

令和3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。本年度はスルホキサフロルとブプロフェジンに暴露された稲とトルフェンピラドとジノテフランに暴露された茶のインカード試料を OECD Guideline for the Testing of Chemicals 509 への準拠を考慮し作成した。稲と茶ともに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日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。

公示試験法を基礎とする方法により分析した結果、玄米試料におけるスルホキサフロルならびにブプロフェジンの濃度はそれぞれ $0.396\sim 0.422\text{ mg kg}^{-1}$ 、 $0.201\sim 0.217\text{ mg kg}^{-1}$ の範囲となった。また、茶試料におけるジノテフランならびにトルフェンピラドの濃度はそれぞれ $20.8\sim 22.6\text{ mg kg}^{-1}$ 、 $15.3\sim 16.3\text{ mg kg}^{-1}$ の範囲となった。以上の結果から、加工による残留物への影響の観察、また分析法の妥当性確認に必要な濃度で農薬残留物を含むインカード試料が作成されたと考えられる。

研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所安全情報部

山田友紀子

国立医薬品食品衛生研究所安全情報部

渡邊敬浩

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 植物防疫研究部門

佐藤安志

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、登録された使用基準に従って当該作物に使用し、3年間で、複数の組み合わせについて、分析及び加工試験に用いるためのインカード試料を作成する。

1年目は、稲体を構成する玄米・粳穀・稲わらに含まれる Etofenprox 並びに Dinotefuran の残留物について検討した。2年目にあたる本年は、1年目と同様に稲を対象にして、玄米に含まれる Sulfoxaflol 並びに Buprofezin 残留物について検討した。加えて、本年度は茶を対象にして荒茶に含まれる Tolfenpyrad と Dinotefuran 残留物について検討した。

B. 研究方法

1) 使用する農薬の決定

稲と茶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分析の評価のために、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複数選ぶ場合には同じ休薬期間であり、混合剤が市販されていること、⑧分析のための研究予算、などを総合的に考慮して選択した。

2) インカード試料の作成方法

2)-1 稲（玄米）

本年度も、1年目と同様に、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。本研究では、MRL の設定に用いる、ならびに、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）において、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、稲栽培用の試験圃場として1年目と同じ約17aの水田を使用した。また、各処理区は、1年目と同じく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3年3月22日に播種し、同年4月22日に苗を定植した。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・ベンゾビシクロン粒剤(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30cm、畝間は24cmとし、栽植密度は13.9本/m²とした。各処理区の面積は200m²とし、うち外周50m²を番外区とし、残りを試験区とした。

分析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成分は、スルホキサフロル(商品名エクシードフロアブル;成分濃度 Sulfoxaflo 20%;日産化学株式会社)とブプロフェジン(商品名アプロード水和剤;成分濃度 Buprofezin 25%;日本農薬株式会社)とした。スルホキサフロル剤は、2000倍希釈で、4回の散布を7日間隔で行った。ブプロフェジン剤は

1000倍希釈で、3回散布を7日間隔で行った。希釈倍率は商品ラベルに記載されている最大の使用方法に則り決定した。

各剤はラベルに記載されている使用時期の収穫前期日ならびに使用間隔が最小となるように、収穫28日前(令和3年7月25日)、収穫21日前(令和3年8月1日)、収穫14日前(令和3年8月8日)、収穫7日前(令和3年8月15日)に散布した。すなわち、スルホキサフロルは休薬期間を7日で計4回、ブプロフェジンは休薬期間を7日で計3回の農薬散布を行った。スルホキサフロルとブプロフェジンの使用回数は育苗箱処理も含めると、それぞれ最大3回と4回であるが、本研究では定植後の最大使用回数分の散布を行った。

収穫(令和3年8月22日)は、農薬成分のコンタミを避けるために無処理区から行い、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、籾摺り後に玄米として直ちに-20℃にて保存した。

2)-2 茶(荒茶)

荒茶も、稲と同様に、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。試験圃場は、品種「やぶきた」を栽培している約10aの茶畑を使用し

た。稲と同様に、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こ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 2）。

本試験開始前の使用農薬履歴を表 1 に示した。

茶木は畝幅 1.8 m で定植されており、高さは 0.65 m²、栽植密度は約 1.8 本 m⁻²であった。各処理区の面積は 15 m²とした。被覆資材（ダイオラッセル黒）は、農薬散布後に薬液が乾燥したことを確認した後に設置した。

本試験で散布した農薬成分は、ジノテフラン（商品名アルバリン顆粒水溶剤；成分濃度 Dinotefuran 20%；アグロカネショウ株式会社）、クロルフェナピル（商品名コテツフロアブル；成分濃度 Chlorfenapyr 10%；日本曹達株式会社）及びトルフェンピラド（商品名ハチハチ乳剤；成分濃度 Tolfenpyrad 15%；日本農薬株式会社）とした。ジノテフラン剤とクロルフェナピル剤は、2000 倍希釈で、1 回の散布を摘採 7 日前（令和 3 年 6 月 22 日）に行った。トルフェンピラド剤は、1000 倍希釈で、1 回の散布を摘採 14 日前（令和 3 年 6 月 15 日）に行った。ジノテフラン剤とクロルフェナピル剤の最大使用回数は 2 回であるが、本試験では最小使用間隔（7 日間）で 1 回の散布とした。トルフェンピラド剤は、最大使用回数（1 回）と最小使用間隔（14 日間）で散布を行った。

収穫（令和 3 年 6 月 29 日）は、4～5 葉期（出開）に、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。試験区の両端約 50cm を除き、乗用型摘採機を用いて試験区全体から摘採した。ブローアにて水滴（朝露）を飛ばし、乾燥したことを確認後、生葉の摘採を行った。その後、直ちに荒茶への調整作業を、無処理区から順に行った。すなわち、各試験区の生葉 約 250 g ずつをそれぞれ清浄なナイロン網袋に詰め、蒸熱処理（約 90 sec；104°C；0.01 MPa）を行った。蒸熱処理後の蒸葉は、網袋に入れたまま、清浄な紙を敷いた浅いコンテナに並べて約 150 min の風乾処理（30 min で 4 回切り返し）を行った。各試験区の試料は包装後にフレスコに入れ、それぞれ窒素封入して密閉し、-40°Cにて保存した。

3) インカード試料の残留農薬分析方法

3)-1 稲（玄米）

約 1 kg の玄米を超遠心粉砕機 ZM-200（Retsch 製）の 0.5 mm メッシュを用い粉砕した。粉砕調製した分析用試料は、公示分析法を基礎として構築した基本分析法により分析した。基本分析法の詳細は、当研究班渡邊分担課題報告書に記載されているため参照されたい。本報告書では、測定溶液の調製部分についてのみ、以下に示す。

玄米試料を対象とする基本分析法

本研究では、玄米試料に含まれるスルホキサフロル及びブプロフェジンを対象とする基本分析法として、公示一斉分析法及

び個別分析法(スルホキサフロル/農産物)が採用している抽出溶媒を変更せず、LC-MS/MSによる測定を前提として、以下の分析法を構築し使用した。

試料 10.0 g に水 20 mL を加え 30 分間静置した。アセトニトリル 100 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトニトリル 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、アセトニトリルを加えて正確に 200 mL とし抽出液とした。抽出液を 1 mL 分取し、メタノールで 20 mL に定容し測定用溶液とした。測定用溶液を LC-MS/MS に注入し測定した。

3)-2 茶 (荒茶)

約 100~150 g の荒茶を小型粉砕機を用いて粉砕した。粉砕調製した分析用試料は、公示分析法を基礎として構築した基本分析法により分析した。基本分析法の詳細は、当研究班渡邊分担課題報告書に記載されているため参照されたい。本報告書では、測定溶液の調製部分についてのみ、以下に示す。

茶試料を対象とする基本分析法

本研究では、茶試料に含まれるジノテフラン及びトルフェンピラドを対象とする基本分析法として、公示一斉分析法及び個別分析法(ジノテフラン/農産物)が採用している抽出溶媒を変更せず、LC-MS/MSによる測定を前提として、以下の分析法を構築し使用した。

試料 5.0 g に水 20 mL を加え 30 分間静

置した。アセトニトリル 100 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトニトリル 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、アセトニトリルを加えて正確に 200 mL とし抽出液とした。抽出液を 1 mL 分取し、メタノールで 100 mL に定容し測定用溶液とした。

C. D. 結果及び考察

1) インカード試料の作成

1)-1 稲 (玄米)

稲の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 2 に示した。草丈は無処理区 122.4(±1.7) cm と農薬処理区 125.2(±2.3) cm であり、茎数は無処理区 30.2(±5.0) 本と農薬処理区 30.8(±2.9) 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、散布した農薬成分の付着量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成分量が増加することが予想される。本研究では葉身、稈+葉鞘およ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、本年度も昨年度と同じく、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

合および千粒重 (g) であり、ここでの登熟歩合は全籾数に対する登熟した籾数の割った値である。玄米収量 (g/m^2) は、これら収量構成要素をすべて乗じた値であり、以下の式で表される。

$$\text{単位面積あたりの玄米収量 (g/m}^2\text{)} = \text{穂数 (本/株)} \times \text{一穂籾数 (粒/穂)} \times \text{登熟歩合} \times \text{千粒重 (g)}$$

玄米収量は、無処理区 $554.5(\pm 67.5) \text{ g m}^{-2}$ と農薬処理区 $657.9(\pm 48.7) \text{ g m}^{-2}$ であり、平均値には大きな差があるように見られるが、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、一穂籾数、登熟歩合およ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影響は無いと考えられる。

1)-2 茶 (荒茶)

茶の場合、機械による収穫には生葉以外の枝なども混入されるため、荒茶に調整する際に、摘採した生茶から荒茶調整用に均一に採取する必要がある。蒸熟工程前の茶葉重量と蒸熟後に乾燥処理した後の茶葉重量の結果を表 3 に示した。

無処理区の荒茶量は 80.1 g m^2 であり、ジノテフラン区では 77.0 g m^2 、クロルフェナピル区では 81.3 g m^2 、トルフェンピラド区では 76.3 g m^2 であり、各試験区か

ら調整された荒茶量に差はないと考えられ、均質なインカード試料が作成できたと考えられる。

2) インカード試料の残留農薬分析結果

稲と茶の各農薬成分の残留濃度を表 4 から表 7 に示した。

各農薬分析に供した玄米試料は、コンバインによる収穫後に、乾燥調整し、合一した後に再分取した試料であるため、前述の生育調査の結果とは対応していない。基本分析法を用いて得られた玄米試料におけるスルホキサフロル濃度は $0.396\sim 0.422 \text{ mg kg}^{-1}$ 、一方のブプロフェジン濃度は、 $0.201\sim 0.217 \text{ mg kg}^{-1}$ の範囲を示した。

基本分析法を用いて得られた荒茶試料におけるジノテフラン濃度は $20.8\sim 22.6 \text{ mg kg}^{-1}$ 、一方のトルフェンピラド濃度は $15.3\sim 16.3 \text{ mg kg}^{-1}$ の範囲を示した。

以上の結果から、加工による残留物への影響の観察、また分析法の妥当性確認に必要な濃度で農薬残留物を含むインカード試料が作成されたと考えられる。

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、スルホキサフロル (Sulfoxaflor 20%) とブプロフェジン (Buprofezin 25%) を散布した稲 (玄米) のインカード試料が作成できることが明らかとなった。また、茶 (荒茶) の場合、ジノテフラン (Dinotefuran 20%) とトルフェンピラド

(Tolfenpyrad 15%) を。それぞれ単独で
せ用した場合、各農薬成分が残留したイ
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

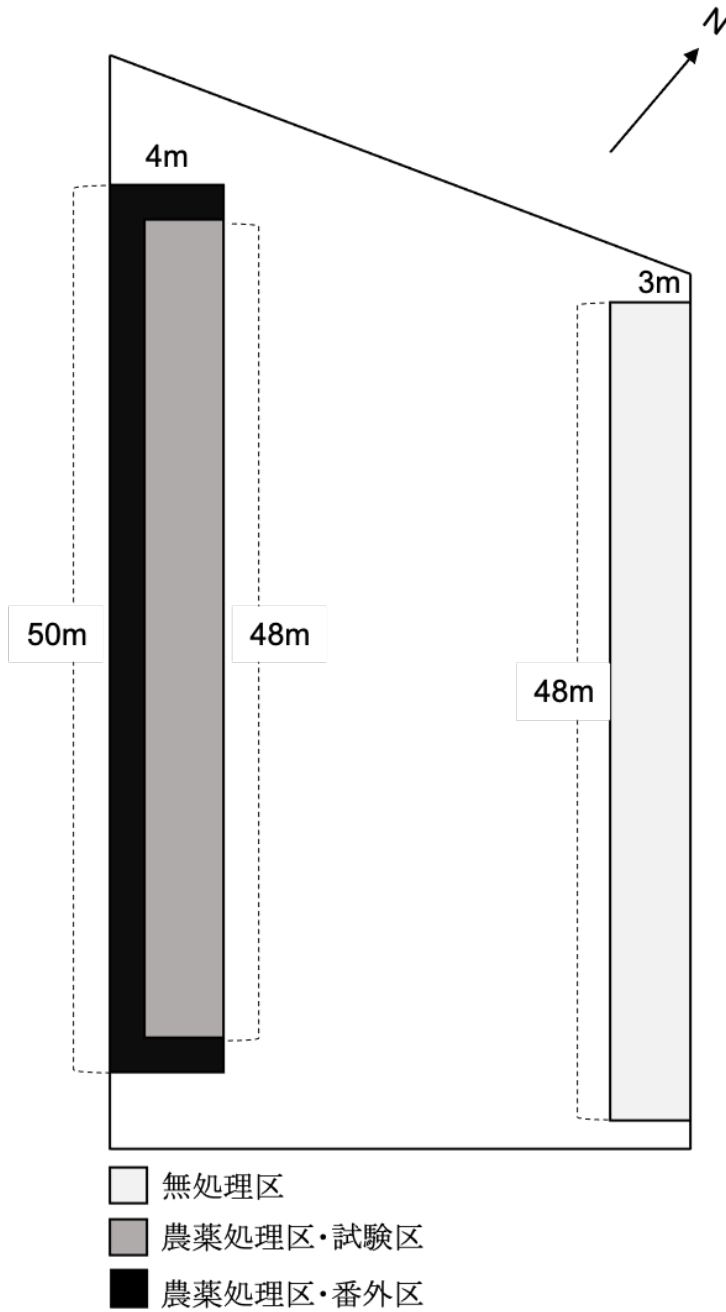
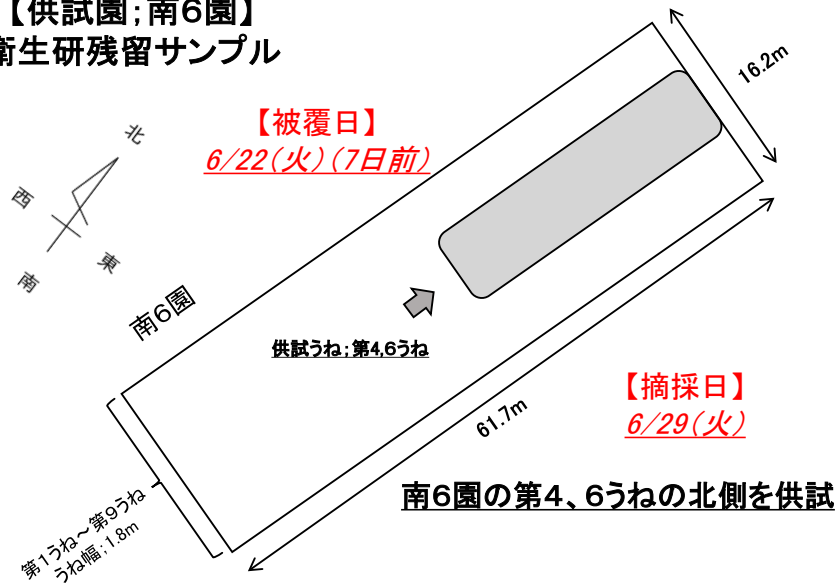
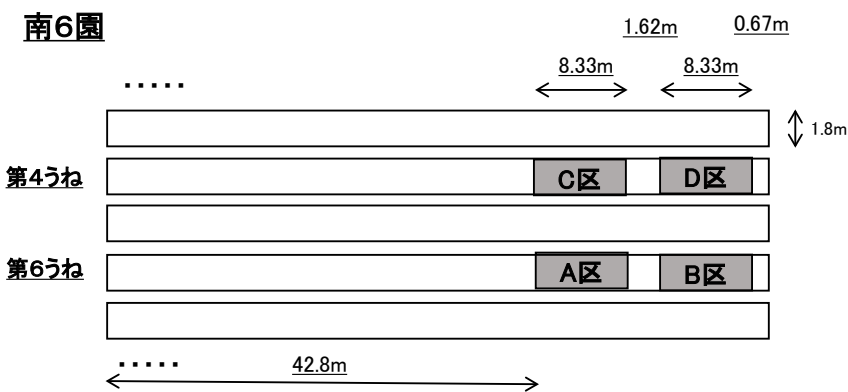


図1 試験圃場概況

**【供試園;南6園】
衛生研残留サンプル**



各区; 15.0m² (1.8m × 8.33m) / 区 約27株/区



【散布日】

6/15(火)(14日前); ハチハチ乳剤(C区)

6/22(火)(7日前); コテツフロアブル(B区)、アルバリン顆粒水溶剤(A区)

【摘採順序】

①D区(無散布)→②C区(ハチハチ)→③B区(コテツ)→④A区(アルバリン)

図 2 試験圃場概況

表1 茶栽培圃場における農薬使用履歴（直近1年分）

作物名	農薬名・商品名 (有効成分・濃度)	希釈倍率
茶	ガンバ水和剤 (ジアフェンチウロン・50.0%)	1000 倍
茶	ファルコンフロアブル (メトキシフェノジド・20.0%)	4000 倍
茶	アクタラ顆粒水和剤 (チアメトキサム・10.0%)	2000 倍
茶	オンリーワンフロアブル (テブコナゾール・20.0%)	2000 倍
茶	フェニックスフロアブル (フルベンジアミド・18.0%)	2000 倍
茶	アプロードエースフロアブル (ブプロフェジン・20.0%、フェンピロキシメート・ 4.0%)	1000 倍
茶	トレファノサイド乳剤 (トルフルラリン・44.5%)	200 倍
茶	サンダーボルト 007 (グリホサートイソプロピルアミン・30.0%、 ピラフルフェンエチル・0.16%)	200 倍
茶	インダーフロアブル (フェンブコナゾール・22.0%)	5000 倍
茶	ウララ DF (フロニカミド・10.0%)	1000 倍
茶	ディアナ SC (スピネトラム・11.7%)	5000 倍
茶	アフーム乳剤 (エマメクチン安息香酸塩・1.0%)	1000 倍
茶	テッパン液剤 (シクラニリプロール・4.5%)	1000 倍
茶	銅シン水和剤 (塩基性塩化銅・75.6% (銅・45.0%)、 カスガマイシン・5.0%)	1000 倍
茶	コテツフロアブル (クロルフェナピル・10.0%)	2000 倍
茶	サンフーロン (グリホサートイソプロピルアミン塩・41.0%)	100 倍
茶	バスタ液剤 (グルホシネート・18.5%)	100 倍
茶	トレファノサイド (トリフルラリン・44.5%)	200 倍

表2 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 ²
1	123	28	29	23.1	50.9	72.1	3031	1744	24.7	104.5	57.5	646.9
2	121	29	26	26.1	53.0	64.0					-	
3	120	40	33	25.9	54.4	61.3					-	
4	123	26	17	26.1	55.7	49.1	2748	1437	24.5	83.3	52.3	528.9
5	125	28	28	21.8	43.6	57.5	2389	1318	24.7	85.3	55.2	487.7
標準偏差	1.7	5.0	5.3	1.8	4.3	7.6	263	179	0.1	9.6	2.1	67.5
平均	122.4	30.2	26.6	24.6	51.5	60.8	2723	1500	24.6	91.0	55.0	554.5
CV	0.01	0.17	0.20	0.07	0.08	0.12	0.10	0.12	0.00	0.11	0.04	0.12

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 ²
1	122	32	29	27.5	53.9	60.6	-	-	-	-	-	-
2	129	28	25	28.6	54.6	57.0	2538	1655	23.7	87.5	65.2	589.3
3	124	36	36	27.0	58.3	75.7	3255	1972	23.6	90.4	60.6	697.8
4	125	29	24	28.5	55.8	59.3	2928	1934	23.7	104.6	66.1	686.6
5	126	29	28	29.0	60.7	72.3	-	-	-	-	-	-
標準偏差	2.3	2.9	4.2	0.7	2.5	7.5	293	141	0.1	7.5	2.4	48.7
平均	125.2	30.8	28.4	28.1	56.7	65.0	2907	1854	23.7	94.2	64.0	657.9
CV	0.02	0.09	0.15	0.03	0.04	0.12	0.10	0.08	0.00	0.08	0.04	0.07

表3 無処理区および各農薬処理区における荒茶の調整量

	蒸熱前茶葉重量 kg	乾燥後茶葉重量 g	荒茶調整量 g/m ²	水分率 %
無処理区	5.2	1201	80.1	76.9
ジノテフラン区	5.0	1155	77.0	76.9
クロルフェナビル区	5.1	1220	81.3	76.1
トルフェンピラド区	5.2	1145	76.3	78.0
標準偏差	0.1	31.2	2.1	0.7
平均	5.1	1180.3	78.7	77.0
CV	0.02	0.03	0.03	0.01

表-4 玄米試料におけるスルホキサフロルの分析結果 (mg/kg)

試行	基本分析法
①	0.4015
②	0.4221
③	0.3970
④	0.4002
⑤	0.3992
⑥	0.3958
平均	0.4026
CV(%)	2.42

表-5 玄米試料におけるブプロフェジンの分析結果 (mg/kg)

試行	基本分析法
①	0.2007
②	0.2171
③	0.2113
④	0.2162
⑤	0.2092
⑥	0.2063
平均	0.2101
CV(%)	2.94

表-6 荒茶試料におけるジノテフランの分析結果 (mg/kg)

試行	基本分析法
①	22.5
②	20.8
③	21.9
④	21.8
⑤	22.4
⑥	22.6
平均	22.0
CV(%)	3.1

表-7 荒茶試料におけるトルフェンピラドの分析結果 (mg/kg)

試行	基本分析法
①	15.5
②	16.3
③	15.5
④	15.3
⑤	15.5
⑥	15.4
平均	15.6
CV(%)	2.3