

## 令和4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 Tricyclazole と Mepronil に暴露された稲と Thiachloprid と Pyflubumide 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、収穫後に試料調整を行った。

次に、公示試験法による各農薬成分（稲：Tricyclazole と Mepronil；茶：Thiachloprid、Pyflubumide）の分析を玄米と荒茶を用いて行った。その結果、公示分析法で十分信頼性が担保できる玄米中の Tricyclazole と Mepronil 濃度及び荒茶中の Thiachloprid、Pyflubumide 濃度を含有したインカード試料が作成できることが示された。

#### 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

農研機構植物防疫研究部門果樹茶病虫害防除研究領域

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年目は、1年目と同様に稲を対象にして、玄米に含まれる Sulfoxaflo 並びに Buprofezin 残留物について検討した。加えて、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。3年目に当たる本年度は、稲を対象にして、玄米に含まれる Tricyclazole 並びに Mepronil と茶を対象にして荒茶に含まれる Thiacloprid 並びに Pyflubumide とその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、過去二年度（R2-R3 年度）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過去二年度（R2-R3 年度）と同

じ約 17a の水田を使用した。また、各処理区は、過去二年度（R2-R3 年度）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 1）。

種籾は令和 4 年 3 月 24 日に播種し、同年 4 月 21 日に苗を定植した。定植時に除草剤としてフェントラザミド・ベンゾピシクロン・メタンスルフロン粒剤（商品名天空ジャンボ；日産化学工業株式会社）を使用した。

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  $\text{m}^{-2}$  とした。各処理区の面積は 200  $\text{m}^2$  とし、うち外周 50  $\text{m}^2$  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、トリシクラゾール（商品名クミアイ ビームゾル；成分濃度 Tricyclazole 20.0%；クミアイ化学工業株式会社）とメプロニル（商品名バンタック水和剤 75；成分濃度 Mepronil 75.0%；クミアイ化学工業株式会社）とした。トリシクラゾール剤は、1000 倍希釈で、4 回の散布を 7 日間隔で行った。メプロニル剤は 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用法に則り決定した。

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 4 年 7 月

27 日）、収穫 21 日前（令和 4 年 8 月 3 日）、収穫 14 日前（令和 4 年 8 月 10 日）、収穫 7 日前（令和 4 年 8 月 17 日）に散布した。すなわち、トリシクラゾールは休薬期間を 7 日で計 4 回、メプロニルは休薬期間を 7 日で計 3 回の農薬散布を行った。トリシクラゾールとメプロニル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 4 年 8 月 24 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、籾摺り後に直ちに玄米とし -20°C 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。品種は、昨年度と同様に品種「やぶきた」を用いた。試験圃場は、昨年度の試験圃場に隣接した約 30a 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、栽植密度は約 1.8 株 m<sup>2</sup>、高さは 0.48 m であった。各処理区の面積は 20 m<sup>2</sup> (1.8 m×11.1 m) とした。被覆資材(ダイオラッセル 1700 黒、70-75%遮光)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、チアクロプリド(商品名バリアード顆粒水和剤;成分濃度 Thiachloprid 30.0%;バイエルクロップサイエンス株式会社)とピフルブミド(商品名ダニコングフロアブル;成分濃度 Pyflubumide 20.0%;日本農薬株式会社)とした。チアクロプリド剤とピフルブミド剤は、2000 倍希釈で、1 回の散布を摘採 7 日前(令和 4 年 4 月 22 日)に行った。茶の生育ステージは 3 葉期であった。チアクロプリド剤とピフルブミド剤の最大使用回数は 1 回であり、本試験においても最小使用間隔(7日間)で 1 回の散布とした。

収穫(令和 4 年 4 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、可搬式摘採機(落合刃物工業 OCHIAI V8-X2HD 1070-3)を用いてサンプルに偏りがでない様に区全体から採取(摘採)した。機械収穫では生葉以外の枝なども混入するため、これらを除いた。選別された各試験区の摘採葉(生葉)約 250 g ずつをそれぞれ清浄なナイロン網袋に詰め、清浄な紙を敷いた浅いコンテナに並べて生葉保冷库(10℃)で一時保管した後に

蒸熱処理(約 45 sec; 101℃; 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目標温度 80℃にするために約 120 min の風乾処理(30 min で 3 回繰り返し)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、-30℃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 の玄米を超遠心粉碎機 ZM-200(Retsch 製)の 0.5 mm メッシュを用い粉碎した。粉碎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トリシクラゾールとメプロニル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。アセトン 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、アセトンを加えて正確に 200 mL とし抽出液とした。抽出液を 1 mL (0.05 g 相

当) 分取し、減圧濃縮、窒素乾固後にメタノールで 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 g の荒茶 (無処理区は約 200 g) 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、茶試料に含まれるチアクロプリド及びトピフルブミド及びピフルブミド代謝物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、それぞれ以下の分析法を構築し使用した。

チアクロプリドは、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 2 mL 分取し、メタノールで 10 mL に定容し測定用溶液とした。ピフルブミド及びピフルブミド代謝物は、チアクロプリドと同様に、試料 5.0 g に水

20 mL を加え 30 分間放置した。ここからチアクロプリドと異なり、アセトン 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、アセトンを加えて正確に 200 mL とした。定容液を 2.5 mL 分取し、メタノールで 10 mL に定容し、これを試験溶液とした。

## 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、無処理区で 110.8(±2.9) cm、農薬処理区で 113.0(±1.0) cm であり、茎数は無処理区で 30.7(±7.8) 本、農薬処理区で 24.1(±6.2) 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、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、本年度も過去二年度 (R2-R3 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粒数に対する登熟した粒数の割った値である。玄米収量（ $\text{g m}^{-2}$ ）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。

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

玄米収量は、無処理区  $453.3(\pm 78.2) \text{ g m}^{-2}$  と農薬処理区  $514.4(\pm 27.2) \text{ g m}^{-2}$  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）

荒茶に調整する際、摘採葉（生葉）から均一に採取した。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。

無処理区では、1 g の生葉から荒茶に調整された量は、0.19 g であり、ピフルブミド区では 0.19 g、チアクロプリド区では 0.20 g であり、各試験区から調整された荒茶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

玄米と荒茶の各農薬成分の残留濃度を表 4 から表 7、チアクロプリド代謝物 B 濃度を表 8 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トリシクラゾール濃度は  $1.849 (\pm 0.028) \text{ mg kg}^{-1}$ 、一方のメプロニル濃度は、 $1.339 (\pm 0.019) \text{ mg kg}^{-1}$  であった。

基本分析法を用いて得られた荒茶試料におけるチアクロプリド濃度は  $10.997 (\pm 0.085) \text{ mg kg}^{-1}$ 、一方のピフルブミド濃度は  $2.053 (\pm 0.035) \text{ mg kg}^{-1}$  であった。

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。

### 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、トリシクラゾール（Tricyclazole 20.0%）とメプロニル（Mepronil 75.0%）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、チアクロプリド（Thiacloprid 30.0%）とピフルブミド（Pyflubumide 20.0%）をそれぞれ単独で使

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

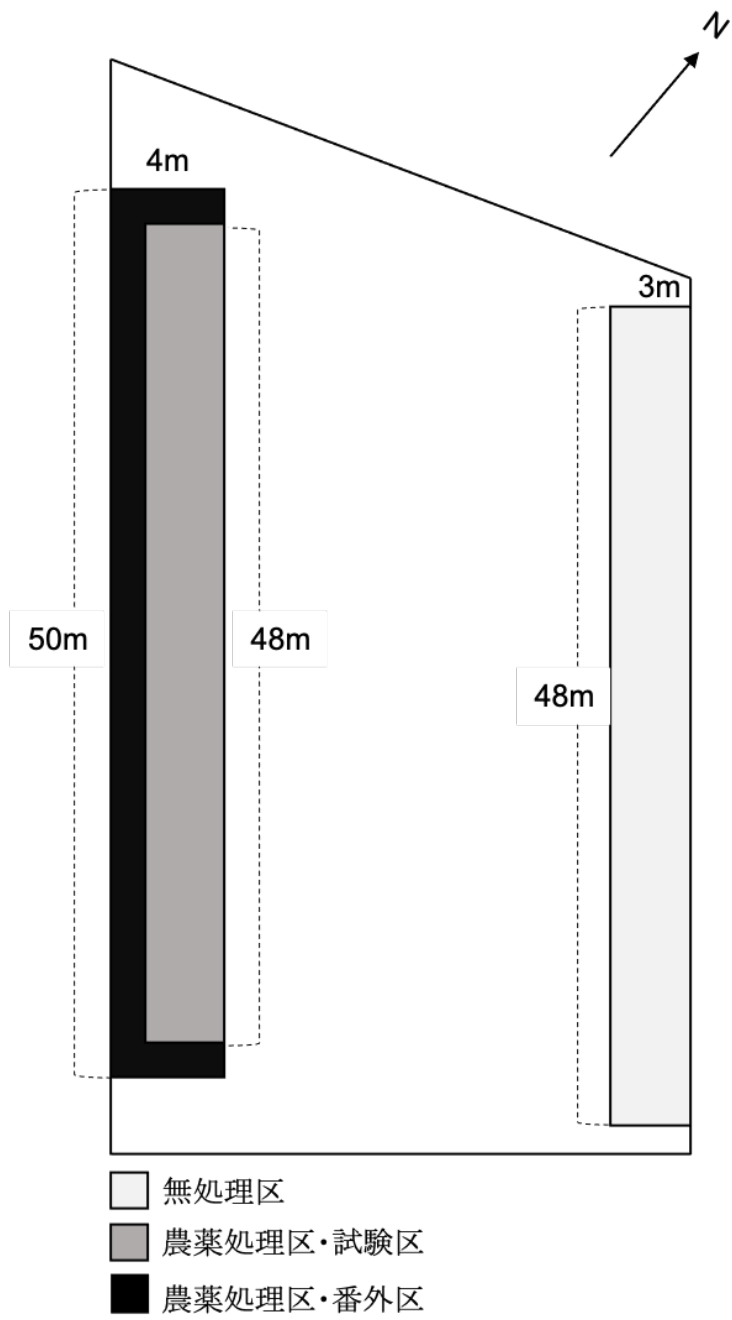
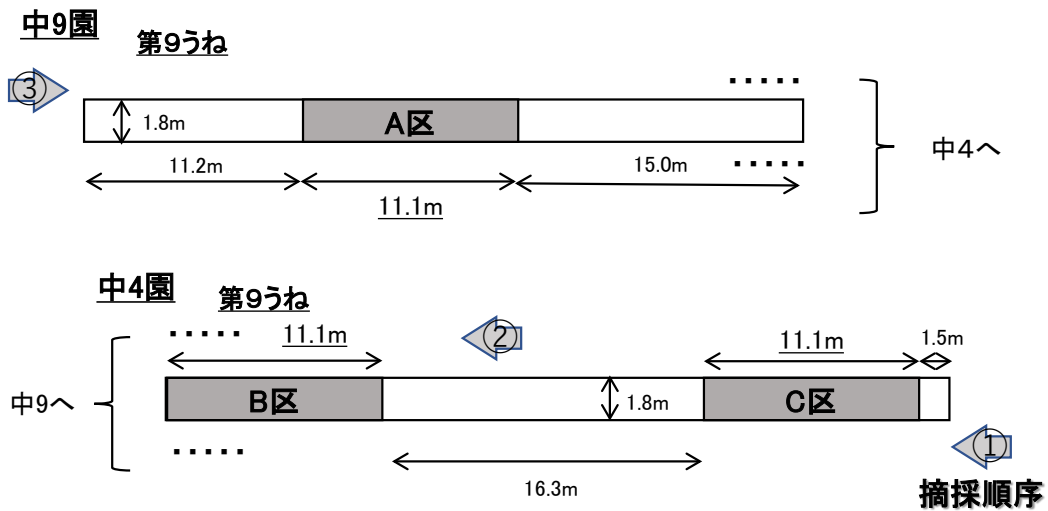
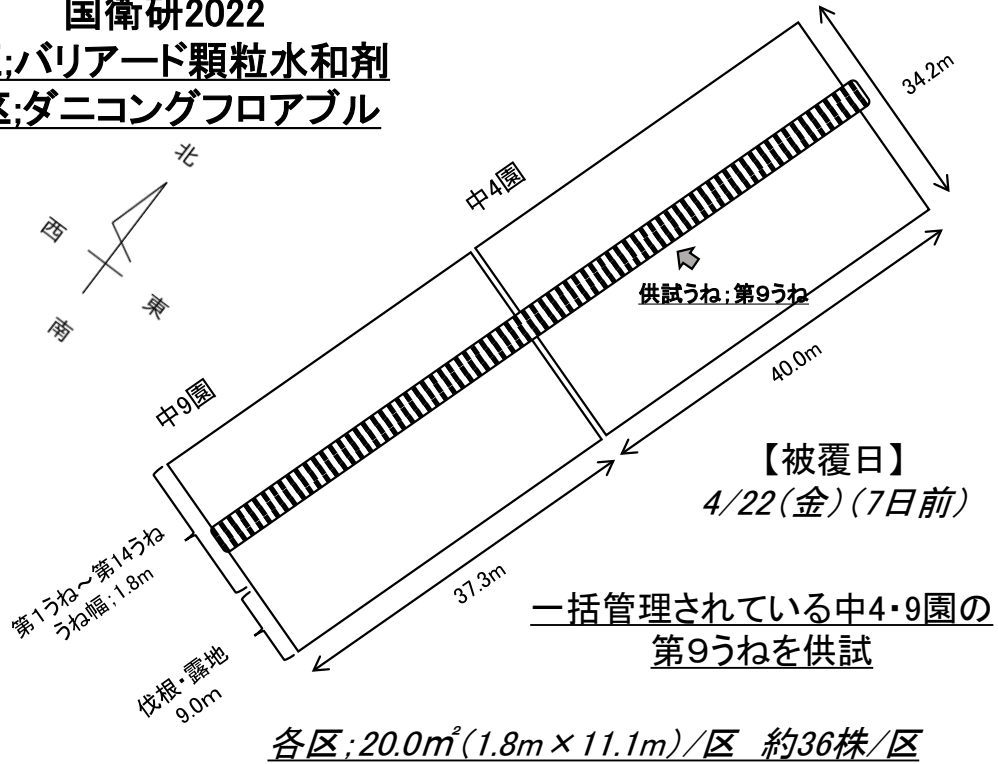


図1 インカード試料作成のための稲栽培試験圃場概況



【供試園;中4・9園】  
**国衛研2022**  
**A区;バリアード顆粒水和剤**  
**B区;ダニコングフロアブル**



【散布日】  
 処理B区、A区;4/22(金)(摘採・加工7日前)  
 【摘採・加工日】  
 無処理区C、処理B区、A区;4/29(金)

図2 インカード試料作成のための茶試料栽培試験圃場概況

表 1 茶栽培圃場における農薬使用履歴（直近一年分）

作物名	農薬名・商品名 (有効成分・濃度)	処理 年月日	希釈倍率
茶	ガンバ水和剤 (ジアフェンチウロン・50.0%)	21/07/06	1000 倍
茶	エクシレル SE (シアントラニリプロール・10.2%)	21/07/06	2000 倍
茶	トレファノサイド乳剤 (トルフルラリン・44.5%)	21/07/16	250 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%)	21/07/16	200 倍
茶	オンリーワンフロアブル (テブコナゾール・20.0%)	21/07/20	2000 倍
茶	スプラサイド乳剤 40 (DMTP・40.0%)	21/07/20	1000 倍
茶	トレファノサイド乳剤 (トルフルラリン・44.5%)	21/07/20	250 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%)	21/07/20	200 倍
茶	ディアナ SC (スピネトラム・11.7%)	21/08/21	5000 倍
茶	アルバリン顆粒水溶剤 (ジノテフラン・20.0%)	21/09/06	2000 倍
茶	ダコニール 1000 (TPN/40.0%)	21/09/06	1000 倍
茶	コテツフロアブル (クロルフェナピル・10.0%)	21/09/21	2000 倍
茶	エンセダン乳剤 (プロフェノホス・40.0%)	21/11/02	1000 倍
茶	フジドーLフロアブル (塩基性硫酸銅・23.0%)	21/11/02	500 倍
茶	ブリグロックス L (ジクワットジプロミド・7.0%、 パラコートジクロリド・5.0%)	21/11/12	200 倍

茶	フルート MC (ピリプロキシフェン・9.0%)	22/03/02	1000 倍
	バスタ液剤 (グルホシネート・18.5%)	22/03/23	200 倍
茶	トレファノサイド (トリフルラリン・44.5%)	22/03/23	250 倍

表2 無処理区および農薬処理区における稲の生育データ（収量構成要素）

No.	株数	幹長	茎数	茎葉重	穂重	穂数	一穂粒数	登熟歩合	千粒重		収量
	(株/m <sup>2</sup> )	(cm)		(g)	(穂数/株)		(粒数/穂)		(整玄米数/粒数)	整玄米重/1000粒	
無処理	1	14	112.0	33	60	50	26	71.7	91.1	23	542.7
	2	14	107.5	37	60	50	37	62.4	65.4	20	419.2
	3	14	112.8	22	50	40	18	79.0	87.6	23	397.9
	AVE	14	110.8	31	57	47	27	71.0	81	22	453.3
	STD	0	2.9	7.8	5.8	5.8	9.5	8.3	13.9	1.7	78.2
	CV	0	0.026	0.253	0.102	0.124	0.353	0.118	0.171	0.079	0.173
No.	株数	幹長	茎数	茎葉重	穂重	穂数	一穂粒数	登熟歩合	千粒重		収量
	(株/m <sup>2</sup> )	(cm)		(g)	(穂数/株)		(粒数/穂)		(整玄米数/粒数)	整玄米重/1000粒	
処理区	4	14	113.5	28	55	50	23	84	84.8	23	523.4
	5	14	113.7	17	45	35	17	108	91.4	23	536.1
	6	14	111.9	27.4	54	45	24.2	81	84.1	22.4	483.8
	AVE	14	113.0	24	51	43	21	91	87	23	514.4
	STD	0	1.0	6.2	5.5	7.6	3.9	14.8	4.0	0.3	27.2
	CV	0	0.009	0.256	0.107	0.176	0.180	0.163	0.047	0.015	0.053

表3 無処理区および農薬処理区における荒茶の調整量

試験区	蒸熱前	蒸熱後茶葉重量	乾燥後	荒茶調整量
	茶葉重量	(乾燥前茶葉重量)	茶葉重量	(乾燥後茶葉重量/蒸熱前茶葉重量)
		(g)		(g)
無処理	5096	5157	976	0.19
ピフルブミド	5004	5088	968	0.19
チアクロプリド	4836	4811	948	0.20
AVE				0.19
STD				0.002
CV				0.012

表 4 玄米試料におけるトリシクラゾールの分析結果 (mg/kg)

試行	基本分析法
①	1.819
②	1.887
③	1.874
④	1.859
⑤	1.841
⑥	1.819
平均	1.849
CV(%)	1.53

表 5 玄米試料におけるトメプロニルの分析結果 (mg/kg)

試行	基本分析法
①	1.309
②	1.366
③	1.343
④	1.344
⑤	1.331
⑥	1.341
平均	1.339
CV(%)	1.39

表 6 荒茶試料におけるチアクロプリドの分析結果 (mg/kg)

試行	基本分析法
①	11.023
②	10.913
③	10.948
④	10.977
⑤	11.154
⑥	10.969
平均	10.997
CV(%)	0.77

表 7 荒茶試料におけるピフルブミドの分析結果 (mg/kg)

試行	基本分析法
①	2.076
②	1.984
③	2.060
④	2.055
⑤	2.071
⑥	2.072
平均	2.053
CV(%)	1.69

表 8 荒茶試料におけるピフルブミド B の分析結果 (mg/kg)

試行	基本分析法
①	4.070
②	3.950
③	4.165
④	4.207
⑤	4.182
⑥	4.210
平均	4.131
CV(%)	2.47