

水産動植物に対する安全性に係る評価の目安の改定について（案）

1 改定の趣旨

(1) これまでの評価方法

特定防除資材の指定における水産動植物に対する安全性の評価の目安については、平成16年3月1日に定められた特定防除資材（特定農薬）指定のための評価に関する指針（以下「評価指針」という。）において、「コイに対する48時間後の半数致死濃度が10ppmを超え、かつミジンコ類に対する3時間後の半数致死濃度が0.5ppmを超えること（登録農薬でいう魚毒性A）」と定めてきたところである。

評価指針策定当時の水産動植物被害防止に係る登録保留基準（以下「旧登録保留基準」という。）では、コイに対する48時間後の半数致死濃度（以下「LC₅₀」という。）が0.1ppm以下のものの登録を保留することとされ、さらに、魚毒性の分類基準での魚毒性Aの区分は、コイに対する基準値が10ppmを超えるものとされていたところである。この分類基準は、旧登録保留基準に比べ100倍の安全性を見込んでいることから、「水産動植物に害を及ぼすおそれがないことが明らかなもの」と確認できる目安に用いることが可能であるとされ、魚毒性Aの基準を特定防除資材の評価の目安に用いることとしたところである。

(2) 改定の必要性

その後、昨年4月に改正水産動植物被害防止に係る登録保留基準（以下「改正登録保留基準」という。）が施行され、従来コイに対する毒性値のみで一律に定めていた基準を、魚類、甲殻類、藻類に対する毒性値と公共用水域における予測濃度を比較して評価する手法に改めたところであり、毒性試験については、魚類はコイ又はヒメダカの96時間後LC₅₀、甲殻類についてはオオミジンコの48時間後の急性遊泳阻害濃度（以下「EC₅₀」という。）藻類については緑藻の72時間後の半数生長阻害濃度を用いることとされたことから、改正登録保留基準との整合性に留意した評価の目安を新たに設定する必要がある。

併せて、これまでの特定防除資材の検討状況を踏まえ、水産動植物に対する安全性の評価をより適切に行う観点から、評価指針等について所要の見直しを行うこととしたい。

2 水産動植物に対する安全性に係る資料を省略することができる旨明記することについて

(1) 必要性

特定防除資材の候補資材には、エチレンガス等の気体の資材も候補資材として要望されている状況にある。このような資材は水系に流出するおそれは無いものと考えられるが、現行の評価指針においては、このような候補資材においても水産動植物に対する安全性に係る資料の提出を要するものとされているところである。一方、登録農薬の登録申請に係る試験成績（以下「農薬GL」という。）においては、水系に流出するおそれがない農薬については水産動植物に係る試験成績の提出を要しな

いこととされていることから、特定防除資材の評価においても水系に流出するおそれがない資材については、その試験データを省略することが適当であると考えられることから、この旨明記する必要がある。

(2) 改定方針

評価指針の 1 に「検討対象となる資材の特性からみて、当該資材の成分等が河川等の水系に流出するおそれがないと客観的に認められる場合にあっては(4)の を、」を追加するとともに、水産動植物に対する安全性に係る具体的な実施方針について(案)(以下「実施方針」という。)の2にその具体例を示す。なお、水系に流出するおそれがないと見込まれる資材については、当該資材が水系に流出するおそれがないことを客観的に示す資料を提出することにより、水産動植物に対する安全性の評価に必要な資料を省略することとしたい。

3 追加資料について

(1) 必要性

改正登録保留基準では、従来の魚類に加え、甲殻類及び藻類も評価対象に加えられたところである。また今までの評価の過程において、候補資材の薬効や物性によっては、藻類に対する影響や有機物質による汚濁も考慮する必要があるのではないかと指摘がなされた事例もあったところである。

このため、水産動植物に対する安全性の評価を行う上で追加資料の収集が必要となる場合が想定されることから、現時点で想定される資料を明記する必要がある。

(2) 改定方針

実施方針の3に示すとおり、想定される資料を明記することとしたい。

4 水産動植物に対する安全性が確認される目安の改定について

(1) 目安の改定について

必要性

改正登録保留基準の施行に伴い、農薬の登録に当たり、魚類のみならず甲殻類や藻類に対する影響も評価することとなったことから、主に魚類への影響で評価している現在の特定防除資材の評価の目安を見直す必要がある。

目安についての考え方

目安の見直しに当たっては、

ア 改正登録保留基準では、魚類、甲殻類、藻類への影響を評価することとしたことから、従来の様に魚類と甲殻類の毒性レベルに差を設ける必然性がなくなったこと

イ 一方で、これまでの基準値からの大幅な見直しを行うことは、これまでの評価とのバランスを欠き、好ましくないこと

を考慮し、さらに化学物質全般に対応する「特定の化学物質の環境への排出量の把握等及び管理の改善の促進に関する法律」における指定対象候補物質から除外となる生態毒性の基準を参考として、魚類(96時間後のLC₅₀値)及び甲殻類(48時間後のEC₅₀値)の急性毒性試験等の試験結果が「10mg/lを超えるもの」とすることとしたい。

藻類への対応

藻類に係る試験については、これまで魚類と甲殻類の毒性試験しか要求してこなかった経緯に鑑み、評価の過程において藻類への影響が懸念される場合のみ藻類の試験成績を収集することにより、水産動植物への安全性を確保することとしたい。

(2) その他安全性に係る資料の留意事項について

混合物の取扱い

複数の原材料から成る混合物については、平成17年2月21日に開催された農業資材審議会農薬分科会特定農薬小委員会及び中央環境審議会土壌農薬部会農薬専門委員会合同会合（第5回）において「すべての原材料について安全性が各々確認されていなければならない。」とされたことから、混合物にあつては、原材料毎に水産動植物に係る試験成績を提出することとしたい。ただし、混合により化学変化の可能性がある場合等は、必要に応じ混合物自体のデータを収集することとしたい。

文献調査結果について

文献等の調査結果については、試験データの信頼性、評価に用いる妥当性等を検証する必要があることから、試験方法等具体的な記載があり試験の再現が可能なものであること、又は、原著論文であることとしたい。

魚類急性毒性試験の供試生物について

評価に用いる供試魚種は、魚類の場合、原則コイ又はヒメダカとしているが、OECD等ではこれら以外の魚種も標準的な供試魚種とされている。このため、文献調査等の結果において、これらの魚種以外であっても農薬GLの試験別表に記載のある魚種の試験結果がある場合は、当該試験結果を用いて評価可能とすることとしたい。

難水溶性の検討対象資材の取扱いについて

通常試験において、原則として製剤を水に溶解させて試験を実施しているが、難水溶性資材にあつては、通常の方法では試験が困難であることから、資材によって試験方法を検討してきたところである。しかしながら、評価を行うに当たっては、試験方法の原則を示すことが重要なことから、実施方針でその原則を示すこととしたい。

なお、上記の方法においても試験が困難な場合は、その取扱いについて検討会等で検討の上、対応方針を決定することとしたい。

水産動植物に対する毒性に係る登録保留基準の改正概要

新しい環境基本計画を踏まえ、持続可能な社会の構築を実現する上で、従来の対応に加え農薬の環境リスクの評価・管理制度の中に生態系の保全を視野に入れた取組を強化することが重要。

現行

登録保留基準

コイの半数致死濃度(48時間)が0.1ppm以下で、かつ毒性の消失日数が7日以上の場合(水田において使用するものに限る)



現状の課題

- ・試験生物はコイのみのため生態系保全の視点が不十分
- ・毒性評価のみで環境中での曝露量が考慮されていないためリスク評価として不十分
- ・畑地等で使用される農薬が適用外であるため農薬全体としてのリスク管理が不十分

等

改正

昭和46年3月農林水産省告示346号(農薬取締法第3条第1項第4号から第7号までに掲げる場合に該当するかどうかの基準を定める件)(平成15年3月28日改正、施行平成17年4月1日)

期待される効果

改正後

・生態系保全の観点から、魚類のみならず藻類、甲殻類を評価対象に追加

・毒性評価のみならず、曝露評価を追加(環境中予測濃度(PEC)と、急性影響濃度(AEC)とを比較することによりリスクを評価)

・畑地等で使用される農薬についても適用

登録保留基準

リスク評価の結果、PECがAECを上回る場合には登録保留



農薬による環境リスクの低減

かけがえのない生態系の保全

農薬の登録申請に係る試験成績について（抄）
 （平成12年11月24日付け12農産第8147号農林水産省農産園芸局長通知）

- 一部改正 平成13年 6月26日 13生産第1739号
- 一部改正 平成14年12月10日 14生産第7269号
- 一部改正 平成16年11月24日 16消安第6197号
- 一部改正 平成17年 3月16日 16消安第9260号

（別紙 2）

第 4 中「別表 2 に掲げる場合」とは、下表の左欄のそれぞれの試験成績ごとに同表の右欄に示す場合のことをいう。

試験成績	試験成績の提出を要しない場合
適用農作物に対する薬害に関する試験成績 〃 (省略) 水中運命に関する試験成績	(省略)
水産動植物への影響に関する試験成績 ----- (1) 魚類 急性毒性試験成績 ----- (2) 魚類（ふ化仔魚）急性毒性試験成績 ----- (3) ミジンコ類急性遊泳阻害試験成績 ----- (4) ミジンコ類（成体）急性遊泳阻害試験成績	次に掲げる区分のいずれかに該当する場合 原体での実施に関し、当該農薬の成分物質等の種類等からみて、その毒性がきわめて弱いこと等の理由により、有害でないと認められる場合 製剤での実施に関し、当該農薬の剤型、使用方法等からみて、当該農薬の成分物質等が河川等の水系に流出するおそれがないと認められる場合 ----- 当該農薬に係る魚類急性毒性試験成績、ミジンコ類急性遊泳阻害試験成績及び藻類生長阻害試験成績の結果等から、追加の魚類の魚類急性毒性試験の必要性がないと認められる場合 ----- 当該農薬に係る魚類急性毒性試験成績、ミジンコ類急性遊泳阻害試験成績及び藻類生長阻害試験成績の結果等から、追加の魚類の魚類急性毒性試験の必要性がないと認められる場合 ----- 「魚類急性毒性試験成績」の場合に同じ ----- 「魚類（ふ化仔魚）急性毒性試験成績」の場合に同じ

(5) ミジンコ類繁殖試験成績	当該農薬の成分物質等の種類等からみて、その毒性がきわめて弱いこと等の理由により、当該農薬が甲殻類の繁殖に影響を及ぼすおそれがない場合
(6) 魚類急性毒性・ミジンコ類急性遊泳阻害共存有機物質影響試験成績	「魚類（ふ化仔魚）急性毒性試験成績」の場合に同じ
(7) ヌマエビ・ヌカエビ急性毒性試験成績	「魚類（ふ化仔魚）急性毒性試験成績」の場合に同じ
(8) ヨコエビ急性毒性試験成績	「魚類（ふ化仔魚）急性毒性試験成績」の場合に同じ
(9) ユスリカ幼虫急性毒性試験成績	「魚類（ふ化仔魚）急性毒性試験成績」の場合に同じ
(10) 藻類生長阻害試験成績	「魚類急性毒性試験成績」の場合に同じ
(以下省略)	(以下省略)

「農薬の登録申請書等に添付する資料等について」(平成14年1月10日付け13生産第3987号農林水産省生産局長通知)の運用について
(平成14年1月10日付け13生産第3988号)
一部改正 平成17年3月16日 16消安第9263号

(別紙)

「農薬登録申請時書等に添付する資料等について」の運用について(抜粋)

1～5(省略)

6. 農薬の公共用水域の水中における予測濃度に関する資料

(1) 本資料は、申請にかかる農薬の有効成分等の公共用水域の水中における予測濃度(以下「P E C」という。)が記載された「農薬の公共用水域の水中における予測濃度算定結果報告書」及びその添付資料とする(別記様式第6号:省略)。

(2) P E Cの算定は、次のアからキまでのいずれかに該当する場合には省略できるものとし、本報告書に代えてその旨が記載された資料を提出することができるものとする。

ア 誘引剤等当該農薬の成分物質が封入された状態で使用される場合

イ 忌避剤、殺そ剤、ナメクジ駆除剤等配置して使用される場合

ウ 適用農作物に塗布し、又は適用農作物の樹幹に注入して使用される場合

エ 倉庫くん蒸剤等施設内でのみ使用される場合

オ エアゾル剤等一度に広範囲かつ多量に使用されないことがない場合

カ 種子等に粉衣又は浸漬して使用される場合

キ 当該農薬の有効成分が食品等において一般に広く利用されており水産動植物に対し安全であることが公知である場合

(3) P E Cの算定は、登録申請された使用方法に基づき、水田に使用する場合(水田使用)と水田以外に使用する場合(水田以外使用)に分け、それぞれの場合について使用方法ごとに算定する。なお、最も予測濃度が高くなる使用方法について算定されていれば、他の使用法での算定は省略することができるものとする。

7～8(省略)

農薬の登録申請に係る試験成績について

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

一部改正 平成13年 6月26日 13生産第1739号

一部改正 平成14年12月10日 14生産第7269号

一部改正 平成16年11月24日 16消安第6197号

一部改正 平成17年 3月16日 16消安第9260号

(別添)

「農薬の登録申請時に提出される試験成績の作成に係る指針」(抜粋)

水産動植物への影響に関する試験(2-7-1~7)

魚類急性毒性試験(2-7-1-1)

1. 目的

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

2. 定義

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

3. 供試生物

(1) 生物種

供試魚は、別表の魚種の中から選択する。

基準物質での LC_{50} を確認することが望ましい。

(2) 順化

供試魚は、試験に供する12日前までには入手し、維持しなければならない。

必要に応じて、入手時に薬浴を行う。

供試魚は、試験に供する前の少なくとも9日間は、試験時における環境条件(水質等)と同様の条件下で順化しなければならない。

餌は少なくとも週に5回与え、供試前24時間は給餌を行ってはならない。

以下に掲げる基準により順化を行い、死亡率を記録する。

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

- イ 群の死亡率が5～10%の場合、さらに7日間順化を継続し、群の死亡率が5%以上の場合は、当該群を廃棄するか、死亡率が5%未満になるまで順化を継続する。
- ウ 群の死亡率が5%未満の場合において当該群の魚類を試験に供するものとする。

4. 暴露方法

止水式、半止水式又は流水式により試験を行う。

5. 暴露期間

96時間とする。

6. 供試魚数及び試験区の設定

(1) 供試魚数

試験区ごとに、少なくとも7尾使用する。

(2) 試験区の設定

試験濃度区の設定

ア 等比級数的に少なくとも5濃度区を設ける。

イ 試験濃度及び濃度公比は、予備試験の結果から定める。

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

対照区の設定

ア 対照として、被験物質を含まない無処理対照区を設ける。

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

7. 試験液の調製

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

(1) 原体を被験物質として用いる場合

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

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

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

(2) 製剤を被験物質として用いる場合

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

8. 環境条件

(1) 収容密度

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

流水式試験では、さらに高い収容密度で試験を行うことができる。

(2) 水温

供試魚種の設定温度は別表のとおりとし、変動範囲は ± 2 以内とする。

(3) 照明

12～16時間明期とする。

(4) 給餌

暴露期間中は給餌を行わない。

(5) 希釈水

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

脱塩素水道水、天然水又は人工調製水を用いる。

使用前には十分に暴気するとともに、温度調節を行う。

(6) 溶存酸素濃度

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

(7) pH

試験液のpH調整は行わない。

9 . 観察及び測定

(1) 供試魚の一般状態の観察

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

(2) 被験物質濃度の測定

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

被験物質濃度は、暴露期間中、設定濃度の80%以上であることが望ましい。

(3) 環境条件の測定

試験に先立って希釈水の水質を確認する。

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

10 . 結果の処理法

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

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

11 . 報告事項

(1) 試験物質について

(2) 試験魚について

種名、供給源、飼育方法、順化、供試魚数、供試魚の全長・体重、基準物質の LC_{50} 等

(3) 試験方法について

暴露条件、環境条件、観察及び測定項目等

(4) 試験結果について

LC_{50} 及びその95%信頼限界(可能であれば各観察時間のもの)

LC_{50} の算定方法

NOEC (NOECの値が求められなかった場合は、その理由を記すこと。)
 各観察時間における各試験区での累積死亡率
 暴露終了時における濃度 - 死亡率曲線のグラフ
 供試魚の異常な症状及び反応
 被験物質濃度の測定値(原体を被験物質として用いた場合のみ)
 環境条件の測定結果
 水質、溶存酸素濃度、pH等
 その他の事項
 試験液の状態、試験結果に影響を及ぼした可能性のある事項等

12. 試験の妥当性

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

別表 試験生物種の条件及び設定温度

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

2 - 7 - 1 - 2 省略

ミジンコ類急性遊泳阻害試験 (2 - 7 - 2 - 1)

1. 目的

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

2. 定義

- (1) 遊泳障害：試験容器を軽く振とうした後、15秒間全く水中を遊泳しない場合、遊泳障害されたとみなす。
- (2) EC₅₀ (Median Effect Concentration：半数遊泳障害濃度)：暴露期間に供試生物の50%を遊泳障害する被験物質の濃度をいう。
- (3) NOEC (No Observed Effect Concentration：最大無影響濃度)：対照区と比べて、何ら影響が認められない試験最高濃度をいう。
- (4) 被験物質：試験に用いる農薬の原体又は製剤をいう。
- (5) 基準物質：試験条件の再現性等を確認するために用いる物質をいう。
- (6) 試験物質：試験に用いる被験物質及び基準物質をいう。
- (7) 止水式試験：暴露期間中試験液を交換しない方式で行う試験をいう。
- (8) 半止水式試験：一定期間ごと試験液を容器ごとに交換する方式で行う試験をいう。
- (9) 流水式試験：連続的に試験液を供給する方式で行う試験をいう。

3. 供試生物

(1) 生物種

オオミジンコ (*Daphnia magna*) を用いる。ただし、当該種と同等の試験結果が得られるミジンコ類であれば他の種を用いてもよい。

供試生物は、経歴 (入手源、飼育方法等) の明らかなものを用いる。

基準物質でのEC₅₀を確認することが望ましい。

(2) 生育段階

生後24時間以内の個体 (以下「幼体」という。) を用いる。

(3) 親ミジンコの飼育

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

4. 暴露方法

止水式、半止水式又は流水式により試験を行う。

5. 暴露期間

48時間とする。ただし、供試生物の種によっては24時間とすることができる。

6. 供試生物数及び試験区の設定

(1) 供試生物数

試験区ごとに少なくとも20頭の供試生物を使用し、必要に応じて観察が可能な個体数に分割する。

(2) 試験区の設定

試験濃度区の設定

ア 等比級数的に少なくとも5濃度区を設ける。

イ 試験濃度及び濃度公比は、予備試験の結果から定める。

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

対照区の設定

ア 被験物質を含まない無処理対照区を設ける。

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

7. 試験液の調製

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

(1) 原体を被験物質として用いる場合

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

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

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

(2) 製剤を被験物質として用いる場合

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

8. 環境条件

(1) 試験液量

ミジンコ1頭当たり5ml以上とする。

(2) 水温

設定温度は20とし、試験期間中の変動範囲は±1以内とする。

(3) 照明

12～16時間明期が望ましい。

(4) 給餌

暴露期間中は給餌を行わない。

(5) 希釈水

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

脱塩素水道水、天然水又は人工調製水を用いる。

使用前には十分に暴気するとともに、温度調節を行う。

(6) 溶存酸素濃度

溶存酸素濃度は、暴露期間を通して飽和濃度の60%以上に保つようにする。

(7) pH

試験液のpH調整は行わない。

9. 観察及び測定

(1) 供試生物の一般状態の観察

暴露開始後24時間目及び48時間目における遊泳障害の有無について観察し記録する。

(2) 被験物質濃度の測定

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

なお、試験区ごとに複数の容器を設けている場合には、各容器から試験液を等量採取し混和後、測定用試料に供する。

被験物質濃度は、暴露期間中、設定濃度の80%以上であることが望ましい。

(3) 環境条件の測定

試験に先立って希釈水の水質を確認する。

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

10. 結果の処理法

(1) 各濃度における遊泳阻害率の結果から、一般的に用いられる手法を用いてEC₅₀を算定する。

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

11. 報告事項

(1) 試験物質について

(2) 供試生物について

種名、経歴(入手源、飼育方法等)、基準物質のEC₅₀等

(3) 試験方法について

暴露条件、環境条件、観察、測定項目等

(4) 試験結果について

EC₅₀及びその95%信頼限界(可能であれば各観察時間のもの)

EC₅₀の算定方法

NOEC(NOECの値が求められなかった場合は、その理由を記す。)

各観察時間における各試験区での累積遊泳阻害率

暴露終了時における濃度 - 遊泳阻害率曲線のグラフ

観察された影響

被験物質濃度の測定値(原体を被験物質として用いた場合のみ)

環境条件の測定結果

水質、溶存酸素濃度、pH等

その他の事項

試験液の状態、試験結果に影響を及ぼした可能性のある事項等

12. 試験の妥当性

(1) 暴露終了時において対照区の遊泳阻害率が10%を超えてはならない。

(2) 暴露開始時において対照区のみジンコが水面に浮いていてはならない。

(3) 溶存酸素濃度は暴露期間中、飽和濃度の60%以上でなければならない。

2 - 7 - 2 - 2 ~ 2 - 7 - 6 省略

藻類生長阻害試験(2 - 7 - 7)

1. 目的

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

2. 定義

- (1) 細胞濃度：1 ml当たりの細胞数をいう。
- (2) 生長：試験期間を通じての細胞濃度の増加をいう。
- (3) 生長速度：単位時間当たりの細胞濃度の増加をいう。
- (4) EC₅₀ (Median Effect Concentration：半数生長阻害濃度)：対照区と比べて50%生長阻害される試験濃度をいう。
- (5) NOEC (No Observed Effect Concentration：最大無影響濃度)：対照区と比べて影響が認められない試験最高濃度をいう。
- (6) 被験物質：試験に用いる農薬の原体又は製剤をいう。
- (7) 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。
- (8) 試験物質：試験に用いる被験物質及び基準物質をいう。

3. 供試生物

(1) 生物種

Pseudokirchneriella subcapitata (旧学名：*Selenastrum capricornutum*) を用いることが望ましい。ただし、培養及び試験に都合がよく、生長が速いものであれば、下記に掲げる種その他の種及び株を用いてもよい。

ア *Pseudokirchneriella subcapitata* (ATCC 22662株)

イ *Scenedesmus subspicatus* (86.81 SAG株)

ウ *Chlorella vulgaris* (CCAP 211/11b株)

基準物質でのEC₅₀を確認することが望ましい。

(2) 培養方法

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

(3) 初期細胞濃度

試験培養地の初期細胞濃度は、約10⁴ cells/mlが適当である。

4. 暴露方法

被験物質を含む培地で処理する方式を用い、振とう又は静置培養を行う。

5. 暴露期間

72時間とする。ただし、96時間まで延長することができる。

6. 試験区の設定

(1) 試験濃度区の設定

等比級数的に少なくとも5濃度区を設ける。

試験濃度及び濃度公比は、予備試験の結果から定める。

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

(2) 対照区の設定

対照区として、被験物質を含まない無処理対照区を設ける。

試験培地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。

(3) 試験区の連数

試験は、各濃度区及び対照区とも3連で行う。

7. 試験培地の調製方法

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

(1) 原体を被験物質として用いる場合

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

難水溶性原体の場合は、以下のいずれかの方法により試験培地を調製する。

ア 被験物質を有機溶剤等の助剤に溶かした試験原液を用いて試験培地を調製する。

この場合、助剤は、試験生物に対して毒性が弱く使用濃度で供試生物に対して有害性が認められず、かつ、被験物質の性質を変えないものを用いる。

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

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

(2) 製剤を被験物質として用いる場合

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

8. 環境条件

(1) 培養方法

無菌培養とする。

試験期間中は試験培地を懸濁状態に保つとともに、通気を促進するため、試験容器を振とう又は攪拌することが望ましい。静置培養で行う場合には、少なくとも1日に2回振とうする。

(2) 培地温度

設定温度は21～25 とし、試験期間中の変動範囲は±2 以内とする。

(3) 照明

400～700nmのスペクトル幅で連続的に均一照射し、液面付近で4000lux程度の照度が望ましい。

(4) 培地

培地の種類

OECD培地 (OECDテストガイドライン201 Alga, Growth Inhibition Test(1984)) 又はAAP(AGP)培地(U.S.EPA:Alga Assay Procedure: Bottle Test, National Environmental Research Center, Corvallis, Oregon(1971))を用いることが望ましい。

培地の量

培地の量は、細胞濃度の測定法及び被験物質濃度の測定法により異なるが、100ml程度が望ましい。

9. 観察及び測定

(1) 細胞濃度の測定

個々の試験容器中の細胞濃度は、曝露開始後24時間間隔で曝露終了時まで測定する。

(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、各試験濃度区ごとに被験物質の濃度を少

なくとも曝露開始時及び終了時に測定する。

被験物質濃度区ごとに各容器から試験液を等量採取し、混和後、測定用試料に供する。

(3) 環境条件の測定

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

測定は、少なくとも曝露開始時及び終了時に行う。

10. 結果の処理法

(1) 濃度 - 阻害率の算出法

試験濃度区と対照区の細胞濃度は測定時間と被験物質(原体を被験物質として用いた場合は実測値)の濃度とともに表にする。それぞれの試験濃度区と対照区の細胞数の平均値を時間に対してプロットし生長曲線を描く。面積法及び速度法を用いて各濃度での生長阻害率を計算する。

(2) EC₅₀の算定

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

11. 回復試験の実施について

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

12. 報告事項

(1) 試験物質について

(2) 供試生物について

種名、株名、入手源、基準物質のEC₅₀等

(3) 試験方法について

曝露条件、環境条件、観察及び測定項目等

(4) 試験結果について

EC₅₀及びその95%信頼限界(可能であれば各観察時間のもの)

EC₅₀の算定方法

NOEC(NOECの値が求められなかった場合はその理由を記す。)

各観察時間における各試験区の細胞濃度及びその平均値

細胞の計数方法

生長曲線

濃度 - 生長阻害率の関係を示すグラフ

観察された影響

被験物質濃度の測定値(原体を被験物質として用いた場合のみ)

環境条件の測定結果

水質、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

13. 試験の妥当性

対照区の細胞濃度は、試験開始後72時間目において、試験開始時における細胞濃度の16倍以上に増加しなければならない。

特定化学物質の環境への排出量の把握等及び管理の改善の促進に関する法律に基づく第一種指定化学物質及び第二種指定化学物質の指定について（答申）の（別紙）PRTR及びMSDS対象化学物質の具体的な選定基準（抜粋）

8. 生態毒性

「動植物の生息若しくは生育に支障を及ぼすおそれ」は、生態系への影響を判断する際に用いる「生態毒性」を意味している。

生態毒性については、OECDが定めたテストガイドラインを用いた生態毒性試験の結果により判断する方法が国際的に定着している。特に、藻類（植物プランクトン）を一次生産者の、ミジンコ（動物プランクトン）を一次消費者の、魚類を高次消費者の代表と見て、この3種類の試験結果で化学物質の生態系への影響を判断する方法が、現時点においてOECDをはじめ国際的に主に用いられていることから、これらを生態毒性の判断の際の項目に用いることが適当である。

生態毒性については、その試験結果の評価を行う機関が少なく、評価済みのデータを集めたデータベースが少ない。今回は、以下の情報源を「評価済み」として用いることが適当である。

- ECETOC (European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals) がまとめた Technical Report (No.56), Aquatic Toxicity Data Evaluation
- 環境庁において実施して評価した生態影響試験報告（平成7～9年度）
- 日本において登録されている農薬に関する公表データ

この他、EUにおける分類表示（Council Directive 67/548/EECに基づくもの）については、根拠としうる定量データがある場合に利用できる。

生態毒性についての分類としては、OECD/IOMCで合意された分類方法を参考にしつつ行うべきである。生態毒性評価においては慢性毒性のデータ数が少ないので、OECD等で実施されているように、データ数の多い急性毒性試験の結果（L(E)C₅₀）も用いて慢性的な影響の程度を判断することが適当である。これにより、今回の物質選定においては、慢性毒性データ（原則としてNOEC）と急性毒性試験結果とを両方利用することとし、この際NOECとL(E)C₅₀とは通常10～100倍程度の開きがあることを考慮して一つの表にまとめた。分類は、OECD/IOMCやEUで用いられている3クラスの分類のうち、有害性の程度の大い方から2つ目までのクラスを用いることとした。なお、これに相当するEUの分類はR50とR51である。

以上より、生態毒性の分類は表7の通りとなる。

これらの分類のいずれかに該当する物質を指定対象候補物質とすることが適当である。

表7 生態毒性の分類

クラス	NOEC	L(E)C ₅₀	EU*
1	0.1mg/l 以下	1mg/l 以下	R50
2	1mg/l 以下	10mg/l 以下	R51

* 根拠となるデータがある場合

魚毒性の判定に必要な試験の具体的な実施方針について（抄）

（平成16年11月30日開催 農業資材審議会農薬分科会特定農薬小委員会及び中央環境審議会土壌農薬部会農薬専門委員会（第4回）資料）

1. 趣旨

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

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

2. 魚毒性の表示設定の経緯について

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

コイとミジンコの具体的な毒性試験方法としては、昭和40年11月25日付け農林省農政局長通知（40農政B第2735号；以下「S40年通知」という）に定められている（別紙2：略）。

表1 魚毒性の分類基準 (ppm)

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

注1：コイに対する48時間後のLC₅₀値

2：ミジンコ類に対する3時間後のLC₅₀値

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

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

3. 現行の魚毒性の分類方法等について

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

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

具体的には、現行GLにより原体を被験物質として、魚類については96時間の急性毒性試験成績から得られた結果に基づく48hr-LC₅₀、ミジンコについては48時間の急性遊泳阻害試験の試験成績から得られた結果に基づく24hr-EC₅₀により分類されている。(例えば、魚類の48hrのLC₅₀が10ppmを超え、かつミジンコの24hrのEC₅₀が0.5ppmを超える場合に魚毒性Aとしている)

なお、平成17年4月より改正水産動植物に係る登録保留基準が施行され、従来コイに対する毒性のみで一律に定めていたものを、魚類、甲殻類、藻類に対する毒性試験結果に基づき環境大臣が定める基準値と公共用水域における環境中予測濃度とを比較して登録の可否を判断する手法を取り入れたものに改めたところであり、魚毒性の分類基準も見直される予定となっている。

4. 国において魚毒性判定のために必要な試験の具体的実施方法

魚毒性試験の方法等については、現行GLと40年通知では以下の相違がある。この点や特定防除資材の特性を踏まえ、特定防除資材の安全性評価を行うための魚毒性試験の具体的実施方法については、以下の方針で行うこととする。

表2 魚類に対する急性毒性試験の比較

	S40年通知	現行GL
曝露期間	48時間 (できる限り24,72時間におけるものを併記する)	96時間 (24,48,72,96時間の一般状態を観察し記録する)
供試生物	原則としてコイ(全長5cm前後) 非水田農薬はヒメダカ、モッコ等でも可	原体はコイ又はヒメダカ ブルギル、グッピー、コジマス等でも可
試験条件 供試魚数 試験濃度区 試験薬液量 その他	各濃度毎に10匹以上 - 特に規定無し - 魚の体重1gにつき1L以上 特になし	各濃度区毎に7匹以上 等比級数的に5濃度区以上 同左 ・曝露期間中の被験物質濃度は設定濃度の80%以上が望ましい ・試験液のPH調整は行わない
結果の処理法	ダートロの方法により半数致死濃度を求める。(片対数グラフの対数目盛に供試薬液の濃度を取り、普通目盛りには生存率を取り、測定された生存率が50%より上の点と下の点で最も50%に近いものを選び、この両者を直線で結び50%の線と交わる点の濃度を半数致死濃度とする)	各濃度における死亡率の結果から一般的に用いられる手法を用いて半数致死濃度を算出する。(報告事項は半数致死濃度と95%信頼限界)

表3 ミジンコに対する急性毒性試験の比較。

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

(1) 被験物質について

登録農薬のほとんどは有効成分が明らかであるため、製剤が有効成分そのものと考えられる一部のもの (有効成分が明らかでない一部のもの) を除き有効成分ベースで LC₅₀ 値等を算出している。しかし、特定防除資材の候補資材については、抽出液であるとか、木酢液等であったりすることから有効成分が何であるのか不明である場合が多いと想定されることから、有効成分ベースでの魚毒性試験の実施が困難である。

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

(2) 魚毒性試験の方法について

評価指針では、昭和 4 0 年代に定めた魚毒性の分類基準が現行でも有効であることから、コイを用いた 4 8 時間の LC₅₀ と、ミジンコを用いた 3 時間の LC₅₀ により魚毒性を判定することとしている。しかし、現行 GL では、魚類に対する 9 6 時間の急性毒性試験とミジンコ類の 4 8 時間急性遊泳阻害試験が位置づけられている。

このため、特定防除資材候補資材の評価に当たり実施する魚毒性試験は、現行 GL に従って魚類急性毒性試験 (9 6 時間) 及びミジンコ類の急性遊泳阻害試験 (4 8 時間) を実施することとする。なお、魚毒性の判定については、評価指針に従って行うこととなるため、当該試験を実施する中で魚類については 4 8 時間時点の LC₅₀ を、ミジンコについては 3 時間後の EC₅₀ を求め、これを用いて行うこととする。(なお、水産動植物に係る登録保留基準の改正等も踏まえ魚毒性の分類基準が見直されたと

きには、特定防除資材の安全性評価に用いる魚毒性の判断基準もこれに準拠することとする。)

(3) 供試魚種について

魚類急性毒性試験の供試魚種については、

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

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