

VI 魚類急性毒性試験

目的

本試験は、魚類を被験物質に 96 時間暴露し、死亡率を測定することにより、魚類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。

1 供試生物

メダカ（ヒメダカ）が推奨されるが、例えば附表 1 に示す魚種などを使用してもよい。魚は良好な健康状態にあり、外見上の奇形があってはならない。

附表 1

| 魚種 | 推奨試験温度 (°C) | 試験魚の推奨全長 (cm) |
|--|----------------|------------------|
| <i>Brachydanio rerio</i> ゼブラフィッシュ | 21-25 | 2.0 ± 1.0 |
| <i>Pimephales promelas</i> ファットヘッドミノー | 21-25 | 2.0 ± 1.0 |
| <i>Cyprinus carpio</i> コイ | 20-24 | 3.0 ± 1.0 |
| <i>Oryzias latipes</i> メダカ | 21-25 | 2.0 ± 1.0 |
| <i>Poecilia reticulata</i> グッピー | 21-25 | 2.0 ± 1.0 |
| <i>Lepomis macrochirus</i> ブルーギル | 21-25 | 2.0 ± 1.0 |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i> ニジマス | 13-17 | 5.0 ± 1.0 |

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。試験容器は、推奨収容量に対し適切な大きさのものを用いる。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、温度調節のための適切な器具又は装置を用いる。

3 試験用水

魚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（注参照）のいずれを用いてもよい。全硬度は炭酸カルシウム濃度 10～250mg/L で、pH6.0～8.5の水が望ましい。人工調製水の調製に用いる試薬は分析用の特級であり、脱イオン水及び蒸留水の電導度は 10 μ S/cm を超えてはならない。

4 じゅん化

すべての供試魚を、少なくとも試験に使用する 12 日前に入手し、じゅん化しなければならない。48 時間の観察期間に続いて、暴露開始前に少なくとも 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じゅん化する。

- ・照明 一日当たり 12～16 時間
 - ・温度 供試魚種の適温(表 1 参照)
 - ・酸素濃度 飽和酸素濃度の少なくとも 80 %
 - ・給餌 暴露開始の 24 時間前まで、週当たり 3 回又は毎日
- じゅん化期間中の死亡率を記録し、供試魚に以下の基準を適用する。
- ・じゅん化期間中の連続した 7 日間で全体の死亡率が 10%を超えた場合、試験に使用しない。
 - ・じゅん化期間中の連続した 7 日間で全体の死亡率が 5～10%の間の場合、7 日間延長してじゅん化する。
 - ・じゅん化期間中の連続した 7 日間で全体の死亡率が 5%より低い場合、試験に使用できる。

5 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 の調整をせずに行う。被験物質を添加後、試験溶液の pH に顕著な変化が認められる場合、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。

6 試験条件

(1) 試験方式

試験は流水式又は半止水式で行うことが望ましい。また、被験物質の濃度が安定しない際には流水式を用いることが望ましい。

(2) 暴露期間

96時間とする。

(3) 収容量と供試魚の数

- ・収容量 止水式及び半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。
- ・供試魚の数 各試験濃度区及び対照区で少なくとも7尾の供試魚を用いる。

(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、すべての魚に致死影響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) 飼育方法

- ・温度 供試魚の適温(表参照)で、2℃の範囲内で一定に保つ。
- ・照明 一日当たり12～16時間
- ・溶存酸素濃度 飽和酸素濃度の60%を下回ってはならない。被験物質の顕著な消失がなければばっ気を行ってもよい。
- ・給餌 行わない。
- ・かく乱 魚の行動を変化させるようなかく乱は避ける。

7 被験物質への暴露の開始

各試験容器に、6(3)に基づき設定した供試数のじゅん化された魚を移して暴露を開始する。

8 観察

暴露開始後少なくとも24、48、72、96時間後に魚の様子を観察する。観察可能な動き(例えば、鰓蓋の動きなど)がなく、尾柄部に触れて反応がない場合には魚は死亡しているとみなす。観察時に死亡魚を取り除き死亡率を記録する。暴露開始後、3時間と6時間後にも観察することが望ましい。平衡、遊泳行動、呼吸機能、体色などに異常が観察された場合は記録しておく。

9 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、原則として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

pH、溶存酸素濃度、水温は少なくとも毎日 1 回測定する。

1 0 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致死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、 LC_{50} がこの濃度より大きいことを示すことができる。限度試験は最少で 7 尾を用い、対照区においても同数を用いる。暴露終了時まで死亡が観察された場合、正規の試験を行う。また、亜致死的な影響が観察された場合は記録する。

1 1 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。

- ・対照区の死亡率が暴露終了時に 10 % (10 尾より少ない数を使った場合は 1 尾) を超えないこと
- ・溶存酸素濃度が暴露期間中少なくとも飽和酸素濃度の 60% を維持していること
- ・被験物質の濃度が暴露期間中十分維持されていることが明らかであること。

1 2 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 $\pm 20\%$ 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累積死亡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各暴露期間における累積死亡率をプロットする。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 96 時間における LC_{50} を算出する。さらに、各観察時毎の LC_{50} を算出することが望ましい。

得られたデータが統計計算を行うのに不十分な場合、全く死亡を起こさない最高試験濃度と 100% 死亡を起こす最低試験濃度の幾何平均を LC_{50} の近似値とみなす。

1 3 結果のまとめ

試験の結果は様式 9 によりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

注 人工調製水

OECD (ISO6341-1982) の組成

(a) 塩化カルシウム溶液

塩化カルシウム二水和物11.76gを脱イオン水に溶かし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を脱イオン水に溶かし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を脱イオン水に溶かし1Lとする。

(d) 塩化カリウム溶液

塩化カリウム0.23gを脱イオン水に溶かし1Lとする。

(a) ~ (d) の溶液各々25mLを混合し、脱イオン水で全量を1Lとする。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。また、カルシウムとマグネシウムイオンの比は4 : 1であり、ナトリウムとカリウムイオンの比は10 : 1である。この溶液の酸容量 KS4.3 は 0.8mmol/L である。

脱イオン水の電導度は $10 \mu \text{ S/cm}$ を越えてはならない。すべての試薬は分析用等級とする。

調製した人工調製水は、溶存酸素が飽和に達するまでばっ気し、使用前までばっ気をせずに約2日間貯蔵する。