

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

【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

1.1 ミツバチ幼虫単回投与毒性試験

OECD 化学物質試験法ガイドライン

237 2013 年 7 月 26 日採択

ミツバチ (*Apis mellifera*) 幼虫単回投与毒性試験

1-1) 緒言

1. このテストガイドライン (TG) 237 は、ミツバチ幼虫を用いた実験室内における急性毒性試験について記したものである。これは、フランスの研究グループが提案する手法 (1)(2)(3)を基に設計され、2005 年から 2008 年にかけてヨーロッパの 7 施設においてリングテストが行われた (4)。
2. この TG はアメリカ (5)、カナダ、ヨーロッパ (6、7) からの要請を受けて、ミツバチ幼虫に対して被験物質を混合した人工飼料を単回投与して、実験室内における毒性影響を調べるための第 1 段階の試験として位置づけられる試験方法である。
3. この TG の目的は、ミツバチ幼虫に対して被験物質（特に殺虫剤の有効成分や製剤について）を単回投与したときの、72 時間後における致死量 (72-hr LD₅₀) を求めることである。この試験により得られたデータは、適切なミツバチ幼虫に対するリスク評価法に用いられる。またこのテストガイドラインは、OECD の若齢成虫を用いた試験法である TG213(8)及び TG214(9)を補完して、ミツバチに対するリスク評価のための下位スクリーニングテストとしての機能を持つものである (4)。

1-2) 試験の原理

4. 試験 1 日 (D1) に、齢の揃った 1 齢幼虫 (L1) を 3 群の巣板より集め、個体毎に 48 ウェルのプレートにセルを設置した飼育容器に移して一定量の基礎人工飼料を給餌する。試験 4 日 (D4) に、被験物質を 1 回投与する。投与量については 5 用量を設定して試験を行う。D5、D6、D7 の死亡数について記録する。D7 までの累計死亡数から 72-hr LD₅₀ を計算する。

被験物質の情報

5. 被験物質の水に対する溶解性、溶媒に対する溶解性及び蒸気圧について記載する。被験物質の構造式、純度、水中及び光安定性、オクタノール/水分配係数 (K_{ow}) についても報告する必要がある。物性、由来（バッチ、ロットナンバー）も記載する。試験を困難にする被験物質の物理化学特性については、OECD ガイダンスドキュメント No.23 (11) 試験と評価のシリーズに記載があるので参考にされたい。

参照化学物質（陽性対照物質）

6. 陽性対照物質（ポジティブコントロール）としてジメトエート原体 (CAS 60-51-5) を用いる。陽性対照物質を用いた試験は、試験系及び試験環境が信頼できる状態であるこ

1.3 成虫に対する 10 日間慢性毒性試験

新しい化学物質試験法ガイドラインの提案

2016 年 2 月

ミツバチ (*Apis mellifera*) 成虫に対する実験室内 10 日間慢性経口毒性試験

1-1) 緒言

1. このガイドラインは、実験室内、10 日間という条件下で行われるミツバチ成虫に対する慢性経口毒性試験について記したものである。この試験は、急性経口毒性に関する OECD ガイドライン TG213 (1998)、CEB (2012) 法、Decourtye らの報告 (2005) 及び Suchail らの報告 (2001) を基に設計されている。このガイドラインについては、2013 年にドイツのリングテストグループにより、また 2014 年には第 1 回の国際的リングテスト、2015 年には第 2 回の国際的リングテストが行われて妥当性についての確認が行われるとともに、参加試験機関における習熟も進んでいる。
2. ミツバチのような花粉媒介者は、巣箱に貯蔵された後の採食された飼料や、薬剤処理された植物からの採餌を介して、植物防疫剤や残留性化学物質に暴露される。このような潜在的リスクに対して、実験室内にて若い働き蜂を用い、被験物質を含む飼料（シヨ糖溶液）を給餌する 10 日間の慢性毒性試験を行えるようにした。

まず検討すべき事柄

3. 被験物質は主に植物防疫剤 (PPP) であり、原体と製剤の両方が試験に用いられる。PPP の使用規制確立を目的として、その物質につきこのテストガイドラインを用いて試験しデータを収集する前に、この試験法がその目的に対して適切な結果を得られるものであるか（また、もし得られなかった場合はそれがなぜか）確認する必要がある。この検討が十分行われた後、初めてそのような物質に対する試験を行い使用規制要請に応えることができるようになる。
4. この試験は、日齢を明確にするために若い働き蜂（2 日齢を最大とする）を用いる。
5. ミツバチの感受性確認及び試験の状況確認のために、陽性対照物質を投与する区を設けること。

1-2) 試験の原理

6. 若い働き蜂（2 日齢まで）に、被験物質を含む 50% (w/v) のシヨ糖溶液を 10 日間継続して自由に摂食させる。10 日間の試験期間中、死亡数と行動の異常について毎日観察、記録する。被験物質の慢性影響について、陰性対照区と投与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、LC₅₀（半致死濃度）及び LDD₅₀（半致死経口摂取量）を算出する。もし可能であれば、NOEC（無影響濃度）及び NOEDD（無影響経口摂取量）についても決定する。また、被験物質の毒性が低いと予想される、または被験物質の溶解性が低いなどの場合では限度試験を実施し、LDD₅₀ が限度試験において投与した量よりも大きいということを確認する。

試験の有効性確認

7. 以下の判断基準を用いて試験の有効性を確認する：

- ・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。

1-3) 試験法の詳細

供試生物の採集

8. 若いハチ（2 日齢以下）を、適切に管理され、可能な限り疾病の兆候がなく、由来や生理的状态の明らかな蜂群から採集する。試験の 1 ヶ月前から、化学物質（抗生物質、殺ダニ剤）を使用してはならない。もし 1 蜂群から十分な数量のハチを採集することができない場合は、複数群の巣板からハチを採集してもよい。このような場合には、異なる群から集められたハチが一定の区に偏らずに、各投与群に分散するよう留意する。当日に羽化が見込まれる有蓋蜂児のいる巣板を、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巣板を用いるか、蜜と花粉のある巣板と共に収納する。試験開始前日、羽化したハチを巣板から回収して飼育ケージに分けて収納する。ハチ採集時の麻酔使用は避けるべきである。採集したハチは飼育ケージ内で 1 日間試験条件に馴化させる（1 日間の羽化期間の後）。馴化及び試験期間中はショ糖溶液を給餌するが、花粉や水は給与しない。試験開始前に絶食期間を設定する必要はない。

試験用飼育ケージ

9. 清掃が容易で通気性のよいケージを用いる。素材としては、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が使用可能である。影響が出ているハチと出ていないハチの見分けを容易にするため、1 ケージあたり 10 匹で飼育する。容器の大きさは、その飼育匹数に適した十分な大きさである必要がある（例えば最低 0.2 dm³）。

飼料溶液

10. 50% (w/v) ショ糖水溶液を用いて、陰性対照飼料、被験物質添加飼料及び陽性対照物質添加飼料を調製する。全ての飼料溶液は、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。

被験物質原液及び被験物質添加飼料溶液の調製

11. 被験物質添加飼料の調製に当たっては、前もって作製した被験物質原液を使用するか、被験物質を直接 50% (w/v) のショ糖溶液に溶解して作製する。被験物質の水溶性が高い場合は、脱イオン水に溶解する。水溶性が低い物質の場合は、アセトンを溶媒として用いることができる。投与飼料中の溶媒濃度は被験物質の溶解性に依存するが、全ての試験区を通じて同じ濃度にしなければならない。アセトンの投与飼料中濃度は 5%を上

限とする。その他の溶媒や可溶化剤あるいは増粘剤を、陰性対照区の生存率に問題が生じない濃度範囲内で用いることができる（投与飼料の投与間隔である 24 時間、飼料中の被験物質の均一性を維持するためにこれらを用いる）。被験物質が溶液中で安定な場合は、試験期間中に用いる被験物質原液をまとめて作製して、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、などの）で保存してもよい。被験物質が水やアセトン溶液中で速やかに分解すると推察される場合は、被験物質原液を毎日、あるいは適切な間隔で調製する必要がある。

12. 最終的な被験物質添加飼料は、被験物質原液から、あるいは 50% (w/v) のショ糖溶液に溶解した高濃度溶液を希釈して調製する。被験物質添加飼料は少なくとも 4 日に一度作製し、およそ $6^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ の条件下で冷蔵保存する。
13. アセトン（もしくは可溶化剤や増粘剤を用いる場合も）を溶媒として用いる場合は、陰性対照区を 2 区設ける必要がある。すなわち 1 つは純粋な 50% (w/v) のショ糖溶液を飼料として投与する区、もう 1 つは 50% (w/v) のショ糖溶液に被験物質投与区と同量のアセトン（もしくは可溶化剤や増粘剤）を加えた溶媒対照区である。

分析による検証

14. 投与飼料液を毎日作製する場合、最も濃度の低い飼料と最も濃度の高い飼料を調製後直ちに分取し、濃度確認試験を行うまでの間冷凍庫で -18°C 以下に保存しておくこと。この試験は試験期間中に一度は行われなくてはならない。もし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。
15. 被験物質原液や投与飼料液を毎日調製しない場合でも、濃度確認試験を実施する必要がある。すなわち、当該原液あるいは飼料の使用期間中の 1 回と使用期限最終日にそれぞれ最低濃度飼料と最高濃度飼料及び原液を採取して濃度を確認する。最大保存期間は 4 日を超えてはならず、投与飼料液や被験物質原液は使用期間中冷凍保存することが推奨される。
16. もし試験期間中に新たなバッチの被験物質を使用する必要がある場合には、新しいバッチの被験物質についても同様にして、最高濃度と最低濃度の濃度確認試験を行わなくてはならない。

1-4) 試験手順

試験区と陰性対照区

17. NOEC/NOEDD 値や試験終了時の $\text{LC}_{50}/\text{LDD}_{50}$ （適用できる場合は EC_x ）を統計解析手法により算出するため、必要かつ十分な濃度段階数及び各濃度の反復数を設定する。通常 2.5 を超えない公比を用いて 5 濃度を設定し、試験 10 日における LC_{50} 濃度を含むような濃度範囲で試験を行う。
18. 毒性についての情報がない場合は、適切な試験濃度の設定のため、前もって濃度設定試験を行ってもよい。

19. 用量反応性試験の場合は、各用量に最低 3 反復（10 匹のハチのケージを 3 ケージ）を設定する。限度試験の場合は陰性対照区と被験物質投与区についてそれぞれ 5 反復及び陽性対照区について少なくとも 3 反復を設定する。

陽性対照区

20. 試験には陽性対照区を設定しなくてはならない。陽性対照物質にはジメトエートが適している（原体、製剤のどちらでもよい）。ハチの感受性と試験の信頼性を確認するため、試験終了時の死亡率が 50%以上となる 1 濃度を設定する。10 日間で 50%以上の死亡率となる濃度は、0.5～1 mg/kg であることが明らかになっている。

曝露（投与）

21. 被験物質投与液はフィーダー（例えば 2 mL 以上の容量の先（針をつける部分）をカットしたプラスチックシリンジなど）を用いてミツバチ成虫に自由摂取させる。1 つの反復に含まれるミツバチは投与液を、栄養交換行動を通じて共有するため、全てのミツバチが投与液を摂食すると期待できる。被験物質投与液は毎日、フィーダーを交換することで交換する。投与は 24 時間（±2 時間）毎に行う。投与液の摂取量は、投与時に投与液を含むフィーダー重量を校正済み天秤で計測しておき、投与後の重量を減じて求める。フィーダーからの投与液の蒸発による影響を補正するため、追加のケージを用意して投与液の蒸発量を求めることを推奨する。追加のケージにはハチを入れず、陰性対照用あるいは溶媒対照用投与液を入れてあらかじめ重量を測定したフィーダーをセットする（それぞれ 3 反復分ずつ）。これらのケージを試験用ケージと並べて同じ条件下に置く。毎日のフィーダー交換時に重量を測定し、新しいフィーダーと交換する。ここで測定した投与液の蒸発量を試験区での投与液摂取量から差し引くことにより、蒸発量で補正した投与液摂取量が求められる。

試験環境

ハチは、温度を $33^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ に、相対湿度を 50%～70% に調整した環境下にて、全暗黒条件で飼育する。推奨試験環境からの短時間（1 日 2 時間以内）の逸脱は、避けがたく、これが試験の有効性や結果に影響を及ぼすことはない。

22. 温度と相対湿度は、試験が適切な環境下で行われたことを示すために、試験期間を通じて継続して記録すること。

試験期間

23. ミツバチは被験物質投与液に 10 日間に渡って連続して曝露される。

観察

死亡数は毎日、最初の投与開始時刻から 24 時間後 ±2 時間から、毎日ほぼ同じ時刻（24 時間 ±2 時間毎に）に記録する。

24. 同時に、行動異常についても記録を行う。
25. 以下のようにカテゴライズした異常行動を示すハチの数を計量的に記録する。
- m= 瀕死（ハチが歩けず、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。例えば光や風を当てたときには動くが普段は死んだように動かない)

a= 影響あり (ハチが姿勢を保って歩こうとするが、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)

c= 痙攣 (ハチが腹部や全身を収縮させる)

ap= 不活発 (刺激に対してハチがわずかな、もしくは遅れた反応のみを示すこと：例えば光や風で刺激しても、そのまま動かずにいるなど)

v= 嘔吐

26. 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をすること。

1-5) データと報告

データ

27. 試験で得られたデータは、試験に用いたハチの個体数、死亡率、異常行動を示した個体数について各観察日毎に表にまとめる。試験終了後、LC₅₀ (mg/kg)、LDD₅₀ (可能であれば EC_x 値、 μg あるいは ng/bee/day) とその 95%信頼限界、及び NOEC/NOEDD を算出するため、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) を用いて死亡率データを解析する。陰性対照区の死亡率を用いて、アボットの式を用いて補正してもよい (Abbott 1925 参照)。
28. 飼料の摂食量については以下のように計算、表記する
- ・ 毎日の投与液の 1 匹あたりの摂食量平均値 (mg/bee)；投与時に生存していた個体数を使用して計算する。
 - ・ 各投与区の平均 1 日摂食量 (mg/bee/day) を、試験期間を通して毎日算出する
 - ・ 各反復の平均 1 日摂食量 (mg/bee/day) を、試験期間を通して毎日算出する
 - ・ 1 匹あたりの 1 日平均被験物質摂取量 (μg あるいは ng 単位/bee/day)
 - ・ 1 匹あたりの累積被験物質摂取量 (μg あるいは ng 単位/bee)
29. 被験物質投与液の蒸発量についての補正を行うことが推奨される。投与液摂取量から蒸発量を差し引いた値が負になった場合は、当該日の摂取量を 0 (摂取なし) とする。

試験報告書

30. 試験報告書は以下の内容を含むこと

被験物質と陽性対照物質

- ・ 由来、バッチやロット番号、あれば使用期限について
- ・ 知見があるならば被験物質の安定性について
- ・ 知見があるならば被験物質の溶解性及び溶媒中の被験物質安定性について
- ・ 必要に応じて、被験物質を投与液に加えたときの pH、浸透圧、沈殿の有無について

単一成分のとき

- ・ 物理性状、水溶解性、その他試験に関係する物理化学的性状

- 化学名（IUPAC や CAS 名、CAS 番号）、SMILES あるいは InCI コード、構造式、純度、存在が考えられる不純物の化学組成など
複数成分からなるもの、UVCB（組成が未知又は不定な構成要素を持つ）物質及び混合物
- 単一成分の項で示した化学的性状、定量データ、構成成分の物理化学的性状等を可能な限り記載

試験系

供試生物の種について（学名、品種、日齢、羽化方法及び採集方法）、供試生物を採集した群の健康状態や薬剤使用歴について

試験条件

羽化、馴化及び試験期間中の飼育環境
飼育容器についての記載（形状、素材、寸法）
被験物質原液や被験物質投与液の調製法
試験区の構成（投与区の数（陰性対照区、溶媒対照区、被験物質投与区、陽性対照区）
反復数、ケージあたりの個体数）
試験開始日及び試験終了日

結果

全ての区についての観察時ごとの死亡率
全ての区についての観察時ごとの被験物質投与液摂取量
試験終了時の結果を用いて求めた LC₅₀/LDD₅₀、NOEC/NOEDD、EC_x 及び算出できるものについてはその 95%信頼限界；算出に用いた統計手法
その他観察された生物学的影響、例えば行動異常や摂食阻害など
ガイドラインからの逸脱やその他の情報について

文献

- (1) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Entomol., 18, 265-267.
- (2) CEB (Commission des Essais Biologiques), 2012. Methode d'évaluation des effets de toxicité aigue et a court terme des preparations phitopharmaceutiques sur l'abeille domestique (Apis mellifera L.). AFPP method n°230.
- (3) Decourtye, A. et al., 2005: Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honey bee *Apis mellifera*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 48, 242-250.
- (4) OECD (1998), Guideline for the Testing of Chemicals No. 213: Honey bee, Acute Oral Toxicity Test, Section 2: Effects on Biotic Systems, OECD, Paris, DOI:

10.1787/9789264070165-en

- (5) Suchail, S., Guez, D. and Belzunces, LP., (2001): Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 2482-2486.
- (6) Kling, A. and Schmitzer, S. (2015): Proposal for a new OECD guideline for the testing of chemicals on adult honey bees (*Apis mellifera* L.) in a 10 day chronic feeding test in the laboratory and results of the recent ring test 2014. Hazards of pesticides to bees – 12th International Symposium of the ICP-PR Bee Protection Group, Ghent (Belgium), 15-17 September 2014. *Julius-Kuhn-Archiv*, 450, pp. 69-74.

1.2 ミツバチ幼虫反復投与毒性試験

ENV/JM/MONO(2016)34

2016 年 7 月 15 日

ミツバチ (*Apis mellifera*) 幼虫反復投与毒性試験に関するガイダンスドキュメント

試験と評価シリーズ

No.239

前書き

この文書は、セイヨウミツバチ (*Apis mellifera*) 幼虫を用いた反復投与毒性試験に関するガイダンスドキュメント (Guidance Document) である。ガイダンスドキュメントを作成するプロジェクトは 2011 年にフランスから提案され、2012 年に TGP ワークプランの一つ (プロジェクト番号 2.44) として採択された。

ミツバチ幼虫反復投与毒性試験法は、2013 年に公表された単回投与毒性試験、すなわち TG237「ミツバチ (*Apis mellifera*) 幼虫単回投与毒性試験」を基本にしている。

2014 年に反復投与法に関するリングテストが行われ、2015 年 3 月に検証報告書が作成された。これを受けて、2015 年 4 月に、専門家会議 (Expert Group on Honeybee Toxicity Testing) において、ガイダンスドキュメント草案と検証報告書について審議された。

検証報告書とガイダンスドキュメント草案は専門家会議の指摘に対応して修正され、2015 年 7 月に、ワーキンググループ (Working Group of National Coordinators of Test Guidance Programme (WNT)) での確認が行われた。ワーキンググループの指摘を反映したガイダンスドキュメントが、2016 年 4 月に開催された第 28 回 WNT で承認された。2016 年 7 月 8 日に開催された Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology において、本ガイダンスドキュメントの公表が承認された。

このガイダンスドキュメントは、Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology の責任の下に公表されている。

緒言

1. この文書は、ミツバチ幼虫を用いた反復投与実験室内毒性試験法に関する文書である。この試験法は、フランスで開発された手法(2)(3)(4)とミツバチの試験、ミツバチの育種、ミツバチの生物学的研究及びミツバチの寄生虫や病原生物に関する書籍 Coloss Beebook に記載された手法(5)を基に、ヨーロッパ 7 試験施設におけるリングテストを経て策定された OECE テストガイドライン 237:ミツバチ (*Apis mellifera*) 幼虫単回投

与毒性試験(1)を基本としている。

2. このガイダンスドキュメントは、アメリカ、カナダ及び EU から提示されている実験室内でミツバチ幼虫に飼料を介して被験化学物質を投与してその毒性を評価する試験法に対する要求事項 (6)(7)(8)に対応している。この文書に記載されているミツバチ幼虫への化学物質の反復投与法のプロトコルについては、試験の妥当性評価基準を確認するための国際的なリングテスト（付属文書 1）で評価されている（第 7 段落参照）
3. この方法の目的は、幼虫に活性物質あるいは製剤（活性物質の溶解性が低い場合は製剤化したもの）を複数回投与し、孵化後 22 日での成虫への羽化数を用いて、無影響濃度あるいは無影響量（NOEC/NOED）と、可能であれば EC_{50}/ED_{50} 及び EC_x/ED_x （定義については付属文書 1 参照）を求めることである。この試験により得られたデータは被験物質のミツバチ幼虫に対するリスク評価に用いられる。ミツバチ幼虫を用いた単回投与(1)及び複数回投与毒性試験法は、OECD の若齢成虫を用いた試験法である TG213 (9) 及び TG214 (10)を補完して、ミツバチに対する総合的なリスク評価のための下位スクリーニングテストとしての機能を持つものである。

試験の原理

4. 試験 1 日（D1）に、齢の揃った 1 齢幼虫（L1）を 3 群の巢板より群ごとに 48 穴の飼育容器に移して規定量の人工飼料を給餌する。試験 3 日（D3）から試験 6 日（D6）まで一定濃度の被験物質を毎日投与するが、飼料給与量が経日で増加するため被験物質投与量も増加することになる。試験 6 日までの累積投与量について少なくとも 5 用量を設定する。限度試験（limit test）の場合は 1 用量を設定する。死亡数及び観察されたその他異常について D4 から D8 までの毎日及び D15 に記録し、D22 には羽化率を記録する。D22 の羽化数を用いて、NOEC/NOED 並びに可能であれば EC_{50}/ED_{50} 及び/あるいは EC_x/ED を算出する。

被験物質についての情報

5. 被験物質については水に対する溶解度、有機溶媒に対する溶解度及び蒸気圧が明らかでなくてはならない。被験物質の構造式、純度、水溶液及び光安定性、オクタノール/水分配係数（ K_{ow} ）等の重要な情報も記載する。被験物質の形態、由来（バッチあるいはロット番号）も記載する。試験を困難にする被験物質の物理化学特性については、OECD ガイダンスドキュメント、試験と評価シリーズ No.23 (11) で解説されている。

陽性対照物質

6. 被験物質の作用機序に応じて、陽性対照物質（ポジティブコントロール）を選択する。被験物質が未成熟なハチの発達に影響を与える昆虫成長制御剤（IGR）の場合は、ジメトエート原体（technical grade）（CAS 60-51-5）あるいはフェノシカルブ原体（CAS

72490-01-8) を使用する。予備試験/用量設定試験 (range-finding test) が、最適な陽性対照物質の選択に有用である (第 24 段落参照)。試験系及び試験環境の反応性及び信頼性を確認するため、常に同一量の陽性対照物質、ジメトエートでは 48 mg 有効成分 (a.i.) /kg 飼料 (0.053 µg a.i./µL 飼料)、フェノキシカルブでは 0.320 mg a.i./kg 飼料 (0.35 ng a.i./µL 飼料)、を投与して試験する。ジメトエートとフェノキシカルブの試験日毎 (試験 3 日から試験 6 日) の幼虫 1 匹あたりの投与量を示す。

試験日	D3	D4	D5	D6	幼虫あたり総摂取量
飼料へのジメトエート添加量 (µg)	1.08	1.56	1.80	2.64	7.08
飼料へのフェノキシカルブ量 (ng)	7.17	10.75	14.34	17.92	50.18

注) ジメトエートは水に直接溶解する。フェノキシカルブはアセトンの飼料中濃度が 0.5%量になるようにアセトンに溶解して飼料に添加することを推奨する。

試験成立基準

7. 複数回投与試験で得られたデータが求める精度であるかどうか、以下の管理基準で確認する。
 - ・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 (第 2 段落参照)
 - ・陽性対照物質としてジメトエートを用いた場合、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。

試験の詳細

試験器具

8. 幼虫は内径 9 mm、高さ 8 mm の結晶ポリスチレン製の幼虫セル (例えば Nicoplast Society 社の製品番号 CNE/3) 内で飼育する。幼虫セルは 70%エタノールあるいは他の消毒液に 30 分浸漬するなどして消毒し、クリーンベンチ内で乾燥させる。セルを 48 穴プレートにセットする。幼虫セルの上端が 48 穴プレートの穴より高くなるよう、500 µL の 15%グリセリン含有消毒液を含ませたデンタルロールなどを移虫セルの下に置く (図 1)。

注：幼虫セルを収容したプレートに蓋をかけるかどうかは、試験者の判断による。

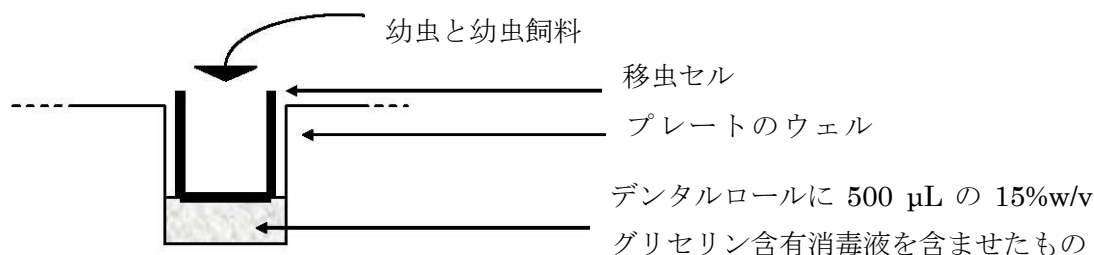


図1 48穴プレート上の幼虫セル

9. このプレートを、気密性の高いアクリル製のデシケーター（必要な容量によりナルゲン 5314-0120 もしくは 5317-0180 など）に収納し、D1～D8 の幼虫に適した相対湿度 95% ±5% に調整する（硫酸カリウム (K_2SO_4) 飽和水溶液を満した皿をデシケーター内に設置することで水蒸気飽和状態を維持できる）。この湿度調節したデシケーターを、試験期間を通じてデシケーター周囲の温度を均一に保てるよう、34℃～35℃ (34.5℃ ± 0.5℃) に設定した空気循環式インキュベーターに収納する。
10. D8（前蛹期）に、プレートを蛹期に適した相対湿度 80% ±5% に調節した気密性アクリル製デシケーター（飽和食塩水を満した皿をデシケーター内に設置することで目的の湿度に調節できる）に移す。デンタルロールはプレートの穴から取り去る。デシケーターは 34℃～35℃ (34.5℃ ± 0.5℃) に設定した空気循環式インキュベーターに収納する。
11. D15（蛹期）に、それぞれのプレートを羽化容器（例えば金網の蓋で通気性をもたせた 11×15×12cm 程度の結晶ポリプロピレン容器）に収納する。羽化した成虫にシロップもしくはショ糖溶液を不断給餌するため、鳥用の給餌器、注射筒、もしくはその他の適した器具を用いる（図 2）。羽化容器は、相対湿度約 50%～80%、温度 34℃～35℃ (34.5℃ ± 0.5℃) に調整したインキュベーターに収納する。

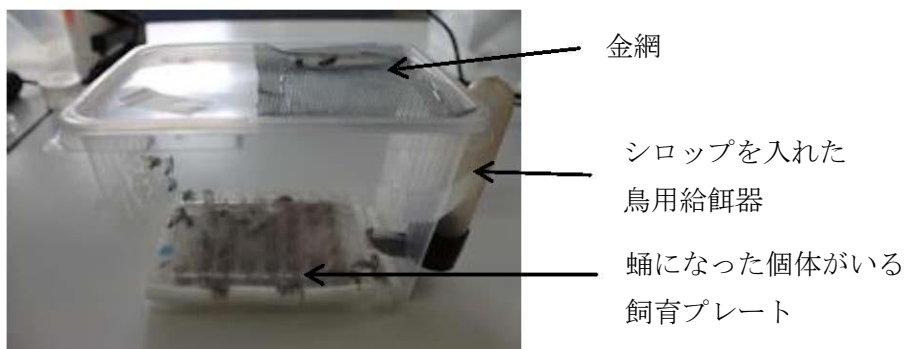


図2 羽化容器の例

試験生物

幼虫

12. 幼虫は3つの異なる群から採集し、それぞれの群から採集した個体群がそれぞれ反復として機能する（第21段落参照）。蜂群は栄養状態もよく、健康状態も良好（可能な限り疾病の兆候がなく、寄生虫感染もないこと）であり、履歴と生理状態が明確であるものを用いる。試験のシーズン前には、蜂群の均一性や試験の有効性を確認するため、候補蜂群から幼虫を採集して予備試験を実施することを推奨する。
13. 試験は女王の産卵期から始まる。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、処置を行った日と使用した薬剤を記録すること。抗生物質、殺ダニ剤などの化学物質を試験前4週間から使用してはならない。均一な健康状態の健康なミツバチを使用すること。
14. 3蜂群から幼虫を確保するため、D-3（試験の初期段階、図5参照）に、少なくとも3群の女王蜂を、隔王板を用いてその蜂群の空の巣板もしくは羽化しつつある蜂児の巣房と蜂児が羽化した後の空の巣房を含む巣板上に隔離する（図3）。隔王板の周りには、幼虫を含む巣板を配置する。D-2（試験の初期段階、図5参照）の女王隔離後30時間以内に、産卵の有無を確認して女王蜂を隔離部分より解放する。女王蜂の産卵力によるが、産卵時間のばらつきをできるだけ小さくするために、隔離時間はできるだけ短くすることを推奨する。産卵が確認された巣板は蜂群の幼虫のいる巣板のそばに戻し、D1までそのまま孵化を待つ。

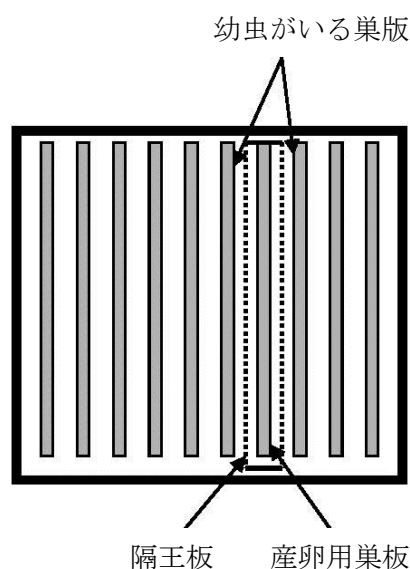


図3 隔王板を含んだ巣の断面図

飼育資材の準備

幼虫飼料

15. 幼虫の発達ステージに応じ、以下の3種類の飼料を調製する。
 - ・飼料A (D1) : 50% (W/W) の新鮮なローヤルゼリー + 50% (W/W) 水溶液 (2% (W/W) 酵母抽出物、12% (W/W) ブドウ糖、12% (W/W) 果糖を含む)

- ・飼料 B (D3) : 50% (W/W) の新鮮なローヤルゼリー + 50% (W/W) 水溶液 (3% (W/W) 酵母抽出物、15% (W/W) ブドウ糖、15% (W/W) 果糖を含む)
- ・飼料 C (D4～D6) : 50% (W/W) の新鮮なローヤルゼリー + 50% (W/W) 水溶液 (4% (W/W) 酵母抽出物、18% (W/W) ブドウ糖、18% (W/W) 果糖を含む)

注記：この組成で調製した飼料 A、B 及び C の密度はおよそ 1.1 mg/ μ L である（つまり飼料 20 μ L は 22 mg の飼料に相当する）。

16. 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こと。新鮮なローヤルゼリーとは、採集後 12 ヶ月以内のものを指す。試験ごとに凍結融解を繰り返すことを避けるため、ローヤルゼリーを一定量ずつ小分けし（例えば 5 g 程度）、 -10°C 以下の冷凍庫で保存する。幼虫期の死亡率が 15% 以下である等、試験施設の背景データからローヤルゼリーの品質が確認できれば、市販のローヤルゼリーを使用してもよい。全てのローヤルゼリーバッチについて網羅的分析を行い、抗生物質や農薬の混入がないか、微量であることを確認することが推奨される。

注：試験の妥当性基準が満たされていれば、微量汚染物質の検査は必ずしも必要ではない。

17. 試験直前に調製した幼虫飼料は、冷蔵庫で 5°C 以下（凍結はさせない）の条件下で試験の期間中保存できる。幼虫飼料を試験に先立って調製し、使用時まで凍結 (-18°C ～ -25°C) 保存することもできる（融解した飼料は、試験期間中 5°C で保存して使用することができる）。

被験物質溶液

18. 被験物質は通常水に溶解するか、懸濁する。水への溶解性が低い物質については、溶媒（アセトンなど）を用いて添加飼料調製用溶液を作製してもよい。この場合は、溶媒対照区（試験区飼料と同じ量の溶媒を投与する区）を、通常の陰性対照区とは別に設定する。飼料に添加する溶媒の量は、できるだけ少なくする必要があり、どのような場合においても D3 から D6 の間で与える飼料容量の 2% を超えてはならない。被験物質の安定性が確認されている場合を除き、添加飼料調製用溶液は毎日調製する。
19. 添加飼料調製用溶液は 5 段階の投与濃度に、可能ならば水を用いて、溶解性が低い物質の場合は溶媒を用いて、フィルターつきのディスポーザブルピペットチップを用いて希釈する。幼虫へ投与する直前に希釈することが望ましい。添加する被験物質溶液量は、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、D3 には最終飼料容量 20 μ L に対して添加飼料調製用溶液 2 μ L）、溶媒を用いて調製した場合は飼料の 2 % を超えてはならない（例えば、D3 には最終飼料容量 20 μ L に対して添加飼料調製用溶液 0.4 μ L）。飼料の全体構成は第 15 段落に記載したとおりであり、調製に使用する水の容量の一部を、添加飼料調製用溶液で置き換えて被験物質添加飼料を調製する。添加飼料調製用溶液は、被験物質が飼料中に均一に分布するような方法で、試料に混合

する（超音波処理による分散などを利用する）。

20. 実際の被験物質濃度確認のための分析に供するため、最高濃度と最低濃度の添加飼料調製用溶液を-20℃以下の冷凍庫で保存しておく。必要があれば、飼料中の被験物質濃度についても測定する。しかし、飼料にはローヤルゼリーが含まれているため、被験物質の飼料中濃度測定は添加飼料調製用溶液の分析より困難なことに留意する必要がある。分析の困難さや妥当性については報告書に記載する。

試験手順

被験物質への曝露条件

21. 幼虫を飼育している個々の移虫セルが試験単位となる。試験に使用する 3 つの蜂群から 1 蜂群につき最低 12 匹ずつ採集された幼虫、つまり最低 36 匹の幼虫を、各用量の被験物質投与区、陰性対照区、及び陽性対照区ごとに、同一のプレートに収容する。試験区の構成は以下のとおりである：

- 溶媒を含まない陰性対照区（最低 12 匹×3 群=最低 36 匹）
- 必要であれば溶媒対照区（最低 12 匹×3 群=最低 36 匹）
- 少なくとも 5 つの被験物質投与区。すなわち、公比 3 以下で、NOEC/NOED、EC₅₀/ED₅₀ あるいは EC_x/ED_x を含む濃度範囲に設定した 5 濃度の被験物質投与区（それぞれ最低 12 匹×3 群=最低 36 匹）。

限度試験（第 24 段落参照）の場合は、1 匹あたり 100 µg の有効成分あるいは原体（650 mg 有効成分あるいは原体/kg 飼料）投与、もしくは溶解性が低い物質の場合はその物質の最大溶解濃度の試験区（最低 12 匹×3 群=最低 36 匹）

- 陽性対照区、ジメトエート 48 mg/kg 飼料もしくはフェノキシカルブ 0.32 mg/kg 飼料（最低 12 匹×3 群=最低 36 匹）

22. 1 試験においては、全部で 7 もしくは 8（溶媒対照区を設定した場合）の 48 穴プレートを使用することになる。各プレートには 1 蜂群から採集された最低 12 匹で構成されるグループ（反復）が 3 つ含まれているので、それぞれの個体がどの群から採集されたものであるかを判別できるようにしておく。

23. 試験期間中をとおして、プレートは全暗黒条件下に置く。また、インキュベーター内の温度は、34℃～35℃に保つ。実験操作の都合でこの温度を保てない場合でも、23℃以下あるいは 40℃以上とすることは避け、至適温度から外れる時間も 1 日あたり 30 分以内とする。

用量設定試験

24. 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。

限度試験

25. 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などでは、幼虫 1 個体当たり 100 μg の有効成分あるいは原体 (飼料中濃度として 650 mg 有効成分あるいは原体/kg)、あるいは物質の溶解性がこれより低い場合はその物質の最大溶解濃度の被験物質で、少なくともその濃度では影響がないことを確認するための限度試験を行う。この場合も 1 蜂群から採集された最低 12 匹で構成される反復グループを 3 つ含んだ区を限度投与量区とし、陰性対照区と陽性対照区も設定する。もし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。

幼虫の採集

26. D1 に、1 齢幼虫のいる巣板 (図 5) を断熱容器に収納して、その時の温度を保ちながら (20°C 以下にはならないよう留意する) 巣箱から実験施設へ運び込む。巣板はファンを止めたクリーンベンチか、清浄な環境に運び込んで移虫を行う。幼虫の不均一性による試験結果の偏りを防ぐため、できるだけ孵化したばかりで形状が C 文字型でない幼虫か、濁ったローヤルゼリー中の幼虫を選ぶことを推奨する。各蜂群から選んだ幼虫は試験に使用する全プレートにランダムに配置する。被験物質を最初に投与する D3 には、各蜂群からの 3 反復それぞれに最低 12 匹の幼虫が必要になる。被験物質の投与を開始する D3 に必要数の幼虫を確保するため、死亡個体や不適切な個体 (小さい個体など) の排除を見込んで、多めの幼虫数で試験を開始した方がよい。
27. 幼虫のランダムな配置は、D3 の被験物質初回投与の直前に行っても良い。

移虫と飼料給与

28. 飼料は、使用前にインキュベーターに入れて温めておく。移虫は 34°C~35°C に調温された加温プレート上で行うとよい。飼料はディスポーザブルチップをつけたマイクロピペットあるいは連続分注ピペットを用いて移虫セルに入れる。試験 1 日 (D1) に 20 μL の飼料 A を各幼虫容器に入れ、幼虫を 1 匹ずつ巣板より、移虫用具か濡らした絵筆 (例えば No. 3/0 など) を用いて、容器の飼料表面に丁寧に移し取る。プレート上の容器にそれぞれの蜂群から最低 12 匹の幼虫を移したら、できるだけ速やかに、34°C~35°C に温度調整した換気機能つきインキュベーター内に設置した密閉容器内に、できれば重ねずにプレートを収納する (図 4)。



図 4 幼虫飼育のための装置

29. 全ての幼虫に、D2 を除いて 1 日 1 回、滅菌済みのフィルターつき（コンタミネーションを防ぐため）透明ピペットチップか、連続分注ピペットを用いて、図 5 に示した日齢に応じて幼虫が摂取するように決められた量の飼料を給与する。この作業は保温プレート上で行うとよいが、35℃よりも高い温度になってはならない。また、幼虫に触れたり、幼虫を飼料に溺れさせたりしないように注意すること。飼料は幼虫のそばに、容器の壁を伝わらせて給与する。もし飼料が完全には摂食されずに残っていたとしても、飼料を給与すること。D8 に飼料が完全に摂食されずに残っていた場合には、そのことを記録すること。

被験物質の複数回投与

30. D3 に、3 蜂群から最低 12 匹ずつ成長の良い幼虫を選択する。D3 から D6 まで、幼虫に毎日指定された量の添加飼料調製用溶液を含んだ飼料（D3 は飼料 B を、D4 から D6 は飼料 C を）を給与する。添加飼料調製用溶液は、被験物質の飼料中における安定性が確認、報告されている場合を除いて、投与直前に飼料に混合すること。またコンタミネーションを防ぐため、飼料の給与には投与区毎に異なるフィルターつきピペットチップ又は連続分注ピペットを使用すること。

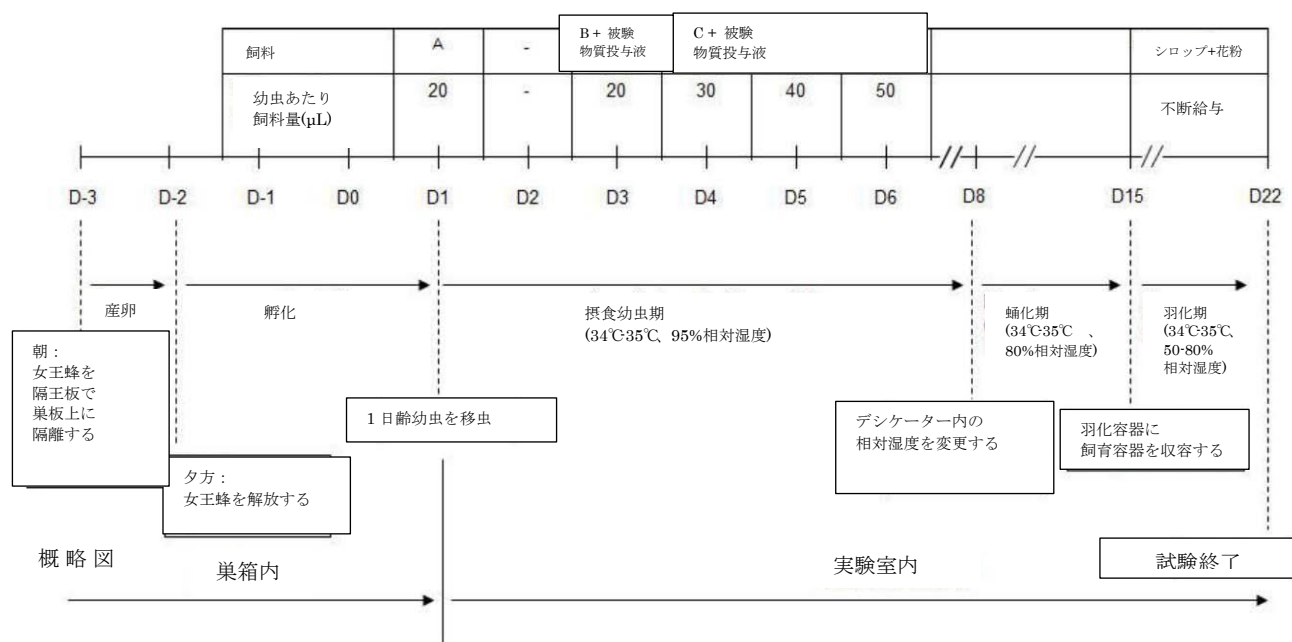


図5 幼虫複数回投与毒性試験における主要な作業手順概略図

試験の終了

31. D22 に、羽化した成虫と羽化しなかった個体（第 33 段落参照）を数えて記録し、プレート上の-10℃以下、できれば-80℃での凍結あるいは他の人道的な処置により試験を終了する。

観察

32. D3 の投与開始時と D4 から D8 までの飼料給与時及び D15 に、死亡数を観察して記録する。幼虫期では動かない個体や、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、あるいは実体顕微鏡下で呼吸が確認できない個体を死亡個体とする。また蛹期としては D15 時点で蛹化していないものを死亡個体として記録する（附属文書 2 参照）とともに、プレートから除去する。D22 には、正常に発育した羽化成虫、すなわち生存している成蜂及びセル内で死亡している成虫の数を記録する。
33. 衛生上の理由から、飼料給与時に発見した死亡幼虫は速やかに除去する。羽化個体数と羽化しなかった個体（蛹期の死亡個体）数を D22 に計数する。（注：空になった移虫セルは飼育していた個体が羽化したことを示す。羽化個体が再度容器に入ることはめったにない。）成虫への羽化率は D3 の投与開始時の個体数と D22 の羽化個体数から算出する。蛹期の死亡率は、D22 に羽化しなかった個体及び D8 から D22 の間で死亡し除去された個体の和と、D8 で蛹化に入った個体の数を比較して算出する。幼虫の死亡率は、幼虫期（D3 から D8 まで）に死亡した個体数を、D3 の投与開始時の個体数と比較して算出する。
34. その他の陰性対照と比較して異なる観察事項、例えば幼虫の外見、大きさ、行動、形

態、また羽化後の何らかの影響等は必ず記録する。羽化後の成虫が異常行動を示していたり重篤な影響が観察される場合は、蜂が痛みを感じている可能性が高いので、直ちに人道的方法で安楽殺する。D8に残餌がある場合も記録する。

データと報告書

データと統計解析

35. 各被験物質投与区、陰性対照区及び陽性対照区の供試幼虫数、死亡数及び毒性影響、すなわち D3 から D8 の幼虫死亡数、D8 から D15 までの蛹期死亡数、及び D22 の羽化率などの試験データを、表を使うなどして取りまとめる。これらのデータを、OECD ガイダンスドキュメント No. 54 (12) に記載されている適切な統計手法を用いて解析する。

NOEC/NOED の推定

36. D22 の成虫羽化率を用いて、NOEC/NOED を求める（定義は付属文書 2 参照）。すべての被験物質投与区で影響が観察されなかった場合は、NOEC/NOED は設定された最高濃度/投与量と同等あるいはそれより高いと判断する。限度試験の場合、試験された濃度/投与量において陰性対照区と統計的な差がなかった場合、NOEC/NOED は設定された濃度/投与量と同等かそれより高いと判断する。

EC₅₀/ED₅₀ 及び EC_x/ED_x の推定

37. 試験により得られた D22 の羽化数データから算出可能であれば、EC₅₀/ED₅₀ 及び EC_x/ED_x 並びに信頼限界値を計算する（定義は付属文書 2 参照）。

試験報告書

38. 試験報告書は、以下の内容を含まなくてはならない。

被験物質

- 外観及び物理化学的特性
- 有効成分の純度や被験物質が製剤であるならその組成などの化学的同定データ

供試生物

- 由来、ミツバチの種及び亜種、入手先（分かるならば）、飼育状況
- 試験に用いた蜂群の健康状態及び試験実施前の冬季からの蜂群管理状況

試験条件

- 試験場所及び試験期間
- 試験についての詳細：使用した 48 穴プレートの種類、飼料原料についての情報（ローヤルゼリー、酵母抽出物の入手先等）、区それぞれについての供試幼虫数、被験物質の溶解に溶媒を用いた場合はその名称、被験物質の用量設定
- 飼育状況：温度（平均値、標準偏差、最低値と最高値）と相対湿度

結果

- 各被験物質投与区、陰性対照区、陽性対照区（ジメトエートあるいはフェノキシカルブ）におけるハチの死亡数及び死亡率
- 添加飼料調製用溶液の設定濃度及び濃度測定結果。濃度測定結果は目標値の±20%以内であること。
- D3 から D8、D15 及び D22 の死亡数、D22 における羽化率、D22 の羽化数を用いて求めた NOEC/NOED 並びに EC₅₀/ED₅₀ 及び **EC_x**/ED_x、当てはめたモデルのグラフ、用量反応曲線の傾き及びその 95%信頼限界、適合度判定の基準、用いた統計/数理手法
- D8 における残飼料の有無を含むその他の観察事項
- 試験方法からの逸脱、及びこれが試験結果に及ぼす影響
- 分析とその正統性に関する問題

文献

- (1) OECD (2013), Test No. 237: Honey Bee (*Apis Mellifera*) Larval Toxicity Test, Single Exposure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing doi: 10.1787/978926203723-en
- (2) Aupinel, P., Fortini, D., Dufour, H., Tasei, J., Michaud, B., Odoux, J., and Pham-Delegue, M. H. (2005). Improvement of artificial feeding in a standard in vitro method for rearing *Apis mellifera* larvae. *Bulletin of Insectorogy*, 58, 107-111
- (3) Aupinel, P., Fortini, D., Michaud, B., Marolleau, F., Tasei, J. N., & Odoux, J. F. (2007, Oct 12- 14). Toxicity of dimethoate and fenoxycarb to honey bee brood (*Apis mellifera*), using a new in vitro standardized feeding method. Paper presented at the 9th International Symposium of the ICPBR-Bee-Protection-Group, York, ENGLAND.
- (4) Aupinel, P., Medrzycki, P., Fortini, D., Michaud, B., Tasei, J. N., & Odoux, J. F. (2007). A new larval in vitro rearing method to test effects of pesticides on honey bee brood. *Redia*, 90, 91-94.
- (5) The COLOSS Beebook- Standard Methods for *Apis mellifera* research: <http://www.Coloss.org/beebook>
- (6) United States Environmental Protection Agency (US EPA), Pest Management Regulatory Agency, Health Canada (PMRA), and California Department of Pesticide Regulation (CDPR). (2012). White Paper in Support of the Proposed Risk Assessment Process for Bees: <http://www.regulations.gov/#/documentDetail;D=EPA-HQ-OPP-2012-0543-0004>.
- (7) European Food Safety Agency (EFSA), Guidance on the Risk Assessment of Plant Protection Products on Bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. And solitary bees), EFSA Journal 2013; 11(7): 3295. <http://www.efsa.europa.eu/it/efsajournal/doc/3295.pdf>

- (8) Alix, A., Lewis, G. (2010). Guidance for the assessment of risks to bees from the use of plant protection products under the framework of Council Directive 91/414 and Regulation 1107/2009. OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 40, 196–203
- (9) OECD (1998), Guideline for the Testing of Chemicals No. 213: Honey bee, Acute Oral Toxicity Test, Section 2; Effects on Biotic Systems, OECD, Paris, DOI: 10.1787/9789264070165-en
- (10) OECD (1998), Guideline for the Testing of Chemicals No. 214: Honey bee, Acute Contact Toxicity Test, Section 2; Effects on Biotic Systems, OECD, Paris, DOI: 10.1787/20745761 237 OECD/OCDE 10 © OECD, (2013)
- (11) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of difficult substances and mixtures, Environmental Health and Safety Publications, series on Testing and Assessment, No. 23, ENV/JM/MONO(2000)6, OECD, Paris:
[http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2000\)6&doclanguage=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2000)6&doclanguage=en)
- (12) OECD (2006), current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: Guidance to application, Environmental Health and Safety Publications, series on Testing and Assessment, No. 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris:
[http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2006\)18&doclanguage=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2006)18&doclanguage=en)

とを確認するために実施する。1 個体当たり $8.8 \mu\text{g} \pm 0.5 \mu\text{g}$ の陽性対照物質有効成分相当量を最大 $3 \mu\text{L}$ 以下の水に溶解してから、D4 の飼料給与直前の飼料に混合して投与する (2) (3)。

試験の妥当性

7. 以下の判断基準で試験の妥当性を確認する。

- ・陰性対照区で全ての反復の 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 における死亡率（補正後のもの、第 33 段落参照）が 50%以上であること。

1-3) 試験の詳細

試験器具

8. 幼虫は内径 9 mm、高さ 8 mm の結晶ポリスチレン製の幼虫セル（例えば ref CNE/3、NICOTPLAST Society）内にて飼育する。あらかじめこのセルを、例えば 70%エタノールあるいは他の消毒液に 30 分浸漬、クリーンベンチ内で乾燥させるなどして消毒しておく。セルを 48 穴プレートにセットする。プレートの穴の縁よりセルが高くなるように、500 μL の 15% (W/V%) グリセリン含有消毒液を含ませたデンタルロールなどを穴の下に置く (図 1)。

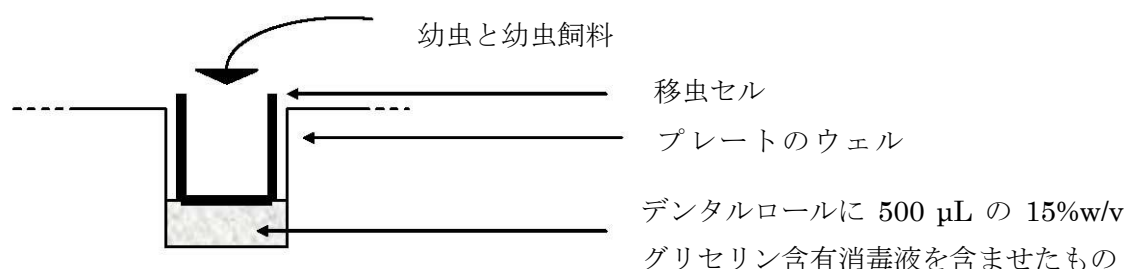


図 1 48 穴プレート上の幼虫セル

9. このプレートを密封したアクリル製のデシケーター（ナルゲン 5314-0120 もしくは 5317-0180 など）に収納し、飽和硫酸カリウム水溶液を満たした皿を用いて水蒸気飽和の状態にする。この湿度調節したデシケーターを $34\text{--}35^\circ\text{C}$ に設定した空気循環式インキュベーターに収納してデシケーターの周りの温度をその温度に調節し、試験期間中できるだけその範囲内で推移するようにする。

試験生物

幼虫

10. 幼虫は 3 つの異なる群から採集し、それぞれの群から採集した個体群がそれぞれ反復として機能する（第 19 段落参照）。蜂群は栄養状態もよく、健康状態も良好（可能な限り疾病、寄生生物フリーであること）であり、履歴と生理状態が明確であるものを用いる。
11. 試験は女王の産卵期から始まる。衛生上の処置（ダニや疾病に対する処置など）を行

った場合は、処置を行った日と処置した薬剤を記録すること。試験の 4 週間前からは、いかなる処置も行ってはならない。

12. D・3（試験 4 日前、図 3 参照）使用蜂群 3 群から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と空の巣板上に隔離する（図 2）。隔王板の周りには、幼虫を含む巣板を配置する。D・2 に、女王隔離時間は最大 30 時間までとして、産卵の有無を確認した後に女王蜂を隔離部分より解放する。女王蜂の産卵力によるが、幼虫齢のばらつきをできるだけ小さくするために、隔離時間はできるだけ短くすることを推奨する。産卵が確認された巣板は蜂群の幼虫のいる巣板のそばに戻し、D1 までそのまま孵化を待つ。

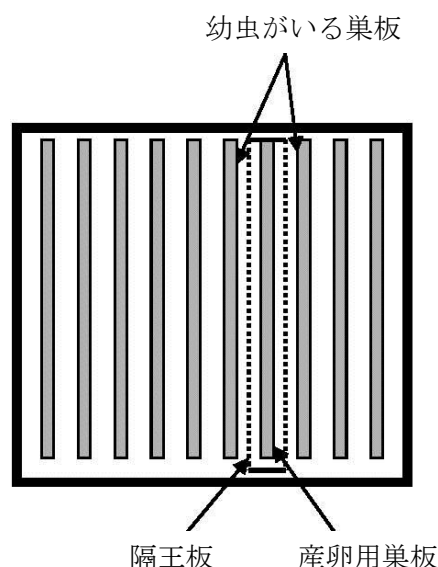


図 2 隔王板を含んだ巣の断面図

飼育資材の準備

幼虫飼料

13. 幼虫飼料は、幼虫の発達ステージにそれぞれ適応した、以下の 3 種類の組成で構成される。
 - ・飼料 A（D1）：50%（w/w）の新鮮なローヤルゼリー + 50%（w/w）水溶液（2%（w/w）酵母抽出物、12%（w/w）ブドウ糖、12%（w/w）果糖溶液）
 - ・飼料 B（D3）：50%（w/w）の新鮮なローヤルゼリー + 50%（w/w）水溶液（3%（w/w）酵母抽出物、15%（w/w）ブドウ糖、15%（w/w）果糖溶液）
 - ・飼料 C（D4～D6）：50%（w/w）の新鮮なローヤルゼリー + 50%（w/w）水溶液（4%（w/w）酵母抽出物、18%（w/w）ブドウ糖、18%（w/w）果糖溶液）
14. 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こと。また新鮮なローヤルゼリーとは、採集後 12 ヶ月以内のものを指し、採集されたローヤルゼリーは毎回試験のたびに凍結融解しないことを目的として 5 g ずつを小

分けし、-10℃以下の冷凍庫で保存する。もしこれまでの試験施設における飼育背景データ（幼虫期の死亡率が 15%以下である等）からその妥当性が確認できれば、市販のローヤルゼリーを使用してもかまわない。全てのローヤルゼリーバッチについて一斉分析を行い、抗生物質や殺虫剤の混入がないことを確認することが推奨される。

15. 試験毎に調製された幼虫飼料は、冷蔵庫で 5℃以下（凍結はさせない）の条件下で試験の期間中保存できる。また幼虫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。

被験物質溶液

16. 被験物質は通常水に溶解する。水への溶解性が低い物質については、溶媒（アセトンが推奨される）を用いて添加飼料調製用溶液を作製してもよい。この場合は、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もの）を、通常の陰性対照区とは別に設定する。飼料に溶媒を添加する場合は、できるだけ少なくする必要がある、アセトンを使用する場合には D4（投与日）に与える飼料容量の 5%を越えてはならない。
17. 添加試料調製用溶液は 5 段階の投与濃度に可能ならば水を用いて、溶解性が低い物質の場合は溶媒を用いて、幼虫への投与の直前に、フィルター付きのディスポーザブルチップをつけたピペットを用いて希釈する。添加する被験物質溶液量は、水を用いて調製した場合には飼料の 10%を越えてはならず（D4 用飼料 30 µL に対して 3 µL）、アセトンを用いて調製した場合は飼料の 5%を越えてはならない（D4 飼料 30 µL に対して 1.5 µL）。
18. 添加試料調製用溶液は、被験物質の分析濃度を確認するために-10℃以下の冷凍庫で保存しておく。

1-4) 試験手順

試験群構成について

19. 試験区は、個体飼育されている幼虫で構成される。1 つの試験区には、試験に使用される 3 つの蜂群から 1 蜂群につき最低 12 匹ずつ採集された幼虫を同じプレートに収容する。試験区は、各用量の被験物質投与区、陰性対照区、及び陽性対照区から構成される。各試験には以下の処置区および対照区を設定する：
 - （溶媒を含まない）陰性対照区（最低 12 匹×3 群=最低 36 匹）
 - （必要であれば）溶媒対照区（最低 12 匹×3 群=最低 36 匹）
 - 5 つの被験物質投与区、すなわちある公比（3 以下であり、LD₅₀ を含むこと）で設定した 5 濃度の被験物質投与区それぞれにつき（最低 12 匹×3 群=最低 36 匹）
あるいは限度試験（第 23 段落参照）の場合は 1 匹あたり 100 µg 投与、もしくは溶解性が低い物質の場合はその物質の最大溶解濃度で（最低 12 匹×3 群=最低 36 匹）
 - 陽性対照区、ジメトエートを 1 匹当たり 8.8 µg（最低 12 匹×3 群=最低 36 匹）

20. 試験においては、全部で 7 もしくは 8（溶媒対照区を設定した場合）の 48 穴プレートが使用される。1 試験区には 1 蜂群から採集された最低 12 匹で構成されるグループが 3 つ含まれている。これらは反復を形成しているとみなされるため、プレート上でそれぞれの個体がどの群から採集されたものであるかを判別できるようにすること。
21. 試験期間中、幼虫を収納したプレートは全暗黒条件下に置かれなくてはならない。試験期間中、インキュベーターは 34℃～35℃の間で調整されなくてはならない。しかしながらある程度の温度逸脱は許容されるが、その場合でも 23℃を下回る、あるいは 40℃を超えてはならず、またその期間は 1 日につき 15 分を超えてはならない。

用量設定試験

22. LD₅₀ を求めることができる濃度範囲設定を行うために、公比 5 から 10 で予備試験を行うことが推奨される。

限度試験

23. 場合によっては（例えば被験物質の毒性が低いと予想されるか、溶解性が極めて低い場合など）、ミツバチ 1 個体当たり 100 µg の投与量で、あるいは物質の溶解性が低い場合はその物質の最大溶解濃度（もしその濃度が低かったとしても、その濃度で影響がないことを確認するために行う）を用いて、LD₅₀ がその投与量以上であることを示すために限度試験を行う。この場合も 1 蜂群から採集された最低 12 匹で構成される反復グループを 3 つ含んだ区を限度投与量区とし、同様にして陰性対照区と陽性対照区を設定する。もし陰性対照区と比べて統計的に有意な死亡数の増加が見られた場合は、LD₅₀ を求めるため通常の試験を再度行う。

幼虫の採集

24. D1 に、1 齢幼虫を含んだ巣板（図 3）を、温度変化を防いで巣板周囲を保温（20℃を下回らないように）するための容器に収納して、巣から実験施設へ運び込む。巣板はクリーンベンチか、清浄な環境に運び込んで移虫を行う。目的としない齢の幼虫の混入を防ぐため、できるだけ孵化したばかりである、幼虫の形状が C 文字型でないものを選ぶことが強く推奨される。選んだ幼虫は各試験区に対してランダムに配置する。各試験区に各蜂群から最低 12 匹、3 グループ 36 匹が必要になるのは、被験物質投与開始直前の D4 であるため、D1 には必要数よりも多い幼虫を各試験区に振り分けておいた方がよい。
25. あるいは、このランダムな配置は D4 の投与直前に行ってもよい。

移虫と飼料給与

26. 飼料は、使用前にインキュベーターに入れて温めておく。移虫は、できれば 34℃～35℃に調温された保温プレート上で行う。温度は 35℃を超えてはならない。飼料はディスプレイザブルチップをつけたマイクロピペットを用いて幼虫容器に入れる。試験 1 日に 20 µL の飼料 A を各幼虫容器に入れてから、幼虫を 1 匹ずつ巣板より、移虫用具か濡らした絵筆（例えば No. 3/0 など）を用いて、容器の飼料表面に丁寧に移し取る。48

ウェルプレート上の容器に各蜂群から最低 12 匹の幼虫を移し終えたら、34-35℃に温度調整した空気循環式インキュベーター内に設置した密閉容器（デシケーター）内に重ねずに収納し、試験期間中は可能な限り指定された温度範囲を維持する。



図 4 幼虫飼育のための装置

27. 全ての幼虫は D2 を除いて 1 日 1 回、滅菌済みの透明ピペットチップを用いて、図 3 に示した日齢に応じて幼虫に給与すべき量の飼料を給与する。この作業は保温プレート上で行うとよりよいが、35℃よりも高い温度になってはならない。また、幼虫に触れたり、幼虫を飼料に溺れさせたりしないように注意すること。飼料は幼虫のそばに、容器の壁を伝わらせて給与する。もし前日給与した飼料が完全には摂食されずに残っていたとしても、飼料を給与すること。試験終了時に飼料が完全に摂食されずに残っていた場合には、そのことを記録すること。

被験物質の単回投与

28. D4 に、1 区につき 1 群から最低 12 匹ずつ、3 群から合わせて最低 36 匹の状態のよい幼虫を選択して、被験物質溶液を添加した飼料 C を 30 μ L 給与する。被験物質の飼料中安定性が、確認あるいは報告されている場合を除き、被験物質溶液と飼料の混合は投与直前に行う。またコンタミネーションを防ぐため、飼料の給与には投与区毎に異なるピペットチップを使用すること。

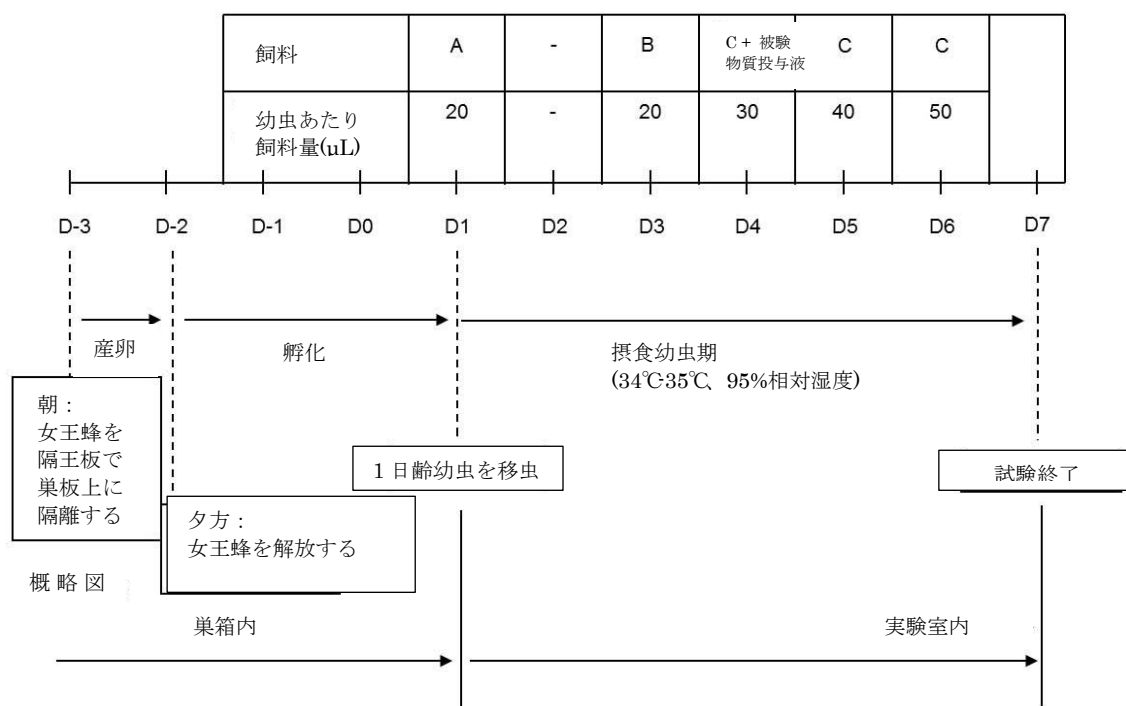


図3 幼虫毒性試験における主要な作業手順概略図

試験の終了

29. D7に、幼虫の死亡数を数えて記録し、プレートを-10℃以下で凍結して試験を終了する。

観察

30. D4の被験物質投与以後、D5とD6の飼料給与時、また試験終了のD7に死亡数を観察して記録する。動かない個体や、移虫用具や絵筆で触れても反応しない個体を死亡個体とする。
31. 死亡した幼虫は、衛生上の理由から飼料の給与時に速やかに除去すること。
32. その他の観察事項について、死亡原因についての説明になるようなことは記録すること。またD7に完全に餌が摂食されずに残っていた場合には、(定性的)に記録すること。

1-5) データと報告書

データと統計解析

LD₅₀の計算

33. 死亡率は、最初の個体数に対する百分率として、アボットの式(11)で補正して表す：

$$M = \frac{(P-T)}{S} \times 100 \quad \text{補正しない死亡率}$$

$$M = \frac{(\%P - \%T)}{100 - \%T} \times 100 \quad \text{補正死亡百分率}$$

M: 最初の幼虫数を用いて求めた（補正）死亡率

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: 投与区の死亡率

%T: 陰性対照区の死亡率

34. データは各試験区、陰性対照区及び陽性対照区について、用いた幼虫数、D5、D6 及び D7（すなわち被験物質投与後 24 時間、48 時間及び 72 時間後）の幼虫死亡数について、表にまとめる。死亡数については適切な統計解析法（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）(8) (9) を用いて解析する。必要な反応時間（24 時間、48 時間もしくは 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（μg/匹）として表現される。

試験報告書

35. 試験報告書には、以下の事項を記載する。

被験物質

- 外観と物理化学的性質
- 純度などの、被験物質の化学分析結果

供試生物

- 由来、ミツバチの種及び品種、入手先（分かるならば）、飼育状況
- 試験に用いた蜂群の健康状態

試験の状況

- 試験場所及び試験日
- 試験についての詳細：使用した 48 ウェルプレートの種類、各試験区及び対照区の幼虫数、溶媒を用いた場合はその名称と濃度、被験物質の投与濃度
- 飼育状況：温度（平均値、標準偏差、最低値と最高値）と相対湿度

結果

- 各被験物質投与区、陰性対照区、陽性対照（ジメトエート投与）区の幼虫死亡数及び死亡率
- 被験物質の設定濃度と被験物質原液中濃度の分析値。濃度測定値は設定値の±10%以内であること。
- D5、D6、D7 の死亡数、D7 における投与 72 時間後の LD₅₀ 値と 95%信頼区間及びフィッティングモデルのプロット図、用量反応曲線の傾き及びその標準偏差、LD₅₀ を求めるために使用した統計学的/数学的方法

- 試験終了時における未摂食飼料の有無などその他の観察事項
本ガイドラインからの逸脱、及びそれに対する適切な説明について

文献

- (1) Aupinel, P., Fortini, D., Dufour, H., Tasei, J. N., Michaud, B., Odoux, J. F., & Pham-Delegue, M. H. (2005). Improvement of artificial feeding in a standard in vitro method for rearing *Apis mellifera* larvae. *Bulletin of Insectology*, 58, 107-111.
- (2) Aupinel, P., Fortini, D., Michaud, B., Marolleau, F., Tasei, J. N., & Odoux, J. F. (2007, Oct 12- 14). Toxicity of dimethoate and fenoxycarb to honey bee brood (*Apis mellifera*), using a new in vitro standardized feeding method. Paper presented at the 9th International Symposium of the ICPBR-Bee-Protection-Group, York, ENGLAND.
- (3) Aupinel, P., Medrzycki, P., Fortini, D., Michaud, B., Tasei, J. N., & Odoux, J. F. (2007). A new larval in vitro rearing method to test effects of pesticides on honey bee brood. *Redia*, 90, 91-94.
- (4) Aupinel, P., Fortini, D., Michaud, D., Medrzycki, P., Padovani, E., Przygoda, D., Maus, C. Charriere, J.D., Kilchenmann, V., Riessberger-Galle, U., Vollmann, J.J., Jeker, L., Janke, M., Odoux, J.F., Tasei, J. N. (2009). Honey bee brood ring-test : method for testing pesticide toxicity on honeybee brood in laboratory conditions. *Julius-Kühn-Archiv*, 423, 96-102.
- (5) United States Environmental Protection Agency (US EPA), Interim Guidance on Honey Bee Data Requirements (2011), available at:
http://www.epa.gov/pesticides/science/efed/policy_guidance/team_authors/terrestrial_biology_tech_team/honeybee_data_interim_guidance.pdf
- (6) European Food Safety Agency (EFSA), draft Guidance on the Risk Assessment of Plant Protection Products on Bees (2012), available at:
<http://www.efsa.europa.eu/en/consultations/call/120920.pdf>
- (7) Alix, A., Lewis, G. (2010). Guidance for the assessment of risks to bees from the use of plant protection products under the framework of Council Directive 91/414 and Regulation 1107/2009. OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 40, 196–203
- (8) OECD (1998), Guideline for the Testing of Chemicals No. 213: Honey bee, Acute Oral Toxicity Test, Section 2; Effects on Biotic Systems, OECD, Paris, DOI: 10.1787/9789264070165-en
- (9) OECD (1998), Guideline for the Testing of Chemicals No. 214: Honey bee, Acute Contact Toxicity Test, Section 2; Effects on Biotic Systems, OECD, Paris, DOI: 10.1787/20745761_237 OECD/OCDE 10 © OECD, (2013)
- (10) OECD (1998), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult

Substances and Mixtures, Environment Monograph, Series on Testing and Assessment
No. 23, OECD, Paris.

(11) Abbott, W.S.(1925) A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour.
Econ. Entomol., 18, 265-267.

【1】 国内外からの知見の収集

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

2.1 ミツバチ幼虫複数回投与摂食毒性試験の国際リングテスト結果概説

妥当性確認報告書

ミツバチ幼虫複数回投与摂食毒性試験の国際リングテスト結果

Aupinel, P. et al.

2005 年にニューヨークにて開催された International Commission for Plant Bee Relationship (ICPBR) シンポジウムにおいて、Aupinel らが実験室内人工ミツバチ幼虫飼育法について発表を行った。ここで発表された試験法を用いて、実験室条件下でミツバチ幼虫に対する殺虫剤/化学物質の短期及び長期的影響を評価することが可能になることが期待された。そこでそのシンポジウムにおいて、この試験法のリングテストを行い試験の有効性について確認することが決定された。

2008 年に行われた幼虫単回投与毒性試験リングテストの結果を受け、2013 年に OECD ガイドライン TG237 として、「ミツバチ幼虫単回投与毒性試験」が採択された。

次いでミツバチ幼虫複数回投与毒性試験のリングテストが 2014 年の春から夏にかけて行なわれたが、その結果につきこの報告書にまとめる。

リングテストは以下の条件で行われた：

- ・投与期間は、移虫時のダメージによる死亡の影響を避けて、投与直前に無作為化が行えるように、試験 3 日から試験 6 日とした。
- ・被験物質として 2 つの化学物質、ジメトエートとフェノキシカルブを用いた。ジメトエートは幼虫期に影響を及ぼし、フェノキシカルブは蛹期に影響を及ぼす物質である。
- ・リングテスト参加機関は純度 98%以上の標準品を購入して使用した。
- ・試験 22 日の成虫羽化率について調査した。ジメトエートについては EC₅₀ 値を計算し、フェノキシカルブについては NOEC を求めた。
- ・データロガーを幼虫飼育環境（デシケーター内）におき、温度と湿度を記録した。温湿度は幼虫の化学物質に対する感受性に影響を及ぼす要素と考えられ、飼育される幼虫の近くの温湿度の記録をとることで、その試験が要求される環境で行われたか、逸脱がなかったかにつき確認する必要がある。

このリングテストには 18 試験機関が興味を示し、そのうち 14 機関がリングテストを実施した。データロガーにより温湿度を記録しなかった 1 機関を除く 5 カ国 13 機関がリングテスト結果データを提出した（オーストラリア 1、オーストリア 1、フランス 2、ドイツ 6、イタリア 2、スイス 1）。

Ecotox Services Australasia (Australia)

University of Graz (Austria)

INRA Le Magneraud (France)

ANSES (France)

LAVES Institute für Bienenkunde Cell (Germany)

BAYER Crop Science AG, (Germany)

BASF SE, (Germany)

Eurofins Agrosience Services EcoChem GmbH, (Germany)

BioChem agrar GmbH, (Germany)

Ibacon GmbH, (Germany)

Biotechnologie BT S.r.l., (Italy)

CRA-API, (Italy)

IES, (Switzerland)

このリングテストに先立って Aupinel らは 2007 年に予備試験を行い、その結果より被験物質投与期間は試験 3 日から試験 6 日に、また確実に試験成立基準を満たす陽性対照物質の濃度についても暫定的に設定した。そこで決定した陽性対照物質濃度の妥当性検証も、今回のリングテストの目的の 1 つである。

試験結果

ジメトエート投与試験

11 試験機関が 13 試験を行った。試験 8 日における陰性対照区の死亡率は 0.0% から 13.9% となり、15% 以下という試験成立基準を満たすことができた。試験 22 日における羽化率 70% 以上という基準は、2 試験機関が満たすことができなかった (66.7% と 69.0%)。被験物質投与飼料調製溶液の濃度確認では、1 試験機関で測定値が基準値から外れており、1 試験機関はサンプルを提出しなかった。結果として 11 試験機関中 2 試験機関において試験成立基準を満たすことができなかった。

試験 22 日の羽化率から補正死亡率を計算して、その結果から EC₅₀ 値を計算したところ、13 試験中 11 試験で 4.72 mg/kg ～ 8.14 mg/kg という値が得られた。

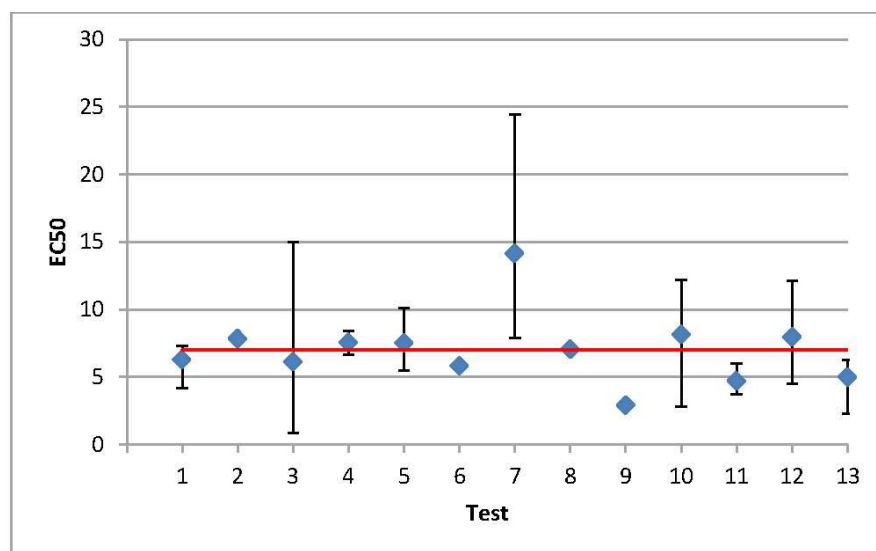


Figure 2: EC_{50} values ($\pm 95\%$ CI when calculation was possible) for each test (the red line indicates the mean value: 7.01 mg.Kg^{-1})

参考資料 1

13 試験中で得られた中で最も高い EC_{50} 値は 14.14 mg/kg であり、最も低い EC_{50} 値は 2.92 mg/kg であった。最も高い EC_{50} 値が得られた試験機関では規定よりも少し低い温度で飼育が行われており、最も低い EC_{50} 値が得られた試験機関では規定よりも低い湿度で飼育が行われていた。温度と湿度は、化学物質に対する感受性に大きく影響する重要な要素であることがわかった。

使用した蜂群の品種による EC_{50} の差は認められなかった。

いくつかの機関では EC_{50} を求めるために用いた回帰式の決定係数が低かったため、95% 信頼区間が計算できなかった。また高い決定係数であっても、 EC_{50} 値が試験の最低濃度に近接していたため、信頼区間が計算できなかった試験機関もあった。

フェノキシカルブ投与試験

11 試験機関がフェノキシカルブについて 13 試験を行った。試験 8 日における陰性対照区の死亡率は 0.0% から 14.6% となり、全ての試験機関が 15% という試験成立基準を満たすことができた。試験 22 日における羽化率 70% 以上という基準は、2 試験機関が満たすことができなかった（陰性対照区 69.4% と溶媒対照区 58.3%）。投与試料調製用溶液の濃度確認試験は、2 試験機関で試験成立基準を満たさず、1 試験期間は試料を提出せず、1 試験期間は輸送中のダメージにより測定ができなかった。結果として 11 試験機関中 4 試験機関が試験成立基準を満たさなかった。

13 試験中 10 試験において、フェノキシカルブの NOEC は $40 \mu\text{g/kg}$ となった。1 試験は

規定よりも低い湿度で試験が行なわれており、NOEC が濃度設定範囲以下となった。

参考資料 2

lab	test	Bee strain	Fenoxycarb Purity (%)	NOEC $\mu\text{g Kg}^{-1}$	Acceptance Criteria			D1-D8 Control		D1 or D3-D8 Treated		D8-D15 Control		D8-D15 Treated	
					57<[C]<86	M<15%	E>70%	T°C mean (Sd)	RH% mean (Sd)	T°C mean (Sd)	RH% mean (Sd)	T°C mean (Sd)	RH% mean (Sd)	T°C mean (Sd)	RH% mean (Sd)
1	1	ligustica	99.5	40	84	2.1	90.0	35.0	92.5	34.3	96.6	34.5	75.3	33.9	79.7
						6.3	85.0	(0.1)	(4.7)	(0.5)	(3.8)	(0.1)	(2.9)	(0.2)	(5.7)
1	2	ligustica	99.5	40	80	12.5	88.0	34.5	94.8	*	*	33.1	77.7	*	*
						4.2	88.0	(0.2)	(4.8)			(0.1)	(3.9)		
2	3	Buckfast	99.5	<20	86	6.3	75.0	34.7	92.2	34.6	95.7	**	**	**	**
						14.6	75.0	(0.3)	(5.4)	(0.3)	(5.9)				
3	4	carnica	99.5	40	63	5.6	69.4	34.7	98.4	34.7	98.4	34.7	76.8	34.7	76.8
						8.3	83.3	(0.2)	(1.8)	(0.2)	(1.8)	(0.2)	(1.0)	(0.2)	(1.0)
4	5	carnica	99.4	40	75	2.1	91.7	34.7	98.8	34.8	94.7	34.9	81.4	34.9	81.4
						0.0	93.8	(0.1)	(3.9)	(0.3)	(6.2)	(0.1)	(4.3)	(0.1)	(4.3)
5	6	carnica	99.3	40	85	0.0	75.0	34.5	95.0	34.5	95.0	34.5	80.0	34.5	80.0
						2.8	58.3	(0.5)	(3.0)	(0.5)	(0.3)	(0.5)	(0.15)	(0.5)	(0.15)
5	7	carnica	99.3	40	82	8.3	77.8	34.5	95.0	34.5	95.0	34.5	80.0	34.5	80.0
						11.1	72.2	(0.5)	(3.0)	(0.5)	(3.0)	(0.5)	(1.5)	(0.5)	(1.5)
6	8	carnica	99.5	40	84	0.0	76.2	33.9	99.7	34.2	99.3	33.7	87.8	33.9	89.4
						2.4	71.4	(0.1)	(2.1)	(0.1)	(3.8)	(0.4)	(4.2)	(0.4)	(4.5)
7	9	carnica	98.5	40	53	4.2	87.5	34.9	96.3	34.9	96.3	34.9	81.6	34.9	81.6
						2.1	81.5	(0.5)	(5.4)	(0.5)	(5.4)	(0.5)	(5.3)	(0.5)	(5.3)
8	10	carnica	99.5	<20	****	8.3	77.8	35.0	69.1	35.0	69.1	34.5	61.7	34.5	61.7
						2.8	88.9	(0.1)	(14.3)	(0.1)	(14.3)	(0.04)	(2.3)	(0.04)	(2.3)
9	11	carnica	98.5	40	*****	0.0	72.9	34.4	99.4	34.4	99.4	34.9	99.3	34.9	99.3
						0.0	72.9	(0.3)	(4.3)	(0.3)	(4.3)	(0.2)	(3.8)	(0.2)	(3.8)
11	12	***	99.9	<20	82	0.0	72.7	34.7	93.6	34.7	93.6	34.7	93.6	34.7	93.6
						5.6	86.7	(0.3)	(6.5)	(0.3)	(6.5)	(0.3)	(6.5)	(0.3)	(6.5)
12	13	ligustica	99.5	40	97	0.0	94.4	34.0	99.0	34	99.0	34.0	99.0	34	99.0
						2.8	94.4	(0.4)	(7.8)	(0.4)	(7.8)	(0.4)	(7.8)	(0.4)	(7.8)

Table 2: Fenoxycarb test results

*: absence of data logger (lack of equipment);

: problem with data logger; *: not informed;

****: no sample sent;

*****: sample damaged during shipment

溶媒対照区と陰性対照区については、どちらの結果を用いても NOEC の推定値に差は生じなかった。全試験機関の得た溶媒対照羽化率と陰性対照羽化率について χ^2 検定を行ったが、両者の分布に差があるという仮説は棄却された。

その他の結果

この試験のエンドポイントは試験 22 日における羽化率であり、その時点での成虫の生死に関わらず、羽化率として記録されるものであったが、試験 22 日時点における生存率についても、データ収集が行われた。試験 22 日における成虫生存率は、被験物質が羽化後間もない成虫の死亡という影響を与える場合、その影響を反映すると考えられる。羽化率のみを記録しただけでは、そのような羽化後間もない成虫に対する影響を反映することができず、化学物質の影響に対して過小評価を行う可能性がある。

2 試験機関が試験 22 日の生存率についてもデータ収集を行った。ジメトエート試験では、1 試験機関は生存率を用いて計算した LD₅₀ 値と羽化率で計算した EC₅₀ 値に大きな差はな

かったが、1 試験機関では 2 倍の差があった。この試験機関における結果からは、羽化率に基づく EC_{50} 値でジメトエートの影響評価を行うと、ジメトエートの影響について過小評価する可能性があることが示唆された。フェノキシカルブの NOEC については、羽化率と生存率、どちらのデータを用いて計算を行なっても違いがなかった。

また幼虫の由来するコロニーの違いによる影響について、3 試験機関が観察結果を提出している。ある試験機関のジメトエート試験において、最低用量区の結果にコロニー間で有意な差が認められた。しかし EC_{50} 値算出のために用いられた回帰直線に対するデータの相関係数が高かったことから、このコロニーの違いに由来する死亡率の相違が、影響の濃度依存性に対しては影響を与えなかったと考えられた。

またある機関ではあるコロニー由来の幼虫で幼虫期及び蛹期の生存率に大きなばらつきが認められたが、フェノキシカルブの NOEC 推定値は他の試験機関で得られた値と乖離がなかった。このことから、コロニー間のばらつきはフェノキシカルブの NOEC 推定には影響を及ぼさなかったと考えられた。一方この試験機関によるジメトエート試験においては、低濃度投与区での羽化率に影響があったため、低濃度区で羽化率が低下することにより EC_{50} 値算出のために求められた回帰直線に対するデータの相関係数が低くなるという影響がみられた。またある機関のフェノキシカルブ試験では、あるコロニー由来の幼虫の死亡率が高く、その結果試験区全体における羽化率が低くなったことが原因で NOEC の推定ができなかった。

陽性対照区の濃度設定は、2014 年 2 月に設定したリングテストのためのドラフトガイダンスドキュメントにおいては、ジメトエートで 40 mg/kg、フェノキシカルブで 250 µg/kg となっていた。今回のリングテスト結果より、試験 8 日における 50%以上の死亡率のためにはジメトエート濃度は 48 mg/kg 必要であり、試験 22 日の羽化率を 20%以下とするためにはフェノキシカルブ濃度が 320 µg/kg 必要であると考えられた。

参考資料 3

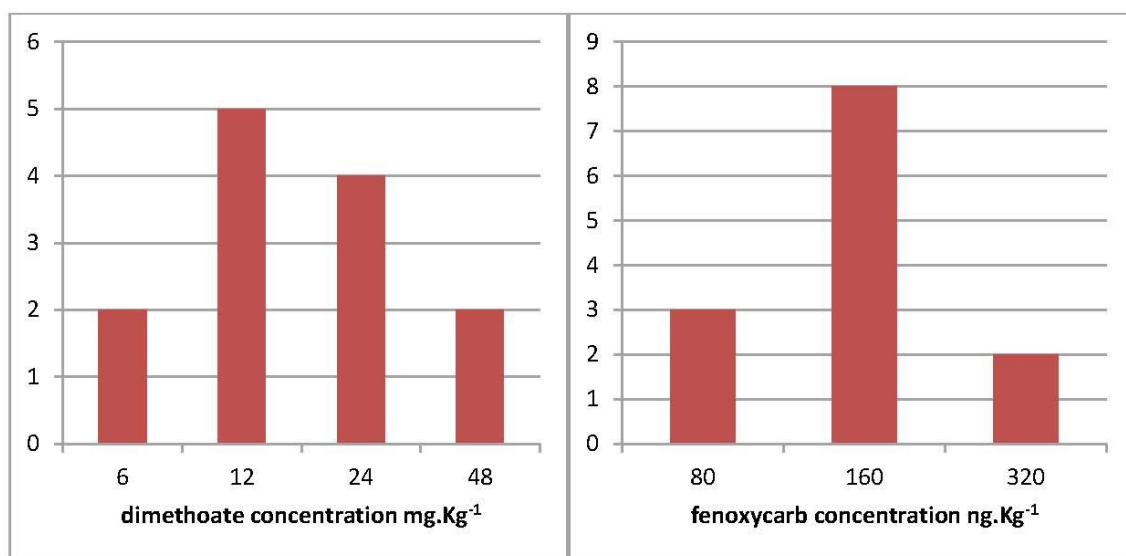


Figure 4: number of test according to the lowest dimethoate concentration leading to a minimum of 50% mortality on D8

Figure 5: number of test according to the lowest fenoxycarb concentration leading to a maximum of 20% emergence on D22

考察

ジメトエート試験における EC_{50} 値は 13 試験中 11 試験で 4.72 mg/kg から 8.14 mg/kg の間であり、ばらつきなくよく一致した値が得られた。 EC_{50} 値がこの範囲内でなかった試験のひとつは指定された温度より 0.5℃低い温度で飼育しており、これが平均値の 2 倍の EC_{50} 値となった原因であると考えられた。また平均よりも低い EC_{50} 値であった試験では、低い相対湿度下で飼育が行われており、このことが殺虫剤に対する感受性を高めたと考えられた。この試験機関は被験物質調製用溶液を提出していないため、低い EC_{50} 値の原因は被験物質投与濃度である可能性もある。

フェノキシカルブ試験では、13 試験中 10 試験で NOEC は 40 µg/kg と推定された。1 つの試験はジメトエート試験と同様に低い湿度で試験が行われており、また被験物質調製用溶液を提出していない。また NOEC が推定できなかった残り 2 つの試験では、死亡率が高いコロニーが供試群に含まれており、それにより羽化率を低下したことで NOEC が求められなかったと考えられた。

いくつかの試験で試験成立基準を満たすことができなかった。ジメトエート試験においては、D22 の羽化率 70%以上という基準を 4%及び 1%下回る試験があり、また濃度確認試験では規定範囲値より低い濃度であった。しかしこれらの試験においても、 EC_{50} 値については他の試験とよい一致を見せた。またフェノキシカルブ試験でも陰性対照区及び溶媒対照区において羽化率の基準を満たすことができない機関があったが、その試験においてもやはり NOEC 値は他の試験と同様、40 µg/kg と計算された。

しかしながら、相対湿度や温度についての逸脱については、幼虫の殺虫剤に対する感受

性に大きく影響を及ぼし、試験の妥当性に対して影響が及ぶことが推測された。これらのことから、データロガーを飼育個体の近くに設置し、飼育環境の温湿度を正確に測定する必要があり、またデシケーターと飽和塩水溶液を用いて温湿度を調整する必要があることが確認できた。

供試蜂群の違いが試験に影響を及ぼす可能性がある。このことから、D15 における死亡数の確認を行い、蜂群による死亡率を比較することが有用であると考えられた。また被検薬の毒性の過小評価を避けるために、D22 における成蜂の生存率を記録することを推奨する。

今回得られた結果から、ジメトエートの陽性対照区における濃度は、暫定的に決定していた 40 mg/kg の代わりに 48 mg/kg を、またフェノキシカルブの陽性対照区における濃度は 250 µg/kg の代わりに 320 µg/kg を推奨する。

2.2 ミツバチ成虫 10 日間慢性摂食毒性試験法の標準化のための第 1 回 2014 年国際リングテスト結果の要約の概説

最終報告書

ミツバチ成虫 10 日間慢性摂食毒性試験法の標準化のための国際リングテスト結果の要約
2014 年 12 月 2 日

Stephan Schmitzer and Annette Kling

緒言

ミツバチのような訪花昆虫は、農薬や化学物質の残留物に汚染された植物から食物を摂取するとともに、巣内に貯蔵された食物を摂取することで長期間それらに暴露される可能性がある。実験室内飼育条件下で 1-4 日齢の若い働き蜂に、被験物質を含む飼料を 10 日間投与する慢性摂食毒性試験を行うことで、このリスクを評価することを試みた。

これまでに公表された CEB 法、Decoyrtye ら (2005)、及び Suchail ら (2001) の方法から、ミツバチ成虫の慢性摂食毒性試験を行うことが可能であると考えられていたが、まだその評価法についての検証は行われていなかった。2013 年と 2014 年に、6 つのドイツ研究機関が最初のリングテストを行った。それから OECD リングテストグループが 2013 年に組織され、OECD テストガイドライン 213 を基に試験を設計し、8 カ国 17 試験施設が農薬の慢性毒性影響評価法のガイドライン化のために試験を行った。

ミツバチ成虫 10 日間慢性摂食毒性試験は、農薬の長期影響を評価するためのものでエンドポイントとして LC₅₀ 及び LDD₅₀、可能であれば NOEC と NOEDD を求めるものである。このリングテストでは被験物質としてジメトエートを選択し、0.2、0.4、0.6、0.8 及び 1.0 mg/kg の 5 飼料濃度にて 10 日間被験物質を含む飼料を自由摂取させて LC₅₀ 及び LDD₅₀、NOEC と NOEDD を求めた。

供試虫としては 1~4 日齢の若いセイヨウミツバチ働き蜂を用い、陰性対照区としては無処理区と溶媒対照区 (5%アセトンが含まれている) の 2 区を設定した。試験成立基準はこの 2 区の陰性対照区で試験終了時に死亡率が 15%以下と設定した。

結果

全 17 試験機関において、被験物質に対して用量反応性のある死亡率結果が得られた。死亡率結果の表を Table 1 に示す。また 17 試験機関名と国名を以下に示す。

IBACON BmbH, (Germany)

Eurofins Agrosience Services EcoChem GmbH, (Germany)

Eurofins Agrosience Services S.L., (Spain)

Eurofins Agrosience Services, INC., (USA)

BioChem ahrar GmbH, (Germany)

ACTA (France)
 Agroscope, (Switzerland)
 Biotechnologie BT S.r.l., (Italy)
 Eurofins Mitox, (Netherlands)
 Innovative Environmental Services (IES) Ltd, (Switzerland)
 Centre for Chemical Safety and Stewardship The Food and Environment Research Agency (UK)
 Wildlife International a Division of EAG, (USA)
 Bayer CropScience AG, (Germany)
 Testapi SARL, (France)
 Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES), (Germany)
 BASF SE, (Germany)
 CRA-API, (Italy)

TABLE 1 Cumulative mortality [%] in the reference item treatment group during the 10 days test period

Treatment [mg a.i./kg]	Cumulative mortality [%]																	
	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	6.7	0.0	6.7	0.0	3.3	0.0	3.3	0.0	0.0	6.7	0.0	0.0	3.3	0.0	3.3	0.0	0.0	2.0
Reference item: Perfekthion																		
0.2	3.3	6.7	0.0	0.0	0.0	0.0	6.7	0.0	10.0	26.7	0.0	36.7	10.0	6.7	6.7	0.0	3.3	6.9
0.4	0.0	13.3	16.7	20.0	60.0	80.0	50.0	26.7	80.0	70.0	26.7	100	10.0	36.7	13.3	0.0	30.0	37.3
0.6	40.0	40.0	73.3	56.7	93.3	100	100	33.3	100	73.3	100	100	20.0	96.7	26.7	16.7	100	68.8
0.8	100	100	100	66.7	100	100	90.6	93.3	100	100	100	100	73.3	100	76.7	33.3	100	90.2
1.0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	93.3	100	100	80.0	100	98.4

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

最低用量区での死亡率は 0%から 36.7%であった。最高用量での死亡率は 15 試験機関で 100%であった。各被験物質投与区における平均死亡率は 6.9% (0.2 mg/kg 飼料)、37.3% (0.4 mg/kg 飼料)、68.8% (0.6 mg/kg 飼料)、90.2% (0.8 mg/kg 飼料) 及び 98.4% (1.0 mg/kg 飼料) であった。またこの結果から、提示された陽性対照区の濃度 0.5 から 1.0 mg/kg の間の 1 濃度は、試験終了時に 50%以上の死亡率を得るのに十分な濃度であることが示された。

無処理区の死亡率は 0.0%から 6.7% (平均 2.0%) であり、全ての研究機関で試験成立基準を満たすことができた。しかし 5%アセトンを含む溶媒対照区の死亡率は 0.0%から 90.0%と幅広く、平均は 18.8%であった。半分以上の試験機関 (10/17) において試験成立基準の 15%以下の死亡率が得られたが、7 試験機関は試験成立基準を満たすことができなかった。

溶媒対照区での高い死亡率の原因を明確にするため、いくつかの要因について検討を行ったが、ミツハチの品種、使用されたアセトンのグレード、供試虫の日齢及び試験実施国による影響はなかったと考えられた。

いくつかの研究機関において、溶媒対照区の死亡率と飼料摂取量との間に相関性が認められた。また、死亡数は試験 6 日を過ぎてから上昇する傾向が認められた。この観察事項から、アセトン摂取量がある閾値を超えると死亡が起こると考えられた。このことの確認、また供試虫の日齢についてさらに確認するため、2 試験機関で追加の試験を行った。その結果、飼料中のアセトン濃度が上昇すると死亡率も上昇し、また若い日齢では死亡率が低下する可能性が示唆された。アセトン濃度と死亡率の関係については、さらに検討が必要であると考えられた。

また飼料摂取量について各試験機関間で比較したところ、無処理区で 27.5 mg/匹/日から 64.0 mg/匹/日の幅が観察された。平均値は 40.6 mg/匹/日であった。無処理区と溶媒対照区の飼料摂取量の比較から、アセトンは摂食忌避作用を持たないことが示唆された。また、飼料摂取量にハチの品種及び試験実施国による差はないことが示された。また飼料摂取量が増加すると被験物質投与区の死亡率が増加することが確認された。

17 試験機関におけるジメトエートの LC₅₀ 値は 0.23 から 0.85 mg/kg 飼料であり、平均値は 0.48±0.15 mg/kg であった。全ての研究機関における LDD₅₀ 値は 0.009 から 0.02 µg/匹で、平均値は 0.015 µg/匹であり、多くの試験機関で信頼区間を計算することができた。また NOEC の平均値は 0.28±0.15 mg/kg であり、NOEDD の平均値は 0.009±0.0026 µg/匹であった。

TABLE 9 LC₅₀, LDD₅₀ and NOEC/NOEDD values of dimethoate

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	SD
LC₅₀ [mg a.i./kg]																		
0.59	0.54	0.50	0.58	0.38	0.34	0.39	0.59	0.30	0.30	0.44	0.23	0.64	0.42	0.65	0.85	0.41	0.48	0.15
Lower confidence limit																		
n.d.	n.d.	0.46	0.51	0.34	0.22	0.34	0.27	0.26	n.d.	0.41	0.20	n.d.	0.04	0.07	0.79	n.d.	0.33	0.20
Upper confidence limit																		
n.d.	n.d.	0.55	0.64	0.42	0.38	0.43	0.75	0.34	n.d.	0.51	0.40	n.d.	0.46	0.87	0.91	n.d.	0.56	0.19
NOEC [mg a.i./kg]																		
0.40	0.40	0.40	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.60	0.20	0.40	0.60	0.20	0.28	0.15
LDD₅₀ [µg a.i./bee/day]																		
0.015	0.019	0.014	0.018	0.016	0.011	0.011	0.02	0.013	0.011	0.01	0.009	0.019	0.017	0.017	0.017	0.013	0.015	0.003
Lower confidence limit																		
n.d.	0.017	0.013	0.016	0.014	n.d.	0.010	0.018	0.011	0.009	0.009	0.008	0.005	0.015	0.015	0.016	0.012	0.013	0.0036
Upper confidence limit																		
n.d.	0.021	0.016	0.020	0.018	n.d.	0.013	0.022	0.014	0.012	0.013	0.015	0.027	0.019	0.018	0.018	0.015	0.017	0.0039
NOEDD [µg a.i./bee/day]																		
0.011	0.012	0.011	0.007	0.008	0.007	0.007	0.008	0.008	0.007	0.005	0.008	0.016	0.009	0.009	0.012	0.007	0.009	0.0026

11 試験機関で行動異常が観察され、ほとんどが瀕死、影響あり及び不活発であった。慢性毒性試験で行動異常を定性的、定量的に調べる事が可能であることが示された。

また、2 試験機関でジメトエート含有飼料を $4\pm 4^{\circ}\text{C}$ で保存し、直後、試験 7 日及び試験 10 日に濃度確認を行ったところ養成物質投与濃度において安定性に問題ないことが示された。

その他、いくつかの試験機関で確認できた事項

- ・飼料溶液中のジメトエートは冷蔵下で 10 日間安定であることが確認できた。
- ・飼育容器サイズによる影響はなかった。
- ・飼育容器の材質（鉄、プラスチック、ダンボール）による影響はなかった。
- ・飼料を冷蔵で 4 日間保存しても、細菌やカビの増殖は認められなかった。
- ・飼育容器としてシリンジが最適であった（エッペンドルフカップとの比較を行った）
- ・界面活性剤（Tween 20 及び Tween 80）を用いた試験も行われた。
- ・DMF と DMSO は溶剤として用いられるべきではない。DMF では 0.04% で 20% 以上の死亡率が得られ、DMSO は 3% で摂食忌避効果が認められた。
- ・水溶性の低い被験物質の溶解度を高めるため、低いショ糖濃度の飼料について検討も行ったが、一貫性のある結果が得られず何らかの結論を導き出すことはできなかった。

まとめ

2014 年の 5 月から 7 月にかけて、8 カ国 17 試験機関によるセイヨウミツバチ慢性摂食毒性試験リングテストを行った。大きな逸脱なく全ての試験機関において実施要綱どおりに試験を行うことができた。今回のリングテストの目的は、この標準化された方法が農薬毒性評価に関するデータを取得するための再現性よく頑健な方法であることを示すことにある。

試験成立基準については、無処理区における試験終了時の死亡率 15% 以下については全ての試験機関において満たすことができ、また陽性対照物質として今回の被験物質ジメトエートを 1 濃度用いて 50% 以上の死亡率を得るという基準を用いることは妥当であることが、今回の結果より示された。全ての試験機関で LC_{50} 及び LDD_{50} 、NOEC と NOEDD を求めることができた。

リングテストの結果から、ここに示した試験法は、農薬のミツバチに対する慢性摂食毒性について実験室内で評価するのに適したものであることが示された。また、10 日間慢性摂食毒性試験に必須である若い働き蜂の採集については、2 つの効果的な方法が記載されている。さらに、この試験の陽性対照物質としては、ジメトエートが適していることも確認できた。

しかし、リングテスト外でこの試験を行ったときに、被験物質の溶解性と均一性について問題があったことが報告されている。このことは、本試験法では被験物質濃度に上限があることを示唆している。

またアセトンに水に溶解性が低い物質の溶媒として用いることについては疑問が提示さ

れた。アセトン添加区でも試験成立基準を満たす結果が得られるのであれば、溶媒として使用することができるだろう。2015年には更なる検討を行い、アセトンのミツバチに対する効果について（低濃度を含むアセトンの用量反応性についてなどの）データを収集する必要があるだろう。

2.3 ミツバチ成虫 10 日間慢性摂食毒性試験法の標準化のための 2016 年第 2 回国際リングテスト結果の要約の概訳

ミツバチ成虫 10 日間慢性摂食毒性試験のリングテストについての最終報告書

2016 年 2 月 1 日

Stephan Schmitzer and Annette Kling

緒言

ミツバチのような訪花昆虫は、農薬や化学物質の残留物に汚染された植物から食物を摂取するとともに、巣内に貯蔵された食物を摂取することで長期間それらに暴露される可能性がある。今回実験室内条件下で 2 日齢以下の若い働き蜂に、被験物質を含む飼料を 10 日間投与する慢性摂食毒性試験を行うことで、このリスクを評価することを試みた。

これまでに 2014 年と 2015 年にリングテストが行われている。2014 年のリングテスト結果については 2015 年の 4 月 22 から 24 日にパリで行われた専門家会議にて議論され、再度リングテストを行うことで合意した。2015 年に行われた 2 回目のリングテストでは、溶媒として使用するアセトンの影響を確認するため、アセトンの最終濃度を振ってその影響を確認した。また、給餌飼料の蒸発量その影響について調査した。さらに 1 試験機関で、飼育容器に収容された供試虫数が 10 日間の試験期間中の自然死亡率に及ぼす影響について検討された。この検討では、供試虫を 1 蜂群から採集した場合と複数蜂群から採集した場合を比較して採集蜂群の違いが結果に与える影響についても調査を行った。

9 カ国 16 試験機関（6 研究機関/大学、2 メーカー研究室、8 受託試験機関）がこの第 2 回リングテストに参加し、19 試験の結果が提出された。16 試験機関名と国名を以下に示す。

IBACON BmbH, (Germany)

Eurofins Agrosience Services EcoChem GmbH, (Germany)

Ecotox Services Australasia Pty Ltd, (Australia)

Agricultura y Ensayo S. L., (Spain)

Agroscope, (Switzerland)

BASF SE, (Germany)

Bayer CropScience AG, (Germany)

Karl-Franzens-Universität Graz (Austria)

ACTA (France)

BioChem ahrar GmbH, (Germany)

Centre for Chemical Safety and Stewardship The Food and Environment Research Agency (UK)

Testapi SARL, (France)

Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit

(LAVES), (Germany)

Biotechnologie BT S.r.l., (Italy)

Eurofins Agrosience Services, INC., (USA)

INRA (France)

アセトンの影響評価では、1%、3%及び5%のアセトンを50%ショ糖液に添加して試験を行った。また陽性対照区（ジメトエート）を設定した。ジメトエートの濃度は最終的に試験終了時の死亡率が50%以上となるように、各試験機関で決定した。また蒸発による飼料の減少量を測定するために、供試虫を導入しない飼育容器に無添加飼料及びアセトン添加飼料を入れた給餌容器を設置し、蒸発による飼料の減少量を測定した。

結果

陽性対照区を設定した試験として15試験の報告があった。陽性対照物質のジメトエート濃度は0.6から1.16 mg/kg 飼料であり、全ての試験において経時的に死亡率が上昇することが観察され、試験終了時の死亡率は1試験の83.3%を除き全て100%に達した。

また無処理区の死亡率は0.0%から10%であり平均値は3.1%であった。全ての試験において無処理区の死亡率は試験成立基準を満たすことができた。

アセトン5%の溶媒対照区における死亡率は、18試験中の17試験で試験成立基準を満たすことができ、0%から13.3%であり、平均値は5.0%であった。1試験で23.3%と試験成立基準を超えた結果が得られたが、この試験は9月下旬に行われたものでありそれが高い死亡率の原因であると考えられた。また3%のアセトン区で20.0%の死亡率が得られた試験があったが、当該試験機関で再試験した結果や過去の試験での死亡率は、リングテストの他の機関のデータと同程度であった。

TABLE 3 Cumulative mortality [%] in the 1, 3 and 5 % acetone group during the 10 days test period

Treatment*	Cumulative mortality after 10 days [%]																		
	Lab 1	Lab 2a	Lab 2b	Lab 3	Lab 4	Lab 5a	Lab 5b	Lab 6	Lab 7a	Lab 7b	Lab 8	Lab 9	Lab 10	Lab 11	Lab 12	Lab 13	Lab 14	Lab 15	Mean
0	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	0.0	-	10.0	3.3	0.0	3.3	3.3	3.3	3.3	2.4	0.0	6.7	0.0	3.1
1	6.7	0.0	0.0	0.0	10.0	0.0	-	6.7	-	-	0.0	6.7	0.0	3.3	0.0	0.0	3.3	3.3	2.7
3	3.3	20.0	0.0	3.3	0.0	6.7	3.3	3.3	-	-	0.0	10.0	0.0	0.0	3.3	0.0	13.3	0.0	4.2
5	3.3	3.3	3.3	3.3	0.0	13.3	13.3	3.3	0.0	0.0	0.0	6.7	0.0	0.0	10.0	6.7	23.3	0.0	5.0

* % acetone in 50 % aqueous sugar solution

Remark: Cells marked in grey show mortalities beyond the validity criterion of ≤ 15 %

1 回目のリングテストで得られた5%アセトン溶媒対照区の高い死亡率は、2 度目のリングテストでは再現されなかった。従って、10 日間慢性摂食毒性試験において、飼料への最終濃度5%までのアセトンの添加は可能であると判断できる。

蒸発量の補正を行わない飼料摂取量は、15 試験機関による 16 試験の結果は最小 30.5 mg/匹/日、最大 54.0 mg/匹/日、平均 37.7 mg/匹/日であった。アセトン を 1%、3%あるいは 5% 添加した飼料の平均摂取量はそれぞれ 36.2 mg/匹/日 (1%)、36.3 mg/匹/日 (3%) 及び 35.4 mg/匹/日 (5%) であり、アセトン を含まない飼料と同等であった。以上のことから、5%までのアセトン添加で摂食忌避効果は認められないことが再確認された。

無添加飼料の蒸発量は、最小 42.6 mg/容器/日、最大 113.5 mg/容器/日、平均で 75.3 mg/容器/日であった。一日当たりの平均蒸発量 (75.3 mg) は、一日当たりのハチ 1 匹の平均飼料摂取量 (37.7 mg) より大きい値であった。アセトン を 5%添加した飼料の蒸発量は、最小で 35.1 mg/容器/日、最大 135.4 mg/容器/日、平均で 86.0 mg/容器/日と通常飼料と比較すると少し大きいという結果が得られた。飼料の蒸発量は、飼料容器の形状や溶媒の揮発性によって変動すると考えられる。

リングテストとは別に、1 試験機関で、飼料の蒸発量と 1 ケージ当たりのハチの数との関連についての解析が行われた。ケージ中のハチが少なくなり飼料摂取量が減少すると、ケージ当たりの飼料摂取量に対する蒸発量の割合が大きくなり、10 匹飼育時の飼料減少量に対する蒸発量の割合は 20%程度であるが、計算上 5 匹飼育時の飼料減少量に対する蒸発量の割合は 50%、1 匹飼育時の飼料減少量に対する蒸発量の割合は 200%となる。

TABLE 7 Ratio of evaporation per food uptake (in %) related to the number of bees for the untreated control (50 % w/v sucrose solution)

Number of bees/cage	Food uptake [mg/day]	Evaporation [mg/day]	Food uptake with evaporation ^a	Ratio evaporation/food uptake [%]
10	376.8	75.3	301.5	20.0
9	339.1	75.3	263.8	22.2
8	301.4	75.3	226.1	25.0
7	263.8	75.3	188.5	28.5
6	226.1	75.3	150.8	33.3
5	188.4	75.3	113.1	40.0
4	150.7	75.3	75.4	50.0
3	113.0	75.3	37.7	66.6
2	75.4	75.3	0.1	99.9
1	37.7	75.3	-37.6	199.8

^a food uptake with Evaporation = Food uptake [mg/day] - Evaporation [mg/day]

また、別の 1 試験機関が、ケージ内の飼育匹数及び採集蜂群によって、ハチの自然死亡数がどの程度変動するか検討した。4 蜂群から採取したハチを用いてそれぞれ 3 反復の試験を行い、飼育匹数は 10 匹及び 50 匹の 2 レベルを設定して比較した。10 匹区では平均死亡率が 14.2% (標準偏差 10%) であったが、50 匹区では平均死亡率は 6.2% (標準偏差 4.5%) であり、統計的に有意な差が認められた (ウェルチの t 検定、片側 5%及び Kruskal-Wallis 検定 5%)。第 1 回と第 2 回リングテスト試験における無処理区死亡率は本試験における 50 匹飼育での死亡率よりも低く、10 匹飼育による試験法の安定性及び頑強性が確認できた。

また、採取蜂群間における死亡率の有意な差は認められなかった。

まとめ

2015 年夏季に第 2 回リングテストが行われ、9 カ国 16 試験機関による 19 試験のデータが得られた。大きな逸脱はなく、全ての試験機関において実施要綱どおりに試験を行うことができた。今回のリングテストの目的は、溶媒として用いるアセトンの試験への影響について調査することと、飼料蒸発量について評価を行うことであった。また飼育容器中の飼育匹数と採取蜂群による自然死亡率の変動についても検討が行われた。

試験成立基準については、無処理区における試験終了時の死亡率 15%以下については全ての試験機関において満たすことができ、また陽性対照物質ジメトエートの 1 濃度を設定して 50%以上の死亡率を得るという基準を用いることは妥当であることが確認でき、無処理区での死亡率及び陽性対照区での死亡率の 2 種の判定基準で試験の成立を判断できることが明らかになった。

前回と異なり、今回 5%アセトンを添加溶媒として用いることが妥当であることが確認できた。また飼料がある程度の量蒸発することが、全ての試験において示された。その蒸発量は試験施設により大きく異なっていたが、以下のファクターによる影響が考えられた。

- ・ 給餌容器の種類
- ・ 飼育容器の給餌部分の口径
- ・ (試験環境の) 相対湿度
- ・ 溶媒のもつ揮発性
- ・ 1 匹あたりの飼料摂取量の計算における飼料蒸発量の影響はケージ当たりのハチ数に依存する。死亡数が少ない場合は蒸発の影響はないが、死亡個体が多く 5 匹以上になった場合には、無視できない程度になることが考えられた。

従って、飼料蒸発量を減少できるよう技術的な努力をすること及び蒸発量による飼料摂取量の補正を行うことが推奨される。実際の飼料摂取量を過大評価なく見積もるため、試験料蒸発量で補正した飼料摂取量を計算すべきである。

【1】 国内外からの知見の収集

3. 国内外の情報・文献収集

マニュアル作成のために必要な国内外の情報・文献を収集した。以下に収集した情報のリストを示す。

- (1) Aupinel, P., Fortini, D., Dufour, H., Tasei, J. N., Michaud, B., Odoux, J. F., & Pham-Delegue, M. H. (2005). Improvement of artificial feeding in a standard in vitro method for rearing *Apis mellifera* larvae. *Bulletin of Insectology*, 58, 107-111.
- (2) Aupinel, P., Medrzycki, P., Fortini, D., Michaud, B., Tasei, J. N., & Odoux, J. F. (2007). A new larval in vitro rearing method to test effects of pesticides on honey bee brood. *Redia*, 90, 91-94.
- (3) Aupinel, P., Fortini, D., Michaud, D., Medrzycki, P., Padovani, E., Przygoda, D., Maus, C., Charriere, J.D., Kilchenmann, V., Riessberger-Galle, U., Vollmann, J.J., Jeker, L., Janke, M., Odoux, J.F., Tasei, J. N. (2009). Honey bee brood ring-test : method for testing pesticide toxicity on honeybee brood in laboratory conditions. *Julius-Kühn-Archiv*, 423, 96-102.
- (4) European Food Safety Agency (EFSA), draft Guidance on the Risk Assessment of Plant Protection Products on Bees (2012), available at:
<http://www.efsa.europa.eu/en/consultations/call/120920.pdf>
- (5) OECD (1998), Guideline for the Testing of Chemicals No. 213: Honey bee, Acute Oral Toxicity Test, Section 2; Effects on Biotic Systems, OECD, Paris, DOI: 10.1787/9789264070165-en
- (6) OECD (1998), Guideline for the Testing of Chemicals No. 214: Honey bee, Acute Contact Toxicity Test, Section 2; Effects on Biotic Systems, OECD, Paris, DOI: 10.1787/20745761 237 OECD/OCDE 10 © OECD, (2013)
- (7) OECD (1998), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Environment Monograph, Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.
- (8) Abbott, W.S.(1925) A method for computing the effectiveness of an insecticide. *Jour. Econ. Entomol.*, 18, 265-267.
- (9) OECD (2013), Test No. 237: Honey Bee (*Apis Mellifera*) Larval Toxicity Test, Single Exposure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing doi: 10.1787/978926203723-en
- (10) Aupinel, P., Fortini, D., Dufour, H., Tasei, J., Michaud, B., Odoux, J., and Pham-Delegue, M. H. (2005). Improvement of artificial feeding in a standard in vitro method for rearing *Apis mellifera* larvae. *Bulletin of Insectorogy*, 58, 107-111

- (11)The COLOSS Beebook- Standard Methods for *Apis mellifera* research: <http://www.coloss.org/beebook>
- (12)United States Environmental Protection Agency (US EPA), Pest Management Regulatory Agency, Health Canada (PMRA), and California Department of Pesticide Regulation (CDPR). (2012). White Paper in Support of the Proposed Risk Assessment Process for Bees: <http://www.regulations.gov/#!documentDetail;D=EPA-HQ-OPP-2012-0543-0004>.
- (13)European Food Safety Agency (EFSA), Guidance on the Risk Assessment of Plant Protection Products on Bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. And solitary bees), EFSA Journal 2013; 11(7): 3295. <http://www.efsa.europa.eu/it/efsajournal/doc/3295.pdf>
- (14)Alix, A., Lewis, G. (2010). Guidance for the assessment of risks to bees from the use of plant protection products under the framework of Council Directive 91/414 and Regulation 1107/2009. OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 40, 196–203
- (15)OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of difficult substances and mixtures, Environmental Health and Safety Publications, series on Testing and Assessment, No. 23, ENV/JM/MONO(2000)6, OECD, Paris: [http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2000\)6&doclanguage=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2000)6&doclanguage=en)
- (16)OECD (2006), current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: Guidance to application, Environmental Health and Safety Publications, series on Testing and Assessment, No. 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris: [http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2006\)18&doclanguage=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2006)18&doclanguage=en)
- (17)OECD (2016), Environment Directorate Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology, OECD Environmental Health and Safety Publications, series on Testing and Assessment, No. 239, ENV/JM/MONO(2016)34, OECD, Paris: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2016\)34&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2016)34&doclanguage=en)
- (18)Decourtye, A. et al., 2005: Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honey bee *Apis mellifera*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 48, 242-250.
- (19)Suchail, S., Guez, D. and Belzunces, LP., (2001): Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. Environmental Toxicology and Chemistry, 20, 2482-2486.
- (20)Schmitzer, S. and Kling, A., (2014): Final Report – Summary of the Results of the

International Ring Test for the Standardization of a 10 Day Chronic Feeding Test on Honey Bees (*Apis mellifera* L.) in the Laboratory.

[https://www.oecd.org/env/ehs/testing/Final_Report_of_Ringtest_Group_Bee_Chronic_Lab_Test_2014%20\(2\).pdf](https://www.oecd.org/env/ehs/testing/Final_Report_of_Ringtest_Group_Bee_Chronic_Lab_Test_2014%20(2).pdf)

(21)Schmitzer, S. and Kling, A., (2016). Report – Summary of the Results of the 2nd International Ring Test for the Standardization of a 10 Day Chronic Feeding Test on Honey Bees (*Apis mellifera* L.) in the Laboratory.

(22)Nakamura, K., Yamazaki, Y., Shiraishi, A., Kobayashi, S., Harada, M., Yoshiyama, M., Osaki, M., Okura, M., Takamatsu, D., (2016). Virulence Differences among *Melissococcus plutonius* Strains with Different Genetic Backgrounds in *Apis mellifera* Larvae under an Improved Experimental Condition. *Scientific Reports*. 6:33329 DOI:10.1038/srep33329

【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

1 研修の目的

近年ハナバチ類に属する種の個体数の大規模な減少が起きているという報告がなされており、この事象が生態系及び農業生産に与える影響について強く懸念されている。現在はハナバチ類に対して植物防疫剤等の物質が及ぼす影響評価系を確立するために、ヨーロッパ、アメリカ及びオーストラリアの試験研究施設において検討が行われている。

特にミツバチに対する影響評価試験は、2013年に幼虫単回摂食毒性試験がガイドライン化され、同時に幼虫複数回摂食毒性試験もドラフトガイダンスが発表されるなど、最も検討が進んだ段階にある。幼虫単回摂食毒性試験は、試験4日から1日間、対照物質を含む飼料をミツバチ幼虫に摂食させる試験である。しかし、本試験の条件は実際に想定される対照物質がミツバチコロニーに長期にわたり持ち込まれる状況とはかけ離れており、あまり起こりそうではない状況を想定した試験系である。よって現実的な長期にわたる接触を想定した試験系である幼虫複数回摂食毒性試験の早期ガイドライン化が重要視されている。しかし2015年に開催された”Expert Meeting on Honeybee Toxicity Testing: 22-24 April 2015, OECD headquarters, Paris”出席者によると、幼虫複数回摂食毒性試験のガイドライン化のためにはさらに検討を重ねる必要があり、2017年のガイドライン化は難しい状況とのことである。成虫10日間慢性毒性試験については、2度のリングテストを終えてガイドライン化の最終段階にあるとのことである。

日本においてもこれら検討中の新規ミツバチ影響評価試験を実施できる体制を整えることを目的として、マニュアルの策定を行う。このために、ミツバチに対する影響評価試験系を確立するためのリングテストに過去参加、また現在参加している試験施設の中からドイツ中西部にある2試験機関を選定し、そこで影響評価試験についての研修を受けた。

2 研修先

1) Bayer Standort Monheim（以下バイエル研究所）EcoToxicology 研究部（以下生態毒性研究部）、Bayer CropScience Bee Care Center（以下ビーケアセンター）、分析部

バイエル研究所 バイエルのクロップサイエンス、アニマルヘルスケア、ヘルスケア各セクションの研究部門が、1つの敷地内の複数の研究棟に設置されている。クロップサイエンスの殺虫剤研究棟内にある生態毒性研究部には、ハナバチの専門家4名、技術員3名からなる”Bee”チームがあり、ハナバチに関する研究を専門的に推進している。実験室と居室が2階の1フロアの半分を占有する。またバイエル所有剤の評価試験もGLP試験として行っている。

また”Bee Care Program”に関する広報、先端的研究成果に関する情報の共有化、教育や啓蒙を推進する機関として、バイエル研究所内に”Bee Care Center”という施設が設置され

ている。

所在地 Alfred-nobel-strasse 50, 40789 Monheim, Deutschland (図1 赤星)

2) IBACON GmbH (以下 IBACON)

1994 年に設立された民間の環境影響評価試験を実施する GLP 試験機関であり、陸生動植物、水生動植物を用いた幅広い環境影響評価試験を行っている。ミツバチの各種生態毒性試験も行っており、試験責任者 5 人、技術員 7 人、ミツバチ飼養管理者 2 人で年間 20 件以上の試験を受託している。またミツバチ成虫 10 日間慢性毒性試験では、リングテスト参加機関全体のリーダーとして結果の取りまとめを行っている。

所在地 Arheilger Weg 17, 64380 Rossdorf, Germany (図1 黄星)

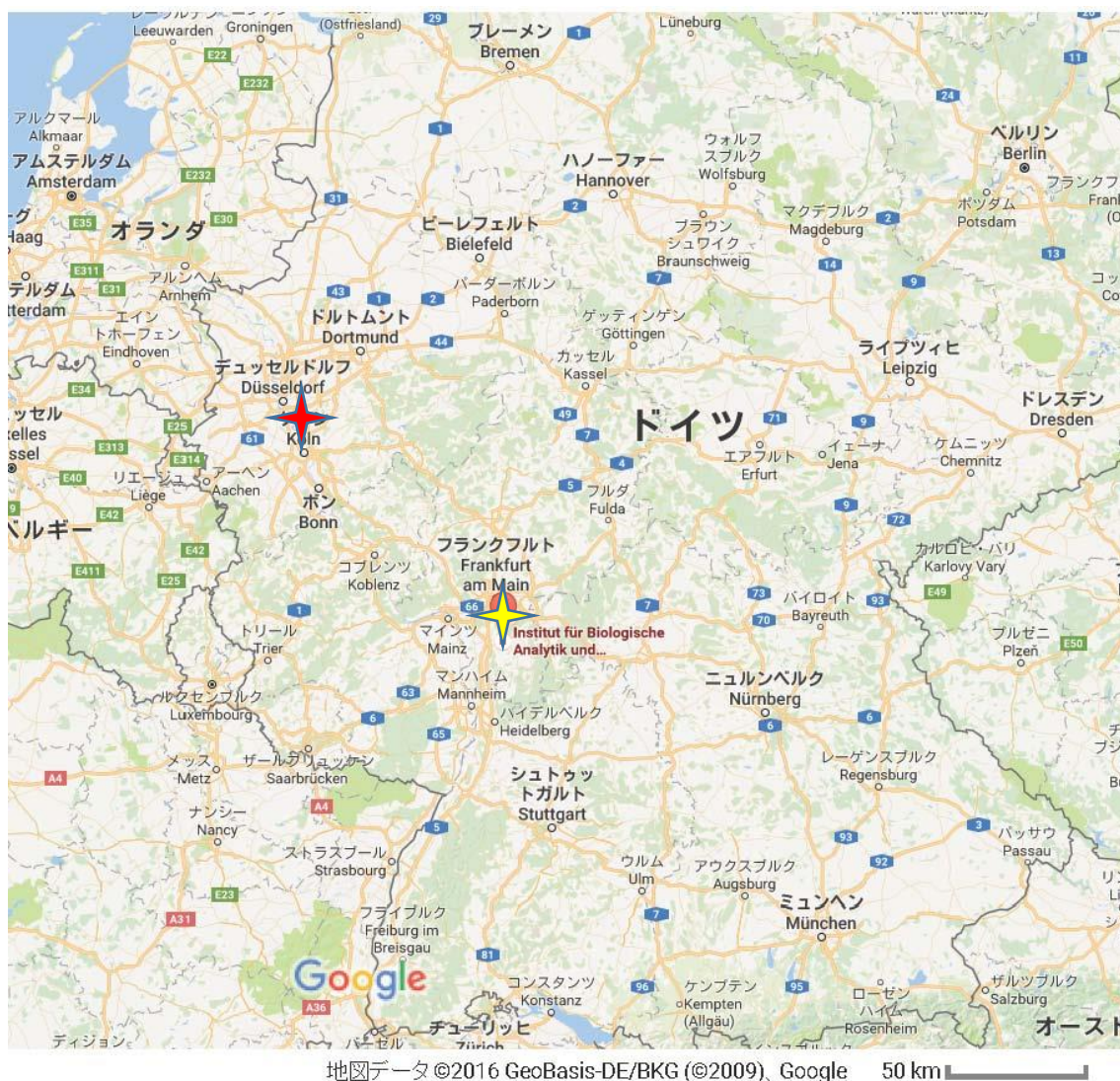


図1 研修実施施設の所在地

3 研修期間及び研修日程

研修期間

2016 年 9 月 11 日から 2016 年 9 月 25 日の 15 日間

研修日程

9 月 11 日

移動日

9 月 12 日

今回の研修をアレンジしたバイエルクロップサイエンス広報部荻上部長に、バイエル研究所まで同行してもらい、研究所内のビーケアセンター担当者に紹介してもらった。

9 月 13 日、14 日

バイエル生態毒性部見学、トレーニング開始

9 月 15 日

フィールド試験場での試験の見学（2 ヶ所）

研究所クロップサイエンス分析部の見学

9 月 16 日

3 日間のまとめ及び質疑応答

ビーケアセンターの見学

9 月 17 日、18 日

休日

9 月 19 日

イバコンへの移動日

9 月 20 日

終日イバコン見学

9 月 21 日

ビーケアセンターで講習、インタビュー、討論、施設見学

9 月 22 日、23 日

予備日、22 日にはミーティングが予定されていたが、生態毒性部メンバーが他のミーティングに出席するため、キャンセルとなった。

9 月 24～25 日

移動日

4 研修内容

1) 幼虫飼育試験

1-1) 幼虫移虫用巢板の準備

バイエル研究所における幼虫試験の実施期間は通常 4 月から 7 月であり、また特に今年度

は夏季の極端な低温のため、研修実施時期には蜂群の育児活動も低下していた。そのため実際に蜂群を用いた幼虫準備の手技について研修を行えず、説明のみ受けた（写真 1）。その際に一般財団法人生物科学安全研究所（以下 RIAS）で試験を行った際に感じていた困難について質問して、疑問を解消することができた。また実験室への巣板移動用の器具、用具についての説明を受けた（写真 2）。

質問 1

巣板を導入して女王蜂に産卵させるときに、巣板が受容されずに産卵が起こらないことがあったが、そのようなことはないか。また、ある場合は対応策など教えてもらえないか。

回答

導入した巣板に女王蜂による産卵がなされないことはよくある。GLP 試験などでどうしても 3 群からそれぞれ最低 120 匹ずつ移虫しなければならないときは、状態のいい 6 群くらいに対して巣板導入作業を行なう必要がある。そして状態のいい 6 群を常に準備するため、研究所内ミツバチ飼育区域では、試験期間中は常に 10 蜂群程度を維持するようにしている。10 蜂群は、養蜂家によって別の場所において管理されている 50 蜂群から状態のいい群を随時導入することで維持している。また導入する巣板については、新しく巣を盛ってから余り時間が経過しておらず育児にも使用されていないような黄色い色の巣板よりは、盛ってから時間が経っており育児にも何回か使用されたような硬化、黒色化した巣板を導入したほうが、受容率が高いとのことであった。

質問 2

RIAS ではミツバチ飼育区域と実験室が離れていて、巣板を実験室まで持ち込むことが難しい。ミツバチ飼育区域に近い建物で一度シャーレに移虫をしてからそれを実験室に持ち込む形を取っているが問題ないだろうか。

回答

ここでも移虫はガイドラインで推奨されているクリーンルームでは行っていない。クリーンルームを使用すると乾燥した空気が大量に流入することによって、幼虫が乾燥してしまうからである。代わりに清浄にした実験台の上で移虫を行っている。比較的清浄な環境であれば、どこで移虫を行っても問題ないと考えているので、移虫を行う蜂場の近くの建物が清浄であれば問題はないだろう。また移虫にあたり孵化後 24 時間以内の幼虫に 2 回機械的に接触することになるが、数日後の投与開始時点の群分け時にその影響による死亡個体を排除することから、そのことについても特に問題ないと考える。



写真 1 幼虫準備オペレーションに使用する器具

働き蜂は通過できるが、女王蜂は通過できない間隔で並べた金属棒で作製されたシャッター（隔王板）で、巣板を挟み込むことができる器具。挟み込んだ巣板にのみ産卵させるために、この器具内部に空の巣板と女王蜂を一定時間収納する。



写真 2 実験室に巣板を移動するための器具

巢板をこのような木箱に収納して実験室内に持ち込む。湿度を高いまま保つために、木綿の布を濡らして巢板を包む。また温度を保つためには保冷剤を暖めて巢板のそばに入れる。

1-2) 幼虫飼料の調製

幼虫飼料の調製実習を行った（写真 3）。バイエル研究所において通常飼料はクリーンベンチで調製しているが、クリーンベンチ内で分かりやすく実習をすることは困難なため、今回の研修では実験台で調製すると説明があった。

バイエル研究所では、自社製品のミツバチに対する影響評価についての GLP 試験を行っているということであった。そこで日本で GLP 試験を行うならば作成すべき、使用したピペッターやその他器具についての記録作成、キャリブレーションの実行とその記録作成、精秤量記録の作成、確認のサイン等について詳しく説明してもらった。また作成すべき書類とその保管法について、総合的なレクチャーもしてもらった。RIAS でも GLP 試験を行っているため、その方法をミツバチ試験に適用することで基本的には GLP 試験に対応することは可能であるが、ミツバチ試験に関しては、試験実施環境をさらに整備していく必要があると考えた。

それから実際に飼料の調製を行った。そして飼料調製用ローヤルゼリー及び調製した幼虫飼料の保存方法（写真 4）、混合方法についての注意等を受けた。



写真 3 幼虫試料調製

本来はクリーンベンチ内に天秤を入れて幼虫飼料を調製しているが、実習が分かりやすく行えないという判断から、実験台の上で行った。

質問

アセトンに溶解した被験物質を 0.5%相当飼料に添加する必要があった場合、これも緩やかに振とう混合するだけで均一に分布させることが可能なのか。

回答

アセトン添加量をできるだけ削減するため、0.5%相当量を飼料に添加することはよくある。0.5%アセトンを添加してから振とう混合して調製した飼料についての被験物質濃度の均一性確認試験を行ったことがあるが、どの部位でも濃度が均一であることを確認することができた。全ての被験物質において濃度確認試験を行った訳ではないため断言はできないが、均一性確認試験の結果から、この調製方法で均一性に特に問題はないと考えている。



写真 4 ローヤルゼリー及び調製した幼虫飼料の保存

調製した幼虫飼料は冷凍庫に入れて保存する。材料のローヤルゼリーも別の段に小分けして保存されていた。

1-3) 幼虫飼料の飼育容器への分注

ポジティブディスプレイメント式のマイクロピペットを用いて飼育容器に幼虫飼料を分注する研修を行った。RIAS ではエアークッション式のマイクロピペットを用いて幼虫飼料を分注している。しかし飼料は粘度が高いため、エアークッション式のマイクロピペットでは容量が正確に量り取れない懸念がある。RIAS では一定量を正確に量り取るため、ゆっくりと時間をかけてピペッティングを行うよう心がけているが、それでも動作時間のばらつきによる人為的な誤差が生じる恐れがあり、ポジティブディスプレイメント式のマイクロピペットの新規導入が必要であると考えた。またバイエル研究所では現在、定法に従い被験物質添加飼料を調製するときには飼料重量を正確に秤量、記録してから被験物質添加用溶液を添加している。しかし秤量記録作成、そのチェック、また記録保存のためにかかる労力や、記録時の人為的なミス削減するために、次年度から飼料給与に用いているものより容量が大きいポジティブディスプレイメント式ピペットを準備して、飼料を一定容量精密に量り取ってから被験物質添加溶液を加える方法を導入することを検討しているということであった。

また飼育容器とディッシュの間に入れるデンタルロールは昨年まで使っていたが、湿度交換をするときに除去する必要がある。除去作業にはかなり時間がかかることで、供試虫が長時間低温低湿度下に置かれることに問題を感じて、今年からはデンタルロールの使用をやめたという説明を受けた。今年の試験ではデンタルロールを使用しなかったが、特に問題はなかったということであった。

1-4) 幼虫の移虫

今回の研修はバイエル研究所における幼虫試験の実施期間ではなく、また今年度の夏季における極端な低温により蜂群の育児活動が低下していたため、実際に蜂群を用いた幼虫準備を行わなかったが、幼虫が存在する巣板を選んで実験室に持ち込み移虫の研修を行った。巣板から移虫器具を用いて移虫の実習を行った（写真 5）。RIAS でも行ったことがある作業なので、移虫ピンによる移虫は問題なく実行できた。へら状の器具も用意されていたが、使ったことがなかったためこれについてはうまく扱えなかった。



写真 5 移虫の研修

移虫は、乾燥を避けるためにクリーンベンチではなく実験台上で行っている。実験台は 70% エタノールで清拭・消毒する。湿度低下を防止するため、実験台に濡らした木綿布を敷き、この上に巢板を置いて作業を行った。

1-5) 幼虫への飼料給与

移虫の実習を行った翌日に、移虫前に飼育容器に幼虫飼料を分注するときに用いたポジティブディスプレイスメント式マイクロピペットを用い、幼虫に飼料を給与する研修を行った（写真 6）。実体顕微鏡下での幼虫観察も実習し、その後群分けの方法についての説明を受けた。群分け時は、本来各幼虫に番号を振り、乱数を発生させて組み分けたいが、そうすると幼虫が低温、低湿度に長時間置かれるため試験に悪影響が出る。このため、3 群からの幼虫を含むプレートが必要群数作成し、プレートに番号を振って乱数を発生させて群分けを行うとのことであった。

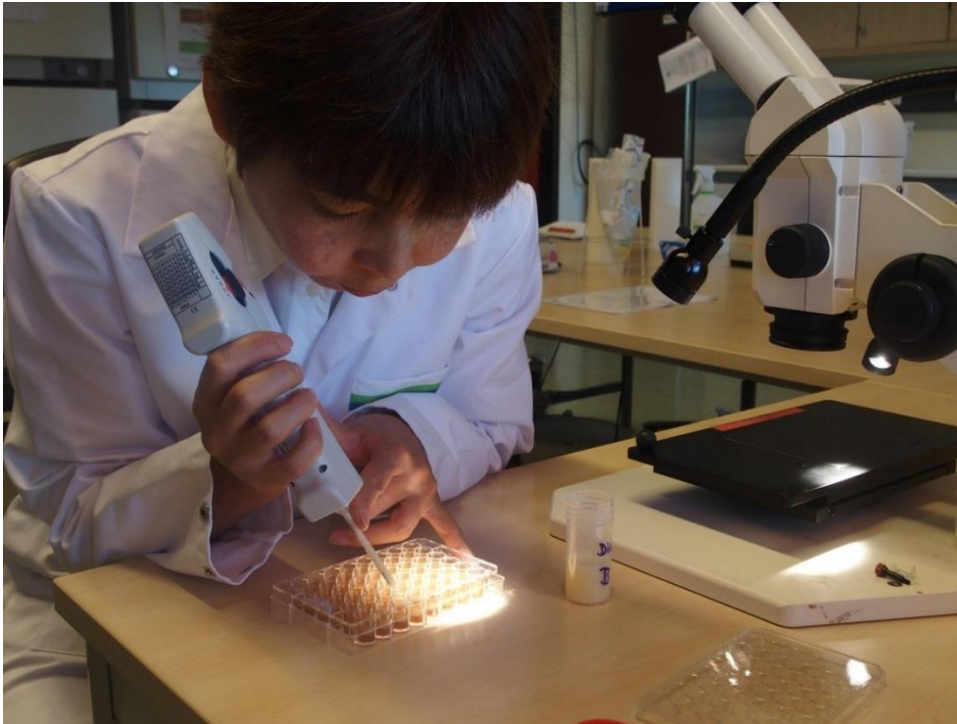


写真 6 飼料給与の研修

幼虫に対してポジティブディスプレイメント式マイクロピペットで飼料を給与した。幼虫の生死については、右側の実体顕微鏡下で確認した。

1-6) 幼虫飼育湿度条件等の変更

今回の研修時期はバイエル研究所における通常の幼虫試験の実施期間ではなく、また今年度は夏季に極端に低温が続き蜂群の育児活動が低下していた。このため供試虫を十分な個体数準備することができず、移虫終了後の継続飼育や観察は行わなかった。そのため実際に飼育条件を変更することではなく、口頭にて飼育条件の変更における注意と説明を受けた。試験 8 日以降の湿度調整に用いる飽和硫酸カリウム溶液を試験 7 日までの飽和塩化ナトリウム溶液と交換する練習を行い、また試験 15 日から幼虫飼育容器を収納するための羽化容器を見せてもらった（写真 7）。試験 15 日以降の湿度については、現在バイエル研究所では、湿度を 50%に調整するための温湿度を調節することができる環境調節機を使えない状況にあるので、試験終了まで 80%に調整したままにしているが、それでも問題はなかったということであった。また温湿度の記録に使用する機器の説明を受けた。RIAS では T&D 社の温湿度センサを使用していたが、結露のため故障することが多かった。今回の研修で収集した情報をふまえ、バイエル研究所で使用しているものと同じ機種（Tiny tag 社製、Tiny tag view2）を購入した（写真 8）。

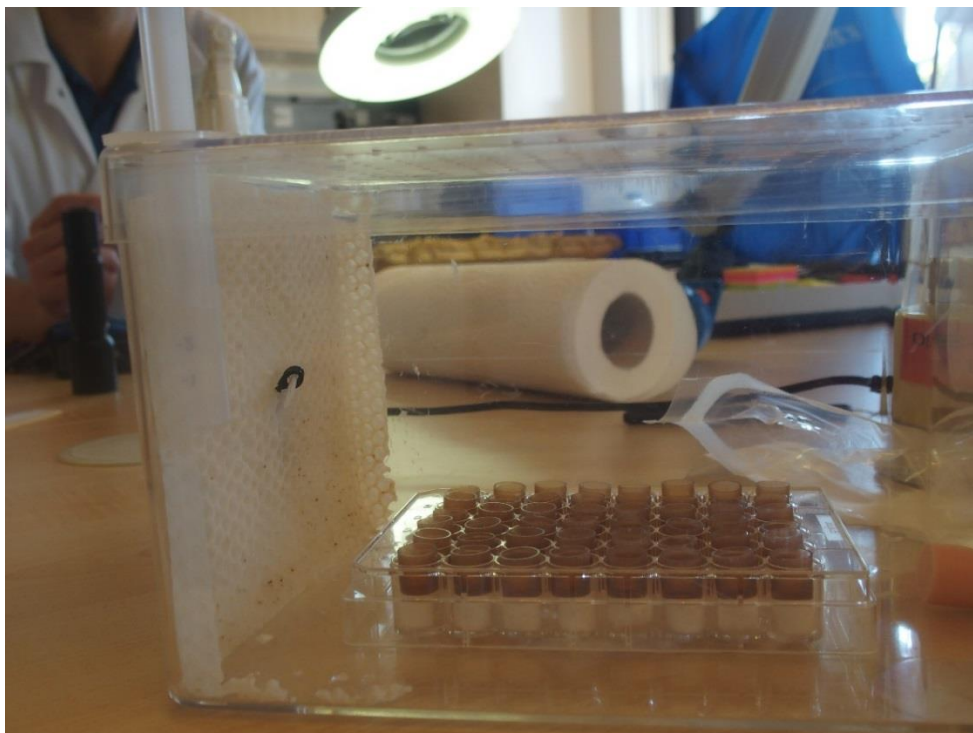


写真 7 羽化容器

容器向かって左側に、巣礎が取り付けられている。巣礎中央には、女王物質（市販品）が取り付けられている。羽化した成虫は飼育容器のような穴状の構造に潜り込む性質を持つため、飼育容器のセルに潜り込みそのまま死亡することが多い。女王物質を用いて壁面の巣礎部分に誘引することで、ある程度死亡率を低下させることができるとのことであった。



写真 8 温湿度記録機器（Tiny tag 社製、Tiny tag view2）

2) 成虫 10 日間慢性摂食毒性試験の研修

2-1) 供試虫の収集

まず飼育容器について説明を受けた（写真 9）。リングテストにも参加しているユーロフィン社から容器及びろ紙製の中敷を購入していると説明を受けたが、帰国後ユーロフィンに問い合わせたところ一般販売は行っていないということであった。そこで日本で、金属と硬質ガラス（どちらもプラスチック製品に比べて脂溶性物質の吸着が少ない）で堅牢にできていて洗浄が容易であるものを、池田理化を通じて業者に注文生産して購入した（写真 10）。また給餌器具は 2 mL のプラスチック製ディスポーザブルシリンジの先端を切除したものであるが、その作製方法及び取り扱い方法について説明を受けた。シリンジの先端はカッターやペンチで切り落とすが、このときには完全に切り落とさずわずかに根元が残るようにしないと液だれが起り、重量が正確に量れなくなるため注意が必要とのことであった。シリコン栓は冷凍してからボーラーで穴を開けるとよいとのことであった。またシリンジを入れて液だれさせずに重量を計測する天秤と給餌を行う作業場所の間を移動するための容器として、金属製のバットに切れ込みを入れたもの（写真 14）を作製するとよいとのことであった。

次に前日に実験室内恒温機に持ち込んでおいた巣板から羽化後 24 時間以内の成虫を取り、10 匹ずつ飼育容器に入れる研修を行った（写真 11）。巣板はアクリル製の大きな密閉容器に収納されていた（写真 12）。ピンセットで飼育容器に 1 匹ずつ移していったが、羽化していた成虫が予想以上に活発で、飛翔行動を取る個体も見られ、室内に逃去してしまう恐れがあった。そこで密閉容器に炭酸ガスを導入して動きを鈍くしてから、速やかにピンセットで集めた。ドラフトガイダンスでは炭酸ガス麻酔をできるだけ避けるようにと記載があるが、室内への逃去や刺針の恐れがある場合は、バイエル研究所では炭酸ガスを使用するとのことであった。時期が建群期前後で羽化する個体が多い場合には、野外から巣板を実験室内恒温機に持ち込む時間を短くすることで、羽化した成虫の活動レベルが低い状態で飼育容器に収容することができる。今回研修を行った時期は育児活動が低下していた時期であり、羽化する個体数が少なくなった巣板を使用するため実験室内に巣板を持ち込む時間も長くする必要があった。このため予想以上に羽化した成虫が活発に活動する状態となったと考えられた。

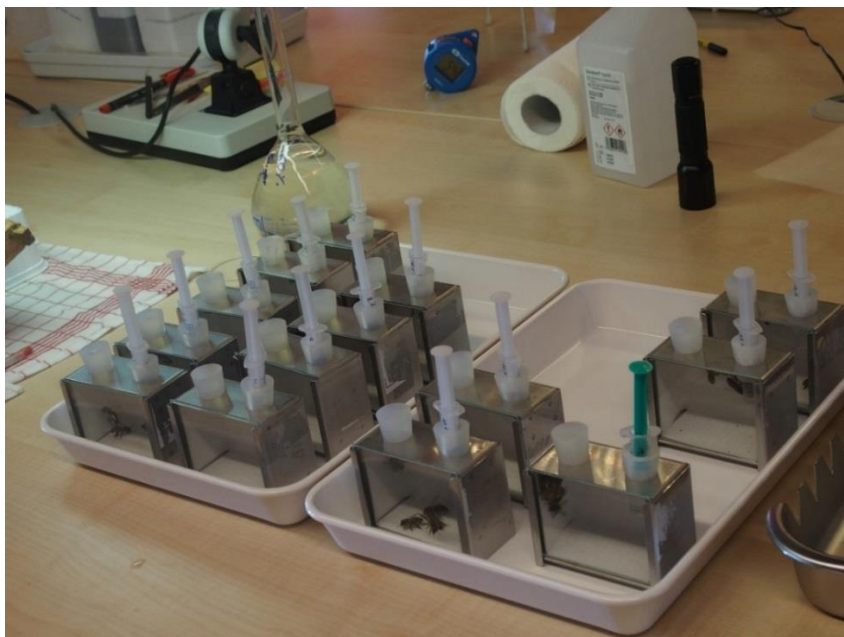


写真 9 成虫飼育容器

溶接した金属の外郭に、厚手で丈夫なガラス板を差し込んで使用する成虫飼育容器。自動器具洗浄機にて 70℃の温水を用いて洗浄できるため、被験物質と微生物を次試験へ持越すことを防ぐことができる。給餌器にはディスポーザブルのプラスチックシリンジの先端を切除したものを、ボーラーで穴を開けたシリコン栓にセットしたものを用いる。



写真 10 日本で注文生産した成虫飼育容器



写真 11 供試成虫の採集

最初は直接成虫を収集することを試みたが、飛翔して逃げ出そうとする個体が多いため、最終的には炭酸ガスで軽度の麻酔をかけてから必要数を収集した。

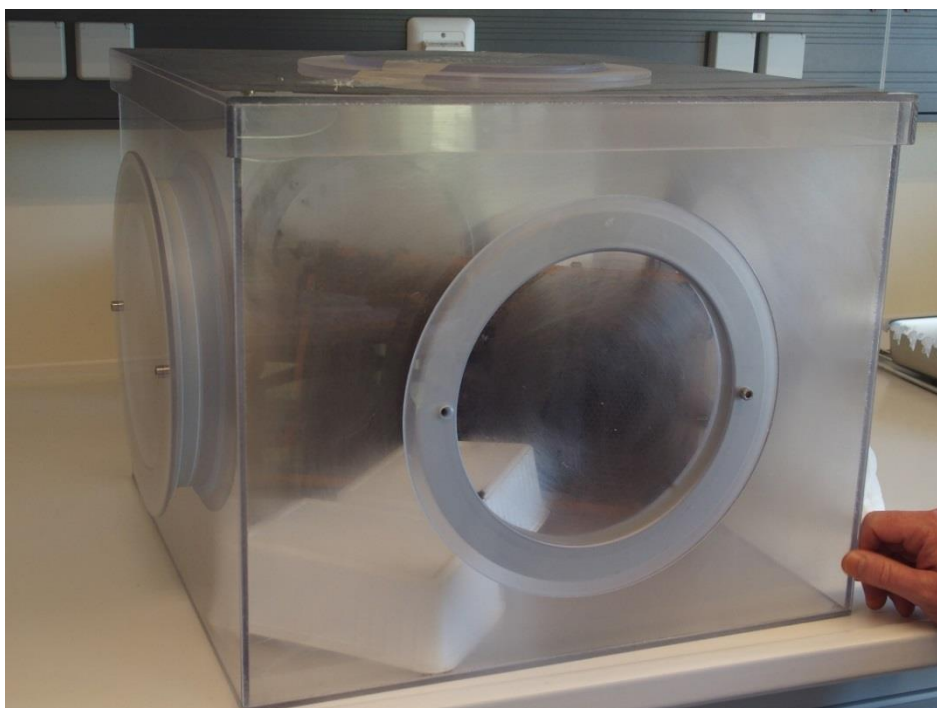


写真 12 アクリル容器に収納された巣板

壁面中央の丸い穴は開くことができそこから手を入れて成虫を収集することもできるが、研修では上部フタを外して成虫を収集した。

2-2) 飼料給与及び飼料交換

50%ショ糖液飼料の調製について研修を受けた。口の広い 500 mL メスフラスコにショ糖を量り込み、脱イオン水で溶解、メスアップした。調製した飼料をディスポーザブルシリンジ製給餌容器に導入後、精密天秤で重量を測定した。人為的ミスを低減するために、重量の記録は完全に自動化しているとのことであった（写真 13）。また収集した成虫に、重量を測定した飼料を給与した（写真 14）。また翌日、重量を測定した飼料と交換して、前日の飼料重量を測定した。

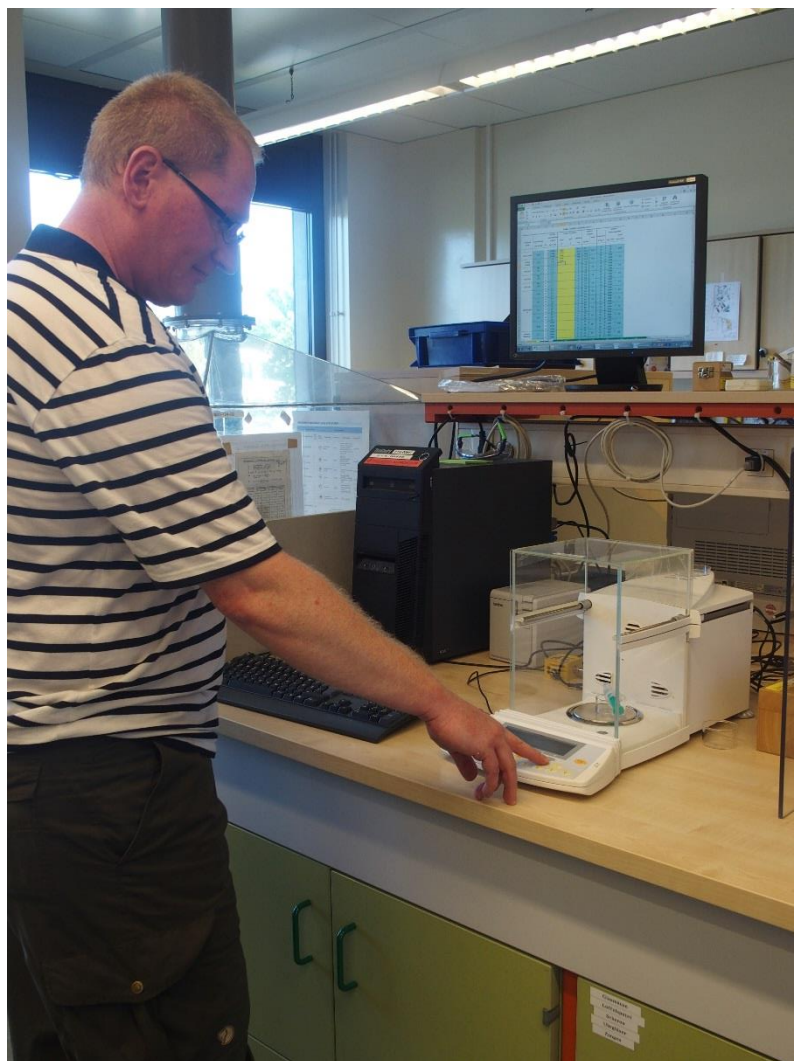


写真 13 飼料給餌容器の重量測定

精密天秤左にある PC で入力シートを開くと、精密天秤の秤量値が自動的に記録されるように制御されている。シリンジにあらかじめ番号を記入しておき、順番を間違えないように注意して秤量した。人物は成虫試験についての研修を担当してくれた技術員の方。

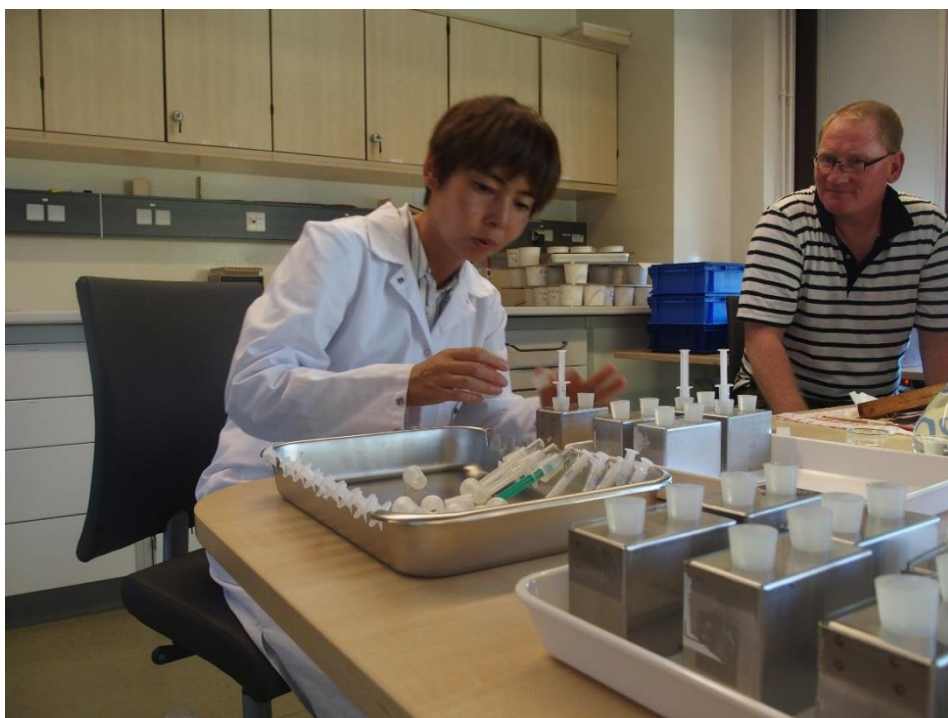


写真 14 飼料給餌容器（ディスポーザブルシリンジ）のセッティング

2-3) 観察

供試中の準備を行った翌日、観察方法について研修を受けた（写真 15）。常に陰性対照区と並べて比較するよう指導された。



写真 15 供試虫の観察

2-4) その他注意事項

飼育容器は丈夫に作られているため自動器具洗浄機で 70℃の温水を用いて洗浄している。そのため殺菌、消毒等の操作は行う必要がないとのことであった。

3) その他の研修、見学

3-1) トンネル試験（セミフィールド試験 OECD No. 75、2007 年 8 月発表）

バイエル研究所の敷地から東に約 25km 離れたところにある Burscheid には Versuchsgut Hoefchen というバイエルクロップサイエンス所有のフィールド試験場があり、そこでは養蜂家が 50 群程度の蜂群の管理を委託されて維持をしていた。180 ha の試験場敷地には 50 ha の果樹園と 70 ha の畑地があり、試験計画に応じて必要な植物を必要な面積に植栽することができる。ミツバチのセミフィールド試験では、必要な植物（特に指定がなければ *Phacelia tanacetifolia*：北米原産の一年草植物で蜜源植物として広く用いられている。和名ハゼリソウ）を植栽、開花後に大きさ 10m×5m のビニールシートで覆ったトンネルを必要数（通常であれば反復数 3、3 濃度投与区、陰性対照区及び陽性対照区の計 5 区で全 15 トンネル）設置しそこに 1 群ずつ蜂を導入するということであった（写真 16）。試験は終了している時期であったが、見学時には小規模な簡易試験（反復数 2、2 濃度区及び陰性対照区の 3 区で計 6 トンネルを使用）を行っていたので実際にデータ収集しているところを見学できた（写真 17 及び 18）。見学した試験では園芸用製剤の影響試験ということで、全トンネルにプランターをほぼ全面積導入し、プランターに植栽した植物に対して被験薬剤を定められた方法で施用して蜂群に対する影響を評価していた。



写真 16 Burscheid にある Versuchsgut Hoefchen フィールド試験場
ビニールシートで覆ったトンネル内でセミフィールド試験を行っていた。



写真 17 残留試験を行うための花粉の採集

園芸用製剤の評価試験のために、実際に製剤の散布対象である園芸作物をトンネル内一面にプランターに植えて導入し、それに製剤を散布指示に従い散布したのちにミツバチを導入していた。写真は残留試験のために花粉採集器を蜂群巢門前に設置して、集めた花粉ダンゴを採集しているところ。人物はバイエルと契約している養蜂家の方で、蜂群提供だけでなく試験計画や観察も担当する。



写真 18 訪花する蜂数の確認

訪花活動を 1 日 2 回、 $1\text{m} \times 1\text{m}$ の 2 ヶ所のグリッド内で観察する。これをトンネル内に蜂群をおく 7 日間につき毎日行うとのことである。

またバイエル研究所敷地から北東に 4.2km 離れたマンハイム郊外にも Laacher Hof というバイエルクロップサイエンス所有の野外試験場があり、ミツバチのセミフィールド試験を実施しているということであった。その時は丁度トンネル試験後の 3 週間の観察期間にあたっている蜂群が維持されているということで、観察実施時に見学することができた（写真 19 及び 20）。ガイドラインでは 7 日おきに全群で巣板の写真を撮影し、幼虫の羽化率（陰性対照で通常 80% くらいである）を算出するということがあったが、蜂群状態が悪く育児活動が不十分であったことから、見学時には巣板活用比率のみを観察、記録していた。



写真 19 Laacher Hof の野外試験場で実施されていたセミフィールド試験

セミフィールド試験では、トンネル内において 7 日間被験物質と接触させた群をその後野外で 3 週間観察を続け、育児活動に対する影響を観察する。



写真 20 トンネルでの被験物質との接触後 3 週間の観察

本来は 7 日に 1 度巣板活用状況を写真撮影して幼虫死亡率を算出するが、育児活動が不十分であったため写真は撮影せず巣板活用状況の記録のみ行っていた。

セミフィールド試験、実験室内試験共に専門契約をしている養蜂家が 50 群程度の蜂群を維持して必要に応じて供給していた。またその養蜂家は試験に応じた適切な状態と数の蜂群を随時供給するだけでなく、セミフィールド試験の試験計画を策定してこれを実施し、試験に問題が生じた際にはこれに適切に対応できるエキスパートであるという説明を受けた。その説明から、このような蜂群と試験の両方に精通したエキスパートの存在が、バイエルのミツバチ試験の品質を担保していることが伝わってきた。

またドイツにおいてもバロア病の被害は大きく、薬剤投与なしでは通年で蜂群を維持できないということであった。具体的には養蜂家は夏季に蟻酸処理を行い（写真 21）、冬季にはシュウ酸処理を行っているということである。バイエルで販売している殺ダニ剤は使わないのかと質問したところ、蠟などへ残留があるため試験に使用する蜂群には一切使用しないということであった。



写真 21 殺ダニ剤である蟻酸処理の様子

日本で殺ダニ剤は現在ピレスロイド系のものが 1 剤と有機窒素系のものが 1 剤承認されているのみである。ドイツでのミツバチ試験において残留がないという理由で使用されていた蟻酸もシュウ酸も、日本ではまだ承認されていない。

3-2) ハナバチの試験

本研修では新規ミツバチ影響評価試験を実施するための情報収集が目的であったため、その他のハナバチを対象とした試験についての研修プログラムは準備されていなかった。しかしハナバチに対する影響評価の重要性については説明があり、影響評価試験の検討作業を見学することができた。カナダ、北米でアルファルファポリネーション用に販売されているハキリバチを用いた急性毒性試験検討は順調に進行していた(写真 22)。マルハナバチも、ポリネーション用に販売されているものから働き蜂を採集し、個体飼育を行って評価試験系をほぼ確立したとのことであった。その他のハナバチでは、給餌方法が難しく難航しているということであった(写真 23)。



写真 22 実験に使用するハキリバチ

販売されているハキリバチの繭から成虫が羽化してくるところ。羽化した幼虫について、被験物質を混合した飼料を給餌して個別に飼育したところ、評価が可能であると考えられたということであった。



写真 23 ハナバチへの給餌方法の検討

ツツハナバチの単独飼育方法の確立のために、給餌方法を検討しているところ。*Osmia bicornis* を、ミツバチ幼虫飼育容器を給餌容器として単独飼育したところ、飼料を摂食できずに死亡してしまったということであった。

3-3) 分析部の見学

生態毒性研究部のある建物とは別の棟にある、ハナバチに関する被験物質濃度分析を専門に行う分析部を見学した。世界各国 1000 ヶ所のバイエル試験圃場から毎年 10000 検体程度の分析用サンプルが冷凍輸送されている。検体は主に植物保護製剤が施用された作物で、各国の農薬残留量について調査をするために送られてくる。それらを 1 日につき 20 から 40 検体ずつ濃度分析を実施していき、分析終了後も再分析に備えて検体を 2 年間冷凍保存するようになっているということであった。バイエルでハナバチ保護に関わる試験に対して使われる予算は、年間で 550 万ユーロだという。各国からの分析用サンプル輸送については厳重な温度管理を実施し、毎年研究所職員が輸送過程を視察して温度管理の適正さについての確認が行われている。またバイエルの新規製剤に対するミツバチ影響評価試験における被験物質飼料調製溶液と調製された被験物質添加飼料における被験物質濃度確認のための試料や、セミフィールド試験で採取されたハチミツ、花粉、幼虫、蜜蝋等における被験物質残留試験のための試料も、全てこの分析部において分析を実施しているということであった。

4) IBACON での情報収集

IBACON のミツバチ試験の試験責任者の一人である Study Director 関根達也氏に、IBACON における環境影響試験の試験実施状況についての概要説明を受け、施設の見学をした。その後、特にミツバチ試験やマルハナバチ試験の実施状況について、詳細な説明を受けた。

IBACON でもミツバチ試験の試験実施期間は 4 月から 7 月になるまでの約 3 ヶ月間であ

り、その間だけで各種のミツバチ試験を毎年約 20 試験程度実施している。試験は今回の研修目的であるミツバチ幼虫単回及び複数回摂食毒性試験と成虫 10 日間慢性毒性試験、セミフィールド試験と、オーメン試験（EPPO Bulletin に、P. A. Oomen、A. de Ruiter と J. van der Steen が 1992 年 12 月に発表した）を受託している。オーメン試験とは蜂群を使用して、被験物質を含んだ各種濃度の糖液を巣箱内に給餌して摂取させ、その後の幼虫発育を観察する試験である。蜂群は野外に同所的に、異なる処理区の群を設置する。通常の訪花採集行動は試験的に制限しないため、給餌した被験物質溶液摂取量にばらつきが生じるという問題があるが、蜜現植物やトンネルなどの準備が必要ないためセミフィールド試験と比較して試験が行いやすい。幼虫摂食毒性試験とセミフィールド試験の中間的な位置付けの試験といえる。

ミツバチ試験の試験責任者は 5 人、技術員は 7 人、ミツバチのオペレーターは 2 人の計 14 人体制で試験にあたっているという。ただし、ミツバチのオペレーターはオフシーズンには休暇を取るか、他の環境影響試験を行っているという。

5) 総括と感想

今回海外で先進的にミツバチ影響評価試験を行っている試験・研究機関で研修を受ける機会を得、日本においてこれら影響評価試験を実施するための有用な情報を、数多く収集することができた。

幼虫を用いた影響評価試験については、RIAS でもこの数年間で実施してきたものであり、今回研修に行ったバイエル研究所や IBACON など、リングテストで先進的にこの評価試験に取り組んでいる機関と手技を比較しても、大きく異なることが確認できた。

また RIAS にて試行錯誤しながら、幼虫影響試験が実施できるようにこれまで工夫をしてきたが、今回の研修により、異なった視点を持った研究機関で行っている試験を見学することで、ミツバチ影響評価試験を客観的に捉えることができるようになり、大変有用であった。1 箇所だけで試験をしていると、そこで行いやすいように試験系を構築してしまい、他の視点や可能性に気づけないことが多々ある。そのことに気づくことができ、試験に対する客観的な視点を持てたことは、日本で複数の研究機関においてミツバチ試験を実施できるようにするためには、有用なことと感じた。

成虫 10 日間慢性毒性試験についてはこれまで RIAS で実施したことがないため、研修した内容をそのまま帰国後に実証試験として実施した。そのため実証試験の試験時期が遅くなり、成虫のジメトエート剤に対する LC₅₀ はリングテストにおける平均値と比較して若干の低値となった。しかし実証試験の結果はリングテストの結果と大きく乖離しておらず、今回の研修成果を活かして、試験成立基準を満たした試験を実施できた。

手技の習得については以上のような成果があったが、試験の実施のための蜂群準備についても、より有用な情報を収集することができた。今回研修した 2 研究所とも、試験のために

専門の養蜂家を配置して 50 から 100 蜂群を通年で維持していた。どちらの試験施設もセミフィールド試験を行う施設であるため、試験に使用する蜂群数は実験室内試験のみの場合より多く必要としている。しかし、実験室内試験に限っても、両試験施設とも常に良好な状態の蜂群を試験施設内に 10 群以上維持していた。これは、手技や施設も重要であるが、何よりも良好な状態の蜂群を十分量確保することが、安定した試験実施に必須であることを意味している。

ドイツでも殺ダニ剤を使用せずには通年で蜂群を維持することはできないということであった。RIAS でも殺ダニ剤を使用しない場合、蜂群は夏季から秋季にかけて全て失われてしまう。夏季の殺ダニ剤処理は蜂群維持に必須であるため、日本で建群期以降でも試験を行う場合には、適切な殺ダニ剤を処理した後、4 週間の休薬期間を設けた蜂群が常に必要数存在するように計画されなくてはならない。

また試験用蜂群に対する適切な薬剤とは、ドイツで使用されているような残留もせず抵抗性も発生しない蟻酸やシュウ酸のような薬剤であるのか、あるいは巣板等に残留し、連用によってダニに抵抗性が発生することが分かっている、現在日本でただ 2 種認可されているピレスロイド系殺ダニ剤かあるいは有機窒素系殺ダニ剤でも許容できるのかについては、速やかに検討する必要があると考えられる。

研修の計画及び調整でお世話になった方々

荻上敬子

バイエルホールディング株式会社 広報本部 クロップサイエンス部門広報部長

Keiko.ogiue@bayer.com

藤村佳樹

バイエルクロップサイエンス株式会社 執行役員 RPGA 本部長

Yoshiki.fujimura@bayer.com

現地で研修を行った方々

Bayer CropScience AG

R&D RS EnSa Ecotoxicology

Dr. Maria Teresa Almanza

Teamleader – Ecotoxicology, Bees

Mariateresa.almanza@bayer.com

Dr. David Gladbach

Ecotoxicology Expert – Bees

David.gladbach@bayer.com

Dr. Nina Exeler
Ecotoxicology Expert – Bees
Nina.exeler@bayer.com

Bayer CropScience AG
Bee Care Center

Dr. Christian Maus
Global Pollinator Safety Manager
Christian.maus@bayer.com
Gillian Mansfield
Communications and Social Media Manager
Gillian.mansfield@bayer.com
Coralie van Breulelen-Groeneveld
Head of Bayer Bee Care Center
Coralie.vanbreykeken-groeneveld@bayer.com

Bayer CropScience AG
Global Regulatory Manager Insecticides

Dr. Hans Werner Rauen
Hans-werner.rauen@bayer.com

IBACON GmbH

Tatsuya Sekine
Study Director
Tatsuya.sekine@ibacon.com

【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

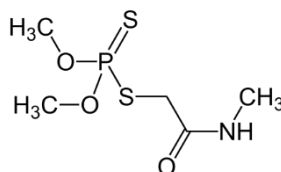
1) 被験物質

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	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

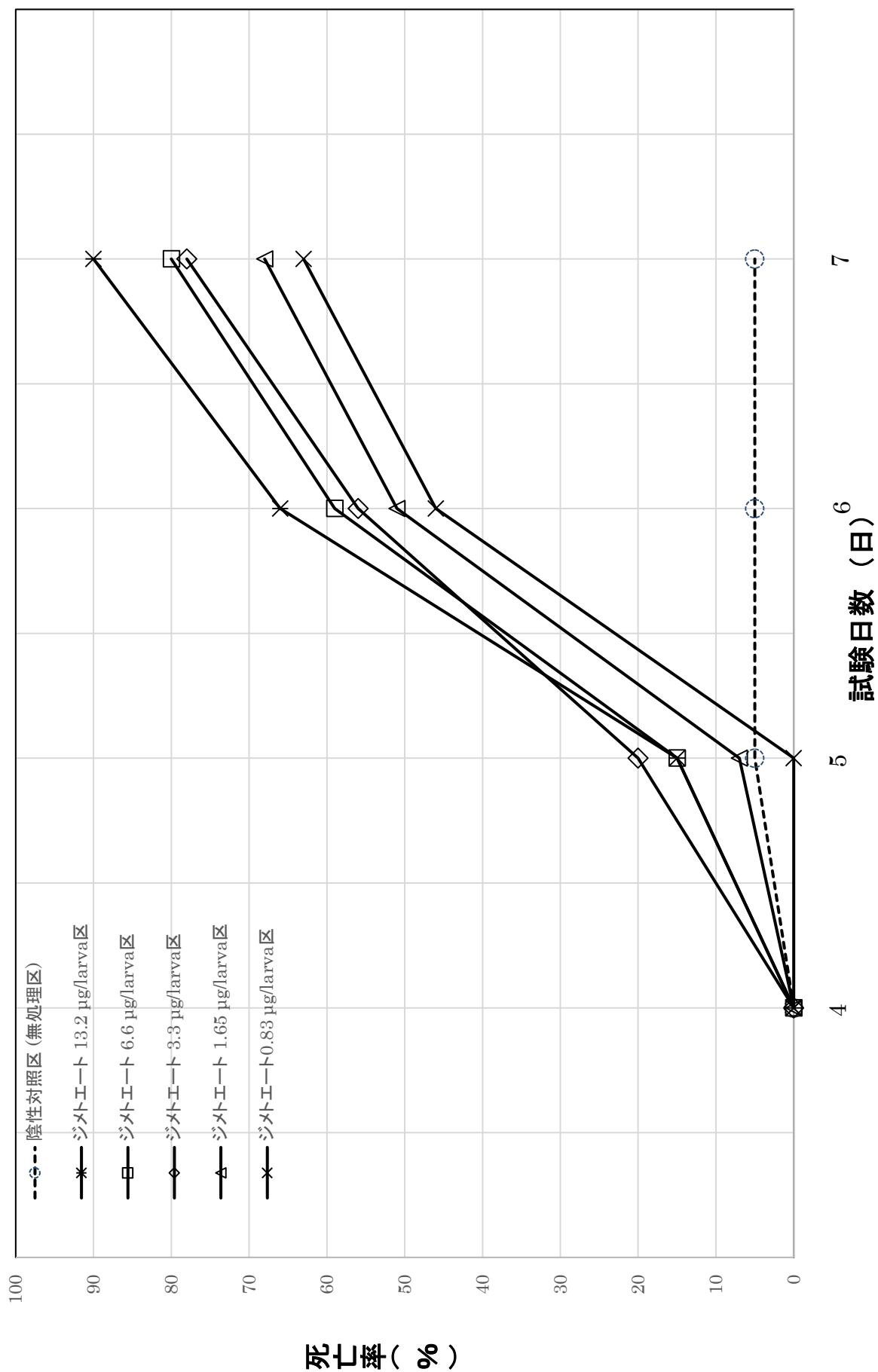


図1 ジメトエートのセイヨウミツバチ幼虫を用いる単回投与毒性試験1回目における累計死亡率推移

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

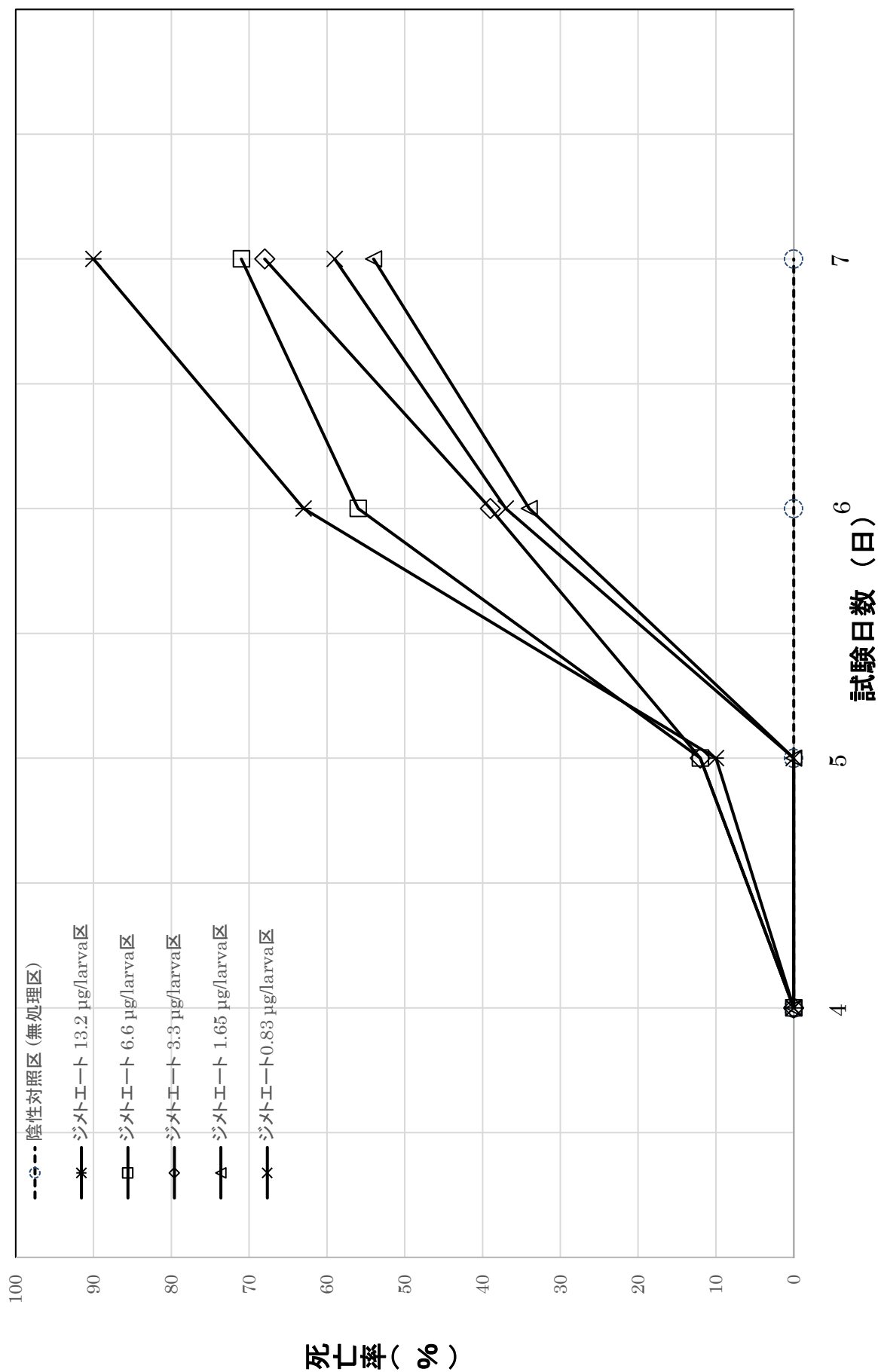


図2 ジメコートのセイウミツバチ幼虫を用いる単回投与毒性試験2回目における累計死亡率推移

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

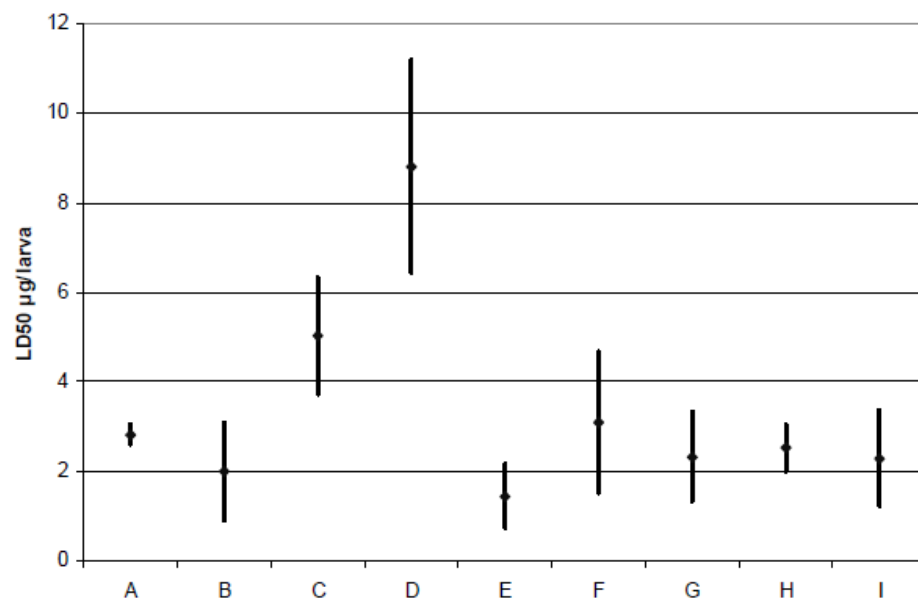


Figure 3 Mean LD50 for each test ($\pm$ standard deviation)

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

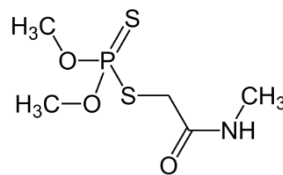
1) 被験物質

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 $34.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $95\% \pm 5\%$ 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

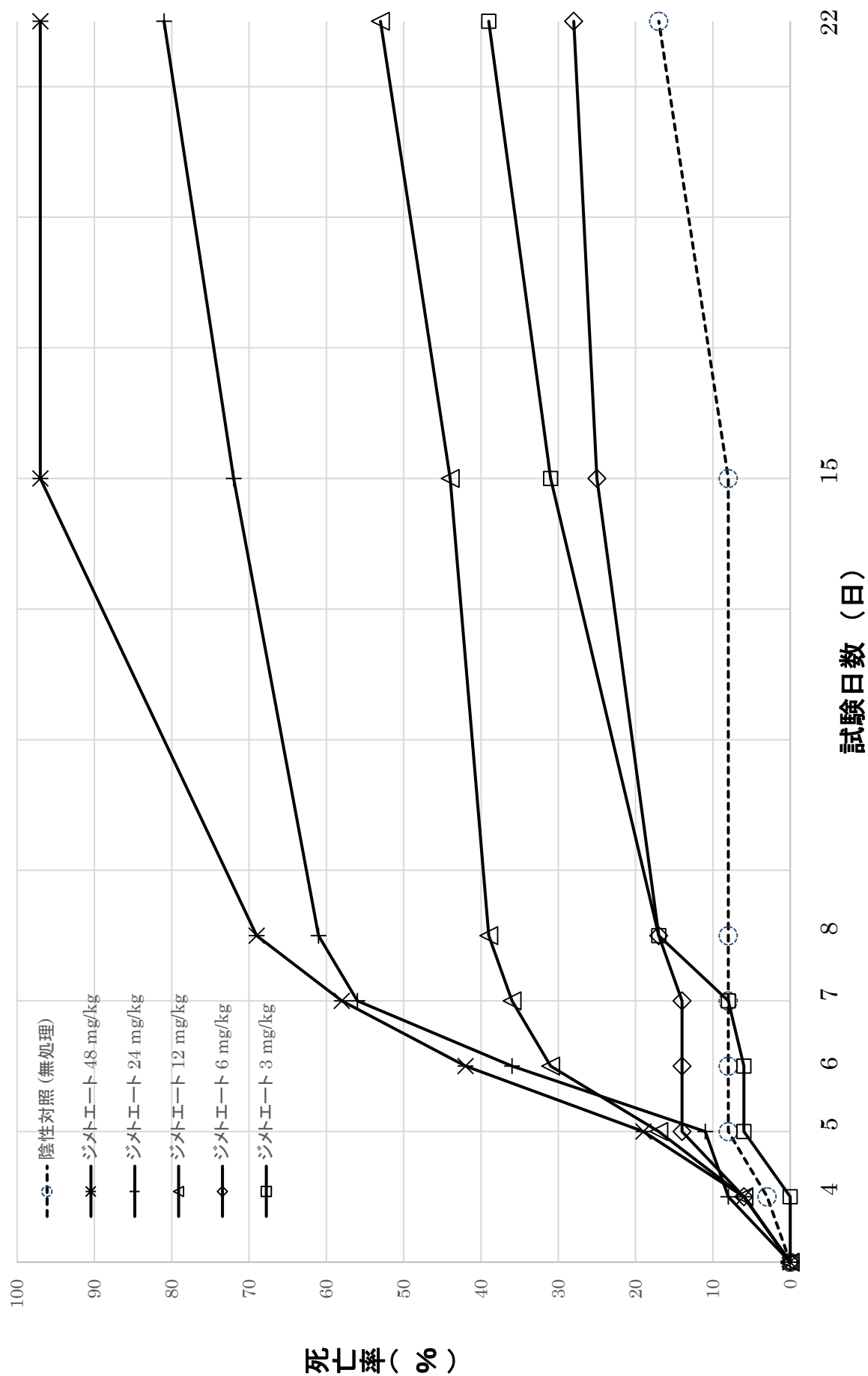


図1 ジメトエートのセイウミツバチ幼虫を用いる複数回投与摂食毒性試験1回目における累計死亡率推移

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										累計死亡数/ 供試匹数	試験22日に おける羽化数	EC ₅₀ 値 (95%信頼限界)	NOEC	累計死亡率(%)									
		試験日数 ^a														試験日数									
		3	4	5	6	7	8	15	22	3	4					5	6	7	8	15	22				
陰性対照 (無処理)	36	0	1	0	0	0	0	3	4			8/36	28/36			0	3	3	3	3	3	3	11	22	
ジメトエート 48 mg/kg	36	0	7	6	4	3	2	11	2			35/36 [*]	1/36 [*]			0	19	36	47	56	61	92	97		
ジメトエート 24 mg/kg	36	0	2	4	8	5	2	5	4			30/36 [*]	6/36 [*]	8.91 mg/kg		0	6	17	39	53	58	72	83		
ジメトエート 12 mg/kg	36	0	1	4	2	4	0	5	2			18/36 [*]	18/36 [*]	(6.74~11.43 mg/kg)	6 mg/kg	0	3	14	19	31	31	44	50		
ジメトエート 6 mg/kg	36	0	1	1	0	1	0	2	2			7/36	29/36			0	3	6	6	8	8	14	19		
ジメトエート 3 mg/kg	36	0	0	0	0	3	1	6	2			12/36	24/36			0	0	0	0	8	11	28	33		

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

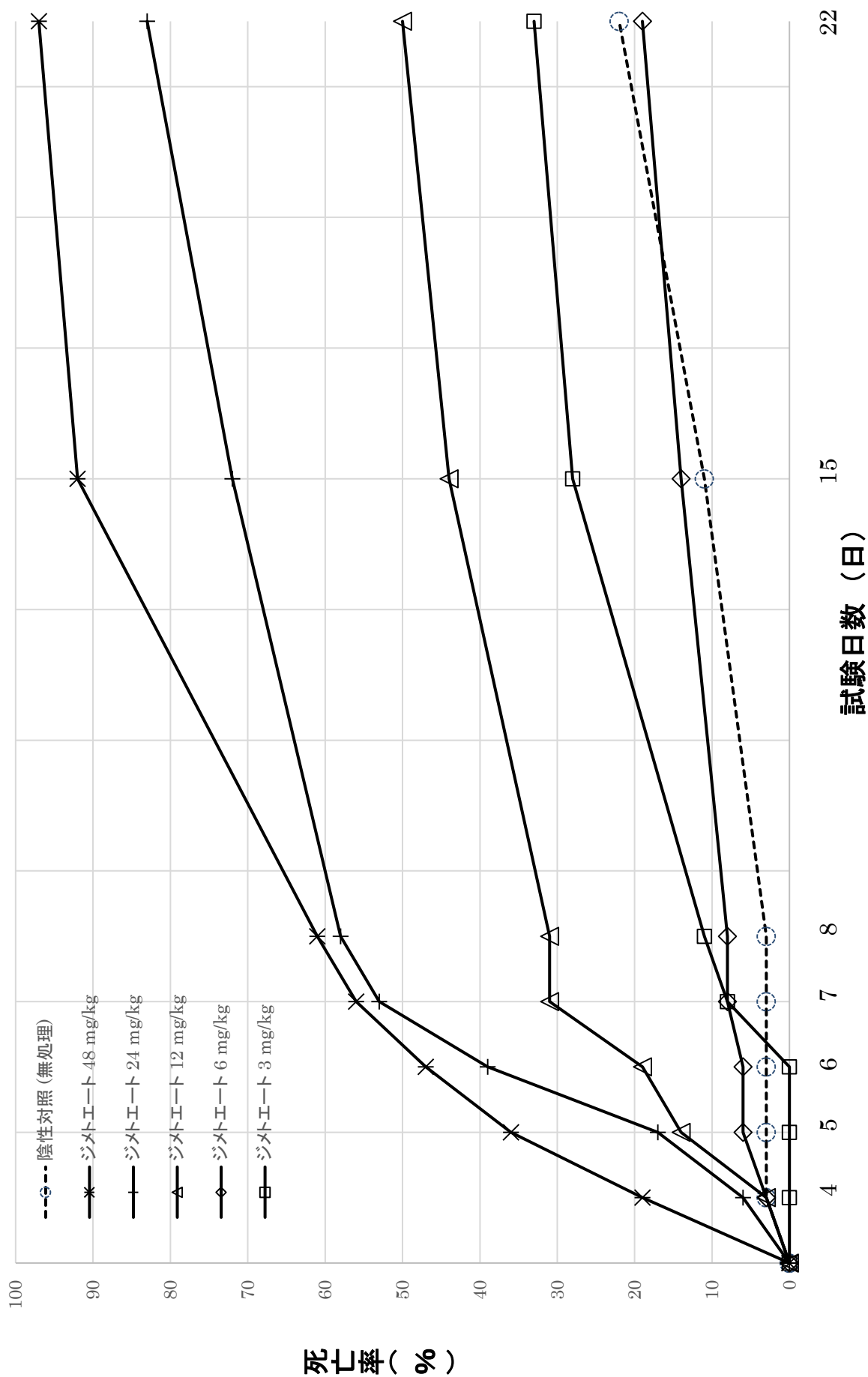


図2 ジメトエートのセイヨウミツバチ幼虫を用いる複数回投与摂食毒性試験2回目における累計死亡率推移

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

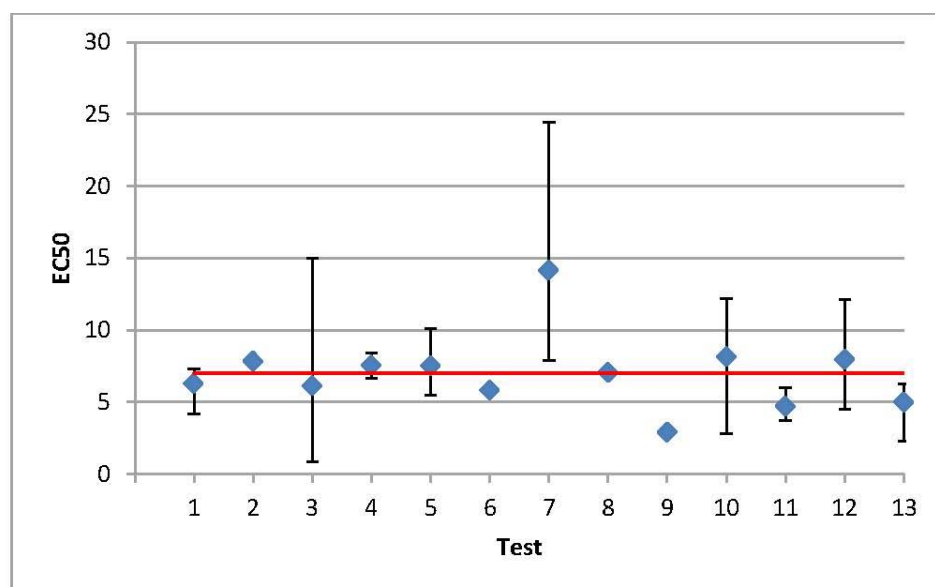


Figure 2: EC_{50} values ($\pm 95\%$ CI when calculation was possible) for each test (the red line indicates the mean value: 7.01 mg.Kg^{-1})

“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

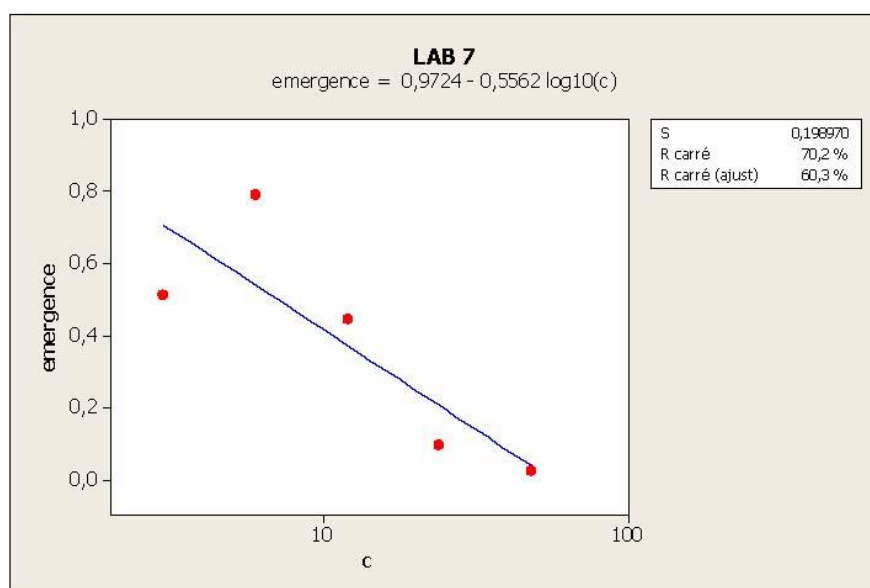
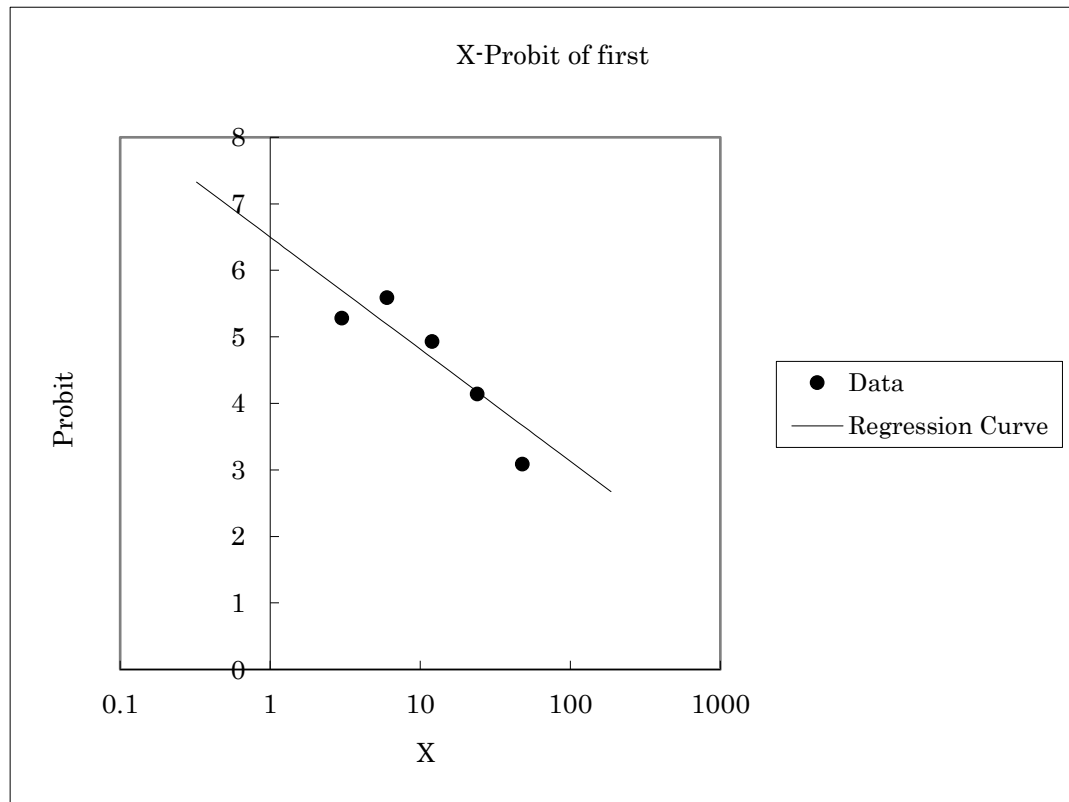


Figure 3: Effect of dimethoate concentration on emergence rate on D22

“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

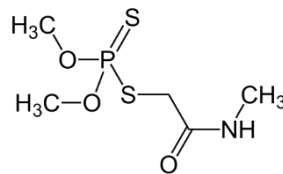
1) 被験物質

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	累計死亡率(%)										
		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	

*: フライシヤ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

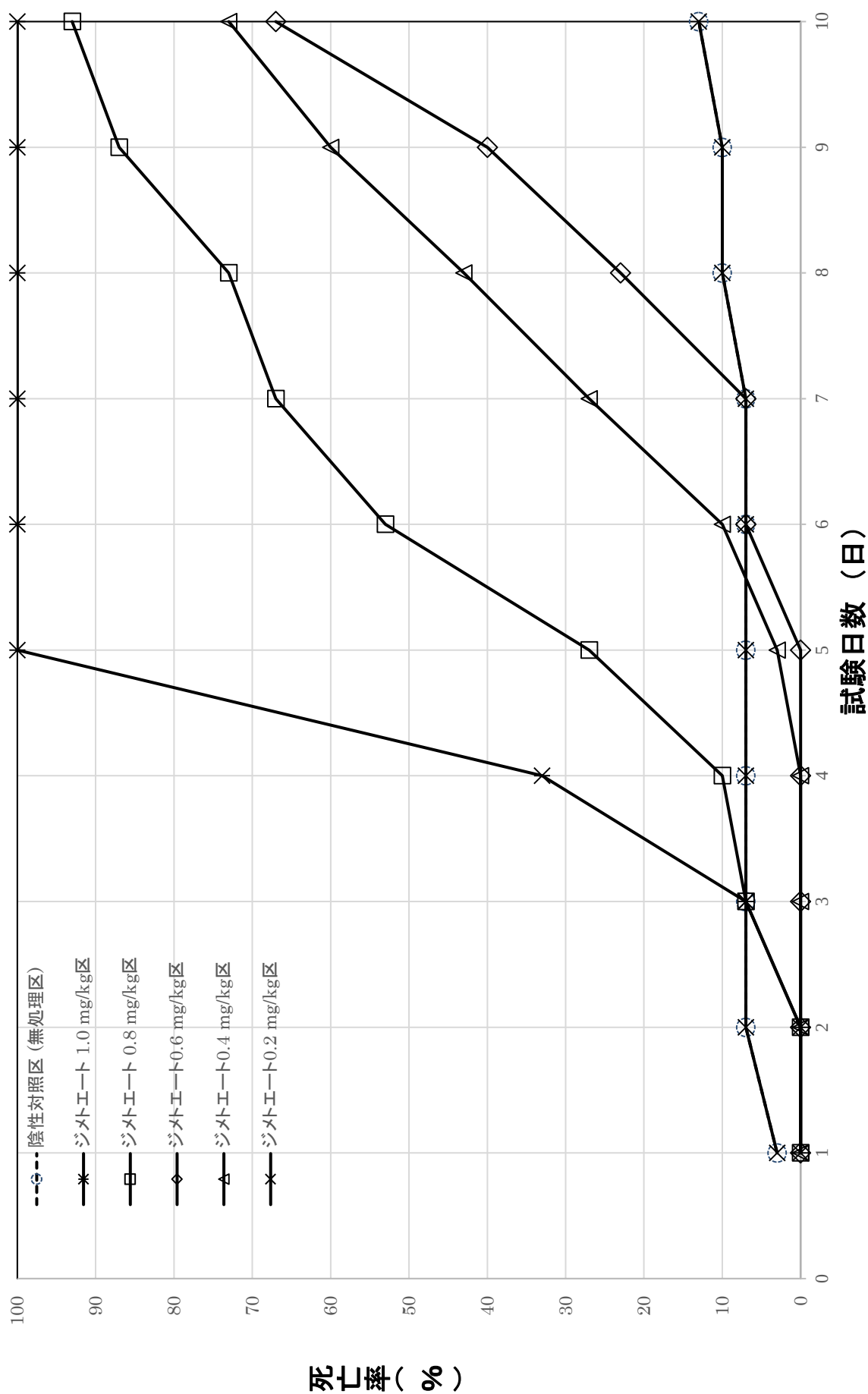


図1 ジメトエートのセイウミツバチ成虫を用いる10日間慢性毒性試験1回目における累計死亡率推移

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

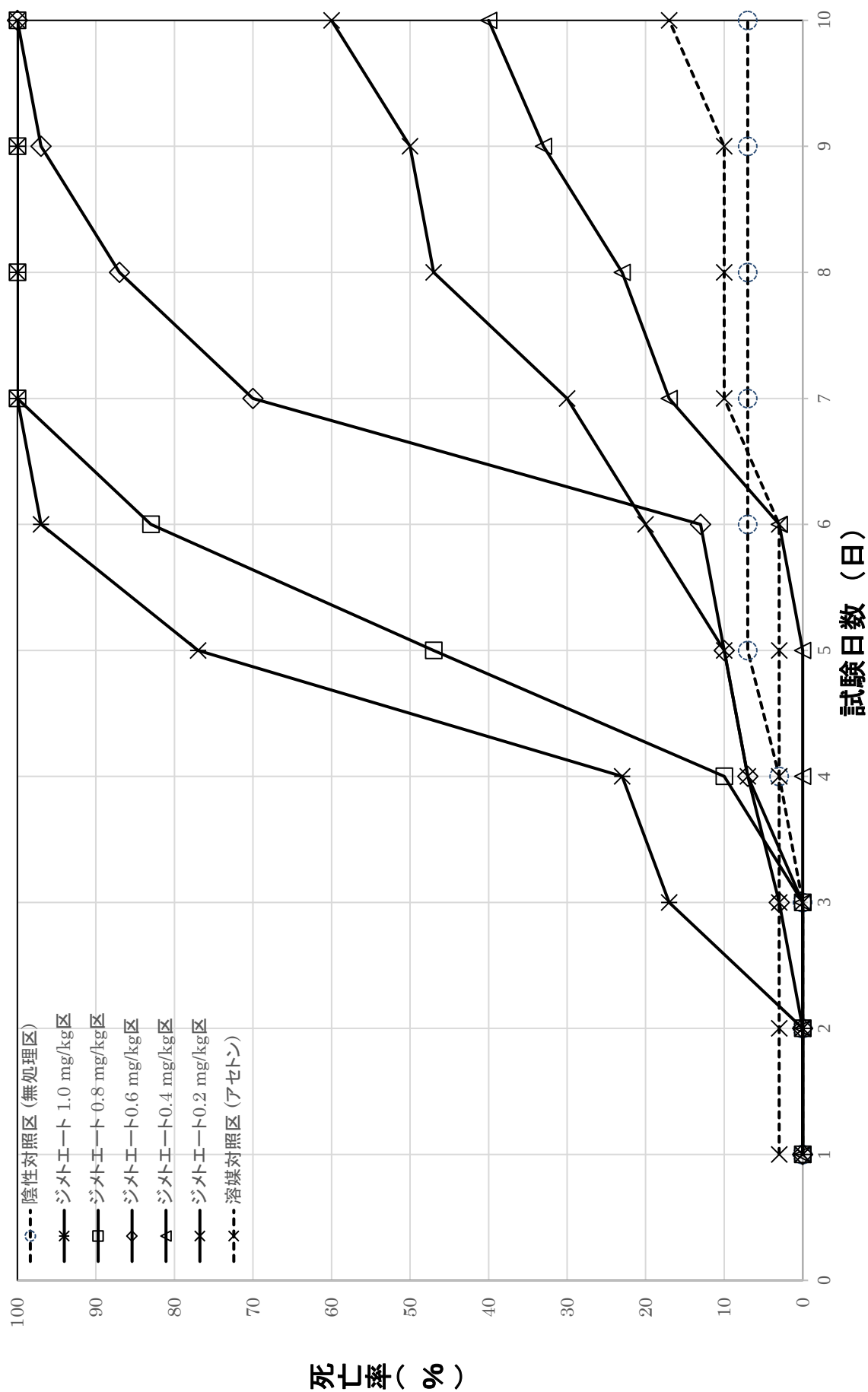


図2 ジメトエートのセイウミツバチ成虫を用いる10日間慢性毒性試験2回目における累計死亡率推移

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

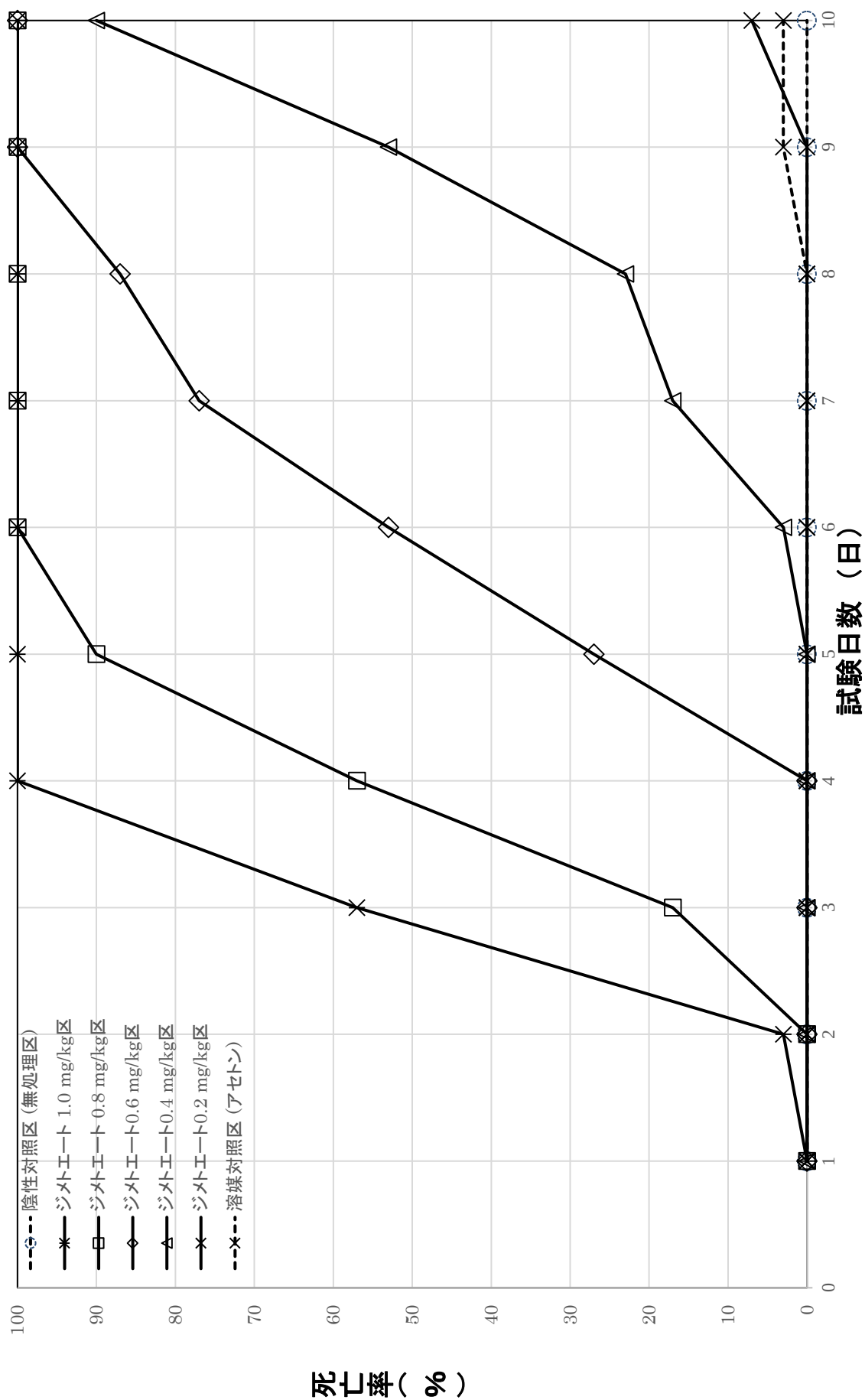


図3 ジメトエートのセイヨウミツバチ成虫を用いる10日間慢性毒性試験3回目における累計死亡率推移

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	リンゲテスト平均*	1回目試験	2回目試験	3回目試験	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)	0.029 (0.006)	0.034 (0.008)
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)	0.022 (0.006)	0.028 (0.006)
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)	0.019 (0.006)	0.020 (0.005)
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)	0.012 (0.004)	0.013 (0.002)
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)	0.007 (0.002)	0.007 (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

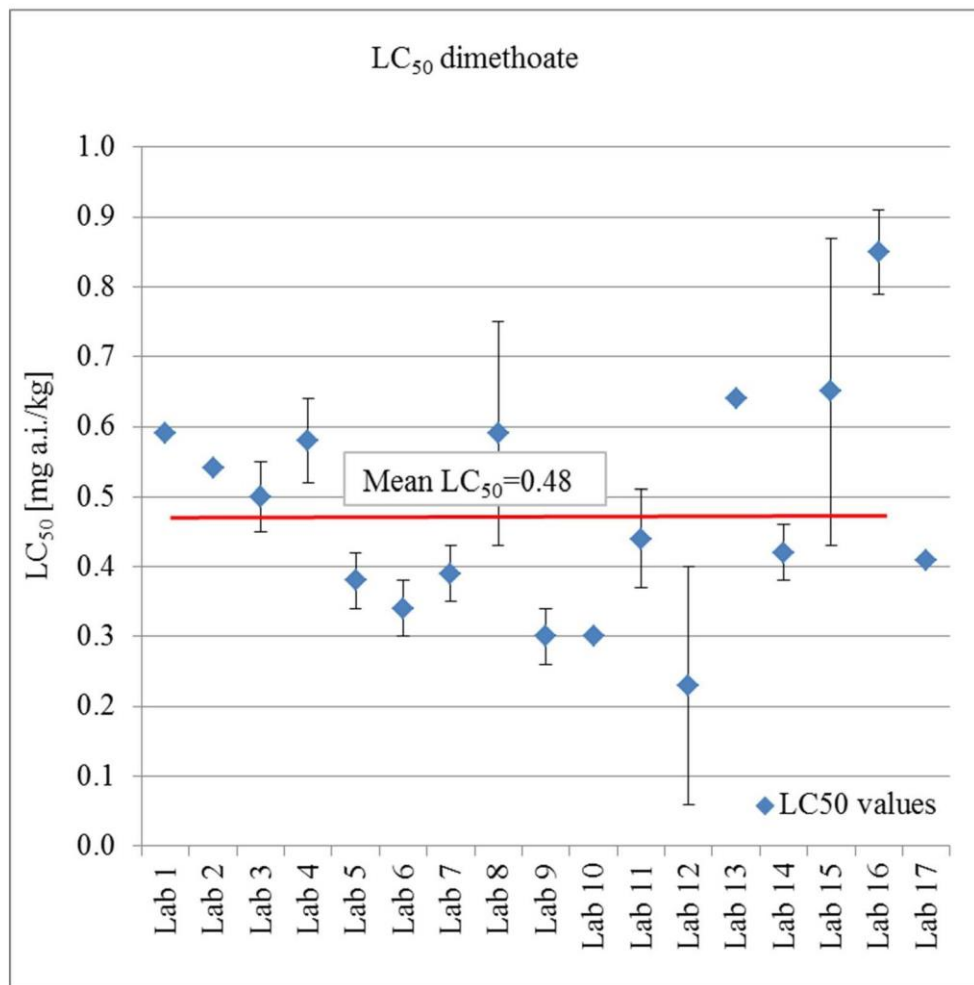


FIGURE 3 LC₅₀ values of dimethoate after 10 days; mean value is visible in figure

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	SD
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	9.2
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	9.4
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	5.4
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	5.8
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	9.2
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	8.4
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	8.5

* 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



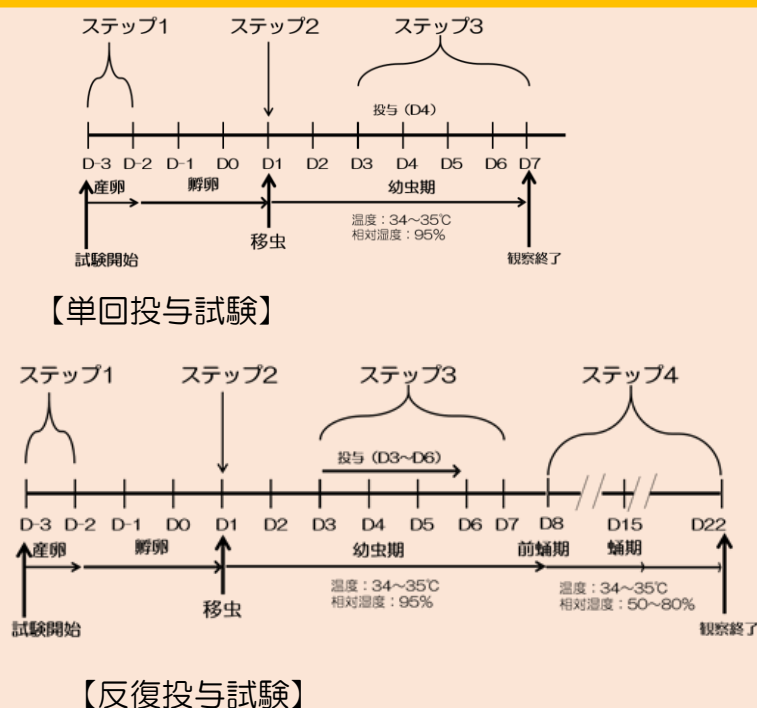
1. 概略

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

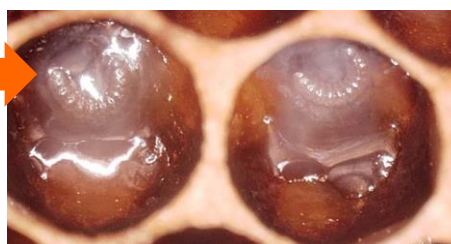


孵化 1 日目



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

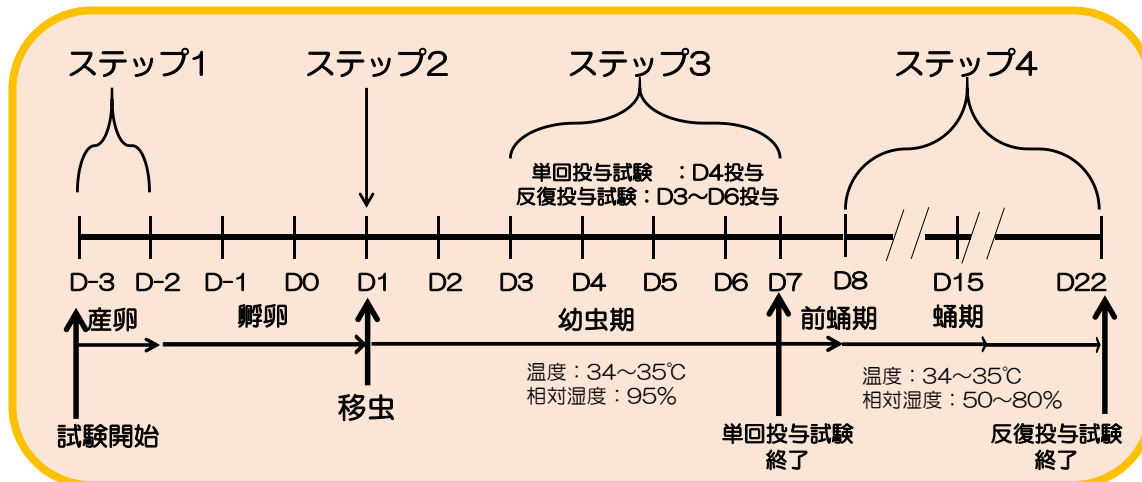
- (ア) 被験物質の毒性が低いと予想される場合や、溶解性が極めて低い場合 [1 幼虫当たり 100 µg の有効成分あるいは原体 (投与飼料液中濃度として 650 mg 有効成分あるいは原体/kg)] は、影響がないことを確認するために、その物質の最大溶解濃度の被験物質で限度試験を行う。この場合も 1 蜂群から採集された最低 12 匹で構成される 3 反復を限度投与量区 (被験物質区) とし、陰性対照区と陽性対照区 (溶媒を用いた場合は溶媒対照区も設置する) も設定する。
- (イ) 陰性対照区と比べて統計的に有意な影響が観察された場合は本試験を実施する。

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

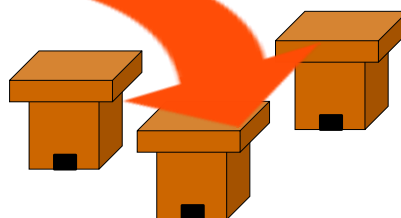
期間：D-3 ～ D-2

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

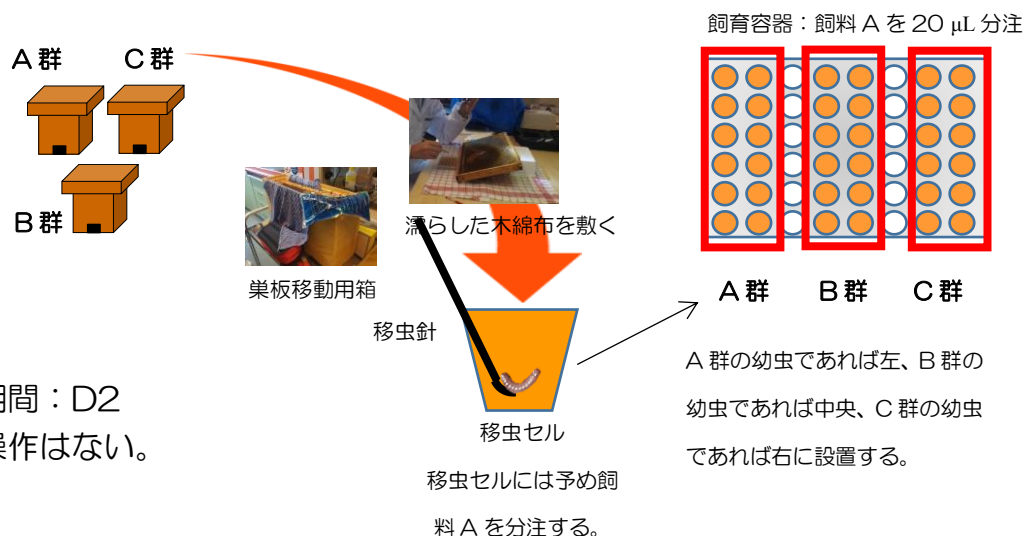
ステップ2

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

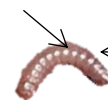
採集について

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



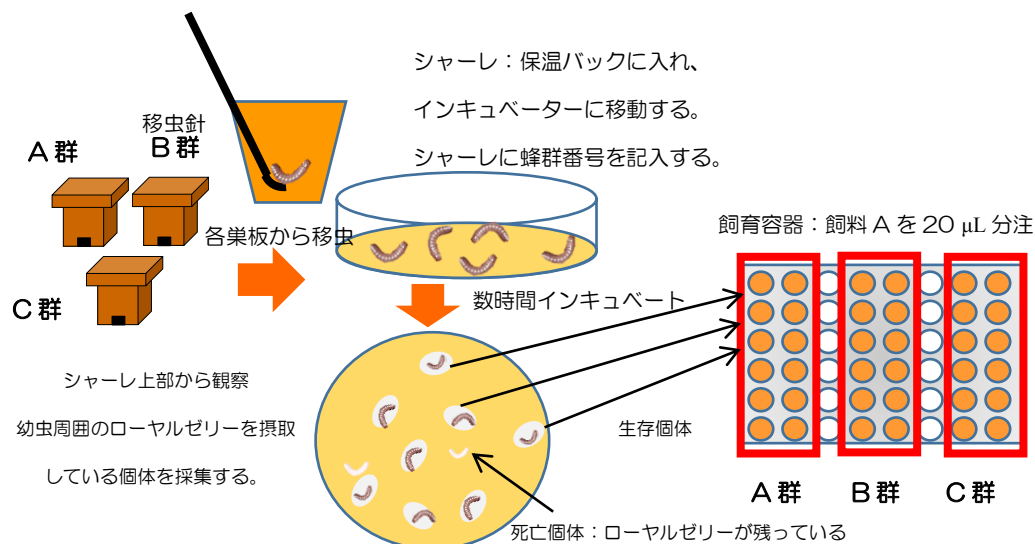
背部から移虫針をあててすくい取る



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）

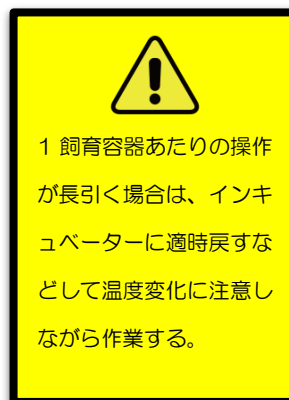
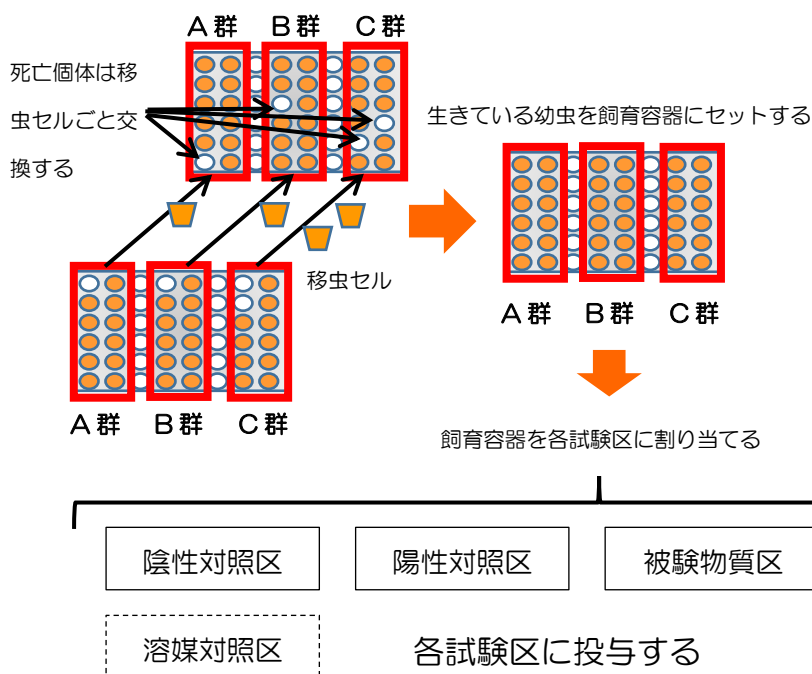
(ア) 幼虫に給餌（飼料 B 20 μ L／幼虫）を行なう。死亡個体は除外する。→ 操作⑥へ

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) 飼育容器を試験区数分用意し、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

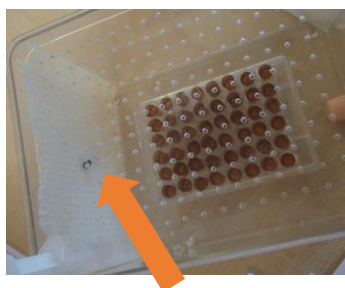
ステップ
4

観察

(反復投与試験のみ)

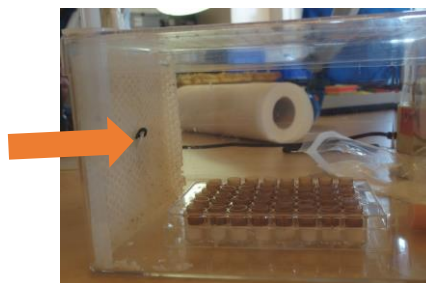
期間： D8、D15、D22

- 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

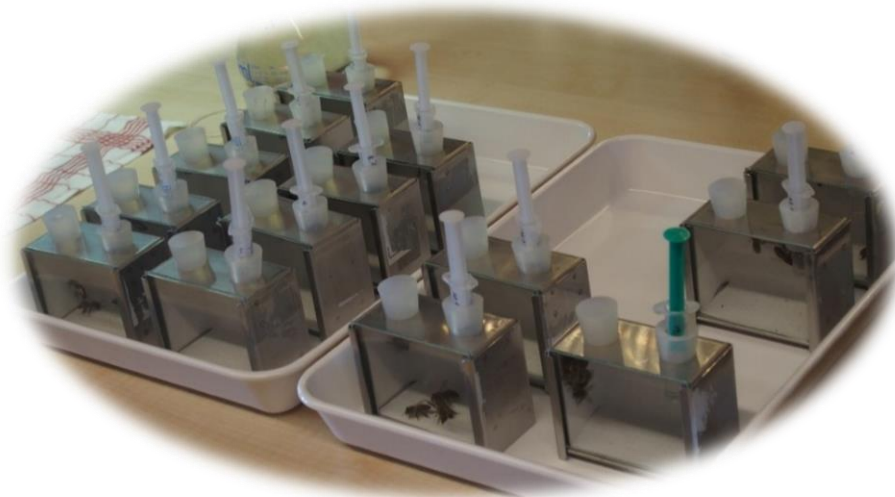
2. マニュアル

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

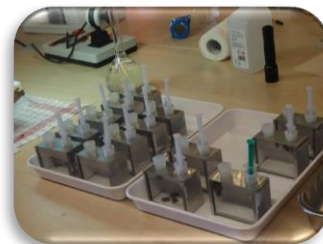
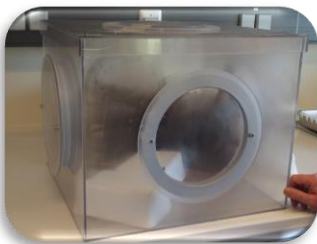
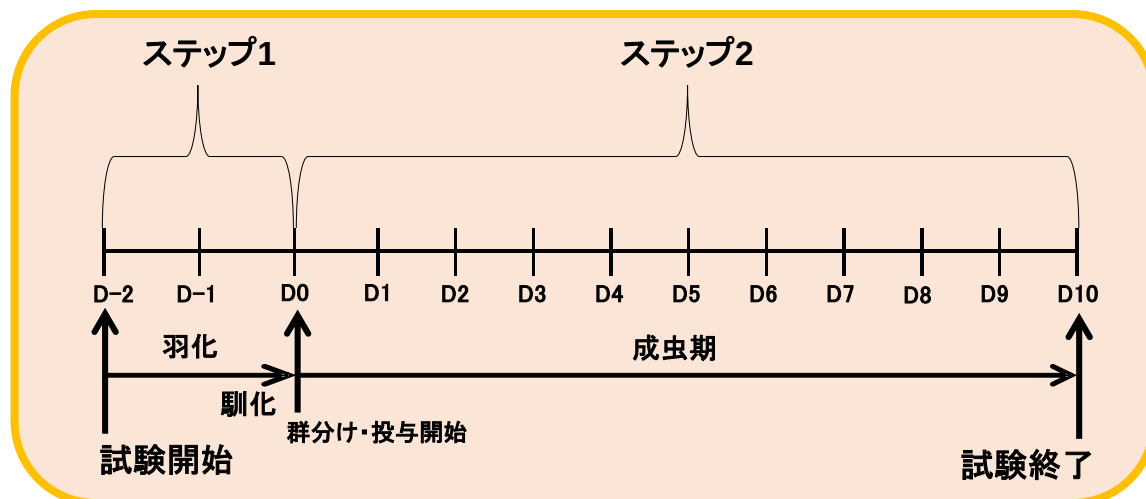
1. 概略	1
2. 実施にあたって	
① 諸注意	2
② 成虫採集について	2
③ 機器・器具の準備	2
④ 飼料	4
⑤ 被験物質調製方法と濃度確認	4
⑥ 陽性対照物質	5
⑦ 観察方法	5
⑧ 用量設定	6
⑨ 試験成立基準	6
3. 試験の流れ	7
① ステップ1	8
② ステップ2	9
4. データ解析	10
5. 報告書の内容	11
添付資料：観察記録の用紙例	12



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。

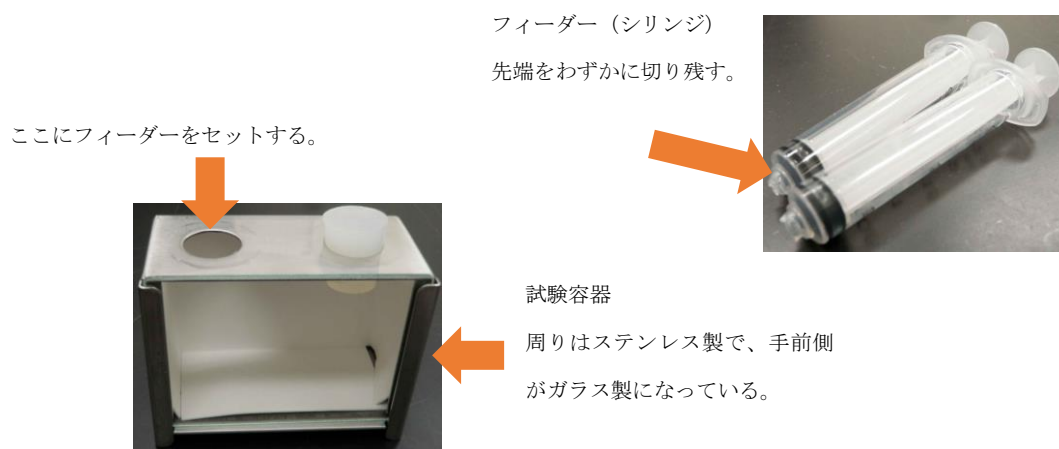
(ウ) 試験容器は、清掃が容易で通気のよい容器を用いる。どのような素材でできていてもかまわない（例えばステンレス、ボール紙、金網、プラスチック、使い捨ての木製容器など）。10匹を1グループとして1試験容器に飼育する。

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 blanks+3 溶媒対照 blanks=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ポザブルシリンジの先端を、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、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。

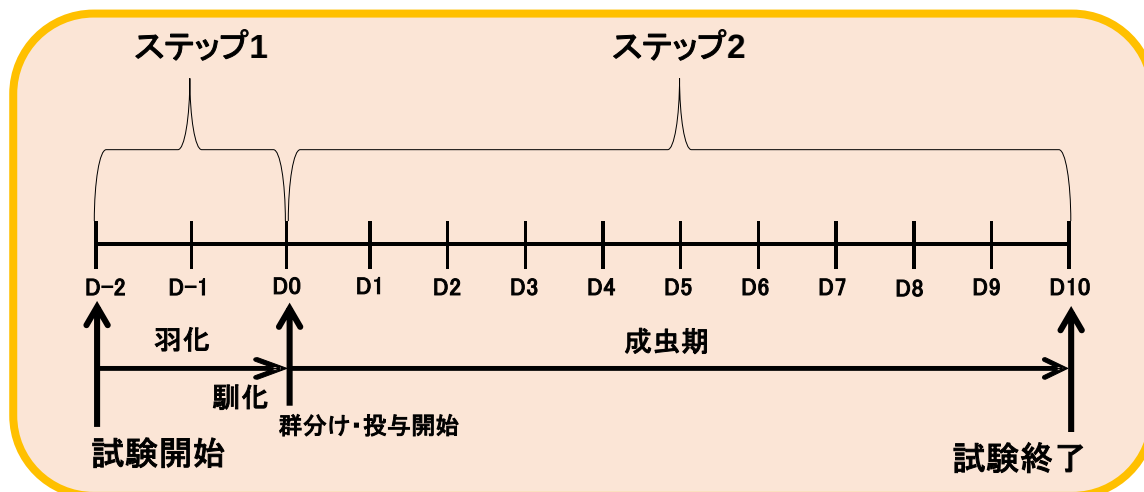
(イ) NOEC/NOEDD や試験終了時の LC_{50}/LDD_{50} を算出するために、必要かつ十分な濃度段階及び各濃度の反復数を設定する。通常は 2.5 を越えない公比で 5 濃度を設定する。

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。