

## 農薬の登録申請に係る試験成績について（抜粋）

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
- 一部改正 平成19年 4月2日 18消安第14851号
- 一部改正 平成20年 3月31日 19消安第14966号
- 一部改正 平成23年 4月 1日 22消安第10015号
- 一部改正 平成25年 5月31日 25消安第630号
- 一部改正 平成26年 5月15日 26消安第532号

### （別添）

#### 家畜代謝試験(2-4-2)

##### 1. 適用範囲

- (1) 農薬（当該農薬の植物代謝物等を含む。）が残留した飼料の用に供される農作物及び稲わら等の農作物の副産物（以下「飼料作物等」という。）を家畜（家きんを含む。以下同じ。）に給与した場合の当該農薬の家畜体内における代謝を定性的、定量的に明らかにするための放射性同位元素で標識した被験物質（以下「標識被験物質」という。）を用いた家畜代謝試験を対象とする。
- (2) 本試験に係る指針はOECDテストガイドライン503「家畜代謝」（2007年1月8日採択）に準拠する。ただし、当該ガイドラインの対象である農薬使用のうち、「農薬の家畜への直接投与」及び「農薬による畜舎内の処理」に係る規定は含まない。

## 2. 目的

- (1) 家畜の組織、臓器、乳及び卵（食用のものに限る。以下「食用の組織等」という。）並びに排泄物中の標識被験物質由来の放射性同位元素を含む成分（以下「残留放射性物質」という。）の性質及びそれらの総濃度（Total Radioactive Residue。以下「TRR」という。）を推定すること。
- (2) 食用の組織等中における残留物の主要成分を同定し、家畜残留試験における分析対象物質（規制対象化合物及び暴露評価対象化合物と考えられるもの）を明らかにすること。
- (3) 反すう動物及び家きんにおける農薬の代謝経路を明らかにすること。
- (4) 残留物が脂溶性（脂肪組織、乳脂肪又は卵黄に分布する性質。以下同じ。）か否かの根拠を提供すること。
- (5) 畜産物に残留する農薬の成分をヒトが摂取する可能性がある場合に、農薬の家畜体内への吸収、分布、代謝及び排泄を説明するための情報を得ること。

## 3. 一般的な留意事項

- (1) 動物代謝試験（2-3-1）のデータ等を家畜代謝試験のデータの代替にすることはできない。ただし、その結果を家畜代謝試験を設計する際に参考とする場合又は家畜代謝試験で残留成分の特徴付けや同定が十分にできなかった場合には、家畜代謝試験の補完として当該試験データを使用することができる。
- (2) 実施した家畜代謝試験データを、家畜残留試験（3-2-1）に関するデータの一部として利用する場合は、実際に起こりえる飼料からの摂取量と同程度の投与量を用いた試験（反すう動物の場合は個体、家きんの場合は投与群）のデータが必要である。その際に食用の組織等中の残留濃度が定常状態に達しないと考えられる場合は、投与期間を延長する必要がある。特に、乳及び卵中の残留濃度が定常状態に達していない場合、当該試験データを家畜残留試験（3-2-1）の一部として利用することについては十分な科学的根拠が必要である。

## 4. 試験の実施が必要な条件

飼料作物等の作物残留試験（3-1-1）において、有効成分及び主要代謝物が定量限界以上残留した場合に本試験の実施が必要である。定量限界は、原則として0.01~0.05 mg/kg（牧草の基準値が適用される飼料作物等の場合は、水分含量を10%に換算した場合に0.01~0.05 mg/kgとなる濃度）を目途に設定するものとする。

## 5. 試験方法

### (1) 被験物質

#### ① 被験物質

被験物質は、原則は農薬の有効成分等（以下「親化合物」という。）とし、親化合物と植物体中の代謝物等との混合物であってはならない。植物体中の主たる代謝物が動物中での代謝物としても存在することが明らかな場合は、原則として当該代謝物を投与する追加試験は必要ない。ただし、植物体中の主たる代謝物が飼料作物等中の総残留の大部分を占める場合等にあっては、当該代謝物を用いた家畜代謝試験を求める場合がある。

#### ② 標識位置

ア 残留する成分を追跡できるように、安定した位置を選定する。

イ 複数の環を持つ構造又は重要な側鎖が存在し、かつ、これらが開裂する可能性がある場合は、それぞれの環又は側鎖を標識し、標識被験物質ごとに試験を実施する。開裂しないことが予想される場合は、その科学的根拠を示すことにより、該当する試験を省略してもよい。ただし、開裂することが明らかになった場合は、開裂した部分を追跡する試験を追加要求する場合がある。

③ 標識に使用する放射性同位元素

ア 標識に使用する放射性同位元素は通常<sup>14</sup>Cとする。

イ 分子内に炭素原子が存在しない場合や不安定な炭素側鎖しか存在しない場合は、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S等も利用可能である。<sup>3</sup>Hは生体内分子中の水素との置換が起こる可能性があることから原則として使用しない。不安定な側鎖への標識あるいは<sup>3</sup>H標識体を用いた試験のデータはその残留放射性物質が全て同定され、かつ、供試した農薬に由来することが確認されている場合にのみ使用することができる。

ウ なお、質量分析法（以下「MS」という。）又は核磁気共鳴法（以下「NMR」という。）による代謝物の同定を目的として、安定同位体<sup>13</sup>C、<sup>15</sup>N、<sup>2D</sup>（置換性のないものに限る。）を併用してもよい。

④ 比放射能

投与する被験物質の比放射能は、食用の各組織等中の総残留量として0.01 mg/kgの定量が可能となるよう設定する。

(2) 投与

① 投与方法

被験物質が確実に投与されるよう、強制経口投与により行う。

② 投与量

ア 家畜代謝試験に用いる投与量は、最大残留濃度の作物を飼料として与えた場合に予想される摂取量（以下「予想飼料最大負荷量」という。）と同等のレベルとする。ただし、各組織における残留物の特徴付け、同定のために十分な残留量を得るため最低でも供与飼料中濃度として10 mg/kg を投与する。

イ 投与量の計算は全て飼料の乾物重ベースとする。予想飼料最大負荷量の算出方法は家畜残留試験（3-2-1）にしたがう。

ウ 投与量が不十分で、残留物の特徴付け及び同定のために十分な放射性物質濃度が得られなかった場合は追加試験を行う。追加試験では、比放射能の増加、最適など殺時間の設定、過剰投与等を検討し、十分な放射性物質濃度を得られるよう試験設計をする必要がある。

③ 投与日数

反すう動物及び非反すう動物は5日間以上、家きんは7日間以上、毎日投与する。

(3) 供試動物及び試料採取

① 供試動物

ア 供試する動物種は、反すう動物においては泌乳山羊、家きんにおいては産卵鶏とする。

イ 供試個体数は標識被験物質ごとに以下のとおりである。ただし、科学的に必要と考える時は、個体数を増やすこと。なお、非反すう動物を用いる場合は、反すう動物の個体数に準じる。

(ア) 泌乳山羊：1頭

(イ) 産卵鶏：10羽（複数の投与量で実施する際には、各投与群あたり10羽）

ウ 対照群は必要ない。

エ 動物代謝試験と反すう動物又は家きんの家畜代謝試験で代謝が顕著に異なる場合（例えば、以下の場合）は、非反すう動物(豚)の代謝試験が必要になる場合がある。

(ア) 代謝経路が異なる場合

(イ) 主要な残留物が異なる場合

(ウ) 毒性学上の懸念が知られている基本構造を持つ代謝物が生じる場合

オ 順化期間は、投与開始時に、乳量及び産卵数が適切に維持されるように設定する。

カ 以下の理由により、組織等中の残留放射性物質濃度が低くなり、組織等への分布が検出されない、又は親化合物と代謝物の相対的な量の比較を困難にする可能性があるため、被験物質を供試動物に事前投与してはならない。

(ア) 代謝酵素が誘導される可能性がある。

(イ) 事前投与された被験物質の残留により、動物体内における分布が変化し、各組織等に存在する親化合物及び代謝物の比放射能が変わる可能性がある。

## ② 動物試料の採取

ア と殺時期の決定に当たっては次の事項に考慮する。また、と殺時期の根拠となった情報を報告書に記載する。

(ア) 一般的にと殺時期（例えば最終投与後1、3、6、9、12時間など）と動態学的情報

(イ) と殺時期は、原則最終投与の6～12時間後とするが、最終投与後の24時間を超えてはならない。また、親化合物の寄与を過大評価することを避けるため、 $T_{max}$ （投与後、被験物質等の濃度が $C_{max}$ （被験物質等の最高濃度）に達するまでの時間）より前にと殺はさけること。

(ウ) 代謝物の同定及び特徴付けに十分な残留放射性物質濃度を確保すること。

(エ) と殺時点における残留放射性物質濃度が十分でないと予想される場合は、動態学的情報から組織中最大濃度を推定し、と殺時期の妥当性を検証する。なお、組織等への分布が速やかな場合には、組織中最大濃度は $T_{max}$ 近傍で生じる。 $T_{max}$ は、供試動物の血液試料を分析することで得ることができる。また、多くの場合、経口投与における動態学的挙動は、ラット、反すう動物、大部分の家きんにおいて類似していることが知られているため、実験動物における動態学的情報や全身オートラジオグラフィーの結果等を参考として用いてよい。

イ 排泄物、乳及び卵は、可能であれば毎日2回採取する。

ウ と殺時には少なくとも以下の組織を採取する。

(ア) 筋肉（反すう動物では腰部及び脇腹の筋肉、家きんでは脚及び胸の筋肉）

(イ) 肝臓（山羊及び家きんでは臓器全部、牛及び豚では肝臓の異なる葉部の代表的部分）

(ウ) 腎臓（反すう動物のみ）

(エ) 脂肪（反すう動物及び豚では腎周囲脂肪、大網膜脂肪及び皮下脂肪、家きんでは内臓脂肪及び皮下脂肪）

エ 採取した臓器について病理検査を行う。異常があった場合には記録し報告書に記載する。

## (4) 試料の分析

### ① 残留放射性物質の同定及び特徴付け

ア 家畜代謝試験では、食用の組織等中に存在するTRRの少なくとも90 %について、付録1に従い、同定及び特徴付けを行う。ただし、次のような理由で同定が困難な場合は、各残留成分の濃度を明らかにし、特徴付けのみを行い、同定が困難な理由及び特徴付けの結果を報告書に記載する。

(ア) 個々の残留放射性物質の量が非常に少ない場合

(イ) 残留放射性物質が生体成分に取り込まれている場合

(ウ) 標識被験物質が容易に代謝され、非常に低濃度の多成分として存在している場合

イ 代謝物の構造が他の登録農薬の有効成分又は代謝物と同じであると同定された場合、当該成分について入手可能な情報を収集する。

## ② 分析対象組織

ア 採取した全ての組織及び臓器等及び排泄物について残留放射性物質濃度を定量する。家きんの場合、1羽ごとの試料の分析が困難であれば10羽分の試料を混合してもよい。

乳についても分析が困難な場合は同一日に採取した同一個体の乳は混合してもよい。乳は脂肪画分と水溶性画分を分離し、それぞれの画分の残留放射性物質濃度を定量する。

イ 組織中残留物が微量であること等により特徴付けが十分に行えない等の場合には、排泄物中の残留物の特徴付けや同定が必要な場合もある。

ウ 筋肉及び脂肪の残留放射性物質濃度は採取部位ごとに定量する。異なる部位(例えば、腹部及び脇腹の筋肉)での残留濃度がほぼ同じ場合は、代謝物を分析する前に同一組織の各部位の試料を混合してもよい。ただし、その際には混合試料中の各部位の混合比を供試動物中の各部位の比率と同等とすること。部位によって残留濃度が明らかに異なる場合は、それぞれ部位ごとに残留放射性物質の特徴付け及び同定を行う。

## ③ 分析方法

ア 分析に供される試料は、均質化したのち、放射能測定を実施し、TRRを算出する。また、投与した放射性物質すべての行方が解明されなければならない。

イ 想定される残留物の性質に応じ、極性その他の特性が異なる溶媒を組み合わせた一連の溶媒系(水溶性の溶媒を含む。)を用いて組織等から残留物を抽出する。得られた抽出液に含まれる残留物を抽出性残留物、抽出残渣に含まれる残留物を非抽出性残留物と定義する。

ウ 抽出性残留物および非抽出性残留物は付録1にしたがって同定、特徴付けを行う。

## (5) 試料の保存

① 代謝試験の試料は原則-18℃以下で保存する。他の条件で保存した場合は、当該条件を記録するとともにその妥当性を説明する。

② 組織等の採取からの期間、分析用試料の調製及び保存期間における試料中の残留物の安定性を確認しなければならない。

③ 試験期間中に採取した組織等及び分析用試料(抽出物を含む。)を適切な条件下で保存し、採取後6ヶ月以内に分析された試料については保存安定性に関するデータは原則必要ない。

④ 試料採取後6ヶ月以内に分析を終了できなかった場合には、試料採取から当該試料を用いた最後の分析が終了するまでの保存安定性を証明しなければならない。保存安定性の検証に使用する組織等は実際に試料として保存されたものとする。例えば、組織等からの抽出物を試料として保存する場合には、その抽出物中での安定性を確認する。

- ⑤ 他の知見から有効成分の安定性が疑われる場合は、採取後6カ月以内であっても試験期間中における安定性を確認する。
- ⑥ 家畜残留試験（3-2-1）等の分析法で用いられる抽出法が代謝試験で用いられた抽出法と異なる場合には、ラジオバリデーションが必要となることがあるため、肝臓、乳とともに、特定の組織等に特定の代謝物が残留している場合は、当該組織等を保存しておくこと。

## 6. 試験報告書に記載すべき事項

### (1) 概要・緒言

- ① 試験の目的、試験設計及びその試験設計を採用した合理的理由
- ② 当該試験の実施にあたって準拠したガイドラインや試験実施体制等に関する情報、予期しなかった試験上の問題、それによる試験計画書からの逸脱及び当該逸脱が試験結果へ及ぼした影響
- ③ 結果の概要（検出された代謝物及び想定代謝経路。（残留物のすべての構成成分（遊離体及び非抽出性画分）の同定及び定量に関する記述、当該構成成分の食用の組織等への分布を含む。））
- ④ 結果の解析（分析した組織、乳及び卵中の残留物の性質に関する結論）
- ⑤ 試験上の問題点及び当該問題点を試験目的に照らした場合の妥当性の評価

### (2) 材料及び方法

#### ① 被験物質

- ア 被験物質の化学名（IUPAC名）、一般名（ISO名等）、企業の開発名、CAS名及び番号、ロット番号、純度、構造式等（分析証明書を添付すること。）
- イ 残留物を構成している親化合物及び代謝物の化学構造、それらの開発名又は実験名（同定において使用した標準物質の純度及びNMRやMSの分析結果等の構造についての情報を記載している分析証明書があれば添付すること。）
- ウ 投与製剤に関する情報（例えば、標識被験物質の投与時に使用した溶媒、担体又は補助成分等）。
- エ 標識被験物質の化学的純度、放射化学的純度、比放射能（MBq/mg）、放射性同位元素の種類及びその由来。標識被験物質に含まれる放射性同位元素で標識された不純物があれば、その化学構造に関する情報。標識被験物質の分子内の標識位置。<sup>14</sup>C以外の放射性同位元素の選択した場合、その妥当性及び分子内の標識位置の決定に関する根拠。
- オ 投与製剤の比放射能（MBq/mg）。実験データから残留放射性物質濃度（mg/kg）に換算した計算例。組織及び臓器並びに各種クロマトグラムの画分ごとの濃度を検証するために十分な情報。
- カ その他標識被験物質に関連があると考えられるすべての追加情報（例えば物理化学的性質等）

#### ② 飼育条件及び供試動物の状態

- ア 飼育環境（例えば、供試動物の収容条件）の詳細な情報
- イ 供試動物の種、系統、年齢、体重、乳量及び産卵数並びに成長段階に関する情報
- ウ 試験中の供試動物の健康に関する情報。例えば、試験中の供試動物の健康状態の所見、肝臓及び腎臓における変化又は所見（あらかじめ実験動物の試験において報告されている場合）

- エ 報告された飼育条件が、試験計画書で定められた供試動物の取扱い方法から逸脱した場合には、その説明及び採用した取扱い方法の根拠
- ③ 投与
  - ア 標識被験物質を供試動物へ投与する際の媒体および投与方法
  - イ 投与量 (mg/kg 体重) と予想飼料最大負荷量 (mg/kg) との関係
  - ウ 1日当たりの投与回数及び投与期間
  - エ 試験計画書で定めた投与量から逸脱した場合には、それに関する考察又は根拠
- ④ 組織及び臓器の採取
  - ア 泌乳山羊、産卵鶏及び豚以外の供試動物を選択した場合、その理由及び妥当性に関する説明。反すう動物又は家きんのいずれかにおける代謝試験が実施されなかった場合、その根拠又は説明。
  - イ 残留放射性物質を分析した組織及び臓器
  - ウ 食用の組織等及び排泄物の採取方法及び採取量
  - エ その他関連があると考えられるすべての追加情報
- ⑤ と殺時期
  - ア 最終投与からと殺までの時間
  - イ と殺時期の根拠となる情報。なお、供試動物から直接得た情報又は実験動物の動態学的情報を利用する場合には、当該情報の要約を記載するか、資料を添付する。
- ⑥ 試料の取扱及び保存安定性 (7. の (3) を参照)
  - ア 採取した試料の取扱、搬出前の保存条件及び保存期間並びに搬出手順
  - イ 実験室での試料の保存条件及び期間
  - ウ 残留物の同定等までの分析用試料の保存条件及び期間
- ⑦ 残留放射性物質の分析に用いた分析法
  - ア 総残留の構成成分が遊離型、抱合型又は非抽出型かを決定するために用いた分析法の性能
  - イ 採取した組織等中の残留物の分析法
  - ウ 酸化燃焼分析又は液体シンチレーション分析法
  - エ 供試動物から検出した残留物の主要な構成成分の定量結果
  - オ 各試料における残留量測定のために使用した装置の詳細を含む分析条件
  - カ 計数時間、1分当たりの壊変率 (dpm)、検出した親化合物当量濃度、感度、検出限界及び代表的な計算例
  - キ クエンチング補正を用いる放射能分析法の場合、クエンチング補正の方法及びクエンチングを低減するために用いた方法。
- ⑧ 残留放射性物質の抽出及び分画
  - ア 採用した抽出法 (分画法を含む。) とその方法に関する考察及び根拠
  - イ 非抽出性残留物の抽出又は抱合体から残留放射性物質を遊離させるために使用した加水分解条件及びそれらを利用した根拠
  - ウ 各抽出画分における遊離型又は抱合型の親化合物若しくは代謝物の比率及び量
  - エ 溶媒抽出及び加水分解処理をした後に抽出残渣に残っている残留放射性物質量の推定値 (TRRに対する割合 (%TRR) 及び濃度 (親化合物当量(mg/kg))) 。
  - オ 採取した組織及び臓器ごとの放射化学的抽出効率

カ 分画及び単離手順における放射性物質のロス及びロスを最小限に留めるために行った方策についての考察

キ 非抽出性残留放射性物質の大部分が生体成分へ組み込まれたか否か。

ク 各試料画分（水溶性、有機溶媒可溶性、加水分解による遊離等）における各残留放射性物質の割合（%TRR）及び濃度（親化合物当量(mg/kg)）。

⑨ 残留放射性物質の特徴付け・同定

ア 特徴付け及び同定に用いた親化合物、すべての既知の代謝物及び想定される中間体（これらの構造及び標準物質の純度）の詳細なリスト

イ TLCラジオオートグラムにおける分析対象物質及び標準物質のRf値、GC及びHPLCカラムにおける相対保持時間。予想値からの逸脱又は差異並びにこれらの問題を補正するために取られた措置についての考察

ウ 同定に使用したTLC板又はオートラジオグラム等の画像及び質量スペクトルスキャンなどを含むHPLC/GCクロマトグラム（分析用標準物質のクロマトグラムを含む。）

エ 代謝物を分離し特徴付け及び同定するために用いた補助的分析法（高電圧電気泳動、イオン交換法、排除クロマトグラフィー、誘導体化等）及び代謝物の最終的な同定を行うために用いた機器分析法（MS、NMR等）の詳細

オ 組織若しくは臓器又は分析した抽出画分から検出した放射性物質の割合（%TRR）及び濃度（親化合物当量(mg/kg)）

カ 非抽出性残留放射性物質を特徴付け又は同定するために用いられた方法

キ 残留物の構成成分が次のいずれに該当するか報告しなければならない。

（ア）遊離型残留物

遊離させるために化学的処理を必要とせず、有機溶媒によって通常抽出可能なもの

（イ）抱合型残留物

農薬由来成分とグルクロン酸、硫酸、アミノ酸、グルタチオン等の生体由来成分との抱合体になっているもの。通常、酸、塩基又は酵素による加水分解によって抱合体を開裂させることにより、農薬由来成分が同定される。

（ウ）非抽出性残留物

生体成分と共有結合している代謝物であって、極性又は非極性溶媒による抽出によって抽出できないもの。酸、塩基又は酵素による加水分解によって抽出残渣から遊離できるものは、非抽出性残留物に分類する。

（エ）生体成分

農薬が分解され、同化サイクルの中に入り込み細胞成分の中へ組み込まれた場合に当てはまる。当該生体成分が抽出されないものである場合には、（ウ）の非抽出性残留物と区別することは困難である。

ク その他家畜の代謝試験の実施及びTRRの決定に関連する追加情報

（3）結果と考察

① 試験計画

予期せぬ実験上の問題により試験計画書から逸脱した場合、当該逸脱に関する考察。例えば、残留物の抽出、分画、特徴付けにおける問題が生じた場合、非抽出性残留物に特殊な抽出法又は特徴付けを採用した場合の考察。また、試験結果に対してこれらの逸脱が影響を及ぼした場合には、その考察。

② 代謝経路

可能であれば、供試動物中での代謝経路の詳細な考察及び代謝経路図。動物代謝試験及び植物代謝試験の結果と本試験で得られた結果を比較考察する。特徴付け・同定試験の結果に基づき、代謝物の化学構造及び名称（IUPAC名及びCAS名、CAS番号を含む。）の表を添付し代謝経路の化学的意味付け（どのような化学反応によるか等）をしなければならない。推定中間体及び推定代謝物も、その経路において明示しなければならない。

③ 総残留の特徴付け、同定及び分布

ア 表又はグラフを用い、総残留のすべての主要な構成成分（遊離型、抱合型及び非抽出型）について、名称、構造及び量（割合%TRR及び濃度（親化合物当量として(mg/kg)））、各画分内の分布及び当該構成成分が遊離型、抱合型、非抽出性又は生体成分のいずれに該当するか。

イ 同定又は特徴付けができない主要な最終残留物の総量及び各画分への分布に関する情報

ウ 統計学的処理（家畜の代謝試験における試料採取及び分析結果の生データに適用した統計学的検定の代表例を含めること。）。また、放射性物質の測定及びクロマトグラフィーにおける定量限界。

④ 試験の妥当性を確保するためにとられた精度管理に関する措置及び事前注意、その他家畜代謝試験に関する詳細な説明のために関連があると考えられるすべての追加情報

(4) 結論

① 供試動物において観察された代謝経路、メカニズム

② 採取された組織、卵及び乳における総残留量、構成成分及び分布

③ 分析対象物質の抽出方法及び分析法。動物組織、臓器、乳、卵試料を用いた当該分析法の妥当性検証結果。

④ 家畜における動態及び代謝プロセスを完全かつ詳細に理解するための結論

(5) 添付資料

① 代表的クロマトグラム、スペクトル等（該当がある場合）

② 試験の実施にあたって参考とした試験報告書等のリスト

7. 参考文献

(1) OECD Guidelines for the testing of chemicals: Metabolism in Livestock (2007)

(2) OECD Guidelines for testing of chemicals: Residues in Livestock (2007)

(3) OECD Guidance Document: Overview for Residue Chemistry Studies (2006)

(4) OECD Guidance Document on the Definition of Residue (2006)

(5) Commission of the European Communities (1997). Document 7030/VI/95-Rev.3 (22/7/1997) ; Appendix F: Metabolism and Distribution in Domestic Animals.

(6) Food and Agriculture Organisation of the United Nations (2009) FAO Manual on the Submission and Evaluation of Pesticide Residues Data.

(7) Food and Agriculture Organisation of the United Nations (2002) Submission and Evaluation of Pesticide Residues Data for the Estimation of Maximum Residue Levels in Food and Feed. Rome.

(8) Food and Agriculture Organisation of the United Nations (1996). Guidelines on Pesticide Residue Trials to Provide Data for the Registration of Pesticides and the Establishment of Maximum Residue Limits, Section 2.1 Radiolabelled Studies (Metabolism Studies). Rome.

## 付録1 残留放射性物質の同定と特徴付け

### 1. 抽出性残留物の同定及び特徴付け

#### (1) 同定

- ① 「同定」は残留放射性物質の構造決定をいう。同定は下記のいずれかの方法で行う。
  - ア 構造既知の標準物質とのクロマトグラフィーによる同定
  - イ MS、NMRなどによる構造決定による同定
  - ウ クロマトグラフィーの場合、例えば順相及び逆相のように独立した二種の系を用いること。逆相及び順相のTLC又はHPLCの分離能が適切である場合は、MS等による追加の確認は要求しない。
- ② 0.05 mg/kg未満又はTRRの10 %未満の代謝物については、推定代謝物を標準物質として用いた一種のクロマトグラフィーでの同定でもよい。

#### (2) 特徴付け

- ① 「特徴付け」は同定の前段階で行われる残留放射性物質の特性の解明をいう。有機溶媒や水への易溶解性、中性、酸性、塩基性、極性、非極性、非抽出性などがある。
- ② 共通構造への変換又は特定試薬への反応性によって、分子内に存在する部分構造を特定することも特徴付けに含まれる。
- ③ 残留放射性物質の全てについて同定できない場合、同定されていない残留放射性物質にどの程度の特徴付けが必要かは以下の要因により決まる
  - ア 残留放射性物質の量
  - イ TRRに対する同定率
  - ウ 食品としての重要性
  - エ 毒性学上の懸念
  - オ 残留放射性物質を検出する分析法の能力

#### (3) その他

- ① 非常に過剰な投与量で実施された代謝試験で、食用の組織等にほとんど残留放射性物質が検出されなかった場合は、特徴付け、同定の必要性は低い。

例えば、以下のような場合、最低限の特徴付け、同定で十分である。ただし、当該残留濃度において、毒性学上の特別な懸念がない場合に限る。

(例) 通常の子鼠最大負荷量が飼料中の濃度として0.01 mg/kg以下であって、家畜代謝試験で飼料中濃度として10 mg/kg以上投与し、その試験の結果、食用の組織等中のTRRが0.1 mg/kg以下であった場合
- ② 代謝物の立体構造は必ずしも決定する必要はない。ただし、毒性学上の懸念がある場合は、立体異性体比を考慮しなければならない。
- ③ 超臨界流体抽出法(SFE)、マイクロ波抽出法、高速溶媒抽出法(ASE)等の新技術を利用可能な範囲で用いてできるだけ代謝経路を明らかにすること。

#### (4) 代謝物の同定が必要な場合

- ① 供試動物の各食用の組織等について特徴付け又は同定が必要となる残留放射性物質濃度の閾値は表1のとおりである。

なお、濃度に基づく閾値は絶対的なものではなく、どの程度の同定又は特徴付けで十分かを判断するための目安である。また、より低濃度で毒性学上の懸念がある場合は同定や特徴付けが必要となる。

- ② 1つの代謝物が複数の抽出画分に存在する可能性があることに留意する。
- ③ 特定の残留放射性物質が多数の抽出画分に分かれる場合、各画分をクロマトグラフィーにより分析し、各画分に含まれる当該物質の量を合計し、同定あるいは特徴づけが必要か否かを判断する。

表 1. 残留放射性物質の同定及び特徴付けの基準

%TRR	濃度 (mg/kg)	必要となる特徴付け及び同定
<10	<0.01	同定等の必要なし。ただし、毒性学上の懸念がある場合を除く。
<10	0.01 - 0.05	特徴付けを行う。標準物質が入手可能な場合、すでに実施された試験で同定がなされている場合など、簡易にできる場合のみ、同一性の確認を行う。
<10	>0.05	TRRに対する同定率を考慮しつつ、特徴付け・同定を行うか否かを個別に決定する。
>10	<0.01	特徴付けを行う。簡易にできる場合のみ、同一性の確認を行う。
>10	0.01 - 0.05	代謝経路を特定するために必要な場合には、同定を試みる。少なくとも特徴付けは必要。
>10	>0.05	技術的に可能な限り同定する。
>10	>0.05 非抽出性放射性物質	「2非抽出性残留物の遊離」及び 図 1 にしたがって残留放射性物質の遊離、特徴付け等が必要。

## 2. 非抽出性残留物の遊離

(1) 残留放射性物質が家畜体内で非抽出性として検出されるのは以下の状況が考えられる。

- ① 生体内分子（アミノ酸、糖等）へ組み込まれた場合。これは、標識被験物質が生体成分の生合成に利用できるほど小さい炭素単位（1個か2個）に分解された場合に起こる。
- ② 生体内分子の特定の部分と強固に結合し、残留物を形成している場合。これは化学反応（例えば、酸、塩基及び酵素による加水分解）によって遊離させることができる。
- ③ 組織への物理的な抱合や取り込みが起こっている場合。この状況で残留物を遊離させるためには組織の可溶化が必要となる。通常は強塩基を用いた還流処理によるが、界面活性剤の使用により、より穏やかな条件で残留物を遊離させることも可能である。

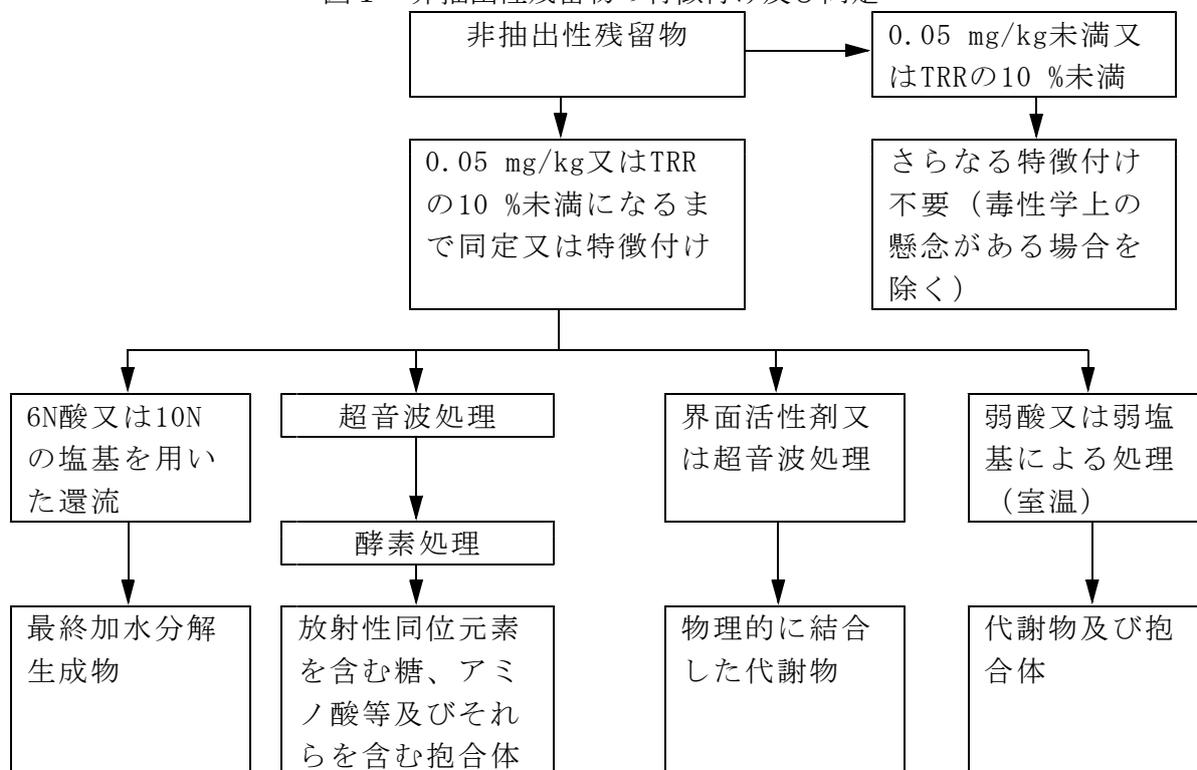
(2) 非抽出性残留物の遊離の一般的手順を以下に示す（図 1 を参照）。

- ① 抽出後、残渣中の残留放射性物質濃度が0.05 mg/kg 又はTRRの10 %以上の場合には、残留放射性物質の遊離を試みる（表1を参照）。遊離処理後、残渣中の非抽出性放射性物質濃度が0.05 mg/kg未満かTRRの10 %未満であった場合は、これ以上、遊離を行う必要はない。
- ② 遊離した残留放射性物質を定量し、表1の基準を適用して同定及び特徴付けを行う。特徴付けは、遊離した残留放射性物質のクロマトグラフィーでの挙動と、親化合物及びその類似構造を持つ想定代謝物の標準品のクロマトグラフィーの挙動を比較する。
- ③ 一連の遊離処理は、連続的に行うか、あるいはサブサンプルごとに行う。遊離処理には以下のものが含まれる（図1参照）。穏やかな処理ほど代謝物の構造は維持される。
  - ア 37 °Cでの弱酸又は弱塩基による処理
  - イ 界面活性剤での処理

ウ 酵素処理

エ 6Nの酸又は10Nの塩基を用いた還流

図1 非抽出性残留物の特徴付け及び同定



(3) 非抽出性残留物が総残留量の大部分を構成すると考えられる場合には、残留物が生体成分であるかどうかを確認することが望ましい。放射性同位元素がアミノ酸、糖、フェノール化合物、ヌクレオチド等の内因性化合物に組み込まれていることが判明した場合、さらなる特徴付け及び同定の必要性は低い。一般に生体成分の生合成に利用できるほど農薬が小さな炭素単位に分解されていることを意味する。このような場合、非抽出性残留物が表1の基準を超えていても、同定及び特徴付けが必要ない場合がある。

ただし、<sup>3</sup>H標識や分子中の不安定な位置を<sup>14</sup>C等で標識した場合又はTRRの相当な部分(0.05 mg/kg以上又は総残留量の10%以上)を占める単一の遊離代謝物が同定されていない場合にはこの限りではない。

## 家畜残留試験(3-2-1)

### 1 適用範囲

- (1) 農薬（当該農薬の植物代謝物等を含む。）が残留した飼料の用に供される農作物及び稲わら等の農作物の副産物（以下「飼料作物等」という。）を給与した家畜（家きんを含む。以下同じ）由来の筋肉、脂肪、肝臓、腎臓、乳、卵等（以下「組織等」という。）中の残留物を定量するために実施する家畜残留試験を対象とする。
- (2) 本試験に係る指針はOECDテストガイドライン505「家畜の残留試験」（2007年1月8日採択）に準拠する。ただし、当該ガイドラインの対象である農薬使用のうち、「農薬の家畜への直接投与」及び「農薬による畜舎内の処理」に係る規定は含まない。

### 2 目的

畜産物の残留基準値（Maximum Residue Limits : MRLs）の設定と暴露評価に用いるデータを提供すること。

### 3 一般的な留意事項

- (1) 本試験を実施することにより、畜産物への残留物の移行を定量的に見積もることができる。
- (2) 家畜に農薬を投与するにあたっては、最大残留濃度の作物を飼料として与えた場合に予想される摂取量（予想飼料最大負荷量）を基準とする。
- (3) 原則は、反すう動物及び家きんを用いて残留試験を実施する。豚で代謝試験を実施し、その代謝経路が反すう動物と異なる結果が得られた場合には、豚を用いた残留試験を実施しなければならない。
- (4) 試験結果の他の動物種への外挿は以下を原則とする。
  - ① 泌乳牛を用いた残留試験から求められた筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及び乳の残留濃度をすべての陸棲ほ乳類の同じ種類の組織等に適用する。ただし、豚を用いた残留試験を行う場合には、その結果を豚の残留濃度とする。
  - ② 産卵鶏を用いた残留試験結果から求められた筋肉、脂肪、肝臓、及び卵の残留濃度をすべての家きん由来の同じ種類の組織等に適用する。

### 4 試験の実施が必要となる条件

家畜代謝試験（2-4-2）の結果、畜産物中に被験物質及び主要代謝物が0.01 mg/kgを超えて残留していると考えられる場合等に本試験の実施が必要である。

ただし、畜産物中に残留が認められる場合であっても、その濃度が定量限界に限りなく近く、かつ、家畜代謝試験（2-4-2）における家畜への投与量が予想飼料最大負荷量より著しく多い場合で、家畜代謝試験（2-4-2）における家畜への投与量に対する予想飼料最大負荷量との比率を考慮して、推定される予想飼料最大負荷量を投与した場合の畜産物の残留濃度が0.01 mg/kg未満であれば、本試験は不要とすることができる。

### 5 試験方法

#### (1) 被験物質

- ① 被験物質は原則、農薬の有効成分とする。
- ② 植物体中の主たる代謝物が動物中での代謝物としても存在することが明らかな場合は、当

該代謝物を用いた追加試験は不要である。植物代謝においてのみ検出される代謝物が飼料作物等中の残留の大部分を占める場合は、当該代謝物を投与することが適切である。一般に、複数の被験物質の同時投与は推奨しない。混合物を用いる場合はその根拠を説明することが必要である。

## (2) 投与

### ① 投与方法

飼料作物等中の残留濃度に基づき、一定期間確実に暴露させるために、被験物質はカプセル投与することが望ましい。混餌投与の場合には、飼料と被験物質を均一に混合することが必要であり、定期的な分析を行って、試験期間における飼料中の被験物質の均一性及び安定性を確認しなければならない。

### ② 投与量

ア 家畜（牛、豚又は家きん）ごとに予想飼料最大負荷量を決定し、通常3段階の用量（予想飼料最大負荷量の1倍、3倍及び10倍）で実施する。予想飼料最大負荷量は、同じ種類の動物で試算した最大負荷量のうち最も高いものとする。例えば、泌乳牛と比較して肉牛に対する飼料負荷量が高いと推定される場合には、家畜残留試験に泌乳牛が用いられる場合でも、肉牛の予想飼料最大負荷量を1倍投与量とする。

イ 将来加工して給餌することを考慮する等、飼料負荷量が予想より低くなる場合を想定し、予想飼料最大負荷量の1倍より低い投与量を追加してもよい。

ウ 予想飼料最大負荷量の具体的な算出方法は付録1のとおりである。

エ 複数の投与量で実施して得た情報は次のように利用する。

(ア) 適用拡大によって、予想飼料最大負荷量が試験実施時よりも高くなった場合に、畜産物の残留基準と暴露評価の見直しが必要になることがある。適用拡大後の予想飼料最大負荷量が実施した家畜残留試験の投与量の範囲内にある場合には、投与量と畜産物中残留濃度を直線回帰し、予想飼料最大負荷量を内挿することにより新しい使用方法に基づいた畜産物中残留濃度を算出することができる。

(イ) 投与量と残留濃度の間に直線関係がない場合には、投与量から残留濃度の推定は慎重に行わなければならない。また、反すう動物と、著しく異なる飼料を給餌されている他の家畜に外挿することは妥当でない場合がある。

### ③ 投与日数

被験物質は、供試動物に少なくとも28日間毎日投与しなければならない。28日間の投与で乳又は卵の残留濃度が定常状態にならない場合は、定常状態になるまで毎日投与しなければならない。

## (3) 供試動物及び試料採取

### ① 供試動物

#### ア 動物種

原則、反すう動物においては泌乳牛、家きんにおいては産卵鶏とする。

#### イ 供試動物数

(ア) 泌乳牛：無処理群（対照群）1頭

被験物質投与群3頭（各投与量ごとに）

(イ) 産卵鶏：無処理群（対照群）1羽（各投与群ごとに）

被験物質投与群は9～10羽（各投与量ごとに）

(ウ) 肉牛あるいは豚を用いた残留試験を実施する際の試験条件は、特に定める場合を除き

泌乳牛に準じる。

## ② 対照群の利用

対照群は、当該残留試験において乳量、産卵数及び動物の健康状態に被験物質投与以外の影響があるか否かを確認するために必要である。また、対照群の試料を分析法の検証に使用することもできる。

## ③ 動物の状態

ア 年齢、体重、各個体又は群平均での毎日の摂餌量、乳量又は産卵数並びに順化及び投与期間中の動物の状態に関する情報を記録すること。泌乳牛は、商業的な牛乳生産における平均的な乳量であることを確認して試験に用いること。産卵鶏は、十分な産卵数であることを確認して試験に用いること。摂餌量を個体ごとではなく群平均として記録する場合には、その個体差に留意すること。

イ 健康上の問題、異常行動、摂餌量の減少があった場合、また、通常行わない治療を行った場合には記録し、試験結果へ影響を及ぼすものであるかを適宜考察することが望ましい。

ウ 適切な順化期間を設け、その期間に摂餌量、体重の推移、乳量及び産卵数が正常であることを確認する。

## ④ 動物試料の採取

ア 泌乳牛は最終投与後24時間以内にと殺する。産卵鶏は最終投与後6時間以内にと殺する。と殺の際に、組織等に血液その他の体液、尿、糞が付着しないよう留意すること。

イ 泌乳牛、産卵鶏及び豚から採取する試料の詳細を、表1、表2及び表3に示す。残留濃度は個体ごとに分析しなければならない。産卵鶏の場合は3羽ごとにまとめて分析しても良い。分析対象物質が脂溶性であると考えられる場合は、各部位の脂肪は混合せず別々に分析する。（(10) ①を参照）

ウ 採取した肝臓及び腎臓の所見を記録すること。特に、動物代謝試験（2-3-1）において報告された所見について注意しなければならない。

エ 乳及び卵は、以下のように採取すること。

（ア）投与開始前に全供試動物から乳又は卵を採取し、対照試料とする。

（イ）投与開始後、試料採取日は少なくとも週に2日（例えば、3日又は4日ごと）とする。

（ウ）乳は試料採取日に午前と午後に1回ずつ、個体ごとに採取する。同一日に投与と採取を行う場合には、投与前に試料採取を実施する。

（エ）対照群の試料を採取後、投与群の試料を採取する。

（オ）同一日に採取した同一個体の乳は混合してもよい。別の個体から採取した乳は混合してはならない。

（カ）卵は、試料採取日には2回採取する。採取時に付着している排泄物等を除去する。

（キ）同一日に同じ投与群の産卵鶏から採取した卵は、分析及び保存に適した試料重量とするために必要な場合は混合してもよい。ただし、各時点で同一投与群ごとに3例の試料を確保すること。

表 1. 反すう動物の試料採取

採取する試料	採取方法	分析用試料の調製	採取重量
筋肉	腰、脇腹及び後脚（もも）の筋肉を概ね等量採取	細切して均一に混合	0.5 kg
脂肪	皮下脂肪、大網膜脂肪、腎周囲脂肪を概ね等量採取	細切して均一に混合	0.5 kg
肝臓	臓器全体又はその代表的部分（例えば各葉の切片）を採取	細切して均一に混合	0.4 kg
腎臓	両腎から採取		0.2 kg
乳 <sup>*1</sup>	個体毎に乳を採取		0.5 L <sup>*2</sup>

\*1 脂溶性化合物については、定常状態に達した時点以降、最終投与時まで乳脂肪中の残留濃度を測定する必要がある。乳脂肪は物理的方法で乳から分離し、分析に供することが望ましい。分離する前に溶媒抽出すると水相と脂肪相の両方から残留物が抽出されるからである。クリーム（脂肪を40～60 %含有）と無脂肪乳を分離し、クリーム中の脂質含有量を記録する。

\*2 分析するまでに凍結保存が必要な場合は、個体ごとに採取試料を混合した後、分析時の試料量まで減じてよい。

表 2. 家きんの試料採取<sup>\*1</sup>

採取する試料	採取方法	分析用試料の調製	採取重量
筋肉	脚及び胸部から概ね等量を採取	3羽分の試料を細切して均一に混合	0.5 kg
脂肪	腹部脂肪を採取 3羽からの脂肪を混合	3羽分の試料を細切して均一に混合	0.05 kg
肝臓	臓器全体を採取	3羽分の試料を細切して均一に混合	0.05 kg
卵	各個体ごとに卵を採取	殻を洗浄し、3羽分の卵を割り、卵黄及び卵白を混合 <sup>*2</sup> 。 残留物が脂溶性の場合は、卵黄及び卵白間の分布を確認するために、別々に分析する必要がある <sup>*3</sup> 。	3 例

\*1 少なくとも1群3例のサンプルを確保する（すなわち1群9羽以上）。

\*2 分析施設への輸送前後のどちらかで試料を調製してもよい。ただし、溶媒の添加は分析開始時に行う。

\*3 卵黄と卵白の重量が既知であれば、それぞれ別々に分析し、MRLの設定のために卵全体の残留濃度を算出してもよい。その場合、卵黄と卵白は試料の保管の前に分離する必要がある。

表 3. 豚の試料採取

採取する試料	採取方法	分析用試料の調製	採取重量
筋肉	腰、脇腹及び後脚の筋肉から概ね等量採取	細切して均一に混合	0.5 kg
脂肪	皮下脂肪、大網膜脂肪及び腎周囲脂肪を概ね等量採取	細切して均一に混合	0.5 kg
肝臓	臓器全体又はその代表的部分（例えば各葉の切片）を採取	細切して均一に混合	0.4 kg
腎臓	両腎臓から採取	細切して均一に混合	0.2 kg

(8) 試料の分析

① 分析対象物質

当該農薬の有効成分のほか、家畜代謝試験（2-4-2）等において生成した主要な代謝分解物とする。ただし、これらの代謝分解物のうち、毒性学上の懸念がない又はそれら代謝分解物が残留するおそれがないと判断される場合は除く。

② 分析方法

ア 分析方法の妥当性は、作物残留試験（3-1-1）に準じて確認又は検証する。

イ 定量限界は、当該化合物の毒性によるが、原則0.01~0.05 mg/kg以下を目途に設定する。

③ 食用組織及び臓器

最高用量群の試料から分析を開始することが望ましい。最高用量群の試料の残留濃度が定量限界未満であれば、低用量群の試料を分析する必要はない。

個体間の残留濃度の変動を明らかにするために、泌乳牛及び豚では、一頭ごとに各組織等を分析しなければならない。家きんについては、3羽から得た試料を混合し、1例としてよい。各投与群について3例を確保する。

④ 乳及び卵

試料を投与開始前及び投与開始後残留濃度が定常状態に至るまではすべての試料を分析する。定常状態に達した後は1週間間隔（例えば14日、21日、28日）で分析してもよい。各投与群について各時点で3例分析する。ただし、最高用量群の試料が定量限界未満であれば、低用量群の試料を分析する必要はない。

(9) 保存安定性

代表的な組織について試料採取から分析までの間の保存安定性を証明するデータを提出しなければならない。ただし、保存期間が30日以内で、物理的・化学的性質等から分析対象物質の安定性を説明できる場合には、省略してもよい。保存安定性試験の方法は、作物残留試験（3-1-1）に準じる。

(10) 試験実施にあたってその他の考慮事項

① 脂溶性化合物の場合の考慮事項

ア 脂溶性に分類するか否かは、主に家畜代謝及び家畜残留試験において見られる筋肉と脂肪の間での分析対象物質の分布割合に基づいて評価する。畜産物の試料採取手順は、脂溶

性であるか否かで変わるため留意すること。

イ 脂溶性であると考えられる場合には異なる種類の脂肪組織を混合すると残留濃度を過小評価する可能性があるため、各脂肪組織を別々に分析しなければならない。また、各脂肪組織について、以下の情報を記録すること。

(ア) 脂肪の種類及び採取部位（例えば、皮下、大網膜及び腎周囲の脂肪）

(イ) 脂質含有量（精製又は抽出された脂肪は100 %脂質であると仮定）又は文献値

② 減衰試験を実施する際の考慮事項

減衰試験を実施するにはOECDテストガイドライン505の減衰試験に関連する項目を参考とすること。

③ 農薬が残留した飼料作物等の給与による暴露だけでなく、当該化合物の家畜への直接使用による暴露が考えられる場合には、事前に独立行政法人農林水産消費安全技術センターに相談すること。

6 試験報告書に記載すべき事項

(1) 概要・緒言

① 試験の目的、試験設計及びその試験設計を採用した合理的理由

② 当該試験の実施に当たって準拠したガイドラインや試験実施体制等に関する情報並びに予期しなかった試験上の問題並びに当該問題による試験計画書からの逸脱及びその逸脱が試験結果へ及ぼした影響

③ 結果の概要（投与後、組織等への残留物の移行、特定の組織等への蓄積の有無、各組織等での最大残留濃度、乳又は卵における残留濃度が定常状態に達したかどうか）

④ 結果の解析（残留物の飼料を通じた組織等への移行についての結論及び移行の程度に関する考察）

⑤ 試験上の問題点及び当該問題点を試験目的に照らした場合の妥当性

(2) 材料及び方法

① 被験物質

ア 被験物質の化学名（IUPAC名）、一般名（ISO名等）、企業の開発名、CAS名及び番号、ロット番号、純度、構造式等。分析証明書を添付すること。

イ 分析対象物質の化学構造、それらの開発名または実験名。その純度及び構造についての情報を記載している分析証明書があれば添付する。

ウ 投与製剤に関する情報（例えば、被験物質の投与時に使用した溶媒、単体又は補助成分等）

エ 農薬の有効成分以外の化合物を被験物質として用いる場合はその根拠

② 飼育条件及び供試動物の状態

ア 飼育方法及び施設（囲いの広さ、飼育単位、飼料及び飲料水の容器、温度、照明、排泄物の取扱い等）

イ 供試動物の種、系統、年齢、体重（推移を含む。）、一般状態

ウ 個体識別の方法（例えば耳標）

エ 順化、投与期間及び消失期間中の体重及び乳量又は産卵数。

オ 供試動物の健康上の問題若しくは異常行動又は予定されていなかった処置及びこれらの試験結果への影響についての考察

カ 採取した肝臓及び腎臓の所見

### ③ 給餌

ア 順化期間及び投与期間中の供試動物の飼料について次の事項を記載すること。

(ア) 飼料及び飲料水の種類

(イ) 給餌量（規定量の給餌か自由摂取か等）

イ 個体又は投与群ごとの摂餌量（反すう動物については乾重量）を記載すること。

### ④ 投与

ア 投与量及び投与方法

混餌又はゼラチンカプセル等の投与方法、投与量（飼料乾重量当たりの被験物質濃度（ppm (mg/kg 飼料)）及び投与量設定の根拠

イ 投与被験物質調製日及び投与までの保存条件

ウ 飼料の添加回収試験に用いた分析方法及びその分析結果。被験物質が飼料調製から投与までの期間を通して飼料中で安定であったことの証明

エ 混餌投与でない場合は投与頻度

オ 投与開始日と終了日（又は投与期間）。投与量はmg/kg飼料、mg/動物/日又はmg/kg 体重/日として記載する。

カ 投与群及び対照群当たりの供試動物数

### ⑤ 乳及び卵の採取

乳及び卵の採取方法が通常の方法と異なる場合があればその内容。また、複数の試料を混合した場合はその方法。

### ⑥ と殺後の試料採取

ア と殺方法及び最終投与からと殺までの時間。最終投与からと殺までの時間が24時間以上経過した場合は、その理由及び残留物への影響の考察。

イ と殺後に採取した組織、その部位（例えば、腰、脇腹及び後脚の筋肉等）及びその重量。異なる個体の試料を混合した場合はその方法。

### ⑦ 試料の取扱い及び保存安定性

ア 試料採取から分析までの期間の試料の保存及び取扱いに関する以下の項目

(ア) 保存前の試料調製方法

(イ) 保存容器

(ウ) 試料採取から保存までの時間

(エ) 保存温度

(オ) 保存期間（採取、発送、分析の日付等）

(カ) 該当がある場合には輸送方法

イ 30日以内に試料を分析しなかった場合、その保存が試験結果に影響を与えなかった根拠（保存安定性等）

### ⑧ 抽出、精製、測定及び解析に用いた方法

試料の抽出、精製及び測定に用いた方法の詳細。組織等中の残留物質の同定、定量及びその結果の解析に用いた方法。

### ⑨ 試料の分析

ア 残留分析に採用した分析方法（妥当性検証結果、回収率及び分析感度を含む。）の詳細。分析対象物質の選定に関する陳述。なお、当該分析方法についての情報を他報告書で提出している場合には、当該報告書を引用することでよい。代謝物が分析対象である場合も同様。

イ 残留濃度及び回収率の根拠となるデータ（対照群、添加回収試料（保存安定性を確認するための試料を含む。）及び投与群の試料重量、最終の抽出液量並びにクロマトグラム上のピークの高さ又はピークの面積等）

ウ 使用した分析機器（その測定条件を含む。）及び試薬。抽出及び精製方法が複雑である場合にはそのフローチャート。

エ 分析法を検証しその感度（定量限界）を確定するため、添加回収試験の結果を記載する際には次の各項目を含める。

（ア） 添加した化合物及び試料（使用した組織等の名称）

（イ） 添加濃度

（ウ） 添加濃度ごとに添加した化合物別の反復分析回数

オ 添加、抽出、分析の日付。添加又は抽出等を行った日に分析をしない場合、当該試料の保存条件。

カ 検量線並びに各組織等ごとの対照群、添加回収試料及び投与群について残留物の代表的なクロマトグラム、生データを用いた濃度計算及び回収率の例

### （3）結果と考察

① 各組織、乳、卵での分析対象物質の回収率（%）（分析ごとの回収率を示すこと。）

② 各組織、乳、卵での分析対象物質の経時的な保存安定性。保存期間及び保存条件（温度等）。

③ 各投与量における各組織等中の残留濃度（対照群試料も含む。）（分析値は個々の試料について示し、回収率による補正を行ったかどうかを明記すること。また、分析対象物質が複数の物質である場合には、分析可能な限り各物質ごとの分析値を報告すること。なお、乳及び卵中の残留濃度は、各試料採取日の投与量ごとに報告すること。）

⑤ 残留物について、乳、卵、脂肪、筋肉、肝臓又は腎臓への移行の有無、乳及び卵において定常状態に達した時期、特定の組織への選択的な蓄積の有無及び家畜代謝試験（2-4-2）の結果との一致の程度についての考察

⑥ 申請した使用方法に照らした試験結果の妥当性の考察

### （4）結論

当該農薬の残留物の飼料を通しての組織等への移行の有無についての結論及び移行の程度についての考察（具体的な畜産物中残留濃度の算出方法は付録2を参照。）

### （5）添付資料

① 代表的クロマトグラム、スペクトル等（該当がある場合）

② 試験の実施にあたって参考とした試験報告書等のリスト

## 7 参考文献

(1) OECD Guidance Document: Overview for Residue Chemistry Studies (2006)

(2) OECD Guidance Document on the Definition of Residue (2006)

(3) OECD Guidelines for the testing of chemicals: Metabolism in Livestock (2007)

(4) OECD Guidelines for the testing of chemicals: Residues in Livestock (2007)

(5) FAO: Submission and evaluation of pesticide residues data for the estimation of maximum residue levels in food and feed (2002)

(付録1) 予想飼料負荷量(予想飼料最大負荷量及び飼料中平均負荷量)の算出(具体例)

予想飼料最大負荷量は、作物残留試験(3-1-1)で得られた各飼料作物等の残留濃度に給餌量表(別表1)における当該飼料の給与割合を乗じた値を、残留濃度(乾重量ベース)の高いものから順に、給与割合の合計が100%になるまで積み上げて積算して推定する。ただし、家畜の栄養バランスに配慮した給与実態を踏まえ、Codexの各飼料作物グループ(以下「作物グループ」という。)で給与割合が最大となる作物の給与割合を超えることはできない。

(1) 予想飼料最大負荷量の算出

① 飼料負荷量の算出の対象となる作物を以下の表の作物グループに分類し、作物残留試験(3-1-1)結果に基づいて、それぞれの作物グループに属する飼料作物等に作物残留濃度を割り当てる。

Codex code	作物グループ	算出に用いる残留濃度
AL	まめ科牧草類	HR
AF/AS	穀物の茎葉、いね科牧草類	HR
AM/AV	雑作物の茎葉	HR
CM/CF	穀物の粉砕副産物	STMR-P
AB	果実及び野菜の加工副産物	STMR-P
SM	雑多な植物由来の副産物	STMR-P
VR	根菜類	HR
VD	まめ類	STMR
GC	穀物類	STMR

② 算出に用いる残留濃度は、上記の表に従い、各農作物での最大残留値(Highest Residue: HR)、中央値(Supervised Trials Median Residue: STMR)、加工副産物の場合は加工係数を加味した中央値(Supervised Trials Median Residue-processed: STMR-P)とする。ただし、作物残留試験(3-1-1)成績が3例以下の場合には、HRの代わりに推定残留基準値(MRL)を代用する。MRLが確定していない場合はHRを使用する。

③ 各飼料作物等中残留濃度は乾重量ベースに換算する。

④ 乾重量ベースの残留濃度の高い順に給与割合を割り振る。各作物グループ内の適用農作物(登録申請中のものを含む。以下同じ。)由来の飼料作物等が2つ以上ある場合は、それらの飼料作物等の給与割合の合計が作物グループ内の適用農作物由来の飼料作物等の最大給与割合となるまで割り振る。

例: AF/ASに関してはそのはいね科(生牧草)が5%(変更なし)。続く稲わらは50%(=55%-5%)となる。

⑤ 合計100%となるまで割り振りを続ける。総給与割合が100%を超えた場合、負荷量が最大となるよう、乾重量当たりの残留量の低い飼料作物等から100%となるまで除外する。

例: 大麦を45%(=100%-55%)とすることにより、総給与割合を100%とする。

- ⑥ 適用農作物由来の飼料作物等の総給与割合が100%未満の場合は、適用のない農作物由来の飼料作物等を給与したと仮定する。
- ⑦ 同じ農薬が輸入飼料に残留しているおそれがある場合は、当該輸入飼料の給与を考慮して算出することが望ましい。

例) 農薬Aの飼料中最大残留濃度の算出例 (肉牛の場合)

飼料作物等	Codex code	作物残留濃度 (mg/kg)		乾物重量割合 (%)	乾物重量当たり残留濃度 (mg/kgdw)	最大給与割合 (%)
その他のいね科 (生牧草)	AF/AS	5	HR	25	20.00	5
稲わら	AF/AS	0.7	HR	90	0.78	55
大麦	GC	0.05	STMR	88	0.06	70

AF/ASのうち、より残留濃度の高い生牧草5%の給与を差し引いた値 (=55%-5%)

飼料作物等	Codex code	作物残留濃度 (mg/kg)		乾物重量割合 (%)	乾物重量当たり残留濃度 (mg/kgdw)	給与割合 (%)	負荷量 (mg/kg)
その他のいね科 (生牧草)	AF/AS	5	HR	25	20.00	5	1
稲わら	AF/AS	0.7	HR	90	0.78	50	0.389
大麦	GC	0.05	STMR	88	0.06	45	0.026
合計						100	1.414

総給与割合を100%とする (=100%-5%)

(2) 飼料中平均負荷量の算出

- ① (1)の最大負荷量を計算した方法と同様に、作物残留試験(3-1-1)結果に基づいて、給餌量表から飼料負荷量の算出の対象となる飼料作物等を選定する。
- ② 対象作物を作物グループに分類し、それぞれの作物グループに属する飼料作物等に作物残留濃度を割り当てる。
- ③ 算出に用いる残留濃度は下記の表に従い、STMR又はSTMR-Pの値を代入する。各飼料作物等中残留濃度は乾重量ベースに換算する。

Codex code	作物グループ	算出に用いる残留濃度
AL	まめ科牧草類	STMR
AF/AS	穀物の茎葉、いね科牧草類	STMR
AM/AV	雑作物の茎葉	STMR
CM/CF	穀物の粉砕副産物	STMR-P

AB	果実及び野菜の加工副産物	STMR-P
SM	雑多な植物由来の副産物	STMR-P
VR	根菜類	STMR
VD	まめ類	STMR
GC	穀物類	STMR

- ④ 予想飼料最大負荷量と同様に、飼料中平均残留濃度を計算する。
- ⑤ 乾物中の残留濃度の高い順に給与割合を割り振る。各作物グループ内の適用農作物由来の飼料作物等が2つ以上ある場合は、それらの飼料作物等の給与割合が作物グループ内の適用農作物由来の飼料作物等の最大給与割合となるまで割り振る。
- ⑥ 合計100%となるまで割り振りを続ける。もし、総給与割合が100%を超えれば、負荷量が最大となるよう、乾重量あたり残留量の低い飼料作物等から100%となるまで除外する。  
例：稲わらを25%(=100%-75%)とすることにより、総給与割合を100%とする。
- ⑦ 適用農作物由来の飼料作物等の総給与割合が100%未満の場合は、適用のない農作物由来の飼料作物等を給与したと仮定する。
- ⑧ 同じ農薬が輸入飼料に残留しているおそれがある場合には、当該輸入飼料の給与を考慮して算出することが望ましい。

例) 農薬Aの飼料中平均残留濃度の算出例 (肉牛の場合)

飼料作物等	Codex code	作物残留濃度 (mg/kg)		乾重量割合 (%)	乾重量当たり残留濃度 (mg/kgdw)	最大給与割合 (%)
その他のいね科 (生牧草)	AF/AS	3	STMR	25	12.00	5
大麦	GC	0.05	STMR	88	0.06	70
稲わら	AF/AS	0.02	STMR	90	0.02	55

飼料作物等	Codex code	作物残留濃度 (mg/kg)		乾重量割合 (%)	乾重量当たり残留濃度 (mg/kgdw)	給与割合 (%)	負荷量 (mg/kg)
その他のいね科 (生牧草)	AF/AS	3	STMR	25	12.00	5	0.6
大麦	GC	0.05	STMR	88	0.06	70	0.0398
稲わら	AF/AS	0.02	STMR	90	0.02	25	0.0056
合計						100	0.6453

総給与割合を100%とする (=100%-75%)

(付録2) 予想飼料負荷量から畜産物中残留濃度の算出 (具体例)

付録1の方法にしたがって算出した予想飼料負荷量と家畜残留試験結果を用いて、当該農薬を処理した飼料作物等を家畜に給与した場合の畜産物中最大残留濃度及び平均残留濃度を算出する。

原則として、算出された畜産物中の最大残留濃度を畜産物中MRLの推定に、平均残留濃度を人の暴露評価に利用する。

(1) 畜産物中の最大残留濃度の算出

① 家畜残留試験結果から、投与量X (飼料乾重量当たりの被験物質濃度 (mg/kg)) に対し 畜産物中残留濃度Y (mg/kg) をプロットする。

ア 筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及び卵中の最大残留量を見積もるためには、当該家畜残留試験の各投与量で最も高い残留が認められた個体の残留濃度を使用する。

イ 乳の最大残留量を見積もる際には、当該家畜残留試験の各投与量での全個体の採取日ごとの平均残留濃度のうち、定常状態における中央値を使用する。

例) 農薬Bを泌乳牛(4頭/群)に投与。最終投与後24時間以内にと殺した場合の組織中残留濃度

組織	組織中残留濃度, mg/kg		
	0.1 mg/kg (X <sub>1</sub> ) 投与	0.3 mg/kg (X <sub>2</sub> ) 投与	1 mg/kg (X <sub>3</sub> ) 投与
筋肉	<0.02 (4)	0.021, 0.024, 0.026, 0.031	0.040, 0.046, 0.051, 0.057
肝臓	0.029, 0.030, 0.032, 0.033	0.081, 0.089, 0.096, 0.114	0.161, 0.217, 0.264, 0.298
腎臓	<0.02 (4)	<0.02 (4)	0.025, 0.031, 0.030, 0.028
脂肪	0.297, 0.303, 0.327, <u>0.338</u>	0.921, 1.045, 1.051, <u>1.245</u>	2.649, 2.737, 3.396, <u>3.493</u>

プロットするには下線値 (最大値) を採用

② ①の結果から予想飼料最大負荷量 (A) に相当する畜産物中残留濃度を求める。

肉牛と泌乳牛、又は産卵鶏とブロイラーの予想飼料最大負荷量が異なる場合は高いほうの値を筋肉、脂肪、肝臓、腎臓、乳及び卵中の残留濃度の計算に使用する。

ア 予想飼料最大負荷量 (A) が2つの投与量間にある場合

最も近い投与量間を直線回帰することによって組織等中残留濃度を見積もることができる。

(例) A=0.50 mg/kgの場合の筋肉中残留濃度の算出 (X<sub>2</sub><A<X<sub>3</sub>)

(X<sub>2</sub>, Y<sub>2</sub>)=(0.3, 0.031)と(X<sub>3</sub>, Y<sub>3</sub>)=(1, 0.057)とを直線回帰し、回帰式より X=0.50 mg/kgでの筋肉中残留濃度を算出する。

Y= 0.037X+ 0.020 X=0.50の場合、Y=0.038 mg/kg

イ 予想飼料最大負荷量 (A) が最低投与量(X<sub>1</sub>)よりも小さい場合

原点と(X<sub>1</sub>, Y<sub>1</sub>)を直線回帰することによって組織等中残留濃度を見積もることができる。

(例)  $A=0.05 \text{ mg/kg}$ の場合の肝臓中残留濃度の算出 ( $A < X_1$ )

$(X_0, Y_0) = (0, 0)$ と $(X_1, Y_1) = (0.1, 0.033)$ とを直線回帰し、回帰式より $X=0.05 \text{ mg/kg}$ での肝臓中残留濃度を算出する。

$Y = 0.33X$   $X=0.05$ の場合、 $Y=0.017 \text{ mg/kg}$

ウ 予想飼料最大負荷量 ( $A$ ) が最大投与量 ( $X_3$ ) よりも大きい場合

原点と $(X_3, Y_3)$ を直線回帰することによって組織等中残留濃度を見積もることができる。

(例)  $A=1.2 \text{ mg/kg}$ の場合の肝臓中残留濃度の算出 ( $A > X_3$ )

$(X_0, Y_0) = (0, 0)$ と $(X_3, Y_3) = (1, 0.298)$ とを直線回帰し、回帰式より $X=1.0 \text{ mg/kg}$ での肝臓中残留濃度を算出する。

$Y = 0.298X$   $X=1.2$ の場合、 $Y=0.358 \text{ mg/kg}$

エ 家畜残留試験での最大投与量 ( $X_3$ ) を30%以上超える外挿は実施しない。

オ 最も近い投与量が両者とも定量限界未満の場合、残留濃度は定量限界未満とする。

(例)  $A=0.20 \text{ mg/kg}$ の場合の腎臓中残留濃度の算出 ( $X_1 < A < X_2$ )

$Y_1 < 0.02$ ,  $Y_2 < 0.02$ なので、 $X=0.20 \text{ mg/kg}$ での腎臓中残留濃度  $Y$ は $< 0.02$

## (2) 畜産物中平均残留濃度の算出

① 家畜残留試験結果から、投与量 $X$  (飼料乾重量当たりの被験物質濃度 (mg/kg)) に対し畜産物中残留濃度 $Y$  (mg/kg) をプロットする。

ア 筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及び卵中の平均残留濃度を見積もるためには、当該家畜残留試験の各投与量での全個体の平均残留濃度を使用する。

イ 乳の平均残留濃度を見積もる際には、当該家畜残留試験の各投与量での全個体の各日毎の平均残留濃度のうち、定常状態の中央値を使用する。

例) 上述の農薬Bを産卵鶏に投与した場合、筋肉、肝、脂肪中残留濃度の平均値

組織	農薬B, mg/kg		
	0.1 mg/kg ( $X_1$ ) 投与	0.3 mg/kg ( $X_2$ ) 投与	1 mg/kg ( $X_3$ ) 投与
筋肉	<0.02	0.026	0.049
肝臓	0.031	0.095	0.235
腎臓	<0.02	<0.02	0.029
脂肪	0.316	1.066	3.069

→ プロットする際には4例の平均残留濃度を採用

② 以下、畜産物中最大残留濃度を算出した方法と同様に算出する。

別表1 給餌量表

## 肉牛

Codex code	飼料作物等	適用農作物	最大給与割合 (%)	DM (%)
AB	ビートパルプ (てんさい)	てんさい	5	88
AF/AS	稲わら	稲	55	90
AF/AS	稲発酵粗飼料 (サイレージ)	稲WCS	5	40
AF/AS	イタリアンライグラス(乾牧草)	いね科牧草	30	86
AF/AS	その他のいね科 (生牧草)	いね科牧草	5	25
AF/AS	その他のいね科 (乾牧草)	いね科牧草	40	88
AF/AS	その他のいね科 (サイレージ)	いね科牧草	5	40
AL	アルファルファ (乾牧草、ヘイキューブ)	まめ科牧草	10	89
AL	その他まめ科 (乾牧草)	まめ科牧草	5	85
CM/CF	大麦混合ぬか	大麦	10	90
CM/CF	米ぬか	稲	20	90
CM/CF	ふすま (小麦)	小麦	55	88
CM/CF	コーングルテンフィード	とうもろこし	25	40
CM/CF	コーンジャムミール	とうもろこし	5	85
CM/CF	ホミニーフード (トウモロコシ)	とうもろこし	35	88
GC	大麦	大麦	70	88
GC	小麦	小麦	25	89
GC	マイロ	食用ソルガム	35	86
GC	とうもろこし	飼料用とうもろこし	75	88
GC	飼料米 (粳米)	稲	30	88
GC	らい麦	らい麦	35	88
SM	ビールかす (大麦)	大麦	45	92
SM	大豆油かす	だいず	65	92
SM	大豆皮 (ソイハルペレット)	だいず	5	90
SM	とうふかす	だいず	40	92
SM	とうもろこしジスチラーズグレインソリュブル	とうもろこし	10	92
SM	なたね油かす	なたね	15	88
SM	やし粕 (コブラフレーク)	やし	5	90
VD	大豆 (全脂大豆)	だいず	15	89

## 泌乳牛

Codex code	飼料作物等	適用農作物	最大給与割合 (%)	DM (%)
AB	ビートパルプ (てんさい)	てんさい	40	88
AF/AS	稲わら	稲	25	90
AF/AS	稲発酵粗飼料 (サイレージ)	稲WCS	55	40
AF/AS	イタリアンライグラス(生牧草)	いね科牧草	10	17
AF/AS	その他のいね科 (生牧草)	いね科牧草	10	25
AF/AS	イタリアンライグラス(乾牧草)	いね科牧草	30	86
AF/AS	イタリアンライグラス(サイレージ)	いね科牧草	35	29
AF/AS	オーチャードグラス (乾牧草)	いね科牧草	5	84
AF/AS	オーチャードグラス (サイレージ)	いね科牧草	20	27
AF/AS	チモシー (乾牧草)	いね科牧草	70	85
AF/AS	チモシー (サイレージ)	いね科牧草	35	40
AF/AS	らい麦 (乾牧草)	いね科牧草	5	88
AF/AS	らい麦 (サイレージ)	いね科牧草	5	28
AF/AS	その他のいね科 (乾牧草)	いね科牧草	70	88
AF/AS	その他のいね科 (サイレージ)	いね科牧草	80	40
AF/AS	えん麦 (生牧草)	飼料用えんばく	5	30
AF/AS	えん麦 (乾牧草)	飼料用えんばく	5	90

AF/AS	えん麦 (サイレージ)	飼料用えんばく	5	35
AF/AS	デントコーン (生牧草)	飼料用とうもろこし	20	40
AF/AS	デントコーン (サイレージ)	飼料用とうもろこし	50	40
AF/AS	ソルゴー (生牧草)	ソルガム	40	35
AF/AS	ソルゴー (乾牧草)	ソルガム	5	88
AF/AS	ソルゴー (サイレージ)	ソルガム	10	21
AL	アルファルファ (乾牧草、ヘイキューブ)	まめ科牧草	25	89
AL	アルファルファ (サイレージ)	まめ科牧草	20	40
AL	その他まめ科 (乾牧草)	まめ科牧草	25	85
AL	その他まめ科 (サイレージ)	まめ科牧草	60	30
CM/CF	米ぬか	稲	10	90
CM/CF	ふすま (小麦)	小麦	45	88
CM/CF	コーングルテンフィード	とうもろこし	25	40
CM/CF	コーングルテンミール	とうもろこし	15	40
GC	えん麦	えん麦	5	89
GC	大麦	大麦	40	88
GC	小麦	小麦	10	89
GC	マイロ	食用ソルガム	30	86
GC	とうもろこし	飼料用とうもろこし	80	88
GC	飼料米 (粳米)	稲	20	88
GC	らい麦	らい麦	15	88
SM	ビールかす (大麦)	大麦	40	92
SM	大豆油かす	だいず	60	92
SM	とうふかす	だいず	20	92
SM	とうもろこしジスチラーゼグレインソリュブル	とうもろこし	15	92
SM	なたね油かす	なたね	25	88
SM	やし粕 (コプラフレーク)	やし	5	90
VD	大豆 (全脂大豆)	だいず	10	89

豚

Codex code	飼料作物等	適用農作物	最大給与割合 (%)	DM (%)
CM/CF	米ぬか	稲	10	90
CM/CF	ふすま (小麦)	小麦	15	88
CM/CF	コーングルテンフィード	とうもろこし	10	40
CM/CF	コーングルテンミール	とうもろこし	5	40
GC	大麦	大麦	30	88
GC	小麦	小麦	35	89
GC	マイロ	食用ソルガム	55	86
GC	とうもろこし	飼料用とうもろこし	85	88
GC	飼料米 (粳米)	稲	45	88
GC	らい麦	らい麦	35	88
SM	大豆油かす	だいず	70	92
SM	なたね油かす	なたね	20	88
SM	アルファルファミール	まめ科牧草	5	89
SM	やし粕 (コプラフレーク)	やし	15	90

ブロイラー

Codex code	飼料作物等	適用農作物	最大給与割合 (%)	DM (%)
CM/CF	米ぬか	稲	5	90
CM/CF	ふすま (小麦)	小麦	5	88
GC	大麦	大麦	10	88
GC	小麦	小麦	10	89
GC	マイロ	食用ソルガム	65	86
GC	とうもろこし	飼料用とうもろこし	70	88
GC	飼料米 (粳米)	稲	40	88
SM	大豆油かす	だいず	35	92
SM	とうもろこしジスチラーズグレインソリュブル	とうもろこし	5	92
SM	なたね油かす	なたね	5	88
SM	アルファルファミール	まめ科牧草	5	89

産卵鶏

Codex code	飼料作物等	適用農作物	最大給与割合 (%)	DM (%)
CM/CF	大麦混合ぬか	大麦	5	90
CM/CF	米ぬか	稲	20	90
CM/CF	ふすま	小麦	30	88
CM/CF	コーングルテンフィード	とうもろこし	10	40
CM/CF	コーングルテンミール	とうもろこし	10	40
GC	マイロ	食用ソルガム	55	86
GC	とうもろこし	飼料用とうもろこし	80	88
GC	飼料米 (粳米)	稲	65	88
SM	ごま油かす	ごま	5	91
SM	大豆油かす	だいず	30	92
SM	とうもろこしジスチラーズグレインソリュブル	とうもろこし	5	92
SM	なたね油かす	なたね	15	88

別表2 加工試験を実施していない場合に使用する加工係数 (デフォルト値)

飼料作物等	加工係数
なたね油かす	2
ごま油かす	2
やし粕 (コブラフレーク)	2
大豆油かす	2
大豆皮 (ソイハルペレット)	10
とうふかす	2
ビートパルプ (てんさい)	10
ビールかす (大麦)	1
大麦混合ぬか	2
コーングルテンフィード	1
コーングルテンミール	1
とうもろこしジスチラーズグレインソリュブル	1
ふすま (小麦)	5
米ぬか	10
大豆 (全脂大豆)	1