

201033028A

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

食品中残留農薬のリスク管理手法の精密化と国際化対応に関する研究

平成22年度総括・分担研究報告書

研究代表者

財団法人 残留農薬研究所 加藤保博

平成23年(2011年)5月

目次

I. 総合研究報告	
食品中残留農薬のリスク管理手法の精密化と国際化 対応に関する研究	1
II. 分担研究報告	
1 残留基準適用部位・分析部位の比較研究	29
2 統計手法を用いる最大残留量の算定手法	63
3 調理加工に伴う分解生成物のリスク管理手法に関する研究： 調理加工における農薬分解物	81
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	95
IV. 研究成果の刊行物・別刷	97

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
I. 平成 22 年度総括研究報告書

食品中残留農薬のリスク管理手法の精密化と国際化対応に関する研究

研究代表者 加藤保博

(財団法人残留農薬研究所)

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 22 年度総括研究報告書

食品中残留農薬のリスク管理手法の精密化と国際化対応に関する研究

代表研究者 加藤保博 財団法人残留農薬研究所 常務理事

研究要旨

残留農薬を含んだ食品を摂取する場合を考慮し、ヒトへの健康影響リスクをより適切に管理する観点から、以下の研究を行った。課題1：残留基準の適用部位及び検査部位、ならびに残留基準値設定に参照する作物残留性試験の分析部位を、国際的な標準に対応したものとするために必要な基礎的知見を得ることを目的とした。初年度は、国際基準と我が国の試験法(国内慣行法と称す)を比較し、両法で分析部位が異なる農産品と相違点を整理した。茎葉散布された非浸透性農薬の主要な残留部位である果皮を、国内慣行法では除去し、果肉のみを分析しているキウイやメロン等については、残留基準値や作物残留性データを国内外で比較することは困難と考えられた。核果類については、国際標準による残留値は国内慣行による分析値と同等であることが既存データを解析して確認された。仁果類については、りんごを中心に5種農薬の作物残留性調査を昨年度と今年度で行い、分析部位の相異(芯及び花落ちの扱い)が残留値に与える影響を調べた。国際基準に基づく残留濃度測定値は、りんごでは、国内慣行に基づく測定値の0.8-2.0倍であった。根菜類の葉と根の接合部の扱いをかぶで検討し、葉部の残留農薬レベルの影響が大きいこと及び、茎葉散布薬剤では分析部位の取扱いが残留値に大きな影響を与える可能性は低いことを確認した。課題2は、農薬登録に際して求められる作物残留性試験の例数が増えること、ならびに試験例数の多いインポートトレランス申請が増えていることから、EU及びNAFTAで採用されている統計処理により最大残留量(MRL)を推定する手法を検討する。適用範囲内で最大残留量を生じる条件で、はくさい(露地栽培)とほうれんそう(施設栽培)に計7種農薬を処理し、2年で各16例の試験データを得た。適用範囲内の使用でも残留基準値を超える残留を生じるケースが認められた。EU及びNAFTAの手法を踏まえたMRL算定法がOECDから公表されたことから、既存法とOECD法ならびに国内で採用されている手法等による残留基準値案を比較検討した。少数例のデータを基に、当該集団の分布のパターンを特定のパターンに当てはめて解析することの不確かさから、特定の分布パターンに依存しないOECDの算定手法は望ましい手法と示唆された。課題3では、食品の加工に伴って生成される分解物データを集積するほか、分解物を把握するモデル実験系を構築し、分解物のリスク管理手法について検討する。初年度で公開資料から食品の調理加工等に基づく農薬の加熱時における分解物の知見を収集したほか、OECDの化学物質テストガイドライン507加工製品中における残留農薬の性質・高温加水分解を翻訳した。また、10種農薬の乾式加熱分解実験を行い、*O,S,S*-トリメチルリン酸ジチオエートをマラチオンの熱分解生成物として検出した。今年度はOECDの上記ガイドラインが食品加工における代表的な加熱加水分解条件とした90℃から120℃、pH4~6の3条件で試験するための加水分解装置を試作し、試験条件を検討するとともに、マラチオンの消失と分解物の生成を追跡した。分解生成物として2物質をGC-MS及びLC/TOF-MSで検出し、フマル酸ジエチル及びメルカプトこはく酸ジエチルとそれぞれ、同定および推定した。

研究分担者

飯島和昭 財団法人残留農薬研究所化学
部残留第1研究室長

永山敏廣 東京都健康安全研究センター
食品部長

加藤保博 財団法人残留農薬研究所 常
務理事

A. 研究目的

食品中の残留農薬のリスク管理については、(1)国際的に流通する農産物で、残留基準の適用部位や検査部位、食品分類がわが国固有のものとなっている場合もあり、リスク管理上、整合性を欠くとの指摘もされている。(2)残留基準値は、GAPに対応した作物残留性試験(作残試験)から推定される最大残留量に基づいて設定される。国内の農産物については、現在、試験例数が少ないことから、経験則を基に基準値が設定されているが、農薬登録制度の改正に伴い、必要な試験例数が今後増えると予想される。また、試験例数の多い海外作残試験の審査の機会も増えつつあることから、これらに対応した最大残留量の算定手法が必要となる。この最大残留量の推定および残留基準の設定はEUおよび米国・カナダ(NAFTA)では統計手法を用いて行っており、近年では国際基準の設定にもNAFTA法が参照されるようになった。OECDで同法の改良が検討されており、JMPRによれば、完成後はNAFTA法に代わってOECD法が国際基準設定に参照される。

(3)インポートトレランスの申請で海外作残試験の審査の機会が増えつつあることから、これに対応したより精密な暴露量の評価が必要となるケースが増えてきており、海外で採用されている暴露量評価手法で有効な情報を収集・整理し、対応できるようにしておくことが望まれる。(5)多くの農産物は何らかの加工を経て喫食される。加熱等を伴う加工によって食品中の残留農薬の一部は分解するが、その実態は明確でなく、分解物のリスク管理の方策は定まっていない。

以上の状況に対応して、残留農薬を含んだ食品を摂取する場合を考慮し、ヒトへの健康影響リスクをより適切に管理する観点から、次の研究を行う。

課題-1(分担研究1)では、国際的に流通する農作物について、残留基準値の適用部位と検査部位を国際的な標準に対応させるために、作残試験の実施を含め、必要な基礎データを収集する(H21-23)。また、インポートトレランス設定における暴露量評価を精密化する評価法についての情報を収集し、整理する(H23)。

昨年度は、前者課題について、国際基準(FAOの基準)と国内慣行(農薬取締法および食品衛生法)を比較し、両法で分析部位が相異なる農産品と相違点を整理するとともに、核果類と仁果実類について、作物残留試験等を行い、両法による残留濃度測定値を比較検討して国内の既存残留データを国際基準に対応する残留値に換算する係数を

算定した。今年度は、昨年度調査で、試料調製場所による差の大きかったりんごについて、再調査をするほか、根菜類について、根と葉の付着部の扱いを検討する。

課題・2 (分担研究 2) では、最大残留量を作残試験から統計学的に推定し、残留基準値を設定する手法の比較と検証を、国内農業慣行に従って農薬施用した作残試験データを用いて行う(H21-23)。また、国際機関で進められている食品分類の改定に係る情報の収集と整理を行う (H22、 23)。

前者については、今年度は、昨年度に引き続いて、ほうれんそう(施設栽培)とはくさい(露地栽培)における計7種農薬の、適用範囲内における最大残留条件での作残試験データを8県で収集する。昨年度分と合わせ各作物、農薬あたり計16例となる残留データを用いて、EU、NAFTAで採用されている手法等による残留基準値案との比較検討を行う。NAFTA及びEUの手法を踏まえた新手法がOECDから提案され、今年度末に公表されたことから、OECDの手法も比較検討する。

課題・3 (分担研究 3) では、食品の加工に伴って生成される分解物データを集積、解析して、分解生成物を把握するモデル実験系を構築する。代表的な事例について試行を実施して、分解生成物の把握を試みて、調理加工にかかわるリスク管理手法の指針案について検討し、加工食品の喫食に伴う健康影響リスクを判断するための基礎資料とする。昨年

度は、公開資料から食品の調理加工等に基づく農薬の加熱時における分解物の知見を収集したほか、OECDの化学物質テストガイドライン#507「加工製品中における残留農薬の性質-高温加水分解」を翻訳した。また、10種農薬の乾式加熱分解実験を行い、O、S、S-トリメチルリン酸ジチオエートをマラチオンの熱分解生成物として検出した。今年度はOECDの上記ガイドラインが食品加工における代表的な加熱加水分解条件とした3条件で試験するための加水分解装置を試作し、試験条件を検討するとともに、マラチオンの消失と分解物の生成を追跡する。

B. 研究方法

分担研究 1

1-1. 仁果類における作物残留性調査

昨年と同様に、りんごでの作物残留性調査を行い、国内慣行(柄、花落ち及び芯を除いた果実)と国際標準(柄を除いた果実)のそれぞれに従って得られた残留値を比較した。

1-1-1 供試農薬

昨年と同じ市販の5種薬剤(ナリア水和剤、アドマイヤー顆粒水和剤、サンリット水和剤、カスケード乳剤、フェニックス顆粒水和剤)を使用した。

1-1-2 圃場試験

りんごの栽培と上記の農薬散布は、社団法人日本植物防疫協会に委託して行った。りんごは長野県(品種:ふじ)及び山梨県(品種:

つがる)の2圃場で調製した。供試農薬は適用範囲内で最大の残留となる条件で散布した(最小希釈倍率、最大散布量、最大散布回数、収穫前最短期間)。

1-1-3 分析法

分析法は、LC-MS/MSへの注入量を10 μ Lとした以外は昨年度と同じ(図1)である。果梗を除去したりんご果実を縦に4等分したもものから、任意の対角の2切片をそれぞれ、芯+花落ち部(「除去部」と残部(「可食部」)に分け、それぞれを試料とした。また、残りの対角の2切片を「全果実」試料とした。処理区では全30個の果実から得た上記の全試料を分析に供した。ミキサーで摩砕均一化した試料からアセトニトリルで抽出し、C18ミニカラムで精製したのち、LC-MS/MSに注入し、ピーク面積に基づく絶対検量線法で、次の分析対象化合物を定量した:イミダクロプリド、シメコナゾール、ピラクロストロビン、フルフェノクスロン、フルベンジアミド、ボスカリド。

1-1-4 添加回収率、妨害ピークなど:

有効成分6種を無処理区の全果実、可食部、及び非可食部(花落ち及び芯)の各試料に0.01~1.5 mg/kg濃度添加して得た平均回収率(n=3)は83~114%の範囲で、RSDもく11%と良好であった。無処理区の分析結果は定量下限(0.01mg/kg)未満であり、クロマトグラム上に分析を妨害するピークは認められなかった。分析時までの試料の凍結保存期間

中の有意な分解のないことは保存安定性試験で確認した。

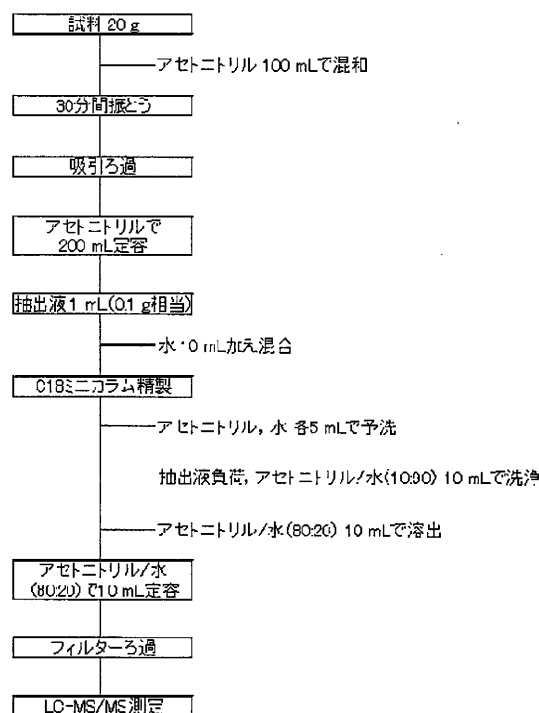


図1 仁果類における残留分析フロー概要

1-2. 根菜類における作物残留調査

かぶにおける作物残留性調査を行い、葉部、根部及びその間の接合部における残留農薬の分布実態を調査した。

1-2-1 供試農薬:

市販の6種薬剤(コテツフロアブル、アミスター20フロアブル、ランマンフロアブル、スタークル顆粒水和剤、モスピラン水溶剤、ハチハチ乳剤)を使用した。

1-2-2. 圃場試験:

社団法人日本植物防疫協会に委託し、茨城県及び宮崎県の2圃場で、供試農薬を適用範囲内で最大の残留となる条件で処理した作

物試料を調製した。品種は、両県とも耐病ひかり。

1-2-3. 試薬：

市販の6種農薬成分（アセタミプリド、アゾキシストロビン、クロルフェナピル、シアゾファミド、ジノテフラン及びトルフェンピラド）の各標準品は市販の高純度品（99.3%以上）を使用した。

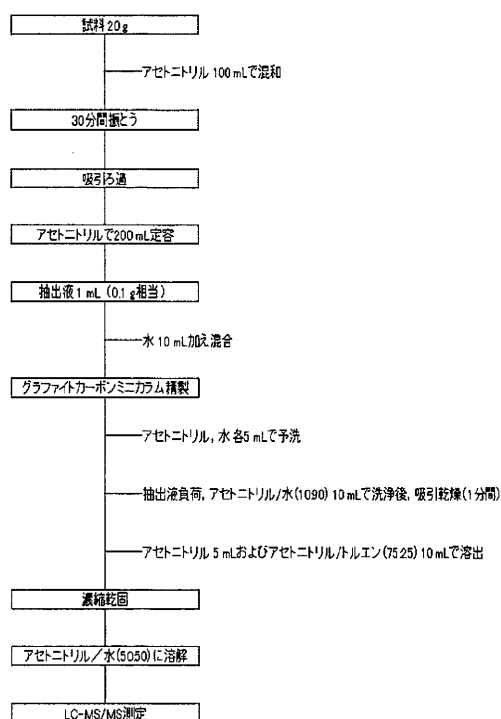


図2 根菜類における残留分析フロー概要

1-2-4. 分析法（概要）：

試料は、葉部と根部の境目よりそれぞれ約1~1.5 cm で切り、葉部、接合部及び根部に分別した。各々を全量又は縦に4分割以上したものから対角の2つを取り合わせ、それぞれその一部を無作為に取り、密閉容器に入れて凍結保存（-20℃）した。分析直前にミキサーで磨砕均一化した。均一化試料 20.0 g

からアセトニトリルで振とう抽出し、グラファイトカーボンミニカラムで精製したのち、LC-MS/MS に注入し、ピーク面積法に基づく絶対検量線法により定量した。

1-2-4-1 LC-MS/MS の操作条件（クロルフェナピル測定用）

・高速液体クロマトグラフ：カラム、ZORBAX Eclipse Plus C18 1.8 μm (2.1 mm i.d.×100 mm、Agilent 製)；移動相、アセトニトリル/5 mM 酢酸アンモニウム[50:50(1 min)-3 min-80:20、v/v]；流速：0.4 mL/min；カラム温度：40℃；注入量：10 μL。

・質量分析計：イオン化法、エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)；乾燥ガス温度、200℃；乾燥ガス流量、8 L/min；ネブライザー圧力、45 psi；シースガス温度、400℃；シースガス流量、12 L/min；イオン導入電圧、2000 V；コリジョンガス、窒素；イオン検出法、MRM 法（モニタリングイオン、フラグメンタ電圧及びコリジョン電圧は表 1 を参照）

1-2-4-2 LC-MS/MS 操作条件（その他の農薬測定用）

・高速液体クロマトグラフ：カラム、クロルフェナピル測定と同じ；移動相、アセトニトリル/5 mM 酢酸アンモニウム [5:95(2 min)-2 min-60:40-3 min-90:10、v/v]；流速及びカラム温度、クロルフェナピル測定時と同じ；注入量、3 μL。

・質量分析計：イオン化法、エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)；乾燥ガス温度、

200℃；乾燥ガス流量、8 L/min；ネブライザー圧力、45 psi；シースガス温度、400℃；シースガス流量、12 L/min；イオン導入電圧、2000 V；コリジョンガス、窒素；イオン検出法、MRM法（モニタリングイオン、フラグメンタ電圧及びコリジョン電圧は次表参照）

表1 モニタリングイオン等

農薬	分子量	保持時間(分)	アリカーサーイオン(m/z)	プロダクトイオン(m/z)	フラグメント電圧(eV)	コリジョン電圧(eV)	測定モード
アセタミプリド	222.7	4.3	223.0	126.0	100	20	+
アキシストロビン	403.4	5.5	404.0	372.0	100	10	+
クロルフェナピル	407.6	4.8	348.7	80.9	150	40	-
シアノフェニド	324.8	6.1	324.9	108.0	100	8	+
ジノテフラン	202.2	3.3	203.0	129.2	100	5	+
トルフェンピラド	383.9	6.9	384.1	197.1	100	20	+

1-2-4-3. 検量線の作成：

混合標準溶液を、水／アセトニトリル(50:50、v/v)混液で希釈して各分析成分濃度が0.0001、0.0002、0.0008、0.002及び0.004 mg/Lの検量線用の混合標準溶液を調製した。その混合標準溶液をLC-MS/MSに注入して各農薬の重量を横軸に、同ピーク面積値を縦軸にとり、絶対検量線法により各検量線を作成した。

1-2-4-4. 保存安定性の確認：

均一化した無処理試料 20 g を 200 mL 容の三角フラスコにはかりとり、2 mg/L 混合標準溶液 1 mL を添加して-20℃に保存した。全試料の分析終了後、実試料と同様に分析して残存率を求めた。

1.3 分析法の妥当性確認

無処理区果実およびかぶから得た、試験区試料と対応する各試料(均一化試料)に0.01、

0.5mg/kg 濃度(ボスカリドは5mg/kg でも実施)で農薬標準品を添加して測定した添加回収率は、りんごの可食部、除去部、全果実のいずれにおいても、全ての農薬について、77~114%の範囲であり、また、RSD(n=3)も0.5~10.7%と、良好であった。保存安定性も77~101%であり、分析法の妥当性は確認された。かぶについても、0.01と0.5mg/kg(接合部については5mg/kgでも実施)濃度で、茎ぶ、接合部、根部に添加して測定した添加回収率は、81~101%であり、RSDも8.9%以下と良好であった。保存安定性も83~99%であり、分析法の妥当性は確認された。

分担研究2

初年度調査の開始時期および試験地に制約があったことから、農作物には、果実以外で、秋～冬に収穫期を迎えるもののうち、露地栽培作物としてはくさいを、施設栽培作物としてほうれんそうをそれぞれ選んだ。これら農作物に適用があり、定量限界以上の残留が見込める農薬を、はくさいでは5種類、ほうれんそうには4種類を選択した(表2、3)。

表2 調査対象農薬

有効成分	剤形	AI含量
農薬1	顆粒水溶剤	20%
農薬2	乳剤	15%
農薬3	フロアブル	10%
農薬4	乳剤	10%
農薬5	顆粒水和剤	20%
農薬6	顆粒水溶剤	6%
農薬7	乳剤	5%

社団法人日本植物防疫協会に委託して、各作物を毎年8県の試験地で2年間(合計10

表3 使用農薬の処理条件

作物	農薬	希釈倍率	散布量	散布回数	散布間隔	採取
はくさい	農薬1 顆粒水溶剤	2000倍	300L/10a	2	7日	最終散布3日後
	農薬2 乳剤	1000倍		2		最終散布14日後
	農薬3 フロアブル	1000倍		2		最終散布7日後
	農薬4 乳剤	2000倍		2		最終散布14日後
	農薬5 顆粒水和剤	2000倍		3		最終散布1日後
ほうれんそう	農薬1 乳剤	3000倍	200L/10a	2	7日	最終散布3日後
	農薬6 顆粒水溶剤	1000倍		3		最終散布7日後
	農薬7 乳剤	2000倍		2		最終散布7日後
	農薬4 乳剤	4000倍		3		最終散布3日後

県) 栽培し、農薬を散布した。農薬の散布条件は、ラベルに表示された最小希釈倍率、最大散布量、最大散布回数、最終処理後収穫まで最短の期間とした(表3)。ただし、ほうれんそうに散布した農薬6については日程の都合で散布回数5回を3回に減らした。農薬試験例数は、NAFTA およびEUの手法で、統計的に適切な結果を得るに必要な最少データ数とされている16例とした。

各農薬の分析方法は昨年度と同一である。ミキサーで摩砕均一化した試料からアセトニトリルまたはアセトンに抽出し、グラファイトカーボンミニカラムまたは、C18 ミニカラム、または C18 ミニカラムとグラフィアトカーボンミニカラムで精製したのち、LC-MS/MS に注入し、ピーク面積法に基づく絶対検量線法で定量した。分析法の妥当性を、無処理試料における0.01ppm 及び0.1ppm での添加回収率とそのRSD、ピークの分離、検量線の直線性、凍結保存安定性により検証し、昨年度同様、問題は認められなかった。

EU および NAFTA の手法による最大残留量の算定、ならびに Shapiro-Francia 検定に

は米国 EPA の HP から入手し NAFTA の MRL カルキュレータースプレッドシート第3版(2009年8月; The NAFTA MRL/Tolerance Harmonization Workgroup 作)を使用した。OECD の手法による最大残留量の算定には OECD の MRL カルキュレーター(エクセルスプレッドシート: 47241282、白書: ENV/JM/MONO (2011)2、マニュアル: ENV/JM/MONO(2011)3)を使用した。その他の統計量はマイクロソフト社のエクセル2010の関数を利用して算出した。農薬登録または残留基準値設定に係る国際機関の食品分類に関する情報は各機関のホームページから入手した。

分担研究3

昨年度と同様、放射性同位元素標識体を用いずに、簡易に生成物を検索する手法を試みた。検討対象農薬として、昨年度の乾式条件下の加熱試験で、加熱により比較的大きく減少の見られたマラチオンを用いた。湿式条件下での加熱実験系は OECD の化学物質試験指針(OECD Guideline: Test No.507)に示された分解生成物検索に関する指針を参考

にした。実験条件は、食品の種々な加熱加工操作の典型的な条件を類型化し、同ガイドラインが推奨する代表的な3つの加水分解条件(表4)を採用した。

表4 加水分解条件

温度	時間	pH	代表的加工工程
90℃	20分	4	低温殺菌
100℃	60分	5	ベーキング、醸造、煮沸
120℃	20分	6	殺菌*

*高圧下の閉鎖系

(例:オートクレーブまたは相当するもの)

3-1 pH調整用緩衝液の検討

規定されたpH条件下で処理した試験溶液を直接LC/MS/MSで測定することを考慮し、適切な揮発性緩衝液の作製を試みた。緩衝液は、揮発性物質の組み合わせで構成することとした。酢酸・ギ酸、ピリジン・ギ酸、トリエチルアミン・ギ酸、トリエチルアミン・酢酸、コリジン・酢酸、アンモニア・ギ酸、アンモニア・酢酸、モノエタノールアミン・塩酸、炭酸アンモニウム・アンモニアなどの組み合わせが考えられたが、的確なpHを得ることができ、また、取り扱いやすさや強い臭気を有さないなどの要件を考慮して、トリエチルアミン・ギ酸緩衝液を選択した。トリエチルアミン及びギ酸の各試液をpHメーターで測定しながら適宜混和し、容易かつ正確にpH4、5及び6の緩衝液を作製した。

3-2. 加熱器具の検討

加水分解処理を行うための器具について検討した。共栓ナス型フラスコにジムロート冷却管を装着してマントルヒーター上で加熱したところ、温度制御がうまくできな

かった。そこで、加熱用容器として共栓試験管を用い、密栓してアルミ製ヒートブロック上で加熱した。その結果、温度は制御できるものの、内圧が上昇し、試験液の一部が漏えい・揮散するなどして液量に変化したことから、農薬本体や加熱生成物も損失している可能性が示唆された。機密性が高く、耐圧性に優れ、アルミ製ヒートブロックで加熱処理できる加熱用容器について調査した結果、化学反応用ガラスバイアル及びアミノ酸分析用加水分解試験管などが候補に挙げられた。これら容器を比較検討し、今回は、ヒートブロック上での操作性がより優れたアミノ酸分析用加水分解試験管(以下、バキュームチューブと称す)を採用することとした。

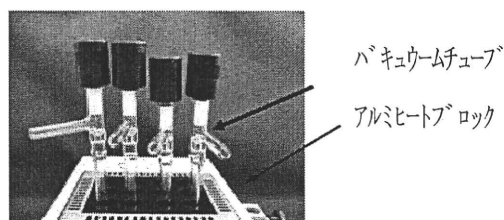


図3 加熱装置及びバキュームチューブ

3-3. 加熱処理方法

それぞれのバキュームチューブに、pH4、5、及び6となるように調整したトリエチルアミン・ギ酸緩衝液1mLを入れ、これにマラチオン10 mg/mLアセトン標準溶液10μLをそれぞれ加えた。加熱により加圧破損しないように、容器内をアスピレーターで減圧した後、密栓し、アルミブロック中で表1の条

件に従い、各 pH の緩衝液それぞれを 90℃20 分、100℃60 分及び 120℃20 分加熱した。

3-4. 分析方法

放冷後、バキュームチューブ内の溶液を 10 μ L ずつ採り、これにアセトン 40 μ L、メタノール 40 μ L を加え、それぞれ GC/MS、LC/TOF-MS で測定した。

<GC/MS 条件>

装置 : Agilent 6890/6973 (Agilent 社製)、カラム : DB-5MS (内径 0.25mm、膜厚 0.25 μ m、長さ 30m) (Agilent 社製)、カラム温度 : 50℃ (1 分) \rightarrow 25℃/分 \rightarrow 125℃ \rightarrow 10℃/分 \rightarrow 300℃ の段階的昇温プログラム

〔「GC/MS による農薬等の一斉試験法」(平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「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」別添)に記載されている条件]、インターフェイス温度 : 280℃、イオン化モード : EI (70eV)、測定モード : スキャン (m/z 50~550)

<LC/TOF-MS 条件>

装置 : UPLC ACQuity-Xevo QTofMS (Waters 社製)、カラム : ACQuity UPLC BEH C18 (内径 2.1mm、膜厚 1.7 μ m、長さ 100m \times mm) (Waters 社製)、カラム温度 : 40℃、移動相 : A 液 メタノール-水=90:10、B 液 メタノール-水=10:90 の混合溶液、グラジエント条件 : A:B=90:10 (0 分) \rightarrow A:B=0:100 (10 分) \rightarrow A:B=90:10 (10.1 分) \rightarrow A:B=90:10 (15 分)、流速 : 0.2mL/min

イオン化法 : ESI(+)、イオン源温度 : 120℃
キャピラリー電圧 : 3.0kV、サンプルコーン電圧 : 20.0V、コーンガス : N₂、50L/hr、乾燥ガス : N₂、1000L/hr、スキャン範囲 : m/z 50~1000、リファレンスマス : m/z 556.2771 [M+H]⁺ 及び m/z 278.1141

(Leucin encephalin、Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu、C28H37N5O7、200pg/ μ L)

C. 結果及び考察

分担研究 1

昨年度は、国際基準 (FAO の基準) と国内慣行 (農薬取締法および食品衛生法) を比較し、両法で分析部位が相異なる農産品と相違点を整理するとともに、核果類と仁果実類について、作物残留試験等を行い、両法による残留濃度の測定値を比較検討した。

茎葉散布された非浸透性農薬の主要な残留部位である皮を、国内慣行法で除いて分析しているキウイ、すいか、メロン、さとうきび等については、残留基準値や作物残留性データを国内外で比較することは困難と考えられた。核果類については、既存の作残試験における関連データを解析して、国際標準 (種子を除く果実全体の分析値を種子を含む果実全体の) による残留値は国内慣行 (種子を除く。ももについては、種子と皮を除去した果実) による分析値と同等 (90-95%に相当) であることが確認された。仁果類は、国際的には全果実を分析するのに対して、国内慣行では、芯と花落ちを除去して分析する。5 種農薬を用いたりんごとなしの作物残留性調査 (試験地 : りんごは青森県と山梨県、品

表5 仁果類（りんごとなし）における5種農薬の残留農薬濃度（平成21及び22年度）

	農薬	残留濃度 可食部 A (mg/kg)	残留濃度 除去部 B (mg/kg)	A/B	残留濃度 全果実 C (mg/kg)	C/A
H21	イミダクロプリド	0.06	0.05	0.8	0.05	0.83
青森県 りんご (王淋)	シメコナゾル	0.08	0.11	1.4	0.08	1.00
	ピラクロストロビン	0.12	0.21	1.8	0.12	1.00
	フルフェノクスロン	0.16	0.16	1.0	0.13	0.81
	フルベンジアミン	0.22	0.22	1.0	0.22	1.00
	ボスカリド	0.27	0.50	1.9	0.32	1.19
H21	イミダクロプリド	0.04	0.22	5.5	0.07	1.75
山梨県 りんご (つがる)	シメコナゾル	0.05	0.34	6.8	0.10	2.00
	ピラクロストロビン	0.14	0.47	3.4	0.18	1.29
	フルフェノクスロン	0.21	0.66	3.1	0.24	1.14
	フルベンジアミン	0.15	0.87	5.8	0.24	1.60
	ボスカリド	0.24	0.26	1.1	0.40	1.67
H22	イミダクロプリド	0.10	0.18	1.8	0.11	1.10
山梨県 りんご (ふじ)	シメコナゾル	0.16	0.38	2.4	0.17	1.06
	ピラクロストロビン	0.20	0.34	1.7	0.23	1.15
	フルフェノクスロン	0.23	0.38	1.7	0.26	1.13
	フルベンジアミン	0.24	0.35	1.5	0.28	1.17
	ボスカリド	0.37	0.77	2.1	0.42	1.14
H22	イミダクロプリド	0.07	0.12	1.7	0.08	1.14
長野県 りんご (つがる)	シメコナゾル	0.03	0.16	5.3	0.05	1.67
	ピラクロストロビン	0.10	0.32	3.2	0.14	1.40
	フルフェノクスロン	0.06	0.16	2.7	0.08	1.33
	フルベンジアミン	0.28	0.32	1.1	0.28	1.00
	ボスカリド	0.28	0.55	2.0	0.32	1.14
H21	イミダクロプリド	0.27	0.3	1.1	0.28	1.04
茨城県 なし (豊水)	シメコナゾル	0.19	0.25	1.3	0.19	1.00
	ピラクロストロビン	0.14	0.20	1.4	0.13	0.93
	フルフェノクスロン	0.10	0.15	1.5	0.08	0.80
	フルベンジアミン	0.12	0.18	1.5	0.14	1.17
	ボスカリド	0.28	0.39	1.4	0.32	1.14

A：国内方式基準値適用部位及び検査部位、C：国際方式基準値適用部位及び検査部位

種はそれぞれ、王淋とつがる、なしは千葉県）を行い、分析部位の相異が残留値に与える影響を調べた。3圃場間での残留濃度の[国5種農薬を用いたりんごとなしの作物残留性調査（試験地：りんごは青森県と山梨県、品種はそれぞれ、王淋とつがる、なしは千葉県）を行い、分析部位の相異が残留値に与える影響を調べた。3圃場間での残留濃度の[国内慣行]／[国際法]比率は、0.81と2.0の範囲であり、平均 1.2 ± 0.35 (sd)。3試料間の比較

では、ボスカリ以外のいずれの農薬においても、山梨産のりんご試料において、除去部（芯＋花落ち）の残留値が可食部の値よりも3～数倍明らかに高い傾向が認められた。一方、青森産のりんご及び茨城産のなしではそのような傾向は認められなかった。その他、可食部と非可食部の試料重量比などには、3圃場で得られた試料間に相異点は認められなかった。

今年度は、昨年度調査で、試料調製場所による差の大きかったりんごについて、その差の原因を明らかにするため再調査をしたほか、根菜類について、根と葉の付着部の扱いについて、検討した。

1. りんご

22年度の調査においても昨年度と類似の結果であった。国内標準（花落ち及び芯を除く可食部）による分析部位における残留濃度測定値に対する国際基準対応分析部位（全果実）中の残留濃度測定値の相対比率は、表5に示すように、1.00～1.67の範囲（平均 1.2 ± 0.2 ）であり、昨年度データを含めたこれまでのりんごの全データで見た場合、0.81～2.0の範囲（平均 1.24 ± 0.30 ）であった。また、なしを含めた全データでは、平均 1.19 ± 0.29 （0.80～2.0）であった。

なお、全果実での残留値を、全果実を分析部位として求めた場合の残留値（国際標準方式）は、可食部と非可食部に分別した残留値から計算で算出した残留値の84～108%（長野・シメコナズール～山梨・フルベンジアミド）の範囲であり、概ね一致することが確認された。

仁果類における6農薬の平均残留値の部位別分布を図4に示す。本年度調査の長野りんごにおいては、非可食部（除去部）の残留農薬量が多かった理由としては、中心部（果梗の基部～芯～花落ち）の空隙が目視により確認された。そのため、一部りんご試料の非可食部の農薬残留量が高くなる原因は、この中心

部の空隙への残留によると推察された。なお、昨年度のように成熟期に比較的高温な場合に、りんご中心部の空隙化やつる割れが生じやすいことが知られている。

以上より、仁果類の残留基準値設定部位及び検査部位を国際基準にそろえる場合、現行の国内方式による最大残留量推定値に少なくとも2倍程度の余裕を持たせることが必要と思われる。

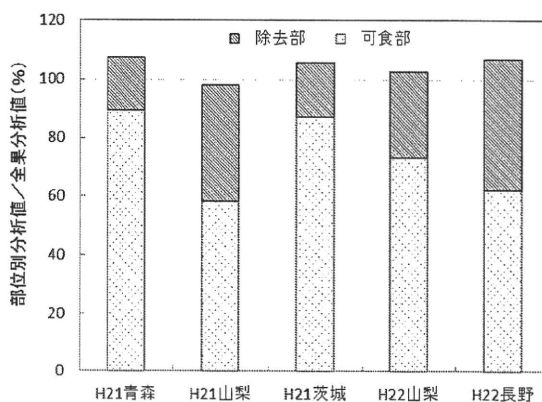


図4 仁果類における6農薬の平均残留値の部位別分布
(H21 茨城試料は日本なし、他はりんご試料)

2. 根菜類の作物残留性調査

残留値と試料重量から算出した部位別の残留量及び試料全体の残留量の比率（部位別/試料全体）を表6に示す。2圃場間の6種農薬において、葉部には93～98%、接合部には1%未満～4%、根部には1%未満～3%が分布していた。

かぶにおける部位別の2圃場の平均残留値を図5に示す。従前の予測としては、葉の基部（根と葉の結合部）への薬剤の濃縮等も想

定された。しかしながら、今回の調査結果では、葉部と根部の残留レベルの差に伴う希釈効果により、結合部の残留レベルは全て葉部の残留レベルより低かった。従って、根菜類の葉と根の結合部の取り扱いが、残留分析結果に与える影響は少ないものと推察された。但し、今回の調査結果は茎葉散布剤であることから、土壌処理剤での残留値の影響は未知数であることや、根部へ葉部の一部が混入した場合には一律基準を超える場合も想定されることから、その取扱いには十分留意する必要があるものと考えられる。OECD テストガイドラインにおける根菜類の分析部位は「地上部を除いた農水産物全体。必要に応じて、残土及び堆積物を、根及び塊茎を冷たい流水中で、もしくは、穏やかに柔らかいブラシでのブラッシングで除去し、清浄なティッシュペーパーを軽く押し当てて水分を除く。にんじんについては、乾燥した地上部の最下部の葉柄部分を、包丁で慎重に切り離す。仮に、根の一部が冠状に切り離されたならば、その部分は根の分析試料に加える。」と記載されており、本調査結果から、この記載の妥当性が確認された。

3. とうもろこしの既存データ調査

未成熟とうもろこしの基準値設定部位および分析部位は、国内慣行では外皮、ひげ及び芯（穂軸）を除いた子実。国際標準は、ひげ及び芯を含む子実全体と異なっている。この違いの影響を把握するため、子実中の残留

農薬の分布に関する情報を JMPR および食品安全委員会の農薬評価書で検索した。子実中の残留農薬レベルは極めて低いものが大部分であったが微量検出される例もあり、次年度に実態調査を行う。

表6 かぶにおける残留分析結果

作物	農薬名	分析部位	平均試料重量 (g/個)	平均残留値 (mg/kg)	部位別の残留量/試料全体の残留量 (%) *
かぶ (茨城)	アセタミプリド	葉部	104	0.78	98
		接合部	14.8	0.02	<1
		根部	150	0.01	2
	アゾキシストロビン	葉部	104	5.88	97
		接合部	14.8	1.29	3
		根部	150	0.02	<1
	クロルフェナピル	葉部	104	4.99	97
		接合部	14.8	1.04	3
		根部	150	0.02	1
	シアゾファミド	葉部	104	4.26	97
		接合部	14.8	0.87	3
		根部	150	0.01	<1
	ジノテフラン	葉部	104	2.7	93
		接合部	14.8	0.74	4
		根部	150	0.07	3
トルフェンピラド	葉部	104	5.36	95	
	接合部	14.8	1.57	4	
	根部	150	0.06	2	
かぶ (宮崎)	アセタミプリド	葉部	364	0.94	98
		接合部	122	0.01	<1
		根部	614	<0.01	2
	アゾキシストロビン	葉部	364	5.86	98
		接合部	122	0.34	2
		根部	614	<0.01	<1
	クロルフェナピル	葉部	364	3.84	98
		接合部	122	0.22	2
		根部	614	<0.01	<1
	シアゾファミド	葉部	364	4.24	97
		接合部	122	0.34	3
		根部	614	<0.01	<1
	ジノテフラン	葉部	364	4.46	96
		接合部	122	0.4	3
		根部	614	0.02	1
トルフェンピラド	葉部	364	6.54	97	
	接合部	122	0.58	3	
	根部	614	<0.01	<1	

* 残留量は分析値が定量限界未満の時、定量限界相当量(0.01 mg/kg)で算出

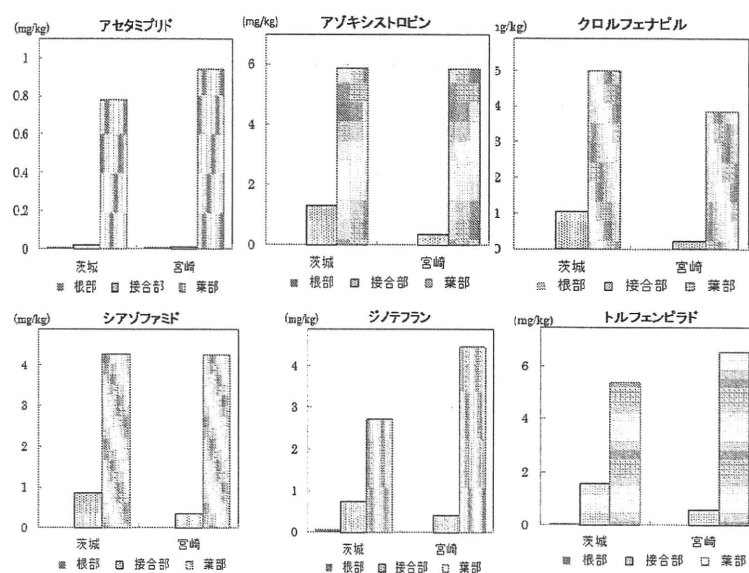


図5 かぶの部位別の2圃場平均残留値

分担研究 2

I. 統計手法による最大残留量の算定

1. 処理区試料における残留値

2年間にわたってはくさいとほうれんそう各 16 例の残留値の分布データを得、解析した(表 7、8)。

最大残留条件またはそれに近い条件では、調査対象とした全農薬 (7 農薬) がすべての試料で LOQ を超えて残留していた。農薬別に 16 例の残留データでみた最大値と最小値の比は、はくさいで 6.0~14 倍、ほうれんそうで 3.6~5.7 倍であり、RSD も、はくさいが 52~64% (平均 58%)、ほうれんそうが 34~43% (平均 40%) と、ほうれんそうでは小さなばらつきであった。これは、はくさいが露地栽培で天候の影響を受けやすいのに対して、ほうれんそうは施設栽培されており、環境の変動が露地に比べて小さいことを反映していると推定される。

同じ試験圃場で 2 年 (2 回) の残留試験データが得られたはくさい 7 試験地、ほうれんそう 6 試験地における 2 年の残留値を比較した。図 6 に示すように、年次差は試験地による差が大きく、薬剤による違いは小さかった。各試験地における年次差は比較的小さく、はくさいで最大 4.1 倍 (平均 2.1 ± 0.91 倍)、ほうれんそうでは最大でも 2.1 倍であった。なお、薬剤間での年次差は、試験地間での年次差に比べてかなり小さいが、これは、本調査では、各薬剤を別々の圃場区画に散布して薬剤ごとに独立した試験としたのではなく、複数剤 (3~4 剤)

の混合剤として散布したためと考えられる。

今回調査した大部分の農薬の残留基準値は、2 例を除いて、後記する標準的基準値案の範囲に入っており、作残試験における測定値もこの基準値以内であった。例外となった、農薬 2 のはくさいにおける基準値は標準基準値案よりも小さく、測定された最大濃度は基準値を少し超えていた。また、農薬 6 のほうれんそうにおける残留基準値は標準的な基準値案範囲の 1/2 以下の小さな値に設定されており、作残材検の全測定値がこの基準値を超えていた。概して、ほうれんそうでは、調査した 4 農薬とも残留基準値は、適用範囲での使用によって生じる最大残留レベルに比べて余裕の少ない値に設定されていた。

2. 残留値の分布

残留値の分布をヒストグラム (図 7) に表したほか、Shapiro Flancia 検定と、Jarque Bera 検定を行い、分布の非正規性を検討した。

Shapiro-Francia の検定では、対数正規分布に従っているとの仮説は、両作物のいずれの農薬についても棄却されなかった ($P > 0.05$) が、Jarque-Bera の検定では、はくさいにおける農薬 5 及びほうれんそうにおける農薬 7 の分布を除いて、正規分布ではないとの仮説が棄却された ($P > 0.05$)。両検定で 9 例中 7 例で類似の判定結果となったが、2 例では一致しなかったことから伺われるように、今回の例数 (16) 程度の集団で残留値の分布が正規分

布か対数正規分布かを的確に判定するのは困難であると思われる。これは、図6のヒストグラムを参照しても同様であった。

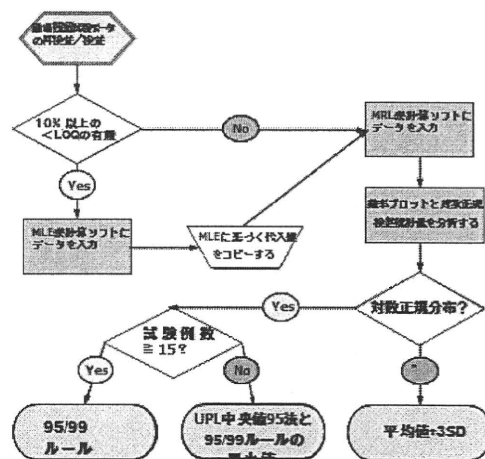
3. 統計手法を用いた最大残留量推定手法

作物残留試験データから統計手法を利用して最大残留量 MRL を推定し、残留基準を設定する既存の代表的な手法には、次の2法がある。

EU の方式には2方式があり^{1, 4)}、EU1法は、残留値の分布は正規分布に従うと仮定し、95 パーセンタイル値の 95%信頼限界上限 (= 平均値 + k・標準偏差) を最大残留量と推定する方式である。k は 95%信頼限界上限を考慮した係数で、母数 > 30 の場合、k は 2 となる。また、RSD=1 であれば、最大残留量は平均値の 3 倍と算定される。もう1つの方式は分布に依存しない場合、分布の 75 パーセンタイル値の 2 倍を最大残留量に採用する方式 (EU2) である。EU1 法と EU2 法の両方で計算し、大きい方の出力値を最終的に採用する。

NAFTA の手法⁴⁾は、残留値の分布の対数正規性を Shapiro-Francia 法で検定し、正規分布であれば、平均値 + 3・標準偏差を最大残留量にする (n=9 では、EU1 法と一致)。対数正規分布に従う場合で、試験例数が 15 以上の場合は、95 パーセンタイル値の 95%信頼限界上限を最大残留量とし (「95/99 ルール」)、例数が 15 未満であれば、中央値の 95% 信頼限界上限 (「UPLMed95 法」) と 95/99 ルール値との小さい方の値を最大残留値とする。NAFTA の方式は、右図のフローのように、上記に加えて、<LOQ のデータが含まれ

る場合の措置も加味されており、複雑な方式になっている。



EU と NAFTA 両者の方式を踏まえ、OECD の農薬作業部会は、新たな MRL 算出方式によるスプレッドシートと白書、およびマニュアルを、本年度末に公表した¹¹⁻¹²⁾。同方式は、最大残留量の推定を特定の分布パターンに依存しない方法にしている点が特徴であり、EU および NAFTA の既存データを使ってその妥当性の検証が行われ、白書に纏められた。

以下は OECD 法の概要である。

- ・分布に依存しない方法を採用する。
- ・採用するデータ：GAP からの逸脱範囲が ±25% 以内のデータ。

・MRL は、次の①～③の中の最大値を採用する：

- ① 最高濃度 (HR)、
- ② 平均値 + 4・標準偏差、
- ③ 3・平均値・CF

CF = 1 ~ 2/3 (<LOQ データの割合) で、<LOQ の割合に応じて平均値の 2 倍から 3 倍の範囲を MRL にする。すなわち、

<LOQ が含まれていない場合、CF=1 とし、平均値の 3 倍を MRL にする。全データが <LOQ の場合、CF は 1/3 となり、平均値の 2 倍を MRL とする。

・MRL は次のように丸めて基準値にする：

- ① 1～10 は 1 桁の数値、10～100 は 10 の整数倍に丸める。
- ② 1 と 2 の間に 1.5 を設ける。その 10 倍 (10 と 20) または 1/10 (0.1 と 0.2)、1/100 (0.01 と 0.02) についても同様とする。
- ③ 最後の数値より小さな位を MRL に付けない (1 は良いが、1.0 とはしない)。
- ④ MRL は原則、切り上げて丸め、基準値等級 (表 9) に当てはめて基準値案とする。
- ⑤ ただし、隣接基準値等級との差の 1/10 以下の場合には、切り下げる (0.021 の例：隣接基準値等級は 0.02 と 0.03。その差の 1/10 は 0.001 であり、基準値は 0.002。0.153 の例：隣接基準値等級は 0.1 と 0.2。その差の 1/10 は 0.005 と 0.01 であり、基準値は 0.15)。

EU、NAFTA、OECD の手法による残留基準算定値は、当研究の残留データについては、どの手法によっても相互の差が相対比で 2.5 倍以内の比較的類似した結果を与えたが、EU 方式によるものが全例で、最も小さな値となった。また、OECD 法は NAFTA 法と同等の結果を与えた。これらと日本の経験則に基づく、標準的な方法で算定した基準値案は、EU と同等、OECD

法とは同等かやや低めの結果となった。

前述のように、本研究で扱った作残試験の残留データは、16 例の試験であるが、その分布パターンを適切に特定するのは難しく、更なるデータが必要であった。現在農薬登録に当たって求められる作残試験の例数は、農薬、使用法、作物当たり 2 例 (2 県) 以上であるが、農薬登録制度の改正に伴い、平成 26 年度以降に申請されるものについては、特に生産量の多い作物では 6 例以上に、その他は 3 例以上 (生産量の少ない作物は 2 例以上) にそれぞれ増やされた¹³⁾。ただし、この例数は今回の調査の試験例数よりも更に少なく、分布パターンに依存した最大残留量推定方式では不適切な結果を導く可能性が危惧される。本研究で検討対象とした試験はごく限られたものではあるが、統計手法による最大残留量の推定手法としては OECD の方式が望ましいと期待される。来年度は、本研究で得た作残データを用い、そこから無作為に選んだ 3 例及び 6 例のデータから推定される OECD 法と国内慣行法による基準値案の関係を検討する。

II. 食品分類の調査

当分担研究の中で今年度から実施する小課題「国際機関における食品分類の調査」については、OECD、JMPR、Codex の HP から改定案など関連する公開資料を収集した。

OECD の作物残留圃場試験ガイドライン
Codex の食品分類

・ CXA_004_1993e

・ CXG_04e(Codex Alimentarius、 vol2A、
part1-2000)

同改定案

・ Pr38CxCl Draft Rev1-2006

・ al33_24e step7 (43thCCPR、 2011)

・ pr43_05e(43th CCPR、 2011)

・ pr43_06e(43thCCPR、 2011)

代表作物選定原則

・ Pr4104be(42thCCPR、 2010)

・ Pr4104ae(42thCCPR、 2010)

参考文献：

1) Commission of the European Communities、 Directorate General for Agriculture: VI BII-1、 Appendix 1、 Calculation of maximum residue levels and safety intervals. 7039/VI/95 EN、 22/7/1997

2) US-EPA、 EPA-HQ-OPP-2007-0632-0003、 Canadian PMRA、 PRO2005-4:Guidance for setting pesticide maximum residue limits based on filed trial data.

3)NAFTA MRL calculator(Aug、 2009) :
www.epa.gov/oppfead1/international/naftatwg/mrl-calculator.xls

4) US-EPA、 EPA-HQ-OPP-2007-0632-0002: Statistical Basis of the NAFTA Method for Calculating Pesticide Maximum Residue Limits from Field Trial Data

5) FAO: Pesticide residues in food 2006、 FAO Plant Production and Protection Paper、 187、 21 (2006)

6) FAO: Pesticide residues in food 2007、 FAO Plant Production and Protection Paper、 191、 18 (2007)

7) FAO: Pesticide residues in food 2009、 FAO Plant Production and Protection Paper、 196、 3 (2009)

8) Discussion paper on the calculation method for the estimation of maximum residue limits for pesticide being developed through the OECD、 CX/PR 10/42/11、 March 2010

9) Codex Alimentarius Commission、 CL2009/19-PR (June、 2009)、 Request for comments on the MRL calculation method being developed through the OECD

10) Kieran Hyder、 Kim Z. Travis、 Zoe K. Welsh and Ian Pate: *Human and Ecological Risk Assessment*: 9 (3)、 721-740 (2003)

11) OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Pesticides, No.56, OECD MRL calculator: User guide (01-Mar-2011),

12) OECD MRL Calculator: Statistical white paper, 01-Mar-2011, ENV/JM/MONO(2011)3

13) 「農薬の登録申請に係る試験成績について」の運用について、平成13年10月10日、生産第3986号農林水産省生産局生産資材課長通知、最終改正平成23年4月1日