

業務報告書

平成 28 年度農薬の影響評価に向けた試験委託事業
(①有用生物の試験実施マニュアル策定)

平成 29 年 3 月

一般財団法人生物科学安全研究所

目次

目次	1
【1】 国内外からの知見の収集	
1. OECD ガイドライン等の全文翻訳	2
2. ドラフトガイダンス作成のためのリングテスト結果の概要	32
3. 国内外の情報・文献収集	48
【2】 海外で先駆的にミツバチに対する影響評価試験の検討を行っている施設での 研修による情報収集	51
【3】 実証試験の実施 ○	
1. セイヨウミツバチ幼虫を用いる単回暴露毒性試験（ジメトエート）	77
2. セイヨウミツバチ幼虫を用いる反復暴露毒性試験（ジメトエート）	87
3. セイヨウミツバチ成虫を用いる 10 日間慢性経口摂食毒性試験 （ジメトエート）	99
【4】 マニュアルの策定 ○	
1. 研修による情報収集結果及び実証試験から得られた情報のまとめ	114
2. セイヨウミツバチ（ <i>Apis mellifera</i> ）を用いる幼虫単回投与毒性試験 及び複数回投与毒性試験	117
3. セイヨウミツバチ成虫を用いる 10 日間慢性経口摂食毒性試験	141
【5】 まとめ ○	
1. 検討課題	157
2. まとめ	159

【3】 実証試験結果報告

3.1 セイヨウミツバチ幼虫でのジメトエート単回投与毒性試験

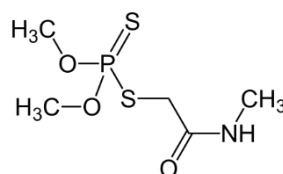
1) 被験物質

名称（英名）：ジメトエート [Dimethoate]

被験物質の選定理由：2008年にOECDが実施した” Honey Bee (*Apis Mellifera* L.) Larval Toxicity Test, Single Exposure” の妥当性及びその有用性を確認するための国際リングテストで用いられた参照物質であるため。

Cas No. : 60-51-5

構造式 :



2) 試験方法

① 供試生物

生物名（学名）：セイヨウミツバチ (*Apis mellifera*) 幼虫

由 来 : 研究所内ミツバチ飼育区域で維持飼育していた蜂群

使用蜂群 : 疫病の兆候が見られず蜂量が適度であり、かつ女王蜂の産卵が正常であることが確認された群

採集幼虫数 : 216匹（孵化後24時間以内）

供試生物の採集：幼虫採集の4日前に健常群であることを確認した蜂箱内に空の巣板を導入した。幼虫採集日に新たに導入した巣板を取り出し、消毒済みステンレス製移虫針を用いて、シャーレに薄く展ばしたローヤルゼリー（国産ローヤルゼリー、熊谷養蜂場）上に幼虫を移した。幼虫を移したシャーレは速やかに実験室へ運搬し、温度34.5℃±0.5℃、相対湿度95%±5%に調整したデシケーターに収容した。さらに2時間後に生存が確認された個体のみを試験に供した。

② 試験期間

1回目試験 : 2016年10月11日から2016年10月17日

2回目試験 : 2016年10月14日から2016年10月20日

③ 区構成及び生物数

1群12匹以上でその3反復36匹以上を1区として、それぞれ投与量の異なる被験物質を投与する5区、陰性対照1区の計6区を設定した。なお、各区への幼虫の割り当ては試験4日（幼虫の孵化日を「試験1日」とする。）に行い、栄養状態が良好と判断された幼虫を無作為に割り当てた。区構成を表1に示す。この試験を繰り返し2回行った。

表1 区構成及び各区生物数

区	投与量	生物数 (匹)
陰性対照	-	39
被験物質（ジメトエート）	0.83 µg/幼虫	41
	1.65 µg/幼虫	41
	3.3 µg/幼虫	41
	6.6 µg/幼虫	41
	13.2 µg/幼虫	41

3) 飼育管理

① 飼育環境

幼虫は、飽和硫酸カリウム溶液によって95%±5%に湿度調整したデシケーター内に入れ、それを温度34.5℃±0.5℃に調整したインキュベーターに入れて飼育した。

② 飼育容器

70%エタノールに1時間浸漬して消毒後に乾燥させたプラスチック製女王蜂養成用人工王椀を、滅菌済み48ウェルの組織培養用ディッシュにセットして用いた。

③ 飼料

ローヤルゼリー（国産ローヤルゼリー 熊谷養蜂場）、果糖（特級、和光純薬株式会社製）、ブドウ糖（特級、和光純薬株式会社製）、イーストエクストラクト（Bacto Yeast Extract、Becton Dickinson and Company社製）を、オートクレーブで滅菌処理した超純水で混合した飼料を、試験2日を除いた5日間について、24時間ごとに個体毎で所定量を給与した（2日目を除く）。飼料の組成及び給与量を表2に示す。

表2 飼料組成及び各試験日における飼料給与量

試験日	飼料給与量 (µL)	ブドウ糖 (%)	果糖 (%)	イーストエクストラクト (%)	ローヤルゼリー (%)
1	20	6	6	1	50
2	-	-	-	-	-
3	20	7.5	7.5	1.5	50
4	30	9	9	2	50
5	40	9	9	2	50
6	50	9	9	2	50

④ 飼料給与

幼虫を飼育容器に移虫後、表2で示した組成の飼料の当該量を、滅菌処理したチップ

を装着したマイクロピペットを用いて幼虫の口の近くに滴下して給与した。

4) 被験物質の投与

投与経路 : 混餌投与

投与量 : 2008年にOECDが実施した幼虫単回投与試験法検討のための国際リングテストにおけるジメトエートの投与量と同様の13.2 µg/幼虫から0.83 µg/幼虫の範囲内で5用量区を設定した。他に陰性対照区を設けた。

投与方法及び投与回数 :

所定濃度に調製した飼料を、試験4日のミツバチ幼虫に1回投与した。

被験物質添加飼料の調製 :

本試験では、ジメトエート投与飼料調製溶液を飼料に5% (w/w) 添加してジメトエート投与飼料を調製した。被験物質投与量と被験物質添加飼料中濃度及び投与飼料調製溶液中被験物質濃度は下記の計算式で求められる。投与飼料給与重量は、投与飼料給与容量である30 µLに、OECD “Honey Bee (*Apis mellifera*) Larval Toxicity Test, Repeated Exposure” ドラフトガイダンス中に示されている飼料の比重1.1を乗じた33 mgとなる。本試験での投与量、飼料中濃度及び投与飼料調製溶液中濃度を表3に示す。表に示した濃度になるよう、被験物質を滅菌蒸留水溶解し投与飼料調製溶液を調製し、使用時まで-10℃以下で保存した。

$$\text{実際の投与量 (µg/幼虫)} = \text{飼料給与重量 (33 mg)} \times \text{飼料中濃度 (mg/kg)}$$

$$\text{飼料中濃度 (mg/kg)} = \frac{\text{飼料への添加割合 (5\%)} \times \text{投与飼料調製溶液濃度 (mg/L)}}{100}$$

表3 各試験区における投与量、飼料中濃度及び投与飼料調製溶液中濃度

区	投与量 (µg)	飼料中濃度 (mg/kg)	投与飼料調製溶液中濃度 (mg/L)
0.83 ng/幼虫	0.83	25	500
1.65 ng/幼虫	1.65	50	1000
3.3 ng/幼虫	3.30	100	2000
6.6 ng/幼虫	6.60	200	4000
13.2 ng/幼虫	13.20	400	8000

5) 観察

試験4日目から試験7日目までの毎日、死亡の有無を観察して記録した。また、試験7日目（試験終了時）における残餌の有無を記録した。なお、死亡した個体については、衛生上の観点から速やかに実験環境から取り出して廃棄した。

6) 統計解析

LD₅₀値は、試験4日から試験6日及び試験7日までの累積死亡数を基にProbit法により算出した。また試験7日及び試験6日における各区の死亡数についてフィッシャーの正確確率検定を行い、有意差がない濃度区内で最も高い濃度をNOAELとした。

7) 試験の有効性

試験4日目から7日目にかけての陰性対照区の死亡率が15%以下である場合に、当試験は有効であると判断した。

8) 結果及び考察

1回目および2回目の試験におけるセイヨウミツバチ幼虫の死亡数及び死亡率をそれぞれ表1、図1及び表2、図2に示す。試験4日（投与日）から試験7日（投与後72時間）までの死亡数（補正累計死亡率）は、各区41匹中、ジメトエート投与区0.83 µg/幼虫において1回目が26匹（61%）、2回目で24匹（59%）、1.65 µg/幼虫において1回目で28匹（66%）、2回目で22匹（54%）、3.3 µg/幼虫において1回目で32匹（77%）、2回目で28匹（68%）、6.6 µg/幼虫において1回目で33匹（79%）、2回目で29匹（71%）、13.2 µg/幼虫において1回目で37匹（89%）、2回目で37匹（90%）認められた。LD₅₀値（95%信頼限界）は1回目が0.32 µg/幼虫（0.01~0.85 µg/幼虫）、2回目が0.77 µg/幼虫（0.12~1.47 µg/幼虫）と算出された。また、試験7日における各区の死亡数についてフィッシャーの正確確率検定を行った結果、NOAELは1回目については求めることができず、2回目試験では1.65 µg/幼虫となった。

なお、陰性対照の無処理区および溶媒対照区の死亡数（死亡率）は、各区39匹中1回目2匹（5%）、2回目0匹（0%）であり、試験成立基準の条件を満たしたことから本試験は有効であったと判断した。

2013年に単回投与毒性試験がガイドライン化される前に、10th International Symposium of the ICP-PR Hazards of pesticides to bee (2009)において発表された各試験機関におけるリングテストの結果をまとめた資料においては、投与48時間後である試験6日の結果について議論が行われている。その資料中に示された各試験機関における平均LD₅₀の分布を参考資料1に示す。

そこで今回の試験における試験6日における結果についても表1、図1及び表2、図2中に示した。試験6日（投与後48時間）までの死亡数（補正累計死亡率）は、各区41匹中、

ジメトエート投与各区においてそれぞれ 0.83 μg /幼虫において 1 回目で 19 匹 (43%)、2 回目で 15 匹 (37%)、1.65 μg /幼虫において 1 回目で 21 匹 (48%)、2 回目で 14 匹 (34%)、3.3 μg /幼虫において 1 回目で 23 匹 (54%)、2 回目で 16 匹 (39%)、6.6 μg /幼虫において 1 回目で 24 匹 (57%)、2 回目で 23 匹 (56%)、13.2 μg /幼虫において 1 回目で 27 匹 (64%)、2 回目で 26 匹 (63%) 認められた。LD₅₀ 値 (95 %信頼限界) は 1 回目の試験では 1.43 μg /幼虫 (-)、2 回目では 4.84 μg /幼虫 (2.53~15.34 μg /幼虫) と算出された。

リングテストでは、LD₅₀ 平均値は 9 試験施設中 2 試験施設で 5.0 μg /幼虫および 8.8 μg /幼虫と高い値であったものの、残り 7 試験施設では 1.5 μg /幼虫から 3.1 μg /幼虫の範囲に入っていた。試験結果は試験施設間でもばらついているが、同試験施設内でもばらつきが大きく、今回の試験における試験 6 日の結果についても、おおむねそのばらつきの範囲内に収まる結果であった。

その後再度のリングテストは行われずに、最終的に試験 7 日、投与 72 時間後の結果を用いること、試験の陽性対照としてはジメトエート 13.2 μg /幼虫区を設定すること、ただし幼虫に対する影響評価としては単回投与試験のみでは不十分で、複数回投与の結果を重要視する必要があるという見解の上に単回投与毒性試験は TG237 として 2013 年 7 月にガイドライン化された。

そのガイドライン化にあたって行われた会合での内部資料は入手することができず、ガイドライン試験終了日が試験 7 日となった理由は明らかではない。しかしリングテストの結果とそれについての解釈及び今回の試験結果から判断すると、投与 48 時間後では LD₅₀ 値の 2~10 倍以上の濃度であると考えられる 13.2 μg /幼虫投与区でも十分に高い死亡率が得られなかったことから、試験 7 日、投与 72 時間後の結果を用いることになったと考えられる。リングテストについてまとめた資料中では、LD₅₀ 値のばらつきの原因としてコロニーの状態の不均一性と移虫した幼虫の齢の不均一性が考えられるとしているが、実施可能な試験デザインのためには幼虫の齢を狭めることは難しく、その影響を相殺するために試験終了時間を延長するという手段をとったと推察される。

また今回の試験結果から、ミツバチ幼虫を用いて急性毒性試験を行ったときには、投与に反応して死亡する個体が有意に出現し始める濃度から、投与された個体群がほぼ死亡する濃度までの幅が広くほぼ 10 倍もの幅をもち、LD₅₀ 値が求めにくく結果もばらついてしまうことが明らかとなった。羽化を試験終了とする複数回投与毒性試験ではこのようなことはなく、用量反応性のある結果が得られている。ミツバチ幼虫が農薬等に汚染された食物を摂食する場合には、単回投与試験で再現されるような短期間のみ食物が汚染されるケースは考えにくく、長期にわたり継続的に汚染された食物を摂取することが考えられる。このことから単回投与試験よりは複数回摂食試験の結果を環境影響評価としては重視するべきであるという共通見解がある。同時に、ミツバチ幼虫の生理的特性からも、単回投与 (急性) 毒性試験結果で得られる LD₅₀ 値はばらつきが大きく再現性が低くなるため、複数回投与毒性試験を行うことにより再現性、信頼性共に高い結果を得たほうが有用であると考えられた。

表1 ジメトエートのセイヨウミツバチ幼虫を用いる単回投与毒性試験結果1回目

試験区	供試 匹数	死亡数				試験6日の 累計死亡数 /供試匹数	試験7日の 累計死亡数 供試匹数	試験6日の LD ₅₀ 値 (95%信頼限界)	試験7日の LD ₅₀ 値 (95%信頼限界)	NOAEL	累計死亡率(%)				試験6日の 補正累計 死亡率(%) ^b	試験7日の 補正累計 死亡率(%) ^b
		試験日数 ^a									試験日数					
		4	5	6	7						4	5	6	7		
陰性対照区(無処理区)	39	0	2	0	0	2/39	2/39				0	5	5	5	5	
ジメトエート 13.2 µg/larva区	41	0	6	21	10	27/41 [*]	37/41 [*]				0	15	66	90	89	
ジメトエート 6.6 µg/larva区	41	0	6	18	9	24/41 [*]	33/41 [*]	1.43 µg/larva	0.32 µg/larva		0	15	59	80	79	
ジメトエート 3.3 µg/larva区	41	0	8	15	9	23/41 [*]	32/41 [*]	(-)	(0.01~0.85 µg/larva)	-	0	20	56	78	77	
ジメトエート 1.65 µg/larva区	41	0	3	18	7	21/41 [*]	28/41 [*]				0	7	51	68	66	
ジメトエート0.83 µg/larva区	41	0	0	19	7	19/41 [*]	26/41 [*]				0	0	46	63	61	

a: 試験4日が投与日となる

b: 補正累計死亡率 $M = (\%P \cdot \%T) / (100 \cdot \%T) \times 100$ %P=投与区の試験7日累計死亡率 %T=陰性対照区(溶媒)の試験7日累計死亡率

*: フライシヤの正確確率検定の結果、陰性対照(溶媒対照)区との間に5%水準で有意差あり

注) 溶媒には水を使用しているため、本試験での溶媒対照区(アセトン)は参考データ

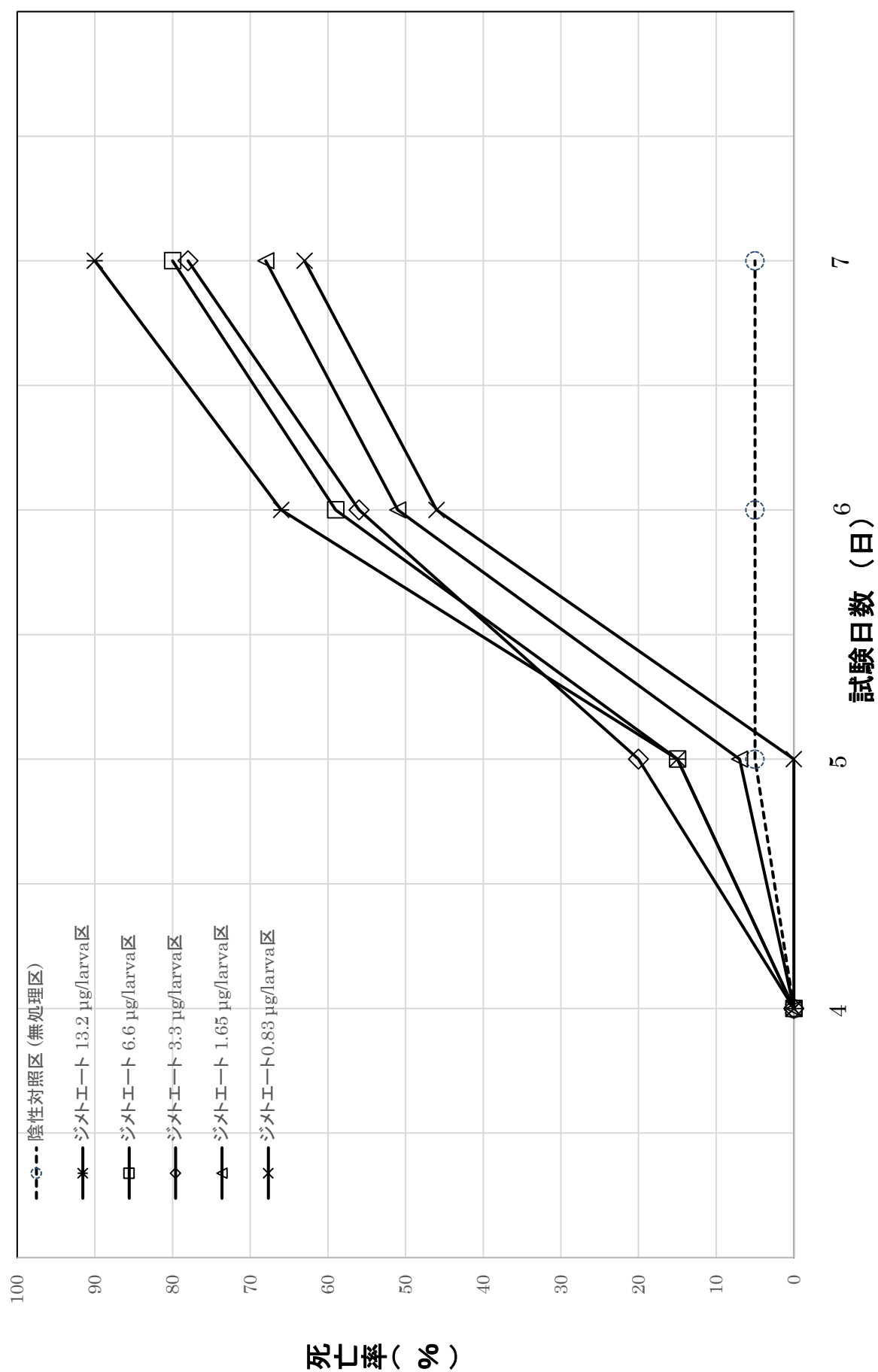


図1 ジメクトートのセイヨウミツバチ幼虫を用いる単回投与毒性試験1回目における累計死亡率推移

注) 溶媒には水を使用しているため、本試験での溶媒対照区(アセトン)は参考データ

表2 ジメトエートのセイウミツバチ幼虫を用いる複数回投与毒性試験2回目

試験区	供試 匹数	死亡数										累計死亡率(%)									
		試験日数 ^a										累計死亡率/試験日数									
		3	4	5	6	7	8	15	22	22	22	試験日数									
陰性対照 (無処理)	36	0	1	0	0	0	0	3	4	8/36	28/36										
ジメトエート 48 mg/kg	36	0	7	6	4	3	2	11	2	35/36 [*]	1/36 [*]										
ジメトエート 24 mg/kg	36	0	2	4	8	5	2	5	4	30/36 [*]	6/36 [*]										
ジメトエート 12 mg/kg	36	0	1	4	2	4	0	5	2	18/36 [*]	18/36 [*]										
ジメトエート 6 mg/kg	36	0	1	1	0	1	0	2	2	7/36	29/36										
ジメトエート 3 mg/kg	36	0	0	0	0	3	1	6	2	12/36	24/36										

a: 試験3日が投与開始日となる

*: 陰性対照(無処理)と比べて、死亡数の有意な増加(片側、p<0.05)

注) 溶媒には水を使用しているため、本試験での溶媒対照区(アセトン)は参考データ

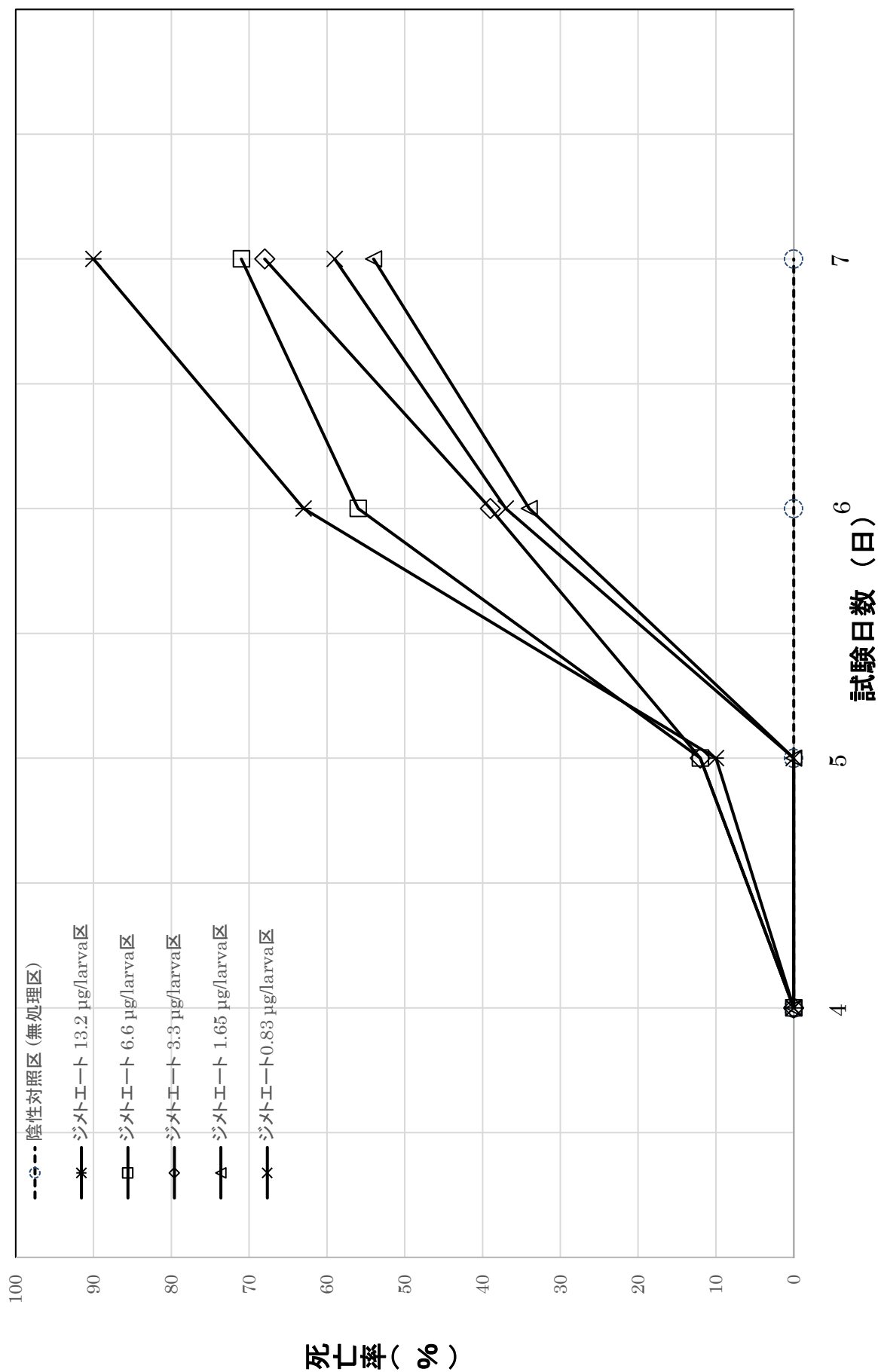


図2 ジメコートのセイウミツバチ幼虫を用いる単回投与毒性試験2回目における累計死亡率推移

注) 溶媒には水を使用しているため、本試験での溶媒対照区(アセトン)は参考データ

参考資料 1

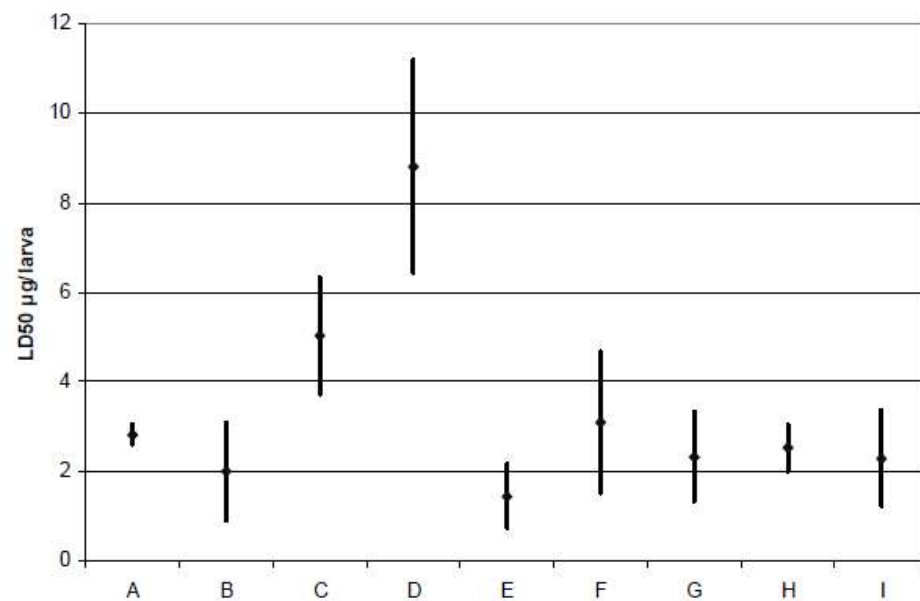


Figure 3 Mean LD50 for each test ($\pm$ standard deviation)

10th International Symposium of the ICP-PR Hazards of pesticides to bee (2009) Page 100 より

3.2 セイヨウミツバチ幼虫でのジメトエート複数回投与毒性試験

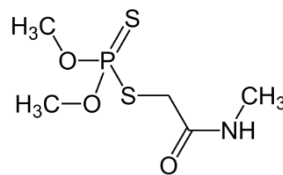
1) 被験物質

名称（英名）：ジメトエート [Dimethoate]

被験物質の選定理由：2013年にOECDが実施した“Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Larval Toxicity Test, Repeated Exposure”の妥当性及びその有用性を確認するための国際リングテストで用いられた参照物質であるため。

Cas No. : 60-51-5

構造式 :



2) 試験方法

① 供試生物

生物名（学名）：セイヨウミツバチ (*Apis mellifera*) 幼虫

由 来 : 研究所内ミツバチ飼育区域で維持飼育していた蜂群

使用蜂群 : 疫病の兆候が見られず蜂量が適度であり、かつ女王蜂の産卵が正常であることが確認された群

採集幼虫数 : 216匹（孵化後24時間以内）

供試生物の採集：幼虫採取の4日前に健常群であることを確認した蜂箱内に空の巣板を導入した。幼虫採集日に新たに導入した巣板を取り出し、消毒済みステンレス製移虫針を用いて、シャーレに薄く展ばしたローヤルゼリー（国産ローヤルゼリー、熊谷養蜂場）上に幼虫を移した。幼虫を移したシャーレは速やかに実験室へ運搬し、温度34.5℃±0.5℃、相対湿度95%±5%に調整したデシケーターに収容した。さらに2時間後、生存が確認された個体のみを試験に供した。

② 試験期間

1回目試験 2016年8月2日から2016年8月23日

2回目試験 2016年8月22日から2016年9月12日

③ 区構成及び生物数

1群12匹以上3反復36匹以上を1区として、それぞれ投与量の異なる被験物質を投与する5区、陰性対照1区の計6区を設定した。なお、各区への幼虫の割り当ては試験3日（幼虫の孵化日を「試験1日」とする。）に行い、栄養状態が良好と判断された幼虫を無作為に割り当てた。区構成を表1に示す。この試験を繰り返し2回行った。

表1 区構成及び各区生物数

区	飼料中濃度	生物数(匹)
陰性対照	-	36
被験物質 (ジメトエート)	3 mg/kg	36
	6 mg/kg	36
	12 mg/kg	36
	24 mg/kg	36
	48 mg/kg	36

3) 飼育管理

① 飼育環境

幼虫は、飽和硫酸カリウム溶液によって95%±5%に湿度調整したデシケーター内に入れ、それを温度34.5℃±0.5℃に調整したインキュベーターに入れて飼育した。湿度は試験7日に飽和塩化ナトリウム溶液を用いて80%±5%に、試験15日以降は50%に調整した。

② 飼育容器

70%エタノールに1時間浸漬して消毒後に乾燥させたプラスチック製女王蜂養成用人工王椀を、滅菌済み48ウェルの組織培養用ディッシュにセットして用いた。

③ 飼料

ローヤルゼリー（国産ローヤルゼリー 熊谷養蜂場）、果糖（特級、和光純薬株式会社製）、ブドウ糖（特級、和光純薬株式会社製）、イーストエクストラクト（Bacto Yeast Extract Becton Dickinson and Company社製）を、オートクレーブで滅菌処理した超純水で混合した飼料を、試験2日を除いた5日間について、24時間ごとに個体毎で所定量を給与した（2日目を除く）。飼料の組成及び給与量を表2に示す。

表2 飼料組成（重量%）及び各試験日における飼料給与量

試験日	飼料給与量 (μ L)	ブドウ糖 (%)	果糖 (%)	イーストエクストラクト (%)	ローヤルゼリー (%)
1	20	6	6	1	50
2	-	-	-	-	-
3	20	7.5	7.5	1.5	50
4	30	9	9	2	50
5	40	9	9	2	50
6	50	9	9	2	50

④ 飼料給与

幼虫を飼育容器に移虫後、表2で示した組成の飼料の当該量を、滅菌処理したチップを装着したマイクロピペットを用いて幼虫の口の近くに滴下して給与した。

4) 被験物質の投与

投与経路 : 混餌投与

投与濃度 : 2014年にOECDが実施した当試験法検討のための国際リングテストにおけるジメトエートの投与濃度と同様の48 mg/kg、24 mg/kg、12 mg/kg、6 mg/kg及び3 mg/kgを設定した。他に陰性対照区を設けた。

投与方法及び投与回数 : 所定濃度に調製した飼料を、試験3日から試験6日までの4日間連続で投与した。

被験物質添加飼料の調製 :

本試験では、ジメトエート投与飼料調製溶液を飼料に5% (w/w) 添加してジメトエート投与飼料を調製した。被験物質添加飼料中濃度及び投与飼料調製溶液中被験物質濃度は下記の計算式で求められる。本試験での飼料中濃度及び投与飼料調製溶液中濃度を表3に示す。表に示した濃度になるよう、被験物質を滅菌蒸留水で溶解し投与飼料調製溶液を調製し、使用時まで-10℃以下で保存した。

$$\text{飼料中濃度 (mg/g)} = \frac{\text{飼料への添加割合 (5\%)} \times \text{投与飼料調製溶液 (mg/L)}}{100}$$

表3 各試験区における投与量、飼料中濃度及び投与飼料調製溶液中濃度

区	飼料中濃度 (mg/kg)	投与飼料調製 溶液中濃度 (mg/L)
3 mg/kg	3	60
6 mg/kg	6	120
12 mg/kg	12	240
24 mg/kg	24	480
48 mg/kg	48	960

5) 観察

試験4日目から試験8日目までは毎日、その後蛹期として試験15日目、成虫として試験22日目に死亡の有無を観察した。その他試験8日の残餌等、異常の有無について観察した。幼虫及び蛹の死亡個体は衛生上の理由から速やかに飼育環境から取り出して処

分した。

6) 統計解析

試験により得られた試験22日の羽化数を用いて、EC₅₀及び95%信頼限界値を計算した。

また試験22日における羽化数を用いて、フィッシャーの正確確率検定によりNOEC(無影響濃度)を求めた。なお、有意水準は $p < 0.05$ を有意差ありとした。

7) 試験の有効性

試験8日の無処理区(陰性対照)の死亡率が15%以下、試験22日の無処理区(陰性対照)の羽化率が70%以上である場合に、当試験は有効であると判断した。

8) 結果及び考察

第1回及び第2回試験の試験22日までの死亡数経日推移、及び試験22日における羽化数及び羽化率をそれぞれ表1、図1及び表2、図2に示す。試験22日までの羽化数は、ジメトエート投与区各区36匹中、3 mg/kg濃度区において1回目が22匹(61%)、2回目が24匹(67%)、6 mg/kg濃度区において1回目が26匹(72%)、2回目29匹(81%)、12 mg/kg濃度区において1回目が17匹(47%)、2回目が18匹(50%)、24 mg/kg濃度区において1回目が7匹(19%)、2回目が6匹(17%)、48 mg/kg濃度区においては1回目、2回目とも1匹(3%)であった。EC₅₀値(95%信頼限界)は1回目が7.76 mg/kg(5.52~10.26 mg/kg)、2回目が8.91 mg/kg(6.74~11.43 mg/kg)と算出された。また、NOECは1回目試験では12 mg/kgとなり、2回目試験では6 mg/kgとなった。

なお、無処理区(陰性対照)試験8日の死亡数(死亡率)は各区36匹中1回目3匹(8%)、2回目1匹(3%)と試験成立基準条件である15%を下回り、また無処理区(陰性対照)の試験22日羽化数(生存率)は各区36匹中1回目30匹(83%)2回目28匹(78%)と試験成立基準条件である70%を上回ったことから、本試験は有効であったと判断した。

2016年に公表されたValidation report “Results of an international ring test of the honey bee (*Apis mellifera*) larval toxicity test, repeated exposure”中のANNEX 1において、各試験機関におけるリングテストの結果がまとめられている。その資料中に示された各試験機関における平均EC₅₀の分布を参考資料1に示す。

リングテストにおいて13試験施設で得られたEC₅₀値の平均値は7.01 mg/kgであり、今回当研究所で行われた2回の試験で得られたEC₅₀値は、その平均値に近い値であった。またリングテストにおいて13試験施設中の2試験施設で行われた試験においては試験成立基準を満たしていなかったが、今回当研究所で行った2回の試験では共に試験成立基準を満たすことができた。当研究所でもリングテストに参加した試験施設と同様に、信頼性、再現性のある試験を行うことができたと考えられた。

今回の試験では、NOEC以下である3 mg/kg区における羽化率が、同様にNOEC以下である6 mg/kg区よりも低かった。しかし、3 mg/kg区の幼虫期における死亡率は、6 mg/kg区より高くはなかった。一方、試験7日の観察において、陰性対照区で飼料を全量摂食していた個体数は1回目試験で3個体、2回目試験で4個体であったが、3 mg/kg区においては1回目試験で13個体、2回目試験で11個体、6 mg/kg区においては1回目試験で15個体、2回目試験で8個体であり、低濃度群の飼料摂取量は陰性対照群より多く、幼虫の生育が早いことがうかがわれた。このため、試験計画書どおりに湿度変更を試験8日に行ったのでは、低濃度区の多くの個体で湿度低下前に脱糞が起こってしまう可能性があると考えられ、試験7日に湿度変更を行った。しかし、低濃度区では試験7日の湿度変更時にすでに脱糞が起こっていた可能性があり、これが3 mg/mL区での羽化率の低下につながったのではないかと考えられる。

今年度はこれ以上の試験を行うことはできず、上記の現象を再確認することはできなかったため、今後検討していく必要があると考えられる。リングテストの結果をまとめた資料中には、ある研究施設で3 mg/kg区における羽化率が6 mg/kg区よりも低かったと記載されていたが、原因等を推察するような記載はなかった。その資料で示されていた被験物質濃度と羽化率との相関図を参考資料2に示す。また、本試験1回目結果における被験物質濃度と羽化率との相関図を参考資料3に示す。

当研究所で幼虫の生育速度について調査した結果、シーズンの始めから6月下旬までの速度と比較して、それ以降シーズン終了までの生育速度は速い、という結果が得られている（未発表データ）。今回の試験は日本で8月以降実施されたが、ドイツにおける情報収集の結果から、リングテストに参加したヨーロッパの試験施設では、一般的に夏になる前の約3ヶ月のみ試験を行っているということであった。すなわち、幼虫の生育速度が遅いシーズン始めから6月下旬までの間にリングテストが実施されたため、試験8日目が湿度変更に適切なタイミングであり、低濃度区における高い死亡率が観察された試験は13試験中1試験にとどまったのではないかと考えられる。

建群期が終了すると幼虫の生育速度が速まることから、ヨーロッパでは建群期に限り試験を行っているということである。試験のための幼虫が得られやすいのは建群期であるが、日本の気候条件においてはそれ以降夏季でも齢の揃った幼虫が得やすく、試験を実施することが可能である。しかしガイドラインのための基礎検討及びヨーロッパの試験期間での試験は建群期でのみ行われていることから、日本で建群期終了後に試験を行うことの妥当性については、再検討すべきと考えられる。また、ミツバチの被験物質に対する感受性を、短く特別な期間である建群期でのみ行われた試験を用いて評価することが、その種の感受性評価として妥当であるかどうかについても、検討する必要があるだろう。

表1 ジメトエートのセイウミツバチ幼虫を用いる複数回投与毒性試験1回目

	経日的死亡個体数推移(匹)													累計死亡率(%)				
	試験日数 ^a													試験日数				
	供試 匹数	3	4	5	6	7	8	15	22	累計死亡数 /供試匹数				試験22日にお ける羽化数				NOEC
陰性対照(無処理)	36	0	1	2	0	0	0	0	3	6/36				30/36				
ジメトエート48 mg/kg	36	0	2	5	8	6	4	10	0	35/36 [*]				1/36 [*]				
ジメトエート24 mg/kg	36	0	3	1	9	7	2	4	3	29/36 [*]				7/36 [*]				
ジメトエート12 mg/kg	36	0	2	4	5	2	1	2	3	19/36				17/36				
ジメトエート6 mg/kg	36	0	2	3	0	0	1	3	1	10/36				26/36				
ジメトエート3 mg/kg	36	0	0	2	0	1	3	5	3	14/36				22/36				

a: 試験3日が投与開始日となる

*: 陰性対照(無処理)と比べて、死亡数の有意な増加(片側、p<0.05)

注) 溶媒には水を使用しているため、本試験での溶媒対照区(アセトン)は参考データ

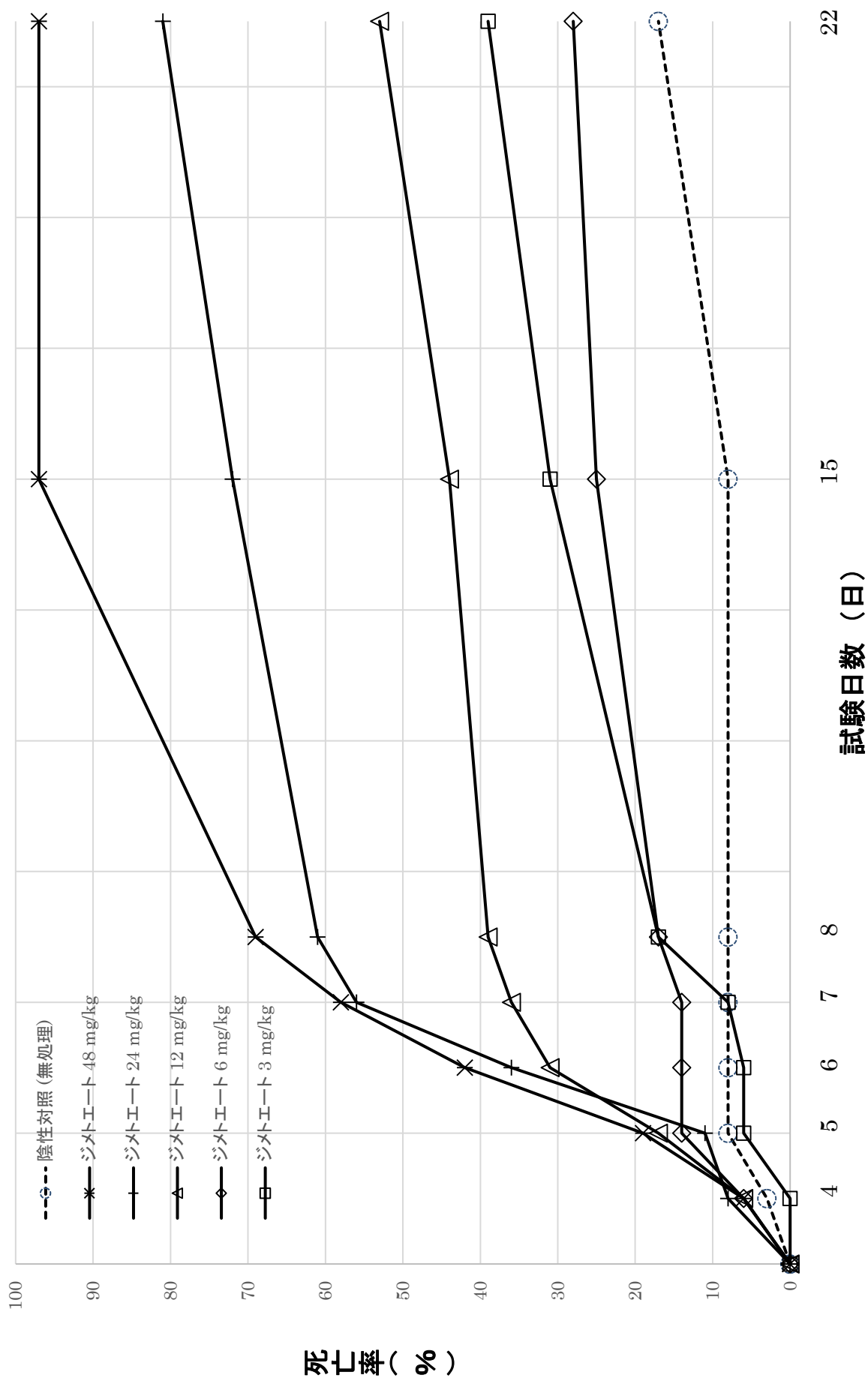


図1 ジメトエートのセイウミツバチ幼虫を用いる複数回投与摂食毒性試験1回目における累計死亡率推移

注) 溶媒には水を使用しているため、本試験での溶媒対照区(アセトン)は参考データ

表2 ジメトエートのセイウミツバチ幼虫を用いる複数回投与毒性試験2回目

試験区	供試 匹数	死亡数										累計死亡率(%)									
		試験日数 ^a										累計死亡率/試験日数									
		3	4	5	6	7	8	15	22	22	22	試験日数									
陰性対照 (無処理)	36	0	1	0	0	0	0	3	4	8/36	28/36										
ジメトエート 48 mg/kg	36	0	7	6	4	3	2	11	2	35/36 [*]	1/36 [*]										
ジメトエート 24 mg/kg	36	0	2	4	8	5	2	5	4	30/36 [*]	6/36 [*]										
ジメトエート 12 mg/kg	36	0	1	4	2	4	0	5	2	18/36 [*]	18/36 [*]										
ジメトエート 6 mg/kg	36	0	1	1	0	1	0	2	2	7/36	29/36										
ジメトエート 3 mg/kg	36	0	0	0	0	3	1	6	2	12/36	24/36										

a: 試験3日が投与開始日となる

*: 陰性対照(無処理)と比べて、死亡数の有意な増加(片側、p<0.05)

注) 溶媒には水を使用しているため、本試験での溶媒対照区(アセトン)は参考データ

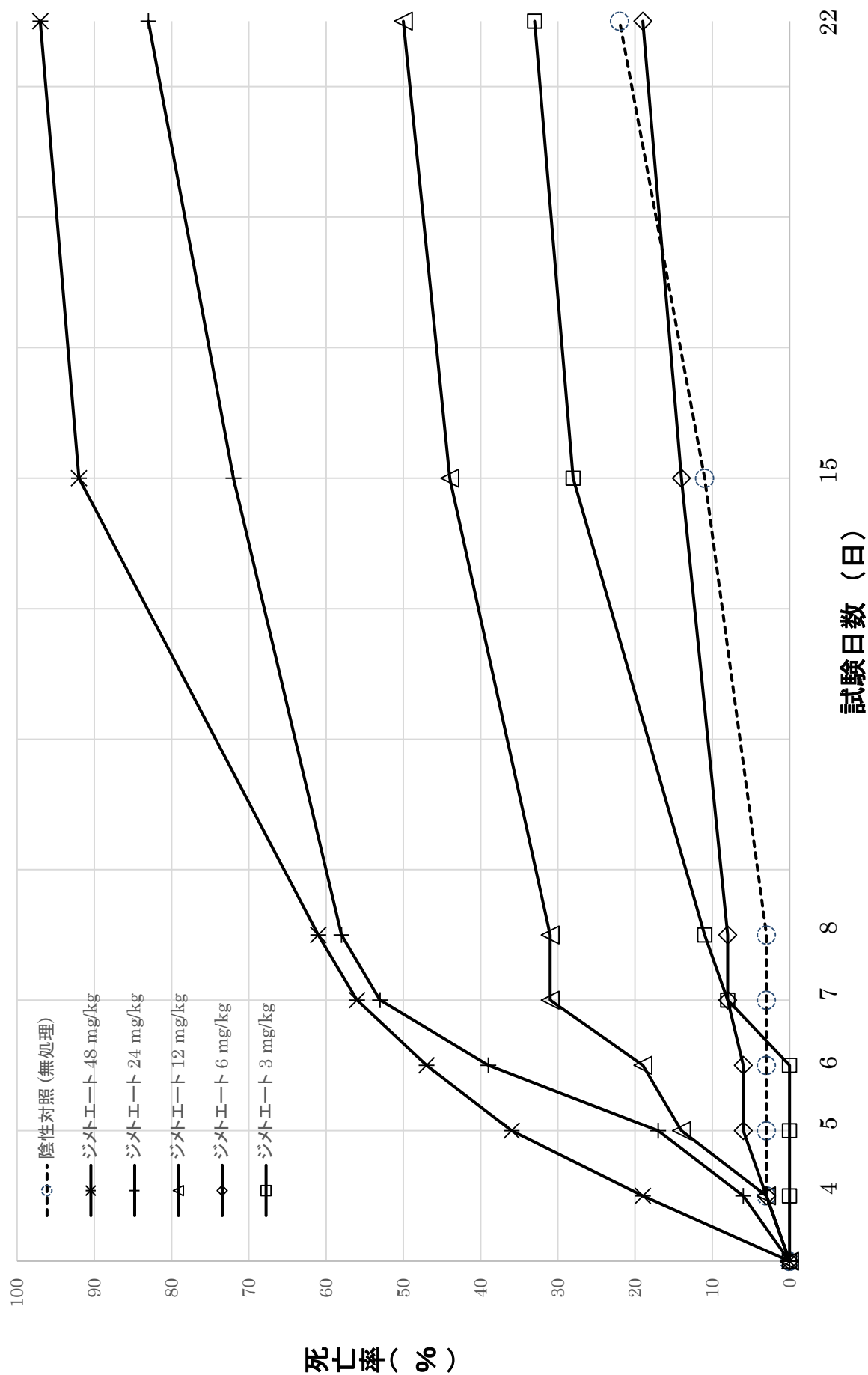


図2 ジメトエートのセイヨウミツバチ幼虫を用いる複数回投与摂食毒性試験2回目における累計死亡率推移

注) 溶媒には水を使用しているため、本試験での溶媒対照区(アセトン)は参考データ

参考資料1

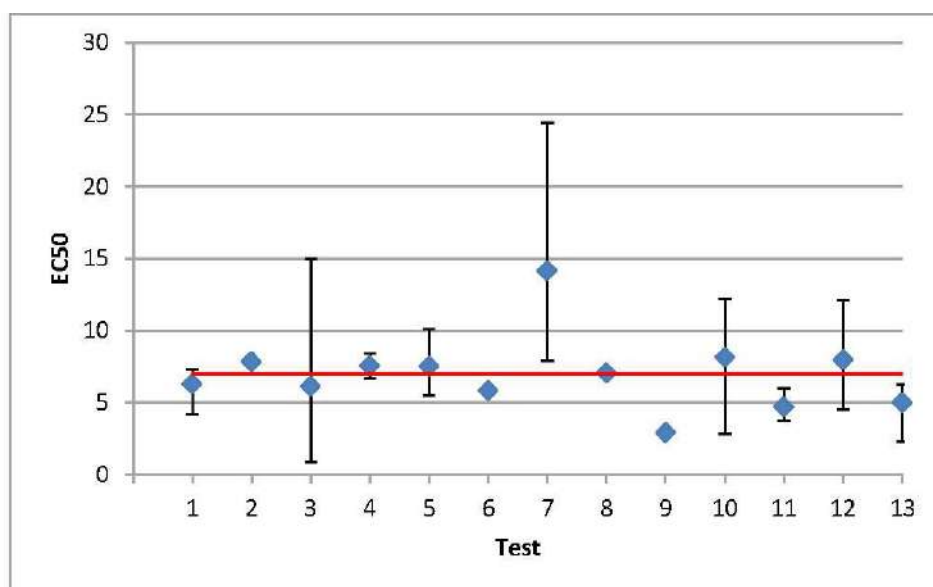


Figure 2: EC_{50} values ($\pm 95\%$ CI when calculation was possible) for each test (the red line indicates the mean value: 7.01 mg.Kg^{-1})

“Guidance Document on Honey Bee Larval Toxicity Test following Repeated Exposure Series on Testing & Assessment No. 239” ANNEX1, Page 26 より

参考資料 2

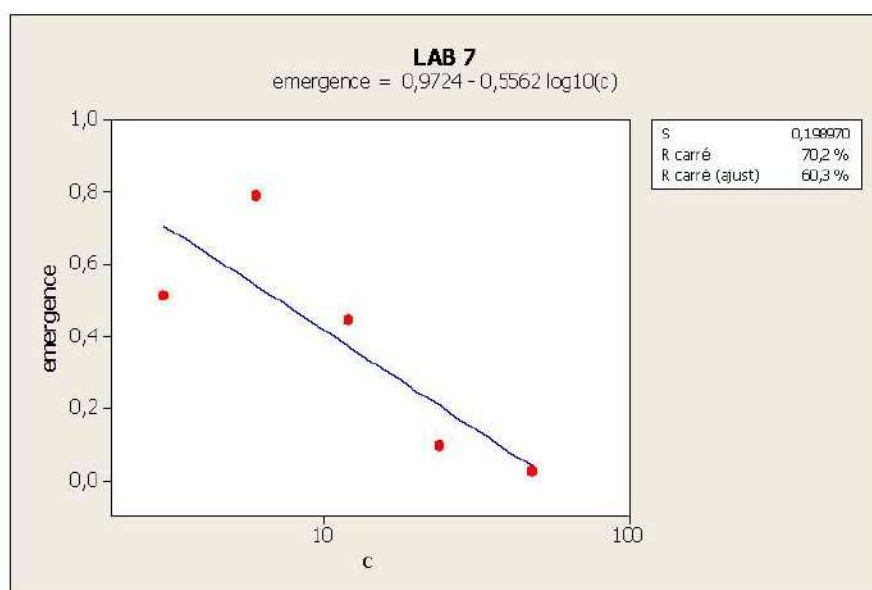
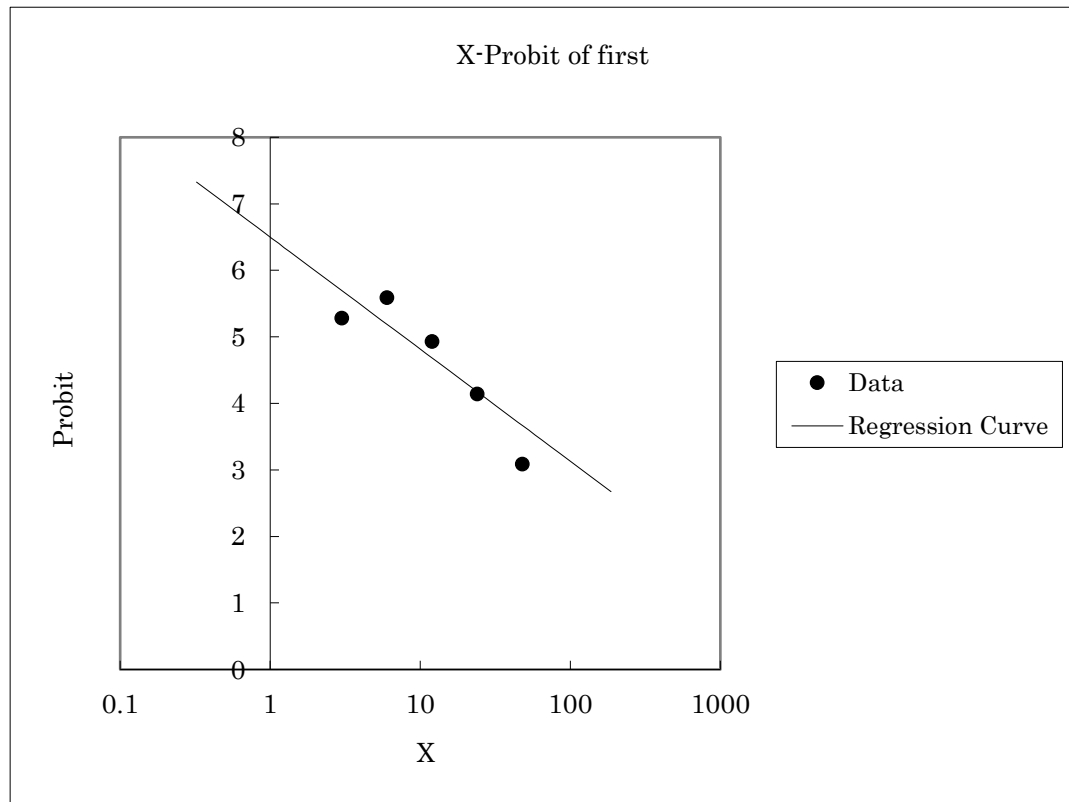


Figure 3: Effect of dimethoate concentration on emergence rate on D22

“Guidance Document on Honey Bee Larval Toxicity Test following Repeated Exposure Series on Testing & Assessment No. 239” ANNEX1, Page 32 より

參考資料 3



3.3 セイヨウミツバチ成虫でのジメトエート10日間慢性摂食毒性試験

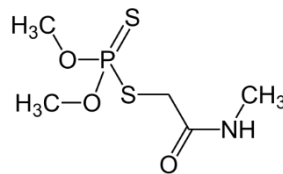
1) 被験物質

名称（英名）：ジメトエート [Dimethoate]

被験物質の選定理由：2014年にOECDが実施した“HONEY BEE (*Apis mellifera* L.), CHRONIC ORAL TOXICITY TEST 10 DAY FEEDING TEST IN THE LABORATORY”の妥当性及びその有用性を確認するための国際リングテストで用いられた参照物質であるため。

Cas No. : 60-51-5

構造式 :



2) 試験方法

① 供試生物

生物名（学名）：セイヨウミツバチ (*Apis mellifera*) 成虫

由 来 : 研究所内ミツバチ飼育領域で維持飼育していた蜂群

試験生物採集巣箱：適切に管理された疾病兆候がない蜂群で、化学物質（抗菌性物質、殺ダニ剤）が1ヶ月以上使用されていない巣箱

供試蜂数 : 210匹

供試生物の採集：成虫採取の2日前に健常群であることを確認した蜂箱から羽化直前の蛹を含む巣板を温度 $34.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ のインキュベーターに導入した。試験前日に、そこから羽化した成虫を飼育容器に10匹ずつ移した。

② 試験期間

1回目試験 2016年10月17日から2016年10月29日

2回目試験 2016年10月18日から2016年10月30日

3回目試験 2016年11月7日から2016年11月19日

③ 区構成及び生物数

1群10匹として、その3反復30匹を1区として、それぞれ投与量の異なる被験物質を投与する5区、無処理区及び溶媒対照区の計7区を設定した。なお、各区への割り当ては供試生物の採集日に行い、行動及び外見に異常がなく健常と判断される若蜂を無作為に割り当てた。区構成を表1に示す。この試験を3回繰り返して行った。

表1 区構成及び各区生物数

群	投与濃度	生物数 (匹)
陰性対照	—	10×3
溶媒対照 (アセトン)		10×3
被験物質 (ジメトエート)	0.2 mg /kg	10×3
	0.4 mg /kg	10×3
	0.6 mg /kg	10×3
	0.8 mg /kg	10×3
	1.0 mg /kg	10×3

3) 飼育管理

① 飼育環境

温度 33℃±2℃、湿度 50%～70%の範囲に調整したインキュベーター下で、全暗黒条件下で飼育した。

② 飼育容器

W95×D35×H100 mm の大きさの通気口をあけたアクリル製容器を使用した。収容羽数は10匹/容器とした。

③ 飼料

50% (w/v) のショ糖溶液を飼料とし、プラスチック製2 mLシリンジを用いて不断給与した。

4) 被験物質の投与

投与経路 : 経口投与

投与濃度 : 2014年にOECDが実施した当試験法検討のための国際リングテストにおけるジメトエートの投与濃度と同様の 0.2 mg/kg、0.4 mg/kg、0.6 mg/kg、0.8 mg/kg及び1.0 mg/kgを設定した。他に被験物質無添加の陰性対照と溶媒添加の溶媒対照を設けた。

投与方法及び投与回数 : 所定濃度に調製した飼料を、給餌器を用いて10日間連続で投与した。被験物質投与飼料は毎日交換した。飼料は4日毎に調製し、投与まで4℃で保存した。

被験物質添加飼料の調製 : 水を媒体として最大飼料中濃度の500倍の濃度に添加飼料調製用標準溶液を調製し、飼料調製までの間 -10℃以下で保存した。被験物質添加飼料中濃度及び投与飼料調製溶液中被験物質濃度は下記の計算式で求められる。本試験での飼料中濃度及び投与飼料調製溶液中濃度を表2に示す。飼料調製日に添加飼料調製用標準溶液を適宜希釈し、添加飼料調製用標準溶液もしくは希釈液を飼料の1/500

量添加して、投与濃度が表1で示した値となるように混合して調製した。

$$\text{飼料中濃度 (mg/g)} = \frac{\text{飼料への添加割合 (5\%)} \times \text{投与飼料調製溶液 (mg/L)}}{100}$$

表2 各試験区における投与量、飼料中濃度及び投与飼料調製溶液中濃度

区	飼料中濃度 (mg/kg)	投与飼料調製 溶液中濃度 (mg/L)
0.2 mg/kg	0.2	100
0.4 mg/kg	0.4	200
0.6 mg/kg	0.6	300
0.8 mg/kg	0.8	400
1.0 mg/kg	1.0	500

5) 飼料摂取量及び被験物質摂取量

投与期間中は、群ごとの摂餌量を毎日測定し、1匹あたりの飼料摂取量及び被験物質摂取量を求めた。

6) 観察

投与期間中の毎日について、死亡及び異常行動を観察した。主な異常行動とその判定基準を以下に示す。

瀕死 : 歩けず、脚や触覚を弱々しくしか動かすことをせず、刺激に対してもわずかにしか反応しない（例えば光を当てたときに動くが普段は死んだように動かない）。

影響（中毒） : 姿勢を保って歩行しているが統合失調的な動きが見られること（過度な活動、攻撃行動、身づくろい行動の亢進、回転、震顫など）。

痙攣 : 腹部や全身を収縮させる。

不活発 : わずかなもしくは遅れた反応のみを示すこと（例えば光や空気刺激しても、そのまま動かずにいるなど）。

嘔吐

7) 統計解析

試験終了時における死亡数について、Probit法によりLC50及び95%信頼限界値を算出した。さらに、試験終了時における死亡数を用いてフィッシャーの正確確率検定によ

りNOEC（無毒性濃度）を求めた。

8) 試験の有効性

陰性対照群と溶媒対照群における試験終了時の平均死亡率が15%以下である場合に、当試験は有効であると判断した。

9) 結果及び考察

1回目、2回目及び3回目のセイヨウミツバチ成虫の死亡数及び死亡率をそれぞれ表1から表3、及び図1から図3に示す。試験終了時（試験10日）の死亡数（死亡率）は、各区30匹中、ジメトエート投与区0.2 mg/kgにおいて1回目が4匹（13%）、2回目が18匹（60%）、3回目が2匹（7%）、0.4 mg/kgにおいて1回目が22匹（73%）、2回目が12匹（40%）、3回目が27匹（90%）、0.6 mg/kgにおいて1回目が20匹（67%）、2回目及び3回目が30匹（100%）、0.8 mg/kgにおいて1回目が28匹（93%）、2回目及び3回目が30匹（100%）、1.0 mg/kgにおいては全ての繰り返しで30匹（100%）の死亡が認められた。LC₅₀値（95%信頼限界）は1回目が0.23 mg/kg（0.16～0.28 mg/kg）、2回目が0.35 mg/kg（0.29～0.41 mg/kg）、3回目が0.29 mg/kg（0.26～0.32 mg/kg）と算出された。LDD₅₀値（95%信頼限界）は1回目が0.009 µg/匹（0.008～0.011 µg/匹）、2回目が0.006 µg/匹（0.004～0.008 µg/匹）、3回目が0.009 µg/匹（0.009～0.010 µg/匹）と算出された。また試験10日における各区の死亡数についてフィッシャーの正確確率検定を行った結果、NOECは1回目試験及び3回目試験では0.2 mg/kgとなり、2回目試験では最低濃度の0.2 mg/kg区でも陰性対照区と比較して有意に死亡数が多くNOECは求められなかった。

なお、陰性対照の無処理区および溶媒対照区の死亡数（死亡率）は、各区30匹中1回目無処理区で4匹（13%）、2回目無処理区で2匹（7%）、3回目無処理区で0匹（0%）であり、全ての試験で試験成立基準の条件（陰性対照区で10日目死亡率15%以下）を満たしたため、本試験は有効であったと判断した。

成虫10日間慢性摂食毒性試験の結果を受けて2014年に公表された”Final Report – Summary of the Results of the International Ring Test for the Standardization of a 10 Day Chronic Feeding Test on Honey Bee (*Apis mellifera*) in the Laboratory”によると、1回目リングテスト（2014）についての全研究機関の平均死亡率はジメトエート投与区0.2 mg/kgで2.0%、ジメトエート投与区0.4 mg/kgで6.9%、ジメトエート投与区0.6 mg/kgで37.3%、ジメトエート投与区0.8 mg/kgで90.2%、ジメトエート投与区1.0 mg/kgで98.4%であった。この資料中に示された各試験機関における平均LC₅₀値の分布を参考資料1に示す。

各試験機関におけるLC₅₀値は平均0.48 mg/kgであり、本試験における3回の結果は全リングテスト参加機関平均値よりやや低値であったものの、大きく異なる値ではなく、当研究所でもリングテストに参加した他の試験施設と同様に信頼性、再現性のある試験を実行で

きたと判断できる。また各試験機関における LDD₅₀ 値の平均は 0.015 µg/匹であり、当研究所における 3 回の実証試験の結果はリングテスト参加機関平均値よりやはり低値であったが、大きく異なる値ではなかった。2 回目のリングテスト結果をまとめたレポート”Report – Summary of the Results of the 2nd International Ring Test for the Standardization of a 10 Day Chronic Feeding Test on Honey Bee (*Apis mellifera*) in the Laboratory”中では、ある試験機関で 5%アセトン溶媒対照区死亡率が試験成立基準を満たさなかった理由について、試験実施時期が影響した可能性があると推察している。その試験の実施時期は 9 月の終わりであり、本試験は 10 月下旬から 11 月上旬にかけて行われていることから、本試験で LC₅₀ 値や LDD₅₀ 値が比較的低値であった原因は、試験実施時期が影響していた可能性も高いと考えられた。

また、本試験における各試験区の飼料摂取量及びジメトエート摂取量、及び 1 回目リングテストでの飼料摂取量及びジメトエート摂取量全試験機関平均値を表 4 に示す。本試験における陰性対照区、溶媒対照区での飼料摂取量はリングテストでの全試験機関平均値と比較して大きな差はなかったが、わずかに低値の傾向があった。試験 1 回目と試験 2 回目ではジメトエート各濃度投与区において、用量依存的に飼料摂取量が減少する傾向が認められた。全リングテスト参加試験機関の平均値からは読み取ることができないが、全ての機関におけるデータ（参考資料 2）を確認すると、試験機関 1、2 及び 16 においては本試験と同様にジメトエート濃度が上昇するにつれて飼料摂取量が減少していた。

また無処理飼料と溶媒対照飼料の平均蒸発量を計算した結果、1 回目試験の無処理飼料は 49.4 mg/容器/日、2 回目試験の無処理飼料は 52.2 mg/容器/日、溶媒対照飼料は 64.5 mg/容器/日であり、3 回目試験の無処理飼料は 56.1 mg/容器/日、溶媒対照飼料は 80.5 mg/容器/日であった。2 回目リングテストにおける全試験平均値は、無処理飼料が 75.3 mg/容器/日、溶媒対照飼料で 86.0 mg/容器/日であり、本試験においては飼料蒸発量についても、第 2 回リングテストで得られた値と変わらない値であった。

2 回行われたリングテスト試験において、実際には蒸発量の補正を行なった LDD₅₀ 値の計算は行われていない。本実証試験ではジメトエート毒性試験と同時に蒸発量についても測定を行ったため、実際に得られた結果を用いて補正を行い、ジメトエートの LDD₅₀ 値を求めた。その結果 1 回目が 0.007 µg/匹 (0.006~0.008 µg/匹)、2 回目が 0.004 µg/匹 (0.002~0.005 µg/匹)、3 回目が 0.007 µg/匹 (0.007~0.008 µg/匹) と、補正を行っていないリングテスト平均 LDD₅₀ 値の半分程度の値となった。

実際の試験においては、影響を受けた個体が不活発になることで消費熱量の減少により飼料摂取量が減少するだけでなく、ミツバチの性質と試験の設計から飼料摂取量が減少する可能性がある。すなわち、飼料を給餌容器から摂取する個体は比較的固定しており、給餌容器から飼料を摂取する性質を持った個体が最も多量に飼料を摂取すると予想される。そのためその個体は早く死亡する可能性が高くなるが、その後残存したその性質を持たない個体は直ちに直接飼料を摂取するようになりにくく、投与薬剤の直接影響ではなく、飼料摂取量の減少で死亡する可能性がある。

2 回目のリングテストについての報告書において、被験物質摂取量を過大評価しないためには飼料蒸発量による補正を行うことが推奨されている。今回の実証試験では、その報告書で述べられている飼育容器内の個体数が減少したとき飼料摂取量が過大に評価されるという恐れについては、確認されなかった。むしろ飼育容器内の個体数が減少したときには、飼料摂取量は大幅に減少することが観察された。試験設計上 LDD_{50} 値は低く得られる可能性があるが、得られた LDD_{50} 値を扱うときにはそのことに留意する必要があると考えられた。

表1 ジメトエートのセイウミツバチ成虫を用いる10日間慢性摂食毒性試験結果1回目

試験区	供試 匹数	死亡数										累計死亡数 /供試匹数	LC ₅₀ 値 (95%信頼限界)	NOAEL	累計死亡率(%)										累計 死亡率(%)
		試験日数													試験日数										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
陰性対照区(無処理区)	30	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	4/30			3	7	7	7	7	7	10	10	13	13	
溶媒対照区(アセトン)	30	1	0	0	0	0	0	2	0	0	2	5/30			3	3	3	3	3	10	10	10	17	17	
ジメトエート1.0 mg/kg区	30	0	0	2	8	20	0	0	0	0	0	30/30*			0	0	7	33	100	100	100	100	100	100	100
ジメトエート0.8 mg/kg区	30	0	0	2	1	5	8	4	2	4	2	28/30*	0.23 mg/kg		0	0	7	10	27	53	67	73	87	93	93
ジメトエート0.6 mg/kg区	30	0	0	0	0	0	2	0	5	5	8	20/30*	(0.16~0.28	0.2 mg/kg	0	0	0	0	0	7	7	23	40	67	67
ジメトエート0.4 mg/kg区	30	0	0	0	0	1	2	5	5	5	4	22/30*	mg/kg)		0	0	0	0	3	10	27	43	60	73	73
ジメトエート0.2 mg/kg区	30	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	4/30			3	7	7	7	7	7	10	10	13	13	13

*: フライシャーの正確率検定の結果、陰性対照(溶媒対照)区との間に5%水準で有意差あり

注) 溶媒には水を使用しているため、本試験での溶媒対照区(アセトン)は参考データ

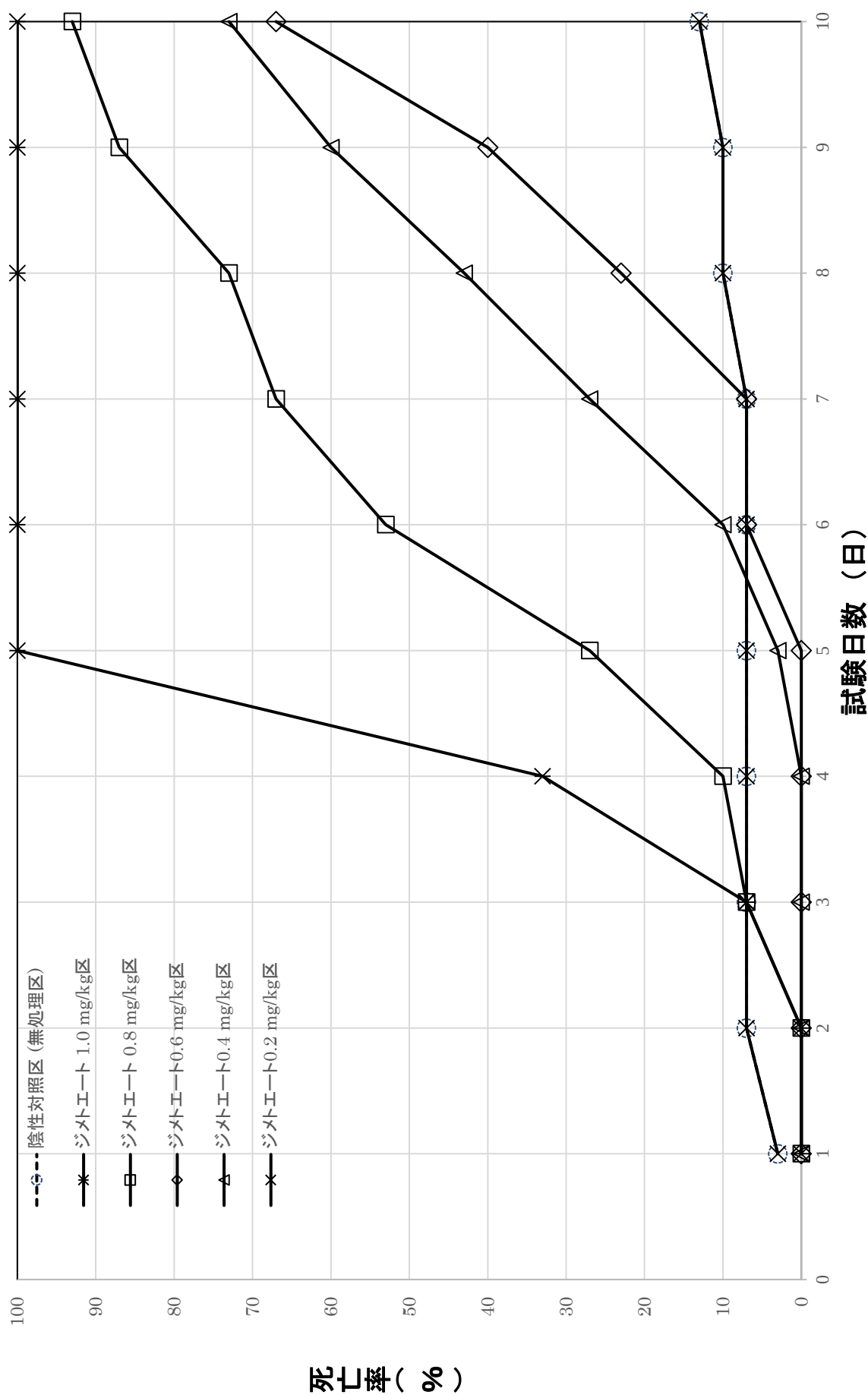


図1 ジメトエートのセイウミツバチ成虫を用いる10日間慢性毒性試験1回目における累計死亡率推移

注) 溶媒には水を使用しているため、本試験での溶媒対照区(アセトン)は参考データ

表2 ジメトエートのセイヨウミツバチ成虫を用いる10日間慢性摂食毒性試験結果2回目

試験区	供試 匹数	死亡数										累計死亡 数/供試匹 数	LC ₅₀ 値 (95%信頼限界)	NOAEL	累計死亡率(%)										累計 死亡率(%)	
		試験日数													試験日数											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
陰性対照区(無処理区)	30	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	2/30			0	0	0	3	7	7	7	7	7	7	7	7
溶媒対照区(アセトン)	30	1	0	0	0	0	0	2	0	0	2	5/30			3	3	3	3	3	3	10	10	10	17	17	17
ジメトエート1.0 mg/kg区	30	0	0	5	2	16	6	1	0	0	0	30/30 [*]			0	0	17	23	77	97	100	100	100	100	100	100
ジメトエート0.8 mg/kg区	30	0	0	0	3	11	11	5	0	0	0	30/30 [*]	0.35 mg/kg		0	0	0	10	47	83	100	100	100	100	100	100
ジメトエート0.6 mg/kg区	30	0	0	1	1	1	1	17	5	3	1	30/30 [*]	(0.29~0.41	-	0	0	3	7	10	13	70	87	97	100	100	100
ジメトエート0.4 mg/kg区	30	0	0	0	0	0	1	4	2	3	2	12/30 [*]	mg/kg)		0	0	0	0	0	3	17	23	33	40	40	40
ジメトエート0.2 mg/kg区	30	0	0	0	2	1	3	3	5	1	3	18/30			0	0	0	7	10	20	30	47	50	60	60	60

*: フライシヤの正確確率検定の結果、陰性対照 (溶媒対照) 区との間に5%水準で有意差あり

注) 溶媒には水を使用しているため、本試験での溶媒対照区 (アセトン) は参考データ

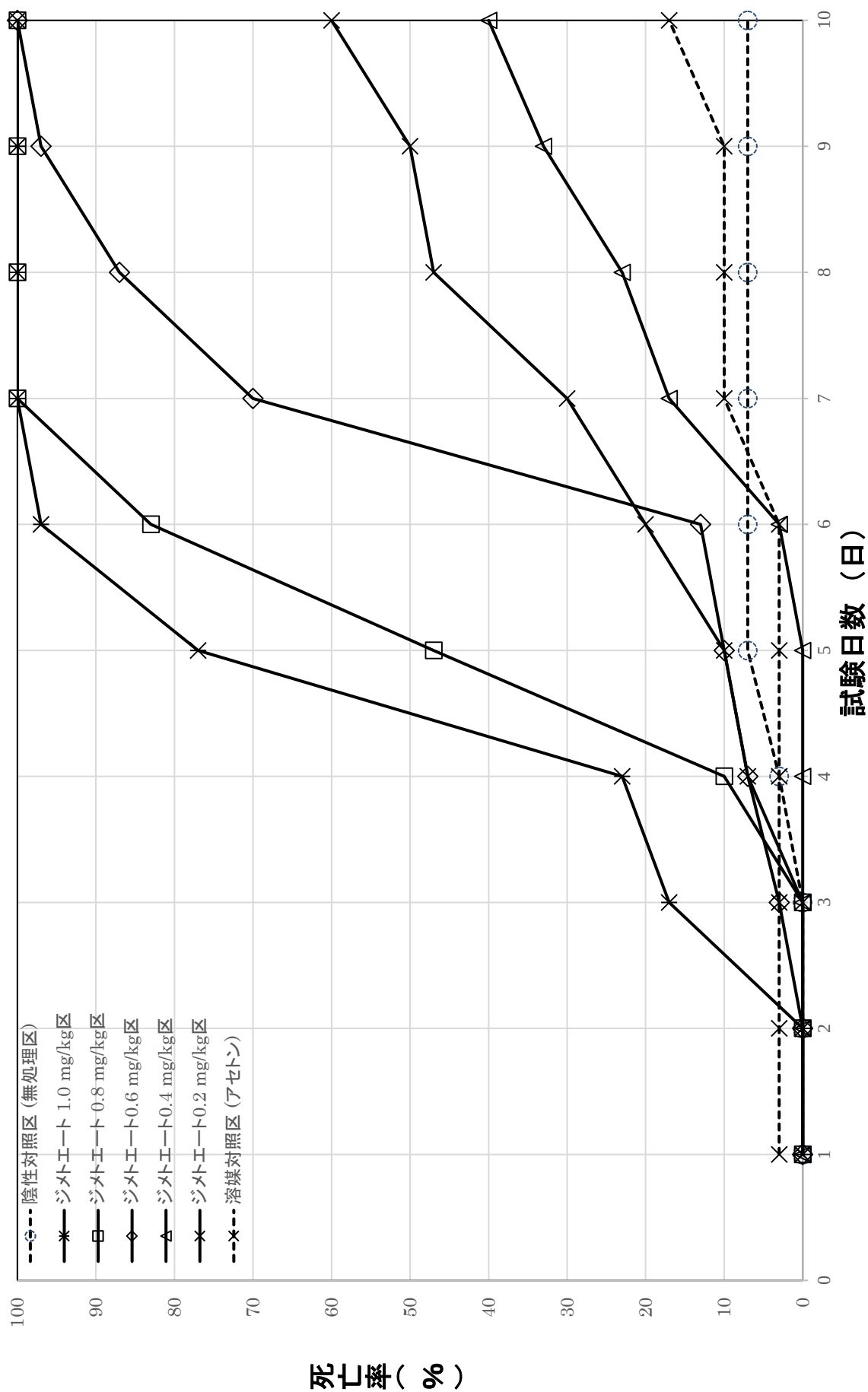


図2 ジメトエートのセイヨウミツバチ成虫を用いる10日間慢性毒性試験2回目における累計死亡率推移

注) 溶媒には水を使用しているため、本試験での溶媒対照区(アセトン)は参考データ

表3 ジメトエートのセイヨウミツバチ成虫を用いる10日間慢性摂食毒性試験結果3回目

試験区	供試 匹数	死亡数										LC ₅₀ 値 (95%信頼限界)	NOAEL	累計死亡率 (%)										累計	
		試験日数												試験日数											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
陰性対照区 (無処理区)	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/30		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
溶媒対照区 (アセトン)	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1/30		0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	3
ジメトエート 1.0 mg/kg区	30	0	1	16	13	0	0	0	0	0	0	30/30 *		0	3	57	100	100	100	100	100	100	100	100	100
ジメトエート 0.8 mg/kg区	30	0	0	5	12	10	3	0	0	0	0	30/30 *	0.29 mg/kg	0	0	17	57	90	100	100	100	100	100	100	100
ジメトエート 0.6 mg/kg区	30	0	0	0	0	8	8	7	3	4	0	30/30 *	(0.26~0.32	0	0	0	0	27	53	77	87	100	100	100	100
ジメトエート 0.4 mg/kg区	30	0	0	0	0	0	1	4	2	9	11	27/30 *	mg/kg)	0	0	0	0	0	3	17	23	53	90	90	90
ジメトエート 0.2 mg/kg区	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2/30		0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	7	7

*: フライジャーの正確率検定の結果、陰性対照(溶媒対照)区との間に5%水準で有意差あり

注) 溶媒には水を使用しているため、本試験での溶媒対照区(アセトン)は参考データ

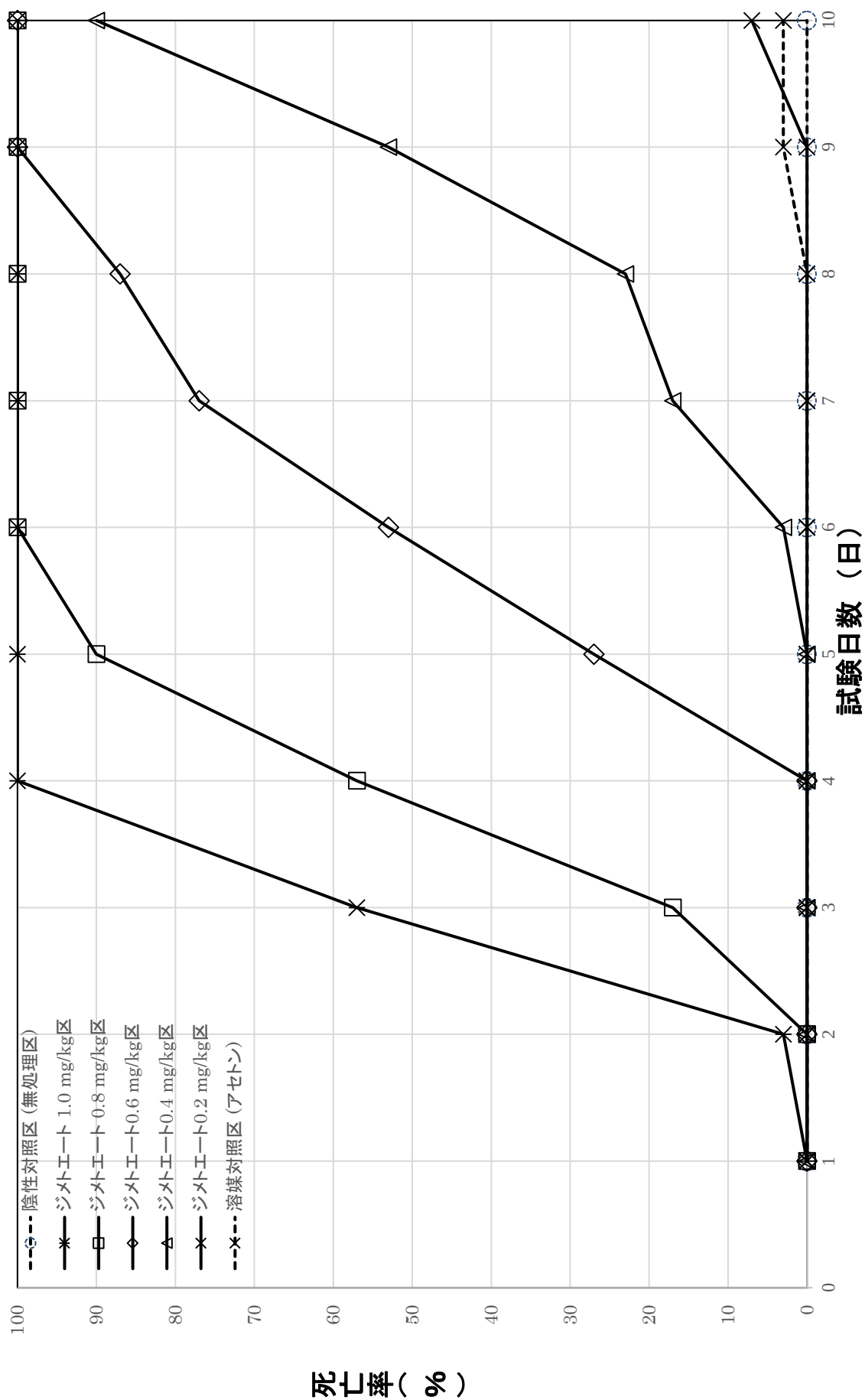


図3 ジメトエートのセイヨウミツバチ成虫を用いる10日間慢性毒性試験3回目における累計死亡率推移

注) 溶媒には水を使用しているため、本試験での溶媒対照区(アセトン)は参考データ

表4 ジメトエートのセイヨウミツバチ成虫を用いる10日間慢性摂食毒性試験における飼料摂取量及びジメトエート摂取量

試験区	飼料摂取量 [mg/個体/日 (標準偏差)]			ジメトエート摂取量 [µg/個体/日 (標準偏差)]		
	1回目試験	2回目試験	3回目試験	1回目試験	2回目試験	3回目試験
	リンゲテスト平均*			リンゲテスト平均*		
陰性対照区 (無処理区)	39.9 (15.2)	39.2 (14.8)	38.7 (15.7)	40.9 (9.2)		
溶媒対照区 (アセトン)		33.0 (15.6)	37.6 (13.6)	40.6 (9.4)		
ジメトエート 1.0 mg/kg区	23.5 (10.3)	23.2 (11.1)	29.0 (12.3)	34.3 (8.5)	0.024 (0.007)	0.026 (0.014)
ジメトエート 0.8 mg/kg区	21.4 (7.3)	28.2 (19.0)	28.1 (9.4)	34.3 (8.4)	0.017 (0.004)	0.025 (0.012)
ジメトエート 0.6 mg/kg区	30.1 (18.6)	28.0 (14.8)	29.7 (10.6)	33.2 (9.2)	0.019 (0.007)	0.019 (0.006)
ジメトエート 0.4 mg/kg区	24.5 (9.6)	27.6 (11.0)	30.4 (15.2)	31.8 (5.8)	0.010 (0.002)	0.011 (0.003)
ジメトエート 0.2 mg/kg区	28.0 (11.7)	27.0 (8.3)	30.6 (15.2)	35.5 (5.4)	0.006 (0.001)	0.005 (0.001)

* Final Report - Summary of the Results of the International Ring Test for the Standardization of a 10 Day Chronic Feeding Test on Honey Bee (*Apis mellifera*) in the Laboratory より引用

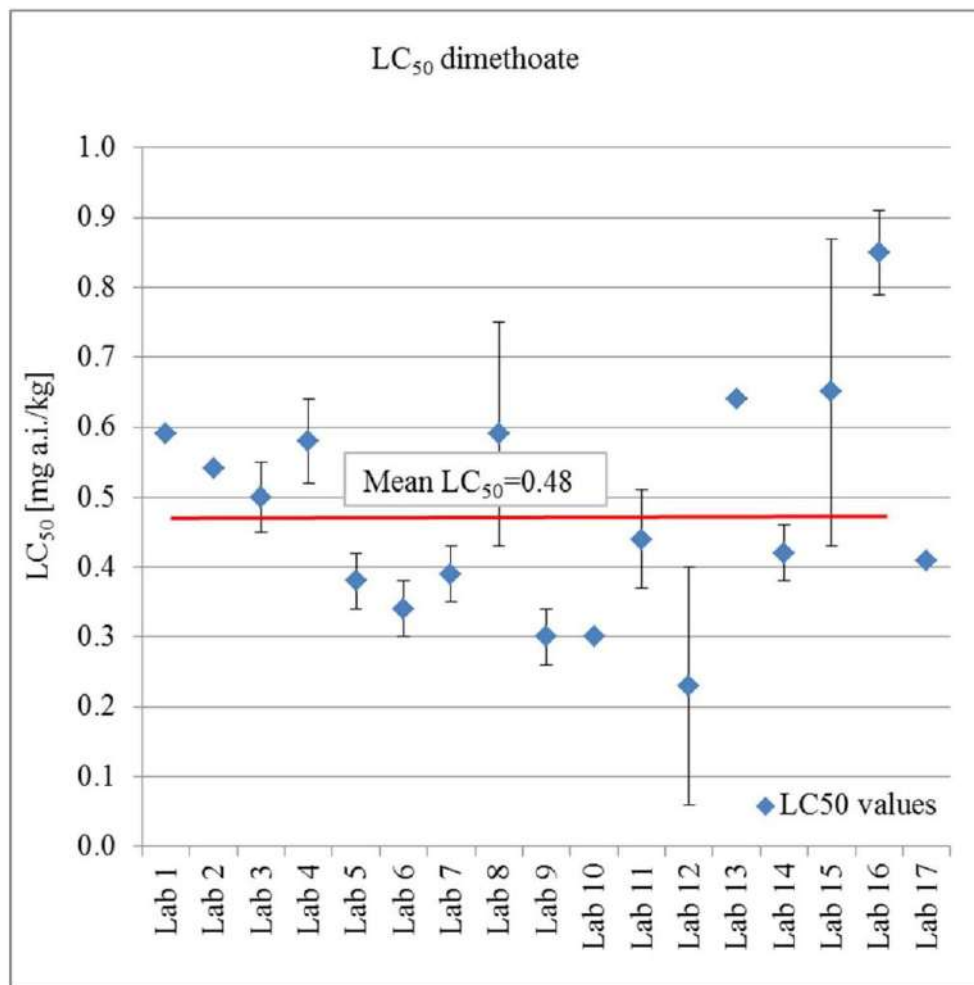


FIGURE 3 LC₅₀ values of dimethoate after 10 days; mean value is visible in figure

Final Report – Summary of the Results of the International Ring Test for the Standardization of a 10 Day Chronic Feeding Test on Honey Bee (*Apis mellifera*) in the Laboratory Page 25 より

参考資料 2

TABLE 7 Mean consumption of feeding solution over the 10 days test period [mg/bee/day]

Consumption of feeding solution [mg/bee/day]																		
Treatment [mg a.i./kg]	Lab 1	Lab 2	Lab 3	Lab 4	Lab 5	Lab 6	Lab 7	Lab 8	Lab 9	Lab 10	Lab 11	Lab 12	Lab 13	Lab 14	Lab 15	Lab 16	Lab 17	Mean
Untreated control																		
0	33.4	49.0	32.0	44.5	50.1	37.0	40.0	46.7	46.7	35.2	33.6	38.4	38.8	64.0	27.5	27.9	49.7	40.9
Solvent control**																		
0	32.7	44.4	34.3	40.7	58.0	36.5	58.0	39.6	42.2	42.5	39.5	50.0	33.4	50.9	34.4	19.7	34.0	40.6
Reference item: Perfekthion																		
0.2	33.0	40.5	28.8	35.7	42.2	33.4	36.1	39.7	42.0	36.0	26.7	39.0	31.2	46.7	29.1	29.0	34.6	35.5
0.4	27.0	30.2	28.5	29.3	38.9	33.2	32.1	36.7	43.5	36.9	22.6	36.5	27.0	38.9	23.5	26.4	29.6	31.8
0.6	23.8	29.3	27.8	28.0	51.2	41.2	33.4	32.6	50.2	28.6	27.6	43.3	26.6	41.7	20.5	20.6	38.0	33.2
0.8	32.4	38.8	37.5	31.5	48.1	32.1	35.4	37.9	40.9	30.7	25.4	24.8	30.1	35.3	28.1	19.4	55.5	34.3
1.0	23.7	30.9	34.0	35.7	41.2	32.8	41.3	40.3	50.9	31.5	24.7	36.5	29.4	35.9	26.2	18.7	49.7	34.3

* untreated control group was fed with 50 % aqueous sucrose solution

** solvent control group was fed with 50 % aqueous sucrose solution containing 5 % acetone

Final Report – Summary of the Results of the International Ring Test for the Standardization of a
10 Day Chronic Feeding Test on Honey Bee (*Apis mellifera*) in the Laboratory Page 23 より

【4】マニュアルの策定

1. 研修による情報収集結果及び実証試験から得られた情報のまとめ

本事業における海外の試験研究機関での研修において収集した情報及び実証試験で得られた情報を要約すると以下の通りである。OECD のガイドライン、ガイダンス文書等を基本に、これらの知見を反映させてミツバチを用いた試験のマニュアルを作成した。

1.1 幼虫単回及び複数回投与摂食毒性試験

海外研修結果から

- 1) ヨーロッパにおいては、例年試験を4月から6月の3ヶ月のみに限って行っている。試験期間を日本ではどうするかについては、今後検討を要する。
- 2) 実際にヨーロッパやアメリカの農薬登録におけるデータ要求では、幼虫単回投与摂食毒性試験は重要視されておらず、幼虫複数回投与摂食毒性試験が要求されるという話であった。理由については実証試験の段落に記載。単回投与試験と複数回投与試験は、試験を用途で使い分けるというよりは、本来は幼虫複数回投与摂食毒性試験結果が望まれているが、実施が難しく単回試験しか実施できない施設が多い、といった状況であるようだ。
- 3) 幼虫試験は3群から幼虫を採集する必要があるが、幼虫採集準備をした群全部から幼虫が取れるわけではない。そのため幼虫採集の準備は、採集する必要がある3群の少なくとも2倍数、6群に対して行なっておく必要がある。6群に対して幼虫採集準備を行うためには、常時10群程度を試験施設内で維持しておき、その中から状態がいい6群を選んで試験に使用する必要がある。巣板は使用歴がある黒色化した古い巣板のほうが受け入れ率が高いとの話を聞いたが、あまり古い巣板を用いることは疾病予防の観点からは好ましくないので注意が必要である。
- 4) 移虫はクリーンベンチで行う必要はない。もしクリーンベンチで行う場合はファンを切る必要があると最新のガイダンスドキュメントには記載された（ファンが回っていると乾燥が起これば幼虫に悪影響を及ぼすため）。RIASでは蜂場近くの部屋の実験台、バイエルでは実験室内の実験台で行っているが、特に問題となるような事象は観察されていない。実験台は70%アルコールなどを用いて清拭、消毒すること。また湿らせた木綿の布を敷いて湿度低下を防ぐとよい。
- 5) 群分けは、個体毎に乱数を発生させて行くと時間がかかりすぎるため、幼虫が長時間低温、低湿度下に置かれ試験に影響が生じる恐れがある。そこでバイエルでは3群から12匹ずつのプレートを必要数準備し、プレート毎に乱数を発生させて各試験区への割り当てを行っていた。
- 6) 幼虫飼料はバイエルでは気泡が発生しないように、静かに飼料を振とう混合して調製していた。バイエルではこの試料調製方法で、ある被験物質の飼料内の被験物質均一性を確認したところ、均一性に問題はなかったとのことである。ただしこれは全ての被験物質で均一性が担保された、というわけではない。RIASでは被験物質の均一性を分析的

に確認できなかったため、ボルテックス機械を用いて被験物質溶解液を強く混合し、その後ごく軽微に遠心分離を行って飼料中に含まれた気泡を除去している（一定容量の飼料を投与するため、気泡が存在すると投与飼料量に影響が生ずる）。どちらの方法で飼料を調製しても、原理的には問題ないと考えられる。

- 7) 飼料給与はバイエルではポジティブディスプレイスメント式のピペットを用いて行っていた。RIAS ではエアクッション式のピペットを用いているが、飼料の粘度が高いため正確に一定量を分注するために、ゆっくりとした動作でピペッティングをしている。ポジティブディスプレイスメント式のピペットの準備が必須というわけではないが、使用が推奨される。
- 8) デンタルロールは幼虫複数回投与摂食毒性試験においては試験 8 日に除去する必要がある。この作業には時間がかかり、その間は幼虫が低温、低湿度に置かれるため、この悪影響を避けるためにバイエルでは複数回投与試験でデンタルロールの使用をやめているが、特に問題はないということであった。RIAS でもデンタルロールは使用せずに試験したが、特に問題となる事象は観察されなかった。
- 9) 試験 15 日以降の湿度については、2014 年ドラフトガイダンスでは 50%となっているが、2016 年に 50%~80%へと変更されている。環境調節機を持っていないと相対湿度を 50%に調節することが困難であるため、変更されたと考えられる。バイエル、RIAS とも環境調節機を幼虫試験に使用できないため、50%前後に湿度を調整するのが難しく試験終了まで 80%のままで試験しているが、そのことを原因とする問題の発生は確認されていない。また実際野外の蜂群においてその時期の蛹がおかれている湿度は、50%よりも高いと考えられる。

実証試験から

- 9) 幼虫を用いる単回投与摂食毒性試験は、投与後 72 時間の死亡率を用いても、結果のばらつきが大きくなることが分かった。被験物質の投与スケジュールも、実際に幼虫が植物防疫剤を摂食すると予想されるパターンとは大きく異なる形（試験 4 日に 1 回）で行われるため、この試験の実施及びその結果の解釈には注意が必要となる。
- 10) 建群期の 4 月から 7 月以外の時期に複数回摂食毒性試験を行うと、生育速度が早いいため試験 8 日に湿度を変更したのでは先に脱糞が起こり、陰性対照区や影響濃度以下の被験物質投与区で死亡率が上昇することが分かった。またジメトエート、その他神経作用物質は低濃度投与で非投与個体よりも生育速度を速めることも分かった。これらの事象は重要であり、検討が必要とされる。

1.3 成虫 10 日間慢性摂食毒性試験

研修より

- 1) 飼育容器、給餌容器についての詳細、飼育容器は図面添付、給餌容器は 2 mL のプラスチック製ディスプレイスブルシリンジの先端をカッターで切除したものである。先端がわ

ずかに（0.5 mm でも）切り残されていると、飼料がそこからたれ落ちることがない。

- 2) 観察は、陰性対照区の容器と観察したい区の容器を並べて比較、観察するようにすること。
- 3) 器具はガラス、金属などの脂溶性物質の吸着が少ない材質を選択した場合は、自動器具洗浄機、手洗いのどちらで洗浄を行っても問題ないと考えられる。手洗いでも消毒の必要はないかもしれない。

実証試験から

特になし

【4】マニュアルの策定

2. マニュアル

2.1 セイヨウミツバチ (*Apis mellifera*) を用いる幼虫単回投与毒性試験及び幼虫反復投与毒性試験

セイヨウミツバチ (*Apis mellifera*) を用いる
幼虫単回投与毒性試験および幼虫反復投与毒性試験

目次

1. 概略	1
2. 実施にあたって	
① 諸注意	2
② 実施に適した時期	2
③ 幼虫採集について	2
④ 機器・器具の準備	3
⑤ 飼料調製方法と保存	5
⑥ 被験物質調製方法と濃度確認	6
⑦ 陽性対照物質	7
⑧ 観察方法	7
⑨ 用量設定	8
⑩ 限度試験	8
⑪ 試験成立基準	8
3. 試験の流れ	10
① ステップ1	11
② ステップ2	12
③ ステップ3	14
④ ステップ4	16
4. データ解析	17
5. 報告書の内容	18
6. 観察記録の用紙例	19



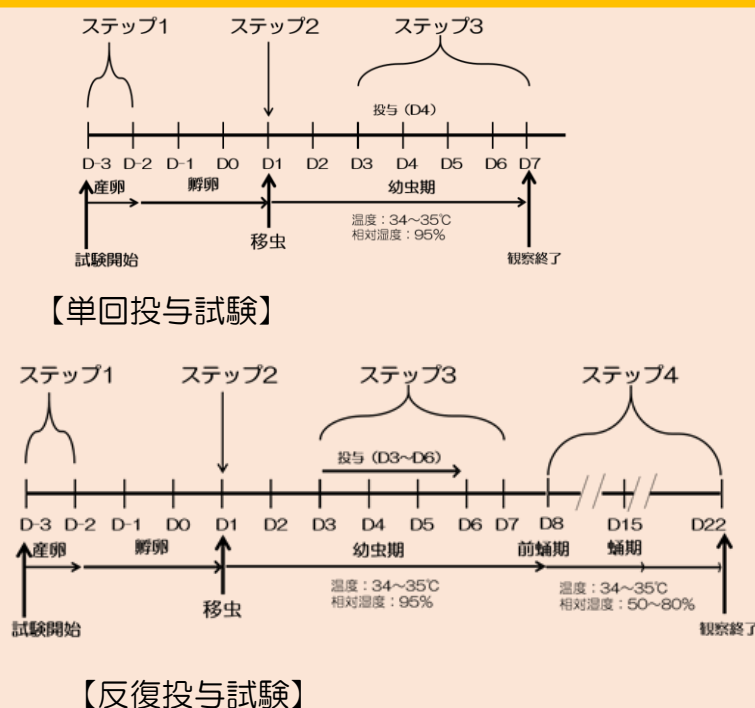
1. 概略

セイヨウミツバチ幼虫単回投与毒性試験（以下、単回投与試験）及びセイヨウミツバチ幼虫反復投与毒性試験（以下、反復投与試験）では、D-3（移虫 4 日前）に十分量の幼虫を得るために、最低 3 群の女王蜂を、隔王板を用いて空の巣板もしくは羽化しつつある蜂児のみがいる巣板上に隔離する。D-2 では、女王蜂隔離時間は最大 30 時間まで（より短い時間が推奨される）として、女王蜂を隔離部分より解放して産卵の有無を確認する。D1 に、齢の揃った孵化 1 日齢幼虫を 3 群の巣板より一定量の飼料を給餌した移虫セルに移虫し、48 穴の飼育容器に移す。

複数回投与試験では D3 から D6 までの間の 4 回、単回投与試験では D4 の 1 回、被験物質を投与する。試験区については 5 試験区を設定して試験を行う。

単回投与試験では投与後 D5、D6、D7 の死亡数及び D7 の残餌について記録後、試験を終了する。また投与後 72 時間における LD₅₀ を求める（D7 までの累計死亡数）。

反復投与試験では、幼虫期の観察の後、D8 及び D15 に死亡数及び観察されたその他の異常を記録し、最終日の D22 には羽化数を記録する。D22 の羽化数を用いて、NOEC/NOED 並びに可能であれば EC₅₀/ED₅₀ 及び/あるいは EC_x/ED_x を算出する。



2. 実施にあたって



諸注意

- (ア) 試験に用いる蜂群は、衛生上の処置（ダニや病気に対する処置など）を行った場合は、処置を行った日と処置した薬剤を記録し、試験前 4 週間から抗生物質、抗ダニ剤などの化学物質を使用してはならない。蜂群は栄養状態がよく、健康状態も良好（疾病の兆候がなく、寄生虫感染も認められないこと）であり、履歴と生理状態が明確である群から採集する。養蜂場から蜂群を購入した場合は、移動の影響がなくなり女王蜂の産卵が安定するまで馴化期間を設定することが望ましい。
- ② 実施に適した時期
 - (ア) 幼虫試験は、通常幼虫採集が容易な 4 月から 7 月の建群期に実施する。
- ③ 幼虫採集について
 - (ア) 3 群から移虫（例えば試験区数が 8 であれば各群より最低 120 匹必要）する。そのため、群分け時に試験に供試可能な適切な個体数を確保できるように、状態の良い 6 群くらいに対して隔王板を取り付けた巣板導入作業を行う。また、状態の良い 6 群を常に準備するために、6 群より多い蜂群を維持しておくことを推奨する。
 - (イ) 新しく使用歴が少ない黄色い色の巣板より、使用歴のある巣板を導入したほうが、女王蜂の受容率が高いが、疾病への感染リスクは高まる。盛られてから 2 年以内の巣板を使用することを推奨する。
 - (ウ) 移虫は、クリーンな室内で清浄にした実験台で湿度を維持しながら行う。クリーンルームやクリーンベンチのように空気が大量に循環する環境は、幼虫が乾燥するので適さない。

(工) 幼虫の見分け方

卵



孵化 1 日目



孵化 2 日目



(C の字になっている)

④ 機器・器具の準備

(ア) 機器・器具類

機器・器具類	用途・説明
巣板(使用歴のある 2 年以内の巣板)	幼虫採集に用いる
隔王板	産卵時の女王の隔離に用いる
巣板移動用箱	蜂場から巣板の移動に用いる
一般的なゲル保冷剤 (暖めて使用)	温めて巣板を保温するために用いる
移虫用具か絵筆 (例えば No. 3/0 など)	巣板から容器に幼虫を移すのに用いる
移虫セル (結晶ポリスチレン製)	幼虫を飼育する容器 (例えば CNE/3、NIKOTPLAST Society 製) (内径 9 mm、高さ 8 mm) ※あらかじめ消毒する (例: 70%エタノールに 30 分浸漬後にクリーンベンチ内で乾燥)

48 穴プレート	移虫セルを収容する飼育容器
木綿布	移虫時の湿度調整に用いる
ヘッドライト	幼虫採集時の照明用
アクリル製のデシケーター	飼育環境の湿度確保のため (例：ナルゲン 5314-0120、 5317-0180 など) (この中に湿度調製用剤をセッ トする)
クリーンベンチ	消毒した器具の乾燥に用いる
空気循環式インキュベーター	試験系の温度の維持 34℃～35℃設定
マイクロピペット	被験物質添加幼虫飼料作製及び 幼虫に飼料を給餌するために用 いる (ポジティブディスプレイスメ ント式は粘度の高い飼料に適し ているため、給餌に推奨)
加温プレート (推奨)	移虫時の温度変化低減のために 用いる
羽化容器 (反復投与試験のみ)	蛹を成虫に羽化させるための容 器 例) 飼育容器にプラスチック製 タッパーにガーゼをかけて、成 虫が出てこないように蓋 (ガー ゼを輪ゴムなどで縛る) をし、 通気性を確保する (ショ糖液の 給餌容器や巣の一部等をおける 容器が推奨される)
女王物質 (反復投与試験のみ：推奨)	羽化した時の成虫を誘引する環 境エンリッチメント
巣の一部 (反復投与試験のみ：推奨)	羽化した時に歩き回る環境エン リッチメント
その他ミツバチ飼育に必要な器具類	

(イ)試薬類

試薬類	用途・説明
70%エタノール	器具・実験台等の清浄
硫酸カリウム (CAS.No: 7778-80-5、 K_2SO_4 : 湿度調製用剤)	湿度の飽和状態をつくるため
塩化ナトリウム (CAS.No: 7647-14-5、 $NaCl$: 湿度調整用剤：反復投与試験のみ)	湿度を 80%程度に調整するた め
※ジメトエート (CAS.No : 60-51-5)	陽性対照として使用
※フェノキシカルブ (CAS.No : 72490-01-8) (反復投与試験のみ)	陽性対照として使用
イーストエクストラクト (CAS.No : 8013-01-2)	幼虫飼料原料として→⑤参照
ブドウ糖 (D(+)-Glucose : CAS.No : 50-99-7)	幼虫飼料原料として→⑤参照
果糖 (D(-)-Fructose : CAS.No : 57-48-7)	幼虫飼料原料として→⑤参照
ローヤルゼリー	幼虫飼料原料として→⑤参照
ショ糖 (Sucrose : CAS.No : 57-50-1) 又はシロップ (反復投与 試験のみ)	成虫飼料原料として シロップは蜂群給餌用の砂糖 や還元麦芽糖の水溶液も使用 可能
アセトン (CAS.No : 67-64-1、フ ェノキシカルブ使用の場合：必須)	溶媒として

※反復投与試験では陽性対照はどちらか一方を用いる

⑤ 飼料調製方法と保存

(ア)全てのローヤルゼリーバッチについて抗生物質や農薬の網羅的分析を行い、これらの混入がない又は微量であることを確認することが推奨されるが、陰性対照区の試験成立基準が満たされれば必ずしも必要ではない。

- (イ) 採集後 12 ヶ月以内の新鮮なローヤルゼリーを使用する。採集したローヤルゼリーは凍結融解による品質低下を避けるために一定分量ずつを小分けし（例えば 5 g）、-10℃以下の冷凍庫で保存する。
- (ウ) 糖水溶液中に不溶物が見られた場合は、ローヤルゼリーと混合する前に完全に溶解させる。
- (エ) 試験実施機関での幼虫期の死亡率が 15%以下である等の背景データがあれば、市販のローヤルゼリーを使用してもよい。
- (オ) 各飼料の調製

(重量%)

	ローヤルゼリー	イーストエキストラクト	ブドウ糖	果糖	脱イオン水
飼料 A (D1)	50	2	12	12	24
飼料 B (D3)	50	3	15	15	17
飼料 C (D4~D6)	50	4	18	18	10

備考：試験毎に調製された飼料は、冷蔵庫にて 5℃以下（凍結はさせない）で試験の期間中保存できる。また飼料は試験に先立って調製して、凍結（-18℃～-25℃）して使用するまで保存することもできる。

⑥ 被験物質調製方法と濃度確認

- (ア) 被験物質は通常、脱イオン水または溶媒を用いて溶解するか、懸濁し、被験物質調製溶液を調製し、各飼料の割合になるように飼料原料を混合し、投与飼料液を調製する。
- (イ) 溶媒（アセトンが推奨される）を用いて作製する場合、通常の陰性対照区とは別に溶媒対照区（投与のために用いた量と同じ量の溶媒を投与する試験区）を設定する。
- (ウ) 通常は 5 濃度区を設定し、幼虫への投与直前に被験物質調製溶液を飼料原料により希釈し、調製する。添加する被験物質調製溶液量は、脱イオン水を用いて調製した場合には飼料の 10%を超えてはならず（例えば D4 の飼料 30 μ L あたり被験物質調製溶液は 3 μ L）、アセトンを用いて調製した場合は単回投与試験では飼料の 5%、反復投与試験では飼料の 2%を超えてはならない（例えば D4 の飼料 30 μ L あたり被験物質調製溶液量は、単回投与試験では 1.5 μ L、反復投与

試験では 0.6 μL となる)。

- (工) 被験物質調製溶液は最高濃度と最低濃度について濃度確認(設定値の $\pm 10\%$ 以内であることを確認する)を行う。また、濃度確認試験までの間、 -10°C 以下の冷凍庫で保存しておくことができる。
- (オ) 投与飼料中の被験物質の濃度確認に関しては、多量に含まれるローヤルゼリーの影響により困難なものとなるが、要求に応じて検討する。

⑦ 陽性対照物質

陽性対照物質の試験区は、試験系及び試験環境についての信頼性保証のために設置しなくてはならない。陽性対照物質としては、単回投与試験ではジメトエートを、反復投与試験ではジメトエートとフェノキシカルブのいずれかを選択して用いる。

単回投与試験

陽性対照物質としてジメトエートを用いる。脱イオン水 3 μL 中に 1 幼虫当たり投与量の $8.8 \mu\text{g} \pm 0.5 \mu\text{g}$ の陽性対照物質活性成分が溶解する濃度の被験物質投与溶液を調製する (2.9 g/L)。D4 の投与直前に溶液を飼料に混合して投与飼料液を調製し、投与する。

反復投与試験

反復投与試験の陽性対照物質に関しては、作用機作により選択する。ジメトエートは幼虫期に作用する物質の陽性対照物質として選択し、フェノキシカルブは変態時期に作用する物質の陽性対照物質として選択する。1 幼虫当たりのジメトエート及びフェノキシカルブの D3 から D6 の投与量を以下に示す

試験日	D3	D4	D5	D6	幼虫当たりの 総摂取量
飼料へのジメト エート投与量 (μg)	1.08	1.56	1.80	2.64	7.08
飼料へのフェノ キシカルブ投与 量 (ng)	7.17	10.75	14.34	17.92	50.18

ジメトエートは 480 mg/L 濃度に調製して、飼料に 1/10 量を添加してジメトエート含有飼料を調製する。

フェノキシカルブは 64 mg/L 濃度に調製して、飼料に 1/200 量を

添加してフェノキシカルブ含有飼料を調製する。

⑧ 観察方法

- (ア) 単回投与試験では、D4 における投与後、D5 及び D6 の飼料給与時、また試験終了の D7 に死亡数を観察し、記録する。死亡個体は速やかに除去する。
- (イ) 反復投与試験では、D3 の投与開始時、D4 から D6 までの飼料給与時、D8 及び D15 に死亡数を観察し、記録する。死亡個体は速やかに除去する。
- (ウ) 動かない個体や移虫用具や移虫に用いた絵筆で触れても反応しない個体を死亡個体とする。反復投与試験では、D15 に蛹化していないものを死亡個体とする。D22 には、生存している正常に発育した羽化成虫及びセル外で死亡している成虫の数を記録する。

⑨ 用量設定

- (ア) LD₅₀、NOEC/NOED もしくは EC₅₀/ED₅₀ の範囲を確認するため、公比 5 から 10 で予備試験を行うことが推奨される。また複数回投与試験では予備試験を行うことによって、被験物質の作用機序についての情報が得られることもあり、その場合は陽性対照物質選択の参考になる。

⑩ 限度試験

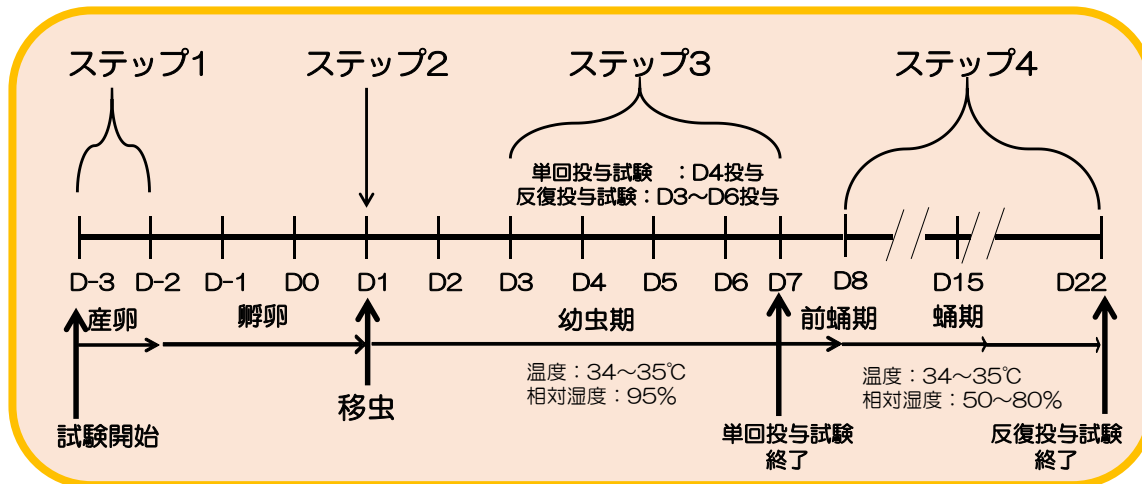
- (ア) 被験物質の毒性が低いと予想される場合や、溶解性が極めて低い場合 [1 幼虫当たり 100 µg の有効成分あるいは原体 (投与飼料液中濃度として 650 mg 有効成分あるいは原体/kg)] は、影響がないことを確認するために、その物質の最大溶解濃度の被験物質で限度試験を行う。この場合も 1 蜂群から採集された最低 12 匹で構成される 3 反復を限度投与量区 (被験物質区) とし、陰性対照区と陽性対照区 (溶媒を用いた場合は溶媒対照区も設置する) も設定する。
- (イ) 陰性対照区と比べて統計的に有意な影響が観察された場合は本試験を実施する。

⑪ 試験成立基準

- (ア) 単回投与試験の試験成立については、以下の試験成立基準成績を満たすかどうかで判断される。
 - 陰性対照区で全ての反復における D4～D7 の累計死亡率が 15%以下であること。

- 陽性対照物質のジメトエートにおいて D7 における補正死亡率（4. のデータ解析に示した補正を行ったもの）が 50%以上であること。
- (イ) 反復投与試験の試験成立については、以下の試験成立基準成績を満たすかどうかで判断される。
- 陰性対照区の全ての反復で D3～D8 の累計死亡率が 15%以下であること。
 - 陰性対照区の全ての反復で D22 における成虫羽化率が 70%以上であること。
 - 陽性対照物質としてジメトエートを用いた場合は、全ての反復で D8 における死亡率が 50%以上であること。フェノキシカルブを用いた場合は、全ての反復で D22 における成虫羽化率が 20%以下であること。

3. 試験の流れ



ステップ 1

隔王板の設置

ステップ 2

移虫

ステップ 3

群分け・投与・観察

ステップ 4

蛹から孵化

(反復投与試験)

ステップ 1

隔王板の設置

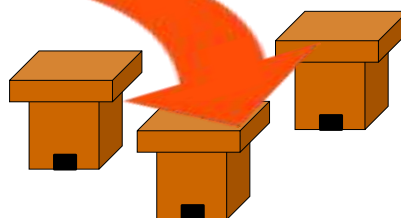
期間：D-3 ～ D-2

① 期間：D-3（隔王板の設置）

(ア) 朝に隔王板を用いて女王蜂を空の巣板もしくは羽化しつつある蜂児と空の巣板上に隔離する。→操作②へ



隔王板の設置



蜂群は 3 つ以上

（実際は状態の良い 6 群くらいに対して隔王板を設置する）

② 期間：D-2

(ア) 出来るだけ短い時間（最大 30 時間）で女王蜂を隔離部分より解放し、産卵の有無を確認する。→ステップ 2 へ

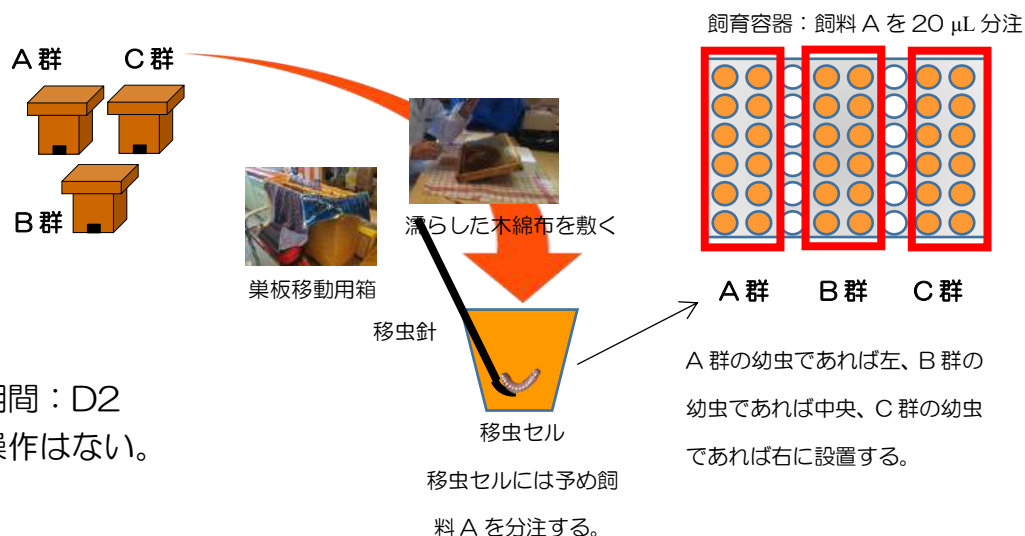
ステップ2

移虫

期間：D1 ～ D2

③ 期間：D1（幼虫の採集）

- (ア) インキュベーター内に、飽和硫酸カリウムを入れたアクリル製デシケーターを入れ、デシケーター内において、温度を 35℃から 36℃に上げることにより相対湿度を 95%±5%に調整しておく。
- (イ) 巣板に蜂群番号（例 A 群、B 群、C 群）を付し、温度変化を起こさないように温めた一般的なゲル保冷剤を入れた巣板移動用箱に巣板を入れ、移虫場所（実験室等）へ運ぶ。
- (ウ) 実験台は 70%エタノールで清拭・消毒する。
- (エ) 湿度低下を防止するため、濡らした木綿布を実験台に敷き、この上に巣板を置いて作業を行う。
- (オ) 各飼育容器の移虫セルに飼料 A を 20 μ L 分注する。
- (カ) 巣板より、形状が C 文字型でない幼虫を、飼料を入れた移虫セルに採集する。
- (キ) 飼育容器は左、中央、右の各 2 列に蜂群番号を記入し、番号と同じ幼虫を移虫する。1 蜂群から 12 匹移虫し、1 飼育容器あたり 3 蜂群(36 匹)からなるようにセットする。これを試験区数以上用意する。これらの飼育容器をインキュベーターに入れる。→ステップ 3 へ



④ 期間：D2 操作はない。

ステップ2 補足

移虫

期間：D1 ～ D2

補足：幼虫の採集と移虫について

採集について

幼虫を採集する場合、幼虫の背部から優しくすくい取る。また、移虫時や給餌時に幼虫側面の気門（天井側）を飼料で塞いだり、幼虫の向きをひっくり返したりしない。形状が C 文字型で大きい幼虫ほど孵化日数が経過しているので採集しない。

孵化 1 日目



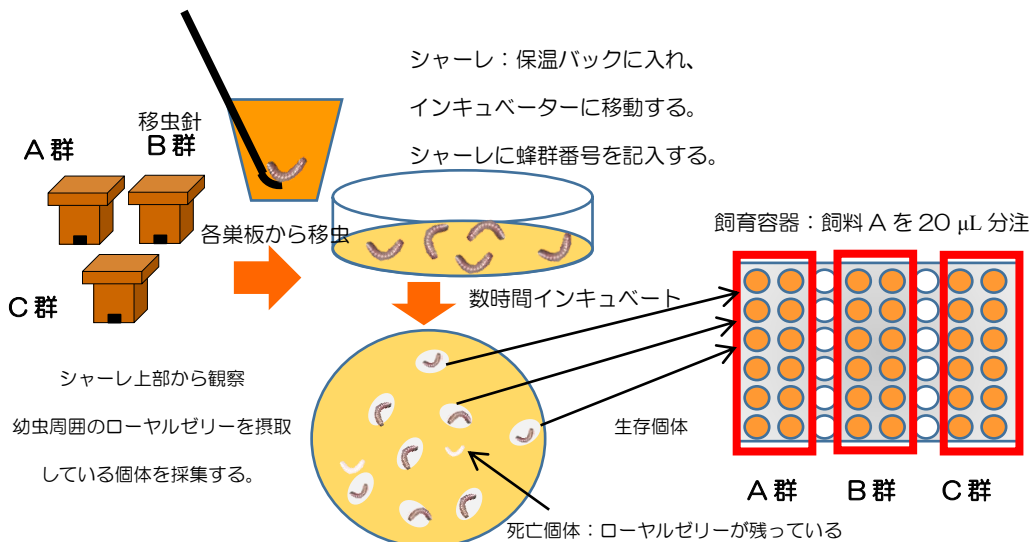
背部から移虫針をあててすくい取る



側面に気門がある

移虫について

幼虫を巣板から飼育容器に直接採集しない方法（安全研方式）として、80%程度に希釈したローヤルゼリーを塗布したシャーレを用意する。シャーレには、同一の蜂群の巣板から幼虫を採集（約 50 匹～60 匹／シャーレ）し、1 蜂群から 3 シャーレ程度、3 蜂群分のシャーレを用意する。シャーレを数時間インキュベートする。その間、移虫セルに飼料 A を 20 μ L 分注する。インキュベートしたシャーレを観察し、幼虫周囲のローヤルゼリーを摂取している個体を生存個体とし、各蜂群に対応した飼育容器に移虫セルを設置する。





群分け・投与・観察

期間：D3 ～ D7

⑤ 期間：D3

単回投与試験の場合：給餌（飼料 B 20 μ L／幼虫）

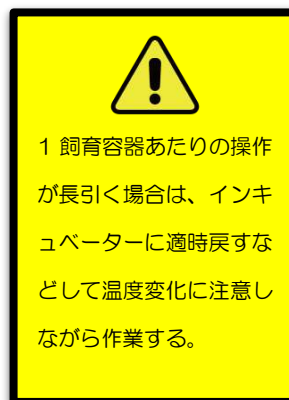
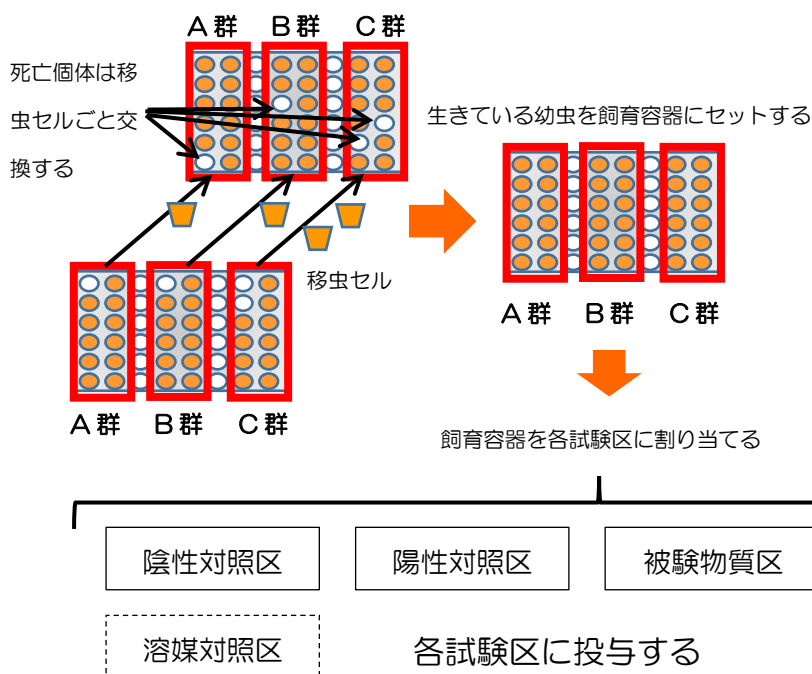
(ア) 幼虫に給餌（飼料 B 20 μ L／幼虫）を行なう。死亡個体は除外する。→ 操作⑥へ

反復投与試験の場合：群分け・投与

(ア) 飼育容器内の死亡個体を移虫セルごと除去し、除去した穴に別飼育容器の同一列（同一蜂群）の幼虫を移虫セルごと移動し、同一蜂群が 12 匹、3 蜂群 36 匹になるように各飼育容器をセットする。

(イ) 飼育容器を試験区分数用意し、各飼育容器に試験区をランダムに割り付ける。試験区名（識別）を容器に記入する。

(ウ) 給餌飼料 B に被験物質を混合したもの（投与飼料）を給餌と同様の操作により 20 μ L 投与する。→操作⑥へ





群分け・投与・給餌・観察

期間：D3 ～ D7

⑥ 期間：D4

単回投与試験の場合：群分け及び投与

(ア) 操作⑤の(ア)(イ)(ウ)の操作を実施する。この時、(ウ)の飼料は、投与飼料 C 30 μ L／幼虫で投与する。→操作⑦へ

反復投与試験の場合：給餌（投与飼料 C 30 μ L／幼虫）

(ア) 投与飼料 C 30 μ L／幼虫で投与し、観察を実施する。死亡の場合は記録する。→操作⑦へ

⑦ 期間：D5（給餌 飼料 C 40 μ L／幼虫）

単回投与試験の場合：給餌（飼料 C 40 μ L／幼虫）

(ア) 給餌し、観察を実施する。死亡の場合は記録する。→操作⑧へ

反復投与試験の場合：給餌（投与飼料 C 40 μ L／幼虫）

(ア) 投与飼料 C 40 μ L／幼虫で投与し、観察を実施する。死亡の場合は記録する。→操作⑧へ

⑧ 期間：D6

単回投与試験の場合：給餌（飼料 C 50 μ L／幼虫）

(ア) 給餌し、観察を実施する。死亡の場合は記録する。→操作⑨へ

反復投与試験の場合：給餌（投与飼料 C 50 μ L／幼虫）

(ア) 投与飼料 C 50 μ L／幼虫で投与し、観察を実施する。死亡の場合は記録する。

(イ) 反復投与試験は、ステップ 4 へ移動する。

⑨ 期間：D7（試験終了の観察） ※単回投与試験の場合

観察し、死亡及び残餌について記録する。データの解析を実施する。

→4.データ解析へ

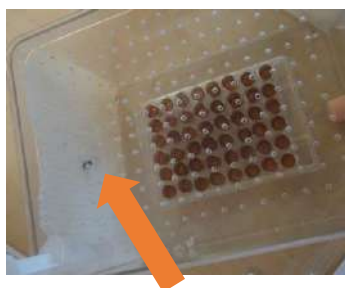
ステップ
4

観察

(反復投与試験のみ)

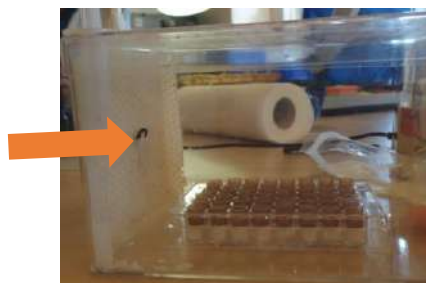
期間： D8、D15、D22

- ⑩ 期間：D8（硫酸カリウムから飽和食塩水に交換）
 (ア) デシケーター内の硫酸カリウムを飽和食塩水に変更し、相対湿度 80%±5%に調節する。観察を実施し、残餌及び死亡の場合は記録する。
- ⑪ 期間：D15（飼育容器の移動）
 (ア) 観察を実施し、死亡個体（蛹化していない幼虫も含む）は記録する。蛹化していないものも死亡個体とする。飼育容器を羽化容器に収納し、羽化した成虫用にショ糖溶液（またはシロップ）を給餌する。相対湿度は 50～80%の範囲に調節する。羽化容器には環境エンリッチメントのため巣の一部や女王物質を入れておくことが推奨される。



羽化容器

矢印は容器壁面に固定された女王物質が付いた巣板



- ⑫ 期間：D22（試験終了）
 (ア) 観察を実施し、羽化個体数と羽化しなかった個体（蛹期の死亡個体）数を記録する。
 (イ) データの解析を実施する。
 →4.データ解析へ

4. データ解析

① 死亡率の補正

補正しない死亡率	$M = (P - T) / S \times 100$
補正死亡百分率	$M = (\%P - \%T) / 100 - \%T \times 100$
P: 投与区の死亡数 T: 陰性対照区の死亡数 S: 陰性対照区の生存数 %P: 投与により生じた死亡率 %T: 陰性対照区の死亡率	

② データのまとめと統計解析

(ア) データは各試験区（陰性対照区、陽性対照区、被験物質区、溶媒対照区）について、用いた幼虫数、死亡数及び残餌について記録して表にまとめる。

(イ) 適切な統計解析法（プロビット回帰分析法、移動平均内挿法、2 項確率分布など）を用いて解析する。

- 単回投与の場合は D4 から D7 の死亡数及び D7 の残餌について記録して表にまとめる。必要な反応時間（24 時間、48 時間あるいは 72 時間後）についての用量反応性曲線をプロットして、曲線の傾きから半数致死量（LD₅₀）と 95%信頼限界を算出する。LD₅₀ は、1 匹あたりの投与量とする。
- 反復投与の場合は D4 から D8 の幼虫死亡数と D8 における残餌について、D8 から D15 の蛹期死亡数及び D22 の羽化数及び羽化率について記録して表にまとめる。EC₅₀/ED₅₀ 及び EC_x/Ed_x 及び 95% 信頼限界を計算し、NOEC/NOED の推定を行う。

5. 報告書の内容

項目	内容
被験物質	外観と物理化学的性質
	化学的測定結果、純度を含む
供試生物	由来
	ミツバチの種及び品種
	入手先
	飼育状況
	蜂群の健康状態
試験の状況	試験場所
	試験期間
試験についての 詳細	使用した 48 穴プレート
	飼料原料についての情報
	試験区
	供試生物数
飼育状況	温度（平均値、標準偏差、最低値と最高値）：最低 15 分間隔で記録する。
	相対湿度
結果 （共通）	死亡数（死亡率）
	被験物質原液の濃度測定結果
	LD ₅₀ 値
	95%信頼限界
結果 （反復投与試験の場合）	蛹期死亡数
	羽化数（率）
	NOEC/NOED
	EC ₅₀ /ED ₅₀ 及び EC _x /ED _x
その他の観察	残餌飼料の有無
逸脱	試験方法からの逸脱、 その他適切な説明
その他の事項	必要に応じて記載

添付資料：観察記録の用紙例

① 単回投与試験記録用紙

試験番号：

試験名：

試験区名：

試験期間

3日目 担当者 供試数 死亡数 生存数	4日目 担当者 前日生存数 死亡数 生存数	5日目 担当者 前日生存数 死亡数 生存数
6日目 担当者 前日生存数 死亡数 生存数	7日目 担当者 前日生存数 死亡数 生存数	

記入方法

①プレートの方向を決め、一部分にマークを付ける（黒いマーク部分）

②カップをはめた所を口で囲む（全日程）

③2日目以降は、生存していたら未記入、死亡していてカップを外した
らへ、怪しいかカップを外さない場合は△を記入する。

④前日の結果を参考に、死亡と生存を明確にする。

試験責任者確認
年 月 日

② 反復投与試験記録用紙

[illegible]

【4】マニュアルの策定

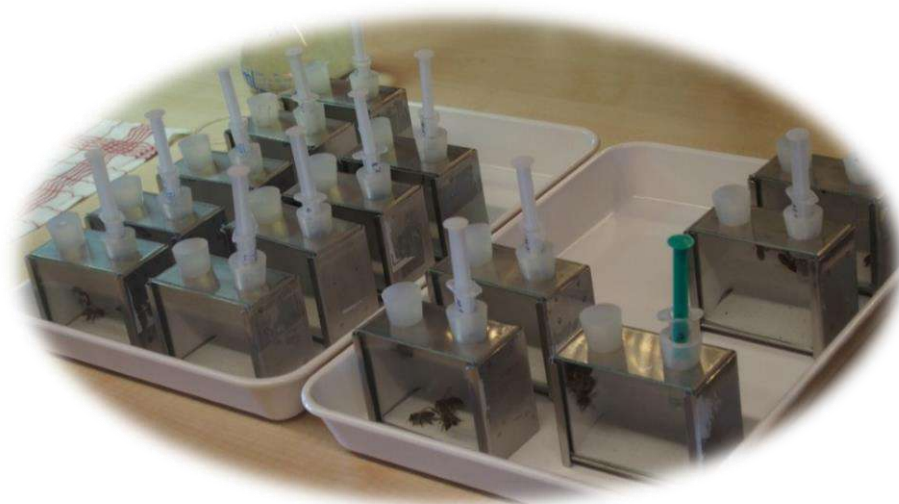
2. マニュアル

2.2 セイヨウミツバチ (*Apis mellifera*) を用いる成虫 10 日間毒性試験

セイヨウミツバチ (*Apis mellifera*) を用いる成虫 10 日間毒性試験

目次

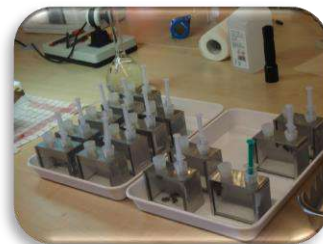
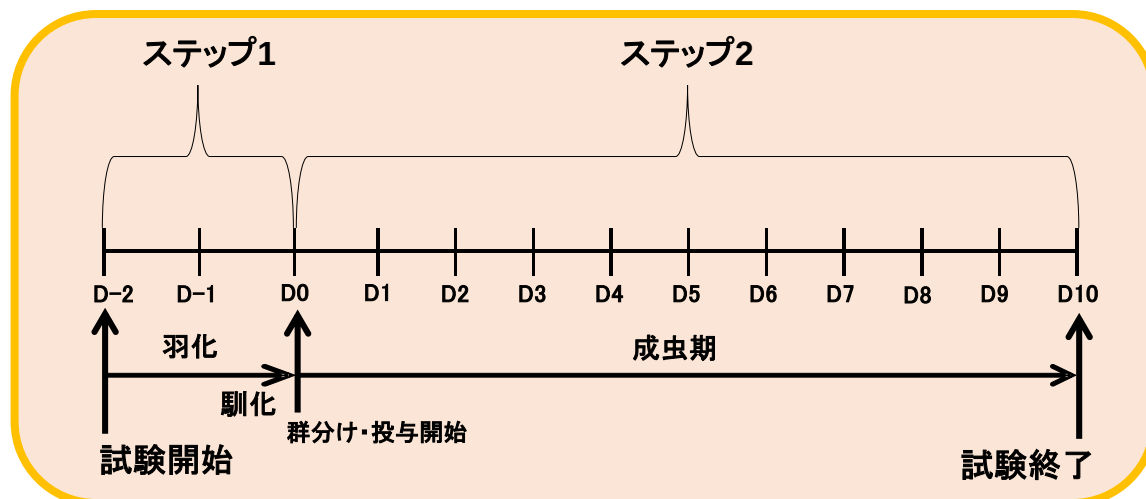
1. 概略	1
2. 実施にあたって	
① 諸注意	2
② 成虫採集について	2
③ 機器・器具の準備	2
④ 飼料	4
⑤ 被験物質調製方法と濃度確認	4
⑥ 陽性対照物質	5
⑦ 観察方法	5
⑧ 用量設定	6
⑨ 試験成立基準	6
3. 試験の流れ	7
① ステップ1	8
② ステップ2	9
4. データ解析	10
5. 報告書の内容	11
添付資料：観察記録の用紙例	12



1. 概略



若い働き蜂（2 日齢まで）に 10 日間続けて被験物質を含む 50%（w/v）のシヨ糖溶液を投与する。死亡数と異常行動について試験期間中毎日観察し記録する。被験物質の慢性影響については陰性対照区と被験物質区の結果を比較して評価する。10 日後の死亡数の結果を用いて、 LC_{50} （半数致死濃度）及び LDD_{50} （半数致死投与量）を算出する。可能であれば、 $NOEC$ （無影響濃度）及び $NOEDD$ （無影響投与量）についても決定する。



2. 実施にあたって



① 諸注意

(ア) 適切に管理された疾病の兆候のない、来歴と生理状態が明確である蜂群から採集する。化学物質（抗生物質、抗ダニ剤）については試験の1ヶ月前から使用してはならない。

② 成虫採集について

(ア) 1蜂群から十分な量の蜂を採集することができない場合は、数群から巢板を集めてもかまわない。このような場合には異なる群から集められた蜂がどこかの区に偏らずに、各投与群に分散するようにする。

(イ) 成虫が羽化しそうな有蓋蜂児のいる巢板を、環境調節された容器もしくは育児蜂を入れないようにした分割箱に収納し、巣箱に戻して羽化を待つ。環境調節された容器を用いる場合、十分な蜜と花粉を摂食できるように蜜と花粉のある巢板を用いるか、ない場合は蜜と花粉のある巢板を共に収納する。

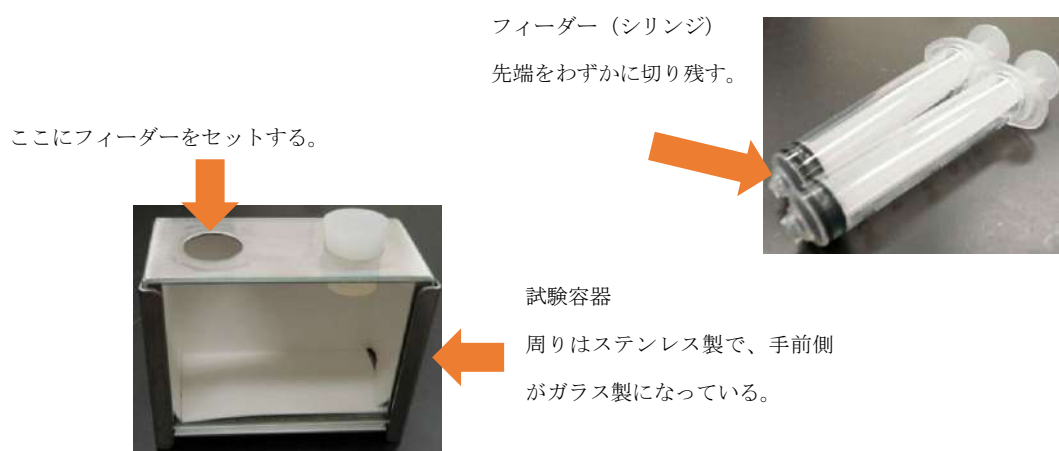
(ウ) 試験容器は、清掃が容易で通気のよい容器を用いる。どのような素材でできていてもかまわない（例えばステンレス、ボール紙、金網、プラスチック、使い捨ての木製容器など）。10匹を1グループとして1試験容器に飼育する。

③ 機器・器具の準備

(ア) 機器・器具類

機器・器具類	用途・説明
巢板（もうすぐ成虫が羽化する時期の有蓋蜂児のいる巢板）	成虫採集に用いる
巢板移動用箱	蜂場からの巢板の移動に用いる
一般的なゲル保冷剤	温めて巢板を保温する
密閉容器	成虫採集に用いる。巢板を収納してから環境調節機に入れる。
試験容器（成虫を飼育する容器）	洗浄が容易で通気のよい容器を用いる。どのような素材でできていてもかまわない（例えばステンレス、ボール紙、金網、プラスチック、使い捨ての木製容

	器など)。試験容器の大きさは例えば最低 0.2 dm ³ 。 仮に試験区が 7 試験区だった場合、7 試験区×3 反復+3 陰性対照空白+3 溶媒対照空白=27（馴化期間は死亡を考慮し+3 試験容器を余分に準備する）
環境調節機	試験系の温度・湿度の維持 温度 33℃±2℃ 相対湿度 50%～70%
フィーダー（給餌容器）	2 mL のプラスチック製ディスプレイシリンジの先端を、カッターで切除したものがよい。先端がわずかに（0.5 mm 程度）切り残されていると、飼料がたれ落ちることがない。 仮に試験区が 7 試験区の場合、馴化期間 21+予備の飼育容器用 3 本、試験期間 27×10 本、計約 300 本/試験を準備する。
電子天秤	フィーダーの重量測定に用いる。
その他ミツバチ飼育に必要な器具類	



(イ) 試薬類

試薬類	用途・説明
70%エタノール	器具・実験台等の清浄
シ ョ 糖（ Sucrose ： CAS.No ： 57-50-1）	飼料として
アセトン（CAS.No：67-64-1）	溶媒として
ジメトエート(CAS.No:60-51-5)	陽性対照として

④ 飼料

(ア) 50% (w/v) のショ糖溶液とし、給与期間（24 時間）中ずっと均一であり、沈殿が生じないものである必要がある。

(イ) フィーダー重量について、投与前後に計測した結果を用い、ブランクによって補正して求める。ブランクは、実際の試験区に追加して蜂を含まない飼育容器に投与飼料液フィーダー（陰性対照もしくは溶媒対照に投与する投与飼料液を含む、最低 3 反復分）を設置し、試験環境下に置いて重量を計測し、24 時間での減量分を投与飼料液の蒸発分（ブランクの計測結果）として、試験区での計測結果から差し引いて（補正）行う。

(ウ) 飼料の調製

(重量/体積%)

	ショ糖	脱イオン水
飼料	50	50

⑤ 被験物質調製方法と濃度確認

(ア) 被験物質は通常、脱イオン水または溶媒を用いて溶解するか、懸濁し、被験物質調製溶液を調製し、各飼料の割合になるように飼料原料を混合し、投与飼料液を調製する。

(イ) 溶媒（アセトンが推奨される）を用いて作製する場合、通常の陰性対照区とは別に溶媒対照区（投与のために用いた量と同じ量の溶媒を投与する試験区）を設定する。また、アセトンの投与飼料液中濃度は 5%を上限とし、陰性対照区と生存率に差が生じない濃度範囲内で用いる。

(ウ) 被験物質原液の安定性によっては、試験期間中に用いる被験物質原液

をまとめて作製し、適切な保存条件（密閉して $6^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ で冷蔵保存等）で保存してもかまわない。

(工) 投与飼料液は少なくとも 4 日に一度作製し、冷蔵庫でおよそ $6^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ の条件下で保存する。

(オ) 被験物質が速やかに分解すると推察される場合（被験物質原液についても毎日あるいは適切な間隔で調製する必要がある）、毎日調製し、最低濃度及び最高濃度の投与飼料液について、試験期間中に一度は濃度確認試験を行う。各確認用試料は分析するまで冷凍庫で -18°C 以下に保存する。

(カ) 被験物質原液や投与飼料液を毎日調製しない場合は、同様に最低濃度と最高濃度について確認するが、試験期間中に一度は濃度確認試験を行う。さらに、保存期間の確認として最大保存期間（4 日を超えてはならない）が経過した投与飼料液及び被験物質原液についても、両濃度につき 1 回濃度確認試験を行う。各確認用試料は分析するまで冷凍庫で -18°C 以下に保存する。

(キ) 投与飼料液を調製するために被験物質原液を用いる場合は、試験物質原液についても同様に濃度確認試験を行うことを推奨する。

⑥ 陽性対照物質

(ア) 陽性対照区を設定し、陽性対照物質としてはジメトエートを用いる（原体、製剤のどちらでもよい）。1 濃度を設定して、その投与濃度で試験終了時に 50%以上の死亡率が得られることについて、成虫の感受性と試験系の妥当性についての確認を行う。10 日間で 50%以上の死亡率が達成される、 $0.5 \sim 1 \text{ mg/kg}$ （有効成分濃度として）の間で濃度設定をする。

⑦ 観察方法

(ア) 死亡数は毎日、最初の投与開始時間から 24 時間 $\pm$ 2 時間後から試験期間中、1 日の同じ時間（毎 24 時間 $\pm$ 2 時間）に記録を行う。

(イ) またその時に、異常行動についても記録を行う。

(ウ) 異常行動とは、以下の区分による行動が見られた匹数について計量的に記録を行う：

m= moribund：瀕死（蜂が歩けず、脚や触覚をあまり動かさない、刺激に対してもわずかにしか反応しない）

例）光を当てたときに動くが普段は死んだように動かない

a= affect：影響あり（蜂が姿勢を保って歩行しているが統合失調的な動きが見られる）

例）過度な活動、攻撃行動、身づくろい行動の亢進、回転、震

顫 等

c= cramps：痙攣（蜂が腹部や全身を収縮させる）

ap= apathy：不活発（蜂がわずかな、もしくは遅れた反応のみを示す）

例）光や空気で刺激してもそのまま動かずにいる 等

v= vomiting：嘔吐

上記リストに含まれない行動が見られたときには明確な表現で記載すること。

⑧ 用量設定

(ア) 毒性について全く未知の場合は、前もって公比 5 から 10 など濃度設定試験を行って、適切な試験濃度の設定を行うことができる。

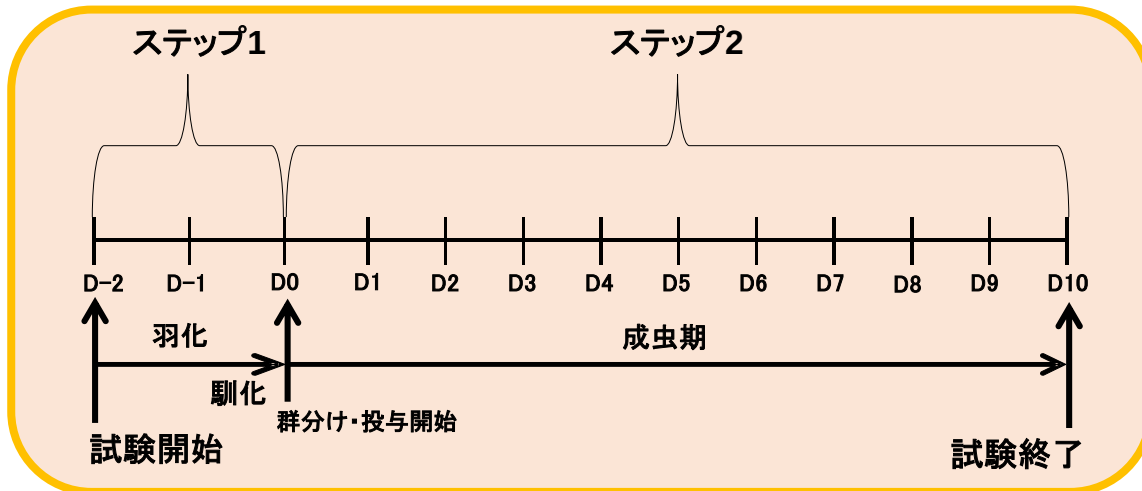
(イ) NOEC/NOEDD や試験終了時の LC_{50} / LDD_{50} を算出するために、必要かつ十分な濃度段階及び各濃度の反復数を設定する。通常は 2.5 を越えない公比で 5 濃度を設定する。

⑨ 試験成立基準

(ア) 試験の成立基準は、以下の成績基準を満たすかどうかで判断される。

- 陰性対照区と溶媒対照区において、試験終了時（投与開始から 10 日後）の平均死亡率が 15%以下であること。
- 陽性対照区の試験終了時（投与開始から 10 日後）の平均死亡率が 50%以上であること。

3. 試験の流れ



ステップ
1

巣板選択・
成虫採集・馴化

ステップ
2

群分け・投与・観察

ステップ 1

巣板選択・成虫採集・馴化

期間：D-2 ～ D0

① 期間：D-2（巣板の移動）

(ア) 巣板移動用箱に巣板を入れ、実験室に運び込み、巣板を密閉容器に移し、環境調節機に入れる。→操作②へ



② 期間：D-1～D0（馴化）

(ア) 試験の始まる前日、密閉容器にいる羽化した成虫を、ピンセット又は手で羽をつかんで試験容器に移す。10 匹／試験容器で最低 3 反復（限度試験の場合は 5 反復）を設定し、フィーダーに 50% ショ糖液を入れ、24 時間馴化する。

(イ) 死亡の可能性も考慮し、約 3 試験容器分を予備として準備する。ステップ 2 へ移動する。



羽化後 24 時間以内の成虫は刺針行動を行わず毒液も合成していないため刺されることはない。



 ステップ
 2

群分け・投与・観察

期間：D0～D10

③ 期間：D0（群分け）

(ア) 10匹生存している健康な成虫の試験容器に試験区名を記入する。途中で死亡等がみられた試験容器は予備と交換するなどして、群分けする。その後、予備分は除外する。→操作④へ

④ 期間：D0（投与）

(ア) 各フィーダーに投与飼料液を充填し、投与飼料液名（試験区名）を記入する。

(イ) フィーダー重量を計測し、投与前重量を測定し記録後投与する。

(ウ) フィーダーは毎日交換し、投与は24時間±2時間毎に行う。→操作⑤へ



⑤ 期間：D1～D10（重量測定と観察）

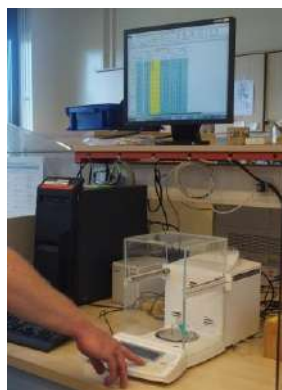
(ア) 観察は、陰性対照区の容器と他の試験区の容器を並べて比較、観察する。

(イ) 摂取された投与飼料液量（投与後重量）を測定し、確認する。

(ウ) 再び、新たなフィーダーを用意し、投与前重量を測定・記録し、投与する。

(エ) 以降（ア）～（ウ）の操作を繰り返す。

→4.データ解析へ



4. データ解析

- ① 投与飼料液の摂取量については以下のように計算、表記する
 - (ア) 測定した摂取量をブランクの計測結果で補正する（負の値になる場合は、摂取量なしとする）。
 - (イ) 毎日の投与液 1 匹あたりの摂取量平均値について（mg/個体）、1 日の摂取量を投与開始時に生存していた個体数で除して算出する。
 - (ウ) 各投与区について、試験期間を通じた平均 1 日摂取量について（mg/個体/day）算出する。
 - (エ) 各反復について、試験期間を通じた平均 1 日摂取量について（mg/bee/day）算出する。
 - (オ) 1 匹あたりの平均被験物質摂取量（ μg か ng /個体/day）
 - (カ) 試験期間中の累積被験物質摂取量（ μg か ng /個体）
- ② データのまとめと統計解析
 - (ア) データは各試験区について供試虫数、死亡数、異常行動を示した個体数、及び投与飼料液摂取量について記録して表にまとめる。
 - (イ) 適切な統計解析手法（例えば回帰分析、移動平均内挿法、2 項確率分布法など）を用いて解析する。LC₅₀、LDD₅₀（可能であれば EC_x）とその 95%信頼限界、及び NOEC/NOEDD を算出する。

5. 報告書の内容



項目	内容
被験物質	外観と物理化学的性質
	化学的測定結果、純度を含む
供試生物	由来
	ミツバチの種及び品種
	入手先
	飼育状況
	蜂群の健康状態
試験の状況	試験場所
	試験期間
試験についての詳細	試験区
	供試生物数
飼育状況	温度（平均値、標準偏差、最低値と最高値）
	相対湿度
結果	死亡数（死亡率）
	全ての区についての観察時の被験物質投与飼料液摂取量
	NOEC/NOEDD
	LC ₅₀ /LDD ₅₀
	95%信頼限界
その他の観察	生物学的影響、異常行動や摂食阻害など
逸脱	試験方法からの逸脱、その他適切な説明
その他の事項	必要に応じて記載

添付資料：観察記録の用紙例

		記録者			記録者				
		記録時間			記録時間				
観察日		前日生存数	死亡数	異常行動	前日生存数	死亡数	異常行動	生存数	
A-2-1	対照区								
A-2-2									
A-2-3									
A-3-1	0.2								
A-3-2									
A-3-3									
A-4-1	0.4								
A-4-2									
A-4-3									
A-5-1	0.6								
A-5-2									
A-5-3									
A-6-1	0.8								
A-6-2									
A-6-3									
A-7-1	1.0								
A-7-2									
A-7-3									
B-2-1	対照区								
B-2-2									
B-2-3									
B-3-1	0.2								
B-3-2									
B-3-3									
B-4-1	0.4								
B-4-2									
B-4-3									
B-5-1	0.6								
B-5-2									
B-5-3									
B-6-1	0.8								
B-6-2									
B-6-3									
B-7-1	1.0								
B-7-2									
B-7-3									
C-4	溶媒対照								
C-5									
C-6									

異常行動とは、以下の区分行動が見られた匹数について計量的に記録を行う：
 m= 瀕死（蜂が歩けず、脚や触覚をあまり動かさない、刺激に対してもわずかにしか反応しない）
 例）光を当てたときに動くが普段は死んだように動かない 等
 a= 影響あり（蜂が姿勢を保って歩行しているが統合失調的な動きが見られる）
 例）過度な活動、攻撃行動、身づくろい行動の亢進、回転、震動 等
 c= 痙攣（ハチが腹部や全身を収縮させる）
 ap= 不活発（蜂がわずかな、もしくは遅れた反応のみを示す）
 例）光や空気で刺激してもそのまま動かずにいる 等
 v= 吐き戻し
 上記リストに含まれない行動が見られたときには明確な表現で記載すること。

【5】まとめ

5.1 今後検討すべき課題

本事業で、国内外の各種情報の収集・整理、海外での試験研究機関での研修及び受託機関での実証試験の実施を行い、多くの知見を蓄積することができたが、その過程で今後検討すべき課題も摘出されたので、それらを以下のとおり取りまとめた。

5.1.1 技術的な事項

今回の海外での研修で収集した重要な情報の一つに、試験実施時期に関する情報がある。すなわち、ヨーロッパでは建群期（4～6月）に限り試験を行っている。これは齢が揃った幼虫をその時期にしか集めることができないためである。一方、日本では代用花粉の給餌等を行えば9月までは試験を行うことが可能である。安全研においても、これまで建群期後に数多くの試験を実施してきた。しかし、建群期後の試験では陰性対照区での死亡率が試験成立基準を上回り、試験が成立しないという事態を経験した。我々がこの原因について検討したところ、建群期以外の時期では幼虫の生育速度が速く、ガイダンスドキュメントに従い試験8日に湿度を変更した場合、陰性対照区の幼虫死亡数が増加してしまうこと、また湿度変更を試験6日に変更することで、この問題に対応できることが確認できた。

ミツバチを用いた試験の実施可能時期は限られており、多くの試験を効率よく行うためには困難が伴う。建群期だけでなく、建群期以外の時期でも再現性の高い試験を実施するためには、幼虫の生育速度を考慮した試験法の改良を検討する必要がある。

我々は、建群期以外の時期にガイダンスドキュメントに従って試験8日に湿度を変更する方法で、リングテストの被験物質にも用いられたジメトエートを用いて試験を行ったところ、低濃度の処理区で死亡数が増加することにより用量反応性が確認できないという事象を経験した。我々の検討では、ジメトエートのような神経作用物質の低濃度での摂食促進作用により幼虫の生育速度が速まり、結果として湿度変更の時期が遅れたことが原因であることを示唆する結果が得られている。

以上のことから、建群期以外の時期に実施する試験や被験物質として神経作用物質を対象とした試験でも、再現性よく精度の高い試験を実施するためには、幼虫の生育速度に対応した湿度変更が重要と考えられ、そのための基礎的検討を早急に実施する必要がある。

幼虫の生育速度に関しては飼育密度の影響も考慮する必要がある。通常の評価試験では1区あたりの個体数と濃度区数が定められていることから、幼虫の飼育密度が問題になる可能性は低いと考えられる。しかし小規模な予備試験を行う場合や、複数の試験を1つの大きなデシケーターに収納して実施する場合などにおいて、予期せぬ影響が生じる可能性に留意する必要がある。

5.1.2 制度的な事項

1) 蜂群維持

健康で均一な幼虫を必要数確保して試験の質を維持するためには、使用する蜂群の維持管理について十分に注意をはらう必要がある。すなわち、ガイドランスに準拠して試験を行う場合、幼虫試験ならば最低 10 群程度、成虫試験ならば最低 5 群程度を、常により状態で維持しておくことが不可欠である。

海外の試験実施施設ではそれぞれの施設が養蜂家と契約することで、多数の蜂群を維持、供給していた。もし試験施設内で必要数の蜂群が維持できない場合には、試験毎に養蜂場から蜂群を購入して、毎回馴化をする必要がある。実験施設内で蜂群を維持せず養蜂場から都度蜂群を購入する場合には、試験使用予定蜂群に対する計画的な投薬と休薬期間の設定を確実に行之、試験機関に供給されることが試験の質の維持のために必要となる。

このように試験施設において使用蜂群をよい状態で必要な量管理することや、適切な薬剤処理と休薬期間の確保等を確実に実施していくために、養蜂家も参加した形での何らかの支援体制が必要である。

2) バロア病対策

海外のミツバチ試験実施機関においては、バロア病対策として残留性が高くまた連用することでダニが抵抗性を獲得するピレスロイド系殺ダニ剤や有機窒素系殺ダニ剤の使用は避けており、夏季には蟻酸、冬季にはシュウ酸を使用していた。

しかし日本では、蟻酸及びシュウ酸はバロア病に使用するための薬剤として承認されておらず、ピレスロイド系殺ダニ剤や有機窒素系殺ダニ剤しか承認されていない。畜産物の生産を目的としない毒性試験に用いる蜂群のバロア病対策として、蟻酸あるいはシュウ酸を使用することが可能なかどうか、検討が必要である。蟻酸あるいはシュウ酸は使用できないのであれば、ミツバチを用いた試験へ影響を及ぼさない、ピレスロイド系殺ダニ剤あるいは有機窒素系殺ダニ剤の使用法を検討する必要がある。

【5】まとめ

5.2 まとめ

国内外の知見・技術を収集して、国内の試験機関でミツバチの成虫の長期的影響及び幼虫試験を滞りなく実施するための飼育技術等も含めたマニュアルを策定することを目的として、文献情報等の知見の集積を行うとともに、海外の試験研究機関での研修で最新の情報を収集した。

これらの知見を踏まえ、OECD で決定あるいは検討中の新規ミツバチ影響評価試験、すなわち幼虫単回摂食毒性試験、幼虫複数回摂食毒性試験及び成虫 10 日間慢性毒性試験について、それぞれ実証試験として実施した。その結果、3 つの試験法全てにおいて、リングテストで得られた結果と同程度の精度で、日本においても試験を行うことが可能であることを確認できた。

また当研究所においてこれまで実施してきた試験や、文献情報等の知見の集積や研修中に得られた情報を反映して、新規ミツバチ影響評価試験のためのマニュアルを作成した。

さらにこれまでに集積した知見や経験、今回の研修における情報収集結果、また今年度の実証試験の結果から、今後検討すべき技術的、制度的な検討課題を明らかにした。