

## 令和2年度厚生労働行政推進調査事業費補助金 食品の安全確保推進研究事業

輸出先国のリスク管理に対応した残留農薬データ等の補完に関する研究

研究分担報告書

農薬等の残留する試料の作成と残留物の評価に関する研究

研究分担者 加藤 拓

東京農業大学応用生物科学部

### 研究要旨

本研究では、新たな作物残留試験等の実施が困難な場合に、加工試験や妥当性確認において利用可能なインカード試料の作成について検討し、作成したインカード試料における残留物を評価した。本年度は Etofenprox と Dinotefuran に暴露された稲のインカード試料を OECD Guideline for the Testing of Chemicals 509 に準拠して作成した。まず、農薬処理区と対照区である無処理区を同一圃場内に設置し、各農薬成分に定められた使用時期の収穫前期間ならびに使用間隔が最小となるように、農薬を散布し、収穫後に試料調製を行った。その結果、各処理間におけるインカード試料の生育量に有意差が無いことが確認された。次に、公示試験法による各農薬成分（Etofenprox と Dinotefuran）の分析を行った。その結果、各農薬成分の残留濃度は、籾殻>稲わら>玄米の順に高い値を示した。これら残留濃度の違いは、農薬散布時期を考慮すると妥当な結果と考えられた。

研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所安全情報部・客員研究員

山田友紀子

### A. 研究目的

精密な暴露量の推定や、農産物に残留する農薬の成分の量の限度値（最大残留基準値、以下、MRL）設定の必要の判断には、農産加工品における残留物の挙動を知らなければならない（加工試験）。また、設定された MRL への適合判定を目的とした分析においては、使用する分析法が必要とされる性能規準を満たしているかを評価

しなければならない（妥当性確認）。本来、これらの加工試験や妥当性確認には、農薬等を投与した結果として生じる残留物を含む試料（以下、インカード試料）を使用しなければならない。農薬等の新規登録時であれば作物残留試験等を通じてインカード試料を作成することが可能である。

しかし、すでに設定されている MRL に関するデータギャップを埋めるために、新

たな作物残留試験等を実施することは不可能である。本研究では、登録済み農薬についてインカード試料の作成を検討し、残留物を評価する。具体的には、作物の栽培方法や当該作物に適用のある農薬の使用時期、使用方法等を考慮して使用する農薬を特定し、実際の栽培を反映する方法で当該作物に使用し、3年間で、複数の組み合わせについて、加工試験及び妥当性確認に用いるためのインカード試料を作成する。

1年目の本研究では、稲（玄米・粳穀・稲わら）に含まれる Etofenprox 並びに Dinotefuran 残留物について検討する。

## B. 研究方法

### 1) 使用する農薬の決定

稲に適用できることが登録されている農薬のうちから、①使用濃度が高く、かつ収穫直前に使用可能であることから、収穫した米粒中の有効成分の残留濃度が定量下限値より有意に高くなると考えられること、② JMPR に作物残留試験が提出されており、収穫物の残留濃度が高いことが示されていること、③浸透移行性の低いものが望ましいこと、④分析法の性能評価のために、水・オクタノール分配係数が高いものと低いもの、⑤分析対象物質として、標準試薬が入手可能であること、⑥使いやすく、残留濃度がより均一になる剤型が存在すること、⑦複数選ぶ場合には収穫前期間が同じであり、混合剤が市販されていること、⑧分析に必要な費用、などを総合的に考慮して、2剤を選択した。

### 2) インカード試料（稲）の作成方法

本年度は、我が国の代表的穀物である稲（品種コシヒカリ）のインカード試料を作成した。イネの場合、肥料試験などでは1/5000 a ワグネルポットが通常用いられるが、根圏が制御されるなどの理由から、稲体が小さくなる傾向がある。本研究では、MRL の設定に用いる、並びに次段階の加工試験に作成したインカード試料を供試するために、実際の栽培に即した条件下におけるインカード試料の作成が求められることから、圃場スケールでのインカード試料の作成を行った。OECD Guideline for the Testing of Chemicals 509（以下、OECD ガイドライン）は、圃場スケールでのインカード試料は、通常の使用方法を反映した方法で試験物質を使用でき、代表性のある試料をバイアスなく採取できる規模の圃場にて作成することを求めている。そこで、本研究では試験圃場として約 17a の水田を使用した。また、各処理区は、OECD ガイドラインに準拠（農薬処理区と無処理区は同様または同一の栽培条件下におく）するために、同一の試験圃場内に設置し、無処理区への農薬成分による汚染が起らないように各処理区間に十分な規模の緩衝地帯を設けた（図1）。

種籾は令和2年4月11日に播種し、同年5月1日に育苗した20日苗を定植した。播種時に除草剤としてカフェンストロール・シクロスルファミロン・ダイムロン・ベンゾピシクロン粒剤（商品名サスケラジカルジャンボ；OAT アグリオ株式会社）

と殺虫剤としてイミダクロプリド粒剤(商品名アドマイヤー CR 箱粒剤;クミアイ化学工業株式会社)を育苗箱処理した。

定植した苗の株間は 30 cm、畝間は 24 cm とし、栽植密度は 13.9 本  $m^{-2}$  とした。各処理区の面積は 200  $m^2$  とし、うち外周 50  $m^2$  を番外区とし、残りを試験区とした。

分析法の妥当性確認及び加工試験のためのインカード試料の作成に使用する農薬は、エトフェンプロックス・ジノテフラン水和剤(商品名トレボンスターフロアブル;三井化学アグロ株式会社)とした。本剤は、Etofenprox (7.0%) と Dinotefuran (3.0%) の二成分を含有する混合剤である。Etofenprox は脂溶性が高く、Dinotefuran は水溶性が高い。本研究で作成したインカード試料は加工試験に用いられるが、本剤は、ラベルに記載されている最大の使用方法に則り、300 倍希釈 (Etofenprox 23 g  $ai\ hL^{-1}$ ; Dinotefuran 10 g  $ai\ hL^{-1}$ ) で使用した。また収穫前期間は 7 日間である。

農薬のラベルに記載されている使用時期の収穫前期間、並びに使用間隔が最小となるように、収穫 21 日前 (令和 2 年 8 月 4 日)、収穫 14 日前 (令和 2 年 8 月 11 日)、収穫 7 日前 (令和 2 年 8 月 18 日) に計 3 回の 7 日おきに農薬散布を行った。各農薬成分の使用回数は育苗箱処理も含めると最大 4 回であるが、本研究では定植後の最大使用回数である 3 回の散布を行った。

収穫時 (令和 2 年 9 月 1 日) に圃場の各処理区から、稲わらと籾の 2 種類のサンプル

を持ち出した。収穫は、農薬成分のコンタミを避けるために無処理区から行った。稲わらは、各処理区の試験区内から、約 4 m 毎に一株を地際から刈り取り、各計 24 株 (各処理区 12 株) を個別にポリエチレン製袋に採取した。採取後、直ちに冷凍保存した。一方、籾は番外区、試験区の順に、乗用コンバインを用いて、刈り取りと脱穀を行った。脱穀後の籾は、ガラス温室にて風乾処理し、水分 16% に調整した。水分調整した籾は、籾摺り後に玄米と籾殻を直ちに  $-20^{\circ}C$  にて保存した。

### 3) インカード試料 (稲) の残留農薬分析方法

玄米は超遠心粉砕機 ZM-200 (Retsch 製) の 0.5 mm メッシュを用い粉砕した。籾殻は超遠心粉砕機 ZM-200 (Retsch 製) の 1.0 mm メッシュを用い粉砕した。稲わらは解凍後、各袋から 2 から 3 本抜き取り、はさみで 10 cm に細断・混合し、各処理区 1 試料とした。分析時に更に 2~3 cm に細切し、ブレンダーミキサー Blixer3 (robot coupe 製) で粉砕した。

粉砕調製した分析用各試料は、公示試験法である LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物) 【以下、一斉試験法】を用いて残留した各農薬成分を定量した。Etofenprox 及び  $\alpha$ -CO 並びに Dinotefuran の一斉試験法の手順を図 2 と図 3 に示した。すなわち、Etofenprox 及び  $\alpha$ -CO では、試料 10.0 g に水 20 mL (稲わらは 30 mL) を加え 2 時間静置後、アセトン 100 mL を加

えてホモジナイズした後に吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトン 50 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過した。得られたろ液を合わせ、アセトンにて 200 mL に定容した。抽出液を 8 mL 分取し、水 20 mL を加え負荷、洗浄後に水及びメタノールの混液 (1:1) 10 mL にて更に洗浄を行い、メタノール 10 mL で溶出させメタノールで 10 mL に定容した。定容した溶液 1 mL を分取し、減圧濃縮、窒素乾固後、ヘキサンにて 5 mL に溶解した。これをヘキサン 5 mL で洗浄した後にジエチルエーテル及びヘキサンの混液 (1:9) 10 mL で溶出し、減圧濃縮後に窒素乾固した。得られた残留物をメタノールにて 1 mL に定容し、Etofenprox の場合では籾殻は 100 倍希釈、稲わらは 50 倍希釈、 $\alpha$ -CO の場合では籾殻は 100 倍希釈、稲わらは 50 倍希釈し、液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計 (以下、LC-MS/MS) にて測定した。

一方、Dinotefuran では、試料 10.0 g に水 20 mL (稲わらは 30 mL) を加え 2 時間静置後、アセトン 100 mL (稲わらは 120 mL) を加えてホモジナイズした後に吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトン 50 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過した。得られたろ液を合わせ、アセトンにて 200 mL に定容した。抽出液を 0.8 mL 分取し、水 3 mL および塩化ナトリウム約 1 g を加え負荷し 5 分間静置した。ヘキサン 40 mL にて洗浄後に、酢酸エチル 60 mL で溶出させた後に減圧濃縮、窒素乾固した。得られた残留物をメタノールにて 1 mL に

定容し、玄米は 5 倍希釈、籾殻は 40 倍希釈、稲わらは 10 倍希釈し、LC-MS/MS にて測定した。

測定用標準溶液を LC-MS/MS に注入し、各成分の重量とピーク面積から検量線 (最小二乗法) を作成し、以下の式 1 または式 2 に従い、試料中の各成分の含有量を算出した。なお、試験溶液中の各成分の重量が検量線の範囲を超えた場合は適宜希釈して再度測定した。

#### 【式 1 : Etofenprox および $\alpha$ -CO】

試料中の Etofenprox 及び  $\alpha$ -CO の含有量 (mg/kg) =  

$$\text{検量線から求めた重量 (ng)} \times 1 \text{ mL} / \text{注入量 } (\mu\text{L}) \times 200 \text{ mL} / 8 \text{ mL} \times 10 \text{ mL} / 1 \text{ mL} \times \text{希釈率} \times 1 / 10 \text{ g}$$

#### 【式 2 : Dinotefuran】

試料中の Dinotefuran の含有量 (mg/kg) =  

$$\text{検量線から求めた重量 (ng)} \times 1 \text{ mL} / \text{注入量 } (\mu\text{L}) \times 200 \text{ mL} / 0.8 \text{ mL} \times \text{希釈率} \times 1 / 10 \text{ g}$$

### C. D. 結果及び考察

#### 1) インカード試料の作成

無処理区および農薬処理区におけるイネの生育データを表 1 に示した。草丈は無処理区 128.8(±2.7) cm と農薬処理区 132.0(±3.9) cm であり、茎数は無処理区 29.4(±4.8) 本と農薬処理区 36.6(±5.2) 本であった。草丈および茎数に、各処理間で有意な差は認められなかった。作物の大き

さ（草丈など）と重量は、農薬成分の残留性に大きく影響すると考えられる。草丈は作物の葉面積と高い正の相関を示す。そのため、作物の大きさに比例して、作物に付着する農薬分量が増加することが予想される。本研究では葉身、稈+葉鞘及び穂の各部位重量にも有意な差は認められなかった。したがって、試験区間の差が少なく、作物体重量が揃ったインカード試料が作成できたと考えられる。

収量構成要素とは作物の収量を規定する形質要素を指す。イネの収量構成要素は、穂数（本/株）、一穂粒数（粒/穂）、登熟歩合及び千粒重（g）であり、ここでの登熟歩合は全粒数に対する登熟した粒数の割った値である。玄米収量（g/m<sup>2</sup>）は、これら収量構成要素をすべて乗じた値であり、以下の式3で表される。

### 【式3：玄米収量】

単位面積あたりの玄米収量（g/m<sup>2</sup>）＝  
穂数（本/株）×一穂粒数（粒/穂）×登熟歩合×千粒重（g）

玄米収量は、無処理区 608.7(±114.3) g/m<sup>2</sup>と農薬処理区 690.7(±75.9) g/m<sup>2</sup>であり、各処理間で有意な差は認められなかった。また、収量構成要素である穂数、一穂粒数、登熟歩合、及び千粒重においても各処理間で有意な差が認められなかったことから、本研究では均質なインカード試料が作成でき、暴露試験による農薬成分残留に対する各処理間における稲体の大きさ

や重量に起因するの影響は無いと考えられた。

## 2) インカード試料の残留農薬分析結果

各農薬成分の残留濃度を表2に示した。各農薬分析に供した作物体試料は、合一した後に再分取した試料であるため、玄米収量などの個別結果とは対応していない。一斉試験法による分析の結果、Etofenproxの残留濃度は籾殻>稲わら>玄米の順に高い値を示した。稲わら（葉身+稈+葉鞘）重と穂重の差が小さいこと、並びに農薬散布が出穂後に行われていることを鑑みると妥当な結果と考えられた。 $\alpha$ -COもEtofenproxと同様の傾向を示し、籾殻>稲わら>玄米の順に残留濃度が高かった。この結果もEtofenproxと同様に薬剤の部位への付着量の違いに起因すると考えられた。Dinotefuranの残留濃度も、他の二成分と同様に、籾殻>稲わら>玄米の順に高い値を示した。また、農薬処理区におけるDinotefuran残留濃度の玄米/籾殻の値は、Etofenproxの10倍近く高い値を示した。生体付着後の保存環境下におけるEtofenproxとDinotefuranの分解率の違いなど様々な条件を考慮する必要があるが、玄米への残留率の違いに与える影響について、今後検討する必要があると考えられた。

## 3) 小括

農薬処理区のインカード試料の生育

量が無処理区（対照区）と同等することが出来れば、Etofenprox（7.0%）とDinotefuran（3.0%）の二成分を含有する混合剤であるエトフェンプロックス・ジノテフラン水和剤のインカード試料が作成できることが明らかとなった。

## **E. 研究発表**

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

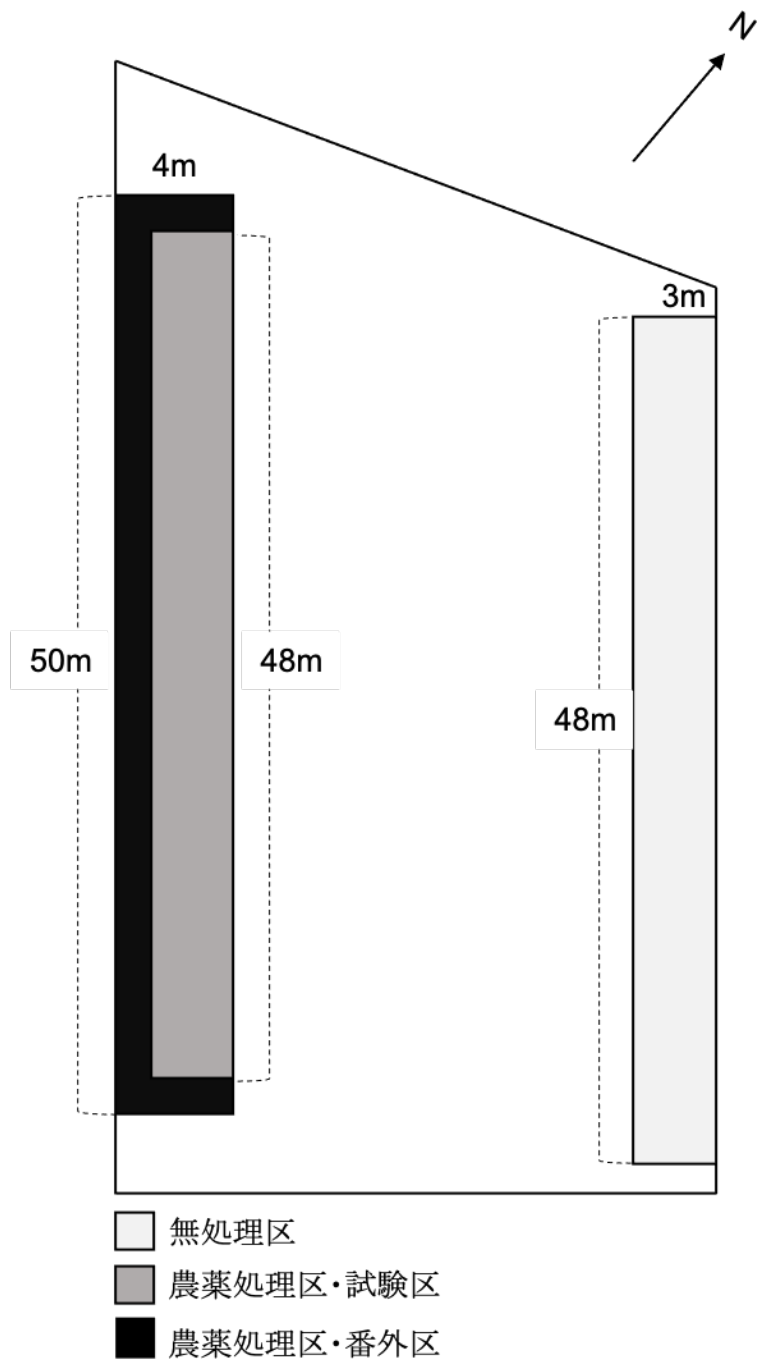


図1 試験圃場概況

試料10.0 g (糠及び脱脂糠は2.0 g) 採取

水20 mL (稲わらは30 mL) を加え2時間放置

アセトン100 mL (稲わらは120 mL) を加えホモジナイズ後、吸引ろ過  
ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えホモジナイズ後、吸引ろ過  
得られたる液を合わせアセトンで200 mLに定容

InertSep C18 (1 g)

(カラムを予め、メタノール5 mL及び水5 mLで洗浄)

抽出液8 mL分取

水20 mLを加え負荷、洗浄

水及びメタノールの混液 (1:1) 10 mLで洗浄

メタノール10 mLで溶出、メタノールで10 mL定容

Sep-pak Long Florisil (910 mg)

(予めヘキサン10 mLで洗浄)

定容液1 mL (糠及び脱脂糠は5 mL) 分取

減圧濃縮、窒素乾固、ヘキサン5 mLに溶解、負荷

ヘキサン5 mLで洗浄

ジエチルエーテル及びヘキサンの混液 (1:9) 10 mLで溶出

減圧濃縮、窒素乾固

残留物

メタノールで1 mL定容

インカード試料エトフェンプロックス：玄米及び糠は5倍希釈、

粃殻は100倍希釈、稲わらは50倍希釈

インカード試料  $\alpha$ -CO：粃殻は100倍希釈、稲わらは50倍希釈

LC-MS/MS注入

図 2 Etofenprox および  $\alpha$ -CO の一斉試験法



試料10.0 g（糠及び脱脂糠は2.0 g）採取

水20 mL（稲わらは30 mL）を加え2時間放置

アセトン100 mL（稲わらは120 mL）を加えホモジナイズ後、吸引ろ過

ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えホモジナイズ後、吸引ろ過

得られたろ液を合わせアセトンで200 mLに定容

InertSep k-solute 5 mL用

抽出液0.8 mL（糠及び脱脂糠は4 mL）分取

糠及び脱脂糠のみ約0.5 mLまで減圧濃縮

水3 mL及び塩化ナトリウム約1 gを加え負荷、5分間放置

ヘキサン40 mLで洗浄

酢酸エチル60 mLで溶出、減圧濃縮、窒素乾固

残留物

メタノールで1 mL定容

インカード試料：玄米、精米及び糠は5倍希釈、脱脂糠は10倍希釈、

粃殻は40倍希釈、稲わらは10倍希釈

LC-MS/MS注入

図 3 Dinotefuran の一斉試験法

表1 無処理区および農薬処理区におけるイネの生育データ

無処理区	草丈 cm	茎数 本/株	穂数 本/株	葉身 g	稈+葉鞘 g	穂 g	籾数 個/株	整粒 個/株	千粒重 g	一穂籾数 個/穂	登熟歩合 %	玄米収量 g/m <sup>2</sup>
1	124.6	28	23	19.0	54.9	51.3	2309	1884	19.5	100.4	81.6	510.9
2	127.4	23	22	15.2	35.8	54.7	-	-	-	-	-	-
3	132.4	37	35	23.3	79.9	99.9	-	-	-	-	-	-
4	129.2	27	30	13.2	40.6	57.4	2638	2001	19.6	87.9	75.9	546.0
5	130.4	32	30	18.5	57.8	76.9	3280	2799	19.8	109.3	85.3	769.1
標準偏差	2.7	4.8	4.9	3.5	15.5	18.3	403	407	0.1	8.8	3.9	114.3
平均	128.8	29.4	28.0	17.8	53.8	68.0	2742	2228	19.7	99.2	80.9	608.7
CV	0.02	0.16	0.17	0.20	0.29	0.27	0.15	0.18	0.01	0.09	0.05	0.19

農薬処理区	草丈 cm	茎数 本/株	穂数 本/株	葉身 g	稈+葉鞘 g	穂 g	籾数 個/株	整粒 個/株	千粒重 g	一穂籾数 個/穂	登熟歩合 %	玄米収量 g/m <sup>2</sup>
1	127.7	39	38	23.2	66.4	91.1	-	-	-	-	-	-
2	130.0	42	44	27.1	61.3	90.5	3981	2968	19.0	90.5	74.6	784.6
3	130.5	29	29	20.8	51.5	71.9	3237	2672	18.6	111.6	82.5	688.9
4	132.6	32	33	21.1	50.2	68.0	3233	2208	19.5	98.0	68.3	598.7
5	139.2	41	41	26.4	62.3	91.2	-	-	-	-	-	-
標準偏差	3.9	5.2	5.4	2.6	6.4	10.3	352	313	0.4	8.8	5.8	75.9
平均	132.0	36.6	37.0	23.7	58.3	82.5	3484	2616	19.0	100.0	75.1	690.7
CV	0.03	0.14	0.15	0.11	0.11	0.13	0.10	0.12	0.02	0.09	0.08	0.11

表2 玄米、籾殻および稲わらにおける各農薬成分の残留濃度

Etofenprox (mg/kg)

玄米		籾殻		稲わら	
無処理区	農薬処理区	無処理区	農薬処理区	無処理区	農薬処理区
0.0029	0.141	0.0542	20.4	N.D.	4.92

α-CO (mg/kg)

玄米		籾殻		稲わら	
無処理区	農薬処理区	無処理区	農薬処理区	無処理区	農薬処理区
N.D.	0.0294	0.0158	6.02	N.D.	2.05

Dinotefuran (mg/kg)

玄米		籾殻		稲わら	
無処理区	農薬処理区	無処理区	農薬処理区	無処理区	農薬処理区
N.D.	0.351	0.0182	5.13	N.D.	1.2

註 N.D. は検出限界以下、Etofenproxの玄米の無処理区の値は、定量下限値（0.01 mg/kg）以下のため参考値