

(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」

試験項目	識別番号
1. 薬効に関する試験	
○適用病害虫に対する薬効に関する試験	
・薬効・薬害試験	1 - 1 - 1
2. 薬害に関する試験	
○適用農作物に対する薬害に関する試験	
・薬効・薬害試験	1 - 1 - 1
・限界薬量（又は濃度）薬害試験	1 - 1 - 2
・茶の残臭試験	1 - 1 - 3
・タバコの喫味試験	1 - 1 - 4
○周辺農作物に対する薬害に関する試験	
・漂流飛散による薬害試験	1 - 2 - 1
・水田水の流出による薬害試験	1 - 2 - 2
・揮散による薬害試験	1 - 2 - 3
○後作物に対する薬害に関する試験	
・後作物薬害試験	1 - 3
3. 毒性に関する試験	
○急性経口毒性試験	2 - 1 - 1
○急性経皮毒性試験	2 - 1 - 2
○急性吸入毒性試験	2 - 1 - 3
○皮膚刺激性試験	2 - 1 - 4
○眼刺激性試験	2 - 1 - 5
○皮膚感作性試験	2 - 1 - 6
○急性神経毒性試験	2 - 1 - 7
○急性遅発性神経毒性試験	2 - 1 - 8
○90日間反復経口投与毒性試験	2 - 1 - 9
○21日間反復経皮投与毒性試験	2 - 1 - 10
○90日間反復吸入毒性試験	2 - 1 - 11
○反復経口投与神経毒性試験	2 - 1 - 12
○28日間反復投与遅発性神経毒性試験	2 - 1 - 13
○1年間反復経口投与毒性試験	2 - 1 - 14
○発がん性試験	2 - 1 - 15
○1年間反復経口投与毒性試験／発がん性併合試験	2 - 1 - 16
○繁殖毒性試験	2 - 1 - 17
○催奇形性試験	2 - 1 - 18
○変異原性試験	

・ 復帰突然変異試験 -----	2 - 1 - 1 9 - 1
・ 染色体異常試験 -----	2 - 1 - 1 9 - 2
・ 小核試験 -----	2 - 1 - 1 9 - 3
○ 生体機能影響試験 -----	2 - 2 - 1
○ 動物体内運命に関する試験 -----	2 - 3 - 1
○ 植物体内運命に関する試験 -----	2 - 4 - 1
○ 土壌中運命に関する試験	
・ 好氣的湛水土壌中運命試験 -----	2 - 5 - 1
・ 好氣的土壌中運命試験 -----	2 - 5 - 2
・ 嫌氣的土壌中運命試験 -----	2 - 5 - 3
○ 水中運命に関する試験	
・ 加水分解運命試験 -----	2 - 6 - 1
・ 水中光分解運命試験 -----	2 - 6 - 2
○ 水産動植物への影響に関する試験	
・ 魚類急性毒性試験 -----	2 - 7 - 1 - 1
・ 魚類（ふ化仔魚）急性毒性試験 -----	2 - 7 - 1 - 2
・ ミジンコ類急性遊泳阻害試験 -----	2 - 7 - 2 - 1
・ ミジンコ類（成体）急性遊泳阻害試験 -----	2 - 7 - 2 - 2
・ ミジンコ類繁殖試験 -----	2 - 7 - 2 - 3
・ 魚類急性毒性・ミジンコ類急性遊泳阻害共存有機物質影響 試験 -----	2 - 7 - 3
・ ヌマエビ・ヌカエビ急性毒性試験 -----	2 - 7 - 4
・ ヨコエビ急性毒性試験 -----	2 - 7 - 5
・ ユスリカ幼虫急性毒性試験 -----	2 - 7 - 6
・ 藻類生長阻害試験 -----	2 - 7 - 7
○ 水産動植物以外の有用生物への影響に関する試験	
・ ミツバチ影響試験 -----	2 - 8 - 1
・ 蚕影響試験 -----	2 - 8 - 2
・ 天敵昆虫等影響試験 -----	2 - 8 - 3
・ 鳥類影響試験	
・ 鳥類強制経口投与試験 -----	2 - 8 - 4 - 1
・ 鳥類混餌投与試験 -----	2 - 8 - 4 - 2
○ 有効成分の性状、安定性、分解性等に関する試験 -----	2 - 9 - 1 ~ 1 7
○ 環境中予測濃度算定に関する試験	
・ 水質汚濁性試験 -----	2 - 1 0 - 1
・ 模擬水田を用いた水田水中農薬濃度測定試験 -----	2 - 1 0 - 2
・ 実水田を用いた水田水中農薬濃度測定試験 -----	2 - 1 0 - 3
・ 模擬圃場を用いた地表流出試験 -----	2 - 1 0 - 4
・ ドリフト試験 -----	2 - 1 0 - 5
・ 河川における農薬濃度のモニタリング -----	2 - 1 0 - 6

4. 残留性に関する試験

○ 農作物への残留性に関する試験	
・ 作物残留性試験 -----	3 - 1 - 1

- ・ 乳汁への移行試験 ----- 3 - 1 - 2
- 土壌への残留性に関する試験
- ・ 土壌残留性試験 ----- 3 - 2 - 1
- ・ 後作物残留性試験 ----- 3 - 2 - 2

基本的事項

1. 基本的考え方

- (1) 本指針は、農薬の登録申請に当たって提出する薬効、薬害、毒性及び残留性に関する試験成績を作成する際の目安として利用するものである。
- (2) 試験実施者は、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。また、試験実施者が被験物質の特性に応じ、試験の目的をよりの確に満たすため試験方法に変更・改善を加えるということを防げるものではない。

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は、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) 製剤を被験物質として用いる場合は、農薬見本品と同等のものでなければならない。
- (3) 試験期間中は、同じロットの被験物質を用いなければならない。やむを得ず他のロットの被験物質を用いる場合は、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。なお、試験成績には、使用したロットの番号を明記しなければならない。
- (4) 急性毒性試験、反復投与毒性試験、発がん性試験、繁殖毒性試験、催奇形性試験及び変異原性試験については、当該試験に用いた原体の組成を個々の試験成績ごとに明らかにしなければならない。

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。

4. 実験動物の取扱い等について

動物を用いた実験を実施するに当たっては、動物愛護等の観点から、動物の愛護及び管理に関する法律（昭和48年法律第105号）、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（平成18年4月28日環境省告示第88号）、動物愛護に係る国際的な規制・動向等を踏まえ、実験動物の飼育管理、実験操作、処分方法等に十分に注意を払わなければならない。

< 薬効に関する試験 >

適用病害虫に対する薬効に関する試験

薬効・薬害試験(1-1-1)

1. 目的

本試験は、農薬のほ場における病害虫・雑草等に対する防除効果（以下「薬効」という。）及び適用農作物に対する薬害に関する科学的知見を得ることを目的とする。

2. 供試農作物

適用農作物の代表的品種。

3. 試験方法

- (1) 試験は、ほ場（適用が施設の場合は施設）で行うこととし、試験の目的を達成するために十分な面積の薬剤処理区及び無処理区並びに原則として対照薬剤区を設ける。薬剤処理区については、登録申請に係る使用方法・薬量（濃度）により薬剤処理を行う。
- (2) 薬剤処理は、適用病害虫・雑草等の発生状況及び農作物の生育ステージが薬効・薬害を評価する上で適切な時期を選定して行う。
- (3) 調査は、供試薬剤、適用病害虫・雑草等及び農作物のそれぞれの特性等を考慮した上で適切な方法を選定して行う。

4. 報告事項

- (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) 薬害の有無及びその状態並びに程度（草丈の測定値等）、回復の程度等
- (3) その他の項目
 - ① 農作物に関する情報（生育状況、処理時の生育ステージ等）
 - ② 適用病害虫・雑草の発生状況
 - ③ 試験期間中の気象状況（気温、降水量等）

＜薬害に関する試験＞

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)

同上

限界薬量(又は濃度)薬害試験(1-1-2)

1. 目的

本試験は、農薬による薬害が発現しない最高薬量又は最高濃度を明らかにし、適用農作物に対する薬害に関する科学的知見を得ることを目的とする。

2. 供試農作物

登録申請に係る農作物の代表的品種とし、原則として、健全で最も感受性が高い生育ステージのものを用いる。

3. 試験方法

- (1) 試験は、薬害が発現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行うが、使用薬量の高薬量の2倍量で実施しても差し支えない。この場合、試験は、登録申請に係る使用方法及び使用薬量の高薬量の2倍量を限度とする薬量(濃度)で行い、使用薬量の高薬量区及び無処理区を設ける。
- (2) 調査は、薬害を評価するための十分な情報が得られる方法で行う。

4. 報告事項

- (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) その他の項目
農作物に関する情報(生育状況、処理時の生育ステージ等)

茶の残臭試験(1-1-3)

1. 目的

本試験は、茶に使用される農薬について、その薬害の一つとして、農薬に起因する臭気が残るか否かに係る科学的知見を得ることを目的とする。

2. 供試農作物

慣行の方法に従って栽培された健全な茶を用いる。品種は「やぶきた」とする。

3. 試験方法

- (1) 試験は、登録申請に係る使用方法及び使用薬量（濃度）で行い、無処理区を設ける。
- (2) 調査は、茶の残臭を評価するための十分な情報を得られる方法で行う。

4. 報告事項

- (1) 残臭の有無
- (2) その他の項目
 - ① 農作物に関する情報（生育状況、処理時の生育ステージ等）
 - ② 製茶工程及び保管等に関する情報

タバコの喫味試験(1-1-4)

1. 目的

本試験は、タバコに使用する農薬について、その薬害の一つとして、農薬に起因する喫味に対する影響の有無に係る科学的知見を得ることを目的とする。

2. 供試農作物

慣行の方法に従って栽培された健全なタバコを用いる。品種は代表的なものとする。

3. 試験方法

- (1) 試験は、登録申請に係る使用方法及び使用薬量(濃度)で行い、無処理区を設ける。
- (2) 調査は、タバコの喫味を評価するための情報を得られる方法で行う。

4. 報告事項

- (1) 喫味への影響の有無
- (2) その他の項目
 - ① 作物に関する情報(生育状況、処理時の生育ステージ等)
 - ② タバコの製造工程及び保管等に関する情報

周辺農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)

1. 目的

本試験は、農薬の飛散による周辺作物への薬害に関する科学的知見を得ることを目的とする。

2. 供試農作物

- (1) 供試農作物の種類は、適用作物又は適用場所によって、ナス科、ウリ科、アブラナ科、マメ科、イネ科等の中から代表的なものを、それぞれ最低1種ずつ選択するよう配慮する。
- (2) 品種は、それぞれの農作物の代表的なものとし、最も感受性が高い生育ステージのものをを用いる。

3. 試験方法

- (1) 試験は、登録申請に係る使用方法及び使用薬量(濃度)で行い、無処理区を設ける。
- (2) 調査は、薬害を評価するための十分な情報が得られる方法で行う。

4. 報告事項

- (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) その他の項目
農作物に関する情報(生育状況、処理時の生育ステージ等)

水田水の流出による薬害試験(1-2-2)

1. 目的

本試験は、水田に施用される農薬のうち、水田水を通じて水系に流出するおそれのあるものを対象に、水系に生育する作物等への薬害に関する科学的知見を得ることを目的とする。

2. 供試作物

イグサ、レンコン、クワイ等代表的なものを用いる。品種は、それぞれの作物の代表的なものとし、最も感受性が高いステージのものをを用いる。

3. 試験方法

- (1) 試験は、登録申請に係る使用方法及び使用薬量(濃度)で行い、無処理区を設ける。
- (2) 調査は、薬害を評価するための十分な情報が得られる方法で行う。

4. 報告事項

- (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) その他の項目
農作物に関する情報(生育状況、処理時の生育ステージ等)

揮散による薬害試験(1-2-3)

1. 目的

本試験は、蒸気圧が高く、かつ、水溶解度が小さい化合物を有効成分とする農薬のうち、当該化合物が特に微量高活性である農薬（ただし、除草剤に限る。）について、水中又は土壌中からの揮散による周辺作物への薬害に関する科学的知見を得ることを目的とする。

2. 供試作物

感受性が高いと考えられる代表的な農作物を用いる。当該農作物の品種は、代表的なものとし、最も感受性が高い生育ステージのものとする。

3. 試験方法

- (1) 試験は、登録申請に係る使用方法及び使用薬量（濃度）で行い、無処理区を設ける。
- (2) 調査は、薬害を評価するための十分な情報を得られる方法で行う。

4. 報告事項

- (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) その他の事項
農作物に関する情報（生育状況、処理時の生育ステージ等）

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. 目的

本試験は、土壌処理剤又は土壌に混入する恐れがある農薬のうち、土壌残留期間が長く、かつ、適用農作物の栽培期間等から判断して必要と考えられる農薬について、後作物への薬害に関する科学的知見を得ることを目的とする。

2. 供試農作物

適用農作物の後作に栽培される可能性のある作物から感受性の高いと思われる作物を選択する。品種はそれぞれの農作物の代表的なものとし、最も感受性が高い生育ステージのものを用いて行う。

3. 試験方法

- (1) 試験は、登録申請に係る使用方法及び使用薬量（濃度）で行い、無処理区を設ける。
- (2) 調査は、薬害を評価するための十分な情報が得られる方法で行う。

4. 報告事項

- (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) その他の項目
農作物に関する情報（生育状況、処理時の生育ステージ等）

＜毒性に関する試験＞

急性経口毒性試験(2-1-1)

1. 目的

本試験は、農薬の毒性を評価する第一段階であり、経口経路による単回暴露によって起こり得る健康障害に関する科学的知見を得ることにより、農薬使用時の安全な取扱方法を確立すること等を目的とする。また、反復投与毒性試験及びその他の試験での用量設定のため、さらに、被験物質の毒作用の性質に関する最初の科学的知見を得るためにも有用である。

2. 試験方法

急性経口毒性試験としては「固定用量法」、「毒性等級法」等がある。

I 固定用量法

1. 供試動物

- (1) げっ歯類動物（通常、ラット）の若齢成獣を用いる。
- (2) 原則として、雌を用いる。ただし、雄の方の感受性が高いと判断される情報がある場合には雄を用いる。
- (3) 雌は、未経産で非妊娠のものを用いる。

2. 投与方法

被験物質は、強制による単回経口投与とし、必要に応じて水若しくは適当な溶媒に溶解し又は懸濁するが、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。

動物種に応じて、被験物質投与前の絶食の程度を考慮する。

3. 観察期間

少なくとも14日間の観察を行う。

4. 動物数の設定

(1) 見当付け試験

1 投与用量につき 1 匹とする。

(2) 主試験

1 投与用量につき 5 匹とする。ただし、見当付け試験を実施している投与用量については、見当付け試験に用いた 1 匹を加えて 5 匹となるように 4 匹を用いて実施する。

5. 試験の手順

(1) 見当付け試験

主試験の開始投与用量を選定するため、投与用量を5mg/kg体重、50mg/kg体重、300mg/kg体重又は2,000mg/kg体重から選択し、付表2-1-1-①の手順に沿って試験を行う。最初の投与用量の選択に当たっては、明確な毒性が発現すると予想される用量を選択する。被験物質の急性毒性に関する情報がない場合には、投与用量を300mg/kg体重から開始することが望ましい。次の投与までの間隔は、少なくとも24時間 空けなければならない

ない。

また、投与用量5mg/kg体重で死亡した場合には、 $LD_{50} \leq 5\text{mg/kg}$ 体重とし、主試験は実施せずに試験を終了する。ただし、必要がある場合には、 LD_{50} の更なる確認を行ってもよい。

(2) 主試験

付表2-1-1-②の手順に沿って試験を行う。ただし、見当付け試験で死亡の見られた投与用量については、主試験で2匹以上の死亡があったものとみなし、主試験は行わない。次の投与までの間隔は、毒性徴候の持続性及び重症度によって決定する。先の投与の動物の生存又は死亡が確認できるまでは、次の投与は行わない。

(3) 限界試験

見当付け試験において投与用量2,000mg/kg体重で死亡せず、かつ、主試験において2,000mg/kg体重で被験物質に起因した死亡が1匹以下の場合には、投与用量2,000mg/kg体重を超える用量の投与を行う必要はない。

6. 観察及び検査

次の(1)及び(2)の項目について実施する。

(1) 一般状態の観察

- ① 被験物質投与後30分以内に少なくとも1回、その後1日は頻繁に観察し、引き続き少なくとも毎日1回注意深く一般状態を観察する。
- ② すべての試験動物について個体ごとに、肉眼的に観察されたすべての毒性徴候の種類、発現時期、回復時期及び死亡時期を記録する。
- ③ 試験動物の体重は、個体ごとに、被験物質投与直前及び投与後は毎週1回測定するものとし、試験動物が死亡した場合には、死亡時においても測定する。
- ④ 毒性の評価に有効な試験動物の損失を最小限に抑える観点から、死亡動物、衰弱動物又は瀕死動物を発見した場合には、速やかに適切な措置（肉眼的剖検、隔離等）を講ずるものとする。

(2) 病理学的検査

すべての試験動物について剖検を行い、肉眼的病理所見を記録する。被験物質投与後24時間以上生存した試験動物の臓器で肉眼的に病理所見の認められたものについては、病理組織学的検査を行うことが望ましい。

II 毒性等級法

1. 供試動物

「固定用量法」に準ずる。

2. 投与方法

「固定用量法」に準ずる。

3. 観察期間

「固定用量法」に準ずる。

4. 動物数の設定

各投与段階につき3匹とする。

5. 試験の手順

- (1) 試験の開始投与用量を5mg/kg体重、50mg/kg体重、300mg/kg体重又は2000mg/kg体重の中から選択し、付表2-1-1-③の手順に沿って試験を行う。最初の投与用量の選択に当たっては、投与した動物のうち何匹かが死亡すると予想される用量を選択する。被験物質の急性毒性に関する情報がない場合には、投与用量を300mg/kg体重から開始することが望ましい。
- (2) 次の投与までの間隔は、毒性徴候の持続性及び重症度によって決定する。先の投与の動物の生存又は死亡が確認できるまでは、次の投与は行わない。
- (3) 3匹の動物に投与用量2,000mg/kg体重を投与して、死亡が1匹以下の場合には、新たに2,000mg/kg体重を3匹の動物に投与する。二度目の投与においても被験物質に起因した死亡が1匹以下の場合には、2,000mg/kg体重を超える用量の投与を行う必要はない。

6. 観察及び検査

次の(1)及び(2)の項目について実施する。

- (1) 一般状態の観察
「固定用量法」に準ずる。
- (2) 病理学的検査
「固定用量法」に準ずる。

急性経皮毒性試験(2-1-2)

1. 目的

本試験は、経皮経路による農薬の単回暴露によって起こり得る健康障害に関する科学的知見を得ることにより、農薬使用時の安全な取扱方法を確立すること等を目的とする。

2. 供試動物

- (1) ラット、ウサギ、モルモット等の哺乳動物のうち一種以上（供試動物の体重範囲はおおむね以下に示すとおり。ラット200～300g、ウサギ2.0～3.0kg、モルモット350～450g）を用いる。
- (2) 若齢成獣を用いる。
- (3) 雌は、未経産で非妊娠のものを用いる。

3. 投与方法

- (1) 被験物質投与の約24時間前に、試験動物の躯幹背部の被毛を刈毛又は剃毛により取り除く。この時、被験物質の皮膚透過性に影響を及ぼすので皮膚を損傷しないよう注意を払う。
- (2) 体表面積の少なくとも10%（ラット4cm×5cm、ウサギ12cm×14cm、モルモット7cm×10cm）は、被験物質の適用のためにきれいに剃毛する。剃毛する範囲を決める際には動物の体重を考慮する。
- (3) 被験物質は、体表面積の約10%の範囲に均一に適用するものとし、高い毒性を有する被験物質では、塗布面積はより小さくなる場合もあるが、塗布部位全体にできるだけ薄く均一に塗布するものとする。
- (4) 被験物質が固体の場合は、適宜、粉碎し、水又は溶媒を用いて十分に湿らせ、皮膚とよく接触させる。なお、溶媒を用いる場合は皮膚に刺激性のないものを用い、また、被験物質の皮膚透過性に対する溶媒の影響に注意を払う。液状の被験物質は、一般に希釈せずに使用する。
- (5) 被験物質の塗布期間は24時間とし、その間、塗布部位を多孔性のガーゼで覆い、非刺激性のテープで皮膚との接触を保つように止める。塗布部位は、被験物質とガーゼを保持するために適当な方法でさらに覆い、試験動物が被験物質を摂取できないようにしなければならない。
- (6) 塗布期間終了後、皮膚に付着している被験物質を水又は適当な溶媒を用いて除去する。

4. 観察期間

少なくとも14日間の観察を行う。

5. 動物数及び試験群の設定

- (1) 動物数の設定
一群につき5匹程度とし、すべて同性とする。
- (2) 試験群の設定
 - ① 少なくとも3段階の用量設定による被験物質投与群を設ける。
 - ② 一方の性での試験に加えて、少なくとも他方の性1群に投与し、他方の性の動物が被験物質に対して著しく高い感受性を持っていないことを確かめる。どちらかの

性の供試動物がより高い感受性を持つという十分な情報が得られている場合には、他の性による試験は省略してもよい。

- ③ 投与群は、毒性徴候と死亡動物が発生するよう適当な間隔の用量段階を設ける。投与群の設定は、用量-反応曲線及びおおよそのLD₅₀を決定するのに十分でなければならない。

(3) 限界試験

2,000mg/kg体重以上の1用量での試験で、被験物質に起因した死亡が認められない場合には、当該用量以上の投与群で試験を実施する必要はない。ただし、他の性1群に2,000mg/kg体重を投与し、感受性を確認するものとする。

6. 観察及び検査

次の(1)及び(2)の項目について実施する。

(1) 一般状態

- ① 被験物質を投与した日は頻繁に観察し、引き続き少なくとも毎日1回注意深く一般状態を観察する。
- ② すべての試験動物について個体ごとに、肉眼的に観察されたすべての毒性徴候の種類、発現時期、回復時期及び死亡時期を記録する。
- ③ 試験動物の体重は、個体ごとに、被験物質投与直前及び投与後は毎週1回測定するものとし、試験動物が死亡した場合には、死亡時においても測定する。
- ④ 毒性の評価に有効な試験動物の損失を最小限に抑える観点から、死亡動物、衰弱動物又は瀕死動物を発見した場合には、速やかに適切な措置（肉眼的剖検、隔離等）を講ずるものとする。

(2) 病理学的検査

「急性経口毒性試験」に準ずる。

急性吸入毒性試験(2-1-3)

1. 目的

本試験は、吸入経路による農薬の単回暴露によって起こり得る健康障害に関する科学的知見を得ることにより、農薬使用時の安全な取扱方法を確立すること等を目的とする。

2. 供試動物

- (1) 1種以上の哺乳動物(通常ラット)の若齢成獣を用いる。
- (2) 雌は、未経産で非妊娠のものを用いる。

3. 暴露方法

- (1) 吸入装置で設定濃度に少なくとも4時間暴露する。暴露方法は全身又は鼻部暴露とし、暴露中は給餌給水は行わない。
- (2) 暴露中は、流量、被験物質の実際濃度、粒子径分布、温度及び湿度をモニタリングし、これらに関する条件を一定に保つ。
- (3) 粒子径(空気力学的質量中位径)は1~4 μ mが望ましい。または、実施可能な最小粒子径とする。
- (4) 被験物質が揮発性の場合には、爆発の起こる濃度にならないよう注意する。

4. 観察期間

少なくとも14日間の観察を行う。

5. 動物数及び試験群の設定

(1) 動物数の設定

一群につき5匹程度とし、すべて同性とする。

(2) 試験群の設定

- ① 少なくとも3段階の用量設定による被験物質暴露群を設ける。
- ② 一方の性での試験に加えて、少なくとも他方の性1群に暴露し、他方の性の動物が被験物質に対して著しく高い感受性を持っていないことを確かめる。どちらかの性の供試動物がより高い感受性を持つという十分な情報が得られている場合には、他の性による試験は省略してもよい。
- ③ 暴露群に毒性徴候と死亡動物が発生するよう適当な間隔の暴露量段階を設ける。
- ④ 暴露群の設定は、濃度-反応曲線及びおおよその半数致死濃度(LC₅₀)を決定するのに十分でなければならない。
- ⑤ 暴露環境中、被験物質の適切な濃度を維持するため媒体を使用する場合には、当該媒体は毒性が既知のものであり、かつ、試験結果に重大な影響を与えないものが望ましい。
- ⑥ 必要な場合には、溶媒対照群試験を行う。

(3) 限界試験

- ① 5mg/lの暴露濃度(呼吸可能な被験物質の実際の濃度)で4時間の試験により被験物質に関連した死亡を生じない場合は、当該濃度以上での試験は必要ない。ただし、他の性1群に5mg/lを暴露し、感受性を確認するものとする。
- ② 被験物質の物理化学的性質のために5mg/lでの暴露が不可能な場合であって、かつ、本試験法の操作手順を使って得られる最高濃度で被験物質に関連した死亡を生

じない場合は、当該濃度以上で実施する必要はない。ただし、他の性1群にその最高濃度を暴露し、感受性を確認するものとする。

6. 観察及び検査

次の(1)及び(2)の項目について実施する。

(1) 一般状態の観察

「急性経皮毒性試験」に準ずる。

(2) 病理学的検査

- ① 呼吸器系の変化に着目し、観察した毒作用を考慮し、すべての試験動物について剖検を行い、すべての肉眼的病理所見を記録する。
- ② 24時間以上生存した試験動物の臓器について肉眼的に異常所見の認められたものについては、病理組織学的検査を行うことが望ましい。

皮膚刺激性試験(2-1-4)

1. 目的

本試験は、農薬の皮膚刺激性／腐食性に関する科学的知見を得ることにより、農薬使用時の安全な取扱方法を確立すること等を目的とする。

2. 供試動物

3匹以上の白色ウサギの若齢成獣を用いる。

3. 投与方法

- (1) 試験の約24時間前に体幹背部の毛を短く刈る。皮膚を損傷しないように注意を払い、健康な無傷の皮膚を持つ動物だけを使用する。
- (2) 被験物質が固体の場合は、適宜、粉碎し、水又は溶媒を用いて十分に湿らせ、皮膚とよく接触させる。なお、溶媒を用いる場合は皮膚に刺激性のないものを用い、また、被験物質の皮膚透過性に対する溶媒の影響に注意を払う。液状の被験物質は、一般に希釈せずに使用する。
- (3) 液状の被験物質は0.5ml、固体又はペースト状の被験物質は0.5gを試験局所に適用する。
- (4) 被験物質は、皮膚の小範囲(約6 cm²)に適用し、投与(適用)期間中、ガーゼパッチで覆い、非刺激性テープで止める。液状やペースト状の場合にはガーゼパッチに被験物質を塗り、そのガーゼパッチを皮膚に適用する方法をとってもよい。パッチは暴露期間中適当な半閉塞包帯で皮膚との接触を保つようにする(場合によっては閉塞包帯を使用してもよい)。なお、その動物の未処置部分の皮膚を対照とする。
- (5) 暴露時間は通常4時間とし、暴露期間終了時に、皮膚に付着している被験物質を水や適当な溶媒等を用いて除去する。

4. 投与に係る留意点

(1) 重度の皮膚刺激性／腐食性が疑われる場合

- ① 被験物質に重度の皮膚刺激性／腐食性が疑われる場合は1匹の動物で実験を行う。
- ② 被験物質に腐食性が疑われる場合は、3つの試験パッチを同時に1匹の動物に適用する。1番目のパッチは暴露3分後に除去する。強い皮膚反応が観察されない時は、2番目のパッチを暴露1時間後に除去する。この段階で暴露を動物愛護の観点から4時間に延長することができると判断した場合には、3番目のパッチを暴露4時間後に除去し、皮膚反応を等級付けする。なお、暴露3分後又は1時間後に強い皮膚刺激性が観察されたときは、残っているパッチを除去して直ちに試験を終了する。

以上の代わりに3つのパッチを連続的に適用して観察してもよい。

- ③ 被験物質に重度の皮膚刺激性が疑われる場合には、1つのパッチを1匹の動物に4時間適用する。
 - ④ 4時間暴露後に重度の皮膚刺激性／腐食性が観察されないときは、2匹の追加試験動物を用い、それぞれ1つのパッチで4時間試験する。
- (2) 被験物質が重度の皮膚刺激性／腐食性を生じないと予想される場合
試験は3匹の動物を用いて開始し、それぞれ1つのパッチを適用し4時間の暴露を行う。

5. 一般状態の観察及び採点

- (1) 動物はパッチ除去30分（又は60分）、24時間、48時間及び72時間後に紅斑と浮腫の徴候について観察し、皮膚反応を採点する。
- (2) 皮膚刺激性／腐食性は、別表の評価基準に基づき採点し記録する。なお、可逆性を明確にさせるために必要な場合には、さらにその後の観察を行う。一般には適用後14日を超える必要はない。
- (3) 皮膚刺激性／腐食性観察に加えて、重篤な障害その他の毒作用を十分に記録する。

(別表) 皮膚刺激性／腐食性の評価基準

1. 紅斑及び痂皮の形成

- (1) 紅斑なし・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 0
 - (2) 非常に軽度の紅斑（かろうじて識別できる。）・・・・・・・・・・・・ 1
 - (3) はっきりした紅斑・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 2
 - (4) 中等度又は重度の紅斑・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 3
 - (5) 重度の紅斑（深紅色）又は痂皮形成（紅斑の採点不能）まで・・・・ 4
- 最高点：4

2. 浮腫の形成

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

眼刺激性試験(2-1-5)

1. 目的

本試験は、農薬の眼及び眼粘膜への刺激性／腐食性に関する科学的知見を得ることにより、農薬使用時の安全な取扱方法を確立すること等を目的とする。

2. 供試動物

3匹以上の白色ウサギの若齢成獣を用いる。

3. 投与方法

- (1) 試験開始前24時間以内に試験動物の両眼を検査する。眼に異常のある動物は使用してはならない。
- (2) 液状の被験物質は希釈しないで0.1ml、固体又はペースト状のものは容量で0.1ml又は重量で0.1gを超えない範囲で適用する(容量又は重量は常に記録する。)。なお、被験物質が固形又は粒状のものについては、粉碎し、微粉末にする。
- (3) 被験物質は、片側の下眼瞼を緩やかに眼球から引き離し、その結膜嚢内に適用する。被験物質の損失を防ぐため約1秒、両眼瞼を緩やかに合わせ保持する。無処置の他眼を対照とする。
なお、圧力のかかったエアゾル容器内に含まれる被験物質については、開眼させた状態で、眼の前方10cmの距離から約1秒間の1回噴射で適用する。
- (4) 被験物質が激しい痛みを起こすと考えられる場合には、投与前に局所麻酔を施しても差し支えない。ただし、局所麻酔を投与するに当たっては、その使用により被験物質に対する生体の反応性に有意な差が生じないように十分に注意する。
- (5) 供試動物の眼は、被験物質点眼後24時間は洗眼してはならない。24時間の時点で適切と考えられる場合には洗眼を行ってもよい。
- (6) 試験の結果、眼刺激性が認められた場合には、少なくとも3匹の動物を用いて洗眼効果を確認する試験を行う。この場合、処置眼は点眼約30秒後に30秒間、眼に障害を与えない程度の量と流速で洗眼を行う。

4. 投与に係る留意点

被験物質に重度の眼刺激性が疑われる場合は、1匹の試験動物で試験を行うこととし、その結果、被験物質に重度の眼刺激性又は腐食性が認められる場合には、試験動物を追加して試験を実施する必要はない。

5. 一般状態の観察及び採点

- (1) 被験物質の投与後1時間、24時間、48時間及び72時間における眼の一般状態について観察し、記録するとともに、別表の評価基準に基づき、被験物質に対する眼の反応性(刺激性／腐食性)を記録する。なお、投与後24時間における観察終了後、一部又はすべての試験動物の眼をフルオレセインを使用して、さらに検査してもよい。
- (2) 投与後72時間までに眼刺激性が認められない場合には、本試験を終了するものとする。
- (3) 持続性の角膜障害その他の眼刺激性認められる場合には、被験物質投与後21日を超えない範囲内において、損傷の経過等(可逆性、非可逆性等)について、観察を続けるものとする。

(4) 観察は、角膜、虹彩及び結膜の観察に加え、確認された損傷等はすべて記録するものとする。

(別表) 眼の刺激性／腐食性の評価基準

角膜 *

混濁：混濁の程度（最も濃い部分で判定する）

- (1) 潰瘍又は混濁を認めない・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 0
 - (2) 散在性又はびまん性の混濁（通常の光沢を持った軽度の曇りとは異なる。）、虹彩の細部は明瞭に透視可能・・・・・・・・ 1
 - (3) 透明な部分は残っているが、虹彩の全体がやや不明瞭・・・・・・・・ 2
 - (4) 真珠様光沢部位あり、虹彩の細部は不明で瞳孔の大きさがかろうじて見分けられる・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 3
 - (5) 角膜不透明、混濁部を通して虹彩は見分けられない・・・・・・・・ 4
- 最高点：4

*：角膜の混濁範囲を記録する

虹彩

- (1) 正常・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 0
 - (2) 明瞭な深いひだ、充血、腫脹、中等度の角膜周囲の充血、これらのいずれか又は組合せ、虹彩はまだ光に反応する（反応は遅く鈍い）・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
 - (3) 対光反応消失、出血、著しい組織崩壊（これらのいずれか又はすべて）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 2
- 最高点：2

結膜

発赤（眼瞼及び眼球結膜、角膜、虹彩）

- (1) 血管正常・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 0
 - (2) 一部の血管が明らかに充血・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
 - (3) びまん性の深紅色、個々の血管は容易に見分けられない・・・・・・・・ 2
 - (4) びまん性の牛肉様赤色・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 3
- 最高点：3

結膜浮腫（眼瞼結膜及び瞬膜）

- (1) 腫脹なし・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 0
 - (2) 正常を超える腫脹（瞬膜を含む）・・・・・・・・・・ 1
 - (3) 眼瞼の外反を伴った明らかな腫脹・・・・・・・・・・ 2
 - (4) 眼瞼の1/2未満の閉鎖を伴った腫脹・・・・・・・・・・ 3
 - (5) 眼瞼の1/2以上の閉鎖を伴った腫脹・・・・・・・・・・ 4
- 最高点：4

皮膚感作性試験(2-1-6)

1. 目的

本試験は、農薬の皮膚感作性に関する科学的知見を得ることにより、農薬使用時の安全な取扱方法を確立すること等を目的とする。

2. 試験動物種、齢及び性

- (1) モルモット若齢成獣を用いる。
- (2) 雌は未経産で非妊娠のものを用いる。

3. 試験方法

比較的实施頻度の高い試験方法は、Guinea-pig Maximization Test (以下「GPM法」という。)及びBuehler Test (以下「Buehler法」という)である。しかしながら、感作性に関する情報を得ることができればその他の試験法で代替してもよい。

4. 試験操作

(1) GPM法

① 試験群の設定

被験物質処置群、陰性対照群及び陽性対照群を設ける。陽性対照群は既知の感作性物質を用いて試験を実施する。最近の背景データがあれば、それを用いてもよい。

② 動物数の設定

ア 被験物質処置群には少なくとも10匹、対照群には少なくとも5匹用いる。

イ 被験物質処置群に20匹未満、対照群に10匹未満の動物を使用している場合でかつ被験物質が感作性物質と結論できない場合には、被験物質処置群では少なくとも総数が20匹、対照群では少なくとも総数が10匹となるまで追加試験を行うことが望ましい。

③ 用量の設定

ア 感作暴露に用いる被験物質の濃度は、全身的に十分に耐性のある濃度で、軽度から中等度の皮膚刺激性を示す最高濃度とする。

イ 惹起暴露に用いる被験物質の濃度は、刺激を示さない最高濃度とする。

ウ 2匹又は3匹の試験動物を用いて、適切な被験物質の濃度を決定する。

④ 初回感作(皮内注射による。)

以下の方法により行う。

ア 被験物質処置群

除毛した肩部の正中線の両側に、以下のとおり3対の皮内注射(0.1ml)を行う。

注射1: Freund's complete adjuvant (以下「FCA」という)と水(又は生理食塩液)の1:1(v/v)の混合物

注射2: 適切な溶媒中での所定濃度の被験物質

注射3: FCAと水(又は生理食塩液)の1:1(v/v)混合物中での所定濃度の被験物質

イ 陰性対照群

以下のとおり3対の皮内注射(0.1ml)を被験物質処置群と同じ位置に行う。

注射1: FCAと水(又は生理食塩液)の1:1(v/v)の混合物

注射2: 処置群で用いた溶媒のみ

注射3: FCAと水(又は生理食塩液)の1:1(v/v)混合物

⑤ 再感作（貼付適用による。）

ア 初回感作5～7日後の再感作

被験物質が皮膚刺激性物質でない場合には、再感作適用の約24時間前に試験区画を短く刈毛又は剃毛した後、再感作を促進するため10%ラウリル硫酸ナトリウム含有のワセリン0.5mlを塗布する。

イ 初回感作6～8日後の再感作

以下の方法により行う。

（ア）被験物質処置群

試験区を再度除毛する。適切な溶媒で調製した被験物質を濾紙又はガーゼ（2×4cm）に十分に含ませた後試験区画に適用し、48時間閉塞貼付する。

溶媒の選択には理由が必要である。固体は細かく粉碎し適切な溶媒と混合する。液体の場合には適切であれば希釈せずに適用する。

（イ）陰性対照群

処置群と同様に溶媒を48時間閉塞貼付する。

⑥ 初回惹起（貼付適用による。）

ア 再感作（貼付適用による。）14日後に行う。

イ 被験物質処置群及び対照群の動物の腹側部を除毛する。被験物質を塗布したパッチ又はチャンバーを動物の一方の腹側部に適用し、必要であれば溶媒のみを塗布したパッチ又はチャンバーも同様に他方の腹側部に適用する。

ウ パッチは24時間閉塞貼付する。

⑦ 観察

ア パッチ除去後の約21時間後に、必要があれば惹起区画を除毛する。

イ 3時間後（惹起パッチ適用開始から約48時間後）皮膚反応を観察し、以下に示した基準に従って記録する。

ウ 1回目の観察の24時間後に再度皮膚反応を観察し、記録する。

<惹起パッチテスト反応評価のための基準>

肉眼的変化なし	0
散在性又は斑状の紅斑	1
中等度びまん性紅斑	2
強い紅斑と浮腫	3

⑧ 再惹起

初回惹起で得られた結果を明白にする必要がある場合には、適切であれば新たに対照群を設けて、初回惹起の約1週間後に実施する。初回惹起に用いた対照群を引き続き用いても差し支えない。

⑨ 一般症状観察

感作及び惹起の結果生じた皮膚反応及び異常所見をすべて記録する。

（2）Buehler 法

① 試験群の設定

被験物質処置群、陰性対照群及び陽性対照群を設ける。陽性対照群は既知の感作性物質を用いて試験を実施する。最近の背景データがあれば、それを用いてもよい。

② 動物数の設定

被験物質処置群には少なくとも20匹、対照群には少なくとも10匹を用いる。

③ 用量の設定

GPM法に同じ。

- ④ 初回感作（貼付適用による。）
以下の方法により行う。
- ア 被験物質処置群
一方の肩又は側部を除毛する。試験に適切な溶媒で調製した被験物質を試験パッチ（4～6cm²）に含ませたものを試験区画に適用し、6時間閉塞貼付する。
- イ 陰性対照群
被験物質処置群と同一の方法で、溶媒のみを適用する。
- ⑤ 再感作（貼付適用による。）
- ア 初回感作6～8日後及び13～15日後に行う。
- イ 同じ肩又は側部の同じ試験区画に初回感作と同様の処置を行う。
- ⑥ 惹起
- ア 再感作14日後に行う。
- イ 被験物質処置群及び対照群の動物の腹側部を除毛する。被験物質を塗布したパッチ又はチャンバーを動物の一方の腹側部の適用し、必要であれば溶媒のみを塗布したパッチ又はチャンバーも同様に他方の腹側部に適用する。なお、パッチは6時間閉塞貼付する。
- ⑦ 観察
- ア パッチ除去後の約21時間後に必要があれば惹起区画を除毛する。
- イ 約3時間後（惹起パッチ適用開始から約30時間後）皮膚反応を観察し、GPM法に示した等級に従って記録する。
- ウ 1回目の観察の24時間後に再度皮膚反応を観察し、記録する。
- ⑧ 再惹起
GPM法に同じ。
- ⑨ 一般状態観察
GPM法に同じ。

急性神経毒性試験(2-1-7)

1. 目的

本試験は、農薬の単回暴露による神経系への毒性の特徴を明確にし、その毒性変化の認められない最高投与量（無毒性量）に関する科学的知見を得ることにより、農薬使用時の安全な取扱方法を確立すること等を目的とする。

2. 供試動物

- (1) げっ歯類（通常、ラット）を用いる。
- (2) 離乳後、馴化期間を経てできるだけ早い時期の同一週齢の動物、通常5～6週齢の動物を用いる。
- (3) 原則として雌雄の動物を同数用いる。なお、雌は未経産で非妊娠のものを用いる。

3. 投与方法

- (1) 被験物質の投与は、必要に応じて投与経路（経口、経皮又は吸入）を選択し行う。
- (2) 方法は急性経口毒性試験、急性経皮毒性試験又は急性吸入毒性試験に準じて行う。

4. 観察期間

被験物質を単回暴露後、14日間の観察を行う。

5. 動物数及び試験群の設定

(1) 動物数の設定

- ① 試験に用いる動物数は、詳細な症状観察及び機能検査のために必要な各群雌雄各10匹以上とし、その中から神経病理組織学的検査に必要な各群雌雄各5匹以上を得ること。
- ② 各群への動物の割付けには、体重層別等による適切な無作為抽出法を用いる。
- ③ 最終的には試験結果の評価を行うのに十分な動物数が確保できていなければならない。

(2) 試験群の設定

① 被験物質投与群

- ア 対照群の他に少なくとも3段階の用量設定により投与群を設ける。
- イ 用量段階は被験物質の毒性の徴候を明らかにし、無毒性量を推定できるように設定する。最高用量は多数例の死亡を引き起こすことなく毒性影響が認められる用量、最低用量は何ら毒性影響が認められない用量とし、かつ、用量反応関係がみられるように各用量段階を設定する。
- ウ 用量設定に当たっては、本試験に先だって実施した毒性試験の結果等を参考とすること。また、用量設定の根拠を示すこと。
- エ 技術的に投与可能な最大量又は2,000mg/kg体重/日相当量で何ら毒性影響が認められない場合は、それ以上の投与量で実施する必要はない。

② 対照群

- ア 対照群としては、被験物質の投与を行わないこと以外、すべての点で被験物質投与群と同一条件の群を設ける。
- イ 被験物質の投与に溶媒等を使用する場合には、投与溶媒量の最も多い用量群と同量の溶媒の投与を行う。毒性に関する情報が十分に得られていない溶媒等を使

用する場合には、さらに無処置対照群を加える。

6. 観察及び検査

次の(1)～(4)の項目について実施する。

(1) 一般状態の観察

- ① 全動物について、一般状態を毎日注意深く観察する。
- ② 観察は全身状態、異常行動の有無及び死亡の有無を観察する。
- ③ 全動物について投与開始前及び投与開始後少なくとも週1回、体重を測定する。

(2) 詳細な状態の観察

- ① 対象となる各群雌雄各10匹以上の動物について、投与開始前、投与後8時間以内で最も影響が現れることが予想される時間、投与7日後及び14日後に行う。観察は、飼育ケージ内及び観察台上で行う。
- ② 観察は、項目毎に明確な判断基準と尺度基準を定めた採点法を用い、標準化された手順に従って行う。
- ③ 検査は、通常、次の項目について行う。
外観（皮膚、被毛、眼・眼球及び粘膜等の変化、分泌物の有無等）、体位、姿勢（円背位等）、自律神経系機能（流涙、立毛、瞳孔径、呼吸状態、排泄状態等）、運動協調性、歩行の異常、動物の取扱操作及び環境刺激に対する反応、神経系（振戦、痙攣、筋収縮性等）、探索行動の変化、常同行動（身づくろいの変化、くびふり、旋回等）、異常行動（自咬、後ずさり、異常発声等）、攻撃性等

(3) 機能検査

- ① 対象となる各群雌雄各10匹以上の動物について、投与開始前、投与後8時間以内で最も影響が現れることが予想される時間、投与7日後及び14日後に行う。
- ② 検査は、通常、次の項目について行う。
種々の刺激（聴覚刺激、視覚刺激、固有受容器刺激等）に対する感覚運動反応、握力及び自発運動量（自動記録装置を用いる。）。
- ③ 他の毒性試験等で神経毒性が疑われた場合、疑われた神経毒性の精査に適した感覚機能、運動機能、学習・記憶に関する試験を実施する。

(4) 病理学的検査

- ① 対象となる各群雌雄各5匹以上について、病理組織学的検査を行う。
- ② 症状観察及び機能検査で、特定の動物に異常が認められた場合は、その動物を検査する。
- ③ 組織は灌流固定その他の適当な方法により固定する。観察された肉眼的病理学的変化はすべて記録する。
- ④ 通常、組織標本はパラフィン包埋され、ヘマトキシリン・エオジン染色等の一般的な染色が施されるが、末梢神経系に神経障害が認められるか又は疑われる場合には、末梢神経系組織の樹脂包埋標本を作製し検査する。
- ⑤ 症状観察等から、適宜、検査部位の追加及び特殊染色を実施する。
- ⑥ 神経病理組織学的所見は、他の毒性試験成績及び行動学的影響と関連付けて評価する。
- ⑦ 中枢神経系と末梢神経系の代表的な切片について、段階的に検査する。
- ⑧ まずはじめに最高用量群と対照群の切片を比較し、最高用量群に神経病理組織学的変化が認められなければ、それ以降の検査は必要ない。最高用量群に変化が認められた場合は、中間用量と最低用量の切片を順次検査する。
- ⑨ 検査は、通常、以下の組織について行う。

前脳、海馬を含む大脳中心部、中脳、小脳、橋、延髄、視神経と網膜を含む眼球、
脊髄の頸膨大と腰膨大、脊髄神経節、神経線維の前根及び後根、近位の坐骨神経、
近位の脛骨神経（膝部）と脛骨神経の腓腹筋分岐部、骨格筋（特に腓腹筋）

⑩ 脊髄及び末梢神経の切片は、横断面と縦断面の両方を含める。

急性遅発性神経毒性試験(2-1-8)

1. 目的

本試験は、急性毒性試験成績その他の毒性試験成績又は既知の遅発性神経毒性を示す物質との化学構造上の相関から遅発性神経毒性を有することが予想される農薬について、その毒性に関する科学的知見を得ることにより、農薬使用時の安全な取扱方法を確立すること等を目的とする。

2. 供試動物

- (1) 一般的な品種及び系統の雌のニワトリを用いる。
- (2) 月齢8～12か月の標準的な大きさの若齢成鶏を用いることが望ましい。
- (3) 実験結果に影響を及ぼすようなウイルス性疾患や薬物処理がなく、歩行異常のない健康な動物を用いる。

3. 投与方法

- (1) 強制による単回経口投与とする。
- (2) 被験物質が液体の場合は、原液により、又は適切な溶媒に溶解した上で投与する。
- (3) 被験物質が固体の場合は、可能な限り溶解した上で投与する。

4. 観察期間

被験物質の投与後、21日間の観察を行う。

5. 動物数及び試験群の設定

(1) 動物数の設定

- ① 投与群、対照群とも、生化学的検査に必要な6羽及び試験終了時まで生存し病理組織学的検査に用いることができる6羽を得るのに十分な数の動物を用いるものとする。
- ② 陽性対照群は、生化学的検査に必要な3羽及び病理組織学的検査に必要な3羽を得るのに十分な数の動物を用いるものとする。

(2) 試験群の設定

① 被験物質投与群

予備試験で、死亡がみられない程度で可能な限り高い用量(最大非致死量)を求める。

被験物質は、2,000mg/kg体重/日相当量を上限として最大非致死量を投与する。

② 対照群

ア 対照群としては、被験物質の投与を行わないこと以外、すべての点で被験物質投与群と同一条件とする。

イ 被験物質の投与に溶媒等を使用する場合には、投与溶媒量の最も多い用量群と同量の溶媒投与を行う。毒性に関する情報が十分に得られていない溶媒等を使用する場合には、さらに無処置対照群を加えるものとする。

③ 陽性対照群

既知の遅発性神経毒性物質(例えば、TOCP等)を用いて試験を実施する。最近の背景データがあれば、それを用いてもよい。

6. 飼育上の注意

動物が自由に歩き回ることができ、歩行状態を容易に観察できるよう十分な大きさの飼育ケージ又は柵を用いる。

7. 観察及び検査

次の(1)～(3)の項目について実施する。

(1) 一般状態の観察

- ① すべての動物について、投与直後から観察を開始するものとし、最初の2日間は1日に数回、それ以降21日間又は計画屠殺されるまでの間は、毎日少なくとも1回注意深く観察する。
- ② あらゆる毒性徴候について、その種類、発現時期、程度及び持続期間を記録する。なお、運動失調は、4段階以上からなる判定基準に基づき評価する。
- ③ 病理学的検査に用いる動物は、少なくとも週2回ケージの外に出し、軽微な毒性影響が観察できるようにするため一定時間の強制運動を行う。
- ④ 瀕死動物は、排除・屠殺後、肉眼的病理学的検査を実施する。
- ⑤ すべての動物について、投与前及びそれ以降週1回、体重測定を行う。

(2) 生化学的検査

- ① 投与群及び対照群から無作為に選択した各6羽と陽性対照群の3羽を被験物質投与後72時間以内に屠殺し、脳及び腰脊髄を採取しNTE (neuropathy target esterase又はneurotoxic esterase) 活性を測定する。
通常、投与群及び対照群の各3羽については被験物質投与後24時間目及び48時間目、陽性対照群の3羽については被験物質投与後24時間目に屠殺し、それぞれ脳及び腰脊髄を採取する。中毒症状から被験物質の排泄がきわめて緩徐であると判断される場合には、遅発性神経毒性誘発能を検出するのに最適な間隔を考慮し、投与後24時間目から遅くとも72時間目以内の間に2回、各3羽を屠殺して脳及び腰脊髄を採取することが望ましい。
- ② NTE活性を測定した同じ動物の組織について、アセチルコリンエステラーゼ活性の測定をすることが、評価の助けとなる。

(3) 病理学的検査

- ① 計画殺及び切迫殺したすべての動物について、脳及び脊髄の外観観察を含む肉眼的病理学的検査を実施する。
- ② 試験終了時において、生存する各群6羽以上の動物から採取した神経組織について、病理組織学的検査を実施する。
- ③ 組織は、灌流固定その他の適当な方法により固定する。
ア 切片には、小脳(中央縦断面)、延髄、脊髄及び末梢神経を含める。
イ 脊髄切片は、上頸部、中胸部及び腰仙部から採取する。
ウ 脛骨神経の近位部、遠位部及び分岐部と坐骨神経を採取する。
- ④ 切片は、髓鞘と軸索を適切な手法で染色する。

90日間反復経口投与毒性試験(2-1-9)

1. 目的

本試験は、被験物質を90日間以上反復経口投与したときに生じる毒性変化及び毒性変化の認められない最高投与量（無毒性量）についての科学的知見を得ることを目的とする。また、本試験は、発がん性試験、1年間反復経口投与毒性試験等における用量設定に関する情報を得るためにも有用である。

2. 供試動物

- (1) げっ歯類1種（通常、ラット）及び非げっ歯類1種（通常、イヌ）について実施する。
- (2) げっ歯類については、離乳後、馴化期間を経てできるだけ早い時期の同一週齢（通常5～6週齢）の動物を用い、非げっ歯類（イヌ）については、4～6か月齢の動物を用いる。
- (3) 原則として雌雄の動物を同数用いる。なお、雌は未経産で非妊娠のものを用いる。

3. 投与方法

経口による連続投与とし、通常、混餌投与又は飲水投与により行う。ただし、これら方法による投与が困難な場合には強制経口投与を行ってもよい。

4. 投与期間

連続90日以上とする。

5. 動物数及び試験群の設定

(1) 動物数の設定

- ① げっ歯類については1群当たり雌雄各10匹以上、非げっ歯類については1群当たり雌雄各4匹以上とする。
- ② 各群への動物の割り付けには、体重層別等による適切な無作為抽出法により行う。なお、中間屠殺を予定する場合は、そのために必要な数を追加設定すること。
- ③ 試験結果の評価を行う上で十分な動物数が確保できていなければならない。

(2) 試験群の設定

① 被験物質投与群

- ア 対照群の他に少なくとも3段階の用量設定による被験物質投与群を設ける。
- イ 用量段階は、被験物質の毒性の徴候を明らかにし、無毒性量を推定できるように設定する。最高用量は多数例の死亡を起こすことなく毒性影響が認められる用量、最低用量は何ら毒性影響が認められない用量とし、用量反応関係がみられるように各用量段階を設定する。（用量設定の根拠を示すこと。）
- ウ 技術的に投与できる最大量又は1,000 mg/kg体重/日相当量で何ら毒性影響が認められない場合は、それ以上の投与量で試験を実施する必要はない。

② 対照群

- ア 被験物質の投与を行わないこと以外、すべての点で被験物質投与群と同一条件とする。
- イ 被験物質の投与に溶媒等を使用する場合には、投与溶媒量の最も多い用量群と同量の投与を行うこと。毒性に関する情報が十分に得られていない溶媒等を使用

する場合には、さらに無処置対照群を加える。

6. 観察及び検査

次の(1)～(5)の項目について実施する。

(1) 一般状態の観察

- ① すべての動物について、毎日、死亡の有無、一般状態（毒性徴候の発現時期やその程度）を観察するとともに、定期的に体重及び摂餌量を測定する（飲水投与の場合にあっては摂水量についても測定する。以下同じ。）。
- ② 体重及び摂餌量の測定は、原則として、投与開始前に1回、投与開始後は少なくとも週1回の割合で行うとともに、被験物質の摂取量を算出する。

(2) 詳細な状態の観察

- ① 投与開始前に1回、投与開始後は週1回の割合で行う。
- ② 観察は、飼育ケージ内及び観察台上で行う。全身状態の変化を把握するのに十分な観察項目、各項目の定義と採点基準及び観察順を決めた観察手順に従って注意深く観察する。観察時の動物の取扱いが試験結果に影響しないよう留意すること。
- ③ 通常、次の項目について行う。
外観（皮膚、被毛、眼・眼球及び粘膜等の変化、分泌物の有無等）、体位、姿勢（円背位等）、自律神経系機能（流涙、立毛、瞳孔径、呼吸状態、排泄状態等）、運動協調性、歩行の異常、動物の取扱操作や環境刺激に対する反応、神経系（振戦、痙攣、筋収縮性等）、探索行動の変化、常同行動（身づくろいの変化、くびふり、旋回等）、異常行動（自咬、後ずさり、異常発声等）、攻撃性等

(3) 機能検査

- ① げっ歯類について投与終了時に近い時点で行う。
- ② 通常、次の項目について行う。
刺激（聴覚刺激、視覚刺激及び固有受容器刺激）に対する感覚運動反応、握力、自発運動量（自動記録装置を用いて測定する。）

(4) 血液検査

- ① げっ歯類については少なくとも試験終了時に1回、非げっ歯類については投与開始前及び試験終了時に、原則として、すべての動物について行うことが望ましいが、げっ歯類については、実施上の理由から、各群の一部（少なくとも5匹）の動物に限ってもよい。
- ② マウスを除き、検査前に一晩絶食させることが望ましい。
- ③ 通常、次の項目について行う。

そのほか試験ごとに適切な項目を追加選定して行うことが望ましい。なお、検査項目及び検査方法は、国際的に広く採用されているものを考慮に入れて選定する。

ア 血液学的検査

赤血球数、白血球数、血液像（白血球型別百分率）、血小板数、血色素量、ヘマトクリット値、その他必要に応じて網状赤血球数、凝固能（プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間）等

イ 血液生化学的検査

血清（血漿）総蛋白、アルブミン、A/G比、ブドウ糖、コレステロール、トリグリセリド、ビリルビン、尿素窒素、クレアチニン、トランスアミナーゼ [AST (GOT)、ALT (GPT)]、γ-GTP、アルカリフォスファターゼ、電解質（ナトリウム、カリウム、塩素、カルシウム、無機リン等）等

(5) 尿検査

① げっ歯類については各群ごとに雌雄それぞれ一定数の動物（5匹以上）について、非げっ歯類についてはすべての動物について、血液検査と同時期に尿検査を行う。

② 通常、次の項目について行う。

尿量、pH、蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲン、潜血、沈渣、比重等

(6) 眼科学的検査

非げっ歯類はすべての動物について、げっ歯類は少なくとも高用量群と対照群について、投与開始前及び試験終了時に行う。なお、被験物質投与に起因する変化が生じた場合にはすべての動物を対象とする。

(7) 病理学的検査等

① 投与期間中の死亡例は、速やかに剖検及び器官・組織の肉眼的観察を行うとともに病理組織学的検査を行い、死因及びその時点での毒性変化の程度を明らかにする。

② 投与期間中の瀕死動物は、速やかに屠殺、剖検し、①と同様の観察及び検査を行い、瀕死状態となった理由及びその時点での毒性変化の程度を明らかにする。

③ 投与期間終了時におけるすべての生存動物は、諸検査等のための採血及び採尿を行った後、屠殺、剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行い、器官ごとに重量を測定する。

④ 重量測定は、通常、次の器官について行う。なお、マウスを除き剖検前に一晩絶食させることが望ましい。

肝臓、腎臓、副腎、精巣、卵巣、胸腺、脾臓、心臓、脳、前立腺^(注)、甲状腺・上皮小体^(注)、下垂体^(注)

(注)：前立腺、甲状腺・上皮小体及び下垂体については、非げっ歯類のみ。

⑤ 病理組織学的検査は、非げっ歯類ではすべての動物について、げっ歯類では少なくとも最高用量群と対照群の動物について行う。

⑥ 通常、次の器官又は組織について行うが、肉眼的所見等から適宜追加すること。皮膚、乳腺、リンパ節（頸部リンパ節、腸間膜リンパ節等）、大動脈、唾液腺、骨及び骨髄（胸骨、大腿骨）、胸腺、気管、肺及び気管支、心臓、甲状腺及び上皮小体、食道、胃、小腸（十二指腸、空腸、回腸）、大腸（盲腸、結腸、直腸）、肝臓（及び胆嚢）、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、精囊凝固腺、前立腺、精巣^(注)、精巣上皮、卵巣、子宮、膣、脳、下垂体、坐骨神経、骨格筋、脊髄（頸部、胸部、腰部）、眼球及びその付属器、その他肉眼的に変化が認められた器官・組織

(注)：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。

⑦ げっ歯類の他の用量群についても、被験物質投与に起因する肉眼的変化が認められる器官がある場合又は高用量群での所見からみて必要と認められる場合は、当該器官・組織についてその用量群の全動物につき病理組織学的検査を行う。なお、げっ歯類において、全動物を対象に病理組織学的検査を行うことは、評価の助けになる。

⑧ 試験終了後であっても、必要なときに病理組織学的検査が行えるように器官及び組織を保存する。

7. その他

本試験の結果から神経系、免疫系、内分泌系に対する影響が認められた場合には、次に掲げる試験を実施することが望ましい。

(1) 神経系：反復経口投与神経毒性試験

- (2) 免疫系：新鮮凍結標本の免疫組織化学的染色、脾臓のリンパ球組成測定及びNK細胞活性測定、免疫グロブリン測定(IgG、IgM、IgE等)等
- (3) 内分泌系：血中のステロイドホルモン、甲状腺ホルモン等の測定

21日間反復経皮投与毒性試験(2-1-10)

1. 目的

本試験は、被験物質を21日間にわたって反復経皮投与したときに生じる毒性変化及び毒性変化の認められない最高投与量（無毒性量）についての科学的知見を得ることにより、農薬使用時の安全な取扱方法を確立すること等を目的とする。

2. 供試動物

- (1) ラット、ウサギ、モルモット等の哺乳動物のうち1種以上について実施する。
- (2) 成獣を用いる。試験の実施を容易にする大きさの動物としては、下記の体重範囲におさまるものがよい。
(ラット：200～300g、ウサギ：2.0～3.0kg、モルモット：350～450g)
- (3) 原則として、雌雄の動物を同数用いる。なお、雌は未経産で非妊娠のものを用いる。

3. 投与方法

- (1) 試験の直前に動物の躯幹部の適用部位の被毛を刈る。毛を剃ってもよいが試験の24時間前に行う。
通常、剃毛は1週間間隔で行う。剃毛時に当たっては、物質の透過性が変わる恐れがあるので皮膚を傷つけないよう注意する。
- (2) 総体表面積の少なくとも10%を刈る。塗布面積や剃毛する面積を決めるに当たっては、体重を考慮する。
- (3) 被験物質が固体の場合は、必要に応じ粉末状にし、皮膚とよく接触させるために、溶媒で十分に湿らす。ただし、溶媒を用いる場合は、皮膚刺激性のないものを用い、また、被験物質の皮膚透過性に対する溶媒の影響に注意する。液状の被験物質は一般に希釈せずに使用する。
- (4) 被験物質は総体表面積の約10%（例えば、上記体重範囲の動物ではラット4cm×5cm、ウサギ12cm×14cm、モルモット7cm×10cm）の範囲に均一に塗布する。毒性の強いものは塗布範囲を少なめにし、可能な限り薄く均一に塗布する。
- (5) 被験物質の塗布期間中は多孔質ガーゼと非刺激性テープを用い、皮膚に被験物質を十分接触させる。塗布部位は、被験物質やガーゼを保持するために、さらに適当な方法でカバーし、動物が被験物質を摂取できないようにする。また、被験物質の摂取を防ぐため固定器を用いてもよいが、完全な固定は好ましくない。

4. 投与期間

1日の暴露時間を6時間として、週7日、21日間投与を継続することが望ましい。

5. 動物数及び試験群の設定

(1) 動物数の設定

- ① 試験に用いる動物数は、1群当たり雌雄各5匹以上とする。
- ② 各群への動物の割り付けには、体重層別等による適切な無作為抽出法を用いる。
なお、最終的に試験結果の評価を行うのに十分な動物数が確保できていなければならない。

(2) 試験群の設定

- ① 被験物質投与群

- ア 対照群の他に少なくとも3段階の投与群を設ける。
- イ 用量段階は、被験物質の毒性の徴候を明らかにし、無毒性量を推定できるように設定する。最高用量は多数例の死亡を起こすことなく毒性影響が認められる用量、最低用量は何ら毒性影響が認められない用量とし、かつ、用量反応関係がみられるように各用量段階を設定する。また、用量設定の根拠を示すこと。
- ウ 技術的に投与できる最大量又は1,000mg/kg体重/日相当量で何ら毒性影響が認められない場合は、それ以上の投与量で実施する必要はない。

② 対照群

- ア 対照群としては、被験物質の投与を行わないこと以外、すべての点で被験物質投与群と同一条件とする。
- イ 被験物質の投与に溶媒等を使用する場合には、投与溶媒量の最も多い用量群と同量の溶媒の投与を行うこと。毒性に関する情報が十分に得られていない溶媒等を使用する場合には、さらに無処置対照群を加える。

6. 観察及び検査

次の(1)～(5)の項目について実施する。

(1) 一般状態の観察

- ① 全動物について、毎日、死亡の有無、一般状態（毒性徴候の発現時期やその程度）を観察するとともに、定期的に体重及び摂餌量を測定する。
- ② 体重及び摂餌量の測定は、原則として、投与開始前に1回、投与開始後は少なくとも週1回の割合で行う。

(2) 血液検査

- ① げっ歯類については少なくとも試験終了時に1回、非げっ歯類については投与開始前及び試験終了時に、原則として、すべての動物を対象に行う。
- ② 検査前に一晚絶食させることが望ましい。
- ③ 通常、次の項目について行うが、そのほか試験ごとに適切な項目を追加選定して行うことが望ましい。なお、検査項目及び検査方法は、国際的に広く採用されているものを考慮に入れて選定する。

ア 血液学的検査

赤血球数、白血球数、血液像（白血球型別百分率）、血小板数、血色素量、ヘマトクリット値、その他必要に応じて網状赤血球数、凝固能（プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間）等

イ 血液生化学的検査

血清（血漿）総蛋白、アルブミン、ブドウ糖、ビリルビン、尿素窒素、クレアチニン、トランスアミナーゼ [AST (GOT)、ALT (GPT)]、γ-GTP、アルカリフォスファターゼ、電解質（ナトリウム、カリウム、塩素、カルシウム、無機リン等）等

(3) 尿検査

- ① げっ歯類は各群ごとに雌雄それぞれ一定数の動物、非げっ歯類は各群のすべての動物について、血液検査と同時期に尿検査を行う。
- ② 通常、次の項目について行う。
尿量、pH、蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲン、潜血、沈渣、比重等

(4) 病理学的検査等

- ① 剖検

ア 途中死亡及び瀕死の状態で屠殺した動物を含め、すべての動物について肉眼的検査を行う。

イ 体表についても検査を行う。

ウ すべての動物について、次の器官を含む主要な臓器の重量を測定する。

肝臓、腎臓、副腎及び精巣

② 器官及び組織の保存

次に掲げる器官及び組織を保存する。

ア 肉眼的病変や大きさに変化の見られた器官及び組織

イ 無処理及び処理した皮膚

ウ 肝臓

エ 腎臓

③ 病理組織学的検査

非げっ歯類については、すべての動物を対象に病理組織学的検査を実施する。げっ歯類については、次の動物等を対象に病理組織学的検査を実施する。

ア 対照群及び最高投与群のすべての動物

イ 試験期間中に死亡及び屠殺したすべての動物

ウ すべての動物における肉眼的病変部

エ すべての動物における標的臓器

オ すべての動物における肝臓及び腎臓

なお、その他の投与群の病理組織学的検査は、最高投与群で作用が発現した部位について必ず行う。

90日間反復吸入毒性試験(2-1-11)

1. 目的

本試験は、被験物質を90日間にわたって反復吸入暴露したときに生じる毒性変化及び毒性変化の認められない最高投与量（無毒性量）についての科学的知見を得ることにより、農薬使用時の安全な取扱方法を確立すること等を目的とする。

2. 供試動物

- (1) 1種以上の哺乳動物（通常、ラット）を用いる。
- (2) 若齢成獣を用いる。
- (3) 原則として、雌雄の動物を同数用いる。なお、雌は未経産で非妊娠のものを用いる。

3. 暴露方法

- (1) 適切な性能を有する吸入装置を用いる。暴露中は給餌、給水を行わない。
- (2) 暴露中、流量、被験物質の実際濃度、粒子径分布、温度、湿度等をモニタリングし、一定条件に保つ。
- (3) 粒子径（空気力学的質量中位径）は、1～4 μ m又は実施可能な最小粒子径とする。
- (4) 揮発性物質の場合は、爆発の起こる濃度にならないよう注意する。

4. 暴露期間

1日の暴露時間は少なくとも6時間とし、毎週5日間以上、90日以上暴露する。

5. 動物数及び試験群の設定

(1) 動物数の設定

- ① 1群当たり雌雄各10匹以上とする。
- ② 各群への動物の割り付けは、体重層別等による適切な無作為抽出法により行う。
なお、試験結果の評価を行う上で十分な動物数を確保すること。

(2) 試験群の設定

① 被験物質投与群

ア 対照群の他に少なくとも3段階の暴露群を設ける。

イ 用量段階は、被験物質の毒性の徴候を明らかにし、無毒性量を推定できるように設定する。最高用量は多数例の死亡を起こすことなく毒性影響が認められる用量、最低用量は何ら毒性影響が認められない用量とし、かつ、用量反応関係がみられるように各用量段階を設定する。また、用量設定の根拠を示すこと。

② 対照群

ア 対照群は、被験物質の投与を行わないこと以外、すべての点で被験物質投与群と同一の条件とする。

イ 被験物質の投与に溶媒等を使用する場合には、投与溶媒量の最も多い用量群と同量の溶媒の投与を行うこと。毒性に関する情報が十分に得られていない溶媒等を使用する場合には、さらに無処置対照群を加える。

6. 観察及び検査

次の(1)～(5)の項目について実施する。

(1) 一般状態の観察

- ① すべての動物について、毎日、死亡の有無及び一般状態（毒性徴候の発現時期やその程度）を観察するとともに、定期的に体重及び摂餌量を測定する。
- ② 体重及び摂餌量の測定の頻度は、通常、投与開始前及び投与開始後少なくとも週1回とする。

（2）血液検査

- ① 少なくとも試験終了時に1回、原則として、すべての動物について行うことが望ましいが、実施上の理由から、各群の一部（少なくとも5匹）の動物に限っても差し支えない。
- ② 検査前に一晩絶食させることが望ましい。
- ③ 通常、次の項目について行うが、そのほか試験ごとに適切な項目を追加選定して行うことが望ましい。なお、検査項目及び検査方法は、国際的に広く採用されているものを考慮に入れて選定する。

ア 血液学的検査

赤血球数、白血球数、血液像（白血球型別百分率）、血小板数、血色素量、ヘマトクリット値、その他必要に応じて網状赤血球数、凝固能（プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間）等

イ 血液生化学的検査

血清（血漿）総蛋白、アルブミン、ブドウ糖、ビリルビン、尿素窒素、クレアチニン、トランスアミナーゼ〔AST（GOT）、ALT（GPT）〕、γ-GTP、アルカリフォスファターゼ、電解質（ナトリウム、カリウム、塩素、カルシウム、無機リン等）等

（3）尿検査

- ① 各群雌雄ごとに一定数の動物（少なくとも5匹）について血液検査と同時期に必要な応じて尿検査を行う。
- ② 検査は、通常、次の項目について行う。
尿量、pH、蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲン、潜血、沈渣、比重等

（4）眼科学的検査

可能な限りすべての動物（少なくとも高用量群と対照群）について、投与開始前と試験終了時に行う。異常が発見された場合にはすべての動物について行う。

（5）病理学的検査等

① 剖検

ア すべての動物について剖検後、体表、開口部、頭蓋、胸腔及び腹腔並びに内部器官の観察を行う。

イ すべての動物について、次の器官を含む主要な臓器の重量を測定する。

肝臓、腎臓、副腎、精巣

② 器官及び組織の保存

試験終了後も必要に応じて病理組織学的検査を実施できるように、次に掲げる器官及び組織を保存する。

すべての肉眼的病変部、皮膚、脳、下垂体、甲状腺（上皮小体を含む）、胸腺、肺（気管を含む）、鼻咽頭、心臓、胸骨、唾液腺、肝臓（及び胆嚢）、脾臓、腎臓、副腎、膵臓、生殖腺、子宮及び性器付属器、乳腺、筋肉、食道、胃、小腸（十二指腸、空腸、回腸）、大腸（盲腸、結腸、直腸）、膀胱、リンパ節、末梢神経、脊髄、眼、大動脈

③ 病理組織学的検査

次の動物等を対象として病理組織学的検査を実施する。

- ア 対照群及び最高投与群のすべての動物
- イ 試験期間中に死亡及び屠殺したすべての動物
- ウ すべての動物における肉眼的病変部
- エ すべての動物における標的臓器
- オ すべての動物における気道、肝臓及び腎臓

なお、その他の投与群の病理組織学的検査は、最高投与群で作用が発現した部位について必ず行う。

反復経口投与神経毒性試験(2-1-12)

1. 目的

本試験は、被験物質を反復経口投与したときに生じる神経系に対する毒性変化を明確にするとともに毒性変化の認められない最高投与量(無毒性量)を求めることを目的とする。

なお、神経毒性と一般毒性を関連付けて評価するために、反復投与毒性試験と併合して行ってもよい。

2. 供試動物

- (1) げっ歯類(通常、ラット)を用いる。
- (2) 離乳後、馴化期間を経てできるだけ早い時期の同一週齢(通常5~6週齢)の動物を用いる。
- (3) 原則として、雌雄の動物を同数用いる。なお、雌は未経産で非妊娠のものを用いる。

3. 投与方法

経口による連続投与とし、通常、混餌投与又は飲水投与により行う。ただし、混餌又は飲水投与が困難な場合は、強制投与を行ってもよい。

4. 投与期間

必要に応じて90日間又は1年間試験を実施する。

5. 動物数及び試験群の設定

(1) 動物数の設定

- ① 詳細な状態の観察及び機能検査のために必要な数を設定するものとし、各群雌雄ごとに10匹以上とし、その中から神経病理組織学的検査に必要な動物数を各群雌雄ごとに5匹以上を得る。
- ② 各群への動物の割り付けは、体重層別等による適切な無作為抽出法により行う。
- ③ 他の試験と併合で実施する場合は、それぞれの試験の目的を踏まえ、動物数は適宜、調整するものとする。また、中間屠殺群及び回復群を設ける場合は、必要な数を追加設定する。なお、試験結果の評価を行うのに十分な動物数が確保できていなければならない。

(2) 試験群の設定

① 被験物質投与群

- ア 少なくとも3段階の用量設定による被験物質投与群を設ける。

イ 用量段階は、被験物質の毒性の徴候を明らかにし、無毒性量を推定できるように設定する。最高用量は多数例の死亡を引き起こすことなく毒性影響が認められる用量、最低用量は何ら毒性影響が認められない用量とし、かつ、用量反応関係がみられるように各用量段階を設定する。

ウ 用量設定に当たっては、本試験に先だって実施した毒性試験の結果等を参考とする。また、用量設定の根拠を示すこと。

エ 技術的に投与可能な最大量又は1,000mg/kg体重/日相当量で何ら毒性影響が認められない場合は、それ以上の投与量で実施する必要はない。

② 対照群

ア 被験物質の投与を行わないこと以外、すべての点で被験物質投与群と同一の条件とする。

イ 被験物質の投与に溶媒等を使用する場合には、投与溶媒量の最も多い用量群と同量の溶媒の投与を行うこと。

ウ 毒性に関する情報が十分に得られていない溶媒等を使用する場合には、さらに無処置対照群を加える。

6. 観察及び検査

次の(1)～(6)の項目について実施する。

(1) 一般状態の観察

① すべての動物について、一般状態を毎日注意深く観察する。

② 観察は全身状態、異常行動の有無及び死亡の有無を観察する。

③ 体重及び摂餌量(飲水投与の場合にあっては摂水量も測定する。以下同じ。)

ア 90日間の試験では、すべての動物について投与開始前に1回、投与開始後は少なくとも週1回の割合で体重及び摂餌量を測定する。

イ 1年間の試験では、すべての動物について投与開始前に1回、投与開始後3か月までは少なくとも週1回、それ以降は少なくとも4週に1回、体重及び摂餌量を測定する。

ウ 被験物質の摂取量を算出する。

(2) 詳細な状態の観察

① 対象となる各群雌雄それぞれ10匹以上の動物について行う。

② 検査の頻度は別表のとおりとする。

③ 回復群を設ける場合は、回復期間終了時に行う。

④ 観察は、飼育ケージ内及び観察台の上で行う。観察は、項目ごとに明確な判断基準と尺度基準を定めた採点法を用い、標準的な手順により行う。

⑤ 通常、次の項目について行う。

外観(皮膚、被毛、眼・眼球及び粘膜等の変化、分泌物の有無等)、体位、姿勢(円背位等)、自律神経系機能(流涙、立毛、瞳孔径、呼吸状態、排泄状態等)、運動協調性、歩行の異常、動物の取扱操作及び環境刺激に対する反応、神経系(振戦、痙攣、筋収縮性等)、探索行動の変化、常同行動(身づくろいの変化、くびふり、旋回等)、異常行動(自咬、後ずさり、異常発声等)、攻撃性等

(3) 機能検査

① 対象となる各群雌雄それぞれ10匹以上の動物について行う。

② 検査の頻度は別表のとおりとする。

③ 回復群を設ける場合、可能な限り試験終了時に近い時点で行う。

④ 通常、次の項目について行う。

種々の刺激（聴覚刺激、視覚刺激及び固有受容器刺激等）に対する感覚運動反応、握力、自発運動量（自動記録装置を用いる。）

- ⑤ 他の毒性試験等で神経毒性が疑われた場合、疑われた神経毒性の精査に適した感覚機能、運動機能及び学習・記憶に関する試験を実施する。

(5) 眼科学的検査

少なくとも高用量群及び対照群について、投与開始前及び試験終了時に行う。被験物質投与による異常が発見された場合には、すべての動物について行う。

(6) 病理組織学的検査

- ① 対象となる各群雌雄それぞれ5匹以上について行う。
- ② 症状観察及び機能検査で特定の動物に異常が認められた場合は、その動物を検査する。
- ③ 組織は、灌流固定その他の適当な方法により固定する。観察された肉眼的病理学的変化は、すべて記録する。
- ④ 通常、組織標本はパラフィン包埋され、ヘマトキシリン・エオジン染色等の一般的な染色が施されるが、末梢神経系に神経障害が認められる場合又は疑われる場合には、末梢神経系組織の樹脂包埋標本を作製し検査する。
- ⑤ 症状観察等から、適宜、検査部位の追加及び特殊染色を実施する。
- ⑥ 神経病理組織学的所見は、他の毒性試験及び行動学的影響と関連付けて評価する。
- ⑦ 中枢神経系と末梢神経系の代表的な切片について、段階的に検査する。
- ⑧ はじめに最高用量群と対照群の切片を比較し、最高用量群に神経病理組織学的変化が認められなければ、それ以降の検査は必要ない。最高用量群に変化が認められた場合は、中間用量と最低用量の切片を順次検査する。
- ⑨ 通常、以下の組織について行う。
前脳及び海馬を含む大脳中心部、中脳、小脳、橋、延髄、視神経及び網膜を含む眼球、脊髄の頸膨大及び腰膨大、脊髄神経節、神経線維の前根及び後根、近位の坐骨神経、近位の脛骨神経（膝部）及び脛骨神経の腓腹筋分岐部、骨格筋（特に腓腹筋）。
- ⑩ 脊髄及び末梢神経の切片は、横断面及び縦断面の両方を含める。
- ⑪ 試験終了後も必要に応じて病理組織学的検査が実施できるように器官及び組織を保存する。

別表 詳細な状態観察と機能検査の頻度

検査の種類	対象動物	90日間試験	1年間試験
一般状態の観察	すべての動物	毎日	毎日
詳細な状態の観察	詳細な状態の観察のために選んだ動物	(1)投与開始前 (2)投与開始第1週又は第2週に1回 (3)投与開始後1か月ごと	(1)投与開始前 (2)投与開始1か月後に1回 (3)投与開始後3か月ごと
機能検査	機能検査のために選んだ動物	(1)投与開始前 (2)投与開始第1週又は第2週に1回 (3)投与開始後1か月ごと	(1)投与開始前 (2)投与開始1か月後に1回 (3)投与開始後3か月ごと

28日間反復投与遅発性神経毒性試験(2-1-13)

1. 目的

本試験は、急性遅発性神経毒性試験で、その存在が確認されたか又は疑われる遅発性神経毒性をさらに検索するために、被験物質を28日間にわたって繰り返し投与した時に生じる毒性変化の内容及び毒性変化の認められない最高投与量(無毒性量)についての情報を得ることを目的とする。

2. 供試動物

- (1) 一般的な品種及び系統の雌のニワトリを使用する。
- (2) 月齢8~12か月の標準的な大きさの若齢成鶏が望ましい。
- (3) 実験結果に影響を及ぼすようなウイルス性疾患や薬物処理がなく、歩行異常のない健康な動物を用いる。

3. 投与方法

- (1) 経口による連続投与とし、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強制的に投与する。
- (2) 液体は原液又は適切な溶媒に溶解し投与する。固体は可能な限り溶解し投与する。

4. 投与期間及び観察期間

- ① 投与期間は28日間とする。
- ② 最終投与終了後も14日間の観察を行う。

5. 動物数及び試験群の設定

(1) 動物数の設定

投与群、対照群とも、生化学的検査に必要な6羽及び試験終了時まで生存し、病理組織学的検査に用いることができる6羽を得るのに十分な数の動物を用いなければならない。

(2) 試験群の設定

① 被験物質投与群

ア 少なくとも3段階の用量設定による投与群を設ける。

イ 最高用量は毒性作用、可能な限り遅発性神経毒性がみられる用量で、かつ、動物が死亡したり著しい苦痛を示さない用量、最低用量は何ら毒性影響が認められない用量とし、かつ用量反応関係がみられるように各用量段階を設定する。

ウ 用量設定に当たっては、急性遅発性神経毒性試験、その他の毒性試験の結果を考慮して設定する。また、用量設定の根拠を示すこと。

エ 技術的に投与可能な最大量又は1,000mg/kg体重/日相当量で何ら毒性影響が認められない場合は、それ以上の投与量で実施する必要はない。

② 対照群

ア 被験物質の投与を行わないこと以外、すべての点で被験物質投与群と同一の条件とする。

イ 被験物質の投与に溶媒等を使用する場合には、投与溶媒量の最も多い用量群と同量の溶媒等の投与を行う。毒性に関する情報が十分に得られていない溶媒等を使用する場合には、さらに無処置対照群を加える。

6. 試験動物の飼育上の注意

動物が自由に歩き回ることができ、歩行状態を容易に観察できるよう十分な大きさの飼育ケージ又は柵を用いる。

7. 観察及び検査

次の(1)～(3)の項目について行う。

(1) 一般状態の観察

- ① すべての動物について投与直後から観察を始める。投与期間中及び最終投与終了後14日間又は計画屠殺されるまでの間、毎日少なくとも1回注意深く観察する。
- ② すべての毒性徴候について、その種類、発現時期、程度及び持続期間を記録すること。運動失調は、4段階以上からなる判定基準に基づき評価するものとする。
- ③ 病理学的検査に用いる動物は、少なくとも週2回ケージの外に出し、軽微な毒性影響が観察できるようにするため、一定時間の強制運動を行う。
- ④ 瀕死動物は速やかに屠殺、剖検し、肉眼的病理学的検査を行う。
- ⑤ すべての動物について、初回投与前及び初回投与後は週に1回の割合で体重測定を行う。

(2) 生化学的検査

- ① 投与群及び対照群から無作為に選択した各6羽を、最終投与後72時間以内に屠殺し、脳及び腰脊髄を採取しNTE (neuropathy target esterase 又はneurotoxic esterase) 活性を測定する。

通常、投与群及び対照群の各3羽については、最終投与後24時間目及び48時間目に屠殺して、脳及び腰脊髄を採取する。

急性遅発性神経毒性試験又はその他の試験成績から、遅発性神経毒性誘発能を検出するのに、より適切な間隔が考えられる場合には、最終投与後の適切な時点で、2回、各3羽を屠殺して、脳及び腰脊髄を採取することが望ましい。

- ② NTE活性測定に供した動物について、当該組織(脳及び脳脊髄)のアセチルコリンエステラーゼ活性を測定することは評価の助けとなる。

(3) 病理学的検査

- ① 計画殺及び切迫殺した全動物について、脳及び脊髄の外観観察を含む肉眼的病理学的検査を実施する。
- ② 試験終了時において生存する各群6羽以上の動物から採取した神経組織について病理組織学的検査を行う。
- ③ 組織は、灌流固定その他適当な方法により固定する。
 - ア 切片には、小脳(中央縦断面)、延髄、脊髄及び末梢神経を含める。
 - イ 脊髄切片は、上頸部、中胸部及び腰仙部から採取する。
 - ウ 脛骨神経の近位部、遠位部及び分岐部並びに坐骨神経を採取する。
- ④ 切片は、髓鞘及び軸索を適切な手法で染色する。

1年間反復経口投与毒性試験(2-1-14)

1. 目的

本試験は、被験物質を長期間にわたって反復投与したときに生じる毒性変化、明らかな毒性変化を惹起する用量及び毒性変化の認められない最高投与量（無毒性量：NOAEL）についての科学的知見を得ることを目的とする。

2. 供試動物

- (1) げっ歯類1種（通常、ラット）及び非げっ歯類1種（通常、イヌ）を用いる。
- (2) げっ歯類については、離乳後、馴化期間を経てできるだけ早い時期の同一週齢の動物（通常、5～6週齢）を用い、非げっ歯類については、4～6か月齢の動物を用いる。
- (3) 原則として、雌雄動物を同数用いる。なお、雌は未経産で非妊娠のものを用いる。

3. 投与方法

経口による連続投与とし、通常、混餌投与又は飲水投与により行う。ただし、混餌又は飲水投与が困難な場合には強制投与を行ってもよい。

4. 投与期間

1年以上とする。

5. 動物数及び試験群の設定

(1) 動物数の設定

- ① げっ歯類は1群当たり雌雄各20匹以上、非げっ歯類は1群当たり雌雄各4匹以上とする。
- ② 各群への動物の割り付けは、体重層別等による適切な無作為抽出法により行う。なお、中間屠殺を予定する場合は、そのために必要な数を追加設定する。
- ③ 試験結果の評価を行うのに十分な動物数が確保できていなければならない。

(2) 試験群の設定

① 被験物質投与群

- ア 対照群の他に少なくとも3段階の用量設定による投与群を設ける。
- イ 用量段階は、被験物質の毒性の徴候を明らかにし、無毒性量を推定できるように設定する。最高用量は多数例の死亡を引き起こすことなく毒性影響が認められる用量、最低用量は何ら毒性影響が認められない用量とし、用量反応関係がみられるように各用量段階を設定する。
- ウ 用量設定は、90日間反復経口投与毒性試験の結果等を参考とすること。また、用量設定の根拠を示すこと。
- エ 技術的に投与可能な最大量又は1,000mg/kg体重/日相当量で何ら毒性影響が認められない場合は、それ以上の投与量で実施する必要はない。

② 対照群

- ア 被験物質の投与を行わないこと以外、すべての点で被験物質投与群と同一条件とする。
- イ 被験物質の投与に溶媒等を使用する場合には、投与溶媒量の最も多い用量群と同量の溶媒の投与を行うこと。

ウ 毒性に関する情報が十分に得られていない溶媒等を使用する場合には、さらに無処置対照群を加える。

6. 観察及び検査

次の(1)～(5)の項目について実施する。

(1) 一般状態の観察

- ① すべての動物について、一般状態を毎日観察する。
- ② 体重及び摂餌量を定期的に測定する（飲水投与の場合にあっては摂水量も測定する。以下同じ。）。
- ③ 体重及び摂餌量の測定は、通常、投与開始前に1回、投与開始後は3か月までの間少なくとも週1回、その後は少なくとも4週に1回の割合で行う。また、被験物質の摂取量を算出すること。

(2) 血液検査

- ① げっ歯類については投与開始後6か月及び試験終了時、非げっ歯類については投与開始前、投与開始後6か月及び試験終了時に検査する。検査は、原則としてすべての動物について行うが、げっ歯類については実施上の理由から、各群の一部の動物（雌雄各10匹以上）に限ってもよい。
- ② マウスを除き、検査前に一晩絶食させることが望ましい。
- ③ 通常、次の項目について行うが、そのほか試験ごとに適切な項目を追加選定して行う。なお、検査項目及び検査方法は、国際的に広く採用されているものを踏まえ選定する。

ア 血液学的検査

赤血球数、白血球数、血液像（白血球型別百分率）、血小板数、血色素量、ヘマトクリット値、その他必要に応じて網状赤血球数、凝固能（プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間）等

イ 血液生化学的検査

血清（血漿）総蛋白、アルブミン、A/G比、ブドウ糖、コレステロール、トリグリセリド、ビリルビン、尿素窒素、クレアチニン、トランスアミナーゼ [AST (GOT)、ALT (GPT)]、γ-GTP、アルカリフォスファターゼ、電解質（ナトリウム、カリウム、塩素、カルシウム、無機リン等）等

(3) 尿検査

- ① げっ歯類では、各群ごとに一定数の動物（雌雄各10匹以上）を選び、非げっ歯類では各群のすべての動物について血液検査と同時期に尿検査を行う。
- ② 血液検査の対象となった動物について実施することが望ましい。
- ③ 通常、次の項目について実施する。

尿量、pH、蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲン、潜血、沈渣、比重等

(4) 眼科学的検査

非げっ歯類ではすべての動物について、げっ歯類では少なくとも高用量群と対照群について投与開始前と試験終了時に行う。なお、被験物質投与に起因する変化が生じた場合にはすべての動物を検査する。

(5) 病理学的検査

- ① 投与期間中に死亡した動物は速やかに剖検し、器官・組織の肉眼的観察及び病理組織学的検査を行い、死因及びその時点での毒性変化の程度を明らかにするよう努める。

② 投与期間中に死に瀕した動物は、速やかに屠殺、剖検し、①と同様の観察及び検査を行い、瀕死状態に至った原因及びその時点での毒性変化の程度を明らかにするよう努める。

③ 投与終了時におけるすべての生存動物は、諸検査等のための採血及び採尿を行った後、屠殺、剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行う。また、げっ歯類では各群雌雄各10匹以上、非げっ歯類では各群のすべての動物について、通常、下記に掲げる器官の重量を測定する。なお、マウスを除き剖検前に一晚絶食させることが望ましい。

肝臓、腎臓、副腎、精巣、卵巣、脾臓、心臓、脳、前立腺（注）、甲状腺・上皮小体（注）、下垂体（注）

（注）：前立腺、甲状腺・上皮小体及び下垂体については非げっ歯類のみ。

④ 病理組織学的検査は、非げっ歯類については全動物、げっ歯類については少なくとも対照群及び最高用量群の全動物の器官又は組織を対象に行う。

⑤ 病理組織学的検査は、通常、下記に掲げる器官又は組織について行う。また、肉眼的所見等からの判断によって適宜追加する。

皮膚、乳腺、リンパ節（頸部リンパ節、腸間膜リンパ節等）、大動脈、唾液腺、骨及び骨髄（胸骨、大腿骨）、胸腺、気管、肺及び気管支、心臓、甲状腺及び上皮小体、食道、胃、小腸（十二指腸、空腸、回腸）、大腸（盲腸、結腸、直腸）、肝臓（及び胆嚢）、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、精嚢・凝固腺、前立腺、精巣・精巣上部、卵巣、子宮、膣、脳、下垂体、坐骨神経、骨格筋、脊髄（頸部、胸部、腰部）、眼球及びその付属器、そのほか肉眼的に変化が認められた器官・組織

⑥ げっ歯類の他の用量群についても、90日間反復経口投与毒性試験における標的器官・組織、本試験において肉眼的に病変の認められた部位又は高用量群での所見から必要と考えられる器官・組織については、全動物について当該器官・組織の病理組織学的検査を行う。

⑦ げっ歯類については、全動物について病理組織学的検査を行うことは、評価の助けになる。

⑧ 試験終了後、必要に応じて、病理組織学的検査を行えるよう器官及び組織を保存する。

発がん性試験(2-1-15)

1. 目的

本試験は、被験物質を反復経口投与したときの発がん性の有無に関する科学的知見を得ることを目的とする。

2. 供試動物

- (1) げっ歯類2種以上(通常、ラット及びマウス)を用いる。
- (2) 離乳後、馴化期間を経てできるだけ早い時期の同一週齢の動物、通常5～6週齢の動物を用いる。また、種及び系統の選択に当たっては、感染性疾患に対する抵抗性、寿命、既知発がん性物質に対する感受性等の特性が知られていて、一般的に実験動物として広く使用されているものとする。特に、自然発生腫瘍の発生頻度に関するデータが蓄積されている系統を選択する。
- (3) 原則として、雌雄の動物を同数用いる。雌は未経産で非妊娠のものを用いる。

3. 投与方法

原則として経口による連続投与とし、通常、混餌投与又は飲水投与により行う。ただし、混餌又は飲水投与が困難な場合には強制投与を行ってもよい。

4. 投与期間

- (1) 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とする。
- (2) 投与期間は、通常、ラットでは24か月以上30か月以内、マウスでは18か月以上24か月以内とする。

5. 動物数及び試験群の設定

(1) 動物数の設定

- ① 1群当たり雌雄各50匹以上とする。
- ② 各群への動物の割り付けは、体重層別等による適切な無作為抽出法により行う。
- ③ 動物数は、すべての群においてその10%以上が共食い等飼育上の問題で失われてはならない。
- ④ 原則としてラット(投与開始後24か月時点)及びマウス(投与開始後18か月時点)の生存率は、25%を下回ってはならない。なお、中間屠殺を予定する場合は、そのために必要な数を追加設定すること。

(2) 試験群の設定

① 被験物質投与群

ア 少なくとも3段階の用量設定により投与群を設ける。

イ 用量段階は下記により用量反応関係がみられるように設定する。なお、用量設定に当たっては、90日間反復経口投与毒性試験の結果等を参考とすること。また、用量設定の根拠を示すこと。

② 用量設定

ア 最高用量

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とする。

技術的に投与できる最大量又は1,000mg/kg体重/日相当量で何ら毒性影響が認められない場合は、それ以上の投与量で実施する必要はない。

イ 最低用量

一般に、最低用量は、最高用量の10%より低くてはいけない。

ウ 中間用量

中間用量は、最高用量と最低用量との等比中項をとることが望ましく、通常、群間の公比は2から3とする。

エ その他

本試験から必ずしも被験物質による無毒性量を求める必要はないが、発がん性等がみられた場合には追加試験等によりその機序を検討するとともに、適切なパラメーターによる発がん性についての無毒性量を検討する。

③ 対照群

ア 被験物質の投与を行わないこと以外、すべての点で被験物質投与群と同一条件とする。

イ 被験物質の投与に溶媒等を使用する場合には、投与溶媒量の最も多い用量群と同量の溶媒の投与を行うこと。毒性に関する情報が十分に得られていない溶媒等を使用する場合には、さらに無処置対照群を加える。

6. 観察及び検査

次の(1)～(3)の項目について実施する。

(1) 一般状態の観察

- ① すべての動物について、一般状態を毎日観察し、定期的に体重及び摂餌量を測定する（飲水投与の場合にあっては摂水量も測定する。以下同じ。）。
- ② 体重及び摂餌量の測定は、通常、投与開始前に1回、投与開始後3か月までは少なくとも週1回、その後は少なくとも4週に1回の割合で行うとともに被験物質の摂取量を算出すること。

(2) 血液検査

試験期間中に死に瀕した動物及び試験終了時の全生存動物について屠殺時に血液沫標本を作製して、胸腺、リンパ節、肝臓、脾臓の腫大等、造血器腫瘍を予想させる例については塗抹標本を検索する。

(3) 病理学的検査

- ① 試験期間中の死亡動物は速やかに剖検し、器官・組織の肉眼的観察及び病理組織学的検査を行う。なお、腫瘍性病変の記載に関しては、腫瘍発生に至る各種変化（過形成、前癌病変等）の所見も付け加える必要がある（以下②及び③において同様）。
- ② 病理組織学的検査は、通常、以下の器官又は組織について行う。また、肉眼的観察所見等からの判断によって適宜追加する。
皮膚、乳腺、リンパ節（頸部リンパ節、腸間膜リンパ節等）、大動脈、唾液腺、骨及び骨髄（胸骨、大腿骨）、胸腺、気管、肺及び気管支、心臓、甲状腺及び上皮小体、食道、胃、小腸（十二指腸、空腸、回腸）、大腸（盲腸、結腸、直腸）、肝臓（及び胆嚢）、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、精嚢・凝固腺、前立腺、精巣・精巣上体、卵巣、子宮、膣、脳、下垂体、坐骨神経、骨格筋、脊髄（頸部、胸部、腰部）、眼球及びその付属器、鼻腔、そのほか肉眼的に変化が認められた器官・組織
- ③ 試験期間中に死に瀕した動物は、速やかに隔離屠殺後、剖検し、上記①と同様の観察及び検査を行う。

- ④ 試験終了時にすべての生存動物は、速やかに屠殺、剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行う。対照群及び最高用量群の全動物について上記①と同様に病理組織学的検査を行う。ただし、最高用量群と対照群の間で腫瘍発生率に差のある器官・組織が認められた場合には、他の用量群の全動物についても当該器官・組織の病理組織学的検査を行う。

なお、全動物について病理組織学的検査を行うことは、評価の助けになる。

- ⑤ 試験終了後、必要に応じて病理組織学的検査が行えるように器官及び組織を保存する。

1年間反復経口投与毒性／発がん性併合試験(2-1-16)

1. 目的

本試験は、長期間にわたり、被験物質を反復投与したときに発現する有害作用を検出するために行われるものであり、被験物質の1年間反復経口投与毒性と同時に発がん性に関する情報を得ることを目的とする。

2. 供試動物

- (1) げっ歯類1種(通常、ラット)について実施する。離乳後、馴化期間を経てできるだけ早い時期の同一週齢(通常、5～6週齢)の動物を用いる。
- (2) 種及び系統の選択に当たっては、感染性疾患に対する抵抗性、寿命、既知発がん性物質に対する感受性等の特性が知られていて、一般的に実験動物として広く使用されているものとする。特に自然発生腫瘍の発生頻度に関するデータが蓄積されている系統を選択する。
- (3) 原則として雌雄の動物を同数用いる。なお、雌は未経産で非妊娠のものを用いる。

3. 投与方法

経口による連続投与とし、通常、混餌投与又は飲水投与により行う。ただし、混餌又は飲水投与が困難な場合には強制投与を行ってもよい。

4. 投与期間

- (1) 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とする。
- (2) 投与期間は、通常、ラットでは24か月以上30か月以内、マウスでは18か月以上24か月以内とする。
- (3) 1年間反復経口投与毒性検索のための衛星群及びその対照群については、原則として1年以上とする。

5. 動物数及び試験群の設定

(1) 動物数の設定

- ① 発がん性検索のために用いる動物数は、1群当たり雌雄各50匹以上とする。
- ② 各群への動物の割り付けは、体重層別等による適切な無作為抽出法による。
- ③ 動物数は、すべての群においてその10%以上が共食い等飼育上の問題で失われてはならない。
- ④ 原則としてラット(投与開始後24か月時点)及びマウス(投与開始後18か月時点)の生存率は、25%を下回ってはならない。なお、中間屠殺を予定する場合は、そのために必要な数を追加設定すること。
- ⑤ 衛星群について
 - ア 1年間反復経口投与毒性検索のために設ける衛星群の動物数は、1群当たり雌雄各10匹以上とする。ただし、最高用量群については、20匹以上とする。
 - イ 各群への動物の割り付けは、体重層別等による適切な無作為抽出法による。
 - ウ 中間屠殺を予定する場合は、そのために必要な数を追加設定する。
 - エ 試験結果の評価を行うのに十分な動物数が確保できていなければならない。

(2) 試験群の設定

① 発がん性検索のための用量段階

対照群の他に少なくとも3段階の投与群を設け、さらに、これらに合わせて1年間反復経口投与毒性検索のための衛星群及びその対照群を設ける。

各用量段階は、下記により、用量反応関係がみられるように設定する。

なお、用量設定に当たっては、90日間反復経口投与毒性試験の結果等を参考とし、用量設定の根拠を示すこと。

ア 最高用量

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とする。

なお、技術的に投与できる最大量又は1,000mg/kg体重/日相当量で何ら毒性影響が認められない場合は、それ以上の投与量で実施する必要はない。

イ 最低用量

一般に、最低用量は、最高用量の10%より低くてはいけない。

ウ 中間用量

中間用量は、最高用量と最低用量との等比中項をとることが望ましく、通常、群間の公比は2から3とする。

エ その他

本試験から必ずしも被験物質による無毒性量を求める必要はないが、発がん性等がみられた場合には追加試験等によりその機序を検討するとともに、適切なパラメーターによる発がん性についての無毒性量を検討する。

② 1年間反復経口投与毒性検索のための用量段階

ア 対照群の他に少なくとも3段階の投与群を設ける。

イ 用量段階は被験物質の毒性の徴候を明らかにし、無毒性量を推定できるように設定する。最高用量は多数例の死亡を引き起こすことなく毒性影響が認められる用量、最低用量は何ら毒性影響が認められない用量とし、かつ、用量反応関係がみられるように各用量段階を設定する。

ウ 用量設定に当たっては、90日間反復経口投与毒性試験の結果等を参考とし、用量設定の根拠を示すこと。

エ 技術的に投与できる最大量又は1,000mg/kg体重/日相当量で何ら毒性影響が認められない場合は、それ以上の投与量で実施する必要はない。

③ 対照群

ア 被験物質の投与を行わないこと以外、すべての点で被験物質投与群と同一条件とする。

イ 被験物質の投与に溶媒等を使用する場合には、投与溶媒量の最も多い用量群と同量の溶媒の投与を行う。

ウ 毒性に関する情報が十分に得られていない溶媒等を使用する場合には、さらに無処置対照群を加える。

6. 観察及び検査

次の(1)～(5)の項目について実施する。

(1) 一般状態の観察

① すべての動物について、一般状態を毎日観察し、定期的に体重及び摂餌量を測定する（飲水投与の場合にあっては摂水量も測定する。以下同じ。）。

② 体重及び摂餌量の測定は、通常、投与開始前に1回、投与開始後3か月までは少なくとも週に1回、その後は少なくとも4週に1回の割合で行うとともに被験物質

の摂取量を算出する。

(2) 血液検査

- ① 発がん性検索のための用量群では、試験期間中に死に瀕した動物及び試験終了時の全生存動物について、屠殺時に血液塗抹標本を作製し、胸腺、リンパ節、肝臓、脾臓の腫大等、造血器腫瘍を予想させる場合には、塗抹標本を検索する。
- ② 1年間反復経口投与毒性検索のための衛星群では、投与開始後6か月及び試験終了時(12か月時)に各群雌雄各10匹以上について採血し、血液学的検査及び血液生化学的検査を実施する。
- ③ マウスを除き、検査前に一晩絶食させることが望ましい。
- ④ 衛星群については、通常、次の項目について行うが、そのほか試験ごとに適切な項目を追加選定して行う。なお、検査項目及び検査方法は、国際的に広く採用されているものを考慮に入れて選定する。

ア 血液学的検査

赤血球数、白血球数、血液像(白血球型別百分率)、血小板数、血色素量、ヘマトクリット値、その他必要に応じて網状赤血球数、凝固能(プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間)等

イ 血液生化学的検査

血清(血漿)総蛋白、アルブミン、A/G比、ブドウ糖、コレステロール、トリグリセリド、ビリルビン、尿素窒素、クレアチニン、トランスアミナーゼ[AST(GOT)、ALT(GPT)]、γ-GTP、アルカリフォスファターゼ、電解質(ナトリウム、カリウム、塩素、カルシウム、無機リン等)等

(3) 尿検査

- ① 1年間反復経口投与毒性検索のための衛星群の各群雌雄それぞれ10匹以上について、血液検査と同時期に尿検査を行う。
- ② 血液検査の対象となった動物について実施することが望ましい。
- ③ 通常、次の項目について実施する。
尿量、pH、蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲン、潜血、沈渣、比重等

(4) 眼科学的検査

1年間反復経口投与毒性検索のための衛星群の少なくとも高用量群と対照群について、投与開始前と試験終了時に行う。もし被験物質投与による異常が発見されたら、すべての動物を検査する。

(5) 病理学的検査

- ① 試験期間中の死亡動物は速やかに剖検し、器官・組織の肉眼的観察及び病理組織学的検査を行い、死因及びその時点での毒性変化の程度を明らかにするよう努める。
なお、腫瘍性病変の記載に関しては、腫瘍発生に至る各種変化(過形成、前癌病変等)の所見も付け加える必要がある(以下②及び③において同様)。
- ② 病理組織学的検査は、通常、次に掲げる器官又は組織について行うものとし、また、肉眼的観察所見等からの判断によって適宜追加する。
皮膚、乳腺、リンパ節(頸部リンパ節、腸間膜リンパ節等)、大動脈、唾液腺、骨及び骨髄(胸骨、大腿骨)、胸腺、気管、肺及び気管支、心臓、甲状腺及び上皮小体、食道、胃、小腸(十二指腸、空腸、回腸)、大腸(盲腸、結腸、直腸)、肝臓(及び胆嚢)、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、精嚢・凝固腺、前立腺、精巣・精巣上部、卵巣、子宮、膣、脳、下垂体、坐骨神経、骨格筋、脊髄(頸部、胸部、腰部)、眼球及びその付属器、鼻腔、そのほか肉眼的に変化が認められた器官・組織

③ 試験期間中に死に瀕した動物は、速やかに隔離屠殺後、剖検し、上記①と同様の観察及び検査を行い、瀕死状態となった理由とその時点での毒性変化の程度を明らかにするよう努める。

④ 発がん性検索のための用量群及び1年間反復経口投与毒性検索のための衛星群に対しては、試験終了時にすべての生存例を速やかに屠殺、剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行う。

また、衛星群では全動物について器官の重量測定を行う。重量測定は、通常、下記の器官について行う。なお、マウスを除き剖検前に一晩絶食させることが望ましい。

肝臓、腎臓、副腎、精巣、卵巣、脾臓、心臓、脳

⑤ 病理組織学的検査は、対照群及び最高用量群のすべての動物について上記①と同様に行う。ただし、対照群及び最高用量群の間で腫瘍発生率に差が認められた器官・組織、90日間反復経口投与毒性試験における標的器官・組織、本試験において肉眼的に病変の認められた部位又は高用量群での所見から必要と考えられる器官・組織については、全動物について当該器官・組織の病理組織学的検査を行う。

なお、上述の場合以外であっても、全動物について病理組織学的検査を行うことは、評価の助けになる。

⑥ 試験終了後も将来において必要な時に病理組織学的検査が行えるように器官及び組織を保存する。

繁殖毒性試験(2-1-17)

1. 目的

本試験は、被験物質を二世代（第一世代（P）及び第二世代（F₁））にわたって投与し、発情周期、交尾、受胎、分娩、哺育等の生殖機能及び出生児の生育に及ぼす影響に関する科学的知見を得ることを目的とする。

2. 供試動物

- (1) げっ歯類1種以上（通常、ラット）を用いる。
- (2) 供試動物の系統の選択に当たっては受胎率の低い系統は避け、一般毒性試験又は繁殖毒性試験に繁用されているものを選ぶ。

3. 投与方法

- (1) 経口による連続投与とし、通常、混餌投与又は飲水投与により行う。混餌又は飲水による投与が困難な場合には強制投与を行ってもよい。
- (2) 投与量は、各週における各個体の体重に基づいて算出する。ただし、妊娠期の雌動物については、妊娠0日及び妊娠6日の体重に基づいて投与量を決定してもよい。

4. 投与期間

被験物質の投与期間は、次のとおりである。

(1) 第一世代（P）

少なくとも5日以上馴化した後、5～9週齢目から投与を開始し、交配するまで10週間以上投与する。その後も、雄は少なくとも交配が終了するまで、雌はF₁児を離乳するまで投与を継続する。

(2) 第二世代（F₁）

離乳の時点から投与を開始し、交配するまで10週間以上連続投与する。その後も、雄は少なくとも交配が終了するまで、雌はF₂児を離乳するまで投与を継続する。

5. 動物数及び試験群の設定

(1) 動物数の設定

試験に用いる動物数は、原則として雌雄同数とし、1群当たり20匹以上の妊娠動物が得られるだけの数とする。

(2) 試験群の設定

① 被験物質投与群

ア 少なくとも3段階の用量設定により被験物質投与群を設ける。

イ 用量段階は、被験物質の毒性の徴候を明らかにし、無毒性量を推定できるように設定する。最高用量は親動物又は児動物に体重増加抑制等何らかの毒性影響が認められるが死には至らしめない用量、最低用量は親動物及び児動物のいずれにも何ら毒性影響が認められない用量とし、用量反応関係がみられるように各用量段階を設定する。また、用量設定の根拠を示すこと。

ウ なお、技術的に投与可能な最大量又は1,000 mg/kg体重/日相当量で何ら毒性影響が認められない場合は、それ以上の投与量で実施する必要はない。

② 対照群

ア 被験物質の投与を行わないこと以外、すべての点で被験物質投与群と同一の条

件とする。

イ 被験物質の投与に溶媒等を使用する場合には、投与溶媒量の最も多い用量群と同量の溶媒の投与を行うこと。毒性に関する情報が十分に得られていない溶媒等を使用する場合には、さらに、無処置対照群を加える。

6. 交配、同腹児数の調整並びに第二世代 (F₁) の選抜

(1) 第一世代 (P)

- ① 同じ用量群の雌雄を1対1で同居させ、交尾が確認されるまで交配させる。同居期間は2週間を限度とする。
- ② 雌動物については、毎朝膣垢内の精子又は膣栓の有無により交尾の有無を確認し、精子又は膣栓が認められた日を妊娠0日とする。
- ③ 必要に応じて、一世代につき第2産児を得ることも考慮する。
- ④ 同腹児は離乳するまで哺育させる。必要に応じて同腹児数を調整する場合は、生後4日に、雌雄各4匹になるよう余分な新生児を無作為に取り除く。なお、1腹当たり雌雄各4匹に調整することができない場合には、総数8匹（例えば雄5匹と雌3匹）となるように調整すればよい。また、同腹児が8匹以下の場合には調整を行わない。
- ⑤ F₁の離乳時に、各群ともできるだけ多くの母動物から、雌雄各1又は2匹を交配用として選抜する。

(2) 第二世代 (F₁)

第一世代 (P) と同様に交配及び同腹児数の調整を行う。交配に際して、同腹児の交配を避ける。

7. 観察及び検査

次の(1)～(3)の項目について実施する。

(1) 親動物

① 一般状態

ア P及び交配用F₁動物について、一般状態を毎日観察する。繁殖期の雌については、妊娠・分娩状態も観察する。

イ 一般状態は、生死、外観のほか、興奮、けいれん、鎮静、歩行異常等を観察する。妊娠・分娩状態は、流産・早産、分娩遅延等を観察する。

② 体重及び摂餌量

ア P及び交配用F₁動物について、定期的に体重及び摂餌量を測定する（飲水投与の場合にあっては摂水量も測定する。以下同じ。）。なお、体重及び摂餌量の測定は、通常、投与開始日及び投与開始後は少なくとも週1回の割合で行う。

イ 繁殖期間中の雌については、妊娠0、7、14、21日及び哺育0、7、14、21日に測定する。

ウ 被験物質の摂取量も合わせて算出すること。

③ 性成熟の観察

交配用F₁動物について、外部生殖器の発育状態を調べる。

④ 発情周期

P及び交配用F₁雌について、交配前に2週間以上発情周期を調べる。必要に応じて第三世代 (F₂) 雌の発情周期も調べる。

⑤ 妊娠、出産及び哺育

ア 雌雄の交尾動物数、妊娠動物数（及び妊娠させ得た雄数）、出産母体数及び離

乳児数を基に、以下の値を算出する。

交尾率【(交尾した動物数/交配に用いた動物数) × 100】

受胎率【(妊娠動物数/交尾した雌動物数) × 100】

出産率【(生存児出産雌数/妊娠雌数) × 100】

離乳率【(離乳時の生存児数/生後4日に調整した児数) × 100】

イ 交尾が成立しなかった雌雄動物については、その原因を調査すること。

⑥ 精子検査

P及び交配用F₁雄について、屠殺時に、精巣の精子細胞数及び精巣上体中の精子の数、運動性、形態等を調べる。

(2) 児動物

- ① 出産後速やかに母動物ごとの産児数、死産児数、生存児数、児動物の外表異常の有無及び性を調べ、体重を測定する。必要に応じて肛門・生殖結節間距離 (AGD : Anogenital Distance) を測定する。
- ② 生後4日、7日、14日及び21日における生存児の数を調べ、生存率を算出するとともに、個体ごとに体重を測定する。
- ③ そのほかに、一般状態の観察を行う。

(3) 病理学的検査

- ① P及び交配に用いたF₁動物はそれぞれの出生児の離乳後速やかに、交配用に選抜されなかったF₁及びF₂児動物にあっては離乳後速やかに屠殺し、特に生殖器系の器官に注意を払いながら、剖検し、肉眼的観察を行う。
- ② 交配に用いた雌の子宮については、着床痕数を調べる。試験期間中の死亡した個体は速やかに剖検し、死因を調べる。試験期間中に死に瀕した動物についても、速やかに屠殺、剖検し、その原因を調査する。
- ③ 重量測定は、通常、以下の器官について行う。
ア 親動物：卵巣、子宮、精巣、精巣上体、精囊・凝固腺、前立腺、脳、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、下垂体、甲状腺その他標的臓器
イ 離乳児：脳、脾臓、胸腺及び子宮
- ④ P及び交配に用いたF₁動物の高用量群と対照群について、生殖器系の器官と標的器官の病理組織学的検査を実施する。被験物質投与の影響と考えられる異常が認められる場合は、中間用量群と低用量群についても同様の検査を実施する。その他、児動物についても、被験物質投与の影響と考えられる肉眼的異常が認められた器官及び組織について病理組織学的検査を実施する。反復投与毒性試験の結果を参考にする。
- ⑤ 試験終了後も必要に応じ、病理組織学的検査が行えるよう親動物及び児動物の生殖器系の器官を中心に保存する。

催奇形性試験(2-1-18)

1. 目的

本試験は、妊娠中の母動物が被験物質に暴露された場合の胎児の発生、発育に及ぼす影響、特に催奇形性に関する科学的知見を得ることを目的とする。

2. 供試動物

げっ歯類1種以上(通常、ラット)及び非げっ歯類(通常、ウサギ)の合計2種以上を用いる。

3. 投与方法

- (1) 原則として、経口による強制連続投与とする。
- (2) 投与量は、投与に最も近い日の体重に基づいて計算する。ただし、被験物質の血中濃度の値、摂餌状況等により、一定の投与量が確保出来ることが確認できる場合には、飼料又は飲水に添加して投与を行ってもよい。

4. 投与期間

- (1) 被験物質の投与期間は、少なくとも着床から分娩予定日の前々日までの期間とし、連日投与とする。
- (2) 膣栓又は膣垢中に精子が認められた日を妊娠0日として起算する。

5. 動物数及び試験群の設定

(1) 動物数の設定

試験に用いる妊娠動物数は、データの解釈が十分できる数とする。

(2) 試験群の設定

① 被験物質投与群

ア 少なくとも3段階の用量設定による投与群を設ける。

イ 用量段階は、被験物質の毒性の徴候を明らかにし、無毒性量を推定できるように設定する。

ウ 最高用量は、母動物又は胎児に体重増加の抑制等何らかの毒性影響が認められる用量とし、一方、最低用量は親動物、胎児のいずれにも何ら毒性影響が認められない用量とし、用量反応関係がみられるように各用量段階を設定する。また、用量設定の根拠を示すこと。

エ 技術的に投与可能な最大量又は1,000 mg/kg体重/日相当量で何ら毒性影響が認められない場合は、それ以上の投与量で実施する必要はない。

② 対照群

ア 被験物質の投与を行わないこと以外、すべての点で被験物質投与群と同一条件とする。

イ 被験物質の投与に溶媒等を使用する場合には、投与溶媒量の最も多い用量群と同量の溶媒の投与を行う。なお、毒性に関する情報が十分に得られていない溶媒等を使用する場合には、さらに無処置対照群を加える。

6. 観察及び検査

次の(1)及び(2)の項目について実施する。

(1) 母動物

① 一般状態の観察

ア すべての母動物について、一般状態及び妊娠状態を毎日観察する。

イ 体重、摂餌量（飲水投与の場合にあっては、摂水量も測定する。以下同じ。）を定期的に測定する。なお、体重及び摂餌量の測定は、通常、妊娠0日、剖検日及び被験物質の投与期間中にあっては少なくとも3日ごとに行う。

ウ 一般状態は、生死、外観のほか、興奮、けいれん、鎮静、歩行異常等を、妊娠状態は、流産、早産等を観察する。

② 剖検

ア 流産や早産の徴候を示した動物は、速やかに屠殺し、器官・組織の肉眼的観察を行う。死亡動物及び死に瀕した動物についても、同様な検索を行う。

イ 分娩予定日の前日にすべての動物を屠殺し、子宮を摘出した後、すべての器官・組織の肉眼的観察を行う。摘出した子宮については、重量を測定した後、下記(2)に記載する検査を行う。

ウ 黄体数を調べる。子宮内に受胎産物がみられない場合には、さらに詳細に検査し、着床痕の有無を調べる。

(2) 胎児

① 母動物より摘出した子宮を切開し、胚死亡、胎児死亡及び生存胎児数を検査する。

死亡胚・胎児については、死亡時期を推定する根拠となる所見をできる限り記録する。胎児の性別判定を行い、胎児体重を個別に測定、記録し、各群雌雄の平均胎児体重を算出する。

② 摘出したすべての胎児について外表異常の検査を行った後、ラットについては同腹胎児の1/2について骨格異常の検査を行い、残りについて内臓異常の検査を行う。ウサギについては、すべての胎児について内臓異常（1/2については頭部を切断して詳細に観察する。）の検査を行った後に骨格異常の検査を行う。

変異原性に関する試験(2-1-19-1~3)

1. 目的

本試験は、被験物質の遺伝子突然変異、染色体構造異常及び数的異常の誘発性の有無を検索することを目的とする。

2. 試験法の選択

変異原性試験としては、「細菌を用いる復帰突然変異試験」、「ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験」及び「げっ歯類を用いる小核試験」を実施する。技術的又は科学的な理由から、上記試験が適用できない場合には、これに類似した指標を持つ試験系によって代行してもよい。これらの試験結果からさらに検索の必要が認められる場合には、適切な変異原性試験を追加して実施する。

復帰突然変異試験(2-1-19-1)

1. 使用菌株

以下の5組の中からそれぞれ1株を選択し、合計5菌株を用いて試験を行う。

- ① ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) T A 98
- ② ネズミチフス菌 T A 100
- ③ ネズミチフス菌 T A 1535
- ④ ネズミチフス菌 T A 1537、T A 97又はT A 97 a
- ⑤ 大腸菌 (*Escherichia coli*) WP 2 *uvrA*、大腸菌WP 2 *uvrA*/pKM101又はネズミチフス菌 T A 102

被験物質の性質からみて必要な場合には他の菌株を追加する。

2. 用量段階

- (1) 適切な間隔で5段階以上の解析できる用量を用いる。
- (2) 最高用量はあらかじめ試験に用いる全菌株を用いて用量設定試験を行い、生育阻害と溶解性を考慮に入れて設定することが望ましい。
- (3) 原則として生育阻害を示す用量を最高用量とし、生育阻害を示さない場合には5 mg /プレートとする。溶解性にかかわらず全く生育阻害を示さない難溶性物質の場合には、析出する用量を最高用量としてもよい。

3. 対照

溶媒を用いる陰性対照及び適切な既知の変異原物質による陽性対照を試験ごとに設定する。

4. 使用プレート数

被験物質の各用量及び各対照について、それぞれ2枚以上のプレートを用いる。

5. 試験方法

- (1) プレインキュベーション法又はプレート法により実施する。科学的に正当な理由があれば他の方法を用いてもよい。
- (2) いずれの方法においても、代謝活性化を用いる系及び用いない系について試験を行

う。代謝活性化を用いる系には、薬物代謝酵素系を誘導する適切な処理を行った動物の肝ホモジネート上清分画（S9）に補酵素等を添加したS9 mixを用いる。

6. 観察

すべてのプレートを原則として37℃で48～72時間培養した後、プレートごとに復帰変異コロニー数を計測する。同時に生育阻害及び被験物質の析出の観察を行う。

7. 結果の判定

- (1) 再現性については、使用菌株、用量段階、対照、プレート数等について十分なデータを提供する用量設定試験が実施されていれば、これで確認してよい。
- (2) 復帰変異コロニー数が陰性対照と比べ明らかに増加し、再現性あるいは用量依存性が認められる場合は陽性と判定する。再現性が認められない場合には、確認試験を実施する。また、明確に陽性あるいは陰性と判定できない場合には、実験条件を変えて確認試験を実施する。

8. 結果の表示

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する。

染色体異常試験(2-1-19-2)

1. 使用細胞

- (1) ヒト細胞を含む初代、継代培養細胞又は株細胞を用いる。例えば、チャイニーズハムスター線維芽細胞株、ヒト末梢血リンパ球である。
- (2) 試験に用いる細胞については、染色体数(modal number)、マイコプラズマの汚染の有無、細胞周期等を調べること。

2. 用量段階

- (1) 適切な間隔（原則として公比2）で3段階以上の染色体分析できる用量を用いる。
- (2) あらかじめ用量設定試験を行うことが望ましい。
- (3) 最高用量は、被験物質の培養液中での溶解性にかかわらず、細胞増殖を明らかに50%以上抑制する濃度とする。50%以上の増殖抑制が認められない場合には、5mg/ml又は10mM（いずれか低い方）を最高用量とする。増殖抑制が全く認められず、処理終了時に被験物質の析出が認められる場合には、析出する用量を最高用量としてもよい。

3. 対照

溶媒を用いる陰性対照及び適切な既知の染色体異常誘発物質による陽性対照を試験ごとに設定する。

4. 使用プレート数

被験物質の各用量及び各対照について、原則としてそれぞれ2枚のプレートを用いる。

5. 試験方法

- (1) 増殖期の細胞を用い、最初に短時間処理法として代謝活性化を用いる系及び用いな

い系について、3～6時間被験物質で処理し、処理開始より約1.5細胞周期後に染色体標本を作製する。

- (2) 短時間処理法で陰性の結果が得られた場合には、代謝活性化を用いない系について1.5細胞周期の連続処理法による試験を実施する。被験物質によっては顕著な細胞周期の遅延が生じる場合がある。代謝活性化を用いない系では1.5細胞周期よりも長い連続処理、代謝活性化を用いる系では1.5細胞周期よりも遅い標本作製時期が必要な場合があり、そのため必要に応じて確認試験を行う。代謝活性化を用いる系には、薬物代謝酵素を誘導する適切な処理を行った動物の肝ホモジネート上清分画(S9)に補酵素等を添加したS9 mixを用いる。

6. 観察

- (1) 陽性対照及び陰性対照を含め、すべてのスライド標本はコード化して、処理条件が分からない状況で観察を行う。
- (2) 用量当たり少なくとも200個、プレート当たり少なくとも100個のよく広がった分裂中期細胞を観察し、染色体構造異常を持つ細胞の数と出現頻度を記録する。構造異常は種類別にその数と出現頻度を記録する。
- (3) ギャップは他の異常と区別して記録するが、総異常頻度には含めない。なお、ギャップは染色分体幅より狭い非染色性部位と定義する。倍数体や核内倍加が観察される場合にはその数と出現頻度を記録する。

7. 結果の判定

- (1) 染色体異常を持つ細胞の出現頻度が陰性対照に比較して明らかに上昇し、用量依存性又は再現性が認められる場合は陽性と判定する。
- (2) 明確に陽性又は陰性と判定できない場合には、実験条件を変えて確認試験を実施する。

8. 結果の表示

プレートごとに各観察データを表示し、群ごとの平均値を表示する。本試験における各用量及び陰性対照群の細胞増殖に関するデータを表示する。被験物質の析出がみられる場合には、その用量を明記する。

小核試験(2-1-19-3)

1. 動物種

通常、骨髄の赤血球を用いる場合にはマウス又はラットを、末梢血の赤血球を用いる場合にはマウスを用いるが、他の適切な動物種を用いてもよい。毒性に明らかな性差がみられない場合には、雄のみで試験を実施してよい。

2. 動物数

一群5匹以上の動物を用いる。

3. 投与経路

強制経口投与又は腹腔内投与とする。

4. 投与回数

単回又は複数回投与とする。

5. 用量段階

- (1) 適切な間隔で3段階以上の用量を設定する。
- (2) 幼若赤血球の減少等骨髄で細胞毒性が認められる用量又は毒性徴候が認められるか若しくはそれ以上の用量で致死が予想される用量を最高用量とする。
- (3) 毒性が認められない場合には2,000mg/kgを最高用量とする。

6. 対照

溶媒を用いる陰性対照及び適切な既知の小核誘発物質による陽性対照を設定する。

7. 試験方法

- (1) 骨髄又は末梢血の赤血球を用いる。
- (2) 単回投与の場合には被験物質投与後適切な時期に2回、複数回投与の場合には最終投与後適切な時期に1回標本作製する。
- (3) 最も感受性の高い時期が確認できれば単回投与の場合でも標本作製は1回にすることができる。

8. 観察

- (1) 陽性対照及び陰性対照を含め、すべてのスライド標本はコード化して、処理条件が分からない状況で観察を行う。
- (2) 個体当たり2,000個以上の幼若赤血球を観察して、小核を有する細胞の出現頻度を記録する。
- (3) 個体当たり骨髄の場合には200個以上、末梢血の場合には1,000個以上の赤血球を観察して全赤血球に対する幼若赤血球の比率を記録する。

9. 結果の判定

- (1) 小核を有する細胞の数の増加に用量依存性が認められる場合又はいずれかの投与群で小核を有する細胞の数が明らかに増加する場合には陽性と判定する。
- (2) 明確に陽性又は陰性と判定できない場合には、実験条件を変えて確認試験を実施する。

10. 結果の表示

個体ごとに各観察データを表示し、群ごとの平均値を表示する。

生体機能への影響に関する試験(2-2-1)

1. 目的

本試験は、被験物質の急性毒性作用を薬理的に解析して、急性中毒症発症の可能性と急性中毒症の特徴を明らかにし、急性中毒症の機序と処置法を考察する上で有益な情報を得ることを目的とする。なお、試験の目的を達成するために被験物質の使用形態、毒性発現の特徴又は物理化学的性状に適した試験項目及び方法を選択するものとする。

2. 供試動物

雌雄の若齢成獣のマウス、ラット、モルモット、ウサギ、イヌ等の中から各検査項目に適した動物種を用いる。

3. 試験設計の基本

(1) 投与経路

原則として、急性暴露が予想される経路を考慮して決める。

(2) 投与回数

動物生体を用いる試験では、単回投与を原則とする。

(3) 用量設定

それぞれの試験において無影響量及び毒性反応の用量依存性が明確になるような用量群を設定する。最高用量は死亡を発現する用量とする。経口投与の場合、2,000mg/kg体重以上の用量について検査する必要はない。

(4) 対照群

それぞれの試験に陰性対照(溶媒)群を設ける。

(5) 観察(検査)時期

毒性反応の始まり、最大変化及び消失を明らかにできる時期に観察する。

(6) 麻酔動物を用いる場合

麻酔剤による被験物質の吸収変化を考慮して試験する。

(7) 摘出器官(組織)標本を用いる場合

陰性対照(溶媒)群を設け、無影響濃度と濃度依存性が明らかになるような濃度群を設定する。動物生体から作用部位における組織内濃度を予想し、濃度を設定するのが望ましい。水溶性の低い被験物質は適切な有機溶媒及び界面活性剤を使用し、栄養液中で溶解又は乳化状態で適用する。作用の可逆性についても検査する。

(8) 例数

1群の例数は、適正な統計処理が可能な数とする。ただし、経時的追跡が重要な項目では1群3例以上を使用し再現性を確認すること。

4. 検査項目

被験物質の急性薬理作用に基づく有害反応を把握するため、下記に掲げる項目に基づき検査を実施するものとする。本試験指針は、すべての項目について検査を要求するものではない。検査項目の選択に当たっては、下記に掲げる項目を参考にして他の毒性試験の結果から得られた情報を基に決定するものとする。

検査方法は、被験物質の薬理作用に基づく有害反応を科学的に正しく評価できる方法を選択するものとする。

(1) 通常実施すべき項目

- ① 症状観察
症状観察は客観的、定量的、経時的に把握する。
 - ② 中枢神経系
自発運動量、痙攣誘発作用等に対する作用
 - ③ 呼吸・循環器系
呼吸、血圧、心拍数、心電図等に対する作用
 - ④ 腎機能
尿量、尿中電解質濃度、尿浸透圧（比重）等
- (2) 上記(1)で得られた結果又は他の毒性試験の結果から得られた情報等により、必要と判断される場合に追加して実施すべき項目
- ① 自律神経系
瞳孔径、瞬膜、摘出輸精管等に対する作用
 - ② 骨格筋
握力、摘出骨格筋等に対する作用
 - ③ 血液系
溶血作用、凝固機能等に対する作用
 - ④ 消化器系
小腸輸送能、摘出腸管、アゴニスト収縮等に対する作用
 - ⑤ その他
症状観察その他毒性試験から必要と思われるもの

動物体内運命に関する試験(2-3-1)

1. 目的

本試験は、被験物質を動物に投与して、当該被験物質の体内動態（吸収、分布、排泄、代謝等）に関する科学的知見を得ることにより、農薬の毒性に関する試験成績の評価等に資することを目的とする。

2. 被験物質

農薬の有効成分等の放射性同位元素で標識した又は非標識の高純度化合物を用い、入手先、純度、安定性等を明確にしておく。なお、同位元素標識体にあつては、合成法、標識核種、標識位置及び比放射能についても明確にしておく。

3. 供試動物

- (1) 1種類（通常、ラット）の若齢成獣を用いる。
- (2) 1年間反復投与経口毒性試験又は発がん性試験に用いたものと同一系統の動物を用いることが望ましい。
- (3) 原則として、雌雄の動物を用いる。
- (4) げっ歯類と非げっ歯類において、標的臓器及び毒性徴候の程度が著しく異なる場合には、一部の試験項目について非げっ歯類を加えることが望ましい。なお、必要に応じ妊娠動物も用いる。

4. 投与方法

(1) 投与経路

原則として経口投与による。必要に応じ静脈内投与等による試験を補足する。

(2) 投与回数、期間

原則として単回投与とする。蓄積性が予想される時等は反復投与による実施について検討する。なお、反復投与の場合、被験物質の体内での定常状態、蓄積性等を推定し得るに足る投与間隔（通常1日1回）と期間（おおむね14日）で行う。

5. 動物数及び試験群の設定

(1) 動物数の設定

動物数は、原則として各用量群とも4匹以上とし、個体差、各観察・測定時点での必要検体数等を考慮して、試験目的にあった適切な数とする。

(2) 試験群の設定

- ① 単回投与では少なくとも2用量を用いる。2段階の用量設定に当たって、高用量は何らかの毒性影響が認められる量を、低用量は何ら毒性影響が認められない用量を目安とする。
- ② 反復投与では原則として低用量のみとし、必要に応じ高用量についても実施する。

6. 検討項目

吸収、分布、排泄、代謝等における検討項目は、通常、次のとおりである。

(1) 吸収

被験物質の吸収量及び吸収速度に関する情報を求める。これらは排泄量又は血中濃度（血清中濃度、血漿中濃度又は全血中濃度）の推移等の解析から求められる。

(2) 分布

主要器官及び組織（毒性影響の見られた器官及び組織を含む。）への被験物質及び代謝物の分布（濃度及び分布率）を、投与後Tmax及び排泄調査の最終時点を含む適当な複数の時点で測定することにより、その分布、経時的変化及び蓄積性に関する情報を求める。

(3) 排泄

被験物質及び代謝物の糞尿及び呼気への排泄量を測定し、これらより総排泄量を求め、排泄経路及び排泄の程度と速度に関する情報を求める。排泄量の測定は、投与後7日間又は投与量の少なくとも90%が排泄されるまでの、どちらか早いほうで経時的に行う。必要に応じ、胆汁及び乳汁への排泄量も測定する。

(4) 代謝

適切な手法により、被験物質及び主要な代謝物の同定と定量を行い、代謝経路及び代謝の程度と速度に関する情報を求める。

(5) その他

例えば、生体高分子との結合等毒性との関連が示唆されるような各種の事項、代謝に関与する器官、組織等の解明等についてできるだけ調査することが望ましい。

植物体内運命に関する試験(2-4-1)

1. 目的

本試験は、被験物質の植物体内での吸収移行、植物表面上での光化学反応を含めた主要代謝経路及び代謝物の量に関する科学的知見を得ることを目的とする。動物体内運命の試験成績とあわせて動物及び植物体内における代謝物の異同の確認並びに作物残留試験の分析対象物質の決定に資するものとする。

2. 被験物質

農薬の有効成分等の放射性同位元素で標識した又は非標識の高純度化合物を用い、入手先、純度、安定性等を明確にしておく。

なお、同位元素標識体にあつては、合成法、標識核種、標識位置及び比放射能についても明確にしておく。

3. 供試植物

栽培環境は、通常の栽培形態に近い条件で試験を行うことが望ましい。

4. 処理方法

(1) 被験物質は、登録を予定している代表的な製剤又はそれに近い形態若しくは組成に調整して用いる。

(2) 原則として登録申請に係る使用方法、使用時期及び使用量に準じて処理を行う。

(3) 異なる複数の施用方法が予定される場合は、原則として複数の試験を実施することが望ましい。

5. 試料採取

(1) 原則として、試料の採取は当該作物の収穫期に行う。ただし、施用から収穫までの

期間が長く、収穫期のみでは代謝経路の解明が困難な場合は、施用の初期から後期までの複数時点で試料を採取する。

- (2) 収穫期間が長い作物は、収穫期間中の複数時点で試料を採取することが望ましい。
- (3) 原則として、根、葉、茎、実等の各植物部位、また、処理部位と非処理部位がある場合には、それぞれを区別して試料とする。

6. 分析

- (1) 区別して採取した試料ごとに代謝物等（未変化の被験物質を含む。以下同じ。）の存在量等を明らかにする。
- (2) 処理部位については、可能な範囲で表面に残存した代謝物等と植物体内部に浸透した代謝物等を区別して分析する。
- (3) 原則として、試料は速やかに分析することとし、植物試料、抽出液等を保存する場合は、代謝物等の分解が最小限に抑えられるよう適切な方法を採用するとともに、保存期間中の代謝物等の変化を把握出できるようにする必要がある。

7. 代謝物の同定等

代謝物の同定は、原則として、次により明らかにすることが望ましい。

- (1) 採取部位における全残留量の10%以上で、かつ、被験物質に換算して0.01mg/kg以上の各代謝物及びそれに近いものは、同定又はその化学的特徴付けを行う。
- (2) 採取部位における全残留量の10%以上で、かつ、被験物質に換算して0.05mg/kg以上の各代謝物及びそれに近いものは、技術的に可能な限り同定する。
- (3) 植物体に固有な代謝物等（抱合体の場合はそのアグリコン）は、量的に満たない場合であっても、技術的に可能な限り同定する。
- (4) 採取部位における放射性残留濃度が被験物質に換算して0.01mg/kg以上の場合、抽出性残留物量の50%以上の同定及び全残留量の70%以上の化学的特徴付けを行うことが望ましい。
- (5) 全残留量の10%以上で、かつ、0.05mg/kg以上生成する抽出残さ成分については、界面活性剤、酵素、酸塩基処理等により化学的特徴付けを行う。
- (6) 採取部位における放射性残留濃度が被験物質に換算して0.01mg/kg以上で、かつ、全残留量の10%未満の代謝物が複数種残留している場合は、可能な限り共通の分子部分に変換する等により特徴付けることが望ましい。

土壤中運命に関する試験(2-5-1~3)

好氣的湛水土壌中運命試験(2-5-1)

1. 目的

本試験は、好氣的条件下の湛水土壌中における被験物質の主要な代謝経路及び代謝により生成される物質の種類並びに被験物質の収支等に関する科学的知見を得ることを目的とする。本試験は、他の生体内運命に関する試験の結果の評価及び土壌残留試験等における分析対象物質の選定に資する。

2. 被験物質

農薬の有効成分等の放射性同位元素で標識した又は非標識の高純度化合物を用い、入手先、純度、安定性等を明確にしておく。

なお、放射性同位元素標識体にあつては、合成法、標識核種、標識位置及び比放射能についても明確にしておく。

3. 供試土壌

- (1) 水田ほ場から採取した新鮮な表層土壌を用いる。
- (2) 土壌は、生土状態又は必要に応じて室温で最小限の風乾をしたのち、原則として2 mmの篩に通したものをを用いる。ただし、完全に風乾してはならない。
- (3) 微生物の影響をみるために、滅菌した土壌を追加して用いることが望ましい。

4. 試験条件

- (1) 土壌層の厚さは、5 cm以上が望ましい。土壌を湛水し、水深は1 cm以上とする。
- (2) 試験は、遮光条件下で、原則として25℃(±2℃) で実施することが望ましい。
- (3) 試験は、原則として、自由な気体交換及び試験期間中気体相に揮発した被験物質等の回収が可能な条件下で実施する。
- (4) 試験期間と同一条件で2週間以上の予備培養(プレインキュベーション)を実施し、還元層が形成されることを確認した後、被験物質を処理する。

5. 試験の実施

(1) 処理

- ① 被験物質を水又は少量の有機溶媒(アセトン等)に溶解し、試験系に1回処理した後、湛水中の被験物質が均一になるように試験系全体を攪拌、振とう等を行う。
- ② 最大慣行施用量で1回施用した被験物質(有効成分)が深さ10cmの土壌に均一に分布した場合の濃度を基準に、一種類の処理濃度を設定する。ただし、最大慣行施用量が低く、分析等に支障がある場合は、分析が可能な範囲の濃度で行う。

(2) 試験期間

被験物質の消失及び主要な代謝物の生成と消失が把握できる期間とする。なお、最大6か月間とする。

(3) 分析試料の採取

代謝物等(未変化の被験物質を含む。以下同じ。)の生成と消失を適切に評価できるように、処理直後と試験期間終了時点を含む6時点以上で経時的に、試験系の土壌、水及び気体を採取する。ただし、土壌と水は傾斜法によって分離して採取する。

(4) 分析

原則として、試料は速やかに分析することとし、土壌試料、抽出液等を保存する場合は、代謝物等の分解が最小限に抑えられるよう適切な方法を採用するとともに、保存期間中の代謝物等の変化を把握できるようにする必要がある。

6. 検討項目

分布及び代謝の各段階における検討項目は、通常、次のとおりである。

(1) 分布

物質収支を明らかにし、試験系の土壌、水及び気体相に含まれる被験物質等の分布の経時的変化に関する情報を得る。土壌の抽出残渣が生成する場合は、その生成率についての情報を得る。

(2) 代謝

適切な手法により、試験系の土壌中、水中及び気体相に含まれる被験物質並びに主要な代謝物の同定又は化学的特徴付けと定量を行い、代謝経路に関する情報を得る。あわせて、被験物質の消失に関する情報及び可能な場合は主要な代謝物の消失に関する情報も得る。土壌中の抽出残渣が生成する場合は特徴付けを行う。

好氣的土壌中運命試験(2-5-2)

1. 目的

本試験は、好氣的条件下での土壌中における被験物質の主要な代謝経路及び代謝により生成する物質の種類並びに物質収支等の情報を得ることを目的とする。本試験は、他の生体内運命に関する試験の結果の評価及び土壌残留試験等における分析対象化合物の選定に資する。

2. 被験物質

農薬の有効成分等の放射性同位元素で標識した又は非標識の高純度化合物を用い、入手先、純度、安定性等を明確にしておく。なお、放射性同位元素標識体にあつては、合成法、標識核種、標識位置及び比放射能についても明確にしておく。

3. 供試土壌

- (1) ほ場から採取した新鮮な表層土壌を用いる。
- (2) 土壌は、生土状態又は必要に応じて室温で最小限の風乾をしたのち、原則として 2 mm の篩に通したものをを用いる。ただし、完全に風乾してはならない。
- (3) 微生物の影響を見るために、滅菌した土壌を追加して用いることが望ましい。

4. 試験条件

- (1) 土壌層の厚さは、1 cm 以上 5 cm 以下が望ましい。
- (2) 土壌含水量は最大容水量の 40~60% に維持する。
- (3) 試験は、遮光条件下で、原則として 25°C (± 2°C) で実施することが望ましい。
- (4) 試験は、原則として、自由な気体交換及び試験期間中気体相に揮発した被験物質等の回収が可能な条件下で実施する。

(5) 試験期間と同一条件で2週間以上の予備培養を実施し被験物質を処理する。

5. 試験の実施

(1) 処理

① 被験物質を水又は少量の有機溶媒（アセトン等）に溶解した後、試験系に1回処理し、被験物質が均一になるよう、攪拌、振とう等を行う。

② 最大慣行施用量で1回施用した被験物質（有効成分）が深さ10cmの土壤に均一に分布した場合の濃度を基準に、一種類の処理濃度を設定する。ただし、最大慣行施用量が低く、分析等に支障がある場合は、分析が可能な範囲の濃度で行う。

(2) 試験期間

被験物質の消失及び主要な代謝物の生成と消失が把握できる期間とする。なお、最大6か月間とする。

(3) 分析試料の採取

代謝物等（未変化の被験物質を含む。以下同じ。）の生成と消失を適切に評価できるように、処理直後と試験期間終了時点を含む6時点以上で経時的に、試験系の土壤及び気体を採取する。

(4) 分析

原則として、試料は速やかに分析することとし、土壤試料、抽出液等を保存する場合は、代謝物等の分解が最小限に抑えられるよう適切な方法を採用するとともに、保存期間中の代謝物等の変化を把握できるようにする必要がある。

6. 検討項目

分布及び代謝の各段階における検討項目は、通常、次のとおりである。

(1) 分布

物質収支を明らかにし、試験系の土壤及び気体相の被験物質及び代謝物の分布の経時的变化に関する情報を得る。土壤の抽出残渣が生成する場合は、その生成率についての情報を得る。

(2) 代謝

適切な手法により、試験系の土壤中及び気体相に含まれる被験物質並びに主要な代謝物の同定又は化学的特徴付け及び定量を行い、代謝経路に関する情報を求める。あわせて、被験物質の消失に関する情報及び可能な場合は主要な代謝物の消失に関する情報も得る。土壤中の抽出残渣が生成する場合は特徴付けを行う。

嫌氣的土壤中運命試験(2-5-3)

1. 目的

本試験は、嫌氣的条件下の土壤中における被験物質の主要な代謝経路及び代謝により生成される物質の種類並びに被験物質の物質収支等に関する科学的知見を得ることを目的とする。本試験は、他の生体内運命に関する試験の結果の評価及び土壤残留試験等における分析対象物質の選定に資する。

2. 被験物質

農薬の有効成分等の放射性同位元素で標識した又は非標識の高純度化合物を用い、入手先、純度、安定性等を明確にしておく。なお、放射性同位元素標識体にあつては、合成法、標識核種、標識位置及び比放射能についても明確にしておく。

3. 供試土壌

- (1) ほ場から採取した新鮮な土壌を用いる。
- (2) 土壌は、生土状態又は必要に応じて室温で最小限の風乾をしたのち、原則として2 mmの篩に通したものをを用いる。ただし、完全に風乾してはならない。

4. 試験条件

- (1) 土壌層の厚さは、5 cm以上が望ましい。
- (2) 土壌を嫌氣的条件になるように湛水し、水深は1 cm以上とする。
- (3) 試験は、遮光条件下で、原則として25℃(±2℃) で実施することが望ましい。
- (4) 試験は、原則として、自由な不活性気体交換により嫌気状態を保つことができ、かつ、試験系の気体相中に揮発した被験物質等の回収が可能な条件下で実施する。
- (5) 試験期間と同一条件で2週間以上の予備培養を実施し、還元層が形成されることを確認した後、被験物質を処理する。

5. 試験の実施

- (1) 処理
 - ① 被験物質を水又は少量の有機溶媒（アセトン等）に溶解し、試験系に1回処理した後、湛水中の被験物質が均一になるように攪拌、振とう等を行う。
 - ② 最大慣行施用量で1回施用した被験物質（有効成分）が深さ10cmの土壌に均一に分布した場合の濃度を基準に、一種類の処理濃度を設定する。ただし、最大慣行施用量が低く、分析等に支障がある場合は、分析が可能な範囲の濃度で行う。
- (2) 試験期間
被験物質の消失及び主要な代謝物の生成と消失が把握できる期間とする。なお、最大6か月とする。
- (3) 分析試料の採取
代謝物等（未変化の被験物質を含む。以下同じ。）の生成と消失を適切に評価できるように、処理直後と試験期間終了時点を含む6時点以上で経時的、試験系の土壌、水及び気体を採取する。ただし、土壌と水は傾斜法によって分離して採取する。
- (4) 分析
原則として、試料は速やかに分析することとし、土壌試料及び抽出液等を保存する場合は、代謝物等の分解が最小限に抑えられるよう適切な方法を採用するとともに、保存期間中の代謝物等の変化を把握できるようにする必要がある。

6. 検討項目

分布及び代謝の各段階における検討項目は、通常、次のとおりである。

- (1) 分布
物質収支を明らかにし、試験系の土壌、水及び気体相に含まれる被験物質等の分布の経時的变化に関する情報を得る。土壌の抽出残渣が生成する場合は、その生成率についての情報を得る。
- (2) 代謝
適切な手法により、試験系の土壌中、水中及び気体相に含まれる被験物質並びに主要

な代謝物の同定又は化学的特徴付け及び定量を行い、代謝経路に関する情報を得る。あわせて、被験物質の消失に関する情報及び可能な場合は主要な代謝物の消失に関する情報も得る。土壌中の抽出残渣が生成する場合は特徴付けを行う。

水中運命に関する試験(2-6-1、2)

加水分解運命試験(2-6-1)

1. 目的

本試験は、加水分解性のある被験物質の水中での加水分解運命に関し、その主要な分解経路及び分解により生成される物質並びに物質収支等の情報を得ることを目的とする。本試験は、他の生体内運命に関する試験の結果の評価及び水質汚濁性試験等における分析対象物質の選定に資する。

2. 被験物質

農薬の有効成分等の放射性同位元素で標識した又は非標識の高純度化合物を用い、入手先、純度、安定性等を明確にしておく。なお、放射性同位元素標識体にあつては、合成法、標識核種、標識位置及び比放射能についても明確にしておく。

3. 供試水

pH4.0、7.0及び9.0の緩衝液を用いる。

4. 試験条件

- (1) 試験は 25 ± 1 ℃で実施する。
- (2) 試験は、加水分解以外の分解要因(光、酸素等)を排除して行う。
- (3) 供試水及び試験容器は滅菌する。

5. 試験の実施

(1) 処理

被験物質の試験濃度は一種類とし、原則として、0.01M又は水溶解度の $1/2$ 以下のうち、いずれか低い方を選択する。

(2) 試験期間

試験期間は、被験物質の消失及び主要な分解物の生成と消長が把握できる期間とする。なお、最大30日間とする。試験終了後に、試験系について滅菌状態が維持されていたことを確認することが望ましい。

(3) 分析試料の採取

被験物質の消失及び主要な分解物の生成と消長を適切に評価できるように、処理直後と試験期間終了時点を含む7時点以上で経時的に、分析試料(水及び気体)を採取する。

(4) 分析

- ① 試料は、採取後、速やかに分析に供する。
- ② 試料及び抽出液等を保存する場合は、分解物等の分解が最小限に抑えられるよう適切な方法を採用するとともに、保存期間中の分解物等の変化を把握できるようにする必要がある。

6. 検討項目

通常、次のとおりとする。

(1) 物質収支

物質収支を明らかにする。

(2) 分解物等

適切な手法により、水中の被験物質及び主要な分解物の同定又は化学的特徴付け及び定量を行うほか、揮発性物質が生成する場合は主要な揮発性物質についても同定又は化学的特徴付け及び定量を行い、分解経路及び分解物の消長に関する情報を得る。

(3) 分解速度

被験物質の消失に関する情報及び可能な場合は主要な分解物の消長に関する情報も得る。

水中光分解運命試験 (2-6-2)

1. 目的

本試験は、水中光分解性のある被験物質の水中での光による分解運命に関し、その主要な分解経路及び分解により生成される物質並びに物質収支等の情報を得ることを目的とする。本試験は、他の生体内運命に関する試験の結果の評価及び水質汚濁性試験等における分析対象物質の選定に資する。

2. 被験物質

農薬の有効成分等の放射性同位元素で標識した又は非標識の高純度化合物を用い、入手先、純度、安定性等を明確にしておく。なお、放射性同位元素標識体にあつては、合成法、標識核種、標識位置及び比放射能についても明確にしておく。

3. 供試水

自然水及び蒸留水（又は緩衝液）を用いる。

4. 試験条件

- (1) 試験に用いる光源は、原則として、地上に到達する太陽光の波長分布に類似した人工光を用い、連続的に照射する。試料部位での入射光の波長分布及び強度を測定する。
- (2) 試験容器の入射光面は、上記の光に対して吸収を示さない材質でなければならない。
- (3) 供試水及び試験容器は滅菌する。自然水の場合は、成分を変質させない方法で滅菌する。
- (4) 試験は 25 ± 2 °Cで実施する。

5. 試験の実施

(1) 処理

被験物質の試験濃度は1濃度とし、水溶解度の1/2以下で、被験物質の消失速度と分解物の消長を分析するのに十分な濃度とする。

(2) 試験期間

試験期間は、被験物質の消失及び主要な分解物の消長が把握できる期間とする。ただし、太陽光に換算（北緯35°（東京）、春（4月から6月））して30日を超える必要はない。試験終了後に、試験系について滅菌状態が維持されていたことを確認することが望ましい。

(3) 分析試料の採取

分析試料の採取は、被験物質の消失と主要な分解物の生成と消長を適切に評価できるように、処理直後と試験期間終了時点を含む7時点以上で経時的に、分析試料（水及び気体）を採取する。

(4) 試験の実施に当たり、暗所対照区試料を設置する。

(5) 分析

① 試料は、採取後、速やかに分析に供する。

② 試料、抽出液等を保存する場合は、分解物等の分解が最小限に抑えられるよう適切な方法を採用するとともに、保存期間中の分解物等の変化を把握できるようにする必要がある。

6. 検討項目

通常、次のとおりとする。

(1) 物質収支

物質収支を明らかにする。

(2) 分解物等

適切な手法により、水中の被験物質及び主要な分解物の同定又は化学的特徴付け及び定量を行うほか、揮発性物質が生成する場合は主要な揮発性物質についても同定又は化学的特徴付け及び定量を行い、分解経路及び分解物の消長に関する情報を得る。

(3) 分解速度

被験物質の消失に関する情報及び可能な場合は主要な分解物の消長に関する情報も得る。

水産動植物への影響に関する試験(2-7-1~7)

魚類急性毒性試験(2-7-1-1)

1. 目的

本試験は、魚類に対する被験物質の短期的影響に関する科学的知見を得ることにより、農薬使用時における安全な取扱方法を確立すること等を目的とする。

2. 定義

- (1) 死亡：観察可能な動き（鰓ふたの動き等）がなく、尾柄部に触れて反応がない場合魚は死亡しているとみなす。
- (2) LC₅₀ (Median Lethal Concentration：半数致死濃度)：暴露期間中に供試生物の50%が死亡する被験物質の濃度をいう。
- (3) 被験物質：試験に用いる農薬の原体又は製剤をいう。
- (4) 基準物質：試験条件の再現性等を確認するために用いる物質をいう。
- (5) 試験物質：試験に用いる被験物質及び基準物質をいう。
- (6) 止水式試験：暴露期間中試験液を交換しない方式で行う試験をいう。
- (7) 半止水式試験：一定期間ごと試験液を容器ごとに交換する方式で行う試験をいう。
- (8) 流水式試験：連続的に試験液を供給する方式で行う試験をいう。

3. 供試生物

(1) 生物種

- ① 供試魚は、別表の魚種の中から選択する。
- ② 基準物質でのLC₅₀を確認することが望ましい。

(2) 順化

- ① 供試魚は、試験に供する12日前までには入手し、維持しなければならない。
- ② 必要に応じて、入手時に薬浴を行う。
- ③ 供試魚は、試験に供する前の少なくとも9日間は、試験時における環境条件（水質等）と同様の条件下で順化しなければならない。
- ④ 餌は少なくとも週に5回与え、供試前24時間は給餌を行ってはならない。
- ⑤ 以下に掲げる基準により順化を行い、死亡率を記録する。
 - ア 順化開始後2日間の安定期間に続く7日間の死亡率が群の個体数の10%を超える場合には、当該群は廃棄する。
 - イ 群の死亡率が5~10%の場合、さらに7日間順化を継続し、群の死亡率が5%以上の場合は、当該群を廃棄するか、死亡率が5%未満になるまで順化を継続する。
 - ウ 群の死亡率が5%未満の場合において当該群の魚類を試験に供するものとする。

4. 暴露方法

止水式、半止水式又は流水式により試験を行う。

5. 暴露期間

96時間とする。

6. 供試魚数及び試験区の設定

(1) 供試魚数

試験区ごとに、少なくとも7尾使用する。

(2) 試験区の設定

① 試験濃度区の設定

ア 等比級数的に少なくとも5濃度区を設ける。

イ 試験濃度及び濃度公比は、予備試験の結果から定める。公比は2.2を超えないことが望ましい。

ウ 濃度範囲には、供試魚のすべてが死亡する濃度と全く死亡しない濃度が少なくともそれぞれ1濃度、一部が死亡する濃度については、少なくとも2濃度含まれることが望ましい。

② 対照区の設定

ア 対照として、被験物質を含まない無処理対照区を設ける。

イ 試験原液の調製に助剤を使用した場合は、試験濃度区と同濃度の助剤を含む助剤対照区を設ける。

7. 試験液の調製

試験液の調製方法は、以下のとおりとする。なお、試験液及び試験原液は、試験に供する直前に調製することが望ましい。

(1) 原体を被験物質として用いる場合

① 易水溶性原体の場合は、被験物質を希積水に溶解して試験液又は試験原液を調製する。

② 難水溶性原体の場合は、被験物質を機械的な手法により分散して試験液又は試験原液を調製するか、有機溶剤、乳化剤、分散剤等の助剤を用いて試験原液を調製する。助剤は、供試魚に対して毒性が弱く、使用濃度で供試魚に対して有害性が認められず、かつ、被験物質の性質を変えないものを用いる。

③ 助剤の試験液中濃度は、原則として全試験濃度区で一定とし、100mg/L (又は0.1ml/L) を超えないことが望ましい。

(2) 製剤を被験物質として用いる場合

製剤を希積水に加え攪拌し、試験液又は試験原液を調製する。なお、製剤の調製には助剤は用いない。

8. 環境条件

(1) 収容密度

① 止水式及び半止水式による試験では、供試魚1g当たり1リットル以上の試験液量が必要である。

② 流水式試験では、さらに高い収容密度で試験を行うことができる。

(2) 水温

供試魚種の設定温度は別表のとおりとし、変動範囲は±2℃以内とする。

(3) 照明

12～16時間明期とする。

(4) 給餌

暴露期間中は給餌を行わない。

(5) 希積水

① 試験に用いる水は、有害物質等試験の妨げになるものを含まず、飼育に用いた水と同じ供給源のもので、魚が良好に生存又は成長ができる水質であることが確認されているものを用いる。

- ② 脱塩素水道水、天然水又は人工調製水を用いる。
- ③ 使用前には十分に暴気するとともに、温度調節を行う。

(6) 溶存酸素濃度

溶存酸素濃度は、暴露期間を通して飽和濃度の60%以上を保つようにする。被験物質の顕著な消失がなければ、必要に応じてゆるやかな暴気を行ってもよい。

(7) pH

試験液のpH調整は行わない。

2. 観察及び測定

(1) 供試魚の一般状態の観察

暴露開始後、少なくとも24、48、72及び96時間後に供試魚の一般状態を観察し、記録する。死亡魚は速かに試験系から取り除く。また、観察された異常は記録する。

(2) 被験物質濃度の測定

- ① 原体を被験物質として用いた場合には、各試験濃度区における被験物質の濃度を少なくとも暴露開始時、48時間後、暴露終了時、換水前及び換水後に測定する。
- ② 被験物質濃度は、暴露期間中、設定濃度の80%以上であることが望ましい。

(3) 環境条件の測定

- ① 試験に先立って希釈水の水質を確認する。
- ② 各試験区における試験液の水温、溶存酸素濃度及びpHを少なくとも暴露開始時、暴露終了時、換水前及び換水後に測定する。

10. 結果の処理法

- (1) 各濃度における死亡率の結果から、一般的に用いられる手法を用いてLC₅₀を算定する。
- (2) 被験物質濃度の測定値が設定濃度から±20%以上変動している場合は、測定濃度の平均値に基づきLC₅₀を算定する。

11. 報告事項

(1) 試験物質について

(2) 試験魚について

種名、供給源、飼育方法、順化、供試魚数、供試魚の全長・体重、基準物質のLC₅₀等

(3) 試験方法について

暴露条件、環境条件、観察及び測定項目等

(4) 試験結果について

- ① LC₅₀ (原体を被験物質として用いた場合は、有効成分濃度に基づくLC₅₀) 及びその95%信頼限界(可能であれば各観察時間のもの)
- ② LC₅₀の算定方法
- ③ 各観察時間における各試験区での累積死亡率
- ④ 暴露終了時における濃度－死亡率曲線のグラフ
- ⑤ 供試魚の異常な症状及び反応
- ⑥ 被験物質濃度の測定値(原体を被験物質として用いた場合のみ)
- ⑦ 環境条件の測定結果
水質、溶存酸素濃度、pH等
- ⑧ その他の事項
試験液の状態、試験結果に影響を及ぼした可能性のある事項(本試験法からの逸

脱等の内容及びそれが試験結果に影響を及ぼした可能性) 等

12. 試験の妥当性

- (1) 暴露終了時において対照区の死亡率が10%を超えてはならない。ただし、10尾より少ない数を用いた場合は死亡が1尾を超えてはならない。
- (2) 溶存酸素濃度は暴露期間中、飽和濃度の60%以上でなければならない。

別表 試験生物種の条件及び設定温度

魚種	設定温度 (°C)	試験魚の全長 (cm)
コイ (<i>Cyprinus carpio</i>)	20~24	4.0 ± 2.0
メダカ (ヒメダカ) (<i>Oryzias latipes</i>)	21~25	2.3 ± 1.2
ブルーギル (<i>Lepomis macrochirus</i>)	21~25	2.0 ± 1.0
ニジマス (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	13~17	5.0 ± 1.0
グッピー (<i>Poecilia reticulata</i>)	21~25	2.0 ± 1.0
ゼブラダニオ (<i>Danio rerio</i>)	21~25	2.0 ± 1.0
ファットヘッドミノー (<i>Pimephales promelas</i>)	21~25	2.0 ± 1.0

魚類(ふ化仔魚)急性毒性試験(2-7-1-2)

1. 目的

魚類急性毒性試験に準ずる。

2. 定義

魚類急性毒性試験に準ずる。

3. 供試生物

(1) 生物種

- ① 供試魚はメダカ (ヒメダカ) (*Oryzias latipes*) のふ化仔魚 (24時間以内齢) を用いる。
- ② 基準物質でのLC₅₀を確認することが望ましい。

(2) 順化

- ① 成熟した雌雄の親メダカを産卵に適した条件下 (温度は25°C程度で、照明は1日当たり13時間以上の長日周期とし、餌を十分に与える) で飼育する。外部から入

手した場合には、魚類急性毒性試験と同様の順化を行う。継代飼育されているメダカを用いる場合には、特段の順化期間は不要とする。

- ② 産卵された受精卵を採集し、付着糸を除去した後、清水（試験に用いる希釈水と同じ水質の水）中でふ化させる。
- ③ ふ化後、水中を遊泳している仔魚をガラス管等を用いて採集する。

4. 暴露方法

魚類急性毒性試験に準ずる。

5. 暴露期間

魚類急性毒性試験に準ずる。

6. 供試魚数及び試験区の設定

魚類急性毒性試験に準ずる。

7. 試験液の調製

魚類急性毒性試験に準ずる。

8. 環境条件

魚類急性毒性試験に準ずる。

9. 観察及び測定

魚類急性毒性試験に準ずる。

10. 結果の処理法

魚類急性毒性試験に準ずる。

11. 報告事項

魚類急性毒性試験に準ずる。

12. 試験の妥当性

魚類急性毒性試験に準ずる。

ミジンコ類急性遊泳阻害試験(2-7-2-1)

1. 目的

本試験は、甲殻類に対する被験物質の短期的影響に関する科学的知見を得ることにより、農薬使用時における安全な取扱方法を確立することを目的とする。

2. 定義

- (1) 遊泳阻害：試験容器を軽く振とうした後、15秒間全く水中を遊泳しない場合、遊泳阻害されたとみなす。
- (2) EC₅₀ (Median Effect Concentration：半数遊泳阻害濃度)：暴露期間に供試生物

の50%を遊泳阻害する被験物質の濃度をいう。

- (3) 被験物質：試験に用いる農薬の原体又は製剤をいう。
- (4) 基準物質：試験条件の再現性等を確認するために用いる物質をいう。
- (5) 試験物質：試験に用いる被験物質及び基準物質をいう。
- (6) 止水式試験：暴露期間中試験液を交換しない方式で行う試験をいう。
- (7) 半止水式試験：一定期間ごと試験液を容器ごとに交換する方式で行う試験をいう。
- (8) 流水式試験：連続的に試験液を供給する方式で行う試験をいう。

3. 供試生物

(1) 生物種

- ① オオミジンコ (*Daphnia magna*) を用いる。ただし、当該種と同等の試験結果が得られるミジンコ類であれば他の種を用いてもよい。
- ② 供試生物は、経歴（入手源、飼育方法等）の明らかな同系統の親ミジンコから得られたものを用いる。
- ③ 基準物質でのEC₅₀を確認することが望ましい。

(2) 生育段階

生後24時間以内の個体（以下「幼体」という。）を用いる。また、ばらつきを減らすため、親ミジンコの1回目の産仔によるものは使用しない。

(3) 親ミジンコの飼育

幼体を得るための親ミジンコは、可能な限り試験環境条件（試験に用いる希釈水と同一の水質、水温等）に近い条件で一定期間飼育し、健康で繁殖の盛んな時期（通常2～4週齢）のものを用いる。

4. 暴露方法

止水式、半止水式又は流水式により試験を行う。

5. 暴露期間

48時間とする。

6. 供試生物数及び試験区の設定

(1) 供試生物数

試験区ごとに少なくとも20頭の供試生物を使用する。この場合、各5頭ずつ4連に分けることが望ましい。

(2) 試験区の設定

① 試験濃度区の設定

ア 等比級数的に少なくとも5濃度区を設ける。公比は2.2を超えないことが望ましい。

イ 試験濃度及び濃度公比は、予備試験の結果から定める。

ウ 濃度範囲には、供試生物のすべてを遊泳阻害する濃度と全く遊泳阻害しない濃度が少なくともそれぞれ1濃度、一部を遊泳阻害する濃度が少なくとも2濃度含まれることが望ましい。

② 対照区の設定

ア 被験物質を含まない無処理対照区を設ける。

イ 試験原液の調製に助剤を使用した場合は、試験濃度区と同濃度の助剤を含む助剤対照区を設ける。

7. 試験液の調製

試験液の調製方法は、以下のとおりとする。なお、試験液及び試験原液は、試験に供する直前に調製することが望ましい。

(1) 原体を被験物質として用いる場合

- ① 易水溶性原体の場合は、被験物質を希釈水に溶解して試験液又は試験原液を調製する。
- ② 難水溶性原体の場合は、被験物質を機械的な手法により分散して試験液又は試験原液を調製するか、有機溶剤、乳化剤、分散剤等の助剤を用いて試験原液を調製する。助剤は、供試生物に対して毒性が弱く、使用濃度で供試生物に対して有害性が認められず、かつ、被験物質の性質を変えないものを用いること。
- ③ 助剤の試験液中濃度は、原則として全試験濃度区で一定とし、100mg/L（又は0.1ml/L）を超えないことが望ましい。

(2) 製剤を被験物質として用いる場合

製剤を希釈水に加え攪拌し、試験液又は試験原液を調製する。なお、製剤の調製には助剤は用いない。

8. 環境条件

(1) 試験液量

ミジンコ1頭当たり5ml以上とする。

(2) 水温

設定温度は20℃とし、試験期間中の変動範囲は±1℃以内とする。

(3) 照明

16時間明期が望ましい。

(4) 給餌

暴露期間中は給餌を行わない。

(5) 希釈水

- ① 試験に用いる水は、有害物質等試験の妨げになるものを含まず、飼育に用いた水と同じ供給源のもので、ミジンコが良好に生存し、繁殖できる水質であることが確認されているものを用いる。
- ② 脱塩素水道水、天然水又は人工調製水を用いる。
- ③ 使用前には十分に暴気するとともに、温度調節を行う。
- ④ Elendt M4、M7培地のようなキレート剤が含まれている水は、金属を含む物質の試験には使用しない。

(6) 溶存酸素濃度

溶存酸素濃度は、暴露期間を通して3mg/L以上に保つようにする。暴露期間中は、原則として暴気は行わない。

(7) pH

試験液のpH調整は行わない。

9. 観察及び測定

(1) 供試生物の一般状態の観察

暴露開始24時間後及び48時間後における遊泳阻害の有無について観察し記録する。遊泳阻害の他にも、行動や外見の異常が見られた場合には記録する。

(2) 被験物質濃度の測定

- ① 原体を被験物質として用いた場合には、各試験濃度区における被験物質の濃度を少なくとも暴露開始時、暴露終了時、換水前及び換水後に測定する。

なお、試験区ごとに複数の容器を設けている場合には、各容器から試験液を等量採取し混和後、測定用試料に供する。ただし、分析上必要がある場合、分析のために別の容器の試験液を用いてもよい。この場合、試験液と全く同じ条件で処理する。

- ② 被験物質濃度は、暴露期間中、設定濃度の80%以上であることが望ましい。

(3) 環境条件の測定

- ① 試験に先立って希釈水の水質を確認する。
- ② 各試験区における試験液の水温、溶存酸素濃度及びpHを少なくとも暴露開始時、暴露終了時、換水前及び換水後に測定する。また、暴露期間中、pHは通常の場合1.5以上変動してはならない。

10. 結果の処理法

- (1) 各濃度における遊泳阻害率の結果から、一般的に用いられる手法を用いてEC₅₀を算定する。
- (2) 被験物質濃度の測定値が設定濃度から±20%以上変動している場合は、測定濃度の平均値に基づきEC₅₀を算定する。

11. 報告事項

- (1) 試験物質について
- (2) 供試生物について
種名、経歴（入手源、飼育方法等）、基準物質のEC₅₀等
- (3) 試験方法について
暴露条件、環境条件、観察、測定項目等
- (4) 試験結果について
 - ① EC₅₀（原体を被験物質として用いた場合は、有効成分濃度に基づくEC₅₀）及びその95%信頼限界（可能であれば各観察時間のもの）
 - ② EC₅₀の算定方法
 - ③ 各観察時間における各試験区での累積遊泳阻害率
 - ④ 暴露終了時における濃度－遊泳阻害率曲線のグラフ
 - ⑤ 観察された影響
 - ⑥ 被験物質濃度の測定値（原体を被験物質として用いた場合のみ）
 - ⑦ 環境条件の測定結果
水質、溶存酸素濃度、pH等
 - ⑧ その他の事項
試験液の状態、試験結果に影響を及ぼした可能性のある事項（本試験法からの逸脱等の内容及びそれが試験結果に影響を及ぼした可能性）等

12. 試験の妥当性

- (1) 暴露期間中において対照区の遊泳阻害率が10%を超えてはならない。
- (2) 暴露期間中において10%を超える対照区のみジンコが脱色、水面に浮いているなどの異常な症状、行動を示してはならない。
- (3) 溶存酸素濃度は暴露終了時において、3mg/L以上でなければならない。

ミジンコ類(成体)急性遊泳阻害試験(2-7-2-2)

1. 目的

ミジンコ類急性遊泳阻害試験に準ずる。

2. 定義

ミジンコ類急性遊泳阻害試験に準ずる。

3. 供試生物

(1) 生物種

ミジンコ類急性遊泳阻害試験に準ずる。

(2) 生育段階

給餌して飼育した生後7日齢のミジンコを用いる。

(3) 親ミジンコの飼育

ミジンコ類急性遊泳阻害試験に準ずる。

4. 暴露方法

ミジンコ類急性遊泳阻害試験に準ずる。

5. 暴露期間

ミジンコ類急性遊泳阻害試験に準ずる。

6. 供試生物数及び試験区の設定

ミジンコ類急性遊泳阻害試験に準ずる。

7. 試験液の調製

ミジンコ類急性遊泳阻害試験に準ずる。

8. 環境条件

ミジンコ類急性遊泳阻害試験に準ずる。

9. 観察及び測定

ミジンコ類急性遊泳阻害試験に準ずる。

10. 結果の処理法

ミジンコ類急性遊泳阻害試験に準ずる。

11. 報告事項

ミジンコ類急性遊泳阻害試験に準ずる。

12. 試験の妥当性

ミジンコ類急性遊泳阻害試験に準ずる。

ミジンコ類繁殖試験(2-7-2-3)

1. 目的

本試験は、甲殻類に対する被験物質の繁殖に及ぼす影響に関する科学的知見を得ることにより、農薬使用時における安全な取扱方法を確立することを目的とする。

2. 定義

- (1) 繁殖率：生存親ミジンコ1頭当たりの平均累積産仔数（生存幼体）をいう。
- (2) EC₅₀ (Median Effect Concentration：半数影響濃度)：対照区と比べて、暴露期間に供試生物の繁殖率を50%阻害する濃度をいう。
- (3) LOEC (Lowest Observed Effect Concentration：最低影響濃度)：対照区と比べて、繁殖性、親ミジンコの死亡率等に影響が認められた試験最低濃度をいう。
- (4) NOEC (No Observed Effect Concentration：最大無影響濃度)：対照区と比べて、何ら繁殖性、親ミジンコの死亡率等に影響が認められない試験最高濃度をいう。
- (5) 被験物質：試験に用いる原体をいう。
- (6) 半止水式試験：一定期間ごと試験液を容器ごとに交換する方式で行う試験をいう。
- (7) 流水式試験：連続的に試験液を供給する方式で行う試験をいう。

3. 供試生物

(1) 生物種

- ① オオミジンコ (*Daphnia magna*)を用いる。ただし、当該種と同等の試験結果が得られるミジンコ類であれば他の種を用いてもよい。
- ② 供試生物は、経歴（入手源、飼育方法等）の明らかな同系統の親ミジンコから得られたものを用いる。

(2) 生育段階

生後24時間以内の個体（以下「幼体」という。）を用いる。また、ばらつきを減らすため、親ミジンコの1回目の産仔によるものは使用しない。

(3) 親ミジンコの飼育

幼体を得るための親ミジンコは、可能な限り試験環境条件（試験に用いる希釈水と同一の水質、水温等）に近い条件で一定期間飼育し、健康で繁殖の盛んな時期（通常2～4週齢）のものを用いる。

4. 暴露方法

半止水式又は流水式により試験を行う。

5. 暴露期間

21日間とする。

6. 供試生物数及び試験区の設定

(1) 供試生物数

試験区ごとに少なくとも10頭の供試生物を使用し、必要に応じて観察が可能な個体数に分割する。

(2) 試験区の設定

- ① 試験濃度区の設定

ア 等比級数的に少なくとも5濃度区を設ける。公比は3.2を超えないことが望ましい。

イ 試験濃度及び濃度公比は、予備試験の結果又は急性遊泳阻害試験の結果を参考にして定める。

ウ 濃度範囲には、供試生物のすべてに影響が見られる濃度と全く影響が見られない濃度が少なくともそれぞれ1濃度、一部に影響が見られる濃度が少なくとも2濃度含まれることが望ましい。

② 対照区の設定

ア 被験物質を含まない無処理対照区を設ける。

イ 試験原液の調製に助剤を使用した場合は、試験濃度区と同濃度の助剤を含む助剤対照区も設ける。

7. 試験液の調製

試験液の調製方法は、以下のとおりとする。

- (1) 通常、試験液は高濃度の試験原液を希釈して調製する。正確な濃度の試験原液の調製に必要な場合は有機溶剤、乳化剤、分散剤等の助剤を用いるが、できる限り助剤を用いないことが望ましい。
- (2) 助剤は、供試生物に対して毒性が弱く、使用濃度で供試生物に対して有害性が認められず、かつ、被験物質の性質を変えないものを用いること。
- (3) 助剤の試験液中濃度は、原則として全試験濃度区で一定とし、100mg/L（又は0.1ml/L）を超えないことが望ましい。

8. 環境条件

(1) 試験液量

ミジンコ1頭当たり少なくとも50ml以上とする。

(2) 水温

設定温度は18～22℃とし、試験期間中の変動範囲は±1℃以内とすることが望ましい。

(3) 照明

16時間明期が望ましい。

(4) 給餌

培養したクロレラなどの単細胞緑藻類等を与える。

(5) 希釈水

- ① 試験に用いる水は、有害物質等試験の妨げになるものを含まず、飼育に用いた水と同じ供給源のもので、ミジンコが良好に生存し、繁殖できる水質であることが確認されているものを用いる。
- ② 脱塩素水道水、天然水又は人工調製水を用いる。
- ③ 使用前には十分に暴気するとともに、温度調節を行う。
- ④ Elendt M4、M7培地のようなキレート剤が含まれている水は、金属を含む物質の試験には使用しない。

(6) 溶存酸素濃度

溶存酸素濃度は、暴露期間を通して3mg/L以上に保つようにする。暴露期間中は、原則として暴気は行わない。

(7) pH

試験液のpH調整は行わない。

9. 観察及び測定

(1) 供試生物の一般状態の観察

親ミジンコの生死及び生存産出幼体数を数え、親ミジンコの状態、死亡幼体、墮胎卵及び休眠卵の有無等を定期的に観察し記録する。

(2) 被験物質濃度の測定

- ① 各試験濃度区における被験物質の濃度を測定する。
- ② 被験物質濃度は、暴露期間中、設定濃度の80%以上であることが望ましい。

(3) 環境条件の測定

- ① 試験に先立って希釈水の水質を確認する。
- ② 各試験区における試験液の水温、溶存酸素濃度、硬度及びpHを測定する。また、暴露期間中、pHは通常の場合1.5以上変動してはならない。

10. 結果の処理法

(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、一般的な手法で可能な限り算定する。

(2) LOEC及びNOEC

各試験容器毎の生存親ミジンコ1頭当たりの累積産仔数（生存幼体）を算出し、対照区（又は助剤対照区）と各濃度区との有意差の有無を統計手法により求め、対照区（又は助剤対照区）と比較して有意差の認められる最低濃度(LOEC)と有意差が認められない最高濃度(NOEC)を求める。

(3) 被験物質濃度の測定値が設定濃度から ±20%以上変動している場合は、測定濃度の平均値に基づきEC₅₀等を算定する。

11. 報告事項

(1) 被験物質について

(2) 供試生物について

種名、経歴（入手源、飼育方法等）等

(3) 試験方法について

暴露条件、環境条件、観察、測定項目等

(4) 試験結果について

- ① 親ミジンコの死亡率
- ② 繁殖率
- ③ 有効成分濃度に基づくEC₅₀及びその95%信頼限界（可能な限り求める。）
- ④ EC₅₀の算定方法
- ⑤ 有効成分濃度に基づくLOEC及びNOEC（これらの値が求められなかった場合は、その理由を記す。）
- ⑥ LOEC及びNOECの算定方法
- ⑦ 各観察時間における各試験区での親ミジンコの死亡率及び繁殖率
- ⑧ 暴露終了時における濃度－親ミジンコの死亡率及び繁殖率曲線のグラフ
- ⑨ 観察された影響
- ⑩ 各試験濃度区における最初の産仔までの日数
- ⑪ 被験物質濃度の測定値
- ⑫ 環境条件の測定結果
水質、溶存酸素濃度、硬度、pH等

⑬ その他の事項

試験液の状態、試験結果に影響を及ぼした可能性のある事項（本試験法からの逸脱等の内容及びそれが試験結果に影響を及ぼした可能性）等

12. 試験の妥当性

- (1) 暴露終了時において対照区の親ミジンコの死亡率が20%を超えてはならない。
- (2) 対照区の親ミジンコ1頭当たりの平均累積産仔数が60頭以上でなければならない。

魚類急性毒性・ミジンコ類急性遊泳阻害共存有機物質影響試験(2-7-3)

1. 目的

本試験は、魚類又は甲殻類に対する被験物質の短期的影響に関する科学的知見を得ることにより、農薬使用時における安全な取扱方法を確立することを目的とする。

2. 定義

- (1) 死亡（魚類）：軽い刺激に対して試験生物の反応がないことをいう。
- (2) 遊泳阻害（ミジンコ類）：試験容器を軽く振とうした後、15秒間全く水中を遊泳しない場合、遊泳阻害されたとみなす。
- (3) LC₅₀ (Median Lethal Concentration：半数致死濃度)：暴露期間中に供試生物の50%が死亡する被験物質の濃度をいう。
- (4) EC₅₀ (Median Effect Concentration：半数遊泳阻害濃度)：暴露期間中に供試生物の50%を遊泳阻害する被験物質の濃度をいう。
- (5) L(E)C₅₀：LC₅₀ 又はEC₅₀であることを示す。
- (6) 被験物質：試験に用いる農薬の原体をいう。
- (7) 助剤：被験物質を溶解するために用いられる溶剤をいう。
- (8) 止水式試験：暴露期間中試験液を交換しない方式で行う試験をいう。
- (9) 半止水式試験：一定期間ごと試験液を容器ごとに交換する方式で行う試験をいう。
- (10) 溶存有機炭素(DOC)：流水あるいは静水生態系で生じる種々の有機分子類をいい、この試験においては不均質なフミン物質群に限定することとする。
- (11) 全有機炭素(TOC)：試験用水中に存在する微粒子、溶存及び懸濁した全ての有機炭素分子類の総和をいう。
- (12) フミン物質：フミン酸類(HAs)、フルボ酸類、フミン画分及びそれらの各種塩類であって不均質な条件で発生する有機物質の化学的分別から生じるものをいう。なお、この試験においてはフミン酸(HA)ナトリウム塩をDOC源として用いることを妨げない。

3. 供試生物

(1) 選択

試験生物種は魚類の場合はメダカ（ヒメダカ）(*Oryzias latipes*)、ミジンコ類の場合はオオミジンコ(*Daphnia magna*)を用いる。

(2) 生物の齢と状態

魚類では稚魚を用いる。試験に用いる魚は同一齢で、その齢に対して正常な大きさと外観を備えた個体とする。最も大きな魚の全長は最短の個体の2倍を超えてはなら

ない。

ミジンコでは生後24時間以内齢の個体を用いる。また、ばらつきを減らすため、親ミジンコの1回目の産仔によるものは使用しない。

供試生物は、経歴（入手源、飼育方法等）の明らかなものを用いる。

(3) 順化又は親ミジンコの飼育

魚類急性毒性試験又はミジンコ類急性遊泳阻害試験に準ずる。

4. 暴露方法

止水式又は半止水式により試験を行う。

5. 暴露期間

メダカでは96時間、ミジンコでは48時間とする。

6. 供試生物数及び試験区の設定

(1) 予備試験

① HA存在下での試験物質の毒性が分かっていない場合、予備試験を行って本試験で用いる試験濃度範囲を決定する。

② 最初に、約5尾の魚または約10頭のミジンコを用いた予備試験をHA濃度10 mg/Lで行う。10 mg/LのHA濃度で、粘性、コロイド状の複合体の形成が生じる場合、HA濃度は10 mg/L以下の適切な濃度に下げてもよい。

③ 10 mg/LのHA濃度で行った予備試験において、HA非存在下で得られた急性毒性値よりも毒性が緩和する可能性がある場合には本試験を行う。

(2) 本試験

① 供試生物数

試験区ごとに、少なくともメダカでは7尾、ミジンコでは20頭を供試し、必要に応じて観察が可能な個体数に分割する。この場合、各試験容器の試験生物数は、同じでなければならない。

② 試験区の設定

ア 試験濃度区の設定

a. HA濃度は、2.5、5及び10mg/Lとし、各HA濃度ごとに等比級数的に少なくとも5試験濃度区を設定する。また、HAを含まない試験区も同様に設定する。

b. 試験濃度及び濃度公比は予備試験の結果から定める。

c. 濃度範囲には、供試魚（又は供試ミジンコ）全てを死亡（又は遊泳阻害）させる濃度と全く死亡（又は遊泳阻害）させない濃度が少なくともそれぞれ1濃度、一部を死亡（又は遊泳阻害）させる濃度については、少なくとも2濃度含まれることが望ましい。

イ 対照区の設定

a. 全ての試験は被験物質が加えられていないことを除いて、同じ希釈水、条件、手法及び試験で用いた同一群の試験生物からなる対照区を設ける。

b. また、全ての試験はHAのみを含む希釈水からなる陰性対照区を設ける。

7. 試験液の調製

被験物質の原液調製には希釈水のみを用いるようにする。有機助剤は原則としてこの試験に用いない。ただし、難水溶性農薬に関して有機助剤を使用しなければ試験の成立

が困難な場合には、必要最小限の量を使用することができる。

8. 環境条件

(1) 試験材料

① 構成材料

原液、試験液、又は希釈水に接触する構成材料と装置は、試験結果を変えるほどの量で水溶液に浸出又は溶解する物質を含まないようにする。原液や試験液に接触する材料や装置は被験物質の吸着を最小限にするように選択する。また、その材質としてできるだけ、ガラス、ステンレス鋼及びフッ素系樹脂を用いるようにする。

② 試験系の洗浄

試験水槽は各試験前に十分洗浄する。

③ 希釈水

ア 試験に用いる水は、有害物質等試験の妨げになるものを含まず、飼育に用いた水と同じ供給源のもので、魚が良好に生存又は成長できる、又は、ミジンコが良好に生存し、繁殖できる水質であることが確認されているものを用いる。

イ 脱塩素水道水、天然水又は人工調製水を用いる。

ウ 使用前には十分に曝気するとともに、温度調節を行う。

(2) 収容密度

① 魚類

試験水槽に入れる魚の数は試験結果に影響するほど多くしてはならない。収容量はいかなる時でも試験容器の試験液量当りの魚重量が0.5g/Lを超えてはならない。これらの収容密度の目安は(3)の溶存酸素濃度を維持するのに十分なものとする。

② ミジンコ類

ミジンコ1頭当たり少なくとも10ml以上とする。

(3) 溶存酸素濃度

溶存酸素濃度は、暴露期間を通して飽和濃度の60%以上を保つようにする。

(4) 水温

設定温度は、メダカでは23℃、ミジンコでは20℃とする。試験期間中の変動範囲はメダカでは±2℃、ミジンコでは±1℃より大きくならないようにする。

(5) 照明

12～16時間明期とする。

9. 観察及び測定

(1) 供試生物の一般状態の観察

暴露開始後少なくとも24時間ごとに死亡あるいは遊泳障害及びその他の異常を観察し、記録する。死亡魚は速やかに取り除く。

(2) 被験物質濃度測定

原則として、試験液の被験物質濃度を測定する必要はない。ただし、試験液の調製時に、原液の被験物質濃度測定を必要に応じて行う。

(3) 環境条件の測定

① 希釈水及び試験液

ア 試験に先立って希釈水の水質を確認する。

イ 各試験区における試験液の水温、溶存酸素及びpHを少なくとも暴露開始時、暴露終了時、喚水前及び喚水後に測定する。

② 溶存有機炭素

この試験において選択する天然由来のDOCはHAとする。

③ TOC測定のための試料採取

TOCを分析するための試料は水槽の上部、底部及び側部の間の中央部で各試験区及び対照区の水槽から採取する。これらの試料には表層スカム（表層浮きかす又は表層薄膜）あるいは底部や側部から除去された物質を含めてはならない。

④ TOCの測定

止水式試験に対し、DOCは試験の開始時（被験物質及び試験生物を入れる前）に各HA濃度ごとに（TOCとして）測定する。

半止水式試験では、換水時にも、予め調製した試験液（被験物質を入れる前）について同様にTOCを測定する。

10. 結果の処理

（1）100%活性成分(AI)に基づく被験物質の設定濃度を全てのL(E)C₅₀の計算と用量反応曲線のプロットに用いる。

（2）各HA濃度ごとに、試験期間中に得られた死亡率又は遊泳阻害率の結果から、一般的に用いられる手法を用いて用量反応曲線とL(E)C₅₀を求める。

（3）各HA濃度ごとに測定したTOCの平均濃度とL(E)C₅₀との関係を回帰分析し、TOC濃度1.5 mg/LにおけるL(E)C₅₀を算出する。

（4）TOC濃度1.5 mg/Lの時のL(E)C₅₀値を、HA濃度0mg/LのときのL(E)C₅₀で除し、TOC濃度1.5 mg/Lにおける毒性緩和係数を求める。

11. 報告事項

（1）試験物質について

（2）供試生物について

種名、経歴（入手源、飼育方法等）、順化等

（3）試験方法について

HA（化学的特徴及び供給源）、TOCの化学的分析方法（検証方法と試薬ブランクを含む）、暴露条件、環境条件（DO、pH、温度及び照明の方法等）、観察、測定項目等

なお、試験に有機助剤を用いた場合は次の事項、①有機溶剤を用いる必要性に関する考察、②有機溶剤の種類及び使用量の妥当性に関する考察、③有機溶剤が試験結果に及ぼした影響に関する考察及び④被験物質の類似物質における試験結果の概要等、当該試験結果の考察の参考となる情報

（4）試験結果について

① 各HA濃度及びTOC1.5mg/Lの時のL(E)C₅₀並びにその95%信頼限界（可能であれば各観察時間のもの）、毒性緩和係数

② L(E)C₅₀の算定方法

③ TOCとL(E)C₅₀との回帰分析結果と用いた手法

④ 各観察時間における各試験区での累積死亡率又は累積遊泳阻害率

⑤ 暴露終了時における濃度－死亡率（又は遊泳阻害率）曲線のグラフ

⑥ 観察された影響

⑦ TOC測定結果

- ⑧ HA濃度10 mg/Lで行った予備試験の結果
- ⑨ 環境条件の測定結果（水質、溶存酸素濃度、pH等）
- ⑩ その他の事項
試験液の状態、試験結果に影響を及ぼした可能性のある事項（本試験法からの逸脱等の内容及びそれが試験結果に影響を及ぼした可能性）等

12. 試験の妥当性

- (1) 暴露終了時において対照区の死亡率（又は遊泳障害率）が10%を超えてはならない。ただし、10尾より少ない数を用いた場合は死亡が1尾を超えてはならない。
- (2) 溶存酸素濃度は暴露期間中、飽和濃度の60%以上でなければならない。
- (3) 暴露開始時において対照区のみジンコが水面に浮いていてはならない。

ヌマエビ・ヌカエビ急性毒性試験(2-7-4)

1. 目的

本試験は、甲殻類（エビ類）に対する被験物質の短期的影響に関する科学的知見を得ることにより、農薬使用時における安全な取り扱い方法を確立することを目的とする。

2. 定義

- (1) 死亡：軽い刺激に対する試験生物の反応がないことをいう。
- (2) LC₅₀ (Median Lethal Concentration：半数致死濃度)：暴露期間中に供試生物の50%が死亡する被験物質の濃度をいう。
- (3) 被験物質：試験に用いる農薬の原体をいう。
- (4) 基準物質：試験条件の再現性等を確認するために用いる物質をいう。
- (5) 試験物質：試験に用いる被験物質及び基準物質をいう。
- (6) 止水式試験：暴露期間中試験液を交換しない方式で行う試験をいう。
- (7) 半止水式試験：一定期間ごと試験液を容器ごとに交換する方式で行う試験をいう。
- (8) 流水式試験：連続的に試験液を供給する方式で行う試験をいう。

3. 供試生物

(1) 生物種

- ① 淡水産のエビを用いる。ミナミヌマエビ (*Neocaridina denticulata*) 又はヌカエビ (*Paratya compressa improvisa*) を用いることが望ましい。
- ② 供試生物は、経歴（入手源、飼育方法等）の明らかなものを用いる。
- ③ 基準物質でのLC₅₀を確認することが望ましい。

(2) 生育段階

成体と形態的に異なる段階のもので未抱卵の個体を用いる。

(3) 順化

- ① 供試生物は、試験に供する12日前までには入手し、維持しなければならない。
- ② 供試生物は、試験に供する前の少なくとも9日間は、試験時における環境条件（水質・温度等）と同様の条件下で順化しなければならない。
- ③ 餌は供試生物に適したものを少なくとも週5日、適量与え、供試前24時間は給餌を行ってはならない。

- ④ 以下に掲げる基準により順化を行い、死亡率を記録する。
- ア 順化開始後2日間の安定期間に続く7日間の死亡率が群の個体数の10%を超える場合には、当該群は廃棄する。
 - イ 群の死亡率が5～10%の場合、さらに7日間順化を継続し、群の死亡率が5%以上の場合には、当該群を廃棄するか、死亡率が5%未満になるまで順化を継続する。
 - ウ 群の死亡率が5%未満の場合において当該群の供試生物を試験に供するものとする。
- ⑤ 継代飼育されているエビを用いる場合には、特段の順化期間は不要とする。

4. 暴露方法

止水式、半止水式又は流水式により試験を行う。

5. 暴露期間

96時間とする。

6. 供試生物数及び試験区の設定

(1) 供試生物数

試験区ごとに、少なくとも10匹以上使用する。

(2) 試験区の設定

① 試験濃度区の設定

ア 等比級数的に少なくとも5濃度区を設ける。

イ 試験濃度及び濃度公比は、予備試験の結果から定める。

ウ 濃度範囲には、供試生物のすべてが死亡する濃度と全く死亡しない濃度が少なくともそれぞれ1濃度、一部が死亡する濃度については、少なくとも2濃度含まれることが望ましい。

② 対照区の設定

ア 対照として、被験物質を含まない無処理対照区を設ける。

イ 試験原液の調製に助剤を使用した場合は、試験濃度区と同濃度の助剤を含む助剤対照区を設ける。

7. 試験液の調製

試験液の調製方法は、以下のとおりとする。なお、試験液及び試験原液は、試験に供する直前に調製することが望ましい。

(1) 易水溶性物質の場合には、被験物質を希釈水に溶解して試験液又は試験原液を調製する。

(2) 難水溶性物質の場合には、被験物質を機械的な手法により分散して試験液又は試験原液を調製するか、有機溶媒、乳化剤、分散剤等の助剤を用いて試験原液を調製する。助剤は供試生物に対して毒性が弱く、使用濃度で供試生物に対して有害性が認められず、かつ、被験物質の性質を変えないものを用いる。

(3) 助剤の試験液中濃度は、原則として全試験濃度区で一定とし、100mg/L（又は0.1ml/L）を超えないことが望ましい。

8. 環境条件

(1) 収容密度

供試生物の大きさ及び数に応じた試験液量が必要である。収容密度は、溶存酸素濃度が飽和濃度の60%を下回らないように設定する。

(2) 水温

20～24℃の範囲で22℃を標準とする。試験期間中の変動範囲は設定温度の±1℃以内とすることが望ましい。

(3) 照明

12～16時間明期が望ましい。

(4) 給餌

暴露期間中は給餌を行わない。

(5) 希釈水

① 試験に用いる水は、有害物質等試験の妨げになるものを含まず、飼育に用いた水と同じ供給源のもので、供試生物が良好に生存又は成育ができる水質であることが確認されているものを用いる。

② 脱塩素水道水、天然水又は人工調製水を用いる。

③ 使用前には十分に暴気するとともに、温度調節を行う。

(6) 溶存酸素濃度

溶存酸素濃度は、暴露期間を通して飽和濃度の60%以上を保つようにする。必要に応じてゆるやかな暴気を行う。

(7) pH

試験液のpH調整は行わない。

9. 観察及び測定

(1) 供試生物の一般状態の観察

暴露開始後、少なくとも24、48、72及び96時間後に供試生物の一般状態を観察し、記録する。死亡個体は速やかに試験液から取り除く。また、観察時に脱皮が確認された場合は記録するとともに殻を試験液から取り除く。

(2) 被験物質濃度の測定

① 各試験濃度区における被験物質の濃度は少なくとも暴露開始時、48時間後、暴露終了時、換水前及び換水後に測定する。

② 被験物質濃度は、暴露期間中、設定濃度の80%以上であることが望ましい。

(3) 環境条件の測定

① 試験に先立って、希釈水の水質を確認する。

② 各試験区における試験液の水温、溶存酸素濃度及びpHを少なくとも暴露開始時、暴露終了時、換水前及び換水後に測定する。

10. 結果の処理法

(1) 各濃度における死亡率の結果から、一般的に用いられる手法を用いてLC₅₀を算出する。

(2) 原則として測定有効成分濃度の平均値に基づきLC₅₀を算出するが、測定値の変動が設定濃度の±20%以内の場合には、設定濃度に基づきLC₅₀を算出してもよい。

11. 報告事項

(1) 試験物質について

(2) 供試生物について

種名、供給源、飼育方法、順化条件、供試数、全長、体重、基準物質のLC₅₀等

(3) 試験方法について

暴露条件、環境条件、観察及び測定項目、被験物質濃度測定等

(4) 試験結果について

- ① 有効成分濃度に基づくLC₅₀及びその信頼限界（可能であれば各観察時間のもの）
- ② LC₅₀の算出方法
- ③ 各観察時間における各試験区での累積死亡率
- ④ 暴露終了時における濃度－死亡率曲線のグラフ
- ⑤ 供試生物に観察された異常及び反応
- ⑥ 被験物質濃度の測定値
- ⑦ 環境条件の測定結果
水質、溶存酸素濃度、pH等
- ⑧ その他の事項
試験液の状態、試験結果に影響を及ぼした可能性のある事項（本試験法からの逸脱等の内容及びそれが試験結果に影響を及ぼした可能性）等

12. 試験の妥当性

- (1) 暴露終了時において対照区の死亡率が10%を超えてはならない。
- (2) 溶存酸素濃度は暴露期間中、飽和濃度の60%以上でなければならない。

ヨコエビ急性毒性試験(2-7-5)

1. 目的

本試験は、甲殻類（端脚目）に対する被験物質の短期的影響に関する科学的知見を得ることにより、農薬使用時における安全な取り扱い方法を確立することを目的とする。

2. 定義

- (1) 死亡：軽い刺激に対して試験生物の反応がないことをいう。
- (2) LC₅₀ (Median Lethal Concentration：半数致死濃度)：暴露期間中に供試生物の50%が死亡する被験物質の濃度をいう。
- (3) 被験物質：試験に用いる農薬の原体をいう。
- (4) 基準物質：試験条件の再現性等を確認するために用いる物質をいう。
- (5) 試験物質：試験に用いる被験物質及び基準物質をいう。
- (6) 止水式試験：暴露期間中試験液を交換しない方式で行う試験をいう。
- (7) 半止水式試験：一定期間ごと試験液を容器ごとに交換する方式で行う試験をいう。
- (8) 流水式試験：連続的に試験液を供給する方式で行う試験をいう。

3. 供試生物

(1) 生物種

- ① 淡水産の端脚目を用いる。*Gammarus fasciatus*、*G. pseudolimnaeus*、*G. lacustris* 及び *Hyalella azteca* が望ましいが、他の端脚目を用いることができる。
- ② 供試生物は、経歴（入手源、飼育方法等）の明らかなものを用いる。
- ③ ヨコエビは実験室で繁殖したり、野外から採集したものを試験に使用することができる。
- ④ 試験に用いるヨコエビは同様の年齢及び大きさで構成し、同一の供給源や繁殖源からのものとする。
- ⑤ 基準物質でのLC₅₀を確認することが望ましい。

(2) 生育段階

成体と形態的に異なる段階のもので未抱卵の個体を用いる。

(3) 順化

- ① 供試生物は、試験に供する12日前までに入手し、維持しなければならない。
- ② 供試生物は、試験に供する前の少なくとも9日間は、試験時における環境条件（水質・温度等）と同様の条件下で順化しなければならない。
- ③ 餌は供試生物に適したものを、適量与える。
- ④ 以下に掲げる基準により順化を行い、死亡率を記録する。
 - ア 順化開始後2日間の安定期間に続く7日間の死亡率が群の個体数の10%を超える場合には、当該群は廃棄する。
 - イ 群の死亡率が5～10%の場合、さらに7日間順化を継続し、群の死亡率が5%以上の場合には、当該群を廃棄するか、死亡率が5%未満になるまで順化を継続する。
 - ウ 群の死亡率が5%未満の場合において当該群の供試生物を試験に供するものとする。

4. 暴露方法

止水式、半止水式又は流水式により試験を行う。

5. 暴露期間

96時間とする。

6. 供試生物数及び試験区の設定

(1) 供試生物数

試験区ごとに、少なくとも20匹以上使用する。

(2) 試験区の設定

① 試験濃度区の設定

- ア 等比級数的に少なくとも5濃度区を設ける。
- イ 試験濃度及び濃度公比は、予備試験の結果から定める。
- ウ 濃度範囲には、供試生物のすべてが死亡する濃度と全く死亡しない濃度が少なくともそれぞれ1濃度、一部が死亡する濃度については、少なくとも2濃度含まれることが望ましい。

② 対照区の設定

- ア 対照として、被験物質を含まない無処理対照区を設ける。
- イ 試験原液の調製に助剤を使用した場合は、試験濃度区と同濃度の助剤を含む助剤対照区を設ける。

7. 試験液の調製

試験液の調製方法は、以下のとおりとする。なお、試験液及び試験原液は、試験に供する直前に調製することが望ましい。

- (1) 易水溶性物質の場合には、被験物質を希積水に溶解して試験液又は試験原液を調製する。
- (2) 難水溶性物質の場合には、被験物質を機械的な手法により分散して試験液又は試験原液を調製するか、有機溶媒、乳化剤、分散剤等の助剤を用いて試験原液を調製する。助剤は供試生物に対して毒性が弱く、使用濃度で供試生物に対して有害性が認められず、かつ、被験物質の性質を変えないものを用いる。
- (3) 助剤の試験液中濃度は、原則として全試験濃度区で一定とし、100mg/L（又は

0.1ml/L) を超えないことが望ましい。

8. 環境条件

(1) 収容密度

供試生物の大きさに応じた試験液量が必要である。

止水式による試験では、供試生物10匹当たり1リットル以上の試験液量が必要であるが、流水式試験では、さらに高い収容密度で試験を行うことができる。

(2) 水温

18～23℃を標準とするが、供試生物種に応じてその生育適温とすることができる。試験期間中の変動範囲は設定温度の±1℃以内とすることが望ましい。

(3) 照明

16時間明期が望ましい。

(4) 給餌

暴露期間中は給餌を行わない。

(5) 希釈水

① 試験に用いる水は、有害物質等試験の妨げになるものを含まず、飼育に用いた水と同じ供給源のもので、供試生物が良好に生存又は成育ができる水質であることが確認されているものを用いる。

② 脱塩素水道水、天然水又は人工調製水を用いる。

③ 使用前には十分に暴気するとともに、温度調節を行う。

(6) 溶存酸素濃度

溶存酸素濃度は、暴露期間を通して飽和濃度の60%以上を保つようにする。必要に応じてゆるやかな暴気を行う。

(7) pH

試験液のpH調整は行わない。

9. 観察及び測定

(1) 供試生物の一般状態の観察

暴露開始後、少なくとも24、48、72及び96時間後に供試生物の一般状態を観察し、記録する。死亡個体は速やかに試験液から取り除く。また、観察時に脱皮が確認された場合は記録するとともに殻を試験液から取り除く。

(2) 被験物質濃度の測定

① 各試験濃度区における被験物質の濃度は少なくとも暴露開始時、48時間後、暴露終了時、換水前及び換水後に測定する。

② 被験物質濃度は、暴露期間中、設定濃度の80%以上であることが望ましい。

(3) 環境条件の測定

① 試験に先立って、希釈水の水質を確認する。

② 各試験区における試験液の水温、溶存酸素濃度及びpHを少なくとも暴露開始時、暴露終了時、換水前及び換水後に測定する。

10. 結果の処理法

(1) 各濃度における死亡率の結果から、一般的に用いられる手法を用いてLC₅₀を算出する。

(2) 原則として測定有効成分濃度の平均値に基づきLC₅₀を算出するが、測定値の変動が設定濃度の±20%以内の場合には、設定濃度に基づきLC₅₀を算出してもよい。

11. 報告事項

- (1) 試験物質について
- (2) 供試生物について
種名、供給源、飼育方法、順化条件、供試数、全長、体重、基準物質の LC_{50} 等
- (3) 試験方法について
暴露条件、環境条件、観察及び測定項目、被験物質濃度測定等
- (4) 試験結果について
 - ① 有効成分濃度に基づく LC_{50} 及びその信頼限界（可能であれば各観察時間のもの）
 - ② LC_{50} の算出方法
 - ③ 各観察時間における各試験区での累積死亡率
 - ④ 暴露終了時における濃度－死亡率曲線のグラフ
 - ⑤ 供試生物に観察された異常及び反応
 - ⑥ 被験物質濃度の測定値
 - ⑦ 環境条件の測定結果
水質、溶存酸素濃度、pH等
 - ⑧ その他の事項
試験液の状態、試験結果に影響を及ぼした可能性のある事項（本試験法からの逸脱等の内容及びそれが試験結果に影響を及ぼした可能性）等

12. 試験の妥当性

- (1) 暴露終了時において対照区の死亡率が10%を超えてはならない。
- (2) 溶存酸素濃度は暴露期間中、飽和濃度の60%以上でなければならない。

ユスリカ幼虫急性毒性試験(2-7-6)

1. 目的

本試験は、ユスリカ幼虫に対する被験物質の短期的影響に関する科学的知見を得ることにより、農薬使用時における安全な取り扱い方法を確立することを目的とする。

2. 定義

- (1) 死亡：軽い刺激に対して試験生物の反応がないこと又は付属肢等をわずかに動かす程度の活動低下をいう。
- (2) LC_{50} (Median Lethal Concentration：半数致死濃度)：暴露期間中に供試生物の50%が死亡する被験物質の濃度をいう。
- (3) 被験物質：試験に用いる農薬の原体いう。
- (4) 基準物質：試験条件の再現性等を確認するために用いる物質をいう。
- (5) 試験物質：試験に用いる被験物質及び基準物質をいう。
- (6) 止水式試験：暴露期間中試験液を交換しない方式で行う試験をいう。
- (7) 半止水式試験：一定期間ごと試験液を容器ごとに交換する方式で行う試験をいう。
- (8) 流水式試験：連続的に試験液を供給する方式で行う試験をいう。

3. 供試生物について

(1) 生物種

- ① セスジユスリカ (*Chironomus yoshimatsui*, *C. tentans* 及び *C. riparius*) が推奨されるが、他のユスリカ属 (*Chironomus sp.*) の淡水産の種を用いても良い。
- ② 供試生物は、経歴(入手源、飼育方法等)の明らかなものを用いる。
- ③ 基準物質でのLC₅₀を確認するのが望ましい。

(2) 生育段階

試験には2~3虫齢の幼生を用いる。

(3) 順化

ユスリカ幼虫は、少なくとも試験開始前24時間以上は試験と同じ環境条件(水温、照明)で順化を行う。この間に10%以上の死亡が見られた場合は試験には用いない。

4. 暴露方法

止水式、半止水式又は流水式により試験を行う。

5. 暴露期間

48時間とする。

6. 供試生物数及び試験区の設定

(1) 供試生物数

試験区ごとに少なくとも10個体の幼虫を用いる。必要に応じて容器に分割しても良い。

(2) 試験区の設定

① 試験濃度区の設定

ア 等比級数的に少なくとも5濃度区を設ける。

イ 試験濃度及び濃度公比は、予備試験の結果から定める。

ウ 濃度範囲には、供試生物のすべてが死亡する濃度と全く死亡しない濃度が少なくともそれぞれ1濃度、一部を死亡させる濃度が少なくとも2濃度含まれることが望ましい。

② 対照区の設定

ア 被験物質を含まない無処理対照区を設ける。

イ 試験原液の調製に助剤を使用した場合は、試験濃度区と同濃度の助剤を含む助剤対照区を設ける。

7. 試験液の調製について

試験液の調製方法は、以下のとおりとする。なお、試験液及び試験原液は、試験に供する直前に調製することが望ましい。

(1) 易水溶性原体の場合は、被験物質を希釈水に溶解して試験液又は試験原液を調製する。

(2) 難水溶性原体の場合は、被験物質を機械的な手法により分散して試験液又は試験原液を調製するか、有機溶剤、乳化剤、分散剤等の助剤を用いて試験原液を調製する。助剤は、供試生物に対して毒性が弱く、使用濃度で供試生物に対して有害性が認められず、かつ、被験物質の性質を変えないものを用いること。

(3) 助剤の試験液中濃度は、原則として全試験濃度区で一定とし、100mg/L (又は0.1ml/L) を超えないことが望ましい。

8. 環境条件

(1) 試験液量

幼虫 1 個体当たり 5 ml 以上とする。

(2) 水温

設定温度はセスジユスリカでは 20～25℃ とし、試験期間中の変動範囲は ± 1℃ 以内とする。他の生物種ではその生物種への最適温度で行っても良い。

(3) 照明

12～16 時間明期が望ましい。

(4) 給餌

暴露期間中は給餌を行わない。

(5) 希釈水

① 試験に用いる水は、有害物質等試験の妨げになるものを含まず、飼育に用いた水と同じ供給源のもので、ユスリカが良好に生存できる水質であることが確認されているものを用いる。

② 脱塩素水道水、天然水又は人工調製水を用いる。

③ 使用前には十分に暴気するとともに、温度調節を行う。

(6) 溶存酸素濃度

溶存酸素濃度は、暴露期間を通して飽和濃度の 60% 以上に保つようにする。

(7) pH

試験液の pH 調整は行わない。

9. 観察及び測定

(1) 供試生物の一般状態の観察

暴露開始後 24 時間後及び 48 時間後における死亡の有無について観察し記録する。

また、対照区と比較して有意な活動度の低下、体色変化及び体の萎縮等の症状が観察された場合には記録するのが望ましい。

(2) 被験物質濃度の測定

① 各試験濃度区における被験物質の濃度を少なくとも暴露開始時、暴露終了時又は換水前に測定する。

② 被験物質濃度は、暴露期間中、設定濃度の 80% 以上であることが望ましい。

(3) 環境条件の測定

① 試験に先立って希釈水の水質を確認する。

② 各試験区における試験液の水温、溶存酸素濃度及び pH を少なくとも暴露開始時、暴露終了時又は換水前に測定する。

10. 結果の処理法

(1) 各濃度における死亡率の結果から、一般的に用いられる手法を用いて LC₅₀ を算定する。

(2) 被験物質濃度の測定値が設定濃度から ± 20% 以上変動している場合は、測定濃度の平均値に基づき LC₅₀ を算定する。

11. 報告事項

(1) 試験物質について

- (2) 供試生物について
種名、経歴(入手源、飼育方法等)、基準物質のLC₅₀等
- (3) 試験方法について
暴露条件、環境条件、観察、測定項目等
- (4) 試験結果について
 - ① 有効成分濃度に基づくLC₅₀及びその95%信頼限界(可能であれば各観察時間のもの)
 - ② LC₅₀の算定方法
 - ③ 各観察時間における各試験区での累積死亡率
 - ④ 暴露終了時における濃度－死亡率曲線のグラフ
 - ⑤ 観察された影響
 - ⑥ 被験物質濃度の測定値
 - ⑦ 環境条件の測定結果
水質、溶存酸素濃度、pH等
 - ⑧ その他の事項
試験液の状態、試験結果に影響を及ぼした可能性のある事項(本試験法からの逸脱等の内容及びそれが試験結果に影響を及ぼした可能性)等

12. 試験の妥当性

- (1) 暴露終了時において対照区の累積死亡率が10%を超えてはならない。
- (2) 溶存酸素濃度は暴露期間中、飽和濃度の60%以上でなければならない。

藻類生長阻害試験(2-7-7)

1. 目的

本試験は、藻類の生長に対する被験物質の影響に関する科学的知見を得ることにより、農薬使用時における安全な取扱方法を確認することを目的とする。

2. 定義

- (1) 生物量(Biomass)：単位体積当たりの生物の乾燥重量をいう。ただし、細胞濃度などの生物量の代替となるパラメータをいうこともある。
- (2) 生長速度：生物量の自然対数の単位時間(日)当たりの増加分をいう。
- (3) EC₅₀(Median Effect Concentration：半数生長阻害濃度)：対照区と比べて供試生物の生長が50%阻害される被験物質の濃度をいう。
- (4) NOEC(No Observed Effect Concentration：最大無影響濃度)：対照区と比べて影響が認められない試験最高濃度をいう。
- (5) 被験物質：試験に用いる農薬の原体又は製剤をいう。
- (6) 基準物質：試験条件の再現性等を確認するために用いる物質をいう。
- (7) 試験物質：試験に用いる被験物質及び基準物質をいう。

3. 供試生物

(1) 生物種

- ① *Pseudokirchneriella subcapitata* (旧学名：*Selenastrum capricornutum*) を用いることが

望ましい。ただし、培養及び試験に都合がよく、試験の妥当性を満たす場合は、下記に掲げる種その他の種及び株を用いてもよい。

ア *Pseudokirchneriella subcapitata* (ATCC 22662株)

イ *Desmodesmus subspicatus* (旧学名：*Scenedesmus subspicatus*) (86.81 SAG株)

② 基準物質でのEC₅₀を確認することが望ましい。

(2) 培養方法

供試藻類は、試験条件に近い培養条件で前培養を行い、対数増殖期にあるものを用いる。原則として培養は、無菌条件下で行う。

(3) 初期生物量

初期生物量は0.5mg/Lを超えないものとし、*Pseudokirchneriella subcapitata* の推奨株を用いる場合、試験培地の初期細胞濃度は、 $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ cells/mlが適当である。

4. 暴露方法

被験物質を含む培地で処理する方式を用い、振とう培養を行う。

5. 暴露期間

原則として72時間とする。

6. 試験区の設定

(1) 試験濃度区の設定

① 等比級数的に少なくとも5濃度区を設ける。

② 試験濃度及び濃度公比は、予備試験の結果から定める。公比は3.2を超えないことが望ましい。

③ 濃度範囲には、供試藻類の生長が75%以上阻害される濃度と全く阻害されない濃度を少なくともそれぞれ1濃度ずつ、藻類の生長が一部阻害される濃度が少なくとも2濃度含まれることが望ましい。

(2) 対照区の設定

① 対照区として、被験物質を含まない無処理対照区を設ける。

② 試験培地の調製に助剤を使用した場合は、試験濃度区と同濃度の助剤を含む助剤対照区を設ける。

(3) 試験区の連数

各試験濃度区は3連以上とし、対照区（助剤を使用した場合は、助剤対照区）については試験濃度区の2倍の連数が望ましい。

7. 試験培地の調製方法

試験培地の調製方法は、以下のとおりとする。なお、試験培地は、試験に供する直前に調製することが望ましい。

(1) 原体を被験物質として用いる場合

① 易水溶性原体の場合は、適切な方法で滅菌した培地に被験物質を溶解して、試験原液を調製する。試験培地は、試験原液を滅菌した培地で希釈した後、これに藻類懸濁液を加えて調製する。

② 難水溶性原体の場合は、以下のいずれかの方法により試験培地を調製する。

ア 被験物質を有機溶剤等の助剤に溶かした試験原液を用いて試験培地を調製する。この場合、助剤は、試験生物に対して毒性が弱く使用濃度で供試生物に対して有害性が認められず、かつ、被験物質の性質を変えないものを用いる。

助剤の試験液中濃度は、原則として全試験濃度区で一定とし、100mg/L（又は0.1ml/L）を超えないことが望ましい。

イ 各濃度ごとに必要量の被験物質を無菌操作により滅菌培地に加え、攪拌、超音波処理等を行い、これに藻類懸濁液を加え、試験培地を調製する。

(2) 製剤を被験物質として用いる場合

製剤を滅菌培地に加え攪拌し、試験原液とする。試験培地は、試験原液を滅菌した培地で希釈した後、藻類懸濁液を加えて調製する。なお、製剤の試験では助剤は用いない。

8. 環境条件

(1) 培養方法

① 無菌培養とする。

② 暴露期間中は試験培地を懸濁状態に保つとともに、通気を促進するため、試験容器を振とう又は攪拌する。

(2) 培養温度

設定温度は21～24℃とし、暴露期間中の変動範囲は±2℃以内とする。

(3) 照明

連続的に均一照射することとし、*Pseudokirchneriella subcapitata* の推奨株を用いる場合、液面付近で波長400～700nmの測定範囲で60～120 μE/m²/s（4440～8880lux）程度の照度が望ましい。

(4) 培地

① 培地の種類

OECD培地（OECDテストガイドライン201 Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test(2006)）又はAAP(AGP) 培地(U. S. EPA:Alga Assay Procedure: Bottle Test, National Environmental Research Center, Corvallis, Oregon(1971))を用いることが望ましい。

② 培地の量

1容器当たりの培地の量は、生物量の測定法及び被験物質濃度の測定法により異なるが、100ml程度が望ましい。

9. 観察及び測定

(1) 生物量の測定

個々の試験容器中の生物量は、暴露開始後24時間間隔で暴露終了時まで測定する。また、外見の異常が見られた場合には記録する。

(2) 被験物質濃度の測定

① 原体を被験物質として用いた場合には、各試験濃度区ごとに被験物質の濃度を少なくとも暴露開始時及び終了時に測定する。

② 被験物質濃度区ごとに各容器から試験液を等量採取して混合し、測定用試料に供する。繰り返し間に差がないと予想される場合には、1容器から採取してもよい。繰り返し間に差がないと予想される場合として、試験開始時に同じ調製液から分配している場合、試験終了時に藻類濃度（阻害率）がほぼ同じ場合が該当する。なお、繰り返し間で藻類濃度（阻害率）が著しく異なる場合は、容器毎に測定する。また、分析上必要がある場合、分析のために別の容器の試験液を用いてもよい。この場合、試験液と全く同じ条件で処理する。

(3) 環境条件の測定

① 各試験区（試験濃度区、対照区）について、試験培地の水温及びpHを測定する。

- ② 測定は、少なくとも暴露開始時及び終了時に行う。

10. 結果の処理法

(1) 濃度－阻害率の算出法

試験濃度区と対照区の生物量を測定時間と被験物質の濃度とともに表にする。それぞれの試験濃度区と対照区の生物量の平均値を時間に対してプロットし生長曲線を描く。速度法を用いて各濃度での生長阻害率を計算する。

(2) EC₅₀の算定

各濃度における生長阻害率の結果から、一般的に用いられる手法を用いてEC₅₀を算定する。

(3) 被験物質濃度の測定値が設定濃度から±20%以上変動している場合は、測定濃度の平均値に基づきEC₅₀を算定する。

11. 回復試験の実施について

必要に応じて、生長阻害が認められた培養液を希釈してさらに培養し、藻類の細胞濃度がどの程度回復するかを明らかにするための回復試験を行う。

12. 報告事項

(1) 試験物質について

(2) 供試生物について

種名、株名、入手源、基準物質のEC₅₀等

(3) 試験方法について

暴露条件、環境条件、観察及び測定項目等

(4) 試験結果について

① EC₅₀（原体を被験物質として用いた場合は、有効成分濃度に基づくEC₅₀）及びその95%信頼限界

② EC₅₀の算定方法

③ NOEC（原体を被験物質として用いた場合は、有効成分濃度に基づくNOEC。

6. (1)②で設定した試験濃度区からNOECの値が求められた場合のみ。)

④ 各観察時間における各試験区の生物量（細胞濃度等）及びその平均値

⑤ 生物量の測定方法

⑥ 生長曲線

⑦ 濃度－生長阻害率の関係を示すグラフ

⑧ 観察された影響

⑨ 被験物質濃度の測定値(原体を被験物質として用いた場合のみ)

⑩ 環境条件の測定結果

水質、pH等

⑪ その他の事項

試験液の状態、試験結果に影響を及ぼした可能性のある事項（本試験法からの逸脱等の内容及びそれが試験結果に影響を及ぼした可能性）等

13. 試験の妥当性

(1) 対照区の生物量は、試験開始72時間後において、試験開始時における生物量の16倍以上に増加していなければならない。

(2) 対照区において、各繰り返し毎に各日（0～1日、1～2日、2～3日）について

求めた生長速度の変動係数を算出する。これらの変動係数の平均値が35%を超えてはならない。

- (3) 対照区において、各繰り返し毎に試験期間中（0～3日）の平均生長速度を求め、その変動係数が7%を超えてはならない。

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)

1. 目的

本試験は、ミツバチに対する被験物質の影響に関する科学的知見を得ることにより、農薬使用時における安全な取扱方法を確立することを目的とする。

2. 試験方法

- (1) 急性毒性試験(急性経口毒性試験又は接触毒性試験)を実施する。なお、科学的に妥当であれば、他の試験方法により実施しても差し支えない。
- (2) 急性毒性試験の結果強い毒性が認められる場合には、ほ場での影響試験を実施する。

蚕影響試験(2-8-2)

1. 目的

本試験は、蚕に対する被験物質の影響に関する科学的知見を得ることにより、農薬使用時における安全な取扱方法を確立することを目的とする。

2. 試験方法

- (1) 急性経口投与試験を実施する。なお、科学的に妥当であれば、他の試験方法により実施しても差し支えない。
- (2) 急性経口投与試験の結果、強い毒性が認められる場合には、残毒試験を実施する。

天敵昆虫等影響試験(2-8-3)

1. 目的

本試験は、天敵等標的外昆虫に対する被験物質の影響に関する科学的知見を得ることにより、農薬使用時における安全な取扱方法を確立することを目的とする。

2. 試験方法

- (1) 急性毒性試験を実施する。科学的に妥当であれば、他の試験方法を用いても差し支えない。
- (2) 急性毒性試験の結果、強い毒性が認められる場合には、ほ場での試験を実施する。

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)

1. 目的

本試験は、被験物質を単回経口投与した場合の鳥類への毒性影響に関する科学的知見を得ることにより、農薬使用時における安全な取扱方法を確立することを目的とする。

2. 試験方法

- (1) 特に規定しない。科学的に妥当な方法で実施すること。
- (2) 試験方法としては、米国EPA 712-C-96-139 April 1996 Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.2100 Avian Acute Oral Toxicity Test “Public Draft” 等がある。

鳥類混餌投与試験(2-8-4-2)

1. 目的

本試験は、より現実的な暴露経路として、被験物質を混餌投与した場合の鳥類への毒性影響に関する科学的知見を得ることにより、農薬使用時における安全な取扱方法を確立することを目的とする。

2. 試験方法

- (1) 特に規定しない。科学的に妥当な方法で実施すること。
- (2) 試験方法としては、OECDテストガイドライン205 Avian Dietary Toxicity Test、1984等がある。

有効成分の性状、安定性、分解性等に関する試験(2-9-1~17)

1. 目的

本試験は、農薬の有効成分等の性状、安定性、分解性等農薬の安全性評価に当たって必要不可欠な基礎的科学的知見を得ることを目的とする。

2. 試験の具体的内容等

本試験は、次に掲げる試験(2-9-1~16)により構成するものとする。

(1) 色調に関する試験(2-9-1)

① 試験方法

常温常圧で目視により測定する。

② 報告事項

色調(「白色」、「淡黄色」、「褐色」等により記載する。)

(2) 形状に関する試験(2-9-2)

① 試験方法

常温常圧で目視により測定する。

② 報告事項

形状(「固体(結晶)」、「固体(粉末)」、「液体」、「気体」等により記載する。)

(3) 臭気に関する試験(2-9-3)

① 試験方法

常温常圧で官能検査により測定する。

② 報告事項

臭気(「刺激臭」、「芳香臭」等により記載する。)

(4) スペクトルに関する試験(2-9-4)

① 試験方法

ア 紫外可視吸収(UV/VIS)スペクトルは、OECDテストガイドライン101(1981年5月12日採択)に準じて測定する。

イ 赤外吸収(IR)スペクトル、核磁気共鳴(NMR)スペクトル(^1H 及び ^{13}C 等)、質量スペクトル(MS)は、いずれも測定用機器を使用して測定する。

② 報告事項

測定条件及びチャート。なお、UV/VISは吸収波長(nm)、モル吸光係数及びIRは吸収波数(cm^{-1})、NMRはppm、MSはM/Zの測定数値をそれぞれ記載する。NMR及びMSについては、各ピークを構造式を用いて可能な限り帰属を明らかにする。

(5) 融点に関する試験(2-9-5)

① 試験方法

OECDテストガイドライン102(1995年7月27日採択)に準じて測定する。

② 報告事項

融点(摂氏単位)

(6) 沸点に関する試験(2-9-6)

① 試験方法

OECDテストガイドライン103(1995年7月27日採択)に準じて測定する。

なお、常圧で沸騰しない場合には、減圧条件下で測定する。

- ② 報告事項
沸点（摂氏単位）。なお、測定中に分解がみられる場合には、その旨も記載。
- (7) 蒸気圧に関する試験（2-9-7）
 - ① 試験方法
OECDテストガイドライン104（1995年7月27日採択）に準じて測定する。
 - ② 報告事項
 - ア 蒸気圧（Pa単位）
 - イ 試験温度（摂氏単位）
- (8) 水に対する溶解度に関する試験（2-9-8）
 - ① 試験方法
OECDテストガイドライン105（1995年7月27日採択）に準じて測定する。
 - ② 報告事項
 - ア 水に対する溶解度（mg/l又はg/l単位）
 - イ 試験温度（摂氏単位）
- (9) 有機溶媒に対する溶解度に関する試験（2-9-9）
 - ① 試験方法
 - ア OECDテストガイドライン105（1995年7月27日採択）に準じて測定する。
 - イ 有機溶媒は、非極性炭化水素としてヘキサン、ヘプタン等、芳香族炭化水素としてキシレン、トルエン等、ハロゲン化炭化水素としてジクロロメタン等、ケトンとしてアセトン等、アルコールとしてメタノール、エタノール等、エステルとして酢酸エチル等を用いる。
 - ② 報告事項
 - ア 有機溶媒に対する溶解度（mg/l又はg/l単位）
 - イ 試験温度（摂氏単位）
- (10) 土壌吸着性に関する試験（2-9-10）
 - ① 試験方法
OECDテストガイドライン106（2000年1月21日採択）に準じて測定する。ただし、供試土壌は、原則として当該テストガイドラインに示されている7つの土壌タイプのうち、タイプ2、3、4及び5ごとにそれぞれ1種類以上とし、少なくとも1種類は火山灰土壌を含める。なお、平衡化温度は25℃で測定する。
 - ② 報告事項
 - ア 土壌吸着係数（ K_{F}^{ads} 及び K_{oc}^{ads} 単位）
 - イ 試験温度（摂氏単位）
- (11) オクタノール／水分配係数に関する試験（2-9-11）
 - ① 試験方法
OECDテストガイドライン107（1995年7月27日採択）又は117（1989年3月30日採択）に準じて測定する。なお、測定温度は25℃とする。
 - ② 報告事項
 - ア オクタノール／水分配係数（log₁₀値）
 - イ 試験温度（摂氏単位）
- (12) 密度に関する試験（2-9-12）
 - ① 試験方法
OECDテストガイドライン109（1995年7月27日採択）に準じて測定する。
 - ② 報告事項
 - ア 密度（g/cm³単位）

- イ 試験温度（摂氏単位）
- (13) 加水分解性に関する試験（2-9-13）
 - ① 試験方法
 - OECDテストガイドライン111（1981年5月12日採択）に準じて測定する。
 - ② 報告
 - ア pHごとの推定半減期
 - イ 試験温度（摂氏単位）
- (14) 解離定数に関する試験（2-9-14）
 - ① 試験方法
 - OECDテストガイドライン112（1981年5月12日採択）に準じて測定する。
 - ② 報告事項
 - ア 解離定数（pKa単位）
 - イ 試験温度（摂氏単位）
- (15) 熱に対する安定性に関する試験（2-9-15）
 - ① 試験方法
 - OECDテストガイドライン113（1981年5月12日採択。加速貯蔵試験法を除く。）に準じて測定する。
 - ② 報告事項
 - 加熱による変質の有無、変質の生じた温度等（摂氏単位）
- (16) 水中光分解性に関する試験（2-9-16）
 - ① 試験方法
 - 滅菌した蒸留水に被験物質を加え、水溶解度以下で、かつ、分析可能な範囲内で希薄溶液を作成し、人工光源（自然光に近い波長分布と光強度をもつもの。）を用いて、被験物質の水中での光分解速度（推定半減期）を求める。この場合、試験は、水温25℃で実施し、容器は石英ガラス製とし、対照試験として光を照射しない試験を併せて行う。
 - ② 報告内容等
 - ア 推定半減期
 - イ 試験温度（摂氏単位）、光強度（ w/m^2 単位）及び測定波長域（nm単位）
- (17) 生物濃縮性試験（魚類濃縮性試験）（2-9-17）
 - ① 定義
 - ア. 生物濃縮：生物中又はその体表面又は特定組織の被験物質濃度が、環境中媒体中のそれに比して増大することをいう。
 - イ. 濃縮倍率：取込期間のある任意の時間の農薬の魚体中濃度と水中濃度の比をいう。
 - ウ. 定常状態：48時間以上の間隔で連続した3回の測定における濃縮倍率の変動が20%以内になった状態をいう。
 - エ. 取込期間：試験魚が被験物質に暴露されている期間をいう。
 - オ. 排泄期間：被験物質を含む試験液からこれを含まない試験液に魚を移した後に、魚体又は特定の組織から被験物質が排泄される程度を調べる期間をいう。
 - カ. 被験物質：試験に用いる農薬の原体をいう。
 - キ. 試験物質：試験に用いる被験物質及び基準物質をいう。
 - ク. 流水式試験：連続的に試験液を供給する方式で行う試験をいう。
 - ケ. 半止水式試験：一定期間ごと試験液を容器ごとに交換する方式で行う試験をいう。

② 試験生物

ア. 生物種

試験魚は、別表の魚種の中から選択する。

イ. 順化

(ア) 供試魚は、試験に供する 14 日前までには入手し、維持しなければならない。

(イ) 必要に応じて、入手時に薬浴を行う。

(ウ) 供試魚は、試験に供する前の少なくとも 14 日間は、試験時における環境条件（水質等）と同様の条件下で順化しなければならない。

(エ) 餌は少なくとも週に 5 回与える。

(オ) 以下に掲げる基準により順化を行い、死亡率を記録する。

a. 順化開始後 2 日間の安定期間に続く 7 日間の死亡率が群の個体数の 10 % を超えた場合には、当該群は廃棄する。

b. 群の死亡率が 5 ~ 10 % の場合、さらに 7 日間順化を継続し、群の死亡率が 5 % 以上の場合は、当該群を廃棄するか、死亡率が 5 % 未満になるまで順化を継続する。

c. 群の死亡率が 5 % 未満の場合において当該群の魚類を試験に供するものとする。

③ 暴露方法

原則として流水式により試験を行う。ただし、流水式が不可能な場合（試験生物に有害な影響を与える場合）には、半止水式を使用してもよい。

④ 試験期間

ア. 試験期間は取込期間と排泄期間（濃縮倍率を BCF_k で求める場合等）を設ける。

イ. 取込期間は、28 日間又は定常状態に達するまでとする。もし、28 日間で定常状態に達しない場合は期間を延長し、定常状態に達するまで、或いは 60 日間とし、いずれか短い方を採用する。

ウ. 排泄期間は、定常状態における魚体中の被験物質濃度の 95% 以上排泄されるまでの期間とする。

⑤ 試験区の設定

ア. 試験濃度区の設定

(ア) 少なくとも 2 濃度区を設ける。

(イ) 試験濃度は、急性毒性試験等の LC₅₀ の 1/100 以下を最高濃度の目安とし、用いる分析法において分析が可能な限り低い 2 濃度区を設定する。

(ウ) 原則として低濃度区は高濃度区の 1/10 の濃度とする。ただし、低濃度区が、分析の検出限界から判断して測定不可能であれば、濃度比を 1/10 より大きくしてもよい。

(エ) 設定する濃度が、検出限界から判断して測定不能であれば、放射性同位元素で標識した被験物質を使用してもよい。

(オ) 試験濃度は、被験物質の水溶解度を上まわらないことが望ましい。

イ. 対照区

(ア) 対照として、被験物質を含まない無処理対照区を設ける。

(イ) 試験液の調製に助剤を使用した場合は、使用最高濃度の助剤を含む助剤対照区を設ける。魚への影響がないことが明らかな助剤を使用した場合は無処理対照区または助剤対照区のどちらかを設ける。

⑥ 試験液の調製

ア. 易水溶性原体の場合は、希釈水に溶解して試験原液とする。

イ. 難水溶性原体の場合は、機械的な分散によるか、有機溶剤、乳化剤、分散剤等の助剤を用いて試験原液を調製する。用いる助剤は、試験生物に対して毒性が弱く、使用濃度で試験生物に対して有害性が認められず、かつ被験物質の性質を変えないものを用いる。助剤の試験液中濃度は 100mg/L (又は 0.1ml/L) を超えないことが望ましい。

⑦ 環境条件

ア. 収容密度

流水式では、魚体重 1 g 当たり 1 L ~ 10L 以上の試験液量が 1 日に交換される必要がある。

イ. 水温

推奨魚種の設定温度は別表のとおりとし、変動範囲は $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 以内とする。

ウ. 照明

12 ~ 16 時間明期とする。

エ. 給餌

毎日給餌を行う。1 日に体重の 1 ~ 2 % 程度与える。

給餌後食べ残しの餌料及び排泄物を除く。

オ. 希釈水

試験に用いる水は有害物質や試験の妨げになるものを含まず、飼育に用いた水と同じ供給源のもので、魚が良好に生存、成長ができる水質であることが確認されているものを用いる。脱塩素水道水あるいは天然水を用いる。使用前には十分に暴気し、温度調節を行う。

カ. 溶存酸素濃度

試験期間を通して溶存酸素濃度は、飽和濃度の 60 % 以上を保つようにする。

必要に応じてゆるやかな暴気を行う。

キ. pH

試験液の pH 調整は行わない。

⑧ 観察及び測定

ア. 魚の生死及び症状

暴露開始後、24 時間毎に観察し、記録する。

死亡魚が見られた場合は速かに取り除く。また、観察された異常は記録する。

イ. 魚体中の被験物質濃度

取込期間中に少なくとも 5 回、排泄期間中に少なくとも 4 回測定する。

1 回の分析に 4 尾以上使用する。分析は原則として個体別に行う。

ウ. 魚体中の脂質含量

魚体中の被験物質濃度測定時に魚体中の脂質含量を測定することが望ましい。

エ. 試験水中の被験物質濃度

暴露開始前及び暴露開始当日、並びに取込期間中に少なくとも 5 回測定する。

取込期間中は、魚体中の被験物質の分析と同時期に行う。

取込期間中、被験物質濃度の変動は、測定値の平均の $\pm 20\%$ 以内であることが望ましい。

オ. 水質

試験に先立って希釈水の一般的な水質項目について測定する。

試験液については、水温、溶存酸素濃度及び pH を全ての試験区について測定する。

⑨ 結果の処理法

魚体中及び試験水中の被験物質濃度の測定結果から、濃縮倍率を算定する。

⑩ 報告事項

ア. 試験物質について

一般名、化学名、構造式、純度、ロット番号、水溶解度、Pow(n-オクタール/水分配係数)等。

また、放射性同位元素を使用した場合は、標識位置及びその根拠、放射化学的純度、比放射能等。

イ. 試験魚について

種名、供給源、飼育方法、順化、供試魚数、供試魚の全長・体重等

ウ. 試験方法について

暴露条件、環境条件、観察及び測定項目等。

エ. 試験結果について

(ア) 濃縮倍率 (BCF_{ss} 又は BCF_k) 及び算定方法。

(イ) 取込速度定数及び排泄速度定数。

(ウ) 供試魚の死亡及び異常な症状及び反応。

(エ) 魚体内の脂質含量の測定値。

(オ) 試験水中の被験物質濃度の測定値。

(カ) 魚体内の被験物質濃度の測定値。

(キ) 水質の測定値。

(ク) 放射性同位元素で標識した被験物質を使用した場合、総放射能の BCF が 1000 を超える場合には、総放射能の 10 % 以上の代謝物については、濃縮性を表示することが望ましい。

(ケ) その他、試験液の状態等、試験結果に影響を及ぼした可能性のある事項 (本試験法からの逸脱等の内容及びそれが試験結果に影響を及ぼした可能性) 等。

⑪ 試験の妥当性

ア. 水温の変動範囲は ± 2 °C 以内でなければならない。

イ. 試験終了時において対照区及び試験区の死亡率又は病気などの異常の発生率が 10 % を超えてはならない。試験が数週あるいは数ヶ月延長になった場合には、死亡又は異常は、対照区及び試験区で 1 ヶ月間で 5 % 未満かつ全期間で 30 % を超えてはならない。

ウ. 溶存酸素濃度は試験期間中、飽和濃度の 60 % 以上でなければならない。

エ. 水槽中の被験物質濃度の変動は測定値の平均の ±20 % 以内でなければならない。

別表 試験生物種の条件及び設定温度

魚種	設定温度 (°C)	試験魚の全長 (cm)
コイ (<i>Cyprinus carpio</i>)	20 ~ 25	8.0 ± 4.0
メダカ (ヒメダカ) (<i>Oryzias latipes</i>)	20 ~ 25	3.0 ± 2.0
ブルーギル (<i>Lepomis macrochirus</i>)	20 ~ 25	5.0 ± 2.0
ニシマス (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	13 ~ 17	8.0 ± 4.0
グッピー (<i>Poecilia reticulata</i>)	20 ~ 25	3.0 ± 1.0
ゼブラフィッシュ (<i>Danio rerio</i>)	20 ~ 25	3.0 ± 0.5
フアットハットミノ (<i>Pimephales promelas</i>)	20 ~ 25	5.0 ± 2.0

環境中予測濃度算定に関する試験（2-10-1～6）

水質汚濁性試験（2-10-1）

1. 目的

本試験は、水質汚濁予測濃度を算出するため、水田に施用される農薬の水田水の水質における汚濁に関する科学的知見を得ることを目的とする。

2. 試験区（試験水田）の設定

下記により、試験区として被験物質処理区及び無処理区を設定する。

（1）試験区（試験水田）の設置方法

- ① 原則として 1 m^2 （ $1\text{ m} \times 1\text{ m}$ ）以上のコンクリート製の容器等とし、浸透水量の調節ができるものとする。
- ② 充てん土壌は、灰色低地土、グライ土、多湿黒ボク土、褐色低地土等からなる水田土壌で、原則として風乾しない状態で砕き、小石及び粗大有機物等を選別除去してからよく混合した後、十分に脱気しながら土層の深さが50 cm程度となるように湿式充てんしたものとする。
- ③ ほ場における気象その他の環境条件が十分に反映されるように設置する。
- ④ 降雨による水田水量の急激な上昇等を避けるため、屋根を設け雨水が入らないようにすることが望ましい。この場合には、大気の流れを妨げないよう留意するとともに、屋根の素材は光線透過率の良好なものを使用する。

（2）試験区（試験水田）の管理

- ① 試験期間を通じて1日当たりの降下浸透は1～2 cm程度とし、水深5 cm程度の湛水状態を保つ。落水や掛け流しは避けるものとする。
- ② 使用する水は、被験物質の分解、分析等に影響を及ぼすおそれのある物質を含まないものとする。

（3）試験区の栽培農作物

試験区で栽培する農作物は、登録申請に係る適用農作物とし、原則として慣行の方法により栽培する。

3. 被験物質の取扱い及び施用

- （1）被験物質は、調製後、速やかに施用する。
- （2）被験物質は、適切な管理条件下で保管するものとし、開封後、長期間保管する場合には、保管中の安定性を確認する。
- （3）被験物質は、登録申請に係る剤型、使用方法（時期、量等）等に基づき、通常用いられる器具を用いて、適切に1回施用する。
ただし、試験水田において当該器具を使用することが困難な場合には、他の同等な方法で代替することができるものとする。
- （4）雨天時又は被験物質の施用後に降雨が予想される場合には、施用は行わない。
ただし、屋根を設置している等降雨の影響がない場合は、この限りでない。

4. 試料（水田水）の採取

（1）採取方法

- ① 粗大有機物や土壌粒子が極力混入しないよう注射器等を用いて必要量をガラス瓶等に採取し、十分に混和する。
- ④ 1回の採取において4か所以上（原則として、水深2～3cm）の異なる地点から採取する。

（2）採取時期及び回数

- ① 原則として、被験物質の施用直前、直後（施用後1～3時間）、1日後、3日後、7日後及び14日後にそれぞれ1回行う。
- ② 施用後14日以降も水田水から分析対象物質が検出される可能性のある場合には、検出濃度がその最高値の10分の1以下になるまで採取を続ける。
- ③ 被験物質の登録申請に係る使用方法に止水期間が設けられている場合には、止水期間終了日にも採取する。

5. 試料の取扱い

（1）試料の輸送

- ① 試料の輸送に当たっては、試料が変質又は汚染しないよう十分留意するとともに、凍結しない程度の低温条件で速やかに輸送する。
- ② 輸送に当たっては、試料の取り違い等を防止するため、識別票を添付する等により適切に取り扱うものとする。

（2）輸送試料の取扱い

試料は、受領後ただちに識別票等により現物の確認を行った後、他の試料との混同がないよう適切に取り扱い、速やかに分析に供するものとする。

6. 試料の分析

（1）分析対象物質

被験物質に係る農薬の有効成分及び当該有効成分が生物的又は化学的に変化して生成した物質とする。ただし、水中における検出量がきわめて微量であること、その毒性がきわめて弱いこと等により有害でないと認められるものは除く。

（2）分析方法

- ① 分析対象物質を正確に分析できる方法を採用する。
- ② 分析対象物質の残留量はmg / l で表す。
- ③ 分析は、各試料ごとに少なくとも2回行い、これらの平均値を測定値とする。
- ④ 分析法の精度は、分析対象物質の検出が見込まれる濃度範囲での変動係数により確認する。
- ⑤ 分析法の感度は、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である定量限界で表すこととし、試験の目的に則した感度とする。
- ⑥ 分析法の回収率は、定量限界及び分析対象物質の検出が見込まれる濃度範囲で、無処理区から採取した試料に既知量の分析対象物質を添加した試料を用いて確認する。
- ⑦ 試料は、原則として、採取後速やかに分析に供することとするが、やむを得ず試料を一時保管しなければならない場合には、適切な管理条件下に保管し、保管期間中は、分析対象物質の安定性を確認するため保存安定性試験を実施する。
- ⑧ 保存安定性試験は、無処理区から採取した試料に既知量の分析対象物質を添加し、分析試料と同一条件で同一期間以上保管した試料を分析する方法により行う。

7. 報告事項

- (1) 試験成績作成機関（ほ場試験実施場所及び分析実施場所）
- (2) 被験物質
- (3) 試験条件
- (4) 分析方法（概要及び詳細）
- (5) 分析対象毎の定量限界及び回収率
- (6) 試料調製に係る明細
- (7) 分析結果（各試料採取時点の分析値）
- (8) 推定半減期及び算出方法

模擬水田を用いた水田水中農薬濃度測定試験(2-10-2)

1. 目的

本試験は、水産動植物被害予測濃度を算出するため、模擬水田を用いて、水田に使用された農薬の水田水中での消長に関する科学的知見を得ることを目的とする。

2. 試験区(試験水田)の設定

水質汚濁性試験に準ずる。

3. 披験物質の取り扱い及び施用

水質汚濁性試験に準ずる。

4. 試料(水田水)の採取

(1) 採取方法

水質汚濁性試験に準ずる。

(2) 採取時期及び回数

- ① 採取は、被験物質の施用直前、直後(施用後1～3時間)及び評価期間(14日間)の間できるだけ短い日数間隔で行う。
- ② 各採取日における採取は同一時間帯に行う。
- ③ 被験物質の登録申請に係る使用方法に止水期間が設けられている場合には、止水期間終了日にも採取する。

5. 試料の取り扱い

水質汚濁性試験に準ずる。

6. 試料の分析

(1) 分析対象物質

水産動植物に対する毒性試験において評価の対象となる物質とする。

(2) 分析方法

水質汚濁性試験に準ずる。

7. 報告事項

水質汚濁性試験に準ずる。

実水田を用いた水田水中農薬濃度測定試験(2-10-3)

1. 目的

本試験は、環境中予測濃度を算出するため、実水田を用いて、水田に使用された農薬の水田水中での消長に関する科学的知見を得ることを目的とする。

2. 試験区(試験水田)の設定

(1) 試験水田

十分な面積（5～30a）を有する漏水が少ない管理水田において実施する。

（2）試験水田の管理

- ① 試験水田の用水は、被験物質の分解、分析等に著しい影響を及ぼすおそれのある物質を含まないものとする。
- ② 試験水田で栽培する農作物は、登録申請に係る適用農作物とし、原則として慣行の方法により栽培する。
- ③ 試験水田では、農薬処理後においては止水条件とし、平均水深を一定（5cm程度）に保つよう注水管理に配慮する。
- ④ 供試農薬以外の農薬を使用する場合には分析妨害にならないことが明らかな農薬とする。

3. 被験物質の取扱い及び施用

（1）被験物質は、調製後、速やかに施用する。

（2）被験物質は、適切な管理条件下で保管するものとし、開封後、長期間保管する場合には、保管中の安定性を確認する。

（3）被験物質は、登録申請に係る剤型、使用方法（時期、量等）等に基づき、通常用いられる器具を用いて、適切に1回施用する。ただし、試験水田において当該器具を使用することが困難な場合には、他の同等な方法で代替することができるものとする。

（4）雨天時又は被験物質の施用後に降雨が予想される場合には、施用は行わない。

4. 試料（水田水）の採取

（1）採取方法

- ① 粗大有機物や土壌粒子が極力混入しないようステンレス又はガラス製のひしゃく若しくは注射器等を用いて必要量をガラス瓶等に採取し、十分に混和する。
- ② 採取は、採取位置の偏りがないようにできるだけ多くの地点（1回の採取において10aにつき10か所以上）を選び、概ね等量ずつ採取し、よく混合する。

（2）採取時期及び回数

水質汚濁予測濃度を算出するために試験を実施する場合には、水質汚濁性試験に準じ、水産動植物被害予測濃度を算出するために試験を実施する場合には、模擬水田を用いた水田水中農薬濃度測定試験に準ずる。

5. 試料の取扱い

水質汚濁性試験に準ずる。

6. 試料の分析

水質汚濁予測濃度を算出するために試験を実施する場合には、水質汚濁性試験に準じ、水産動植物被害予測濃度を算出するために試験を実施する場合には、模擬水田を用いた水田水中農薬濃度測定試験に準ずる。

7. その他の調査項目

試験期間中の気象（天候、気温、降水量、可能なら蒸発量）、水温、pH及び水深を調査する。また、試験水田からのオーバーフローの有無等についても観察する。

8. 報告事項

水質汚濁性試験に準ずる。

模擬圃場を用いた地表流出試験(2-10-4)

1. 目的

本試験は、環境中予測濃度を算定するため、模擬圃場を用いて水田以外に使用された農薬の地表流出に関する科学的知見を得ることを目的とする。

2. 試験装置等

本試験には、人工降雨装置、土壌を充填するコンテナ及び表流水採取装置を用い、それぞれ以下の要件を満たすものを使用する。

(1) 人工降雨装置

土壌表面からの高さが2 m以上確保でき、かつ小規模圃場全体に均一に任意の降水量の人工降雨が正確に行える装置を用いる。

(2) コンテナ

面積0.7 m²以上、正方形又は長方形、土壌充填後の土壌厚が20 cm確保できる大型容器とし、浸透水を土壌底面から排水できる構造を有するものを用いる。容器は人工降雨装置下で傾斜角5度で設置する。

(3) 表流水採取装置

土壌を充填した小規模圃場の一辺に設置する表流水採取装置は、人工降水の直接混入を防止し、表流水を確実に捕集できる構造であること。

3. 試験区(模擬圃場)

(1) 供試土壌

供試土壌は、黒ボクに相当する農耕地土壌を用いる。

(2) 土壌の充填

供試土壌は、壁面浸透流出が生じないように適切な密度で充填し、容器最上面よりも約5 cm高くなるように充填する。次に自然または人工降雨に曝して、雨水を土壌底面まで浸透させたのち、土壌表層が乾燥するまで風乾する。なお、この段階で土壌表層面が容器最上面より下回った場合には、土壌を補充して約5 cm高くなるようにする。次に、壁面から2～3 cm内側の表層土壌を深さ約15 cmまで十分に耕起する。

(3) 土壌水分計の設置

土壌容器には、深さ約15 cmの土壌水分が測定できるよう、土壌水分計を設置しておく。

(4) 作物栽培

作物は栽培しないものとする。

(5) 反復

3反復とする。

4. 表流水の発生状態の確認

農薬処理前に各区に30mm/hrの人工降雨を何回か行い、土壌水分がpF1.8～2.0の状態か

ら土壤面積 1 m²あたり 1.5L の表流水を得るまでの時間が 30～120 分の範囲にあり、かつその時間の区間差が 30% 以内となることを確認する。その際得られた任意の表流水試料を添加回収及び保存安定性試験用試料（無処理区の試料）とする。

5. 被験物質の取扱い及び施用

- (1) 被験物質は、調製後、速やかに施用する。
- (2) 被験物質は、適切な管理条件下で保管するものとし、開封後、長期間保管する場合には、保管中の安定性を確認する。
- (3) 被験物質は、登録申請に係る剤型、使用方法（時期、量等）等に基づき、通常用いられる器具を用いて、適切に 1 回施用する。ただし、試験区において当該器具を使用することが困難な場合には、他の同等な方法で代替することができるものとする。
- (4) 農薬処理は pF 2.0～2.2 の範囲にある状態で行うものとし、処理直前に試験区を充分耕起し表面を整地し、採取装置が農薬により汚染しないよう注意して行う。

6. 人工降雨処理と試料（表流水）の採取

- (1) 農薬処理 1 日後、3 日後、7 日後及び 14 日後に各区に人工降雨を行い、土壤面積 1 m²あたり 1.5L の表流水を得る。
- (2) 表流水は、採取目標量を 5 程度に分割し、分割量ごとの採取時間を毎回記録する。
- (3) 農薬処理 1 日後の人工降雨強度は 30mm/hr とし、処理 3 日後以降の人工降雨は、処理 1 日後の人工降雨による分画ごとの採取時間とできるだけ同等となるよう、10～30mm/hr の範囲で降雨強度を適宜調節して行う。
- (4) 表流水はガラス又はステンレス製の容器に捕集し、10 分間静置して沈殿物が混入しないよう別のガラス又はステンレス製の容器に移し、速やかに分析に供する。

7. 試験期間中の管理

試験期間中においては、各試験区は、自然光に十分曝すとともに、自然降雨の影響を受けないように注意して管理する。

8. 試料の分析

(1) 分析対象物質

水質汚濁予測濃度を算出するために試験を実施する場合には、水質汚濁性試験に準じ、水産動植物被害予測濃度を算出するために試験を実施する場合には、模擬水田を用いた水田水中農薬濃度測定試験に準ずる。

(2) 分析方法

- ① 分析対象物質を正確に分析できる方法を採用する。
- ② 試料は十分に攪拌したのち一定量を分取し、水中に含まれる浮遊性土壌粒子(SS)を除去することなく、分析に供する。
- ③ 分析対象物質の量は mg/l で表す。
- ④ 分析は、各試料ごとに少なくとも 2 回行い、これらの平均値を測定値とする。
- ⑤ 分析法の精度は、分析対象物質の検出が見込まれる濃度範囲での変動係数により確認する。
- ⑥ 分析法の感度は、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

- られる最低濃度である定量限界で表すこととし、試験の目的に則した感度とする。
- ⑦ 分析法の回収率は、定量限界及び分析対象物質の検出が見込まれる濃度範囲で、無処理区から採取した試料に既知量の分析対象物質を添加した試料を用いて確認する。
 - ⑧ 試料は、原則として、採取後速やかに分析に供することとするが、やむを得ず試料を一時保管しなければならない場合には、適切な管理条件下に保管し、保管期間中は、分析対象物質の安定性を確認するため保存安定性試験を実施する。
 - ⑨ 保存安定性試験は、無処理区から採取した試料に既知量の分析対象物質を添加し、分析試料と同一条件で同一期間以上保管した試料を分析する方法により行う。

9. 報告事項

- (1) 試験成績作成機関（圃場試験実施場所及び分析実施場所）
- (2) 被験物質
- (3) 試験条件（土壌特性及び試験操作の詳細）
- (4) 分析方法（概要及び詳細）
- (5) 分析対象ごとの定量限界及び回収率
- (6) 試料調製に係る明細
- (7) 分析結果（各試料採取時点の分析値）
- (8) 流出率（期間平均流出率）

ドリフト試験(2-10-5)

1. 目的

本試験は、環境中予測濃度を算出するため、地上散布農薬を圃場において散布し、風下における農薬落下量を距離別に調査し、散布農薬成分量に対するドリフト率を距離別に明らかにすることを目的とする。

2. 試験圃場

圃場は少なくとも20mの奥行きを有し、かつ風下側に十分な広さの調査区域が設定できる場所とする。

3. 農薬の散布

- (1) 農薬の散布は、平均風速が概ね2.0m/s以上の条件下で行う。
- (2) 被験物質は、調製後、速やかに施用する。
- (3) 被験物質は、適切な管理条件下で保管するものとし、開封後、長期間保管する場合には、保管中の安定性を確認する。
- (4) 被験物質は、登録申請に係る剤型、使用方法（時期、量等）等に基づき、通常用いられる器具を用いて、適切に1回施用する。
- (5) 被験物質の散布時に風速等気象状態を観測し記録する。

4. 落下量調査

- (1) トラップ
トラップにはガラスシャーレを用いる。

(2) トラップの設置

調査区域には、主風向きに沿った風下方向に適当な間隔でトラップを設置する。

トラップは、地表面にほぼ水平に設置し、同一距離においては数m間隔で3個以上を設置する。

(3) トラップの回収

散布終了後、飛散粒子が完全に落下したら、速やかに各トラップに蓋をして回収し、速やかに分析に供する。

5. 分析

(1) 分析対象物質

原則として、農薬の有効成分とする。

(2) 分析方法

- ① 分析対象物質を正確に分析できる方法を採用する。
- ② 分析は、同一距離の複数のトラップをひとまとめにした後、試料ごとに少なくとも2回行い、これらの平均値を測定値とする。
- ③ 分析法の精度は、分析対象物質の検出が見込まれる濃度範囲での変動係数により確認する。
- ④ 分析法の感度は、試験の目的に則した感度とし、定量限界を表示する。
- ⑤ 分析法の回収率は、トラップ容器に既知量の分析対象物質を添加したのちに、試験で用いた一定量の溶媒で溶出した試料を用いて確認する。
- ⑥ 試料は、原則として、速やかに分析に供することとするが、やむを得ず試料を一時保管しなければならない場合には、適切な管理条件下に保管し、保管期間中は、分析対象物質の安定性を確認するため保存安定性試験を実施する。
- ⑦ 保存安定性試験は、⑤と同様な方法で、分析試料と同一条件で同一期間以上保管した試料を分析する方法により行う。

6. 報告事項

- (1) 試験成績作成機関（圃場試験実施場所及び分析実施場所）
- (2) 被験物質
- (3) 試験条件（試験圃場、調査方法及び試験操作の詳細）
- (4) 分析方法（概要及び詳細）
- (5) 分析対象ごとの定量限界及び回収率
- (6) 試料調製に係る明細
- (7) 分析結果
- (8) 理論散布量に対する距離別のドリフト率

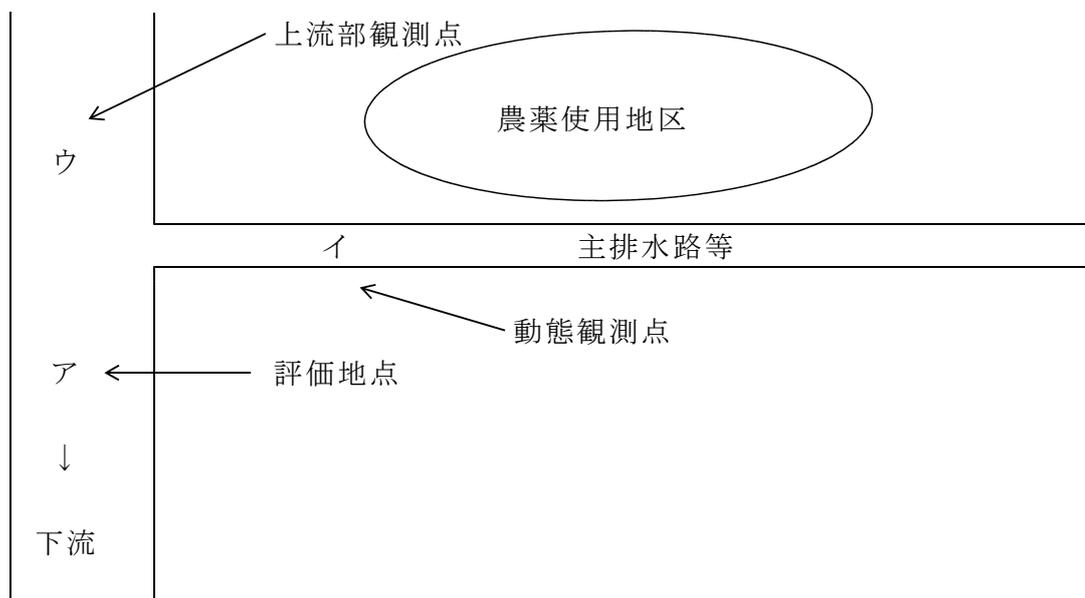
河川における農薬濃度のモニタリング(2-10-6)

1. 目的

本モニタリングは、現に登録を有する農薬について、公共用水域の水中における当該農薬の濃度に関する知見を得ることを目的とする。

2. 調査地域

- (1) 直近における出荷量統計に基づく都道府県別普及率の上位県のなかから、使用状況等を踏まえ、対象農薬及び用途分野について河川中農薬濃度が最も高くなると考えられる2地域以上を選定する。
- (2) 調査河川は、調査対象農薬の使用地区からの排水が流入することが明らかな河川を選定する。
- (3) 調査地点は、少なくとも以下の地点を選定する。
- ① 水質汚濁性の評価に用いる場合
 - ア 評価地点
当該地区からの主排水路等の調査河川への合流地点の直近下流域とする。
 - イ 動態観測点
当該地区からの農薬流出動態を的確に把握できる主排水路等において動態観測点を設置することが望ましい。
 - ウ 上流部観測点
当該地区からの排水の調査河川への合流地点の上流部とする。
 - ② 水産動植物に対する毒性影響の評価に用いる場合
 - ア 評価地点
当該地区下流域の最寄りの公共用水域常時監視地点（環境基準点又は補助点）とする。
 - イ 動態観測点
当該地区からの農薬流出動態を的確に把握できる主排水路等とする。なお、地域内において農薬使用地区が複数まとまって存在する場合は、2地区以上において動態観測点を設置することが望ましい。
 - ウ 上流部観測点
当該地区からの排水の調査河川への合流地点の上流部とする



3. 流量測定及び気象観測

水質汚濁性の評価に用いる場合には、4半期に1回以上、水産動植物に対する毒性影響の評価に用いる場合には、調査期間中に1回以上、評価地点における流量（

m³/s) を測定する。さらに、期間中の気象について記録を行う。

4. 試料（河川水）の採取

（1）採取方法

- ① 採取器具はステンレス又はガラス製の適切なものを用い、原則として各調査地点の流心から採取する。
- ② 採取は底質が入らないよう注意して行い、粗大な浮遊物は除去する。

（2）採取期間及び間隔

① 水質汚濁性の評価に用いる場合

ア 水田に使用する農薬の場合

試料採取は、農薬使用時期前から開始し、農薬使用時期においては1週間ごとに、その後においては1ヶ月ごとに、評価地点における農薬濃度が定量限界以下となることが確認されるまで行う。

イ 水田以外に使用する農薬の場合

試料採取は、農薬使用時期においては約2週間ごとに、その後においては1ヶ月ごとに、評価地点における農薬濃度が定量限界以下となることが確認されるまで行う。

② 水産動植物に対する毒性影響の評価に用いる場合

ア 水田に使用する農薬の場合

試料採取は、農薬使用時期前から開始し、農薬使用最盛期においてはできるだけ毎日、その後においては数日～1週間おきに実施し、評価地点における農薬濃度の不可逆的な減衰傾向が確認されるまで行う。

イ 水田以外に使用する農薬の場合

試料採取は、農薬使用期間において約1週間ごとに、使用時期の概ね1か月後まで行う。

5. 試料の取り扱い

水質汚濁性試験に準ずる。

6. 試料の分析

（1）分析対象物質

水質汚濁性の評価に用いる場合には、水質汚濁性試験に準じ、水産動植物に対する毒性影響の評価に用いる場合には、模擬水田を用いた水田水中農薬濃度測定試験に準ずる。

（2）分析方法

- ① 分析対象物質を正確に分析できる方法を採用する。
- ② 分析対象物質の濃度は $\mu\text{g}/\text{l}$ で表す。
- ③ 分析は、各試料ごとに少なくとも2回行い、これらの平均値を測定値とする。
- ④ 分析法の精度は、分析対象物質の検出が見込まれる濃度範囲での変動係数により確認する。
- ⑤ 分析法の感度は、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である定量限界で表すこととし、試験の目的に則した感度とする。
- ⑥ 試料は、原則として、採取後速やかに分析に供することとするが、やむを得ず試料を一時保管しなければならない場合には、適切な管理条件下に保管し、保管

期間中は、分析対象物質の安定性を確認するため保存安定性試験を実施する。

- ⑦ 保存安定性試験は、分析対象物質を含まない類似試料に既知量の分析対象物質を添加し、分析試料と同一条件で同一期間以上保管した試料を分析する方法により行う。
- ⑧ 分析法の回収率は定量限界及び分析対象物質の検出が見込まれる濃度範囲で、類似試料（調査対象農薬の混入のない上部から採取した河川水、もしくは農薬使用時期以外に採取した河川水等）に既知量の分析対象物質を添加した試料を用いて確認する。

7. 報告事項

- (1) 試験成績作成機関（設計機関及び実施機関）
- (2) 被験物質
- (3) 試験条件（調査実施地域、調査方法、調査期間中の気象及び試料採取操作等の詳細）
- (4) 分析方法（概要及び詳細）
- (5) 分析対象ごとの定量限界及び回収率
- (6) 分析結果
- (7) 農薬流出要因に関する考察
- (8) 年間又は最大濃度期における平均濃度

＜残留性に関する試験＞

農作物等への残留性に関する試験

作物残留性試験(3-1-1)

1. 目的

本試験は、農薬の農作物における残留性の程度等に関する科学的知見を得ることを目的とする。

2. 供試農作物

- (1) 登録申請に係る適用農作物ごとにその代表的品種及び作型を選択する。
- (2) 栽培方法は、標準的な方法を選択する。特に栽培条件（施設・露地、有袋・無袋）は、残留性に大きく影響することから、施設栽培又は無袋栽培を基本とする。

3. 試験区（ほ場）の設定

- (1) 試験区として、被験物質処理区及び無処理区を設ける。
- (2) 試験区は、分析を行う上で十分な量の供試農作物のが確保できる面積を有しなければならない。
- (3) 試験区は、外部からの農薬の飛散等による汚染防止措置が講じられていなければならない。
- (4) 被験物質処理区は、原則として被験物質の残留の消長が確認できるよう経過日数を設定する。ただし、農作物の生育初期に使用する被験物質や土壌処理剤等限られた時期に使用される被験物質についてはこの限りでない。

4. 供試農作物の栽培

- (1) 供試農作物は、収穫時に市場出荷可能な状態となるよう、通常の栽培方法に従って適切に栽培管理を行う。
- (2) やむを得ず病害虫等の防除等を行わなければならない場合は、試験結果に影響を及ぼさない方法により防除等を行うこと。

5. 被験物質の取扱い及び施用

- (1) 被験物質は、調製後、速やかに施用する。
- (2) 被験物質は、適切な管理条件下で保管するものとし、開封後、長期間保管する場合には、保管中の安定性を確認する。
- (3) 被験物質は、登録申請に係る使用方法（時期、回数、量等）等に基づき、通常用いられる器具を用いて、適切に施用する。ただし、試験水田において当該器具を使用することが困難な場合には、他の同等な方法で代替することができるものとする。
- (4) 雨天時又は被験物質の施用後に降雨が予想される場合には、施用は行わない。ただし、屋根を設置している等降雨の影響がない場合は、この限りでない。

6. 試料の採取

- (1) 採取部位及び採取量は、別表1に定めるところによる。
- (2) 採取方法は、採取の偏りが無いよう適切な採取方法とする。

- (3) 試料は、市場へ出荷できる状態のものであって、かつ、可能な限り均一なサイズ（長さ及び大きさ）のものを採取し、障害（病虫害、薬害、未熟等）のあるものは採取しない。
- (4) 試料の採取及び包装は、試料の取り違いや汚染が生じないよう適切な方法により行う。

7. 試料の取扱い

(1) 試料の輸送

- ① 試料の輸送に当たっては、試料が変質又は汚染しないよう十分留意するとともに、天日乾燥や機械乾燥した試料を除き、凍結しない程度の低温条件で速やかに輸送する。
- ② 輸送に当たっては、試料の取り違い等を防止するため、識別票を添付する等により適切に取り扱うものとする。

(2) 輸送試料の取り扱い

試料は、受領後ただちに識別票等により現物の確認を行った後、他の試料との混同がないよう適切に取り扱い、速やかに分析に供するものとする。

8. 試料の分析

(1) 分析対象物質

被験物質に係る農薬の有効成分及び当該有効成分が生物的又は化学的に変化して生成した物質（以下「成分物質」という。）とする。ただし、残留量がきわめて微量であること、その毒性がきわめて弱いこと等により有害でない認められる場合は除く。

なお、展着剤については、原則として展着剤及び適用対象農薬とするが、当該展着剤の適用農薬の残留性への影響等から判断して合理的な理由ある場合にあっては、別表2に掲げるものとする。

(2) 分析部位

分析部位は、食品、添加物等の規格基準（昭和34年12月28日厚生省告示第370号）に定めるところによる。なお、稲については、稲わらも分析すること。

(3) 分析方法

- ① 試料は、分析部位ごとにその全量又は均質化した一部を磨碎して分析に供する。
- ② 分析対象物質を正確に分析できる方法により行う。なお、食品規格（残留農薬基準値）の設定に際して分析法が定められている場合は、当該方法による。
- ③ 分析対象物質の残留量は ppm で表す。
- ④ 分析は、各試料ごとに少なくとも2回行う。
- ⑤ 分析法の精度は、分析対象物質の残留が見込まれる濃度範囲での変動係数により確認する。
- ⑥ 分析法の感度は、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である定量限界で表すこととし、試験の目的に即した感度とする。
- ⑦ 分析法の回収率は、定量限界及び分析対象物質の残留が見込まれる濃度範囲で、無処理区から採取した試料に既知量の分析対象物質を添加した試料を用いて確認する。
- ⑧ 試料は、原則として、受領後速やかに分析に供することとするが、やむを得ず試料を一時保管しなければならない場合は、適切な管理条件下に保管し、保管期間中は、分析対象物質の安定性を確認するため保存安定性試験を実施する。

- ⑨ 保存安定性試験は、無処理区から採取した試料に既知量の分析対象物質を添加し、分析試料と同一条件で同一期間以上保管した試料を分析する方法により行う。

9. 報告事項

- (1) 被験物質
- (2) 供試農作物の栽培及び被験物質の施用方法等
- (3) 供試農作物の栽培期間中における気象条件（気温、降雨量、日照等）
- (4) 分析対象物質
- (5) 分析方法（概要及び詳細）
- (6) 分析対象物質ごとの定量限界及び回収率
- (7) 試料の調製方法等
- (8) 分析結果

別表1

作物名	採取部位	採取量
稲	玄米	1 k g
	稲わら	5 束 (2 k g)
小麦	脱穀した種子	1 k g
大麦	脱穀した種子	1 k g
とうもろこし (未成熟とうもろこしを含む)	未成熟：雌穂 乾燥種実	1 k g
みかん	果実	2 k g
なつみかん	果実	2 k g
いよかん	果実	2 k g
はっさく	果実	2 k g
ぼんかん	果実	2 k g
もも	果実	2 k g
すいか	果実	5 k g
メロン	果実	5 k g
りんご	果実	2 k g
なし (日本なし、西洋なしを含む)	果実	2 k g
かき	果実	2 k g
うめ	果実	1 k g
いちご	果実	1 k g
ぶどう	果実	1 k g
ピーマン	果実	1 k g
かぼちゃ	果実	2 k g
きゅうり	果実	2 k g
トマト	果実	2 k g
ミニトマト	果実	1 k g
なす	果実	2 k g

えだまめ	さや	1 k g
さやいんげん	さや	1 k g
キャベツ	葉球	5 k g
はくさい	茎葉	5 k g
カリフラワー	花蕾	2 k g
ブロッコリー	花蕾	2 k g
こまつな	茎葉	1 k g
しゅんぎく	茎葉	1 k g
セルリー	茎葉	1 k g
チンゲンサイ	茎葉	1 k g
レタス	茎葉	3 k g
ねぎ	茎葉	1 k g
ほうれんそう	茎葉	1 k g
にら	可食部	1 k g
かぶ	根部 葉部	2 k g 1 k g
だいこん	根部 葉部	5 k g 1 k g
ごぼう	根部	2 k g
にんじん	根部	2 k g
れんこん	地下茎	2 k g
しょうが	根茎	1 k g
たけのこ	たけのこ	2 k g
たまねぎ	鱗茎	2 k g
かんしょ	塊根	2 k g
ばれいしょ	塊茎	2 k g
こんにゃく	球茎	2 k g
さといも	塊茎	2 k g
やまのいも	塊茎(担根体)	2 k g
だいず	乾燥子実	1 k g
あずき	乾燥子実	1 k g
てんさい	根部	5 k g
さとうきび	茎	5 k g
茶	あら茶	200 g
上記以外の作物	可食部	同一試料内の変動 及び分析の精度確保を勘案して適宜採取量を決定する。 なお、少なくとも5個以上採取するものとする。

注1： みかんは、果肉と果皮は分けて分析する。

注2： 採取量の欄に掲げる量に達するに要する個数が5個未満の農作物等にあつては、それぞれ大きさのそろった5個を採取する。

別表 2

	当該展着剤の適用対象農薬の残留性への影響	
	適用対象農薬の残留量を増加させるおそれがないと認められる場合	適用対象農薬の残留量を増加させるおそれがあると認められる場合
1. 当該展着剤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		適用対象農薬の成分物質等
2. 人が当該展着剤の成分物質等を長期にわたって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から安全と認められる場合		適用対象農薬の成分物質等
3. 上記1及び2のいずれにも該当しない場合	展着剤の成分物質等	展着剤及び適用対象農薬の成分物質等

乳汁への移行試験(3-1-2)

1. 目的

本試験は、農薬が稲わら、飼料用作物に残留し、人畜に悪影響を与えないよう作物残留試験での残留が一定濃度以上検出された場合に行い、乳汁中の移行の程度に関する情報を得ることを目的とする。

2. 供試動物

原則として1日の乳量が約15kg以上の乳牛2頭以上を用いる。

3. 飼育条件

当該施設の飼育方法に従う。

4. 投与方法及び投与量

投与方法は、乳牛1頭当たり作物残留試験で得られた稲わら（又は飼料用作物）における規制対象物質の最大残留量の2倍量を1日1回定時（朝搾乳直後）に7日間連続経口投与する。

なお、投与方法としてカプセルでの経口強制投与でも差し支えない。

5. 試料の採取

- (1) 試料の採取は、投与前、投与中1、3、7日目及び投与終了後1、3、5日目に、各乳牛から乳汁を朝と夕に搾乳し、そのうち試料としてそれぞれ約100m^lを採取する。
- (2) 採取した試料は採取時点別に容器に入れ凍結し、分析に供試する。

6. 試料の保存、輸送及び分析

- (1) 試料の保存、輸送及び分析については、作物残留性試験に準じる。
- (2) 分析は、朝と夕に採取したサンプルについてプールして分析に供する。

7. 観察事項

- (1) 一般症状
活動性、食欲、糞便性状等について毎日観察し、記録する。
- (2) 体重
試験開始時に測定する。
- (3) 泌乳量
試験期間中毎日測定する。

8. 結果報告

作物残留性試験ガイドラインに準ずる。

土壌残留性試験(3-2-1)

1. 目的

本試験は、農薬の土壌中におけるほ場条件での残留性の程度に関する科学的知見を得ることを目的とする。

2. 試験ほ場

- (1) 試験ほ場は、国内の土性、母材その他の土壌の特性の異なる2か所以上のほ場で、分析に支障を及ぼすおそれのある農薬等を含まない場所とする。
- (2) 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にあっては、気象その他土壌の特性以外の条件の異なるほ場を選定して試験ほ場とすることができるとする。なお、水田で用いる農薬については水田ほ場、畑地で用いられる農薬については畑地ほ場を選定し、当該農薬が使用される代表的作物を栽培している状況で試験を実施する。

3. 被験物質の取扱い及び施用

- (1) 被験物質は、調製後、速やかに施用する。
- (2) 被験物質は、適切な管理条件下で保管するものとし、開封後、長期保管する場合は、

保管期間中の安定性を確認する。

- (3) 被験物質は、登録申請に係る剤型・使用方法（時期、回数、量等）に基づき、通常用いられる器具を用いて、適切に施用する。
- (4) 雨天時又は被験物質の施用後に降雨が予想される場合には、施用は行わない。
ただし、温室等で試験を行う場合で、降雨の影響が無いときはこの限りではない。

4. 試料（土壌）の採取

(1) 採取方法

- ① 試料は、試験ほ場ごとに1回の採取において4か所以上の異なる地点から採取し、十分に混和する。
- ② 試料は、地表面から10cmの深さまで柱状に採取する方法により、200g以上採取するものとする。なお、試験ほ場が水田であるときは、田面水とともに採取する。

(2) 採取時期及び回数

被験物質の最初の施用の直前に1回、最終の施用後においては、直後に1回、その後さらに4回以上採取する。

5. 試料の取扱い

(1) 試料の輸送

- ① 試料の輸送に当たっては、試料が変質又は汚染しないよう十分留意するとともに、凍結しない程度の低温条件で速やかに輸送する。
- ② 輸送に当たっては、試料の取り違い等を防止するため、識別票を添付する等により適切に取り扱うものとする。

(2) 輸送試料の取扱い

試料は、受領後ただちに識別票等により現物の確認を行った後、他の試料との混同がないよう適切に取り扱い、速やかに分析に供するものとする。

6. 試験期間

試験期間は、原則として、供試土壌中における分析対象物質の分析値（分析対象物質が複数である場合は、それぞれの分析値をもとの化合物に換算し合計した値）が、最高濃度の濃度の10%程度に減少するまでの期間（10%程度まで減少しない場合にあっては、確実に最高濃度の濃度の2分の1に減少するまでの期間）とする。

7. 試料の分析

(1) 分析対象物質

被験物質に係る農薬の有効成分及び当該有効成分が生物的又は化学的に変化して生成した物質とする。ただし、残留量がきわめて微量であること、その毒性がきわめて弱いこと等により有害でない認められるものは除く。

(2) 分析方法

- ① 分析対象物質を正確に分析できる方法により行う。
- ② 分析対象物質の残留量は、乾土当たりの濃度（mg/kg）で表す。
- ③ 分析は、各試料ごとに少なくとも2回以上行い、これらの平均値を測定値とする。
- ④ 分析法の精度は、分析対象物質の残留が見込まれる濃度範囲での変動係数により確認する。
- ⑤ 分析法の感度は、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である定量限界で表すこととし、試験の目的に即した感度とする。

- ⑥ 分析法の回収率は、定量限界及び当該農薬の残留が見込まれる濃度範囲で、無処理試料に既知量の分析対象物を添加した試料を用いて確認する。
- ⑦ 試料は、原則として採取後速やかに分析に供することとするが、やむを得ず試料を一時保管しなければならない場合は、適切な管理条件下に保管し、保存期間中は分析対象物質の安定性を確認するため保存安定性試験を実施する。
- ⑧ 保存安定性試験は、無処理区試料から採取した試料に既知量の分析対象物質を添加し、分析試料と同一条件で同一期間以上保管した試料を分析する方法により行う。

8. 報告事項

- (1) 試験成績作成機関（試験実施機関及び分析実施機関）
- (2) 被験物質
- (3) 試験条件
- (4) 分析対象物質
- (5) 分析方法（概要及び詳細）
- (6) 分析対象物質ごとの定量限界及び回収率
- (7) 試料の調製方法等
- (8) 分析結果（各試料採取時点の分析値）
- (9) 推定半減期及び算出方法

後作物残留性試験(3-2-2)

1. 目的

本試験は、農薬が土壌を経由して農作物に残留する程度に関する科学的知見を得ることを目的とする。

2. 供試農作物

- (1) 被験物質が水田施用の場合は、麦、大豆又は根菜類の中から異なる植物群に属する農作物を2種類以上選定すること。
- (2) 被験物質が畑地施用の場合は、根菜類に属する農作物を1種類以上、その他後作物として想定される農作物から1種類以上を選定すること。

3. 試験区（ほ場）の設定

試験区は、供試農作物の栽培前に被験物質を登録申請に係る農作物に対して登録申請に係る使用方法で施用したほ場とし、当該ほ場の確保が困難な場合は、被験物質を登録申請に係る農作物に対して登録申請に係る使用方法で施用したほ場の土壌を用いて、ポットによる試験を行っても差し支えない。その他、作物残留性試験に準ずる。

4. 供試農作物の栽培

作物残留性試験に準ずる。

5. 被験物質の取扱い及び施用

作物残留性試験に準ずる。

6. 試料の採取

作物残留性試験に準ずる。

7. 試料の取扱い

作物残留性試験に準ずる。

8. 試料の分析

作物残留性試験に準ずる。

9. 報告事項

作物残留性試験に準ずる。