

国内外で主に用いられている淡水生物に係る急性毒性試験

1. 藻類に係る主な急性毒性試験の概要

生物種	番号	国内/海外	試験対象毒性等		根拠法制度・規格等	制度等での位置付け	試験期間	測定、結果の算出・評価等 ^{*1}		
			毒性試験	成長段階				観測または測定	結果の算出	試験の有効性
ムレミカツキモ (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> 、旧名 <i>Selenastrum capricornutum</i>) (緑藻)	①	国内	藻類生長阻害試験	指数増殖期	化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律(化審法)	新規化学物質での審査での推奨種	72時間	生物量は、少なくとも暴露開始後24、48及び72時間後に測定する。被験物質の濃度は、少なくとも最低及び最高試験濃度区並びに予測されるEC50付近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とする。また、暴露期間中に設定濃度より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。試験溶液のpHを暴露開始時及び終了時に測定する。暴露期間中、対照区(助剤対照区を含む。)のpHは通常の場合、1.5以上変動してはならない。	生長速度に対する半数影響濃度(ErC50)及び無影響濃度(NOEC)	・対照区(助剤対照区を含む。)の生物量が暴露期間中に少なくとも16倍に増殖すること。 ・対照区の毎日の生長速度の変動係数(助剤対照区の毎日の生長速度の変動係数を含む。)が暴露期間を通じて35%を超えないこと。 ・対照区の繰り返し間の生長速度の変動係数(助剤対照区の繰り返し間の生長速度の変動係数を含む。)が7%を超えないこと
	②	国内	藻類生長阻害試験	指数増殖期	農薬取締法	水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準の設定における対象生物(必須)	72時間	(1)生物量の測定 個々の試験容器中の生物量は、暴露開始後24時間間隔で暴露終了時まで測定する。また、外見の異常が見られた場合には記録する。 (2)被験物質濃度の測定 ①原体を被験物質として用いた場合には、各試験濃度区ごとに被験物質の濃度を少なくとも暴露開始時及び終了時に測定する。 ②被験物質濃度区ごとに各容器から試験液を等量採取して混合し、測定用試料に供する。繰り返し間に差がないと予想される場合には、1容器から採取してもよい。 (3)環境条件の測定 ①各試験区(試験濃度区、対照区)について、試験培地の水温及びpHを測定する。 ②測定は、少なくとも暴露開始時及び終了時に行う。	生長速度に対する半数生長阻害濃度(ErC50)及び無影響濃度(NOEC)	(1)対照区の生物量は、試験開始72時間後において、試験開始時における生物量の16倍以上に増加していなければならない。 (2)対照区において、各繰り返し毎に各日(0~1日、1~2日、2~3日)について求めた生長速度の変動係数を算出する。これらの変動係数の平均値が35%を超えてはならない。 (3)対照区において、各繰り返し毎に試験期間中(0~3日)の平均生長速度を求め、その変動係数が7%を超えてはならない。
	③	国内・海外(OECD)	Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test 藻類生長阻害試験	指数増殖期	経済協力開発機構(Organisation for Economic Co-operation and Development: OECD)テストガイドライン201(2011)		72時間	生物量:毎日測定 pH:試験開始時、終了時、1.5以上変動してはならない。 被験物質の濃度:試験開始時とばく露状態を捉えるために測定 設定値から20%未満の場合は、EC50付近の試験濃度、初期濃度と最終濃度を測定すること 濃度が設定の80-120%以内に残らない場合、初期濃度と最終濃度をすべての濃度区で行うことが望ましい。揮発性物質、不安定な試験物質あるいは強く吸着する試験物質については、暴露期間中の24時間間隔で追加のサンプリングを行うことが望ましい。	藻類の生長に対する試験物質の影響を測定すること。 生長阻害は2つの反応変数による。 ①平均生長速度:1日当たりの値を算出して表現、試験期間中の生長の対数増加に基づき算出 ②収量:最終的な生物量から初期の生物量を差し引いた値 これらの値は比較できない。 平均生長速度から、x%阻害、例えば50%の阻害を引き起こす濃度、ErCx(例えばErC50)として表現。 最低観察影響濃度(LOEC)および無影響濃度(NOEC)は、統計的に測定	・対照区の生物量は、試験開始72時間後において、試験開始時における生物量の16倍以上に増加していなければならない。これは、0.92 day ⁻¹ に該当する。推奨種の生長速度は通常この値より高いが、生長速度が遅く種類については、16倍以上でなければならない。その場合、16倍を満足するため、試験期間を延長すべきである。16倍に達しており、また、指数関数的な生長を維持するため、試験期間を48時間にしてもよい。
	④	海外(米国)	Standard Guide for Conducting Static 96-h Toxicity Tests with Microalgae 微細藻類を用いた96時間の止水式毒性試験を行うための標準ガイド		ASTM 1218-97		96時間	細胞数またはクロロフィルaを測定する。 →IC50の計算の際、 現存量に基づく場合→試験終了時に生物量を測定。 生長率もしくは生長曲線の面積に基づく場合→試験期間中毎日測定。 pH:試験開始時・終了時に測定(コントロール、最高、中間、最低濃度区)。 室内温度:一時間おきに測定、もしくは毎日最高温度と最低温度を測定。 光フルエンス率:試験前に測定。 被験物質濃度:試験開始と終了後に測定。	IC50	対照区の細胞数が、試験開始時の16倍以上に増加していること。
イカダモ属(<i>Desmodesmus subspicatus</i> 、旧名 <i>Scenedesmus subspicatus</i>) (緑藻)	⑤	国内	藻類生長阻害試験	指数増殖期	化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律(化審法)	新規化学物質での評価に用いてもよい	72時間	①と同じ	①と同じ	①と同じ
	⑥	国内	藻類生長阻害試験	指数増殖期	農薬取締法	水産動植物登録保留基準策定において、培養及び試験に都合がよく、試験の妥当性を満たす場合は用いてもよい	72時間	②と同じ	②と同じ	②と同じ
	⑦	国内・海外(OECD)	Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test 藻類生長阻害試験	指数増殖期	OECD TG201		72時間	③と同じ	③と同じ	③と同じ
	⑧	海外(米国)	微細藻類を用いた96時間の止水式毒性試験を行うための標準ガイド		ASTM 1218-97		96時間	④と同じ	④と同じ	④と同じ

*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

生物種	番号	国内/ 海外	その他試験実施に係る技術的条件等*1								
			試験方式	試験媒体	助剤の使用	試験濃度	生物数/密度	給餌	連数	試験温度	照明
ムレミカツキモ (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> 、旧名 <i>Selenastrum capricornutum</i>) (緑藻)	①	国内	止水式	OECD培地 (OECDテストガイドライン 201 Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test(2006))又は AAP(AGP) 培地 (U.S.EPA:Alga Assay Procedure:Bottle Test, National Environmental Research Center, Corvallis, Oregon(1971))を用いることが望ましい。	被験物質の原液は助剤を使用せずに調製することが望ましい。被験物質を直接水又は培地等に溶解して原液を調製することが困難な場合には、超音波等の機械的な分散によるか、あるいは、低毒性の有機溶剤等の助剤(溶剤又は分散剤をいう。以下同じ。)を使用してもよい。ただし、原則として界面活性作用のある分散剤は使用しない。	少なくとも5濃度区を等比級数的にとる。この濃度範囲で、0~75%の生長阻害を起こす範囲が含まれることが望ましい。	乾燥重量が0.5mg/Lを超えないように設定する。 $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ cells/mL	-	各試験濃度区について3連とする。対照区については6連(助剤対照区を設けている場合には、対照区については3連、助剤対照区については6連)で試験を実施することが望ましい。	21~24°Cの範囲内で設定し、培養器又は培養室内の変動は±2°C以内とする	60-120mE/m ² /s(白色又は屋光色の蛍光灯を用い、連続的かつ均一に照射する。)
	②	国内	止水式	同上	難水溶性原体の場合、以下のいずれかの方法により試験培地を調整する。 ア 被験物質を有機溶剤等の助剤に溶かした試験原液を用いて試験培地を調整する。 この場合、助剤は、試験生物に対して毒性が弱く使用濃度で供試生物に対して有害性が認められず、かつ、被験物質の性質を変えないものを用いる。 助剤の試験液中濃度は、原則として全試験濃度区で一定とし、100mg/L(又は0.1ml/L)を超えないことが望ましい。	① 等比級数的に少なくとも5濃度区を設ける。 ② 試験濃度及び濃度公比は、予備試験の結果から定める。公比は3.2を超えないことが望ましい。 ③ 濃度範囲には、供試藻類の生長が75%以上阻害される濃度と全く阻害されない濃度を少なくともそれぞれ1濃度ずつ、藻類の生長が一部阻害される濃度が少なくとも2濃度含まれることが望ましい。	初期生物量は0.5mg/Lを超えないものとし、試験培地の初期細胞濃度は、 $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ cells/mlが適当である。	-	各試験濃度区は3連以上とし、対照区(助剤を使用した場合は、助剤対照区)については試験濃度区の2倍の連数が望ましい。	設定温度は21~24°Cとし、暴露期間中の変動範囲は±2°C以内とする。	連続的に均一照射することとし、液面付近で波長400~700nmの測定範囲で60~120 μE/m ² /s(4440~8880lux)程度の照度が望ましい。
	③	国内・海外(OECD)	止水式	同上		・試験濃度及び濃度公比は、予備試験の結果から定める。公比は3.2を超えないことが望ましい。 ・濃度範囲には、供試藻類の生長が75%以上阻害される濃度と全く阻害されない濃度を少なくともそれぞれ1濃度ずつ、藻類の生長が一部阻害される濃度が少なくとも2濃度含まれることが望ましい。	$5 \times 10^3 - 10^4$ cells/mL	-	対照区(助剤対照区)少なくとも3連とするが、理想的には濃度区の2倍(6連)であること、濃度区3連	21-24°C±2°Cで維持	連続照明、一定の蛍光性を有する照明。coolwhiteかdaylightタイプ。 種類により強度は異なる。±15%を維持すること。 ・緑藻類の推奨種: 60-120 μE・m ² ・s ⁻¹ (coolwhite で4440-8880 luxに相当)
	④	海外(米国)	止水式	濾過、脱イオン水、または蒸留水に適量の成分を加える。試験目的に応じて、天然水を用いることができる。	試験生物に影響を与えない、最小限の量に抑える。 有機溶剤の濃度は0.5mL/L以下	24±2°C	最初に接種する細胞密度。 <i>Selenastrum capricornutum</i> 及びその他の緑藻類: 1-2 × 10 ⁴ cells/mL <i>Navicula pelliculosa</i> : 1-2 × 10 ⁴ cells/mL <i>Microcystis aeruginosa</i> : 5 × 10 ⁴ cells/mL <i>Anabaena flos-aquae</i> : 1-2 × 10 ⁴ cells/mL Saltwater Species: 1-2 × 10 ⁴ cells/mL	-		24±2°C	白色蛍光灯による連続照明。 淡水珪藻及び緑藻の推奨種: 60 μmol m ⁻² s ⁻¹ (4300lm/m ²) 淡水藍藻の推奨種: 30 μmol m ⁻² s ⁻¹ (2150lm/m ²)
イカダモ属(<i>Desmodesmus subspicatus</i> 、旧名 <i>Scenedesmus subspicatus</i>) (緑藻)	⑤	国内	①と同じ	①と同じ	①と同じ	①と同じ	2 ~ 5 × 10 ³ cells/mL	-	①と同じ	①と同じ	①と同じ
	⑥	国内	②と同じ	②と同じ	②と同じ	②と同じ	初期生物量は0.5mg/Lを超えない。細胞数に関する具体的な記載なし	-	②と同じ	②と同じ	②と同じ
	⑦	国内・海外(OECD)	③と同じ	③と同じ	③と同じ	③と同じ	初期生物量は0.5mg/Lを超えない。 $2 \sim 5 \times 10^3$ cells/mL	-	③と同じ	③と同じ	③と同じ
	⑧	海外(米国)	④と同じ	④と同じ	④と同じ	④と同じ	④と同じ	-	④と同じ	④と同じ	④と同じ

*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

生物種	番号	国内/ 海外	試験対象毒性等		根拠法制度・規格等	制度等での位置付け	試験期間	測定、結果の算出・評価等 ^{*1}		
			毒性試験	成長段階				観測または測定	結果の算出	試験の有効性
フナガタケイソウ属 (<i>Navicula pelliculosa</i>) (珪藻)	⑨	国内・海外 (OECD)	Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test 藻類生長阻害試験	指数増殖期	OECD TG201		72時間	③と同じ	③と同じ	③と同じ
アナベナ属 (<i>Anabaena flos-aquae</i>) (藍藻)	⑩	国内・海外 (OECD)	Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test 藻類生長阻害試験	指数増殖期	OECD TG201		72時間	③と同じ	③と同じ	③と同じ
シネコックス属 (<i>Synechococcus leopoliensis</i>) (藍藻)	⑪	国内・海外 (OECD)	Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test 藻類生長阻害試験	指数増殖期	OECD TG201		72時間	③と同じ	③と同じ	③と同じ
クロレラ属 (<i>Chlorella vulgaris</i>) (緑藻)	⑫	海外 (米国)	微細藻類を用いた96時間の止水式毒性試験を行うための標準ガイド		ASTM 1218-97		96時間	④と同じ	④と同じ	④と同じ
マイクロキスチス属 (<i>Microcystis aeruginosa</i>) (藍藻)	⑬									
アナベナ属 (<i>Anabaena flos-aquae</i>) (藍藻)	⑭									
フナガタケイソウ属 (<i>Navicula pelliculosa</i>) (珪藻)	⑮									

*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

生物種	番号	国内/ 海外	その他試験実施に係る技術的条件等 ^{*1}								
			試験方式	試験媒体	助剤の使用	試験濃度	生物数/密度	給餌	連数	試験温度	照明
フナガタケイソウ属 (<i>Navicula pelliculosa</i>) (珪藻)	⑨	国内・海外 (OECD)	③と同じ	③と同じ	③と同じ	③と同じ	初期生物量は0.5mg/Lを超えない。 10 ⁴ cells/mL	-	③と同じ	③と同じ	連続照明、一定の蛍光性を有する照明。coolwhiteかdaylightタイプ。 種類により強度は異なる。±15%を維持すること。
アナベナ属 (<i>Anabaena flos-aquae</i>) (藍藻)	⑩	国内・海外 (OECD)	③と同じ	③と同じ	③と同じ	③と同じ	初期生物量は0.5mg/Lを超えない。 10 ⁴ cells/mL	-	③と同じ	③と同じ	光強度が高い場合に阻害を受ける種類: 平均40-60 μE・m ² ・s ⁻¹
シネココックス属 (<i>Synechococcus leopoliensis</i>) (藍藻)	⑪	国内・海外 (OECD)	③と同じ	③と同じ	③と同じ	③と同じ	初期生物量は0.5mg/Lを超えない。 5 × 10 ⁴ ~ 10 ⁵ cells/mL	-	③と同じ	③と同じ	連続照明、一定の蛍光性を有する照明。coolwhiteかdaylightタイプ。 種類により強度は異なる。±15%を維持すること。
クロレラ属 (<i>Chlorella vulgaris</i>) (緑藻)	⑫	海外 (米国)	④と同じ	④と同じ	④と同じ	④と同じ	④と同じ	-	④と同じ	④と同じ	④と同じ
マイクロキスチス属 (<i>Microcystis aeruginosa</i>) (藍藻)	⑬										
アナベナ属 (<i>Anabaena flos-aquae</i>) (藍藻)	⑭										
フナガタケイソウ属 (<i>Navicula pelliculosa</i>) (珪藻)	⑮										

*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

2. 無脊椎動物に係る主な急性毒性試験の概要

生物種	番号	国内/海外	試験対象毒性等		根拠法制度・規格等	制度等での位置付け	試験期間	測定、結果の算出・評価等*1		
			毒性試験	成長段階				観測または測定	結果の算出	試験の有効性
オオミジンコ (<i>Daphnia magna</i>)	①	国内	ミジンコ類に対する急性遊泳阻害試験	ふ化後24時間未満	化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律(化審法)	新規化学物質の審査における推奨種(必須)	48時間	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。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。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。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。	暴露期間48時間における遊泳阻害に対する半数影響濃度(EC50)	・対照区において、ミジンコが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。
	②	国内	ミジンコ類急性遊泳阻害試験	生後24時間未満	農薬取締法	水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準の設定における対象生物(必須)	48時間	(1) 供試生物の一般状態の観察 暴露開始24時間後及び48時間後における遊泳阻害の有無について観察し記録する。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。 (2) 被験物質濃度の測定 ① 原体を被験物質として用いた場合には、各試験濃度区における被験物質の濃度を少なくとも暴露開始時、暴露終了時、換水前及び換水後に測定する。 ② 被験物質濃度は、暴露期間中、設定濃度の80%以上であることが望ましい。 (3) 環境条件の測定 ① 試験に先立って希釈水の水质を確認する。 ② 各試験区における試験液の水温、溶存酸素濃度及びpHを少なくとも暴露開始時、暴露終了時、換水前及び換水後に測定する。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。	半数遊泳阻害濃度(EC50)	(1) 暴露期間中において対照区の遊泳阻害率が10%を超えてはならない。 (2) 暴露期間中において10%を超える対照区のミジンコが脱色、水面に浮いているなどの異常な症状、行動を示してはならない。 (3) 溶存酸素濃度は暴露終了時において、3mg/L以上でなければならない。
	③	国内・海外(OECD)	Daphnia sp., Acute Immobilisation Test	ふ化後24時間未満	経済協力開発機構(Organisation for Economic Co-operation and Development: OECD)テストガイドライン201(2011)		48時間	・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。 ・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。 ・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。 ・pH範囲は6-9とし、これから逸脱する場合は、pHを調整する試験を実施することが望ましい。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。	遊泳阻害に対する半数影響濃度(EC50)	・対照区において、ミジンコが10%を超えて遊泳阻害されてはならないこと(10パーセント以上の個体が遊泳阻害あるいは疾病あるいはストレス(例えば変色、水の表面でトラップするよう異常な挙動を示す場合)。 ・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。
	④	海外(米国)	DAPHNIA PULEX AND D. MAGNA ACUTE TOXICITY TESTS(ミジンコ及びオオミジンコ急性毒性試験)	24時間齢未満	米国 水質清浄法(Clean Water Act: CWA)402条NPDES	事業場排水等排出認可	24,48,96時間(利用可能な方式)	【採水、試験容器】 ○サンプリング及び保持容器 排水:採集時期の36時間内で最初に採取されるグラブ又は混合サンプル 排出先水域水:同上 ○サンプル容量 1L ○試験容器の大きさ 30mL(推奨される最小サイズ) ○試験容量 15mL(推奨される最低容量) 【生物観察等】 ○不安定な水泳、反応の損失、変色、過度の粘液産生、呼吸亢進、不透明な眼球、背曲がり、出血、脱皮および共食いのような、外観および行動を毎日記録 ○試験開始後早い時間に死亡を確認すること、また、死亡個体は速やかに除去すること 【試験環境の測定】 ○止水式 ・最低最高濃度区、希釈水で試験開始時と試験原液調製時、試験終了時にpH、塩分、導電率、残留塩素の合計を測定する。 ・DO、pH、水温はすべての濃度区で毎日測定 ・対照区、最高濃度区では試験開始時と換水時に全アルカリと全硬度の測定が推奨 ○流水式 ・最高濃度区でpH、塩分、導電率、全アルカリ、全硬度、残留塩素合計を測定 ・DOと水温は対照区と全ての濃度区で毎日測定	排水:死亡 排出先水域水:死亡	対照区の生残率が90%を超えること

*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

生物種	番号	国内/ 海外	その他試験実施に係る技術的条件等*1								
			試験方式	試験媒体	助剤の使用	試験濃度	生物数/密度	給餌	連数	試験温度	照明
オオミジンコ (<i>Daphnia magna</i>)	①	国内	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。	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のいずれを用いてもよい。	被験物質の原液は助剤を使用せずに調製することが望ましい。被験物質を直接水又は培地等に溶解して原液を調製することが困難な場合には、超音波等の機械的な分散によるか、あるいは、低毒性の有機溶剤等の助剤(溶剤又は分散剤をいう。以下同じ。)を使用してもよい。ただし、原則として界面活性作用のある分散剤は使用しない。	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。	各試験濃度区及び対照区で少なくとも20頭を使用する。 1頭当たり少なくとも2mlの試験溶液を用いる。	なし	各5頭ずつ4連に分けることが望ましい。	8～22℃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。	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。
	②	国内	止水式、半止水式又は流水式により試験を行う。	① 試験に用いる水は、有害物質等試験の妨げになるものを含まず、飼育に用いた水と同じ供給源のもので、ミジンコが良好に生存し、繁殖できる水質であることが確認されているものを用いる。 ② 脱塩素水道水、天然水又は人工調製水を用いる。 ③ 使用前には十分に暴気するとともに、温度調節を行う。 ④ Elendt M4、M7培地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。	難水溶性原体の場合、以下のいずれかの方法により試験培地を調整する。 ア 被験物質を有機溶剤等の助剤に溶かした試験原液を用いて試験培地を調整する。 この場合、助剤は、試験生物に対して毒性が弱く使用濃度で供試生物に対して有害性が認められず、かつ、被験物質の性質を変えないものを用いる。 助剤の試験液中濃度は、原則として全試験濃度区で一定とし、100mg/L(又は0.1ml/L)を超えないことが望ましい。	ア等比級数的に少なくとも5濃度区を設ける。公比は2.2を超えないことが望ましい。 イ試験濃度及び濃度公比は、予備試験の結果から定める。 ウ濃度範囲には、供試生物のすべてを遊泳阻害する濃度と全く遊泳阻害しない濃度が少なくともそれぞれ1濃度、一部を遊泳阻害する濃度が少なくとも2濃度含まれることが望ましい。	試験区ごとに少なくとも20頭の供試生物を使用する。 ミジンコ1頭当たり5ml以上とする。	なし	各5頭ずつ4連に分けることが望ましい。	設定温度は20℃とし、試験期間中の変動範囲は±1℃以内とする。	16時間明期が望ましい。
	③	国内・海外(OECD)	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。	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のいずれを用いてもよい。	・可能な限り、溶剤、乳化剤あるいは分散剤は利用しない。 ・助剤の使用はガイダンス文書23に従う。	・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、対照区に加え助剤対照区を設ける。 ・試験物質濃度は溶解度を超えるべきではない。	各試験濃度区及び対照区で少なくとも20頭を使用する。 1頭当たり少なくとも2mlの試験溶液を用いる。	なし	各5頭ずつ4連に分けることが望ましい。	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。	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。
	④	海外(米国)	止水式、半止水式、流水式(利用可能な方式)(換水する場合は)48時間後換水	事業場排水又は排出先公共用水		排水:5濃度区+対照区 排出先水域水:100%河川水、対照区 希釈系列 排水:希釈率0.5以上 排出先水域水:なし、あるいは希釈率0.5以上	供試生物数/濃度区:20頭/濃度区(排水及び排出先水域水) 供試生物数/試験容器:5頭/容器(排水及び排出先水域水)	試験前の飼育期間中にはマス用餌料(yeast-cerophyl-trout-chow:YTC)と緑藻(Selenastrum)を給餌すること、新たに産出した仔虫は、試験前に最低2時間餌料をとるようにすべきである。換水の前、2時間はYTCと緑藻をそれぞれ0.1mLずつ加えること。	連数/濃度区:4連/濃度区(排水及び排出先水域水)	20±1℃、25℃±1℃(推奨) 試験温度の変動は試験期間中3℃を上回らないこと(すなわち、最大温度-最低温度の差が3℃を超えないこと)	光質 研究所で通常用いている光質 光強度 10-20 μE/m ² /s (50-100 ft-c)通常用いているレベル 明暗周期 16時間 明:8時間暗

*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

生物種	番号	国内/ 海外	試験対象毒性等		根拠法制度・規格等	制度等での位置付け	試験期間	測定、結果の算出・評価等*1		
			毒性試験	成長段階				観測または測定	結果の算出	試験の有効性
オオミジンコ(Daphnia magna)	⑤	海外(米国)	Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. (魚、大型無脊椎動物、両生類を用いた試験物質における急性毒性試験を行うための標準的なガイド)		ASTME729		48時間	試験生物: 実験開始後24時間おきに観察。 毒性に時間依存が見られる場合は実験開始後3.6,12,24時間で観察、その後一日に2回実験終了まで観察するのが望ましい。 ミジンコやアミの幼体のような小さい有機体をのぞいて、試験前に代表的なグループの有機体と、試験後のコントロールで生き残ったものの重量をはかる。 ミジンコ、アミは乾燥重量(60°Cで72~96時間乾燥)、それ以外の有機体は余分な水分を拭き取った湿重量。 水質: ・止水式 硬度、アルカリ度、EC、pH (Ca、Mg、Na、K、Cl、硫酸測定できれば望ましい)(淡水) 塩分、pH (海水)。 アンモニア、粒子状物質、全溶解ガス、TOC(淡水の場合はCOD)(淡水海水、測定できれば望ましい)。 DO(試験開始前と終了後、48時間おきにコントロール、最高、中間、最低濃度区)。 pH(試験開始前と終了後、コントロール、最高、中間、最低濃度区)。 ・流水式 水質が一定の場合、30日置きに一回、もしくは試験前に測定。そうでない場合は毎日測定。 硬度、アルカリ度、EC、pH (Ca、Mg、Na、K、Cl、硫酸測定できれば望ましい)(淡水) 塩分、pH (海水)。 アンモニア、粒子状物質、全溶解ガス、TOC(淡水の場合はCOD)(淡水海水、測定できれば望ましい)。 DO(試験開始前と終了後、48時間おきにコントロール、最高、中間、最低濃度区)。 pH(試験開始前と終了後、コントロール、最高、中間、最低濃度区)。	LC50,EC50	LC50,EC50を計算するにおいて、ばく露された生物に対し処理区は63%よりも影響を及ぼしていること、及び対照区は37%以上影響を及ぼさないこと。
	⑥	海外(カナダ)	Biological Test Method: Acute Lethality Test Using Daphnia spp(ミジンコ遊泳阻害試験)	24時間齢未満	・製紙パルプ排水規制(PPER) ・金属鉱業排水規制(MMER)	事業場排水	48時間	○希釈水のDO飽和度は90-100%、試験中は通気しない。 ○pH6.0-8.5 ○水温、DO、pHは試験開始時と終了時にすべての濃度区で測定、伝導率は少なくとも開始時に測定、硬度も評価に用いられる ○150又は250mL容器、密度15mL/1頭を超えない ○死亡及び異常行動(遊泳影響、致死、回旋運動、水面遊泳等)を最低、試験開始時と終了時に観察	半数致死濃度(LC50)	対照区での死亡と異常行動が10%を超える場合は無効
	⑦	海外(ドイツ)	Determining the tolerance of Daphnia to the toxicity of waste water by way of a dilution series (L30)(ミジンコ遊泳阻害試験)	2 - 26 時間齢 (24時間以内に2回選別)	ドイツの法令(Waste Water Ordinance)	事業場排水	24時間	○pH7.0±0.2 ○試験溶液20mL/容器50mL	遊泳阻害に対する半数影響濃度(EC50)(緩やかに攪拌し遊泳できない個体を計数)	対照区で遊泳阻害が1頭より多かった場合は試験は無効

*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

生物種	番号	国内/海外	その他試験実施に係る技術的条件等*1								
			試験方式	試験媒体	助剤の使用	試験濃度	生物数/密度	給餌	連数	試験温度	照明
オオミジンコ (<i>Daphnia magna</i>)	⑤	海外(米国)	止水式、半止水式、流水式。(半止水式、流水式が一般的に望ましい)	天然水、人工水 ・淡水:硬度範囲は5mg/L以下、もしくは平均の10%以下の高い方いずれか。	試験生物に影響を与えない、最小限の量に抑える。 有機溶剤の濃度は0.5mL/L以下	等比級数的(希釈係数0.6)に5濃度区以上と対照区。 ・止水式、半止水式:試験開始直前に少なくともコントロール、最高、中間、最低濃度区を測定。 ・流水式:少なくとも試験開始前に全ての区を測定。試験期間中にコントロール以外の区(特にLC50、EC50、IC50も近い濃度区)を少なくとも一回は追加測定。	・止水式及び半止水式:0.8g/L以下(表水温17°C以下の種)、0.5g/L以下(高水温の種) ・流水式:1g/L/day以下で常時10g/L以下(水温17°C以下の種)、0.5g/L/day以下または5g/L以下(高水温の種) ・藻類を入れない場合:1個/L/h以下(二枚貝軟体動物)。	急性試験中、もしくは試験前は可能な限り餌を与えない。共食いが起きる種は最低限の給餌(隔離などの処置ができない場合)。		Daphnids, <i>Daphnia magna</i> , <i>D. pulex</i> , <i>D. pulicaria</i> , 20°C <i>Ceriodaphnia dubia</i> 25°C Amphipods, <i>Gammarus lacustris</i> , <i>G. fasciatus</i> , 17°C <i>G. pseudolimnaeus</i> 17°C Crayfish, <i>Orconectes sp.</i> , <i>Cambarus sp.</i> , 17, 22°C <i>Procambarus sp.</i> , 17, 22°C <i>Pacifastacus leniusculus</i> 17°C Stoneflies, <i>Pteronarcys sp.</i> 12°C Mayflies, <i>Baetis sp.</i> , <i>Ephemera sp.</i> 17°C <i>Hexagenia limbata</i> , <i>H. bilineata</i> 22°C Midges, <i>Chironomus sp.</i> 22°C Snails, <i>Physa integra</i> , <i>P. heterostropha</i> , <i>Amnicola limosa</i> , <i>Aplexa hypnorum</i> 22°C <i>Planaria</i> , <i>Dugesia tigrina</i> 22°C	16時間の照明、8時間の暗期が望ましい。
	⑥	海外(カナダ)	止水式	事業場排水		対照区と100%事業場排水又は排出先水域水	10頭/濃度区	無給餌		20±2°C	400-800lux 16±1時間明、8±1時間暗
	⑦	海外(ドイツ)	止水式	事業場排水		希釈系列は排水と希釈水の容量により調製される。例えば希釈水の容量が0,1,2,3,5の場合は、希釈率(G)は1,2,3,4,6となる。下記表は希釈系列と結果を併記した例である。	5頭/容器(ビーカー)		2容器	20±2°C	

Table 2.

Parts by volume		Dilution factor, G	Number of <i>Daphnia</i> incapable of swimming after 24 h
Waste water	Dilution water		
1	0	1	10
1	1	2	10
1	2	3	9
1	3	4	8
1	5	6	6
1	7	8	5
1	11	12	2
1	15	16	0
1	23	24	0
1	31	32	0

In this example, the G_D value is 16.

*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

生物種	番号	国内/海外	試験対象毒性等		根拠法制度・規格等	制度等での位置付け	試験期間	測定、結果の算出・評価等*1		
			毒性試験	成長段階				観測または測定	結果の算出	試験の有効性
ミジンコ (<i>Daphnia pulex</i>)、ニセネコゼミジンコ (<i>Ceriodaphnia dubia</i>) など、他のミジンコ (<i>Daphnia</i>) 属	⑧	国内	ミジンコ類に対する急性遊泳阻害試験	ふ化後24時間未満	化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律(化審法) ※化審法試験は <i>Daphnia</i> 属に限定	新規化学物質の審査で使用可能な種類(任意)	48時間	①と同じ	①と同じ	①と同じ
(<i>Daphnia pulex</i>)	⑨	海外(米国)	○ CERIODAPHNIA DUBIA ACUTE TOXICITY TESTS (ニセネコゼミジンコ急性毒性試験) ○ DAPHNIA PULEX AND D. MAGNA ACUTE TOXICITY TESTS (ミジンコ及びオオミジンコ急性毒性試験)	24時間齢未満	米国 水質清浄法 (Clean Water Act: CWA) 402条NPDES	事業場排水等排出認可	24,48,96時間(利用可能な方式)	【採水、試験容器】 ○ サンプリング及び保持容器 排水: 採集時期の36時間内で最初に採取されるグラブ又は混合サンプル 排出先水域水: 同上 ○ サンプル容量 1L ○ 試験容器の大きさ 30mL(推奨される最小サイズ) ○ 試験容量 15mL(推奨される最低容量) 【生物観察等】 ○ 不安定な水泳、反応の損失、変色、過度の粘液産生、呼吸亢進、不透明な眼球、背曲がり、出血、脱皮および共食いのような、外観および行動を毎日記録 ○ 試験開始後早い時間に死亡を確認すること、また、死亡個体は速やかに除去すること 【試験環境の測定】 ○ 止水式 ・ 最低最高濃度区、希釈水で試験開始時と試験原液調製時、試験終了時にpH、塩分、導電率、残留塩素の合計を測定する。 ・ DO、pH、水温はすべての濃度区で毎日測定 ・ 対照区、最高濃度区では試験開始時と換水時に全アルカリと全硬度の測定が推奨 ○ 流水式 ・ 最高濃度区でpH、塩分、導電率、全アルカリ、全硬度、残留塩素合計を測定 ・ DOと水温は対照区と全ての濃度区で毎日測定	排水: 死亡 排出先水域水: 死亡	対照区の生残率が90%を超えること
(<i>Daphnia pulex</i>)	⑩	海外(カナダ)	Biological Test Method: Acute Lethality Test Using <i>Daphnia</i> spp(ミジンコ遊泳阻害試験)	24時間齢未満	・ 製紙パルプ排水規制(PPER) ・ 金属鉱業排水規制(MMER)	事業場排水	48時間	○ 希釈水のDO飽和度は90-100%、試験中は通気しない。 ○ pH6.0-8.5 ○ 水温、DO、pHは試験開始時と終了時にすべての濃度区で測定、伝導率は少なくとも開始時に測定、硬度も評価に用いられる ○ 150又は250mL容器、密度15mL/1頭を超えない ○ 死亡及び異常行動(遊泳影響、致死、回旋運動、水面遊泳等)を最低、試験開始時と終了時に観察	半数致死濃度(LC50)	対照区での死亡と異常行動が10%を超える場合は無効
	⑪	海外(米国)	魚、大型無脊椎動物、両生類を用いた試験物質における急性毒性試験を行うための標準的なガイド		ASTME729		48時間	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ
ミナミヌマエビ (<i>Neocaridina denticulata</i>) 又はヌカエビ (<i>Paratya compressa improvisa</i>)	⑫	国内	ヌマエビ・ヌカエビ急性毒性試験	成体と形態的に異なる段階のもので未抱卵の個体を用いる。	農薬取締法	水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準の設定における対象生物(任意)	96時間	(1) 供試生物の一般状態の観察 暴露開始後、少なくとも24、48、72及び96時間後に供試生物の一般状態を観察し、記録する。死亡個体は速やかに試験液から取り除く。また、観察時に脱皮が確認された場合は記録するとともに殻を試験液から取り除く。 (2) 被験物質濃度の測定 ① 各試験濃度区における被験物質の濃度は少なくとも暴露開始時、48時間後、暴露終了時、換水前及び換水後に測定する。 ② 被験物質濃度は、暴露期間中、設定濃度の80%以上であることが望ましい。 (3) 環境条件の測定 ① 試験に先立って、希釈水の水質を確認する。 ② 各試験区における試験液の水温、溶存酸素濃度及びpHを少なくとも暴露開始時、暴露終了時、換水前及び換水後に測定する。	半数致死濃度(LC50)	(1) 暴露終了時において対照区の死亡率が10%を超えてはならない。 (2) 溶存酸素濃度は暴露期間中、飽和濃度の60%以上でなければならない。
淡水産の端脚目を用いる。 ヨコエビ属 (<i>Gammarus fasciatus</i> , <i>G. pseudolimnaeus</i> , <i>G. lacustris</i>) 及びヨコエビ科 (<i>Hyaella azteca</i>)	⑬	国内	ヨコエビ急性毒性試験	成体と形態的に異なる段階のもので未抱卵の個体を用いる。	農薬取締法	水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準の設定における対象生物(任意)	96時間	(1) 供試生物の一般状態の観察 暴露開始後、少なくとも24、48、72及び96時間後に供試生物の一般状態を観察し、記録する。死亡個体は速やかに試験液から取り除く。また、観察時に脱皮が確認された場合は記録するとともに殻を試験液から取り除く。 (2) 被験物質濃度の測定 ① 各試験濃度区における被験物質の濃度は少なくとも暴露開始時、48時間後、暴露終了時、換水前及び換水後に測定する。 ② 被験物質濃度は、暴露期間中、設定濃度の80%以上であることが望ましい。 (3) 環境条件の測定 ① 試験に先立って、希釈水の水質を確認する。 ② 各試験区における試験液の水温、溶存酸素濃度及びpHを少なくとも暴露開始時、暴露終了時、換水前及び換水後に測定する。	半数致死濃度(LC50)	(1) 暴露終了時において対照区の死亡率が10%を超えてはならない。 (2) 溶存酸素濃度は暴露期間中、飽和濃度の60%以上でなければならない。

*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

生物種	番号	国内/ 海外	その他試験実施に係る技術的条件等*1								
			試験方式	試験媒体	助剤の使用	試験濃度	生物数/密度	給餌	連数	試験温度	照明
ミジンコ (<i>Daphnia pulex</i>)、ニセネコゼミジンコ () など、他のミジンコ (<i>Daphnia</i>) 属	⑧	国内	①と同じ	①と同じ	①と同じ	①と同じ	①と同じ	①と同じ	①と同じ	①と同じ	①と同じ
(<i>Daphnia pulex</i>)	④⑨	海外(米国)	止水式、半止水式、流水式(利用可能な方式)(換水する場合は)48時間後換水	事業場排水又は排出先公共用水		排水:5濃度区+対照区 排出先水域水:100%河川水、対照区 希釈系列 排水:希釈率0.5以上 排出先水域水:なし、あるいは希釈率0.5以上	供試生物数/濃度区:20頭/濃度区 (排水及び排出先水域水) 供試生物数/試験容器:5頭/容器 (排水及び排出先水域水)	試験前の飼育期間中にはマス用餌料(yeast-cerophyl-trout-chow:YTC)と緑藻(<i>Selenastrum</i>)を給餌すること、新たに産出した仔虫は、試験前に最低2時間餌料をとるようにすべきである。換水の前、2時間はYTCと緑藻をそれぞれ0.1mLづつ加えること。	連数/濃度区:4連/濃度区(排水及び排出先水域水)	20±1°C、25°C±1°C(推奨) 試験温度の変動は試験期間中3°Cを上回らないこと(すなわち、最大温度-最低温度の差が3°Cを超えないこと)	光質 研究所で通常用いている光質 光強度 10-20 μE/m2/s (50-100 ft-c)通常用いているレベル 明暗周期 16時間明:8時間暗
(<i>Daphnia pulex</i>)	⑥	海外(カナダ)	止水式	事業場排水		対照区と100%事業場排水又は排出先水域水	10頭/濃度区	無給餌		20±2°C	400-800lux 16±1時間明、8±1時間暗
	⑩	海外(米国)	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ
ミナミヌマエビ (<i>Neocaridina denticulata</i>) 又はヌカエビ (<i>Paratya compressa improvisa</i>)	⑪	国内	止水式、半止水式又は流水式により試験を行う。	① 試験に用いる水は、有害物質等試験の妨げになるものを含まず、飼育に用いた水と同じ供給源のもので、供試生物が良好に生存又は成育ができる水質であることが確認されているものを用いる。 ② 脱塩素水道水、天然水又は人工調製水を用いる。	(2) 難水溶性物質の場合には、被験物質を機械的な手法により分散して試験液又は試験原液を調製するか、有機溶媒、乳化剤、分散剤等の助剤を用いて試験原液を調製する。助剤は試験生物に対して毒性が弱く、使用濃度で供試生物に対して有害性が認められず、かつ、被験物質の性質を変えないものを用いる。 (3) 助剤の試験液中濃度は、原則として全試験濃度区で一定とし、100mg/L(又は0.1ml/L)を超えないことが望ましい。	ア等比級数的に少なくとも5濃度区を設ける。 イ試験濃度及び濃度公比は、予備試験の結果から定める。 ウ濃度範囲には、供試生物のすべてが死亡する濃度と全く死亡しない濃度が少なくともそれぞれ1濃度、一部が死亡する濃度については、少なくとも2濃度含まれることが望ましい。	試験区ごとに、少なくとも10匹以上使用する。	なし		20~24°Cの範囲で22°Cを標準とする。試験期間中の変動範囲は設定温度の±1°C以内とすることが望ましい。	12~16時間明期が望ましい。
淡水産の端脚目を用いる。 ヨコエビ属 (<i>Gammarus fasciatus</i> , <i>G. pseudolimnaeus</i> , <i>G. lacustris</i>) 及びヨコエビ科 (<i>Hyalomma azteca</i>)	⑫	国内	止水式、半止水式又は流水式により試験を行う。	① 試験に用いる水は、有害物質等試験の妨げになるものを含まず、飼育に用いた水と同じ供給源のもので、供試生物が良好に生存又は成育ができる水質であることが確認されているものを用いる。 ② 脱塩素水道水、天然水又は人工調製水を用いる。	(2) 難水溶性物質の場合には、被験物質を機械的な手法により分散して試験液又は試験原液を調製するか、有機溶媒、乳化剤、分散剤等の助剤を用いて試験原液を調製する。助剤は試験生物に対して毒性が弱く、使用濃度で供試生物に対して有害性が認められず、かつ、被験物質の性質を変えないものを用いる。 (3) 助剤の試験液中濃度は、原則として全試験濃度区で一定とし、100mg/L(又は0.1ml/L)を超えないことが望ましい。	ア等比級数的に少なくとも5濃度区を設ける。 イ試験濃度及び濃度公比は、予備試験の結果から定める。 ウ濃度範囲には、供試生物のすべてが死亡する濃度と全く死亡しない濃度が少なくともそれぞれ1濃度、一部が死亡する濃度については、少なくとも2濃度含まれることが望ましい。	試験区ごとに、少なくとも20匹以上使用する。	なし		18~23°Cを標準とするが、供試生物種に応じてその生育適温とすることができる。試験期間中の変動範囲は設定温度の±1°C以内とすることが望ましい。	12~16時間明期が望ましい。

*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

生物種	番号	国内/ 海外	試験対象毒性等		根拠法制度・規格等	制度等での位置付け	試験期間	測定、結果の算出・評価等*1		
			毒性試験	成長段階				観測または測定	結果の算出	試験の有効性
端脚類(ヨコエビ属 <i>Gammarus lacustris</i> , <i>G. fasciatus</i> , <i>G. pseudolimnaeus</i>) ザリガニ類(アメリカザリガニ科 <i>Orconectes</i> sp., <i>Cambarus</i> sp., アメリカザリガニ属 <i>Procambarus</i> sp., ウチダザリガニ <i>Pacifastacus leniusculus</i>)	⑭	海外(米国)	魚、大型無脊椎動物、両生類を用いた試験物質における急性毒性試験を行うための標準的なガイド		ASTME729		96時間以上	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ
ドブユスリカ(<i>Chironomus riparius</i>)、セスジユスリカ(<i>C.yoshimatsui</i>)又は <i>C.dilutus</i> のいずれか	⑮	国内	ユスリカ幼虫急性遊泳阻害試験	1 齢幼虫	農薬取締法	水産動植物登録保留基準策定での対象生物(一部必須※) ※ 特定の農薬(新規に登録申請する殺虫剤及び既に登録されているニコチン性アセチルコリン受容体又はGABA受容体に作用する殺虫剤(ネライストキシン系殺虫剤を除く。))については、本試験が必要。	48時間	(1) 供試生物の一般状態の観察 暴露開始後24時間後及び48時間後における遊泳阻害の有無について観察し記録する。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。 (2) 被験物質濃度の測定 ① 各試験濃度区における被験物質の濃度を少なくとも暴露開始時、暴露終了時又は換水前に測定する。 ② 被験物質濃度は、暴露期間中、設定濃度の80%以上であることが望ましい。 (3) 環境条件の測定 ① 試験に先立って希釈水の水质を確認する。 ② 各試験区における試験液の水温、溶存酸素濃度及びpHを少なくとも暴露開始時、暴露終了時、換水前及び換水後に測定する。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。	遊泳阻害に対する半数影響濃度(EC50)	(1) 暴露終了時において対照区の遊泳阻害率が15%を超えてはならない。 (2) 溶存酸素濃度は暴露期間中、3mg/L以上でなければならない。
ユスリカ類(ユスリカ属 <i>Chironomus</i> sp.)	⑯	海外(米国)	魚、大型無脊椎動物、両生類を用いた試験物質における急性毒性試験を行うための標準的なガイド		ASTME729		96時間以上	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ
カワゲラ類(カワゲラ目 <i>Pteronarcys</i> sp.)	⑰									
カゲロウ類(コカゲロウ属 <i>Baetis</i> sp., マダラカゲロウ属 <i>Ephemerella</i> sp., モンカゲロウ科 <i>Hexagenia limbata</i> , <i>H. bilineata</i>)	⑱									
巻貝類(サカマキガイ属 <i>Physa integra</i> , <i>P. heterostropha</i> , マツボ属 <i>Amnicola limosa</i> , ホタルヒダリマキガイ <i>Aplexa hypnorum</i>)	⑲									
ウズムシ類(扁形動物)(アメリカナミウズムシ <i>Dugesia tigrina</i>)	⑳									

*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

生物種	番号	国内/ 海外	その他試験実施に係る技術的条件等*1									
			試験方式	試験媒体	助剤の使用	試験濃度	生物数/密度	給餌	連数	試験温度	照明	
端脚類(ヨコエビ属 <i>Gammarus lacustris</i> , <i>G. fasciatus</i> , <i>G. pseudolimnaeus</i>) ザリガニ類(アメリカザリガニ科 <i>Orconectes</i> sp., <i>Cambarus</i> sp., アメリカザリガニ属 <i>Procambarus</i> sp., ウチダザリガニ <i>Pacifastacus leniusculus</i>)	⑬	海外(米国)	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ
ドブユスリカ(<i>Chironomus riparius</i>)、セスジユスリカ(<i>C.yoshimatsui</i>)又は <i>C.dilutus</i> のいずれか	⑭	国内	止水式、半止水式又は流水式により試験を行う。	① 試験に用いる水は、有害物質等試験の妨げになるものを含まず、飼育に用いた水と同じ供給源のもので、ユスリカが良好に生存できる水質であることが確認されているものを用いる。 ② 脱塩素水道水、天然水又は人工調製水を用いる。	助剤の試験液中濃度は、原則として全試験濃度区で一定とし、100mg/L(又は0.1ml/L)を超えないことが望ましい。	ア 等比級数的に少なくとも5濃度区を設ける。公比は2.2を超えないことが望ましい。 イ 試験濃度及び濃度公比は、予備試験の結果から定める。 ウ 濃度範囲には、供試生物の全てを遊泳阻害する濃度と全く遊泳阻害しない濃度が少なくともそれぞれ1濃度、一部を遊泳阻害する濃度が少なくとも2濃度含まれることが望ましい。	試験区ごとに少なくとも20個体の幼虫を使用する。 幼虫1個体当たり2 ml以上とする。	なし	各5個体ずつ4連に分けることが望ましい。	設定温度は <i>C.riparius</i> では18~22 °C、 <i>C.yoshimatsui</i> 及び <i>C.dilutus</i> では23~25 °Cとし、試験期間中の変動範囲は±1 °C以内とする。	16時間明期が望ましい。	
ユスリカ類(ユスリカ属 <i>Chironomus</i> sp.)	⑮	海外(米国)	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ	⑤と同じ
カワゲラ類(カワゲラ目 <i>Pteronarcys</i> sp.)	⑯											
カゲロウ類(コカゲロウ属 <i>Baetis</i> sp., マダラカゲロウ属 <i>Ephemerella</i> sp., モンカゲロウ科 <i>Hexagenia limbata</i> , <i>H. bilineata</i>)	⑰											
巻貝類(サカマキガイ属 <i>Physa integra</i> , <i>P. heterostropha</i> , マツボ属 <i>Amnicola limosa</i> , ホタルヒダリマキガイ <i>Aplexa hypnorum</i>)	⑱											
ウズムシ類(扁形動物)(アメリカナミウズムシ <i>Dugesia tigrina</i>)	⑲											

*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

3. 魚類に係る主な急性毒性試験の概要

生物種	番号	国内/海外	試験対象毒性等		根拠法制度・規格等	制度等での位置付け	試験期間	測定、結果の算出・評価等*1		
			毒性試験	成長段階(推奨全長cm)				観測または測定	結果の算出	試験の有効性
ゼブラフィッシュ (<i>Brachydanio rerio</i>) ファットヘッドミノー (<i>Pimephales promelas</i>) コイ (<i>Cyprinus carpio</i>) メダカ (<i>Oryzias latipes</i>) グッピー (<i>Poecilia reticulata</i>) ブルーギル (<i>Lepomis macrochirus</i>) ニジマス (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	①	国内	魚類に対する急性毒性試験	ゼブラフィッシュ 2.0±1.0 ファットヘッドミノー 2.0±1.0 コイ 4.0±1.0 メダカ 2.0±1.0 グッピー 2.0±1.0 ブルーギル 2.0±1.0 ニジマス 1 5.0±1.0	化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律(化審法)	新規化学物質の審査における推奨種、メダカは必須	96時間	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こととみなす。 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。 pH、溶存酸素濃度、水温は少なくとも毎日1回測定する。	死亡に対する半数致死濃度(LC50)	・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。
	②	国内	魚類急性毒性試験	ゼブラフィッシュ 2.0±1.0 ファットヘッドミノー 2.0±1.0 コイ 3.0±1.0 メダカ 2.3±1.0 グッピー 2.0±1.0 ブルーギル 2.0±1.0 ニジマス 1 5.0±1.0	農業取締法	水産動植物登録保留基準策定での対象生物、コイ又はヒメダカを用いた試験が必須である。	96時間	(1) 供試魚の一般状態の観察 暴露開始後、少なくとも24、48、72及び96時間後に供試魚の一般状態を観察し、記録する。死亡魚は速かに試験系から取り除く。また、観察された異常は記録する。 (2) 被験物質濃度の測定 ① 原体を被験物質として用いた場合には、各試験濃度区における被験物質の濃度を少なくとも暴露開始時、48時間後、暴露終了時、換水前及び換水後に測定する。 ② 被験物質濃度は、暴露期間中、設定濃度の80%以上であることが望ましい。 (3) 環境条件の測定 ① 試験に先立って希釈水の品質を確認する。 ② 各試験区における試験液の水温、溶存酸素濃度及びpHを少なくとも暴露開始時、暴露終了時、換水前及び換水後に測定する。	死亡に対する半数致死濃度(LC50)	(1) 暴露終了時において対照区の死亡率が10%を超えてはならない。ただし、10尾より少ない数を用いた場合は死亡が1尾を超えてはならない。 (2) 溶存酸素濃度は暴露期間中、飽和濃度の60%以上でなければならない。
	③	国内・海外(OECD)	Fish, Acute Toxicity Test	ゼブラフィッシュ 2.0±1.0 ファットヘッドミノー 2.0±1.0 コイ 3.0±1.0 メダカ 2.0±1.0 グッピー 2.0±1.0 ブルーギル 2.0±1.0 ニジマス 1 5.0±1.0	経済協力開発機構 (Organisation for Economic Co-operation and Development: OECD) テストガイドライン 201(2011)		96時間	・少なくとも24、48、72および96時間後に観察すること ・鰓運動がない場合、尾部を触れても反応しない場合は死亡とみなす ・死亡個体は除去する ・試験開始後3時間後、6時間後にも観察することが望ましい ・重篤な症状(平衡感覚の損失、異常遊泳、呼吸機能、体色等)も記録すること ・pH、DO、温度は毎日測定すること ・pH調整は行わない	死亡に対する半数致死濃度(LC50)	・各暴露期間の累積率死は対数確率紙で算出される。 ・ばく露期間での毒性値、95%CI値を適切な統計処理により求める
ファットヘッドミノー (<i>Pimephales promelas</i>) ニジマス (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) カワマス (<i>Salvelinus fontinalis</i>)	④	海外(米国)	FATHEAD MINNOW, PIMEPHALES PROMELAS, ACUTE TOXICITY TESTS RAINBOW TROUT, ONCORHYNCHUS MYKISS, AND BROOK TROUT, SALVELINUS FONTINALIS, ACUTE TOXICITY TESTS	○ファットヘッドミノー: 1-14日齢; その24時間以下の範囲であること ○ニジマス: 15-30日齢(卵黄吸収後30日) ○カワマス: 30-60日齢	米国 水質浄法 (Clean Water Act: CWA) 402条 NPDES	事業場排水等排出認可	24,48,96時間 (利用可能な方式)	【採水、試験容器】 ○サンプリング及び保持容器 排水: 採集時期の36時間内で最初に採取されるグラブ又は混合サンプル 排出先水域水: 同上 ○ファットヘッドミノー ・サンプル容量2L ・試験容器の大きさ 250mL (推奨される最小サイズ) ・試験容量 200mL (推奨される最低容量) ○ニジマス・カワマス ・サンプル容量20L(排水)、40L(排出先水域水) ・試験容器の大きさ: 5L ・試験容量: 4L (推奨される最低容量) 【生物観察等】 ○不安定な水泳、反応の損失、変色、過度の粘液産生、呼吸亢進、不透明な眼球、背曲がり、出血、脱皮および共食のような、外観および行動を毎日記録 ○試験開始後早い時間に死亡を確認すること、また、死亡個体は速やかに除去すること 【試験環境の測定】 ○溶存酸素濃度: ファットヘッドミノー4.0mg/L、ニジマスとカワマスは6.0mg/Lを下回らない限り曝気しない、1分間に100気泡以上は超えないようにすること ○止水式 ・最低最高濃度区、希釈水で試験開始時と試験原液調製時、試験終了時にpH、塩分、導電率、残留塩素の合計を測定する。 ・DO、pH、水温はすべての濃度区で毎日測定 ・対照区、最高濃度区では試験開始時と換水時に全アルカリと全硬度の測定が推奨 ○流水式 ・最高濃度区でpH、塩分、導電率、全アルカリ、全硬度、残留塩素合計を測定 ・DOと水温は対照区と全ての濃度区で毎日測定	排水: 死亡 排出先水域水: 死亡	対照区の生残率が90%を超えること

*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

生物種	番号	国内/海外	その他試験実施に係る技術的条件等								
			試験方式	試験媒体	助剤の使用	試験濃度	生物数/密度	給餌	連数	試験温度(°C)	照明
ゼブラフィッシュ (<i>Brachydanio rerio</i>) ファットヘッドミノー (<i>Pimephales promelas</i>) コイ (<i>Cyprinus carpio</i>) メダカ (<i>Oryzias latipes</i>) グッピー (<i>Poecilia reticulata</i>) ブルーギル (<i>Lepomis macrochirus</i>) ニジマス (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	①	国内	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。	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。	・可能な限り、溶剤、乳化剤あるいは分散剤は利用しない。 ・助剤の使用はガイダンス文書23に従う。	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。	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。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。	なし	1連	ゼブラフィッシュ 21-25 ファットヘッドミノー 21-25 コイ 20-24 メダカ 21-25 グッピー 21-25 ブルーギル 21-25 ニジマス 13-17 2°Cの範囲内で一定に保つ	一日当たり12~16時間
	②	国内	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。	①試験に用いる水は、有害物質等試験の妨げになるものを含まず、飼育に用いた水と同じ供給源のもので、魚が良好に生存又は成長ができる水質であることが確認されているものを用いる。 ②脱塩素水道水、天然水又は人工調製水を用いる。	助剤の試験液中濃度は、原則として全試験濃度区で一定とし、100mg/L(又は0.1ml/L)を超えないことが望ましい。	ア等比級数的に少なくとも5濃度区を設ける。 イ試験濃度及び濃度公比は、予備試験の結果から定める。公比は2.2を超えないことが望ましい。 ウ濃度範囲には、供試魚のすべてが死亡する濃度と全く死亡しない濃度が少なくともそれぞれ1濃度、一部が死亡する濃度については、少なくとも2濃度含まれることが望ましい	試験区ごとに、少なくとも7尾使用する。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。① 止水式及び半止水式による試験では、供試魚1g当たり1リットル以上の試験液量が必要である。② 流水式試験では、さらに高い収容密度で試験を行うことができる。	なし	1連	ゼブラフィッシュ 21-25 ファットヘッドミノー 21-25 コイ 20-24 メダカ 21-25 グッピー 21-25 ブルーギル 21-25 ニジマス 13-17 変動範囲は±2°C以内とする。	12~16時間明期とする
	③	国内・海外(OECD)	止水式と半止水式試験では最大1.0g魚体/Lが推奨される。流水式ではより多くの生物が可能	清浄な自然水又は調製水、飲料水も利用可能。硬度は10~250mg/LCaCO3としてpHは6.0-8.5の範囲 調製水は分析試薬級の試薬を使用し、10 μ Scm-1以下の脱イオン水又は蒸留水を用いること	必要に応じて魚類への毒性が低い、有機溶媒、乳化剤あるいは分散剤を用いてもよい。その場合は助剤対照区を設定すること。 有機溶媒、乳化剤あるいは分散剤の濃度は100mg/Lを超えてはならない	・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。 ・試験設定のための予備試験を行うことにより設定できる。	少なくとも7尾を使用する	試験開始24時間前から試験期間中は行わない。			ゼブラフィッシュ 21-25 ファットヘッドミノー 21-25 コイ 20-24 メダカ 21-25 グッピー 21-25 ブルーギル 21-25 ニジマス 13-17 ±2°C範囲内であること。
ファットヘッドミノー (<i>Pimephales promelas</i>) ニジマス (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) カワマス (<i>Salvelinus fontinalis</i>)	④	海外(米国)	止水式、半止水式、流水式(利用可能な方式) (換水する場合は)48時間後換水	事業場排水又は排出先公共用水		排水:5濃度区+対照区 排出先水域水:100%河川水、対照区 希釈系列 排水:希釈率0.5以上 排出先水域水:なし、あるいは希釈率0.5以上	供試生物数/濃度区:20個体/濃度区(排水) 供試生物数/濃度区:40個体/濃度区(排出先水域水) 供試生物数/試験容器:10個体/容器(排水及び排出先水域水)	ファットヘッドミノー:試験前の飼育時はブラインシュリンプのノープリウス幼生を利用できるようにすること、換水前2時間は0.2mLのブラインシュリンプのノープリウス幼生濃縮液を追加すること ニジマス・カワマス:無給餌	連数/濃度区:2連/濃度区(排水) 連数/濃度区:4連/濃度区(排出先水域水)	ファットヘッドミノー:20±1°C、25°C±1°C(推奨) ニジマス・カワマス:12±1°C(推奨) 試験温度の変動は試験期間中3°Cを上回らないこと(すなわち、最大温度-最低温度の差が3°Cを超えないこと)	光質 研究所で通常用いている光質 光強度 10-20 μ E/m2/s (50-100 ft-c)通常用いているレベル 明暗周期 16時間明:8時間暗

*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

生物種	番号	国内/ 海外	試験対象毒性等		根拠法制度・規格等	制度等での位置付け	試験期間	測定、結果の算出・評価等*1		
			毒性試験	成長段階(推奨全長cm)				観測または測定	結果の算出	試験の有効性
ギンザケ(<i>Oncorhynchus kisutch</i>) ニジマス(<i>Oncorhynchus mykiss</i>) カワマス(<i>Salvelinus fontinalis</i>) キンギョ(<i>Carassius auratus</i>) ファットヘッドミノー(<i>Pimephales promelas</i>) アメリカナマズ属(<i>Ictalurus punctatus</i>) ブルーギル(<i>Lepomis macrochirus</i>) ブルーギル属(<i>Lepomis cyanellus</i>)	⑤	海外 (米国)	Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. (魚、大型無脊椎動物、両生類を用いた試験物質における急性毒性試験を行うための標準的なガイド)		ASTME729		2-8日間(種によって異なる) 止水式は96時間以内。 半止水式、流水式は96時間以上。 ・8日間飢餓の影響をあまり受けけないものは、96時間以降で毒性の影響があるかどうか観察する。	試験生物: 実験開始後24時間おきに観察。 毒性に時間依存が見られる場合は実験開始後3.6,12,24時間で観察、その後一日に2回実験終了まで観察するのが望ましい。 ミジンコやアミの幼体のような小さい有機体をのぞいて、試験前に代表的なグループの有機体と、試験後のコントロールで生き残ったものの重量をはかる。 ミジンコ、アミは乾燥重量(60℃で72~96時間乾燥)、それ以外の有機体は余分な水分を拭き取った湿重量。 水質: ・止水式 硬度、アルカリ度、EC、pH (Ca、Mg、Na、K、Cl、硫酸測定できれば望ましい)(淡水) 塩分、pH (海水)。 アンモニア、粒子状物質、全溶解ガス、TOC(淡水の場合はCOD)(淡水海水、測定できれば望ましい)。 DO(試験開始前と終了後。48時間おきにコントロール、最高、中間、最低濃度区)。 pH(試験開始前と終了後。コントロール、最高、中間、最低濃度区)。 ・流水式 水質が一定の場合、30日置きに一回、もしくは試験前に測定。そうでない場合は毎日測定。 硬度、アルカリ度、EC、pH (Ca、Mg、Na、K、Cl、硫酸測定できれば望ましい)(淡水) 塩分、pH (海水)。 アンモニア、粒子状物質、全溶解ガス、TOC(淡水の場合はCOD)(淡水海水、測定できれば望ましい)。 DO(試験開始前と終了後。48時間おきにコントロール、最高、中間、最低濃度区)。 pH(試験開始前と終了後。コントロール、最高、中間、最低濃度区)。		LC50,EC50を計算するにおいて、ばく露された生物に対し処理区は63%よりも影響を及ぼしていること、及び対照区は37%以上影響を及ぼさないこと。
ニジマス(<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	⑥	海外(カナダ)	Biological Test Method: Reference Method for Determining Acute Lethality of Effluents to Rainbow Trout(ニジマス急性毒性試験)	平均体重0.3-2.5g(同一試験で用いる魚体の最小から最大の長さが2倍以内)	・製紙パルプ排水規制(PPER) ・金属鉱業排水規制(MMER)	事業場排水	96時間	○試験中6.5±1mL/minで通気、最高濃度区で飽和度70-100% ○pH調整はしないが、pHが5.5-8.5を外れる場合は、調整する。pH調整したサンプルとしないサンプルではないサンプルの結果を用いる。 ○DO,pH,水温は対照区と各濃度区で試験的試験終了時に測定 ○生物の観察は可能であれば、各容器につき、少なくとも24、48、72、96時間時に行う。 ○試験魚の尾叉長を試験終了時に測定し、平均尾叉長を記録集計する。 ○試験魚の体重を試験終了時に測定し、平均体重を記録集計する。この結果は有効性基準となる重量範囲と比較する。 ○生残魚数を試験終了時に計数する。	死亡に対する半数致死濃度(LC50)	対照区の魚体の10%以上が死亡するか異常/ストレス的な行動をとった場合は有効ではない
ゼブラフィッシュ(<i>Brachydanio rerio</i>)	⑦	海外(ドイツ)	Determination of the effect of nonacute toxicity of waste water on the development of fish eggs(魚類胚試験)DIN 38415-T 6	受精卵	ドイツの法令(Waste Water Ordinance)	事業場排水	48時間	○試験容器: 2.5-5.0mlの底面が平らな容器 ○pH: 7±0.2 ○受精卵の選別: 40卵/100mLペトリ皿を用いて選別し、受精卵をマルチウェルに移す ○生物観察 ・凝固した胚の数 ・体節の発達状態 ・卵黄からの尾部の分離 ・心拍の有無 ○致死の判定は、より詳細にはふ化の有無でより判断できる。 48時間暴露後26℃では72~96時間後にふ化 ○死亡の判定: 48時間時に、胚の凝固、体節の未発達、尾部が卵黄から分離していない、心拍を検知できなければ、死亡と見なせるであろう。	生残に対する半数影響濃度(EC50)	○少なくとも試験終了時の対照区の胚生残率が90%であること ○毎日実施されるポジティブコントロール(3,4-ジクロロアニリン3.7mg/Lを用いた、供試卵数10個)の死亡は10%を超えること

*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。

生物種	番号	国内/ 海外	その他試験実施に係る技術的条件等								
			試験方式	試験媒体	助剤の使用	試験濃度	生物数/密度	給餌	連数	試験温度(°C)	照明
ギンザケ (<i>Oncorhynchus kisutch</i>) ニジマス (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) カワマス (<i>Salvelinus fontinalis</i>) キングヨ (<i>Carassius auratus</i>) ファットヘッドミノ (<i>Pimephales promelas</i>) アメリカナマズ属 (<i>Ictalurus punctatus</i>) ブルーギル (<i>Lepomis macrochirus</i>) ブルーギル属 (<i>Lepomis cyanellus</i>)	⑤	海外 (米国)	止水式、半止水式、流水式。(半止水式、流水式が一般的に望ましい)	天然水、人工水 ・淡水: 硬度範囲は5mg/L以下、もしくは平均の10%以下の高い方いずれか。	試験生物に影響を与えない、最小限の量に抑える。 有機溶剤の濃度は0.5mL/L以下	等比級数的(希釈係数0.6)に5濃度区以上と対照区。 ・止水式、半止水式: 試験開始直前に少なくともコントロール、最高、中間、最低濃度区を測定。 ・流水式: 少なくとも試験開始前に全ての区を測定。試験期間中にコントロール以外の区(特にLC50、EC50、IC50も近い濃度区)を少なくとも一回は追加測定。	・止水式及び半止水式: 0.8g/L以下(表水温17°C以下の種)、0.5g/L以下(高水温の種) ・流水式: 1g/L/day以下で常時10g/L以下(水温17°C以下の種)、0.5g/L/day以下(水温17°C以下の種)、0.5g/L/day以下(水温17°C以下の種) ・藻類を入れない場合: 1個/L/h 以下(二枚貝軟体動物)。	急性試験中、もしくは試験前は可能な限り餌を与えない。共食いが起きる種は最低限の給餌(隔離などの処置ができない場合)。		Coho salmon, <i>Oncorhynchus kisutch</i> 12°C Rainbow trout, <i>Oncorhynchus mykiss</i> 12°C Brook trout, <i>Salvelinus fontinalis</i> 12°C Goldfish, <i>Carassius auratus</i> 17, 22°C Fathead minnow, <i>Pimephales promelas</i> 25°C Channel catfish, <i>Ictalurus punctatus</i> 17, 22°C Bluegill, <i>Lepomis macrochirus</i> 17, 22°C Green sunfish, <i>Lepomis cyanellus</i> 17, 22°C	16時間の照明、8時間の暗期が望ましい。
ニジマス (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	⑥	海外(カナダ)	止水式	事業場排水		対照区と100%未満の排水濃度区	○0.5g魚体/Lを超えないこと ○10尾/濃度区	無給餌	2連以上	15±1°C	16±1時間明、8±1暗
ゼブラフィッシュ (<i>Brachydanio rerio</i>)	⑦	海外(ドイツ)		事業場排水 希釈水はDIN EN ISO7346-3での標準希釈水		希釈系列は排水と希釈水の容量により調製される。例えば希釈水の容量が0.1, 2, 3, 5の場合は、希釈率(G)は1, 2, 3, 4, 6となる。	○2mLの試験溶液に少なくとも10個の受精卵			26±1°C	16時間明8時間暗又は12時間明暗

*1)国内で用いられている試験法については、一部項目の番号等のみを変更した上で、根拠文書の規定のまま掲載している。