

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

厚生労働省医薬食品局長

経済産業省製造産業局長

環境省総合環境政策局長

新規化学物質等に係る試験の方法について

「第三種監視化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める省令及び第三種監視化学物質の有害性の調査の指示に関する省令を廃止する省令」（平成 22 年経済産業省、環境省令第 1 号）をもって「第三種監視化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める省令」（平成 15 年経済産業省、環境省令第 10 号。以下「旧省令」という。）が廃止され、旧省令により定められていた有害性の調査の項目等は、「新規化学物質に係る試験並びに第一種監視化学物質及び第二種監視化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める省令」（昭和 49 年総理府、厚生省、通商産業省令第 1 号）の全面的な改正により新たに定められた「新規化学物質に係る試験並びに優先評価化学物質及び監視化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める省令」（平成 22 年厚生労働省、経済産業省、環境省令第 3 号。以下「新省令」という。）に追加された。また、新省令の施行に伴い、「新規化学物質に係る試験並びに優先評価化学物質及び監視化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める省令第 2 条及び第 4 条第 4 号の規定により厚生労働大臣、経済産業大臣及び環境大臣が別に定める試

験（平成２３年厚生労働省・経済産業省・環境省告示第５号）」において、哺乳類を用いる２８日間の反復投与毒性試験と同等以上のものとして、哺乳類を用いる反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験が追加された。さらに、経済協力開発機構（OECD）における試験法テストガイドライン（以下「OECD テストガイドライン」という。）の一部が改正されたこと等を踏まえ、既存の試験方法について一部見直しを行った。

これらにより、平成２３年４月１日より新省令第１条第１項第２号、同条第２項、同条第３項、第２条、第３条第２項及び第４条第２号から第５号までに掲げる試験並びに第５条又は第６条に規定する慢性毒性、生殖能及び後世代に及ぼす影響、催奇形性、変異原性、がん原性、生体内運命、薬理学的特性、藻類の生長に及ぼす影響、ミジンコの繁殖に及ぼす影響、魚類の初期生活段階における生息若しくは生育に及ぼす影響その他優先評価化学物質の環境における残留の状況からみて経済産業大臣及び環境大臣が特に必要があると認める生活環境動植物の生息若しくは生育に及ぼす影響又は鳥類の繁殖に及ぼす影響についての調査のための試験については、原則として下記第１の方法によることとし、下記第２のとおり取り扱うこととする。

なお、「新規化学物質等に係る試験の方法について（平成１５年１１月２１日薬食発第１１２１００２号厚生労働省医薬食品局長、平成１５・１１・１３製局第２号経済産業省製造産業局長、環境企発第０３１１２１００２号環境省総合環境政策局長連名通知）」（以下「平成１５年連名通知」という。）は、平成２３年３月３１日をもって廃止する。

記

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、環境企発第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。

別添

＜微生物等による化学物質の分解度試験＞

I 適用範囲

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

II 用語

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

III 活性汚泥の調製

1 汚泥採集場所

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

2 汚泥採集回数

年間4回とする。

3 汚泥採集方法

3-1 都市下水 下水処理場の返送汚泥 1L

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

4 調製

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

5 培養

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

(注1) 0.1%合成下水

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

6 管理

培養段階での管理は、次の項目を点検し、所要の調製を行う。

6-1 上澄液の外観 活性汚泥の上澄液は透明であること。

6-2 活性汚泥の沈でん性 フロックが大きく、沈でん性がすぐれていること。

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

6-4 pH 上澄液の pH は、 7.0 ± 1.0 であること。

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

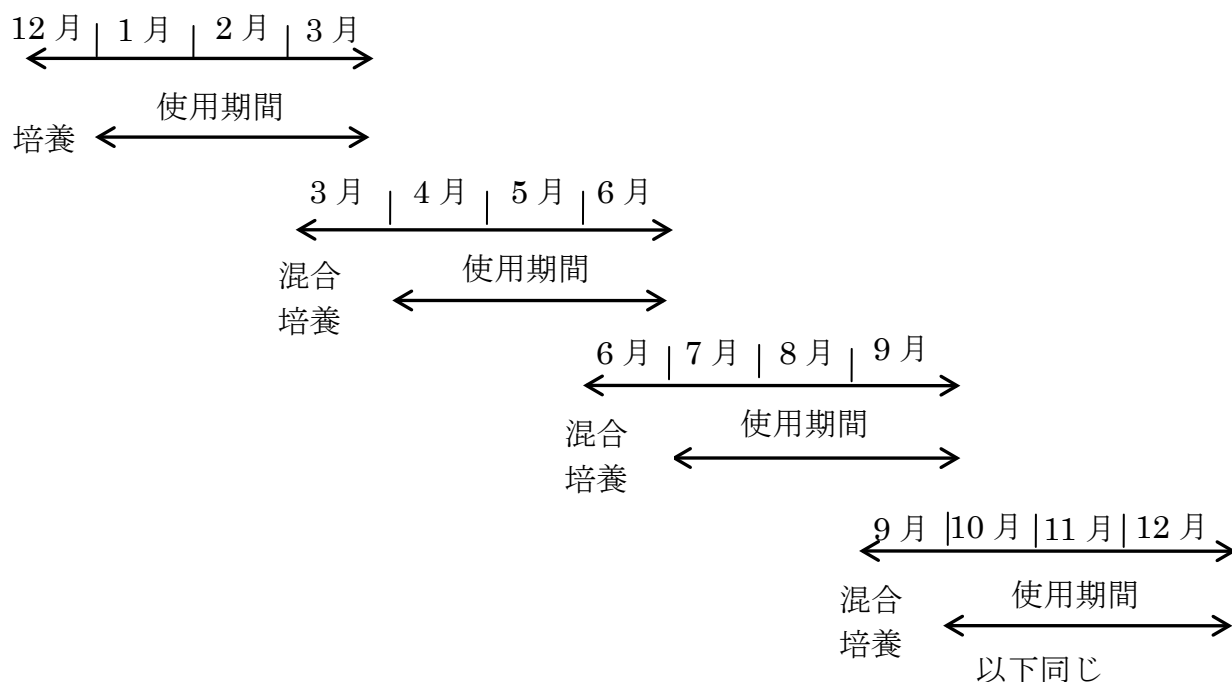
7 新旧活性汚泥の混合

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

8 活性汚泥の活性度の点検

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

[活性汚泥の調製と使用期間の例]



IV 試験方法

1 分解度試験装置

閉鎖系酸素消費量測定装置

2 基礎培養基

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

3 被験物質の添加及び試験の準備

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

ない。

3-1 水に被験物質が 100mg/L となるように添加したものを入れた試験容器 1 個

3-2 基礎培養基に被験物質が 100mg/L となるように添加したものを入れた試験容器 3 個

3-3 基礎培養基にアニリンが 100mg/L となるように添加したものを入れた試験容器 1 個

3-4 基礎培養基のみを入れた試験容器 1 個

4 活性汚泥の接種

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

5 分解度試験の実施

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

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

(注2) 通常は 28 日間とする。

6 試験結果の算出方法

6-1 試験条件の確認

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

6-2 酸素消費量から分解度 (%) を算出する方法

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

BOD：被験物質の生物化学的酸素消費量（測定値）(mg)

B：基礎培養基に活性汚泥を接種したものの酸素消費量（測定値）(mg)

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

6-3 直接定量^(注3) から分解度 (%) を算出する方法

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

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3) 直接定量による化学分析法

① 全有機炭素分析計を用いる場合

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

② その他の分析計を用いる場合

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

V 結果のまとめ

試験の結果を様式 1 によりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

<魚介類の体内における化学物質の濃縮度試験>

I 適用範囲

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

II 用語

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

III 試験方法

1 被験物質の試験濃度の設定

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

1-1 供試魚

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

1-2 急性毒性試験の実施（LC₅₀測定）

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

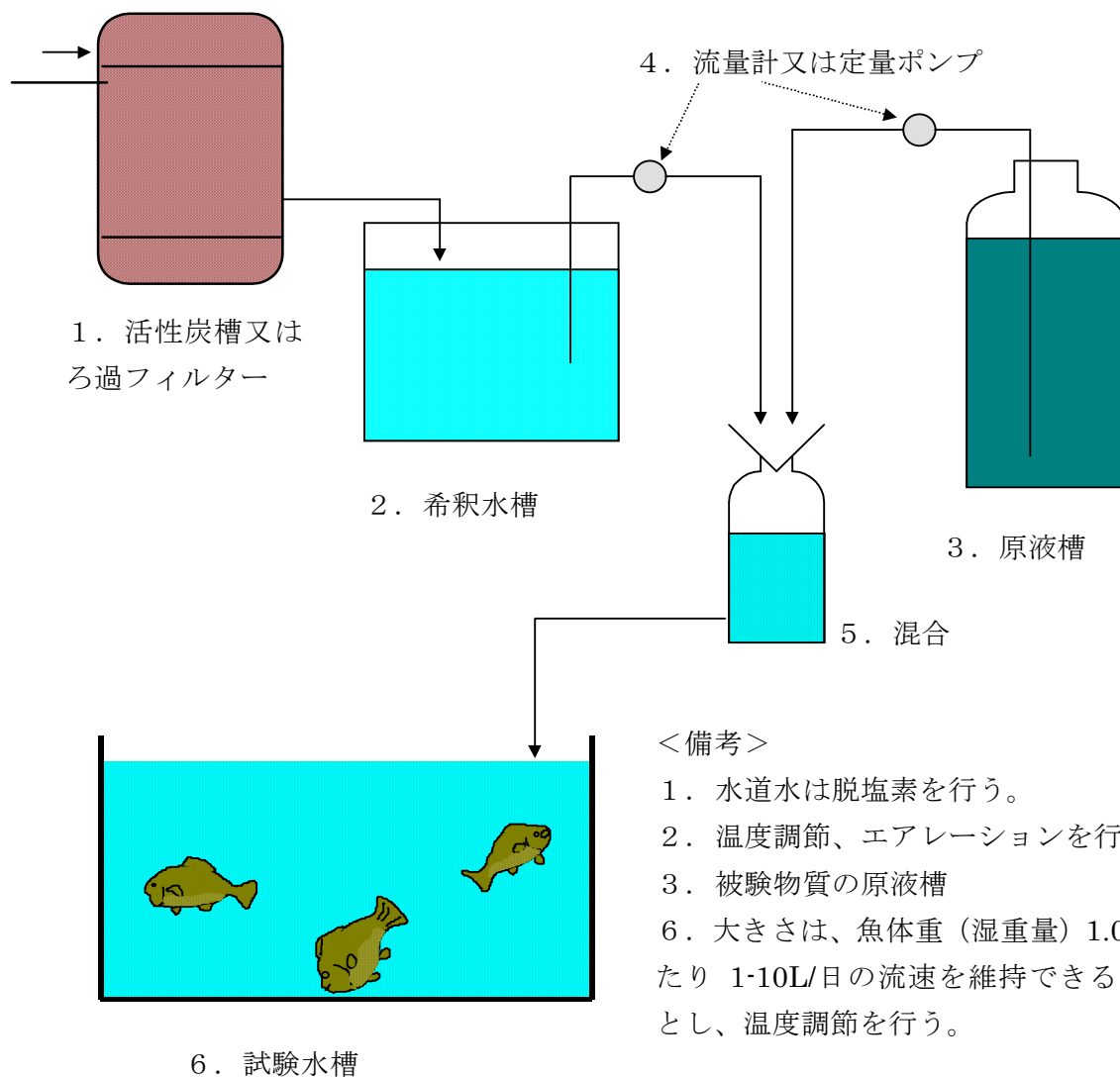
2 濃縮度試験の実施

この試験は、流水状態で行い、被験物質が魚体内に濃縮される度合いを調べる。

2-1 装置及び器具

2-1-1 装置

概要は次のとおりとする。



2-1-2 試験水槽

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

2-1-3 その他の器具

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

2-2 供試魚

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

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

付表1 試験に推奨される魚種

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

2-3 蓄養及びじゅん化

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

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

- ・ じゅん化期間中の連続した7日間で全体の死亡率が10%を超えた場合、試験に使用しない。
- ・ じゅん化期間中の連続した7日間で全体の死亡率が5-10%の間の場合、7日間延長してじゅん化する。
- ・ じゅん化期間中の連続した7日間で全体の死亡率が5%より低い場合、試験に使用できる。もし、その後の7日間で全体の死亡率が5%より高くなった場合には試験に使用しない。

病気の魚は試験に使用しない。試験前2週間あるいは試験中、魚に対し薬浴等の処置はしない方がよい。

2-4 給餌

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

2-5 試験の実施

2-5-1 試験用水

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

2-5-2 被験物質溶液

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

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

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

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

被験物質は放射性同位元素により標識してもよい。

2-5-3 試験濃度

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

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

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

（注1） 1-2で求めた LC_{50} 値の1/100、1/1000、1/10000の濃度のうち分析が可能な限り低い方の2濃度区が参考となる。

2-5-4 試験温度及び照明

温度は、供試魚に適したものとし（付表1参照）、その変動は $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 未満とする。照光時間は12から16時間／日が推奨される。

2-5-5 試験期間

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

（1）取込期間

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

48時間以上の測定間隔で連続した3回の測定における濃縮倍率の変動が20%以内の場合に定常状態に達したとみなす。（濃縮倍率が100未満の場合、濃縮倍率の変動が20%以上であっても28日目には定常状態に達しているとみなしてもよい。）

(2) 排泄期間

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

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

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

2-5-6 操作

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

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

なお、試験期間中は、供試魚の排泄物、水槽壁の汚れ等を1日1回程度除去する。

2-6 試験の有効性

試験を有効なものとするために、次の条件を適用する。

- ・ 温度変動は $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 未満であること。
- ・ 溶存酸素濃度は、飽和酸素濃度の通常60%以下にならないこと。
(揮発性物質用水槽などエアレーションができない場合には、流速を上げるなどの対策を講じ、溶存酸素濃度を維持する。そのために講じた対策を報告書に記述する。)
- ・ 流水式及び半止水式のいずれの場合も、水槽中の被験物質濃度の変動は、取込期間中の測定値の平均に対して $\pm 20\%$ 以内に保たれること。
(濃縮倍率が極めて高い場合には取込期間中の被験物質濃度の変動が大きくなる場合がある。この場合には、定常状態における被験物質濃度の変動が測定値の平均に対して $\pm 20\%$ 以内に保たれること。)
(揮発性物質の試験においては、気相を少なくした揮発性物質用水槽を使用するなどの適切な対応を行う。)
- ・ 死亡又は病気などの異常は、対照区及び試験区の魚において試験終了時に10%未満であること。試験が数週あるいは数ヶ月延長になった場合には、死亡又は異常は、対照区及び試験区で1ヶ月間で5%未満かつ全期間で30%を超えないこと。

2-7 供試魚と試験水の分析

2-7-1 供試魚と試験水のサンプリングスケジュール

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

2-7-2 サンプリングとサンプルの前処理

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

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

2-7-3 供試魚試料の分析

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

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

2-8 試験結果の算出方法及び報告

2-8-1 結果の処理法

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

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

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

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

2-9 結果のとりまとめ

試験の結果を様式2によりとりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

試験法解説

1 供試魚

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

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

(1) 試験温度が蓄養池の水温より高い場合は、蓄養池の水温より5℃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。各サンプリング時に1濃度区あたり最低4尾のサンプルとなるような魚の尾数を選択する。

成魚を使用する場合、雄か雌かどちらかあるいは両方を使用するのかを報告する。

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

2 試験用水

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

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

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

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

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

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

付表2 測定しておくことが望ましい試験用水の水質項目

1	浮遊物質	2 1	遊離塩素
2	全有機炭素量	2 2	臭化物イオン
3	化学的酸素要求量（COD）	2 3	フッ素化合物
4	全リン	2 4	硫化物イオン
5	pH	2 5	アンモニウムイオン
6	大腸菌群	2 6	亜硝酸態チッ素
7	水銀	2 7	ヒ素
8	銅	2 8	陰イオン界面活性剤
9	カドミウム	2 9	セレン
1 0	亜鉛	3 0	蒸発残留物
1 1	鉛	3 1	電気伝導度
1 2	アルミニウム	3 2	全硬度（ CaCO_3 として）
1 3	ニッケル	3 3	アルカリ度
1 4	クロム	3 4	ナトリウム
1 5	マンガン	3 5	カリウム
1 6	スズ	3 6	カルシウム
1 7	銀	3 7	マグネシウム
1 8	コバルト	3 8	有機塩素系農薬
1 9	鉄	3 9	有機リン系農薬
2 0	シアン化合物		

3 被験物質溶液

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

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

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

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

付表 3

濃縮度試験に用いられる溶剤や分散剤の48時間 LC_{50} 値（mg/L、w/v）

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

魚：ヒメダカ 水温：25℃

HCO：ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油

4 試験水

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

5 照明及び温度

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

6 取込期間の長さの予測

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

を開始する前に得ることができる。

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

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

又は、Kristensenの式を用いる^(注3)。

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

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

ここでs=対水溶解度(mol/L): (n=36)

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

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

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

C_w が一定ならば

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

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

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

すなわち

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

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

式3は次のように書き換えられる。

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

すなわち

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

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

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

定常状態の80%に達する時間は式4から

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

すなわち

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

同様に定常状態の95%に達する時間は次のようになる。

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

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

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

又は

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

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

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

又は

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

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

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

7 排泄期間の長さの予測

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

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

排泄期間中は、 C_w はゼロと仮定されるので、式は次のように省略できる。

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

すなわち

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

ここで $C_{f,0}$ は排泄期間開始時の濃度である。

50%排泄は以下の式で表される時間(t_{50})に達成される。

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

すなわち

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

同様に、95%排泄は以下の時間 (t_{95}) に達成される。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

付表 4

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

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

* 水槽容量の最低3倍量の試験水を流した後で水をサンプリングする。

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

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

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

9 サンプルングとサンプルの前処理

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

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

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

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

10 分析方法について

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

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

11 供試魚試料の分析

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

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

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

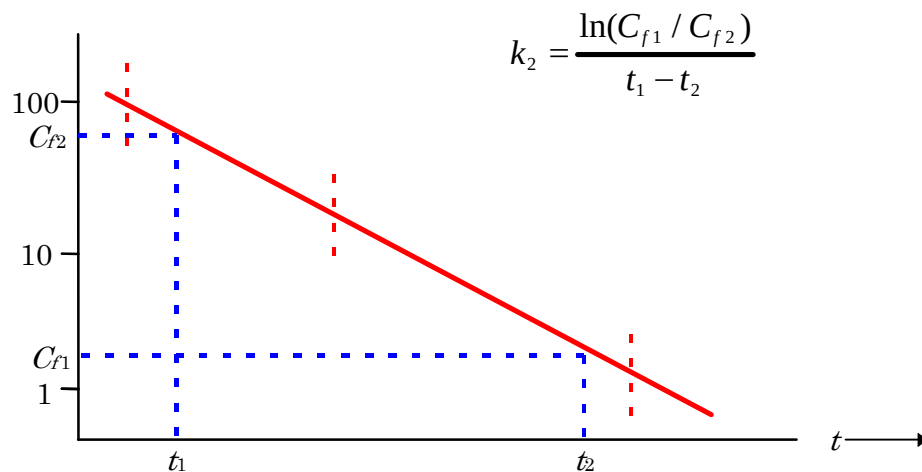
（注10） Gardner et al. : *Limnol. & Oceanogr.*, **30**, 1099-1105 (1995).

1.2 BCF_kの算出方法

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

1.2-1 グラフによる排泄(消失)速度定数 k_2 決定のための方法

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



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

1.2-2 グラフによる取込速度定数 k_1 決定のための方法

得られた k_2 から、次式より k_1 を計算する：

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

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

1 2 - 3 コンピューターによる取込と排泄(消失)速度定数の計算方法

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

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

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

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

ここで t_c = 取込期間の終了時間。

このアプローチは、 k_1 及び k_2 の標準偏差の算出を併せて行う。

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

1 3 結果の解釈

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

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

< 1-オクタノールと水との間の分配係数測定試験 >

I 適用範囲及び試験方法

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

II 結果のまとめ

試験の結果を様式 3 によりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

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

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

II 総則

1 試験動物

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

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

2 飼育管理

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

3 被験物質

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

4 対照群

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

5 予備試験

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

6 その他

用量設定などのために行われた予備試験の結果も同時に報告書として提出する。

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

III 慢性毒性試験

目的

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

1 試験動物

1-1 動物種及び性

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

1-2 年齢

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

1-3 動物数

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

2 被験物質

2-1 投与方法

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

2-2 用量

用量と作用との関係を知るために、投与量は 3 段階以上とする。

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

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

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

る。

2-3 投与期間

12 か月以上とする^(注1)。

3 観察・測定事項

原則として、次の事項について観察を行う。

3-1 一般状態、死亡率

3-2 体重、摂餌量及び摂水量、食餌効率^(注2)

3-3 血液検査

3-3-1 血液学的検査^(注3)

3-3-2 血液生化学的検査^(注4)

3-4 尿検査^(注5)

3-5 病理学的検査

3-5-1 肉眼的観察及び器官重量^(注6)

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

3-6 その他の必要な事項

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

（注7）において*印を付した器官・組織について、その重量を測定する。

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

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

（#）吸入試験の場合は、鼻腔、咽頭、喉頭及び気管。

IV 生殖能及び後世代に及ぼす影響に関する試験

目的

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

1 試験動物

1-1 動物種

1-1-1

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

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

1-1-2

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

1-1-3

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

1-2 動物数

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

2 被験物質

2-1 投与方法

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

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

2-2 用量

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

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

3 交配と被験物質の投与

3-1

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

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

3-2

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

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

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

3-3

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

4 観察事項

4-1 F_0

4-1-1

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

4-1-2

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

4-1-3

F_1 の離乳時に母動物を剖検し、内部器官を観察する。

4-1-4

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

4-2 F₁

4-2-1

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

4-2-2

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

4-2-3

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

4-3 F₂

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

4-4 観察のまとめ方

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

5 試験の延長など

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

(注1) 通常、次の計算法による。

交尾率 = (交尾動物数 / 同居動物数) × 100

受胎率 = (妊娠動物数 / 交尾動物数) × 100

出産率 = (生仔出産雌数 / 妊娠雌数) × 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。

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

検索の時期により分母が異なる。

離乳率 = (離乳時生仔数 / 生後4日又は淘汰直後の生仔数) × 100

V 催奇形性試験

目的

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

1 試験動物

1-1 動物種

1-1-1

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

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

1-1-2

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

1-1-3

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

1-2 動物数

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

2 被験物質

2-1 投与方法

原則として、強制経口投与で行う

2-2 用量

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

2-3 投与期間

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

3 観察事項

3-1 母動物

3-1-1

試験期間を通じ一般状態を観察し、体重及び摂餌量を測定する。

3-1-2

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

3-2 胎仔

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

3-3 観察のまとめ方

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

VI 変異原性試験

目的

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

試験法の選択

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

1 細菌を用いる復帰突然変異試験

1-1 目的

細菌を用いて、被験物質の遺伝子突然変異誘発性の有無を検索する。

1-2 使用菌株

以下の5菌株を用いて試験を行う。

(1) ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA98

(2) ネズミチフス菌 TA100

(3) ネズミチフス菌 TA1535

(4) ネズミチフス菌 TA1537、TA97 又は TA97a

(5) 大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2 *uvrA*、大腸菌 WP2 *uvrA*/pKM101 又はネズミチフス菌 TA102

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

1-3 試験法

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

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

2-4 被験物質の調製

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

2-5 用量段階

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

2-6 対照

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

2-7 プレート数

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

2-8 染色体異常の観察

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

2-9 結果の判定

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

2-10 結果の表示

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

3 げっ歯類を用いる小核試験

3-1 動物及び観察細胞

若い成熟げっ歯類を用い、骨髓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、骨髓を用いた場合に肥満細胞の顆粒による疑似小核の出現、末梢血を用いた場合に脾臓で小核を持つ赤血球が除去されることに注意し、より適切な観察方法を用いる。

3-2 動物の性及び数

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

3-3 被験物質の調製

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

3-4 対照群

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

3-5 投与経路

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

3-6 投与回数

単回又は反復投与とする。

3-7 用量段階

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

3-8 標本作製時期

3-8-1 骨髓を用いる場合

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、骨髓塗抹標本作製する^(注7)。また、反復投与を行った場合には、最終投与後18～24時間の間に1回、標本作製を行う。^(注8)

3-8-2 末梢血を用いる場合

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

3-9 観察

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

3-10 結果の表示

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

3-11 結果の判定

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

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

3-1-2 結果の評価

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

(注1) ここで得られる結果は、化学物質の変異原性に関する最少情報である。

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

1 DNA 損傷を指標とする試験

in vitro 及び *in vivo* 試験系

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

2 DNA 修復を指標とする試験

A *in vitro* 試験系

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

B *in vivo* 試験系

- 1) げっ歯類を用いる不定期 DNA 合成試験 (UDS)

3 遺伝子突然変異誘発性を指標とする試験

A *in vitro* 試験系

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

B *in vivo* 試験系

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

4 染色体異常誘発性を指標とする試験

A *in vitro* 試験系

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

B *in vivo* 試験系

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

5 その他の試験

A *in vitro* 試験系

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

B *in vivo* 試験系

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

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

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

(注4) 陽性対照物質の例

メタンスルホン酸エチル

マイトマイシン C

シクロフォスファミド

トリエチレンメラミン

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

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

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

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

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

(注8) 陽性対照については適切な時期に 1 回、標本作製を行う。

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

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

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

VII がん原性試験

目的

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

1 試験動物

1-1 動物種及び性

マウス、ラット等 2 種以上の雄及び雌を用いる。

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

1-2 年齢

5～6 週齢の体重のそろったものを用いる。

1-3 動物数

各群雄及び雌それぞれ 50 匹以上を用いる。

2 被験物質

2-1 投与方法

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

2-2 用量

用量と反応との関係を知るために、投与量は 3 段階とする。

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

なお、実際の摂取量は動物の摂餌量又は摂水量と被験物質の濃度から算出する。

2-3 投与期間

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

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

3 観察・測定事項

3-1 一般的観察^(注1)

3-2 体重、摂餌量及び摂水量、食餌効率^(注2)

3-3 病理学的検査

3-3-1 肉眼的観察^(注3)

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

3-4 血液検査^(注5)

3-5 その他の必要な事項

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

（注1） 一般状態及び死亡の有無を観察し、生存率を算出する。

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

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

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

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

脳、脊髄、末梢神経、下垂体、眼球、鼻腔^(#)、肺（気管支を含む。）、口腔及び舌、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、外耳道、皮膚、唾液腺、リンパ節、甲状腺（上皮小体を含む。）、胸腺、心臓、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、精巣、精のう、前立腺、乳腺（雌）、卵巢、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作製するとともに、必要に応じて、血球数の計測及び血液生化学的検査を行う。

VIII 生体内運命に関する試験

目的

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

より、被験物質の生体内における動態を把握することを目的とする。

1 試験動物

1-1 動物種及び性

ラット、ウサギ、イヌ、サル等のうち 1 種以上の雄又は雌を用いる。

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

1-2 年齢

成熟に達した若い動物を用い、年齢を記載する。

なお、必要に応じ、幼若動物又は他の条件の動物を用いる。

1-3 動物数

ラット等では各群 4 匹以上の雄又は雌を用いる。

また、イヌ、サル等では各群 2 匹以上とする。

2 被験物質

2-1 投与方法

原則として、強制経口投与で行う。

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

2-2 用量

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

なお、可能ならば自然環境及び食物経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} 、 α $1/2$ 、 β $1/2$ 等を求めると共に静脈内投与群の血中濃度の推移と比較して被験物質の消化管からの吸収速度、吸収量及び吸収率を推定する。

3-2 分布

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

なお、必要に応じてオートラジオグラフィ等を併用して調べる。

また、血漿蛋白との可逆的結合性等についても調べることが望ましい。

3-3 蓄積

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

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

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

(注 4) 例えば、

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

IX 薬理学的試験

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＞

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

II 哺乳類の生殖能及び後世代に及ぼす影響に関する試験

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

III 鳥類の繁殖に及ぼす影響に関する試験

目的

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

1 定義

この試験法において使用する用語は、次の例による。

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

2 被験物質の物理化学的特性等

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

3 予備試験

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

4 供試生物

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

5 試験方法

5-1 試験設備及び機器

(1) 試験設備

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

(2) 装置

次の装置を用いる。

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

5-2 じゅん化

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

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

5-3 試験の実施

5-3-1 試験条件

(1) 環境条件

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

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

には記載する。

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

卵と若鳥の環境条件を表2に示す。

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

表1 親鳥のための推奨される条件

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

(注1) 羽数が多くなる場合、床面積はそれに応じて広くする。

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

表2 卵と若鳥のための推奨される条件

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

(2) 被験物質の投与

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

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

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

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

若鳥の餌料には、被験物質及び助剤を添加してはならない。

表 3 繁殖に係る項目の正常値（注 3）

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

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

（3）試験操作

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

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

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

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

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

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

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

餌料中で被験物質が安定であっても、鳥かご中の餌料を少なくとも 1 週間に一度交換する。もし、被験物質が飼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 時間一明、10 時間一暗）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＞

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

II 哺乳類を用いる 28 日間の反復投与毒性試験

目的

本試験は、動物に被験物質を一定期間反復投与したときに現れる生体の機能及び形態の変化を観察することにより、被験物質の毒性を明らかにすることを目的とする。

1 試験動物^(注1)

1-1 動物種及び性

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

1-2 週齢

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

1-3 動物数

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

2 被験物質

2-1 投与方法

原則として、経口投与とする。ただし、被験物質の性状により経口投与ができない場合は、非経口投与とする。強制投与の場合は、被験物質を適切な溶媒に溶解又は懸濁し、毎日一定の時刻に投与する。

2-2 用量^(注3)

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

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

2-3 投与期間

原則として、28日間連続投与とする。

3 観察・検査

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

さらに、次の事項について検査する。

3-1 死亡率

3-2 体重、摂餌量及び摂水量（被験物質を飲料水に添加した場合）^(注8)

3-3 機能検査^(注9)

3-4 血液検査^(注10)

3-4-1 血液学的検査^(注11)

3-4-2 血液生化学的検査^(注12)

3-5 尿検査^(注13)

3-6 病理学的検査

3-6-1 肉眼的検査及び器官重量^(注14、15)

3-6-2 病理組織学的検査^(注16)

3-7 その他の必要な事項

試験中死亡した動物については、可能な限りその死因を調べる。

また、一般状態が極めて不良となり、死期の迫った動物は速やかに安楽死させた後、剖検を行う。

4 結果報告

試験の結果は様式4によりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

また、可能な項目については、適切な統計学的手法を用いて評価する。

(注1) 動物愛護の観点から、全ての動物を適切に取り扱うこととする。

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

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

(注4) 少なくとも1日に2回、動物の生死及び死亡の徴候を観察する。

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

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

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

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

(注 8) 週 1 回以上測定する。

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

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

(注 11) 血液学的検査として次の項目を検査する。

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

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

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

(注 12) 血液生化学的検査として次の項目を検査する。

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

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

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

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

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

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

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

なお、*印を付した諸器官については、全例その重量を測定する。

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

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

III 哺乳類を用いる 90 日間試験の反復投与毒性試験

OECD テストガイドライン 408 で定められた方法に準じて実施する。

IV 哺乳類を用いる反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

目的

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

1 試験動物^(注 1)

1-1 動物種及び性

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

1-2 週齢

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

1-3 動物数

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

1-4 交配方法

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

2 被験物質

2-1 投与方法

原則として、経口投与とする。ただし、被験物質の性状により経口投与ができない場合は、非経口投与とする。強制投与の場合は、被験物質を適切な溶媒に溶解又は懸濁し、毎日一定の時刻に投与する。

2-2 用量^(注6)

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

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

2-3 投与期間

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

3 観察・検査

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

さらに、次の事項について検査する。

3-1 親／成熟動物

3-1-1 死亡率

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

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

試験中死亡した動物については、可能な限りその死因を調べる。

また、一般状態が極めて不良となり、死期の迫った動物は速やかに安楽死させた後、剖検を行う。交尾が成立しなかった雌雄、出産予定日を過ぎても分娩が認められない雌についてはその原因を調べる。

4. 結果報告

試験の結果は様式5によりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

また、可能な項目については、適切な統計的手法を用いて評価する。

(注1) 動物愛護の観点から、全ての動物を適切に取り扱うこととする。

(注2) 性成熟期は系統により異なるので注意する。

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

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

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

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

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

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

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

(注10) 少なくとも1日に2回、動物の生死及び死亡の徴候を観察する。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

眼による異常（口蓋を含む。）の検査する。

【参考】哺乳類を用いる簡易生殖発生毒性試験

目的

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

1 試験動物^(注2)

1-1 動物種及び性

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

1-2 週齢

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

1-3 動物数

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

1-4 交配方法

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

2 被験物質

2-1 投与方法

原則として、経口投与とする。ただし、被験物質の性状により経口投与ができない場合は、非経口投与とする。強制投与の場合は、被験物質を適切な溶媒に溶解又は懸濁し、毎日一定の時刻に投与する。

2-2 用量

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

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

2-3 投与期間

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

する。)まで、原則として連続投与する^(注7、8、9)。

3 観察・検査

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

さらに、次の事項について検査する。

3-1 親／成熟動物

3-1-1 死亡率

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

3-1-3 性周期^(注4)及び妊娠期間^(注14)

3-1-4 病理学的検査

3-1-4-1 肉眼的検査及び器官重量^(注15)

3-1-4-2 病理組織学的検査^(注16)

3-2 児動物^(注17)

3-3 その他の必要な事項

試験中死亡した動物については、可能な限りその死因を調べる。

また、一般状態が極めて不良となり、死期の迫った動物は速やかに安楽死させた後、剖検を行う。交尾が成立しなかった雌雄、出産予定日を過ぎても分娩が認められない雌についてはその原因を調べる。

4. 結果報告

試験の結果は様式6によりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

また、可能な項目については、適切な統計的手法を用いて評価する。

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

(注2) 動物愛護の観点から、全ての動物を適切に取り扱うこととする。

(注3) 性成熟期は系統により異なるので注意する。

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

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

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

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

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

ばく露を実施する。

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

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

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

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

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

(注 14) 妊娠期間について、妊娠 0 日から起算する。

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

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

なお、*印を付した諸器官については、全例その重量を測定する。

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

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

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

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

V 変異原性試験

目的

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

試験法について

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

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

1 細菌を用いる復帰突然変異試験

1-1 目的

細菌を用いて、被験物質の遺伝子突然変異誘発性の有無を検索する。

1-2 使用菌株

以下の5菌株を用いて試験を行う。

(1) ネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)TA98

(2) ネズミチフス菌 TA100

(3) ネズミチフス菌 TA1535

(4) ネズミチフス菌 TA1537、TA97 又は TA97a

(5) 大腸菌(*Escherichia coli*)WP2 *uvrA*、大腸菌 WP2 *uvrA*/pKM101 又はネズミチフス菌 TA102

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

1-3 試験法

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

1-4 用量段階

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

とすることができる。

1-5 対照

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

1-6 プレート数

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

1-7 復帰変異コロニーの観察

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

1-8 再現性

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

1-9 結果の判定

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

1-10 結果の表示

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

1-11 結果のまとめ

試験の結果は様式 7 によりまとめる。

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

2 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

2-1 目的

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

2-2 使用細胞

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

2-3 試験法

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

代謝活性化による場合には、適切な薬物代謝酵素誘導剤（例えばフェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンとの併用など）で処理したげっ歯類（通常ラット）肝ホモジネートの9,000×g上清画分（S9）に補酵素などを加えたS9mixを用いる。S9の最終濃度は1～10%の範囲内（通常5%）とする。

2-4 被験物質の調製

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

2-5 用量段階

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

2-6 対照

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

2-7 プレート数

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

2-8 染色体異常の観察

スライド標本はコード化し、処理条件がわからない状況で観察する。染色体構造異常については、各用量当たり少なくとも200個のよく広がった分裂中期細胞（染色体数がモード±2）を観察し、染色体構造異常をもつ細胞数及び構造異常の種類別に細胞数を記録する。2枚のプレートを用いた場合には、原則としてプレート当たり少なくとも100個の分裂中期細胞を観察する。ギャップは他の異常と区別して記録す

るが、構造異常には含めない。ギャップは染色分体幅よりも狭い非染色性部位と定義する。染色体の数的異常については、各用量当たり 200 個以上の分裂中期細胞について観察し、倍数体等の出現数を記録する。

2-9 結果の判定

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

2-10 結果の表示

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

2-11 結果のまとめ

試験の結果は様式 8 によりまとめる。

3 マウスリンフォーマ T K 試験

3-1 目的

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

3-2 使用細胞

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

3-3 試験法

対数増殖期にある細胞を用い、最初に 3～4 時間の短時間処理法として代謝活性化系の非存在下及び、存在下について試験を実施する。代謝活性化系の非存在下の結果が陰性の場合には、代謝活性化系の非存在下の 24 時間連続処理による試験を実施する（注 2）。代謝活性化系の存在下の短時間処理法の結果が陰性の場合には、必要に応じて確認試験を行う（注 3）。代謝活性化には、適切な薬物代謝酵素誘導剤（例えばフェノバルビタールと 5,6-ベンゾフラボンとの併用など）で処理したげっ歯類（通常ラット）肝ホモジネートの 9000 × g 上清画分（S9）に補酵素などを加えた S9 mix を用いる。S9 の最終濃度は 1～10% の範囲内（通常 2%）とする。

3-4 被験物質の調製

被験物質を適切な溶媒に溶解または懸濁させる。被験物質が液体の場合は直接試験系に加えてもよい。被験物質が水溶性の場合は生理食塩液などを用いて溶解させ、水に不溶の場合にはジメチルスルホキシド（DMSO）などを用いて溶解させる。

3-5 用量段階

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

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

3-6 対照

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

3-7 処理系列数

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

3-8 細胞毒性及び突然変異の検出

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

3-9 結果の判定

結果の判定は、適切な統計処理法を用いると共に、突然変異頻度の有意な上昇、及び用量依存性の有無を考慮して行う。最終的な判定は試験条件下での生物学的な妥当性も考慮して行うことが望ましい。明確に陽性あるいは陰性と結論づけられない場合には、適切な実験条件で確認試験を実施する。

3-10 結果の表示

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

3-11 その他

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

- ・ マウスリンパ腫 L5178Y 細胞株を用いた試験系による試験であること
- ・ 最初に短時間処理法として代謝活性化による場合及びよらない場合について試験を実施し、短時間処理法の結果がともに陰性の場合には、代謝活性化によらな

い場合について、連続処理法による試験を実施すること

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

<藻類生長阻害試験、ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験>

I 適用範囲

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

II 定義

この試験法において使用する用語は、次に掲げた定義による。

1 試験方式

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

2 エンドポイント

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

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

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

III 総則

1 試験実施に当たっての基本的考え方

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

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

2 試験溶液の調製

各濃度の試験溶液の調製は、必要量の被験物質を培地等で直接溶解するか、あるいは、適切な濃度の被験物質の原液を調製し、原液を培地等で希釈することにより行う。被験物質の原液は助剤を使用せずに調製することが望ましいが、被験物質を直接水又は培地等に溶解して原液を調製することが困難な場合には、超音波等の機械的な分散によるか、あるいは、低毒性の有機溶剤等の助剤（溶剤又は分散剤をいう。以下同じ。）を使用してもよい。ただし、原則として界面活性作用のある分散剤は使用しないこととし、試験濃度は被験物質の試験条件下での培地等への溶解度（以下「溶解限度」という。）以下に設定することとする。

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

3 難水溶性物質の扱い

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

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

IV 藻類生長阻害試験

目的

本試験は、指数増殖期の藻類を被験物質に暴露し、対照区に対する生長阻害率を測定することにより、藻類の生長に対する被験物質の毒性を明らかにすることを目的とする。なお、本試験において生長とは暴露期間中の生物量の増加をいう。

1 供試生物

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

2 試験容器及び機器

本試験では次に示す試験容器及び機器を用いる。

2-1 試験容器

試験容器等、試験溶液と接触する器具はすべてガラス製又は化学的に不活性な材質でできたものを用いる。試験容器は、空気に接する面が十分確保できるものを用いる。例えば、100mLの容量の試験溶液には250mLの三角フラスコが適している。

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

2-2 培養装置

培養は、温度、照明条件を一定に維持できる培養器又は培養室において行う。

2-3 生物量計測装置

生物量の計測は、例えば、粒子計数装置、顕微鏡下での血球計算盤の使用、蛍光光度計、分光光度計又は比色計を用いて行う。なお、分光光度計を使用して低濃度の細胞濃度を測定する場合は、少なくとも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（Ⅲ）六水和物 0.064 mg/L
- ・ エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 0.1 mg/L
- ・ ホウ酸 0.185 mg/L
- ・ 塩化マンガン四水和物 0.415 mg/L

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

この培地は大気との平衡状態で pH は 8.1 となる。

4 前培養

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

5 試験溶液

各濃度の試験溶液の調製は、必要量の被験物質を培地で直接溶解するか、あるいは、適切な濃度の被験物質の原液を調製し、原液を培地で希釈することにより行う。この他、試験溶液の調製に関しては、Ⅲ 総則の 2 試験溶液の調製によるものとする。

6 試験条件

6-1 暴露期間

原則として 72 時間とする。

6-2 初期生物量

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

6-3 試験濃度

少なくとも 5 濃度区を等比級数的にとる。この濃度範囲で、0 ～ 75% の生長阻害を起こす範囲が含まれることが望ましい。なお、100mg/L 以上の濃度で試験を行う必要はない。

別に対照区をおく。やむを得ず助剤を使用した場合は、対照区に加え助剤対照区を設ける。

6-4 連数（繰り返し）

各試験濃度区について 3 連とする。対照区については 6 連（助剤対照区を設けている場合には、対照区については 3 連、助剤対照区については 6 連）で試験を実施することが望ましい。

6-5 培養方法

- ・ 温度 21 ～ 24 °C の範囲内で設定し、培養器又は培養室内の変動は ± 2 °C 以内とする。
- ・ 照明 60-120 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ （白色又は昼光色の蛍光灯を用い、連続的かつ均一に照射する。）
- ・ 培養方法 振とう培養（被験物質が揮発性でない場合は、試験容器は通気性のよい蓋を用いる。暴露期間中、藻類は懸濁状態にしておく必要がある。）

7 被験物質への暴露の開始

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

8 生物量の測定

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

9 被験物質濃度等の測定

9-1 被験物質濃度の測定

被験物質の濃度は、少なくとも最低及び最高試験濃度区並びに予測される EC_{50} 付近の試験濃度区について暴露開始時及び終了時に測定することとする。また、暴露期間中に設定濃度より 20%以上低下することが予測される場合は、すべての試験濃度区について暴露開始時及び終了時に測定することが望ましい。さらに、揮発性あるいは吸着性の強い物質など、暴露期間中に著しく濃度が低下することが予測されるものについては、暴露期間中 24 時間間隔で分析を追加することが望ましい。

9-2 試験環境の測定

試験溶液の pH を暴露開始時及び終了時に測定する。暴露期間中、対照区（助剤対照区を含む。）の pH は通常の場合、1.5 以上変動してはならない。

10 限度試験

100mg/L 又は水溶解限度のより低い方の濃度で被験物質が毒性を示さないことが予想される場合等には、この濃度で限度試験を行い、NOEC 等がこの濃度より大きいことを示すことができる。前述の試験条件および有効性の基準は、限度試験にも適用するが、試験の連数は 2 倍に増やすこととする。対照区（助剤対照区を設けている場合には助剤対照区）と試験濃度区の生長速度等の平均値を比較するために、t 検定等の統計解析を行う。

11 試験の有効性

Pseudokirchneriella subcapitata 及び *Desmodesmus subspicatus* では、次の条件が満たされる場合、試験は有効とみなされる。

- ・ 対照区（助剤対照区を含む。）の生物量が暴露期間中に少なくとも 16 倍に増殖すること。
- ・ 対照区の毎日の生長速度の変動係数（助剤対照区の毎日の生長速度の変動係数を含む。）が暴露期間を通じて 35%を超えないこと。
- ・ 対照区の繰り返し間の生長速度の変動係数（助剤対照区の繰り返し間の生長速度の変動係数を含む。）が 7%を超えないこと。

12 結果の算出方法

1 2 - 1 結果の取扱い

結果の算出は、原則として被験物質の実測濃度の適切な平均値に基づいて行う。暴露期間中、被験物質濃度が設定濃度または初期実測濃度の± 20%以内に保たれていたことが証明できる場合には、設定濃度または初期実測濃度に基づいて結果の算出を行うことができる。

各試験濃度区と対照区(助剤対照区を含む。)の生物量を暴露期間と被験物質濃度とともに表にする。各試験濃度区の生物量の平均値と対照区の生物量の平均値(助剤対照区の生物量の平均値を含む。)を時間に対してプロットし、生長曲線を描く。このとき、対照区(助剤対照区を含む。)の生長曲線が、暴露期間を通じて指数増殖期にあることを確認する。

被験物質濃度と影響の関係は、1 2 - 2に示す方法を用いて計算する。

1 2 - 2 生長速度の比較

指数関数的に増殖しているときの生長速度は次のようにして計算される。

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

ここで、

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

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

X_j = t_j 時の生物量。

t_i = 暴露開始後*i*回目に生物量を測定した時間(d)

t_j = 暴露開始後*j*回目に生物量を測定した時間(d)

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

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

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

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

1 2 - 3 毒性値の算出

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

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

の値について、分散分析と多重比較を行い、NOECを求める。

1 3 結果のまとめ

試験の結果は様式9によりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

V ミジンコ急性遊泳阻害試験

目的

本試験は、ミジンコを被験物質に 48 時間暴露し、対照区に対する遊泳阻害率を測定することにより、ミジンコの遊泳に対する被験物質の毒性を明らかにすることを目的とする。なお、本試験において、遊泳阻害とはミジンコが試験容器を穏やかに動かしても 15 秒間泳げない状態をいう。

1 供試生物

オオミジンコ (*Daphnia magna*) が推奨されるが、*Daphnia pulex* など、他の *Daphnia* 属の種を用いてもよい。

供試ミジンコは、暴露開始時に 24 時間齢未満のものを用いる。また、ばらつきを減らすため、親ミジンコの 1 回目の産仔によるものは使用しない。供試ミジンコは、健康に飼育された親世代（例えば、高死亡率、雄及び抱卵嚢の出現、1 回目の産仔までの期間の遅延、変色等の飼育時に何らかのストレスを受けた兆候がないもの）から得られたものを用い、また、すべて同じ系統のものを用いることとする。

供試ミジンコを得るための親世代のミジンコは、試験条件（光・温度・水）と同じ条件下で飼育されなければならない。もし、試験に用いる水が通常のみジンコを飼育する際に用いられるものと異なる場合は、暴露開始前にじゅん化期間を設けるとよい。じゅん化させるには、暴露開始前に最低 48 時間、ミジンコを試験温度の試験用水で飼育し、生まれた子ミジンコを試験に用いるようにする。

2 試験容器及び機器

本試験では次に示す試験容器及び機器を用いる。

2-1 試験容器

試験容器等、試験溶液と接触する器具はすべてガラス製又は化学的に不活性な材質でできたものを用いる。水の蒸発及び試験溶液へのほこりの混入を防ぐため、試験容器は緩く蓋をする。

被験物質が揮散しやすい物質の場合は、密閉系で試験を行うこととし、溶存酸素不足を防ぐために十分な大きさの試験容器を用いる。

2-2 器具

本試験には、溶存酸素計（少量のサンプルで溶存酸素濃度を計測できる微小電極や他の適した器具）、pH 計測器、温度管理に適切な器具等を用いる。

3 試験用水

ミジンコの飼育及び試験に適した水ならば、天然水（表流水又は地下水）、脱塩素した水道水又は人工調製水（例：付表 1）のいずれを用いてもよい。また、試験用水は付表 2 の条件を満たすものとする。

ElendtM4、M7 飼育水のようなキレート剤が含まれている水は、金属を含む物質の試験には使用しない。硬度は炭酸カルシウム濃度で 250mg/L 以下とし、pH は 6 ～ 9 とする。

試験用水は、試験に使用する前にばっ気を行う。

4 試験溶液

各濃度の試験溶液の調製は、必要量の被験物質を試験用水で直接溶解するか、あるいは、適切な濃度の被験物質の原液を調製し、原液を試験用水で希釈することにより行う。この他、試験溶液の調製に関

しては、Ⅲ総則の2 試験溶液の調製によるものとする。

試験は pH を調整せずに行う。pH が 6 ～ 9 の範囲でない場合、pH を被験物質添加前の試験用水の pH に調整して追加試験をすることが望ましい。この pH の調整は被験物質の濃度変化がなく、被験物質の化学反応又は沈殿が起こらないような方法で行う。pH 調整には塩酸又は水酸化ナトリウムを用いることが望ましい。

5 試験条件

5-1 試験方式

試験は、止水式、半止水式又は流水式のいずれで行ってもよいが、被験物質の濃度が安定しない際には半止水式又は流水式で行うことが望ましい。

5-2 暴露期間

48 時間とする。

5-3 収容量と供試数

- ・収容量 1 頭当たり少なくとも 2ml の試験溶液を用いる。
- ・供試数 各試験濃度区及び対照区で少なくとも 20 頭を使用する。この場合、各 5 頭ずつ 4 連に分けることが望ましい。

5-4 試験濃度

少なくとも 5 濃度区を等比級数的にとる。公比は 2.2 を超えないことが望ましい。最高試験濃度区では、100%の遊泳阻害が起こることが望ましいが、100mg/L 以上の濃度で試験を行う必要はない。最低試験濃度区では影響が観察されないことが望ましい。

別に対照区をおく。やむを得ず助剤を使用した場合は、対照区に加え助剤対照区を設ける。

5-5 飼育方法

- ・照明 明暗周期を 16 : 8 時間に設定することが望ましい。被験物質が光に対して不安定な場合は暗条件でもよい。
- ・温度 18 ～ 22 °C の範囲内に設定し、各試験容器間の変動は ± 1.0 °C 以内とする。
- ・溶存酸素濃度 3mg/L を下回ってはならない。暴露期間中は、原則としてばっ気は行わない。
- ・給餌 行わない。

6 被験物質への暴露の開始

各試験容器に、5-3 で設定した供試数のミジンコを移して暴露を開始する。

7 観察

暴露開始後少なくとも 24、48 時間後にミジンコの遊泳阻害を観察する。ミジンコが試験容器を穏やかに動かしても 15 秒間泳げない場合、遊泳阻害されたとみなす。遊泳阻害の他にも、行動や外見の異常が見られた場合には記録する。

8 被験物質濃度等の測定

8-1 被験物質濃度の測定

被験物質の濃度は、少なくとも最低及び最高試験濃度区について暴露開始時及び終了時に測定する。また、暴露期間中に初期濃度より 20%以上低下することが予測される場合は、すべての試験濃度区

について暴露開始時及び終了時に測定することが望ましい。さらに、揮発性あるいは吸着性の強い物質など、暴露期間中に著しく濃度が低下することが予測されるものについては、暴露期間中 24 時間間隔で分析を追加することが望ましい。

半止水式試験の場合は、換水直後と次の換水の直前を 1 セットとして、少なくとも 2 セット測定を行うことが望ましい。

8-2 試験環境の測定

対照区及び最高試験濃度区について暴露開始時及び終了時に溶存酸素濃度と pH を測定する。対照区の水温についても、少なくとも暴露開始時及び終了時に測定することとするが、試験水温の変動を監視するために、対照区又は周囲の大気等の温度を暴露期間中に継続して測定し、その変動について記録することが望ましい。また、暴露期間中、pH は通常の場合 1.5 以上変動してはならない。

9 限度試験

100mg/L 又は水溶解限度のより低い方の濃度で被験物質が遊泳阻害を示さないことが予想される場合等には、この濃度で限度試験を行い、EC₅₀ がこの濃度より大きいことを示すことができる。限度試験は 20 頭のみジンコ（5 頭ずつ 4 群に分けることが望ましい。）を用い、対照区においても同数を用いる。暴露終了時に遊泳阻害率が 10%を超える場合、正規の試験を行う。また、異常な行動が観察された場合は記録する。

10 試験の有効性

次の条件が満たされる場合、試験は有効とみなされる。

- ・対照区において、みジンコが 10%を超えて遊泳阻害されたり、水面に浮いたりしてはならないこと。
- ・溶存酸素濃度は、暴露終了時において 3mg/L 以上であること。

11 結果の算出方法

結果の算出は、原則として被験物質の実測濃度の適切な平均値に基づいて行う。暴露期間中、被験物質濃度が初期濃度の± 20%以内に保たれていたことが証明できる場合には、初期濃度に基づいて結果の算出を行うことができる。

各試験濃度区と対照区の遊泳阻害率を暴露期間と被験物質濃度とともに表にまとめるとともに、各試験濃度区に対する 24 時間及び 48 時間における遊泳阻害率をプロットする。次にプロビット法などの適切な統計手法を用い、95%信頼限界における回帰直線の傾き及び暴露期間 48 時間における EC₅₀ を求める。

得られたデータが統計計算を行うのに不十分な場合、全く遊泳阻害を起こさない最高試験濃度と 100%遊泳を阻害する最低試験濃度の幾何平均を EC₅₀ の近似値とみなす。

12 結果のまとめ

試験の結果は様式10によりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

付表1 人工調製水

(1) ISO 試験水

(a) 塩化カルシウム溶液

塩化カルシウム二水和物 11.76g を希釈水に溶かし 1L とする。

(b) 硫酸マグネシウム溶液

硫酸マグネシウム七水和物 4.93g を希釈水に溶かし 1L とする。

(c) 炭酸水素ナトリウム溶液

炭酸水素ナトリウム 2.59g を希釈水に溶かし 1L とする。

(d) 塩化カリウム溶液

塩化カリウム 0.23g を希釈水に溶かし 1L とする。

(a) ～ (d) の溶液各々 25mL を混合し、希釈水で全量を 1L とする。

希釈水には適切な純水（例えば、イオン交換水、蒸留水又は逆浸透水）を用いることとする。希釈水の電導度は $10 \mu \text{ S/cm}$ を越えてはならない。すべての試薬は分析用特級とする。

(2) Elendt M4 及び M7 飼育水

各飼育水は飼育水原液Ⅰ（微量成分）と飼育水原液Ⅱ（主成分）を希釈水（適切な純水、例えば、脱イオン水、蒸留水又は逆浸透水を用いる。）に加えて調製する。

①飼育水原液Ⅰの調製

各物質の飼育水原液Ⅰは、表1の上欄の物質毎にそれぞれ中欄に示した量を 1L の希釈水に添加し、溶解させて調製する。エチレンジアミン四酢酸鉄（Ⅱ）溶液は、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム・二水和物と硫酸鉄（Ⅱ）七水和物を別々に調製した後混合し、混合後すぐにオートクレーブにかけて調製する。

各物質の飼育水原液Ⅰを調製した後、それぞれから表1の下欄に示す量を分取し、混合し、希釈水で全量を1Lとし、これを「飼育水原液Ⅰ混合液」とする。

表1 飼育水原液Ⅰの構成物質と添加量等

飼育水原液Ⅰ (単物質)	水に添加する量 (単位： mg/L)	飼育水原液Ⅰ混合液調製のための添加量			
		Elendt M4		Elendt M7	
		添加量 (mL/L)	最終希釈率*	添加量 (mL/L)	最終希釈率*
ホウ酸	57,190	1.0	20,000 倍	0.25	80,000 倍
塩化マンガン四水和物	7,210	1.0	20,000 倍	0.25	80,000 倍
塩化リチウム	6,120	1.0	20,000 倍	0.25	80,000 倍
塩化ルビジウム	1,420	1.0	20,000 倍	0.25	80,000 倍
塩化ストロンチウム六水和物	3,040	1.0	20,000 倍	0.25	80,000 倍
臭化ナトリウム	320	1.0	20,000 倍	0.25	80,000 倍
モリブデン酸二ナトリウム	1,260	1.0	20,000 倍	0.25	80,000 倍

二水和物					
塩化銅二水和物	335	1.0	20,000 倍	0.25	80,000 倍
塩化亜鉛	260	1.0	20,000 倍	1.0	20,000 倍
塩化コバルト六水和物	200	1.0	20,000 倍	1.0	20,000 倍
ヨウ化カリウム	65	1.0	20,000 倍	1.0	20,000 倍
亜セレン酸ナトリウム	43.8	1.0	20,000 倍	1.0	20,000 倍
メタバナジン酸アンモニウム	11.5	1.0	20,000 倍	1.0	20,000 倍
エチレンジアミン四酢酸 （Ⅱ）溶液		20.0	1,000 倍	5.0	4,000 倍
エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物	5,000	—		—	
硫酸鉄（Ⅱ）七水和物	1,991	—		—	

*最終希釈率：Elendt M4 又は M7 飼育水に対する飼育水原液Ⅰの最終的な希釈率

②飼育水原液Ⅱの調製

飼育水原液Ⅰ混合液を除く各物質の飼育水原液Ⅱは、表 2 の上欄の物質毎にそれぞれ中欄に示した量を 1L の希釈水に添加し、溶解させて調製する。なお、混合ビタミン保存溶液は、調製後、少量ずつ凍結保存し、使用する直前に飼育水に加える。

③各飼育水の調製

各飼育水は、各物質の飼育水原液Ⅱから表 2 の下欄に示す量を分取し、混合し、希釈水で全量を 1L として調製する。なお、各飼育水を調製するときには、塩類の沈殿を避けるために、500 ～ 800mL 程度の希釈水に分取量の飼育水原液を加え、その後に希釈水を足して 1L に合わせる。

表 2 飼育水原液Ⅱの構成物質と添加量等（Elendt M4 及び M7 共通）

飼育水原液Ⅱ （主成分原液）	水に添加する量 （単位：mg/L）	飼育水（人工調製水） 調製のための添加量	
		Elendt M4 及び M7	
		添加量*1 （mL/L）	最終希釈率 *2
飼育水原液Ⅰ混合液* *Elendt M4 と M7 で成分比率が異なる事に注意	—	50	20 倍
塩化カルシウム二水和物	293,800	1.0	1,000 倍
硫酸マグネシウム七水和物	246,600	0.5	2,000 倍

塩化カリウム	58,000	0.1	10,000 倍
炭酸水素ナトリウム	64,800	1.0	1,000 倍
ケイ酸二ナトリウム九水和物	50,000	0.2	5,000 倍
硝酸ナトリウム	2,740	0.1	10,000 倍
リン酸第一カリウム	1,430	0.1	10,000 倍
リン酸第二カリウム	1840	0.1	10,000 倍
混合ビタミン保存溶液	—	0.1	10,000 倍
塩酸チアミン	750		10,000 倍
シアノコバラミン (B12)	10		10,000 倍
ビオチン	7.5		10,000 倍

*1 添加量：Elendt M4 及び M7 飼育水を調製するための添加量（mL/L）

*2 最終希釈率：M4 又は M7 飼育水に対する飼育水原液Ⅱの最終的な希釈率

付表 2 試験用水の化学的条件

物質名	濃度条件
粒子状物質	20 mg/L 未満
全有機炭素	2 mg/L 未満
非イオン化アンモニア	1 μ g/L 未満
塩素	10 μ g/L 未満
全有機リン系農薬	50 ng/L 未満
全有機塩素系農薬及び PCB	50 ng/L 未満
全有機塩素	25 ng/L 未満

VI 魚類急性毒性試験

目的

本試験は、魚類を被験物質に 96 時間暴露し、死亡率を測定することにより、魚類に対する被験物質の毒性を明らかにすることを目的とする。

1 供試生物

メダカ（ヒメダカ）が推奨されるが、例えば付表 1 に示す魚種などを使用してもよい。魚は良好な健康状態にあり、外見上の奇形があってはならない。また、各試験に使用する魚はできるだけ均一な大きさであることが望ましい。

付表 1

魚種	推奨試験温度 (℃)	試験魚の推奨全長 (cm)
<i>Danio rerio</i> ゼブラフィッシュ	21-25	2.0 ± 1.0
<i>Pimephales promelas</i> ファットヘッドミノー	21-25	2.0 ± 1.0
<i>Cyprinus carpio</i> コイ	20-24	4.0 ± 2.0
<i>Oryzias latipes</i> メダカ	21-25	2.3 ± 1.2
<i>Poecilia reticulata</i> グッピー	21-25	2.0 ± 1.0
<i>Lepomis macrochirus</i> ブルーギル	21-25	2.0 ± 1.0
<i>Oncorhynchus mykiss</i> ニジマス	13-17	5.0 ± 1.0

2 試験容器及び機器

本試験では次に示す試験容器及び機器を用いる。

2-1 試験容器

試験容器等、試験溶液と接触する器具はすべてガラス製又は化学的に不活性な材質でできたものを用いる。試験容器は、推奨収容量に対し適切な大きさのものを用いる。水の蒸発及び試験溶液へのほこりの混入を防ぐため、試験容器は緩く蓋をする。

被験物質が揮散しやすい物質の場合は、密閉系で試験を行うこととし、溶存酸素不足を防ぐために十分な大きさの試験容器を用いる。

2-2 器具

本試験には、溶存酸素計、温度調節のための適切な器具又は装置を用いる。

3 試験用水

魚の飼育及び試験に適した水ならば、天然水（表流水又は地下水）、脱塩素した水道水又は人工調製水（注参照）のいずれを用いてもよい。全硬度は炭酸カルシウム濃度 10 ～ 250mg/L で、pH6.0 ～ 8.5 の水が望ましい。人工調製水の調製に用いる試薬は分析用の特級であり、脱イオン水及び蒸留水の電導度は 10 μ S/cm を超えてはならない。

4 じゅん化

すべての供試魚を、少なくとも試験に使用する 12 日前に入手し、じゅん化しなければならない。48 時間の観察期間に続いて、暴露開始前に少なくとも 7 日間試験で使用する水質の水で以下の条件下においてじゅん化する。なお、観察期間以降は薬浴は行わないことが望ましい。

- ・照明 一日当たり 12 ～ 16 時間
- ・温度 供試魚種の適温(表 1 参照)
- ・酸素濃度 飽和酸素濃度の少なくとも 80%
- ・給餌 暴露開始の 24 時間前まで、週当たり 3 回又は毎日

じゅん化期間中の死亡率を記録し、供試魚に以下の基準を適用する。

- ・じゅん化期間中の連続した 7 日間で全体の死亡率が 10%を超えた場合、試験に使用しない。
- ・じゅん化期間中の連続した 7 日間で全体の死亡率が 5 ～ 10%の間の場合、7 日間延長してじゅん化する。
- ・じゅん化期間中の連続した 7 日間で全体の死亡率が 5%より低い場合、試験に使用できる。

5 試験溶液

各濃度の試験溶液の調製は、必要量の被験物質を試験用水で直接溶解するか、あるいは、適切な濃度の被験物質の原液を調製し、原液を試験用水で希釈することにより行う。この他、試験溶液の調製に関しては、Ⅲ総則の 2 試験溶液の調製によるものとする。

試験は pH の調整をせずに行う。被験物質を添加後、試験溶液の pH に顕著な変化が認められる場合、pH を被験物質添加前の試験用水の pH に調整して追加試験をすることが望ましい。この pH の調整は被験物質の濃度変化がなく、被験物質の化学反応又は沈殿が起こらないような方法で行う。pH 調整には塩酸又は水酸化ナトリウムを用いることが望ましい。

6 試験条件

6-1 試験方式

試験は流水式又は半止水式で行うことが望ましい。また、被験物質の濃度が安定しない際には流水式を用いることが望ましい。

6-2 暴露期間

96 時間とする。

6-3 収容量と供試魚の数

- ・収容量 半止水式では最高密度で 1.0 魚体 g/L が推奨される。流水式ならもっと多く収容できる。

- ・供試魚の数 各試験濃度区及び対照区で少なくとも 7 尾の供試魚を用いる。

6-4 試験濃度

少なくとも 5 濃度区を等比級数的にとる。公比は 2.2 を超えないことが望ましい。最高試験濃度区では、すべての魚に致死影響が起こることが望ましいが、100mg/L 以上の濃度で試験を行う必要はない。最低試験濃度区では影響が観察されないことが望ましい。

別に対照区をおく。やむを得ず助剤を使用した場合は、対照区に加え助剤対照区を設ける。

6-5 飼育方法

- ・温度 供試魚の適温(表参照)で、2℃の範囲内で一定に保つ。
- ・照明 一日当たり 12 ～ 16 時間
- ・溶存酸素濃度 飽和酸素濃度の 60%を下回ってはならない。被験物質の顕著な消失がなければ大丈夫を行ってもよい。
- ・給餌 行わない。
- ・かく乱 魚の行動を変化させるようなかく乱は避ける。

7 被験物質への暴露の開始

各試験容器に、6-3 に基づき設定した供試数のじゅん化された魚を移して暴露を開始する。

8 観察

暴露開始後少なくとも 24、48、72、96 時間後に魚の様子を観察する。観察可能な動き(例えば、鰓蓋の動きなど)がなく、尾柄部に触れて反応がない場合には魚は死亡しているとみなす。観察時に死亡魚を取り除き死亡率を記録する。暴露開始後、3 時間と 6 時間後にも観察することが望ましい。平衡、遊泳行動、呼吸機能、体色などに異常が観察された場合は記録しておく。

9 被験物質濃度等の測定

9-1 被験物質濃度の測定

被験物質の濃度は、原則として少なくとも最低及び最高試験濃度区について暴露開始時及び終了時に測定する。また、暴露期間中に初期濃度より 20%以上低下することが予測される場合は、すべての試験濃度区について暴露開始時及び終了時に測定することが望ましい。さらに、揮発性あるいは吸着性の強い物質など、暴露期間中に著しく濃度が低下することが予測されるものについては、暴露期間中 24 時間間隔で分析を追加することが望ましい。

半止水式試験の場合は、換水直後と次の換水の直前を 1 セットとして、少なくとも 2 セット測定を行うことが望ましい。

9-2 試験環境の測定

pH、溶存酸素濃度、水温は少なくとも毎日 1 回測定する。

10 限度試験

100mg/L 又は水溶解限度のより低い方の濃度で被験物質が致死を示さないことが予想

される場合等には、この濃度で限度試験を行い、 LC_{50} がこの濃度より大きいことを示すことができる。限度試験は最少で 7 尾を用い、対照区においても同数を用いる。暴露終了時まで死亡が観察された場合、正規の試験を行う。また、亜致死的な影響が観察された場合は記録する。

1 1 試験の有効性

次の条件が満たされる場合、試験は有効とみなされる。

- ・対照区の死亡率が暴露終了時に 10%(10 尾より少ない数を使った場合は 1 尾)を超えないこと。
- ・溶存酸素濃度が暴露期間中少なくとも飽和酸素濃度の 60%を維持していること。
- ・被験物質の濃度が暴露期間中十分維持されていることが明らかであること。

1 2 結果の算出方法

結果の算出は、原則として被験物質の実測濃度の適切な平均値に基づいて行う。暴露期間中、被験物質濃度が初期濃度の $\pm 20\%$ 以内に保たれていたことが証明できる場合には、初期濃度に基づいて結果の算出を行うことができる。

各試験濃度区と対照区の累積死亡率を暴露期間と被験物質濃度とともに表にする。対数正規確率紙に各試験濃度区に対する各暴露期間における累積死亡率をプロットする。次にプロビット法などの適切な統計手法を用い、95%信頼限界における回帰直線の傾き及び暴露期間 96 時間における LC_{50} を算出する。さらに、各観察時毎の LC_{50} を算出することが望ましい。

得られたデータが統計計算を行うのに不十分な場合、全く死亡を起こさない最高試験濃度と 100%死亡を起こす最低試験濃度の幾何平均を LC_{50} の近似値とみなす。

1 3 結果のまとめ

試験の結果は様式11によりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

注 人工調製水

OECD (ISO6341-1982) の組成

(a) 塩化カルシウム溶液

塩化カルシウム二水和物 11.76g を脱イオン水に溶かし 1L とする。

(b) 硫酸マグネシウム溶液

硫酸マグネシウム七水和物 4.93g を脱イオン水に溶かし 1L とする。

(c) 炭酸水素ナトリウム溶液

炭酸水素ナトリウム 2.59g を脱イオン水に溶かし 1L とする。

(d) 塩化カリウム溶液

塩化カリウム 0.23g を脱イオン水に溶かし 1L とする。

(a) ~ (d) の溶液各々 25mL を脱イオン水に混合し、全量を 1 L とする。この溶液のカルシウムイオンとマグネシウムイオンの量の和は、2.5mmol/L である。また、カルシウムとマグネシウムイオンの比は 4 : 1 であり、ナトリウムとカリウムイオンの比は 10 :

1 である。

脱イオン水の電導度は $10 \mu \text{ S/cm}$ を越えてはならない。すべての試薬は分析用特級とする。

調製した人工調製水は、溶存酸素が飽和に達するまでばっ気し、使用前までばっ気をせずに約 2 日間貯蔵する。

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

I ここでは、藻類の生長に及ぼす影響に関する試験、ミジンコの繁殖に及ぼす影響に関する試験、魚類の初期生活段階における生息又は生育に及ぼす影響に関する試験及び優先評価化学物質の環境における残留の状況からみて経済産業大臣及び環境大臣が特に必要があると認める生活環境動植物の生息又は生育に及ぼす影響に関する試験の標準となるべき方法について規定する。

II 藻類の生長に及ぼす影響に関する試験（藻類生長阻害試験）

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

III ミジンコの繁殖に及ぼす影響に関する試験（ミジンコ繁殖試験）

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

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

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

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

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

[様式 1]

分解度試験結果報告書

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

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	
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	1 4 日 目	2 1 日 目	2 8 日 目
(水 + 被 験 物 質) 系					
(汚 泥 + 被 験 物 質) 系	No. 1				
	No. 2				
	No. 3				
(汚 泥 + ア ニ リ ン) 系					
汚 泥 ブ ラ ン ク 系					

(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		
B O D * 1	mg					
D O C * 1	mg					
被験物質残留量 及び残留率 (分析機器名称)	mg					
	%①					
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	*2	*2	*2	
物質収支 (①＋②)	%					

*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。

(4)分解度

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

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 2]

濃縮度試験結果報告書

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. 急性毒性試験

供 試 魚 （ 学 名 ）		
L C ₅₀ （ h r ）		
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）

3. 試験方法

試 験 方 法			
供試魚（学名）			
脂 質 含 量 （％）	開始時： 終了時：		
被験物質設定濃度 （ μ g/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（ μ g/L）	
		第一濃度区：	
		第二濃度区：	
		第一濃度区：	
		第二濃度区：	

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($\mu\text{g/L}$)					
	濃 縮 倍 率					
第 二 濃 度 区	水中の被験物質濃度($\mu\text{g/L}$)					
	濃 縮 倍 率					

(2) 定常状態における濃縮倍率又は濃縮倍率の上下限

濃 度 区	濃 縮 倍 率	
第 一 濃 度 区	BCF _{ss} ・ BCF	
第 二 濃 度 区	BCF _{ss} ・ BCF	

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。

[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又は日本工業規格Z7260-107(2000)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	$pK_{a1} =$ $pK_{a2} =$	$pK_{a1} =$ $pK_{a2} =$
酸・塩基の区別		
温度 (°C)		
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又は日本工業規格Z7260-107(2000)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		

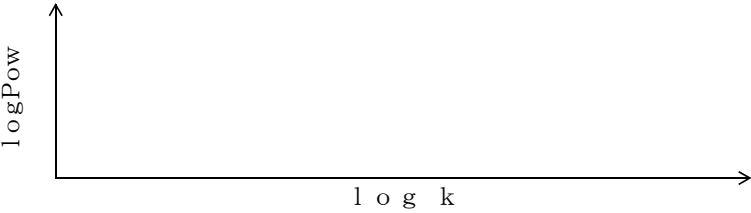
3-2 OECDテストガイドライン117に定められた方法

(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					

t₀ : 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 - t₀) / t₀

(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. 一般的事項

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NOEL* (mg/kg)	実験場所

*NOEL : No-Observed-Effect-Level

3. 28日間反復投与毒性試験

被験物質投与期間			平成 年 月 日より平成 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 回復群 雄 匹 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														
NOEL (mg/kg)		mg/kg/day												
NOEL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

1. 一般的事項

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NOEL* (mg/kg)	実験場所

*NOEL : No-Observed-Effect-Level

3. 反復投与毒性に係る結果

被験物質投与期間			平成 年 月 日より平成 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 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														
その他														
NOEL (mg/kg)		mg/kg/day												
NOEL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			平成 年 月 日より平成 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										
生後0日生存率										
生後4日生存率										
性比 (計算式)										
新生児体重	(0日)									
新生児体重	(4日)									
外表異常										
内臓異常										
その他										
NOEL (mg/kg)		mg/kg/day								
NOEL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

着床率[Implantation Index] : (着床数/黄体数) X 100

受胎率[Fertility Index] : (妊娠動物数/交尾動物数) 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

性比 : 計算式を記載してください

外表異常・内臓異常等 : 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ありません

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

1. 一般的事項

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NOEL* (mg/kg)	実験場所

*NOEL : No-Observed-Effect-Level

3. 簡易生殖発生毒性試験

被験物質投与期間			平成 年 月 日より平成 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 ***	
			♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
死亡										
体重変化										
摂餌量										
一般状態										
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										
妊娠期間										
交尾率										
着床率										
受胎率										
出産率										
生後0日生存率										
生後4日生存率										
性比 (計算式)										
新生児体重	(0日)									
新生児体重	(4日)									
外表異常										
内臓異常										
その他										
NOEL (mg/kg)		mg/kg/day								
NOEL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

着床率[Implantation Index] : (着床数/黄体数) X 100

受胎率[Fertility Index]：(妊娠動物数／交尾動物数) 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

性比：計算式を記載してください

外表異常・内臓異常等：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ありません

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. S 9 m i x

(1) S 9 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 No.	
保 存 温 度	℃

(2) S 9 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 / k g 体 重)	

(3) S 9 m i x の組成

成 分	S9 mix 1ml中の量	成 分	S9mix 1ml中の量
S 9	ml	N A D P H	μ mol
M g C l ₂	μ mol	N A D H	μ mol
K C l	μ mol	Na-リン酸緩衝液	μ mol
グルコース-6-リン酸	μ mol	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 No.	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 No.
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	μ l

（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 2. 段階希釈法 3. その他（ ）				

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 No.	
使用寒天の名称・製造元・Lot No.	

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。

(別表1)

試 験 結 果 表

被験物質の名称：

試験実施期間		年 月 日 より 年 月 日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μ g/プレート)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
-S9 mix	陰性対照	()	()	()	()	()	
		()	()	()	()	()	
		()	()	()	()	()	
		()	()	()	()	()	
		()	()	()	()	()	
		()	()	()	()	()	
		()	()	()	()	()	
+S9 mix	陰性対照	()	()	()	()	()	
		()	()	()	()	()	
		()	()	()	()	()	
		()	()	()	()	()	
		()	()	()	()	()	
		()	()	()	()	()	
		()	()	()	()	()	
陽性対照	S9 mixを必要としないもの	名 称					
		用量(μ g/プレート)					
		コロニー数/ プレート	()	()	()	()	()
	S9 mixを必要とするもの	名 称					
		用量(μ g/プレート)					
		コロニー数/ プレート	()	()	()	()	()

[備考]

1. 菌の生育阻害が認められる場合は、該当する数値の右上に*印を付すこと。
2. 括弧内には各プレートのコロニー数の平均値を記入すること。
3. 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入すること。
4. プレート上に沈澱が析出した場合は、その用量に†印を付すこと。
5. 略称で示された陽性物質の名称を欄外に記載すること。

(別表 2)

比 活 性

	菌株名	－ S 9 m i x		＋ S 9 m i x	
		比活性	計算に用いた用量	比活性	計算に用いた用量
用 量 設 定 試 験					
本 試 験					

[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 No.)	
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. S 9 mix

(1) S 9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 No.	
保存温度	℃

(2) S 9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) S9 mix 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) S9 mix 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 No.	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 (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。
 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

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 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 （％）	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T O Xを記入すること。

7． 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 （％）	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T O Xを記入すること。
- 7． 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	
	試験濃度（設定値）	
	初期生物量	
	連数	年 月 日～ 年 月 日
		(公比)
	cells/mL	
	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]

1. 「対照物質への感受性」の欄には、試験生物の感受性検定の結果を記入（対照物質を明記した上で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	

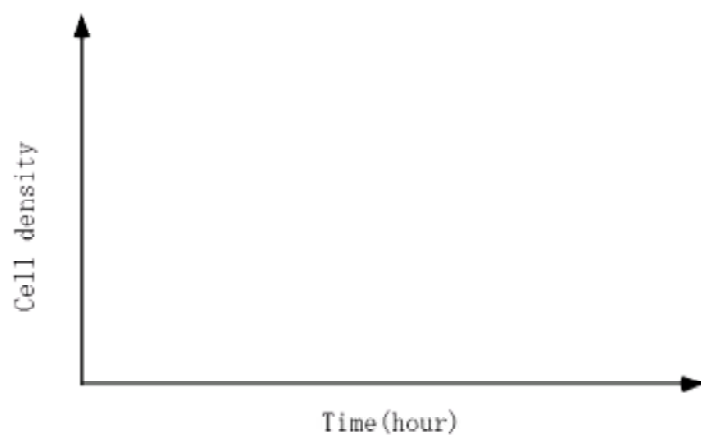
[備 考]

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。

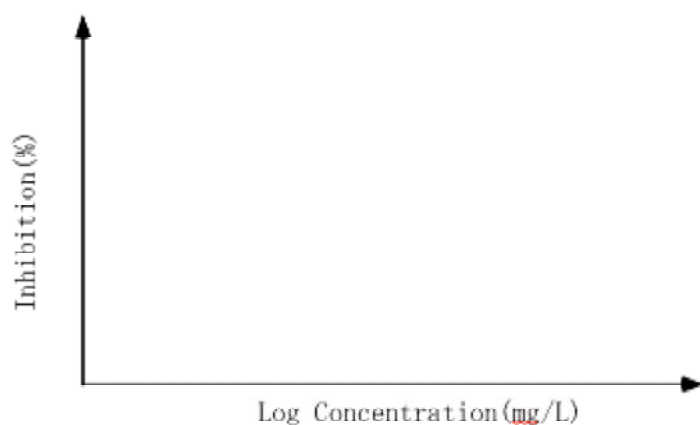
5 . 藻 類 の 生 長 曲 線 及 び 濃 度 － 生 長 阻 害 率 曲 線

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			
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량			
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]

1. 「対照物質への感受性」の欄には、試験生物の感受性検定の結果を記入（対照物質を明記した上で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	

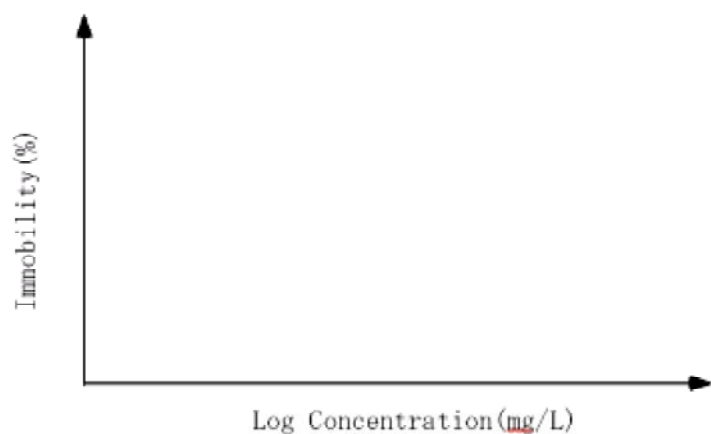
[備 考]

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。

[様式 11]

魚類急性毒性試験結果報告書

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

[備 考]

1. 「対照物質への感受性」の欄には、試験生物の感受性検定の結果を記入（対照物質を明記した上でLC₅₀を記入）すること。
2. 「じゅん化」の「じゅん化前の薬浴の有無」の欄には、じゅん化前に行った薬浴の有無を記入し、薬浴を実施した場合は薬剤の種類も記載すること。

3. 「試験濃度（設定値）」の欄には、試験に用いた被験物質の濃度をすべて掲げ、その公比も記入すること。
4. 「試験条件」の「試験容器」の欄には、材質及び容量を記入すること。なお、被験物質が揮発性を有する場合は「密閉の有無」を記載すること。
5. 「結果の算出方法」の欄には、毒性値の（ LC_{50} ）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	96h LC_{50} = mg/L
試験濃度	1. 設定値 2. 実測値
考察及び 特記事項	

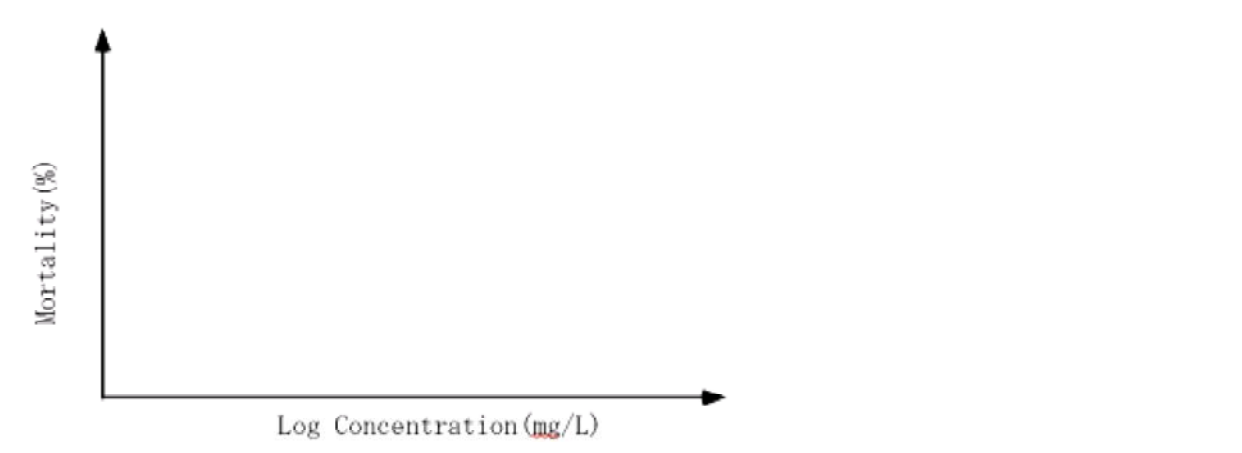
[備 考]

1. 毒性値の欄には、96時間での LC_{50} を記入すること。
2. 「試験濃度」の欄には、毒性値（ LC_{50} ）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 . 魚 類 の 濃 度 － 死 亡 率 曲 線

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

例図1 魚類の濃度－死亡率曲線



6 . そ の 他

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

[備 考]

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