

I. 総合研究報告

研究代表者 鈴木美成

研究要旨

課題 1. 食品を介した農薬等の摂取量推定に関する研究

有害物質の摂取量推定値は、健康リスクの管理を目的とする規格値策定等の行政施策の検討、及び効果検証のための科学的根拠となる。本研究では、日常的な食事から国民が平均的に摂取する残留農薬の量を、マーケットバスケット方式により全国 6 地域、トータルダイエツト試料の分析結果に基づき推定した。調査対象とした農薬等にはこれまで ADI に対する推定摂取量の割合が高いと推定されている農薬と、国民の関心が高まっているネオニコチノイド系農薬に対して摂取量評価研究を行った。さらに有機塩素系農薬についても調査を行った。

令和元年度から令和 3 年度にかけて、継続して残留農薬摂取量を推定したところ、各農薬の推定一日摂取量は次の通りであった;BHC: 0.049 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$, γ -BHC: 0.025 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$, アセタミプリド (代謝物含む): 1.51 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$, アセフェート: 0.236 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$, イミダクロプリド: 1.07 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$, インドキサカルブ: 0.004 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$, クロチアニジン: 0.644 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$, クロルピリホス: 0.151 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$, ジノテフラン: 4.69 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$, スルホキサフロル: 0.470 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$, チアクロプリド: 0.328 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$, チアメトキサム: 0.328 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$, テフルトリン: 0.040 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$, ニテンピラム: 0.223 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$, ノバルロン: 0.088 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$, ハルフエンブロック: 0.040 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$, ビフェントリン: 0.150 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$, ピリダベン: 0.060 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$, フェニトロチオン: 0.184 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$, ブプロフェジン: 0.091 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$, フルアジホップブチル(代謝物含む): 0.062 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$, フルベンジアミド: 0.344 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$, ヘキサジノン: 0.023 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$, ヘプタクロル (異性体含む): 0.006 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$, ボスカリド: 1.43 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$, メタミドホス: 0.064 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ 。調査した全ての農薬において、対 ADI 比は 1%未満であった。対 ADI 比が比較的高かったのは、クロルデン (0.35%)、クロルピリホス (0.27%)、メタミドホス (0.19%)、アセフェート (0.18%)であった。以上の検討から、一般的な食事を介した残留農薬の摂取による日本人への健康影響のリスクは小さいと推定された。

課題 2. 食品以外の暴露要因である環境中の農薬濃度の評価に関する研究

令和元年度は、大気中農薬を評価するための分析系の構築を行った。農薬を捕集するためのフィルターには、石英フィルターとエムポアディスク C18 FF オクタデシルを用いて、アセトンにより対象化合物の抽出を行った。11 種類の農薬は LC/MS/MS にて、4 種類の農薬は GC/MS にて分析を行った。その結果、1.08 m^3 の空気吸引後の対象化合物の抽出効率はいずれも 90%以上の回収率が得られ、フィルターでの農薬のトラップならびに抽出工程での溶出が十分であることが確認できた。また、サンプリング後のフィルターを 1 週間冷蔵保存しても測定には影響ないことが確認できた。本法における定量限界は、いずれの農薬に対しても ADI の 5%に相当する曝露量を評価するのに必要な低い濃度を定量できることが示された。また、令和 2 年度には実地における分析系について検討し、

0.36m³の空気吸引でヘプタクロル以外の農薬においてはほぼ 80%以上の回収率が得られることを確認した。

令和 2 年度から 3 年度にかけて、構築した分析系を用いて、継続的なモニタリングを行った。地方部として、愛媛県愛媛大学の食堂、農場近傍、建物近傍の 3 か所にて空气中農薬の分析を行った。都市部として、東京都早稲田大学キャンパス内および横浜市中川スクウェア（住宅展示場）で築17年の住宅内のウォークインクローゼット内にて空气中農薬の分析を行った。

その結果、地方部においては、春から夏にかけて果樹等に使用される殺虫剤のブプロフェジンが 4 月、6 月、7 月に約 2.1~6.0 ng/m³の濃度で検出された。ブプロフェジンは本対象農薬中では愛媛県で最も多く使用される農薬であり、測定地点の周囲にある果樹園等で使用されたものが飛散し検出されたものと考えられた。一方で都市部においては、フェニトロチオンは春季、アセフェート、フルアジホップブチル、ノバルロンは夏季、クロルピリホスとブプロフェジンは夏季と冬季、ボスカリドは秋季と冬季に高いことが分かった。また、室内からはクロルピリホスの明瞭なピークが検出されたものの検出下限であった。検出濃度はいずれも低濃度であり、検出できた濃度の最大値と、日本人の平均呼吸率 (17.3 m³/day) を用いて、24 時間曝露したと仮定した吸入曝露量は、対 ADI 比は最大でフェニトロチオンの 0.23%であった。以上の結果より、都市部において一般的な生活をしている限り、農薬の吸入曝露による健康影響はほぼないと考えられた。また、ウェアブルサンプラーに用いる捕集材として、ポリジメチルシロキサン (PDMS) をコーティングさせた Twister (ゲステル社製) を用いた検討も行った。

課題 3. 総合的な摂取量評価における推定値の精緻化および信頼性の向上に関する研究

本研究では、国民が食品を介して摂取する農薬の量をより精緻に推定するために、1) 確率論的な摂取量推定を行うため、喫食量の確率密度分布の推定、2) 不検出値を含むデータに対する統計的妥当性の高い推定法、3) モンテカルロシミュレーションを用いた確率論的な摂取量推定について検討を行った。

令和元年度は、確率論的な摂取量推定を行うため、喫食量の確率密度分布の推定をおこなった。喫食量には 0 にマスを持つ正の値であるので、ゼロ過剰を表現できる Tweedie 分布、ゼロ過剰ガンマ (ZIG) 分布、ゼロ過剰対数正規 (ZILN) 分布の確率密度分布を検討した。Tweedie 分布が最適だったのは、2 群、8 群、9 群、10 群、12 群であった。ZIG 分布が最適だったのは、1 群、4 群、5 群、6 群、7 群、11 群であり、ZILN 分布が最適だったのは 3 群と 13 群であった。

令和 2 年度は、不検出例 (ND) を含むデータにおける統計妥当性の高い推定法として、従来もちいられてきた ND に LOQ の 0.2 倍の値を代入する方法 (代入法) と最尤推定 (MLE) 法とベイズ (BE)法を比較した。MLE 法による 1 日農薬摂取量の平均値は、全て BE 法による平均値の事後予測分布の四分位範囲内に収まっていた。しかしながら、代入法では一部の農薬が BE 法による平均値の事後予測分布の四分位範囲から外れていた。下限値が 0 のデータの割合が多く、相対標準偏差が大きいと、BE 法と MLE 法の推定値の相対的な差異が大きくなる傾向が認められた。MLE 法は、サンプルサイズが小さく、歪度が大きいデータが不得意であることが知られている。この点を踏まえると、本研究の結果は、BE 法の方が MLE 法よりも妥当な推定結果であることを示唆していると考えられた。

令和 3 年度は、令和 2 年度に引き続き、不検出例を含むデータにおける統計妥当性の高い推定法として BE 法を用いた摂取量評価を行った。さらに、真値に 0 を含むデータにおける統計的妥当性の高い推定法に関する数値シミュレーション、および二次元モンテカルロシミュレーション (2D-MCS)

を用いた摂取量分布の推定に関して検討を行った。数値シミュレーションの結果、MLE法よりもBE法の方が、推定の真度・精度・妥当性が良好であった。さらに、この傾向は事前分布の設定に寄らず、無情報事前分布を用いた場合でもBE法の方がMLE法よりも良好な真度・精度・妥当性を示した。以上のことから、ZILN分布に従う不検出例を含むデータの解析においても、BE法が有効であることが示された。これらの結果を基にゼロ過剰モデルも考慮して、各食品群中の農薬濃度分布をBE法で推定し、2D-MCSによる残留農薬摂取量分布を推定した。ADIを超過する確率は、アセフェートの0.001%が最大であったことから、検討したいずれの農薬も健康リスクは小さいと示唆された。さらに、2D-MCSから推定した結果と、摂取量のデータからBE法で推定した結果を比較したところ、農薬摂取量の平均値の事後予測分布が良い一致を示した。以上のことから、いずれの推定方法も妥当であると考えられた。

課題 4. 検査部位の変更が残留農薬等の検査及び分析結果に及ぼす影響と対処法の検討

令和元年度は、調製試料の均質性に及ぼす影響について検討した。検査部位変更前後の試料を調製し、調製試料の状態や粒子の大きさなどを比較、考察した。その結果、種子や果皮等が含まれることにより変更前の検査部位とは若干均質性が異なるものの、調製試料のほとんどは微細な粒子まで粉碎されており、特定部位の沈殿等もないことから、種々の試料調製機を用いて均質な調製試料が得られるものと考えられた。

令和2年度は、検査部位の変更が残留農薬等の分析結果に及ぼす影響について検討した。すなわち、みかん、すいか、びわを検討対象食品として、これら食品の検査部位変更前後の試料を調製した。検討対象農薬等39化合物を調製した試料に添加し、「LC/MSによる農薬等の一斉試験法Ⅰ(農産物)」を用いて試験溶液を調製した。調製した試験溶液をLC-MS/MSで測定し、添加した各農薬等の回収率を求めた。検査部位変更前後の調製試料における回収率を比較し、検査部位の変更が農薬等の分析結果に及ぼす影響について検討した。

令和3年度は、検査部位が変更される果実を含めた10食品について、通常の常温磨砕法よりも均質な試料が得られる可能性が高い凍結粉砕法を用いた試料調製を検討した。凍結粉砕法の操作手順を確立した後、試料の粉砕状況を常温磨砕法と比較した。その結果、柔軟性のある果皮は凍結粉砕法の方が微粒子となったのに対し、硬い種子や果皮は常温磨砕法の方が小さくなる傾向が認められ、食品によって均質化しやすい試料調製法が異なることが明らかとなった。また、農薬が残留した食品を凍結粉砕法及び常温磨砕法で試料調製し、分析値のばらつきを求めた結果、均質性が低い場合、少量の試料を分析に供すると農薬の分布によってはばらつきが大きくなることが示された。これらの結果から、食品によって適切な試料調製法を選択するのが望ましいと考えられた。

以上の検討から、検査部位の変更後も従来から用いられている常温磨砕法で、検査に必要な均質な調製試料が得られるものと考えられた。ただし、試料に種子や果皮等が含まれるため、農薬によっては試料マトリックスの測定への影響により異なる結果を生じる可能性があることがわかった。このような場合でも、使用するLC-MS/MSの測定感度に応じて試験溶液を希釈することで、大幅な変更をすることなく対応可能であると考えられた。また、凍結粉砕法は、一般に、常温磨砕法よりも均質な試料が得られる可能性が高いと思われるが、食品によって均質化しやすい試料調製法は異なり、必ずしも凍結粉砕法の方が均質化しやすいとは言えないことが示された。これらの結果から、食品によって適

課題1. 食品を介した農薬等の摂取量推定に関する研究

研究分担者

鈴木 美成 (国立医薬品食品衛生研究所
食品部第四室長)

研究協力者

北海道立衛生研究所 平間祐志、竹脇優太郎、
宮島祥太、青柳 光敏

秋田市保健所 戸田英汰、伊藤功一

神奈川県衛生研究所 萩尾真人、福光 徹、林
孝子

和歌山県環境衛生研究センター 新宅 沙織

広島県立総合技術研究所 井原紗弥香、川崎恭
寛、中島 安基江

福岡県保健環境研究所 飛石和大、佐藤 環、堀
就英

課題2. 食品以外の暴露要因である環境中の農薬濃度の評価に関する研究

研究分担者

鈴木 美成 (国立医薬品食品衛生研究所
食品部第四室長)

大河内 博 (早稲田大学理工学術院教授)

研究協力者

川嶋文人 (愛媛大学大学院農学研究科教授)

課題3. 総合的な摂取量評価における推定値の精緻化および信頼性の向上に関する研究

研究分担者

鈴木 美成 (国立医薬品食品衛生研究所
食品部第四室長)

課題4. 検査部位の変更が残留農薬等の検査及び分析結果に及ぼす影響と対処法の検討

研究分担者

根本 了 (国立医薬品食品衛生研究所
食品部第一室長)

研究協力者

坂井隆敏 (国立医薬品食品衛生研究所

食品部主任研究官)

志田 (齊藤) 静夏 (国立医薬品食品衛生研究所
食品部主任研究官)

菊地博之 (国立医薬品食品衛生研究所
食品部主任研究官)

A. 研究目的

課題1. 食品を介した農薬等の摂取量推定に関する研究

厚生労働省では食品を介した残留農薬等の摂取量を推定し、ADIの80%を超えないことを確認している。しかし、食品以外の曝露経路も懸念され、例えば、家庭用殺虫剤を使用することで吸入曝露の可能性がある。食品を介した農薬等の曝露推定のみを根拠とした食品中残留農薬の基準値設定は、食品以外の曝露量に不確定な要素があるため、精密なリスク管理には食品以外の経路も含めた総合的評価が必要である。

本研究班においては、ADIが低く設定されている成分かつ、一日推定摂取量試算でのADI占有率が70%を超える農薬等に加えて、国民の関心の高いネオニコチノイド系農薬・残留性の高い有機塩素系農薬を主な調査対象物質とした。また、本分担課題においては、令和元年から令和3年度にかけて食品からの摂取量をマーケットバスケット(MB)方式によるトータルダイエツト(TD)試料を用いた評価研究を行った。

課題2. 食品以外の暴露要因である環境中の農薬濃度の評価に関する研究

厚生労働省では食品を介した残留農薬等の摂取量を推定し、ADIの80%を超えないよう食品中残留農薬等の基準値を設定している。しかし、国際的にはADIの100%を基に食品中の残留農薬基準値が設定されているのが現状である。

日本においてADIの80%としているのは、農薬摂取は80%が食品から、残りの20%は環境由来の

吸入曝露あるいは経皮曝露によるものとの仮定の元に成り立つ。食品以外の曝露経路として、室内で家庭用殺虫剤を使用する、あるいは家庭菜園等に散布した農薬の吸入曝露の可能性がある。

しかしながら、全農薬摂取量の 20%と設定するに足る科学的な根拠は充分ではない。したがって、食品を介した農薬等の曝露推定のみを根拠とした食品中残留農薬の基準値設定は、食品以外の曝露量に不確定な要素があるため、精密なリスク管理には食品以外の経路も含めた総合的評価が必要である。

本研究班においては、ADI が低く設定されている成分かつ、一日推定摂取量試算での ADI 占有率が 70%を超える農薬を主な調査対象物質とし、令和元年度は大気中農薬の測定系の構築を行った。測定系のバックグラウンドの確認、フィルターでの農薬の吸脱着の確認、空気吸引条件下での農薬回収率の確認、サンプルの保管試験等の検討を行い、以下に示す測定系を構築した。令和 2 年度は実地での回収試験を行い、令和 2 年度から令和 3 年度においては構築した測定系を用いて、地方部（愛媛県）を対象とした大気中農薬濃度の分析並びに吸入曝露量の推定を行った。

課題 3. 総合的な摂取量評価における推定値の精緻化および信頼性の向上に関する研究

食品を介した農薬の摂取量評価は、残留農薬基準値といった健康リスクの管理を目的とする規格値策定等の行政施策の検討、及び効果検証のための科学的根拠となる。

食品中農薬濃度については打ち切り (censoring) 問題が生じる。打ち切りは、ある値よりも大きい、小さい、またはその両方の値を非表示にする。切り捨てられた (truncated) データとは異なるのは、打ち切られたデータポイントの数がわかっている点である。より具体的に残留農薬分析の場合について言及すると、検出限界 (LOD) あるい

は定量下限値 (LOQ) 未満のデータは、妥当な数値を割りてゐることは困難となる。とくに、本研究課題の様に複数の研究機関が参加した調査の場合には、ある機関の LOQ が他の機関の LOQ よりも高い場合に不検出 (ND) となった場合には影響が大きくなる。

これまでの厚生労働省が主体となって行ってきた農薬摂取量評価において、LOD 未満・および LOD 以上 LOQ 未満のデータは、ND として扱い、ND には LOQ の 0.2 倍した値を代入し平均的な摂取量を評価してきた。しかしながら、代入法は問題のある方法として認識されて来ており、限定された場合にのみ使用を推奨されるようになってきている。代入法に代わり、最尤推定 (MLE) 法などの代替法の使用が推奨されて来ている。しかしながら、サンプル数が少ない場合は、検出値と検出された割合のみを報告すべきとの提言もある。

このような場合に、ベイズ推定 (BE) 法が有効となる可能性がある。BE 法は尤度分布にこれまでの知識を用いて重み付けしたものと解釈できる。適切な事前分布を用いることで、MLE 法よりも安定した推定値を得ることができると期待されている。そこで、2019 年から 2021 年度の間に得られた農薬摂取量のデータに対して、BE 法による推定を行い、代入法および MLE 法との相違について評価した。

ND の問題と関連して、非天然型農薬は、使用履歴が無ければ、検体中の残留農薬含有量が 0 である可能性もありうる。近年になって、真値に 0 を含むようなデータの解析に関する報告がなされてきた。既存の報告は仮定したモデルの相違に注目した検討であり、推定法の差異については検討していない。また、真値が 0 である割合も最大で 60% であり、より広い範囲での検討が必要である。そこで、本研究では真値が 0 となる割合および ND 割合について幅広い組合せで、BE 法と MLE 法による推定結果の真度・精度・妥当性について評価を

行った。また、BE法については事前分布の影響についても検討した。さらに、TD 試料中の農薬濃度について適用を試み、二次元モンテカルロシミュレーション (2D-MCS) を用いた農薬の摂取量推定を行った。

課題 4. 検査部位の変更が残留農薬等の検査及び分析結果に及ぼす影響と対処法の検討

国内の残留農薬等の検査における検査部位は『食品、添加物等の規格基準 (昭和 34 年厚生省告示第 370 号)』に規定されているが、一部の食品は CODEX 基準と一致していない。検査部位の不一致は輸出入の際に係争の原因となるため、国際的な整合を図る必要がある。

CODEX 基準の検査部位を採用した場合、現行の検査部位とは試料マトリックス等が異なるため、試験操作や分析結果に影響を及ぼす可能性がある。そのため、検査部位の変更の影響の有無や程度を明らかにするとともに対処法について提案する必要がある。

そこで本研究では、検査機関における変更後の検査部位の円滑な導入及び運用を目的として、検査部位変更前後の試料を調製し、調製試料の状態や添加回収試験結果等を比較することにより、検査部位の変更によって起こり得る検査への影響や問題点を把握するとともに、それらの対処法について提案する。

令和元年度は、検討対象食品について検査部位変更前後の試料を調製し、調製した試料の状態や粒子の大きさなどを比較、考察することにより、検査部位の変更が調製試料の均質性に及ぼす影響について検討した。

令和 2 年度は、検査部位変更前後の試料を用いて添加回収試験を行い、得られた結果を比較することにより、検査部位の変更が分析結果に及ぼす影響について検討した。

令和 3 年度は、検査部位が変更される果実を含

めた 10 食品について、通常の常温磨砕法よりも均質な試料が得られる可能性が高い凍結粉砕法を用いた試料調製を検討し、試料の粉砕状況や分析値のばらつきを比較することを目的とした。

B. 研究方法

課題 1. 食品を介した農薬等の摂取量推定に関する研究

日常食からの残留農薬摂取量を推定するため、日常食のモデルとして MB 方式による TD 試料を調製した。各地域における個々の食品喫食量は、平成 26 から平成 28 年に行われた国民健康・栄養調査の結果を地域別に集計した平均値を用いた。2021 年の夏から秋にかけて、各地の小売店から食品を購入し、茹でる、焼く等の一般的な調理加工を行ってから、一日当たりの摂取量に従って秤量し、混合・均一化して試料とした。分析に必要な均質性を確保する目的から、調製時に試料に加水される場合があるが、その量は農薬濃度を算出する過程において考慮した。

TD 試料は、混合・均質化の際に組み合わせる食品の種類に応じて、下記 14 群に分割して調製した。1 群:米及びその加工品、2 群:雑穀・芋、3 群:砂糖・菓子類、4 群:油脂類、5 群:豆・豆加工品、6:果実類、7 群:有色野菜、8 群:その他の野菜・海草類、9 群:嗜好飲料、10 群:魚介類、11 群:肉・卵、12 群:乳・乳製品、13 群:調味料、14 群:飲料水。

各食品群に含まれる農薬等濃度は、LC-MS/MS あるいは GC-MS/MS で分析し、得られた濃度と食品喫食量を掛け合わせて、各食品群からの一日当たりの食品を介した残留農薬摂取量とした。各食品群からの残留農薬摂取量の総和を推定 1 日摂取量とした。1 日当たりの飲水量を 250 mL day⁻¹ として 14 群から残留農薬摂取量を算出した。各分析は 3 試行で行い、各食品群において 1 試行で添加試料の分析を行うことを基本とした。

摂取量調査の対象とした農薬等は、ADI 占有率が高いことが推定される農薬 (アセフェート、インドキサカルブ、クロルピリホス、ノバルロン、ビフェントリン、ピリダベン、フェントロチオン、ブプロフェジン、フルアジホップブチル、フルベンジアミド、ヘキサジノン、ヘプタクロル、ボスカリド、メタミドホス) およびネオニコチノイド系農薬 (アセタミプリド、イミダクロプリド、クロチアニジン、ジノテフラン、スルホキサフロル、チアクロプリド、チアメトキサム、ニテンピラム) とした。また、残留性の高い有機ハロゲン系農薬 (BHC、 γ -BHC、クロルデン、テフルトリン、ハルフェンプロックス) およびフェンプロパトリンも測定を行った。

分析法の妥当性の確認として行った添加回収試験においては、試験は最低限 2 種の濃度で行った。1 つは定量下限近辺の濃度とし、もう 1 つは定量下限の 10 倍近辺の濃度、検量線の間近辺の濃度、基準値がある場合は基準値近辺の濃度等から適切な濃度を選んで行った。

定量下限値および検出限界値は、5 併行以上でブランク操作を実施し、それぞれの測定溶液から得られた対象農薬等に由来する信号の平均値と標準偏差 σ を求める。あるいは、目的とする農薬等に由来するピークの近傍 (ピークの半値幅の 10 倍の範囲) のノイズを計測し、その幅 (最大値と最小値の差) の 2/5 をノイズの標準偏差とした。

このブランクの信号の平均値と σ の値から、平均値 + 3σ に相当する濃度を検出限界値、平均値 + 10σ に相当する濃度を定量下限値とした。

課題 2. 食品以外の暴露要因である環境中の農薬濃度の評価に関する研究

1. 分析法の検討

1-1. 試薬

フルアジホップ、フルアジホップブチル、アセフェート、クロルピリホス、ヘキサジノン、ボスカリド、ブプロフェジン、ノバルロン、ピリダベン、フルベン

ジアミド、ビフェントリンの 11 種類の標準物質については、富士フィルム和光純薬製を使用した。ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド A、ヘプタクロルエポキシド B については、AccuStandard 製を使用した。メタミドホス、フェントロチオン、インドキサカルブは、Dr.Ehrenstorfer GmbH 製を使用した。内部標準物質は、チアメトキサム-d₄、クロルピリホス-d₁₀ は関東化学製を、フェントロチオン-d₆ は林純薬工業製を、¹³C₁₀-ヘプタクロル、¹³C₁₀-ヘプタクロルエポキシド B は Cambridge Isotope Laboratories 製を使用した。アセトン、メタノール、アセトニトリル、ヘキサンは、富士フィルム和光純薬製の残留農薬・PCB 試験用 (300 倍) を使用した。LC/MS/MS の移動層に用いるメタノール及び蒸留水は関東化学製の LC/MS 用、酢酸アンモニウムはシグマアルドリッチ製の LC/MS 用を使用した。

1-2. 捕集方法

捕集フィルターには、石英フィルター (東京ダイレック製 Model 2500 QAT-UP, 47 mm) 及びエムポアディスク C18 FF オクタデシル (3M 製, 47 mm) を用いた。捕集フィルターは事前に測定対象化合物が無いことを確認し、そのまま用いた。捕集時に使用するフィルターホルダーは、使用前にアセトン及びヘキサンで溶媒洗浄を行い、乾燥させた後サンプリングに用いた。前段に石英フィルター、後段にエムポアディスクを配置し、吸引速度 3 L/min (柴田科学製ミニポンプ MP-Σ300NII) で 6 時間捕集し、捕集量は 1.08 m³とした。

1-3. 測定用試料の調製方法

捕集後の石英フィルター及びエムポアディスクはそれぞれねじ口試験管に入れ、内部標準 (クロルピリホス-d₁₀、チアメトキサム-d₄、フェントロチオン-d₆ 各 100 ng) 添加アセトン 10 mL を正確に加え、蓋の間にナフロン PTFE シートをはさみこみ、蓋をしめた。その後、軽く手で振り混ぜ vortex ミキサーで攪拌し、フィルター全体がアセトンに浸かるように

した。さらに、10 分間超音波処理を行った。遠心分離機にて $1000 \times g$ で 10 分間遠心処理を行い、上澄み液を各捕集フィルターからの抽出液として各分析に使用した。

1-3-1. LC/MS/MS 測定用の試料調製方法

上記の方法にて抽出したアセトン溶液 1 mL を分取し、窒素にて緩やかに濃縮乾固させた。その後、メタノールを 1 mL 添加し、内容物を再溶解させた。バイアルフィルター [GE ヘルスケアライフサイエンス製 ミニユニ G2 (PVDF 0.2 μm)] でろ過し、LC/MS/MS 測定用試料とした。

1-3-2. GC/MS 測定用の試料調製方法

バイアルインサートに 20 μL のアセトンを入れ、手書きで目安線を引いた。上記の方法にて抽出したアセトン溶液を精確に 100 μL 分取し、バイアルインサートに入れた。内部標準液 ($^{13}\text{C}_{10}$ -ヘプタクロル, $^{13}\text{C}_{10}$ -ヘプタクロルエポキシド B 各 0.2 ng) 10 μL を添加し、窒素にて緩やかに約 20 μL に濃縮し、ボルテックスミキサーで攪拌・均一化したものを GC/MS 測定用サンプルとした。

2. 捕集地点

採取地点は、早稲田大学西早稲田キャンパス (東京都新宿区) のある研究棟屋上 (高さ 65 m) で行った。室内環境中農薬を調べるため、2021 年 4 月 22 日から 23 日、12 月 15 日から 19 日にかけて、横浜市中川スクウェア (住宅展示場) で築 17 年の住宅内のウォークインクローゼット内で 24 時間毎の採取を行った。

3. 捕集方法

2019 年度の研究成果に基づき、エアロゾル態捕集用に石英繊維フィルター、ガス態捕集用エムポアディスクを重ねて大気捕集を行った。

さらに、ウェアブルサンプラーに用いる捕集材として、ポリジメチルシロキサン (PDMS) をコーティングさせた Twister (ゲステル社製) を用いて屋内、屋外での採取を行った。

4. 試料調製方法

採取した試料は、25 mL 試験管にフィルターを導入し、アセトンを約 7 mL 加え、超音波抽出を行った。Twister については、アセトンを約 5 mL 加え、超音波抽出を行った。その後、25 mL 試験管内の溶液を褐色遠沈管に移し替えた。このとき、ガラスシリンジに 0.45 μm メンブランフィルターを取り付け、溶液を汙過しながら移し替えた。フィルターの入っていた 25 mL 試験管を 3 回ほど洗浄した溶液も汉過して遠沈管に移した。その後、窒素 (純度 99.9999%) を吹き付けて、遠沈管内の溶液が 0.2 mL 以下となるまで濃縮した。そして、LC-MS 用メタノールを使用し、1 mL に定容し、GC-MS、LC-MS に導入した。

課題 3. 総合的な摂取量評価における推定値の精緻化および信頼性の向上に関する研究

1. 喫食量分布の推定

2014 年から 2016 年の国民健康・栄養調査のデータを解析に使用した (2014 年: 8047 件, 2015 年: 7456 件, 2016 年: 30820 件)。コード化された情報 (都道府県名、食品分類) を変換後、無効レコードを削除したものを (約 10%が無効) 解析に使用した。データベース内の数字は適宜換算を行った。

喫食量は非負値の連続変数であり、0 にマスを持っていた。そこで、0 過剰を表現できる確率密度分布である Tweedie 分布、zero-inflated gamma 分布、zero-inflated log-normal 分布を検討した。

解析には R (3.4.0) を用いた。ベイズモデルの計算は rstan パッケージ (2.16.2) を用いた。作成したベイズモデルの妥当性は、下記の式で示した広く使える情報量規準 [widely applicable information criterion (WAIC)] を用いて WAIC が最も低いモデルを採用した。

2. 不検出例を含んだ残留農薬摂取量の推定

データには、2019 年から 2021 年に本研究班で行った TD 試料を用いた調査による、残留農薬摂取

量の下限值および上限値を用いた。ただし、下限値がすべて 0 となった農薬及び、サンプル数が 2 未満の農薬は除いた。

ここで、解析の基本となる尤度について基本的な数式を示す。 N 個の観測値 Y がパラメーター θ を持つ確率密度関数 $f(Y|\theta)$ に従うと仮定したときの尤度 (L) は、以下の式で算出することができる。

$$L(\theta|Y) = \prod_{i=1}^N f(Y_i|\theta) \cdots \text{Eq. 1}$$

打ち切りのあるデータの場合、定量できたレコードには確率密度関数 $f(Y|\theta)$ から確率密度を、打ち切りとなったレコードには累積確率関数 $F(L, U|\theta) = P(L \leq Y \leq U|\theta)$ から累積確率を使用して、尤度関数次のように求めることができる。

$$L(\theta|Y) = \prod_{i=1}^{N_{\text{obs}}} f(Y_i|\theta) \cdot \prod_{j=1}^{N_{\text{cen}}} F(L_j, U_j|\theta) \cdots \text{Eq. 2}$$

ここで、 N_{obs} は定量値が得られたサンプル数、 N_{cen} は定量値未満のサンプル数、 L_j はサンプル j の下限値、 U_j は上限値を示す。Eq.2 で示した尤度関数を用いて、MLE 法および BE 法を用いた推定を行った。

解析には R (3.4.0) を用いた。ベイズモデルの計算は rstan パッケージ (2.16.2) を用いた。

作成したベイズモデルの選択は、広く使える情報量規準 [widely applicable information criterion (WAIC)] を用いて WAIC が最も低いモデルを採用した。

3. 真値に 0 を含むデータの解析方法に関する数値シミュレーション研究

以下の①～⑥に従って、MLE 法および BE 法で分布パラメーターの推定を行った。

- ① サンプルサイズ=200、幾何平均値=1、幾何標準偏差=3 の乱数を生成した。
- ② 真値が 0 のレコードとなる割合 ω (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9) を決め、200 のサンプルから ω の割合で 0、 $(1 - \omega)$ の割合で 1 を

生成し、①と掛け合わせることで ZILN 分布に従う乱数を得た。

- ③ 不検出割合 φ (0.15, 0.25, 0.35, 0.45, 0.55, 0.65, 0.75, 0.85, 0.95) を決めた。ただし、 $\varphi > \omega$ を満たす。
- ④ 不検出とした最大値—検出された最小値間の一様分布から、不検出となる基準 (reporting limit, RL) を決めた。不検出となった測定値の下限値を 0, 上限値を RL とした。
- ⑤ 無情報、弱情報、強情報事前分布を用いた BE 法および MLE 法を用いて、分布パラメーター等を推定した。その際には Eq.2 で示した尤度関数を用いた。ただし、 L の値には 0 を、 U の値には RL を用いた。
- ⑥ ①～⑤を 1000 回 (N_{sim}) 繰返す。

BE 法においては、3つの事前分布を用いた；無情報事前分布、弱情報事前分布 [gsd~cauchy(3,1), mean_est~cauchy(mean^{MB}, mean^{MB})], 特定情報事前分布 [ω ~N(ω , $\omega/10$), gm~N(1,0.1), gsd~N(3, 0.3)]。ここで、mean^{MB}は不検出となった観測値に LOQ の半値を代入して算出した平均値である。

推定した分布パラメーターおよび期待値等について、以下の項目で評価した。

$$\text{真度: rMSE}(\hat{\theta}) = \sqrt{\frac{\sum(\hat{\theta} - \theta)^2}{N_{\text{sim}}}}$$

精度: RSD($\hat{\theta}$)

妥当性: 平均値の 95%推定区間に母平均が含まれる確率

平均値の 95%推定区間は、BE 法では事後予測分布の 95%信用区間を用い、MLE 法ではブートストラップ法 (500 回) を用いて計算した平均値の 95%区間を用いた。

解析には R (4.1.0) を用いた。BE 法には cmdstanr パッケージ (0.4.0) を用いた。MLE 法に stats パッケージ (4.1.0) の constrOptim 関数を用いた。

4. 二次元モンテカルロシミュレーションを用いた農薬摂取量分布の推定

TD 試料中の残留農薬濃度データには、2019 年

から 2021 年に本研究班で行った TD 試料中の残留農薬濃度の下限値および上限値を用いた。各食品群の喫食量には、2014 年から 2016 年の国民健康・栄養調査のデータを用いた。

解析には R (3.4.0) を用いた。BE 法には rstan パッケージ (2.16.2) を用いて、2000 個のモンテカルロサンプルを事後予測分布として得た。得られた事後予測分布を分布パラメーターとする乱数を 50 個発生させ、計 10 万 (2000×50) 個の乱数を残留農薬濃度及び喫食量について生成した。

課題 4. 検査部位の変更が残留農薬等の検査及び分析結果に及ぼす影響と対処法の検討

I. 試料の均質性に対する影響[令和元年度]

1. 食品

検討対象食品として、検査部位が変更される食品のうち、みかん、メロン、キウイ、すいか及びももを選択した。

2. 試料調製機

市販の 3 種類の試料調製機 (Braun 社製 Multiquick 7、FMI 社製 robot coupe R-4V.V.B、Blendtec 社製 EZ blender EZM-2J) を用いた。

3. 試料の均質性の検討

各試料調製機を使用した常温磨砕により、各検討対象食品について、変更前 (現行の国内の検査部位、原則として可食部位) 及び変更後 (CODEX における検査部位、種や果皮等を含む) の試料を調製した。調製した各試料について、目視により果肉、果皮、種子などの状態を確認した。次いで、調製した試料を標準網ふるいに供し、ふるいを通過する重量や調製試料の状態などを指標として、均質性への影響の有無や程度を調査した。

II. 分析結果に対する影響[令和 2 年度]

1. 検討対象食品

検討対象食品として、検査部位が変更される食

品のうち、みかん、びわ及びすいかを選択した。

2. 試料調製

試料調製機は Braun 社製 Multiquick 7 を用いた。検査部位変更前後の検討対象食品をそれぞれ試料調製機で均質化した。

3. 検討対象農薬等

検討対象農薬等は、検査部位が変更される食品 (キウイ、すいか、みかん、もも、びわ、まくわうり、メロン類果実) に共通して基準値が設定されている農薬等のうち、「LC/MS による農薬等の一斉試験法I(農産物)」の別表 1 に記載された 39 化合物を選択した。なお、これら化合物のうち、代謝物や関連化合物など、親化合物以外の化合物も規制対象に含まれているが、本研究では親化合物のみを対象として検討を実施した。

4. 添加回収試験

みかん、びわ及びすいかについて、検査部位変更前後の試料を調製した。調製した試料に検討対象化合物を添加、攪拌し、室温で 30 分間放置したものを添加試料とした。添加試料を「LC/MS による農薬等の一斉試験法I(農産物)」に従って操作し、試験溶液を調製した。

得られた試験溶液を LC-MS/MS に注入し、各検討対象農薬等のピーク面積値を求めた。得られたピーク面積値から、絶対検量線法により各検討対象化合物の回収率を求めた。

5. 装置及び測定条件

以下に、本研究で使用した装置及び測定条件を示した。

① LC 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフ: Nexera X2 (島津製作所製)

分析カラム: XTERRA MS C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 µm、Waters 製)

カラム温度: 40°C

移動相: 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (A 液)

及び 5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液 (B 液)

グラジエント条件 [t:時間 (分)]

t₀, B=15%; t₁, B=40%; t_{3.5}, B=40%; t₆, B=50%; t₈, B=55%; t_{17.5}, B=95%; t₃₅, B=95%

流速:0.2 mL/分

注入量:5 µL

② 質量分析装置及び測定条件

タンデム型質量分析計:LCMS-8060

イオン化モード:ESI (+) 及び ESI (-)

インターフェイス電圧:4.0 kV [ESI (+)] 及び 3.0 kV [ESI (-)]

インターフェイス温度:300°C

DL 温度:250°C

ネブライザーガス:3 L/min

ドライイングガス:10 L/min

ヒーティングガス:10 L/min

ヒートブロック温度:400°C

コリジョンガス:アルゴン (270 kPa)

III. 試料調製法の検討[令和 3 年度]

1. 食品

果実 (みかん、びわ、もも、キウイ、すいか、まくわうり、メロン、トマト、ぶどう及びパイナップル)、大豆及びごまの種子 (洗いごま及びいりごま) はインターネットを介して購入したものを用了。みかん、びわ、もも、キウイ、すいか、まくわうり及びメロンについては変更後の検査部位、トマト、ぶどう、パイナップル、大豆及びごまの種子は食品、添加物等の規格基準 (昭和 34 年厚生省告示第 370 号) の第 1 食品の部 A 食品一般の成分規格に示された部位を試料調製した。

2. 試料調製

検体約 500 g を約 2.5 cm 角にカットし、常温磨砕法 (A) 及び凍結粉砕法 (B~D) の各方法で試料調製した。なお、びわ及びももの種子はいず

れの方法でも粉砕が困難であったため、種子を除いた後、試料調製を行った。

A. 常温磨砕法

カットした検体約 500 g を全量、粉砕機に入れ、120 秒間磨砕した。

B. 凍結粉砕法 (液体窒素・凍結方式)

①ステンレスビーカー (5 L 容) に液体窒素を約 2 L 入れ、カットした検体約 500 g を加えた。

②①の液体窒素が 500 mL 程度となったら、液体窒素をさらに 1~2 L 加え、合計 4 分間冷却した。

③液体窒素約 200 mL を粉砕機に入れ、約 5 秒間運転し、粉砕機を冷却した。

④②で得られた凍結試料の約半量をステンレス製穴あきおたまを用いて粉砕機に入れ、10 秒間粉砕した。

⑤残りの凍結試料を穴あきおたまを用いて粉砕機に加え、110 秒間粉砕した。

C. 凍結粉砕法 (ドライアイス・予冷方式)

①カットした検体約 500 g 及び検体重量の 1.1 倍量のドライアイス (約 550 g) を予冷用容器に入れ、蓋を被せ (密閉せずに)、3 分間予冷した。なお、予冷容器に入れる際は、予冷に用いるドライアイスの約半量を入れた後、検体を加え、その上に残り半量のドライアイスを加えた。また、予冷中は、約 30 秒毎に 5 秒間程度、容器を振り、よく混合した。

②粉砕機にドライアイス 100 g (粉砕機冷却用) を入れ、約 10 秒間運転し、粉砕機を冷却した。

③①で得られたドライアイス混合試料の約半量を粉砕機に入れ、10 秒間粉砕した。

④残りのドライアイス混合試料を粉砕機に加え、110 秒間粉砕した。

⑤①で得られたドライアイス混合試料の約半量を粉砕機に入れ、10 秒間粉砕した。

④残りのドライアイス混合試料を粉砕機に加え、110 秒間粉砕した。

D. 凍結粉砕法 (ドライアイス・予備凍結方式)

①カットした検体約 500 g をフリーザーバッグに入れた。これを冷凍庫 (-30°C) で一晩静置し、凍結した。

②粉砕機にドライアイス 100 g (粉砕機冷却用) を

入れ、約 10 秒間運転し、粉砕機を冷却した。

③①で得られた凍結試料の約半量を粉砕機に入れ、10 秒間粉砕した。

④残りの凍結試料及び試料重量の 0.5 倍量のドライアイス (約 250 g) を加え、110 秒間粉砕した。

3. 粒子径分布測定

調製した試料の粒子径分布をレーザー回折法により測定した。

4. 分析値のばらつきの検討

農薬が残留したぶどう (巨峰、種子なし) を A～D の各方法により試料調製した。得られた試料を量り採り (試料量 5、10 及び 20 g: 各 5 個)、試験溶液を調製後、LC-MS/MS で測定し、分析値及びそのばらつきを求めた。

(倫理面への配慮)

人、動物を研究対象としていないため特に必要としなかった。

C. 研究結果及び考察

課題 1. 食品を介した農薬等の摂取量推定に関する研究

TD 試料中の農薬分析は、地方衛生研究所に協力して頂き行った。各食品群について、分析の妥当性を添加回収試験により確認したところ、全食品群の平均回収率は低濃度或いは高濃度添濃度のどちらかで、ほとんどの農薬の回収率は 70～120%の範囲内であった。

食品中農薬濃度に喫食量を乗じて 1 日農薬摂取量を推定した。各地域の 1 日農薬摂取量の平均値を一日推定摂取量とした。定量下限 (LOQ) 値未満のデータは not detected (ND) として扱った。なお、農薬の摂取量評価においてはこれまで ND に 0.2×LOQ を代入して算出してきたことから、これまでと同様の計算方法と同様に算出した。とくに断りが無い限り、以降の解析においては

ND=0.2LOQ を代入して解析を行った。

3 年間継続して推定した残留農薬 1 日摂取量の平均値±標準偏差は、BHC: 0.049 ± 0.014 µg/person/day, γ-BHC: 0.025 ± 0.020 µg/person/day, アセタミプリド (代謝物含む): 1.51 ± 1.10 µg/person/day, アセフェート: 0.236 ± 0.271 µg/person/day, イミダクロプリド: 1.07 ± 0.89 µg/person/day, インドキサカルブ: 0.004 ± 0.005 µg/person/day, クロチアニジン: 0.644 ± 0.529 µg/person/day, クロルピリホス: 0.151 ± 0.119 µg/person/day, ジノテフラン: 4.69 ± 2.86 µg/person/day, スルホキサフロル: 0.470 ± 0.639 µg/person/day, チアクロプリド: 0.328 ± 0.547 µg/person/day, チアメトキサム: 0.328 ± 1.072 µg/person/day, テフルトリン: 0.040 ± 0.002 µg/person/day, ニテンピラム: 0.223 ± 0.232 µg/person/day, ノバルロン: 0.088 ± 0.137 µg/person/day, ハルフエンブロック: 0.040 ± 0.002 µg/person/day, ビフェントリン: 0.150 ± 0.098 µg/person/day, ピリダベン: 0.060 ± 0.109 µg/person/day, フェニトロチオン: 0.184 ± 0.294 µg/person/day, ブプロフェジン: 0.091 ± 0.104 µg/person/day, フルアジホップブチル(代謝物含む): 0.062 ± 0.063 µg/person/day, フルベンジアミド: 0.344 ± 0.290 µg/person/day, ヘキサジノン: 0.023 ± 0.040 µg/person/day, ヘプタクロル (異性体含む): 0.006 ± 0.004 µg/person/day, ボスカリド: 1.43 ± 0.99 µg/person/day, メタミドホス: 0.064 ± 0.108 µg/person/day であった。

調査した全ての農薬において、対 ADI 比は 1% 未満であった。対 ADI 比が比較的高かったのは、クロルデン (0.35 ± 0.23%)、クロルピリホス (0.27 ± 0.22%)、メタミドホス (0.19 ± 0.33%)、アセフェート (0.18 ± 0.21%) であった。

多くの農薬について、農作物である 1・2・6・7・8 群の寄与率が高い傾向にあった。

課題2. 食品以外の暴露要因である環境中の農薬濃度の評価に関する研究

1. 測定系の構築

1-1. LC/MS/MS 対象化合物の測定条件の検討

LC/MS/MS では、フルアジホップ、フルアジホップブチル、アセフェート、クロルピリホス、ヘキサジノン、ボスカリド、ブプロフェジン、ノバルロン、ピリダベン、フルベンジアミド、ピフェントリン、メタミドホス、インドキサカルブを測定対象とした。標準溶液や試料溶液の液性は、LC の移動相として一般的に使用されるメタノールとアセトニトリル、さらに農薬の抽出効率が高いとされるアセトンを検討した。アセトニトリルとアセトンでは LC カラムからの溶出力が強く、保持の弱い化合物のピーク形状が悪いため今回の化合物の測定には適さなかった。そこで水の添加を行い、ピーク形状の改善を試みたが効果はほとんどなかった。以上のことから LC/MS/MS での検量線溶液及び試料溶液はメタノールとした。

1-1-1. LC/MS/MS 対象化合物のろ過方法および抽出条件の検討

捕集フィルターから溶媒抽出を行った後、遠心分離で得られた上澄み液を分析に用いた。上澄み液に懸濁物質が目視で確認できない場合でも、LC/MS/MS 測定における安全を考えろ過処理を行うことにした。その際に用いるろ過用フィルターの検討を行った。0.01 mg/L 混合標準メタノール溶液を調製し、ろ過フィルターに通し、吸着等の不具合が起きないか確認した。ポリプロピレン製のディスクシリンジと 0.45 μm PTFE フィルターユニットを用いてろ過を行ったところ、ポリプロピレン製のディスクシリンジへのピフェントリンの吸着が顕著にみられた。そこでガラスシリンジを用いて上記と同じ 0.45 μm PTFE フィルターユニットでのろ過処理を行ったが、若干ではあるが吸着が確認された。0.45 μm PTFE フィルターユニットにもポリプロピレン

が使用されていることから、ポリプロピレンへの吸着が疑われた。そのため、ポリプロピレンに直接接触しないろ過作業が可能なバイアルフィルター [GEヘルスケア製 ミニユニ G2 (PVDF 0.2 μm)]でろ過することにより吸着等の影響がなく測定用溶液の調製が可能であることが確認できた。

次いで、各フィルターからの添加回収試験を行い、抽出溶媒の検討を行った。1 mg/L 混合標準液 0.1 mL を石英フィルターとエムポアディスクにそれぞれ添加し、1 時間放置することで溶媒を除去した。農薬添加フィルターをねじ口試験管に入れ、内部標準添加 (クロルピリホス-d₁₀, チアメキサム-d₄, フェントロチオン-d₆ 各 100 ng), メタノール 10 mL, アセトニトリル 10 mL, アセトン 10 mL のいずれかを正確に加え、蓋の間にナフロン PTFE シートをはさみこみ、蓋を閉めた。その後、軽く手で振り混ぜ、10 秒程度 vortex ミキサーで攪拌し、フィルター全体が溶媒に浸かるようにした。さらに、10 分間超音波処理を行った。遠心分離機で 1000 g にて 10 分間処理を行った。この上澄み液をフィルターからの抽出液とした。メタノールで抽出したものは、バイアルフィルターでろ過を行い測定に用いた。アセトンもしくはアセトニトリルで抽出を行った抽出液はそのままの液性ではピーク形状が悪いため測定できないため、窒素の吹き付けにより緩やかに溶媒を揮発・乾固し、メタノール 1 mL で再溶解した。その後、バイアルフィルターでろ過を行い測定に用いた。各溶媒からの回収率は、どの溶媒でも抽出効率に大きな違いが無いことが確認できた。

1-1-2. LC/MS/MS 対象化合物の保管試験

捕集後から分析までの期間を考慮するために保管試験を行った。1 mg/L 混合標準液 0.1 mL を石英フィルターとエムポアディスクにそれぞれ添加し、1 時間放置することで溶媒を除去した。その後、ねじ口試験管にそれぞれの捕集フィルターを入れ、ナフロン PTFE シートを挟み込み、蓋を閉めた。そ

の試験管を冷蔵庫 (4°C) にて 7 日間保管した。保管後、前述のアセトンを用いた測定試料調製法により測定試料を調製し分析を行った。その結果、1 週間程度の冷蔵庫での保管では試料に影響がないことが確認できた。

1-2. GC/MS 対象化合物の測定条件の検討

GC/MS では、フェニトロチオン、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド A、ヘプタクロルエポキシド B を測定対象とした。検討初期では低濃度まで測定可能な GC/MS/MS を用いクロルピリホス-d₁₀ を内部標準として抽出液を直接注入することを想定して検討を行った。検討の結果、低濃度領域ではカラムでの吸着の影響が大きく、濃度が高くなるにつれピーク面積が大きくなり、絶対検量線法では二次曲線になる傾向が顕著に見られた。また、クロルピリホス-d₁₀ を内部標準として用いた場合には、内部標準と測定対象化合物の吸着挙動が異なり、正しい定量ができなかった。そのため、GC/MS 対象化合物においては、濃縮を行いカラムでの吸着の影響を減らすとともに、各測定対象化合物の d 体もしくは ¹³C ラベル体を内部標準として用い測定系構築の検討を行った。濃縮を行うことで GC/MS で測定可能な濃度レベルとなったため、GC/MS の SIM 測定で検討を行った。フェニトロチオンはフェニトロチオン-d₆ を抽出液にあらかじめ添加しておき定量に用いた。ヘプタクロル及びヘプタクロルエポキシド B については、入手した ¹³C ラベル体の濃度が薄く量に限りがあったため、抽出液に添加して使用するのではなく抽出液を分取した後に添加し分析を行った。抽出条件の検討については、濃縮作業が容易であるアセトンを用いて検討を行った。

1-2. GC/MS 対象化合物の抽出条件ならびに保管試験の検討

1 回のサンプリングから得られる捕集フィルターから抽出した同一の抽出液を用いて LC/MS/MS および GC/MS の両方に使用できるようアセトンを

抽出溶媒として検討を行った。なお、本検討では保管試験の結果からアセトンでの抽出が可能であるか、7 日間の保管が可能であるかを同時に評価した。

捕集後、分析までの期間を考慮するため保管試験の手順は以下のように行った。1 mg/L 混合標準液 0.1 mL を石英フィルターとエムポアディスクにそれぞれ添加し、1 時間放置することで溶媒を除去した。その後、ねじ口試験管にそれぞれ捕集フィルターを入れ、ナフロン PTFE シートを挟み込み蓋を閉めた。その試験管を冷蔵庫 (4°C) にて 7 日間保管した。保管後、内部標準 (クロルピリホス-d₁₀, チアメトキサム-d₄, フェニトロチオン-d₆ 各 100 ng) 添加アセトン 10 mL、を正確に加え、蓋の間にナフロン PTFE シートをはさみこみ蓋を閉めた。その後、軽く手で振り混ぜ、10 秒程度 vortex ミキサーで攪拌し、フィルター全体が溶媒に浸かるようにした。さらに、10 分間超音波処理を行った。遠心分離機で 1000 × g にて 10 分間処理を行った。この上澄み液をフィルターからの抽出液とした。バイアルインサートに 20 µL のアセトンを入れ、手書きで目安線を引いた後、アセトン抽出液を正確に 100 µL 分取しバイアルインサートに入れた。内部標準液 (¹³C₁₀-ヘプタクロル, ¹³C₁₀-ヘプタクロルエポキシド B 各 0.2 ng) を 10 µL 添加し、窒素にて緩やかに約 20 µL まで濃縮し、ボルテックスミキサーで攪拌、均一化したものを GC/MS 測定用サンプルとした。各フィルターからの回収率は良好な範囲内に入り抽出方法、作業手順、冷蔵庫 (4°C) にて 7 日間保管に問題がないことが確認できた。

1-3. 捕集性能評価

本検討では実際の捕集作業に近い状況で農薬がフィルター上に保持されるか確認を行った。石英フィルター上に 1 mg/L 混合標準液 0.1 mL を添加し、1 時間放置することで溶媒を除去し農薬を石英フィルター上に保持させた。前段に対象化合物を

添加後の石英フィルター、後段にエムポアディスクを配置し、実験室内の空気を吸引速度 3 L/min で 6 時間、合計 1.08 m³ の空気を捕集した。その後、前述のアセトン抽出ならびに測定試料調製方法により測定試料を調製し各装置にて分析を行った。その結果、各測定対象化合物は 1.08 m³ の空気を捕集しても石英フィルターとエムポアディスクに保持されていることが確認できた。

2. 実地での添加回収試験と測定系構築

令和元年度の空气中農薬の測定系の構築においては添加回収試験を実験室内にて行い、いずれの農薬においても良好な回収率が得られることを確認した。そこで令和 2 年度度は検討の開始にあたり測定予定の 3 つのサンプリング地点のうち、建物近傍において添加回収試験を行ない、本測定系の実地での性能評価を行った。石英フィルター上に 1 mg/L 混合標準液 0.1 mL を添加し、1 時間放置することで溶媒を除去し農薬を石英フィルター上に保持させた。前段に対象化合物を添加後の石英フィルター、後段にエムポアディスクを配置し、実地にて空気を吸引速度 1~3 L/min で 6 時間捕集した。その後、前述のアセトン抽出ならびに測定試料調製方法により試料を調製し各装置にて分析を行った。

初めに、前段に対象化合物を添加後の石英フィルター1枚、後段にエムポアディスク1枚を配置し、実地にて空気を吸引速度 3L/min で 6 時間、合計 1.08 m³ の空気を捕集した。フィルターから農薬を抽出し各農薬の回収率を解析した。LC-MS/MS 対象農薬ではクロルピリホス、メタミドホス、ピリダベン、ビフェントリンが、GC-MS 対象農薬ではヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド A において回収率が低い傾向がみられた。後段のエムポアディスクで十分なトラップができていない可能性、あるいは、対象農薬が光により分解している可能性が考えられたため、空気流量を 2L/min で 6 時間の捕集と

し、サンプリング時に遮光をして添加回収試験を行った。ピリダベンにおいては遮光したことにより回収率の向上がみられたが、その他の 5 農薬においては改善効果が見られなかった。そこで、空気流量を 1 L/min とし、後段のエムポアディスクを 2 枚配置して遮光下にて添加回収試験を行った。ヘプタクロル以外の農薬においてはほぼ 80%以上の回収率を得られることが確認された。ヘプタクロルについては 50%程度の回収率しか得られなかったため、測定値を補正する必要があると考えられる。

以上の検討結果をもとに実地での測定条件を以下のように決定した。前段に石英フィルター1枚、後段にエムポアディスク2枚を配置し、空気の吸引速度は 1 L/min で 6 時間、合計 0.36 m³ の空気を捕集することとした。また、GC-MS 測定対象農薬についてはサンプリング空気量の低下により定量下限が高くなるため、GC-MS 測定サンプルの最終溶液濃度を 10 倍濃縮することにより、いずれの農薬についても定量下限の目標値をクリアできることを確認した。

3-1. 実地での空气中農薬の測定 (地方部)

本分析法を用いて、愛媛大学の食堂、農場近傍、建物近傍の 3 か所にて n=2 で空气中農薬の測定を行った。サンプリングは2020年10月~2022年2月の期間に月1回、晴天または曇りの日の10時~17時の間に行った。4月、6月、7月の農場近傍と建物近傍の2か所において対象農薬のうちブプロフェジンのみが検出され、6月、7月の検出濃度は定量下限 (0.73 ng/m³、1.14 ng/m³) 以上の 5.2~6.2 ng/m³であった。食堂では全期間において対象農薬は検出されなかった。また、7月のサンプリング時に建物近傍にて 24 時間サンプリングも行い、ブプロフェジン 1.8 ng/m³を検出した。日中の 6 時間サンプリングの濃度が高く、24 時間サンプリングの検出濃度が低いことからブプロフェジンの夜間の揮散は少ないものと推測された。

ブプロフェジンは蒸気圧 4.2×10^{-5} Pa (20°C) の比較的揮発しやすい農薬である。また、分解性についてはpH=7での加水分解半減期378日(25°C)、水中光分解における自然水中での半減期14日(25°C)と報告されている。これらの物性から散布形態等によっては飛散が予想され、本サンプリング方法における検出は十分に可能と考えられる。

また、ブプロフェジンは本曝露評価の測定対象農薬14種の内、愛媛県で最も使用される農薬である。令和元年度(2019年度)愛媛県の農薬に係る適用対象別・対象化学物質別の排出量推計結果によると、年間推定使用量1803kgであり、農薬155種における使用順位18位となっている。県内での使用内分けとしては果樹が74%と最も多く、次に家庭10%、田9%となっている。使用時期としては、平成23年度の愛媛県の農作物病害虫等防除指針によると4月～10月であり、特に5月～8月にかけての使用作物種(柑橘類、水稻、桃、栗、キウイフルーツ、イチジク等)での使用が多い。サンプリング地点である農場近傍、建物近傍は果樹(柑橘類)や田が多い。また、これらの防除指針における散布時期は柑橘5月～10月、田4月中旬～8月までである。以上のことから、今回のサンプリングで検出したブプロフェジンは物性、散布時期の観点からも検出は妥当であると考えられる。

次に、健康影響について検討した。ブプロフェジンのADIは0.009mg/kg体重/日である。体重約52.7kgの成人が1日に取り込む空気量を約17.3m³とすると、今回の検出量の最大値である6ng/m³を曝露濃度とすると24時間の曝露量は約103.8ng/dayとなる。これは体重52.7kgの人のADI474300ng/dayの4570分の1である。このことから、今回の検出量による健康影響はないと考えられる。

3-2. 実地での空气中農薬の測定(都市部)

2020年度は石英繊維フィルター、エムポアフィルターの個別抽出を行ったが、簡便性かつ迅速性

を高めるために2021年度からはフィルターを分けずに2枚重ねて抽出を行った。また、LCMSを用いた農薬分析条件の検討も行い、12種類の分析が可能となった。

季節変化を明らかにすることを目的として、春季として2021年3月29日～4月2日、夏季として7月19～24日、8月23～28日、秋季として10月18～21日、冬季として2022年1月5～8日にかけて昼夜12時間採取(6:00～18:00、18:00～6:00)を行った。その結果、最大濃度に着目すると、フェニトロチオン36.44(ng/m³)は春季、アセフェート2.10(ng/m³)、フルアジホップブチル1.43(ng/m³)、ノバルロン2.81(ng/m³)は夏季、クロルピリホス(夏季:0.47ng/m³、冬季:0.38ng/m³)とブプロフェジン(夏季:0.12ng/m³、冬季:0.13ng/m³)は夏季と冬季、ボスカリド(秋季:0.26ng/m³、冬季:0.29ng/m³)は秋季と冬季に高いことが分かった。なお、インドキサカルブ、ヘキサジノンには秋季にのみ検出され、それぞれ 0.16 ± 0.03 ng/m³、 0.15 ± 0.10 ng/m³であった。ボスカリドは気温が低下する秋季と冬季に高いことから、粒子態として大気中に存在している可能性が考えられる。アセフェートはすべての季節を通じて夜間にのみ検出されることが明らかになった。

室内環境中農薬を調べるため、2021年4月22日から23日、12月15日から19日にかけて、横浜市中川スクウェア(住宅展示場)で築17年の住宅内のウォークインクローゼット内で24時間毎の採取を行った。クロルピリホスの明瞭なピークが検出されたものの検出下限であった。

4. ウェラブルサンプラーによる大気中農薬濃度の曝露量評価

Twister(液相:PDMS)を用いた曝露実験でも一週間程度で農薬は捕集されていない。これはアクティブ捕集でも検出限界が多いことを考えれば妥当であった。2021年度には室内実験によりTwister

による農薬吸着特性を調べた。30°Cに設定した密閉恒温槽内で農薬の揮発を行って Twister で捕集し、アセトンで超音波抽出を行って LCMS および GCMS で各種農薬を定量した。GCMS で定量したクロルピリホス、フェントロチオン、ヘプタクロルは蒸気圧に応じた回収量が得られた（相関係数 $r=0.979$ ）。一方、LCMS で定量したフルアジホップ、ピリダベン、アセフェート、ブプロフェジン、メタミドホス、クロルピリホスは、蒸気圧が低いことからバラツキが大きいものの、蒸気圧とともに回率が増加する傾向が見られた。

次に、最適曝露日数の検討を行ったところ、蒸気圧の高いクロルピリホス、フェントロチオン、ヘプタクロルは 14 日までは日数とともに直線的に回収率が增大したが、これ以降は減少することが分かった。したがって、蒸気圧の高いクロルピリホス、フェントロチオン、ヘプタクロルは二週間程度の屋外曝露によりパッシブサンプラーにより大気中濃度を計測できるものと考えられた。今後、屋外曝露試験により大気中農薬の広域濃度分布を調べ、都内における発生源解明を行って行く予定である。

5. 吸入曝露による農薬摂取量の推定とリスク評価

検出できた濃度の最大値と、日本人の平均呼吸率 ($17.3 \text{ m}^3/\text{day}$) を用いて、吸入曝露量を評価したところ次のように推定された；フェントロチオン： $0.630 \text{ } \mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ ，アセフェート： $0.036 \text{ } \mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ ，フルアジホップブチル： $0.025 \text{ } \mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ ，ノバルロン： $0.049 \text{ } \mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ ，クロルピリホス： $0.008 \text{ } \mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ ，ブプロフェジン： $0.107 \text{ } \mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ ，ボスカリド： $0.005 \text{ } \mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ ，インドキサカルブ： $0.003 \text{ } \mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ ，ヘキサジノン： $0.003 \text{ } \mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ 。体重 55 kg とすると、対 ADI 比は次のように推定された；フェントロチオン： 0.23% ，アセフェート： 0.03% ，フルアジホップブチル： 0.01% ，ノバルロン： 0.01% ，クロルピリホス： 0.01% ，ブプロフェジン：

0.02% ，ボスカリド： $2.1 \times 10^{-4}\%$ ，インドキサカルブ： $9.7 \times 10^{-4}\%$ ，ヘキサジノン： $9.6 \times 10^{-5}\%$ 。

季節変動及び日内変動が観察された点および室内では検出されなかった点を踏まえると、上記の推定は平均的な吸入曝露量としては過剰推定となっている点には注意が必要であろう。しかしながら、調査対象とした全ての農薬について、対 ADI 比は 1% 未満であったことから、日本において一般的な生活をしている限り、農薬の吸入曝露による健康影響はほぼないと考えられた。

課題3. 総合的な摂取量評価における推定値の精緻化および信頼性の向上に関する研究

1. 喫食量分布の推定

BE 法を用いて各食品群の喫食量 (g/person) を解析したところ、Tweedie 分布が最適だったのは、2 群、8 群、9 群、10 群、12 群であった。ZIG 分布が最適だったのは、1 群、4 群、5 群、6 群、7 群、11 群であり、ZILN 分布が最適だったのは 3 群と 13 群であった。

2. 不検出例を含んだ残留農薬摂取量の推定

BE 法では、対数正規分布が 12 農薬で、ガンマ分布が 4 農薬で、ワイブル分布が 4 農薬で最も適していると判断された。

対数正規分布の形状パラメーターは平均して 3.14 ± 1.20 、ガンマ分布の形状パラメーターは 1.63 、ワイブル分布の形状パラメーターは平均して 0.97 ± 0.51 であった。これらの値は、設定した事前分布との乖離は小さかった。この結果から、BE 法に用いた形状パラメーターの事前分布は妥当であったと判断できた。

BE 法と MLE 法で異なる確率密度分布と推定された農薬が散見された。MLE 法でガンマ分布が最適と判断されたもののうち、フルアジホップブチル・フルアジホップブチル代謝物・フラ時ホップブチルは、BE 法ではワイブル分布が最適であると判断された。

1 日農薬摂取量の理論平均値に関する事後予測分布と LOQ の 0.2 倍の値を代入した推定値お

よび MLE 法と比較した。ND に LOQ の 0.2 倍の値を代入して推定した値よりも BE 法による推定値の方が低かったのは、アセフェート・メタミドホスであった。MLE 法よりも BE 法による推定値の方が低かったのは、アセフェート・クロチアニジン・クロルピリホス・チアクロプリド・ノバルロン・ビフェントリン・ヘキサジノン・メタミドホスであった。インドキサカルブ・ビフェントリン・ブプロフェジン・フルベンジアミド代謝物の BE 法による平均値の事後予測分布の四分位範囲内には、0.2LOQ を代入して推定した値が含まれていなかった。MLE 法による 1 日農薬摂取量の平均値は、全て BE 法による平均値の事後予測分布の四分位範囲内に収まっていた。

MLE 法と BE 法の差異に与える要因を解析するために、BE 法と MLE 法で推定した平均値の相対的な差 $[2(\hat{\mu}^{BE} - \hat{\mu}^{MLE})/(\hat{\mu}^{BE} + \hat{\mu}^{MLE})]$ について解析を行った。

すべての食品群で不検出となったサンプルの割合が高い場合、推定した分布の σ/μ 比が大きい場合、用いたデータのサンプルサイズが小さい場合に、BE 法と MLE 法による推定値の相対的な差が大きくなる傾向が認められた。 $L=0$ となるサンプルの割合は、有効なサンプルサイズに相当すると考えられる。また、本研究で仮定した確率密度分布の場合、 σ/μ が大きくなると歪度が大きくなることを意味する。これらの結果より、BE 法と MLE 法の差異が大きくなった要因は、歪みの大きい確率密度分布であること、サンプルサイズが小さいこと、および $L=0$ となるサンプルの割合が大きかったことの影響が大きいと考えられた。

MLE 法は、有効なサンプルサイズが少なくなるほど、また分布の歪みが大きくなるほど、推定の精度が低くなることが報告されている。この点を踏まえ、MLE 法が不得意なデータにおいて、事前分布を用いることで BE 法が MLE 法の弱点をカバーしているとも捉えることができる。つまり、BE 法による推定結果の方が MLE 法による推定結果よりも妥当である可能性が示唆された。

3. 真値に 0 を含むデータの解析方法に関する数

値シミュレーション研究

BE 法の点推定値として事後分布の中央値 (MED) を用いて、真度・精度・妥当性を評価した。MLE 法は、 ω よりも φ による影響を強く受け、 φ が大きくなるほど、推定の真度および精度が悪くなる傾向があった。一方で、BE 法は φ よりも ω による影響の方が強い傾向にあった。また、MLE 法よりも BE 法の方が、推定の真度・精度・妥当性が良好であった。さらに、この傾向は事前分布の設定に寄らず、無情報事前分布を用いた場合でも BE 法の方が MLE 法よりも良好な真度・精度・妥当性を示した。MLE と BE(NIP) を比較すると、 ω と gm の真度・精度は BE 法が広い φ と ω の組合せで MLE 法よりも良い推定結果となる傾向を示したが、gsd に関してはそれほど大きな差異は認められなかった。この結果は、事前分布に形状パラメーターである gsd の情報を追加することで推定結果が向上する可能性を示唆するものと考えられた。実際に、弱事前分布として、gsd に関する事前分布を用いることで、推定の真度・精度・妥当性が向上することが示された。以上のことから、ZILN 分布に従う不検出例を含むデータの解析においても、BE 法が有効であることが示された。また、事前分布の利用は推定の真度・精度・妥当性を向上させるが、通常の利用では真値は不明であるため、弱情報事前分布の使用を検討するのが現実的であろう。事前分布に利用できるデータベースを整備することが有効であると考えられる。

4. 二次元モンテカルロシミュレーションによる農薬摂取量分布の推定

ゼロ過剰モデルも考慮に入れ、TD 試料中の残留農薬濃度を、BE 法を用いて推定した。解析の対象としたのは、14 群全てから農薬が検出され、サンプルサイズが 6 以上のものとした。ここでは、サンプルサイズの最も大きかったチアメキサムの結果を以下に示す。14 群中 13 群でゼロ過剰モデルが最適なモデルであると推定され、ZILN 分布は 11 の食品群で、ゼロ過剰ワイブル分布が 2 つの食品群で最適な分布であった。検出率が最も高かった 8

群でもゼロ過剰モデルが採用されたことから、ゼロ過剰モデルが適切かどうかは検出率だけで決定されるものではないと示唆された。

農薬濃度分布の推定の不確かさを考慮するために、BE法で得られた2000個の事後予測サンプルから50個の乱数を生成し、計10万個の乱数を生成した。別途国民健康・栄養調査のデータを解析して得られた体重当たりの喫食量分布の乱数と掛け合わせ、摂取量分布を推定した。チアメトキサムの場合、5, 25, 50, 75, 96パーセントイル値は、0.0005, 0.0024, 0.0060, 0.0148, 0.0586 µg/kg/dayであり、ADI (18 µg/kg/day) を超過する確率は0%であった。ADIを超過する確率は、アセフェートの0.001%が最大であったことから、検討したいずれの農薬も健康リスクは小さいと示唆された。

農薬摂取量の平均値について、2D-MCSから推定した結果と、摂取量のデータからBE法で推定した結果を比較した。異なるアプローチで算出した平均値の分布が良い一致を示したことから、いずれの推定方法も妥当であると考えられた。

課題 4. 検査部位の変更が残留農薬等の検査及び分析結果に及ぼす影響と対処法の検討

I. 試料の均質性に対する影響[令和元年度]

1. 調製試料の状態について

一部の検討食品においては、果皮や種子等の粒子が目視により確認されたものの、果肉等と共に比較的均質に分散していた。また、調製した試料において層分離や特定組織の沈殿などは確認されず、試料採取において問題となる事項は確認されなかった。

2. 調製試料中の粒子の大きさについて

検査部位変更前後の調製試料を各目開きの標準網ふるいに供し、各ふるいを通過しなかった調製試料の重量を測定し、調製試料中の粒子の分布を調査した。検査部位が変更される食品と使用する試料調製機の組み合わせによっては、変更後の検査部位において調製試料中の粒子が大きく

なる傾向が確認されたものの、0.5 mm以上の大きさの粒子の量は調製試料の5%未満であり、ほとんどは0.5 mm未満の微細な粒子に粉碎されていることが確認された。

これらの結果から、検査部位の変更、すなわち国際基準の検査部位を採用した場合には、種子や果皮等が含まれることにより変更前の検査部位とは若干均質性が異なるものの、調製試料のほとんどは微細な粒子まで粉碎されており、特定部位の沈殿等もないことから、種々の試料調製機を用いて均質な調製試料が得られるものと考えられた。

II. 分析結果に対する影響[令和2年度]

1. 一斉試験法の適用性について

先ず、本検討で用いた一斉試験法の適用性について検討した。精製用ミニカラムにおいてはロットによる保持・溶出のばらつきが問題になることから、精製用ミニカラム(グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム、500 mg/500 mg)からの回収率を確認した。

チアベンダゾールを除き、検討対象農薬等は使用した精製用ミニカラムから良好に回収された。なお、チアベンダゾールについて、標準溶液のみを負荷した場合には良好な回収率が得られなかったが、検討対象食品を用いた添加回収試験においては比較的良好的な回収率が得られたことから、試料マトリックス共存下においては良好なカラム回収率が得られると推察された。

以上の結果から、「LC/MSによる農薬等の一斉試験法I(農産物)」を用いることで、検討対象農薬等を精確に測定可能であり、検査部位の変更の影響の有無を正確に評価することが可能であることが期待された。

2. 分析結果に及ぼす検査部位の変更の影響

2-1 びわ

検査部位変更前後の試料を調製し、それぞれの

調製試料に 0.01 ppm の濃度となるように検討対象農薬等を添加した。それぞれの添加試料から試験溶液を調製し、LC-MS/MS で測定した。

アトラジンでは、検査部位の変更に伴い回収率が低下した (変更前 83%、変更後 63%)。びわにおけるアトラジンの基準値が 0.02 ppm であることを考慮すると、実際の検査等において測定の際の影響により良好な回収率が得られない場合には、試験溶液を希釈して測定するなどの対応が効率的であると考えられた。イプロジオンにおいても、検査部位の変更に伴う回収率の低下が確認された (変更前 93%、変更後 72%)。びわにおけるイプロジオンの基準値が 10 ppm であることを考慮すると、実際の検査で基準値濃度を分析する場合には、検査部位変更の影響はほとんどないと考えられた。

その他の検討対象農薬等については、検査部位の変更に伴う回収率の大きな変動は確認されなかったことから、分析結果に及ぼす影響は小さいことが予想された。

2-2 すいか

検査部位変更前後の試料を調製し、それぞれの調製試料に 0.01 ppm の濃度となるように検討対象農薬等を添加した。それぞれの添加試料から試験溶液を調製し、LC-MS/MS で測定した。

メソミルにおいては、ブランク試料にピークが検出されたため、良好な回収率及びピーク面積比 (「マトリックス添加標準溶液のピーク面積値」/「溶媒標準溶液のピーク面積値」) が得られなかった。しかしながら、検査部位変更前後の試料におけるブランク値は大きく変わらなかったことから、分析結果に及ぼす影響は小さいことが予想された。

その他の検討対象化合物については、検査部位の変更に伴う回収率の大きな変動は確認されなかったことから、分析結果に及ぼす影響は小さいことが予想された。

2-3 みかん

検査部位変更前後の試料を調製し、それぞれの調製試料に 0.01 ppm の濃度となるように検討対象農薬等を添加した。それぞれの添加試料から試験溶液を調製し、LC-MS/MS で測定した。

検査部位変更前の試料において、ジウロンでは、測定の際の試料マトリックスの影響により (ピーク面積比 0.76)、良好な真度が得られなかった (真度 66%)。ジウロンを除く検討対象農薬等については、比較的良好な真度、併行精度及びピーク面積比が得られた。

検査部位変更後の試料については、イプロジオン (真度 47%、ピーク面積比 0.51)、トリアジメノール (真度 40%、ピーク面積比 0.43)、トリアジメホン (真度 39%、ピーク面積比 0.38)、ブタフェナシル (真度 34%、ピーク面積比 0.35) 及びメキシフェノジド (真度 38%、ピーク面積比 0.39) においては、測定の際の試料マトリックスの影響が大きくなった結果、回収率が大幅に低下した。

実際の検査においては、基準値濃度における分析結果への影響の有無が重要と考えられることから、検査部位変更後の 0.01 ppm 添加試料において回収率の低下が確認された 10 化合物について、基準値濃度での添加回収試験を実施した。イプロジオン、トリアジメノール、トリアジメホン及びブタフェナシルについては、基準値濃度においても良好な真度が得られなかった。このことから、これらの化合物については、実際の検査において誤判定を生じる可能性が高くなることが予想された。

3. 良好な分析結果が得られない際の対応等

みかんにおいては、検査部位の変更に伴う試料中のマトリックス成分の変化により、回収率が大幅に低下する化合物が確認された (イプロジオン、トリアジメノール、トリアジメホン、ブタフェナシル及びメキシフェノジド)。これらの化合物については、実際の検査において誤判定の結果を生じる可能性が高くなることが予想されたため、対応等について

検討した。

本検討では実際の検査における効率等を考慮し、先ず試験溶液の希釈の有効性について検討した。検査部位変更後のみかん試料の添加回収試験（添加濃度：基準値）で得られた試験溶液を4倍希釈して再測定した。イプロジオン、トリアジメール及びブタフェナシルについては、試験溶液を希釈することにより比較的良好な回収率が得られた。トリアジメホンについては、若干ではあるが回収率が改善されたことから、更に高倍率の希釈を行うことで更に回収率が改善されることが期待された。メキシフェノジドについては、回収率・ピーク面積値ともに4倍希釈での改善は認められなかったものの、基準値が2 ppmと高いことから、更に高倍率の希釈を行うことで回収率が改善される可能性があると考えられた。

以上の結果から、検査部位の変更に伴い良好な回収率が得られなくなった場合、使用する LC-MS/MS における測定感度に応じて試験溶液を希釈することで効率的な対応が可能であると考えられた。

III. 試料調製法の検討[令和3年度]

凍結粉砕法による試料調製では、通常行われている常温磨砕法よりも均質な試料が得られると考えられている。しかしながら、各試料調製法による均質性を比較した報告は非常に少ない。そこで本研究では、検査部位が変更される7食品（みかん、びわ、もも、キウイ、すいか、まくわうり及びメロン）に加えて、常温磨砕法では均質化が困難とされているトマト、ぶどう及びパイナップルについて、3種類の凍結粉砕法[液体窒素・凍結方式 (B)、ドライアイス・予冷方式 (C) 及びドライアイス・予備凍結方式 (D)] の操作手順を確立した後、試料の粉砕状況や分析値のばらつきを常温磨砕法 (A) と比較することとした。なお、試料の均質性は、試料

調製法に加えて、使用する粉砕機、刃の形状、回転数、粉砕時間、検体量等によって大きく異なることから、本研究では以下の条件に統一して検討を行うこととした。

粉砕機： 残留農薬等の検査で汎用されている Robot Coupe BLIXER-3D (回転数 3000 rpm)

運転時間： 120 秒間

検体量： 500 g

1. 粉砕状況及び粒子径分布

検査部位が変更される果実を含めた10食品について、凍結粉砕法を用いた試料調製法を確立後、試料の粉砕状況を常温磨砕法と比較した。その結果、柔軟性のある果皮（ぶどう、トマト及びキウイ）は、常温磨砕法では均質化しにくいことが確認された。これらの果皮は、刃と接触しても切断されにくいためと考えられた。一方、硬い果皮（メロン及びすいか）や種子（キウイ、すいか及びまくわうり）は、凍結粉砕法では常温磨砕法と比べ、粉砕されにくいことがわかった。常温磨砕法では試料が液状となるものが多いが、凍結粉砕法では試料が粉体であるため、流動性がやや低く、試料と刃が接触しにくいことが原因と考えられた。

ぶどう及びすいか試料の粒子径分布を測定したところ、いずれも微粒子の割合は常温磨砕法の方が低いことがわかった。ぶどう及びすいかの果肉は、いずれも常温では柔軟性があり、凍結した試料よりも切断されにくいためと推測された。また、凍結粉砕法間で比較すると、液体窒素を用いた凍結粉砕法 (B) の方がドライアイスを用いた凍結粉砕法 (C 及び D) よりも粒子が小さく、C と D では大きな差異は認められなかった。液体窒素を用いた凍結粉砕法 (B) では、液体窒素によって脆化することに加え、冷却剤の非存在下で粉砕するため、刃と接触しやすく、小さい粒子に粉砕されやすいものと考えられた。

2. 分析値のばらつき

試料調製法による試料の均質性の違いを評価するため、農薬が残留したぶどう（巨峰、種子なし）を A～D の各方法により試料調製し、得られた試料を 5、10 及び 20 g（各 5 個）量り採り、試験溶液を調製後、LC-MS/MS で測定して分析値及びそのばらつきを求めた。その結果、分析に供する試料量を 20 g とした場合、試料調製法間で分析値のばらつきに大きな差は認められず、いずれも RSD 11%以下であった。分析に供する試料量を 5 g とした場合においても、アセタミプリド及びイミダクロプリドは、試料調製法間で分析値のばらつきに大きな差は認められず、いずれも RSD 9%以下であった。テブコナゾール及びフルジオキシニルについても、凍結粉碎法（B～D）では RSD 10%以下であった。しかしながら、常温磨砕法（A）ではテブコナゾールは RSD 17%、フルジオキシニルは RSD 20%となり、凍結粉碎法と比較してばらつきが大きかった。これらの結果から、試料の均質性が低い場合、分析に供する試料量が少量であると、農薬の分布によっては分析値のばらつきが大きくなることが示された。

3. 凍結粉碎法を行う上での留意事項の検討

凍結粉碎法を行う上での主な懸念点として、1) 試料への冷却剤の残存、2) 結露や吸湿による試料中の水分含量の増加、3)（ドライアイスを用いた凍結粉碎法では）ドライアイス由来の二酸化炭素による試料 pH の変化が挙げられる。そこで本研究ではこれら 3 点について検討した。

1) 試料への冷却剤の残存

ドライアイスを用いた凍結粉碎法で試料調製を行うと、粉碎直後の試料中にはドライアイスが残存している。試料採取時にドライアイスが大量に残存していた場合、正確に試料を秤量することができない。そこで、試料中のドライアイスが昇華したかどうかを判断する方法を検討することとした。粉碎後の

試料の温度は、ドライアイスの残存量が減少すると上昇することから、試料温度を判断指標として用いることができるか検討した。キウイを用いてドライアイス・予冷方式（C）で凍結粉碎し、残存するドライアイスの割合と試料温度の関係を調べた。その結果、試料中のドライアイスの残存割合が 2%以上の場合、試料温度は -79～-78℃となった。一方、2%未満の場合は、ドライアイスの割合が低くなるほど、試料温度が上昇し、1%では約 -60℃となった。ドライアイスの残存割合が 1%未満であれば、ドライアイスの残存に伴う試料の秤量誤差が分析値へ及ぼす影響はほとんどないものと考えられる。-50℃以上の時、ドライアイスの残存割合は常に 0.6%以下であったことから、「試料温度 -50℃以上」を分析値への影響がほとんどない量までドライアイスが昇華したことを示す判断指標とすることができると考えられた。なお、試料温度が -50℃未満となり、ドライアイスが昇華させる必要がある場合は、粉碎机で追加粉碎するか、冷凍庫内で静置するのが良いと考えられた。

2) 吸湿・結露の影響

凍結粉碎法では、粉碎机及び試料を低温に保ちながら粉碎を行うため、空気中の水分による試料の吸湿の可能性がある。また、空気中の水分はドライアイス自身にも結露すると考えられており、ドライアイスによる水分の持ち込みの可能性も指摘されている。そこで、水分含量の高いキウイと低い大豆及びごまの種子（洗いごま及びいりごま）を A～D の各方法で試料調製し、得られた試料の水分含量を比較した。その結果、凍結粉碎法（B～D）ではいずれの食品においても常温粉碎法と比較して 0.1～1%高値を示した。調製直後の試料温度を測定したところ、常温粉碎法ではキウイで 19℃であったのに対し、水分含量の低い食品では大豆：46℃、洗いごま：53℃、いりごま：59℃と粉碎時に発熱が見られた。一方、凍結粉碎法では、い

ずれの食品も液体窒素を用いた凍結粉砕法 (B) : -69~-38°C、ドライアイスを用いた凍結粉砕法 (C 及び D) : -79~-78°Cと低温であった。これらの結果から、常温磨砕法よりも凍結粉砕法の方が水分含量が高値を示した原因として、①凍結粉砕法での吸湿、持ち込みの他に、②水分含量の低い食品では常温粉砕時に発生する熱による試料中水分の気化の可能性が考えられた。しかしながら、常温磨砕法と凍結粉砕法の水分含量の差は 2%未満であることから、水分含量の変化による分析値への影響はほとんどないと考えられた。

3) ドライアイスを用いた凍結粉砕法における試料 pH への影響

ドライアイスを用いた凍結粉砕法では、試料調製の過程でドライアイス由来の二酸化炭素が試料に溶解し、試料の pH が低下する可能性が指摘されている。そこで、A~D の各方法で調製した試料の pH を測定し、比較した。その結果、いずれの食品においても凍結粉砕法 (B~D) で得られた試料と常温磨砕法 (A) で得られた試料の pH の差は±0.3 以内であり、ドライアイス由来の二酸化炭素による試料の pH 変化はほとんどないことが示された。

D. 結論

課題 1. 食品を介した農薬等の摂取量推定に関する研究

ADI に対する推定摂取量の割合が高いと推定されている農薬と、国民の関心が高まっているネオニコチノイド系農薬に対してトータルダイエット試料の分析結果に基づき農薬摂取量を評価した。その結果、調査対象とした農薬の 1 日推定摂取量の ADI に対する比率は、全ての農薬において、対 ADI 比は 1%未満であった。また、多くの農薬で 6 (果実類)、7 (有色野菜)、あるいは 8 群 (その他の野菜・海草類) 群の寄与率が高かった。

課題 2. 食品以外の暴露要因である環境中の農薬濃度の評価に関する研究

本検討では空気中農薬の測定系の構築を行った。捕集フィルターは石英フィルターとエムポアディスク C18 FF オクタデシルを用い、アセトンにより対象化合物の抽出を行った。その結果、1.08 m³の空気吸引後の対象化合物の抽出効率はいずれも 90%以上の回収率が得られ、フィルターでの農薬のトラップならびに抽出工程での溶出が十分であることが確認できた。また、サンプリング後のフィルターを 1 週間冷蔵保存しても測定には影響ないことが確認できた。本法における各農薬の定量限界はいずれも目標値よりも低い値であった。

2020 年~2022 年の期間に地方部 (愛媛大学の食堂、農場近傍、建物近傍の 3 か所) および都市部 (東京都新宿区早稲田大学西早稲田キャンパスおよび横浜市中川スクウェア (住宅展示場) で築17年の住宅内のウォークインクローゼット内) にて空気中農薬の分析を行った。その結果、地方部においては、春から夏にかけて果樹等に使用される殺虫剤のブプロフェジンが 4 月、6 月、7 月に約 2.1~6.0 ng/m³の濃度で検出された。都市部においても、複数の農薬が検出されたものの、検出された濃度は低く、検出された最大値を用いて推定した吸入曝露量はすべての農薬で ADI の 1%未満であった。以上の結果から、都市部において一般的な生活をしている限り、農薬の吸入曝露による健康影響はほぼないと考えられた。

課題 3. 総合的な摂取量評価における推定値の精緻化および信頼性の向上に関する研究

本研究では、国民が食品を介して摂取する農薬の量をより精緻に推定するために、1) 確率論的な摂取量推定を行うため、喫食量の確率密度分布の推定、2) 不検出値を含むデータに対する統計的妥当性の高い推定法、3) 2D-MCS を用いた確率論的な摂取量推定について検討を行った。

令和元年度は、確率論的な摂取量推定を行うため、喫食量の確率密度分布の推定をおこなった。喫食量には 0 にマスを持つ正の値であるので、ゼロ過剰を表現できる Tweedie 分布、ゼロ過剰ガンマ (ZIG) 分布、ゼロ過剰対数正規 (ZILN) 分布の確率密度分布を検討した。Tweedie 分布が最適だったのは、2 群, 8 群, 9 群, 10 群, 12 群であった。ZIG 分布が最適だったのは、1 群, 4 群, 5 群, 6 群, 7 群, 11 群であり、ZILN 分布が最適だったのは 3 群と 13 群であった。

令和 2 年～令和 3 度は、不検出例 (ND) を含むデータにおける統計妥当性の高い推定法として、従来用いられてきた ND に LOQ の 0.2 倍の値を代入する方法 (代入法) と MLE 法と BE 法を比較した。MLE 法による 1 日農薬摂取量の平均値は、全て BE 法による平均値の事後予測分布の四分位範囲内に収まっていた。しかしながら、代入法では一部の農薬が BE 法による平均値の事後予測分布の四分位範囲から外れていた。下限値が 0 のデータの割合が多く、相対標準偏差が大きいと、BE 法と MLE 法の推定値の相対的な差異が大きくなる傾向が認められた。MLE 法は、サンプルサイズが小さく、歪度が大きいデータが不得意であることが知られている。この点を踏まえると、本研究の結果は、BE 法の方が MLE 法よりも妥当な推定結果であることを示唆していると考えられた。

令和 3 年度は、令和 2 年度に引き続き、不検出例を含むデータにおける統計妥当性の高い推定法に関する検討を行った。さらに、真値に 0 を含むデータにおける統計的妥当性の高い推定法に関する数値シミュレーション、および 2D-MCS を用いた摂取量分布の推定に関して検討を行った。数値シミュレーションの結果、MLE 法よりも BE 法の方が、推定の真度・精度・妥当性が良好であった。さらに、この傾向は事前分布の設定に寄らず、無情報事前分布を用いた場合でも BE 法の方が MLE

法よりも良好な真度・精度・妥当性を示した。以上のことから、ZILN 分布に従う不検出例を含むデータの解析においても、BE 法が有効であることが示された。これらの結果を基にゼロ過剰モデルも考慮して、各食品群中の農薬濃度分布を BE 法で推定し、2D-MCS による残留農薬摂取量分布を推定した。ADI を超過する確率は、アセフェートの 0.001% が最大であったことから、検討したいずれの農薬も健康リスクは小さいと示唆された。さらに、2D-MCS から推定した結果と、摂取量のデータから BE 法で推定した結果を比較したところ、農薬摂取量の平均値の事後予測分布が良い一致を示した。以上のことから、いずれの推定方法も妥当であると考えられた。

課題 4. 検査部位の変更が残留農薬等の検査及び分析結果に及ぼす影響と対処法の検討

I. 試料の均質性に対する影響[令和元年度]

国内の残留農薬等の検査において国際的に採用されている検査部位を導入することは、輸出入の際の係争を回避する点から非常に重要である。この導入に伴う検査部位変更が、試料調製や試験操作、検査結果に及ぼす影響を明らかにするとともに、問題点への対処法を提案することにより、検査部位変更後の国内及び輸出入における残留農薬等の検査及び基準値判定の円滑な対応が可能となる。

令和元年度は、検討対象食品について検査部位変更前後の試料を調製し、調製した試料の状態や粒子の大きさなどを比較、考察することにより、検査部位の変更が調製試料の均質性に及ぼす影響について検討した。その結果、種子や果皮等が含まれることにより変更前の検査部位とは若干均質性が異なるものの、調製試料のほとんどは微細な粒子まで粉砕されており、特定部位の沈殿等もないことから、種々の試料調製機を用いて均質な調製試料が得られるものと考えられた。

II. 分析結果に対する影響[令和2年度]

検査部位の変更が残留農薬等の分析結果に及ぼす影響について検討した。みかん、びわ、すいかを検討対象食品として、これら食品の検査部位変更前後の試料を調製した。検討対象農薬等 39 化合物を調製した試料に添加し、「LC/MS による農薬等の一斉試験法I(農産物)」を用いて添加回収試験を実施した。検査部位変更前後の回収率を比較した結果、びわ及びすいかについては、検査部位の変更に伴う回収率の変化の程度は小さく、検査部位の変更が分析結果に及ぼす影響は小さいことが推察された。一方、みかんについては、検査部位の変更に伴いイプロジオン、トリアジメノール、トリアジメホン、ブタフェナシル及びメキシフェノジドにおいて回収率が大幅に低下したことから、実際の検査において誤判定の結果を生じる可能性が高くなることが予想された。

このような場合の効率的な対応としては、使用する LC-MS/MS の測定感度に応じて試験溶液を希釈することが有用である可能性が高いと考えられた。

III. 試料調製法の検討[令和3年度]

検査部位が変更される果実を含めた 10 食品について、通常の常温磨砕法よりも均質な試料が得られる可能性が高い凍結粉砕法を用いた試料調製を検討した。凍結粉砕法の操作手順を確立した後、試料の粉砕状況を常温磨砕法と比較した。その結果、食品によって均質化しやすい試料調製法は異なり、必ずしも凍結粉砕法の方が均質化しやすいとは言えないことが示された。また、農薬が残留した食品を用いて分析値のばらつきを求めた結果、均質性が低い場合、少量の試料を分析に供すると農薬の分布によってはばらつきが大きくなることが示された。これらの結果から、食品によって適切な試料調製法を選択するのが望ましいと考えられた。

以上の検討から、検査部位の変更後も、従来から用いられている常温磨砕法で、調製試料のほとんどは微細な粒子まで粉砕されており、特定部位の沈殿等もないことから、検査に必要な均質な調製試料が得られるものと考えられた。ただし、試料に種子や果皮等が含まれるため、農薬によっては試料マトリックスの測定への影響により、異なる結果を生じる可能性があることがわかった。このような場合の効率的な対応としては、使用する LC-MS/MS の測定感度に応じて試験溶液を希釈することで、大幅な変更をすることなく対応可能であると考えられた。また、凍結粉砕法は、一般に、常温磨砕法よりも均質な試料が得られる可能性が高いと思われるが、食品によって均質化しやすい試料調製法は異なり、必ずしも凍結粉砕法の方が均質化しやすいとは言えないことが示された。これらの結果から、食品によって適切な試料調製法を選択するのが望ましいと考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki Y, Tanaka N, Akiyama H.; Attempt of Bayesian Estimation from Left-censored Data Using the Markov Chain Monte Carlo Method: Exploring Cr(VI) Concentrations in Mineral Water Products. Food Safety. 8(4):67-89 (2020).

2. 学会発表

- 1) 鈴木美成, 穂山浩; 未検出例を含むデータをどのように扱うのが適切か? —ミネラルウォーター中 Cr(VI)を例として—, 第 56 回全国衛生化学技術協議会年会 2019 年 12 月.
- 2) 鈴木美成, 穂山浩; トータルダイエットスタディによる農薬摂取量の推定におけるベ

イズモデルを用いた精緻化, 日本食品衛生学会第 116 回学術講演会 2020 年 11 月-12 月.

- 3) 鈴木美成, 青柳光敏, 戸田英汰, 伊藤功一, 福光徹, 萩尾真人, 林孝子, 新宅沙織, 井原紗弥香, 川崎恭寛, 中島安基江, 佐藤環, 飛石和大, 堀就英, 穂山浩; ベイズ法を用いた食品を介した残留農薬摂取量の推定の試み, 第 29 回環境化学討論会 2021 年 6 月.
- 4) 駒場啓祐, 大河内博, 鈴木美成, 川嶋文人; 都市大気中農薬の実態解明と個人暴露評価のためのウェアブルサンプラーの開発 (1), 第 29 回環境化学討論会 2021 年 6 月.
- 5) 駒場啓祐, 大河内博, 鈴木美成, 川嶋文人; 都市大気中農薬の実態解明と個人暴露評価のためのウェアブルサンプラーの開発 (3), 第 63 回大気環境学会年会 2021 年 9 月
- 6) Keisuke KOMABA, Hiroshi OKOCHI,

Yoshinari SUZUKI, Ayato KAWASHIMA; Pesticides in the urban atmosphere and the development of wearable samplers to assess personal exposure(2), The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem), 2021 年 12 月.

- 7) 鈴木 美成, 青柳 光敏, 戸田 英汰, 伊藤功一, 福光 徹, 萩尾 真人, 林 孝子, 新宅沙織, 井原 紗弥香, 川崎 恭寛, 中島 安基江, 佐藤 環, 飛石 和大, 堀 就英, 穂山 浩; 不検出値を含むデータを用いたベイズ推定による残留農薬摂取量の精緻化の試み, 第 58 回全国衛生化学技術協議会年会 2021 年 12 月.

F. 知的所有権の取得状況

なし