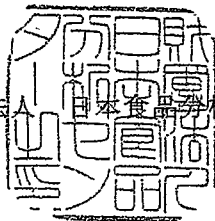


最 終 報 告 書

竹酢液のヒメダカに対する急性毒性試験

平成17年3月31日

財団法人 日本食品分析センター



竹酢液のヒメダカに対する急性毒性試験

試験の要約

竹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、竹酢液のヒメダカに及ぼす影響を評価することを目的として、「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に従い、ヒメダカ(*Oryzias latipes*)に対する96時間急性毒性試験を実施した。

試験には滝沢養魚場(埼玉県鴻巣市)から入手したものを、当センターにおいて自家繁殖させ、順化飼育したヒメダカ(平均全長2.3 cm, 平均体重0.09 g)を用いた。

試験は、10尾/試験区、公比1.3で5濃度区(320, 420, 560, 750及び1,000 mg/l)を設定した。

環境条件は、水温23.0~24.2℃, 溶存酸素濃度6.0~8.5 mg/l, pH4.9~8.1であった。

試験の結果、竹酢液の48及び96時間後のLC₅₀(Median Lethal Concentration)は940 mg/l及び890 mg/lで、96時間後のNOEC(No Observed Effect Concentration)は420 mg/lであった。また、試験生物の症状等として、異常遊泳、不活発及び水面浮上が観察された。

試験責任者

吉安友二



(平成 17 年 3 月 31 日)

目次

表題	1
試験受託番号	1
試験委託者	1
試験責任者	1
試験担当者	1
試験施設	1
試験期間	1
1 試験目的	2
2 試験法ガイドライン	2
3 被験物質	2
4 試験生物	3
5 試験方法	4
6 観察及び測定方法	4
7 試験結果	5
8 試験の妥当性	6
図表	7～10
付属資料-1	予備試験結果 11
付属資料-2	希釈水の水質測定結果 12～13

表 題：竹酢液のヒメダカに対する急性毒性試験

試験受託番号：第105013255号

試験委託者

名 称：環境省

所在地：〒100-8975 東京都千代田区霞ヶ関1丁目2番2号

試験責任者

所 属：環境科学部 環境生物安全課

氏 名：吉安 友二

試験担当者

所 属：環境科学部 環境生物安全課

氏 名：清水 正恵 ， 藤野 仁美

試験施設

名 称：財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

所在地：〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目11番10号

〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目21番6号(別館)

試験期間

試験開始日：平成17年1月7日

実験開始日：平成17年2月28日

実験完了日：平成17年3月4日

試験完了日：平成17年**月**日

1 試験目的

竹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、竹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：竹酢液

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：B15050

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: 24.1~24.2 °C

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：23.0～24.2 °C
- ⑦ 照 明：16時間明期
- ⑧ 給 餌：無給餌
- ⑨ 溶存酸素濃度：6.0～8.5 mg/l(暴露期間中，緩やかに通気を行い，飽和溶存酸素量の60%以上を保った。)
- ⑩ 試験水のpH：4.9～8.1 (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の濃度区ではヒメダカが80%死亡し，320 mg/lの濃度区では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，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，予備試験の結果は付属資料-1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：DO-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

- ①LC₅₀(Median Lethal Concentration)：各試験区のヒメダカの死亡数と試験生物数(10尾)から死亡率(%)を算出し、Binominal法を用いてLC₅₀を算出した。24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、1,000 mg/l以上、940 mg/l, 890 mg/l及び890 mg/lであった(表-1)。

2) NOEC

96時間後のNOECは420 mg/lであった。

なお、異常な行動及び外観は750 mg/l以下の濃度区では観察されなかったが、72時間後の観察において、560 mg/l濃度区で10%の死亡が観察された。経験上、対照区を含む試験区において偶発的に試験生物が死亡するケースはほとんど認められておらず、被験物質又はpHの影響により死亡した可能性が否定できなかったことから、本試験のNOECは420 mg/lとした。

3) 累積死亡率

96時間後の累積死亡率は、対照区、320 mg/l、420及び750 mg/lで0%、560 mg/lで10%、1,000 mg/lで90%であった。

なお、本試験で死亡が観察された濃度区では、試験水中のpHが試験環境条件(6.0~8.5)の範囲を外れていたことから、死亡の原因には、毒性以外にpHの影響が含まれる可能性があるとして推測された。

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、320~750 mg/lでは観察されなかったが、1,000 mg/lで異常遊泳、不活発及び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-2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23.0~24.2℃、D0は6.0~8.5 mg/l、pHは4.9~8.1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320 mg/lの濃度区で無色透明であり、560~1,000 mg/lではわずかに黄色がかっていたが、被験物質は試験水中に溶解していることが目視にて確認された。また、24時間後の換水前の試験水は、すべての濃度区において、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して推測された。

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。