

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

農薬等の一律基準と加工食品基準及び急性暴露評価に関する研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 国立医薬品食品衛生研究所食品部 米谷 民雄

平成19（2007）年4月

目 次

I. 総括研究報告書

- 農薬等の一律基準と加工食品基準及び急性暴露評価に関する研究 1
米谷 民雄

II. 分担研究報告書

1. GC/MS による加工食品中の残留農薬分析法の開発 13
根本 了
2. LC/MS による加工食品中の残留農薬分析法の開発 35
寺田久屋
3. 残留農薬等の急性参照用量に関する調査研究 51
菅野 純
4. 食物摂取量調査から見た残留農薬等の暴露評価の精密化手法の検討及び
残留農薬等の短期暴露評価法の検討 57
吉池 信男

I. 総括研究報告書

農薬等の一律基準と加工食品基準及び急性暴露評価に関する研究

主任研究者 米谷 民雄

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
総括研究報告書

農薬等の一律基準と加工食品基準及び急性暴露評価に関する研究

主任研究者 米谷民雄 国立医薬品食品衛生研究所 食品部長

研究要旨：

①加工食品中の残留農薬分析の一層の迅速化・効率化を図るために、次の新規技術の活用について検討した。i) stir bar sorptive extraction法(SBSE法)を用いる果実果汁中の残留農薬GC/MSスクリーニング分析法について検討しその適用範囲を明らかにした。ii) 測定時間の短縮に有効なLow-pressure GC (LP-GC) 測定の最適条件について検討するとともに、ガスクロマトグラフィー・タンデム型質量分析法(GC/MS/MS法)の残留農薬分析への適用を図るためにMS/MS測定条件の最適化を行い、両手法を組み合わせたLP-GC/MS/MS分析法を開発した。iii) 超臨界流体抽出法(SFE法)を用いる製粉化穀類中の残留農薬スクリーニング分析法について検討しその適用範囲を明らかにした。以上の検討により、これらの新規技術が加工食品中の残留農薬分析の迅速化・効率化に有効であること及びその適用範囲を明らかにすることができた。

②LC/MSによる加工食品中の残留農薬分析法を開発するために、水系ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)による試料精製法と液体クロマトグラフ/タンデム型質量分析計(LC/MS/MS)を組み合わせることにより、乾燥果実及び香辛料中のカーバメート系農薬29種類及び殺菌剤3種類の一斉分析法を開発した。また、高速溶媒抽出装置を用いた抽出法についても検討した。試料に0.1 mg/kg及び0.01 mg/kgとなるように標準品を添加したとき、試行の70%において回収率60-120%、変動係数25%未満(n=5)を達成した。さらに本法が味噌、しょう油など夾雑物を多量に含有する加工食品にも適用できることを確認した。

③残留農薬の急性毒性評価をNOAELを指標に行う手法を確立する一貫として、いくつかの有機リン系農薬の急性参照用量(ARFD)設定の JMPR、EPA、EU、オーストラリア間の比較を実施し、相違点について整理した。

④2006年10月に公表された最新の国民健康・栄養調査データを加えて、2001～04年分合わせたデータセットを整えた。短期暴露評価の目的に最も適うように、加工食品等を農薬が使用される個々の農作物に分解するとともに、コモディティの大きさ、バルク等に応じて分類整理した。農薬としてEndosulfanとFenamiphosを選び、各農作物の残留濃度データを抽出した。これらのデータベースに基づき、モンテカルロ法によるリスクシミュレーションツール@RISKを使用して、シミュレーションを試行し、わが国においてもこのような手法が適用できることを確認した。

分担研究者（番号は以下の研究内容と対応している）

- ①根本 了（国立医薬品食品衛生研究所）
- ②寺田久屋（名古屋市衛生研究所）
- ③菅野 純（国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター）
- ④吉池信男（(独)国立健康・栄養研究所）

研究協力者

- ②丸山吉正（名古屋市衛生研究所）
加藤陽康（名古屋市衛生研究所）
岡 尚男（金城学院大学薬学部）
- ③高木篤也（国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター）
- ④山田友紀子（農林水産省消費・安全局）

A. 研究目的

平成15年に食品衛生法が改正され、残留農薬等にポジティブリスト制度が導入されることになった。今回のポジティブリスト制度では、加工食品も対象であるため、加工程度が低くかつ流通量が多い食品について、その分析法を開発することを企図した。一方、残留農薬の暴露評価を行うにあたり、急性毒性評価手法を確立することが課題となっており、コーデックスにおいても議論されている。手法の確立にあたっては、国際的に提案されている手法を参考にしつつ、急性参照用量（ARFD）の設定、個別農作物についてのデータ収集、統計学的手法の検討などが必要である。そこで、それらについて情報を収集するとともに、特定の農作物については圃場での作物残留試験を実施することにした。

B. 研究方法

①GC/MSによる加工食品中の残留農薬分析法の開発では、平成18年度は以下の3項目について検討した。(i) SBSE法を用いる果実果汁中の残留農薬GC/MSスクリーニング分析法の検討。(ii) LP-GC法を用いたGC/MS/MS分析法

(LP-GC/MS/MS)の検討。(iii) SFE法を用いる製粉化穀類中の残留農薬スクリーニング分析法の検討。(i)については、試料の前処理法及びSBSE条件について検討し、得られた方法を用いて、農薬の果実果汁から添加回収実験を行った。(ii)については、LP-GC条件及びMS/MS測定条件の最適化を行い、両手法を組み合わせたLP-GC/MS/MS分析法を開発した。(iii)については、SFE法と開発したLP-GC/MS/MS分析法を用いて、小麦全粒粉からの農薬の添加回収実験を行った。

②LC/MSによる加工食品中の残留農薬分析法の開発では、平成18年度は、試験対象食品として夾雑物を多量に含有する乾燥果実及び香辛料を選択し、LC/MS/MSを用いた残留農薬の一斉分析法を確立することを目的とした。試料精製法として、極性の高い農薬に対して効率の良い効果が期待できる水系GPCを検討した。さらに、高速溶媒抽出装置を利用した自動抽出法についても検討し、カーバメート系農薬29種類及び殺菌剤3種類の一斉分析法の開発を試みた。高速溶媒抽出装置条件の検討では加熱温度100℃、圧力1500psiの条件を採用したが、微粉末状の香辛料（セージ）に適用したところ、装置の配管中に試料が漏れて故障を生じたため、微粉末試料については、超音波水浴中でアセトニトリル抽出した。

③残留農薬等の急性参照用量に関する調

査研究では、JMPRIにおけるARFD設定のガイダンス及び米国EPAのARFD設定のガイダンスを中心に参考資料を前年度に引き続いて検索した。また、新たに、いくつかの農薬のARFD設定の国際間の比較を実施し、相違点について考察した。

④食物摂取量調査から見た残留農薬等の暴露評価の精密化手法の検討及び残留農薬等の短期暴露評価法の検討では、2つの研究を行った。

i) 国民健康・栄養調査データの加工・解析による曝露評価データベースの作成

食品の摂取量情報に関しては、最新の国民健康・栄養調査データを加え、4年分を合わせたデータセットを整え、加工食品等を農薬が使用される個々の農作物に分解し、分類整理する作業も合わせ実施した。対象食品については、摂取パターン（コモディティの大きさ、バルク、加工・調理の形態等）を勘案しながら、125の食品群に分類をした。

ii) リスクシミュレーションの試行による急性参照用量を規準とするMRLの適正さの確認

EndosulfanとFenamiphosについて、JMPRIに提出された作物残留試験の結果の中から、当該国の使用基準（GAP）に適合するものを選び、各々の休薬期間（PHI）における残留濃度を特定した。さらに、Highest residue（HR）を決定し、JMPRIが活用している一点推定法の応用による摂取推定量と、残留濃度とわが国の国民健康・栄養調査による125食品群の摂取量データを用いた確率論的推定法による97.5パーセントイル摂取推定量を比較・検討した。シミュレーションには、@Risk version 4.5（Parisade Co, USA）を使用した。

C. 研究結果

① (i) SBSE法の試料前処理法として、果実果汁を水で希釈してそのまま用いる方法と、アセトニトリル抽出した抽出液を水で希釈してから用いる方法について検討したところ、アセトニトリル抽出液を用いてSBSEを行う方法の方が高回収率であり、精度の良い結果が得られた。(ii) 測定感度及び精度に影響を与えるLP-GC条件として、キャリアガス流速、昇温速度及び試料注入量について検討し、最適な条件としてそれぞれ1.3 mL/min、30°C/min及び2~6 μLが得られた。また、MS/MS測定条件の最適化について検討し、最適な条件として、検出器電圧：チューニング時の値に400 Vを加えた値、SCAN time：0.4 sec/scan、フィラメント電流：50 μA、アルゴンガス圧：2 mTorrが得られた。(iii) SFE法を用いて187農薬について小麦全粒粉からの添加回収実験を行ったところ、一部の分解しやすい農薬等を除き、大部分の農薬については70~120%の良好な回収率が得られ、回収率のRSDの平均値は5.6%であり精度の良い結果が得られた。

② Fig. 1に分析操作のフローシートを示す。アセトニトリル抽出液を直接注入できる水系GPCカラムを検討した結果、Shodex Asahipak GF-310 HQが、目的に適った分離を示すことが判明した。移動相にアセトニトリルを用いた場合、各農薬はカルベンダジム、クロルプロファム、プロパモカルブ、フェンメディファムを除いて13~18分（容量3.5mL）に溶出した。市販の乾燥果実及び香辛料について添加回収実験（n=5）を、添加量0.1 mg/kgと一律基準値0.01mg/kgで実施した。0.1 mg/kgでは、回収率70-110%、変動係数15%未満の条件を満たすものは全体の61%、0.01

mg/kgでは、回収率60-120%、変動係数25%未満の条件を満たすものは全体の70%であった (Table 1)。さらに、味噌、しょう油に各農薬を0.01mg/kg添加して回収試験

(n=5)を行ったところ、分析対象とした32農薬のうち味噌では23農薬、しょう油では21農薬が回収率60-120%、変動係数25%未満で定量することができた (Table 2)。

③残留農薬等の急性参照用量に関する調査研究では、今年度も引き続き、JMPRをはじめ、ARFD設定の新たなガイダンスを検索したが、新たな報告は無かった。有機リン剤のクロルピリホス、フェナミホス、フェンチオン、及びホスメットメタミドホスについてARFD設定の比較を行った結果、ヒトデータの使用、血漿コリンエステラーゼ値等の扱い、安全係数の設定について、国・機関に明らかな相違が見られた。

④i) 国民健康・栄養調査データの加工・解析による暴露評価データベースの作成

125の食品グループについて、N=43,839 (人)の1日摂取量データにより構成されるデータベースを作成した。

ii) リスクシミュレーションの試行による急性参照用量を規準とするMRLの適正さの確認

残留農薬濃度については、JMPRでARFDが設定されている農薬を選び、当該農薬をGAPの最大条件の下で施用した場合の残留濃度のデータを抽出し、モンテカルロ法によるリスクシミュレーションツール@RISKを使用して、シミュレーションを試行し、わが国においてもこのような手法が適用できることを確認した。

<Endosulfan>

2006年JMPRの評価では、一般人の短期摂取

推定量がブロッコリとセロリにおいて急性参照用量 (20 μ g/kg bw)の210及び120%で、6歳以下の子供の場合、ブロッコリ、セロリ、チェリー、トマトにおいて、390、270、120、110%であった。そこで、ブロッコリについて、短期摂取量を推定した。食品の摂取量を対数正規分布に近似した場合の97.5パーセンタイル値は2.57 g/kg bw/dayであり、平均的な一人当たりの摂取量がわずかにユニット重量より少ない。一点推定法による短期摂取量推定値は、 $2.57 \times 2.40 \times 3 = 18.5 \mu$ g/kg bw/dayであった。一方、残留濃度も対数正規分布に近似させた場合、予想通り一点推定法より小さな値が得られた。

この例のように残留濃度の数値が20しかない場合、きわめて高いパーセンタイル値を出すのは適切とはいえない。さらに、対数正規分布はテールが長い傾向を示すので、きわめて高いパーセンタイル値では、非現実的に高い数値が出る可能性もある。この場合、変動係数3を使用すると、99パーセンタイル値が16.1となり、一点推計法に近い値となった。このことから、わが国では、ブロッコリ摂取によるEndosulfanの摂取量が急性毒性を上回る可能性は否定できないと考えられた。

<Fenamiphos>

2006年JMPRはいくつかの新しい作物残留試験データを得て、再評価を行った。そのデータを活用してピーマンとトマトからの短期摂取量を推定した。ピーマンについては、食品の摂取量を対数正規分布に近似した場合の97.5パーセンタイル値は1.43 g/kg bw/dayであり、平均的な一人当たりの摂取量はユニット重量より多かった。一点推定法による短期摂取量推定値は、 $40/53.6 \times 0.35 \times 3 + (1.43 - 40/53.6) \times 0.35 = 1.02 \mu$ g/kg bw/day

であった。一方、残留濃度も対数正規分布と近似させた場合、予想に反して、一点推定法より大きな値が得られた。この場合、変動係数3を使用すると、99パーセンタイル値が5.85となり、一点推計法よりはるかに大きい値となった。

トマトについては、食品摂取量を対数正規分布に近似した場合の97.5パーセンタイル値は3.90 g/kg bw/dayであり、平均的な一人当たりの消費量がわずかにユニット重量より多かった。一点推定法による短期摂取量推定値は、

$150/53.6 * 0.27 * 3 + (3.90 - 150/53.6) * 0.27 = 2.57 \mu\text{g/kg bw/day}$ であった。一方、残留濃度を指数分布に近似させると、やはり、一点推定法より小さな値が得られた。この場合も、変動係数3を使用すると、99パーセンタイル値が2.97となり、一点推計法に近い値となった。

D. 考察

① (i) 果実果汁に対してSBSE法を適用する場合には、水で希釈しただけでは食品マトリックスの影響により試料溶液と攪拌子の間の分配が阻害されるため、試料のアセトニトリル抽出液を用いると良いことが分かった。得られた方法を用いてもLog Ko/wが1~4付近の農薬は回収率が理論値を下回っており、更にSBSE条件の改善が必要と思われる。

(ii) LP-GC測定は、従来のキャピラリーカラムを用いた測定法に比べ分離能はやや低下するものの、約半分の時間で測定が可能であり、スクリーニング分析に適した方法であると思われる。また、MS/MS条件の検討から、測定ノイズが発生しやすいプリカーサーイオンとプロダクトイオンの組合せ(MRM条件)

があることがわかった。MRM条件として、測定ノイズが発生しにくい条件を選択すればより高感度化が可能と思われる。MRM条件については、今後更に高感度で夾雑成分の影響を受けにくい、食品中の残留農薬分析に適した条件を検討する必要がある。(iii) SFE法で抽出しLP-GC/MS/MSで測定する方法は、従来の溶媒抽出とキャピラリーカラム-GC/MSを用いる方法と比較して、分析時間を約半分短縮でき、操作も簡略化された。また、SFEの間は別の作業が可能であり非常に効率的であった。

②LC/MS/MSによる残留農薬の一斉分析のための試料精製法として、水系GPCを応用した。試料調製から分析結果を得るまでの所要時間は約90分で、その大部分を自動化することが可能であった。

③ARFD設定法の国際間の比較において、エンドポイントとなる試験の選択法に差が見られた。また、安全係数の考え方については、JMPRIは通常用いられる安全係数100を、場合により、chemical-specific adjustment factor(CSAF)に基づき、さらに下げているが(例えば25)、その他の国・機関では、CSAFは採用されておらず、逆に米国では上げる場合もあり、日本が将来ARFDの設定を行う場合にはこれらの考え方について、整理しておく必要があると考えられた。

④ブロッコリ中のEndosulfanとトマト中のFenamiphosは予想に近い結果となったが、ピーマン中のFenamiphosは予想から大きく外れた結果となった。ユニット重量と97.5パーセンタイル消費量が大きく違うため、一点推定法との差が大きくなった可能性がある。今後の課題として、いくつかの改良点を下記に示す。

・摂食者の平均体重と対象者全員の平均体重が同じではない。

・残留濃度のデータポイントが少なく、対数正規分布から外れる。これは、実際の数値を抽出して計算に使う方がよい可能性を示している。どちらにしても、2点では問題にならない。また、LOQ以下の数値をどう取り扱うかを決定する必要がある。

・今後、加工品も計算に入れるならば、加工係数が必要となる。

E. 結論

①SBSE法は極性の高い農薬に対しては回収率が低いが、濃縮操作無しに試験溶液に攪拌子を入れて攪拌するといった簡便な操作のみで短時間で分析できるため、残留農薬分析の迅速化・効率化が期待できる。また、LP-GCとMS/MS測定を組み合わせた農薬分析に適したLP-GC/MS/MS分析法を開発した。LP-GC/MS/MS測定を行えば、測定時間の短縮を図りかつ選択性の高い分析が可能となり、測定過程の一層の迅速化・効率化が期待できる。SFE法を用いる製粉化穀類中の残留農薬スクリーニング分析法の検討では、開発したLP-GC/MS/MS分析法を用いることにより、抽出・精製過程及び測定過程の迅速化・効率化を同時に図り、分析時間を従来法の約半分に短縮した方法を開発した。更に抽出操作の自動化が可能であるため、分析時間の有効活用、分析精度の向上及び個人差の低減が期待される。

②水系GPCによる試料精製法とLC/MS/MSを組み合わせる方法により、加工食品中のカーバメート系農薬29種類及び殺菌剤3種類の一斉分析法を開発した。水系GPCによる試料精製法は、簡便で効率の良い精製が可能であり、

高速溶媒抽出装置を用いた抽出法は、微粉末の試料には適用できなかったが、有機溶媒使用量の削減、分析操作の自動化を達成する上で有用な手段であった。本研究で開発した手法は、今回の分析対象以外の残留農薬分析においても非常に有効な手段になると考えられる。

③残留農薬等の急性参照用量（ARfD）に関連する情報を収集・整理するとともに、農薬のARfD設定の国際間の比較を行い、相違点を明らかにした。

④2006年10月に公表された最新の国民健康・栄養調査データ（1次DB）を加えて、2001～04年分合わせたデータセットを整えた。短期暴露評価の目的に最も適うように、加工食品等を農薬が使用される個々の農作物に分解するとともに、コモディティの大きさ、バルク等に応じて分類整理した。農薬については、EndosulfanとFenamiphosを選び、各農作物の残留濃度データを抽出した。これらのデータベースに基づき、モンテカルロ法によるリスクシミュレーションツール@RISKを使用して、シミュレーションを試行し、わが国においてもこのような手法が適用できることを確認した。

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 寺田久屋、野口昭一郎、丸山吉正、加藤陽康、岡 尚男：高速溶媒抽出装置および水系GPC精製を利用したカーバメート系農薬

分析法の検討 日本食品衛生学会第92回
学術講演会、春日井市 (2006. 10)

- 2) 石脇亜紗子、藤井紘子、齋藤京子、野末
みほ、由田克士、吉池信男：食品中の化学
物質の急性暴露評価のための特定食品の
“多食者”の把握 第60回日本栄養・食糧
学会大会、静岡市 (2006. 05)

H. 知的財産所有権の出願・登録状況（予定も
含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Table 1. 乾燥果実及び香辛料からの農薬の回収率 (1)

n=5

Pesticides	Fortified (mg/kg)	Raisin		Prune		Mungo	
		Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)
Alanycarb	0.01	57	12.3	19	45.3	55	39.7
	0.1	58	1.9	11	19.7	27	71.0
Aldicarb	0.01	29	83.6	47	35.8	47	47.8
	0.1	31	47.0	37	24.1	25	54.7
Aldoxycarb	0.01	94	6.7	93	12.8	85	2.7
	0.1	100	5.3	88	2.9	88	4.4
Bendiocarb	0.01	73	9.9	83	14.1	61	15.1
	0.1	105	3.4	86	2.9	60	11.5
Benfuracarb	0.01	58	8.5	52	25.4	52	38.2
	0.1	65	4.6	56	9.1	32	13.9
Carbaryl	0.01	104	4.9	63	11.4	74	13.8
	0.1	98	3.5	68	4.6	88	7.3
Carbofuran	0.01	88	7.8	82	9.0	76	12.2
	0.1	90	1.6	83	5.6	78	4.9
Diethofencarb	0.01	71	16.6	82	14.1	72	20.1
	0.1	83	8.1	73	7.8	81	4.5
Dimepiperate	0.01	76	6.8	86	15.4	59	30.7
	0.1	97	9.5	78	3.3	74	4.6
Esprocarb	0.01	62	11.9	64	7.5	48	26.8
	0.1	87	4.9	84	5.4	65	14.0
Ethiofencarb	0.01	68	11.6	40	15.7	50	14.8
	0.1	73	10.9	70	12.4	67	16.1
Fenobucarb	0.01	59	15.2	94	8.9	36	26.9
	0.1	89	13.4	85	7.6	56	19.8
Fenothiocarb	0.01	82	6.5	79	4.9	68	11.5
	0.1	98	4.4	78	2.5	70	7.6
Fenoxycarb	0.01	79	8.9	100	9.0	83	28.8
	0.1	84	6.4	83	8.3	89	6.9
Furathiocarb	0.01	68	7.5	59	7.0	67	16.7
	0.1	68	5.2	71	3.5	75	3.9
Indoxacarb	0.01	67	18.5	58	35.8	81	45.2
	0.1	75	3.0	67	8.0	72	12.7
Iprovalicarb	0.01	81	10.3	61	13.3	86	28.1
	0.1	82	3.6	68	4.8	81	4.1
Isoprocarb	0.01	67	14.5	84	15.2	37	37.4
	0.1	84	4.2	98	6.9	47	20.4
Methiocarb	0.01	67	14.3	121	13.3	102	84.0
	0.1	85	3.3	82	11.6	86	11.1
Methomyl	0.01	79	21.8	70	11.0	63	11.0
	0.1	82	6.1	65	6.2	64	20.3
Oxamyl	0.01	88	19.6	84	15.6	82	8.4
	0.1	94	5.7	77	7.2	77	9.3
Pirimicarb	0.01	82	8.7	52	4.4	90	11.1
	0.1	84	4.1	60	4.6	76	5.8
Promecarb	0.01	100	21.0	80	17.3	59	20.6
	0.1	95	9.3	92	4.3	63	12.1
Propoxur	0.01	73	16.1	74	7.9	66	21.3
	0.1	88	2.9	77	5.4	70	12.4
Pyributicarb	0.01	60	13.2	51	5.5	75	19.0
	0.1	66	3.5	56	6.3	75	4.4
Terbucarb	0.01	74	9.7	76	11.5	55	27.5
	0.1	83	3.7	85	4.5	76	12.2
Thiobencarb	0.01	66	18.5	63	10.5	79	46.1
	0.1	92	12.4	77	5.1	61	11.8
Thiodicarb	0.01	75	14.8	12	63.3	52	35.7
	0.1	58	16.5	4	22.9	26	113.2
XMC	0.01	58	13.3	58	12.5	41	21.3
	0.1	78	2.8	74	4.9	51	20.1
Imidacloprid	0.01	81	15.3	88	10.8	82	15.7
	0.1	94	5.9	85	5.1	88	3.4
Methoxyfenozide	0.01	69	49.0	65	11.8	66	17.8
	0.1	87	10.1	67	3.5	78	3.5
Tebufenozide	0.01	81	8.0	57	8.6	74	16.9
	0.1	74	6.6	77	4.9	75	5.2

Table 1. 乾燥果実及び香辛料からの農薬の回収率 (2)

n=5

Pesticides	Fortified (mg/kg)	White pepper		Turmeric *		Masala *	
		Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)
Alanycarb	0.01	45	14.5	113	8.2	80	10.8
	0.1	51	7.1	103	5.1	84	9.0
Aldicarb	0.01	112	54.3	63	55.0	51	64.6
	0.1	96	16.9	57	17.6	65	18.4
Aldoxycarb	0.01	105	8.0	96	7.1	78	9.4
	0.1	99	3.3	98	2.6	86	2.5
Bendiocarb	0.01	85	11.4	86	5.9	80	7.9
	0.1	90	6.0	84	3.5	89	14.2
Benfuracarb	0.01	61	9.2	90	5.9	78	8.0
	0.1	42	13.3	86	3.4	82	4.6
Carbaryl	0.01	69	15.5	71	8.6	85	17.7
	0.1	77	8.3	59	5.4	69	8.1
Carbofuran	0.01	93	8.5	71	10.4	83	21.6
	0.1	84	6.8	72	4.1	80	0.8
Diethofencarb	0.01	22	44.7	36	20.6	56	25.0
	0.1	23	11.8	33	18.5	62	9.5
Dimepiperate	0.01	39	18.0	85	22.6	64	17.6
	0.1	39	10.6	77	10.9	88	8.0
Esprocarb	0.01	71	7.8	61	6.4	69	11.0
	0.1	54	13.4	79	7.0	84	4.1
Ethiofencarb	0.01	12	32.1	35	20.9	67	9.7
	0.1	15	19.0	30	9.5	69	6.6
Fenobucarb	0.01	8	133.3	66	18.4	62	17.2
	0.1	22	6.2	56	8.0	70	7.5
Fenothiocarb	0.01	9	5.9	38	9.2	72	9.0
	0.1	11	6.8	36	4.5	45	7.1
Fenoxycarb	0.01	46	25.5	65	19.3	65	22.9
	0.1	33	10.0	52	8.5	62	4.5
Furathiocarb	0.01	75	7.5	69	10.6	79	4.8
	0.1	41	19.4	71	3.8	81	2.7
Indoxacarb	0.01	64	17.4	87	24.6	88	10.5
	0.1	75	9.5	89	11.3	92	9.7
Iprovalicarb	0.01	62	6.3	-	-	79	22.6
	0.1	61	6.1	214	28.4	63	5.1
Isoprocarb	0.01	-	-	78	9.4	101	11.4
	0.1	45	7.4	83	9.5	88	6.2
Methiocarb	0.01	9	64.6	37	25.0	55	28.7
	0.1	9	40.2	34	4.9	85	19.0
Methomyl	0.01	77	3.0	87	4.7	86	13.6
	0.1	98	5.6	89	7.2	91	2.9
Oxamyl	0.01	120	24.4	65	57.3	72	9.9
	0.1	89	5.2	65	6.1	72	1.2
Pirimicarb	0.01	109	3.0	49	4.5	58	6.0
	0.1	80	1.0	58	2.3	59	2.9
Promecarb	0.01	58	12.9	28	15.7	93	14.1
	0.1	64	3.7	34	10.5	80	6.5
Propoxur	0.01	75	6.2	65	5.0	77	10.6
	0.1	99	3.9	76	4.4	84	4.8
Pyributicarb	0.01	29	22.9	65	4.6	58	14.5
	0.1	27	6.4	66	2.3	63	7.2
Terbucarb	0.01	27	13.3	79	12.7	81	8.4
	0.1	27	9.5	90	2.4	88	4.0
Thiobencarb	0.01	27	24.4	69	8.8	27	21.1
	0.1	25	11.5	74	13.1	22	8.8
Thiodicarb	0.01	86	4.6	114	7.4	101	10.1
	0.1	101	3.2	96	2.3	95	4.8
XMC	0.01	73	7.6	61	12.0	63	12.5
	0.1	78	7.0	73	6.0	67	5.6
Imidacloprid	0.01	85	5.7	88	10.8	76	12.6
	0.1	87	7.0	85	5.1	91	4.5
Methoxyfenozide	0.01	115	14.0	80	13.6	104	14.1
	0.1	62	5.6	72	4.1	90	6.0
Tebufenozide	0.01	42	15.2	86	9.6	85	94.5
	0.1	44	3.2	94	7.7	86	6.4

Table 1. 乾燥果実及び香辛料からの農薬の回収率 (3)

n=5

Pesticides	Fortified (mg/kg)	Sage *		Thyme *		Red pepper	
		Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)
Alanycarb	0.01	83	7.2	108	6.5	87	11.7
	0.1	98	5.6	108	7.3	94	6.2
Aldicarb	0.01	91	36.7	92	80.2	154	21.5
	0.1	84	16.6	48	9.5	127	15.5
Aldoxycarb	0.01	92	8.1	83	6.0	97	8.0
	0.1	90	5.7	88	6.6	100	4.2
Bendiocarb	0.01	82	16.0	58	13.9	92	6.5
	0.1	83	5.8	62	3.6	114	4.0
Benfuracarb	0.01	95	4.0	91	7.5	74	4.2
	0.1	85	5.0	95	2.1	86	4.4
Carbaryl	0.01	111	18.6	76	20.9	93	10.4
	0.1	73	6.4	56	12.8	120	4.9
Carbofuran	0.01	90	6.2	52	6.1	107	6.0
	0.1	82	3.6	60	6.4	99	3.9
Diethofencarb	0.01	87	16.9	73	26.4	69	14.2
	0.1	102	6.1	76	4.4	78	9.5
Dimepiperate	0.01	46	7.8	59	15.6	84	7.2
	0.1	43	10.1	61	5.9	84	3.5
Esprocarb	0.01	93	6.5	50	10.8	89	5.7
	0.1	65	10.8	49	6.3	97	9.9
Ethiofencarb	0.01	66	13.8	53	18.9	109	7.6
	0.1	95	9.5	55	8.0	96	13.3
Fenobucarb	0.01	74	11.8	63	21.9	90	20.4
	0.1	73	13.8	56	15.8	102	10.7
Fenothiocarb	0.01	69	14.2	56	4.4	86	7.7
	0.1	76	8.3	62	7.6	86	5.8
Fenoxycarb	0.01	50	15.6	63	17.4	64	24.0
	0.1	61	18.0	76	19.6	83	28.6
Furathiocarb	0.01	103	3.4	81	7.9	101	5.3
	0.1	91	4.6	70	2.9	103	2.4
Indoxacarb	0.01	79	11.7	87	6.9	95	21.6
	0.1	79	17.1	92	13.5	115	18.5
Iprovalicarb	0.01	95	8.1	86	17.8	59	10.1
	0.1	98	6.0	65	4.9	59	3.9
Isoprocarb	0.01	77	10.2	93	34.5	108	11.2
	0.1	101	6.3	59	3.8	101	7.0
Methiocarb	0.01	57	18.3	55	76.3	92	18.9
	0.1	70	20.7	29	11.4	83	13.9
Methomyl	0.01	97	6.4	77	17.0	83	9.6
	0.1	94	3.5	82	1.4	91	2.1
Oxamyl	0.01	99	25.5	65	9.4	82	17.4
	0.1	91	6.6	64	5.7	101	6.0
Pirimicarb	0.01	87	7.6	46	5.8	87	4.9
	0.1	86	3.5	53	8.4	95	2.7
Promecarb	0.01	79	8.8	32	10.1	31	62.7
	0.1	82	5.8	36	11.7	46	11.0
Propoxur	0.01	81	15.0	76	17.3	109	10.0
	0.1	86	4.3	61	4.4	120	5.4
Pyributicarb	0.01	84	5.0	53	8.4	79	5.1
	0.1	71	8.0	46	5.7	76	5.6
Terbucarb	0.01	82	14.1	83	7.2	92	4.1
	0.1	80	5.0	71	6.8	99	5.5
Thiobencarb	0.01	73	17.5	57	39.3	100	8.7
	0.1	74	9.8	70	17.2	107	11.2
Thiodicarb	0.01	98	6.8	83	11.4	77	7.9
	0.1	96	7.3	71	8.3	84	5.9
XMC	0.01	104	18.8	74	6.7	123	13.2
	0.1	98	8.3	74	9.0	128	6.6
Imidacloprid	0.01	88	19.5	82	10.3	81	10.5
	0.1	79	5.9	76	5.0	83	3.6
Methoxyfenozide	0.01	93	11.6	97	11.1	95	6.2
	0.1	81	2.3	81	5.2	98	5.2
Tebufenozide	0.01	96	8.2	84	12.3	81	9.6
	0.1	84	3.8	78	3.3	88	2.7

Table 2. 味噌及びしょう油からの農薬の回収率

n=5

Pesticides	Fortified (mg/kg)	Miso		Shoyu	
		Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)
Alanycarb	0.01	-	-	-	-
Aldicarb	0.01	34	64.5	19	87.9
Aldoxycarb	0.01	74	9.9	86	8.2
Bendiocarb	0.01	74	14.2	112	13.5
Benfuracarb	0.01	29	11.2	16	10.8
Carbaryl	0.01	57	11.5	104	11.1
Carbofuran	0.01	76	9.5	123	8.0
Diethofencarb	0.01	86	20.9	103	7.1
Dimepiperate	0.01	105	4.2	99	16.2
Esprocarb	0.01	111	5.5	76	32.7
Ethiofencarb	0.01	48	23.4	106	6.4
Fenobucarb	0.01	95	13.6	89	27.6
Fenothiocarb	0.01	84	8.9	102	7.1
Fenoxycarb	0.01	84	18.9	92	11.5
Furathiocarb	0.01	84	4.3	103	3.8
Indoxacarb	0.01	109	8.3	104	17.5
Iprovalicarb	0.01	79	11.5	117	8.3
Isoprocarb	0.01	88	16.3	90	46.3
Methiocarb	0.01	87	14.7	104	13.7
Methomyl	0.01	47	15.6	60	15.4
Oxamyl	0.01	71	16.3	110	10.8
Pirimicarb	0.01	58	4.7	86	7.7
Promecarb	0.01	79	14.0	99	9.6
Propoxur	0.01	71	5.1	102	11.8
Pyributicarb	0.01	76	9.1	97	4.4
Terbucarb	0.01	93	9.8	97	6.0
Thiobencarb	0.01	91	11.8	87	32.9
Thiodicarb	0.01	3	83.4	8	31.8
XMC	0.01	57	10.1	89	48.7
Imidocloprid	0.01	81	14.9	85	9.5
Methoxyfenozide	0.01	61	8.9	81	14.0
Tebufenozide	0.01	84	9.4	107	7.8

高速溶媒抽出

試料 5 g
| EXTrelut NT と混和
高速溶媒抽出装置 (ASE-200)
| (抽出溶媒: アセトニトリル)
抽出液
| アセトニトリルで全量 50mL
ろ過 (0.45 μ m PTFE フィルター)
ろ液 (300 μ L)
|
水系 GPC (Shodex Asahipak GF-310 HQ) 分取
|
農薬フラクション (13-18 min)
| 溶媒留去 (45°C, 窒素気流)
残留物
| 50%アセトニトリル-10mmol/L ギ酸アンモニウム緩衝液 pH6.0 200 μ L
かく拌 (超音波洗浄器)
遠心ろ過 (0.22 μ m) 12000 rpm
ろ液
|
LC/MS/MS 5 μ L

超音波抽出

試料 5 g
| アセトニトリル 30mL, 20mL
超音波水浴 15 min
遠心分離 (2500 rpm, 5 min)
上澄液
| アセトニトリルで全量 50mL
ろ過 (0.45 μ m PTFE フィルター)
ろ液 (300 μ L)
|
水系 GPC (Shodex Asahipak GF-310 HQ) 分取
|
農薬フラクション (13-18 min)
| 溶媒留去 (45°C, 窒素気流)
残留物
| 50%アセトニトリル-10mmol/L ギ酸アンモニウム緩衝液 pH6.0 200 μ L
かく拌 (超音波洗浄器)
遠心ろ過 (0.22 μ m) 12000 rpm
ろ液
|
LC/MS/MS 5 μ L

Fig.1 分析操作のフローシート

Ⅱ．分担研究報告書

1． GC/MS による加工食品中の残留農薬分析法の開発

分担研究者 根本 了

厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)
平成 18 年度分担研究報告書

農薬等の一律基準と加工食品基準及び急性暴露評価に関する研究
GC/MS による加工食品中の残留農薬分析法の開発

分担研究者 根本 了 国立医薬品食品衛生研究所 食品部主任研究官

研究要旨

加工食品中の残留農薬分析の一層の迅速化・効率化を図るために、以下の新規技術の活用について検討した。

- 1) SBSE 法(stir bar sorptive extraction 法)を用いる果実果汁中の残留農薬 GC/MS スクリーニング分析法について検討しその適用範囲を明らかにした。
- 2) 測定時間の短縮に有効な Low-pressure GC(LP-GC) 測定の最適条件について検討するとともに、GC/MS/MS 法(ガスクロマトグラフィー・タンデム型質量分析法)の残留農薬分析への適用を図るために MS/MS 測定条件の最適化を行い、両手法を組み合わせた LP-GC/MS/MS 分析法を開発した。
- 3) SFE 法(超臨界流体抽出法)を用いる製粉化穀類中の残留農薬スクリーニング分析法について検討しその適用範囲を明らかにした。

以上の検討により、これらの新規技術が加工食品中の残留農薬分析の迅速化・効率化に有効であること及びその適用範囲を明らかにすることができた。

A. 研究目的

食品に残留する農薬等に関するポジティブリスト制度が平成 18 年 5 月 29 日から施行された。加工食品については、これまで残留基準が設定されていなかったが、ポジティブリスト制度の導入にともない、主に加工程度が低く、かつ流通量が多い加工食品については基準値が設定された。

加工食品に対しては、これまで農薬の残留基準が設定されていなかったことから、その残留分析法も整備されていない。そこで、GC/MS による加工食品中の残留農薬分析法について検討した。基準値が設定された加工食品としては、植物油、小麦粉等の製粉化穀類、乾燥果実・野菜、果実果汁などがある。平成 16 年度及び平成 17 年度は、行政検査のニーズに適する試験法開

発を目的として、従来の技術を応用して植物油、製粉化穀類、果実果汁、乾燥果実及びトマト加工品に対する残留農薬 GC/MS 一斉分析法を開発した。平成 18 年度は、分析の一層の迅速化・効率化を図るために、1) SBSE 法、2) LP-GC を用いる GC/MS/MS 法及び 3) 超臨界流体抽出法の新規技術の加工食品中の残留農薬分析への活用について検討した。

検討結果を以下の 3 項目に分けて記載した。

(I) SBSE 法を用いる果実果汁中の残留農薬 GC/MS スクリーニング分析法の検討

(II) LP-GC を用いた GC/MS/MS 分析法(LP-GC/MS/MS)の検討

(III) SFE 法を用いる製粉化穀類中の残留農薬スクリーニング分析法の検討

(I) SBSE 法を用いる果実果汁中の残留農薬 GC/MS スクリーニング分析法の検討

A. 研究目的

SBSE 法は、表面に PDMS (ポリジメチルシロキサン) をコーティングした撈拌子を試料溶液中で撈拌させて目的成分を抽出する手法である¹⁾。SBSE 法は、液-液分配の原理を応用した方法であり、目的物質のオクタノール-水分配係数 (K_{ow}) から抽出可能な物質を推定することが可能であり¹⁾、今回検討対象とした農薬は、一部の極性の高い農薬を除き大部分は SBSE 法で理論上抽出可能であった。

SBSE 法の一般的な手法としては、撈拌子を試料溶液に入れて一定時間マグネチックスターラーで撈拌後、撈拌子を取り出し、撈拌子に分配した目的成分を加熱脱着 (TD) 装置付 GC/MS (TD-GC/MS) で分析するもので、濃縮やカラム精製などの操作が無く非常に簡便な方法である²⁾。SBSE 法は液体中で撈拌子を撈拌させる手法であるため、果実果汁への応用が期待できることから、抽出精製過程の迅速化・効率化を目的として、SBSE 法の果実果汁中の残留農薬 GC/MS スクリーニング分析法への応用について検討した。

B. 研究方法

1. 試料

トマト果汁、りんご果汁、オレンジ果汁及びぶどう果汁を重量比で等量ずつ混合したものを検討用試料とした。

2. 試薬及び試液

試薬: 有機溶媒は残留農薬試験用試薬 (和光純薬工業株式会社または関東化学株式会社製) を使用した。Bondesil PSA は Varian 社製を使用した。

撈拌子: Gerstel 社製の PDMS 量 63 μ L (長さ 10 mm, 膜厚 1.0 mm) の Twister を用いた。

抽出容器: 10 mL のヘッドスペース用バイアル (Agilent 社) を用い、抽出時には同社製のヘッドスペース用ブチルセプタム付きアルミキャップをした。

農薬標準品: 林純薬工業株式会社、関東化学株式会社、和光純薬工業株式会社、Riedel-de Haën 社または Dr. Ehrenstorfer 社製の残留農薬試験用試薬を用いた。

農薬標準原液: 各農薬標準品をヘキサンで溶解して (溶解しにくい場合にはできるだけ少量のアセトンで溶解後ヘキサンで希釈して) 1 mg/mL の濃度に調製し冷凍庫 (-30°C) に保存した。

農薬標準混液: 各農薬標準原液をとり、アセトンを加えて 10 mg/L (ジエトフェンカルブは 25 mg/L、アルジカルブ、プロパモカルブ、カプタホール、アミトラス代謝物、イマザリル、イプロジオン、チアベンダゾール、トリシクラゾール、アセフェート、メタミドホスビピレトリンは 50 mg/L、オキサミル、アセタミプリド、イミベンコナゾール脱ベンジル体、イプロジオン代謝物及びバミドチオンは 100 mg/L) の濃度に調製し、冷凍庫 (-30°C) に保存した。表 1 に検討対象農薬を示した。

3. 装置

TD-GC/MS: TD 装置は Gerstel 社製の Twister 専用熱脱着装置 (TDU: thermal desorption unit) 及び同社製の昇温気化 (PTV: programmed temperature vaporizing) 注入口 CIS 4 を使用した。TDU 及び CIS 4 には不活性化処理済みのマルチバツフルライナーを使用した。GC/MS は Agilent 社製のガスクロマトグラフ GC6890 及び同社製質量分析計 5973MSD を使用した。Twister の TDU への導入には MPS2 オートサンプラー (Gerstel 社) を使用した。CIS 4 の冷却には液化炭酸ガスを使用した。

マグネチックスターラー: 20 連マグネスター GMG-20 型 (柴田科学株式会社) を使用した。

4. TD-GC/MS 条件

抽出後の撈拌子は水洗後無塵紙で拭いたのち、不活性化処理をした TDU 用チューブに入れた。その後 TDU 用チューブをオートサンプラーで TDU に導入し、300°C まで加熱して分析対象農薬を熱脱着した。脱着された農薬は -30°C に冷却された PTV 注入口で一旦捕集され、次に注入口を 300°C まで加熱し GC カラムへ導入し

た。

GC カラム: J&W Scientific 社製のキャピラリーカラム DB-5MS (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μ m)。ガードカラムとして不活性化キャピラリーカラム (内径 0.25 mm、長さ 2 m、Agilent 社) を接続した。

GC/MS 条件: オープン温度、50°C (3 min) \rightarrow 25°C/min \rightarrow 125°C \rightarrow 10°C/min \rightarrow 300°C (6.5 min); トランスファーライン温度、200°C (3 min) \rightarrow 10°C/min \rightarrow 300°C; イオン源温度、220°C; 四重極温度、150°C; キャリヤーガス、He; キャリヤーガス圧プログラム、定流量モード (流速 1.1 mL/min); イオン化電圧、70 eV (EI モード); 測定モード、SIM (selected ion monitoring) モード (測定イオンは表 1 参照) 及びスキャンモード (スキャン範囲 50-550 amu)。エレクトロンマルチプライヤ電圧は SIM 測定では 2800V、スキャン測定ではオートチューニングでの設定値を用いた。

5. 試料溶液の調製

[方法 A]

試料を水で 10 倍希釈したものを試料溶液とした。

[方法 B]

試料 5.0 g にアセトニトリル 10 mL を加えて 10 分間振とう後、遠心分離 (3000 rpm、10 分) し上澄液をとる操作を 2 回繰り返した。得られた上澄液を合わせてメスフラスコに移し、アセトニトリルで 25 mL 定容とした。抽出液の一定量を取り、1 mL あたり Bondesil PSA 25 mg を添加して 1 分間攪拌後、遠心分離 (3000 rpm、5 分) して得られた上澄液を水で 10 倍希釈したものを試料溶液とした。

6. SBSE 条件

試料溶液 2 mL を抽出容器にとり、攪拌子を入れアルミキャップをした。室温で 90 分間 1000 rpm で攪拌後、攪拌子を取り出し水洗し、無塵紙で水分を除いたのち TD-GC/MS 測定した。

7. 添加回収試験

試料に 0.025 μ g/g になるように農薬標準混液を添加し、30 分間放置してから試料溶液を調

製した。

8. 定量

無添加試料を用いて添加試料と同時に SBSE を実施し、得られた攪拌子に農薬標準混液 1 μ L を添加し、TD-GC/MS 測定して得られたピーク面積を用いて絶対検量線法で定量を行った。0.125 ng \sim 2 ng の範囲で検量線を求めたところ、amitraz の相関係数(r)が 0.978 だった以外は $r = 0.991 \sim 1.000$ の良好な直線性が得られた。

C. 研究結果及び考察

果実果汁は液体試料であるため、先ず直接 SBSE 法による農薬の抽出を試みた。即ち、果実果汁を水で 10 倍希釈して試料溶液を調製 (方法 A) し、SBSE を行った。その結果、広い範囲の K_o/w 値の農薬について低回収率となり、また回収率の RSD 値が 10% を大きく超える農薬も見られ、分析の精度も不十分であった (表 2 及び図 1 参照)。この原因としては、果実果汁には果実中の食品成分や果肉などの固形物が含まれているため、これらの食品マトリックスにより攪拌子と試料溶液との間の農薬の分配が妨げられたためと考えられた。食品マトリックスの影響を減らすためには、試料を水で希釈する方法が考えられるが、農薬も希釈されるため感度低下を招くとともに、果汁の種類により最適な希釈率が異なる可能性がある。そこで、厚生労働省より通知された GC/MS による農薬等の一斉試験法 (農産物)³⁾ を参考にして、果実果汁から農薬をアセトニトリル抽出してから SBSE を行う方法を検討し、試料溶液の調製の方法 B に示した方法が得られた。

方法 B を用いて試料溶液を調製し SBSE 法により添加回収率を求め、その結果を表 2 及び図 1 に示した。その結果、方法 A では、検討した 186 農薬中、回収率 70 \sim 120% が 73 農薬、50 \sim 70% が 34 農薬、 $<50\%$ が 77 農薬及び妨害により定量できなかった農薬が 2 農薬であった。これに対して、方法 B では、回収率 70 \sim 120% が 108 農薬、

50～70%が 12 農薬、<50%が 66 農薬となり、全体的に回収率が改善された。更に、回収率の RSD 値についてもその平均値が方法 A では 15%(0.1～113%)であったのに対して方法 B では 7%(0.7～50%)となり、精度も改善された。回収率が低くなった農薬は、分析中に分解しやすい農薬あるいは極性が高く攪拌子の液相に分配しにくい農薬と思われる。分析中の農薬の分解には、試料溶液中での分解のほかに、TD-GC/MS 測定時の加熱脱着操作中に分解したものも含まれる。TD-GC/MS 測定では、加熱脱着操作が TDU と PTV での 2 回あるため、熱に不安定な農薬は、通常用いられるスプリットレス注入法よりも熱分解し易いと思われる。

図 2 には農薬の K_o/w 値から求めた回収率の理論値を示した。方法 B は方法 A よりも回収率が改善されたものの、方法 B を用いても $\log K_o/w$ が 1～4 付近の農薬は回収率が理論値を下回っており、今後更に SBSE 条件の改善が必要と思われる。

D. 結論

SBSE 法は攪拌子に用いる液相の制約から、極性の高い農薬に対しては回収率が低いほか、測定に TD-GC/MS を用いた場合には、熱に不

安定な農薬は分解しやすい特徴がある。また、SBSE 条件を更に改善する必要があるが、本法は、濃縮操作無しに試料溶液に攪拌子を入れて攪拌するといった簡便な操作のみで短時間で分析できるため、SBSE 法の特徴を踏まえて利用すれば残留農薬分析の迅速化・効率化が期待できる。

E. 参考文献

- 1) E. Baltussen et. al. Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE), a Novel Extraction Technique for Aqueous Samples: Theory and Principles. *J. Microcolumn Separations*, 11(10), 737-747 (1999).
- 2) P. Sandra et. al. Multi-residue screening of pesticides in vegetables, fruits and baby food by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatography A*, 1000, 299-309 (2003).
- 3) 「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について(一部改正)」(厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知、食安発第 1129002 号、平成 17 年 11 月 29 日)