

1 試験目的

スギ(木酢液)のヒメダカに対する急性毒性試験を実施し、50%致死濃度(LC₅₀)及び最大無作用濃度(NOEC)を求め、スギ(木酢液)のヒメダカに及ぼす影響を評価した。

2 試験法ガイドライン

本試験は「農薬の登録申請に係る試験成績について」(平成12年11月24日付 12農産第8147号)、水産動植物への影響に関する試験、魚類急性毒性試験に準拠した。

3 被験物質

1) 名称及び有効成分の含有量等

名称：スギ木酢液

常温における性状：褐色液体

2) 供試試料

入手先：環境省

入手年月日：2004年12月9日

入手量：1 l

ロット番号：W15080

純度：-

有効期限：-

3) 被験物質の保管方法

被験物質は冷暗所にて保管した。

4) 取り扱い上の注意

被験物質の取り扱いにおいては、保護具等を着用の上、人体への吸入、摂取、接触等がないよう十分注意して取り扱った。

4 試験生物

1) 生物種

試験生物として下記に示したヒメダカで、定期的な基準物質(硫酸銅(Ⅱ)五水和物、試薬特級、純度99.5%以上[関東化学株式会社])による生物検定においてLC₅₀の確認されたものを用いた。

なお、基準物質による96時間後のLC₅₀は0.57 mg/l(平成16年10月18日)であった。また、当センターにおける96時間後のLC₅₀のバックグラウンドデータは0.75±0.22 mg/lであった。

- ① 学名：*Oryzias latipes*
- ② 全長：2.3 cm (2.2~2.4 cm) (n=10)
- ③ 体重：0.09 g (0.08~0.11 g) (n=10)
- ④ 入手等：滝沢養魚場[埼玉県鴻巣市](平成9年1月29日)より入手したものを、当センターにおいて自家繁殖した種である。試験には、生後5ヶ月令の個体を使用した。

2) 順化

順化飼育に用いるヒメダカには、蓄養飼育を行っている群から、外観に異常が無い個体をランダムに選別したものをを用いた。順化飼育は、試験に用いる希釈水と同一の水質、水温等、可能な限り試験環境条件に近い条件で14日間飼育した。ただし、暴露開始前24時間は給餌を行わなかった。また、選別した試験生物のうちの10尾について全長及び体重の測定を行った。

なお、暴露開始前7日間の死亡率は0%であった。

<順化条件>

- ① 飼育方法：循環ろ過式
- ② 飼育水槽：50 l容ガラス製水槽
- ③ 水温：24.0℃
- ④ 照明：16時間明期
- ⑤ 飼育水：水道水(東京都多摩市)を脱塩素したもの
- ⑥ 給餌：体重の約3%の市販配合飼料[中部飼料株式会社]を毎日給餌した。

5 試験方法

1) 暴露条件及び環境条件

- ① 暴露方式：半止水式(24時間ごと全量換水)
- ② 暴露期間：96時間
- ③ 試験個体数：10尾/試験区
- ④ 試験水量：2 l(収容密度；0.50 g/l)
- ⑤ 試験容器：2 l容ガラス製ビーカー(容器のサイズ；内径 約13 cm×高さ 約20 cm)
- ⑥ 試験水温：23.0～24.3 ℃
- ⑦ 照 明：16時間明期
- ⑧ 給 餌：無給餌
- ⑨ 溶存酸素濃度：6.3～8.5 mg/l

(暴露期間中、緩やかな通気を行い、飽和溶存酸素量の60%以上を保った。)

- ⑩ 試験水のpH：6.6～8.1 (pHの調整は行わなかった。)
- ⑪ 希 積 水：水道水(東京都多摩市)を脱塩素したもの

2) 試験濃度の設定

予備試験の結果から、1,000 mg/l の濃度区で死亡及び異常な行動や外観等が認められなかったことに基づき、本試験では、当初、1,000 mg/l の限度試験を設定したが、暴露終了時の観察において、最高試験濃度区の累積死亡率が 70 %となった。

以上の経緯から、本試験 2 回目(再試験 1 回目)では、1,000 mg/l 以下の濃度を公比 1.3 で 5 濃度区(320, 420, 560, 750 及び 1,000 mg/l)を設定した。

なお、予備試験及び本試験1回目の結果は付属資料-1及び2に示した。

3) 試験水の調製

被験物質を希積水に直接添加して各濃度区の試験水を調製した。

対照区は希積水のみとした。

6 観察及び測定方法

1) 試験生物の生死、症状等の観察

暴露開始から、24、48、72及び96時間後にヒメダカの死亡尾数を記録するとともに異常な行動や外観等について記録した。

なお、観察可能な動きがなく、尾柄部に触れて反応が無い個体を死亡とみなした。また、死亡が見られた場合は速やかに取り除いた。

2) 水質の測定

① 希釈水

一般的な水質測定を定期的を実施した。

使用条件は総硬度10～250 mgCaCO₃/l及びpH 6.0～8.5とした。

② 試験水

各試験区の水質として、水温、溶存酸素濃度(以下「DO」と略す。)及びpHを暴露開始時、換水前後及び終了時に測定した。

<測定機器>

- a) 温度計：AP-210[安立計器株式会社]
- b) pH計：HM-21P[東亜ディーケーケー株式会社]
- c) DO計：D0-24P[東亜ディーケーケー株式会社]
- d) 残留塩素比色測定器：OT-I型[理研光学株式会社]

3) 試験水の状態観察

暴露開始時及び最初の換水前の試験水について状態観察を行い、試験水の色調や析出、沈殿物等の有無について記録した。

4) 結果の処理法

本試験の経過については、5の2)項に示した通りであり、試験結果として本試験2回目(再試験1回目)におけるデータを採用した。

- ①LC₅₀(Median Lethal Concentration)：24時間後、48時間後、72時間後及び96時間後のLC₅₀は、最高試験濃度で死亡率が50%未満であったため、算出しなかった。
- ②NOEC(No Observed Effect Concentration)：目視により、対照区と比較して外部形態及び行動に差が認められない最高濃度をNOECとした。

7 試験結果

1) LC₅₀

24, 48, 72及び96時間後のLC₅₀は、全て1,000 mg/l以上であった(表-1)。

2) NOEC

96時間後のNOECは420 mg/lであった。

3) 累積死亡率

96時間後の累積死亡率は、対照区及び320 mg/l、420 mg/l及び560 mg/lで0 %、750 mg/l及び1,000 mg/lで10 %であった。

24, 48, 72及び96時間後の累積死亡率を表-2に示した。また、濃度-死亡率のグラフを図-1に示した。

4) 試験生物の症状等の観察

各濃度区における試験生物の行動及び外観について対照区と比較した。異常な行動及び外観は、対照区、320及び420 mg/lでは観察されなかったが、560 mg/l、750及び1,000 mg/lで水面浮上が観察された。

24, 48, 72及び96時間後の試験生物の症状等を表-3に示した。

5) 水質の測定

① 希釈水

一般的な水質測定を定期的実施した結果を付属資料-3に示した。なお、試験に使用した希釈水の総硬度は61~66 mgCaCO₃/l、pHは8.0であった。

② 試験水

暴露期間中における試験水の水温は23.0~24.3℃、D0は6.3~8.5 mg/l、pHは6.6~8.1であった。

暴露期間中の各試験区の試験水の水温、D0及びpHを表-4~6に示した。

6) 試験水の状態

暴露開始時の試験水は560 mg/l以下の濃度区で無色透明であり、750 mg/l以上の濃度区ではわずかに茶色がかった透明であり、被験物質は試験水中に溶解していることが目視にて観察された。また、24時間後の換水前の試験水は、全濃度区においてわずかに白濁した状態であった。試験水の白濁は、バクテリア等の作用により、試験水中の被験物質が分解されたことにより生じたと推測された。

7) 試験結果に影響を及ぼした可能性のある事項

なし。

8) 試験の妥当性

暴露終了時に対照区の死亡率は0 %であり、暴露期間中の各試験区のD0も飽和濃度の60 %以上であったため、本試験の成立が確認された。