

魚毒性の判定に必要な試験の具体的な実施方針について（案）

1．趣旨

特定防除資材の指定にかかる評価については、「特定防除資材（特定農薬）指定のための評価に関する指針（以下「評価指針」）」に基づいて行うこととされており、水産動植物に対する安全性については、魚毒性 A に該当するか否かで評価することとしている。

今般、特定防除資材の候補資材について、魚毒性分類に基づく判定を行うに当たり必要な、試験（魚類及びミジンコ類に対する急性毒性試験。以下「魚毒性試験」という）の実施方法について、より具体化する。

2．魚毒性の表示設定の経緯について

魚毒性表示については、昭和 38 年の農取法改正により水産動植物被害に係る登録保留基準が規定されたことを受け、農薬の魚毒性についての注意事項を表示する必要があることから、当時の農林省農薬検査所が中心となってコイとミジンコに対する急性毒性試験の結果から農薬を A B C の 3 段階に分類して表示をさせることとして定めたものである（別紙 1）。

コイとミジンコの具体的な毒性試験方法としては、昭和 40 年 11 月 25 日付け農林省農政局長通知（40農政 B 第 2735 号；以下「S 40 年通知」という）に定められている（別紙 2）。

表 1 魚毒性の分類基準

(ppm)

コイ 注 1 ミジンコ (LC50) 注 2			
	> 10	0.5 < LC50 10	0.5
> 0.5	A	B	C
0.5	B	B	C

注 1：コイに対する 48 時間後の LC₅₀ 値

2：ミジンコ類に対する 3 時間後の LC₅₀ 値

ただし、現行 GL に基づく試験法では 3hr-LC₅₀ の値が取れないことから、平成 13 年からは 24hr-EC₅₀ を採用している。

3：水産動植物の被害に係る登録保留基準については、魚類、甲殻類、藻類に対する毒性値と公共用水域における予測濃度を比較して評価する手法に改め、平成 17 年 4 月から施行する告示改正を行ったところであり、魚毒性の分類基準についてもこのこと等を踏まえ見直しが行われる予定

3．現行の魚毒性の分類方法等について

現在の登録農薬の検査の際に提出が義務付けられている試験成績を作成するための試験方法は、平成 12 年 11 月 24 日付け農林水産省農産園芸局長通知「農薬登録申請に係る試験成績について」（12農産第 8147 号；以下「現行 GL」という。）に定められており（別紙 3）、魚類、ミジンコ類ともに農薬 GLP 基準に適合した試験施設で実施することとなっている。

このため、現在の登録農薬の魚毒性の分類は、現行 G L に規定された「魚類急性毒性試験」及び「ミジンコ類急性遊泳障害試験」の結果を基に判定されている。

具体的には、現行 GL により原体を被験物質として、魚類については 9 6 時間の急性毒性試験成績から得られた結果に基づく 48hr-LC₅₀、ミジンコについては 4 8 時間の急性遊泳障害試験の試験成績から得られた結果に基づく 24hr-EC₅₀により分類されている。(例えば、魚類の 48hr の LC₅₀ が 10ppm を超え、かつミジンコの 24hr の EC₅₀ が 0.5 ppm を超える場合に魚毒性 A としている)

なお、平成 1 7 年 4 月より改正水産動植物に係る登録保留基準が施行され、従来コイに対する毒性のみで一律に定めていたものを、魚類、甲殻類、藻類に対する毒性試験結果に基づき環境大臣が定める基準値と公共用水域における環境中予測濃度とを比較して登録の可否を判断する手法を取り入れたものに改めたところであり、魚毒性の分類基準も見直される予定となっている。

4 . 国において魚毒性判定のために必要な試験の具体的実施方法

魚毒性試験の方法等については、現行 G L と 4 0 年通知では以下の相違がある。この点や特定防除資材の特性を踏まえ、特定防除資材の安全性評価を行うための魚毒性試験の具体的実施方法については、以下の方針で行うこととする。

表 2 魚類に対する急性毒性試験の比較

	S 4 0 年通知	現行 G L
曝露期間	4 8 時間 (できる限り 24, 72 時間におけるものを併記する)	9 6 時間 (24, 48, 72, 96 時間の一般状態を観察し記録する)
供試生物	原則としてコイ (全長 5 c m 前後) 非水田農薬はヒメダカ、モロコ等でも可	原体はコイ又はヒメダカ ブルギル、グッピー、ゴジマ等でも可
試験条件 供試魚数 試験濃度区 試験薬液量 その他	各濃度毎に 1 0 匹以上 - 特に規定無し - 魚の体重 1 g につき 1 L 以上 特になし	各濃度区毎に 7 匹以上 等比級数的に 5 濃度区以上 同左 ・ 曝露期間中の被験物質濃度は設定濃度の 8 0 % 以上が望ましい ・ 試験液の PH 調整は行わない
結果の処理法	ゲートウの方法により半数致死濃度を求める。(片対数グラフの対数目盛に供試薬液の濃度を取り、普通目盛りには生存率を取り、測定された生存率が 5 0 % より上の点と下の点で最も 5 0 % に近いものを選び、この両者を直線で結び 5 0 % の線と交わる点の濃度を半数致死濃度とする)	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半数致死濃度を算出する。(報告事項は半数致死濃度と 9 5 % 信頼限界)

表3 ミジンコに対する急性毒性試験の比較。

	S 4 0 年通知	現行 G L
試験期間	3 時間	4 8 時間 (24, 48 時間目の遊泳阻害の有無について観察し記録する)
供試生物	ミジンコ又はマミジンコの雌成体	オミジンコの幼体 (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良い)
試験条件 供試生物数 試験濃度区 試験薬液量 その他	各濃度毎に約 2 0 匹 コイの毒性試験に準じる 1 0 0 ml 特になし	各濃度区毎に 2 0 匹以上 等比級数的に 5 濃度区以上 ミジンコ 1 頭当たり 5 ml 以上 ・曝露期間中の被験物質濃度は設定濃度の 8 0 % 以上が望ましい ・試験液の PH 調整は行わない
結果の処理法	コイに準じる。	魚類に準じる

(1) 被験物質について

登録農薬のほとんどは有効成分が明らかであるため、製剤が有効成分そのものと考えられる一部のもの (有効成分が明らかでない一部のもの) を除き有効成分ベースで LC_{50} 値等を算出している。しかし、特定防除資材の候補資材については、○○抽出液であるとか、木酢液等であったりすることから有効成分が何であるのか不明である場合が多いと想定されることから、有効成分ベースでの魚毒性試験の実施が困難である。

このため、製剤ベース (○○抽出液そのものを原体と見なす) で魚毒性の試験を実施することとする。

(2) 魚毒性試験の方法について

評価指針では、昭和 4 0 年代に定めた魚毒性の分類基準が現行でも有効であることから、コイを用いた 4 8 時間の LC_{50} と、ミジンコを用いた 3 時間の LC_{50} により魚毒性を判定することとしている。しかし、現行 GL では、魚類に対する 9 6 時間の急性毒性試験とミジンコ類の 4 8 時間急性遊泳阻害試験が位置づけられている。

このため、特定防除資材候補資材の評価に当たり実施する魚毒性試験は、現行 GL に従って魚類急性毒性試験 (9 6 時間) 及びミジンコ類の急性遊泳阻害試験 (4 8 時間) を実施することとする。なお、魚毒性の判定については、評価指針に従って行うこととなるため、当該試験を実施する中で魚類については 4 8 時間時点の LC_{50} を、ミジンコについては 3 時間後の EC_{50} を用いて行うこととする。(なお、水産動植物に

係る登録保留基準の改正等も踏まえ魚毒性の分類基準が見直されたときには、特定防除資材の安全性評価に用いる魚毒性の判断基準もこれに準拠することとする。)

(3) 供試魚種について

魚類急性毒性試験の供試魚種については、

- ・改正水産動植物に対する毒性に係る登録保留基準でコイ、ヒメダカを同等に扱っていること
- ・農水省のテストガイドラインにおける原体による急性毒性試験でも両者を同等に扱うこととして見直されていること。

から、試験に要する経費、時間等の面で効率的なヒメダカを供試魚種として用いることとする。

農薬の魚毒性表示について

農林省農薬検査所 吉田孝二・橋本 康・西内原浩

農薬取締法第2条2項には農薬の登録申請の際、申請書に記載すべき事項が列記してあるが、その6番目に「水産動植物に有害な農薬については、その旨」という事項がある。これは昭和38年の法律改正に伴って新しく追加されたもので、農薬が広く普及された結果、時に起こる農薬の水産生物に対する不測の事故をできるだけ防ぐことを目的とするものであった。またこのような事故の原因は農薬使用者の不注意な使い方によることが多くまた農薬のいわゆる魚毒性についての知識が不十分であることも手伝っていると考えられた。そして取締法第7条によって「製造業者又は輸入業者はその製造し、若しくは加工し、又は輸入した農薬を販売するときはその容器(容器に入れないで販売する場合にあってはその包装)に上記事項の真実の表示をしなければならない」とことになっており、魚毒性についての注意事項も表示をすることが要求された。しかし、最近まではこの指導が徹底せず魚毒性の強弱を決定する技術的方法にも不備な点があったので、申請書あるいは容器(包装)に、適正な記載、表示がなされていた、とは必ずしもいいがたい状態であった。一方、この間にも有明海で魚貝類の大量死事故があり、この原因の一つに農薬があげられた。農薬によるものかどうかは別として、この事故に関連して農薬の魚毒性に関する適正な記載表示をすべきであるという問題があらためて大きく取り上げられ、個々の農薬についてその魚毒性を再検討する必要が生じた。そこで農林省は農薬検査所を中心としてこれまでの文献の調査を行なうとともに昭和41年に各農薬会社の協力を得て通達試験を行ない大部分の農薬成分について魚毒性の強弱を明らかにすることができた。これらの結果から各農薬成分は毒性に応じて、別表のようにA、B、Cの3段階に分けられ、申請書および容器(包装)にはおのおの定められた記載、表示をすることに定められた。なおこの問題の提起、通達試験の打ち合わせおよび結果の検討、記載、表示する文章、実施要領については農林省は常に業界との連絡を取り安全使用のための円滑な運用をはかった。

A B C分類の基準は次のとおりである。すなわち

A類：コイに対する48時間後のTLm(半数致死濃度)が10ppm以上で、ミジンコおよびタマシニコに対する3時間後のTLmが0.5ppm以上であるもの。

B類：コイに対する48時間後のTLmが0.5~10

ppmの範囲であるか、コイに対する48時間後のTLmが10ppm以上であっても、ミジンコおよびタマシニコに対するTLmが0.5ppm以下であるもの。

C類：コイに対する48時間後のTLmが0.5ppm以下であるもの。その他、PCP除草剤やドリノ剤のようにこれまでもすでに指定農薬、規制農薬の使用規制を受けているものは従来どおりの記載や表示をし、また規制を受けるのであって今回の分類とは直接関係はない。なお、分類の基礎となっているコイに対するTLm値は原則として昭和40年11月25日付け40年農政B第2735号によって通達された「魚類に対する農薬の毒性検定のための標準法」によった。ミジンコおよびタマシニコについては、魚類とともに水産有用生物の一つである甲殻類の薬剤感受性を代表するものとして、供試生物に定め下記要領により試験を行なった。

【供試生物】ミジンコ *Daphnia pulex* およびタマシニコ *Moina macrocarpa* は屋外コンクリート水槽で繁殖させたもので成体のみを用いた。

【試験条件】腰高シャーレ(内径9cm、深さ7cm)に供試薬液を100ml入れる。薬液は農薬を純水に溶解させたものである。試験は実験室内で行ない水温は24~26°Cであった。1区に放したミジンコあるいはタマシニコは20~30尾である。

【試験方法】コイに対する試験に準じて薬液の濃度段階をとり、放飼9時間後のTLmをみた。生死の判定は触角の運動が停止しているものを死とする基準によった。最初死数を観察してから、供試生物を全部殺し全数を調べ死亡率を求めた。TLmの計算はコイの場合と同じくDoudoroffの作図法によった。

以上の試験結果を中心にして農薬成分の魚毒性の分類を行なったが、各農薬はその分類に従って申請書には次のような記載をすることとした。

A類：通常の使用方法ではその該当がない。

B類：通常の使用方法では影響は少ないが、一時に広範囲に使用する場合に十分注意する。

C類：毒性があるので使用にあたっては薬剤が河川などに飛散、流入しないよう十分に注意する。

この文章は申請書の「水産動植物に有害な農薬については、その旨」という項目を受けたものであり、製品の容器(包装)表示にはこの趣旨を十分伝えるような文章の

の天または上側に貼布する。

(10) その他疑問の点は農薬検査所に照会すること。

この要領は 41 年 10 月 27 日現在のもので、4 項はすでに述べてあり、5 項における検討は大部分解決されている。以上のような経過で魚毒性の表示は 42 農薬年度から実施されることになったが、今後早急に解決しなければならぬいくつかの問題点を残している。第一に水産動植物に対する毒性という法律との項目に対して、その分類は魚類コイと甲殻類ミジンコ、クマミジンコに対する毒性を基準としており、貝類など他の水産動物や植物に対する毒性は考慮されていないし、甲殻類に対する毒性がいかに強くともそれだけでは G 類にしていけない。ミジンコ、クマミジンコをもって甲殻類の薬剤感受性を代表させたこと自体問題がある。甲殻類、貝類、水産植物などに対する毒性の試験方法について、水産関係者の協力を得て将来標準法をつくり、各農薬の毒性の正確な知識を得ることがぜひ必要であると思われる。またこの分類は各農薬成分そのものの毒性を基準に行なったものであり、製剤の毒性がいちじるしく原体に比べて強いものには安全性の面から製剤の値をとったことを除いては製剤型、一定面積当たりの使用量、使用場所などの環境条件などはまったく考慮していない。したがって各

製剤の実際の使用面における毒性の現われ方とは必ずしも一致していない。今後十分検討すべき問題である。混合剤についても、構成している成分のうち魚毒性の最も強い成分の分類に従うこととしたが混合の仕方によっては協力作用も考えられる。

また、くん蒸剤、植物成長調整剤、殺そ剤、展着剤についてはさしあたり A 類としたが、これも問題があるので、今後試験を行ない毒性の強いものは相当するランクに移すことになっている。なお、別表の分類表中に * 印をつけた農薬については本年再検討を予定しているので年内には最終決定をみるはずである。

いずれにしても、この分類方法には今後解決すべき問題が多いが、この件については年 1 回以上関係者が集まり、この分類を基礎として訂正、改正をはかることが取り決められている。

このように将来における改善を前提とした不完全な形でありながら、魚毒性表示を急いだのは決して農薬の使用をこれにより規制したり、制限しようとするためではなく、この表示をよく読み、注意事項をよく守れば農薬による不祥事故は少なくなり、農薬の安全使用に寄与する点が多いという趣旨からである。各位のご協力をお願いする次第である。

表示をすることとした。ただしA類に属する製品についての表示をする、しないは任意とした。なお、表示の具体的な実施については農林省は実施を早急にするという立場から業界に連絡し、暫定措置を認めて、次の要領で行なうことになった。

(1) ラベル表示は原則として41年10月より実施する。ただし本年10月以前の製品で流通段階にあるものおよび工場在庫品の措置は従来どおりとするが、別途の方法で本施行の徹底をはかること。

(2) 本年10月以降新たにラベルを作成するときは所定の表示を行なうこと。

(3) 手持ラベルの有効使用と準備不足を補うために暫定措置として包装ケースごとに個数に該当する枚数だけ表示事項記載の印刷物を挿入するなど周知徹底をはかる暫定措置をとること(たとえば、粉剤8袋入りのケースには8枚入れる)。ただし、この暫定期間は42年9月までであって42年10月よりはすべて各製品ごと所定

のラベル表示をすること。

(4) PCF およびドリン剤については上記A、B、C類の分類外であり、すでに規定されている従来どおりの表示をすること。

(5) 現在、農薬検査所を中心とした魚毒性に関する連絡試験でとりあげられ、11月初旬開催予定の技術懇談会で検討の上決定されることになっているものについても、それまでは一応別表の分類によって措置すること。ただしその分類に変更があると思われるものについては農薬検査所と協議の上措置すること。

(6) 別表に記載のない最近登録になった薬剤などは登録申請書に記載してあるように表示する。

(7) バルク輸送のもので、末端使用でないことが確実なものについては、42年9月までは従来どおりとする。

(8) 原体で農薬登録の対象にならないものは表示しなくてもよろしい。

(9) 20 l または 20 kg など大型容器については別

別表 各農薬成分の魚毒性の強弱による分類

A類	殺虫剤	ヒ酸鉛、ヒ酸石灰、除虫菊、硫酸ニコチン、硫酸アナバジン、タバコ粉、松脂合剤、MNFAマシン油、DN、クロルベンジレート、クロルプロピレート、ジフェニルスルホン、ジフェニルスルフィド、キノキサリン系、アゾキシベンゼン、D-D、EDB、CDBE、DCIP、DBCP、メタブルドヒド、酸化第二鉄、パミドチオン、ESP、モノフルオール酢酸アミド、FABA、ケイフ化亜鉛、DDDS*, CPA S*, トキサメート*
	殺菌剤	硫酸、石灰硫酸合剤、カスガイシン、硫酸オキシキノリン、有機ヒ素、ストレプトマイシン、フェナジン、有機ニッケル、チアジアジン*, PCBA*
	除草剤	DCBN、2,4-PAソーダ塩、2,4-PAアミン塩、ATA、CMU、DPA、シアノ酸塩、スルファミン酸塩、MDBA、GNP、アマトリン、アトラジン、プロパジン、ジフェナミド、DBN、MC Pソーダ塩、MCPアミン塩、CAT、リニエロン、クロロIPC、DCPA、TCA、塩素酸塩、パラコート、レナシル、プロマシル、トリニタジン*, プロメトリン*, MCC*, SAP*, DSP*, COMU*, BICP
B類	殺虫剤	TEPP、エチルパラチオン、メチルパラチオン、EPHP、マラソン、ジメトエート、エチルチオメトン、チオメトン、IPSP、DDVP、メカルバム、PAP、DEP、MPP、MEP、ダイアジノン、メチルジメトン、ホルモテオン、マイトメート、エチオン、メナゾン、ECP、PMP、BRP、DAEP、TCP、BAB、NAC、PHC、CPMC、REE、BCPE、カーボノレート、APC、CYAP、CYA、ジオキサリン系有機リン、GPCBS、CMP、ホサロン、DDT*, BHC*, EPN*, ケルセン*, DCPN*
	殺菌剤	硫酸亜鉛、銅、有機銅、ジネブ、マンネブ、フンバム、メチラム、有機硫黄、テウラム、カルバジン酸塩、DPC、キノキサリン系、NBT、PCNB、DAPA、CNA、フンスラキノン系、シクロヘキシミド、グリセオフルビン、ブラストサイジン-S、セロサイジン、NCS、ポリカーバメイト、サルチルアニリド、EBP、PCM、NCPA、ジクロン*, フェーバム*, ジラム*, ETM*, TPN*, キャブタン*, ニトロステレン*, トリアジン*, ダイホルタン*, 硫酸銅*
	除草剤	2,4,5-T、MCP、エチルエステル、2,4PAエチルエステル、DCMU、CBN、ジクワット、トリフルラリン、キサントゲン酸塩、MCPP、MCPGA*, MCFB*, NIP*
C類	殺虫剤	アルドリン、ヘプタクロル、クロルデン、デリス、DNOC、DNBP、ベンゾニピン
	殺菌剤	有機水銀、有機スズ、ジメチルアンバム、PCP(クロン)、PCP-Ba塩、NBA
	除草剤	DNBP、DNOC、DNBPA、有機スズ
指定	規制農薬	殺虫剤 エンドリン、ディルドリン、テロドリン
	除草剤	PCP

*印は本年再検討を予定されているもの。

18. 魚類に対する毒性試験法

〔試験法〕

魚類に対する急性毒性試験法としてはTL_m (median tolerance limit) 値を求める試験法で行う。TL_m値は48時間におけるものを使用し、できる限り24時間、72時間におけるものを併記する。

(1) 装置および器具

試験容器は容量が10ℓ以上のガラス水槽を用い、方形のものでは3辺の比が、円筒形のものでは直径と高さの比が大きくないものが望ましい。同時に行う試験には同一種類の容器を用いなければならない。

(2) 供試生物

供試生物は原則として全長5cm前後のコイとする。ただしその農薬が水田に使用されないものであればヒメダカ、モツゴなどを用いてもよいが、この場合はその毒性が他の農薬の毒性と容易に比較できるような参考資料を併記しなければならない。供試魚は試験条件になじませるため入手後供試までに最低1週間の期間を置く。この期間中は1日1回給餌し、試験前48時間は餌止めをする。

試験に際しては供試魚の大きさをできるだけそろえ、同一試験に供試する魚は同一条件で入手したものとする。この試験には病気または外見や行動に異状のある魚は使わないようにする。

(3) 試験条件および操作

試験の際の水温は20～28℃とし試験中の水温変化は±2℃以内にとどめるようにする。供試薬液の各濃度について同時に試験する固体数は少なくとも10尾とする。供試薬液の量は供試魚の体重1gについて1ℓ以上とする。必ず希釈に用いた水のみを対照区を設け、この区において10%以上の斃死があった場合はこの試験結果は使用しない。

(4) 試験結果の取り扱い

試験結果からTL_m値を求めるにはダートロフの方法による。すなわち、片対数グラフの対数目盛に供試薬液の濃度を取り、普通目盛には生存率を取り、測定された生存率が50%より上の点と下の点で最も50%に近いものを選ぶ。この二点を直線で結び50%の線と交わる点の濃度をTL_m値とする。

(5) 供試薬剤の取り扱い

ある農薬の試験はその製剤とともに原体について行うことが望ましい。水に親和しない原体はできる限り少量の適当な溶剤を加えて懸濁するようにする。なお、溶剤を使用した場合は溶剤のみの対照区をつくらなければならない。粉剤、水和剤はできるだけ毒性を把握するようにするが、この場合溶剤などは加えない。必要に応じて魚を入れる直前および24時間後に供試薬液を攪拌する。

〔ミジンコ類の試験法(暫定)〕

(1) 供試生物

ミジンコまたはタマミジンコの雌成体

(2) 試験条件

腰高シャーレに供試薬液を100ml入れる。薬液は農薬を井水に溶解させたものである。
一区に放すミジンコは約20尾とする。

(3) 試験方法

コイに対する毒性試験に準じて薬液の濃度段階をとり、3時間後のTL_m値を測定する。生死の判定は触角の運動が停止しているものを「死」とする基準による。

農薬の登録申請に係る試験成績について

(平成12年11月24日付け12農産第8147号農林水産省農産園芸局長通知)

一部改正 平成13年 6月26日 13生産第1739号

一部改正 平成14年12月10日 14生産第7269号

(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」(抄)

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 - 1 3
○ 1年間反復経口投与毒性試験 -----	2 - 1 - 1 4
○ 発がん性試験 -----	2 - 1 - 1 5
○ 1年間反復経口投与毒性試験 / 発がん性併合試験 -----	2 - 1 - 1 6
○ 繁殖毒性試験 -----	2 - 1 - 1 7
○ 催奇形性試験 -----	2 - 1 - 1 8
○ 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
・ ミジンコ類急性遊泳阻害試験 -----	2 - 7 - 2 - 1
・ ミジンコ類繁殖試験 -----	2 - 7 - 2 - 2
・ 藻類生長阻害試験 -----	2 - 7 - 3
○ 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 6
○ 水質汚濁性に関する試験	
・ 水質汚濁性試験 -----	2 - 1 0 - 1

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	
・ 容器内試験 -----	3 - 2 - 1 - 1
・ ほ場試験 -----	3 - 2 - 1 - 2
・ 後作物残留性試験 -----	3 - 2 - 2

水産動植物への影響に関する試験(2 - 7 - 1 ~ 3)

魚類急性毒性試験(2 - 7 - 1)

1. 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（鰓ぶたの動き等）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) 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) NOEC (No Observed Effect Concentration：最大無影響濃度)：対照区と比べて、何ら影響が認められない試験最高濃度をいう。
- (4) 被験物質：試験に用いる農薬の原体又は製剤をいう。
- (5) 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。
- (6) 試験物質：試験に用いる被験物質及び基準物質をいう。
- (7) 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。
- (8) 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。
- (9) 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

供試魚は、別表の魚種の中から選択する。
基準物質での LC_{50} を確認することが望ましい。

(2) 順化

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。
必要に応じて、入手時に薬浴を行う。
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。
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。
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

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。

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、使用最高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

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。

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。

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。

(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) 収容密度

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。

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) 希釈水

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。

脱塩素水道水、天然水又は人工調製水を用いる。

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時間目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

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。

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

試験に先立って希釈水の水質を確認する。

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 LC_{50} を算定する。

(2) 被験物質濃度の測定値が設定濃度から $\pm 20\%$ 以上変動している場合は、測定濃度の平均値に基づき LC_{50} 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 LC_{50} 等

(3) 試験方法について

暴露条件、環境条件、観察及び測定項目等

(4) 試験結果について

LC_{50} 及びその95%信頼限界(可能であれば各観察時間のもの)

LC_{50} の算定方法

NOEC (NOECの値が求められなかった場合は、その理由を記すこと。)

各観察時間における各試験区での累積死亡率

暴露終了時における濃度 - 死亡率曲線のグラフ

供試魚の異常な症状及び反応

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)

環境条件の測定結果

水質、溶存酸素濃度、pH等

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 ()	試験魚の全長 (cm)
コイ (<i>Cyprinus carpio</i>)	20 ~ 24	5.0 ± 1.0
ヒメダカ (<i>Oryzias latipes</i>)	21 ~ 25	2.0 ± 1.0
ブルーギル (<i>Lepomis macrochirus</i>)	21 ~ 25	3.0 ± 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>Brachydanio 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

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) NOEC (No Observed Effect Concentration : 最大無影響濃度) : 対照区と比べて、何ら影響が認められない試験最高濃度をいう。
- (4) 被験物質：試験に用いる農薬の原体又は製剤をいう。
- (5) 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。
- (6) 試験物質：試験に用いる被験物質及び基準物質をいう。

- (7) 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。
- (8) 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。
- (9) 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

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。

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。

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。

(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。ただし、供試生物の種によっては24時間とすることができる。

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

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。

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、使用最高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

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。

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。

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。

（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

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

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。

脱塩素水道水、天然水又は人工調製水を用いる。

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時間目及び48時間目における遊泳阻害の有無について観察し記録する。

（２）被験物質濃度の測定

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。

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

試験に先立って希釈水の水質を確認する。

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 $\pm 20\%$ 以上変動している場合は、測定濃度の平均値に基づき EC_{50} 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 EC_{50} 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

EC_{50} 及びその 95% 信頼限界 (可能であれば各観察時間のもの)

EC_{50} の算定方法

NOEC (NOEC の値が求められなかった場合は、その理由を記す。)

各観察時間における各試験区での累積遊泳阻害率

暴露終了時における濃度 - 遊泳阻害率曲線のグラフ

観察された影響

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)

環境条件の測定結果

水質、溶存酸素濃度、pH 等

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等

12. 試験の妥当性

- (1) 暴露終了時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。

- (3) 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。