

微生物農薬の登録申請に係る
安全性評価に関する試験成績の取扱いについて

(平成9年8月29日付け9農産第5090号
農林水産省農産園芸局植物防疫課長通知)

(別添)

微生物農薬の安全性評価に必要な資料を作成するに当たっての指針

I 基本的事項

1 本指針に対する基本的考え方

- (1) 本指針は微生物農薬の登録申請に当たって提出する安全性評価に必要な資料を作成するに当たっての目安として利用するものである。
- (2) 試験者は安全性評価試験を実施するに当たって、本指針に厳密に従うことを要求されているものではない。試験者が被験試料の特性に応じ、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。

2 被験試料について

- (1) 原体を被験試料として用いる場合は、市販用微生物農薬の製剤原料としての原体と同等の成分組成のものとする。

なお、原体を被験試料としての試験実施に困難があるときは、原体に代え原体に含まれる微生物と同じ形態（栄養体、孢子、結晶等）の微生物を被験試料として用いてもよい。

- (2) 製剤を被験試料として用いる場合は、原則として農薬使用時の安全性確保の観点から必要性の最も高いと考えられる製剤を被験試料として選択する。

なお、製剤を被験試料としての試験実施に困難があるときは、製剤に代え原体を被験試料として用いてもよい。

- (3) 試験期間中、原則として同じロットの被験試料を用いなければならない。やむを得ず他のロットの被験試料を用いなければならないような場合は、引き続きロットは、先のロットの成分組成と十分近似しているものでなければならない。

なお、試験成績には使用したロットの番号を明記する。

- (4) 安全性評価試験に用いた被験試料の成分組成を個々の試験成績ごとに明記する。

- (5) 被験試料の単位は、次によるものとする。

ア 細菌の栄養体細胞の場合は、CFU (Colony Forming Unit) を単位とする。

イ 原生動物、包埋体ウイルスの場合は、血球計算盤で計数する。

ウ 細菌の孢子、糸状菌の孢子の場合は、CFU 又は血球計算盤で計数する。

エ 糸状菌の菌糸の場合は、乾燥重量が 10^{-9} g を1単位とする。

オ 上記以外の単位については、微生物の種類に応じて最も適した方法で定量するものとする。

3 試験動植物について

微生物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、同一条件の健全な試験動物、植物を用いる。また、環境生物に対する影響試験の試験動物、植物の選択に当たっては、農薬微生物の種類、微生物農薬の使用法、使用場所による暴露の可能性、標的生物との近縁関係等を十分考慮し、その選択理由を明らかにする。

4 農薬微生物の確認、検出について

微生物農薬の成分となっている微生物（以下「農薬微生物」という。）の確認、検出には、微生物の種類に応じて選択性、感度及び信頼性の高い方法を用いる。

5 微生物農薬の性質について

本指針で用いる微生物農薬の性質の判断要因は次のとおりである。

(1) 感染性

農薬微生物が供試動植物体内又は供試培養細胞内に侵入後、増殖した場合に感染性が認められるという。

(2) 病原性

農薬微生物が供試動植物に感染した結果、当該供試動植物に対して細胞組織レベルあるいは個体レベルで病気を起こさせた場合に病原性が認められるという。

(3) 毒性

農薬微生物が供試動植物又は供試培養細胞に感染はしないが、当該微生物の産生する毒素や毒物あるいは当該微生物の増殖に用いた基材が当該供試動植物又は当該供試培養細胞に対し有害（生命維持に障害を与える）なんらかの反応を起こさせた場合に毒性が認められるという。

(4) 生残性

農薬微生物が供試動植物に感染はしないが、当該供試動植物体で、一定時間後も死滅することなく生残する場合又は土壌中などで一定時間後も死滅することなく生残する場合に生残性が認められるという。

Ⅱ 微生物農薬の規格性状に関する資料の作成方法

1 微生物の名称及び分類学上の位置

(1) 微生物の名称

学名(異名)、和名、英名

(2) 微生物分類学上の位置

綱、目、科、属、種、亜種、系統、血清型、株等

(3) 分離・同定方法(形態学的、生化学的、血清学的方法等)

(4) 由来(人為処理、遺伝的安定性等を含む)

2 微生物の生物学的性質

(1) 生育条件(温度、pH、栄養条件等)

(2) 宿主域、生活史、作用機作

(3) 毒素の存在又は産生及びその性質と同定方法

(4) 自然界における存在、地理的分布

(5) ヒト、環境、標的外生物に対する既知及び潜在的有害性に関する考察

3 農薬原体の成分組成

微生物の含量(力価)及び混在物の種類、含量、性質

4 農薬原体の製造方法

製造方法(培地組成、培養条件、精製方法等を含む。)、品質管理方法(微生物の同一性及び含量(力価)を確保する方法、生物学的夾雑物の混入防止方法、元種(菌株)及び原体の保存管理方法等)

5 製剤の組成

微生物の含量(力価)及びその他成分の種類、含量

6 製剤の製造方法

製造方法、品質管理方法(製品の均一性及び安定性を確保する方法等)

Ⅲ ヒトに対する安全性試験の実施方法

1 単回経口投与試験

(1) 目的

微生物農薬に経口的に暴露した場合のヒトの健康への影響を評価するために、高濃度の農薬微生物を動物に1回経口投与し、供試動物に対する臨床的、病理学的影響や死亡を調べる。

(2) 試験方法

ア 被験試料：原体

イ 試験動物

ラット又はマウス（SPF、成熟初期動物、雌は未経産・非妊娠、体重範囲：平均値±20%以内、投与前及び投与後一定時間絶食）

ウ 群構成

対照群：溶媒対照群（2匹以上／性）

非投与群（2匹以上／性、投与に溶媒を使用し、溶媒の影響が不明のとき必要）

投与群： 10^8 単位／動物（1ml以下/100g 体重：1回経口投与）

最終解剖群（5匹以上／性）

途中解剖群（3匹以上／性／群、投与3日、7日、14日後（生残状況の推移を明らかにする。）

エ 試験期間

原則として投与後21日間

オ 検査項目

(7) 症状観察

症状の種類、程度、発現、推移及び可逆性を時間との関連で観察、記録する。観察期間は通常21日間とする。

(1) 体重測定

投与直前、7日、14日後、屠殺時及び死亡時に測定する。

(ウ) 農薬微生物の体外への排出状況

糞中の微生物数を定期的(投与前、1日、3日、7日、14日後)に測定する。

(エ) 剖検

試験中に死亡した動物は死後直ちに解剖し、死亡日時、所見を記録する。生存している動物は実験終了時に解剖する。

途中解剖群については、投与3日、7日、14日後に雌雄各3匹以上を解剖する。

すべての解剖について、解剖時期、所見を記録するとともに器官における感染の有無等を調べる。

(オ) 農薬微生物の体内における生残状況

解剖した動物の腎臓、脳、肝臓、肺、脾臓、胃、血液、小腸、大腸、代表的なリンパ節及び肉眼的病変がみられた各器官中の微生物数を測定する。

(3) 結果の整理

症状観察、剖検、微生物数の測定の結果を基にして次の項目に関して整理する。

①一般症状、②死亡率、③体重変動、④体外への排出状況、⑤病理的变化、⑥器官別感染の有無

(4) 次の試験への進行

ア 供試動物に感染性、病原性、毒性及び生残性が認められなかった場合は、これ以上の試験は必要ない。

イ 供試動物に感染性又は生残性が認められた場合は、反復投与試験(90日)を行う。

ウ 供試動物に病原性が認められた場合は、その後の試験については十分検討し決定する。

エ 供試動物に毒性が認められた場合は、毒性成分を同定し、その成分を用いて「農薬の登録申請に係る毒性試験成績の取扱いについて」(昭和60年1月28日付け59農蚕第4200号農林水産省農蚕園芸局植物防疫課長通達)に準じた試験を行う。

2 単回経皮投与試験

(1) 目的

微生物農薬に皮膚を介して暴露した場合のヒトの健康への影響を評価するために、高濃度の農薬微生物を動物の皮膚に1回塗布し、供試動物に対する局所刺激性及び全身影響を調べる。

(2) 試験方法

ア 被験試料：製剤

イ 試験動物

白色ウサギ（SPF、成熟初期動物、雌は未経産・非妊娠、体重範囲：平均値±20%以内）

ウ 群構成

対照群：不要（投与に溶媒を使用し、溶媒の影響が不明のとき溶媒対照群、非投与群（各群2匹/性）必要）

投与群：10⁸ 単位/動物（5匹以上/性、2 g 以下/動物：投与24時間前に体表の10%以上の毛を刈取って被験試料を塗布し、ガーゼパッチで覆う。暴露24時間後水又は溶媒で被験試料を除去する。）

エ 試験期間

投与後14日間

オ 検査項目

(7) 症状観察

症状の種類、程度、発現、推移及び可逆性を時間との関連で観察、記録する。
観察期間は通常14日間とする。

(4) 体重測定

投与直前、7日後、屠殺時及び死亡時に測定する。

(5) 剖検

試験中に死亡した動物は死後直ちに、生存している動物は実験終了時に解剖し、死亡日時、解剖時間、所見を記録する。

(I) 皮膚刺激状態

塗布直後及び毎日別表2の皮膚の紅斑、浮腫等の徴候を観察する。

(3) 結果の整理

症状観察、剖検の結果を基にして次の項目に関して整理する。

①一般症状、②死亡率、③体重変動、④病理的变化、⑤皮膚刺激状態（別表2に準拠して計算）

(4) 次の試験への進行

ア 供試動物に毒性が認められなかった場合は、これ以上の試験は必要ない。

イ 供試動物に毒性が認められた場合は、毒性成分を同定し、その成分を用いて「農薬の登録申請に係る毒性試験成績の取扱いについて」（昭和60年1月28日付け59農蚕第4200号農林水産省農蚕園芸局植物防疫課長通達）に準じた試験を行う。

別表2 皮膚反応の数値による記録

紅斑及び痂皮の形成

紅斑なし	0
非常に軽度の紅斑（かろうじて識別出来る）	1
はっきりした紅斑	2
中等度ないし高度紅斑	3
高度紅斑（beet redness）からわずかな痂皮の形成（深部損傷）まで	4
最高点 4	

浮腫の形成

浮腫なし	0
非常に軽度の浮腫（かろうじて識別出来る）	1
軽度浮腫（はっきりした膨隆による明確な縁が識別出来る）	2
中等度浮腫（約1mmの膨隆）	3
高度浮腫（1mm以上の膨隆と暴露範囲を越えた広がり）	4
最高点 4	

3 単回経気道投与試験

(1) 目的

微生物農薬に呼吸器系を介して暴露した場合のヒトの健康への影響を評価するために、高濃度の農薬微生物を動物に1回経気道投与し、供試動物に対する臨床的、病理学的影響や死亡を調べる。

(2) 試験方法

ア 被験試料：原体

イ 試験動物

ラット又はマウス（SPF、成熟初期動物、雌は未経産・非妊娠、体重範囲：平均値±20%以内）

ウ 群構成

対照群：溶媒対照群（2匹以上／性）

非投与群（2匹以上／性、投与に溶媒を使用し、溶媒の影響が不明のとき必要）

投与群： 10^8 単位／動物（0.3 ml以下/100g 体重：1回経気道投与）

最終解剖群（5匹以上／性）

途中解剖群（3匹以上／性／群、投与直後、3日、7日、14日後（生残状況の推移を明らかにする。）

エ 試験期間

原則として投与後21日間

オ 検査項目

(7) 症状観察

症状の種類、程度、発現、推移及び可逆性を時間との関連で観察、記録する。観察期間は通常21日間とする。

(4) 体重測定

投与直前、7日、14日後、屠殺時及び死亡時に測定する。

(5) 剖検

試験中に死亡した動物は死後直ちに解剖し、死亡日時、所見を記録する。生存

している動物は実験終了時に解剖する。

途中解剖群については、投与直後、3日、7日、14日後に雌雄各3匹以上を解剖する。

すべての解剖について、解剖時期、所見を記録するとともに器官における感染の有無等を調べる。

(I) 農薬微生物の体内における生残状況

解剖した動物の肺、鼻腔、気管等の他に腎臓、脳、肝臓、脾臓、血液、代表的なリンパ節及び肉眼的病変がみられた器官中の微生物数を測定する。

(3) 結果の整理

Ⅲの1の(3)に準ずる。(④体外への排出状況を除く)

(4) 次の試験への進行

Ⅲの1の(4)に準ずる。

4 単回静脈内投与試験

(1) 目的

微生物農薬が直接体内に侵入した場合のヒトの健康に対する影響を評価するために、高濃度の農薬微生物を動物に1回静脈内投与し、供試動物に対する臨床的、病理学的影響や死亡を調べる。

(2) 試験方法

ア 被験試料：原体

イ 試験動物

ラット又はマウス（SPF、成熟初期動物、雌は未経産・非妊娠、体重範囲：平均値±20%以内）

ウ 群構成

対照群：溶媒対照群（2匹以上／性）

非投与群（2匹以上／性、投与に溶媒を使用し、溶媒の影響が不明のとき必要）

投与群： 10^7 単位／動物（0.3 ml以下/100g 体重：1回静脈内投与）

最終解剖群（5匹以上／性）

途中解剖群（3匹以上／性／群、投与直後、3日、7日、14日後（生残状況の推移を明らかにする。）

エ 試験期間

原則として投与後21日間

オ 検査項目

(7) 症状観察

症状の種類、程度、発現、推移及び可逆性を時間との関連で観察、記録する。観察期間は通常21日間とする。

(4) 体重測定

投与直前、7日、14日後、屠殺時及び死亡時に測定する。

(5) 剖検

試験中に死亡した動物は死後直ちに解剖し、死亡日時、所見を記録する。生存

している動物は実験終了時に解剖する。

途中解剖群については、投与直後、3日、7日、14日後に雌雄各3匹以上を解剖する。

すべての解剖について、解剖時期、所見を記録するとともに器官における感染の有無等を調べる。

(I) 農薬微生物の体内における生残状況

解剖した動物の血液、腎臓、脳、肝臓、脾臓、小腸、大腸、代表的なリンパ節及び肉眼的病変がみられた器官中の微生物数を測定する。

(3) 結果の整理

Ⅲの1の(3)に準ずる。(④体外への排出状況を除く)

(4) 次の試験への進行

ア 供試動物に病原性及び毒性が認められなかった場合はこれ以上の試験は必要ない。

イ 供試動物に病原性が認められた場合は、その後の試験について十分検討し決定する。

ウ 供試動物に毒性が認められた場合は、毒性成分を同定し、その成分を用いて「農薬の登録申請に係る毒性試験成績の取扱いについて」（昭和60年1月28日付け59農蚕第4200号農林水産省農蚕園芸局植物防疫課長通達）に準じた試験を行う。

5 眼一次刺激性試験

(1) 目的

微生物農薬がヒトの眼に入った場合に生ずる刺激性を予測するために、微生物農薬を動物の眼に1回滴下し、眼刺激性を調べる。

(2) 試験方法

ア 被験試料：製剤

イ 試験動物

白色ウサギ（SPF、成熟初期動物、雌は未経産・非妊娠、体重範囲：平均値±20%以内）

ウ 群構成

対照群：溶媒対照群（不要：一方の眼が対照となる）

非投与群（3匹以上、投与に溶媒を使用し、溶媒の影響が不明のとき必要）

投与群： 10^7 単位/眼（6匹以上、液体の場合0.1 ml、固体の場合0.1g/眼：投与24時間前に眼に異常がないことを確認すること。苦痛を与えるときは、局所麻酔を使用してもよい。暴露24時間後微温湯で洗浄する。）

エ 試験期間

原則として暴露後7日間

オ 検査項目

(7) 症状観察

別表1 障害の発現の有無を観察する。

刺激症状及び眼の損傷の観察は投与1時間、1日、2日、3日、4日、7日後に行う。

7日目に刺激症状がみられたときは、その後3日毎に最長21日間観察する。

(4) 結果の整理

観察結果を基にして、次の項目に関して整理する。

- ①眼刺激性を別表1に準拠して計算する
- ②刺激及び浸蝕の程度
- ③眼以外の障害の発生状況

なお、眼の表面に薬剤を滴下した場合に起こる可逆的変化を眼刺激、不可逆的変化を眼浸蝕と云う。

- (5) 次の試験への進行
特に必要ない。

別表 1 眼障害の数値による記録

1 角膜

A 混濁：（混濁の最も濃い部分で評価する。）

潰瘍なし、混濁なし	0
混濁散在、虹彩異常なし	1
半透明の区域あり、虹彩一部見えず	2
真珠様光沢部位、虹彩の細部見えず、瞳孔の存在を認めるのみ	3
角膜白濁、虹彩見えず	4

B 混濁した角膜の範囲

なし	0
0~1/4	1
1/4~1/2	2
1/2~3/4	3
>3/4	4

$$\text{障害値} = A \times B \times 5 \quad (\text{最大値}80)$$

2 虹彩

A 病変

正常	0
著明な深い褶、鬱血、肥厚、中等度の角膜周囲充血、虹彩の 光反射遅滞すれど陽性	1
光反射陰性、出血、虹彩破壊あり	2

$$\text{障害値} = A \times 5 \quad (\text{最大値}10)$$

3 結膜

A	充血（眼瞼結膜、眼球結膜、角膜、虹彩を含めて）	
	血管正常	0
	血管の幾つかが充血、拡散	1
	深紅色に充血、個々の血管見分け難い	2
	結膜全体が鮮紅色	3
B	肥厚、腫脹	
	腫脹なし	0
	正常とは異なる腫脹あり（膜を含む）	1
	眼瞼の一部外反を含む著明な腫脹	2
	眼瞼腫脹著明、1/2閉鎖	3
	眼瞼腫脹強度、1/2～全閉鎖	4
C	排出液	
	排出液なし	0
	異常排出液少量あり（正常動物の内眼角の分泌液と区別）	1
	異常排出液で眼瞼及び近接皮膚、毛が湿潤	2
	異常排出液多量、眼瞼、近接皮膚、毛の湿潤区域大	3

$$\text{障害値} = (A + B + C) \times 2 \quad (\text{最大値} 20)$$

最大障害値 = 角膜の障害値 + 虹彩の障害値 + 結膜の障害値

6 皮膚感作性試験

(1) 目的

微生物農薬にヒトの経皮、経気道を介し繰返し暴露した場合に生ずる感作性を予測するために、微生物農薬を動物に皮内注射し、感作性を調べる。

本試験は、農薬微生物がウイルス、細菌及び真菌の場合に実施する。

(2) 試験方法

ア 被験試料：製剤

イ 試験動物

白色モルモット（SPF、成熟初期動物、雄）

ウ 群構成

対照群：陽性対照群（5匹以上、既アレルギー）

投与群：10匹以上

液体の場合は希釈せずに使用、固体の場合は生理食塩水で希釈して使用する。（被験試料が刺激性のものである場合は、生理食塩水で刺激が弱くなるまで希釈して使用。）

供試動物の毛を除毛し、第1回目は被験試料 0.05 ml/動物を、その後は隔日に0.1 ml/動物を3週間、合計10回感作のための皮内注射、10回目注射2週間後に惹起のための注射を行う。

エ 試験期間

投与開始から惹起投与後48時間まで

オ 検査項目

惹起投与24時間、48時間後に紅斑、浮腫、その他の反応をみる。

(3) 結果の整理

投与後の反応を記録する。

(4) 次の試験への進行

特に必要ない。

7 細胞培養試験

(1) 目的

ウイルスを成分とする微生物農薬について、感染性、毒性、形質転換を有するか否かを評価するために、ウイルスを哺乳動物細胞に接種して調べる。

(2) 試験方法

ア 被験試料

包埋ウイルスの場合は、非包埋ウイルス (non-occluded viruses) を、その他のウイルスの場合は、感染宿主細胞又は組織より抽出したウイルスを用いる。本試験でのウイルスの単位はPFU (Plaque Forming Unit) を単位とし、プラークアッセイが行えない場合は感受性細胞又は宿主生物に対するLD₅₀又はTCID₅₀を単位とする。

なお、昆虫ウイルスについては、昆虫の血液及びリンパ液が細胞培養に影響を与えないことが確認できている場合を除きこれらの被験試料への混入がないものとする。

イ 細胞株

原則として次の細胞株を試験に用いる。

- ①ヒト胎児初代細胞 ②ヒト2倍体細胞株 ③霊長類由来株化細胞 ④シリアンハムスター胎仔初代細胞(SHE) ⑤当該ウイルスの増殖と定量に用い得る感受性細胞株

ウ 試験項目

(ア) 感染性試験

シャーレ当たり 2×10^5 細胞程度のSubconfluentとなった各培養細胞株にシャーレ当たり 10^6 単位以上のウイルスを接種する。

本試験では細胞当たり最低5PFU又は7LD₅₀単位のウイルスを使用するものとし、若しこれより少ない単位を使用する場合にはその根拠を示すものとする。

対照群としてウイルス液を構成する無脊椎動物細胞用培養液のみを等量加えるウイルス培養液対照群、不活化したウイルスを接種する不活性化対照群及び感受性細胞又は宿主生物を使用した陽性対照群を設定する。

接種7日、14日後に植代え、21日間にわたり細胞変性を観察する。また、接種1日、2日、5日、7日、14日、21日後に培養液を回収し、適当な宿主系を用いて感染性ウイルス数を定量するとともに細胞中のウイルス抗原及び核酸を定量する。

(イ) 細胞毒性試験

①～④の各培養細胞株をそれぞれシャーレ当たり200個ずつ、30枚のシャーレに分注培養し、24時間後に各細胞株毎にシャーレ10枚に 10^5 単位/枚のウイルスを接種する。別の10枚にはウイルス液を構成している無脊椎動物細胞用の培養液を等量加えるウイルス培養液対照群、残りの10枚は適当な脊椎動物細胞用培養液を等量加える非処理対照群とする。

1時間暴露後、全シャーレを適当な脊椎動物細胞用培養液で洗い、非処理対照群で少なくとも25細胞以上の小コロニーが形成されるまで培養し、各培養細胞株の3群のコロニー形成への影響を観察する。

(ウ) 細胞形質転換試験

感染性試験でウイルス核酸が細胞内に確認できない場合は実施する必要はない。

SHE細胞にウイルスを接種し、形質転換の有無を観察する。対照群としてウイルス液を構成する無脊椎動物細胞用培養液のみを加えるウイルス培養液対照群、不活性化したウイルスを接種する不活性化対照群及びSHE細胞にサルアデノウイルス-7型(SAV-7)を接種した陽性対照群を設定する。

形質転換が認められた場合には、形質転換の認められたコロニーの細胞をハムスターに接種して腫瘍形成の有無を確認する。

(3) 結果の整理

観察結果等を基にして、次の項目に関して整理する。

①細胞変性の有無、②感染性ウイルスの定量結果、③コロニー形成への影響、④形質転換の有無、⑤形質転換があった場合の腫瘍形成の有無

(4) 次の試験への進行

ア 哺乳動物細胞に対して感染性、毒性、形質転換が認められないと判断された場合は、これ以上の細胞培養試験を行う必要はない。

イ 哺乳動物細胞のいずれかに対して感染性が認められた場合は、ウイルス発がん性試験、繁殖試験、免疫不全誘起試験及び霊長類影響試験を行う。

ウ 哺乳動物細胞のいずれかに対して毒性が認められた場合は、毒性成分を同定し、その成分を用いて、「農薬の登録申請に係る毒性試験成績の取扱いについて」（昭和60年1月28日付け59農蚕4200号農林水産省農蚕園芸局植物防疫課長通達）に準じ試験を行う。

8 反復投与試験（90日）

(1) 目的

単回投与試験において感染性又は生残性が認められた場合、農薬微生物の反復投与により、当該微生物農薬摂取に起因する影響を評価するために、高濃度の農薬微生物を動物に毎日1回、90日以上にわたり投与し、その影響を調べる。

(2) 試験方法

ア 被験試料

単回投与試験で使用したのと同じものを用いる。

イ 試験動物

単回投与試験で使用したのと同じものを用いる。

ウ 群構成

対照群：溶媒対照群（10匹以上／性）

非投与群（10匹以上／性、投与に溶媒を使用し、溶媒の影響が不明のとき必要）

投与群：10⁸ 単位／動物（10匹以上／性、単回投与試験で感染性又は生残性が認められた投与経路）

エ 試験期間

90日以上

オ 検査項目

(7) 症状観察

症状の種類、程度、発現、推移及び可逆性を時間との関連で観察、記録する。観察期間は通常90日間とする。

また、1週間毎に飼料の摂取量を記録する。

(イ) 体重測定

投与直前、その後1週間毎、屠殺時及び死亡時に測定する。

(ウ) 剖検

試験中に死亡した動物は死後直ちに解剖し、死亡日時、所見を記録する。生存している動物は実験終了時に解剖する。

すべての解剖について、解剖時期、所見を記録するとともに器官における感染

の有無等を調べる。

(E) 農薬微生物の体内における生残状況

解剖した動物の腎臓、脳、肝臓、肺、脾臓、胃、血液、小腸、大腸、代表的なリンパ節及び肉眼的病変がみられた各器官中の微生物数を測定する。

(3) 結果の整理

症状観察、剖検、微生物数の測定の結果を基にして次の項目に関して整理する。

①一般症状、②死亡率、③飼料摂取量、④体重変動、⑤病理的变化、⑥器官別感染の有無

(4) 次の試験への進行

ア 供試動物に感染性、病原性及び毒性が認められなかった場合は、これ以上の試験は必要ない。ただし、単回投与試験で認められた感染性の理由は明らかにされねばならない。

イ 供試動物に感染性が認められた場合は、繁殖試験を行う。

また、農薬微生物が真菌である場合は、さらに変異原性試験を行う。

ウ 供試動物に病原性が認められた場合は、その後の試験については十分検討し決定する。

エ 供試動物に毒性が認められた場合は、毒性成分を同定し、その成分を用いて、「農薬の登録申請に係る毒性試験成績の取扱いについて」（昭和60年1月28日付け59農蚕第4200号農林水産省農蚕園芸局植物防疫課長通達）に準じた試験を行う。

9 変異原性試験

(1) 目的

反復投与試験において感染性が認められた真菌を成分とする微生物農薬について、発がん性の危険性があるか否かを評価するために、本試験を実施する。

(2) 試験方法

ア 被験試料：原体抽出物（脂溶性物質）

イ 試験項目

次の3試験を実施する。

(ア) 微生物を用いる復帰変異試験

(イ) 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

(ウ) げっ歯類を用いる小核試験

(3) 結果の整理

各試験の結果を記録するほか、必要に応じ用量－反応曲線を付図する。

(4) 次の試験への進行

本試験で陽性の結果が出た場合、変異原物質を同定し、その成分を用いて「農薬の登録申請に係る毒性試験成績の取扱いについて」（昭和60年1月28日付け59農蚕第4200号農林水産省農蚕園芸局植物防疫課長通達）の発がん性試験に準じた試験を行う。

10 繁殖試験

(1) 目的

微生物農薬が哺乳動物の繁殖及び胎仔の発達に及ぼす影響や新生仔への移行を評価するために、次のいずれかに該当する場合に農薬微生物を交配前の雌雄の動物に投与するとともに、妊娠成立後は妊娠雌に継続投与し、繁殖及び胎仔に対する影響及び新生仔への移行を調べる。

- ① 反復投与試験で供試動物に感染性が認められた場合
- ② 農薬微生物が哺乳動物細胞に寄生性を有することが知られている微生物と近縁関係があると考えられる場合
- ③ 農薬微生物が十分に分離、精製されておらず、哺乳動物に寄生性を有する汚染微生物を含んでいる可能性がある場合
- ④ 農薬微生物がウイルスであって、細胞培養試験で哺乳動物細胞に感染性が認められた場合

(2) 試験方法

ア 被験試料：原体

イ 試験動物

ラット又はマウス（SPF、6～8週令 雄：20匹以上、雌：20匹以上の妊娠動物が得られる匹数、多産系でないものは使用しない。）

ウ 群構成

対照群：溶媒対照群

非投与群（投与に溶媒を使用し、溶媒の影響が不明のとき必要）

投与群： 10^8 単位／動物（1 ml以下/100g 体重：経口投与。なお単回投与試験で経気道投与経路のみで影響が認められた場合には 10^8 単位／動物（0.3ml以下/100g 体重）を当該投与経路で投与する。交配2週間前、交配期間中及び妊娠期間中高レベルの感染が保持できる頻度で投与する。）

エ 試験期間

投与開始から新生仔の屠殺まで

オ 検査項目

(7) 症状観察

症状の種類、程度、発現、推移及び可逆性を時間との関連で観察、記録する。
観察時間は通常投与開始から新生仔の屠殺までとする。

また、妊娠雌については、さらに毎日の飼料の摂取量と妊娠の経過、妊娠期間の延長の有無、分娩直後の新生仔については、新生仔の体重、同腹胎仔数、死産仔数、生産仔数、新生仔の外観の異常等を観察し記録する。

(イ) 体重測定

投与直前、その後1週間毎、屠殺時又は死亡時に測定する。

(ウ) 剖検

雄は、対の雌の妊娠が確認され次第解剖する。

雌は、分娩後できるだけ速やかに解剖する。

新生仔は、分娩の翌日に解剖する。

(エ) 農薬微生物の体内における生残状況

解剖された動物の器官、組織、体液中の微生物数を測定する。

(3) 結果の整理

症状観察、剖検、微生物数の測定結果を基にして、次の項目に関して整理する。

①一般症状、②妊娠指数と妊娠期間、③妊娠継続中の死亡と生存、④生殖能力への影響と異常出産の有無、⑤親動物及び産仔の体重への影響、⑥飼料摂取量、⑦病理的变化、⑧新生仔の形態の異常、⑨器官別感染の有無

なお、妊娠指数は交尾率、妊娠率、出産率とし、次により求める。

交尾率 = 交尾した動物数 / 交配に用いた動物数 × 100

妊娠率 = 妊娠した動物数 / 交尾した雌動物数 × 100

出産率 = 生存仔を出産した雌動物数 / 妊娠した動物数 × 100

(4) 次の試験への進行

特に必要ない。

11 ウイルス発がん性試験

(1) 目的

微生物農薬が発がん性を有するか否かを評価するために、次のいずれかに該当する場合に本試験を実施する。

- ① ウイルスに発がん性の疑いがあるか、あるいは発がん性のウイルスに近縁である場合
- ② 細胞培養試験で哺乳動物細胞に対し感染性が認められた場合
- ③ その他、①、②に該当するウイルスが当該微生物農薬中に混入している可能性が否定出来ない場合

(2) 試験方法等

代表的腫瘍ウイルスの発がん性試験を参考に個々に検討する。

(3) 次の試験への進行

特に必要ない。

12 免疫不全誘起試験

(1) 目的

ウイルスを成分とする微生物農薬について、ウイルスが免疫不全誘起作用を有するか否かを評価するために、ウイルスが次のいずれかに該当する場合に本試験を実施する。

① 細胞培養試験で哺乳動物細胞に感染性が認められた場合

② ウイルスが哺乳動物の免疫系に感染ないし病変を起こし、免疫不全状況を誘起することが知られているウイルスに近縁である場合

なお、哺乳動物に免疫不全状況を誘起することの知られているウイルスには、次のものがある。

ネコ白血病ウイルス、マウスエイズウイルス、ウシ白血病ウイルス等のレトロウイルス、ヒトのサイトメガロウイルス等のヘルペスウイルス等

(2) 試験方法等

上記の免疫不全を起こすウイルスのうち、微生物農薬に用いられているウイルスと近縁と見られるものについて、個々に免疫不全を証明する試験法を策定し、当該農薬について、同じ試験法を平行して行い、同じような免疫不全の起こらないことを証明する。

(3) 次の試験への進行

特に必要ない。

13 霊長類影響試験

(1) 目的

微生物農薬が霊長類に感染性、病原性を有するか否かを評価するため、次のいずれかに該当する場合に農薬微生物を霊長類に接種して感染性及び病原性を調べる。

- ① 農薬微生物がウイルスであって、細胞培養試験でいずれかの哺乳動物細胞に感染性が認められた場合。
- ② 農薬微生物が哺乳動物細胞に寄生性を有することが知られている微生物である場合。
- ③ 微生物農薬中に哺乳動物細胞に寄生性を有する汚染微生物が含まれている可能性が否定できない場合。
- ④ 農薬微生物がその分類上の位置からヒトへの感染性、病原性を示すことが示唆される場合。

(2) 試験方法等

必要なサル種（カニクイザル、アカゲザル、アフリカミドリザル、その他）、サルの頭数、年齢、接種経路（経口、静脈、経気道、中枢神経系、その他）、観察方式、測定法については個々に検討する。

(3) 次の試験への進行

特に必要ない。

IV 製造、使用に際して発生した過敏性反応等事例の調査方法

1 目的

微生物農薬がヒトに過敏性反応を引き起こすか否かを評価するために、微生物農薬の生産に関わったヒトにおける過敏性反応の発生の有無を調べる。

2 調査方法

微生物農薬の生産及び試験使用に関わったヒトにおける過敏性反応の発生について、モニタリング調査や検診により調査する。

また、ヒト及び家畜で発生した過敏性反応事例を文献等によりとりまとめる。

3 結果の整理

次の事項について整理する。

- ① 暴露した原体や製剤、その成分
- ② 暴露した日時と場所
- ③ 暴露した頻度
- ④ 暴露した経路
- ⑤ 暴露した環境及び状況
- ⑥ 臨床的所見
- ⑦ その他関係情報

4 次の試験への進行

過敏性反応が発生したことが明確なときは、個々の事例に基づき過敏性反応原因について追求する。

V 作物生残性試験の実施方法

1 目的

食用作物（特用作物、飼料用作物を含む。）に使用する微生物農薬について、ヒトに対する安全性試験の第一段階試験で影響が認められた場合に食用作物の安全性を確認するために、微生物農薬を使用して食用作物における生残性を調べる。

2 試験方法

(1) 被験試料

製剤

(2) 供試作物

原則として登録申請する作物の中から食用作物全てを選定する。

(3) 試料の調製

ア 栽培条件

(7) 試験は、作物の品種、栽培方法、農薬の散布歴、気象条件等が明らかな隔離、管理された複数施設で行うものとする。

(4) 慣行の方法で栽培する。

イ 施用方法

被験試料の施用は、登録を申請する場合の使用方法で均一に施用を行う。
なお、被験試料を使用しない試験区（無処理区）を設け対照とする。

ウ 試料の採取時期

試料は、市場へ出荷する状態のものを採取する。

エ 試料の採取方法

試料は、試験区毎に可食部を均等に必要量を採取し、損傷を受けた試料は採取しない。

オ 試料の保存

試料は、採取後速やかに調査する。輸送等やむを得ない事情があるときは、5℃以下で保存する。

(4) 検査項目

採取した試料について、農薬微生物の計数を行う。

3 結果の整理

検査結果を整理して記録する。

4 次の試験への進行

特に必要ない。

VI 環境生物に対する影響試験の実施方法

1 淡水魚影響試験

(1) 目的

微生物農薬が淡水魚に及ぼす影響を評価するために、高濃度の農薬微生物に淡水魚を水中暴露させ、供試淡水魚に対する影響を調べる。

なお、微生物の生物学的性質により科学的な根拠がある場合及び微生物農薬の使用方法から淡水魚に暴露の可能性がない場合には当該試験を省略することがある。

(2) 試験方法

ア 被験試料：原体

イ 供試動物

原則としてコイ (*Cyprinus carpio*) 又はニジマス (*Oncorhynchus mykiss*)

(当歳魚、体重 5 g 前後、1 週間以上馴化したもの)

ウ 試験区構成

対照区：無添加区

処理区：単位面積当たりの施用量を水深 15 cm の水層に直接投下した場合の濃度の 1000 倍濃度とする。

なお、上記濃度での試験で影響が認められた場合は、影響を生じる農薬微生物の濃度を明らかにするために、濃度－反応試験を実施する。

1 試験区当たり供試魚は 10 尾以上とし、試験は 3 反復で実施する。

エ 暴露方法及び飼育条件

所定濃度の試験液に 30 日間半止水式で水中暴露させる。飼育水は脱塩素水道水あるいは滅菌した良質の地下水を使用し、水質は pH 6.5～8.0 とする。試験水量は 1 L 以上/g 体重とし、水温は試験に用いる魚種の適温 ± 2 °C、溶存酸素濃度は飽和濃度の 60% 以上とする。飼料は毎日一定量の配合飼料（乾燥重量で魚体重の約 3%）を与える。

オ 試験期間

原則として暴露開始から 30 日間とする。試験期間中に影響が現れた場合は、回復、死亡、瀕死の状態が確認できるまで試験期間を延長する。

カ 検査項目

(7) 水質検査

水温、溶存酸素濃度、pH、全硬度及び水槽中の微生物濃度を定期的に測定する。

(イ) 体重測定

試験開始時及び解剖時に測定する。

(ウ) 症状観察

外観、摂餌状況、遊泳異常、死亡等を毎日観察する。生死の判定は、刺激を与え反応のないものを死亡とみなす。

(エ) 病理検査

試験中死亡があった場合は速やかに、また、試験終了時に生存している全ての個体について解剖し、死亡日時、所見を記録するとともに農薬微生物の感染の有無等を調べる。

(3) 結果の整理

検査項目に沿って成績を整理する。また、影響が認められた場合は最大無作用濃度を求める。

(4) 次の試験への進行

ア 供試生物に影響が認められなかった場合は、これ以上の試験は必要ない。

イ 供試生物に影響が認められた場合は、環境中での動態に関する試験を行う。

2 淡水無脊椎動物影響試験

(1) 目的

微生物農薬が淡水無脊椎動物に及ぼす影響を評価するために、高濃度の農薬微生物に淡水無脊椎動物を水中暴露させ、供試淡水無脊椎動物に対する影響を調べる。

なお、微生物の生物学的性質により科学的な根拠がある場合及び微生物農薬の使用方法から淡水無脊椎動物に暴露の可能性がない場合には当該試験を省略することがある。

(2) 試験方法

ア 被験試料：原体

イ 供試動物

ミジンコ (*Daphnia pulex*)、セスジミジンコ (*Daphnia carinata*)、オオミジンコ (*Daphnia magna*) のうちの1種（飼育条件が明らかで生後24時間以内のもの）

ウ 試験区構成

対照区：無添加区

処理区：単位面積当たりの施用量を水深15cmの水層に直接投下した場合の濃度の1000倍濃度とする。

なお、上記濃度での試験で影響が認められた場合は、影響を生じる農薬微生物の濃度を明らかにするために、濃度－反応試験を実施する。

1 試験区当たり供試ミジンコは20頭以上とし、試験は3反復で実施する。

エ 暴露方法及び飼育条件

所定濃度の試験液に21日間半止水式で水中暴露させる。飼育水は脱塩素水道水あるいは滅菌した良質の地下水を使用し、水質はpH6.5～8.0とする。試験水量は40ml以上／頭とし、水温は20℃±2℃、溶存酸素濃度は飽和濃度の60%以上とする。飼料（藻類）は一定量を与える。

オ 試験期間

原則として暴露開始から21日間とする。試験期間中に影響が現れた場合は、回復、死亡、瀕死の状態が確認できるまで試験期間を延長する。

カ 検査項目

(7) 水質検査

水温、溶存酸素濃度、pH、全硬度及び水槽中の微生物濃度を定期的に測定する。

(イ) 症状の観察

外観、遊泳異常、死亡等を毎日観察する。生死の判定は、触角の運動が停止しているものを死亡とみなす。

(ウ) 繁殖能力の観察

産出された仔虫、卵を2日毎に計数する。それらは計数後除く。

(3) 結果の整理

VIの1の(3)に準ずる。

(4) 次の試験への進行

VIの1の(4)に準ずる。

3 鳥類影響試験

(1) 目的

微生物農薬が鳥類に及ぼす影響を評価するために、高濃度の農薬微生物を鳥類に経口投与し、供試鳥類に対する影響を調べる。

なお、微生物の生物学的性質により科学的な根拠がある場合及び微生物農薬の使用方法から鳥類に暴露の可能性がない場合には当該試験を省略することがある。

(2) 試験方法

ア 被験試料：原体

イ 供試動物

ウズラ又はマガモ（14～28日令、平均体重±20%以内、1週間馴化したもの）

ウ 試験区構成

対照区：溶媒処理区

無処理区（投与に溶媒を使用し、溶媒の影響が不明なとき必要）

処理区：10⁸ 単位／0.2ml／羽を5日間経口投与

なお、上記投与量での試験で病原性、毒性が認められた場合は、病原性、毒性を生じる農薬微生物の用量を明らかにするために、用量－反応試験を実施する。

1 試験区当たり供試鳥類は10羽以上とし、試験は3反復で実施する。

エ 試験期間

原則として投与開始後30日間とする。試験期間中に病原性、毒性が現れた場合は、回復、死亡、瀕死の状態が確認できるまで試験期間を延長する。

オ 飼育条件

飼料は抗生物質を含まない初生雛用飼料を雛の生長に応じて適当量を与える。飲料水は自由に与え、毎日交換する。温度及び湿度は齢に応じた最適条件とし、照明は16時間明、8時間暗の照明周期とする。

カ 検査項目

(7) 症状観察

羽毛逆立、翼下垂、元気消失、頭部懸垂、閉眼、流涎、下痢、呼吸困難、衰弱、

死亡等を毎日観察する。

(イ) 体重測定

投与直前、7日、14日、21日、28日後及び死亡時とし、試験期間を延長した場合は1週間毎に測定する。

(ウ) 病理検査

試験中死亡があった場合は速やかに、また、試験終了時に生存している全ての個体について解剖し、死亡日時、所見等を記録すると共に農薬微生物の感染の有無等を調べる。

(3) 結果の整理

症状観察、病理検査結果を基にして次の項目に関して整理をする。

①一般症状、②死亡率、③体重変動、④病理的变化、⑤器官別感染率の有無。

また、病原性、毒性が認められた場合は最大無作用量を求める。

(4) 次の試験への進行

VIの1の(4)に準ずる。

4 植物影響試験

(1) 目的

微生物農薬が標的外植物に及ぼす影響を評価するために、高濃度の農薬微生物に農作物を含む標的外植物を単回暴露させ、供試植物に対する影響を調べる。

なお、微生物の生物学的性質により科学的な根拠がある場合及び微生物農薬の使用方法から植物に暴露の可能性がない場合には当該試験を省略することがある。

(2) 試験方法

ア 被験試料：原体

イ 供試植物

(ア) 原則として経済的に重要な植物の中から4科6種以上の双子葉植物、2科4種以上の単子葉植物を選択する。

(イ) 雑草防除用微生物農薬及び植物病原微生物に近縁の微生物農薬については、上記に加えて、標的植物に密接に関連する植物及び農薬微生物に密接に関連する植物病原微生物に感受性の植物の中から、経済的に重要な植物あるいは生態系の維持に有益な植物2種以上を選択する。

(ウ) 水中使用される微生物農薬については、藻類を追加しOECDテストガイドライン201（藻類成長阻害試験）に準じて試験を行う。

ウ 試験区構成

対照区：無処理区（処理区で展着剤を添加する場合は展着剤を処理する。）

参考区（雑草防除用微生物農薬については、当該微生物を標的植物に用いて、植物病原微生物に近縁の微生物農薬については、分類学的に近縁の植物病原微生物を感受性植物に用いて対照区とする。）

処理区：当該微生物農薬を登録申請する場合の最大表示使用濃度の10倍濃度とする。

なお、上記濃度での試験で影響が認められた場合は影響を生じる農薬微生物の濃度を明らかにするため用量－反応試験を実施する。

試験は3反復で実施する。

エ 暴露方法

農薬微生物の種類、作用機作及び供試植物の種類から最も感染しやすい暴露経路及び生育ステージを選択し暴露させる。また、植物への付着をよくするため農薬微生物懸濁液に展着剤を適量添加してもよい。

オ 試験期間

原則として暴露後3週間とする。

カ 栽培条件

健全な植物の生育を維持するために施肥、水、光、温度及び湿度の適正な管理に努める。なお、他剤による防除は行わない。

キ 検査項目

(7) 症状観察

植物の生育状況、病徴等を定期的に観察する。

(イ) 病理検査

試験中枯死及び影響が認められた植物の根、葉及び脈管等について、農薬微生物の感染の有無等を調べる。

(3) 結果の整理

VIの1の(3)に準ずる。

(4) 次の試験への進行

VIの1の(4)に準ずる。

5 標的外昆虫影響試験

(1) 目的

微生物農薬が標的外昆虫に及ぼす影響を評価するために、高濃度の農薬微生物に寄生性昆虫又は捕食性昆虫を単回暴露させ、供試昆虫に対する影響を調べる。

なお、微生物の生物学的性質により科学的な根拠がある場合及び微生物農薬の使用方法から標的外昆虫に暴露の可能性がない場合には当該試験を省略することがある。

(2) 試験方法

ア 被験試料：原体

イ 供試昆虫

下記の7目のなかの少なくとも2つの目に属する3種の昆虫等を選択する。

寄生性双翅目（寄生バエ）

寄生性膜翅目（寄生バチ）

捕食性半翅目（メクラカメムシ等）

捕食性鞘翅目（テントウムシ等）

捕食性脈翅目（クサカゲロウ等）

捕食性ダニ目（カブリダニ）

捕食性クモ目（コモリグモ等）

ウ 試験区構成

対照区：無処理区（処理区で展着剤を添加する場合は展着剤を処理する。）

処理区：当該微生物農薬を登録申請する場合の最大表示使用濃度の10倍濃度とする。

なお、上記濃度での試験で影響が認められた場合は影響を生じる農薬微生物の濃度を明らかにするため用量－反応試験を実施する。

試験は3反復で実施する。

エ 暴露方法

農薬微生物の種類、作用機作及び供試昆虫の種類から最も感染しやすい暴露経路を選択する。また、昆虫への付着をよくするため農薬微生物懸濁液に展着剤を適量添加してもよい。

オ 試験期間

農薬微生物の種類、供試昆虫の種類等により適宜設定する。

カ 検査項目

(7) 症状観察

供試虫の種類、発病状態、試験方法によって異なるが、蛹化までの日数、蛹化率、産卵率、孵化率(受精率)、生死数等を定期的に観察する。

(イ) 病理検査

試験中死亡及び影響が認められた個体について、農薬微生物の感染の有無等を調べる。

(3) 結果の整理

VIの1の(3)に準ずる。

(4) 次の試験への進行

VIの1の(4)に準ずる。

6 蜜蜂影響試験

(1) 目的

微生物農薬が蜜蜂に及ぼす影響を評価するために、高濃度の農薬微生物に蜜蜂を暴露させ、供試蜜蜂に対する影響を調べる。

なお、微生物の生物学的性質により科学的な根拠がある場合及び微生物農薬の使用方法から蜜蜂に暴露の可能性がない場合には当該試験を省略することがある。

(2) 試験方法

ア 被験試料：原体

イ 供試蜜蜂

セイヨウミツバチ（羽化後3～7日までの同日齢成虫）

ウ 試験区構成

対照区：無処理区

処理区：当該微生物農薬を登録申請する場合の最大表示使用濃度の10～100倍濃度とし、可能な限り高濃度液を供試する。

なお、上記濃度での試験で影響が認められた場合は、影響が生じる農薬微生物の濃度を明らかにするため用量－反応試験を実施する。

1試験区当たり25匹とし、試験は3反復で実施する。

エ 暴露方法及び飼育条件

農薬微生物が糸状菌の場合は、噴霧器を使用して農薬微生物で蜜蜂が完全に覆われるまで噴霧する。蜜蜂に付着が悪い供試液については、蜜蜂に影響がない展着剤を添加して行う。

農薬微生物が糸状菌以外の場合は、農薬微生物を混ぜた蔗糖液（20～50%、供試液の微生物に対する影響がないことを確認）を給餌器に入れて48時間摂取させる。

噴霧後（体表面の液が乾いた後）あるいは供試液摂取後の蜜蜂には、農薬微生物を含まない飼料を給餌する。飼料及び水は適宜交換する。

オ 試験期間

原則として暴露後20日間とする。

カ 検査項目

(7) 症状観察

行動、死亡等を暴露4時間後に1回目の観察を行う。その後は毎日適宜観察する。異常行動の判定は処理区と対照区とを比較して行う。

(イ) 病理検査

試験中死亡個体については、二次感染を回避するためその都度、また、影響が認められた個体については試験終了時に農薬微生物の感染の有無等を調べる。死亡個体の収集にあたっては、蜜蜂が騒動を起こさないように注意して行う。

(3) 結果の整理

VIの1の(3)に準ずる。

(4) 次の試験への進行

VIの1の(4)に準ずる。

7 蚕影響試験

(1) 目的

微生物農薬が蚕に及ぼす影響を評価するために、高濃度の農薬微生物に蚕を暴露させ、供試蚕に対する影響を調べる。

なお、微生物の生物学的性質により科学的な根拠がある場合及び微生物農薬の使用方法から桑に暴露の可能性がない場合には当該試験を省略することがある。

(2) 試験方法

ア 被験試料：原体

イ 供試蚕

4 齢起蚕

ウ 試験区構成

対照区：無処理区（処理区で展着剤を添加する場合は展着剤を処理する。）

処理区：当該微生物農薬を登録申請する場合の最大表示施用濃度の10倍濃度とする。

なお、上記濃度での試験で影響が認められた場合は、影響を生じる農薬微生物の濃度を明らかにするため用量－反応試験を実施する。

1 試験区当たりの供試蚕は50頭とし、試験は2反復で実施する。

エ 暴露方法及び飼育条件

対照区：農薬微生物に汚染されていない桑の葉又は人工飼料（抗菌物質を含まないもの）を毎日給餌する。

処理区：農薬微生物が糸状菌の場合は、その懸濁液に蚕を浸漬し、処理後は農薬微生物に汚染されていない桑の葉を毎日給餌する。また、蚕への付着をよくするためにその懸濁液に展着剤を適量添加してもよい。

農薬微生物が糸状菌以外の場合は、桑の葉を懸濁液に浸漬し、乾燥させたもの又はその懸濁液を人工飼料に混合したもの（0.05～0.1 ml/g）を24時間給餌し、その後は無処理葉、飼料を毎日給餌する。人工飼料は蚕が好んで摂取し、生育に十分なものを選択する。

オ 試験期間

原則として暴露後20日間とする。

カ 検査項目

(7) 症状観察

日別死亡蚕数を調べ、必要に応じて4、5齢経過日数、結繭蚕数、化蛹歩合、繭重、繭層重、中毒症状等を観察する。

(1) 病理検査

試験中死亡及び影響が認められた個体について、農業微生物の感染の有無等を調べる。

(3) 結果の整理

VIの1の(3)に準ずる。

(4) 次の試験への進行

VIの1の(4)に準ずる。

8 土壤微生物影響試験

(1) 目的

微生物農薬が土壤微生物（細菌、放線菌、真菌）に及ぼす影響を評価するために、高濃度の農薬微生物を土壤に混和し、土壤微生物に対する影響を調べる。

微生物の生物学的性質により科学的な根拠がある場合及び微生物農薬の使用方法から土壤微生物に暴露の可能性がない場合には当該試験を省略することがある。

なお、必要に応じ土壤微生物の炭素代謝、窒素代謝に関する農薬微生物の影響を調べる。

(2) 試験方法

ア 被験試料：原体

イ 試験土壤

水田で用いるものについては水田状態の土壤を、畑地等で用いるものについては畑地土壤を用いる。また、試験に当っては1 m × 1 m 程度の大きさの隔離、管理された施設を用いる。

ウ 試験区構成

対照区：無添加区

処理区：単位面積当たりの施用量の10倍量を土壤に混和する。混和深は20 cmとする。

なお、上記施用量での実験で影響が認められた場合は、影響を生じる農薬微生物の用量を明らかにするため用量－反応試験を実施する。

試験は3反復で実施する。

エ 試験期間

原則として3カ月間とする。

オ 土壤の採取

1 試験区4箇所以上から土壤を採土管（径4 cm × 深4 cm程度）等を用いて採取し、よく混合する。採取時期は、原則として1日、10日、30日、90日後とする。

カ 検査項目

採取した土壤中の細菌、放線菌、真菌について、それぞれの菌数を測定する。な

お、菌数の測定には、菌の種類に応じて選択性、感度及び信頼性の高い方法を用いる。

(3) 結果の整理

検査項目に沿って成績を整理する。また影響が認められた場合は最大無作用量を求める。

(4) 次の試験への進行

VIの1の(4)に準ずる。

Ⅶ 環境中での動態に関する試験成績

1 目的

環境生物に対する影響試験において、いずれかの生物種に影響が認められた場合に、当該生物種に対する暴露の可能性等を評価するため、農薬微生物の環境中での生残性、増殖性等の動態を調べる。

2 試験方法等

農薬微生物の生物学的性質、微生物農薬の使用方法、環境生物に対する影響試験で影響が認められた生物種の種類、生物学的性質等を十分勘案して、当該生物種に対する当該農薬微生物の環境中での暴露の可能性が評価できる適切な試験方法を個々に検討する。

3 次の試験への進行

- (1) 当該生物種に対する暴露の可能性が認められなかった場合は、これ以上の試験は必要ない。
- (2) 当該生物種に対する暴露の可能性が認められた場合は、その後の試験について十分に検討し決定する。