

日羽協試験方法	ゼブラフィッシュ胚発生評価試験	JDFA-SH002 (D) 2019/07 (D) : ドラフト試験方法
---------	-----------------	---

序文

本試験方法は、羽毛製品に用いる羽毛原料を対象とし、羽毛から水に溶出する物質がゼブラフィッシュ受精卵(胚)の発生に影響を与えるかを評価する試験方法について規定する。

引用資料：

- (1) EURL ECVAM Recommendation on the Zebrafish Embryo Acute Toxicity Test Method (ZFET) for Acute Aquatic Toxicity Testing.
- (2) Kawada T, et al. “An Integrative Evaluation Method for the Biological Safety of Down and Feather Materials” Int J Mol Sci, 20(6) 1434, Mar 21, 2019, doi: 10.3390/ijms20061434
- (3) THE ZEBRAFISH BOOK http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html
- (4) ゼブラフィッシュの管理と飼育のための環境要素飼育 JIS K 0420-71-30

2. 器具及び装置

- (1) 電子はかり (電子天びん) 0.02 g ならびに 0.2 mg までひょう量できるもの。
- (2) 三角フラスコ JIS R 3503 に規定する 100 mL のもの。
- (3) 振とう機 振とう幅 40 mm, 振とう数毎分 150 回±10 回に調整可能なもの。
- (4) ピペット この規格で測定する容量に適切なもので、先端がガラス製又はプラスチック製であり、かつ、JIS K 0970 又は JIS R 3505 のクラス A に適合したものの若しくは同程度の精度をもつもの。
- (5) 実体顕微鏡 JIS B 7139 に規定するもの。
- (6) 40 µm メンブレンフィルター
- (7) 12 ウェルプレート
- (8) シャーレ JIS K 0950 に規定する 90A 号
- (9) ピンセット 滅菌できる材料で作られたもの。
- (10) オートクレーブ 温度 121 °C±2 °C (圧力 103 kPa±5 kPa 相当) に保てるもの。
- (11) インキュベーター 28 °C±2 °C の温度を維持できるもの。

3. 試薬及び培地

培地などは次に示す組成のものを用いる。また、同一の組成のものであれば、市販品を用いることができる。

- (1) 水
試験に用いる水の質は、JIS K 0557 の 4. (種別及び質) に規定する A3 又は A4 の水を用い、オートクレーブによって滅菌したもの。
- (2) 0.3×Danieau's solution (飼育水)
次の成分をよくかくはんし、その後、オートクレーブによって滅菌したもの。
 - 塩化ナトリウム 1017 mg
 - KCl 15.6 mg
 - MgSO₄・7H₂O 29.6 mg
 - Ca(NO₃)₂ 42.5 mg
 - HEPES buffer 357.5 mg
 - 水 1000 mL
- (3) 0.003 % 次亜塩素酸ナトリウム水溶液
JIS K 8227 に規定するものを 0.003 % になるように希釈したもの。
- (4) アンピシリン(100 g/L)
アンピシリンナトリウム 1 g を水 10 mL に溶かして 100 mg/mL となるように調

整した後、ろ過除菌したもの。

(5) カナマイシン (50 g/L)

カナマイシン硫酸塩 1 g を水 20 mL に溶かして 50 mg/mL となるように調整した後、ろ過除菌したもの。

4. 試験生物

試験種は、ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) AB strain を用いる。ゼブラフィッシュの管理と飼育は” THE ZEBRAFISH BOOK” もしくは JIS K 0420-71-30 付属書 A を準拠する。

5. 試験手順

5-1. ゼブラフィッシュ受精卵の調製

- (1) 試験前日夕方よりゼブラフィッシュ雌 2~4 尾・雄 2~4 尾を交配用小型水槽に入れ、自然調光による産卵誘発にて受精卵を回収する。
- (2) 回収後の受精卵はこし器などで微細なゴミを除去したのち、0.003 %次亜塩素酸ナトリウム水溶液内で 5 分間室温にて保持し、消毒する。
- (3) 飼育水 (0.3×Danieau's solution) で 3 回洗浄したのち、飼育水を満たした 10 cm シャーレに入れ、約 28 °C で飼育する。この際の飼育密度は、飼育水 30 mL あたり 100-150 受精卵とする。

5-2. 羽毛抽出液の調製

- (1) 試料から 0.20 g±0.01 g の試験試料を 2 個採取する。試験試料を三角フラスコに入れる。
- (2) 三角フラスコに水 10 mL を加えて試験試料を十分湿潤させた後、振とう機を用いて 60 分間振とう幅 40 mm, 振とう数毎分 150 回±10 回で振とうする。
- (3) 振とう後、抽出液を 40 µm メンブレンフィルターでろ過し、ファイバーやゴミを除去する。
- (4) 試験中の雑菌繁殖を抑えるため抗生物質をアンピシリン最終濃度 100 µg/mL、カナマイシン最終濃度 50 µg/mL なるように加える。

5-3. ゼブラフィッシュ受精卵への投与

- (1) 5-1. で回収した受精卵を実体顕微鏡下で、正常に後期胞胚まで発生した卵を選択し、12 ウェルプレート の 1 ウェルに 10 個ずつ入れる。
- (2) 5-2. で調製した羽毛抽出液を 1 mL 加えて約 28 °C 環境下で飼育する。試験は、1 試験試料につき 3 ウェルで試験を実施する。
- (3) ブランク試験として水のみで試験する。

5-4. 途中観察

開始 1 日目および 2 日目の死魚数を記録し、死んだ卵を除去する。

5-5. 試験結果

- (1) 開始 3 日目に途中で死んだ個体数、参考写真を参照して正常個体の数と正常個体と比較して形態が異なる個体数を記録し、試験結果については下記の式で正常個体率を求め、試験試料 2 個の平均値で表す。(整数値に丸める)
- (2) ブランク試験の正常個体率を求め、85 %以上の場合には試験が成立したとみなす。

$$\text{正常個体率 (\%)} = \left(\frac{\text{1 ウェル目 正常個体数}}{10} + \frac{\text{2 ウェル目 正常個体数}}{10} + \frac{\text{3 ウェル目 正常個体数}}{10} \right) \div 3 \times 100$$

10:試験開始時個体数

補足説明

ドラフト試験方法 (D)

ドラフト試験方法とは、正式に日羽協試験方法として採用される前段階の試験方法であり、日羽協試験方法ではありません。

正式に日羽協試験方法として採用するための準備期間を設け、期間内に試験方法の妥当性、商業的意義の確認や試験結果データの収集し、正式な日羽協試験方法として採用するかを審議します。

参考写真

写真1. 受精後 72 時間 正常個体



写真2. 異常個体例(尾奇形)



写真3. 異常個体例(尾奇形)

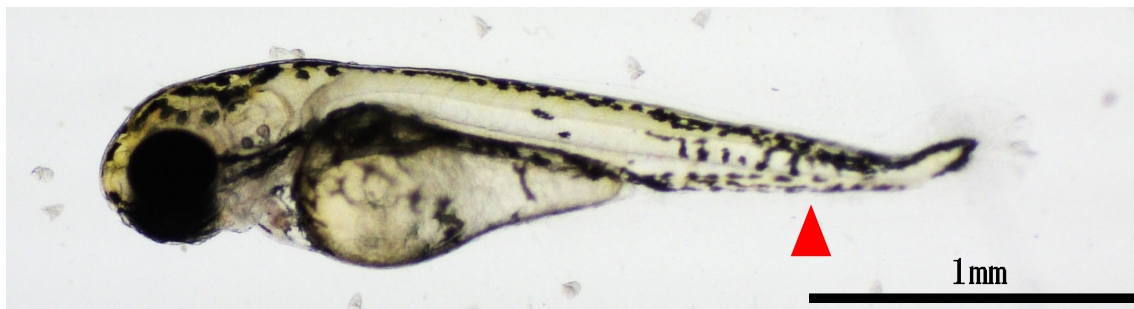
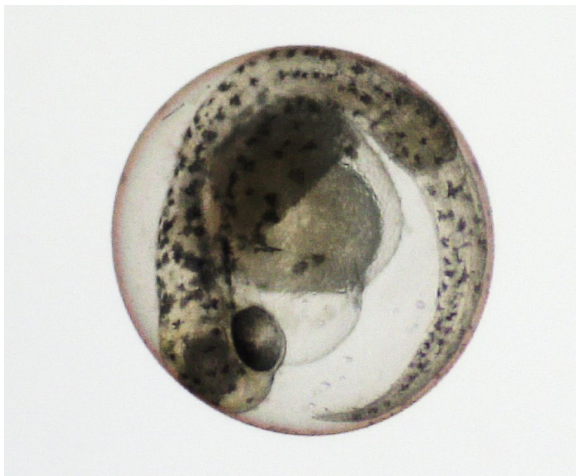


写真4. 異常個体例(心肥大)



写真 6. 異常個体例(未孵化)



以上