

水産動植物に対する安全性に関する資料
(試験結果等)

目 次

	頁
魚類及び甲殻類に対する試験結果（概要）	1
1 クヌギ（木酢液）のヒメダカに対する急性毒性試験報告書（表紙）	3
試験の要約	4
目次	5
試験受託番号、試験委託者、試験責任者、試験担当者、	6
試験施設、試験期間	
1 試験目的	7
2 試験法ガイドライン	7
3 被験物質	7
4 試験生物	8
5 試験方法	9
6 観察及び測定方法	9
7 試験結果	10
8 試験の妥当性	11
表	12
付属資料－1：予備試験結果	14
付属資料－2：希釈水の水質測定結果	15
2 クヌギ（木酢液）のオオミジンコに対する急性毒性試験	17
報告書（表紙）	
試験の要約	18
目次	19
試験受託番号、試験委託者、試験責任者、試験担当者、	20
試験施設、試験期間	
1 試験目的	21
2 試験法ガイドライン	21
3 被験物質	21
4 試験生物	22
5 試験方法	23
6 観察及び測定方法	23
7 試験結果	24
8 試験の妥当性	25
表	26
付属資料－1：希釈水の水質測定結果	28
3 スギ（木酢液）のヒメダカに対する急性毒性試験報告書（表紙）	31
試験の要約	32
目次	33
試験受託番号、試験委託者、試験責任者、試験担当者、	34
試験施設、試験期間	
1 試験目的	35
2 試験法ガイドライン	35
3 被験物質	35
4 試験生物	36
5 試験方法	37
6 観察及び測定方法	37
7 試験結果	38
8 試験の妥当性	39

表	40
付属資料-1: 予備試験結果	43
付属資料-2: 本試験1回目の結果	44
付属資料-3: 希釈水の水質測定結果	45
4 スギ(木酢液)のオオミジンコに対する急性毒性試験	47
報告書(表紙)	
試験の要約	48
目次	49
試験受託番号、試験委託者、試験責任者、試験担当者、	50
試験施設、試験期間	
1 試験目的	51
2 試験法ガイドライン	51
3 被験物質	51
4 試験生物	52
5 試験方法	53
6 観察及び測定方法	53
7 試験結果	54
8 試験の妥当性	55
表	56
付属資料-1: 希釈水の水質測定結果	58
5 竹酢液のヒメダカに対する急性毒性試験報告書(表紙)	61
試験の要約	62
目次	63
試験受託番号、試験委託者、試験責任者、試験担当者、	64
試験施設、試験期間	
1 試験目的	65
2 試験法ガイドライン	65
3 被験物質	65
4 試験生物	66
5 試験方法	67
6 観察及び測定方法	67
7 試験結果	68
8 試験の妥当性	69
表	70
付属資料-1: 予備試験結果	74
付属資料-2: 希釈水の水質測定結果	75
6 竹酢液のオオミジンコに対する急性毒性試験報告書(表紙)	77
試験の要約	78
目次	79
試験受託番号、試験委託者、試験責任者、試験担当者、	80
試験施設、試験期間	
1 試験目的	81
2 試験法ガイドライン	81
3 被験物質	81
4 試験生物	82
5 試験方法	83
6 観察及び測定方法	83
7 試験結果	84
8 試験の妥当性	85
表	86
付属資料-1: 希釈水の水質測定結果	88

魚類及び甲殻類に対する試験結果（概要）

資材名	試験結果 (mg/l)		魚毒性 判定
	魚類急性毒性試験 (ヒメダカ)	甲殻類急性毒性試験 (オシジコ)	
	48時間LC ₅₀	3時間LC ₅₀	
木酢液（クヌギ）	> 1,000	> 1,000	A
木酢液（スギ）	> 1,000	> 1,000	A
竹酢液	940	> 1,000	A

【参考】魚毒性の分類基準

（単位：ppm）

コイ 注1 ミジンコ (LC50) 注2	>10	0.5 < LC50 ≤ 10	≤ 0.5
>0.5	A	B	C
≤0.5	B	B	C

注1：コイに対する48時間後のLC₅₀値

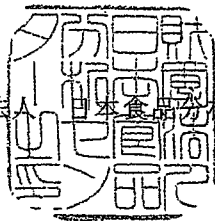
注2：ミジンコ類に対する3時間後のLC₅₀値

最 終 報 告 書

クヌギ(木酢液)のヒメダカに対する急性毒性試験

平成17年3月31日

財団法人 日本食品分析センター



クヌギ(木酢液)のヒメダカに対する急性毒性試験

試験の要約

クヌギ(木酢液)のヒメダカに対する急性毒性試験を実施し、50%致死濃度(LC₅₀)及び最大無作用濃度(NOEC)を求め、クヌギ(木酢液)のヒメダカに及ぼす影響を評価することを目的として、「農薬の登録申請に係る試験成績について」(平成12年11月24日付 12農産第8147号)、水産動植物への影響に関する試験に従い、ヒメダカ(*Oryzias latipes*)に対する96時間急性毒性試験を実施した。


試験には滝沢養魚場(埼玉県鴻巣市)から入手したものを、当センターにおいて自家繁殖させ、順化飼育したヒメダカ(平均全長2.3 cm, 平均体重0.09 g)を用いた。

試験は、10尾/試験区、限度試験として1,000 mg/lのみの濃度区を設定した。

環境条件は、水温23.0~24.4℃, 溶存酸素濃度7.1~8.4 mg/l, pH5.9~7.9であった。

試験の結果、クヌギ(木酢液)の48及び96時間後のLC₅₀(Median Lethal Concentration)は共に1,000 mg/l以上で、96時間後のNOEC(No Observed Effect Concentration)は1,000 mg/lであった。また、試験生物の異常な行動及び外観は観察されなかった。

試験責任者

吉安友二 

(平成 17 年 3 月 31 日)

目次

表題	1
試験受託番号	1
試験委託者	1
試験責任者	1
試験担当者	1
試験施設	1
試験期間	1
1 試験目的	2
2 試験法ガイドライン.....	2
3 被験物質	2
4 試験生物	3
5 試験方法	4
6 観察及び測定方法	4
7 試験結果	5
8 試験の妥当性	6
図表	7～ 8
付属資料-1	予備試験結果 9
付属資料-2	希釈水の水質測定結果 10～11

表 題：クヌギ(木酢液)のヒメダカに対する急性毒性試験

試験受託番号：第105013255号

試験委託者

名 称：環境省

所 在 地：〒100-8975 東京都千代田区霞ヶ関1丁目2番2号

試験責任者

所 属：環境科学部 環境生物安全課

氏 名：吉安 友二

試験担当者

所 属：環境科学部 環境生物安全課

氏 名：清水 正恵 ， 藤野 仁美

試験施設

名 称：財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

所 在 地：〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目11番10号

〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目21番6号(別館)

試験期間

試験開始日：平成17年1月7日

実験開始日：平成17年2月21日

実験完了日：平成17年2月25日

試験完了日：平成17年**月**日

1 試験目的

クヌギ(木酢液)のヒメダカに対する急性毒性試験を実施し、50%致死濃度(LC₅₀)及び最大無作用濃度(NOEC)を求め、クヌギ(木酢液)のヒメダカに及ぼす影響を評価した。

2 試験法ガイドライン

本試験は「農薬の登録申請に係る試験成績について」(平成12年11月24日付 12農産第8147号)、水産動植物への影響に関する試験、魚類急性毒性試験に準拠した。

3 被験物質

1) 名称及び有効成分の含有量等

名 称：クヌギ木酢液

常温における性状：褐色液体

2) 供試試料

入手先：環境省

入手年月日：2004年12月9日

入手量：2 l

ロット番号：W15020

純 度：-

有効期限：-

沈殿物が認められたため、一晩静置した後の上澄み液について試験した。

3) 被験物質の保管方法

被験物質は冷暗所にて保管した。

4) 取り扱い上の注意

被験物質の取り扱いにおいては、保護具等を着用の上、人体への吸入、摂取、接触等がないよう十分注意して取り扱った。

4 試験生物

1) 生物種

試験生物として下記に示したヒメダカで、定期的な基準物質(硫酸銅(Ⅱ)五水和物、試薬特級、純度99.5%以上[関東化学株式会社])による生物検定においてLC₅₀の確認されたものを用いた。

なお、基準物質による96時間後のLC₅₀は0.57 mg/l(平成16年10月18日)であった。また、当センターにおける96時間後のLC₅₀のバックグラウンドデータは0.75±0.22 mg/lであった。

- ① 学名：*Oryzias latipes*
- ② 全長：2.3 cm (2.2～2.4 cm) (n=10)
- ③ 体重：0.09 g (0.08～0.11 g) (n=10)
- ④ 入手等：滝沢養魚場[埼玉県鴻巣市](平成9年1月29日)より入手したものを、当センターにおいて自家繁殖した種である。試験には、生後5ヶ月令の個体を使用した。

2) 順化

順化飼育に用いるヒメダカには、蓄養飼育を行っている群から、外観に異常が無い個体をランダムに選別したものをを用いた。順化飼育は、試験に用いる希釈水と同一の水質、水温等、可能な限り試験環境条件に近い条件で21日間飼育した。ただし、暴露開始前24時間は給餌を行わなかった。また、選別した試験生物のうちの10尾について全長及び体重の測定を行った。

なお、暴露開始前7日間の死亡率は0%であった。

<順化条件>

- ① 飼育方法：循環ろ過式
- ② 飼育水槽：50 l容ガラス製水槽
- ③ 水温：24.0～24.2 °C
- ④ 照明：16時間明期
- ⑤ 飼育水：水道水(東京都多摩市)を脱塩素したもの
- ⑥ 給餌：体重の約3%の市販配合飼料[中部飼料株式会社]を毎日給餌した。

5 試験方法

1) 暴露条件及び環境条件

- ① 暴露方式：半止水式(24時間ごと全量換水)
- ② 暴露期間：96時間
- ③ 試験個体数：10尾/試験区
- ④ 試験水量：2 l(収容密度；0.50 g/l)
- ⑤ 試験容器：2 l容ガラス製ビーカー(容器のサイズ；内径 約13 cm×高さ 約20 cm)
- ⑥ 試験水温：23.0～24.4 °C
- ⑦ 照 明：16時間明期
- ⑧ 給 餌：無給餌
- ⑨ 溶存酸素濃度：7.1～8.4 mg/l
(暴露期間中、緩やかな通気を行い、飽和溶存酸素量の60%以上を保った。)
- ⑩ 試験水のpH：5.9～7.9 (pHの調整は行わなかった。)
- ⑪ 希 積 水：水道水(東京都多摩市)を脱塩素したもの

2) 試験濃度の設定

予備試験の結果から、1,000 mg/lの濃度区でヒメダカの死亡及び異常な行動や外観等が認められなかったことに基づき、本試験は限度試験として1,000 mg/lのみの濃度区を設定した。

なお、予備試験の結果は付属資料-1に示した。

3) 試験水の調製

被験物質を希積水に直接添加して1,000 mg/lの濃度区の試験水を調製した。

対照区は希積水のみとした。

6 観察及び測定方法

1) 試験生物の生死、症状等の観察

暴露開始から、24、48、72及び96時間後にヒメダカの死亡尾数を記録するとともに異常な行動や外観等について記録した。

なお、観察可能な動きがなく、尾柄部に触れて反応が無い個体を死亡とみなした。また、死亡が見られた場合は速やかに取り除いた。

2) 水質の測定

① 希釈水

一般的な水質測定を定期的実施した。

使用条件は総硬度10～250 mgCaCO₃/l及びpH 6.0～8.5とした。

② 試験水

各試験区の水質として、水温、溶存酸素濃度(以下「DO」と略す。)及びpHを暴露開始時、換水前後及び終了時に測定した。

<測定機器>

a) 温度計：AP-210[安立計器株式会社]

b) pH計：HM-21P[東亜ディーケーケー株式会社]

c) DO計：DO-24P[東亜ディーケーケー株式会社]

d) 残留塩素比色測定器：OT-I型[理研光学株式会社]

3) 試験水の状態観察

暴露開始時及び最初の換水前の試験水について状態観察を行い、試験水の色調や析出、沈殿物等の有無について記録した。

4) 結果の処理法

①LC₅₀(Median Lethal Concentration)：限度試験のため、LC₅₀の算出は行わなかった。

②NOEC(No Observed Effect Concentration)：目視により、対照区と比較して外部形態及び行動に差が認められない場合、本試験濃度をNOECとした。

7 試験結果

1) LC₅₀

24, 48, 72及び96時間後のLC₅₀は、全て1,000 mg/l以上であった(表-1)。

2) NOEC

96時間後のNOECは1,000 mg/lであった。

3) 累積死亡率

96時間後の累積死亡率は、対照区及び1,000 mg/lで0%であった。

24, 48, 72及び96時間後の累積死亡率を表-2に示した。

4) 試験生物の症状等の観察

1,000 mg/l濃度区における試験生物の行動及び外観について対照区と比較した。異常な行動及び外観は、対照区及び1,000 mg/lでは観察されなかった。

24, 48, 72及び96時間後の試験生物の症状等を表-3に示した。

5) 水質の測定

① 希釈水

一般的な水質測定を定期的実施した結果を付属資料-1に示した。なお、試験に使用した希釈水の総硬度は59～66 mgCaCO₃/l, pHは8.0であった。

② 試験水

暴露期間中における試験水の水温は23.0～24.4℃, DOは7.1～8.4 mg/l, pHは5.9～7.9であった。

暴露期間中の各試験区の試験水の水温, DO及びpHを表-4～6に示した。

6) 試験水の状態

暴露開始時の試験水は薄黄色透明であり, 被験物質は試験水中に溶解していることが目視にて確認された。また, 24時間後の換水前の試験水は, わずかに白濁した状態であった。試験水の白濁は, バクテリア等の作用により, 試験水中の被験物質が分解されたことにより生じたと推測された。

7) 試験結果に影響を及ぼした可能性のある事項

なし。

8) 試験の妥当性

暴露終了時に対照区の死亡率は0%であり, 暴露期間中の各試験区のDOも飽和濃度の60%以上であったため, 本試験の成立が確認された。

表-1 24, 48, 72 及び 96 時間後の LC₅₀

(単位: mg/l)

24 時間後	48 時間後	72 時間後	96 時間後
> 1,000*	> 1,000*	> 1,000*	> 1,000*

*: 1,000 mg/l の限度試験であり, 本試験濃度で死亡が認められなかったため, 算出しなかった。

表-2 24, 48, 72 及び 96 時間後の累積死亡率

(単位: %)

試験濃度 (mg/l)	24 時間後	48 時間後	72 時間後	96 時間後
1,000	0	0	0	0
対照区	0	0	0	0

表-3 24, 48, 72 及び 96 時間後の試験生物の症状等

試験濃度 (mg/l)	24 時間後	48 時間後	72 時間後	96 時間後
1,000	n. a. d	n. a. d	n. a. d	n. a. d
対照区	n. a. d	n. a. d	n. a. d	n. a. d

n. a. d: no abnormalities are detected; 正常

表-4 試験水の水温

(単位:°C)

試験濃度 (mg/l)	開始時	24 時間		48 時間		72 時間		96 時間 終了時
		換水前	換水後	換水前	換水後	換水前	換水後	
1,000	23.6	23.3	23.0	23.5	24.3	24.4	23.5	24.0
対照区	23.9	23.3	23.0	23.2	24.3	23.7	23.5	23.6

表-5 試験水の DO

(単位:mg/l)

試験濃度 (mg/l)	開始時	24 時間		48 時間		72 時間		96 時間 終了時
		換水前	換水後	換水前	換水後	換水前	換水後	
1,000	8.2	7.1	7.9	7.7	8.3	8.0	8.4	8.2
対照区	7.9	7.6	8.0	7.9	8.0	7.8	8.3	8.4

表-6 試験水の pH

試験濃度 (mg/l)	開始時	24 時間		48 時間		72 時間		96 時間 終了時
		換水前	換水後	換水前	換水後	換水前	換水後	
1,000	6.0	7.2	6.0	7.3	6.0	7.3	5.9	7.3
対照区	7.9	7.7	7.9	7.8	7.9	7.6	7.9	7.8

付属資料-1 : 予備試験結果

予備試験結果を表-1 及び表-2 に示した。

表-1 24, 48, 72 及び 96 時間後の累積死亡率

(単位：%)

試験濃度 (mg/l)	24 時間後	48 時間後	72 時間後	96 時間後
1,000	0	0	0	0
対照区	0	0	0	0

表-2 24, 48, 72 及び 96 時間後の試験生物の症状等

試験濃度 (mg/l)	24 時間後	48 時間後	72 時間後	96 時間後
1,000	n. a. d	n. a. d	n. a. d	n. a. d
対照区	n. a. d	n. a. d	n. a. d	n. a. d

n. a. d : no abnormalities are detected ; 正常

付属資料-2：希釈水の水質測定結果

希釈水の水質測定結果-1

項目名	結果	検出限界
pH 値	7.4 (19 °C)	
大腸菌群	陰性/100 ml	
蒸発残留物	120 mg/l	
フェノール類	検出せず	0.005 mg/l
カルシウム、マグネシウム等(硬度)	60 mg/l	
硝酸態窒素及び亜硝酸態窒素	1.7 mg/l	
フッ素及びその化合物	検出せず	0.10 mg/l
ジクロロメタン	検出せず	0.001 mg/l
四塩化炭素	検出せず	0.0002 mg/l
1,2-ジクロロエタン	検出せず	0.0002 mg/l
1,1-ジクロロエチレン	検出せず	0.001 mg/l
シス-1,2-ジクロロエチレン	検出せず	0.001 mg/l
1,1,1-トリクロロエタン	検出せず	0.001 mg/l
1,1,2-トリクロロエタン	検出せず	0.0005 mg/l
トリクロロエチレン	検出せず	0.001 mg/l
テトラクロロエチレン	検出せず	0.001 mg/l
1,3-ジクロロプロペン	検出せず	0.0002 mg/l
ベンゼン	検出せず	0.001 mg/l
クロロホルム	検出せず	0.001 mg/l
チウラム(チラム)	検出せず	0.0002 mg/l
シマジン(CAT)	検出せず	0.00001 mg/l
チオベンカルブ(ベンチオカーブ)	検出せず	0.00002 mg/l
イソキサチオン	検出せず	0.00001 mg/l
ダイアジノン	検出せず	0.00002 mg/l
フェニトロチオン(MEP)	検出せず	0.00001 mg/l
イソプロチオラン	検出せず	0.00001 mg/l
クロロタロニル(TPN)	検出せず	0.00001 mg/l
プロピザミド	検出せず	0.00001 mg/l
EPN	検出せず	0.00005 mg/l
ジクロロボス(DDVP)	検出せず	0.00005 mg/l
フェノブカルブ(BPMC)	検出せず	0.00001 mg/l
イプロベンホス(IBP)	検出せず	0.00005 mg/l
クロルニトロフェン(CNP)	検出せず	0.0001 mg/l

希釈水の水質測定結果-2

項目名	結果	検出限界
化学的酸素消費量(COD _{Cr})	10 mg/l 以下	
生物化学的酸素要求量	1 mg/l 以下	
浮遊物質量	1 mg/l 以下	
全リン	検出せず	0.01 mg/l
臭化物イオン	検出せず	0.5 mg/l
硫化物イオン(S ²⁻)	検出せず	0.01 mg/l
電気伝導率(25 °C)	19 mS/m	
総アルカリ度(CaCO ₃ として)	47 mg/l	
有機体炭素(TOC)	検出せず	0.3 mg/l
アンモニア性窒素	検出せず	0.04 mg/l
PCB	検出せず	0.0005 mg/l
水銀	検出せず	0.0001 mg/l
カドミウム	検出せず	0.001 mg/l
シアン化物イオン及び塩化シアン	検出せず	0.001 mg/l
鉛	0.002 mg/l	
六価クロム	検出せず	0.005 mg/l
ヒ素	検出せず	0.01 mg/l
セレン	検出せず	0.01 mg/l
ニッケル	検出せず	0.001 mg/l
銅	検出せず	0.01 mg/l
亜鉛	0.006 mg/l	
アルミニウム	検出せず	0.05 mg/l
マンガン	検出せず	0.005 mg/l
鉄	0.03 mg/l	
スズ	検出せず	0.1 mg/l
ナトリウム	13 mg/l	
カリウム	2.0 mg/l	
カルシウム	18 mg/l	
マグネシウム	3.9 mg/l	

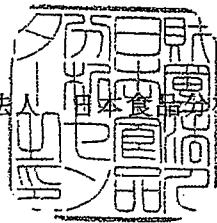
採水年月日：平成 16 年 12 月 21 日

最 終 報 告 書

クヌギ(木酢液)のオオミジンコに対する急性毒性試験

平成17年3月31日

財団法人 日本食品分析センター



クヌギ(木酢液)のオオミジンコに対する急性毒性試験

試験の要約

クヌギ(木酢液)のオオミジンコに対する急性毒性試験を実施し、50%致死濃度(LC₅₀)を求め、クヌギ(木酢液)のオオミジンコに及ぼす影響を評価することを目的として、「農薬の登録申請に係る試験成績について」(平成12年11月24日付 12農産第8147号)、水産動植物への影響に関する試験及び「魚類に対する毒性試験法」(昭和40年11月25日付 40農政B第2735号)、ミジンコ類の試験法(暫定)に従い、オオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する3時間急性毒性試験を実施した。

試験には国立環境研究所から入手したものを、当センターにおいて継代及び順化飼育したオオミジンコを用いた。

試験は、20頭/試験区(5頭4連)、限度試験として1,000 mg/lのみの濃度区を設定した。

環境条件は、水温19.4~20.2℃、溶存酸素濃度9.0~9.2 mg/l、pH6.3~8.0であった。

試験の結果、クヌギ(木酢液)の3時間後のLC₅₀(Median Lethal Concentration)は1,000 mg/l以上であった。

試験責任者

吉安友二 (印) (平成 17 年 3 月 31 日)

目次

表題	1
試験受託番号	1
試験委託者	1
試験責任者	1
試験担当者	1
試験施設	1
試験期間	1
1 試験目的	2
2 試験法ガイドライン.....	2
3 被験物質	2
4 試験生物	3
5 試験方法	4
6 観察及び測定方法	4
7 試験結果	5
8 試験の妥当性	6
図表	7～ 8
付属資料-1	希釈水の水質測定結果 9～10

表 題：クヌギ(木酢液)のオオミジンコに対する急性毒性試験

試験受託番号：第105013255号

試験委託者

名 称：環境省

所 在 地：〒100-8975 東京都千代田区霞ヶ関1丁目2番2号

試験責任者

所 属：環境科学部 環境生物安全課

氏 名：吉安 友二

試験担当者

所 属：環境科学部 環境生物安全課

氏 名：角田 紗代子 ， 杉原 夕華

試験施設

名 称：財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

所 在 地：〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目11番10号

〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目21番6号(別館)

試験期間

試験開始日：平成17年1月7日

実験開始日：平成17年3月1日

実験完了日：平成17年3月1日

試験完了日：平成17年**月**日

1 試験目的

クヌギ(木酢液)のオオミジンコに対する急性毒性試験を実施し、50%致死濃度(LC₅₀)を求め、クヌギ(木酢液)のオオミジンコに及ぼす影響を評価した。

2 試験法ガイドライン

本試験は「農薬の登録申請に係る試験成績について」(平成12年11月24日付 12農産第8147号)、水産動植物への影響に関する試験、ミジンコ類急性遊泳阻害試験及び「魚類に対する毒性試験法」(昭和40年11月25日付 40農政B第2735号)、ミジンコ類の試験法(暫定)に準拠した。

3 被験物質

1) 名称及び有効成分の含有量等

名 称：クヌギ木酢液

常温における性状：褐色液体

2) 供試試料

入手先：環境省

入手年月日：2004年12月9日

入手量：2 l

ロット番号：W15020

純 度：-

有効期限：-

沈殿物が認められたため、一晚静置した後の上澄み液について試験した。

3) 被験物質の保管方法

被験物質は冷暗所にて保管した。

4) 取り扱い上の注意

被験物質の取り扱いにおいては、保護具等を着用の上、人体への吸入、摂取、接触等がないよう十分注意して取り扱った。

4 試験生物

1) 生物種

試験生物として下記に示したオオミジンコで、定期的な基準物質(二クロム酸カリウム、試薬特級、純度99.5%以上[和光純薬工業株式会社])による生物検定において EC_{50} の確認されたものを用いた。

なお、基準物質による48時間後の EC_{50} は0.53 mg/l(平成16年10月18日)であった。また、当センターにおける48時間後の EC_{50} のバックグラウンドデータは 0.55 ± 0.14 mg/lであった。

① 学名：*Daphnia magna*

② 入手先：国立環境研究所(平成15年3月7日)から入手したものを、当センターにおいて継代飼育した種である。

③ 生育段階：生後24時間以内の個体(以下「幼体」という。)を用いた。

2) 親ミジンコの飼育

親ミジンコの飼育は、試験に用いる希釈水と同一の水質、水温等、可能な限り試験環境条件に近い条件で飼育した。なお、幼体を得るための親ミジンコには、健康で繁殖盛んな生後3週令のものを用いた。

<飼育条件>

① 飼育密度：25頭/1飼育水(順化初期は35頭/1飼育水)

② 飼育容器：1.1容ガラス製ビーカー

③ 水温：19.8～20.8℃

④ 照明：16時間明期

⑤ 飼育水：水道水(茨城県つくば市)を脱塩素したもの

⑥ 給餌：成長段階に合わせてミジンコ1頭当たり0.01～0.13 mgC(有機体炭素)の
Chlorella vulgaris / *Scenedesmus subspicatus*(1:1)混液を毎日給餌した。

5 試験方法

1) 暴露条件及び環境条件

- ① 暴露方式：止水式
- ② 暴露期間：3時間
- ③ 試験個体数：20頭/試験区(5頭4連)
- ④ 試験容器：100 ml容ガラス製ビーカー(容器のサイズ；内径 約50 mm×高さ 約70 mm)
- ⑤ 試験水量：100 ml/1連
- ⑥ 試験水温：19.4～20.2 °C
- ⑦ 照 明：16時間明期
- ⑧ 給 餌：無給餌
- ⑨ 溶存酸素濃度：9.0～9.2 mg/l(飽和溶存酸素量の60 %以上を保った。)
- ⑩ 試験水のpH：6.3～8.0 (pHの調整は行わなかった。)
- ⑪ 希 積 水：水道水(茨城県つくば市)を脱塩素したもの

2) 試験濃度の設定

被験物質の性状等から、1,000 mg/lの濃度区ではミジンコの死亡が認められないと予測されたことに基づき、本試験は限度試験として1,000 mg/lのみの濃度区を設定した。

3) 試験水の調製

被験物質を希積水に直接添加して1,000 mg/lの濃度区の試験水を調製した。
対照区は希積水のみとした。

6 観察及び測定方法

1) 試験生物の生死の観察

暴露開始から、3時間後にミジンコの死亡数を観察し、記録した。
なお、触角の運動が停止しているものを死亡とみなした。

2) 水質の測定

① 希積水

一般的な水質測定を定期的実施した。
使用条件は総硬度10～250 mgCaCO₃/l及びpH6.0～9.0とした。

② 試験水

各試験区の水質として、水温、溶存酸素濃度(以下「D0」と略す。)及びpHを暴露開始時及び終了時に測定した。なお、暴露開始時は4連分を同時に調製した容器について測定した。また、暴露終了時は各試験区の1容器について測定した。

<測定機器>

- a) 温度計：AP-210[安立計器株式会社]
- b) pH計：HM-21P[東亜ディーケーケー株式会社]
- c) D0計：D0-24P[東亜ディーケーケー株式会社]
- d) 残留塩素比色測定器：OT-I型[理研光学株式会社]

3) 試験水の状態観察

暴露開始時及び終了時の試験水について状態観察を行い、試験水の色調や析出、沈殿物等の有無について記録した。

4) 結果の処理法

限度試験のため、 LC_{50} (Median Lethal Concentration)の算出は行わなかった。

7 試験結果

1) LC_{50}

3時間後の LC_{50} は1,000 mg/l以上であった(表-1)。

2) 死亡率

3時間後の死亡率は、対照区及び1,000 mg/lで0%であった。

3時間後の死亡率を表-2に示した。

3) 水質の測定

① 希釈水

一般的な水質測定を定期的実施した結果を付属資料-1に示した。なお、試験に使用した希釈水の総硬度は69 mgCaCO₃/l、pHは7.3であった。

② 試験水

暴露期間中における試験水の水温は19.4~20.2℃、D0は9.0~9.2 mg/l、pHは6.3~8.0であった。

暴露期間中の各試験区の試験水の水温、D0及びpHを表-3~5に示した。

4) 試験水の状態

暴露開始時の試験水はわずかに褐色透明で、被験物質は試験水中に溶解していることが目視にて確認された。また、暴露終了時の試験水の状態に変化は認められなかった。

5) 試験結果に影響を及ぼした可能性のある事項

なし。

8 試験の妥当性

暴露終了時において対照区の死亡率は0%であり、暴露開始時においてはミジンコが水面に浮いておらず、暴露期間中の各試験区のDOは飽和濃度の60%以上であったため、本試験の成立が確認された。

表-1 3時間後のLC₅₀

(単位：mg/l)

3時間後
> 1,000*

*：1,000 mg/lの限度試験であり，本試験濃度で死亡が認められなかったため，算出しなかった。

表-2 3時間後の死亡率

(単位：%)

試験濃度 (mg/l)	死亡率
	3時間後
1,000	0
対照区	0

表-3 試験水の水温

(単位：℃)

試験濃度 (mg/l)	開始時	3 時間
		終了時
1,000	19.4	20.1
対照区	19.5	20.2

表-4 試験水の DO

(単位：mg/l)

試験濃度 (mg/l)	開始時	3 時間
		終了時
1,000	9.2	9.0
対照区	9.2	9.1

表-5 試験水の pH

試験濃度 (mg/l)	開始時	3 時間
		終了時
1,000	6.3	6.7
対照区	7.9	8.0

付属資料-1：希釈水の水質測定結果

希釈水の水質測定結果-1

項目名	結果	検出限界
pH 値	7.2 (20 °C)	
大腸菌群	陰性/100 ml	
蒸発残留物	150 mg/l	
フェノール類	検出せず	0.005 mg/l
カルシウム, マグネシウム等(硬度)	64 mg/l	
硝酸態窒素及び亜硝酸態窒素	0.8 mg/l	
フッ素及びその化合物	0.11 mg/l	
ジクロロメタン	検出せず	0.001 mg/l
四塩化炭素	検出せず	0.0002 mg/l
1,2-ジクロロエタン	検出せず	0.0002 mg/l
1,1-ジクロロエチレン	検出せず	0.001 mg/l
シス-1,2-ジクロロエチレン	検出せず	0.001 mg/l
1,1,1-トリクロロエタン	検出せず	0.001 mg/l
1,1,2-トリクロロエタン	検出せず	0.0005 mg/l
トリクロロエチレン	検出せず	0.001 mg/l
テトラクロロエチレン	検出せず	0.001 mg/l
1,3-ジクロロプロペン	検出せず	0.0002 mg/l
ベンゼン	検出せず	0.001 mg/l
クロロホルム	0.014 mg/l	
チウラム(チラム)	検出せず	0.0002 mg/l
シマジン(CAT)	検出せず	0.00001 mg/l
チオベンカルブ(ベンチオカーブ)	検出せず	0.00002 mg/l
イソキサチオン	検出せず	0.00001 mg/l
ダイアジノン	検出せず	0.00002 mg/l
フェニトロチオン(MEP)	検出せず	0.00001 mg/l
イソプロチオラン	検出せず	0.00001 mg/l
クロロタロニル(TPN)	検出せず	0.00001 mg/l
プロピザミド	検出せず	0.00001 mg/l
EPN	検出せず	0.00005 mg/l
ジクロルボス(DDVP)	検出せず	0.00005 mg/l
フェノブカルブ(BPMC)	検出せず	0.00001 mg/l
イプロベンホス(IBP)	検出せず	0.00005 mg/l
クロルニトロフェン(CNP)	検出せず	0.0001 mg/l

希釈水の水質測定結果-2

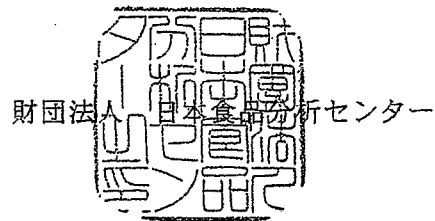
項目名	結果	検出限界
化学的酸素消費量(COD _{Cr})	10 mg/l 以下	
生物化学的酸素要求量	1 mg/l 以下	
浮遊物質量	1 mg/l 以下	
全リン	0.03 mg/l	
臭化物イオン	検出せず	0.5 mg/l
硫化物イオン(S ²⁻)	検出せず	0.01 mg/l
電気伝導率(25 °C)	25 mS/m	
総アルカリ度(CaCO ₃ として)	36 mg/l	
有機体炭素(TOC)	0.9 mg/l	
アンモニア性窒素	検出せず	0.04 mg/l
PCB	検出せず	0.0005 mg/l
水銀	検出せず	0.0001 mg/l
カドミウム	検出せず	0.001 mg/l
シアン化物イオン及び塩化シアン	検出せず	0.001 mg/l
鉛	検出せず	0.001 mg/l
六価クロム	検出せず	0.005 mg/l
ヒ素	検出せず	0.01 mg/l
セレン	検出せず	0.01 mg/l
ニッケル	検出せず	0.001 mg/l
銅	検出せず	0.01 mg/l
亜鉛	検出せず	0.005 mg/l
アルミニウム	検出せず	0.05 mg/l
マンガン	検出せず	0.005 mg/l
鉄	検出せず	0.03 mg/l
スズ	検出せず	0.1 mg/l
ナトリウム	20 mg/l	
カリウム	5.3 mg/l	
カルシウム	16 mg/l	
マグネシウム	6.2 mg/l	

採水年月日：平成 16 年 12 月 21 日

最 終 報 告 書

スギ(木酢液)のヒメダカに対する急性毒性試験

平成17年3月31日



スギ(木酢液)のヒメダカに対する急性毒性試験

試験の要約

スギ(木酢液)のヒメダカに対する急性毒性試験を実施し、50%致死濃度(LC₅₀)及び最大無作用濃度(NOEC)を求め、スギ(木酢液)のヒメダカに及ぼす影響を評価することを目的として、「農薬の登録申請に係る試験成績について」(平成12年11月24日付 12農産第8147号)、水産動植物への影響に関する試験に従い、ヒメダカ(*Oryzias latipes*)に対する96時間急性毒性試験を実施した。

試験には滝沢養魚場(埼玉県鴻巣市)から入手したものを、当センターにおいて自家繁殖させ、順化飼育したヒメダカ(平均全長2.3 cm, 平均体重0.09 g)を用いた。

試験は、10尾/試験区、公比1.3で5濃度区(320, 420, 560, 750及び1,000 mg/l)を設定した。

環境条件は、水温23.0~24.3℃, 溶存酸素濃度6.3~8.5 mg/l, pH6.6~8.1であった。

試験の結果、スギ(木酢液)の48及び96時間後のLC₅₀(Median Lethal Concentration)は最高試験濃度で死亡率が50%未満であったため、算出しなかった。96時間後のNOEC(No Observed Effect Concentration)は420 mg/lであった。また、試験生物の症状等として、水面浮上が観察された。

試験責任者

吉安 友二 (印) (平成 17 年 3 月 31 日)

目次

表題	1
試験受託番号	1
試験委託者	1
試験責任者	1
試験担当者	1
試験施設	1
試験期間	1
1 試験目的	2
2 試験法ガイドライン.....	2
3 被験物質	2
4 試験生物	3
5 試験方法	4
6 観察及び測定方法	4
7 試験結果	5
8 試験の妥当性	6
図表	7～ 9
付属資料-1	予備試験結果 10
付属資料-2	本試験1回目の結果 11
付属資料-3	希釈水の水質測定結果 12～13

表 題：スギ(木酢液)のヒメダカに対する急性毒性試験

試験受託番号：第105013255号

試験委託者

名 称：環境省

所 在 地：〒100-8975 東京都千代田区霞ヶ関1丁目2番2号

試験責任者

所 属：環境科学部 環境生物安全課

氏 名：吉安 友二

試験担当者

所 属：環境科学部 環境生物安全課

氏 名：清水 正恵 ， 藤野 仁美

試験施設

名 称：財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

所 在 地：〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目11番10号

〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目21番6号(別館)

試験期間

試験開始日：平成17年1月7日

実験開始日：平成17年2月28日

実験完了日：平成17年3月4日

試験完了日：平成17年**月**日

1 試験目的

スギ(木酢液)のヒメダカに対する急性毒性試験を実施し、50%致死濃度(LC₅₀)及び最大無作用濃度(NOEC)を求め、スギ(木酢液)のヒメダカに及ぼす影響を評価した。

2 試験法ガイドライン

本試験は「農薬の登録申請に係る試験成績について」(平成12年11月24日付 12農産第8147号)、水産動植物への影響に関する試験、魚類急性毒性試験に準拠した。

3 被験物質

1) 名称及び有効成分の含有量等

名称：スギ木酢液

常温における性状：褐色液体

2) 供試試料

入手先：環境省

入手年月日：2004年12月9日

入手量：1 l

ロット番号：W15080

純度：-

有効期限：-

3) 被験物質の保管方法

被験物質は冷暗所にて保管した。

4) 取り扱い上の注意

被験物質の取り扱いにおいては、保護具等を着用の上、人体への吸入、摂取、接触等がないよう十分注意して取り扱った。

4 試験生物

1) 生物種

試験生物として下記に示したヒメダカで、定期的な基準物質(硫酸銅(Ⅱ)五水和物、試薬特級、純度99.5%以上[関東化学株式会社])による生物検定においてLC₅₀の確認されたものを用いた。

なお、基準物質による96時間後のLC₅₀は0.57 mg/l(平成16年10月18日)であった。また、当センターにおける96時間後のLC₅₀のバックグラウンドデータは0.75±0.22 mg/lであった。

- ① 学名：*Oryzias latipes*
- ② 全長：2.3 cm (2.2～2.4 cm) (n=10)
- ③ 体重：0.09 g (0.08～0.11 g) (n=10)
- ④ 入手等：滝沢養魚場[埼玉県鴻巣市](平成9年1月29日)より入手したものを、当センターにおいて自家繁殖した種である。試験には、生後5ヶ月令の個体を使用した。

2) 順化

順化飼育に用いるヒメダカには、蓄養飼育を行っている群から、外観に異常が無い個体をランダムに選別したものをを用いた。順化飼育は、試験に用いる希釈水と同一の水質、水温等、可能な限り試験環境条件に近い条件で14日間飼育した。ただし、暴露開始前24時間は給餌を行わなかった。また、選別した試験生物のうちの10尾について全長及び体重の測定を行った。

なお、暴露開始前7日間の死亡率は0%であった。

<順化条件>

- ① 飼育方法：循環ろ過式
- ② 飼育水槽：50 l容ガラス製水槽
- ③ 水温：24.0℃
- ④ 照明：16時間明期
- ⑤ 飼育水：水道水(東京都多摩市)を脱塩素したもの
- ⑥ 給餌：体重の約3%の市販配合飼料[中部飼料株式会社]を毎日給餌した。

5 試験方法

1) 暴露条件及び環境条件

- ① 暴露方式：半止水式(24時間ごと全量換水)
- ② 暴露期間：96時間
- ③ 試験個体数：10尾/試験区
- ④ 試験水量：2 l(収容密度；0.50 g/l)
- ⑤ 試験容器：2 l容ガラス製ビーカー(容器のサイズ；内径 約13 cm×高さ 約20 cm)
- ⑥ 試験水温：23.0～24.3 ℃
- ⑦ 照 明：16時間明期
- ⑧ 給 餌：無給餌
- ⑨ 溶存酸素濃度：6.3～8.5 mg/l
(暴露期間中、緩やかな通気を行い、飽和溶存酸素量の60%以上を保った。)
- ⑩ 試験水のpH：6.6～8.1 (pHの調整は行わなかった。)
- ⑪ 希 積 水：水道水(東京都多摩市)を脱塩素したもの

2) 試験濃度の設定

予備試験の結果から、1,000 mg/l の濃度区で死亡及び異常な行動や外観等が認められなかったことに基づき、本試験では、当初、1,000 mg/l の限度試験を設定したが、暴露終了時の観察において、最高試験濃度区の累積死亡率が 70 %となった。

以上の経緯から、本試験 2 回目(再試験 1 回目)では、1,000 mg/l 以下の濃度を公比 1.3 で 5 濃度区(320, 420, 560, 750 及び 1,000 mg/l)を設定した。

なお、予備試験及び本試験1回目の結果は付属資料-1及び2に示した。

3) 試験水の調製

被験物質を希積水に直接添加して各濃度区の試験水を調製した。

対照区は希積水のみとした。

6 観察及び測定方法

1) 試験生物の生死、症状等の観察

暴露開始から、24、48、72及び96時間後にヒメダカの死亡尾数を記録するとともに異常な行動や外観等について記録した。

なお、観察可能な動きがなく、尾柄部に触れて反応が無い個体を死亡とみなした。また、死亡が見られた場合は速やかに取り除いた。

2) 水質の測定

① 希釈水

一般的な水質測定を定期的に実施した。

使用条件は総硬度10～250 mgCaCO₃/l及びpH 6.0～8.5とした。

② 試験水

各試験区の水質として、水温、溶存酸素濃度(以下「DO」と略す。)及びpHを暴露開始時、換水前後及び終了時に測定した。

<測定機器>

- a) 温度計：AP-210[安立計器株式会社]
- b) pH計：HM-21P[東亜ディーケーケー株式会社]
- c) DO計：D0-24P[東亜ディーケーケー株式会社]
- d) 残留塩素比色測定器：OT-I型[理研光学株式会社]

3) 試験水の状態観察

暴露開始時及び最初の換水前の試験水について状態観察を行い、試験水の色調や析出、沈殿物等の有無について記録した。

4) 結果の処理法

本試験の経過については、5の2)項に示した通りであり、試験結果として本試験2回目(再試験1回目)におけるデータを採用した。

- ①LC₅₀(Median Lethal Concentration)：24時間後、48時間後、72時間後及び96時間後のLC₅₀は、最高試験濃度で死亡率が50%未満であったため、算出しなかった。
- ②NOEC(No Observed Effect Concentration)：目視により、対照区と比較して外部形態及び行動に差が認められない最高濃度をNOECとした。

7 試験結果

1) LC₅₀

24, 48, 72及び96時間後のLC₅₀は、全て1,000 mg/l以上であった(表-1)。

2) NOEC

96時間後のNOECは420 mg/lであった。

3) 累積死亡率

96時間後の累積死亡率は、対照区及び320 mg/l、420 mg/l及び560 mg/lで0 %、750 mg/l及び1,000 mg/lで10 %であった。

24, 48, 72及び96時間後の累積死亡率を表-2に示した。また、濃度-死亡率のグラフを図-1に示した。

4) 試験生物の症状等の観察

各濃度区における試験生物の行動及び外観について対照区と比較した。異常な行動及び外観は、対照区、320及び420 mg/lでは観察されなかったが、560 mg/l、750及び1,000 mg/lで水面浮上が観察された。

24, 48, 72及び96時間後の試験生物の症状等を表-3に示した。

5) 水質の測定

① 希釈水

一般的な水質測定を定期的実施した結果を付属資料-3に示した。なお、試験に使用した希釈水の総硬度は61~66 mgCaCO₃/l、pHは8.0であった。

② 試験水

暴露期間中における試験水の水温は23.0~24.3℃、D0は6.3~8.5 mg/l、pHは6.6~8.1であった。

暴露期間中の各試験区の試験水の水温、D0及びpHを表-4~6に示した。

6) 試験水の状態

暴露開始時の試験水は560 mg/l以下の濃度区で無色透明であり、750 mg/l以上の濃度区ではわずかに茶色がかった透明であり、被験物質は試験水中に溶解していることが目視にて観察された。また、24時間後の換水前の試験水は、全濃度区においてわずかに白濁した状態であった。試験水の白濁は、バクテリア等の作用により、試験水中の被験物質が分解されたことにより生じたと推測された。

7) 試験結果に影響を及ぼした可能性のある事項

なし。

8) 試験の妥当性

暴露終了時に対照区の死亡率は0 %であり、暴露期間中の各試験区のD0も飽和濃度の60 %以上であったため、本試験の成立が確認された。

表-1 24, 48, 72 及び 96 時間後の LC₅₀

(単位: mg/l)

24 時間後	48 時間後	72 時間後	96 時間後
> 1,000*	> 1,000*	> 1,000*	> 1,000*

*: 最高試験濃度で死亡率が 50 %未満であったため, 算出しなかった。

表-2 24, 48, 72 及び 96 時間後の累積死亡率

(単位: %)

試験濃度 (mg/l)	24 時間後	48 時間後	72 時間後	96 時間後
320	0	0	0	0
420	0	0	0	0
560	0	0	0	0
750	0	0	10	10
1,000	10	10	10	10
対照区	0	0	0	0

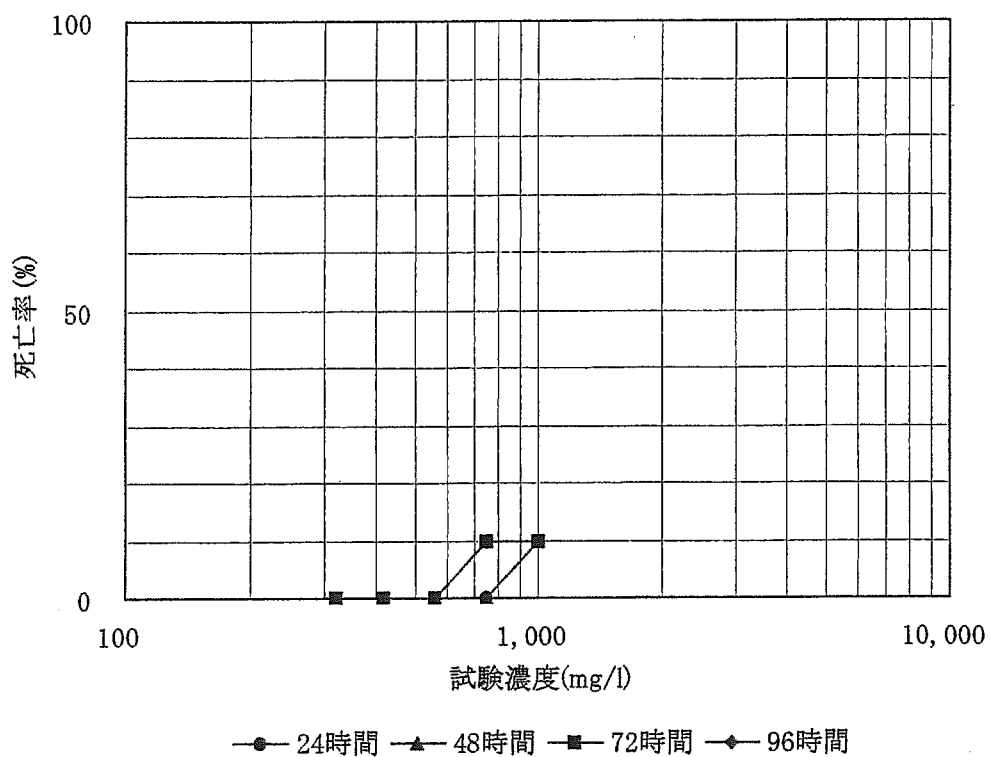


図-1 濃度-死亡率曲線

表-3 24, 48, 72 及び 96 時間後の試験生物の症状等

試験濃度 (mg/l)	24 時間後	48 時間後	72 時間後	96 時間後
320	n. a. d	n. a. d	n. a. d	n. a. d
420	n. a. d	n. a. d	n. a. d	n. a. d
560	n. a. d	n. a. d	n. a. d	n. a. d, s. s
750	n. a. d	n. a. d	n. a. d, s. s	n. a. d, s. s
1,000	n. a. d	n. a. d, s. s	n. a. d, s. s	n. a. d, s. s
対照区	n. a. d	n. a. d	n. a. d	n. a. d

n. a. d : no abnormalities are detected ; 正常
s. s : surface slicks ; 水面浮上

表-4 試験水の水温

(単位: °C)

試験濃度 (mg/l)	開始時	24 時間		48 時間		72 時間		96 時間
		換水前	換水後	換水前	換水後	換水前	換水後	終了時
320	23.6	23.1	23.2	24.3	23.9	23.3	23.0	24.0
420	23.7	23.1	23.4	23.2	24.0	23.3	23.4	23.8
560	23.8	23.3	23.3	23.4	24.3	23.4	23.5	24.2
750	23.8	23.2	23.3	24.1	24.3	23.2	23.4	23.2
1,000	23.8	23.2	23.3	24.1	24.3	23.2	23.4	23.6
対照区	23.1	23.6	23.5	24.1	23.8	23.4	23.4	24.2

表-5 試験水の DO

(単位: mg/l)

試験濃度 (mg/l)	開始時	24 時間		48 時間		72 時間		96 時間
		換水前	換水後	換水前	換水後	換水前	換水後	終了時
320	8.4	7.4	8.4	7.7	8.0	8.1	8.0	7.8
420	8.4	7.2	8.4	8.0	8.1	8.3	8.3	7.9
560	8.4	6.3	8.4	8.0	8.1	8.4	8.3	7.7
750	8.5	6.6	8.5	7.7	8.2	8.2	8.4	7.9
1,000	8.5	6.6	8.5	7.8	8.2	8.2	8.3	7.9
対照区	8.1	8.0	8.5	7.9	8.2	8.1	8.3	8.0

表-6 試験水の pH

試験濃度 (mg/l)	開始時	24 時間		48 時間		72 時間		96 時間
		換水前	換水後	換水前	換水後	換水前	換水後	終了時
320	7.3	7.7	7.3	7.8	7.3	7.7	7.3	8.0
420	7.2	7.6	7.1	7.8	7.2	7.8	7.2	7.9
560	6.9	7.5	7.0	7.8	7.0	7.8	7.0	8.0
750	6.8	7.4	6.9	7.8	6.8	7.7	6.8	7.9
1,000	6.6	7.4	6.7	7.9	6.6	7.8	6.6	7.9
対照区	7.9	7.8	8.1	8.0	8.0	7.9	8.0	8.0

付属資料-1：予備試験結果

予備試験結果を表-1及び表-2に示した。

表-1 24, 48, 72及び96時間後の累積死亡率

(単位：%)

試験濃度(mg/l)	24時間後	48時間後	72時間後	96時間後
100	0	0	0	0
1,000	0	0	0	0
対照区	0	0	0	0

表-2 24, 48, 72及び96時間後の試験生物の症状等

試験濃度(mg/l)	24時間後	48時間後	72時間後	96時間後
100	n. a. d	n. a. d	n. a. d	n. a. d
1,000	n. a. d	n. a. d	n. a. d	n. a. d
対照区	n. a. d	n. a. d	n. a. d	n. a. d

n. a. d : no abnormalities are detected ; 正常

付属資料-2：本試験1回目の結果

本試験1回目結果を表-1及び表-2に示した。

表-1 24, 48, 72及び96時間後の累積死亡率

(単位：%)

試験濃度 (mg/l)	24 時間後	48 時間後	72 時間後	96 時間後
1,000	0	60	60	70
対照区	0	0	0	0

表-2 24, 48, 72及び96時間後の試験生物の症状等

試験濃度 (mg/l)	24 時間後	48 時間後	72 時間後	96 時間後
1,000	n. a. d, le	n. a. d	n. a. d	n. a. d
対照区	n. a. d	n. a. d	n. a. d	n. a. d

n. a. d : no abnormalities are detected ; 正常

le : lethargy ; 不活発

付属資料-3 : 希釈水の水質測定結果

希釈水の水質測定結果-1

項目名	結果	検出限界
pH 値	7.4 (19 °C)	
大腸菌群	陰性/100 ml	
蒸発残留物	120 mg/l	
フェノール類	検出せず	0.005 mg/l
カルシウム, マグネシウム等(硬度)	60 mg/l	
硝酸態窒素及び亜硝酸態窒素	1.7 mg/l	
フッ素及びその化合物	検出せず	0.10 mg/l
ジクロロメタン	検出せず	0.001 mg/l
四塩化炭素	検出せず	0.0002 mg/l
1,2-ジクロロエタン	検出せず	0.0002 mg/l
1,1-ジクロロエチレン	検出せず	0.001 mg/l
シス-1,2-ジクロロエチレン	検出せず	0.001 mg/l
1,1,1-トリクロロエタン	検出せず	0.001 mg/l
1,1,2-トリクロロエタン	検出せず	0.0005 mg/l
トリクロロエチレン	検出せず	0.001 mg/l
テトラクロロエチレン	検出せず	0.001 mg/l
1,3-ジクロロプロペン	検出せず	0.0002 mg/l
ベンゼン	検出せず	0.001 mg/l
クロロホルム	検出せず	0.001 mg/l
チウラム(チラム)	検出せず	0.0002 mg/l
シマジン(CAT)	検出せず	0.00001 mg/l
チオベンカルブ(ベンチオカーブ)	検出せず	0.00002 mg/l
イソキサチオン	検出せず	0.00001 mg/l
ダイアジノン	検出せず	0.00002 mg/l
フェニトロチオン(MEP)	検出せず	0.00001 mg/l
イソプロチオラン	検出せず	0.00001 mg/l
クロロタロニル(TPN)	検出せず	0.00001 mg/l
プロピザミド	検出せず	0.00001 mg/l
EPN	検出せず	0.00005 mg/l
ジクロルボス(DDVP)	検出せず	0.00005 mg/l
フェノブカルブ(BPMC)	検出せず	0.00001 mg/l
イプロベンホス(IBP)	検出せず	0.00005 mg/l
クロルニトロフェン(CNP)	検出せず	0.0001 mg/l

希釈水の水質測定結果-2

項目名	結果	検出限界
化学的酸素消費量 (COD _{Cr})	10 mg/l 以下	
生物化学的酸素要求量	1 mg/l 以下	
浮遊物質量	1 mg/l 以下	
全リン	検出せず	0.01 mg/l
臭化物イオン	検出せず	0.5 mg/l
硫化物イオン (S ²⁻)	検出せず	0.01 mg/l
電気伝導率 (25 °C)	19 mS/m	
総アルカリ度 (CaCO ₃ として)	47 mg/l	
有機体炭素 (TOC)	検出せず	0.3 mg/l
アンモニア性窒素	検出せず	0.04 mg/l
PCB	検出せず	0.0005 mg/l
水銀	検出せず	0.0001 mg/l
カドミウム	検出せず	0.001 mg/l
シアン化物イオン及び塩化シアン	検出せず	0.001 mg/l
鉛	0.002 mg/l	
六価クロム	検出せず	0.005 mg/l
ヒ素	検出せず	0.01 mg/l
セレン	検出せず	0.01 mg/l
ニッケル	検出せず	0.001 mg/l
銅	検出せず	0.01 mg/l
亜鉛	0.006 mg/l	
アルミニウム	検出せず	0.05 mg/l
マンガン	検出せず	0.005 mg/l
鉄	0.03 mg/l	
スズ	検出せず	0.1 mg/l
ナトリウム	13 mg/l	
カリウム	2.0 mg/l	
カルシウム	18 mg/l	
マグネシウム	3.9 mg/l	

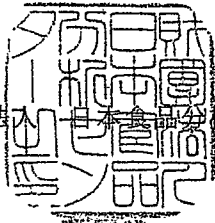
採水年月日：平成 16 年 12 月 21 日

最 終 報 告 書

スギ(木酢液)のオオミジンコに対する急性毒性試験

平成17年3月31日

財団法人 日本食品分析センター



スギ(木酢液)のオオミジンコに対する急性毒性試験

試験の要約

スギ(木酢液)のオオミジンコに対する急性毒性試験を実施し、50%致死濃度(LC₅₀)を求め、スギ(木酢液)のオオミジンコに及ぼす影響を評価することを目的として、「農薬の登録申請に係る試験成績について」(平成12年11月24日付 12農産第8147号)、水産動植物への影響に関する試験及び「魚類に対する毒性試験法」(昭和40年11月25日付 40農政B第2735号)、ミジンコ類の試験法(暫定)に従い、オオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する3時間急性毒性試験を実施した。

試験には国立環境研究所から入手したものを、当センターにおいて継代及び順化飼育したオオミジンコを用いた。

試験は、20頭/試験区(5頭4連)、限度試験として1,000 mg/lのみの濃度区を設定した。

環境条件は、水温19.1~20.3℃、溶存酸素濃度8.8~9.4 mg/l、pH7.0~7.9であった。

試験の結果、スギ(木酢液)の3時間後のLC₅₀(Median Lethal Concentration)は1,000 mg/l以上であった。

試験責任者

吉安友二



(平成 17 年 3 月 31 日)

目次

表題	1
試験受託番号	1
試験委託者	1
試験責任者	1
試験担当者	1
試験施設	1
試験期間	1
1 試験目的	2
2 試験法ガイドライン	2
3 被験物質	2
4 試験生物	3
5 試験方法	4
6 観察及び測定方法	4
7 試験結果	5
8 試験の妥当性	6
図表	7～8
付属資料-1	希积水の水質測定結果 9～10

表 題：スギ(木酢液)のオオミジンコに対する急性毒性試験

試験受託番号：第105013255号

試験委託者

名 称：環境省

所在地：〒100-8975 東京都千代田区霞ヶ関1丁目2番2号

試験責任者

所 属：環境科学部 環境生物安全課

氏 名：吉安 友二

試験担当者

所 属：環境科学部 環境生物安全課

氏 名：角田 紗代子 ， 杉原 夕華

試験施設

名 称：財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

所 在 地：〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目11番10号

〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目21番6号(別館)

試験期間

試験開始日：平成17年1月7日

実験開始日：平成17年3月3日

実験完了日：平成17年3月3日

試験完了日：平成17年**月**日

1 試験目的

スギ(木酢液)のオオミジンコに対する急性毒性試験を実施し、50 %致死濃度(LC₅₀)を求め、スギ(木酢液)のオオミジンコに及ぼす影響を評価した。

2 試験法ガイドライン

本試験は「農薬の登録申請に係る試験成績について」(平成12年11月24日付 12農産第8147号)、水産動植物への影響に関する試験、ミジンコ類急性遊泳阻害試験及び「魚類に対する毒性試験法」(昭和40年11月25日付 40農政B第2735号)、ミジンコ類の試験法(暫定)に準拠した。

3 被験物質

1) 名称及び有効成分の含有量等

名 称：スギ木酢液

常温における性状：褐色液体

2) 供試試料

入手先：環境省

入手年月日：2004年12月9日

入手量：1 l

ロット番号：W15080

純 度：-

有効期限：-

3) 被験物質の保管方法

被験物質は冷暗所にて保管した。

4) 取り扱い上の注意

被験物質の取り扱いにおいては、保護具等を着用の上、人体への吸入、摂取、接触等がないよう十分注意して取り扱った。

4 試験生物

1) 生物種

試験生物として下記に示したオオミジンコで、定期的な基準物質(ニクロム酸カリウム、試薬特級、純度99.5%以上[和光純薬工業株式会社])による生物検定においてEC₅₀の確認されたものを用いた。

なお、基準物質による48時間後のEC₅₀は0.53 mg/l(平成16年10月18日)であった。また、当センターにおける48時間後のEC₅₀のバックグラウンドデータは0.55±0.14 mg/lであった。

① 学名：*Daphnia magna*

② 入手先：国立環境研究所(平成15年3月7日)から入手したものを、当センターにおいて継代飼育した種である。

③ 生育段階：生後24時間以内の個体(以下「幼体」という。)を用いた。

2) 親ミジンコの飼育

親ミジンコの飼育は、試験に用いる希釈水と同一の水質、水温等、可能な限り試験環境条件に近い条件で飼育した。なお、幼体を得るための親ミジンコには、健康で繁殖盛んな生後2週令のものを用いた。

<飼育条件>

① 飼育密度：25頭/1飼育水(順化初期は35頭/1飼育水)

② 飼育容器：1 l容ガラス製ビーカー

③ 水温：19.6～20.8℃

④ 照明：16時間明期

⑤ 飼育水：水道水(茨城県つくば市)を脱塩素したもの

⑥ 給餌：成長段階に合わせてミジンコ1頭当たり0.01～0.12 mgC(有機体炭素)の *Chlorella vulgaris* / *Scenedesmus subspicatus*(1:1)混液を毎日給餌した。

5 試験方法

1) 暴露条件及び環境条件

- ① 暴露方式：止水式
- ② 暴露期間：3時間
- ③ 試験個体数：20頭/試験区(5頭4連)
- ④ 試験容器：100 ml容ガラス製ビーカー(容器のサイズ；内径 約50 mm×高さ 約70 mm)
- ⑤ 試験水量：100 ml/1連
- ⑥ 試験水温：19.1～20.3 °C
- ⑦ 照 明：16時間明期
- ⑧ 給 餌：無給餌
- ⑨ 溶存酸素濃度：8.8～9.4 mg/l(飽和溶存酸素量の60 %以上を保った。)
- ⑩ 試験水のpH：7.0～7.9 (pHの調整は行わなかった。)
- ⑪ 希 積 水：水道水(茨城県つくば市)を脱塩素したもの

2) 試験濃度の設定

被験物質の性状等から、1,000 mg/lの濃度区ではミジンコの死亡が認められないと予測されたことに基づき、本試験は限度試験として1,000 mg/lのみの濃度区を設定した。

3) 試験水の調製

被験物質を希積水に直接添加して1,000 mg/lの濃度区の試験水を調製した。
対照区は希積水のみとした。

6 観察及び測定方法

1) 試験生物の生死の観察

暴露開始から、3時間後にミジンコの死亡数を観察し、記録した。
なお、触角の運動が停止しているものを死亡とみなした。

2) 水質の測定

① 希積水

一般的な水質測定を定期的実施した。
使用条件は総硬度10～250 mgCaCO₃/l及びpH6.0～9.0とした。

② 試験水

各試験区の水質として、水温、溶存酸素濃度(以下「DO」と略す。)及びpHを暴露開始時及び終了時に測定した。なお、暴露開始時は4連分を同時に調製した容器について測定した。また、暴露終了時は各試験区の1容器について測定した。

〈測定機器〉

- a) 温度計：AP-210[安立計器株式会社]
- b) pH計：HM-21P[東亜ディーケーケー株式会社]
- c) DO計：DO-24P[東亜ディーケーケー株式会社]
- d) 残留塩素比色測定器：OT-I型[理研光学株式会社]

3) 試験水の状態観察

暴露開始時及び終了時の試験水について状態観察を行い、試験水の色調や析出、沈殿物等の有無について記録した。

4) 結果の処理法

限度試験のため、LC₅₀(Median Lethal Concentration)の算出は行わなかった。

7 試験結果

1) LC₅₀

3時間後のLC₅₀は1,000 mg/l以上であった(表-1)。

2) 死亡率

3時間後の死亡率は、対照区及び1,000 mg/lで0%であった。

3時間後の死亡率を表-2に示した。

3) 水質の測定

① 希釈水

一般的な水質測定を定期的実施した結果を付属資料-1に示した。なお、試験に使用した希釈水の総硬度は69 mgCaCO₃/l、pHは7.3であった。

② 試験水

暴露期間中における試験水の水温は19.1~20.3℃、DOは8.8~9.4 mg/l、pHは7.0~7.9であった。

暴露期間中の各試験区の試験水の水温、DO及びpHを表-3~5に示した。

4) 試験水の状態

暴露開始時の試験水はわずかに褐色透明で、被験物質は試験水中に溶解していることが目視にて確認された。また、暴露終了時の試験水の状態に変化は認められなかった。

5) 試験結果に影響を及ぼした可能性のある事項

なし。

8 試験の妥当性

暴露終了時において対照区の死亡率は0%であり、暴露開始時においてはミジンコが水面に浮いておらず、暴露期間中の各試験区のDOは飽和濃度の60%以上であったため、本試験の成立が確認された。

表-1 3時間後のLC₅₀

(単位：mg/l)

3時間後
> 1,000*

*：1,000 mg/lの限度試験であり，本試験濃度で死亡が認められなかったため，算出しなかった。

表-2 3時間後の死亡率

(単位：%)

試験濃度 (mg/l)	死亡率
	3時間後
1,000	0
対照区	0

表-3 試験水の水温

(単位：℃)

試験濃度 (mg/l)	開始時	3 時間
		終了時
1,000	19.8	19.8
対照区	20.3	19.1

表-4 試験水の DO

(単位：mg/l)

試験濃度 (mg/l)	開始時	3 時間
		終了時
1,000	9.2	8.9
対照区	9.4	8.8

表-5 試験水の pH

試験濃度 (mg/l)	開始時	3 時間
		終了時
1,000	7.1	7.0
対照区	7.9	7.7

付属資料-1 : 希釈水の水質測定結果

希釈水の水質測定結果-1

項目名	結果	検出限界
pH 値	7.2 (20 °C)	
大腸菌群	陰性/100 ml	
蒸発残留物	150 mg/l	
フェノール類	検出せず	0.005 mg/l
カルシウム, マグネシウム等(硬度)	64 mg/l	
硝酸態窒素及び亜硝酸態窒素	0.8 mg/l	
フッ素及びその化合物	0.11 mg/l	
ジクロロメタン	検出せず	0.001 mg/l
四塩化炭素	検出せず	0.0002 mg/l
1,2-ジクロロエタン	検出せず	0.0002 mg/l
1,1-ジクロロエチレン	検出せず	0.001 mg/l
シス-1,2-ジクロロエチレン	検出せず	0.001 mg/l
1,1,1-トリクロロエタン	検出せず	0.001 mg/l
1,1,2-トリクロロエタン	検出せず	0.0005 mg/l
トリクロロエチレン	検出せず	0.001 mg/l
テトラクロロエチレン	検出せず	0.001 mg/l
1,3-ジクロロプロペン	検出せず	0.0002 mg/l
ベンゼン	検出せず	0.001 mg/l
クロロホルム	0.014 mg/l	
チウラム(チラム)	検出せず	0.0002 mg/l
シマジン(CAT)	検出せず	0.00001 mg/l
チオベンカルブ(ベンチオカーブ)	検出せず	0.00002 mg/l
イソキサチオン	検出せず	0.00001 mg/l
ダイアジノン	検出せず	0.00002 mg/l
フェニトロチオン(MEP)	検出せず	0.00001 mg/l
イソプロチオラン	検出せず	0.00001 mg/l
クロロタロニル(TPN)	検出せず	0.00001 mg/l
プロピザミド	検出せず	0.00001 mg/l
EPN	検出せず	0.00005 mg/l
ジクロルボス(DDVP)	検出せず	0.00005 mg/l
フェノブカルブ(BPMC)	検出せず	0.00001 mg/l
イプロベンホス(IBP)	検出せず	0.00005 mg/l
クロルニトロフェン(CNP)	検出せず	0.0001 mg/l

希釈水の水質測定結果-2

項目名	結果	検出限界
化学的酸素消費量(COD _{Cr})	10 mg/l 以下	
生物化学的酸素要求量	1 mg/l 以下	
浮遊物質量	1 mg/l 以下	
全リン	0.03 mg/l	
臭化物イオン	検出せず	0.5 mg/l
硫化物イオン(S ²⁻)	検出せず	0.01 mg/l
電気伝導率(25 °C)	25 mS/m	
総アルカリ度(CaCO ₃ として)	36 mg/l	
有機体炭素(TOC)	0.9 mg/l	
アンモニア性窒素	検出せず	0.04 mg/l
PCB	検出せず	0.0005 mg/l
水銀	検出せず	0.0001 mg/l
カドミウム	検出せず	0.001 mg/l
シアン化物イオン及び塩化シアン	検出せず	0.001 mg/l
鉛	検出せず	0.001 mg/l
六価クロム	検出せず	0.005 mg/l
ヒ素	検出せず	0.01 mg/l
セレン	検出せず	0.01 mg/l
ニッケル	検出せず	0.001 mg/l
銅	検出せず	0.01 mg/l
亜鉛	検出せず	0.005 mg/l
アルミニウム	検出せず	0.05 mg/l
マンガン	検出せず	0.005 mg/l
鉄	検出せず	0.03 mg/l
スズ	検出せず	0.1 mg/l
ナトリウム	20 mg/l	
カリウム	5.3 mg/l	
カルシウム	16 mg/l	
マグネシウム	6.2 mg/l	

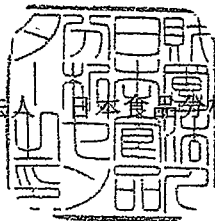
採水年月日：平成 16 年 12 月 21 日

最 終 報 告 書

竹酢液のヒメダカに対する急性毒性試験

平成17年3月31日

財団法人 日本食品分析センター



竹酢液のヒメダカに対する急性毒性試験

試験の要約

竹酢液のヒメダカに対する急性毒性試験を実施し、50%致死濃度(LC₅₀)及び最大無作用濃度(NOEC)を求め、竹酢液のヒメダカに及ぼす影響を評価することを目的として、「農薬の登録申請に係る試験成績について」(平成12年11月24日付 12農産第8147号)、水産動植物への影響に関する試験に従い、ヒメダカ(*Oryzias latipes*)に対する96時間急性毒性試験を実施した。

試験には滝沢養魚場(埼玉県鴻巣市)から入手したものを、当センターにおいて自家繁殖させ、順化飼育したヒメダカ(平均全長2.3 cm, 平均体重0.09 g)を用いた。

試験は、10尾/試験区、公比1.3で5濃度区(320, 420, 560, 750及び1,000 mg/l)を設定した。

環境条件は、水温23.0~24.2℃, 溶存酸素濃度6.0~8.5 mg/l, pH4.9~8.1であった。

試験の結果、竹酢液の48及び96時間後のLC₅₀(Median Lethal Concentration)は940 mg/l及び890 mg/lで、96時間後のNOEC(No Observed Effect Concentration)は420 mg/lであった。また、試験生物の症状等として、異常遊泳、不活発及び水面浮上が観察された。

試験責任者

吉安友二



(平成 17 年 3 月 31 日)

目次

表題	1
試験受託番号	1
試験委託者	1
試験責任者	1
試験担当者	1
試験施設	1
試験期間	1
1 試験目的	2
2 試験法ガイドライン	2
3 被験物質	2
4 試験生物	3
5 試験方法	4
6 観察及び測定方法	4
7 試験結果	5
8 試験の妥当性	6
図表	7～10
付属資料-1	予備試験結果 11
付属資料-2	希釈水の水質測定結果 12～13

表 題：竹酢液のヒメダカに対する急性毒性試験

試験受託番号：第105013255号

試験委託者

名 称：環境省

所在地：〒100-8975 東京都千代田区霞ヶ関1丁目2番2号

試験責任者

所 属：環境科学部 環境生物安全課

氏 名：吉安 友二

試験担当者

所 属：環境科学部 環境生物安全課

氏 名：清水 正恵 ， 藤野 仁美

試験施設

名 称：財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

所在地：〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目11番10号

〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目21番6号(別館)

試験期間

試験開始日：平成17年1月7日

実験開始日：平成17年2月28日

実験完了日：平成17年3月4日

試験完了日：平成17年**月**日

1 試験目的

竹酢液のヒメダカに対する急性毒性試験を実施し、50%致死濃度(LC₅₀)及び最大無作用濃度(NOEC)を求め、竹酢液のヒメダカに及ぼす影響を評価した。

2 試験法ガイドライン

本試験は「農薬の登録申請に係る試験成績について」(平成12年11月24日付 12農産第8147号)、水産動植物への影響に関する試験、魚類急性毒性試験に準拠した。

3 被験物質

1) 名称及び有効成分の含有量等

名称：竹酢液

常温における性状：褐色液体

2) 供試試料

入手先：環境省

入手年月日：2004年12月9日

入手量：1 l

ロット番号：B15050

純度：-

有効期限：-

3) 被験物質の保管方法

被験物質は冷暗所にて保管した。

4) 取り扱い上の注意

被験物質の取り扱いにおいては、保護具等を着用の上、人体への吸入、摂取、接触等がないよう十分注意して取り扱った。

4 試験生物

1) 生物種

試験生物として下記に示したヒメダカで、定期的な基準物質(硫酸銅(Ⅱ)五水和物, 試薬特級, 純度99.5%以上[関東化学株式会社])による生物検定においてLC₅₀の確認されたものを用いた。

なお, 基準物質による96時間後のLC₅₀は0.57 mg/l(平成16年10月18日)であった。また, 当センターにおける96時間後のLC₅₀のバックグラウンドデータは0.75±0.22 mg/lであった。

① 学名: *Oryzias latipes*

② 全長: 2.3 cm (2.2~2.4 cm) (n=10)

③ 体重: 0.09 g (0.08~0.11 g) (n=10)

④ 入手等: 滝沢養魚場[埼玉県鴻巣市](平成9年1月29日)より入手したものを, 当センターにおいて自家繁殖した種である。試験には, 生後5ヶ月令の個体を使用した。

2) 順化

順化飼育に用いるヒメダカには, 蓄養飼育を行っている群から, 外観に異常が無い個体をランダムに選別したものを用いた。順化飼育は, 試験に用いる希釈水と同一の水質, 水温等, 可能な限り試験環境条件に近い条件で14日間飼育した。ただし, 暴露開始前24時間は給餌を行わなかった。また, 選別した試験生物のうちの10尾について全長及び体重の測定を行った。

なお, 暴露開始前7日間の死亡率は0%であった。

<順化条件>

① 飼育方法: 循環ろ過式

② 飼育水槽: 50 l容ガラス製水槽

③ 水温: 24.1~24.2 °C

④ 照明: 16時間明期

⑤ 飼育水: 水道水(東京都多摩市)を脱塩素したもの

⑥ 給餌: 体重の約3%の市販配合飼料[中部飼料株式会社]を毎日給餌した。

5 試験方法

1) 暴露条件及び環境条件

- ① 暴露方式：半止水式(24時間ごと全量換水)
- ② 暴露期間：96時間
- ③ 試験個体数：10尾/試験区
- ④ 試験水量：2 l(収容密度；0.50 g/l)
- ⑤ 試験容器：2 l容ガラス製ビーカー(容器のサイズ；内径 約13 cm×高さ 約20 cm)
- ⑥ 試験水温：23.0～24.2 °C
- ⑦ 照 明：16時間明期
- ⑧ 給 餌：無給餌
- ⑨ 溶存酸素濃度：6.0～8.5 mg/l(暴露期間中，緩やかに通気を行い，飽和溶存酸素量の60%以上を保った。)
- ⑩ 試験水のpH：4.9～8.1 (pHの調整は行わなかった。)
- ⑪ 希 積 水：水道水(東京都多摩市)を脱塩素したもの

2) 試験濃度の設定

予備試験の結果から，1,000 mg/lの濃度区ではヒメダカが80%死亡し，320 mg/lの濃度区では死亡及び異常な行動や外観等が認められなかったことに基づき，本試験では，1,000 mg/l以下の濃度を公比1.3で5濃度区(320, 420, 560, 750及び1,000 mg/l)を設定した。

なお，予備試験の結果は付属資料-1に示した。

3) 試験水の調製

被験物質を希積水に直接添加して各濃度区の試験水を調製した。

対照区は希積水のみとした。

6 観察及び測定方法

1) 試験生物の生死，症状等の観察

暴露開始から，24，48，72及び96時間後にヒメダカの死亡尾数を記録するとともに異常な行動や外観等について記録した。

なお，観察可能な動きがなく，尾柄部に触れて反応が無い個体を死亡とみなした。また，死亡が見られた場合は速やかに取り除いた。

2) 水質の測定

① 希釈水

一般的な水質測定を定期的実施した。

使用条件は総硬度10~250 mgCaCO₃/l及びpH 6.0~8.5とした。

② 試験水

各試験区の水質として、水温、溶存酸素濃度(以下「DO」と略す。)及びpHを暴露開始時、換水前後及び終了時に測定した。

<測定機器>

a) 温度計：AP-210[安立計器株式会社]

b) pH計：HM-21P[東亜ディーケーケー株式会社]

c) DO計：DO-24P[東亜ディーケーケー株式会社]

d) 残留塩素比色測定器：OT-I型[理研光学株式会社]

3) 試験水の状態観察

暴露開始時及び最初の換水前の試験水について状態観察を行い、試験水の色調や析出、沈殿物等の有無について記録した。

4) 結果の処理法

①LC₅₀(Median Lethal Concentration)：各試験区のヒメダカの死亡数と試験生物数(10尾)から死亡率(%)を算出し、Binominal法を用いてLC₅₀を算出した。24時間後のLC₅₀は、最高試験濃度で死亡率が50%未満であったため、算出しなかった。

②NOEC(No Observed Effect Concentration)：目視により、対照区と比較して外部形態及び行動に差が認められない最高濃度をNOECとした。

7 試験結果

1) LC₅₀

24, 48, 72及び96時間後のLC₅₀は、1,000 mg/l以上, 940 mg/l, 890 mg/l及び890 mg/lであった(表-1)。

2) NOEC

96時間後のNOECは420 mg/lであった。

なお、異常な行動及び外観は750 mg/l以下の濃度区では観察されなかったが、72時間後の観察において、560 mg/l濃度区で10%の死亡が観察された。経験上、対照区を含む試験区において偶発的に試験生物が死亡するケースはほとんど認められておらず、被験物質又はpHの影響により死亡した可能性が否定できなかったことから、本試験のNOECは420 mg/lとした。

3) 累積死亡率

96時間後の累積死亡率は、対照区、320 mg/l、420及び750 mg/lで0%、560 mg/lで10%、1,000 mg/lで90%であった。

なお、本試験で死亡が観察された濃度区では、試験水中のpHが試験環境条件(6.0~8.5)の範囲を外れていたことから、死亡の原因には、毒性以外にpHの影響が含まれる可能性があるとして推測された。

24、48、72及び96時間後の累積死亡率を表-2に示した。また、濃度-死亡率のグラフを図-1に示した。

4) 試験生物の症状等の観察

各濃度区における試験生物の行動及び外観について対照区と比較した。異常な行動及び外観は、対照区、320~750 mg/lでは観察されなかったが、1,000 mg/lで異常遊泳、不活発及び水面浮上が観察された。

24、48、72及び96時間後の試験生物の症状等を表-3に示した。

5) 水質の測定

① 希釈水

一般的な水質測定を定期的実施した結果を付属資料-2に示した。なお、試験に使用した希釈水の総硬度は61~66 mgCaCO₃/l、pHは8.0であった。

② 試験水

暴露期間中における試験水の水温は23.0~24.2℃、D0は6.0~8.5 mg/l、pHは4.9~8.1であった。

暴露期間中の各試験区の試験水の水温、D0及びpHを表-4~6に示した。

6) 試験水の状態

暴露開始時の試験水は320 mg/lの濃度区で無色透明であり、560~1,000 mg/lではわずかに黄色がかっていたが、被験物質は試験水中に溶解していることが目視にて確認された。また、24時間後の換水前の試験水は、すべての濃度区において、わずかに白濁した状態であった。試験水の白濁は、バクテリア等の作用により、試験水中の被験物質が分解されたことにより生じたとして推測された。

7) 試験結果に影響を及ぼした可能性のある事項

なし。

8) 試験の妥当性

暴露終了時に対照区の死亡率は0%であり、暴露期間中の各試験区のD0も飽和濃度の60%以上であったため、本試験の成立が確認された。

表-1 24, 48, 72 及び 96 時間後の LC₅₀

(単位: mg/l)

24 時間後	48 時間後	72 時間後	96 時間後
> 1,000*	940**	890**	890**

*: 最高試験濃度で死亡率が 50 %未満であったため, 算出しなかった。

** : Binominal 法

表-2 24, 48, 72 及び 96 時間後の累積死亡率

(単位: %)

試験濃度 (mg/l)	24 時間後	48 時間後	72 時間後	96 時間後
320	0	0	0	0
420	0	0	0	0
560	0	0	10	10
750	0	0	0	0
1,000	10	70	90	90
対照区	0	0	0	0

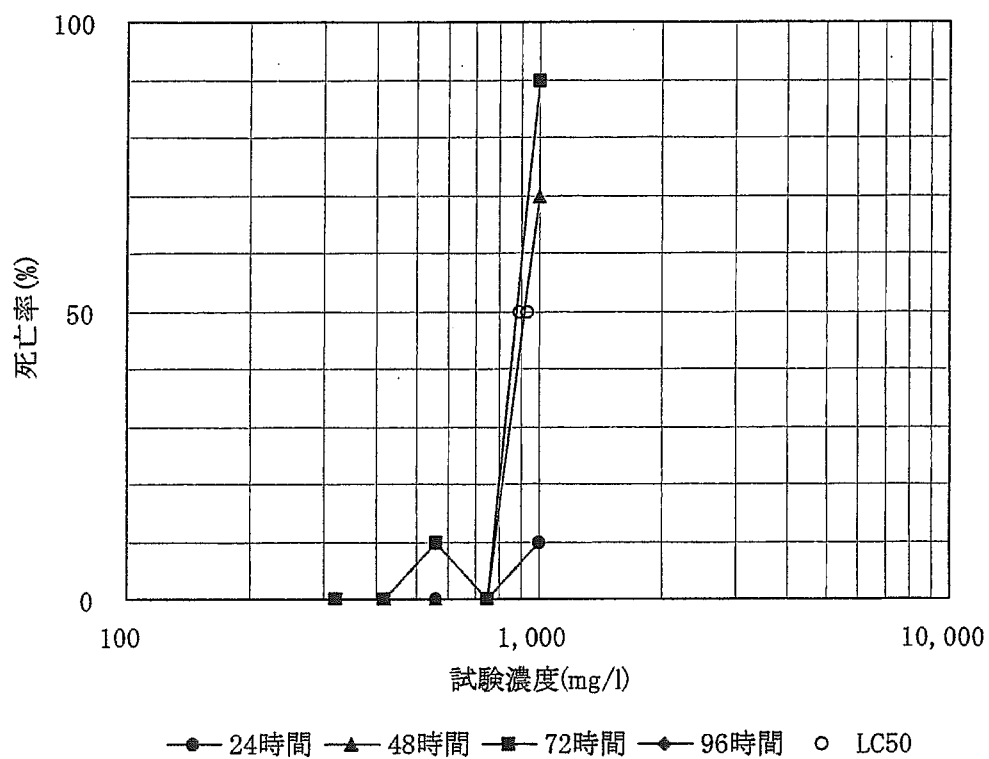


図-1 濃度-死亡率曲線

表-3 24, 48, 72 及び 96 時間後の試験生物の症状等

試験濃度 (mg/l)	24 時間後	48 時間後	72 時間後	96 時間後
320	n. a. d	n. a. d	n. a. d	n. a. d
420	n. a. d	n. a. d	n. a. d	n. a. d
560	n. a. d	n. a. d	n. a. d	n. a. d
750	n. a. d	n. a. d	n. a. d	n. a. d
1,000	e. s, le	e. s, le s. s	le	le
対照区	n. a. d	n. a. d	n. a. d	n. a. d

n. a. d : no abnormalities are detected ; 正常

e. s : erratic swimming ; 異常遊泳

le : lethargy ; 不活発

s. s : surface slicks ; 水面浮上

表-4 試験水の水温

(単位:℃)

試験濃度 (mg/l)	開始時	24 時間		48 時間		72 時間		96 時間
		換水前	換水後	換水前	換水後	換水前	換水後	終了時
320	23.8	23.0	23.3	23.7	23.4	23.0	23.0	24.2
420	24.0	23.4	23.7	23.1	23.9	23.2	23.0	23.2
560	24.0	23.5	23.7	23.2	24.0	23.6	23.0	23.4
750	23.9	23.4	23.6	23.0	24.0	23.0	23.1	23.4
1,000	23.9	23.4	23.7	23.2	24.1	23.0	23.0	23.5
対照区	23.1	23.9	23.2	24.1	23.7	23.7	23.4	24.2

表-5 試験水の DO

(単位:mg/l)

試験濃度 (mg/l)	開始時	24 時間		48 時間		72 時間		96 時間
		換水前	換水後	換水前	換水後	換水前	換水後	終了時
320	8.3	6.0	8.2	7.3	8.1	8.3	8.4	7.9
420	8.4	6.2	8.4	7.4	8.2	8.4	8.5	7.9
560	8.5	6.5	8.4	7.6	8.2	7.1	8.5	7.8
750	8.5	7.8	8.4	7.7	8.2	8.2	8.5	7.7
1,000	8.5	8.2	8.4	8.2	8.2	8.3	8.5	8.0
対照区	8.1	8.1	8.5	7.8	8.2	8.1	8.2	8.0

表-6 試験水の pH

試験濃度 (mg/l)	開始時	24 時間		48 時間		72 時間		96 時間
		換水前	換水後	換水前	換水後	換水前	換水後	終了時
320	6.5	7.3	6.6	7.9	6.4	7.6	6.6	7.8
420	6.2	7.2	6.3	7.8	6.2	7.6	6.2	7.8
560	5.8	7.1	5.9	7.7	5.8	7.9	5.8	7.5
750	5.3	5.7	5.4	7.3	5.4	6.2	5.3	6.1
1,000	5.0	5.1	5.0	5.1	5.0	4.9	4.9	5.1
対照区	7.9	7.8	8.1	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0

付属資料-1：予備試験結果

予備試験結果を表-1及び表-2に示した。

表-1 24, 48, 72及び96時間後の累積死亡率

(単位：%)

試験濃度 (mg/l)	24 時間後	48 時間後	72 時間後	96 時間後
100	0	0	0	0
320	0	0	0	0
1,000	20	60	60	80
対照区	0	0	0	0

表-2 24, 48, 72及び96時間後の試験生物の症状等

試験濃度 (mg/l)	24 時間後	48 時間後	72 時間後	96 時間後
100	n. a. d	n. a. d	n. a. d	n. a. d
320	n. a. d	n. a. d	n. a. d	n. a. d
1,000	n. a. d, le s. s	e. s, le	e. s, le	le
対照区	n. a. d	n. a. d	n. a. d	n. a. d

n. a. d: no abnormalities are detected; 正常

e. s: erratic swimming; 異常遊泳

le: lethargy; 不活発

s. s: surface slicks; 水面浮上

付属資料-2：希釈水の水質測定結果

希釈水の水質測定結果-1

項目名	結果	検出限界
pH 値	7.4 (19 °C)	
大腸菌群	陰性/100 ml	
蒸発残留物	120 mg/l	
フェノール類	検出せず	0.005 mg/l
カルシウム, マグネシウム等(硬度)	60 mg/l	
硝酸態窒素及び亜硝酸態窒素	1.7 mg/l	
フッ素及びその化合物	検出せず	0.10 mg/l
ジクロロメタン	検出せず	0.001 mg/l
四塩化炭素	検出せず	0.0002 mg/l
1,2-ジクロロエタン	検出せず	0.0002 mg/l
1,1-ジクロロエチレン	検出せず	0.001 mg/l
シス-1,2-ジクロロエチレン	検出せず	0.001 mg/l
1,1,1-トリクロロエタン	検出せず	0.001 mg/l
1,1,2-トリクロロエタン	検出せず	0.0005 mg/l
トリクロロエチレン	検出せず	0.001 mg/l
テトラクロロエチレン	検出せず	0.001 mg/l
1,3-ジクロロプロペン	検出せず	0.0002 mg/l
ベンゼン	検出せず	0.001 mg/l
クロロホルム	検出せず	0.001 mg/l
チウラム(チラム)	検出せず	0.0002 mg/l
シマジン(CAT)	検出せず	0.00001 mg/l
チオベンカルブ(ベンチオカーブ)	検出せず	0.00002 mg/l
イソキサチオン	検出せず	0.00001 mg/l
ダイアジノン	検出せず	0.00002 mg/l
フェニトロチオン(MEP)	検出せず	0.00001 mg/l
イソプロチオラン	検出せず	0.00001 mg/l
クロロタロニル(TPN)	検出せず	0.00001 mg/l
プロピザミド	検出せず	0.00001 mg/l
EPN	検出せず	0.00005 mg/l
ジクロルボス(DDVP)	検出せず	0.00005 mg/l
フェノブカルブ(BPMC)	検出せず	0.00001 mg/l
イプロベンホス(IBP)	検出せず	0.00005 mg/l
クロルニトロフェン(CNP)	検出せず	0.0001 mg/l

希釈水の水質測定結果-2

項目名	結果	検出限界
化学的酸素消費量(COD _{Cr})	10 mg/l 以下	
生物化学的酸素要求量	1 mg/l 以下	
浮遊物質	1 mg/l 以下	
全リン	検出せず	0.01 mg/l
臭化物イオン	検出せず	0.5 mg/l
硫化物イオン(S ²⁻)	検出せず	0.01 mg/l
電気伝導率(25 °C)	19 mS/m	
総アルカリ度(CaCO ₃ として)	47 mg/l	
有機体炭素(TOC)	検出せず	0.3 mg/l
アンモニア性窒素	検出せず	0.04 mg/l
PCB	検出せず	0.0005 mg/l
水銀	検出せず	0.0001 mg/l
カドミウム	検出せず	0.001 mg/l
シアン化物イオン及び塩化シアン	検出せず	0.001 mg/l
鉛	0.002 mg/l	
六価クロム	検出せず	0.005 mg/l
ヒ素	検出せず	0.01 mg/l
セレン	検出せず	0.01 mg/l
ニッケル	検出せず	0.001 mg/l
銅	検出せず	0.01 mg/l
亜鉛	0.006 mg/l	
アルミニウム	検出せず	0.05 mg/l
マンガン	検出せず	0.005 mg/l
鉄	0.03 mg/l	
スズ	検出せず	0.1 mg/l
ナトリウム	13 mg/l	
カリウム	2.0 mg/l	
カルシウム	18 mg/l	
マグネシウム	3.9 mg/l	

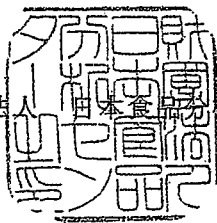
採水年月日：平成 16 年 12 月 21 日

最 終 報 告 書

竹酢液のオオミジンコに対する急性毒性試験

平成17年3月31日

財団法人 日本食品分析センター



竹酢液のオオミジンコに対する急性毒性試験

試験の要約

竹酢液のオオミジンコに対する急性毒性試験を実施し、50%致死濃度(LC₅₀)を求め、竹酢液のオオミジンコに及ぼす影響を評価することを目的として、「農薬の登録申請に係る試験成績について」(平成12年11月24日付 12農産第8147号)、水産動植物への影響に関する試験及び「魚類に対する毒性試験法」(昭和40年11月25日付 40農政B第2735号)、ミジンコ類の試験法(暫定)に従い、オオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する3時間急性毒性試験を実施した。

試験には国立環境研究所から入手したものを、当センターにおいて継代及び順化飼育したオオミジンコを用いた。

試験は、20頭/試験区(5頭4連)、限度試験として1,000 mg/lのみの濃度区を設定した。

環境条件は、水温19.3~20.2℃、溶存酸素濃度8.6~9.5 mg/l、pH5.1~7.8であった。

試験の結果、竹酢液の3時間後のLC₅₀(Median Lethal Concentration)は1,000 mg/l以上であった。

試験責任者

吉安友二



(平成17年3月31日)

目次

表題	1
試験受託番号	1
試験委託者	1
試験責任者	1
試験担当者	1
試験施設	1
試験期間	1
1 試験目的	2
2 試験法ガイドライン.....	2
3 被験物質	2
4 試験生物	3
5 試験方法	4
6 観察及び測定方法	4
7 試験結果	5
8 試験の妥当性	6
図表	7～8
付属資料-1	希积水の水質測定結果 9～10

表 題：竹酢液のオオミジンコに対する急性毒性試験

試験受託番号：第105013255号

試験委託者

名 称：環境省

所在地：〒100-8975 東京都千代田区霞ヶ関1丁目2番2号

試験責任者

所 属：環境科学部 環境生物安全課

氏 名：吉安 友二

試験担当者

所 属：環境科学部 環境生物安全課

氏 名：角田 紗代子 ， 杉原 夕華

試験施設

名 称：財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

所在地：〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目11番10号

〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目21番6号(別館)

試験期間

試験開始日：平成17年1月7日

実験開始日：平成17年3月3日

実験完了日：平成17年3月3日

試験完了日：平成17年**月**日

1 試験目的

竹酢液のオオミジンコに対する急性毒性試験を実施し、50%致死濃度(LC₅₀)を求め、竹酢液のオオミジンコに及ぼす影響を評価した。

2 試験法ガイドライン

本試験は「農薬の登録申請に係る試験成績について」(平成12年11月24日付 12農産第8147号)、水産動植物への影響に関する試験、ミジンコ類急性遊泳阻害試験及び「魚類に対する毒性試験法」(昭和40年11月25日付 40農政B第2735号)、ミジンコ類の試験法(暫定)に準拠した。

3 被験物質

1) 名称及び有効成分の含有量等

名称：竹酢液

常温における性状：褐色液体

2) 供試試料

入手先：環境省

入手年月日：2004年12月9日

入手量：1 l

ロット番号：B15050

純度：-

有効期限：-

3) 被験物質の保管方法

被験物質は冷暗所にて保管した。

4) 取り扱い上の注意

被験物質の取り扱いにおいては、保護具等を着用の上、人体への吸入、摂取、接触等がないよう十分注意して取り扱った。

4 試験生物

1) 生物種

試験生物として下記に示したオオミジンコで、定期的な基準物質(二クロム酸カリウム, 試薬特級, 純度99.5%以上[和光純薬工業株式会社])による生物検定において EC_{50} の確認されたものを用いた。

なお, 基準物質による48時間後の EC_{50} は0.53 mg/l(平成16年10月18日)であった。また, 当センターにおける48時間後の EC_{50} のバックグラウンドデータは 0.55 ± 0.14 mg/lであった。

- ① 学名: *Daphnia magna*
- ② 入手先: 国立環境研究所(平成15年3月7日)から入手したものを, 当センターにおいて継代飼育した種である。
- ③ 生育段階: 生後24時間以内の個体(以下「幼体」という。)を用いた。

2) 親ミジンコの飼育

親ミジンコの飼育は, 試験に用いる希釈水と同一の水質, 水温等, 可能な限り試験環境条件に近い条件で飼育した。なお, 幼体を得るための親ミジンコには, 健康で繁殖盛んな生後3週令のものを用いた。

<飼育条件>

- ① 飼育密度: 25頭/1飼育水(順化初期は35頭/1飼育水)
- ② 飼育容器: 1 l容ガラス製ビーカー
- ③ 水温: 19.8~20.8 °C
- ④ 照明: 16時間明期
- ⑤ 飼育水: 水道水(茨城県つくば市)を脱塩素したもの
- ⑥ 給餌: 成長段階に合わせてミジンコ1頭当たり0.01~0.13 mgC(有機体炭素)の *Chlorella vulgaris* / *Scenedesmus subspicatus*(1:1)混液を毎日給餌した。

5 試験方法

1) 暴露条件及び環境条件

- ① 暴露方式：止水式
- ② 暴露期間：3時間
- ③ 試験個体数：20頭/試験区(5頭4連)
- ④ 試験容器：100 ml容ガラス製ビーカー(容器のサイズ；内径 約50 mm×高さ 約70 mm)
- ⑤ 試験水量：100 ml/1連
- ⑥ 試験水温：19.3～20.2 °C
- ⑦ 照 明：16時間明期
- ⑧ 給 餌：無給餌
- ⑨ 溶存酸素濃度：8.6～9.5 mg/l(飽和溶存酸素量の60 %以上を保った。)
- ⑩ 試験水のpH：5.1～7.8 (pHの調整は行わなかった。)
- ⑪ 希 積 水：水道水(茨城県つくば市)を脱塩素したもの

2) 試験濃度の設定

被験物質の性状等から、1,000 mg/lの濃度区ではミジンコの死亡が認められないと予測されたことに基づき、本試験は限度試験として1,000 mg/lのみの濃度区を設定した。

3) 試験水の調製

被験物質を希釈水に直接添加して1,000 mg/lの濃度区の試験水を調製した。
対照区は希釈水のみとした。

6 観察及び測定方法

1) 試験生物の生死の観察

暴露開始から、3時間後にミジンコの死亡数を観察し、記録した。
なお、触角の運動が停止しているものを死亡とみなした。

2) 水質の測定

① 希釈水

一般的な水質測定を定期的実施した。
使用条件は総硬度10～250 mgCaCO₃/l及びpH6.0～9.0とした。

② 試験水

各試験区の水質として、水温、溶存酸素濃度(以下「D0」と略す。)及びpHを暴露開始時及び終了時に測定した。なお、暴露開始時は4連分を同時に調製した容器について測定した。また、暴露終了時は各試験区の1容器について測定した。

〈測定機器〉

- a) 温度計：AP-210[安立計器株式会社]
- b) pH計：HM-21P[東亜ディーケーケー株式会社]
- c) D0計：D0-24P[東亜ディーケーケー株式会社]
- d) 残留塩素比色測定器：OT-I型[理研光学株式会社]

3) 試験水の状態観察

暴露開始時及び終了時の試験水について状態観察を行い、試験水の色調や析出、沈殿物等の有無について記録した。

4) 結果の処理法

限度試験のため、 LC_{50} (Median Lethal Concentration)の算出は行わなかった。

7 試験結果

1) LC_{50}

3時間後の LC_{50} は1,000 mg/l以上であった(表-1)。

2) 死亡率

3時間後の死亡率は、対照区及び1,000 mg/lで0%であった。

3時間後の死亡率を表-2に示した。

3) 水質の測定

① 希釈水

一般的な水質測定を定期的実施した結果を付属資料-1に示した。なお、試験に使用した希釈水の総硬度は69 mgCaCO₃/l、pHは7.3であった。

② 試験水

暴露期間中における試験水の水温は19.3~20.2℃、D0は8.6~9.5 mg/l、pHは5.1~7.8であった。

暴露期間中の各試験区の試験水の水温、D0及びpHを表-3~5に示した。

4) 試験水の状態

暴露開始時の試験水はわずかに褐色透明で、被験物質は試験水中に溶解していることが目視にて確認された。また、暴露終了時の試験水の状態に変化は認められなかった。

5) 試験結果に影響を及ぼした可能性のある事項

なし。

8 試験の妥当性

暴露終了時において対照区の死亡率は0%であり、暴露開始時においてはミジンコが水面に浮いておらず、暴露期間中の各試験区のDOは飽和濃度の60%以上であったため、本試験の成立が確認された。

表-1 3時間後のLC₅₀

(単位：mg/l)

3時間後
> 1,000*

*：1,000 mg/lの限度試験であり，本試験濃度で死亡が認められなかったため，算出しなかった。

表-2 3時間後の死亡率

(単位：%)

試験濃度 (mg/l)	死亡率
	3時間後
1,000	0
対照区	0

表-3 試験水の水温

(単位：℃)

試験濃度 (mg/l)	開始時	3時間 終了時
1,000	19.3	19.6
対照区	20.2	19.5

表-4 試験水の DO

(単位：mg/l)

試験濃度 (mg/l)	開始時	3時間 終了時
1,000	9.5	8.6
対照区	9.0	8.6

表-5 試験水の pH

試験濃度 (mg/l)	開始時	3時間 終了時
1,000	5.1	5.1
対照区	7.8	7.8

付属資料-1：希釈水の水質測定結果

希釈水の水質測定結果-1

項目名	結果	検出限界
pH 値	7.2 (20 °C)	
大腸菌群	陰性/100 ml	
蒸発残留物	150 mg/l	
フェノール類	検出せず	0.005 mg/l
カルシウム, マグネシウム等(硬度)	64 mg/l	
硝酸態窒素及び亜硝酸態窒素	0.8 mg/l	
フッ素及びその化合物	0.11 mg/l	
ジクロロメタン	検出せず	0.001 mg/l
四塩化炭素	検出せず	0.0002 mg/l
1,2-ジクロロエタン	検出せず	0.0002 mg/l
1,1-ジクロロエチレン	検出せず	0.001 mg/l
シス-1,2-ジクロロエチレン	検出せず	0.001 mg/l
1,1,1-トリクロロエタン	検出せず	0.001 mg/l
1,1,2-トリクロロエタン	検出せず	0.0005 mg/l
トリクロロエチレン	検出せず	0.001 mg/l
テトラクロロエチレン	検出せず	0.001 mg/l
1,3-ジクロロプロペン	検出せず	0.0002 mg/l
ベンゼン	検出せず	0.001 mg/l
クロロホルム	0.014 mg/l	
チウラム(チラム)	検出せず	0.0002 mg/l
シマジン(CAT)	検出せず	0.00001 mg/l
チオベンカルブ(ベンチオカーブ)	検出せず	0.00002 mg/l
イソキサチオン	検出せず	0.00001 mg/l
ダイアジノン	検出せず	0.00002 mg/l
フェニトロチオン(MEP)	検出せず	0.00001 mg/l
イソプロチオラン	検出せず	0.00001 mg/l
クロロタロニル(TPN)	検出せず	0.00001 mg/l
プロピザミド	検出せず	0.00001 mg/l
EPN	検出せず	0.00005 mg/l
ジクロルボス(DDVP)	検出せず	0.00005 mg/l
フェノブカルブ(BPMC)	検出せず	0.00001 mg/l
イプロベンホス(IBP)	検出せず	0.00005 mg/l
クロルニトロフェン(CNP)	検出せず	0.0001 mg/l

希釈水の水質測定結果-2

項目名	結果	検出限界
化学的酸素消費量(COD _{Cr})	10 mg/l 以下	
生物化学的酸素要求量	1 mg/l 以下	
浮遊物質量	1 mg/l 以下	
全リン	0.03 mg/l	
臭化物イオン	検出せず	0.5 mg/l
硫化物イオン(S ²⁻)	検出せず	0.01 mg/l
電気伝導率(25℃)	25 mS/m	
総アルカリ度(CaCO ₃ として)	36 mg/l	
有機体炭素(TOC)	0.9 mg/l	
アンモニア性窒素	検出せず	0.04 mg/l
PCB	検出せず	0.0005 mg/l
水銀	検出せず	0.0001 mg/l
カドミウム	検出せず	0.001 mg/l
シアン化物イオン及び塩化シアン	検出せず	0.001 mg/l
鉛	検出せず	0.001 mg/l
六価クロム	検出せず	0.005 mg/l
ヒ素	検出せず	0.01 mg/l
セレン	検出せず	0.01 mg/l
ニッケル	検出せず	0.001 mg/l
銅	検出せず	0.01 mg/l
亜鉛	検出せず	0.005 mg/l
アルミニウム	検出せず	0.05 mg/l
マンガン	検出せず	0.005 mg/l
鉄	検出せず	0.03 mg/l
スズ	検出せず	0.1 mg/l
ナトリウム	20 mg/l	
カリウム	5.3 mg/l	
カルシウム	16 mg/l	
マグネシウム	6.2 mg/l	

採水年月日：平成16年12月21日