

OECDにおける生態影響試験法

(藻類生長阻害試験、ミジンコ類急性遊泳阻害試験・繁殖試験、魚類急性毒性試験)

201 藻類生長阻害試験

1984年6月7日採択

1 事前資料**必須資料**

- 水への溶解度
- 蒸気圧

補足資料

- 構造式
- 供試物質の純度
- 水及び光に対する化学的安定性
- 水中の供試物質の定量分析法
- pK_a 値
- n-オクタノール/水分配係数
- 易生分解性試験の結果(テストガイドライン 301A - E 参照)

制限条件

- このガイドラインは多くの淡水緑藻類に対して適用できる。
- このガイドラインは、試験条件下で、水中に保持される様な、水に可溶性物質に対して、最も容易に適用できる。
- 試験培地への溶解度が低い物質に対しては EC₅₀ を正確に測定できない場合もある。(次の定義の項参照)
- このガイドラインは藻類の生長の測定を直接妨害しない物質に対して適用できる。

基準文書

- 4** 文献を参照

2 方法**A 試験の導入、目的、範囲、妥当性、適用性及び限界**

この試験の目的は、単細胞緑藻類の生長に対する物質の影響を測定することにある。

比較的短期間の試験で数世代を越える影響を評価することが可能である。

このガイドラインは、何種類かの単細胞藻類に用いるために改良することが可能である。そのような場合には、用いた方法を試験報告に必ず記載すること。

定義

細胞濃度とは 1mL 当たりの細胞の数をいう。

生長とは試験期間中の細胞濃度の増加をいう。

生長速度とは単位時間当たりの細胞濃度の増加をいう。

このガイドラインにおける EC_{50} とは対照区に比べ生長または生長率を 50% 減少させる供試物質濃度をいう。

このガイドラインにおける NOEC(no observed effect concentration : 影響が観察されない濃度)とは、測定パラメーターが対照区の値と比べて、有意な生長阻害が認められない範囲での最高試験濃度をいう。

基準物質

不十分な試験条件を見つける手段として基準物質を試験してもよい。

基準物質を用いた場合、その結果を試験報告に記載する。重クロム酸カリウムは基準物質として用いることが可能である。

試験方法の原理

選んだ緑藻の指数生長期の培養液を、規定条件下で、数世代にわたって、供試物質の種々の濃度に曝露する。対照区に対する生長阻害を一定期間後に測定する。

必須試験条件

- 対照区の細胞濃度が 3 日以内で少なくとも 16 倍に増加すること。
- 供試物質の水から藻体への移行による消失は、必ずしもその試験を無効にするものではない。

B 試験操作

準備

装置

- 通常の実験室の装置
- 適切な容量の試験フラスコ
(例えば、試験液が 100mL のときは 250mL の三角フラスコが適切である。)
- 培養装置 : 21 から 25 の幅で、 ± 2 に維持でき、400 ~ 700nm のスペクトル幅で連続的に均一照射できる箱又は部屋。 0.72×10^{20} photons/m²s ($\pm 20\%$ 以内)の光量が推奨される。
- 細胞濃度を計数する装置、例えば、電子粒子計数装置、計算盤と顕微鏡、蛍光光度計、分光光度計、比色計(注 : 分光光度計を使用する場合は低濃度の細胞測定を可能にするために、少なくとも 4 cm の光路長のセルが必要である)

藻類の培地

以下の培地が推奨される。

NH ₄ Cl	15 mg/L
MgCl ₂ ·6H ₂ O	12 mg/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	18 mg/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	15 mg/L
KH ₂ PO ₄	1.6 mg/L
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.08 mg/L
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0.1 mg/L
H ₃ BO ₃	0.185 mg/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.415 mg/L
ZnCl ₂	3 × 10 ⁻³ mg/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1.5 × 10 ⁻³ mg/L
CuCl ₂ ·2H ₂ O	10 ⁻⁵ mg/L
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7 × 10 ⁻³ mg/L
NaHCO ₃	50 mg/L

空气中で平衡化後のこの培地の pH は約 8 である。

上記の培地を推奨するが、他の培地を使用してもよい。ただし、その場合には必須成分に対して次の限界を守ること。

P	0.7 mg/L
N	10 mg/L
キレート剤	10 ⁻³ mg/L
硬度(Ca+Mg)	0.6 mg/L

ここに推奨した培地及び文献⁽⁶⁾で挙げた培地は、この条件を満たしている。

供試生物

種の選択

緑藻の種としては培養及び試験に都合のよい、生長が速いものを使用すればよい。次の種が適切であると考えられる。

- *Selenastrum capricornutum* ATCC 22662
- *Scenedesmus subspicatus* 86.81 SAG
- *Chlorella vulgaris* CCAP 211/11b

他の種を使う場合は、その株名を報告すること。

試験計画

初期細胞濃度

試験培養液の初期細胞濃度は、*Selenastrum capricornutum* と *Scenedesmus subspicatus* では約 10⁴cell/mLであることを推奨する。他の種を使う時は現存量で同程度とする。

供試物質の濃度

毒性予測試験(rang-finding test)の結果をもとに影響が起こる濃度範囲を決定する。

この試験では、少なくとも5濃度を等比級数的にとる。試験最低濃度においては藻類の生長に影響が見られないことが必要である。試験最高濃度では対照区と比較して少なくとも生長を50%阻害し、できれば完全に生長を阻害することが望ましい。

連数と対照

試験は、各々の濃度でなるべく3連で、そして理想的には対照区の2倍の数で行うように計画する。

正当な理由があれば、試験濃度区の数を増やしたり、また濃度区当りの連数を減らしてもよい。

供試物質を溶解させるために助剤を使用した場合は、試験に用いた最高濃度の助剤を含む助剤対照区も設けること。

試験の実施

この頃には、易水溶性、難水溶性及び揮発性物質の試験法についての指針が含まれる。

(1) 易水溶性物質

必要な濃度の供試物質と必要な量の藻類を含む試験培地は、濾過滅菌した藻類培地で一定量の供試物質保存液と藻類懸濁液を希釈して調製する。

培養フラスコを振りまぜ培養装置に入れる。試験中は藻類を懸濁状態に保ち、CO₂の移動を促進してやる必要がある。このため、振とうや攪拌や曝気を行う。培養液は21 ~ 25 の範囲で±2 に維持する。

各々のフラスコの細胞濃度は少なくとも試験開始後24、48及び72時間に測定する。濾過滅菌した藻類培地を粒子計数機のバックグラウンドの測定に、また分光光度計のブランクとして用いる。

pHは試験の開始時と72時間後に測定する。溶液のpHは通常、試験中に1以上変動してはならない。

(2) 難水溶性物質

供試物質の溶解度が試験する最高濃度程度の場合は、上の方法をわずかに変えて試験溶液を調製することが必要である。供試物質の飽和溶液を供試物質保存液として使用してもよい。藻類懸濁液の添加前に、培地に必要濃度の供試物質を溶かすという方法もある。

難水溶性物質の保存溶液は機械的な分散によって、あるいは藻類に対し毒性の低い有機溶媒や界面活性剤や分散剤のような、助剤を使用することによって調製してもよい。助剤を使用する場合はその濃度は100mg/Lを越えないようにし、また試験液中に存在する最高濃度での、助剤対照区試験を加えなければならない。

(3) 揮発性物質

揮発性物質の試験として現在一般的には受け入れられている方法はない。ある物質が揮発性があることがわかっている場合は、大きな上部空間をもつ密栓付の試験フラスコを使用してもよい。現在この方法での変法が提案されている（文献 11 参照）。溶液中に残っている供試物質の量の測定を試み、このような密閉系で揮発性物質を試験した場合は結果の解釈に特別な注意を払う必要がある。

3 データと報告

結果の取扱い

試験濃度区と対照区の細胞濃度は測定時間と供試物質の濃度とともに表にする。各々の試験濃度と対照区の細胞数の平均値を時間に対してプロットし、生長曲線を描く。濃度と影響の関係を決定するために次に推奨する方法のうち一つを使用して計算する。

(1) 生長曲線下の面積の比較

生長曲線の下面積は次の式に従って計算される。

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) \\ + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

ここで、A = 面積

N_0 = 試験開始時(t_0)の設定細胞数(cells/mL)

$N_1 = t_1$ 時の実測細胞数(cells/mL)

$N_n = t_n$ 時の実測細胞数(cells/mL)

T_1 = 試験開始後最初に細胞数を測定した時間

t_n = 試験開始後 n 回目に細胞数を測定した時間

各々の供試物質濃度における細胞生長の障害百分率(I_A)は対照区の生長曲線下の面積(A_c)と各供試物質濃度での生長曲線下の面積(A_t)との間の差として次のようにして計算する。

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

I_A の値は、対応する濃度に対して片対数紙又は片対数正規確率紙にプロットする。正規確率紙にプロットした場合は、目で見て、適合する直線を引く。あるいは対数正規分布が仮定される場合には計算により回帰直線を引くこともできる。

EC_{50} 値は $I_A = 50\%$ の所で横軸に平行に引いた線と(回帰)直線との切片から求める。この計算法を用いた値であることを明確に表すために E_bC_{50} という記号を使うこととする。24、48 及び 72 時間後の測定を規定しているこのガイドラインにおい

ては、記号は $E_b C_{50}$ (0 - 72h)となる。

$E_b C_{10}$ のような他の EC 値や NOEC も対数濃度に対して I_A をプロットして導くことができる。

(2) 生長速度の比較

指数増殖している培養での平均の比成長速度(μ)が次のようにして計算される。

$$m = \frac{\ln N_n - \ln N_1}{t_n - t_1}$$

別の方法としては平均比生長速度を、時間に対して $\ln N$ をプロットした回帰直線の傾きから導くこともできる。対照区の値と比較した場合の各々の試験濃度区での平均生長速度の低下率を濃度の対数に対しプロットする。得られたグラフから EC_{50} が読みとれる。この方法により導かれた EC_{50} であることを明らかにするために $E_r C_{50}$ という記号を用いることとする。細胞数を測定した時間を表示しなければならない。例えば、もしその値が 24 時間と 48 時間の観察から導びいたものならば記号は $E_r C_{50}(24 - 48h)$ となる。

注:生長速度は対数項であり、生長速度での小さな変化は現存量にすると大きな変化になる。したがって $E_b C$ と $E_r C$ 値は数値として比較できるものではない。

試験報告

試験報告は次の情報を含む。

供試物質：化学的同定データ

供試生物：由来、研究室培養、株番号、培養方法

試験条件：

- 試験開始日、試験終了日及び試験期間
- 温度
- 培地組成
- 培養装置
- 試験開始及び終了時の試験溶液の pH(もし 1 以上の pH 変動が認められたら、説明が必要である。)
- 供試物質を溶解させるために用いた助剤と方法及び試験溶液中での助剤の濃度
- 光の強さと質
- 濃度 (実測あるいは設定)

結 果：

- 各計数時のフラスコについての細胞濃度と細胞の計数方法
- 細胞濃度の平均値
- 生長曲線
- 濃度 - 影響関係を示すグラフ

- EC 値と計算方法
- NOEC
- 他に観察された影響

4 文献

標準操作

- (1) Draft International Standard ISO/TC 147/SC 5/W 5/N 67: Toxicity with Respect to Algae.
- (2) NEN 6506: Water-Determination of Toxicity With Algae, (Dutch standard) Nederlands Normalisatie Instituut,Rijswijk(1979).
- (3) DIN 38 412, teil 1: Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L) Allgemeine Hinweise zur Planung, Durchführung und Auswertung biologischer Testverfahren (German standard) Deutsches Institut für Normung e.V, Berlin (June 1982)
- (4) DIN Draft 38 412, Teil 9: Testverfahren mit Wasserorganismen(Gruppe L). Bestimmung der Wirkung von Wasserinhaltsstoffen auf Grünalgen (Scenedesmus-Zellvermehrungshemmtest) (German standard) Deutsches Institut für Normung e.V., Berlin (April 1982)
- (5) U.S.EPA: Algal Assay Procedure: Bottle Test, National Environmental Research Centre, Corvallis, Oregon(1971)
- (6) U.S.EPA: The *Selenastrum capricornutum* Printz Algal Assay Bottle Test, EPA-600/9-78-018 (July 1978).
- (7) AFNOR T 90 304 (French standard).

その他

- (8) A.O.Hanstveit,in Degradability, Ecotoxicity and Bioaccumulation: The Determination of the Possible Effects of chemicals and Wastes on the Aquatic Environment, Chapter 5, Government Publishing Office, The Hague(1980).
- (9) G.Bringmann and R.Kuhn, Water Research 14, 231-241 (1980)
- (10) A.G Payne and R.H.Hall, in Aquatic Toxicology, (edited by L.L. Marking and R.A.Kimble),ASTM STP 667,pp.171-180 American Society for Testing and Materials,(1979).
- (11) S.Galassi and M.Vighi, Chemosphere 10, 1123-1126(1981).
- (12) Standard Methods for Examination of Water and Waste Water, Part 800.15th ed., American Public Health Association, Washington, D.C.(1980)

5 付 録

藻類培養方法の一例

概 論

以下の操作に基づく培養の目的は、毒性試験用の藻類培養を得ることである。藻類培養の微生物による感染を防ぐよう適切な方法を用いる(ISO 4833)。無菌培養が望ましいが、純培養であることが必須である。細菌や他の藻類が混入することを避けるため、全操作を無菌条件下で行う。

装置及び材料

2の B 試験操作の準備と供試生物を参照

藻類培養を得るための操作

- 栄養溶液(培地)の調製

培地の栄養塩類はすべて濃厚保存溶液として調製し、冷暗所に保存する。これら溶液は濾過又は高圧蒸気により滅菌する。

感染しないように注意しながら、正確な量の保存溶液を滅菌蒸留水に加え培地を調製する。固型培地用には寒天を 0.8%加える。

- 保存培養

保存培養は最初の試験材料とするため、定期的に新しい培地に植え継いでおく小規模な藻類培養である。

もし培養を定期的に使用しないならば斜面寒天培地に画線しておき、少なくとも 2 ヶ月に 1 回、これらを新しい培地に植え継ぐ。

保存培養液は適量の培地(容量約 1000mL)を含む三角フラスコで培養する。20 の連続照明下で藻類を培養するときは毎週植え継ぐ必要がある。

植え継ぎの間は滅菌したピペットを用いて“旧”培養液の一定量を新しい培地のフラスコに植え継ぐ。速く生長する種については初期濃度を旧培地の 1/100 程度とする。

種の生長速度は生長曲線から求められる。もしこれがわかれば新しい培地に植え継ぐべき培養液の密度を算定することができる。培養液が死滅期に達する前に植え継がなければならない。

- 前培養

前培養は試験培養の接種に適している藻類の一定量を得るためのものである。前培養は試験条件下で培養し、指数生長期にある、通常は約 3 日間の培養期間後のものを使用する。変形や異常な細胞が現れた培養液は廃棄しなければならない。

202 ミジンコ類、急性遊泳阻害試験および繁殖試験

以下のテストガイドラインは、二部より成る。

第 部 - 24 時間 EC50 急性遊泳阻害試験

第 部 - 繁殖試験（最低 14 日間）

第 部 24 時間 EC50 急性遊泳阻害試験

1 事前資料

必須資料

- 水への溶解度
- 蒸気圧

補足資料

- 構造式
- 供試物質の純度
- 水中の供試物質の定量分析法
- 水及び光に対する化学的安定性
- n-オクタノール/水 分配係数
- 易生分解性試験結果（テストガイドライン 301A - E 参照）

制限条件

試験条件下で難水溶性の化学物質に対して EC50 値を正確に決定できない場合もある。

基準文書

第 部、4の文献（1）～（6）を参照

2 方法

A 試験の導入、目的、範囲、妥当性、適用性及び限界

定義と単位

24 時間 EC50 とは、24 時間の曝露によってミジンコの 50% を遊泳阻害すると算定される供試物質濃度である。（若し他の定義を使う場合はその文献とともにそのことを記載しなければならない。）

遊泳阻害：試験容器を穏やかに動かしたのち、15 秒間泳げない場合、遊泳阻害されたとみなす。（若し他の定義を使用する場合は、その文献とともにそのことを記載する。）

基準物質

急性遊泳阻害試験において試験条件が信頼できるものかどうかを評価する手段として基準物質の EC50 試験を行うことがある。

試験方法の原理

急性遊泳阻害試験において、同一条件下で供試物質の濃度に応じミジンコの遊泳能力に様々な程度に毒性の影響が見られる。ある濃度において 24 時間後にはある割合で遊泳能力を有しないミジンコが生ずる。もし必要なら、試験を 48 時間まで延長することができる。

必須試験条件

- 対照区において、ミジンコの 10%以上が遊泳阻害されたり、水面に浮いたりしてはならない。
- 試験終了時の溶存酸素濃度は、試験温度での飽和酸素濃度の 60%以上でなければならない。

B 試験操作

準備 器具

試験溶液と接触する器具は全ガラス製が望ましい。このガラス器具は、前に試験した化学物質を取り除くことができる溶剤を用いて洗浄しておく。

蓄養と希釈水

ミジンコの飼育に適した水ならば、天然水若しくは調製水^{*1)}のいずれをこの試験に用いても良い。試験を始める前に順化の必要性を避けるために、試験に用いる水は、飼育水と同様であることが推奨される。引用文献(1)、(2)、(4)および(8)に調製水の例を挙げた。

*1) reconstituted water

実験動物

種の選択

オオミジンコ (*Daphnia magna*): 試験開始時に生後 24 時間以内のもので試験所で繁殖させ、外観上健康で経歴(飼育方法、前処理)の知られているオオミジンコ又は、他の適切なミジンコを、この試験に使用する。第 部と第 部の試験には、同じ種を用いることが望ましい。

試験の実施

- 各試験濃度区及び対照区で少なくとも 20 頭を使用し、各 5 頭を 4 群に分けることが望ましい。
- ミジンコは、試験期間中、給餌してはならない。
- 収容量：1 頭当たり少なくとも 2mL の試験溶液が必要である。
- 試験温度は、18～22 とし、各試験では±1.0 以内で一定とする。
- 明暗の周期は任意である。暗条件でも差しつかえない。
- 試験濃度は、等比級数で設定する。試験の最高濃度は、100%の遊泳阻害が起こることが望ましい。しかし、1g/L 以上の濃度で行う必要はない。試験の最低濃度では影響が観察されないことが望ましい。

濃度は実測又は設定（即ち試験溶液調製時に用いた量から計算するもの）のいずれでもよい。

- 試験溶液は、溶解助剤を使用せずに調製することが望ましい。水への溶解度の低い供試物質の場合、機械的な分散によるかあるいは、もし必要なら、ミジンコに対して低毒性の有機溶剤、乳化剤、分散剤のような助剤を使用して、試験溶液を調製してもよい。そのような助剤が使われる時は、供試物質の最高濃度で使われた助剤の濃度の対照群を設けなければならない。有機溶剤、乳化剤又は分散剤の濃度は、100mg/L を超えてはならない。データの評価においては、その結果は供試物質そのものと助剤との複合作用によるものかもしれないことに留意しなければならない。この作用は通常、実験的に区別できないものである。
- 希釈水は、供試物質を加える前に曝気を行う。対照区と試験濃度区の溶存酸素濃度は、試験開始時と終了時に測定する。
- 揮発性物質の場合、溶存酸素不足を防ぐのに十分な大きさの容器を用い、密閉系で試験を行う。
- 対照区と試験濃度区の pH は試験開始時と終了時に測定する。試験溶液の pH は調整しない。

3 データと報告

結果の取り扱い

24 時間と 48 時間（測定した場合のみ）における遊泳阻害百分率を、対数正規確率紙に濃度に対してプロットする。次に一般的な統計手法を用いて、調べようとする曝露期間における EC50 を算出する（[4](#)文献参照）。算出された EC50 値に対する信頼限界（ $p = 0.95$ ）は、引用されている標準の手法によって求めることができる。

EC50 を算出する標準方法へ適用するには不十分なデータしか得られない場合、遊泳阻害を起こさない最高濃度と 100%遊泳阻害を起こす最低濃度を用い EC50 の近似値を

算定する。(これは2つの濃度の等比中項とみなされる)。

この場合、上下2濃度の比は2を越えないこととする。

試験報告

このテストガイドラインの第 部 最低14日間繁殖試験 [3] データと報告を参照のこと。

第 部 最低14日間 繁殖試験

急性遊泳阻害試験での結果をもとに、繁殖試験の濃度範囲を決定する。繁殖試験は、最大10の間隔の等比級数でとった少なくとも5濃度で行い、およそ24時間EC50値から始めて、24時間EC50値のおよそ1/100で終るのがよい。必要であれば、より低い濃度でも試験する。

[1] 事前資料

必須資料

- 水への溶解度
- 蒸気圧
- 水及び光に対する化学的安定性
- 易生分解性試験結果(テストガイドライン 301A - E 参照)
- ミジンコに対する24時間EC50値

補足資料

- 構造式
- 供試物質の純度
- n-オクタノール/水 分配係数
- 水中の供試物質の定量分析法

制限条件

- 試験条件下で難水溶性の化学物質に対しては、EC50値を正確に決定できない場合もある。

勧告

- 2週間の試験では、雌1頭より3腹の仔虫を産むが、生死や繁殖に及ぼす供試物質の影響をより正確に判定するには、3若しくは4週間の試験が望ましい。この期間

- では、雌 1 頭当たり 6 から 9 腹の仔虫を産む。
- 数連の試験結果が合わせて解析することができるか否かを（分散分析のような）統計的手法を用いて調べることを望ましい。

基準文書

4 文献（1）～（6）参照

2 方法

A 試験の導入、目的、範囲、妥当性、適用性及び限界

定義

半止水式試験とは、試験水を流水にはしないが、ある期間（例えば 24 時間）経過毎にバッチ式に交換して行う試験である。

流水式試験とは、試験水槽中の試験水が絶えず交換され、供試物質はその交換水によって運ばれる試験である。

EC50 は、ある特定の曝露期間内（記載しなければならない）にミジンコの繁殖を 50% 減少させたと算定される水中の供試物質濃度である。

基準物質

繁殖試験に推奨できる基準物質はない。しかし、急性毒性試験で基準物質を用いた場合はその結果を試験報告書に記載する。

試験方法の原理

繁殖試験では水中に溶解した供試物質の毒性指標として用いるため、ミジンコの死亡率や繁殖能力への影響とその他の中毒症状を調べる。この目的のため、供試生物を何段階かの濃度の供試物質溶液に 2 週間以上、少なくとも 3 腹の産仔に十分な期間曝露する。そして死亡率、最初の産仔の時期、産仔数及び観察された中毒症状を対照区でのそれぞれの項目と比較する。

必須試験条件

- 対照区での死亡率は試験終了時で 20% を超えてはならない。
- 試験期間を通じて溶存酸素濃度は飽和溶存酸素濃度の 60% 以上でなければならぬ。
- 試験期間を通じて対照区と、少なくとも最高濃度区の pH を調べておかなければならない。開始時における値からの偏差は 0.3 以下とする。
- 試験する物質の濃度が試験期間中十分（例えば、少なくとも設定濃度の 80%）維持された証拠がなければならない。もし設定濃度からの変動が 20% を越える場合

- は、試験結果は実測濃度に基づいて算出する。
- 対照区で最初の仔虫は9日以内に産まれなければならない。
 - 対照区において雌の3腹の平均累積産仔数は 20 ± 1.0 の温度で20頭以上でなければならない。
 - もし、試験した最高濃度で繁殖になんら影響が認められなかった場合、その旨報告する。

B 試験操作

準備

装置と器具

一般的な研究用器具及び装置を使用する。試験溶液と接触する装置、器具はガラス製が望ましい、このガラス器具は、前に試験した化学物質が取り除ける溶剤で洗浄しておく。

希釈水

ミジンコが良好に繁殖できるなら、天然水若しくは調製水のいずれを用いてもよい（上記必須試験条件参照）。希釈水は、文献(7)の基準に合ったものとする。(1)(2)(4)(8)に調製水の例をあげた。

実験動物

種の選択

オオミジンコ (*Daphnia magna*) は試験開始時に生後24時間以内のもので、試験所で繁殖させ、外観的に健康で、経歴（飼育方法、前処理）が知られているものを試験に使用する。繁殖状況が、オオミジンコのそれと同様であれば他のミジンコを用いてもよい。

給餌

14日間繁殖試験において、前述の「必須試験条件」の繁殖の基準に適合するならば、どの種類の餌料のどのような量を与えてもよい、供試物質の餌料に対する吸着を最小限にするため、餌料を多く与えずがないようにする。通常、対数期の単細胞の緑藻が餌料として適切である。

試験の実施

- この繁殖試験は、止水試験式で行わず、半止水式又は流水式のいずれかで行わなければならない。換水の時期は化学分析と（若し適用できるなら）試験溶液の溶存酸素レベルから決定する。溶液は少なくとも48時間毎に換水する（例えば月、水、

金曜日)

- 換水方式で行う場合は、換水時にガラス容器を空にし、残餌は取り除かなければならない。ガラス容器は蒸留水で洗い、次の交換のために印をつけて保管する。従って、各試験単位で二つの容器を交互に使う。流水式で行う場合、せいぜい1週間に2度の間隔で洗浄する。
- 各試験濃度及び対照区で少なくとも、40頭を使用し、各10頭を4群に分けるのが望ましい。
- ミジンコには、少なくとも毎日給餌する。
- 収容量：1頭当り少なくとも40mLの試験溶液が必要である。
- 試験温度は18~22の間で行い、各試験では ± 1 以内で一定とする。
- 明暗の周期が必要で、8時間が暗期、16時間が明期の周期が推奨される。
- 試験濃度は等比級数で設定する。1g/Lを越える濃度での試験は行わない。
- 供試物質の分析試料は、試験の開始時と途中で採取する。水槽中の濃度は、設定濃度の80%以下に低下してはならない。試験溶液のエアレーションは供試物質の水槽中の濃度を、設定濃度の80%以下に低下させないなら行ってよい。
- 試験溶液は、有機溶媒や乳化剤や分散剤のような溶解助剤を使用しないで調製することが望ましい。
- 対水溶解度の低い供試物質の試験溶液は機械的な分散、あるいは必要ならばミジンコに対して毒性の低い、有機溶剤や乳化剤や分散剤のような助剤の使用により調製する。そのような助剤を使用した場合は、最高濃度区で使用した助剤の濃度に曝露する助剤対照区を設ける。有機溶剤や乳化剤や分散剤の濃度は100mg/Lを越えてはならない。データの評価においては、その結果は供試物質そのものと助剤との複合作用によるものかも知れないことに留意しなければならない。この作用は通常、実験的に区別できないものである。
- 試験溶液は供試物質とミジンコを加える前に曝気しておく。
- 供試物質の20%以上が、揮散によって失われる場合、試験は流水式か溶存酸素レベルが飽和値の60%以下に低下しないような十分な大きさの密閉容器で行う。
- 溶存酸素濃度はすべての試験溶液について48時間毎に測定する(例えば月、水、金曜日)
- 対照区と少なくとも最高濃度区のpHは、換水の前後に測定する。必要ならば、他の試験区のpHも測定する。これらの測定結果は記録する。
- 親のミジンコ(P世代)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時間毎には行わなければならない
(例えば月、水、金曜日)
- 育苗内の卵の有無、オスか休眠卵かを記録する。肉眼的にP世代の大きさと状態を対照区と比較する。

- 親はおよそ 7 日齢で育房から初めて産仔する。その後、2~3 日毎に新しい群が出現する。これらの群を F₁ (子供 1) 世代の腹仔 (brood) と呼ぶ。
(訳注：仔虫産出 1 回につき、1 腹とする。)
- F₁ 世代の新生仔は少なくとも週に 3 回、48 から 72 時間間隔 (例えば月、水、金曜日) に計数し、肉眼的に判定した状態を記録する。計数及び観察後の仔虫はすべて、仔虫を生じていない試験容器の底の卵の有無を調べ記録する。
- 試験期間：最短の試験期間は 14 日間である。この期間で対照区において、3 腹以上の F₁ 世代の産仔がなければならない。もし、このようにならない場合は、対照区で 3 腹日が産まれるまでの期間、試験を続行する。3 腹の産仔は通常 21 日以内で終了する。

3 データと報告

試験報告

急性及び繁殖試験両方に関する報告

- 供試物質：化学的な同定データ
- 供試生物：ミジンコの入手先、すべての前処理、飼育方法 (入手先、餌料の種類と量、給餌頻度を含む。)
- 試験方法：使用した方法の記述又は文献
- 試験条件：
 - 用いた助剤及び又は添加剤とその濃度。供試物質の安定性や均一性が保たれていないことが観察された場合は、結果の解釈に注意を払い、再現性がないかもしれない旨記載する。
 - 希釈水：供給源及び少なくとも、硬度、pH、Ca/Mg 比、Na/K 比、アルカリ度を含む物理化学的性質
 - 試験温度
 - 光の質、強度と周期
 - 試験期間中の pH と溶存酸素濃度の測定値、表にすることが望ましい
 - 基準物質での試験を行った場合は、その結果と日付
 - 試験容器の記述：溶液の容量、容量当りの試験生物数、濃度当たりの試験容器数、試験容器にほどこしたすべての処理、希釈水への供試物質の添加法
 - 換水の場合は、換水の操作と方式、流水式の場合は供試物質の供給システム、流速、清掃の周期とその方法
 - 測定している場合には供試物質の測定濃度と測定日
- 対照区及び各処理区で各観察期間に悪影響を受けたミジンコの数と割合及び観察された影響の性質 (例えば、遊泳障害、死亡率) を表形式に記述する。

- 用いた統計手法の記述又は文献
- 試験区と対照区において差異を認め得るその他すべての影響

24 時間 EC50 (急性遊泳阻害) 試験に関する報告には次の項目も含む。

- 適切な方法で算定された 24 時間 EC50, 95% 信頼限界を算出することが望ましい。
- 可能ならば、95% 信頼限界での濃度 - 影響曲線の傾き
- ミジシロコが全く遊泳阻害されない最高試験濃度
- ミジシロコが 100% 遊泳阻害される最低試験濃度

繁殖試験に関する報告には、次の項目も含む。

- 可能であれば計算機かグラフで算定された 24, 48, 96 時間、7 日、14 日及び試験終了時の EC50 値 (遊泳阻害) と EC50 値 (繁殖) 及びそれらの 95% 信頼限界 (算定は、プロビット法で行う。)
- 各濃度での最初の産仔までの日数
- すべての計数日における各試験容器の生存仔数 (最低週 3 回の計数が必要)
- 各計数日における死亡仔数
- 餌の供給源、種類、量、給餌頻度

上述の各項目に対し、各濃度区の数連の結果の均一性を統計的に解析する。均一性が認められたならば、適切な統計解析法で対照区と試験区の間には有意差が存在するかどうかを調べる。

次の項目について報告する。

- 死亡率、繁殖率や他の観察された影響について対照区と有意差の認められない最高試験濃度
- 対照区と有意差のある最低試験濃度

4 文献

標準手法

- (1) ISO6341 : Water Quality-Determination of the Inhibition of the Mobility of Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) (15 March 1982) .
- (2) DIN38412, Part1 : Allgemeine Hinweise zur Planung, Durchführung und Auswertung biologischer Testverfahren, (June 1982), and DIN38412, Part2 : Bestimmung der Wirkung von Wasserinhaltsstoffen auf Kleinkrebse (Daphnien Kurzzeittest), (L11), Normenausschuss Wasserwesen (NAW) beim Deutschen Institut für Normung, e. V. (DIN), Arbeitsgruppe "Biotests" : Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L), Berlin (March 1982) .
- (3) U. S. EPA : Registration of Pesticides in the United States-Proposed Guidelines, Federal Register, 43, N.132 (July 10, 1978) .

- (4) AFNOR T 90 301 : Qualite d'eau Determination de l'inhibition de la mobilite de Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea)(French standard 1974) .
- (5) NEN 6501 (Dutch standard on acute test) .
- (6) NEN 6502 (Dutch standard on reproduction test) .

その他

- (7) U. S.EPA : Environmental Effects Test Guidelines, ES-1, EPA560/6 82 002, Office of Toxic Substances, U. S. Environmental Protection Agency, Washington, D. C (1982) .
- (8) D. M. M. Adema, in Degradability, Ecotoxicity and Bioaccumulation : The Determination of the Possible Effects of Chemicals and Wastes on the Aquatic Environment, Chapter 5, Government Publishing Office, The Hague (1980) .
- (9) D. M. M. Adema, Hydrobiologia 519 (2) , 125 134 (1978) .
- (10) K. E. Biesinger and G. M. Christensen, J. Fish. Res. Board of Canada 29(12), 1691 1700 (1972) .
- (11) Commission of the European Communities, Study D. 8369, Inter laboratory Test Programme concerning the Study of the Ecotoxicity of a Chemical Substance with respect to Daphnia (1979) .
- (12) J. H. Canton and D. M. M. Adema, Hydrobiologia 519 (2) , 135 140 (1978) .
- (13) J. Finney, Statistical Methods in Biological Assay, Griffin, Weycombe, U. K. (1978) .
- (14) J. T. Litchfield and F. Wilcoxon, J. Pharmacol, Exper. Ther. 96, 99-113 (1949) .
- (15) C. E. Stephan, in Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation : Methods for Calculating an LC 50, (edited by F. L. Mayer and J. L. Hamelink), ASTM STP 634, pp. 65 84, American Society for Testing and Materials (1977) .
- (16) R. W. Wimmer and M. P. Farrel, J. Fish Res. Board. of Canada 33. 1685 1691 (1976) .

203 魚類急性毒性試験

序論

- 1 このガイドラインは 1981 年に採択され、1984 年に最初の改訂がなされたものであるが、この改訂版は急性の水系毒性試験における魚の数を減らすという英国からの提案に基づいている。この提案は 1988 年 11 月に Medmenham(英国)で開催された OECD 専門家会議において論議された。
- 2 旧版との主な違いは、1 群当り 7 尾の魚の使用を認める群の大きさの縮小、公比 2 を 2.2 とすることを認める濃度間隔の拡大、及び被験物質の 100mg/l の濃度での限度試験の導入である。

試験の原理

- 3 試験魚を望ましくは 96 時間被験物質に曝露し、死亡率を 24、48、72 と 96 時間に記録し、可能な場合は 50%の魚を死亡させる濃度(LC₅₀)を求める。

被験物質に関する情報

- 4 試験条件下での被験物質の対水溶解度を知る必要がある。試験液中の被験物質を定量するため、信頼性のある分析方法も必要である。
- 5 構造式、被験物質の純度、水及び光に対する安定性、pK_a(解離定数)、P_{ow}、蒸気圧と易生分解性試験(ガイドライン 310 参照)の結果は有用な情報である。溶解度と蒸気圧は被験物質の損失が生じるかどうかを示すヘンリー定数の計算に用いることができる。

試験の有効性

- 6 試験が有効であるためには次の条件が満たされていること。
 - 対照区の死亡率が試験終了時に 10%(10 尾より少ない数を使った場合は 1 尾)を超えない。
 - 試験期間中可能な限り一定条件を維持し、必要ならば半止水式又は流水式(定義は付録 1 参照)で行う。
 - 溶存酸素濃度は、試験期間中少なくとも飽和濃度の 60%でなければならない。
 - 試験期間中、被験物質の濃度が十分維持されていることが明らかでなければならず、設定濃度の少なくとも 80%であることが望ましい。設定濃度からの変動が 20%以上の場合、結果は実測濃度に基づき算出する。

試験方法

装置

- 7 一般的な実験用装置及び特に以下のものが必要である。
 - (a) 溶存酸素計

- (b) 水の硬度を測定するための装置
- (c) 温度調節のための適当な装置
- (d) 化学的に不活性な材料で推奨収容量に対し適切な大きさの水槽

種の選択

- 8 1種又はそれ以上の魚類を用い、その選択は試験機関の判断による。使用魚種の選択は、例えば、周年容易に入手可能なこと、管理が容易であること、試験に対して便利であること、及び経済的・生物学的・生態学的要因のような重要で実際的な基準に基づいて行えばよい。魚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。
- 9 試験に推奨される魚種の例を表に示す。表の魚種は飼育が容易であり、又周年広く入手できるものである。これらの魚は養魚場または研究所のどちらにおいても病気や寄生虫を抑制した状態で繁殖・飼育することができるので、供試魚は健康であり、系統がはっきりする。これらの魚は世界の多くの地域で入手できる。上記の基準を満たす他の魚種を用いる場合は、適切な試験条件になるよう試験方法を適合させる。

魚の維持

- 10 すべての魚を試験に使用する少なくとも12日前に試験研究所で入手し、維持しなければならない。試験実施前に少なくとも7日間試験で使用する水質の水で以下の条件下において維持しなければならない。
 - 照 明 : 12~16時間照明/日
 - 温 度 : その魚種の適温(表参照)
 - 酸 素 濃 度 : 飽和酸素濃度の少なくとも80%
 - 給 餌 : 試験開始の24時間前まで、3回/週又は毎日
- 11 48時間の安定化期間後、死亡率を記録し、次の基準を適用する。
 - 7日間の死亡が群の10%以上の場合、群のすべてを廃棄する。
 - 群の死亡が5~10%の場合、さらに7日間順化を続ける。
 - 群の死亡が5%以下の場合、供試できる。

表：試験に推奨される魚種

推奨される魚種	推奨試験温度	試験魚の推奨全長 cm ⁽¹⁾
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Zebra-fish ゼブラフィッシュ	21-25	2.0 ± 1.0
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Fathead Minnow ファットヘッドミノー	21-25	2.0 ± 1.0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Common carp コイ	20-24	3.0 ± 1.0
Oryzias latipes (Teleostei, Cyprinodontidae) (Temminck and Schlegel) Ricefish メダカ	21-25	2.0 ± 1.0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) Guppy グッピー	21-25	2.0 ± 1.0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque) Bluegill ブルーギル	21-25	2.0 ± 1.0
Oncorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum) Rainbow trout ニジマス	13-17	5.0 ± 1.0

(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。

水

- 12 飲料水(必要なら脱塩素したもの)を使用してもよいが、良質の天然水あるいは人口調整水(付録2参照)が望ましい。全硬度は10~250mgCaCO₃/Lで、pH6.0~8.5の水が望ましい。人工調整水の調製に用いる試薬は分析用の等級であり、脱塩水及び蒸留水は10 μScm⁻¹かそれ以下の電導度とする。

試験溶液

- 13 各濃度の試験液は保存溶液を希釈して調節する。水に対する溶解度の低い物質の保存溶液は、超音波あるいは他の適切な物理的方法で調製してよい。必要なら魚に対して低

毒性の有機溶剤、乳化剤又は分散剤のような助剤を用いて調製してもよい。そのような助剤を使用する場合、被験物質の最高濃度区で使用した助剤濃度に曝露する助剤対照区を設ける。

- 14 試験は pH の調製をせずに行う。被験物質を添加後、試験液の pH に顕著な変化が認められる場合、保存溶液の pH を被験物質添加前の水の pH に調製して再試験をすることが望ましい。この pH の調節は保存溶液の濃度変化がなく、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。塩素及び水酸化ナトリウムが望ましい。

操作

曝露条件

- 15 期 間：96 時間が望ましい。
- 収 容 量：止水式及び反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。
- 照 明：12～16 時間照明/日
- 温 度：その魚類の適温(表参照)で、2 の範囲内で一定に保つ。
- 酸 素 濃 度：飽和濃度の 60%以下にならないようにする。被験物質の顕著な消失がなければ曝気を行ってもよい。
- 給 餌：行わない。
- 攪 乱：魚の行動を変化させるような攪乱は避ける。

魚の数

- 16 少なくとも 7 尾の魚を各試験濃度区と対照区で用いなければならない。

試験濃度

- 17 少なくとも 5 濃度を等比級数的にとり、公比は 2.2 を超えないことが望ましい。本試験の前に毒性予測試験を適宜行くと、本試験の濃度範囲を適切に選択できる。

対照区

- 18 一対照区と、必要なら助剤対照区を試験系列に加える。

観察

- 19 少なくとも 24、48、72、96 時間後に魚を観察する。観察可能な動き(例えば、鰓蓋の動き)がない場合及び尾柄部に触れて反応がなければ、魚は死亡しているとみなす。観察時に死亡魚は取り除き死亡率を記録する。試験開始後、3 時間と 6 時間に観察することが望ましい。観察された異常は記録しておく(例えば、平衡喪失、遊泳行動、呼吸機能、体色変化など)。pH、溶存酸素濃度、温度は少なくとも毎日 1 回測定する。

限度試験

- 20 このガイドラインは記載の方法を用い、100mg/L(有効成分として)の限度試験を行い、 LC_{50} 値がこの濃度より大きいことを示すこともできる。限度試験は最小で7尾を用い、同じ生物数の対照区とともに行う。(死亡率が0%で10尾の魚を用いたときには、その LC_{50} が100mg/L以上である信頼性は99.9%であることを二項定理は示す。7、8あるいは9尾の魚で死亡がない場合は LC_{50} がその限度試験での濃度より高いことの信頼性は少なくとも99%である)、死亡がある場合は正規の試験を行う。亜致死的な影響が観察される場合は、これを記録する。

データと報告

結果の取扱い

- 21 対数 - 確率紙に各濃度に対する各々の曝露期間での累積死亡率をプロットする。次に一般的な統計手法を用い、適切な曝露期間に対する LC_{50} を算出する。算出した LC_{50} 値に対する95%信頼限界を標準方法⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾で求める。
- 22 得られたデータが LC_{50} 算出の標準方法を用いるには不十分な場合、全く死亡を起こさない最高濃度と100%の死亡を起こす最低濃度から LC_{50} の近似値を求める(これは、これら二つの濃度の等比中項とみなされる)。

試験報告書

- 23 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：

- 物性及び必要なら物理化学的性状
- 同定データ

試験魚：学名、系統、大きさ、購入先、前処理など

試験条件

- 用いた試験手法(例えば、止水式・反止水式・流水式、曝気、魚の収容量など)
- 水質(pH、硬度、温度)
- 24時間毎の試験液の溶存酸素濃度、pH、温度(反止水式では、pHは換水の前後に測定する)
- 保存及び試験液の調整法
- 試験濃度
- 試験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
- 試験中に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

文献

- (1) Litchfield, J. T., and Wilcoxon, F., (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol and Exper. Ther.*, 96, 99-113.
- (2) Sprague, J. B., (1969). Measurement of pollutant toxicity to fish. I Bioassay methods for acute toxicity. *Water Res.* 3, 793-821
- (3) Sprague, J. B., (1970). Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. *Water Res.* 4, 3-32.
- (4) Stephan, C. E., (1977). Methods for calculating an LC50. In *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation* (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTMSTP 634, pp. 65-84, American Society for Testing and Materials.
- (5) Finney, D. J., (1978). *Statistical Methods in Biological Assay*. Griffin, Weycombe, U.K.

付録 1

定義

止水式試験とは、試験液が流水でない条件の水生生物を用いた試験である。試験期間中、試験液は交換しない。

半止水式試験とは、試験液を流水式にはしないが、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である。

流水式試験とは、試験水槽中の試験液が自動的に絶えず交換され、交換された液は排水される試験である。

LC50 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）の曝露で試験区の魚の 50% を死亡させる被験物質の水中濃度である。

付録 2

適切な人工調整水の例 (ISO6341-1982)

(a) 塩化カルシウム溶液

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 11.76g を脱イオン水に溶かし 1L にする。

(b) 硫酸マグネシウム溶液

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.93g を脱イオン水に溶かし 1L にする。

(c) 炭酸水素ナトリウム溶液

NaHCO_3 2.59g を脱イオン水に溶かし 1L にする。

(d) 塩化カリウム溶液

KCl 0.23g を脱イオン水に溶かし 1L にする。

すべての試薬は分析用等級とする。

蒸留水又は脱イオン水の電導度は $10 \mu \text{Scm}^{-1}$ を越えてはならない。

(a) ~ (d) の溶液各々 25mL を混合し脱イオン水で全量 1L にする。この溶液のカルシウムとマグネシウムイオンの量は 2.5mmol/L である。Ca と Mg イオンの比は 4 : 1 であり、Na と K イオンの比は 10 : 1 である。この溶液の酸容量 KS4.3 は 0.8mmol/L である。

溶存酸素が飽和に達するまで希釈水を曝気し、使用前まで曝気をせずに約 2 日間貯蔵する。

本資料は、(財)化学品検査協会編集 / 第一法規出版 (株) 発行 (1981 年) の「OECD テストガイドライン」から抜粋、一部変更したものである。