

水生生物を用いた生態毒性試験 実施における留意点

1. 急性毒性試験共通の留意点

2. 魚類ELS試験 TG 210 (2013)

※最新版は2025年ですが、試験法の基本は2013年改定版で規定されています。

3. ミジンコ繁殖試験 TG211(2012)

菅谷 芳雄（国立環境研究所 客員研究員）

1. 急性毒性試験共通の留意点

【1】 界面活性剤の使用について

(原則)

農薬テストガイドライン(農薬の登録申請において提出すべき資料について(平成31年3月29日付け30消安第6278号農林水産省消費・安全局長通知))では、以下のように記載されています。試験濃度区の調製において、助剤を使用しないこと。ただし、難水溶性原体に関して助剤(原則、界面活性作用を有しないもの)を使用しなければ試験の成立が困難な場合には、必要最小限の量を使用することができる

(対応) もし助剤を使用する場合は、その理由と試験結果への影響を報告書に掲載すること。

(利用) (ア)難水溶性物質であること。

(イ)低濃度の試験溶液の調製のする必要があるため

(ウ)当該助剤は低毒性であることが既知である

【2】限度試験における試験濃度設定

(原則)

OECD TG203の「限度試験」の項では、100 mg/L又は試験条件下での被験物質の試験溶液での溶解限度、又は付属書1(中略)で96時間の限度試験を実施し、LC50がこの濃度より大きいことを示すことができる。

(対応)

もし、限度試験を100mg/Lより低い濃度で実施する場合は、必ず、試験用水への溶解性(予備試験)の結果に基づいた考察を行うこと。

※ 付属書1は、国外の制度でThreshold approachが取り入れられている場合で、国内では適用していない。

【3】測定値が定量限界未満の場合

(問題) GD23における定量限界未満の場合の数値の扱いが、2018年の改訂のGD23(2nd)で変更された。届出された報告書には以前のGD23の手順のものがあつた。

(原則と対応)

(ア)分析法は必要十分な精度を有すること。

(イ)試験ガイドラインに規定されていれば、その手順が優先する。(例:藻類生長阻害試験:測定頻度を増やして減少曲線から濃度を推定する)

(ウ)GD23の規定:「**被験物質が検出されても定量されない場合**の平均暴露濃度の算出には、定量限界の1/2の値を用いる方法が考えられる。暴露濃度の決定方法は様々であり、**特に定量限界未満の場合は、試験結果の報告において選択した方法を明示する必要がある。**」に従う。

※もし、現行の技術では測定できない場合は、GLP上のSOP手順で、曝露したことを示す

【4】未溶解物・不溶解物質

試験溶液の観察を行った結果

「最高濃度区で析出し、沈殿が見られた」

「容器へ吸着が予測された」

「濁りが生じた」場合は、被験物質が溶解度以上で存在する兆候とみて対処する必要がある。

(対応) 被験物質濃度は試験液を濾過して濃度測定し、試験用液への溶解性(予備試験段階)の結果と比較して考察する。

(対応) 試験生物なし(試験溶液のみ)の容器を準備して、試験区と同様に被験物質の濃度測定を行った結果を加味して考察する。

(原則) 未溶解物・不溶物(粒子状・容器吸着・沈殿)は、試験生物への暴露に寄与しない分画として扱う。ただし、藻類曝露濃度は、藻体表面に吸着した分画も暴露に寄与したと考える。

2. 魚類初期生活段階毒性試験

Test Guideline No. 210

Fish, Early-life Stage Toxicity Test

25 June 2025

この試験法に関する以下のスライドは
鑑迫(愛媛大学)氏が2013改正時に作成したものをベースに作成しました。

https://www.nies.go.jp/risk_health/seminar/text/h260214/h260214data02.pdf

TG210の位置付け

- 魚類の初期生活段階の複数のステージを含み、多くの場合、全生活史試験と同程度の毒性値が期待できる。
- 本ガイドラインは、1998年に採択され、2013年に改定された。
- 2025年の改訂で組織標本に関する規定を追加した。

本試験法の改訂について

OECDは2010年に魚類専門家会合を開催し、開発中であった内分泌かく乱作用のための試験法を含め魚類試験法全般の整合化について話し合われました。

そこでは、以下が合意された。

- TG204の廃止、TG210の改定、繁殖を含む生活史段階試験の開発を推進する
- ガイダンスドキュメント23の改定、特に魚類を用いた試験法についての手順を追加する(2018年改定)
- 魚類AOP(Adverse Outcome Pathways)の開発の基礎固め
- 魚類試験法の動物福祉の観点からの見直し

以下に示す、パラグラフ番号は 2025年改定版の記載に従います。

OECD試験法の種類

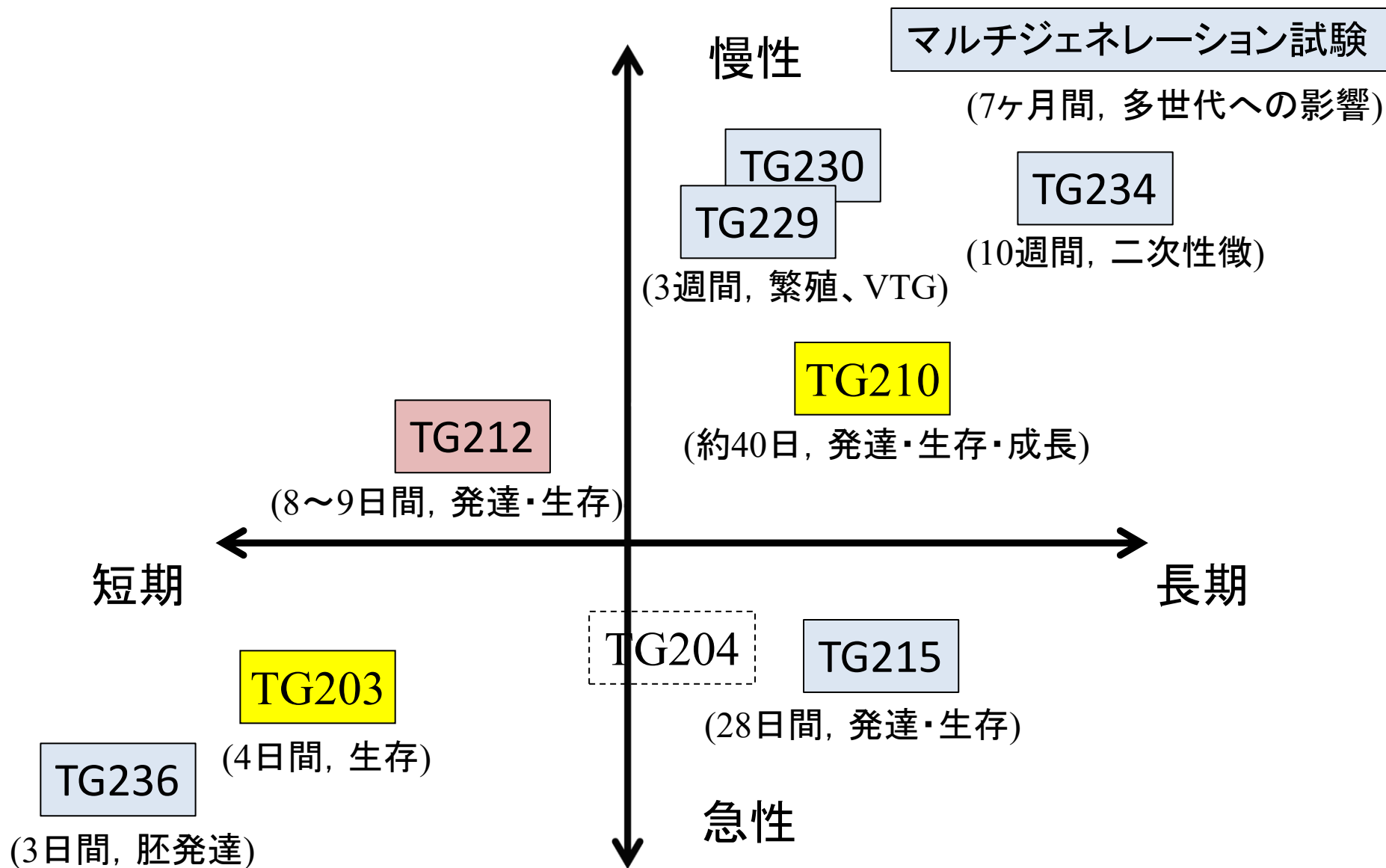
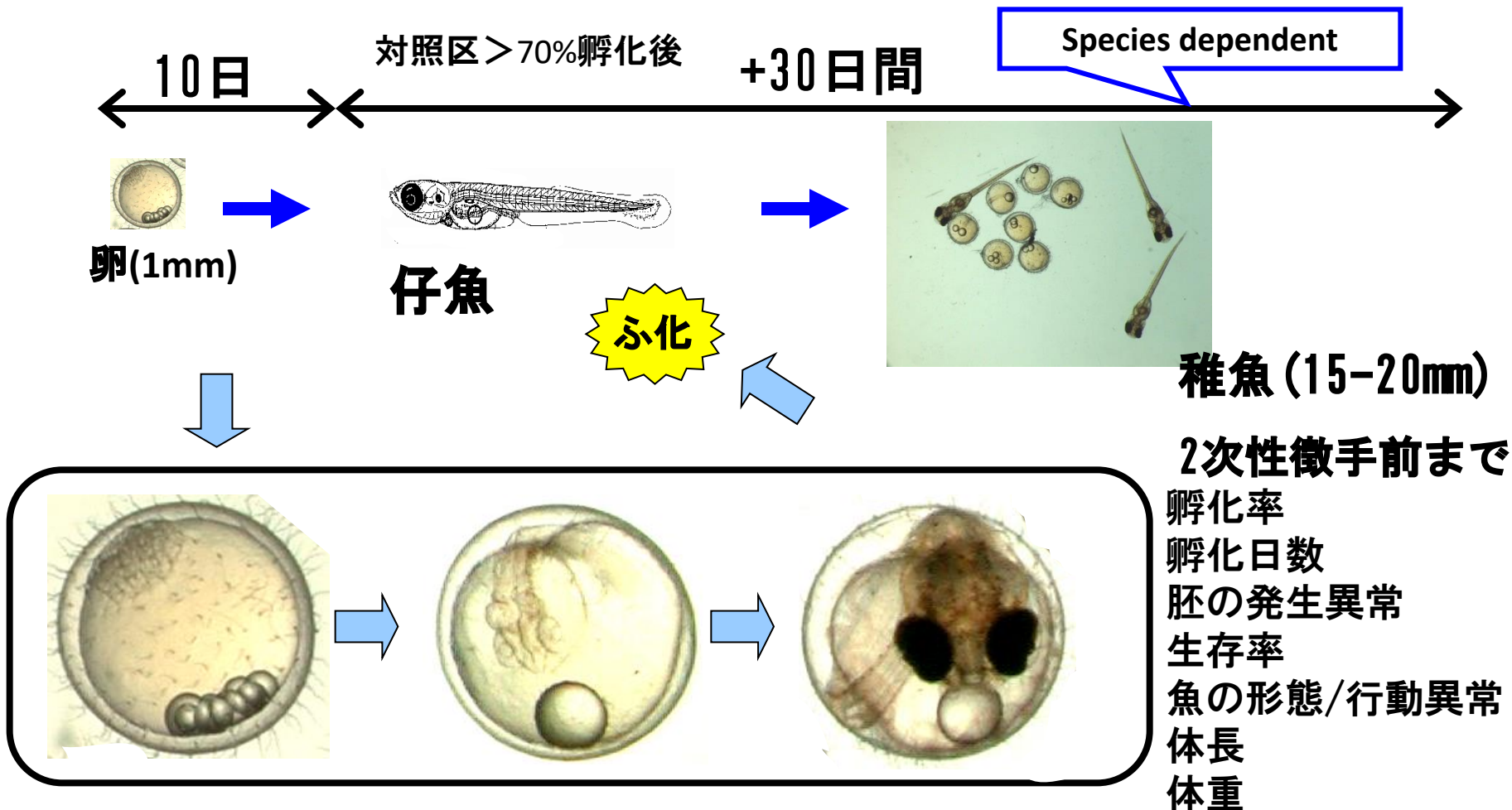


図. 魚類を用いた生態影響試験の分類(概念)

OECD TG210 魚類初期生活段階毒性（ELST）試験

目的：連続曝露による化学物質の胚から稚魚期への影響を評価

※ OECD-TG210のANNEX2の規定で30days Post-hatchの起算日として、ここでは
対照区で開始時の受精卵の70%がふ化した日を示すもので、実務上の目安である。



TG210 2013年改定箇所について

【パラグラフ 3、35】

- 従来の毒性値であるNOECだけではなくEC_x使用についても記載されている。ただし、強制ではない。
- ※ 試験を要求する、化学物質管理当局が何を求めているかによる。
NOEC＝EC₁₀が一般的であるが、限定されていない。

【パラグラフ 5、7】

- 旧法では暗にTG203を行ってTG210を行う流れが記載されていたが、新法では急性毒性は必須ではないと明言された。ただし物性情報としてのTG104、105の利用、急性毒性試験としてTG203に加えてTG236の利用が書き加えられた。
- 生分解性情報としてTG301にTG310が追加された。
- ※ 試験は多様な被験物質に対応した手順で実施する必要がある。

【パラグラフ 6】 被験物質を混合物に拡大

- 混合物の試験について記載が追記された。被験物質の化学的同一性を明らかにする必要がある。
- 試験結果を管理に用いる場合は当該制度に従う

※ 試験はガイドランに従って実施するが、データ処理は管理制度により異なる場合がある。また、被験物質の扱いに関してはOECD GLPのガイダンス文書がある。

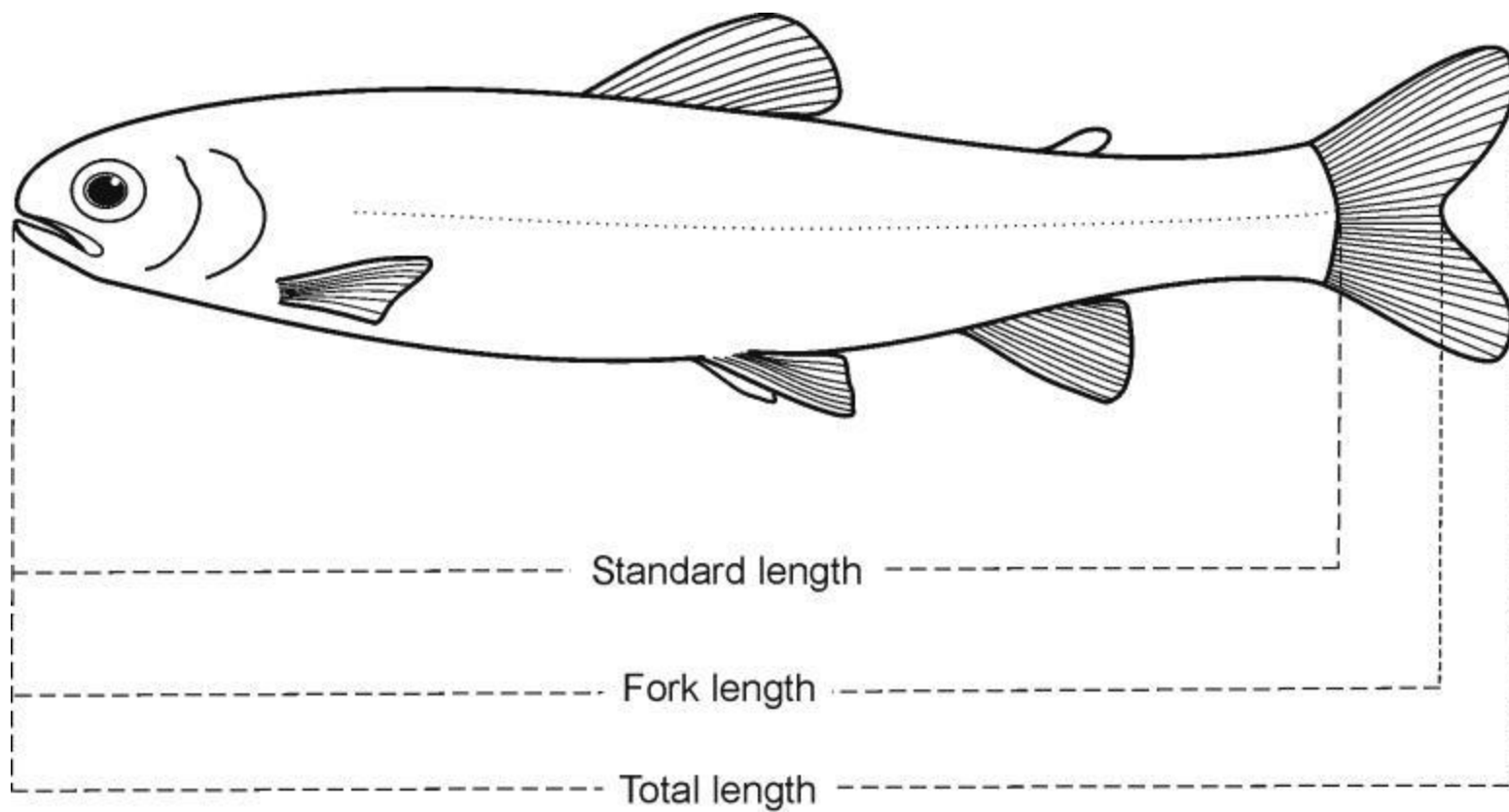
【パラグラフ 8 Annex 2】 試験の妥当性の基準

- 溶存酸素量が60～100%から、60%以上に変更。
- 温度変動(1.5°C)がmustからshouldに変更。
- 化学物質の分析定量は義務付けられた。
- 物質濃度が20%以内という記述が無くなった。
- コントロールの孵化率と孵化後生存率が決められた。

Annex 2

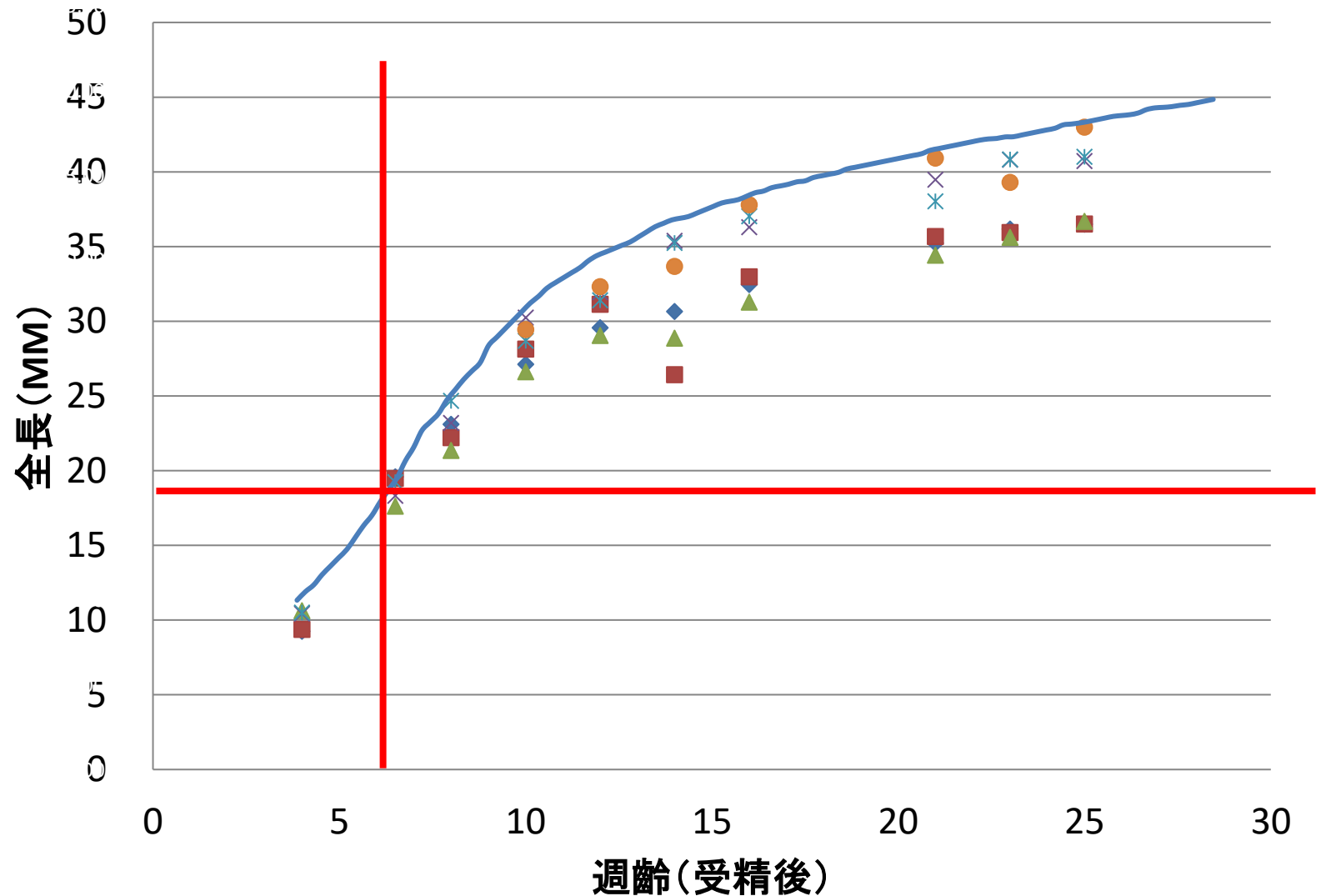
Species	Temperature(°C)	Photo period (hrs)	RECOMMENDED DURATION OF TEST	Typical minimum mean total length of control fish at the end of the study (mm) *	Hatching success	Post-hatch success
<i>Oryzias latipes</i> Japanese Ricefish or Medaka	25 ± 2	12 - 16	30 days post-hatch	17	80%	80%
<i>Danio rerio</i> Zebrafish	26 ± 1.5	12 –16	30 days post-hatch	11	70%	75 %

* Typical minimum mean total length is not a validity criterion but deviations below the figure indicated should be carefully examined in relation to the sensitivity of the test. The minimum mean total length is derived from a selection of data available at the current time.



OECD-TG210 Annex 1より

国環研でのメダカ成長曲線



【パラグラフ 10】 試験容器の材質と大きさ

- 試験容器に関する記載。シリコンを避けるためオールガラス容器の使用を推奨している。
- 魚の成長や溶存酸素確保のために、小型魚で7Lを推奨している。（流水式であっても、7Lの大きさは、試験魚のストレスを避けるために必要との意図である）

【パラグラフ17】 試験溶液の調製

- ・ スtockソリューションは溶剤を極力用いずに作成することが好ましいとされた。
- ※ OECDガイダンス文書No.23（第2版、2019）で詳しく解説されており、試験手順を決定する際には参照する必要がある。

【パラグラフ19～25】 曝露条件等

- 試験期間 Annex2に日数で記載されている。
- 繰り返し (旧) 少なくとも60卵を2水槽に分ける
(現) 少なくとも80卵を4水槽に分ける
- 卵・仔魚期のエアレーションはしない
- 給餌は1個体あたり同じ量に(死亡率補正)
- 濃度区 最低5区＋対照区＋助剤対照区
動物福祉のため、対照区と助剤対照区に有意な差がない場合に限り
Pooled Control。差があれば、助剤対照区を用いる。
- 被験物質濃度測定の頻度は週1回以上(流水)、週1回換水前後(半止水)

TG210改定(2013)の留意点まとめ

- 溶剤の使用を極力なくし、実測値を重視することになった。
- 試験期間は日数決められているが、毒性指標は成長阻害であり、試験の妥当性基準として、目標となる成長量が「典型的な魚体の最小の大きさ」が試験ガイドラインに記載された(OECD-TG210 ANNEX2)。
正常な発育のできる飼育条件であることが重要。
- メダカの場合、典型例として全長17mm(最小)と記載されたが、日本のGLPラボで行われた過去の試験結果はすべて値を超えていた。
- 統計処理の結果として、毒性値としてのNOEC/LOECを算出する。なおEC_xの算出もこの試験法で可能である。化学物質管理制度によって、EC_xを使用する場合もあるため、OECD-TG210の規定はそれに対応している。

TG 210試験に当たっての留意点

【A】 魚種の選択

管理制度の規定に従い選択する。淡水魚で推奨できる4種

ミナミメダカ(*Oryzias latipes*)に由来するヒメダカ(品種)

なお国内産メダカは遺伝的には2種であることが認められ
一方をキタメダカ(*O.sakaizumii*)と命名された(2012年)。

ゼブラフィッシュ(生餌で飼育可能な系統が試験に適していた)

ファットヘッドミノー(国内で入手は可能だが試験経験
は少ない。米国では一般的)

ニジマス(国内で養殖事業者より試験に用いる卵を入手すること
は可能だが、通年対応しているとは限らない)

【B】妥当性基準を満たすことは必須 数値データは一貫していること

妥当性基準を満たさない試験については、試験の妥当性を示すための「根拠」が必要となり、GLP試験の試験責任者試験結果に及ぼす影響についての考察を検討すること。

試験結果は、TGで示されている統計的手法に従い処理すること(パラグラフ32、33 だがデータの状況に応じて変更は許容)。

処理の過程は報告書に記載し、一貫したデータの流れ(data integrity)を示すこと。

【c】被験物質と手順の選択

管理制度の要求に応じて被験物質を選択すること。

評価すべき化学物質や工業用原体を被験物質とすることが原則ではあるが、水中での変化（または物化性状）を考慮して、より適切な被験物質を選択することが推奨される。

【D 被験物質濃度の維持】

被験物質の性状により、曝露のための試験手順を選択する。

流水式

半止水式

【E 動物福祉の観点での規制に留意】

諸外国において、動物愛護の法的な制限がある場合には、魚類の扱いに、留意する必要があります。

※OECDテストガイドラインプログラムでは、International Council on Animal Protection in OECD Programmes (ICAPO)が参画しています。

※我が国では「動物の愛護及び管理に関する法律」があり、実験用の魚類について、この法の趣旨に即した対応が望ましいとされています。

3. オオミジンコ繁殖試験

OECD TG 211

***Daphnia magna* Reproduction Test**

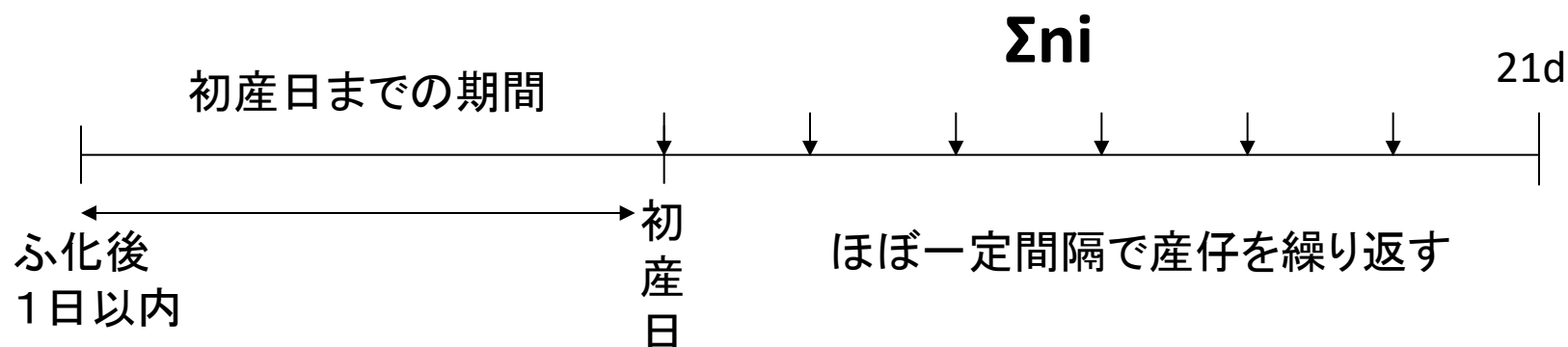
**TG 202 Part 2
TG 211**

**1984年採択
1998年採択、 2008年改訂、 2012年改訂**

OECD TG 211 (21st Sep. 1998)

Daphnia magna Reproduction Test

OECD TG 202(1984) Part II (→ その後1998年に独立して採択)



試験期間: 21d

試験生物: オオミジンコを推奨、ふ化後1日以内、1個体／容器: 10繰り返し／濃度

試験区: 対照区(助剤対照区)と最低5暴露濃度区

エンドポイント: 繁殖阻害 (試験期間中の総産仔数、初産日までの期間...)

妥当性クライテリア: 対照区の1親当たり総産仔数60個体以上

算出する毒性値: EC_x NOEC(LOEC)

2012年改訂版の骨子

パラグラフ 2.(抄訳)

TG 202 Part 2 (1984)からTG 211(1998)への主な変更点

- (a) 推奨種をオオシニコとする
- (b) 試験期間は21日とする
- (c) 半止水式試験においては、使用する生物個体数を最低40から、最低10個体に減らし、反復数を4であったものを10(1濃度区当たり、1容器1個体)とする。
(流水式試験においては、反復数最低4(1濃度区当たり4容器40個体とする)
- (d) 試験培地および給餌について試験特有の規定を設けた、

TG211(1998)から本改訂版への主な変更点

- (e) 2008年に、付録7を追加した、これは産子個体の性比を調べる手順を規定したもの。
- (f) 2012年に、反応変数として、
「試験終了時まで生存した親個体当たりの産子数」に
事故や予期しない死亡を除き、「試験開始時の親個体当たりの産子数」を追加した。
- (g) 統計処理のための指針をさらに追加した
- (h) 限度試験を導入した。

改訂点は試験の中心点

変更点 1（パラグラフ4、パラグラフ51）

曝露濃度と死亡率に有意な相関がみられる場合には、被験物質の影響であるので繁殖阻害率を算出する際の反応変数は、「試験開始時の親個体当たりの試験期間に正常に産出された子の総数」を使う（従前の手法と比較して厳しい毒性値となる場合）

そのため

試験の結果曝露区で親の死亡が見られた場合には、（1）曝露に起因するものかどうか、（2）曝露濃度依存的に増加しているかどうかを確認する。後者の場合は、統計手法として、Cochran-Armitage trend test が有効であろう。

親個体は、ハンドリング上の間違いで死亡（事故死）や、曝露とは無関係の意図しない死亡が見られるので、親の死亡については記録にその理由を記載すること。

対象となるミジンコの種類

変更点2（パラグラフ11、21、60）

試験生物種は、オオミジンコとするものの、その他のDaphnids（枝角類）でもよい。ただし妥当性基準を満たさなければならないし、満たしたことを示さなければならない。

留意点

一方、パラグラフ21では、ニセネコゼミジンコの使用に言及しているが、オオミジンコの妥当性基準や試験期間をニセネコゼミジンコを使っては達成できないので、もし、ニセネコゼミジンコを使う場合には別途科学的妥当性を示す必要がある（パラグラフ60）。

試験手順の変更

オオミジンコ以外の種を用いる場合には、妥当性基準を満たすこと、または、科学的妥当性を有することを示す（パラグラフ 60）。

試験デザインで流水式も

変更点3（パラグラフ24）

流水式試験の場合には、1つの容器に複数（例えば5，10）個体入っており、もし一部の親が死亡し、死亡した親個体を含めどの親の産子であるかわからない場合には、反応変数は、「試験開始時の親当たりの総産子数」を用いることとする。

試験手順の変更

例えば事故で死亡したことが明確で、かつ、その時点では産子が見られていない場合の場合には、反応変数を「試験開始時の親当たりの総産子数」とすることはない。どの反応変数を利用したかについては、十分な考察が必要となる。

濃度設定のための情報

変更点4（パラグラフ33、34）

もし必要がある場合には、曝露濃度設定予備試験を実施する。その場合は、1濃度区当たり2回の反復とする。追加的に、文献から得られた似た化学物質の情報、Daphnia属の急性毒性値その他は、この予備試験の濃度設定に有用である。

曝露濃度設定予備試験の試験期間は21日間、もしくは影響レベルを予測するに十分な期間とする。試験結果を記録すること。

試験手順の変更

曝露濃度設定予備試験の手順の追加

曝露濃度設定予備試験を行う必要としない場合の判断と記載方法

統計的手法

変更点5（パラグラフ35）

試験設計の段階で、統計処理方法を検討すること、その場合には検出力についても検討すること。

試験手順の変更

統計処理方法についての、指針を参照して適切に対処すること

限度試験

変更点6（パラグラフ36）

36. If no effects are observed at the highest concentration in the range-finding test (e.g. at 10 mg/l), or when the test substance is highly likely to be of low/ no toxicity based on lack of toxicity to other organisms and/or low/no uptake, the reproduction test may be performed as a limit test, using a test concentration of e.g.10 mg/l and the control. Ten replicates should be used for both the treatment and the control groups. When a limit test might need to be done in a flow-through system less replicates would be adequate. A limit test will provide the opportunity to demonstrate that there is no statistically significant effect at the limit concentration, but if effects are recorded a full test will normally be required.

試験手順の変更

- ・ 限度試験に移行する手順を明確に規定すること。その際、統計処理方法についても、指針を参照して適切に対処すること
- ・ 試験最高濃度は、例示では10mg/Lとなっているがこの数値は規定ではなく、試験結果の利用目的や化学物質規制当局からのデータ要求に従って試験を実施すべきであると解釈される。

試験の妥当性は検出力の維持

変更点7（パラグラフ 37－38）

38. Generally in a well-run test, the coefficient of variation around the mean number of living offspring produced per parent animal in the control(s) should be $\leq 25\%$, and this should be reported for test designs using individually held animals.

試験手順の変更

- ・ 対照区を設けること（パラグラフ37）
- ・ 対照区における平均産仔数の変動係数は、25%未満であること。（パラグラフ38）

今回の改訂で変更になったものではないが……検出力を高める規定で特に重要

致死と繁殖阻害への対応

変更点8（パラグラフ 44、52）

親ミジンコの死亡率が、明らかに濃度依存的に増加している場合には・・・
反応変数として、

「試験終了時まで生存した親個体当たりの産子数」ではなく、
事故や予期しない死亡を除き、「試験開始時の親個体当たりの産子数」

試験手順の変更

- 1) 親の死亡の原因が、事故や予期しない死亡であるかどうかを判断し、適切に記録する手順の追加
- 2) 死亡率と暴露濃度との関係の統計解析する手順の追加 (Cochran-Armitage trend test)
- 3) 反応変数「試験開始時の親個体当たりの産子数」による毒性地算出の手順の追加
- 4) 2つの反応変数による毒性値の比較と、毒性値の決定の手順の追加

統計手法の検討

変更点8（パラグラフ 56-57）

OECD ガイダンス文書 No. 54 の引用

対照区との比較においては、悪影響をみるものであり、片側検定が基本である。

試験手順の変更

統計的な手法を紹介しているので、適した手法をここから引用して、必要に応じて毒性値を算出する

有意差検定は片側で $p \leq 0.05$ で検定を実施する（必要に応じて、手順の見直しを行う）。

統計手法の検討(続き)

変更点9 (パラグラフ 58)

限度試験の際の統計的方法についての手法を示して規定した

試験手順の変更

- 1) 等分散性、正規性の検定
- 2) 量的反応では Student test (t-テスト)
- 3) 等分散性、正規性が仮定できない場合は、ノンパラメトリックの手法を用いる
例: Mann-Whitney-U-test

対照区のpooled controlの是非

変更点10（パラグラフ 59）

対照区の取り扱いについての新たな記述

手順の変更

- 1) 無処理対照区と助剤対照区間に有意差があるかどうかを判断するには、限度試験の場合と同じ手法が利用できる（パラグラフ 58）
※ 助剤の利用により、有意に毒性が緩和もしくは増悪することが観察された場合には、当該助剤の妥当性に問題がないか検討が必要であろう。

- 2) 無処理対照区と助剤対照区間に有意差がないと判定された場合には、pooled control を用いてよい。そうでない場合には、助剤対照区を用いる。
※ pooled controlに関しては、OECD GD 54 とは結論が異なっている。そのため、ここでの規定は、一般化することは危険であり、ある限られた場合にpooled controlを利用できると解釈すべきであろう。

資料 ミジンコ繁殖試験のNOEC再計算のまとめ

OECD-TG 211 試験 調査対象報告書 合計 277報		優勢な影響での分類(予備的検討)				
		繁殖のみ	主に繁殖	致死・繁殖	主に致死	
		70	111	50	46	
再計算が必要な 報告書数*		0	4	33	16	53
現行の試験 法の反応変 数による NOEC値と 旧試験法の NOECの比 較	同じ	－	2	25	10	37
	低い	－	2	6	6	14
	高い	－	0	2	0	2

- NOEC値よりも低い濃度区で、親ミジンコの死亡が見られた場合には、NOECがより低くなる可能性があったので、旧試験法(1998)と現行の試験法(2012)の反応変数を使った場合のNOECを比較した。

TG 211 試験に当たっての留意点

参考：改定時に提起した留意点

- ・ 化学物質はミジンコにさまざまな影響を与えるが、致死的影响が現れる前に、必ず産仔数の低下が起こる・・・場合は、従来の手法が適している。
- ・ 致死的影响は2値（生と死）データ、産仔数は連続数データであり、両者を一緒に解析することはこれまで提案された統計手法にはなじまない。
改定案はこのようなデータを解析する手法を提示していない。
- ・ 改定案は親世代の死亡原因が被験物質曝露によらず偶発的または操作ミスなどの事故による場合は毒性値算出データから除外するとしている。この判断は試験担当者により異なることが予想されたため、除外のルールを明確にする必要がある。
- ・ 被験物質影響が産仔数低下よりも致死影響が顕著でより低い濃度で起こる場合は、死亡率からNOECが最低値となるため、最低繰り返し数10（10個体／濃度区）では統計的検出力が十分ではない。死亡率がNOECの根拠とする場合は他の繁殖試験同様のNested designが適当であろう。

【A】 種の選択

最新ガイドライン上は、

(1) *Daphnia*属(TG202)でも、他の枝角類の種。

(2) *Ceriodaphnia dubia*

の使用にも言及している。ただし、その場合は本ガイドラインの妥当性基準を満たす必要があり、例えば一部の大型の*Daphnia*属の種では適用できる可能性はある。

ただし中型種・小型種には現行の妥当性基準(21日間の試験期間で60個体以上の産仔)を満たすことは無理である。

今後、オオミジンコ以外の種に適用できる新たな妥当性基準が合意された後に、試験が可能になるだろう。

【B】妥当性基準を満たすことは必須 数値データは一貫していること

妥当性基準を満たさない試験については、試験の妥当性を示すための「根拠」が必要となり、GLP試験の試験責任者試験結果に及ぼす影響についての考察を検討すること。

試験結果は、TGで示されている統計的手法に従い処理すること処理の過程は報告書に記載し、一貫したデータの流れ (data integrity)を示すこと。

【c】被験物質と手順の選択

管理制度の要求に応じて被験物質を選択すること。

評価すべき化学物質や工業用原体を被験物質とすることが原則ではあるが、水中での変化（または物化性状）を考慮して、場合によってはより適切な被験物質を選択することが推奨される。

【D 事故による死亡の扱い】

ガイドラインでは、統計的に濃度依存性があれば、被験物質の影響と判断する。

一方、親ミジンコの試験途中での死亡の原因が、人為的なミス・偶発的な事故による場合は母数から排除することになり、試験結果に影響を及ぼす。試験従事者および試験責任者は、その点を留意して報告すること。

【注記】

本 資 料 に つ い て

本資料は令和7年度 農薬の生態影響評価試験（水域の生活環境動植物）に係る意見交換会における講演者の発表資料であり、内容は演者個人の知見・解釈を含みます。環境省の立場・見解を示すものではありません。

また、制度運用における最終的な判断は、各関連法令・通知等に基づき行われます。