

微生物農薬の評価及び評価に関する試験成績の取扱いの見直しについて（案）

微生物農薬の評価は、これまで、「微生物農薬の登録申請に係る安全性評価に関する試験成績の取扱いについて」（平成9年8月29日付け農産第5090号農林水産省農産園芸局長通知）及び「微生物農薬の登録申請に係る安全性評価に関する試験成績の取扱いについて」（平成9年8月29日農林水産省農産園芸局植物防疫課長通知）（以下、併せて「微生物ガイドライン」という。）に基づき審査を行い、登録しているところ。最新の科学的知見に基づき審査を行うため、諸外国のデータ要求やテストガイドラインを参考に、微生物ガイドラインの改正を検討しているところ。

第1回生物農薬評価部会（令和4年10月7日）及び第3回生物農薬評価部会（令和5年6月9日）において、現行の欧米のデータ要求と比較し、微生物ガイドラインにおいて不足している事項及び過剰なデータ要求となっている項目について改正を行う方針についてご了承いただいた（参考資料1）。

部会での決定事項を踏まえ、別添のとおり微生物ガイドラインの改正案を作成したので、御議論いただきたい。

改 正 案	(参 考) 現 行
微生物農薬の登録申請において提出すべき資料について 農薬取締法（昭和 23 年法律第 82 号。以下「法」という。）第 3 条第 2 項及び第 7 条第 1 項（これらの規定を同法第 34 条第 6 項において準用する場合を含む。）並びに農薬取締法施行規則（昭和 26 年農林省令第 21 号。以下「規則」という。）第 2 条及び第 11 条第 3 項の規定に基づき、微生物農薬の登録を申請する者（以下「申請者」という。）が提出すべき資料の具体的内容は、次に掲げるとおりとする。 また、本通知の規定は、法第 8 条第 3 項（法第 34 条第 6 項において準用する場合を含む。）の規定に基づき再評価を受けるべき者が提出すべき資料（規則第 2 条第 1 項各号（第 3 号、第 4 号及び第 11 号を除く。）に掲げるものをいう。）の具体的内容について準用する。 1 基本的な考え方 （１）微生物農薬とは、ウイルス、細菌、<u>菌類、原生生物</u>及び線虫（共生細菌のようなものを活性成分にもつものに限る。）（以下「微生物」という。）を生きた状態で防除のために利用するものであって、農薬として製造・販売される形態のもの（製剤）をいい、寄生蜂、捕食虫等の天敵農薬及び抗生物質等の微生物源農薬は対象としないものとする。 （２）<u>微生物農薬の有効成分は微生物であり、孢子、分生子、芽胞、包埋体等の形態で利用されるものを含む。</u>なお、遺伝子改変された微生物を農薬として利用する場合は別途の対応が生じ得るため個別に検討する。	微生物農薬の登録申請に係る安全性評価に関する試験成績の取扱いについて （平成 9 年 8 月 29 日付け 9 農産第 5090 号農林水産省農産園芸局長通知及び 平成 9 年 8 月 29 日付け 9 農産第 5090 号農林水産省農産園芸局植物防疫課長通知） 微生物農薬の安全性評価に関する基準 本基準は、微生物農薬の安全性評価の基本的考え方を示すとともに、微生物農薬の登録申請者の提出すべき安全性評価に必要な資料を規定するものである。 1 安全性評価に関する基本的考え方 （１）本基準において「微生物農薬」とは、ウイルス、細菌、真菌、原生動物、線虫（共生細菌のようなものを活性成分にもつものに限る。）を生きた状態で農薬としての目的で、製造又は輸入して販売しようとするものとし、寄生蜂、捕食虫等の天敵及び抗生物質等の微生物源農薬は対象としないものとする。 なお、遺伝子組換え微生物については当対象の範囲に含めないものとする。 （新設）

(3) 微生物農薬の農薬原体（以下「原体」という。）は、微生物の他、微生物が生成する代謝物並びに添加物及び混在物から成る。

(4) 人畜及び生活環境動植物に対する影響については、微生物の生物学的性質等を踏まえた科学的な資料に基づいて明らかにしなければならない。

GLP 省令に記載

(5) 資料は別紙 1 の条件に従って提出しなければならない。

別紙 1 の条件にかかわらず、微生物の生物学的性質又は微生物農薬の使用方法を踏まえ、微生物農薬の登録申請において農林水産大臣は必要と認める資料の提出を求めることができる。(規則第 2 条第 1 項第 11 号)

(6) 農薬の登録申請において提出することとされている試験成績の一部が、すでに他の登録申請において提出されており、かつ、これらの試験成績を当該申請に係る農薬の試験成績として利用できると認められる場合には、申請者は、別添様式による試験成績代替書を当該試験成績に代えて提出することができる。この場合において、利用しようとする試験成績を提出した者が当該申請者と異なる場合にあっては、当該申請者は、利用しようとする試験成績を提出した者が当該試験成績を利用して差し支えない旨を記した書類を添付しなければならない。

(別添様式（試験成績代替書）挿入)

(新設)

(2) ヒトに対する安全性及び環境生物等環境に対する影響については、いずれも 2 に規定する科学的資料に基づき実証又は確認されなければならない。

(3) ヒトに対する安全性試験成績は、特定試験成績及びその信頼性の確保のための基準に関する省令（平成 30 年農林水産省令第 76 号）及び「特定試験成績及びその信頼性の確保のための基準に関する省令第 5 条から第 19 条までに定める基準に適合していることの確認及びその調査等について」（平成 30 年 11 月 30 日付け 30 消安第 4215 号農林水産省消費・安全局長通知）の G L P 制度にのっとった試験成績でなければならない。

(4) 提出された資料に基づく評価の結果、微生物の生物学的性質、微生物農薬の使用方法等から安全性をさらに実証又は確認する必要がある場合は、さらに資料の提出を求めるものとする。

2 安全性評価の基礎となる資料

(1) 微生物農薬に係る安全性評価に必要な資料については、別表の「微生物農薬の安全性評価資料の微生物別要求項目」に規定するとおりとする。

(2) 既に他剤の申請において同様の試験成績が提出されている場合には、当該提出済みの試験成績を新たに登録申請を行う農薬に係る試験結果として利用することができるものとする。なお、利用する試験成績を本人以外が提出している場合、既に当該試験成績を提出した申請者の了解を得ている旨の証明を添付すること。

2 提出すべき資料の具体的な内容

(新設)

(1) 微生物農薬及び原体の組成等に関する試験成績 (規則第2条第1項第1号及び第10号)

- ① 微生物の生物学的情報
- ② 原体の組成及び製造方法
- ③ 微生物農薬の組成及び製造方法

(2) 微生物農薬の安定性その他の性状に関する試験成績 (規則第2条第1項第2号)

- ① 物理的・化学的性状
- ② 経時安定性

(3) 適用病害虫等に対する薬効及び農作物等に対する薬害に関する試験成績 (規則第2条第1項第3号及び第4号)

- ① 適用病害虫又は適用農作物等に対する薬効
- ② 適用農作物に対する薬害
- ③ 茶の残臭
- ④ たばこの喫味
- ⑤ 適用農作物以外の農作物等に対する影響

(4) 人に対する影響に関する試験成績 (規則第2条第1項第5号及び第11号)

- ① 単回経口投与
- ② 単回経気道投与
- ③ 単回静脈内投与
- ④ 単回経皮投与
- ⑤ 皮膚刺激性
- ⑥ 眼刺激性
- ⑦ 皮膚感作性
- ⑧ 細胞培養
- ⑨ 反復投与

- ⑩ 遺伝毒性
- ⑪ 繁殖毒性
- ⑫ ウイルス発がん性
- ⑬ 免疫不全誘起
- ⑭ 製造、使用に際して発生した有害事例に関する資料

(5) 農作物等への生残性に関する試験成績（規則第2条第1項第6号、第7号及び第10号）

(6) 生活環境動植物及び蜜蜂・蚕に対する影響に関する試験成績（規則第2条第1項第9号）

- ① 淡水魚影響
- ② 淡水無脊椎動物影響
- ③ 藻類生長阻害
- ④ 鳥類影響
- ⑤ 植物影響
- ⑥ 標的外昆虫等に対する影響
- ⑦ 蜜蜂影響
- ⑧ 蚕影響
- ⑨ 土壌微生物に対する影響

(7) 環境中における動態に関する試験成績（規則第2条第1項第8号及び第10号）

(8) 農薬の見本検査に関する資料（規則第2条第2項）

3 資料の作成方法

(1) 試験方法

- ① 別紙1の資料は別紙2の方法を標準として作成するものとする。

(別添)

微生物農薬の安全性評価に必要な資料を作成するに当たっての指針

I 基本的事項

1 本指針に対する基本的考え方

- (1) 本指針は微生物農薬の登録申請に当たって提出する安全性評価に必要な資料を作成

- ② 試験の目的をよりの確に満たすため、微生物の特性等に応じて試験方法を変更することは妨げない。ただし、試験方法を変更した場合は、その変更点及び変更した理由を明らかにして試験報告書に記載しなければならない。

(2) 文献情報

公表文献、書籍等によって情報を収集する場合、使用するデータベースは、「公表文献の収集、選択等のためのガイドライン（令和3年9月22日農業資材審議会農薬分科会決定 令和5年〇月〇日付け一部改正）の1に準じる。

(3) 被験試料について

- ① 原体を被験試料として用いる場合は、申請する微生物農薬の原料としての原体と同等の成分組成のものをを用いる。ただし、試験の目的を達成するため、適切と考えられる場合は、原体に代え原体中の微生物と同じ形態（栄養体、孢子、結晶等）の微生物を被験試料として用いてもよい。この場合、微生物を試験試料として用いる理由及び妥当性並びに原体中の微生物以外の成分が試験結果に影響を及ぼさないことを説明する。
- ② 微生物農薬を被験試料とする試験において、微生物農薬を被験試料としての試験実施に困難があるときは、微生物農薬に代え原体を被験試料として用いてもよい。ただし、原体を被験試料として用いる理由及び妥当性を説明する。
- ③ 試験期間中、原則として同じロットの被験試料を用いなければならない。やむを得ず他のロットの被験試料を用いる場合は、ロットの成分組成が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する。
- ④ 人に対する影響に関する試験に用いた被験試料については成分組成を試験成績ご

するに当たっての目安として利用するものである。

- (2) 試験者は安全性評価試験を実施するに当たって、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。試験者が被験試料の特性に応じ、試験の目的をより満たすため試験方法に変更、改善を加えるという柔軟性を保持することを妨げるものではない。

(これまでも文献情報を用いていたが、使用するデータベースを明確化)

2 被験試料について

- (1) 原体を被験試料として用いる場合は、市販用微生物農薬の製剤原料としての原体と同等の成分組成のものとする。
- なお、原体を被験試料としての試験実施に困難があるときは、原体に代え原体に含まれる微生物と同じ形態（栄養体、孢子、結晶等）の微生物を被験試料として用いてもよい。
- (2) 製剤を被験試料として用いる場合は、原則として農薬使用時の安全性確保の観点から必要性の最も高いと考えられる製剤を被験試料として選択する。
- なお、製剤を被験試料としての試験実施に困難があるときは、製剤に代え原体を被験試料として用いてもよい。
- (3) 試験期間中、原則として同じロットの被験試料を用いなければならない。やむを得ず他のロットの被験試料を用いなければならないような場合は、引き続くロットは、先のロットの成分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する。
- (4) 安全性評価試験に用いた被験試料の成分組成を個々の試験成績ごとに明記する。

とに明記する。原体を用いる試験については、別途、試験に用いたロットごとの組成分析結果を報告する。

⑤ 微生物の単位

ア 細菌の栄養体細胞の場合は、CFU (Colony Forming Unit) を単位とする。

イ 原生生物、包埋体ウイルスの場合は、血球計算盤で計数する。

ウ 細菌の孢子、菌類の孢子の場合は、CFU 又は血球計算盤で計数する。

エ 菌類の菌糸の場合は、乾燥重量が 10^{-9}g を 1 単位とする。

オ 上記で測定又は分析できない場合は、微生物の種類に応じて最も適した方法で定量してもよい。

(4) 試験動植物について

適用農作物以外の農作物等に対する影響試験、標的外昆虫等影響試験の試験植物、昆虫等の選択にあたっては、微生物の種類、微生物農薬の使用法、使用場所による暴露の可能性、標的生物との近縁関係等を十分考慮し、その選択理由を明らかにする。

(5) 微生物の測定又は分析について

微生物の測定又は分析には、微生物の種類に応じて感度及び信頼性の高い方法を用いる。

(6) 試験施設について

「特定試験成績及びその信頼性の確保のための基準に関する省令」(平成 30 年農林水産省令第 76 号。以下「農薬 GLP 省令」という。)第 2 条に定める特定試験成績以外の試験については以下による。

① 適用病害虫又は適用農作物等に対する薬効試験及び農作物等に対する薬害試験成

(5) 被験試料の単位は、次によるものとする。

ア 細菌の栄養体細胞の場合は、CFU (Colony Forming Unit) を単位とする。

イ 原生動物、包埋体ウイルスの場合は、血球計算盤で計数する。

ウ 細菌の孢子、糸状菌の孢子の場合は、CFU 又は血球計算盤で計数する。

エ 糸状菌の菌糸の場合は、乾燥重量が 10^{-9}g を 1 単位とする。

オ 上記以外の単位については、微生物の種類に応じて最も適した方法で定量するものとする。

3 試験動植物について

微生物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、同一条件の健全な試験動物、植物を用いる。また、環境生物に対する影響試験の試験動物、植物の選択に当たっては、農薬微生物の種類、微生物農薬の使用法、使用場所による暴露の可能性、標的生物との近縁関係等を十分考慮し、その選択理由を明らかにする。

4 農薬微生物の確認、検出について

微生物農薬の成分となっている微生物(以下「農薬微生物」という。)の確認、検出には、微生物の種類に応じて選択性、感度及び信頼性の高い方法を用いる。

(6278 号局長通知に準じた実施を求めているもの)

績

6278 号局長通知の第 3 の 5 （ 2 ） に準じて実施しなければならない。

② その他の試験成績

試験成績に係る信頼性確保のため、農薬 GLP 省令第三章の基準に準じて実施することが望ましい。なお、申請者は、少なくとも当該農薬が登録されるまでの間、当該試験の試験計画書、試験の生データ及び最終報告書が保管されることを保証すること。

(別紙 3 用語の定義へ移動)

5 微生物農薬の性質について

本指針で用いる微生物農薬の性質の判断要因は次のとおりである。

(1) 感染性

農薬微生物が供試動植物体内又は供試培養細胞内に侵入後、増殖した場合に感染性が認められるという。

(2) 病原性

農薬微生物が供試動植物に感染した結果、当該供試動植物に対して細胞組織レベルあるいは個体レベルで病気を起こさせた場合に病原性が認められるという

(3) 毒性

農薬微生物が供試動植物又は供試培養細胞に感染はしないが、当該微生物の産生する毒素や毒物あるいは当該微生物の増殖に用いた基材が当該供試動植物又は当該供試培養細胞に対し有害（生命維持に障害を与える）ななんらかの反応を起こさせた場合に毒性が認められるという。

(4) 生残性

農薬微生物が供試動植物に感染はしないが、当該供試動植物体で、一定時間後も死滅することなく生残する場合又は土壌中などで一定時間後も死滅することなく生残する場合に生残性が認められるという。

別紙 1 提出すべき資料の項目及び提出すべき条件

別表 微生物農薬の安全性評価資料の微生物別要求項目

要求項目	提出の要否		備考	
	微生物の種類			
	ウイルス	その他の微生物		
○：必ず提出を要するもの △：条件付きで提出を要するもの ×：提出を要しないもの				
I 微生物の生物学的情報				
(1) 名称及び分類学上の位置	○	○		
(2) 微生物の生物学的性質	○	○		
(3) 二次代謝物（内毒素を含む。以下「二次代謝物等」という。）に関する情報	○	○		
II 微生物農薬の組成及び性状				
1 原体の組成、製造方法及び組成分析				
(1) 原体中の成分の種類及びその含有量	○	○		
(2) 原体の製造方法	○	○		
(3) 原体の組成分析	○	○		
2 微生物農薬の組成及び製造方法	○	○		
3 微生物農薬の性状等				
(1) 物理的・化学的性状				
① 外観（色調、形状）	○	○		
② 粉末度	△	△	農薬の登録申請において提出すべき資料について（平成 31 年 3 月 29 日付け 30 消安第 6278 号農林水産省消費・安全局長通知。以下「6278 号局長通知」という。）の表 2（2）に準じる。	
③ 粒度	△	△		
④ 原液安定性	△	△		
⑤ 希釈液安定性又は水和性	△	△		
⑥ 水溶解性又は水溶性	△	△		

要求項目	(新設)		備考	
	微生物の種類			
	ウイルス	その他		
1 農薬の規格性状に関する資料				
(1) 微生物の名称及び分類学上の位置	○	○		
(2) 微生物の生物学的性質	○	○		
(新設)				
(3) 農薬原体の組成	○	○		
(4) 農薬原体の製造方法	○	○		
(農薬成分に関する登録検査上の取扱いについて（48 農蚕第 6359 号農蚕園芸局長通知）に基づき要求)				
(5) 製剤の組成	○	○		
(6) 製剤の製造方法	○	○		
(申請書の根拠資料として要求)				

⑦ 懸垂性	△	△	
⑧ 密度	△	△	
⑨ 引火性	△	△	
⑩ その他微生物農薬によって必要な資料	△	△	
(2) 経時安定性	○	○	
(申請書に記載するためデータ要求通知には含めない)			
Ⅲ 適用病害虫又は適用農作物等に対する薬効及び農作物等に対する薬害に関する試験成績			
(1) 適用病害虫又は適用農作物等に対する薬効	○	○	原則、薬害試験と同時に実施する。 適用農作物又は作物群、病害虫・雑草及び使用方法等の組合せ毎の試験例数は別紙のとおりとする。 同一時期に複数の試験ほ場で実施する場合は、気象条件が異なる試験ほ場を選択する。 同一ほ場で複数の試験を実施する場合は、異なる時期や季節で実施する。
(2) 適用農作物に対する薬害	○	○	適用農作物又は作物群と使用方法等の組み合わせごとの試験例数は別紙1別添のとおりとする。
(3) 茶の残臭	△	△	茶に使用する場合、提出を要する。試験例数は別紙1別添のとおりとする。
(4) たばこの喫味	△	△	たばこに使用する場合、提出を要する。試験例数は別紙1別添のとおりとする。
(5) 適用農作物以外の農作物等に対する影響	△	△	雑草防除用微生物又は植物病原微生物若しくは植物病原微生物に近縁な微生物である場合、提出を要する。

2 使用方法に関する資料			
(1) 適用病害虫、雑草等及び散布対象農作物			
(2) 使用方法及び使用量			
(植物影響試験から移動)			

IV 人に対する影響に関する試験成績（図1参照）			
（1）単回経口投与	○	○	
（2）単回経気道投与	○	○	
（3）単回静脈内投与	○	○	
（4）単回経皮投与	△	△	単回経口投与試験で影響が見られた場合で、微生物が哺乳動物において経皮感染することが知られている微生物に近縁である場合 なお、哺乳動物に経皮感染することが知られている微生物には、次のものがある。 <i>Bacillus anthracis</i> 、 <i>Leptospira interrogans</i> 、皮膚糸状菌等
（5）皮膚刺激性	○	○	
（6）眼刺激性	○	○	
（7）皮膚感作性	○	○	
（8）細胞培養	○	×	
（9）反復投与	△	△	単回投与試験で感染性又は生残性が認められた場合、提出を要する。
（10）遺伝毒性	×	△	微生物が菌類であって、反復投与試験で感染性が認められた場合、提出を要する。
（11）繁殖毒性	△	△	次のいずれかに該当する場合、提出を要する。 ① 反復投与試験で供試動物に感染性が認められた場合 ② 微生物が哺乳動物細胞に寄生性を有することが知られている微生物と近縁関係があると考えられる場合 ③ 原体が哺乳動物細胞に寄生性を有する微生物を含んでいる場合

3 ヒトに対する安全性試験成績			
（1）単回経口投与試験	○	○	
（3）単回経気道投与試験	○	○	
（4）単回静脈内投与試験	○	○	
（2）単回経皮投与試験	○	○	
（単回経皮投与試験から分離）			
（5）眼一次刺激性試験	○	○	
（6）皮膚感作性試験	○	○	ウイルス、細菌、真菌においては、当該試験を実施する。
（7）細胞培養試験	○	×	
（8）反復投与試験	△	△	単回投与試験で、感染性又は生残性が認められた場合においては、当該試験を実施する。
（9）変異原性試験	×	▲	真菌であって反復投与試験で、感染性が認められた場合においては、当該試験を実施する。
（10）繁殖試験	▲	▲	反復投与試験で、感染性が認められた場合等においては、当該試験を実施する。

			④ 微生物がウイルスであって、細胞培養試験でいずれかの哺乳動物細胞に感染性が認められた場合				
(12) ウイルス発がん性	△	×	次のいずれかに該当する場合、提出を要する。 ① ウイルスに発がん性の疑いがある、又は、発がん性のウイルスに近縁である場合 ② 細胞培養試験でいずれかの哺乳動物細胞に対し感染性が認められた場合 ③ 原体又は微生物農薬に①又は②に該当するウイルスが、混入している可能性を否定できない場合	(11) ウイルス発がん性試験	▲	×	細胞培養試験で、哺乳動物細胞に感染性が認められた場合等においては、当該試験を実施する。
(13) 免疫不全誘起	△	×	次のいずれかに該当する場合、提出を要する。 ① 細胞培養試験でいずれかの哺乳動物細胞に感染性が認められた場合 ② 微生物が、哺乳動物の免疫系に感染又は病変を起こし、免疫不全状況を誘起することが知られているウイルスに近縁である場合 なお、哺乳動物に免疫不全状況を誘起することの知られているウイルスには、次のものがある。 ネコ白血病ウイルス、マウスエイズウイルス、ウシ白血病ウイルス等のレトロウイルス、ヒトのサイトメガロウイルス等のヘルペスウイルス等	(12) 免疫不全誘起試験	▲	×	細胞培養試験で、哺乳動物細胞に感染性が認められた場合等においては、当該試験を実施する。
(削除)				(13) 霊長類影響試験	▲	×	同上
(14) 製造、使用に際して発生した有害事例に関する資料	○	○		4 製造、使用に際して発生した過敏性反応等事例に関する資料	○	○	
【IVの試験成績の提出を要しない場合】							

原体を被験物質とする試験について 微生物又は原体が、食品等に広く利用されており、人に対して安全であることが明らかである場合。ただし、原体ではなく微生物が食品等に広く利用されている場合は、原体中の微生物以外の成分が人に対して安全であることを説明すること。 微生物農薬を被験物質とする試験について 「化学品の分類及び表示に関する世界調和システム（GHS）」に示されている混合物の分類基準（つなぎの原則、加成方式（カットオフ値濃度限界））によって、GHS 分類区分に分類できる場合は、上記の試験成績に代えて当該分類結果を提出することができる。この場合、6278 号通知別紙 1 別添 5「ハザードに基づく評価法」に準じて利用する類似の混合物又は各成分の毒性データを提出すること。					(新設)			
V 農作物等への生残性に関する試験成績		△	△	食用又は飼料用作物に利用される農作物に使用する場合であって、IV（１）、（３）、（４）、（８）で影響が認められた場合、提出を要する。	5 作物生残性試験成績	△	△	食用作物に使用する場合であって、ヒトに対する安全性試験の第一段階試験で影響が認められた場合においては、当該試験を実施する。
VI 生活環境動植物及び蜜蜂・蚕に対する影響に関する資料（図 2 参照）								
(１) 淡水魚影響		○	○		(１) 淡水魚影響試験	○	○	微生物の生物学的性質により科学的な根拠がある場合及び使用方法から暴露の可能性がない場合には当該試験を省略することがある。
(２) 淡水無脊椎動物影響		○	○		(２) 淡水無脊椎動物影響試験	○	○	同上
(３) 藻類生長阻害		△	△	水田で使用する場合に提出を要する。	(植物影響試験の一部であったものを移動)	△	△	
(４) 鳥類影響		○	○		(３) 鳥類影響試験	○	○	同上
(５) 植物影響		△	△	雑草防除用微生物又は植物病原微生物若しくは植物病原微生物に近縁な微生物である場合、提出を要する。	(４) 植物影響試験	○	○	
(６) 標的外昆虫等影響		△	△	昆虫病原微生物である場合、提出を要する。	(５) 標的外昆虫影響試験	○	○	
(７) 蜜蜂影響		経口暴露	○	○	(６) 蜜蜂影響試験	○	○	
		接触暴露	×	△				
(８) 蚕影響		○	○		(７) 蚕影響試験	○	○	

(9) 土壌微生物影響	○	○	
(10) 環境中における動態	△	△	(1)～(9)の試験等で影響が認められる場合に、試験成績を提出する。 <u>(1)～(9)の試験等で影響が認められ、リスク管理措置の提案及びその妥当性の考察を行う場合には、試験成績の提出を要しない。</u>
(表の最初に○、△、×の説明を追加)			
【VIの試験成績の提出を要しない場合】 1 微生物の生物学的性質等の科学的な情報又は微生物が農薬以外で広く利用されていることから、 <u>(1)から(8)の試験対象生物に対して安全であることが明らかな場合は当該試験成績の提出を要しない。</u> 2 微生物が河川等の水系に流出するおそれがないと考えられる次の①～③に該当する場合は、(1)から(3)の試験成績の提出を要しない。 ①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 ②倉庫、温室等の施設内でのみ使用される場合 ③粉衣など種子等に直接付着させて使用される場合（適用農作物に水田において栽培される作物を含まない場合に限る。） 3 鳥類が微生物に暴露するおそれがないと考えられる次の①又は②に該当する場合は、(4)の試験成績の提出を要しない。 ①可食部以外の農作物に塗布し、又は適用農作物の樹幹に注入して使用される場合 ②倉庫、温室等の施設内でのみ使用される場合 4 適用作物以外の農作物を含む植物が微生物に暴露するおそれがないと考えられる次の場合は、(5)の試験成績の提出を要しない。 倉庫等、適用作物以外の農作物を含む植物の植生がない施設内のみで使用される場合 5 標的外昆虫等が微生物に暴露するおそれがないと考えられる次の場合は、(6)の試験成績の提出を要しない。 倉庫等、標的外昆虫等が生息していない施設内のみで使用される場合 6 蜜蜂が微生物に暴露するおそれがないと考えられる次の①～④に該当する場合は、(7)の試験成績			

(8) 土壌微生物影響試験	○	○	
7 環境中での動態に関する試験成績	△	△	環境生物に対する影響試験で影響が認められた場合においては、当該試験を実施する。
○：第一段階試験で要求 △：第二段階試験で要求 ▲：第三段階試験で要求 ×：不要			

(注) 第一段階、第二段階、第三段階試験とは、第一段階試験の結果、いずれかで感染性等が認められた場合に第二段階試験へ、また第三段階試験は第二段階試験のいずれかで感染性等が認められた場合又は第一段階試験の細胞培養試験で感染性等が認められた場合に実施する。なお、ヒトに対する安全性試験成績については別図1、環境生物に対する影響試験成績（第一段階試験）及び環境中での動態に関する試験成績（第二段階試験）については別図2を参照のこと。

(新設)

績の提出を要しない。 ①蜜蜂を放飼することがない倉庫等の施設内でのみ使用される場合 ②閉鎖系施設栽培*でのみ使用される場合 ③開花前に収穫する作物及び開花しない作物（管理により開花しない作物を含む）に使用される場合 ④蜜蜂が訪花しないとの見解がある開花作物に使用される場合 ③、④の作物については、6278号局長通知の別添「蜜蜂が暴露しないと想定される作物」による * 閉鎖系施設栽培とは、側面及び上面が、蜜蜂が通り抜けられない資材で被覆されており、密閉可能な施設（被覆資材はネット等でも可）であって、原則栽培終了まで作物が施設内に留まるもの。 開花期間中（連続して開花する作物については、着花が認められてから全ての花が落花するまで）、蜜蜂が通り抜けられない密閉可能なネット等では場を覆う場合（べたがけ等）も「閉鎖系施設栽培」と同様に扱う。			
7 蚕が微生物に暴露するおそれがないと考えられる次の①～④に該当する場合は、（8）の試験成績の提出を要しない。 ①土壤に施用される場合、田面水に施用される場合（投入、滴下、水口処理）、育苗箱に施用される場合、粉衣など種子等に直接付着させて使用される場合 ②適用農作物に塗布し、または適用農作物の樹幹に注入して使用される場合 ③倉庫、温室等の施設内でのみ使用される場合 ④剤型が粒剤の場合			
8 微生物が土壤に混入するおそれがないと考えられる次の①又は②に該当する場合は、（9）の資料の提出を要しない。 ①適用農作物に塗布し、または適用農作物の樹幹に注入して使用される場合 ②倉庫等、土壤が露出していない施設内でのみ使用される場合			
VII 農薬の見本検査に関する資料			
見本の分析結果	△	△	農薬の見本及び当該見本の検査書を提出する場合は、試験成績の提出を要する。

図 1

図 2

図 1 ヒトに対する安全性試験成績

図 2 環境生物に対する影響、環境中での動態に関する試験成績

（別紙 1 別添）適用病害虫又は適用農作物等に対する薬効試験及び適用農作物に対する薬害試験の試験数について

（6278 号局長通知に準じて実施）

1 基本的な考え方

申請に係る適用農作物（適用農作物が作物群である場合には、当該作物群に含まれる作物とする。）、適用病害虫・雑草等及び使用方法等の組合せ毎に、原則として気象条件や栽培条件が異なる 6 か所以上の施設において実施するものとする。ただし、次に掲げる場合には、当該試験を省略、または、例数を以下のとおりとすることができる。

本項で既登録微生物農薬とは、申請者が登録を取得している微生物農薬であって、当該微生物農薬に係る試験成績の利用について権利を有するものをいう。

- （1）植物病原性等の植物に対する有害性が無く、微生物農薬の組成からも薬害を生じる可能性がない場合は薬害試験を省略することができる。
- （2）既登録の使用手法等から薬効の有無が明らかな場合には、薬効試験を、薬害の有無が明らかな場合には薬害試験を省略することができる。
- （3）申請に係る適用農作物と適用病害虫・雑草等の組合せが既登録微生物農薬のそれと同一であり、かつ、次に掲げる条件のいずれかを満たす場合には、当該申請に係る適用農作物と適用病害虫・雑草等の組合せ毎に、当該試験の例数を下表のとおりとすることができる。

条件	薬効試験	薬害試験
① 既登録微生物農薬と同一の微生物であって、微生物農薬の剤型が異なる場合	3 例以上	3 例以上
② 既登録微生物農薬と微生物及び剤型が同一であって、微生物の投下量が既登録微生物農薬のそれより減少する場合	3 例以上	3 例以上
③ 既登録微生物農薬であって、微生物の使用濃度又は使用量（微生物の投下量）を減少させる場合	3 例以上	3 例以上 （省略可）
④ 既登録微生物農薬であって、微生物の使用濃度又は使	3 例以上	3 例以上

用量（微生物の投下量）を増加させる場合	（省略可）	
⑤ 既登録微生物農薬であって、使用方法を変更する場合	3 例以上	3 例以上
⑥ 既登録微生物農薬と微生物及び剤型が同一であって、微生物の投下量が既登録微生物農薬のそれと同一である、又は増加する場合	2 例以上	2 例以上

（２）次に掲げる条件のいずれかを満たす場合には、当該申請に係る適用農作物と適用病害虫・雑草等の組合せ毎に、当該試験の例数を下表のとおりとすることができる。

条件	薬効試験	薬害試験
① 既登録微生物農薬であって、対象農作物を追加することなく、主要病害虫以外の適用病害虫を追加する場合	2 例以上	2 例以上 （省略可）
② 既登録微生物農薬であって、当該既登録微生物農薬の適用病害虫の対象作物に当該作物に類似した作物を追加する場合	2 例以上	6 例以上
③ 限定された地域でのみ生産される農作物又は生産量の少ない農作物を適用農作物とする場合	2 例以上	2 例以上
④ 発生地域が一部の地域に限られている病害虫・雑草等を適用対象とする場合	2 例以上	2 例以上
⑤ 既登録微生物農薬であって、植物防疫上緊急的に適用病害虫・雑草等の範囲を拡大する必要がある場合	2 例以上	2 例以上
⑥ 既登録微生物農薬であって、当該既登録微生物農薬の適用病害虫のうち多数の作物に共通する難防除病害虫に適用農作物を追加する場合	3 例以上	6 例以上

（３）次に掲げる条件満たす場合には、当該申請に係る適用農作物と適用病害虫・雑草等の組合せ毎に、当該試験の例数を下表のとおりとすることができる。

条件	薬効試験	薬害試験
倉庫、サイロ等において使用される農薬の場合	3 例以上	3 例以上

2 作物群を申請する場合

微生物農薬において、果樹類又は野菜類を申請する場合に必要な試験例数を、下表に示す。その他の作物群を申請する場合の必要例数については、6278 号局長通知に準じる。

作物群	試験例数	
	薬効試験	薬害試験
果樹類	当該作物群に含まれる 3 科以上かつ 5 種類以上の作物※で合計 14 例以上（少なくとも 1 種類の作物は 6 例以上、他の作物は各 2 例以上）	当該作物群に含まれる 3 科以上かつ 5 種類以上の作物※で合計 14 例以上（少なくとも 1 種類の作物は 6 例以上、他の作物は各 2 例以上）
野菜類	当該作物群に含まれる 3 科以上かつ 5 種類以上の作物※で合計 14 例以上（少なくとも 1 種類の作物は 6 例以上、他の作物は各 2 例以上）	当該作物群に含まれる 3 科以上かつ 5 種類以上の作物※で合計 14 例以上（少なくとも 1 種類の作物は 6 例以上、他の作物は各 2 例以上）

※ 生産量が特に多い農作物又は生産量が多い農作物の中から選定

3. 茶の残臭及びたばこの喫味について

6278 号局長通知の「別紙 適用病虫害又は適用農作物等に対する薬効試験及び適用農作物に対する薬害試験の試験数について」の 5 に準じる。

別紙 2 提出すべき資料の作成要領

I 微生物の生物学的情報

1 目的

微生物農薬の製造に用いる有効成分を特定するための生物学的情報を示す。

II 微生物農薬の規格性状に関する資料の作成方法

1 微生物の名称及び分類学上の位置

2 報告事項

文献等を引用した場合は引用元を明らかにし、必要に応じて該当資料を添付する。

(1) 名称及び分類学上の位置に関する情報

① 微生物の名称

学名（異名）、和名、英名

② 分類学上の位置

綱、目、科、属、種、亜種、系統、血清型、株等

③ 分離・同定方法（形態学的、生化学的、血清学的、分子遺伝学的方法等）

④ 由来（人為処理、遺伝的安定性等を含む）

(2) 生物学的性質に関する情報

① 生育条件（温度、pH、栄養条件等）

② 宿主域、生活史

③ 作用機作

④ 自然界における存在、地理的分布

⑤ 人畜に対する有害性の情報（病原性、感染性、毒素の存在又は産生。牛、豚等の家畜に対する有害性の情報を含む。）

⑥ 生活環境動植物に対する有害性の情報（病原性、感染性、競争等）

(3) 二次代謝物等の情報（別紙2別添も参照すること）

① 名称、化学的構造

② 性質（安定性、分解性等）

③ 産生条件（微生物の作用機作との関係、保存条件では産生しないことの考察を含む）

④ 産生量

⑤ 確認方法（同定及び分析方法）

⑥ 毒性に係る情報（毒性の種類、影響を受ける生物、症状、毒性参照値等）

⑦ 当該株の情報がない場合は、近縁株又は同属近縁種の上記①～⑥の情報

(1) 微生物の名称

学名（異名）、和名、英名

(2) 微生物分類学上の位置

綱、目、科、属、種、亜種、系統、血清型、株等

(3) 分離・同定方法（形態学的、生化学的、血清学的方法等）

(4) 由来（人為処理、遺伝的安定性等を含む）

2 微生物の生物学的性質

(1) 生育条件（温度、pH、栄養条件等）

(2) 宿主域、生活史、作用機作

(3) 毒素の存在又は産生及びその性質と同定方法

(4) 自然界における存在、地理的分布

(5) ヒト、環境、標的外生物に対する既知及び潜在的有害性に関する考察

（新設）

⑧ 追加の調査による報告事項

Ⅱ 微生物農薬の組成及び性状

1 原体の組成、製造方法及び組成分析

(1) 目的

原体中の成分の種類及び含有濃度の設定根拠とするための情報を得る。

(2) 報告事項

以下の事項を報告する。

① 組成

以下の物質の種類及び原体中の含有濃度又は密度。含有濃度又は密度についてはその規格及び通常値を示す。原体の組成を報告する物質は、微生物、添加物、混在物及び二次代謝物（内毒素を含む。以下「二次代謝物等」という。）とする。

ア 微生物（菌数、孢子数、力価等）

イ 添加物

ウ 混在物

培地残渣の原体中の含有濃度は必須としない。

エ 微生物の二次代謝物等

二次代謝物等の原体中の含有濃度は、別紙2別添の（2）で示す条件に従い報告する。

② 製造方法

次のア及びイをフロー図により、工程ごとに報告する。工程の途中で品質管理を行う場合は、工程の記載に含める。

ア 元種の維持管理方法

イ 元種から原体を製造するための増殖方法（培地組成、培養条件）及び工程

ウ 原体の品質管理方法（微生物の同一性及び含有濃度又は密度（菌数、孢子数、力価等）を確保する方法、確認頻度、生物学的夾雑物の混入防止方法）

3 農薬原体の成分組成

微生物の含量（力価）及び混在物の種類、含量、性質

4 農薬原体の製造方法

製造方法（培地組成、培養条件、精製方法等を含む。）、品質管理方法（微生物の同一性及び含量（力価）を確保する方法、生物学的夾雑物の混入防止方法、元種（菌株）及び原体の保存管理方法等）

エ 原体の製造者、製造場の名称及び所在地

③ 原体の組成分析

登録申請した製造方法により製造した原体を製造場ごとに5以上の異なるバッチ（連続製造の場合には、ロット。以下同じ。）から採取し、その組成分析を実施する。

ア 原体中の微生物、添加物及び混在物の測定又は分析方法

微生物の測定又は分析は微生物に適した方法を採用する。

化学分析により分析する場合は、分析方法の妥当性確認結果

イ 申請した製造方法により製造した微生物原体の分析結果

(48農蚕第6359号農蚕園芸局長通知に即して実施)

2 微生物農薬の組成及び製造方法

(1) 目的

微生物農薬の製造において含有する原体及び補助成分等の名称及び含有濃度、製造方法及び製造工程を確認する。

(2) 報告事項

以下の情報を報告する。

① 微生物農薬の組成

ア 微生物農薬に含有される原体濃度若しくは微生物の含有濃度又は密度（菌数、孢子数等）

イ 補助成分の種類及び名称

ウ 補助成分の細説等

イ及びウは6278号局長通知に準じて報告する。

② 微生物農薬の製造方法

微生物農薬の組成に記載された成分等及び管理条件を記載した製造工程をフローシート様式で報告する。

③ 微生物農薬の品質管理方法

5 製剤の組成

微生物の含量（力価）及びその他成分の種類、含量

6 製剤の製造方法

製造方法、品質管理方法（製品の均一性及び安定性を確保する方法等）

微生物の含有濃度又は密度等

④ 微生物農薬中の微生物の測定又は分析

ア 微生物を測定又は分析する方法（手順の詳細）を記載する

イ 申請した製造方法により製造した微生物農薬の測定又は分析結果（5点以上分析し平均値を結果とする。見本検査の結果を利用しても良い）

(見本検査として実施)

3 微生物農薬の性状等

(6278号局長通知に準じて実施)

(1) 目的

微生物農薬の物理的・化学的性状を確認することにより微生物農薬の均一性及び性能等を確認すること並びに経時安定性の情報を得ることにより使用時まで品質が確保されていることを確認する。

(2) 試験方法

① 物理的・化学的性状

外観（色調・形状）、粉末度、粒度、原液安定性、希釈液安定性又は水和性、懸垂性、水溶解性又は水溶性、密度、引火性等は、6278号局長通知の別添「農薬の物理的・化学的性状」の2に準じて実施する。

② 経時安定性

ア 生きた微生物を含有する微生物農薬としての特性、販売方法等を考慮して試験を実施する。

イ 使用期限を設定するため、微生物農薬の品質（微生物の生存及び活性）を担保できる条件（温度、湿度、明暗、保管期間等）が明らかになるよう試験を設計する。

ウ 設定した保存条件における微生物農薬中の微生物の含有量（菌数、孢子数、力価等）及び微生物農薬の物理的・化学的性状、容器の状態について、経時的に調査する。

エ 1つの保存条件ごとに、5連以上で試験を行い、平均値を結果とする。試験方

法は微生物に最も適した方法を採用する。

(3) 報告事項

以下の事項を報告する。

ア 農薬の種類及び名称

イ 農薬の微生物の種類及び含有濃度又は密度

ウ 試験結果

エ 結果の考察：設定する使用期限の妥当性を考察する。

Ⅲ 適用病害虫又は適用農作物等に対する薬効及び農作物等に対する薬害

(6278 号局長通知に準じて実施)

1 適用病害虫又は適用農作物等に対する薬効試験

本試験は、微生物農薬の標的生物に対する防除効果に関する科学的知見を得ることを目的とする。基本事項、試験方法、報告事項及び効果の評価に用いる指数の算出方法は、6278 号局長通知別添の適用病害虫又は適用農作物等に対する薬効に準じる。

2 適用農作物に対する薬害試験

本試験は、微生物農薬の適用農作物に対する薬害に関する科学的知見を得ることを目的とする。基本事項、試験方法及び報告事項は、6278 号局長通知別添の適用農作物に対する薬害に準じる。

3 茶の残臭

本試験は、茶に使用される微生物農薬について、その薬害の一つとして、微生物農薬に起因する臭気が残るか否かに係る科学的知見を得ることを目的とする。基本事項、試験方法、評価方法及び報告事項は、6278 号局長通知別添の茶の残臭に準じる。

4 たばこの喫味

本試験は、たばこに使用される微生物農薬について、その薬害の一つとして、微生物

農薬に起因する喫味における影響の有無に係る科学的知見を得ること。基本事項、試験施設、試験方法、官能検査の方法及び報告事項は、6278 号局長通知別添のたばこの喫味に準じる。

5 適用農作物以外の農作物等に対する影響

(植物影響試験の内容を移動)

(1) 目的

雑草防除用微生物又は植物病原微生物若しくは植物病原微生物に近縁な微生物である場合に、適用農作物以外の農作物に対する微生物の影響に関する科学的知見を得る。

(2) 試験方法

① 被験試料：原体

② 供試農作物

原則として、単子葉の農作物から 1 科 1 作物以上、双子葉の農作物から 4 科 4 作物以上を選定する。雑草防除用微生物については、標的雑草の近縁種の中から 2 作物以上含める。植物病原微生物若しくは植物病原微生物に近縁な微生物については、当該植物病原微生物に感受性を有する植物の中から原則 2 作物以上含める。

③ 試験区構成

試験は対照区及び処理区を設ける。雑草防除用微生物又は植物病原微生物に近縁な微生物については参考区（陽性対照区）を設けてもよい。試験は少なくとも 3 反復で実施する。

対照区：微生物を暴露しない区。処理区で微生物を水等に懸濁して暴露する場合は、対照区では水等のみを暴露する。処理区で微生物を水等に懸濁し、散布する場合で、展着剤を加用する場合は、対照区では水等に展着剤のみを加用して暴露する。

処理区：原則として、登録申請する微生物農薬の使用方法における最大濃度の 10 倍濃度を暴露する。登録申請する最大濃度の 10 倍濃度での暴露が困難な場合

は、調製可能な最大濃度で暴露する。上記濃度での試験で影響が認められた場合は影響を生じる微生物の濃度を明らかにするため用量－反応試験を実施する。

参考区：雑草防除用微生物については、登録申請する使用方法における最大濃度で標的植物に対して暴露し、陽性対照区とする。植物病原微生物に近縁な微生物については、微生物に近縁な植物病原微生物を感染の成立に十分と考えられる濃度で感受性植物に対して暴露し、陽性対照区とする。

④ 暴露方法

微生物の種類、作用機作、実際の使用場面で想定される暴露経路及び供試生物の種類から最も感染しやすい暴露方法及び生育ステージを選択し、暴露する。例えば、申請する使用方法が茎葉に対する散布であれば、茎葉に対して暴露する。また、植物への付着をよくするため微生物懸濁液に展着剤を適量添加してもよい。もしくは、根又は根圏土壌から単離された微生物については土壌灌注等の土壌処理で実施してもよい。

⑤ 試験期間

原則として暴露後3週間とする。

⑥ 栽培条件

健全な植物の生育を維持するために施肥、水、光、温度及び湿度の適正な管理に努める。なお、他剤による防除は行わない。

⑦ 検査項目

ア 症状観察

植物の生育状況、病徴等を定期的に観察する。

イ 病理検査

試験中枯死及び病徴等が認められた場合、植物の根、葉及び維管束系について、微生物の感染の有無等を調べる。

(3) 結果の整理

検査項目に沿って成績を整理する。用量－反応試験を実施した場合は最大無影響濃度を求める。

(4) その他

供試作物に影響が認められた場合は、暴露を回避するためのリスク管理措置を提案する。

IV 人に対する影響

1 単回経口投与

(1) 目的

微生物農薬に経口的に暴露した場合の人の健康への影響に関する科学的知見を得る。

(2) 試験方法

① 被験試料

原体

② 試験動物

ラット又はマウス（SPF、若齢成熟動物、雌は未経産・非妊娠、体重範囲：平均値±20 %以内、投与前及び投与後一定時間絶食）

③ 群構成

対照群：溶媒対照群（2匹以上／性）

非投与群（2匹以上／性、投与に溶媒を使用し、溶媒の影響が不明のとき必要）

投与群：10⁸ 単位／動物（1 mL 以下/100 g 体重：1回経口投与）

最終解剖群（5匹以上／性）

途中解剖群（3匹以上／性／群、投与3日、7日、14日後（生残状況の推移を明らかにする。）

④ 試験期間

III ヒトに対する安全性試験の実施方法

1 単回経口投与試験

(1) 目的

微生物農薬に経口的に暴露した場合のヒトの健康への影響を評価するために、高濃度の農薬微生物を動物に1回経口投与し、供試動物に対する臨床的、病理学的影響や死亡を調べる。

(2) 試験方法

ア 被験試料：原体

イ 試験動物

ラット又はマウス（SPF、成熟初期動物、雌は未経産・非妊娠、体重範囲：平均値±20%以内、投与前及び投与後一定時間絶食）

ウ 群構成

対照群：溶媒対照群（2匹以上／性）

非投与群（2匹以上／性、投与に溶媒を使用し、溶媒の影響が不明のとき必要）

投与群：10⁸ 単位／動物（1 ml 以下/100g 体重：1回経口投与）

最終解剖群（5匹以上／性）

途中解剖群（3匹以上／性／群、投与3日、7日、14日後（生残状況の推移を明らかにする。）

エ 試験期間

原則として投与後 21 日間

⑤ 検査項目

ア 一般状態観察

毒性徴候の種類、程度、発現、推移及び可逆性を時間との関連で観察、記録する。観察期間は通常 21 日間とする。

イ 体重測定

投与直前、7 日、14 日後、屠殺時及び死亡時に測定する。

ウ 微生物の体外への排出状況

糞中の微生物数を定期的（投与前、1 日、3 日、7 日、14 日後）に測定する。

エ 剖検

試験中に死亡した動物は死後直ちに解剖し、死亡日時、所見を記録する。生存している動物は実験終了時に解剖する。

途中解剖群については、投与 3 日、7 日、14 日後に雌雄各 3 匹以上を解剖する。すべての解剖について、解剖時期、所見を記録するとともに器官における感染の有無等を調べる。

オ 微生物の体内における生残状況

解剖した動物の腎臓、脳、肝臓、肺、脾臓、胃、血液、小腸、大腸、代表的なリンパ節及び肉眼的病変がみられた各器官中の微生物数を測定する。

（3）結果の整理

一般状態観察、剖検、微生物数の測定の結果を基にして次の項目に関して整理する。

①毒性徴候、②死亡率、③体重変動、④体外への排出状況、⑤病理的变化、⑥器官別感染の有無

（4）次の試験への進行

① 供試動物に感染性、病原性、毒性及び生残性が認められなかった場合は、これ以上の試験は必要ない。

原則として投与後 21 日間

オ 検査項目

（ア）症状観察

症状の種類、程度、発現、推移及び可逆性を時間との関連で観察、記録する。観察期間は通常 21 日間とする。

（イ）体重測定

投与直前、7 日、14 日後、屠殺時及び死亡時に測定する。

（ウ）農薬微生物の体外への排出状況

糞中の微生物数を定期的（投与前、1 日、3 日、7 日、14 日後）に測定する。

（エ）剖検

試験中に死亡した動物は死後直ちに解剖し、死亡日時、所見を記録する。生存している動物は実験終了時に解剖する。

途中解剖群については、投与 3 日、7 日、14 日後に雌雄各 3 匹以上を解剖する。すべての解剖について、解剖時期、所見を記録するとともに器官における感染の有無等を調べる。

（オ）農薬微生物の体内における生残状況

解剖した動物の腎臓、脳、肝臓、肺、脾臓、胃、血液、小腸、大腸、代表的なリンパ節及び肉眼的病変がみられた各器官中の微生物数を測定する。

（3）結果の整理

症状観察、剖検、微生物数の測定の結果を基にして次の項目に関して整理する。

①一般症状、②死亡率、③体重変動、④ 体外への排出状況、⑤病理的变化、⑥器官別感染の有無

（4）次の試験への進行

ア 供試動物に感染性、病原性、毒性及び生残性が認められなかった場合は、これ以上の試験は必要ない。

- ② 供試動物に感染性又は生残性が認められた場合は、反復投与試験を行う。
- ③ 供試動物に病原性が認められた場合は、個別に対応を検討する。
- ④ 供試動物に毒性が認められた場合は、別紙 2 別添に従う。

(静脈内投与の後に移設)

イ 供試動物に感染性又は生残性が認められた場合は、反復投与試験（90 日）を行う。

ウ 供試動物に病原性が認められた場合は、その後の試験については十分検討し決定する。

エ 供試動物に毒性が認められた場合は、毒性成分を同定し、その成分を用いて「農薬の登録申請において提出すべき資料について」（平成 31 年 3 月 29 日付け 30 消安第 6278 号農林水産省消費・安全局長通知。以下「30 消安第 6278 号局長通知」という。）に準じた試験を行う。

2 単回経皮投与試験

（1）目的

微生物農薬に皮膚を介して暴露した場合のヒトの健康への影響を評価するために、高濃度の農薬微生物を動物の皮膚に 1 回塗布し、供試動物に対する局所刺激性及び全身影響を調べる。

（2）試験方法

ア 被験試料：製剤

イ 試験動物

白色ウサギ（SPF、成熟初期動物、雌は未経産・非妊娠、体重範囲：平均値 $\pm$ 20%以内）

ウ 群構成

対照群：不要（投与に溶媒を使用し、溶媒の影響が不明のとき溶媒対照群、非投与群（各群 2 匹／性）必要）

投与群：10⁸ 単位／動物（5 匹以上／性、2g 以下／動物：投与 24 時間前に体表の 10%以上の毛を刈取って被験試料を塗布し、ガーゼパッチで覆う。暴露 24 時間後水又は溶媒で被験試料を除去する。）

エ 試験期間

(皮膚刺激に関する試験は皮膚刺激試験へ)

投与後 14 日間

オ 検査項目

(ア) 症状観察

症状の種類、程度、発現、推移及び可逆性を時間との関連で観察、記録する。
観察期間は通常 14 日間とする。

(イ) 体重測定

投与直前、7 日後、屠殺時及び死亡時に測定する。

(ウ) 剖検

試験中に死亡した動物は死後直ちに、生存している動物は実験終了時に解剖し、死亡日時、解剖時間、所見を記録する。

(エ) 皮膚刺激状態

塗布直後及び毎日別表 2 の皮膚の紅斑、浮腫等の徴候を観察する。

(3) 結果の整理

症状観察、剖検の結果を基にして次の項目に関して整理する。

①一般症状、②死亡率、③体重変動、④ 病理的变化、⑤皮膚刺激状態（別表 2 に準拠して計算）

(4) 次の試験への進行

ア 供試動物に毒性が認められなかった場合は、これ以上の試験は必要ない。

イ 供試動物に毒性が認められた場合は、毒性成分を同定し、その成分を用いて 30 消安第 6278 号局長通知に準じた試験を行う。

別表 2 皮膚反応の数値による記録

紅斑及び痂皮の形成

紅斑なし	0
非常に軽度の紅斑（かろうじて識別出来る）	1
はっきりした紅斑	2

中等度ないし高度紅斑……………	3
高度紅斑(beetredness)からわずかな痂皮の形成（深部損傷）まで……………	4
最高点 4	

浮腫の形成

浮腫なし……………	0
非常に軽度の浮腫（かろうじて識別出来る）……………	1
軽度浮腫（はっきりした膨隆による明確な縁が識別出来る）……………	2
中等度浮腫（約 1 mm の膨隆）……………	3
高度浮腫（1 mm 以上の膨隆と暴露範囲を越えた広がり）……………	4
最高点 4	

2 単回経気道投与

（1）目的

微生物農薬に呼吸器系を介して暴露した場合の人の健康への影響に関する科学的知見を得る。

（2）試験方法

① 被験試料

原体

② 試験動物

ラット又はマウス（SPF、若齢成熟動物、雌は未経産・非妊娠、体重範囲：平均値±20 %以内）

③ 群構成

対照群：溶媒対照群（2 匹以上／性）

非投与群（2 匹以上／性、投与に溶媒を使用し、溶媒の影響が不明のと

3 単回経気道投与試験

（1）目的

微生物農薬に呼吸器系を介して暴露した場合のヒトの健康への影響を評価するために、高濃度の農薬微生物を動物に 1 回経気道投与し、供試動物に対する臨床的、病理学的影響や死亡を調べる。

（2）試験方法

ア 被験試料：原体

イ 試験動物

ラット又はマウス（SPF、成熟初期動物、雌は未経産・非妊娠、体重範囲：平均値±20 %以内）

ウ 群構成

対照群：溶媒対照群（2 匹以上／性）

非投与群（2 匹以上／性、投与に溶媒を使用し、溶媒の影響が不明の

き必要)

投与群：10⁸ 単位／動物（0.3 mL 以下/100 g 体重：1 回経気道投与）

最終解剖群（5 匹以上／性）

途中解剖群（3 匹以上／性／群、投与直後、3 日、7 日、14 日後（生残状況の推移を明らかにする。))

④ 試験期間

原則として投与後 21 日間

⑤ 検査項目

ア 一般状態観察

毒性徴候の種類、程度、発現、推移及び可逆性を時間との関連で観察、記録する。観察期間は通常 21 日間とする。

イ 体重測定

投与直前、7 日、14 日後、屠殺時及び死亡時に測定する。

ウ 剖検

試験中に死亡した動物は死後直ちに解剖し、死亡日時、所見を記録する。生存している動物は実験終了時に解剖する。

途中解剖群については、投与直後、3 日、7 日、14 日後に雌雄各 3 匹以上を解剖する。

すべての解剖について、解剖時期、所見を記録するとともに器官における感染の有無等を調べる。

エ 微生物の体内における生残状況

解剖した動物の肺、鼻腔、気管等の他に腎臓、脳、肝臓、脾臓、血液、代表的なリンパ節及び肉眼的病変がみられた器官中の微生物数を測定する。

（３）結果の整理

一般状態観察、剖検、微生物数の測定の結果を基にして次の項目に関して整理する。

とき必要)

投与群：10⁸ 単位／動物（0.3 ml 以下/100g 体重：1 回経気道投与）

最終解剖群（5 匹以上／性）

途中解剖群（3 匹以上／性／群、投与直後、3 日、7 日、14 日後（生残状況の推移を明らかにする。))

エ 試験期間

原則として投与後 21 日間

オ 検査項目

ア) 症状観察

症状の種類、程度、発現、推移及び可逆性を時間との関連で観察、記録する。観察期間は通常 21 日間とする。

イ) 体重測定

投与直前、7 日、14 日後、屠殺時及び死亡時に測定する。

ウ) 剖検

試験中に死亡した動物は死後直ちに解剖し、死亡日時、所見を記録する。生存している動物は実験終了時に解剖する。

途中解剖群については、投与直後、3 日、7 日、14 日後に雌雄各 3 匹以上を解剖する。

すべての解剖について、解剖時期、所見を記録するとともに器官における感染の有無等を調べる。

エ) 農薬微生物の体内における生残状況

解剖した動物の肺、鼻腔、気管等の他に腎臓、脳、肝臓、脾臓、血液、代表的なリンパ節及び肉眼的病変がみられた器官中の微生物数を測定する。

（３）結果の整理

Ⅲの 1 の（３）に準ずる。（④体外への排出状況を除く）

①毒性徴候、②死亡率、③体重変動、④病理的变化、⑤器官別感染の有無

(4) 次の試験への進行

- ① 供試動物に感染性、病原性、毒性及び生残性が認められなかった場合は、これ以上の試験は必要ない。
- ② 供試動物に感染性又は生残性が認められた場合は、反復投与試験を行う。
- ③ 供試動物に病原性が認められた場合は、個別に対応を検討する。
- ④ 供試動物に毒性が認められた場合は、別紙2別添に従う。

3 単回静脈内投与

(1) 目的

微生物農薬が直接体内に侵入した場合の人の健康に対する影響に関する科学的知見を得る。なお、有効成分が菌類、原生生物等の場合は腹腔内投与を選択しても良い。

(2) 試験方法

- ① 被験試料：原体
- ② 試験動物

ラット又はマウス（SPF、若齢成熟動物、雌は未経産・非妊娠、体重範囲：平均値 $\pm$ 20 %以内）

③ 群構成

対照群：溶媒対照群（2匹以上／性）

非投与群（2匹以上／性、投与に溶媒を使用し、溶媒の影響が不明のとき必要）

投与群： 10^7 単位／動物（0.3 mL 以下/100 g 体重：1回静脈内又は腹腔内投与）
最終解剖群（5匹以上／性）
途中解剖群（3匹以上／性／群、投与直後、3日、7日、14日後（生残状況の推移を明らかにする。))

(4) 次の試験への進行

Ⅲの1の(4)に準ずる。

4 単回静脈内投与試験

(1) 目的

微生物農薬が直接体内に侵入した場合のヒトの健康に対する影響を評価するために、高濃度の農薬微生物を動物に1回静脈内投与し、供試動物に対する臨床的、病理学的影響や死亡を調べる。

(2) 試験方法

- ア 被験試料：原体
- イ 試験動物

ラット又はマウス（SPF、成熟初期動物、雌は未経産・非妊娠、体重範囲：平均値 $\pm$ 20%以内）

ウ 群構成

対照群：溶媒対照群（2匹以上／性）

非投与群（2匹以上／性、投与に溶媒を使用し、溶媒の影響が不明のとき必要）

投与群： 10^7 単位／動物（0.3ml 以下/100g 体重：1回静脈内投与）
最終解剖群（5匹以上／性）
途中解剖群（3匹以上／性／群、投与直後、3日、7日、14日後（生残状況の推移を明らかにする。))

④ 試験期間

原則として投与後 21 日間

⑤ 検査項目

ア 一般状態観察

毒性徴候の種類、程度、発現、推移及び可逆性を時間との関連で観察、記録する。観察期間は通常 21 日間とする。

イ 体重測定

投与直前、7 日、14 日後、屠殺時及び死亡時に測定する。

ウ 剖検

試験中に死亡した動物は死後直ちに解剖し、死亡日時、所見を記録する。生存している動物は実験終了時に解剖する。

途中解剖群については、投与直後、3 日、7 日、14 日後に雌雄各 3 匹以上を解剖する。

すべての解剖について、解剖時期、所見を記録するとともに器官における感染の有無等を調べる。

エ 微生物の体内における生残状況

解剖した動物の血液、腎臓、脳、肝臓、脾臓、小腸、大腸、代表的なリンパ節及び肉眼的病変がみられた器官中の微生物数を測定する。

(3) 結果の整理

一般状態観察、剖検、微生物数の測定の結果を基にして次の項目に関して整理する。

①毒性徴候、②死亡率、③体重変動、④病理的变化、⑤器官別感染の有無

(4) 次の試験への進行

① 供試動物に病原性及び毒性が認められなかった場合はこれ以上の試験は必要ない。

② 供試動物に病原性が認められた場合は、個別に対応を検討する。

エ 試験期間

原則として投与後 21 日間

オ 検査項目

(ア) 症状観察

症状の種類、程度、発現、推移及び可逆性を時間との関連で観察、記録する。観察期間は通常 21 日間とする。

(イ) 体重測定

投与直前、7 日、14 日後、屠殺時及び死亡時に測定する。

(ウ) 剖検

試験中に死亡した動物は死後直ちに解剖し、死亡日時、所見を記録する。生存している動物は実験終了時に解剖する。

途中解剖群については、投与直後、3 日、7 日、14 日後に雌雄各 3 匹以上を解剖する。

すべての解剖について、解剖時期、所見を記録するとともに器官における感染の有無等を調べる。

(エ) 農薬微生物の体内における生残状況

解剖した動物の血液、腎臓、脳、肝臓、脾臓、小腸、大腸、代表的なリンパ節及び肉眼的病変がみられた器官中の微生物数を測定する。

(3) 結果の整理

Ⅲの 1 の(3)に準ずる。(④体外への排出状況を除く)

(4) 次の試験への進行

ア 供試動物に病原性及び毒性が認められなかった場合はこれ以上の試験は必要ない。

イ 供試動物に病原性が認められた場合は、その後の試験について十分検討し決定す

③ 供試動物に毒性が認められた場合は、別紙 2 別添に従う。

4 単回経皮投与

(1) 目的

微生物農薬に皮膚を介して感染する恐れがある場合の人の健康への影響に関する科学的知見を得る。

(2) 試験方法等

別紙 1 に記載されている皮膚感染性が既知の微生物について、個々に適した皮膚感染性を観察する試験法を策定し、当該農薬の微生物の皮膚感染性について観察する。

5 皮膚刺激性

(1) 目的

微生物農薬の皮膚刺激性／腐食性に関する科学的な知見を得る。

(2) 試験方法

OECD Test No. 404 : Acute Dermal Irritation/Corrosion

OECD Test No. 430 : *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test Method (TER)

OECD Test No. 431 : *In Vitro* Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Method

OECD Test No. 435 : *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion
被験試料：微生物農薬

(3) 次の試験への移行

- ① 供試生物に刺激性が認められなかった場合は、これ以上の試験は必要ない。
- ② 供試生物に刺激性が認められた場合は、リスク管理措置を検討する。

る。

ウ 供試動物に毒性が認められた場合は、毒性成分を同定し、その成分を用いて 30 消安第 6278 号局長通知に準じた試験を行う。

(単回経皮投与試験を移設)

(単回経皮投与試験の皮膚刺激性に関する項目を分離)

6 眼刺激性

(1) 目的

微生物農薬が人の眼に入った場合に生じる刺激性に関する科学的な知見を得る。

(2) 試験方法

OECD Test No. 405 : Acute Eye Irritation/Corrosion

OECD Test No. 437 : Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation Or Serious Eye Damage (BCOP)

OECD Test No. 438 : Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage (ICE)

OECD Test No. 460 : Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants

OECD Test No. 491 : Short Time Exposure *In Vitro* Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage

OECD Test No. 492 : Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage

① 被験試料：微生物農薬

5 眼一次刺激性試験

(1) 目的

微生物農薬がヒトの眼に入った場合に生ずる刺激性を予測するために、微生物農薬を動物の眼に1回滴下し、眼刺激性を調べる。

(2) 試験方法

ア 被験試料：製剤

イ 試験動物

白色ウサギ（SPF、成熟初期動物、雌は未経産・非妊娠、体重範囲：平均値±20%以内）

ウ 群構成

対照群：溶媒対照群（不要：一方の眼が対照となる）

非投与群（3匹以上、投与に溶媒を使用し、溶媒の影響が不明のとき必要）

投与群：10⁷単位／眼（6匹以上、液体の場合0.1ml、固体の場合0.1g／眼：投与24時間前に眼に異常がないことを確認すること。苦痛を与えるときは、局所麻酔を使用してもよい。暴露24時間後微温湯で洗浄する。）

エ 試験期間

原則として暴露後7日間

オ 検査項目

（ア）症状観察

別表1 障害の発現の有無を観察する。

刺激症状及び眼の損傷の観察は投与1時間、1日、2日、3日、4日、7日後に行う。

7日目に刺激症状がみられたときは、その後3日毎に最長21日間観察する。

(3) 結果の整理

② 投与量：10⁷ 単位／眼（液体の場合 0.1 mL、固体の場合重量で 0.1 g 又は体積で 0.1 mL）

（3）次の試験への進行

- ① 供試生物に刺激性が認められなかった場合は、これ以上の試験は必要ない。
- ② 供試生物に刺激性が認められた場合は、リスク管理措置を検討する。

観察結果を基にして、次の項目に関して整理する。

- ① 眼刺激性を別表 1 に準拠して計算する
- ② 刺激及び浸蝕の程度
- ③ 眼以外の障害の発生状況

なお、眼の表面に薬剤を滴下した場合に起こる可逆的变化を眼刺激、不可逆的变化を眼浸蝕と云う。

（4）次の試験への進行

特に必要ない。

別表 1 眼障害の数値による記録

1	角膜
A	混濁：（混濁の最も濃い部分で評価する。）
	潰瘍なし、混濁なし…………… 0
	混濁散在、虹彩異常なし…………… 1
	半透明の区域あり、虹彩一部見えず…………… 2
	真珠様光沢部位、虹彩の細部見えず、瞳孔の存在を認めるのみ…………… 3
	角膜白濁、虹彩見えず…………… 4
B	混濁した角膜の範囲
	なし…………… 0
	0～1/4 …………… 1
	1/4～1/2 …………… 2
	1/2～3/4 …………… 3
	>3/4 …………… 4

障害値 = $A \times B \times 5$ (最大値 80)

2 虹彩

A 病変

正常..... 0

著明な深い褶、鬱血、肥厚、中等度の角膜周囲充血、虹彩の

光反射遅滞すれど陽性..... 1

光反射陰性、出血、虹彩破壊あり..... 2

障害値 = $A \times 5$ (最大値 10)

3 結膜

A 充血 (眼瞼結膜、眼球結膜、角膜、虹彩を含めて)

血管正常..... 0

血管の幾つかが充血、拡散..... 1

深紅色に充血、個々の血管見分け難い..... 2

結膜全体が鮮紅色..... 3

B 肥厚、腫脹

腫脹なし..... 0

正常とは異なる腫脹あり (膜を含む) 1

眼瞼の一部外反を含む著明な腫脹..... 2

眼瞼腫脹著明、1/2 閉鎖..... 3

眼瞼腫脹強度、1/2 ～全閉鎖..... 4

C 排出液

排出液なし..... 0

異常排出液少量あり（正常動物の内眼角の分泌液と区別）	1
異常排出液で眼瞼及び近接皮膚、毛が湿潤	2
異常排出液多量、眼瞼、近接皮膚、毛の湿潤区域大	3

障害値＝（A＋B＋C）×2（最大値 20）

最大障害値＝角膜の障害値＋虹彩の障害値＋結膜の障害値

7 皮膚感作性

（1）目的

微生物農薬が人の皮膚を介し繰返し暴露した場合に生じる皮膚感作性を予測する。

（2）試験方法

OECD Test No. 406: Skin Sensitisation

OECD Test No. 429: Skin Sensitisation (Local Lymph Node Assay: LLNA)

被験試料：微生物農薬

6 皮膚感作性試験

（1）目的

微生物農薬にヒトの経皮、経気道を介し繰返し暴露した場合に生ずる感作性を予測するために、微生物農薬を動物に皮内注射し、感作性を調べる。

本試験は、農薬微生物がウイルス、細菌及び真菌の場合に実施する。

（2）試験方法

ア 被験試料：製剤

イ 試験動物

白色モルモット（SPF、成熟初期動物、雄）

ウ 群構成

対照群：陽性対照群（5匹以上、既アレルギー）

投与群：10匹以上

液体の場合は希釈せずに使用、固体の場合は生理食塩水で希釈して使用する。（被験試料が刺激性のものである場合は、生理食塩水で刺激が弱くなるまで希釈して使用。）

供試動物の毛を除毛し、第1回目は被験試料 0.05ml／動物を、その後は隔日に 0.1ml／動物を3週間、合計10回感作のための皮内注射、10回目注射2週間後に惹起のための注射を行う。

エ 試験期間

(3) 次の試験への進行

- ① 供試生物に感作性が認められなかった場合は、これ以上の試験は必要ない。
- ② 供試生物に感作性が認められた場合は、リスク管理措置を検討する。

(4) その他

原則として、適切に微生物の経皮及び経気道感作性を評価する試験方法が確立されるまでの間、微生物には潜在的に感作性があるものとみなす。

8 細胞培養

(1) 目的

ウイルスを有効成分とする微生物農薬について、哺乳動物細胞への感染性、毒性、形質転換性を有するか否かに関する科学的知見を得る。

(2) 試験方法

① 被験試料

包埋体ウイルスの場合は、非包埋ウイルス (non-occluded viruses) を、その他のウイルスの場合は、感染宿主細胞又は組織より抽出したウイルスを用いる。本試験でのウイルスの単位は PFU (Plaque Forming Unit) を単位とし、プラークアッセイが行えない場合は宿主生物又は感受性細胞に対する LD₅₀ 又は TCID₅₀ を単位とする。

なお、昆虫ウイルスについては、昆虫の血液及びリンパ液が細胞培養に影響を与えないことが確認できている場合を除きこれらの被験試料への混入がないものとする。

投与開始から惹起投与後 48 時間まで

オ 検査項目

惹起投与 24 時間、48 時間後に紅斑、浮腫、その他の反応をみる。

(3) 結果の整理

投与後の反応を記録する。

(4) 次の試験への進行

特に必要ない。

7 細胞培養試験

(1) 目的

ウイルスを成分とする微生物農薬について、感染性、毒性、形質転換を有するか否かを評価するために、ウイルスを哺乳動物細胞に接種して調べる。

(2) 試験方法

ア 被験試料

包埋ウイルスの場合は、非包埋ウイルス (non-occluded viruses) を、その他のウイルスの場合は、感染宿主細胞又は組織より抽出したウイルスを用いる。本試験でのウイルスの単位は PFU (Plaque Forming Unit) を単位とし、プラークアッセイが行えない場合は感受性細胞又は宿主生物に対する LD₅₀ 又は TCID₅₀ を単位とする。

なお、昆虫ウイルスについては、昆虫の血液及びリンパ液が細胞培養に影響を与えないことが確認できている場合を除きこれらの被験試料への混入がないものとする。

② 細胞株

原則として次の細胞株を試験に用いる。

(ア) ヒト2倍体細胞株、(イ) 霊長類由来株化細胞、(ウ) シリアンハムスター胎児初代細胞 (SHE)、(エ) 当該ウイルスの増殖と定量に用い得る感受性細胞株

③ 試験項目

ア 感染性試験

シャーレ当たり 2×10^5 細胞程度の Subconfluent となった各培養細胞株にシャーレ当たり 10^6 単位以上のウイルスを接種する。

本試験では細胞当たり最低 5 PFU 又は $7 LD_{50}$ 単位のウイルスを使用するものとし、もしこれより少ない単位を使用する場合にはその根拠を示すものとする。対照群としてウイルス液を構成する無脊椎動物細胞用培養液のみを等量加えるウイルス培養液対照群、不活化したウイルスを接種する不活性化対照群及び感受性細胞又は宿主生物を使用した陽性対照群を設定する。

接種7日及び14日後に植代え、21日間にわたり細胞変性を観察する。また、接種1日、2日、5日、7日、14日及び21日後に培養液を回収し、適当な宿主系を用いて感染性ウイルス数を定量するとともに細胞中のウイルス抗原及び核酸を定量する。

イ 細胞毒性試験

(2) ② (ア) ~ (エ) の各培養細胞株をそれぞれシャーレ当たり 200 個ずつ、30 枚のシャーレに分注培養し、24 時間後に細胞株ごとにシャーレ 10 枚に 10^5 単位/枚のウイルスを接種する。別の 10 枚にはウイルス液を構成している無脊椎動物細胞用の培養液を等量加えるウイルス培養液対照群、残りの 10 枚は適当な脊椎動物細胞用培養液を等量加える非処理対照群とする。

1 時間暴露後、全シャーレを適当な脊椎動物細胞用培養液で洗い、非処理対照群で少なくとも 25 細胞以上の小コロニーが形成されるまで培養し、各培養細胞株

イ 細胞株

原則として次の細胞株を試験に用いる。

①ヒト胎児初代細胞②ヒト2倍体細胞株③霊長類由来株化細胞④シリアンハムスター胎児初代細胞(SHE)⑤当該ウイルスの増殖と定量に用い得る感受性細胞株

ウ 試験項目

(ア) 感染性試験

シャーレ当たり 2×10^5 細胞程度の Subconfluent となった各培養細胞株にシャーレ当たり 10^6 単位以上のウイルスを接種する。

本試験では細胞当たり最低 5 PFU 又は $7 LD_{50}$ 単位のウイルスを使用するものとし、若しこれより少ない単位を使用する場合にはその根拠を示すものとする。

対照群としてウイルス液を構成する無脊椎動物細胞用培養液のみを等量加えるウイルス培養液対照群、不活化したウイルスを接種する不活性化対照群及び感受性細胞又は宿主生物を使用した陽性対照群を設定する。

接種7日、14日後に植代え、21日間にわたり細胞変性を観察する。また、接種1日、2日、5日、7日、14日、21日後に培養液を回収し、適当な宿主系を用いて感染性ウイルス数を定量するとともに細胞中のウイルス抗原及び核酸を定量する。

(イ) 細胞毒性試験

①~④の各培養細胞株をそれぞれシャーレ当たり 200 個ずつ、30 枚のシャーレに分注培養し、24 時間後に各細胞株毎にシャーレ 10 枚に 10^5 単位/枚のウイルスを接種する。別の 10 枚にはウイルス液を構成している無脊椎動物細胞用の培養液を等量加えるウイルス培養液対照群、残りの 10 枚は適当な脊椎動物細胞用培養液を等量加える非処理対照群とする。

1 時間暴露後、全シャーレを適当な脊椎動物細胞用培養液で洗い、非処理対照群で少なくとも 25 細胞以上の小コロニーが形成されるまで培養し、各培養細胞株の 3 群の

の3群のコロニー形成への影響を観察する。

ウ 細胞形質転換試験

感染性試験でウイルス核酸が細胞内に確認できない場合は実施する必要はない。

SHE 細胞にウイルスを接種し、形質転換の有無を観察する。対照群としてウイルス液を構成する無脊椎動物細胞用培養液のみを加えるウイルス培養液対照群、不活性化したウイルスを接種する不活性化対照群及び SHE 細胞にサルアデノウイルス-7 型 (SAV-7) を接種した陽性対照群を設定する。

形質転換が認められた場合には、形質転換の認められたコロニーの細胞をハムスターに接種して腫瘍形成の有無を確認する。

(3) 結果の整理

観察結果等を基にして、次の項目に関して整理する。

①細胞変性の有無、②感染性ウイルスの定量結果、③コロニー形成への影響、④形質転換の有無、⑤形質転換があった場合の腫瘍形成の有無

(4) 次の試験への進行

- ① 哺乳動物細胞に対して感染性、毒性、形質転換が認められないと判断された場合は、これ以上の細胞培養試験を行う必要はない。
- ② 哺乳動物細胞のいずれかに対して感染性が認められた場合は、ウイルス発がん性試験、繁殖毒性試験及び免疫不全誘起試験を行う。
- ③ 哺乳動物細胞のいずれかに対して形質転換が認められた場合は、個別に対応を検討する。
- ④ 哺乳動物細胞のいずれかに対して毒性が認められた場合は、毒性成分を同定し、その成分を被験物質として 6278 号局長通知の別添「人に対する影響」に準じて試験を行う。

9 反復投与

コロニー形成への影響を観察する。

(ウ) 細胞形質転換試験

感染性試験でウイルス核酸が細胞内に確認できない場合は実施する必要はない。

SHE 細胞にウイルスを接種し、形質転換の有無を観察する。対照群としてウイルス液を構成する無脊椎動物細胞用培養液のみを加えるウイルス培養液対照群、不活性化したウイルスを接種する不活性化対照群及び SHE 細胞にサルアデノウイルス-7 型 (SAV-7) を接種した陽性対照群を設定する。

形質転換が認められた場合には、形質転換の認められたコロニーの細胞をハムスターに接種して腫瘍形成の有無を確認する。

(3) 結果の整理

観察結果等を基にして、次の項目に関して整理する。

①細胞変性の有無、②感染性ウイルスの定量結果、③コロニー形成への影響、④形質転換の有無、⑤形質転換があった場合の腫瘍形成の有無

(4) 次の試験への進行

- ア 哺乳動物細胞に対して感染性、毒性、形質転換が認められないと判断された場合は、これ以上の細胞培養試験を行う必要はない。
- イ 哺乳動物細胞のいずれかに対して感染性が認められた場合は、ウイルス発がん性試験、繁殖試験、免疫不全誘起試験及び霊長類影響試験を行う。
- ウ 哺乳動物細胞のいずれかに対して毒性が認められた場合は、毒性成分を同定し、その成分を用いて、30 消安第 6278 号局長通知に準じた試験を行う。

8 反復投与試験 (90 日)

(1) 目的

単回投与試験において感染性又は生残性が認められた場合、微生物の反復投与により、当該微生物農薬摂取に起因する影響に関する科学的知見を得る。

(2) 試験方法

① 被験試料

単回投与試験で使用したものと同一ものを用いる。

② 試験動物

単回投与試験で使用したものと同一ものを用いる。

③ 群構成

対照群：溶媒対照群（10 匹以上／性）

非投与群（10 匹以上／性、投与に溶媒を使用し、溶媒の影響が不明のとき必要）

投与群：10⁸ 単位／動物（10 匹以上／性、単回投与試験で感染性又は生残性が認められた投与経路）

④ 試験期間

90 日以上

⑤ 検査項目

ア 一般状態観察

毒性徴候の種類、程度、発現、推移及び可逆性を時間との関連で観察、記録する。観察期間は通常 90 日間とする。

また、1 週間ごとに摂餌量を記録する。

イ 体重測定

投与直前、その後 1 週間ごと、屠殺時及び死亡時に測定する。

ウ 剖検

試験中に死亡した動物は死後直ちに解剖し、死亡日時、所見を記録する。生存

(1) 目的

単回投与試験において感染性又は生残性が認められた場合、農薬微生物の反復投与により、当該微生物農薬摂取に起因する影響を評価するために、高濃度の農薬微生物を動物に毎日 1 回、90 日以上にわたり投与し、その影響を調べる。

(2) 試験方法

ア 被験試料

単回投与試験で使用したものと同一ものを用いる。

イ 試験動物

単回投与試験で使用したものと同一ものを用いる。

ウ 群構成

対照群：溶媒対照群（10 匹以上／性）

非投与群（10 匹以上／性、投与に溶媒を使用し、溶媒の影響が不明のとき必要）

投与群：10⁸ 単位／動物（10 匹以上／性、単回投与試験で感染性又は生残性が認められた投与経路）

エ 試験期間

90 日以上

オ 検査項目

(ア) 症状観察

症状の種類、程度、発現、推移及び可逆性を時間との関連で観察、記録する。観察期間は通常 90 日間とする。

また、1 週間毎に飼料の摂取量を記録する。

(イ) 体重測定

投与直前、その後 1 週間毎、屠殺時及び死亡時に測定する。

(ウ) 剖検

試験中に死亡した動物は死後直ちに解剖し、死亡日時、所見を記録する。生存

している動物は実験終了時に解剖する。

すべての解剖について、解剖時期、所見を記録するとともに器官における感染の有無等を調べる。

エ 微生物の体内における生残状況

解剖した動物の腎臓、脳、肝臓、肺、脾臓、胃、血液、小腸、大腸、代表的なリンパ節及び肉眼的病変がみられた各器官中の微生物数を測定する。

(3) 結果の整理

一般状態観察、体重測定、剖検、微生物数の測定の結果を基にして次の項目に関して整理する。

①毒性徴候、②死亡率、③摂餌量、④体重変動、⑤病理的变化、⑥器官別感染の有無

(4) 次の試験への進行

① 供試動物に感染性、病原性及び毒性が認められなかった場合は、これ以上の試験は必要ない。ただし、単回投与試験で認められた感染性の理由は明らかにされなければならない。

② 供試動物に感染性が認められた場合は、繁殖毒性試験を行う。

また、微生物が菌類である場合は、さらに遺伝毒性試験を行う。

③ 供試動物に病原性が認められた場合は、個別に対応を検討する。

④ 供試動物に毒性が認められた場合は、別紙 2 別添に従う。

10 遺伝毒性

(1) 目的

反復投与試験において感染性が認められた菌類を成分とする微生物農薬について、発がん性を有するか否かの科学的知見を得る。

(2) 試験方法

している動物は実験終了時に解剖する。

すべての解剖について、解剖時期、所見を記録するとともに器官における感染の有無等を調べる。

(エ) 農薬微生物の体内における生残状況

解剖した動物の腎臓、脳、肝臓、肺、脾臓、胃、血液、小腸、大腸、代表的なリンパ節及び肉眼的病変がみられた各器官中の微生物数を測定する。

(3) 結果の整理

症状観察、剖検、微生物数の測定の結果を基にして次の項目に関して整理する。

①一般症状、②死亡率、③飼料摂取量、④体重変動、⑤病理的变化、⑥器官別感染の有無

(4) 次の試験への進行

ア 供試動物に感染性、病原性及び毒性が認められなかった場合は、これ以上の試験は必要ない。ただし、単回投与試験で認められた感染性の理由は明らかにされねばならない。

イ 供試動物に感染性が認められた場合は、繁殖試験を行う。また、農薬微生物が真菌である場合は、さらに変異原性試験を行う。

ウ 供試動物に病原性が認められた場合は、その後の試験については十分検討し決定する。

エ 供試動物に毒性が認められた場合は、毒性成分を同定し、その成分を用いて、30 消安第 6278 号局長通知に準じた試験を行う。

9 変異原性試験

(1) 目的

反復投与試験において感染性が認められた真菌を成分とする微生物農薬について、発がん性の危険性があるか否かを評価するために、本試験を実施する。

(2) 試験方法

① 被験試料：原体抽出物

② 試験項目

次の3試験を実施する。

ア 復帰突然変異試験

OECD Test No. 471 : Bacterial Reverse Mutation Test

イ 染色体異常試験

OECD Test No. 473 : *In Vitro* Mammalian Chromosomal Aberration Test

OECD Test No. 487 : *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test

OECD Test No. 490 : *In Vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Tests Using the Thymidine Kinase Gene

ウ 小核試験

OECD Test No. 474 : Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test

(3) 次の試験への進行

① 結果が陰性であった場合は、これ以上の試験は必要ない。

② (2) ② (ア) の結果が陽性であった場合には以下のいずれかの試験を実施する。

OECD Test No. 488 : Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays

OECD Test No. 489 : *In Vivo* Mammalian Alkaline Comet Assay

③ (2) ②ウ、(3) ②のいずれかで陽性の結果が出た場合は、原因物質を同定し、その成分を用いて 6278 号局長通知の別添「人に対する影響」に準じて発がん性試験を行う。

ア 被験試料：原体抽出物（脂溶性物質）

イ 試験項目

次の3試験を実施する。

(ア) 微生物を用いる復帰突然変異試験

(イ) 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

(ウ) げっ歯類を用いる小核試験

(3) 結果の整理

各試験の結果を記録するほか、必要に応じ用量－反応曲線を付図する。

(4) 次の試験への進行

本試験で陽性の結果が出た場合、変異原物質を同定し、その成分を用いて 30 消安第 6278 号局長通知の発がん性試験に準じた試験を行う。

11 繁殖毒性

(1) 目的

微生物農薬が哺乳動物の繁殖及び胎児の発達に及ぼす影響や新生児への移行に関す

10 繁殖試験

(1) 目的

微生物農薬が哺乳動物の繁殖及び胎仔の発達に及ぼす影響や新生仔への移行を評価

る科学的知見を得る。

(別紙 1 に記載)

(2) 試験方法

① 被験試料：原体

② 試験動物

ラット又はマウス (SPF、6～8 週齢 雄：20 匹以上、雌：20 匹以上の妊娠動物が得られる匹数、多産系でない系統は使用しない。)

③ 群構成

対照群：溶媒対照群

非投与群（投与に溶媒を使用し、溶媒の影響が不明のとき必要）

投与群：10⁸ 単位／動物（1 mL 以下/100 g 体重：経口投与。なお単回投与試験で経気道投与経路のみで影響が認められた場合には 10⁸ 単位／動物（0.3 mL 以下／100 g 体重）を当該投与経路で投与する。交配 2 週間前、交配期間中及び妊娠期間中高レベルの感染が保持できる頻度で投与する。)

④ 試験期間

投与開始から新生児の屠殺まで

⑤ 検査項目

ア 一般状態観察

するために、次のいずれかに該当する場合に農業微生物を交配前の雌雄の動物に投与するとともに、妊娠成立後は妊娠雌に継続投与し、繁殖及び胎仔に対する影響及び新生仔への移行を調べる。

① 反復投与試験で供試動物に感染性が認められた場合

② 農業微生物が哺乳動物細胞に寄生性を有することが知られている微生物と近縁関係があると考えられる場合

③ 農業微生物が十分に分離、精製されておらず、哺乳動物に寄生性を有する汚染微生物を含んでいる可能性がある場合

④ 農業微生物がウイルスであって、細胞培養試験で哺乳動物細胞に感染性が認められた場合

(2) 試験方法

ア 被験試料：原体

イ 試験動物

ラット又はマウス (SPF、6～8 週令 雄：20 匹以上、雌：20 匹以上の妊娠動物が得られる匹数、多産系でないものは使用しない。)

ウ 群構成

対照群：溶媒対照群

非投与群（投与に溶媒を使用し、溶媒の影響が不明のとき必要）

投与群：10⁸ 単位／動物（1 mL 以下/100g 体重：経口投与。なお単回投与試験で経気道投与経路のみで影響が認められた場合には 10 単位／動物（0.3 mL 以下／100g 体重）を当該投与経路で投与する。交配 2 週間前、交配期間中及び妊娠期間中高レベルの感染が保持できる頻度で投与する。)

エ 試験期間

投与開始から新生仔の屠殺まで

オ 検査項目

(ア) 症状観察

毒性徴候の種類、程度、発現、推移及び可逆性を時間との関連で観察、記録する。観察時間は通常投与開始から新生児の屠殺までとする。

また、妊娠雌については、さらに毎日の摂餌量と妊娠の経過、妊娠期間の延長の有無、分娩直後の新生児については、新生児の体重、同腹胎児数、死産児数、生産児数、新生児の外観の異常等を観察し記録する。

イ 体重測定

投与直前、その後1週間ごと、屠殺時又は死亡時に測定する。

ウ 剖検

雄は、対の雌の妊娠が確認され次第解剖する。

雌は、分娩後できるだけ速やかに解剖する。

新生児は、分娩の翌日に解剖する。

エ 微生物の体内における生残状況

解剖された動物の器官、組織、体液中の微生物数を測定する。

(3) 結果の整理

一般状態観察、剖検、微生物数の測定結果を基にして、次の項目に関して整理する。

①毒性徴候、②妊娠指数と妊娠期間、③妊娠継続中の死亡と生存、④生殖能力への影響と異常出産の有無、⑤親動物及び産児の体重への影響、⑥摂餌量、⑦病理的变化、⑧新生児の形態の異常、⑨器官別感染の有無

なお、妊娠指数は交尾率、妊娠率、出産率とし、次により求める。

交尾率＝交尾した動物数／交配に用いた動物数×100

妊娠率＝妊娠した動物数／交尾した雌動物数×100

出産率＝生存児を出産した雌動物数／妊娠した動物数×100

症状の種類、程度、発現、推移及び可逆性を時間との関連で観察、記録する。観察時間は通常投与開始から新生仔の屠殺までとする。

また、妊娠雌については、さらに毎日の飼料の摂取量と妊娠の経過、妊娠期間の延長の有無、分娩直後の新生仔については、新生仔の体重、同腹胎仔数、死産仔数、生産仔数、新生仔の外観の異常等を観察し記録する。

(イ) 体重測定

投与直前、その後1週間毎、屠殺時又は死亡時に測定する。

(ウ) 剖検

雄は、対の雌の妊娠が確認され次第解剖する。雌は、分娩後できるだけ速やかに解剖する。新生仔は、分娩の翌日に解剖する。

(エ) 農薬微生物の体内における生残状況

解剖された動物の器官、組織、体液中の微生物数を測定する。

(3) 結果の整理

症状観察、剖検、微生物数の測定結果を基にして、次の項目に関して整理する。

①一般症状、②妊娠指数と妊娠期間、③妊娠継続中の死亡と生存、④生殖能力への影響と異常出産の有無、⑤親動物及び産仔の体重への影響、⑥飼料摂取量、⑦病理的变化、⑧新生仔の形態の異常、⑨器官別感染の有無なお、妊娠指数は交尾率、妊娠率、出産率とし、次により求める。

交尾率＝交尾した動物数／交配に用いた動物数×100

妊娠率＝妊娠した動物数／交尾した雌動物数×100

出産率＝生存仔を出産した雌動物数／妊娠した動物数×100

(4) 次の試験への進行

特に必要ない。

12 ウイルス発がん性

(1) 目的

ウイルスを有効成分とする微生物農薬について、発がん性を有するか否かに関する科学的知見を得る。

(別紙1に記載)

(2) 試験方法等

代表的腫瘍ウイルスの発がん性試験を参考に個々に検討する。

13 免疫不全誘起

(1) 目的

ウイルスを有効成分とする微生物農薬について、免疫不全誘起作用を有するか否かに関する科学的知見を得る。

(別紙1に記載)

11 ウイルス発がん性試験

(1) 目的

微生物農薬が発がん性を有するか否かを評価するために、次のいずれかに該当する場合に本試験を実施する。

- ① ウイルスに発がん性の疑いがあるか、あるいは発がん性のウイルスに近縁である場合
- ② 細胞培養試験で哺乳動物細胞に対し感染性が認められた場合
- ③ その他、①、②に該当するウイルスが当該微生物農薬中に混入している可能性が否定出来ない場合

(2) 試験方法等

代表的腫瘍ウイルスの発がん性試験を参考に個々に検討する。

(3) 次の試験への進行

特に必要ない。

12 免疫不全誘起試験

(1) 目的

ウイルスを成分とする微生物農薬について、ウイルスが免疫不全誘起作用を有するか否かを評価するために、ウイルスが次のいずれかに該当する場合に本試験を実施する。

- ① 細胞培養試験で哺乳動物細胞に感染性が認められた場合
- ② ウイルスが哺乳動物の免疫系に感染ないし病変を起し、免疫不全状況を誘起することが知られているウイルスに近縁である場合

なお、哺乳動物に免疫不全状況を誘起することの知られているウイルスには、次のものがある。

ネコ白血病ウイルス、マウスエイズウイルス、ウシ白血病ウイルス等のレトロウイ

(2) 試験方法等

別紙 1 に記載されている免疫不全を起こすウイルスのうち、微生物農薬に用いられているウイルスと近縁と見られるものについて、個々に免疫不全を証明する試験法を策定し、当該農薬について、同じ試験法を並行して行い、同じような免疫不全が起こらないかを観察する。

(削除)

ルス、ヒトのサイトメガロウイルス等のヘルペスウイルス等

(2) 試験方法等

上記の免疫不全を起こすウイルスのうち、微生物農薬に用いられているウイルスと近縁と見られるものについて、個々に免疫不全を証明する試験法を策定し、当該農薬について、同じ試験法を平行して行い、同じような免疫不全の起こらないことを証明する。

(3) 次の試験への進行

特に必要ない。

13 霊長類影響試験

(1) 目的

微生物農薬が霊長類に感染性、病原性を有するか否かを評価するため、次のいずれかに該当する場合に農薬微生物を霊長類に接種して感染性及び病原性を調べる。

- ① 農薬微生物がウイルスであって、細胞培養試験でいずれかの哺乳動物細胞に感染性が認められた場合。
- ② 農薬微生物が哺乳動物細胞に寄生性を有することが知られている微生物である場合。
- ③ 微生物農薬中に哺乳動物細胞に寄生性を有する汚染微生物が含まれている可能性が否定できない場合。
- ④ 農薬微生物がその分類上の位置からヒトへの感染性、病原性を示すことが示唆される場合。

(2) 試験方法等

必要なサル種（カニクイザル、アカゲザル、アフリカミドリザル、その他）、サルの頭数、年令、接種経路（経口、静脈、経気道、中枢神経系、その他）、観察方式、測定法については個々に検討する。

(3) 次の試験への進行

14 製造、使用に際して発生した有害事例調査

(1) 目的

微生物農薬の生産及び試験使用に関わった人における刺激性やアレルギー反応等の有害事例の発生の有無を調べる。

(2) 調査方法

微生物農薬の生産及び試験使用に関わった人における有害事例の発生について、モニタリング調査や検診により調査する。有害事例が発生した場合は、個々の事例に基づきその原因について考察する。

また、人畜で発生した有害事例を文献等によりとりまとめる。

(3) 結果の整理

次の事項を報告する。

- ① 暴露した原体や微生物農薬、その成分
- ② 暴露した日時と場所
- ③ 暴露した頻度
- ④ 暴露した経路
- ⑤ 暴露した環境及び状況
- ⑥ 臨床的所見
- ⑦ その他関係情報

V 農作物等への残留性

1 目的

特に必要ない。

IV 製造、使用に際して発生した過敏性反応等事例の調査方法

1 目的

微生物農薬がヒトに過敏性反応を引き起こすか否かを評価するために、微生物農薬の生産に関わったヒトにおける過敏性反応の発生の有無を調べる。

2 調査方法

微生物農薬の生産及び試験使用に関わったヒトにおける過敏性反応の発生について、モニタリング調査や検診により調査する。

また、ヒト及び家畜で発生した過敏性反応事例を文献等によりとりまとめる。

3 結果の整理

次の事項について整理する。

- ① 暴露した原体や製剤、その成分
- ② 暴露した日時と場所
- ③ 暴露した頻度
- ④ 暴露した経路
- ⑤ 暴露した環境及び状況
- ⑥ 臨床的所見
- ⑦ その他関係情報

4 次の試験への進行

過敏性反応が発生したことが明確なときは、個々の事例に基づき過敏性反応原因について追求する。

V 作物生残性試験の実施方法

1 目的

食用又は飼料用に利用される農作物に使用する微生物農薬について、人に対する影響試験のうち単回投与試験で影響が認められた場合に農作物における微生物の生残性に係る情報を得る。

2 試験方法

OECD Test NO.509 : Crop Field Trial

試料の採取、分析、報告書については 6278 号の作物残留性に準じるほか、以下の事項に留意する。

- ① 被験試料は原則として微生物農薬とする。
- ② 微生物の測定又は分析方法に準じて残留物を測定又は分析（菌数、孢子数、力価等）する。必要に応じて、発芽試験等を行い、生存率を調査する。

食用作物（特用作物、飼料用作物を含む。）に使用する微生物農薬について、ヒトに対する安全性試験の第一段階試験で影響が認められた場合に食用作物の安全性を確認するために、微生物農薬を使用して食用作物における生残性を調べる。

2 試験方法

（１）被験試料

製剤

（２）供試作物

原則として登録申請する作物の中から食用作物全てを選定する。

（３）試料の調製

ア 栽培条件

（ア）試験は、作物の品種、栽培方法、農薬の散布歴、気象条件等が明らかな隔離、管理された複数施設で行うものとする。

（イ）慣行の方法で栽培する。

イ 施用方法

被験試料の施用は、登録を申請する場合の使用方法で均一に施用を行う。

なお、被験試料を使用しない試験区（無処理区）を設け対照とする。

ウ 試料の採取時期

試料は、市場へ出荷する状態のものを採取する。

エ 試料の採取方法

試料は、試験区毎に可食部を均等に必要量を採取し、損傷を受けた試料は採取しない。

オ 試料の保存

試料は、採取後速やかに調査する。輸送等やむを得ない事情があるときは、5℃以下で保存する。

（４）検査項目

VI 生活環境動植物及び蜜蜂・蚕に対する影響

1 淡水魚影響

(1) 目的

淡水魚に対する微生物の影響に関する科学的知見を得る。

(2) 試験方法

① 被験試料：原体

② 供試生物

原則としてコイ (*Cyprinus carpio*) 又はニジマス (*Oncorhynchus mykiss*)
(当歳魚、体重 5 g 前後、1 週間以上馴化したもの)

③ 試験区構成

対照区：無添加区

処理区：単位面積当たりの施用量を水深 15 cm の水層に直接投下した場合の濃度の 1000 倍濃度とする。

なお、上記濃度での試験で影響が認められた場合は、影響を生じる微生物の濃度を明らかにするために、用量－反応試験を実施する。

採取した試料について、農薬微生物の計数を行う。

3 結果の整理

検査結果を整理して記録する。

4 次の試験への進行

特に必要ない。

VI 環境生物に対する影響試験の実施方法

1 淡水魚影響試験

(1) 目的

微生物農薬が淡水魚に及ぼす影響を評価するために、高濃度の農薬微生物に淡水魚を水中暴露させ、供試淡水魚に対する影響を調べる。

なお、微生物の生物学的性質により科学的な根拠がある場合及び微生物農薬の使用方法から淡水魚に暴露の可能性がない場合には当該試験を省略することがある。

(2) 試験方法

ア 被験試料：原体

イ 供試動物

原則としてコイ (*Cyprinus carpio*) 又はニジマス (*Oncorhynchus mykiss*)
(当歳魚、体重 5 g 前後、1 週間以上馴化したもの)

ウ 試験区構成

対照区：無添加区

処理区：単位面積当たりの施用量を水深 15cm の水層に直接投下した場合の濃度の 1000 倍濃度とする。

なお、上記濃度での試験で影響が認められた場合は、影響を生じる農薬微生物の濃度を明らかにするために、濃度－反応試験を実施する。

1 試験区当たり供試魚は 10 尾以上とし、試験は少なくとも 3 反復で実施する。

④ 暴露方法及び飼育条件

所定濃度の試験液に 30 日間半止水式で水中暴露させる。飼育水は脱塩素水道水あるいは滅菌した良質の地下水を使用し、水質は pH6.5～8.0 とする。試験水量は 1 L 以上/g 体重とし、水温は試験に用いる魚種の適温 $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、溶存酸素濃度は飽和濃度の 60%以上とする。飼料は毎日一定量の配合飼料（乾燥重量で魚体重の約 3 %）を与える。

⑤ 試験期間

原則として暴露開始から 30 日間とする。試験期間中に影響が現れた場合は、回復、死亡、瀕死の状態が確認できるまで試験期間を延長する。

⑥ 検査項目

ア 水質検査

水温、溶存酸素濃度、pH、全硬度及び水槽中の微生物濃度を定期的に測定する。

イ 体重測定

試験開始時及び解剖時に測定する。

ウ 症状観察

外観、摂餌状況、遊泳異常、死亡等を毎日観察する。生死の判定は、刺激を与え反応のないものを死亡とみなす。

エ 病理検査

試験中死亡があった場合は速やかに、また、試験終了時に生存している全ての個体について解剖し、死亡日時、病変の有無等の所見を記録するとともに、病変が認められた場合は感染の有無等を調べる。

（3）結果の整理

検査項目に沿って成績を整理する。また、影響が認められた場合は最大無影響濃度

1 試験区当たり供試魚は 10 尾以上とし、試験は 3 反復で実施する。

エ 暴露方法及び飼育条件

所定濃度の試験液に 30 日間半止水式で水中暴露させる。飼育水は脱塩素水道水あるいは滅菌した良質の地下水を使用し、水質は pH6.5～8.0 とする。試験水量は 1 L 以上/g 体重とし、水温は試験に用いる魚種の適温 $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、溶存酸素濃度は飽和濃度の 60%以上とする。飼料は毎日一定量の配合飼料（乾燥重量で魚体重の約 3 %）を与える。

オ 試験期間

原則として暴露開始から 30 日間とする。試験期間中に影響が現れた場合は、回復、死亡、瀕死の状態が確認できるまで試験期間を延長する。

カ 検査項目

（ア）水質検査

水温、溶存酸素濃度、pH、全硬度及び水槽中の微生物濃度を定期的に測定する。

（イ）体重測定

試験開始時及び解剖時に測定する。

（ウ）症状観察

外観、摂餌状況、遊泳異常、死亡等を毎日観察する。生死の判定は、刺激を与え反応のないものを死亡とみなす。

（エ）病理検査

試験中死亡があった場合は速やかに、また、試験終了時に生存している全ての個体について解剖し、死亡日時、所見を記録するとともに農薬微生物の感染の有無等を調べる。

（3）結果の整理

検査項目に沿って成績を整理する。また、影響が認められた場合は最大無作用濃度

を求める。

(4) 次の試験への進行

ア 供試生物に影響が認められなかった場合は、これ以上の試験は必要ない。

イ 供試生物に影響が認められた場合は、暴露を回避するためのリスク管理措置の検討及びその妥当性の考察を行う。または環境中における動態に関する試験を行う。

2 淡水無脊椎動物影響

(1) 目的

淡水無脊椎動物に対する微生物の影響に関する科学的知見を得る。

(2) 試験方法

① 被験試料：原体

② 供試生物

原則としてオオミジンコ (*Daphnia magna*) とするが、感受性等から科学的に説明できる場合には、ミジンコ (*Daphnia pulex*)、セスジミジンコ (*Daphnia carinata*) 等、他の種を用いても良い。いずれも飼育条件が明らかで生後 24 時間以内のものを用いる。

③ 試験区構成

対照区：無添加区

処理区：単位面積当たりの施用量を水深 15 cm の水層に直接投下した場合の濃度の 1000 倍濃度とする。

なお、上記濃度での試験で影響が認められた場合は、影響を生じる微生物の濃度を明らかにするために、用量－反応試験を実施する。

を求める。

(4) 次の試験への進行

ア 供試生物に影響が認められなかった場合は、これ以上の試験は必要ない。

イ 供試生物に影響が認められた場合は、環境中での動態に関する試験を行う。

2 淡水無脊椎動物影響試験

(1) 目的

微生物農薬が淡水無脊椎動物に及ぼす影響を評価するために、高濃度の農薬微生物に淡水無脊椎動物を水中暴露させ、供試淡水無脊椎動物に対する影響を調べる。

なお、微生物の生物学的性質により科学的な根拠がある場合及び微生物農薬の使用方法から淡水無脊椎動物に暴露の可能性がない場合には当該試験を省略することがある。

(2) 試験方法

ア 被験試料：原体

イ 供試動物

ミジンコ (*Daphnia pulex*)、セスジミジンコ (*Daphnia carinata*)、オオミジンコ (*Daphnia magna*) のうちの 1 種 (飼育条件が明らかで生後 24 時間以内のもの)

ウ 試験区構成

対照区：無添加区

処理区：単位面積当たりの施用量を水深 15cm の水層に直接投下した場合の濃度の 1000 倍濃度とする。

なお、上記濃度での試験で影響が認められた場合は、影響を生じる農薬微生物の濃度を明らかにするために、濃度－反応試験を実施する。

1 試験区当たり供試ミジンコは 20 頭（5 頭ずつ 4 連が望ましい）以上とし、試験は少なくとも 3 反復で実施する。

④ 暴露方法及び飼育条件

所定濃度の試験液に 21 日間半止水式で水中暴露させる。飼育水は脱塩素水道水、滅菌した良質の地下水又は調整水（OECD Test No.202 : *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test に示されている培地等）を使用し、水質は pH6.5～8.0 とする。試験水量は 40mL 以上／頭とし、水温は 20℃±2℃、溶存酸素濃度は飽和濃度の 60%以上とする。飼料（藻類）は一定量を与える。

⑤ 試験期間

原則として暴露開始から 21 日間とする。試験期間中に影響が現れた場合は、回復、遊泳阻害の状態が確認できるまで試験期間を延長する。

⑥ 検査項目

ア 水質検査

水温、溶存酸素濃度、pH、全硬度及び水槽中の微生物濃度を定期的に測定する。

イ 症状の観察

外観、遊泳阻害等を毎日観察する。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、遊泳阻害されたとみなす。

ウ 繁殖能力の観察

産出された仔虫、卵を 2 日毎に計数する。それらは計数後除く。

（3）結果の整理

検査項目に沿って成績を整理する。また、影響が認められた場合は最大無影響濃度を求める。

（4）次の試験への進行

VIの 1（4）に準ずる。

1 試験区当たり供試ミジンコは 20 頭以上とし、試験は 3 反復で実施する。

エ 暴露方法及び飼育条件

所定濃度の試験液に 21 日間半止水式で水中暴露させる。飼育水は脱塩素水道水あるいは滅菌した良質の地下水を使用し、水質は pH6.5～8.0 とする。試験水量は 40ml 以上／頭とし、水温は 20℃±2℃、溶存酸素濃度は飽和濃度の 60%以上とする。飼料（藻類）は一定量を与える。

オ 試験期間

原則として暴露開始から 21 日間とする。試験期間中に影響が現れた場合は、回復、死亡、瀕死の状態が確認できるまで試験期間を延長する。

カ 検査項目

（ア）水質検査

水温、溶存酸素濃度、pH、全硬度及び水槽中の微生物濃度を定期的に測定する。

（イ）症状の観察

外観、遊泳異常、死亡等を毎日観察する。生死の判定は、触角の運動が停止しているものを死亡とみなす。

（ウ）繁殖能力の観察

産出された仔虫、卵を 2 日毎に計数する。それらは計数後除く。

（3）結果の整理

VIの 1 の（3）に準ずる。

（4）次の試験への進行

VIの 1 の(4) に準ずる。

3 藻類生長阻害

(1) 目的

水田で使用する場合に藻類に対する微生物の影響に関する科学的知見を得る。

(2) 試験方法

- ① 被験試料：原体
- ② 供試生物：*Raphidocelis subcapitata* (*Pseudokirchneriella subcapitata*) を用いることを必須とする。
- ③ その他は OECD Test No. 201 : Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test に準ずる。
- ④ 影響が認められた場合は最大無影響濃度を求める。

(3) 次の試験への進行

VIの1(4)に準ずる。

4 鳥類影響

(1) 目的

鳥類に対する微生物の影響に関する科学的知見を得る。

(2) 試験方法

- ① 被験試料：原体
- ② 供試生物：コリンウズラ (*Colinus virginianus*)、ウズラ (*Coturnix japonica*)
又はマガモ (*Anas platyrhynchos*) (14~28 日齢、平均体重 $\pm$ 20%以内、1 週間馴化したもの) のほか、OECD Test No. 223 や EPA OCSPP 850.2100 に記載の鳥種
- ③ 試験区構成
対照区：溶媒処理区
無処理区 (投与に溶媒を使用し、溶媒の影響が不明なとき必要)

(植物影響試験の一部を移動)

3 鳥類影響試験

(1) 目的

微生物農薬が鳥類に及ぼす影響を評価するために、高濃度の農薬微生物を鳥類に経口投与し、供試鳥類に対する影響を調べる。

なお、微生物の生物学的性質により科学的な根拠がある場合及び微生物農薬の使用
方法から鳥類に暴露の可能性がない場合には当該試験を省略することがある。

(2) 試験方法

- ア 被験試料：原体
- イ 供試動物
ウズラ又はマガモ (14~28 日令、平均体重 $\pm$ 20%以内、1 週間馴化したもの)
- ウ 試験区構成
対照区：溶媒処理区

処理区：10⁸ 単位／0.2 mL／羽を 5 日間経口投与

なお、上記投与量での試験で病原性、毒性が認められた場合は、病原性、毒性を生じる微生物の用量を明らかにするために、用量－反応試験を実施する。

1 試験区当たり供試鳥類は 10 羽以上とし、試験は少なくとも 3 反復で実施する。

④ 試験期間

原則として投与開始後 30 日間とする。試験期間中に病原性、毒性が現れた場合は、回復、死亡、瀕死の状態が確認できるまで試験期間を延長する。

⑤ 飼育条件

飼料は抗生物質を含まない初生雛用飼料を雛の生長に応じて適当量を与える。飲料水は自由に与え、毎日交換する。温度及び湿度は齢に応じた最適条件とし、照明は 16 時間明、8 時間暗の照明周期とする。

⑥ 検査項目

ア 症状観察

羽毛逆立、翼下垂、元気消失、頭部懸垂、閉眼、流涎、下痢、呼吸困難、衰弱、死亡等を毎日観察する。

イ 体重測定

投与直前、7 日、14 日、21 日、28 日後及び死亡時とし、試験期間を延長した場合は 1 週間毎に測定する。

ウ 病理検査

試験中、死亡があった場合は速やかに解剖し、死亡日時、所見を記録する。生存している個体については、実験終了時に解剖する。すべての解剖について、解剖時期、所見を記録し、病変が認められた場合は感染の有無等を調べる。試験中、いずれの個体にも死亡や臨床兆候のない場合は剖検を不要とする。

(3) 結果の整理

症状観察、病理検査結果を基にして次の項目に関して整理をする。

無処理区（投与に溶媒を使用し、溶媒の影響が不明なとき必要）

処理区：10⁸ 単位／0.2ml／羽を 5 日間経口投与

なお、上記投与量での試験で病原性、毒性が認められた場合は、病原性、毒性を生じる農薬微生物の用量を明らかにするために、用量－反応試験を実施する。

1 試験区当たり供試鳥類は 10 羽以上とし、試験は 3 反復で実施する。

エ 試験期間

原則として投与開始後 30 日間とする。試験期間中に病原性、毒性が現れた場合は、回復、死亡、瀕死の状態が確認できるまで試験期間を延長する。

オ 飼育条件

飼料は抗生物質を含まない初生雛用飼料を雛の生長に応じて適当量を与える。飲料水は自由に与え、毎日交換する。温度及び湿度は齢に応じた最適条件とし、照明は 16 時間明、8 時間暗の照明周期とする。

カ 検査項目

(ア) 症状観察

羽毛逆立、翼下垂、元気消失、頭部懸垂、閉眼、流涎、下痢、呼吸困難、衰弱、死亡等を毎日観察する。

(イ) 体重測定

投与直前、7 日、14 日、21 日、28 日後及び死亡時とし、試験期間を延長した場合は 1 週間毎に測定する。

(ウ) 病理検査

試験中死亡があった場合は速やかに、また、試験終了時に生存している全ての個体について解剖し、死亡日時、所見等を記録すると共に農薬微生物の感染の有無等を調べる。

(3) 結果の整理

①一般症状、②死亡率、③体重変動、④病理的变化、⑤器官別感染率
また、病原性、毒性が認められた場合は最大無影響量を求める。

(4) 次の試験への進行

VIの1(4)に準ずる。

5 植物影響

(1) 目的

微生物が雑草防除用微生物又は植物病原微生物若しくは植物病原微生物に近縁な微生物である場合に、植物に対する微生物の影響に関する科学的知見を得る。

(2) 調査方法

III 5 適用農作物以外の農作物等に対する影響の試験結果をふまえ、被験作物以外の植物に対する影響について考察する。

(3) 次の試験への進行

VIの1(4)に準ずる。

症状観察、病理検査結果を基にして次の項目に関して整理をする。

①一般症状、②死亡率、③体重変動、④ 病理的变化、⑤器官別感染率の有無。

また、病原性、毒性が認められた場合は最大無作用量を求める。

(4) 次の試験への進行

VIの1の(4)に準ずる。

4 植物影響試験

(1) 目的

微生物農薬が標的外植物に及ぼす影響を評価するために、高濃度の農薬微生物に農作物を含む標的外植物を単回暴露させ、供試植物に対する影響を調べる。

なお、微生物の生物学的性質により科学的な根拠がある場合及び微生物農薬の使用方法から植物に暴露の可能性がない場合には当該試験を省略することがある。

(2) 試験方法

ア 被験試料：原体

イ 供試植物

(ア) 原則として経済的に重要な植物の中から4科6種以上の双子葉植物、2科4種以上の単子葉植物を選択する。

(イ) 雑草防除用微生物農薬及び植物病原微生物に近縁の微生物農薬については、上記に加えて、標的植物に密接に関連する植物及び農薬微生物に密接に関連する植物病原微生物に感受性の植物の中から、経済的に重要な植物あるいは生態系の維持に有益な植物2種以上を選択する。

(ウ) 水田で使用する微生物農薬については、藻類を追加しOECDテストガイドライン201（藻類生長阻害試験）に準じて試験を行う。

ウ 試験区構成

対照区：無処理区（処理区で展着剤を添加する場合は展着剤を処理する。）

参考区（雑草防除用微生物農薬については、当該微生物を標的植物に用

いて、植物病原微生物に近縁の微生物農薬については、分類学的に近縁の植物病原微生物を感受性植物に用いて対照区とする。)

処理区：当該微生物農薬を登録申請する場合の最大表示使用濃度の 10 倍濃度とする。

なお、上記濃度での試験で影響が認められた場合は影響を生じる農薬微生物の濃度を明らかにするため用量－反応試験を実施する。試験は 3 反復で実施する。

エ 暴露方法

農薬微生物の種類、作用機作及び供試植物の種類から最も感染しやすい暴露経路及び生育ステージを選択し暴露させる。また、植物への付着をよくするため農薬微生物懸濁液に展着剤を適量添加してもよい。

オ 試験期間

原則として暴露後 3 週間とする。

カ 栽培条件

健全な植物の生育を維持するために施肥、水、光、温度及び湿度の適正な管理に努める。なお、他剤による防除は行わない。

キ 検査項目

(ア) 症状観察

植物の生育状況、病徴等を定期的に観察する。

(イ) 病理検査

試験中枯死及び影響が認められた植物の根、葉及び脈管等について、農薬微生物の感染の有無等を調べる。

(3) 結果の整理

VIの 1 の(3) に準ずる。

(4) 次の試験への進行

VIの 1 の(4) に準ずる。

6 標的外昆虫等影響

(1) 目的

微生物が昆虫病原微生物である場合に、標的外昆虫等に対する微生物の影響に関する科学的知見を得る。

(2) 試験方法

① 被験試料：原体

② 供試生物

下記の7目のなかの少なくとも2つの目に属する3種の昆虫等を選択する。

寄生性双翅目（寄生バエ）

寄生性膜翅目（寄生バチ）

捕食性半翅目（カスミカメムシ等）

捕食性鞘翅目（テントウムシ等）

捕食性脈翅目（クサカゲロウ等）

捕食性ダニ目（カブリダニ）

捕食性クモ目（コモリグモ等）

③ 試験区構成

対照区：無処理区（処理区で展着剤を添加する場合は展着剤を処理する。）

処理区：登録申請する微生物農薬の使用法における最大濃度の10倍濃度とする。なお、上記濃度での試験で影響が認められた場合は影響を生じる微生物の濃度を明らかにするため用量－反応試験を実施する。

試験は少なくとも3反復で実施する。

④ 暴露方法

5 標的外昆虫影響試験

(1) 目的

微生物農薬が標的外昆虫に及ぼす影響を評価するために、高濃度の農薬微生物に寄生性昆虫又は捕食性昆虫を単回暴露させ、供試昆虫に対する影響を調べる。

なお、微生物の生物学的性質により科学的な根拠がある場合及び微生物農薬の使用方法から標的外昆虫に暴露の可能性がない場合には当該試験を省略することがある。

(2) 試験方法

ア 被験試料：原体

イ 供試昆虫

下記の7目のなかの少なくとも2つの目に属する3種の昆虫等を選択する。

寄生性双翅目（寄生バエ）

寄生性膜翅目（寄生バチ）

捕食性半翅目（メクラカメムシ等）

捕食性鞘翅目（テントウムシ等）

捕食性脈翅目（クサカゲロウ等）

捕食性ダニ目（カブリダニ）

捕食性クモ目（コモリグモ等）

ウ 試験区構成

対照区：無処理区（処理区で展着剤を添加する場合は展着剤を処理する。）

処理区：当該微生物農薬を登録申請する場合の最大表示使用濃度の10倍濃度とする。

なお、上記濃度での試験で影響が認められた場合は影響を生じる農薬微生物の濃度を明らかにするため用量－反応試験を実施する。試験は3反復で実施する。

エ 暴露方法

微生物の種類、作用機作及び供試生物の種類から最も感染しやすい暴露経路を選択する。また、供試生物への付着をよくするため微生物懸濁液に展着剤を適量添加してもよい。

⑤ 試験期間

微生物の種類、供試生物の種類等により適宜設定する。

⑥ 検査項目

(ア) 症状観察

供試生物の種類、発病状態、試験方法によって異なるが、蛹化までの日数、蛹化率、産卵率、孵化率（受精率）、生死数等を定期的に観察する。

(イ) 病理検査

試験中死亡及び影響が認められた個体について、微生物の感染の有無等を調べる。

(3) 結果の整理

検査項目に沿って成績を整理する。また、影響が認められた場合は最大無影響濃度を求める。

(4) 次の試験への進行

VIの1(4)に準ずる。

7 蜜蜂影響

(1) 目的

蜜蜂に対する微生物の影響に関する科学的知見を得る。

(2) 試験方法

① 被験試料：原体

農薬微生物の種類、作用機作及び供試昆虫の種類から最も感染しやすい暴露経路を選択する。また、昆虫への付着をよくするため農薬微生物懸濁液に展着剤を適量添加してもよい。

オ 試験期間

農薬微生物の種類、供試昆虫の種類等により適宜設定する。

カ 検査項目

(ア) 症状観察

供試虫の種類、発病状態、試験方法によって異なるが、蛹化までの日数、蛹化率、産卵率、孵化率(受精率)、生死数等を定期的に観察する。

(イ) 病理検査

試験中死亡及び影響が認められた個体について、農薬微生物の感染の有無等を調べる。

(3) 結果の整理

VIの1の(3)に準ずる。

(4) 次の試験への進行

VIの1の(4)に準ずる。

6 蜜蜂影響試験

(1) 目的

微生物農薬が蜜蜂に及ぼす影響を評価するために、高濃度の農薬微生物に蜜蜂を暴露させ、供試蜜蜂に対する影響を調べる。

なお、微生物の生物学的性質により科学的な根拠がある場合及び微生物農薬の使用方法から蜜蜂に暴露の可能性がない場合には当該試験を省略することがある。

(2) 試験方法

ア 被験試料：原体

② 供試生物

セイヨウミツバチ (*Apis mellifera*) : 若齢の働き蜂成虫を供試する。

③ 試験区構成

対照区：無処理区（処理区で展着剤を添加する場合は展着剤を処理する。）

処理区：登録申請する微生物農薬の使用法における最大濃度の 10～100 倍濃度とし、可能な限り高濃度液を供試する。

なお、上記濃度での試験で影響が認められた場合は、影響が生じる微生物の濃度を明らかにするため用量－反応試験を実施する。

1 試験区当たり 25 匹とし、試験は少なくとも 3 反復で実施する。

④ 暴露方法及び飼育条件

（経口暴露試験）

原体を混ぜたシヨ糖液（20～50%、供試液の微生物に対する影響がないことを確認）を給餌器に入れて 48 時間摂取させる。

（接触暴露試験）

微生物が菌類の場合は、接触暴露試験を行う。

噴霧器を使用して蜜蜂が微生物に完全に覆われるまで噴霧する。蜜蜂に付着しにくい供試液については、蜜蜂に影響がない展着剤を添加して行う。

供試液摂取後又は噴霧後（体表面の液が乾いた後）の蜜蜂には、微生物を含まない飼料を給餌する。飼料及び水は適宜交換する。

⑤ 試験期間

原則として暴露後 20 日間とする。

⑥ 検査項目

ア 症状観察

行動、死亡等を暴露 4 時間後に 1 回目の観察を行う。その後は毎日適宜観察する。異常行動の判定は処理区と対照区とを比較して行う。

イ 病理検査

イ 供試蜜蜂

セイヨウミツバチ（羽化後 3～7 日までの同日齢成虫）

ウ 試験区構成

対照区：無処理区

処理区：当該微生物農薬を登録申請する場合の最大表示使用濃度の 10～100 倍濃度とし、可能な限り高濃度液を供試する。

なお、上記濃度での試験で影響が認められた場合は、影響が生じる農薬微生物の濃度を明らかにするため用量－反応試験を実施する。

1 試験区当たり 25 匹とし、試験は 3 反復で実施する。

エ 暴露方法及び飼育条件

農薬微生物が糸状菌の場合は、噴霧器を使用して農薬微生物で密蜂が完全に覆われるまで噴霧する。蜜蜂に付着が悪い供試液については、蜜蜂に影響がない展着剤を添加して行う。

農薬微生物が糸状菌以外の場合は、農薬微生物を混ぜた蔗糖液（20～50%、供試液の微生物に対する影響がないことを確認）を給餌器に入れて 48 時間摂取させる。

噴霧後（体表面の液が乾いた後）あるいは供試液摂取後の蜜蜂には、農薬微生物を含まない飼料を給餌する。飼料及び水は適宜交換する。

オ 試験期間

原則として暴露後 20 日間とする。

カ 検査項目

（ア）症状観察

行動、死亡等を暴露 4 時間後に 1 回目の観察を行う。その後は毎日適宜観察する。異常行動の判定は処理区と対照区とを比較して行う。

（イ）病理検査

試験中死亡個体については、二次感染を回避するためその都度、また、影響が認められた個体については試験終了時に微生物の感染の有無等を調べる。死亡個体の収集にあたっては、蜜蜂の巣箱にできるだけ影響しないように注意して行う。

(3) 結果の整理

検査項目に沿って成績を整理する。また、影響が認められた場合は最大無影響濃度を求める。

(4) 次の試験への進行

VIの1 (4) に準ずる。

8 蚕影響

(1) 目的

蚕に対する微生物の影響に関する科学的知見を得る。

(2) 試験方法

① 被験試料：原体

② 供試生物

実用品種の蚕 (*Bombyx mori*)：脱皮直後の4齢初期の幼虫を供試する。

なお、飼育期間中に3齢から4齢幼虫への脱皮が始まったところで給餌を止めることで、先に脱皮した個体の発育を抑え、大きさの揃った4齢初期の個体群を用意することができる。

③ 試験区構成

対照区：無処理区（処理区で展着剤を添加する場合は展着剤を処理する。）

処理区：登録申請する微生物農薬の使用方法における最大濃度の10倍濃度とす

試験中死亡個体については、二次感染を回避するためその都度、また、影響が認められた個体については試験終了時に農薬微生物の感染の有無等を調べる。死亡個体の収集にあたっては、蜜蜂が騒動を起こさないように注意して行う。

(3) 結果の整理

VIの1 (3) に準ずる。

(4) 次の試験への進行

VIの1 (4) に準ずる。

7 蚕影響試験

(1) 目的

微生物農薬が蚕に及ぼす影響を評価するために、高濃度の農薬微生物に蚕を暴露させ、供試蚕に対する影響を調べる。

なお、微生物の生物学的性質により科学的な根拠がある場合及び微生物農薬の使用方法から桑に暴露の可能性がない場合には当該試験を省略することがある。

(2) 試験方法

ア 被験試料：原体

イ 供試蚕

4齢起蚕

ウ 試験区構成

対照区：無処理区（処理区で展着剤を添加する場合は展着剤を処理する。）

処理区：当該微生物農薬を登録申請する場合の最大表示施用濃度の10倍濃度とす

る。

なお、上記濃度での試験で影響が認められた場合は、影響を生じる微生物の濃度を明らかにするため用量－反応試験を実施する。

1 試験区当たりの供試蚕は 50 頭とし、試験は少なくとも 2 反復で実施する。

④ 暴露方法及び飼育条件

対照区：微生物に汚染されていない桑の葉又は人工飼料（抗菌物質を含まないもの）を毎日給餌する。

処理区：微生物が菌類の場合は、その懸濁液に蚕を浸漬し、処理後は微生物に汚染されていない桑の葉を毎日給餌する。また、蚕への付着をよくするためにその懸濁液に展着剤を適量添加してもよい。

微生物が菌類以外の場合は、桑の葉をその懸濁液に浸漬し、乾燥させたもの又はその懸濁液を人工飼料に混合したもの（0.05～0.1 mL/g）を 24 時間給餌し、その後は無処理の葉又は人工飼料を毎日給餌する。人工飼料は蚕が好んで摂取し、生育に十分なものを選択する。

⑤ 試験期間

原則として暴露後 20 日間とする。

⑥ 検査項目

（ア）症状観察

日別死亡蚕数を調べ、必要に応じて 4、5 齢経過日数、結繭蚕数、化蛹歩合、繭重、繭層重、中毒症状等を観察する。

（イ）病理検査

試験中死亡及び影響が認められた個体について、微生物の感染の有無等を調べる。

（3）結果の整理

検査項目に沿って成績を整理する。また、影響が認められた場合は最大無影響濃度を求める。

る。

なお、上記濃度での試験で影響が認められた場合は、影響を生じる農薬微生物の濃度を明らかにするため用量－反応試験を実施する。

1 試験区当たりの供試蚕は 50 頭とし、試験は 2 反復で実施する。

エ 暴露方法及び飼育条件

対照区：農薬微生物に汚染されていない桑の葉又は人工飼料（抗菌物質を含まないもの）を毎日給餌する。

処理区：農薬微生物が糸状菌の場合は、その懸濁液に蚕を浸漬し、処理後は農薬微生物に汚染されていない桑の葉を毎日給餌する。また、蚕への付着をよくするためにその懸濁液に展着剤を適量添加してもよい。

農薬微生物が糸状菌以外の場合は、桑の葉を懸濁液に浸漬し、乾燥させたもの又はその懸濁液を人工飼料に混合したもの（0.05～0.1 mL/g）を 24 時間給餌し、その後は無処理葉、飼料を毎日給餌する。人工飼料は蚕が好んで摂取し、生育に十分なものを選択する。

オ 試験期間

原則として暴露後 20 日間とする。

カ 検査項目

（ア）症状観察

日別死亡蚕数を調べ、必要に応じて 4、5 齢経過日数、結繭蚕数、化蛹歩合、繭重、繭層重、中毒症状等を観察する。

（イ）病理検査

試験中死亡及び影響が認められた個体について、農薬微生物の感染の有無等を調べる。

（3）結果の整理

VI の 1 の（3）に準ずる。

(4) 次の試験への進行

VIの1 (4) に準ずる。

9 土壤微生物影響

(1) 目的

土壤微生物（細菌、菌類）に対する微生物の影響に関する科学的知見を得る。
なお、必要に応じ土壤微生物の炭素代謝、窒素代謝に関する微生物の影響を調べる。

(2) 調査方法

① 公表文献による考察

公表文献により微生物の土壤微生物に対する影響について考察する。

② 微生物の土壤環境中における動態の考察

微生物の生物学的性質により土壤環境中での微生物の動態について考察する。

(3) 次の試験への進行

VIの1 (4) に準ずる。

(4) 次の試験への進行

VIの1 の(4) に準ずる。

8 土壤微生物影響試験

(1) 目的

微生物農薬が土壤微生物（細菌、放線菌、真菌）に及ぼす影響を評価するために、高濃度の農薬微生物を土壤に混和し、土壤微生物に対する影響を調べる。

微生物の生物学的性質により科学的な根拠がある場合及び微生物農薬の使用方法から土壤微生物に暴露の可能性がない場合には当該試験を省略することがある。

なお、必要に応じ土壤微生物の炭素代謝、窒素代謝に関する農薬微生物の影響を調べる。

(2) 試験方法

ア 被験試料：原体

イ 試験土壤

水田で用いるものについては水田状態の土壤を、畑地等で用いるものについては畑地土壤を用いる。また、試験に当っては1m×1m 程度の大きさの隔離、管理された施設を用いる。

ウ 試験区構成

対照区：無添加区

処理区：単位面積当たりの施用量の10 倍量を土壤に混和する。混和深は20cm とする。

なお、上記施用量での実験で影響が認められた場合は、影響を生じる農薬微生物の用量を明らかにするため用量－反応試験を実施する。試験は3 反復で実施する。

エ 試験期間

原則として3 カ月間とする。

10 環境中における動態試験

1 目的

生活環境動植物等に対する影響試験において、いずれかの生物種に影響が認められた又は影響があると判断された場合に、当該生物種に対する暴露の可能性等を評価するため、微生物の環境中での生残性、増殖性、動態を調べる。

2 試験方法等

微生物の生物学的性質、微生物農薬の使用法、生活環境動植物及び蜜蜂・蚕に対する影響試験で影響が認められた生物種の種類及びその生物学的性質等を十分勘案して、対象生物に対する暴露の可能性が評価できる適切な試験方法を個別に検討する。

3 次の試験への進行

(1) 当該生物種に対する暴露の可能性が認められなかった場合は、これ以上の試験は必

オ 土壌の採取

1 試験区4箇所以上から土壌を採土管(径4cm×深4cm程度)等を用いて採取し、よく混合する。採取時期は、原則として1日、10日、30日、90日後とする。

カ 検査項目

採取した土壌中の細菌、放線菌、真菌について、それぞれの菌数を測定する。なお、菌数の測定には、菌の種類に応じて選択性、感度及び信頼性の高い方法を用いる。

(3) 結果の整理

検査項目に沿って成績を整理する。また影響が認められた場合は最大無作用量を求める。

(4) 次の試験への進行

VIの1の(4)に準ずる。

VII 環境中での動態に関する試験成績

1 目的

環境生物に対する影響試験において、いずれかの生物種に影響が認められた場合に、当該生物種に対する暴露の可能性等を評価するため、農薬微生物の環境中での生残性、増殖性等の動態を調べる。

2 試験方法等

農薬微生物の生物学的性質、微生物農薬の使用法、環境生物に対する影響試験で影響が認められた生物種の種類、生物学的性質等を十分勘案して、当該生物種に対する当該農薬微生物の環境中での暴露の可能性が評価できる適切な試験方法を個々に検討する。

3 次の試験への進行

(1) 当該生物種に対する暴露の可能性が認められなかった場合は、これ以上の試験は必

要ない。

- (2) 当該生物種に対する暴露の可能性が認められた場合は、暴露を回避するためのリスク管理措置の提案及びその妥当性の考察を行う。

VII 農薬の見本検査に関する資料

1 目的

規則第2条第2項の規定に基づき提出する農薬登録申請見本検査書の詳細を示すこと。

2 基本事項

- ① 広く一般の測定者が実施可能で簡便な方法で実施すること。
- ② 測定又は分析方法は、微生物農薬中のその他の成分等の影響を受けることなく、有効成分を特異的に定量できる方法であること。
- ③ 登録申請した製造方法により製造した微生物農薬5点以上を用いて測定すること。

3 報告事項

以下の事項を報告する。

- ① 試料の情報（ロット番号等）
- ② 測定又は分析方法（使用する機器、試薬等）、手順、含有濃度の算出方法
- ③ 測定又は分析結果（各試料の結果及びその平均値、標準偏差、相対標準偏差等（必要に応じて、孢子発芽率、半数致死量（LD₅₀）等）
- ④ 関係資料（試験結果の写真等）

4 提出する容器に添付するラベルへの記載事項

- (1) 農薬の種類
- (2) 農薬の名称
- (3) 申請者の氏名
- (4) 製造年月日
- (5) 製造場所（工場名）

要ない。

- (2) 当該生物種に対する暴露の可能性が認められた場合は、その後の試験について十分に検討し決定する。

(これまで申請書の添付資料として提出されていたもの)

(6) ロット番号

(7) 有効成分の含有濃度（表示値及び分析値）

(8) 有効期限（保存温度等の保管条件）

（別紙２別添）二次代謝物等の人に対する影響評価について

（新設）

1 目的

微生物は様々な二次代謝物等を産生するが、人の健康に被害を生ずる可能性のある二次代謝物等である場合に、当該二次代謝物等の人に対する影響を評価し、微生物農薬の評価の一部とすること。この内容は、微生物農薬における微生物が産生する二次代謝物等の国際的な評価法の確立の進展に伴い見直される必要がある。

2 調査事項

(1) 基本的な情報

別紙２のⅠ２（３）の項目について、公表文献より、株名と二次代謝物又は毒素をキーワードに情報を収集する。当該株が産生する二次代謝物等について十分な情報がない場合は、同種の近縁株、同種の微生物における情報もない場合又は所属する種が不明の場合は、同属内を限度とし、徐々に類縁関係の遠い種について情報収集する。

(2) 追加の調査内容

(1) の情報を踏まえ、以下について調査し報告する。

① 人に対する安全性試験において毒性が観察されなかった場合

ア 報告事項

(i) 原体中の含有濃度の測定及び暴露量の推定を行うべき二次代謝物等への該当の有無

以下の A 又は B に該当する場合は、(ii) ～ (v) を報告する。

A 当該株が OECD Working Document of the Risk Assessment of Secondary Metabolites of Microbial Biocontrol Agents (OECD No. 98, 2018) の 8.2.1 の

一覧に掲載されている二次代謝物等を産生するという情報がある場合

B 近縁株が OECD No. 98, 2018 の 8.2.1 の一覧に掲載されている二次代謝物等を産生するという情報があり、当該株が当該二次代謝物等を産生しないことを関連する遺伝子の発現状況等により示せない場合

(ii) 当該二次代謝物等の原体中の含有濃度

機器分析が困難な場合は、他の適切な方法を用いてもよい

(iii) 農薬使用者に対する推定暴露量

当該二次代謝物等の原体中の含有濃度を用いて、6278 号局長通知の別紙 1「農薬使用者への影響評価ガイダンス」に準じて農薬使用者の 1 日当たりの農薬暴露量を推定する。

(iv) 農作物への推定最大残留量

微生物の生物学的性質、二次代謝物等の性質及び産生条件等から、農作物の栽培期間中の二次代謝物等の産生が無視できると考えられる場合は、原体中の二次代謝物等がすべて農作物に残留すると仮定した最大残留量を算出する。

(v) 毒性参照値の比較による考察

(iii) 及び (iv) を毒性参照値と比較することにより、農薬使用者及び消費者に対する二次代謝物の影響を考察する。

イ 次の試験への移行

(i) 農作物への二次代謝物等の残留量のより精緻な推定が必要な場合又は農作物の栽培期間中における二次代謝物等の産生が見込まれる場合は、6278 号局長通知の別添「植物の体内での代謝及び農作物等への残留」の「作物残留」に準じ、作物残留試験を実施する。作物残留試験は、微生物の生物学的性質、二次代謝物等の性質及び産生条件を考慮して、試験の設計及び採取後の試料の取扱いを検討する。

(ii) ア (v) 毒性参照値の比較による考察により農薬使用者及び消費者に対する影響を考察できない場合は、二次代謝物等を被験物質として、6278 号局長通知の

別添「人に対する影響」に準じて試験を実施する。

② 人に対する安全性試験において毒性が観察された場合

OECD No. 98, 2018 の 9 を参考に、毒性の原因となる物質を同定し、当該物質を被験物質として、6278 号局長通知の別添「人に対する影響」に準じて試験を実施する。

図 3

別紙 3 用語の定義

感染性	微生物が供試動植物又は供試培養細胞に侵入後、増殖した場合に感染性が認められるという。
菌類	菌界を構成する真核生物をいう。
混在物	微生物農薬の製造方法に由来する物質であって、微生物の培養又は精製に用いた培地残渣を含む。
生残性	微生物が供試動植物に感染はしないが、当該供試動植物体で、一定時間後も死滅することなく生存する場合又は土壌中等で一定時間後も死滅することなく生存する場合に生残性が認められるという。
代謝物	一次代謝物（微生物の成長、発達、生殖に関わり、通常の生理学的プロセス維持の主要な要素であるもの（例：エタノール、乳酸、アミノ酸）。（出典：OECD No. 98, 2018））及び二次代謝物の総称
添加物	保存安定性、取扱い等を向上させるために意図的に加える成分。
毒性	微生物が供試動植物又は供試培養細胞に感染はしないが、当該微生物の産生する二次代謝物等又は当該微生物の増殖に用いた基材が当該供試動植物若しくは当該供試培養細胞に対し有害（生命維持に障害を与える）な反応を起こさせた場合に毒性が認められるという。
毒素	微生物体内で産生されるあらゆる物質であって、生物に対して毒性を示す物質。（出典：SANCO/2020/12258, 2020）

内毒素	グラム陰性細菌が産生する毒素。細胞壁中のリポ多糖が毒性を有する。 (出典 : OECD No. 98, 2018)
二次代謝物	微生物、特に放線菌や菌類 (fungi) が、その一次代謝過程に必須ではないが、(中略) 一次代謝物から特殊な経路 (例えば、アセチル CoA やアミノ酸に由来するポリケチドやメバロン酸経路) で生合成し、(中略) 他の微生物や生物との競争、共生、物質輸送など、当該微生物の生存機能に関連すると考えられるいくつかの生物活性を示すもの。(出典 : OECD No. 98, 2018)
微生物	微生物農薬の有効成分。ウイルス、細菌、菌類、原生生物及び線虫 (共生細菌のようなものを活性成分にもつものに限る。) を生きた状態で防除のために利用するものであって、孢子、分生子、芽胞、包埋体等の形態で利用されるものを含む。
微生物農薬	微生物を生きた状態で農薬として製造・販売される形態のもの (製剤)。
病原性	微生物が供試動植物に感染した結果、当該供試動植物に対して細胞組織レベル又は個体レベルで病気を起こさせた場合に病原性が認められるという。
元種	微生物農薬を製造するために増殖する元となる株