

＜哺乳類を用いる 28 日間の反復投与毒性試験、哺乳類を用いる 90 日間の反復投与毒性試験及び哺乳類を用いる反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験並びに細菌を用いる復帰突然変異試験、哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験及びマウスリンフォーマ TK 試験による変異原性試験＞

I ここでは、哺乳類を用いる 28 日間の反復投与毒性試験並びに細菌を用いる復帰突然変異試験及び哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験による変異原性試験の標準となるべき方法について規定する。

II 哺乳類を用いる 28 日間の反復投与毒性試験

目的

本試験は、動物に被験物質を一定期間反復投与したときに現れる生体の機能及び形態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^(注1)

1-1 動物種及び性

ラット以外のげっ歯類を用いる妥当な理由がある場合を除き、原則として、順調に発育したラットの雄及び雌を用いる。

1-2 週齢

ラットでは投与開始時に 5 あるいは 6 週齢^(注2)とし、その際の体重の変動範囲は、雌雄それぞれ平均体重の± 20 %以内とする。

1-3 動物数

各群雄及び雌それぞれ 5 匹以上とする。なお、途中解剖を行う場合は、それに要する数をあらかじめ加えるものとする。また、投与終了後少なくとも 14 日間飼育し、変化の可逆性及び持続性、遅発性毒性等について観察するために、雄及び雌それぞれ 5 匹以上で構成される回復群を、少なくとも対照群及び最高用量群にそれぞれ設けることが望ましい。

2 被験物質

2-1 投与方法

原則として、経口投与とする。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、非経口投与とする。強制投与の場合は、被験物質を適切な溶媒に溶解又は懸濁し、毎日一定の時刻に投与する。

2-2 用量^(注3)

被験物質投与群は 3 段階以上を設定し、投与群とは別に対照群をおく。最高用量は被験物質による毒性影響が明らかに認められる量とし、最低用量は試験期間を通じて被験物質による毒性影響が発現しない量とする。また、最高用量と最低用量の間に 1 段階以上の中間用量を設ける。

最高投与限度用量は、強制経口投与の場合は、1000mg/kg/day の用量とする。また、飼料又は飲料水に添加して投与する場合は摂餌量又は摂水量から算出される被験物質の用量が 1000mg/kg/day に相当する用量とする。この量で何ら毒性が認められないときは必ずしも試験で 3 用量を用いなくてもよい。

2-3 投与期間

原則として、28 日間連続投与とする。

3 観察・検査

全ての動物について、その生死^(注4)及び一般状態等を観察し、全ての毒性徴候を記録する^(注5)。さらに、馴化期間中に 1 回、その後は少なくとも週に 1 回、全ての動物について詳細に観察し、記録する^(注6、7)。

さらに、次の事項について検査する。

3-1 死亡率

3-2 体重、摂餌量及び摂水量（被験物質を飲料水に添加した場合）^(注8)

3-3 機能検査^(注9)

3-4 血液検査^(注10)

3-4-1 血液学的検査^(注11)

3-4-2 血液生化学的検査^(注12)

3-5 尿検査^(注13)

3-6 病理学的検査

3-6-1 肉眼的検査及び器官重量^(注14、15)

3-6-2 病理組織学的検査^(注16)

3-7 その他の必要な事項

試験中死亡した動物については、可能な限りその死因を調べる。

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安楽死させた後、剖検を行う。

4 結果報告

試験の結果は様式 4 によりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

また、可能な項目については、適切な統計学的手法を用いて評価する。

(注1) 動物愛護の観点から、全ての動物を適切に取り扱うこととする。

(注2) 5 あるいは 6 週齢の動物が得られない場合でも、9 週齢を超えないものとする。

(注3) 用量設定に際しては、全身的な毒性（例えば、体重減少や、肝臓、心臓、肺又は腎臓に対する影響など）や毒性と断定できない変化が観察された場合は、免疫系や、神経系、内分泌関連の影響についても考慮する。

(注4) 少なくとも 1 日に 2 回、動物の生死及び死亡の徴候を観察する。

(注5) 少なくとも 1 日に 1 回（毒性の徴候が観察された場合は、より頻繁に）、投与の予測される影響のピーク時を考慮し、可能な限り同じ時刻に観察する。

(注6) 観察は飼育室内又はそれと同等の環境下のケージ外の標準的な観察の場にお

いて行う。試験施設で明確に定義されたスコアリングシステムを用いて記録することが望ましい。試験条件のばらつきを最小にするよう配慮する。観察は投与について知らされていない観察者が実施することが望ましい。

(注 7) 観察は、少なくとも、皮膚、被毛、眼、粘膜の状態、分泌物及び排泄物の状態、自律神経系への影響を示す反応（流涎、流涙、立毛、縮瞳・散瞳、異常呼吸等）を観察する。また、間代性・強直性痙攣、常同行動（過度の身づくろい、反復旋回運動等）及び異常行動（自傷行動、後ずさり等）の有無とともに、歩行、姿勢及びハンドリングへの反応に異常がないかを確認する。

(注 8) 週 1 回以上測定する。

(注 9) 投与 4 週目の観察において、異なる種類の刺激に対する感覚応答（聴覚、視覚、深部知覚等）、握力の測定及び自発運動量の測定を、必要に応じ、測定機器等を使って全ての動物について行う。影響が認められた場合には、回復 2 週目にも同様に検査する。

(注 10) 剖検時や剖検の直前など、適切な時期に採血する。採血前に一晩絶食することが望ましい。途中死亡等により検査を実施できない場合を除き、全ての動物を検査する。

(注 11) 血液学的検査として次の項目を検査する。

赤血球数、網状赤血球率、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、白血球数、白血球百分率、血小板数、その他の血液凝固能の指標など。

なお、血液凝固能の指標としては、血液凝固時間、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間等がある。

このほか、被験物質の化学構造等からみて毒性影響が示唆される項目、例えばメトヘモグロビン濃度、ハインツ小体等についても検査する。

(注 12) 血液生化学的検査として次の項目を検査する。

総たん白、アルブミン、血糖、総コレステロール、尿素窒素、クレアチニン、Na、K、Cl、肝細胞への影響を示す 2 種以上の酵素（アラニンアミノトランスフェラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、γ-グルタミルトランスペプチターゼ、ソルビトールデヒドロゲナーゼ、グルタメートデヒドロゲナーゼ等）、胆汁酸など。

このほか、被験物質の化学構造等からみて毒性影響が示唆される項目、例えば、コリンエステラーゼ、トリグリセリド、ホルモン、Ca、P、総ビリルビン等についても検査する。

下垂体－甲状腺系への影響が示唆される場合は、甲状腺ホルモン（T 3 及び T 4）及び TSH を測定するため、血漿又は血清サンプルをマイナス 20℃ 以下で保存しておくことが望ましい。

(注 13) 原則として、剖検を実施する週に新鮮尿又は一定時間の蓄尿を用いて、性状、量、浸透圧又は比重、pH、蛋白、糖、潜血、沈査等の尿検査を実施する。

(注 14) 解剖に当たり、膣垢を採取し、全ての雌の性周期を決定することは、エストロゲン感受性組織の病理組織的評価の手助けになり得る。

(注 1 5) 原則として、最終投与の翌日（回復群については回復期間終了後）に剖検する。試験に使用した全ての動物について、体表、開孔部、頭蓋腔、胸腔、腹腔及びその内容の観察を含む肉眼的検査を十分に行う。病理組織学的検査のため次の器官・組織を適切な固定液中に保存する（例えば、精巣などに関しては、ブアン液や改良ダビドソン液などが推奨されている。）。

全ての肉眼的病変部、脳*（大脳、小脳及び橋を含む代表的な部位）、下垂体、脊髓、眼球、顎下腺、甲状腺*（上皮小体を含む。）、心臓*、気管及び肺（固定液を注入後浸漬）、肝臓*、腎臓*、胸腺*、脾臓*、膵臓、副腎*、胃、小腸及び大腸（パイエル板を含む。）、生殖腺（精巣*又は卵巣*）、副生殖器（前立腺*、精囊*（凝固腺を含む。）、精巣上体*、子宮*）、膣、膀胱、リンパ節（投与経路に関連するリンパ節及び試験施設の経験に従ってその他のリンパ節を採取する。）、筋肉に近い末梢神経（坐骨神経又は脛骨神経）、骨格筋、骨、骨髓（大腿骨）及び肉眼的所見・他の情報・検査等から標的器官と疑われた器官及び組織。

なお、*印を付した諸器官については、全例その重量を測定する。

(注 1 6) 最高用量群と対照群の全ての動物で（回復群を除く。）、保存した全ての器官・組織について病理組織学的検査を行う。特に、最高用量群で被験物質によると考えられる変化が認められた器官及び組織については、他の全ての用量群の動物についてもその該当所見に注目して検査する。

回復群では、少なくとも投与群で投与期間終了時に影響の認められた器官・組織及び、特に回復期間に変化が認められた場合には関連する器官及び組織についても検査する。

III 哺乳類を用いる 90 日間試験の反復投与毒性試験

OECD テストガイドライン 408 で定められた方法に準じて実施する。

IV 哺乳類を用いる反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

目的

本試験は、動物に被験物質を一定期間反復投与したときに現れる被験物質の一般毒性及び生殖発生毒性を明らかにすることを目的とする。

1 試験動物^(注 1)

1-1 動物種及び性

ラット以外のげっ歯類を用いる妥当な理由がある場合を除き、原則として、順調に発育したラットの雄及び雌を用いる。

1-2 週齢

ラットでは、交配開始時に性成熟期^(注 2)に達する週齢とする。投与開始に際しては、体重の変動範囲は、雌雄それぞれ平均体重の± 20 %以内とする。また、雌動物については、未経産で正常な性周期^(注 3)を示している動物を使用する。

1-3 動物数

交配群については、各群雄及び雌それぞれ 10 匹以上とし、著しい毒性影響が認められる場合を除き、妊娠末期において 1 群 8 匹以上の妊娠動物を確保する。また、雌については少なくとも対照群及び最高用量群については、それぞれ 5 匹以上で構成される非交配群を設けることが望ましい。なお、途中解剖を行う場合は、それに要する数をあらかじめ加えるものとする。また、投与終了後少なくとも 14 日間飼育し、変化の可逆性及び持続性、遅発性毒性等について観察するために、雄及び雌それぞれ 5 匹以上で構成される回復群を、少なくとも対照群及び最高用量群にそれぞれ設けることが望ましい^(注4)。

1-4 交配方法

雌動物は、交尾が確認されるまで同じ試験群の同一の雄動物と 1 対 1 で同居させる。交配期間は 14 日間を限度とする^(注5)。

2 被験物質

2-1 投与方法

原則として、経口投与とする。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、非経口投与とする。強制投与の場合は、被験物質を適切な溶媒に溶解又は懸濁し、毎日一定の時刻に投与する。

2-2 用量^(注6)

被験物質投与群は 3 段階以上を設定し、投与群とは別に対照群をおく。最高用量は被験物質による毒性影響が明らかに認められる量とし、最低用量は試験期間を通じて被験物質による毒性影響が発現しない量とする。また、最高用量と最低用量の間に 1 段階以上の中間用量を設ける。

最高投与限度用量は、強制経口投与の場合は、1000mg/kg/day の用量とする。また、飼料又は飲料水に添加して投与する場合は摂餌量又は摂水量から算出される被験物質の用量が 1000mg/kg/day に相当する用量とする。この量で何ら毒性が認められないときは必ずしも試験で 3 用量を用いなくてもよい。

2-3 投与期間

雌雄少なくとも交配前 14 日間投与する。雄^(注7)及び雌の非交配群については合計で最低 28 日間以上、雌の交配群については交配期間、妊娠期間及び剖検前日（分娩完了確認日を分娩 0 日とした場合、分娩後 4 日）まで、原則として連続投与する^(注8、9)。

3 観察・検査

全ての動物について、その生死^(注10)及び一般状態等を観察し、全ての毒性徴候を記録する^(注11、12)。さらに、詳細な観察は、馴化期間中に 1 回、その後は少なくとも週に 1 回、全ての親／成熟動物について詳細を観察し、記録する^(注13、14)。

さらに、次の事項について検査する。

3-1 親／成熟動物

3-1-1 死亡率

3-1-2 体重、摂餌量及び摂水量（被験物質を飲料水に添加した場合）^(注15)

- 3-1-3 機能検査^(注16)
- 3-1-4 性周期^(注3) 及び妊娠期間^(注17)
- 3-1-5 血液検査^(注18)
 - 3-1-5-1 血液学的検査^(注19)
 - 3-1-5-2 血液生化学的検査^(注20)
- 3-1-6 尿検査^(注21)
- 3-1-7 病理学的検査
 - 3-1-7-1 肉眼的検査及び器官重量^(注22、23)
 - 3-1-7-2 病理組織学的検査^(注24)
- 3-2 児動物^(注25)
- 3-3 その他の必要な事項

試験中死亡した動物については、可能な限りその死因を調べる。

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安楽死させた後、剖検を行う。交尾が成立しなかった雌雄、出産予定日を過ぎても分娩が認められない雌についてはその原因を調べる。

4. 結果報告

試験の結果は様式5によりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

また、可能な項目については、適切な統計的手法を用いて評価する。

(注1) 動物愛護の観点から、全ての動物を適切に取り扱うこととする。

(注2) 性成熟期は系統により異なるので注意する。

(注3) 交配群の全ての雌動物について、性周期を馴化期間中から交尾まで毎日観察し、記録する。

(注4) 雄については、投与終了時に各群それぞれ少なくとも5匹以上を選択し、回復群としてもよい。雌については、別途回復群として、交配させない群を設定する。

(注5) 雌動物については、毎朝膣垢中の精子又は膣栓の検査を行い、精子又は膣栓が認められた日を妊娠0日とする。

(注6) 用量設定に際しては、全身的な毒性（例えば、体重減少や、肝臓、心臓、肺又は腎臓に対する影響など）や毒性と断定できない変化が観察された場合には、免疫系や、神経系、内分泌関連の影響についても考慮する。

(注7) 交尾が確認できなかった、又は雌を妊娠させ得なかった雄について、無処置の成熟した雌との再交配する場合などは、それを考慮して適切な時期まで雄を飼育しその間投与を継続する。

(注8) 被験物質を吸入又は経皮ばく露する場合、雌については少なくとも妊娠19日までばく露を実施する。

(注9) 交尾が確認できなかった雌についても投与を継続し、交配期間の最終日の24日から26日後に安楽死させた後、剖検する。

(注10) 少なくとも1日に2回、動物の生死及び死亡の徴候を観察する。

- (注11) 少なくとも1日に1回(毒性の徴候が観察された場合はより頻繁に)、投与の予測される影響のピーク時を考慮し、可能な限り同じ時刻に観察する。
- (注12) 母動物については、妊娠期における分娩の障害又は遅延の徴候、授乳期における哺育行動等、児動物については異常がないかを確認する。
- (注13) 観察は飼育室内又はそれと同等の環境下のケージ外の標準的な観察の場において行う。試験施設で明確に定義されたスコアリングシステムを用いて記録することが望ましい。試験条件のばらつきを最小にするよう配慮する。観察は投与について知らされていない観察者が実施することが望ましい。
- (注14) 少なくとも、皮膚、被毛、眼、粘膜の状態、分泌物及び排せつ物、自律神経系への影響を示す反応(流涎、流涙、立毛、縮瞳・散瞳、異常呼吸等)を観察する。また、間代性・強直性痙攣、常同行動(過度の身づくろい、反復旋回運動等)、異常行動(自傷行動、後ずさり等)の有無と共に、歩行、姿勢及びハンドリングへの反応に異常がないかを確認する。
- (注15) 投与開始日、その後週に1回以上及び解剖時に体重を測定する。交尾が成立した雌については、妊娠0、7、14及び20日、分娩後0日及び4日に体重を測定する。また、摂餌量及び摂水量については、原則として週1回以上測定する。
- (注16) 試験期間中の適切な時期(母動物については授乳期に児動物への影響に十分配慮した上で適切に、その他の動物については剖検を実施する週に行うのが望ましい。)に1回、全ての群の雄及び雌のそれぞれ少なくとも5匹以上について、異なる種類の刺激に対する感覚応答(聴覚、視覚、深部知覚等)、握力の測定及び自発運動量の測定を、必要に応じ、測定機器等を使って行う。影響が認められた場合には、回復2週目にも同様に検査する。
- (注17) 妊娠期間について、妊娠0日から起算する。
- (注18) 剖検時や剖検の直前など、適切な時期に採血する。採血前に一晩絶食することが望ましい。全ての群の雄及び雌についてそれぞれ少なくとも5匹以上(母動物については投与期間を十分に考慮して選択することが望ましい。)を検査する。
- (注19) 血液学的検査として次の項目を検査する。
赤血球数、網状赤血球率、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、白血球数、白血球百分率、血小板数、その他の血液凝固能の指標など。
なお、血液凝固能の指標としては、血液凝固時間、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間等がある。
このほか、被験物質の化学構造等からみて毒性影響が示唆される項目、例えばメトヘモグロビン濃度、ハイツ小体等についても検査する。
- (注20) 血液生化学的検査として次の項目を検査する。
総たん白、アルブミン、血糖、総コレステロール、尿素窒素、クレアチニン、Na、K、Cl、肝細胞への影響を示す2種以上の酵素(アラニンアミノトランスフェラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、γ-グルタミルトランスぺプチターゼ、ソルビトールデヒドロゲナーゼ、グルタメートデヒドロゲナーゼ等)、胆汁酸など。
このほか、被験物質の化学構造等からみて毒性影響が示唆される項目、例えば、コリ

ンエステラーゼ、トリグリセリド、ホルモン、Ca、P、総ビリルビン等についても検査する。

下垂体―甲状腺系への影響が示唆される場合は、甲状腺ホルモン（T 3 及び T 4）及び T S H を測定するため、血漿又は血清サンプルをマイナス 20℃以下で保存しておくことが望ましい。

（注 2 1） 原則として、雄及び雌（母動物を除く。）について、各群それぞれ少なくとも 5 匹以上、剖検を実施する週に新鮮尿又は一定時間の蓄尿を用いて、性状、量、浸透圧又は比重、p H、蛋白、糖、潜血、沈査等の尿検査を実施する。

（注 2 2） 雌の非交配群については、解剖に当たり、膣垢を採取し、全ての雌の性周期を決定することは、エストロゲン感受性組織の病理組織的評価の手助けになり得る。

（注 2 3） 原則として、最終投与の翌日（回復群については回復期間終了後）に剖検する。試験に使用した全ての動物について、体表、開孔部、頭蓋腔、胸腔、腹腔及びその内容の観察を含む肉眼的検査を、特に生殖器官に十分に注意を払いながら行う。雌の交配群については着床痕数を記録する。また、黄体数を調べるのが望ましい。病理組織学的検査のため次の器官・組織を適切な固定液中に保存する（例えば、精巣などに関しては、ブアン液や改良ダビドソン液などが推奨されている。）。

全ての肉眼的病変部、脳*（大脳、小脳及び橋を含む代表的な部位）、下垂体、脊髄、眼球、顎下腺、甲状腺*（上皮小体を含む。）、心臓*、気管及び肺（固定液を注入後浸漬）、肝臓*、腎臓*、胸腺*、脾臓*、膵臓、副腎*、胃、小腸及び大腸（パイエル板を含む。）、生殖腺（精巣*又は卵巣*）、副生殖器（前立腺*、精囊*（凝固腺を含む。）、精巣上体*、子宮*）、膣、膀胱、リンパ節（投与経路に関連するリンパ節及び試験施設の経験に従ってその他のリンパ節を採取する。）、筋肉に近い末梢神経（坐骨神経又は脛骨神経）、骨格筋、骨、骨髓（大腿骨）及び肉眼的所見・他の情報・検査等から標的器官と疑われた器官・組織。

なお、*印を付した諸器官については、全例その重量を測定する。ただし、妊娠した雌の子宮の測定は任意とする。

（注 2 4） 交配群及び非交配群の最高用量群及び対照群について各群（回復群を除く。）雄及び雌それぞれ少なくとも 5 匹以上の保存した全ての器官及び組織について病理組織学的検査を行う。特に、卵巣、精巣及び精巣上体（精子形成過程と精巣の間質細胞に注意を払う。）について詳細に検査する。また、最高用量群で被験物質によると考えられる変化が認められた器官・組織については、他の全ての用量群の動物についてもその該当所見に注目して検査する。

回復群では、少なくとも投与群で投与期間終了時に影響の認められた器官・組織及び、特に回復期間に変化が認められた場合には関連する器官・組織についても検査する。

（注 2 5） 各母動物について出産後の可能な限り早い時期に出産生児及び死産児の数及び性別並びに肉眼による異常（口蓋を含む。）の有無を調べる。

生存児については、出産直後又は出産後の早い時期及び生後 4 日に匹数と性別を調べ、児体重を個別に測定する。

死亡児及び生後 4 日（出生日を生後 0 日とする。）に安楽死させた新生児について肉

眼による異常（口蓋を含む。）の検査する。

【参考】哺乳類を用いる簡易生殖発生毒性試験

目的

本試験は、生殖発生毒性に関する情報を得ることを目的とした簡易試験である^(注1)。

1 試験動物^(注2)

1-1 動物種及び性

ラット以外のげっ歯類を用いる妥当な理由がある場合を除き、原則として、順調に発育したラットの雄及び雌を用いる。

1-2 週齢

ラットでは、交配開始時に性成熟期^(注3)に達する週齢とする。投与開始に際しては、体重の変動範囲は、雌雄それぞれ平均体重の±20%以内とする。また、雌動物については、未経産で正常な性周期^(注4)を示している動物を使用する。

1-3 動物数

各群雄及び雌それぞれ10匹以上とし、著しい毒性影響が認められる場合を除き、妊娠末期において1群8匹以上の妊娠動物を確保する。

1-4 交配方法

雌動物は、交尾が確認されるまで同じ試験群の同一の雄動物と1対1で同居させる。交配期間は14日間を限度とする^(注5)。

2 被験物質

2-1 投与方法

原則として、経口投与とする。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、非経口投与とする。強制投与の場合は、被験物質を適切な溶媒に溶解又は懸濁し、毎日一定の時刻に投与する。

2-2 用量

被験物質投与群は3段階以上を設定し、投与群とは別に対照群をおく。最高用量は被験物質による毒性影響が明らかに認められる量とし、最低用量は試験期間を通じて被験物質による毒性影響が発現しない量とする。また、最高用量と最低用量の間に1段階以上の中間用量を設ける。

最高投与限度用量は、強制経口投与の場合は、1000mg/kg/dayの用量とする。また、飼料又は飲料水に添加して投与する場合は摂餌量又は摂水量から算出される被験物質の用量が1000mg/kg/dayに相当する用量とする。この量で何ら毒性が認められないときは必ずしも試験で3用量を用いなくてもよい。

2-3 投与期間

雌雄少なくとも交配前14日間投与する。雄については交配期間も含めて最低28日間以上^(注6)とする。雌については交配期間、妊娠期間及び分娩後3日（分娩完了確認日を分娩0日と

する。)まで、原則として連続投与する^(注7、8、9)。

3 観察・検査

全ての動物について、その生死^(注10)及び一般状態等を観察し、全ての毒性徴候を記録する^(注11、12)。

さらに、次の事項について検査する。

3-1 親／成熟動物

3-1-1 死亡率

3-1-2 体重、摂餌量及び摂水量（被験物質を飲料水に添加した場合）^(注13)

3-1-3 性周期^(注4)及び妊娠期間^(注14)

3-1-4 病理学的検査

3-1-4-1 肉眼的検査及び器官重量^(注15)

3-1-4-2 病理組織学的検査^(注16)

3-2 児動物^(注17)

3-3 その他の必要な事項

試験中死亡した動物については、可能な限りその死因を調べる。

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安楽死させた後、剖検を行う。交尾が成立しなかった雌雄、出産予定日を過ぎても分娩が認められない雌についてはその原因を調べる。

4. 結果報告

試験の結果は様式6によりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

また、可能な項目については、適切な統計的手法を用いて評価する。

(注1) 本試験は、原則として反復投与毒性試験がすでに行われている場合に行う。反復投与毒性試験が実施済みである化学物質について、反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験における生殖発生毒性試験相当部分の試験成績を得るために本試験を実施することができる。

(注2) 動物愛護の観点から、全ての動物を適切に取り扱うこととする。

(注3) 性成熟期は系統により異なるので注意する。

(注4) 全ての雌動物について、性周期を馴化期間中から交尾まで毎日観察し、記録する。

(注5) 雌動物については、毎朝膣垢中の精子又は膣栓の検査を行い、精子又は膣栓が認められた日を妊娠0日とする。

(注6) 交尾が確認できなかった、又は雌を妊娠させ得なかった雄について、無処置の成熟した雌との再交配する場合などは、それを考慮して適切な時期まで雄を飼育しその間投与を継続する。

(注7) 剖検前に血液検査等のため一晩絶食させる場合は、投与期間は分娩後4日までとし、剖検は分娩後5日とする。

(注8) 被験物質を吸入又は経皮ばく露する場合は、雌については少なくとも妊娠19日まで

ばく露を実施する。

(注 9) 交尾が確認できなかった雌についても投与を継続し、交配期間の最終日の 24 日から 26 日後に安楽死させた後、剖検する。

(注 10) 少なくとも 1 日に 2 回、動物の生死及び死亡の徴候を観察する。

(注 11) 少なくとも 1 日 1 回 (毒性の徴候が観察された場合はより頻繁に)、投与の予測される影響のピーク時を考慮し、可能な限り同じ時刻に観察する。

(注 12) 母動物については、妊娠期における分娩の障害又は遅延の徴候、授乳期における哺育行動等、児動物については異常がないかを確認する。

(注 13) 投与開始日、その後週に 1 回以上及び解剖時に体重を測定する。交尾が成立した雌については、妊娠 0、7、14 及び 20 日、分娩後 0 日及び 4 日に体重を測定する。また、摂餌量及び摂水量については、原則として週 1 回以上測定する。

(注 14) 妊娠期間について、妊娠 0 日から起算する。

(注 15) 原則として、最終投与の翌日に剖検する。試験に使用した全ての動物について、体表、開孔部、頭蓋腔、胸腔、腹腔及びその内容の観察を含む肉眼的検査を、特に生殖器官に十分に注意を払いながら行う。雌については着床痕数を記録する。また、黄体数を調べることが望ましい。病理組織学的検査のため次の器官・組織を適切な固定液中に保存する (例えば、精巣などに関しては、ブアン液や改良ダビドソン液などが推奨されている。)。

全ての肉眼的病変部、生殖腺 (精巣*又は卵巣*)、副生殖器 (前立腺*、精囊* (凝固腺を含む。)、精巣上体*、子宮)、膣。

なお、*印を付した諸器官については、全例その重量を測定する。

(注 16) 最高用量群及び対照群について各群雄及び雌それぞれ少なくとも 5 匹以上の保存した全ての器官・組織について病理組織学的検査を行う。特に、卵巣、精巣及び精巣上体 (精子形成過程と精巣の間質細胞に注意を払う。) について詳細に検査する。保存した他の器官・組織については、肉眼的変化が認められた場合や毒性が予想される場合などは検査をすることが望ましい。また、最高用量群で被験物質によると考えられる変化が認められた器官・組織については、他の全ての用量群の動物についてもその該当所見に注目して検査する。

(注 17) 各母動物について出産後の可能な限り早い時期に出産児及び死産児の数及び性別並びに肉眼による異常 (口蓋を含む。) の有無を調べる。

生存児については、出産直後又は出産後の早い時期及び生後 4 日に匹数と性別を調べ、児体重を個別に測定する。

死亡児及び生後 4 日 (出生日を生後 0 日とする。) に安楽死させた新生児について肉眼による異常 (口蓋を含む。) の検査をする。

V 変異原性試験

目的

本試験は、比較的簡便な短期間の試験により、被験物質の遺伝毒性、がん原性を予測することを目的とする。

試験法について

本試験においては、遺伝子突然変異誘発性を指標とする試験として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哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を行うこととする。

なお、上記の試験を実施し得ない科学的根拠のある場合には、類似の遺伝学的指標を持つ試験系で代行することができる。

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 5mg/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。

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℃で 48～72 時間培養した後に、プレート毎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。又、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

各プレート毎の復帰変異コロニー数を示すとともに、各用量毎にその平均値を表示する。

1-11 結果のまとめ

試験の結果は様式 7 によりまとめる。

なお、様式 7 に代えて昭和 63 年 9 月 16 日付け労働省基発第 602 号「労働安全衛生規則の一部を改正する省令、ボイラー及び圧力容器安全規則の一部を改正する省令及び有機溶剤中毒予防規則等の一部を改正する省令の施行について」の別添様式「微生物を用いる変異原性試験結果報告書」によりとりまとめてもよい。

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S9mix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±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。又、群毎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。

2-11 結果のまとめ

試験の結果は様式 8 によりまとめる。

3 マウスリンフォーマ TK 試験

3-1 目的

マウスリンパ腫細胞のチミジンキナーゼ遺伝子座の変異を指標として、被験物質の遺伝毒性誘発性の有無を検索する。

3-2 使用細胞

マウスリンパ腫細胞 L5178Y tk^{-/-}-3.7.2c 株を用いる。試験に用いる細胞については、マイコプラズマ汚染の有無、細胞周期、自然突然変異頻度などを調べておく（注 1）。

3-3 試験法

対数増殖期にある細胞を用い、最初に 3～4 時間の短時間処理法として代謝活性化系の非存在下及び、存在下について試験を実施する。代謝活性化系の非存在下の結果が陰性の場合には、代謝活性化系の非存在下の 24 時間連続処理による試験を実施する（注 2）。代謝活性化系の存在下の短時間処理法の結果が陰性の場合には、必要に応じて確認試験を行う（注 3）。代謝活性化には、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 9000 × 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 2%）とする。

3-4 被験物質の調製

被験物質を適切な溶媒に溶解または懸濁させる。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液などを用いて溶解させ、水に不溶の場合にはジメチルスルホキシド（DMSO）などを用いて溶解させる。

3-5 用量段階

適切な間隔（原則として公比 $\sqrt[10]{10}$ 以下）で 4 段階以上の突然変異コロニーが解析できる用量を用いる。最高用量は、用量設定試験の結果から 80%以上の細胞毒性（20%

以下の相対生存率または相対増殖率）が得られる用量とする^(注4)。ただし、90%以上の細胞毒性が認められる用量で陽性結果が得られた場合には、結果の解釈には注意を要する。80%以上の細胞毒性が認められない場合には5 mg/ml または 10 mM（いずれか低い方）を最高用量とする。80%以上の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、析出が認められる最低濃度を試験の最高用量とすることができる。析出物が試験の測定を妨げる場合には、要求されている細胞毒性が得られなくても良い^(注5)。

3-6 対照

陰性対照として溶媒処理群を、陽性対照として小さなコロニーを主として誘発する既知の遺伝毒性物質で処理した群を設ける^(注6)。

3-7 処理系列数

被験物質の各用量群並びに陽性対照群について、それぞれ1～2系列の処理を行う。ただし陰性対照群については、2系列の処理を行う。

3-8 細胞毒性及び突然変異の検出

被験物質処理直後の細胞を一部分取し、マイクロウェルプレートに播種して適切な期間培養し、生育コロニーを含むウェルを計数し、生存率を算出する^(注7)。残りの細胞は2日間の突然変異発現期間に、毎日細胞濃度を測定して適宜継代した後、マイクロウェルプレートにトリフルオロチミジン（TFT）存在下及び非存在下で播種して適切な期間（通常12日間）培養し、それぞれTFT耐性変異体コロニー、及び生育コロニーを含むウェルを計数して、突然変異頻度を算出する。なおコロニーサイズの解析のためにTFT耐性変異体コロニーを含むウェルはコロニーの大小別に計数する。

3-9 結果の判定

結果の判定は、適切な統計処理法を用いると共に、突然変異頻度の有意な上昇、及び用量依存性の有無を考慮して行う。最終的な判定は試験条件下での生物学的な妥当性も考慮して行うことが望ましい。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。

3-10 結果の表示

被験物質処理群、陰性及び陽性対照群について、薬物処理直後のコロニー形成率（PE0）と陰性対照に対する相対生存率（RS）、2日間の突然変異発現期間中の細胞増殖率を考慮した細胞毒性指標（RSG、RTG）、突然変異発現期間終了後のコロニー形成率（PE2）、突然変異頻度（MF）、統計処理結果を表示する。陰性及び陽性対照でのコロニーサイズの解析、ならびに被験物質処理群で突然変異頻度の上昇が認められた場合には、最大突然変異頻度が得られた用量を含めた少なくとも一用量以上でのコロニーサイズの解析結果を表示する^(注8)。

3-11 その他

上記によらず、OECDテストガイドライン476に準じて実施する場合には、以下の条件を満たすものとする。

- ・ マウスリンパ腫 L5178Y 細胞株を用いた試験系による試験であること
- ・ 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試験を実施し、短時間処理法の結果がともに陰性の場合には、代謝活性化によらな

い場合について、連続処理法による試験を実施すること

- (注 1) 細胞周期は、増殖曲線から求めた世代倍加時間でよい。自然突然変異頻度が著しく高い場合 ($>200 \times 10^{-6}$) は適切な方法により、使用する細胞中より TK 変異体を除去する必要がある。
- (注 2) マウスリンフォーマ TK 試験のマイクロウェル法では代謝活性化系非存在下の 24 時間処理法を用いると、核酸及び塩基アナログや一部の異数性誘発物質の検出力が高くなる。それにも関わらず、特異性、すなわち非遺伝毒性物質に対する検出力には影響を与えないという結果が得られている。
- (注 3) 同じ種類及び濃度の代謝活性化系を用いた繰り返しの試験は、通常必要ない。しかしながら、特別な代謝が必要なある種の化合物については代謝活性化系の変更が必要である。この場合には、当該種類の物質を代謝活性化するのに適切だと認められている外来の代謝活性化系の使用が通常求められる。
- (注 4) 細胞毒性の指標としては、処理直後の陰性対照に対する相対生存率(RS)、あるいは相対増殖率(RTG)を用いる。RTG は突然変異発現期間中の相対浮遊細胞増殖率(RSG)と突然変異を選抜する際のコロニー形成率から算出される。
- (注 5) 被験物質の析出は処理の開始と終了時に、肉眼で観察する。
- (注 6) 一般的に陽性対照物質としてメタンスルホン酸メチル、(代謝活性化系の非存在下)、シクロフォスファミド、ベンツ[a]ピレン、3-メチルコラントレン(代謝活性化系の存在下)が用いられる。
- (注 7) 1つのウェル中に発生するコロニーの数はポアソン分布に従い、 x 個のコロニーからなるウェルの割合を $P(x)$ とすると、 $P(x) = e^{-\lambda} \lambda^x / x!$ と表される (λ : 期待されるコロニーの発生数)。コロニーを含まないウェルの割合は $p(0) = e^{-\lambda}$ となり、 $P(0) = y/n$ (y : コロニーを含まないウェルの数、 n : 全体のウェルの数) であることから、 λ が計算できる。この式はコロニー形成率や、突然変異頻度を求める際に用いる。
- (注 8) 突然変異体コロニーを大(正常の増殖)と小(増殖が遅い: SC)の2種類に分類してウェルを計数して、全体に対する小コロニーの変異体の割合を%SCとして算出する。

<藻類生長阻害試験、ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験>

I 適用範囲

ここでは、化学物質の藻類生長阻害試験、ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験の標準となるべき方法について規定する。

II 定義

この試験法において使用する用語は、次に掲げた定義による。

1 試験方式

- ・ 止水式試験 試験容器中の試験溶液を、暴露期間中、交換しないで行う試験をいう。
- ・ 半止水式試験 試験容器中の試験溶液を、ある期間（例えば、24 時間）経過ごとにバッチ式に交換して行う試験をいう。
- ・ 流水式試験 試験容器中の試験溶液を、自動的に絶えず交換し、交換した液は排水して行う試験をいう。

2 エンドポイント

- ・ LC_{50} ある特定期間内（記載しなければならない。）に供試生物の 50 %を死亡させたと算定される試験溶液中の被験物質濃度をいう。
- ・ EC_x ある特定期間内（記載しなければならない。）に供試生物の生長、遊泳、繁殖等を x %減少させたと算定される試験溶液中の被験物質濃度をいう。
- ・ LOEC 暴露期間中に、対照区と比較して、被験物質が供試生物の繁殖等に統計的に有意な影響（ $p < 0.05$ ）を与えていると観察される最低の試験濃度をいう。

LOEC より高濃度な全ての試験濃度区では、LOEC で観察されるのと同等以上の有害な影響が観察されなければならない。これらの条件が満たされない場合は、どのようにして LOEC や NOEC を選択したかの十分な説明がなされなければならない。

- ・ NOEC LOEC より一段階下の試験濃度で、対照区と比較したとき、暴露期間中に統計的に有意な影響（ $p < 0.05$ ）を与えない最高の試験濃度をいう。

III 総則

1 試験実施に当たっての基本的考え方

藻類、ミジンコ又は魚類を用いた試験は、培地又は試験用水（以下「培地等」という。）を通じて供試生物を被験物質に暴露させ、その毒性を明らかにすることを目的とするものであり、原則として被験物質を培地等に溶解させて実施するものである。そのため、試験の実施に当たり、被験物質の試験条件下での培地等への溶解性を確認する必要がある。また、試験溶液中の被験物質を定量するための信頼性のある分析法が必要である。

また、試験は暴露期間中可能な限り一定条件を維持して行われるべきである。例えば、被験物質の濃度については、暴露期間中、初期濃度（設定濃度又は暴露開始時の実測濃度をいう。以下同じ。）の少なくとも 80 %を維持できることが望ましい。各被験物質ごとの試験条件の検討に当たっては、構造式、純度、水及び光に対する安定性、解離定数（ pK_a ）、オクタノール水分配係数（ Pow ）、蒸気圧及び微生物等による分解度に関する情報をできるだけ収集する。被験物質は蒸気圧が大きい場合には暴露期間中に損失することが考えられることから、損失の有無の指標となるヘンリー定数を求めておくことが望ましい。ヘンリー定数は溶解度と蒸気圧から計算により求めることができる。

2 試験溶液の調製

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。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が、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こととし、試験濃度は被験物質の試験条件下での培地等への溶解度（以下「溶解限度」という。）以下に設定することとする。

助剤を使用した場合は、試験濃度区で使用した助剤と同じ濃度の助剤対照区を追加して設けなければならない。また、助剤の濃度は 100mg/L を超えてはならない。なお、助剤の濃度は、原則として全試験濃度区で一定とする。試験結果の評価においては、試験の結果は被験物質そのものと助剤との複合作用による可能性があることに留意しなければならない。

3 難水溶性物質の扱い

被験物質が水に溶けにくい場合であっても、原則として分散剤は使用せず、試験濃度は被験物質の溶解限度以下に設定することとする。ただし、被験物質の培地等への溶解度が極端に低く、通常の測定法では溶解限度を求めることができない場合であっても、溶解限度以下の濃度では LC_{50} 等の毒性値は求めることができない場合には、分散系で試験を行うこととする。当該被験物質が分散剤や乳化剤とともに使用されるものである場合には、分散剤を使用して試験を行ってもよい。

試験の結果、被験物質の培地等への溶解又は分散可能な上限濃度以下の濃度では LC_{50} 等の毒性値は求められないと結論づけるためには、被験物質を培地等に可能な限り溶解又は分散させる手段を講じた上で、被験物質の培地等への溶解又は分散可能な上限の濃度の値を測定しておくことが必要である。

IV 藻類生長阻害試験

目的

本試験は、指数増殖期の藻類を被験物質に暴露し、対照区に対する生長阻害率を測定することにより、藻類の生長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、本試験において生長とは暴露期間中の生物量の増加をいう。

1 供試生物

Pseudokirchneriella subcapitata（旧名 *Selenastrum capricornutum*）が推奨されるが、*Desmodesmus subspicatus*（旧名 *Scenedesmus subspicatus*）など、他の種を用いてもよい。なお、これらの2種以外の種を使用する場合には、暴露期間中、指数増殖期が維持されることが確認されていなければならない。

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。

2-1 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、空気に接する面が十分確保できるものを用いる。例えば、100mLの容量の試験溶液には250mLの三角フラスコが適している。

被験物質が揮散しやすい物質の場合は、密栓付フラスコを使用するなど適切な対応を行う。

2-2 培養装置

培養は、温度、照明条件を一定に維持できる培養器又は培養室において行う。

2-3 生物量計測装置

生物量の計測は、例えば、粒子計数装置、顕微鏡下での血球計算盤の使用、蛍光光度計、分光光度計又は比色計を用いて行う。なお、分光光度計を使用して低濃度の細胞濃度を測定する場合は、少なくとも4 cmの光路長のセルを使用する。

3 培地

次の組成の培地又はこれと同程度の組成の培地が推奨される。

- ・ 塩化アンモニウム 15 mg/L
- ・ 塩化マグネシウム六水和物 12 mg/L
- ・ 塩化カルシウム二水和物 18 mg/L
- ・ 硫酸マグネシウム七水和物 15 mg/L
- ・ リン酸二水素カリウム 1.6 mg/L
- ・ 塩化鉄（Ⅲ）六水和物 0.064 mg/L
- ・ エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 0.1 mg/L
- ・ ホウ酸 0.185 mg/L
- ・ 塩化マンガン四水和物 0.415 mg/L

- ・ 塩化亜鉛 0.003 mg/L
- ・ 塩化コバルト六水和物 0.0015 mg/L
- ・ 塩化銅二水和物 0.00001 mg/L
- ・ モリブデン酸二ナトリウム二水和物 0.007 mg/L
- ・ 炭酸水素ナトリウム 50 mg/L

この培地は大気との平衡状態で pH は 8.1 となる。

4 前培養

藻類を試験条件にじゅん化させ、試験に用いる指数増殖期の藻類を得るため、暴露開始前に 2 ～ 4 日間、試験と同条件で前培養を行う。前培養液に接種する藻類の生物量を調整し、暴露開始時に指数増殖期になるようにする。

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 試験溶液の調製によるものとする。

6 試験条件

6-1 暴露期間

原則として 72 時間とする。

6-2 初期生物量

試験での初期生物量は、藻類が暴露期間中指数関数的な増殖を維持できるように十分低くする。乾燥重量が 0.5mg/L を超えないように設定する。例えば、*Pseudokirchneriella subcapitata* では $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ cells/mL、*Desmodesmus subspicatus* では $2 \sim 5 \times 10^3$ cells/mL とすることが推奨される。他の種を使う時は乾燥重量で同程度となるようにする。

6-3 試験濃度

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。なお、100mg/L 以上の濃度で試験を行う必要はない。

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。

6-4 連数（繰り返し）

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。

6-5 培養方法

- ・ 温度 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。
- ・ 照明 60-120 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ （白色又は昼光色の蛍光灯を用い、連続的かつ均一に照射する。）
- ・ 培養方法 振とう培養（被験物質が揮発性でない場合は、試験容器は通気性のよい蓋を用いる。暴露期間中、藻類は懸濁状態にしておく必要がある。）

7 被験物質への暴露の開始

各試験容器に、6-2に基づき設定した生物量になるように前培養した藻類を接種して暴露を開始する。

8 生物量の測定

各試験容器の生物量は、少なくとも暴露開始後 24、48 及び 72 時間後に測定する。滅菌した培地を粒子計測装置のバックグラウンドや分光光度計等のブランクとして用いる。

9 被験物質濃度等の測定

9-1 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並びに予測される EC_{50} 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。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。

9-2 試験環境の測定

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。

10 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毒性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、NOEC 等がこの濃度より大きいことを示すことができる。前述の試験条件および有効性の基準は、限度試験にも適用するが、試験の連数は 2 倍に増やすこととする。対照区（助剤対照区を設けている場合には助剤対照区）と試験濃度区の生長速度等の平均値を比較するために、t 検定等の統計解析を行う。

11 試験の有効性

Pseudokirchneriella subcapitata 及び *Desmodesmus subspicatus* では、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（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。

12 結果の算出方法

1 2 - 1 結果の取扱い

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、被験物質濃度が設定濃度または初期実測濃度の± 20%以内に保たれていたことが証明できる場合には、設定濃度または初期実測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(助剤対照区を含む。)の生物量を暴露期間と被験物質濃度とともに表にする。各試験濃度区の生物量の平均値と対照区の生物量の平均値(助剤対照区の生物量の平均値を含む。)を時間に対してプロットし、生長曲線を描く。このとき、対照区(助剤対照区を含む。)の生長曲線が、暴露期間を通じて指数増殖期にあることを確認する。

被験物質濃度と影響の関係は、1 2 - 2に示す方法を用いて計算する。

1 2 - 2 生長速度の比較

指数関数的に増殖しているときの生長速度は次のようにして計算される。

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i}$$

ここで、

μ_{ij} = t_i 時から t_j 時までの期間の生長速度。通常、日当たり(d^{-1})で表す。

X_i = t_i 時の生物量。試験開始時(t_0)の生物量については設定値を用いる。

X_j = t_j 時の生物量。

t_i = 暴露開始後*i*回目に生物量を測定した時間(d)

t_j = 暴露開始後*j*回目に生物量を測定した時間(d)

EC₅₀を算出する場合は、暴露開始時から 72 時間後までの暴露期間を通じた生長速度を求める。

なお、生長速度は、生物量の対数を時間に対してプロットし、その回帰直線の傾きから導くこともできる。

各試験濃度区における生長(速度)阻害率(I_μ)は、対照区(助剤対照区を設けている場合には助剤対照区)の生長速度の平均値(μ_c)と各試験濃度区での生長速度の平均値(μ_n)との間の差として次のように計算する。

$$I_\mu = \frac{\mu_c - \mu_n}{\mu_c} \times 100$$

1 2 - 3 毒性値の算出

I_μ の値を被験物質濃度の対数に対してプロットする。その回帰式等を用いて 50%阻害濃度を求める。 I_μ より導かれた EC₅₀ は ErC₅₀ と表す。

また、対照区(助剤対照区を設けている場合には助剤対照区)と各試験濃度区の μ_{0-3d}

の値について、分散分析と多重比較を行い、NOECを求める。

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。

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。

2-1 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。

2-2 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試験用水で直接溶解するか、あるいは、適切な濃度の被験物質の原液を調製し、原液を試験用水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

5-1 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。

5-2 暴露期間

48 時間とする。

5-3 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。

5-4 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、対照区に加え助剤対照区を設ける。

5-5 飼育方法

- ・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 °C の範囲内に設定し、各試験容器間の変動は ± 1.0 °C 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

8-1 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、換水直後と次の換水の直前を 1 セットとして、少なくとも 2 セット測定を行うことが望ましい。

8-2 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、EC₅₀ 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まとめるとともに、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 EC₅₀ 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 EC₅₀ の近似値とみなす。

12 結果のまとめ

試験の結果は様式10によりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

付表1 人工調製水

(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 1L 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を調製した後、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1L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 (単物質)	水に添加する量 (単位： 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 (mL/L)	最終希釈率*	添加量 (mL/L)	最終希釈率*
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物	3,040	1.0	20,000 倍	0.25	80,000 倍
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	1,260	1.0	20,000 倍	0.25	80,000 倍

二水和物					
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 （Ⅱ）溶液		20.0	1,000 倍	5.0	4,000 倍
エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物	5,000	—		—	
硫酸鉄（Ⅱ）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、溶解させて調製する。なお、混合ビタミン保存溶液は、調製後、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 （主成分原液）	水に添加する量 （単位：mg/L）	飼育水（人工調製水） 調製のための添加量	
		Elendt M4 及び M7	
		添加量*1 （mL/L）	最終希釈率 *2
飼育水原液Ⅰ混合液* *Elendt M4 と M7 で成分比率が異なる事に注意	—	50	20 倍
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 (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	20 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 μ g/L 未満
塩素	10 μ g/L 未満
全有機リン系農薬	50 ng/L 未満
全有機塩素系農薬及び PCB	50 ng/L 未満
全有機塩素	25 ng/L 未満

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、例えば付表 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。また、各試験に使用する魚はできるだけ均一な大きさであることが望ましい。

付表 1

魚種	推奨試験温度 (℃)	試験魚の推奨全長 (cm)
<i>Danio 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	4.0 ± 2.0
<i>Oryzias latipes</i> メダカ	21-25	2.3 ± 1.2
<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。

2-1 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。

2-2 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。なお、観察期間以降は薬浴は行わないことが望ましい。

- ・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試験用水で直接溶解するか、あるいは、適切な濃度の被験物質の原液を調製し、原液を試験用水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

6-1 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。

6-2 暴露期間

96 時間とする。

6-3 収容量と供試魚の数

- ・収容量 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。

6-4 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、対照区に加え助剤対照区を設ける。

6-5 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大丈夫を行ってもよい。
- ・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

9-1 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、換水直後と次の換水の直前を 1 セットとして、少なくとも 2 セット測定を行うことが望ましい。

9-2 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。

10 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11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 を脱イオン水に混合し、全量を 1 L とする。この溶液のカルシウムイオンとマグネシウムイオンの量の和は、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。

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特級とする。

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。

＜藻類の生長に及ぼす影響に関する試験、ミジンコの繁殖に及ぼす影響に関する試験、魚類の初期生活段階における生息又は生育に及ぼす影響に関する試験及び優先評価化学物質の環境における残留の状況からみて経済産業大臣及び環境大臣が特に必要があると認める生活環境動植物の生息又は生育に及ぼす影響に関する試験＞

I ここでは、藻類の生長に及ぼす影響に関する試験、ミジンコの繁殖に及ぼす影響に関する試験、魚類の初期生活段階における生息又は生育に及ぼす影響に関する試験及び優先評価化学物質の環境における残留の状況からみて経済産業大臣及び環境大臣が特に必要があると認める生活環境動植物の生息又は生育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 藻類の生長に及ぼす影響に関する試験（藻類生長阻害試験）

原則として藻類生長阻害試験又は OECD テストガイドライン 201 で定められた方法に準じて実施する。

III ミジンコの繁殖に及ぼす影響に関する試験（ミジンコ繁殖試験）

原則として OECD テストガイドライン 211 で定められた方法に準じて実施する。

IV 魚類の初期生活段階における生息又は生育に及ぼす影響に関する試験（魚類初期生活段階毒性試験）

原則として OECD テストガイドライン 210 で定められた方法に準じて実施する。

V 優先評価化学物質の環境における残留の状況からみて経済産業大臣及び環境大臣が特に必要があると認める生活環境動植物の生息又は生育に及ぼす影響に関する試験

当該優先評価化学物質について既に得られているその組成、性状等に関する知見に基づいて、その優先評価化学物質が環境中において底質に分布し残留しやすいものであつて、かつ、その優先評価化学物質による底質の汚染により底質中の生活環境動植物の生息又は生育に係る被害を生ずるおそれがあると思込まれる場合には、ユスリカの生息又は生育に及ぼす影響に関する試験（底質添加によるユスリカ毒性試験）とし、当該試験は、原則として OECD テストガイドライン 218 で定められた方法に準じて実施する。