

仕 様 書

1. 件名

水生生物を用いた新規化学材料の生態毒性試験

2. 実験の目的

国立研究開発法人産業技術総合研究所安全科学研究部門（以下「産総研」という。）では、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の受託研究事業「炭素循環社会に貢献するセルロースナノファイバー関連技術開発／研究開発項目②「CNF 利用技術の開発」／（２）「多様な製品用途に対応した有害性評価手法の開発と安全性評価」の一環としてセルロースナノファイバー（以下、「CNF」という。）の安全性評価の手法開発を行っている。本件は、その中で、水生生物に対する CNF の生態影響を評価するために、2 種類の CNF について藻類生長阻害試験を行うとともに、1 種類の CNF についてオオミジンコ遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験を行うものである。

3. 試験項目別仕様

3. 1. 被験材料

- ・ 2 種類の CNF（以下、「CNF-A」、「CNF-B」という。）の 1000mg/L ストック調製液
 - CNF-A：藻類生長阻害試験用ストック調製液、オオミジンコ遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験用ストック調製液の 2 種類
 - CNF-B：藻類生長阻害試験用ストック調製液
- ・ 被験材料は、産総研より支給する

3. 2. 試験項目

3. 2. 1. 藻類生長阻害試験

3. 2. 1. 1. 試験生物

- ・ 試験生物として、ムレミカツキモ (*Raphidocelis subcapitata*) を使用すること。

3. 2. 1. 2. 被検材料

- ・ CNF-A 及び CNF-B

3. 2. 1. 3. 試験培地

- ・ 試験培地として、OECD 培地を使用すること。

3. 2. 1. 4. 試験条件

- ・ OECD（経済協力開発機構）テストガイドライン No.201 に準拠して試験をおこなうこと。
- ・ CNF を添加する試験区（以下、濃度区）の設定濃度は、6 濃度区とすること。具体的な設定濃度は、調達請求者と協議の上、最終決定すること。
- ・ 試験開始時の藻類の初期密度は調達請求者と協議の上、最終決定すること。
- ・ 試験温度は $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ とすること。
- ・ 振とう条件は、加速度が 0.28G 程度になるように振とうすること（例えば、振とう機の全

振幅が 70mm の場合、回転数は 85rpm) (調達請求者と協議の上、最終決定する)。

- ・ 試験区の条件は以下の通り。
 - OECD 培地に CNF1000 mg/L ストック調製液を添加して濃度区を調製し、試験を実施すること。対照区の繰り返し連数を 6 検体、6 つの濃度区の繰り返し連数を各 3 検体とし、合計 24 検体とする。

3. 2. 1. 5. 藻類密度の測定

- ・ 請負者は、試験開始時及び試験開始後 24 時間ごとに検体のクロロフィル抽出物を測定し、試験開始前の前培養の溶液及び試験終了後の対照区を用いて作成した測定項目と藻類密度の検量線をもとに藻類密度を推定すること (測定のために採取する検体の量は、調達請求者と協議の上、最終決定する)。
- ・ 試験開始前の前培養の溶液、及び試験終了後の対照区の 6 連のうち少なくとも 3 連の溶液を用いて、各溶液を OECD 培地で希釈をして異なる藻類密度の系列を作成し、藻類密度とクロロフィル抽出物の検量線を作成すること。希釈により作成する藻類密度の系列の区数は、試験開始時の藻類密度の 2 分の 1、検量線作成に使用した溶液の藻類密度を含む 6 程度とする (藻類密度系列の区数は、調達請求者と協議の上、最終決定する)。前培養の溶液を用いて検量線を作成する際には、藻類密度区ごとに測定用検体を 3 検体ずつ用意すること。

3. 2. 1. 6. 被験物質濃度の測定用試料の採取

3. 2. 1. 6. 1. CNF-A

- ・ 検体の CNF 濃度を測定するために、試験開始時に、対照区及び濃度区ごとにサンプルを採取するための検体を 1 つ用意し、検体の上層 5 mm 及び下層 5 mm から試験溶液 1 mL をそれぞれ採取し、滅菌済みのマイクロチューブに入れること。
- ・ 対照区及び濃度区ごとに試験溶液を採取する検体を 1 つ設定し、試験開始後 24 時間ごとに、各検体の上層 5 mm 及び下層 5 mm から試験溶液を 1 mL ずつ採取し、滅菌済みのマイクロチューブにそれぞれ入れること。
- ・ 検体から試験溶液を採取する前に、必ず、5 分間以上の振とう攪拌を行い、その直後に試験溶液を採取すること (検体の採取方法は、調達請求者と協議の上、最終決定する)。
- ・ 採取後にマイクロチューブを 4°C の冷蔵庫で保管し、試験終了後に調達請求者へ冷蔵で送付すること。

3. 2. 1. 6. 2. CNF-B

- ・ 検体の CNF 濃度を測定するために、試験開始時に、対照区及び濃度区ごとにサンプルを採取するための検体を 3 つ用意し、検体の上層 5 mm 及び下層 5 mm から試験溶液 1 mL をそれぞれ 4 回採取し、採取した溶液 1 mL ごとに滅菌済みのマイクロチューブに入れること。
- ・ 試験開始後 24 時間ごとに、各検体の上層 5 mm 及び下層 5 mm から試験溶液を 1 mL ずつ 4 回採取し、滅菌済みのマイクロチューブにそれぞれ入れること。
- ・ 採取後にマイクロチューブを 4°C の冷蔵庫で保管し、試験終了後に調達請求者へ冷蔵で送付すること。

3. 2. 1. 7. 水質分析試料の採取

- ・ CNF-A 及び CNF-B の試験において、試験開始時に、各濃度区の被験物質濃度の測定用に用意した検体の試験溶液を 0.45 µm の PTFE (ポリテトラフルオロエチレン) 製のシリンジフィルターでろ過し、ポリプロピレン製の滅菌済みの 15 mL ディスポーザブル遠沈管にろ液 10 mL を採取すると共に、50mL ディスポーザブル遠沈管にろ液 30 mL を採取すること。採取後、50 mL ディスポーザブル遠沈管に 69%硝酸を 0.31 mL 添加すること。
- ・ CNF-B の試験において、試験開始後 24、48 時間目に、各試験区のすべての検体の中層から試験溶液 2 mL 程度を均等量分取し、試験区ごとに混合した後、0.45 µm の PTFE 製のシリンジフィルターを用いてろ過し、ろ液をポリプロピレン製の滅菌済みの 15 mL ディスポーザブル遠沈管に採取すること。
- ・ CNF-A 及び CNF-B の試験において、試験終了時 (試験開始後 72 時間目) に、各濃度区の検体から均等に分取した試験溶液を 0.45 µm の PTFE 製のシリンジフィルターを用いてろ過し、ポリプロピレン製の滅菌済みの 15 mL ディスポーザブル遠沈管にろ液 10 mL を採取すると共に、50mL ディスポーザブル遠沈管にろ液 30 mL を採取すること (検体の採取方法は、調達請求者と協議の上、最終決定する)。採取後、50 mL ディスポーザブル遠沈管に 69%硝酸を 0.31 mL 添加すること。
- ・ 採取後に遠沈管を 4°C の冷蔵庫で保管し、試験終了後に調達請求者へ冷蔵で送付すること。

3. 2. 2. オオミジンコ遊泳阻害試験

3. 2. 2. 1. 試験生物

- ・ 試験生物として、オオミジンコ (*Daphnia magna*) を使用すること。

3. 2. 2. 2. 被検材料

- ・ CNF-A

3. 2. 2. 3. 試験培地

- ・ 試験培地は、U.S.EPA の EPA-21-R-02-013 で示されている Very soft reconstitute water (以下、「VSRW」という。) と、活性炭ろ過器でろ過したつくば市の水道水 (以下、「脱塩素水道水」という。) を 9:1 で混合して作製した培地を使用すること。なお、請負者は、脱塩素水道水の輸送に使用するポリタンク等の容器を用意するとともに、脱塩素水道水を冷蔵で送付する費用を負担すること。

3. 2. 2. 4. 試験条件

- ・ OECD テストガイドライン No.202 に準拠して試験を行うこと。
- ・ 濃度区の設定濃度は、6 濃度区とし、止水式で試験を実施すること。具体的な設定濃度は、調達請求者と協議の上、最終決定すること。
- ・ 少なくとも試験開始 48 時間前に成熟個体を「3. 2. 2. 3. 試験培地」に示す試験培地で順化した後、順化した成熟個体が産仔した個体を供試個体として使用すること。
- ・ 調達請求者が貸与する 100mL 振とう三角フラスコを試験容器として使用して実験すること。

- ・ 試験期間中は、振とう機を用いて、試験培地と供試個体を入れた 100mL 振とう三角フラスコを常時振とうさせること。具体的な振とう条件は、調達請求者と協議の上、最終決定すること。

3. 2. 2. 5. 被験物質濃度の測定用試料の採取

- ・ 試験開始時に、対照区及び濃度区ごとにサンプルを採取するための検体を 1 つ用意し、検体の上層 5 mm 及び下層 5 mm から試験溶液 1 mL をそれぞれ採取し、滅菌済みのマイクロチューブに入れること。
- ・ 試験終了時（試験開始後 48 時間目）に、対照区及び濃度区ごとに試験溶液を採取する検体を 1 つ設定し、検体の上層 5 mm 及び下層 5 mm から試験溶液 1 mL をそれぞれ採取し、滅菌済みのマイクロチューブに入れること。各検体から試験溶液を採取する前に、必ず、5 分間以上の振とう撹拌を行い、その直後に試験溶液を採取すること（検体の採取方法は、調達請求者と協議の上、最終決定する）。
- ・ 採取後にマイクロチューブは 4°C の冷蔵庫で保管し、試験終了後に調達請求者へ冷蔵で送付すること（調達請求者と協議の上、最終決定する）。

3. 2. 2. 6. 水質測定用試料の採取

- ・ 試験開始時にフレッシュな試験培地を採取し、0.45 μm の PTFE 製のシリンジフィルターを用いてろ過し、ポリプロピレン製の滅菌済みの 15 mL ディスポーザブル遠沈管 1 本及び 100 mL ポリプロピレン製ボトルに満水までろ液を採取する。ポリプロピレン製ボトルに採取する際には、ろ過した試験培地で必ず共洗いを 2 回すること。
- ・ 試験開始時に、各濃度区の被験物質濃度の測定用に用意した検体の試験溶液を 0.45 μm の PTFE（ポリテトラフルオロエチレン）製のシリンジフィルターでろ過し、ポリプロピレン製の滅菌済みの 15 mL ディスポーザブル遠沈管にろ液 10 mL を採取すること。
- ・ 試験終了時（試験開始後 48 時間目）に、対照区及び濃度区ごとに、被験物質濃度の測定用試料を採取した検体から、試験溶液を採取し、それぞれ、0.45 μm の PTFE 製のシリンジフィルターを用いてろ過し、ポリプロピレン製の滅菌済みの 15 mL ディスポーザブル遠沈管にろ液 10mL を採取すること。
- ・ 採取後に遠沈管は 4°C の冷蔵庫で保管し、試験終了後に調達請求者へ冷蔵で送付すること。

3. 2. 3. 魚類急性毒性試験

3. 2. 3. 1. 試験生物

- ・ 試験生物として、ミナミメダカ (*Oryzias latipes*) を使用すること。

3. 2. 3. 2. 被検材料

- ・ CNF-A

3. 2. 3. 3. 試験培地

- ・ 「3. 2. 2. 3. 試験培地」で示された試験培地を使用すること。

3. 2. 3. 3. 試験条件

- ・ OECD テストガイドライン No.203 に準拠して試験を行うこと。
- ・ 上記のガイドラインに従い、供試個体を試験培地に順化すること。

- ・ 試験は半止水式で実施し、48 時間ごとに換水を行うこと。
- ・ 濃度区の設定濃度は、6 濃度区とすること。具体的な設定濃度は、調達請求者と協議の上、最終決定すること。
- ・ エアレーションの実施は不可とする。
- ・ 必要であれば、調達請求者が、試験容器として 3L 丸形ガラス水槽を貸与する。ただし、請負者は、3L 丸形ガラス水槽の輸送に使用する輸送容器と梱包材を用意するとともに、3L 丸形ガラス水槽を輸送する費用を負担すること。
- ・ 試験期間中は、スターラーおよび攪拌子を用いて、試験区を常時攪拌させること。具体的な攪拌条件は、調達請求者と協議の上、最終決定すること。

3. 2. 3. 4. 魚類の測定

- ・ 魚類の観察の際に、少なくとも、死亡 (D)、重篤 (C)、異常 (A) または正常 (N) のいずれかに区分するとともに、異常については、遊泳異常 (AS)、外見異常 (AA)、呼吸異常 (AR) またはその他の異常 (AO) のいずれかに分類して、それぞれの個体数が分かるように記載すること。また、重篤と異常の症状等が重複して観察される場合には、重篤な症状のみを記載する。異常の症状が重複して観察される場合には、原則としてすべてを併記し、一個体が呈している症状が分かるように記載すること。ただし、試験生物が活発に動き回る等個体識別が困難であり、無理に行おうとすると試験系に影響を及ぼすおそれがある場合などには、ばく露終了後 (96 時間) 時のみ個体別に症状の観察を行い、ばく露期間中の観察については症状ごとの記載としてもよい。

3. 2. 3. 5. 被験物質濃度の測定用試料の採取

- ・ 試験開始時、試験開始後 48 時間目での水換え時、及び試験終了時 (試験開始後 96 時間目) において、試験区ごとに検体の上層 5 mm 及び下層 5 mm からスターラーの回転を止めずに試験溶液 1 mL を 2 回ずつ採取し、それぞれ滅菌済みのマイクロチューブに入れて、試験区ごとに 4 検体の測定用試料を作成すること。
- ・ 採取後にマイクロチューブは 4°C の冷蔵庫に保管し、試験終了後に調達請求者へ冷蔵で送付すること。(調達請求者と協議の上、最終決定する)

3. 2. 3. 6. 水質分析用試料の採取

- ・ 試験開始時及び試験開始後 48 時間目での水換え時にフレッシュな試験培地を採取し、0.45 μm の PTFE 製のシリンジフィルターを用いてろ過し、滅菌した 15 mL ディスポーザブル遠沈管 1 本及び 100 mL ポリプロピレン製ボトル 1 本に満水までろ液を採取すること。ポリプロピレン製ボトルに採取する際には、ろ過した試験培地で共洗いを必ず 2 回すること。
- ・ 試験開始時、試験開始後 48 時間目での水換え時、及び試験終了時において、試験区ごとに検体の中層から試験溶液を採取し、それぞれ、0.45 μm の PTFE 製のシリンジフィルターを用いてろ過した後、ポリプロピレン製の滅菌済みの 15 mL ディスポーザブル遠沈管にろ液 10mL を採取すること。
- ・ 採取後に遠沈管を 4°C の冷蔵庫で保管し、試験終了後に調達請求者へ冷蔵で送付すること。

3. 3. 支給品

- ・ 藻類生長阻害試験用 CNF-A 及び CNF-B の 1000 mg/L ストック調製液
 - ストック調製液の支給量は調達請求者と協議の上、最終決定することとする。
 - ストック調製液は滅菌済みであり、使用している溶媒は OECD 培地である。
 - ストック調製液は産総研より冷蔵で発送する。
 - 4 または 5°C で暗所に保管すること。
- ・ オオミジンコ遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験用 CNF-A の 1000 mg/L ストック調製液
 - ストック調製液の支給量は調達請求者と協議の上、最終決定することとする。
 - ストック調製液は滅菌済みであり、使用している溶媒は VSRW と脱塩素水道水を 9 : 1 で混合した水である。
 - ストック調製液は産総研より冷蔵で発送する。
 - 4 または 5°C で暗所に保管すること。
 -
- ・ 脱塩素水道水
 - 脱塩素水道水の支給量は調達請求者と協議の上、最終決定することとする。
 - 脱塩素水道水を入れるポリタンク等の容器は請負者が用意すること。

3. 4. 貸与品

- ・ 100 mL 振とう三角フラスコ
 - 100mL の振とう三角フラスコの貸与数は調達請求者と協議の上、最終決定することとする。
- ・ 3 L 丸形ガラス水槽
 - 3 L 丸形ガラス水槽の貸与数は調達請求者と協議の上、最終決定することとする。
 - 3 L 丸形ガラス水槽を輸送するための輸送容器と梱包材は請負者が用意すること。

3. 5. 打ち合わせ

- ・ 業務に関する打ち合わせ記録の整理は請負者が行い、議事録を作成するものとする。打ち合わせは下記の区切りにおいて行うものとし、回数は計 2 回を予定するものとする。
 - ① 事前打ち合わせ
 - ② 業務完了時打ち合わせ
- ・ 事前打ち合わせにおいて、請負者は試験計画を調達請求者に説明し、調達請求者の確認を受けること。
- ・ 業務完了時の打ち合わせにおいて、請負者は試験結果を調達請求者に説明し、結果のとりまとめ方について調達請求者の確認を受けること。

4. 特記事項

- ・ 本件で実施する試験において、環境省の Good Laboratory Practice (以下、「GLP」という。) 基準に適合していることの確認を国から受けている GLP 基準適合試験施設であること。

- ・ 試験は「3. 2. 試験項目」に示す点を遵守して実施すること。
- ・ 試験を円滑に遂行するために、必要に応じて、調達請求者と協議すること。
- ・ 請負者は試験計画書を作成し、事前打ち合わせにおいて調達請求者と協議すること。
- ・ 請負者はナノ材料または OECD ガイダンス文書 No.23 に示されている試験困難物質の生態毒性試験の実施経験や研究実績があること。
- ・ 請負者は本件に係る総括責任者を 1 名配置し、各試験の責任者との連絡窓口をするとともに請負者側の全体調整を行うこと。
- ・ 請負者は、本件で実施する試験にかかる責任者（試験責任者）を試験につき 1 名以上配置し、試験の実施を統括すること。
- ・ 各試験の試験責任者は、生態毒性試験に関する十分な知識を持ち、最近の生態毒性試験に関する十分な知識を持ち、ナノ材料または OECD ガイダンス文書 No.23 に示されている試験困難物質の生態毒性試験の実施経験や研究実績を有すること。
- ・ 納入前に生態毒性試験に精通し、自立的に試験業務を実施した実務経験を有する者による成果物の確認を行うこと。
- ・ 請負者が試験に使用した CNF を添加した OECD 試験培地及びその培地を入れた器具の三次洗浄までの洗浄廃液は、廃棄せずに 20 L ポリタンク等の容器に全て回収すること。全ての試験が終了した後、廃液を回収した容器を調達請求者に送付すること。使用するポリタンクは請負者が用意すること。
- ・ 当該試験で得られた試験関係書類一式、余剰の被験材料、測定用に採取した試料及び廃液を入れた容器の送付時期は調達請求者と協議し決定すること。

5. 納入物品

- ・ 試験計画書 一式（電子媒体）
- ・ 試験報告書（図表を含む）一式（電子媒体）
※電子媒体の場合、原則として USB メモリ等の外部電磁的記録媒体は用いないこと。
- ・ 藻類生長阻害試験の被験物質濃度測定用試料 800 検体
 - CNF-A の被験物質濃度測定用試料 56 検体
 - ◇ 試験開始時、試験開始後 24、48、72 時間後に各 14 検体(7 試験区のそれぞれで、1 検体の上層及び下層から採取し、計 2 検体の測定用試料を作成)
 - CNF-B の被験物質濃度測定用試料 744 検体
 - ◇ 試験開始時に 168 検体(7 試験区のそれぞれで、3 検体の上層及び下層から検体ごとそれぞれ 4 回採取し、計 24 検体の測定用試料を作成)
 - ◇ 試験開始後 24、48、72 時間後に各 192 検体を採取し、計 576 検体（24 検体の上層及び下層からそれぞれ 4 回採取し、計 192 検体の測定用試料を作成）
- ・ オオミジンコ遊泳阻害試験の被験物質濃度測定用試料 28 検体
 - 試験開始時及び試験終了時に各 14 検体（7 試験区のそれぞれで、1 試験検体の上層及び下層から採取し、計 14 検体の測定用試料を作成）
- ・ 魚類急性毒性試験の被験物質濃度測定用試料 112 検体

- 試験開始時、試験開始後 48 時間後（水換え前）、48 時間後（水換え後）及び 96 時間後（試験終了時）に各 28 検体（7 試験区のそれぞれで、1 水槽の上層及び下層から 2 回ずつ採取し、計 28 検体の測定用試料を作成）
- ・ 藻類生長阻害試験の水質分析用試料 70 検体
 - CNF-A 試験の水質分析用試料 28 検体
 - ◇ 試験開始時及び試験終了時に各 14 検体（7 試験区のそれぞれで、15mL ディスポーザブル遠沈管 1 本及び 50mL ディスポーザブル遠沈管 1 本に採取）
 - CNF-B 試験の水質分析用試料 42 検体
 - ◇ 試験開始時及び試験終了時に各 14 検体（7 試験区のそれぞれで、15mL ディスポーザブル遠沈管 1 本及び 50mL ディスポーザブル遠沈管 1 本に採取）
 - ◇ 試験開始後 24、48 時間後に各 7 検体（7 試験区のそれぞれで、1 検体の水質分析用試料を作成）
- ・ ミジンコ遊泳阻害試験の水質分析用試料 16 検体
 - 試験開始時に 2 検体（フレッシュな試験培地を 15mL ディスポーザブル遠沈管 1 本及び 100 mL ポリプロピレンボトル 1 本に採取）
 - 試験開始時及び試験終了時に各 7 検体（7 試験区のそれぞれで、15mL ディスポーザブル遠沈管 1 本に採取）
- ・ 魚類急性毒性試験の水質分析用試料 32 検体
 - 試験開始時及び試験開始後 48 時間後に各 2 検体（15mL ディスポーザブル遠沈管 2 本及び 100 mL ポリプロピレンボトル 2 本に採取）
 - 試験開始時、試験開始後 48 時間後（水換え前）、48 時間後（水換え後）及び 96 時間後（試験終了時）に各 7 検体（7 試験区のそれぞれで、15mL ディスポーザブル遠沈管 1 本に採取）
- ・ 廃液を回収した容器

6. 納入の完了

作業の完了後、「5. 納入物品」に記載された納入物品が過不足なく納入され、仕様書を満たしていることを確認して、納入の完了とする。

7. 納入期限及び納入場所

納入期限：令和 6 年 11 月 29 日

納入場所：茨城県つくば市小野川 1 6 - 1

国立研究開発法人産業技術総合研究所 安全科学研究部門

つくばセンター 西事業所 西-4F 棟 2101 室

8. 付帯事項

- ・ 本仕様書の技術的内容及び知り得た情報については、守秘義務を負うものとする。
- ・ 本仕様の技術的内容に関する質問等については、調達請求者と協議すること。

- ・ 本仕様に定めのない事項及び疑義が生じた場合は、調達担当者と協議の上決定すること。
- ・ 納入後も調達請求者からの問い合わせに応じること。

以上