

新規化学物質等に係る試験の方法について

改正案	現行
＜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 ・LC₅₀ 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。 3 その他 ・<u>閾値濃度（Threshold Concentration） 既存で信頼できる藻類又は急性無脊椎動物（例えばミジンコ）毒性試験データの最小 EC₅₀ 値をいう（No. 126 SHORT GUIDANCE ON THE THRESHOLD APPROACH FOR ACUE FISH TOXICITY OECD, 2010（以下「OECD, 2010」という。）。</u> ・<u>全長 魚の正中線に沿って吻端から尾びれの先端までの直線的長さをいう。</u> ・<u>UVCB 物質（chemical substances of Unknown or Variable composition, Complex reaction products and Biological materials） 組成が未知か又は不定な構成要素を持つ物質、複雑な反応生成物又は生体物質をいう。</u> ・<u>(Q)SAR モデル 物質の化学構造や物性から生物活性を予測する構造活性相関（(Quantitative) Structure-Activity Relationship）モデルをいう。</u> ・<u>カテゴリーアプローチ 有害性が類似又は規則的なパターンを示す構造の類似した物質群をグループ化して評価を行う方法をいう。</u>	＜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 ・LC₅₀ 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。

- ・リードアクロス（read-across） 試験データがない化学物質の安全性を類似物質の試験データから推定する手法をいう。
- ・トレンドアナリシス推定値 観測された測定値の時系列を踏まえて傾向分析して推定した値をいう。
- ・レンジファインディングテスト 暴露濃度の水準を決めるための予備試験をいう。

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（pKa）、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、溶解限度以下の濃度では LC50 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 LC50 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。

なお、難水溶性物質の扱いについては、OECD ガイダンス文書（Guidance document on aqueous-phase aquatic toxicity testing of difficult test chemicals, Series on Testing and Assessment No. 23 second edition, 2019, OECD,以下「OECD ガイダンス文書 No.23」という。）も参照して対応すること。

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（pKa）、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、溶解限度以下の濃度では LC50 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 LC50 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。

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（ミナミメダカ）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、外見上の奇形があつてはならない。また、各試験に使用する魚は同一供給源と個体群に由来した性分化していない同一齢（同一採卵日からふ化したバッチや同一週齢の様に同一齢と定義できる群）で、できる限り均一な大きさの幼魚を用いること。付表 1 の推奨魚種の場合、全長は推奨される全長の範囲にあること。なお、野生の個体からの魚の使用は可能な限り避けること。

付表 1 推奨される供試魚種の全長と試験の条件

魚種	推奨試験温度 (℃)	<u>塩分濃度</u> (‰)	<u>硬度</u> (mg/L CaCO ₃)	試験魚の推奨全長 (cm)
<i>Danio rerio</i> ゼブラフィッシュ	21-25	<u><0.2</u>	<u>40-250</u> <u><180 を推奨</u>	<u>1.0-2.0</u>
<i>Pimephales promelas</i> ファットヘッドミノー	21-25	<u><0.2</u>	<u>40-250</u> <u><180 を推奨</u>	<u>1.0-3.0</u>
<i>Cyprinus carpio</i> コイ	20-24	<u><0.2</u>	<u>40-250</u> <u><180 を推奨</u>	<u>2.0-4.0</u>
<i>Oryzias latipes</i> メダカ（ <u>ミナミメダカ</u> ）	<u>23-27</u>	<u><0.2</u>	<u>40-250</u> <u><180 を推奨</u>	<u>1.0-2.0</u>
<i>Poecilia reticulata</i> グッピー	21-25	<u><0.2</u>	<u>40-250</u> <u><180 を推奨</u>	<u>1.0-2.0</u>
<i>Lepomis macrochirus</i> ブルーギル	21-25	<u><0.2</u>	<u>40-250</u> <u><180 を推奨</u>	<u>1.0-3.0</u>
<i>Oncorhynchus mykiss</i> ニジマス	<u>10-14</u>	<u><0.2</u>	<u>40-250</u> <u><180 を推奨</u>	<u>3.0-6.0</u>
<u><i>Gasterosteus aculeatus</i></u> <u>イトヨ</u>	<u>13-19</u>	<u>0-35</u>	<u>40-7,500</u>	<u>1.0-2.0</u>
<u><i>Cyprinodon variegatus</i></u> <u>シープヘッドミノー</u>	<u>23-27</u>	<u>15-35</u>	<u>3,000-7,500</u>	<u>1.0-2.0</u>
<u><i>Dicentrarchus labrax</i></u> <u>ヨーロッパアンシーバス</u>	<u>18-22</u>	<u>15-35</u>	<u>3,000-7,500</u>	<u>4.0-8.0</u>
<u><i>Pagrus major</i></u> <u>マダイ</u>	<u>18-22</u>	<u>30-35</u>	<u>5,000-7,500</u>	<u>2.0-4.0</u>

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全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。シリコン樹脂の器具については、被験物質を吸着することから、試験溶液と接触する部分への使用は最小にすること。

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、外見上の奇形があつてはならない。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	<u>2.0 ± 1.0</u>
<i>Pimephales promelas</i> ファットヘッドミノー	21-25	<u>2.0 ± 1.0</u>
<i>Cyprinus carpio</i> コイ	20-24	<u>4.0 ± 2.0</u>
<i>Oryzias latipes</i> メダカ	<u>21-25</u>	<u>2.3 ± 1.2</u>
<i>Poecilia reticulata</i> グッピー	21-25	<u>2.0 ± 1.0</u>
<i>Lepomis macrochirus</i> ブルーギル	21-25	<u>2.0 ± 1.0</u>
<i>Oncorhynchus mykiss</i> ニジマス	<u>13-17</u>	<u>5.0 ± 1.0</u>

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、推奨収容量に対し適切な大きさのものをを用いる。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、<u>以下の器具又は装置を適切に</u>用いる。 ・<u>酸素濃度計</u> ・<u>pH 計</u> ・<u>照度計</u> ・<u>水の硬度を測定する装置</u> ・<u>適切な温度制御を行う装置</u> ・<u>全有機炭素（TOC）濃度及び／又は化学的酸素要求量（COD）を測定する装置</u> ・<u>試験溶液中の被験物質濃度を測定する装置</u> ・<u>溶存酸素濃度を維持する装置</u> 3 試験用水 <u>淡水魚の場合</u>、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。<u>汽水魚又は海水魚の場合、海水よりも、脱イオン水又は蒸留水に市販の海塩（Instant Ocean® Sea Salt、Red Sea Salt®又は同等品）を加えることで調製した再構成水を用いることが望ましい。</u>全硬度は炭酸カルシウム濃度<u>で付表 1 に記載した範囲</u>、pH <u>は 6.0～8.5 の水が望ましい</u>。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。<u>天然水を使用する場合</u>には、<u>OECD テストガイドライン 203 のパラグラフ 15 に定められている方法に準じて実施すること。</u> <u>試験用水は半年ごとに分析を行うこと。分析は専門の分析機関に委託することが可能である。付表 2 に記載された水質の基準を満たした試験水は試験に適しているが、基準を満たせない場合でも、魚の飼育に影響を及ぼさないことを、飼育時やじゅん化期間における死亡率等により判断できるものは試験用水として使用しても差し支えない。</u> <u>付表 2 試験水の水質</u> <table><tr><th><u>パラメーター</u></th><th><u>最大濃度</u></th></tr><tr><td><u>SS</u></td><td><u>5 mg/L</u></td></tr><tr><td><u>全有機炭素（TOC）</u></td><td><u>2 mg/L</u></td></tr><tr><td><u>非イオン化アンモニア（NH₃）</u></td><td><u>1 μg/L</u></td></tr><tr><td><u>硝酸イオン（NO₃⁻）</u></td><td><u><9 mg/L</u></td></tr><tr><td><u>残留塩素</u></td><td><u>10 μg/L</u></td></tr><tr><td><u>全有機リン系農薬</u></td><td><u>50 ng/L</u></td></tr><tr><td><u>全有機塩素系農薬+PCB</u></td><td><u>50 ng/L</u></td></tr><tr><td><u>全有機塩素</u></td><td><u>25 ng/L</u></td></tr><tr><td><u>アルミニウム（Al）</u></td><td><u>1 μg/L</u></td></tr><tr><td><u>ヒ素（As）</u></td><td><u>1 μg/L</u></td></tr><tr><td><u>クロム（Cr）</u></td><td><u>1 μg/L</u></td></tr><tr><td><u>コバルト（Co）</u></td><td><u>1 μg/L</u></td></tr><tr><td><u>銅（Cu）</u></td><td><u>1 μg/L</u></td></tr><tr><td><u>鉄（Fe）</u></td><td><u>1 μg/L</u></td></tr><tr><td><u>鉛（Pb）</u></td><td><u>1 μg/L</u></td></tr></table>	<u>パラメーター</u>	<u>最大濃度</u>	<u>SS</u>	<u>5 mg/L</u>	<u>全有機炭素（TOC）</u>	<u>2 mg/L</u>	<u>非イオン化アンモニア（NH₃）</u>	<u>1 μg/L</u>	<u>硝酸イオン（NO₃⁻）</u>	<u><9 mg/L</u>	<u>残留塩素</u>	<u>10 μg/L</u>	<u>全有機リン系農薬</u>	<u>50 ng/L</u>	<u>全有機塩素系農薬+PCB</u>	<u>50 ng/L</u>	<u>全有機塩素</u>	<u>25 ng/L</u>	<u>アルミニウム（Al）</u>	<u>1 μg/L</u>	<u>ヒ素（As）</u>	<u>1 μg/L</u>	<u>クロム（Cr）</u>	<u>1 μg/L</u>	<u>コバルト（Co）</u>	<u>1 μg/L</u>	<u>銅（Cu）</u>	<u>1 μg/L</u>	<u>鉄（Fe）</u>	<u>1 μg/L</u>	<u>鉛（Pb）</u>	<u>1 μg/L</u>	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、<u>溶存酸素計、温度調節のための適切な器具又は装置を</u>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 <u>10～250mg/L で</u>、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。
<u>パラメーター</u>	<u>最大濃度</u>																																
<u>SS</u>	<u>5 mg/L</u>																																
<u>全有機炭素（TOC）</u>	<u>2 mg/L</u>																																
<u>非イオン化アンモニア（NH₃）</u>	<u>1 μg/L</u>																																
<u>硝酸イオン（NO₃⁻）</u>	<u><9 mg/L</u>																																
<u>残留塩素</u>	<u>10 μg/L</u>																																
<u>全有機リン系農薬</u>	<u>50 ng/L</u>																																
<u>全有機塩素系農薬+PCB</u>	<u>50 ng/L</u>																																
<u>全有機塩素</u>	<u>25 ng/L</u>																																
<u>アルミニウム（Al）</u>	<u>1 μg/L</u>																																
<u>ヒ素（As）</u>	<u>1 μg/L</u>																																
<u>クロム（Cr）</u>	<u>1 μg/L</u>																																
<u>コバルト（Co）</u>	<u>1 μg/L</u>																																
<u>銅（Cu）</u>	<u>1 μg/L</u>																																
<u>鉄（Fe）</u>	<u>1 μg/L</u>																																
<u>鉛（Pb）</u>	<u>1 μg/L</u>																																

<table><tr><td><u>ニッケル (Ni)</u></td><td><u>1 µg/L</u></td></tr><tr><td><u>亜鉛 (Zn)</u></td><td><u>1 µg/L</u></td></tr><tr><td><u>カドミウム (Cd)</u></td><td><u>100 ng/L</u></td></tr><tr><td><u>水銀 (Hg)</u></td><td><u>100 ng/L</u></td></tr><tr><td><u>銀 (Ag)</u></td><td><u>100 ng/L</u></td></tr><tr><td><u>化学的酸素要求量 (COD)</u></td><td><u>5 mg/L</u></td></tr></table>	<u>ニッケル (Ni)</u>	<u>1 µg/L</u>	<u>亜鉛 (Zn)</u>	<u>1 µg/L</u>	<u>カドミウム (Cd)</u>	<u>100 ng/L</u>	<u>水銀 (Hg)</u>	<u>100 ng/L</u>	<u>銀 (Ag)</u>	<u>100 ng/L</u>	<u>化学的酸素要求量 (COD)</u>	<u>5 mg/L</u>	
<u>ニッケル (Ni)</u>	<u>1 µg/L</u>												
<u>亜鉛 (Zn)</u>	<u>1 µg/L</u>												
<u>カドミウム (Cd)</u>	<u>100 ng/L</u>												
<u>水銀 (Hg)</u>	<u>100 ng/L</u>												
<u>銀 (Ag)</u>	<u>100 ng/L</u>												
<u>化学的酸素要求量 (COD)</u>	<u>5 mg/L</u>												
4 じゅん化 <u>全て</u>の供試魚を、少なくとも試験に使用する <u>9</u> 日前に入手し、じゅん化しなければならない。48 時間の<u>新たな生育環境への移行期間</u>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、<u>新たな生育環境への移行期間以降</u>の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 (<u>付表 1 参照</u>) ・酸素濃度 飽和酸素濃度の少なくとも 80% ・給餌 暴露開始の <u>24～48</u> 時間前まで、3 回／<u>週</u>又は毎日 <u>給餌する。給餌量については、飽食になるまで与えても良いが、魚種によっては過度の給餌により付表 1 の全長を超えることがあるので注意すること。余剰な餌やフン等の老廃物が溜まらない様に除去すること。</u> 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。<u>2 回目のじゅん化期間の死亡率が 5%以上の場合、そのバッチは試験に使用しない。</u> ・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。<u>助剤を使用する場合は、OECD ガイダンス文書 No.23 で推奨されている低毒性溶媒（アセトン、エタノール、メタノール、ターシャリーブチルアルコール、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、トリエチレングリコール）のみを使用し、毒性が不明な溶媒は使用しないこと。なお、ジメチルホルムアミド及びジメチルスルホキシドは、人に対する健康影響と安全性の観点から、その使用については考慮すべきである。また、アセトニトリル等は藻類生長阻害試験において生長促進作用を有する場合もあることに留意すること。</u> 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	4 じゅん化 <u>すべて</u>の供試魚を、少なくとも試験に使用する <u>12</u> 日前に入手し、じゅん化しなければならない。48 時間の<u>観察期間</u>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、<u>観察期間以降</u>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(<u>表 1 参照</u>) ・酸素濃度 飽和酸素濃度の少なくとも 80% ・給餌 暴露開始の <u>24</u> 時間前まで、<u>週当たり</u> 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 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 止水式及び半止水式では最高密度で 0.8 魚体 g/L が推奨される。流水式の場合、推奨される最大収容密度は、24 時間あたり 0.5 g 魚体湿重量/ L である（例：10L 容量の水槽を用い、流量は 24 時間で 5 倍量とすると、24 時間で合計 50 L が水槽を通過する。収容する魚の合計体重が 25 g の場合、これは 24 時間で 50 L 当たり 25 g となり、24 時間で 0.5 g/L に相当する）。また常に収容密度は 5 g/L を超えないことが推奨される。
- ・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

試験濃度範囲の選択には、例えば適切な (Q) SAR モデルによる適用ドメイン内での推定値、カテゴリーアプローチによるリードアクロスやトレンドアナリシス推定値、魚類胚試験や培養細胞を使用した試験等他の試験法によるデータ等、全ての情報源を使用することができる。そのようなデータが利用できない場合や十分な信頼性が得られない場合は、同じ種の魚を使用したレンジファインディングテストを検討する必要がある。この場合、藻類及びミジンコの試験から得られた閾値濃度 (OECD, 2010) を使用して、濃度範囲の設定を行うことができる。

試験濃度範囲の設定においては、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、全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ることが望ましい。なお、0%の死亡率を引き起こす最大濃度又は 100%の死亡率を引き起こす最小濃度での試験の実施は必須ではない。

6-5 对照区

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。ただし、当局の了解が得られる場合、助剤対照区のみの実施で評価することができる。

6-6 試験中の暴露環境

- ・温度 供試魚の適温 (付表 1 参照) で、 $\pm 2^{\circ}\text{C}$ の範囲内で一定に保つ。
- ・照明 一日当たり 12～16 時間、光強度が $10\text{--}20\ \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 、 $540\text{--}1000\ \text{lux}$ 又は $50\text{--}100\ \text{ft}^{\circ}$ (実験室レベル) でなければならぬ。
- ・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確認できなければばつ気を行ってもよい。
- ・給餌 行わない。
- ・かく乱 過度の振動や騒音などの魚の行動を変化させるようなかく乱要因は回避又は可能な限り軽減すること。

6-7 魚の測定

暴露開始前に、試験に使用する魚と同一の飼育容器より少なくとも 10 尾の魚について個別に湿重量と全長を測定する。測定に使用された魚を試験に使用しないこと。これらの魚の全長測定を試験開始の 8 日以上前に実施した場合、暴露終了時に、付表 1 に示す推奨魚種のサイズ要件を満たしていることを確認するために再度魚の全長を測定する必要がある。全長の測定は写真を使用することができる。湿重量は、例えば飼育水を入れ、事前に計量した飼育水入り容器の中に生きた魚を入れ、重量増加分を湿重量とみなす。

6-8 魚の人道的殺処分

暴露終了後、生き残った魚を別の試験に用いてはならない。生き残った魚に対して殺処分を行う場合は、深い麻酔、迅速な中枢の破壊等を用いてよい。また、OECD テストガイドライン 203 のパラグラフ 28 に定められた方法に準じて実施してもよい。

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 觀察

暴露開始後 24 時間以内に少なくとも 2 回の観察を実施し、観察の間隔は少なくとも 3 時間とすることが望ましい。(例えば、0－1 日は暴露開始の 2 ± 0.5 時間後、 5 ± 1 時間後、 24 ± 2 時間後に観察する。) また、2－4 日は

- ・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 試驗濃度

- 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ばつ氣を行ってもよい。
- ・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 觀察

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

<u>2回／日</u>魚の様子を観察する（<u>観察時間については様式 11 の 4. 各観察時間における観察された症例の記録を参照しても良い。</u>）。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。<u>また付表 3 に記述された</u>異常が観察された場合は記録しておく。<u>付表 3 に当てはまらない魚種特有の観察される症状についても記録しておく。</u>			する。<u>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</u>が観察された場合は記録しておく。		
付表 3 観察される症状例					
症 状 分 類	症 状 名	症状の定義			
平 行 喪 失	バ ラ ン ス	バランスを失う、上下・水平感覚を失う、頭部を上又は下に向けた体勢			
	喪 失				
	浮 力 喪 失	着底・横転するか表面に浮上			
遊泳及び行動異常	不 活 発 ・	自発運動の低下、刺激への反応が鈍った状態、嗜眠状態			
	嗜 眠				
	過 活 発	自発運動の上昇、刺激等により不定方向への激しい動き			
	異 常 な 遊	背泳、スパイラル（らせん運動）、コークスクリュウ（ドリル状の回転運動）			
	泳 方 法	これらの症例は多くの場合、複合的に観察			
	け い れ ん	遊泳中に筋肉が強く収縮することで起こるピクツとした動き			
	硬 直	ヒレがたたまれて硬直して遊泳不能			
	鼻 上 げ	水面に口を出す呼吸異常行動			
	着 底	水槽の底面に腹部をつけ遊泳不能			
	孤 立	集団と離れた行動			
呼 吸 機 能 異 常	密 集	密な状態で集団を形成			
	過 呼 吸	呼吸頻度の増加と頻繁な開口と鰓蓋を開く行動			
	低 呼 吸	呼吸頻度と鰓蓋を開く行動の低下			
	深 呼 吸 ・ 飲 み 込 み	大きく口を膨らませて水を吸い込む、あるいは水面での呼吸行動、及び過度な逆洗(coughing)運動			
そ の 他	体 色 変 化	脱色、白化、鮮明化等			
	眼 球 突 出	眼窩の腫れによる眼球の突出			
	浮 腫	腹部の膨張とそれに伴う鱗の突出と腹部の亀裂			
	出 血	皮下出血等			
	曲 り	骨折などによる背骨の曲り等			
	攻 撃 性	他の個体を追い回すなどの異常行動			
	糞 便 異 常	異常な糞便状況（偽糞、排泄行動の増加等）			
9 被験物質濃度等の測定			9 被験物質濃度等の測定		
9－1 被験物質濃度の測定			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、 <u>全て</u> 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。			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、 <u>すべて</u> 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。			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			9－2 試験環境の測定		
pH、溶存酸素濃度、水温、 <u>塩分濃度</u> は少なくとも毎日 1 回測定する。 <u>また、硬度（安定性が実証されない場合）</u>			pH、溶存酸素濃度、水温は少なくとも毎日 1 回測定する。		

<u>及び TOC は希釈水での暴露開始時に測定する。</u>	
1 0 限度試験	1 0 限度試験
100mg/L 又は水溶解限度のより低い方の濃度で被験物質が致死を示さないことが予想される場合等には、この濃度で限度試験を行い、LC ₅₀ が <u>そ</u> の濃度より大きいことを示すことができる。限度試験には <u>少なくとも</u> 7尾を用い、対照区においても同数を用いる。 <u>目視可能な異常が確認された場合は記録する。</u> 暴露終了時までに死亡が観察された場合、正規の試験を行う。	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 <u>こ</u> の濃度より大きいことを示すことができる。限度試験は <u>最少で</u> 7尾を用い、対照区においても同数を用いる。暴露終了時までに死亡が観察された場合、正規の試験を行う。 <u>また、亜致死的な影響が観察された場合は記録する。</u>
1 1 試験の有効性	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。	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	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±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、回帰直線の傾き、 <u>暴露期間 96 時間における LC₅₀ 及び 95%信頼限界</u> を算出する。さらに、各観察時毎の LC ₅₀ <u>及び 95%信頼限界</u> を算出することが望ましい。 得られたデータが <u>100%あるいは 0%死亡のみを示す</u> 場合 <u>は</u> 、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。	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、 <u>95%信頼限界における</u> 回帰直線の傾き <u>及び</u> 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 <u>統計計算を行うのに不十分な</u> 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	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。	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	注 人工調製水
OECD（ISO6341-1982）の組成	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。	(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。	(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。	(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。	(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 1L 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。	(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 μ S/cm を越えてはならない。 <u>全て</u> の試薬は分析用特級とする。	脱イオン水の電導度は 10 μ S/cm を越えてはならない。 <u>すべて</u> 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。	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。

[様式11] 魚類急性毒性試験結果報告書				[様式11] 魚類急性毒性試験結果報告書			
1. 一般的事項				1. 一般的事項			
新規化学物質等の名称 (IUPAC命名法による)				新規化学物質等の名称 (IUPAC命名法による)			
別名				別名			
CAS番号				CAS番号			
構造式又は示性式 (いずれも不明な場合は、 その製法の概要)				構造式又は示性式 (いずれも不明な場合は、 その製法の概要)			
分子量				分子量			
試験に供した新規 化学物質の純度(%)				試験に供した新規 化学物質の純度(%)			
不純物の名称 及び含有率				不純物の名称 及び含有率			
蒸気圧				蒸気圧			
対水溶解度				対水溶解度			
1-オクタノール/水分配係数				1-オクタノール/水分配係数			
融点				融点			
沸点				沸点			
常温における性状				常温における性状			
安定性				安定性			
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性	溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
[備考] 物理化学的性状は、 <u>UVCB物質のような多成分物質及び混合物においても</u> 、可能な限り記入すること。 1. 「蒸気圧」の欄には、被験物質の蒸気圧を記入すること。 2. 「安定性」の欄には、温度、光等に対する安定性を記入すること。 3. 「溶媒に対する溶解度等」の欄には、被験物質の溶媒に対する溶解度及びその溶媒中での安定性を記入すること。				[備考] 物理化学的性状は、可能な限り記入すること。 1. 「蒸気圧」の欄には、被験物質の蒸気圧を記入すること。 2. 「安定性」の欄には、温度、光等に対する安定性を記入すること。 3. 「溶媒に対する溶解度等」の欄には、被験物質の溶媒に対する溶解度及びその溶媒中での安定性を記入すること。			

2. 試験溶液の被験物質濃度の分析方法		2. 試験溶液の被験物質濃度の分析方法	
項 目	方法	項 目	方法
分析方法		分析方法	
前処理法		前処理法	
定量条件		定量条件	
〔備 考〕 1. 「分析方法」の欄には、実測した分析法を具体的に記入すること。 2. 「前処理法」の欄には、分析を行う前に実施した処理の概要を記入すること。藻類においては細胞の分離手法を明記すること。 3. 「定量条件」の欄には、分析に用いた機器や温度・溶離液等の分析の条件を記入すること。		〔備 考〕 1. 「分析方法」の欄には、実測した分析法を具体的に記入すること。 2. 「前処理法」の欄には、分析を行う前に実施した処理の概要を記入すること。藻類においては細胞の分離手法を明記すること。 3. 「定量条件」の欄には、分析に用いた機器や温度・溶離液等の分析の条件を記入すること。	

3. 試験材料及び方法

項 目		内容
試験生物	種（和名・学名・系統）	
	入手先	
	大きさ（全長、体重）・月齢	
	対照物質への感受性（LC ₅₀ ） （対照物質名）	
じゅん化	じゅん化期間	
	飼育水の種類	
	じゅん化前の薬浴の有無	
	じゅん化方式（止水、半止水、流水等）	
	環境条件（水温、明暗周期）	
	餌料（種類・量・頻度等）	
試験条件	試験容器	
	試験用水	種類（天然水、脱塩素水道水、人工調製水等）
		硬度
		pH
		<u>TOC 又は COD</u>
	暴露期間	
	試験濃度（設定値）	
	供試数	
	試験溶液量	
	助剤	助剤の有無
		種類
		濃度
	<u>試験溶液調製方法</u>	
	試験方式（止水、半止水、流水等）	
	換水又は流水条件	
	水温	
	溶存酸素濃度（DO）	
	明暗周期	
	<u>光強度</u>	

[備 考]

1. 「試験生物」の「対照物質への感受性」の欄については、試験生物の感受性検定試験を実施している場合はその結果を記入（対照物質を明記した上で LC₅₀ を記入）すること。実施していない場合は空欄としてもよい。
2. 「じゅん化」の「じゅん化前の薬浴の有無」の欄には、じゅん化前に行った薬浴の有無を記入し、薬浴を実施した場合は薬剤の種類も記載すること。
3. 「試験条件」の「試験容器」の欄には、材質及び容量を記入すること。なお、被験物質が揮発性を有する場合は「密閉の有無」を記載すること。
4. 「試験条件」の「試験濃度（設定値）」の欄には、試験に用いた被験物質の濃度を全て掲げ、その公比も記入すること。
5. 「試験条件」の「試験溶液調製方法」の欄には、用いた調製方法に応じ、WSF、WAF、懸濁液、分散液等、適切なものを記入すること。
6. 「試験条件」の「換水又は流水条件」の欄には、半止水式の場合は換水の頻度、流水式の場合は流量を記入する

3. 試験材料及び方法

項 目		内容	
試験生物	種（和名・学名・系統）		
	入手先		
	大きさ（全長、体重）・月齢		
	対照物質への感受性 （LC ₅₀ ） （対照物質名）		
じゅん化	じゅん化期間		
	飼育水の種類		
	じゅん化前の薬浴の有無		
	じゅん化方式（止水、半止水、流水等）		
	環境条件（水温、明暗周期）		
	餌料（種類・量・頻度等）		
試験条件	試験容器		
	試験用水	種類（天然水、脱塩素水道水、人工調製水等）	
		硬度	
		pH	
	暴露期間		
	試験濃度（設定値）		
	供試数		
	試験溶液量		
	助剤	助剤の有無	
		種類	
		濃度	
	試験方式（止水、半止水、流水等）		
	換水又は流水条件		
	水温		
	溶存酸素濃度（DO）		
	明暗周期		
	結果の算出 方法	LC ₅₀	

[備 考]

1. 「対照物質への感受性」の欄には、試験生物の感受性検定の結果を記入（対照物質を明記した上で LC₅₀ を記入）すること。
2. 「じゅん化」の「じゅん化前の薬浴の有無」の欄には、じゅん化前に行った薬浴の有無を記入し、薬浴を実施した場合は薬剤の種類も記載すること。
3. 「試験濃度（設定値）」の欄には、試験に用いた被験物質の濃度をすべて掲げ、その公比も記入すること。
4. 「試験条件」の「試験容器」の欄には、材質及び容量を記入すること。なお、被験物質が揮発性を有する場合は「密閉の有無」を記載すること。
5. 「結果の算出方法」の欄には、毒性値の（LC₅₀）算出に用いた統計解析手法（例えば、probit 法等）を記入すること。

こと。

4. 各観察時間における観察された症例の記録（例）

各観察時間における記録									
試験日／観察時間	0日目 2-3時間	0日目 5-6時間	1日目午前	1日目午後	2日目午前	2日目午後	3日目午前	3日目午後	4日目午前
暴露開始からの概算経過時間	2.5時間	5.5時間	24時間	30時間	48時間	54時間	72時間	78時間	96時間
日付／時間									
水槽内の生存魚数									
水槽内の瀕死魚数									
取り除かれた死亡魚数									
症例記録欄 異常がない場合は「ND」を記入									
平衡喪失	バランス喪失								
	浮力喪失								
遊泳及び行動異常	不活発・嗜眠								
	過活発								
	異常な遊泳方法								
	けいれん								
	硬直								
	鼻上げ								
	着底								
	孤立								
	密集								
呼吸機能異常	過呼吸								
	低呼吸								
	深呼吸・飲み込み								
その他	体色変化								
	眼球突出								
	浮腫								
	出血								
	曲り								
	攻撃性								
	糞便異常								

5. 試験結果及び考察

項 目	内 容			
試験濃度	1.設定値 2.実測値 <u>（算術平均値、時間加重平均値）</u> 3.推定値			
<u>毒性値</u>	<u>試験時間 (h)</u>	<u>LC₅₀ 値 (mg/L)</u>	<u>95%信頼限界</u>	<u>毒性値算出法（傾き）</u>
	<u>24</u>			
	<u>48</u>			
	<u>72</u>			
	<u>96</u>			
考察及び特記事項				

[備 考]

1. 「毒性値」の欄には、経過時間ごとの LC₅₀ を記入すること。

4. 試験結果及び考察

項 目	内 容
<u>毒性値</u>	<u>96hLC₅₀= mg/L</u>
試験濃度	1.設定値 2.実測値
考察及び特記事項	

[備 考]

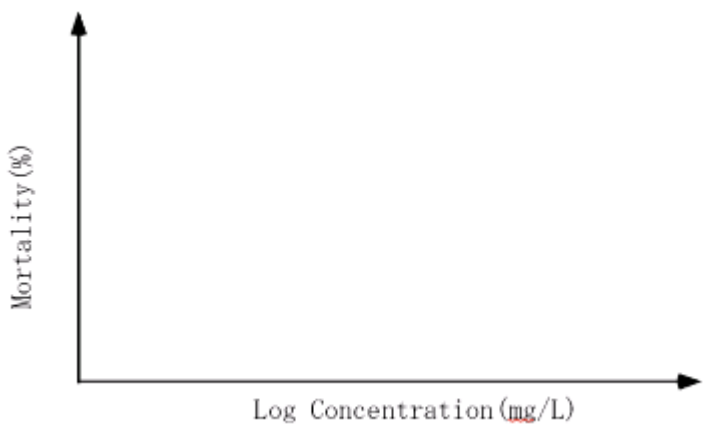
1. 毒性値の欄には、96時間での LC₅₀ を記入すること。

<u>2.「毒性値算出法（傾き）」の欄には、毒性値（LC₅₀）の算出に用いた統計解析手法（例えば、Probit 法等）を記入すること。</u> 3.「考察及び特記事項」の欄には、被験物質の物理的・化学的特性を踏まえて、毒性値の特徴や試験の有効性に関して考察すること。また、試験における異常な事項や本試験法から逸脱した事項等については、試験結果への影響等を記載すること。	<u>2.「試験濃度」の欄には、毒性値（LC₅₀）を算出するために用いた濃度が「設定値」か、あるいは「実測値」かを明記すること。</u> 3.「考察及び特記事項」の欄には、被験物質の物理的・化学的特性を踏まえて、毒性値の特徴や試験の有効性に関して考察すること。また、試験における異常な事項や本試験法から逸脱した事項等については、試験結果への影響等を記載すること。
--	--

6. 魚類の濃度－死亡率曲線

暴露期間中における各試験濃度での魚類に対する死亡率を示した図（例図1）を添付すること。

例図1 魚類の濃度－死亡率曲線



7. その他

試験実施施設	名 称	
	所 在 地	電話 () FAX ()
試験責任者	職 氏 名	
	経 験 年 数	
試験番号		
試験期間	年 月 日 から 年 月 日 まで	

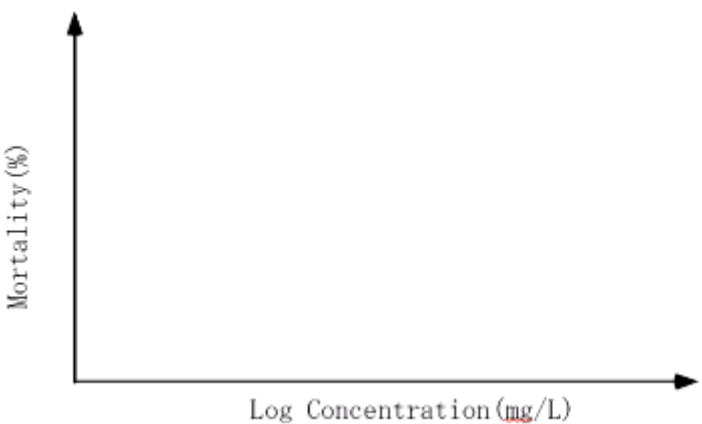
[備考]

- 1. 本様式への記載は、最終報告書より転記して作成すること。
- 2. 最終報告書と同じ試験番号を記入すること。
- 3. 本様式の作成責任者は、本様式の欄外に、所属及び氏名を記載すること。

5. 魚類の濃度－死亡率曲線

暴露期間中における各試験濃度での魚類に対する死亡率を示した図（例図1）を添付すること。

例図1 魚類の濃度－死亡率曲線



6. その他

試験実施施設	名 称	
	所 在 地	電話 () FAX ()
試験責任者	職 氏 名	
	経 験 年 数	
試験番号		
試験期間	年 月 日 から 年 月 日 まで	

[備考]

- 1. 本様式への記載は、最終報告書より転記して作成すること。
- 2. 最終報告書と同じ試験番号を記入すること。
- 3. 本様式の作成責任者は、本様式の欄外に、所属及び氏名を記載すること。

