

「農薬の登録申請時に提出される試験成績の作成に係る指針」  
( 抜粋版 )

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

催奇形性試験	-----	2 - 1 - 1 8
変異原性試験		
・復帰突然変異試験	-----	2 - 1 - 1 9 - 1
・染色体異常試験	-----	2 - 1 - 1 9 - 2
・小核試験	-----	2 - 1 - 1 9 - 3
生体機能影響試験	-----	2 - 2 - 1
動物体内運命に関する試験	-----	2 - 3 - 1
植物体内運命に関する試験	-----	2 - 4 - 1
土壌中運命に関する試験		
・好氣的湛水土壌中運命試験	-----	2 - 5 - 1
・好氣的土壌中運命試験	-----	2 - 5 - 2
・嫌氣的土壌中運命試験	-----	2 - 5 - 3
水中運命に関する試験		
・加水分解運命試験	-----	2 - 6 - 1
・水中光分解運命試験	-----	2 - 6 - 2
水産動植物への影響に関する試験		
・魚類急性毒性試験	-----	2 - 7 - 1
・ミジンコ類急性遊泳阻害試験	-----	2 - 7 - 2 - 1
・ミジンコ類繁殖試験	-----	2 - 7 - 2 - 2
・藻類生長阻害試験	-----	2 - 7 - 3
水産動植物以外の有用生物への影響に関する試験		
・ミツバチ影響試験	-----	2 - 8 - 1
・蚕影響試験	-----	2 - 8 - 2
・天敵昆虫等影響試験	-----	2 - 8 - 3
・鳥類影響試験		
・鳥類強制経口投与試験	-----	2 - 8 - 4 - 1
・鳥類混餌投与試験	-----	2 - 8 - 4 - 2
有効成分の性状、安定性、分解性等に関する試験	-----	2 - 9 - 1 ~ 1 6
水質汚濁性に関する試験		
・水質汚濁性試験	-----	2 - 1 0 - 1

#### 4. 残留性に関する試験

##### 農作物への残留性に関する試験

・作物残留性試験	-----	3 - 1 - 1
・乳汁への移行試験	-----	3 - 1 - 2

##### 土壌への残留性に関する試験

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

# 基本的事項

## 1. 基本的考え方

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

## 2. 被験物質について

- (1) 原体を被験物質として用いる場合は、農薬見本品の原料としての原体と同等のものでなければならない。
- (2) 製剤を被験物質として用いる場合は、農薬見本品と同等のものでなければならない。
- (3) 試験期間中は、同じロットの被験物質を用いなければならない。やむを得ず他のロットの被験物質を用いる場合は、先のロットの組成と十分近似しているものでなければならない。なお、試験成績には、使用したロットの番号を明記しなければならない。
- (4) 急性毒性試験、反復投与毒性試験、発がん性試験、繁殖毒性試験、催奇形性試験及び変異原性試験については、当該試験に用いた原体の組成を個々の試験成績ごとに明らかにしなければならない。

## 3. 供試生物について

農薬の安全性評価を的確に行う観点から、各試験項目にわたり同一種・同一系統の試験生物を用いることが望ましい。

## 4. 実験動物の取扱い等について

動物を用いた実験を実施するに当たっては、動物愛護等の観点から、動物の愛護及び管理に関する法律（昭和48年法律第105号）、実験動物の飼養及び保管等に関する基準（昭和55年3月27日総理府告示第6号）、動物愛護に係る国際的な規制・動向等を踏まえ、実験動物の飼育管理、実験操作、処分方法等に十分に注意を払わなければならない。

## < 毒性に関する試験 >

### 急性経口毒性試験(2 - 1 - 1)

#### 1. 目的

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

#### 2. 試験方法

急性経口毒性試験としては「固定用量法」、「毒性等級法」等がある。

##### 固定用量法

##### 1. 供試動物

(1) げっ歯類動物の若齢成獣を用いる。

(2) 通常はラット、雌動物を用いる。雄動物の方が感受性が高いという情報がある場合には雄動物を用いる。

(3) 雌は、未経産で非妊娠のものを用いる。

##### 2. 投与方法

被験物質は、強制による単回経口投与とし、必要に応じて水若しくは適当な溶媒に溶解し又は懸濁するが、当該溶媒の毒性は既知のものであり、かつ、試験結果に重大な影響を与えないものが望ましい。

動物種に応じて、被験物質投与前の絶食の程度を考慮する。

##### 3. 観察期間

少なくとも14日間の観察を行う。

##### 4. 動物数の設定

##### (1) 見当付け試験

1投与用量につき1匹とする。

##### (2) 主試験

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

##### 5. 試験の手順

##### (1) 見当付け試験

主試験の開始用量を選定するため、投与用量を5、50、300、2000mg/kg体重から選択し付表1の手順に沿って試験を行う。最初の投与用量の選択にあたっては、明確な毒性が発現すると予想される用量を選択する。被験物質の急性毒性に関する情報がない場合に

は投与を300mg/kg体重から開始することが望ましい。次の投与までの間隔は少なくとも24時間空けること。

また、投与用量5mg/kg体重で死亡した場合は、LD<sub>50</sub>は5mg/kg体重とし、主試験は実施せず試験を終了する。ただし、必要がある場合にはLD<sub>50</sub>の更なる確認を行ってもよい。

#### (2) 主試験

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

#### (3) 限界試験

見当付け試験で投与用量2,000mg/kg体重でも死亡しなかった場合には2,000mg/kg体重から主試験を開始するが、主試験において被験物質に起因した死亡が1匹以下の場合には、投与用量2,000mg/kg体重以上の投与を行う必要はない。

### 6. 観察及び検査

次の(1)及び(2)の項目について実施する。

#### (1) 一般状態の観察

被験物質投与後30分以内に少なくとも1回、その後1日は頻繁に観察し、引き続き少なくとも毎日1回注意深く一般状態を観察する。

すべての試験動物について個体ごとに、肉眼的に観察されたすべての毒性徴候の種類、発現時期、回復時期及び死亡時期を記録する。

試験動物の体重は、個体ごとに、被験物質投与直前及び投与後は毎週1回測定するものとし、試験動物が死亡した場合には、死亡時においても測定する。

毒性の評価に有効な試験動物の損失を最小限に抑える観点から、死亡動物、衰弱動物又は瀕死動物を発見した場合には、速やかに適切な措置(肉眼的剖検、隔離等)を講ずるものとする。

#### (2) 病理学的検査

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

#### 毒性等級法

##### 1. 供試動物

固定用量法に準ずる。

##### 2. 投与方法

固定用量法に準ずる。

##### 3. 観察期間

固定用量法に準ずる。

##### 4. 動物数の設定

各投与段階につき3匹とする。

##### 5. 試験の手順

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

## 6 . 観察及び検査

次の( 1 )及び( 2 )の項目について実施する。

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

## 90日間反復経口投与毒性試験(2 - 1 - 9)

### 1. 目的

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

### 2. 供試動物

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

### 3. 投与方法

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

### 4. 投与期間

連続90日以上とする。

### 5. 動物数及び試験群の設定

#### (1) 動物数の設定

げっ歯類については1群当たり雌雄各10匹以上、非げっ歯類については1群当たり雌雄各4匹以上とする。

各群への動物の割り付けには、体重層別等による適切な無作為抽出法により行う。なお、中間屠殺を予定する場合は、そのために必要な数を追加設定すること。

試験結果の評価を行う上で十分な動物数が確保できていなければならない。

#### (2) 試験群の設定

##### 被験物質投与群

ア 対照群の他に少なくとも3段階の用量設定による被験物質投与群を設ける。

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

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

##### 対照群

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

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

## 6. 観察及び検査

次の(1)～(5)の項目について実施する。

### (1) 一般状態の観察

すべての動物について、毎日、死亡の有無、一般状態(毒性徴候の発現時期やその程度)を観察するとともに、定期的に体重及び摂餌量を測定する(飲水投与の場合にあっては摂水量についても測定する。以下同じ。)

体重及び摂餌量の測定は、原則として、投与開始前に1回、投与開始後は少なくとも週1回の割合で行うとともに、被験物質の摂取量を算出する。

### (2) 詳細な状態の観察

投与開始前に1回、投与開始後は週1回の割合で行う。

観察は、飼育ケージ内及び観察台上で行う。全身状態の変化を把握するのに十分な観察項目、各項目の定義と採点基準及び観察順を決めた観察手順に従って注意深く観察する。観察時の動物の取扱いが試験結果に影響しないよう留意すること。

通常、次の項目について行う。

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

### (3) 機能検査

げっ歯類について投与終了時に近い時点で行う。

通常、次の項目について行う。

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

### (4) 血液検査

げっ歯類については少なくとも試験終了時に1回、非げっ歯類については投与開始前及び試験終了時に、原則として、すべての動物について行うことが望ましいが、げっ歯類については、実施上の理由から、各群の一部(少なくとも5匹)の動物に限ってもよい。

マウスを除き、検査前に一晩絶食させることが望ましい。

通常、次の項目について行う。

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

#### ア 血液学的検査

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

#### イ 血液生化学的検査

血清(血漿)総蛋白、アルブミン、A/G比、ブドウ糖、コレステロール、トリグリセリド、ビリルビン、尿素窒素、クレアチニン、トランスアミナーゼ[AST(GOT)、ALT(GPT)]、 $\gamma$ -GTP、アルカリフォスファ



ターゼ、電解質（ナトリウム、カリウム、塩素、カルシウム、無機リン等）等

#### （５）尿検査

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

通常、次の項目について行う。

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

#### （６）眼科学的検査

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

#### （７）病理学的検査等

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

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

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

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

肝臓、腎臓、副腎、精巢、卵巣、胸腺、脾臓、心臓、脳、前立腺<sup>(注)</sup>、甲状腺・上皮小体<sup>(注)</sup>、下垂体<sup>(注)</sup>

（注）：前立腺、甲状腺・上皮小体及び下垂体については、非げっ歯類のみ。

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

通常、次の器官又は組織について行うが、肉眼的所見等から適宜追加すること。

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

（注）：精巢は、ブアン液等精細管の構築保持に適した固定液を用いて検査する。

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

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

## 7. その他

本試験の結果から神経系、免疫系、内分泌系に対する影響が認められた場合には、次に

掲げる試験を実施することが望ましい。

( 1 ) 神経系：反復経口投与神経毒性試験

( 2 ) 免疫系：新鮮凍結標本の免疫組織化学的染色、脾臓のリンパ球組成測定及び  
NK細胞活性測定、免疫グロブリン測定(IgG、IgM、IgE等)等

( 3 ) 内分泌系：血中のステロイドホルモン、甲状腺ホルモン等の測定

## 変異原性に関する試験(2 - 1 - 19 - 1 ~ 3)

### 1 . 目的

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

### 2 . 試験法の選択

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

## 復帰突然変異試験(2 - 1 - 19 - 1)

### 1 . 使用菌株

以下の5組の中からそれぞれ1株を選択し、合計5菌株を用いて試験を行う。

ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) T A 98

ネズミチフス菌 T A 100

ネズミチフス菌 T A 1535

ネズミチフス菌 T A 1537、T A 97又はT A 97 a

大腸菌 (*Escherichia coli*) W P 2 *uvrA*、大腸菌 W P 2 *uvrA* / p K M 101又はネズミチフス菌 T A 102

被験物質の性質からみて必要な場合には他の菌株を追加する。

### 2 . 用量段階

(1) 適切な間隔で5段階以上の解析できる用量を用いる。

(2) 最高用量はあらかじめ試験に用いる全菌株を用いて用量設定試験を行い、生育阻害と溶解性を考慮に入れて設定することが望ましい。

(3) 原則として生育阻害を示す用量を最高用量とし、生育阻害を示さない場合には5 mg / プレートとする。溶解性にかかわらず全く生育阻害を示さない難溶性物質の場合には、析出する用量を最高用量としてもよい。

### 3 . 対照

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

### 4 . 使用プレート数

被験物質の各用量及び各対照について、それぞれ2枚以上のプレートを用いる。

### 5 . 試験方法

(1) プレインキュベーション法又はプレート法により実施する。科学的に正当な理由が

あれば他の方法を用いてもよい。

- (2) いずれの方法においても、代謝活性化を用いる系及び用いない系について試験を行う。代謝活性化を用いる系には、薬物代謝酵素系を誘導する適切な処理を行った動物の肝ホモジネート上清分画(S9)に補酵素等を添加したS9 mixを用いる。

## 6. 観察

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

## 7. 結果の判定

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

## 8. 結果の表示

プレートごとの復帰変異コロニー数の実測値及び群ごとの平均値を表示する。

染色体異常試験(2-1-19-2)(略)

小核試験(2-1-19-3)(略)

## 水産動植物への影響に関する試験(2 - 7 - 1 ~ 3)

### 魚類急性毒性試験(2 - 7 - 1)

#### 1 . 目的

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

#### 2 . 定義

- ( 1 ) 死亡：観察可能な動き（鰓ふたの動き等）がなく、尾柄部に触れて反応がない場合魚は死亡しているとみなす。
- ( 2 ) LC<sub>50</sub> (Median Lethal Concentration：半数致死濃度)：暴露期間中に供試生物の50%が死亡する被験物質の濃度をいう。
- ( 3 ) NOEC (No Observed Effect Concentration：最大無影響濃度)：対照区と比べて、何ら影響が認められない試験最高濃度をいう。
- ( 4 ) 被験物質：試験に用いる農薬の原体又は製剤をいう。
- ( 5 ) 基準物質：試験条件の再現性等を確認するために用いる物質をいう。
- ( 6 ) 試験物質：試験に用いる被験物質及び基準物質をいう。
- ( 7 ) 止水式試験：暴露期間中試験液を交換しない方式で行う試験をいう。
- ( 8 ) 半止水式試験：一定期間ごと試験液を容器ごとに交換する方式で行う試験をいう。
- ( 9 ) 流水式試験：連続的に試験液を供給する方式で行う試験をいう。

#### 3 . 供試生物

##### ( 1 ) 生物種

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

##### ( 2 ) 順化

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

#### 4 . 暴露方法

止水式、半止水式又は流水式により試験を行う。

#### 5 . 暴露期間

96時間とする。

## 6. 供試魚数及び試験区の設定

### (1) 供試魚数

試験区ごとに、少なくとも7尾使用する。

### (2) 試験区の設定

#### 試験濃度区の設定

ア 等比級数的に少なくとも5濃度区を設ける。

イ 試験濃度及び濃度公比は、予備試験の結果から定める。

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

#### 対照区の設定

ア 対照として、被験物質を含まない無処理対照区を設ける。

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

## 7. 試験液の調製

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

### (1) 原体を被験物質として用いる場合

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

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

助剤の試験液中濃度は、100mg/l（又は0.1ml/l）を超えないことが望ましい。

### (2) 製剤を被験物質として用いる場合

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

## 8. 環境条件

### (1) 収容密度

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

流水式試験では、さらに高い収容密度で試験を行うことができる。

### (2) 水温

供試魚種の設定温度は別表のとおりとし、変動範囲は $\pm 2$ 以内とする。

### (3) 照明

12~16時間明期とする。

### (4) 給餌

暴露期間中は給餌を行わない。

### (5) 希釈水

試験に用いる水は、有害物質等試験の妨げになるものを含まず、飼育に用いた水

と同じ供給源のもので、魚が良好に生存又は成長ができる水質であることが確認されているものを用いる。

脱塩素水道水、天然水又は人工調製水を用いる。

使用前には十分に暴気するとともに、温度調節を行う。

(6) 溶存酸素濃度

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

(7) pH

試験液のpH調整は行わない。

9. 観察及び測定

(1) 供試魚の一般状態の観察

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

(2) 被験物質濃度の測定

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

被験物質濃度は、暴露期間中、設定濃度の80%以上であることが望ましい。

(3) 環境条件の測定

試験に先立って希釈水の水質を確認する。

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

10. 結果の処理法

(1) 各濃度における死亡率の結果から、一般的に用いられる手法を用いてLC<sub>50</sub>を算定する。

(2) 被験物質濃度の測定値が設定濃度から±20%以上変動している場合は、測定濃度の平均値に基づきLC<sub>50</sub>を算定する。

11. 報告事項

(1) 試験物質について

(2) 試験魚について

種名、供給源、飼育方法、順化、供試魚数、供試魚の全長・体重、基準物質のLC<sub>50</sub>等

(3) 試験方法について

暴露条件、環境条件、観察及び測定項目等

(4) 試験結果について

LC<sub>50</sub>及びその95%信頼限界(可能であれば各観察時間のもの)

LC<sub>50</sub>の算定方法

NOEC (NOECの値が求められなかった場合は、その理由を記すこと。)

各観察時間における各試験区での累積死亡率

暴露終了時における濃度 - 死亡率曲線のグラフ

供試魚の異常な症状及び反応

被験物質濃度の測定値(原体を被験物質として用いた場合のみ)

環境条件の測定結果

水質、溶存酸素濃度、pH等

その他の事項

試験液の状態、試験結果に影響を及ぼした可能性のある事項等

12. 試験の妥当性

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

別表 試験生物種の条件及び設定温度

魚種	設定温度 ( )	試験魚の全長 (cm)
コイ ( <i>Cyprinus carpio</i> )	20 ~ 24	5.0 ± 1.0
ヒメダカ ( <i>Oryzias latipes</i> )	21 ~ 25	2.0 ± 1.0
ブルーギル ( <i>Lepomis macrochirus</i> )	21 ~ 25	3.0 ± 1.0
ニジマス ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	13 ~ 17	5.0 ± 1.0
グッピー ( <i>Poecilia reticulata</i> )	21 ~ 25	2.0 ± 1.0
ゼブラダニオ ( <i>Brachydanio rerio</i> )	21 ~ 25	2.0 ± 1.0
ファットヘッドミノー ( <i>Pimephales promelas</i> )	21 ~ 25	2.0 ± 1.0

ミジンコ類急性遊泳阻害試験(2 - 7 - 2 - 1)(略)

ミジンコ類繁殖試験(2 - 7 - 2 - 2)(略)

藻類生長阻害試験(2 - 7 - 3)(略)