

別添

＜微生物等による化学物質の分解度試験＞

I 適用範囲

ここでは、微生物等による化学物質の分解度試験の標準となるべき方法について規定する。

II 用語

この試験法において使用する用語は、日本工業規格（以下「JIS」という。）において使用する用語の例による。

III 活性汚泥の調製

1 汚泥採集場所

全国的な地域分布を考慮の上、多種類の化学物質が消費、廃棄されるとみられる場所を中心に全国十カ所以上とする。

2 汚泥採集回数

年間4回とする。

3 汚泥採集方法

3-1 都市下水 下水処理場の返送汚泥 1L

3-2 河川、湖沼又は海 表層水 1L 及び大気と接触している波打際の表土 1L

4 調製

各所から集めた汚泥を一つの容器内で混合かくはんして静置したのち浮んだ異物を除去し、上澄液を No.2 ろ紙を用いてろ過する。ろ液の pH を水酸化ナトリウム又はりん酸で 7.0 ± 1.0 に調整し、培養槽に移してばっ気する。

5 培養

4によって得られた液のばっ気を約 30 分間止めたのち、全量の約 3 分の 1 量の上澄液を除去し、これと等量の 0.1%合成下水^(注1)を加えて再びばっ気する。この操作を毎日 1 回繰り返す。培養温度は、 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ とする。

(注 1) 0.1%合成下水

グルコース、ペプトン、りん酸二水素一カリウムおのおの 1g を水 1L に溶解し、水酸化ナトリウムで pH を 7.0 ± 1.0 に調整したもの

6 管理

培養段階での管理は、次の項目を点検し、所要の調製を行う。

6-1 上澄液の外観 活性汚泥の上澄液は透明であること。

6-2 活性汚泥の沈でん性 フロックが大きく、沈でん性がすぐれていること。

6-3 活性汚泥の生成状態 フロックの増加が認められない場合には 0.1%合成下水の添加量又は添加回数を増やすこと。

6-4 pH 上澄液の pH は、 7.0 ± 1.0 であること。

- 6-5 温度 活性汚泥の培養温度は、 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ であること。
- 6-6 通気量 上澄液と合成下水を交換する時点において、培養槽内の液中溶存酸素濃度が少なくとも 5mg/L 以上となるように十分通気すること。
- 6-7 活性汚泥の生物相 活性汚泥を顕微鏡（100～400 倍）で観察したとき、雲状のフロックとともに種々の原生動物が多数見られること。

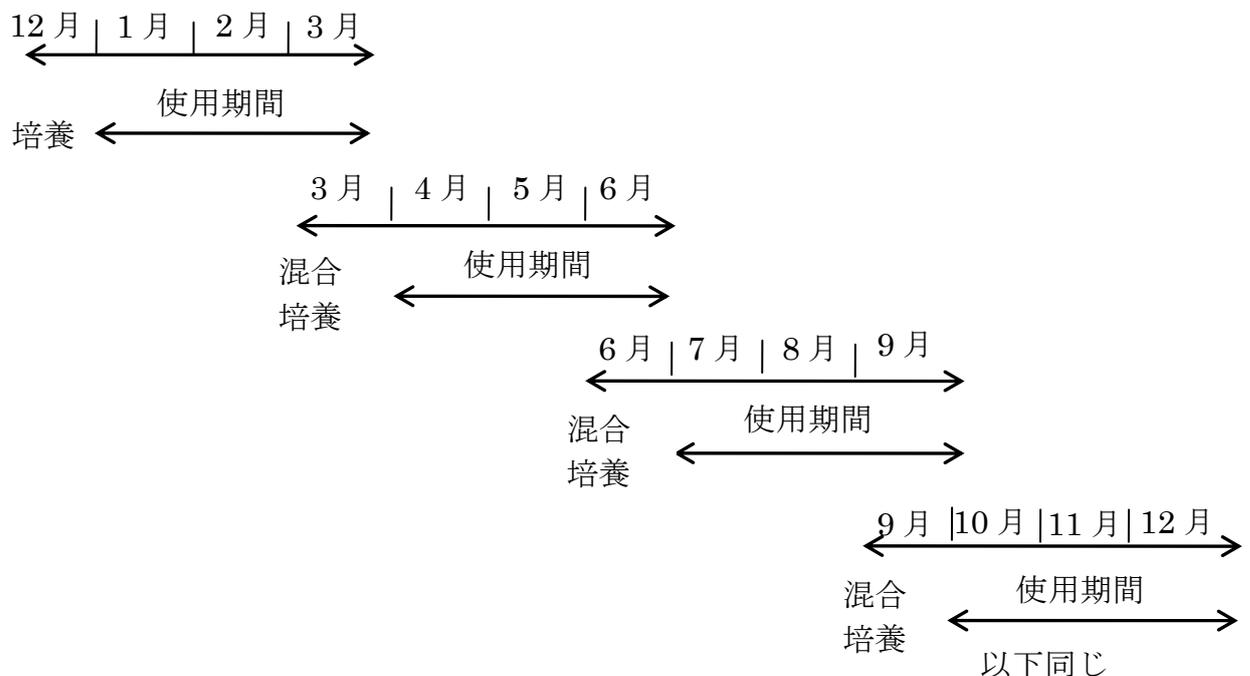
7 新旧活性汚泥の混合

新旧活性汚泥の均一性を保つため、現に試験に供している活性汚泥の上澄液のろ液と新たに採集してきた汚泥の上澄液のろ液との等量を混合し、培養する。

8 活性汚泥の活性度の点検

標準物質を用いて少なくとも 3 ヶ月に 1 回定期的に活性度を点検する。試験法はIVに準ずる。特に、新旧活性汚泥を混合したときは、旧活性汚泥との関連性に留意する。

[活性汚泥の調製と使用期間の例]



IV 試験方法

1 分解度試験装置

閉鎖系酸素消費量測定装置

2 基礎培養基

JIS K0102-1998 の 21 で定められた組成のA液、B液、C液及びD液それぞれ 3 ml に水を加えて 1L とする。

3 被験物質の添加及び試験の準備

次の試験容器（各 300ml）を準備し、これらを試験温度に調整する。なお、被験物質が水に試験濃度まで溶解しない場合は、可能な限り微粉碎したものをい、溶媒や乳化剤は使用し

ない。

- 3-1 水に被験物質が 100mg/L となるように添加したものを入れた試験容器 1 個
- 3-2 基礎培養基に被験物質が 100mg/L となるように添加したものを入れた試験容器 3 個
- 3-3 基礎培養基にアニリンが 100mg/L となるように添加したものを入れた試験容器 1 個
- 3-4 基礎培養基のみを入れた試験容器 1 個

4 活性汚泥の接種

3-2、3-3 及び 3-4 の試験容器に JIS K0102-1998 の 14.1 で定められた懸濁物質濃度が 30mg/L になるように活性汚泥を接種する。ただし、3-2 については必要な場合には接種の前に溶液の pH を 7.0 に調整する。なお、活性汚泥は合成下水を添加してから 18~24 時間後のものを使用する。

5 分解度試験の実施

遮光した条件のもとで 25±1℃で十分かきまぜながら一定期間^(注2)培養し、酸素消費量の変化を経時的に測定する。

一定期間培養した後、残留する被験物質と変化物を分析に供し、その量を測定する。被験物質が水に溶解する場合は、溶存有機炭素の残存量も測定する。

(注2) 通常は 28 日間とする。

6 試験結果の算出方法

6-1 試験条件の確認

試験終了時の被験物質の分解度の最大値と最小値の差が 20%未満であり、酸素消費量から求めたⅣの 3-3 のアニリンの分解度が 14 日後に 60%以上の場合は、この試験は有効とする。

6-2 酸素消費量から分解度 (%) を算出する方法

$$\text{分解度 (\%)} = \frac{\text{BOD}-\text{B}}{\text{TOD}} \times 100$$

BOD：被験物質の生物化学的酸素消費量 (測定値) (mg)

B：基礎培養基に活性汚泥を接種したものの酸素消費量 (測定値) (mg)

TOD：被験物質が完全に酸化された場合に必要とされる理論的酸素消費量 (計測値) (mg)

6-3 直接定量^(注3)から分解度 (%) を算出する方法

$$\text{分解度 (\%)} = \frac{\text{S}_B - \text{S}_A}{\text{S}_B} \times 100$$

S_A：分解度試験終了後の被験物質の残留量 (測定値) (mg)

S_B：水に被験物質のみを添加した空試験における被験物質の残留量 (測定値) (mg)

(注3) 直接定量による化学分析法

- ① 全有機炭素分析計を用いる場合

試験容器から試験液を適量分取し、これを 3000G で 5 分間遠心分離又はろ過 (0.45 μ m) し、その上澄液又はろ液から適量を分取して全有機炭素分析計により残存する溶存有機炭素を定量する。

② その他の分析計を用いる場合

試験容器内の内容物を被験物質等に適した溶剤により抽出、濃縮等適切な前処理を行った後分析機器等による定量分析を行う。この場合、原則として JIS に規定された分析法通則（ガスクロマトグラフ分析法、吸光光度分析法、質量分析法、原子吸光分析法等）に従い分析を行う。

V 結果のまとめ

試験の結果を様式 1 によりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

<魚介類の体内における化学物質の濃縮度試験>

I 適用範囲

ここでは、魚介類のうち特に魚類の体内における化学物質の濃縮度試験の標準となるべき方法について規定する。

II 用語

この試験法において使用する用語は、日本工業規格（以下「JIS」という。）において使用する用語の例による。

III 試験方法

1 被験物質の試験濃度の設定

次の方法により魚類の急性毒性試験を実施し、濃縮度試験における被験物質の試験濃度決定の参考とする。

1-1 供試魚

供試魚種は、ヒメダカ及びコイが推奨されるが、濃縮度試験に用いる魚種及び次の基本条件を考慮して他の魚種を用いてもよい。水温、餌、取扱い等、実験室内の飼育管理条件に適していること、及び大きさがそろい、健康であり、一度に多数得られること等である。病気又は外観や行動に異常のあるものは、供試魚としない。

1-2 急性毒性試験の実施（LC₅₀測定）

本通知で定められた魚類急性毒性試験、JIS K0102-1998の71.で定められた方法又はOECDテストガイドライン203で定められた方法に準じて急性毒性試験を実施する。

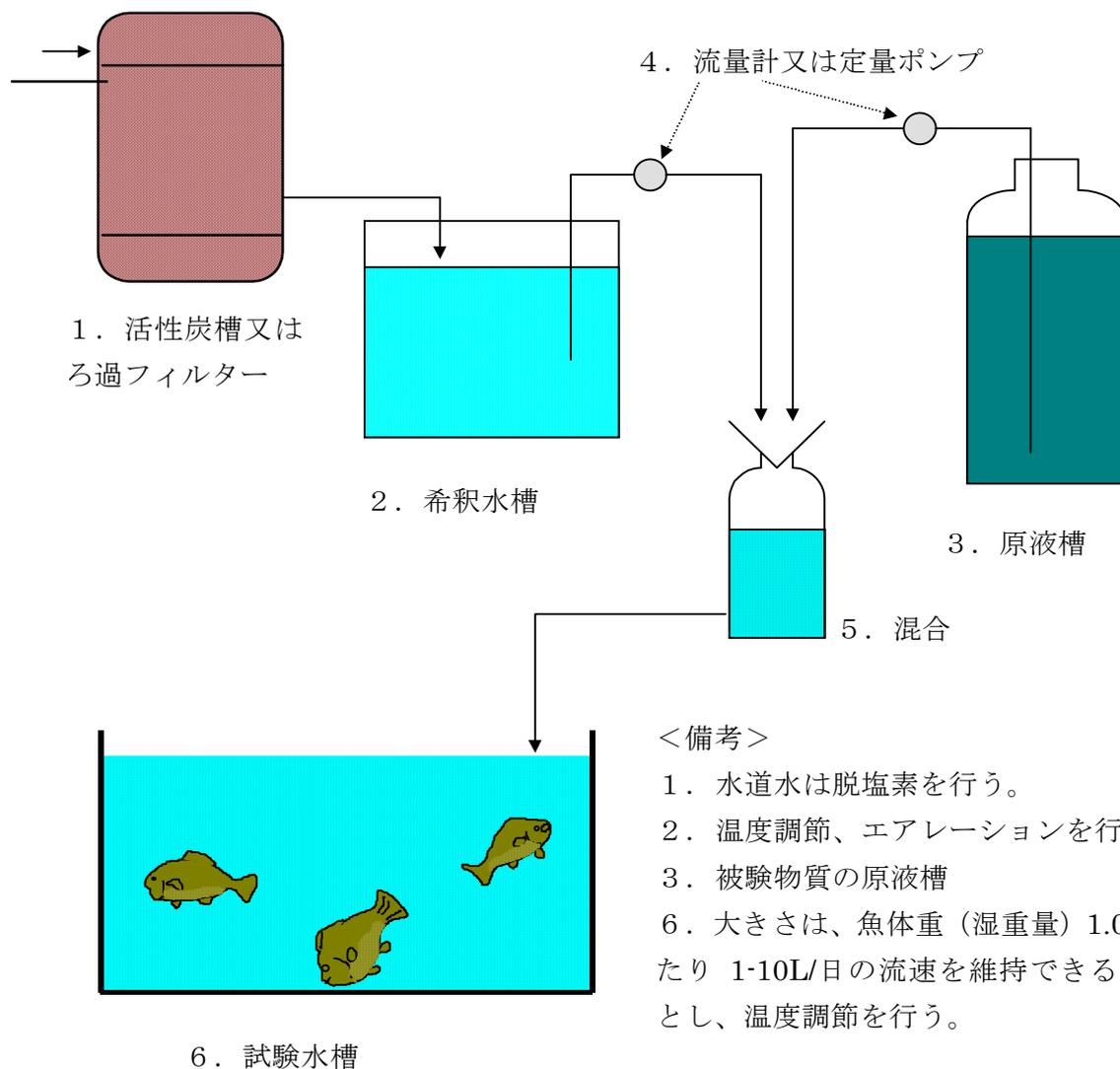
2 濃縮度試験の実施

この試験は、流水状態で行い、被験物質が魚体内に濃縮される度合いを調べる。

2-1 装置及び器具

2-1-1 装置

概要は次のとおりとする。



2-1-2 試験水槽

試験水槽は、ガラス製の清浄なものであって供試魚の試験飼育に支障のない容量のものとする。

2-1-3 その他の器具

通水又は被験物質の希釈のために用いる器具は、可能な限りガラス、テフロン®あるいはステンレススチール製の清浄なものとし、軟質プラスチック配管の使用は最小限とし、連結部等のやむを得ない箇所に限る。

2-2 供試魚

コイ又はヒメダカが推奨されるが付表1に示されている他の魚種を使用してもよい。その試験手順は適切な試験条件を設定し、これに適合させなければならない。この場合、魚種と試験方法の選択の根拠は報告すること。

各試験において、体重の最小値が最大値の2/3より小さくならないようにできるだけ均一な体重の魚を選ぶ。すべての魚は同じ年齢で同じ供給源の方がよい。

付表1 試験に推奨される魚種

推奨される種類	試験温度の推奨される範囲 (°C)	試験生物の推奨される全長 (cm)
ゼブラフィッシュ (Zebra-fish) <i>Danio rerio</i> (コイ科)	20-25	3.0±0.5
ファットヘッドミノー (Fathead minnow) <i>Pimephales promelas</i> (コイ科)	20-25	5.0±2.0
コイ (Common carp) <i>Cyprinus carpio</i> (コイ科)	20-25	8.0±4.0
ヒメダカ (Ricefish) <i>Oryzias latipes</i> (ヒメダカ科)	20-25	3.0±2.0
グッピー (Guppy) <i>Poecilia reticulate</i> (カダヤシ科)	20-25	3.0±1.0
ブルーギル (Bluegill) <i>Lepomis macrochirus</i> (サンフィッシュ科)	20-25	5.0±2.0
ニジマス (Rainbow trout) <i>Oncorhynchus mykiss</i> (サケ科)	13-17	8.0±4.0

2-3 蓄養及びじゅん化

供試魚は、適切な蓄養池で育養し、病魚、衰弱している魚又はその他の異常のある魚を除去する。その後、必要に応じて薬浴及び投薬により外部及び内部の寄生性病原生物を駆除し、体調を整え、殺菌消毒後じゅん化槽へ移す。蓄養した魚群を48時間観察し、その後少なくとも2週間じゅん化する。その間、試験期間（2-5-5に示す）中に使用されるのと同じタイプの餌を十分に与え続ける。

48時間の観察期間に続いて、じゅん化期間中の死亡率を記録し、適用される基準を以下に示す。

- ・ 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。もし、その後の7日間で全体の死亡率が5%より高くなった場合には試験に使用しない。
- 病気の魚は試験に使用しない。試験前2週間あるいは試験中、魚に対し薬浴等の処置はしない方がよい。

2-4 給餌

じゅん化及び試験期間中、魚を健全な状態に保ち、かつ、体重を維持するために十分な量の脂質や総蛋白質含量がわかっている適切な餌を与える。給餌量は1日に体重の約1-2%程度とし、じゅん化及び試験期間中に毎日餌を与える。試験期間中、水槽中の有機物濃度をできるだけ低く保つために、食べ残しの餌や排泄物は、1日1回程度取り除き、水槽をできるだけきれいにしておく。

2-5 試験の実施

2-5-1 試験用水

試験用水は汚染されていない均質な水質の水源から得られる天然水又は脱塩素した水道水とし、選択した魚種がじゅん化及び試験期間中に異常な外観や挙動を示さずに生存できる水質でなければならない。

2-5-2 被験物質溶液

適切な濃度の被験物質の原液を調製すること。原液は被験物質を試験用水中で単純に混合又は攪拌することで調製することが望ましい。溶剤又は分散剤（助剤）の使用は推奨できないが、適切な濃度の原液を調製するために使用してもよい。

使用可能な溶剤として、エタノール、メタノール、エチレングリコールモノメチルエーテル、エチレングリコールジメチルエーテル、ジメチルホルムアミド、トリエチレングリコール、ジメチルスルホキシドなどがある。

使用可能な分散剤として、Cremophor®RH40、Tween®80、NIKKOL®HCO-40などがある。生分解性のある試薬を用いる場合、バクテリアの増殖をもたらすので注意を払った

方がよい。

流水式試験では、試験水槽に被験物質の原液を連続的に供給、希釈するシステムが必要である。少なくとも1日に各試験水槽の5倍量の試験用水を流すことが好ましい。流水式が推奨されるが、流水式が不可能な場合（試験生物に有害な影響を与える場合）には、試験液を定期的に交換する半止水式を使用してもよい。

被験物質は放射性同位元素により標識してもよい。

2-5-3 試験濃度

流水条件下で、少なくとも2濃度区の被験物質に供試魚を暴露する。通常、被験物質濃度の高い方（又は最高濃度）を被験物質のLC₅₀値（定められた暴露期間に供試魚の50%を死亡させる被験物質濃度）の約1/100以下となるように選択し、かつ、用いる分析法において分析が可能な限り低い2濃度区を設定する（一方は、他方の10倍の濃度）^(注1)。LC₅₀値の1/100という基準で設定した被験物質濃度が分析の検出下限から判断して測定が不可能であれば、10倍より小さい濃度比で行うか、放射性同位元素で標識した被験物質を使用してもよい。被験物質の水溶解度以上の濃度は使用しない方がよい。

助剤を使用する場合、その濃度は0.1 ml/Lを超えるべきではない。試験水中の有機炭素の全含有量に対する助剤の寄与を（被験物質と共に）把握しておく。しかしながら、そのような物質の使用を避けるよう努力する。

対照区は、助剤が供試魚に影響を与えないことが立証されていれば、試験用水のみの対照区又は使用した助剤を含んだ対照区を試験系に加えて実施する。もし立証されていなければ、両方の対照区を実施した方がよい。

（注1） 1-2で求めたLC₅₀値の1/100、1/1000、1/10000の濃度のうち分析が可能な限り低い方の2濃度区が参考となる。

2-5-4 試験温度及び照明

温度は、供試魚に適したものとし（付表1参照）、その変動は±2℃未満とする。照明時間は12から16時間/日が推奨される。

2-5-5 試験期間

濃縮倍率を被験物質の水中濃度に対する魚体中濃度の比（BCF_{ss}）、あるいは取込速度定数に対する排泄速度定数の比（BCF_K）のいずれか、又は両方から算出するとして以下の期間を設定する。

(1) 取込期間

取込期間は、28日間又は定常状態に達するまでとする。もし28日間で定常状態に達しなければ、取込期間は追加測定を行いながら定常状態に達するまでか60日間かどちらか短い方まで期間を延長する。

48時間以上の測定間隔で連続した3回の測定における濃縮倍率の変動が20%以内の場合に定常状態に達したとみなす。（濃縮倍率が100未満の場合、濃縮倍率の変動が20%

以上であっても28日目には定常状態に達しているとみなしてもよい。)

(2) 排泄期間

濃縮倍率を BCF_K で求める場合、取込期間の終了後、排泄期間を設ける。排泄期間は取込期間に続いて被験物質を含まない清浄な水槽に供試魚を移し、開始する。

排泄期間は、定常状態における魚体中濃度の5%未満に到達するまでの期間とすることが望ましい。もしこの条件に到達するまでに必要とされる期間が長い場合は、半減期を求めることが可能な期間とする。

濃縮倍率を BCF_{SS} のみで算出する場合でも、 BCF_{SS} が1000以上の場合には排泄期間を設けることが望ましい。

2-5-6 操作

2-1の装置及び器具を使用し、2-3の判定に合格した供試魚を用いて2-5-1～5の条件下で試験を実施する。

供試魚を試験水槽に移す前に、被験物質を設定濃度になるように加え、水槽中の試験液が十分に換水されてから、被験物質を定量するために、試験水槽から試験水を採取する(例えば取込試験を始める24時間前)。ただし、濃縮倍率を BCF_{SS} のみで算出する場合には、供試魚を水槽に移した後に被験物質を徐々に加え、水槽中の試験水が十分に換水されてから試験水分析を実施してもよい。取込期間の間、試験の有効性についての基準(2-6参照)に対応していることを確認するために、少なくとも供試魚の採取と同時に、給餌前に試験水槽から試験水を採取し、被験物質の濃度を測定する。排泄期間(排泄試験を実施する場合)においては、試験水分析は行わない。

なお、試験期間中は、供試魚の排泄物、水槽壁の汚れ等を1日1回程度除去する。

2-6 試験の有効性

試験を有効なものとするために、次の条件を適用する。

- 温度変動は $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 未満であること。
- 溶存酸素濃度は、飽和酸素濃度の通常60%以下にならないこと。
(揮発性物質用水槽などエアレーションができない場合には、流速を上げるなどの対策を講じ、溶存酸素濃度を維持する。そのために講じた対策を報告書に記述する。)
- 流水式及び半止水式のいずれの場合も、水槽中の被験物質濃度の変動は、取込期間中の測定値の平均に対して $\pm 20\%$ 以内に保たれること。
(濃縮倍率が極めて高い場合には取込期間中の被験物質濃度の変動が大きくなる場合がある。この場合には、定常状態における被験物質濃度の変動が測定値の平均に対して $\pm 20\%$ 以内に保たれること。)
(揮発性物質の試験においては、気相を少なくした揮発性物質用水槽を使用するなどの適切な対応を行う。)
- 死亡又は病気などの異常は、対照区及び試験区の魚において試験終了時に10%未満であること。試験が数週あるいは数ヶ月延長になった場合には、死亡又は異常は、対照区及び

試験区で1ヶ月間で5%未満かつ全期間で30%を超えないこと。

2-7 供試魚と試験水の分析

2-7-1 供試魚と試験水のサンプリングスケジュール

少なくとも取込期間中に5回、また排泄試験を実施する場合には排泄期間中に4回、供試魚を採取する（解説8参照）。必要であれば追加のサンプルを保存しておき（2-7-2参照）、一連の分析結果が、要求される精度のBCFを計算するのに不適切であることが判明したときのみ、それらを分析する。

2-7-2 サンプリングとサンプルの前処理

分析のための試験水を、例えば試験水槽の中心から不活性チューブを通して吸い取り採取する。

各サンプリング時には各試験水槽から適切な数の魚（通常、最低4尾）を取り上げ、これらの体重を測る。

2-7-3 供試魚試料の分析

被験物質の濃度は個々の魚ごとに測定する。個体が小さくて個体ごとの分析が困難な場合には、各サンプリング時における個体をまとめて行ってもよい。この場合、2群以上とすることが望ましい。

試験の前後に供試魚と同一の条件で飼育した魚の脂質含量を測定する。可能ならそれぞれのサンプリング時における魚の脂質含量を測定する。試験ごと又は魚のロットごとに脂質含量を測定してもよい。

2-8 試験結果の算出方法及び報告

2-8-1 結果の処理法

取込期間における魚体中の被験物質濃度を時間に対して作図することにより、定常状態におけるBCF_{ss}は魚体中濃度（ C_f ）と水中濃度（ C_w ）を用いて以下の式から計算する。

$$\text{BCF}_{\text{ss}} = \frac{\text{定常状態における } C_f \text{ (平均)}}{\text{定常状態における } C_w \text{ (平均)}}$$

また、濃縮係数(BCF_K)は2つの1次式（取込曲線及び排泄曲線）の係数、 k_1/k_2 の比として決定される。排泄速度定数(k_2)は、通常、排泄曲線から決定する（すなわち、時間における魚体中の被験物質濃度の減少の図）。取込速度定数(k_1)は、そのとき与えられた k_2 と取込曲線から得られた C_f の値から計算する。

$$\text{BCF}_k = \frac{\text{取込速度定数}(k_1)}{\text{排泄速度定数}(k_2)}$$

2-9 結果のとりまとめ

試験の結果を様式2によりとりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

試験法解説

1 供試魚

魚種を選択するための重要な基準は、すぐに入手でき手ごろなサイズが得られ試験所で十分飼育できることである。他の基準としては、娯乐的、商業的、生態的な重要性だけでなく、毒性に対する感受性等も考慮する。推奨される魚種は付表1に示されている。他の種も使用してもよいが、その試験手順は選択した魚種に適切な試験条件を用意して適合させなければならない。この場合、魚種と試験方法の選択の根拠を報告する。

蓄養及びじゅん化において、試験温度と蓄養池の水温に差がある場合には次の(1)又は(2)の方法によりじゅん化水槽中でじゅん化し、この間に、エラや皮膚の損傷している供試魚あるいは衰弱していたり疾病にかかっている供試魚は除去する。なお、蓄養池及びじゅん化水槽は流水とすることが望ましい。

(1) 試験温度が蓄養池の水温より高い場合は、蓄養池の水温より5°C以内高い温度で1日以上ならし、その後1日3°C以内ずつ順次昇温し、最終的に試験温度と同一温度で5-7日間飼育する。

(2) 試験温度が蓄養池の水温より低い場合は、蓄養池の水温より3°C以内低い温度で1日以上ならし、その後1日2°C以内ずつ順次降温し、最終的に試験温度と同一温度で7-10日間飼育する。各サンプリング時に1濃度区あたり最低4尾のサンプルとなるような魚の尾数を選択する。

成魚を使用する場合、雄か雌かどちらかあるいは両方を使用するのかを報告する。

各試験において、体重の最小値が最大値の2/3より小さくならないように均一の体重の魚を選ぶ。ただし、魚の重さを直接測ることは困難なので目視により全長を観察し選別してもよい。すべての魚は同じ年齢で同じ供給源の方がよい。魚の体重や年齢は、時々BCF値に重要な影響を与えることがあるので、それらの詳細を正確に記録する。試験の前に予備的に魚の平均体重を測ることが推奨される。

2 試験用水

被験物質及び助剤を含まない試験に用いる水を試験用水と定義する。試験用水は、一般的に天然水が使用され、汚染されていないこと、均質であることなどが要求される。脱塩素した水道水でもよい。pHは6.0から8.5の範囲に保ち、かつ試験期間中の変動幅は±0.5の以内とする。

選択した魚種がじゅん化及び試験期間中に異常な外観や挙動を示さずに生存できる水質でなければならない。試験用水を採取し付表2に示す項目を確認することにより、試験用水が試験結果に不当に影響（被験物質の錯化による影響など）を与えないこと、又は魚の活動に有害な影響を与えないことを保証してもよい。水質が少なくとも1年以上一定であることが実証されているならば、測定の間隔を減らし、かつ、その間隔をあけることができる（例えば6ヶ月ごと）。

付表2の上限濃度についてはOECDテストガイドラインなどを参照するが、その濃度が実現

困難な場合は、使用する試験用水で供試魚が飼育可能なことをあらかじめ確認すること。

被験物質の魚体への取込を阻害するような有機物への被験物質の吸着を避けるために、試験用水中の全有機炭素（TOC）だけでなく天然粒子の含量もまた可能な限り低減する。必要ならば、試験用水を使用前にろ過してもよい。供試魚の排泄物や餌の残渣に由来する有機炭素含量は可能な限り低くする。

試験開始時に魚を加えることによる C_w 低下を最小限にするため、及び溶存酸素濃度の低下を避けるために、流速の尾数に対する比を高くする。流速は使用される魚種によって適切なものにする。各場合において、流速は魚体重（湿重量）1.0gあたり1-10L/日になることが標準的に推奨される。被験物質濃度変動を設定値の±20%以内で維持するため、及び溶存酸素濃度が飽和酸素濃度の60%以下とならないようにするために流速を大きくする。

付表2 測定しておくことが望ましい試験用水の水質項目

1	浮遊物質	2 1	遊離塩素
2	全有機炭素量	2 2	臭化物イオン
3	化学的酸素要求量（COD）	2 3	フッ素化合物
4	全リン	2 4	硫化物イオン
5	pH	2 5	アンモニウムイオン
6	大腸菌群	2 6	亜硝酸態チッ素
7	水銀	2 7	ヒ素
8	銅	2 8	陰イオン界面活性剤
9	カドミウム	2 9	セレン
1 0	亜鉛	3 0	蒸発残留物
1 1	鉛	3 1	電気伝導度
1 2	アルミニウム	3 2	全硬度（CaCO ₃ として）
1 3	ニッケル	3 3	アルカリ度
1 4	クロム	3 4	ナトリウム
1 5	マンガン	3 5	カリウム
1 6	スズ	3 6	カルシウム
1 7	銀	3 7	マグネシウム
1 8	コバルト	3 8	有機塩素系農薬
1 9	鉄	3 9	有機リン系農薬
2 0	シアン化合物		

3 被験物質溶液

流水式試験では、試験水槽に被験物質の原液を連続的に供給、希釈するシステムが要求される。少なくとも1日に各試験水槽の5倍量の試験用水を流すのが好ましい。流水式が奨励され

るが、流水式が不可能な場合（試験生物に有害な影響を与える場合）には、試験液を定期的に交換する半止水式を使用してもよい。

原液と試験用水の流速は、試験開始の48時間前と試験期間中は少なくとも毎日確認する。各試験水槽ごとの流速の測定と水槽間及び一つの水槽内で流速に20%以上の変動がないことを併せて確認する。

原液は被験物質を試験用水中で単純に混合又は攪拌することで調製することが望ましい。溶剤や分散剤（助剤）の使用は推奨できないが、適切な濃度の原液を調製するために使用してもよい。

付表 3

濃縮度試験に用いられる溶剤や分散剤の48時間LC₅₀値（mg/L、w/v）

溶 剤		分 散 剤	
メチルアルコール	16,200	HCO-10	5,300
エチルアルコール	12,000	HCO-20	>50,000
アセトン	11,200	HCO-40	>100,000
ジメチルホルムアミド	9,800	HCO-50	>100,000
ジメチルスルホキシド	33,000	HCO-100	>100,000
テトラヒドロフラン	3,800	Tween-40	2,800
1,4-ジオキサン	7,200	Tween-80	50,000
エチレングリコールジメチルエーテル	21,500	SPAN-85	1,000
エチレングリコールモノメチルエーテル	22,000		

魚：ヒメダカ 水温：25℃

HCO：ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油

4 試験水

試験用水に被験物質あるいは助剤を加えた水を試験水と定義する。試験期間中、試験水の水质を一定に保つ。試験水は少なくともpH、溶存酸素濃度、温度を測定する。

5 照明及び温度

照光時間は通常12から16時間であり、温度は供試魚に適したものとする。照明の種類と特徴を把握しておく。試験における照明条件下では被験物質の光分解の可能性があるので注意すること。人工的な光反応生成物の魚への暴露を避けるために適切な照明を使用する。場合によっては、290nmより低波長のUV照射を遮蔽する適切なフィルターを使用してもよい。

6 取込期間の長さの予測

排泄速度定数（ k_2 ）の見積り及び定常状態に対するある割合に達するために必要な時間は、 k_2 とオクタノール-水間の分配係数(Pow)又は k_2 と対水溶解度(s)間の経験的な関係から試験

を開始する前に得ることができる。

例えば、以下の経験式^(注2) から k_2 (日⁻¹) の見積りを得ることができる。

$$\log_{10}k_2 = -0.414\log_{10}(\text{Pow}) + 1.47 \quad (r^2 = 0.95) \quad [\text{式1}]$$

又は、Kristensenの式を用いる^(注3)。

もし分配係数(Pow)が未知の場合、被験物質の対水溶解度(s)から見積ることができる^(注4)。

$$\log_{10}(\text{Pow}) = -0.862\log_{10}(s) + 0.710 \quad (r^2 = 0.994) \quad [\text{式2}]$$

ここでs=対水溶解度(mol/L):(n=36)

これらの関係式はPow値が2から6.5の間にある化学物質に対してのみ適用される^(注5)。

定常状態に対して一定の割合に達する時間は、見積った k_2 を用いて、取込と排泄を記述する一般的な速度式 (1次の速度式) から得ることができる。

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_f$$

C_w が一定ならば

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{式3}]$$

定常状態に近づくと ($t \rightarrow \infty$)、式3は以下のように近似できる^(注6, 7)。

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w$$

すなわち

$$C_f / C_w = k_1 / k_2 = \text{BCF}$$

ここで $k_1/k_2 \cdot C_w$ は定常状態における魚体中濃度 ($C_{f,s}$) に近づく。

式3は次のように書き換えられる。

$$C_f = C_{f,s} \cdot (1 - e^{-k_2 t})$$

すなわち

$$\frac{C_f}{C_{f,s}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad \text{[式4]}$$

式1又は2を用いて k_2 を見積っておくと、式4を用いて、定常状態に対する一定の割合に達するまでの時間を予測することができる。

統計的な基準を満たしたデータ(BCF_K)を得るための統計的に最適な取込期間の長さは、時間に対してプロットされた魚体中の被験物質濃度の対数値の曲線において、その中間点、又は $1.6/k_2$ 、又は定常状態の80% ($3.0/k_2$ あるいは定常状態の90%以上は不可) に達するまでの期間である^(註8)。

定常状態の80%に達する時間は式4から

$$0.80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}}$$

すなわち

$$t_{80} = \frac{1.6}{k_2} \quad \text{[式5]}$$

同様に定常状態の95%に達する時間は次のようになる。

$$t_{95} = \frac{3.0}{k_2} \quad \text{[式6]}$$

例えば、 $\log \text{Pow} = 4$ の被験物質に対する取込期間の長さ (up) は式1, 5及び6を用いると以下のようなになる。

$$\begin{aligned} \log_{10} k_2 &= -0.414 \cdot (4) + 1.47 \\ k_2 &= 0.652 \text{ days}^{-1} \\ \text{up}(80 \text{ pct}) &= 1.6/0.652、すなわち 2.45 \text{ 日 (59時間)} \end{aligned}$$

又は

$$\text{up}(95 \text{ pct}) = 3.0/0.652、すなわち 4.60 \text{ 日 (110時間)}$$

同様に、 $s = 10^{-5} \text{ mol/L}$ ($\log(s) = -5.0$) の被験物質に対する取込期間の長さは式1, 2及び式5, 6を用いると以下のようなになる。

$$\begin{aligned}\log_{10}(\text{Pow}) &= -0.862 \cdot (-5.0) + 0.710 = 5.02 \\ \log_{10} k_2 &= -0.414 \cdot (5.02) + 1.47 \\ k_2 &= 0.246 \text{ days}^{-1} \\ \text{up}(80 \text{ pct}) &= 1.6/0.246, \text{ すなわち } 6.5 \text{ 日 (156時間)}\end{aligned}$$

又は

$$\text{up}(95 \text{ pct}) = 3.0/0.246, \text{ すなわち } 12.2 \text{ 日 (293時間)}$$

あるいは、次式で定常状態に達するまでの時間を計算することができる^(注8)。

$$t_{eq} = 6.54 \times 10^{-3} \text{Pow} + 55.31 \text{ (hours)}$$

7 排泄期間の長さの予測

排泄期間は、定常状態の5%未満に到達するまでの期間とする。もし定常状態の5%未満に到達するまでに要求される時間が非現実的な程長ければ、排泄期間は通常の入取期間の2倍以上（すなわち56日間以上）か、又はより短い期間を用いる（例えば、被験物質濃度が定常状態の10%未満になるまで）。しかしながら、1次式に従う単純なモデルより複雑な取込と排泄のパターンを持っている物質には、消失速度定数を求めるために排泄期間をより長くしてもよい。ただし、その期間は、魚体中の被験物質濃度が分析の検出下限値以上である期間によって左右される。

体内濃度が初濃度に対して一定の割合まで減少するために必要な時間の予測は、取込と排泄を記述する一般的な関係式（1次の速度式）から得ることができる^(注3, 9)。

排泄期間中は、 C_w はゼロと仮定されるので、式は次のように省略できる。

$$\frac{dC_f}{dt} = -k_2 \cdot C_f$$

すなわち

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t}$$

ここで $C_{f,0}$ は排泄期間開始時の濃度である。

50%排泄は以下の式で表される時間(t_{50})に達成される。

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

すなわち

$$t_{50} = \frac{0.693}{k_2}$$

同様に、95%排泄は以下の時間(t_{95})に達成される。

$$t_{95} = \frac{3.0}{k_2}$$

もし取込期間で80%の取込 ($1.6/k_2$) 及び排泄期間で95%の消失 ($3.0/k_2$) を設定する場合、排泄期間は取込期間の約2倍になる。

以上の算出は、取込と排泄パターンが1次式に従うという仮定に基づくものであることに注意する。もし明らかに1次式に従わないならば、さらに複雑なモデルを用いるべきである^(注2)。

(注2) Spacie A. and Hamelink J.L.: Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.*, **1**, 309-320 (1982).

(注3) Kristensen P.: Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute (1991).

(注4) Chiou C.T. and Schmedding D.W.: Partitioning of organic compounds in octanol-water systems. *Environ. Sci. Technol.* **16**(1), 4-10 (1982).

(注5) Hawker D.W. and Connell D.W.: Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* **22**(6), 701-707 (1988).

(注6) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B.: *Transactions of the American Fisheries Society*, **104** (4), 785-792 (1975).

(注7) Ernst W.: Accumulation in Aquatic Organisms. In: Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals. Ed. by Sheehman P., Korte F., Klein W. and Bourdeau P.H., 1985 SCOPE, John Wiley & Sons Ltd., New York, Part 4.4 pp 243-255 (1985).

(注8) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W.: Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models, *Can. J. Chem. Eng.*, **55**, 614-622 (1977).

(注9) Konemann H. and Van Leeuwen K.: Toxicokinetics in Fish: Accumulation and Elimination of Six Chlorobenzenes by Guppies. *Chemosphere*, **9**, 3-19 (1980).

供試魚を加える前と取込期間及び排泄期間の間、被験物質を定量するために試験水槽から試験水を採取する。少なくとも供試魚のサンプリングと同時に、給餌前に試験水を採取する。取込期間の間、試験の有効性についての基準（2-6参照）に対応していることを確認するために被験物質の濃度を測定する。

少なくとも取込期間に5回、排泄期間に4回、供試魚を採取する。簡単な1次の排泄速度式で表されない場合等は、このサンプル数に基づいてBCFの正確な計算値を算出することは困難であるので、両期間中により高い頻度でサンプルを採取することを勧める（付表4参照）。2-7-2で記述しているように必要であれば追加のサンプルを保存しておき、一連の分析結果が、要求される精度のBCFを計算するのに不適切であることが判明したときにのみ、それらを分析する。

BCF_Kを求めるための妥当なサンプリングスケジュールの一例を付表4に示す。95%取込までの暴露時間を計算するために、Powの計算値を使って容易に他のスケジュールを定めることができる。

取込期間の間、定常状態に達するまでか、あるいは28日間のどちらか短い期間サンプリングを続ける。もし28日間以内に定常状態に達しない場合は、定常状態に達するまでか、あるいは60日間のどちらか短い期間サンプリングを続ける。

取込期間の終了後、被検物質を含まない清浄な水槽に供試魚を移して排泄試験を開始する。

付表 4

logP_{ow}=4である物質の生物濃縮試験のためのサンプリングスケジュールの理論的な例

魚サンプリング	サンプリング時間スケジュール		水サンプルの数	1回のサンプルの魚の尾数
	最低限必要なサンプリング日(日)	追加のサンプリング日(日)		
取込期間	-1 0		2* 2	45-80尾加える
1回目	0.3	0.4	2 (2)	4 (4)
2回目	0.6	0.9	2 (2)	4 (4)
3回目	1.2	1.7	2 (2)	4 (4)
4回目	2.4	3.3	2 (2)	4 (4)
5回目	4.7		2	6
排泄期間				被験物質を含まない水に魚を移す
6回目	5.0	5.3		4 (4)
7回目	5.9	7.0		4 (4)
8回目	9.3	11.2		4 (4)
9回目	14.0	17.5		6 (4)

* 水槽容量の最低3倍量の試験水を流した後で水をサンプリングする。

カッコ内の数値は追加のサンプリングを行う際の(水または魚の)サンプル数である。

注: logP_{ow} が 4.0 のときの予備的に求めた k_2 の概算値は 0.652 1/日である。

全試験期間は $3 \times$ 取込期間 = 3×4.6 日、すなわち 14 日間となる。

9 サンプリングとサンプルの前処理

分析のための試験水を、例えば試験水槽の中心から不活性チューブを通して吸い取り採取する。その際、試験水の汚れをろ過や遠心分離により取り除かないようにする。高い脂溶性物質 ($\log Pow > 5$ の物質) の場合には、汚れに吸着した被験物質も魚に取り込まれる可能性があるため、代わりに可能な限り水槽を清浄に保つための処理を行う。

各サンプリング時には試験水槽から適切な数の魚 (通常、最低4尾) を取り上げる。採取した魚を水で素早く洗い、水をふき取り、動物愛護の観点から最も適切な方法で直ちに屠殺し、体重を測定する。また、1g未満の小さい魚を使用し、まとめて分析する際には、可能な場合には、個別に測定する。

分解又はその他の損失を防ぐために、また試験を続行しながら大まかな取込速度及び排泄速度を計算するために、サンプリング後、直ちに供試魚と試験水を分析するのが好ましい。即時の分析は、平衡に達したかどうかの決定の遅延も避けることができる。

直ちに分析ができない場合は、適切な方法でサンプルを保存する。試験開始前に個々の被験物質の適切な保存方法、保存期間、前処理などに関する情報を得ておく。

10 分析方法について

全体の手順は被験物質に用いられる分析法の正確さ、精度及び感度に支配されるので、化学分析の精度及び再現性を実験的に確認する。同様に試験水及び供試魚から被験物質の回収が特定の方法に対して十分であることも確認する。また被験物質が試験用水中で検出されないことをチェックする。必要ならば、回収試験と対照区のバックグラウンド値によって C_w 、 C_f を補正する。汚染や損失 (例えば、サンプリング装置への吸着) を最小にするような操作を通して供試魚と試験水サンプルを処理する。

試験において放射性同位元素を使って標識した物質が使われる場合、全標識化物 (すなわち親物質と代謝物) の分析が可能である。

11 供試魚試料の分析

被験物質の濃度は重量測定された個々の魚ごとに測定する。もし個体が小さくて個体ごとの分析が困難な場合には、各サンプリング時における試料をまとめて行ってもよい。もし統計的手法及び検出力が重要な問題であれば、要求されるサンプリング数、手法及び検出力に適応するための適切な魚の尾数 (通常、最低4尾) が、試験の中に含まれるようにする。各サンプリング時における試料をまとめて分析する場合には、あらかじめ2群以上に分けて分析することが望ましい。

BCFは、全湿重量の関数で表現する。高い脂溶性物質の場合は、脂質含量の関数で表現してもよい。可能ならそれぞれのサンプリング時における魚の脂質含量を決定する。適切な手法を脂質含量の決定に使用すること。当面用いる方法としては、クロロホルム/メタノール抽出の技法が標準法として推奨される^(注10)。脂質はしばしばクロマトグラフィーで分析する前に抽出物から取り除かれるので、可能ならば脂質の分析は被験物質の分析のための抽出物と同じもので行われた方がよい。実験の終了時における魚の脂質含量 (mg/kg湿重量) は、

開始時の±25%以内とする。脂質濃度の基準を湿重量から乾重量に変換する場合のために、試験魚の乾燥重量比率（乾燥重量／湿重量）も報告した方がよい。

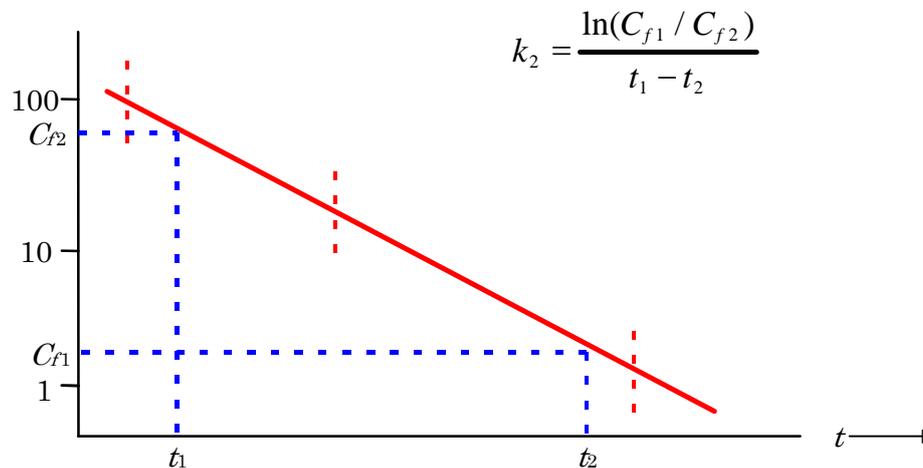
（注10） Gardner et al. : *Limnol. & Oceanogr.*, **30**, 1099-1105(1995).

1.2 BCF_Kの算出方法

排泄期間中における魚体中濃度を片対数紙にプロットしたときの近似曲線が直線で示された場合、生物濃縮のデータが単純なモデルによつて的確に記述されることが合理的であると考えられる。（それらのポイントが直線により記述できない場合は、より複雑なモデルを使用すべきである。）

1.2-1 グラフによる排泄(消失)速度定数 k_2 決定のための方法

片対数グラフ上に、サンプリング時点でのそれぞれの魚体中被験物質濃度をプロットする。その直線の傾きが k_2 である。



直線からのはずれは、1次式よりもっと複雑な排泄のパターンを示している場合もあるので注意する。図による方法は、排泄が1次速度論からはずれている形式を解明するために利用できる。

1.2-2 グラフによる取込速度定数 k_1 決定のための方法

得られた k_2 から、次式より k_1 を計算する：

$$k_1 = \frac{C_f k_2}{C_w \times (1 - e^{-k_2 t})} \quad \text{[式1]}$$

C_f の数值は、対数濃度を時間に対してプロットして得られた取込曲線の中心点から読みとる。

1 2-3 コンピューターによる取込と排泄(消失)速度定数の計算方法

生物濃縮係数と k_1 及び k_2 の速度定数を得るためにより好まれる方法は、コンピューターによる非線形パラメータ推定法を用いることである。

それらのプログラムは、ひと組の連続した時間-濃度データから次のモデル式の k_1 及び k_2 を算出する：

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times (1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{式2}]$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times (e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t > t_c \quad [\text{式3}]$$

ここで t_c = 取込期間の終了時間。

このアプローチは、 k_1 及び k_2 の標準偏差の算出を併せて行う。

多くの場合 k_2 は相対的に高い精度で排泄曲線から求めることができる。同時に k_1 及び k_2 が算出される場合、強い相関が2つのパラメータ k_1 及び k_2 の間に存在するので、非線形回帰式を用いて、最初に排泄のデータだけから k_2 を計算し、その後を取込のデータから k_1 を計算することを勧める。

1 3 結果の解釈

試験液中の測定濃度が分析方法における検出下限に近いレベルである場合、結果は慎重に解釈すること。

生物濃縮データの精度がよければ、取込と消失(排泄)曲線は明瞭に描かれる。2濃度区間において取込/排泄の定数の変動は、20%より小さいこと。2濃度区間において観測された取込/排泄の速度が著しく相違する場合はこれを記録し、そして可能なら説明を行う。適切な計画に基づく試験の場合、BCFssの信頼限界は一般に±20%の範囲内に収まる。なお、濃縮倍率が高い場合は、部位別の濃縮倍率等を求めることが望ましい。

< 1-オクタノールと水との間の分配係数測定試験 >

I 適用範囲及び試験方法

水に可溶で界面活性を有さない化学物質（有機金属化合物を除く。）の 1-オクタノールと水との間の分配係数の測定は、原則として OECD テストガイドライン 107 又は日本工業規格 Z7260-107（2000）「分配係数（1-オクタノール／水）の測定－フラスコ振とう法」で定められた方法に準じて実施する。

II 結果のまとめ

試験の結果を様式 3 によりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

<化学物質の慢性毒性試験、生殖能及び後世代に及ぼす影響に関する試験、催奇形性試験、変異原性試験、がん原性試験、生体内運命に関する試験及び薬理学的試験>

I ここでは、化学物質の慢性毒性試験、生殖能及び後世代に及ぼす影響に関する試験、催奇形性試験、変異原性試験、がん原性試験、生体内運命に関する試験及び薬理学的試験の標準となるべき方法について規定する。

II 総則

1 試験動物

試験動物は原則として、哺乳類の中から選択し、その出所、系統又は品種の明らかなものを使用する。また、特殊な試験を除いては、年齢による影響（幼若又は加齢による影響）の少ないものであることが必要である。また、ヒトにおいて被験物質の代謝様式が知られている場合には、代謝様式がヒトと類似した動物を用いることが望ましい。

試験動物は原則として、各試験間で共通の動物種、系統又は品種を用いる。更に、適正な飼育条件下における自然発生病変の種類及び頻度が知られている系統を用いることが望ましい。

2 飼育管理

長期間動物を飼育する場合には、特に管理条件（温度、湿度、換気、照明等の飼育環境、飼料等）を適切に保ち、感染症等を発生させないように注意する。

3 被験物質

被験物質を飼料等に添加して投与する場合には、添加後の被験物質の均一性、添加濃度及び安全性について十分留意するとともに一定期間ごとに確認する。また、被験物質を溶媒等に溶解、懸濁又は乳化させた場合等にも被験物質の濃度及び安定性について明らかにしておく。

4 対照群

被験物質を飼料等に添加して投与する場合には、被験物質を除いた飼料等を与えて飼育する対照群をおく。また、溶媒、懸濁化剤、乳化剤等を用いて投与した場合には、対照群として溶媒、懸濁化剤、乳化剤等のみを含む飼料等を与えて飼育する群を設けることが望ましい。なお、被験物質の添加が高濃度の場合には、栄養バランスについて考慮することが必要である。

5 予備試験

あらかじめ被験物質のおおよその毒性を把握するために、急性毒性試験を行ったのち、他の予備試験を実施する。（ただし、哺乳類を用いる 28 日間の反復投与毒性試験の結果を用いることができる場合には、この限りでない^(注)。)

6 その他

用量設定などのために行われた予備試験の結果も同時に報告書として提出する。

(注) 急性毒性試験及び1～3ヶ月の短期の予備試験は、OECD Test Guideline (OECD 理事会決定 [C (81) 30 最終別添1]) 402、403、420、423 及び 425 並びに 407～413、及び哺乳類を用いる 28 日間の反復投与毒性試験等を参考にして実施することが望ましい。

III 慢性毒性試験

目的

本試験は、動物に被験物質を長期関連投与したときに現れる生体の機能及び形態等の変化を観察することにより、被験物質の毒性を明らかにすることを目的とする。

1 試験動物

1-1 動物種及び性

1～3か月の短期の予備試験で用いたものと同種のマウス、ラット等2種以上の雄及び雌を用いる。このうち1種は非げっ歯類であることが望ましい。

1-2 年齢

マウス、ラット等の寿命の短い動物種では、5～6週齢の体重のそろったものを用い、寿命の比較的長い動物種では、マウス、ラット等におおむね対応する年齢のものを用いる。

1-3 動物数

マウス、ラット等では、各群雄及び雌それぞれ20匹以上を用いる。非げっ歯類では、各群雄及び雌それぞれ4匹以上を用いる。なお、マウス、ラット等について途中で屠殺して検査を行う場合には、それに要する数をあらかじめ加えるものとする。

2 被験物質

2-1 投与方法

原則として経口投与で行う。被験物質は飼料又は飲料水に添加して投与することが望ましい。なお飼料に添加する被験物質の濃度は5W/W%以下とする。ただし、被験物質の性状により経口投与ができない場合は、非経口投与で行う。強制投与の場合は、毎日一定の時刻に投与する。

2-2 用量

用量と作用との関係を知るために、投与量は3段階以上とする。

あらかじめ1～3か月の短期の予備試験を行い、多数の死亡例を引き起こすことなく、被験物質による何らかの毒性影響が認められる量を最高用量とする。

最低用量は試験期間を通じて動物に影響が発現しない量とする。別に対照群をおく。

なお、実際の被験物質摂取量は動物の摂餌量又は摂水量と被験物質の濃度から算出す

る。

2-3 投与期間

12 か月以上とする^(注1)。

3 観察・測定事項

原則として、次の事項について観察を行う。

3-1 一般状態、死亡率

3-2 体重、摂餌量及び摂水量、食餌効率^(注2)

3-3 血液検査

3-3-1 血液学的検査^(注3)

3-3-2 血液生化学的検査^(注4)

3-4 尿検査^(注5)

3-5 病理学的検査

3-5-1 肉眼的観察及び器官重量^(注6)

3-5-2 顕微鏡的観察（必要に応じて電子顕微鏡による検査又は組織化学的検査を行う。）^(注7)

3-6 その他の必要な事項

試験中死亡した動物についてはその死因を調べる。また、一般状態が極めて不良となり、死期の迫った動物は速やかに屠殺解剖を行う。

(注1) マウス、ラットでは、少なくとも投与期間の中間時点で1回、雄雌それぞれ5匹以上を用いて、実験終了時に行う検査と同様の諸項目について検討することが望ましい。

(注2) 摂水量については、被験物質を飲料水に混ぜて投与するときのみ測定し、食餌効率については、動物の成長期間中は算出することが望ましい。

(注3) 一般的に行われている血液学的検査の項目は次のとおりである。各項目の測定には、それぞれ国際的に繁用されている方法と測定単位を採用する。このほか、毒性との関連性が示唆される項目についても検査することが望ましい。

赤血球数、網状赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、白血球数、白血球百分率、血小板数など。

(注4) 一般的に行われている血液生化学的検査の項目は次のとおりである。各項目の測定には、それぞれ国際的に繁用されている方法と測定単位を採用する。このほか、毒性との関連性が示唆される項目についても検査することが望ましい。

総蛋白、A/G比、血糖、トリグリセライド、リン脂質、総コレステロール、尿素窒素、クレアチニン、尿酸、Na、K、Cl、Ca、P、GOT、GPT、LPH、アルカリホスファターゼ、クレアチンホスホキナーゼ、 γ -GTP、オルニチンデカルボキシラーゼなど。

(注5) 尿量、pH、潜血、総蛋白、糖、ケトン体、ウロビリノーゲン及びビリルビンの半定量試験を行い、必要に応じて沈渣の顕微鏡的検査を行う。

(注6) 試験に使用したすべての動物（途中死亡及び途中屠殺した動物も含む。）を解

剖し、全器官・組織について十分な肉眼的観察を行う。(注7)において示すすべての器官・組織を全群について適当な保存液中に保存する。

(注7)において*印を付した器官・組織について、その重量を測定する。

(注7) 病理組織学的検査を必要とする器官・組織は次のとおりである。本検査は最高用量群と対照群について実施し、最高用量群で変化が認められた器官・組織については他の用量群についても検査を実施する。

脳*、脊髄、末梢神経、下垂体*、眼球、鼻腔(#)、肺* (気管支を含む。)、舌、食道、胃、小腸、大腸、皮膚、唾液腺、リンパ節、甲状腺(上皮小体を含む。)、胸腺、心臓*、肝臓*、膵臓、脾臓*、腎臓*、副腎*、膀胱、精巣*、精のう、前立腺、乳腺(雌)、卵巣*、子宮、胸骨(骨髄を含む。)、椎骨又は大腿骨(関節を含む。))及び肉眼的に変化の認められた器官・組織。

(#) 吸入試験の場合は、鼻腔、咽頭、喉頭及び気管。

IV 生殖能及び後世代に及ぼす影響に関する試験

目的

本試験は、動物の雄及び雌に被験物質を多世代にわたり投与し、被験物質の生殖能及び後世代の発生に及ぼす障害を明らかにすることを目的とする。

1 試験動物

1-1 動物種

1-1-1

ラット又はマウスなど1種以上とし、Vの催奇形性試験に用いられるもののうちから選ぶ。

動物種、系統又は品種の選択に当たっては、受胎能など生殖に関連する知見、自然発生奇形の発生頻度、既知生殖・発生毒性物質に対する感受性などを考慮する。また、自然発生奇形の発生頻度の低いものを選択することが望ましい。

1-1-2

慢性毒性試験と同じ動物種を用いる場合は、その系統が同一であるものを選択することが望ましい。

1-1-3

ラット又はマウス以外の動物種を用いるときは、この指針は試験の目的にかなうよう適切な修正を必要とする。

1-2 動物数

ラット又はマウスでは、被験物質を投与しない対照群において、20匹程度の妊娠動物を得られることが期待される数の雌と同数の雄を用意する。

2 被験物質

2-1 投与方法

原則として、経口投与で行う。被験物質は飼料又は飲料水に添加して投与することが

望ましい。なお、飼料に添加する被験物質の濃度は 5W/W%以下とする。ただし、被験物質の性状により経口投与ができない場合は非経口投与で行う。

2-2 用量

用量・反応関係を知り、最大無作用量を推定するために、少なくとも 3 段階の用量の試験群を設定する。最高用量は、親世代動物 (F_0) に摂餌量の低下や体重増加の抑制などの若干の毒性徴候が示されるが 10%以上の死亡率をきたさない量とする。

最低用量は、生殖能及び後世代の発生に毒性影響を及ぼさない量とする。別に対照群をおく。

3 交配と被験物質の投与

3-1

F_0 は、5~8 週齢頃までに被験物質の投与を開始し、原則として、10 週間（マウスでは 8 週間）以上の間、連日投与したのち交配にあてる。

同一の雄と雌の同居期間は 2 ないし 3 週間とし、その間毎日交尾の有無を確認する。

3-2

交尾を確認した雌は分離飼育し、自然分娩させ第 1 世代 (F_1) を得る。

同腹生存数を調整する場合には、出生後比較的早い時期に 1 母体当たり雄と雌がほぼ同数からなる一定匹数無作為に残す。仔はそのまま母動物に哺育させる。

なお、父動物にあつては、 F_1 を得るための交配終了まで、母動物においては F_1 の離乳まで継続して被験物質を投与する。

3-3

F_1 の離乳時に次世代を得るための動物を無作為に選択し、残りの動物は剖検する。次世代を得るための動物には、離乳後 F_0 と同様に被験物質を 10 週間（マウスでは 8 週間）以上投与した後に、原則として、同腹仔でない雄と雌の対を 20 以上とり、 F_0 と同様に交配させ第 2 世代 (F_2) を得る。 F_2 は原則として、離乳後性成熟期に至るまで被験物質を投与し、飼育する。

4 観察事項

4-1 F_0

4-1-1

一般状態及び死亡の有無を観察し、体重及び摂餌量（必要に応じ摂水量）を測定し、被験物質摂取量を算出する。

4-1-2

親動物について交尾率及び受胎率を算出する。また、母動物については分娩の異常を検索し、出産率を算出する^(注1)。

4-1-3

F_1 の離乳時に母動物を剖検し、内部器官を観察する。

4-1-4

雄及び交尾、妊娠又は出産をしなかった雌は適切な時期に屠殺し、内部器官を観察する^(注2)。

4-2 F₁

4-2-1

新生仔については、出生仔数、その生死、性別、体重及び外表における変化等を調べる。

4-2-2

出生後は、一般状態、死亡の有無、成長及び形態と機能の発達を観察する。少なくとも週一回体重の測定を行う。適当な期間ごとに生存率を算出し、離乳時に離乳率を算出する^(注3)。

4-2-3

F₂を得るための交配に用いた F₁については、F₀と同様の検索を行う。残りの F₁は離乳時に剖検する。

4-3 F₂

F₁と同様の観察を行い、原則として、性成熟期に剖検する。必要に応じ、組織学的あるいは生化学的方法により詳細に検査を行う。

4-4 観察のまとめ方

観察された異常又は毒性症状と被験物質の投与量との関係について適切な統計学的手法を用いて考察し、最大無作用量について見解をのべる。この際、離乳までは1腹仔を標本単位とするのが望ましい。

5 試験の延長など

必要に応じて、第2産仔以後を得るために F₀及び F₁の交配を繰り返し行う検査、又は F₂について性成熟期以後の長期間観察、更には F₃を得るための交配と生殖能の検査を行う。また、被験物質投与による生殖障害が主として雄・雌いずれの側への影響によるかを明らかにする必要がある場合には、投与雄と非投与雌、あるいは非投与雄と投与雌との交配を行う。

(注1) 通常、次の計算法による。

$$\text{交尾率} = (\text{交尾動物数} / \text{同居動物数}) \times 100$$

$$\text{受胎率} = (\text{妊娠動物数} / \text{交尾動物数}) \times 100$$

$$\text{出産率} = (\text{生仔出産雌数} / \text{妊娠雌数}) \times 100$$

(注2) 雄では通常、交配期間の終了時に屠殺する。雌では例えば交尾を認めなかったものは、交配期間の終了時に、また、妊娠又は出産しなかったものは、交尾日から計算して、出産予定日を2、3日経過した時に屠殺する。

(注3) 通常、次の算出法による。

$$\text{生存率} = (\text{検索日の生仔数} / \text{出産時の生仔数、生後4日若しくは淘汰直後の生仔数} \\ \text{又は離乳時の生仔数}) \times 100$$

検索の時期により分母が異なる。

$$\text{離乳率} = (\text{離乳時生仔数} / \text{生後4日又は淘汰直後の生仔数}) \times 100$$

V 催奇形性試験

目的

本試験は、胎仔の器官形成期に妊娠動物に被験物質を投与し、被験物質の胎仔の発生に及ぼす障害、特に催奇形性を明らかにすることを目的とする。

1 試験動物

1-1 動物種

1-1-1

ラット又はマウスなどのげっ歯類及びウサギなどの非げっ歯類から各1種以上とする。

動物種、系統又は品種の選択に当たっては、受胎能などの生殖に関連する知見、自然発生奇形の発生頻度、既知生殖・発生毒性物質に対する感受性などを考慮する。また、自然発生奇形の発生頻度の低いものを選択することが望ましい。

1-1-2

慢性毒性試験と同じ動物種を用いる場合は、その系統が同一であることが望ましい。

1-1-3

ラット、マウス又はウサギ以外の動物種を用いるときは、この指針は本試験の目的にかなうよう適切な修正を必要とする。

1-2 動物数

ラット、マウスでは妊娠が成立した個体の数として、各用量群20匹以上、ウサギでは12匹以上を用いる。

2 被験物質

2-1 投与方法

原則として、強制経口投与で行う

2-2 用量

用量・反応関係を知り、最大無作用量を推定するために、原則として3段階以上の用量を試験群を設定する。最高用量は原則として母動物に摂餌量の低下や体重増加の抑制などの若干の毒性徴候が示されるが、10%以上の死亡をきたさない量とする。投与可能な最大量（1,000mg/kgを限度とする。）においても母動物に毒性徴候が示されない場合には、その量を最高用量とする。最低用量は胎仔の発生に毒性影響が示されない量とする。別に溶媒のみを投与する対照群をおく。

2-3 投与期間

胎仔の器官形成期を通じて連日投与を行う。通常、交尾確認日を妊娠0日とした場合、マウスでは妊娠6日より15日まで、ラットでは妊娠7日より17日まで、ウサギでは妊娠6日より18日までとする。ただし、ラットでは妊娠6日より15日まででもよい。

3 観察事項

3-1 母動物

3-1-1

試験期間を通じ一般状態を観察し、体重及び摂餌量を測定する。

3-1-2

出産予定日のほぼ前日に全数を剖検し、妊娠の成立を調べ、黄体数、着床数を数え、内部器官を肉眼的に観察する。

3-2 胎仔

胎仔の生死を判定し、死亡仔については死亡時期を推定する。生仔については、体重を測定し、性を判定する。更に外表及び内部器官の肉眼的検査と骨格染色透明標本による骨の形態や骨化に関する検査を行う。

3-3 観察のまとめ方

観察された異常又は毒性症状と被験物質の投与量との関係について適切な統計学的手法を用いて考察し、最大無作用量について見解をのべる。この際、1腹仔を標本単位とするのが望ましい。

VI 変異原性試験

目的

比較的簡便な短期間の試験により被験物質の遺伝毒性を検出し、それに基づくがん原性及び次世代への遺伝的影響について予測することを目的とする。

試験法の選択

変異原性試験には種々の方法^(注1)があるが、このうち遺伝子突然変異誘発性を指標とする試験として、「1 細菌を用いる復帰突然変異試験」、及び染色体異常誘発性を指標とする試験として、「2 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験」を行い、両者いずれかで陽性の結果が得られた場合には、「3 げっ歯類を用いる小核試験」を行う。

1 細菌を用いる復帰突然変異試験

1-1 目的

細菌を用いて、被験物質の遺伝子突然変異誘発性の有無を検索する。

1-2 使用菌株

以下の5菌株を用いて試験を行う。

- (1) ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA98
- (2) ネズミチフス菌 TA100
- (3) ネズミチフス菌 TA1535
- (4) ネズミチフス菌 TA1537、TA97 又は TA97a
- (5) 大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2 *uvrA*、大腸菌 WP2 *uvrA/pKM101* 又はネズミチフス菌 TA102

DNAにクロスリンクする化合物を検出する時には、ネズミチフス菌ではTA102を含めるか、大腸菌では除去修復能が野生型のWP2株又はWP2/pKM101株を追加する。必要に応じて他の菌株を追加する。

1-3 試験法

プレインキュベーション法又はプレート法のいずれかで実施する。科学的に正当な理由があれば、他の方法を用いてもよい。いずれの方法においても、代謝活性化による場合及びよらない場合について試験を行う。代謝活性化による場合には、適切な薬物代謝酵素誘導剤（例えばフェノバルビタールと 5,6-ベンゾフラボンの併用など）で処理したげっ歯類（通常ラット）肝ホモジネート 9,000×g 上清分画（S9）に補酵素などを加えた S9mix を用いる。S9 の最終濃度は 5~30% の範囲内（通常 10%）とする。

1-4 用量段階

適切な間隔で 5 段階以上の解析できる用量を用いる。最高用量は、あらかじめ用量設定試験を行い、生育阻害及び溶解性を考慮に入れて設定する。原則として、生育阻害の現れる用量を最高用量とし、生育阻害の現れない場合は 5 mg/plate を最高用量とする。難溶性物質で全く生育阻害がみられない場合には、析出する用量を最高用量とすることができる。

1-5 対照

陰性対照として溶媒処理群を、陽性対照として適切な既知の変異原物質による処理群を設ける。

1-6 プレート数

被験物質の各用量、並びに陰性及び陽性対照について、原則としてそれぞれ 2 枚以上のプレートを用いる。

1-7 復帰変異コロニーの観察

全てのプレートを原則として 37°C で 48~72 時間培養した後に、プレートごとに復帰変異コロニー数を計測し、記録する。同時に生育阻害を観察し、それが認められた場合には、その用量を記録する。また、被験物質の析出が認められた場合にも記録する。

1-8 再現性

原則として試験結果には再現性がなければならない。ただし、全菌株を用いて、陰性対照及び陽性対照も含めた用量設定試験が各用量 2 枚以上のプレートを用いて行われている場合には、再現性の確認に用いることができる。

1-9 結果の判定

復帰変異コロニー数が陰性対照に比較して明らかに増加し、かつ、その作用に用量依存性あるいは再現性が認められた場合に陽性と判定する。用量設定試験及び本試験の結果に再現性が認められない場合には、再現性を確認する試験を実施する。明確に陽性あるいは陰性と結論づけられない場合には、適切な実験条件で確認試験を実施する。

1-10 結果の表示

各プレートごとの復帰変異コロニー数を示すとともに、各用量ごとにその平均値を表示する。

2 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

2-1 目的

哺乳類培養細胞を用いて、被験物質の染色体構造異常の誘発性の有無を検索する。倍数体等が出現した場合には、それを記録する。

2-2 使用細胞

チャイニーズ・ハムスター線維芽細胞株（例えば CHL/IU、CHO）、ヒト末梢血リンパ球、若しくは、その他の初代、継代又は株細胞を用いる。試験に用いる細胞については、染色体数（modal number）、マイコプラズマの汚染の有無、細胞周期などを調べる。

2-3 試験法

増殖期にある細胞を用い、最初に短時間処理法として代謝活性化による場合及びよらない場合について、3~6時間被験物質で処理し、処理開始より約 1.5 細胞周期後に染色体標本作製する。短時間処理法の結果が陰性の場合には、次に代謝活性化によらない場合について 1.5 細胞周期の連続処理法による試験を実施する。被験物質によっては顕著な細胞周期の遅延が生じる場合がある。代謝活性化によらない場合には 1.5 細胞周期よりも長い連続処理、代謝活性化による場合には 1.5 細胞周期よりも遅い標本作製時期が必要な場合があり、そのため必要に応じて確認試験を行う。

代謝活性化による場合には、適切な薬物代謝酵素誘導剤（例えばフェノバルビタールと 5,6-ベンゾフラボンとの併用など）で処理したげっ歯類（通常ラット）肝ホモジネートの 9,000×g 上清画分（S9）に補酵素などを加えた S9 mix を用いる。S9 の最終濃度は 1~10% の範囲内（通常 5%）とする。

2-4 被験物質の調製

被験物質を適切な溶媒に溶解又は適切な媒体に懸濁させる。被験物質が液体の場合は直接試験系に加えてもよい。被験物質が水溶性の場合は生理食塩水などを用いて溶解させ、水に不溶の場合はジメチルスルホキシド（DMSO）などを用いて溶解させる。必要に応じてカルボキシメチルセルロース（CMC）ナトリウムなどを用いて均一な懸濁液を調製する。

2-5 用量段階

適切な間隔（原則として公比 2）で 3 段階以上の染色体分析ができる用量を用いる。最高用量は、あらかじめ 5mg/mL 又は 10mM（いずれか低い方）を最高用量とした細胞増殖抑制試験を行って設定することが望ましい。原則として、被験物質の培養液中での溶解性にかかわらず、細胞増殖が明らかに 50% 以上抑制される用量を最高用量とする。細胞増殖は短時間処理法による試験あるいは連続処理法による試験においても染色体標本作製時に計測する。50% 以上の細胞増殖抑制が認められない場合は、5mg/mL 又は 10mM（いずれか低い方）を最高用量とする。細胞毒性が認められず、処理終了時に被験物質の析出が認められた場合には、析出する用量を最高用量とすることができる。

2-6 対照

陰性対照として溶媒処理群を、陽性対照として適切な既知の染色体異常誘発物質による処理群を設ける。

2-7 プレート数

被験物質の各用量群、並びに陰性及び陽性対照群について、原則としてそれぞれ 2 枚のプレートを用いる。

2-8 染色体異常の観察

スライド標本はコード化し、処理条件がわからない状況で観察する。染色体構造異常については、各用量当たり少なくとも 200 個のよく広がった分裂中期細胞（染色体数がモード \pm 2）を観察し、染色体構造異常をもつ細胞数及び構造異常の種類別に細胞数を記録する。2 枚のプレートを用いた場合には、原則としてプレート当たり少なくとも 100 個の分裂中期細胞を観察する。ギャップは他の異常と区別して記録するが、構造異常には含めない。ギャップは染色分体幅よりも狭い非染色性部位と定義する。染色体の数的異常については、各用量当たり 200 個以上の分裂中期細胞について観察し、倍数体等の出現数を記録する。

2-9 結果の判定

染色体異常をもつ細胞の出現頻度が陰性対照に比較して明らかに上昇し、かつ、その作用に用量依存性又は再現性が認められた場合に陽性と判定する。明確に陽性あるいは陰性と結論づけられない場合には、適切な実験条件で確認試験を実施する。

2-10 結果の表示

短時間処理法による試験あるいは連続処理法による試験における全てのプレートについて、染色体構造異常をもつ細胞数及びその出現頻度（%）並びに構造異常の種類別に細胞数を表示する。また、群ごとにプレートの平均値を表示する。倍数体等についてもその数と出現頻度（%）を表示する。細胞増殖抑制試験並びに短時間処理法による試験あるいは連続処理法による試験における各用量群と陰性対照群の細胞増殖に関するデータを表示する。被験物質の析出が見られた場合には、その用量を明記する。

3 げっ歯類を用いる小核試験

3-1 動物及び観察細胞

若い成熟げっ歯類を用い、骨髄又は末梢血の幼若赤血球を観察対象とする。一般的にはマウス又はラットが用いられるが、ラットについては、骨髄を用いた場合に肥満細胞の顆粒による疑似小核の出現、末梢血を用いた場合に脾臓で小核を持つ赤血球が除去されることに注意し、より適切な観察方法を用いる。

3-2 動物の性及び数

1 群、性あたり 5 匹以上とする。ただし、毒性に明らかな性差が見られない場合には、片性のみ（5 匹以上）の使用で十分である。

3-3 被験物質の調製

被験物質が固体の場合には適切な溶媒に溶解又は媒体に懸濁させ、液体の場合には直接投与するか又は適切な溶媒で希釈して調製する^(注2)。被験物質が気体の場合には清浄な空気等を用いて希釈する。調製後の安定性が判明している場合には、安定な期間内に使用し、不明な場合には用時に調製する。

3-4 対照群

陰性対照^(注3)としては溶媒又は媒体を、陽性対照としては適切な既知小核誘発物質^(注4)を、それぞれ設定する。

3-5 投与経路

強制経口投与又は腹腔内投与を原則とする。ただし、特定の暴露経路（吸入暴露等）が想定される等、科学的な理由がある場合にはこの限りでない。

3-6 投与回数

単回又は反復投与とする。

3-7 用量段階

最高用量は、幼若赤血球の減少等、骨髄で細胞毒性が認められる用量、何らかの毒性兆候が認められる、若しくはそれ以上で致死が予想される用量又は技術的に投与可能な上限の用量とする^(注5)。また、毒性兆候が現れない場合の最高用量は、単回又は14日以内の反復投与については2,000mg/kg/日、それを超える長期反復投与については1,000mg/kg/日とする。なお、被験物質が気体の場合は、安全に暴露できる濃度を最高用量とする^(注6)。適切な間隔（公比2を原則とするが、公比 $\sqrt{10}$ 以下であればよい。）で3段階以上の用量を設定する。

3-8 標本作製時期

3-8-1 骨髄を用いる場合

単回投与では、投与後24～48時間の間に適切な間隔をおいて最低2回の標本作製時期を設定し、動物を屠殺、骨髄塗沫標本作製する^(注7)。また、反復投与を行った場合には、最終投与後18～24時間の間に1回、標本作製を行う。^(注8)

3-8-2 末梢血を用いる場合

単回投与では、投与後36～72時間の間に適切な間隔をおいて最低2回の採血時期を設定し、標本作製する^(注7)。また、反復投与を行った場合には、最終投与後24～48時間の間に1回、標本作製を行う。^(注8)

3-9 観察

観察前に、陰性対照及び陽性対照を含め、すべてのスライド標本をコード化して、処理条件がわからない状況で観察を行う。個体当たり2,000個以上の幼若赤血球を観察して、小核を有する細胞の出現頻度を求める。また、骨髄細胞の増殖抑制の指標として、全赤血球に対する幼若赤血球の出現頻度を、個体当たり、骨髄を用いた場合には200個以上、末梢血を用いた場合には1,000個以上の赤血球を観察することにより求める。^(注9)

3-10 結果の表示

個体ごとに、観察した幼若赤血球に対する小核を有する細胞の出現頻度及び全赤血球に対する幼若赤血球の出現頻度を、表形式にて表示するとともに、群ごとの平均値についても表示する。

3-11 結果の判定

被験物質が十分な高用量まで適切に投与され、かつ陰性及び陽性対照群で期待どおりの結果が得られていることを前提とし、陰性対照群の背景データの利用を含め、適切な統計処理を用いることにより結果の判定を行う^(注10)。なお、両性を用いた場合の結果に明確な性差が認められなければ、両性のデータをまとめて統計処理を行ってもよい。

明確に陰性又は陽性と判断できない場合には、統計的な有意性のみが判断基準ではないので、実験条件を考慮して再試験を実施し、最終的な判断をすることが望ましい。

3-1-2 結果の評価

いずれかの *in vitro* 試験で陽性結果が認められ、かつ本試験で陰性結果となった被験物質については、生体内運命に関する入手可能な知見等を利用して、判定結果を考察する。

(注1) ここで得られる結果は、化学物質の変異原性に関する最少情報である。

がん原性及び次世代への遺伝的影響を予測する試験方法には、以下に例示する各種の短期試験法がある。

1 DNA 損傷を指標とする試験

in vitro 及び *in vivo* 試験系

- 1) ³²P ポストラベル法
- 2) 酸化的 DNA 損傷を検出する試験
- 3) 単細胞ゲル電気泳動法 (コメットアッセイ)

2 DNA 修復を指標とする試験

A *in vitro* 試験系

- 1) 枯草菌を用いる DNA 修復試験
- 2) ネズミチフス菌を用いる *umu* 試験
- 3) 大腸菌を用いる SOS 試験
- 4) 哺乳類培養細胞を用いる不定期 DNA 合成試験 (UDS)

B *in vivo* 試験系

- 1) げっ歯類を用いる不定期 DNA 合成試験 (UDS)

3 遺伝子突然変異誘発性を指標とする試験

A *in vitro* 試験系

- 1) ネズミチフス菌 (Ames 試験)、大腸菌等を用いる復帰突然変異試験
- 2) 哺乳類の培養細胞 (マウスリンパ腫 L5178Y、ヒトリンパ球 TK6、チャイニーズハムスター細胞株 V79、CHO 等) を用いる遺伝子突然変異試験

B *in vivo* 試験系

- 1) ショウジョウバエを用いる伴性劣性致死試験、翅毛スポット試験
- 2) トランスジェニック動物を用いる試験
- 3) マウスを用いる特定座位試験、毛色スポット試験
- 4) 哺乳類の内在性遺伝子 (*hprt* 等) を用いた突然変異試験

4 染色体異常誘発性を指標とする試験

A *in vitro* 試験系

- 1) 酵母を用いる異数性を含む染色体異常試験
- 2) ヒト培養リンパ球を用いる染色体異常試験
- 3) チャイニーズハムスター等細胞株を用いる染色体異常試験
- 4) 哺乳類培養細胞を用いる小核試験

B *in vivo* 試験系

- 1) げっ歯類を用いる小核試験
- 2) げっ歯類骨髓細胞を用いる染色体異常試験
- 3) 優性致死試験
- 4) 相互転座試験

5 その他の試験

A *in vitro* 試験系

- 1) 酵母を用いる体細胞組換え試験
- 2) 酵母を用いる遺伝子転換試験
- 3) 哺乳類培養細胞を用いる姉妹染色分体交換試験
- 4) 哺乳類培養細胞を用いる形質転換試験

B *in vivo* 試験系

- 1) げっ歯類を用いる姉妹染色分体交換試験
- 2) げっ歯類を用いる精子形態異常試験

(注2) 溶媒又は媒体については、被験物質と反応しないものを選択し、毒性を示さない用量で使用する。一般に、生理食塩液などの水系溶媒の使用が推奨される。

(注3) 末梢血を用いる短期試験（1～3回投与）の場合、投与前サンプルを陰性対照とすることができる。

(注4) 陽性対照物質の例

メタンスルホン酸エチル

マイトマイシン C

シクロフォスファミド

トリエチレンメラミン

なお、投与用量としては、極端に高くはないが、明確な小核誘発性を示す用量が推奨される。

(注5) 媒体が水を主成分とする場合は 20mL/kg、それ以外では 10mL/kg を最大の投与液量とする。

(注6) 暴露可能な最大濃度あるいはミストとダストでは 5mg/L、ガスと蒸気では適切な酸素濃度（19～21%）を維持でき、安全に暴露できる技術的に可能な最高濃度を用いる。

(注7) 単回投与の場合でも、予備試験によって標本作製時期を検討した結果、最も感受性の高い時期が確認され、陽性の結果が得られることが認められる場合、この時期 1 回のみの標本作製とすることができる。この場合の標本作製時期は、小核誘発頻度の最も顕著な上昇が認められる時期とする。

ただし、いずれの時期においても明白な小核誘発頻度の上昇が認められない場合には、骨髓を用いる場合は投与後 24～30 時間、末梢血を用いる場合は 36～48 時間を標本作製時期とする。

(注8) 陽性対照については適切な時期に 1 回、標本作製を行う。

(注9) 標本の染色は、骨髓標本に対しては、通常、アクリジン・オレンジ蛍光染色法又はギムザ染色法を用い、末梢血標本の場合には通常アクリジン・オレンジ超生体染色法を用いる。

(注10) 被験物質が十分な高用量まで適切に投与され、かつ陰性及び陽性対照群で期待ど

おりの結果が得られた場合で、すべての処理群において陰性対照群との間に統計学的な有意差が認められない場合には、陰性と判定する。一方、小核を有する細胞数に統計学的な有意差があり、用量依存性があるか、又は結果に再現性がある場合に陽性と判定する。

VII がん原性試験

目的

本試験は、動物に被験物質をほぼ一生涯にわたる期間連続投与し、被験物質のがん原性の有無を明らかにすることを目的とする。

1 試験動物

1-1 動物種及び性

マウス、ラット等 2 種以上の雄及び雌を用いる。

一般には、通常の飼育条件下における腫瘍の自然発生率及び既知がん原性物質に対する感受性などが良く知られている動物種、系統の近交系又はその一代雑種を用いる。この場合、腫瘍の自然発生率の低いものを選択することが望ましい。

1-2 年齢

5~6 週齢の体重のそろったものを用いる。

1-3 動物数

各群雄及び雌それぞれ 50 匹以上を用いる。

2 被験物質

2-1 投与方法

原則として、経口投与で行う。被験物質は、飼料又は飲料水に添加して投与することが望ましい。なお、飼料に添加する被験物質の濃度は 5W/W% 以下とする。ただし、被験物質の性状により経口投与ができない場合は非経口投与で行う。強制投与の場合は、毎日一定の時刻に投与する。

2-2 用量

用量と反応との関係を知るために、投与量は 3 段階とする。

あらかじめ 1~3 か月の短期試験を行い、対照群に比し 10% 程度の体重減少にとどまり、中毒による死亡例がなく、かつ、一般状態に著しい変化を示さない最大量を最高用量とする。最高用量から原則として、公比 2 ないし 3 で中用量及び最低用量を設定する。別に対照群をおく。

なお、実際の摂取量は動物の摂餌量又は摂水量と被験物質の濃度から算出する。

2-3 投与期間

動物のほぼ一生涯とする（マウス及びハムスターでは 18 か月以上、ラットでは 24 か月以上）。

ただし、マウス、ハムスターで 18 か月、ラットで 24 か月の時点で被験物質に起因する腫瘍性病変以外の原因による死亡率が 50% 以内であることが必要である。

3 観察・測定事項

3-1 一般的観察^(注1)

3-2 体重、摂餌量及び摂水量、食餌効率^(注2)

3-3 病理学的検査

3-3-1 肉眼的観察^(注3)

3-3-2 顕微鏡的観察（必要に応じて電子顕微鏡による検査、組織化学的検査を行う。）^(注4)

3-4 血液検査^(注5)

3-5 その他の必要な事項

試験中死亡した動物についてはその死因を調べる。また、一般状態が極めて不良となり、死期の迫った動物は速やかに屠殺解剖を行う。

(注1) 一般状態及び死亡の有無を観察し、生存率を算出する。

(注2) 摂水量については、被験物質を飲料水に混ぜて投与するときのみ測定し、食餌効率については、動物の成長期間中は算出することが望ましい。

(注3) 試験に使用したすべての動物（途中死亡及び途中屠殺した動物も含む。）を解剖し、全器官・組織について十分な肉眼的観察を行う。（注4）において示すすべての器官・組織を全群について適当な保存液中に保存する。

(注4) 肉眼的に認められた全腫瘍性病変部の他に対照群及び最高用量群の全例について次の器官・組織の顕微鏡的検査を行う^(※1)。

最高用量群で変化の認められた器官・組織については、他の用量群についても検査を実施する^(※2)。

脳、脊髄、末梢神経、下垂体、眼球、鼻腔^(#)、肺（気管支を含む。）、口腔及び舌、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、外耳道、皮膚、唾液腺、リンパ節、甲状腺（上皮小体を含む。）、胸腺、心臓、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、精巣、精のう、前立腺、乳腺（雌）、卵巣、子宮、膣、胸骨（骨髄を含む。）、椎骨又は大腿骨（関節を含む。）。

(#) 吸入試験の場合は、鼻腔、咽頭、喉頭及び気管。

(※1) 最高用量群の生存動物が対照群と比べて非常に少ない場合には、次の用量群についても行う。

(※2) 最高用量群が前記の(※1)に該当する場合は、最高用量群又は次の用量群で変化の認められた器官・組織とする。

最高用量群又は次の用量群で認められる変化には、腫瘍性病変だけでなく、一般的な毒性変化も含むものとする。

(注5) 剖検に際し、全例について血液塗抹標本を作製するとともに、必要に応じて、血球数の計測及び血液生化学的検査を行う。

VIII 生体内運命に関する試験

目的

本試験は、動物に被験物質を投与し、吸収、分布、蓄積、代謝、排泄等を調べることに

より、被験物質の生体内における動態を把握することを目的とする。

1 試験動物

1-1 動物種及び性

ラット、ウサギ、イヌ、サル等のうち1種以上の雄又は雌を用いる。

なお、動物種は他の毒性試験と同一の種類を用いること、また、2種以上を用いることが望ましい。

1-2 年齢

成熟に達した若い動物を用い、年齢を記載する。

なお、必要に応じ、幼若動物又は他の条件の動物を用いる。

1-3 動物数

ラット等では各群4匹以上の雄又は雌を用いる。

また、イヌ、サル等では各群2匹以上とする。

2 被験物質

2-1 投与方法

原則として、強制経口投与で行う。

なお、経口投与では試験目的を達成することが困難な場合には非経口投与により行う。

2-2 用量

1回投与の場合は少なくとも2段階とする。この場合、最高用量は反復投与により毒性徴候が現れる量とし、最低用量は動物に影響が発現しない量とする。

なお、可能ならば自然環境及び食物経路により摂取が予測される推定量に近い用量についても検討することが望ましい。

2-3 投与期間

1回投与により行う。更に一定期間にわたる反復投与についても検討することが望ましい。

なお、蓄積試験においては十分な期間にわたって継続して投与を行う。

3 検索

本試験は標識又は非標識の被験物質を動物に投与し、被験物質の吸収速度及び吸収量、被験物質及び主要な代謝物（以下「被験物質等」という。）の器官・組織、体液等への分布パターン、蓄積性、代謝の様式と速度、排泄経路及び排泄速度並びに排泄量を検索する。更に、被験物質等の毒性に関連があると考えられる生体成分及び生体機能（酵素活性等）への影響等についても検索することが望ましい。また、*in vivo*における検査を中心とするが、必要に応じて *in situ* 及び *in vitro* の検査を併用する。

なお、被験物質について生体試料からの分析法及び回収率、検出限界等を記載する。

被験物質として同位元素標識化合物を使用する場合は、標識する部位は代謝に関して最も多くの情報が得られる部位とし、調製法、純度、同位体濃度、比放射能等を記載する。また、検出された放射能が被験物質そのものによるか否かを確認するとともに、代謝物等の場合は化学構造を同定することが望ましい。

3-1 吸収

3-1-1、3-1-2いずれかの方法を用いて被験物質の消化管からの吸収速度、吸収量及び吸収率を推定する^(注1)。

3-1-1

被験物質の消化管内残存量、被験物質等の尿、胆汁、糞、呼気等への排泄量及び体内残存量を経時的に測定し、被験物質の消化管からの吸収速度、吸収量及び吸収率を推定する。

3-1-2

被験物質等の血中濃度（血液、血漿又は血清中濃度）について C_{max} 、 T_{max} 、 α $1/2$ 、 β $1/2$ 等を求めると共に静脈内投与群の血中濃度の推移と比較して被験物質の消化管からの吸収速度、吸収量及び吸収率を推定する。

3-2 分布

できるだけ多くの器官・組織について被験物質等の濃度及び量を経時的に測定し、分布パターンを明らかにする^(注2)。更に生物学的半減期を算出し、主要器官・組織における蓄積性を予測する。

なお、必要に応じてオートラジオグラフィ等を併用して調べる。

また、血漿蛋白との可逆的結合性等についても調べるのが望ましい。

3-3 蓄積

分布等の結果を参考にして蓄積の可能性がある器官・組織を中心に、被験物質の蓄積を経時的に検討する。また、被験物質の投与をやめた後の蓄積量の減少を経時的に調べるのが望ましい。

3-4 代謝

尿、糞、呼気等の分析を行い、被験物質が体内で代謝される場合は代謝物を分離し、主要な代謝物を同定し、それらの生成率を求め、更に、*in vitro* の試験等を併用して主要な代謝経路を推定する。

なお、生体成分との相互作用のうち毒性との関連性が示唆されている生体高分子との結合、肝臓、腎臓等における内因性の非蛋白性チオール化合物の減少及び薬物代謝酵素系等に与える影響等についても検討するのが望ましい。

3-5 排泄

被験物質等の糞、尿、呼気等への排泄を7日間又は投与量の約95%が排泄されるまでの期間のどちらか早い方の期間にわたって経時的に測定し、被験物質等の排泄速度及び排泄率を求める。

また、被験物質等の主な排泄経路を明らかにすることが望ましい^(注3)。

4 その他の試験

他の毒性試験により被験物質等によると考えられる障害が認められ、それを説明する上で、被験物質等の体内動態をより詳細に検討することが有用であると考えられた場合は、更に特定の条件で一定の試験を行うことが望ましい^(注4)。

(注1) 被験物質等の排泄経路によっては、尿、呼気等への排泄量の比較から吸収速度、吸

収量及び吸収率を推定し得る。

なお、初回通過効果、腸肝循環について留意する。

(注 2) 使用する測定法の感度にもよるが、放射性同位元素標識化合物を用いて次に示す器官・組織について調べた例がある。

大脳、小脳、延髄、脊髄、坐骨神経、眼球、肺、心臓、肝臓、脾臓、胃、小腸、盲腸、結腸・直腸、下垂体、甲状腺、胸腺、副腎、唾液腺、膵臓、腸間膜リンパ節、精巣、精巣上体、精のう、前立腺、卵巣、子宮、腸間膜、横隔膜、筋肉、大腿骨、脂肪組織、皮膚、毛、血液

(注 3) 被験物質等の乳汁への排泄や皮膚からの排泄についても必要に応じて検討する。

(注 4) 例えば、

- 1) 慢性毒性試験において障害が認められた場合、被験物質等の体内分布を測定すると共に、障害の認められた特定の器官、組織について活性代謝物の生成、分布等について検討を加える。
- 2) 催奇形性試験において催奇形性が認められた場合は、妊娠動物に被験物質を投与し、被験物質等の胎盤通過、胎仔への分布等を調べると共に可能なならば胎仔における代謝を検討することが望ましい。

IX 薬理的試験

目的

本試験は、被験物質の薬理学的特性を明らかにすることを目的とする。

1 試験項目

主要な生体機能への影響について試験を行う。なお、他の毒性試験結果から毒性影響との関連が考えられる器官・組織の機能への影響についても検討することが望ましい。

2 試験動物

それぞれの試験に適した哺乳類及び性を選択して用いる。また、試験によっては哺乳類以外の動物を用いることができる。

3 被験物質

3-1 投与方法

3-1-1

in vivo の場合は原則として、経口投与で行う。ただし、経口投与では被験物質による影響が的確に観察出来ない場合は非経口投与で行う。

3-1-2

in vivo、*in situ*、*in vitro* のいずれの場合も被験物質を水、食用油又は他の適当な溶媒を用いて溶液として投与する。これが不可能な場合は、適当な懸濁化剤、乳化剤等を用いる。

3-1-3

通常 1 回投与によるが、試験目的によっては反復又は継続投与する。

3-2 用量

用量と反応との関係に留意し、被験物質に由来する影響を把握し得るに十分な用量とする。

4 試験法の選択

試験の種類は多岐にわたるが、被験物質の有する特異的作用が明らかとなる方法を用いる。この際、作用部位、作用機序についても検討することが望ましい。

<哺乳類の生殖能及び後世代に及ぼす影響に関する試験並びに鳥類の繁殖に及ぼす影響に関する試験>

I ここでは、哺乳類の生殖能及び後世代に及ぼす影響に関する試験並びに鳥類の繁殖に及ぼす影響に関する試験の標準となるべき方法について規定する。

II 哺乳類の生殖能及び後世代に及ぼす影響に関する試験

哺乳類の生殖能及び後世代に及ぼす影響に関する試験については、<化学物質の慢性毒性試験、生殖能及び後世代に及ぼす影響に関する試験、催奇形性試験、変異原性試験、がん原性試験、生体内運命に関する試験及び薬理学的試験>のIV 生殖能及び後世代に及ぼす影響に関する試験に規定する方法に準じるものとする。

III 鳥類の繁殖に及ぼす影響に関する試験

目的

本試験は、親鳥に被験物質を投与し、親鳥の死亡率、産卵数、卵殻にひびの入った卵数、卵殻の厚さ、胚の発生率、孵化率及び若鳥に対する影響を観察することにより、被験物質が鳥類の繁殖に及ぼす毒性を明らかにすることを目的とする。

1 定義

この試験法において使用する用語は、次の例による。

- NOEC（無影響濃度） 試験に用いた濃度のうち、悪影響を生じさせない最高の被験物質濃度をいう。
- 基礎餌料 親に対する繁殖用餌料あるいは幼鳥に対する初期餌料で、それぞれの試験種に適切で、必要な栄養素をすべて含むものをいう。
- 卵群 一度に孵卵する卵、又は生まれた卵のうち卵殻にひびの入った卵及び卵殻の厚さ測定のために使用する卵を除いた残りのすべての卵をいう。

2 被験物質の物理化学的特性等

試験を実施するためには、被験物質の水への溶解度及び蒸気圧を測定し、餌料中の被験物質を定量するための信頼できる分析方法が必要である。また、被験物質の試験手法に関係する、構造式、純度、水及び光に対する安定性並びに餌料中における安定性に関する情報をできるだけ収集する。

3 予備試験

あらかじめ被験物質のおおよその毒性を把握するために、OECDテストガイドライン205で定められた方法に準じて鳥類摂餌毒性試験を行う。

4 供試生物

1種又は、それ以上の鳥類を用いる。ウズラ(*Coturnix japonica*)を推奨するが、例えば、マガモ(*Anas platyrhynchos*)、 コリンウズラ(*Colinus virginianus*)等を使用してもよい。これら以外の鳥類を使用する場合には、その種を使う正当性を報告書の中に記載する。鳥は購入するか、当該施設で維持・飼養しているものを使用する。搬入時に検査して、鳥が病気及び傷害をうけていないことを確認する。試験に用いる鳥は、既知の系統の同一集団からのものでなければならない。マガモとコリンウズラは野生種と外見的に同様でなければならない。

5 試験方法

5-1 試験設備及び機器

(1) 試験設備

適切な試験設備を用い、室内で鳥を飼育することが望ましい。試験設備には、良好な換気、温度、湿度、照明を制御する機構が必要である。人工照明は自動制御でき、可視部のスペクトルが太陽光に近似したものをを用いる。点灯及び消灯時に15-30分の照明移行期間を設けることが望ましい(15-30分かけて、徐々に明るくするあるいは暗くすることが望ましい)。

(2) 装置

次の装置を用いる。

- ・ 親鳥及び若鳥を飼育するための適切な広さを有する清浄な鳥かごあるいは囲い(以下鳥かご)。きれいな床敷きを用いてもよい。若鳥に対する育雛器は温度制御装置を設けなければならない。
- ・ 孵卵器は自動的に温度及び湿度を調節でき、転卵装置を有するものが望ましい。
- ・ 一定の温度及び湿度で卵を保管する装置あるいは設備

5-2 じゅん化

親鳥を無作為に試験濃度区及び対照区に割り付ける。少なくとも2週間、試験濃度区及び対照区の鳥を試験設備及び基礎餌料に慣らす。じゅん化1週間の間には共存できない鳥を再配分しなおしてもよい。

じゅん化期間中に雄雌のいずれかの3%が死ぬか又は衰弱した場合、当該群の鳥を試験に使用してはならない。

5-3 試験の実施

5-3-1 試験条件

(1) 環境条件

親鳥を $22\pm 5^{\circ}\text{C}$ 、50~75%の湿度で良好な換気のもとに維持する。表1には、これ以外のそれぞれの種に特有の条件を記す。

餌料中に被験物質を入れない点を除き、環境条件は、じゅん化期間も暴露期間も同じである。可能な限り化学物質の使用あるいは薬物の投与を避けるが、使用した場合

には記載する。

鳥の行動に著しい影響を与える環境のかく乱を避ける。(環境を著しく乱して、鳥の行動に影響を与えることは極力避けるようにする)

卵と若鳥の環境条件を表2に示す。

表に示された温度と湿度は強制的な通風装置を有する孵卵器を用いる場合の条件である。強制的に通風しない場合は、温度は1.5~2℃、湿度は約10%高くしなければならない。高地ではより高い湿度が必要である。育雛器における温度は床面から2.5~4cmの位置で測定しなければならない。

表1 親鳥のための推奨される条件

種	暴露開始時の齢	齢の範囲	つがい当りの鳥かごの最小床面積 ^(注1)
ウズラ	^(注2)	±1/2週	0.15m ²
マガモ	9-12ヶ月	±2週	1m ²
コリンウズラ	20-24週	±1週	0.25m ²

(注1) 羽数が多くなる場合、床面積はそれに応じて広くする。

(注2) ウズラに関しては、この種にみられる変動の幅を小さくするために、使用前に繁殖可能な鳥である事を確認することを推奨する。

表2 卵と若鳥のための推奨される条件

	温度(℃)	湿度(%)	転卵
ウズラ			
貯卵	15-16	55-75	任意
孵卵	37.5	50-70	行う
孵化	37.5	70-75	行わない
若鳥、1週目	35-38	50-75	—
若鳥、2週目	30-32	50-75	—
マガモ			
貯卵	14-16	60-85	任意
孵卵	37.5	60-75	行う
孵化	37.5	75-85	行わない
若鳥、1週目	32-35	60-85	—
若鳥、2週目	28-32	60-85	—
コリンウズラ			
貯卵	15-16	55-75	任意
孵卵	37.5	50-65	行う
孵化	37.5	70-75	行わない
若鳥、1週目	35-38	50-75	—
若鳥、2週目	30-32	50-75	—

(2) 被験物質の投与

試験には少なくとも被験物質の3濃度区が必要である。被験物質の飼料中濃度は、鳥類摂餌毒性試験の結果に基づき定める。最高濃度はLC₁₀(10%の鳥を死亡させたと算定される餌料中の被験物質濃度)の約1/2とする。それ以下の濃度区は最高濃度の

等比級数的にとる（例えば最高濃度の 1/6 及び 1/36）。推奨する最高濃度は 1000mg/kg である。

被験物質の必要量を含む餌料は、被験物質の必要量と親鳥を飼育するための基礎餌料とを混合することによって調製する。被験物質は、餌料中で均一に分散していなければならない。均一に分散させるために、鳥に対して低毒性の助剤を用いてもよい。助剤は餌料重量の 2% を超えてはならない。

助剤を用いる場合、対照区の餌料にも同一助剤を添加しなければならない。水、コーンオイル、あるいは被験物質の毒性を変化させないという明白な証明が得られているその他の助剤を使用することができる。毒性を変化させないという明白な証明のない助剤を用いる場合には、その正当性を報告書の中に記載する。

若鳥の餌料には、被験物質及び助剤を添加してはならない。

表 3 繁殖に係る項目の正常値（注 3）

項目	ウズラ	マガモ	コリンウズラ
産卵数／雌鳥（10 週間）	40-65	28-38	28-38
卵殻にひびのある卵の発生率（%）	—	0.6-6	0.6-2
発生率（卵群あたりの生存胚、%）	80-92	85-98	75-90
孵化率（卵群あたりの孵化した卵、%）	65-80	50-90	50-90
14 日間生存した雛鳥の率（%）	93	94-99	75-90
14 日齢の生存数／雌鳥	28-38	16-30	14-25
卵殻の厚さ（mm）	0.19-0.23	0.35-0.39	0.19-0.24

（注 3） この値は典型的なものであるが、必ずしもすべての試験機関にとって代表的なものではない。対照区の鳥がこれらの値と合致しない場合には、試験のやり方及び条件を検討しなければならない。

（3）試験操作

鳥を一つがい又は一羽の雄と二羽の雌（ウズラ及びコリンウズラの場合）若しくは一羽の雄と三羽の雌（マガモの場合）よりなる一群を鳥かごで飼育する。適切と考えられる場合には、他の組み合わせも可能である。試験濃度区と対照区の鳥を同一試験条件下で飼育する。一つがいで行う場合、少なくとも 12 の鳥かごを各試験濃度区及び対照区に用いる。一群の場合、少なくともマガモでは 8 鳥かご、コリンウズラ及びウズラでは 12 鳥かごを各試験濃度区及び対照区に用いる。

試験は、被験物質を含む餌料を親鳥に与えることによって始まり、暴露期間中、親鳥に餌料を与えつづける。若鳥に対しては、被験物質及び助剤を含まない餌料を与える。清浄な水を随意に飲めるようにする。

試験を人工的な室内条件で行う場合、暴露開始後 8 週間、短日条件下で鳥を飼育する（7-8 時間照明／日）。この期間、暗期を光中断すべきではない。それ以降、照明時間を 16～18 時間照明／日に延長し、鳥を繁殖状態にする。照明時間を延長した後、2～4 週で産卵を開始する。

試験を屋外条件で実施する場合、用いる種の各試験地点での自然産卵季節に対応する時期に行わなければならない。産卵が始まる前の少なくとも 10 週間、被験物質を含む餌料を鳥に与える。

いずれの条件でも、産卵開始後、少なくとも 8 週間、なるべくなら 10 週間試験を続ける。

暴露開始 1 週間後の餌料中の被験物質濃度は、設定濃度の 80% を下回ってはならない。餌料中の被験物質の安定性が十分明らかでない場合には、最初の一週間の間に、最高及び最低試験濃度の被験物質を含む餌料を、混合直後及び餌料を交換した 4 時間以内に分析する。すべての分析値が設定濃度の 80% を超えている場合、新たに分析を行う必要はなく、被験物質濃度を維持するために十分な頻度で供試餌料を取り替えることとする。

一連の分析で、餌料中の被験物質濃度が設定濃度の 80% 以下である場合、初期濃度を上げるか又は頻繁に餌料を交換することによって、実際の濃度を維持するための調整を行なう。この調整によって設定濃度の 80% が保たれていることを確認するために、暴露第 2 週目にも分析を行なう。

餌料中で被験物質が安定であっても、鳥かご中の餌料を少なくとも 1 週間に一度交換する。もし、被験物質が餌料を毎日取り替えることでしか安定に投与できない場合は、試験そのものの有効性は保証できない。

産卵開始後は卵を毎日集め、鳥かごに対応する記号をつける。貯卵し、孵化させるために毎週又は隔週で孵卵器に入れる（表 2 参照）。孵卵器に入れる前に、卵を光にかざし傷を検出する。傷の入った卵は孵化に用いない。6～11 日後に孵化用の卵を光にかざし発生が進んでいるかどうかを調べる。

各鳥かごから少なくとも 2 つの卵を、あらかじめ決めておいたスケジュール（たとえば 3 番目と 10 番目の卵又は 5、20、35 日に集められたすべての卵）に従い集め、卵殻の厚さを測定する。傷の入った卵については数を記録するが、卵殻の厚さは測定しない。卵を割り、洗い、膜をつけたまま乾燥し、周囲の 3～4 点の卵殻の厚さを測定する。

卵はウズラの場合 16 日目、マガモの場合 23 日目、コリンウズラの場合 21 日目で孵卵条件から孵化条件に移す。孵化はウズラの場合 17～18 日目、マガモの場合 25～27 日目、コリンウズラの場合 23～24 日目までに完了するはずである。

雛鳥をもとの鳥かごに対応するグループとして収容するか、個々に印をつけて収容する。雛鳥を被験物質を含まない適切な餌で 14 日間飼育する。若鳥のための温度及び湿度を表 2 に示す。なるべく点灯時及び消灯時に 15～30 分の移行期間を設けた明暗周期のある条件（例えば 14 時間－明、10 時間－暗）のもとで飼育する。

5-3-2 観察

試験期間中、次の項目について観察しなければならない。

- ・ 死亡及び中毒症状 毎日

- ・ 親鳥の体重 摂食期間の最初、産卵の開始前、及び試験終了時
- ・ 若鳥の体重 14日齢
- ・ 親鳥の摂餌量 試験期間中毎週又は隔週
- ・ 若鳥の摂餌量 孵化後第1週及び第2週
- ・ 肉眼的病理検査 全ての親鳥

また、被験物質のある特定の組織への残留量の測定値も用いることができる。

5-4 試験の有効性

試験を有効なものとするためには、次の条件を満たさなければならない。

- ・ 対照区における親鳥の死亡率は、試験終了時に10%を超えてはならない。
- ・ 対照区の親雌鳥あたりの14日齢の若鳥の平均生存数は、ウズラ、マガモ及びコリンウズラにおいて少なくとも各々24、14、12羽でなければならない。
- ・ 対照区における卵殻の平均の厚さは、ウズラ、マガモ及びコリンウズラにおいて少なくとも各々0.19、0.34、0.19mmでなければならない。
- ・ 試験期間中、被験物質の餌料中濃度が十分に維持されていること（設定濃度の少なくとも80%以上）が明らかでなければならない。

なお、推奨された濃度設定を用い、さらに繁殖への影響が認められない場合、NOEC（無影響濃度）は、試験した最高濃度以上であると報告してもよい。

6 結果の処理

分散分析法などの適切な統計的手法を用いて、試験濃度区のデータを個々に対照区と比較する。

分析対象は、表3に示す項目と可能ならば産卵鳥の比率（%）、親鳥の体重及び生存していた14日齢の若鳥の体重とする。