

新規化学物質等に係る試験の方法について
(平成23年3月31日 薬食発0331第7号、平成23・03・29製局第5号、環保企発第110331009号)

最終改正 令和2年11月5日
薬生発1105第2号、20201015製局第1号、環保企発第2011055号
施行日 令和2年11月5日

第1 新規化学物質等に係る試験の方法について
新規化学物質等に係る試験は、原則として別添の方法によるものとする。

第2 新規化学物質等に係る試験の方法の取扱いについて

1 経過規定

- 1) 平成23年3月31日以前に開始された試験であって、平成15年連名通知及び「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(平成16年3月25日平成16・03・19製局第6号、環保企発第040325004)」に規定する各試験の方法に基づき行われたものの取扱いについては、なお従前の例によることができるものとする。
- 2) 平成23年3月31日以前に開始された試験であって、その目的が上記第1に規定する哺乳類を用いる反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験の目的のいずれかに合致するものであり、OECDテストガイドラインに基づき行われたものについては、当該平成23年3月31日以前に開始された試験を、これらの試験のうちその目的が合致している試験として取り扱うことができるものとする。

2 その他

試験の目的が上記第1に規定する慢性毒性試験、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又は薬理学的試験の目的に合致している試験であって、OECDテストガイドラインに基づき行われたものについては、原則として、これらの試験のうちその目的が合致している試験として取り扱うことができるものとする。

< 微生物等による化学物質の分解度試験 >

: 微生物による化学物質の分解度試験 (301C 相当)

- 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。

- 用語

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

- 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 ~ 6 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 ± 2 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 ± 2 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（ $100 \sim 400$ 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。

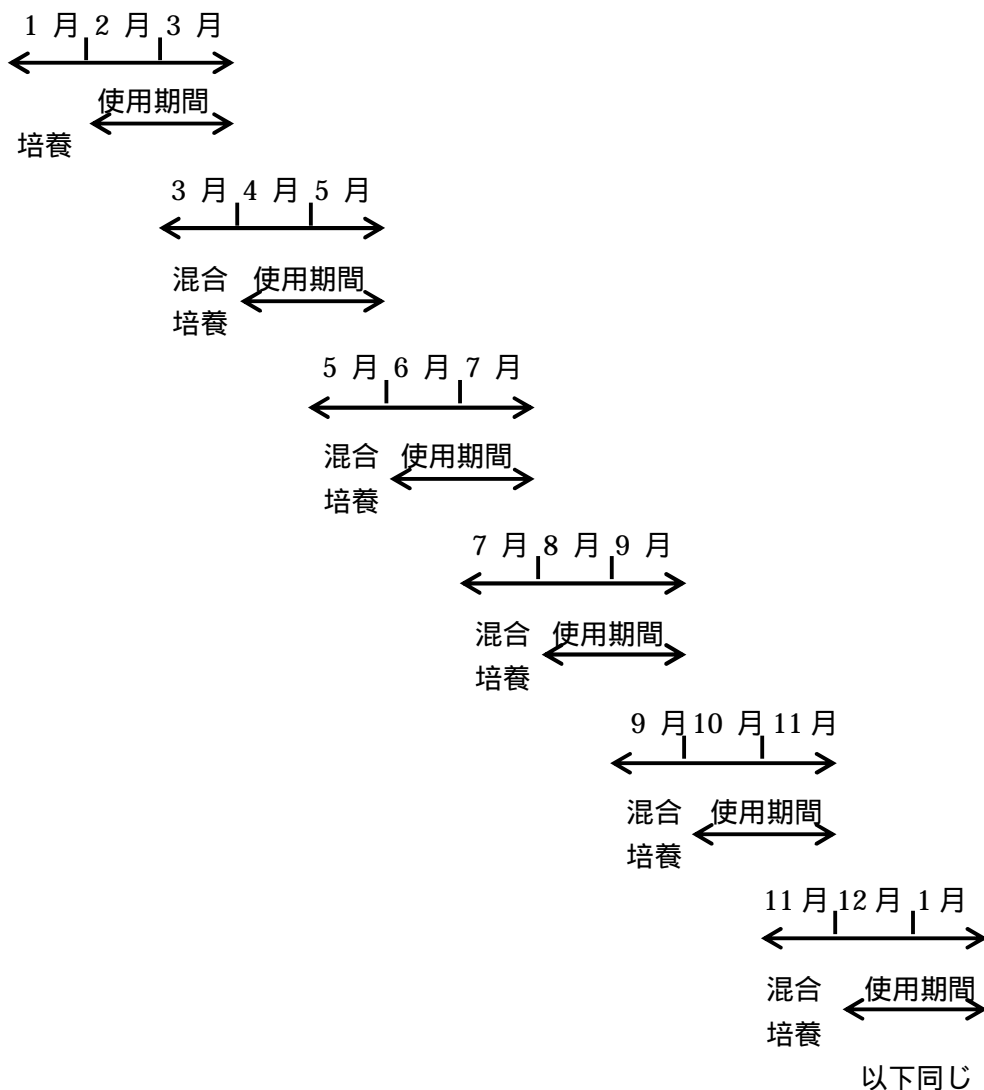
7 新旧活性汚泥の混合

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 - 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（年間 6 回採集の場合）]



- 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 K0102-2016 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を用い、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 K0102-2016 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。また、試験液の pH を測定する。
(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 - の 3 - 3 のアニリンの分解度が 7 日後に 40% を超えかつ 14 日後に 65% を超えるときは、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

$$\text{分解度 (\%)} = \frac{\text{BOD} - \text{B}}{\text{TOD}^{(\text{注}3)}} \times 100$$

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（計算値）(mg)

（注3）窒素を含む被験物質が分解した場合、硝化の程度に応じた TOD を算出する。

6 - 3 直接定量^(注4)から分解度(%)を算出する方法

$$\text{分解度}(\%) = \frac{S_B - S_A}{S_B} \times 100$$

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4）直接定量による化学分析法

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、これを約 40,000m/s² で 15 分間遠心分離又はろ過（0.45 μm）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。

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、高速液体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。

- 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。

: 微生物による化学物質の分解度試験 (301F 相当)

- 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。

- 用語

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

- 植種源 (微生物源)

地方自治体が管轄する主として家庭排水を処理する下水処理場の好氣的反応槽 (出口付近) の活性汚泥又は返送汚泥を用いる。下水処理場より汚泥を採取後、必要に応じてふるい等を用いて大きな粒子を除去し、試験に使用するまで好氣的条件を維持する。採取当日に汚泥を使用しない場合は、約 22 で好氣的条件を維持し、採取後 7 日間使用してよい。なお、被験物質、基準物質 (アニリン、酢酸ナトリウム又は安息香酸ナトリウム) 及びその他の化学物質を用いてじゅん化してはならない。

- 試験方法

1 分解度試験装置

酸素消費量測定装置

2 基礎培養基

以下に示した A 液、B 液、C 液及び D 液を調製する。A 液 10 mL、B 液 1 mL、C 液 1 mL 及び D 液 1 mL に水を加えて 1 L とし、これを基礎培養基とする。

A 液 :

りん酸二水素カリウム (KH_2PO_4) 8.50 g
りん酸水素二カリウム (K_2HPO_4) 21.75 g
りん酸水素二ナトリウム二水和物 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 33.40 g
又はリン酸水素二ナトリウム十二水和物 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 67.21 g
塩化アンモニウム (NH_4Cl) 0.50 g
上記を水に溶解させ 1 L とする。また、pH を 7.4 に調整する。

B 液 :

塩化カルシウム (CaCl_2) 27.50g
又は塩化カルシウム二水和物 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 36.40 g
上記を水に溶解させ 1 L とする。

C 液 :

硫酸マグネシウム七水和物 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 22.50 g
上記を水に溶解させ 1 L とする。

D 液 :

塩化鉄 (III) 六水和物 ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.25 g
上記を水に溶解させ 1 L とする。なお、本液は使用する直前に調製する。

3 被験物質の添加及び試験の準備

3 - 1 ~ 3 - 3 の試験容器（例：各 300 ml）を準備し、これらを試験温度に調整する。被験物質が固体で水に試験濃度まで溶解しない場合は、可能な限り微粉碎等を実施したものをを用いる。

必要に応じて 3 - 4 ~ 3 - 9 の試験容器を追加してよい。微生物への阻害性がある被験物質については、微生物への阻害を低減する目的で低濃度での分解性を評価する 3 - 5 を追加してよいが、その妥当性（被験物質に微生物への阻害性があること等）を 3 - 6 の試験容器によって示すこと。また、難水溶性物質については、試験液中における被験物質と微生物の接触を改善する目的で補助物質（溶媒、乳化剤又は担体）を使用した 3 - 7 ~ 3 - 9 を追加してよいが、その妥当性（補助物質に生分解性や微生物への阻害性がないこと等）を示すこと。

- 3 - 1 基礎培養基に被験物質が 100 mg/L となるように添加したものを入れた試験容器 少なくとも 2 個
- 3 - 2 基礎培養基に基準物質（アニリン、酢酸ナトリウム又は安息香酸ナトリウム）が 100 mg/L となるように添加したものを入れた試験容器 1 個
- 3 - 3 基礎培養基のみを入れた試験容器 2 個

< 非生物的影響を確認する場合 >

- 3 - 4 精製水に被験物質が 100 mg/L となるように添加したものを入れた試験容器 任意の個数

< 微生物への阻害性がある被験物質に対して低濃度における分解性を確認する場合 >

- 3 - 5 基礎培養基に被験物質が 30 mg/L となるように添加したものを入れた試験容器 少なくとも 2 個
- 3 - 6 基礎培養基に被験物質（100 mg/L となる量）及び基準物質（100 mg/L となる量）を添加したものを入れた試験容器 任意の個数

< 難水溶性物質に対して補助物質を使用する場合 >

- 3 - 7 基礎培養基に被験物質（100 mg/L となる量）及び補助物質（適切な量）を添加したものを入れた試験容器 少なくとも 2 個
- 3 - 8 基礎培養基に基準物質（100 mg/L となる量）及び補助物質（適切な量）を添加したものを入れた試験容器 1 個
- 3 - 9 基礎培養基に補助物質（適切な量）を添加したものを入れた試験容器 2 個

4 植種源の接種

3 - 1 ~ 3 - 3 の試験容器に JIS K0102-2016 の 14.1 で定められた懸濁物質濃度が 30 mg/L となるように植種源を接種する。ただし、3 - 1 については必要な場合には接種の前に溶液の pH を 7.4 ± 0.2 に調整する。

試験容器を追加する場合は 3 - 5 ~ 3 - 9 にも同様に植種源を接種する。ただし、3 - 5 ~ 3 - 9 については必要な場合には接種の前に溶液の pH を 7.4 ± 0.2 に調整する。

5 分解度試験の実施

遮光した条件のもとで 22 ± 1 で十分かくはんしながら一定期間^(注5)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。ただし、3 - 6の試験容器については、残留する被験物質と変化物及び溶存有機炭素の残存量の測定は不要である。また、試験液の pH を測定する。

(注5) 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

試験終了時において、 - の 3 - 1 の分解度の最大値と最小値の差が 20%未滿、 - の 3 - 3 の酸素消費量が 60 mg/L 以下、さらに酸素消費量から求めた - の 3 - 2 の基準物質の分解度が 14 日後までに 60%に達するときは、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

$$\text{分解度 (\%)} = (\text{BOD} - \text{B}) / \text{TOD}^{(\text{注}6)} \times 100$$

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 (計算値)(mg)

(注6) 窒素を含む被験物質が分解した場合、硝化の程度に応じた TOD を算出する。

6 - 3 直接定量^(注7)から分解度 (%) を算出する方法

$$\text{分解度 (\%)} = (\text{B} - \text{A}) / \text{B} \times 100$$

A：分解度試験終了後の被験物質の残留量 (測定値)(mg)

B：被験物質の添加量 (理論値)(mg)

(注7) 直接定量による化学分析法

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、これを約 40,000m/s² で 15 分間遠心分離又はろ過 (0.45 μm) 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。

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、高速液体クロマトグラフ分析法、吸光度分析法、質量分析法、原子吸光分析法等) に従い分析を行う。

6 - 4 備考

- の 6 - 2 において酸素消費量から分解度を算出する際、必要に応じて 10%に達した時から 10 日間 (10-d window) 以内に 60%に達するか否かを確認してもよい。

- 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 >

: 魚を用いた濃縮度試験（水暴露法）

- 適用範囲

ここでは、魚介類のうち特に水（経鰓）を介した魚類の体内における化学物質の濃縮性を評価する試験の標準となるべき方法について規定する。魚を用いた生物濃縮度試験については、原則、本試験法を用いる。

- 用語

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

- 試験方法

1 試験の概要

本試験法は、魚類体内への水（経鰓）を介した化学物質の取込及び蓄積を評価する方法である。本試験では、化学物質が溶解した試験水に試験魚を暴露して、試験水及び試験魚中における化学物質濃度を測定し、定常状態における生物濃縮係数（ BCF_{SS} ）を算出する。また、必要に応じて、上記の取込期間に加えて、取込期間終了後の試験魚を化学物質が含まれない試験水に移動し排泄期間を設ける。この場合には、取込・排泄の両期間を通して速度論による生物濃縮係数（ BCF_K ）を算出することができる。

2 試験に用いる装置及び材料

2 - 1 装置及び器具

すべての装置及び材料は、溶解、吸着、あるいは浸出により試験魚に有害な影響を与えないものを用いる。試験水槽は、化学的に不活性な材料で、流量に応じた適切な容量の角型あるいは円筒形とする。テフロン、ステンレススチール又はガラス配管を使用し、軟質プラスチック配管の使用は最小限とし、やむを得ない箇所に限る。合成ピレスロイド類のように高い吸着性を有する被験物質には、シラン処理ガラスが必要な場合もある。

2 - 2 試験用水

- (1) 試験用水とは、被験物質及び溶解補助剤（溶剤及び分散剤）を含まない試験用の水である。汚染されていない水質の水源から得られる天然水、脱塩素した水道水又は人工

調製水（特定の栄養素を既知量添加した脱塩素した水道水）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。試験用水は、少なくとも pH、硬度、全粒子状物質濃度、全有機炭素（TOC⁽¹⁾）濃度を測定する。アンモニウム、亜硝酸及びアルカリ度についても測定することが望ましい。

- (2) 試験期間中、試験用水の水質を一定に保つ。試験開始時の pH は 6.0 から 8.5 までの範囲とし、試験期間中の変動幅は ± 0.5 以内とする。試験用水が試験結果に影響（例えば、被験物質の錯体形成による影響）を与えないようにする。試験魚の活動に有害な影響を与えないことを保証するために、定期的（少なくとも試験開始時及び終了時）に試験用水を採取し、重金属類、主要なアニオン類及びカチオン類、農薬、TOC、全粒子状物質の濃度等を測定する（試験法解説参照）。試験用水の水質が一定であることが確認できれば、測定頻度を 3 か月ごとなどにしてもよい。さらに、1 年間以上にわたって一定であると示される場合は、測定頻度を 6 か月ごとなどにしてもよい。試験用水中の TOC だけでなく天然粒子の含量も可能な限り低減する。必要に応じて、試験用水を使用前にろ過する。また、試験魚の排泄物及び残餌による有機炭素量を可能な限り小さくする。

2 - 3 試験魚

2 - 3 - 1 魚種を選択

コイ又はメダカ（ヒメダカ）が推奨されるが、試験法解説に示す他の魚種を使用してもよい。

2 - 3 - 2 蓄養及びじゅん化

- (1) 蓄養した魚群を試験水温で少なくとも 2 週間じゅん化させ、その間十分な餌を与える。じゅん化中の水及び餌は試験に使用するものと同じ種類のものとする。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、以下の基準に従い試験に使用する。
- ・ 7 日間で 10% を超える死亡率の場合：試験に使用しない。
 - ・ 7 日間で 5% から 10% の死亡率の場合：さらに 7 日間延長してじゅん化する。次の 7 日間で 5% より高い死亡率になった場合には試験に使用しない。
 - ・ 7 日間で 5% より低い死亡率の場合：試験に使用できる。
- (2) 試験に使用する魚に外観上、病気や異常がないことを確認する。病気の魚は試験に使用しない。試験開始前 2 週間あるいは試験期間中に病気などに対する処置はしない。

(1) 全有機炭素（TOC）には、粒子状有機炭素（POC）及び溶存有機炭素（DOC）が含まれる（TOC = POC + DOC）。

2 - 3 - 3 給餌

- (1) じゅん化及び試験期間中は、試験魚を健康な状態に保ち、かつ、体重を一定に維持するため、脂質や総蛋白質含量が既知の餌を適切な量与える。給餌量は魚種、試験条件及び餌のカロリー値を考慮して設定し、じゅん化及び試験期間中に毎日餌を与える（例えば、コイの場合は魚体重の 1-2% 程度（湿重量））。給餌量は、急激な成長及び脂質含量の増加がないように設定し、各試験水槽から直近に採取した試験魚の体重から適宜、再計算する（週 1 回など）。
- (2) 給餌後 30 分から 1 時間以内に、試験水槽から食べ残しの餌及び糞便を吸い上げる。有機炭素の存在は、被験物質の生物学的利用能を制限する可能性があるため、試験期間を通して試験水槽を清掃し、有機炭素濃度を可能な限り低く保つ。

3 試験の実施

3 - 1 試験水

- (1) 試験水とは、試験用水に被験物質や溶解補助剤を加えた水である。試験原液は、被験物質を試験用水に単純に混合又は攪拌し調製することが望ましい。溶解補助剤を使用する場合は最小限にする。また、それらの臨界ミセル濃度を超えてはならない。使用可能な溶剤としては、アセトン、エタノール、メタノール、*N,N*-ジメチルホルムアミド、トリエチレングリコールなどがある。使用可能な分散剤としては、Tween[®]80、メチルセルロース 0.01%、NIKKOL[®]HCO-40 などがある。試験水中の溶解補助剤濃度は、すべての試験区及び対照区において同一とし、かつ溶解補助剤が試験魚に毒性影響を与えないようにする。溶解補助剤の最高濃度は、100 mg/L（又は 0.1 mL/L）とする。試験水における有機炭素の総量に対する溶解補助剤及び被験物質の割合を把握する。試験期間を通して、試験水中の TOC 濃度は 10 mg/L（±20%）以下とする（被験物質及び溶解補助剤由来の有機炭素濃度を除く）。試験水中の被験物質濃度は、溶解補助剤の使用に関わらず、水溶解度以上の濃度は使用しない方がよい。生分解性のある溶解補助剤を用いる場合、バクテリアの増殖をもたらすので注意が必要である。
- (2) 試験水槽中の被験物質濃度を維持するには、試験水槽に試験原液を連続的に供給・希釈する流水式システムが有効である。少なくとも 1 日に試験水槽容量の 5 倍量の試験水を流すことが好ましい。流水式による試験が推奨されるが、流水式が不可能であり、有効性基準を満たす場合は、半止水式による試験を実施してもよい。試験原液及び試験用水の流量を、試験開始の 48 時間前と試験期間中に毎日確認する。各試験水槽の流量の変動及び試験水槽間の流量の差異は 20% 以内とする。
- (3) 試験水中被験物質濃度について、流水式による試験において試験原液交換前後で濃度変動が認められる場合や、半止水式による試験において換水前後で濃度変動が認められる場合は、OECD テストガイドライン 211 の付属書 6 の手順に従って、時間加重平均（TWA；Time Weighted Average）により試験水中被験物質濃度（ C_w ）を算出してもよい。

3 - 2 水質測定の種類

試験期間中は、すべての試験水槽について、溶存酸素濃度、TOC 濃度、試験水温及び pH を測定する。全硬度については、試験区（設定濃度が最も高い区の 1 水槽）及び対照区の水槽を測定する。溶存酸素濃度については、取込期間中は少なくとも 3 回（取込期間の開始時、中間時及び終了時）、排泄期間中は 1 週間に 1 回測定する。TOC 濃度については、取込期間開始の 24 及び 48 時間前、取込期間中及び排泄期間中は 1 週間に 1 回測定する。試験温度は毎日 1 回、pH は取込期間及び排泄期間の開始時及び終了時、全硬度は取込期間及び排泄期間に 1 回測定し記録する。試験温度については、少なくとも一つの試験水槽中で連続的にモニターすることが好ましい。

3 - 3 流量

取込期間開始時の試験魚の搬入による試験水中の被験物質濃度の低下を最小限にし、かつ、溶存酸素濃度の低下を避けるため、試験魚尾数に応じて、試験水の流量を調整する。流量は使用する魚種によって調整する。通常、流量は魚体重（湿重量）1.0 g 当たり 1-10 L/日が推奨される。

3 - 4 試験魚の条件

各試験区において、試験開始時の魚体重の最小値は最大値の 2/3 以上であること。同じ年齢で同じ供給源の魚を用いる。魚の年齢及び体重が BCF に大きく影響する可能性があるため、これらの詳細を記録する。試験開始時の平均魚体重を推定するため、試験開始直前にじゅん化中の予備魚の体重を測定することが推奨される。

3 - 5 試験水濃度

3 - 5 - 1 急性毒性試験の実施（LC₅₀測定）

本通知で定められた魚類毒性試験、JIS K0102-2016 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。ただし、被験物質の最大無影響濃度（NOEC）のデータが得られている場合は実施しなくてもよい。

3 - 5 - 2 試験濃度の設定

(1) 試験は少なくとも 2 濃度区で実施する。第 1 濃度区の試験濃度の設定は、被験物質の急性毒性値（LC₅₀ 値）の 1% 以下もしくは NOEC 以下とし、技術的に可能な限り低くする。試験水の分析における被験物質の定量下限濃度より、少なくとも 10 倍程度高い濃度を目安とする。第 2 濃度区は、第 1 濃度区より 10 倍低い濃度とする。ただし、毒性及び分析感度から、これが不可能であれば、10 倍より小さい濃度比で行うか、放射性同位元素を使って標識した被験物質（高純度、例えば > 98%）を使用してよい。いずれの試験濃度も被験物質の水溶解度を超えないように注意する。

(2) BCFの濃度依存性がないと予想される試験条件においては、試験は1濃度区でよい場合がある。1濃度区での水暴露法を適用する場合は、試験濃度を試験用水に対する被験物質の溶解度の10分の1以下に設定すること。ただし、無機化合物、有機金属化合物、界面活性作用を有する物質、トリフルオロメチル基若しくはテトラフルオロエチレン基を有する物質又は構造不明な複雑な反応生成物若しくは成分が不定の混合物等については、上記の設定濃度であっても濃度依存性を示す可能性が否定できないため、1濃度区での水暴露法は適さない。また、蛋白質と結合する可能性が高い物質（溶媒抽出で魚体から回収されない等）についても、濃度依存性を示す可能性が否定できないため、1濃度区での水暴露法は適さない。

一連の試験に加えて、試験用水のみの対照区又は試験原液に溶解補助剤を用いる場合は溶解補助剤のみを含む対照区を設定する。

3 - 6 照明及び試験温度

照明時間は通常12から16時間とする。照明の種類及び特性を把握しておく。試験における照明条件下では被験物質が光分解する可能性があるため注意する。人工的な光反応生成物の試験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、290 nm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する。試験温度は試験魚の推奨試験温度とし、その変動は ± 2 未満とする。

3 - 7 試験期間

3 - 7 - 1 取込期間

取込期間は、試験魚中の被験物質濃度が取込期間の早い段階で定常状態（試験法解説参照）に達することが確認される場合を除き、28日間とする。試験魚中の被験物質濃度が少なくとも2日間の間隔を置いて採取したサンプルについて、連続した3回の被験物質濃度の分析結果が $\pm 20\%$ 以内の場合は定常状態に達したと判断する。ただし、試験魚を複数尾まとめて分析する場合には、少なくとも連続した4回の試験魚分析で定常状態を判断する。28日間で定常状態に達しない場合、定常状態に達するまで又は60日間のどちらか短い方まで取込期間を延長し、定常状態におけるBCF（ BCF_{SS} 、試験法解説参照）を算出する。BCFが100 L/kg未満の場合は、試験魚中の被験物質濃度の変動が20%を超えても、28日後には定常状態に達しているとみなしてよい。排泄試験を実施した場合は、速度論によるBCF（ BCF_K 、試験法解説参照）を算出する。28日後に明らかに被験物質の取込が確認されない場合は、試験を終了できる。 BCF_{SS} が1000 L/kg以上の場合（ BCF_{SS} が得られなかった場合においては、個々の試験魚について分析を行った際は取込期間における最後の連続した3回の測定におけるBCFの平均値が1000 L/kg以上の場合、試験魚を複数尾まとめて分析を行った際は取込期間における最後の連続した4回の測定におけるBCFの平均値が1000 L/kg以上の場合）には、部位別試験を実施する。部位については、頭部、内臓、外皮（鰓及び消化管を含む）及び可食部（頭部、内臓、外皮を除くその他の部位）の4部位に分けて実施し、それぞれの部位における被験物質濃度とBCFを報告する。

3 - 7 - 2 排泄期間

BCF_{SS} が 1000 L/kg 以上の場合（BCF_{SS} が得られなかった場合においては、個々の試験魚について分析を行った際は取込期間における最後の連続した 3 回の測定における BCF の平均値が 1000 L/kg 以上の場合、試験魚を複数尾まとめて分析を行った際は取込期間における最後の連続した 4 回の測定における BCF の平均値が 1000 L/kg 以上の場合）、又は BCF_K を算出する場合は、排泄期間を設ける。排泄期間は、試験魚中の被験物質濃度が十分に減少（例えば定常状態の 95% が消失）するまでの期間とすることが望ましい（試験法解説参照）。試験魚中の被験物質濃度が 95% 消失するまでの期間が通常取込期間の 2 倍以上の場合は、期間を短縮してもよい（例えば、試験魚中の被験物質濃度が定常状態の 10% 未満に減少するまでの期間とする）。ただし、取込及び排泄が 1 次速度式による 1 コンパートメントモデルより複雑なパターンを示す化学物質については、排泄速度定数を求めるために、より長い排泄期間を必要とする。排泄期間を延長する場合は、試験魚の成長が試験結果に影響する可能性を考慮する。

3 - 8 採取及び分析

3 - 8 - 1 分析方法

- (1) 分析方法については、化学分析の正確さ、精度及び再現性、さらには試験水及び試験魚からの被験物質の回収が十分であることを実験的に確認する。また、被験物質が試験用水中で検出されないことを確認する。必要な場合、回収値と対照区のバックグラウンド値によって、試験で得られた試験水及び試験魚における被験物質濃度値を補正する。試験水及び試験魚の採取を行う際は、被験物質の汚染及び損失（例えば、採取装置への吸着）を最小限にする。
- (2) 被験物質の分解などを防止するために、採取後、直ちに試験魚と試験水を分析する。速やかに分析できない場合は、サンプルを適当な方法で保存する。被験物質について、適切な保存方法、保存期間及び前処理などに関する情報を試験開始前に得る。

3 - 8 - 2 試験水の分析

- (1) 被験物質濃度の決定のために、取込期間開始前及び取込期間中に試験水を分析する。また、排泄期間を設定した場合は、排泄期間中にも試験水を分析する。試験水の分析は給餌前に試験魚の分析と同時に行う。ただし、排泄期間開始時の試験水分析において、被験物質が検出されないことが確認できる場合は、その後の排泄期間における試験区及び対照区の試験水の分析を省略してもよい。
- (2) 試験水は、例えば試験水槽の中心から不活性チューブなどを通して吸い取り分析する。このとき、通常、試験水の汚れをろ過や遠心分離により取り除かない。これらを分離する場合は、その分離技術の根拠又は妥当性を報告する。特に高疎水性化学物質（すなわち $\log P_{ow} > 5$ の化学物質）については、フィルターの材料又は遠心分離の容器への吸着が起るため、このような処理を行わない。代わりに、可能な限り試験水槽を清浄に保つための処置を行う。また、取込期間及び排泄期間に TOC 濃度を測定する。

3 - 8 - 3 試験魚の分析

- (1) 各試験魚の分析は、1試験区当たり最低4尾とし、個々の試験魚について実施する。ただし、個体ごとの分析が困難な場合には、各分析時における試験魚を複数尾まとめて分析する。その場合は、2群以上とすることが望ましい。
- (2) 取込期間中に少なくとも5回、試験魚を分析する。排泄期間を設定した場合には、排泄期間中に少なくとも4回、試験魚を分析する。排泄期間を開始する前に、試験魚を清浄な試験水槽に移す。特に、取込及び排泄が単純な1次速度式に従わないことが予想される場合は、正確なBCFの算出が困難であるため、両期間において、より高頻度の分析が推奨される（試験法解説参照）。動物愛護の観点から最も適した方法で採取した試験魚を安楽死させ、体重及び全長を測定する。それぞれの個体の体重及び全長は、識別コードなどを付して、被験物質濃度（該当する場合は脂質含量も）の結果と整合させる。
- (3) 脂質含量は、少なくとも取込期間の開始時及び終了時、排泄期間終了時に測定しなければならない。脂質含量は、被験物質濃度測定と同一の試験魚を用いて測定するが、同一の試験魚を用いた測定が困難な場合は、上記3回の測定時に、少なくとも別途3尾を採取し測定する。対照区の試験魚において被験物質が顕著に検出されないことが明らかな場合、対照区の試験魚は脂質含量のみ測定し、被験物質濃度は測定しなくてもよい。
- (4) BCF_{SS}が1000 L/kg以上の場合、被験物質が主に脂質に蓄積しないと考えられる場合を除き、5%の脂質含量で標準化（湿重量に基づく）したBCF_{SS}（BCF_{SSL}）も報告する。
- (5) 試験に放射性同位元素を使って標識した化学物質を使用する場合、全標識化物（すなわち親化合物及び代謝物）として測定するか、あるいは、サンプルをクリーンアップして親化合物のみを測定する。親化合物に基づいてBCFを決定する場合は、主な代謝物を少なくとも取込期間の終了時に確認する。

3 - 8 - 4 試験魚の成長の測定

試験水槽に搬入する前の試験魚から取込期間開始時に5から10尾採取し、個別に体重及び全長を測定する。これらの試験魚は、取込期間開始前の被験物質濃度及び脂質含量の測定に用いることができる。試験期間中に採取した試験魚の体重及び全長は、被験物質濃度又は脂質含量の測定前に記録する。これらの測定値から、試験区及び対照区の魚体重及び全長を推定する。試験区及び対照区における魚の平均成長率の顕著な差は、化学物質の毒性影響を示唆する。

4 試験結果の算出

4 - 1 生物濃縮係数の算出

取込期間における試験魚中（又は特定の組織）の被験物質濃度（ C_f ）を時間に対してプロットし、取込曲線を得る。その曲線が平衡に達した場合、以下の式から定常状態におけるBCF（BCF_{SS}）を算出する。

$$BCF_{SS} = \frac{\text{定常状態における試験魚中の平均被験物質濃度}}{\text{定常状態における試験水中の平均被験物質濃度}}$$

また、速度論による生物濃縮係数（ BCF_K ）を以下の式から算出する。なお、 k_1 及び k_2 の算出法は試験法解説に示す。

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

4 - 2 成長希釈補正と脂質含量の標準化

- (1) 排泄期間中の試験魚の成長は、見かけ上、試験魚中の被験物質濃度を低下させ、排泄速度定数（ k_2 ）に大きな影響を与える。そのため、 BCF_K を求める場合には、 BCF_K と合わせて成長希釈補正した BCF_K （ BCF_{Kg} ）も報告する。成長希釈補正した排泄速度定数（ k_{2g} ）は、通常、排泄速度定数（ k_2 ）から成長速度定数（ k_g ）を差し引くことにより算出する。さらに、取込速度定数（ k_1 ）を成長希釈補正した排泄速度定数（ k_{2g} ）で除することにより BCF_{Kg} を算出する。成長希釈補正の方法については、上記以外の方法も含めて試験法解説に示す。
- (2) BCF_{SS} が 1000 L/kg 以上の場合は、 BCF_K 又は BCF_{SS} と合わせて 5% の脂質含量で標準化した BCF_K （ BCF_{KL} ）又は BCF_{SS} （ BCF_{SSL} ）も報告する（試験法解説参照）。また、 BCF_K を報告する場合には、成長希釈補正かつ 5% の脂質含量で標準化した BCF_K （ BCF_{KgL} ）も報告する。被験物質濃度及び脂質含量の測定を同一の魚を用いて実施した場合には、それぞれの試験魚中被験物質濃度をその魚の脂質含量を用いて標準化する。試験区及び対照区の試験魚の成長が同程度であれば、対照区の試験魚の脂質含量を用いて標準化してもよい。

5 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（試験水温の大きな変動は試験生物へのストレスのほか、取込及び排泄に関する生物学的パラメータに影響する）。
- ・ 溶存酸素濃度は飽和酸素濃度の 60% 以下にならないこと。
- ・ 試験水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は測定値の平均に対して $\pm 20\%$ 以内に保たれること。）
- ・ 死亡又は病気などの異常は、試験区及び対照区の試験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か月延長になった場合には、死亡又は異常は、試験区及び対照区で 1 か月間に 5% 未満かつ全期間で 30% を超えないこと。

6 結果のとりまとめ

試験の結果を様式 2 - 1 によりとりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

: 魚を用いた濃縮度試験（簡易水暴露法）

- 適用範囲

ここでは、魚介類のうち特に水（経鰓）を介した魚類の体内における化学物質の簡易な濃縮度試験の標準となるべき方法について規定する。この方法は、濃度依存性がないと予想される物質かつ取込及び排泄が1次速度式に従うもののみ適用すべきである。

- 用語

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

- 試験方法

1 試験の概要

本試験法は、魚類体内への水（経鰓）を介した化学物質の取込及び蓄積を評価する試験である。試験は、魚を用いた濃縮度試験（水暴露法）に準拠するが、試験魚中の化学物質濃度の測定を4回（取込期間に2回、排泄期間に2回）に削減し、速度論による生物濃縮係数（ BCF_{Km} ）及び定常状態における生物濃縮係数（ $minimised\ BCF_{SS}$ ）を算出する。

2 試験に用いる装置及び材料

: 魚を用いた濃縮度試験（水暴露法）と同様とする。

3 試験の実施

: 魚を用いた濃縮度試験（水暴露法）と同様とする。ただし、採取スケジュール及び計算方法は次のとおりとする。

3 - 1 試験水の分析

被験物質濃度の決定のために、取込期間開始前に少なくとも1回と取込期間中に少なくとも5回（そのうち2回は試験魚の分析と同時）、試験水を分析する。さらに、排泄期間中は週1回とする。排泄期間開始時の試験水分析において、被験物質が検出されないことが確認できる場合は、その後の排泄期間における試験区及び対照区の試験水の分析を省略してもよい。

3 - 2 試験魚の分析

次のとおり試験魚を分析し、試験魚中の被験物質濃度を測定する。

- ・ 各試験魚の分析は、1試験区当たり最低4尾とし、個々の試験魚について実施する。ただし、個体ごとの分析が困難な場合には、各分析時における試験魚を複数尾まとめて分析する。その場合は、2群以上とすることが望ましい。
- ・ 取込期間の分析は、取込期間の中間及び終了時（終了時は排泄期間開始時に相当する）とする（例えば、取込期間の14及び28日後）。
- ・ 排泄期間の分析は、排泄期間の中間及び終了時（被験物質濃度が最高濃度の10%未満となることが望ましいが、少なくとも被験物質の排泄半減期が算出できるまで）とする（例えば、排泄期間の7及び14日後）。排泄が早いと予想される場合、試験魚中の被験物質濃度が定量下限未満とならないようにする。

4 試験結果の算出

取込終了時（ t_1 ）の試験魚中の被験物質濃度（ C_{f1} ）及び排泄終了時（ t_2 ）の試験魚中の被験物質濃度（ C_{f2} ）を用いて、式1に従い排泄速度定数（ k_2 ）を算出する。

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}) - \ln(C_{f2})}{t_2 - t_1} \quad \text{[式 1]}$$

得られた排泄速度定数（ k_2 ）、取込期間における試験水中の平均被験物質濃度（ C_w ）及び取込期間終了時（ t_1 ）の試験魚中の被験物質濃度（ C_{f1} ）を用いて、式2に従い取込速度定数（ k_1 ）を算出する。

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

さらに、取込速度定数（ k_1 ）と排泄速度定数（ k_2 ）の比を用いて、式3に従い簡易水暴露法における速度論による生物濃縮係数（ BCF_{km} ）を算出する。

$$BCF_{km} = \frac{k_1}{k_2} \quad \text{[式 3]}$$

取込期間中に定常状態に達したと仮定して、試験水中の被験物質濃度（ $C_{w-minSS}$ 、mg/L）と取込期間の終了時の試験魚中の被験物質濃度（ $C_{f-minSS}$ 、mg/kg 湿重量）を用いて、式4に従い簡易水暴露法における定常状態による生物濃縮係数（minimised BCF_{SS} ）を算出する。

$$\text{minimised } BCF_{SS} = \frac{C_{f-minSS}}{C_{w-minSS}} \quad \text{[式 4]}$$

脂質含量の測定、成長希釈補正は：魚を用いた濃縮度試験（水暴露法）と同様とする。

5 試験の有効性

：魚を用いた濃縮度試験（水暴露法）と同様とする。

6 結果のとりまとめ

試験の結果を様式 2 - 1 によりとりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

: 魚を用いた濃縮度試験（餌料投与法）

- 適用範囲

ここでは、魚介類のうち特に餌を介した魚類の体内における化学物質の濃縮性を評価する試験の標準となるべき方法について規定する。本試験は水溶解度が 0.01 mg/L 未満、かつ log Pow が 5 を超える被験物質に適用できることとする。なお、水溶解度は実測値とするが、log Pow は(Q)SAR 等による推定値でもよい。また、水暴露法において試験水中濃度の維持が困難である物質、あるいは試験魚中の被験物質の定量下限値から算出可能な生物濃縮係数（BCF）が 1000 L/kg 程度を超える物質は、水暴露法の実施が困難であるため餌料投与法を実施してもよいが、試験開始前に当局に相談すること。

なお、構造不明な複雑な反応生成物又は成分が不定の混合物等には、原則として本試験を適用しないこととする。

- 用語

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

- 試験方法

1 試験の概要

本試験法は、魚類体内への餌を介した化学物質の取込及び排泄を評価する試験である。試験は取込及び排泄の 2 つの期間からなり、取込期間では化学物質を混合した餌料を試験魚に給餌し、その後、排泄期間において化学物質を含まない餌料を給餌する。試験の両期間を通して、試験餌料及び試験魚中における化学物質濃度を測定し、経口生物濃縮係数（BMF、試験法解説参照）を算出する。BMF として、速度論による経口生物濃縮係数（ BMF_K ）及び取込期間終了時における経口生物濃縮係数（BMF）のいずれか又は両方を算出する。

2 試験に用いる装置及び材料

2 - 1 装置及び器具

すべての装置及び器具は、：魚を用いた濃縮度試験（水暴露法）に記載したものと同様のものとする。試験水槽に十分な量の試験用水を供給する流水式又は半止水式システムを使用し、その流量を記録する。

2 - 2 試験用水

試験用水は、：魚を用いた濃縮度試験（水暴露法）に記載したものと同様のものとする。

2 - 3 試験魚

2 - 3 - 1 魚種を選択

：魚を用いた濃縮度試験（水暴露法）に規定された魚種が使用可能である。試験魚は、推奨されるサイズのもの（試験法解説参照）を使用し、個体ごとの分析が可能なサイズが好ましい。

2 - 3 - 2 蓄養及びじゅん化

試験実施前のじゅん化条件、さらにじゅん化中の死亡率及び疾病の許容範囲は、：魚を用いた濃縮度試験（水暴露法）と同様とする。

2 - 3 - 3 餌料

餌料とは、被験物質及び媒体（有機溶剤又はオイル）を含まない餌である。少なくとも蛋白質及び脂質含量が既知である市販の魚の餌料（浮遊性又はゆっくり沈降するペレット状あるいはクランブル状の餌料）が推奨される。餌料は、摂餌効率を高めるため、均一な大きさの餌料とし、試験開始時の試験魚に合わせて適当なサイズに調製する。餌料のサイズは、排泄期間開始時に試験魚の成長に合わせて調製してもよい。適切な市販餌料の組成の一例を試験法解説に示す。試験区及び対照区の餌料の脂質含量は、取込期間開始前及び取込期間の終了時に測定する。餌料の栄養素、水分、繊維及び灰分などの情報を試験報告書に記載する。

3 試験の実施

3 - 1 試験餌料

(1)試験餌料とは、餌料に被験物質及び媒体を添加したものである。被験物質の物理化学的性状及び溶解度に基づき、下記の方法を参考に餌料に添加する（試験法解説参照）。被験物質を餌料に添加する場合は、試験餌料中の均一性を確保する。餌料への添加方法及び手順は試験報告書に記載する。

- ・ 被験物質がトリグリセリド類に可溶でかつ安定である場合、餌料と混合する前に被験物質を少量のオイル（魚油又は食用植物油）に溶解する。この場合、餌料の本来の脂質含量を考慮し、オイル量は最小限とする。
- ・ 適当な有機溶剤（ヘキサン、アセトン及びテトラヒドロフラン等の揮発性を有する溶剤）に溶解して餌料と混合した後、添加した溶媒を留去することにより、試験餌料中の被験物質の分散及び均一性を確保する（有機溶剤の留去により被験物質の結

晶化が生じ、被験物質の生物学的利用能が低下する可能性がある)。また、有機溶剤の添加により餌料中の成分(例えば、脂質又は蛋白質)が抽出され、餌料中の成分の均一性に影響を与える可能性があるため、有機溶剤の添加量は最小限とする。

- ・非粘ちょう性の液体の被験物質は直接餌料に添加し、均一性及び良好な同化を促すために良く混合する。

- (2) 取込期間中及び排泄期間中に、栄養的に等価な餌料、又は試験餌料を試験区及び対照区に給餌する。被験物質の添加媒体としてオイル又は有機溶剤を使用した場合は、対照区の試験餌料についても試験区と等量の媒体(被験物質を含まない)を添加する。被験物質を添加した試験餌料は、試験餌料中の被験物質が安定に維持される条件下で保管し、その方法を報告する。

3 - 2 給餌

- (1) じゅん化期間中及び排泄期間中は餌料を、取込期間中は試験餌料(ただし、対照区には、被験物質を添加していない試験餌料)を、一定の給餌量(例えば、コイの場合は魚体重の1-2%程度(湿重量))で給餌する。流水式の条件下で試験を実施する場合は、魚が摂餌している間は流水を一時停止する。給餌量は、試験魚の急速な成長及び脂質含量の大幅な増加を回避するように設定する。試験中に設定した実際の給餌量は記録する。試験開始時の給餌は、試験開始前のじゅん化した魚群の測定体重に基づき設定する。給餌量は、試験中の成長を考慮して、各採取時の試験魚体重(湿重量)に基づいて調整する。試験区及び対照区水槽における魚の体重及び体長は各採取時に採取した魚から推定する(試験区及び対照区水槽に残った魚の体重及び体長を測定してはならない)。試験期間を通して一定の給餌量を維持することが重要である。
- (2) 試験魚が餌料及び試験餌料をすべて摂餌していることを確認する。給餌量は、試験魚が1日1回の給餌において餌料及び試験餌料をすべて摂餌するように設定する。餌料及び試験餌料が一貫して摂餌されずに残る場合、投与を分割してもよい。例えば、1日1回を1日2回に分ける場合、2回目の給餌は一定間隔で行い、試験魚の採取までに可能な限り時間を空けるようにする。
- (3) 被験物質が試験餌料から水中に分散し、試験魚が水中の被験物質に暴露されることを回避するために、給餌後1時間以内、好ましくは30分以内に試験区及び対照区の水槽から残餌及び糞便をすべて除去する。溶解した物質をすべて吸着させるために、活性炭フィルターで水を連続的に清浄するシステムを使用できる。流水式システムは、餌料粒子及び溶解した物質を速やかに除去するのに有用である⁽²⁾。

3 - 3 水質測定の頻度

：魚を用いた濃縮度試験(水暴露法)と同様とする。ただし、TOC濃度は試験用水の特性把握の一部として試験開始前のみ測定すればよい。

-
- (2) 試験魚からの排泄又は餌料からの溶出の結果、試験水中に被験物質が存在することを完全には回避できない可能性がある。したがって、取込期間の終了時に水中の被験物質濃度を測定することは、一つの対策であり、特に半止水式を用いる場合、水暴露が生じているか確認するのに有用である。

3 - 4 流量

適当な溶存酸素濃度を維持し、試験動物へのストレスを軽減するため、試験魚尾数に応じて、試験用水の流量を調整する。通常、流量は魚体重（湿重量）の 1.0 g あたり 1-10 L/日 が推奨される。

3 - 5 試験魚の条件

試験開始時の魚体重の最小値は最大値の 2/3 以上であること。同じ年齢で同じ供給源の魚を用いる。

試験魚数は採取回数及びそのときの尾数を考慮して決定する。試験魚の尾数を含む採取スケジュールの一例を試験法解説に示す。

3 - 6 試験餌料濃度

試験は、原則 1 濃度区で実施する。同時に、被験物質を添加していない餌料を給餌する対照区を設定する。試験濃度の設定は、分析感度（排泄期間中の魚体中被験物質濃度が取込期間終了時の魚体中被験物質濃度の 10% 未満まで測定できる）、被験物質の毒性（既知なら最大無影響濃度（NOEC））及び忌避行動を考慮して選択する。これまでの知見から、1-1000 µg/g の範囲の被験物質濃度は、特定の毒性メカニズムを示さない化学物質について実用的な範囲となる。試験魚が試験餌料を適切に摂餌していること及び試験結果が妥当であることを確認するため、当面、試験区及び対照区の試験餌料に BCF 及び BMF が既知である基準物質⁽³⁾を添加し、被験物質と同様の方法で BMF を算出することを推奨する。

3 - 7 照明及び試験温度

: 魚を用いた濃縮度試験（水暴露法）と同様とする。

3 - 8 試験期間

3 - 8 - 1 取込期間

取込期間は通常 7 - 14 日間とする。実験開始は、試験餌料を最初に給餌した時点とする。実験日のカウントは、給餌した時点から次の給餌の直前まで（例えば、1 時間前）を 1 日とする。取込期間は被験物質及び媒体を添加していない餌料を最初に給餌する直前（例えば 1 時間前）までとする。排泄期間中に少なくとも 10% までの魚体中被験物質濃度の低下を測定できるように、分析感度を考慮して、魚体中被験物質濃度が十分に高いことを確認する。また、試験魚中における被験物質の蓄積挙動を確認するために、取込期間を延長し（最長 28 日間）、追加の分析を実施してもよい。

(3) 基準物質の例を試験法解説に示す。これらの例に加え、今後、知見が蓄積され適切な物質が明らかになった場合、それらも基準物質として使用してもよい。

3 - 8 - 2 排泄期間

- (1)原則、排泄期間は28日間とし、試験魚からの被験物質の排泄の程度をさらに確認する必要がある場合には、期間を延長する。排泄期間の開始は試験魚に被験物質及び媒体を添加していない餌料を給餌した時点とする。排泄初期（例えば7日後又は14日後）における試験魚中の被験物質濃度が定量下限未満の場合、以降の分析を中止し、試験を終了してもよい。排泄期間終了時に半減期が得られない場合にも、実施した排泄試験の結果から経口生物濃縮係数（BMF）を算出する。
- (2)取込期間を10日間以上実施した試験において、取込期間終了時におけるBMFが0.007未満であって、次の及びを満たす場合は試験を終了できる。

試験の有効性の条件を満たす。

取込の欠如が試験設計の問題（例えば、試験餌料調製上の不具合による生物学的利用能の低下、分析感度の欠如、魚が試験餌料を食べない等）によるものでない。

3 - 9 分析

分析においては、：魚を用いた濃縮度試験（水暴露法）に記載された事項に準拠する。

3 - 9 - 1 試験餌料の分析

試験区及び対照区の試験餌料については、少なくとも取込期間開始前及び終了時に、それぞれ被験物質濃度及び脂質含量を3点以上測定する。

放射性同位元素を使って標識した材料を試験する場合は、：魚を用いた濃縮度試験（水暴露法）に準拠して試験餌料を分析する。

3 - 9 - 2 試験魚の分析

- (1)試験魚の分析は、試験区及び対照区から5-10尾を採取し、個々の試験魚について実施する。ただし、個体ごとの分析が困難な場合には、各分析時における試験魚を複数尾まとめて分析する。その場合は、2群以上とすることが望ましい。試験魚の採取は、同一時間（給餌時間を目安にする）に実施する。試験魚の消化管内に試験餌料が残っていると試験魚の被験物質濃度の測定に影響を与えるため、次回の給餌直前（例えば1時間前）に採取する。残餌が疑われる場合は、消化管を除去し、別々に分析することが望ましい。消化管内の残餌の有無については、予備検討において確認してもよい。
- (2)試験区及び対照区において、取込期間の終了時及び排泄期間中に4回から6回（例えば1、3、7、14及び28日）、試験魚を分析する。また、詳細な組織ごとの濃縮性の確認が必要な場合、部位別試験を実施する。部位については、頭部、内臓、外皮（鰓を含む）、消化管及び可食部（頭部、内臓、外皮及び消化管を除くその他の部位）の5部位に分けて実施し、それぞれの部位における被験物質濃度とBMFを報告する。対照区の試験魚については被験物質濃度が排泄期間開始時に不検出の場合、排泄期間終了時に2-3尾の対照区の魚について分析を行えば十分である。すべての分析時におい

て、採取した試験魚を動物愛護の観点から最も適した方法で安楽死させた後、体重及び全長を個別に測定する（試験区及び対照区から同数の試験魚が採取されるようにする）。それぞれの個体の体重及び全長は、識別コードなどを付して、被験物質濃度（及び該当する場合は脂質含量）の結果と整合させる。

- (3)放射性同位元素を使って標識した材料を試験する場合は、：魚を用いた濃縮度試験（水暴露法）の試験水分析を試験餌料分析に置き替えて、3 - 5 - 2 試験濃度の設定（1）に記載された事項に準拠する。
- (4)試験区及び対照区における試験魚の脂質含量は、各採取時に測定することが好ましいが、少なくとも取込期間開始時及び終了時並びに排泄期間終了時に測定する。取込期間開始時の脂質含量は3 - 9 - 3 試験魚の成長の測定において採取した試験魚を用いてもよい。脂質含量は、被験物質濃度測定に用いた試験魚と同一の魚について測定する。測定できない場合、別途採取した試験魚について測定する。対照区の試験魚において被験物質が顕著に検出されないことが明らかな場合、対照区の試験魚は脂質含量のみ測定し、被験物質濃度は測定しなくてもよい。脂質含量の定量化の方法は、試験報告書に記載する。

3 - 9 - 3 試験魚体重の測定

成長速度定数 (k_g) を算出するために、3 - 9 - 2 試験魚の分析において採取した試験魚の体重（湿重量）を測定する。実験開始時の魚体重として、試験餌料を初めて給餌する直前に、少なくとも試験期間中の試験魚分析時と同数（5 - 10尾）の試験魚を採取し、魚体重を測定する。

4 試験結果の算出

4 - 1 経口生物濃縮係数の算出

排泄期間中の試験魚中被験物質濃度 (C_f) の自然対数と排泄期間との関係を最小二乗法により計算し、その直線の傾きを排泄速度定数 (k_2)、切片を排泄期間開始時における試験魚中の被験物質濃度 (mg/kg、外挿値 $C_{0,d}$) とする。これらの値、給餌量 (I)、取込期間の長さ (t) 及び試験餌料中の被験物質濃度 (C_{food}) を用いて、式5に従い生体内吸収効率 (α) を算出する。

$$\alpha = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{\text{food}}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \quad [\text{式5}]$$

さらに、給餌量 (I)、生体内吸収効率 (α) 及び排泄速度定数 (k_2) を用いて、式6に従いBMF_kを算出する。

$$\text{BMF}_k = \frac{I \cdot \alpha}{k_2} \quad [\text{式6}]$$

また、取込期間終了時におけるBMFを以下の式から算出する。定常に達したと推定される場合は以下の式からBMF_{ss}を算出できる。

取込期間終了時における試験魚中の平均被験物質濃度

$$\text{BMF} = \frac{\text{試験魚中の平均被験物質濃度}}{\text{試験餌料中の平均被験物質濃度}}$$

4 - 2 成長希釈及び脂質含量補正

- (1) 排泄期間中の試験魚の成長は、試験魚中の被験物質濃度を低下させ、排泄速度定数 (k_2) に大きな影響を与える。そのため、 BMF_K を算出する場合には、合わせて成長希釈補正した BMF_K (BMF_{Kg}) も報告する。成長希釈補正した排泄速度定数 (k_{2g}) は、通常、排泄速度定数 (k_2) から成長速度定数 (k_g) を差し引くことにより算出する。さらに、式 6 において成長希釈補正した排泄速度定数 (k_{2g}) を用いて、成長希釈補正した BMF_K (BMF_{Kg}) を算出する。成長希釈補正の方法については、上記以外の方法も含めて試験法解説 6.6 に示す。
- (2) BMF は、被験物質がほとんど脂質に蓄積されないことが明確な場合を除き、試験魚及び試験餌料の脂質含量を用いて補正する⁽⁴⁾。採取したすべての試験魚に関して脂質含量の測定を実施していない場合、平均脂質含量 (w/w) を算出する。試験魚の平均脂質含量を試験餌料の平均脂質含量で割り脂質含量補正係数 (L_c) を算出する。取込期間終了時における BMF 、 BMF_K 及び BMF_{Kg} を脂質含量補正係数で割り、脂質含量補正した取込期間終了時における BMF (BMF_L)、 BMF_K (BMF_{KL}) 及び BMF_{Kg} (BMF_{KgL}) を算出する。
- (3) 各採取時において被験物質及び脂質含量の測定を同一の試験魚で実施した場合、脂質含量補正した被験物質濃度データを時間軸に対してプロットし、脂質含量補正した $C_{0,d}$ 及び k_2 を得る。生体内吸収効率 (α) は、脂質含量補正した給餌量 (I_{lipid}) 及び脂質含量補正した試験餌料中の被験物質濃度 ($C_{\text{food-lipid}}$) を用いて算出する (試験法解説参照)。これらの値を用いて BMF_{KgL} を算出する (脂質含量及び成長希釈補正した BMF の算出には、試験魚の湿重量ではなく脂質含量当たりの成長速度定数を用いて補正する)。

5 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 60% 以下にならないこと。
- ・ 試験区の試験餌料中における被験物質濃度 (少なくとも各 3 点測定) について、取込期間の開始前の平均値と終了時の平均値との変動が $\pm 20\%$ 以内であること。
- ・ 試験区の試験餌料中における被験物質濃度 (少なくとも各 3 点測定) について、取込期間の開始前の試料間の変動が平均値の $\pm 15\%$ 以内であること。

(4) この手法は水暴露法とは手順が異なり餌料投与法に限定される。したがって、誤解防止のために「標準化」ではなく「補正」が使われている。

- ・ 対照区の試験餌料又は試験魚中の被験物質濃度は、試験区と比較して検出されない又は定量下限未満であること。
- ・ 死亡又は病気などの異常は、試験区及び対照区の試験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か月延長になった場合には、死亡又は異常が、試験区及び対照区で1か月間に5%未満かつ全期間で30%を超えないこと。

6 結果のとりまとめ

試験の結果を様式2 - 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. 定義及び単位

取込期間とは、魚が化学物質に暴露される期間である。

排泄期間とは、魚体内に取り込まれた化学物質が、排泄あるいは代謝により減少する過程（半減期）を調べるための期間である。

取込速度定数 (k_1) とは、取込期間中の、試験魚の生体内及び表面（又は特定の組織）における被験物質濃度の増加率として定義される数値である (k_1 は L/kg/day で表される)。

排泄速度定数 ; depuration rate constant (k_2) とは、排泄期間における試験魚（又は特定の組織）の被験物質濃度の低下率として定義される数値である (k_2 は day⁻¹ で表される)。

定常状態とは、取込期間に少なくとも 2 日間の間隔をおいて採取した試験魚の被験物質濃度 (C_f) のうち、連続した 3 回の C_f の分析結果が $\pm 20\%$ 以内であり、かつ 1 回目と 3 回目の分析において C_f に顕著な増加がない状態をいう。試験魚を複数尾まとめて分析する場合には、連続した 4 回以上の C_f の分析結果が $\pm 20\%$ 以内である必要がある。取込が遅い化学物質については、7 日間の間隔で採取することがより適当である。

生物濃縮係数 (BCF ; bioconcentration factor) とは、濃縮度試験の取込期間中の各時間における試験魚の生体内及び表面又は特定の組織における被験物質濃度 (C_f , mg/kg 湿重量) を周囲の水中の被験物質濃度 (C_w , mg/L) で除したものである (BCF は L/kg で表される)。

定常状態における生物濃縮係数 (BCF_{SS} ; steady-state bioconcentration factor) とは、定常状態における試験魚中被験物質濃度 (C_f , mg/kg 湿重量) を定常状態における試験水中被験物質濃度 (C_w , mg/L) で除したものである。

脂質含量標準化した定常状態における BCF (BCF_{SSL} ; lipid normalised steady-state bioconcentration factor) とは、5% の脂質含量で標準化した BCF_{SS} である。

速度論による生物濃縮係数 (BCF_K ; kinetic bioconcentration factor) とは、取込速度定数 k_1 と排泄速度定数 k_2 の比 (k_1/k_2) である。本来、試験魚への化学物質の取込及び排泄が一次速度式に従う場合、この値は理論的に BCF_{SS} と等しくなる。しかし、試験魚中の化学物質濃度が定常状態に達していない場合、あるいは BCF_K について成長希釈補正を行った場合は、BCF_{SS} と乖離が生じる可能性がある。

成長希釈補正した速度論による BCF (BCF_{Kg} ; growth corrected kinetic bioconcentration factor) とは、試験期間中の試験魚の成長希釈補正した BCF_K である。

脂質含量標準化した速度論による BCF (BCF_{KL} ; lipid normalised kinetic bioconcentration factor) とは、5% の脂質含量で標準化した BCF_K である。

脂質含量標準化及び成長希釈補正した速度論による BCF (BCF_{KgL} ; lipid normalised, growth corrected kinetic bioconcentration factor) とは、5% の脂質含量で標準化し、かつ試験期間中の試験魚の成長希釈補正した BCF_K である。

オクタノール-水分配係数 (P_{ow} ; octanol-water partition coefficient) とは、平衡状態での 1-オクタノール及び水に対する化学物質の溶解度の比 (OECD テストガイドライン 107、117、123) である。 K_{ow} と表記されることも多い。

溶存有機炭素 (DOC; dissolved organic carbon) とは、試験水中に溶解している有機物質に由来する炭素である。

粒子状有機炭素 (POC; particulate organic carbon) とは、試験水中に懸濁している有機物質に由来する炭素である。

全有機炭素 (TOC; total organic carbon) とは、試験水中に溶解及び懸濁している有機物質に由来する炭素である。

UVCB 物質 (chemical substances of Unknown or Variable composition, Complex reaction products and Biological materials) とは、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である。

経口生物濃縮係数 (BMF; biomagnification factor) とは、捕食動物の餌 (又は食物) 中の化学物質濃度に対する捕食動物中の化学物質の濃度の比である。本試験方法で得られる BMF は、餌を介した化学物質の濃縮であり、OECD テストガイドライン 305 では、環境中で得られる BMF (水及び餌を介した化学物質の濃縮) と区別するため、dietary BMF と定義している。

取込期間終了時における経口生物濃縮係数 (BMF) とは、取込期間終了時における試験魚中の化学物質濃度 (C_{fish} , mg/kg 湿重量) を試験餌料中の化学物質濃度 (C_{food} , mg/kg) で除したものである。なお、OECD テストガイドライン 305 では、取込期間において定常状態に達したと推定された BMF を、定常状態における経口生物濃縮係数 (BMF_{SS}; indicative steady-state BMF) と定義している。

速度論による経口生物濃縮係数 (BMF_K; kinetic biomagnification factor) とは、生体内吸収効率 (α) と給餌量 (I) の積と排泄速度定数 (k_2) の比 ($I \times \alpha / k_2$) である。

生体内吸収効率 (α) とは、消化管から生体内に吸収された化学物質の相対量の測定値である (α は無次元であるが、比ではなくパーセントで表されることが多い)。

給餌量 (I) とは、推定される平均の全試験魚体重に対して、各試験魚が 1 日に摂取した試験餌料の量 (g food/g fish/day) である。

成長希釈補正した速度論による経口生物濃縮係数 (BMF_{Kg}; growth corrected kinetic biomagnification factor) とは、試験期間中の試験魚の成長希釈を補正した BMF_K である。

脂質含量補正した速度論による経口生物濃縮係数 (BMF_{KL}; lipid corrected kinetic biomagnification factor) とは、脂質含量補正係数 (L_c) で除した BMF_K である。

脂質含量補正係数 (L_c) とは、試験魚の平均脂質含量を試験餌料の平均脂質含量で除したものである。

脂質含量及び成長希釈補正した速度論による経口生物濃縮係数 (BMF_{KgL}; lipid-corrected growth-corrected kinetic BMF) とは、脂質補正係数 (L_c) で除した BMF_{Kg} である。

2 . 被験物質の水溶解度

被験物質の水溶解度は、OECD テストガイドライン 105 等の標準的な試験法を参考に実施した結果を入手する。濃縮度試験の報告書には測定結果、測定方法及び測定温度を記載する。なお、入手すべき被験物質の水溶解度の上限濃度は 100 mg/L とする。

3. 測定することが望ましい試験用水の水質項目（試験法「2 - 2 試験用水」）

試験用水における各測定項目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。

物質
pH
硬度
全粒子状物質
全有機炭素
アンモニウム
亜硝酸
アルカリ度
非イオン性アンモニア
残留塩素
全有機リン系殺虫剤
全有機塩素系殺虫剤及びポリ塩化ビフェニル
全有機塩素
アルミニウム
ヒ素
クロム
コバルト
銅
鉄
鉛
ニッケル
亜鉛
カドミウム
水銀
銀
カルシウム
マグネシウム
ナトリウム
カリウム
塩化物イオン
硫酸イオン

4 . 試験魚

4 . 1 試験に使用可能な魚種 (試験法「 2 - 3 - 1 魚種の選択」)

試験に使用可能な魚種、推奨する試験温度及び全長 [頭部の先端 (吻端) から尾の先端 (尾端) までの長さ] は以下のとおりである。なお、コイ又はメダカが推奨されるが、その他の魚種を使用する場合は、魚種の選択根拠を報告する。

魚種	試験温度の推奨範囲 (°C)	試験生物の推奨全長 (cm)
コイ (Common carp) <i>Cyprinus carpio</i> (コイ科)	20 - 25	8.0 ± 4.0
メダカ (Ricefish) <i>Oryzias latipes</i> (メダカ科)	20 - 25	4.0 ± 1.0
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
グッピー (Guppy) <i>Poecilia reticulata</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
イトヨ (Three-spined stickleback) <i>Gasterosteus aculeatus</i> (トゲウオ科)	18 - 20	3.0 ± 1.0

4.2 試験魚の蓄養及びじゅん化（試験法「2-3-2 蓄養及びじゅん化」）

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、例えば次の(1)又は(2)の方法によりじゅん化水槽中でじゅん化することができる。じゅん化の間に、エラや皮膚の損傷している試験魚あるいは衰弱していたり疾病にかかっている試験魚は除去する。また、試験期間中に脂質含量の極端な変化が生じないように給餌量等を調整する。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℃以内高い温度で1日以上ならし、その後1日3℃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℃以内低い温度で1日以上ならし、その後1日2℃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。

5. 水暴露法を実施する上での注意点

5.1 溶解補助剤（試験法「3-1 試験水」）

適切な濃度の原液を調製するために溶解補助剤を使用する場合は、最小限にする。

濃縮度試験に用いられる主な溶解補助剤の48時間LC₅₀値（mg/L、w/v）

溶剤		分散剤	
メタノール	16,200	HCO-10	5,300
エタノール	12,000	HCO-20	>50,000
アセトン	11,200	HCO-40	>100,000
N,N-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：メダカ 水温：25

HCO：ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油

5.2 流量（試験法「3-3 流量」）

通常、流量は魚体重（湿重量）1.0 g 当たり 1-10 L/day が推奨される。ただし、被験物質濃度を±20%以内で維持することができ、かつ溶存酸素濃度が飽和酸素濃度の60%を超える場合には、推奨流量よりも下げてもよい。

5.3 試験濃度（試験法「3-5-2 試験濃度の設定」）

被験物質の魚体内への取込は設定した試験濃度によっては制限される場合がある（BCFの濃度依存性）。そのような場合、取込が制限されないことを確認するために、少なくとも2濃度区、場合によっては3濃度区以上で試験を実施する必要がある。第1濃度区の試験濃度の設定は、被験物質の急性毒性値（LC₅₀値）の1%以下もしくは最大無影響濃度（NOEC）以下とし、技術的に可能な限り低くする。分析方法による試験水中における定量下限濃度より、少なくとも10倍程度高い濃度を目安とする。第2濃度区は、第1濃度区より10倍低い濃度とする。ただし、毒性及び分析感度から、これが不可能であれば、10倍より小さい濃度比で行うか、放射性同位元素を使って標識した被験物質（高純度、例えば>98%）を使用してもよい。また、水溶解度付近の試験濃度で実施せざるを得ない被験物質でも、設定濃度の信頼性を担保できるように、少なくとも2濃度区での試験が推奨される。

UVCB物質のような多成分物質については、評価対象成分が水溶解度以下になるように試験濃度を設定すればよい。

5.4 $\log P_{OW} = 4$ である被験物質の理論的なサンプリングスケジュール例（試験法「3-8 採取及び分析」）

採取	サンプリングスケジュール		水試料数	魚試料数 ⁽¹⁾
	最低限必要な頻度（日）	追加のサンプリング（日）		
取込期間前				
1	-1 0		1-2 ⁽³⁾	4 ⁽⁴⁾ (3 ⁽⁶⁾)
取込期間				
2	0.3	0.4	1-2	4
3	0.6	0.9	1-2	4
4	1.2	1.7	1-2	4
5	2.4	3.3	1-2	4
6	4.7		1-2	4-8 ⁽⁵⁾ (3 ⁽⁶⁾)
排泄期間を設ける場合				被験物質を含まない 水に魚を移動
7	5.0	5.3	1-2	4
8	5.9	7.0	1-2 ⁽⁷⁾	4
9	9.3	11.2	1-2 ⁽⁷⁾	4
10	14.0	17.5	1-2 ⁽⁷⁾	4-8 ⁽⁵⁾ (3 ⁽⁶⁾)

- (1) 括弧内の値は、追加で採取する場合の試料数である。
- (2) $\log P_{OW}$ が 4.0 のとき k_2 の推定値は 0.652 day^{-1} である。試験の総期間は、 $3 \times t_{SS} = 3 \times 4.6$ 日すなわち 14 日間に設定される。 t_{SS} （定常状態到達時間）の推定については「6. BCFの算出法」参照。
- (3) 少なくとも、水槽容量の 3 倍の水が供給された後に水を採取する。
- (4) これらの魚は蓄養群から採取する。
- (5) 高い精度でのカーブフィッティングや代謝物の知見が必要な場合は、より多くの試験魚を採取する必要があるが、取込期間及び排泄期間の終了時に、特に多くの試験魚を採取した方がよい。
- (6) 試験開始時、取込期間終了時及び排泄期間終了時に、被験物質濃度測定用として採取した魚と同一の魚を脂質含量測定に使用できない場合は、追加で少なくとも 3 尾の脂質含量測定用の試験魚を採取する。その場合、試験区の魚ではなく対照区の 3 尾を脂質含量測定に用いてもよい。
- (7) 排泄期間開始時の試験水分析において、被験物質が検出されないことが確認できる場合は、その後の排泄期間における試験水中の被験物質を測定しなくてもよい。

5.5 成長の比較（試験法「3-8-4 試験魚の成長の測定」）

試験区及び対照区における魚の成長速度定数を算出し、試験区と対照区の成長の差を統計的手法（例えば t 検定、又は試験濃度が複数の場合は F 検定）によって確認する。試験区と対照区の成長に有意な差が認められる場合は、試験の信頼性と完全性に与える影響を考察することが望ましい。

6 . 試験結果の処理

6 . 1 試験設計のための取込期間の長さ予測（試験法 「取込期間 3 - 7 - 1」）

排泄速度定数 (k_2) と $n1$ -オクタノール/水分配係数 (P_{OW})、取込速度定数 (k_1) と BCF との経験的な関係を用いることで、試験実施前に k_2 及び試験魚中被験物質濃度が定常状態の $X\%$ に達する時間 t_x を推定することができる。ただし、これらの式は取込及び排泄が 1 次速度式に従う場合にのみ適用される。明らかに 1 次速度式に従わない場合は、これらの予測は有効ではない。X と t_x の関係は以下の式で示される。

$$\frac{X}{100} = 1 - e^{-k_2 t_x} \quad [\text{式 A6.1}]$$

k_2 (day^{-1}) の推定値はいくつかの方法で得ることができる。例えば、以下の経験式を用いることができる。：

$$\log k_2 = 1.47 - 0.414 \log P_{OW} \quad (r^2=0.95) \quad [\text{式 A6.2}^{(\text{注}1)}]$$

又は

$$k_2 = \frac{k_1}{BCF} \quad [\text{式 A6.3}]$$

$\log P_{OW}$ が 3 を超える化学物質の場合は、上式で、 $k_1 = 520 \cdot W^{-0.32}$ ($r^2=0.85$)

[式 A6.4]

$$\text{及び } BCF = 10^{(0.910 \log K_{OW} - 1.975 \log(6.8 \cdot 10^{-7} K_{OW} + 1) - 0.786)} \quad (r^2=0.90)$$

[式 A6.5^(注3)]

W = 取込終了時 / 排泄開始時における平均魚体重 (g 湿重量)

その他、 k_2 を推定する方法として「注 4」がある。例えば、代謝が早いと考えられる場合には、複雑なモデルを用いて k_2 を推定した方がよい場合もある^(注5、6)。ただし、モデルが複雑になるほど、予測結果の解釈にいつそう注意を払わなければならない。したがって、推定結果の取り扱いについては、被験物質の構造及び他の関連情報（例えば予備試験結果）と比較しつつ、慎重に判断すべきである。

定常状態に対し一定の割合に達するのに必要な時間は、取込及び排泄を記述する一般的な速度式（1 次速度式）に k_2 推定値を代入することにより算出することができる。しかしながら、試験期間中の成長が著しい場合は、6 . 6 「速度論による BCF についての成長希釈補正」に記載する成長希釈補正した排泄速度定数 (k_{2g}) を用いて算出する方が適切である。

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_w - k_2 C_f \quad [\text{式 A6.6}]$$

C_w が一定の場合

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{式 A6.7}]$$

定常状態に近づくと ($t \rightarrow \infty$)、式 A6.7 は以下のように省略できる (注7、8)。

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \quad [\text{式 A6.8}]$$

又は

$$\frac{C_f}{C_w} = \frac{k_1}{k_2} = \text{BCF} \quad [\text{式 A6.9}]$$

すなわち、 $\text{BCF} \times C_w$ は、定常状態における試験魚中被験物質濃度 (C_{f-SS}) の近似値である。

式 A6.7 は、次のように書き換えられる。

$$C_f = C_{f-SS} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{式 A6.10}]$$

又は

$$\frac{C_f}{C_{f-SS}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad [\text{式 A6.11}]$$

式 A6.2 又は式 A6.3 を用いて k_2 を事前に推定し、式 A6.11 に代入することで、 t_x を予測することができる。

蓄積が定常状態の 95% を超える場合は、 BCF_{SS} の算出が可能となる。 BCF_K を算出するための統計的に最適な取込期間として、試験魚中被験物質濃度が定常状態の 50% ($0.69/k_2$) に達する期間が少なくとも必要である (注9)。

定常状態の 80% に到達する時間 (t_{80}) は、以下に示される。

$$0.80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \quad [\text{式 A6.12}]$$

又は

$$t_{80} = \frac{-\ln(0.20)}{k_2} = \frac{1.6}{k_2} \quad [\text{式 A6.13}]$$

同様に、定常状態の 95% に到達する時間 (t_{95}) は、以下に示される。

$$t_{95} = \frac{-\ln(0.05)}{k_2} = \frac{3.0}{k_2} \quad [\text{式 A6.14}]$$

例えば、 $\log P_{OW} = 4$ である被験物質の t_{80} 又は t_{95} は (式 A6.2、式 A6.13、及び式 A6.14 を用いて)、以下に示される：

$$\log k_2 = 1.47 - 0.414 \cdot 4$$

$$k_2 = 0.652 \text{ day}^{-1}$$

$$t_{80} = \frac{1.6}{0.652} = 2.45 \text{ days (59 hours)}$$

$$t_{95} = \frac{3.0}{0.652} = 4.60 \text{ days (110 hours)}$$

代わりに、以下の式を用いて、定常状態に達するまでの時間 (t_{eSS}) を算出できる
(注10)。

$$t_{\text{eSS}} = 6.54 \cdot 10^{-3} \cdot P_{\text{OW}} + 55.31 \text{ (hours)} \quad [\text{式 A6.15}]$$

$\log P_{\text{OW}} = 4$ である被験物質の結果は以下に示される：

$$t_{\text{eSS}} = 6.54 \cdot 10^{-3} \cdot 10^4 + 55.31 = 121 \text{ hours}$$

6.2 試験設計のための排泄期間の長さ予測 (試験法「排泄期間 3 - 7 - 2」)

取込及び排泄を記述した一般的な数式を用いることで、試験魚中被験物質濃度が排泄期間の初期濃度に対して一定の割合まで減少するのに必要な時間を予測することができる。ただし、これらの式は取込及び排泄が1次速度式に従う場合にのみ適用される。明らかに1次速度式に従わない場合は、これらの予測は有効ではない。(式 A6.6 参照)
(注11)。

排泄期間において、 C_w をゼロと仮定すると、以下の式で示される：

$$\frac{dC_f}{dt} = -k_2 C_f \quad [\text{式 A6.16}]$$

又は

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t} \quad [\text{式 A6.17}]$$

上式で、 $C_{f,0}$ は排泄期間開始時の試験魚中被験物質濃度である。

式 A6.2 又は式 A6.3 を用いて k_2 を事前に推定し、式 A6.17 に代入することで、Y% 排泄される時間 t_Y を予測することができる。

50%排泄される時間 (t_{50}) は以下の式で示される :

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

又は

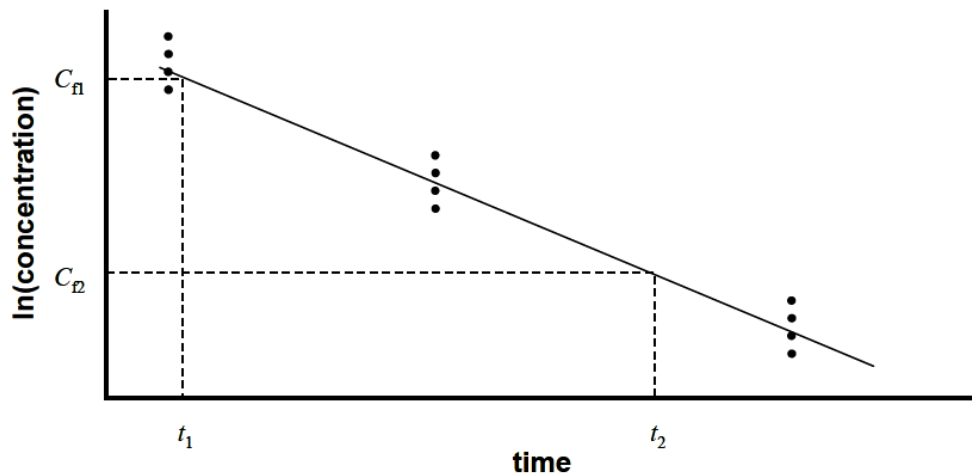
$$t_{50} = \frac{-\ln(0.50)}{k_2} = \frac{0.693}{k_2}$$

同様に、95%排泄される時間 (t_{95}) は以下の式で示される :

$$t_{95} = \frac{-\ln(0.05)}{k_2} = \frac{3.0}{k_2}$$

6. 3 逐次法 (Sequential method) : 排泄速度定数 k_2 の決定 (試験法「生物濃縮係数の算出4-1」)

排泄期間中の試験魚中被験物質濃度 (自然対数) が時間軸に対して直線上にプロットされる (排泄が1次速度式に従う) 場合、 k_2 は単純な二つのコンパートメント/二つのパラメータのモデルにより、説明が可能である。



k_2 が直線上にプロットされない場合は、排泄が1次速度式より複雑なパターンである可能性が示唆される。1次速度式から外れる場合の排泄のパターンは、図式解法により明らかにすることができる可能性がある。

複数のサンプリングポイントから k_2 を算出するためには、縦軸に \ln (濃度)、横軸に時間を取り直線回帰を実施する。その結果得られる回帰直線の傾きが排泄速度定数 k_2 である。切片からは、排泄期間開始時における試験魚中被験物質濃度の平均値 ($C_{0,d}$; 取込期間終了時の試験魚中被験物質濃度の平均値に等しいが誤差範囲を含む) が算出可能である。

$$C_{0,d} = e^{\text{intercept}}$$

[式 A6.18]

k_2 を算出するためのサンプリングポイントが2つしかない場合（簡易水暴露法の排泄期間開始時（すなわち取込期間終了時）及び終了時）は、各サンプリングポイントにおける平均濃度を下式に代入する。

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}) - \ln(C_{f2})}{t_2 - t_1} \quad [\text{式 A6.19}]$$

上式で、 $\ln(C_{f1})$ 及び $\ln(C_{f2})$ は、それぞれ時間 t_1 及び t_2 における試験魚中被験物質濃度の自然対数であり、 t_2 及び t_1 は2つのサンプリングポイントの排泄開始時からの時間である。ただし、この方法を用いた場合は、 k_2 の標準誤差あるいは信頼区間を得ることができない。

6.4 逐次フィッティング法（Sequential method）：取込速度定数 k_1 の決定（試験法「4-1 生物濃縮係数の算出」）

取込期間中における一連の連続した時間-濃度データから k_1 を算出することができる。その場合、コンピュータプログラムを用いて、データを以下のモデルにフィッティングさせる。

$$C_f(t) = C_w(t) \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{式 A6.20}]$$

上式で、 k_2 は6.3「逐次法」において算出した値であり、 $C_f(t)$ 及び $C_w(t)$ はそれぞれ時間 t における試験魚中及び試験水中被験物質濃度である。

k_1 を算出するためのサンプリングポイントが2つしかない場合（簡易水暴露法の排泄期間開始時（すなわち取込期間終了時）及び終了時）は、下式を用いる。

$$k_1 = \frac{C_f \cdot k_2}{C_w (1 - e^{-k_2 t})} \quad [\text{式 A6.21}]$$

上式で、 k_2 は6.3「逐次法」において算出した値であり、 C_f は排泄期間開始時の試験魚中被験物質濃度であり、 C_w は取込期間中の平均試験水中被験物質濃度である。ただし、この方法を用いた場合は、 k_1 の標準誤差あるいは信頼区間を得ることができない。

測定したサンプリングポイントのデータをプロットすることで、目視により k_1 及び k_2 の妥当性を判断できる。逐次フィッティング法による k_1 の値が適切ではないと判断された場合は、同時フィッティング法を用いて k_1 及び k_2 を算出すべきである（6.5「同時フィッティング法」参照）。

6.5 同時フィッティング法（Simultaneous method）による取込速度定数及び排泄速度定数の決定（試験法「4-1 生物濃縮係数の算出」）

コンピュータプログラムを用いて、一連の連続した時間-濃度データ及び下記のモデル式より k_1 及び k_2 を算出することができる。

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{式 A6.22}]$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t > t_c \quad [\text{式 A6.23}]$$

上式で、 t_c = 取込期間終了時の時間

この手法は、 k_1 及び k_2 の標準誤差を直接算出できる。式 A6.22 及び式 A6.23 における k_1/k_2 を BCF に置き換えることで、BCF の標準誤差及び 95% 信頼区間も推定可能である。このことは、試験魚中被験物質濃度の対数変換の有無による BCF 算出結果の差異を比較する際に特に有用である。

同時フィッティング法で k_1 及び k_2 を算出する場合、 k_1 と k_2 の間には強い相関関係が存在する。また、ほとんどの場合、 k_2 は、排泄曲線から比較的高い精度で算出可能であることから、まず、逐次フィッティング法を用いて k_1 及び k_2 を算出することが推奨される。逐次フィッティング法で k_1 及び k_2 を算出する場合には、両方について同様なデータの取り扱いをする（試験魚中被験物質濃度を自然対数変換する / しない）ことが推奨される。測定したサンプリングポイントのデータをプロットすることで、得られた曲線の妥当性を目視により判断する。逐次フィッティング法により得られた k_1 が妥当でないと判断される場合は、同時フィッティング法を用いて k_1 及び k_2 を算出する。再度、得られた曲線の妥当性を目視により判断し、 k_1 、 k_2 及び BCF について、逐次フィッティング法で得られた結果と比較する。

いずれの方法も妥当ではないと判断された場合には、1 次速度式に従っていない可能性があり、より複雑な他のモデルを採用すべきである。妥当性の判断を難しくする最も一般的な要因の一つとして、試験期間中の試験魚の成長が挙げられる。

6.6 速度論による BCF についての成長希釈補正（試験法「4 - 2（1） 成長希釈補正と脂質含量の標準化」）

化学物質の取込及び排泄が 1 次速度式に従う場合に適用する。1 次速度式に従わない場合は、被験物質量を基にした手法（mass based approach）を用いることが推奨される。

成長に伴う希釈を補正するための本方法は、精度が悪い場合や適切に補正できない場合がある（例えば、成長が早い魚を用いて排泄が非常に遅い化学物質について試験を実施した場合、成長補正した排泄速度定数（ k_{2g} ）に必要な 2 つの速度定数（ k_2 及び k_g ）の誤差も大きくなり、 k_{2g} は非常に小さくなる可能性がある。そのような場合には、被験物質量を基にした代替法を用いてもよい。なお、BCF_{SS} も成長による影響を受けるが、現在のところ、BCF_{SS} を成長希釈補正するための適切な方法はない。

成長速度定数差引き法による成長希釈補正

標準的な方法として、全ての個々の体重データを自然対数に変換し、試験区と対照区に分けて、 $\ln(\text{魚体重})$ 又は $\ln(1/\text{魚体重})$ を時間(日)に対してプロットする。この処理を取込及び排泄期間のデータについて別々に実施する。成長に伴う希釈補正に用いる成長速度定数 (k_g) は、一般に試験期間全体の体重データを使用することが望ましいが、取込及び排泄期間における2つの成長速度定数の間に統計的に有意な差がある場合には、排泄期間における速度定数を使用し、報告する。

成長速度定数 (k_g) を排泄速度定数 (k_2) から差し引いて、成長補正した排泄速度定数 (k_{2g}) を算出する。

$$k_{2g} = k_2 - k_g \quad [\text{式 A6.24}]$$

取込速度定数を成長補正した排泄速度定数で除することで、成長補正した速度論による BCF (BCF_{K_g}) を算出する。

$$\text{BCF}_{K_g} = \frac{k_1}{k_{2g}} \quad [\text{式 A6.25}]$$

被験物質濃度に基づく成長希釈補正

「成長速度定数差引き法」の代替法として、以下の方法が使用可能である。

- 排泄期間の試験魚中被験物質濃度(すなわち、魚の単位質量あたりの被験物質濃度)を試験魚中の被験物質濃度に変換する。
- $\ln(\text{被験物質濃度})$ を時間(排泄期間)に対してプロットし、その傾きから排泄速度定数を算出する。
- ただし、 k_1 を算出する際には6.3「逐次法」及び6.5「同時フィッティング法」に記載された方法を用い、試験魚中被験物質濃度から算出する通常の k_2 を使用することに注意する。

6.7 5%脂質含量での標準化(試験法「4-2(2)成長希釈補正と脂質含量の標準化」)

BCF_{SS} が 1000 L/kg 以上の場合は、被験物質がほとんど脂質に蓄積されないことが明確な場合を除き、5%脂質含量(湿重量に基づく)に対する BCF (BCF_K 又は BCF_{SS}) を報告すべきである。魚の濃度データ又は BCF は 5%脂質含量(湿重量に基づく)あたりの値に標準化する必要がある。

脂質含量の測定にはクロロホルム/メタノール抽出法及び Smedes 法の2種類を推奨する。他の方法を用いる場合は、推奨する2種類と同程度の抽出効率及び精度が得られることを事前に確認する。なお、脂質含量は、被験物質濃度測定に用いた試験魚と同一の魚について測定することが望ましい。

$$C_{f,L} = \frac{0.05}{L} \cdot C_f \quad [\text{式 A6.26}]$$

$C_{f,L}$ = 5%脂質含量で標準化した試験魚中被験物質濃度 (mg/kg 湿重量)

L = 脂質含量 (湿重量に基づく)

C_f = 試験魚中被験物質濃度 (mg/kg 湿重量)

すべてのサンプリングポイントにおいて、被験物質分析及び脂質含量測定を同一の魚を用いて実施した場合を除いて、 BCF_{SS} については、試験区の取込期間終了時の平均値を使用する。 BCF_K の標準化は脂質含量の平均値を用いて実施する。ただし、脂質含量が取込期間又は排泄期間中に大きく変化した場合等は、その旨と合わせて適切な値を用いて脂質含量で標準化した BCF を報告する。

$$BCF_{SSL} = \frac{0.05}{L_n} \cdot BCF_{SS} \quad [\text{式 A6.27}]$$

$$BCF_{KL} = \frac{0.05}{L_n} \cdot BCF_K \quad [\text{式 A6.28}]$$

BCF_{SSL} = 5%脂質含量で標準化した BCF_{SS}

BCF_{KL} = 5%脂質含量で標準化した BCF_K

L_n = 平均脂質含量 (湿重量に基づく)

BCF_{SS} = 定常状態における BCF

BCF_K = 速度論による BCF

すべてのサンプリングポイントにおいて、被験物質分析及び脂質含量測定を同一の魚を用いて実施した場合には、それぞれの試験魚中被験物質濃度をその魚の脂質含量を用いて標準化する。

7. : 魚を用いた濃縮度試験（簡易水暴露法）

この手法の原理は、水暴露法における生物濃縮係数は、試験魚中被験物質濃度と試験水中被験物質濃度の比から BCF_{SS} として算出できるが、取込速度定数 k_1 と排泄速度定数 k_2 の比から BCF_K としても算出できることに基づくものである。

試験魚中被験物質濃度 (C_{f1}) の測定を取込期間終了時 (t_1) に実施し、その後、排泄期間中のある時間 (t_2) に試験魚中被験物質濃度 (C_{f2}) を再度測定することにより、「6. BCFの算出法」の式 A6.19 を用いて排泄速度定数 (k_2) が算出可能である。

取込速度定数 k_1 は、「6. BCFの算出法」の式 A6.20 を用いて算出することができる（この式で、 C_f は C_{f1} 、 t は t_1 とする）^(注12、13)。したがって、簡易水暴露法における速度論による生物濃縮係数 (BCF_{Km}) は、以下のとおりになる。

$$BCF_{Km} = \frac{k_1}{k_2} \quad \text{[式 A7.1]}$$

可能であれば、試験魚中被験物質濃度や BCF_{Km} は、「6. BCFの算出法」に記載のように、成長希釈補正を実施すべきである。

BCF_{Km} の結果の妥当性を評価する際に必要な minimised BCF_{SS} は、取込期間終了時に定常状態に達したと仮定して算出される BCF であり、: 魚を用いた濃縮度試験（水暴露法）で規定する BCF_{SS} とは異なることに注意が必要である。

$$\text{minimised } BCF_{SS} = \frac{C_{f-\text{minSS}}}{C_{w-\text{minSS}}} \quad \text{[式 A7.2]}$$

$C_{f-\text{minSS}}$ = 取込期間終了時に定常状態に達したと仮定した場合の試験魚中被験物質濃度 (mg/kg 湿重量)

$C_{w-\text{minSS}}$ = 取込期間終了時に定常状態に達したと仮定した場合の試験水中被験物質濃度 (mg/L)

8. : 魚を用いた濃縮度試験（餌料投与法）

8.1 適切な餌料の成分量の例（試験法「2-3-3 餌料」）

主な成分	餌料
粗蛋白質	55.0%
粗脂肪	10～15%程度
粗繊維	2.0%
水分	12%
灰分	8%

8.2 餌料への添加技術の例（試験法「3-1 試験餌料」）

一般的ポイント

- 対照区の試験餌料は、被験物質を含まないことを除き、被験物質を添加した試験餌料と厳密に同一の方法で調製すべきである。
- 試験餌料の被験物質濃度をチェックするため、サンプルから3連で適切な方法で被験物質を抽出し、抽出物中の被験物質濃度又は放射能測定を実施すべきである。被験物質の分析感度を考慮し、最小限の量の餌料を分析することが望ましい。サンプル間のバラツキが小さく分析回収率が高く(>85%)なるようにするべきである（取込期間の開始前に採取した3連のサンプル中被験物質濃度は、平均値から±15%を超えて変動してはならない）。
- 餌料投与法中の試験餌料の被験物質濃度決定のため、少なくとも各3連のサンプルを取込期間の0日目及び終了時に採取して分析する。

液体試料の餌料の調製（例）

餌料に添加する被験物質設定濃度は、例えば500 µg 被験物質/g 餌料とする。ガラス瓶又はナスフラスコに適切な量の被験物質と既知量の餌料を添加する。餌料量は、取込期間に十分な量とすべきである（試験魚の成長による給餌量の増加を考慮する）。餌料/被験物質の混合物は、一晩混合すべきである（例えばロトラックミキサーを用いて、又はナスフラスコを用いる場合は回転により）。被験物質を添加した餌料は、試験終了まで餌料中の被験物質の安定性を維持する条件下で（例えば冷蔵）保管すべきである。

コーンオイル又は魚油による餌料の調製（例）

固形の被験物質は、必要に応じて乳鉢等で粉碎して微粉にする。液状の被験物質は、コーンオイル又は魚油に直接加えることができる。被験物質は、既知量（例えば5-15 mL）のコーンオイル又は魚油に溶解する。被験物質を添加したオイルを適当な大きさのナスフラスコに移す。このオイルの調製に使用した容器を、少量のオイルで2回洗浄し、これらをナスフラスコに加えることで溶解した被験物質を確実に移す。オイル内で

の完全な溶解/分散を確実にするため（又は試験において複数の被験物質が使用される場合）、マイクロスターラーを加え、フラスコに栓をし、混合物を高速で一晩攪拌する。試験に適当な量の餌料を添加し、ナスフラスコの内容物を少なくとも 30 分間、好ましくは一晩連続回転によって混合する。被験物質を添加した餌料は、使用まで餌料中の被験物質を安定に保存できる条件下（例えば冷蔵）で保管すべきである。

有機溶媒による餌料の調製（例）

投与量に適した量の被験物質を適当量の有機溶媒（例えばシクロヘキサン又はアセトン、ただし添加される餌料の量に応じ必要な場合にはより多量）に溶解する。この溶液の一定量又はすべてのいずれかを、試験に必要とされる投与濃度に適した餌料と混合する。餌料/被験物質混合物は、ステンレススチール製の混合容器中で混合可能であり、容器中の添加された餌料は、試験室のドラフト内に放置、溶媒を十分に蒸発させる、あるいはナスフラスコ内で連続回転によって混合する。余分な溶媒は、必要に応じて空気又は窒素パージにより留去することが可能である。溶媒が除去される際に被験物質が結晶化しないように注意しなければならない。被験物質を添加した餌料は、使用まで餌料中の被験物質を安定に保存できる条件下（例えば冷蔵）で保管すべきである。

8.3 10日間の取込期間及び42日間の排泄期間に従う理論的なサンプリングスケジュールの例（試験法「3-9 分析」）

採取	サンプリングスケジュール		餌試料数	魚試料数	
	各期間の日数	追加の魚サンプルの有無		試験区	対照区
取込期間					
1	0	可能性あり (1)(2)	3-試験区 3-対照区 ⁽¹⁾	0	5-10 (8-13) ⁽²⁾
1A ⁽³⁾	1-3			5-10	5-10
2	10	あり ⁽⁴⁾	3-試験区 3-対照区 ⁽¹⁾	10-15 ⁽⁴⁾ (13-18) ⁽⁵⁾	5-10 (8-13) ⁽⁵⁾
排泄期間					
3	1	あり ⁽⁴⁾		10-15 ⁽⁴⁾	5-10
4	2			5-10	5-10
5	4			5-10	5-10
6	7	あり ⁽⁴⁾		10-15 ⁽⁴⁾	5-10
7	14			5-10	5-10
8	28			5-10	5-10
9	42	あり ⁽⁴⁾		10-15 ⁽⁴⁾ (13-18) ⁽⁵⁾	5-10 (8-13) ⁽⁵⁾
合計				59-120 (63-126) ^(4,5)	50-110 (56-116) ^(4,5)

- (1) 被験物質濃度及び脂質含量について、対照区及び試験区から3試料を分析する。
(2) 取込開始時にできる限り近い時期にじゅん化水槽から採取する；取込開始時には少なくとも3尾の魚を脂質含量測定用に採取する。
(3) 取込期間初期に採取することにより生体内吸収効率の算出が可能となり、排泄期間のデータから算出される被験物質の生体内吸収効率と比較できる（任意）。
(4) 組織別分析のために、追加で5尾の魚を採取することができる。
(5) 取込開始時、取込期間終了時及び排泄期間終了時に、被験物質濃度測定用として採取した魚と同一の魚を使用できない場合、追加で少なくとも3尾を脂質含量測定用に採取する。多くの場合、対照区の3尾の魚が脂質含量測定用のみに使用できる。

期間及び採取における注意点：取込期間は、被験物質を添加した試験餌料の最初の給餌を行った時点で開始となる。各実験日は、ある回の給餌から24時間後の次の給餌の直前までである。最初の採取（上表の1）は、最初の給餌の直前（例えば1時間前）に実施されるべきである。試験中の採取は、理想的には次の日の給餌の直前に実施されるべきである（例えば、取込10日後の試験魚の採取は、取込10日後の給餌の約23時間後）。取込期間は、被験物質を添加していない餌料の給餌直前に終了し、その時点から

排泄期間が開始される（試験区の魚は、最後の被験物質を添加した餌料の給餌 24 時間後まで試験餌料を消化している可能性が高い）。このため、取込終了時の採取は、被験物質を添加していない餌料の最初の給餌の直前に実施すべきであり、かつ排泄期間最初の採取は、被験物質を添加していない餌料の最初の給餌の約 23 時間後におこなうべきである。

8.4 生体内吸収効率及び経口生物濃縮係数の算出（試験法「4-1 経口生物濃縮係数の算出」）

生体内吸収効率を算出するために、まず排泄速度定数を試験法解説 6.3 に従って排泄期間中の試験魚中平均被験物質濃度を用いて推定する（「sequential 法」すなわち標準的な線形回帰を用いて実施する）。給餌量 I 及び取込期間 t は、試験の既知のパラメータである。試験餌料における被験物質の平均濃度 C_{food} は、試験における測定変数である。排泄期間開始時における試験魚中被験物質濃度の外挿値 $C_{0,d}$ は、通常は \ln （濃度）と排泄日数のプロットの切片から算出される。

被験物質の生体内吸収効率（ α 、消化管からの被験物質の吸収）は、以下のように算出される。

$$\alpha = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{\text{food}}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \quad [\text{式 A8.1}]$$

$C_{0,d}$ = 排泄期間開始時における試験魚中被験物質濃度の外挿値（mg/kg）

k_2 = 試験法解説 6.3 の式に従って算出された、（成長希釈補正されていない）排泄速度定数（/日）

I = 給餌量（g 餌料/g 魚/日）

C_{food} = 試験餌料中被験物質濃度（mg/kg 餌料）

t = 取込期間（日）

ただし、算出に用いる給餌量 I は、正確な生体内吸収効率 α を求めるために、試験魚の成長について補正しなければならない可能性がある。取込期間中に試験魚が著しく成長する試験において、取込期間の適切な給餌量は設定した給餌量より低くなり、結果として“実際の”生体内吸収効率より高い値が得られる（注意； I は式 A8.1 と式 A8.4 の間において、事実上相殺されるため、これは BMF の算出自体に重要ではない）。成長に伴う希釈について補正した平均給餌量 I_g はいくつかの方法で算出可能であるが、直接的で厳密な算出方法は成長速度定数（ k_g ）を用いて取込期間中の各サンプリング時における試験魚の体重を推定する方法である。すなわち；

$$W_{f(t)} = W_{f,0} \times e^{k_g t} \quad [\text{式 A8.2}]$$

$W_{f(t)}$ = 取込日 t における平均試験魚体重

$W_{f,0}$ = 試験開始時の平均試験魚体重

このようにして（少なくとも）取込期間最終日の試験魚の平均体重（ $W_{f,\text{end-of-uptake}}$ ）は、推定可能である。給餌量は $W_{f,0}$ に基づいて設定されているため、取込期間の各実験日における適切な給餌量は、これら二つの体重を用いて算出可能である。取込期間中に

急速な成長が認められる場合、 I の代わりに成長希釈補正した給餌量 I_g (g 餌料/g 魚/日) を以下のように算出する。

$$I_g = \frac{I \times W_{f0}}{W_{f \text{ end-of-uptake}}} \quad [\text{式 A8.3}]$$

生体内吸収効率が得られると、それに給餌量 I (又は I_g 、 α の算出に用いた場合) を乗じ、総排泄速度定数 k_2 で除することにより、 BMF_K を算出できる。

$$\text{BMF}_K = \frac{I \times \alpha}{k_2} \quad [\text{式 A8.4}]$$

成長希釈補正した経口生物濃縮係数も成長希釈補正した排泄速度定数 (試験法解説 6.6 に従い算出される) を用いて、同様に算出すべきである。 α の算出に I_g を用いた場合、ここでも I の代わりに I_g を用いなければならない。

$$\text{BMF}_{Kg} = \frac{I \times \alpha}{k_{2g}} \quad [\text{式A8.5}]$$

α = 生体内吸収効率 (消化管からの被験物質の吸収)

k_2 = 試験法解説 6.3 の式に従って算出された、(成長希釈補正していない) 排泄速度定数 (/日)

k_{2g} = 成長希釈補正した排泄速度定数 (/日)

I = 給餌量 (g 餌料/g 魚/日)

成長希釈補正した排泄半減期 ($t_{1/2}$) は、以下のように算出される。

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{k_{2g}} \quad [\text{式 A8.6}]$$

取込期間において直線的に被験物質が取り込まれる期間に組織中の被験物質濃度を測定した場合、下記のように被験物質の生体内吸収効率 (α) を推定することも可能である。

$$= \frac{C_{\text{fish}}(t)}{I \times C_{\text{food}} \times t} \quad [\text{式 A8.7}]$$

$C_{\text{fish}}(t)$ = 時間 t における試験魚中被験物質濃度 (mg/kg 湿重量)

8.5 脂質含量補正 (試験法「4-2 成長希釈及び脂質含量補正」)

すべてのサンプリングにおいて被験物質分析したものと同一の試験魚について脂質含量が測定されていれば、個々の被験物質濃度を脂質含量で補正すべきであり、 \ln (脂質含量補正濃度) を排泄期間 (日) に対してプロットすると、 $C_{0,d}$ 及び k_2 が得られる。脂質含量あたりの C_{food} を用いて、脂質含量あたりの生体内吸収効率 (式 A8.1) の算出が可能である (すなわち C_{food} に餌料の平均脂質含量を乗ずる)。式 A8.4 及び式 A8.5 を用いて計算することで、脂質含量補正 (成長希釈補正) した BMF を直接求めることができる。

あるいは、試験魚及び試験餌料における試験区及び対照区の平均脂質含量 (w/w) を算出する (試験餌料及び対照区の試験魚については、通常、取込開始時及び終了時に測定する。試験区の試験魚については、通常、取込終了時の測定データのみから算出する)。試験によっては、試験魚の脂質含量が大幅に増大することがあり、そのような場合、取込終了時及び排泄終了時での脂質含量の測定値より算出した試験魚の脂質含量平均値を使用することがより適切である。一般に、試験区のデータのみを用いてそれぞれの脂質含量を算出すべきである。

脂質含量補正係数 (L_c) は、以下のように算出される。

$$L_c = \frac{L_{\text{fish}}}{L_{\text{food}}} \quad [\text{式 A8.8}]$$

L_{fish} 及び L_{food} は、それぞれ試験魚及び試験餌料における平均脂質含量である。

脂質含量補正係数は、脂質含量補正した経口生物濃縮係数 (BMF_L) の算出に用いられる。

$$\text{BMF}_L = \frac{\text{BMF}}{L_c} \quad [\text{式 A8.9}]$$

8.6 取込期間終了時における試験魚中被験物質濃度の実測値 ($C_{0,m}$) と排泄期間開始時における試験魚中被験物質濃度の外挿値 ($C_{0,d}$) との差の評価

取込期間終了時における試験魚中被験物質濃度の実測値 ($C_{0,m}$) 及び排泄期間開始時における試験魚中被験物質濃度の外挿値 ($C_{0,d}$) を比較する。それらが非常に近似している場合には、排泄パラメータの算出に使用した 1 次速度モデルを裏付けることになる。

試験によっては、外挿値 ($C_{0,d}$) と、実測値 ($C_{0,m}$) との間に著しい差がある場合がある。 $C_{0,d}$ が $C_{0,m}$ よりはるかに低い ($C_{0,d} \ll C_{0,m}$) 場合、この違いは、消化管内に未消化の試験餌料が存在することを示唆している可能性がある。これは、取込期間終了時に追加の (全量の試験魚) サンプルを保管していれば、消化管を解剖し部位別試験を実施することにより実験的に確認は可能である。あるいは、排泄期間の線形回帰に適用する際に、排泄の最初のサンプリングが統計的に有効な棄却検定により不適当と示されるなら、 k_2 算出のために線形回帰を実施する際に、排泄の最初のサンプリングを除外することが適当である。そのような場合、もし線形回帰における不確かさが大幅に低減し、かつ排泄期間に 1 次速度が認められたことが明らかなら、得られた $C_{0,d}$ 及び k_2 の値を生体内吸収効率の算出に用いることは適切である。この場合には、報告書において十分に正当性を説明しなければならない。排泄期間において、被験物質の排泄が 1 次速度に従わない可能性もある。

$C_{0,d}$ が測定値よりはるかに高い ($C_{0,d} \gg C_{0,m}$) 場合には、その被験物質が非常に急速に排泄された (すなわち、排泄期間の非常に早期のサンプリングで、分析方法の定量下限に近づいた、試験法解説 8.7 参照)、排泄期間に 1 次速度からの逸脱があった、 k_2 及び $C_{0,d}$ を算出するための線形回帰が不適である、あるいはいくつかのサンプリングにおいて、測定した被験物質濃度に問題があったことを示している可能性がある。そのような場合、線形回帰プロットを、測定した試料が定量下限にある、又は定量下限付近であるという証拠や、棄却及び明らかな曲率 (1 次速度に従わないことを示唆する) の証拠が

ないかを精査し、報告書で説明する。推定された値を改善するための線形回帰の再評価についても記載し説明すべきである。

8.7 非常に急速に排泄される被験物質についてのガイダンス

いくつかの被験物質は排泄期間の非常に早い時期（すなわち、排泄の2日目のサンプリング以降）に被験物質が事実上測定不能になるために、信頼できる0時濃度 $C_{0,d}$ 及び k_2 が算出できないことがある。このような状況は、ベンゾ[a]ピレンを用いて実施されたリングテストでも認められ、バリデーション報告書に文書化されている。このような場合、線形回帰を実施しても信頼性が低く、 $C_{0,d}$ が非現実的に高い予測値になり、生体内吸収効率は1よりはるかに大きくなる。このような場合、高めに見積もった k_2 の推定値と高めに見積もった BMF（"upper bound" BMF）を算出することが可能である。

最初の「不検出」濃度（定量下限として設定した濃度）を含む排泄期間の被験物質濃度が測定できたデータポイントを用いて、線形回帰（時間に対して自然対数変換された濃度を用いる）を作成することにより、 k_2 の推定値が得られる。場合によって、2つのデータポイント（例えば、排泄のサンプリング日、1日目及び2日目）のみ算出可能な場合があり、その場合には、試験法解説 6.3 の式 A6.19 を用いて k_2 を推定することが可能である。 $C_{0,d}$ が試験で得られる数値よりはるかに大きいと明らかに推定される場合、この k_2 の推定値は式 A8.1 に従い、式中の $C_{0,d}$ の値を実測による0時濃度（ $C_{0,m}$ ）で置き換え、生体内吸収効率の推定に使用可能である。もし $C_{0,m}$ が測定不能であったなら、試験魚の組織における検出下限値を用いるべきである。こうして得られる α の値が1を超えるなら、「最悪のケース」として生体内吸収効率は1と仮定する。

高めに見積もった BMF は、式 A8.4 を用いて推定でき、" (<<) 値"として記載するべきである。例えば、給餌量を試験魚体重の3%において排泄半減期が3日未満の場合、「最悪のケース」として $\alpha=1$ と仮定した場合、 BMF_K は約 0.13 未満となる。推定の目的及びそもそもこの値が保守的であることを考慮すると、成長に伴う希釈又は試験魚や餌料の脂質含量で補正する必要はない。

8.8 基準物質の例（試験法「3-6 試験餌料濃度」）

餌料投与法に使用する基準物質の例として、以下の物質が挙げられる（注14、15、16）。

被験物質	水溶解度*1	log K _{ow} *2	BCF	取込期間 終了時に おける BMF	BMF _{Kg}	BMF _{KgL}
デカヒドロナフ タレン (CAS: 91-17- 8)	0.889 mg/L (文献値、 25)	4.20 (推定 値)	1800 (<i>cis</i> 体) 1900 (<i>trans</i> 体) (第2濃 度区 56日後の 平均値)	0.0893 (<i>cis</i> 体) 0.109 (<i>trans</i> 体) (10日 後)	0.112 (<i>cis</i> 体) 0.137 (<i>trans</i> 体)	0.301 (<i>cis</i> 体) 0.369 (<i>trans</i> 体)
エチルシクロヘ キサン (CAS: 1678- 91-7)	6.3 mg/L (文献値、 20)	4.56 (実測 値)	2100 (第2濃 度区 56日後の 平均値)	0.0162 (10日 後)	0.0172	0.0512
2,4-ジクロロ フェニル-4'- ニトロフェニ ルエーテル (CAS: 1836- 75-5)	1 mg/L (文献値、 22)	4.64 (文献 値)	3400 (第2濃 度区 70日後の 平均値)	0.0517 (10日 後)	0.0622	0.179
<i>o</i> -テルフェニル (CAS: 84-15- 1)	1.24 mg/L (文献値、 25)	5.52 (推定 値)	1400 (第2濃 度区 BCF _{ss})	0.0343 (13日 後)	0.0370	0.0912
メトキシクロル (CAS: 72-43- 5)	0.1 mg/L (文献値、 25)	5.08 (文献 値)	620 (第2濃 度区 BCF _{ss})	0.0128 (13日 後)	0.0138	0.0340
<i>N,N'</i> -ジ-2-ナ フチル- <i>p</i> - フェニレンジ アミン (CAS: 93-46- 9)	0.001446 mg/L (推定値)	6.39 (推定 値)	1100 (第2濃 度区 BCF _{ss})	0.0206 (10日 後)	0.0252	0.0802

*1 Wskowwin v. 1.42 (US Environmental Protection Agency, USA)より算出。文献値がある場合は文献値を、文献値がない場合は、推定値を示す。

*2 Kowwin v. 1.68 (US Environmental Protection Agency, USA)より算出。文献値がある場合は文献値を、文献値がない場合は、推定値を示す。

- (注1) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1: 309-320.
- (注2) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995). Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined in vivo and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131: 130-135.
- (注3) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993). Nonlinear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. *SAR QSAR Environ. Res.* 1: 29-39.
- (注4) Kristensen P. (1991). 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, Hørsholm, Denmark.
- (注5) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009). A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1168-1177.
- (注6) OECD (2011). QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.
- (注7) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975). Bioconcentration of 2,2',4,4' tetrachlorobiphenyl in rainbow trout as measured by an accelerated test. *T. Am. Fish. Soc.* 104: 785-792.
- (注8) Ernst W. (1985). Accumulation in aquatic organisms, in *Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals*, Sheeman, P., et al., Editors. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, USA: 243-255.
- (注9) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977). Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models. *Can. J. Chem. Eng.* 55: 614-622.
- (注10) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* 22: 701-707.
- (注11) Konemann H. and van Leeuwen K. (1980). Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six chlorobenzenes by guppies. *Chemosphere.* 9: 3-19.
- (注12) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008). Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2271-2280.
- (注13) Hashizume N., Inoue Y., Murakami H., Ozaki H., Tanabe A., Suzuki Y., Yoshida T., Kikushima E. and Tsuji T. (2013). Resampling the bioconcentration factors data from Japan's chemical substances control law database to simulate and evaluate the bioconcentration factors derived from minimized aqueous exposure tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 32: 406-409
- (注14) Inoue Y., Hashizume N., Kikushima E., Otsuka M. (2011). Comparison of nitrofen uptake via water and food and its distribution in tissue of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 87 (3): 287.

- (注 15) Inoue Y., Hashizume N., Yoshida T., Murakami H., Suzuki Y., Koga Y., Takeshige R., Kikushima E., Yakata N., Otsuka M. (2012). Comparison of the Bioconcentration and Biomagnification Factors for Poorly-Water-Soluble Chemicals using Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 63 (2):241-248
- (注 16) Hashizume N., Tanabe A., Inoue Y., Sawada T., Murakami H., Suzuki Y., Sumi S., Tsubokura Y., Yoshida T., Ajimi S., Tsuji T., Furukawa K. (2014). Prediction of the bioconcentration factor in common carp (*Cyprinus carpio* L.) using data from the dietary exposure bioaccumulation fish test. Environ. Toxicol. Chem. 33 (6): 1406-1414

< 1-オクタノールと水との間の分配係数測定試験 >

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 OECD テストガイドライン 117 で定められた方法に準じて実施する。

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 >

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。

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。

慢性毒性試験

目的

本試験は、動物に被験物質を長期連続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、ラット等について中間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。

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、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。

同腹生子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を無作為に残す。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。

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

目的

本試験は、胎子の器官形成期に妊娠動物に被験物質を投与し、被験物質の胎子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。最低用量は胎子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

胎子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。

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

ブ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β-ナフトフラボンの併用等）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 1～2%）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 2mg/mL、2μL/mL 又は 10mM のうちいずれか低い濃度を最高用量とし、細胞増殖抑制試験を行って設定することが望ましい。

細胞毒性の指標として、細胞株については相対的細胞集団倍加（RPD）、又は相対的細胞数増加（RICC）を、初代培養リンパ球については分裂指数（MI）の相対値を用い、原則として、最高用量はこれらの指標において 50% 以上 60% 以下の細胞毒性を示す（RICC、RPD、MI が陰性対照の 50% 以下 40% 以上となる）用量に設定する。

ただし、60% を超えた細胞毒性が認められる場合であっても、染色体の観察が十分に可能であれば、その用量を最高用量とすることができる。50% 以上の細胞毒性が認められない場合は 2mg/mL、2μL/mL 又は 10mM のうちいずれか低い方を最高用量とする。50% 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300個のよく広がった分裂中期細胞（染色体数が $2n \pm 2$ ）を計数する。なお、染色体異常を有する細胞が多数観察され、被験物質が明らかに陽性と判定される場合、分析する分裂中期細胞数を減らすことができる。

また、染色体構造異常を有する細胞を計数する。染色分体型及び染色体型の異常はそれぞれ別に記録し、さらに細分類（切断、交換）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。染色体数的異常については、倍数体等の出現数を記録する。

2 - 9 結果の判定

原則として、次に掲げる全ての要件を満たすものと認められた場合に陽性と判定する。

- a) 少なくとも1つの試験濃度において、陰性対照と比較して統計学的に有意に増加していること。
- b) 適切な傾向検定において、用量依存性があること。
- c) 試験結果は、いずれも陰性対照の背景データの分布から外れていること。

明確に陽性又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

短時間処理法又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。ギャップは他の異常とは区別して記録するが、総異常頻度には含めない。倍数性や核内倍加の細胞が観察された場合はその割合（%）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及び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、処理群、陰性対照群及び陽性対照群の全てについて細胞毒性

を同時に測定、記録する。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。

（注）

細胞毒性評価のための計算式

分裂指数 (MI: Mitotic Index) :

$$MI (\%) = \frac{\text{分裂細胞の数}}{\text{計数した細胞の総数}} \times 100$$

相対的細胞数増加 (RICC: Relative Increase Cell Count) 又は相対的細胞集団倍加 (RPD: Relative Population Doubling) は、いずれも分裂した細胞集団の割合を考慮に入れたものとして用いられる。

$$RICC (\%) = \frac{(\text{処理した培養細胞における細胞数の増加 (終了時 - 開始時)})}{(\text{対照培養細胞における細胞数の増加 (終了時 - 開始時)})} \times 100$$

$$RPD (\%) = \frac{(\text{処理した培養細胞における細胞集団倍加})}{(\text{対照培養細胞における細胞集団倍加})} \times 100$$

細胞集団倍加 (PD: Population Doubling) = [log (処理後の細胞数 ÷ 処理開始時の細胞数)] ÷ log 2

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(注5)。

3 - 5 投与経路

強制経口投与を原則とする。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6)。また、毒性兆候が現れない場合の最高用量は、単回又は14日未満の反復投与については2,000mg/kg/日、14日以上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7)。適切な間隔(公比2を原則とするが、公比4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8)。連日の2回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。連日の3回以上の投与を行った場合には、最終投与後24時間以内に1回、標本作製を行う^(注9)。

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8)。連日の2回投与を行った場合には、最終投与後36~48時間の間に1回、標本作製を行う。連日の3回以上の投与を行った場合には、最終投与後40時間以内に1回、標本作製を行う^(注9)。

3 - 9 観察

観察前に、陰性対照及び陽性対照を含め、全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4,000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500個以上、末梢血を用いた場合には2,000個以上の赤血球を観察することにより求める。^{(注10)(注11)}

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12)。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

メタンスルホン酸メチル
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) 試験施設が十分な習熟度を備えていることが示され、陽性対照の背景データの範囲が確立されている場合は、同時陽性対照群の代わりに適切な陽性対照標本を使用することができる。その場合、定期的に別途実施する陽性対照実験で作成され、保存された適切な標本を含める。

(注6) 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7) 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8) 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回だけ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、骨髄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9) 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10) 標本の染色は、骨髄標本に対しては、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11) 小核を有する赤血球の測定が可能な自動化システム(フローサイトメーター等)

を用いて観察することもできる。

(注12) 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、全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。

がん原性試験

目的

本試験は、動物に被験物質をほぼ一生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。

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由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} 、 $1/2$ 、 $1/2$ 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ことを望ましい。

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ことが望ましい。

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ことが望ましい。

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らば胎仔における代謝を検討することが望ましい。

薬理学的試験

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 >

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。

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 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。

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受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週間間に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 ± 5 、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飼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。

< 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 >

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。

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

で行う。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、-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、グルタマ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(T₃及びT₄)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15) 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16) 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。

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。

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)に達している週齢とする。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、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、それに要する数の動物をあらかじめ加えておくものとする。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)

被験物質投与群は原則として 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、1000 mg/kg/day 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摂取量が 1000 mg/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

雌雄に少なくとも交配前 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少なくとも 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後 0 日とした場合、分娩後 13 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、詳細な観察を、投与期間前に1回以上、その後は少なくとも週に1回、全ての親/成熟動物について行い、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、21)

3 - 1 - 6 尿検査^(注22)

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23、24)

3 - 1 - 7 - 2 病理組織学的検査^(注25)

3 - 2 児動物^(注26、27)

3 - 2 - 1 生存児検査^(注28、29、30)

3 - 2 - 2 剖検時検査^(注31)

3 - 2 - 3 血液検査^(注32、33)

3 - 2 - 3 - 1 血液生化学的検査^(注21)

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った瀕死の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、性周期を投与前期間の 2 週間を含め交尾まで毎日観察し、記録する。膣垢を採取する際は子宮頸部の刺激による偽妊娠を引き起こさないように注意する。
- (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、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、無処置の成熟雌と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暴露する場合、雌については少なくとも妊娠 19 日まで暴露し、分娩後 4 日までに暴露を再開する。
- (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）、投与により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、形態、哺乳状態及び行動の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。観察は投与内容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 日、7 日、14 日及び 20 日、分娩後 0 日、4 日及び 13 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、適切な時期に全ての雄及び雌動物について採血する。採血前に一晩絶食することが望ましい。

(注19) 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。)について、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) 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。)について、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。

(注21) 生後13日(出生日を生後0日とする。)児動物及び成熟雄動物について血清T4濃度を測定する。関連性がある場合、母動物及び生後4日児動物についてもT4測定する。必要に応じて、他のホルモン濃度の測定を検討する。T4及びTSHなど甲状腺ホルモン測定のために、児動物の血液は同腹ごとにまとめて、総量として測定することが望ましい。甲状腺ホルモン(T3及びT4)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℃以下で保存する。

(注22) 原則として、雄及び雌(非交配群)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、pH、蛋白、糖、潜血、沈査等の尿検査を実施する。

(注23) 解剖に当たり、膣垢を採取し、全ての雌の性周期を特定し、エストロゲン感受性組織の病理組織学検査の結果との関連性を検討する。

(注24) 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。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*(子宮頸部を含む。))、

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、骨髄(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。また、必要に応じて、肛門挙筋-球海綿体筋複合体、カウパー腺及び陰茎亀頭の重量を測定する。

(注25) 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26) 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外表異常(口蓋、外部生殖器を含む。)の有無を調べる。

(注27) 生後4日に同腹児動物の匹数が雌雄各4~5匹になるように余分な児動物を無

作為に取り除いてもよい。各腹あたり雌雄各 4 ~ 5 匹に調整できない場合には、総数を 8 ~ 10 匹に調整する。体重や肛門生殖突起間距離などに基づいて児動物を選択して除去するのは適切でない。

(注 28) 出産直後又は出産後の早い時期、生後 4 日及び生後 13 日に児動物の数と性別を調べ、児体重を個別に測定する。

(注 29) 肛門生殖突起間距離を、生後 0 日から 4 日の間の同一日に測定する。測定日の体重の立方根で補正する。

(注 30) 生後 12 日又は 13 日に雄の児動物の乳頭数 / 乳輪数を算出する。

(注 31) 死亡児及び生後 13 日などに安楽死させた児動物について肉眼による外表異常(口蓋、外部生殖器を含む。)の検査をする。生後 13 日児動物について同腹の雌雄それぞれ 1 匹以上の甲状腺を保存し、必要に応じて病理組織学的検査を行う。

(注 32) 生後 4 日児動物について、同腹児動物の匹数が 8 ~ 10 匹より多い場合には、同腹ごとに可能な限り 2 匹以上を安楽死させ、採血する。同腹児動物の匹数が 8 ~ 10 匹に欠ける場合には安楽死及び採血は行わない。

(注 33) 生後 13 日に安楽死させた児動物について同腹の少なくとも 2 匹以上から採血する。

【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、順調に发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)に達している週齢とする。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 $\pm 20\%$ 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 (注6)

被験物質投与群は原則として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、1000 mg/kg/day 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摂取量が 1000 mg/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

雌雄に少なくとも交配前 14 日間投与する。雄については交配期間も含めて少なくとも 28 日間以上 (注7) とする。雌については交配期間、妊娠期間及び分娩後 13 日 (分娩完了確認日を分娩後 0 日とする。) まで、原則として連続投与する (注8、9、10)。

3 観察・検査

全ての動物について、その生死 (注11) 及び一般状態等を観察し、全ての毒性徴候を記録する (注12、13)。

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14)

3 - 1 - 3 性周期 (注4) 及び妊娠期間 (注15)

3 - 1 - 4 血液検査 (注16)

3 - 1 - 4 - 1 血液生化学的検査 (注17)

3 - 1 - 5 病理学的検査

3 - 1 - 5 - 1 肉眼的検査及び器官重量 (注18、19)

3 - 1 - 5 - 2 病理組織学的検査 (注20)

3 - 2 児動物 (注 21、22)

3 - 2 - 1 生存児検査 (注 23、24、25)

3 - 2 - 3 剖検時検査 (注 26)

3 - 2 - 1 血液検査 (注 27、28)

3 - 2 - 1 - 1 血液生化学的検査 (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った瀕死の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既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、性周期を投与前期間の 2 週間を含め交尾まで毎日観察し、記録する。膣垢を採取する際は子宮頸部の刺激による偽妊娠を引き起こさないように注意する。
- (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、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、無処置の成熟雌と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) 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 13 日までとし、剖検は分娩後 14 日とする。
- (注 9) 被験物質を吸入又は経皮暴露する場合は、雌については少なくとも妊娠 19 日まで暴露し、分娩後 4 日までに暴露を再開する。
- (注 10) 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 11) 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12) 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)、投与により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13) 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、形態、哺乳状態及び行動の異常がないかを確認する。
- (注14) 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日、7日、14日及び20日、分娩後0日、4日及び13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15) 妊娠期間について、妊娠0日から起算する。
- (注16) 剖検時や剖検の直前など、適切な時期に全ての雄及び雌動物について採血する。
- (注17) 生後13日(出生日を生後0日とする。)児動物及び成熟雄動物について血清T4濃度を測定する。関連性がある場合、母動物及び生後4日児動物についてもT4測定する。必要に応じて、他のホルモン濃度の測定を検討する。T4及びTSHなど甲状腺ホルモン測定のために、児動物の血液は同腹ごとにまとめて、総量として測定することが望ましい。甲状腺ホルモン(T3及びT4)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以下で保存する。
- (注18) 解剖に当たり、臍垢を採取し、全ての雌の性周期を特定し、エストロゲン感受性組織の病理組織学検査の結果との関連性を検討する。
- (注19) 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。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、甲状腺*、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(子宮頸部を含む。))、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。

また、必要に応じて、肛門挙筋-球海綿体筋複合体、カウパー腺及び陰茎亀頭の重量を測定する。

- (注20) 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21) 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外表異常（口蓋、外部生殖器を含む。）の有無を調べる。

（注 2 2）生後 4 日に同腹児動物の匹数が雌雄各 4 ～ 5 匹になるように余分な児動物を無作為に取り除いてもよい。各腹あたり雌雄各 4 ～ 5 匹に調整できない場合には、総数を 8 ～ 10 匹に調整する。体重や肛門生殖突起間距離などに基づいて児動物を選択して除去するのは適切でない。

（注 2 3）出産直後又は出産後の早い時期、生後 4 日及び生後 13 日に児動物の数と性別を調べ、児体重を個別に測定する。

（注 2 4）肛門生殖突起間距離を、生後 0 日から 4 日の間の同一日に測定する。測定日の体重の立方根で補正する。

（注 2 5）生後 12 日又は 13 日に雄の児動物の乳頭数 / 乳輪数を算出する。

（注 2 6）死亡児及び生後 13 日などに安楽死させた児動物について肉眼による外表異常（口蓋、外部生殖器を含む。）の検査をする。生後 13 日児動物について同腹の雌雄それぞれ 1 匹以上の甲状腺を保存し、必要に応じて病理組織学的検査を行う。

（注 2 7）生後 4 日児動物について、同腹児動物の匹数が 8 ～ 10 匹より多い場合には、同腹ごとに可能な限り 2 匹以上を安楽死させ、採血する。同腹児動物の匹数が 8 ～ 10 匹に欠ける場合には安楽死及び採血は行わない。

（注 2 8）生後 13 日に安楽死させた児動物について同腹の少なくとも 2 匹以上から採血する。

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 - 1 1 結果のまとめ

試験の結果は様式 7 によりまとめる。

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を作製する。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 β -ナフトフラボンの併用等）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 1~2 %）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に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 2mg/mL、2 μ L/mL 又は 10mM のうちいずれか低い濃度を最高用量とし、細胞増殖抑制試験を行って設定することが望ましい。

細胞毒性の指標として、細胞株については相対的細胞集団倍加（RPD）、又は相対的細胞数増加（RICC）を、初代培養リンパ球については分裂指数（MI）の相対値を用い、原則として、最高用量はこれらの指標において 50% 以上 60% 以下の細胞毒性を示す（RICC、RPD、MI が陰性対照の 50% 以下 40% 以上となる）用量に設定する。

ただし、60%を超えた細胞毒性が認められる場合であっても、染色体の観察が十分に可能であれば、その用量を最高用量とすることができる。50%以上の細胞毒性が認められない場合は2mg/mL、2 μ L/mL又は10mMのうちいずれか低い方を最高用量とする。50%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300個のよく広がった分裂中期細胞（染色体数がモード \pm 2）を計数する。なお、染色体異常を有する細胞が多数観察され、被験物質が明らかに陽性と判定される場合、分析する分裂中期細胞数を減らすことができる。

また、染色体構造異常を有する細胞を計数する。染色分体型及び染色体型の異常はそれぞれ別に記録し、さらに細分類（切断、交換）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。染色体数的異常については、倍数体等の出現数を記録する。

2 - 9 結果の判定

原則として、次に掲げるすべての要件を満たすものと認められた場合に陽性と判定する。

a) 少なくとも1つの試験濃度において、陰性対照と比較して統計学的に有意に増加していること。

b) 適切な傾向検定において、用量依存性があること。

c) 試験結果は、いずれも陰性対照の背景データの分布から外れていること。

明確に陽性又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

短時間処理法又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。ギャップは他の異常とは区別して記録するが、総異常頻度には含めない。倍数性や核内倍加の細胞が観察された場合はその割合（%）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及び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、処理群、陰性対照群及び陽性対照群のすべてについて細胞毒性を同時に測定、記録する。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 - 1 1 結果のまとめ

試験の結果は様式 8 によりまとめる。

(注)

細胞毒性評価のための計算式

分裂指数 (MI: Mitotic Index) :

$$\text{MI}(\%) = \frac{\text{分裂細胞の数}}{\text{計数した細胞の総数}} \times 100$$

相対的細胞数増加 (RICC: Relative Increase Cell Count) 又は相対的細胞集団倍加

(RPD: Relative Population Doubling) は、いずれも分裂した細胞集団の割合を考慮に入れたものとして用いられる。

$$\text{RICC}(\%) = \frac{\text{(処理した培養細胞における細胞数の増加 (終了時 - 開始時))}}{\text{(対照培養細胞における細胞数の増加 (終了時 - 開始時))}} \times 100$$

$$\text{RPD}(\%) = \frac{\text{(処理した培養細胞における細胞集団倍加)}}{\text{(対照培養細胞における細胞集団倍加)}} \times 100$$

細胞集団倍加 (PD: Population Doubling) = $[\log(\text{処理後の細胞数} \div \text{処理開始時の細胞数})] \div \log 2$

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 L5178Y 細胞を用いて、被験物質のチミジンキナーゼ遺伝子 (TK) 遺伝子における突然変異誘発性の有無を検索する^(注1)。

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、TK 遺伝子自然突然変異頻度、核型などを調べておく^(注2)。

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による場合及びよらない場合について試験を実施する。短時間処理法の結果が陰性の場合には、代謝活性化によらない場合について 24 時間処理法による試験を実施する。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等) 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 1~2%)

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。

3 - 5 用量段階

適切な間隔 (原則として公比 2) 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。最高用量が細胞毒性に基づく場合、最高用量は、相対総増殖率 (Relative Total Growth; RTG) が 10 ~ 20% になるよう設定する (注³)。80% 以上の細胞毒性が認められない場合の最高用量は、2 mg/mL、2 µL/mL 又は 10 mM のうちいずれか低い濃度とすることができる。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。

3 - 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突然変異誘発物質による処理群を設ける (注⁴)。

3 - 7 処理系列数

2 系列の培養を使用するのが望ましいが、試験する各濃度で複数系列または 1 系列の培養を使用することも可能である (注⁵)。

3 - 8 コロニーの観察及び特徴づけ

コロニーの観察は肉眼、顕微鏡又は適当な器具を用いて行う。LC 変異体コロニーを含むウェル、SC 変異体コロニーを含むウェル、両タイプのコロニーを含むウェルを分けてカウントする。コロニーの区別に関する基準は以下の通りである。

1) LC 変異体コロニー

大きさ：ウェルの直径の 1/4 を越えるもの

形態：一層になって広がっているもの

2) SC 変異体コロニー

大きさ：ウェルの直径の 1/4 以下のもの

形態：塊状にコンパクトとなっているもの

基本的には、大きさを判断し、それで判断が難しい場合は形態的違いを考慮する。

3 - 9 細胞毒性及び突然変異の検出

十分な数の細胞を被験物質で処理し、細胞を洗浄、新鮮培地に移し、約 48 時間培養を行う (突然変異発現期間)。突然変異発現期間の相対浮遊細胞増殖率 (Relative Suspension Growth; RSG) を記録する。その後、細胞を 96 ウェルプレートにトリフルオロチミジン (TFT) 存在下で、2,000 細胞/well の濃度で播種する (変異体選択プレート)。同時に

TFT を含まない平板効率測定用の 96 ウェルプレート (1.6 細胞/well) を作製する (平板効率プレート)。細胞を播種した 96 ウェルプレートで 10~14 日間細胞を培養後、変異体選択プレートと平板効率プレートのコロニーを含むウェルの数を数え、記録する。これらの値から、ポアソン分布の計算式に従い、遺伝子突然変異頻度、平板効率を求める。

3 - 1 0 結果の判定

陽性又は陰性の判定には、増加した突然変異頻度に生物学的妥当性があることを保証する方法として、他の試験に一般的に使用される統計解析の代わりに、事前に定義された誘発突然変異頻度 (総合的評価ファクター (Global Evaluation Factor; GEF)) を利用する。マイクロウェル法の GEF は 126×10^{-6} である。すべての被験物質処理群において、誘発突然変異頻度 (陰性対照群に対する増加分) が GEF を超えていない場合、被験物質は原則として陰性であると判定される。いくつかの被験物質処理群の誘発突然変異頻度が GEF を超えており、かつ、その増加が濃度依存性である (例: 傾向検定を使用) 場合、被験物質は陽性であると判定される。明確に陽性又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ことが望ましい。

3 - 1 1 結果の表示

被験物質処理群、陰性対照群及び陽性対照群の全てについて、以下の事項を記録する。毒性を同時に測定、記録する。

- ・変異体選択プレートの LC 変異体コロニーを含むウェル数、SC 変異体コロニーを含むウェル数、両タイプのコロニーを含むウェル数。平板効率プレートのコロニーを含むウェル数
- ・これらの値から算出された総突然変異頻度 (MF) ($\times 10^{-6}$) と SC 変異体の割合 (%) (注 6、7)
- ・被験物質処理前の細胞数及び細胞濃度、処理後の細胞数及び細胞濃度、発現期間における細胞の増殖率
- ・これらの値から算出された相対浮遊細胞増殖率 (RSG) と相対総増殖率 (RTG)

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。また、バクテリア、カビ等のコンタミが認められたウェルは観察対象からはずし、その数の分は総ウェル数から引いて計算する。

(注 1) 本試験では細胞増殖速度の異なる 2 種類の変異体 (large colony (LC) 変異体、small colony (SC) 変異体) が出現する。SC 変異体は染色体レベルの大きなゲノム変化に起因すると考えられているので、突然変異誘発性が見られた場合は、SC 変異体の割合を記録する。

(注 2) 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。核型の代わりに染色体モード数を調べることでよい。

(注3) 細胞毒性計算式

細胞毒性は、2日間の突然変異発現期間中の相対浮遊細胞増殖率(RSG)と、突然変異体選択時に得られる相対平板効率(RCE)を含む相対総増殖率(RTG)と定義される。RTG、RSG、およびRCEはすべて割合(%)で表す。

RSGの算出：浮遊細胞増殖比1(SG1)は、0日目から1日目の増殖比(1日目の細胞濃度/0日目の細胞濃度)で、浮遊細胞増殖比2(SG2)は1日目から2日目の増殖比(2日目の細胞濃度/1日目の細胞濃度)である。RSGは陰性対照に対する処理培養の総SG(SG1 × SG2)である。つまり、

$$RSG = [SG1(\text{処理群}) \times SG2(\text{処理群})] / [SG1(\text{陰性対照群}) \times SG2(\text{陰性対照群})]$$
となる。SG1は、試験開始時に使用される開始時の細胞濃度から算出する。細胞処理中の試験培養で発生する細胞毒性はすべて含める。ただし、細胞の遠心、洗浄の過程で細胞を消失することがあるので、その前後で細胞数を計測し、操作による細胞の消失を補正することが望ましい。

相対平板効率(RCE)は、突然変異体選択時の平板効率で得られる処理培養/陰性対照の相対平板効率である(注7参照)。相対総増殖率(RTG)はRSGとRCEの積から求めることができる。

相対総増殖率(RTG)： $RTG = RSG \times RCE$

(注4) 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5) 原則として、陰性対照群に関しては1系列あたり、平板効率プレート2枚、変異体選択プレート4枚、被験物質の各用量群、及び陽性対照群については、平板効率プレート1枚、突然変異プレート2枚を用いる。

(注6) 突然変異頻度の計算式

96ウェルプレートのコロニー形成率はポアソン分布のゼロ項から、Pは次式で求められる。

$$P = -\ln(E_w / T_w)$$

E_w : Empty Well (コロニーを含まないウェル数)

T_w : Total Well (総ウェル数)

i. 変異体選択プレート

$$CE_M = -\ln(EW_M / TW_M) / N_M$$

・ EW_M : 変異体選択プレートのコロニーを含まないウェル数

・ TW_M : 変異体選択プレートの総ウェル数

・ N_M : 変異体選択プレートの1ウェルあたりの平均播種細胞数(2000個)

ii. 平板効率マイクロウェルプレート

$$CE_v = -\ln(EW_v / TW_v) / N_v$$

- ・ EW_v : 平板効率プレートのコロニーを含まないウェル数
- ・ TW_v : 平板効率プレートの総ウェル数
- ・ N_v : 平板効率プレートの1ウェルあたりの平均播種細胞数 (1.6個)

iii. 突然変異頻度 (MF)

$$MF = CE_M / CE_v$$

(注7) SC 変異体の割合 (%SC) の計算式

$$\%SC = (\text{SC 変異体コロニーを含むウェル数} + \text{両タイプのコロニーを含むウェル数}) / (\text{全てのコロニーを含むウェル数})$$

< 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 >

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。

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。

3 その他

- ・ 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 ACUTE FISH TOXICITY OECD, 2010（以下「OECD, 2010」という。）。）
- ・ 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。
- ・ 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。
- ・ (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。
- ・ 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。
- ・ 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。

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。

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4cm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()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、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 の範囲内で設定し、培養器又は培養室内の変動は ± 2 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_{i-j} = 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_r)との間の差として次のように計算する。

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

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。

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、 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 の範囲内に設定し、各試験容器間の変動は ± 1.0 以内とする。
- ・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 μ 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（微量成分）と飼育水原液（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。

飼育水原液 の調製

各物質の飼育水原液 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（ ）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（ ）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 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 混合液」とする。

表1 飼育水原液 の構成物質と添加量等

飼育水原液 (単物質)	水に添加する量 (単位： mg/L)	飼育水原液 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 () 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 () 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 の最終的な希釈率

飼育水原液 の調製

飼育水原液 混合液を除く各物質の飼育水原液 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。

各飼育水の調製

各飼育水は、各物質の飼育水原液 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 の構成物質と添加量等 (Elendt M4 及び M7 共通)

飼育水原液 (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 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 の最終的な希釈率

付表 2 試験用水の化学的條件

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

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、外見上の奇形があってはならない。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 ()	塩分濃度 (‰)	硬度 (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	<0.2	40-250 <180 を推奨	1.0-2.0
<i>Pimephales promelas</i> ファットヘッドミノー	21-25	<0.2	40-250 <180 を推奨	1.0-3.0
<i>Cyprinus carpio</i> コイ	20-24	<0.2	40-250 <180 を推奨	2.0-4.0
<i>Oryzias latipes</i> メダカ（ミナミメダカ）	23-27	<0.2	40-250 <180 を推奨	1.0-2.0
<i>Poecilia reticulata</i> グッピー	21-25	<0.2	40-250 <180 を推奨	1.0-2.0
<i>Lepomis macrochirus</i> ブルーギル	21-25	<0.2	40-250 <180 を推奨	1.0-3.0
<i>Oncorhynchus mykiss</i> ニジマス	10-14	<0.2	40-250 <180 を推奨	3.0-6.0
<i>Gasterosteus aculeatus</i> イトヨ	13-19	0-35	40-7,500	1.0-2.0
<i>Cyprinodon variegatus</i> シープヘッドミノー	23-27	15-35	3,000-7,500	1.0-2.0
<i>Dicentrarchus labrax</i> ヨーロッパアンシーバス	18-22	15-35	3,000-7,500	4.0-8.0
<i>Pagrus major</i> マダイ	18-22	30-35	5,000-7,500	2.0-4.0

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。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、以下の器具又は装置を適切に用いる。

- ・酸素濃度計
- ・pH 計
- ・照度計
- ・水の硬度を測定する装置
- ・適切な温度制御を行う装置
- ・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
- ・試験溶液中の被験物質濃度を測定する装置
- ・溶存酸素濃度を維持する装置

3 試験用水

淡水魚の場合、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。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。全硬度は炭酸カルシウム濃度で付表 1 に記載した範囲、pH は 6.0 ~ 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 µS/cm を超えてはならない。天然水を使用する場合には、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。

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。

付表 2 試験水の水質

パラメーター	最大濃度
SS	5 mg/L
全有機炭素（TOC）	2 mg/L
非イオン化アンモニア（NH ₃ ）	1 µg/L
硝酸イオン（NO ₃ ⁻ ）	<9 mg/L
残留塩素	10 µg/L
全有機リン系農薬	50 ng/L
全有機塩素系農薬 + PCB	50 ng/L
全有機塩素	25 ng/L
アルミニウム（Al）	1 µg/L
ヒ素（As）	1 µg/L
クロム（Cr）	1 µg/L
コバルト（Co）	1 µg/L
銅（Cu）	1 µg/L
鉄（Fe）	1 µg/L
鉛（Pb）	1 µg/L
ニッケル（Ni）	1 µg/L
亜鉛（Zn）	1 µg/L

カドミウム (Cd)	100 ng/L
水銀 (Hg)	100 ng/L
銀 (Ag)	100 ng/L
化学的酸素要求量 (COD)	5 mg/L

4 じゅん化

全ての供試魚を、少なくとも試験に使用する 9 日前に入手し、じゅん化しなければならない。48 時間の新たな生育環境への移行期間に続いて、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、新たな生育環境への移行期間以降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 (付表 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 24～48 時間前まで、3 回/週又は毎日給餌する。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。

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。2 回目のじゅん化期間の死亡率が 5% 以上の場合は、そのバッチは試験に使用しない。
- ・じゅん化期間中の連続した 7 日間で全体の死亡率が 5% 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、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。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。

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ないことが望ましい。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 対照区

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、 ± 2 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 $10-20 \mu E/m^2/s$ 、540-1000 lux 又は 50-100 ft^c (実験室レベル) でなければならない。
- ・ 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大丈夫を行ってもよい。
- ・ 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 観察

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 2 回 / 日魚の様子を観察する (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。) 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。また付表3に記述された異常が観察された場合は記録しておく。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。

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	バランス喪失	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
	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・嗜眠	自発運動の低下、刺激への反応が鈍った状態、嗜眠状態
	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
	異常な遊泳方法	背泳、スパイラル(らせん運動)、コークスクリュー(ドリル状の回転運動)遊泳 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ビクツとした動き
	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
	密集	密な状態で集団を形成
呼吸機能異常	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 - 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、全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、塩分濃度は少なくとも毎日1回測定する。また、硬度(安定性が実証さ

れない場合)及び TOC は希釈水での暴露開始時に測定する。

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、LC₅₀ がその濃度より大きいことを示すことができる。限度試験には少なくとも 7 尾を用い、対照区においても同数を用いる。目視可能な異常が確認された場合は記録する。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。

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 ±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、暴露期間 96 時間における LC₅₀ 及び 95% 信頼限界を算出する。さらに、各観察時毎の LC₅₀ 及び 95% 信頼限界を算出することが望ましい。

得られたデータが 100% あるいは 0% 死亡のみを示す場合は、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 LC₅₀ 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 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。

脱イオン水の電導度は 10 µS/cm を越えてはならない。全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。

1. 一般的事項

新規化学物質等の名称 (IUPAC 命名法による)			
別 名			
C A S 番 号			
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合は、その製法の概要)			
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 化学物質のロット番号			
不 純 物 の 名 称 及 び 含 有 率			
蒸 気 圧			
対 水 溶 解 度			
1-オクタノール/水分配係数			
融 点			
沸 点			
常 温 に お け る 性 状			
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、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. 試験方法

試 験 方 法	
暴 露 期 間 (日)	
汚 泥 の 種 類	
被 験 物 質 濃 度	
汚泥の懸濁物質濃度	
基 準 物 質	
p H 調 整	有 ・ 無

3. 試験結果

(1) BODチャート

*別添としても良い。

(2) BOD測定結果

試験容器	測定日	BOD (mg)			
		7日目	14日目	21日目	28日目
(水 + 被験物質)系		*1	*1	*1	*1
(汚泥 + 被験物質)系	No.1				
	No.2				
	No.3	*2	*2	*2	*2
(汚泥 + 基準物質)系					
汚泥ブランク系	No.1				
	No.2	*3	*3	*3	*3

*1: 301F相当の試験において、実施していない場合は、記載不要

*2: 301F相当の試験において、試験容器2個で実施した場合は、記載不要

*3: 301C相当の試験の場合は、記載不要

< 301F相当の試験において、微生物への阻害性がある被験物質に対して低濃度における分解性を確認する場合 >

試験容器	測定日	BOD (mg)			
		7日目	14日目	21日目	28日目
(汚泥 + 被験物質)系	No.1				
	No.2				
(汚泥 + 被験物質 + 基準物質)系					

< 301F相当の試験において、難水溶性物質に対して補助物質を使用する場合 >

試験容器	測定日	BOD (mg)			
		7日目	14日目	21日目	28日目
(汚泥 + 被験物質 + 補助物質)系 補助物質 () 補助物質濃度 ()	No.1				
	No.2				
(汚泥 + 基準物質 + 補助物質)系 補助物質 () 補助物質濃度 ()					
(汚泥 + 補助物質)系 補助物質 () 補助物質濃度 ()	No.1				
	No.2				

(3)測定結果 (28日後の値)

測定項目		(汚泥 + 被験物質)系			(水 + 被験物質)系	仕込み理論量
		No.1	No.2	No.3		
BOD *1	mg			*3	*4	
DOC *1	mg			*3	*4	
被験物質残留量 及び残留率 (分析機器名称)	mg			*3	*4	
	%			*3	*4	
変化物生成量 及び生成率 *2 (分析機器名称)	mg	*2	*2	*2, *3	*2, *4	*2
	%	*2	*2	*2, *3	*2, *4	*2
物質収支 (+)	%			*3	*4	

*1: (汚泥 + 被験物質)系は汚泥ブランク系の値を差し引いて表示する

*2: 変化物が生成した場合に記入する

*3: 301F相当の試験において、試験容器2個で実施した場合は、記載不要

*4: 301F相当の試験において、実施していない場合は、記載不要

< 301F相当の試験において、微生物への阻害性がある被験物質に対して低濃度における分解性を確認する場合 >

測定項目		(汚泥 + 被験物質)系		(汚泥 + 被験物質 + 基準物質)系	仕込み理論量
		No.1	No.2		
BOD *1	mg				
DOC *1	mg				
被験物質残留量 及び残留率 (分析機器名称)	mg				
	%				
変化物生成量 及び生成率 *2 (分析機器名称)	mg	*2	*2	*2	*2
	%	*2	*2	*2	
物質収支 (+)	%				

*1: (汚泥 + 被験物質)系及び(汚泥 + 被験物質 + 基準物質)系は、汚泥ブランク系の値を差し引いて表示する

*2: 変化物が生成した場合に記入する

< 301F相当の試験において、難水溶性物質に対して補助物質を使用する場合 >

測定項目		(汚泥+被験物質+補助物質)系		(汚泥+基準物質+補助物質)系	仕込み理論量
		No.1	No.2		
BOD *1	mg				
被験物質残留量 及び残留率 (分析機器名称)	mg				
	%				
変化物生成量 及び生成率 *2 (分析機器名称)	mg	*2	*2	*2	*2
	%	*2	*2	*2	
物質収支 (+)	%				

*1: (汚泥+被験物質+補助物質)系及び(汚泥+基準物質+補助物質)系は、(汚泥+補助物質)系の値を差し引いて表示する

*2: 変化物が生成した場合に記入する

(4)分解度

		(汚泥+被験物質)系			平均値
		No.1	No.2	No.3	
BOD分解度	%			*1	
DOC分解度	%			*1	
被験物質分解度	%			*1	

*1: 301F相当の試験において、試験容器2個で実施した場合は、記載不要

< 301F相当の試験において、微生物への阻害性がある被験物質に対して低濃度における分解性を確認する場合 >

		(汚泥+被験物質)系		平均値
		No.1	No.2	
BOD分解度	%			
DOC分解度	%			
被験物質分解度	%			

< 301F相当の試験において、難水溶性物質に対して補助物質を使用する場合 >

		(汚泥+被験物質+補助物質)系		平均値
		No.1	No.2	
BOD分解度	%			
被験物質分解度	%			

4. 回収率(平均値)

(水+被験物質)系回収率	%	*1
(汚泥+被験物質)系回収率	%	

*1: 301F相当の試験において、実施していない場合は、記載不要

< 301F相当の試験において、微生物への阻害性がある被験物質に対して低濃度における分解性を確認する場合 >

(汚泥+被験物質)系回収率	%	
---------------	---	--

< 301F相当の試験において、難水溶性物質に対して補助物質を使用する場合 >

(汚泥+被験物質+補助物質)系回収率	%	
--------------------	---	--

5. 考察

* 可能な限り、本試験結果の考察（本被験物質の生分解性について）を記載してください。
 * 特に変化物を生じた場合には物質収支等について記載してください。
 * 301F相当の試験において、微生物への阻害性がある被験物質に対して低濃度における分解性を確認する場合又は難水溶性物質に対して補助物質を使用する場合は、その妥当性について記載してください。

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。

濃縮度試験結果報告書（水暴露法、簡易水暴露法）

1. 一般的事項

新規化学物質等の名称 (IUPAC 命名法による)			
別 名			
C A S 番 号			
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合 は、その製法の概要)			
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 化学物質のロット番号			
不 純 物 の 名 称 及 び 含 有 率			
蒸 気 圧			
対 水 溶 解 度 又は対試験水溶解度	(測定法 :)		
1-オクタノール/水分配係数			
融 点			
沸 点			
常温における性状			
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]

1. 物理化学的性状は、可能な限り記入すること。
2. 「蒸気圧」の欄には、被験物質の蒸気圧を記入すること。
3. 「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。
4. 「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。
5. 「対水溶解度又は対試験水溶解度」の欄にその測定法を記入すること。また、1濃度区での水暴露法を適用する場合には、対試験水溶解度報告書を、簡易水暴露法を適用する場合には、対水溶解度報告書をそれぞれ添付すること。

2. 急性毒性試験

供試魚（学名）		
LC ₅₀ 又はNOEC	LC ₅₀ （ hr ）・NOEC	
助剤の使用	有 ・ 無	
助剤を使用した場合の名称及び濃度	名 称	濃度（mg/L）

[備考]

1. LC₅₀又はNOECのいずれかにまるを付し、その値を記入すること。

3. 試験方法

試験方法		
供試魚（学名）		
脂 質 含 量 （ % ）	取込期間開始時：	
	取込期間終了時： 排泄期間終了時（実施した場合）：	
魚 体 重 （ g ）	取込期間開始時：	
	取込期間終了時： 排泄期間終了時（実施した場合）：	
被験物質設定濃度 （mg/L）	第一濃度区	
	第二濃度区	
助剤の使用	有 ・ 無	
助剤を使用した場合の名称及び濃度	名 称	濃 度（μg/L）
		第一濃度区：
		第二濃度区：
		第一濃度区：
		第二濃度区：

[備考]

1. 「試験方法」の欄には、用いた試験の種類（水暴露法・簡易水暴露法）を記入すること。
2. 1濃度区での水暴露法及び簡易水暴露法を適用する場合には、第二濃度区の欄に斜線を引くこと。

4. 試験結果

(1)濃縮度試験の結果表

	取 込 期 間	日	日	日	日	日
第 一 濃 度 区	水中の被験物質濃度(単位)					
	魚体中の被験物質濃度(単位)					
	B C F					
第 二 濃 度 区	水中の被験物質濃度(単位)					
	魚体中の被験物質濃度(単位)					
	B C F					

[備 考]

1 濃度区での水暴露法及び簡易水暴露法を適用する場合には、該当しない欄に斜線を引くこと。

(2)定常状態又は速度論による B C F

		濃 縮 倍 率	
		第 一 濃 度 区	第 二 濃 度 区
水暴露法	$BCF_{SS} \cdot BCF$		
	BCF_{SSL}		
	BCF_K		
	BCF_{Kg}		
	BCF_{KL}		
	BCF_{KgL}		
簡易水暴露法	minimised BCF_{SS}		
	BCF_{Kn}		
定常状態の確認方法		個別分析・まとめて分析	個別分析・まとめて分析

[備 考]

- 1 . 定常状態の確認方法として、魚体分析は、個別分析又はまとめて分析のいずれかにまるを付すこと。
- 2 . $BCF_{SS} \cdot BCF$ のほか、 BCF_{SSL} 、 BCF_K 、 BCF_{Kg} 、 BCF_{KL} 、 BCF_{KgL} の値がある場合は記入すること。
- 3 . 適用した試験方法を踏まえ、該当しない欄に斜線を引くこと。

(3)部位別のBCF及び半減期

部 位	第 一 濃 度 区	第 二 濃 度 区
頭 部		
内 臓		
外 皮		
可 食 部		

	第 一 濃 度 区	第 二 濃 度 区
排泄試験における半減期(日)		

[備 考]

BCFが1,000倍以上かつ5,000倍未満の場合は、(2)定常状態又は速度論によるBCFと併せて、必ず部位別のBCF及び排泄試験における半減期も記入すること。

5. 試験水及び魚体分析方法

(1)試験水及び魚体分析フロー（手順について簡潔に記載してください。）

--

(2)使用した分析機器の種類とその条件

--

6. 回収率（平均値）

水からの回収率	(%)	
魚体からの回収率	(%)	

7. 考察

*可能な限り、本試験結果の考察（本被験物質の蓄積性について）を記載してください。

8. 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。

1. 一般的事項

新規化学物質等の名称 (IUPAC 命名法による)			
別 名			
C A S 番 号			
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合は、その製法の概要)			
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 化学物質のロット番号			
不 純 物 の 名 称 及 び 含 有 率			
蒸 気 圧			
対 水 溶 解 度	(測定法 :)		
1-オクタノール/水分配係数			
融 点			
沸 点			
常 温 に お け る 性 状			
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]

1. 物理化学的性状は、可能な限り記入すること。
2. 「蒸気圧」の欄には、被験物質の蒸気圧を記入すること。
3. 「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。
4. 「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。
5. 「対水溶解度」の欄にその測定法を記入すること。

2. 試験方法

試験方法		
供試魚（学名）		
供試魚の脂質含量（％）	取込期間開始時： 取込期間終了時： 排泄期間終了時：	
餌料		
被験物質の設定濃度		
餌料の脂質含量（％）	取込期間開始時： 取込期間終了時：	
使用した有機溶剤 又はオイルの名称 及び濃度	名 称	濃 度 (単位)
給 餌 量 (g 餌料/g 魚/日)		
基 準 物 質		

3. 試験結果

(1) 濃縮度試験の実測結果

		取込期間 開始時	取込期間 終了時	排泄期間					
		日	日	日	日	日	日	日	
被験物質	試験餌料中濃度 (mg/kg)			/	/	/	/	/	/
	魚 体 中 濃 度 (mg/kg)								
	魚 体 重 (g)								
基準物質 (試験区)	試験餌料中濃度 (mg/kg)			/	/	/	/	/	/
	魚 体 中 濃 度 (mg/kg)								
	魚 体 重 (g)								
基準物質 (対照区)	試験餌料中濃度 (mg/kg)			/	/	/	/	/	/
	魚 体 中 濃 度 (mg/kg)								
	魚 体 重 (g)								

[備 考]

1. 該当しない欄に斜線を引くこと。

(2) 経口生物濃縮係数

	被験物質	基準物質（試験区）	基準物質（対照区）
BMF			
BMF _L			

BMF _K			
BMF _{Kg}			
BMF _{KL}			
BMF _{KgL}			

[備考]

1. 該当しない欄に斜線を引くこと。

(3) 部位別試験のBMF

部位	被験物質	基準物質
頭部		
内臓		
外皮		
消化管		
可食部		

[備考]

1. 該当しない欄に斜線を引くこと。

4. 餌料及び魚体分析方法

(1) 餌料及び魚体分析フロー（手順について簡潔に記載してください。）

(2) 使用した分析機器の種類とその条件

5. 回収率 (平均値)

餌料からの回収率	(%)	
魚体からの回収率	(%)	

6. 考察

*可能な限り、本試験結果の考察(本被験物質の蓄積性について)を記載してください。

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。

[様式 3]

1 - オクタノールと水との間の分配係数測定試験結果報告書

1 . 一般的事項

新規化学物質等の名称 (IUPAC命名法による)			
別 名			
C A S 番 号			
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合 は、その製法の概要)			
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 化学物質のロット番号			
不 純 物 の 名 称 及 び 含 有 率			
蒸 気 圧			
対 水 溶 解 度			
1-オクタノール/水分配係数			
融 点			
沸 点			
常 温 に お け る 性 状			
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、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. 試験方法等

試験方法	OECDテストガイドライン107に定められた方法	OECDテストガイドライン117に定められた方法
解離定数	pKa ₁ = pKa ₂ =	pKa ₁ = pKa ₂ =
酸・塩基の区別		
温度()		
溶離液の名称及び組成		

[備考] 「溶離液の名称及び組成」の欄には、緩衝液を使用した場合は緩衝液の種類及びpHも記入すること。

3. 試験結果

3-1 OECDテストガイドライン107に定められた方法

(1) 分配係数測定結果

		Pow = Co/Cw				log Pow				
		測定値	平均値	全平均	標準偏差	測定値	平均値	全平均	標準偏差	最大差
測定条件 - 1	a									
	b									
測定条件 - 2	a									
	b									
測定条件 - 3	a									
	b									

(2) 水層のpH測定結果

		測定値	
			平均値
使用した水			
測定条件 - 1	a		
	b		
測定条件 - 2	a		
	b		
測定条件 - 3	a		
	b		

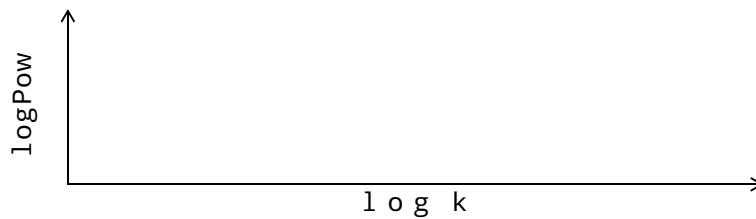
3 - 2 OECDテストガイドライン117に定められた方法

(1)測定結果

	測定物質名称	t_R	k	log k	logPow
標準物質	(デッドタイム測定用: t_0)		-	-	-
			-	-	
被験物質					

t_0 : Dead time(デッドタイム)(min)
 t_R : Retention time(保持時間)(min)
 k (保持係数) = $(t_R - t_0) / t_0$

(2)相関図及び回帰式(相関係数を含む)



[備考] 標準物質及び被験物質についてプロットすること。

(3)被験物質の分配係数

log Pow	
実 測 値	平 均 値

4. 考察

5. 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。

[様式 4]

哺乳類を用いる28日間の反復投与毒性試験結果報告書

1 . - 般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC命名法による)			
別名			
CAS番号			
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合はその製法の概要)			
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ロット番号			
不純物の名称及び含有率			
蒸気圧			
対水溶解度			
1-オクタノール/水分配係数			
融点			
沸点			
常温における性状			
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

2 . 急性毒性試験又は反復投与予備試験等

試験 No.	試験の種類及び期間	動物種	1群当たりの動物数	投与経路	投与量 (mg/kg)	概略の致死量又はNOAEL* (mg/kg)	実験場所

*NOAEL : No-Observed- Adverse- Effect-Level

3 . 28日間反復投与毒性試験

被験物質投与期間			年 月 日より 年 月 日											
使用動物種・系統			1群当たりの動物数											
投与経路 (経口投与の溶媒)			投与群 雄		匹		回復群 雄		匹		回復群 雌		匹	
被験物質 の純度 ** . %	投与 量	mg/kg	投与期				回復期							
			対照群 0	低用量群 *	中用量群 **	高用量群 ***	対照群 0	高用量群 ***						
死亡														
体重変化														
摂餌量														
一般状態														
機能検査所見														
尿所見														
血液学的所見														
血液生化学的 所 見														
血中ホルモン 所 見														
肉眼的所見														
器官重量 (絶対重量)														
器官重量 (相対重量)														
病理組織学的 所 見														
性周期														
その他														
NOAEL (mg/kg)		mg/kg/day												
NOAELの推定根拠とした 変化														
[備考]														

4. その他

試験実施施設	名称	
	所在地	
試験責任者	職氏名	
	経験年数	
試験番号		
試験期間		

本様式の作成責任者	所属	
	氏名	

[様式 5]

哺乳類を用いる反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験結果報告書

1 . - 般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC命名法による)			
別名			
CAS番号			
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合はその製法の概要)			
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ロット番号			
不純物の名称及び含有率			
蒸気圧			
対水溶解度			
1-オクタノール/水分配係数			
融点			
沸点			
常温における性状			
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

2 . 急性毒性試験又は反復投与予備試験等

試験 No.	試験の種類 及び期間	動物種	1群当たり の動物数	投与 経路	投与量 (mg/kg)	概略の致死量 又はNOAEL* (mg/kg)	実験場所

*NOAEL : No-Observed- Adverse- Effect-Level

3. 反復投与毒性に係る結果

被験物質投与期間		年月日より		年月日						
使用動物種・系統		1群当たりの動物数								
投与経路 (経口投与の溶媒)		投与群		雄		雌				
				匹		匹				
被験物質の純度 **.*%		投与量 mg/kg	投与期				回復期			
			対照群 0	低用量群 *	中用量群 **	高用量群 ***	非交配群 対照群 高用量群 0 ***	対照群 0	高用量群 ***	
死亡										
体重変化										
摂餌量										
一般状態										
機能検査所見										
尿所見										
血液学的所見										
血液生化学的所見										
血中ホルモン所見										
肉眼的所見										
器官重量(絶対重量)										
器官重量(相対重量)										
病理組織学的所見										
その他										
NOAEL(mg/kg)		mg/kg/day								
NOAELの推定根拠とした変化										
[備考]										

4. 生殖発生毒性に係る結果

被験物質投与期間		年 月 日より 年 月 日					
使用動物種・系統		1群当たりの動物数					
投与経路 (経口投与の溶媒)		投与群		雄 匹		雌 匹	
被験物質 の純度 **.*%	投与 量	mg/kg	投与期				
			対照群 0	低用量群 *	中用量群 **	高用量群 ***	
性周期							
妊娠期間							
交尾率							
着床率							
受胎率							
出産率							
生存率	(生後0日)						
	(生後4日)						
	(生後13日)						
性比	(生後0日)						
児動物体重	(生後0日)						
	(生後4日)						
	(生後13日)						
外表異常							
肛門生殖突起間 距離							
乳頭数 / 乳輪数							
児動物 血中ホルモン 所見							
児動物 病理組織学的 所 見							
その他							
NOAEL(mg/kg)	mg/kg/day						
NOAELの推定根拠とした 変化							
[備考]							

交尾率[Copulation Index] : (交尾成立動物数 / 交配動物数) X 100

受胎率[Fertility Index] : (妊娠雌動物数 / 交尾雌動物数) X 100

出産率[Delivery Index] : (生存児出産雌数 / 妊娠雌数) X 100

生後0日生存率[Viability Index on Day 0] : (生後0日生存児数 / 出産児数) X 100

生後4日生存率[Viability Index on Day 4] : (生後4日生存児数 / 出產生児数) X 100

生後13日生存率[Viability Index on Day 13]

: (生後13日生存児数 / 出產生児数又は生後4日児数調整後の生児数) X 100

性比[Sex Ratio] : 雌児動物数 / 雄児動物数

外表異常等 : 雌雄別に観察していない場合はまとめて記載しても差し支えない。

: 児動物生存率及び性比については、母動物ごとに値を求めてから群平均を算出する。

5. その他

試験実施施設	名称	
	所在地	
試験責任者	職氏名	
	経験年数	
試験番号		
試験期間		

本様式の作成責任者	所属	
	氏名	

[様式 6]

哺乳類を用いる簡易生殖発生毒性試験結果報告書

1 . - 般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC命名法による)			
別名			
CAS番号			
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合はその製法の概要)			
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ロット番号			
不純物の名称及び含有率			
蒸気圧			
対水溶解度			
1-オクタノール/水分配係数			
融点			
沸点			
常温における性状			
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

2 . 急性毒性試験又は反復投与予備試験等

試験 No.	試験の種類 及び期間	動物種	1群当たり の動物数	投与 経路	投与量 (mg/kg)	概略の致死量 又はNOAEL* (mg/kg)	実験場所

*NOAEL : No-Observed- Adverse- Effect-Level

児動物 病理組織学的 所見									
その他									
NOAEL(mg/kg)	mg/kg/day								
NOAELの推定根拠とした 変化									
[備考]									

交尾率[Copulation Index] : (交尾成立動物数 / 交配動物数) X 100

受胎率[Fertility Index] : (妊娠雌動物数 / 交尾雌動物数) X 100

出産率[Delivery Index] : (生存児出産雌数 / 妊娠雌数) X 100

生後0日生存率[Viability Index on Day 0] : (生後0日生存児数 / 出産児数) X 100

生後4日生存率[Viability Index on Day 4] : (生後4日生存児数 / 出產生児数) X 100

生後13日生存率[Viability Index on Day 13]

: (生後13日生存児数 / 出產生児数又は生後4日児数調整後の生児数) X 100

性比[Sex Ratio] : 雌児動物数 / 雄児動物数

外表異常等 : 雌雄別に観察していない場合はまとめて記載しても差し支えない。

: 児動物生存率及び性比については、母動物ごとに値を求めてから群平均を算出する。

4. その他

試験実施施設	名称	
	所在地	
試験責任者	職氏名	
	経験年数	
試験番号		
試験期間		

本様式の作成責任者	所属	
	氏名	

[様式 7]

細菌を用いる復帰突然変異試験結果報告書

1 . 一般的事項

新規化学物質等の名称 (IUPAC命名法による)			
別 名			
C A S 番 号			
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合 は、その製法の概要)			
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 化学物質のロット番号			
不 純 物 の 名 称 及 び 含 有 率			
蒸 気 圧			
対 水 溶 解 度			
1-オクタノール/水分配係数			
融 点			
沸 点			
常温における性状			
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、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. 試験に用いた菌株

菌株名	入手先	入手年月日
		年 月 日
		年 月 日
		年 月 日
		年 月 日
		年 月 日

3. S9 mix

(1) S9の入手方法等(該当する番号を で囲み、必要事項を記入すること。)

自製・購入の別	1. 自製 2. 購入(製造元)
製造年月日	年 月 日 製造
購入の場合のLot	
保存温度	

(2) S9の調製方法

使用動物		誘導物質	
種・系統		名称	
性		投与方法	
週令	週	投与期間及び投与量	
体重	g	(g/kg体重)	

(3) S9mixの組成

成分	S9 mix 1ml中の量	成分	S9mix 1ml中の量
S9	ml	NADPH	μmol
MgCl ₂	μmol	NADH	μmol
KCl	μmol	Na-リン酸緩衝液	μmol
グルコース-6-リン酸	μmol	その他()	

4. 被験物質溶液の調製（被験物質溶液の性状及び純度換算の有無は該当するものを で囲むこと。）

使用溶媒	名称	製造元	Lot	グレード	純度（%）
溶媒選択の理由					
被験物質溶液の性状	溶解	懸濁	その他（ ）		
被験物質が難溶性の場合における懸濁等の方法					
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	時間	分			
純度換算の有無	有		無		

5. 前培養の条件等

(1) 条件

ニュートリエントブロス	名称	製造元	Lot	
前培養時間	時間	分		
培養容器（形状・容量）				ml
培養液量	ml	接種菌量	μl	

(2) 前培養終了時の生菌数等

菌株名		塩基対置換型			フレームシフト型	
生菌数 ($\times 10^9$ /ml)	用量設定試験					
	本試験					
測定方法 (いずれかを で囲むこと。)		1. O.D. 値よりの換算 3. その他（			2. 段階希釈法 ）	

6．最小グルコース寒天平板培地（該当する番号を で囲み、必要事項を記入すること。）

自 製 ・ 購 入 の 別	1．自 製 2．購 入（製造元 ）
製 造 年 月 日	年 月 日 製造
購 入 の 場 合 の L o t	
使用寒天の名称・製造元・Lot	

7．試験の方法（該当する番号を で囲み、必要事項を記入すること。）

（1）試験方法とその選定理由

採用した試験方法	1．プレインキュベーション法 2．プレート法 3．その他（ ）
その他の場合は その選定理由	

（2）試験条件

組 成	菌 懸 濁 液	ml
	被 験 物 質 溶 液	ml
	Na - リン酸緩衝液（直接法による場合）	ml
	S9mix（代謝活性化法による場合）	ml
	ト ッ プ ア ガ ー	ml
	そ の 他（ ）	
プレインキュベーション	温 度	
	時 間	分
インキュベーション	温 度	
	時 間	時間

8．コロニー計測の方法

計測方法	1．マニュアル計測 2．機器計測
補正の有無	1．無 2．有（補正の方法 ）

9 . 試験の結果

(1) 試験の結果は別表 1 による。

(2) 結果の判定

判 定 (いずれかを で囲むこと。)	陽 性	陰 性
判定の理由		

(陽性と判定した場合には、別表 2 比活性の表を添付すること。)

(3) 参考事項

--

[備 考] 「参考事項」の欄には、試験結果に対する試験責任者の見解等を記入すること。

10. 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。

[様式 8]

哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質等の名称 (IUPAC命名法による)			
別 名			
C A S 番 号			
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合 は、その製法の概要)			
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 化学物質のロット番号			
不 純 物 の 名 称 及 び 含 有 率			
蒸 気 圧			
対 水 溶 解 度			
1-オクタノール/水分配係数			
融 点			
沸 点			
常 温 に お け る 性 状			
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、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. 細胞の種類 - 培養条件

細胞名		入手先	
種		入手年月日	年 月 日
培養液		製造元	
血清の種類と添加量	%	製造元(Lot)	
細胞周期	h	凍結条件	
継代数		培養 条件	容器
染色体数	本		温度
(モード)			CO ₂ 濃度
備考			

3. S9mix

(1) S9の入手方法等(該当する番号を で囲み、必要事項を記入すること。)

自製・購入の別	1.自製 2.購入(製造元)
製造年月日	年 月 日 製造
購入の場合のLot	
保存温度	

(2) S9の調製方法

使用動物		誘導物質	
種・系統		名称	
性		投与方法	
週令	週	投与期間及び投与量 (g/kg体重)	
体重	g		

(3) S 9 m i x の組成

成 分	S9 mix 1ml中の量	成 分	S9 mix 1ml中の量
S 9	ml	N A D P	μ mol
M g C l ₂	μ mol	Na-リン酸緩衝液	μ mol
K C l	μ mol	その他 ()	μ mol
グルコース-6-リン酸	μ mol		

(4) S 9 m i x の処理条件 (該当する番号を で囲み、必要事項を記入すること。)

1 . プレート法	2 . 浮遊細胞法	3 . その他 ()
S 9 量 (最終濃度)		%
S 9 蛋白量 (最終濃度)		mg/ml
処 理 時 間		h
回 復 時 間		h
備 考		

4 . 被験物質溶液の調製 (被験物質溶液の性状及び純度換算の有無は該当するものを で囲むこと。)

使用溶媒	名称	製造元	Lot	グレード	純度 (%)
溶媒選択の理由					
被験物質溶液の性状	溶解	懸濁	その他 ()		
被験物質が難溶性の場合における懸濁等の方法					
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	時間	分			
純度換算の有無	有		無		

5. 短時間処理法における試験
 (1) 細胞増殖抑制試験の条件

		代謝活性化法によらない場合	代謝活性化法による場合
試験実施期間		年 月 日から 年 月 日	年 月 日から 年 月 日
培 養 器	形 状		
	大 き さ		
	培 養 液 量	ml/培養器	ml/培養器
	用量当たりの培養器数		
細 胞	播 種 細 胞 数	個/ml	個/ml
	前 培 養 日 数	日間	日間
処 理 条 件	被 験 物 質 溶 液 添 加 量	ml/培養器	ml/培養器
	S 9 m i x 添 加 量		ml/培養器
	S 9 の 最 終 濃 度		
	S 9 蛋 白 の 最 終 濃 度		
	処 理 時 間	h	h
	回 復 時 間	h	h
細胞増殖抑制 測定法			
備考			

(2) 細胞増殖抑制試験結果

代謝活性化法によらない場合 (- h)		代謝活性化法による場合 (- h)	
用量 (mg/ml)	細胞増殖率 (%)	用量 (mg/ml)	細胞増殖率 (%)

[備考] 括弧内には処理時間及び回復時間を記入すること。
細胞増殖率は溶媒処理群を100%とし、濃度の低い順に記録すること。

(3) 染色体異常試験の条件

		代謝活性化法によらない場合	代謝活性化法による場合
試験実施期間		年 月 日から 年 月 日	年 月 日から 年 月 日
培 養 器	形 状		
	大 き さ		
	培 養 液 量	ml/培養器	ml/培養器
	用量当たりの培養器数		
細 胞	播 種 細 胞 数	個/ml	個/ml
	前 培 養 日 数	日間	日間
処 理 条 件	被験物質溶液添加量	ml/培養器	ml/培養器
	S 9 m i x 添加量		ml/培養器
	S 9 の 最 終 濃 度		
	S 9 蛋 白 の 最 終 濃 度		
	処 理 時 間	h	h
	回 復 時 間	h	h
備考			

(4) 染色体異常試験結果 (別表 1 による。)

6 . 連続処理法による試験 (短時間処理法による試験で陰性と判定された場合に試験を実施すること。)

(1) 細胞増殖抑制試験の条件

試験実施期間		年 月 日から 年 月 日	年 月 日から 年 月 日
培 養 器	形 状		
	大 き さ		
	培 養 液 量	ml/培養器	ml/培養器
	用量当たりの培養器数		
細 胞	播 種 細 胞 数	個/ml	個/ml
	前 培 養 日 数	日間	日間
処 理 条 件	被 験 物 質 溶 液 添 加 量	ml/培養器	ml/培養器
	処 理 時 間	h	h
	回 復 時 間	h	h
細胞増殖抑制 測定法			
備考			

(2) 細胞増殖抑制試験結果

(- h) 処理による場合		(- h) 処理による場合	
用量 (m g / m l)	細胞増殖率 (%)	用量 (m g / m l)	細胞増殖率 (%)

[備 考] 括弧内には処理時間及び回復時間を記入すること。
 連続処理法は代謝活性化法によらない方法による。
 細胞増殖率は溶媒処理群を 1 0 0 % とし、濃度の低い順に記録すること。

(3) 染色体異常試験の条件

試験実施期間		年 月 日から 年 月 日	年 月 日から 年 月 日
培 養 器	形 状		
	大 き さ		
	培 養 液 量	ml/培養器	ml/培養器
	用量当たりの培養器数		
細 胞	播 種 細 胞 数	個/ml	個/ml
	前 培 養 日 数	日間	日間
処 理 条 件	被 験 物 質 溶 液 添 加 量	ml/培養器	ml/培養器
	処 理 時 間	h	h
	回 復 時 間	h	h
備考			

(4) 染色体異常試験結果 (別表 2 による。)

7. 結果の判定及び参考事項

(1) 結果の判定

判 定 (いずれかを で囲むこと。)		陽 性		陰 性			
判定の理由							
D ₂₀ 値	構造異常	短時間処理法	-S9 mix	-	h 処理	mg/ml	
			+S9 mix	-	h 処理	mg/ml	
		連続処理法	/		-	h 処理	mg/ml
					-	h 処理	mg/ml
	数的異常	短時間処理法	-S9 mix	-	h 処理	mg/ml	
			+S9 mix	-	h 処理	mg/ml	
		連続処理法	/		-	h 処理	mg/ml
					-	h 処理	mg/ml

[備 考] D₂₀値は分裂中期像20%に異常を誘発させるために必要な被験物質の推定用量であり、陽性と判断した試験系列について、異常のタイプ別に記入すること。

(2) 参考事項

--

[備 考] 「参考事項」の欄には、試験結果に対する試験責任者の見解等を記入すること。

8. 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記載すること。
- 2．最終報告書と同じ試験番号を記載すること。
- 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。

別表1 染色体異常試験の結果（短時間処理法）

被験物質の名称

処理時間(h)	S9 mix	被験物質の用量 (mg/ml)	染色体構造異常の細胞数（出現頻度%）						ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	RPD/RICC/ MI (%)	染色体の数的異常の細胞数（出現頻度%）						
			観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	その他				総異常細胞数(%)	観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数(%)		
-	-	陰性対照 ()																()
-	-																	()
-	-																	()
-	-																	()
-	-																	()
-	-	陽性対照 ()																()
-	+	陰性対照 ()																()
-	+																	()
-	+																	()
-	+																	()
-	+																	()
-	+	陽性対照 ()																()

[備考]

1. 処理時間の欄には、処理時間 - 回復時間の順に記入すること。
2. 被験物質の用量は、低い方から順に記入すること。
3. 溶媒、陰性対照物質を括弧内に記入する。物質名を略称で記入した場合には、欄外にその名称を記入すること。
4. 各群のプレートごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入すること。
5. 被験物質の析出が認められた場合は、その用量に+印を付すこと。
6. 細胞毒性のために染色体の観察が不能であった用量を表記する場合は、観察細胞数の欄にTOXを記入すること。
7. RPD/RICC/MIの欄には、相対的細胞集団倍加（RPD:Relative Population Doubling）、相対的細胞数増加（RICC:Relative Increase Cell Count）、分裂指数（MI:Mitotic Index）のいずれかを記入すること。
8. 細胞増殖率の欄には、評価の参考となる場合があるため、相対的細胞数（RCC:relative cell count）を記入すること。
9. その他の欄を用いる場合は、その内容を欄外に記載すること。

別表2 染色体異常試験の結果（連続処理法）

被験物質の名称

処理時間 (h)	被験物質の用量 (mg/ml)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度%)							ギャップの出現数	細胞増殖率 (%)	RPD/RICC/MI (%)	染色体の数的異常の細胞数 (出現頻度%)			
		観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常細胞数 (%)				観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数 (%)
-	陰性対照 ()							()							()
-								()							()
-								()							()
-								()							()
-								()							()
-	陽性対照 ()							()							()
-	陰性対照 ()							()							()
-								()							()
-								()							()
-								()							()
-								()							()
-	陽性対照 ()							()							()

[備考]

1. 処理時間の欄には、処理時間 - 回復時間の順に記入すること。
2. 被験物質の用量は、低い方から順に記入すること。
3. 溶媒、陰性対照物質を括弧内に記入する。物質名を略称で記入した場合には、欄外にその名称を記入すること。
4. 各群のプレートごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入すること。
5. 被験物質の析出が認められた場合は、その用量に†印を付すこと。
6. 細胞毒性のために染色体の観察が不能であった用量を表記する場合は、観察細胞数の欄にTOXを記入すること。
7. RPD/RICC/MIの欄には、相対的細胞集団倍加 (RPD:Relative Population Doubling)、相対的細胞数増加 (RICC:Relative Increase Cell Count)、分裂指数 (MI:Mitotic Index) のいずれかを記入すること。
8. 細胞増殖率の欄には、評価の参考となる場合があるため、相対的細胞数 (RCC:relative cell count) を記入すること。
9. その他の欄を用いる場合は、その内容を欄外に記載すること。

[様式 9]

藻類生長阻害試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質等の名称 (IUPAC 命名法による)			
別 名			
C A S 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)			
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 化学物質のロット番号			
不 純 物 の 名 称 及 び 含 有 率			
蒸 気 圧			
対 水 溶 解 度			
1-オクタノール/水分配係数			
融 点			
沸 点			
常 温 に お け る 性 状			
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、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

項目	方 法
分析方法	
前処理法	
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。

3 . 試験材料及び方法

項目		内容	
試験方法			
試験生物	種（学名・株名）		
	入手先		
	対照物質への感受性 （EC ₅₀ ） （対照物質名）		
前培養	前培養の期間		
	培地名		
	環境条件（水温、光強度）		
試験条件	試験容器		
	培地名		
	暴露期間	年 月 日～年 月 日	
	試験濃度（設定値）	（公比）	
	初期生物量	cells/mL	
	連数	試験濃度区	
		対照区	
	試験溶液量		
	助剤	助剤の有無	
		種類	
		濃度	
		助剤対照区の連数	
	培養方式（振とう培養、 静置培養、連続培養等）		
	水温又は培養温度		
照明（光強度・時間等）			
結果の算出 方法	速度法		

[備 考]

- 「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 EC₅₀ を記入）すること。
- 「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。
- 「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。
- 「結果の算出方法」の欄には、毒性値（EC₅₀ 及び NOEC）の算出に用いた統計解析手法（例

えば、probit 法、ANOVA 等) を記入すること。

4 . 試 験 結 果 及 び 考 察

項 目	内 容
毒性値	0-72hErC ₅₀ = mg/L NOEC (速度法) = mg/L
試験濃度	1. 設定値 2. 実測値
考察及び 特記事項	

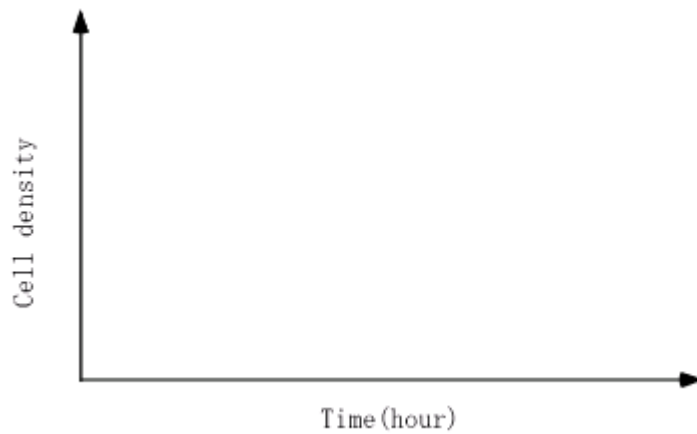
[備 考]

1. 「試験濃度」の欄には、毒性値 (EC₅₀ 及び NOEC) 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。
2. 「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。

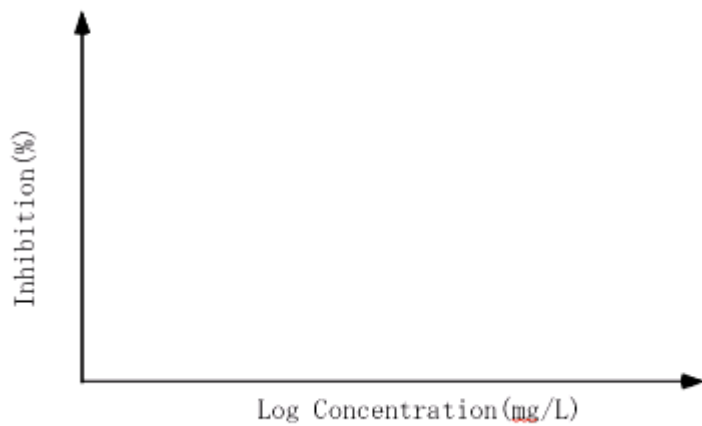
5 . 藻 類 の 生 長 曲 線 及 び 濃 度 - 生 長 阻 害 率 曲 線

暴露期間中の①生長曲線 (例図 1) 及び②各試験濃度での生長阻害率を示した図 (例図 2) を添付すること。

例図1 藻類の生長曲線



例図2 藻類の濃度－生長阻害率曲線（生長速度）



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。

[様式10]

ミジンコ急性遊泳阻害試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質等の名称 (IUPAC命名法による)			
別 名			
C A S 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)			
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 化学物質のロット番号			
不純物の名称 及び含有率			
蒸 気 圧			
対 水 溶 解 度			
1-オクタノール/水分配係数			
融 点			
沸 点			
常温における性状			
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、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

項目	方 法
分析方法	
前処理法	
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。

3. 試験材料及び方法

項目		内容	
試験生物	種 (学名・系統・時間齢)		
	入手先		
	対照物質への感受性 (EC ₅₀) (対照物質名)		
飼育	飼育水の種類		
	環境条件 (水温、明暗周期)		
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		年 月 日 ~ 年 月 日
	試験濃度 (設定値)		(公比)
	供試数		頭/試験容器
	連数	試験濃度区	
		対照区	
	試験溶液量		
	助剤	助剤の有無	
		種類	
		濃度	
		助剤対照区の連数	
	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)		mg/L	
明暗周期			
結果の算出方法	EC ₅₀		

[備考]

- 「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 EC₅₀ を記入) すること。

2. 「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。
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. 「結果の算出方法」の欄には、毒性値（EC₅₀）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。

4. 試験結果及び考察

項目	内容
毒性値	48hEC ₅₀ = mg/L
試験濃度	1. 設定値 2. 実測値
考察及び特記事項	

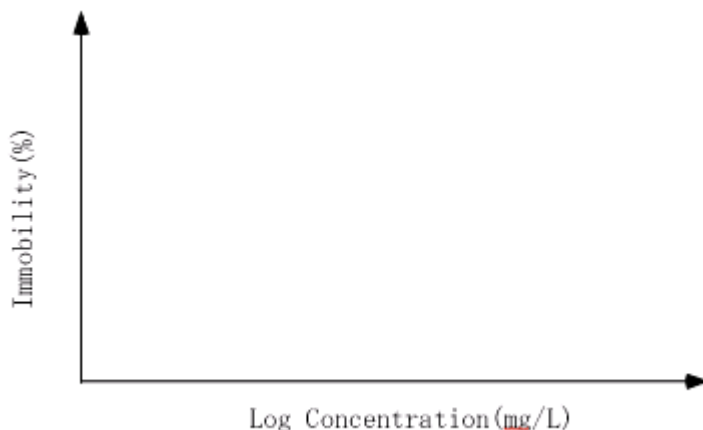
[備考]

1. 「毒性値」の欄には、48 時間での遊泳阻害における EC₅₀ を記入すること。
2. 「試験濃度」の欄には、毒性値（EC₅₀）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。
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。

5. ミジンコの濃度－遊泳阻害率曲線

暴露期間中における試験濃度でのミジンコに対する各遊泳阻害率を示した図（例図 1）を添付すること。

例図 1 ミジンコの濃度－遊泳阻害率曲線



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。

1. 一般的事項

新規化学物質等の名称 (IUPAC命名法による)			
別名			
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)			
分子量			
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			
蒸気圧			
対水溶解度			
1-オクタノール/水分配係数			
融点			
沸点			
常温における性状			
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、UVCB物質のような多成分物質及び混合物においても、可能な限り記入すること。

- 「蒸気圧」の欄には、被験物質の蒸気圧を記入すること。
- 「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。
- 「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

項目	方法
分析方法	
前処理法	
定量条件	

[備考]

- 「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。
- 「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。
- 「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。

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 (算術平均値、時間加重平均値) 3.推定値			
毒性値	試験時間 (h)	LC ₅₀ 値 (mg/L)	95%信頼限界	毒性値算出法 (傾き)
	24			
	48			
	72			
96				
考察及び特記事項				

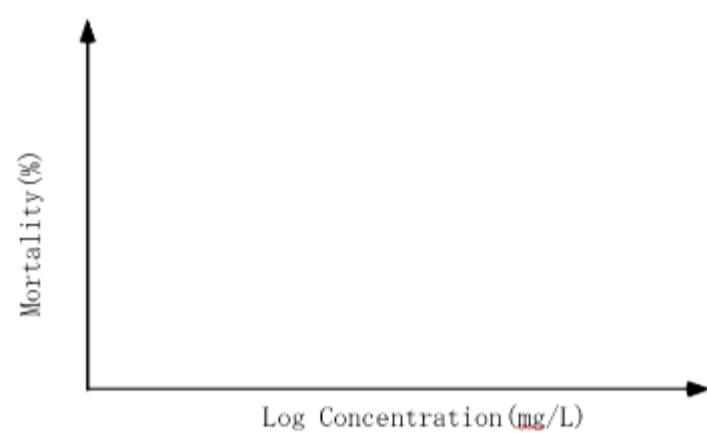
[備考]

- 「毒性値」の欄には、経過時間ごとの LC₅₀ を記入すること。
- 「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。
- 「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]

- 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。
- 最終報告書と同じ試験番号を記入すること。
- 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。