

生物応答を用いた排水試験法（検討案）

平成25年3月

排水（環境水）管理のバイオアッセイ技術検討分科会

目次

1		
2	第1部	はじめに.....1
3		
4	第2部	排水の採取.....1
5	1.	採取計画.....1
6	1.1	対象とする排水.....1
7	1.2	採取計画の立案において参考となる事項.....1
8	1.3	その他の参考情報.....2
9	2.	排水の採取と取り扱い.....3
10	2.1	適用範囲.....3
11	2.2	排水の採取.....3
12	2.3	試料の輸送方法.....5
13	2.4	試験機関における試料の取り扱い.....5
14		
15	第3部	試験の実施.....7
16	1.	試験計画の立案.....7
17	1.1	試験計画立案の流れ.....7
18	1.2	実施する試験（試験生物）の選定.....7
19	1.3	試験濃度の設定.....7
20	1.4	スケジュールの策定.....7
21	1.5	留意事項.....8
22	2.	胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験法.....9
23	2.1	試験の概要.....9
24	2.2	試験生物.....9
25	2.3	試験用水.....10
26	2.4	試験容器、装置および器具.....10
27	2.5	試験方法および条件.....11
28	2.6	結果の算出方法.....13
29	2.7	参考文献.....14
30	3.	ニセネコゼミジンコを用いるミジンコ繁殖試験法.....20
31	3.1	試験の概要.....20
32	3.2	試験生物.....20
33	3.3	試験用水.....21
34	3.4	試験容器、装置および器具.....21
35	3.5	試験方法および条件.....22
36	3.6	結果の算出方法.....23
37	3.7	参考文献.....24
38	4.	淡水藻類を用いる生長阻害試験法.....25
39	4.1	試験の概要.....25

1	4.2 試験生物.....	25
2	4.3 培養方法.....	25
3	4.4 試験容器、装置および器具.....	26
4	4.5 試験方法および条件.....	26
5	4.6 結果の算出方法.....	28
6	4.7 参考文献.....	29
7		
8	第4部 試験結果のとりまとめ.....	30
9	1. 統計解析—無影響濃度（NOEC）の算出.....	30
10	1.1 定義.....	30
11	1.2 解析手順の概要.....	30
12	1.3 各試験法における解析手順.....	30
13	1.4 ECx/ICx の算出.....	33
14	1.5 参考文献.....	33
15	2. 試験結果のとりまとめ.....	35
16	2.1 基本的な事項.....	35
17	2.2 補足的な事項.....	36
18		
19	第5部 試験結果の信頼性評価.....	38
20	1. 基本的な事項.....	38
21	2. 試験結果の信頼性にかかわる事項.....	38
22	3. 試験成立要件.....	38
23	4. 標準物質を用いた感受性試験.....	38
24		

初 版：2013年3月1日^{注1}

第二版：2014年3月12日^{注2}

第三版：2015年3月20日^{注3}

注1：生物応答手法を用いた排水試験に関する技術セミナー（2013年3月1日開催）にて配付（セミナー後、再推敲し、誤字脱字等を修正）

注2：生物応答手法を用いた排水試験に関する技術セミナー（平成25年度）（2014年3月12日開催）にて配付

注3：排水管理等に用いる生物応答手法に関する技術セミナー（平成26年度）（2015年3月20日開催）にて配付

35

1 第1部 はじめに

2 本試験法（検討案）は、事業場排水の水生生物への総合的な影響の程度を魚類、甲殻類、
3 藻類の3種の生物を用いて把握することを目的とするものである。本書では、排水の採取か
4 ら試験の実施まで、利用者が使いやすいよう、できるだけ具体的に記載し、各項目で独立し
5 て利用できる構成としている。なお、本検討案の内容は、試行試験を実施する中で明らかと
6 なった課題や科学技術の進歩などを踏まえて、適宜改訂する。

8 第2部 排水の採取

9 1. 採取計画

10 1.1 対象とする排水

11 事業場から排出される代表的な排水を採取することを基本とする。しかし、化学物質の使
12 用工程を考慮して、工程内の排水などを採取することも有効である。

14 1.2 採取計画の立案において参考となる事項

15 採取計画の立案にあたっては、以下の点を参考に、効率的かつ有効的に行うことが望まし
16 い。なお、以下の事項は参考情報であり、強要するものではない。

17 ① 排水の質（有害性、変動性など）

18 （具体的な考慮事項）

- 19 ・水生生物への影響が懸念される化学物質が排水中に含まれる可能性がある場合、当該
20 化学物質についての情報（SDSシート、使用実績、物理化学性状など）を収集する。
- 21 ・排水の質についてその変動や傾向を示す情報がない場合は、排水の質の変動要因を考
22 慮の上、経時的な採取の可否を検討する。
- 23 ・排水の質の変動に応じて、採取方法（グラブ（スポット）採水あるいはコンポジット
24 採水、2.2項参照）を選択する。特にグラブ採水の場合はそのタイミング、コンポジット
25 採水の場合は時間と回数を考慮する。
- 26 ・採取方法、採取地点の状況に適切な採水器具、装置を用いる。

28 ② 排出の特徴（連続放流、間欠放流など）

29 （具体的な考慮事項）

- 30 ・事業場の操業計画、操業日誌などを参考にして、平常操業時でありかつ排水量が大き
31 く変動していない時に採取を行う。
- 32 ・バッチ式処理や間欠放流を行っている事業場排水については、排水中の有害な物質の
33 挙動に配慮した採取方法を検討する。
- 34 ・連続放流排水の場合でも、日間変動、月間変動がある場合は、排水の発生源（製造品
35 目、製造量の変動など）を考慮し、排水処理工程での処理時間を加味した上で、最も
36 負荷が高いと予想される時期、時間に採取を行うことが望ましい。
- 37 ・採取時に、通常排水中に含まれないと考えられる不純物（浮遊物やゴミなど）は除外
38 してもよい。

1
2 ③ 排水口の特徴（排水口の位置、構造、数、排水の種類など）

3 （具体的な考慮事項）

- 4 ・複数の排水口が存在する場合や排水の種類などを考慮して、排水の採取地点を決定す
5 ることが望ましい（詳細は2.2（1）を参照）。

6
7 ④ その他

- 8 ・採取計画は、採水側の事情だけではなく、試験を迅速かつ確実にできるように考慮し
9 て立案されることが望ましい。

10 11 1.3 その他の参考情報

12 排水採取を行う者は、秘密保持の範囲内で事前に排水の情報を収集しておくことが望まし
13 い。具体的に下記の事項などが挙げられる。

14 ① 事業場で扱っている化学物質（物質名、量、使用時の形態、使用場所、該当する法制度
15 （化学物質排出把握管理促進法、化学物質審査規制法ほか））

16 ② 排水に含まれるまたは含まれる可能性のある化学物質（基準項目などを基本に、可能で
17 あれば含有化学物質、予想される変化物など）

18 ③ 排水の状況（基本的な水質測定項目。BOD などの変動有無、処理排水量の変動幅、排水
19 処理方法、排水口の位置と周囲の状況、排水の系統図）

20 ④ 用水の水源および水質

21 ⑤ 排出先の公共用水域の状況（可能であれば水位、流量など、また、〇〇川右岸〇〇橋下
22 流 300 m など、具体的に記載）

23 ⑥ 法制度への対応（水質汚濁防止法上の特定施設、地方条例、自主的な排水監視項目など）

24 ⑦ その他（操業日誌、採水時間、事業場側の担当者、採取後の取り扱いなど、後日採水時
25 の問題点などの確認を可能とする情報）

26 なお、第三者機関が採取計画を立案し、実施する場合は、事業者情報の開示を求めるこ
27 とが望ましいが、困難な場合においては、公的機関において公表されている情報などの収集
28 に努める。

29 30 2. 排水の採取と取り扱い

31 2.1 適用範囲

32 本検討案は、生物応答手法（バイオアッセイ）を用いて排水の生物影響を評価する場合の、
33 排水の採取に適用される。

34 なお、事業場などから排出される排水について、バイオアッセイを実施するために必要な
35 排水の採取、保存および輸送などの方法並びに留意事項については、本検討案に示されてい
36 るが、必要に応じて、日本工業規格（以下、「JIS」という。）K 0094(工業用水・工場排水の
37 試料採取方法)、JIS K 0410-3-1～10(水質—サンプリング—第1部～第10部)も参照することが
38 推奨される。

2.2 排水の採取

(1) 採取地点

原則として排水を公共用水域に排出する最終排水口を採取地点とする（水質汚濁防止法により届出されている排水口）。ただし、以下に示す事例を参考に適切な場所（位置）を採取地点とすることが望ましい。

1) 最終排水口の位置、構造などの物理的要因により採取が困難な場合

事業場の排水の最終処理施設と最終排水口間で採取が可能または適した地点を選択する。採取地点の決定に際しては、当該事業場以外の排水の影響が全くないか極めて小さく、かつ当該事業場の特性を最もよく示していると考えられる排水（場所、種類）であることを考慮する。

2) 同一事業場内に複数の最終排水口が存在する場合

事業場内のすべての排水口で採取し、排水量比に合わせて混合したものを代表排水とする。または排水の種類、量などを考慮し、明らかに当該事業場を代表すると考えられる排水が存在する場合、その特定の排水口を採取地点とする。採取地点の決定に際しては、当該事業場と相談の上で適切に判断することが望ましい。

3) 最終放流水に海水などが含まれている場合

本検討案では淡水生物種を用いていることから、採取した排水に海水が含まれると生物試験が成立しない。よって最終排水口で海水の混入が考えられる場合は、海水の影響を受けない範囲で最終排水口に近い場所（位置）を採取地点とする。

4) その他

事業場の状況に応じ、排水の生物影響を評価する上で最も妥当であると判断される地点を専門家と相談の上決定しても構わない。例えば、最終排水口より前の排水経路において、事業場固有ではない排水（雨水、生活排水など）や化学物質の影響が考えられない排水（冷却水など）が混合されている場合や、塩素処理による影響が懸念される場合、それらが混合する前に採取することもありうる。

(2) 採取方法と採取時間

1) 採取方法

排水の採取方法は、Grab（スポット）採水とコンポジット採水に類別される。バイオアッセイに供する排水は、事業場の稼働状況などを考慮して最も適切な条件で採水を行うことが望ましい。排水の変動性を考慮しなければならない場合にはコンポジット採水が推奨される。しかし、採水担当者の負担などを考慮して、事業場の定常操業時に1日1～数回のGrab採水を行い、それぞれ試験に供することも可能である。

① Grab（スポット）採水：特定の時間に1回だけ採取する方法。Grab（スポット）

採水には、採取にかかるコストが少ないなどの利点がある反面、特定の時間に1回だけ採取した排水であるため、必ずしも事業場排水の平均的または代表的な排水ではな

1 い可能性もある。

2 ②コンポジット採水：持続的または間欠的に採取した排水を混合する方法。コンポジット採水は、グラブ（スポット）採水に比べて事業場排水の平均的または代表的な水質を得ることが可能ではあるが、時間とコストがかかる。

5 【考慮事項】

- 6 ・平均的な操業時でも、排水の質が日内または日間で大きく変動することが分かっている時間帯、たとえば、機器の稼働時や点検時に定常時と異なる排水が排出される場合などに注意する必要がある。
- 7 ・間欠排水を行っている場合、たとえば、排水を一時的に貯留して一定時間後に排出する場合などに注意する必要がある。
- 8 ・使用する原材料あるいは製造する製品の変更などによって排水の質が大きく変化することが判明した場合には、改めて採取を行うことが望ましい。

14 2) 採取時間

15 排水の質が日内または日間で変動することが分かっている場合、採取を行う日時を決定するための目安（判断基準）を定めておくことが望ましい。たとえば、継時的にモニタリングされた COD（化学的酸素要求量）を指標として、最も COD が高い時に採取を行うことが考えられる。排水の COD と生物影響とは必ずしも相関しないが、事業場の活動（操業）に伴う排出負荷が最も高い状態と想定され、より安全側に立つ採取ができると考えられる。

19 なお、排水の評価結果の信頼性を担保する上で、同一排水を複数の試験機関でバイオアッセイ（または化学分析など）に供し、結果のばらつきなどを把握することは重要であり、質の変化が想定される排水では、それらも考慮して採取方法などを計画することも有効な手段である。排水の種類や特徴によって推奨される採取方法が異なる場合もあるため、JIS K 0410-3-2（水質—サンプリング—第2部）を参照し、あらかじめ適切な採取方法を選択しておくことが推奨される。

27 (3) 採取に使用する器具および装置

28 採取に使用する器具や装置などは、採取地点の状況（高さや足場など）、排水の質（含有することが想定される化学物質など）、採水方法（グラブ（スポット）採水またはコンポジット採水）に応じて、適切なものを選択する。たとえば、グラブ（スポット）採水の場合には、バケツや柄付きひしゃく、採水器などを使用する。一方、コンポジット採水の場合には、排水を連続的または間欠的に自動採取できる装置を使用することが望ましい。いずれの場合においても、採取には、排水の汚染（コンタミネーション）を招かないように、適切に洗浄された清浄な器具や装置を使用する。

35 なお、排水の採取に使用できる器具および装置などの種類、特徴および使用方法などに関しては、別途、JIS K 0094 および K 0410-3-10 を参照することが推奨される。

38 (4) 試料容器および採取量

39 採取した排水（以下、試料）を入れる容器（試料容器）には、できるだけ不活性かつ破損しにくい材質のものを用いる。排水の質（容器への吸着）や採取時の状況など（採取量

1 など) に応じて選択する。たとえば密栓できる 3~4 L 容の褐色ガラス製容器や液体用の折
2 りたたみ式ポリタンクが挙げられる。輸送時はできるだけ遮光する。排水の必要採取量は、
3 3 生物 1 試験分として 6 L 程度必要とするが、実施を予定しているバイオアッセイの種類と
4 量、化学分析実施の有無、保存試料の必要性などに応じて採水量を調整する。

5 なお、バイオアッセイとは別に化学分析などを行う場合には、別途、試料容器を用意し、
6 輸送中の損失を最小限にするための工夫をすることが望ましい。

8 (5) 試料採取時の記録

9 試料採取時には、以下の内容を記録する。

- 10 1) 試料の名称 (またはその識別記号) ※明瞭かつ容易に消えない方法で記載またはラ
11 ベルを添付する。
- 12 2) 採取日時 (作業の開始時刻と終了時刻)
- 13 3) 採取地点 (可能であれば、採取地点を示した排水経路図)
- 14 4) 試料の性状 (水温、色調、浮遊物、臭気および pH など)
- 15 5) 採取担当者、立会者の氏名
- 16 6) 採取方法
- 17 7) 採取試料量
- 18 8) 採取時の状況 (天候、気温など)
- 19 9) その他 試験結果に影響を与えられ得る事象

20 また、採取を行った排水口での一日あたりの排水量、年間排水量、事業場の操業日誌、
21 排水について過去 (採取時の直近) に測定された COD (または BOD)、pH、SS などのデー
22 タ (事業場が保有する記録の写し)、排水の放流先の状況 (放流先が河川の場合にはその水
23 量や河床の状況) などを採取時の記録に添付しておくことが望ましい。

25 2.3 試料の輸送方法

26 バイオアッセイは、採取終了時から 36 時間以内にばく露を開始することが望ましい。その
27 ため、試料は速やかに以下の処理を行い、保冷しながら輸送する。宅配便で輸送する場合に
28 は冷蔵指定 (0~6°C) にする。

29 試料輸送中の揮発性物質の損失を最小にするため、できる限り気相部分がない状態で容器
30 を密栓 (密封) する。試料を容器に封入後、できるだけ速やかに粗熱を取り (可能であれば、
31 氷水中で水温を 4°C 付近まで低下させる)、輸送用の容器に収容する (試料容器がガラス製容
32 器の場合は、輸送中の破損を防ぐために各容器の間に緩衝材 (発泡スチロールなど) を入れ
33 る)。なお、このとき内容証明も同封しておく。

35 2.4 試験機関における試料の取扱い

36 (1) 試料の受け入れ

37 試験施設は、輸送で受け入れた試料について、同封の内容証明と照合して同一性を確認
38 する。また、搬入日時、搬入 (輸送) 方法、搬入時の状態 (試料の漏えい、容器破損の有
39 無など)、水温および受け入れ担当者の氏名などを記録する。

1 (2) 試料の前処理

2 排水の生物影響評価を適切に行うには、試料は採取終了時から 36 時間以内にバイオアッ
3 セイに供することが望ましい。そのため、試験機関は、試料の搬入後、直ちにバイオアッ
4 セイを開始できるように事前の準備を行う。試験機関が排水採取後 36 時間以内にバイオア
5 ッセイが開始できない場合には、改めて採取を行うか、開始できない理由を示して関係各
6 所の合意を得た上で試験を実施する。

- 7
- 8 1) 試験機関に搬入された試料は、遮光および保冷された状態で試験施設に搬入後、粗大
9 な夾雑物を除去する目的で、速やかに目開き約 60 μm のプランクトンネット（ナイロ
10 ン製）で通水し、粗大な夾雑物を除去する。
11 なお、藻類用の試料は、ろ過滅菌(0.2~0.4 μm)が認められていることから（第 3 部 4.5.1
12 項）、ろ過中の目詰まりが懸念される場合、事前にガラス繊維ろ紙 (GF/F、孔径 0.7 μm)
13 でろ過することが望ましい。
- 14 2) 粗大な夾雑物を除去した後、当日使用分を除いて、一日に使用する分量ずつ密栓でき
15 るガラス製容器に試料を分注し、できるだけ速やかに暗所（または遮光容器）にて冷
16 蔵保存（0~6°C）する。これらの保存容器には、試料の名称（またはその識別記号）
17 および容器個別の識別記号などを記載しておく。
- 18 3) 残留塩素、SS、TOC、pH、硬度、塩分（もしくは電気伝導率）などの水質分析を行う。
- 19 4) なお、粗大な夾雑物を除去前の排水についても残留塩素、SS、TOC、pHなどを測定
20 しておくことが望ましい。

21 (3) 試料の水質測定

22 バイオアッセイに用いる試料は、試験に供する前に一部をガラスビーカーに分取して pH
23 および溶存酸素（以下、DO）を測定する。pH は排水基準を遵守していれば 6.5~8.5 の範
24 囲内であるため、原則として調整しない。ただし、輸送・貯蔵途中で pH が 6.5 未満あるい
25 は 8.5 以上に変わった場合はその限りではない。pH が 6.5 未満の場合には水酸化ナトリウ
26 ム (NaOH、1 N 程度) の添加により pH 6.5 付近に、pH が 8.5 を超える場合には塩酸 (HCl、
27 1 N 程度) の添加により pH 8.5 付近に調整する。

28 また、DO が飽和濃度の 60%未満の場合には、先端の口径が 1 mm 程度のガラス管（パス
29 ツールピペットなど）を用いて緩やかに通気し、溶存酸素が飽和濃度の 60%以上になった
30 時点で止める。
31

32 (4) バイオアッセイ終了後の試料の取扱い

33 試験施設で保存する試料については、バイオアッセイの終了後、適切な方法により処分
34 する。事業者の要望などにより、バイオアッセイの再実施などに備えた長期保存も可能で
35 あるが、1 年を経過した試料については適宜処分しても構わない。
36

37 (5) バイオアッセイ終了後の試験生物の取扱い

38 試験終了後の試験生物は回収し、環境中に排出されないよう適切に処理する。
39
40
41

1 第3部 試験の実施

2 1. 試験計画の立案

3 1.1 試験計画立案の流れ

4 試料採取後に速やかに試験を開始できるように、採取計画と試験計画の立案に当たっては、
5 あらかじめよく調整しておく必要がある。よって試験計画は、採取担当者と試験担当者の合
6 意の上に作成されなければならない。

8 1.2 実施する試験（試験生物）

9 魚類・甲殻類・藻類の3種の生物を用い、標準化された試験法に基づき実施されることを
10 基本とする。排水の自然環境への影響についてより理解を深めるために、上記生物以外の試
11 験を追加で行うことは構わない。本検討案ではゼブラフィッシュ、メダカ（魚類）、ニセネコ
12 ゼミジンコ（甲殻類）、ムレミカツキモ（藻類）を用いた短期慢性毒性試験法を示す。

13 試験開始前にそれぞれの試験生物を供給機関（たとえば、国立環境研究所）から入手し、
14 馴化しておく。また入手した生物について、標準物質による感受性試験を実施しておくこと
15 が望ましい。

16 試験は十分な経験を有する試験機関によって実施されなければならない（試験機関の認証
17 制度については未定）。

19 1.3 試験濃度の設定

- 20 ・試験に用いる排水は、試験用水を用いて希釈し、指定濃度に調製する。試験用水とは通
21 常試験機関で用いている飼育水または OECD（経済協力開発機構）テストガイドライン
22 などに記載されている試験標準水を指し、試験の対照区としても用いられる。試験用水
23 の一般水質分析は定期的に行う。

- 24 ・無希釈の試料を100%と定義する。試験に用いる希釈濃度区の範囲は、80%以下とする。

25 理由：特に藻類の試験において、排水100%では窒素、りんが不足している場合に生
26 長阻害が起きる。20%の OECD 培地存在下では窒素・りん不足が解消されること
27 が確かめられているため、最低でも20%の OECD 培地を含有させる。また、
28 魚類及び甲殻類の試験においても、100%排水で試験をする場合、水質の急激な
29 変化によるストレス反応を起こす可能性があるため、藻類の試験に合わせて、
30 試料の最高濃度を80%とする。

- 31 ・試験濃度は、希釈倍率を公比2とし、5濃度区を基本とする。すなわち、80、40、20、10
32 および5%とする。ただし、過去に実施した試験の結果などから、濃度区を増減すること
33 も可能である。

35 1.4 スケジュールの策定

- 36 ・採取計画を熟知した上で試験実施のスケジュールを作成する。
- 37 ・排水入手日に速やかに試験が開始できるように、下記に示すような各試験の準備を十分
38 に整える（詳細は各試験法を参照のこと）。
- 39 ・魚類試験の場合：試験開始時刻に受精卵を必要数だけ用意しなければならないため、

1 事前に産卵周期を調節するなどの配慮が必要となる。

- 2 ・甲殻類試験の場合：試験開始の約1週間以上前から、供試個体を選別するための個別
- 3 飼育（シングルカルチャー）を開始する。
- 4 ・藻類試験の場合：試験開始の2～4日前から、指数増殖期の藻類細胞を得るための前
- 5 培養を開始する。
- 6 ・排水入手時の状態（入手時の様態、水温、pHなどの一般水質）に関する記録用紙を用
- 7 意する。
- 8 ・試験期間中の試料保存（保存容器、保存場所、保存期間中の試料の性状の観察、温度
- 9 など）に関する記録用紙を用意する。

11 1.5 留意事項

- 12 ・各試験における観察項目だけではなく、試験結果に影響を与えられられる試験中
- 13 の事項についても記載する。
- 14 ・客観的に試験が遂行されていることを証明できるように、結果の記載方法などについ
- 15 て工夫する。
- 16 ・試験の有効性条件を満たさなかった場合の対応（再試験や試料の再採取の実施など）
- 17 については、試験依頼者と相談の上、決定する。

18

2. 胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験法

2.1 試験の概要

本試験は、魚類の胚を排水（以下、試料）に受精直後からふ化後の卵黄吸収完了の直前までばく露し、ふ化率や生存率、発生異常などを調べ、対照区と比較することにより、胚・仔魚期の魚類に対する試料の致死影響（急性毒性）および亜致死的影响（亜慢性毒性）を明らかにすることを目的とする。器官形成や体成長など、生物にとって重要かつ外的影響を受けやすい時期（発生・成長段階）である胚期の魚類をばく露に用いることから、試料の魚類に対する（亜）慢性毒性に相当する影響が推定できると考えられる。

本試験法は、OECD テストガイドライン 212 “Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages”⁽¹⁾、国際標準化機構（ISO）規格 15088 “Water quality — Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)”⁽²⁾および米国環境保護庁（U.S. EPA）の試験法 “Fathead Minnow, *Pimephales promelas*, embryo-larval survival and teratogenicity test method”⁽³⁾を参考にして策定したものである。本試験の実施には、本試験法のほかに、胚期を含む時期の魚類が試験生物として用いられている既存試験法のガイドラインなど⁽¹⁾⁽⁷⁾も参考となる。

2.2 試験生物

2.2.1 生物種

ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) またはメダカ (*Oryzias latipes*) が推奨される*。

*ゼブラフィッシュとメダカは、既存の排水（または環境水）を対象とする試験ガイドラインまたは国際規格などで用いられている魚種であり⁽²⁾⁽³⁾、小型で飼育や繁殖（採卵）手法が確立されている。本種は、現在世界各国の大学や研究機関（国立環境研究所等）等から入手できるが、適切な方法で維持、継代されている系統を入手する。入手した生物は、試験を実施する施設で馴化し、再現性のある試験結果が得られることを確認しておく。試験生物の繁殖飼育および採卵方法などについては、本検討案のほかに、既存の試験法ガイドラインやガイダンスドキュメントなどの方法⁽¹⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁹⁾⁻⁽¹²⁾を参考にしてもよい。

2.2.2 採卵に用いる親魚

(1) 系統

試験には、化学物質の毒性試験に用いられている系統を用いることが望ましい。観賞用、特殊な実験への利用を目的に作出された系統（近交系など）、遺伝子組み換え魚などは推奨しない。

(2) 履歴

試験に用いる受精卵を得るための親魚には、試験に用いるまでの履歴が明確な個体を用いる。そのため試験施設で継代的に繁殖・飼育されている個体を用いることが推奨される。採卵には、繁殖が可能な大きさ（齢）に達した成熟した雌雄を用いるが、初回産卵や老成した雌から得た卵は受精率や受精卵のふ化率が低い場合があるため注意する。

1 (3) 飼育および選抜

2 成熟期までの期間は、魚種または発育段階や大きさに応じて適切な条件下で飼育する。
3 この飼育群から、外見的に異常がなく成熟した雌雄を親魚として選抜する。性別（雌雄）
4 および成熟状態は、魚種に応じて二次性徴、体型、体色などから判別する。

5 採卵用の親魚は、受精卵の採取を実施するまでの間、ばく露試験に用いる試験用水と同
6 質の水で飼育する。飼育水槽は、個体数に合わせて適切な大きさのものを用いる。飼育は
7 流水式または半止水式で行う。適切な餌を十分に与えるが、餌の食べ残しや糞などによる
8 水質悪化を招かないようにする。

9 試験開始に合わせて確実に良好な受精卵を得るためには、飼育中に雌が産卵した卵の受
10 精率やふ化率を定期的に調べ、良い個体を選別しておくといよい。

11 12 2.2.3 受精卵の採取

13 (1) 採卵および受精卵の選別

14 良質な受精卵を得るためには、選抜した親魚を適切な密度および性比で水槽（産卵用水
15 槽）に収容して産卵させることが重要である。採卵に用いる親魚の個体数は、試験に必要な
16 受精卵数と雌 1 個体あたりの産卵数を考慮して決める。試験には、胞胚期までの卵（胚）
17 を用いるため、試験の開始予定時刻に合わせて採卵ができるように親魚を準備しておく（た
18 とえば、照明の点灯時刻を調節するなどの方法により産卵時刻の人為的な調整を行う）。参
19 考として、ゼブラフィッシュおよびメダカでの親魚の飼育および採卵方法を別添 1 および 2
20 に示す。

21 産卵用水槽に産出された卵は、ピペットやサイフォンなどを用いて飼育水と一緒に速や
22 かに回収する。このとき、卵は、可能な限り空気に晒さないように注意して取り扱う。回
23 収した卵を適量の飼育水と一緒にシャーレなどに移し入れ、実体顕微鏡下で観察し、未受
24 精卵や形態などに異常が認められる卵を除去し、試験に必要な数の受精卵（供試用受精卵）
25 を得る。このとき、容器内の糞などの異物をできる限り除去する。

26 供試用受精卵を入れた容器は、ばく露開始時まで試験温度に調整した恒温装置内に静置
27 しておく。

28 29 2.2.4 試験に用いる受精卵

30 試験には、受精後から胞胚期までの発生段階にある胚（受精卵）を供することが望まし
31 い。ゼブラフィッシュでは受精後 4 時間以内、メダカでは受精後 10 時間以内の胚であるこ
32 とが望ましい。

34 2.3 試験用水

35 試験用水には有害物質が含まれていない良質の淡水（たとえば、活性炭で脱塩素処理した
36 水道水など）を用いる。pH は 6.5～8.5、溶存酸素は飽和酸素濃度の 80%以上とする。試験に
37 は必ず試験用水を対照区として設ける。

39 2.4 試験容器、装置および器具

- 40 ・試験容器：容量 100 mL 程度のガラス製容器（直径 5 cm 程度）

1 (水分蒸発や揮発成分の周囲への影響を防ぐために、透光性のあるふたなどで
2 容器を覆うなどの工夫をする。)

- 3 ・恒温装置：温度、照明条件（照度、明暗周期）を一定に維持できる装置（インキュベーター、
4 ウォーターバスなど）または部屋
- 5 ・観察装置：実体顕微鏡
- 6 ・水質測定装置：水温計、溶存酸素計、pH 計など
- 7 ・器具類：メスシリンダー、ガラスピペット（先端の口径を 3～4 mm に広げ、バーナーな
8 どで焼き丸めたもの）、ガラス容器（ビーカーまたは試薬瓶）など
9 （器具類の材質は適切なものを選択する。）

11 2.5 試験方法および条件

12 2.5.1 試料の前処理

13 試料は、第 2 部 2.4 項に示した前処理を除いて、前処理せずに試験に供することが望まし
14 い。

16 2.5.2 試験溶液の調製

17 試験溶液は、試験濃度ごとに適当量の試料を試験用水と混合（試料を試験用水で希釈）
18 して調製する。なお、試験濃度（試験溶液中の試料の濃度）は、無希釈の試料を 100%とす
19 る。対照区の試験溶液には、試験用水を用いる。

20 試験濃度は、希釈倍率を公比 2 とする 5 濃度区を基本とする。80、40、20、10 および 5%
21 の 5 濃度区を標準とするが、過去に実施した試験の結果などから、最大無影響濃度が含ま
22 れるように、濃度区を増減することも検討してよい。

23 試験溶液の調製では、試料濃度ごとに清浄なガラス容器（ビーカーまたは試薬瓶）を用
24 意し、メスシリンダーなどを用いて試料必要量を分取し、同じく必要量の試験用水と混合
25 して、所定濃度に希釈する。沈殿物がある場合はよく攪拌してから希釈を行う。

26 調製した試験溶液の水温は、恒温装置内に静置などして試験温度に調温する。

28 2.5.3 試験条件

- 29 ・ばく露方式：半止水式（少なくとも週 3 回、2 日または 3 日ごとに換水）
- 30 ・ばく露期間：ふ化日*から 5 日後まで
 - 31 ゼブラフィッシュ：ばく露開始から 8～10 日間
 - 32 メダカ：ばく露開始から 13～16 日間
- 33 ・繰り返し数：4 容器以上/濃度区
- 34 ・供試卵数：最低 10 粒/容器（15 粒/容器が推奨される）
- 35 ・試験溶液量：50 mL/容器
- 36 ・試験温度：ゼブラフィッシュ 26±1℃
37 メダカ 24±1℃
38 （容器間変動および日間変動は 1.5℃以下であることが望ましい）
- 39 ・照明：室内光で明期 12～16 時間、暗期 8～12 時間
- 40 ・給餌：なし

1 ・通気：なし

2
3 ※対照区において 50%を超える胚（受精卵）がふ化した日をふ化日（ふ化 0 日後）とする。

4 5 **2.5.4 試験操作**

6 後述の試験操作を行う際は、操作中試験溶液の水温ができるだけ変化しないように配慮
7 する（たとえば、ウォーターバスの使用や実験室の室温を試験温度付近にしておくなど）。

8 9 **(1) ばく露開始時の操作**

10 試験容器には、試験濃度や容器番号などを記載（またはラベルを添付）しておく。

11 あらかじめ調製した各試験溶液の水温を測定し、試験温度の範囲を外れている場合は、
12 再度、恒温装置内に静置などして水温を調整する。各試験容器に調製した試験溶液を分注
13 する（各 50 mL）。前述 2.2.3 で用意した供試用受精卵を、試験濃度ごとに試験容器に必要
14 数（試験濃度あたりの供試数）を手早くガラスピペットを用いて移し入れる。この時点
15 をばく露開始とする。

16 受精卵を入れた試験容器は、ふたなど（透光性のあるもの）で覆い、速やかに恒温装置
17 内に入れる。

18 19 **(2) ばく露期間中の操作**

20 原則としてばく露開始から 24 時間ごとに、すべての試験容器について試験生物の観察
21 を行う。死亡個体がみられた場合は、速やかに除去する。観察の終了後、試験溶液を少な
22 くとも週 3 回、2 日または 3 日ごとに換水する。換水時には試験溶液の水質測定を行う。
23 試験溶液の換水または観察終了後、試験容器を速やかに恒温装置内に戻す。

24 一般に胚期および仔魚期の魚類は、物理的刺激に対して脆弱で、ガラスピペットで試験
25 溶液とともに吸引された際などに骨折による奇形を生じることがある。そのため試験溶液
26 の換水は、試験容器内の試験溶液のみを抜き取って新しいものに入れ替える方法で行うこ
27 とを基本とする（換水手順①）。ただし、試験容器内に顕著な微生物の増殖（容器壁面の
28 バイオフィーム形成など）が認められるなど、試験結果に影響を及ぼす可能性が考えられ
29 る場合には、換水時に試験容器も清浄なものに交換する方法で換水を行う（換水手順②）。
30 いずれの方法を用いる場合でも、換水する際に、試験生物を傷つけたり逸失したりしない
31 ように注意する。

32 33 換水手順①：試験容器を交換しない場合

34 ガラスピペットを用いて、試験生物を吸わないように注意して試験容器内の試験溶液を
35 約 5 mL 残して除去する。そこにできるだけ試験生物をかく乱しないよう緩やかに、新調し
36 た試験溶液（水温調整したもの）を 50 mL 入れる。この方法により換水した場合は、試験
37 溶液の約 90%が新鮮な試験溶液に入れ替わり、換水後の試験液量は約 55 mL になる。

38 39 換水手順②：試験容器を交換する場合

40 新しい試験容器に新調した試験溶液 50 mL を入れる。ガラスピペットを用いて、換水

1 前の試験容器内の試験生物を少量の試験溶液とともに新しい試験容器に移し入れる。こ
2 のとき試験生物と一緒に新しい試験容器に持ち越す試験溶液は 5 mL 以下（試験液量の
3 10%以下）にする。

5 (3) ばく露終了時の操作

6 すべての試験容器について、試験生物の観察および試験溶液の水質測定を行う。すべて
7 の試験操作の終了後、試験に供した試料および生物は適切な方法で処分する。

9 2.5.5 水質の測定

10 すべての試験濃度について、ばく露開始時、ばく露期間中の換水前後、ばく露終了時の
11 試験溶液の水温、pH、溶存酸素を測定し、記録する。なお、換水前の試験溶液とは新調し
12 た試験溶液、換水後の試験溶液とは換水時に除去した試験溶液を指す。

13 2.5.6 試験生物の観察

14 試験容器中の試験生物を肉眼または実体顕微鏡下で観察し、生死およびふ化した胚体数
15 を記録する。発生前期（器官形成前）の胚では、全体の透明性が消失して白濁したものを
16 死亡とみなす。発生後期（器官形成後）およびふ化後の仔魚では、白濁または心臓の拍動
17 が認められないものを死亡とみなす。卵膜から胚（体幹部）が完全に出ていない状態のも
18 のはふ化前とみなす。観察後、死亡した胚、仔魚およびふ化後の卵膜を除去する。

19 ばく露開始から 48 時間後以降の観察では、各試験濃度の生存する胚または仔魚のうち、
20 対照区と比較して、「体幹部の発育不全」、「尾部の卵黄からの不分離」などの形態異常、「心
21 拍数の低下」あるいは行動などに異常が認められる個体数を記録しておくことも、供試
22 料の毒性の評価などにおいて有効である⁽²⁾⁽⁶⁾。

24 2.5.7 試験の有効性

25 本試験は、以下を満たさなければならない。

- 26 ・対照区におけるふ化率（2.6.1（2）参照）が 80%以上であること。
- 27 ・対照区におけるばく露終了時の生存率が 70%以上であること。
- 28 ・対照区における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。

31 2.6 結果の算出方法

32 2.6.1 影響指標の算出

33 試験から得られたデータをもとに、以下に定義される影響指標値を試験容器ごとに算出
34 する。

36 (1) 生存率

37 供試卵数に対する、ばく露終了時に生存した胚体*または仔魚数の割合（%）。

38 生存率＝ばく露終了時の（生存胚体数＋生存仔魚数）／供試卵数×100

39 ※発生は進んでいるがふ化前の胚（卵）。

1 (2) ふ化率

2 供試卵数に対する、最大ふ化所要日数*までにふ化した卵数の割合 (%)。

3 ふ化率=最大ふ化所要日数での総ふ化仔魚数/供試卵数×100

4 ※ゼブラフィッシュの最大ふ化所要日数はばく露開始から 5 日後、メダカの最大ふ化所
5 要日数はばく露開始から 14 日後。

7 (3) ふ化後生存率

8 ばく露期間にふ化した仔魚数に対する、ばく露終了時に生存した仔魚数の割合 (%)。

9 ふ化後生存率=ばく露終了時の生存仔魚数/ばく露期間の総ふ化仔魚数×100

11 (4) 生存指標

12 ふ化に対する遅延の影響も加味した胚期からふ化後の仔魚に対する影響の指標※。

13 生存指標=ふ化率×ふ化後生存率/100

14 ※試料の胚に対する影響(ふ化率)とふ化後の仔魚に対する影響(ふ化後生存率)を総合する指標。なお、
15 最大ふ化所要日数までにすべての供試卵がふ化または死亡した場合には、生存指標は(1)の生存率と
16 等しくなる。

18 2.6.2 最大無影響濃度

19 ふ化率、ふ化後生存率、生存率または生存指標について、対照区と比較して統計学的に
20 有意な低下が認められた最も低い試験濃度を最小影響濃度(LOEC)、その一つ下の試験濃
21 度を最大無影響濃度(NOEC)とする(ただし、LOECより高濃度では、LOECと同等以上
22 の影響がみられること)。すべての試験濃度において、いずれの影響指標値も対照区と有意
23 差が認められなかった場合は、最も高い試験濃度をNOECとする。

24 なお、統計学的手法では対照区と各試験濃度間の有意差を適切に検出できない場合は、
25 非線形回帰モデルなどを用いて推定したECx/ICx(x%影響/阻害濃度)を算出してもよい⁽¹⁴⁾
26 (詳細は第4部を参照のこと)。ECx/ICx推定では、各試験濃度における影響指標値は全試
27 験容器の平均値を用い、以下の式(Abbott's formula)による補正を行う。

$$28 \quad P = 100 - \{(C - P') / C \times 100\}$$

29 ここで、

30 P: 補正された各試験濃度における影響指標値

31 P': 各試験濃度における観察された影響指標値

32 C: 対照区における観察された影響指標値

34 2.7 参考文献

- 35 (1) OECD (1998), OECD Guideline for testing of chemicals 212, Fish, Short-term toxicity test on
36 embryo and sac-fry stages.
- 37 (2) ISO (2007), International Standard 15088, Water quality — Determination of the acute toxicity
38 of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*).
- 39 (3) U.S. EPA (2002), WET Test Method 1001.0, Fathead Minnow, *Pimephales promelas*,
40 embryo-larval survival and teratogenicity test method, Short-term methods for estimating the

- 1 chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms, Fourth edition,
2 pp.112-140.
- 3 (4) OECD (1992), OECD Guideline for testing of chemicals 210, Fish, early-life stage toxicity
4 test.
- 5 (5) OECD (2013), OECD Guideline for testing of chemicals 236, Fish Embryo Acute Toxicity
6 (FET) Test.
- 7 (6) U.S. EPA (1996), Ecological effects test guidelines OPPTS 850.1400, Fish early-life stage
8 toxicity test.
- 9 (7) ASTM (2005), Standard guide for conducting early life-stage toxicity tests with fishes,
10 E1241-05, Annual books ASTM standards, vol 11.06, 2008, pp.308-336.
- 11 (8) ECETOC (2005), Alternative testing approaches in environmental safety assessment, ECETOC
12 Technical Report No.97.
- 13 (9) U.S. EPA (1991), Guidelines for conducting early life stage toxicity tests with Japanese
14 Medaka (*Oryzias latipes*), EPA/600/3-91-063.
- 15 (10) Umweltbundesamt (2006), Background paper on fish embryo toxicity assays, UBA Conduct
16 Number 203 85 422)
- 17 (11) Monte Westerfield (2007), The zebrafish book, A guide for laboratory use of zebrafish (*Danio*
18 *rerio*), edition 5, Institute of Neuroscience, University of Oregon.
- 19 (12) Environment Canada (1992), Biological Test Method: Test of larval growth and survival using
20 *Fathead minnows*, Report EPS 1/RM/22.
- 21 (13) OECD (2006), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to
22 application, OECD series on testing and assessment, Number 54.
- 23 (14) European Commission (2003), Technical guidance document on risk assessment. Part II,
24 Institute for Health and Consumer Protection, European Chemicals Bureau., EUR 20418 EN/2.
- 25 (15) 岩松鷹司 (1998), メダカ学全書, 株式会社大学教育出版.
- 26

1 (別添1) ゼブラフィッシュでの受精卵の採取法

2 ゼブラフィッシュでは、以下に示す方法により効率的に採卵予定日（ばく露試験の開始
3 日）に受精卵を採取することができる。なお、下記以外の方法で親魚を飼育して産卵させ
4 受精卵を得ることも可能である⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾。

6 (1) 採卵に用いる親魚

7 採卵に用いる親魚は、4～12 カ月齢の個体が適している。試験施設で繁殖・飼育した個体
8 を用いることが望ましい。

10 (2) 親魚の維持飼育および選抜

11 ふ化から約 4 カ月齢までは、発育段階や大きさに応じて適切な条件下で飼育する。この
12 飼育個体群から外見的に異常が認められない成熟した個体を試験に供する受精卵を得るた
13 めの親魚として選抜する。性別（雌雄）および成熟状態は、体型および体色から判別可能
14 である。

15 選別した親魚は、後述の受精卵採取まで以下の条件下で維持（飼育）する。水槽は、飼
16 育する個体数に合わせて適切な大きさのものを用いる。飼育水には、ばく露試験に用いる
17 試験用水と同質の水（たとえば、活性炭で脱塩素処理した水道水など）を用いる。雌の産
18 卵数や卵質は餌料にも依存するため、維持飼育中はできるだけ多様な餌を十分に与える。
19 そのため採卵に用いる親魚は、飼育水を連続的に供給する流水式で飼育することが望まし
20 いが、半止水式で飼育する場合は、餌の食べ残しや糞などによる水質悪化を招かないよう
21 に適切な頻度で換水する。

22 一般にゼブラフィッシュでは、初回の産卵は産卵数が少なく受精率が低い。また、低い
23 受精率やふ化率は、雄よりも雌（卵質）に依存する場合が多く、受精率やふ化率が低い卵
24 を産んだ雌はその後も受精率やふ化率の低い卵を産む傾向にあるとされている。そのため、
25 可能であれば、維持飼育中に後述する受精卵採取の方法などにより雌に数回産卵させ、受
26 精率やふ化率の高い卵を産む個体を選別しておくといよい。親魚の飼育条件は以下のとおり
27 である。

29 (3) 親魚の飼育条件

- 30 ・水温：26±1℃
- 31 ・照明：12～16 時間明/12～8 時間暗（照度は通常の室内程度）
- 32 ・飼育密度：飼育水 1 L あたり 1 個体未満
- 33 ・餌料：市販の観賞魚用飼料、ふ化直後のアルテミアやミジンコ類など

35 (4) 採卵用親魚の準備（雌雄の分離飼育）

36 採卵予定日（ばく露試験の開始日）前に維持飼育している親魚群から、採卵に用いる親
37 魚（雌：雄の比＝約 1：2）を選抜する。選別した親魚は、採卵予定日の前日～1 週間程度
38 前から雌雄を別々の水槽に隔離して飼育しておく（適切な雌雄分離の日数は、個体によっ
39 ても異なるため、事前に使用する採卵用の親魚で調べておくことが望ましい）。飼育条件な
40 どは維持飼育と同じでよい。

1 2 **(5) 親魚のペアリング (参考例)**

3 採卵予定日の採卵時刻の 1 時間程度前に、分離飼育しておいた雄と雌を同じ産卵用水槽
4 に収容する。産卵用の水槽として、雌の産卵後に沈降した卵を同居する親魚が食べるのを
5 防ぐために、底に直径 1~1.5 cm のガラスビーズを敷き詰めるか、水槽底から 2~3 cm の位
6 置に目合い 2 mm 程度のメッシュを設置しておく。卵の回収が容易であり、また受精率の高
7 い卵のみを選択して試験に用いることができるように、親魚のペアリングは、複数の小型
8 水槽を用いるのが望ましい(たとえば、10 L 程度のガラス水槽を用いる)。産卵用水槽には、
9 約 1:2 の比率で雌雄を入れる。飼育密度は飼育水量 1L あたり 1~2 個体とする(たとえば、
10 10 L の水槽に雄 10~6 個体と雌 5~3 個体)。採卵に用いる雌の個体数は、試験に必要な受
11 精卵数を考慮して決める。

12 なお、採卵予定日前日の消灯直前に雌雄をペアリングし、翌日の照明点灯直後に産卵さ
13 せることもできる。ただし、雌の産卵時刻は、それまでの照明周期(点灯時刻)の影響を
14 受ける場合があるので、予定の採卵時刻に産卵が行われるように事前に照明周期に馴化さ
15 せておくことが必要である。また、雌雄の親魚を入れた水槽は、照明の点灯まで光が入ら
16 ないように水槽全体を箱などで覆い完全に遮光(暗条件)した状態にしておく。

17 18 **(6) 採卵**

19 採卵用の親魚(雌)が産卵可能な状態であれば、ペアリングしてからおよそ 30 分~1.5
20 時間後までに産卵がみられる。

21 雌の産卵を確認できたら(または明条件にしてから 1.5 時間後に)、水槽底に沈降した卵
22 を回収する。ガラスビーズを敷いた産卵用水槽を用いた場合は、ネットなどで水槽内の親
23 魚を別の水槽に移してから、ガラスビーズが入らないように目合い 2 mm 程度のネットを通
24 して別の容器に飼育水と一緒に回収する。メッシュを設置した産卵用水槽を用いた場合は、
25 親魚を別の水槽に移してからメッシュを外して、サイフォンなどを用いて水槽底に沈降し
26 ている卵を飼育水と一緒に別の容器に回収する。

27 28 **(7) 受精卵の選別**

29 容器に回収した卵は、ピペット(先端の内径は 4 mm 程度)で適量の飼育水と一緒にシャ
30 ーレに移し入れ、実体顕微鏡下で観察して、未受精卵(外見的に、「透明感がない」または
31 「細胞分裂がみられない」状態のもの)を除去する。また、受精卵のうち、「形状が歪んで
32 いる」、「卵膜や卵黄に白濁部がみられる」、「卵割のサイズが不均一である」などの異常が
33 認められるものも除去する。このとき混入している糞なども除去する。

34 選別後、受精卵の入ったシャーレの飼育水を試験に用いる試験用水で置換する。試験用
35 水の水温は試験温度(26±1℃)に調整しておく。

36 この受精卵の選別作業は、各産卵用水槽から回収した卵を混合せずに、産卵用水槽ごと
37 に別のシャーレに移し入れて行う。また、作業中の水温変化を防ぐために、室温(実験室)
38 を試験温度付近に調整しておくことが望ましい。

39
40

1 (別添2) メダカでの受精卵の採取法

2 メダカでは、以下に示す方法により親魚の飼育（繁殖）し、試験に用いるための受精卵
3 を採取することができる。なお、親魚飼育および受精卵採取の方法は、既存の文献なども
4 参考にすることが望ましい⁽⁹⁾⁽¹⁵⁾。

5 6 (1) 採卵に用いる親魚

7 3カ月齢以上の成熟した個体を採卵用の親魚として用いる。ただし、老成した雌では受精
8 率が低い場合があるので注意する。

9 採卵用の親魚は、試験施設で繁殖・飼育した個体を用いることが望ましい。ふ化から成
10 熟期（約3カ月齢）までは、発育段階や大きさに応じて適切な条件下で飼育する。この飼
11 育個体群から外見的に異常が認められない成熟した個体を試験に供する受精卵を得るため
12 の親魚として選抜する。性別（雌雄）および成熟状態は、体型および体色から判別可能で
13 ある。

14 15 (2) 親魚の飼育

16 メダカの親魚は、以下の条件下で飼育（繁殖）する。水槽は、飼育する個体数に合わせて
17 適切な大きさのものを用いる。飼育水には、ばく露試験に用いる試験用水と同質の水（た
18 とえば、活性炭で脱塩素処理した水道水など）を用いる。一般に、メダカは十分に給餌し
19 て良好な環境で飼育すれば毎日産卵させることも可能である。そのため、受精卵を得るた
20 めの飼育は、飼育水を連続的に供給する流水式で行うことが望ましい。半止水式で飼育す
21 る場合は、餌の食べ残しや糞などによる水質悪化を招かないように適切な頻度で換水する。

22 飼育する個体数は、試験に必要な受精卵数を考慮して決める。一般にメダカの産卵数は1
23 個体当たり10～40粒/日であるが、採卵予定日にすべての雌が産卵するとは限らないため、
24 その点も考慮して必要な受精卵を得るのに十分な個体数を用意する。

- 25
- 26 ・水温：24±1℃
- 27 ・照明：12～16時間明/12～8時間暗（照度は通常の室内程度）
- 28 ・飼育密度：飼育水1Lあたり2個体程度として、雄：雌=1：2とする。
29 （たとえば、30L水槽に雌40個体と雄20個体）
- 30 ・餌料：市販の観賞魚用飼料、ふ化直後のアルテミアやミジンコ類など

31 32 (3) 採卵

33 メダカの雌は、照明の点灯後30分～1.5時間に産卵する。雌の産卵を確認できたらネッ
34 トなどで雌をすくい、腹部（総排泄口）に付着している卵塊を採取する。水槽底に落下し
35 ている卵塊はサイフォンなどを用いて飼育水と一緒に別の容器に回収する。採取した卵塊
36 は、適量の飼育水と一緒にシャーレに入れる。

37 38 (4) 受精卵の選別

39 採取した卵塊は、付着糸を除去して1粒ずつに分離する。たとえば、シャーレに適量の
40 飼育水と一緒にガーゼを敷き、その上に卵塊を置いて指先で転がすようにすることで付着

1 糸を除去することができる。付着糸を除去した卵について、実体顕微鏡下で観察して、未
2 受精卵（外見的に、「透明感がない」、「囲卵腔が形成されていない」または「細胞分裂がみ
3 られない」状態のもの）を除去する。また、受精卵のうち、「形状が歪んでいる」、「卵膜や
4 卵黄に白濁部がみられる」、「卵黄が小さい」、「囲卵腔が狭い」などの異常が認められるも
5 のも除去する。このとき混入している糞なども除去する。

6 選別後、受精卵の入ったシャーレの飼育水を試験に用いる試験用水で置換する。試験用
7 水の水温は試験温度（ $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ ）に調整しておく。また、受精卵の選別作業中の水温変化を
8 防ぐために、室温（実験室）を試験温度付近に調整しておくことが望ましい。

9

3. ニセネコゼミジンコを用いるミジンコ繁殖試験法

3.1 試験の概要

本試験は、ふ化後 24 時間以内のミジンコを排水（以下、試料）に 7 日前後（最大 8 日間）ばく露し、ばく露中の死亡および産まれた仔虫の数（産仔数）を調べ、対照区と比較することにより、ミジンコの繁殖に対する試料の影響（慢性毒性）を明らかにすることを目的とする。

本試験法は、カナダ環境省（Environment Canada）の試験法“Test of Reproduction and Survival Using the Cladoceran *Ceriodaphnia dubia*”⁽¹⁾、米国環境保護庁（U.S. EPA）の試験法“*Ceriodaphnia* 7-day survival and reproduction test”⁽²⁾、および米国試験材料協会（ASTM）のガイドライン⁽³⁾を参考に策定したものであり、本試験の実施にあたっては、本試験法のほかに、これらの既存の試験法ガイドラインなども参考になる。

3.2 試験生物

3.2.1 生物種

ニセネコゼミジンコ（*Ceriodaphnia dubia*）を用いる*。

*ニセネコゼミジンコは、成体で体長 0.9~1.0 mm、仔虫で体長 0.1 mm 程度の小型のミジンコであり、寿命は 3 週間程度と OECD テストガイドラインなどで推奨されるオオミジンコ（*Daphnia magna*）より短い（オオミジンコの寿命は 60 日以上）。本種は、現在世界各国の大学や研究機関（国立環境研究所等）等から入手できるが、適切な方法で維持、継代されている系統を入手する。入手した生物は、試験を実施する施設で馴化し、再現性のある試験結果が得られることを確認しておく。

3.2.2 飼育方法

試験に用いる少なくとも 3 週間前から、試験用水（3.3 に後述）中で試験条件と同じ環境下において飼育する。

飼育方法には、マスカルチャー（集団飼育）とシングルカルチャー（個別飼育）がある。マスカルチャーでは、適当数のミジンコを 1 個体/15 mL 程度の密度となるように飼育する。試験用水を適度に換水し、仔虫を除去する。生後 1 週間以上飼育し、成熟した個体から産まれた雌仔虫を毎週継代し、一定数のマスカルチャーを維持する。多くの死亡個体や体色などの異常がみられる個体、休眠卵やオスが観察された、または 1 回目の産仔までの期間遅延など異常が生じたマスカルチャーは、継代やシングルカルチャーの作製には使用しない。

シングルカルチャーは、マスカルチャーで生後 1 週間以上飼育した個体から産まれたメス仔虫を用いて開始する。シングルカルチャーでは、15 mL の試験用水を満たした容器で 1 個体ずつ飼育を行い、飼育開始から約 7 日間の産仔数を記録する。マスカルチャーと同様に、異常が観察されない個体から産まれた仔虫を用いて継代するが、3.2.3 に後述する条件を満たした成熟個体の仔虫を継代に用いることが望ましい。一連のシングルカルチャー（たとえば同じマスカルチャーから作製した 30~40 個体）に識別番号を付ける。

飼育中は、供試個体の条件（3.2.3 参照）を満たすよう、適当量の YCT および単細胞緑藻類を毎日与える。YCT（Yeast・Cerophyll・Trout Chow）は、Environment Canada または U.S. EPA の試験法⁽¹⁾⁽²⁾の手順に準拠して作製されたものを用いる。また、単細胞緑藻類は、クロ

1 レラ (*Chlorella vulgaris*) を用いるが、感受性や産仔数に影響がなければムレミカツキモ
2 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) を用いてもよい。1日当たりの給餌量は、たとえばシング
3 ルカルチャーにおいては、ミジンコ1個体当たり、YCTを50 µL、藻類濃縮液を有機炭素
4 換算量で0.02-0.05 mgCを目安とする。

6 3.2.3 供試個体の準備

7 試験を開始するために、以下の条件を満たした個体を十分数含む一連のシングルカルチ
8 ャーを準備しておくことが望ましい。

- 9 ・試験前7日間の平均死亡率が20%を超えないこと
- 10 ・試験に用いる3腹目以降の産仔数が1親個体あたり8個体以上であること
- 11 ・試験前7日間の3腹分の合計産仔数の平均値が15個体以上であること
- 12 ・休眠卵が観察されないこと

13
14 試験開始日に、容器内に産出された仔虫を肉眼または実体顕微鏡下で観察する。試験に
15 は、外見的に異常が認められない生後24時間以内のメス仔虫を供する。なお、供試する仔
16 虫の生後の経過時間のばらつきは12時間以内にするのが望ましいが、ニセネコゼミジ
17 コでは、産仔のタイミングをコントロールすることは困難であるため、仔虫の大きさを目
18 視で確認し、大きさをそろえることで対応する。なお、試験に用いた親個体の由来がわか
19 るように、識別番号、作製日を記録しておく。

21 3.3 試験用水

22 試験用水は、水道水または地下水を活性炭ろ過した水、M4培地(硬度は約250 mg CaCO₃/L)
23 を希釈した水、U.S. EPAの試験法²⁾などに準じて調製した人工調製水や市販のミネラルウ
24 ォーターなどが適当である。硬度は60~100 mg CaCO₃/Lが望ましい。たとえば、U.S. EPA推奨
25 の人工調製水(Moderately hard water)の硬度は80~100 mg CaCO₃/L、国立環境研究所で使用
26 している試験用水の硬度は70~80 mg CaCO₃/L程度である。

27 試験用水は、水温を25±1°Cに調整し、溶存酸素量が飽和濃度の90~100%になるようにする。
28 エアレーションしてから試験に用いる。なお、エアレーション後に過飽和にならないよう注
29 意する。試験用水のpHは6.5~8.5が望ましいが、この範囲を外れる場合には、水酸化ナトリ
30 ウム(NaOH)水溶液または塩酸(HCl)で調整する。

32 3.4 試験容器、装置および器具

- 33 ・試験容器：容量50 mL程度のガラス製容器
34 (水分蒸発や揮発成分の周囲への影響を防ぐために、透光性のあるふたなどで
35 容器を覆うなどの工夫をする。)
- 36 ・恒温装置：温度、照明条件(照明の種類、明暗周期)を一定に維持できる装置(インキ
37 ュベーター、ウォーターバスなど)または部屋
- 38 ・観察装置：実体顕微鏡
- 39 ・水質測定装置：水温計、溶存酸素計、pH計など
- 40 ・器具類：メスシリンダー、ガラスパスツール、ガラスピペット(先端の口径を3~4 mm

1 に広げ、バーナーなどで焼き丸めたもの)、ガラス容器(ビーカーまたは試薬瓶)、
2 分注器など(器具類の材質は適切なものを選択する。)

4 3.5 試験方法および条件

5 3.5.1 試料の前処理

6 試料は、第2部2.4項に示した前処理を除いて、できるだけ前処理せずに試験に供するこ
7 とが望ましい。

9 3.5.2 試験溶液の調製

10 試験溶液は、試験濃度ごとに適当量の試料を試験用水と混合(試料を試験用水で希釈)
11 して調製する。なお、試験濃度(試験溶液中の試料の濃度)は、無希釈の試料を100%とす
12 る。対照区の試験溶液には、試験用水を用いる。

13 試験濃度は、希釈倍率を公比2とする5濃度区を基本とする。80、40、20、10および5%
14 の5濃度区を標準とするが、過去に実施した試験の結果などから、最大無影響濃度が含ま
15 れるように、濃度区を増減することも検討してよい。

16 試験溶液の調製では、試料濃度ごとに清浄なガラス容器(ビーカーまたは試薬瓶)を用
17 意し、メスシリンダーなどを用いて試料必要量を分取し、同じく必要量の試験用水と混合
18 して、所定濃度に希釈する。

19 調製した試験溶液の水温は、恒温装置内に静置またはウォーターバスに水浴させるなど
20 して試験温度に調整する。

22 3.5.3 試験条件

- 23 ・ばく露方式：半止水式(少なくとも週3回または2日ごとに換水)
- 24 ・ばく露期間：最長8日間(対照区で60%以上の個体が3腹以上産仔するまで)
- 25 ・繰り返し数：10容器/濃度区
- 26 ・供試生物数：10個体/濃度区(1個体/容器)
- 27 ・試験溶液量：15 mL/容器
- 28 ・試験温度：25±1℃
- 29 ・硬度：60~100 mg CaCO₃/Lが望ましい
- 30 ・照明：室内光で明期16時間、暗期8時間
- 31 ・餌：適量のYCTおよび単細胞緑藻類を毎日与える。給餌量は、1日1個体当たり、YCT
32 を50 μL、藻類濃縮液を有機炭素換算量で0.02-0.05 mgCを目安とする

34 3.5.4 試験操作

35 (1) ばく露開始時の操作

36 あらかじめ調製した各試験溶液の水温を測定し、試験温度の範囲を外れている場合は、
37 再度、恒温装置内に静置などして水温を調整する。各試験容器に調製した試験溶液を分注
38 する(各15 mL)。

39 3.2.3の条件を満たした一連のシングルカルチャーから、仔虫数が試験区数(5濃度区の
40 場合、対照区を含めて試験区数は6となる。)以上いる容器を繰り返し数(通常10)分用

1 意する。ガラスピペットなどを用いて、同じ親個体から産まれた同一腹仔の仔虫を 1 個体
2 ずつ、対照区と各濃度区の試験容器に移し入れる。同様に、各容器から繰り返し分の試験
3 容器（通常残り 9）に仔虫を投入する。この時点をばく露開始とする。

4 (2) ばく露期間中の操作

5 毎日、試験容器ごとに供試個体（親個体）の生死の観察および産まれた仔虫の計数を行
6 う。産まれた仔虫のうち、計数時に死亡していた個体は産仔数に含めない。容器内の仔虫
7 は、計数時にガラスピペットなどを用いて除去する。このとき、何腹目の産仔かを記録す
8 ることが望ましい。同一記録日において 2 腹分の仔虫が混在している場合、仔虫の大きさ
9 を観察することにより、腹目の区別をするとよい。

10 換水は供試個体の生死の観察後、供試個体を新しく用意した試験容器に移すことで行う。
11 仔虫の計数は、換水前後のどちらで行ってもよい。

12 (3) ばく露終了時の操作

13 毎日の上記操作の終了後、対照区における産仔数を集計し（3.6.1 参照）、60%以上の供
14 試個体（対照区を繰り返し数 10 で実施した場合は 6 個体以上）で 3 腹以上の産仔が確認さ
15 れた日をもって、試験を終了する。ただし、ばく露期間は最長 8 日間とする。

17 3.5.5 水質の測定

18 すべての試験濃度区および対照区について、ばく露開始時、ばく露期間中の換水前後、
19 ばく露終了時の試験溶液の水温、pH および溶存酸素を測定し、記録する。換水後の試験溶
20 液の測定は、各繰り返し容器（通常 10）より分取し、混合したものをを用いてよい。なお、
21 換水前の試験溶液とは新調した試験溶液、換水後の試験溶液とは換水時に除去した試験溶
22 液を指す。塩分の測定は換水前の試験溶液について 1 回以上行うことが望ましい。

24 3.5.6 試験の有効性

25 本試験は以下の条件を満たさなければならない。

- 26 ・対照区における親個体の死亡率が 20%以下であること
- 27 ・対照区における供試個体の 60%以上が最大 8 日間で 3 腹分の産仔をすること
- 28 ・対照区における 3 腹分の合計産仔数が平均して 15 個体以上であること
- 29 ・対照区において休眠卵の生産が確認されないこと

31 3.6 結果の算出方法

32 3.6.1 産仔数の集計

33 対照区における供試個体の 60%以上が仔虫を 3 腹産んだ時点において、濃度区において
34 も 3 腹分の産仔数を容器ごとに集計し、各濃度区で平均値を算出する。集計に当たっては
35 以下の点に留意する。

- 36 ・原則、1 日の産仔数が 2 個体以上の場合に 1 腹とみなす。ただし、初産の場合や、ば
37 く露の影響が認められる場合は、1 個体でも 1 腹とみなす。
- 38 ・産仔途中の換水操作などにより、1 腹分の産仔が 2 日間に分かれて観察された場合は、
39 1 日の産仔数が 2 個体以上でも 2 日分をまとめて 1 腹とみなす（たとえば 24 時間齢
40 以上とみられるサイズの仔虫が数個体観察され、前日にも産仔があった場合、前日の

1 産仔と同一腹仔とみなす)。

- 2 ・供試個体が死亡した場合、それまでの産仔数(産仔開始前の場合は0とする)を集計
3 に含める。ただし、死亡原因が試験操作上の問題など、試料に起因しないことが明確
4 な場合は、集計から除外する。

6 3.6.2 供試個体の半数致死濃度(LC50)

7 供試個体の死亡率について、試験最高濃度区での死亡率が50%以上であった場合には、
8 可能であれば供試個体の半数致死濃度(LC₅₀)を推定する(詳細は第4部を参照のこと)。

10 3.6.3 最大無影響濃度(NOEC)

11 産仔数について、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
12 度を最小影響濃度(LOEC)、その一つ下の試験濃度を最大無影響濃度(NOEC)とする(た
13 だし、LOECより高濃度では、LOECと同等以上の影響がみられること)。すべての試験濃
14 度において対照区と有意差が認められなかった場合は、最も高い試験濃度をNOECとする。

15 なお、統計学的手法では対照区と各試験濃度間の有意差を適切に検出できない場合は、
16 非線形回帰モデルなどを用いて推定したEC_x/IC_x(x%影響/阻害濃度)を算出してもよい
17 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽⁴⁾(詳細は第4部を参照のこと)。

19 3.7 参考文献

- 20 (1) Environment Canada (2007), Biological Test Method: Test of Reproduction and Survival Using
21 the Cladoceran *Ceriodaphnia dubia*, EPS1/RM/21, Second Edition
- 22 (2) U.S. EPA (2002), WET Test Method 1002.0, Daphnid, *Ceriodaphnia dubia*, Survival and
23 reproduction test, Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and
24 receiving waters to freshwater organisms, Fourth edition, pp.141-196.
- 25 (3) ASTM (1989), Proposed new standard guide for conducting three brood, renewal toxicity tests
26 with *Ceriodaphnia dubia*, American Society for Testing and Materials, Committee E-47, Draft
27 no.6, 79p. Philadelphia PA
- 28 (4) European Commission (2003), Technical guidance document on risk assessment. Part II,
29 Institute for Health and Consumer Protection, European Chemicals Bureau., EUR 20418 EN/2.

1 4. 淡水藻類を用いる生長阻害試験法

2 4.1 試験の概要

3 本試験は、指数増殖期の藻類を排水（以下、試料）に添加して72時間ばく露し、ばく露中
4 およびばく露終了時に生物量（細胞濃度）を調べ、対照区と比較することにより、藻類の生
5 長に対する試料の影響を明らかにすることを目的とする。なお、本試験において生長とは、
6 ばく露期間中の生物量の増加を言う。

7 本試験法は、2006年に改訂された OECD テストガイドライン 201” Freshwater Alga and
8 Cyanobacteria, Growth Inhibition Test”⁽¹⁾および化学物質審査規制法の藻類試験法⁽²⁾を基本に、国
9 際標準化機構（ISO）規格 8692 “Water quality — Freshwater algal growth inhibition test with
10 unicellular green algae”⁽³⁾および米国環境保護庁（U.S. EPA）の試験法 “Green alga, *Selenastrum*
11 *capricornutum*, growth test”⁽⁴⁾ならびに”Algal Toxicity, Tier I and II”⁽⁵⁾も参考に策定したものであ
12 る。本試験の実施にあたっては、本試験法のほかに、これらの既存の試験法ガイドラインな
13 ども参考になる。

14

15 4.2 試験生物

16 ムレミカツキモ (*Pseudokirchneriella subcapitata* (旧 *Selenastrum capricornutum* Printz)) が推
17 奨される※。ムレミカツキモ以外の藻類 (*Desmodesmus subspicatus* など) を用いる場合は、ば
18 く露期間中、指数増殖期が維持されることが確認されていなければならない。継代方法など
19 について既存の試験法ガイドラインやガイダンスドキュメントなど^{(1), (3)-(5)}を参考にすること。

20 ※適切な方法で維持、継代されている系統を入手する。入手した生物は、試験を実施する施設で馴化し、再
21 現性のある試験結果が得られることを確認しておく。ムレミカツキモは OECD テストガイドラインなどの
22 既存試験法で最も広く用いられている単細胞緑藻類であり、系統保存されている本種は、国内の研究機関
23 では、国立環境研究所で入手できる。

24

25 4.3 培養方法

26 4.3.1 培地

27 OECD テストガイドライン 201 に示された OECD 培地⁽¹⁾が推奨されるが、U.S. EPA の AAP
28 培地や C 培地など⁽⁴⁾⁽⁵⁾と同程度の培地を使用することもできる。なお、OECD 培地の組成な
29 らびに調製時の留意点などは以下のとおりである。

- 30 ・塩化アンモニウム (NH_4Cl) 15 mg/L
- 31 ・塩化マグネシウム六水和物 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 12 mg/L
- 32 ・塩化カルシウム二水和物 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 18 mg/L
- 33 ・硫酸マグネシウム七水和物 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 15 mg/L
- 34 ・リン酸二水素カリウム (KH_2PO_4) 1.6 mg/L
- 35 ・塩化鉄 (Ⅲ) 六水和物 ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.064 mg/L
- 36 ・エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.1 mg/L
- 37 ・ホウ酸 (H_3BO_3) 0.185 mg/L
- 38 ・塩化マンガン四水和物 ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 0.415 mg/L
- 39 ・塩化亜鉛 (ZnCl_2) 0.003 mg/L
- 40 ・塩化コバルト六水和物 ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.0015 mg/L

- 1 ・塩化銅二水和物 ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.00001 mg/L
- 2 ・モリブデン酸二ナトリウム二水和物 ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.007 mg/L
- 3 ・炭酸水素ナトリウム (NaHCO_3) 50 mg/L

4 これらをイオン交換水などに直接もしくは濃厚保存液として必要量添加する。大気と平
5 衡状態であれば pH は 8.1 となる。pH が 8.1 にならない場合は、通気や攪拌などを行う (pH
6 の調整は行わない)。調製した培地の滅菌は、孔径 0.22 μm 程度のフィルターによるろ過滅
7 菌もしくはオートクレーブにより行う。

8 9 **4.3.2 前培養**

10 供試に適した指数増殖期の藻類細胞を得るため、試験を開始する前に、生物を試験と同
11 じ条件で 2~4 日間、前培養する。前培養液に接種する藻類の生物量を調整し、ばく露開始
12 時に指数増殖期になるようにする。前培養において形態の異常な細胞が出現した場合は、
13 それらを試験に使用しない。なお、指数増殖に達するまでの前培養の期間や添加する生物
14 量などは、前培養中の温度や光強度、培地の容量などにも依存するため、あらかじめ前培
15 養に使用する培養装置や条件で生長曲線を描き、初期添加生物量と指数増殖期間の関係、
16 最終増殖量などを調べておくとよい。以下に前培養の例と指数増殖期の目安を示す。

- 17 ・250 mL の三角フラスコに 100 mL の試験培地を入れる。
- 18 ・滅菌したピペットを用いて、生物量が約 5,000 cells/mL となるように供試藻類を無菌的
19 に接種する。この際、加える藻類懸濁液は 5mL 以内とする。
- 20 ・温度 23 \pm 2 $^{\circ}\text{C}$ 、照度約 60~120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ に調整した培養器内などで、連続光下で振とう
21 培養する。
- 22 ・毎日、培養液を分取して生物量を計数し、生物量が 0.5~1 $\times 10^6$ cells/mL に達した時点で
23 本試験に供する。

24 25 **4.4 試験容器、装置および器具**

- 26 ・試験容器：原則として容量 250~500 mL のガラス製三角フラスコ（通気性のあるシリコ
27 ン栓などを装着）
- 28 ・培養装置：温度、照明条件を一定に維持できる装置または部屋、振とう器
- 29 ・生物量計測装置：粒子計数装置、粒子分布解析装置、顕微鏡（血球計算盤を使用）、蛍光
30 光度計、分光光度計、比色計など
- 31 ・観察装置：光学顕微鏡（100~400 倍での観察が可能なもの）
- 32 ・水質測定装置：温度計、pH 計、光量子計など
- 33 ・器具類：メスシリンダー、メスピペット、メンブレンフィルターユニットなど（器具類
34 の材質は適切なものを選択する。）

35
36 なお、試験容器は、使用前に滅菌しておく。また、その他の器具類についても、必要に応
37 じて適切な方法で滅菌しておく。

4.5 試験方法および条件

4.5.1 試料の前処理

試料は、第2部 2.4 項に示した前処理を除いて、できる限り前処理せずに試験に供することが望ましいが、藻類生長阻害試験では試料中の浮遊物質や他の藻類等による試験結果への影響を除外するため、フィルター (0.2~0.4 μm) を用いたろ過滅菌が認められる。(なお、試料中の懸濁物が多い場合には、ろ過滅菌前に、孔径 0.7 μm のガラス繊維ろ紙を用いてろ過してもよい) (第2部 2.4 参照)。

4.5.2 試験溶液の調製

1.3 に従い、試験溶液は、試験濃度ごとに適量の試料を 4.3.1 に示す培地と混合 (試料を培地で希釈) して調製する。なお、試験濃度 (試験溶液中の試料の濃度) は、無希釈の試料を 100% とする。対照区の試験溶液には、培地を用いる。

試験濃度は、希釈倍率を公比 2 とする 5 濃度区を基本とする。80、40、20、10 および 5% の 5 濃度区を標準とするが、過去に実施した試験の結果などから、最大無影響濃度が含まれるように、濃度区を増減することも検討してよい。

また、対照区を含む各試験区の培地濃度を統一して試験しても良い。その場合は、試料をイオン交換水など (培地の調製に用いた水) で所定濃度になるように希釈し、そこに培地の 20% 濃度相当になるように培地中の栄養塩を添加する。

試験溶液の調製では、試料濃度ごとに清浄なガラス容器 (ビーカーまたは試薬瓶) を用意し、メスシリンダーなどを用いて試料必要量を分取し、同じく必要量の試験用水と混合して、所定濃度に希釈する。調製した試験溶液は、孔径 0.22 μm のメンブレンフィルターでろ過滅菌してから、滅菌された試験容器に分注する。あるいは、試料を孔径 0.22 μm のメンブレンフィルターでろ過滅菌してから、同様にろ過滅菌した培地で希釈して各試験濃度区の試験溶液を調製してもよい。

試験容器に分注後、培養装置内 (または恒温器や恒温室内) で静置して液温を試験温度 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ に調整する。

4.5.3 試験条件

- ・ばく露方式：止水式、原則として振とう培養 (100rpm)
- ・ばく露期間：72 時間
- ・繰り返し数：3 容器/濃度区、6 容器/対照区
- ・初期生物量： 5×10^3 cells/mL が推奨される
- ・試験溶液量：原則として 100 mL/容器
- ・試験温度：21~24 $^{\circ}\text{C}$ の範囲内で設定し、培養装置内および試験期間中の変動は $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 以内とする
- ・照明：白色または昼光色の蛍光灯光、24 時間明期、試験容器内の液面付近の光強度として 60~120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$

4.5.4 試験操作

前培養した供試藻類の生物量を測定し、試験溶液中の初期生物量が 5×10^3 cells/mL となる

1 ように、前培養液（藻類懸濁液）の所定量を温度が試験温度 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ に調整された各試験容器
2 の試験溶液に添加する。各試験容器を培養装置内に置き、ばく露を開始する。なお、藻類
3 の接種は、無菌室やクリーンベンチ内などの無菌的条件下で行うことが望ましい。

4 ばく露開始から 24、48 および 72 時間後（ばく露終了時）に、各試験容器より試験溶液
5 を適量採取し、粒子計数装置などを用いて生物量を測定する。試験終了時には、光学顕微鏡
6 下で細胞の形態などを観察し、異常の有無を記録する。また、ばく露開始時および終了時
7 に、各試験区の試験溶液の pH を測定する。なお、培養装置内の温度および光強度を少なく
8 ともばく露開始時および終了時に測定することが望ましい。

10 4.5.5 水質の測定

11 すべての試験濃度区および対照区について、ばく露開始時およびばく露終了時に試験液
12 の pH を測定し、記録する。対照区の pH は 1.5 以上変動してはならない。各濃度区の測定
13 は、各繰り返し容器（通常 3）より分取し、混合したものをを用いてよい。

15 4.5.6 試験の有効性

16 本試験は以下の条件を満たさなければならない。

- 17 ・対照区の生物量がばく露期間中に少なくとも 16 倍増加すること
- 18 ・対照区の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
19 こと
- 20 ・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

22 4.6 結果の算出方法

23 4.6.1 生長速度の算出

24 対照区*および各濃度区について、ばく露開始時およびばく露中に測定した細胞濃度に基
25 づいて、次式より生長速度(μ)を算出する。4.6.2~4.6.4 では、通常、ばく露開始時からばく
26 露終了時（72 時間後）までのばく露期間を通じた生長速度を用いる。

$$27 \mu_{i-j} = (\ln N_j - \ln N_i) / (t_j - t_i)$$

28 ここで、

29 μ_{i-j} : t_i 時から t_j 時までの期間の生長速度。通常、日当たり(d^{-1})で示す。

30 N_i : t_i 時の生物量 (cells/mL)。ばく露開始時 (t_0) の生物量については設定値 (5×10^3
31 cells/mL) を用いる。

32 N_j : t_j 時の生物量 (cells/mL)

33 t_i : ばく露開始後 i 回目に細胞濃度を測定した時間(d)

34 t_j : ばく露開始後 j 回目に細胞濃度を測定した時間(d)

35
36 ※対照区については、1 日毎の生長速度を容器ごとに算出し、その変動係数がばく露期
37 間を通じて 35%を超えないことを確認する。

39 4.6.2 生長阻害率の算出

40 各濃度区・各容器について、対照区の生長速度の平均値(μ_c)と各濃度区の生長速度(μ_i)に基

1 づいて、次式により生長（速度）阻害率(I_{μ})を算出する。各濃度区の平均生長阻害率は、各
2 容器の生長阻害率の平均ではなく、各濃度区における平均生長速度から次式により算出し
3 てもよい。

$$4 \quad I_{\mu} = (\mu_c - \mu_t) / \mu_c \times 100$$

5 μ_c : 対照区の平均生長速度

6 μ_t : 各濃度区における（平均）生長速度

8 4.6.3 50%生長阻害濃度 (EC_{50}) の算出

9 各濃度区の平均生長阻害率あるいは各容器の生長阻害率 I_{μ} の値を試料濃度の対数に対し
10 てプロットし、非線形回帰モデルなどを用いて 50%阻害濃度を求める。

12 4.6.4 最大無影響濃度 (NOEC)

13 ばく露開始時からばく露終了時までの生長速度について、対照区と比較して統計学的に
14 有意な低下が認められた最も低い試験濃度を最小影響濃度 (LOEC)、その一つ下の試験濃
15 度を最大無影響濃度 (NOEC) とする（ただし、LOEC より高濃度では、LOEC と同等以上
16 の影響がみられること）。すべての試験濃度において対照区と有意差が認められなかった場
17 合は、最も高い試験濃度を NOEC とする。

18 なお、統計学的手法では対照区と各試験濃度間の有意差を適切に検出できない場合は、
19 非線形回帰モデルを用いて推定した EC_x/IC_x ($x\%$ 影響/阻害濃度) を算出してもよい⁽⁴⁾⁽⁷⁾ (詳
20 細は第4部を参照のこと)。

22 4.7 参考文献

- 23 (1) OECD (2006), OECD Guideline for testing of chemicals 201, Freshwater Alga and
24 Cyanobacteria, Growth Inhibition Test.
- 25 (2) 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 (2011),
26 新規化学物質等に係る試験の方法について, 別添IV藻類生長阻害試験.
- 27 (3) ISO (2004), International Standard 8693, Water quality — Freshwater algal growth inhibition
28 test with unicellular green algae.
- 29 (4) U.S. EPA (2002), WET Test Method 1003.0, Green alga, *Selenastrum capricornutum*, growth
30 test, Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to
31 freshwater organisms, Fourth edition, pp.197-230.
- 32 (5) U.S. EPA (1996), Ecological effects test guidelines OPPTS 850.5400, Algal toxicity, Tier I and
33 Tier II.
- 34 (6) 松浦武, 国内排水規制に関わる WET 手法によるバイオアッセイへの取り組みと今後の
35 展開, 第15回化学物質評価研究機構研究発表会-技術報告講演要旨集 p.43-46.
- 36 (7) European Commission (2003), Technical guidance document on risk assessment. Part II,
37 Institute for Health and Consumer Protection, European Chemicals Bureau., EUR 20418 EN/2.

1 第4部 試験結果のとりまとめ

2 1. 統計解析—最大無影響濃度 (NOEC) の算出

3 1.1 定義

4 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
5 最も低い試験濃度を最小影響濃度 (LOEC)、その一つ下の試験濃度を最大無影響濃度 (NOEC)
6 とする (ただし、LOEC より高濃度では、LOEC と同等以上の影響がみられること)。すべて
7 の試験濃度において、いずれの影響指標値も対照区と有意差が認められなかった場合は、最
8 も高い試験濃度を NOEC とし、LOEC は推定しない。

10 1.2 一般的な解析手順の概要

11 有意差検定は対照区と複数濃度区を比較する多重比較法により行う。一般的な解析手順の
12 概要は以下のようなになる⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾。なお、それぞれの検定における有意水準は 5%とし、片側検
13 定を前提とする。

- 14 ① 試験区間 (対照区を含む) の等分散性を検定する (Bartlett または Levene 検定)
- 15 ② ①で等分散性が認められた場合、パラメトリックによる一元配置分散分析 (ANOVA)
16 により試験区間内に有意差があるか検定する。
- 17 ③ ②で有意差が認められた場合、Dunnnett の多重比較検定により、対照区と濃度区間の有
18 意差を検定し、有意差が認められた最低濃度区を LOEC、その一つ下の濃度区を NOEC
19 とする。②または多重比較検定で有意差が認められなかった場合、NOEC は最高濃度
20 区以上とする。
- 21 ④ ①等分散性が認められない場合は、データを変換 (比率データは Arcsine 変換、連続
22 データは Log 変換など) して再度等分散性を検定する。等分散性が認められた場合は
23 ②を実施する。
- 24 ⑤ ④で有意差が認められた場合、ノンパラメトリックによる Kruskal-Wallis の順位和検
25 定により試験区間内に有意差があるか検定する。
- 26 ⑥ ⑤で有意差が認められた場合、Steel の多重比較検定 (または Bonferroni 補正による
27 Wilcoxon の順位和検定 (別名 Mann-Whitney の U 検定)) により、対照区と濃度区間の
28 有意差を検定し、有意差が認められた最低濃度区を LOEC、その一つ下の濃度区を
29 NOEC とする。④または多重比較検定で有意差が認められなかった場合、NOEC は最
30 高濃度区以上とする。

31
32 以上の手順を基本として、米国環境保護庁 (U.S. EPA)⁽⁴⁾やカナダ環境省 (Environment
33 Canada)⁽⁵⁾で用いられている解析手順、各生物・各エンドポイントのデータの性質を踏ま
34 えて、一部手順の省略、検定法の選択などを行った。次項に魚類、ミジンコ、藻類それぞ
35 れの解析手順を示す。

37 1.3 各試験法における解析手順

38 (1) 魚類試験

39 図 1 に魚類試験データのふ化率、ふ化後生存率、生存率および生存指標の解析手順を示
40 した。これらのエンドポイントは、特に対照区において、分散が 0 (例: 4 つの繰り返し容

1 器すべて 100%を示す) となることが多く、データの正規性や等分散性を仮定することは適
2 切ではないと考えられる。そこで初めから等分散性の検定を省略し⁽³⁾、ノンパラメトリック
3 手法を選択する。さらに多重比較検定前に実施する ANOVA や Kruskal-Wallis の順位和検定
4 は必ずしも必要ではないという考えが近年主流になりつつあり⁽²⁾⁽³⁾、U.S. EPA の解析手順か
5 らも省略されていることから⁽⁴⁾、これも省略した。

6 まず解析前に、影響値がすべて 0%の濃度区は除外してもよい⁽⁴⁾。多重比較検定は Steel
7 の検定あるいは Bonferroni 補正による Wilcoxon の順位和検定 (別名 Mann-Whitney の U 検
8 定) を実施する。有意差検出力は Steel の検定の方が大きい。データ欠損により繰り返し数
9 が試験区間で異なってしまっても検定できるが、繰り返し数が 2 以下になった場合は、
10 ダミーデータを入れて検定を実施する (ただし、NOEC/LOEC 近辺ではダミーデータの導
11 入は避けるべきである)。U.S. EPA の試験法で提示されている Steel's Many-One Rank Test
12 は Steel の検定を簡略化したものであり、繰り返し数がすべて等しいことが前提となってい
13 る。

14 5 濃度区、繰り返し数 4 で試験する魚類試験の場合、Steel の検定の特徴として、濃度区
15 において 1 つでも対照区のデータより大きい数値があると有意差は検出されない。あるい
16 は逆に、わずかな差でもすべて対照区より低ければ有意差がついてしまう。そのため、補
17 足データとして、パラメトリックの多重比較検定である Dunnett の検定などを実施する、あ
18 るいは非線形回帰分析により ECx/ICx を推定してもよい。これらの結果やデータのバラツ
19 キ、生物学的に有意であると考えられる差を考慮し、ノンパラメトリック手法の結果を採
20 用するか判断する。

21 例: 40%濃度区において生存率 $60 \pm 45\%$ (平均 \pm SD) であり、ノンパラメトリック手法で
22 は有意差がつかなかったが、パラメトリック手法では有意差がついた。Probit 法により推定
23 した IC₁₀ は 27%濃度、IC₅₀ は 45%濃度であったことから、40%濃度区において生物学的に
24 有意な影響があったと判断しても妥当であると考えられる。

26 (2) ミジンコ試験

27 図 2 にミジンコ試験データの親個体の死亡率および産仔数の解析手順をそれぞれ示した。
28 親個体の死亡率は繰り返し数がないデータ (供試数 10 個体中の死亡数) として扱い、非線
29 形回帰分析により LC₅₀ を推定する。

30 産仔数データは、解析前にまず、すべて 0 の濃度区を除外してよい。そして等分散性の
31 検定を行うが、等分散性の検定後によく実施される ANOVA や Kruskal-Wallis の順位和検定
32 は (1) 魚類試験と同様に省略する。等分散の場合はパラメトリックの Dunnett の多重比
33 較検定を行う。濃度依存性のある (高濃度ほど値が増加あるいは減少する) データの場合、
34 Canada では Dunnett の検定より検出力の高い Williams の検定が推奨されている⁽⁵⁾。ただし、
35 試験区間で繰り返し数の異なるデータに対しては検出力が下がるため、OECD では、その
36 ようなデータに対し使用するべきではないとされている⁽⁵⁾。

37 非等分散の場合はノンパラメトリックの Steel の検定あるいは Bonferroni 補正による
38 Wilcoxon の順位和検定 (別名 Mann-Whitney の U 検定) を実施する。魚類試験と同様に、
39 結果の妥当性を検討するために、パラメトリックの多重比較検定である Dunnett の検定な
40 どを実施する、あるいは非線形回帰分析により ECx/ICx を推定してもよい。

1

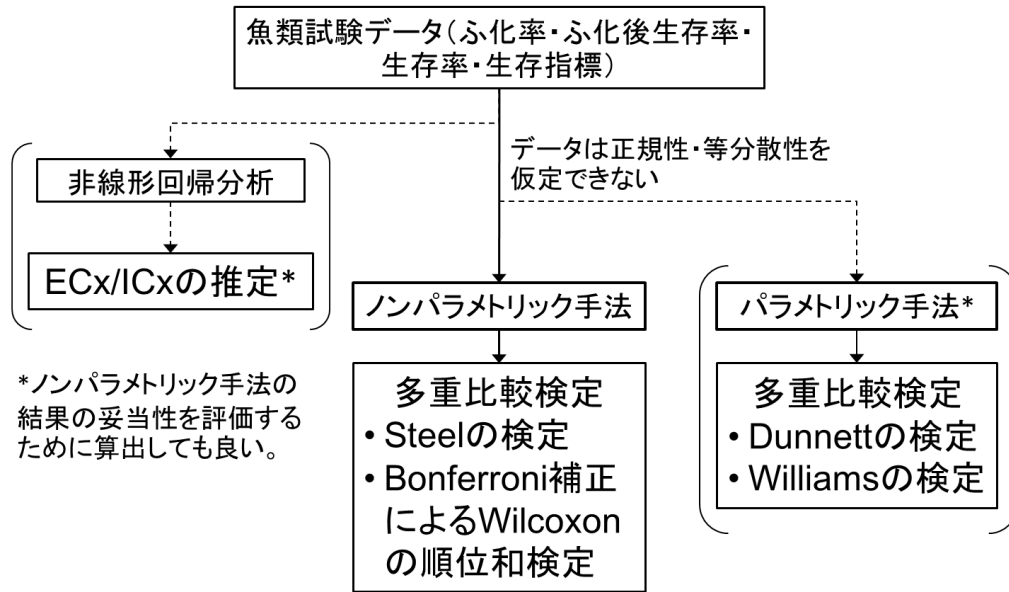


図1 魚類試験データの解析手順

2
3
4

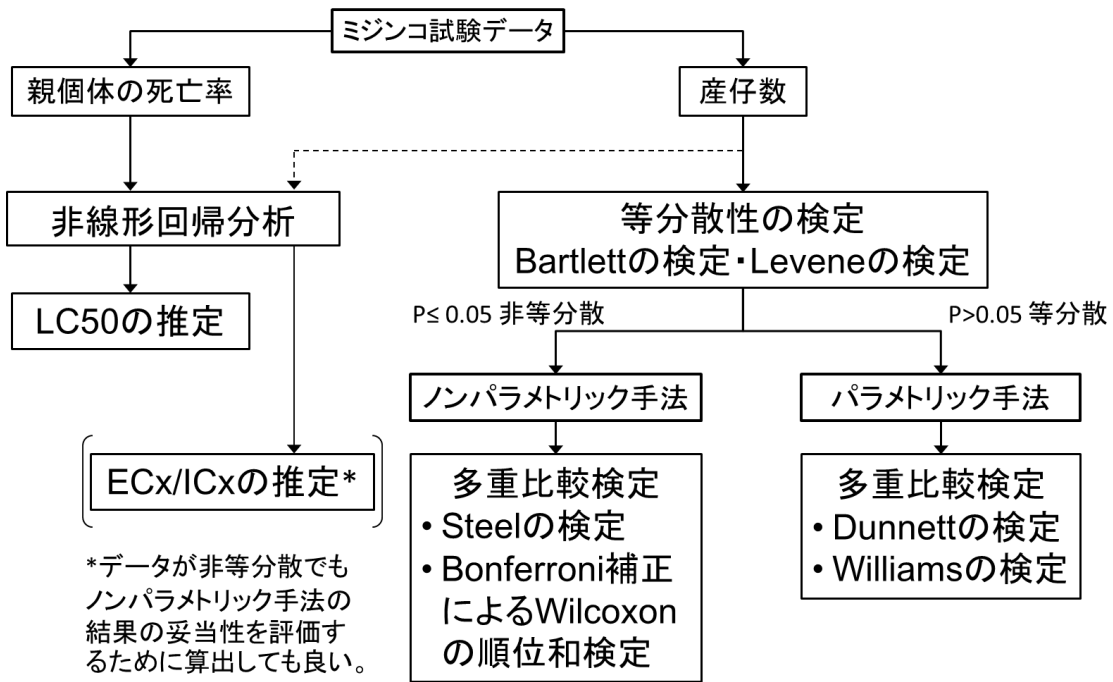


図2 ミジンコ試験データの解析手順

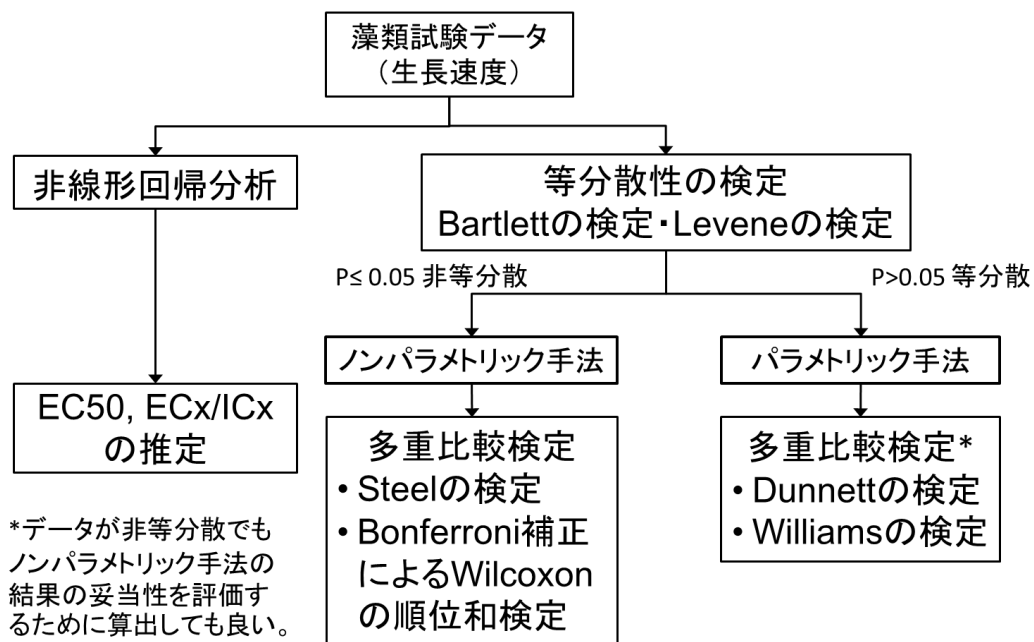
5
6
7

(3) 藻類試験

図3に藻類試験データの生長速度の解析手順を示した。藻類試験においては化学物質審査規制法での試験法や OECD テストガイドラインと同様に、NOEC だけではなく、非線形回帰モデルにより EC50 も求めることが望ましい。NOEC の算出は、ミジンコ試験の産仔数データと同様に、等分散性の検定およびパラメトリックまたはノンパラメトリックの多重比較検定を行う。

繰り返し数が、対照区は 6、濃度区は 3 であるため、魚類試験と同様に、Steel の検定で

1 は数が3であるため、濃度区において1つでも対照区のデータより大きい数値があると有
 2 意差は検出されない。あるいは逆に、わずかな差でもすべて対照区より低ければ有意差が
 3 ついてしまう。そのため、補足データとして、パラメトリックの多重比較検定である Dunnett
 4 の検定などを実施する、あるいは非線形回帰分析により EC_x/IC_x を推定してもよい。これ
 5 らの結果やデータのばらつき、生物学的に有意であると考えられる差を考慮し、ノンパラ
 6 メトリック手法の結果を採用するか判断する。



8
9 図3 藻類試験データの解析手順

10
11 **1.4 EC_x/IC_x の算出**

12 統計学的手法では対照区と各試験濃度間の有意差を適切に検出できない場合（ノンパラメ
 13 トリック検定において、設定濃度区数や繰り返し数などの制約から、対照区と試験濃度間の
 14 有意差を検出できない場合、統計学的な有意差より生物学的な影響値の差が重要だと考えら
 15 れる場合など）、別途、非線形回帰モデルなどを用いて推定した EC_x/IC_x (x%影響/阻害濃度)
 16 を算出してもよい。

17 特に魚類試験の影響値は、データの質として正規性および等分散性が仮定できる場合が少
 18 なく、濃度に対する影響指標値の関係を表した濃度反応曲線を、非線形回帰モデル（Probit
 19 法または Logit 法など）によって作成する方が適している。得られた濃度反応曲線より、対照
 20 区と比較して x%の影響または阻害を引き起こすと推定される濃度 EC_x/IC_x を推定するが、
 21 NOEC に相当する x%の適正值については、国際的な共通見解は得られていない。

22
23 **1.5 参考文献**

- 24 (1) 永田靖・吉田道弘 (1997), 多重比較法の基礎、サイエンティスト社。
 25 (2) 小林克己 (2010), 毒性試験に用いる統計解析法の動向2010、薬事日報社。
 26 (3) 日本毒性環境学会編 (2003) 生態影響試験ハンドブック; 吉岡義正, 6.2 LC50, EC50,
 27 LOEC, NOEC の算出, 有意差検定法, P.301-313.

- 1 (4) U.S. EPA (2002) Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and
2 receiving waters to freshwater organisms, Fourth edition.
- 3 (5) Environment Canada (2005, 2007) Guidance Document on Statistical Methods for
4 Environment Toxicity Tests, EPS 1/RM/46.
- 5

1 2. 試験結果のとりまとめ

2 2.1 基本的な事項

3 試験結果をとりまとめ、基本的に以下に示す事項を記載した報告書を作成すること。

4 (1) 一般的な情報

- 5 ・ 試験名
- 6 ・ 試験目的
- 7 ・ 試験内容（選択した試験法など）
- 8 ・ 試験実施機関
- 9 ・ 試験責任者および担当者
- 10 ・ 試験期間

11

12 (2) 排水試料に関する情報

- 13 ・ 採取地点
- 14 ・ 採取日時
- 15 ・ 採取に使用した器具・装置
- 16 ・ 採取方法
- 17 ・ 試料容器
- 18 ・ 採取量
- 19 ・ 採取時の記録（試料の性状、採取担当者など）
- 20 ・ 試料の輸送方法
- 21 ・ 試料の前処理（ろ過方法、pH 調整・エアレーションの有無など）
- 22 ・ 試料の水質測定結果
- 23 ・ 試料の保存方法

24

25 (3) 生物応答試験に関する情報

- 26 1) 試験生物（履歴、飼育・前培養方法、標準物質への感受性など）
- 27 2) 試験用水/培地（調整方法、水質など）
- 28 3) 試験方法および条件
 - 29 ・ 試験機関が設定した試験条件（試験濃度、供試生物数、換水頻度、給餌方法など）
 - 30 ・ 試験機関が設定した観察・水質測定項目
 - 31 ・ 統計解析手法
- 32 4) 試験結果および考察*
- 33 5) 試験の有効性

34

35 ※4) の試験結果および考察については、各試験において以下の項目をまとめる。

36 ①胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験法

- 37 ・ 各容器におけるふ化率
- 38 ・ 試験終了時・各容器における生存率・ふ化後生存率・生存指標
- 39 ・ 各濃度区における平均生存率、ふ化率、ふ化後生存率、生存指標および各標準偏差（SD）（およびそのグラ
40 フ）

- 1 • NOEC/LOEC または ECx/ICx (各検定の判定結果、最小有意差など)
- 2 • 水質測定結果の概要 (各濃度区における平均値あるいは最低～最高値など)
- 3 • 試験の結果に影響したと考えられる事項
- 4 • 結果の考察
- 5
- 6 ②ニセネコゼミジンコを用いるミジンコ繁殖試験法
- 7 • 試験終了時・各濃度区における平均死亡率
- 8 • 試験終了時・各濃度区における平均産仔数 (および繁殖阻害率) ±SD (およびそのグラフ)
- 9 • NOEC/LOEC または ECx/ICx (各検定の判定結果、最小有意差など)
- 10 • 水質測定結果の概要 (各濃度区における平均値あるいは最低～最高値など)
- 11 • 試験の結果に影響したと考えられる事項
- 12 • 結果の考察

- 13
- 14 ③淡水藻類を用いる生長阻害試験法
- 15 • 各容器における生長速度および生長阻害率
- 16 • 各濃度区における平均細胞濃度、生長速度および生長阻害率±SD
- 17 • 各濃度区での生長曲線グラフ
- 18 • 濃度—生長阻害率曲線グラフ
- 19 • NOEC/LOEC または ECx/ICx (各検定の判定結果、有意差検出力など)
- 20 • EC₅₀ (用いられた回帰モデル、算出方法)
- 21 • 試験開始時および終了時・各試験区における pH
- 22 • 試験の結果に影響したと考えられる事項
- 23 • 結果の考察

25 2.2 補足的な事項

26 必要に応じて以下の補足的な事項も報告書に記載する。

27 (1) 排水試料に関する情報

- 28 • 事業場の概要 (業種・主な使用化学物質)
- 29 • 排水処理設備の概要 (処理方法、一日排水量など)
- 30 • 排水基準項目の自主測定結果
- 31 • 排水口の位置 (公共用水域との接続など)

33 (2) 生物応答試験に関する項目

- 34 ①胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験法
- 35 • 各観察時・各容器における累積死亡数 (胚・仔魚別)
- 36 • 各観察時・各容器における累積ふ化仔魚数 (胚・仔魚別)
- 37 • 各観察時・各容器における試験個体の観察結果
- 38 • 各試験区における平均ふ化日数
- 39 • ECx/ICx と 95%信頼区間、回帰モデル、回帰曲線のグラフなど
- 40 • QA/QC (Quality Assurance/Quality Control) およびそれに対する考察
- 41
- 42 ②ニセネコゼミジンコを用いるミジンコ繁殖試験法
- 43 • 試験個体の親世代の個別飼育状況

- 1 • 各観察時における各試験個体の累積死亡率
- 2 • 各観察時における各試験個体の産仔数
- 3 • 濃度-繁殖阻害率グラフ
- 4 • ECx/ICx と 95%信頼区間、回帰モデル、回帰曲線のグラフなど
- 5 • 各観察時・各試験区における水質測定結果
- 6 • QA/QC およびそれに対する考察
- 7
- 8 ③淡水藻類を用いる生長阻害試験法
- 9 • 前培養状況
- 10 • 各観察時・各容器における細胞濃度
- 11 • 細胞観察結果
- 12 • 各観察時・各容器における水質測定結果（pH、温度など）
- 13 • ECx/ICx と 95%信頼区間、回帰モデル、回帰曲線のグラフなど
- 14 • QA/QC およびそれに対する考察
- 15

1 第5部 試験結果の信頼性評価

2 1. 基本的な事項

3 試験を実施するに際し、試験結果の精度および信頼性の確保が必要である。試験結果の信
4 頼性を確保するために、試験計画書（試験計画書とは、本検討案に沿った試験実施の目的及
5 び採取計画、試験設計を明記した文書）等に規定された手順に従い試験を行い、その手順が
6 遵守されているかを確認し、記録することが望ましい。また、排水の採取および試験実施時、
7 生データを迅速かつ正確に記録し、確認することが望ましい。必要に応じ、試験施設が遵守
8 すべき基本事項（試料の受け入れ体制、信頼性保証部門の設置等）を定めることにより試験
9 結果の信頼性の向上を図るとよい。

11 2. 試験結果の信頼性にかかわる事項

12 試験結果に影響すると考えられる以下の事項に留意し、適切に管理すること。

- 13 ① 試験容器、装置および器具
- 14 ② 試験生物
- 15 ③ 試験用水（対照区および希釈用）
- 16 ④ 排水の採取と前処理方法
- 17 ⑤ 試験条件
- 18 ⑥ 供試生物の状態
- 19 ⑦ 餌の質
- 20 ⑧ 試験成立要件
- 21 ⑨ 水質測定装置・器具
- 22 ⑩ 繰り返し数と濃度区数の設定
- 23 ⑪ 標準物質に対する感受性

25 3. 試験成立要件

26 胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験においては、対照区において、(1)ふ化率が80%以
27 上であること、(2)ばく露終了時の生存率が70%以上であること、(3)溶存酸素がばく露期間を
28 通して飽和酸素濃度の60%以上であること、の3条件が達成されたとき、試験結果は有効で
29 あるとみなせる。

30 ニセネコゼミジンコを用いるミジンコ繁殖試験においては、対照区において、(1)親個体の
31 死亡率が20%以下であること、(2)親個体の60%以上が最大8日間で3腹分の産仔をすること、
32 (3)3腹分の合計産仔数が平均して15個体以上であること、(4)休眠卵の生産が確認されないこ
33 と、の4条件が達成されたとき、試験結果は有効であるとみなせる。

34 藻類を用いる生長阻害試験においては、対照区において、(1)生物量がばく露期間中に少な
35 くとも16倍増加すること、(2)毎日の生長速度の変動係数がばく露期間を通じて35%を超え
36 ないこと、(3)繰り返し間の生長速度の変動係数が7%を超えないこと、の3条件が達成され
37 たとき、試験結果は有効であるとみなせる。

39 4. 標準物質を用いた感受性試験

40 以下に示す標準物質を用いて、定期的（1年に1～2回程度が推奨される）に試験生物の感

- 1 受性を確認することが推奨される。試験は常に同じ条件（試験物質、設定濃度、ばく露条件
- 2 など）で実施する。特に飼育系統を新しく立ち上げる場合には、試験前に感受性が以前と大
- 3 きく変動していないことを確認するべきである。許容変動範囲の目安として、各試験機関に
- 4 おいて NOEC または IC_x の記録を取り、NOEC の場合は平均値±1 濃度区、IC_x の場合は平均
- 5 値±2SD の範囲内に各データが収まっていることを確認する。
- 6 ・有機化合物：3,5-ジクロロフェノール (C₆H₄Cl₂O) 、3,4-ジクロロアニリン (C₆H₅Cl₂N)
- 7 ・無機化合物：塩化ナトリウム (NaCl) 、硫酸銅 (CuSO₄) 、重クロム酸カリウム (K₂Cr₂O₇)