

平成 29 年 4 月 21 日 平成 29 年度水産動植物登録保留基準設定検討会 (第 1 回) 了承

## ユスリカ幼虫急性遊泳阻害試験に用いる 1 齢幼虫の判断について (案)

### 1. 経緯

平成 28 年 3 月 3 日開催の中央環境審議会土壤農薬部会農薬小委員会 (第 50 回) 決定に基づき、既に登録されている農薬の成分については、ニコチン性アセチルコリン受容体又は GABA 受容体に作用する殺虫剤 (ネライストキシン系殺虫剤を除く) を対象に、ユスリカ幼虫急性遊泳阻害試験 (以下「ユスリカ急性試験」という。) 成績の提出を求めた。

試験機関によっては、ユスリカ急性試験に用いる 1 齢幼虫をふ化後 3～5 日齢の幼虫としているが、水産検討会において「ふ化後 3～5 日齢の場合、供試生物に 2 齢幼虫が混在している可能性がある」との指摘があり、ふ化後 3～5 日齢の幼虫を用いている試験については、供試生物を 1 齢幼虫と判断した根拠を申請者に求めることとなり継続審議となったところ。なお、これらの農薬有効成分の審議の際に、供試生物が 1 齢幼虫かどうかの判断基準について議論があったが、ユスリカ急性試験ガイドラインには、1 齢幼虫を判断するため明確な基準は記載されていない。

そのため、ユスリカ 1 齢幼虫を用いた OECD テストガイドライン (以下「OECDTG」という。) 等において、1 齢幼虫のふ化後日齢等の情報を比較し、ユスリカ急性試験に用いる 1 齢幼虫の判断基準を整理する。

### 2. OECDTG 等における試験に用いるユスリカ 1 齢幼虫のふ化後日数について

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) 及び「農薬の登録申請に係る試験成績について」の運用について (平成 13 年 10 月 10 日付け 13 生産第 3986 号農林水産省生産局生産資材課長通知) (以下「農取法 TG」という。) 並びに OECDTG235 に掲載されているユスリカ急性試験に加え、OECDTG にはユスリカ 1 齢幼虫を用いる長期の試験が 3 種類 (OECDTG218、219 及び 233) 掲載されている。また、OECDTG に掲載のユスリカ幼虫を用いる 4 種の試験では、ユスリカ幼虫の齢数は頭幅の計測により確認できる旨記載されており、引用元は Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates (以下「EPA 文書」という。) である。これらのテストガイドライン等における 1 齢幼虫のふ化後日齢等の状況は表のとおり。

表：OECDTG 等における試験に用いるユスリカ 1 齢幼虫の日齢の比較

	試験の種類	1 齢幼虫の日齢 <sup>*1</sup>
農取法 TG	急性遊泳阻害試験	記載なし
OECD TG235	急性遊泳阻害試験	明確な記載はないが、 ・ <i>C. riparius</i> : 2～3 日齢 ・ <i>C. dilutes</i> , <i>C. yoshimatsui</i> : 1～4 日齢 と解釈できる <sup>*2</sup>
OECD TG218	Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment	ふ化後 2～3 又は 1～4 日齢
OECD TG219	Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Water	ふ化後 2～3 又は 1～4 日齢
OECD TG233	Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Sediment	ふ化後 48 時間齢 <sup>*3</sup>
EPA 文書		ふ化後 1～4.4 日齢( <i>C. tentans (dilutus)</i> )

\*1：OECDTG 等における 1 齢幼虫の日齢に関する記述は別紙 1（4～5 項）にまとめて記載する。

\*2：OECDTG235 の関係箇所とその解釈を別紙 2（6～7 項）に記載する。

\*3：OECDTG233 においては、48 時間齢の幼虫を用いる旨記載されているが、「Spiked Water」試験法においては、1 齢幼虫（ふ化後 48 時間齢）を試験系に移してから 24 時間後に被験物質を投入する旨記載されていることから、被験物質ばく露開始時にはふ化後 72 時間（3 日）齢となっており、実質的にはふ化後 3 日齢も許容されていると考えられる。

以下に OECDTG233 の該当段落を記載する。

#### Spiking the overlying water

26. **Twenty-four hours after adding the first instar larvae for the 1st generation, the test substance is spiked into the overlying water column, and slight aeration is again supplied (for possible amendments of the test design, see paragraph 7).** Small volumes of the test substance stock solutions are applied below the surface of the water using a pipette. The overlying water should then be mixed with care not to disturb the sediment. In the spiked water design, exposure starts with the spiking of the water (i.e. one day after addition of the larvae).

### 3. ユスリカ 1 齢幼虫の判断基準について（案）

OECDTG 等既存のガイドラインの記載を分析すると、1 齢幼虫のふ化後日齢等については、統一された基準はないが、*C. riparius* では、ふ化後 3 日齢まで許容され、*C. dilutus* 及び *C. yoshimatsui* では、ふ化後 4 日齢まで許容されているものと考えることができる。

このことから、水産検討会においては、*C. riparius* を用いた試験では、試験開始時にふ化後 3 日齢を超える幼虫が試験に供されている場合（3～5 日齢、4 日齢など）、*C. dilutus* 及び *C. yoshimatsui* 用いた試験では、ふ化後 4 日齢を超える幼虫が試験に供されている場合（3～5 日齢、5 日齢など）、原則として不適切と判断することとする。なお、*C. yoshimatsui* については、OECDTG ではふ化後 4 日齢までの 1 齢幼虫は供試生物となり得ると解釈できるが、我が国において *C. yoshimatsui* については、ふ化後 2 日齢以内の 1 齢幼虫を試験に用いていることも勘案し、個別に判断することが必要。

以上の条件から不適切と判断される試験が提出された場合は、事務局判断により、申請者を通じて試験実施機関等に 1 齢幼虫と判断した根拠（頭の幅の測定結果等）を求めた上で、その妥当性を水産検討会において個別に判断する。

【別紙 1】

## 農薬取締法テストガイドライン及び関係ガイドラインにおける ユスリカ幼虫の齢数に係る記載

●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（抄）

### 3. 供試生物について

#### (1) 生物種

略

#### (2) 生育段階

試験には 1 齢幼虫を用いる。1 齢幼虫は、産卵直後の卵塊を試験開始 4～5 日前に採取し、孵化させて得ることができる。

### ●OECD235 第 16 段落

#### PROCEDURE

#### Preparation of Test Organisms Prior to Exposure

16. Four to five days before adding 1st instar larvae to the test vessels (test initiation), fresh egg masses (< 24 h) should be taken from the culture. To ensure the correct age of the egg masses used in the test, the rims of the culture vessels should be cleaned from old egg masses 24 h before collection (the old egg masses can stay in the culture vessels). For starting the toxicity test, at least three but preferably six egg ropes are selected from the culture and they are allowed to hatch together with some added food (see paragraph 17). Larvae for the test are randomly selected from this batch. Aged medium from the stock culture or freshly prepared medium may be used. Normally, the larvae begin to hatch within a few days after the eggs are laid (2 to 3 days for *C. riparius* at 20°C, and 1 to 4 days for *C. dilutus* at 23°C and for *C. yoshimatsui* at 25°C). First instar larvae should be used in the test. If considered necessary, the instar of midge larvae can be checked by measuring the head capsule width (20). Figures 1 and 2 show a freshly laid egg mass and an egg mass that has almost completed hatching, respectively.

### ●OECD218 第 25 段落（219 には同一の内容が第 24 段落に記載されている）

25. Four to five days before adding the test organisms to the test vessels, egg masses should be taken from the cultures and placed in small vessels in culture medium. Aged medium from the stock culture or freshly prepared medium may be used. If the latter is used, a small amount of food, for example green algae and/or a few droplets of filtrate from a finely ground suspension of flaked fish food should be added to the culture medium (see Annex 2). Only freshly laid egg masses should be

used. Normally, the larva begin to hatch a couple of days after the eggs are laid (2 to 3 days for *Chironomus riparius* at 20°C and 1 to 4 days for *Chironomus tentans* at 23 °C and *Chironomus yoshimatsui* at 25°C) and larval growth occurs in four instars, each of 4-8 days duration. **First instar larvae (2-3 or 1-4 days post hatching) should be used in the test.** The instar of midges can possibly be checked using head capsule width (6).

●OECD233 第 24 段落

24. Four to five days before adding the first instar larvae for the 1st generation, egg masses should be taken from the culture and placed in small vessels in culture medium. Aged medium from the stock culture or freshly prepared medium may be used. In any case, a small amount of food, e.g. a few droplets of filtrate from a finely ground suspension of flaked fish food, should be added to the culture medium (see Annex 2). Only freshly laid egg masses should be used. Normally, the larvae begin to hatch a couple of days after the eggs are laid (2 to 3 days for *C. riparius* at 20°C and 1 to 4 days for *C. dilutus* at 23°C and *C. yoshimatui* at 25°C) and larval growth occurs in four instars, each of 4-8 days duration. **First instar larvae (maximum 48 h days post hatching) should be used in the test.** The instar stage of larvae can potentially be checked using head capsule width (7).

●EPA 文書の該当部分抜粋

**Table 10.2** *Chironomus tentans* Instar and Head Capsule Widths<sup>1</sup>

Instar	Days after hatching	Mean (mm)	Range (mm)
First	1 to 4.4	0.10	0.09 to 0.13
Second	4.4 to 8.5	0.20	0.18 to 0.23
Third	8.5 to 12.5	0.38	0.33 to 0.45
Fourth	≥12.5	0.67	0.63 to 0.71

<sup>1</sup> T.J. Norberg-King, USEPA, Duluth, MN, unpublished data.

## 【別紙 2】

## OECD Test Guideline No. 235 におけるユスリカ幼虫の齢数に係る記載

OECD Test Guideline No. 235 には、一齢幼虫を試験に用いるべきで、必要であれば頭部の幅を測定することにより齢数を見分けるべきと記載がある（第 16 パラグラフ（第 7 ～ 8 文））。

また、産卵から卵塊の準備までの日数（第 1 文）、卵塊の準備から試験開始までの日数（第 1 文）、また、産卵からふ化までの一般的な日数（第 6 文）が記載されているため、これらの数字の関係からふ化から試験開始までの、想定日数を推し量ることが可能。

## ●OECDTG235 第 16 段落

*Preparation of Test Organisms Prior to Exposure*

16. ①Four to five days before adding 1st instar larvae to the test vessels (test initiation), fresh egg masses (< 24 h) should be taken from the culture. ②To ensure the correct age of the egg masses used in the test, the rims of the culture vessels should be cleaned from old egg masses 24 h before collection (the old egg masses can stay in the culture vessels). ③For starting the toxicity test, at least three but preferably six egg ropes are selected from the culture and they are allowed to hatch together with some added food (see paragraph 17). ④Larvae for the test are randomly selected from this batch. ⑤Aged medium from the stock culture or freshly prepared medium may be used. ⑥Normally, the larvae begin to hatch within a few days after the eggs are laid (2 to 3 days for *C. riparius* at 20°C, and 1 to 4 days for *C. dilutus* at 23°C and for *C. yoshimatsui* at 25°C). ⑦First instar larvae should be used in the test. ⑧If considered necessary, the instar of midge larvae can be checked by measuring the head capsule width (20). ⑨Figures 1 and 2 show a freshly laid egg mass and an egg mass that has almost completed hatching, respectively.

## ●OECD TG235 第 16 段落の概要

## 暴露開始前の供試生物の準備

- ①試験容器に 1 齢幼虫を入れる（試験開始）4～5 日前に、新鮮な（産卵後 24 時間以内の）卵塊を採卵する。
- ②試験で用いる卵塊の産卵後日数が正しいこと【つまり 24 時間以内に産卵されたものであること】を保証するため、採卵の 24 時間前に飼育容器のフチから古い卵塊を取り除く（古い卵塊は飼育容器中にあっても可）。
- ③毒性試験を始めるに当たって、少なくとも 3 個、望ましくは 6 個の卵塊を選択（適量の餌と共にふ化させても可）（第 17 段落参照）。
- ④試験に用いる幼虫は、このバッチからランダムに選ぶ。

- ⑤（親世代の）飼育に用いている培養液又は新しく調製した培地を用いる。
- ⑥一般的に、幼虫は産卵後数日以内にふ化を始める（*C. riparius* は 20℃で 2～3 日、*C. dilutus* は 23℃で、*C. yoshimatsui* は 25℃で 1～4 日）。
- ⑦試験では 1 齢幼虫が用いられるべき。
- ⑧必要があれば、ユスリカ幼虫の頭幅を計ることで確認できる（20）。※20 とは、EPA 文書を指している。
- ⑨図 1 に産卵直後の卵塊、図 2 にほぼふ化が終了した卵塊を示す。

図：OECDTG235 から解釈できる供試生物の日齢

※図中の①、②、⑥は OECDTG235 第 16 段落の根拠となった文に対応

