

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研究等の事例

- 別紙 1 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 17 年 11 月、国立環境研究所化学物質環境リスク研究センター）
- 別紙 2 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
- 別紙 3 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
- 別紙 4 海産生物を用いる米国 WET 試験の試験条件

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

<海産魚類及び海産エビ類の急性毒性試験法（案）（第1版）>

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 ⁽¹⁾
<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 μ 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 μ 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 ± 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

- ・ LC₅₀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
- ・ LC₅₀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 ⁽¹⁾
<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 μ 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 μ 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 ± 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 ₂	1,120mg/L
Na ₂ SO ₄	3,912mg/L
MgCl ₂	4,981mg/L
NaCl	23,477mg/L
NaHCO ₃	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 tricorutum</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°C、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°C、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°C、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°C、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°C程度（マダイ）、23-26°C（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°C、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°C、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°C、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°C（ジャワメダカ）、16-22°C（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 tricornerutum</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 tricornerutum</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 ^a	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	2日(曝露) + α 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 ^b	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 ^a	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 ^b	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日後ま	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 ^c	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 ^a	急性	ウニ	<i>Arbacia punctulata</i> (<i>アサギ</i> 属)	精子60分曝露+20分受精	受精率	養殖業者から成熟個体入手し、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> （ <i>アサギ</i> ） <i>Arbacia punctulata</i> (<i>アサギ</i> 属) <i>Lytechinus pictus</i> <i>Dendraster excentricus</i> （カシパンの一種）	①精子10分曝露+10分受精 ②精子20分曝露+20分受精 ③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 シーブスヘッドミノー	<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> (シーブスヘッドミノー)	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、 シーブスヘッドミノー、 マミチヨグ、カダヤシ、 イトヨ、カレイなど	<i>Cyprinodon variegatus</i> (シーブスヘッドミノー), <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> (加イ目), <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 commission, 2006 ^a	急性	ターボット (カレイの一種) シーブスヘッドミノー	<i>Scophthalmus maximus</i> (ターボット) (推奨種) <i>Cyprinodon variegatus</i> (シーブスヘッドミノー)	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 シーブスヘッドミノー シルバーサイド	<i>Opsanus beta</i> (Gulf toadfish) <i>Cyprinodon variegatus</i> (シーブスヘッドミノー) <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	シーブスヘッドミノー シルバーサイド	<i>Cyprinodon variegatus</i> (シーブスヘッドミノー) <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 シーブスヘッドミノー	<i>Menidia peninsulae</i> (タイトウォーターシルバーサイド) <i>Clupea harengus</i> (タヒイロニシン) <i>Gadus morhua</i> (タヒイロウナギ) <i>Cyprinodon variegatus</i> (シーブスヘッドミノー)	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 ^b : 胚・仔魚期毒性試験	亜慢性	シーブスヘッドミノー	<i>Cyprinodon variegatus</i> (シーブスヘッドミノー)	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 ^b : 仔魚生存・成長試験	慢性	シーブスヘッドミノー シルバーサイド	<i>Cyprinodon variegatus</i> (シーブスヘッドミノー) <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 (シーブスヘッドミノー)、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	シーブスヘッドミノー	<i>Cyprinodon variegatus</i> (シーブスヘッドミノー)	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 ^a	飼育機関より受精卵 ^b 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 ^c
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 ^d	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 ^d	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 ² /s	16 時間明：8 時間暗、 10-20 μmol/m ² /s	16 時間明：8 時間暗、 10-20 μmol/m ² /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 ^e 、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 ^f	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 ² /s	16 時間明: 8 時間暗、 10-20 μmol/m ² /s	16 時間明: 8 時間暗、 75 μmol/m ² /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。