

I. 総括研究報告

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

渡邊敬浩

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 総括研究報告書

研究代表者	渡邊敬浩	国立医薬品食品衛生研究所安全情報部
研究分担者	山田友紀子	国立医薬品食品衛生研究所安全情報部
研究分担者	加藤 拓	東京農業大学応用生物科学部
研究分担者	荒川史博	日本ハム株式会社 中央研究所

研究概要

研究課題 1. 農薬等の残留する試料の作製と残留物の評価に関する研究

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製を検討し当該試料に含まれる残留物を評価した。本年度研究においては、トリシクラゾール並びにメプロニル残留物を含む米・インカード試料、及びチアクロプリド及びピフルブミド残留物(ピフルブミド並びにピフルブミド代謝物 B)を含む茶・インカード試料の作製を試みた。インカード試料の作製のための作物栽培においては、OECD Guideline for the Testing of Chemicals 509 への準拠を考慮するとともに、わが国に登録されている農薬の使用基準を遵守した。

稲とチャノキの両方について、同一圃場内に農薬処理区と無処理区を設置し、各農薬の有効成分に定められた収穫前期間並びに投与間隔が最小となるように農薬を投与した。収穫した稲は脱稈までを行い玄米として調製し、摘採した生茶葉は加熱と乾燥までを行い荒茶として調製した。調製した玄米及び荒茶を分析した結果、加工試験や分析法の性能評価において定量性を失わずに分析可能な高濃度で残留物が含まれていることが明らかとなった。

研究課題 2. 近年国際的に求められているリスク管理のための新規分析手法の開発と国内導入に関する研究

食品安全行政による取組が国際整合していなければ、相手国との交渉が円滑に行われるはずもなく、農産品等の輸出促進を期待することはで

きない。農薬残留物の規制に関する国際整合としては、輸出先国により設定された最大残留基準値(MRL)への適合を確実にすることや、MRL が設定されていない場合には設定申請(インポートトレランス申請)することが具体的な取組となる。規制の目的で使用可能な簡易で迅速な分析法を輸出先国に提示することも、農産品等の輸出促進に必要な取組の 1 つである。しかしわが国においては、そのような分析法の開発や検証が十分でなく、また国内導入も進んでいない。そのため、農産品等輸出促進の障壁となり、また国内における検査効率向上の妨げとなる可能性があり、解決すべき課題である。

本研究では、インカード試料の分析と公示分析法との比較を通じて、農薬残留物の簡易で迅速な分析法として国際的にも急速に認められつつある QuEChERS 法の厳密な性能評価を試みた。本年度研究においては、研究課題 1 の成果として作製されたトリシクラゾール並びにメプロニルの残留物を含む米・インカード試料、及びチアクロプリド、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B を含む茶・インカード試料を適正な実験計画に従い分析することで、QuEChERS 法の性能を評価しその妥当性を確認する一方で、公示分析法との性能差を明らかにした。

研究課題 3. 輸出可能性が高い農産品における残留物濃度の加工による変化に関する研究

MRL 設定は一国の課題ではなく、多くの国で受け入れられるよう適切な科学的根拠に基づき行わなければならない。農産品等の輸出促進にも影響する。農薬等を使用して栽培された作物由来の農産品を原料とする農産加工品を対象に、精密暴露量を推定するため、あるいは MRL 設定の必要性を判断するためには、個々の農産品と農薬等との組み合わせごとに、残留物の特性に応じた加工による変化や加工後の濃度を明らかにする必要がある。そのために実施される研究は、加工試験と呼ばれるが、世界規模で輸出入される主要な農産加工品でしか実施されていない。

本研究課題では、わが国からの輸出可能性が高く特有の農産加工品の原料ともなる農産品を対象とした加工試験を実施する上で必要な条件を検討し、農薬の有効成分やそれらの代謝物並びに分解物の挙動に加工が与える影響に関するデータを収集し解析を行うことを目的に、研究課題 1 で作製した農薬を投与して栽培した結果得られた農薬残留物を含むイン

カード試料を原料として加工試験を行った。

本年度は、トリシクラゾール、メプロニルを投与した稲から玄米、精白米を経て米飯を調製する加工試験を行い、上記農薬の加工係数及び物質収支(マスバランス)を算出した。また、チアクロプリド並びにピフルブミドを投与し栽培したチャノキから製造した荒茶から、飲料茶を淹れる加工試験を行い、上記農薬の加工係数及び物質収支を算出した。飲料茶加工試験の結果、一煎目のお茶における濃度から算出した加工係数は、チアクロプリドで0.006、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物Bでそれぞれ、0.0001と0.0001となった。

研究課題 4. MRL 設定に関わる残留物の定義、MRL 設定やインポートトレランス設定に利用可能なデータセットに関する研究

わが国における農薬の MRL 設定や、わが国から輸出先国へのインポートトレランス設定の申請が、より科学的かつ国際的に整合した方法で実施できるようにすることを目的として、令和 2 年度並びに令和 3 年度の研究に引き続き、令和 4 年度の研究においては、MRL やインポートトレランスを設定するために最重要な「残留物の定義」の決定に関する OECD Working Group on Pesticides の傘下にある Residue Chemistry Expert Group のリモート会議に参加し、残留物の定義に関する OECD ガイダンス文書改定案の完成に向けて貢献した。また、他国で実施した作物残留試験の結果をわが国における残留基準値の設定に使用できるかどうかの検証をするために、令和 3 年度までの研究成果として特定した、食品 41 種(群を含む)と有効成分 23 種について、JMPR に提出された作物残留試験条件とわが国の農薬登録における Critical な使用条件を比較した。その結果、わが国の使用基準と整合する試験もしくは、Proportionality の原則を適用できる試験が十分な例数あることが確認された 19 種の有効成分・食品の組み合わせについて、国際標準の方法を用いて基準値を推定した。

本総括研究報告書は、研究課題 1～研究課題 4 について各分担研究者により執筆された分担研究報告書から選択した内容を、原文に忠実に抽出した後に再構成することにより作成されている。従って、詳細は各分担研究報告書によりご確認いただきたい。

研究課題 1. 農薬等の残留する試料の作製と残留物の評価に関する研究

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(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製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製を検討し、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年間を通じて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

試料を作製する。

1年目は、稲体を構成する玄米・粃殻・稲わらに含まれるエトフェンプロックス並びにジノテフラン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、玄米に含まれるスルホキサフロル並びにブプロフェジン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トルフェンピラド並びにジノテフラン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、玄米に含まれるトリシクラゾール並びにメプロニル、及びチャノキを対象にして荒茶に含まれるチアクロプリド並びにピフルブミドとその残留物について検討した。

B. 研究方法

B-1. 投与農薬の選定

稲とチャノキに適用可能な登録農薬の中から、①投与する薬液の濃度が高かつ収穫前期間がより短いことから、収穫する農産品における残留物濃度が定量下限値に比べて十分に高くなると期待されること、②FAO/WHO 合同残留農薬専門家会議(Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues:JMPR)に提出された作物残留試験データにより、農産品における残留物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観点から、水・オクタノール分配係数(LogPow)が高いものと低いもの、⑤分析対象とする物質の標準品が試薬として入手可能であること、⑥農薬として使いやすく残留物濃度がより均質になることが期待される剤型が存在すること、⑦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分析に係る経費、などを総合的に考慮して選択した。

B-2. インカード試料の作製方法

B-2-1. 稲(玄米)

本年度研究においても、これまでの研究と同様に、わが国の代表的穀物である稲(品種：コシヒカリ)を栽培し、インカード試料の作製について検討した。本研究が目的とするインカード試料の作製には、実際の農業に即した条件での作物栽培が求められることから、圃場スケールでの稲の栽培を検討した。OECD Guideline for the Testing of Chemicals 509 (OECD ガイドライン)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おける試験の実施を求めている。そこで、稲栽培用の試験圃場として過去2年間(令和2年度並びに令和3年度)の研究に使用したのと同じ、約17aの水田を使用した。また、OECD ガイドラインに準拠するために、

十分な規模の緩衝地帯を設けた上で、同一の試験圃場内に処理区と無処理区とを設置した。

種籾は2022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・ベンゾビシクロン・メタンスルフロロン粒剤(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30cm、畝間は24cmとし、裁植密度は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。

インカード試料の作製に使用する農薬の有効成分は、トリシクラゾール(農薬商品名クミアイビームゾル；有効成分濃度トリシクラゾール20%；クミアイ化学工業株式会社)とメプロニル(農薬商品名バシタック水和剤75；有効成分濃度メプロニル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使用方法に則り決定した。

各剤はラベルに記載のあるうち収穫前期間並びに投与間隔が最小となるように、収穫28日前(2022年7月27日)、収穫21日前(同年8月3日)、収穫14日前(同年8月10日)、収穫7日前(同年8

月 17 日)に散布した。すなわち、トリシクラゾールは 7 日間の間隔で計 4 回、メプロニルは 7 日間の間隔で計 3 回投与した。トリシクラゾールとメプロニルの使用基準に決められた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投与を行った。

収穫(2022 年 8 月 24 日)は、農薬残留物のコンタミネーション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、水分が 16%になるように調整した。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。

B-2-2. チャノキ(荒茶)

米・インカード試料の作製と同様に茶・インカード試料の作製に関しても、実際の農業に即した条件での作物栽培が求められることから、圃場スケールでのチャノキの栽培を検討した。

品種には昨年度研究と同様に「やぶきた」を用いた。試験圃場は、昨年度使用した試験圃場に隣接した約 30 a の茶畑とした。栽培条件を同様または同一とするために、十分な規模の緩衝地帯を設けた上で、農薬処理区と無処理区とを同一圃場内に設置した。また、処理区を選ぶにあたり農薬の使用履歴を確認し、作製するインカード試料への影響が無いこ

とを確認した。

チャノキは畝幅 1.8 m で定植されており、高さは 0.48 m、栽植密度は約 1.8 本/m²であった。各処理区の面積は 20 m² (1.8 m x 11.1 m)とした。被覆資材(ダイオラッセル 1700 黒)は、農薬投与後に薬液が乾燥したことを確認した後に設置した。

本研究において投与した農薬の有効成分は、チアクロプリド(農薬商品名バリアード顆粒水和剤;有効成分濃度チアクロプリド 30.0%;バイエルクロップサイエンス株式会社)、ピフルブミド(農薬商品名ダニコングフロアブル;有効成分濃度ピフルブミド 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 回の投与を摘採 7 日前(2022 年 4 月 22 日)に行った。投与した 2 剤の最大投与回数は 1 回であり、本研究においても 7 日間の最小使用間隔 1 回の投与とした。

収穫(2022 年 4 月 29 日)は、4~5 葉期(出開)に、農薬残留物のコンタミネーションを避けるために無処理区から行った。試験区の両端約 50 cm を除き、可搬式摘採機(落合刃物工業 OCHIAI V8-X2HD 1070-3)を用いて試験区全体から摘採した。収穫時に混入した枝などは、除去した。選別し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 秒; 101°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目標温度 80 °Cにするために約 120 分の風乾処理(30 分で 3 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、-30°C にて保存した。

B-3. インカード試料における農薬残留物の分析

約 1 kg の玄米を 0.5 mm メッシュを装着した超遠心粉碎機 ZM-200(Retsch 製)を用いて粉碎した。また、100~200 g の荒茶を小型粉碎機を用いて粉碎した。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、研究課題 2 の結果報告に含まれているため、参照されたい。測定用溶液の調製についてのみ以下に示す。

B-3-1. 玄米試料を対象とする基本分析法

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、アセトンを加えて正確に 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。

B-3-2. 荒茶試料を対象とする基本分析法

・チアクロプリド

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 25 mL に定容した。定容した溶液の 2 mL を分取し、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

試料 5.0 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 4 mL 分取し、メタノールで 25 mL に定容した。定容した溶液の 2.5 mL を分取し、メタノールで 10 mL に定容し測定用溶液とした。

C. D. 結果及び考察

CD-1. インカード試料の作製

CD-1-1. 米・インカード試料

米・インカード試料を作製するために、約 17a の水田において稲を栽培した。栽培した稲の草丈は無処理区において 110.8±2.9 cm、農薬処理区において 113.0±1.0 cm であり、茎数は無処理区において 30.7±7.8 本、農薬処理区において 24.1±6.2 本であった。草丈及び茎数に、処理区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、散布した農薬の有効成分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ため、作物の大きさに比例して、作物に付着する農薬有効成分の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。これらの結果から、過去 2 年間の研究同様に、処理区間の差が少なく、体重量のそろった作物栽培がされたものと考えられる。

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。稲の収量構成要素は、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/m²)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。

単位面積あたりの玄米収量(g/m²) =
穂数(本/株) × 一穂粒数(粒/穂) × 登熟歩

合 × 千粒重(g)

玄米収量は、無処理区において 453.3 ±78.2 g/m²、農薬処理区において 514.1 ±27.2 g/m² であり、処理区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処理区間で有意な差が認められなかったことから、本研究で実施した農薬投与による作物栽培への影響は小さいと考えられ、通常農業における農薬使用の場合と同様の残留物を含むインカード試料が作製されたものと考えられる。

CD-1-2. 茶・インカード試料

摘採葉(生葉)から均一に採取して荒茶を調製した。農薬を投与しなかったチャノキから採取された 1g の生葉からは、0.19 g の荒茶が調製された。同様に、チアクロプリドを投与したチャノキからは 0.20 g、ピフルブミドを投与したチャノキからは 0.19 g の荒茶が調製された。農薬投与による荒茶重量への影響はなく、均質なインカード試料が作製されたものと考えられた。

CD-2. インカード試料における各農薬残留物濃度

玄米インカード試料における濃度

本研究において作製された玄米インカード試料を、公示分析法を基礎とする基本分析法により分析した。なお、収穫

後脱稃して得た玄米の一部(約1 kg)を採取し粉碎することで分析用試料を調製した。基本分析法を用いて得られた米・インカード試料におけるトリシクラゾール濃度は 1.819 mg/kg～1.887 mg/kg、メプロニル濃度は、1.309 mg/kg～1.366 mg/kg の範囲であった。

茶インカード試料における濃度

本研究において作製された茶・インカード試料を、公示分析法を基礎とする基本分析法により分析した。なお、調製した荒茶の一部(約 100 g)を採取し粉碎することで分析用試料を調製した。基本分析法を用いて得られた茶・インカード試料におけるチアクロプリド濃度は 10.91 mg/kg～11.15 mg/kg、ピフルブミド濃度は 1.98 mg/kg～2.08 mg/kg、ピフルブミド代謝物 B 濃度は 3.95 mg/kg～4.21 mg/kg の範囲であった。

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製されたと考えられた。

研究課題 2. 近年国際的に求められているリスク管理のための新規分析手法の開発と国内導入に関する研究

A. 研究目的

農林水産物・農産加工品(農産品等)の輸出促進は、現在のわが国における重要な政策の1つであり政府方針である。令和3年には、この政府方針に沿った取組の成果として、農産品等の輸出額が初めて1兆円を達成した。今後も輸出額を継続的に増加させるためには、政府方針に沿った取組の基礎となり、輸出先国による受容性の向上につながることから、食品安全行政の国際整合を進めることが極めて重要である。例えば、輸出先国に設定された最大残留基準値(MRL)に対して、輸出農産品等における農薬残留物濃度の適合を確実にすること、またMRLが設定されていない場合等には、輸出先国が要求するデータを科学的根拠として示しMRL設定を申請(インポートトレランス申請)することが、国際整合した食品安全行政に基づく輸出促進のための取組の具体例となる。国際標準のMRL設定あるいはインポートトレランス申請の際には、農薬残留物濃度データ等の他に、規制目的で使用可能な簡易で迅速な分析法の提示が求められる。しかし、これまでのわが国においては、そのような分析

法の開発事例は少なく、また十分に検証されてもおらず、その結果、国内導入も進んでいない。より高性能であるが煩雑な工程を含む分析法が主として、現在も広く用いられている。そのため、農産品等輸出促進の障壁となり、また国内における検査効率向上の妨げとなる可能性があり、解決すべき課題である。

近年、農薬残留物の簡易で迅速な分析法としてQuEChERS法が開発され、農薬残留物の分析に求められる様々な要件を満たす分析法として期待されている。国際的にも急速に認められつつあり、規制のための分析法としてインポート申請時等において提出が求められるだけでなく、作物残留試験データの取得にも利用され始めている。国内においても、QuEChERS法の利用が検討され始めているが、公的に示されてきた従来の分析法(公示分析法)との比較も含めた厳密な性能評価が重要課題の1つである。

QuEChERS法は、簡易で迅速な分析法の総称であり多様性を有する。そのため本研究では、QuEChERS法と呼称される分析法のうち代表的な方法であるEU法(EN 15662)に着目して、玄米と茶に適用可能な分析法を構築し

た。構築した QuEChERS 法と公的に示されている従来の分析法の両方を用いて、使用基準に従い農薬を投与した結果としての残留物を含む玄米と茶のインカード試料を計画的に分析し、得られた分析値を比較することで、QuEChERS 法の性能を厳密に評価することを目的とした。

B. 研究方法

B-1. 試薬等

B-1-1. 標準品

- ・チアクロプリド標準品：純度 98.1% (富士フィルム和光純薬製)
- ・トリシクラゾール標準品：純度 98.85% (Dr.Ehrenstorfer 製)
- ・ピフルブミド標準品：純度 98.6% (富士フィルム和光純薬製)
- ・ピフルブミド代謝物 B 標準品：純度 99.4% (富士フィルム和光純薬製)
- ・メプロニル標準品：純度 99% (富士フィルム和光純薬製)

B-1-2. 試薬

- ・アセトン、アセトニトリル：残留農薬試験用(関東化学製)
- ・メタノール：高速液体クロマトグラフ用(関東化学製)
- ・塩化ナトリウム、酢酸アンモニウム：試薬特級(関東化学製)
- ・くえん酸三ナトリウム二水和物、無水硫酸マグネシウム：試薬特級(富士フィルム和光純薬製)

- ・くえん酸水素二ナトリウム 1.5 水和物：和光一級(富士フィルム和光純薬製)

B-1-3. 試液の調製

- ・1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液：酢酸アンモニウム 15.43 g を水に溶解し 200 mL とした。
- ・2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液：1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 2 mL に水を加えて 1000 mL とした。

B-1-4. 標準溶液の調製

標準原液の調製

- ・チアクロプリド標準原液：チアクロプリド標準品 25 mg を精密に量り、50 mL 容全量フラスコに入れた。アセトンを加え、超音波を照射して溶解した後定容し、これをチアクロプリド標準原液(500 mg/L)とした。
- ・トリシクラゾール標準原液：トリシクラゾール標準品 25 mg を精密に量り、上記と同様に調製し、トリシクラゾール標準原液(500 mg/L)とした。
- ・メプロニル標準原液：メプロニル標準品 25 mg を精密に量り、上記と同様に調製し、メプロニル標準原液(500 mg/L)とした。
- ・ピフルブミド標準原液：ピフルブミド標準品 10 mg を精密に量り、上記と同様に調製し、ピフルブミド標準原液(200 mg/L)とした。

・ピフルブミド代謝物 B 標準原液：ピフルブミド代謝物 B 標準品 10 mg を精密に量り、上記と同様に調製し、ピフルブミド代謝物 B 標準原液(200 mg/L)とした。

添加用混合標準溶液の調製

・トリシクラゾール及びメプロニル添加用混合標準溶液(各 1.0 mg/L)：トリシクラゾール標準原液(500 mg/L)及びメプロニル標準原液(500 mg/L)それぞれ 1.0 mL を 25 mL 容全量フラスコに採り、アセトニトリルを加えて定容し、混合標準溶液(20 mg/L)を調製した。次いで、その 1.0 mL を 20 mL 容全量フラスコに採り、アセトニトリルを加えて定容し、添加用混合標準溶液(各 1.0 mg/L)を調製した。

・チアクロプリド、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B 添加用混合標準溶液(10 mg/L、5.0 mg/L 及び 1.0 mg/L)：チアクロプリド標準原液(500 mg/L)1.0 mL、ピフルブミド標準原液(200 mg/L)2.5 mL、及びピフルブミド代謝物 B 標準原液 2.5 mL を 25 mL 容全量フラスコに採り、アセトニトリルを加えて定容した。その 10.0 mL、5.0 mL 又は 1.0 mL をそれぞれ 20 mL 容全量フラスコに採り、アセトニトリルを加えて定容し、添加用混合標準溶液(10.0 mg/L、5.0 mg/L 又は 1.0 mg/L)を調製した。

検量線用混合標準溶液の調製

各種標準溶液を希釈・混合し、測定用混合標準溶液を調製した。試料から検出された濃度に応じて、5 点以上の測定用混合標準溶液選択し検量線用混合標準溶液とした。

B-2. 装置

- ・超遠心粉碎機：ZM-200
[Retsch 製]
- ・小型粉碎機：ABSOLUTE3
[Vitamix 製]
- ・ホモジナイザー：T25 digital ULTRA-TURRAX
[IKA 製]
- ・エルビスシェーカー
[スギヤマゲン製]
- ・多本架冷却遠心機：H-80Rα
[コクサン製]
- ・高速液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計(LC-MS/MS)
機種：LC 部；Nexera X2(LC30-AD)
[島津製作所製]
MS 部；LCMS-8050
[島津製作所製]
- 解析ソフト：LabSolutions LCMS (ver. 5.114)
[島津製作所製]
- カラム：InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm)
[ジーエルサイエンス製]
- カラム温度：40°C

B-3. 試料の調製

B-3-1. 分析用試料(インカード試料及びコントロール試料)の調製

玄米試料の調製

稲の栽培時に使用基準に従い農薬を投与し調製した玄米をインカード試料、農薬を投与せず調製した玄米をコントロール試料とした。約 1 kg のインカード試料及びコントロール試料を 0.5 mm メッシュを装備した超遠心粉碎機を用いて粉碎することにより、分析用試料を調製した。調製した分析用試料は、-20°C の条件で冷凍保存した。

茶試料の調製

チャノキの栽培時に使用基準に従い農薬を投与し調製した荒茶をインカード試料、農薬を投与せず調製した荒茶をコントロール試料とした。小型粉碎機を用いて約 100 g のインカード試料及び約 200 g のコントロール試料を粉碎し分析用試料を調製した。調製した分析用試料は、-20°C の条件で冷凍保存した。

B-3-2. 管理用試料の調製

管理用試料を調製しインカード試料とともに併行分析した。各管理用試料の調製方法は以下のとおりである。

玄米管理用試料の調製

B-1-3-1. に示した方法に従い調製した玄米コントロール試料を、基本分析

法の場合には 10.0 g、QuEChERS 法の場合には 5.0 g 採取後、それぞれの試料について濃度が 0.1 mg/kg になるようにトリシクラゾール及びメプロニル標準品を添加することで管理用試料を調製した。調製した管理用試料をインカード試料との併行分析、及び凍結保存安定性の確認に使用した。

茶管理用試料の調製

B-1-3-1. に示した方法に従い調製した茶コントロール試料を、基本分析法の場合には 5.0 g、QuEChERS 法の場合には 2.0 g 採取後、それぞれの試料について濃度が 1 mg/kg になるようにチアクロプリド、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B 標準品を添加し、インカード試料と併行分析するための管理用試料を調製した。また同様に、0.1 mg/kg の濃度の管理用試料を調製し、凍結保存安定性の確認に使用した。

B-4. 分析

B-4-1. 分析対象化合物

稲の栽培時にはトリシクラゾール並びにメプロニルを、チャノキの栽培時にはチアクロプリド並びにピフルブミドを有効成分として含む農薬を投与した。上記有効成分は、農薬投与の結果、残留物として農産品に含まれる可能性があり、国際的な残留物の定義及び本研究の分析対象化合物に一致する。ピフルブミドに関しては、ピ

フルブミド代謝物 B (3'-isobutyl-1,3,5-trimethyl-4'-[2,2,2-trifluoro-1-methoxy-1-(trifluoromethyl)ethyl] pyrazole-4-carboxanilide (P-NH)が残留物の定義に含まれる。

インカード試料作製方法の詳細は、加藤による報告書を参照のこと。

B-4-2. 分析法

B-4-2-1. 測定用溶液の調製

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及び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(LC/MS 一斉試験法 I)及び個別分析法(トリシクラゾール/農産物、アラクロール等メプロニルを含む/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、アセトンを加えて正確に 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、B-1-4-2-2.に示した条件に従い測定した。

玄米試料を対象とする QuEChERS 法

本研究では、玄米試料に含まれるトリシクラゾール及びメプロニルを対象とする QuEChERS 法として以下を構築し使用した。

試料 5.0 g に水 10 g 及びアセトニトリル 10 mL を加え、シェイカーを用いて 250 rpm で 1 分間振とうした。無水硫酸マグネシウム 4 g、塩化ナトリウム 1 g、くえん酸三ナトリウム二水和物 1 g 及びくえん酸水素二ナトリウム 1.5 水和物 0.5 g を加え、250 rpm で 1 分間振とうした。3000 rpm で 5 分間遠心分離し、アセトニトリル層を抽出液として得た。抽出液を 0.5 mL 分取し、メタノールで 100 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、B-1-4-2-2.に示した条件に従い測定した。

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ピフルブミドを対象とする基本分析法として、公示一斉分析法(LC/MS 一斉試験法 I)及び個別分析法(ピフルブミド/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、チアクロプリド及びピフルブミドを対象に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

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 25 mL に定容し、保存安定性試験においてはこれを測定用溶液とした。その他の分析においては、定容した溶液の 2 mL を分取し、メタノールで 10 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、B-1-4-2-2.に示した条件に従い測定した。

・ピフルブミド及びピフルブミド代謝物

試料 5.0 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 4 mL 分取し、メタノールで 25 mL に定容し、保存安定性試験においてはこれを測定用溶液とした。その他の分析においては、定容した溶液の 2.5 mL を分取し、メタノールで 10 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、B-1-4-2-2.に示した条件に従い測

定した。

茶試料を対象とする QuEChERS 法

本研究では、茶試料に含まれるチアクロプリド、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B を対象とする QuEChERS 法として以下を構築し使用した。

試料 2.0 g に水 10 g 及びアセトニトリル 10 mL を加え、シェイカーを用いて 250 rpm で 1 分間振とうした。無水硫酸マグネシウム 4 g、塩化ナトリウム 1 g、くえん酸三ナトリウム二水和物 1 g 及びくえん酸水素二ナトリウム 1.5 水和物 0.5 g を加え、250 rpm で 1 分間振とうした。3000 rpm で 5 分間遠心分離し、アセトニトリル層を抽出液として分取した。抽出液を 0.5 mL 分取しメタノールで 25 mL に定容した。チアクロプリドの分析時には定容液 2mL を分取しメタノールで 20 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 B の分析時には定容液 2.5 mL を分取しメタノールで 10 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、B-1-4-2-2.に示した条件に従い測定した。

B-4-2-2. 測定条件

1) トリシクラゾール測定のための LC-MS/MS 操作条件例

移動相：A 液；2 mmol/L 酢酸アンモニ

ウム溶液

B 液 ; メタノール

A 液 : B 液(40 : 60)

流量 : 0.2 mL/min

注入量 : 4 μ L

コリジョンガス : アルゴン

2)メプロニル測定のための LC-MS/MS
操作条件

移動相 : A 液 ; 2 mmol/L 酢酸アンモニ
ウム溶液

B 液 ; メタノール

A 液 : B 液(20 : 80)

流量 : 0.2 mL/min

注入量 : 2 μ L

コリジョンガス : アルゴン

3)チアクロプリド測定のための LC-
MS/MS 操作条件

移動相 : A 液 ; 2 mmol/L 酢酸アンモニ
ウム溶液

B 液 ; メタノール

A 液 : B 液(65 : 35)

流量 : 0.2 mL/min

注入量 : 1 μ L

コリジョンガス : アルゴン

4)ピフルブミド及びピフルブミド代
謝物 B 測定のための LC-MS/MS 操作条
件

移動相 : A 液 ; 2 mmol/L 酢酸アンモニ
ウム溶液

B 液 ; メタノール

A 液 : B 液(20 : 80)

流量 : 0.2 mL/min

注入量 : 4 μ L

コリジョンガス : アルゴン

B-4-2-3. 検量線の作成

分析時ごとに、検量線用混合標準溶
液を測定して、各分析対象化合物の重
量とピーク面積から最小二乗法によ
り得た一次回帰式を検量線として用
いた。いずれの検量線についても、決
定係数は ≥ 0.999 となった。

B-4-3. 濃度の計算

各測定用溶液を LC-MS/MS に注入
し計測されたピーク面積から、検量線
を用いて各分析対象化合物の重量を
逆推定後、分析法と分析対象化合物と
の組合せごとに、次式に従い試料にお
ける濃度を算出した。

玄米試料を対象とする基本分析法

公示分析法に基づき構築した基本
分析法によるトリシクラゾール並び
にメプロニルの分析時には、下式に従
い、試料における濃度を算出した。

・トリシクラゾール濃度(mg/kg) = 検
量線から求めた重量(ng) 20 mL/注入量
(μ L) \times 200 mL/1 mL \times 1/10 g

・メプロニル濃度(mg/kg) = 検量線か
ら求めた重量(ng) \times 20 mL/注入量
(μ L) \times 200 mL/1 mL \times 1/10 g

玄米試料を対象とする QuEChERS 法

EN15662 に基づき構築した QuEChERS 法によるトリシクラゾール並びにメプロニルの分析時には、下式に従い、試料における濃度を算出した。

・トリシクラゾール濃度(mg/kg) = 検量線から求めた重量(ng) × 100 mL / 注入量(μL) × 10 mL / 0.5 mL × 1/5 g

・メプロニル濃度(mg/kg) = 検量線から求めた重量(ng) × 100 mL / 注入量(μL) × 10 mL / 0.5 mL × 1/5 g

茶試料を対象とする基本分析法

公示分析法に基づき構築した基本分析法によるチアクロプリド、ピフルビミド及びピフルブミド代謝物 B の分析時には、下式に従い、試料における濃度を算出した。

・チアクロプリド濃度(mg/kg) = 検量線から求めた重量(ng) × 25 mL / 注入量(μL) × 200 mL / 2 mL × 10 mL / 2 mL × 1/5 g

・ピフルブミド濃度(mg/kg) = 検量線から求めた重量(ng) × 25 mL / 注入量(μL) × 200 mL / 4 mL × 10 mL / 2.5 mL × 1/5 g

・ピフルブミド代謝物 B 濃度(mg/kg) = 検量線から求めた重量(ng) × 25 mL / 注入量(μL) × 200 mL / 4 mL × 10 mL / 2.5 mL × 1/5 g × 25 mL / 注入量(μL) × 200 mL / 4 mL × 10 mL / 2.5 mL × 1/5 g

茶試料を対象とする QuEChERS 法

EN15662 に基づき構築した QuEChERS 法によるチアクロプリド、

ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B の分析時には、下式に従い、試料における濃度を算出した。

・チアクロプリド濃度(mg/kg) = 検量線から求めた重量(ng) × 25 mL / 注入量(μL) × 10 mL / 0.5 mL × 20 mL / 2 mL × 1/2 g

・ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B 濃度(mg/kg) = 検量線から求めた重量(ng) × 25 mL / 注入量(μL) × 10 mL / 0.5 mL × 10 mL / 2.5 mL × 1/2 g

B-4-4. 定量下限値(LOQ)の推定

各分析法の LOQ は、検量線の最下点として設計した分析対象化合物の量と、希釈を含む測定用溶液の調製手順から、計算により推定した。インカード試料における各種農薬残留物濃度、及び残留濃度を考慮し決定した管理試料における濃度の定量性の保証を推定目的とした。推定した LOQ の範囲は 0.08 mg/kg ~ 0.5 mg/kg である。

C. D. 結果及び考察

CD-1-1. 分析法の構築と管理用試料(添加試料)の分析

CD-1-1-1. 基本分析法並びに QuEChERS の構築

わが国において公的に示されている農産品中のトリシクラゾール、メプロニル、チアクロプリド、ピフルブミドを対象とする分析法は、アセトンあるいはアセトニトリルを溶媒として

ホモジナイズ抽出した後に精製し、LC-MS(MS/MS)、GC-FTD あるいは GC-NPDにより測定することを骨格としている。本研究における公的に示された分析法の役割は、QuEChERS 法の性能を評価するための基準を与えることである。そのため、測定には QuEChERS 法と共通して LC-MS/MS 系を使用することとした。測定用溶液の希釈により、妨害ピークの影響を受けずに測定が可能であったため、ミニカラム等を用いた精製工程は不要であると判断した。構築した基本分析法、及び QuEChERS 法を、本報告の方法 B-1-4-2. に示した。構築した分析法を用いた標準品の測定またインカード試料の分析により得られたクロマトグラムは、左右対称なピークが妨害ピークの影響なく測定されていることを示した。また、コントロール試料からは、分析対象化合物としたトリシクラゾール、メプロニル、チアクロプリド、ピフルブミド、ピフルブミド代謝物 B は検出されなかった。

CD-1-1-2. 管理用試料(添加試料)の分析結果に基づく妥当性確認

コントロール試料に標準品を添加することで管理用試料(添加試料)を調製し、インカード試料とともに併行分析(n=6)した。その結果、異常な分析値が得られることはなかった。このこと

から、予期せぬ人為的なミスや装置の不具合等がなく、分析が適切に行われたことが確認された。以下、玄米と茶とに分けて管理用試料の分析結果を示し考察する。

玄米試料

玄米コントロール試料にそれぞれの濃度が 0.1 mg/kg になるようにトリシクラゾール及びメプロニル標準品を添加し調製した管理用試料を、インカード試料とともに併行分析した。得られた分析値に基づき推定した結果、玄米中のトリシクラゾール及びメプロニルを対象とする基本分析法並びに QuEChERS 法の併行精度(RSD%)はそれぞれ 3%未満、回収率は 90%~105%の範囲に含まれていた。これら性能の推定値は、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」(平成 22 年 12 月 24 日食安発 1224 第 1 号)(以下、「妥当性評価ガイドライン」という。)により示された性能規準の値を満たしている。そのため、管理用試料の分析値に基づけば、基本分析法並びに QuEChERS 法ともに妥当性が確認されたと判断される。

管理用試料から得られたトリシクラゾール及びメプロニルの分析値を基本分析法と QuEChERS 法との間で比較した結果、QuEChERS 法を用いた場合のトリシクラゾール回収率が若

干低値となった。これらの回収率を与えたトリシクラゾール分析値を対象に non-paired t-test を用いた検定を行った結果、有意差が認められた (P<0.01)。なお、メプロニル分析値についても同様に t 検定を行ったが、有意差は認められなかった。

茶試料

茶コントロール試料にそれぞれの濃度が 1.0 mg/kg になるようにチアクロプリド、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B 標準品を添加し調製した管理用試料を、インカード試料とともに併行分析した。得られた分析値に基づき推定した結果、茶試料中のチアクロプリド、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B を対象とする基本分析法、並びに QuEChERS 法の併行精度はそれぞれ 5%未満、回収率は 90%~110%の範囲に含まれていた。これら性能の推定値は、妥当性評価ガイドラインにより示された性能規準の値を満たしている。そのため、管理用試料の分析値に基づけば、基本分析法並びに QuEChERS 法ともに、妥当性が確認されたと判断される。

管理用試料から得られたチアクロプリド、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B の分析値を基本分析法と QuEChERS 法との間で比較した結果、いずれの残留物についても QuEChERS 法を用いた場合に回収率

が若干低値となった。これらの回収率を与えた分析値を対象に non-paired t-test を用いた検定を行った結果、有意差が認められた (P<0.01)。

CD-1-1-3. マトリクス効果の検証

分析法に従い得られたクロマトグラムからは、分析対象化合物に由来する左右対称のピークが検出され、その測定を妨害するピークがないことが確認されていた。このクロマトグラムによる確認に加え、測定用溶液に標準品を添加したマトリクス添加標準溶液の測定を通じて、試料マトリクス由来成分の測定に対する影響を検証した。

コントロール試料を基本分析法及び QuEChERS 法により操作し、測定用溶液調製時に管理用試料の添加濃度にあわせて標準品を添加した。こうして調製したマトリクス添加標準溶液と、溶媒を用いて通常どおり調製した対応する濃度の標準溶液を交互に 2 回測定し、マトリクス添加標準溶液から得られたピーク面積値と溶媒標準溶液から得られたピーク面積値の比を求めた。トリシクラゾールのピーク面積値比は基本分析法で 1.024、QuEChERS 法で 1.002、メプロニルのピーク面積値比は基本分析法で 0.987、QuEChERS 法で 0.980、チアクロプリドのピーク面積値比は基本分析法で

1.028、QuEChERS 法で 1.039、ピフルブミドのピーク面積値比は基本分析法で 1.005、QuEChERS 法で 1.001、ピフルブミド代謝物 B のピーク面積値比は基本分析法で 0.989、QuEChERS 法で 0.992 であった。いずれの化合物についても、基本分析法と QuEChERS 法ともに、分析値のバイアスにつながるような試料由来マトリクス成分が測定用溶液に含まれていないこと、すなわち、いわゆるマトリクス効果がないことが確認された。

CD-1-1-4. インカード試料の凍結保存安定性の確認

管理用試料を、インカード試料と同一の条件(-20°C)で凍結保存し、玄米試料の場合には 0 日目及び 44 日目に、茶試料の場合には 0 日目及び 110 日目に基本分析法を用いて併行分析(n=2)した。玄米管理用試料に含まれるトリシクラゾール及びメプロニルを対象に、保存後 0 日目と 44 日目に実施した併行分析の結果に、異常なばらつきは認められなかった。また 0 日目の分析値に対する 44 日目の分析値の割合(残存率%)を計算した結果、トリシクラゾール及びメプロニルのそれぞれについて 94%及び 95%であった。これらの結果により、トリシクラゾールとメプロニルは、凍結保存された試料において最低 44 日間は安定であること

が確認された。

茶試料

茶管理用試料に含まれるチアクロプリド、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B を対象に、保存後 0 日目と 110 日目に実施した併行分析の結果に、異常なばらつきは認められなかった。また 0 日目の分析値に対する 110 日目の分析値の割合(残存率%)を計算した結果、チアクロプリド、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B のそれぞれについて 109%、99%及び 101%であった。これらの結果により、チアクロプリド、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B は、凍結保存された試料において最低 110 日間は安定であることが確認された。

CD-1-2. インカード試料の分析を通じた QuEChERS 法の性能評価

最初に、基本分析法を用いてインカード試料を分析し、その結果に基づき農薬残留物濃度の値付けをした。次いで、QuEChERS 法により得た分析値と値付けした値とを比較することで、QuEChERS 法の性能評価を試みた。なお、分析までの凍結保存期間は、玄米試料については約 40 日、茶試料については約 80 日であり、各試料に含まれる残留物の安定性は保証されている。

玄米試料

玄米インカード試料を基本分析法、及び QuEChERS 法のそれぞれにより併行分析(n=6)した。その結果、玄米インカード試料から得られたトリシクラゾールの分析値は、基本分析法を用いた場合には 1.819 mg/kg～1.887 mg/kg の範囲に含まれ平均値は 1.850 mg/kg、QuEChERS 法を用いた場合には 1.752 mg/kg～1.856 mg/kg の範囲に含まれ平均値は 1.820 mg/kg であった。QuEChERS 法により得られた分析値の範囲が若干、低値側に広いが平均値はよく一致しており、unpaired t-test を用いた検定によっても有意差は認められなかった。また、基本分析法により値付けされた値を真値とすると QuEChERS 法の回収率は 95%～100% と推定された。精度及び真度ともに、妥当性評価ガイドラインにされた性能規準値を高い水準で満たしており、玄米に含まれるトリシクラゾールを対象とする基本分析法と QuEChERS 法との間には、注意すべき性能の違いはないと考えられる。

先述のとおり、トリシクラゾールを含む管理用試料を用いた検討においては、基本分析法に比べ QuEChERS 法により得られる分析値が若干低値となり unpaired t-test を用いた検定により有意差が認められている。つまり、トリシクラゾールに関しては、管理用試料とインカード試料を用いた検討

の間で検定結果が異なることとなったが、その原因は不明である。インカード試料分析時には、基本分析法と QuEChERS 法の抽出力が同程度になった結果かもしれないが証明はできない。管理用試料の濃度が 0.1 mg/kg であるのに対し、インカード試料の濃度がその 20 倍程高いことが分析値に影響した可能性もある。小数試料の繰り返し分析結果から区別することが困難な程に、性能差が小さいともいえるだろう。このような場合、実際に分析する試料により近い特性を持つと考えられるインカード試料の分析に基づく性能評価結果を優先すべきと考える。

玄米インカード試料から得られたメプロニルの分析値は、基本分析法を用いた場合には 1.309 mg/kg～1.366 mg/kg の範囲であり平均値は 1.339 mg/kg、QuEChERS 法を用いた場合には 1.318 mg/kg～1.382 mg/kg の範囲であり平均値は 1.362 mg/kg であった。これらの分析値を対象に、unpaired t-test を用いた検定を行った結果、有意差が認められなかった(P<0.01)。基本分析法と QuEChERS 法を用いて得られる分析値に有意差が認められなかったことは、管理用試料の場合と同じである。基本分析法により値付けされた値を真値とすると QuEChERS 法の回収率は 98%～103% と推定された。こ

の結果に基づき、妥当性が確認されたと判断してよい。

トリシクラゾール及びメプロニルの logPow はそれぞれ 1.41 及び 3.66、水溶解度は 596.0 mg/L(20-25℃)及び 8.23 mg/L(20℃)であり、トリシクラゾールの脂溶性が比較的強く水溶性が高いものの、これらの物理的・化学的特性は分析値に影響を与えなかったものと考えられた。これまでの研究において、エトフェンプロックスやブプロフェジンのように脂溶性が高い農薬を対象として QuEChERS 法により得られる分析値は、分析法の妥当性には影響を及ぼさない範囲で、真値に比べて低値になりやすいことが強く示唆されている。しかし、logPow や水溶解度を指標とした脂溶性の高さ以外の要素が、試料となる食品と農薬残留物の組合せによっては、QuEChERS 法の性能に影響を与える可能性も考えられる。

茶試料

茶インカード試料を基本分析法、及び QuEChERS 法のそれぞれにより併行分析(n=6)した。その結果、茶インカード試料から得られたチアクロプリドの分析値は、基本分析法を用いた場合には 10.91 mg/kg～11.15 mg/kg の範囲に含まれ平均値は 11.00 mg/kg、QuEChERS 法を用いた場合には 10.54 mg/kg～10.75 mg/kg の範囲に含まれ平

均値は 10.66 mg/kg であった。上記のとおり、基本分析法と QuEChERS 法を用いて茶試料から得られたチアクロプリド分析値の範囲には重複がない。このことは、一般に考えれば、分析に起因する変動を考慮しても、同一試料から一致した分析値が得られる確率が低いことを意味する。unpaired t-test を用いた検定によっても有意差が認められた(P<0.01)。また、基本分析法により値付けされた値を真値とすると QuEChERS 法の回収率は 96%～98%と推定された。

茶インカード試料から得られたピフルブミドの分析値は、基本分析法を用いた場合には 1.98 mg/kg～2.08 mg/kg の範囲であり平均値は 2.05 mg/kg、QuEChERS 法を用いた場合には 1.97 mg/kg～2.04 mg/kg の範囲であり平均値は 2.01 mg/kg であった。基本分析法と QuEChERS 法により得られたピフルブミド分析値は良く一致しており範囲の重なりも非常に大きかった。unpaired t-test を用いた検定により有意差も認められていない。そのため、先述のトリシクラゾールと同様に、管理用試料から得られた分析値とインカード試料から得られた分析値との間で検定結果が矛盾することになった。検定結果に矛盾を生じた原因についても、トリシクラゾールと同様に不明である。ただし、トリシクラゾー

ルについて得られた結果の原因の1つとして考察した濃度については、ピフルブミドについては2倍程度の違いしかないため、原因から除外されるものとする。判断についても同じであり、実際の検査試料により性質が類似したインカード試料の分析値に基づく評価結果を尊重すべきと考える。基本分析法により値付けされた値を真値とすると QuEChERS 法の回収率は 96%~99%と推定された。

茶インカード試料から得られたピフルブミド代謝物 B の分析値は、基本分析法を用いた場合には 3.95 mg/kg~4.21 mg/kg の範囲に含まれ平均値は 4.13 mg/kg、QuEChERS 法を用いた場合には 3.77 mg/kg~3.96 mg/kg の範囲に含まれ平均値は 3.88 mg/kg であった。上記のとおり、基本分析法と QuEChERS 法を用いて茶試料から得られたピフルブミド代謝物 B の分析値の範囲にはほぼ重複がなく、チアクロプリド分析値の分布に類似していた。unpaired t-test を用いた検定によっても有意差が認められた($P<0.01$)。また、基本分析法により値付けされた値を真値とすると QuEChERS 法の回収率は 91%~96%と推定された。

基本分析法と QuEChERS 法を用いて管理用試料(添加試料)から得られたピフルブミド分析値には有意差が認められたが、インカード試料から得ら

れた分析値には有意差が認められなかった。その原因は不明である。一方で、チアクロプリド並びにピフルブミド代謝物 B については、インカード試料と管理用試料から得られた分析値が同じ傾向を示しており、QuEChERS 法により得られる分析値が基本分析法により得られる分析値に比べて低値になることは、管理用試料の分析結果からも推測可能であったかもしれない。

チアクロプリド、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B の logPow はそれぞれ 1.26、5.34 及び 5.02、水溶解度は 185.0 mg/L(20-25°C)、 2.7×10^{-4} mg/L(20-25°C)、及び 1.23×10^{-2} mg/L(20°C)であることから、チアクロプリドは水溶性が高く、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B は脂溶性が高い。先に言及したとおり、玄米インカード試料を用いた研究からは、エトフェンプロックスやブプロフェジンのような脂溶性の高い農薬残留物が対象となった場合に、QuEChERS 法を用いて得られる分析値が基本分析法を用いて得られる分析値に比べて低値になることが強く示唆されている。一方で、茶インカード試料を用いたこれまでの研究によって、脂溶性が大きく異なるジノテフラン(logPow; -0.549)、トルフェンピラド(logPow; 5.61)ともに、QuEChERS 法を用いて得られる分析

値が基本分析法を用いて得られる分析値に比べて低値になることが示されていた。チアクロプリド並びにピフルブミド代謝物 B を対象とした場合に、基本分析法により得られる分析値に比べて QuEChERS 法により得られる分析値が有意に小さくなる結果もまた、脂溶性や水溶解度以外の特性が基本分析法と QuEChERS 法との性能

差の要因になること、さらに性能差の要因となる要素が食品と農薬残留物の組合せによっては異なることを示唆している。しかし、基本分析法と QuEChERS 法との間で性能差を生じる要因を明らかにするためには、食品と農薬残留物のより多様な組合せを対象にするなど、さらに検討が必要である。

研究課題 3. 輸出可能性が高い農産品における残留物濃度の加工による変化に関する研究

A. 研究目的

わが国は 1981 年から 30 年連続して貿易黒字が続く貿易立国であったが、2011 年の東日本大震災発生を機に貿易赤字を記録するようになった。財務省の令和 4 年度貿易統計(令和 5 年 4 月 27 日)によると、輸出額は 99 兆 2262 億円、輸入額は 120 兆 9770 億円となり、輸出から輸入を差し引いた貿易収支は 21 兆 7509 億と 2 年連続の赤字となっている。食料品については輸出額が 1.2 兆円である一方、輸入額が 9.6 兆円であるために純輸入額が 8.4 兆円にもなり、世界一の純輸入国となっている。このような状況を是正するために令和 2 年 4 月に施行された「農林水産物及び食品の輸出の促進に関する法律」では、輸出拡大のための課題の 1 つとして「輸出先国の食品安全等の規制への対応」が挙げられている。例えば、国内の農産品等の輸出先国において、該当する品目に農薬等の MRL が設定されていない場合や、設定されていたとしてもその値がわが国に比べ低い場合への対応がこれにあたる。世界標準の MRL 設定においては、加工試験の実施とその結果の評価が求められる。しかし、わが国においては求められていない。また、世

界規模で輸出入される主要な農産加工品でしか実施されていない現状がある。

そこで本分担研究では、わが国からの輸出可能性は高いが OECD のガイドラインに加工係数の収載がない農産品について加工係数を算出することを目的とした。令和 2 年度及び令和 3 年度の研究において、米を原材料とする加工試験として、輸出産品になる可能性のあるこめ油及び消費量の最も多い炊飯米の加工係数とマスバランスを算出した。また、令和 3 年度の研究においては、茶を原材料とする加工試験として、飲料茶の加工係数とマスバランスも算出した。本年度研究においては、これまでの研究とは異なる農薬残留物を含む米及び荒茶を原材料とし、炊飯米と飲料茶を作製する加工試験を継続して実施した。

B. 研究方法

B-1. 米加工試験

研究課題 1 の結果として報告したとおり、本年度研究においてはトリシクラゾール及びメプロニルを有効成分として含む農薬を投与して稲を栽培し、米・インカード試料を作製した。米・インカード試料の作製に関して、

圃場における収穫、脱穀、脱稈までの工程は東京農業大学で実施した。

インカード試料として得られた玄米の一部を、精米度合いを 9%として精米し 1.78 kg の米糠と 17.3 kg の白米を得た。本研究では、玄米、糠、精白米、炊飯米を試験対象とし、マスバランス及び加工係数を算出した。

B-1-1. 炊飯米の調理

炊飯時の白米の研ぎ方は様々な方法があり、調査の結果、一様とはならなかった。そのため、令和 2 年度の研究において、株式会社神明及び福井精米株式会社が推奨する 2 種の方法で白米を研ぐ加工試験を実施し、加工係数への影響について検証した。その結果、白米の研ぎ方の違いが加工係数に影響を与えないことを確認した。この結果を踏まえ、本年度研究においても、これまでの研究における実施内容を継続するために、株式会社神明が推奨する方法で白米を研ぎ、家庭用炊飯器を使用し炊飯した。具体的な炊飯方法は以下のとおりである。

炊飯釜に約 480 g(3 合)の米を入れ、水 1 L を加え 2~3 回手早くかき混ぜ、水を捨てた。この操作をさらに 2 回繰り返した。最後に水を約 560 mL 加え、30 分間浸漬し、家庭用炊飯器の標準モードで炊飯した。

分析用試料を調製するために、得ら

れた炊飯米に重量の 1.15 倍の水を加え、米粒が確認できなくなる程度まで粉砕した。

B-2. 茶加工試験

B-2-1. 飲料茶の調製

研究課題 1 の結果として報告したとおり、本年度研究においてはチアクロプリド及びピフルブミドを有効成分として含む農薬を投与してチャノキを栽培し、茶・インカード試料を作製した。チャノキの栽培から生葉の摘採、荒茶への加工は、国立研究開発法人農研機構植物防疫研究部門果樹茶病虫害防除研究領域(金谷茶業研究拠点)に委託した。

調製後の保管や輸送が分析に与える影響を考慮し、分析を実施する一般財団法人日本食品分析センターにおいて飲料茶を調製した。令和 3 年度の研究において実施したインターネット等調査の結果に基づき規定した淹れ方を基本として、飲料茶を調製した。具体的な飲料茶の調製方法は以下のとおりである。

荒茶を急須に 5 g 採取し、あらかじめ 90℃に加温したイオン交換水 250 mL を茶葉が舞わないように静かに注いだ。お湯を注いだ急須を時計回りに 2 回転、反時計回りに 2 回転した後に、2 分間静置した。浸漬液を全量回収し、飲料茶 1(1 煎目)とした。次いで、90℃

に加温したイオン交換水 250 mL を飲料茶 1 を回収した後の急須に注いだ。お湯を注いだ急須を時計回りに 2 回転、反時計回りに 2 回転した後に、2 分間静置し、浸漬液を全量回収し、飲料茶 2(2 煎目)とした。飲料茶 2 を回収した後に急須に残った茶殻も全量回収し試料とした。飲料茶の調製は 2 試行した。

B-3. 分析

各試料における農薬残留物の分析は、一般財団法人日本食品分析センターが実施した。

B-3-1. 分析対象品目

米加工試験に関しては、玄米、糠、精白米及び炊飯米の 4 品目を分析対象品目とした。また、茶加工試験に関しては、荒茶、飲料茶 1、飲料茶 2 及び茶殻の 4 品目を分析対象品目とした。

B-3-2. 分析対象化合物

米加工品目における分析対象化合物は、トリシクラゾール及びメプロニル、また茶加工品目における分析対象化合物は、チアクロプリド、ピフルブミド、及びピフルブミド代謝物 B とした。

B-3-3. 試薬

アセトン、アセトニトリル、ヘキサンは関東化学株式会社製の残留農薬

試験用、メタノールは関東化学株式会社製の高速液体クロマトグラフ用を使用した。塩化ナトリウム、酢酸アンモニウムは関東化学株式会社製の特級を使用した。InertSep C18(1 g)、InertSep Slim-J C18-C(500 mg)はジューエルサイエンス株式会社製を使用した。その他の試薬等の詳細は荒川による分担報告書を参照のこと。

B-3-4. 測定用溶液の調製

米分析対象品目

米分析対象品目の種類に応じて、4 種の方法を用いて測定用溶液を調製した。その一例として、玄米を試料とする場合の調製方法を以下に示す。

玄米 10.0 g を採取し、水 20 mL を加え 30 分間静置した。その後、アセトン 100 mL を加え、ホモジナイズ後吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトン 50 mL を加え、再度ホモジナイズし、吸引ろ過した。得られたろ液を合一し、アセトンを加え 200 mL に定容した。定容後の溶液 1 mL を分取し、メタノールで 20 mL に定容した溶液を、LC-MS/MS により測定した。

茶分析対象品目

茶分析対象品目及び分析対象化合物の種類に応じて、4 種の方法を用いて測定用溶液を調製した。一例として荒茶を分析対象品目、チアクロプリド

を分析対象化合物とする場合の調製方法を以下に示す。

試料 5.0 g を採取し、水 20 mL を加え 30 分間静置した。その後、アセトニトリル 100 mL を加え、ホモジナイズ後吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトニトリル 50 mL を加え、再度ホモジナイズし、吸引ろ過した。得られたろ液を合一後、アセトニトリルを加えて正確に 200 mL に定容した。定容した溶液 2 mL を分取しメタノールで 25 mL に定容後、さらに 2 mL を分取しメタノールで 10 mL に定容した溶液を LC-MS/MS により測定した。

B-3-5. LC-MS/MS による測定条件

トリシクラゾールを分析対象とする場合を、LC-MS/MS による測定条件の一例として示す。

LC-MS/MS 機種

LC 部 : Nexera X2(LC-30AD)

(島津製作所製)

MS 部 : LCMS-8050

(島津製作所製)

解析ソフト : LabSolutions LCMS

(島津製作所製)

カラム : InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm)

(ジーエルサイエンス製)

カラム温度 : 40°C

移動相 : A 液 ; 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液、B 液 ; メタノール

A 液 : B 液(40 : 60)

流量 : 0.2 mL/min

注入量 : 4 μL

コリジョンガス : アルゴン

モニターイオン等 : 190、163 m/z

C. D. 結果及び考察

CD-1. 保管設備及び試料輸送時の温度モニタリング

分析対象品目を含む試料の保存を開始した 2022 年 9 月 1 日より、6 時間毎に冷凍庫内の温度をモニタリングした。保存期間中に観察された最高温度は -18.1°C、最低温度は -20.5°C であり、異常な変動は確認されなかった。また、試料に温度記録計を同梱し、圃場や試験所等の間で輸送する際の温度をモニタリングした結果からも、異常な変動は確認されなかった。

CD-2. 炊飯調理

農林水産省食料・農業・農村政策審議会食糧部会において纏められた資料「米をめぐる関係資料」(令和 2 年 7 月 30 日)において、国内の米の 67.3% が家庭内で消費されているとの調査結果が示されていることから、令和 2 年度及び令和 3 年度の研究に引き続き、本年度の研究においても、炊飯米の加工試験は家庭用炊飯器を用いて行った。

収穫された玄米 45.6 kg からその一

部(20 kg)を分取し搗精し、米糠 1.78 kg と精白米 17.3 kg を得た。精白米は炊飯調理に供するまで冷凍庫で保存した。

炊飯調理の 1 試行目においては、0.45 kg の精白米から 1.03 kg の炊飯米が得られ、2 試行目においては、0.45 kg の精白米から 1.04 kg の炊飯米が得られた。コントロール試料もインカード試料と同様に炊飯調理し、0.45 kg の精白米から 1.00 kg の炊飯米を得た。コントロール試料とインカード試料との間、また試行の間で、炊飯米の収量の違いはなかった。

CD-3. 飲料茶の調製

B-2-1.に示した方法に従い、2 試行で飲料茶を調製した。チアクロプリド残留物を含む茶インカード試料を用いた調製結果を例として示す。飲料茶調製の結果、1 試行目において 223.0 g の飲料茶 1、237.5 g の飲料茶 2、24.7 g の茶殻が得られた。2 試行目においては、226.7 g の飲料茶 1、241.2 g の飲料茶 2、24.3 g の茶殻が得られた。試行の間で収量の違いはなかった。

CD-4. 分析法の性能評価

本研究に用いる分析法の性能規準の基本として、LOQ が 0.01 mg/kg 以下であること、回収率が 70~120%であること、及び併行精度が 20%未満で

あることとした。

検量線の設計並びに分析法に規定された希釈率に基づき、本研究に用いたトリシクラゾール及びメプロニル分析法の LOQ は、分析対象品目が玄米の場合には 0.08 mg/kg、糠、精白米、及び炊飯米の場合には 0.01 mg/kg であると推定された。またチアクロプリド、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B 分析法の LOQ は、分析対象品目が荒茶の場合には 0.4 mg/kg、飲料茶の場合には 0.0001 mg/kg、茶殻の場合には 0.01 mg/kg であると推定された。玄米並びに荒茶を対象に推定される LOQ は要求事項の一部として設定した LOQ に比べて高値となったが、作製したインカード試料から検出された濃度に比べて十分に低値(1/10 ないし 1/5 未満の値)であったことから、許容した。

米加工試験における分析対象品目のうち、玄米については 0.1 mg/kg、また糠、精白米及び炊飯米については 0.01 mg/kg になるようにトリシクラゾールあるいはメプロニル標準品を添加し、玄米試料については 6 併行、その他品目については 3 併行で分析した。得られた分析値から推定された併行精度(RSD%)は全品目を通じて最大でも 4.5%であった。回収率は全品目を通じて 80%~103%となり、設定した性能規準の値を満たした。

茶加工試験における分析対象品目のうち、荒茶については 1.0 mg/kg、飲料茶については 0.0001 mg/kg、茶殻については 0.01 mg/kg の濃度になるようにチアクロプリド、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B 標準品を添加し、荒茶については 6 併行、その他品目については 3 併行で分析した。得られた分析値から推定された併行精度(RSD%)は全品目を通じて最大でも 4.6%であった。回収率は全品目を通じて 84%~105%となり、設定した性能規準の値を満たした。

以上の結果から、本研究において使用する分析法の妥当性を確認した。

CD-5. 炊飯米の加工係数とマスバランス

トリシクラゾール及びメプロニルを有効成分として含む農薬を使用基準に従い投与して稲を栽培し、米・インカード試料を作製した。作製した米・インカード試料を原料として、炊飯米を調理した。玄米の搗精は 1 試行で、精白米から炊飯米への調理工程は 2 試行で実施した。その結果得られた玄米、糠、精白米及び炊飯米の 4 品目を分析した。

マスバランスは、各加工工程で得られた産物の収量にその一部を採取した試料から得られた残留物濃度を乗じて計算により求めた。炊飯米のマス

バランスは得られた精白米を全て炊飯したと仮定し、計算した。玄米を通常取引される生鮮農産品として加工係数の推定を試みた。

米・インカード試料を搗精して得た糠と精白米の分析結果から、玄米に含まれるトリシクラゾール残留物の 49%が精白米となる部分に局在していること、またメプロニル残留物の 68%が糠となる部分に局在していることが明らかとなった。令和 2 年度並びに令和 3 年度研究の結果を合わせて考察すれば、農薬残留物の脂溶性と糠への局在性との間に相関が示されたといえる。具体的にいえば、ジノテフラン(-0.549)、スルホキサフロル(0.8)、トリシクラゾール(1.41)、メプロニル(3.66)、ブプロフェジン(4.8)、エトフェンプロックス(7.05)の順に糠におけるマスバランスの値が大きくなる傾向が確認された(括弧内の数値は logPow)。

炊飯調理の結果からは、トリシクラゾールとメプロニルのマスバランスがそれぞれ 87.9%と 48.0%に減少することが示された。炊飯米への加工係数はトリシクラゾールについて 0.22、メプロニルについて 0.06 と算出された。これらの加工係数が算出されたことにより、より精密な暴露量推定が可能になると考えられる。

CD-6. 飲料茶の加工係数とマスバランス

輸出可能性が高く日本国内でも消費量の多い荒茶を原料として飲料茶を調製し、チアクロプリド、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B のマスバランス及び加工係数を算出した。チアクロプリド、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B を残留物として含む荒茶を原料として一煎目の茶(飲料茶 1)、二煎目の茶(飲料茶 2)及び茶殻を調製し分析対象品目とした。荒茶から飲料茶 2 までの調製を 2 試行で行い、得られた試料のそれぞれを分析した。ただし、茶殻のみ 1 試行分の試料を分析した。マスバランスは、加工工程ごとの試料収量に、相当する試料から得た分析値を乗じて計算により求めた。荒茶を流通する生鮮農産品として、飲料茶 1 及び飲料茶 2 への加工係数を算出した。

荒茶に含まれていたチアクロプリド残留物の 28%が飲料茶 1 に、また約 23%が飲料茶 2 に含まれていた。茶殻に含まれる残留物の量は、荒茶に含まれる量の 51%であった。ピフルブミド残留物については、荒茶に含まれていた量の 0.4%が飲料茶 1 に、また 0.3%が飲料茶 2 に含まれていた。茶殻に含まれる量の割合は 78%であった。ピフルブミド代謝物 B については、0.6%が飲料茶 1 に、また 0.7%が飲料茶 2

に含まれていた。茶殻に含まれる量の割合は 79%であった。マスバランスの合計はチアクロプリドについて 1.01、ピフルブミドについて 0.79、ピフルブミド代謝物 B について 0.80 となった。この結果からは、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B が加工によりわずかに分解等したことも考えられる。

2 試行した調理の結果として得られた加工係数をそれぞれ示すと、チアクロプリドについては、飲料茶 1 で 0.0062 並びに 0.0058、飲料茶 2 で 0.0048 並びに 0.0058 であり、ピフルブミドについては、飲料茶 1 で 0.000079 並びに 0.000076、飲料茶 2 で 0.000054 並びに 0.000057、フルブミド代謝物 B については、飲料茶 1 で 0.00014 並びに 0.00015、飲料茶 2 で 0.00012 並びに 0.00014、であった。以上の値は、わが国における一般的な茶の淹れ方(飲料茶の調製方法)を踏まえて算出された、適正な加工係数であると考えられる。また、飲料茶の調製を一煎目と二煎目とに分けているが、それらの結果を併せた加工係数を算出することについても考察可能だと考える。

本年度研究においては、栽培時に投与する農薬を新たに選択し、令和 2 年度及び令和 3 年度研究において作製した試料とは異なる残留物を含む米・インカード試料を原料とする炊飯米

加工試験及び飲料茶加工試験を実施した。このような研究の拡充により、国産農産品の輸出促進に繋がるより多くのデータを取得できたものと考え

える。今後も引き続き輸出可能性の高い農産加工品と農薬の組合せを模索し検討を重ね、精緻な研究を遂行していく必要がある。

研究課題 4. MRL 設定に関わる残留物の定義、MRL 設定やインポートトレランス設定に利用可能なデータセットに関する研究

A. 研究目的

農産品等々の輸出には、作物への使用が登録されている農薬を使用した結果として農産品等に含まれる残留物の濃度が、輸出先国において設定された MRL、または輸出国から輸入国にインポートトレランス申請して設定される MRL に適合していなければならない。輸出先国において、当該農薬と食品の組合せに MRL が設定されていない場合、輸出先国の要件を満たす科学的データを輸出先国担当部局に提出し、インポートトレランスの設定を申請することが必須である。そのことに関連して、農林水産省や農薬メーカーは、厚生労働省が食品衛生法に基づいて設定した MRL を輸出先国が受け入れるよう依頼していた。しかし、2 例の作物残留試験(作残試験)は、海外先進国で MRL を設定するには不十分とされているため、現在では農林水産省が資金援助をしてメーカーが追加の作残試験を実施し、輸出先国に対するインポートトレランス申請時にメーカーがその結果を提出している。

一昨年度、厚生労働省と農林水産省との協議により、作残試験が 8 例実施されており、欧米等輸出先国にインポートトレランスを申請できる状態に

ある有効成分については、厚生労働省が優先的に MRL を見直すことが決定された。今後、Codex 委員会による MRL 設定に貢献し、また欧米等先進国においてインポートトレランス申請による MRL 設定を進めるためには、農林水産省だけでなく厚生労働省も、JMPR (Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues)や欧米諸国による MRL 設定の方法や考え方をしっかりと理解し、それに対応するデータ要件を決定し評価方法を確立する必要がある。

MRL 設定及び暴露評価それぞれの目的に応じた残留物の定義が国ごとに異なれば、同じ作残試験データを活用しても異なる数値の MRL が設定されたり、暴露評価が示す安全性の程度が異なる結果となったりする可能性がある。つまり、世界標準の方法で残留物の定義を決定できることが、国内における MRL 設定、並びに Codex MRL、及びインポートトレランス申請による輸出先国での MRL 設定に不可欠である。現在、OECD Working Group on Pesticides 傘下の Residue Chemistry Expert Group (RCEG)の下部組織である Drafting group on Definition of Residue が、残留物の定義に関するガ

イダンス文書(GD)の改定案を策定中である。本 Drafting Group は、2018年に設置され、同年12月にジュネーブで会合を持ち論点を検討した。改定GDが設定されればそれを国内のMRL設定のガイドラインに反映するため、厚生労働省はDrafting Groupの会議に積極的に参加する必要がある。そこで本研究では、改訂GDの設定に貢献することを目的にDrafting Groupに参加した。

2019年に厚生労働省は、MRL設定のための基本原則を改訂し、OECDのZoning Project報告書を参考に、海外で実施された作残試験であっても、わが国の適正農業規範により規定される農薬使用基準(GAP)に整合しているか、Proportionalityの原則を適用できる場合には、わが国のMRL設定に使用できることを決定した。そこで本研究では、わが国のGAPの特殊性も考慮した上で、海外で実施された作残試験のデータがMRL設定に使用可能であるかについて、JMPRに提出された作残試験データを活用して検証することを目的とした。

B. 研究方法

B-1. OECD Working Group on Pesticides 傘下の RCEG の下部組織である Drafting group on Definition of Residue への参加

約4週間に1回の頻度で開催された全体会議(Zoomによるバーチャル会議)に参加し、適宜発言した。

B-2. 海外で実施した作残試験が、国内のMRL設定に使用可能であるかどうかの検証

海外において実施された作残試験のデータがわが国におけるMRL設定に使用可能かについて、以下に示す順に従い検証した。

- (1) 昨年度選択した23種の農薬有効成分の中から、2000年以降に新規剤としての評価または再評価がされている有効成分を抽出した。
- (2) 2022年に評価された有効成分については、本報告書作成の時点でJMPREvaluationが公表されていなかったため、検証には含めなかった。
- (3) 上記(1)並びに(2)、及び何らか別の理由で本研究の対象から除外した成分以外の有効成分について、昨年特定した食品(作物)(群を含む)41種の登録使用条件のうち、使用方法(例えば葉面散布、雑草への直接散布、土壌散布、種子処理など)と休薬期間(PHI)を調査し、その中から最短のPHIを抽出した。
- (4) 上記食品(作物)41種の作残試験でJMPRに提出されたものの実施条件のうち、有効成分ごとに使用方法と最終使用時から試料採取までの日数(DALA)を抽出した。

(5) 上記の(3)と(4)を比較し、同一または同様の使用方法であり、最短 PHI±25%で試料が採取されている作残試験データを抽出した。

(6) 上記によって選択された作物について、JMPR に提出された作残試験データごとに使用量・濃度、使用回数等を記述した。また、同様の情報をわが国の登録情報を対象に調査し、そのうちから Critical GAP を選択した。

(7) 抽出された作残試験データごとに(6)の使用量または濃度を比較し、同一(25%ルールを適用)または Proportionality concept を適用できる条件であれば、当該作残試験データを用いて、JMPR で決定された Residue definition に従って、MRL 案を推定した。その際、必要に応じて OECD MRL Calculator を使用した。

C. D. 結果及び考察

CD-1. OECD Working Group on Pesticides 傘下の RCEG の下部組織である Drafting group on Definition of Residue への参加

本文書案は、当初は 2022 年半ばの完成を目指していたが、参加者の関連組織における非公式なコメント要請を通じて、大きな進歩は成し遂げているものの、外部にはわかりにくい記述が多いことが指摘されたこと、リモートだけの作業では進行が遅いことな

どから、完成は 2023 年末を目指すこととなった。令和 4 年度における議論の中心も、令和 3 年度同様に暴露評価用(リスク評価用)の残留物の定義であった。現在の議論のポイントは以下の通りである。

残留物の定義に入れるかどうかを決定するための Decision tree の改訂と説明文の整合

昨年度 Decision tree については議論がほぼ完了したが、今年度はさらに、過程の重複がないようにや、理解しやすくなるようになどを目的として、Decision tree を改訂した。さらに本文もそれに合わせて改訂した。

毒性サブグループが毒性評価について本文を改訂し、ほぼ終了した。

Conjugates と Bound residues について

本年度に本格的な議論をする予定であったが、2023 年中に議論することとなった。

未同定代謝物の扱い

暴露評価をする場合、未同定の代謝物を含めなければ、リスクを過小評価するのではないかという問題については、暴露評価の不確実性に関する短いテキストを加えることとなった。

飲料水に関する記述

飲料水に関する記述を米国・カナダが作成した。欧州連合とは検討方法が異なるため、必ずしも同じ方法で飲料水の Residue definition を検討する必要はないことを追加した。

章立ての再検討

論理を追いやすいように何度も検討が繰り返されている。

それ以外の論点

非公式なコメント提供期間に、数多くのコメントが提出された。その多くは理解を助けるための改訂の要請であったが、技術的な問題については現在も検討中である。

対面形式での会議を 2023 年秋に実施することが検討されており、本文書の完成は、2023 年末の予定である。

CD-2. 海外で実施した作残試験が、国内の MRL 設定に使用可能であるかどうかの検証

CD-2-1. 詳細な検討の対象とする有効成分の決定

①再評価が 2000 年より前に実施されている有効成分

- Cartap
- 2,4-PA dimethylamine (2.4-D)
- Diazinon
- Methyl bromide

②新規評価または再評価が 2022 年に実施されたが、Evaluation が未公表であるため、評価に使用できない有効成分

- Methidathion
- Trifluralin

③その他の理由で本研究における評価の対象には適さない有効成分

- Maneb, Mancozeb, Thiram

Dithiocarbamates 類として評価されており、個別に評価されていないため。

- Thiophanate-methyl, Benomyl

2017 年 JMPR で Carbendazim、Benomyl、Thiophanate-methyl が再評価の予定であったが、Carbendazim の毒性データが提出されず、評価は完了できなかった。その後も JMPR の議題に載っても Benomyl のデータは提出されなかった。Thiophanate-methyl の作残試験の結果が 2017 年に提出されているが、評価が完了しなかったため、Residue definition が決定されておらず、本研究で評価できない。

- Dinotefuran

主要メーカーが日本の会社である比較的新しい有効成分であるため、日本の作残データも新しく、JMPR にも提出されている。

④上記①~③の検討結果を踏まえ、以下に示す 10 種の有効成分を本研究の対象とした。

- Glyphosate
- Bentazone
- Chlorothalonil (TPN)
- Captan
- Fenitrothion (MEP)
- Acephate
- Propineb
- Dichlobenil (DBN)
- Glufosinate
- Pendimethalin

このうち、除草剤が 5 剤、殺菌剤が 3 剤、殺虫剤が 2 剤である。

CD-2-2. 10 種の有効成分の登録使用条件との比較

10 種の有効成分について、作物ごとの使用方法及び最終使用時から試料採取までの日数(DALA)・休薬期間(PHI)・使用時期を調査した。その結果として、JMPR に作残試験データが提出されており、わが国に農薬登録のある作物の情報を選択して抽出し整理した。なお、調査の結果、Propineb 及び Dichlobenil(DBN)については、本研究による検討の対象とすることが可能な作残試験データがないことが明らかとなった。本調査を進めるにあたり、以下が留意事項としてあげられた。

- ・混合剤を含め多くの製剤が登録されている有効成分においては、同じ剤型であっても Critical GAP の特定が困難であること。

・Glyphosate などでは、広い範囲の作物群に登録があるため、JMPR に提出されたほとんどの作残試験データと比較が可能である。ただし、JMPR に提出された作残試験データがすべて葉面散布によるものであるのに対して、わが国における使用は、雑草に向けて播種・定植前に散布するものであるため、JMPR の提出された作残試験データの多くは、わが国における MRL 設定には使用できなかったこと。

本検討の結果として、以下に示す 8 種の有効成分と食品の組合せ(33 組合せ)について、さらに検討を行うこととした。

- Glyphosate: だいず、とうもろこし(GM)、茶
- Bentazone: たまねぎ、こめ
- Chlorothalonil(TPN): たまねぎ、ねぎ、メロン、トマト、いんげんまめ、にんじん、ばれいしょ
- Captan: なし、ぶどう、いちご、メロン
- Fenitrothion(MEP): りんご、えだまめ、だいず、こめ
- Acephate: キャベツ、いんげんまめ(未成熟)、いんげんまめ
- Glufosinate: オレンジ、ばれいしょ
- Fendimethalin: たまねぎ、ねぎ、リーキ、非結球レタス、だいず、にんじん、アスパラガス、こめ

CD-2-3. 8つの有効成分と各種食品との組合せにおける農薬使用条件の比較と MRL の推定

更なる検討のために選択した8種の有効成分と食品との33通りの組合せについて、 JMPR に提出された作残試験データから当該有効成分の使用量・濃度(情報がある場合)を抽出し、わが国において登録されている使用量・濃度と比較した。 JMPR 作残試験データに含まれる残留物濃度の由来を明確にするために、残留物の定義についても整理した。その上で、わが国の GAP に整合する条件で実施された作残試験により得られた残留物濃度データを選択し、それらを使用して MRL を推定した。その際、より高い使用量や、より遅い時期での使用の結果、残留物濃度が<LOQ の場合には、その結果も活用した。また、必要に応じて、 Proportionality concept 並びに OECD MRL Calculator を活用した。

本総括報告書においては、検討結果の一例を以下に示す。全ての検討結果並びにその詳細は、山田による分担研究報告書を参照されたい。

Glyphosate

- ・だいず(Desiccation use)

JMPR に提出された作残試験の多くの例で、わが国の GAP に比べて散布回数が1回多かった。しかし前3回の

散布は最終的な残留物の濃度に大きな影響を与えていないように見えた。コントロール区の濃度が散布区の濃度に比べて3分の1から同程度の値を示す3例を除外して Proportionality concept を最終使用量に対して適用して計算すると、有効な残留物の濃度は以下となった。1.26、1.31、1.73、2.44、2.44、3.32、3.32、4.21、5.14、5.32、7.09、7.09、7.53、8.86、8.86、10.4、12.0、13.1、14.6、15.3、16.8、16.8、18.4、20.2、21.3 mg/kg。これらの濃度データから、 OECD MRL Calculator を活用して推定された MRL の値は 40 mg/kg となった。

- ・とうもろこし(GM)

わが国の GAP(出芽前使用)に整合した GAP に基づく作残試験データは無かった。

- ・茶

わが国の GAP に整合した GAP に基づき実施された作残試験は4例しかなかった。 JMPR による評価の後に、わが国の GAP が変更になったことが考えられる。例数不足のために、MRL を推定することはできなかった。

Bentazone

- ・たまねぎ

DALA がわが国の PHI に整合する作残試験を抽出した。ただし、農薬の使用時期はより遅くなっていた。使用量

が約倍量であるため、Proportionality concept を活用すると、有効な残留物の濃度は $<0.005 \times 7$ 、0.01 mg/kg となり、推定された MRL は 0.015 mg/kg となった。

・こめ

DALA がわが国の使用基準に設定されている PHI に整合する作残試験は 4 例しかなかった。そのうち農薬使用回数が整合している作残試験は 2 例しかなかった。さらに、中国で実施された作残試験ではもみ米が、わが国で実施された作残試験では玄米が分析されていた。例数不足のために、MRL を推定することはできなかった。

Chlorothalonil (TPN)

・たまねぎ

DALA はわが国の使用基準により規定される PHI と整合していたが、使用濃度が Proportionality concept を提供できないほどに高くまた、使用回数が少なかった。作残試験例数は十分であったが、上記の理由により、MRL の推定に使用する作残試験データとしては不適切であった。

・ねぎ

DALA はわが国の使用基準により規定される PHI と整合していたが、使用濃度が Proportionality concept を提供できないほどに高くまた、使用回数が多かった。例数が 3 しかないこともあ

り、MRL の推定に使用する作残試験データとしては不適切であった。

・メロン

DALA がわが国の PHI に整合する作残試験を抽出した。なお、PHI に比べてより長い DALA における残留物濃度がより高値である場合には、その作残試験データを採用した。Proportionality concept を活用すると、有効な残留物の濃度は 0.01、0.02、0.05、0.07、0.09、0.11、0.12、0.19、0.20、0.25 mg/kg となり、推定された MRL は 0.5 mg/kg となった。

・トマト

Proportionality concept の活用が可能な作残試験データも含めて 1 例しかなく、例数不足のために、MRL を推定することはできなかった。

・いんげんまめ

DALA がわが国の使用基準に設定されている PHI に整合しており、使用濃度がより高く Proportionality concept の活用が可能な作残試験データを抽出した。Proportionality concept を活用すると、有効な残留物の濃度は 0.04×3 、0.08、0.10、 0.11×2 mg/kg となり、OECD MRL Calculator を用いて推定された MRL は 0.3 mg/kg となった。

・にんじん

活用可能な作残試験データが 2 例しかなく、例数不足のために MRL を推定することはできなかった。

・ばれいしょ

わが国の GAP により規定される使用濃度の3倍以上高い濃度で葉面散布された作残試験により得られた残留物濃度は、一例を除き<0.01 mg/kg であった。その一例の濃度も 0.01 mg/kg であり、Proportionality concept を活用し調整された濃度は<0.01 mg/kg となった。十分な例数の作残試験データの全てにおいて残留物濃度が<0.01 mg/kg であることから、MRL は 0.01 mg/kg として推定された。

CD-2-4. 推定された MRL のまとめ

8 種類の有効成分と食品による 33 通りの組合せの中で、7 種類の有効成分について、わが国の GAP に基づく 19 の MRL を推定することができた。なお、わが国の GAP に基づく作残試験データを抽出し解析しているため、JMPR により同一の作残試験データから推定された MRL と数値が一致するとは限らない。また、JMPR の評価後に GAP が変更になっていた場合にも、異なる MRL が推定される可能性がある。さらに、OECD MRL Calculator や Proportionality concept の導入前に評価された残留試験データも多いため、考え方や評価手法の違いにより異なる MRL が推定されている可能性もある。以上のことは全て、定期的な再評価が必要であることを示している。

わが国の GAP が希釈倍率を規定している場合には、Proportionality concept を適用することができない場合が多かった。具体的には、わが国の GAP によって規定される散布液の濃度が低く、その濃度比べて 4 倍以上高い濃度で作残試験が行われているために、Proportionality concept を適用することができず、結果として作残試験データを MRL の推定に使えないことが多かった。有効成分濃度の低い散布液を大量に散布することは、水資源に負荷をかけることになる。そのため、諸外国ではより高濃度の散布液を用いて、水使用量を低減することが多い。また、低濃度で大量に散布した場合と、より高濃度で少量を散布した場合との間で総使用量の差が大きいことも多く、今後、農薬製剤のラベルには単位面積当たりの使用量を記載するように変更するのが良いのではないかと考える。または、散布量表示も義務とすることにより、使用量を比較することができるようになる。そうするとさらにいくつかの基準値が設定できるようになる。

CD-2-5. 提言

・使用基準の記載が煩雑であり、植物防疫の観点からラベルが作成されている。使用者のためにも、MRL 策定のためにも改善が必要

- 個別の病害に対する使用基準ではなく、使用方法や使用料・濃度について病害をまとめて書くべき。行も少なくなり、他の記載が可能となる
- 特に古い有効成分の場合、製造者・販売者が異なると、同じ剤型・同じ濃度の製剤でも、使用料や回数が異なっていることがあり、Critical GAPを決定するのが困難であった。これは使用者にとっても使用基準通りに使うことを困難にする。同一剤型・濃度であれば、同じ使用基準とするようにすべきではないか。
- 当該剤の使用回数と当該有効成分を含む剤の総使用回数についての記載が、剤や作物によって不整合である。古い有効成分の場合に顕著であり、新しい有効成分の場合にはあまり問題はない。

・新しい剤や新しいラベルでは単位面積当たりの使用量が記載されているが、希釈して散布する古い剤の場合、希釈倍率と水量が記載されている。前者は義務であり、後者は慣行であるとされているが、それを期する公文書はない。それを公的に規定するべき。

・「野菜」、「果樹」、「麦類」など作物群に対して登録があり、これらに

属する個別の作物に対しても登録がある場合、「野菜」、「果樹」などから、それらが削除されていない場合や、大分類と同じ使用方法であるのに、個別に記載している場合などがあり、整理が必要である。これも古い有効成分の場合によく見られた。

・欧米のラベルには記載されているが日本のラベルには記載されていない事項がある。

- 複数回使用可能な剤の使用間隔：慣行として7日とのことだが、これも公文書にはないとのこと。

・2023年末には、OECDのResidue definitionに関するガイダンス文書が完成し、2024年早々にはOECD文書となることが予想されることから、厚生労働省においても、今後はそれに則ったResidue definitionの策定が必要となる。そのためには、植物・動物代謝試験や土壌中の動態、転作への影響等を評価する必要がある。

E.健康危険情報(研究班全体を通じて)

なし

F.研究発表(研究班全体を通じて)

1.論文発表

渡邊敬浩, 永山敏廣, 中村歩, 渡邊文子, 河野洋一, 伊佐川聡, 加藤拓, 荒川史博, 松田りえ子, 畝山智香子: 玄米インカード試料を用いた

QuEChERS 法と公定法との性能比較,
第 45 回残留農薬分析研究会プロシ
ディング, 45, 171-180 (2022)

2. 学会発表

渡邊敬浩, 永山敏廣, 中村歩, 渡邊文
子, 河野洋一, 伊佐川聡, 加藤拓, 荒川
史博, 松田りえ子, 畝山智香子: 玄米イ
ンカード試料を用いた QuEChERS 法と
公定法との性能比較, 第 45 回残留農薬
分析研究会, 2022, 11.24

渡邊敬浩, 永山敏廣, 中村歩, 渡邊文子,
河野洋一, 伊佐川聡, 加藤拓, 荒川史博,

松田りえ子, 畝山智香子: 玄米インカー
ド試料を用いた QuEChERS 法の厳密な
性能評価, 日本農薬学会第 48 回大会,
2023, 3.10

3. 特記事項

・ Zoom meetings of the Drafting Group
on Definition of Residue(平均 4 週間に
1 回。1 回当たり 1.5 時間から 2 時間)
に参加

G.知的財産権の出願・登録状況(研究班
全体を通じて)
なし