。

#### 11 限度試験

100mg/L又は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、 $LC_{50}$ がこの濃度より大きいことを示すことができる。限度試験は最少で7尾を用い、対照区においても同数を用いる。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。また、亜致死的な影響が観

察された場合は記録する。

## 1.2 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。

## 1.3 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幾何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 $\pm 20\%$ 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。次にプロビット法等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96時間における $LC_{50}$ を算出する。さらに、観察時毎の $LC_{50}$ を算出することが望ましい。

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 $LC_{50}$ の近似値とみなす。

## 1.4 結果のまとめ

試験報告書には、以下の情報を記載しなければならない。

### 被験物質

- ・ 物性、必要に応じて物理化学的性状
- ・ 同定データ

### 供試生物

- ・ 学名、大きさ(体長及び全長、体重)、購入先等

### 試験条件

- ・ 試験手法(例えば、半止水式・流水式、エアレーションの有無、魚の収容量等)
- ・ 水質(TOC、その他関連項目等)
- ・ 24時間毎の試験溶液の水温、塩分、溶存酸素濃度、pH
- ・ 保存及び試験溶液の調製法
- ・ 試験濃度
- ・ 試験溶液の被験物質の濃度に関する情報
- ・ 各試験での供試魚数

### 結果

- ・ 試験期間内に死亡率0%であった最高濃度
- ・ 試験期間内に死亡率100%であった最低濃度
- ・ 各観察時における各濃度での累積死亡率

- ・ LC<sub>50</sub>値(95%信頼限界を含めて)、可能なら各観察時間のもの
- ・ 試験終了時での濃度・死亡率曲線のグラフ
- ・ LC<sub>50</sub>を求めるために用いた統計的手法
- ・ 対照区における死亡率
- ・ 試験の結果に影響したかもしれない付帯事項
- ・ 魚の異常な反応

結果の考察

## 海産エビ類急性毒性試験

### 1 目的

本試験は、海産エビ類を被験物質に96時間暴露し、死亡率を測定することにより、エビ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。

### 2 供試生物

クルマエビが推奨されるが、他のエビ類を用いてもよい。ただし、推奨種以外を用いる場合には、その種を用いた理由を明記するとともに、「12 試験の有効性」に掲げた項目を満足しなければならない。推奨種のクルマエビは飼育が容易であり、又周年広く入手できるものである。試験に供する個体は良好な健康状態にあり、外見の奇形があってはならない。試験に用いるクルマエビの例を表2に示す。クルマエビの場合、試験に際して、その感受性が脱皮の有無により変化することも考えられることから、脱皮した群とそうで無い群を分けて扱うことが望ましい。

表2

推奨種	推奨試験 温度	推奨試験 塩分	試験エビの 推奨全長 <sup>(1)</sup>
<i>Penaeus japonicus</i> kuruma prawn クルマエビ	20 ± 1	32 ± 2	ポストラバーバ 期以後で 30 ± 10mm

(1)上記で奨励した大きさ以外のエビを用いる場合は、その旨を理由とともに報告すること。

### 3 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。

#### 3 - 1 試験容器

エビ類は、個体間の活力に極端な差が生じるような状況下におかれると共食いが起こることが知られている他、対照区や低濃度側の濃度区で共食いが起きなくても、死亡率が50%付近の濃度区では共食いが起こる場合がある。また脱皮個体が出現しても共食いが起こる場合がある。したがって、試験に用いる容器は、共食いを防止し、1個体毎の試験期間中の脱皮を調べるため、エビが1個体ずつ隔離でき、推奨収容量に対し適切な大きさのものを用いる。また、試験溶液と接触する試験容器等の器具はすべてガラス製又はテフロン製等不活性な材質でできたものを用い、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。

#### 3 - 2 機器

本試験には、塩分計、溶存酸素計、温度調節のための適切な器具又は分析に必要な装置を用いる。

#### 4 希釈水

エビ類の飼育及び試験に適した水ならば、天然海水又は人工海水（付録1）のいずれを用いてもよいが、天然海水中には供試生物に影響を及ぼす寄生虫や被験物質の毒性を変化させる化学物質等が含まれている可能性も考えられるため、10 $\mu$ m以下のフィルターでろ過した後、活性炭処理を行うこと。なお、キレート剤を含む人工海水は金属を含む物質の試験には使用しない。

希釈水には次の基準を適用する。

- ・試験個体が死亡あるいは異常な行動を引き起こさないこと。
- ・塩分が10%以上変動しないこと、塩分の調整には人工海水や脱塩素水道水を用いてもよい。
- ・全有機炭素量（TOC）が5mg/Lを超えないこと。
- ・pH値が6.0～8.5の範囲であること。
- ・飽和酸素濃度の80%以上であることが望ましい。

試験に用いる天然海水は、少なくとも半年に1回、次に示す項目を測定する。また、近傍に環境基準点がある場合はその値を利用できる。人工海水の調製には原則として伝導度が10 $\mu$ S/cmを超えない脱イオン水及び蒸留水を用いるべきであるが、活性炭で処理した脱塩素水道水又は地下水でも代用できるとし、以下の項目の存在状況について水質分析を行うこととする。

一般項目：pH、粒子状物質、全有機炭素量（TOC）、塩分あるいは塩素イオン濃度  
有害性関連項目：有機リン系農薬、有機塩素（有機塩素系農薬とPCBs）、クロロフェノキシ系除草剤、アンモニア、シアン化物、硫化物、臭化物、フッ化物、ヨウ化物、硝酸塩、リン酸塩、硫酸塩、カルシウム、マグネシウム、カリウム、アルミニウム、ヒ素、ベリリウム、ホウ素、カドミウム、クロム、コバルト、銅、鉄、鉛、マンガン、水銀、モリブデン、ニッケル、セレン、銀、亜鉛。

#### 5 じゅん化

すべての供試生物は、暴露開始前に少なくとも7日間、試験で使用する希釈水で以下の条件下においてじゅん化する。じゅん化に際しては、脚の損傷を防ぐため底面に砂利等を敷き飼育する。じゅん化期間前に発病した個体群は原則として用いない。

- ・じゅん化方式 じゅん化は試験と同様の条件（生息密度、流水式・半止水式等）で行うことが望ましい。じゅん化期間中は給餌の頻度・種類等を考慮し、飼育水水質を悪化させないようにする。
- ・照明 一日当たり12～16時間、なお、光分解の可能性のある被験物質を供する場合は、濃度の低下を踏まえて照度、明暗周期を設定する。
- ・温度 供試生物種の適温(表2参照)
- ・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時間前まで、毎日。体重の3～4%程度を目安とする。
- ・じゅん化期間中の死亡率を記録し、供試生物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。

- ・発病した個体群は試験に用いない。

## 6 試験溶液

### 6 - 1 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希釈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、原液を希釈水で希釈することにより行う。被験物質が海水に溶けにくい場合は、総則（ 2 ）に掲げた考え方に従って、助剤等を用いて原液を調製する。また、助剤を使用した場合には、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。

### 6 - 2 pHの調整

試験はpHの調整をせずに行う。ただし、被験物質を添加後、試験溶液のpHが6.0～8.5の範囲から逸脱するに場合は、pHを被験物質添加前の希釈水の値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の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。

## 7 試験条件

### 7 - 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。

### 7 - 2 暴露期間

96時間が望ましい。

### 7 - 3 収容量と供試生物の数

- ・収容量 半止水式では0.3g/L未満が推奨される。流水式であれば多くすることができる。
- ・供試生物の数 各試験濃度区及び対照区で少なくとも20個体のエビ類を用いる。

### 7 - 4 試験濃度

少なくとも5濃度区を等比級数的にとる。濃度の設定には予備的な試験を実施し、公比は2.2を超えないで設定することが望ましい。最高試験濃度区では、すべてのエビ類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。

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。

### 7 - 5 飼育方法

- ・温度 供試生物の適温(表2参照)で、 $20 \pm 1$  の範囲内で一定に保つ。
- ・照明 一日当たり12～16時間、なお、光分解の可能性のある被験物質を供する場合は、濃度の低下を踏まえて照度、明暗周期を設定する。
- ・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なければエアレーションを行ってもよい。
- ・給餌 給餌は行わない。

## 8 被験物質への暴露の開始

各試験容器に、7 - 3に基づき設定した供試数のじゅん化されたエビ類を移して暴露を開始する。

## 9 観察

暴露開始後少なくとも24、48、72、96時間後に観察を行い、死亡、横転あるいは狂奔等の異常行動、体色の変化や刺激に対する反応を記録する。また毎朝、1個体毎に脱皮の有無を確認し、個体別に記録する。観察可能な動き（例えば、鰓の動き等）がない場合は死亡しているとみなす。死亡したエビは速やかに取り除き死亡率を記録する。試験開始後、3時間と6時間後に観察することが望ましい。遊泳行動、呼吸（鰓の動き）、体色等に異常が観察された場合は記録しておく。

## 10 被験物質濃度等の測定

### 10 - 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、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等、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。

### 10 - 2 試験環境の測定

水温、塩分、pH、溶存酸素濃度は少なくとも毎日1回測定する。なお、半止水式では、pHは換水の前後に測定することが望ましい。

## 11 限度試験

100mg/L又は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、 $LC_{50}$ がこの濃度より大きいことを示すことができる。限度試験は最少で20個体を用い、対照区においても同数を用いる。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。また、亜致死的な影響が観察された場合は記録する。

## 12 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%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。



### 1.3 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幾何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 $\pm 20\%$ 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。次にプロビット法等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96時間における $LC_{50}$ を算出する。さらに、観察時毎の $LC_{50}$ を算出することが望ましい。

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 $LC_{50}$ の近似値とみなす。

### 1.4 結果のまとめ

試験報告書には、以下の情報を記載しなければならない。

#### 被験物質

- ・物性、必要に応じて物理化学的性状
- ・同定データ

#### 供試生物

- ・学名、大きさ（全長、体重）、購入先等

#### 試験条件

- ・試験手法(例えば、半止水式・流水式、エアレーションの有無、エビ類の収容量等)
- ・水質(TOC、その他関連項目等)
- ・24時間毎の試験溶液の水温、塩分、溶存酸素濃度、pH
- ・保存及び試験溶液の調製法
- ・試験濃度
- ・試験溶液の被験物質の濃度に関する情報
- ・各試験での供試生物数

#### 結果

原則として脱皮、未脱皮及び全個体に分けて記載する。

- ・試験期間内に死亡率0%であった最高濃度
- ・試験期間内に死亡率100%であった最低濃度
- ・各観察時における各濃度での累積死亡率
- ・ $LC_{50}$ 値(95%信頼限界を含めて)、可能なら各観察時間のもの
- ・試験終了時での濃度・死亡率曲線のグラフ
- ・ $LC_{50}$ を求めるために用いた統計的手法
- ・対照区における死亡率
- ・試験の結果に影響したかもしれない付帯事項
- ・エビ類の異常な反応

#### 結果の考察

参考文献)

- ・ ASTM 1996 : Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians, E729 - 96.
- ・ 堀英夫・山田久 2001 : 海産エビ類による急性毒性試験法、瀬戸内海区水産研究所調査研究叢書 第2号 有害物質の水域生態系影響評価と生態毒性試験法、(独)水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所 : 77-83
- ・ 角埜彰・小山次朗 2001 : 海産魚類急性毒性試験法、瀬戸内海区水産研究所調査研究叢書 第2号 有害物質の水域生態系影響評価と生態毒性試験法、(独)水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所 : 57-61.
- ・ 厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長、環境省総合環境政策局長(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) 新規化学物質等に係る試験の方法について、<藻類生長阻害試験、ミジンコ急性毒性試験及び魚類急性毒性試験>
- ・ OECD 2004 : OECD Guideline for testing of chemicals 202 *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test.
- ・ OECD 1992 : OECD Guideline for testing of chemicals 203 Fish Acute Toxicity Test.

## 付録1

適切な人工海水の例 (Lyman and Flemingが提案した人工海水の調製方法をもとに設定)

KCl	660mg/L
CaCl <sub>2</sub>	1,120mg/L
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,912mg/L
MgCl <sub>2</sub>	4,981mg/L
NaCl	23,477mg/L
NaHCO <sub>3</sub>	192mg/L

人工海水を希釈水として用いる場合は、被験物質の毒性が変化してはならない。EDTAのようなキレ-ト剤を用いた場合、重金属の毒性が変化することから、キレ-ト剤を含む人工海水を使用することは適当でない。また、有機被験物質において、pHの変化により存在形態が変化し、毒性試験結果に影響を及ぼす可能性があるものを使用する場合、試験中のpH変動をできるだけ小さくすることが必要である。人工海水を半止水式試験に用いる場合、試験溶液のpHの変動することが考えられるため、pH緩衝能の低いものは使用しない。

出典)

- ・堀英夫・立石晶浩・高柳和史・山田久 1996 : 海産魚を用いる有害物質の毒性試験における人工海水の試験海水としての適正評価、日水誌、62(4):614-622.
- ・角埜彰・小山次朗 2001 : 海産魚類急性毒性試験法、瀬戸内海区水産研究所調査研究叢書 第2号 有害物質の水域生態系影響評価と生態毒性試験法、(独)水産総合研究センター 瀬戸内海区水産研究所 : 57-61.
- ・Lyman, J. and Fleming, R.H. 1940: Composition of Sea Water, J. Mar. Res., 3:134-146.

<海生生物ガイドライン検討会名簿>

角埜 彰 独立行政法人 水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所  
小山 次朗 鹿児島大学水産学部 海洋資源環境教育研究センター  
菅谷 芳雄 独立行政法人 国立環境研究所 化学物質環境リスク研究センター  
若林 明子 淑徳大学 国際コミュニケーション学部 人間環境学科

: 座長

## 水産庁海産生物毒性試験指針で提案されている試験法について

出典：海産生物毒性試験指針（平成22年3月水産庁）より事務局作成

試験法名	試験区分	生物種（分類）	生物種（種名）	試験期間	エンドポイント	試験容器	備考
植物プランクトン生長阻害試験法	急性	珪藻が基本、ほか緑藻、ハプト藻、渦鞭毛藻	<i>Skeletonema costatum</i> （スケルトネマ）が基本、ほか <i>Dunariella tertiolecta</i> （緑藻） <i>Thalassiosira pseudonana</i> （珪藻） <i>Phaeodactylum tricornutum</i> （珪藻） <i>Heterosigma akashiwo</i> （ラフィド藻） <i>Pavlova lutheri</i> （ハプト藻） <i>Isochrysis galabana</i> （ハプト藻） <i>Prorocentrum minimum</i> （渦鞭毛藻）	72時間	生長（in vivo蛍光、クロロフィルaや細胞数を測定）	ネジロ試験管（φ24mm×200mm, 容量64mL）	対数増殖期、22℃、f/2培地（滅菌海水に金属・栄養塩などを添加）、照明付きインキュベーター内で培養（14時間明／10時間暗）
シオダマリミジンコ幼生の遊泳阻害試験法	急性	カイアシ類	<i>Tigriopus japonicus</i> （シオダマリミジンコ）	24時間	遊泳阻害（致死）	ガラスシャーレ（φ25-26mm）、1容器あたり5個体、5個体/2mL, 20個体/試験	ふ化後24時間未満のノープリウス幼生、20-25℃、16時間明／8時間暗、32-35psu
エビ類ゾエア幼生の遊泳阻害試験法	急性	エビ類	<i>Palaemon serrifer</i> （スジエビモドキ）	48時間	遊泳阻害（致死）	不活性で吸着しにくい試験容器、1個体/10mL、10個体/試験	第1ゾエア幼生（ふ化幼生）、20-25℃、16時間明／8時間暗、32-35psu
稚エビの急性毒性試験	急性	エビ類	<i>Marsupenaeus japonicus</i> （クルマエビ） <i>Heptacarpus futilirostris</i> （アシナガモエビモドキ）	96時間	致死	1個体ずつ隔離できる容器（もしくはガラスビーカー）、収容密度は0.3 g/L以下	全長25-35mm（クルマエビ）、8-10mm（アシナガモエビモドキ）、20-25℃、33-35psu
海産魚類急性毒性試験法	急性	魚類	<i>Pagrus major</i> （マダイ） <i>Sillago japonica</i> （シロギス）	96時間	致死	水槽、収容密度は0.28g/L以下（マダイ）、0.12g/L以下	20℃程度（マダイ）、23-26℃（シロギス）、29-35psu
シオダマリミジンコの繁殖阻害試験法	慢性	カイアシ類	<i>Tigriopus japonicus</i> （シオダマリミジンコ）	21日間	変態の可否、変態までの日数、親の生残率、繁殖	ウェルプレートもしくはガラスビーカー、1mL/1個体で20個体/試験（8日目以降は合して10mL、産卵した雌は隔離）	20-25℃、16時間明／8時間暗、32psu程度
魚類—マミチヨグの初期生活段階毒性試験法	慢性	魚類	<i>Fundulus heteroclitus</i> （マミチヨグ）	受精後8-10週間	ふ化率、生残率、成長（全長、体重、肥満度）	50L程度のガラス製試験水槽（流水式、500 mL/分、5回転以上／日）	受精卵、16-22℃、31-35psu
魚類—マミチヨグの成熟・再生産阻害試験法	慢性	魚類	<i>Fundulus heteroclitus</i> （マミチヨグ）	3か月間程度	産卵数、放卵・放精、GSI、（生殖腺の組織学的検討、血漿ステロイドホルモン）	50L程度のガラス製試験水槽（流水式、水量40L、300 mL/分、5回転以上／日）	雌雄判別できる未成熟の成魚、16-22℃、31-35psu
魚類全生活環毒性試験法	慢性	魚類	<i>Oryzias javanicus</i> （ジャワメダカ） <i>Fundulus heteroclitus</i> （マミチヨグ）	約100日間	受精卵(F0)のふ化率・生残率、一部はGSI、産卵数、Fiの受精率、ふ化率	流水式で5回転以上／日、25L程度のガラス製試験水槽（200 mL/分、ジャワメダカ）、40L程度のガラス製試験水槽（300 mL/分、マミチヨグ）	受精卵、23-26℃（ジャワメダカ）、16-22℃（マミチヨグ）、明期14-16時間、31-35psu

## 諸外国等で用いられている海産生物に係る生物応答試験 / WET試験の例

## 【1. 藻類】

試験法規格 (国)	試験法名	試験区分	生物種 (分類)	生物種 (種名)	試験期間	エンドポイント	備考
ISO	ISO 10253:2006	急/慢性	珪藻類	<i>Skeletonema costatum</i> (珪藻) <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (珪藻)	72時間	生長阻害 (細胞濃度)	
ASTM (米国)	E1218-04	急/慢性	珪藻類 緑藻類	<i>Skeletonema costatum</i> (珪藻) (推奨種) <i>Thalassiosira pseudonana</i> (珪藻) <i>Dunaliella tertiolecta</i> (緑藻) <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (珪藻)	96時間 (72時間)	生長阻害 (細胞濃度)	
US EPA (米国)	OCSPP 850.4500	急/慢性	珪藻類	<i>Skeletonema costatum</i>	96時間	生長阻害 (細胞濃度)	群体形成
EA (英国)	DTA試験法 <sup>a</sup>	慢性	珪藻類	<i>Skeletonema costatum</i>	72時間	生長阻害 (細胞濃度)	群体形成
ISO	ISO 10710:2010	慢性	紅藻類	<i>Ceramium tenuicorne</i>	7日間	生長阻害 (長さ)	
ASTM (米国)	E1498-92: 海藻有性生殖試験	慢性	海藻	<i>Champia parvula</i> など <sup>b</sup>	2日(曝露) + $\alpha$ 日 (繁殖観察、種によって異なる)	繁殖 (子実体数等)	雌雄配偶体を曝露後、雌のみ清澄水に入れ、繁殖形成体 (子実体など) を観察する
US EPA (米国)	EPA-821-R-02-014 <sup>b</sup>	慢性	紅藻類	<i>Champia parvula</i> (ワツナギソウ)	7-9日 (曝露2日 + 回復5-7日)	繁殖 (子実体数)	雌雄配偶体を曝露後、雌のみ清澄水に入れ、子実体を計数する

a: The direct toxicity assessment of aqueous environmental samples using the *Skeletonema costatum* marine algal growth inhibition test (2009)

b: Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms 3rd Edition October 2002

【 2 . 無脊椎動物 ( 甲殻類・貝類・棘皮動物・環形動物 ) 】

試験法規格 ( 国 )	試験法名	試験区分	生物種 ( 分類 )	生物種 ( 種名 )	試験期間	エンドポイント	備考
ISO	ISO 14669:1999: カイアシ急性試験	急性	カイアシ類	<i>Acartia tonsa</i> <i>Tisbe battagliai</i> <i>Nitocra spinipes</i>	48時間	生存	供試齢：第5コペポデイド期または成体 ( <i>Acartia tonsa</i> )、コペポデイド期: 6±2日齢 ( <i>Tisbe battagliai</i> )、成体: 3-4週齢 ( <i>Nitocra spinipes</i> )
EA ( 英国 )	DTA: カイアシ急性試験 <sup>a</sup>	急性	カイアシ類	<i>Tisbe battagliai</i>	48時間	生存	供試齢：5-6日齢 ( 第一コペポデイド期 )
ISO	ISO 16778:2015: カイアシ初期生活段階試験	慢性	カイアシ類	<i>Acartia tonsa</i>	5-6日	生存、発生阻害	供試齢：受精卵
OECD	Guidance document No.201: カイアシ成長・繁殖試験	慢性	カイアシ類	<i>Amphiascus tenuiremis</i>	36日	生存、繁殖	幼体 (<24h齢) をマイクロプレートで1頭/穴ずつ ( 60-120頭/濃度区 ) 曝露し、成熟後(15-18日後)、性判定・ペアリングして7-14日間繁殖を観察する。
ASTM ( 米国 )	E2317-04: カイアシ・ライフサイクル試験	慢性	カイアシ類	<i>Amphiascus tenuiremis</i>	約24日	生存、繁殖	幼体 (<24h齢) をマイクロプレートで1頭/穴ずつ ( 144頭/プレート ) 曝露し、成熟後(12-15日後)、性判定・ペアリングして産卵・ふ化を観察する ( 約12日 )
ASTM ( 米国 )	E1463-92: アミ類急性試験	急性	アミ類 ( 西海岸 )	<i>Holmesimysis costata</i> <i>Neomysis mercedis</i>	96時間	生存	供試齢：3-7日齢 ( <i>H. costata</i> )、1-5日齢 ( <i>N. mercedis</i> )
US EPA ( 米国 )	OCSPP 850.1035: アミ急性試験	急性	アミ類	<i>Mysidopsis bahia</i>	96時間	生存	供試齢：幼体 (<24h齢) または亜成体 ( 5-6日齢 )
ASTM ( 米国 )	E1191-03a: アミ類フルライフサイクル試験	慢性	アミ類	<i>Mysidopsis bahia</i> <i>Mysidopsis bigelowi</i> <i>Mysidopsis almyra</i>	第一世代が死亡するまで	生存、成長、繁殖	供試齢：幼体 (<24h齢)
US EPA ( 米国 )	OPPTS 850.1350: アミ繁殖試験	慢性	アミ類	<i>Mysidopsis bahia</i>	28日	繁殖	供試齢：幼体 (<24h齢)
US EPA ( 米国 )	EPA-821-R-02-014 <sup>b</sup>	慢性	アミ類	<i>Mysidopsis bahia</i>	7日	生存、成長、繁殖	有性生殖、容器から脱走する
OECD	Draft test guideline: アミ二世世代試験	慢性	アミ類	<i>Mysidopsis bahia</i>	約2ヶ月 ( すべての2世代目が2腹目を産むまで、または対照区が2腹目を産んだ7日後)	生存、成長、繁殖	US EPAが内分泌かく乱物質の試験として開発。検証試験の結果が良好ではなかったため承認されないまま、研究開発凍結。
ASTM ( 米国 )	E1498-92(2004)Annex: ワムシ急性試験	急性	ワムシ	<i>Brachionus calyciflorus</i> ( 推奨種 ) <i>B. plicatilis</i>	24時間	生存	淡水種であるが、卵を15‰の海水でふ化させて試験する。
US EPA ( 米国 )	OCSPP 850.1045: クルマエビ急性試験	急性	クルマエビ	<i>Farfantepenaeus aztecus</i> <i>Farfantepenaeus duorarum</i> <i>Litopenaeus setiferus</i>	96時間	生存	供試齢：後幼体 ( 0.4 mm-約25 mm )
ISO	ISO 17244:2015: マガキ・イガイ胚・幼生発生試験	急性	二枚貝	<i>Crassostrea gigas</i> ( マガキ ) <i>Mytilus edulis</i> ( ヨーロッパイガイ ) <i>Mytilus galloprovincialis</i>	24/48時間	生存、発生異常	供試齢：受精胚
ASTM ( 米国 )	E724-98 ( 2012 ) : 二枚貝急性	急性	二枚貝	<i>Crassostrea virginica</i> ( セイヨウカキ ) <i>Crassostrea gigas</i> ( マガキ ) <i>Mercenaria mercenaria</i> ( ホンビノスガイ ) <i>Mytilus edulis</i> ( ヨーロッパイガイ )	48時間	生存、発生異常	供試齢：受精後4時間以内の2-8cellsのもの
US EPA ( 米国 )	OCSPP 850.1055: 二枚貝胚・幼生発生試験	急性	二枚貝	<i>Crassostrea virginica</i> ( セイヨウカキ ) <i>Crassostrea gigas</i> ( マガキ ) <i>Mercenaria mercenaria</i> ( ホンビノスガイ ) <i>Mytilus edulis</i> ( ヨーロッパイガイ )	48時間	生存、発生異常	供試齢：受精後4時間以内の2-8cellsのもの
US EPA ( 米国 )	OCSPP 850.1025: カキ成長	急性?	カキ	<i>Crassostrea virginica</i> ( セイヨウカキ )	96時間	生存、行動、成長 ( 外殻長 )	試験開始24時間前に外縁部を3-5mm削る
EA ( 英国 )	DTA: カキ胚・幼生発生試験 <sup>c</sup>	急性	カキ	<i>Crassostrea gigas</i> ( マガキ )	24時間	発生阻害	供試齢：受精胚
ASTM ( 米国 )	E1563-98: ウニ胚発生試験	急性	ウニ	試験時に入手可能なもの： 東海岸： <i>Arbacia punctulata</i> , <i>Strongylocentrotus droebachiensis</i> 西海岸： <i>S. purpuratus</i> , <i>S. droebachiensis</i> , and <i>Dendraster excentricus</i>	48-98時間	生存、発生異常	供試齢：受精後4時間以内の2-8cellsのもの
US EPA ( 米国 )	EPA-821-R-02-014 <sup>a</sup>	急性	ウニ	<i>Arbacia punctulata</i> ( アサドクニ属 )	精子60分曝露+20分受精	受精率	養殖業者から成熟個体を手し、精子を1時間曝露後、卵を加えて20分間で受精させる
Environment Canada	EPS 1/RM/27: ウニ網受精試験	急性	ウニ、カシパンの一種	<i>Strongylocentrotus droebachiensis</i> <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> ( アサドクニ ) <i>Arbacia punctulata</i> ( アサドクニ属 ) <i>Lytechinus pictus</i> <i>Dendraster excentricus</i> ( カシパンの一種 )	精子10分曝露+10分受精 精子20分曝露+20分受精 精子60分曝露+20分受精		供試齢：精子と卵子
ASTM ( 米国 )	E1562-00: ゴカイ急性・慢性・フルライフサイクル試験	急/慢性	ゴカイ類	<i>Neanthes arenaceodentata</i> <i>Capitella capitata</i> <i>Ophryotrocha diadema</i> <i>Dinophilus gyrociliatus</i>	急性：96時間 慢性：96時間～10-28日 フルライフ：10日～3か月	生存、成長、繁殖	

a: The direct toxicity assessment of aqueous environmental samples using the marine copepod *Tisbe battagliai* lethality test (2007)

b: US EPA (2002) Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms 3rd Edition,

c: The direct toxicity assessment of aqueous environmental samples using the oyster (*Crassostrea gigas*) embryo-larval development test (2007)

【 3 . 魚類】

試験法規格(国)	試験法名	試験区分	生物種(分類)	生物種(種名)	試験期間	エンドポイント	備考
US EPA (米国)	OCSP 850.1075: 魚類急性試験	急性	シルバーサイド シープスヘッドミノール	<i>Menidia menidia</i> (アトランティックシルバーサイド) <i>Menidia beryllina</i> (インランドシルバーサイド) <i>Menidia peninsulae</i> (タイトウォーターシルバーサイド) <i>Cyprinodon variegatus</i> (シープスヘッドミノール)	96時間	生存	供試齢: 稚魚(体長は魚種によって異なる)
ASTM (米国)	E729-96: 魚類・大型無脊椎動物・両生類急性毒性試験	急性	シルバーサイド、 シープスヘッドミノール、 マミチヨグ、カダヤシ、 イトヨ、カレイなど	<i>Cyprinodon variegatus</i> (シープスヘッドミノール), <i>Fundulus heteroclitus</i> (マミチヨグ), <i>Fundulus similis</i> (ロングノーズキルフィッシュ), <i>Menidia sp.</i> (シルバーサイド), <i>Gasterosteus aculeatus</i> (イトヨ), <i>Lagodon rhomboides</i> (Pinfish), <i>Leiostomus xanthurus</i> (Spot), <i>Cymatogaster aggregata</i> (Shiner perch), <i>Oligocottus maculosus</i> (Tidepool sculpin), <i>Citharichthys stigmaeus</i> (Sanddab), <i>Paralichthys dentatus</i> , <i>P. lethostigma</i> , <i>Starry flounder</i> , <i>Platichthys stellatus</i> , <i>Parophrys vetulus</i> (カレイ目), <i>Clupea harengus</i> (ヒメ)	96時間(+2-8日回復期)	生存	供試齢: 稚魚(体長は魚種によって異なる) 曝露後、清澄水に移して2-8日観察し、後遺症の有無を見ることが望ましい。
ASTM (米国)	E1192-97: 魚類・大型無脊椎動物・両生類を用いた環境水・排水の急性毒性試験	急性	同上	同上	同上	同上	同上
OSPAR	OSPAR commision, 2006 <sup>a</sup>	急性	ターボット(カレイの一種) シープスヘッドミノール	<i>Scophthalmus maximus</i> (ターボット)(推奨種) <i>Cyprinodon variegatus</i> (シープスヘッドミノール)	96時間	生存	供試齢: 稚魚(体長は魚種によって異なる)
OECD	TG 210: 魚類初期生活段階試験	慢性	記載なし	記載なし	36-40日	ふ化、生存、成長	受精卵から稚魚期まで流水式にて曝露
ASTM (米国)	E1241-98: 魚類初期生活段階試験	慢性	アンコウ シープスヘッドミノール シルバーサイド	<i>Opsanus beta</i> (Gulf toadfish) <i>Cyprinodon variegatus</i> (シープスヘッドミノール) <i>Menidia menidia</i> , <i>M. peninsulae</i> 等(シルバーサイド)	42日(Gulf toadfish) 28日(Sheepshead minnow) 28日(Silversides)	ふ化、生存、成長	受精卵から稚魚期まで流水式にて曝露
US EPA (米国)	OCSP 850.1400: 魚類初期生活段階試験	慢性	シープスヘッドミノール シルバーサイド	<i>Cyprinodon variegatus</i> (シープスヘッドミノール) <i>Menidia menidia</i> , <i>M. peninsulae</i> 等(シルバーサイド)	28日	ふ化、生存、成長	受精卵から稚魚期まで流水式にて曝露
OECD	TG 212: 魚類胚・仔魚期毒性試験	亜慢性	シルバーサイド ニシン タラ シープスヘッドミノール	<i>Menidia peninsulae</i> (タイトウォーターシルバーサイド) <i>Clupea harengus</i> (タレイヨウニシン) <i>Gadus morhua</i> (タレイヨウダラ) <i>Cyprinodon variegatus</i> (シープスヘッドミノール)	ふ化後卵黄吸収まで(対照区において餓死が見られない時点まで)	ふ化、生存、発生異常	供試齢: 受精後8時間以内(30分以内が望ましい)
US EPA (米国)	EPA-821-R-02-014 <sup>b</sup> : 胚・仔魚期毒性試験	亜慢性	シープスヘッドミノール	<i>Cyprinodon variegatus</i> (シープスヘッドミノール)	9日(またはふ化後4日間まで)	生存、ふ化、催奇形性	供試齢: 受精後24時間以内
US EPA (米国)	EPA-821-R-02-014 <sup>b</sup> : 仔魚生存・成長試験	慢性	シープスヘッドミノール シルバーサイド	<i>Cyprinodon variegatus</i> (シープスヘッドミノール) <i>Menidia beryllina</i> (インランドシルバーサイド)	7日	生存、成長	供試齢: ふ化後24時間以内(シープスヘッドミノール)、7-11日齢(ふ化後1-3日以内)(シルバーサイド)
US EPA (米国)	OPPTS 850.1500: ライフサイクル試験 [draft]	慢性	シープスヘッドミノール	<i>Cyprinodon variegatus</i> (シープスヘッドミノール)	F1のフルライフ+F2(F1開始時と同じ生活段階まで)、例: F1の卵からF2の卵まで	生存、成長、繁殖	Life-cycle toxicity test using sheepshead minnows ( <i>Cyprinodon variegatus</i> ), in Bioassay Procedures for the Ocean Disposal Permit Program. EPA-600/9-78-010
ASTM (米国)	E1562-00: ゴカイ急性・慢性・フルライフサイクル試験	急/慢性	ゴカイ類	<i>Neanthes arenaceodentata</i> <i>Capitella capitata</i> <i>Ophryotrocha diadema</i> <i>Dinophilus gyrociliatus</i>	急性: 96時間 慢性: 96時間~10-28日 フルライフ: 10日~3か月	生存、成長、繁殖	

a: OSPAR Commission (2006) OSPAR Protocols on Methods for the Testing of Chemicals Used in the Offshore Oil Industry.  
b: US EPA (2002) Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms 3rd Edition



## 海産生物を用いる米国WET試験の試験条件

	仔魚生存・成長試験 Method 1006.0	仔魚生存・成長試験 Method 1004.0	胚・仔魚生存・催奇形性 試験 Method 1005.0
供試生物	インランドシルバーサイド ( <i>Menidia beryllina</i> ) 	シープスヘッドミノー ( <i>Cyprinodon variegatus</i> )  写真出典：USGS	
供試齢	生後 7-11 日齢（ふ化後 24-96 時間齢？）、個体差 24 時間以内	ふ化後 24 時間齢未満	受精後 24 時間未満
供試個体の準備	飼育機関より受精卵または ふ化仔魚（8-10 日齢） を入手し、飼育して生後 7-11 日齢の仔魚を得る <sup>a</sup>	飼育機関より受精卵 <sup>b</sup> を 入手し、飼育してふ化仔 魚を得る（受精後 48 時間 後に発生段階と生存率を 確認すること）	飼育親魚より自然産卵 （水温 25°C に上げる）ま たは人工受精により受 精後 24 時間以内の受精 卵を得る <sup>c</sup>
試験期間	7 日間	7 日間	9 日間またはふ化後 4 日 間（どちらか早い方）
エンドポイント	生存、成長（重量）	生存、成長（重量）	生存（発生異常）
試験成立条件	対照区において生存率 80%以上、1 個体あたりの 乾燥重量 0.50 mg 以上 <sup>d</sup>	対照区において生存率 80%以上、1 個体あたりの 乾燥重量 0.60 mg 以上 <sup>d</sup>	対照区において生存率 80%
対照区・希釈水	自然海水、人工海水		
塩分濃度	5-32‰	20-32‰	5-32‰
換水	毎日	毎日	毎日
試料量／容器	500-750 mL	500-750 mL	250-400 mL（推奨）
生物数／容器	10（最小）	10（最小）	10（最小）、15（推奨）
繰り返し	4（最小）	4（最小）	3（最小）、4（推奨）
試験濃度	排水：公比 2、5 濃度＋対照区 環境水：100%濃度区（または 5 濃度区）＋対照区		
必要試料量	一日 6 L	一日 6 L	一日 5 L
試験温度	25±1°C	25±1°C	25±1°C
光条件	16 時間明：8 時間暗、 10-20 μmol/m <sup>2</sup> /s	16 時間明：8 時間暗、 10-20 μmol/m <sup>2</sup> /s	16 時間明：8 時間暗、 10-20 μmol/m <sup>2</sup> /s
給餌	アルテミア	アルテミア	なし

a: 生後7週間（ふ化直後）は感受性が高いので輸送は避ける。ふ化前か、ふ化後（8-10日齢）でアルテミアをしっかり食べる段階のものを輸送する。

b: 自然産卵（24時間回収）または人工受精（ヒト絨毛性性腺刺激ホルモンを与えて抱卵させ、メスの腹部から卵をペトリ皿に押し出す。オス3-5匹から精巣を取り出し精液を得て、受精させる）により受精卵を得る。受精後4時間後に粘着糸を除去して、流水式または半止水式（毎日換水）で飼育する。

c: 外部機関からの輸送は推奨しない。外部機関より一晩かけて輸送する場合、発送時に受精後8時間以内であること

d: 固定液保存前の場合、4%ホルマリンまたは70%エタノールで7日間保存後はSheepshead minnowは0.43mg以上、Silversideは0.50mg以上

	アミ生存・成長・繁殖試験 Method 1007.0	ウニ胚受精試験 Method 1008.0	紅藻類有性生殖試験 Method 1009.0
供試生物	アミ属 ( <i>Mysidopsis bahia</i> , 現 <i>Americamysis bahia</i> )  出典：Marinco bioassay laboratory, Inc.	アスナロウニ属 ( <i>Arbacia punctulata</i> )  出典：NOAA	ワツナギソウ ( <i>Champia parvula</i> )  出典：algaeBASE
供試齢	7日齢	精子と卵子	配偶体
供試個体の準備	試験開始 8 日前に抱卵したメスを一晩隔離し仔虫を回収 <sup>e</sup> 、試験前まで塩分順化しながら飼育する	飼育機関または野外より成熟個体入手し、精子および卵子をそれぞれ得る <sup>f</sup>	雌雄別々の飼育容器よりそれぞれ配偶体の先端を鉗子で切る
試験期間	7日間	精子 1 時間+卵子を加えて受精 20 分	2 日間+5-7 日間回復期 (繁殖観測)
エンドポイント	生存、成長 (必須) 繁殖 (抱卵) (推奨)	受精率	繁殖 (子実体数)
試験成立条件	対照区において生存率 80%以上、乾燥重量 0.2 mg 以上、50%以上のメスが抱卵する	対照区において受精率 70-90%	対照区において生存率 80%以上、1 個体あたり平均子実体数 10 個以上
対照区・希釈水	自然海水、人工海水		
塩分濃度	20-30‰	30‰	30‰
換水	毎日	なし	なし
試料量/容器	150 mL	5 mL (推奨)	100 mL (最小)
生物数/容器	5 (最小)	精子 500 万細胞、卵 200 (推奨)	メス配偶体の枝先端 5 個、オス配偶体 1 個体
繰り返し	8 (最小)	4 (最小)	3 (最小)、4 (推奨)
試験濃度	排水：公比 2、5 濃度+対照区 環境水：100%濃度区 (または 5 濃度区) +対照区		
必要試料量	一日 3 L	1 試験 1 L	1 試験 2 L
試験温度	26±1°C	20±1°C	23±1°C
光条件	16 時間明: 8 時間暗、 10-20 μmol/m <sup>2</sup> /s	16 時間明: 8 時間暗、 10-20 μmol/m <sup>2</sup> /s	16 時間明: 8 時間暗、 75 μmol/m <sup>2</sup> /s
給餌	アルテミア	なし	なし

e: 必要個体数の倍のメス親個体を別の水槽に移し、翌日、1000 μmメッシュのついた容器で親個体を分離する。

f: 1試験当たりオス4個体、メス4個体から電流刺激を与えてそれぞれ精子、卵をプールして得る。

## 公共用水域を対象に生物応答試験を実施した研究等の事例

表中の各文献は、公共用水域を対象に生物応答試験を実施しているとみられるものを事務局が民間のデータベースサービスより抽出したものであり、各文献で用いられている生物応答試験の再現性や信頼性、試験結果の妥当性等について何ら評価を行ったものではない。また、表中の情報も、今後の精査の過程で追加や修正がなされる可能性がある。

「生物応答を利用した排水管理手法の活用について」(平成27年11月生物応答を利用した水環境管理手法に関する検討会)において引用されている公共用水域を対象とした生物応答試験の実施に係る文献(5本)については、以下には含めていない。

番号	和文標題 (原文が英文のものは仮訳)	著者名	資料名	巻号ページ	年	国内/海外	対象水域	試験法の概要					生態影響の検出又はその原因に関する言及の有無	
								試験対象毒性	試験水の濃縮	試験生物種(該当に「」)				
										藻類	無脊椎動物 (エビ類)	魚類		その他
1	特集 バイオアッセイによる水質評価の現状と課題 セレナストラム・ヌカエビの生物試験による除草剤・殺虫剤の潜在的生態影響モニタリング	畠山成久(環境研)	用水と廃水 JST資料番号: G0195A ISSN:0513-5907	Vol.35, No.4, Page.337-343 (1993.04)	1993	国内	河川	急性毒性	-	-	-	-	-	有
2	バイオアッセイを用いた河川の汚濁評価 降雨時における化学物質の河川流入現象の解明	伏脇裕一(神奈川県環境科セ), 大久保卓也(滋賀県琵琶湖研), 須戸幹(滋賀県大環境科学), 市木敦之(立命館大理工), 岡村秀雄(岡山大資源生物科研)	環境トキシコロジーシンポジウム講演要旨集	Vol.24th, Page.36 (1998.10)	1998	国内	河川	急性毒性 その他(マウスの細胞増殖阻害)	-	-	(ミジンコ)	-	-	有
3	水圏モデル生態系マイクロコズムを用いた農薬散布後の環境水の生態系影響評価	稲森悠平(環境研), 竹村崇, 長谷川博(東邦大), 小松央子(茨城県科学技術振興財団)	日本水処理生物学会誌 別巻 JST資料番号: L4132A ISSN:0910-6766	No.21, Page.27 (2001.10.15)	2001	国内	河川	その他(マイクロコズム)	-	-	-	-	-	有
4	藻類,甲殻類,魚類を用いた都内環境水の有害性調査	塩田勉, 若林明子	東京都環境科学研究所年報	Vol.2001, Page.91-95 (2001.11.30)	2001	国内	河川	急性毒性	-	-	(ミジンコ)	-	-	有
5	農薬の藻類に対する影響評価について	石原悟(農業環境技研)	植調 JST資料番号: L2274A ISSN:0289-8233	Vol.36, No.1, Page.22-31 (2002.04)	2002	国内	河川	急性毒性	有(一部で実施)	-	-	-	-	-
6	湖内現象を考慮したノンポイント負荷削減対策の検討 3. ノンポイント排水の生物への影響評価 3.2 植物プランクトンおよび動物プランクトンへの影響(滋賀県琵琶湖研究所S)	岡村秀雄(岡山大資源生物科研)	湖内現象を考慮したノンポイント負荷削減対策の検討 平成14年 JST資料番号: N20022335	Page.276-286 (2002)	2002	国内	河川	急性毒性	-	-	(ミジンコなど)	-	-	有
7	AGP試験と藻類生長阻害試験を用いた下水処理水の河川水質に対する影響評価	山下尚之, 田中宏明, 宮島潔(土木研), 宮本宣博(環境科学コーポレーション), 玉本博之	日本水環境学会年会講演集	Vol.38th, Page.126 (2004.03.17)	2004	国内	河川	急性毒性	-	-	-	-	-	有
8	河川環境における農薬類生態影響の総合評価	畠山成久(環境研)	水環境学会誌 JST資料番号: Z0777A ISSN:0916-8958	Vol.29, No.8, Page.444-449 (2006.08.10)	2006	国内	河川	急性毒性・慢性毒性	-	(藻類, ウキクサ)	(エビ類, カゲロウ類, 二枚貝)	-	-	有
9	水環境中の化学物質が及ぼす生態影響に関する研究	鈴木穰, 宮島潔(土木研)	土木研究所成果報告書 JST資料番号: L5019A	Vol.2005, 2分冊 - 1, Page.339-350 (2006.03)	2006	国内	河川	急性毒性, 慢性毒性	有(一部で実施)	-	-	-	-	有
10	藻類,ミジンコ属及び魚類に対する毒性ランクにより環境水の生物学的安全性を評価する新しい方法	WEI Dongbin, KISUNO Akira, KAMEYA Takashi, URANO Kohei	Sci Total Environ	Vol.371, No.1-3, Page.383-390 (2006.12.01)	2006	国内	河川	急性毒性, 慢性毒性	有	-	(ミジンコ)	-	-	-
11	バイオモニタリングによる農薬類の生態影響評価	菅谷芳雄(環境研)	環境毒性学会誌 JST資料番号: L4237A ISSN: 1344-0667	Vol.9, No.2, Page.61-68 (2006.12.30)	2006	国内	河川	急性毒性・慢性毒性	-	-	(エビ類)	-	-	有
12	水生生物の保全に向けた金目川水系の実態調査 III(河川水の生態影響試験結果)	大塚知泰, 三島聡子, 斉藤和久, 石綿進一, 川原博満, 安部明美(神奈川県環境科セ)	日本水環境学会年会講演集 JST資料番号: S0264B	Vol.41st, Page.568 (2007.03.15)	2007	国内	河川	急性毒性	-	-	-	-	-	有

番号	和文標題 (原文が英文のものは仮訳)	著者名	資料名	巻号ページ	年	国内/海外	対象水域	試験法の概要					生態影響の検出又はその原因に関する言及の有無	
								試験対象毒性	試験水の濃縮	試験生物種(該当に「」)				
										藻類	無脊椎動物	魚類		その他
13	都市水環境における水質評価手法に関する調査	鈴木穰, 北村清明, 北村友一, 原田新(土木研)	下水道関係調査研究年次報告書集 JST資料番号: G0037C ISSN: 0386-5878	Vol.2006, Page.163-168 (2007.10)	2007	国内	湖沼	急性毒性	-		-	-	-	有
14	1連のバイオアッセイを使った2つの日本河川における生物学的安全性指標の適用	WEI Dongbin, DU Yuguo, WEI Dongbin, KAMEYA Takashi, URANO Kohei	Chemosphere	Vol.72, No.9, Page.1303-1308	2008	国内	河川	急性毒性、慢性毒性	有		(ミジンコ)	-	-	有
15	生理活性物質の水環境中での挙動と生態系影響の評価方法に関する研究	鈴木穰, 小森行也, 北村清明, 北村友一(土木研)	下水道関係調査研究年次報告書集 JST資料番号: G0037C ISSN: 0386-5878	Vol.2008, Page.131-143 (2009.11)	2009	国内	河川	その他(細菌試験)	有	-	-	-	-	有
16	都市水環境における水質評価手法に関する調査	鈴木穰, 北村清明, 岡安祐司, 北村友一(土木研)	下水道関係調査研究年次報告書集 JST資料番号: G0037C ISSN: 0386-5878	Vol.2008, Page.152-158 (2009.11)	2009	国内	河川	急性毒性 その他(細菌試験)	有		-	-	-	有
17	生態影響試験による河川水のリスク評価と化学物質濃度の比較	三島聡子, 大塚知泰, 長谷川敦子, 斎藤和久(神奈川県環境科セ)	環境化学討論会講演要旨集 JST資料番号: L3491A	Vol.19th, Page.192-193 (2010.06.20)	2010	国内	河川	急性毒性	-		(ミジンコ)	-	-	有
18	中国の淮河で採取した堆積物の芳香族縮合炭化水素や生態毒性試験	FU Jie, SHENG Sheng, WEN Teng, AN Shu Qing, ZHU Hai Liang, DING Yan Hua, LI Luo, CHEN Wu, YU Lu Ji	J Environ Monit	Vol.13, No.3, Page.597-604	2011	海外	河川	急性毒性、慢性毒性	-	-	(二枚貝)	-	-	有
19	都市水環境における水質評価手法に関する調査	南山瑞彦, 平山孝浩, 北村友一, 村山康樹, 鈴木穰, 北村清明	下水道関係調査研究年次報告書集	Vol.2010, Page.270-285 (2011.11)	2011	国内	河川	急性毒性	有		-	-	-	有
20	生活排水に汚染された河川水に対する短期慢性毒性試験	安田侑右, 米多佐織, 田村生弥, 駕田啓一郎, 中田典秀, 花本征也, 亀田豊, 木村久美子, 鎌迫典久, 山本裕史	土木学会論文集G(環境)	Vol.67, No.7, Page. 249-256 (2011)	2011	国内	河川	慢性毒性	-		(ミジンコ)	-	-	有
21	日本の酒匂川水系の生物学的安全性と底生大型無脊椎動物集団との間の関係の評価	KUBO Takashi (Joint Res. Center, Nagasaki Univ., JPN), WEI Dongbin (Res. Center for Eco-Environment Sciences, Chinese Acad. of Sciences, CHN), KISUNO Akira, YUSA Natsumi, KAMEYA Takashi, URANO Kohei (Graduate School of Environment and Information Sciences, Yokohama National Univ., JPN)	J Water Environ Technol (Web) JST資料番号: U0066A ISSN: 1348-2165	Vol.9, No.4, Page.381-389	2012	国内	河川	急性毒性	有		(ミジンコ)	-	-	有
22	水枠組み指令に関するプロキシとしての汚染された川のサイトの生態毒性評価:酸性鉱山排水事例研究	VIDAL Tania, PEREIRA Joana Luisa, SOARES Amadeu M V M, GONCALVES Fernando, ABRANTES Nelson	Water Air Soil Pollut	Vol.223, No.9, Page.6009-6023	2012	海外	河川	急性毒性、慢性毒性 その他(細菌試験)	-		(ミジンコ)	-	-	有
23	河川水中の医薬品類の存在実態と生態影響評価に関する研究	真野浩行, PARK Chang Beom, 北村友一, 鈴木穰(土木研)	日本水環境学会年会講演集 JST資料番号: S0264B	Vol.47th, Page.98 (2013.03.11)	2013	国内	河川	急性毒性	有		-	-	-	有
24	水生生物3種に対する短期慢性毒性試験を利用した河川水試料中の毒性原因物質群の特徴化	森田準平, 安田侑右, 田村生弥, 鎌迫典久, 山本裕史	土木学会論文集G(環境)	Vol.69, No.7, Page. 401-410 (2013)	2013	国内	河川	慢性毒性	-		(ミジンコ)	-	-	有
25	物理化学や生物学, 生態毒性試験を併用した河川の水質試験	SERPA Dalila, KEIZER Jan Jacob, CASSIDY Joana, CUOCO Ana, SILVA Vera, GONCALVES Fernando, CERQUEIRA Mario, ABRANTES Nelson	Environ Sci Process Impact	Vol.16, No.6, Page.1434-1444	2014	海外	河川	慢性毒性 その他(細菌試験)	-		(ミジンコ)	-	-	-

番号	和文標題 (原文が英文のものは仮訳)	著者名	資料名	巻号ページ	年	国内/海外	対象水域	試験法の概要					生態影響の検出又はその原因に関する言及の有無	
								試験対象毒性	試験水の濃縮	試験生物種(該当に「」)				
										藻類	無脊椎動物	魚類		その他
26	コンゴ民主共和国,Kwilu Ngongo川(コンゴ中央州)の河川堆積物と複数の魚類における微量金属の汚染	NGELINKOTO Patience, MALIANI Jeef, BULUKU Alain, MUBEDI Josue L, POTE John, THEVENON Florian, DEVARAJAN Naresh, BIRANE Niane, POTE John, DEVARAJAN Naresh, MUSIBONO Dieudonne	Toxicol Environ Chem	Vol.96, No.1 - 2, Page.48-57	2014	海外	河川	急性毒性	-	-	(ミジンコ)	-	-	有
27	イタリア国内Sarno川流域の土壌に混入する芳香族縮合炭化水素や有機塩素系農薬濃度の測定やDaphnia magnaによる生態毒性試験	ARIENZO Michele, ALBANESE Stefano, LIMA Annamaria, CANNATELLI Claudia, DE VIVO Benedetto, ALIBERTI Francesco, CICOTTI Flavia, QI Shihua	Environ Monit Assess	Vol.187, No.2, Page.52,1-14	2015	海外	河川	急性毒性	-	-	(ミジンコ)	-	-	有
28	Don川(ロシア)下流で採取した表層堆積物に混入する芳香族縮合炭化水素の分布と細菌lux式バイオセンサによる生態毒性試験	SAZYKIN I. S., SAZYKINA M. A., KHAMMAMI M. I., KOSTINA N. V., KHMELEVTSOVA L. E., TRUBNIK R. G.	Environ Monit Assess	Vol.187, No.5, Page.277,1-12	2015	海外	河川	その他(細菌試験)	-	-	-	-	-	有
29	ブラジル国内で採取した地表水や飲用水に混入するホルモン類の検出やDaphnia magnaによる生態毒性試験	TORRES Nadia Hortense, TORNISIELO Valdemar Luiz, AGUIAR Mario Mamede, FERREIRA Luiz F. R., CAVALCANTI Eliane Bezerra, AMERICO Juliana Heloisa Pine, MACHADO Angela Maria	Environ Monit Assess	Vol.187, No.6, Page.379,1-13	2015	海外	河川	急性毒性	-	-	(ミジンコ)	-	-	有
30	水生生物における泡消火剤の生態毒性から学ぶ:組成の異なる水で飼育されたミドリゾウリムシ及びメダカに対するアルキルスルホン酸ナトリウム生態毒性の変動	GOTO Kaishi, TAKAICHI Hiroshi, KAWANO Tomonor	J Disaster Res	Vol.10, No.4, Page.604-612	2015	国内	河川	急性毒性	-	-	-	-	-	有

## 公共用水域を対象とした生物応答試験に関する報告事例(平成27年11月報告書紹介分)

本資料では、「生物応答を利用した排水管理手法の活用について」(平成27年11月生物応答を利用した水環境管理手法に関する検討会報告書)で紹介されている標題の事例について整理している

番号	文献名	著者、発行年等	生物応答試験の概要	試験対象水域	試験結果の概要	備考
1	水生生物3種を用いた全国一級河川の短期慢性毒性試験 (土木学会論文集G(環境), 68(7): 217- 225)	森田隼平, 安田侑右, 鷲田啓一郎, 田村生弥, 鐘迫典久, 山本裕史(2012) (著者の所属: 徳島大学大学院又は国立環境研究所)	【試験対象毒性(試験項目)】 ・短期慢性毒性試験  【試験生物種・試験方法】 ・藻類(ムレミカツキモ)成長阻害試験 ・甲殻類(ニセネコゼミジンコ)繁殖阻害試験 ・魚類(ゼブラフィッシュ)胚・仔魚期短期毒性試験  【希釈の有無等】 有(3濃度区: 25%、50%、95%(藻類)又は100%(ミジンコ、魚類))	河川水 (一級河川の環境基準点28地点)  ・北海道2地点 ・東北4地点 ・関東5地点 ・中部3地点 ・近畿5地点 ・中国、四国6地点 ・九州3地点	【生態毒性試験結果】 ・藻類生長阻害試験 4地点の試料で影響を検出 ・ミジンコ繁殖阻害試験 8地点の試料で影響を検出 ・魚類胚・仔魚期短期毒性試験 5地点の試料で孵化率や致死率への影響を検出  【毒性原因についての推定】 ・原因物質及び発生源は未特定	【採水時期】 ・平成23年10月～平成24年4月
2	バイオアッセイによる河川水の生態影響評価 (第34回神奈川県市環境・公害研究合同発表会(平成22年6月4日開催))	三島聡子, 大塚知素, 齋藤和久(2010) (著者の所属: 神奈川県環境科学センター)	【試験対象毒性(試験項目)】 ・短期慢性毒性及び急性毒性  【試験生物種・試験方法】 ・藻類生長阻害試験 ・ミジンコ繁殖阻害試験 ・魚類(メダカ)急性毒性試験 (藻類、ミジンコは生物種情報なし)  【希釈の有無等】 無(無希釈)	河川水 ・スクリーニング調査: 神奈川県内河川下流域18地点 ・詳細調査: 2河川(多種多様な化学物質の流入が想定される河川: 8地点、流域に水田の多い河川: 5地点。)  18地点のスクリーニング調査地点の結果、銅、亜鉛の藻類及びミジンコ毒性値が環境中化学物質濃度/毒性値0.1であった河川において詳細調査を実施。	【生態毒性試験結果】 ・スクリーニング調査結果: 影響なし ・詳細調査結果: 2河川ともミジンコ遊泳阻害を検出。  【毒性原因についての推定】 ・原因物質及び発生源は未特定 (重金属及び農薬を合計した(環境中化学物質濃度/毒性値)の影響が認められ、うち銅の環境中濃度/毒性値が大きな割合を占めていると考察。)	【採水時期】 ・スクリーニング調査: 平成19年11～12月、平成20年7月 ・詳細調査: 8地点(平成20年12月、平成21年7月)、5地点(平成21年6月(農薬散布期))  【同時化学分析】 ・有機スズ、アルキルフェノール類、農薬(39物質)、重金属(11物質)、界面活性剤等(5物質)
3	河川水中化学物質による生態影響の評価 (神奈川県環境科学センター研究報告第35号(2013))	三島聡子, 大塚知素, 長谷川敦子, 齋藤和久(2013) (著者の所属: 神奈川県環境科学センター)	【試験対象毒性(試験項目)】 ・短期慢性毒性及び急性毒性  【試験生物種・試験方法】 ・藻類生長阻害試験 ・ミジンコ繁殖阻害試験 ・魚類(メダカ)メダカ急性毒性試験 (藻類、ミジンコは生物種情報なし)  【希釈の有無等】 無(無希釈)	河川水 ・スクリーニング調査: 神奈川県内河川下流域18地点(文献2と同じ) ・詳細調査: 2河川(文献2と同じ)	【生態毒性試験結果】 ・スクリーニング調査結果: 影響なし ・詳細調査結果 2河川でミジンコ遊泳阻害を検出 1河川で藻類生長阻害を検出  【毒性原因についての推定】 ・多種多様な化学物質の流入が想定される河川: 不明(毒性試験と(環境中化学物質濃度/毒性値)の相関なし) ・流域に水田の多い河川: ミジンコ遊泳阻害は殺虫剤、藻類生長阻害は除草剤の影響を推定	【採水時期】 ・スクリーニング調査: 平成19年11～12月、平成20年7月(文献2と同じ) ・詳細調査: 小出川8地点(平成20年12月、平成21年7月)、金目川4地点(平成21年6月(農薬散布期))  【同時化学分析】 アルキルフェノール類、界面活性剤(5物質)、農薬(38物質)、重金属(11物質)

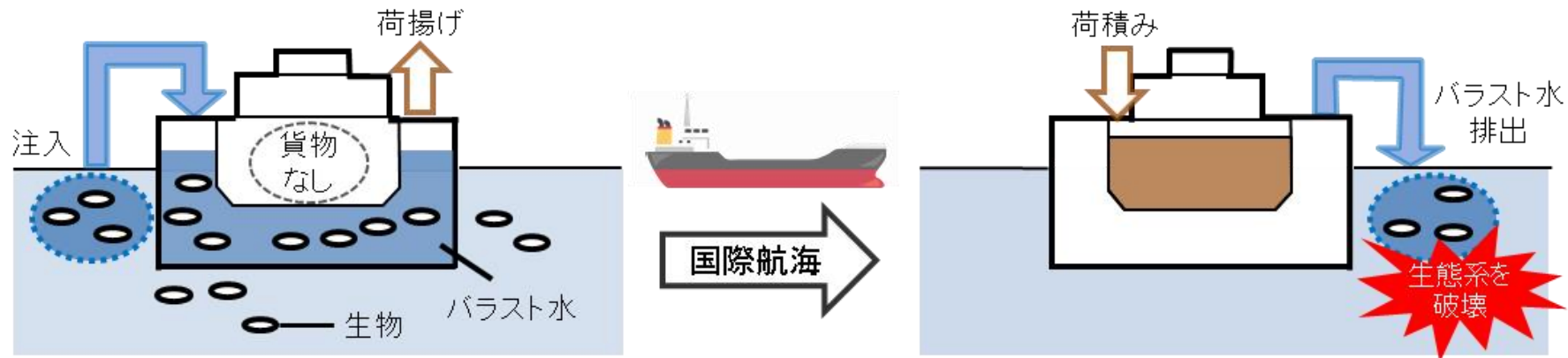
番号	文献名	著者、発行年等	生物応答試験の概要	試験対象水域	試験結果の概要	備考
4	バイオアッセイによる目久尻川の水質評価 (第38回神奈川県環境研究合同発表会)	大塚知泰, 石割隼人, 三島聡子, 長谷川敦子(2014) (著者の所属: 神奈川県環境科学センター)	【試験対象毒性(試験項目)】 ・短期慢性毒性試験  【試験生物種・試験方法】 ・藻類生長阻害試験(生物種情報なし) ・ミジンコ繁殖阻害試験  【希釈の有無等】 無(無希釈)	河川水(過去に原因不明の魚の斃死の水質事故が発生した神奈川県内の河川(文献2及び3とは異なる河川))	【生態毒性試験結果】 ・藻類: 阻害影響検出なし ・ミジンコ: 遊泳阻害を検出(季節変動あり)  【毒性原因についての推定】 ・同時に測定した化学物質濃度は全てミジンコに対する毒性値未満 ・化学物質単独によるものではなく他の要因による可能性があると推定	【採水時期】 ・平成24年5月、6月、7月 ・平成25年5月、6月、7月 ・平成26年1月  【同時化学分析】 TOC、農薬110物質、重金属19物質を同時に分析
5	事業所排水の生態毒学的評価: 毒性原因物質の特徴化と放流先河川への影響 (環境化学, 25(1), 19-26)	板津靖之, 高野智弘, 金俊, 福富真美子, 楠井隆史(2015) (著者の所属: 富山県立大学)	【試験対象毒性(試験項目)】 ・短期慢性毒性試験  【試験生物種・試験方法】 ・藻類(ムレミカツキモ)生長阻害試験 ・甲殻類(ニセネコゼミジンコ)繁殖阻害試験 ・魚類(ゼブラフィッシュ)胚・仔魚期短期毒性試験  【希釈の有無等】 有(5濃度区: 5%、10%、20%、40%、80%)	・富山県内5事業場排水(うち2事業場の) ・1事業場の放流先河川水(4地点)	【生態毒性試験結果】 ・5事業場排水の全てで3種の生物種への影響を検出。 ・甲殻類、藻類に比較的強い影響(甲殻類では全ての場合TU>20、最大で>320) ・河川水では事業場上流2地点では影響なし。下流2地点では藻類、甲殻類への影響を検出。  【毒性原因についての推定】 ・2事業場排水について毒性原因物質の追跡調査を実施。一方の事業場では重金属、もう一方の事業場ではアンモニアの部分的な寄与を推定。	【採水時期】 ・事業場排水: 平成25年8月 ・河川水: 平成25年11月下旬  【参考情報】 ・5事業場とも水質汚濁防止法の一般排水基準には適合

# 船舶バラスト水規制管理条約における 生物応答(WET)試験について



# 船舶バラスト水規制管理条約について①

## 背景



バラスト水(船舶の安定のために取り入れる海水等)に含まれる生物が、バラスト水とともに本来の生息地ではない外国で排出されることにより、生態系破壊等の**環境問題が顕在化**

・国際海事機関(IMO)において、生態系破壊等を防止するため、バラスト水規制管理条約を採択(平成16年(2004年)2月)

## 世界での被害例



ゼブラガイによる発電所被害  
(1989~2000 米国・五大湖)



中国モクズガニによる漁業被害  
(1910年代~ 欧州・ドイツ、バルト海)



ムラサキイガイによる漁業被害  
(1970年代~ 日本・広島湾等)



ワカメによる貝類養殖被害  
(1980年代後半~ オーストラリア、北米大陸太平洋岸) 2

# 船舶バラスト水規制管理条約について②

## ■ 正式名称

International Convention for the Control and Management of Ship's Ballast Water and Sediments, 2004  
(2004年の船舶のバラスト水及び沈殿物の規制及び管理のための国際条約)

## ■ 目的

船舶バラスト水を適切に管理し、バラスト水を介した有害水生生物及び病原体の移動を防止、最小化、最終的には除去することにより、海洋環境保護、生物多様性の保持等を図ること。

## ■ 採択・発効要件

採択： 2004年(平成16年)2月

発効要件： **30カ国以上**の国が批准し、かつ、その合計商船船腹量が世界の全商船船腹量の**35%以上**となった日の**12ヶ月後**

現状： 締結国数 **54カ国**、合計商船船腹量 **53.41%** (2017年3月14日時点) (**日本は締結済**) (2017年9月8日発効)

## ■ 主な規制内容

### ● バラスト水管理の実施

船舶の建造時期及び大きさに応じ、**排出基準を満たすバラスト水処理**を義務化。(排出基準適用開始までは、バラスト水交換でも可。)

＜バラスト水排出基準＞

対象生物		排出濃度(生存個数)
50 $\mu$ m以上の生物 (主として動物プランクトン)		10個/m <sup>3</sup> 未満
10~50 $\mu$ mの生物 (主として植物プランクトン)		10個/ml未満
細菌	病毒性コレラ (O1及びO139)	1 cfu/100ml未満 又は、動物プランクトン1g当たり 1cfu未満
	大腸菌	250 cfu/100ml未満
	腸球菌	100 cfu/100ml未満

cfu : colony forming unit (群体形成単位)

● 締約国間で規制の免除を行うためのリスクアセスメント

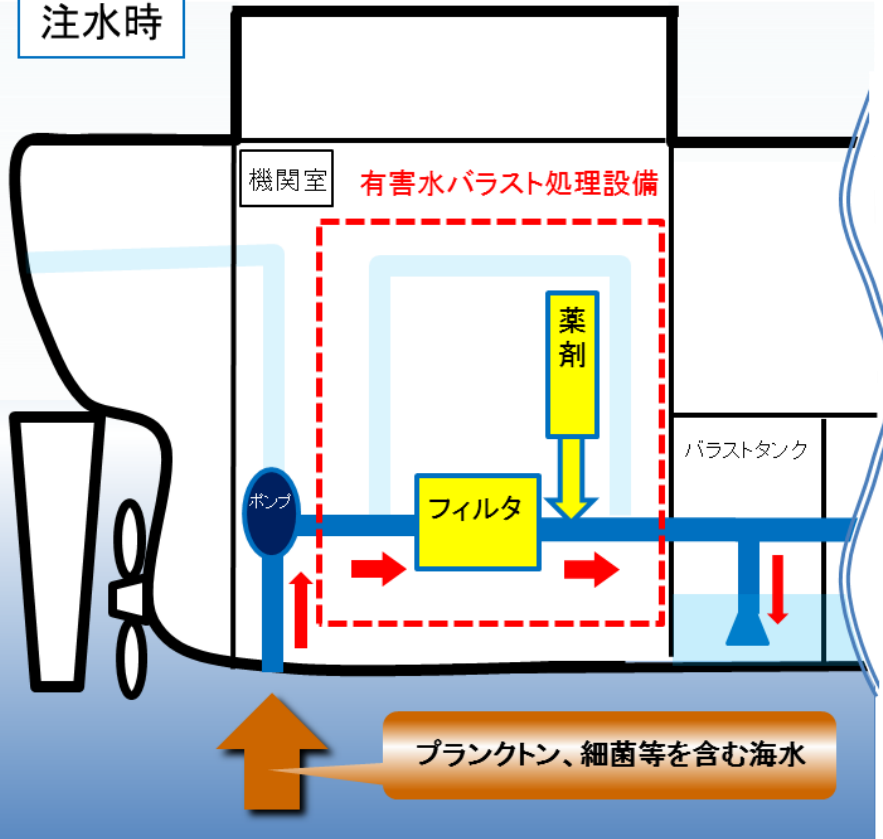
● 日本周辺でバラスト水交換を可能とする海域の指定

● 化学物質等を用いたバラスト水を処理する装置の承認 等

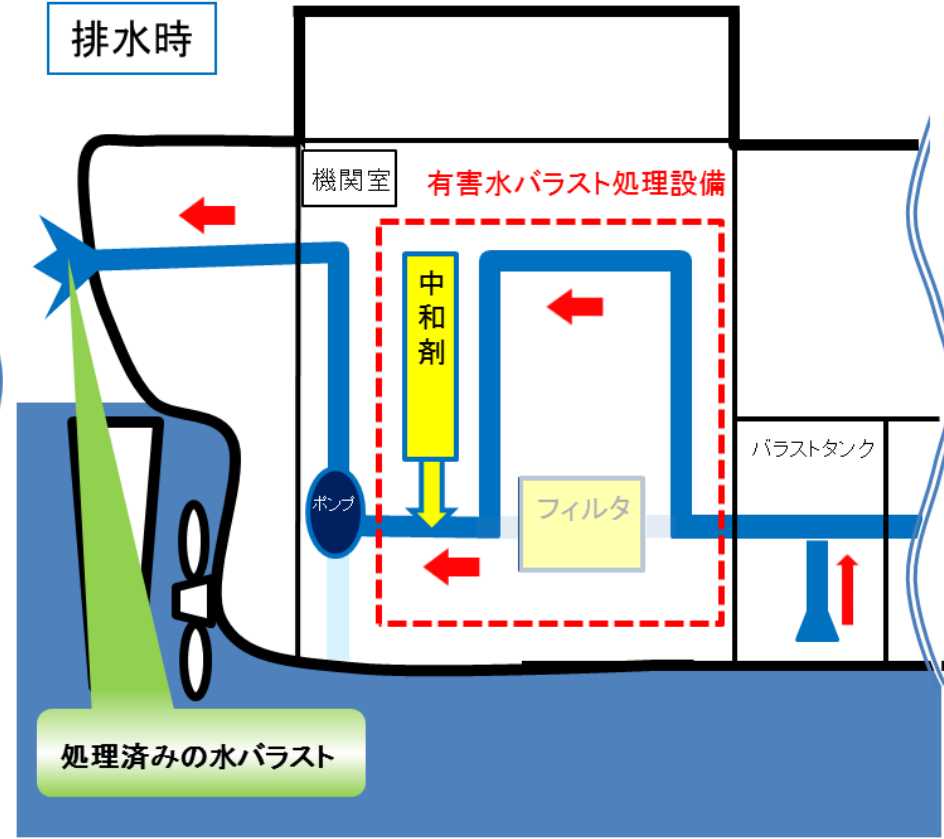
# 有害水バラスト処理設備について

## 有害水バラスト処理設備の一例

注水時



排水時



大型プランクトン等はフィルタにより取り除き、小型プランクトン、細菌類は薬剤、紫外線等により殺滅

中和剤を投入して無害化

# IMOが作成したガイドラインにおける生物応答（WET）試験

- 薬剤等を用いた有害水バラスト処理設備については、条約において、IMOが作成したガイドラインに基づき、IMOにより承認されなければならないこととされている。
- IMOのガイドラインにおいては、処理後のバラスト水の生態毒性に関して、申請者に対し、複数の試験生物種（魚類、無脊椎動物及び植物（藻類））に係る急性毒性・慢性毒性両方のWET試験データの提出を求めている。また、試験データには、感受性の高い生活段階における慢性試験法のデータを含めることを求めている。
- 処理設備の申請に際し必要となるデータの情報収集に関するメソドロジーにおいて、試験法として推奨されているものは、下記のとおり

	推奨試験法
急性毒性	<ul style="list-style-type: none"><li>・OECDテストガイドライン201(藻類)</li><li>・ " 202(ミジンコ)</li><li>・ " 203(魚類)</li><li>・米国環境保護庁(US EPA)のエビ類急性毒性試験</li><li>・ISOで作成された藻類、ミジンコ、魚類に係る試験法</li></ul>
慢性毒性	<ul style="list-style-type: none"><li>・OECDテストガイドライン210、212、215(魚類)</li><li>・ " 211(ミジンコ)</li><li>・US EPA、ISOで作成された試験法</li></ul>

※1 エンドポイントは、亜致死(成長)と致死の両方を含むことが望ましいとされている。

※2 淡水生物(淡水)試験と海産生物(海水)試験は、いずれかを実施することとされている。なお、個別の事例でいずれか一方の生物が他より感受性が高いことが実証される場合には、この点を考慮すべきとしている。

出典: バラスト水処理システム承認に関する一般的なガイドラインの手続き(G8)[MEPC.174(58)]

活性物質を使用するバラスト水処理システム承認に関するガイドラインの手続き(G9)[MEPC.169(57)]

Methodology for information gathering and conduct of work of the GESAMP-BMWG [BWM.2/Circ.13/Rev.3, 28 May 2015]

# 平成28年度パイロット事業の試験データを用いた 急性毒性と慢性毒性の検出率比較

※本資料には、平成28年度パイロット事業<sup>1</sup>で実施した短期慢性試験から、急性毒性(致死に関わるエンドポイント)に該当する部分を抽出し、影響がどの程度みられたのか比較を行ったデータを掲載している。(平成29年11月末時点)

<sup>1</sup> 平成28年度パイロット事業について

- ・事業の目的等 <http://www.env.go.jp/press/102994.html>
- ・実施内容・結果の概要 <http://www.env.go.jp/water/seibutsu/conf/05/mat01.pdf>

# 急性毒性と慢性毒性の比較

- 短期慢性毒性試験の実施結果(対象:14事業場(A~N))より、諸外国で用いられている急性毒性試験(下表)に該当する部分を抽出し、急性毒性として再評価
- 最高濃度80%で影響が検出されたを比較する

表 抽出に用いた急性毒性試験の試験条件

	試験期間	供試個体数	エンドポイント	参照試験法	慢性試験からの評価
魚類胚急性毒性試験	48h	1/穴×10 (24穴プレート)	致死率 <sup>1</sup> (LC50)	ドイツ、 ISO15088	48h時点の受精卵 (15個×4)の死亡率をみる
ミジンコ急性毒性試験	48h	5/容器 ×4	致死率 (LC50)	米国WET、 OECD TG202	48h時点の親ミジンコ (10個体)の死亡率をみる
藻類生長阻害試験	72h	5000 cells/mL	生長阻害 (EC50)	OECD TG201	50%阻害濃度 (EC50)を算出 <sup>2</sup>

<sup>1</sup> 胚の凝集、尾部剥離、心拍なしがみられた個体を死亡とみなす

<sup>2</sup> 化審法では急性毒性としてEC50、慢性毒性としてNOECを影響値として用いる。

# 急性毒性と慢性毒性：魚類試験

事業場 ID	急性毒性 (Day2 生存率)			慢性毒性 (Day 8)	
	LC50 (%)	TUa =100/LC50	80%濃度で の死亡率	NOEC (%)	TUc =100/NOEC
A	>80	NA	0	80	1.25
B	>80	NA	0	40	2.5
C	>80	NA	0	80	1.25
D	>80	NA	0	80	1.25
E	>80	NA	0	80	1.25
F	>80	NA	2%	80	1.25
G	>80	NA	0	80	1.25
H	>80	NA	3%	80	1.25
I	>80	NA	0	80	1.25
J	>80	NA	2%	80	1.25
K	>80	NA	2%	80	1.25
L	>80	NA	0	80	1.25
M	>80	NA	0	80	1.25
N	>80	NA	0	80	1.25

黄色の網掛けは最高濃度80%で影響が示されたもの(急性:80%濃度で死亡率が20%以上、慢性:TUc>1.25)を示す

# 急性毒性と慢性毒性：ミジンコ試験

事業場ID	急性毒性：親ミジンコの死亡率							慢性毒性：産仔数	
	Day 2 (48h)				試験終了時				
	LC50 (%)	95%信頼区間(%)	TUa	80%濃度での死亡率	LC50 (%)	95%信頼区間(%)	TUa	NOEC (%)	TUc =100/NOEC
A	>80	-	NA	0%	>80	-	NA	80	1.25
B	80	58.8-109	1.25	50%	43.3	算出不可	2.3	5	20
C	>80	-	NA	0%	>80	-	NA	40	2.5
D	>80	-	NA	0%	>80	-	NA	40	2.5
E	>80	-	NA	0%	18.9	13.6-26.2	5.3	5	20
F	>80	-	NA	0%	>80	-	NA	5	20
G	>80	-	NA	20%	67.8	算出不可	1.5	10	10
H	80	58.8-109	1.25	50%	22	8.0-60.8	4.5	<5	>20
I	>80	-	NA	0%	>80	-	NA	20	5
J	>80	-	NA	0%	>80	-	NA	5	20
K	56.6	47.6-67.3	1.8	100%	57	算出不可	1.8	20	5
L	>80	-	NA	0%	>80	-	NA	80	1.25
M	>80	-	NA	20%	>80	-	NA	40	2.5
N	>80	-	NA	0%	>80	-	NA	80	1.25

TUa=100/LC50、NA: Not available(算出なし)

黄色の網掛けは最高濃度80%で影響が示されたもの(急性:80%濃度で死亡率が20%以上、慢性:TUc>1.25)を示す



# 急性毒性と慢性毒性：藻類試験

事業場 ID	急性毒性			慢性毒性	
	EC50 (%)	95%信頼 区間(%)	TUa =100/EC50	NOEC (%)	TUc =100/NOEC
A	58.7	57.5-59.9	1.7	10	10
B	65.6	63.7-67.6	1.5	5	20
C	>80	—	NA	<1.3	>20
D	>80	—	NA	5	20
E	>80	—	NA	<5	>20
F	>80	—	NA	80	1.25
G	(7.16)	(7.11-7.21)	14.0	<5	>20
H	>80	—	NA	20	5
I	>80	—	NA	80	1.25
J	>80	—	NA	80	1.25
K	>80	—	NA	10	10
L	>80	—	NA	5	20
M	>80	—	NA	<5	>20
N	>80	—	NA	5	20

NA: 算出不可、事業場Gは排水5%、10%のみから算出した参考値

黄色の網掛けは最高濃度で影響が示されたもの(急性: TUa ≥ 1、慢性: TUc > 1.25)を示す

# 急性毒性と慢性毒性の影響検出率まとめ

今回の抽出条件における影響検出率  
(影響※を示した事業場の数/全14事業場)

	急性毒性	慢性毒性
魚類	0/14 (0%)	1/14 (7%)
ミジンコ	5/14 (36%)	11/14 (79%)
藻類	3/14 (21%)	11/14 (79%)

- ※以下のケースのとき、最高濃度80%で影響ありとした
- 急性毒性: 最高濃度80%において死亡率 $\geq 20\%$ 、または  $TU_a = 100/EC_{50} \geq 1$
  - 慢性毒性:  $TU_c = 100/NOEC > 1.25$  ( $NOEC < 80\%$ )

## 水生生物保全環境基準に関する中央環境審議会答申の関連記述（抜粋）

特に関連すると思われる箇所は下線を付している。

### 1. 水生生物の保全に係る水質環境基準の設定について（答申）（平成 15 年 9 月 12 日中央環境審議会）（抜粋）

#### 4. 水生生物の保全に係る水質目標

この項では、環境基準等の水質目標の設定にあたり、その基本的考え方をまず示した上で、目標値導出についての詳細を述べる。

##### （1）水質目標の設定に当たっての基本的考え方

水生生物保全の観点からの水質目標の設定は、諸外国の環境保全行政において採用されている考え方を参考に、我が国の水生生物を保全する環境管理施策を適切に講じる観点から行うこととする。

##### 目指すべき保全の水準

水生生物の保全に係る水質目標では、公共用水域における水生生物の生息の確保という観点から世代交代が適切に行われるよう、水生生物の個体群レベルでの存続への影響を防止することが必要であることから、特に感受性の高い生物個体の保護までは考慮せず、集団の維持を可能とするレベルで設定するものとする。

また、目標値は、水質による水生生物への影響（リスク）を未然に防止する観点から環境水中の濃度レベルを導出するものとし、水生生物にとっての「最大許容濃度」や「受忍限度」といったものではなく、維持することが望ましい水準として設定することが適当である。

目標を最大許容限度及び受忍限度として採る場合には、その限度までは汚染することもやむを得ない、あるいは、その限度まで我慢しなければならない水準となるし、またその限度を超えるならば直ちに水生生物にある程度以上の影響を及ぼすという性格を持つ。環境基準等の水質目標は、水生生物の集団維持の最低限度としてではなく、より積極的にこの保護を図るという観点の性格を持つべきである。

このため、この数値を超える水域であっても、直ちに水生生物にある程度以上の影響を及ぼすといった性格をもつものではない。

##### 目標値の導出

水生生物の生息は、開発行為による生息場の消失等の多様な要因によって影響を受け

ることから、化学物質の生態系への影響の程度を実環境において定量的に分離・特定することは困難である。したがって、目標値を導出するためには、個別物質ごとに代表的な生物種について、半数致死濃度等（毒性値）に係る再現性のある方法によって得られたデータをもとに、試験生物への毒性発現が生じないレベルを確認し、その結果に、種差等に関する科学的根拠を加味して演繹的に求めることが適当である。

化学物質については、毒性の程度はもとより、その数や環境への排出の形態、環境中の挙動、影響に至るメカニズム、発現する影響の内容が物質ごとに大きく異なるため、環境中に排出されうる物質ごとに検討するものとする。

水生生物の保全の観点からは、当該水域に生息する魚介類の餌となる生物の個体数に影響が出れば、当該水域に生息する魚介類の生息にも影響が生じることから、評価対象とする生態影響は、魚介類及び餌生物双方の生息に直接関係する、死亡、成長・生長、行動、忌避、繁殖、増殖等の影響内容に関するものとする。

また、公共用水域において通常維持されるべき水質の水準を検討するものであることから、基本的に慢性影響の観点から目標値を導出することが妥当である。また、科学的知見に基づき、同一区分内の生物種による感受性の相違等を考慮することにより、同一区分内で最も感受性が高い生物種に影響を及ぼさない濃度を目標値として導出することとする。

#### 対象とする試験生物及び水域区分

目標値は科学的根拠に基づいて設定する必要があることから、我が国に生息する魚介類及びその餌生物等に係る化学物質の用量反応関係に関する既存試験結果の中から、科学的に信頼性のおける文献のみを収集・評価し、利用することが妥当である。また、魚介類のみならず、餌生物についても評価の対象とする。

水生生物については、淡水域及び海域でそれぞれ生息する種も異なり、また、化学物質の毒性発現についても異なると考えられることから、まず大きく主たる生息域によって淡水域と海域に区分するものとする。

淡水域については、河川と湖沼での生息種を明確に区分することは困難であるため、河川と湖沼と区別せず淡水域として一括するものとする。他方、淡水域に生息する魚介類が冷水域と温水域では異なっていることから、淡水域の生息域を水温を因子として2つに区分することが適当である。ただし、通し回遊魚については、主たる生息域で区分することが適当である。

海域については、生息域が広範にわたり、生息域により水生生物をグルーピングすることは困難であることから、当面、一律の区分とすることが適当である。

なお、淡水域・海域とも、特に、産卵場及び感受性の高い幼稚仔等の時期に利用する水域についてはより厳しい目標をあてはめることがあり得るものである。

## (2) 目標値の導出方法

### エ．目標値導出の手順等

評価対象となる毒性試験結果を、水域区分ごとに魚介類とその餌生物に分類し、魚介類に慢性影響を生じないレベルとして算出される「最終慢性毒性値(魚介類)」と餌生物が保全される「最終慢性毒性値(餌生物)」の小さい方の数値を採用し、目標値とする。

目標値は、慢性影響の観点から設定するものであることから、原則として信頼できる慢性毒性値のみを目標値の導出に用いるものとし、信頼できる慢性毒性値が得られない場合には、米国EPAにおいて利用されている手法と同様に、信頼できる急性毒性試験結果に、急性慢性毒性比(急性毒性値と慢性毒性値との比)を用いて慢性毒性値を求めるものとする。

急性慢性毒性比は、魚類、甲殻類及び藻類の急性慢性毒性比に係るこれまでの知見、当該評価対象物質について得られている毒性試験結果から導出可能な急性慢性毒性比等を総合的に勘案し、専門家の判断により、適切な値を用いることとする。

また、急性毒性及び慢性毒性双方の信頼できる試験結果が得られている場合は、急性毒性試験結果は用いない。なお、目標値の導出にあたっては、魚介類は水産資源としての重要性があることから、少なくとも淡水域・海域それぞれについて1種以上の魚介類の信頼できる毒性値が得られていることを必要条件とする(魚介類の信頼できる毒性値がいずれの水域においても得られない場合には、目標値は導出しない)。

#### i)最終慢性毒性値(魚介類)の算出

同一水域区分内の魚介類に係る毒性試験結果から得られる慢性毒性値の最小値に着目して最終慢性毒性値を導出する。

毒性試験結果が得られた魚介類が、当該水域区分において最も感受性が強いとは限らないことから、最終慢性毒性値に種比を用いて目標値を導出するものとする。

種比は、最終慢性毒性値の導出に用いた毒性試験の生物種、信頼できる毒性試験結果の数、試験結果間のばらつき(例:OECDテストガイドライン推奨種等、毒性データが多い種の毒性値のばらつき)、対象物質の蓄積性等を総合的に勘案し、専門家の判断の上で決定する。

なお、脆弱な個体までの保護を目的とするものではないことから、いわゆる安全係数

は適用しない。

2 .水生生物の保全に係る水質環境基準の項目追加等について(第1次答申)(平成24年3月中央環境審議会)(抜粋)

2 基本的考え方

(3) 水生生物の保全に係る水質目標の設定の考え方

2) 目標値の導出方法

エ. 目標値の導出

評価対象となる試験結果を、類型区分ごとに魚介類とその餌生物に分類し、魚介類に慢性影響を生じないレベルとして算出される「無影響導出値(魚介類)」と餌生物が保全される「無影響導出値(餌生物)」を算出する。

「無影響導出値」の算出には、原則として、慢性影響の観点から信頼できる試験より得られた影響を生じない濃度(以下、「無影響濃度」という。)を用いるものとする。

ただし、慢性影響の観点での信頼できる試験結果がない場合は、適切な推定法を用いて無影響濃度を推定するものとする。無影響濃度を推定する場合は、魚介類及びその餌生物に係るこれまでの知見、検討対象物質について得られている毒性試験結果等を総合的に勘案し、専門家の判断により、急性慢性毒性比(急性毒性値と慢性毒性値との比)など適切な値(推定係数)を用いることとする。

i) 無影響導出値(魚介類)の算出

各類型区分内において魚介類に係る無影響濃度の最小値に着目して「無影響導出値(魚介類)」を算出する。

なお、得られた無影響濃度の最小値が、当該類型区分において最も感受性が高い魚介類を代表するものとは限らないことから、専門家の判断の上で、無影響濃度の導出に用いた試験法の種類、試験の生物種、試験結果のばらつき、対象物質の蓄積性等を総合的に勘案し、「無影響導出値(魚介類)」を算出するものとする。

なお、個体群の存続への影響を防止することを目指して設定するものであることから、いわゆる個体差を考慮した安全係数は適用しない。

ii) 無影響導出値(餌生物)の算出

餌生物については、一般的に魚介類が単一の生物のみを餌生物としているとは考えがたいこと等を考慮し、主たる生息域(淡水域と海域)において同属種ごとに無影響濃度の幾何平均値を算出し、その幾何平均値の最小値を「無影響導出値(餌生物)」とする。この際、慢性影響の観点から信頼できる試験より得られた無影響濃度の幾何平均値を優先する。

### iii) 目標値の導出

「無影響導出値(魚介類)」と「無影響導出値(餌生物)」の小さい方の数値を「無影響導出値」として採用する。

一般域の無影響導出値が特別域の値に比べて小さい場合においては、特別域の無影響導出値が慢性影響から得られたものであり、かつ、一般域の無影響導出値がその他の影響から推定された値の場合は特別域の値を一般域の無影響導出値とし、それ以外は一般域の値を特別域の無影響導出値として、目標値の導出に用いる。

## 3 検討結果

### (1) 目標値

ノニルフェノールの水質目標値の導出に当たっては、2の(3)の基本的考え方及び導出方法に則った。

ノニルフェノールの各類型での水質目標値と導出の根拠データは表1の通りである(有害性評価及び水質目標値導出過程は別紙参照)。

表1 ノニルフェノールの水質目標値と目標値導出の概要

水域	類型	水生生物の生息状況の適応性	目標値(μg/L)	目標値導出の概要
淡水域 (河川・湖沼)	生物A	イワナ、サケマス等比較的低温域を好む水生生物及びこれらの餌生物が生息する水域	1	ニジマス(代表種、全長約5cm稚魚)の4日間半数致死濃度(LC50)95.1μg/Lに基づいて、推定係数「10」、および、他種の毒性値が得られていないことから種比「10」で除して水質目標値とした。
	生物特A	生物Aの水域のうち、生物Aの欄に掲げる水生生物の産卵場(繁殖場)又は幼稚子の生育場として特に保全が必要な水域	0.6	ニジマス(代表種、胚から稚魚期)の初期生活段階試験により得られた成長への影響を及ぼさない無影響濃度(NOEC)6μg/Lに基づいて、他種の毒性値が得られていないことから、種比「10」で除して水質目標値とした。
	生物B	コイ、フナ等比較的高温域を好む水生生物及びこれらの餌生物が生息する水域	2	(「生物特B」の無影響導出値を「生物B」の水質目標値として採用。)
	生物特B	生物A又は生物Bの水域のうち、生物Bの欄に掲げる水生生物の産卵場(繁殖場)又は幼稚子の生育場として特に保全が必要な水域	2	メダカ(代表種、胚から稚魚期)の初期生活段階試験により得られた成長への影響を及ぼさない無影響濃度(NOEC)22μg/Lに基づいて、他種の慢性影響に対する毒性試験結果が得られていないことから、種比「10」で除して水質目標値とした。
海域	生物A	水生生物の生息する水域	1	マダイ(代表種、全長約2.5cm稚魚)の4日間半数致死濃度(LC50)118μg/Lに基づいて、推定係数「10」、および、他種の毒性値が得られていないことから種比「10」で除して水質目標値とした。
	生物特A	生物Aの水域のうち、水生生物の産卵場(繁殖場)又は幼稚子の生育場として特に保全が必要な水域	0.7	マダイ(代表種、全長約6.3mm仔魚)の2日間半数致死濃度(LC50)71μg/Lに基づいて、推定係数「10」、および、他種の毒性値が得られていないことから種比「10」で除して水質目標値とした。

3 .水生生物の保全に係る水質環境基準の項目追加等について(第2次答申)(平成24年12月中央環境審議会)(抜粋)

3 検討結果

(2) 環境基準項目等の検討

目標値を導出した4物質及び要監視項目3項目について、公共用水域要調査項目等の水質調査結果を用いて検討を行った。

1) 新たに目標値を導出した物質

直鎖アルキルベンゼンスルホン酸及びその塩

(略)全国的な環境管理施策を講じて、公共用水域における濃度の低減を図ることが必要であり、環境基準項目として設定することとする。

4-t-オクチルフェノール

(略)当面監視を行うこととし、その結果をもって全国的な環境管理施策の必要性を検討することが妥当であると考えられることから、要監視項目として設定することとする。

アニリン

(略)当面監視を行うこととし、その結果をもって全国的な環境管理施策の必要性を検討することが妥当であると考えられることから、要監視項目として設定することとする。

2,4-ジクロロフェノール

(略)当面監視を行うこととし、その結果をもって全国的な環境管理施策の必要性を検討することが妥当であると考えられることから、要監視項目として設定することとする。

別紙1-1 直鎖アルキルベンゼンスルホン酸及びその塩(LAS)の水質目標値の導出根拠

3. 水質目標値の導出

本項では、平成24年第一次答申「(参考5)水質目標値の導出手順について」に従い、目標値の導出に利用できるとされた毒性値(表5)に基づいて、LASの水質目標値を検討した。



### 3) 水質目標値の導出

各類型において、類型毎無影響導出値を水質目標値とする(表9)

表9 LASの水質目標値と目標値導出の概要

水域	類型	水生生物の生息状況の 適応性	目標値 ( $\mu\text{g/L}$ )	目標値導出の概要
淡水域 (河川・湖沼)	生物A	イワナ、サケマス等比較的低温域を好む水生生物及びこれらの餌生物が生息する水域	30	ニジマス(代表種、全長約5cm稚魚)の4日間半数致死濃度(LC <sub>50</sub> )3,000 $\mu\text{g/L}$ に基づいて、推定係数「10」、および、他種の毒性値が得られていないことから、種比「10」で除して水質目標値とした。
	生物特A	生物Aの水域のうち、生物Aの欄に掲げる水生生物の産卵場(繁殖場)又は幼稚仔の生育場として特に保全が必要な水域	20	ニジマス(代表種、胚から稚魚期)の初期生活段階試験により得られた成長への影響を及ぼさない無影響濃度(NOEC)150 $\mu\text{g/L}$ に基づいて、他種の毒性値が得られていないことから、種比「10」で除して水質目標値とした。
	生物B	コイ、フナ等比較的高温域を好む水生生物及びこれらの餌生物が生息する水域	50	メダカ(代表種、全長約2cm稚魚)の4日間半数致死濃度(LC <sub>50</sub> )4,600 $\mu\text{g/L}$ に基づいて、推定係数「10」、および、他種の毒性値が得られていないことから、種比「10」で除して水質目標値とした。
	生物特B	生物A又は生物Bの水域のうち、生物Bの欄に掲げる水生生物の産卵場(繁殖場)又は幼稚仔の生育場として特に保全が必要な水域	40	メダカ(代表種、胚から稚魚期)の初期生活段階試験により得られた成長への影響を及ぼさない無影響濃度(NOEC)389 $\mu\text{g/L}$ に基づいて、他種の慢性影響に対する毒性試験結果が得られていないことから、種比「10」で除して水質目標値とした。
海域	生物A	水生生物の生息する水域	10	マダイ(代表種、全長約5cm稚魚)の4日間半数致死濃度(LC <sub>50</sub> )1,300 $\mu\text{g/L}$ に基づいて、推定係数「10」、および、他種の毒性値が得られていないことから、種比「10」で除して水質目標値とした。
	生物特A	生物Aの水域のうち、水生生物の産卵場(繁殖場)又は幼稚仔の生育場として特に保全が必要な水域	6	マダイ(代表種、全長約7mm仔魚)の2日間半数致死濃度(LC <sub>50</sub> )550 $\mu\text{g/L}$ に基づいて、推定係数「10」、および、他種の毒性値が得られていないことから、種比「10」で除して水質目標値とした。

別紙1-2 4-t-オクチルフェノール(4(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノール)の水質目標値の導出根拠

### 3. 水質目標値の導出

本項では、平成24年第一次答申「(参考5)水質目標値の導出手順について」に従い、目標値の導出に利用できるとされた毒性値(表4)に基づいて、4-t-オクチルフェノールの水質目標値を検討した。

#### (3) 水質目標値の導出

各類型において、類型毎無影響導出値を水質目標値とする(表8)

表 8 4-*t*-オクチルフェノールの水質目標値と目標値導出の概要

水域	類型	水生生物の生息状況の 適応性	目標値 ( $\mu\text{g/L}$ )	目標値導出の概要
淡水域 (河川・湖沼)	生物 A	イワナ、サケマス等比較的低温域を好む水生生物及びこれらの餌生物が生息する水域	1	ニジマス（代表種、全長約 4cm 稚魚）の 4 日間半数致死濃度 ( $\text{LC}_{50}$ ) $131\mu\text{g/L}$ に基づいて、推定係数「10」、および、他種の毒性値が得られていないことから、種比「10」で除して水質目標値とした。
	生物特 A	生物 A の水域のうち、生物 A の欄に掲げる水生生物の産卵場（繁殖場）又は幼稚子の生育場として特に保全が必要な水域	0.7	ニジマス（代表種、胚から稚魚期）の初期生活段階試験により得られた成長への影響を及ぼさない無影響濃度 (NOEC) $7.2\mu\text{g/L}$ に基づいて、他種の毒性値が得られていないことから、種比「10」で除して水質目標値とした。
	生物 B	コイ、フナ等比較的高温域を好む水生生物及びこれらの餌生物が生息する水域	4	メダカ（代表種、全長約 2cm 稚魚）の 4 日間半数致死濃度 ( $\text{LC}_{50}$ ) $363\mu\text{g/L}$ に基づいて、推定係数「10」、および、他種の毒性値が得られていないことから、種比「10」で除して水質目標値とした。
	生物特 B	生物 A 又は生物 B の水域のうち、生物 B の欄に掲げる水生生物の産卵場（繁殖場）又は幼稚子の生育場として特に保全が必要な水域	3	メダカ（代表種、胚から稚魚期）の初期生活段階試験により得られた成長への影響を及ぼさない無影響濃度 (NOEC) $33.4\mu\text{g/L}$ に基づいて、他種の慢性影響に対する毒性試験結果が得られていないことから、種比「10」で除して水質目標値とした。
海域	生物 A	水生生物の生息する水域	0.9	マダイ（代表種、全長約 2 cm 稚魚）の 4 日間半数致死濃度 ( $\text{LC}_{50}$ ) $85.2\mu\text{g/L}$ に基づいて、推定係数「10」、および、他種の毒性値が得られていないことから種比「10」で除して水質目標値とした。
	生物特 A	生物 A の水域のうち、水生生物の産卵場（繁殖場）又は幼稚子の生育場として特に保全が必要な水域	0.4	マダイ（代表種、全長約 8mm 仔魚）の 2 日間半数致死濃度 ( $\text{LC}_{50}$ ) $44.4\mu\text{g/L}$ に基づいて、推定係数「10」、および、他種の毒性値が得られていないことから種比「10」で除して水質目標値とした。

別紙 1 - 3 アニリンの水質目標値の導出根拠

3. 水質目標値の導出

本項では、平成 24 年第一次答申「(参考 5) 水質目標値の導出手順について」に従い、目標値の導出に利用できることとされた毒性値(表 5)に基づいて、アニリンの水質目標値を検討した。

淡水域生物 A 及び生物特 A 並びに生物 B 及び生物特 B の水質目標値については、平成 15 年答申において、オオミジンコの慢性影響に対する毒性値から  $20\mu\text{g/L}$  という水質目標値が導出されている。今般の見直しにおいて、新たに信頼できる毒性情報として、オオミジンコの繁殖に対する毒性値(21 日 NOEC  $24.6\mu\text{g/L}$ )が得られたが、現行の水質目標値に比べて大きな値となっていることから、平成 15 年答申の水質目標値を引き続き目標値とすることが適当である。

海域生物 A 及び生物特 A の水質目標値については、新たに収集した信頼できる毒性情報から以下のとおり水質目標値を導出した。

(3) 水質目標値の導出

生物特 A の無影響導出値が生物 A を上回っていること、これらの値はいずれもその他の試験法から得られた値であることから、(参考 5) の手順 2 から、生物特 A の水質目標値は生物 A の値を採用する(表 9)

表 9 アニリンの水質目標値と目標値導出の概要

水域	類型	水生生物の生息状況の 適応性	目標値 ( $\mu\text{g/L}$ )	目標値導出の概要
淡水域 (河川・湖沼)	生物 A	イワナ、サケマス等比較的低温域を好む水生生物及びこれらの餌生物が生息する水域	20	平成 15 年答申での水質目標値
	生物特 A	生物 A の水域のうち、生物 A の欄に掲げる水生生物の産卵場(繁殖場)又は幼稚仔の生育場として特に保全が必要な水域	20	
	生物 B	コイ、フナ等比較的高温域を好む水生生物及びこれらの餌生物が生息する水域	20	
	生物特 B	生物 A 又は生物 B の水域のうち、生物 B の欄に掲げる水生生物の産卵場(繁殖場)又は幼稚仔の生育場として特に保全が必要な水域	20	
海域	生物 A	水生生物の生息する水域	100	マダイ(代表種、全長約 3cm の稚魚)の 4 日間半数致死濃度(LC <sub>50</sub> ) 12,700 $\mu\text{g/L}$ に基づいて、推定係数「10」、および、他種の毒性値が得られていないことから、種比「10」で除して水質目標値とした。
	生物特 A	生物 A の水域のうち、水生生物の産卵場(繁殖場)又は幼稚仔の生育場として特に保全が必要な水域	100	(海域「生物 A」の無影響導出値を「生物特 A」の水質目標値として採用。)

#### 別紙 1 - 4 2,4-ジクロロフェノールの水質目標値の導出根拠

##### 3. 水質目標値の導出

本項では、平成 24 年第一次報告「(参考 5) 水質目標値の導出手順について」に従い、目標値の導出に利用できることとされた毒性値(表 5)に基づいて、2,4-ジクロロフェノールの水質目標値を検討した。

水質目標値の検討は、魚介類による毒性値が得られていない「生物 B」と毒性情報が得られなかった海域の生物 A 及び特 A について行った。

##### (3) 水質目標値の導出

各類型において、無影響導出値を水質目標値とする(表 9)。

表9 2,4-ジクロロフェノールの水質目標値と目標値導出の概要

水域	類型	水生生物の生息状況の適応性	目標値 (μg/L)	目標値導出の概要
淡水域 (河川・湖沼)	生物A	イワナ、サケマス等比較的低温域を好む水生生物及びこれらの餌生物が生息する水域	30	平成15年答申での水質目標値
	生物特A	生物Aの水域のうち、生物Aの欄に掲げる水生生物の産卵場(繁殖場)又は幼稚仔の生育場として特に保全が必要な水域	3	
	生物B	コイ、フナ等比較的高温域を好む水生生物及びこれらの餌生物が生息する水域	30	メダカ(代表種、被鱗体長約1.6cm)の4日間半数致死濃度(LC <sub>50</sub> )3,400μg/Lに基づいて、推定係数「10」、および、他種の毒性値が得られていないことから、種比「10」で除して水質目標値とした。
	生物特B	生物A又は生物Bの水域のうち、生物Bの欄に掲げる水生生物の産卵場(繁殖場)又は幼稚仔の生育場として特に保全が必要な水域	20	平成15年答申での水質目標値
海域	生物A	水生生物の生息する水域	20	マダイ(代表種、全長約3cm稚魚)の4日間半数致死濃度(LC <sub>50</sub> )1,890μg/Lに基づいて、推定係数「10」、および、他種の毒性値が得られていないことから、種比「10」で除して水質目標値とした。
	生物特A	生物Aの水域のうち、水生生物の産卵場(繁殖場)又は幼稚仔の生育場として特に保全が必要な水域	10	マダイ(代表種、全長約9mm仔魚)の2日間半数致死濃度(LC <sub>50</sub> )1,400μg/Lに基づいて、推定係数「10」、および、他種の毒性値が得られていないことから、種比「10」で除して水質目標値とした。

諸外国における WET 試験の活用等に関する事例

別添 1 諸外国における WET 試験の活用事例について

別添 2 諸外国の排水に対する生物応答試験の結果の評価方法、試験頻度等の例

別添 3 米国における WET 試験を活用した排水改善（TRE）手法について

別添 4 米国 WET に係る制度を評価した文献の例



# 諸外国におけるWET試験の活用事例について

# ①米国



# WET導入の背景・経緯（米国）①

## 背景・経緯

- 1960年代まで：各地で水質汚染が深刻化  
→ 1970年：米国環境保護庁（EPA）が設立
- 1972年：連邦水質汚染防止法（Federal Water Pollution Control Act）の改正（改正法は「水質浄化法」（Clean Water Act）とも呼ばれる）により、全国汚染物質排水削減制度（National Pollutant Discharge Elimination System, NPDES）に基づく排水基準・排出認可制度を導入
- 1977年：水質浄化法において、個別汚染物質対策を強化
- 1987年：化学物質の個別規制では排水の潜在的なリスクの評価が十分でない場合を考慮し、WET試験による排水評価手法を排水監視ツールとして追加（個別物質規制と併用）。
- 1995年：NPDESの下でWETに係る要件が法規制として位置づけ。

### 背景・経緯（続き）

#### ● 生物応答試験が規制要件として追加された背景・経緯

- ・ NPDESに基づく排水基準・排出認可制度が導入された後の初期の頃、制度に位置付けられた化学物質に特化した（Chemical-Specific）管理を実施した場合であっても、受水域における水生生物（魚など）の致死や減少といった被害が発生。  
→ 国内の水質について、生物学的に健全なものに回復し、維持するために必要な水準に生態影響を低減できるよう、WET試験を導入
- ・ NPDESに基づく法規制要件へのWET試験の導入は、規制を行う者（許可権限者）と規制を受ける者（規制対象施設）に、WETに係る取組（モニタリング等）が広まってから行われた。
- ・ EPAによるWET試験の導入は、急性毒性試験から始まり、その後、許可権限者や規制対象施設における取組の進展状況を見つつ、慢性毒性試験の導入が進められた。

# 排水規制制度の概要、WETの位置付け（米国）

## 排水規制制度の概要

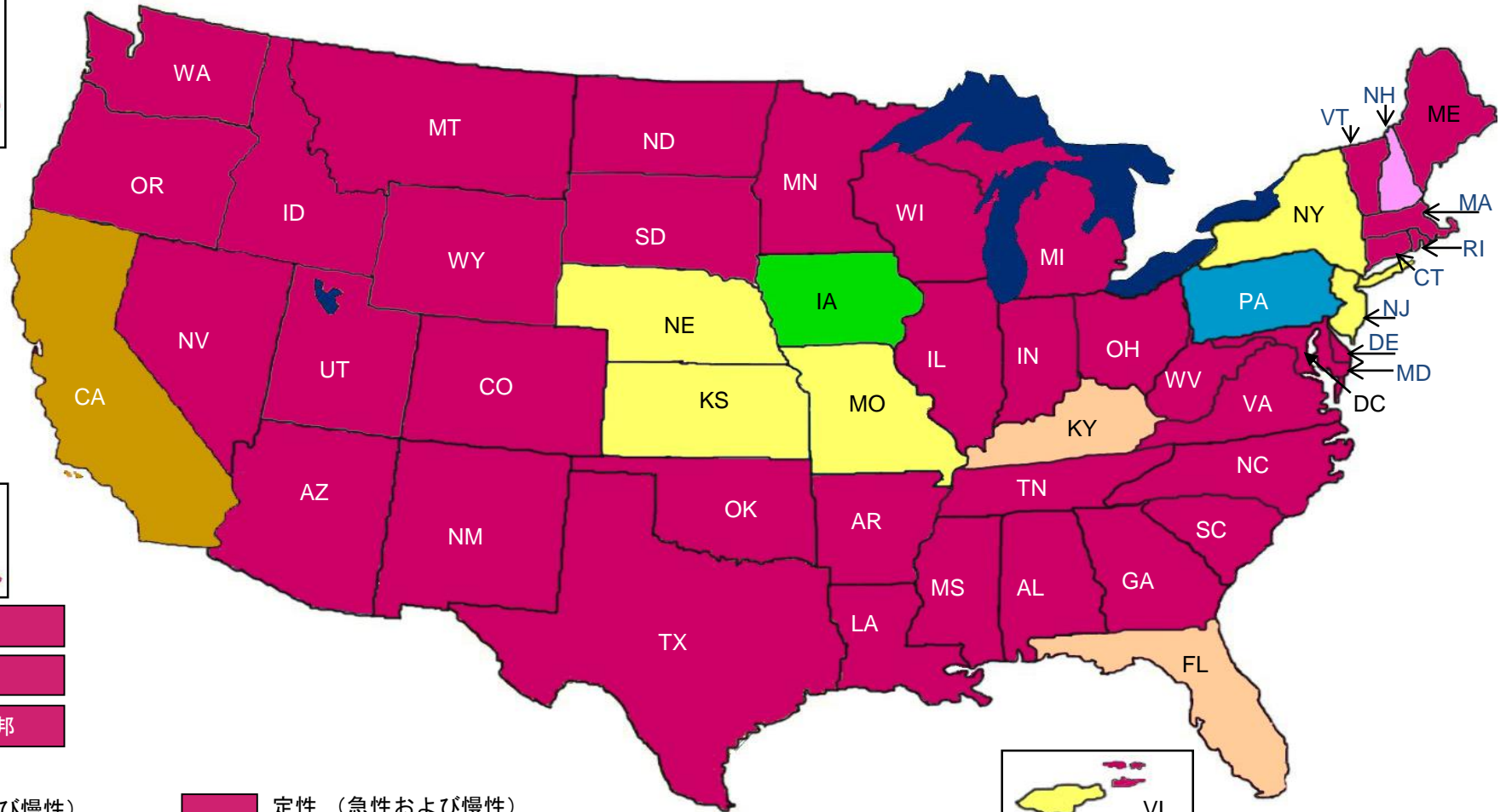
- 事業場等から排水を排出するには、当該事業場等の所有者等は、NPDESに係る各州等の当局から排水の許可 (permit) を受ける必要。
- 排水規制の対象となる事業場等は、大きく分けて、汚染物質を排出している既存の工場・事業場、公共用下水処理上及び新規の排水施設の3つ。  
(後述)
- EPAにより、人健康又は水生生物に影響を及ぼすおそれがあるとされた個別規制物質 (65項目)、BOD、pH等について、法律やEPAの各州等の当局が水質基準 (Water Quality Standard) を設定。
- 各州の基準 (クライテリア) が有効となるには、EPAの承認が必要。

## WET手法の制度上の位置付け

- WET試験により評価される全排水毒性 (Whole Effluent Toxicity) は、個別物質規制の項目とは別に、WETに係る基準値を超過する合理的な可能性等があると当局が判断した場合に排水許可の要件とされる (当局が個別物質規制で十分な水質保全が可能と判断する場合にはWET試験の実施は不要)。

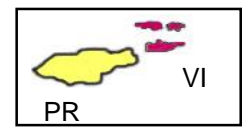
# 各州におけるWETに係る水質基準の設定状況（米国）

（EPA担当者講演資料（平成22年2月）より）



- アメリカ領サモア
- グアム島
- 北マリアナ諸島連邦

- |   |   |
|---|---|
| <span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #4682B4; border: 1px solid black;"></span> 定量（急性および慢性）           | <span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #DC143C; border: 1px solid black;"></span> 定性（急性および慢性）                                 |
| <span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #FFFF00; border: 1px solid black;"></span> 定性および定量（急性および慢性）      | <span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #FFDAB9; border: 1px solid black;"></span> 定性（急性および慢性）<br>定量（慢性）                       |
| <span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #FFB6C1; border: 1px solid black;"></span> 定性（急性および慢性）<br>定量（慢性） | <span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #D2B48C; border: 1px solid black;"></span> 定性（急性および慢性 - 内陸および河口水域）<br>定量（急性および慢性 - 海水） |
| <span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #FF6347; border: 1px solid black;"></span> 定量（慢性）                | <span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #32CD32; border: 1px solid black;"></span> 定性（急性）                                      |



EPA HQ 2/10



※注：「定性」の基準とは、「・・・を排出しないこと」などの、定量的な排水許可要件を含まない基準を指す。

# 排水規制・WETの適用対象等（米国）

## 排水規制・WET試験の適用対象等

- 製造業中心に56業種（次ページ）がEPAにより排水規制の適用対象に指定。
- これとは別に、公共下水処理場（Publicly Owned Treatment Works）に対しても規制が適用。
- 具体的な適用対象や規制項目、基準値等は、EPAが定めた法規を踏まえ、各州等の当局が規定。
- 全国で規制対象となる56業種の排水施設の数は35,000～45,000、下水処理場の数は約12,000。
- WET試験の適用は、WETに係る基準値を超過する合理的な可能性等があると当局が判断した場合に排水許可の要件とされる。その際、排水の受水域における排水希釈率の大小などに応じて、急性又は慢性毒性試験データの提出が許可申請者に求められる。
- 公共用下水処理場の場合、排水量が100万ガロン（約3,800トン）/日以上であることが基本要件となる。

※出典（いずれも米国EPA）

- ・ Technical Support Document for the 2004 Effluent Guidelines Program Plan
- ・ 40 Code of Federal Regulation Part 122
- ・ Technical Support Document for Water Quality-based Toxics Control

# (参考) 米国の排水規制の対象となる事業場等

※注: 下記の外、下水処理場も対象となっている

Industrial Category	40 CFR Part
Dairy products processing	405
Grain mills manufacturing	406
Fruits and vegetable processing	407
Canned and preserved seafood	408
Sugar processing	409
Textile mills	410
Cement manufacturing	411
Concentrated animal feeding operations (feedlots)	412
Electroplating	413
Organic chemicals, plastics and synthetic fibers	414
Inorganic chemicals manufacturing	415
Soaps and detergents manufacturing	417
Fertilizer manufacturing	418
Petroleum refining	419
Iron and steel manufacturing	420
Nonferrous metals manufacturing	421
Phosphate manufacturing	422
Steam electric power generation	423
Ferroalloy manufacturing	424
Leather tanning and finishing	425
Glass manufacturing	426
Asbestos manufacturing	427
Rubber manufacturing	428
Timber products processing	429
Pulp, paper and paperboard	430
Meat products	432
Metal finishing	433
Coal mining	434
Oil and gas extraction	435
Mineral mining and processing	436
Centralized waste treatment	437

Industrial Category	40 CFR Part
Metal products and machinery	438
Pharmaceutical manufacturing	439
Ore mining and dressing	440
Industrial laundries	441
Transportation equipment cleaning	442
Paving and roofing materials	443
Waste combustors	444
Landfills	445
Paint formulating	446
Ink formulating	447
Aquatic animal production	451
Gum and wood chemicals	454
Pesticide chemicals	455
Explosives	457
Carbon black manufacturing	458
Photographic	459
Hospitals	460
Battery manufacturing	461
Plastic molding and forming	463
Metal molding and casting	464
Coil coating	465
Porcelain enameling	466
Aluminum forming	467
Copper forming	468
Electrical and electronic components	469
Nonferrous metals forming and metal powders	471

# WET試験で用いられる生態毒性試験等（米国）

## 試験生物種・生態毒性評価方法

- EPAが定めた以下の試験法から、対象施設に応じて試験方法を各当局で選択。試験種は2種以上（EPAでは藻類、無脊椎動物及び魚類の3種を用いることを推奨）。
  - ・急性毒性試験法（計8試験法）：淡水生物（無脊椎動物、魚類）、海産生物（無脊椎動物、魚類）
  - ・慢性毒性試験法（計9試験法）：淡水生物（藻類、無脊椎動物、魚類）、海産生物（藻類、無脊椎動物、魚類）

## WET手法の実施事例（ヴァージニア州の例）

- EPAが定めた工場その他、製造工程、処理工程、立地の保守状況、排水や受水域となる河川のデータ等に基づいて生態毒性や河川への影響を持つ可能性がある工場も適用対象となる。
- 受水域の塩分濃度が0.5%以上の場合は海生生物、0.1%未満の場合は淡水生物を試験に用いる。

※出典：ヴァージニア州当局担当者講演資料（平成22年2月）

# WET試験に基づく排水改善プロセスの概要（米国）

※詳細は資料2-2(参考5)参照

## 排水改善プロセス

- 米国では、WET試験の結果、生態影響があると判定された排水に対し、排水改善が事業者に対し義務付け。
- 排水改善のための手法は毒性削減評価（TRE）と呼ばれ、EPAにより手法の概要、排水改善につなげるための標準的な手順、適用事例等がガイダンスやマニュアルとして作成。
- TREにおける排水改善は、大きく6段階に分かれる。各種関連データの収集後、施設の運転管理方法の評価・改善等により排水毒性の効果が得られない場合には、毒性原因を特定するため、毒性要因評価（TIE）を行う。
- TIEで、原因物質（群）の特定に至らない場合、排水経路を遡り生物応答試験を行う等により、原因の発生源を特定し、その処理プロセスの見直し等の排水改善手法を事業者が選択する。

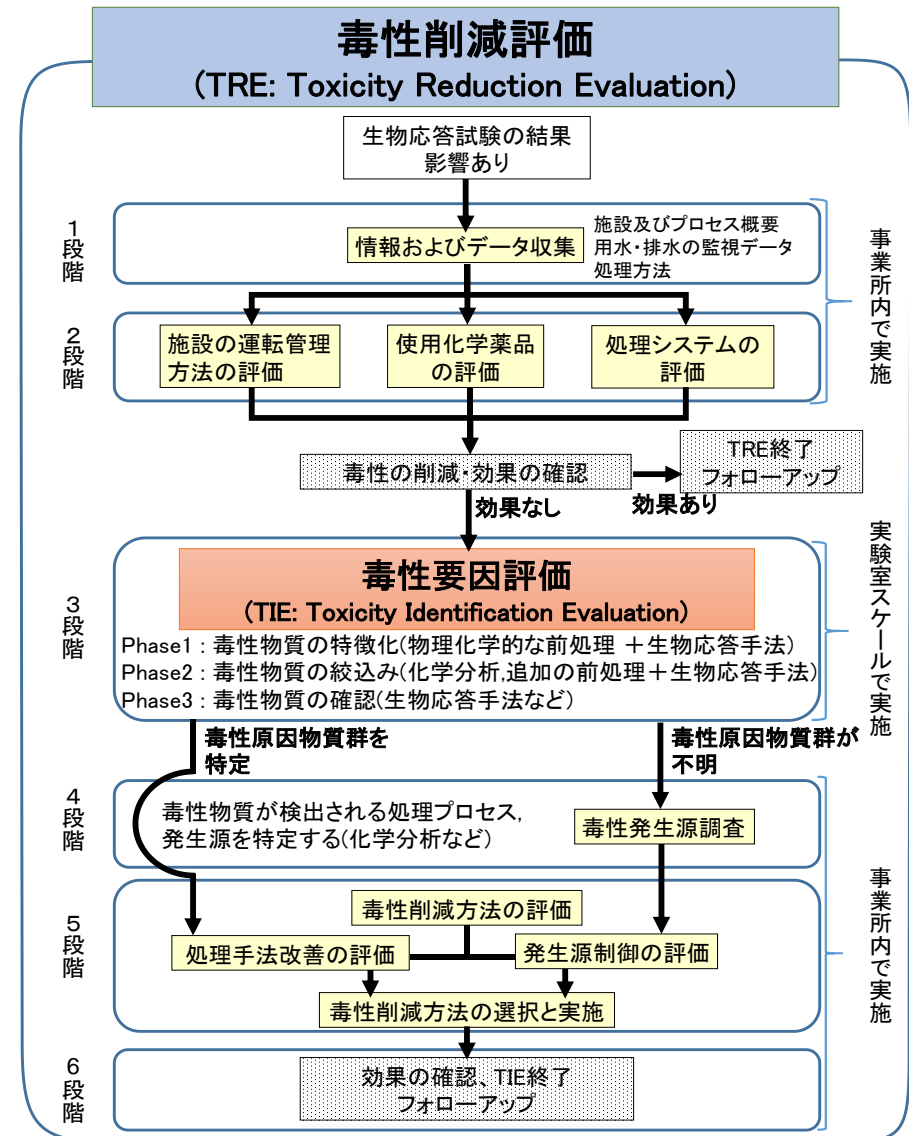


図 米国における毒性削減評価（TRE）の概要と手順



## ②カナダ

## 背景・経緯

- 1970年代：魚類やその生息地等の保護を目的に、漁業法（Fisheries Act）の下で、従来の個別物質規制に加え、排水許可制度の要件として全排水の魚類に対する急性毒性試験の実施が一部の業種において義務化。以降、対象業種を順次拡大（製紙・パルプ製造排水、石油精製排水、金属鉱業排水、食肉・家禽生産排水等に対して順次適用）。
- 1992年に製紙・パルプ製造業、2002年に金属鉱業に対して以下の規制強化を実施
  - ・無脊椎動物に係る急性毒性試験の導入
  - ・排水の環境影響を調査するモニタリングの導入
    - 排水の慢性毒性（亜致死毒性）試験の実施と当局への報告を対象業種に義務付け
- 2012年：排水（下水）処理施設に対して魚類に係る急性毒性試験を導入（2015年1月から適用）

## WET導入の背景・経緯（カナダ）②

### 背景・経緯（続き）

- カナダにおいて排水毒性に係る生物応答試験が用いられている主な理由
  - ・有害物質の生態影響を直接的に推定する。
  - ・毒物学的なデータが不足している物質などについて、排水や受水域における潜在的な毒性を測定する。
  - ・毒性を有する複数の物質が混合された場合の影響を考慮する
  - ・比較的短時間で試験結果が判明する。（※カナダでは基本的に急性毒性試験が用いられている）
  - ・複雑な組成で様々な化学物質が含まれている場合、個別の物質について化学的な分析を行うより、生物応答試験の方がコストが低減されることが多い。
  - ・排水規制を受ける関係者、行政担当者、一般市民にとって、結果が理解されやすく、説明がしやすい。
  - ・水質に問題があることが確認された場合、早期対処につながりやすい。

# 排水規制制度におけるWET試験の位置付け、適用対象等（カナダ）

## 排水規制制度の概要とWETの位置付け

- 漁業法において、魚類、その生息域又は人による魚類の利用に有害な物質の水域への排出・投入を、認められた場合を除き禁止。全国共通で行われる規制対象物質等の具体的な規制の内容は、業種（対象となる排水）毎に個別に下位法令（Regulation）で規定。
- 全国共通の規制が行われている業種以外に対する規制は、各州で必要に応じて規制している。また、排水の許可等の権限は各州が有する。
- WET試験に基づく基準は、個別規制物質（項目）とは独立した項目として規制要件化。

## 排水規制の適用対象等

- 全国共通規制の対象は、製紙・パルプ製造業、石油精製業、金属鉱業、食肉・家禽生産業、下水処理施設等の7業種
- これまでWET試験の対象とされているのは、製紙・パルプ製造業、金属鉱業及び下水処理施設の3業種

※各州により、対象業種を追加している場合がある

※出典：カナダ環境省ウェブサイト、Pulp and Paper Effluent Regulations, Metal Mining Effluent Regulations, Wastewater Systems Effluent Regulations 等

# 業種毎のWET試験の適用状況（カナダ）

## 業種毎のWET手法の適用状況（試験方法を含む）

- 製紙・パルプ製造業（1992年～）（※規模等については特段規定なし）
  - ・規制対象項目：ミジンコ及び魚類に係る急性毒性の他、BODと浮遊性固体（suspended solids）
  - ・排水の藻類・ミジンコに係る亜致死毒性についてのモニタリング実施と当局への報告が必要
- 金属鉱業（2002年～）（※規模等については特段規定なし）
  - ・規制対象項目：ミジンコ及び魚類に係る急性毒性の他、重金属、浮遊性固体、pH等の9項目
  - ・排水の藻類・ミジンコ・魚類に係る亜致死毒性についてのモニタリング実施と当局への報告が必要
- 下水処理施設（2015年～）
  - ・排水規制の対象：2500m<sup>3</sup>/日超の排水量の施設
  - ・規制対象項目：魚類に係る急性毒性の他、BOD、浮遊性固体、アンモニア、残留塩素の4項目
  - ・排水量が大きな施設ほど、モニタリングの頻度や地点を増やす必要

## ③ドイツ

# WET導入の背景・経緯と手法の位置付け（ドイツ）

## 背景・経緯

- 1960～70年代：工場排水によるライン川などの水質汚染が問題に。また、一部利水事業者の活動にも支障。
- 1974年：環境庁（German Environment Agency）が設立
- 1975～76年：排水対策関連法（Federal Water Act, Waste Water Charge Act等）が改正又は制定
- 1975年：魚類毒性試験を排水規制の要件化。  
（これ以降、甲殻類、藻類等の生態毒性試験を順次追加）

## 排水規制制度の概要とWETの位置付け

- Federal Water Actの下での排水規則（Waste Water Ordinance）において、具体的な規制対象事業場等や規制項目、各水質規制項目について用いるべき試験法等を規定。規制項目（個別規制物質含む）は、業種等によって異なる（数～数十項目）。
- WET試験に基づく基準は、個別規制物質（項目）とは独立した項目として規制要件化。
- 基準に適合しない排水を排出した場合には、その者には罰金等が課される。

# 排水規制・WET試験の適用対象等（ドイツ）

## 試験生物種・生態毒性評価方法

- ミジンコ及び魚類胚に係る急性毒性（遊泳阻害）試験、藻類に係る慢性毒性（生長阻害）試験、発光バクテリア試験、変異原性試験の5種。
- 各試験のエンドポイントが以下の値のとき、生態影響がないと判断する。
  - ・ 魚類胚試験、ミジンコ遊泳阻害試験：死亡率が10%以下
  - ・ 藻類生長阻害試験、発光バクテリア試験：生長阻害が20%以下
  - ・ 変異原性試験：変異原性を引き起こす割合が1.5%以下

## 排水規制・WET手法の適用対象等

- 排水規制の対象となる業種等は53区分あり、汚染が生じた場合の影響を考慮した25区分に対してWET規制が適用。
- 多くの区分では魚類胚に係る急性毒性試験のみが課されているが、一部区分に対しては他の試験も課される。（詳細は次ページ以降参照）

※出典：Promulgation of the New Version of the Ordinance on Requirements for the Discharge of Waste Waters（ドイツ連邦環境省）



# WET試験の適用対象等（ドイツ）

番号	業種等（括弧内は原文）	適用されるWET試験	希釈係数 *1
1	塗装材料製造業及びワニス樹脂製造業 (Manufacture of coating materials and varnish resins)	[急]48h 魚類胚試験	2
2	炉ぶた製造業 (Fireboard)	[急]48h 魚類胚試験	2
3	パルプ製造業 (Pulp production)	[急]48h 魚類胚試験	2
4	化学産業 (Chemical industry)	[急]48h 魚類胚試験 [急]24h オオミジンコ遊泳阻害試験 [慢]72h 藻類生長阻害試験 発光バクテリア試験 変異原性試験	2 8 16 32 1.5
5	廃棄物処理施設 (バイオ処理を行うもの) (Facilities for biological treatment of waste)	[急]48h 魚類胚試験 [急]24h オオミジンコ遊泳阻害試験 発光バクテリア試験	2 4 4
6	製鉄・鉄鋳物工場	[急]48h 魚類胚試験	2
7	皮革・毛皮加工業、皮繊維板製造業	[急]48h 魚類胚試験 [急]48h 魚類胚試験 (※毛皮加工業の場合)	2 4
8	廃棄物処理業 (化学的又は物理的プロセスでの処理若しくは 廃油処理を行うもの) (Treatment of waste by means of chemical and physical processes (CP facilities) and processing of used oil)	[急]48h 魚類胚試験 発光バクテリア試験 [急]24h オオミジンコ遊泳阻害試験	2 4 4
10	浄水場、冷却施設等 (Water treatment, cooling systems, steam generation)	発光バクテリア試験 (※一部の施設のみ)	12
11	生ゴム・ラテックス加工業、ゴム製品製造業 (Processing of caoutchouc and latex, manufacture and processing of rubber)	[急]48h 魚類胚試験 発光バクテリア試験	2 12

※1 希釈係数 (Dilution factor, TF) : 生態毒性に係る基準値への適合性を判断する際に、影響の有無を検討する際の排水の希釈倍率の基準値。例えば、「2」であれば、排水を2倍希釈して影響がないとき基準値が満たされる。

# WET試験の適用対象等（ドイツ）

番号	業種等（括弧内は原文）	適用されるWET試験	希釈係数 ※1
12	廃棄物焼却由来ガスの浄化施設 (Scrubbing of waste gases from waste incineration)	[急]48h 魚類胚試験	2
13	無機系色素製造業 (Production of inorganic pigments)	[急]48h 魚類胚試験	2
14	繊維製造・加工業 (Textile manufacturing and finishing)	[急]48h 魚類胚試験	2
15	非鉄金属製造業 (Non-ferrous metal production)	[急]48h 魚類胚試験 (※アルミ製錬施設等は除く)	4
16	金属加工業 (Metal finishing, metal processing)	[急]48h 魚類胚試験	2~6*2
17	クロロアルカリ電気分解施設 (Chloralkali electrolysis)	[急]48h 魚類胚試験	2
18	化学繊維、フィルム、ビスコースプロセスで製造されたスポンジ及び酢酸セルロース製造業 (Production of chemical fibres, films and sponge cloth based on the viscose process and of cellulose acetate fibre)	[急]48h 魚類胚試験	2
19	石炭コークス施設 (Coal coking)	[急]48h 魚類胚試験	2
20	発火装置由来ガスの洗浄施設 (Scrubbing of flue gases from firing systems)	[急]48h 魚類胚試験	2
21	有害物質の使用工程 (Use of certain hazardous substances)	[急]48h 魚類胚試験 (※一定の要件に該当する二酸化チタンを使用する工程の場合)	2
22	廃棄物保管施設 (地上に設置のもの) (Storage of waste above ground)	[急]48h 魚類胚試験 発光バクテリア試験 [急]24h オオミジンコ遊泳阻害試験	2 4 4
23	半導体部品製造業 (Production of semi-conductor components)	[急]48h 魚類胚試験	2
24	版木製造・印刷業 (Production of printing blocks, publications and graphic-arts products)	[急]48h 魚類胚試験	4
25	羊毛洗浄工場 (Wool scouring plants)	[急]48h 魚類胚試験 [急]24h オオミジンコ遊泳阻害試験	2 2

※1 希釈係数 (Dilution factor, TF): 生態毒性に係る基準値への適合性を判断する際に、影響の有無を検討する際の排水の希釈倍率の基準値。例えば、「2」であれば、排水を2倍希釈して影響がないとき基準値が満たされる。

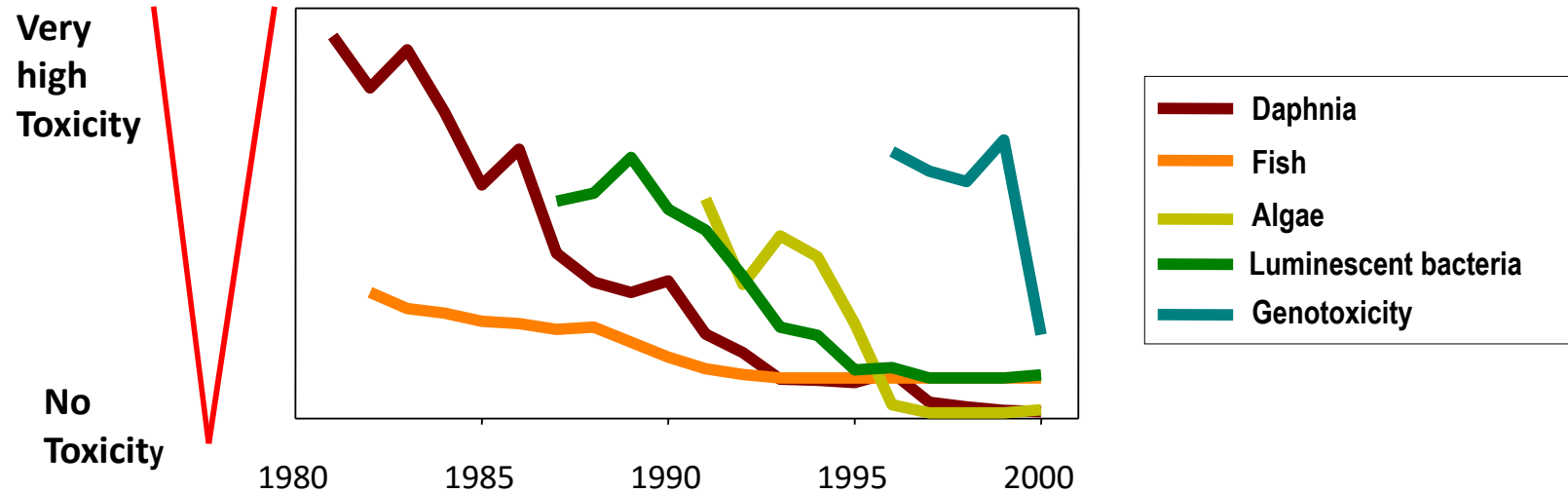
※2 排水発生源となる製造工程等によって異なる。

# 排水管理の効果（ドイツ）

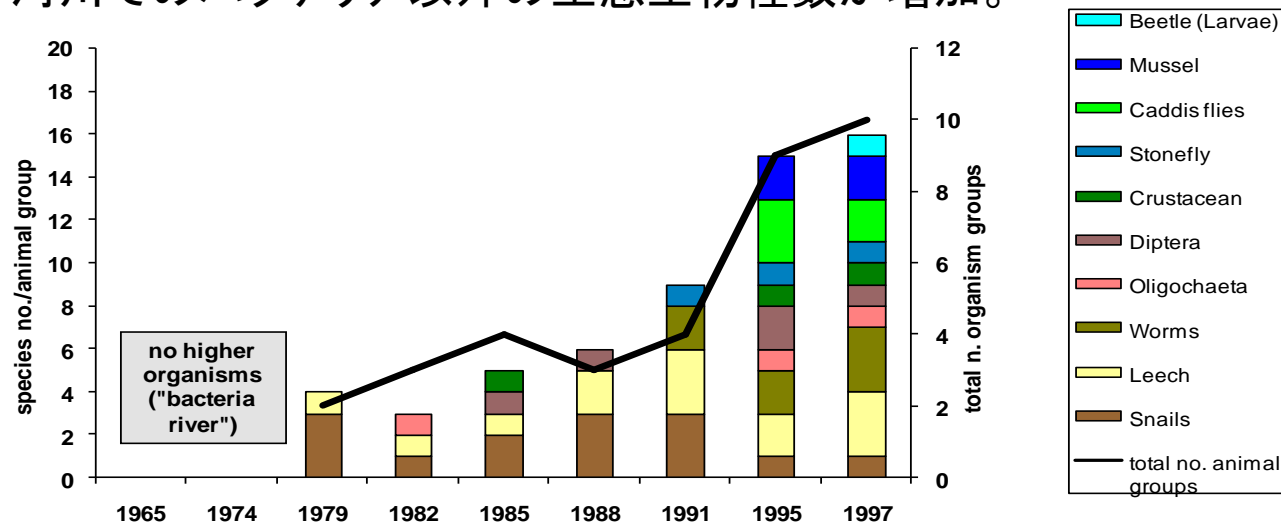
（ドイツ環境庁担当者講演資料（平成27年2月）より）

## 排水管理の効果

- 1980年台以降、生態毒性が強い排水が減少。（ノルトライン＝ヴェストファーレン州の事例）



- 1970年台末以降、河川でのバクテリア以外の生息生物種数が増加。



## ④英国

# WET (DTA) の実施・導入の背景・経緯 (英国)

## 背景・経緯

### ● 1990年代初頭:

- ・米国やカナダで確立(※)されたWET試験について、従来からの化学物質毎の排水管理を補完する手法として着目し、両国のWET試験をモデルとして、直接毒性評価(Direct Toxicity Assessment(DTA))と呼ばれる手法を開発。
- ・排水中の有害化学物質による水生生物死をなくしていく観点から、手法のターゲットは急性毒性試験。

※同時期までに、米国及びカナダでは、WET試験法が整備され、WET手法が排水規制制度の一部に既に導入又は導入されようとしていた。

- 1997～2000年:産学官から構成される作業会合(Steering group)の下で、3地域(河川の流域の一部)を対象を実証プログラムを実施。
- 2006年:イングランド及びウェールズにおいて、DTA手法の試験法や利用法に係るガイダンス文書を作成。
- 2012年:スコットランドにおいてDTA手法を排水毒性をスクリーニング手法として用いる際のガイダンス文書を作成。

# WET (DTA) 試験の概要と実施状況 (英国) ①

## 試験生物種・生態毒性評価方法

- 淡水生物と海産生物の両方に係る急性毒性試験が作成されている(ただし、藻類は生長阻害試験であり、米国等の慢性毒性試験と基本的に同様)。
- イングランド及びウェールズにおけるDTA実証プログラム実施時やガイダンス文書では、淡水生物と海産生物のそれぞれについて、魚類、無脊椎動物及び藻類に係る試験が用いられている。しかし、スコットランドでは魚類試験がないなど、実施方法には地域差があるとみられる。
- 試験生物種はイングランド及びウェールズでは藻類等毎に各1種、スコットランドでは無脊椎動物の海産生物試験は2種。

## 試験の活用方法・運用手順

- イングランド等のガイダンスでは、排水の毒性が水生生物に影響しているとみられる水域を選定し、排水毒性を急性毒性試験によりスクリーニングした後、より詳細な排水毒性の調査、対象施設・地域に固有のリスクの評価、排水毒性の削減を行う等の手順が示されている。
- スコットランドのガイダンスでは、急性毒性試験を主に排水毒性のスクリーニングに使うこととされている。

## WET (DTA) 試験の概要と実施状況 (英国) ②

### 実施対象業種、施設等

- 試験の実施は全国レベルでの法的義務化はされていない。
- 統合的汚染防止管理指令 (Integrated Pollution Prevention and Control Directive。エネルギー、金属・鉱業、化学、廃棄物等関連施設が対象。) の対象施設のうち、河川、湖沼、海域等の水域への直接の排水量が100m<sup>3</sup>/日を超える有機化学又は無機化学工場で、かつ複雑な組成の排水を排出するものには、ガイドラインに基づくDTA試験の実施が推奨されている。
- イングランド等では2006年のガイダンス作成時に上記に該当する約100施設を環境保護庁 (Environmental Agency) が選定するなどしている。
- なお、2011年の段階で、選定された施設のうち、試験を実施したのは約50施設、排水性状等から試験の実施が不要であることを示す報告を行った施設は約10施設。

### DTAの実施事例

- 2011年時点までに実施されたDTA手法の結果で、無希釈の排水でいずれの生物種を用いた試験でも急性毒性が検出されなかったものは50事例中1件で、約半数の事例では、排水を100倍希釈しても毒性が検出される結果が報告されたとしている。





## 諸外国の排水に対する生物応答試験の結果の評価方法、試験頻度等の例

### 1. 諸外国における試験結果の影響評価基準の例

諸外国における試験結果の影響評価基準は、国等により制度等は様々であるが、設定の考え方は概ね次の2通りに分類される。(事例の一覧は「別紙」参照)

(1) 受水域 (Mixing zone 周縁) での希釈を主に考慮する

(2) 利用可能な最善技術 (BAT: Best Available Technology) を主に考慮する

なお、いずれのアプローチにおいても、上記の判定とは別に、排出制限値 (Permit Limit) を算出する際に、排水の変動および試験の変動を考慮した換算が行われている。

#### (1) 受水域での希釈を主に考慮するアプローチ (米国等)

米国に代表されるアプローチで、「毒性がない」という定義は急性毒性試験と慢性毒性試験でそれぞれ異なる。以下では米国の事例について述べる。

米国環境保護庁 (EPA) では LC50 や NOEC の逆数である毒性単位 TU (Toxic Unit) 等を用いて、次の2つの場合に、排水の「毒性がある」という評価基準を設けている<sup>1</sup>。

- 急性毒性試験:  $RWC > 0.3 TU_a$  ( $TU_a = 100/LC50$ )
- 慢性毒性試験:  $RWC > 1.0 TU_c$  ( $TU_c = 100/NOEC$ )

ここで、「RWC (Receiving water concentration)」は受水域 (Mixing zone 周縁) で希釈された状態の毒性を表す指標であり、単位は TU (Toxic unit: 毒性値 (LC50、NOEC など) の逆数) である。

(補足) 急性毒性試験における 0.3 「TU<sub>a</sub>」とは、半数致死濃度である LC50 を致死影響のない LC1 に換算するための値である。これは、EPA が収集した 496 の排水試料における LC1 / LC50 比の 91% 点値から導出されたもので、0.3TU<sub>a</sub> とはすなわち、LC50 が 300% 排水濃度未満になることを意味し、実際の水環境の条件では評価できない。

このため、実質的には上記の条件を下記のように換算し、排水の LC50 や NOEC と、受水域で希釈された状態の排水濃度 (%) を表す IWC (Instream Waste Concentrations、受水域で希釈された状態の排水濃度) と比較される。ただし、IWC が 30% を越える場合、LC50 < 100% 超になってしまうため、そのような場合は、100% 排水における生存率と、対照区における生存率に有意差があるかどうか検定することで判定する。

なお、IWC は下記の式により算出される<sup>2</sup>。

$$IWC (\%) = 100 \times \frac{Q_e}{(1-f)Q_e + Q_r}$$

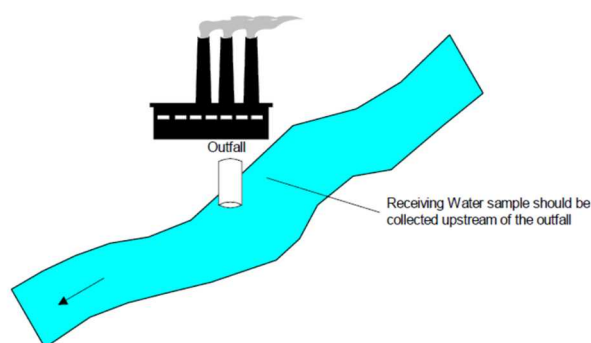
<sup>1</sup> EPA Technical support document for water quality-based toxics control (1991TSD)

<sup>2</sup> Q<sub>e</sub>: 排水量 Q<sub>r</sub>: 受水域の水量 f: 受水域の水量から排水量を引く割合

【排水の希釈を考慮した米国ウィスコンシン州の例】

- ・ ウィスコンシン州では、デフォルトとして  $Q_s: Q_e = 10:1$ 、または  $IWC = 9\%$  が適用。
- ・ 又は  $Q_s$  として、「10年に一度の低水量時の7日間平均値」である  $Q_{7,10}$  の  $1/4$  が適用。
- ・ 排水の希釈率を考慮した化学物質の排出制限値 (Water Quality Based Effluent Limit) を決定するときと同じ  $Q_s$  を適用。
- ・ 例えば魚類や水生生物が生息している河川に直接又は間接的に排出する場合、 $Q_{7,10}:Q_e$  と  $IWC$  の状況に応じて試験法や頻度が設定(参考図参照)。なお、 $Q_{7,10}:Q_e =$  排水の流量( $Q_e$ )に対する河川での低水流量( $Q_{7,10}$ )の比で、流出水の希釈率を判断する上で用いる。通常は急性あるいは慢性毒性試験の必要性を決める際に利用。

Example #1: Fish and Aquatic Life (FFAL) Stream



(参考図) ウィスコンシン州において試験法等を決定する際の要件 (魚類と水生生物が生息している河川への直接排出する場合)

acute & chronic  $Q_s = Q_{7,10}$  of receiving water  
Need for acute and chronic testing evaluated using the WET Checklist:  
 $Q_{7,10}:Q_e > 1,000:1$  No WET usually recommended  
 $Q_{7,10}:Q_e \leq 1,000:1$  &  $> 100:1$ , Acute WET only usually recommended  
 $Q_{7,10} \leq 100:1$  Acute & Chronic testing recommended

(2) 利用可能な最善技術 (BAT) を主に考慮するアプローチ (ドイツ等)

ドイツや韓国に代表されるアプローチで、(1)のように受水域における希釈率によるのではなく、業種などに応じて利用可能な最善技術 (BAT) を考慮した TU 値で表現される評価基準を設定するアプローチである。

2. 諸外国における試験頻度の例

国等により様々であるが、例としては次のものがある (詳細は「別紙」参照)。

- ・ 排水量: 多いほど高頻度で実施 (カナダ)
- ・ 放流先の河川水量に対する排水量の割合: 高いほど高頻度で実施 (米国)
- ・ バイオアッセイの種類: 急性毒性試験は月1回の頻度で実施 (カナダ、ドイツ、韓国)
- ・ 受水域環境: 利水区分、水質、生態系の状態など (例: 生態系保護区の水域では厳しい管理が適用)
- ・ 業種: 製紙業、金属採鉱業は、下水処理場と比べて高頻度で実施 (カナダ)
- ・ 過去の試験結果に基づいて増減措置が取られている: 基準を超過した場合、確認のため頻度を上げて追加試験が実施される (米国・カナダ)

(例)

- ・排水変動が著しい場合は月1回実施。ただし、影響がない状態が継続している場合は、年1回や排出認可更新時のみ(5年に一度)に軽減する措置が取られている。(米国バージニア州)
- ・排水量等の各要素をポイント化し、それらの総得点に応じてモニタリング頻度(5年間で2回(隔年)から年6回(2ヶ月に1回)の間)を決定。(米国ウィスコンシン州)

### 3. 影響評価基準と試験頻度(回数)の関係の例

1. の諸外国における影響評価基準と試験頻度(回数)の関係については、以下のよう  
な事例がある。(詳細は「別紙」参照)

(米国)

- ・複数の試験結果から評価基準値(Permit Limit)を算出し、基準超過があった場合はモニタリング回数を増やす。そして、一定以上継続的に基準超過がみられた場合(基準超過率が高い場合)に当局から事業者へTREの開始が求められる。
- ・排水改善が必要とされる「基準超過率」の条件は州によって異なるが、多くの州で、複数回の試験結果による基準超過率が25%以上(=75%未満の試験で影響なし、25%以上の試験の際に影響がある)のとき、TRE/TIEの実施が事業者へ求められる。
- ・なお、この「25%」は生物応答試験の変動を考慮に入れたものである。

(韓国)

- ・評価基準を超過した時点で、排水改善命令が(段階的に)出される。



## 諸外国の排水に対する生物応答試験の結果の評価方法、試験頻度等の例（一覧）

国等	対象事業場	試験頻度	影響判定(下記のと看影響なし)	試験頻度の増減措置と排水改善
米国 EPA 技術指針 <sup>1</sup>	• NPDES 対象事業場	• 月 1 回 ~ 年 4 回	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>RWC &lt; CMC = 0.3TU_a</math> (<math>TU_a = 1/LC50</math>) → <math>LC50 \geq 100\%</math> 排水、または 100% 排水で生存率 80% 以上</li> <li>• <math>RWC &lt; CCC = 1.0TU_c</math> (<math>TU_c = 1/NOEC</math>) → <math>NOEC &gt; RWC</math></li> </ul> <p>RWC (receiving water concentration) : 排出先の Mixing zone 周縁で希釈された状態での排水による毒性</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 試験回数が 10 未満のときは、Permit の算出の際、変動係数 CV に 0.6 を用いる</li> <li>• Permit の違反があった場合、試験回数を増やし、その期間で継続的に違反がみられる場合に TRE を開始する</li> <li>• 違反から 15 日以内に TRE を開始する。認可発行の 90 日以内に一般的な TRE 計画を提出しなければならない</li> <li>• 基準超過は 3 年に 1 回まで許容される (once in 3-year average frequency for excursions of both acute and chronic criteria)</li> <li>• 1 年目に毒性がなかった場合、2 年目以降は試験回数を減らしてよい。ただし設備変更があったり再び毒性がみられた場合は通常に戻す。</li> <li>• 2 年目以降は最も感受性の高い 1 生物のみによるモニタリングでもよい。</li> </ul>
米国 バージニア州 <sup>2</sup>	<p>産業:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Effluent Guideline 対象事業場</li> <li>• Acute IWC が 33% 以上</li> <li>• その他、排水処理、地域を考慮</li> <li>• 例外業種あり</li> </ul> <p>公共下水処理場:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 排水量 <math>V(t/\text{日})</math> 3,785</li> <li>• Pretreatment program および SIUs 実行・準備中</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 月 1 回: 排水変動が著しい場合</li> <li>• 年 4 回: 最も多く利用される頻度</li> <li>• 年 2 回: 小規模事業場</li> <li>• 年 1 回: 高頻度でスクリーニング試験を実施した後</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>LC50 = 100\%</math></li> <li>• <math>NOEC = IWC \rightarrow TU_c</math> (<math>= IWC/NOEC</math>) &lt; 1</li> </ul> <p>IWC (instream waste concentration) : 排出先の Mixing zone 周縁における排水の濃度。河川水量として 10 年に一度の低水量時の値が用いられる。</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 年半以上かけて 10 試験 (脊椎動物 1 種、無脊椎動物 1 種) 分を収集。</li> <li>• 基準達成率が 75% 未満 (=25% の試験で影響あり) のとき、TRE/TIE を実施しなければならない</li> <li>• 8 回中 6 回、または 75% の試験で影響がないとき、最も感受性の高い生物種で年 1 回試験に軽減される。</li> </ul>

<sup>1</sup> EPA Technical support document for water quality-based toxics control (1991TSD)

<sup>2</sup> DeBiasi D.L. (2010) 米国における WET システムに関するセミナー (平成 21 年度) 講演資料

国等	対象事業場	試験頻度	影響判定(下記のと看影響なし)	試験頻度の増減措置と排水改善
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• その他、様々な化学物質が含まれている、受水域の環境など考慮</li> </ul>			
米国 ウィスコンシン州 <sup>3</sup>	排水量、河川水量、受水域環境、業種、過去データなどの区分で加算していき、総得点で分類	総得点により <ul style="list-style-type: none"> <li>• なし、5年間で2回(隔年)、5年間で3回(隔年)、年1回、年2回、年4回、年6回(2ヶ月に1回)</li> <li>• ただし、WET limit がある場合、最低年4回試験することが推奨される</li> <li>• 大規模な下水処理場および主要産業の場合、最低年1回、急性及び慢性試験の実施が推奨</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 受水域の水量 <math>Q_{7,10}</math>: 排水量が1000:1以上の時、WETは要求されない、1000:1未満、100:1以上の時、急性試験のみ推奨、100:1以下の時、急性及び慢性試験の実施が推奨(受水域が河川か支流か)</li> <li>• LC50 100%</li> <li>• NOEC IWC→TU<sub>c</sub> (=IWC/NOEC) &lt; 1</li> <li>• ZID (zone of initial dilution)が認められる場合は補正を行う。rTU=(3.3×ZID%)/LC50。ZID=100/(希釈率+1)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 影響が出た(Test failed)場合、90日以内に2回追加試験すること</li> <li>• 以下、調査中</li> </ul>
米国 Region 9&10 <sup>4</sup>	排水量 V(t/日) 3,785 (IMG) V>3,785 (IMG)	年4回 月1回	<ul style="list-style-type: none"> <li>• EPA 技術指針と同様</li> <li>• 希釈倍率が3未満のときは、急性毒性は100%排水濃度における生存率と対照区における生存率の統計的有意差の有無によって判定する</li> </ul>	EPA 技術指針、NPDES ガイダンスに従う。
カナダ(下水施設排水規制 <sup>5</sup> )	排水量 V(t/日) 2500 < V 5,000 V > 5,000	年4回、ただし60日以上間隔を空けること 月1回、ただし21日以上間隔を空けること	魚類急性毒性試験において、100%排水で生存率50%以上(毒性なし)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 致死毒性が見られた場合、月2回(7日以上おきに)追加試験を行い、毒性を確認すること</li> <li>• 追加試験において3回連続で毒性がなかった場合、通常の試験頻度に戻る。</li> <li>• 排水量 2500 &lt; V 5,000 の場合:4回連続で毒性がない場合、年1回(ただし6ヵ月おき)に減らしてよい</li> </ul>

<sup>3</sup> WDNR (2005) WET guidance document, <http://dnr.wi.gov/topic/wastewater/WETguidance.html>

<sup>4</sup> Debra L Denton (2010) 米国における WET システムに関するセミナー(平成21年度)講演資料

<sup>5</sup> Canada (2012) Wastewater Systems Effluent Regulations

国等	対象事業場	試験頻度	影響判定(下記のと看影響なし)	試験頻度の増減措置と排水改善
				<ul style="list-style-type: none"> <li>排水量 <math>V &gt; 5,000</math> の場合: 12 回連続で毒性がない場合、年 4 回に減らしてよい</li> </ul>
カナダ (PPER, 定期モニタリング) <sup>6</sup>	オオミジンコ遊泳阻害試験	月 1 回、ただし 21 日以上の間隔を空けること	生存率 50% 以上 (1992 年改正)	(オオミジンコの場合) <ul style="list-style-type: none"> <li>致死毒性が見られた場合、毎週追加試験を行う</li> <li>連続して 3 回、毒性がみられなくなったら、元の試験頻度(月 1 回)に戻る。</li> </ul>
	魚類(ニジマス)急性毒性試験		100% 排水で生存率 50% 以上	
カナダ (EEM) <sup>13, 7</sup>	EEM 要件の亜致死(慢性)毒性試験。主に無脊椎動物と藻類試験について実施する <sup>13</sup> 。	年 2 回、ただし、サイクル 3 年目は年 1 回		<ul style="list-style-type: none"> <li>稼働期間が 120 日未満の事業場は年 1 回でよい</li> <li>8 か月以上工場を稼働していない場合は、試験を実施・報告しなくてよい</li> <li>規制適用から 6 か月以内に、6 回の試験結果が提出された場合は、その後は年 1 回でよい</li> <li>改善対策措置については調査中</li> </ul>
韓国 <sup>8</sup>	下水処理場	月 1 回	TU (=100/EC50) < 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>基準を超過した時点で改善命令となる(段階的に下される、最大 8 か月未満)。</li> <li>改善効果がみられなかった場合は最大 20 日間の操業停止となる場合がある(2013 年 1 月までに操業停止となった施設はなし)</li> <li>塩類が原因で、排出先が海域の場合、専門委員会の承認を得られれば、改善命令は免除される。</li> </ul>

<sup>6</sup> Canada (2012) Pulp and Paper Effluent Regulations

<sup>7</sup> Canada (2012) Metal Mining Effluent Regulations

<sup>8</sup> Kim Sang-Hoon (2012) 諸外国における生物応答を用いた排水管理手法に関するセミナー講演資料





## 米国における WET 試験を活用した排水改善 (TRE) 手法について

## 1 排水改善手法の概要

生物応答手法を用いた排水管理の運用においては、生物応答手法を用いて排水を評価した後、影響があると判定された排水に対し、適切な改善措置を実施することも重要な管理の一環となる。米国や韓国では、排水改善が義務づけられており、改善手法に関するガイダンス文書が作成されている。この手法は米国で毒性削減評価 (TRE: Toxicity Reduction Evaluation) と呼ばれる手法で、米国環境保護庁 (US EPA) によって、手法の概要や標準的な手順を解説し、適用事例を紹介したマニュアルが公表されている<sup>\*1-3</sup>。また、これらのマニュアルでは、産業系事業場と下水処理施設を区別しつつ、WET 試験を活用した排水改善等の事例も紹介している (別紙)。

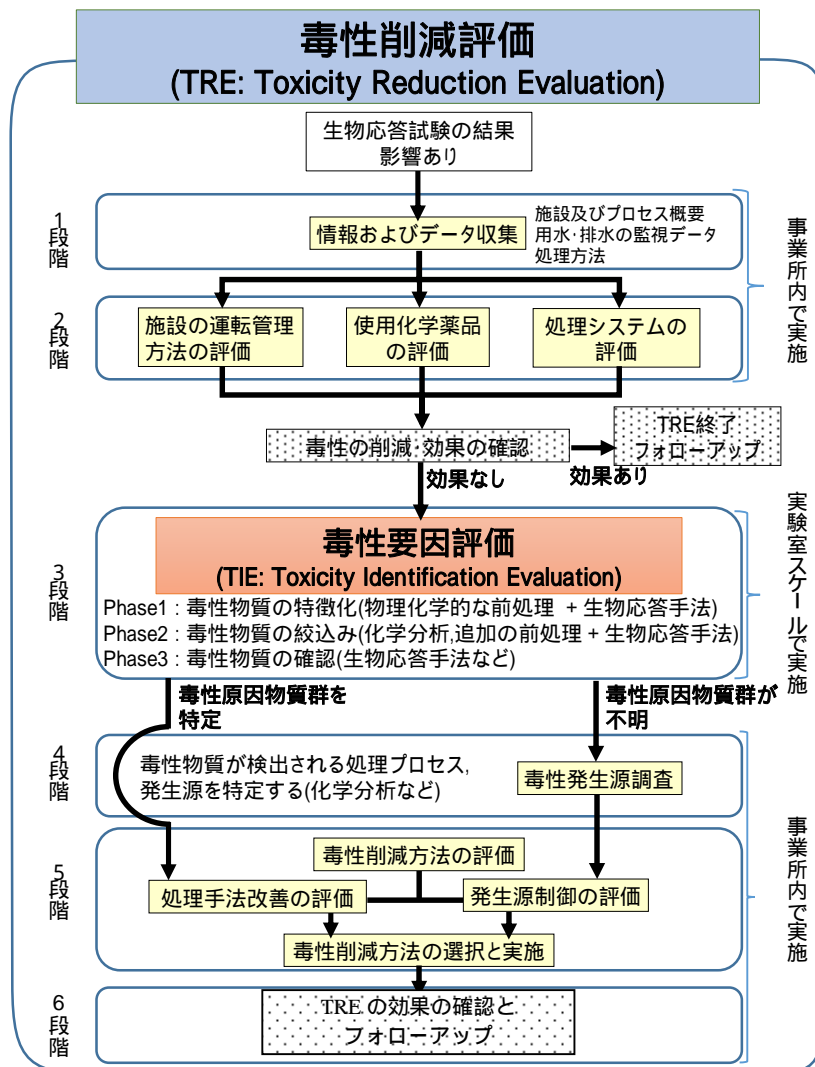


図 1 毒性削減評価 (TRE) の概要と手順

米国の TRE マニュアルに基づいた TRE の実施手順について図 1 に示す。主に 6 段階から構成され、第 1 段階では、使用化学物質や処理方法等の情報収集を行い、第 2 段

階では、収集した情報を基に施設の運転管理方法、使用化学薬品及び処理システムの評価・見直しを行い、適切な低減対策を実施し、その効果を確認する。影響が低減された場合、TRE は終了するが、影響低減が図れなかった場合、毒性原因を特定するため、第 3 段階の毒性同定評価 (TIE: Toxicity Identification Evaluation) へと進む。ここでは、生物応答手法と化学分析を併用するなどして、排水影響の原因となる化学物質 (群) を実験室レベルで明らかにし、あるいは削減手法を特定する。第 4 段階では、第 3 段階で原因化学物質 (群) が特定されている場合、その物質を使用している工程の洗い出しや処理方法の検討を行うが、特定できなかった場合には、生物応答試験を用いて生物への影響が最も大きい排水路 (工程) の特定を行う等して、原因物質が使用されている発生源を特定すべく努力する。第 5 段階では、特定された原因物質や発生源に対して適切な改善方法の検討を行い、削減を実行する。最後に、第 6 段階で削減の確認を行う流れとなっている。

## 2 排水改善手法の標準的な手順

### [ 第 1 段階 ] 情報及びデータ収集

第 1 段階では生物影響が検出された排水について、用水・排水の水質モニタリングデータ、生產品目やその製造方法および使用化学物質についての情報、排水処理施設に関するデータ、排水規制に関する情報などを収集する。

### [ 第 2 段階 ] 処理工程の最適化

第 2 段階では第 1 段階で得られた情報を基に、使用化学物質と現行の排水処理について評価し、以下の 3 つの負荷削減対策のいずれか (またはすべて) を実施する。

- ・ 使用化学物質の見直し

  - 代替品への変更や使用量の削減

- ・ 処理手法の見直し

  - 既存の処理システムの処理性能が最大になるよう改善する。例えば、粉末活性炭投入量の変更、活性汚泥法の汚泥滞留時間の延長などが挙げられる。

- ・ 処理施設の運転管理方法の改善

  - 施設清掃や廃棄物管理の方法、化学物質を取り扱う機具やエリアの管理方法、排水経路の見直しや、漏水の確認などを行う。

この段階で問題となった排水の影響を削減できた場合 TRE は終了となる。しかし、削減できない場合は第 3 段階の毒性同定評価 (TIE) を実施する。

### [ 第 3 段階 ] 毒性同定評価 (TIE)

第 3 段階では、排水影響の原因となる化学物質 (群) やそれらを削減することができ処理手法を特定する。原因推定の基本的な考え方は、排水に実験室レベルで物理化学的な前処理を行った後に生物応答試験に供し、未処理の排水に対して影響が低減した場合、処理によって除去・分画された物質 (群) を原因と推定するというものである。例えば金属のキレート処理後の排水の生物影響が低減した場合は、金属類が主要な原因物質群として推定される。具体的には以下の 3 つの手順 Phase 1 ~ 3 により

構成される。

Phase 1 では、どのような物理的・化学的特性の化学物質群が生物影響に寄与しているのか、排水影響や原因物質の特徴を整理する。排水処理を模した物理化学的な処理や特定の物質群を除去できる前処理（pH 調整、エアレーション、活性炭・吸着剤・イオン交換樹脂処理、チオ硫酸ナトリウム添加等）を実験室レベルで行い、未処理排水とともに生物応答試験に供して、生物影響が低減されるかを評価する。生物影響が低減された場合、処理によって除去・分画された化学物質群を主要原因と推定する。

Phase 2 では、Phase 1 において主要原因と推定された化学物質群が広範囲にわたる場合に、さらに絞り込みを行う。Phase 1 と同様に排水の物理化学的な前処理と生物応答試験により、排水中の特定の物質群の生物影響を確認するとともに、化学分析を併用して物質の同定を試みる。このとき、検出された化学物質について、各試験生物に対する感受性データが入手可能な場合は、最大無影響濃度等と排水中濃度を比較し、排水中濃度の方が高い場合は原因物質候補とする。ただし、個別物質では毒性レベルに達していなくても、複数の物質と合わさることで相乗的な影響を引き起こしている場合や、反対に毒性が相殺されている場合があるため、Phase 3 における確認が必要不可欠である。

Phase 3 では、Phase 2 で推定された原因物質（群）候補が、排水の生物影響に寄与しているかどうか確認試験を行う。確認方法は物質により様々であるが、主に、生物影響のない処理排水や試験用水等に原因物質（群）候補を添加して生物応答試験に供し、元の排水と同程度の生物影響を示すか否かで判断する。

TIE で大切なことは、排水が有する毒性の原因物質（群）の名前を明らかにすることではなく、原因物質（群）の特性すなわち生物への影響の度合い（毒性負荷）を把握することである。具体的には、TRE/TIE 手法では、排水に対してまず何らかの処理を行い、その処理後に生物影響が削減された場合、その処理によって削減された物質の中に原因物質が含まれていたと考える。この時に把握した削減方法は、第 5 段階で実施する効果的な排水改善方法のヒントになる。

例えば、キレート処理によって金属を除去して毒性が削減された場合、原因物質（群）は金属の可能性が高く、金属を除去するような排水処理方法を導入すれば毒性が低減されることが期待できる。また、排水の pH を一度アルカリ側にして沈殿処理を行い、もう一度中性に戻して試験した結果毒性が削減された場合、アルカリ側で分解または沈殿する物質群が原因物質の可能性もある。ただし、この場合はアルカリで分解する物質としては様々な有機化合物が、沈殿する物質としては様々な重金属類が考えられるため、これだけで原因物質を推定できるわけではない。しかし、処理工程に pH 調整の工程を加えることで、特定の原因物質は分からなくても、影響を低減することは可能となる。

#### [ 第 4 段階 ] 発生源評価

第 4 段階では、第 3 段階で原因物質（群）が特定された場合、ピンポイントでその最適な処理を行うため、その物質（群）がどの工程で発生しているか特定を試みる。発生源であると疑われる工程の排水を用いて、原因物質（群）の化学分析または生物

応答試験を実施し、影響を及ぼしている工程を特定する。第3段階で原因物質（群）が特定されていない場合は、生物応答試験のみを用いて、最も生物影響が大きい排水経路の特定を試みる。発生源の見当がつかない場合は、最終放流口から排水経路をさかのぼり、生物応答試験または化学分析の結果から発生源を特定する。

#### [ 第5段階 ] 排水改善方法の選択と実施

第5段階では、第3段階、第4段階で特定された原因物質や発生源に対して、排水改善方法を検討・実行する。原因物質の発生源の処理プロセスを見直し、原因物質が生成されないようにする方法と、発生した原因物質を適切な処理により除去する方法の2通りのアプローチがある。現実に原因物質を除去するためにどのような手法を選択するかはTIEの結果を参考にした上で利用可能な最善の手法（BAT: Best Available Technology/Technique）を事業者が判断する。

#### [ 第6段階 ] 確認とフォローアップ

第6段階では、生物応答試験による定期的なモニタリングを実施して、排水の生物影響が規制基準等を達成するレベルまで改善したかを確認する。特定した原因物質のモニタリングを行うこともある。削減効果が確認されればTREは終了となる。

- \*1)US EPA, Generalized Methodology for Conducting Industrial Toxicity Reduction Evaluations (TREs), EPA/600/2-88/070(1989)
- \*2)US EPA, Toxicity Reduction Evaluation Guidance for Municipal Wastewater Treatment Plants, EPA/833B-99/002(1999)
- \*3)US EPA, Clarifications Regarding Toxicity Reduction and Identification Evaluations in the National Pollutant Discharge Elimination System Program(2001)

## 米国におけるWET試験を活用した排水改善等の事例について

※本資料で記載した事例は、米国環境保護庁(EPA)が発行している次の文書で紹介されている事例である。これらは、海外における1970～1990年代の排水毒性の原因調査、排水改善等の事例であり、各事例中で行われた取組が現在の我が国で実施可能又は必要かどうかを判断するものではない。

・産業系事業場: Generalized Methodology for Conduction Industrial Toxicity Reduction Evaluation (TREs), EPA/600/2-88/070, 1989年4月

・下水処理施設: Toxicity Reduction Evaluation Guidance for Municipal Wastewater Treatment Plants, EPA/833B-99/002, 1999年8月

※下記の事例で紹介されている事業場における排水処理技術等は、現在の我が国の事業場で用いられているものとは異なる可能性がある。また、各州における関連制度等は排水改善等が行われた当時から変更されているものがある(例: 慢性毒性試験法の整備等)。

※各欄中で「-」とされているものは、当該欄に対応する情報が出典元の文書に記載されていなかったことを示す。

### 1. 産業系事業場

番号	施設の名称	所在地(州)	排水毒性に係る調査、排水改善等の時期	事業場情報							主な排水毒性原因とされた物質(群)	排水毒性削減が必要とされた生態毒性と試験生物種	毒性原因調査の際に用いられた生物応答試験	
				業種、施設の概要	規模(排水量)	排水口の数	排水先水域	当初想定された排水中の主な汚濁物質	排水の発生・処理工程、処理技術の概要等	排水前の塩素添加				
1	A Multipurpose Speciality Chemical Plant (MSCP) in Virginia	ヴァージニア州	1985年～1986年前半	多目的化学工場(高機能物質、農薬、アミン化合物等の製造、研究所等)	約1,960m <sup>3</sup> /日(518,000ガロン/日)	1	-	-	-	・排水は各製造物質の製造工程の他、研究所、冷却水等からも発生 ・ばっ気槽、沈殿槽(2槽)等により排水処理	-	農業(ジクロルボス、製造工程で使用)	・魚類(ファットヘッドミノー)急性毒性 ・オオミジンコ(D. magna)急性毒性	オオミジンコ(D. magna)急性毒性試験
2	Tosco Corporation's Avon Refinery	カリフォルニア州	1986年6月頃～(1989年の出典文書とりまとめ当時、調査未了)	精油所(ガソリン、ディーゼル燃料などを精製)	約11,700m <sup>3</sup> /日(310万ガロン/日)	1	海域	-	-	・排水は、化学物質や油類、生活排水などを含むもの。 ・ばっ気、生物処理(Rotating biological contactors)、沈殿・ろ過により排水処理。	-	中性有機化合物(具体的な原因物質は不明)	魚類(トゲウオ)急性毒性	発光細菌試験(標準試験法として整備されたものではないが、魚類急性毒性試験の結果との相関性があるとして、より簡易に実施できる方法として用いられた)
3	Martinez Manufacturing Complex, Shell Oil Company	カリフォルニア州	1976年～1985年(調査は数次に分かれる)	精油所(ガソリン、ディーゼル燃料、潤滑油、グリースなどを精製・製造)	15,000m <sup>3</sup> /日	1	河川(河口域)	油類・グリース、アンモニア、浮遊物質など	・原油と水を分離後、活性汚泥処理、二次分離、ろ過などにより排水処理。	-	油・グリース(主にナフテン酸)、アンモニア、有機アミン化合物	魚類(トゲウオ)急性毒性	・急性毒性試験: 魚類(トゲウオ)急性毒性試験など計6種(トゲウオ試験以外の内訳は記載なし) ・慢性毒性試験3種(内訳は記載なし)	
4	A North Carolina Textile Mill (Glan Raven Mills)	ノースカロライナ州	1985年初頭～1987年前半	繊維工場(染色等)	約100m <sup>3</sup> /日(2万7千ガロン/日)	不明	河川	BOD、COD(界面活性剤由来など)、浮遊物質、硫化物、フェノール、クロム等の金属類	・約9割が染色工程に由来する排水。残りは生活排水。 ・工程排水は活性汚泥処理。	あり	界面活性剤	ミジンコ(D. pulex)急性毒性	ミジンコ(D. pulex)急性毒性試験	
5	A North Carolina Metal Product Manufacturer (Halstead Metal Products)	ノースカロライナ州	1985年6月頃～1987年(毒性削減は未了)	金属製品製造工場(銅製パイプの成型など)	約20m <sup>3</sup> /日(5,400ガロン/日)	不明	河川	銅、pH、BOD、COD(界面活性剤由来など)、油・グリースなど	・排水は生活排水(従業員の作業後に行う手洗い等の排水)由来で、製造工程に直接由来する排水は僅少。 ・活性汚泥法で排水処理。	あり	銅	ミジンコ(D. pulex)急性毒性	ニセネコゼミジンコ(C. dubia)急性毒性試験	
6	Texas Instruments Facility in Attleboro	マサチューセッツ州	1984年～1985年前半(毒性削減は未了)	-	-	3つ(うち金属加工工程に由来する一つについて調査)	河川	金属	不明(過酸化処理あり)	-	金属	・魚類(ファットヘッドミノー)急性毒性 ・ミジンコ(D. pulex)急性毒性	・ミジンコ(D. pulex)急性毒性試験 ・ミジンコ(C. affinis/dubia)慢性毒性試験(魚類よりも当該事業場の排水毒性の影響を受けやすいことからミジンコが選択されたもの)	

番号 (再掲)	排水生態毒性の原因調査の主な内容						排水毒性削減方法	一連の調査、排水改善等 において生じた課題
	処理工程等の最適化に ついての検討内容	毒性同定評価 (Toxicity Identification Evaluation, TIE)			毒性発生源の調査			
		Phase1: 毒性物質の特徴化に係る調査	Phase2: 毒性物質の絞り込みに係る調査	Phase3: 毒性物質の確認に係る調査				
1	—	・排水中の化学物質をガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) によって無機化合物と有機化合物に分画し、分画後のそれぞれのサンプルについて生物応答試験を実施。生態毒性を調査。有機化合物を含むサンプルで毒性を確認。 ・当該サンプルに含まれる有機化合物を、更に、酸性、中性・アルカリ性、残渣に含まれるものに分画。酸性、中性・アルカリ性の化合物に由来する毒性を確認。	GC/MS分析により、具体的な生態毒性原因となった有機化合物の絞り込みを行った結果、ジクロロボス(農業)など3種類の化合物が候補とされた。	3種の原因候補物質の排水中濃度と排水毒性の関係を生生物応答試験を用いて調査した結果、ジクロロボス濃度とミジンコ急性毒性の関係が認められた一方、他2物質についてはこうした結果が得られず、ジクロロボスを主な毒性原因物質と判断。	・事業場で製造している農業を梱包する工程で原因物質が使用され、梱包用容器の洗浄水が排水に流入したことが発生源と推定。 ・1985年11月に上記の使用プロセスを停止した後、排水毒性が低減されたことで確認。	毒性の発生源とされた作業プロセスの停止により、排水毒性を削減。	ジクロロボスに由来する排水毒性を削減した後、事業場内の排水処理施設の不具合により、別の物質が原因とみられる毒性が一時的に確認された。	
2	—	・分画用の樹脂や有機溶媒を用い、排水中の有機化合物と無機化合物を分画し、分画後のそれぞれのサンプルについて生物応答試験を実施。有機化合物を含むサンプルで毒性を確認。 ・当該サンプルに含まれる有機化合物を、更に、酸性、中性、アルカリ性のものに分画。中性有機化合物を含むサンプルから最も強い毒性が、次いで酸性有機化合物を含むものから毒性を確認。 ・無機化合物を含むサンプルは、有する電荷の陰陽によって更に分画したサンプルについて試験を実施。	・有機化合物に由来する毒性原因について、GC/MS分析と既存文献における検出物質の毒性値を比較したが、3回の測定結果が変動し、また、GC/MS分析で検出された物質の範囲内では元のサンプルの毒性を説明できなかった。 ・別途行われている排水の常時水質モニタリング結果 (pH、浮遊物質量、フェノール、アンモニア、油類・グリース、クロム、亜鉛、硫黄、塩素、溶存酸素量 (DO)、水温、流量) と生態毒性との相関性を比較したが、相関は確認されなかった。	—	・排水処理前後や排水の発生源となる各工程の前後でサンプル採取し生態毒性を比較した結果、排水処理により80%以上の生態毒性が削減されていること、毒性への寄与が大きな排水発生源としてアンモニアリカバリーユニット (Ammonia Recovery Unit) 等があることが判明。 ・化学分析により、当該ユニット等を経た後のサンプルからは、中性以外の有機化合物が相対的に高濃度で検出。	中性有機化合物を除去する様々な処理方法を検討中 (1989年当時)。	生産プロセスの予期せぬ変更によって排水の性状が変動し、予定していた調査が困難になったことがあった。	
3	・化学分析の結果から、油類中のナフテン酸の排水毒性への寄与を推定。 ・アミン化合物の製造状況が排水毒性と関連することが確認され、当該化合物の分解等により生成したとみられるアンモニアやポリエチレンイミン (別途、排水処理工程において凝集剤として利用) も毒性原因候補として推定。 ・アンモニアの排水毒性への寄与は、定期的な生物応答試験と化学分析、生物硝化処理の導入によるアンモニア濃度低下による排水毒性の低下などから確認。	各原因候補物質 (群) の排水中濃度などから、排水毒性への各物質 (群) の寄与を推定したところ、約3割がナフテン酸、約2割がアンモニア、約4割がポリエチレンイミン、残り約1割が浮遊物質と推定。	・ナフテン酸: 原油脱塩装置の洗浄水から排水に流入したとみられたため、当該装置の改良を実施。 ・アンモニア: 活性汚泥槽に硝化処理を設置。 ・ポリエチレンイミン: 排水処理工程における使用を停止。(浮遊物質については、特段対策不要と判断)	一部の原因物質は非急性の毒性を示したが、こうした毒性に係る削減評価方法は当初未確立だった。				
4	染色工程で使用する化学物質質量 (染料、界面活性剤など) の最適化を図ったが、更なる毒性原因調査を行わない段階では、毒性削減には特段効果がなかった。	・当初より毒性原因と推定されていた金属と界面活性剤について、排水中濃度分析を生物応答試験と組み合わせつつ実施。結果、銅などの金属、非イオン系界面活性剤、陰イオン系界面活性剤が毒性に寄与していると考えられる濃度で検出。 ・排水サンプル中から金属を除去した後も排水毒性の削減は僅少だったことから、界面活性剤が主な毒性原因と判断。	・当初より染色工程が原因と推定されていた。 ・既存の知見で未分会の非イオン系界面活性剤が水生生物への影響を及ぼすと報告があったことから、染色工程に添加する界面活性剤を生分解性のより高いものに代替。 ・また、排水処理工程への排水流入量の均等化による処理槽滞留時間の延長、染色工程への染料の添加量低減を実施。	—				
5	右欄のTIEに先立ち、排水路にトラップを設置し銅片の排水処理工程への流入を防止。	・毎月の生物応答試験と排水中銅濃度の測定により、排水中の銅濃度が試験生物に毒性のあるレベルだと確認。また、銅に比べ寄与度は低いが、亜鉛も排水毒性に寄与している可能性があることを排水中濃度の測定などから確認。 ・有機化合物については、既存の排水処理設備で処理されていることをCOD等の測定から確認。	・金属を選択的に試験生物に対して無害化するキレート剤を排水サンプルに添加するなどし、生物応答試験を行った結果、排水毒性の削減を確認。これにより、銅などの金属が毒性原因物質と確認。 ・なお、排水中の塩素が銅の可溶性を高めていると考えられた。	事業場で使用している井戸の一つで、銅濃度が生態毒性を生じるレベルであったことを確認。	・排水処理槽のばつ気頻度を高める、製造工程で使用している石灰を排水処理工程でも活用するなどの処理方法の改善が費用対効果を考慮に入れて有効とされた。 ・また、排水中の塩素濃度を削減する方法も提案された。	—		
6	—	・排水の急性・慢性毒性試験を、重金属類を中心とした約20の水質項目の測定とともに5セット実施。 ・この結果、個別の金属種の濃度と排水毒性の間に相関関係は確認されなかったが、銀、銅及び鉛が濃度が低いとき、排水毒性も低くなった。この傾向は、他の金属種の濃度が高くても影響されなかった。	—	・排水処理工程における不溶 (鉄) 硫化物沈殿処理、膜処理、キレート樹脂によるイオン交換、溶存硫化物 (硫化ナトリウム) による沈殿ろ過を改善策の候補としてパイロットスケールで実施し、これらの実施可能性をコスト面を踏め検討。 ・パイロット試験で十分な毒性削減が行われた不溶 (鉄) 硫化物沈殿処理を既存の処理に追加して導入する方向で、検討することとされた。	—			

7	Chemical Plant I	西海岸	1985年～1986年	化学工業 (有機染料(中間生成物を含む)、エポキシ樹脂、紡績・製紙・プラスチック産業に用いる化学製品を製造)	—	—	海域	—	排水は活性汚泥処理	—	非生分解性有機化合物	アミ(M. bahia)急性毒性	アミ(M. bahia)急性毒性試験
---	------------------	-----	-------------	---	---	---	----	---	-----------	---	------------	------------------	--------------------

7	<p>・ばっ気期間を延長し、生分解性の塩素系有機化合物を除去したが、毒性削減されず。</p>	<p>・排水中の多くの有機化合物を抽出・分離できる添加剤を加えて処理を行ったサンプルに対し、生物応答試験を実施。毒性低減は確認されず。</p> <p>・非生分解性/無極性有機化合物の影響を調べるため、活性炭を用いて追加的な処理を行ったサンプルに対し、生物応答試験を実施。結果、サンプルの全有機物量(TOC)及び生態毒性が完全に除去。</p> <p>・金属類については、除去のための硫化物、水酸化物、ミョウバンを用いて沈殿・ろ過処理を追加的に行ったサンプルに対し、生物応答試験を実施したが、毒性低減は確認されず。</p>	<p>・GC/MS分析の結果、生態毒性を示したサンプルから、毒性を及ぼすレベルの濃度のベンズアントラセンを検出。</p> <p>・この他、毒性の有無にかかわらず、クロロホルム、テトラクロロエチレン、1,1,1-トリクロロエタン、ナフタレン、フタル酸ジブチルがサンプルから、ベンズアントラセンと同程度の濃度で検出。</p>	<p>・既存の排水処理工程における生物処理が排水毒性に及ぼす影響を調査した結果、処理前後でTOCと毒性への影響は確認されず。</p> <p>・これにより、非生分解性の有機化合物物が主な毒性原因とされた。</p>	<p>・7つの製造工程排水について調査したところ、排水処理前後のいずれでも生態毒性を確認。</p> <p>・126の排水ラインを調査したところ、クラスA(非生分解性、毒性あり)に該当するものが14ライン、クラスB(生分解性、毒性あり)が24ライン、クラスC(毒性なし)が、間接的に毒性に寄与する可能性あり)が29ライン、クラスD(毒性への影響なし)が54ラインとされた。</p> <p>・クラスA及びBにかかわる工程について毒性削減を検討。</p>	<p>・毒性発生源対策として、製造ユニットごとに工程排水のプロファイル、マテリアルバランスシートを作成し、毒性物質の負荷量を削減。</p> <p>・排水処理改善方策として、金属沈殿、逆浸透膜処理、過酸化処理、活性炭処理、粉末状活性炭処理、粒状活性炭処理、湿エアレーション処理、オゾン処理等が排水改善方法として検討され、結果、処理能力、設備上の実施の容易さ、コスト等を考慮し、粉末活性炭処理を選択。</p>	<p>・排水性状に日変動があった。</p> <p>・活性汚泥法での有機物除去性能を向上させると、添加する粉末活性炭の消費量が増える。</p>
---	--	---	--	---	--	--	--



番号	施設の名称	所在地(州)	排水毒性に係る調査、排水改善等の時期	事業場情報							排水毒性削減が必要とされた生態毒性と試験生物種	毒性原因調査の際に用いられた生物応答試験	
				業種、施設の概要	規模(排水量)	排水口の数	排水先水域	当初想定された排水中の主な汚濁物質	排水の発生・処理工程、処理技術の概要等	排水前の塩素添加			
8	Chemical Plant II	-	-	化学工業 (界面活性剤及びその誘導体、合成有機化合物等を製造)	-	1つ	-	フェノール、陰イオン系界面活性剤、油類・グリース	・排水組成は複雑で、製造工程中の反応容器に由来する排水と、冷却設備などからの塩分を含む排水、生活排水など混合されたもの。 ・排水は、不溶物の粗ふるい分け、油分の回収、中和処理、活性汚泥処理、ポリマー添加などによる沈殿ろ過等を経て、塩素処理される。排水処理槽は6つ(以上)ある。	あり	ノニルフェノール及びノニルフェノールエトキシレート	アミ(M. bahia)急性毒性	アミ(M. bahia)急性毒性試験
9	I.T.T. Rayonier Plant	フロリダ州	1985年～1986年前半	パルプ製造業	-	-	河川	-	沈殿処理、中和処理、ばっ気等により排水処理を実施	-	アンモニア	ミジンコ(Ceriodaphnia属)急性毒性	(淡水生物試験) ・魚類(ファッドヘッドミノー)短期慢性毒性試験 ・ニセネコゼミジンコ(C. dubia)急性毒性試験(主に使用) ・ミジンコ(C. reticulata)短期慢性毒性試験 ・ウキクサ慢性毒性試験(海産生物試験) ・魚類(シルバーサイドミノー、シーブスヘッドミノー)急性・慢性毒性試験 ・ウニ急性・慢性毒性試験 ・アミ急性・慢性毒性試験 ・紅藻急性・慢性毒性試験

番号 (再掲)	排水生態毒性の原因調査の主な内容			排水毒性削減方法	一連の調査、排水改善等 において生じた課題	
	処理工程等の最適化に ついての検討内容	毒性同定評価 (Toxicity Identification Evaluation, TIE)				
		Phase1: 毒性物質の特徴化に係る調査	Phase2: 毒性物質の絞り込みに係る調査			Phase3: 毒性物質の確認に係る調査
8	製造工程排水処理槽と生活排水処理槽のそれぞれの有機化合物除去率を評価した結果、既存の処理工程の最適化で排水改善が当初可能と考えられたことから、この可能性を訴求する観点を持ちつつ以降のTIEを実施。	<ul style="list-style-type: none"> <li>排水の化学分析結果と生物応答試験の結果を比較することにより、ノニルフェノール及びその誘導体であるノニルフェノールエトキシレートの濃度と排水毒性の間に相関があることが確認された。</li> <li>ノニルフェノールを添加した活性汚泥処理槽ではTOCの除去率が低くなることを確認。</li> <li>これらにより原因物質として推定。</li> </ul>			<ul style="list-style-type: none"> <li>毒性発生源対策については、濃度が高く排水量の少ない工程排水を冷却水等から分離して混合を回避し、事前に処理することが有効とされた。</li> <li>排水改善方策として、活性炭処理、イオン交換樹脂等の添加、ミョウバン処理、過酸化水素処理を検討し、活性炭処理については粉末活性炭処理と粒状活性炭処理を比較したところ、粉末活性炭処理が最もノニルフェノールエトキシレートの除去率が高く、コストと施設面でも適していることが分かった。</li> </ul>	—
9	—	<ul style="list-style-type: none"> <li>文献値と金属濃度を比較する等しつつ、金属を選択的に無害化するキレート剤を排水サンプルに添加し、毒性の低減の調べたところ、毒性が低減されたサンプルと低減されなかったサンプルがあり、金属が毒性原因の可能性が残された。</li> <li>排水サンプルのpHを調整し、pH上げたサンプルを用いて生物応答試験を実施すると毒性が大きくなり、pHを下げたサンプルを用いると毒性が低減された結果となった。また、比較のため、排水中と同濃度のアンモニアを水に添加し、pHを調整したサンプルを用いて生物応答試験を実施したところ、排水由来のサンプルと同程度の生態毒性を示した。これらにより、アンモニアを毒性原因物質の候補として絞り込み。</li> <li>金属とアンモニアのいずれが主要な毒性原因であるか調べるため、排水サンプルのろ過（懸濁物の除去）、エアーストリッピング（揮発性かつ酸化性物質を除去）、キレート剤処理（陽イオン性金属の除去）、還元剤添加処理（酸化性の物質（塩素等）の濃度を低減）、無極性有機化合物の除去等を行った上で、生物応答試験（ミジンコ急性毒性試験）を実施。結果、揮発性を有するアルカリ性の物質であるアンモニアが主な毒性原因候補物質と判断。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>排水サンプルのミジンコ急性毒性とアンモニア濃度の相関性を、試験サンプルの状態を調整しつつ調べた結果、非イオン態のアンモニアの濃度と毒性の間に有意な相関あり。</li> <li>サンプル中のアンモニア濃度の低減により、紅藻類への生態影響が低減。</li> <li>海産生物（ウニ、アミ、魚類）に対する排水中アンモニアの毒性と、アンモニアの毒性文献値を比較した結果、排水中濃度と文献における感受性データが整合。</li> <li>以上からアンモニアを毒性原因物質と同定。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>エアーストリッピングによるアンモニアの除去後、中和処理やバクテリアによる生物学的な硝化・脱窒処理を実施することが毒性削減に有効だった。</li> <li>電気化学的処理、塩素処理、イオン交換、微生物同化処理も検討されたが、本事例では適切な技術ではないとされた。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>小規模実験系での生物応答試験（ミジンコ試験）はpHの制御が困難であったが、排水の着色により大規模な実験系での試験は行えなかった。</li> <li>これに対する対応として、ミジンコより感受性の高いファットヘッドミノーの急性毒性試験も代替的に実施した。</li> </ul>	

2. 下水処理施設

番号	施設又は施設所在地等の名称	所在地(州)	排水毒性に係る調査、排水改善等の時期	事業場情報							排水前の塩素添加	主な排水毒性原因とされた物質(群)	排水毒性削減が必要とされた生態毒性と試験生物種	毒性原因調査の際に用いられた生物応答試験
				排水の発生元の内訳等	規模(排水量)	排水口の数	排水先水域	当初想定された排水中の主な汚濁物質	排水処理技術の概要等					
1	Central Contra Cost Sanitary District, Martinez	カリフォルニア州	-	・生活排水と事業場排水の両方が流入 ・排水元となる地域の人口は約40万人、面積は約325km <sup>2</sup> (126平方マイル)	約14万6千m <sup>3</sup> /日(38.7百万ガロン/日)	-	海域	-	-	一次沈殿処理、活性汚泥処理(石灰添加あり)、二次沈殿を経て、塩素添加	あり	金属(主に銅)、アンモニア	ウニ受精阻害(D. excentricus: カシパンウニ、S. purpuratus: ムラサキウニの2種。排水先海域に生息することから使用。)	ウニ受精阻害試験(生物種は左記の2種)
2	Central Contra Cost Sanitary District, Martinez, California, and Other San Francisco Bay Area Publicly Owned Treatment Works (POTWs)	カリフォルニア州	1992年~1997年	・主な調査対象は番号1の事例と同様に生活排水と事業場排水が両方流入する下水処理施設(1カ所) ・排水元となる地域の人口等は1番の事例と同様 ・この他、上記処理施設を含む計9つの近郊の下水処理施設が毒性原因物質の存在状況調査(注:生物応答試験を用いた調査ではない)の対象に。	主な調査対象において約14万7千m <sup>3</sup> /日(39百万ガロン/日) (他8つの処理施設は、約2万3千m <sup>3</sup> ~約51万8千m <sup>3</sup> /日(6~137百万ガロン/日))	-	-	-	(主な調査対象処理施設) ・活性汚泥処理  (他の毒性原因物質の存在状況調査対象処理施設) ・5つの処理施設: 活性汚泥処理 ・2つの処理施設: フィルムリアクター(1つは嫌気槽あり) ・1つの処理施設: 生物膜処理	紫外線照射で消毒を実施(他の8つの処理施設では、6つで塩素処理、1つで紫外線照射、1つは特段添加等なし)	有機リン系殺虫剤(ダイアジノン、クロピリフォス)	・ミジンコ(C. dubia)急性毒性 ・ウニ急性毒性	ミジンコ(C. dubia)急性毒性試験	
3	City of Reidsville	ノースカロライナ州	1992年~1994年	8つの事業場(繊維工場、たばこ製造工場、缶製造工場、食品工場、金属加工工場等)が接続している下水処理施設	-	-	-	(TIEでの排水毒性原因の特定が困難だった事例として紹介されている)	-	-	-	ニセネコゼミジンコ(C. dubia)慢性毒性	ニセネコゼミジンコ(C. dubia)繁殖試験	
4	Michigan City Sanitary District	インディアナ州	1991年4月~1997年10月(1992年6月以降に急性毒性は確認されず)	-	約4万5千m <sup>3</sup> /日(12百万ガロン/日)	-	-	金属、アンモニア	・活性汚泥、砂ろ過 ・BOD除去率 96.7%、浮遊物質除去率 96%	-	金属	・魚類(ファットヘッドミノー)急性・慢性毒性 ・ミジンコ(C. dubia)急性・慢性毒性	・魚類(ファットヘッドミノー)急性・慢性毒性試験 ・ミジンコ(C. dubia)急性毒性試験・繁殖毒性試験(調査の初期段階では、コストと感受性の観点から、ミジンコ急性毒性試験を使用)	
5	Linden Roselle Sewage Authority	ニュージャージー州	1989年~1997年	・流入水量の約20%が産業系(40事業者) ・排水元の地域の面積は約33km <sup>2</sup> (13平方マイル)	約4万9千m <sup>3</sup> /日(13百万ガロン/日)	不明	河川(河口域)	不明	・沈殿ろ過、活性汚泥処理等	あり(州の排水許可要件により、生物応答試験には塩素添加前の段階の排水が用いられた)	アンモニア、無極性有機化合物	アミ(M. bahia)急性毒性	・ミジンコ(C. dubia)急性毒性試験 ・アミ(M. bahia)急性毒性試験(調査の初期段階では、当時アミへの毒性についての知見が乏しかったことから、ミジンコ試験を使用)	

番号 (再掲)	処理工程等の最適化についての検討内容	排水生態毒性の原因調査の主な内容			排水毒性削減方法	一連の調査、排水改善等において生じた課題	
		毒性同定評価 (Toxicity Identification Evaluation, TIE)					毒性発生源の調査
		Phase1: 毒性物質の特徴化に係る調査	Phase2: 毒性物質の絞り込みに係る調査	Phase3: 毒性物質の確認に係る調査			
1	—	<ul style="list-style-type: none"> <li>EPAが1988年に発行したTIEメソッドに従い、排水サンプルに対し、pH、ばっ気、金属を選択的に除去するキレート剤添加、無極性有機化合物の除去等を実施して毒性原因を調査した結果、既存の知見との比較から、排水中の陽イオンが原因物質として疑われ、特に銅が主要因として推定。</li> <li>他の陽イオン性物質(銀等)とアンモニアの生態影響も調査。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>排水に対する生物応答試験では、カシバウニの方が、ムラサキウニよりも感受性が高かった。</li> <li>銅、アンモニアを個別物質としてばく露した試験でも、カシバウニの方が感受性が高くなった(排水に対する試験と同じ傾向だった)が、銀等の陽イオン性の金属に係るばく露試験では2種の感受性は同程度だった。これらの結果は、排水中の銅とアンモニアが毒性原因物質である場合に想定される試験結果と矛盾しない。(アンモニアに係る調査はここまで)</li> <li>銅については更に、排水中濃度を調べたところ、当該排水には、試験生物種に対する最大無影響濃度(NOEC)の0.4~5.3倍の銅が含まれていた。他の金属の濃度はNOEC未満で、銅が主な毒性原因であることが更に支持された。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>排水中の銅濃度を、サンプルに銅を加えるなどして調整して生物応答試験の結果への影響を調べたところ、銅濃度に従って排水毒性が増加。</li> <li>これにより、銅が主な毒性原因物質と確認。</li> </ul>	—	—	
2	下水処理施設の処理性能に特段問題はなかった。	<ul style="list-style-type: none"> <li>5つの排水サンプルを対象に、無極性有機化合物を選択的に除去する処理、有機リン系殺虫剤の生態毒性を選択的に除去する添加剤を用いる処理、金属を選択的に除去するキレート剤処理、還元剤の添加処理、pH調整等の前後で生物応答試験を実施し、各処理等による毒性変化を調査。</li> <li>金属除去、pH調整等では大きな毒性変化がない一方、有機リン系殺虫剤の除去処理等によりサンプルの毒性が低減されたことから、有機リン系殺虫剤が毒性原因物質の候補とされた。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>4つの排水サンプルを対象に、クロマトグラフィーなどによる化学的な手法により排水中物質の分離・抽出を実施。</li> <li>分離後のサンプルの毒性評価により、ダイアジノンが原因物質の一つであることを特定。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>7つの排水サンプルを対象にダイアジノン濃度と毒性の相関関係を、生物応答試験を用いるなどして評価。</li> <li>当該相関は認められたが、排水全体の毒性値がダイアジノンの毒性のみでは説明できないことが判明。追加の化学的な手法による排水サンプルからの有機リン化合物の抽出・分析を実施。</li> <li>全サンプルから有機リン系殺虫剤のクロピリフォスが試験生物に生態毒性を及ぼすレベルの濃度で検出。</li> <li>これらの調査により、有機リン系殺虫剤である2物質が毒性原因と特定された。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>農業規制当局と共同で、住宅地区5地点、商業地区12地点から計200以上の排水サンプルを採取して、原因2物質の濃度・流量を測定するなどし、下水処理施設への負荷量を推計。</li> <li>結果、排水中濃度変動は大きかったが、ダイアジノンの52%、クロピリフォスの60%が生活排水等の住宅地域由来であったと推計(割合の残りは、調査対象となったペット関係事業場又は不明)</li> <li>(原因物質はペットのノミ駆除などに用いられていたことから、調査対象業種はこれを踏まえたものとされた)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>左記調査が行われた下水処理施設を含めた近隣の計9つの処理施設における原因2物質の流入水・排水中濃度が農業規制当局により調査され、全処理施設で両物質の流入等が確認された。</li> <li>これらの調査の後、原因2物質の大手製造事業者(紹介は物質毎に各1事業者)において、EPAと連携した製造製品における原因物質の使用量削減や消費者への製品の適正廃棄(殺虫剤を側溝等に流さないことなど)を呼びかける製品表示の充実等の取組が行われた。</li> </ul>	—
3	—	TIEでは毒性原因物質の絞り込みが行えず。			<ul style="list-style-type: none"> <li>排水元の7事業場の排水を対象とした生物応答試験の実施により、5事業場が毒性発生源の可能性があるとされた。</li> <li>実際の下水処理施設の排水フローを模した小規模な実験系で、5事業場の排水を加えて最終排水の生物応答試験を実施。(Toxicity Tracking Assessment (RTA)と呼ばれる手法)</li> <li>結果、繊維工場排水のみを加え場合に最終排水の生態毒性が大きくなり、当該工場を毒性発生源と判断。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>実用的な排水毒性削減技術として、生態毒性を有する化学物質の使用の代替、これらを含む排水の最小化などの取組が各排水元の事業場(繊維工場以外を含む)に求められた。</li> </ul>	TIEによる毒性原因物質の絞り込みが行えなかった。
4	—	<ul style="list-style-type: none"> <li>排水サンプルに対し、無極性化合物(有機金属錯体、一部の金属等)を選択的に除去する処理、金属(イオン)選択的に除去するキレート処理等を行い、各処理後のサンプルについて生物応答試験を実施。</li> <li>上述の2種類の処理により排水毒性が低減されたことから、金属が毒性原因と推定された。(ただし、具体的な金属の種類は特定できなかったとみられる)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>排水サンプルに対して特定の物質群の抽出処理等を行い、各処理後のサンプルについて生物応答試験を実施。</li> <li>上述の2種類の処理により排水毒性が低減されたことから、金属が毒性原因と推定された。(ただし、具体的な金属の種類は特定できなかったとみられる)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>MSiン市当局が、金属を当該下水処理施設に排出している可能性がある事業場を調査したところ、許可違反のあるカドミウムめっき工場が排出元にあることが判明。</li> <li>当該工場の操業が停止した1992年4月以降、下水処理施設排水の毒性が確認されなくなった。</li> </ul>	—	—	
5	下水処理施設の処理性能に特段問題はなかった。 アンモニア濃度と排水毒性の関係について、評価が必要と示唆された。	<ul style="list-style-type: none"> <li>EPAが1988年に発行したTIEメソッドに従い、排水サンプルに対して特定の物質群の抽出処理等を実施し、その前後でのサンプルの毒性を比較。</li> <li>これにより、アンモニアを主要な毒性原因物質と推定。</li> <li>また、無極性有機化合物も毒性に寄与している可能性があると推定。(以降は、これらの化合物の中での具体的な原因物質の特定を試みるための調査を実施)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>化学的な手法でアンモニアを除去した上で、選択的に無極性有機化合物を抽出する処理を行い、これによる排水サンプルの毒性への影響を生物応答試験で調査。結果、無極性有機化合物が、排水毒性の原因の一つと確認された。</li> <li>具体的な原因物質の特定に向けて、GC/MS等の化学的手法を用い、無極性有機化合物の分離・抽出を行ったところ、20種の候補物質の他、毒性不明の他種類の物質が排水に含まれることが判明。</li> <li>分析対象とするサンプルによって検出される無極性有機化合物が異なったことから、原因物質の特定のための更なる調査は実施せず。</li> <li>検出された無極性有機化合物は、通常生活排水やその処理により生じる排水には含まれないものであったため、発生源としては事業場からの排水であることが推定された。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>RTA手法(3番の事例を参照)を用いて、アンモニアも含めた毒性原因全体の発生源を調査。</li> <li>アンモニアの主な発生源(言及なし)を特定後、約20の排水元(事業場又はマンホール)地点を対象に、無極性有機化合物の主な発生源を調査するためのRTA手法を追加して実施。(この際、アンモニアの試験結果への影響を除去するため、左欄と同様の前処理を実施)</li> <li>地点毎に、異なる2つの時期に採取したサンプルについて生物応答試験を実施した結果、計10事業場が無極性有機化合物に係る毒性原因の主な排出元と特定。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>(アンモニア)</li> <li>下水処理施設内のアンモニア処理法として6種の技術を検討したが、いずれも技術的・経済的に実用的ではなかった。</li> <li>結果的に、当局がアンモニアの前処理基準を定め事業者を実施を求めることで、アンモニア由来の排水毒性削減が実現。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>アンモニアによる全排水毒性への影響を適切に評価しつつ、他の物質に由来する排水毒性を評価することに複雑な処理等を必要とした。</li> <li>無極性有機化合物の中から具体的な毒性原因物質を特定が難しく、さらに毒性情報が不足した物質も検出された。</li> </ul>	

概要

1995年に、米国のWET試験に係る制度の運用状況等をレビューする専門家のワークショップが開催。その中でWET試験については、「紛れもなく有効だが(他のツールと同様に)多くの不完全性がある」\*として、次のとおり有効性、課題等が整理されている。

\*原文: Current WET testing is undeniably useful but has a number of imperfections (as does any tool).

項目	主な課題		米国EPAでの対応
有効性	変動性	<ul style="list-style-type: none"> <li>WET試験には試験内変動、試験機内および試験機間の変動があり、2倍程度の差は許容されているため、規制で明確な線引きをするのは適当ではない。</li> <li>NPDESでWET試験結果を用いる場合は、認可制限値を平均値で表すか、より変動の小さい試験を用いることを提案(Mountら、1998)。</li> <li>あるいは標準物質試験と同じようにControl chartを用いて管理し、許容可能な反応レベル、変動レベルを決めて、許容可能な(変動)下限値を決める。</li> <li>1つの試験結果ではなく、非達成率に基づくべき(Diamondら、1999、2000)の提案に一致。</li> <li>結果表記にECxを用いるか仮説検定(NOEC)を用いるか?</li> </ul>	ガイダンス等を改訂し、排水の変動を考慮したLimitやTriggerの設定方法や直近10回の結果のLimitからの逸脱を評価する等、“Step-wise approach”の評価方法や、PMSD等を用いた精度基準などを記載  (運用評価方法関連) ・USEPA, EPA 832-B-04-003, 2004 (試験法関連) ・Federal register 40 CFR Part 136.3, 2002 ・USEPA, EPA-821-B-00-004, 2000.

(出典) Ausley, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 19, No. 1, pp. 1-2, 2000  
 Chapman, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 19, No. 1, pp. 3-13, 2000

0

米国WETに係る制度を評価した文献の例 (続き)

項目	主な課題		米国EPAでの対応
有効性	生物種による違い	<ul style="list-style-type: none"> <li>試験生物と生息生物の感受性は同じではない。</li> <li>試験生物間でも感受性や耐性は異なる(→複数種の利用、ミジンコとして何を使うか?)</li> <li>遺伝系統による差もある。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>地域固有種(カゲロウ、西海岸海産生物種など)の試験の確立(USEPA, 1995 など)</li> </ul>
	実験室と受水域の違い	<ul style="list-style-type: none"> <li>受水域では環境条件や生物の状態によって影響を受けるが、実験室では制御されている。</li> <li>特に餌の影響を受けるのでニセネコゼミジンコの試験では厳しく標準化されている。</li> <li>個別曝露と集団曝露で違いが出ることもある。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>希釈に実験室の飼育水を用いる場合、水質(pHや硬度)を受水域の水に合わせてもよい(USEPA, 2000)</li> <li>生物調査との併用(USEPA, 2010)</li> </ul>
保護のレベル	過大保護	<ul style="list-style-type: none"> <li>WET試験は以下の4つの理由からワーストケースの試験である。</li> <li>試験環境が通常の生息環境と異なる、曝露・毒性を低減させる環境プロセスが存在しない、生物の馴化や適応がない、必須元素が不足している恐れ(=感受性が高い可能性)</li> <li>また自然由来の汚染域での評価を想定していない(上流域より低いレベルでラボで影響が出る)。</li> <li>非汚染物質以外の要因(例:硬度)に弱い恐れ。</li> </ul>	特になし
	過小保護	<ul style="list-style-type: none"> <li>WET試験は4つの理由から過小保護にもなりうる。</li> <li>最も感受性の高い生物は飼育・試験できない、受水域での環境ストレスを受けない、水経路の曝露のみ想定(餌経路曝露が重要な時あり)、行動異常などすべてのエンドポイントを見ていない</li> </ul>	

USEPA, 1995 EPA/ 600/R-95/136, 1995. USEPA, EPA-821-B-00-004, 2000,  
 USEPA, National Pollutant Discharge Elimination System (NPDES) Permit Writers' Manual, EPA-833-K-10-001, 2010.

## 米国WETに係る制度を評価した文献の例（続き）

項目	主な課題		米国EPAでの対応
保護のレベル	保護レベルの不確実性	<ul style="list-style-type: none"> <li>• WET試験では保護レベルが過大なのか過小なのか5つの理由からはっきりしない可能性がある。</li> <li>• 生物のおよび非生物的要因、間欠曝露、環境中の混合物と様々な反応を生じる可能性、環境中での適応(エネルギー消費)、ホルミシス(対照区より応答が増強)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 環境中での影響は野外生物モニタリングによって評価する(USEPA, 2010)</li> <li>• 濃度依存性のない結果に関する解釈ガイドラインを提供(USEPA, 2000)</li> </ul>
	実環境との比較	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1980年代に実施した排水影響を受けた河川の調査では、排水の魚類ミジンコに対する影響と下流の生物相への関連性が示されたが、河川水毒性が高く生物相影響が知られた事例に限られているとの批判あり。</li> <li>• 河川水毒性が十分高くない場所での定量的な比較はあまりなく、WET試験や野外生物調査の結果の不確実性により複雑になる。</li> <li>• Diamondらの250排水のWETと河川生物調査の結果によると、河川中排水濃度が80%以上で、影響が明確なとき以外、両者は一致しない。</li> <li>• Sarakinos and Rasmussenらによると、野外調査の結果から推測した排水の影響は、実験室で得られた排水の影響より大きく、野外への外挿に安全係数(欧州では8程度)が必要。</li> <li>• In site毒性試験または生態系レベルの試験は長期に行えば、最も実環境に近い条件を提供できる。</li> </ul>	

(出典) Chapman, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 19, No. 1, pp. 3-13, 2000.  
USEPA, EPA-833-K-10-001, 2010; USEPA, EPA-821-B-00-004, 2000

2

## 米国WETに係る制度を評価した文献の例（続き）

項目	主な課題		米国EPAでの対応
リスク評価	有害性(ハザード)評価とリスク評価	<ul style="list-style-type: none"> <li>• WETは生態リスク評価の第一段階のハザード評価に当たる。</li> <li>• 1つのWET試験が基準を超過したからと言って、環境影響の潜在的可能性が大きいわけではない。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• WET試験、化学分析、生物調査の結果は原則、独立に評価する(どれか1つでも非遵守ならば非遵守)が、例外もあり</li> <li>• 化学物質のLimitで基準が十分達成できる場合、WET試験のLimitを化学物質のLimitで代替しても良い(USEPA, 2004)</li> <li>• 深刻な生態影響が起きるかもしれない前に予測・防止するため、排水を管理する方法としてWET試験を用いる(USEPA, 2004)</li> </ul>
	適切でないWET試験の使い方	<ul style="list-style-type: none"> <li>• WETだけではハザードは特定できてもリスクは特定できない。</li> <li>• USEPAの「毒性試験、化学分析、野外群集」をそれぞれ独立にハザード評価に使い、リスク評価に移行しないのは誤った使い方。</li> </ul>	
	リスク評価(Risk assessment)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• リスク評価は独立ではなく協同で適用すべき。</li> <li>• 試験生物へのリスクは定量化できるが、実環境情報なしに、直接、受水環境リスクにつなげることはできない。</li> </ul>	
	適切なWET試験の使い方	<ul style="list-style-type: none"> <li>• WETは問題のある排水を特定・描出するのに適切(ハザードランキング)。</li> <li>• 正式なリスク評価のスクリーニングとして使うなら、一度詳細試験で排水の特徴が分かったら、限界試験(100%排水と対照区のみ)を多くやるほうが良い。</li> <li>• 受水域でのワーストケースの希釈濃度より、採水・試験時の希釈濃度を使うべき。</li> <li>• WET試験は将来の低水量時での排水毒性を予測し、確実な予防方法(TRE/TIE)を提供するもの(Marshall, 1999)。</li> <li>• WET試験は意思決定のWeight of evidenceアプローチの一部で、化学分析と受水域の生物調査と併用すべき。</li> </ul>	

(出典) USEPA, EPA 832-B-04-003, 2004; Federal register 40 CFR Part 136.3, 2002; USEPA, EPA 833-R-10-003, 2010.

3

# 短期慢性毒性試験法案の 試験精度について

※平成27年検討会報告書で提案された短期慢性毒性試験法案の試験精度について、環境省事業(平成23、24年度)や国立環境研究所(平成25年度)での検証等が行われており、本資料では、これらの検証等の概要をまとめています。

# 生物応答試験における“ばらつき”

- 排水水質の変動
  - 生産品目・使用化学物質等の変動
  - 複数回採水・試験した結果から、総合的に判断する（例：10試験中3試験で基準満たしていなかったら排水改善）
- 試験機関間変動
  - 異なる複数の試験機関で同一試料を試験したときのばらつき
  - 試験の実用性→手順書の改訂によって改善 主な検証対象
- 試験機関内変動
  - 同じ試験機関で、同一試料を繰り返し試験したときのばらつき
  - 各試験機関の再現性→精度管理によって改善
- 試験内変動
  - ある試験内の、繰り返し間の変動
  - 供試生物のばらつき
  - 試験有効性条件によって担保される



# 用語説明

- **最小影響濃度 LOEC (Lowest observed effect concentration)** : 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
- **最大無影響濃度 NOEC (No observed effect concentration)** : LOEC より一段階下の試験濃度で、対照区と比較したとき、ばく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
- **有意水準  $p$**  : 誤って対照区とばく露区との間に差があると判断してしまう確率 (第一の過誤、偽陽性)。一般に  $p < 0.05$  のときに、“差があるのは偶然ではない” → 有意な差があるとする。
- **IC $x$  (x% Inhibition concentration)** : 濃度反応曲線モデルより、阻害率  $x\%$  が観察されると推定される濃度。致死毒性は LC $x$ 、遊泳阻害等は EC $x$  と表記することも (L: Lethal, E: Effect)。
- **阻害率** : 対照区の応答 (生存率、産仔数、生長速度など) に対して何%減少したかを表す。
- **連数** : 1つの試験区 (濃度) に対し、用意する容器の数
- **変動係数 CV (coefficient of variation)** : 標準偏差を算術平均で割ったものの。相対的なばらつきを表す。

# 胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験の概要

ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) またはメダカ (*Oryzias latipes*)



OECD Test guideline  
212に準拠

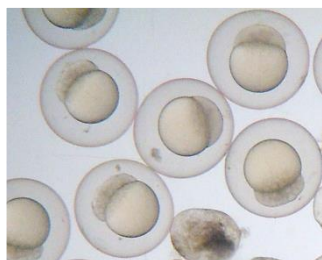
最大ふ化所要日数\*  
までにふ化した割合

\*ゼブラ: 5日  
メダカ: 14日

採卵



受精後4時間以内  
の受精卵



ばく露開始  
DAY0

ふ化開始  
DAY3~4

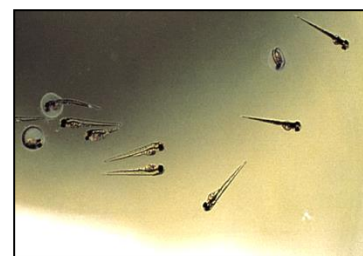
ふ化率

DAY5

ばく露終了  
DAY8~16\*\*

平均ふ化日数

\*\*対照区で半分  
以上ふ化してから  
5日後



10粒以上(15粒推奨) / 容器  
50mL / 容器  
4連 / 試験区  
隔日換水  
温度: 26±1°C  
照明: 明期12~16h

ふ化後生存率

仔魚の生存率

生存率

全供試個体の生存率

(総合指標として) 生存指標 = ふ化率 × ふ化後生存率

# ニセネコゼミジンコを用いたミジンコ繁殖試験の概要

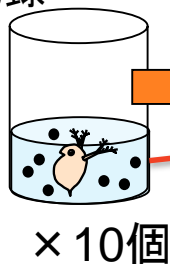


ニセネコゼミジンコ (*Ceriodaphnia dubia*)

産仔条件を満たした親を選別してその仔虫を試験に供する

## 個別飼育

1匹ずつ飼育し、約1週間の産仔数を記録



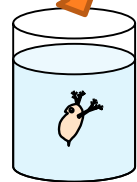
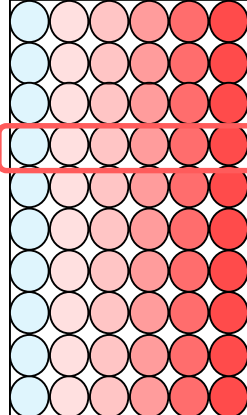
× 10個

同一親の仔虫 (生後24時間以内) をすべての試験区に分配

1匹/容器  
15mL/容器  
10連/試験区  
隔日or週3回換水

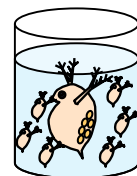
ばく露区

対照区 Low → High



ばく露開始  
DAY0

産仔開始  
DAY3~4



ばく露終了  
DAY8

温度: 25 ± 1°C

照明: 明期16h暗期8h

給餌: 藻類+YCT(毎日)

Environment CanadaおよびUS-EPAのWET試験法に準拠

試験期間: 最大8日間

試験成立(終了)要件: 対照区において

- 6割以上の個体が3回(3腹)産仔すること
- 総産仔数の平均が15匹以上
- 親個体の死亡率が20%以下
- 耐久卵が作られないこと

親ミジンコの死亡率

3回(3腹)分の産仔数をカウント

総産仔数

# 淡水藻類を用いる生長阻害試験の概要

ムレミカツキモ (*Pseudokirchneriella subcapitata*)



OECD Test guideline  
201に準拠

前培養開始                      ばく露開始                      ばく露終了  
DAY-4~DAY-2                      0h    24h    48h    72h

前培養2~4日

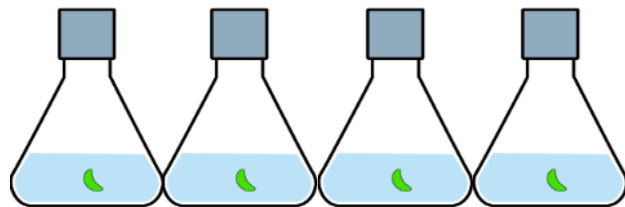


対数増殖期の藻類を  
5000cells/mLになるよ  
う、試験溶液に添加

5000cells/mL／容器  
100mL／容器  
3連／ばく露区  
6連／対照区容器  
振とう培養(100rpm)  
試験温度:23±1°C  
照明:明期24h  
(60~120 μmol/m<sup>2</sup>/s)

細胞濃度

24hごとに粒子計  
数装置等により細胞濃  
度を計測

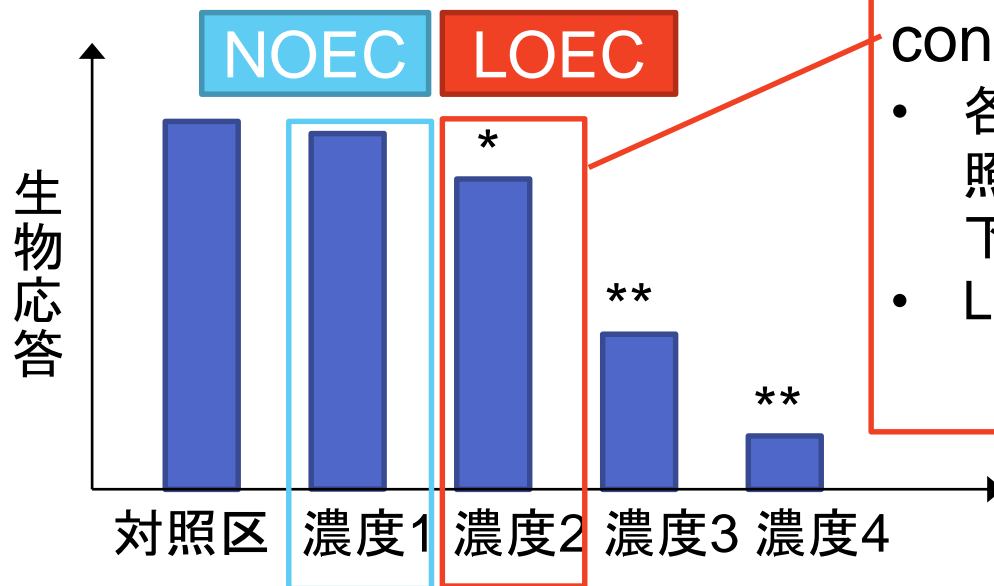


Control 低濃度

高濃度

生長速度・生長速度  
阻害率を算出

# 最大無影響濃度NOECについて



**LOEC:** Lowest observed effect concentration (最低影響濃度)

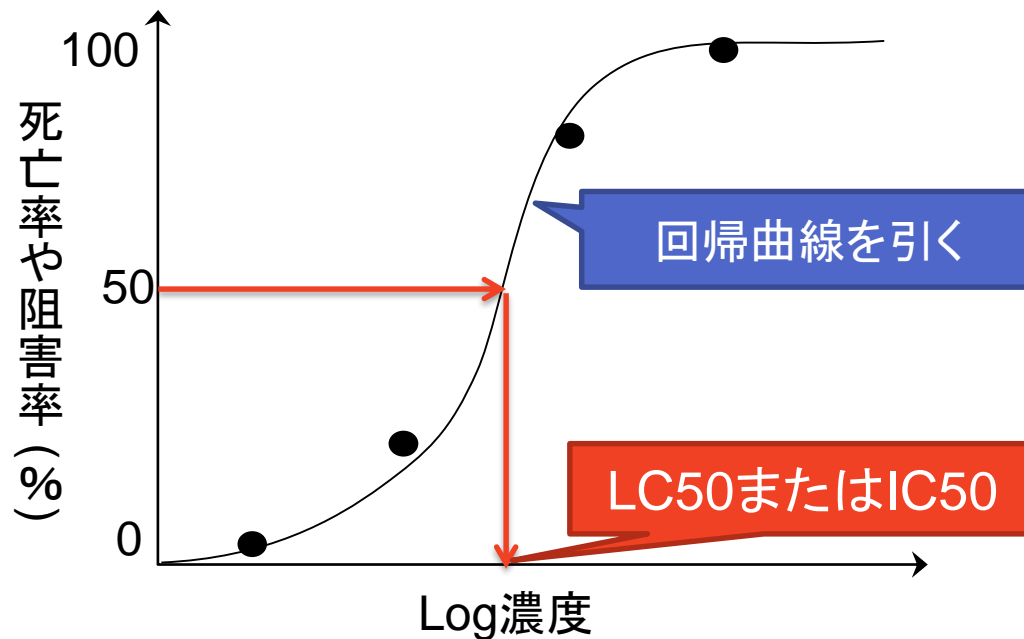
- 各試験のエンドポイントについて、対照区と比較して統計学的に有意な低下が認められた最も低い試験濃度
- LOECより高濃度では、LOECと影響がみられること

**NOEC:** No observed effect concentration (最大無影響濃度)

- LOECより1つ下の試験濃度で、対照区と比較したとき、ばく露期間中に統計的に有意な影響を与えない最高濃度
- 最高濃度でも有意差がなかった場合は、最高濃度をNOECとみなす

# LC50やIcxについて

供試個体のふ化率・生存率(死亡率)や、生長速度や繁殖の阻害率について、横軸にlog濃度、縦軸に反応(ふ化率・生存率・阻害率等)をとって回帰曲線を作成する(対数ロジスティック、プロビットなど)。そこから**半数致死濃度 (LC50:50% Lethal concentration)** や、**X%阻害濃度 (ICx:X% Inhibition concentration)** を推定する。



# 平成23年度 環境省事業でのリングテストの結果

# リングテストの実施目的と参加機関

延べ9つの試験機関(T1～T9)によって試験排水を用いた当時の試験法案のリングテストを実施

- 目的:




- 試験法案全体の妥当性検証
- **精度確認: 試験機関間の変動は許容範囲かどうか**
- 試験条件等の課題を検討
- 新たに検討すべき課題を抽出

- 参加機関: **T1～T9**

(財)化学物質評価研究機構、(株)クレハ分析センター、住化テクノサービス(株)、いであ(株)、(株)エコジェノミクス、三菱化学メディエンス(株)、富士フィルム(株)、徳島大学、国立環境研究所(国環研) の延べ9機関

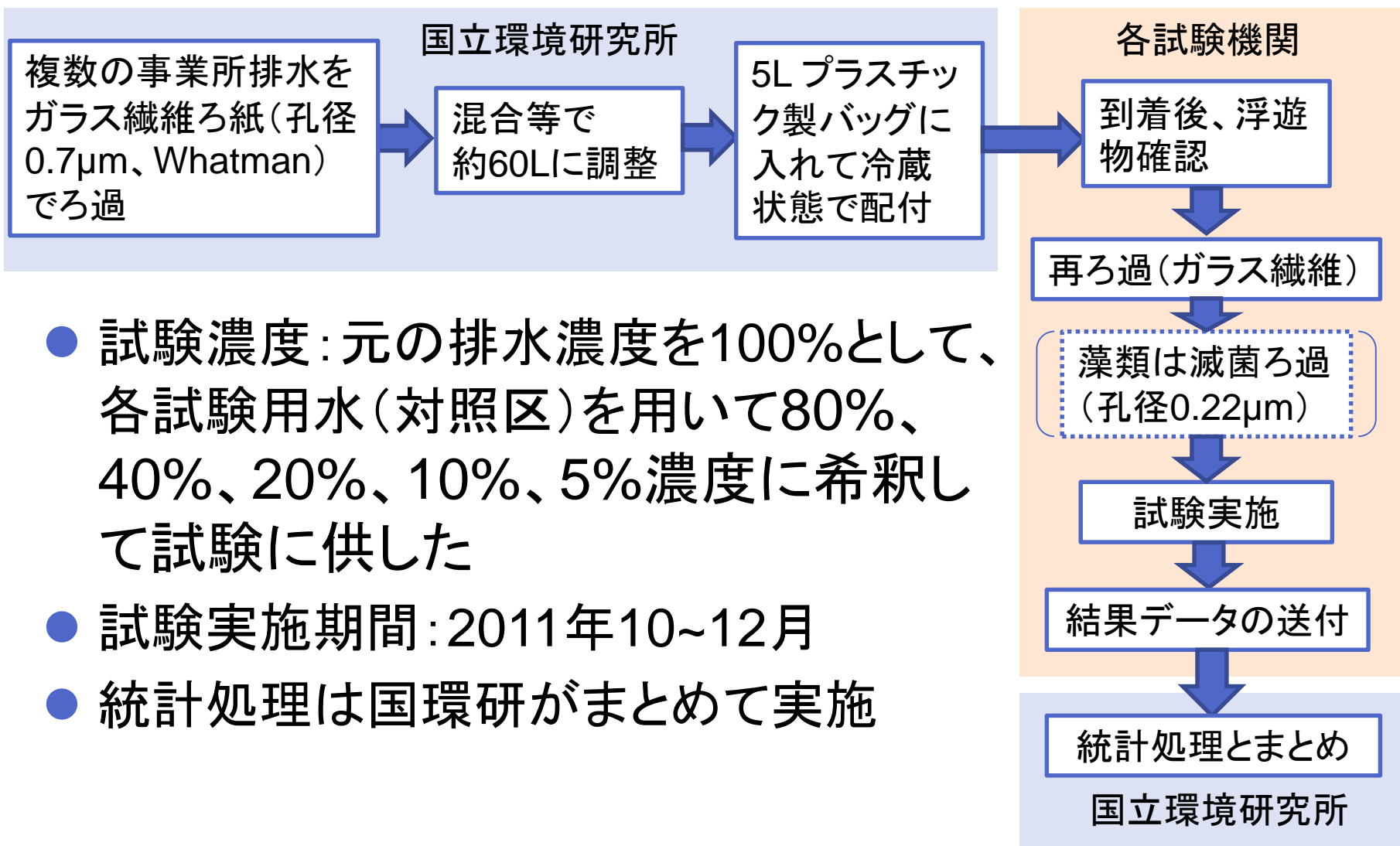


# 試験法の種類と生物種

試験名	胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験法	ニセネコゼミジンコを用いる繁殖試験法	淡水藻類を用いる生長阻害試験法
参照試験法	ISO 12890 USEPA WET chronic test method 1001.0	ISO 20665 Environment Canada EPS 1/RM/21 USEPA WET chronic test method 1002.0	ISO 8692 Environment Canada EPS 1/RM/25 (USEPA WET chronic test method 1003.0)
生物種	ゼブラフィッシュ ( <i>Danio rerio</i> ) またはヒメダカ ( <i>Oryzias latipes</i> ) の受精卵 	ニセネコゼミジンコの幼体 ( <i>Ceriodaphnia dubia</i> ) 	対数増殖期のムレミカツキモ ( <i>Psuedokirchneriella subcapitata</i> ) 
試験期間	8～10日間(ゼブラフィッシュ)、 13～16日間(メダカ)	6～8日間	72時間
指標	胚のふ化、 胚～仔魚期の生存	繁殖(産仔数)や 親の生存	細胞濃度および 生長速度
試験濃度と評価	対照区(飼育に用いる水) + 排水の希釈列(80%、40%、20%、10%、5%)で試験 →対照区と有意な差がない排水の濃度((NOEC: 最大無影響濃度)を求める。		

## 試験実施概要

## ● 試験排水の調製と配付：



- 試験濃度：元の排水濃度を100%として、各試験用水(対照区)を用いて80%、40%、20%、10%、5%濃度に希釈して試験に供した

- 試験実施期間：2011年10~12月

- 統計処理は国環研がまとめて実施

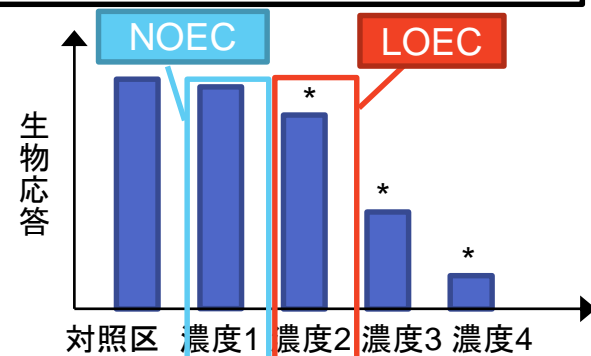
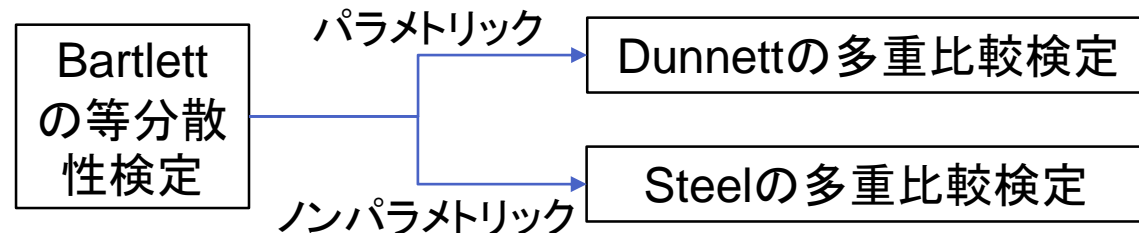
# 統計処理－NOECとIC25の算出

使用した統計ソフトウェア：国際的に広く用いられているフリーの統計ソフトウェアRおよびRstudioを用いた。

NOEC (No observed effect concentration)

対照区と比較したとき、統計的に有意な影響が見られなかった最高濃度

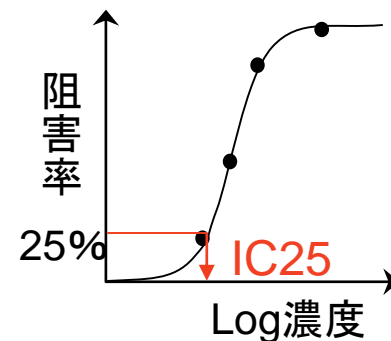
## 対照区との有意差の検定方法



IC25 (25% inhibition concentration)

生存、繁殖等が25%阻害された濃度

- 算出方法：対数ロジスティック法により用量反応曲線を作成して算出
- US-EPAと同じWET試験法（ミジンコ・藻類）については、リングテスト結果（US-EPA, 2002）との比較を行う  
→IC25の変動係数CVは同程度か？



# 試験有効性条件

各試験は**対照区**において以下の条件を満たすときに**有効**とする。

## 魚類

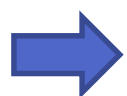
- ふ化率が80%以上であること
- ばく露終了時の生存率が70%以上であること
- 溶存酸素がばく露期間を通して飽和酸素濃度の60%以上であること

## ミジンコ

- 6割以上の個体が3回(3腹)産仔すること
- 総産仔数の平均が15匹以上であること
- 親個体の死亡率が20%以下であること
- 耐久卵が作られないこと

## 藻類

- 生物量がばく露期間中に少なくとも16倍増加すること
- 毎日の生長速度の変動係数(平均値)がばく露期間を通じて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が7%を超えないこと



すべての試験機関において、すべての試験有効性条件を満たしていた。

# 胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験

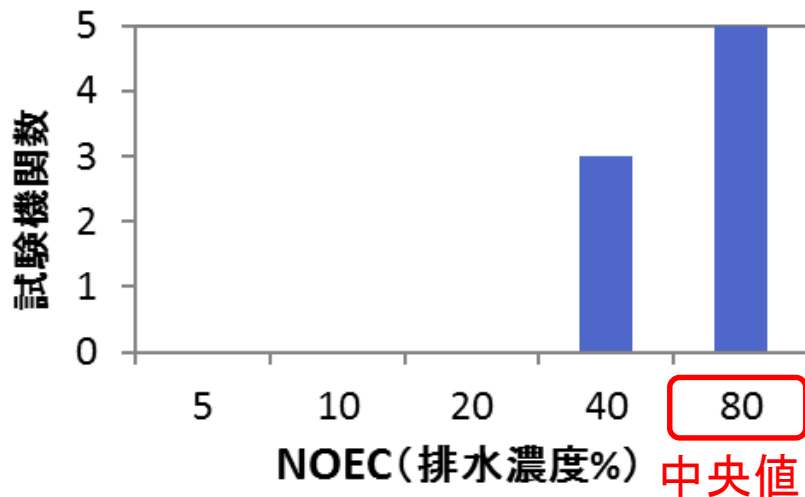
試験 機関	NOEC (排水濃度%)			
	ふ化率	ふ化後 生存率	生存率	生存指標
T1*	80	80	80	80
T2*	40	80	40	40
T4*	80	80	80	80
T5*	40	80	40	40
T6*	80	80	80	80
T7*	80	80	80	80
T8	40	80	40	40
T9	80	80	80	80
平均	65	80	65	65
中央値	80	80	80	80
CV (%)	30	0	30	30

生存指標  
= ふ化率 ×  
ふ化後生存率

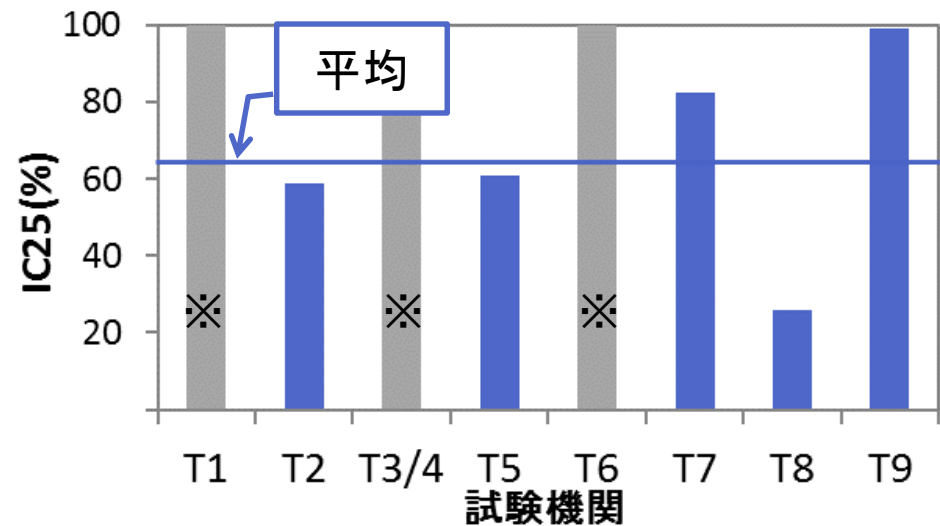
\*化学物質GLP(動植物毒性試験)機関

# 胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験

## NOEC(生存指標) の度数分布



## 各機関のIC25



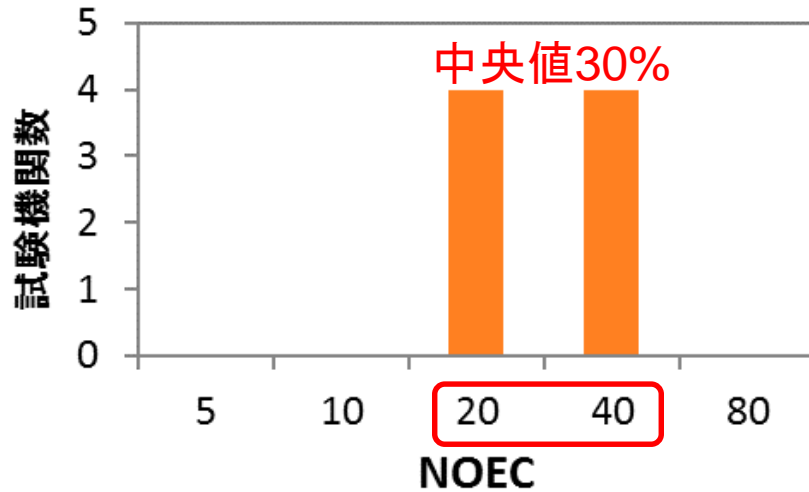
※最高濃度80%でも影響25%未満のため算出不可

すべての機関のNOECは、  
中央値40%の±1濃度区間内  
(1/2~2倍以内)に収まった

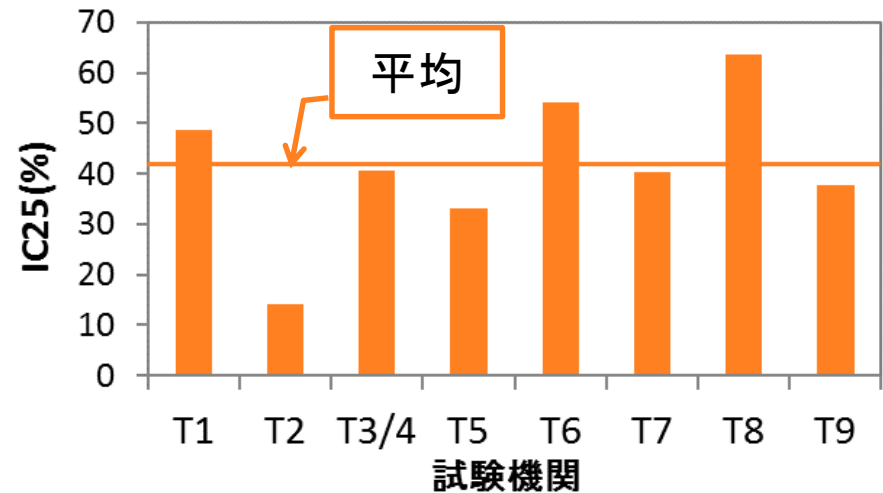
IC<sub>25</sub>平均=65%(CV=42%)(n=5)  
非GLP機関(T8、T9)を除くと  
IC<sub>25</sub>平均=67%(CV=19%)

## ニセネコゼミジンコを用いたミジンコ繁殖試験

NOECの度数分布



各機関のIC25



すべての機関のNOECは中央値30%の±1濃度区間内であった。

試験機関間変動はWET導入10年後(2001年)のUSEPAの結果と同程度

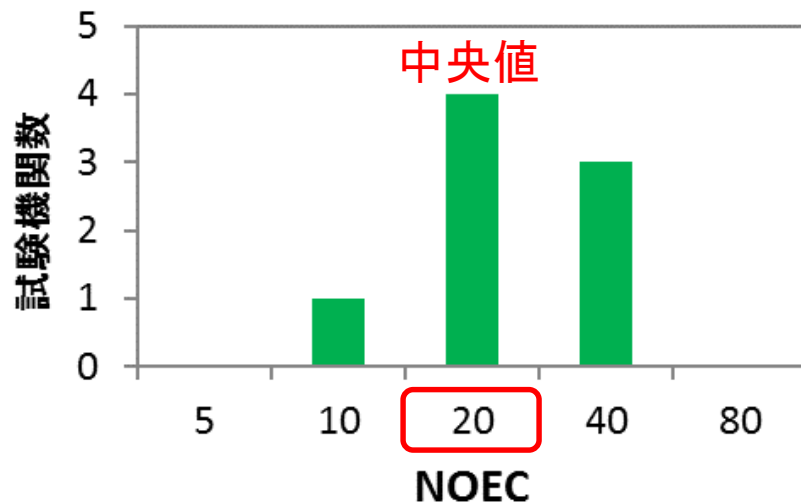
$IC_{25}$  平均=42% (CV=36%) (n=8)

USEPAのリングテスト

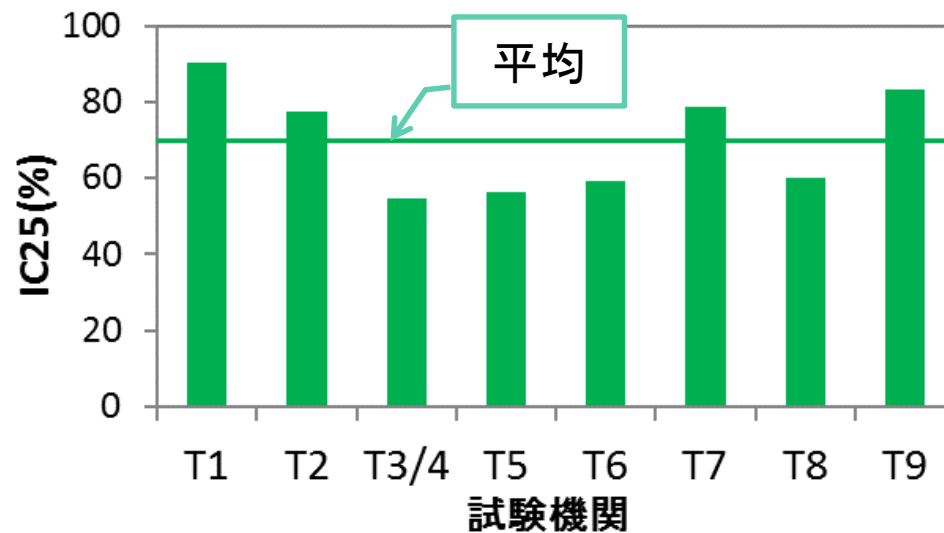
- 1991年(WET導入当初)  
 $IC_{25}$  の CV=73% (n=155)
- 2001年  
 $IC_{25}$  の CV=35% (n=34)

# 淡水藻類を用いる生長阻害試験法

## NOECの度数分布



## 各機関のIC25



すべての機関のNOECは、中央値20%の1/2～2倍以内に収まった

IC<sub>25</sub>平均=70% (CV=20%) (n=8)

USEPAのリングテストにおけるIC<sub>25</sub>のCV=34% (n=21)

(※)USEPAの試験法は96時間のバイオマス法であり、72時間の速度法である検討案とは厳密には異なる

USEPAの結果より試験機関間変動が小さく、十分な精度が示された



# 試験精度検証の結論(平成23年度)

- 試験排水を用いて延べ9機関による試験法案のリングテストを行った結果、各機関のNOECは中央値の±1濃度区間(1/2~2倍)以内であり、良好な結果が得られた。
- ➡ 試験法案は日本の試験機関によって実施可能(精度確保可能)である
- 当時(平成23年度)における今後の検討課題：
  - ゼブラフィッシュ: 総合指標の生存指標の検証
  - ニセネコゼミジンコ: 試験用水の硬度と給餌条件の規定、産仔数の集計方法
  - 藻類: 特になし
  - 共通: 適切な統計手法の確定、試験・飼育方法のノウハウの共有

➡ その後マニュアル案の修正と、国環研主催の生態毒性試験実習セミナー(2011年(平成23年)より計11回開催)などを通し、基礎知識やノウハウの共有が図られている。

米国WET試験法の実効性特性 (網掛けは海産生物種)

出典: US 40 CFR Part 136, 2002.

試験法	分類	成功率 (%)	偽陽性率(%) <sup>a</sup>	試験機関間精度 (CV%) <sup>b</sup>
ニセネコゼミジンコ急性試験	淡水 甲殻類	95.2	0.00	29.0
ニセネコゼミジンコ生存・繁殖試験	淡水 甲殻類	82.0	3.70	35.0
ファットヘッドミノール急性試験	淡水 魚類	100	0.00	20.0
ファットヘッドミノール仔魚生存・成長試験	淡水 魚類	98	4.35	20.9
ムレカズキモ生長試験	淡水 藻類	63.6	0.00	34.3
アミ生存成長繁殖試験	海水 甲殻類	97.7	0.00	41.3
シープスヘッドミノール急性試験	海水 魚類	100	0.00	26.0
シープスヘッドミノール仔魚生存・成長試験	海水 魚類	100	0.00	10.5
インラントシルバーサイト急性試験	海水 魚類	94.4	0.00	38.5
インラントシルバーサイト仔魚生存・成長試験	海水 魚類	100	0.00	43.8

a 各試験法の偽陽性率は仮設検定または点推定のエンドポイントについて観察された偽陽性の高さを示す。b 各試験法の変動係数 (CVs) は急性試験はLC0、慢性試験はIC25の変動係数を示す。CVsは総合的な試験機関間変動(試験内と試験機関間のばらつきを含む)に基づき、異なるサンプルタイプも含めて平均した。

# 平成24年度 環境省事業での事業場 排水に用いた場合の検証結果

# 事業場排水A

試験	エンドポイント		試験機関	
			国環研	A
藻類	生長速度	NOEC (%)	5	5
		EC50 (%) (95%信頼区間)	18 (17-20)	40 (38-42)
甲殻類	産仔数	NOEC (%)	<5	<5
		EC50 (%) (95%信頼区間)	0.89 (0.59-2.3)	4.2 (2.7-7.8)
魚類	ふ化率	NOEC (%)	80	80
	ふ化後生存率		80	80
	生存率		80	80
	生存指標		80	80



- 3生物すべてほぼ同等な結果が得られた
- NOECが5%未満となった場合の対応については、事業者との協議の上、決定するとした。

# 事業場排水B

試験	エンドポイント		試験機関	
			国環研	B
藻類	生長速度	NOEC (%)	80	<5
		EC50 (%) (95%信頼区間)	>80	>80
甲殻類	産仔数	NOEC (%)	5	10
		EC50 (%) (95%信頼区間)	15 (11-22)	23 (16-35)
魚類	ふ化率	NOEC (%)	80	40
	ふ化後生存率		80	40
	生存率		80	40
	生存指標		80	40



- 藻類で異なる結果が得られたが、原因はpH調整の有無であると推定された。→試験法案の修正

# 事業場排水C

試験	エンドポイント		試験機関	
			国環研	C
藻類	生長速度	NOEC (%)	5	<5
		EC50 (%) (95%信頼区間)	16 (14-17)	11 (10-12)
甲殻類	産仔数	NOEC (%)	5	<5
		EC50 (%) (95%信頼区間)	8.3 (6.0-11)	4.5 (1.1-6.6)
魚類	ふ化率	NOEC (%)	5	<5
	ふ化後生存率		20	20
	生存率		5	20
	生存指標		5	<5



- 3生物すべてほぼ同等な結果が得られた

# 平成25年度 国立環境研究所における 標準物質を用いた感受性試験結果

# 検証目的

- 各試験機関では精度管理のために、標準物質を用いた感受性試験を定期的に行っている。
- 平成25年度事業場排水実態調査において試験を委託した10試験機関から、各生物応答試験の感受性試験を収集。
- **試験機関間変動**や、**試験検出力・試験内変動**を算出し、USEPAのデータ\*と比較。検証した。
- **試験機関：L1～L10**  
(一財) 化学物質評価研究機構、(一財) 生物科学安全研究所、いであ(株)、(株) 環境管理センター、(株) 神鋼環境ソリューション、(株) 住化分析センター(住化テクノサービス(株))、(株) 日曹分析センター、三菱化学メディエンス(株)、中外テクノス(株)、国立環境研究所
- **標準物質**
  - 魚類: 塩化ナトリウム (NaCl)
  - ミジンコ: 塩化ナトリウム (NaCl)
  - 藻類: 重クロム酸カリウム ( $K_2Cr_2O_7$ )



# 試験検出力と試験内変動

- **MSD (Minimum of significant difference): 最小有意差の影響値**

- Dunnett の多重比較検定において、検出可能な最小有意差に相当する

$$MSD = d\sqrt{MSw} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n}}$$

- d: Dunnettの棄却値(片側検定、有意水準5%)
- MSw: 群内平方平均
- $n_1$ : 対照区の連数、n: 濃度区の連数

- **PMSD (Percent of minimum significant difference) : MSDを対照区の平均値で割った値**

- 試験内のばらつきと、試験の検出力(感受性)を評価する指標
- Dunnett の多重比較検定において、検出可能な最小阻害率に相当する
- US EPA ではPMSD の10%点を試験の統計学的有意差あるいは感受性の下限値、90%点を上限値として扱い、PMSD の上限値を超えたデータについては再試験を推奨している。

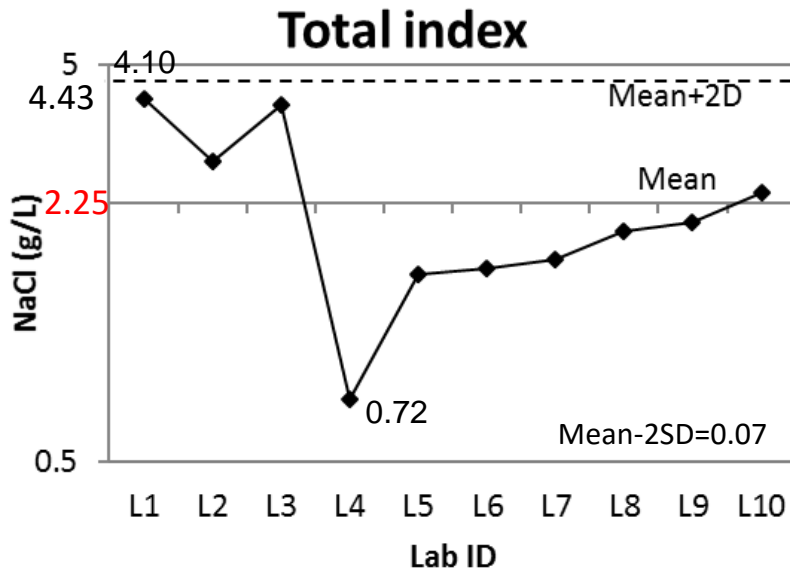
- **対照区の変動係数(CV)**

- 対照区の産仔数のばらつき
- 複数試験データの90%点を上限値の目安とする(US EPA)

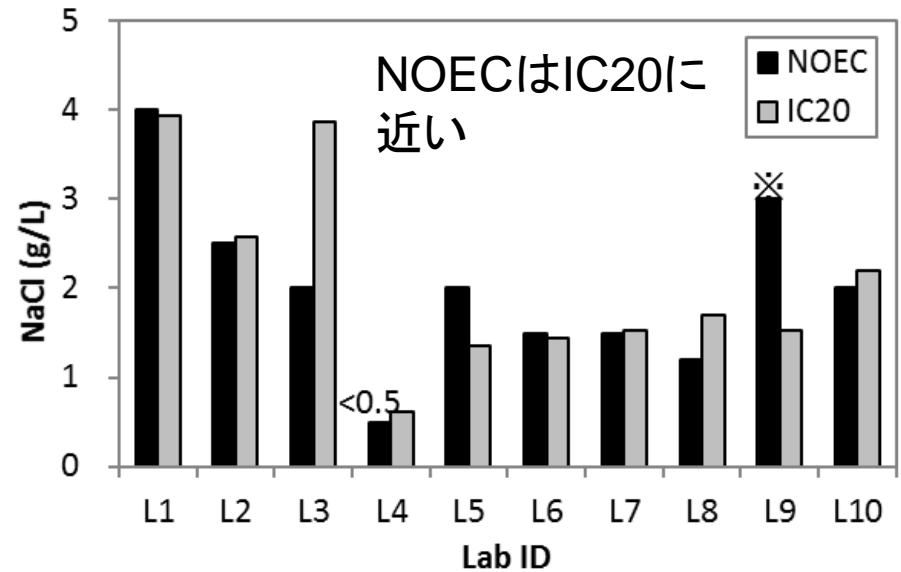


# NaClを用いた魚類試験結果の比較

## 各機関のIC25



## IC20とNOEC



生存指標IC25: 0.72~4.10 g/L

- 平均 (Mean): 2.25 g/L
- 標準偏差 (SD): 1.09 g/L
- 変動係数 (CV): 48%

Mean ± 2SD: 0.07 ~ 4.43 g/L

US EPAファットヘッドミノ仔魚成長試験のIC25 (NaCl, 73試験6機関)

- 平均: 2.6 g/L
- 試験機関内CV: 25%
- 試験機関間CV: 11%

# 魚類試験のPMSDと対照区のCV

ID	PMSD	Control CV
L1	14%	3%
L2*	19%	4%
L3*	21%	4%
L4	11%	7%
L5*	34%	10%
L6	18%	6%
L7*	21%	8%
L8*	20%	4%
L9*	37%	16%
L10	9%	0%
Mean	21%	6%

\*GLP試験機関

US EPAが収集したファッドヘッドミノー仔魚成長試験、標準物質205試験より

- PMSD: 10%点9.4%~90%点35%
- 対照区のCV: 10%点3.5%~90%点20%



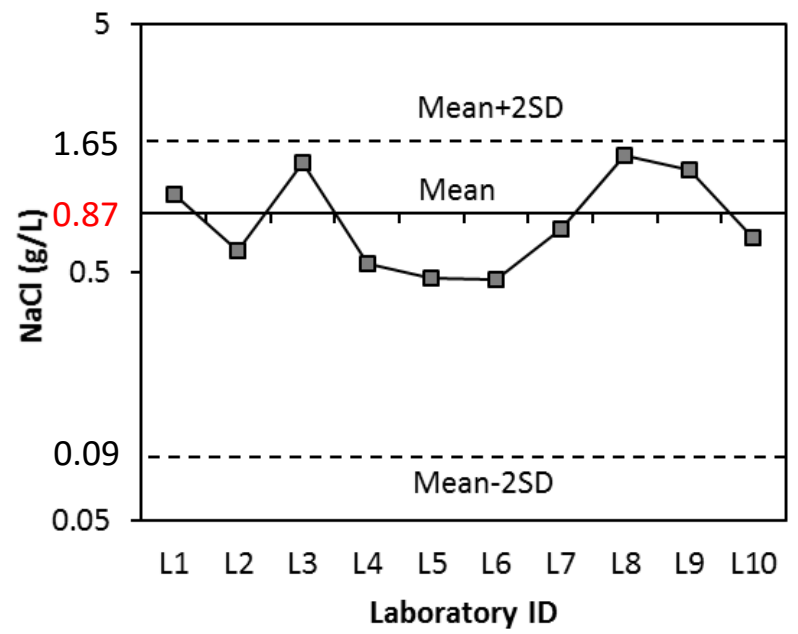
- PMDSはL9(37%)を除いて、US EPAの90%点未満であり、十分な検出力を示した。
- Control CVはUS EPAの90%点未満であり、試験内のばらつきは十分小さい。

➡ 試験機関間のばらつき(CV=48%)は、ゼブラフィッシュの系統や飼育・試験用水の差が影響したか？

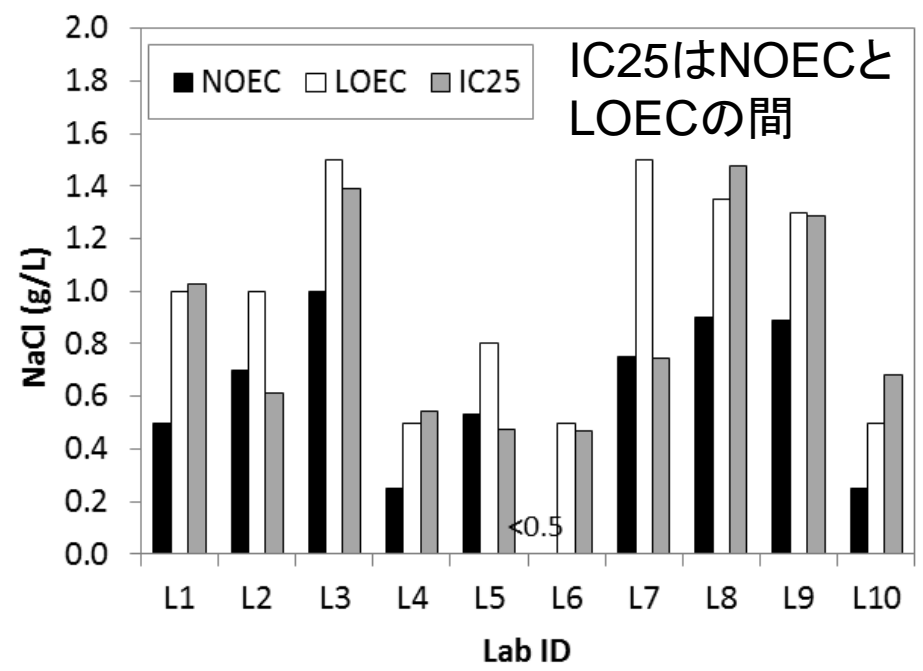


# NaClを用いたミジンコ繁殖試験結果の比較

## 各機関のIC25



## IC25とNOEC/LOEC



IC25: 0.47~1.48 g/L

- 平均 (Mean): 0.87 g/L
- 標準偏差 (SD): 0.39 g/L
- 変動係数 (CV): 45%

Mean ± 2SD: 0.09~1.65 g/L

US EPAが収集した23機関292試験 (NaCl) のIC25

- 平均: 0.92 g/L
- 試験機関内CV: 32%
- 試験機関間CV: 29%

# ミジンコ試験のPMSDと対照区のCV

ID	PMSD	Control CV
L1	14%	22%
L2*	35%	40%
L3*	32%	42%
L4	17%	29%
L5*	27%	47%
L6	24%	37%
L7*	17%	25%
L8*	14%	14%
L9*	21%	24%
L10	18%	9%
Mean	22%	29%

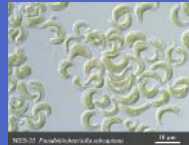
\*GLP試験機関

US EPAが収集した標準物質393試験より

- PMSD: 10%点11%~90%点37%
- 対照区のCV: 10%点9%~90%点42%

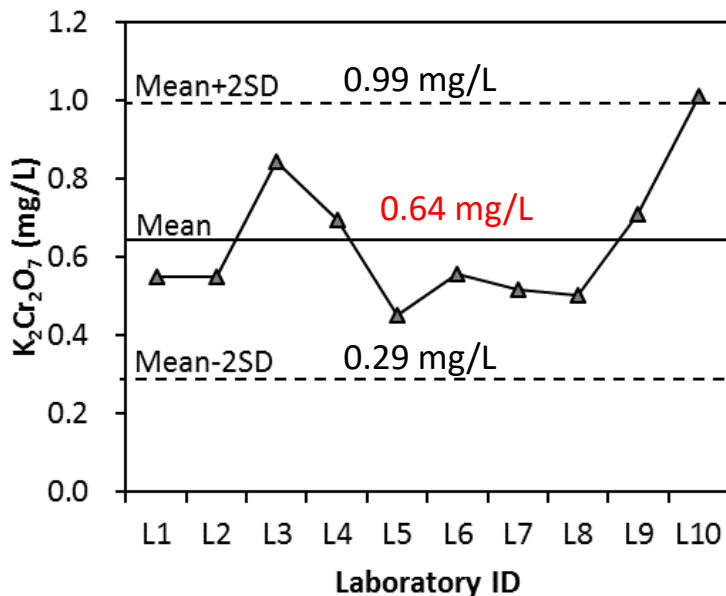


- PMDSはUS EPAの90%点未満であり、すべての試験機関で十分な検出力を示した。
- Control CVはL5(47%)を除いてUS EPAの90%点未満であり、試験内のばらつきは十分小さい。

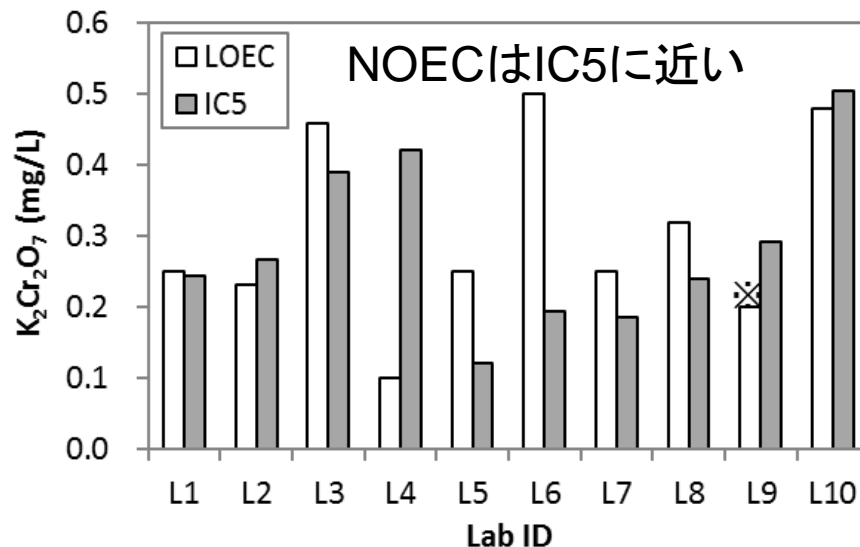


# K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>を用いたの藻類試験結果の比較

## 各機関のIC25



## IC5とLOEC



IC25: 0.45~1.01 mg/L

- 平均 (Mean): 0.64 mg/L
- 標準偏差 (SD): 0.18
- 変動係数 (CV): 28%

IC50: 0.78~1.53 mg/L

US EPA標準物質7試験<sup>a</sup>

- 試験機関内CV: 21%
- 化審法GLP5機関のIC50<sup>b</sup>
- 平均: 0.96 mg/L
- 試験機関間CV: 10%

a: USEPA (2001) EPA 821-B-01-004、b: 国環研 (2006) 藻類生長阻害試験 (平成18年11月版)

# 国内試験機関による藻類試験のPMSDと対照区のCV

ID	PMSD	Control CV
L1	3%	1%
L2*	3%	1%
L3*	5%	2%
L4	2%	1%
L5*	4%	2%
L6	7%	4%
L7*	3%	2%
L8*	3%	2%
L9*	6%	0%
L10	2%	1%
Mean	4%	2%

\*GLP試験機関

US EPAが収集した標準物質85試験

(※)より

- PMSD: 10%点9.3%~90%点23%
- 対照区のCV: 10%点3.4%~90%点17%



- PMDSはUS EPAの90%点未満であり、すべての試験機関で十分な検出力を示した。
- Control CVはUS EPAの90%点未満であり、試験内のばらつきは十分小さい。

(※)USEPAの試験法は96時間のバイオマス法であり、72時間の速度法である  
検討案とは厳密には異なる

# 試験精度検証の結論(平成25年度)

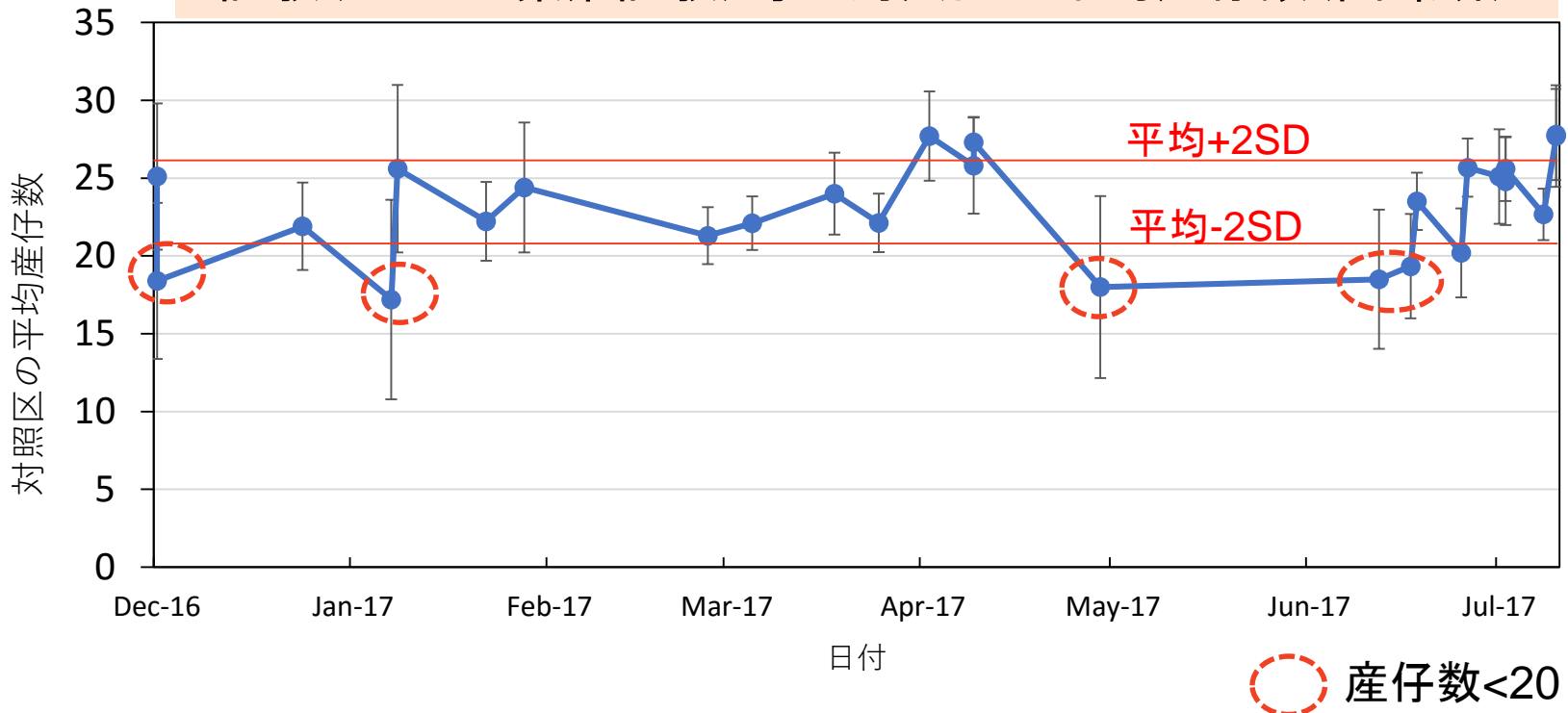
- 魚類, ミジンコ, 藻類を用いた各生物応答試験案は, 国内の試験機関によって実施可能
- 魚類およびミジンコを用いた試験では, 機関間変動がやや大きかったが, 試験内精度および試験感受性は, US EPAの事例と比べて十分許容範囲内にあることが示された。
- 米国ではWET 導入8年後の1999年に実施されたリングテストにおいても、参加した34機関中、10機関が試験の有効性条件を満たさなかった。一方、国内試験機関ではすべて有効性条件を満たしている。



# 排水等に生物応答試験を適用する場合の特徴、関連動向等

# 試験毎の検出力：対照区の応答の評価

試験(ミジンコ繁殖試験)毎の対照区の平均産仔数(国環研)



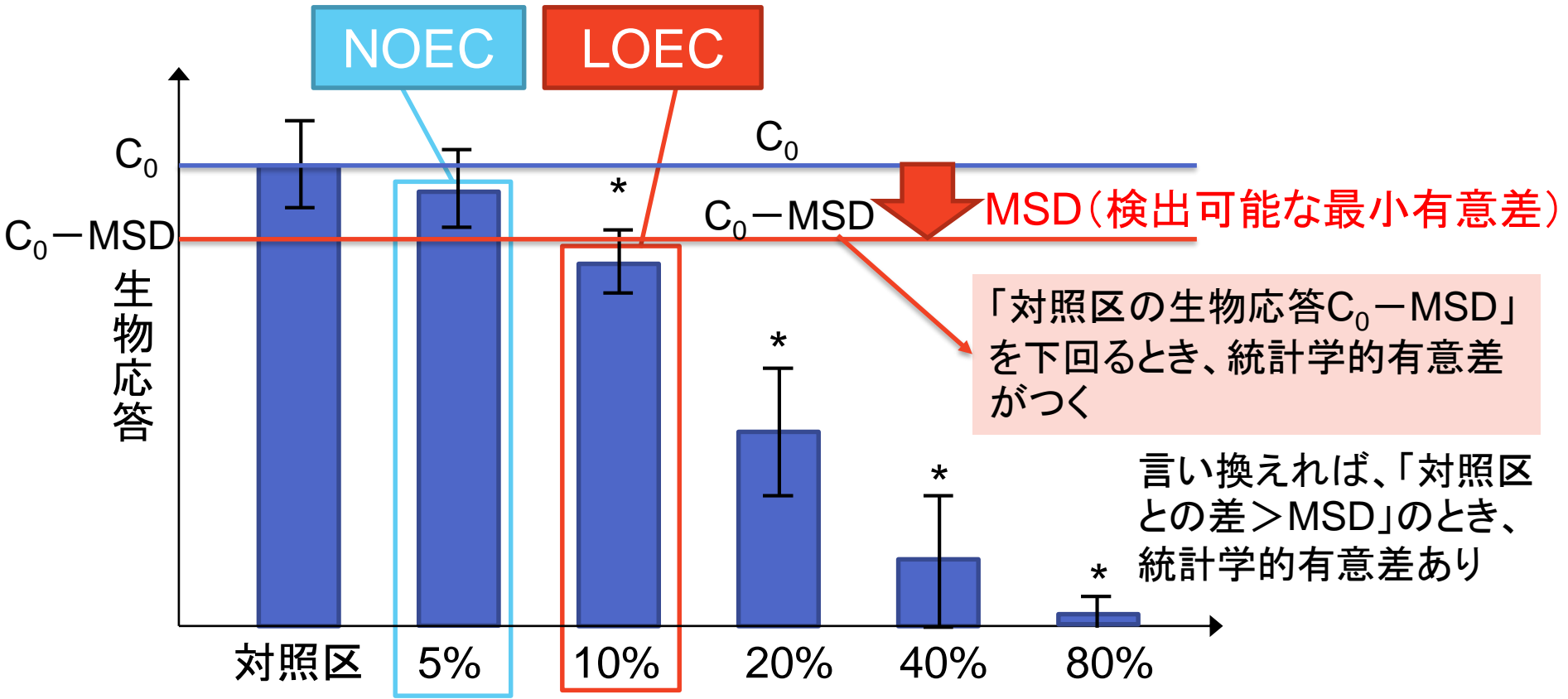
各試験の産仔数：平均23.2、標準偏差(SD)1.4、変動係数(CV)6%、

平均±2SD: 20.5~26.0

各試験のCV: 6~37%(平均14%) USEPAのCV上限値は42%→該当なし

平均産仔数が通常25~30程度の試験機関において、平均産仔数が18~20かつ濃度反応曲線に異常が合ったり、NOECとIC25が一致していなかったときは、再試験したほうがよい(USEPA, 2000)

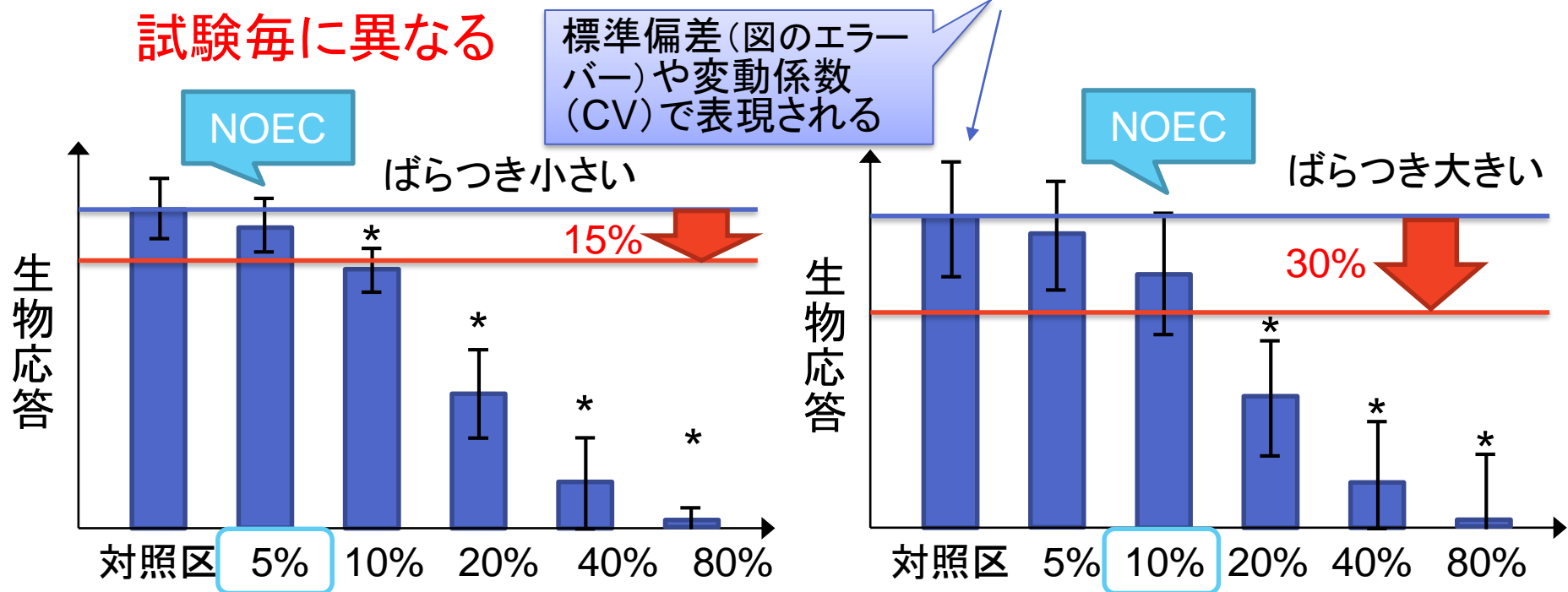
# PMSD: 検出可能な最小有意差 (阻害率%)



**PMSD = MSD / 対照区の生物応答  $C_0 \times 100$**   
→ 検出可能な最小阻害率  
→ 各濃度区の阻害率 > PMSD のとき、統計学的有意差あり

# 試験毎のPMSD(検出力)の違い

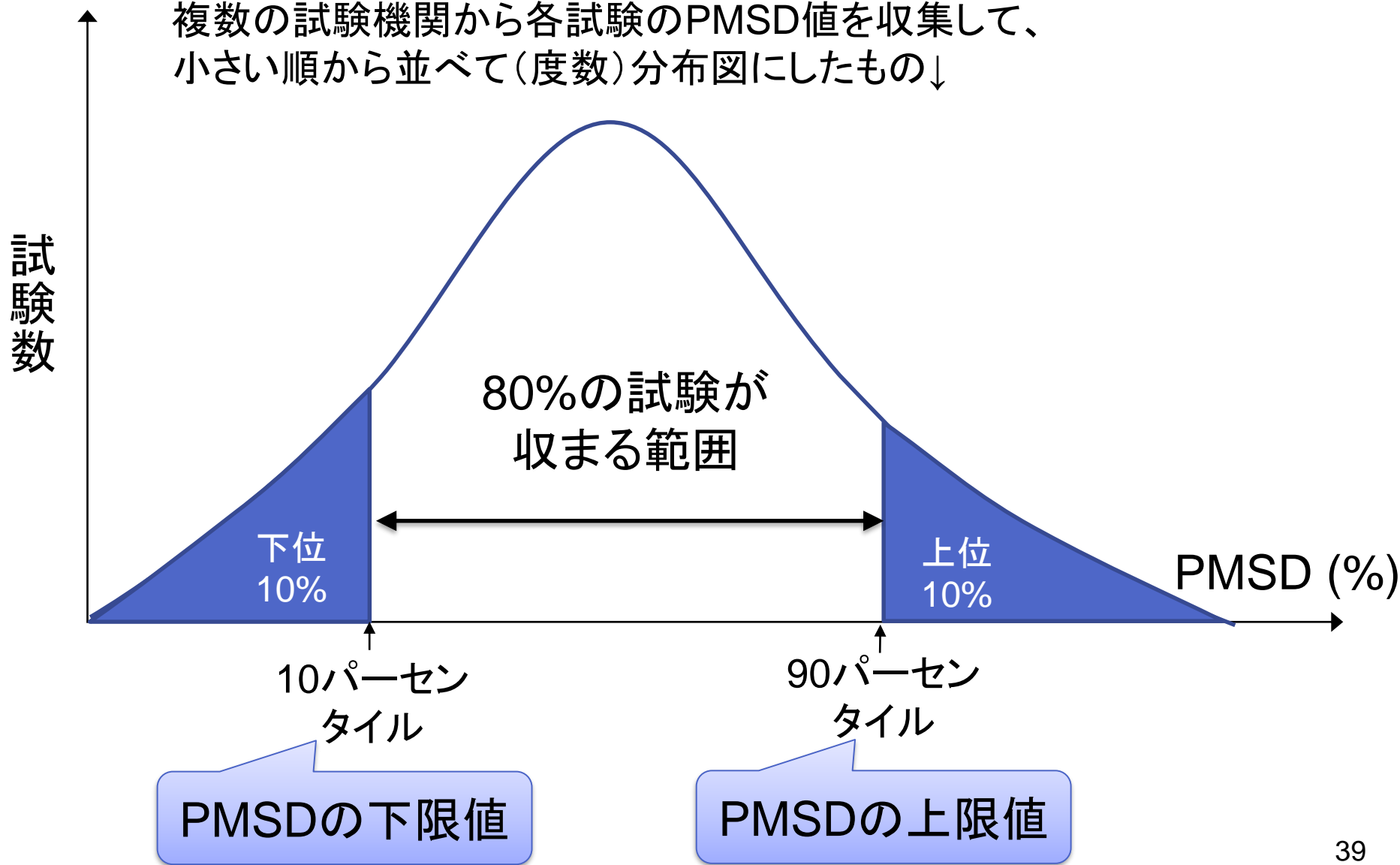
- PMSD(検出力)は、各試験区のばらつきによって決まるため、**試験毎に異なる**



- ばらつきが大きい(試験精度が低い)試験はPMSDが大きくなる(検出力が低くなる)
- PMSDが大きすぎる試験結果は無効とするべきではないか?
- PMSDがどの程度だったら許容範囲内か?

# PMSDの下限値と上限値

複数の試験機関から各試験のPMSD値を収集して、小さい順から並べて(度数)分布図にしたもの↓



# 検出力 米国WET試験におけるPMSDとControl CV

出典: USEPA (2000)  
EPA 833-R-00-003

Test Method <sup>b</sup>	Endpoint <sup>c</sup>	No. of Labs	No. of Tests	PMSD		Control CV <sup>d</sup>	
				10 <sup>th</sup>	90 <sup>th</sup>	10 <sup>th</sup>	90 <sup>th</sup>
1000.0 Fathead Minnow	G	19	205	9.4	35	0.035	0.20
1002.0 <i>Ceriodaphnia dubia</i>	R	33	393	11	37	0.089	0.42
1003.0 Green Alga	G	9	85	9.3	23	0.034	0.17
1004.0 Sheepshead Minnow	G	5	57	6.3	23	0.034	0.13
1006.0 Inland Silverside	G	18	193	12	35	0.044	0.18
1007.0 Mysid	G	10	130	12	32	0.088	0.28
2000.0 Fathead Minnow	S	20	217	4.2	30	0	0.074
2002.0 <i>Ceriodaphnia</i>	S	23	241	5.0	21	0	0.11
2004.0 Sheepshead Minnow	S	5	65	0 <sup>e</sup>	55	0	0
2006.0 Inland Silverside	S	5	48	7.0	41	0	0.079
2007.0 Mysid ( <i>A. bahia</i> )	S	3	32	5.1	26	0	0.081
2011.0 Mysid ( <i>H. costata</i> )	S	2	14	18	47	0	0.074
2021.0 Daphnia ( <i>D. magna</i> )	S	5	48	5.3	23	0	0.11
2022.0 Daphnia ( <i>D. pulex</i> )	S	6	57	5.8	23	0	0.11

a The precision of the data warrants only three significant figures. When determining agreement with these values, one may round off values to two significant figures (e.g., values >3.45000... and #3.5000... are rounded to 3.5). Method 1009.0 (red macroalga) is not reported because it is inadvisable to characterize method variability using only 23 tests from just two laboratories.

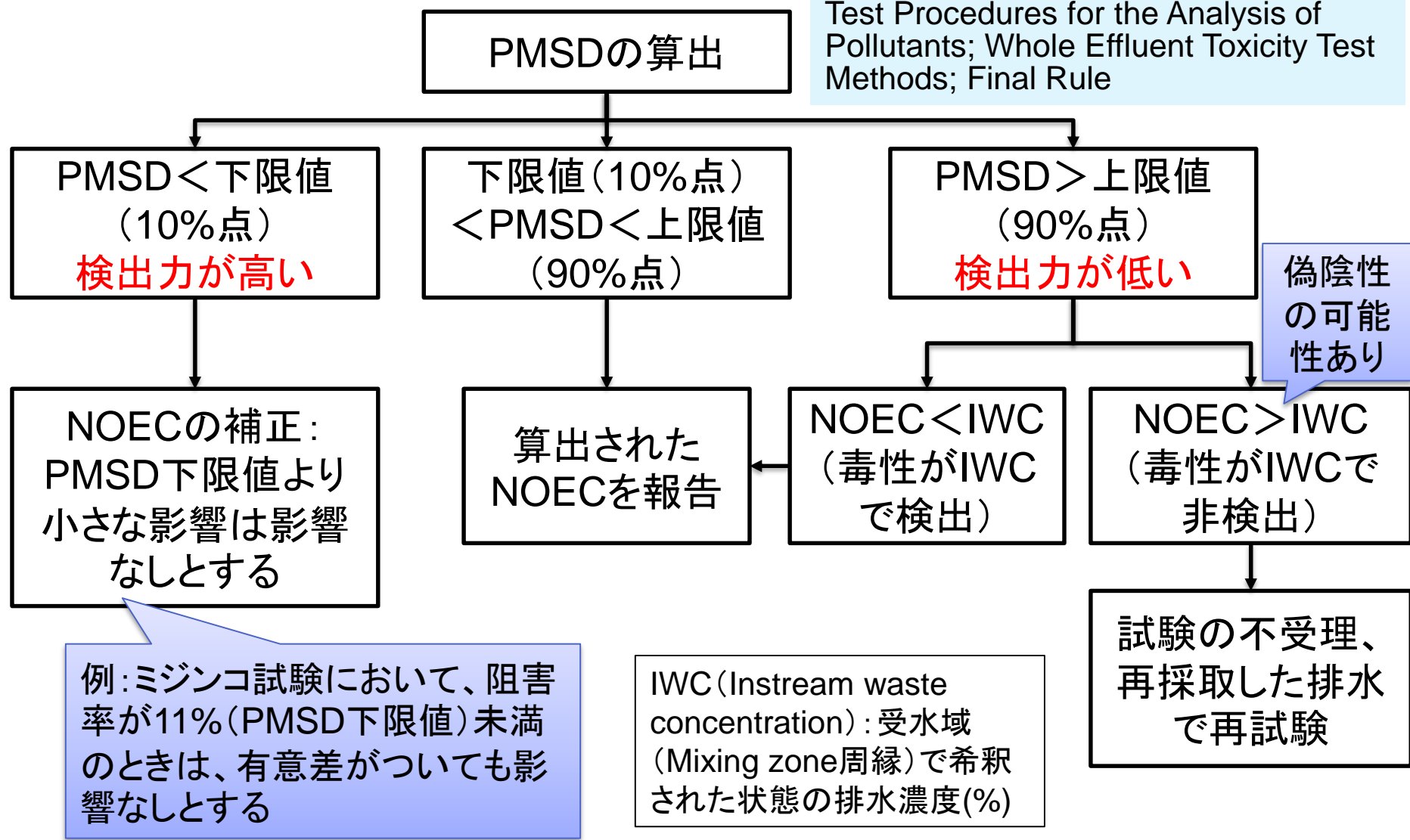
b EPA did not assign method numbers for acute methods in EPA/600/4-90/027F. The numbers assigned here were created for use in this document and in related materials and data bases.

c G = growth, R = reproduction, S = survival. d CVs were calculated using untransformed control means for each test.

e An MSD of zero will not occur when the EPA flow chart for statistical analysis is followed. In this report, MSD was calculated for every test, including those for which the flow chart would require a nonparametric hypothesis test. EPA recommends using the value 4.2 (the 10th percentile shown for the fathead minnow acute test) in place of zero as the 10<sup>th</sup> percentile PMSD (lower PMSD bound) for the sheepshead minnow acute test.

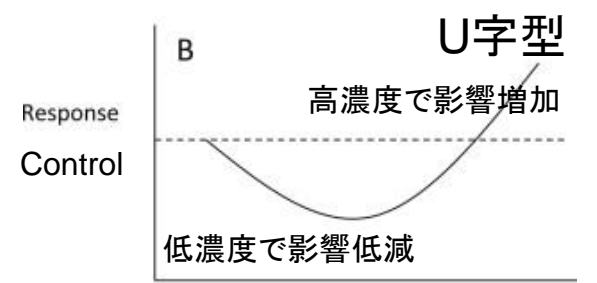
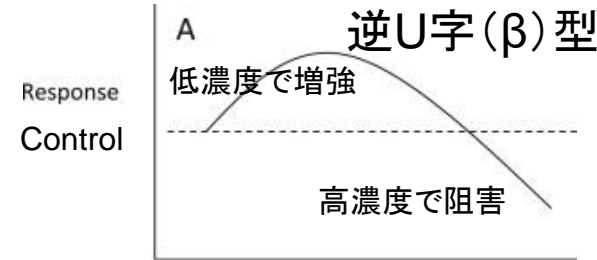
# 米国でのPMSDの活用方法

US EPA (2002) Guidelines Establishing Test Procedures for the Analysis of Pollutants; Whole Effluent Toxicity Test Methods; Final Rule

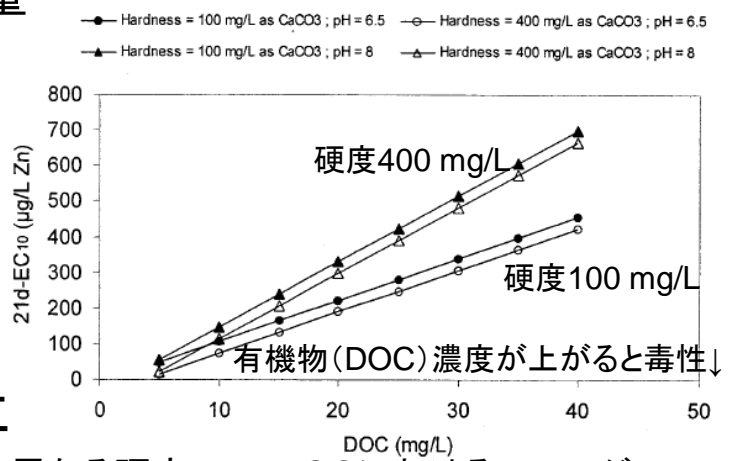


# U字型の用量反応曲線について

- **ホルミシス (Hormesis)**
  - 低濃度では応答(生長、繁殖等)が増加(または有益な影響がある)するが、高濃度で毒性が生じる濃度反応の現象
  - 放射線、生理活性物質、必須元素など
- **硬度や有機物(栄養塩)等による毒性緩和作用**
  - 硬度や有機物濃度等が高いと、化学物質(金属類等)の毒性は低くなる
    - 化学物質形態の変化による生物取り込み量(Bioavailability)の減少
    - 金属類のBiotic Ligand Model
    - 栄養塩による応答の増大
  - 排水が高濃度のときは、硬度や有機物濃度も高いため、毒性緩和作用がある
  - 排水を希釈して硬度や有機物濃度が低くなったとき、原因物質がまだ毒性レベルにあると、毒性が増加したように見える。



Calabrese EJ (2013) Environ. Pollut. 182, 452-460



異なる硬度・pH・DOCにおけるZnのミジンコ繁殖影響(EC10)の変化 (D. G. Heijerick et al., 2003)

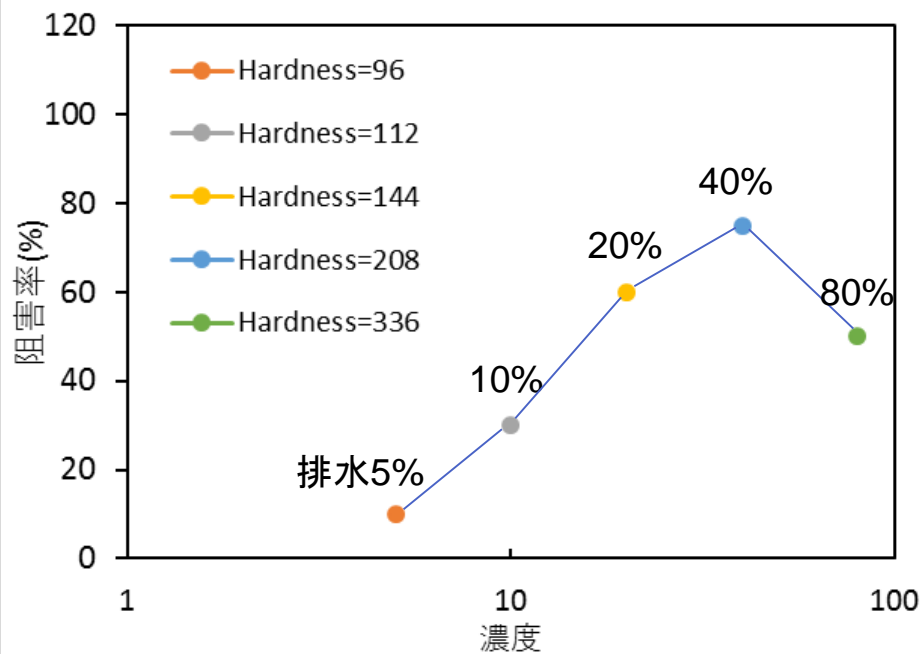
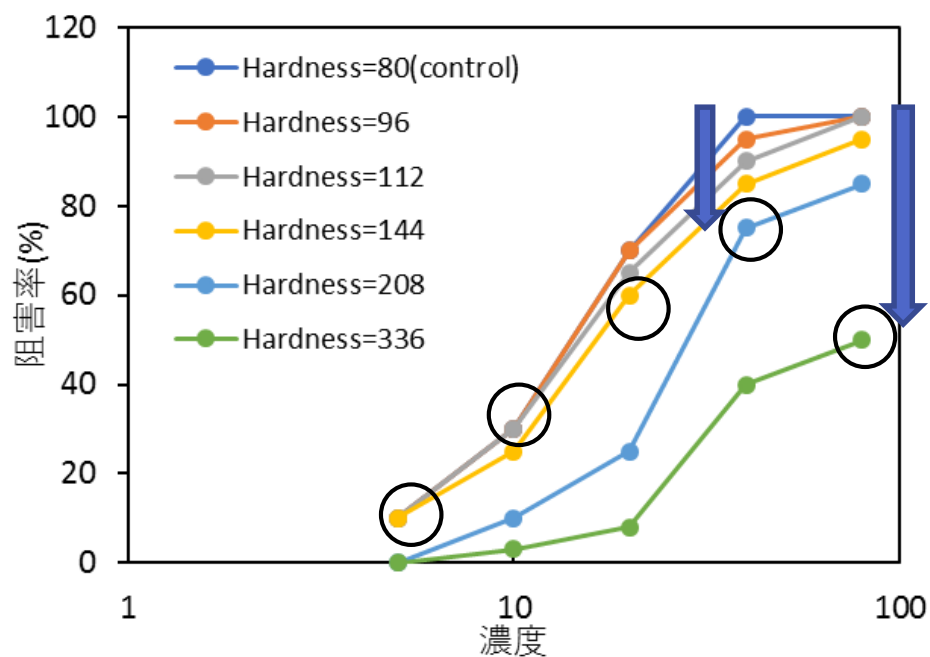


# 毒性緩和作用によるU字型応答のシミュレーション

排水濃度	0% (対照区)	5%	10%	20%	40%	80%	100% (排水)
硬度	80	96	112	144	208	336	400

様々な硬度のときの原因物質の毒性応答(仮想データ)

排水希釈列における原因物質Aの毒性応答



硬度が高くなると毒性が低下する  
(注)仮想の毒性応答データによるシミュレーションです

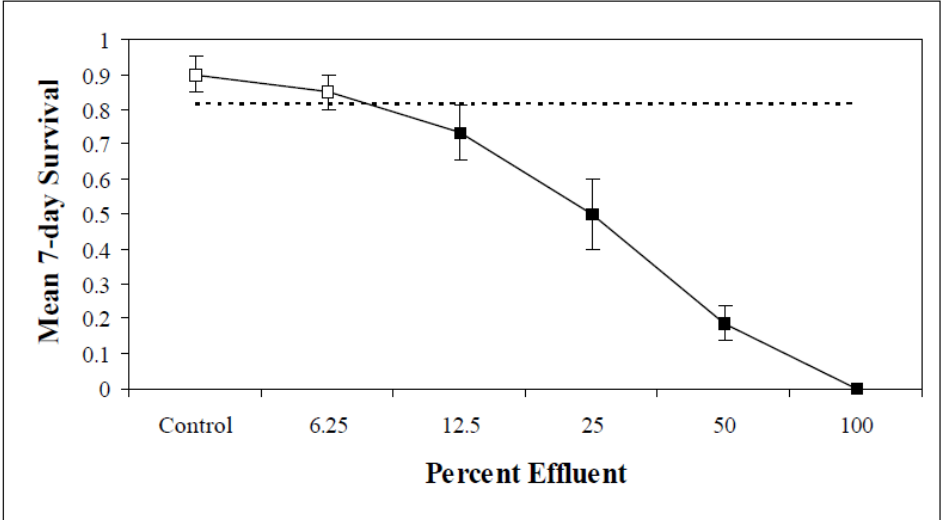
「毒性緩和作用の減少>原因物質の濃度減少による毒性低下」のとき、毒性の逆転が起きる(40%⇔80%)

# 様々な濃度反応関係の解釈(米国の例)

USEPA (2000) Method Guidance and Recommendations for Whole Effluent Toxicity (WET) Testing (40 CFR Part 136), EPA 821-B-00-004

**What are some patterns of concentration-response relationships typically seen in WET test data?**

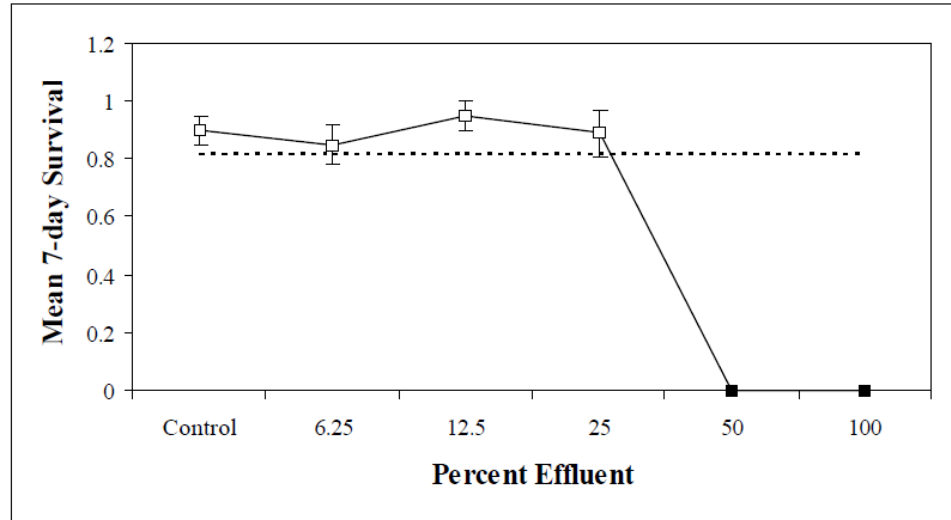
## 1. 正常な濃度反応関係



濃度を対数にとると、シグモイド曲線に近似される。

- 白抜きプロットはControlと比べて有意差なし、黒プロットは有意差あり
- 点線はControlの応答からMSD(最小有意差)を引いた応答を示す(これより下で有意差あり)

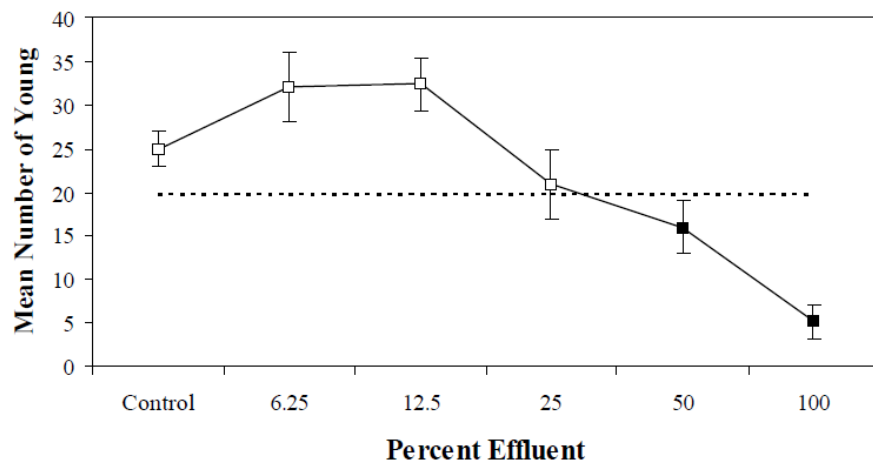
## 2. All or nothing (100%か0%か)



傾きが急なパターン。NOECでもICxでも信頼性のある結果が得られる。影響がない濃度(25%)とある濃度(50%)の間に濃度区を追加すると良い。

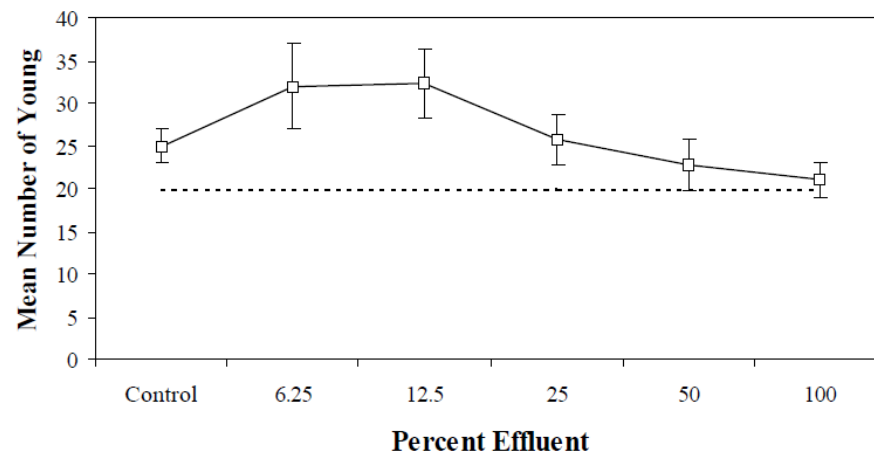
# 様々な濃度反応関係の解釈(米国の例)

## 3. 低濃度で増加、高濃度で有意な影響あり



毒性試験(特に慢性影響)ではみられることがある。NOEC、IC<sub>x</sub>ともに信頼性のある結果が得られる。

## 4. 低濃度で増加、高濃度で影響なし



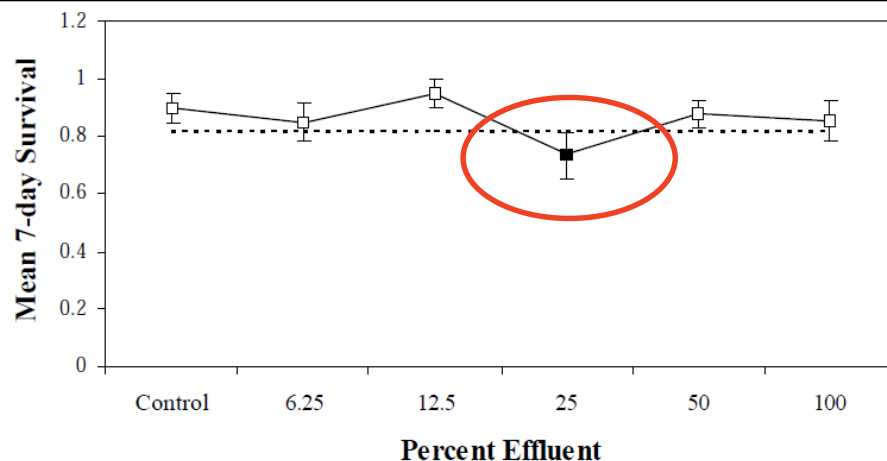
IC<sub>x</sub>の結果の解釈に注意が必要。NOECは信頼性のある結果が得られる。

### 【対応】

- 最高濃度が100%未満の場合は、高濃度区を追加する(認可レベルが<100%のときは不要)
- NOECとIC<sub>25</sub>を比較し、IC<sub>25</sub>の方が低い場合、対照区の応答や検出力(MSD)、IC<sub>25</sub>の推定方法を確認する(以下略)。

# 様々な濃度反応関係の解釈(米国の例)

## 5. 分断された濃度反応曲線: 影響のない濃度の中に影響のある濃度がある

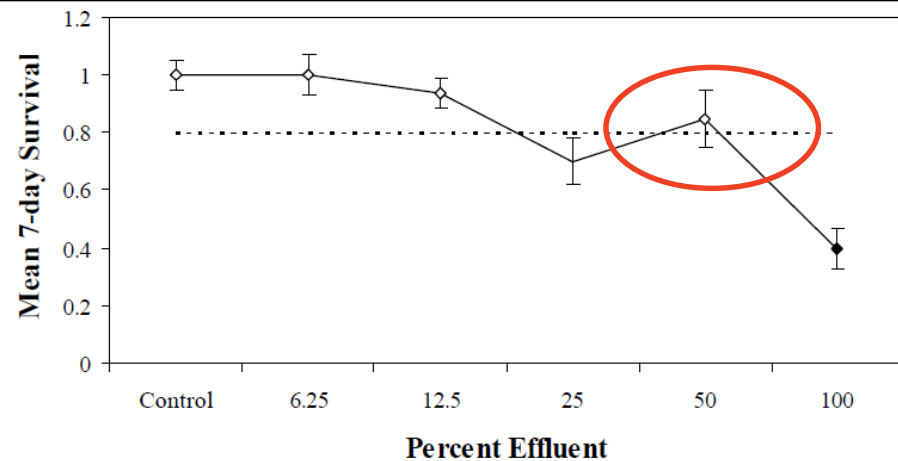


NOECの結果の解釈に注意が必要。IC<sub>x</sub>は信頼性のある結果が得られる。

### 【対応】

- 試験条件や試験操作に問題がないか確認
- 濃度区内の変動(繰り返し間のばらつき)を評価(1容器だけ外れ値を示していないか?)
- 試験の検出力(MSD)の確認(検出力が良過ぎるときはMSD下限値より小さい差は無視、検出力が悪いときは再試験等)

## 6. 分断された濃度反応曲線: 影響のある濃度の中に影響のない濃度がある



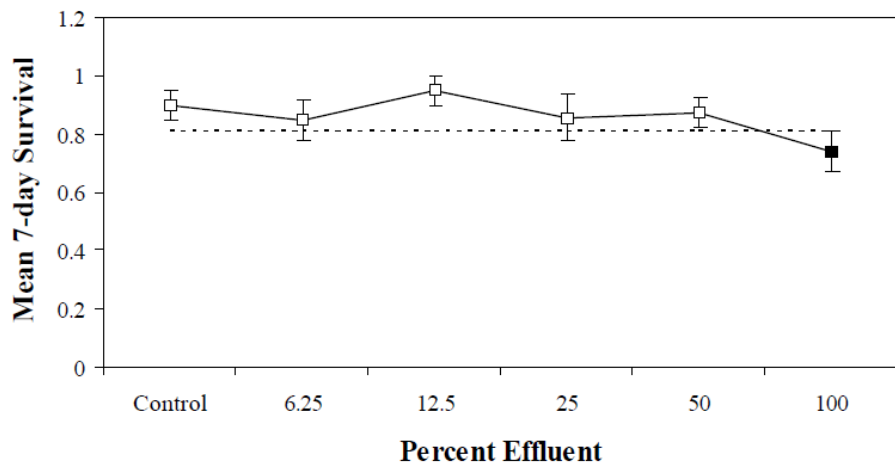
NOECの結果の解釈に注意が必要。IC<sub>x</sub>は信頼性のある結果が得られる。

### 【対応】

- 仮説検定(NOEC算出)の有効性の確認
- 試験の検出力(MSD)の確認(検出力が良過ぎるときはMSD下限値より小さい差は無視、検出力が悪いときは再試験等)

# 様々な濃度反応関係の解釈(米国の例)

## 7. 最高濃度のみ有意な影響あり

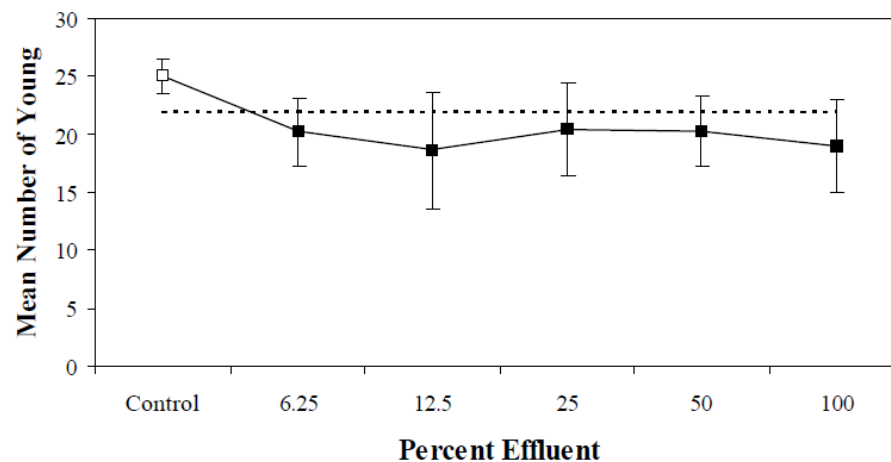


NOEC、IC<sub>x</sub>ともに信頼性のある結果が得られる。

### 【対応】

- 濃度設定の確認(次回見直し)
- 試験の検出力(MSD)の確認(検出力が良過ぎるときはMSD下限値より小さい差は無視、検出力が悪いときは再試験等)

## 8. すべての濃度区で有意な影響があるが、濃度反応曲線が平坦



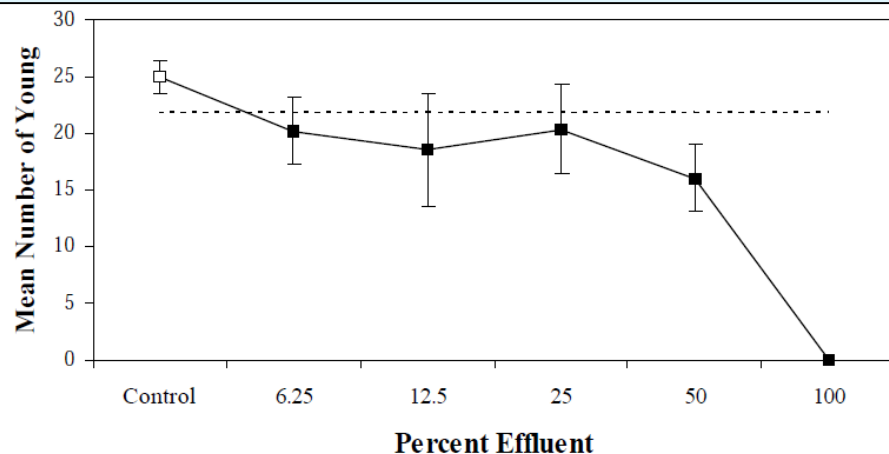
対照区の応答が通常より高くてばらつきが著しく低く、希釈方法に何らかのエラー、排水と希釈水が反応または排水中の病原菌が影響した可能性あり。

### 【対応】

- 試験の検出力(MSD)の確認(検出力が良過ぎるときはMSD下限値より小さい差は無視、検出力が悪いときは再試験等)
- 対照区の応答、希釈水、設定濃度の確認
- 病原菌の影響を疑う(UV殺菌を試みる) 47

# 様々な濃度反応関係の解釈(米国の例)

## 9. すべての濃度区で有意な影響があり、傾斜のある(sloped)濃度反応曲線

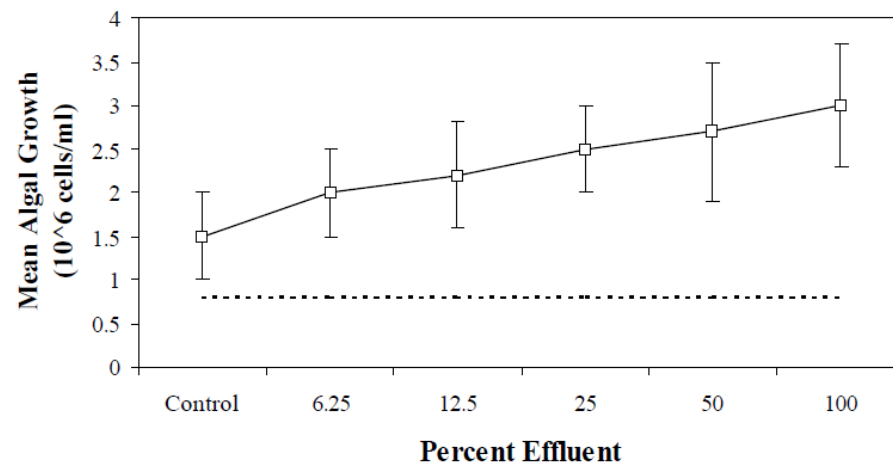


最高濃度で大きな影響がある以外は8に類似。NOECの結果の解釈に注意が必要。IC<sub>x</sub>は信頼性のある結果が得られる。

### 【対応】

- 低濃度で影響がみられた原因について、8と同様に評価する

## 10. 逆の濃度反応曲線



影響が濃度依存的に低減(よく藻類でみられる)。

無影響とされるが、過剰な栄養塩が富栄養化や酸素欠乏のリスクをもたらすかもしれないことに注意。

希釈水に受水域の環境水やそれと水質を合わせた人工調製水を用いている場合にも生じ得る。希釈水によって排水の毒性が緩和されている可能性に注意。

# 生物系統による感受性の違いと生物供給

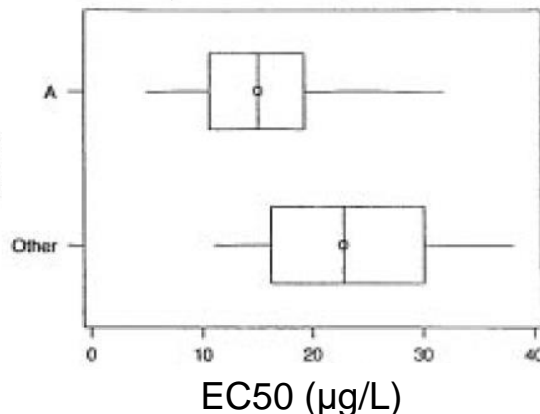
## 生物系統による感受性の違い

- 生物系統による感受性の違いはOECDテストガイドラインのリングテスト等で指摘されている。
- ただし、系統、試験物質により感受性の違いは異なる。

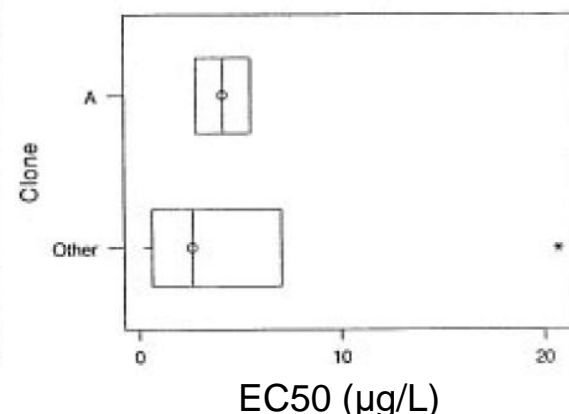
標準系統の確立と安定供給が望ましい

## *Daphnia magna*繁殖試験における系統差 (CloneAとその他系統)

3,4ジクロロアニリン



塩化カドミウム



出典: OECD (1997) Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction test

## 国立環境研究所による生物供給

ミジンコ・魚類・その他無脊椎動物: 環境リスク研究センター・リスク評価科学事業  
 連携オフィス・生態毒性標準拠点(水環境実験施設)「**実験試料の有償分譲**」

(<http://www.nies.go.jp/kenkyu/yusyo/suisei/index.html>)

- ニセネコゼミジンコ: 硬度70程度に順化した系統(US EPAより1994年分譲)を継代飼育
- ゼブラフィッシュ: 掛け合わせにより産卵能力の高い系統(NIES-R)を確立、継代飼育

藻類: 微生物系統保存施設、高品質で凍結保存、培養方法についてもHPに詳細が記載(<http://mcc.nies.go.jp/index.html>)





## 環境基準と排水基準の関係

## 0. はじめに

- 環境基準: 環境基本法に基づく政策上の目標。水質環境基準では、概ね年間平均値で評価。  
 ○排水基準: 水濁法に基づく原則最大値として定められる超過には罰則等を伴う法的拘束力のある基準。

## 1. 健康項目

項目名 <sup>(注1)</sup>	環境基準 <sup>(注2)</sup>	排水基準(水質汚濁防止法)	関係(倍率) (排水基準値/環境基準値 等)
	対象: 公共用水域	対象: 排水水	
カドミウム 【カドミウム及びその化合物】	0.003mg/L 以下	0.03mg/L	10 倍
全シアン 【シアン化合物】	検出されないこと	1mg/L	環境基準に係る公定法の定量限界(0.1mg/L)の 10 倍
【有機燐化合物】	— <sup>(注3)</sup>	1mg/L <sup>(注4)</sup>	— (環境基準が設定されていた間は、公定法の定量限界(0.1mg/L)の 10 倍)
鉛 【鉛及びその化合物】	0.01mg/L 以下	0.1mg/L	10 倍
六価クロム 【六価クロム化合物】	0.05mg/L 以下	0.5mg/L	10 倍
砒素 【砒素及びその化合物】	0.01mg/L 以下	0.1mg/L	10 倍
総水銀 【水銀及びアルキル水銀その他の水銀化合物】	0.0005mg/L 以下	0.005mg/L	10 倍
アルキル水銀 【アルキル水銀化合物】	検出されないこと	検出されないこと	—(生物濃縮等を考慮)
PCB 【ポリ塩化ビフェニル】	検出されないこと (公定法の定量限界: 0.0005mg/L)	0.003mg/L	生物濃縮等を考慮しても問題がない環境水中濃度(0.0003mg/L)の 10 倍
ジクロロメタン	0.02mg/L 以下	0.2mg/L	10 倍
四塩化炭素	0.002mg/L 以下	0.02mg/L	10 倍
1, 2-ジクロロエタン	0.004mg/L 以下	0.04mg/L	10 倍
1, 1-ジクロロエチレン	0.1mg/L 以下	1mg/L	10 倍
シス-1, 2-ジクロロエチレン	0.04mg/L 以下	0.4mg/L	10 倍
1, 1, 1-トリクロロエタン	1mg/L 以下	3mg/L	3 倍 (排水基準設定当時の水道水質基準(0.3mg/L)の 10 倍)
1, 1, 2-トリクロロエタン	0.006mg/L 以下	0.06mg/L	10 倍
トリクロロエチレン	0.01mg/L 以下	0.1mg/L	10 倍
テトラクロロエチレン	0.01mg/L 以下	0.1mg/L	10 倍
1, 3-ジクロロプロペン	0.002mg/L 以下	0.02mg/L	10 倍
チラウム	0.006mg/L 以下	0.06mg/L	10 倍
シマジン	0.003mg/L 以下	0.03mg/L	10 倍
チオベンカルブ	0.02mg/L 以下	0.2mg/L	10 倍
ベンゼン	0.01mg/L 以下	0.1mg/L	10 倍
セレン 【セレン及びその化合物】	0.01mg/L 以下	0.1mg/L	10 倍
硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素【アンモニア、アンモニウム化合物、亜硝酸化合物及び硝酸化合物】	10mg/L 以下	1Lにつき、アンモニア性窒素に 0.4 を乗じたもの、亜硝酸性窒素及び硝酸性窒素の合計量 100mg	10 倍
ふっ素 【ふっ素及びその化合物】	0.8mg/L 以下 (海域を除く)	8mg/L (海域への排出は 15 mg/L) <sup>(注5)</sup>	10 倍 (海域:—)
ほう素 【ほう素及びその化合物】	1mg/L 以下 (海域を除く)	10mg/L (海域への排出は 230mg/L) <sup>(注6)</sup>	10 倍 (海域:—)
1,4-ジオキサン	0.05mg/L 以下	0.5mg/L	10 倍

(注1) 環境基準に合わせたもの。環境基準と排水基準で項目名が異なる場合、【】内が排水基準のもの。(生活環境項目も同様)

(注2) 全シアン(最大値で評価)を除き、評価は年間平均値。

(注3) 有機燐に係る環境基準は、現在は設定されていないが、昭和 45 年から平成5年までの間は設定されており、当時の基準は「検出されないこと」とされていた。

(注4) パラチオン、メチルパラチオン、メチルチルトン及びEPNに限る。

(注5) 現行基準の見直し前(生活環境項目とされていたとき)の値を考慮。

(注6) 関係業種の排水実態、適用可能な排水処理技術、耐用摂取量等を考慮。

## 2. 生活環境項目

※BOD など、実際には地域に応じ上乘せ基準が設定されている場合が多い項目があることに注意。

※環境基準設定項目をベースに記載。

項目名	環境基準 <sup>(注1、注2)</sup>		排水基準 (水質汚濁防止法)		関係(倍率) (排水基準値/環境 基準値)
	水域	対象:公共用水域	対象:排出水	項目毎の考え方等	
水素イオン濃度 (pH)	河川	6.0~8.5	5.8~8.6	一般家庭下水を簡 易な沈殿法処理して 得られる数値と同等 のもの(地域毎に上 乗せ基準を設定)	— (排水基準値のものに 幅がある)
	湖沼	6.0~8.5			
	海域	7.0~8.3	5.0~9.0		
生物化学的酸素要 求量(BOD)	河川	≤1~10mg/L	160mg/L (日間平均 120mg/L)	同上	16~160 倍(最大値で)
化学的酸素要求量 (COD)	湖沼	≤1~8mg/L	160mg/L (日間平均 120mg/L)	同上	20~160 倍(最大値で)
	海域	≤2~10mg/L			16~80 倍(最大値で)
浮遊物質(SS)	河川	≤25~100mg/L等 <sup>(注3)</sup>	200mg/L (日間平均 150mg/L)	同上	2~8 倍(最大値で)
	湖沼	≤25~100mg/L等 <sup>(注3)</sup>			2~8 倍(最大値で)
溶存酸素量(DO)	河川	2~7.5mg/L≤	—	—	—
	湖沼	2~7.5mg/L≤			
	海域	2~7.5mg/L≤			
大腸菌群数	河川	≤50~5,000MPN/100mL	日間平均 3000 個/cm <sup>3</sup>	下水道法の技術上 の基準に準じて塩 素殺菌法によって確 保し得る数値	— (評価単位が異なる)
	湖沼	≤50~5,000MPN/100mL			
	海域	≤1,000MPN/100mL			
n-ヘキサン抽出物 質(油分等) 【ノルマルヘキサン 抽出物質含有量】	海域	検出されないこと	(鉱油類)5mg/L	環境基準に係る公 定法の定量限界の 10 倍(定量限界以 下でも着臭の場合 があるため)	10 倍
			(動植物油脂類) 30mg/L	汚水処理技術等を 考慮	60 倍
全窒素 【窒素含有量】 <sup>(注4)</sup>	湖沼	≤0.1~1mg/L	120mg/L (日間平均 60mg/L)	一般家庭下水を簡 易な沈殿法処理して 得られる数値と同等 のもの(地域毎に上 乗せ基準を設定)	120~1200 倍(最大値で)
	海域	≤0.2~1mg/L			120~600 倍(最大値で)
全燐 【燐含有量】 <sup>(注4)</sup>	湖沼	≤0.005~0.1mg/L	16mg/L (日間平均 8mg/L)	同上	160~3200 倍(最大値で)
	海域	≤0.02~0.09mg/L			177~800 倍(最大値で)
全亜鉛 【亜鉛含有量】	河川	≤0.03mg/L	2mg/L	一般的な排水処理 技術で現実的に適 用可能な濃度水準、 諸外国の排水規制 動向、自治体の上 乗せ基準の適用状 況等を考慮	約 67 倍
	湖沼	≤0.03mg/L			約 67 倍
	海域	≤0.01~0.02mg/L			100~200 倍
ノニルフェノール	河川	≤0.0006~0.002mg/L	—	—	—
	湖沼	≤0.0006~0.002mg/L			
	海域	≤0.0007~0.001mg/L			
アルキルベンゼン スルホン酸及びそ の塩(LAS)	河川	≤0.02~0.05mg/L	—	—	—
	湖沼	≤0.02~0.05mg/L			
	海域	≤0.006~0.01mg/L			
底層溶存酸素量 (底層 DO)	湖沼	2.0~4.0mg/L≤	—	—	—
	海域	2.0~4.0mg/L≤			

(注1)生活環境項目では、具体的な環境基準の値は水域に応じてあてはめられる類型によるが、ここでは排水基準との比較をしやすくするため、全ての類型における環境基準の範囲等を記載している。

(注2)全窒素、全燐、全亜鉛、ノニルフェノール及びLASは年間平均値、他は日間平均値で評価。

(注3)値以外で表現される基準があるため、「等」としている。

(注4)排水基準は、環境大臣が定める湖沼、閉鎖性海域及びこれらに流入する公共用水域に限り適用。