

平成 16 年 3 月 25 日
平成 16・3・19 製局第 6 号
環保企発第 040325004 号

経済産業省製造産業局長
環境省総合環境政策局長

第三種監視化学物質に係る有害性の調査のための試験の方法について

第三種監視化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める省令(平成 15 年経済産業省、環境省令第 10 号)第 1 条に規定する藻類の生長に及ぼす影響、ミジンコの繁殖に及ぼす影響、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その他第三種監視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ついての調査のための試験は、原則として下記の方法により行うこととする。

記

1 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「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121002 号、平成 15・11・13 製局第 2 号、環保企発第 031121002 号)に規定する藻類生長阻害試験又は経済協力開発機構(OECD)における試験法ガイドライン(OECD 理事会決定[C(81)30 最終別添 1]をいう。以下「OECD テストガイドライン」という。)201 で定められた方法に準じて実施する。

2 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。

3 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。

4 第三種監視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

当該第三種監視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、その第三種監視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、その第三種監視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見込まれる場合には、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、原則として別添の方法によるものとする。

(別添)

ユスリカの生息又は生育に及ぼす影響に関する試験の方法
(底質添加によるユスリカ毒性試験)

目的

本試験は、底質に被験物質を添加することにより^(注1)、ユスリカをふ化後一齢幼虫から羽化まで被験物質に暴露し、羽化率等を測定することにより、ユスリカに対する被験物質の慢性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。

- ・ EC₅₀ 暴露期間中に供試生物の羽化等を 50 % 減少させたと算定される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羽化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様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。

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、水及び底質中の被験物質を定量するための信頼できる分析方法及び被験物質の 1 - オクタノールと水との間の分配係数の対数 (以下「log Pow」という。) に関する情報が必要である。また、被験物質の試験手法に係る構造式、純度、水及び光に対する安定性並びに微生物による分解性に関する情報をできるだけ収集する。

3 供試生物

セスジユスリカ (*Chironomus yoshimatsui*)^(注2) が推奨されるが、他のユスリカ (*Chironomus*) 属の淡水産の種を用いてもよい。

供試するユスリカは、一齢幼虫を用いる。セスジユスリカを用いる場合は、成虫を交尾・産卵のためのケージに収容し、水面直上に産卵した卵塊を採取して小型容器に移しふ化するのを待つ。ふ化までに要する時間は 25 で 48 時間程度である。卵塊はゼラチン質の物質で覆われており、1 つの卵塊は 500 個程度の卵からなる。ふ化直後の幼虫はこのゼラチン質の中に留まり、やがて水中に遊泳するようになる。試験に用いるのは、卵塊の中でふ化した時間から 24 時間以内の個体である。なお、通常はふ化後数時間で水中に泳ぎ出すので、それを待って採取して用いる方がよく、卵塊から人為的に水中に追い出すことは避ける。

4 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。

4 - 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、直径8cm前後のビーカー等の円筒形ガラス容器を用いる。水の蒸発及び試験容器へのほこりの混入を防ぐため、試験容器は緩く蓋をする。

4 - 2 器具及び機材

本試験には、上層水のpH、溶存酸素濃度、アンモニア濃度を測定するための計測器及び温度調節のための適切な器具等を用いる。

5 試験用水

ユスリカ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（例えば「新規化学物質等に係る試験の方法について」（平成15年11月21日薬食発第1121002号、平成15・11・13製局第2号、環保企発第031121002号）のミジンコ急性遊泳阻害試験の項に記載のあるElendt M4又はM7飼育水）のいずれを用いてもよい。上層水の硬度は炭酸カルシウム濃度400 mg/L^(注3)未滿とし、pHは6～9とする。

6 底質の調製

6 - 1 底質の調製方法

本試験では人工底質を用いることを推奨し、被験物質を混合した人工底質の調製は例えば次の方法によるものとする。なお、人工底質は用時調製とする。

- (1) 園芸用に市販されている *Sphagnum* spp. のピートモス（pH無調整）を乾燥させる。
- (2) 乾燥したピートモスを粉碎し、孔径 250 μ m の篩に通す。
- (3) 粉末になったピートモスの重量を量り、必要量をガラス容器に移し、少量の蒸留水又は脱イオン水で練って均一なペースト状にする。
- (4) 全量のピートモスをガラス製三角フラスコ又はビーカーに適量の試験用水を加えながら移す。
- (5) マグネティックスターラーを用いて2日間攪拌する。
- (6) 被験物質の物性で log Pow が 5 を超えない場合は次の方法により人工底質を調製する。

試験容器に乾燥重量でそれぞれ(5)を静置して沈殿したピートモスを5%量、カオリン（試薬級）を20%量、石英砂（メルク社、Quarz, fine granular, 1.07536.1000又は同等品）を75%量を入れ、さらに6 - 2 人工底質への被験物質の添加方法に規定する方法にしたがい石英砂に吸着させた被験物質を十分に混合する。

被験物質の物性で log Pow が 5 を超える場合は、上記にユスリカの餌として植物粉末を底質の乾燥重量の 0.5 ~ 1.0% 量加える。

植物粉末は、イラクサ (*Urtica dioeca* (日本には自生しない。)) 又はイラクサ (*Urtica*) 属の植物を使用できる。それ以外ではハウレンソウ、クワ、シロツメクサが使用可能である。いずれもその葉又は葉と葉柄部分を使うが、生きたもの（枯れたり変色していないもの）を用いる。粉末は、植物を十分空気乾燥し、乾燥後粉碎

器を用いて調製する。なお、利用する人工底質の成分には試験に影響を及ぼさないように農薬等の動植物への生理活性の強い物質による汚染が極力少ないものを使用する。

- (7) 少量の試験用水を入れてよく混合する。この時、比重や粒子径の異なるものを混合しているため分離しないように注意する。必要ならばその状態でしばらく加えた水分が蒸発するのを待つ。
- (8) 試験用水をごく静かに注ぎ、水深で底質の厚み（1.5～3cm程度）の4倍量とする。この際、混合した人工底質の混合状態をくずさないようにする。必要ならばここで炭酸カルシウムを用いてpHを6.5～7.5に調整する。

6 - 2 人工底質への被験物質の添加方法

人工底質に添加する被験物質は、次の方法によりあらかじめ石英砂に吸着させる。

- (1) 石英砂を、ガラス製シャーレに1試験容器当たり10g分取する。
- (2) 被験物質を助剤（ヘキサン、アセトン、クロロホルム等の揮発性有機溶剤を用いる。）に溶解又は混和し、先細のガラス製ピペットを用いて石英砂全体に注ぎ、直ちにステンレス製薬さじで混合する。
- (3) ドラフトの中に放置し、有機溶剤を完全に蒸発させて除去する。
- (4) 10gずつ分けて、各試験容器の人工底質の調製に用いる。

7 試験条件

7 - 1 暴露期間

セスジユスリカを用いる場合（以下同じ。）20～28日間である。

7 - 2 収容量と連数

- ・収容量 1試験容器当たり20頭
- ・連数 各試験濃度区及び対照区につき少なくとも4連とする。必要に応じて、被験物質濃度測定用の試験容器を追加する。

7 - 3 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以下とする。試験濃度は、羽化率の対照区に対する比率が95%から5%となる試験濃度区が3つ以上得られるように、評価目的（NOEC又はEC50）を考慮して設定する。なお、1000mg/kg以上（人工底質の乾燥重量当たりの被験物質重量の設定値）の濃度で試験を行う必要はない。

別に対照区及び助剤対照区を設ける。

7 - 4 飼育方法

照明 明暗周期を16：8時間とする。

水温 25 ± 2 とし、暴露期間中及び全試験容器の水温の変動は ± 1 以内とする。

pH 暴露開始時点で6～9の範囲とする。

硬度 上層水の硬度は炭酸カルシウム換算で400mg/L以下^(注3)とする。

溶存酸素濃度 ごく弱く通気を行い、飽和酸素濃度の60%以上に保つ。

給餌 人工熱帯魚用飼料であるテトラミン等を乾燥し、粉末にしたものを用いる。給餌は、乾燥した粉末飼料を試験開始後10日間は1日当たり0.35～0.5mg/個体を与える。試験後半には餌量を0.5～1.0mg/個体に増やしてもよい。なお、被験物質の

物性で log Pow が 5 を超える場合は、人工底質にあらかじめ餌が混合されているので給餌はしない。

8 試験操作及び試験環境の測定

8 - 1 6 - 1 底質の調製方法にしたがい用時調製した人工底質に、通気用のガラス又はステンレス製の管（パスツールピペット等）を底質表面から 2 ~ 3cm の位置にセットし、48時間以上（7日間は望ましい。）通気する。

8 - 2 暴露開始時の被験物質濃度等について測定を行う。被験物質濃度は必ずしも全濃度区、全試験容器で測定する必要はないが、少なくとも最高試験濃度区及びさらに 1 試験濃度区（EC₅₀ に近い濃度であることが望ましい。）について測定する。サンプリングは上層水、間隙水及び底質についてそれぞれ次の方法により行うが、暴露開始時においては、少なくとも底質について被験物質濃度を測定することとする。

上層水 底質を乱さないように上層水のサンプルを一部または全量採取する。

間隙水 底質を遠心分離して（又は他の適当な方法で）間隙水を採取する。

底質 間隙水を除去した底質中の被験物質濃度を測定する。

また、pH、水温及び溶存酸素濃度を全試験容器について、アンモニア濃度及び硬度を対照区及び最高試験濃度区について測定する。

8 - 3 通気を止めて、セスジユスリカ一齢幼虫、20 頭をピペットを用いて試験容器に入れて暴露を開始する。

8 - 4 ユスリカを容器に入れてから 24 時間後（幼虫の定着が確認できれば短くしてもよい。）に通気を再開する。

8 - 5 pH、水温、溶存酸素濃度について、適当な間隔（2 回/週程度）で測定を行う。また、蒸発した水分については、蒸留水又は脱イオン水を加えて水量を一定に保つようにする。

8 - 6 ユスリカの観察は幼虫の間は少なくとも週 3 日行う。ユスリカが幼虫の間は、異常行動について観察を行い、底質から這い出している幼虫数を計数し記録する。暴露開始 12 日頃より対照区では蛹化が始まるので、給餌量を減らし水質の悪化を防ぐ。また、暴露開始後 14 日頃より対照区では羽化（雄の方が雌より 2 日程度早い。）が始まる。羽化開始後は給餌を終了してもよい^(注4)。羽化及び羽化失敗数を毎日雌雄別に記録し、羽化個体は取り除くようにする。雌雄の別は触覚又は腹部末端の形態によって判別する。

8 - 7 対照区で最後の羽化が観察された日から数えて 5 日経過した時点で試験を終了してよい。ただし暴露期間は最長でも 28 日間とする。

暴露終了時に被験物質濃度等を測定する。被験物質濃度は、少なくとも 8 - 2 で暴露開始時に測定を行った 2 試験濃度区について測定する。8 - 2 に記載した方法にしたがい上層水、間隙水及び底質をサンプリングし、それぞれについて測定を行う。また、底質中の有機炭素含量を測定することが望ましい。さらに、水質（pH、水温、溶存酸素濃度、アンモニア濃度、硬度等）を測定する。

9 限度試験

1000mg/kg で被験物質が毒性を示さないことが予想される場合には、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。限度試験は試験濃度区、対照区ともに 6 連以上で行うこととする。対照区と試験濃度区の変態速度^(注5)等を比較するために、t 検定等の統計解析を行う。

1 0 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。

- ・対照区の羽化率が70%以上であること。
- ・対照区での羽化が試験開始12日から23日にあること。
- ・暴露終了時にすべての試験容器の溶存酸素が飽和酸素濃度の60%を維持しており、pH が 6 ~ 9 の範囲にあること。
- ・暴露期間中の水温の変異が ± 1 以内であること。

1 1 結果の算出方法

1 1 - 1 羽化個体数（雌雄別）を容器毎に集計する。なお、雌雄で感受性差がないと判断された場合には雌雄を区別せずに以下の統計検定を実施する^(注6)。

1 1 - 2 結果の算出に用いる被験物質濃度は、原則として暴露開始時の実測底質濃度（底質乾燥重量当たりの被験物質重量）とする。

1 1 - 3 NOEC 及び LOEC の算出

NOEC 及び LOEC は、次の方法により求める。

- (1) 羽化率（ER）（1 容器当たりの羽化数 / 1 容器に入れた幼虫数（20 頭））を試験容器ごとに求める。
- (2) ER と被験物質濃度との関係、各濃度の容器毎の変動の大きさなどを考慮して適当な統計解析法を選択する。
- (3) 容器毎に求めた ER から NOEC 及び LOEC を求める。なお、ANOVA 法を用いて解析する場合には、ER を arcsin-sqrt 変換又は Tukey-Freeman 変換してから解析に供する。

1 1 - 4 EC₅₀（羽化個体数）の算出

EC₅₀（羽化個体数）は、次の方法により求める。

- (1) 容器毎の羽化個体数と被験物質濃度との関係をプロットし、濃度 - 反応関係を明らかにする。
- (2) 対照区の羽化個体数で補正した後に相対羽化率が 5 ~ 95% の範囲の試験濃度区的数据を用い^(注7)、濃度 - 反応関係からみて適切な手法^(注8)で EC₅₀ を計算する。

1 1 - 5 EC₅₀（変態速度^(注5)）の算出

EC₅₀（変態速度）は、次の方法により求める。

(1) 平均変態速度を求める（毎日観察する場合）

$$X = \frac{\sum f_i x_{ii}}{n_e}$$

f_i : i-1 ~ i 日に羽化した個体数

x_{ii} : 1/ (i-1/2) 1/day

n_e : 1 容器当たり羽化個体総数

(2) 平均変態速度と暴露濃度に有意な濃度 - 反応関係があるかどうか検定する。有意な濃度 - 反応関係があった場合は、その関係を示すグラフと適当な回帰式を求め、さらに EC_{50} を求める。

(注1) 本試験は水溶解度が低く底質中の有機炭素に吸着しやすい化学物質の評価には有効である。水溶解度が低いとはいえない化学物質については、たとえユスリカのような底生動物を用いる場合でも底質を含まない試験系の方が優れている。

(注2) 試験には独立行政法人国立環境研究所で保有する殺虫剤感受性系統のセスジユスリカを用いることが望ましい。

(注3) 被験物質と二価陽イオンとの相互作用が認められる場合は、より低い硬度としなければならない。

(注4) ユスリカの成長が揃っている場合は比較的短期間にすべての個体の羽化が終了するので、最初の羽化個体が見られた段階で給餌を停止してよい。

(注5) ここで用いる「変態速度」(development rate) は記載した式のとおり、一齢幼虫から羽化までに要した時間の逆数で示されるものである。つまり「成長速度」(growth rate) ではない。そのため特にここでは混乱を避けるため変態速度の用語を用いているが、この用語は一般的なものではないことに注意すべきである。

また、セスジユスリカの場合、羽化に要する時間は正常な個体群でも雌の方が雄より長い事が普通である。つまり雌雄差があり、この値の取り扱いに際してはそのことを考慮する必要がある。

(注6) 雌雄に感受性差があるかないかを判別するには χ^2 検定 (試験濃度区数 \times 2 の表を用いたもの) によることが適当である。

(注7) 本試験では供試数を 20 頭としているので、対照区より 1 頭でも羽化個体数が少なかった試験濃度区や、1 頭しか羽化しなかった試験濃度区のデータを用いることとなるが、あくまでも濃度と反応の関係が明らかな場合に適当な回帰式で計算するものである。

(注8) 理論的にはプロビット式が適合する。