

殺虫剤効力試験法解説

目次

- 1. 効力試験法概説
 - 1. 1 製造販売承認申請に必要な試験
 - 1. 1. 1 原体
 - 1. 1. 2 製剤
 - 1. 1. 3 基礎試験
 - (1) 試験の目的
 - (2) 供試虫の条件
 - (3) 温湿度条件
 - (4) 評価
 - 1. 1. 4 実地試験
 - (1) 試験の目的
 - (2) 試験の特徴と問題点
 - (3) 注意事項
 - 1. 2 供試虫の種類と試験の特徴
 - 1. 2. 1 蚊類
 - (1) 成虫
 - (2) 幼虫
 - 1. 2. 2 ハエ類
 - (1) 成虫
 - (2) 幼虫
 - 1. 2. 3 ゴキブリ類
 - 1. 2. 4 ノミ類
 - (1) 成虫
 - (2) 幼虫
 - 1. 2. 5 シラミ類
 - 1. 2. 6 トコジラミ
 - 1. 2. 7 イエダニ
 - 1. 2. 8 屋内塵性ダニ類
 - 1. 3 剤型の種類と試験法の特徴
 - 1. 3. 1 原体
 - 1. 3. 2 製剤
 - (1) 油剤
 - (2) 乳剤
 - (3) 水和剤
 - (4) ME剤 (micro emulsion)、可溶化型乳剤、水性乳剤
 - (5) 蚊取り剤
 - (6) エアゾール剤
 - (7) 粉剤
 - (8) 懸濁剤 (フロアブル製剤、ゾル剤)
 - (9) マイクロカプセル剤 (MC剤)
 - (10) 粒剤
 - (11) 錠剤
 - (12) 燻煙剤 (全量噴射型エアゾールを含む)
 - (13) 蒸散剤
 - (14) 毒餌剤
 - (15) 忌避剤
- 2. 効力試験法詳説
 - 2. 1 基礎試験法
 - 2. 1. 1 微量滴下試験法
 - 2. 1. 2 残渣接触試験法
 - (1) 限定時間接触試験法 (短時間接触試験法)
 - (2) 継続接触試験法
 - (3) 残効性試験法
 - (4) ドライフィルム試験法
 - (5) クリップ試験法
 - 2. 1. 3 噴霧試験法
 - (1) 噴霧降下試験法
 - (2) 直接噴霧試験法
 - (3) 箱型試験法
 - (4) ピート・グラディー試験法
 - 2. 1. 4 燻煙試験法
 - (1) 通気試験法
 - (2) 定量燻煙試験法
 - 2. 1. 5 培地混入試験法 (1)
 - 2. 1. 6 培地混入試験法 (2)
 - 2. 1. 7 薬液浸漬試験法
 - 2. 1. 8 薬液継続接触試験法
 - 2. 1. 9 散粉降下試験法
 - 2. 1. 10 食毒試験法

- (1) ゴキブリに対する試験
- (2) イエバエに対する試験
- 2. 1. 11 経口投与試験法
- 2. 1. 12 忌避試験法
 - (1) 吸血害虫に対する試験法
 - (2) ゴキブリに対する試験法
- 2. 2 実地試験法
 - 2. 2. 1 成虫に対する試験法
 - 2. 2. 1. 1 空間処理試験法
 - 2. 2. 1. 1. 1 閉鎖空間での試験法
 - (1) ハエ類を対象にする試験法
 - (2) 蚊類を対象にする試験法
 - (3) ゴキブリ類を対象にする試験法
 - 2. 2. 1. 1. 2 開放空間での試験法
 - (1) ハエ類を対象にする試験法
 - (2) 蚊類を対象にする試験法
 - 2. 2. 1. 2 残留処理試験法
 - (1) ハエ類を対象にする試験法
 - (2) 蚊類を対象にする試験法
 - (3) ゴキブリ類を対象にする試験法
 - (4) 屋内塵性ダニ類を対象にする試験法
 - 2. 2. 1. 3 蒸散剤試験法
 - (1) ハエ類を対象にする試験法
 - (2) 蚊を対象にする試験法
 - (3) ゴキブリ類を対象にする試験法
 - 2. 2. 1. 4 蚊取り剤試験法
 - (1) 屋内試験法
 - (2) 屋外試験法
 - 2. 2. 1. 5 毒餌剤試験法
 - (1) ゴキブリ類を対象にする試験法
 - (2) ハエ類を対象にする試験法
 - 2. 2. 1. 6 忌避剤試験法
 - 2. 2. 2 幼虫に対する試験法
 - 2. 2. 2. 1 ハエ類を対象にする試験法
 - (1) 畜鶏舎での試験法
 - (2) 畜鶏糞を用いる試験法
 - 2. 2. 2. 2 蚊類を対象にする試験法
 - 2. 2. 2. 3 プユ幼虫を対象にする試験法
 - 2. 2. 3 その他の種に対する試験法
- 2. 2. 3. 1 ノミ、トコジラミ、イエダニを対象にする試験法
- 2. 2. 3. 2 シラミを対象にする試験法
- 3. 殺虫剤抵抗性
 - 3. 1 殺虫剤抵抗性が生じるしくみ
 - (1) 抵抗性遺伝子と殺虫剤選抜
 - (2) 殺虫剤抵抗性と耐性
 - (3) 殺虫剤の作用機作と抵抗性
 - (4) 交差抵抗性
 - (5) 選択毒性
 - (6) 昆虫成長制御剤の選択毒性
 - 3. 2 殺虫剤抵抗性の事例
 - (1) コガタアカイエカ
 - (2) アカイエカ種群
 - (3) イエバエ
 - (4) チャバネゴキブリ
 - (5) アタマジラミ
 - 3. 3 殺虫剤抵抗性の検出と系統の確立
 - (1) プロビット解析における注意点
 - (2) 室内選抜系統
 - (3) 感受性系統
 - 3. 4 殺虫剤抵抗性の対策

1. 試験法概説

殺虫剤の効力を評価するために行う生物試験は、規格化された標準的な方法によって実施することが必要であるが、殺虫剤は種類が多く、どのような害虫に、どのような場面で、どのように使用されるかが様々であるため、その試験方法も多種多様である。したがって、殺虫剤の全てについて画一的に試験法の標準化をはかることは困難である。ここでは殺虫剤（忌避剤も含める。）の有効性についての相対評価を得ることを主目的に、一般によく行われる標準的な試験法について概説する。

効力試験は基礎試験（室内試験）と実地試験（野外試験）の二つに大別される。

基礎試験は、基本的には有効成分自体の殺虫（または忌避）効力そのものの評価、および、実用製剤の処方並びに用法用量の設定根拠や有効性を基礎的に評価することを目的とし、実地試験は、実用製剤に関して基礎試験で得られた結果に基づいて、実際の環境に適用した場合の実用効果とその変動をとらえ、設定した用法用量で十分な効果が得られるかどうかといった、適切な実地適用基準を明らかにすることが目的であるから、試験設計および評価もそれに見合ったものであることが必要となる。

また、供試虫によっては実地試験を行うことが難しいもの、実地試験を行っても必ずしも適切な評価が行えないもの、あるいは、実地試験を行うにあたって、基礎試験と実地試験の中間的な試験が必要なものがでてくる場合がある。このような場合には、両者の中間ともいべき内容の準実地試験によって評価を行う。

なお、本解説に示された供試虫数、容器サイズ、処理量、観察時間等は、標準的なものやこれまでよく採用されてきた値を示したものであるので、試験の内容等に応じて変更することも差し支えない。

1. 1 製造販売承認申請に必要な試験

一般用医薬品・医薬部外品の殺虫剤は、ハエ成虫・幼虫、蚊成虫・幼虫、ゴキブリ、ノミ、シラミ、トコジラミ、イエダニ、屋内塵性ダニ類を対象とする。製造販売承認申請にあたってどのような殺虫試験を行うかは、申請する薬剤の種類や対象害虫、適用方法などによるが、薬剤によっては、必ずしもここで示すような標準化された方法では実施や評価ができない場合、あるいは、できにくい場合がある。しかし、使用方法や対象にしたい害虫の種類に見合った試験を行わなければ、申請する薬剤に対して適切な評価が行えない。そこで、参考として、下表に原体と製剤に関して適用した方がよいと思われる試験区分の目安を示した。

1. 1. 1 原体

ここでいう原体とは新殺虫成分を指す。

新規に開発された殺虫成分は、基礎効力を明らかにしなければならないので、以下のような試験で効力を検証する。

微量滴下試験や残渣接触試験は、その薬剤の基礎的な効力や対象虫の範囲等を判断する上で最も必要とされる試験であり、これまで多くの原体について、これらの方法で評価が行われていて、既存の成分との比較も行いやすい。培地混入試験や薬液浸漬（接触）試験は、ハエ、蚊幼虫や屋内塵性ダニ類を対象にした薬剤の評価に適している。さらに、毒餌を目的にした場合には、経口摂食での効果を知る必要がある。忌避剤の場合は接触効果を見ることが出来る試験法などによる評価が望ましい。

1. 1. 2 製剤

新殺虫成分、既存の殺虫成分に関わらず、それらを用いた新たな製剤について製造販売承認を得るためには、基礎効力に加えて、実用的な効力を判断するための試験が必要である。製剤にはその剤型を製造するために必須な副資材以外に、効力面を増強する目的で2種以上の原体の配合や、共力剤などを添加する場合がある。このような製剤は複数の成分を含んだものであるから、それらを配合した理由や利点なども明らかにする必要がある。

基礎試験では、残渣接触試験、培地混入試験、葉液浸漬（接触）試験、噴霧試験、燻煙・煙霧試験、食毒試験、忌避・誘引試験などの試験法の中から、製剤の使用目的にそって必要な試験を実施する。新たな用途や特殊用途（用法、用量）についても、それらに見合った試験を追加設定することが必要である。この場合、設定理由などを明らかにしておく。

次に、基礎試験で得られた結果をもとに、使用場面を想定した実地試験を実施する。

表 薬剤の形態と効力試験内容

試験法の種類	原体	製剤
基礎効力試験		
a. 微量滴下試験	○	△
b. 残渣接触試験	○	○
c. 培地混入試験	○	○
d. 葉液浸漬（接触）試験	○	○
e. 噴霧試験	△	○
f. 燻煙・煙霧試験	×	○
g. 食毒試験（経口投与試験）	△	○
h. 忌避・誘引試験	○	○
実地効力試験	×	○

注1 ○：よく実施される △：場合によって実施される

×：全くかほとんど実施されない

注2 必要性は成分や剤型によって異なる

1. 1. 3 基礎試験

(1) 基礎試験の目的

基礎試験は、殺虫剤の対象害虫に対する基礎的な効力を明らかにすることが目的であり、温湿度条件のほか、実地とは異なって変動要因が少ない条件で行えるので、基本的な情報が得られる。ここで得られる情報は、その後に行う実地試験などの薬量設定や処理法に対する目安にも重要な指針を与える。

原体を用いた基礎試験では、殺虫成分のみの効力を知ることができることから、同種昆虫に対する他の既存殺虫成分の効力との比較、また、一つの殺虫成分のさまざまな昆虫種に対する作用性の比較が行える。したがって、原体を用いた基礎試験は、殺虫成分が新規に開発された際に、まず実施されるべき試験である。

原体の試験では、試験条件の単純化と高い再現性が必要である。そのためには、殺虫剤の施用方法についてのみならず、供試する虫の標準系統が殺虫剤感受性に関して遺伝的に均一で、継代によって感受性レベルが変動しないことも要件となる。この試験において新規の殺虫原体が既承認の原体に比べて、効力、作用スペクトラム（適用発育ステージまたは昆虫種）などの

面で同等以上の利点を有するかを明らかにする。また、選択毒性や交差抵抗性発達の有無を判断する上で、できる限り作用点が明らかにされていることが必要である。

一方、製剤を用いた試験は、基本的な効力を明らかにするだけでなく、その後に実施する実地試験のために設定する用法、用量の情報を得るという大きな目的がある。

(2) 供試虫の条件

供試虫は効力評価の物差しとなるものであるから、基礎試験では、種類、系統、飼育条件、日齢（羽化後の日数、幼虫の齢期など）、性別など、すべて標準化されたものを使用することを原則とする。なお、飼育法に関しては「衛生動物検査指針」などを参照されたい。

試験には、目的に応じて感受性ないし抵抗性の程度が明らかな標準的な系統を用いるか、できるだけ素性のはっきりした累代飼育集団を用いる。場合によっては、野外から採集した集団や、それらの次世代を用いる場合もあるが、その場合は感受性の程度についてあらかじめ明らかにしておくことが望ましい。

1) 供試虫の種類

供試虫は通常、以下の種について試験を行う。

蚊：アカイエカを用いるのが一般的であるが、代わりにチカイエカを用いることは差し支えない。ヒトスジシマカやコガタアカイエカ、ハマダラカなど他の種が対象となるような条件で使用する製剤を申請する場合には、できるだけ該当種も用いる。

ハエ：原則としてイエバエを用いるが、適用場所でニクバエ、クロバエなどが対象となる場合には、できるだけ該当種も用いる。

ゴキブリ：小型のチャバネゴキブリおよび大型のクロゴキブリやワモンゴキブリなどで行うことが望ましい。

ダニ：種類によって効力差が著しく異なるので、イエダニの効力を標榜する場合にはイエダニを、また、屋内塵性ダニ類を標榜する場合にはケナガコナダニとヒョウヒダニ類を、加えて、ツメダニが対象となる場合にはツメダニ類をそれぞれ用いる（薬審二第84号通知：昭和63年2月18日）。

その他：その他の種（ノミ、シラミ、トコジラミ）に関しては、飼育法が確立していないものもあり、十分な試験が行えない場合がある。そのような場合には、少数の供試虫を持ちいた基礎試験を実施し、ゴキブリを代替種として標榜する種との効力差がわかるように、標榜種について実施した試験結果をつける。

2) 日齢、性別等

日齢、性別に関しては、低感受性の時期と性を使用するのが一般的である。

ハエ、蚊の成虫に関しては、羽化後2～5日の間の雌が最も低い感受性を示す。チャバネゴキブリの成虫の場合には、羽化後10～15日の雌が最も感受性が低い。このように、一般に成虫を用いる試験では、感受性が低い雌のみを使用するが、場合によっては雌雄同数を供試する場合もある。微量滴下法では、いずれの供試虫の場合も原則として雌のみを供試する。

幼虫に対する薬液接触試験では、蚊の場合は3齢後期から4齢初期、ハエの場合は、通常、終齢期に入った時点のものを供試する。培地混入法においてはイエバエでは2～5日齢幼虫を用いるが、IGR（昆虫成長制御剤）の試験では効力が評価できる発育段階を選択する。イエダ

ニでは成虫を、また、ケナガコナダニやヒョウヒダニを用いる試験では、培地からの這い出し個体や培地ごと採取したものを用いる。飼育法が確立されていないものにあつては、野外から採集した集団を用いて良いが、できるだけ齢（または大きさ）を揃え、雌雄や齢（大きさ）などを記録しておく。

3) 供試虫の感受性

基礎的な資料を得るためには感受性標準系統を用いればよいが、現実には野外では感受性が低下した集団が多くなっていることから、実用性の評価のために抵抗性の飼育集団や野外集団を用いた試験も行う。

4) 供試虫の取り扱い

ハエ、蚊の成虫を取り扱う場合、通常、エチルエーテル、二酸化炭素あるいは低温で麻酔を行うが、過度の麻酔は悪影響を及ぼすので十分注意する必要がある。微量滴下法を除き、試験は供試虫が完全に麻酔から醒めるのを待って実施する。屋内塵性ダニ類やイエダニは麻酔せずにすばやく取り扱う。

薬剤処理が終了した供試虫については、多くの場合、乾燥しないように湿度を保ち、また、餌を与える必要がある。とくに水は欠かすことができないので、ハエ・蚊成虫に対しては、一般には2~5%程度の砂糖水を脱脂綿に含ませて、観察する容器に入れておくことが必要である。ゴキブリに対しては、脱脂綿に含ませた水とともに、市販のマウス・ラット用の固型飼料を与えるのがよい。このように供試虫の種類によって水や餌の与え方が異なる。観察が少なくとも6時間以上にわたる試験の場合にも、供試虫に砂糖水（および必要に応じ固型餌）を与えることが必要である。

5) 供試虫数

供試虫数は試験法にもよるが1薬量、1回につき、少なくともハエ、蚊では15匹以上、ゴキブリでは10匹以上とすることが望ましい。屋内塵性ダニ類の場合でも正確な個体数を用いることが望ましいが、数を数えて揃えることにはかなり困難を伴うので、数十匹などある程度の見当で数を揃えて供試し、終了後に数を確認することでもよい。

繰り返しは3回以上を原則とするが、きわめて速効性の薬剤にあつては、効果判定を容易にするため、1回の供試虫数を減らして繰り返しの回数を増やしてもよい。

また、IGRや培地混入試験では、薬剤処理後、長期にわたって飼育が必要になるので、無処理区でも途中の死亡などによって数が次第に減少することがある。したがって、あらかじめ途中の減少数を予測して1群の供試虫数を多めにし、その管理には十分な注意を払う。

(3) 温湿度条件

試験期間中の温湿度条件はできるだけ標準化することが望ましい。一般に試験温度は25℃前後とし、試験期間中の温度を記録する。試験環境の湿度は、一般には60%RH前後とするが、屋内塵性ダニ類では60~80%の高い湿度環境を維持し、同様に試験期間中の湿度を記録する。

(4) 評価

1) 致死の判定

殺虫試験の致死効果を判定するとき、処理後の経過時間によっては正常虫^{*}、ノックダウン

虫*(または、苦悶虫)、死虫*(瀕死虫を含む)が観察される場合がある。ノックダウン虫は時間の経過にしたがって蘇生するものやあるいは逆に死亡するものが見られる。このような現象は、有効成分の作用性、処理薬量、使用方法や製剤特性などに起因する。これまでの殺虫剤は一般に飛翔性害虫では処理後 24 時間、匍匐性害虫に対しては 72 時間に生死判定の観察時間としてきたが、有効成分や製剤型も多様になってきているため、このような生死判定を処理後時間限定で一律的に実施することは作用性や殺虫特性を見極めるには不十分である場合がある。従って、生死の判定は、上記の観察時間を目安にするものの、できれば経日的に観察を継続し、ノックダウン虫が蘇生するか致死するかを見極めた上で、効果を判定する。

※ 正 常 虫 :

殺虫剤処理される前と変わりなく正常な動きをするものを指す。

ノックダウン虫 :

薬剤中毒の症状の一つ。間歇的に、又は継続的に興奮状態で、多くは仰向けになって羽や脚を激しく震わせて動き回りもがき苦しむ状況のものを指す。また、動かなくなった状態でも刺激を与えると激しく反応するもの、時間の経過にしたがって蘇生するものや正常に快復するものがみられる。苦悶虫と同義。

死 虫 :

全く動かない状態のもので、刺激を与えても、生命活動がみられないものを指す。

なお、瀕死虫（脚や羽等が全く静止している状態であるが、刺激を与えると、死にかけていて、かすかに生命反応するものを指す。これらは中毒症状が進行して、快復しないもの）は、時間の経過にしたがって致死することから、判定時には死虫とみなす。

2) 試験結果の取り扱い

試験結果は、一般に数回の繰り返しの平均値で求め、無処理や溶剤のみなどの対照区で死虫やノックダウン虫が認められた場合には、以下に示す Abott の補正式を用いて補正死亡（ノックダウン）率を計算する。IGR で羽化阻害率を求める場合も、同様の式を適用する。

$$\text{補正死亡率 (\%)} = \frac{\text{処理区の死亡率} - \text{対照区の死亡率}}{100\% - \text{対照区の死亡率}} \times 100$$

原則として、対照区の死亡率ないしノックダウン率が 10%を越えた場合や、IGR 剤の評価で対照区の羽化率が 70%未満などの場合には、通常、その試験は破棄し、再試験を行う方がよい。

試験結果の解析については、プロビット法などによって LD₅₀ (50%致死薬量) 値およびその信頼限界や可能な限り LD₉₀ (90%致死薬量) 値をもとめ、また、有意差を確認する場合は適切な統計処理を行ったうえで評価する。この様な処理は KT (ノックダウン時間) 値、LC (致死濃度) 値、IC (阻害濃度) 値、LT (致死日数) 値などを求める場合も同様である。

なお、わが国では、まだ公定の標準薬剤はないが、相対的な有効性を明らかにするうえでは、

原則として普遍性のある現行の市販製剤を選んで対照薬剤とし、相対有効度を表示する。

(5) 試験実施上の注意

- 1) 実験動物を吸血源などとして使用する場合、当該研究機関などの倫理委員会等に使用について諮問を行い、許可を得てから実施する。
- 2) 許可があつて実験動物を使用する場合でも、実験動物に対しては、極力苦痛を与えない方法をとるなどの配慮が必要である。

1. 1. 4 実地試験

(1) 試験の目的

実地試験の目的は、承認申請予定の殺虫製剤（検体）を、設定した用法用量で実際の場所に適用して、その効力を評価するものである。基礎試験では優れた効力を示した検体が、実地に適用した時に優れた効果を示すとは限らない。効力の発現に關与する複雑な変動要因を持つ実地で、検体の実用的効力の確認を得ることが実地試験の目的である。

(2) 試験の特徴と問題点

1) 複雑な環境条件

実地では環境その他の複雑で雑多な流動的要因がある。したがって試験のたびに異なった結果が得られることも多い。このため少ない事例しか得られない場合には、それらの結果が普遍的なものかどうかを十分に考察することが望ましい。

2) 周辺環境との関係

屋内で実施する基礎試験と異なって、実際の環境や人が生活する場で実施するので、処理する薬剤が人や環境に影響を及ぼす場合がある。また、処理した薬剤が洗い流されたり、配置した毒餌が紛失したりする場合がある。気温や風雨など自然現象の影響を受けることもある。さらには、店舗などの施設を借りて実施する場合には、営業時間を避けて行わなければならないという制約も出てくる。

このようなことから、実施時期、実施場所について、できるだけ試験期間中に安定した状況が得られるような配慮をすると同時に、実施する場所の所有者などと十分な打ち合わせを行い、試験に支障が生じないように配慮する。このためには、周辺の環境を考慮した上で、できるだけ以下のような条件を備えた場所で実施することが望まれる。

- ① 隣接地区から対象とする種の侵入があると結果が乱れるので、できる限り隔離された場所であること。
- ② 環境条件が単純化されていること。
- ③ 試験期間中、清掃、整理、排除などにより人為的に状況が変化しないこと。
- ④ 実施する場所で人やペットなど、また、環境等に悪影響を与えないこと。

3) 対照区設定の問題

実地条件下では試験を実施する場所の対象虫の個体群密度が、駆除を必要とする程度まで達しているのが前提である。個体群密度は季節や温度などによって変動するため、理想的には、処理区と類似した条件の場所を同時期に選定し、対照区として設けることが望ましい。しかし、無処理のまま試験場所の提供を受けられるかどうか、対照に適した場所が得られるかどうか

など、現実にはかなり難しい問題がある。実験場所の提供を受けようとする場合、試験後、駆除を行うことを条件にすればある程度可能である。また、対照区が設けられない場合には、処理区のみでも正しい評価が得られるように試験設計などを工夫する。

4) 評価の困難性

実地試験では多くの場合、効果判定の方法として、処理前後の害虫の個体群密度の増減により効果を評価する。

この方法の第一の難しさは、どのような調査法によって個体群密度を把握するかである。密度変化は絶対的ではなく、相対的な変化でも良い。

第二の難しさは、処理後の密度の低下が、薬剤に由来するものか自然の消長によるものかを識別することにある。さらに、その低下に普遍性があるかどうか、実地の場面で広く通用するかどうかとも判断できなければならない。

評価は、基本的に、対象とする害虫の防除効果が90%以上になるか、密度指数が客観的に見て妥当な水準以下になることをもって効果があったと判断する。例えば非常に高密度に発生があった場合、計算上の防除効果が90%以上あったとしても、実態的にはまだかなり高い密度が維持されていて、十分に効果があるという評価にはならない場合がある。この場合は、個体群密度が処理によって妥当な水準以下になったかの考察が求められることになる。

無処理との比較は統計処理などを行って有意差を検定することが望ましい。

実地試験を実施するにあたっては、以上のような諸条件を考慮した上で、できるだけ一般性のある普遍的な効力結果が得られるような試験設計をしなければならない。

また、実地試験が困難な場合、準実地試験によって実用効果を確認することになるが、実使用場面の主要な変動要因を抜いて準実地試験を実施することは、必ずしも適当ではない。変動要因なしの条件で試験を実施した場合には、基礎試験の規模を拡大しただけの意味しかないことがあるので、実用効果の確認にはならない場合があり、注意しなければならない。

(3) 注意事項

吸血害虫を対象とした忌避剤の試験において、人おとり法を採用する場合は、おとりとなる人に対して事前に内容を説明した上で、必ず了解を取ること。実施にあたっては、吸血害虫が体表上に係留する時間ができるだけ短くなるよう、速やかに採集する。おとりとなることを職制上の権限を持って強制してはならない。また、動物を用いる場合には、動物に極力、苦痛を与えることがないように配慮しなければならない。

1. 2 供試虫の種類と試験法の特徴

1. 2. 1 蚊類

(1) 成虫

蚊成虫は雌を用いる。供試は感受性が低い羽化後2~5日齢を用いる。但し、吸血忌避試験では吸血活動が旺盛となる羽化後概ね5日齢以上が適している。種によって吸血活動の時間帯が異なる場合があるので、供試虫に適した時間帯を考慮して試験する。

試験場所の明暗が結果に影響を与えることがある。蚊は光を避けて暗い側に集合する性質があるため、照明が均一にあたるように配慮する。また、壁面に係留する習性を持つことから、シャーレを用いて、水平面の残渣に接触させるゴキブリやハエ成虫の様な方法で残渣接触試験を実施すると、底の残渣面に接触しないで、かぶせてあるシャーレの壁面にとどまってしまう

ので注意が必要である。野外産蚊成虫の殺虫剤抵抗性検定法として WHO がテストキット（図4参照）による方法を推奨しているので参考にするとよい。

[適用できる標準的な試験法]

微量滴下試験法、残渣接触試験法、噴霧試験法、燻煙試験法、忌避試験法、実地試験法

(2) 幼虫

多くの場合、終齢期の幼虫を用い、蛹は供試しない。終齢後期の個体が混ざっていると、薬液浸漬試験などでは観察時までには蛹化する個体が出てくるが、これらは供試虫数から除外する。致死虫及び瀕死虫は水底に沈んで水面に上がってくることはないので、観察時に容器壁面を軽く叩き、水中を泳ぐ個体を生存個体として扱う。

長期観察を伴う試験では餌を与える。幼若ホルモン様の羽化阻害剤では終齢後期の個体を用い、蛹化させて羽化阻害状況を観察する。

[適用できる標準的な試験法]

薬液浸漬試験法、水面処理試験法、実地試験法

1. 2. 2 ハエ類

(1) 成虫

イエバエ、ヒメイエバエ、クロバエ、ニクバエなどの雌雄成虫を対象とする。試験は主として雌を供試する。前出の1. 1. 3 (2) 1) に記載のとおり、試験は原則としてイエバエが用いられる。標榜する種がイエバエ以外の場合にはできるだけその種を用いた試験を実施することが望ましいが、ハエの種類によって実施できる試験の種類や内容が異なるので注意する必要がある。

[適用できる標準的な試験法]

微量滴下試験法、残渣接触試験法、噴霧試験法、燻煙試験法、食毒試験法、経口投与試験法、実地試験法

(2) 幼虫

培地混入試験では、通常、飼育用培地に薬剤を混合して供試する。培地は種類によって組成が異なるので、種に適した培地を用いること。ニクバエで薬液に継続接触させる場合、幼虫の体の全てが液に沈まないように、用いる薬液量は少量にするなど、供試虫によっては試験条件に配慮を要する場合がある。また、薬液が付着した幼虫はガラス容器といえども壁面を登って逃亡する場合があるので注意が必要である。また、布など吸湿性のある素材で蓋をすると、幼虫の体表についた薬液が吸い取られて、容器内の薬剤が無くなる場合があるので、吸湿性のない素材を蓋に用いる。

[適用できる標準的な試験法]

培地混入試験法、薬液継続接触試験法、実地試験法

1. 2. 3 ゴキブリ類

ゴキブリは供試虫としては大型なので比較的扱いやすい。残渣接触試験や噴霧降下試験などを実施する場合は、チャバネゴキブリのような小形の種では、深さ 6cm 程度の深型（腰高）シャーレを用い、内壁にワセリンやバターを薄く塗っておけば、壁面をのぼって逃亡することもない。しかし、大型種では投入直後あるいは刺激を与えた時に、暴れて飛び出ることがある

ので、直径 15cm 程度の広めの容器を用いた方がよい。

クロゴキブリ、ワモンゴキブリ、ヤマトゴキブリ、チャバネゴキブリは飼育系統が確立しているため、供試虫としても適しているが、大型の種類では飼育箱からピンセットなどで脚をつかんで取り出そうとすると脚が取れてしまう場合がある。飼育箱ごと軽く二酸化炭素や低温で麻酔すると簡単に取り出せて、残った使用しない個体に対する影響も少ない。

ゴキブリの致死の判定は、処理後 48 時間や 72 時間のように、やや長めの時間まで行うほうが安定した結果が得られる。薬剤種によっては 1~4 週間後の観察が必要なこともある。

[適用できる標準的な試験法]

微量滴下試験法、残渣接触試験法、噴霧試験法、燻煙試験法、直接散布試験法、食毒試験法、経口投与試験法、実地試験法

1. 2. 4 ノミ類

(1) 成虫

よく跳ねるので、逃げないように背の高い容器や密閉容器を用いて試験を行う。蓋をする場合には、硬すぎると虫体を傷つけるので注意する。また、体が小さいので歩行して隙間から逃げることがあり、取り扱いには十分注意する。

[適用できる標準的な試験法]

残渣接触試験法、燻煙試験法、噴霧試験法

(2) 幼虫

深型（腰高）シャーレなどの容器の底にカーペット片などを敷き、幼虫を放して薬剤を処理する。餌として乾燥牛血に粉末乾燥酵母などを混合して与える。

[適用できる標準的な試験法]

噴霧試験法、燻煙試験法、培地混入試験法

1. 2. 5 シラミ類

飼育している試験機関は現在ほとんどない。シラミは 1 日 1 度、人の血液を必要とするため、観察時間を長時間設けることはできない。処理後 24 時間を最長に、観察をすませるようにする。また、乾燥にも弱いので、高湿に保つように心がける。

[適用できる標準的な試験法]

残渣接触試験法、燻煙試験法、薬液浸漬試験法

1. 2. 6 トコジラミ

飼育している試験機関は現在ほとんどないが、小動物が吸血源になるので、飼育は比較的簡単であり、試験もゴキブリと同じように実施できる。吸血の状況で感受性が異なるので、供試するまでに無吸血だった期間や、吸血後の日数など供試する個体の吸血状況を記録しておく。

[適用できる標準的な試験法]

残渣接触試験法、燻煙試験法、噴霧試験法

1. 2. 7 イエダニ

扱いはそれほど難しくないが、小さいため逃亡には十分に注意する。逃亡個体は人を吸血する。トコジラミと同様、飼育している試験機関は現在ほとんどないが、小動物が吸血源になる

ので飼育は容易である。吸血の状況が効果に影響するので、供試するまでに無吸血だった期間や、吸血後の日数など供試する個体の吸血状況を記録しておくが、原則として吸血後の個体を試験に供する。

[適用できる標準的な試験法]

残渣接触試験法、燻煙試験法、噴霧試験法

1. 2. 8 屋内塵性ダニ類

屋内塵性ダニ類は、ケナガコナダニ、コナダニ類、ツメダニ類などを対象とする。このダニ類はイエダニと同様に虫体が小さく、基礎試験においても、多くの昆虫で適用できる微量滴下試験は適用できない。乾燥には弱く、条件が悪いと対照区でも死亡率が高まるので、処理後の供試虫は湿度が60~80%以上に保たれるような環境条件に置かなければならない。とくにケナガコナダニでは75%以上とする。供試数をあらかじめ揃えることも難しいので、そのような場合には必要とする数(目分量)の前後を細筆などでとって供試し、試験後正確な数を数える方法でもよい。あらかじめ雌雄や齢を揃えることもできないので、供試に際して性および歳期を考慮しなくてもよい。雌雄などを確認する必要がある場合には、観察が終了した後、顕微鏡下で行う。また、試験中にごく僅かな隙間から逃げだしても、それを確認することは容易ではないので、取扱いはできるだけ速やかに行わなければならない。

[適用できる標準的な試験法]

残渣接触試験法、燻煙試験法、噴霧試験法、培地混入試験法、実地試験法

1. 3 剤型の種類と試験法の特徴

1. 3. 1 原体

原体はアセトンやエタノール、あるいはケロシンなどの有機溶剤に溶解して用いる。有機溶剤に対して溶解性が低いものは懸濁して使う。また、用いた溶剤そのものが供試虫に影響を与える場合があるので、必ず溶剤だけの対照区と無処理対照区を設ける必要がある。微量滴下試験をはじめ、実際に供試虫に処理される原体量は極めて少ないので、薬液の調製は慎重に行わなければならない。溶解性にもよるが、一般には高濃度の溶液を調製し、次第に低くなるように数段階濃度の薬液を調製して供試する。

新規の殺虫原体が既承認の原体に比べて、効力、作用スペクトラム(適用発育ステージまたは昆虫種)などの面で同等以上の利点を有するかを明らかにする。また、新規殺虫原体の選択毒性の程度や交差抵抗性の有無を把握するために、できる限り作用点を明らかにすることが必要である。

1. 3. 2 製剤

試験方法はできるだけ標準的な方法を採用することが必要であるが、製剤は使用する状況によって使い分けることができるよう配慮されているため様々な形態のものがあ、必ずしもこの解説で示した標準的な試験法と全く同一の方法では実施できないことがある。この様なことから、製剤では原体以上に試験機関によって方法が異なり、また、試験機関ごとに独自の方法が採用されていることもあるため、客観的評価になるように2つ以上の試験機関で評価することが必要になっている。

既存製剤と異なる用法用量や効能効果の新殺虫製剤の効力試験は、この解説に示した標準的な方法を参考に、再現性のある、また、追試ができる方法で実施する。

希釈が必要な製剤の多くは水が用いられることが多い。この場合、水の影響を少なくするためにイオン交換された純水を用いる。蚊幼虫の試験では、汲みたての水道水を用いると、薬剤によっては塩素が効果を減退させることがあるので、純水を用いるか、または、水道水であれば1日以上経過した汲み置き水を用いる。

(1) 油剤

[特徴]

希釈せずにそのまま使用する、ケロシン等をベースにした製剤。残渣接触試験では、薬剤処理面の材質、薬剤処理から供試虫接触までの時間などが効力に影響するので、薬剤処理後、供試虫に接触させるまでの時間を一定させたり、いくつかの異なる処理面を使用したりして試験を実施する。

[適用できる標準的な試験法]

噴霧試験法、残渣接触試験法、煙霧試験法、実地試験法

(2) 乳剤

[特徴]

殺虫剤の中で最も汎用の製剤で、油性の液体であるが水で希釈して使用する。試験を実施する場合には、希釈液が変質することがあるため、できるだけ試験直前に希釈調製したものを用いる。残渣接触試験では、薬剤処理面の材質、薬剤処理から供試虫接触までの時間などが効力に影響するので、薬剤処理後、供試虫に接触させるまでの時間を一定させたり、いくつかの異なる処理面を使用したりして試験を実施する。

[適用できる標準的な試験法]

噴霧試験法、残渣接触試験法、薬液浸漬試験法、実地試験法

(3) 水和剤

[特徴]

粉末を水で希釈し懸濁した形で用いる製剤。残渣接触試験では、薬剤処理面の材質、薬剤処理から供試虫接触までの時間などが効力に影響するので、薬剤処理後、供試虫に接触させるまでの時間を一定させたり、いくつかの異なる処理面を使用したりして試験を実施する。

[適用できる標準的な試験法]

残渣接触試験法、薬液浸漬試験法、実地試験法

(4) ME剤 (micro emulsion)、可溶化型乳剤、水性乳剤

[特徴]

水ベースの製剤で、水で希釈して使用する。残渣接触試験では、薬剤処理面の材質、薬剤処理から供試虫接触までの時間などが効力に影響するので、薬剤処理後、供試虫に接触させるまでの時間を一定させたり、いくつかの異なる処理面を使用したりして試験を実施する。

[適用できる標準的な試験法]

噴霧試験法、残渣接触試験法、薬液浸漬試験法、実地試験法

(5) 蚊取り剤

[特徴]

蚊取り線香、蚊取りマット、液体蚊取りなど、いずれもそのまま着火あるいは通電させて空

間に処理する製剤。これらの蚊取り剤は吸血阻止という要素も重要なので、評価は主としてノックダウン速効性を見る。しかし、ノックダウンしても蘇生し、吸血する場合がありますので、致死効果も重要であり、致死効果と両面から評価する。

[適用できる標準的な試験法]

通気円筒試験法、定量円筒試験法、箱型試験法、実地試験法

(6) エアゾール剤

[特徴]

液剤と同じような方法で試験できるが、噴射剤により薬液を放出する製剤なので、小さな供試虫では噴射圧による影響に注意する。残渣接触試験では、エアゾールから原液を取り出して、それを油剤と同様にして残留処理して試験を行う場合もある。

[適用できる標準的な試験法]

噴霧試験法、残渣接触試験法、実地試験法

(7) 粉剤

[特徴]

原体に鉱物質微粉末を増量剤として加え、均等に混合粉碎して作ったもので、そのまま用いる製剤。粉剤では有効成分以外にも、基剤そのものが供試虫の皮膚を損傷させる効果を持っているので、試験にあたっては、タルク、クレーなど基剤のみを供試した対照区と何も使用しない無処理区を設ける。低薬量の試験では製剤そのものだけで散布量を減らして試験を行うことは難しいので、同様の基剤（増量剤）で希釈したものをを用いる場合もある。

[適用できる標準的な試験法]

残渣接触試験法、直接散布試験法、培地混入試験法、実地試験法

(8) 懸濁剤（フロアブル製剤、ゾル剤）

[特徴]

乳剤・水和剤と同じ。

[適用できる標準的な試験法]

残渣接触試験法、薬液浸漬試験法、実地試験法

(9) マイクロカプセル剤（MC 剤）

[特徴]

乳剤・水和剤と同じ。

[適用できる標準的な試験法]

残渣接触試験法、薬液浸漬試験法、実地試験法

(10) 粒剤

[特徴]

粒剤は 300~1700 μm 、微粒剤は 100~300 μm の粒度で、そのまま使用する製剤。処理後、すぐに溶解して一気に有効成分が放出されるものもあるが、薬剤の放出を調節している製剤の場合は、時間の経過に伴って順次有効成分が水中に放出されるので、この点を考慮して試験設計をする。

[適用できる標準的な試験法]

薬液浸漬試験法、実地試験法

(11) 錠剤

[特徴]

有効成分を錠剤状に成型した製剤。試験は薬剤をそのまま水中に処理し、原液又は希釈液に供試虫を浸漬する方法によって実施する。薬剤の放出を調節している製剤では時間の経過に伴って順次有効成分が水中に放出されるので、この点を考慮して試験設計をする。

[適用できる標準的な試験法]

薬液浸漬試験法、実地試験法

(12) 燻煙剤（全量噴射型エアゾール剤を含む）

[特徴]

製品化された製剤では、その一部をとると製剤の特性が失われるものもあり、また、全量噴射型エアゾール剤では、小空間で試験をすると薬液の空間での均一性が担保できない可能性が高いため、広空間のテストチャンバーで基礎的な試験を実施せざるを得ない。

[適用できる標準的な試験法]

燻煙試験法、実地試験法

(13) 蒸散剤

[特徴]

蒸気圧が高い有効成分を樹脂などに含浸させ、有効成分の長期にわたる自然蒸散による効果を目的とした製剤で、主に吊り下げタイプと殺虫機使用タイプがある。現在では、主にジクロロボスを用いた製剤が対象となる。効力の評価のための試験は、燻煙剤と同様の扱いでよい。なお、蒸散剤については、安全性試験、空气中濃度及び効力試験等に関する通知（昭和44年6月9日薬製第227号、平成16年11月10日薬食審査発第1110005号）が発出されている。

[適用できる標準的な試験法]

燻煙試験法、実地試験法

(14) 毒餌剤

[特徴]

一般には原体に食餌誘引物質を加えて作ったもので、経口的に摂取させる目的の製剤。基礎試験では、検体を用法に応じて容器内に配置して自由に摂食させて試験を行うが、喫食性が問題となるので、検体のみを与えた単独区の試験のほか、検体と同時に通常の飼料を与えた併置区を設けて摂食選好性を比較調査する試験も併せて実施する必要がある。試験は、接触毒が発現しないような配慮を必要とするが、とくにハエを対象にした毒餌の場合には、効果は食毒と接触毒の複合作用として評価できる。但し、ハエを対象にした毒餌の場合、接触毒が発現しないような条件を整えることは困難なため、効果が食毒と接触毒の複合作用としての評価になっても構わない。

[適用できる標準的な試験法]

食毒試験法、経口投与試験法、実地試験法

(1.5) 忌避剤

[特徴]

目的物に処理して害虫の加害から保護するために用いる薬剤。蚊成虫の忌避剤のように吸血被害を防止するために使用されるものが多い。このような場合の試験設定は、吸血が行われるような状況を設定して行う。

また、一方ではゴキブリなどの潜伏を阻止するために使用される場合がある。このような場合の試験設定は、対象虫が潜みやすい、或いは生息しやすい状況を作って行う。

[適用できる標準的な試験法]

忌避試験法、実地試験法

2. 効力試験法詳説

2. 1 基礎試験法

2. 1. 1 微量滴下試験法

[概要]

供試虫の体表に原体のアセトン溶液などを一定量滴下して付着させ、一定時間後の薬量と致死率の関係から通常 LD_{50} 値を求めて効力を判定する、原体では最も基礎的な試験法で広く実施される。薬剤間の相対評価をするのに適しているが、一般に製剤の試験には適用しにくい。

この試験法では殺虫剤を直接に虫体に付着させるので、効果を変動させる要因の介入が少なく、また供試虫 1 匹あたりの処理薬量を正確に知ることができることから、比較的安定した結果が得られる利点がある。

[対象薬剤]

原体

[対象虫]

ハエ成虫、蚊成虫、ゴキブリなど

[装置]

薬液の滴下処理に用いる微量滴下装置（図 1）は、先端につける注射針と一定規格のマイクロシリンジおよびその押し込み部分を動かすマイクロメーターからなっている。マイクロシリンジの先につける針は通常約 45 度に曲げて使うと取り扱いやすい。マイクロメーターの代わりに、ディスペンサー（米国ハミルトン社製など）とマイクロシリンジのセット（図 2）も利用できる。

[手順]

- ① 原体をアセトンや殺虫力の少ないその他の溶剤に溶かし、通常 1.4~3 倍程度の公比をもつ 4~8 段階の薬液を作製する。
- ② エーテル、二酸化炭素あるいは低温で麻酔した供試虫を、厚紙上などに薬剤を処理する部位を上にして並べる。
- ③ ①で作製した薬液を装置を用いて供試虫に正確に滴下する。
- ④ 溶剤のみを等量滴下して対照区にする。無処理のものも対照区として設定する。
- ⑤ 処理後の供試虫は清潔な容器に移して餌を与えて飼育し、通常ハエ・蚊では 24 及び 48 時間後、ゴキブリに対しては 48 及び 72 時間後の致死率を求める。
- ⑥ 薬量一致死率からプロビット統計処理し、 LD_{50} 値と LD_{90} 値を求める。

[備考]

- ① 供試虫は原則として雌成虫を使用する。
- ② 麻酔はエーテルでは深くかけすぎると蘇生しないことがある。また、二酸化炭素では蘇生が早いので、曝露させながら薬液を滴下するとよい。
- ③ 厚紙上に並べる数は 10~15 匹程度がよい。
- ④ 標準の滴下量は蚊では 0.2~0.5 μ L、ハエ成虫では 0.5~1 μ L、ゴキブリでは 1~3 μ L とし、ゴキブリでは胸部腹面両脚間に、他の供試虫では胸部背面に処理する。希釈液の滴下量は標準を示したもので、供試する虫の種類によって増減してよいが、正確な量を付着させな

くてはならない。

- ⑤ 必要があれば、各濃度段階区の致死率から得られた 1 匹あたりの LD₅₀ 値を、供試虫の単位体重あたりに換算する。この場合は供試虫の平均体重を求め、1 匹あたりの LD₅₀ 値を平均体重で除し、体重 1g あたりの薬量を μg などで表す。
- ⑥ 致死率の判定は、供試虫や薬剤の作用性に応じて異なる。ノックダウン虫（苦悶虫）が蘇生するか死亡するかを見極めるまで観察を経目的に継続し、評価が安定した時点で致死効果を判定することが望ましい。

2. 1. 2 残渣接触試験法

[概要]

紙や板などの表面に薬剤を処理して残渣面をつくり、ここに供試虫を接触させて効果を調べる試験法で、薬剤の残留効果を見るためには欠かせない試験法である。また、この試験法では、薬剤を処理する処理面の種類や性状、処理薬量、薬剤を処理してから供試虫を接触させるまでの時間など、効力に直接影響する様々な要因があるので、試験条件を一定にして試験する必要がある。

薬剤の処理面としては、濾紙、ベニヤ板、化粧合板が広く用いられるが、非吸収性のステンレス板やガラス板なども利用される。屋内塵性ダニ類では観察のしやすさ等から濾紙の代わりに黒色のラシャ紙も用いられる。処理面の種類によって薬剤の吸収性が異なり、虫体に直接作用する表面の薬剤残渣量が異なって効力に影響する。供試薬剤の主剤や補助剤の物理化学的性質と湿度や処理面の水分含量なども関与するので、用いる処理面の種類や環境条件は一定にすることが望ましい。

残渣接触試験法では、限定時間接触試験法と継続接触試験法の二つの接触方法があるが、いずれの接触方法でも残効性試験が行われる。試験目的に応じて適切な接触方法を採用する。

(1) 限定時間接触試験法（短時間接触試験法）

[概要]

薬剤を残留処理した実際の場面では、ゴキブリなどの対象虫は長時間連続的に残渣面に留まるよりも、通過による短時間接触が多いとの見方から導かれた試験法である。この試験では、ある基準量の薬剤を処理した残渣面に 2、10、20 分などの限定した時間だけ供試虫を接触させ、その後は清潔な場所（容器）に移し、一定時間後に致死率を求める。接触時間は使用目的などに応じて、1、2、4 時間など、比較的長時間接触させることもある。

[対象薬剤]

原体、油剤、乳剤、粉剤、エアゾール剤

[対象虫]

ハエ成虫、蚊成虫、ゴキブリ、ヒトジラミ、ノミ成虫、トコジラミなど

[手順]

① 使用する薬剤

原体：アセトンやケロシンなどの有機溶剤に溶かして用いる。

油剤：そのまま用いる。

乳剤・水和剤等：水で希釈して用いる。

粉剤：そのまま、または基剤で希釈して用いる。

エアゾール剤：原液をそのまま用いる。

② 処理量

液剤：処理する面が吸収性の材質の場合、 1m^2 あたりの処理量は 50 mL を標準とする。この量は円形濾紙を使用する場合、直径 9 cm の濾紙であれば 0.32 mL 、直径 11 cm であれば 0.48 mL に相当する。板など四角い処理面の場合は 10 cm 角であれば 0.5 mL になる。処理面が非吸収性の材質の場合、標準の処理量は 25 mL/m^2 とする。

粉剤：シャーレなどを利用し、 1 m^2 当り $1.5\sim 15\text{ g}$ 処理することを標準とする。これは直径 9 cm のシャーレを使用する場合 $10\sim 100\text{ mg}$ に相当する。希釈しない場合は、この範囲の処理量を上限にし、例えば $1/3$ ずつ薬量を低減した区を 3 段階以上設定する。処理量が著しく少なくなる場合には、同質の粉剤の基剤を用いてあらかじめ希釈したものを処理量を変えずに用いる。

③ 処理法

原体・液剤：原体は有機溶剤で希釈した液、製剤はそのまま、あるいは水で希釈したものをガラス板などの上に置いた濾紙などに、所定量をピペットで均一に滴下処理する。

粉剤：シャーレの底に濾紙を敷き、その上に粉剤をできるだけ均一に散布する。

- ④ 液剤では薬剤処理後 1 時間以上経過し、溶剤が十分に揮散してから供試虫を接触させる。
- ⑤ 処理面は、ハエ、蚊では平型シャーレで、ゴキブリでは内面上壁にバターやワセリンを薄く塗った深型（腰高）シャーレで覆う（図3）。ただし、蒸気圧の高い薬剤で実施する場合は、密閉されたシャーレでは、気門からの吸入効果が加味されて効果が強く現れるので、上面が開放されたガラスリング等を用い、上面を金網蓋で覆う。なお、速効性を評価する場合、接触時間中、経過時間（分）ごとにノックダウン虫数を観察し、 KT_{50} 値及び KT_{90} 値を求める。
- ⑥ 所定時間の接触が終了したら、供試虫を清潔な容器に移し、砂糖水に浸した脱脂綿球等を餌として入れ、一般的にハエ、蚊では 24 及び 48 時間後、ゴキブリでは 48 及び 72 時間後に、致死率を求める。2. 1. 1⑥に記述したように必要に応じて 7 日後も実施するなど観察を継続することが望ましい。この場合、水と飼育用飼料片を与える。
- ⑦ 蚊成虫の試験では WHO テストキット（図4）を用いた方法を準用してもよい。

WHO のテストキット試験では、薬剤を処理した長方形の濾紙を円筒の内側に巻き付け、これに蚊を接触させる（処理区）。この方法を用いて短時間接触を行う場合、無処理の円筒を用意し、内壁に無処理の紙を巻きつけ（無処理区）、接触完了後は、両者の円筒を連結させ、処理区の蚊を無処理区に吹き込むようにして移す。円筒の上は網、下はプラスチック製のスライド板でふさがれている。

⑧ ノミ成虫を用いる試験の場合

- i) $10\times 10\text{ cm}$ に切ったカーペットやベニヤ板等に、原体では有機溶剤希釈液、製剤では水希釈液を 1 m^2 当たり $10\sim 50\text{ mL}$ の割合になるように、均一に処理する。
- ii) 供試虫を濾紙上に置いた直径 9 cm 、高さ 6 cm のガラスリング内に放ち、逃亡防止のため上端をパラフィルム等で覆う。
- iii) 薬剤を処理した残渣面に供試虫を入れたリングを濾紙ごと置き、跳びはねるノミの体表

を傷つけないように濾紙を引き抜き、残渣面にノミを接触させる。

iv) 接触時間は 10, 30 及び 90 分を標準とし、所定時間接触終了後は、直ちに供試虫を回収してプラスチックカップに入れ、水分を含ませた濾紙小片を与えて保存し、24 時間及び 48 時間後の致死率を求める。

v) 供試虫の採取や回収の際には、軽く二酸化炭素で麻酔すると扱いやすい。

⑨ シラミを用いる試験の場合

方法はハエ・蚊の試験に準じる。供試虫を濾紙の上に放し、シャーレで蓋をし、6 時間目までの所定の時間経過後及び 12 時間、24 時間後のノックダウン虫を観察する。接触試験中はシャーレ内の乾燥を防ぐために、したたり落ちない程度に水を含ませた脱脂綿小片をシャーレの上部縁とふたの間に挟んでおく。

【備考】

- ① 1 群の供試虫数は、通常ゴキブリで 5~10 匹程度、それ以外では 10~20 匹程度を用いる。
- ② たとえば照明などの試験環境条件又は供試虫の習性等が残渣面の虫の均一な接触到影響を与える場合がある。特に、蚊の場合は、容器の側壁に静止する習性があり、水平面の残渣に対しては接触を期待しにくい傾向があるので、WHO 型リングを用いる場合はキットを垂直に立てて行う。
- ③ ノックダウン効果の早い薬剤では、致死量を摂取する前にノックダウンして、その後の薬剤の取り込みが行われず致死しないことがあるので、さらに時間をおいて観察を行った方がよい。
- ④ 薬剤によっては、供試虫がノックダウンせずにそのまま動かなくなることがあるので、注意して観察しなければならないが、これもノックダウンとみなす。また、ノックダウンしてもその後死亡しない場合がある。
- ⑤ 致死の判定：2. 1. 1⑥を参照。

(2) 継続接触試験法

【概要】

接触から死亡するまでの供試虫の薬剤に対する反応を経時的に観察でき、また、同時に速効性を評価することができる試験法の一つである。ある基準濃度の薬剤残渣面に供試虫を継続的に接触させ、時間の経過にともなう供試虫のノックダウン虫数から KT 値を求める方法である。基本的な手順は短時間接触法と同様の試験法である。

【対照薬剤】

原体、油剤、乳剤、粉剤、エアゾール剤

【対象虫】

ハエ・蚊成虫、ゴキブリ、シラミ、ノミ成虫、トコジラミなど

【試験法】

供試虫を残渣面に接触させたまま、2、5、10、20 分など時間経過ごとにノックダウン虫数を数え、経過時間に伴うノックダウン率から KT_{50} 値及び KT_{90} 値を求める。それ以外は限定時間接触試験法を準用する。

(3) 残効性試験法

[概要]

残効性の試験では、薬剤を処理した濾紙や板などを試験目的に応じた環境条件に保存し、所定期間ごとに上記（１）、（２）と同様の試験を行って薬剤の残留効果を調べる。この場合、たとえば 1 時間の接触で 90%以上の効果が得られる日数（LT₉₀）などの期間を求めて評価する。

[備考]

- ① 残渣面の保存は、一般に室内の散光下、室温（25℃前後）で行われる。
- ② 試験は薬剤の処理後、1、2、4 週後を目安として行う。目的に応じて観察回数を増やしたり減らしたりする場合がある。
- ③ 残渣面は、すでに接触試験に供試したものを繰り返し使用する場合と、接触試験に使用せずに保存しておいたものを使用する場合がある。
- ④ 致死の判定：2. 1. 1⑥参照

（４）ドライフィルム試験法

[概要]

試験管などの内壁に薬剤を付着させ、供試虫を投入して残渣面に接触させて効果を調べる試験法である。屋内塵性ダニ類のように試験器具の隙間から逃亡したり、壁面を歩き回ったりして残渣面への接触が行われにくい供試虫の試験に用いられる。微量滴下試験の実施が困難な小さな対象虫に対する原体等の基礎効力を評価する手段としても利用されている。

[対象薬剤]

原体、液剤

[対象虫]

主に屋内塵性ダニ類やイエダニを対象にするが、他の供試虫でも準用できる。

[手順]（屋内塵性ダニ類に対する試験）

- ① ガラス製の小管瓶に原体のアセトン所定希釈液を一定量滴下し、その滴下液で管瓶の内壁を均一にコーティングするように、管瓶をまわしながら処理する。
- ② 付着させた薬液のアセトンが十分揮散するまで室内に放置する。
- ③ 揮散後、一定数のダニをとって投入し、蓋をして、一定時間後に致死率を観察する。

[備考]

- ① 直径 2.0 cm、高さ 4.5 cm、容量 10 mL 程度の大きさのガラス製管瓶が扱いやすい。このサイズの管瓶であれば、処理量は 0.1 mL が適当である。
- ② 1 薬剤について数段階の濃度で試験を行う。
- ③ 生存、ノックダウン、瀕死の判別が難しいので、観察は実体顕微鏡下で行い、針先で刺激を与えても微動しかない個体や全く動かない個体のみを致死と見なす。接触は 24 時間（必要に応じて 48 時間）までとする。
- ④ 液体の製剤についてもこの方法で実施できるが、アセトンのように揮発性が良い溶剤ではなく、粘着性がある溶剤等が用いてあると、屋内塵性ダニ類が処理面に付着するなど効果に影響を与えるので、溶剤のみを用いた対照区の設定が不可欠である。
- ⑤ 致死の判定：2. 1. 1⑥参照

(5) クリップ試験法

[概要]

本法は、逃亡を防ぎ屋内塵性ダニ類が残渣面に確実に接触するように開発された残渣接触試験法である。

[対象薬剤]

原体、製剤

[対象虫]

イエダニ、屋内塵性ダニ類等（飛翔性昆虫類以外の他の供試虫でも応用できる）。

[手順]

- ① 長さ 10 cm×幅 5 cm の大きさに切った濾紙またはラシヤ紙を用意する。
- ② 原体はアセトンで希釈した数段階の薬液、製剤では所定濃度に水などで希釈した薬液を、それぞれ 0.25 mL (50 mL/m²)、均一に滴下処理し、室内に保存して溶剤等を揮散させる。防虫紙では、そのままこのサイズに切断して用いる。
- ③ 紙を二つ折りにして、二方を目玉クリップで留め、開放された一方の口から小筆などを用いて生ダニのみを 20~30 匹入れ、ここのクリップで留めて密封する（図 5）。粉剤の場合は、同様の手順で作成した二つ折りの紙の中に所定量の薬剤を入れ、さらにダニを入れて封をする。
- ④ 所定時間経過後に致死率を求める。
- ⑤ 残効性調査は、薬剤を処理した残渣を、試験の目的に従って一定期間室内などに保存し、同様の手順で実施する。

[備考]

- ① 薬剤処理は 10cm×10cm の大きさの紙に行って、処理後半分に切断しても良いが、切断時に残渣面を擦らないように注意する。
- ② 供試虫を入れて処理が終了したものは、乾燥を避けるため、水を張った密閉容器など、高湿度で保存する。
- ③ 別に薬剤を処理しない対照区を設ける。
- ④ 通常、一旦使用した処理紙は観察終了後破棄するので、一接触時間ごとに同じ濃度のものを何枚も用意しておく必要がある。
- ⑤ 致死の観察は実体顕微鏡下で行い、針先で刺激を与えても微動しつかない個体や全く動かない個体を致死と見なす。
- ⑥ 致死の判定：2. 1. 1 ⑥参照
- ⑦ 製剤のうち、粒剤はその粒度によっては本試験法に適さないことがある。

2. 1. 3 噴霧試験法

(1) 噴霧降下試験法

[概要]

ガラス円筒の中に薬液を噴霧し、一定時間後、粗い粒子が落下した後に、下のポットに用意した供試虫を細霧に曝露させて効果を調べる試験法である。

[対象薬剤]

原体、油剤、エアゾール剤など

[対象虫]

ハエ、蚊、ゴキブリ、屋内塵性ダニ類等

[使用装置]

①噴霧降下装置 (図6)

内径 20cm、高さ 43 cm のガラス円筒を、高さ 30 cm 程度の木製の架台上に置き、ガラスのすべり蓋 (シャッター板) を仕切りにして円筒の直下に供試虫を入れるガラスポット (内径 15cm、深さ 18 cm 程度) を取りつけたものである。円筒の上にかぶせるガラス板 (直径 27cm 程度の円板がよい) には、中央に薬液を噴霧するための直径 2~5cm の円孔が開けてある。噴霧時以外は栓をしておく。ガラス円筒、ガラスポット、すべり蓋の接合部には霧滴が漏れるのを防ぐためゴムパッキングを取り付ける。ガラスポットの上面には 12~24 メッシュの金網をかぶせる。円筒、板、ポットはガラスの代わりに透明樹脂製でもよいが、洗浄しても薬剤が残る恐れがある素材は使用しない。

②エアコンプレッサー

薬液噴射には、1.5~2.0 kg/cm の圧力調整装置のついたエアコンプレッサーを用いる。

③噴射装置

一般によく用いられる塗装用 R2 噴霧器 (図7) を例に示す。噴霧器は基部 (D) をゴム管でコンプレッサーと接続し、噴射口の近くにあるネジ (C の裏側) に薬液容器 (E) のネジ (C) を固定する。ピペットで正確な量の薬液を容器の中に注入する。レバー (A) を手前に引いて、容器内の薬液を全量噴霧降下装置内に噴射する。

[手順]

- ① 原体はケロシンなどの溶剤に溶解させ、製剤は水などで希釈する。油剤、エアゾール剤はそのまま用いる。
- ② ガラスポットの底面には濾紙を敷き、供試虫をいれる。ハエ、蚊では 24 メッシュの網などで蓋をする。ゴキブリではポット内面上壁に薄くバターやワセリンを塗って上部からの逃亡を防止する。屋内塵性ダニ類の場合には、直径 9cm 程度のガラス容器に入れ、これをガラスポットの中央に置く。
- ③ 噴射装置 (アトマイザー: 図8) を用いて供試薬剤を上方円板中央の小孔から 1.5~2.0 kg/cm² の圧力で噴霧する。噴霧量はハエ・蚊・ダニでは 0.5mL、ゴキブリでは 1mL を標準とする。エアゾール剤では 1 秒間噴霧を標準とするが、製剤によっては適宜調整する。
- ④ 上方の小孔を栓で塞ぎ、噴霧終了から 10 秒後に下方のすべり蓋を開き、円筒内に残った細かな噴霧粒子を供試虫の上に降下させる。
- ⑤ すべり蓋を開いてからの時間経過にともなうノックダウン虫数を観察する。屋内塵性ダニ類ではこのような速効性評価のための観察は困難なので、曝露のみ実施する。
- ⑥ その後、10~20 分後に供試虫を別の清潔な容器に移し、餌と水を与え、25℃前後の室温下に保存する。
- ⑦ 観察は、ハエ・蚊では 24 時間 (または 48 時間) 後、屋内塵性ダニ類では 24 時間 (必要に応じて 48~72 時間) 後、ゴキブリでは 48 時間ないし 72 時間後に行い、正常虫、ノックダウン虫 (苦悶虫)、致死虫 (瀕死虫を含む) 数を記録する。
- ⑧ 3 回以上の繰り返しを行う。

[備考]

- ① ピレスロイドのような速効性薬剤を用いて速効性を評価する場合には、観察を容易にするために、1 ポット内の供試虫数を 10~20 匹程度とし、3~5 回の繰り返し実験を行う。

- ② 噴霧後、すべり蓋を引くまでの時間によって効力に開きが出てくるので、その時間を明記する。通常 10 秒程度を目安にする。
- ③ 屋内塵性ダニ類では逃亡を防ぐことが難しいので、供試ダニを入れてから薬剤処理までをできるだけ素早く行う。
- ④ 装置のうち円板や円孔の大きさは必要に応じて変えてもよい。
- ⑤ 屋内塵性ダニ類では容器表面に薄いビニルや食品用ラップなどで蓋をして、内部に水に浸した濾紙を入れて高湿に保つ。
- ⑥ 屋内塵性ダニ類は実体顕微鏡下で素早く致死を観察する。供試ダニが入った容器の内壁を洗剤水で洗って、これを濾紙上に展開して顕微鏡下で観察しても良い。
- ⑦ 繰り返しは通常 3 回実施する。
- ⑧ 致死の判定：2. 1. 1⑥参照

(2) 直接噴霧試験法

[概要]

円筒の上方から内部に噴霧した薬剤に供試虫を直接曝露させて効果を調べる試験法である。

[対象薬剤]

原体、油剤、乳剤、エアゾール剤

[対象虫]

ハエ、蚊、ゴキブリ、屋内塵性ダニ類等

[装置]

噴霧降下試験法と同じ装置 (図 6) を使用するが、すべり蓋は使用しない。

[手順]

- ① ガラスポットに供試虫を入れて金網蓋をする。ゴキブリでは内面上壁に薄くバターやワセリンを塗って上部からの逃亡を防止する。底面には濾紙を敷く。ダニの場合には、さらに直径 9cm 程度のガラス容器に入れ、これをガラスポットの中央に置く。
- ② 溶剤で希釈された原体、油剤や水で希釈された乳剤は、噴射装置 (アトマイザー; 図 8) を用いて 0.5 mL を、エアゾール剤は所定の秒数あるいは噴射量を、上方円板中央の小孔から 1.5 kg/cm² の圧力で噴霧する。
- ③ 上方の小孔を栓で塞ぎ、噴霧終了から 10~20 分間、時間の経過に伴う供試虫のノックダウン虫数を観察する。
- ④ 曝露終了後、直ちに供試虫を清潔な容器に移し、餌と水を与えて 25℃前後の室温下に保存する。
- ⑤ 24 時間後 (必要に応じて 48 時間または 72 時間後) に死虫数を観察して致死率を求める。
- ⑥ 通常 3 回の繰り返しを行う。

[備考]

- ① プレスロイドのような速効性薬剤を用いて速効性を評価する場合には、観察を容易にするために、1 ポット内の供試虫数を 10~20 匹程度とし、3~5 回の繰り返し実験を行う。
- ② 屋内塵性ダニ類は逃亡を防ぐことが難しいので、供試ダニを入れてから薬剤処理までを、できるだけ素早く行う。
- ③ 装置のうち円板や円孔の大きさは必要に応じて変えてもよい。
- ④ 屋内塵性ダニ類では容器表面に薄いビニルや食品用ラップなどで蓋をして、内部に水に浸した濾紙を入れて高湿に保つ。

- ⑤ 供試ダニは顕微鏡下で素早く観察する。供試ダニが入った容器の内壁を洗剤水で洗って、これを濾紙上に展開して実体顕微鏡下で観察しても良い。
- ⑥ 繰り返しは通常3回実施する。
- ⑦ 致死の判定：2. 1. 1⑥参照

(3) 箱型試験法

[概要]

小型の箱内で薬剤を噴射してから、所定時間後に供試虫を放して薬剤の空間処理効果を見る方法。または供試虫を箱内に放つて後に薬剤を噴霧する方法である。前者は供試虫を箱内に導入後、後者は薬剤の噴霧後に時間の経過ともなうノックダウン率を見ることによって速効性を調べる試験方法である。曝露時間終了後供試虫を回収して24～72時間後の致死効果も観察する。時には、限定時間曝露試験法として、一定時間だけ曝露させた後に致死効果を調べる場合もある。

[対象薬剤]

原体、製剤

[対象虫]

ハエ、蚊、ゴキブリ、屋内塵性ダニ類等

[装置]

内容積0.5m³ (63 cm×63 cm×125 cm 高さ) 程度の、洗浄し易いガラスまたは透明の樹脂製の箱 (図9) を用いる。図の各辺の長さは標準を示したもので、とくに規格化されたものではない。箱には薬液の噴射孔や、供試虫を出し入れする小窓がある。

[手順]

- ① 床に非光沢性の紙を敷く。
- ② 噴射装置を用いて装置内に薬液を2秒間噴射し、一定時間(30秒程度)経過後に下部の小窓から内部に供試虫を放つか、容器に入れた供試虫を入れる。または、装置内に供試虫を放つか、容器に入れた供試虫を導入し、上記と同様に噴霧装置を用いて薬剤処理する。製剤によっては噴射時間を適宜調整する。
- ③ 薬液に曝露後10～20分など一定時間経過後に全供試虫を回収し、餌と水を与え、所定の時間後致死率を求める。
- ④ 限定時間曝露試験法の場合は、10～60分間曝露した後に回収し、所定の時間後の致死数を観察する。

[備考]

- ① 床に敷く紙は、一実験ごとに新しいものに交換する。
- ② ここに記載した以外に一辺が60cm～1mの立方体(例：60cm×60cm×60cm=0.216 m³)の箱型装置を使用することもできる。
- ③ きわめて速効性の高いエアゾール剤の場合は、電磁式微量噴射装置を用いて0.3秒、0.5秒または1秒間等の噴射を適用する。この場合、噴射量を記録する。
- ④ 処理後の経過時間ごとにノックダウン率を求め、プロビット法によりKT₅₀値及びKT₉₀値を算出する。
- ⑤ ダニではノックダウン個体を判別するのが困難なので、ドライフィルム試験法と同様の観察で、一般的に24及び72時間後に致死数のみを数え、致死率を求める。
- ⑥ 致死の判定：2. 1. 1⑥参照

(4) ピート・グラディー試験法

[概要]

ピート・グラディー装置内に所定の数の供試虫を放ち、薬剤を噴射後、観察窓からノックダウン虫数を調べることによって効果を見る試験法である。米国で家庭用殺虫剤の効力試験法として開発されたもので、主にハエの試験に用いられるが、蚊でも準用できる。

[対象薬剤]

油剤、エアゾール剤

[対象虫]

ハエ成虫、蚊成虫

[装置]

ピート・グラディー装置は 6 フィート (182.9cm) 立方の、人が出入りできる金属製の箱であり、薬剤の噴射孔、換気装置、照明、観察窓が設けられている (図 10)。

[手順]

- ① 床に非光沢性の紙を敷く。
- ② 装置内に、ハエでは雌雄比を 1 にして供試する。蚊では雌のみを供試する。
- ③ 約 10 分経過後に供試エアゾール剤 $0.65g \pm 0.1g$ を噴射窓から噴射する。油剤の場合はアトマイザー (DeVilbiss Special Atomiser など) で 12mL を噴射する。
- ④ 噴射後 5 分、10 分、15 分あるいは KT_{50} 値が得られるような時間を 3 点ほど設定して、観察窓からノックダウン虫数を調べる。
- ⑤ 観察終了後直ちに換気を開始すると同時に、ノックダウン虫も含めて全ての供試虫を清潔な容器に回収し、水と餌を与えて飼育し、24 及び 72 時間後に致死数を数える。

[備考]

- ① 床に敷く紙は一実験ごとに新しいものと交換し、換気を十分に行う。
- ② 1 回の供試虫数はハエでは雌雄約 100 匹、蚊では雌 50 匹を原則とし、3 回以上の繰返しを行うことが望ましい。
- ③ エアゾール剤を一定量噴射するには、あらかじめ供試薬剤について、噴霧時間と噴射量の関係を測定しておき、所定量に相当する時間だけ噴射する。噴射後の減量から実噴射量を求めて記録する。
- ④ 観察時間内に供試虫のすべてがノックダウンしない場合があるので、供試虫を回収する際に逃亡しないように注意する。20 分以内に供試虫の回収を終了するようにする。
- ⑤ 速効性は経過時間に伴うノックダウン率から、また、致死効果は 24 時間及び 48 時間後の致死率から評価する。
- ⑥ 致死の判定: 2. 1. 1 ⑥参照

2. 1. 4 燻煙試験法

(1) 通気試験法

[概要]

上部が網蓋などによって通気される円筒内で、蚊取り剤に点火あるいは通電して、有効成分

を含んだ煙ないし気流をつくり、供試虫を曝露させて速効性を調べる試験法である。

[対象薬剤]

蚊取り線香、蚊取りマット、液体蚊取り

[対象虫]

蚊成虫

[装置] 通気式円筒装置 (図 1 1)

木枠の上に直径 5cm の円孔付きガラス板をのせ、その上に内径 20cm、高さ 43cm のガラス円筒 2 個と短いガラス円筒 2 個を順にのせる。各円筒はゴムパッキングを置いてサランネットで蓋をする。さらにその上に内径 20cm、高さ 20cm のガラス円筒をいずれもゴムパッキングを置いて 2 つ載せる。上から 2 つ目の短いガラス円筒は供試虫用とする。供試虫を入れるときは下部の蓋はサランネットでよいが、上蓋は規定の目 (48~65 メッシュ) の合織布を用いる。円筒、板、ポットはガラスの代わりに透明樹脂製でもよいが、洗浄後、薬剤が残る恐れがある素材は使用しない。

[手順]

- ① 下部のガラス円筒内底部中央 (E のガラス中央の円孔下部) に、準備した供試薬剤を設置し、着火もしくは通電する。
- ② その後、0.5 分、1.0 分、1.5 分、2.0 分、3.0 分のように、20 分間、時間の経過に伴うノックダウン虫数を観察する。
- ③ 曝露終了後、ただちに全供試虫を清潔な紙コップなどの容器に移して、脱脂綿に含ませた砂糖水を与えて、25℃前後で保存する
- ④ 24 時間及び 48 時間後にノックダウン虫数、死虫数を観察する。

[備考]

- ① 供試虫数は 10~20 匹とし、通常 3 回の繰り返しを行う。
- ② 経過時間に伴うノックダウン率から KT_{50} 値と KT_{90} 値を求める。
- ③ 致死の判定：2. 1. 1 ⑥参照

(2) 定量燻煙試験法

[概要]

密閉装置内に供試虫を放ち、この中に点火もしくは通電した蚊取り剤を入れて一定時間燻煙後とり除き、供試虫を曝露させて速効性を調べる試験方法である。

[対象薬剤]

蚊取り線香、蚊取りマット、液体蚊取り

[対象虫]

蚊成虫

[装置]

通気式円筒装置や、噴霧降下装置を用いる。後者の場合は、ゴムパッキングをはさんで、上下にガラス板を有する内径 20 cm、高さ 43 cm のガラス円筒を高さ 30 cm 程度の架台の上に置く。下方のガラス板は中央に径 5 cm の円孔のあるものを用意する。

[手順]

- ① 装置内に供試虫を放つ。
- ② 蚊取り線香は線香立てに水平にとりつけ、一端または両端に点火する。正常な燻煙状態になるまで、あらかじめ3分間ほど経過させた検体を、下方の円孔から装置内に入れる。
液体蚊取りや蚊取りマットでは、通電を開始してから30分程度経過した検体を、同様に円孔部より装置内に導入する。
- ③ 検体を装置内で密封のまま所定時間燻煙後、すばやく検体を取り除く。
- ④ 直ちに供試虫を導入して、その後の時間の経過に伴うノックダウン率を求める。
- ⑤ 一定時間後に全供試虫を清潔な容器に移して、水・餌を与え、24時間後又は48時間後に致死数を観察する。

[備考]

- ① 1回の試験の供試虫数は10~20匹とし、これを3回以上繰り返す。
- ② 線香では単位時間当りの燃焼量を調べて明記する。
- ③ 燻煙時間：線香の場合は、0.2gあるいは0.5gなど所定量の検体を秤取して、それを装置内で燃焼し尽くすまで密閉しておく方法もある。蚊取りマットや液体蚊取りの場合は通電時間を1分、2分間等を標準とするが、この時間は目的に応じて適宜変更できる。
- ④ 蚊取りマットや液体蚊取りは、通電の経過時間により揮散量が異なるので、通電開始後有効使用期間の初期、中期、後期など数回の時間帯について試験を行う。
- ⑤ 曝露時間を20分間程度にし、経過時間に伴うノックダウン率からKT₅₀値とKT₉₀値を求める。
- ⑥ 曝露終了後直ちに供試虫をすべて回収し、24~72時間後に致死率を求める。
- ⑦ 箱型装置を用いて、同様の試験を行うことができる。
- ⑧ 致死の判定：2. 1. 1⑥参照

2. 1. 5 培地混入試験法(1)

[概要]

ハエに対して実施する。幼虫の飼育培地の中に所定量の殺虫剤を処理し、その中に2~4日齢の幼虫を放ってそのまま飼育し、羽化率を調べて効果を判定する試験法である。この方法は食毒以外に接触毒の効果も加わり、総合的な評価となる。

[対象薬剤]

原体、乳剤、水和剤、油剤、粉剤など

[対象虫]

イエバエ幼虫など

[手順]

- ① 市販の粉末飼料、フスマ、水を1:1:2~2.5の比率で混合した培地50gを深型(腰高)シャーレなどに入れる。
- ② 原体はアセトンやエタノールで希釈し、数段階の濃度の薬液を準備する。乳剤や水和剤などは水、油剤などはケロシンなど、粉剤などはタルクなどの担体で希釈する。
- ③ 薬液1mLあるいは1gを前記の培地に加えてよく混合する。
- ④ 供試虫1群50匹をこのシャーレに放ち、木綿布で覆い、輪ゴムでとめる。

- ⑤ 通常 1 週間後に蛹化個体を取り出し、これを別の清潔な容器に移し、さらに 1 週間後に羽化数を観察して致死率を求める。

[備考]

- ① 無処理対照区を設け、その羽化率で供試薬剤の羽化率を補正する。幼虫から羽化までの観察を行うので、無処理対照区でも死虫が現れやすい。そのような場合は Abott の補正式により処理区の死虫率を補正する。
- ② IGR の試験では使用する幼虫の日齢は供試薬剤の作用性や目的に応じて選択する。供試虫のすべてが羽化または致死する時点まで飼育し、羽化阻害率(下式)を求める。

$$\text{羽化阻害率 (\%)} = \frac{(\text{処理区の羽化阻害率} - \text{対照区の羽化阻害率})}{(100\% - \text{対照区の羽化阻害率})} \times 100$$

- ③ ニクバエ幼虫など対象によっては、培地の組成を変える。
- ④ 培地量に対して幼虫数が少なくなるとカビによる影響を受けることがあるので注意する。
- ⑤ 蛹化状況は観察しにくい、必要がある場合には蛹化数、蛹化異常、幼虫死亡についても観察する。
- ⑥ 供試薬剤を培地に混入せず、表面に処理する方法もある。
- ⑦ 得られた結果は LC₅₀ 値や IC₅₀ 値 (50%羽化抑制値) として示す。

2. 1. 6 培地混入試験法 (2)

[概要]

主として屋内塵性ダニ類に対して実施する。殺虫剤を所定の濃度混合した培地でダニを飼育し、一定期間後の繁殖状況を無処理の培地で飼育した場合と比較検討する試験法である。したがって、短期的な薬剤の致死効果というよりも、長期間にわたる個体群の増殖に与える影響を見る試験である。観察に時間がかかるという欠点があるが、比較的安定した結果が得られる。ダニは微小なため他の昆虫類のような微量滴下試験を行いにくく、本法は屋内塵性ダニ類に対する薬剤の基礎的な評価を行う上で重要な方法の一つと考えてよい。

[対象薬剤]

原体、製剤

[対象虫]

ヒョウヒダニ、ケナガコナダニなど屋内塵性ダニ類

[手順]

- ① 市販の昆虫飼育用粉末飼料を乾熱乾燥した後、水を加えてケナガコナダニ用には 15%、ヒョウヒダニ用には 12%に含水量を調整して飼育培地を用意する。
- ② アセトンに溶解させた原体や水などで希釈した製剤を、培地重量に対して所定濃度になるように入れてよく混合し、これを深型 (腰高) シャーレやサンプル瓶にとる。
- ③ ダニのよく繁殖した培地から、ダニを培地ごと少量とって薬剤を処理した培地に入れ、軽く混合する。
- ④ これらが入ったシャーレや瓶は、ポリエチレンラップ等で蓋をして針先でダニが逃げ出さない程度の小さな空気穴をあけ、ヒョウヒダニでは 60~80%RH、ケナガコナダニでは 75

～90%の環境下に保存する。

- ⑤ 一定期間後、処理した培地の一部または全部をとり、サンプリング法、視野法、飽和食塩水浮遊法などにより生ダニ数を観察する。
- ⑥ 別に薬剤を処理しない無処理対照区を設け、両者の生ダニ数の差から増殖抑制率を算出する。

[備考]

- ① 培地に使用する飼料はダニが生息していることがあること、含水量が一定していないことなどの理由で、供試前に乾熱乾燥してから含水量を調整して供試する。
- ② 培地量は5g～50gを標準にする。
- ③ 投入ダニ数の目安は、培地1g中、ケナガコナダニでは100～200匹、ヒョウヒダニでは200～500匹とする。
- ④ 混合する薬液量は培地重量の1%程度を目安にする。
- ⑤ 観察はケナガコナダニでは4週まで、ヒョウヒダニでは6～8週まで数回行う。この間、ヒョウヒダニでは週1回培地を攪拌した方がよい。ダニ数が少なくなると、カビが生えたり培地が固化したりして影響を受けるので注意する。
- ⑥ 防虫紙の効力評価を本法で行う場合、紙を1cm角に切り、これを培地50gあたり50枚、100枚、200枚のように入れて混和し、試験を行う。
- ⑦ ダニの投入は、培地に混合した溶剤が十分に揮散してから行う。

[ダニの計数法]

① サンプリング法

培地をよく攪拌して100mg程度を精秤してとり、これを実体顕微鏡下で観察し、有柄針等で生ダニを1匹ずつ除去しながら全数を数える。ただし、ダニ数が著しく多い場合には、さらにこれを同質の培地で一定倍率に希釈してから、同様の方法で観察してもよい。この場合、観察で得られた数に希釈倍率をかけて、もとの値にする。

② 視野法

粉末培地をよく攪拌してシャーレなどの容器の底に広げ、直接、実体顕微鏡下(×20)で、一つの視野内に見える生ダニ数を数える。視野を変えるごとに培地を攪拌し、一つの観察あたり6視野を見る。

③ 飽和食塩水浮遊法

適量の培地(通常0.05～0.5g程度)をとり出してワイルドマンフラスコの中に入れ、飽和食塩水を用いてダニを浮遊させ、ダニが浮遊している上層の水を吸引装置をつけた濾紙上に移し、ろ過する。観察がし易いように、濾紙を0.1%メチレンブルー水溶液で染色した後、実体顕微鏡(×20)を用いて生ダニ数を数える。浮遊時間は原則として10分とする。計数は一視野あたり3回の繰り返しを行う。

2. 1. 7 薬液浸漬試験法

[概要]

単に浸漬試験法と呼ばれているものである。供試薬剤の希釈液中に蚊の幼虫を放ち、24時間後の致死数を観察する。通常、乳剤及び水和剤の試験に適用するが、この方法は原体の効力

試験にも利用することもできる。この場合は、原体を溶剤に溶解させたものを水中に分散させて適用する。

[対象薬剤]

原体、乳剤、水和剤、懸濁剤など

[対象虫]

蚊幼虫

[手順]

- ① 原体はエタノールで溶解（溶解しにくい場合はアセトンに懸濁）、製剤は水で所定濃度に希釈して、5～6段階の薬液をつくる。希釈を必要としない粉剤や粒剤ではそのまま使用するので、量を変えて段階を設定する。
- ② 原体では、エタノールの最終濃度が 0.5% (v/v) となるように、まず供試虫 20～50 匹を 199 mL の水の入った容器に放ち、次に原体のエタノール希釈液 1 mL を加え攪拌する。
- ③ 24 時間後（及び必要に応じ 48 時間後）の致死数を観察し、致死率を求める。IGR の場合は 1～2 週後の羽化阻害率を求める。

[備考]

- ① 希釈に使用する水は、蒸留水、純水、1 日以上汲み置いた水道水等を用い、塩素が含まれる汲みたての水道水は使わない。
- ② 粉剤や粒剤では 250～500mL 容量のビーカーなど深めの容器を使用するとよい。
- ③ 幼虫はあらかじめ水につけた茶こしの中に駒込ピペットで移す。所定数茶こしの中に入れたら、さっと水を切って、供試する容器に素早く移す。
- ④ 生死の観察にあたっては、器底に沈み、浮上できないものは死虫に含める。
- ⑤ IGR を用いる試験では供試虫の発育段階を正確に揃える。例えばキチン合成阻害剤では 2 齢、幼若ホルモン様薬剤では蛹になる直前の個体を使用するのがよい。
- ⑥ IGR 剤以外は、24 時間後に蛹化していたものは供試虫数から除外して死虫率を算出する。IGR 剤は、全供試虫が死亡するか羽化まで飼育して羽化阻害率を求める。
- ⑦ 残効性の試験では、所定の試験調製液を室温あるいは恒温室に保存し、所定期間ごとに上記の方式に準じて残留効果を調べる。この場合、たとえば 24 時間の浸漬で 90% 以上の効果が得られる持続期間、日数などを求めて評価する。この場合に汚水を用いて調製液を作り試験すると実用効果の推定に役立つ。

2. 1. 8 薬液継続接触試験法

[概要]

幼虫がわずかに水に浸るような場所に生息するハエ種に対して適用できる試験法である。

一定の濃度の薬剤を用い、浸漬時間を変えて 3 段階以上に調製した薬液シリーズで、短時間浸漬を行う場合（薬液短時間接触法）と、浸漬時間を一定とし数段階の薬液を適用する場合（薬液継続接触法）とがある。短時間浸漬を行う場合、浸漬を終えた供試虫は、水洗してからそのまま飼育し、一定時間後に致死率を調べる。前者の場合は供試薬量における 50% 致死浸漬時間、後者では 50% 致死濃度が求められる。ここでは、薬液継続接触法について述べる。

[対象薬剤]

原体、乳剤、水和剤、懸濁剤など

[対象虫]

イエバエ、ニクバエ幼虫など

[手順]

- ① 原体は 10%エタノール液に溶解するか、試験乳剤を調製して、これをもとに薬液をつくる。製剤は水で所定濃度に希釈し、5~6段階の濃度の薬液を作る。
- ② 各希釈液 3~5mL を直径 9 cm の深型（腰高）シャーレにとる。
- ③ 終齢後期の供試虫の 20~30 匹をその中に入れ、シャーレを金網等で覆い、輪ゴムで止める。
- ④ そのシャーレを、わずかに水を張った容器等に入れ、湿度環境を 90%以上に保ってそのまま保存する。
- ⑤ 24 時間及び 48 時間後の致死数を観察する。48 時間後を標準判定時間とし、その後、普通の湿度環境に移して保存し、羽化まで観察する。
- ⑥ IGR を検体とする場合、途中の致死は観察せず、全供試虫が死亡するか、羽化するまで保存して観察し、羽化阻害率を求める。

[備考]

- ① 供試虫を薬液に比較的長時間継続的に接触させるので、薬液層の深さが問題となり、容器と供試液量を標準化させる必要がある。供試虫は這い上がる性質があるので、少ない液量で実施する関係上、シャーレの上部を吸水性の高い布地で覆うと、供試虫に付着して運ばれた薬液がその布地に吸着され、極端な場合にはシャーレ内の薬液がほとんど見られなくなり、結果に大きく影響してくることになるので、蓋には吸水性のない材質を選んで使い、薬液の蒸散を防ぐために試験を通じて容器内を高湿度に保つ必要がある。
- ② 得られた結果から LC₅₀ 値や LC₉₀ 値（IGR では IC₅₀ 値や IC₉₀ 値）を計算すると、他薬剤との比較が容易である。
- ③ 致死の判定：2. 1. 1.⑥参照

2. 1. 9 散粉降下試験法

[概要]

あらかじめ供試虫を放ったガラス円筒の下部の小孔から、一定量の粉剤を所定の圧力で吹き上げて虫体に付着させ、供試虫の経時的落下状況を調べ速効性などの判定する試験法である。

[対象薬剤]

粉剤

[対象虫]

イエバエ成虫、ゴキブリなど

[装置]

本体：主要部分は噴霧降下試験装置と同じである。

図 12 の右に示すように上下に直径 27 cm のガラス製の板 B、C を有する内径 20cm、高さ 43cm のガラス円筒 A を、高さ 30cm 程度の木製の架台 F の上に置いたものである。上方から供試虫を導入する。その後、直径 5cm の円孔を持つ上方の円盤の穴に栓で蓋をしておく。下方の円板の中央にあけられた直径 5cm の円孔は、粉剤を噴出して円筒内の供試虫を処理するためのもので、散粉時以外はゴム栓 D でふさいしておく。

散粉用漏斗：図の左は、粉剤を入れて噴出させるための漏斗で、口径 3.5 cm である。なお、1cm ずつ外方にひろがって、下方板の円孔（D）に、16 メッシュの金網 G を間において密着

し、試験前の粉剤の散失を防ぐようになっている。金網は木製の枠 H で、漏斗にかぶせるように縁どりがある。中央の玉 I は、粉剤がこぼれ落ちないためのものである。漏斗の下方はエアコンプレッサーに連結する。

エアコンプレッサー：1.5kg/cm²程度の圧力調整装置のついたもの。

[手順]

- ① 円筒内に供試虫を導入する。
- ② 粉剤 100mg を漏斗にとり、下方の円板のゴム栓をはずして円孔に漏斗を密着保持する。
- ③ エアコンプレッサーから約 3 秒間送風して、粉剤を円筒内に噴出させる。
- ④ 噴出終了と同時にゴム栓をする。
- ⑤ 時間経過に伴うノックダウン虫数を観察する。
- ⑥ ノックダウン虫の観察終了後、供試虫を清潔な容器に移し、イエバエに対しては 24 時間及び 48 時間後、ゴキブリに対しては 48 時間及び 72 時間後に致死数を観察する。

[備考]

- ① ピレスロイドのように速効性薬剤にあつては、供試虫数は 10～15 匹が適当であり、3 回以上の繰り返しを行う。
- ② 低薬量を処理するときには、散布量を変えることが難しいので、効果に影響を与えない増量剤で希釈し 100mg を散布する。
- ③ 噴出圧力は約 1.5kg/cm²とする。
- ④ KT₅₀ 値は時間の経過に伴うノックダウン率から、また、LD₅₀ 値は致死率から求める。
- ⑤ 農業害虫用の試験で用いられる散粉器（ベルジャーダスター等）も使用することができる。
- ⑥ 致死の判定：2. 1. 1⑥参照。

2. 1. 10 食毒試験法

[概要]

適当な大きさの容器に供試虫を放ち、検体を容器内に配置して自由に摂食させ、所定時間後の致死数によって効果を判定する試験法である。特にゴキブリを対象とした毒餌剤の場合は、検体のみを与えた単独区（強制摂食法）のほか、検体と同時に通常の飼料を与えた併置区を設けて喫食嗜好性を比較調査する試験（任意摂食法）も必要である。効果が食毒と接触毒の複合作用として現れがちなので、餌としてのみの効果が評価できるような方法を設定して実施する。

[対象薬剤]

毒餌製剤

[対象虫]

ゴキブリ、ハエ成虫

(1) ゴキブリに対する試験

[試験容器]

逃亡防止用に内壁にバターなどを薄く塗った、底面が 100cm x 100cm 程度の広さを持った容器を用意する。

[手順]

- ① 容器は小さなサイズでも良いが、狭いため供試虫が薬剤に直接接触する機会が多くなりすぎない程度や、検体を分割しなければならないといった状況が生じないように、適当な広さを確保する。
- ② 容器内にゴキブリのシェルター（ベニヤ板などを隙間をあけて重ねたものなど）を配置す

る。

- ③ 容器内に 10～50 匹の虫を放し、餌と水を与えて馴化させる。
- ④ 毒餌を給水用の水とともに試験容器内に入れて、7～10 日間所定日数毎に致死数を観察する。

【備考】

- ① 容器の大きさは供試虫の種類、齢期などによって調節する。深さはゴキブリが出ない程度で、水の交換など扱い易い深さとする。
- ② 試験は毒餌単独で設置する場合（強制摂食法）と毒餌を無毒餌と併置する場合（任意摂食法）の両方で試験する。
- ③ 対照の無毒餌には飼育用の餌（実験動物用固形飼料など）を用いる。
- ④ 観察は全供試虫が死亡するまで行うのがよいが、一般には毒餌配置後 1 週間後あるいは供試虫の 90%以上が死亡するまで観察する。
- ⑤ 試験は 3 回以上の繰り返しを行う。
- ⑥ 死虫率の経日変化を求め対照薬剤と比較する。評価は LT_{50} 値（50%致死日数）で行う。
- ⑦ 供試した毒餌の摂取量を経日的に測定し、喫食の程度を考察するのが望ましいが、測定にあたっては吸湿補正の必要があるので、同じ温・湿度条件下で保管した毒餌で補正する。

（2）イエバエに対する試験

【対象薬剤】

毒餌製剤

【容器】

20cm 立法以上の金網やナイロンメッシュのケージ、または箱形チャンバーなどを用いる。

【手順】

- ① ケージまたはチャンバー内に毒餌、給水用の水を配置した後、成虫を 20～30 匹放つ。
- ② 経時的なノックダウン虫数及び 24 時間後の致死虫数を観察して、致死率を求める。

【備考】

- ① 使用する容器は、用法用量の設定を行う目的も持っているもので、小さくなりすぎないように製剤に見合った大きさを確保する。
- ② 強制摂食法と任意摂食法の両法で実施する。
- ③ 対照無毒餌にはザラメや、粉ミルクと砂糖を混合した餌などを用いる。
- ④ イエバエを対象としたいわゆる誘引殺虫剤と称されている毒餌剤の場合は、時間の経過に伴う誘殺虫数を調べる。
- ⑤ 致死率の経時変化から LT_{50} 値を求める。

2. 1. 11 経口投与試験法

【概要】

砂糖水に溶解させた原体や製剤を、1 匹ごとにマイクロシリンジを用いて経口投与して、経口毒としての効果を評価する試験法である。

【対象薬剤】

原体

【対象虫】

ハエ成虫、ゴキブリなど

【使用装置】

微量滴下試験で用いるのと同じ装置を用いる。

【手順】

- ① 供試虫はゴキブリの場合は投与前半日～1日間、イエバエの場合は数時間～半日間、水も餌も与えないでおく。
- ② 原体は所定濃度になるよう、超音波破砕機などで5%砂糖水に溶解（または十分に懸濁）させて、投与する薬液を準備する。
- ③ 小管瓶に供試虫を1匹ずつ入れ、ガーゼで蓋をする。
- ④ マイクロシリンジの先に取り付けた注射針を、ガーゼの隙間から挿入して薬液を出し、供試虫に自発的に吸飲させる。
- ⑤ 吸飲した個体は投与群ごとにまとめて清潔な容器に入れ、餌と水を与えて24時間後及び48時間後に致死数を観察して、致死率を求める。

【備考】

- ① 小管瓶はイエバエでは3mL程度の容量のものがよいが、供試虫に合わせて適当な大きさのものを使用してよい。
- ② 薬液を出しても自発的に飲まない個体があるので、あらかじめ供試虫は多めに準備し、吸飲した個体のみで評価する。
- ③ 吸飲させる薬液量はハエでは0.2～1 μ L、ゴキブリでは1～2 μ Lとする。
- ④ 薬液が口器以外の虫体に付着しないよう注意する。

2. 1. 12 忌避試験法

(1) 吸血害虫に対する試験法

【概要】

マウスを吸血源として利用する。マウスを入れた金網に薬液を処理して忌避効果をみる試験法である。

【対象薬剤】

原体、製剤

【対象虫】

アカイエカ、ヒトスジシマカなど

【手順】

- ① 金網製、合繊製あるいは寒冷紗を張ったケージを用意する。
- ② 2～5%の砂糖水を用意し、ケージの中に供試虫を放す。
- ③ 金網でマウスを固定し、体表全面に均一になるよう薬剤0.5～1.0mLを約10cmはなれたところから噴霧処理する。
- ④ 薬剤を処理してから風乾後、ケージの中に吊し、マウス体上への誘引虫数を観察する。
- ⑤ その後2時間おきに3回以上、吸血蚊数を観察する。
- ⑥ 上記手順を無処理マウスについても実施する。
- ⑦ 試験終了後冷凍などによって殺虫を行い、供試虫をろ紙上でつぶして、吸血、無吸血を判定し吸血阻害率を求める。

【備考】

- ① ケージの大きさは30×30×30cm程度以上が良い。
- ② 供試虫は吸血力の高まったステージの未吸血の雌成虫50～100匹を用いる。

- ③ 試験は、マウスを固定した金網のみにピペットなどで薬剤の 0.3~1mL を滴下して行う場合もあるが、とくにヒトスジシマカを用いる場合は、薬剤の処理むらがあると、その場所から吸血するので、十分注意して表裏にくまなく均一に処理する。
- ④ 1 ケージ当り 2 匹のマウスを用いるのが望ましい。
- ⑤ 無処理対照区も設ける。
- ⑥ 十分に吸血した個体以外は、ケージからの視察法による判別は困難なので、最終的には前項の手順⑦の方法で確認する。
- ⑦ 経過時間にもともなう忌避率（次式）を求める。

$$\text{忌避率 (\%)} = \frac{(\text{無処理区の吸血蚊数} - \text{処理区の吸血蚊数})}{\text{無処理区の吸血蚊数}} \times 100$$

- ⑧ ヒトスジシマカとアカイエカは吸血活動の時間帯が異なるので、適した時間帯を選択すること。
- ⑨ 24 時間後に吸血蚊がほとんど得られない時は、観察時間を 48 時間後などに延長して再度観察する。

(2) ゴキブリに対する試験法

[概要]

ゴキブリの潜み場所に忌避剤を処理してその効果を確認するための試験法である。

薬剤処理区単独で試験する方法と、無処理区と薬剤処理区を同じ容器の中で試験する方法がある。単独配置で十分な効果が認められない場合には、併置処理で評価する意味は薄いですが、単独処理で効果が認められた場合には、実用性を予測するために併置処理の評価は欠かせない。

[対象薬剤]

原体、製剤

[対象虫]

ゴキブリ

[容器]

衣装箱など

[手順]

- ① ゴキブリの逃亡を防ぐため、容器内壁上面にワセリンやバターなどを薄く塗布する。
- ② シェルター（潜み場所）を用意する。
- ③ シャーレに脱脂綿に浸した水を入れて、餌と共に容器内に配置する。
- ④ 用意した潜み場所に、供試薬剤の所定量を均等に処理し、風乾する。併置する場合には 2 つを処理区、残りの 2 つを無処理区とする。
- ⑤ 容器内床面の 4 方向に潜み場所を配置する。
- ⑥ 供試虫を容器内に放す。
- ⑦ 1 日後に各潜み場所内にいるゴキブリ数を数えて、忌避率を求める。

[備考]

- ① 容器は、床面積 100×100 cm 以上など大きなものでもよい。
- ② 潜み場所は、厚紙の小箱の両端に出入り口を開けたもの、15 × 3.5 cm 程度の大きさに切

ったベニヤ板 3 枚で中空の三角柱としたもの、又は 10cm×10cm 程度のベニヤ板 2 枚を 1cm 程度の隙間を設けて重ねたものなどを用いる。

- ③ 潜み場所は薬剤が処理されていなくても配置位置による影響が出やすいので、潜み場所は 1 日おきに配置位置を交換して観察する。なお、潜み場所は常に新しいものを使う。
- ④ 供試虫は 100 匹を用いる。雌雄どちらか、または両方を用いて良いが、雌雄の数は明らかにしておく。
- ⑤ 試験は 3 回以上の繰り返しを行う。
- ⑥ 夜間や暗い条件では、ゴキブリは潜伏場所から出て活動するので、観察時間はシェルターへの潜伏時間帯の午前から日中になるように試験設計をする。
- ⑦ 忌避の判定は次式によって忌避率を求めて行う。

$$\text{忌避率 (\%)} = \frac{\text{無処理区の数} - \text{処理区の数}}{\text{無処理区の数}} \times 100$$

- ⑧ 残効性を見る場合には、薬剤処理した潜み場所を室温で保存し、一定期間経過ごとに、同様の方法で試験を繰り返す。

(* ツツガムシに対する試験法については、方法がないわけではないが、確立しているとはいえないので、現時点で標準試験法として提案するのは適当ではないため、記載しないこととした。)