

## V ミジンコ急性遊泳阻害試験

### 目的

本試験は、ミジンコを被験物質に 48 時間暴露し、対照区に対する遊泳阻害率を測定することにより、ミジンコの遊泳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。なお、本試験において、遊泳阻害とはミジンコが試験容器を穏やかに動かしても 15 秒間泳げない状態をいう。

### 1 供試生物

オオミジンコ (*Daphnia magna*) が推奨されるが、*Daphnia pulex* など、他の *Daphnia* 属の種を用いてもよい。

供試ミジンコは、暴露開始時に 24 時間齢未満のものを用いる。また、ばらつきを減らすため、親ミジンコの 1 回目の産仔によるものは使用しない。供試ミジンコは、健康に飼育された親世代（例えば、高死亡率、雄及び抱卵嚢の出現、1 回目の産仔までの期間の遅延、変色等の飼育時に何らかのストレスを受けた兆候がないもの）から得られたものを用い、また、すべて同じ系統のものを用いることとする。

供試ミジンコを得るための親世代のミジンコは、試験条件（光・温度・水）と同じ条件下で飼育されなければならない。もし、試験に用いる水が通常のみジンコを飼育する際に用いられるものと異なる場合は、暴露開始前にじゅん化期間を設けるとよい。じゅん化させるには、暴露開始前に最低 48 時間、ミジンコを試験温度の試験用水で飼育し、生まれた子ミジンコを試験に用いるようにする。

### 2 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。

#### (1) 試験容器

試験容器等、試験溶液と接触する器具はすべてガラス製又は化学的に不活性な材質でできたものを用いる。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物質の場合は、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。

#### (2) 器具

本試験には、溶存酸素計（少量のサンプルで溶存酸素濃度を計測できる微小電極や他の適した器具）、pH 計測器、温度管理に適切な器具等を用いる。

### 3 試験用水

ミジンコの飼育及び試験に適した水ならば、天然水（表流水又は地下水）、脱塩素した水道水又は人工調製水（例：付表 1）のいずれを用いてもよい。また、試験用水は付表 2 の条件を満たすものとする。

ElendtM4、M7 飼育水のようなキレート剤が含まれている水は、金属を含む物質の試験には使用しない。硬度は炭酸カルシウム濃度で 250mg/L 以下とし、pH は 6～9 とする。

試験用水は、試験に使用する前にばっ気を行う。

#### 4 試験溶液

各濃度の試験溶液の調製は、必要量の被験物質を培地等で直接溶解するか、あるいは、適切な濃度の被験物質の原液を調製し、原液を培地等で希釈することにより行う。この他、試験溶液の調製に関しては、Ⅲ総則の2 試験溶液の調製（助剤の使用）によるものとする。

試験は pH を調整せずに行う。pH が 6～9 の範囲でない場合、pH を被験物質添加前の試験用水の pH 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 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。

#### 5 試験条件

##### (1) 試験方式

試験は、止水式、半止水式又は流水式のいずれで行ってもよいが、被験物質の濃度が安定しない際には半止水式又は流水式で行うことが望ましい。

##### (2) 暴露期間

48 時間とする。

##### (3) 収容量と供試数

- ・収容量 1 頭当たり少なくとも 2ml の試験溶液を用いる。
- ・供試数 各試験濃度区及び対照区で少なくとも 20 頭を使用する。この場合、各 5 頭ずつ 4 連に分けることが望ましい。

##### (4) 試験濃度

少なくとも 5 濃度区を等比級数的にとる。公比は 2.2 を超えないことが望ましい。最高試験濃度区では、100 % の遊泳阻害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、助剤対照区を設ける。

##### (5) 試験方法

- ・照明 明暗周期を 16 : 8 時間に設定することが望ましい。被験物質が光に対して不安定な場合は暗条件でもよい。
- ・温度 18～22℃の範囲内に設定し、各試験容器間の変動は±1.0℃以内とする。
- ・溶存酸素濃度 3mg/L を下回ってはならない。暴露期間中は、原則としてばっ気は行わない。
- ・給餌 行わない。

#### 6 被験物質への暴露の開始

各試験容器に、5 (3) で設定した供試数のミジンコを移して暴露を開始する。

#### 7 観察

暴露開始後少なくとも 24、48 時間後にミジンコの遊泳阻害を観察する。ミジンコが試験容器を穏やかに動かしても 15 秒間泳げない場合、遊泳阻害されたとみなす。遊泳阻害の他にも、行動や外見の異常が

見られた場合には記録する。

## 8 被験物質濃度等の測定

### (1) 被験物質濃度の測定

被験物質の濃度は、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、少なくとも 2 回、換水前後に測定を行うことが望ましい。

### (2) 試験環境の測定

対照区及び最高試験濃度区について暴露開始時及び終了時に溶存酸素濃度と pH を測定する。対照区の水温についても、少なくとも暴露開始時及び終了時に測定することとするが、試験水温の変動を監視するために、対照区又は周囲の大気等の温度を暴露期間中に継続して測定し、その変動について記録することが望ましい。また、暴露期間中、pH は通常の場合 1.5 以上変動してはならない。

## 9 限度試験

100mg/L 又は水溶解限度のより低い方の濃度で被験物質が遊泳阻害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、EC<sub>50</sub> 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 20 頭のみジンコ（5 頭ずつ 4 群に分けることが望ましい。）を用い、対照区においても同数を用いる。暴露終了時に遊泳阻害率が 10%を超える場合、正規の試験を行う。また、異常な行動が観察された場合は記録する。

## 10 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。

- ・対照区において、みジンコが 10 %を超えて遊泳阻害されたり、水面に浮いたりしてはならないこと
- ・溶存酸素濃度は、暴露終了時において 3mg/L 以上であること

## 11 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適切な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± 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遊泳阻害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 24 時間及び 48 時間における遊泳阻害率をプロットする。次にプロビット法など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 48 時間における EC<sub>50</sub> を求める。

得られたデータが統計計算を行うのに不十分な場合、全く遊泳阻害を起こさない最高試験濃度と 100% 遊泳を阻害する最低試験濃度の幾何平均を EC<sub>50</sub> の近似値とみなす。

## 1 2 結果のまとめ

試験の結果は様式 8 によりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

付表1 人工調整水

(1) ISO 試験水

(a) 塩化カルシウム溶液

塩化カルシウム二水和物11.76gを希釈水に溶かし1Lとする。

(b) 硫酸マグネシウム溶液

硫酸マグネシウム七水和物4.93gを希釈水に溶かし1Lとする。

(c) 炭酸水素ナトリウム溶液

炭酸水素ナトリウム2.59gを希釈水に溶かし1Lとする。

(d) 塩化カリウム溶液

塩化カリウム0.23gを希釈水に溶かし1Lとする。

(a) ~ (d) の溶液各々25mLを混合し、希釈水で全量を1Lとする。

希釈水には適切な純水（例えば、イオン交換水、蒸留水又は逆浸透水）を用いることとする。希釈水の電導度は  $10 \mu \text{ S/cm}$  を越えてはならない。すべての試薬は分析用特級とする。

(2) Elendt M4 及び M7 飼育水

各飼育水は飼育水原液 I（微量成分）と飼育水原液 II（主成分）を希釈水（適切な純水、例えば、脱イオン水、蒸留水又は逆浸透水を用いる。）に加えて調製する。

①飼育水原液 I の調製

各物質の飼育水原液 I は、表 1 の上欄の物質毎にそれぞれ中欄に示した量を 1 L の希釈水に添加し、溶解させて調製する。エチレンジアミン四酢酸鉄（II）溶液は、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム・二水和物と硫酸鉄（II）七水和物を別々に調製した後混合し、混合後すぐにオートクレーブにかけて調製する。

各物質の飼育水原液 I の調製した後、それぞれから表 1 の下欄に示す量を分取し、混合し、希釈水で全量を 1 L とし、これを「飼育水原液 I 混合液」とする。

表 1 飼育水原液 I の構成物質と添加量等

| 飼育水原液 I<br>(単物質) | 水に添加<br>する量<br>(単位：<br>mg / L) | 飼育水原液 I 混合液調製のための添加量 |            |               |            |
|------------------|--------------------------------|----------------------|------------|---------------|------------|
|                  |                                | Elendt M4            |            | Elendt M7     |            |
|                  |                                | 添加量<br>(mL/L)        | 最終希釈率<br>* | 添加量<br>(mL/L) | 最終希釈率<br>* |
| ホウ酸              | 57,190                         | 1.0                  | 20,000 倍   | 0.25          | 80,000 倍   |
| 塩化マンガン四水和物       | 7,210                          | 1.0                  | 20,000 倍   | 0.25          | 80,000 倍   |
| 塩化リチウム           | 6,120                          | 1.0                  | 20,000 倍   | 0.25          | 80,000 倍   |
| 塩化ルビジウム          | 1,420                          | 1.0                  | 20,000 倍   | 0.25          | 80,000 倍   |
| 塩化ストロンチウム六水和     | 3,040                          | 1.0                  | 20,000 倍   | 0.25          | 80,000 倍   |

|                                   |       |      |          |      |          |
|-----------------------------------|-------|------|----------|------|----------|
| 物                                 |       |      |          |      |          |
| 臭化ナトリウム                           | 320   | 1.0  | 20,000 倍 | 0.25 | 80,000 倍 |
| モリブデン酸二ナトリウム<br>二水和物              | 1,260 | 1.0  | 20,000 倍 | 0.25 | 80,000 倍 |
| 塩化銅二水和物                           | 335   | 1.0  | 20,000 倍 | 0.25 | 80,000 倍 |
| 塩化亜鉛                              | 260   | 1.0  | 20,000 倍 | 1.0  | 20,000 倍 |
| 塩化コバルト六水和物                        | 200   | 1.0  | 20,000 倍 | 1.0  | 20,000 倍 |
| ヨウ化カリウム                           | 65    | 1.0  | 20,000 倍 | 1.0  | 20,000 倍 |
| 亜セレン酸ナトリウム                        | 43.8  | 1.0  | 20,000 倍 | 1.0  | 20,000 倍 |
| メタバナジン酸アンモニウム                     | 11.5  | 1.0  | 20,000 倍 | 1.0  | 20,000 倍 |
| エチレンジアミン四酢酸<br>(Ⅱ) 溶液             |       | 20.0 | 1,000 倍  | 5.0  | 4,000 倍  |
| エチレンジア<br>ミン四酢酸二<br>ナトリウム二<br>水和物 | 5,000 | —    |          | —    |          |
| 硫酸鉄 (Ⅱ)<br>七水和物                   | 1,991 | —    |          | —    |          |

\*最終希釈率：Elendt M4 又は M7 飼育水に対する飼育水原液Ⅰの最終的な希釈率

## ②飼育水原液Ⅱの調製

飼育水原液Ⅰ混合液を除く各物質の飼育水原液Ⅱは、表2の上欄の物質毎にそれぞれ中欄に示した量を1Lの希釈水に添加し、溶解させて調整する。なお、混合ビタミン保存溶液は、調整後、少量ずつ凍結保存し、使用する直前に飼育水に加える。

## ③各飼育水の調製

各飼育水は、各物質の飼育水原液Ⅱから表2の下欄に示す量を分取し、混合し、希釈水で全量を1Lとして調製する。なお、各飼育水を調製するときには、塩類の沈殿を避けるために、500～800ml程度の希釈水に分取量の飼育水原液を加え、その後に希釈水を足して1Lに合わせる。

表2 飼育水原液Ⅱの構成物質と添加量等 (Elendt M4 及び M7 共通)

|                   |                        |                          |       |
|-------------------|------------------------|--------------------------|-------|
| 飼育水原液Ⅱ<br>(主成分原液) | 水に添加する量<br>(単位：mg / L) | 飼育水 (人工調製水)<br>調製のための添加量 |       |
|                   |                        | Elendt M4 及び M7          |       |
|                   |                        | 添加量*1                    | 最終希釈率 |

|                               |         | (mL/L) | *2       |
|-------------------------------|---------|--------|----------|
| 飼育水原液 I 混合液*                  | —       | 50     | 20 倍     |
| *Elendt M4 と M7 で成分比率が異なる事に注意 |         |        |          |
| 塩化カルシウム二水和物                   | 293,800 | 1.0    | 1,000 倍  |
| 硫酸マグネシウム七水和物                  | 246,600 | 0.5    | 2,000 倍  |
| 塩化カリウム                        | 58,000  | 0.1    | 10,000 倍 |
| 炭酸水素ナトリウム                     | 64,800  | 1.0    | 1,000 倍  |
| ケイ酸二ナトリウム九水和物                 | 50,000  | 0.2    | 5,000 倍  |
| 硝酸ナトリウム                       | 2,740   | 0.1    | 10,000 倍 |
| リン酸第一カリウム                     | 1,430   | 0.1    | 10,000 倍 |
| リン酸第二カリウム                     | 1840    | 0.1    | 10,000 倍 |
| 混合ビタミン保存溶液                    | —       | 0.1    | 10,000 倍 |
| 塩酸チアミン                        | 750     |        | 10,000 倍 |
| シアノコバラミン<br>(B12)             | 10      |        | 10,000 倍 |
| ビオチン                          | 7.5     |        | 10,000 倍 |

\*1 添加量：Elendt M4 及び M7 飼育水を調製するための添加量 (mL/L)

\*2 最終希釈率：M4 又は M7 飼育水に対する飼育水原液 II の最終的な希釈率

付表 2 試験用水の化学的条件

| 物質名            | 濃度条件             |
|----------------|------------------|
| 粒子状物質          | 2 0 mg/L 未満      |
| 全有機炭素          | 2 mg/L 未満        |
| 非イオン化アンモニア     | 1 $\mu$ g/L 未満   |
| 塩素             | 1 0 $\mu$ g/L 未満 |
| 全有機リン系農薬       | 5 0 ng/L 未満      |
| 全有機塩素系農薬及び PCB | 5 0 ng/L 未満      |
| 全有機塩素          | 2 5 ng/L 未満      |