

13生産第3986号
平成13年10月10日

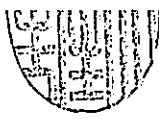
独立行政法人農薬検査所理事長殿

農林水産省生産局生産資材課長

「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
け12農産第8147号農林水産省農産園芸局長通知）の運用について

このことについて、別紙のとおり定め、農薬工業会会長等関係者あて通知したので
農薬の登録検査の円滑な実施方お願いします。





13生産第3986号

平成13年10月10日

農薬工業会会長殿

農林水産省生産局生産資材課長

「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
け12農産第8147号農林水産省農産園芸局長通知）の運用について

今般、「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日付け
12農産第8147号農産園芸局長通知。以下「局長通知」という。）を一部改正し
たことを踏まえ、局長通知の円滑な運用を図る観点から、別紙のとおり局長通知の細
部に関する事項を定めたので、十分御留意の上、貴会会員への周知徹底を図り、農薬
の登録申請に係る事務の円滑な運用につき、御協力をお願いします。

(別紙)

「農薬の登録申請に係る試験成績について」の運用について

目次

	頁
1. 試験成績の種類について	1
2. 試験成績の代替について	1
3. 試験を実施するに当たって必要とされる条件について	1
(1) 被験物質の種類について	
(2) 薬効・薬害試験の試験例数について	
(3) 限界薬量（又は濃度）薬害試験、茶の残臭試験及びタバコの喫味試験の試験例数について	
(4) 植物体内運命に関する試験の試験例数について	
(5) 試験施設の基準について	
4. 試験成績の提出の除外について	10
(1) 薬害に関する試験成績について	11
① 適用農作物に対する薬害に関する試験成績	
ア 茶の残臭試験成績について	
イ タバコの喫味試験成績について	
ウ 限界薬量（又は濃度）薬害試験成績について	
② 周辺農作物に対する薬害に関する試験成績	
ア 漂流飛散による薬害試験成績について	
イ 水田水の流出による薬害試験成績について	
ウ 揮散による薬害試験成績について	
③ 後作物に対する薬害に関する試験成績について	
(2) 毒性に関する試験成績について	12
① 急性経口毒性試験成績について	
② 急性経皮毒性試験成績について	
③ 急性吸入毒性試験成績について	
④ 皮膚刺激性試験成績について	
⑤ 眼刺激性試験成績について	
⑥ 皮膚感作性試験成績について	
⑦ 急性神経毒性試験成績について	
⑧ 急性遅発性神経毒性試験成績について	
⑨ 90日間反復経口投与毒性試験成績、催奇形性試験成績、変異原性に関する試験成績、生体機能への影響に関する試験成績及び動物体内運命に関する試験成績について	

- ⑩ 21日間反復経皮投与毒性試験成績について
- ⑪ 90日間反復吸入毒性試験成績について
- ⑫ 反復経口投与神経毒性試験成績について
- ⑬ 28日間反復投与遅発性神経毒性試験成績について
- ⑭ 1年間反復経口投与毒性試験成績、発がん性試験成績、繁殖毒性試験成績について
- ⑮ 植物体内運命に関する試験成績について
- ⑯ 土壌中運命に関する試験成績について
- ⑰ 水中運命に関する試験成績について
- (3) 水産動植物への影響に関する試験成績について ----- 19
 - ① 魚類急性毒性試験成績及びミジンコ類急性遊泳阻害試験成績について
 - ② ミジンコ類繁殖試験成績について
 - ③ 藻類生長阻害試験成績について
- (4) 水産動植物以外の有用生物への影響に関する試験成績について ----- 20
 - ① ミツバチ影響試験成績について
 - ② 蚕影響試験成績について
 - ③ 天敵昆虫等影響試験成績について
 - ④ 鳥類影響試験成績（鳥類経口投与試験成績、鳥類混餌投与試験成績）について
- (5) 有効成分の性状、安定性、分解性等に関する試験成績について ----- 22
- (6) 水質汚濁性に関する試験成績について ----- 22
- (7) 農作物への残留性に関する試験成績について ----- 22
 - ① 作物残留性試験成績について
 - ② 乳汁への移行試験成績について
- (8) 土壌への残留性に関する試験成績について ----- 24
 - ① 土壌残留性試験成績について
 - ② 後作物残留性に関する試験成績について
- 5. 局長通知別添「農薬の登録申請時に提出される試験成績の作成に係る指針」について ----- 25

1. 試験成績の種類について

局長通知第3の試験の種類の詳細については、以下のとおりとする。

- (1) 局長通知第1の(1)及び(2)に掲げる試験成績に関する試験成績概要書は、農薬の登録申請の際に提出する試験成績をとりまとめて提出するものとする。
- (2) 局長通知第1の(3)及び(4)に掲げる試験成績に関する試験成績概要書は、試験成績ごとに添付して提出するものとする。
- (3) 必要に応じ、上記(2)の他、局長通知第1の(3)及び(4)に掲げる試験成績に関する試験成績概要書及びその他必要事項を記載した資料(以下「農薬抄録」という。)を提出するものとする。
- (4) (1)から(3)までを作成する上で必要な事項は別添「試験成績概要書等の作成について」において定めるものとする。
- (5) 農薬抄録に添付する試験成績概要書の試験成績の範囲及び提出部数等は農林水産省生産局長(以下「生産局長」という。)の指示によるものとし、農薬検査所を経由して提出するものとする。

2. 試験成績の代替について

局長通知第5の試験成績の代替についての(2)の詳細については、以下のとおりとする。

- (1) 現に登録を受けている農薬(初回登録後15年以上経過したものに限る。)と農薬登録申請書(農薬取締法施行規則(昭和26年農林省令第21号)の別記様式第1号)中の記の3の農薬の種類及び4から6までの記載が同一であり、かつ、8の適用病害虫の範囲内で農薬登録申請をしようとする場合が該当する。
- (2) 「(3)のアからウまでの一部」とは、被験物質の種類が製剤の場合の急性経口毒性試験、急性経皮毒性試験及び急性吸入毒性試験をいう。
- (3) 「(4)のアの一部」とは、各作物群(中分類)ごとに代表的な作物について1種類以上実施されている場合、その他の作物の作物残留性試験をいう。

3. 試験を実施するに当たって必要とされる条件について

(1) 被験物質の種類について

局長通知別表1中の被験物質の種類の詳細については、以下のとおりとする。

① 製剤について

被験物質として使用する製剤は、原則として登録申請時に提出された農薬の見本(以下「見本」という。)と同等のものでなければならない。

被験物質として使用された製剤が見本と同等でない場合には、試験項目ごとに被験物質として使用された製剤と見本との差異が、試験成績に何ら影響を及ぼすものでないことその他当該製剤を被験物質として使用することの妥当性について記載した書類を当該試験成績に添付するものとする。

試験の実施に際し、被験物質である製剤について粉碎、溶解等の処理を行う場合にあっては、当該処理が試験成績に影響を及ぼすことのないよう留意する

ものとする。

なお、展着剤に係る薬効試験、薬害試験及び作物残留性試験については、展着剤が常に適用対象となる農薬と組み合わせて使用されることから、原則として適用農作物ごとにそれぞれ適用対象農薬と組み合わせて試験を実施するものとする。

② 原体について

被験物質として使用する原体は、原則として見本の原料として使用された原体と同等のものでなければならない。

被験物質として使用された原体が見本の原料として使用された原体と同等でない場合には、試験項目ごとに被験物質として使用された原体と見本の原料として使用された原体との差異が、試験成績に何ら影響を及ぼすものでないことその他当該原体を被験物質として使用することの妥当性について記載した書類を当該試験成績に添付するものとする。

③ 放射性同位元素で標識した有効成分等又は非標識の有効成分等について

ア. 被験物質は塩等の場合も含め、原則として製剤中の有効成分と同一でなければならない。ただし、有効成分と異なる物質を被験物質とした場合であっても、当該被験物質を使用した試験の結果が、有効成分そのものを被験物質とした試験の結果と異なることについて科学的な説明が可能な場合は、その説明を付すことにより、有効成分を被験物質とした試験に代えることができるものとする。

イ. 有効成分の主要代謝物等で、個別に試験が必要と判断される場合は、当該代謝物等についても被験物質とする。

ウ. 標識化合物を被験物質とする場合、標識核種は原則として ^{14}C とし、標識位置は代謝に対して安定な部位とする。また、分子の開裂が予想されるときは、開裂体の運命も把握できるよう、分子内の異なる位置に標識した複数の標識化合物を被験物質とすることが望ましい。

④ 試験ごとの被験物質の考え方の詳細については、以下のとおりとする。

ア. 急性吸入毒性試験について

原則として、製剤そのものを被験物質とするが、くん煙剤にあつては当該農薬の使用方法に従って発生させた煙霧を、くん蒸剤にあつてはくん蒸ガスを被験物質として使用するものとする。

イ. 皮膚刺激性試験及び眼刺激性試験について

「製剤での実施が困難な場合」とは、例えば有効成分を樹脂に練り込んだプレート状の剤型の農薬又は腐食性を有する農薬がこれに該当する。

ウ. 土壌中運命に関する試験のうち好氣的土壌中運命試験及び嫌氣的土壌中運命試験について

主要代謝物であつて、当該運命試験の実施が必要となる代謝物とは、処理量の10%以上生成する代謝物であつて、推定半減期が100日以上であると判断される物質が該当する。

ただし、土壌への吸着が強いこと等により、その移動性及び生物学的利用性

の程度から安全性に問題がないと判断できる場合及び毒性が低いことが明らか
かな場合にあつてはこの限りではない。

具体的には

(ア) 好氣的湛水土壌中運命試験を有効成分で実施した結果、処理量の10%以上生成する代謝物であつて、推定半減期が100日以上であると判断される物質では、その代謝物を用いた好氣的土壌中運命試験が必要である。

なお、この場合であつても、有効成分を用いた好氣的土壌中運命試験が実施されており、その中で当該主要代謝物の挙動が把握できる場合には、当該主要代謝物を用いた好氣的土壌中運命試験を実施する必要はない。

(イ) 好氣的土壌中運命試験を有効成分で実施した結果、処理量の10%以上生成する代謝物であつて、推定半減期が100日以上であり土壌中における移動性が低くないと判断される物質では、その代謝物を用いた嫌氣的土壌中運命試験が必要である。

なお、この場合であつても、有効成分を用いた嫌氣的土壌中運命試験が実施されており、その中で当該主要代謝物の挙動が把握できる場合には、当該主要代謝物を用いた嫌氣的土壌中運命試験を実施する必要はない。

エ. ミツバチ影響試験、蚕影響試験及び天敵昆虫等影響試験について

(ア) ミツバチ影響試験(2-8-1)の急性経口毒性試験及び接触毒性試験、蚕影響試験(2-8-2)の急性経口投与試験並びに天敵昆虫等影響試験(2-8-3)の急性毒性試験については、原則として原体を被験物質とする。

(イ) ミツバチ影響試験のほ場での影響試験、蚕影響試験の残毒試験及び天敵昆虫等影響試験のほ場での試験については、製剤を被験物質とする。

(ウ) 製剤を被験物質とする場合は、剤型、使用方法、使用量(濃度)等から最も影響が強いものを用いること。

オ. 有効成分の性状、安定性、分解性等に関する試験について

(ア) 原則として、有効成分の純品を試験に供試すべきであるが、塩又はエステル等を有効成分とする農薬で、合理的な説明がなされる場合は、有効成分と異なる物質を被験物質とすることができる。

(イ) 「有効成分の純品による実施が困難な場合」とは、原体の精製が困難で純品を得ることができない場合等であるが、これ以外に、原体の純度が比較的高く、試験の特性から当該原体の純度であれば純品での試験と異なる結果となることが予想される場合には、当該原体での試験成績をもって純品での試験成績に代えることができる。

(ウ) 「有効成分等」とは、有効成分及び有効成分の生体内又は環境中での解離、分解、代謝等により生成する代謝分解物であつて、人畜又は環境に対し影響を及ぼすおそれがある物質(水質汚濁性試験及び土壌残留性試験の評価に際して規制の対象となる代謝物等であつて、有効成分の分解消失過程で有効成分の残留量を上回ることとなる化合物)をいう。

(エ) 有効成分の代謝分解物について必要とされる試験項目は、原則として、

蒸気圧、水溶解度、*n*-オクタノール／水分配係数（水溶解度が10mg/L以上の場合は除く。）、土壌吸着係数（水溶解度が10mg/L以下の場合は除く。）、加水分解性（水溶解度が10mg/L以下の場合は除く。）及び水中光分解性（280～800nmに吸収がない場合は除く。）に関する試験とする。

また、加水分解性及び水中光分解性に関する試験については、有効成分を用いた試験により代謝分解物についても測定することができれば、代謝分解物単独での当該試験の実施は省略して差し支えない。

(オ) 有効成分が複数の物質から構成されている場合は、構成している物質ごとに試験を実施するものとするが、構成している物質の分離が著しく困難な場合（ピレスロイド剤、異性体が鏡像異性体である農薬等）は、代表的な物質又は混合物を被験物質とすることができるものとする。

(2) 薬効・薬害試験の試験例数について

農薬の薬効及び薬害は、年ごとの気候の変動、地域間における気象条件、農作物の栽培様式等の違い等の影響を受けるため、これらのことを踏まえ、薬効及び薬害試験を実施する必要がある。

このため、登録の申請に当たって申請者が提出すべき薬効及び薬害試験成績の作成に係る試験は、少なくとも2か年にわたって、原則としてそれぞれ異なる都道府県から選定した3か所以上の施設において実施し、試験例数は、合計6例以上とするものである。この場合において、同一施設で実施された試験であっても、実施年が異なれば、それぞれ1例とみなすものとする。

なお、局長通知別添表1の試験例数の欄の(1)から(5)までに掲げる場合には、当該試験例数を以下のとおり軽減することができるものとする。ただし、新規の申請であって、試験例数の軽減に必要な条件を満たす場合であっても、試験例数の軽減の根拠となる既登録農薬と補助成分の組成等が異なり、当該補助成分が農薬の薬効及び薬害に影響を及ぼすおそれがある場合にあっては、この限りでない。

また、ここでいう既登録農薬とは、当該申請者が登録を取得している農薬に限定されるものであって、当該登録農薬に係る試験成績の利用について権利を有さない場合は該当しない。

試験として成立するための要件を満たしていない場合にあっては、当該試験は、登録申請に必要とされる試験として取り扱わないものとする。

① 局長通知の別添表1の試験例数の欄の(1)の詳細については、以下のとおりとする。

ア. 既登録農薬（現に登録を受けている農薬をいう。以下同じ。）に係る有効成分については、既にその登録に係る剤型につき、適用農作物及び適用病害虫・雑草等の組合せごとに薬効及び薬害に関する試験成績が提出され、かつ、その薬効及び薬害について登録検査がなされていることから、

(ア) 局長通知の別添表1の試験例数の欄の(1)の①から③までに掲げる場合における法第2条第2項に係る登録の申請

(イ) 局長通知の別添表 1 の試験例数の欄の (1) の④及び⑤に掲げる場合における法第 6 条の 2 第 1 項に係る変更の登録の申請に当たって申請者が提出すべき薬効及び薬害試験成績の作成に係る試験例数は、原則としてそれぞれ異なる都道府県から選定した 3 か所以上の施設において実施されたものとし、単年度での実施でも差し支えない。

イ. ここでいう「申請に係る適用農作物と適用病害虫・雑草等の組合せが既登録農薬のそれと同一」とは、申請に係る適用農作物と適用病害虫・雑草等の組合せが既登録農薬のそれと同一であるか、又はその範囲内にある場合をいう。

ウ. 以下局長通知の別添表 1 の試験例数の欄の (1) の①から⑤までに係る具体的運用指針を示す。

(ア) ①について

a. ここでいう「剤型」とは、粉剤、粉剤 DL、粉剤 FD、粒剤、粉粒剤、微粒剤、微粒剤 F、細粒剤 F、粉末、水和剤、フロアブル、ドライフロアブル、顆粒水和剤、水和剤 SE、乳剤、乳剤 EW、乳剤 CE、液剤、液剤 ME、油剤、エアゾル、マイクロカプセル剤、ペースト剤、くん煙剤、塗布剤、微量散布剤、農薬肥料等をいう (以下同じ。)。なお、既登録農薬を当該登録使用濃度に希釈しただけで原液使用する家庭園芸用スプレー剤は当該既登録農薬と同一剤型とみなす。

b. 申請に係る農薬の有効成分の種類、適用農作物と適用病害虫・雑草等の組合せ及び使用方法が既登録農薬のそれと同一である場合には、これに該当するものとする。

(イ) ②について

a. 申請に係る農薬の有効成分の種類、剤型、適用農作物と適用病害虫・雑草等の組合せ及び使用方法が既登録農薬のそれと同一であるが、有効成分の含有量を変更する場合において、有効成分の投下量が既登録農薬のそれより減少する場合はこれに該当する。

b. 既登録農薬の有効成分が複数の光学異性体により構成される場合において、各光学異性体の存在比を変更し、有効成分の含有量を減少させる場合についても、これに該当するものとする。

(ウ) ③について

申請に係る農薬が、複数の既登録農薬の有効成分を含有しており、適用農作物と適用病害虫・雑草等の組合せ及び使用方法がそれぞれの既登録農薬のそれと同一である場合において、それぞれの有効成分の含有量が当該既登録農薬のそれと異なる場合は、これに該当する。

(エ) ④について

既登録農薬に関し、適用農作物と適用病害虫・雑草等の組合せは変更せず、使用濃度又は使用量 (有効成分投下量) を減少させる場合は、これに該当する。

(オ) ⑤について

既登録農薬に関し、使用方法の変更として、例えば、植穴土壌混和を株元土壌混和に変更する場合等がこれに該当する。

- ② 局長通知の別添表1の試験例数の欄の(2)の詳細については、以下のとおり。
- ア. 既登録農薬に係る有効成分については、既にその登録に係る剤型につき、適用農作物と適用病害虫・雑草等に対する薬効及び薬害に関する試験成績が提出され、かつ、その薬効及び薬害について登録検査がなされていることから、
- (ア) 局長通知の別添表1の試験例数の欄の(2)の①及び②に掲げる場合における法第2条第2項に係る登録の申請
- (イ) 局長通知の別添表1の試験例数の欄の(2)の③に掲げる場合における法第6条の2第1項に係る変更の登録の申請に当たって申請者が提出すべき薬効及び薬害試験成績の作成に係る試験例数は、原則としてそれぞれ異なる都道府県から選定した2か所以上の施設において実施されたものとし、単年度での実施でも差し支えない。
- イ. ここでいう「申請に係る適用農作物と適用病害虫・雑草等の組合せが既登録農薬のそれと同一」とは、申請に係る適用農作物と適用病害虫・雑草等の組合せが既登録農薬のそれと同一であるか、又はその範囲内にある場合をいう。
- ウ. 以下、局長通知の別添表1の試験例数の欄の(2)の①から③までに係る運用指針を示す。
- (ア) ①について
- 申請に係る農薬の有効成分の種類、剤型、適用農作物と適用病害虫・雑草等の組合せ及び使用方法が既登録農薬のそれと同一であるが、有効成分の含有量を変更する場合において有効成分投下量が既登録のそれと同一又は増加する場合がこれに該当する。
- (イ) ②について
- 申請に係る農薬が複数の既登録農薬の有効成分を含有しており、かつ、有効成分の含有量、適用農作物と適用病害虫・雑草等の組合せ及び使用方法がそれぞれの既登録農薬のそれと同一である場合が、これに該当する。
- (ウ) ③について
- 既登録農薬に関し、適用農作物と適用病害虫・雑草等の組合せは変更せず、使用濃度又は使用量(有効成分投下量)を増加させる場合として、使用方法として空中散布、無人ヘリコプターによる散布、常温煙霧、又は地上液剤少量散布を追加する場合等がこれに該当する。
- ③ 局長通知の別添表1の試験例数の欄の(3)の詳細については、以下のとおり。
- ア. 既登録農薬に係る有効成分については、既にその登録に係る剤型につき、適用農作物及び適用病害虫・雑草等に対する薬効及び薬害に関する試験成績が提出され、かつ、その薬効及び薬害について登録検査がなされていることから、

- (ア) 局長通知の別添表1の試験例数の欄の(3)の③、④及び⑥に掲げる場合における法第2条第2項に係る登録の申請
- (イ) 局長通知の別添表1の試験例数の欄の(3)の①から⑥までに掲げる場合における法第6条の2第1項に係る変更の登録の申請に当たって申請者が提出すべき薬効及び薬害試験成績の作成に係る試験は、原則として異なる都道府県から選定した2か所以上の施設において実施されたものとし、単年度での実施でも差し支えない。ただし、③から⑥までに掲げる場合については、農作物の栽培状況、病害虫・雑草等の発生状況を考慮する。
- イ. 以下局長通知の別添表1の試験例数の欄の(3)の①から⑤までに係る具体的運用指針を示す。
- (ア) ①について
- 既登録農薬の適用病害虫・雑草等の防除を行った際に当該農作物に対しては主要でない病害虫・雑草等も同時に防除される場合において、当該主要でない病害虫・雑草等を適用病害虫・雑草等に追加する場合は該当する。
- (イ) ②について
- 当該規定は、アブラナ科、ナス科、ウリ科の各科内及びユリ科のAllium属の属内の作物間において、一定の適用対象病害虫を対象に類似作物を追加する場合に適用するものとする。例えば、はくさいのアブラムシが既登録の場合に、だいこんのアブラムシを追加する場合はこれに該当する。
- (ウ) ③について
- 年間生産量3万トン以下の農作物及び地域的に栽培が限られている農作物を適用農作物として登録申請(変更の登録を含む。)する場合は該当する。
- (エ) ④について
- 発生地域が一部の地域に限られている病害虫と発生地域の組合せの例として、下記のものあげられる。
- アリモドキノウムシ(南西諸島)、インゲンテントウムシ(長野山梨県境)、カーネーションシストセンチュウ(長野)、キオビエダシヤク(沖縄)、イチゴ角斑細菌病(静岡)
- (オ) ⑤について
- 農業生産に重大な影響を及ぼすおそれのある病害虫・雑草等を緊急に防除しなければならない場合であって、当該病害虫・雑草等に対し有効な登録農薬が少ない場合等が該当する。
- (カ) ⑥について
- 展着剤については、適用農作物と適用対象農薬を組み合わせ、その適用の範囲とする。ただし、農作物と雑草の区別なく殺草する除草剤(以下「非選択性除草剤」という。)の場合は、適用雑草と適用対象農薬を組み合わせ、その適用の範囲とする。適用農作物又は適用雑草ごとに2か所以上で、かつ、すべての適用農作物と適用対象農薬又は適用雑草と適用対象農薬の組合せについて1か所以上とする。

展着剤の特性がパラフィン等の固着性の場合及び適用対象農薬が除草剤（非選択性除草剤を除く。）又は植物生長調節剤等の場合等、適用農作物及び適用農薬について個別に判断する必要がある場合以外は、適用農作物群と適用農薬群の取扱いができるものとする。この場合の試験実施は、以下によるものとする。

- a. 「稲、麦類」、「野菜、花卉類」、「果樹類」、「緑化（花）木」又は「林木」の作物群の中から代表的な2作物以上について、試験を実施する。
- b. 「殺虫剤」、「殺菌剤」又は「非選択性除草剤」の農薬群の中の代表的な2剤以上について、試験を実施する。

④ 局長通知の別添表1の試験例数の欄の（4）の詳細については、以下のとおり。

ア. 既登録農薬に係る有効成分については、既にその登録に係る剤型につき、適用作物及び適用病害虫・雑草等の組合せごとに薬効及び薬害に関する試験成績が提出され、かつ、その薬効及び薬害について登録検査がなされていることから、

（ア）①に掲げる場合における法第2条第2項に係る登録の申請

（イ）①から③までに掲げる場合における法第6条の2第1項に係る変更の登録の申請に当たって申請者が提出すべき薬効及び薬害試験成績の作成に係る試験例数は、原則としてそれぞれ異なる都道府県から選定した3カ所以上の施設において実施されたものとし、単年度での実施でも差し支えない。

イ. 以下局長通知の別添表1の試験例数の欄の（4）の①から③までに係る具体的運用指針を示す。

（ア）①について

申請に係る農薬が新規の有効成分と既登録農薬の有効成分を含有しており、申請に係る適用農作物と適用病害虫・雑草等の組合せのうち、既登録農薬の有効成分に係る適用農作物と適用病害虫・雑草等の組合せ及び使用方法が既登録農薬のそれと同一である場合において、当該申請に係る適用農作物と適用病害虫・雑草等の組合せのうち、既登録農薬の有効成分のみに係る部分について実施する場合は、これに該当する。

例：新規有効成分（殺菌剤）と既登録有効成分（殺虫剤）が混在する混合剤

新規有効成分（殺虫剤）と既登録有効成分（殺菌剤）が混在する混合剤

（イ）②について

多数の作物に共通する難防除病害虫としては以下のものが挙げられる。

例：ハスモンヨトウ、シロイチモジヨトウ、紫紋羽病、白紋羽病

（ウ）③について

作物のない状態又は作物に接触しない状態において使用される既登録農薬（植物体内への浸透移行性により効果を発現する病害虫を対象とするものを除く。）としては以下のものが挙げられる。

例：土壌病害虫（センチュウ類、ネキリムシ類）に直接作用する農薬、忌避剤、殺そ剤、ナメクジ駆除剤等配置して使用される農薬

- ⑤ 局長通知の別添表 1 の試験例数の欄の（5）の詳細については、以下のとおり。

農作物を倉庫、サイロ、天幕等に搬入して病害虫を防除する場合には、農薬の薬効及び薬害は農作物の栽培様式等に影響を受けない。

このため、倉庫、サイロ等において使用される農薬の登録の申請又は変更の登録の申請に当たって申請者が提出すべき薬効及び薬害試験成績の作成に係る試験例数は、3か所以上の施設で実施されたものとし、単年度での実施でも差し支えない。

- （3）限界薬量（又は濃度）薬害試験、茶の残臭試験及びタバコの喫味試験の試験例数について

局長通知の別表 1 の試験例数の詳細については、以下のとおり。

同一施設で実施されたものであっても実施年が異なれば、それぞれ 1 例とみなすものとする。

なお、同一試験施設、同一時期で供試農作物の品種のみを変更した試験は 1 例とする。

- （4）植物体内運命に関する試験の試験例数について

局長通知の別添表 1 の試験例数の欄の詳細については、以下のとおり。

- ① 申請に係る適用農作物が属する植物群ごとに、1種類以上の農作物を選定して、試験を行うことが原則であるが、申請に関係のない植物群を含めた3種類の植物群で、各植物群に係る農作物における代謝に大きな差がないことが示される場合は、申請に係る植物群による試験成績の有無にかかわらず、更に試験を実施する必要はない。
- ② 申請に係る農作物が1植物群に限られるが、当該試験の植物以外の農作物を含む場合は、当該植物群による試験成績以外に1種類の他の植物による試験成績が必要である。この場合の植物群はいずれでも差し支えない。
- ③ 申請に係る農作物が1種類に限られ、当該試験の植物が同一の場合は、更に試験を実施する必要はない。

- （5）試験施設の基準について

局長通知別表 1 において農薬の薬効、薬害及び残留性に関する試験のうち、薬効試験、薬害試験、茶の残臭試験、タバコの喫味試験、水質汚濁性試験、作物残留性試験及び土壌残留性試験（ほ場試験に限る。）については、「公的試験研究施設又はこれに準じた施設」で実施することとされている。これは、当該試験の実施に当たっては、特に高い信頼性等を確保することが必要であるため、農作物等の栽培管理、試験の実施等に関し一定以上の専門的知見を有し、かつ、中立的な立場にあるものがこれらの試験を実施することが適当であることによるものであ

る。

一方、限界薬量（又は濃度）薬害試験、周辺農作物に対する薬害に関する試験、後作物に対する薬害に関する試験、水産動植物以外の有用生物への影響に関する試験、乳汁への移行試験及び後作物残留性試験については、特に試験施設の基準は設けられてはいないものの、同様に当該試験の信頼性等を確保する観点から農作物の栽培、供試生物の取扱い等に関し一定以上の専門的知見を有し、かつ、中立的な立場にあるものが実施することが望ましいものである。

以下、局長通知別表1の注5及び注6の「公的試験研究機関」及び「公的試験研究施設に準じた施設」に係る運用指針を示す。

① 注5の公的試験研究施設について

ア。「国又は地方公共団体が試験を実施するために必要な管理を行っている施設」とは、国又は都道府県の農業試験場、国公立大学等国又は地方公共団体が直接的に運営・管理する試験研究施設をいう。

イ。ほ場試験等については、公的試験研究施設の試験実施者が試験の実施に必要な期間、一時的に農家のほ場等を借り上げて試験を実施する場合等もこれに該当する。

ウ。局長通知の別添表1の(1)、(2)、(3)の①から④まで及び(4)に掲げる場合に係る薬効薬害試験成績については、申請者、農家、都道府県の地域農業改良普及センター（以下「普及所」という。）等が実施した場合であっても、公的試験研究施設の試験実施者が試験設計し、指導又は評価を行った場合には、公的試験研究施設で実施された試験により得られた試験成績として取り扱うものとする。

② 注6の公的試験研究施設に準じた施設について

ア。「農薬登録申請者と利害関係がないことが明らかなもので、かつ、当該試験を適正に実施する能力を有すると認められる者が試験を実施するために必要な管理を行っている施設」とは、農林水産省植物防疫所、都道府県の病害虫防除所、私立大学等をいう。

イ。特用作物については、専ら当該農作物の栽培管理等に関する試験研究を目的とした試験研究施設もこれに該当するものとする。

ウ。ほ場試験等については、公的試験研究施設に準じた施設の試験実施者が試験の実施に必要な期間、一時的に農家のほ場等を借り上げて試験を実施する場合もこれに該当する。

エ。局長通知の別添表1の(1)、(2)、(3)の①から④まで及び(4)に掲げる場合に係る薬効薬害試験及び水質汚濁性試験（分析試験に限る。）については、申請者、農家、普及所等が実施した場合であっても、公的試験研究施設に準じた施設の試験実施者が試験設計し、指導又は評価を行った場合においては、公的試験研究施設に準じた施設で実施された試験により得られた試験成績として取り扱うものとする。

4. 試験成績の提出の除外について

局長通知の第1に掲げる試験成績は、農薬の登録検査を行う上で必要不可欠なものとして位置付けられたものであるが、農薬の有効成分の種類、剤型、使用方法等の観点から、その一部につき提出を要しない場合もある。

これら試験成績の提出を要しない場合に係る条件等については、登録申請に係る農薬ごとに判断すべきものである一方、個々の試験成績の登録検査における位置付け等を踏まえ、提出を要しない場合の考え方についてその一部を局長通知の別表2に示したところである。

以下、局長通知の別表2及びその他試験成績の提出の除外に係る運用指針を示す。

なお、被験物質の性状等から、試験の実施が困難である場合についても、ここでいう「試験成績の一部につきその提出を必要としない合理的な理由」がある場合とみなすものとする。

(1) 薬害に関する試験成績について

① 適用農作物に対する薬害に関する試験成績

ア. 茶の残臭試験成績について

適用農作物に茶を含まない場合のほか、例えば次に掲げる場合が、本試験成績の提出を必要としない場合に該当する。

(ア) 当該農薬の剤型、使用方法等からみて、適用農作物である茶が当該農薬に直接暴露するおそれがない場合。例えば、次に掲げる場合がこれに該当する。

- a. 誘引剤等当該農薬の成分物質が封入された状態で使用される場合
- b. 忌避剤、殺そ剤、ナメクジ駆除剤等配置して使用される場合

(イ) 土壤に施用される場合（植物体内に浸透移行性がある農薬を使用する場合は除く。）

イ. タバコの喫味試験成績

適用農作物にタバコを含まない場合のほか、例えば次に掲げる場合が、本試験成績の提出を必要としない場合に該当する。

(ア) 当該農薬の剤型、使用方法等からみて、適用農作物であるタバコが当該農薬に直接暴露するおそれがない場合。例えば、次に掲げる場合がこれに該当する。

- a. 誘引剤等当該農薬の成分物質が封入された状態で使用される場合
- b. 忌避剤、殺そ剤、ナメクジ駆除剤等配置して使用される場合

(イ) 土壤に施用される場合（植物体内に浸透移行性がある農薬は除く。）

(ウ) 苗床で使用される場合

(エ) 種子等に粉衣又は浸漬して使用される場合

ウ. 限界薬量（又は濃度）薬害試験成績について

「当該農薬の使用方法等からみて、適用農作物が当該農薬の適用の範囲以上（使用量、濃度）に暴露されるおそれがないと認められる場合」として、次に掲げる場合等がこれに該当する。

(ア) 誘引剤等当該農薬の成分物質が封入された状態で使用される場合

(イ) 忌避剤、殺そ剤、ナメクジ駆除剤等配置して使用される場合

② 周辺農作物に対する薬害に関する試験成績

ア. 漂流飛散による薬害試験成績について

「当該農薬の有効成分の種類、剤型、使用方法等からみて、当該農薬が漂流飛散し、周辺農作物に影響（薬害）を及ぼすおそれがないと認められる場合」として、次に掲げる場合等がこれに該当する。

(ア) 展着剤のうち既に広く利用されており、薬害の面で問題がないことが確認されている場合

(イ) 誘引剤等当該農薬の成分物質が封入された状態で使用される場合

(ウ) 忌避剤、殺そ剤、ナメクジ駆除剤等配置して使用される場合

(エ) 倉庫くん蒸剤等施設内でのみ使用される場合

(オ) 土壌に施用される場合（除草剤及び土壌くん蒸剤は除く。）、田面水に施用される場合（投入、滴下、水口処理）、育苗箱に施用される場合、種子等に粉衣又は浸漬して使用される場合、又は適用農作物に塗布、若しくは適用農作物の樹幹に注入して使用される場合

(カ) 剤型が粒剤（水田以外で使用される除草剤又は空中散布若しくは無人ヘリコプターによる散布の場合は除く。）の場合

イ. 水田水の流出による薬害試験成績について

「当該農薬の使用方法等からみて、当該農薬が水田水を通じて河川等の水系に流出し、周辺農作物影響（薬害）を及ぼすおそれがないと認められる場合」として、除草剤以外の農薬を使用する場合（局長通知別表2の①の場合を除く。）がこれに該当する。

ウ. 揮散による薬害試験成績について

「当該農薬の有効成分の特性、剤型、使用方法等からみて、当該農薬が揮散し、周辺農作物に影響（薬害）を及ぼすおそれがないと認められる場合」として、次に掲げる農薬を使用する場合等がこれに該当する。

(ア) 除草剤以外の農薬

(イ) 除草剤のうち有効成分の蒸気圧がおよそ 10^{-4} hPa未満の農薬

③ 後作物に対する薬害に関する試験成績

後作物に対する薬害に関する試験成績（後作物薬害試験成績）について

「当該農薬の使用方法、土壌残留性の程度等からみて、当該農薬が適用農作物の後に栽培される農作物に影響（薬害）を及ぼすおそれがないと認められる場合」として、土壌処理除草剤を除く農薬であって土壌残留性試験（ほ場試験に限る。）における有効成分の推定半減期が原則として100日を超えない農薬を使用する場合等がこれに該当する。

(2) 毒性に関する試験成績について

① 急性経口毒性試験成績について

次に掲げる場合等にあつては、本試験成績の提出を必要としないものとする。

ア. 原体での実施について

当該農薬の有効成分の種類等からみて、その毒性がきわめて弱いこと等の

理由により安全と認められる場合。例えば、当該農薬の有効成分が既に食品等において一般に広く利用されており安全であることが公知である場合がこれに該当する。

イ. 製剤での実施について

当該農薬の剤型、使用方法等からみて、当該農薬を直接経口的に摂取するおそれがきわめて低いこと等の理由により安全と認められる場合。例えば、誘引剤等当該農薬の成分物質が封入された状態で使用される場合がこれに該当する。

② 急性経皮毒性試験成績について

「腐食性を有すると認められる場合」のほか、例えば、次に掲げる場合等にあつては、本試験成績の提出を必要としないものとする。

ア. 原体での実施について

(ア) 当該農薬の有効成分の種類等からみて、その毒性がきわめて弱いこと等の理由により安全と認められる場合。例えば、当該農薬の有効成分が既に食品等において一般に広く利用されており安全であることが公知である場合がこれに該当する。

(イ) 当該農薬の剤型、使用方法等からみて、当該農薬の成分物質の暴露量（経皮的な暴露に限る。）がきわめて微量であること等の理由により安全と認められる場合。例えば、誘引剤等当該農薬の成分物質が封入された状態で使用される場合がこれに該当する。

イ. 製剤での実施について

当該農薬の剤型、使用方法等からみて、当該農薬の成分物質の暴露量（経皮的な暴露に限る。）がきわめて微量であること等の理由により安全と認められる場合。例えば、誘引剤等当該農薬の成分物質が封入された状態で使用される場合がこれに該当する。

③ 急性吸入毒性試験成績について

次に掲げる場合等にあつては、本試験成績の提出を必要としないものとする。

ア. 原体での実施について

(ア) 当該農薬の有効成分の種類等からみて、その毒性がきわめて弱いこと等の理由により安全と認められる場合。例えば、当該農薬の有効成分が既に食品等において一般に広く利用されており安全であることが公知である場合がこれに該当する。

(イ) 当該農薬の剤型、使用方法等からみて、当該農薬の成分物質が直接経気道暴露するおそれがきわめて低いこと等の理由により安全と認められる場合。例えば、次に掲げる場合がこれに該当する。

- a. 誘引剤等当該農薬の成分物質が封入された状態で使用される場合
- b. 忌避剤、殺そ剤、ナメクジ駆除剤等配置して使用される場合

イ. 製剤での実施について

「当該農薬の剤型、使用方法等からみて、当該農薬の使用者等が経気道暴露を受けるおそれがないと認められる場合」として、例えば、くん蒸剤、くん煙剤等当該農薬の成分物質を気化させて使用する農薬以外の農薬を使用する場合はこれに該当する。

④ 皮膚刺激性試験成績について

「腐食性を有すると認められる場合」のほか、当該農薬の剤型、使用方法等からみて、当該農薬に直接暴露するおそれがきわめて低いこと等の理由により安全と認められる場合等には、本試験成績の提出を必要としないものとする。例えば、誘引剤等当該農薬の成分物質が封入された状態で使用される場合はこれに該当する。

⑤ 眼刺激性試験成績について

局長通知別表2の試験成績の提出を要しない場合の①及び②に掲げる場合のほか、当該農薬の剤型、使用方法等からみて、当該農薬に直接暴露するおそれがきわめて低いこと等の理由により安全と認められる場合等には、本試験成績の提出を必要としないものとする。例えば、誘引剤等当該農薬の成分物質が封入された状態で農薬を使用する場合はこれに該当する。

⑥ 皮膚感作性試験成績について

次に掲げる場合等にあつては、本試験成績の提出を必要としないものとする。

ア. 原体での実施について

(ア) 当該農薬の有効成分の種類等からみて、その毒性がきわめて弱いこと等の理由により安全と認められる場合。例えば、当該農薬の有効成分が既に食品等において一般に広く利用されており安全であることが公知である場合はこれに該当する。

(イ) 当該農薬の剤型、使用方法等からみて、当該農薬の成分物質の暴露量（経皮的な暴露に限る。）がきわめて微量であること等の理由により安全と認められる場合。例えば、誘引剤等当該農薬の成分物質が封入された状態で使用される場合はこれに該当する。

イ. 製剤での実施について

当該農薬の剤型、使用方法等からみて、当該農薬の成分物質の暴露量（経皮的な暴露に限る。）がきわめて微量であること等の理由により安全と認められる場合。例えば、誘引剤等当該農薬の成分物質が封入された状態で使用される場合はこれに該当する。

⑦ 急性神経毒性試験成績について

ア. 「急性毒性試験等の結果から、神経毒性を有するおそれがないと認められる場合」とは、急性経口毒性試験における一般状態の観察及びラットを用いた90日間反復経口投与毒性試験における詳細な状態の観察、機能検査、病理

組織学的検査等において、致死量以下の用量で特異的な神経毒性を示唆する所見のないことが確認でき、かつ、既知神経毒性物質と化学構造に類似性がない場合又は、反復経口投与神経毒性試験若しくは28日間反復経口投与神経毒性試験(OECD424)で神経毒性が示唆されない場合が原則としてこれに該当する。

イ. 前項に掲げる場合のほか、次に掲げる場合等にあつては、本試験成績の提出を必要としないものとする。

(ア) 当該農薬の有効成分の種類等からみて、その毒性がきわめて弱いこと等の理由により安全と認められる場合。例えば、当該農薬の有効成分が既に食品等において一般に広く利用されており安全であることが公知である場合がこれに該当する。

(イ) 当該農薬の剤型、使用方法等からみて、当該農薬の成分物質の暴露量がきわめて微量であること等の理由により安全と認められる場合。例えば、次に掲げる場合がこれに該当する。

- a. 誘引剤等当該農薬の成分物質が封入された状態で使用される場合
- b. 忌避剤、殺そ剤、ナメクジ駆除剤等配置して使用される場合

⑧ 急性遅発性神経毒性試験成績について

ア. 「急性毒性試験等の結果から、遅発性神経毒性を有するおそれがないと認められる場合」とは、急性毒性試験等他の試験成績から、当該農薬の有効成分がコリンエステラーゼ阻害性を有しないと認められる場合をいう。

イ. 「遅発性神経毒性を有する既知の化学物質との化学構造上の相関等からみて、遅発性神経毒性を有するおそれがないと認められる場合」とは、有効成分がりん酸エステル系で、かつ、コリンエステラーゼ阻害性を有する農薬以外の農薬を使用する場合がこれに該当する。

ウ. 前2項に掲げる場合のほか、例えば、次に掲げる場合等にあつては、本試験成績の提出を必要としないものとする。

(ア) 当該農薬の有効成分の種類等からみて、その毒性がきわめて弱いこと等の理由により安全と認められる場合。例えば、当該農薬の有効成分が既に食品等において一般に広く利用されており安全であることが公知である場合がこれに該当する。

(イ) 当該農薬の剤型、使用方法等からみて、当該農薬の成分物質の暴露量がきわめて微量であること等の理由により安全と認められる場合。例えば、次に掲げる場合等がこれに該当する。

- a. 誘引剤等当該農薬の成分物質が封入された状態で使用される場合
- b. 忌避剤、殺そ剤、ナメクジ駆除剤等配置して使用される場合

⑨ 90日間反復経口投与毒性試験成績、催奇形性試験成績、変異原性に関する試験成績、生体機能への影響に関する試験成績及び動物体内運命に関する試験成績について

ア。「当該農薬の剤型、使用方法等からみて、当該農薬の使用に係る当該農薬の成分物質等の暴露量及び摂取量がきわめて微量であること等の理由により、安全と認められる場合」として、例えば次に掲げる場合等がこれに該当する。

ただし、(イ)に関し、変異原性試験のうち復帰突然変異試験については、この限りでない。これは、当該試験成績については、農薬等化学物質の毒性に関する基本情報として位置付けられていることから、その安全性を確認する必要があるためである。

(ア) 誘引剤等当該農薬の成分物質が封入された状態で使用される場合

(イ) 忌避剤、殺そ剤、ナメクジ駆除剤等配置して使用される場合

なお、この場合において、「摂取」とは、農作物等を通して当該農薬の成分物質等を経口的に摂取することをいう。

イ。「当該農薬の成分物質等の種類等からみて、その毒性がきわめて弱いこと等の理由により、安全と認められる場合」として、例えば、当該農薬の有効成分が既に食品等において一般に広く利用されており安全であることが公知である場合がこれに該当する。

ただし、窒素、デンプン等食品として一般に広く利用されており、特に安全と認められる物質を除き、変異原性試験のうち、復帰突然変異試験については、この限りではない。これは、当該試験成績については、農薬等化学物質の毒性に関する基本情報として位置付けられていることから、その安全性を確認する必要があるためである。

ウ。前2項に該当する場合のほか、90日間反復経口投与毒性試験について、くん蒸剤等、当該農薬の成分物質の揮発性が高い等の理由により、90日間反復経口投与毒性試験に代えて90日間反復吸入毒性試験を実施する場合もこれに該当する。

⑩ 21日間反復経皮投与毒性試験成績について

ア。「当該農薬の使用者等が長期にわたって当該農薬の経皮暴露を受けるおそれがないと認められる場合」として、例えば、次に掲げる場合がこれに該当する。

(ア) 誘引剤等当該農薬の成分物質が封入された状態で使用される場合

(イ) 忌避剤、殺そ剤、ナメクジ駆除剤等配置して使用される場合

イ。「急性経皮毒性試験の結果から、強い経皮毒性等を有するおそれがないと認められる場合」として、急性経皮毒性試験の結果から他の暴露経路による急性毒性に比べ著しく強い経皮毒性が認められない場合がこれに該当する。

ウ。前2項に該当する場合のほか、当該農薬の有効成分の種類等からみて、その毒性がきわめて弱いこと等の理由により安全と認められる場合。例えば、当該農薬の有効成分が既に食品等において一般に広く利用されており安全であることが公知である場合がこれに該当する。

⑪ 90日間反復吸入毒性試験成績について

ア.「当該農薬の使用者等が長期にわたって当該農薬の経気道暴露を受けるおそれがないと認められる場合」として、例えば、次に掲げる場合がこれに該当する。

(ア) 誘引剤等当該農薬の成分物質が封入された状態で使用される場合

(イ) 忌避剤、殺そ剤、ナメクジ駆除剤等配置して使用される場合

イ.「急性吸入毒性試験の結果から、強い吸入毒性等を有するおそれがないと認められる場合」として、急性吸入毒性試験の結果から、他の暴露経路による急性毒性に比べ著しく強い吸入毒性が認められない場合がこれに該当する。

ウ. 前2項に該当する場合のほか、当該農薬の有効成分の種類等からみて、その毒性がきわめて弱いこと等の理由により安全と認められる場合。例えば、当該農薬の有効成分が既に食品等において一般に広く利用されており安全であることが公知である場合がこれに該当する。

⑫ 反復経口投与神経毒性試験成績

ア.「90日間反復経口投与毒性試験等の結果から、神経毒性を有するおそれがないと認められる場合」とは、ラットを用いた90日間反復経口投与毒性試験等における詳細な状態の観察、機能検査、病理組織学的検査等において、致死量以下の用量で特異的な神経毒性を示唆する所見のないことが確認でき、かつ、既知神経毒性物質と化学構造に類似性がない場合、又は28日間反復経口投与神経毒性試験(OECD424)で神経毒性が示唆されない場合が原則としてこれに該当する。

イ. 前項に掲げる場合のほか、次に掲げる場合にあつては、本試験成績の提出を必要としないものとする。

(ア) 当該農薬の有効成分の種類等からみて、その毒性がきわめて弱いこと等の理由により安全と認められる場合。例えば、当該有効成分が既に食品等において一般に広く利用されており安全であることが公知である場合がこれに該当する。

(イ) 当該農薬の剤型、使用方法等からみて、当該農薬の成分物質の暴露量がきわめて微量であること等の理由により安全と認められる場合。例えば、次に掲げる場合がこれに該当する。

a. 誘引剤等当該農薬の成分物質が封入された状態で使用される場合

b. 忌避剤、殺そ剤、ナメクジ駆除剤等配置して使用される場合

⑬ 28日間反復投与遅発性神経毒性試験成績について

急性遅発性神経毒性試験の結果、明らかに遅発性神経毒性がないと認められる場合のほか、急性遅発性神経毒性試験成績を提出する必要がないと認められる場合にあつては、本試験成績の提出を必要としないものとする。

⑭ 1年間反復経口投与毒性試験成績、発がん性試験成績及び繁殖毒性試験成績

ア.「当該農薬の剤型、使用方法等からみて、人が当該農薬の成分物質等を長期

にわたり摂取するおそれがないこと、摂取する量がきわめて微量であること等の理由により、安全と認められる場合」として、例えば、次に掲げる場合がこれに該当する。

(ア) 食品の用に供される農作物以外の農作物に使用される場合

(イ) 当該農薬の剤型、使用方法等からみて適用農作物が直接当該農薬に暴露するおそれがない場合として、例えば、次に掲げる場合。

a. 誘引剤等当該農薬の成分物質が封入された状態で使用される場合

b. 忌避剤、殺そ剤、ナメクジ駆除剤等配置して使用される場合

(ウ) 種子等に粉衣又は浸漬して使用される農薬等適用農作物の生育の初期段階において使用されること等の理由により、当該農作物を通して人が当該農薬の成分物質等を摂取するおそれがきわめて低いと認められる場合

イ. 「当該農薬の成分物質等の種類等からみて、その毒性がきわめて弱いこと等の理由により、安全と認められる場合」として、例えば、当該農薬の有効成分が既に食品等において一般に広く利用されており安全であることが公知である場合がこれに該当する。

⑮ 植物体内運命に関する試験成績について

ア. 「当該農薬の剤型、使用方法等からみて、人が当該農薬の成分物質等を長期間にわたり摂取するおそれがないこと、摂取する量がきわめて微量であること等の理由により、安全と認められる場合」として、局長通知別表2の①「食品の用に供される農作物（特用作物及び家畜の飼料の用に供される農作物を含む。）以外の農作物に使用される場合」に掲げる農薬以外の農薬について、次に掲げる場合等がこれに該当する。

(ア) 当該農薬の剤型、使用方法等からみて適用農作物が直接当該農薬に暴露するおそれがない場合。例えば、次に掲げる場合がこれに該当する。

a. 誘引剤等当該農薬の成分物質が封入された状態で使用される場合

b. 忌避剤、殺そ剤、ナメクジ駆除剤等配置して使用される場合

(イ) 倉庫くん蒸に使用される農薬等適用農作物が収穫後の農作物である場合

(ウ) 種子等に粉衣又は浸漬して使用される農薬等、適用農作物の生育の初期段階において使用されること等の理由により、当該農作物をとおして人が当該農薬の成分物質等を摂取するおそれがきわめて低いと認められる場合。

イ. 「当該農薬の成分物質等の種類等からみて、その毒性がきわめて弱いこと等の理由により、安全と認められる場合」として、例えば、有効成分が食品等において一般に広く利用されており安全であることが公知である場合がこれに該当する。

⑯ 土壌中運命に関する試験成績について

ア. 「当該農薬の剤型、使用方法等からみて、当該農薬の成分物質等がその使用に係る農地に混入するおそれがないと認められる場合」として、次に掲げる

場合がこれに該当する。

- (ア) 誘引剤等当該農薬の成分物質が封入された状態で使用される場合
- (イ) 忌避剤、殺そ剤、ナメクジ駆除剤等配置して使用される場合
- (ウ) 適用農作物に塗布し、又は適用農作物の樹幹に注入して使用される場合
- (エ) 倉庫くん蒸剤等施設内でのみ使用される場合
- (オ) エアゾル剤等一度に広範囲かつ多量に使用されないことがない場合

イ。「当該農薬の成分物質等の種類等からみて、その毒性がきわめて弱いこと等の理由により、安全と認められる場合」として、当該有効成分が食品等において一般に広く利用されており安全であることが公知である場合がこれに該当する。

ウ。「水田」とは、湛水状態で農作物を栽培するすべての状態を含むもので、水稻以外に「クワイ」、「レンコン」、「いぐさ」等の栽培に供される場合を含むものとする。

エ。「好氣的湛水土壤中における当該農薬の成分物質等の消失速度からみて必要と認められる場合」、「好氣的土壤中における当該農薬の成分物質等の消失が速やかである場合」に該当するか否かは、原則として、当該農薬の成分物質等の土壤中での推定半減期が100日を超えるか否かにより判断するものとする。

オ。「土壤中における移動性が低い」とは、原則として、被験物質の水溶解度が10mg/L以下又は土壤吸着係数 (K_{ads}^{soc}) が500以上の場合をいう。

⑩ 水中運命に関する試験成績

ア。「当該農薬の剤型、使用方法等からみて、当該農薬の成分物質等が河川等の水系に流出するおそれがないと認められる場合」として、次に掲げる場合等がこれに該当する。

- (ア) 誘引剤等当該農薬の成分物質が封入された状態で使用される場合
- (イ) 忌避剤、殺そ剤、ナメクジ駆除剤等配置して使用される場合
- (ウ) 適用農作物に塗布し、又は適用農作物の樹幹に注入して使用される場合
- (エ) 倉庫くん蒸剤等施設内でのみ使用される場合
- (オ) エアゾル剤等一度に広範囲かつ多量に使用されないことがない場合

イ。「当該農薬の成分物質等の種類等からみて、その毒性がきわめて弱いこと等の理由により、安全と認められる場合」として、例えば、当該有効成分が既に食品等において一般に広く利用されており人畜及び水産動植物に対し安全であることが公知である場合が該当する。

(3) 水産動植物への影響に関する試験成績について

① 魚類急性毒性試験成績及びミジンコ類急性遊泳阻害試験成績について

ア。「原体での実施に関し、当該農薬の成分物質等の種類等からみて、その毒性がきわめて弱いこと等の理由により、有害でないとして認められる場合」として、例えば、当該有効成分が既に食品等において一般に広く利用されており水産

動物に対し安全であることが公知である場合が該当する。

イ。「製剤での実施に関し、当該農薬の剤型、使用方法等からみて、当該農薬の成分物質等が河川等の水系に流出するおそれがないと認められる場合」として、次に掲げる場合等がこれに該当する。

(ア) 誘引剤等当該農薬の成分物質が封入された状態で使用される場合

(イ) 忌避剤、殺そ剤、ナメクジ駆除剤等配置して使用される場合

(ウ) 適用農作物に塗布し、又は適用農作物の樹幹に注入して使用される場合

(エ) 倉庫くん蒸剤等施設内でのみ使用される場合

(オ) エアゾル剤等一度に広範囲かつ多量に使用されることがない場合

(カ) 種子等に粉衣又は浸漬して使用される場合

(キ) 畑地適用農薬で剤型が粒剤（空中散布又は無人ヘリコプターによる散布の場合は除く。）の場合及び植穴処理、土壤に灌注して使用される場合

② ミジンコ類繁殖試験成績について

「当該農薬の成分物質等の種類等からみて、その毒性がきわめて弱いこと等の理由により、当該農薬が甲殻類の繁殖に影響を及ぼすおそれがない場合」として、次に掲げる農薬を使用する場合が該当する。

ア. キチン合成阻害等昆虫成長制御作用を有する農薬以外の農薬

イ. キチン合成阻害等昆虫成長制御作用を有する農薬であって水中での推定半減期が4日未満の農薬

③ 藻類生長阻害試験成績について

ア。「原体での実施に関し、当該農薬の成分物質等の種類等からみて、その毒性がきわめて弱いこと等の理由により、有害でない」と認められる場合」として、例えば、当該有効成分が既に食品等において一般に広く利用されており水産植物に対し安全であることが公知である場合が該当する。

イ。「製剤での実施に関し、当該農薬の剤型、使用方法等からみて、当該農薬の成分物質等が河川等の水系に流出するおそれがないと認められる場合」として、次に掲げる場合等がこれに該当する。

(ア) 誘引剤等当該農薬の成分物質が封入された状態で使用される場合

(イ) 忌避剤、殺そ剤、ナメクジ駆除剤等配置して使用される場合

(ウ) 適用農作物に塗布し、又は適用農作物の樹幹に注入して使用される場合

(エ) 倉庫くん蒸剤等施設内でのみ使用される場合

(オ) エアゾル剤等一度に広範囲かつ多量に使用されることがない場合

(カ) 種子等に粉衣又は浸漬して使用される場合

(キ) 畑地適用農薬で剤型が粒剤（空中散布又は無人ヘリコプターによる散布の場合は除く。）の場合及び植穴処理、土壤に灌注して使用される場合

(4) 水産動植物以外の有用生物への影響に関する試験成績について

「当該農薬の成分物質等の種類等からみて、その毒性がきわめて弱いこと等の

理由により、有害でない」と認められる場合」として、例えば、当該農薬の有効成分が既に食品等において一般に広く利用されておりミツバチ、蚕、天敵昆虫等及び鳥類に対し安全であることが公知である場合がこれに該当する。

試験の種類ごとの運用は以下によるものとする。

① ミツバチ影響試験成績について

「当該農薬の剤型、使用方法等からみて、ミツバチが当該農薬に暴露するおそれがない」と認められる場合」として、次に掲げる場合等がこれに該当する。

ア. 誘引剤等当該農薬の成分物質が封入された状態で使用される場合

イ. 忌避剤、殺そ剤、ナメクジ駆除剤等配置して使用される場合

ウ. 倉庫くん蒸剤等施設内でのみ使用される場合

エ. 土壌に施用される農薬（殺虫剤及び土壌くん蒸剤は除く。）、田面水に施用される場合（投入、滴下、水口処理）、育苗箱に施用される場合、種子等に粉衣又は浸漬して使用される農薬又は、適用農作物に塗布若しくは、適用農作物の樹幹に注入して使用される農薬

オ. 剤型が粒剤。（殺虫剤又は空中散布若しくは無人ヘリコプターによる散布の場合は除く。）の場合

② 蚕影響試験成績

「当該農薬の剤型、使用方法等からみて、蚕が桑葉を摂取すること等により、当該農薬に暴露するおそれがない」と認められる場合」として、次に掲げる場合等がこれに該当する。

ア. 誘引剤等当該農薬の成分物質が封入された状態で使用される場合

イ. 忌避剤、殺そ剤、ナメクジ駆除剤等配置して使用される場合

ウ. 倉庫くん蒸剤等施設内でのみ使用される場合

エ. 土壌に施用される場合（適用農作物に桑が含まれる場合、殺虫剤及び土壌くん蒸剤は除く。）、田面水に施用される場合（投入、滴下、水口処理）、育苗箱に施用される場合、種子等に粉衣又は浸漬して使用される場合又は、適用農作物に塗布若しくは、適用農作物の樹幹に注入して使用される場合

オ. 剤型が粒剤（適用農作物に桑が含まれる農薬、殺虫剤又は空中散布若しくは無人ヘリコプターによる散布の場合は除く。）の場合

③ 天敵昆虫等影響試験成績について

「当該農薬の剤型、使用方法等からみて、天敵昆虫等が当該農薬に暴露するおそれがない」と認められる場合」としては、次に掲げる場合等がこれに該当する。

ア. 誘引剤等当該農薬の成分物質が封入された状態で使用される場合

イ. 忌避剤、殺そ剤、ナメクジ駆除剤等配置して使用される場合

ウ. 倉庫くん蒸剤等施設内でのみ使用される場合

エ. 田面水に施用される場合（投げ入れ、滴下、水口処理）、育苗箱に施用され

る場合、種子等に粉衣又は浸漬して使用される場合又は、適用農作物に塗布若しくは、適用農作物の樹幹に注入して使用される場合
オ. 剤型が粒剤（殺虫剤又は田面水以外に施用する場合は除く。）の場合

④ 鳥類影響試験成績（鳥類経口投与試験成績、鳥類混餌投与試験成績）について

ア. 「当該農薬の剤型、使用方法等からみて、鳥類が当該農薬に暴露するおそれがないと認められる場合」として、次に掲げる場合等がこれに該当する。

（ア）誘引剤等当該農薬の成分物質が封入された状態で使用される場合

（イ）適用農作物に塗布し、又は適用農作物の樹幹に注入して使用される場合

（ウ）倉庫くん蒸等施設内でのみ使用される場合

イ. 「鳥類混餌投与試験については、鳥類経口投与試験の結果から、強い毒性が認められない場合」として、半数致死濃度が300mg/kgより大きい農薬を使用する場合がこれに該当する。

（5）有効成分の性状、安定性、分解性等に関する試験成績について

① 「当該農薬の成分物質等の種類等からみて、その毒性がきわめて弱いこと等の理由により、安全と認められる場合」とは、原則として、当該農薬の有効成分が既に食品等において一般に広く利用されており安全であることが公知である場合がこれに該当する。

② 「当該農薬の使用方法等からみて、当該農薬の成分物質等がその使用に係る農地に混入し、又は河川等の水系に流出するおそれがないと認められる場合」としては、次に掲げる場合等がこれに該当する。

ア. 誘引剤等当該農薬の成分物質が封入された状態で使用される場合

イ. 忌避剤、殺そ剤、ナメクジ駆除剤等配置して使用される場合

ウ. 適用農作物に塗布し、又は適用農作物の樹幹に注入して使用される場合

エ. 倉庫くん蒸剤等施設内でのみ使用される場合

オ. エアゾル剤等一度に広範囲かつ多量に使用されることがない場合

（6）水質汚濁性に関する試験成績について

① 「水田」とは、湛水状態で農作物を栽培するすべての状態を含むもので、水稻以外に「クワイ」、「レンコン」、「いぐさ」等の栽培に供される場合を含むものとする。

② 「当該農薬の成分物質等の種類等からみて、その毒性がきわめて弱いこと等の理由により有害でない」と認められる場合」として、当該農薬の有効成分が既に食品等において一般に広く利用されており安全であることが公知である場合がこれに該当する。

（7）農作物への残留性に関する試験成績について

① 作物残留性試験成績について

ア。「当該農薬の剤型、使用方法等からみて、人が当該農薬の成分物質等を長期にわたり摂取するおそれがないこと、摂取するもののその摂取量がきわめて微量であること等の理由により、安全と認められる場合」として、局長通知別表2の1の①及び2の①「食品の用に供される農作物（特用作物及び家畜の飼料の用に供される農作物を含む。）以外の農作物に使用される場合」に掲げる農薬以外の農薬について、次に掲げる場合等がこれに該当する。

(ア) 当該農薬の剤型、使用方法等からみて適用農作物が直接当該農薬に暴露するおそれがない場合。例えば、次に掲げる場合がこれに該当する。

a. 誘引剤等当該農薬の成分物質が封入された状態で使用される場合

b. 忌避剤、殺そ剤、ナメクジ駆除剤等配置して使用される場合

(イ) 種子等に粉衣又は浸漬して使用される農薬等、適用農作物の生育の初期段階において使用されること等の理由により、当該農作物を通して人が当該農薬の成分物質等を摂取するおそれがきわめて低いと認められる場合

(ウ) 間引き菜及びつまみ菜の作物残留性試験については、「間引き菜、つまみ菜に使用しないこと」との旨の注意事項を付す場合。

イ。「当該農薬の成分物質等の種類等からみて、その毒性がきわめて弱いこと等の理由により、安全と認められる場合」として、例えば、当該有効成分が既に食品等において一般に広く利用されており安全であることが公知である場合が該当する。

ウ。展着剤が適用対象となる農薬の残留性に対し何ら影響を及ぼすおそれがないと認められる場合とは、原則として、以下の方法で実施した試験により、当該展着剤が適用対象となる農薬の残留性に影響を与えないことが確認された場合をいう。

散布液の付着しやすい農作物（きゅうり、はくさい、りんご等）と付着しにくい農作物（稲、麦類、ねぎ、キャベツ等）の各1種類以上を供試農作物として選定し、当該展着剤の適用対象農薬であり、かつ、当該供試農作物に適用がある農薬を使用して、展着剤の有無の下で適用対象農薬の有効成分等の残留性を経時的に比較する。

なお、農作物ごとの試験例数及び分析は1例とし、試験施設については特に定めない。

② 乳汁への移行試験成績について

ア。家畜の飼料の用に供される農作物には、飼料用農作物のほか、稲わらが含まれる。

ただし、稲わらについては「当該農薬を使用した稲わらを家畜飼料として使用しないこと」との旨の注意事項を付す場合は除外することとする。

イ。残留するもののその残留量がきわめて微量であること等の理由により、安全と認められる場合とは、作物残留性試験の結果、稲わらについては当該農薬の成分等の残留量が1 ppm以下である場合、飼料作物については当該農薬が検出されない場合をいう。

(8) 土壌への残留性に関する試験成績について

① 土壌残留性試験成績について

ア.「当該農薬の剤型、使用方法等からみて、当該農薬の成分物質等がその使用に係る農地に混入するおそれがないと認められる場合」として、次に掲げる場合等がこれに該当する。

(ア) 誘引剤等当該農薬の成分物質が封入された状態で使用される場合

(イ) 忌避剤、殺そ剤、ナメクジ駆除剤等配置して使用される場合

(ウ) 適用農作物に塗布し、又は適用農作物の樹幹に注入して使用される場合

(エ) 倉庫くん蒸剤等施設内でのみ使用される場合

(オ) エアゾル剤等一度に広範囲かつ多量に使用されることがない場合

イ.「当該農薬の成分物質等の種類等からみて、その毒性がきわめて弱いこと等の理由により、安全と認められる場合」として、例えば、当該農薬の有効成分が既に食品等において一般に広く利用されており安全であることが公知である場合がこれに該当する。

② 後作物残留性に関する試験成績について

局長通知別表2の土壌残留試験成績の試験成績の提出を要しない場合に該当する農薬及び土壌残留性試験(ほ場試験による。)における当該農薬の有効成分等の推定半減期が、原則として、100日を超えない農薬を使用する場合等がこれに該当する。

5. 局長通知別添「農薬の登録申請時に提出される試験成績の作成に係る指針」について

基本的事項

1. 基本的考え方について

- (1) 本解説は、「農薬登録申請時に提出される試験成績の作成に係る指針」（以下、「指針」という。）を補足するものであり、試験を実施するに当たり参考となる事項、考え方等をまとめたものである。指針及び解説は標準的な試験方法を示したものであり、今後の毒性学や科学技術の発展等により、逐次、改善・向上が図られるべきものである。
- (2) 試験実施者が被験物質の特性等に応じ試験の目的をより満たすため、試験方法に変更・改善を加えるという柔軟性を保持することを妨げるものではない。
ただし、試験方法を変更した場合には、変更点及び変更した理由を明らかにして試験報告書等に記載する必要がある。

2. 被験物質について

(1) 原体を被験物質として用いる場合

- ① 農薬見本品の原料としての原体と同等のものでなければならない。
- ② 試験期間中、原則として同じロットの被験物質を用いなければならないが、やむを得ず他のロットの被験物質を用いる場合には、引き続くロットは先のロットの組成と十分近似しているものでなければならない。
- ③ 一般名、化学名、構造式、純度、ロット番号、蒸気圧・水溶解度等物理化学的性質及び不純物の組成をできるだけ明らかにしておくことが必要である。

(2) 製剤を被験物質として用いる場合

- ① 農薬見本品と同等のものでなければならない。
- ② 試験期間中、原則として同じロットの被験物質を用いなければならないが、やむを得ず他のロットの被験物質を用いる場合には、引き続くロットは先のロットの組成と十分近似しているものでなければならない。
- ③ 種類名、有効成分含有量、ロット番号、その他の成分の種類等をできるだけ明らかにしておくことが必要である。

(3) 毒性試験等で被験物質を混餌により投与する場合には、均一性、安定性等に留意する。また、溶媒等を用いて投与する場合には、当該溶媒の毒性は既知のものであり、かつ試験結果に重大な影響を与えないものが望ましい。

(4) なお、被験物質の有害性に注意して実験者の健康管理及び廃棄物処理を行うことが重要である。特に変異原性試験等で使用する陽性対照物質の取扱いには十分な注意が必要である。

3. 供試生物について

農薬の安全性評価を的確に行う観点から、各試験項目にわたり同一種・同一系統の試験生物を用いることが望ましい。

各試験における供試生物に関する条件等は、試験ごとの該当項目を参照のこと。

4. 実験動物の取扱い等について

最近、国内外で動物愛護の気運が高まってきており、農薬の毒性試験を実施する場合にも動物愛護の精神を忘れてはならない。従って、試験の実施に先立ち、十分な資料収集を行い、試験実施の必要性の有無を検討し、更に試験を実施する場合には、あらかじめ収集した資料をもとに慎重かつ十分な実験計画を作成して、必要最小限の動物数により実験を行うことが望ましい。

<薬効及び薬害に関する試験>

適用病害虫に対する薬効・

適用農作物に対する薬害に関する試験 (1-1-1~4)

薬効・薬害試験 (1-1-1)

1. 試験方法について

- (1) 試験ほ場は、農薬散布の履歴が明らかである等、試験結果に悪影響を与えないものであること。
- (2) 剤型、病害虫・雑草、農作物又は処理方法により試験法が異なることから、効果・薬害の評価ができるそれぞれの特性を考慮した適切な試験方法を用い、登録申請する使用濃度(量)及び使用方法で実施する。
- (3) 登録申請する病害虫・雑草等の種、態(卵、幼虫等)、生育ステージ、発生量及び発生推移の確認を行う。
なお、対象病害虫・雑草等の発生の状況により、接種又は放飼又は播種等を行って~~も~~の試験もやむを得ない。この場合、自然発生量と大きく異ならないような方法を採用する。
- (4) 対照薬剤区では当該申請に係る適用農作物と適用病害虫・雑草等の組合せに登録のある農薬を用いる。
- (5) 調査方法は、農薬の種類、対象病害虫・雑草又は対象農作物の特性に応じ、薬効薬害が評価できる周知された適切な方法を用いる。

2. 報告事項について

試験成績報告書には、原則として以下の項目が記載されていること。

- (1) 試験実施機関及び試験担当者(所属)
- (2) 試験目的
- (3) 被験物質に関する情報
農薬名(コード番号でもよいが、登録申請時の農薬名との関連を明らかにする)、ロット番号等
- (4) 供試農作物について
 - ① 農作物名(品種)
 - ② 農作物に関する情報(生育状況、栽培条件等)
- (5) 対象病害虫・雑草名及びその発生状況
- (6) 試験場所、ほ場の条件(土性等)及び区制・面積
- (7) 農薬の処理方法(処理年月日、処理時の作物の生育ステージ、処理器具、希釈倍数、

- 処理量、処理法、処理回数、展着剤添加の有無等)
- (8) 試験期間中の気象状況 (気温、降水量等)
試験結果に影響を及ぼしたと考えられる降雨等の状況については詳細な記録及び考察
 - (9) その他の農薬の使用の有無
 - (10) 調査方法 (方法、時期、回数等)
 - (11) 試験結果
 - ① 無処理区及び対照薬剤区と比較した薬剤処理区における薬効
 - ② 薬害の有無、その状態及び程度 (草丈の測定値等)、回復の程度等
 - ③ 考察
 - ④ その他評価に必要と判断される事項

限界薬量 (又は濃度) 薬害試験 (1 - 1 - 2)

1. 供試農作物について

慣行の方法に従って栽培された健全な植物を用いる。

2. 試験方法について

- (1) ほ場試験が望ましいが、科学的評価が可能であればポットで実施してもよい。
- (2) 薬害が発生しない最高薬量又は最高濃度を明らかにすることを目的としていることから、薬害が発生しない薬量 (濃度) から薬害を生ずるまでの段階的な薬量 (濃度) 設定して行うことが望ましいが、申請使用最大薬量 (濃度) の2倍量で実施しても差し支えない。
- (3) 申請使用最大薬量 (濃度) の2倍量の試験を行う場合、登録申請に係る使用方法及び使用薬量の最高薬量の2倍量を下限とする薬量 (濃度) 区及び無処理区を設ける。
また、薬害発生状況の解析のため、必要に応じ登録申請を行う範囲の最高薬量 (最高濃度) 区を設ける。

3. 報告事項について

試験成績報告書には、原則として以下の項目が記載されていること。

- (1) 試験実施機関及び試験担当者 (所属)
- (2) 試験目的
- (3) 被験物質に関する情報
農薬名 (コード番号でもよいが、登録申請時の農薬名との関連を明らかにする)、ロット番号等
- (4) 供試農作物について
 - ① 農作物名 (品種)
 - ② 農作物に関する情報 (生育状況、栽培条件等)
- (5) 試験場所、ほ場の条件 (土性等) 及び区制・面積
- (6) 農薬の処理方法 (処理年月日、処理時の作物の生育ステージ、処理器具、希釈倍数、処理量、処理法、処理回数、展着剤添加の有無等)
- (7) 試験期間中の気象状況 (気温、降水量等)
試験結果に影響を及ぼしたと考えられる降雨等の状況については詳細な記録及び考

察

- (8) その他の農薬の使用の有無
- (9) 調査方法（方法、時期、回数等）
- (10) 試験結果
 - ① 薬害の有無、その状態及び程度（草丈の測定値等）、回復の程度等
 - ② 考察
 - ③ その他評価に必要と判断される事項

茶の残臭試験（1-1-3）

1. 試験方法について

- (1) 試験ほ場は、農薬散布の履歴が明らかである等、試験結果に悪影響を与えないものであること。
- (2) 農薬の処理は、農薬登録申請する使用方法及び最高薬量（最高濃度）で行う。
- (3) 無処理区及び登録を行う摘採前日数の処理区のほか、残臭審査の基準となる摘採前日処理区を設ける。
- (4) 試料は、試験区から均一に採取し、直ちに標準製茶法に従って荒茶を調製する。
- (5) 試料に熱湯を注ぎ、香気により農薬の残臭の有無を調査する。なお、同一試料については2回以上繰り返して調査を行う。調査は、数名の熟練した専門家により実施する。

2. 報告事項について

試験成績報告書には、原則として以下の項目が記載されていること。

- (1) 試験実施機関及び試験担当者（所属）
- (2) 試験目的
- (3) 被験物質に関する情報
農薬名（コード番号でもよいが、登録申請時の農薬名との関連を明らかにする）、ロット番号等
- (4) 供試農作物について
 - ① 農作物名（品種、年生等）
 - ② 農作物に関する情報（生育状況、栽培条件等）
- (5) 試験場所、ほ場の条件（土性等）及び区制・面積
- (6) 農薬の処理方法（処理年月日、処理時の作物の生育ステージ、処理器具、希釈倍数、処理量、処理法、処理回数、展着剤添加の有無等）
- (7) 試験期間中の気象状況（気温、降水量等）
試験結果に影響を及ぼしたと考えられる降雨等の状況については詳細な記録及び考察
- (8) その他の農薬の使用の有無
- (9) 製茶工程及び保管条件等に関する情報
- (10) 調査方法
- (11) 試験結果
 - ① 残臭の有無
 - ② 考察

③ その他評価に必要と判断される事項

タバコの喫味試験 (1-1-4)

1. 試験方法について

- (1) 試験ほ場は、農薬散布の履歴が明らかである等、試験結果に悪影響を与えないものであること。
- (2) 試験は、登録申請を行う使用方法及び申請最高薬量（濃度）で行い、原則として無処理区を設ける。
- (3) 試料は、中葉及び上葉をそれぞれ収穫適期に手摘みで採取し、品種ごとの乾燥法に従って乾燥した葉を裁刻し、巻き上げて試料とする。
- (4) 調査は、熟練した専門家が外香と喫味により農薬に起因する臭気の有無を調査する。

2. 報告事項について

試験成績報告書には、原則として以下の項目が記載されていること。

- (1) 試験実施機関及び試験担当者（所属）
- (2) 試験目的
- (3) 被験物質に関する情報
農薬名（コード番号でもよいが、登録申請時の農薬名との関連を明らかにする）、ロット番号等
- (4) 供試農作物について
 - ① 農作物名（品種）
 - ② 農作物に関する情報（生育状況、栽培条件等）
- (5) 試験場所、ほ場の条件（土性等）及び区制・面積
- (6) 農薬の処理方法（処理年月日、処理時の作物の生育ステージ、処理器具、希釈倍数、処理量、処理法、処理回数、展着剤添加の有無等）
- (7) 試験期間中の気象状況（気温、降水量等）
試験結果に影響を及ぼしたと考えられる降雨等の状況については詳細な記録及び考察
- (8) その他の農薬の使用の有無
- (9) たばこの製造工程及び保管条件に関する情報
- (10) 調査方法
- (11) 試験結果
 - ① 喫味への影響の有無
 - ② 考察
 - ③ その他評価に必要と判断される事項

周辺作物に対する薬害に関する試験 (1-2-1~3)

漂流飛散による薬害試験 (1-2-1) 及び
水田水の流出による薬害試験 (1-2-2)

1. 試験方法について

- (1) 試験は、科学的評価が可能であればポットでもよい。
- (2) 試験は、登録申請を行う使用方法及び申請最高薬量（濃度）で行い、無処理区を設ける。

2. 報告事項について

試験成績報告書には、原則として以下の項目が記載されていること。

- (1) 試験実施機関及び試験担当者（所属）
- (2) 試験目的
- (3) 被験物質に関する情報
農薬名（コード番号でもよいが、登録申請時の農薬名との関連を明らかにする）、ロット番号等
- (4) 供試農作物について
 - ① 農作物名（品種）
 - ② 農作物に関する情報（生育状況、栽培条件等）
- (5) 区制等
- (6) 農薬の処理方法（処理年月日、処理時の作物の生育ステージ、処理器具、希釈倍数、処理量、処理法、処理回数、展着剤添加の有無等）
- (7) その他の農薬の使用の有無
- (8) 調査方法（方法、時期、回数等）
- (9) 試験結果
 - ① 薬害の有無及びその状態並びに程度（草丈の測定値等）、回復の程度等
 - ② 考察
 - ③ その他評価に必要と判断される事項

揮散による薬害試験（1-2-3）

1. 試験方法について

- (1) 試験は、登録申請に係る使用方法を考慮して行い、無処理区を設ける。
- (2) 供試作物及び試験方法については被験物質の特性等により異なるが、一例としてキュウリ苗を用いたトンネル試験法を示す。
 - ① 供試植物：鉢植えの~~5~~5葉期以下の苗 5鉢
 - ② 供試薬剤：製剤
 - ③ 試験方法：高さ40cm、巾30cm、長さ3mのポリエチレンフィルム製カマボコ型トンネル内に鉢植えキュウリ苗を50cm間隔に設置し、一方の入り口に供試薬剤20gと水1ℓを入れたホーロー製バットをおき、ファンで送風する。
 - ④ 試験期間：処理を3日間行った後、キュウリ苗をトンネルから出し、7日間観察する。

2. 報告事項について

試験成績報告書には、原則として以下の項目が記載されていること。

- (1) 試験実施機関及び試験担当者（所属）
- (2) 試験目的
- (3) 被験物質に関する情報

- 農薬名（コード番号でもよいが、登録申請時の農薬名との関連を明らかにする）、
ロット番号等
- (4) 供試農作物について
 - ① 農作物名（品種）
 - ② 農作物に関する情報（生育状況、栽培条件等）
 - (5) 区制等
 - (6) 農薬の処理方法（処理年月日、処理時の作物の生育ステージ、希釈倍数、処理量、処理法等）
 - (7) その他の農薬の使用の有無
 - (8) 調査方法
 - (9) 試験結果
 - ① 薬害の有無、その状態及び程度（草丈の測定値等）、回復の程度等
 - ② 考察
 - ③ その他評価に必要と判断される事項

後作物に対する薬害に関する試験

後作物薬害試験（1－3）

- 1. 供試作物について
慣行の方法に従って栽培する。
- 2. 試験方法について
 - (1) 試験は、科学的評価が可能であればポットでもよい。
 - (2) 試験は、登録申請を行う使用方法及び申請最高薬量（濃度）で処理した土壌を用い、土壌処理除草剤等処理直後では影響が明らかな場合、慣行栽培で後作物の栽培が開始される時期までエージングした後、後作物を栽培する。
- 3. 報告事項について
試験成績報告書には、原則として以下の項目が記載されていること。
 - (1) 試験実施機関及び試験担当者（所属）
 - (2) 試験目的
 - (3) 被験物質に関する情報
農薬名（コード番号でもよいが、登録申請時の農薬名との関連を明らかにする）、
ロット番号等
 - (4) 供試農作物について
 - ① 農作物名（品種）
 - ② 農作物に関する情報（生育状況、栽培条件等）
 - (5) 区制等
 - (6) 農薬の処理方法（土壌の種類、農薬の処理年月日、農薬の処理量、処理方法、土壌のエージングの条件、後作物処理年月日、処理時の生育ステージ等）
 - (7) その他の農薬の使用の有無
 - (8) 調査方法

(9) 試験結果

- ① 被害の有無、その状態及び程度（草丈の測定値等）、回復の程度等
- ② 考察
- ③ その他評価に必要と判断される事項

<毒性に関する試験>

急性経口毒性試験～催奇形性試験（2-1-1～18）

1. 供試動物について

- (1) 供試動物は原則として起源が既知であり、健康で若い成熟した動物を用いる。
- (2) 試験開始前に実験環境に適度に馴化させる。通常、試験開始前少なくとも5日間は、実験室条件で馴化させる（一般には1週間を馴化期間としている）。その後供試動物を無作為に試験群に割り付ける。
- (3) 各試験群への供試動物の割り付けに際しては、供試動物の体重範囲を、各性別に平均体重の±20%以内となるよう留意する。
- (4) 試験開始時の週（月）齢は、げっ歯類では8週齢、非げっ歯類では9か月齢を超えないことが望ましい。
- (5) 動物管理において、有意義な結果を得るために厳重に環境条件をコントロールする。特に長期に飼育する場合は温度、湿度、換気等の環境条件を適切に保ち、感染症を発生させないように注意する。
- (6) 動物飼育室の温度は、げっ歯類は22℃±3℃、ウサギでは20℃±3℃、相対湿度は30～70%、照明は人工照明の場合は12時間点灯、12時間消灯とする。餌は一般に実験室で汎用する飼料を用い、飲料水は制限せず必要なだけ与える。

2. 投与方法について

- (1) 反復投与の場合、供試動物に投与する限界用量の1,000mg/kg体重相当量は、混餌投与の場合、およそ、ラットで20,000ppm、マウスで7,000ppm、イヌで40,000ppmに相当する。
(IPCS EHC Criteria No. 70, WHO (1987))
- (2) 被験物質を懸濁液として強制経口投与する場合の投与量は、通常、水では20ml/kg体重以下、その他の溶媒では10ml/kg体重以下とする。

3. 観察期間等について

測定又は検査時期に用いている1か月は4週、3か月は13週を意味する。

4. 被験物質の摂取量について

被験物質を飼料又は飲料水に混合して投与する場合には、投与期間中、個別又は群ごとに摂餌量（飲水投与の場合は、摂水量）を測定し、その消費量から被験物質の摂取量を算出する。

5. 無毒性量（No Observed Adverse Effect Level, NOAEL）について

無毒性量は主として、長期反復投与による試験結果から導き出されるもので「動物に対して何ら毒性変化の認められない、被験物質の最高投与量」と定義され、1日当たりの用

量 (mg/kg/day) で表す。

なお、類似の用語として「動物に対して何ら影響が認められない被験物質の最高投与量」(無影響量、No Observed Effect Level、NOEL)がある。

多くの場合、無毒性量と無影響量の値は一致するが、毒性学的にみて意味をもたない変化、又は変動が観察された場合は無影響量の方が低い値を示す場合がある。

急性経口毒性試験 (2-1-1)

1. 投与方法について

- (1) 被験物質を適当な溶媒に溶解又は懸濁する場合、まず水により検討する。次にその他の溶媒により検討する。
- (2) 投与が1回で行えない場合は、24時間以内に分割して投与してもよい。
- (3) 被験物質投与前の絶食の程度は、ラットでは投与前に一晚、代謝速度が速い他のげっ歯類ではより短い絶食期間が適当である。例えば、マウスの場合3~4時間の投与前絶食が適当である。また、被験物質投与後3~4時間は餌を与えない。

2. 観察期間について

観察期間は、反応速度、発現頻度又は回復期間の長さによって、必要なら延長も考慮する。特に、投与から死亡までが長い場合には14日以上観察する。投与後から毒性徴候が現れるまでの時間、消えるまでの時間及び死亡までの時間が重要である。

3. 動物数及び試験群の設定について

感受性の確認のため、他方の性1群に対する投与量はLD₅₀相当量とする。

4. その他

- (1) LD₅₀の算出には、一般に使用されているいずれの方法(文献(1)-(7)参照)を用いてもよい。
- (2) OECDガイドライン423「Acute Oral Toxicity:Acute Toxic Class Method」(以下「毒性等級法」という)やOECDガイドライン425「Acute Oral Toxicity:Up-and-Down Procedure」(以下「上げ下げ法」という)等の他の急性毒性試験法により、おおよそのLD₅₀が算出され、十分な毒性情報が得られれば、これらの試験方法を急性毒性試験の代替としてもよいが、以下に示す事項に留意する。
 - ① 毒性等級法でLD₅₀が5mg/kg以上であると推測される場合、30mg/kgの投与によるおおよそのLD₅₀の範囲を確認し、中毒症状を示す用量の確認をする。
 - ② 上げ下げ法により2日目以降の遅発性の死亡が認められる場合、追加試験が望まれる。一方の性のみの成績の場合、他方の性での試験も必要である。
 - ③ OECDガイドライン420「Acute Oral Toxicity:Fixed Dose Method」の場合、30mg/kgの投与によるおおよそのLD₅₀の範囲を確認できないことから、本試験の目的を十分には達成しないものと考えられる。

5. 報告書について

報告書には原則として以下の内容が記載されていること。

- (1) 被験物質に関する情報

被験物質の名称、略称又はコード番号、化学名、CAS 番号（既知の場合）、純度及び安定性等の物理化学的性質

溶媒等を用いた場合には、名称及び選択理由

(2) 供試動物に関する情報

動物種、系統、齢、性、供給源、1 群当たりの匹数、開始時の個体別体重、飼育条件（飼育環境、飼料の品質及び水質）等

(3) 試験条件に関する情報

被験物質の調製方法、用量設定理由、投与方法及び期間、投与量等

(4) 試験結果

一般状態の種類・程度・持続時間、体重、性・用量ごとの毒性反応データ（期間中に死亡又は屠殺した動物数、毒性徴候を示した動物数等）、投与期間中及び投与後の死亡時間、剖検所見、病理組織学的所見、その他検査所見、統計処理方法・結果等

(5) 考察及び結論

性別の LD_{50} 値、 LD_{50} の 95 % 信頼限界値、用量-死亡曲線及び勾配等（算出法により可能な場合）

(6) 参考文献

6. 文献

- (1) Bliss, C.I., Quart. J. Pharm. Pharmacol., 11, 192-216, 1938.
- (2) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., J. Pharmacol. Exp. Ther. 96, 99-113, 1949.
- (3) Finney, D.G., Probit Analysis. (3rd Edn.) London, Cambridge University Press, 1971.
- (4) Weil, C.S., Biometrics, 8, 249-263, 1952.
- (5) Weil, C.S., Drug Chem. Toxicol. 6, 595-603, 1983.
- (6) Thompson, W., Bact. Rev., 11, 115-141, 1947.
- (7) Miller, L.C. and Tainter, M.L., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. NY, 57, 246-264, 1944.

急性経皮毒性試験（2-1-2）

急性経口毒性試験（2-1-1）に準ずる。

急性吸入毒性試験（2-1-3）

1. 暴露方法について

- (1) 原則として、被験物質をそのまま暴露に供するが、被験物質を吸入装置内に適切に発生させるために、必要に応じて適当な溶媒に溶解又は懸濁したり、粉剤の粒子径をより小さくするために粉碎又は発生の時点で媒体を使用する場合もある。
- (2) 鼻部（頭部）暴露法は比較的少ない被験物質で試験を実施できること、非吸入経路での吸収が少ないこと、試験実施者にとっても安全性が高いこと等の理由から、広く用いられるようになっている。
- (3) 暴露中に吸入装置内が低酸素状態にならないように留意する。全身暴露では換気回数が 12 回以上/時間、鼻部暴露では動物の呼吸換気量の合計の 2 倍以上の空気流量が必要である。
- (4) 暴露濃度は、暴露期間中に 3 回以上実際に動物が吸入する領域からサンプリングし測定する。原則として化学分析を実施する。

- (5) 粒子径は、暴露期間中に少なくとも1回実際に動物が吸入する領域からサンプリングして、重量分析又は化学分析を実施し、空気力学的質量中位径 (MMAD) 及び幾何標準偏差 (GS あるいは σg) を算出する。
- (6) 吸入可能な粒子径として、以前は鼻腔に吸入される 10 又は 15 μm が目安とされていたが、近年は気管支に到達するとされる 4 μm が一つの基準となっている。
MMAD は 1-4 μm が望ましいが、被験物質によっては 4 μm 以下にすることが難しい場合が考えられる。このような場合は、分析結果から、4 μm 以下の粒子が含まれる割合 (%) を算出する。
- (7) 吸入装置内濃度は連続してモニターし、暴露時間の起点は暴露を開始してから濃度が安定するまでの時間を考慮し決定する。
- (8) 暴露中の吸入装置内温湿度は飼育環境と同様であることが望ましい (高濃度の暴露を除く)。

2. 観察期間について

急性経口毒性試験 (2-1-1) に準ずる。

3. 観察及び検査について

- (1) 一般状態の観察では、暴露部位が気道であるため呼吸の変化等に注意が必要である。
- (2) 剖検では、被験物質の暴露部位である呼吸器系臓器に留意する。

4. 報告書について

報告書には原則として以下の内容が記載されていること。

- (1) 被験物質に関する情報
急性経口毒性試験 (2-1-1) に同じ。
- (2) 供試動物に関する情報
急性経口毒性試験 (2-1-1) に同じ。
- (3) 試験条件に関する情報
被験物質の調製方法、用量設定理由、暴露方法、暴露装置及び測定装置、濃度測定 (実測濃度及び名目濃度の算出)、吸入装置内温湿度測定、吸入装置内の気流に関する情報 (流量、換気回数等)、粒子径分布 (MMAD、GS)、呼吸可能な粒子の割合等
- (4) 試験結果
急性経口毒性試験 (2-1-1) に同じ。
- (5) 考察及び結論
性別の LC_{50} 値、 LC_{50} の 95 % 信頼限界値、用量-死亡曲線及び勾配等 (算出法により可能な場合)
- (6) 参考文献

皮膚刺激性試験 (2-1-4)

1. 投与方法について

- (1) 被験物質を皮膚に適用する際、毛周期を選び緻密に毛生する部位を避ける。
- (2) 液状の被験物質を未希釈で適用できない場合は、実使用最高濃度の希釈液を用いる。

2. 報告書について

報告書には原則として以下の内容が記載されていること。

- (1) 被験物質に関する情報
急性経口毒性試験(2-1-1)に同じ。
- (2) 供試動物に関する情報
急性経口毒性試験(2-1-1)に同じ。
- (3) 試験条件に関する情報
急性経口毒性試験(2-1-1)に同じ。
- (4) 試験結果
一般状態の種類・程度・持続時間、体重、個体・観察時間ごとの刺激データ、観察された全ての病変、観察された刺激の程度及び状態、その他すべての毒作用等
- (5) 考察及び結論
- (6) 参考文献

眼刺激性試験(2-1-5)

1. 投与方法について

- (1) 液状の被験物質を未希釈で適用できない場合は、実使用最高濃度の希釈液を用いる。
- (2) 投与開始時に投与量を算出できない場合、例えば、エアロゾルの試験ではウサギの眼の大きさの窓を通して、あらかじめ秤量しておいた紙に噴射し、その増加量から概算する。また、揮発性物質の場合は使用前後の容器の重量から概算する。
洗眼効果確認のため、洗眼を行う場合には、通常、微温湯水又は生理的食塩水を用いる。

2. 報告書について

報告書には原則として以下の内容が記載されていること。

- (1) 被験物質に関する情報
急性経口毒性試験(2-1-1)に同じ。
- (2) 供試動物に関する情報
急性経口毒性試験(2-1-1)に同じ。
- (3) 試験条件に関する情報
急性経口毒性試験(2-1-1)に同じ。
- (4) 試験結果
皮膚刺激性試験(2-1-4)に同じ。
- (5) 考察及び結論
- (6) 参考文献

皮膚感作性試験(2-1-6)

1. 試験方法について

原体では Guinea pig Maximization Test(以下「GPM法」という)、製剤では Buehler 法が推奨

される。

2. 陽性対照群について

陽性対照群の代替とする背景データは、定期的実施されたものに改訂することが推奨される。また、試験施設において、基本的な試験条件（系統、餌、飼育条件、実験者等）を変えた場合には、新たに背景データを作成する必要がある。

3. GPM 法について

(1) 用量の設定

予備試験では、無処置動物又は Freund's complete adjuvant(以下「FCA」という。)の処理を行った動物を使用する。

(2) 初回感作（皮内注射による）

注射 1 及び注射 2 は互いに近接して試験区画の頭側に、注射 3 は尾側の位置に行う。

注射 3 では水溶性物質は FCA と混合する前に水層に溶かす。脂溶性物質又は不溶性物質は水層と混合する前に FCA に懸濁する。被験物質濃度は注射 2 と等しくする。

(3) 観察

剃毛後、必要があればさらに化学的に除毛しても良いが、なるべく刺激性を誘起しないものを選択する。

(4) 再惹起

再惹起のための対照群を新たに設けることが適切であるものの、初回惹起濃度が感作反応を誘発する濃度ではなく、再惹起の結果に影響を与えないと判断される場合には、初回惹起に用いた動物を用いてもよい。

4. Buehler 法について

被験物質の調製では、被験物質が水溶性の場合、水又は希釈された刺激性のない界面活性剤溶液を溶媒として使用する。感作性に関する情報のない界面活性剤を使用する場合、溶媒の感作性を考慮し、感作時と惹起時で溶媒を変えてもよい。それ以外では、感作には 80 % エタノール水溶液、惹起にはアセトンを用いることが望ましい。

5. 報告書について

報告書には原則として以下の内容が記載されていること。

(1) 被験物質に関する情報

急性経口毒性試験（2-1-1）に同じ。

(2) 供試動物に関する情報

急性経口毒性試験（2-1-1）に同じ。

(3) 試験条件に関する情報

急性経口毒性試験（2-1-1）に同じ。

(4) 試験結果

一般状態の種類・程度・持続時間、体重、個体・観察時間ごとの感作データ、観察された作用の性質及び程度、その他すべての毒作用、陽性対照物質による試験結果等

(5) 考察及び結論

(6) 参考文献

急性神経毒性試験（2-1-7）及び 反復経口投与神経毒性試験（2-1-12）

1. 投与方法について

- (1) 反復経口投与神経毒性試験の場合、被験物質が飼料（飲水）中で不安定である場合、飼料（飲水）中の被験物質の分析が困難である場合又は飼料（飲水）が忌避される場合等は強制経口投与を行ってもよい。
- (2) 被験物質をゼラチンカプセルに封入して投与してもよい。

2. 投与期間について

反復経口投与神経毒性試験における投与期間は、通常、90日間である。しかし90日間反復経口投与神経毒性試験における無毒性量が一般毒性の無毒性量に近似している等の場合には、1年間反復経口投与神経毒性試験も必要になる。

3. 観察及び検査について

(1) 詳細な状態の観察及び機能検査について

- ① 熟練した観察者（少なくとも過去に一度以上、陽性対照物質を用いて神経毒性試験における状態の観察を行った経験のある者）が、観察及び検査を注意深く行い、適切に記録する。原則として、1つの試験の中では、同一人物が、観察及び検査を一貫して行うことが望ましい。

また、結果に先入観が入るのを防ぐために、投与内容についての情報を分からないようにして観察及び検査を行うこと（ブラインド試験）も考慮する。

- ② 観察及び検査に当たっては、被験物質の投与以外の要因（注）が、動物の行動に影響を与えないように配慮する。また、観察順は動物に対する刺激が弱い項目から順次検査するように配慮する。
- ③ 詳細な状態の観察では全身状態や行動の変化を客観的、定量的に把握することを求めている。このために、試験実施に先立って、試験機関ごとに各項目の判断基準と採点基準及び標準的な観察手順を定めておく必要がある。
- ④ 詳細な状態の観察項目は、指針に列挙したものに限定しない。予備試験及びその他の毒性試験で、例示した以外の項目に異常が見られた場合には、それらも積極的に観察することが望ましい。
- ⑤ 機能検査のうち感覚運動反応の検査は、詳細な状態の観察の過程で実施してもよい。
- ⑥ 機能検査における自発運動量測定では、動物が環境（測定ボックス）に慣れた後の運動量も評価できるような期間、測定時間を区切って実施することが望ましい。（例えば、動物を装置の測定ボックスに収容した直後から10分間隔で1時間の測定をする等）。
- ⑦ 本指針では、他の毒性試験、構造活性相関等で神経毒性が疑われた又は認められた神経毒性を精査するのに適した感覚機能試験、運動機能試験、学習・記憶試験を神経毒性試験に盛り込むように求めている。

精査するための試験方法は、測定機器を用いる方法が望ましいが、生存期の動物に適さない場合もあるので、採用に当たり考慮が必要である。試験法の採用に当たっては文献(1)を参照することが望ましい。

なお、学習・記憶に関連した領野に、被験物質投与に起因する病理組織学的変化が認められた場合には、学習・記憶試験を行うことが望ましい。

注：行動に影響を与え得る要因には、騒音レベル、室温、湿度、照度、臭気度、検査時刻及び環境変動等がある。

(2) 眼科学的検査について

90日間以上の試験では、眼科学的検査を実施する必要があるが、検査は通常、肉眼的及び検眼鏡的に前眼房・中間透光体・眼底のそれぞれについて行う。検査期間及び用量の類似した他の試験の検査結果があれば、それを検査結果とすることができる。

(3) その他

詳細な状態の観察、機能検査、病理組織学的検査に関して、試験施設は陽性対照データを用いて、検査の信頼性を示す必要がある。陽性対照データには背景データを用いてもよい。

なお、背景データは、定期的（1年に1回程度）に改訂することが推奨される。また、試験施設において、基本的な試験条件又は試験実施者等を変えた場合には、新たに背景データを作成する必要がある。

陽性対照物質に関する情報は、文献(2)～(10)から得ることができる。

4. 結果の評価について

本試験で認められた影響は、機能神経学的影響と神経病理組織学的影響との間の調和を図ると同時に、観察された他の毒性学的影響とも関連付けて評価すること。

5. 報告書について

報告書には原則として以下の内容が記載されていること。

(1) 被験物質に関する情報

急性経口毒性試験(2-1-1)に同じ。

(2) 供試動物に関する情報

急性経口毒性試験(2-1-1)に同じ。

(3) 試験条件に関する情報

被験物質の調製方法、用量設定理由、暴露経路及び期間、被験物質摂取量(mg/kg/day)、灌流固定に用いた動物の振り分けの詳細、詳細な状態の観察に用いた採点法の詳細、機能検査方法の詳細、評価に用いた検査手順等

(4) 試験結果

一般状態の種類・程度・持続時間、体重、性・用量ごとの死亡を含む毒性反応データ、詳細な状態の種類・程度・持続時間、機能検査の結果の詳細、可逆的又は非可逆的、剖検所見、病理組織学的及び行動学的所見、その他の検査所見、統計処理方法・結果等

(5) 考察及び結論

用量一反応、他の毒性影響と神経毒性の関連、無毒性量、総合的な神経毒性についての記述等

(6) 参考文献

6. 文献

(1) OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris In Preparation.

- (2) Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In Preparation.
- (3) World Health Organization WHO (1986). Environmental Health Criteria Document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals.
- (4) Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (1980). Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds. Williams and Wilkins. Baltimore/London.
- (5) Tupper D.E. and Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40, 999-1003.
- (6) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health 9, 691-704.
- (7) Maser V.C., McDaniel, K.M. and Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108, 267-283.
- (8) Meyer O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. and Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1, 233-236.
- (9) Crofton K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, L.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13, 599-609.
- (10) Tilson, H.A., and Mitchell, C.L. eds. (1992). Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York

急性遅発性神経毒性試験（2-1-8）及び 28日間反復投与遅発性神経毒性試験（2-1-13）

本試験は、行動観察、生化学的検査及び病理組織学的検査により、農薬の遅発性神経毒性の有無及び無毒性量を求めることを目的としている。

遅発性神経毒性とは、遅延して発現する運動失調、脊髄と末梢神経の遠位軸索障害及び神経組織でのNTE (neuropathy target esterase 又は neurotoxic esterase) の阻害とエージングに関連した一連の徴候のことである。

エージングとは、NTEの活性部位のリン酸化に引き続き起こる、ホスホリル基とNTE結合複合体形成のことをいう。

1. 供試動物について

均一性及再現性のある結果を得るために標準的な大きさの成熟した系統の明らかな雌のニワトリを使用する。また、使用する動物は神経侵襲性の疾患に感染されていないことが重要である。

2. 投与方法について

被験物質の投与は、通常、胃管、ゼラチンカプセル又はそれらに匹敵する方法を用いて行う。

3. 試験群の設定について

(1) 予備試験について

本試験では死亡がみられない程度で可能な限り高い用量を投与しなければならない。また、試験結果の解釈のためには死亡が生じた場合でも最終的に各検査に必要な動物数が確保されていなければならない。このことを踏まえ、本試験での用量設定のために、適当な動物数と用量段階を用いた予備試験を行う。予備試験では死亡する用量も一般的には必要である。

さらに、急性コリン作動性神経興奮による死亡を防ぐために保護剤を使用する場合は、保護剤使用条件下での最大非致死量を保護剤の投与量、投与回数等を含めて検討する必要がある。保護剤は、本試験においても同じ目的で投与されることがある。

(2) 陽性対照群について

急性遅発性神経毒性試験には陽性対照群が必要である。陽性対照群は既知の遅発性神経毒性物質を用いて本試験と同時に試験を実施するか、又は最近の背景データを提出し陽性対照群とすることができる。

なお、背景データは、定期的（1年に1回程度）に改訂することが推奨される。また、試験施設において、基本的な試験条件又は試験実施者等を変えた場合には、新たに背景データを作成する必要がある。

既知の遅発性神経毒性物質には、用量と行動学的異常及び NTE 活性阻害の関係が調べられているものを用いればよい。広く用いられているものにトリ-O-クルゾールホスフェート (TOCP) がある。

4. 観察及び検査について

(1) 一般状態の観察について

観察には行動異常、歩行失調、麻痺を含まなければならないが、これらに限定するものではなく、あらゆる毒性徴候を注意深く観察し記録すること。また、遅発性神経毒性本試験では神経症状の発現の有無の確認が重要であるため、ケージ内のみの観察では不十分である。従って、少なくとも1週間に2回、ニワトリをケージの外に出して、一定期間はしご登り等の強制運動をさせて詳細に観察する。

運動失調は4段階以上からなる判定基準に基づき評価しなければならないので、試験実施機関では試験に先立って判定基準を作成しておく必要がある。判定基準については、文献(1)が参考になる。

(2) 生化学的検査について

NTE 活性とは、基質の phenylvalarate を加水分解する酵素活性のうち、特に遅発性神経毒性を誘発しない paraoxon で阻害されないが、遅発性神経毒性を誘発する mipafox で阻害されるエステラーゼ活性をいう。

NTE 活性の測定は、TOCP を用いた場合に、適切な結果を示す方法であれば、それを用いてよい。それには、文献(2)から(5)までが参考になる。

脳及び腰脊髄の採取時間を決定するのに当たり、被験物質が緩慢に消失するかどうかは、コリン作動性症状の開始を観察し判断する。

採取部位は脳と腰脊髄であるが、さらに坐骨神経を含めることも有用である。アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 活性の測定が評価の助けとなることもあるが、AChE 活性は、in vitro において自然に再活性化を起こすことがあるので、被験物質の AChE 阻害作用が過小評価されることに留意する。

5. 結果の評価について

試験で得られた所見について、試験群と対照群のそれぞれにみられた行動学的、生化学的及び病理組織学的変化の発生率、程度及び相互関係その他の観察された変化について評価する。

なお、NTE 活性を阻害する有機リン化合物のすべてが遅発性神経毒性を誘発するわけではないが、遅発性神経毒性を誘発する有機リン化合物のほとんどは NTE 活性を阻害する。

(例外、2,4,5-trichlorophenyl ether phosphonotioate は NTE 活性の抑制はないが、遅発性神経毒性を誘発する。)

6. 報告書について

報告書には原則として以下の内容が記載されていること。

- (1) 被験物質に関する情報
急性経口毒性試験 (2-1-1) に同じ。
- (2) 供試動物に関する情報
急性経口毒性試験 (2-1-1) に同じ。
- (3) 試験条件に関する情報
被験物質の調製方法、用量設定理由、暴露経路及び期間、被験物質摂取量 (mg/kg/day) 等
- (4) 試験結果
一般状態の種類・程度・持続時間、体重、用量ごとの死亡を含む毒性反応データ、可逆的又は非可逆的、生化学的検査の方法及び所見、剖検所見、病理組織学的所見、その他の検査所見、統計処理方法・結果等
- (5) 考察及び結論
- (6) 参考文献

7. 文献

- (1) Roberts, N.L., Fairley, C., Phillips, C. (1983) Screening acute delayed and subchronic neurotoxicity studies in the hen: Measurements and evaluations of clinical signs following administration of TOCP. Neurotoxicol 4, 263-270
- (2) Johnson, M.K.: Archives of Toxicology, 37, 113-115 (1977)
- (3) Johnson, M.K.: Reviews in Biochem. Toxicology, 4, 141-212 (1982)
- (4) Johnson, M.K., Richardson, R.J.: Neurotoxicology, 4, 311 - 320, 1983
- (5) Soliman, SA et al.: J. Toxicol. Env. Hlth, 9, 189-197, 1982

90 日間反復経口投与毒性試験 (2-1-9)

1. 投与方法について

- (1) 被験物質が飼料 (飲水) 中で不安定である場合、飼料 (飲水) 中の被験物質の分析が困難である場合又は飼料 (飲水) が忌避される場合等は強制経口投与を行ってもよい。
- (2) 被験物質をゼラチンカプセルに封入して投与してもよい。
- (3) 長期試験の用量設定根拠とする場合には、長期試験と同じ投与方法で実施すること。

2. 投与期間について

各週ごとの投与日数は、原則として週7日とする。なお、強制経口投与の場合は、週5日も容認される。

3. 動物数及び試験群の設定について

毒性徴候の回復状況等を観察するための衛星群を設けてもよい。なお、衛星群の規模は、げっ歯類では雌雄各5匹以上、非げっ歯類では雌雄各4匹とし、投与終了後もさらに28日間以上飼育する。

4. 観察及び検査について

- (1) 詳細な状態の観察、機能検査については神経毒性試験を参照すること。
- (2) 被験物質を飼料又は飲料水に混入して投与する場合には、投与期間中、摂餌量（飲水投与の場合は、摂水量）を測定し、その消費量から被験物質の摂取量を算出する。摂餌（摂水）量の測定は、げっ歯類の場合、個別又は群ごとのいずれかによって行ってもよい。また、投与開始前の測定は必要に応じ行うこと。
- (3) げっ歯類の尿検査は、個別別又は雌雄各群ごとのいずれの方法で行ってもよい。
- (4) 眼科学的検査は通常、肉眼的及び検眼鏡的に行い、前眼房・中間透光体・眼底のそれぞれについて実施する。
- (5) 生殖器官への影響が考えられる場合、高用量群以外の投与群における全臓器の病理組織学的検査が評価の助けになる。
- (6) 神経系に対する影響としては、詳細な状態観察・機能検査における特異的な神経症状及び脳、坐骨神経、脊髄等の神経細胞変性、軸索変性等の病理組織学的変化が挙げられる。
- (7) 免疫系に対する影響としては、胸腺萎縮、脾臓重量の増加等臓器重量の変化及びリンパ系臓器の肥大やリンパ球増生等の病理組織学的変化のような免疫系組織の異常が挙げられる。
- (8) 免疫系に対する影響が認められた場合、通常被験物質の1か月間反復経口投与後に免疫学的検査を行う。試験の実施に当たっては、下記文献等を参照すること。
- (9) 内分泌系に対する影響としては、副腎、精巣、卵巣、甲状腺・上皮小体、下垂体等内分泌系臓器の重量変化、内分泌系臓器の萎縮、変性、壊死又は肥大等の病理組織学的変化が挙げられる。

5. 結果の解析

得られた成績を表又は図で示し、考察を加える。表示方法としては、全群の成績を概括する総括表を作成するほか、群ごとに個々の動物のデータを記した表も作成し、必要に応じて参照できるようにしておく。

観察結果は、適切な統計方法によって解析する。統計方法は、試験の計画段階で選択する。

6. 報告書について

報告書には原則として以下の内容が記載されていること。

- (1) 被験物質に関する情報
急性経口毒性試験（2-1-1）に同じ。

- (2) 供試動物に関する情報
急性経口毒性試験(2-1-1)に同じ。
- (3) 試験条件に関する情報
被験物質の調製方法、用量設定理由、投与方法及び期間、被験物質摂取量(mg/kg/day)等
- (4) 試験結果
一般状態の種類・程度・持続時間、体重、摂餌量(摂水量)、性・用量ごとの死亡を含む毒性反応データ、詳細な状態の種類・程度・持続時間、機能検査結果の詳細、可逆性又は非可逆性、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、眼科学的検査、剖検所見、臓器重量、病理組織学的所見、その他検査所見、統計処理方法・結果等
- (5) 考察及び結論
- (6) 参考文献

7. 文献

- (1) US EPA OPPTS (1998) Health Effect Test Guideline, OPPTS870.7800 Immunotoxicity

21日間反復経皮投与毒性試験(2-1-10)

1. 投与期間について

各週ごとの投与日数は、原則として週7日とする。なお、やむを得ない場合は、週5日も容認される。

2. 動物数及び試験群の設定について

毒性徴候の回復状況等を観察するための衛星群を設けてもよい。なお、衛星群の規模は、雌雄各5匹以上とし、投与終了後もさらに14日間以上飼育する。

3. 結果の解析について

得られた成績を表又は図で示し、考察を加える。表示方法としては、全群の成績を概括する総括表を作成するほか、群ごとに個々の動物のデータを記した表も作成し、必要に応じて参照できるようにしておく。

観察結果は、適切な統計方法によって解析する。統計方法は、試験の計画段階で選択する。

4. 報告書について

報告書には原則として以下の内容が記載されていること。

- (1) 被験物質に関する情報
急性経口毒性試験(2-1-1)に同じ。
- (2) 供試動物に関する情報
急性経口毒性試験(2-1-1)に同じ。
- (3) 試験条件に関する情報
90日反復経口投与毒性試験に同じ。
- (4) 試験結果
一般状態の種類・程度・持続時間、体重、摂餌量、性・用量ごとの死亡を含む毒性

反応データ、可逆的又は非可逆的、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検所見、臓器重量、病理組織学的所見、その他検査所見、統計処理方法・結果等

(5) 考察及び結論

(6) 参考文献

90日間反復吸入毒性試験(2-1-11)

1. 暴露方法について

(1) 全身暴露型又は鼻部暴露型吸入装置を用いる。

(2) 吸入装置内では3か月間の実測濃度の平均値が設定濃度の±20%以内となるように発生させる。

(3) 詳細については、急性吸入毒性試験を参照のこと。

2. 動物数及び試験群の設定について

毒性徴候の回復状況等を観察するための衛星群を設けてもよい。なお、衛星群の規模は、雌雄各10匹以上とし、投与終了後もさらに28日間以上飼育する。

3. 観察及び検査について

(1) 一般状態の観察では、暴露部位が気道であるため呼吸の変化等に注意が必要である。

(2) 剖検では、被験物質の暴露部位である呼吸器系臓器に留意する。

4. 結果の解析について

得られた成績を表又は図で示し、考察を加える。表示方法としては、全群の成績を概括する総括表を作成するほか、群ごとに個々の動物のデータを記した表も作成し、必要に応じて参照できるようにしておく。

観察結果は、適切な統計方法によって解析する。統計方法は、試験の計画段階で選択する。

5. 報告書について

報告書には原則として以下の内容が記載されていること。

(1) 被験物質に関する情報

急性経口毒性試験(2-1-1)に同じ。

(2) 供試動物に関する情報

急性経口毒性試験(2-1-1)に同じ。

(3) 試験条件に関する情報

急性吸入毒性試験に同じ。

(4) 試験結果

一般状態の種類・程度・持続時間、体重、摂餌量、性・用量ごとの死亡を含む毒性反応データ、可逆的又は非可逆的、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、眼科学的検査、剖検所見、臓器重量、病理組織学的所見、その他検査所見、統計処理方法・結果等

(5) 考察及び結論

(6) 参考文献

1年間反復経口投与毒性試験（2-1-14）

本試験は、農薬を長期間かつ反復して投与し哺乳動物に対する慢性的影響を明らかにし、用量-反応関係を把握できることが必要である。

試験の計画と実施に当たっては、神経学的、生理学的、生化学的、血液学的所見及び投与に関連した病理学的所見等、一般毒性の検出を可能にし、無毒性量が得られるようにする必要があり。

1. 投与方法について

- (1) 被験物質が飼料（飲水）中で不安定である場合、飼料（飲水）中の被験物質の分析が困難である場合又は飼料（飲水）が忌避される場合等は強制経口投与を行ってもよい。
- (2) 被験物質をゼラチンカプセルに封入して投与してもよい。
- (3) 本試験を発がん性試験の予備試験として行う場合には、発がん性試験の投与方法に準じて行う。

2. 投与期間について

被験物質の投与は、原則として週7日、1年（52週）以上とする。しかし、強制経口投与の場合、一般的に週5日も容認される。

3. 観察及び検査

- (1) 摂餌（摂水）量の測定は、げっ歯類の場合、個別あるいは群ごとのいずれかによってもよい。また、投与開始前の測定は必要に応じ行うこと。
- (2) げっ歯類の尿検査は、個体別または雌雄各群毎のいずれの方法で行ってもよい。
- (3) 眼科学的検査は通常、肉眼的及び検眼鏡的に行い、前眼房・中間透光体・眼底のそれぞれについて実施する。
- (4) 病理学的検査で、指針に記載した以外に、主要臓器である肺（げっ歯類及び非げっ歯類）、90日間反復経口投与毒性試験における標的器官を含めできるだけ多くの器官の重量を測定しておくことが評価に際し参考となることがある。内分泌系に対する影響を評価する上で、ラットにおける甲状腺・上皮小体、下垂体、子宮、前立腺（腹葉）及び精囊・凝固腺の重量が測定してあると役に立つ。

4. 報告書について

報告書には試験手順の完全かつ正確な記載と結果の評価に必要なすべての情報を含んでいなければならない。報告書にはデータの要約、データの解析及び解析から導き出された結論の説明を入れる必要がある。要約にはデータ又は観察事項及び毒性作用を示唆する対照データとの差違について述べる。

報告書には原則として以下の内容が記載されていること。

- (1) 被験物質に関する情報
急性経口毒性試験に同じ。
- (2) 供試動物に関する情報
急性経口毒性試験に同じ。
- (3) 試験条件に関する情報
90日反復経口投与毒性試験に同じ。

(4) 試験結果

一般状態の種類・程度・持続時間、体重、摂餌量（飲水量）、性・用量ごとの死亡を含む毒性反応データ、可逆性又は非可逆性、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、眼科学的検査、臓器重量、剖検所見、病理組織学的所見、その他の検査所見、統計処理方法・結果等

(5) 考察及び結論

用量一反応、無毒性量

(6) 参考文献

発がん性試験（2-1-15）

本試験の目的は、試験動物の生涯の大半にわたり種々の用量の農薬を投与し、当該農薬摂取に起因する腫瘍性病変の発生を明らかにすることである。

1. 投与方法について

(1) 被験物質が飼料（飲水）中で不安定である場合、飼料（飲水）中の被験物質の分析が困難である場合又は飼料（飲水）が忌避される場合等は強制経口投与を行ってもよい。

(2) 被験物質をゼラチンカプセルに封入して投与してもよい。

2. 投与期間について

被験物質の投与期間は、動物の種・系統における平均寿命を十分考慮して、試験目的を達成するのに必要な期間でなければならない。

一般に試験終了は、ラットでは24か月（104週）以上、マウスでは18か月（78週）以上であるが、ラットでは30か月（130週）、マウスでは24か月（104週）を超えてはいけない。

また、被験物質の投与は原則として週7日とするが、強制経口投与の場合、一般的に週5日も容認される。

3. 試験群の設定について

(1) 試験群には発がん性の用量一反応関係をみる目的で、少なくとも3段階の投与群が必要であるが、用量の設定は試験結果を左右する大きな因子となるので特に注意が必要である。なお、用量設定は必ずしも雌雄同じでなくとも構わない。

(2) 最高用量は、腫瘍以外の原因で対照群に比して有意に死亡率が増加せず、何らかの毒性影響が認められる用量であるが、投与は試験動物の生涯の大半にわたり行われるので設定にあたり十分な注意が必要である。結果として最高用量が低すぎると発がん性を見逃すことになるし、最高用量が高すぎて多くの動物が死亡してしまった場合にも、発がん性は評価できないことになる。そのため最高用量の設定を目的とした予備試験結果を十分に考慮することが重要である。

(3) また、用量段階にも十分な注意が必要である。最高用量で多数の動物が死亡してしまった場合、用量段階がかけ離れていなければ、次の用量が最高用量としての役割を果たしてくれることになるが、次の用量との差を大きくとりすぎていると発がん性を評価する用量としては低く、発がん性を見逃すことになる。そのため3段階の用量はすべて高い用量域に設定するよう求めており、「一般に、最低用量は、最高用量の1

0%より低くてはいけない。」としているのは、その意味である。

4. 観察及び検査について

- (1) 動物の健康状態には十分に注意を払い、死亡動物を発見した場合は速やかに剖検を行うのはもちろんのこと衰弱動物の隔離又は屠殺・剖検等の適切な処置が一刻も早くできるように観察を行う。共食いや自己融解等により病理組織学的検査の不能例が10%を超えた場合には、試験として成立しなくなる可能性もあるので注意を要する。
- (2) 一般状態の観察に当たって、腫瘍の発生には特に注意を払い、腫瘍の発生時期、発生部位、外観（大きさ等）及び進行等について記録する。
- (3) 投与期間中、個別あるいは群ごとのいずれかにより摂餌（摂水）量を測定し、その消費量から被験物質の摂取量を計算する。
投与開始前の摂餌（摂水）量の測定は、必要に応じ行うこと。
- (4) 病理学的検査において、器官の重量が測定されていると評価に際し参考になることもある。

5. 結果の評価について

- (1) 得られた試験結果をもとに、過形成、前癌病変も含め腫瘍性病変について、その発生頻度、用量反応、発生時期等について検討する。
- (2) 発がん性試験の陽性判定基準として、以下のような WHO の判定基準（文献(1)）がある。これらの基準を参考にして試験結果を評価すること。
 - ① 対照群にはみられないタイプの腫瘍発生が認められる場合
 - ② 対照群にみられる腫瘍が、投与群においてより高率に発生した場合
 - ③ 対照群に比べて、より多種類の器官・組織に腫瘍の発生が認められる場合
 - ④ 対照群と投与群の間で腫瘍発生率に差はないが、投与群における腫瘍の発生が対照群に比し、より早期に認められる場合

6. その他

発がん性試験は実験動物を対象として実施されるのであるが、最終目的はその被験物質のヒトにおける危険性若しくは安全性を判断することにある。

ヒトに対して発がん性を示唆する発がん性物質のほとんどは、実験動物にも発がん性を示すという事実から、実験動物による試験が行われている。従って、しかるべき科学的根拠がない場合、「動物に発がん性を示す物質はヒトに対しても同様の作用を示す可能性がある」という立場をとるべきである。

しかしながら、発がん性試験において試験動物に腫瘍性病変を発生させたという事実だけから、被験物質が直ちにヒトにおいても発がん性の危険性があるとみなすのは早計である。ヒトに起こりうる危険性の評価において、現在までに得られているデータを活用して、それに関する多くの重要な因子（例：変異原性、発がん性の作用機序、発がん標的臓器等）を考慮した上で発がん性を評価する必要がある。

従って、発がん性試験において非遺伝毒性によると考えられる発がん性等がみられた場合には、追加試験等により、予想される機序を検討するとともに、適切な指標を用いた発がん性についての無毒性量を検討する必要がある。通常、次のようなステップで検討がなされる。

第一に、その被験物質の動物に対する発がん性の機序を考察する必要がある。被験物質もしくは代謝物が標的細胞の遺伝子を傷害する、いわゆる遺伝毒性発がん物質か、又は遺伝子を直接傷害しない、いわゆる非遺伝毒性発がん物質かを明らかにする。そのためには

必要に応じて、その物質の標的細胞における不定期 DNA 合成、DNA 傷害、付加体形成についての検討、DNA 合成などの細胞増殖活性、二段階発がんモデルを用いたプロモーター作用の検索、内分泌環境への影響等の検討を行うべきである。

第二に、予想される機序による作用がどの程度ヒトに発現するかの推測を行うために、種々の追加試験を実施する必要がある。

また、非遺伝毒性発がん物質の場合、閾値が設定できることから、適切な生体指標（例、DNA 合成や前がん病変など）を用い、低用量での長期試験や中期発がん試験法などを実施し、無毒性量の検討を行う。また、被験物質の活性経路の検索、代謝活性化や解毒機構についての種差の検討、特に代謝活性化がヒトにおいて強く発現することはないか等の情報収集等も重要なことである。

7. 報告書について

報告書には試験手順の完全かつ正確な記載と結果の評価に必要なすべての情報を含んでいなければならない。報告書にはデータの要約、データの解析及び解析から導き出された結論の説明を入れる必要がある。要約にはデータ又は観察事項及び毒性作用を示唆する対照データとの差違についても述べる。

報告書には原則として以下の内容が記載されていること。

- (1) 被験物質に関する情報
急性経口毒性試験に同じ。
- (2) 供試動物に関する情報
急性経口毒性試験に同じ。
- (3) 試験条件に関する情報
90日反復経口投与毒性試験に同じ。
- (4) 試験結果
一般状態の種類・程度・持続時間、体重、摂餌量（飲水量）、性・用量ごとの死亡を含む毒性反応データ、腫瘍の発生部位・時期・外観（大きさ等）、血液学的検査、剖検所見、病理組織学的所見、腫瘍性病変等についての詳細な記述と背景データ、その他の検査所見、統計処理方法・結果等
- (5) 考察及び結論
用量一反応、無毒性量
- (6) 参考文献

8. 文献

- (1) WHO: Technical Report Series No.426 (1969)

1年間反復経口投与毒性/発がん性併合試験（2-1-16）
基本的に、1年間反復経口投与毒性試験、発がん性試験と同様である。

繁殖毒性試験（2-1-17）

1. 供試動物について

被験物質に対する感受性がラットより高いなど、適切な理由がある場合は、ラット以外の動物種を用いてもよい。

2. 投与期間について

P及びF₁雄の屠殺時期は、再交配の必要のないことを確認してから決定する。

3. 交配、同腹児数の調整並びに第二世代 (F₁) の選抜について

淘汰した同腹児は、剖検する。

4. 観察及び検査について

- (1) 生死を毎日少なくとも2回確認するほか、詳細な状態観察を毎週1回実施する。
- (2) 性成熟の観察の指標として、雄は包皮分離、雌は膣開口の日齢などが用いられる。
交配用F₁動物の性成熟に被験物質投与の影響がみられる時は、F₂児について肛門生殖突起間の長さを測るなど、適切な検査を実施する。
- (3) 発情周期の観察は、交配開始後も交尾成立が確認されるまで継続する。発情周期の段階によって子宮重量が著しく変動するので、最終屠殺時にも観察する。膣垢を採取する場合は、偽妊娠を起こさせないように注意する。
- (4) 精子検査は精巣及び精巣上体の片側を使用し、他方の精巣及び精巣上体は病理学的検査用に固定する。精巣上体の精子の形態は、200個以上観察して正常と異常を分類し、正常率あるいは異常率を算出する。
- (5) 精巣は、ブアン液等、精細管の構築保持に適した固定液を用いて検査する。
- (6) 卵巣については、統計的に評価できるように、切片を作製して黄体や発育途中の卵胞の有無を観察し、第二世代 (F₁) については発育卵胞数及び未成熟卵胞数を測定することが望ましい。

5. 結果の解析について

得られた成績を表又は図で示し、考察を加える。表示方法としては、全群の成績を概括する総括表を作成するほか、群ごとに個々の動物のデータを記した表も作成し、必要に応じて参照できるようにしておく。

データの統計学的分析に際しては、離乳期までは各児を独立した標本として扱わず、1腹児を標本単位とすることが望ましい。

考察には、当該試験における親動物の生殖及び出生児の生育における無毒性量 (NOAEL) についての見解を含めること。

6. 報告書について

報告書には原則として以下の内容が記載されていること。

- (1) 被験物質に関する情報
急性経口毒性試験に同じ。
- (2) 供試動物に関する情報
急性経口毒性試験に同じ。
- (3) 試験条件に関する情報
被験物質の調製方法、用量設定理由、投与方法及び期間、投与量、交配方法、哺育児数の調製方法、被験物質摂取量 (mg/kg/day) 等
- (4) 試験結果
 - ① 親動物に対する影響 (一般状態、体重、摂餌量、被験物質摂取量、性成熟、発情周期、妊娠・出産及び哺育状況、精子検査結果、剖検所見、臓器重量、病理組織学的検査、その他検査所見、統計処理方法・結果等)
 - ② 児動物に対する影響 (一般状態、外表異常の有無、産児数、性比、生存児数、体

重、剖検所見、臓器重量、病理組織学的検査、その他検査所見、統計処理方法・結果等)

- (5) 考察及び結論
用量一反応、無毒性量
- (6) 参考文献

催奇形性試験 (2-1-18)

1. 供試動物について

妊娠雌は、個別に飼育する。

2. 投与方法について

被験物質の投与は、毎日ほぼ同じ時間帯に行う。

3. 投与期間について

ウサギで人工授精を行った場合は、人工授精日を妊娠0日として起算する。

4. 動物数及び試験群の設定について

一群当たりの動物数は、通常、ラットでは20匹以上、ウサギでは16匹以上の妊娠動物を用いる。

5. 観察及び検査について

- (1) 母動物の一般状態の観察は、投与期間中は少なくとも被験物質の投与前と投与後の2回実施する。被験物質投与の影響がみられる時は、持続期間等を記録する。
- (2) 着床痕を調査するための子宮染色には、硫化アンモニウム等が用いられる。
- (3) 骨格異常の検査は、ラットでは骨と軟骨について行うことが望ましい。
- (4) 胎盤に肉眼的変化が認められる場合は、ここの生存胎児の胎盤重量を測定する。

6. 結果の解析について

得られた成績を表又は図で示し、考察を加える。表示方法としては、全群の成績を概括する総括表を作成するほか、群ごとに個々の動物のデータを記した表も作成し、必要に応じて参照できるようにしておく。

データの統計学的分析に際しては、1腹児を標本単位とすることが望ましい。

考察には、当該試験における親動物及び胎児に対する無毒性量 (NOAEL) についての見解を含めること。

7. 報告書について

報告書には原則として以下の内容が記載されていること。

- (1) 被験物質に関する情報
急性経口毒性試験に同じ。
- (2) 供試動物に関する情報
急性経口毒性試験に同じ。
- (3) 試験条件に関する情報
被験物質の調製方法、用量設定理由、投与方法及び期間、投与量、交配方法等

(4) 試験結果

- ① 親動物に対する影響（一般状態及び妊娠状況、体重、摂餌量、剖検所見、その他検査所見、統計処理方法・結果等）
- ② 児動物に対する影響（胚・胎児死亡数、生存胎児数、性比、体重、外表・内臓・骨格の奇形学的検査結果、その他検査所見、統計処理方法・結果等）

(5) 考察及び結論

用量一反応、無毒性量

(6) 参考文献

変異原性に関する試験（2-1-19-1～3）

試験法の選択について

「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」又は「げっ歯類を用いる小核試験」のいずれかで結果が陽性又はその疑いがある場合等、さらに検索の必要が認められる場合に追加する試験の代表例を以下に例示する。なお、被験物質の変異原性を適切に評価できる場合には、これ以外の試験を用いてもよい。

1 遺伝子突然変異を指標とする試験

- (1) ほ乳類培養細胞を用いる遺伝子突然変異試験
- (2) ショウジョウバエを用いる遺伝子突然変異試験
- (3) げっ歯類（トランスジェニック動物を含む。）を用いる遺伝子突然変異試験

2 染色体異常を指標とする試験

- (1) げっ歯類の骨髄細胞を用いる染色体異常試験
- (2) げっ歯類の生殖細胞を用いる染色体異常試験
- (3) げっ歯類を用いる優性致死試験

3 DNA 損傷を指標とする試験

- (1) 細菌を用いる DNA 修復試験（Rec-assay など）
- (2) 細菌を用いる umu テスト
- (3) ほ乳類の細胞を用いる不定期 DNA 合成（UDS）試験
- (4) ほ乳類の細胞を用いる姉妹染色分体交換（SCE）試験
- (5) ほ乳類の細胞を用いるコメットアッセイ

復帰突然変異試験（2-1-19-1）

1. 使用菌株について

使用菌株の選択に当たっては被験物質の化学構造などをもとに判断する。例えば、DNA 鎖間に架橋を形成するような被験物質（例えばマイトマイシンC）については、大腸菌 WP2uvrA の代わりに、除去修復能を有する大腸菌 WP2 若しくは WP2/pKM101 又はネズミチフス菌 TA102 を選択する。

菌株はいずれも適切な研究機関より、品質が保証されたものを入手し、定期的に試験菌株の特性（アミノ酸要求性、薬剤耐性因子の有無、紫外線に対する感受性又は膜変異など）について確認しておく。

2. 用量段階について

用量設定試験で変異原性が認められる場合には、本試験において用量依存性が求められ

る適切な用量間隔（通常は公比2又は3）を設定する。

菌に生育阻害が認められた場合又はプレート上に被験物質が析出しているような場合は、そのことを記録する。復帰変異コロニー数の減少、バックグラウンドローンの透明化、あるいは菌の生存度が生育阻害の指標となる。

3. 対照について

陰性対照には原則として溶媒のみを加える。被験物質が水溶性の場合は、滅菌水等に溶解する。水に不溶な被験物質は、通常、DMSOに溶解又は懸濁して用いる。水及びDMSOを溶媒とすることが不適切な場合は、被験物質の溶解性及び安定性、テスト菌株及びS9Mixに対する毒性を考慮して溶媒を選択する。背景データのない溶媒を用いる場合には無処理対照を追加する。陽性対照には、試験菌株の種類及び代謝活性化の有無に応じて適切な既知の変異原物質を用いる。

4. 使用プレート数について

海外ガイドラインでは、通常、3枚以上のプレートを用いることが推奨されている。

5. 試験方法について

S9 mix中のS9濃度は、通常、10%で用いられる。ただし、被験物質の化学構造によっては、S9量がこれよりも少ない時が最適濃度の場合（例えば芳香族炭化水素など）や多い量で最適濃度となるもの（例えばニトロサミン類など）がある。したがって、被験物質の化学構造によっては、適切なS9濃度を選択する。

また、被験物質の構造によっては、ラット以外の動物種のS9を用いることが必要な場合がある（例えば、フェナセチンやブセチンの変異原性はハムスターのS9によって検出される）。したがって、被験物質の化学構造によって、適切な動物種由来のS9を選択する。

6. 観察について

復帰変異コロニー数は、肉眼あるいは自動コロニー計測器を用いて計測するが、被験物質がプレート上に析出して自動計測が不適切な場合には、肉眼によって計測する。菌の生育阻害状況を実体顕微鏡を用いて観察し、抗菌作用の有無を確認する。

7. 結果の判定について

復帰変異コロニー数が陰性対照群と比べ明らかな増加とは、少なくとも1菌株において、プレート当たりの復帰変異コロニー数が2倍以上の増加を判断の目安とする。統計学的手法は客観的な評価のための補助的手段として用い、最終的な判定は生物学的意義を考慮した上で総合的に行う。

8. 報告書について

プレートごとの復帰変異コロニー数の実測値及び群ごとの平均値を表示し、併せて復帰変異コロニー数と用量との関係を図で表す。

報告書には原則として以下の内容が記載されていること。

(1) 被験物質に関する情報

急性経口毒性試験に同じ。

(2) 使用菌株に関する情報

試験菌株の種類、入手経路等

(3) 試験条件に関する情報

用量設定理由、培地の組成、陰性及び陽性対照、S9 及び S9mix の調製法及び処理法、実験操作手順、プレート数、結果の判定基準等

(4) 試験結果

復帰変異コロニー数の実測値および平均値、復帰変異コロニー数と用量との相関図、生育阻害の有無、析出の有無、背景データ等

(5) 考察及び結論

(6) 参考文献

染色体異常試験 (2-1-19-2)

1. 使用細胞について

試験には、無処理群での染色体異常の出現頻度ができるだけ低い細胞を使用する。細胞を長期間にわたって継代培養すると、染色体異常の自然発生率が高まるなど、細胞の特性に変化を生ずる可能性がある。したがって、細胞の特性に何らかの変化が認められた場合には、凍結保存細胞から新たに細胞をおこす。

2. 用量段階について

- (1) 単層培養細胞ではプレート上の細胞密度又は細胞数の計測で細胞増殖抑制率を求める。懸濁培養細胞では細胞数の計測又は細胞分裂指数を指標として増殖抑制率を求める。いずれの場合も、代謝活性化を用いない系及び用いる系に関する情報を得ておく。
- (2) 析出用量域で細胞毒性が認められる場合には、析出がみられる用量を2段階以上含めて本試験を行う。
- (3) 培養液の pH や浸透圧の変化又は著しい細胞毒性など、細胞にとって非生理的な条件下で試験を行ったと考えられる場合には、それらに関するデータを提示する。

3. 対照について

陰性対照は原則として溶媒のみを加える。被験物質が水溶性の場合は、滅菌生理食塩水等に溶解する。水に不溶な被験物質は、通常、DMSO に溶解する。DMSO に不溶な場合には CMC 溶液に懸濁する。水及び DMSO を溶媒とすることが不適切な場合は、被験物質の溶解性及び安定性、テスト菌株及び S9Mix に対する毒性を考慮して溶媒を選択する。背景データのない溶媒を用いる場合には無処理対照を追加する。陽性対照には、代謝活性化の有無に応じて適切な既知の染色体異常誘発物質を用いる。

4. 使用プレート数について

2枚のプレート間の異常頻度のばらつきが少ないことを示す背景データがある場合には、1枚のプレートを用いてもよい。

5. 試験方法について

チャイニーズハムスター株細胞の細胞周期は、通常、12～17時間であるので、1.5細胞周期は18～26時間に相当する。それぞれの細胞株の細胞周期に合わせて標本作製時期を決める。

DNA 合成を阻害する物質や細胞周期をブロックする物質は大幅に細胞周期を遅延させることが知られており、染色体の数的異常は第2回目の分裂中期で観察されることから、

さらに長時間の連続処理、例えば 48 時間の連続処理を行って確認する。代謝活性化を用いる系で確認試験を実施する必要がある場合には、1.5 細胞周期よりも遅い時期に標本作製したり、S 9 量を変化させるなどの方法が考えられる。

6. 観察について

- (1) ギャップは染色分体幅よりも狭い非染色性部位で、染色分体軸上に沿って位置するものとする。構造異常は染色分体型と染色体型とに分類し、さらにそれぞれ切断型と交換型に分類して、その数を記録する。
- (2) 複雑な異常が 1 個の細胞に多数観察された場合には、必ずしも異常数を記録せずに、別途異常細胞を記録する。ただし、構造異常の総細胞数には含める。
- (3) 染色体数の異常は異数性 (aneuploidy) と倍数性 (polyploidy) とがあるが、樹立細胞では、異数性誘発の判定が困難であるので、倍数体 (核内倍加を含む) のみを記録する。

7. 結果の判定について

- (1) 結果の判定は構造異常と数的異常に分けて、それぞれ行う。
 - ① 構造異常ではギャップを除いた異常細胞総数を用いて判定を行う。
 - ② 数的異常では倍数体と核内倍加の総数で判定を行うが、必要があればそれぞれに分けて判定する。
- (2) 統計学的手法は客観的な評価のための補助的手段として用い、最終的な判定は生物学的意義を考慮した上で総合的に行う。

8. 報告書について

異常細胞数の合計の表示には、ギャップのみの異常を持つ細胞を除いた異常細胞総数を用い、ギャップのみをもつ細胞数は別途表示する。

報告書には原則として以下の内容が記載されていること。

- (1) 被験物質に関する情報
急性経口毒性試験に同じ。
- (2) 使用細胞に関する情報
細胞の種類、入手経路、培養液の種類、血清のロット等
- (3) 試験条件に関する情報
用量設定理由、陰性及び陽性対照、S9 及び S9mix の調製法ならびに処理法、実験操作手順、処理時間、標本作製時期、異常細胞の判定基準及び結果の判定基準等
- (4) 試験結果
観察細胞数、構造異常をもつ細胞の出現頻度及び種類別の異常数、倍数体 (核内倍加を含む) の出現頻度、細胞増殖に関するデータ (抑制率、分裂指数等)、析出の有無、背景データ等
- (5) 考察及び結論
- (6) 参考文献

小核試験 (2-1-19-3)

1. 動物種について

マウス以外の動物を用いて末梢血の小核試験を行う場合、その動物の末梢血を用いた小

核試験が、骨髄を用いた小核試験と同等であることを示す科学的な知見を得ていることが必要である。マウスの場合、雌雄間での小核誘発率に大きな差が認められた場合には雄の感受性が高い傾向があるので、供試動物は若い成熟した7～10週齢の雄動物を用いる。

2. 投与回数について

複数回投与とは、通常、24時間間隔で2～4回の投与を指す。それ以上の投与回数による試験も可能であるが、最高用量は何らかの毒性徴候がみられる用量を用いること。

3. 用量段階について

- (1) 最高用量は、実際の小核試験と同一条件下での予備試験によって求めること。
- (2) 用量段階は $\sqrt{10}$ 以下の公比で3段階とすることを原則とする。2,000mg/kg以上の用量で毒性が認められず、被験物質の化学構造の特性などから変異原性が予想されない場合は、2,000mg/kgと陰性対照のみの試験を実施する。
- (3) 複数回投与の場合、14日までの試験では、2,000mg/kgを、14日を超える試験では1,000mg/kgを最高用量とする。

4. 対照について

背景データのない溶媒を用いる場合には無処理対照を追加すること。

5. 試験方法について

- (1) 単回投与では、骨髄の場合、1回目の標本作製時期は投与後24時間以降とし、2回目の標本作製時期は投与後48時間以内とし、末梢血の場合、1回目の標本作製時期は投与後36時間以降とし、2回目の標本作製時期は投与後72時間以内とする。2回目の標本作製時期には最高用量のみ標本作製する。
- (2) 複数回投与では、骨髄の場合、最終投与後18～24時間以内に1回、末梢血の場合、最終投与後24～36時間以内に1回の標本作製を行う。OECDのガイドラインとは末梢血の場合の標本作製時間帯が少し異なるが、そのガイドラインにも引用されているHigashikuni等のデータによると 30 ± 6 時間で最大頻度を示す化学物質が多いことが示されている。

6. 観察について

- (1) 標本の染色は、骨髄標本に対しては、通常、アクリジン・オレンジ蛍光染色法また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。幼若赤血球とはギムザ染色法ではいわゆる多染性赤血球を指し、アクリジン・オレンジ蛍光染色では細胞質が赤色蛍光を発するRNA含有赤血球や、超生体染色法で識別できる網赤血球などを指す。
- (2) 4週間以上投与した動物については、各個体当たり2,000個以上の成熟赤血球を観察し、成熟赤血球における小核出現頻度を記録する。

7. 結果の判定について

統計学的手法は客観的な評価のための補助的手段として用い、最終的な判定は生物学的意義を考慮した上で総合的に行う。

8. 報告書について

原則として、個体ごとの観察結果及び群ごとのデータのまとめ（平均値又は標準偏差）

を表示する。

報告書には原則として以下の内容が記載されていること。

- (1) 被験物質に関する情報
急性経口毒性試験に同じ。
- (2) 供試動物に関する情報
急性経口毒性試験に同じ。
- (3) 試験条件に関する情報
用量設定理由、投与経路、投与回数、投与量、標本作製時期および作製法、陰性及び陽性対照（物質及び方法）、染色法、小核の観察方法等
- (4) 試験結果
小核を有する幼若赤血球の出現頻度および観察細胞数、幼若赤血球の全赤血球に対する割合（%）および観察細胞数、統計処理方法及び結果、背景データ等
- (5) 考察及び結論
- (6) 参考文献

生体機能への影響に関する試験 生態機能影響試験（2-2-1）

1. 試験設計の基本

既に毒性作用に関する情報が得られている経路については、その情報を利用できる。中毒の特徴を把握するために、全身症状を多次元観察法によって定量的、経時的に観察する。全体を通じて、供試動物は単一の動物種に偏らないように配慮するとともに、性差が考察できるように試験を設計する。また、処置方法を理論的に考察するために、急性毒性作用の様式を推定し、必要に応じて可能性のある拮抗薬（処置）の影響を調べておく。

麻酔動物を用いる場合、投与方法等で被験物質の吸収が異なる場合があるので、被験物質の吸収変化を考慮して試験を行うこと。なお、麻酔動物を用いる場合は静脈内投与が一般的である。

2. 検査項目について

急性毒性の程度に応じ、以下の検査項目について検査する。

- (1) 急性毒性が劇物相当以上の場合は、検査項目の全般及び解毒剤又は救命処置方法の十分な検索を対象とする。
- (2) 急性毒性が弱い場合（経口 LD50 > 2000mg/kg）は最小限の検査項目（状態観察、呼吸・血圧に対する影響）を対象とする。
- (3) 急性毒性が上記(1)(2)以外の場合は、急性毒性の程度及び毒性発現の特徴に応じた検査項目及び解毒剤の検索を対象とする。

通常実施すべき項目のうち、他の毒性試験の結果等から十分影響が考察できる項目については検査を行う必要はない。

また、必要に応じて追加実施すべき項目のうち、他の毒性試験成績から必要な情報が得られている場合にも検査を実施する必要はない。

3. 報告書について

報告書には以下の内容を記載し、本試験で得られた成績並びに既存の情報を基に急性中毒の発症の可能性、特徴、様式を考察すること。

- (1) 被験物質に関する情報

- 急性経口毒性試験に同じ。
- (2) 供試動物に関する情報
急性経口毒性試験に同じ。
- (3) 試験条件に関する情報
被験物質の調製方法、用量設定理由、投与経路及び期間、投与量、漸増投与の場合は投与間隔の根拠等
- (4) 試験結果及び統計処理方法・結果
- (5) 考察及び結論
- (6) 参考文献

＜動物体内、植物体内、土壌中及び水中運命に関する試験＞

定義

1. 「被験物質等」：被験物質とその代謝物との合計（放射性標識体の場合は、全放射能）をいう。
2. 「同定」：化学構造の完全な決定をいい、原理の異なる複数のクロマトグラフィーにおける標準品若しくは同定済みの代謝物とのコクロマトグラフィー又はスペクトル分析により行う。
3. 「化学的特徴付け」：同定に到らないまでも、極性、有効成分の基本骨格の有無の特定、動物、植物、土壌又は水中における代謝物との異同の確認をいい、1種類のクロマトグラフィーにおける標準品との一致による仮同定、化学変換等による分解生成物の同定、分子量のみの特定等により、性状を明らかにすることをいう。

動物体内運命に関する試験

動物体内運命試験（2-3-1）

本試験は指針を参考にして行う。ただし、被験物質の性質に応じて適切な方法を考慮し、試験の目的に沿うように適宜取捨選択又は他の方法に置き換えても差し支えない。また、被験物質の体内動態に関する適切なデータが毒性試験から得られた場合には、これを利用してよい。

1. 供試動物について

繁殖試験及び催奇形性試験の結果、妊娠動物の毒性徴候が一般毒性試験の結果と著しく異なる場合や胎盤を通しての毒性が示唆された場合等には妊娠動物も用いる。

2. 投与方法について

- (1) 経口投与における吸収率が著しく低い等により吸収された被験物質等の体内分布や代謝を適切に把握することが困難な場合等には静脈内投与による試験も併せて行う。
- (2) 単回投与試験による被験物質等の血漿中濃度の半減期が48時間以上で、かつ器官又は組織中の被験物質等の半減期が血漿中濃度の半減期より明らかに長いことが示唆された場合等は蓄積性が予想されることから反復投与を行うことが望ましい。
- (3) 蓄積性をみるための反復投与は原則として標識化合物の投与で行う。この試験では少なくとも次の情報を得られる必要がある。

血漿及び蓄積性が予想された器官又は組織、90日間反復投与試験、1年間反復投与試験又は発がん性試験で病理変化等毒性影響が認められた（又は疑われた）器官又は

組織について、反復投与期間終了後、原則として複数時点における被験物質等の濃度及び単回投与後の濃度に対する比率。

3. 動物数及び試験群の設定について

- (1) 動物数は、げっ歯類の場合、排泄及び物質収支の評価に供する動物の数は、原則として各性、各用量当たり4匹以上、体内分布の経時調査及び血中濃度推移調査においては原則として3匹以上とし、非げっ歯類の場合、より少数の個体数でもよい。
- (2) 単回投与または反復投与で毒性影響が認められる量で、かつ死亡例の出ない用量を高投与量とする。なお、1,000mg/kgを上限の目安とする。
- (3) 毒性評価に重要と思われる毒性症状が認められ、単回投与による試験及び低用量の反復投与の結果のみではその毒性発現を理解することが難しい場合には高用量の反復投与試験を行う。

4. 検討項目について

(1) 吸収

- ① 吸収量（投与量に対する比率）の算定には、例えば、次のような方法がある。
 - ア 糞への排泄量が少ない場合には被験物質等の尿及び呼気への排泄量（投与量に対する比率）と体内残留量（投与量に対する比率）の合計として求める。
 - イ 胆管にカニューレを挿入した動物における尿中・胆汁中の被験物質等の排泄量と体内残留量の合計として求める。
 - ウ 静脈内投与後と経口投与後の被験物質等の尿中への排泄量（投与量に対する比率）又は被験物質等の血中濃度－時間曲線下面積（AUC）等とを比較して求める。
- ② 「血中濃度の推移」においては、少なくとも、次の情報を得る。
 - ア 被験物質等の最高濃度（Cmax）
 - イ 投与後被験物質等の濃度がCmaxに達するまでの時間（Tmax）
 - ウ 被験物質等のAUC
 - エ 被験物質等の半減期

(2) 分布

- ① 「主要器官及び組織」には、生殖腺、副腎、甲状腺等の内分泌器官、脳、肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、子宮及び消化管等並びに血液、筋肉及び脂肪等が含まれる。
- ② 「毒性影響が見られた器官及び組織」とは、90日間又は1年間反復投与試験、発がん性試験等で被験物質の投与による病理変化等が認められた器官及び組織をいう。
- ③ 血液は血漿と血球画分に分離して両者を分析するか、又は全血と血漿の両者を分析し、血中での被験物質等の分布を把握できるようにする。
- ④ 「適当な複数の時点」とは、原則として3時点以上とする。
- ⑤ 「分布率」とは、当該器官又は組織に分布する被験物質等の投与量に対する％比をいい、全量を摘出することが困難な組織（脂肪、血液等）においては分布率の算出は省いてもよい。
- ⑥ 全身オートラジオグラフィーは器官及び組織を摘出して測定する方法では明らかにし難い部位への被験物質等の分布に関する情報を得るための補助的な手段である。

(3) 排泄

- ① 予備試験において、呼気に有意な量（投与後24時間までに投与された放射能の1%以上）の被験物質等が認められなかった場合には、本試験で呼気の採取は必要

ない。

- ② 胆汁排泄は、糞中に被験物質等が投与量の 20 % 以上排泄された場合、他の毒性試験で胆汁中代謝物による毒性が疑われた場合等に測定する。
- ③ 乳汁排泄は、生まれた児動物の発育が悪い場合等の乳汁への被験物質等の排泄による毒性が示唆された場合に測定する。
- ④ 排泄量の測定期間終了時に動物を屠殺し、体内に残留する被験物質等の量を測定して投与された被験物質の物質収支を明らかにする。物質収支は原則として 90 ~ 110 % の範囲である。

主たる排泄経路が胆汁の場合には腸肝循環についても検討する。

ここで「物質収支」とは、各個体に投与された被験物質の総回収率（排泄された被験物質等の量と体内に残留する量との合計の投与量に対する割合）をいう。

(4) 代謝

原則として排泄中での投与量の 5 % 以上の代謝物は同定対象とする。毒性評価に必要な場合には 5 % 未満の代謝物でも同定が必要になる場合もある。

(5) その他

毒性に関する代謝の情報を得るためには、必要に応じ、代謝酵素系に対する影響、内因性の非蛋白質性 SH 化合物の減少等の生化学的検査を行う。

5. 報告書について

報告書には原則として以下の内容が記載されていること。

(1) 被験物質に関する情報

急性経口毒性試験に準じるほか、標識位置及びその根拠、放射化学的純度、比放射能等（代謝物の同定をする場合には参照物質（代謝物標準品等）に関する同様の情報）

(2) 供試動物に関する情報

急性経口毒性試験に同じ。

(3) 試験条件に関する情報

投与液の仕様及び調製法、担体の毒性情報、各動物に実際に投与された量及びその算定法並びにその他用いた方法の詳細

(4) 動物数及び試験群

用量段階と設定根拠（反復投与を実施した場合は投与間隔と投与期間も含む）、試験群の配置、屠殺時点、試料採取時点又は間隔

(5) 試験結果

(6) 考察及び解釈

推定吸収率及び推定代謝経路を含む。

(7) 参考文献

植物体内運命に関する試験 植物体内運命試験（2-4-1）

1. 供試植物について

供試植物の栽培に当たっては、光分解の影響についても考慮できる条件で行う。

2. 処理方法について

- (1) 異なる複数の施用方法とは、例えば土壌処理と茎葉処理（局所塗布を含む。）等を

いう。

ただし、より適切に代謝物の経路等を把握できる試験方法がとられるなら、実や葉への局所施用、単回の処理等で行うことができる。

- (2) やむを得ず製剤以外の形で試験する場合は、理由を明記しておく。
- (3) 当該農薬の使用量に準ずる範囲とは、2～3倍程度とする。
- (4) 代謝物の量が極めて少なく、同定が困難と思われる場合は、同定可能な処理量での試験も行う。
- (5) 複数の使用方法が予定されており、複数の使用方法で同一供試植物に処理した方が代謝物と代謝経路がより明らかになる場合は体系処理で行うことができる。

3. 試料採取について

収穫期間が長い植物とは、トマト、キュウリ等開花、結実が収穫開始後継続される植物をいう。

4. 分析について

試料ごとの代謝物等の存在の分析にあたっては、特に人畜可食部への移動を明らかにする。

5. 代謝物の同定等について

- (1) 化学的特徴付けに当たっては、当該代謝物の残留量又は全残留量及び他の代謝物等の同定割合を考慮する。
- (2) 被験物質が異性体を有する場合には、その異性体存在比の変化の有無について確認する。

6. 報告書について

報告書には原則として以下の内容が記載されていること。

- (1) 被験物質に関する情報
化学名、化学構造、標識位置、純度（放射化学的純度、化学的純度）及び保存方法
- (2) 参照物質（合成代謝物標準品等）に関する情報
化学名、化学構造、化学的純度及び保存方法
- (3) 供試植物に関する情報
品種等
- (4) 作物栽培環境
栽培状況、人工光を用いた場合は波長分布と光強度、温度および湿度、圃場の場合は時期と天候、特に降雨に関する情報
- (5) 施用方法
設定濃度の根拠（慣行施用量との関係）、施用方法（施用液媒体、試験系への処理経路、処理回数と間隔等）及び施用時の被験物質の放射化学的純度に関する情報
- (6) 試料採取
生育ステージ、採取作物部位と分離方法、処理後日数と採取間隔
- (7) 試料保存方法と期間
- (8) 放射能測定法
- (9) 代謝物等の分析法
- (10) 計算例（代謝物及び分解物の定量を含む。）
- (11) 使用機器

- (12) 全残留量の分布
- (13) 抽出率
- (14) 抽出残さの生成量
- (15) 主要な各代謝物等の量と可食部における分布
- (16) 主要な代謝物等の同定結果及び化学的特徴
- (17) 保存安定性
- (18) 主要な推定代謝分解経路
- (19) 考察

土壤中運命に関する試験（2-5-1~3）

農薬は、土壤中で土壤微生物による代謝（生物的分解）及び土壤粘土鉱物に触媒された反応等の非生物的分解を受ける可能性がある。本試験では、これらの分解を「代謝」と総称する。

定義

- 1. 「好氣的」:分子状酸素が豊富な状態をいう。
- 2. 「物質収支」:試験系に処理された被験物質の総回収率（揮発性物質として回収された被験物質等の量と土壤及び湛水中に残留する量との合計の処理量に対する割合）をいう。
- 3. 「DT50、DT90」:それぞれ、被験物質の50%、90%が消失するまでの時間をいう。
- 4. 「新鮮な土壤」:微生物活性が保持できている土壤をいう。

好氣的湛水土壌中運命試験（2-5-1）

湛水した水田環境では、作土層は水で覆われ、表層数 mm から 1cm の土壤層は好氣的環境にあり、下部では、根圏で酸化的な環境が含まれるものの全体としては還元的環境になっている。湛水した水田における代謝を明らかにするため、好氣的湛水土壌中運命試験を実施する。

1. 供試土壤について

- (1) 土壤は、当該農薬の使用が予定される圃場条件を代表し得る特性のものを用いることが望ましい。粒径組成及び土性分類（国際土壤学会等）、土壤 pH（水、KCl 水溶液、CaCl₂ 水溶液）、有機炭素含量、CEC（陽イオン交換容量）、主粘土鉱物、その他試験結果の評価に有益な性質及び採取した場所の詳細情報（履歴情報を含む）が明らかな土壤を使用する。土壤群（土壤統群）又は成因の知見は、試験結果の評価に有益な情報の1つとなることから確認しておくことが望ましい。
- (2) 土壤を保存する場合は、採取してから実験に供するまでの間、自然の微生物活性を保持するよう 4 ± 2 °C の冷暗所で保存することが望ましい。保存期間は1年を超えてはならない。
- (3) 2mm の篩では篩別が困難な場合、目開きの広い篩を用いてもよいが、5mm を超えてはならない。
- (4) 供試土壤を滅菌する場合は、原則として、オートクレーブにより滅菌することが望ましい。

2. 試験条件について

- (1) 試験温度は、原則として 25℃とするが、試験の実施にあたり、被験物質の代謝経路、代謝物種及び物質収支を解明する上で、より適切と考えられる場合には、20～30℃の間の一定温度（±2℃）で実施しても差し支えない。

試験温度における±2℃とは、試験の設定温度に対する制御範囲のことをいう。

- (2) 土壌の厚さは、還元層が形成されるために十分な厚さにする。
- (3) 還元層の形成は、土壌下層部における酸化還元電位が 200mV 以下になっていることにより確認する。

3. 試験の実施について

- (1) 被験物質の処理に使用する溶媒は、原則として、微生物相に影響を与えない溶媒を用いる。くん蒸作用を持つような溶媒（クロロホルム、ジクロロメタン等有機ハロゲン化合物）は使用してはならない。
- (2) 処理濃度は、土壌の仮比重を 1 として計算する。
- (3) 代謝物の同定に際して有益であることから、最高使用量以上を処理した区を設けることが望ましい。

4. 検討項目について

- (1) 分布

物質収支は、処理量の 100 ± 10% を目標とする。

- (2) 代謝

原則として、試験期間中で処理量の 10% 以上の代謝物は可能な限り同定する。これに近いものは化学的に特徴付ける。安全性評価に必要な場合には 10% 未満の代謝物でも同定が必要になる場合もあることから同定しておくことが望ましい。

抽出残渣は、処理量の 20% 以上の割合で生成した場合は、残留物の特徴付け分析（例えば、熱抽出（ソックスレー抽出等）等による徹底的な抽出、酸塩基性溶媒による抽出等を行う。

被験物質が光学異性体の場合で土壌試料中に有意に残留している場合は、その光学異性体存在比の変化の有無についての情報を得ておくことが望ましい。

5. 報告書について

報告書には原則として以下の内容が記載されていること。

- (1) 被験物質に関する情報

化学名、化学構造、標識位置、純度（放射化学的純度、化学的純度）及び保存方法

- (2) 参照物質（合成代謝物標準品等）に関する情報

化学名、化学構造、化学的純度及び保存方法

- (3) 試験条件

土壌の採取地、採取時期、土壌特性と準拠した測定方法、保存方法と保存期間及び篩別方法

試験容器

インキュベーション条件（プレインキュベーションを含む。）

還元層の形成（酸化還元電位の測定方法及び結果）

揮発性物質の捕集方法

湛水深とその維持方法

- 設定温度及び実測温度
試験容器内の土壌厚さと土壌重量
- (4) 処理
設定濃度の根拠 (最大慣行施用量との関係)
処理方法 (土壌への処理時の施用液媒体を含む。)
処理時の被験物質の放射化学的純度
- (5) 試料採取及び分析
試料の採取時期
分析方法
放射能測定の方法
消失に関する情報 (DT50 及び DT90) の算出方法
計算例 (代謝物の定量計算を含む。)
- (6) 結果
分布及び物質収支
抽出率
主要な各代謝物の生成率
主要な代謝物の同定及び化学的特徴付けの結果
揮発性物質の生成率
抽出残渣の生成率
被験物質の消失に関する情報 (DT50 及び DT90)
- (7) 考察と解釈 (推定代謝経路を含む)
- (8) 必要な場合、試料の保存方法、保存期間及び保存安定性

好氣的土壌中運命試験 (2-5-2)

水田以外の圃場の作土層は、通常、好氣的環境にあり、土壌微生物による酸化的な代謝等が主体である。これらによる代謝を明らかにするため、好氣的土壌中運命試験を実施する。

1. 供試土壌について

好氣的湛水土壌中運命試験 (2-5-1) に準ずる。

2. 試験条件について

- (1) 原則として、土壌含水量を適切な期間ごとにモニターし、必要に応じて水を添加して調査する。
- (2) 土壌くん蒸剤等の揮発性の被験物質の場合には、必ずしも通気系ではない試験系の方が適切なこともある。
- (3) 好氣的湛水土壌中運命試験 (2-5-1) に準ずる。

3. 試験の実施について

好氣的湛水土壌中運命試験 (2-5-1) に準ずる。

4. 検討項目について

好氣的湛水土壌中運命試験 (2-5-1) に準ずる。

5. 報告書について

報告書には原則として以下の内容が記載されていること。

- (1) 土壌水分量（最大容水量に対する割合）とその維持方法
- (2) その他は好氣的湛水土壌中運命試験（2-5-1）に準ずる（還元層の形成（酸化還元電位の測定方法及び結果）、湛水深とその維持方法を除く。）

嫌氣的土壌中運命試験（2-5-3）

作土層以下の土壌層は、通常、嫌氣的環境にあり、好氣的な代謝とは異なる代謝が行われることもある。地下浸透性の高い農薬については、この土壌層における代謝を明らかにする必要があるため、嫌氣的土壌中運命試験を実施する。

1. 試験土壌について

好氣的湛水土壌中運命試験（2-5-1）に準ずる。

還元層の形成は、土壌表面から2 cm以下の層における酸化還元電位が0 mV（目途）になっていることにより確認する。

2. 試験条件について

好氣的湛水土壌中運命試験（2-5-1）に準ずる。

3. 試験の実施について

好氣的湛水土壌中運命試験（2-5-1）に準ずる。

4. 検討項目について

好氣的湛水土壌中運命試験（2-5-1）に準ずる。

5. 報告書

報告書には原則として以下の内容が記載されていること。

- (1) インキュベーション条件（プレインキュベーション、不活性ガスの種類を含む）
- (2) その他は好氣的湛水土壌中運命試験（2-5-1）に準ずる。

水中運命に関する試験（2-6-1、2）

定義等は土壌中代謝試験に準ずる

加水分解運命試験（2-6-1）

1. 供試水について

分解が認められた pH の緩衝液を用いて試験を実施する。

なお、pH によって分解物質が異なる場合があるので、分解の認められたすべての pH で試験を実施する。

試験温度における緩衝液の pH を少なくとも ± 0.1 pH の精度で測定する。

ここで、「分解が認められる」とは、25℃における半減期が1年未満の場合をいう。

2. 試験条件について

試験容器には、密封可能な容器を使用する。原則として、金属製の容器は使用しない。

気体の捕集は、揮発性分解物の生成があり、気体の捕集を行わないと十分な物質収支が得られない場合に必要であるが、水の採取のみで十分な物質収支が得られる場合は必ずしも必要としない。

気体の捕集が不要な場合は、試験容器内の試験溶液の上部空間は極力少なくすることが望ましく、気体の捕集を行う場合にあっては、気相が酸素の供給源とならないよう配慮する必要がある。

試験温度における $\pm 1^\circ\text{C}$ とは、試験の設定温度に対する制御範囲のことをいう。

被験物質の水溶解度の低いものについては、容器壁面への吸着を防ぐため、溶解補助剤を使用することもできる。ただし、この場合の溶剤濃度は原則として1%以下とする。

酸素の排除は、例えば、溶液の調製の前に5分間窒素またはアルゴンを吹き込んで泡立たせて行う。

3. 検討項目について

(1) 物質収支

物質収支は、処理量の $100 \pm 10\%$ を目標とする。

(2) 分解物等

原則として、試験期間中で処理量の10%以上の分解物は、同定又は化学的に特徴付ける。安全性評価に必要な場合には10%未満の分解物でも同定が必要になる場合もある。また、処理量の10%以上生成した分解物を主要分解物とする。

被験物質が光学異性体の場合で試料中に有意に残留している場合は、その光学異性体存在比の変化の有無についての情報を得ておくことが望ましい。

4. 報告書について

報告書には原則として以下の内容が記載されていること。

(1) 被験物質に関する情報

化学名、化学構造、標識位置、純度（放射化学的純度、化学的純度）及び保存方法

(2) 参照物質（合成代謝物標準品等）に関する情報

化学名、化学構造、化学的純度及び保存方法

(3) 試験条件及び被験物質の処理

試験容器

緩衝液の組成、濃度、pH、試験容器内での試験溶液の液量

設定濃度とその根拠（水溶解度との関係）及び処理直後の実測濃度

設定温度及び実測温度

被験物質の加水分解以外の分解要因の排除（遮光、滅菌、脱酸素等）

処理方法（処理時に溶解補助剤を用いた場合は、試験系中での濃度）

処理時の被験物質の放射化学的純度

(4) 試料採取及び分析

試料の採取時期

分析方法

放射能測定の方法

消失に関する情報（DT50及び可能な場合DT90）の算出方法

計算例（分解物の定量計算を含む）

- (5) 結果
 - 物質収支
 - 主要な各分解物の生成率
 - 主要な分解物の同定及び化学的特徴付けの結果
 - 揮発性物質が生成した場合、その生成率
 - 被験物質の消失に関する情報 (DT50 及び可能な場合 DT90)
 - 可能な場合、主要な分解物の消長に関する情報 (DT50、DT90)
- (6) 考察と解釈 (推定分解経路を含む。)
- (7) 必要な場合、試料の保存方法、保存期間及び保存安定性

水中光分解運命試験 (2-6-2)

1. 供試水について

- (1) 蒸留水 (又は緩衝液) は、調製方法、pH、電気伝導率、必要に応じて、溶存酸素量、290nm から 750nm までの波長域における吸収スペクトル、その他試験結果の評価に有益な性質が明らかな水を使用する。
- (2) 自然水は、pH、溶存酸素量、懸濁物質量、全蒸発残留物量、電気伝導率、290nm から 750nm までの波長域における吸収スペクトル、その他試験結果の評価に有益な性質並びに採取した場所及び採取時期の詳細情報が明らかな水を使用する。
- (3) 土壌または底質を湛水して調製した水は、自然水に含まれる。
- (4) 自然水を保存する場合は、変質しないように注意する。
- (5) 自然水の滅菌方法の1つとして、オートクレーブあるいは除菌フィルターがある。
- (6) 被験物質が pH 条件によって不安定である場合には、蒸留水に換えて緩衝液 (安定な pH とする。) を用いてもよい。
- (7) 試験の実施に当たり、被験物質の分解経路、分解物種及び物質収支を解明する上で、より適切と考えられる場合、自然水に換えてフミン酸水溶液等を使用することは可能である。

2. 試験条件について

- (1) 光源には、地上に達する太陽光の波長分布に類似した人工光として、通常、波長 290nm 以下をカットしたキセノンランプを用いる。正確な光強度及びその測定波長範囲が測定されている等の場合、自然太陽光を用いることもできる。
- (2) 試験容器の入射光面が普通ガラス製の容器を用いることはできない。
- (3) 気体の捕集は、揮発性分解物の生成があり、気体の捕集を行わないと十分な物質収支が得られない場合に必要であるが、水の採取のみで十分な物質収支が得られる場合は必ずしも必要としない。
- (4) 試験温度における $\pm 2^{\circ}\text{C}$ とは、試験の設定温度に対する制御範囲のことをいう。
- (5) 被験物質の水溶解度の低いものについては、容器壁面への吸着を防ぐため、溶解補助剤を使用することもでき、この場合、溶剤濃度は原則として 1% 以下とする。ただし、光増感作用 (アセトン等) 又は消光作用を有することが既知の溶解補助剤は使用してはならない。

3. 検討項目について

加水分解運命試験 (2-6-1)

4. 報告書について

報告書には原則として以下の内容が記載されていること。

(1) 被験物質に関する情報

化学名、化学構造、標識位置、純度（放射化学的純度、化学的純度）及び保存方法

(2) 参照物質（合成代謝物標準品等）に関する情報

化学名、化学構造、化学的純度及び保存方法

(3) 試験条件及び被験物質の処理

蒸留水（又は緩衝液）の調製方法及び特性

自然水の採取地、採取時期、特性と準拠した測定方法、保存方法及び保存期間

蒸留水の代わりに緩衝液を用いた場合は、その調製方法及び理由

土壌または底質を湛水して調製した自然水の場合は、その調製方法及び土壌等の由来

自然水の代わりにフミン酸等の水溶液を用いた場合は、その調製方法

滅菌方法及び滅菌状態の維持

光源（入射光の波長分布については、測定した情報又は照射装置製造業者の情報等とする。）

照射方法

光強度 (W/m^2) とその測定波長域 (nm)

試験容器

試験容器内の水の光行路長

設定温度及び実測温度

設定濃度とその根拠（水溶解度との関係）及び実測濃度

処理方法（処理時に溶解補助剤を用いた場合は、試験系中での濃度）

処理時の被験物質の放射化学的純度

(4) 試料採取及び分析

試料の採取時期

分析方法

放射能測定の測定方法

消失に関する情報（DT50 及び DT90）の算出方法

計算例（分解物の定量計算を含む。）

(5) 結果

物質収支

主要な各分解物の生成率

主要な分解物の同定及び化学的特徴付けの結果

揮発性物質が生成した場合、その生成率

被験物質の消失に関する情報（DT50 及び可能な場合 DT90）

自然太陽光下（北緯 35°（東京）、春（4月から6月まで））での推定される消失に関する情報（DT50）

可能な場合、主要な分解物の消長に関する情報（DT50 及び DT90）

(6) 考察と解釈（推定分解経路、自然水の代わりにフミン酸等の水溶液を用いた場合は光分解への影響を含む。）

(7) 必要な場合、試料の保存方法、保存期間及び保存安定性

[参考]

太陽光下での水中半減期の推定例を以下に示す。

1. 全天日射量

東京における全天日射量の1日積算値（平成10年版理科年表、1974から1990年の累年平均値）は、次のとおり。

4月	5月	6月	平均
14.3	16.0	13.6	14.6 (MJ/m ² /d)

- ・全天日射量とは直達日射量及び散乱日射量の合計。
- ・測定装置は、全天電気式日射計（測定波長範囲は約300～2800nm）。

2. 太陽光の分光放射照度分布

地上に到達する太陽光は、緯度、季節、時刻、大気汚染度、水蒸気量等により変化し、その変化量も波長によって異なる。太陽光放射の分光特性は絶えず変化するため、平均的な太陽光の分光分布を設定することは困難である。

そこで、日本工業規格（JIS）の「二次基準結晶系太陽電池セル（C8911-1998）」に規定されている基準太陽光の分光放射照度分布を利用する。

3. 太陽光下での水中半減期の推定

- ・全天日射量の1日積算値を I_0 とすると、4～6月の平均値は、

$$I_0 = 14.6 \text{ (MJ/m}^2\text{/d)}$$

(1)

- ・試験にいた人工光源の光強度を I_{L-H} （測定波長範囲 $L \sim H$ nm、 W/m^2 ）とすると、 $L \sim H$ nmの波長領域での太陽光の放射照度（ I_s ）は、基準太陽光の分光放射照度分布（JIS C8911-1998）から(2)式で表される。

$$I_s = I_0 \times (L - H \text{ nm の放射照度}) / (\text{全波長の照射照度})$$

(2)

- ・光強度 I_{L-H} における化学物質の半減期を $DT50_{lab}$ (d)とすると、試験開始から半減期までの放射照度の積算値 $IDT50$ (MJ/m²)は次式で表される。

$$IDT50 = I_{L-H} \times DT50_{lab} \times 24 \times 3600 \times 10^{-6} \text{ (MJ/m}^2\text{)}$$

(3)

- ・従って、太陽光下での半減期 $DT50_{sun}$ (d)は(4)式で示される。

$$DT50_{sun} = IDT50 / I_s$$

(4)

<具体例>

以下の条件で試験が行われたとした場合の算出方法は次のとおり。

- ・人工光源の光強度 ($I_{300-400}$) : 30 W/m^2 (試験期間中一定)
- ・光強度の測定波長範囲 : 300 ~ 400 nm

この条件下における化学物質の半減期 $DT50_{lab}$ が10日と仮定する。

東京における春（4-6月）の太陽光の300-400nmの放射照度（月別平均値）は、JIS C8911より（全波長の放射照度）に対する（300-400nmの放射照度）の比率は4.6%であるから(2)式より、

$$\begin{aligned} I_s &= I_o \times (300-400\text{nmの放射照度}) / (\text{全波長の放射照度}) \\ &= 14.6 \times 4.6\% = 0.672 \text{ (MJ/m}^2\text{/d)} \end{aligned}$$

試験開始から半減期までの放射照度の積算値は(3)式により、

$$\begin{aligned} I_{DT50} &= 30 \times 10 \times 24 \times 3600 \times 10^{-6} \\ &= 25.92 \text{ (MJ/m}^2\text{)} \end{aligned}$$

ゆえに太陽光下での半減期 DT50sun は(4)式により、

$$\begin{aligned} DT50_{\text{sun}} &= 25.92 / 0.672 \\ &= 38.6 \text{ 日} \end{aligned}$$

水産動植物への影響に関する試験（2-7-1~3）

魚類急性毒性試験（2-7-1）

1. 供試生物について

(1) 生物種

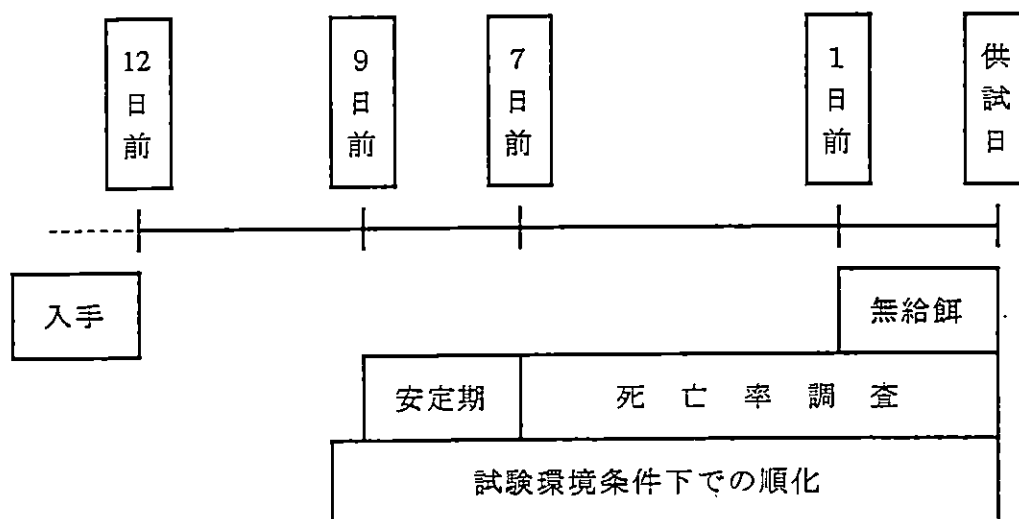
- ① 原体については、コイを用いた試験が必須である。製剤についても、コイを用いて試験を実施することが望ましい。試験に用いる生物は、入手源、飼育方法等を明らかにしておく。
- ② 試験の再現性等を確認するため基準物質での試験を行うことが望ましい。基準物質での試験は、被験物質の試験ごとに行うことが望ましいが、同一生物群（同一入手群）ごとや一定期間ごとに行ってもよい。PCP-Na（ペンタクロフェノールナトリウム塩）及び硫酸銅(II)は基準物質として用いることができる。ただし、PCP-Na では pH が、硫酸銅では水の硬度が毒性の変動要因になるので留意する。また、薬液を調製する際の残液や使用後の薬液は適切な処理を行い廃棄すること。

試験濃度は 100% 死亡率や 0% 死亡率が必ずしも含まれなくても、96 時間の LC_{50} が算定される濃度範囲（例えば 3 濃度程度）で行ってもよい。

用いた基準物質の LC_{50} をバックグラウンドデータ（平均±標準偏差値）とともに試験報告書に記載する。

(2) 順化

標準的な順化期間は下図で示される。



2. 試験濃度区の設定について

- (1) 通常、濃度公比は 1.3 ~ 2.2 で行う。ただし、広い濃度範囲で影響が認められる場合には、より大きな濃度公比で行ってもよい。
- (2) 試験上限濃度は、原体では原則として 100mg/l とする。製剤は可能な範囲内で試験を行うが、上限濃度は原則製剤濃度として 1,000mg/l とする。上限濃度で被験物質に関連した影響を示さなければ、試験濃度区は 1 濃度でよい。

3. 試験液の調製について

- (1) 難水溶性原体の場合は、超音波処理等の機械的な分散によるか、ジメチルスルホキシド、N,N-ジメチルホルムアミド、トリエチレングリコール、アセトン、エタノール、メタノール、硬化ヒマシ油等の一般的に用いられている助剤を用いて試験原液を調製する。この場合、完全に溶解していなくても、薬剤が均一に分散していればよい。
- (2) 助剤は2種類以上を組み合わせ使用してもよいが、その場合は、用いた助剤の総量が 100mg/l (又は 0.1ml/l) を超えないことが望ましい。

4. 環境条件について

(1) 照明

光の強さと質は特に規定しない。通常の実験室の照明条件でよい。

(2) 希釈水

- ① 全硬度は 10 ~ 250mgCaCO₃/l で、pH6.0 ~ 8.5 の水が望ましい。
- ② 人工調製水を使用する場合、その調製には特級又は分析用特級の試薬を用い、調製に用いる蒸留水又は脱イオン水の電気伝導度は 10 μScm⁻¹ 以下とする。
- ③ 用いた希釈水に関しては、水道水及び天然水の場合は入手先及び前処理法を、人工調製水の場合は組成を明記する。
- ④ 以下に、人工調製水の例を示す。

人工調製水の例 (ISO6341-1982)

(a) 塩化カルシウム溶液

CaCl₂·2H₂O ; 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

MgSO₄·7H₂O ; 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

NaHCO₃ ; 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

KCl ; 0.23g を脱イオン水に溶かし 1l とする。

(a)~(d)の溶液各々 25ml を混合し、脱イオン水で全量を 1l とする。この溶液のカルシウムとマグネシウムイオンの量は 2.5mmol/l である。Ca と Mg イオンの比は 4 : 1 であり、Na と K イオンの比は 10 : 1 である。

(3) pH

通常、魚類の飼育に適した pH の範囲は 6.0 ~ 8.5 程度であるが、被験物質の添加により pH がこの範囲を超えた場合でも、試験液の pH の調整は行わない。

5. 観察及び測定について

(1) 供試魚の一般状態の観察

平衡失調、遊泳異常、鼻上げ、出血、背曲り、立鱗、体色変化等が観察された場合は必ず記録する。

(2) 被験物質濃度の測定

- ① 原体を被験物質とした場合、試験液中の被験物質濃度の確認や濃度の安定性に関する情報を得るために各試験濃度区について濃度の測定を行うこと。
- ② 流水式又は止水式試験の場合、少なくとも暴露開始時及び終了時に測定する。さらに、半止水式試験の場合は、換水前及び換水後にも測定する。
- ③ 測定用試料は試験液の中層から採取する。被験物質の一部が沈殿している場合や

表層に浮いている場合であっても原則として攪拌は行わない。

④ 製剤で試験を行う場合は被験物質濃度の測定を行う必要はない。

(3) 環境条件の測定

① 希釈水として脱塩素水道水若しくは天然水を用いる場合、試験に先立って水産用水基準等を参考に水質検査を行うことが望ましい。水質検査は一定期間ごとに行ってもよい。

② 試験液については、水温、溶存酸素濃度及び pH をすべての試験区について測定する。測定は少なくとも暴露開始時及び終了時、更に半止水式試験の場合は換水前及び換水後にも行う。ただし、変動幅の確認等の目的から 24 時間ごとに測定することが望ましい。

6. 結果の処理法について

(1) LC_{50} を算定する場合に用いられる一般的手法としては Probit 法、Moving average 法、Binomial 法、Doudoroff *et al.* 法等がある。

(2) 被験物質として原体を用いた場合、試験期間をとおして、被験物質濃度の変動が設定濃度又は暴露開始時測定濃度の $\pm 20\%$ 未満の場合は、それぞれ設定濃度又は暴露開始時測定濃度を結果の処理に用いてもよい。

測定濃度の平均値の算出方法には以下のような方法がある。

① 止水式試験の場合

$$\overline{MC} = \frac{\text{Conc A} - \text{Conc B}}{\ln(\text{Conc A}) - \ln(\text{Conc B})}$$

\overline{MC} : 平均測定濃度

Conc A : 暴露開始時 (又は調製時) の測定濃度

Conc B : 暴露終了時の測定濃度

$\ln(\text{Conc A})$: 暴露開始時 (又は調製時) の測定濃度の自然対数

$\ln(\text{Conc B})$: 暴露終了時の測定濃度の自然対数

② 半止水式試験の場合

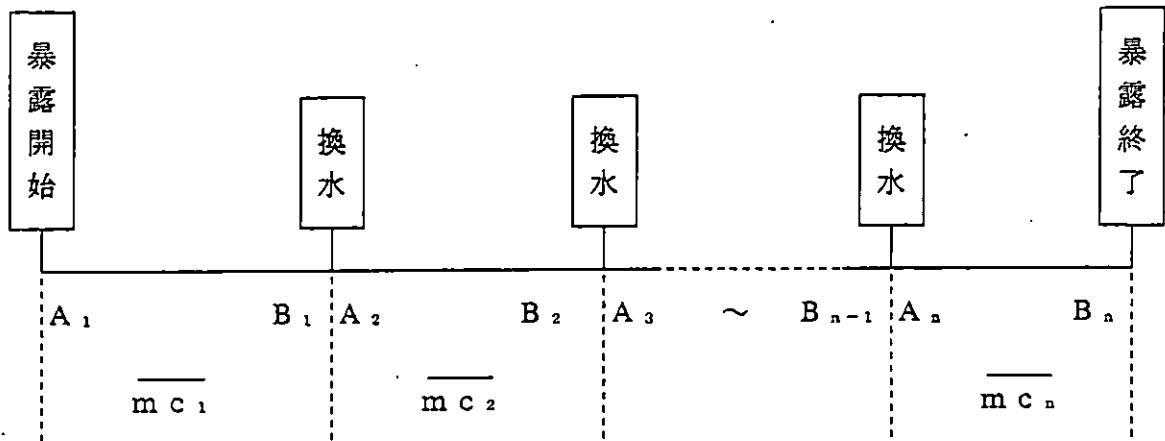
次の式を用いて各暴露期間 (暴露開始時から換水前、換水後から換水前、換水後から暴露終了時) の平均測定濃度を算出する。

$$\overline{m \cdot c_n} = \frac{\text{Conc A}_n - \text{Conc B}_n}{\ln(\text{Conc A}_n) - \ln(\text{Conc B}_n)}$$

$\overline{m \cdot c_n}$: 各暴露期間の平均測定濃度

Conc A_n : 暴露開始時又は換水後の測定濃度

Conc B_n : 暴露終了時又は換水前の測定濃度



上記で求めた各暴露期間の平均測定濃度を用い算術平均により算出する。

$$\overline{MC} = \frac{\overline{mc_1} + \overline{mc_2} + \overline{mc_3} + \dots + \overline{mc_n}}{n}$$

③ 流水式試験の場合

各測定濃度の算術平均により算出する。(暴露開始時及び暴露終了時のみ測定した場合は $n = 2$ とする。)

$$\overline{MC} = \frac{\text{Conc 1} + \text{Conc 2} + \dots + \text{Conc n}}{n}$$

Conc n : 各時間の測定濃度

7. 報告事項について

(1) 試験方法については以下の内容を記載する。

① 暴露条件

暴露方式 (止水式、半止水式、流水式)、試験設定濃度及び濃度公比、試験液の調製法 (助剤を用いた場合は種類及び使用濃度)、暴露期間等

② 環境条件

希釈水、試験容器及び装置、試験液量、水温、照明等

③ 観察及び測定項目等

観察項目及び観察方法、被験物質濃度の測定方法 (原体を被験物質として用いた場合場合)、水質の測定項目及び測定方法、結果の処理法等

(2) 試験結果について

① 供試魚に異常な症状がみられた場合は、写真等を添付することが望ましい。

② その他の事項の試験液の状態とは、析出、沈殿の有無等をいう。

(3) 試験方法を変更した場合は、変更点及び変更した理由を報告すること。

ミジンコ類急性遊泳障害試験 (2-7-2-1)

1. 供試生物について

(1) 生物種

- ① オオミジンコ (*Daphnia magna*) 以外の種を試験に用いる場合は、比較試験を実施するか、過去の知見、予備試験の結果、基準物質の試験等を参考にすること。当該種と同等の試験結果が得られることを確認すること。オオミジンコ (*Daphnia magna*) 以外の種を試験に用いた場合は、その妥当性について報告書に記載する。
- ② 試験の再現性等を確認するため基準物質での試験を行うことが望ましい。基準物質での試験は、被験物質の試験ごとに行うことが望ましいが、同一生物群ごとや一定期間ごとに行ってもよい。PCP-Na (ペンタクロフェノールナトリウム塩) 及び重クロム酸カリウム (六価クロム; Cr⁶⁺) は基準物質として用いることができる。但し、PCP-Na では pH が試験の変動要因になるので留意する。また、薬液を調製する際の残液や使用後の薬液は適切な処理を行い廃棄すること。重クロム酸カリウムの処理法には還元-薬液沈殿法やイオン交換法等がある。

試験濃度は、100%遊泳阻害率や0%遊泳阻害率が必ずしも含まれなくても、48時間(供試生物の種によっては、24時間)のEC₅₀が算定される濃度範囲(例えば3濃度程度)で行ってもよい。

用いた基準物質のEC₅₀をバックグラウンドデータ(平均±標準偏差値)とともに試験報告書に記載する。

(2) 親ミジンコの飼育

親ミジンコには、餌として単細胞の緑藻類等を与える。

2. 暴露期間について

48時間とする。ただし、供試生物の種によっては無給餌の状態でも48時間生存が困難な場合があり、その場合には24時間とすることができる。

3. 試験濃度区の設定について
魚類急性毒性試験に準ずる。

4. 試験液の調製について
魚類急性毒性試験に準ずる。

5. 環境条件について

(1) 溶存酸素濃度

原則として暴気は行わない。やむを得ない場合は、換水又はゆるやかな暴気を行う。ただし、試験期間中の暴気はミジンコの遊泳に影響を与える可能性があるため、行う場合には遊泳に影響を与えないよう必要最小限で行う。

(2) pH

被験物質の添加によりpHが変動した場合でも、試験液のpHの調整は行わない。

(3) その他は魚類急性毒性試験に準ずる。

6. 観察及び測定について

(1) 被験物質濃度の測定
魚類急性毒性試験に準ずる。

(2) 環境条件の測定
魚類急性毒性試験に準ずる。

7. 結果の処理法について

- (1) EC_{50} を算定する場合に用いられる一般的な手法としては、Probit 法、Moving average 法、Binomial 法、Doudoroff *et al.* 法等がある。
- (2) 被験物質として原体を用いた場合、試験期間をとおして、被験物質濃度の変動が設定濃度又は暴露開始時測定濃度の±20%未満の場合は、それぞれ設定濃度又は暴露開始時測定濃度を結果の処理に用いてもよい。
測定濃度の平均値の算出方法は、魚類急性毒性試験に同じ。

8. 報告事項について

魚類急性毒性試験に同じ。

ミジンコ類繁殖試験 (2-7-2-2)

1. 供試生物について

- (1) 生物種
21日間の親ミジンコ1頭当たりの平均累積産仔数が60頭以上の種を用いる。
- (2) 生育段階
初産の幼体は用いない。
- (3) 親ミジンコの飼育
親ミジンコには、餌としてクロレラなどの単細胞緑藻類等を与える。給餌量は有機炭素量で、0.1~0.2mgC/ミジンコ/日程度とする。

2. 供試生物数及び試験区の設定について

- (1) 供試生物数
 - ① 各試験区での個体数は多い方が望ましいが、少なくとも10頭を使用すること。
 - ② 必要に応じて観察が可能な個体数に分割する。各試験区で10頭ずつ使用した場合、1頭ずつ個別の容器に分割することが望ましい。なお、OECDテストガイドライン211 *Daphnia magna* Reproduction Test(1998)では、半止水式では10頭(10頭別々の容器で試験)を使用し、流水式では40頭(10頭×4グループ)又はそれ以下の場合、例えば20頭(10頭×2グループ若しくは5頭×4グループ)を提案している。
- (2) 試験濃度区の設定
 - ① 通常、濃度公比は公比1.3~3.2で行う。ただし、広い濃度範囲で影響が認められる場合には、条件を満たす限り、より大きな濃度公比で行ってもよい。
 - ② 急性遊泳障害試験の結果を参考にする場合は、当該急性遊泳障害試験の EC_{50} を最高濃度、 EC_{50} の100分の1を最低濃度の目安とするとよい。

3. 試験液の調製について

- (1) 現在一般的に用いられている助剤としてはジメチルスルホキシド、N,N-ジメチルホルムアミド、トリエチレングリコール、アセトン、エタノール、メタノール、硬化ヒマジン等がある。
- (2) 助剤は2種類以上を組み合わせ使用してもよいが、その場合は、用いた助剤の総量が100mg/l(又は0.1ml/l)を超えないことが望ましい。

4. 環境条件について

- (1) 試験液量

ミジンコ1頭当たり 50ml ~ 100ml が望ましい。被験物質の分析条件等により試験液量を増やすこともできるが、その場合には、餌の量も考慮すること。

(2) 照明

照度は約 1200 ルクスを超えないことを目安とする。OECD テストガイドライン 211 *Daphnia magna* Reproduction Test (1998) では光強度は $15-20 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ を超えないこととされているが、測定 of 簡便さ等から目安となる照度を示す。光の質は特に規定しない。

(3) 給餌

餌は、培養したクロレラなどの単細胞緑藻類等を与える。給餌量は親ミジンコが必要とする有機炭素量を基本とし、 $0.1 \sim 0.2 mg C / \text{ミジンコ} / \text{日}$ 程度とする。給餌は毎日行うことが望ましい。

(4) 希釈水

① 希釈水として脱塩素水道水又は天然水を用いる場合は、試験に先立って希釈水について水産用水基準等を参考に水質検査を行うことが望ましい。水質検査は一定期間ごとに行ってもよい。

② 全硬度は $10 \sim 250 mg CaCO_3 / l$ で、 $pH 6.0 \sim 9.0$ の水が望ましい。

③ 人工調製水を使用する場合、その調製には特級又は分析用特級の試薬を用い、調製に用いる蒸留水又は脱イオン水の電気伝導度は $10 \mu S cm^{-1}$ 以下とする。

④ 用いた希釈水に関しては、水道水及び天然水の場合は入手先及び前処理法を、人工調製水の場合は組成を明記する。

⑤ 人工調製水としては、OECD テストガイドライン 211 *Daphnia magna* Reproduction Test (1998) では Elendt M4 または M7 を提案している。調製方法を別添に示す。

(5) 溶存酸素濃度

原則として暴気は行わない。やむを得ない場合は、換水又はゆるやかな暴気を行う。但し、試験期間中の暴気はミジンコの遊泳に影響を与える可能性があるため、行う場合には影響を与えないよう必要最小限で行う。

5. 観察及び測定について

(1) 供試生物の一般状態の観察

親ミジンコの生死を計数し、死亡個体は取り除く。これは毎日行うことが望ましいが、少なくとも 48 時間毎に行わなければならない。親ミジンコの大きさと状態、育房内の卵の有無、随胎卵及び休眠卵の有無等を定期的に観察し、記録することが望ましい。

産出幼体については生存数を計数し、死亡幼体の有無及び肉眼的に判定した状態を記録する。これは毎日行うことが望ましいが、少なくとも週に 3 回は行わなければならない。計数及び観察後の幼体は取り除き、継続して飼育する必要はない。

(2) 被験物質濃度の測定

① 測定用試料は、それぞれの試験濃度区 of 各試験液から等量を採取し、混和後、測定用試料に供することが望ましいが、予備試験等の結果から各試験液の均一性が確認できれば、例えば各試験濃度区 1 つの容器から採取して測定用試料とすることができる。

② 測定用試料は試験液の中層から採取する。被験物質の一部が沈殿している場合や表層に浮いている場合であっても原則として攪拌は行わない。

③ 半止水式の場合は、全ての試験濃度区について測定する。ただし、暴露開始時の被験物質濃度が継続されて安定である (すなわち、暴露開始濃度の 80 ~ 120 % の

範囲内) ことを示す十分な証拠がある試験の場合、2回目以降の被験物質濃度の測定は、最高濃度区及び最低濃度区だけに減らすことができる。測定は、少なくとも1週間に1回程度の頻度で換水前及び換水後に行うこと。

- ④ 流水式の場合は、半止水式のサンプリング方法に準じて行うが、被験物質の安定性確認のために第1週目の測定回数を増やす(例えば3回/週)ことは、有益である。

(3) 環境条件の測定

- ① 各試験区における試験液の水溫、溶存酸素濃度、硬度及びpHを測定することが望ましいが、少なくとも水溫は対照区、それ以外は対照区及び最高濃度区で測定する。
- ② 測定は、少なくとも1週間に1回程度の頻度で行う。

6. 結果の処理法について

(1) EC₅₀及び95%信頼限界

対照区(又は助剤対照区)と各濃度区での生存親ミジンコ1頭当たりの平均累積産仔数(生存幼体)を用いてロジスティック曲線に当てはめ、回帰分析し、21日間のEC₅₀及び95%信頼限界を算定する統計手法が用いられる。結果の評価は、グラフ表示するか有意差検定を行い確認する。多くの場合以下の式により解析することが有用であることが知られているが、Hormesisのモデルを用いる方が適切な場合もある。

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

Y = 各試験濃度区での生存親ミジンコ1頭当たりの
生存産出総幼体数

x = 濃度

c = 対照区での生存産出総幼体数

x₀ = EC₅₀

b = 係数

(2) LOEC及びNOEC

各濃度区と対照区の比較は、一元配置分散分析(ANOVA)を用いて分析する。多重検定(Dunnnett's または Williams)等が有用である。この時、ANOVAが有意かどうか確認するには、グラフ表示するかBartlettを用いて確認する。もし、この計算が有意でなければ、そのデータを同一分散に置き換えてANOVAを実施するか加重ANOVAを実施する。

- (3) 試験期間をとおして、被験物質濃度の変動が設定濃度又は暴露開始時測定濃度の±20%未満の場合は、それぞれ設定濃度又は暴露開始時測定濃度を結果の処理に用いてもよい。

測定濃度の平均値の算出方法には以下のような方法がある。

- ① 半止水式試験の場合

各暴露期間（暴露開始時から換水前、換水後から換水前、換水後から暴露終了時）の指数曲線下の面積を算出する。

$$\text{Area} = \frac{\text{Conc } A_n - \text{Conc } B_n}{\ln(\text{Conc } A_n) - \ln(\text{Conc } B_n)} \times \text{Days}$$

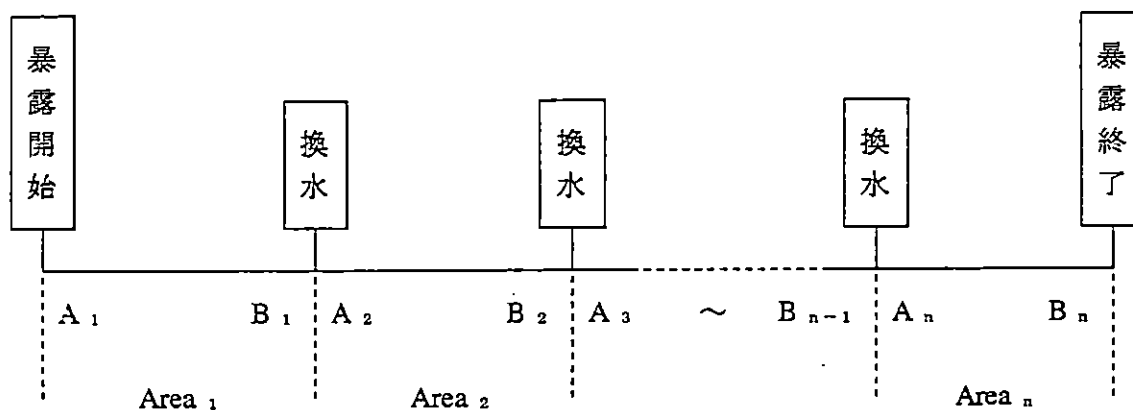
Area : 各暴露期間の指数曲線下の面積

Days : 各暴露期間の日数

Conc A_n : 暴露開始時又は換水後の測定濃度

Conc B_n : 暴露終了時又は換水前の測定濃度

ln : 自然対数



上記で求めた各暴露期間の指数曲線下の面積の合計を、暴露期間の総日数 (Total Days) で除した値を平均測定濃度とする。

$$\overline{\text{MC}} = \frac{\text{Area}_1 + \text{Area}_2 + \dots + \text{Area}_n}{\text{Total Days}}$$

② 流水式試験の場合

各測定濃度の算術平均により算出する。

$$\overline{\text{MC}} = \frac{\text{Conc } 1 + \text{Conc } 2 + \dots + \text{Conc } n}{n}$$

Conc n : 各時間の測定濃度

7. 報告事項について

(1) 試験方法については以下の内容を記載する。

① 暴露条件

暴露方式（半止水式、流水式）、試験設定濃度及び濃度公比、試験液の調製法（効剤を用いた場合は種類及び使用濃度）、暴露期間等

② 環境条件

希釈水、試験容器及び装置、試験液量、水温、照明、飼育方法（餌の種類と量、給餌頻度）等

③ 観察及び測定

観察項目及び観察方法、被験物質濃度の測定方法、水質の測定項目及び測定方法、結果の処理法等

(2) 試験結果について

その他の事項の試験液の状態とは、析出、沈殿の有無等をいう。

(3) 試験方法を変更した場合は、変更点及び変更した理由を報告すること。

別添

Elendt M4 及び M7 培地の調製方法

○ 微量元素原液

それぞれの微量元素原液 (I) を脱イオン水等を用いて調製する。これらの原液を所定量混合し原液 (II) を調製する。

原液 (I) 物質名	希釈水に 加える量 mg/l	濃 度 (M4 培地との関連)	原液 (II) 希釈水に原液 (I) を以下の 量加えて調製する。 ml/l	
			M4	M7
H ₃ BO ₃	57,190	20,000 倍	1.0	0.25
MnCl ₂ ·4H ₂ O	7,210	20,000 倍	1.0	0.25
LiCl	6,120	20,000 倍	1.0	0.25
RbCl	1,420	20,000 倍	1.0	0.25
SrCl ₂ ·6H ₂ O	3,040	20,000 倍	1.0	0.25
NaBr	320	20,000 倍	1.0	0.25
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1,260	20,000 倍	1.0	0.25
CuCl ₂ ·2H ₂ O	335	20,000 倍	1.0	0.25
ZnCl ₂	260	20,000 倍	1.0	1.0
CoCl ₂ ·6H ₂ O	200	20,000 倍	1.0	1.0
KI	65	20,000 倍	1.0	1.0
Na ₂ SeO ₃	43.8	20,000 倍	1.0	1.0
NH ₄ VO ₃	11.5	20,000 倍	1.0	1.0
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	5,000	2,000 倍	-	-
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1,991	2,000 倍	-	-
Na ₂ EDTA 溶液及び FeSO ₄ 溶液は別々に用意し、混合して直ちにオートクレーブで処理した後に加える。				
21Fe-EDTA 溶液		1,000 倍	20.0	5.0

○ M4 培地及び M7 培地

原液 (Ⅱ)、栄養素原液及びビタミン原液を用いて、M4 培地及び M7 培地を調製する。

	希釈水に加える量 mg/l	濃度 (M4 培地との関連)	培地を調製するために加える原液の量 ml/l	
			M4	M7
原液 (Ⅱ)		20 倍	50	50
栄養素原液				
CaCl ₂ · H ₂ O	293,800	1,000 倍	1.0	1.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246,600	2,000 倍	0.5	0.5
KCl	58,000	10,000 倍	0.1	0.1
NaHCO ₃	64,800	1,000 倍	1.0	1.0
Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	50,000	5,000 倍	0.2	0.2
NaNO ₃	2,740	10,000 倍	0.1	0.1
KH ₂ PO ₄	1,430	10,000 倍	0.1	0.1
K ₂ HPO ₄	1,840	10,000 倍	0.1	0.1
ビタミン原液	-	10,000 倍	0.1	0.1
ビタミン原液は、以下に示す 3 種のビタミンを 1 リットルの脱イオン水に加え調製する。 ビタミン原液は、小分けして冷蔵保存し、使用する直前に培地に加える。				
	mg/l			
Thiamine hydrochloride	750	10,000 倍		
Cyanocobalamine (B12)	10	10,000 倍		
Biotine	7.5	10,000 倍		

注： 培地の調製に際し、塩の析出をさけるためには、約 500 ~ 800ml の脱イオン水に所定量の原液を加えた後、脱イオン水で 1 リットルに調製する。

藻類生長阻害試験 (2-7-3)

1. 供試生物について

(1) 生物種

- ① 試験に用いる緑藻類は入手源等を明らかにしておく。
- ② *Selenastrum capricornutum* の学名は *Pseudokirchneriella subcapitata* に変更されている。
- ③ 試験の再現性等を確認するため、基準物質での試験を行うことが望ましい。基準物質での試験は、被験物質の試験ごとに行うことが望ましいが、一定期間ごとに行ってもよい。PCP-Na(ペンタクロロフェノールナトリウム塩)及び重クロム酸カリウム(六価クロム; Cr⁶⁺)は基準物質として用いることができる。ただし、PCP-NaではpHが試験の変動要因になるので留意する。また、薬液を調製する際の残液や使用後の薬液は適切な処理を行い廃棄すること。重クロム酸カリウムの処理法には還元-薬液沈殿法やイオン交換法等がある。

試験濃度は、100%生長阻害率や0%生長阻害率が必ずしも含まれなくても、72時間のEC₅₀が算定される濃度範囲(例えば3濃度程度)で行ってもよい。

用いた基準物質のEC₅₀をバックグラウンドデータ(平均±標準偏差値)とともに試験報告書に記載する。

2. 試験濃度区の設定について

魚類急性毒性試験に準ずる。

3. 試験培地の調製方法について

- (1) 現在一般的に用いられている助剤としてはジメチルスルホキシド、N,N-ジメチルホルムアミド、トリエチレングリコール、アセトン、エタノール、メタノール、硬化ヒマシ油等がある。
- (2) 助剤は2種類以上を組み合わせ使用してもよいが、その場合は、用いた助剤の総量が100mg/l(又は0.1ml/l)を超えないようにすることが望ましい。

4. 環境条件について

(1) 照明

400 ~ 700nmのスペクトル幅で連続的に均一照射し、液面付近で4000lux程度の照度が望ましい。OECDテストガイドライン201 Alga, Growth Inhibition Test (1984)では、 0.72×10^{20} photons/m²sの光源が適当であるとされているが、測定の簡便さ等から、上記条件に相当する液面付近の照度を規定することとした。この程度の照度であれば対照区の72時間後の細胞濃度の増加には十分である。

なお、対照区の72時間後における増殖が初期細胞濃度の1.6倍以上となる光条件であればそれ以上の光度でもよい。

(2) 培地

① 培地の種類

OECD培地又はAAP(AGP)培地を用いることが望ましい。

a. OECD培地

NH₄Cl

15

mg/l

MgCl ₂ ·6H ₂ O	12	mg/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	18	mg/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	15	mg/l
KH ₂ PO ₄	1.6	mg/l
FeCl ₂ ·6H ₂ O	0.08	mg/l
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0.1	mg/l
H ₃ BO ₃	0.185	mg/l
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.415	mg/l
ZnCl ₂	3	μ g/l
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1.5	μ g/l
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.01	μ g/l
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7	μ g/l
NaHCO ₃	50	mg/l

空気で飽和後のこの培地の pH は約 8 である。

b. AAP (AGP) 培地

NaNO ₃	25.5	mg/l
K ₂ HPO ₄	1.04	mg/l
MgCl ₂	5.7	mg/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	14.7	mg/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	4.41	mg/l
NaHCO ₃	15	mg/l
H ₃ BO ₃	0.186	mg/l
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.264	mg/l
ZnCl ₂	32.7	μ g/l
CoCl ₂	0.78	μ g/l
CuCl ₂	0.009	μ g/l
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7.26	μ g/l
FeCl ₃	96	μ g/l
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0.30	mg/l

空気で飽和後のこの培地の pH は約 7.5 である。必要があれば希塩酸又は水酸化ナトリウム水溶液により 7.5 ± 0.1 に調整する。

含水量の異なる試薬を用いる場合は、有効成分に換算して用いる。

また、他の培地を用いる場合も必須成分に対して次の限界を守ること。

P	≤ 0.7	mg/l
N	≤ 10	mg/l
キレ-ト剤	≤ 10 ³	mmol/l
硬度 (Ca + Mg)	≤ 0.6	mmol/l

5. 観察及び測定について

(1) 細胞濃度の測定

- ① 電子粒子計数装置や計数盤と顕微鏡により細胞濃度を直接計数する。また、蛍光光度計、分光光度計、比色計等を用いてクロフィル、ATP 又は濁度から間接的に測定してもよい。

② 細胞濃度の測定は、形態学的な変化が認められた細胞も含めて測定してよい。ただし、細胞に形態学的変化が認められた場合は、その旨を観察結果として報告すること。

(2) 被験物質濃度の測定

- ① 原体を被験物質とした場合、試験液中の被験物質濃度の確認や濃度の安定性に関するの情報を得るために各試験濃度区について濃度の測定を行うこと。
- ② 濃度の測定は、少なくとも暴露開始時と終了時に行うこと。
- ③ 暴露開始時の被験物質濃度は設定濃度の80%以上であることが望ましい。
- ④ 測定用試料は試験液の中層から採取する。被験物質の一部が沈殿している場合や表層に浮いている場合であっても原則として攪拌は行わない。
- ⑤ 製剤で試験を行う場合は被験物質濃度の測定を行う必要はない。

(3) 環境条件の測定

試験液については、水温及びpHを各試験区(試験濃度区、対照区)の1容器について測定する。測定は少なくとも暴露開始時及び終了時に行う。ただし、変動幅の確認等の目的から24時間ごとに測定することが望ましい。

6. 結果の処理法について

(1) 濃度-阻害率の算出法

- ① 被験物質として原体を用いた場合、暴露開始時の被験物質濃度が設定濃度から±20%以上変動している場合は測定濃度に基づき濃度-阻害率を算出する。測定濃度が設定濃度の±20%未満の場合は、設定濃度を用いて濃度-阻害率を算出してもよい。
- ② 面積法及び速度法を用いて濃度-阻害率を求めることが望ましい。算出方法は次のとおり。

ア 生長曲線下の面積の比較(面積法)

生長曲線下の面積は次の式に従って計算される。

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) \\ + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

A = 面積

N_0 = 試験開始時 (t_0) の設定細胞数 (cells/ml)

N_1 = t_1 時の実測細胞数 (cells/ml)

N_n = t_n 時の実測細胞数 (cells/ml)

t_1 = 試験開始後最初に細胞数を測定した時間

t_n = 試験開始後 n 回目に細胞数を測定した時間

各々の被験物質濃度における生長阻害百分率 (I_A) は対照区の生長曲線下の面積 (A_c) と各被験物質濃度での生長曲線下の面積 (A_i) との間の差として次のようにして計算する。

$$A_c - A_i$$

$$I_A = \frac{\quad}{A_c} \times 100$$

I_A の値は、対応する濃度に対して片対数紙または片対数正規確率紙にプロットする。

イ 生長速度の比較 (速度法)

指数増殖している培養での平均の比生長速度 (μ) は次の式に従って計算される。

$$\mu = \frac{l_n N_n - l_n N_1}{t_n - t_1}$$

μ = 比生長速度

$N_1 = t_1$ 時の実測細胞数 (cells/ml)

$N_n = t_n$ 時の実測細胞数 (cells/ml)

t_1 = 試験開始後最初に細胞数を測定した時間

t_n = 試験開始後 n 回目に細胞数を測定した時間

l_n = 自然対数

別の方法としては平均比生長速度を、時間に対して $l_n N$ をプロットした回帰直線の傾きから導くこともできる。対照区の値と比較した場合の試験濃度区での平均生長速度の低下率を濃度の対数に対しプロットする。

(2) EC_{50} の算定

- ① EC_{50} を算定する場合に用いられる一般的な手法としては Probit 法、Moving average 法、Binomial 法、Doudoroff *et al.* 法等がある。
- ② 面積法により求めたものは、 EbC_{50} 、速度法により求めたものは ErC_{50} という記号を用いる。
- ③ 速度法による EC_{50} は、最初の細胞濃度測定時間から各測定時間ごとに求めることが望ましい。

7. 回復試験について

- (1) 藻類に対し有害性が高い場合には回復試験を行うことが望ましい。この試験結果から、被験物質が希釈され、濃度が低下した時に、藻類がどの程度の回復能力を有しているかを明らかにすることができる。
- (2) 回復試験を実施する場合には、例えば、生長阻害試験において最も生長阻害が認められた濃度区の試験培養液を、阻害が認められなかった濃度区と被験物質濃度が同程度となるまで希釈して、試験と同様の培養条件により 7 ~ 10 日間程度培養する。細胞濃度はこの間 1 ~ 5 日ごとに測定する。なお、並行して対照区を設置する。生長阻害試験で用いた対照区を、濃度区の初期細胞濃度と同程度になるように希釈し対照区とする。

8. 報告事項について

- (1) 供試生物については、培養方法等も記載すること。

(2) 試験方法については以下の内容を記載すること。

① 暴露条件

初期細胞濃度、暴露方式（振とう培養、静置培養）、試験設定濃度及び濃度公比、試験培地の調製法（助剤を用いた場合は種類及び使用濃度）、暴露期間等

② 環境条件

培地、培養方法、試験容器及び装置、水温、照明等

③ 観察及び測定項目等

観察項目及び観察方法、被験物質濃度の測定方法（原体を被験物質として用いた場合）、水温・pHの測定方法、結果の処理法等

(3) 試験結果について

① 観察された影響には、形態学的な変化も含まれる。

② その他の事項の試験液の状態とは、析出、沈殿の有無等をいう。

(4) 試験方法を変更した場合は、変更点及び変更した理由を報告すること。

水産動植物以外の有用生物への影響に関する試験（2-8-1~4）

ミツバチ影響試験（2-8-1）

急性毒性試験として OECD テストガイドラインに準拠した急性経口毒性及び急性接触毒性試験及びほ場での影響試験の試験方法の一例を示す。また、急性毒性試験を省略してほ場での影響試験を実施してもよい。

1. 急性経口毒性試験

本試験の原理は OECD テストガイドライン 213 に準拠している。

(1) 試験方法について

① 供試虫

セイヨウミツバチ (*Apis mellifera*) の若い働きバチを用いる。入手元・飼育方法等の経歴が明らかなものを用いる。供試虫は処理当日の朝又は前日の夕方に採取し、試験開始まで試験期間と同じ条件で管理し順化する。投与前2時間は絶食させる。

② 試験区

等比級数的に少なくとも5薬量区、被験物質を含まない無処理対照区及び少なくとも3薬量の基準物質（ジメトエート等毒性が既知のもの）区とする。

ただし、低毒性を確認するための予備的試験では、1薬量区と無処理対照区とし、投与区の薬量は $100 \mu\text{g}/\text{頭}$ とする。

1区10頭以上とし3反復以上で実施する。

③ 暴露方法及び飼育方法

被験物質を50% (W/V) ショ糖液に溶解又は分散し、供試虫10頭当たり $100 \sim 200 \mu\text{l}$ を原則として4時間（最大6時間以内）給餌する。被験物質投与後は50% ショ糖液を与える。飼育管理は $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度50~70%程度、暗黒条件で行う。

④ 試験期間

暴露開始4、24、及び48時間後に生存、死亡及び異常の各個体数を記録する。

ただし、24~48時間後における死亡率が10%を超える場合には96時間後まで延長する。また、暴露時間中に消費された被験物質溶液量を測定する。

⑤ その他

その他の試験条件の詳細は、OECDテストガイドライン213に準ずる。

(2) 結果の報告について

原則として以下の項目が記載されていること。

- ① 試験実施機関及び試験担当者（所属）
- ② 被験物質に関する情報
原体の場合 一般名、化学名、構造式、純度、ロット番号等
製剤の場合 種類名、有効成分含有量、ロット番号等
- ③ 試験区構成
- ④ 試験方法
- ⑤ 試験結果
ア 観察時間ごとのLD₅₀（ μ g/頭）
イ LD₅₀の算定方法
ウ 各観察時間における各試験区での累積死亡率
エ 観察された行動異常等の内容
オ その他結果の分析に必要なデータ・情報等

2. 急性接触毒性試験

本試験の原理はOECDテストガイドライン214に準拠している。

(1) 試験方法について

- ① 供試虫
急性経口毒性試験に準ずる。
- ② 試験区
急性経口毒性試験に準ずる。
- ③ 暴露方法及び飼育方法
被験物質は有機溶媒又は湿展剤を加えた水に溶解する。麻酔した供試虫の胸部背面に被験物質を1頭当たり1 μ l局所施用する。飼育管理は25℃ \pm 2℃、湿度50~70%程度、暗黒条件で行う。
- ④ 試験期間
急性経口毒性試験に準ずる。
- ⑤ その他
その他試験条件の詳細は、OECDテストガイドライン214に準ずる。

(2) 結果の報告について

急性経口毒性試験に準ずる。

3. ほ場での影響試験

(1) 試験方法について

ミツバチが利用する代表的な作物を用い、開花期に当該農薬の申請最高薬量（濃度）を単回施用し、一定の期間ミツバチに対する影響（死亡・行動異常等）を調査する。

(2) 結果の報告について

原則として以下の項目が記載されていること。

- ① 試験実施機関及び試験担当者（所属）
- ② 被験物質に関する情報
種類名、有効成分含有量、ロット番号等
- ③ 試験方法
- ④ 試験結果

ア 死亡・行動異常等についてそれぞれ適切に整理すること。

イ 考察

影響の内容、程度及び影響期間等に関する考察を行うこと。

4. 文献

- (1) EPPO(1992).Guideline on Test Methods for Evaluation the Side-Effects of Plant Protection Products on Honeybees(No.170).OEPP/EPPO Bulletin 22,203-215.
- (2) Harrison,E.G.(1993).Proceedings of the Fifth International Symposium on the Hazards of Pesticides to Bees, October 26-28, 1993, Plant Protection Service, Wageningen, The Netherlands. Report IUBBS,14pp + Appendices 180pp.
- (3) SETAC(1995).Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticide. Edited by Dr. Mark R.Lynch. Published by SETAC-Europe, Belgium. March 1995.
- (4) Stute, K. (1991). Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf die Honigbiene. Richtlinien für die Prüfung von Pflanzenschutzmitteln im Zulassungsverfahren, Teil VI, 23 - 1, Biologische Bundesanstalt für Land - und Forstwirtschaft (BBA), Braunschweig, Germany.
- (5) US-EPA(1995). Honey Bee Acute Contact Toxicity Test (OPPTS 850.3020). Ecological Effects Test Guidelines. EPA 712-C-95-147, Washington DC, United States of America.
- (6) EPPO/Council of Europe. (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products - Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, No.1, 151-165. March 1993.
- (7) Gough, HJ, McIndoe, E.C, Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity test on honey bees (*Apis mellifera* L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research 22, 119-125.
- (8) ICPBR Validation Exercise on the Use of Dimethoate as a Toxic Reference Substance in Toxicity Test on Honeybees (in preparation).
- (9) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, f. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.
- (10) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-york.
- (11) Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, 265-267.
- (12) U.S.EPA/OPPTS Guideline 850.3030"Toxicity of Residue on Foliage"
- (13) EPPO 170 "Cage tests"

蚕影響試験 (2-8-2)

急性経口毒性試験及び残毒試験の試験方法の一例を示す。また、急性毒性試験を省略して残毒試験を実施してもよい。

1. 急性経口毒性試験

(1) 試験方法について

- ① 供試蚕：実用品種
- ② 試験区構成

対照区として無処理区（被験物質が無添加であること以外は処理区と同じ）を設けること。

処理区は、当該農薬の申請最高薬量（濃度）で実施する。

③ 供試条件

桑葉に所定量を散布・風乾後、定法で飼育した蚕に4齡期間中毎日給餌する。また、人工飼料を用いる場合は、4齡期間中の摂食量に基づき飼料中の農薬成分量を調整する。

④ 試験期間

結繭までとする。

(2) 結果の報告について

原則として以下の項目が記載されていること。

① 試験実施機関及び試験担当者(所属)

② 被験物質に関する情報

種類名、有効成分含有量、ロット番号等

③ 試験区構成

④ 試験方法

⑤ 試験結果

ア 死亡

イ 中毒症状

ウ 4、5齡期間中の経過日数

エ 健蛹歩合と繭質

オ その他蚕に影響を及ぼす事項

カ 考察

2. 残毒試験

被験物質を散布した桑葉を蚕に摂食させ、残毒期間を経時的に調べる試験である。

(1) 試験方法について

① 供試蚕：実用品種

② 試験区構成

無処理区：被験物質が無添加であること以外は処理区と同じとする。

処理区：当該農薬の申請最高薬量(濃度)で実施する。

③ 供試条件

各区の処理葉を、設定経過日数に達した最初の日にまとめて採取し、検定蚕の4齡期間中毎日蚕に給餌する。

④ 試験期間

結繭までとする。

(2) 結果の報告について

原則として以下の項目が記載されていること。

① 試験実施機関及び試験担当者(所属)

② 被験物質に関する情報

種類名、有効成分含有量、ロット番号等

③ 試験区構成

④ 試験方法

⑤ 試験結果

ア 日別死亡蚕数及び減蚕歩合

イ 中毒症状

ウ 発育の斉一度

エ 4、5齡期間中の経過日数

- オ 健蛹歩合と菌質
- カ 安全日数の目安
- キ その他蚕に影響を及ぼす事項
- ク 考察

3. 文献

- (1) 日植防委託試験試験法「農薬の蚕に対する影響調査の指針」平成7年1月(社)日本植物防疫協会

天敵昆虫等影響試験(2-8-3)

急性毒性試験及びほ場での試験の試験方法の一例を示す。また、急性毒性試験を省略してほ場での試験を実施してもよい。

1. 急性毒性試験

(1) 試験方法について

① 供試昆虫等

適用農作物及び使用方法等を考慮し、原則として捕食昆虫類(双翅目(ハナアブ類等)、半翅目(カメムシ類等)、鞘翅目(テントウムシ類、オサムシ類等)、脈翅目(クサカゲロウ類等))、寄生蜂類(膜翅目(アブラバチ類、タマゴバチ類、ツヤコバチ類等))、クモ目(コモリグモ類等)捕食性ダニ類(ダニ目(カブリダニ類等))から2目3種以上を供試昆虫等として選択すること。

供試昆虫等は、日齢、行動、繁殖力、卵活性等を可能な限り揃え、感受性の高い発育期のものを使用することが望ましい。

② 試験区構成

無処理区：被験物質が無添加であること以外は処理区と同じ区を設ける。

処理区：当該農薬の申請最高薬量(濃度)で実施する。

③ 暴露方法及び飼育条件

被験物質及び供試昆虫等の性質等から、暴露可能な経路を選択し、供試昆虫等が被験物質に十分接触するように曝露させる。

飼育は供試昆虫等の最適条件下で行う。

④ 試験期間

被験物質及び供試昆虫等の性質等により適宜設定する。

(2) 結果の報告について

原則として以下の項目が記載されていること。

① 試験実施機関及び試験担当者(所属)

② 被験物質に関する情報

一般名、化学名、構造式、純度、ロット番号等

③ 生物種名

④ 試験区構成

⑤ 試験方法

⑥ 試験結果

ア 死亡率

イ 異常行動

ウ 被験物質及び供試昆虫等の性質等により、以下についても適宜調査すること。

- (ア) 捕食又は寄生性
- (イ) 生育状況 (期間、体長等)
- (ウ) 蛹化率 (完全変態するもの)
- (エ) 産卵率及び産卵数
- (オ) 次世代生存率 (孵化率)

エ 考察

2. ほ場での試験

(1) 試験方法について

① 供試昆虫等

供試昆虫等が存在するほ場等を選択する。場合によっては、供試昆虫等を放飼する。

② 試験区構成

無処理区：被験物質が無添加であること以外は処理区と同じ区を設ける。

処理区：当該農薬の申請最高薬量 (濃度) を単回で処理する。

③ 曝露方法

登録申請される農作物のうち代表的作物を栽培したほ場又は施設において、被験物質を登録申請に係る使用方法で処理する。

④ 試験期間

被験物質及び供試昆虫等の種類等により適宜設定する。

⑤ 調査方法

被験物質及び供試昆虫等の種類等の特性に応じ、適切な方法を用いる。

(2) 結果の報告について

原則として以下の項目が記載されていること。

① 試験実施機関及び試験担当者 (所属)

② 被験物質に関する情報

種類名、有効成分含有量、ロット番号等

③ 生物種名

④ 試験区構成

⑤ 試験方法

⑥ 試験結果

ア 生物種ごとの個体数

イ 個体ごとの齢

ウ 死亡、行動異常等についてそれぞれ適切に整理する。

エ 被験物質及び供試昆虫等の性質等により、捕食又は寄生性、繁殖等についても適宜調査し、適切に整理すること。

オ 考察

3. 文献

(1) BARRETT, K.L., et al. (1994): Guidance document on regulatory testing procedures for pesticides with non-target arthropods, SETAC-Europe, pp.51.

(2) HASSAN, S.A. (1985): Standard methods to test the side-effects of pesticides on natural enemies on insects and mites developed by the IOBC/WPRS working group, "Pesticide and biological organisms", Bull. OEPP/EPPO 15 : 214-255.

(3) HASSAN, S.A. (1992): Guidelines for testing the effects of pesticides on beneficial organisms :

Description of test methods, IOBC/WPRS Bulletin, 1992/XV/3, pp. 186.

(4) 平井一男(1996) : 非対象生物に及ぼす化学農薬の影響評価基準案 - EUの例 - : 植物防疫 50 : 285 ~ 289.

(5) 平井一男、森克彦(1997) : 農薬と有益生物のエコトキシコロジー研究の現状と論点 : 植物防疫 51 : 72-73.

(6) 平井一男(1999) : 天敵生物 : 総論 / 化学農薬の影響評価法の基礎 : 植物防疫 53 : 197 ~ 200.

鳥類影響試験 (2-8-4-1、2)

鳥類強制経口投与試験 (2-8-4-1)

試験方法は、米国EPA 712-C-96-139 April 1996 Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.2100 Avian Acute Oral Toxicity Test "Public Draft"等を参考に行う。

鳥類混餌投与試験 (2-8-4-2)

OECDテストガイドライン 205 Avian Dietary Toxicity Test, 1984 に準じて行うことが望ましい。

試験方法の概要を以下に示す。

1. 供試生物について

(1) 生物種

1種又はそれ以上の鳥類を用いる。種は、試験を行うための目的に従って選択されなければならない。供試種は実験室条件下での飼育又は試験に関する経験に基づき、選択される事が望ましい。鳥は良好な健康状態にあり、外見的に奇形があってはならない。試験に推奨される鳥類を表1にあげる。他の鳥類を使用する場合は、適切な試験条件になるよう試験方法を適合させなければならない。

表1にあげた鳥は、飼育が容易で同年広く入手できる。鳥は購入又は、卵から孵化させる事ができる。購入した鳥は、aspergillosis, Newcastle disease, pullorum等の様な病気の無いこと又はこのような病気の無い群から孵化したものであることを確認しなければならない。

(2) 生育段階

全試験区及び対照区の鳥は既知の系統の同じ詳からなり、少なくとも10~17日齢の幼鳥を使用する場合は、令の差は互いに1日以内でなければならない。

(3) 順化

鳥は少なくとも7日間設備及び基礎餌料に馴らさなければならない。鳥を無作為に鳥かごに入れ、その鳥かごに投与される濃度レベルを無作為に割りあてなければならない。基礎餌料は随意に食べられるようにしなければならない。

試験前72時間の間に、群の健康状態を調べなければならない。死亡率を記録し、次の基準を適用する。

- ① 健康状態又は未知の原因による群の死亡率が5%以上の場合 : 群のすべてを廃棄。
- ② 群の死亡率が5%以下の場合 : 群は供試できる。

(4) 試験個体数

各区は10羽以上とする。

2. 試験方法について

(1) 試験期間

一連の濃度に調製した供試物質を含む餌料を5日間鳥に与える。6日目に供試物質を含まない基礎餌料を最低3日間鳥に与える。

もし、死亡が7日目又は8日目に起こったり、中毒症状が8日目に残るか、又は回復が明確でない場合には、2日間死亡が認められなくなるまで試験を続け、鳥が回復する事を確認するか、又は実験開始から21日目まで行う。

(2) 飼料の調製について

少なくとも異なった5濃度の供試物質を含む餌料及び無処理の餌料が必要である。各々の濃度レベルは2.0以下の公比で行う。使用する濃度の設定には、毒性予測試験 (range-finding test) が必要である。

試験上限濃度は原則として5000ppmとする。この濃度で死亡又は毒性影響が認められなければ、5濃度レベルの試験を必要としない。

供試物質の必要量を含む餌料は、供試物質の適量と若鳥のために処方された基礎餌料とを均一に混合して調整する。供試物質が餌料中で均一に分散している事が混合方法の選択のための基準である。必要があれば、均一に分散させるために鳥に対して低毒性の助剤を使用してもよい。助剤は、餌料重量の2%以下とし、助剤を用いた場合には助剤対照区を設けること。

供試物質の毒性を変化させないという明白な証明が与えられている水、コーンオイル又は他の助剤を使用してもよい。

供試物質を含む餌料又は無処理の餌料は随意に食べられるようにしなければならない。

予防薬その他の薬物の使用は、可能な場合は避けるべきであるが、使用した場合は、その旨を報告する。

3. 環境条件について

種特有の環境条件を表1に示す。

また、以下に述べる一般的な環境条件は維持され、鳥の行動に著しい影響を与える環境変化をさげなければならない。

(1) 随意に清潔な水が飲めること。

(2) 1日に12～16時間の明期とすること。

(3) 1鳥かごに5～10羽を収容限度とすること。鳩の場合は、1羽ずつ収容すること。

(4) 換気は良好であること。

4. 観察及び測定について

実験期間中少なくとも以下の項目を観察する。

(1) 中毒症状と他の異常な挙動：処理1日目に2度、それ以降毎日1度観察

(2) 死亡率：処理1日目に2度、それ以降毎日1度

(3) 体重：処理0、5、8日及び試験終了日（8日を超えた場合）

(4) 摂餌量：0～5日、5～8日及び8～終了日（延長した場合）

5. 結果の処理について

半数致死濃度 (LC₅₀) はプロビット法、他の適切な統計的手法又はグラフを用いて測定する事ができる。(文献7、8及び9を参照) データが許す限り95%信頼限界を適当な方法によって求め、統計的な不均一性を検定し、データの信頼性を確定する。濃度公比が2又はそれ以下で試験し、得られたデータがLC₅₀の算出に際し、プロビット法が不適当な場合(殆どの結果が全く死亡がないか、すべて死亡したかのどちらかである場合)には、死亡を起こさない最高濃度、100%死亡させる最低濃度及び部分的に死亡させる濃度を用いLC₅₀を求める。(文献9、10及び11を参照)

5000 ppmでの死亡率が(推奨する最高処理濃度)50%以下であり、LC₅₀が計算できない場合には、LC₅₀を5000 ppm以上と報告し、無影響レベルを同時に報告する。

6. 報告書について

報告書には原則として次の内容を記載すること。

(1) 被験物質に関する情報

一般名、化学名、構造式、純度、ロット番号等

(2) 供試生物

種の学名、系統及び実験開始時の鳥の日齢

(3) 実験条件

- ① 収容状態(鳥かごの形式、大きさ、材質、温度、概算湿度、照明時間及び照度)
- ② 基礎餌料(入手先、組成、製造者の餌料分析結果(蛋白質、炭水化物、脂肪、カルシウム、リン等その他の添加物及び助剤))
- ③ 供試餌料(調整法、濃度数、餌料中の設定及び(測定した場合)実測供試物質濃度、濃度測定方法、混合及び交換頻度、助剤(使用時)、保管条件並びに投与方法)
- ④ 順化操作と鳥を鳥かごに無作為に入れる方法
- ⑤ 各濃度及び対照区の鳥かごの数及び鳥かご当たりの鳥の数
- ⑥ 観察の頻度、期間及び方法
- ⑦ 基準物質が用いられた場合、物質名及び供試餌料の調製方法

(4) 試験結果

- ① 各処理レベル及び対照群での死亡数
- ② 体重(試験開始時、暴露終了時及び試験終了時の各鳥かごの中の生存鳥の平均体重;試験期間中死亡したすべての鳥の個々の体重)
- ③ 中毒症状(けいれん又は運動不活発)及び他の異常な挙動(他の鳥との異常な相互作用)
試験開始日、試験期間、中毒の程度(死亡を含む)及び試験期間中の各日における各供試濃度及び対照餌料によって影響を受けた鳥数の記載
- ④ 摂餌量(暴露期間及びその後の回復期間での鳥かご当たりの摂餌量を重量差し引き法で測定する。)
- ⑤ 毒性予測試験結果(当該試験が行われた場合に限り。)
- ⑥ LC₅₀
95%信頼限界、濃度-死亡率曲線の傾き、適合度試験、 χ^2 検定の結果、死亡を起こさない最高濃度及び100%死亡させる最低濃度、用いた統計的方法又はその文献を記載

7. 試験の妥当性について

- (1) 対照区での死亡率は、試験終了時に10%を超えてはならない。

- (2) 試験期間中の最初の5日間を通して、餌料中の供試物質濃度が十分(少なくとも設定濃度の80%以上)維持されている事を明らかにしなければならない。
- (3) 最低処理濃度では、供試物質による死亡又は他の観察しうる毒性影響が生じてはならない。

表1 推奨される鳥の種と環境条件

推奨される種	推奨される条件			
	温度 (°C)	湿度 (%)	齢 (日)	スペース (cm ² /鳥)
マガモ <i>Anas platyrhynchos</i>		60 - 85	10 - 17	600
齢 0 - 7日	32 - 35			
8 - 14日	28 - 32			
>14日	22 - 28			
コリンウスラ <i>Colinus virginianus</i>		50 - 75	10 - 17	300
齢 0 - 7日	35 - 38			
8 - 14日	30 - 32			
>14日	25 - 28			
ハト <i>Columba livia</i>		50 - 75	56 - 70	2500*
齢 >35日	18 - 22			
ウスラ <i>Coturnix Coturnix japonica</i>		50 - 75	10 - 17	300
齢 0 - 7日	35 - 38			
8 - 14日	30 - 32			
>14日	25 - 28			
コウライキジ <i>Phasianus colchicus</i>		50 - 75	10 - 17	600
齢 0 - 7日	32 - 35			
8 - 14日	28 - 32			
>14日	22 - 28			
シヤコ <i>Alectoris rufa</i>		50 - 75	10 - 17	450
齢 0 - 7日	35 - 38			
8 - 14日	30 - 32			
>14日	25 - 28			

* ハトは個々に収容する。

8. 文献

- (1) U.S.EPA:Registration of Pesticides in the United States-Proposed Guidelines *Federal Register* 43, 123 (July 10, 1978).
- (2) Toxic Substances Control Act, Section 4:Five-day Dietary Toxicity Test Standard for Mallard and Bobwhite Office of Toxic Substances, U.S.EPA, Washington, D.C.
- (3) Pesticides Safety Precautions Scheme, Working Document D S: Evaluating the Acute Oral and Short-Term Cumulative Oral Toxicity of Pesticides to Birds, Tolworth Laboratory, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, U.K (1979).
- (4) Protocols for Sub-acute Toxicity Test (LC50-8 days) in Quail and Mallards, Central Institute for Nutrition and Food Research, TNO, The Netherlands.
- (5) E.F.Hill, R.G.Heath, J.W.Spann and J.D.Williams, Lethal Dietary Toxicities of

- Environmental Polluants to Birds, U.S. Fish and Wildlife Service, Special Scientific Report-Wildlife N 191, Washington, D.C. (1975)
- (6) National Research Council: Coturnix Standards and Guidelines for the Breeding, Care, and Management of Laboratory Animals, U. S. National Academy of Sciences, Washington, D.C. (1969).
 - (7) D. J. Finney, Probit Analysis, 3rd ed, Cambridge University Press, London (1971)
 - (8) J.J. Litchfield and F. Wilcoxon, *J. Pharmacol. Exper. Ther.* 96, 99-113 (1949).
 - (9) C.E. Stephan, in Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.L. Mayer and J.L. Hamelink), ASTM STP 634, pp. 65-84, American Society for Testing and Materials (1977).
 - (10) W.R. Thompson, *Bacteriological Review* 11, 115-145 (1974).
 - (11) C.S. Weil, *Biometrics* 8, 249-263 (1952)

有効成分の性状、安定性、分解性等に関する試験（2-9-1～16）

本試験で用いる被験物質はできるだけ純度の高い標品を用いることが望ましいことから可能な限り精製した標品を用いる。精製が困難な場合等で純度の低い標品を用いる場合は、その理由を明らかにしておく必要がある。また、各試験で用いた被験物質の純度を報告書に記載する。

色調に関する試験（2-9-1）

1. 光条件は自然光で差し支えない。
2. 観察条件（温度、光条件等）を記録する。
3. 色調の表示方法は、原則としてJISで規定された用語を用いる。

形状に関する試験（2-9-2）

観察条件（温度、光条件等）を記録する。

臭気に関する試験（2-9-3）

1. 観察者の健康に危害が及ぶおそれがある場合は、試験を実施する必要はない。ただし、その理由を明らかにしておく。
2. 観察条件（温度等）を記録する。
3. 臭気の表現例としては、「刺激臭」、「芳香臭」、「イオウ臭」、「エーテル臭」、「フェノール臭」、「アルデヒド臭」、「アミン臭」、「にんにく臭」、「特異臭」、「無臭」等を用い、これらに「強い」、「わずかな」などの強弱の表現を併せて用いる。

スペクトルに関する試験（2-9-4）

1. 用いた測定装置（製造会社及び機種）、測定条件（温度、溶媒の種類、被験物質の濃度等の一般条件、IRの試料調製法、MSの導入条件、イオン化条件、NMRの測定核種、基準物質等の各測定固有条件）を記録する。
2. UV/VISの測定波長幅は、220～400nm程度は必要である。また、有色物質の場合は、可視部も必須とする。強度の異なる吸収があつて同一強度ですべてのピークトップを明瞭に表示することができない時は、拡大・縮小チャート添付が望ましい。pHによって解離する成分については、解離状態と非解離状態のスペクトルを測定すること。なお、測定条件下で短時間に分解する場合は、試験を実施する必要はない。ただし、その理由を明らかにしておく。
3. NMRは、 ^1H -NMR及び ^{13}C -NMRを測定すること。

融点に関する試験（2-9-5）

1. $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 程度で凝固が見られる場合には、試験を行う。なお、融点が $10\text{ }^\circ\text{C}$ 未満の場合は、OECDテストガイドラインに準拠した方法以外の方法で測定しても差し支えない。
2. 測定中、融点に達しない温度で熱分解が起こるなど、測定が不可能な場合には、その旨を記録する。

沸点に関する試験（2-9-6）

1. 液体・固体等の形態にかかわらず、実施可能な範囲で測定を行う。
2. 熱分析法の場合、ピンホールセルの使用や基準物質の沸点を用いた校正等、測定方法

を工夫する。

蒸気圧に関する試験 (2-9-7)

1. 沸点が 30℃以下の物質については、試験を実施する必要はない。
2. 気体流動法の場合、何らかの方法で飽和していることを確認する。
3. 蒸気圧が 10⁻⁵Pa 未満であることが推定できる場合は、試験を実施する必要はない。ただし、その理由を明らかにしておく。

水溶解度に関する試験 (2-9-8)

1. 測定は、250g/l を測定上限値に、10⁻⁶ g/l を測定下限値とする。なお、分析が困難である場合は測定の下限は測定可能な濃度までで差し支えない。
2. 短時間で分解する場合は、試験を実施する必要はない。ただし、その理由を明らかにしておく。

有機溶媒に対する溶解度に関する試験 (2-9-9)

測定は、250g/l を測定上限値に、10⁻²g/l を測定下限値とする。

土壌吸着性に関する試験 (2-9-10)

1. 平衡化試験における変化率は、測定時間当たり 10%以内を目安とする。
2. $K_{d, \alpha}^{ad}$ は、フロイントリッヒの吸着等温式のパラメータ $K_{d, \alpha}^{ad}$ を有機炭素含有率(OC%)で割って求める ($K_{d, \alpha}^{ad} = K_{d, \alpha}^{ad} \div OC\% \times 100$)。

オクタノール/水分配係数に関する試験 (2-9-11)

1. 解離する物質については、緩衝液を用いるなど非解離条件で測定する。また、その理由及び根拠を明記する。
2. フラスコ振とう法の場合、相比等複数条件下で測定し、平衡条件にあることを確認する。

密度に関する試験 (2-9-12)

かさ密度でなく真密度を測定する。

加水分解性に関する試験 (2-9-13)

予備試験で分解が予想される場合は、直接本試験を実施して差し支えない。

解離定数に関する試験 (2-9-14)

1. プロトン付加を含め、溶液中でのイオン化を解離とする。
2. アルカリ側を含め、可能な範囲で実施するものとする。
3. 水溶解度が 10⁻⁴ g/l 以下の被験物質については試験を実施する必要はない。
4. 滴定法の場合、CO₂の除去方法を報告書へ記載する。
5. 化学構造等から明らかに通常の pH 範囲では解離しないことがわかる被験物質については、試験を実施する必要はない。ただし、その理由を明らかにしておく。

熱に対する安定性に関する試験 (2-9-15)

1. 400℃程度まで測定する。
2. DSCまたはDTA法の場合、示差熱チャートを添付する。

3. DTA法の雰囲気ガスについては特に指定しない。

水中光分解性に関する試験（2-9-16）

1. 試験実施に当たり合理的理由がある場合は、蒸留水に換えて緩衝液を用いた試験を実施して差し支えない。
2. 水中光分解運命試験に準拠して実施する。

水質汚濁性に関する試験

水質汚濁性試験（2-10-1）

1. 試験水田について

(1) 試験水田の調製

試験水田を新たに調製する場合には、充填土層内が粗密になったり、割れ目等がでないよう十分注意する。また、調製後は、土壌が落ち着くまでの間（数か月程度）水を張り放置する。

(2) 試験水田の土壌

試験土壌は、できる限り土壌の特性の異なるものを選定する。
粒径組成及び土性分類（国際土壌学会等）、土壌 pH（水及び KCl 水溶液又は CaCl₂ 水溶液）、有機炭素含量、CEC（陽イオン交換容量）、主粘土鉱物、その他試験結果の評価に有益な性質及び採取した場所の詳細情報（履歴情報を含む）が明らかな土壌を使用する。土壌群（土壌統群）又は成因の知見は、試験結果の評価に有益な情報の1つとなる。

(3) 試験水田に使用する水

河川水等については被験物質の有効成分等を含まないものを、また、水道水については、一洗汲み置きをしたものを使用する等、被験物質の有効成分等の分析、分解等に影響を及ぼすおそれのある物質を含んだ水は使用しない。

2. 試験区（試験水田）の管理について

試験水田の水が不足した場合には、速やかに補充する。

なお、試験水田に屋根を設けてない場合には、雨水による溢水等に十分注意する。

3. 試験区の栽培作物について

(1) 試験水田で栽培する作物は、当該農薬の登録申請にあたりその申請書の記載に基づいて使用される範囲の作物とするが、特殊な作物で栽培が困難な場合には、作物を栽培しないで試験を行うことができる。

(2) 使用される作物が複数ある場合には、原則として、有効成分投下量が最も多くなる作物とする。

(3) 被験物質の処理の時期は、登録申請の農作物の使用時期とする。

(4) 登録申請の農作物及び使用方法が複数ある場合には、原則として、有効成分等の水田水中の濃度が他の方法に比べ最も高くなると考えられる農作物の使用方法とする。

4. 被験物質の取扱い及び施用について

(1) 被験物質は、1回の処理量が有効成分換算で最大となる使用方法で施用する。

乳剤等の希釈液を施用する場合は、10a 当たりの散布液量を 150 L として計算により求める。

育苗箱処理の場合には、10a 当たり 20 箱使用するものとして、計算により求める。

- (2) 被験物質は、密栓、密封等により適切に保管すること。開封後長期間保管する場合であっても 1 年間を限度とする。
- (3) 被験物質の調製後、速やかに施用できない場合は、再度調製の上施用する。
- (4) 被験物質の施用時に天候、雨量、風向、風速等の気象条件を記録する。

5. 試料の採取について

- (1) 採取は、乱数表による無作為法、又は S 字若しくは X 字型等の系統的な方法とし、試験区の端からは採取しない。
- (2) 採取に使用する用具等は清浄であることを確認して使用する。
- (3) 採取及び包装は無処理区から行い、被験物質の接触したと思われる手、用具又は衣服から試料が汚染されることを避ける。
- (4) 採取した試料は試験区毎にそれぞれ包装し、輸送中に破損しないようにする。
- (5) 浸透水についても、水田水を採取するための試験期間内で、適切な時期（通常 1 週間間隔）に採取し、分析を行う。

6. 試料の取り扱いについて

- (1) 試料を保管する場合は、5℃以下で保管する。
- (2) 保管する場合は、保存安定性試験を実施する。
- (3) 試験水中に浮遊物質（藻、ミジンコ、腐植等）が明らかに存在した場合、濾過等適切な手段をもって除去する。

7. 試料の分析について

(1) 分析対象物質

- ① 分析対象物質は、当該農薬の有効成分のほか、土壤中運命試験において生成した代謝分解物及び水中運命試験において生成した代謝分解物等のうち主要なもの（通常、10%以上生成したものとし、CO₂を除く。）とする。ただし、これらの代謝分解物の内、毒性上問題ないことが知られている場合、毒性試験の結果（通常は急性毒性及び突然変異原性）等から毒性上の懸念がないことが示される場合又はそれら代謝分解物が残留するおそれがないと判断される場合には、除く。
- ② 分析対象物質の標準品の純度は、おおむね 95%以上を目安とする。

(2) 分析方法

分析方法は必要な精度、定量限界及び回収率を有するものとする。

- ① 同一試料について 2 回以上繰り返して分析を行ない分析値を平均して測定値とする。
- ② 原則として、標準偏差パーセント（変動係数＝標準偏差÷平均値×100）が 10%（ただし、定量限界付近においては 20%）以内の精度、1 μg/L 以下の定量限界を有するものであること。
- ③ 定量限界は、試料について全操作を行った場合に十分な回収率が得られる最低濃度とし、無処理区の試料に検出限界量のおおむね 1～10 倍になるよう分析対象物質を添加して、分析の全操作を行った場合の添加量に対する回収率が、70～120%の回収率が得られる濃度を定量限界とする。分析は 3 回以上行う。有効数字は、2 桁以内とする。
- ④ 回収率は、無処理区の水田水に被験物質の有効成分を添加し、定量限界濃度において、3 回以上繰り返し測定する。被験物質の施用量から求められる理論濃度及び

定量限界との中間付近の濃度においても添加回収試験を実施する。有効数字は、原則として小数点第一位を四捨五入し整数で表記する。

- ⑤ 検出限界は、試料について分析の全操作を行ったと仮定した場合、分析対象物質の有無が明らかに判断できる最低濃度とする。有無が明らかに判断できるとは、例えばクロマトグラム上で当該物質の保持時間に明確なピークが認められ、試料由来の妨害ピークが重ならない等、その分析方法において当該物質の有無が明らかに判断できることをいう。有効数字は、2桁以内とする。

(3) 保存安定性試験

保管する場合は、原則として、別に採取した水に、既知量の分析対象物質を添加した試料を同時に冷蔵保管することにより、保管中の分析対象物質の減少を把握し、減少のないことを確認する。試料の保管後の回収率は、70%以上得られることを目安とする。(回収率の試験による補正によらない。)

8. 報告書について

(1) 分析値

- ① 分析値は、無処理区の値を差し引くことなく、そのまま記載し、また、回収率による補正も行わない。
- ② 分析値は、定量限界の位にまとめる。ただし、有効数字は3桁以内とする。数字のまるめ方はJIS Z8401-1999の規定による。
- ③ 分析値が定量限界 ($a \mu\text{g/L}$) 未満のときは「 $< a \mu\text{g/L}$ 」と記載する。
- ④ 分析値に定量限界未満の値が含まれている場合は、平均しない。
- ⑤ 代謝分解物の分析値は、被験物質の有効成分に換算する。
- ⑥ 測定値の記載方法は分析値の場合に準じる。
- (2) 報告書は、「水質汚濁に係る分析結果報告書」(別記様式1)及び「水質汚濁に係る分析試料調整明細書」(別記様式2)により記載し、別紙の資料を添付する。

<残留性に関する試験>

農作物等への残留性に関する試験 (3-1-1、2)

作物残留性試験 (3-1-1)

1. 供試農作物について

栽培条件(施設・露地、有袋・無袋)については、施設栽培又は無袋栽培が通常に行われている農作物はその栽培法を、施設栽培又は無袋栽培が普及すると思われる農作物はできるだけその栽培法を採用する。

2. 試験区について

- (1) 汚染を防止するための措置としては、緩衝地帯、遮蔽措置等がある。
- (2) 同一ほ場から収穫時期を変えて採取し、それぞれを別試験区としても差し支えない。

3. 供試農作物の栽培について

- (1) 栽培期間中に病害虫等の発生で、他の農薬を使用する場合は、試験農薬の分析を妨害しない農薬を選択すること。
- (2) 干ばつ等で供試農作物が通常の生育に満たない矮小な場合等は、試験に用いない。

4. 被験物質の取扱い及び施用について

- (1) 被験物質は、密栓、密封等により適切に保管すること。開封後長期間保管する場合であっても1年間を限度とする。
- (2) 被験物質の調製後、速やかに施用できない場合は、再度調製の上施用する。
- (3) 展着剤を加用する場合は、慣行の使用方法で行う。

5. 試料の採取について

- (1) 採取は、乱数表による無作為法又はS字若しくはX字型等の系統的な方法とし、試験区の端からは採取しない。ただし、登録申請の適用場所が水田畦畔の場合は、処理した畦畔に沿って採取すること。
- (2) 採取に使用する用具、袋等は清浄であることを確認して使用する。
- (3) 採取及び包装は無処理区から行い、手、用具又は衣服から試料が汚染されることを避ける。
- (4) 試料の取扱いに当たっては、表面に付着している被験物質を除去しないように注意する。
- (5) 採取した試料は試験区毎（場合によっては個々）にそれぞれ包装し、輸送中に破損しないようにする。

6. 試料の取扱いについて

- (1) 試料の調製者は、別記様式3の別紙「農薬作物残留量分析試料調製明細書」に所要事項を記載し、分析者に送付する。
- (2) 受領した試料は到着後、速やかに写真（試料の大きさ又は状態が分かるようなもの）を撮る。
- (3) 受領した試料を保管する場合は、冷蔵の場合は5℃以下、冷凍の場合は-20℃以下で保管するものとするが、冷凍の場合であっても保存期間は、原則として採取後1カ年を超えてはならない。
- (4) 保管する場合は、保存安定性試験を実施する。

7. 試料の分析について

(1) 分析対象物質

分析対象物質は、当該農薬の有効成分のほか、植物体内運命試験等において生成した主要な代謝物（通常、10%以上生成したものとし、CO₂を除く。）とする。

ただし、これらの代謝分解物の内、毒性上問題ないことが知られている場合、毒性試験の結果（通常は急性毒性及び突然変異原性）等から毒性上の懸念がないことが示される場合又はそれら代謝分解物が残留するおそれがないと判断される場合は、除く。

分析対象物質の標準品の純度は、おおむね95%以上を目安とする。

(2) 分析部位

- ① みかん及びももについては、参考として果皮も分析することが望ましい。
- ② 茶については、参考として食品規格に基づく熱湯抽出法についても分析することが望ましい。
- ③ 登録申請の使用時期が生育初期に該当する大根については、間引菜及びつまみ菜も分析すること。

(3) 分析方法

食品規格又は農薬登録保留基準値の設定に際して定められた告示分析法があっても、

それらの告示分析法では適切な分析ができないおそれがある場合は他の分析法を用いて差し支えない。分析方法は必要な精度、定量限界及び回収率を有するものとする。

- ① 同一試料について2回以上繰り返して分析を行い分析値とする。
- ② 当該分析法は原則として、標準偏差パーセント（変動係数＝標準偏差÷平均値×100）が10%（ただし、定量限界付近においては20%）以内の精度（代謝物については親化合物換算していない数字とする。）を有するものであること。
- ③ 無処理区の試料に定量限界量及び当該農薬の残留が見込まれる濃度になるよう、分析対象物質を添加して3回以上繰り返し分析を行い、平均及び変動係数を求める。
- ④ 定量限界は、食品規格又は農薬登録保留基準値が定められている農薬については、基準値の1/10を目途に、その他の農薬では通常0.01～0.05ppmを目途に設定し、試料について、分析の全操作を行った場合の添加量に対する回収率が、70～120%の値が得られる濃度を定量限界とする。分析は3回以上行う。定量限界の有効数字は、2桁以内とする。
- ⑤ 回収率は70～120%の範囲とし、回収率の試験は、試料調製場所ごとの試料について行う。
- ⑥ 検出限界は、試料について分析の全操作を行ったと仮定した場合、分析対象物質の有無が明かに判断できる最低濃度とする。有無が明かに判断できるとは、例えばクロマトグラム上で当該物質の保持時間に明確なピークが認められる、試料由来の妨害ピークが目的とするピークに重ならないなど、その分析法において当該物質の有無が明かに判断できることをいう。検出限界は装置の試料測定感度、試料の採取量又は分析操作による濃縮割合から算出する。
検出限界の有効数字は、2桁以内とする。

(4) 保存安定性試験について

- ① 分析試料を有姿で保存し、保存安定性試験は磨砕試料で行なっても差し支えない。
- ② 保管後の回収率は、70%以上得られること。（回収率の試験による補正によらないこと。）

8. 報告事項について

(1) 分析値

- ① 分析値は無処理区の値を差し引くことなくそのまま記載し、また、回収率による補正は行わない。
- ② 代謝物の分析値は、本体と代謝物の分子量を基に、本体に換算した値も記載する。
- ③ 分析結果は、分析対象物質・分析部位毎（ホール換算）にまとめる。
- ④ 分析値は有効数字3桁以内とする。ただし、定量限界の次の位にわたる時は、定量限界の次の位で四捨五入する。
- ⑤ 分析値が定量限界「a p p m」未満の時は「<a p p m」と記載する。
- ⑥ 食品規格又は農薬登録保留基準値の設定に際して定められた告示分析法以外の分析法を用いた場合、又は告示分析法を変更した分析法を用いた場合は、分析法確立の経緯を添付する。
- ⑦ 回収率の有効数字は原則として小数点第一位を四捨五入し整数で表記する。

(2) 報告事項は、別記様式3「作物残留分析結果報告書」により記載し、別紙の資料を添付する。

乳汁への移行試験（3-1-2）

1. 供試動物について

原則として乳牛を用いるが、乳汁が十分得られる山羊での試験でも差し支えない。

2. 投与方法及び投与量について

- (1) 被験物質として放射性同位元素で標識した化合物を使用することができる。
- (2) 被験物質について、原体又は製剤の純度、組成が明らかであること。
- (3) 投与量は、稲わらの場合、2 ppm 残留する農薬であれば、乳牛は1日に2 kg の稲わらを摂取するものとし、 $2 \text{ ppm} \times 2 \text{ kg} = 4 \text{ mg}$ となり、2倍の安全率を乗じて1日に8 mg の農薬を投与する。飼料作物の場合は、一日に20 kg 摂取するものとして、同様に一日当たりの投与量を算出する。
- (4) 被験物質を混餌して投与する場合は、吐き戻し、残量等を明らかにしておく。

土壌への残留性に関する試験（3-2-1、2）

土壌残留性試験（3-2-1-1、2）

農薬の成分物質等とは、被験物質に係る農薬の有効成分（以下「親化合物」という。）及び農薬の成分である物質が生物的又は化学的に変化して生成した物質をいう。

「DT₅₀、DT₁₀」とは、それぞれ、被験物質の濃度が、最高濃度の50%、10%になるまでの時間をいい、「農薬取締法第三条第一項第四号から第七号までに掲げる場合に該当するかどうかの基準（昭和46年3月2日農林省告示第346号）」の二における「農薬の成分物質等が2分の1に減少する期間」は、DT₅₀と同等とみなす。

容器内試験（3-2-1-1）

1. 供試土壌について

- (1) 試験土壌は、鉍質土壌及び火山灰土壌のそれぞれ特性の異なる2種類以上を日本国内のほ場より選定する。
- (2) 粒径組成及び土性分類（国際土壌学会等）、土壌pH（水及びKCl水溶液又はCaCl₂水溶液）、有機炭素含量、CEC（陽イオン交換容量）、主粘土鉍物、その他試験結果の評価に有益な性質及び採取した場所の詳細情報（履歴情報を含む）が明らかな土壌を使用する。土壌群（土壌統群）又は成因の知見は、試験結果の評価に有益な情報の1つとなる。

2. 供試土壌の調製について

- (1) 土壌を充てんした試験容器は、上部をアルミホイル等で覆う。
- (2) 水分を補給する場合は、土壌を混和しない。なお、水分を補給した日及び補給量を明確に記録する。
- (3) 試験容器中における土壌温度は25～30℃とするが、25℃が望ましい。
- (4) 供試土壌の土壌微生物の活性を高めるため、予備培養は1週間は最低必要であり、2週間程度行うことが望ましい。
- (5) 供試土壌は、採取後速やかに実験に供するものとするが、やむを得ず保存する場合は4℃の冷暗所で保存し、保存期間は3か月を超えてはならない。

3. 被験物質の処理について

- (1) 乳剤等、希釈液をそのまま散布する農薬であって、具体的な散布液量が記載されていない場合には10a当たりの散布液量を、稲の場合は150L、野菜の場合は300 L、果樹の場合は700 Lとして計算により求める。ただし、土壤の仮比重は1とする。また、当該濃度で分析が困難な場合はその可能な濃度の範囲にすることもできる。
- (2) 被験物質の試験土壤への処理は、必要に応じて、蒸留水、有機溶媒又はクレーなどの担体で希釈し、当該土壤中に添加し、添加後は葉さじ等を用い均一に混合する。有機溶媒を使用する場合は、土壤微生物に影響のないものを用い、その量はできる限り少量とする。
- (3) 試験は、光をさけた条件で実施する。
- (4) 試験期間は、最長1年とする。

4. 試料の取扱いについて

- (1) 試料は、採取後すみやかに分析するものとするが、やむを得ない事情があるときは、凍結保管することができる。保管する場合は、-20℃以下で保管する。
- (2) 保管する場合は、保存安定性試験を実施する。

5. 試料の分析について

(1) 分析対象物質

分析対象物質は、当該農薬の有効成分のほか、土壤中運命試験及び水中運命試験等において生成した主要な代謝物（通常、10%以上生成したものとし、CO₂を除く。）とする。

ただし、これらの代謝分解物の内、毒性上問題ないことが知られている場合、毒性試験の結果（通常は急性毒性及び突然変異原性）等から毒性上の懸念がないことが示される場合又はそれら代謝分解物が残留するおそれがないと判断される場合は、除く。

分析対象物質の標準品の純度は、おおむね95%以上を目安とする。

(2) 分析方法

分析方法は必要な精度、定量限界及び回収率を有するものとする。

- ① 同一試料について2回以上繰り返して分析を行い、分析値を平均して測定値とする。
- ② 当該分析方法は原則として、標準偏差パーセント（変動係数＝標準偏差÷平均値×100）が10%（ただし、定量限界付近においては20%）以内の精度、0.01 mg/kg以下の定量限界（やむを得ない場合は試験期間中における有効成分物質の最高値の1%以下の濃度。代謝物については親化合物換算していない数字とする。）を有するものであること。
- ③ 定量限界は、試料について分析の全操作を行った場合に十分な回収率が得られる最低濃度とし、無処理区の試料ごとに検出限界のおおむね1～10倍になるよう分析対象物質を添加して、分析の全操作を行った場合の添加量に対する回収率が、70～120%の値が得られる濃度を定量限界とする。分析は3回以上行う。定量限界の有効数字は、2桁以内とする。
- ④ 回収率は、無処理区の土壤に被験物質を添加し、定量限界の濃度並びに本試験の処理濃度とその中間付近の濃度において3回以上繰り返し測定する。有効数字は、原則として小数点第一位を四捨五入し整数で表記する。
- ⑤ 検出限界は、試料について分析の全操作を行ったと仮定した場合、分析対象物質の有無が明らかに判断できる最低濃度とする。有無が明らかに判断できるとは、例

えばクロマトグラム上で当該物質の保持時間に明確なピークが認められ、試料由来の妨害ピークが重ならない等、その分析方法において当該物質の有無が明らかに判断できることをいう。検出限界は装置の試料測定感度、試料の採取量及び分析操作による濃縮割合から算出する。

検出限界の有効数字は、2桁以内とする。

(3) 保存安定性試験

保管する場合は、原則として、別に採取した土壌に、既知量の分析物質を添加した試料を同時に凍結保管することにより、保管中の分析物質の減少を把握し、減少のないことを確認する。保管後の回収率は、70%以上得られることを目安とする。(回収率の試験による補正によらない。)

6. 報告書について

(1) 分析値

- ① 分析値は、無処理区の値を差し引くことなく、そのまま記載し、また、回収率による補正は行わない。
- ② 分析値は、定量限界の位にまとめる。ただし、有効数字は3桁以内とする。数字のまるめ方はJIS Z8401-1999の規定による。
- ③ 分析値が定量限界 (a mg/kg) 未満のときは「< a mg/kg」と記載する。
- ④ 分析値に定量限界未満の値が含まれている場合は、平均しない。
- ⑤ 分析値は、乾土当たりで表す。
- ⑥ 代謝物の分析値は、親化合物に換算し、報告書には親化合物換算していない数字と親換算した数字を記載する。親化合物と代謝物(換算後)の合計濃度も算出する。
- ⑦ 測定値の記載方法は分析値の場合に準じる。

(2) 農薬の成分物質等の土壌中濃度が2分の1に減少するのに要する期間は以下により求める。

- ① 成分物質等の土壌中濃度とは、親化合物及び毒性並びに残留量の点から無視することができない代謝物の合計濃度であること。
なお、親化合物と代謝物の濃度の含量を求める場合、代謝物については親化合物換算し、各成分ともその濃度が定量限界以下の場合には、定量限界値を加算する。
- ② 最高濃度が2分の1に減少した時点は、濃度と時間を軸とするグラフにおいて経時的に隣接する二つの測定値を結んだ線が最高濃度の2分の1である濃度を通過した時点であること。
なお、最高濃度の2分の1である濃度を通過した時点が複数ある場合は、最後に通過した時点とする。

(3) 報告書は、「土壌残留分析結果報告書」(別記様式4)により記載し、別紙資料を添付する。

- ① 分析値が処理直後の分析値又は最高値の2分の1になる期間を記した消失曲線の片対数図表(濃度を対数にとる)及びDT50。
- ② クロマトグラフィーによって分析する場合は、標準品の検出例、最小検出量又は定量限界の確認、回収率の例、標準物質無添加の無処理区、試料分析例等のクロマトグラム。
- ③ 分光光度法によって分析する場合は、標準品の最小検出量又は定量限界の確認、回収率の例、無処理区、試料分析例等の吸収スペクトルと吸光度。
- ④ その他の方法で分析する場合も、これに準ずる資料。
- ⑤ 試料分析に当たり、抽出から定量まで時間を要した場合は、報告書中の「試料分

析年月日」には、当該範囲を記載する。

ほ場試験（3-2-1-2）

1. 試験ほ場について

- (1) 試験ほ場は、前作及び試験実施前の農薬散布の履歴農薬の散布歴、土壌の特性等が確認されたほ場で試験を行う。土壌の特性の異なる国内の2か所以上とする。
ただし、やむを得ない事情により、土壌の特性の異なるほ場を選定できない場合は、気象その他土壌の特性以外の条件の異なるほ場を選定することができる。
- (2) 試験ほ場で栽培する作物は、当該農薬の登録申請に当たり、その使用される範囲の作物とする。
- (3) 当該農薬の成分物質等の分析を妨害する農薬は試験期間中も使用はしない。
- (4) 施設の場合、栽培作物を収穫した後においても通常のかん水を行う。

2. 被験物質の取扱い及び施用について

- (1) 使用方法が、2以上ある時は、いずれかのうち、供試農薬の分析物質等が2分の1に減少する期間が他の使用方法より短いと予想される場合は、省略することができる。その場合、当該農薬の登録申請に当たって、他の使用方法より半減期が短い又は同程度という判断根拠を示す必要がある。
- (2) 乳剤等、希釈液をそのまま散布する農薬であって、具体的な散布液量が記載されていない場合には10a当たりの散布液量は、稲の場合は150L、野菜の場合は300L、果樹の場合は700Lとする。
- (3) 種子消毒の場合、播種直後に使用する場合又は播種箱に施用する場合は、当該農薬の使用量から算出した量をほ場に処理して試験を実施する。なお、稲の場合は10a当たり粉は4kg、育苗箱は20箱使用するものとする。
- (4) 登録申請の使用が水田耕起前及び水田不耕起の場合は、当該農薬の使用 방법에即した方法で試験を実施する。
- (5) 登録申請の適用場所等が水田畦畔、休耕田及び水田刈り取り後の場合は、畑地条件で試験を実施しても差し支えない。
- (6) 登録申請の作物が果樹、野菜等の形態が異なる複数の作物に及ぶ場合は、土壌への落下量が多い作物を選定し、その作物の栽培ほ場で試験を実施する。通常、果樹と野菜がある場合は野菜を選定する。
- (7) 登録申請の作物の栽培形態が施設及び露地の場合は、使用時期、使用方法及び薬剤の特性を考慮して試験を実施する。
- (8) 当該農薬の登録申請に当たりその申請書の記載に基づいて使用される使用方法とするが、特異な使用方法で試験が困難な場合には、他の方法で試験を行うことができる。
- (9) 被験物質の調製後、速やかに施用できない場合は、再度調製の上施用する。
- (10) 被験物質は、密栓、密封等により適切に保管すること。開封後長期間保管する場合であっても1年間を限度とする。
- (11) 施用時の天候、雨量、風向、風速等の気象条件を記録する。

3. 試料の採取について

- (1) 試験期間は、原則として、DT50を明確にすることができる期間とする。
土壌の採取期間が1年にわたる場合は、途中で耕起・掘起し等が想定されるが、原

則として、耕起しない状態のままサンプリングを続ける。

- (2) 採取は、乱数表による無作為法又はS字若しくはX字型等の系統的な方法とし、試験区の端からは採取しない。
- (3) 採取に使用する用具等は清浄であることを確認して使用する。
- (4) 採取及び包装は無処理区から行い、被験物質の接触したと思われる手、用具又は衣服から試料が汚染されることを避ける。
- (5) 試料は、原則として風乾することなく、生土のまま土塊を細かく砕き、ふるいを用い粒径5 mm以上のれき及び粗大有機物を選別除外してからよく混合した後、一定量を分析試料とする。

畑地土壌はポリエチレン袋又はガラス瓶など、水田土壌はガラス瓶などに入れ、包装する。

- (6) 採取した試料は試験区毎（場合によっては個々）にそれぞれ包装し、輸送中に破損しないようにする。

4. 試料の取り扱いについて

- (1) 試料の調製者は、別記様式4の別紙2の「農薬土壌残留分析試料調製明細書」に所要事項を記載し、分析者に送付する。
- (2) 試料は、採取後すみやかに分析するものとする。やむを得ない事情があるときは、凍結保管することができる。保管する場合は、-20℃以下で保存する。

5. 分析について

容器内試験（3-2-1-1）に準ずる

6. 報告書について

容器内試験（3-2-1-1）に準ずる

後作物残留性試験（3-2-2）

1. 供試農作物について

- (1) 供試農作物については、後作物として栽培される可能性が高い農作物を選定する。
- (2) 永年作物や同一ほ場で長期間栽培（1年以上）される農作物は対象外とする。

2. 試験区について

前作は、登録申請予定作物の中で最も土壌残留量が多くなると想定される農作物及び使用方法を選択する。

3. 分析対象物質について

- (1) 対象となる農薬の規制対象物質とする。規制対象物質が定められていない農薬については、規制対象物質となるおそれのある物質とする。
- (2) 土壌残留試験において規制対象物質となったもので、土壌に長期に残留するものについては分析対象物質とする。