

トピックス

「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」について

農林水産省生産局生産資材課農薬対策室 ^{あん}安 ^{どう}藤 ^ゆ由 ^き紀 ^こ子

はじめに

昨年12月号で「農薬登録申請に係る試験成績について」（平成12年11月農産第8147号農産園芸局長通知）について、見直しの概要を紹介した。同通知には、試験実施のための「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」（以下「試験指針」という。）が定められている。今回は新たに追加された試験成績について試験指針の概要を紹介する。

Ⅰ 急性神経毒性試験（指針識別番号2-1-7）

1. 単回暴露による神経系への毒性変化を明確にし、その毒性変化の認められない最高投与量（無毒性量）を明らかにすることを目的とした試験である。

2. 供試動物

げっ歯類（通常、ラット）。

3. 投与方法

被験物質の投与は、必要に応じて投与経路（経口、経皮又は吸入）を選択し行う。

4. 観察期間

被験物質を単回暴露後、14日間の観察を行う。

5. 動物数および試験群の設定

（1）動物数の設定

各群雌雄10匹以上。神経病理組織学的検査に必要な各群雌雄各5匹以上を含む。

（2）試験群の設定

1) 被験物質投与群

少なくとも3段階の投与群を設ける。

2) 対照群

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。

6. 観察および検査

（1）一般状態の観察

1) 全動物について、全身状態、異常行動の有無および死亡の有無を観察。

2) 全動物について投与開始前および投与開始後少なくとも週1回、体重測定。

（2）詳細な状態の観察および機能検査

1) 全動物について投与開始前、投与後8時間以内で最も影響が現れることが予想される時間、投与7日後および14日後に行う。

2) 飼育ケージ内および観察台上で外観（皮膚、被毛、眼・眼球および粘膜等の変化、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、動物の取扱操作および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）、攻撃性等について観察する。

3) 種々の刺激（聴覚刺激、視覚刺激、固有受容器刺激等）に対する感覚運動反応、握力および自発運動量（自動記録装置を用いる。）

4) 他の毒性試験等で神経毒性が疑われた場合、疑われた神経毒性の精査に適した感覚機能、運動機能、学習・記憶に関する試験を実施する。

（3）病理学的検査

1) 対象となる各群雌雄各5匹以上について、病理組織学的検査を行う。

2) 状態観察および機能検査で、特定の動物に異常が認められた場合は、その動物を検査する。

3) 組織は灌流固定その他の適当な方法により固定する。観察された肉眼的病理学的変化はすべて記録する。

4) 末梢神経系に神経障害が認められるかまたは疑われる場合には、末梢神経系組織の樹脂包埋標本作製し検査する。

5) 状態観察等から、適宜、検査部位の追加および特殊染色を実施する。

6) 神経病理組織学的所見は、他の毒性試験成績および行動学的影響と関連付けて評価する。

7) 中枢神経系と末梢神経系の代表的な切片について、最高用量群と対照群の切片を比較し、最高用量群に神経病理組織学的変化が認められなければ、それ以降の検査は必要ない。最高用量群に変化が認められた場合

は、中間用量と最低用量の切片を順次検査する。

8) 前脳、海馬を含む大脳中心部、中脳、小脳、橋、延髄、視神経と網膜を含む眼球、脊髄の頸膨大と腰膨大、脊髄神経節、神経線維の前根および後根、近位の坐骨神経、近位の脛骨神経(膝部)と脛骨神経の腓腹筋分岐部、骨格筋(特に腓腹筋)を検査する。なお、脊髄および末梢神経の切片は、横断面と縦断面の両方を含める。

II 反復経口投与と神経毒性試験(2-1-12)

1. 反復経口投与による神経系への毒性変化を明確にし、その毒性変化の認められない最高投与量(無毒性量)を明らかにすることを目的とした試験である。

2. 供試動物

げっ歯類(通常、ラット)。

3. 投与方法

経口による連続投与。混餌投与又は飲水投与。ただし、困難な場合は、強制投与を行ってもよい。

4. 投与期間

90日間または1年間。

5. 動物数および試験群の設定

(1) 動物数の設定

各群雌雄10匹以上。神経病理組織学的検査に必要な各群雌雄各5匹以上を含む。

中間屠殺群および回復群を設ける場合は、必要な数を追加設定する。

(2) 試験群の設定

1) 被験物質投与群

少なくとも3段階の投与群を設ける。

2) 対照群

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。

6. 観察および検査

(1) 一般状態の観察

1) 全動物について、全身状態、異常行動の有無および死亡の有無を観察。

2) 体重および摂餌量(飲水投与の場合にあっては摂水量も測定する。以下同じ)。

投与開始前に1回、投与開始後は少なくとも週1回、それ以降は少なくとも4週に1回、体重および摂餌量を測定する。

被験物質の摂餌量を算出する。

(2) 詳細な状態の観察および機能検査

1) 全動物について定められた期間ごとに行う。

(i) 90日間の試験の場合

投与開始前、開始後の2週間以内に1回。それ以降は1か月ごとに1回。

(ii) 1年間の試験の場合

投与開始前、開始後の1か月以内に1回。それ以降3か月ごとに1回。

2) 回復群を設ける場合、可能な限り試験終了時に近い時点で行う。

3) 観察項目および方法は急性に同じ

(3) 病理学的検査

急性に同じ

III 水中運命に関する試験(加水分解運命試験

(2-6-1) および水中光分解運命試験(2-6-2))

(共通事項)

1. 水中での加水分解および光による分解による、有効成分等の主要な分解経路および分解により生成される物質並びに物質収支等の情報を得ることを目的とした試験である。

2. 被験物質

農薬の有効成分の放射性同位元素で標識したまたは非標識の高純度化合物を用い、入手先、純度、安定性等を明確にしておく。なお、放射性同位元素標識体にあつては、合成法、標識核種、標識位置および比放射能についても明確にしておく。

3. 分析試料の採取

分析試料の採取は、被験物質の消失と主要な分解物の生成と消長を適切に評価できるように、処理直後と試験期間終了時点を含む7時点以上で経時的に、分析試料(水および気体)を採取する。

4. 分析

(1) 試料は、採取後、速やかに分析に供する。

(2) 試料、抽出液等を保存する場合は、分解物等の分解が最小限に抑えられるよう適切な方法を採用するとともに、保存期間中の分解物等の変化を把握できるようにする必要がある。

(加水分解運命試験に関する事項)

1. 供試水

pH 4.0、7.0 および 9.0 の緩衝液を用いる。

2. 試験条件

25±1℃の温度で加水分解以外の分解要因(光、酸素等)を排除し、滅菌した条件下で実施する。

3. 試験の実施

(1) 処理

被験物質の試験濃度は一種類とし、原則として、0.01 M または水溶解度の 1/2 以下のうち、いずれか低い方

を選択する。

(2) 試験期間

試験期間は、被験物質の消失および主要な分解物の生成と消長が把握できる期間とする。なお、最大30日間とする。

(3) 分析試料の採取

被験物質の消失および主要な分解物の生成と消長を適切に評価できるように、処理直後と試験期間終了時点を含む7時点以上で経時的に、分析試料（水および気体）を採取する。

(水中光分解運命試験に関する事項)

1. 供試水

自然水および蒸留水（または緩衝液）を用いる。

2. 試験条件

(1) 試験に用いる光源は、原則として、地上に到達する太陽光の波長分布に類似した人工光を用い、連続的に照射する。試料部位での入射光の波長分布および強度を測定する。

(2) 試験容器の入射光面は、上記の光に対して吸収を示さない材質でなければならない。

(3) 供試水および試験容器は滅菌する。自然水の場合は、成分を変質させない方法で滅菌する。

(4) 試験は $25 \pm 2^\circ\text{C}$ で実施する。

3. 試験の実施

(1) 処理

被験物質の試験濃度は1濃度とし、水溶解度の1/2以下で、被験物質の消失速度と分解物の消長を分析するのに十分な濃度とする。

(2) 試験期間

試験期間は、被験物質の消失および主要な分解物の消長が把握できる期間とする。ただし、太陽光に換算（北緯 35° (東京)、春(4月から6月)) して30日を超える必要はない。試験終了後に、試験系について滅菌状態が期待されていたことを確認することが望ましい。

(3) 試験の実施に当たり、暗所対照区試料を設置する。

IV 藻類生長阻害試験 (2-7-3)

1. 藻類の生長に対する被験物質の EC_{50} を得ることを目的とした試験である。

2. 供試生物

(1) *Selenastrum capricornutum* を用いることが望ましい。ただし、培養および試験に都合がよく、生長が速いものであれば、次に記載した種その他の種および株を用いてもよい。

Selenastrum capricornutum (ATCC 22662 株)

Scenedesmus subspicatus (86.81 SAG 株)

Chlorella vulgaris (CCAP 211/11 b 株)

(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

試験培地の初期細胞濃度は、約 10^4 cells/ml が適当である。

3. 暴露方法

被験物質を含む培地で処理する方式を用い、振とうまたは静置培養を行う。

4. 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。

5. 試験区の設定

(1) 試験濃度区は等比級数的に少なくとも5濃度区を設ける。

(2) 対照として、被験物質を含まない無処理対照区を設ける。

(3) 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。

(4) 各濃度区および対照区とも3連で行う。

6. 試験培地の調製方法

(1) 原体を被験物質として用いる場合

1) 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。

2) 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。

(i) 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。

(ii) 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、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。

7. 環境条件

(1) 培養方法

無菌培養で、振とう培養または静置培養（少なくとも1日に2回振とうする。）

(2) 培養温度

設定温度は 21~25°C (±2°C)

(3) 照明

400~700 nm のスペクトル幅で連続照射 (液面付近で 4,000 lux 程度の照度)

(4) 培地

培地の種類は OECD 培地又は AAP (AGP) 培地を用い培地の量は 100 ml 程度が望ましい。

8. 観察および測定

(1) 細胞濃度の測定

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

(2) 被験物質濃度の測定

1) 原体を被験物質として用いた場合には、各試験濃度区分ごとに被験物質の濃度を少なくとも暴露開始時および終了時に測定する。

2) 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

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

2) 測定は、少なくとも暴露開始時及び終了時に行う。

9. 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。面積法およ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。

10. 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。

V 小核試験 (2-1-19-3) (変異原性に関する試験)

1. 被験物質の染色体異常の誘発性の有無を検索することを目的とした試験である。

2. 動物種

骨髓の赤血球を用いる場合にはマウスまたはラット。末梢血の赤血球を用いる場合にはマウス。他の適切な動物種を用いてもよい。性差が見られない場合には、雄のみで試験を実施。

3. 動物数

一群 5 匹以上。

4. 投与経路

強制経口投与または腹腔内投与とする。

5. 投与回数

単回または複数回投与。

6. 用量段階

(1) 3 段階以上の用量を設定。(毒性が認められない場合には 2,000 mg/kg を最高用量とする。)

7. 対照

溶媒を用いる陰性対照および適切な既知の小核誘発物質による陽性対照を設定する。

8. 試験方法

(1) 骨髓または末梢血の赤血球を用いる。

(2) 単回投与の場合には被験物質投与後適切な時期に 2 回、(最も感受性の高い時期が確認できれば 1 回でも可) 複数回投与の場合には最終投与後適切な時期に 1 回標本を作製する。

9. 観察

(1) すべてのスライド標本はコード化して、処理条件が分からない状況で観察を行う。

(2) 個体当たり 2,000 個以上の幼若赤血球を観察して、小核を有する細胞の出現頻度を記録する。

(3) 骨髓の場合には個体当たり 200 個以上、末梢血の場合には個体当たり 1,000 個以上の赤血球を観察して全赤血球に対する幼若赤血球の比率を記録する。

10. 結果の判定

(1) 小核を有する細胞の数の増加に用量依存性が認められる場合またはいずれかの投与群で小核を有する細胞の数が明らかに増加する場合には陽性。

お わ り に

現在、ミジンコ類繁殖試験の試験指針を定める方向で作業中である。その他の試験指針が定められていない試験についても、今後検討を進めてまいりたい。OECD 等の国際的な動きを踏まえつつ、農業的的確な安全評価のための試験指針の検討等を進める所存であり、関係者のなお一層のご協力とご理解をお願いしたい。