

農薬調査研究報告

第15号

令和5年

Research Report of Agricultural Chemicals

Vol. 15
2023



独立行政法人 農林水産消費安全技術センター
Food and Agricultural Materials Inspection Center
(Incorporated Administrative Agency)

Kodaira, Japan

はじめに

独立行政法人農林水産消費安全技術センター（略称：FAMIC）は、農林水産省所管の独立行政法人であり、国の行政事務と密接に関連した事務・事業を執行する行政執行法人として、農薬取締法、肥料法、飼料安全法、JAS法、輸出促進法等の法律に基づき、農業生産資材（農薬、肥料、飼料等）や食品を対象として科学的な検査・分析を行い、農業生産資材の安全性の確保、食品等の品質・表示の適正化等に技術で貢献することを使命に掲げ、業務を行っています。

農薬は、農薬取締法に基づく登録制度により農林水産大臣の登録を受けなければ製造、加工、輸入等を行うことができない仕組みとなっており、FAMIC 農薬検査部は農薬登録制度の根幹である農薬の審査業務を担っています。また、市場に流通する農薬の品質の確保のため、農林水産大臣の指示に基づき農薬製造場に対し立入検査を行っています。その他農林水産省と連携して、全国の農業生産現場における農薬の使用状況及び生産者から収集した農産物中の農薬の残留状況についての分析調査を行っています。

2021（令和3）年から始まった登録農薬の再評価では、既に登録されている全ての農薬について、最新の科学的知見に基づき安全性等を評価することとされており、農薬に関する新たな技術的知見を探求する必要性が高まっています。

今般、2022（令和4）年度までの農薬検査部における調査研究成果を収録した農薬調査研究報告第15号を発行しました。農薬検査部の調査研究は、登録審査業務の遂行に必要な新たな知見や技術力の獲得、並びに残留農薬の調査に必要な分析技術の向上を目的としています。また、農林水産省との連携により、農薬登録制度の国際調和を進める上で必要な技術情報を収集し、分析した結果を提供する役割も担っています。こうした観点から、調査研究の対象については、実験を伴うもののみならず、文献等により収集した情報の分析・考察も含めたものとしており、これらの成果は関係学会等での発表を通じて公表しています。

また、上述した再評価については、2025（令和7）年度までに延べ118有効成分に対する試験成績等が提出されることとなっており、業務量が大幅に増えていることから、登録審査業務を効率的に進めるとともに、調査研究についても限られた時間を工夫しながら取り組んでいます。

農薬検査部では、今後も調査研究を積極的に取り組んでいくこととしていますので、この調査研究の充実のため、引き続き皆様からのご指導、ご鞭撻を賜りますようお願い申し上げます。

本報告書が関係者の皆様の業務の参考となれば幸いです。

2024（令和6）年3月

独立行政法人 農林水産消費安全技術センター
理事長 木内 岳志

目 次

人の健康影響に係る OECD テストガイドラインの作成状況に関する調査 駒林卓磨、中村正宏	1
動物試験の代替法に関する調査 栗田招子、駒林卓磨、鶴居義之	6
樹木類の花における農薬の残留傾向 高野優美、秋山嘉大、市原直登、平松未森、石原 悟	14
除草剤の効果と処理後の散水による影響調査 村山和晃、藤田智紀、泉澤 努、工藤幹子、佐々木千潮、笹沼伸一郎	32
植物代謝試験の作物グループに関する調査 伊藤和男、新井奈津子、元木 裕	44
農薬の後作物残留における新たな評価法に係る調査 鈴木万智、元木 裕、加藤貴央、岩船 敬	48
令和4年度学会等での発表実績一覧	72
【技術レポート】	
残留農薬分析業務における分析法の検討 (LC-MS/MS を用いたミニトマト中の残留農薬一斉試験法の妥当性評価) 坂部亮介、山本謙吾、大原 望、中村健二、臼井裕一、野村哲也	73

人の健康影響に係る OECD テストガイドラインの 作成状況に関する調査

駒林卓磨^{**}, 中村正宏^{*}

^{*} 独)農林水産消費安全技術センター 農薬検査部

^{**} 内閣府 食品安全委員会事務局

我が国における農薬登録申請の際に提出される人に対する影響に関する試験成績は、経済協力開発機構 (OECD) の Section 4 Health Effects に分類されるテストガイドラインに沿って実施することが平成 31 年 3 月 29 日付消安第 6278 号農林水産省消費・安全局長通知 (以下「局長通知」という。)により求められている。OECD のテストガイドラインについては、毎年 4 月に開かれるテストガイドラインプログラム各国調整官作業部会 (WNT) において、テストガイドラインやガイダンス文書の作成および改訂作業が行われており、当該部会の作業内容を定期的に把握することは、国際的な状況を踏まえて、局長通知の改正等に迅速かつ適切に対応するために重要である。本調査では、令和 4 年度に行われた WNT での Section 4 におけるテストガイドラインおよびガイダンス文書の作成状況や改訂状況の把握を行った。

令和 4 年度の WNT では、3 つのテストガイドラインの作成、6 つのテストガイドラインの改訂が行われ、承認された。本報告では、新たに作成された 3 つのテストガイドラインである、OECD TG 492B および OECD TG 467 : *in vitro* 眼刺激性試験ならびに OECD TG 470 : 遺伝子突然変異試験 (Pig-a assay) の概要について主に紹介する。

Keywords ; OECD テストガイドライン, *in vitro*, 眼刺激性試験, Pig-a assay

緒言

我が国における農薬の登録申請の際に提出が求められる人に対する影響に関する試験成績は、経済協力開発機構 (OECD : Organization for Economic Co-operation and Development) の Section 4 Health Effects に分類されるテストガイドラインに沿って実施することが平成 31 年 3 月 29 日付消安第 6278 号農林水産省消費・安全局長通知 (以下「局長通知」という。)により求められている。

OECD では、テストガイドラインプログラム各国調整官作業部会 (WNT : Working Group of National Coordinators of the Test Guidelines programme) において、テストガイドラインやガイダンス文書の作成および改訂作業が行われている。例年、新規に作成または改訂されたテストガイドラインは、4 月の WNT 会合で承認され、6 月から 9 月頃にかけて OECD の公開ウェブサイトですべて入手可能になる。

令和 4 年度において、Section 4 Health Effects 分野では、皮膚刺激性、眼刺激性、皮膚感作性に関する *in vitro* テストガイドラインや、発達神経毒性試験、経皮吸収試験のガイダンス文書等の議論および検討が行われた。

OECD におけるテストガイドラインやガイダンス文書の作成状況や改訂状況を定期的に把握することは、局長通知の改正等に迅速かつ適切に対応するために重要である。

そこで、令和 4 年度の OECD におけるテストガイド

ラインの作成状況を調査し整理することにより、現行のデータ要求や評価法への反映に資することを目的として調査を行った。

1. 調査研究方法

1.1. 調査対象

令和 4 年度新たに作成、改訂されたテストガイドラインについて、OECD のホームページより確認し、Section 4 に該当するテストガイドラインの内容の把握を行った。

2. 結果の概要

2.1. 新たに作成、改訂されたテストガイドライン

令和 4 年 6 月 30 日に、WNT 会合で承認され、新たに作成、改訂されたテストガイドラインが OECD のホームページ上に公開された。そのうち、Section 4 に該当するテストガイドラインの中で我が国の農薬の登録に関連する試験に関するテストガイドラインは表 1 および 2 のとおりである。

眼刺激性に関するテストガイドライン 2 つ (TG492B および TG467)、遺伝子突然変異に関するテストガイドライン 1 つ (TG470) が新たに作成され、急性経口毒性に関するテストガイドライン 1 つ (TG425)、皮膚感作性に関するテストガイドライン 4 つ (TG406, TG442C, TG442D および TG442E)、遺伝子突然変異に関するテ

トガイドライン1つ (TG488), が新たに改訂された。 TG467 およびTG470 について概要を報告する。
 新たに作成されたテストガイドラインである TG492B,

表1. 令和4年度に新たに作成されたテストガイドライン (Section4)

分野	番号	試験名
眼刺激性	492B	Reconstructed Human Cornea-like Epithelium (RHCE) Test Method for Eye Hazard Identification
	467	Defined Approaches for Serious Eye Damage and Eye Irritation
遺伝子突然変異	470	Mammalian Erythrocyte <i>Pig-a</i> Gene Mutation Assay

表2. 令和4年度に新たに改訂された主なテストガイドライン (Section4)

分野	番号	試験名	変更内容
急性経口毒性	425	Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure	個別飼育に関する説明の追加
皮膚感受性	406	Skin Sensitisation	信頼性に関する例示の記載削除
	442C	<i>In chemico</i> Skin Sensitisation (Assays addressing the Adverse Outcome Pathway key event on covalent binding to proteins)	ADRA 法の内容更新 (蛍光検出の追加, UVCB 物質への適用拡大)
	442D	<i>In Vitro</i> Skin Sensitisation (ARE-Nrf2 Luciferase Test Method)	陽性対照物質の事前確認の記載削除
	442E	<i>In Vitro</i> Skin Sensitisation (In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the Key Event on activation of dendritic cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation)	GARD™Skin 法の追加 (SenzaCell による試験方法の追加)
遺伝子突然変異	488	Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays	体細胞組織と生殖細胞の変異解析の調整

2.2. 新たに作成されたテストガイドラインの概要

2.2.1. TG492B (*in vitro*眼刺激性試験)²⁾

2.2.1.1. 概要

既存の *in vitro* 眼刺激性試験である TG492 の改良版である。TG492 では GHS 区分における区分外 (刺激性なし) しか分類できないが, 本ガイドラインでは GHS 区分1 (眼に対する重篤な損傷性/不可逆的) と区分2 (眼刺激性/可逆的) についても分類できる試験法となっている。

2.2.1.2. 原理

RhCE (再構築ヒト角膜様上皮) 組織構造物の生存細胞の組織生存率を, 生体染色色素 MTT を還元し生成した MTT ホルマザンの吸光度から測定し (MTT アッセイ), 被験物質の眼刺激性を評価する。TTL 法 (液体用) と TTS 法 (固体用) の2つの試験方法がある。

2.2.1.3. 適用範囲

ガス, エアロゾルには適用できない。

2.2.1.4. 試験方法

○ TTL 法

RhCE 組織構造物の表面に被験物質を均一に塗布 ($160 \pm 2 \mu\text{L}/\text{cm}^2$) する。処理時間を3点設定し, 5分の場合はそのまま, 16分および120分の場合には蒸留水で20% (w/v) に希釈した上で塗布する。暴露終了後, 室温下で $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 非含有 DPBS 溶液を用いて十分にすすぎ, 組織表面上の被験物質を除去し, 新鮮な培地に10分間浸漬する。浸漬後, MTT アッセイを実施する。

○ TTS 法

RhCE 組織構造物の表面に被験物質を均一に塗布 ($160 \pm 2 \text{mg}/\text{cm}^2$) する。処理時間を2点設定する (30分および120分)。暴露終了後, 室温下で $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 非含有 DPBS 溶液を用いて十分にすすぎ, 組織表面上の被験物質を除去し, 新鮮な培地に30分間浸漬する。浸漬後, MTT アッセイを実施する。

2.2.1.5. 判定基準

○ TTL 法

区分1：全ての時間処理において平均生存率が50%以下

区分2：区分1，区分外に該当しない場合

区分外：全ての時間処理において平均生存率が50%を超える

○ TTS 法

区分1：30分後の平均生存率が40%以下で120分後の平均生存率が60%以下

区分2：区分1，区分外に該当しない場合

区分外：30分後の平均生存率が40%を超えて，120分後の平均生存率が60%を超える

2.2.2. TG467 (*in vitro*眼刺激性試験)³⁾

2.2.2.1. 概要

従来の *in vitro* 眼刺激性試験のテストガイドラインで判定可能な GHS 区分は，区分1もしくは区分外であり，1つのテストガイドラインの試験結果だけでは区分判定が困難な場合がある．本テストガイドラインは，従来の2つのテストガイドラインの試験結果を組み合わせる (Defined Approach, DA) ことにより1つのテストガイドラインでは区分判定が困難な内容であった場合も区分判定を可能とする方法を示したものである (表3)．

DAL1 と DAL2 の2つの判定方法がある．

表3.TG467の判定可能な区分と，それに用いる各*in vitro*眼刺激性試験における個別での判定可能な区分

TG	GHS 判定区分			
	区分1	区分2	区分外	
従来	437	○	×	○
	491	○	×	○
	492	×	×	○
新規	467	○	○	○

○：判定可能な区分，×：判定不能な区分

2.2.2.2. 適用範囲

DAL1：混合物，UVCB 物質には適用できない．

DAL2：界面活性剤を含む剤には適用できない．

2.2.2.3. 判定方法および判定基準

DAL1 は TG437 と TG492 を，DAL2 は TG437 と TG491 を組み合わせて行う．また，それぞれに2つの手順 (option 1, 2) がある．図1および2に DAL1, DAL2 における実験手法のフローチャートをそれぞれ示す．

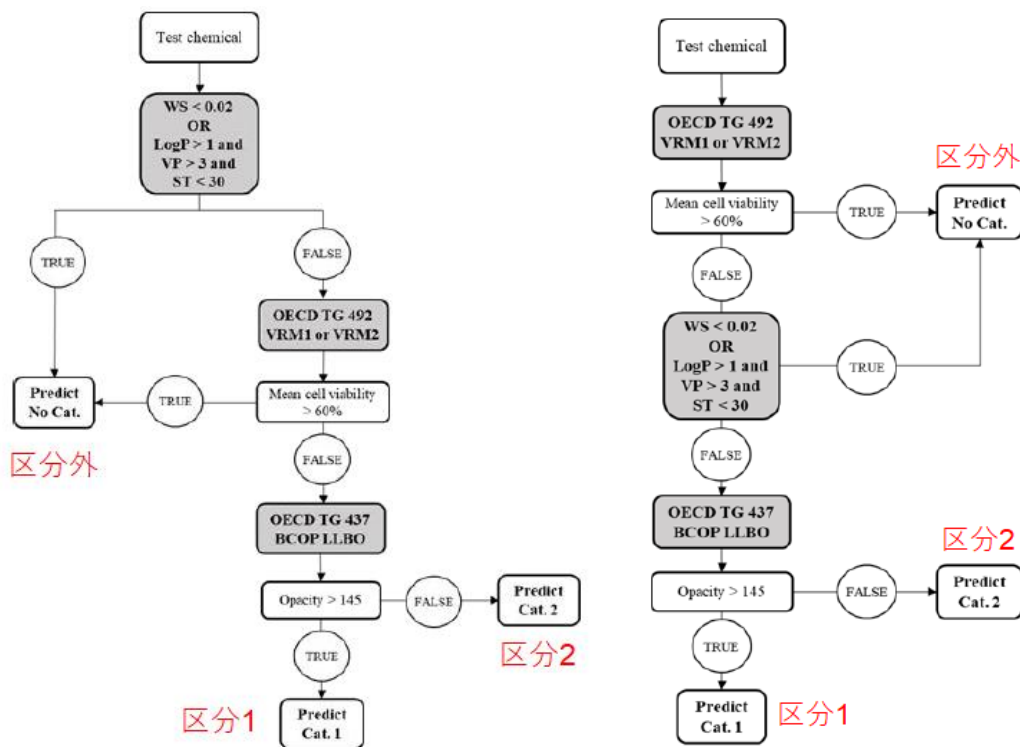


図1. DAL1における実験手法のフローチャート (左: option 1, 右: option 2)

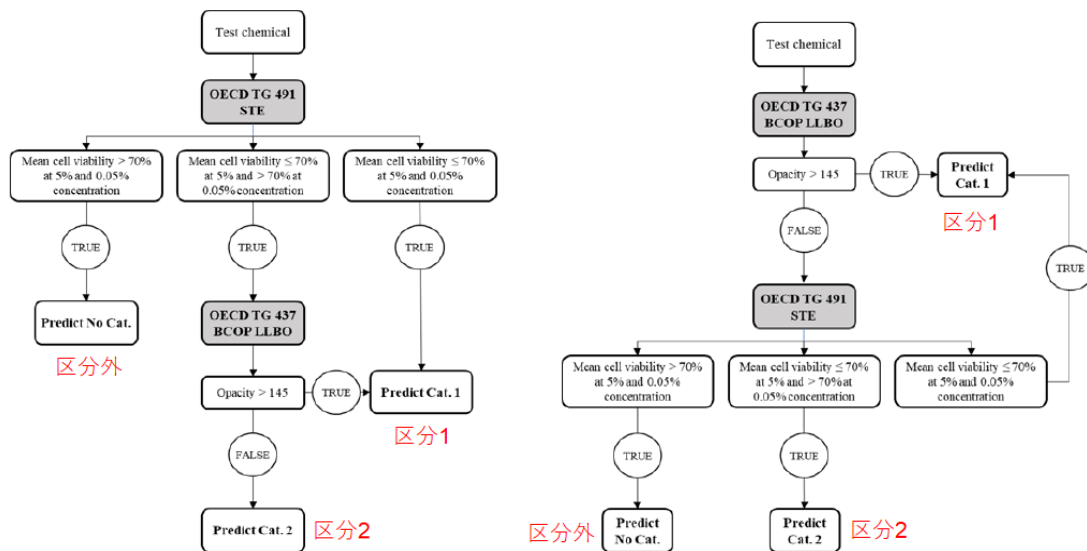


図2. DAL2における実験手法のフローチャート (左: option 1, 右: option 2)

2.2.3. TG470 (Pig-a assay, 遺伝子突然変異試験)⁴⁾

2.2.3.1. 概要

細胞膜表面タンパク質の結合に関与する GPI アンカーの生合成に関係する *Pig-a* 遺伝子 (Phosphatidylinositol glycan class A) の変異を指標とした遺伝子突然変異試験である。本アッセイは成熟げっ歯類の主に骨髄に存在する赤血球前駆細胞に誘発される遺伝子突然変異を検出するものであり、解析に用いる試料は血液のみであるため、他の毒性試験 (反復投与毒性試験や発がん性試験等) と併合して実施可能である。

2.2.3.2. 原理

GPI アンカー生合成に関わる遺伝子の中で *Pig-a* 遺伝子は唯一 X 染色体上に存在する。雄の有する X 染色体は 1 本、雌の機能している (不活性化していない) X 染色体は 1 本であるため、*Pig-a* 遺伝子上にその機能を失うような変異が生じると GPI アンカータンパク質が欠損した細胞が生じる。他の GPI アンカー生合成に関わる遺伝子 (常染色体上に存在している遺伝子) については、2 対の染色体両方に変異が生じた場合にのみその機能が失われるため、機能が喪失する頻度は *Pig-a* と比べ低い⁵⁾。

2.2.3.3. 適用範囲

骨髄に到達しない物質やその代謝物には適用できない。

3.2.3.4. 試験方法

3 用量の被験物質投与群および溶媒対照群を設け、ラ

ットまたはマウスに 28 日間反復経口投与する。投与終了 1~3 日後に末梢血を採取する。末梢血中の細胞は GPI アンカータンパク質に対する蛍光標識抗体で染色し、フローサイトメトリーにより全赤血球数、野生型赤血球数、全網状赤血球数および野生型網状赤血球数を測定する。得られた結果から、MUT RET 頻度 (変異型網状赤血球数/全網状赤血球数)、MUT RBC 頻度 (変異型赤血球数/全赤血球数)、%RET (網状赤血球数/全赤血球数) を算出する。

2.2.3.5. 判定基準

以下を全て満たす場合、陽性と判定する。

- 1 用量以上の被験物質投与群で、MUT RET 頻度および MUT RBC 頻度が溶媒対照群と比較し有意な増加を示す
- MUT RET 頻度および MUT RBC 頻度に用量関連性を示す
- 1 用量以上の被験物質投与群で、MUT RET 頻度および MUT RBC 頻度が背景データの上限值を超過する

以下を全て満たす場合、陰性と判定する。

- 全ての被験物質投与群の MUT RET 頻度および MUT RBC 頻度が溶媒対照群と比較し有意な増加を示さない
- MUT RET 頻度および MUT RBC 頻度に用量関連性を示さない
- 全ての被験物質投与群の MUT RET 頻度および MUT RBC 頻度が背景データの上限值を超えない
- 全ての被験物質投与群の %RET が、溶媒対照群

と比較し、有意な減少を示す

3. まとめ

OECD テストガイドラインの Section 4 Health Effects について、令和4年度における新規作成、改訂状況およびその内容を調査した。以下に調査結果の概要を示す。

- ・新たに作成されたテストガイドラインは眼刺激性に関するものが2つ (TG492B, TG467)、遺伝子突然変異に関するものが1つ (TG470) であった。
- ・新たに改訂されたテストガイドラインは急性経口毒性に関するものが1つ (TG425)、皮膚感作性に関するものが4つ (TG406, TG442C, TG442D, TG442E)、遺伝子突然変異に関するものが1つ (TG488) であった。
- ・TG492B はRhCE 組織構造物に被験物質を塗布し、その後 MTT を還元し、ホルマザンを測定することにより組織生存率を求める方法である。同様の手法により測定を行う TG492 では判定できなかった GHS 区分1 と区分2 についても区別できる試験方法である。
- ・TG467 は従来よりテストガイドラインとして存在していた *in vitro* 眼刺激性試験を複数組み合わせることで1つのテストガイドラインのみでは判定できなかった GHS 区分についても判定可能な試験方法である。
- ・TG470 は GPI アンカー生合成に関与する遺伝子である *Pig-a* をレポーターとする方法であり、他の毒性試験と併合して実施可能な試験方法である。

今回新規作成または改訂されたテストガイドラインについて、局長通知におけるデータ要求や評価法への反映がなされた場合に迅速に対応できるよう、検討していく予定である。

参考文献

- 1) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 : Health Effects | OECD Guidelines for the Testing of Chemicals | OECD iLibrary (oecd-ilibrary.org)
https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788/datedesc#collection-sort
- 2) Test Guideline No. 492B Reconstructed Human Cornea-like Epithelium (RHCE) Test Method for Eye Hazard Identification
<https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/0d603916-en.pdf?expires=1667804454&id=id&accname=guest&checksum=A3017CA6968DC2FDE055A4C5186C6233>

- 3) Test Guideline No. 467 Defined Approaches for Serious Eye Damage and Eye Irritation

<https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/28fe2841-en.pdf?expires=1669624160&id=id&accname=guest&checksum=34385CEE07F2B32D904F6DA65B6C9B2C>

- 4) Test Guideline No. 470 Mammalian Erythrocyte Pig-a Gene Mutation Assay

<https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/4faea90e-en.pdf?expires=1667804557&id=id&accname=guest&checksum=414618CC2D9DA2A4DEB8124E051F899E>

- 5) 鈴木, 王, Pig-a アッセイ-末梢血を用いるインビボ遺伝子突然変異評価系一, 労働安全衛生研究(2014)

(全 URL のリンクについての確認は、2023 年 8 月 2 日に実施)

動物試験の代替法に関する調査

栗田招子*, 駒林卓磨**, 鶴居義之*

* 独)農林水産消費安全技術センター 農薬検査部

** 内閣府食品安全委員会事務局

近年、動物愛護、試験コスト及びメカニズム解明並びに統合的評価の観点から、実験動物を用いた *in vivo* 毒性試験に代わる評価方法の需要が高まっている。OECD では、リードアクロス、AOP (Adverse Outcome Pathway), *in chemico*, *in vitro*, *in vivo* などのデータを組み合わせることにより、より効率的、効果的に評価を行う IATA (Integrated Approaches to Testing and Assessment) を推奨しており、IATA に関する様々なガイダンス文書やテストガイドラインが公表されている。本調査では OECD 主導の Case Studies Project において実施された IATA に関するケーススタディについて検討し、そのうちの神経毒性及び内分泌かく乱の 2 つについて内容把握を行った。選択したケーススタディについて、いずれもあらゆる神経毒性や内分泌かく乱を検出できるものではなく、特定の神経毒性及び内分泌かく乱に関わる重要事象 (KEs : Key Events) を代替試験法を用いて検出することにより、既存の試験を代替できる可能性を検証したものであった。しかしながら、このようなケーススタディの積み重ねは、1) 化学構造類似の新規化合物については、従来の *in vivo* 毒性試験の代わりに代替試験法の結果及び既存化学物質の毒性試験結果によるリードアクロスによる評価、あるいは 2) AOP が確立したエンドポイントについては、代替試験法のみによる評価を行うといったデータ要求見直しの際の重要な知見になると考えられる。

Keywords ; AOP, *in vitro*, *in chemico*, IATA, KEs, OECD

緒言

新規化合物を有効成分とする農薬登録においては、有効成分に係る急性毒性、短期毒性、慢性毒性、発がん性、遺伝毒性、生殖発生毒性、神経毒性等の評価項目に対し実験動物を用いた *in vivo* 毒性試験のフルパッケージによる評価が行われている。

しかし、このようなフルパッケージによる評価は膨大な数の既存化学物質や新規化学物質には、資源配分の限界から必ずしも全ての化学物質に適用できない。このため、近年、OECD では、評価対象物質による生体内での分子レベルの反応から最終的な有害性発現に至るまでの経路 (AOP) とそれに関わる重要事象 (KEs) を明らかにし、KEs に関わるリードアクロス、*in silico*, *in chemico*, *in vitro* 試験などの代替試験法を組み合わせることにより、より効率的、効果的に評価を行う「試験評価統合アプローチ (IATA)」を推進しており、IATA に関する様々なガイダンス文書やテストガイドラインが公表されている。

特に、皮膚刺激性、眼刺激性及び皮膚感作性については、それぞれ OECD ガイダンス文書 No. 203, No. 263 及び No. 256 において、*in vitro* 試験法を組み合わせることにより GHS のハザード区分判定を可能にする IATA ガイダンスが示され、利用可能な新規テストガイドラインが継続的に公表されており、欧州等の農薬の評価で採用されている。

一方、我が国では、2019 年農薬取締法改正において、

参議院の附帯決議で動物実験の 3R (代替法活用、使用数削減、苦痛軽減) が求められ、これを推進するため、我が国の農薬の評価に皮膚刺激性、眼刺激性及び皮膚感作性の *in vitro* 試験及びその評価法を導入したところである。

今回、上記以外の試験のうち神経毒性及び内分泌かく乱について、代替試験等の導入を検討するため、OECD 等海外における開発、検討状況を調査した。

1. はじめに

1.1. IATA の概要について

IATA とは、化学物質の毒性等について複数の情報源を基に総合的な評価を行うためのアプローチである。複数の情報源とは、物理化学的性状や構造活性相関 ((Q) SAR), リードアクロス, AOP, *in chemico*, *in vitro*, *in vivo* などのデータのことを指し、これらのデータを統合し証拠の重みを付けて評価することにより、化学物質における安全性を確保するための指針として用いることが可能である。

1.2. OECD IATA Case Studies Project について

OECD は IATA に関して、化学物質共同評価プログラム (CoCAP : Cooperative Chemicals Assessment Programme) の下で Case Studies Project を 2015 年に開始した。このプロジェクトは、規制での使用に適した

予測のケーススタディを実施し、IATA の使用実績を増やすことを目的としている。

これまでに実施されたケーススタディは、OECD が発行している報告書「Report on Considerations from Case Studies on Integrated Approaches for Testing and Assessment (IATA)」の First Review Cycle (2016 年発行) から Sixth Review Cycle (2021 年発行) に掲載されている。公表されたケーススタディ数は 24 件あり (図 1)、エンドポイント別の内訳は、反復投与毒性 12 件、神経毒性 3 件、繁殖毒性 2 件、内分泌かく乱 2 件、発生毒性 1 件、遺伝毒性 1 件、変異原性 1 件、その他の試験 2 件 (生態毒性、生物濃縮) である。エンドポイント別の件数を以下の図に示す。このうち農薬を対象としたケーススタディは、反復投与毒性 2 件、神経毒性 3 件、内分泌かく乱 1 件の合計 6 件であった。

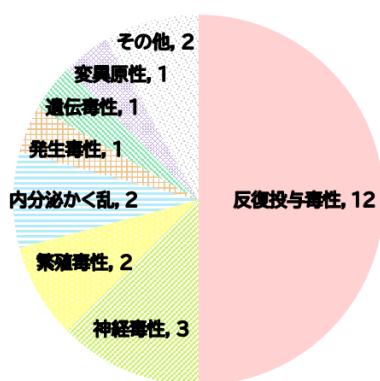


図 1. OECD の公表するケーススタディのエンドポイント別内訳 (エンドポイント名、件数の順)

これらのケーススタディの中から、2020 年に公表された神経毒性に関するケーススタディ「Case Study on the use of Integrated Approaches to Testing and Assessment for Mitochondrial Complex-III-mediated neurotoxicity of Read-Across to other strobilurins (他のストロビルリン系殺菌剤へのリードアクロスによるアゾキシストロビンのミトコンドリア複合体IIIを介した神経毒性について IATA を用いたケーススタディ)」²⁾及び 2019 年に公表された内分泌かく乱に関するケーススタディである「Case Study on the Use of an Integrated Approach to Testing and Assessment for Identifying Estrogen Receptor Active Chemicals (エストロゲン受容体 (ER) 活性物質の IATA の利用による評価に関するケーススタディ)」³⁾の計 2 件について調査した。以下に各ケーススタディの内容をまとめた。

2. ケーススタディ

2.1. 他のストロビルリン系殺菌剤へのリードアクロスによるアゾキシストロビンのミトコンドリア複合体IIIを介した神経毒性について IATA を用いたケーススタディ

2.1.1. 背景

ストロビルリン系殺菌剤は、ミトコンドリア複合体III (以下、複合体III) のシトクロム b のキノール酸化部位に結合して ATP の生成を阻害する作用を持っており、EU で登録されている剤は 10 種類程度である。標準的な *in vivo* 試験では、比較的安全であることが示されている。神経毒性については、反復投与毒性試験 (*in vivo* 試験) では強い兆候は見られないが、*in vitro* 試験では複数の試験で複合体IIIを介したメカニズムによる神経毒性を示すシグナルがあることから、神経毒性の潜在性が示唆されている

(Pearson et al. 2016, Regueiro et al. 2015, Simon et al. 2019)。

2.1.2. 目的

本ケーススタディの目的は、他のストロビルリン系殺菌剤へのリードアクロスによるアゾキシストロビンの複合体IIIを介した潜在的な神経毒性について、その正当性を新規アプローチ法 (NAM: New Approach Methodology) のデータで示し、げっ歯類の神経毒性試験 (OECD TG424) の代替とすることである。

2.1.3. 供試化合物

本ケーススタディのリードアクロスに用いた評価対象化合物はアゾキシストロビンであり、類似化合物はストロビルリン系殺菌剤のピラクロストロビン、ピコキシストロビン、トリフロキシストロビン、クレソキシムメチルの 4 剤である。類似化合物は EU の規制当局において評価・承認を受けたストロビルリン系殺菌剤について、ADME、神経毒性を中心に既存の *in vivo* データを収集し、さらに、アゾキシストロビンと類似した作用機序、トキシコフォア、神経毒性の潜在性、トキシコキネティクスを共有しているという仮説に基づいて選択した。また、作用機序の参照化合物として、神経毒性が既知の複合体III阻害物質であるアンチマイシン A を用いた。

本ケーススタディに用いた化合物名、使用用途、ADME 及び神経毒性に関する *in vivo* データの概要を表 1 に示す。

2.1.4. AOP

本ケーススタディでの推定 AOP (図 2) は、複合体IIIを阻害すると神経毒性が発現することである。分子開始イベント (MIE: Molecular Initiating Event) は阻害剤の複合体IIIへの結合、KE1 は複合体IIIの阻害、KE2

表1. 本ケーススタディの供試化合物と *in vivo* データ (ADME, 神経毒性) の概要

使用用途	評価対象	類似				参照
化合物名	アゾキシストロ ビン	ピラクロストロ ビン	ピコキシストロ ビン	トリフロキシス トロピン	クレソキシムメ チル	アンチマイシン A
毒性 吸収 分布 代謝 排泄	High Moderate Extensive High	Moderate Moderate Extensive Moderate	High 未実施 Extensive High	Low Low Extensive Extensive	Low Low Extensive High	No data No data No data No data
神経 (<i>in vivo</i>)	—	急性及び90日 間反復投与と神経 毒性でなし	反復経口投与毒 性で神経毒性検 出せず	急性及び90日間 反復投与と神経毒 性でなし	急性及び90日 間反復投与と神経 毒性でなし	—

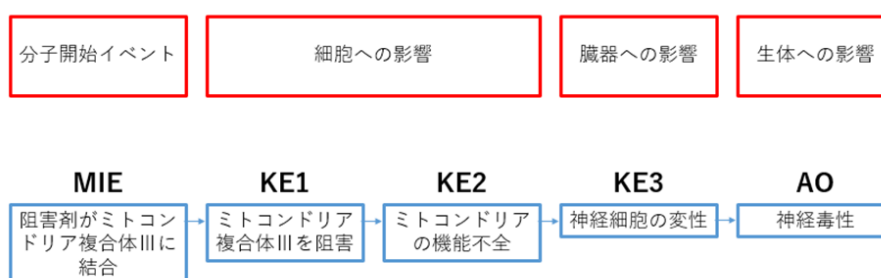


図2. ミトコンドリア複合体IIIを介した神経毒性の推定 AOP

はミトコンドリアの機能不全, KE3 は神経細胞の変性, AO は神経細胞への毒性であり, OECD で承認を受けたミトコンドリア複合体阻害によるパーキンソン症候群の運動障害発現の AOP に基づいた。

2.1.5. AOP 各キーイベントのアッセイとその他のデータ (NAM データ, *in silico*)

本ケーススタディで用いた手法について表2に示す。MIE は, 2つのアッセイがあり, 一方は, 受容体のドッキングに関する研究についてモデリングを用いた。もう一方は, 物理化学的なパラメータに基づく類似性研究について, Tanimoto 係数, 3D 構造類似性, SMARTS を用いた。

KE1 は, 細胞及び電子伝達系阻害部位の酸素消費速度 (OCR) について, シーホース・バイオアナライザーを用い, 神経系の LUHMES 細胞を供試し測定した。

KE2 のミトコンドリアの機能不全は, OCR, 膜電位, 解糖系, ATP レベルでの影響を確認した。OCR への影響は, シーホース・バイオアナライザーを用い, LUHMES 細胞, 腎臓系の RPTEC 細胞, 肝臓系の HepG2 細胞を供試し測定した。膜電位への影響は, ミトコンドリア膜電位アッセイを用い, 神経系の SH-SY5Y 細胞, RPTEC 細胞, HepG2 細胞を供試し測定した。解糖系への影響は, ミトコンドリア呼吸が阻害される際に副産物として生成される乳酸について, LUHMES 細胞, SH-SY5Y 細胞, RPTEC 細胞, HepG2 細胞を供試

し測定した。ATP レベルへの影響は, ミトコンドリアが機能不全に陥った際に細胞内の ATP が減少することについて, SH-SY5Y 細胞を供試し測定した。

KE3 は, 神経細胞への変性について2つのアッセイがあり, 一方は, 細胞の成長の低下や分解を示す細胞生存率への影響を, レサズリン又はヨウ化プロビジウム (PI) 染色を用い, SH-SY5Y 細胞, RPTEC 細胞, HepG2 細胞を供試し測定した。もう一方のアッセイは, 神経突起の伸長に関する影響を, LUHMES 細胞と SH-SY5Y 細胞を供試し測定した。

AOP の各キーイベントに係るアッセイの他に, 細胞への反復投与, *in vitro in silico* モデルによる細胞内濃度予測, PBPK モデル解析を実施した。長期にわたる暴露の影響を評価するために実施した反復投与は, LUHMES 細胞では神経突起の伸長と生存率 (レサズリン), SH-SY5Y 細胞では ATP 量及び神経突起の変性及び生存率 (PI), RPTEC 細胞では乳酸濃度及び生存率 (レサズリン) について測定した。*In vitro in silico* モデル (バイオアベイラビリティ) は, *in vitro* での KE 活性化の測定データを *in vivo* に外挿することが必要なため, ストロビルリン系の細胞内濃度を適切に評価できるよう, コンピュータを用いて細胞内濃度のモデル化を実施した。また, PBPK モデルを用いて, 被験物質に暴露した際のヒトの組織内濃度と *in vivo* ラットの濃度を予測した。

表2. 本ケーススタディに用いた手法

キーイベント		アッセイ	目的	細胞株
MIE	阻害剤がミトコンドリア複合体IIIに結合	受容体のドッキングに関する調査	モデリングによる複合体IIIと化合物の相互作用の評価	—
		類似性調査	Tanimoto 係数による構造類似性の評価	—
			三次元構造による構造類似性の評価	—
			SMARTS による構造類似性の評価	—
KE1	ミトコンドリア複合体IIIを阻害	シーホースアッセイ	細胞及び阻害部位の酸素消費速度(OCR)の測定	LUHMES
KE2	ミトコンドリアの機能不全	ミトコンドリア膜電位アッセイ	シーホース・バイオアナライザーを用いた OCR の測定(OCR への影響測定)	LUHMES RPTEC HepG2
			電子伝達系阻害による膜電位低下の測定(膜電位への影響測定)	SH-SY5Y RPTEC HepG2
			呼吸阻害による乳酸の生成の測定(解糖系への影響測定)	SH-SY5Y RPTEC HepG2
			ミトコンドリア機能不全による細胞内の ATP 減少の測定(ATP レベルへの影響測定)	SH-SY5Y
KE3	神経細胞の変性	細胞生存アッセイ	細胞生存率(レサズリン)の測定	LUHMES SH-SY5Y RPTEC HepG2
			細胞生存率(ヨウ化プロピジウム)の測定	SH-SY5Y
		神経細胞の正常性	神経突起の伸長の測定	LUHMES SH-SY5Y
項目			目的	細胞株
反復投与			神経突起の伸長及び細胞生存率(レサズリン)の測定	LUHMES
			ATP 量の測定	SH-SY5Y
			神経突起の変性及び細胞生存率(ヨウ化プロピジウム)の測定	
			乳酸濃度及び細胞生存率(レサズリン)の測定	RPTEC
<i>in vitro in silico</i> モデル (バイオアベイラビリティ)			<i>in vitro</i> での KE 活性化の測定データを <i>in vivo</i> に外挿するため、 <i>in silico</i> で細胞内濃度のモデル化	—
PBPK モデル			被験物質に暴露した際のヒト組織内及び <i>in vivo</i> ラットの濃度予測	—

2.1.6. 結果

OCR で測定した複合体IIIの阻害 (KE1) は、評価対象化合物であるアゾキシストロビンの複合体III阻害率は55%、類似化合物であるピラクロストロビンやピコキシストロビンは80%、アンチマイシン A は88%以上の阻害効果を示した。膜電位への影響 (KE2) は、

アンチマイシン A が顕著で、評価対象化合物と類似化合物では桁違いに小さい結果を示した。神経細胞の変性 (KE3) について、SH-SY5Y 細胞の神経突起伸長アッセイでは、評価対象化合物は陰性であったが、類似化合物の一部は弱い影響を示した。

2.1.7. 結論

本ケーススタディのリードアクロス仮説は、OCRや膜電位への影響などのNAMデータによって裏付けられた。このことから、アゾキシストロビンの複合体IIIを介する潜在的な神経毒性が類似化合物と比較してより強いという証拠はなく、評価対象化合物のアゾキシストロビンは神経毒性を示さないと結論付けられた。

3. エストロゲン受容体 (ER) 活性物質の IATA の利用による評価に関するケーススタディ

3.1. 内分泌かく乱物質について

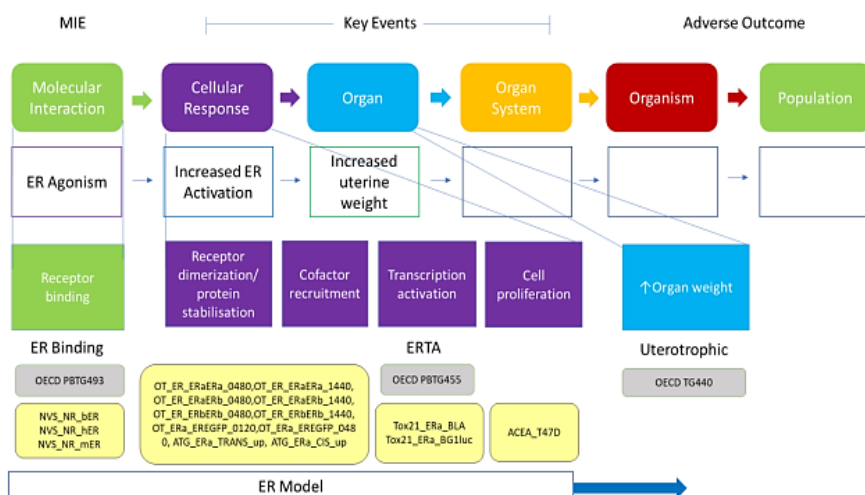
内分泌かく乱物質は正常な内分泌機能を阻害し、生殖能力の低下などの悪影響をもたらす可能性を有する。内分泌系は高度に統合された複雑なシステムであり、暴露後の活動は、調査する器官やタイムポイントによって変動する。潜在的な影響を把握するために、内分泌活性物質への暴露後の健康影響が研究されており、多くの研究論文やレビューが執筆されている。これらの研究発表以外にも、内分泌かく乱化学物質の評価に関する多数のガイダンス文書や標準化された試験ガイドラインが発表されている。OECDは、科学文献の中から、標準化することが可能であり、化学物質の規制の中で内分泌かく乱化学物質がもたらすリスクを検出し、特徴付けるのに使用可能な試験方法を調査した。内分泌かく乱物質の試験と評価に関する概念的フレームワーク（2012年改訂版）には、OECDの試験ガイドラインや、化学物質の内分泌かく乱作用の評価に利用可能な試験方法が掲載されている。分析が必要な環境中の潜在的な内分泌かく乱物質の数を

鑑みると、これらの物質をより早く分析するために、より迅速で費用対効果の高い方法を取り入れる必要がある。

3.2. 本ケーススタディにおける IATA について

本ケーススタディではハイスループットスクリーニング(HTS)アッセイとER活性の計算モデルを組み合わせIATAを構築している。内分泌活性物質への暴露後の健康影響はよく研究されており、今回の事例では哺乳類系でER結合から下流のER経路を調べる16種類のハイスループット*in vitro*アッセイを集めたデータを用いてERアゴニスト活性の評価が行われた。図3は計算モデルの基礎となったER経路とキーイベント及び*in vitro* HTSアッセイと各キーイベントとの対応関係を示したものである。

16種類のアッセイはEPAのToxcastプログラムにて使用されたアッセイ群より選定された。いずれもER経路のいくつかのKE（例：受容体の二量化、DNA結合、転写促進、遺伝子発現、細胞増殖）に加えて、MIE（受容体結合）を測定するものである。また、これらのアッセイにはヒト、マウス、ウシのER結合アッセイや、様々なヒト組織におけるER経路の相互作用が含まれている。本IATAの用途は、ERアゴニスト活性に基づく環境化学物質のスクリーニングとさらなる実験を行うための優先順位付けであり、さらなる実験としては高次の*in vivo*試験（雌の思春期アッセ



ER pathway showing MIE and key events and how they relate to OECD technical guidance (grey squares). Perturbation of the MIE and downstream key events (KEs) are evaluated using high-throughput screening (HTS) assays (yellow squares). ER = Estrogen receptor; ERTA = ER transactivation; MIE = molecular initiating event.

図3. ER 経路, *in vitro* HTS アッセイとキーイベントとの対応関係

表3. 本 IATA が代替となることを目標とするガイドライン

PBTG493	ER Binding	Performance-Based Test Guideline for Human Recombinant Estrogen Receptor (hrER) In vitro Assays to Detect Chemicals with ER Binding Affinity	OECD, 2015b
PBTG455	ER Transactivation	Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation In vitro Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists	OECD, 2015a
TG440	Uterotrophic assay	Uterotrophic Bioassay in Rodents: A Short-Term Screening Test for Oestrogenic Properties	OECD, 2007

イ、二世世代生殖毒性試験など)が想定されており、この結果から内分泌関連活性性を評価することが考えられる。現行のガイドラインであるER結合 (OECD TG493), ER転写活性化 (OECD TG455), 子宮肥大試験 (OECD TG440) の代替とすることが本モデルの目標である (表3)。

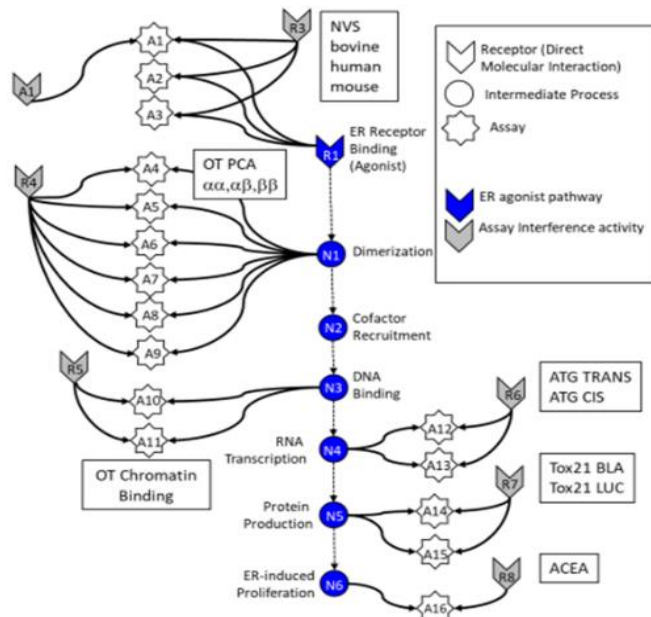
3.3. 本 IATA の仕組み

本 IATA は検査対象物質が ER アゴニストとして作用するかどうかの情報を提供するように設計されている。個々のアッセイのデータについて計算モデルに統合し、モデルから得られたスコアが物質の ER アゴニスト活性の特定、定量化に利用される。

無細胞結合アッセイを除くアッセイにおいては化学物質を濃度反応形式で実施し、無細胞結合アッセイでは最初に単一のスクリーニング濃度 (25 μ M) で実施し、被験物質がアッセイで活性化した場合、濃度反応形式でアッセイを実施した。RNA 転写レベルを測定するアッセイを除く全ての *in vitro* アッセイについて

は17 β -エストラジオールで正規化した (17 β -エストラジオールの活性=1)。RNA 転写産物のデータは溶媒 (DMSO) 対照からの倍数変化として正規化した。異なる *in vitro* アッセイの結果を統合する際には、0.01~100 μ M の 14 種類の標準化された濃度での合成濃度反応曲線を作成し、結果を「ER 経路モデル」と呼ぶ計算モデルに含めた。本モデルの仕組みを図4に示す。

この図には、3 種類のノードがある。黒色のノードは、図3のER アゴニスト経路における一連の既知の生物学的プロセスを表す。灰色のノードは、化学物質が引き起こす可能性のあるアッセイ干渉プロセスである。白色のノードはアッセイである。ER または干渉ノードとアッセイノードを結ぶ線は、生物学的ノード (アゴニストまたは干渉) の1つが活性化された場合に、どのアッセイが活性化されるかを示している。例えば、化学物質が真のアゴニストである場合、矢印が ER 受容体結合/アゴニストノードと全てのアッセイノードを結んでいるため、すべてのアッセイ (A1~A16) がアクティブになる。化学物質がアゴニストではなく、例えば干渉プロセス R3 によってアッセイ A1



The input data for the model includes concentration-response data for 16 ER-related *in vitro* assays. The model produces scores for agonist activity (blue) and for assay interference activity (grey). These scores can then be compared with reference chemicals, structure classes, and other properties.

図4. ER 経路モデルの仕組み

～A3 が妨害された場合、アッセイ A1～A3 は活性化されますが、他のアッセイはどれも活性化されません。このモデルを用いて各化学物質のアゴニスト、アンタゴニスト、干渉の各ノードの濃度反応曲線を作成し、濃度反応曲線の積分として AUC が得られる。ER アゴニストの AUC モデルスコアは 0 (活性なし) から 1 (17β-エストラジオールの活性) の範囲になるように正規化される。モデルスコアは 0.001 未満の値の際は ER の活性化がないとみなし、スコアが 0.1 以上の場合は、陽性と判断する。スコアが 0.001<AUC<0.1 の際は、これらの化学物質が 1 つまたは 2 つのアッセイでのみ活性を示し、活性は試験された最高濃度に限られていたため、活性の有無は決定できません。

このモデルを、1812 種類の化学物質からなる ToxCast ライブラリに適用したところ、活性が試験した濃度範囲外であった弱いアゴニストを除き、正しくアゴニストを同定することができた。なお、この 1812 種類の化学物質の中には 387 種の農薬活性成分が含まれている。

3.4. ER 経路モデルの性能評価

ER 経路モデルの性能評価の一環として、以下の 3 組の参照化学物質と比較した。

- (1) *in vitro* ER アッセイの結果から ER アゴニスト活性を有すると複数報告のある参照化学物質のセット (*in vitro* 参照化学物質)
- (2) *in vivo* ガイドラインに則した子宮肥大データを有すると複数報告のある参照化学物質のセット (*in vivo* 参照化学物質)
- (3) 米国 EDSP Tier1 ガイドラインの ER アッセイ (ER 結合アッセイ, ER 転写活性化アッセイ, ER 子宮刺激性アッセイ) のデータの結果を持つ化学物質セット

比較の結果、ER 経路モデルの精度は参照化学物質と比較して 84% から 93% の一致を示した。

3.5. アッセイ数の違いによる性能変化について

ER 経路モデルについて、16 種類のうちの一部のみを用いた場合であっても同等の性能が発揮できるかを検討した。検討では ER アゴニスト活性の単純な相加モデルを開発し、完全な ER 経路モデルに対してキャリブレーションを行い、サブセットモデルでは、式を用いて化学物質固有の ER アゴニスト AUC 値の算出を行った。次に 16 種類のアッセイをすべて組み合わせた個別のサブセットモデル (計 65,535 個) を、性能指標としてバランス精度を用いて、フルモデルに対して評価した。分析の結果、16 種類のアッセイを用いた完全なモデルと同等の性能を発揮するアッセイのサブセットが多数存在することが判明し、最もアッセイ

数が少ないサブセットでのアッセイ数は 4 つであった。

3.6. ER 経路モデルの動向

ER 経路モデルは専門家による詳細なレビューを受けており、2015 年 6 月、米国 EPA は ER 経路モデルを生物活性のスクリーニングに用いることを認め、子宮肥大 (OCSPP 890.1600)、内分泌受容体結合 (OCSPP 890.1250)、および内分泌受容体転写活性化 (OCSPP 890.1300) の 3 つの Tier1 アッセイに代替できるようにした。本ケーススタディによる手法は一部の EDSP の Tier1 試験 (結合, ERTA, 子宮肥大) の代替として、米国 EPA によってすでに使用されており、エストロゲン関連内分泌活性に関する最近の ECHA/EFSA ガイドライン (ECHA and EFSA 2018) では、好ましいデータソースとされている。他の規制機関においても規制決定の際に HTS アッセイと計算モデルの使用を検討していることから、この ER 経路モデルは、これらの決定に情報を提供するための優先順位付けの代替手段として使用することができ、また、規制決定の状況で必要とされる場合には、特定の内分泌作用モード (ER アゴニスト) に関する情報を提供するために使用することができる。

3.7. 結論

本ケーススタディでは、物質による ER アゴニスト活性を通じた潜在的な内分泌かく乱作用を同定するための IATA を紹介している。このモデルを用いて、4～16 種類の *in vitro* HTS アッセイを用いて、IATA としての使用可能性を評価した。これらの ER HTS アッセイの結果は、ER アゴニスト活性をアッセイ固有の干渉や細胞毒性から識別できる計算モデルに統合された。本 IATA は、*in vitro* および *in vivo* の参照化学物質の ER アゴニスト活性を 84～93% の精度で予測することが実証された。この ER 経路モデルの性能評価の結果は、ER アゴニスト活性の化学物質のスクリーニングにおける本 IATA の精度、感度、特異性を示している。本 IATA の分析結果は、既存の OECD TG の代替として、エストロゲン活性に関連する規制決定に利用できる可能性を科学的に裏付けるものである。

4. おわりに

本調査では OECD 主導の Case Studies Project において実施された IATA に関するケーススタディについて検討した。現在までに 24 件のケーススタディが公表されており、そのうちの神経毒性及び内分泌かく乱の 2 つについて内容把握を行った。

アゾキシストロピンの神経毒性に関するケーススタディでは、類似した作用機序等を持つ他のストロピ

ルリン系化合物の情報を利用したリードアクロスを用いて神経毒性能の評価が可能である。また、エストロゲン受容体の ER アゴニスト活性に関するケーススタディでは、ER 経路に係る *in vitro* アッセイを組み合わせた IATA の利用により ER アゴニスト活性能の評価が可能であるという内容が報告されていた。

今回のケーススタディでは、リードアクロスやアッセイを組み合わせた IATA を用いることで、現在は *in vivo* 試験を要求している試験について、今後、動物を用いずに評価できる可能性が示唆されている。

アッセイを組み合わせた IATA について、今回紹介した例では ER アゴニスト活性に関する内容であったが、他の毒性についてもそのメカニズムが判明していれば同様の手法によって IATA を構築し評価することは可能と考えられ、将来的には *in vivo* 要求試験についても試験の代替・省略ができる可能性があると推測される。

選定した 2 件のケーススタディは、特定の神経毒性及び内分泌かく乱に関わる重要事象 (KEs) を、代替試験法を用いて検出することにより、既存の試験方法を代替できる可能性が示すが、いずれもあらゆる神経毒性や内分泌かく乱に適用できるというわけではない。しかしながら、今後、国際機関において、このような代替試験法の開発と IATA に関するケーススタディを積み重ねることによって、将来の農薬の評価において、データ要求の抜本的な見直しを国内で議論する際に重要な知見となると考えられる。例えば、毒性に関わる構造が既知の既存化学物質があった場合に、同じ構造を有する新規化合物については、動物試験の代わりに代替試験法の結果と既存化学物質の毒性データによるリードアクロスを受け入れる。あるいは有害性発現経路 (AOP) の確立したエンドポイントについては代替試験法のみで評価を行うといった評価法導入について議論する際に役立つ。また、これまで動物試験の結果に基づき登録してきた既存化学物質についても、必ずしも既存の動物試験ではヒトへの影響を捉えきれていないのではないかという社会的関心を集める科学文献等があった場合に、ヒトとの関連性をよりの確に検出できる代替試験法の必要性が国際的に認識されることが示唆される。その結果、国際的に合意された代替試験法や IATA が開発され、それらを活用することで既存化学物質に対する社会的関心・不安に答えていく、あるいは評価を見直すといったことに、極めて有用であると考えられる。ハイスループットスクリーニング (HTS) は、農薬の登録申請に必要なデータとしての活用には向いていないが、新規化合物の開発段階におけるスクリーニングや、登録後の科学の進展に応じた新たなニーズに対して規制当局自らがスクリーニングを行うといった場合に有用なツ

ールとなる可能性がある。

また、他の毒性に係る新たな IATA の構築方法としては当該毒性経路に係る経路を把握し、その後当該経路に関与するアッセイに関する情報を収集 (場合によっては新たに開発) し、得られたアッセイを基に構築した IATA について実際に利用可能であるかを検証することが必要である。

今後も本件に関する調査を続けることがさらなる動物試験の代替に繋がると考えられる。

引用文献

1) Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA)
<https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/iata-integrated-approaches-to-testing-and-assessment.htm>

2) CASE STUDY ON THE USE OF INTEGRATED APPROACHES TO TESTING AND ASSESSMENT FOR MITOCHONDRIAL COMPLEX-III-MEDIATED NEUROTOXICITY OF AZOXYSTROBIN - READ-ACROSS TO OTHER STROBILURINS
[https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2020\)23&docLanguage=en](https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2020)23&docLanguage=en)

3) CASE STUDY ON THE USE OF AN INTEGRATED APPROACH TO TESTING AND ASSESSMENT FOR ESTROGEN RECEPTOR ACTIVE CHEMICALS
[https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2019\)28&docLanguage=en](https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2019)28&docLanguage=en)

(全 URL のリンクについての確認は、2023 年 8 月 8 日に実施)

樹木類の花における農薬の残留傾向

高野優美*, 秋山嘉大*, 市原直登**, 平松未森*, 石原 悟***

*独)農林水産消費安全技術センター 農薬検査部

**環境省 水・大気環境局

***農林水産省 消費・安全局

常緑樹のツツジおよび落葉樹のドウダンツツジの開花前後にジノテフラン、クロチアニジンおよびエトフェンプロックス製剤を処理し、開花後の花または葉における各農薬の残留量を調査した。開花前処理では、ツツジの葯でジノテフランのみわずかに検出され、ドウダンツツジの花からはいずれの成分も定量下限値以上の濃度では検出されなかった。開花始処理では、処理直後の残留農薬濃度が最も高く、その後、経時的な減衰が見られた。また、ツツジの調査では、農薬処理時の花が蕾の状態の場合、残留農薬濃度が低くなる傾向が認められ、開花ステージの異なりに伴う薬液の付着量の異なりが花の残留農薬濃度に影響を及ぼすことが示唆された。

農薬の花への残留傾向は、供試作物の処理時の枝葉の繁茂状況、花の形態や咲き方の相違、花卉への害虫被害有無などの影響を受けることが考えられた。

Keywords : ミツバチ, 蜜蜂, ポリネーター, リスク評価, 樹木, 花, 花粉, 花蜜, 残留

結 言

ミツバチが農薬に暴露する経路は、虫体に直接付着する接触暴露と農薬を含んだ食物などを摂取する経口暴露の2つがあり、農薬のミツバチに対するリスク評価では両方の暴露経路を考慮した評価が行われている。ミツバチにとって花粉はタンパク源、花蜜はエネルギー源であり蜂群の維持に必須であるため、経口暴露の主な暴露源は花粉・花蜜とされている。

経口暴露量の推定は、「ミツバチの摂餌量」に、「花粉・花蜜の農薬残留濃度」を乗じて算出する。ミツバチの摂餌量は、ミツバチが餌として摂取する花粉・花蜜の量であり、ミツバチの階級毎、花粉・花蜜毎の摂餌量データを元に設定された定数を用いている。これに対し、農薬残留濃度は農薬の使用方法に応じた暴露シナリオ（茎葉散布、土壌処理、種子処理）ごとに予測式を用いて推定値を算出するが、評価対象農薬の適用に即した試験方法で実施した花粉・花蜜残留試験より得られた実測値を、推定値の代わりに用いることができる。これを暴露量の精緻化という。

花粉・花蜜残留試験は、作物の性質等を考慮し、代表作物データの活用が検討されている。また、花粉・花蜜の採取が困難な場合、花粉または花蜜の代替として花全体、花粉の代替として葯、花蜜の代替として花蜜を含む花の一部等を分析部位とするこ

とができるとされている。

花粉・花蜜への農薬残留については、これまで農林水産省の事業で主にイネ²⁾、ウリ科作物等³⁾および果樹⁴⁾についての調査が実施されているが、非食用の作物、特に樹木についての知見は少ない。

本調査では、樹木における農薬の花粉・花蜜への残留性について調査することを目的に、ツツジおよびドウダンツツジを試験作物とした花粉・花蜜残留試験を実施した。

材料および方法

1. 供試作物および試験区概要

ツツジ (*Rhododendron* sp.) (図 1A) およびドウダンツツジ (*Enkianthus perulatus*) (図 1B) を供試作物とした。



図 1. 供試作物の花

A : ツツジ, B : ドウダンツツジ

開花前に農薬処理を行う区では、開花約3ヶ月前、2ヶ月前、2週間前になるよう農薬処理日を設定した。また、BBCHスケール⁵⁾で開花開始(Beginning of flowering)と定義されている樹当たり10%の花が開花した日を「開花始」とし、開花始に農薬処理を行う区を設定した。試験区概要を表1に示す。

ツツジは試験区当たり10樹とし、試験区間距離を約3~4mとした。試験区間の3~4樹はマージン区として農薬処理およびサンプリングを行わない区とした。ドウダンツツジは試験区当たり7樹とし、試験区間に9樹のマージン区を設け、試験区間の距離を約7~8mとした。

各試験区の外観を図2-1および図2-2に、平面概略図を図2-3に示す。

表1. 供試作物および試験区の概要

作物名	試験区	処理時の生育ステージ	樹数(樹)	面積(m ²)
ツツジ	1	開花3ヶ月前	10	12.4
	2	開花2ヶ月前		12.7
	3	開花2週間前		13.6
	4	開花始		14.8
ドウダンツツジ	1	開花3ヶ月前	7	1.8
	2	開花2ヶ月前		
	3	開花2週間前		
	4	開花始		

2. 農薬の処理方法

供試農薬は、浸透移行性を有する、ネオニコチノイド系農薬のジノテフラン(20%水溶剤;アルバリン顆粒水溶剤)とクロチアニジン(16%水溶剤;ダントツ水溶剤)および浸透移行性を有しない、合成ピレスロイド系農薬のエトフェンプロックス(20%乳剤;トレボン乳剤)の3成分を選定した。

各農薬製剤を表2に示す有効成分投下量となるよう混用し、噴霧器(乾電池式噴霧器GT-5S, KOSHIN社製)で散布した。農薬処理は、風が弱く晴れた日の午前中に行った。

表2. 各農薬の単位面積当たりの有効成分投下量(kg ai/ha)

ジノテフラン	クロチアニジン	エトフェンプロックス
0.30	0.56	0.70



図2-1. ツツジ試験区

(撮影日: 2022年1月16日)



図2-2. ドウダンツツジ試験区

(撮影日: 2022年4月11日)

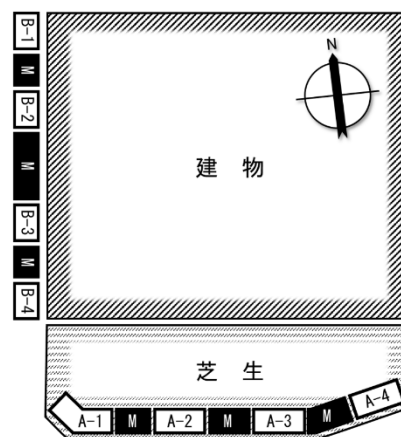


図2-3. 建物配置図および試験区平面概略図

A-1: ツツジ試験区1, A-2: ツツジ試験区2, A-3: ツツジ試験区3, A-4: ツツジ試験区4,

B-1: ドウダンツツジ試験区1, B-2: ドウダンツツジ試験区2, B-3: ドウダンツツジ試験区3, B-4: ドウダンツツジ試験区4,

M: マージン区

ツツジの農薬処理時は、マージン区を挟んで隣の試験区をブルーシートで覆い、ドリフトによる他試験区との交差汚染を防止した(図2-1)。ドウダンツツジは試験区間の距離を7~8 m とすることで交差汚染を防止した。

3. 農薬処理時期

4月中下旬での開花が予想されたため、試験区1の農薬処理は1月中旬に、試験区2の農薬処理は2月下旬に行い、試験区3の処理は3月下旬に行った。試験区4の処理は、樹当たり10%が開花したことを目視で確認し、処理を行った。開花約2週間前の花芽の様子を図3に示す。

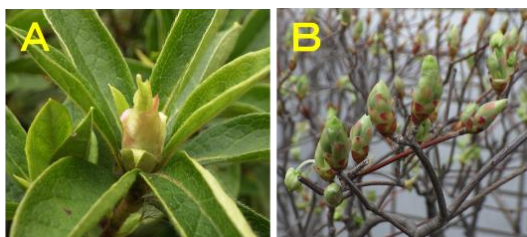


図3. 各供試作物の花芽

A : ツツジ花芽, B : ドウダンツツジ花芽および葉芽

4. 試料採取方法

試料は、開花始当日、開花始3日後および開花始7日後に採取した。ただし、採取予定日に降雨が予想された場合は、前日または翌日に採取した。開花始処理区の試料採取は、農薬処理後、薬液が乾いたことを確認してから行った。各作物の試料採取方法は下記のとおり。いずれも、清浄なニトリルグローブおよび器具を用い、試験区の両端を避けて無作為に採取した。

4.1. ツツジ

開花した花を萼の下から手で採取し、ジッパー付きポリ袋に入れて実験室内に持ち帰った。試験区4(開花始処理区)では、農薬処理後、薬液が十分乾いたことを確認してから、開花している花すべてにタグを付け、処理4日後の試料採取時に農薬処理時に開花していた花として採取した。タグがついてい

ない花は、処理時に開花していなかった花として採取した。室内に持ち帰った花は、ハサミおよびピンセットを用いて萼を取り除いた後(図4I)、乳鉢内で細切し、乳棒を用いて全体を磨砕均質化して-80℃で冷凍保存した。分析操作の直前にデシケーター内で解凍し分析に供した。試験区3の開花始当日試料および試験区4の農薬処理4日後試料は、花粉の代替として葯、花蜜(図4II)の溜まる花卉基部約1 cmの部位、花卉基部を取り除いた花卉を分離し、部位別に分析した(図4III)。葯は1.5 mL容速沈管に、花卉基部および花卉は50 mL容速沈管に入れて-80℃で冷凍保存した。分析操作の直前にデシケーター内で解凍し、花卉基部および花卉は50 mL容速沈管に入れて-80℃で冷凍保存した。分析操作の直前にデシケーター内で解凍し、花卉基部および花卉は乳鉢内で細切後、乳棒を用いて磨砕均質化した。葯は1.5 mL容速沈管内で、ホモジナイザー(パワーマッシャーIIおよびバイオマッシャーII, (株)ニッピ製)を用いて磨砕均質化した。無処理試料は、試験区4から農薬処理前に採取し、花全体を試験区と同様に調製、保管した。農薬処理日および開花始とした日、ならびに試料採取日までの経過日数および分析対象部位を表3に示す。



図4. ツツジ試料と花蜜

I : 花全体試料, II : 花蜜, III : 部位別分析試料

表 3. ツツジの農薬処理, 試料採取スケジュールおよび分析対象部位

試験区	農薬処理 (年/月/日)	開花始 (年/月/日)	処理後 日数	開花始後 日数	分析対象部位
1	2022/1/20	2022/4/18	95	7	花全体
			92	4	花全体
			88	0	花全体
2	2022/2/25	2022/4/16	56	6	花全体
			53	3	花全体
			50	0	花全体
3	2022/3/29	2022/4/14	24	8	花全体
			20	4	花全体
			16	0	花全体・部位別
4	2022/4/12	2022/4/12	7	7	花全体
			4	4	花全体*1・部位別*2
			0	0	花全体

*1 農薬処理時に開花していた花と農薬処理後に開花した花を区別して採取

*2 農薬処理後に開花した花から採取

4.2. ドウダンツツジ

開花した花および葉をハサミで切り落とし、それぞれ 50 mL 容遠沈管に入れて室内に持ち帰り、乳鉢内で細切後、乳棒を用いて磨砕均質化した。その後、50 mL 容遠沈管に入れて -80 °C で冷凍保存した。分析操作の直前にデシケーター内で解凍し、分析に供した。なお、開花した花が少なく分析可能な量を採取できなかった場合は、葉のみを分析対象とした。

無処理試料は、農薬検査部敷地内の無処理の樹から試験区と同様に採取、保管した。

農薬処理日および開花始とした日、ならびに試料採取日までの経過日数および分析対象部位を表 4 に示す。

表 4. ドウダンツツジの農薬処理, 試料採取スケジュールおよび分析対象部位

試験区	農薬処理 (年/月/日)	開花始 (年/月/日)	処理後 日数	開花始後 日数	分析対象部位
1	2022/1/20	2022/4/11	88	7	葉
			84	3	花全体・葉
			81	0	花全体・葉
2	2022/2/25	2022/4/14	56	8	葉
			52	4	花全体・葉
			48	0	花全体・葉
3	2022/3/29	2022/4/13	21	6	葉
			18	3	葉
			15	0	葉
4	2022/4/12	2022/4/12	7	7	葉
			4	4	花全体・葉
			0	0	花全体・葉

5. 分析方法および精度管理

QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) 法に準じ検討した分析方法に従い試験溶液を調製し、添加回収試験の結果概ね良好な回収率が得られた分析方法を用いた。分析方法の概要、添加回収試験および保存安定性試験結果を別添 2 に示す。

分析は各 2 連で実施した。ただし、採取量が少なく必要量に満たなかった試料については、1 連もしくは全量を量り取り試料重量で分析値を補正した。測定は高速液体クロマトグラフ/タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) で行い、内部標準法を用いて定量した。定量用検量線溶液は、試験溶液中の各成分の濃度の概ね 0.5 倍、1 倍および 2 倍の濃度に調製したアセトニトリル溶液を用いた。ただし、定量下限値の 200 倍の濃度以上検出された成分については、試験溶液を希釈し、外部標準法 (絶対検量線法) を用いて定量した。内部標準物質には、安定同位体標識化合物のクロチアニジン d3 およびエトフェンプロックス d5 を用いた。

定量下限値は、ジノテフランおよびクロチアニジンが 0.005 mg/kg、エトフェンプロックスが 0.01 mg/kg とした。

結果および考察

1. 分析結果

各試料の分析結果を別添 1 の表 1 から表 5 に示す。

1.2. ツツジ

試験区 1, 2 および 3 (開花始前処理区) からはいずれの農薬も定量下限値以上で検出されなかった。

試験区 4 (開花始処理区) では、残留農薬濃度の減衰が確認できた。いずれの成分も、処理直後の残留農薬濃度がもっとも高く、処理 7 日後には最高濃度の 1% 前後まで減少した。また、農薬処理時に開花していた花は、開花していなかった花に比べて残留農薬濃度が高かった (図 9 I および図 9 II)。

試験区 3 の葯、花弁基部、花弁を分析した結果では、葯でのみジノテフランが 0.023 mg/kg 検出され、開花前の農薬処理による残留は葯で最も高かった。試験区 4 の農薬処理後に開花した花の処理 4 日後の試料では、葯で 0.28~0.45 mg/kg、花弁基部で 0.33~4.3 mg/kg、花弁で 0.95~6.3 mg/kg 検出され、花弁で残留農薬濃度が最も高かった (図 9 III)。

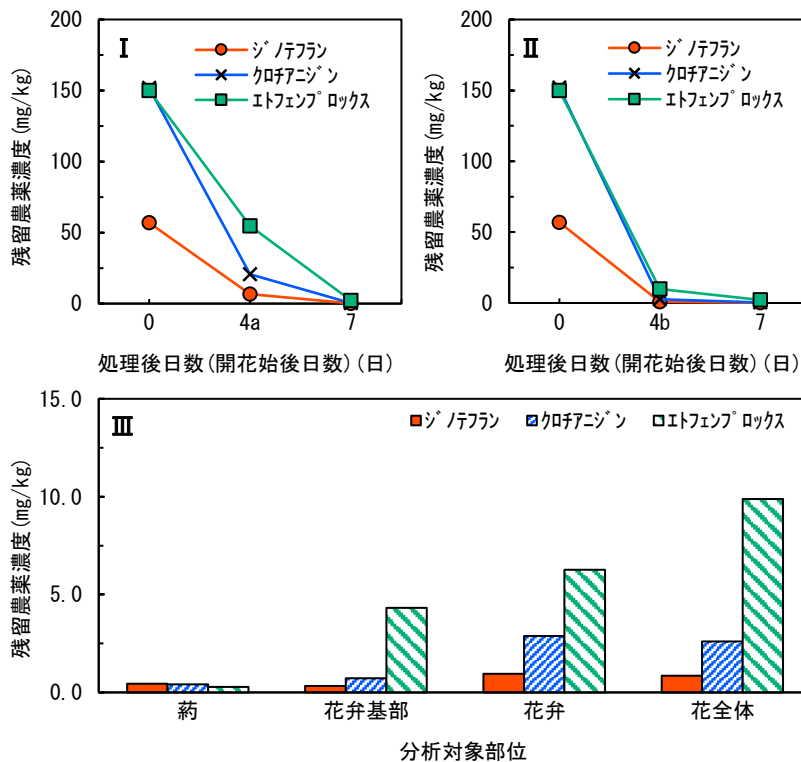


図 9. ツツジ試験区 4 (開花始処理区) 試料中残留農薬濃度
 I : 花全体試料中の減衰経過 (処理時に開花していた花を処理 4 日後試料 (4a) として分析)
 II : 花全体試料中の減衰経過 (処理後に開花した花を処理 4 日後試料 (4b) として分析)
 III : 処理 4 日後試料 (処理後開花) 中の部位別残留農薬濃度

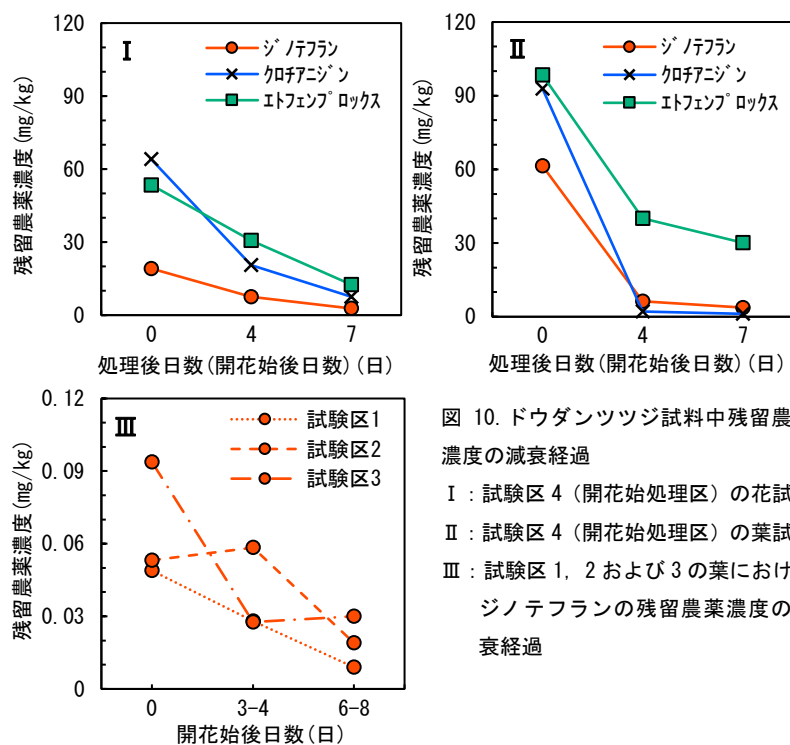


図 10. ドウダンツツジ試料中残留農薬濃度の減衰経過
 I : 試験区 4 (開花始処理区) の花試料
 II : 試験区 4 (開花始処理区) の葉試料
 III : 試験区 1, 2 および 3 の葉におけるジノテフランの残留農薬濃度の減衰経過

1.3. ドウダンツツジ

花試料の分析では、試験区 1 および 2 (開花始前処理区) からはいずれの農薬も定量下限値以上で検出されなかった。

試験区 4 (開花始処理区) では、残留農薬濃度の減衰が確認できた (図 10 I)。いずれの成分も、処理直後の残留農薬濃度がもっとも高く、その後処理 7 日後には最高濃度の 12~23 % まで減少した。

葉試料の分析では、ジノテフランが試験区 1, 2 および 3 (開花始前処理区) から 0.0090~0.094 mg/kg 検出され、クロチアニジンは試験区 3 から定量下限値未満または 0.0061~0.010 mg/kg 検出された。ジノテフランは、農薬処理後日数に伴い減少する傾向が認められた (図 10 III)。

試験区 4 (開花始処理区) では、残留農薬濃度の減衰が確認できた (図 10 II)。いずれの成分も、処理直後の残留濃度がもっとも高く、処理 7 日後には最高濃度の 1.3~31 % まで減少した。

2. 考察

開花始前および開花始後に農薬処理を行い、ツツジおよびドウダンツツジにおける農薬残留分析調査を行った。

開花始前の処理では、ツツジの花全体試料およびドウダンツツジの花全体試料からは、いずれの農薬も定量下限値以上の濃度で検出されなかった。また、ツツジの処理 16 日後の花を葯、花卉基部、花卉の部位別に分析した結果、葯以外からはいずれの農薬も検出されなかったことから、ツツジおよびドウダンツツジでは、開花前に処理した農薬の開花後の花への移行性は低いことが示唆された。ドウダンツツジでは、花と葉で残留傾向が異なる結果となった。ドウダンツツジは一つの芽の中に複数の花芽と葉芽が集合しており、花と葉が同時に展開し、花が開花した後に葉が伸張する。開花始前の処理時期には葉も展開しておらず、花と同様に薬液に直接暴露はしていないが、花よりも葉で残留が認められたことから、ジノテフランは花よりも葉に移行しやすいことが示唆された。

開花始の処理では、すべての試料において処理直

後の残留農薬濃度が最も高く、その後、経時的な減衰が認められた。また、ツツジでは、農薬処理時に開花していた花は、開花していなかった花（蕾）に比べて残留農薬濃度が高くなる傾向が認められた。このことについて、開花している花の方が表面積が大きいこと、ツツジの花の形状から花弁のひだ部分および基部に薬液が溜まりやすく、薬液の付着量が多くなったことが原因であると考えられた。

ツツジの部位別分析では、開花始処理区の全ての部位で定量下限値以上検出された。ツツジ一花当たりの各部位の平均重量（表 12）から、各部位の農薬残留量を算出し、花全体試料の残留量を 100%として各部位への残留分布を算出した結果（図 11）、ジノテフランおよびクロチアニジンでは 80%以上が花弁に分布しており、一花中の分布は花弁で最も高かった。エトフェンプロックスは約 50%が花弁以外に分布しており、部位別の分析では、雄蕊花糸、雌蕊、子房を取り除いたため、それらの部位への残留が示唆された。

調査結果の比較として、果樹類であるモモの開花前および開花始に、本調査と同一成分を含む農薬製

剤を処理し、萼片および花柄を除く花全体試料への残留性を調べた結果、花芽休眠期（開花約 2.5 ヶ月前）および花芽萌芽後（開花約 2 週間前）に処理した農薬は、開花後の花から定量下限値以上の濃度で検出された。このことから、作物によって開花始前に処理した農薬の残留傾向に差があることが示唆された。

試験区 4（開花始処理区）の花全体試料での各成分の残留農薬濃度を単位面積当たりの有効成分投下量で除した値（RUD : Residue per Unit Dose）を比較した結果を図 12 に示す。なお、ツツジの処理 4 日後の RUD の算出には、処理時に開花していた花および処理後に開花した花の残留農薬濃度の平均値を用いた。開花始処理における花への農薬の残留はドウダンツツジよりもツツジの方が高かった。この要因として、ツツジの花は上向きまたは横向きに開花するのに対し（図 1A）、ドウダンツツジの花はすべて下向きに開花し、形状が釣り鐘型をしており（図 1B）、薬液が花弁の内側に直接暴露しにくいことが考えられる。一方で、モモの RUD は両作物よ

表 12. ツツジ一花あたりの部位別平均重量および農薬残留分布

分析部位	平均重量 (g/花)	ジノテフラン		クロチアニジン		エトフェンプロックス	
		残留量 ($\mu\text{g}/\text{花}$)	残留量/ 花全体	残留量 ($\mu\text{g}/\text{花}$)	残留量/ 花全体	残留量 ($\mu\text{g}/\text{花}$)	残留量/ 花全体
薬	0.012	0.0055	0.48 %	0.0050	0.15 %	0.0033	0.026 %
花弁基部	0.12	0.0039	3.4 %	0.084	2.5 %	0.51	3.9 %
花弁	0.97	0.92	82 %	2.8	82 %	6.1	47 %
花全体	1.3	1.1	-	3.4	-	13	-

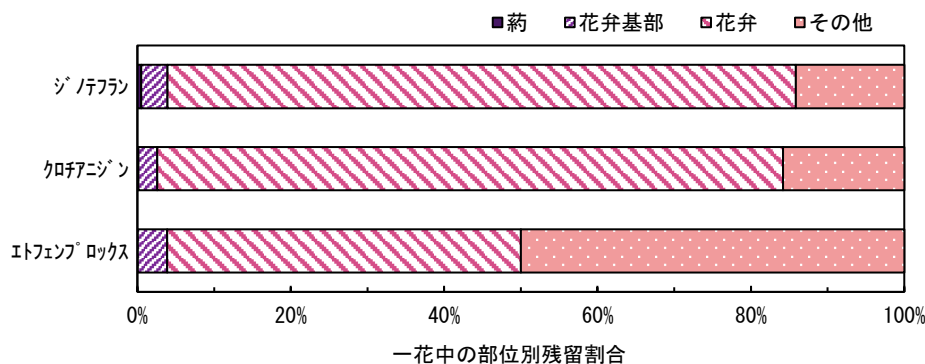


図 11. ツツジ試験区 4（開花始）処理 4 日後試料（処理後開花）の一花中残留分布

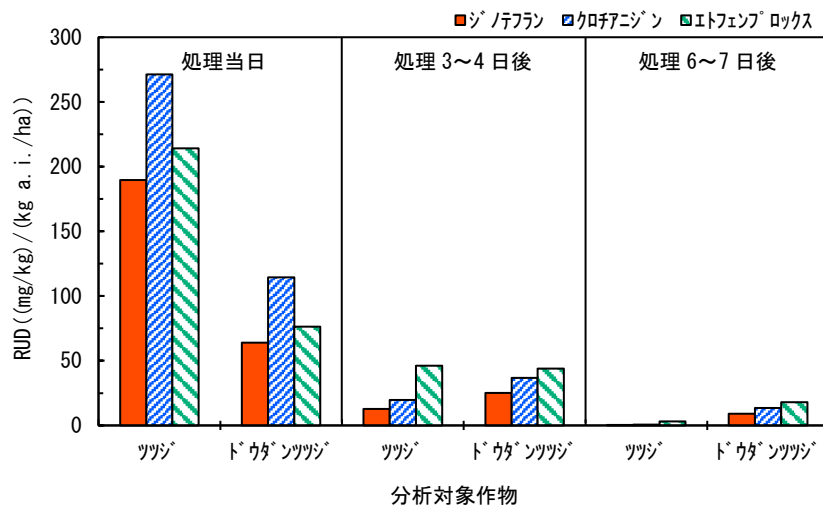


図 12. 開花始処理区における各作物の花試料中 RUD

りも高い結果となった。この要因として、ツツジは常緑樹で農薬処理時にも葉が密集しており、一方で、モモは開花始期には葉がなく、枝から花のみが展開しており、花への葉液の直接暴露が大きかったことが考えられた。また、モモでは他の作物と異なりエトフェンプロックスの RUD が最も高かった。この要因のひとつとして、ツツジの部位別分析結果より、エトフェンプロックスは他の成分とは花中の分布が異なる傾向が認められ、本調査ではモモの開花前の花芽において害虫による食害が発生したことにより試料の部位別重量比率に影響を及ぼした結果、RUD にも影響した可能性が考えられた。

各農薬の減衰傾向は作物によって大きな違いはみられなかったが、エトフェンプロックスの減衰がその他 2 成分に比べて緩やかであった。この要因のひとつとして、ジノテフランおよびクロチアニジンは浸透移行性が高く、花中の濃度の減少が早かったことが考えられた。

また、ツツジよりもドウダンツツジの方で減衰が早い傾向が認められ、この要因として供試作物間の日照条件の違いが考えられた。ドウダンツツジ試験区は建物の西側壁面に沿って設置されているのに対し、ツツジ試験区は建物南側に設置されており、処理後の日照条件が異なっていた (図 2-3)。調査に用いた成分はいずれも水中光分解性が比較的高い成分⁶⁾ (水中光分解半減期は、ジノテフラン、クロチアニジンおよびエトフェンプロックスでそれぞ

れ 3.8 時間、40~46 分および 4.7~7.9 日) であることから、日照条件の違いによって光分解による消失速度に差が生じた可能性が考えられた。

本調査では、花全体または部位別試料を花粉および花蜜の代替試料として分析した。本調査結果は、花粉、花蜜試料を部位別試料で代替することの妥当性の検討に資すると考えられる。

引用文献

- 1) 農林水産省(2020): 農薬の登録申請において提出すべき資料について (平成 31 年 3 月 29 日付け 30 消安第 6278 号農林水産省消費・安全局長通知) 別紙 2 ミツバチへの影響評価ガイドンス
- 2) 一般社団法人日本植物防疫協会(2021):平成 29 年度 農薬の影響評価に向けた試験委託事業 (①有用生物の水稻花粉を経由した暴露影響調査) 水稻花粉の農薬残留量調査報告書
- 3) 一般社団法人日本植物防疫協会(2020): 平成 31 年度 農薬の影響評価に向けた試験委託事業 有用生物の評価に係る花粉・花蜜残留試験法の検討・検証報告書
- 4) 一般社団法人日本植物防疫協会(2022): 令和 3 年度 農薬の蜜蜂への影響評価の充実のためのデータ収集委託事業 (花粉・花蜜残留試験法

の検討・検証) 報告書

- 5) Federal Research Centre for cultivated Plants(2018): Growth stages of mono- and dicotyledonous plants, BBCH Monograph, p.144, 178, 180
- 6) 一般社団法人日本植物防疫協会 (2016): 農薬ハンドブック 2016年版, p.76, 98, 100

別添 1.

表 1. ツツジ分析結果（花全体）

試験区	処理後 日数(日)	開花始後 日数(日)	ジノテフラン(mg/kg)			クロチアニジン(mg/kg)			エトフェンプロックス(mg/kg)		
			分析値①	分析値②	平均値	分析値①	分析値②	平均値	分析値①	分析値②	平均値
無処理	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1	95	6	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00
	92	4	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00
	88	0	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00
2	56	6	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00
	53	4	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00
	50	0	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00
3	24	8	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00
	20	4	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00
	16	0	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00	<L00
4	7	7	0.14	0.16	0.15	0.33	0.35	0.34	1.9	2.4	2.1
	4	4b	0.84	0.87	0.85	2.6	2.6	2.6	10	10	9.9
	4	4a	6.7	6.8	6.8	22	20	21	61	49	55
	0	0	57	56	57	153	151	152	162	138	150

ND : 未検出 <L00 : 定量下限値 (ジノテフランおよびクロチアニジン ; 0.005 mg/kg, エトフェンプロックス ; 0.01 mg/kg) 未満

a : 農薬処理時開花 b : 農薬処理後開花

表 2. ツツジ分析結果 (部位別)

試験区	処理後 日数 (日)	開花始 後日数 (日)	試料 部位	ジノテフラン (mg/kg)			クロチアニジン (mg/kg)			エトフェンプロックス (mg/kg)		
				分析値①	分析値②	平均値	分析値①	分析値②	平均値	分析値①	分析値②	平均値
3	16	0	葯	0.023	0.022	0.023	<L0Q	<L0Q	<L0Q	<L0Q	<L0Q	<L0Q
			花弁基部*	<L0Q	-	<L0Q	<L0Q	-	<L0Q	<L0Q	-	<L0Q
			花弁	<L0Q	<L0Q	<L0Q	<L0Q	<L0Q	<L0Q	<L0Q	<L0Q	<L0Q
4	4	4b	葯	0.41	0.49	0.45	0.36	0.47	0.42	0.30	0.25	0.28
			花弁基部*	0.33	-	0.33	0.72	-	0.72	4.3	-	4.3
			花弁	0.94	0.96	0.95	2.8	2.9	2.9	6.3	6.2	6.3

* : 1連で分析を実施 <L0Q : 定量下限値 (ジノテフランおよびクロチアニジン ; 0.005 mg/kg, エトフェンプロックス ; 0.01 mg/kg) 未満 b : 農薬処理後開花

表 3. ドウダンツツジ分析結果（花全体）

試験区	処理後 日数(日)	開花始後 日数(日)	ジノテフラン(mg/kg)			クロチアニジン(mg/kg)			エトフェンプロックス(mg/kg)		
			分析値①	分析値②	平均値	分析値①	分析値②	平均値	分析値①	分析値②	平均値
無処理	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1	84	3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	81	0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	52	4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	48	0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
4	7	7	2.8	2.6	2.7	7.7	7.5	7.6	13	12	13
	4	4	7.6	7.5	7.5	21	20	21	31	30	31
	0	0	19	19	19	63	65	64	53	54	53

ND : 未検出 <LOQ : 定量下限値（ジノテフランおよびクロチアニジン ; 0.005 mg/kg, エトフェンプロックス ; 0.01 mg/kg）未満

表 4. ドウダンツツジ分析結果 (葉)

試験区	処理後 日数(日)	開花始後 日数(日)	ジノテフラン(mg/kg)			クロチアニジン(mg/kg)			エトフェンプロックス(mg/kg)		
			分析値①	分析値②	平均値	分析値①	分析値②	平均値	分析値①	分析値②	平均値
無処理	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1	88	7	0.0095	0.0084	0.0090	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	84	3	0.026	0.031	0.028	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	81	0	0.047	0.051	0.049	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	56	8	0.017	0.021	0.019	<LOQ	<LOQ	<LOQ	ND	ND	ND
	52	4	0.057	0.059	0.058	<LOQ	<LOQ	<LOQ	ND	ND	ND
	48	0	0.054	0.052	0.053	<LOQ	<LOQ	<LOQ	ND	ND	ND
3	21	6	0.030	0.030	0.030	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	18	3	0.029	0.026	0.028	0.0061	0.010	0.0081	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	15	0	0.093	0.095	0.094	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
4	7	7	3.8	3.7	3.7	1.2	1.2	1.2	30	30	30
	4	4	6.1	6.4	6.3	2.0	2.1	2.1	40	40	40
	0	0	61	61	61	91	95	93	100	97	98

ND : 未検出 <LOQ : 定量下限値 (ジノテフランおよびクロチアニジン ; 0.005 mg/kg, エトフェンプロックス ; 0.01 mg/kg) 未満

表 5. モモ分析結果（花全体）

試験区	処理後 日数(日)	開花始 後日数 (日)	ジノテフラン(mg/kg)			クロチアニジン(mg/kg)			エトフェンプロックス(mg/kg)		
			分析値①	分析値②	平均値	分析値①	分析値②	平均値	分析値①	分析値②	平均値
無処理	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
花芽 休眠期 処理	85	9	0.0076	0.0064	0.0070	0.0071	0.0062	0.0066	0.026	0.030	0.028
	79	3	0.0074	0.0079	0.0077	0.0063	0.0071	0.0067	0.031	0.029	0.030
	76	0	0.035	0.038	0.037	0.017	0.018	0.018	0.094	0.11	0.10
花芽 萌芽後 処理	28	8	0.023	0.020	0.022	0.024	0.020	0.022	0.13	0.11	0.12
	23	3	0.066	0.053	0.060	0.103	0.087	0.095	0.83	0.57	0.70
	20	0	0.089	0.089	0.089	0.077	0.076	0.076	0.39	0.40	0.40
開花始 処理	6	6	2.6	3.1	2.9	2.5	3.0	2.7	57	61	59
	3	3	13	12	13	15	14	15	227	240	234
	0	0	389	244	316	366	238	302	1047	1054	1051

ND : 未検出

別添 2.

分析方法概要、添加回収試験結果 および保存安定性試験結果

1. 前処理

抽出および精製処理の概要を図 1 に示す。

1.1. ツツジ

1.1.1. 花全体、花卉基部、花卉

磨砕均質化後の試料を 50 mL 容遠沈管に 3.0 g 量り取り、抽出溶媒（超純水：アセトニトリル（ACN）：1%酢酸 = 44:55:1）27 mL を添加後、1 分間振とうして懸濁溶液とした。これに内部標準溶液 50 μ L を添加し軽く攪拌した後、抽出塩（硫酸マグネシウム（MgSO₄）6 g および酢酸ナトリウム（NaOAc）1.5 g）を添加し、1 分間振とう後、3,000 rpm で 5 分間遠心分離した。上澄み液 1 mL を 2 mL 容遠沈管（精製塩（MgSO₄ 150 mg, エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル（PSA）50 mg およびオクタデシルシリル化シリカゲル（C₁₈）50 mg）を含む）に移し入れ、1 分間振とうした。これを 15,000 rpm で 10 分間遠心分離後、上澄み液を試験溶液とした。

1.1.2. 葯

磨砕均質化後の試料を 1.5 mL 容遠沈管に 0.10 g 量り取り、抽出溶媒（超純水：ACN：1%酢酸 = 44:55:1）900 μ L を添加後、1 分間振とうし、懸濁溶液とした。これに内部標準溶液 3 倍希釈液 5 μ L を添加し軽く攪拌した後、抽出塩（MgSO₄ 200 mg および NaOAc 50 mg）を添加し、1 分間振とう後、3,000 rpm で 5 分間遠心分離した。上澄み液 420 μ L を 1.5 mL 容遠沈管（精製塩（MgSO₄ 75 mg, PSA 25 mg および C₁₈ 25 mg）を含む）に移し入れ、1 分間振とうした。これを 15,000 rpm で 10 分間遠心分離後、上澄み液を試験溶液とした。

1.2. ドウダンツツジおよびモモ

磨砕均質化後の試料を 50 mL 容遠沈管に 3.0 g 量り取り、抽出溶媒（超純水：ACN：1%酢酸 = 44:55:1）27 mL を添加後、1 分間振とうし、懸濁溶液とした。これに内部標準溶液 50 μ L を添加し軽く攪拌した後、抽出塩（MgSO₄ 6 g および NaOAc 1.5 g）を添

加し、1 分間振とう後、3,000 rpm で 5 分間遠心分離した。上澄み液 12 mL を 15 mL 容遠沈管（精製塩（MgSO₄ 1200 mg, PSA 400 mg および C₁₈ 400 mg）を含む）に移し入れ、1 分間振とうした。これを 3,000 rpm で 5 分間遠心分離後、上澄み液 8 mL を 50 mL 容ナス型フラスコに採取し、40 °C 以下の水浴中で減圧濃縮後、窒素気流下で溶媒を留去、乾固した。残留物に ACN：トルエン（3:1）混液 2 mL を加え、ACN：トルエン（3:1）混液 20 mL であらかじめ洗浄した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, 6 mL）に負荷し、ACN：トルエン（3:1）混液 20 mL で溶出した。溶出液を 40 °C 以下の水浴中で減圧濃縮後、窒素気流下で溶媒を留去、乾固した。残留物を ACN 0.8 mL で溶解し、1.5 mL 容遠沈管に移し入れ、15,000 rpm で 5 分間遠心分離した。上澄みを ACN で 4 倍に希釈し、試験溶液とした。

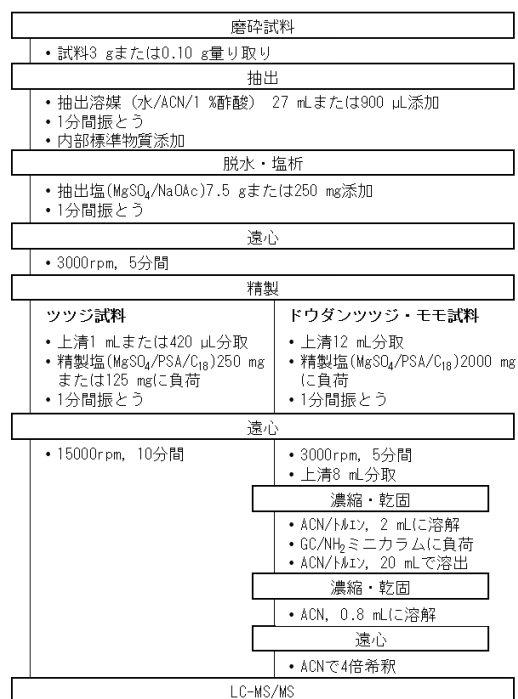


図 1. 試験溶液の調製

2. 測定装置および測定条件

LC-MS/MS（島津製作所，LCMS-8045）を用いて，Multiple Reaction Monitoring（MRM）（多重反応モニタリング）モードにより測定した．測定条件および測定イオンを表1から表4に示す．

表 1. 測定条件

装置	島津製作所製 LC-MS/MS(LCMS-8045)		
カラム	Waters 社製 Atlantis T3 (粒径 3.0 μ m, 内径 2.1 mm, 長さ 50 mm)		
流量	0.2 mL/min		
カラム温度	40 $^{\circ}$ C		
注入量	2 μ L		
移動相 A液	ツツジ試料	: 0.1 %ギ酸 + 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液	
	ドウダンツツジ, モモ試料	: 0.1 %ギ酸 + 10 mM ギ酸アンモニウム水溶液	
B液	ツツジ試料	: メタノール	
	ドウダンツツジ, モモ試料	: アセトニトリル	
イオン化法	エレクトロスプレーイオン化法 (ESI+)		

表 2. MS 温度条件

	ツツジ	ドウダンツツジ, モモ	
		クロチアニジン	ジノテフラン エトフェンブロックス
インターフェイス温度	200 $^{\circ}$ C	350 $^{\circ}$ C	150 $^{\circ}$ C
DL 温度	120 $^{\circ}$ C	250 $^{\circ}$ C	100 $^{\circ}$ C
ヒートブロック温度	250 $^{\circ}$ C	450 $^{\circ}$ C	200 $^{\circ}$ C

表 3. グラジエント条件

時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)
0	80	20
0.5	80	20
10	5	95
17.5	5	95
24	80	20

表 4. 測定イオン

	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)
ジノテフラン	203.00	129.10
クロチアニジン	249.85	169.10
エトフェンブロックス	394.30	177.20
クロチアニジン d3	253.10	172.10
エトフェンブロックス d5	400.30	183.20

3. 添加回収試験結果および保存安定性試験結果

添加回収試験の結果を表 5-1 から表 5-3 に示す。
各濃度に調製した混合標準溶液を無処理試料に添

加し、回収率および併行精度を求めた。

保存安定性試験の結果を表 6-1 から表 6-3 に示す。
各濃度に調製した混合標準溶液をツツジおよびド

表 5-1. ジノテフラン添加回収試験結果

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)	平均回収率 (%)	RSDr
ツツジ(花全体)	0.5	114 107 102 102 100	105	5.0
	0.05	102 103 105 105 103	104	1.2
	0.005	89 105 100 105 95	99	6.3
ドウダンツツジ(花全体)	0.5	73 72 79 78 72	75	0.5
	0.05	71 79 89 65 63	74	10
	0.005	72 69 75 72 69	71	2.2
ドウダンツツジ(葉)	0.5	88 93	90	2.5
	0.05	79 100	89	11
	0.005	108 124	116	7.0
モモ(花全体)	0.05	70 80	75	6.7
	0.005	85 93	89	4.5

表 5-2. クロチアニジン添加回収試験結果

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)	平均回収率 (%)	RSDr
ツツジ(花全体)	0.5	99 99 96 95 95	97	1.8
	0.05	98 97 101 100 96	98	1.9
	0.005	91 99 93 94 95	94	2.7
ドウダンツツジ(花全体)	0.5	97 95 93 91 82	96	1.1
	0.05	94 94 93 90 80	94	0.7
	0.005	99 90 89 86 76	94	4.4
ドウダンツツジ(葉)	0.5	108 108	108	0.0
	0.05	89 116	102	13
	0.005	86 169	127	33
モモ(花全体)	0.05	82 92	87	5.7
	0.005	93 98	95	2.6

表 5-3. エトフェンプロックス添加回収試験結果

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)	平均回収率 (%)	RSDr
ツツジ(花全体)	1.0	98 99 96 96 96	97	1.2
	0.10	91 92 95 95 93	93	1.7
	0.010	99 101 103 98 95	99	2.5
ドウダンツツジ(花全体)	1.0	94 91 90 88 80	89	1.3
	0.10	89 91 86 86 78	86	2.6
	0.010	80 75 75 72 63	73	3.5
ドウダンツツジ(葉)	1.0	90 93	91	1.6
	0.10	77 91	84	8.0
	0.010	93 130	111	16
モモ(花全体)	0.10	81 95	88	7.8
	0.010	83 80	81	2.2

ウダンツツジの花全体試料の無処理試料に添加し、
-80℃で一定期間冷凍保存した後、回収率を求めた。

表 6-1. ジノテフラン保存安定性試験結果

試料	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
ツツジ (花全体)	0.05	232	139 127	133
ドウダンツツジ (花全体)		160	78 73	76

表 6-2. クロチアニジン保存安定性試験結果

試料	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
ツツジ (花全体)	0.05	232	122 114	118
ドウダンツツジ (花全体)		160	92 84	88

表 6-3. エトフェンプロックス保存安定性試験結果

試料	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
ツツジ (花全体)	0.10	232	121 114	117
ドウダンツツジ (花全体)		160	89 84	86

除草剤の効果と処理後の散水による影響調査

村山和晃, 藤田智紀, 泉澤努, 工藤幹子, 佐々木千潮, 笹沼伸一郎

独)農林水産消費安全技術センター 農薬検査部

有効成分が雑草の茎葉から吸収されて効果を発現する除草剤は、対象となる雑草に散布液が一定時間以上留まることが必要である。近年は夏場に突然の降雨も頻発することから、除草剤使用後の降雨までの時間の違いがどの程度効果に影響を及ぼすかに関する知見は、除草剤の効率的な使用にも資すると考えられる。そのため、除草剤の効果と雨の関係に関する情報を得ることを目的に、除草剤処理後に降雨を想定した散水を行い、除草剤の効果にどの程度影響するのか調査を行った。その結果、除草剤処理1時間後の散水処理は除草剤の効果に影響はなかった。一方、除草剤処理5分後の散水処理は除草剤の効果に影響を与えた。また、降雨による除草剤の効果への影響には除草剤の有効成分の log Pow と植物種が関与していると考えられた。

Keywords: 除草剤, 降雨, 散水, クロタラリア, エンバク

緒言

有効成分が雑草の茎葉から吸収されて効果を発現する除草剤は、対象となる雑草に散布液が一定時間以上留まることが必要である。近年は夏場に突然の降雨も頻発することから、除草剤使用後の降雨までの時間の違いがどの程度効果に影響を及ぼすかに関する知見は、除草剤の効率的な使用にも資すると考えられる。そのため、除草剤の効果と雨の関係に関する情報を得ることを目的に、除草剤処理後に降雨を想定した散水を行い、除草剤の効果にどの程度影響するのか調査を行った。

材料および方法

1 供試材料

1.1 供試除草剤

2021年度はグルホシネートを含有する除草剤1種類を選定した。

2022年度は2021年度に供試したグルホシネートを含有する除草剤1剤に加えて、グリホサートカリウム塩を含有する除草剤1剤、グリホサートイソプロピルアミン塩を含有する除草剤1剤、アシラムを含有する除草剤1剤の合計4種類の除草剤を選定した。

供試除草剤は、降雨に関する注意事項が付されているものから選定した。なお、使用方法は農薬登録の範囲内で行った。散布器具はハンドスプレーを用いた。

1.2 供試植物

供試植物は、2021年度はクロタラリア (品種:ネコブキラー, タキイ種苗株式会社)を、2022年度は2回試験を行い、試験1ではクロタラリア (品種:ネコブキラー, タキイ種苗株式会社)を、試験2ではエンバク (品種:KSO-OT3, カネコ種苗株式会社)を用いた。

1.3 散水器具

降雨を再現するために、散水ノズル (TRCN-ST, 株式会社テクノコア)を用いた。株式会社テクノコアの人工降雨システム「レインカーテン」標準ノズルテストデータ (垂直下向き散水、高さによる影響)¹⁾を参考に、散水量および散水範囲を検討し、2021年度は2個を20cm間隔、高さ2mに、2022年度は3個を10cm間隔、高さ2mに設置した。

2 試験方法

試験場所は、東京都小平市に所在するFAMIC農薬検査部のビニールハウス (全体面積0.7a (5.4m×13m))を用いた。

2.1 2021年度試験

2021年度はビニールハウス1棟当たり、①除草剤処理後に散水処理をした区 (処理区)、②除草剤処理後に散水処理をしなかった区 (対照区)、③除草剤処理および散水処理をしなかった区 (無処理区)の3種類の試験区を設定した。1試験区の面積は0.25m² (0.5m×0.5m)とし、配置は図1のとおり各4反復とした。ビニールハウスは3棟使用し、ビニールハウス毎に、

除草剤処理後から散水处理までの時間を1,3,6時間とした。試験スケジュールは表1のとおりとした。

各試験区に除草剤を処理し、1,3,6時間後に処理区にのみ1時間散水处理をした。また、試験区内に升(68mm×68mm)を配置し、散水開始から30分間の散水量を計測した。除草剤処理約2週間後に供試植物の外観を肉眼観察した後、地際で刈取り、本数および生重量を測定した。処理区および対照区の残草量について、無処理区の生重量に対する処理区および対照区の生重量の比より算出した。また、刈り取った植物体は80℃で3日以上乾燥した後、乾燥重量を測定した。なお、乾燥重量の結果は参考とし、評価には用いなかった。

2.2 2022年度試験

2021年度の結果を踏まえて、2022年度は、処理から降雨までの時間がさらに短い場合の影響と、有効成分が異なる場合の影響、供試植物の違いによる影響について調査することとした。2022年度はビニールハウス1棟当たり、①除草剤処理後に散水处理をした区(処理区)、②除草剤処理後に散水处理をしなかった区(対照区)、③除草剤処理および散水处理をしなかった区(無処理区)の3種類の試験区を設定した。ビニールハウスは合計3棟を使用し、3反復とした。1試験区の面積は0.25m²(0.5m×0.5m)とし、配置は図2のとおりとした。試験スケジュールは表1のとおりとした。

各試験区に除草剤を処理し、5分後に処理区にのみ1時間散水处理をした。また、試験区内に升(68mm×68mm)を配置し、散水開始から30分間の散水量を計測した。除草剤処理約2週間後に供試植物の外観を肉眼観察した後、地際で刈取り、本数および生重量を測定した。処理区および対照区の残草量について、無処理区の生重量に対する処理区および対照区の生重量の比より算出した。さらに80℃で3日以上乾燥した後、乾燥重量を測定した。なお、乾燥重量の結果は参考とし、評価には用いなかった。

2.3 肉眼観察による供試植物の外観の評価

供試植物の外観の評価は除草剤の効果が強く発現している順に、①「完全枯死」(全て枯死した)、②「枯死」(一部の株が枯死した)、③「褐変」(枯死はしていないが、葉の一部が褐変した)、④「健全」(全て健全に生育した)の4段階で評価した。

2.4 残草量による除草効果の評価

除草剤の雑草に対する効果の評価は農薬(製剤)の薬効及び薬害の試験方法等に関する審査ガイダンス(以下、薬効・薬害ガイダンスという。)を参考にした。薬効・薬害ガイダンスにおいて、除草剤の雑草に対す

る効果は、無処理区に対して、①残草量が10%以下の場合、「十分な効果が認められる」、②10%を超えて20%以下の場合、「効果が認められる」、③20%を超えて40%以下の場合、「一定程度の効果が認められる」、④40%を超えている場合は、「効果は認められない」、の4段階で評価されている。²⁾

結果および考察

1 散水量

2021年度試験の散水量は、除草剤処理から散水处理までの時間が1,3,6時間としたビニールハウスの順に23.3,21.6,39.8mm/hだった。

2022年度試験の散水量は反復毎に試験1では21.6,32.5,29.0mm/h、試験2では25.7,20.4,31.0mm/hだった。

気象庁より雨の強さが示されており³⁾、今回の試験の散水量はいずれの年の試験も「強い雨」または「激しい雨」に相当することから、散水量は十分であったと考えられる。

2.1 2021年度試験の結果および考察

2021年度の試験結果を表2および図3に示す。除草剤処理約2週間後の外観は、除草剤処理1,3,6時間後において、全て「完全枯死」となり、処理区と対照区に差は認められなかった。

グルホシネートを含有する除草剤の処理区と対照区の生重量の残草量による除草効果を比較すると、除草剤処理から散水处理までの時間が1時間の処理区は12.1%、対照区は10.9%、3時間の処理区は7.4%、対照区は6.0%、6時間の処理区は9.2%、対照区は8.2%となり、処理区と対照区に差は認められなかった。

よって、除草剤処理1時間後の降雨は、グルホシネートを含有する除草剤のクロタラリアに対する効果に影響はなかったと考えられた。

2.2 2022年度試験の結果および考察

2022年度試験1の結果を表3、図4-1および図4-2に示す。除草剤処理約2週間後の外観は、除草剤処理5分後において、グルホシネートを含有する除草剤およびグリホサートイソプロピルアミン塩を含有する除草剤の処理区は「枯死」、対照区は「完全枯死」となり、グリホサートカリウム塩を含有する除草剤の処理区は「枯死」、対照区は「枯死～完全枯死」となり、処理区と対照区に差が認められた。一方、グリホサートカリウム塩を含有する除草剤は処理区、対照区ともに「枯死」となり、アシュラムを含有する除草剤は処理区、対照区ともに「褐変」となり、差は認められなかった。

各除草剤の処理区と対照区の生重量による除草効果を比較すると、グルホシネートを含む除草剤の処理区は17.4%、対照区は3.2%、グリホサートイソプロピルアミン塩を含む除草剤の処理区は12.6%、対照区は3.4%、グリホサートカリウム塩を含む除草剤の処理区は16.2%、対照区は8.3%となり、差が認められた。アシュラムを含む除草剤の処理区は51.6%、対照区は38.4%であった。対照区の効果の評価は、「一定程度の効果が認められる」、ではあるものの「効果が認められない」、となる水準である残草量40%に近い値となり除草剤の効果が十分に発揮されていなかった可能性が考えられた。この原因としては有効成分の効果が遅効性であり、処理後から効果を判定するまでの期間が約2週間では短かったと考えられる。このため、アシュラムを含む除草剤は今回の評価対象から除いた。

よって、除草剤処理5分後の降雨はグルホシネートを含む除草剤、グリホサートイソプロピルアミン塩を含む除草剤およびグリホサートカリウム塩を含む除草剤のクロタラリアに対する効果に影響を与えたと考えられた。

2022年度試験2の結果を表4、図5-1および図5-2に示す。除草剤処理約2週間後の外観は、除草剤処理5分後において、グルホシネートを含む除草剤、グリホサートイソプロピルアミン塩を含む除草剤およびグリホサートカリウム塩を含む除草剤の処理区は「枯死」、対照区は「完全枯死」となり処理区と対照区に差が認められた。一方、グリホサートカリウム塩を含む除草剤は処理区、対照区ともに「枯死」となり、アシュラムを含む除草剤は処理区、対照区ともに「褐変」となり、差は認められなかった。

各除草剤の処理区と対照区の生重量による除草効果を比較すると、グルホシネートを含む除草剤の処理区は49.1%、対照区は11.4%、グリホサートイソプロピルアミン塩を含む除草剤の処理区は41.2%、対照区は17.8%、グリホサートカリウム塩を含む除草剤の処理区は24.0%、対照区は17.0%となり、差が認められた。アシュラムを含む除草剤の処理区は84.3%、対照区は77.9%であった。対照区の効果の評価は「効果が認められない」となり除草剤の効果が十分に発揮されていなかった可能性が考えられる。この原因としては有効成分の効果発現が遅効的³⁾であり、処理後から効果を判定するまでの調査期間が約2週間では短かったと考えられる。このため、アシュラムを含む除草剤は今回の評価対象から除いた。

よって、除草剤処理5分後の降雨はグルホシネートを含む除草剤、グリホサートイソプロピルアミ

ン塩を含む除草剤およびグリホサートカリウム塩を含む除草剤のエンバクに対する効果に影響を与えたと考えられた。

各除草剤の処理区と対照区の除草効果の差は、表5のとおり、グルホシネートを含む除草剤、グリホサートイソプロピルアミン塩を含む除草剤およびグリホサートカリウム塩を含む除草剤の除草効果がクロタラリアを供試した2022年度試験1ではそれぞれ14.3、9.2、7.9%低下し、エンバクを供試した2022年度試験2ではそれぞれ37.7、23.4、7.0%低下した。また、有効成分が雑草の茎葉から吸収されて効果を発現する除草剤は、対象となる雑草に散布液が一定時間以上留まることが必要であり、降雨による影響の受けやすさは有効成分の水溶性が関与していることが予想されたため、各除草剤の有効成分のオクタノール/水分分配係数(log Pow)に着目して処理区と対照区の除草効果の差をみると、表5のとおり、供試植物に関わらず、有効成分のオクタノール/水分分配係数(log Pow)が小さい除草剤ほど除草効果が低下していることから、除草剤の有効成分のlog Powが降雨による除草効果への影響に関与していると考えられた。また、散水処理の除草効果への影響をクロタラリアとエンバクと比較すると、グルホシネートを含む除草剤およびグリホサートイソプロピルアミン塩を含む除草剤では、クロタラリアよりエンバクが散水によって除草効果が低下しており、このことから、植物種が降雨による除草剤の効果への影響に関与していると考えられた。

3. 結論

除草剤処理1時間後の散水処理は除草剤の効果に影響はなかったが、除草剤処理5分後の散水処理は除草剤の効果に影響を与えた。また、除草剤の有効成分のlog Powと植物種が除草剤の降雨による除草剤の効果への影響に関与していると考えられた。

引用文献

- 1) 農林水産省(2022): 農薬(製剤)の薬効及び薬害の試験方法等に関する審査ガイダンス(令和4年3月22日付け3消安第6700号農林水産省消費・安全局農産安全管理課長通知)
- 2) 気象庁: 雨の強さと降り方
https://www.jma.go.jp/jma/kishou/known/yougo_hp/amehyo.html (2023年9月7日アクセス)

3) 日本雑草学会：除草剤解説-Asulam アシュラム、
雑草研究 Vol.44(4), 412-413(1999).

テストデータ（垂直下向き散水、高さによる影響）
<http://www.technocore.jp/image/RCNZ-004.pdf>
(2023年10月16日アクセス)

4) 人工降雨システム「レインカーテン」標準ノズル

表1. 試験スケジュール

試験名	2021年度試験	2022年度試験1	2022年試験2
供試植物	クロタラリア	クロタラリア	エンバク
は種日	2021年10月6日	2022年5月25日	2022年10月19日
除草剤及び散水処理日	2021年10月29日	2022年6月17日	2022年11月17日
供試植物回収日 生重量測定日	2021年11月12日	2022年7月1日	2022年11月30日
乾燥重量測定日	2021年11月15日	2022年7月4日	2022年12月5日

表2. 2021年度試験の結果

除草剤処理から散水処理までの時間	試験区	反復	生重量 (g)	生重量			乾燥重量 (g)	乾燥重量			供試植物の外観	供試植物の残存本数 (本)
				平均 (g)	標準偏差	残草量 (%)		平均 (g)	標準偏差	残草量 (%)		
1時間	無処理区	1	200.8	234.4	87.4	-	21.2	23.3	7.3	-	健全	144
		2	164.3				17.5					92
		3	210.4				20.5					93
		4	362.1				33.9					152
	除草剤A処理区	1	31.3	28.4	2.3	12.1	13.2	11.6	1.3	49.8	完全枯死	250
		2	26.4				11.7					201
		3	26.8				11.6					198
		4	29.2				9.9					129
	除草剤A対照区	1	32.6	25.7	6.5	10.9	12.6	9.7	2.4	41.7	完全枯死	170
		2	16.9				7.1					107
		3	27.1				10.5					143
		4	26.0				8.6					118
3時間	無処理区	1	231.3	199.0	27.3	-	22.1	19.0	2.6	-	健全	122
		2	200.5				18.7					80
		3	164.5				15.8					84
		4	199.6				19.4					105
	除草剤A処理区	1	22.1	17.3	6.2	7.4	8.9	7.9	2.1	33.9	完全枯死	160
		2	14.9				7.7					126
		3	22.4				10					184
		4	9.6				5					86
	除草剤A対照区	1	15.7	14.2	2.5	6.0	7.9	7.1	0.9	30.5	完全枯死	136
		2	12.4				6.5					98
		3	16.8				7.9					109
		4	11.8				6.1					95
6時間	無処理区	1	211.5	272.7	45.7	-	23.5	28.8	3.9	-	健全	140
		2	304.7				30.8					160
		3	310.4				32.6					184
		4	264.2				28.3					162
	除草剤A処理区	1	23.3	21.6	3.8	9.2	11.1	10.4	1.6	44.5	完全枯死	223
		2	25.6				12					235
		3	20.6				10.1					172
		4	16.8				8.2					137
	除草剤A対照区	1	24.1	19.2	4.5	8.2	12.3	9.0	2.5	38.7	完全枯死	203
		2	15.3				6.9					99
		3	15.4				7.3					93
		4	22.0				9.5					146

除草剤A：グルホシネートを含有する除草剤

表3. 2022年度試験1の結果

試験区	反復	生重量 (g)	生重量			乾燥重量 (g)	乾燥重量			供試植物 の外観	供試植物の 残存本数 (本)
			平均 (g)	標準偏差	残草量 (%)		平均 (g)	標準偏差	残草量 (%)		
無処理区	1	239.6	341.4	102.8	—	44.1	61.6	19.0	—	健全	57
	2	339.4				58.9					81
	3	445.2				81.8					69
除草剤A 処理区	1	40.0	59.6	30.6	17.4	9.7	12.5	3.7	20.2	枯死	77
	2	94.8				16.7					82
	3	43.9				11					79
除草剤A 対照区	1	9.5	10.8	1.6	3.2	8.9	10.0	1.5	16.2	完全枯死	54
	2	12.6				11.7					86
	3	10.2				9.4					71
除草剤B 処理区	1	73.8	43.1	32.1	12.6	14	10.0	4.7	16.3	枯死	67
	2	45.9				11.2					87
	3	9.7				4.9					56
除草剤B 対照区	1	10.4	11.8	3.2	3.4	9.7	11.2	3.4	18.1	完全枯死	82
	2	15.4				15					80
	3	9.5				8.8					79
除草剤C 処理区	1	64.7	55.3	9.0	16.2	13.9	13.1	0.8	21.2	枯死	88
	2	46.7				12.4					76
	3	54.6				12.9					62
除草剤C 対照区	1	56.8	28.5	24.6	8.3	14.3	13.5	2.1	21.9	枯死～ 完全枯死	58
	2	16.6				15.1					92
	3	12.0				11.1					76
除草剤D 処理区	1	202.9	176.0	44.6	51.6	37.3	31.8	7.4	51.6	褐変	89
	2	200.6				34.7					77
	3	124.5				23.3					68
除草剤D 対照区	1	109.0	131.3	22.5	38.4	22.6	26.6	3.9	43.2	褐変	64
	2	154.0				30.3					74
	3	130.8				26.9					88

除草剤A: グルホシネートを含む除草剤

除草剤B: グリホサートイソプロピルアミン塩を含む除草剤

除草剤C: グリホサートカリウム塩を含む除草剤

除草剤D: アシラムを含む除草剤

表4. 2022年度試験2の結果

試験区	反復	生重量 (g)	生重量			乾燥重量 (g)	乾燥重量			供試植物 の外観	供試植物の 残存本数 (本)
			平均 (g)	標準偏差	残草量 (%)		平均 (g)	標準偏差	残草量 (%)		
無処理区	1	283.6	221.1	54.5	-	20.2	16.6	3.1	-	健全	99
	2	196.7				15					108
	3	183.1				14.6					101
除草剤A 処理区	1	112.4	108.6	53.2	49.1	10.3	9.8	3.8	59.2	枯死	112
	2	159.8				13.4					105
	3	53.6				5.8					100
除草剤A 対照区	1	32.3	25.1	7.0	11.4	7.9	7.3	0.6	44.0	完全枯死	117
	2	24.7				7.2					107
	3	18.4				6.8					105
除草剤B 処理区	1	65.1	91.1	27.6	41.2	10.3	10.5	1.1	63.1	枯死	106
	2	88.1				9.5					108
	3	120.0				11.6					115
除草剤B 対照区	1	52.7	39.4	15.9	17.8	10.7	9.1	2.3	54.6	完全枯死	102
	2	43.7				10.1					118
	3	21.7				6.4					98
除草剤C 処理区	1	64.0	53.1	9.8	24.0	11	9.7	1.2	58.2	枯死	112
	2	50.3				8.8					95
	3	44.9				9.2					101
除草剤C 対照区	1	55.2	37.6	15.8	17.0	11.5	9.2	2.0	55.6	完全枯死	102
	2	32.9				8.2					102
	3	24.7				8					99
除草剤D 処理区	1	216.5	186.4	29.3	84.3	17.6	15.5	1.9	93.2	健全	110
	2	184.7				14.5					115
	3	157.9				14.3					105
除草剤D 対照区	1	179.0	172.3	19.1	77.9	17.3	16.1	1.1	97.2	健全	101
	2	187.1				16					109
	3	150.7				15.1					112

除草剤A: グルホシネートを含む除草剤

除草剤B: グリホサートイソプロピルアミン塩を含む除草剤

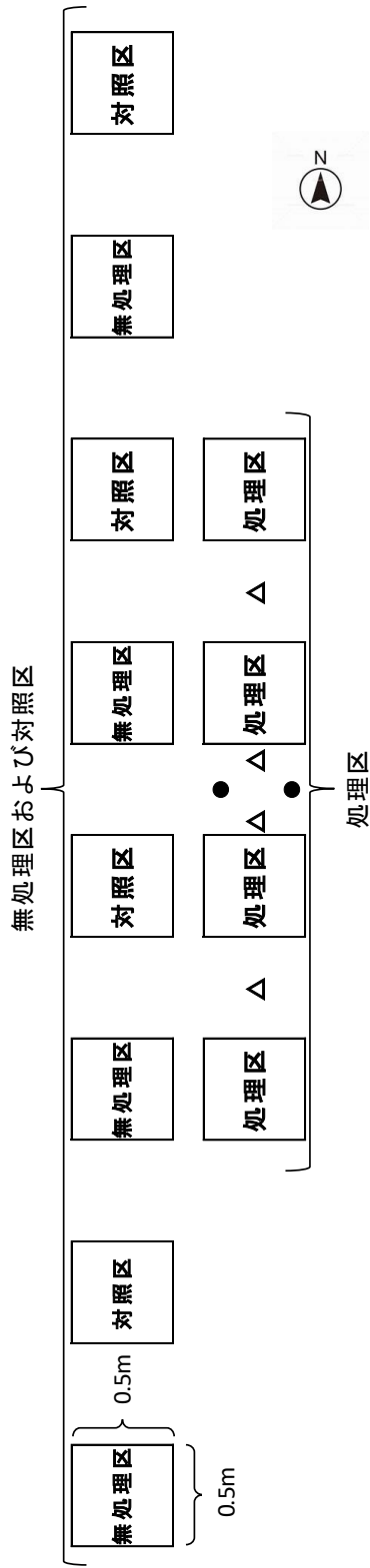
除草剤C: グリホサートカリウム塩を含む除草剤

除草剤D: アシュラムを含む除草剤

表5. 散水処理の残草量への影響

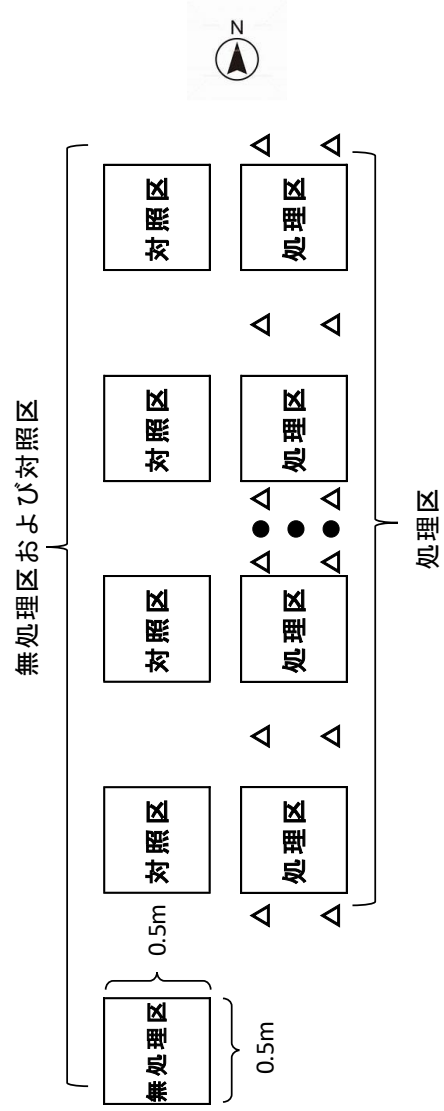
オクタノール/水分係数 (log Pow)は農薬抄録(農林水産消費安全技術センター)より抜粋

供試除草剤	有効成分名	生重量による残草量の処理区と対照区の差 (%)		オクタノール/水分係数 (log Pow)
		2022年度試験1	2022年度試験2	
除草剤A	グルホシネート	14.3	37.7	-4.01 (25 °C, pH7)
除草剤B	グリホサートイソプロピルアミン塩	9.2	23.4	-3.61 (25 °C)
除草剤C	グリホサートカリウム塩	7.9	7.0	≦ -1.3 (20 °C)



黒丸(●)は散水ノズルの位置、三角(△)は升の位置を示す

図1. 2021年度試験区配置図



黒丸(●)は散水ノズルの位置、三角(△)は升の位置を示す

図2. 2022年度試験区配置図

除草剤処理 1 時間後散水



処理区



対照区



無処理区

除草剤処理 3 時間後散水



処理区



対照区



無処理区

除草剤処理 6 時間後散水



処理区



対照区



無処理区

図 3. 2021 年度試験 処理後約 2 週間後の外観

※写真は反復のうち 1 つを抜粋した

無処理区



反復 1



反復 2



反復 3

除草剤 A 処理区



反復 1



反復 2



反復 3

除草剤 A 対照区



反復 1



反復 2



反復 3

除草剤 B 処理区



反復 1



反復 2



反復 3

除草剤 B 対照区



反復 1



反復 2



反復 3

図 4-1. 2022 年度試験 1 無処理区, 除草剤 A, 除草剤 B の処理後約 2 週間後の外観

除草剤 C 処理区



反復 1



反復 2



反復 3

除草剤 C 対照区



反復 1



反復 2



反復 3

除草剤 D 処理区



反復 1



反復 2



反復 3

除草剤 D 対照区



反復 1



反復 2



反復 3

図 4-2. 2022 年度試験 1 除草剤 C, 除草剤 D の処理後約 2 週間後の外観

無処理区



反復 1



反復 2



反復 3

除草剤 A 処理区



反復 1



反復 2



反復 3

除草剤 A 対照区



反復 1



反復 2



反復 3

除草剤 B 処理区



反復 1



反復 2



反復 3

除草剤 B 対照区



反復 1



反復 2



反復 3

図 5-1. 2022 年度試験 2 無処理区, 除草剤 A, 除草剤 B の処理後約 2 週間後の外観

除草剤 C 処理区



反復 1



反復 2



反復 3

除草剤 C 対照区



反復 1



反復 2



反復 3

除草剤 D 処理区



反復 1



反復 2



反復 3

除草剤 D 対照区



反復 1



反復 2



反復 3

図 5-2. 2022 年度試験 2 除草剤 C, 除草剤 D の処理後約 2 週間後の外観

植物代謝試験の作物グループに関する調査

伊藤和男, 新井奈津子, 元木 裕

独)農林水産消費安全技術センター 農薬検査部

農薬登録に必要な試験成績要求の現行通知(30 消安第 6278 号農林水産省消費・安全局長通知)において、植物代謝試験は旧通知(12 農産第 8147 号農林水産省農産園芸局長通知)とは実施すべき作物分類などで差異があり、既登録農薬については再評価や適用拡大申請においてデータギャップとみなされる可能性がある。このため、既登録農薬の植物代謝試験における供試作物及び代謝経路等を調査し、分類とは異なる作物の結果で評価可能かを検討した。その結果、特に浸透性または浸透移行性がない農薬の場合は、葉菜類の代謝の評価において、葉菜類以外の作物茎葉部の試験結果で評価できる可能性が示された。

Keywords : 30 消安第 6278 号, OECD Test No. 501, 植物代謝試験, 作物群, データギャップ

緒 言

現行通知(農薬の登録申請において提出すべき資料について(平成 31 年 3 月 29 日付け 30 消安第 6278 号農林水産省消費・安全局長通知))¹⁾において、植物代謝試験は基本的に経済協力開発機構(OECD)のテストガイドライン No. 501: Metabolism in Crops (以下「OECD TG501」という)²⁾に準じて実施することとなっている。旧通知(農薬の登録申請に係る試験成績について(12 農産第 8147 号農林水産省農産園芸局長通知))³⁾とは実施すべき作物分類などに差異(表 1 及び 2)があり、既登録農薬であっても再評価や適用拡大時では最新の試験要求が課せられるため、データギャップとみなされる可能性がある。

本研究では、主に植物代謝試験の作物分類に係る差異について、既登録農薬の植物代謝試験における供試作物及び代謝経路等を調査し、データ要求とは異なる作物の試験成績で評価が可能であるか、一般的に許容できる事項について検討を試みた。

表 1. 旧通知における作物分類

作物群	主な作物
稲	水稻
穀類及びさとうきび	小麦, 大麦, ライ麦, とうもろこし, そば, さとうきび, えんぱく, ソルガム
果実(かんきつ, うり類を除く。)	もも, びわ, キウイ, りんご, なし, かき, ネクタリン, あんず, おうとう, うめ, いちご, ぶどう, ぎんなん, くり, くるみ
かんきつ類	温州みかん, 大粒かんきつ類, 小粒かんきつ類
果菜(うり類を含む。)	ピーマン, おくら, ししとう, かぼちゃ, きゅうり, トマト, なす, すいか, メロン
葉または花を可食部とする植物	キャベツ, はくさい, 大根の葉, ブロッコリー, こまつな, えだまめ, さやえんどう, さやいんげん, 玉葱, にんにく, らっきょう, ホップ
根・茎を可食部とする植物	大根の根, にんじん, しょうが, ばれいしょ, かんしょ, さといも, てんさい
豆類・採油植物	大豆, 小豆, えんどう, そらまめ, なたね, ごま, べにばな
きのこ類	しいたけ, えのきたけ
茶樹	茶並びに果実(かんきつ, うり類を除く。)及びかんきつ類の植物群に該当する作物の葉

表 2. OECD TG501 における作物分類

作物群	主な作物
穀類／牧草類	穀類 牧草と飼料作物
果実類	かんきつ類, ナッツ類, 仁果類, 核果類, ベリー類, 小果実類, ぶどう, 果菜類, パナナ, かき
葉菜類	アブラナ科野菜類, 葉菜類, 茎野菜類, ホップ, たばこ
根菜類	根菜類, 塊茎類, 鱗茎類
豆類及び油糧種子	豆類, 豆類(種実), 油糧種子, ピーナッツ, マメ科牧草, カカオ豆, コーヒー豆
その他	上記以外は「その他」。

調査方法

国内に登録のある農薬有効成分のうち、植物代謝試験が複数の作物群で実施されているものを選定し(95 有効成分)、これらについて、農薬抄録及び食品安全委員会の評価書⁴⁾を用いて植物代謝試験成績の情報を収集し、有効成分毎に以下の項目を調査した。

調査項目：供試作物、使用方法、分析部位、試験結果、各作物における主要代謝経路

各作物における主要代謝経路から、有効成分毎に主要代謝経路が同等であるか判断を行った。ある作物において特有の主要代謝物(10%TRR 以上定量され、他作物では認められなかった代謝物)が生成されている場合、主要代謝経路は異なると判断した。

本調査の具体的な調査項目。

1. 葉菜類に係る代謝経路の調査

旧通知において葉菜類に属する作物は「葉または花を可食部とする植物」に分類され、具体的には旧通知に主な作物として記載のあった「キャベツ、はくさい、大根の葉、ブロッコリー、こまつな、えだまめ、さやえんどう、さやいんげん、玉葱、にんにく、らっきょう、ホップ」のいずれかで植物代謝試験が実施されていれば、葉菜類に属する作物の登録申請が可能であった。一方、OECD TG501 では葉菜類の申請にあたって、「アブラナ科野菜類、葉菜類、茎野菜類、ホップ、たばこ」のいずれかの作物

での試験実施を求めている。このため、「葉または花を可食部とする植物」に分類される作物のうち、根菜類、鱗茎類及び豆類に分類される「大根の葉、えだまめ、さやえんどう、さやいんげん、玉葱、にんにく、らっきょう」を供試した植物代謝試験成績については葉菜類の評価に用いることはできず、葉菜類の植物代謝試験成績の提出が必要となる。

これを踏まえ、葉菜類の植物代謝試験について、他作物の試験結果での評価の可能性を検討するため、有効成分を以下のとおり4つに分類し、各作物における主要代謝経路が同等であるか調査した。なお、農薬の使用方法が異なると代謝経路も異なる可能性があることから、有効成分毎に同一の使用方法で実施された植物代謝試験を比較した。

(1)「葉または花を可食部とする植物」(※1)と「葉菜類」(OECD TG501 における分類)の代謝経路が比較可能な有効成分

(2)「葉または花を可食部とする植物」と「葉菜類」以外の作物茎葉部の代謝経路が比較可能な有効成分

(3)「葉菜類」と「葉または花を可食部とする植物」以外の作物茎葉部の代謝経路が比較可能な有効成分

(4)「葉菜類」及び「葉または花を可食部とする植物」以外の作物茎葉部の代謝経路が比較可能な有効成分

※1：旧通知における「葉または花を可食部とする植物」に該当し、OECD TG501 で葉菜類に属さない作物(すなわち、大根の葉、えだまめ(えだまめの試験数が少ないため、だいたひも含めて調査した)、さやえんどう、さやいんげん、玉葱、にんにく、らっきょう)

2. 茶とその他の作物の葉部における代謝経路の比較

茶は旧通知においては「茶樹」(※2)に分類されていたが、OECD TG501 においては「その他」に分類され、いずれの作物群にも属さない。OECD TG501 では植物代謝試験が3作物群で実施されており、主要代謝経路が同等と見なせる場合には追加の試験は不要となる。このため、茶の申請にあたって提出された植物代謝試験成績が2作物群以下の場合には茶の植物代謝試験成績の提出が必要となる。

茶の植物代謝試験について、その他の作物の葉部の試験結果による読み替えの可能性を検討するため、茶の植物代謝試験が実施されており、その他の作物の葉部における代謝経路が比較可能な有効成分については、茶とその他の作物の葉部における主要代謝経路が同等であるか調査した。

※2：茶並びに果実（かんきつ，うり類を除く.）及びかんきつ類の植物群に該当する作物の葉

3. 稲とその他の穀類における代謝経路の比較

稲は旧通知においては「稲」、OECD TG501においては「穀類／牧草類」に分類される。日本で稲を申請する場合、現在も水稻の植物代謝試験成績の提出が必須である。これは、水稻は湛水条件下で栽培するため、麦類等のその他の穀類や牧草類の申請で、水稻の植物代謝試験成績で評価するのは適切ではないからである、このため、湛水条件下ではない畑地で栽培された作物で実施された植物代謝試験成績の提出が必要となる。

このため、水稻及びその他の穀類の植物代謝試験が実施されており、栽培条件が湛水条件であるか否かによる代謝経路が比較可能な有効成分について、主要代謝経路が同等であるか調査した。

4. 農薬の浸透移行性および浸達性の有無

植物代謝試験の結果、被験物質の処理部位（例えば葉部）から他の作物部位（例えば果実）へ放射能の移行が確認された場合、浸透移行性はありと判断した。浸達性の有無の判断にあたっては、植物代謝試験の結果から、処理した被験物質の多くが処理部位の表面洗浄液から回収された場合、浸達性はなしと判断した。

調査結果及び考察

1. 葉菜類に係る代謝経路の調査

調査した農薬について、調査方法で示した分類を行い、各分類に該当する有効成分数及び各作物における主要代謝経路が同等であると判断した有効成分数は表3のとおりであった。各分類とも7割以上の有効成分について、主要代謝経路は同等であることが明らかとなった。このため、葉菜類の植物代謝試験については、旧通知の「葉または花を可食部とする植物」または葉菜類以外の作物茎葉部の植物代謝試験が実施されている場合、当該試験成績により代替できる可能性が示された。

各作物における主要代謝経路が異なると判断した16有効成分（表3の79成分以外）の中で、使用方法が「散布」で行われた試験を対象にして解析すると、全体的に浸達性（葉面から葉の内部への移行）または浸透移行性（葉部から根部や果実等他の部位への移行）を有する有効成分において主要代謝経路が異なる傾向が明らかとなった。

表3. 葉菜類の調査を行った各分類の有効成分数

分類	有効成分数*
(1)	11 (9)
(2)	10 (7)
(3)	48 (42)
(4)	26 (21)
計	95 (79)

*括弧書きは主要代謝経路が同等であると判断した有効成分数（内数）

2. 茶とその他の作物の葉部における代謝経路の比較

調査した農薬のうち4有効成分について、茶とその他の作物の葉部における主要代謝経路の比較が可能であった。4有効成分とも茶とその他の作物の葉部における主要代謝経路は同等であった。調査例数が少なく、今後も調査を継続していく必要があるが、茶の植物代謝試験についてはその他の作物の茎葉部の試験結果で代替できる可能性が示された。

3. 稲とその他の穀類における代謝経路の比較

調査した農薬のうち4有効成分について、水稻とその他の穀類における主要代謝経路の比較が可能であった。4有効成分とも水稻とその他の穀類における主要代謝経路は同等であった。調査例数が少なく、今後も調査を継続していく必要があるが、穀類の植物代謝試験については水稻の試験結果で代替できる可能性が示された。

おわりに

旧通知と同様に、OECD TG501においても3作物群の主要代謝経路が同等の場合、追加の植物代謝試験は不要となる。しかし、OECD TG501は

旧通知と作物分類が異なるため、通知改正の結果として OECD TG501 の要求を満たさなくなった有効成分が存在する。このため、適用拡大申請や再評価においてデータギャップと判断される可能性もある。通知の要求を満たすかどうかの判断は提出されている植物代謝試験成績、適用の範囲、有効成分の特性等から総合的に行われる必要がある。

本調査では、主に「葉菜類」、「茶」及び「穀類」の植物代謝試験を対象として他作物の試験結果による評価の可能性について調査を行った。その結果、「茶」及び「穀類」については調査例数が少なく今後も調査を継続する必要があるが、いずれの作物も他作物の試験結果で評価できる可能性が示された。特に浸達性または浸透移行性がない農薬の場合は、葉菜類の代謝の評価において、葉菜類以外の作物茎葉部の試験結果で評価可能と考えられた。本調査で得られた知見は植物代謝試験のデータギャップを判断する上での一助となることが期待される。

引用文献

- 1) 農薬の登録申請において提出すべき資料について（平成 31 年 3 月 29 日付け 30 消安第 6278 号農林水産省消費・安全局長通知）
- 2) OECD (2007). Test No. 501: Metabolism in Crops.
- 3) 農薬の登録申請に係る試験成績について（12 農産第 8147 号農林水産省農産園芸局長通知）
- 4) 食品安全委員会：評価書，https://www.fsc.go.jp/fsciis/evaluationDocument/search?kya=on&Exact=true&_Exact=on&Fuzzy=true&_Fuzzy=on&Logic=AND&Type=all&pagesize=100&itemCategoryId=001（2023 年 9 月 13 日閲覧）

農薬の後作物残留における新たな評価法に係る調査

鈴木万智*, 元木 裕*, 加藤貴央*, 岩船 敬*

* 独)農林水産消費安全技術センター 農薬検査部

農薬の後作物残留の新たな評価法の導入に向けて、後作物残留に係る国内外の知見を整理した。新評価法の参考となる海外の評価スキームに関する情報を収集した結果、欧米では第1段階として後作物代謝試験を要求し、その結果に応じて第2段階の後作物残留試験を要求するスキームとなっていた。また、国内の知見を整理した結果、有機炭素含量が少ない土壤中で生育速度が速い葉菜類を栽培した場合に後作物残留が起りやすいことが明らかになった。一方、有効成分投下量、土壤中半減期、土壤吸着定数、オクタノール/水分分配係数等の個別の要因では農薬の後作物残留性を正確に評価できないことが示された。移行係数を用いた後作物残留濃度の推定法を構築し、検証を行った結果、一定の推定精度が得られたことから、現在の後作物残留試験の要求トリガーである土壤中半減期に代わって本推定手法が活用できる可能性が示された。

Keywords : 農薬, 後作物残留性, リスク評価, 簡易推定法

緒 言

平成18年5月からポジティブリスト制度が施行され、基準値がない作物と農薬の組み合わせには一律基準(0.01 ppm)が適用されるようになった。これまでに国産農作物について一律基準を超過するいくつかの事例があったが、その中には、作物の栽培に使用された農薬が土壤へ残留し、その後に作付けされた作物(以下「後作物」という)が土壤残留農薬によって汚染された事例も確認された¹⁾。

農薬の後作物への残留は、土壤に残留した農薬を後作物が取り込むことによって引き起こされる。このため、農薬の後作物への残留による人への影響について評価を行う目的で、我が国では農薬の登録審査において、土壤残留試験成績(以下「土残試験」という)及び後作物残留試験成績等の提出を求めている。現行の後作物残留に係る登録審査においては、農薬の土壤中での減衰速度、すなわち土壤中半減期(以下「DT₅₀」という)に着目し、DT₅₀が100日を超えない場合は後作物残留試験成績の提出を不要としている。しかし、DT₅₀が短い場合においても、農薬の土壤への投下量が多ければ土壤中に残留する農薬量は増加する。また土壤中農薬の残留量が同じ場合であっても、土壤から作物への農薬の移行量は土壤の種類によって異なる。一般に農薬の吸着が弱い土壤ほど、作物が吸収可能な農薬(以下「可給態農薬」という)の量は多く、後作物へ移行する農薬量も増大する²⁾。また、植物による有機化学物質の取り込みと茎葉部への移行性は、化学物質の親水性および疎水性によって影響を受けることが報告されており、Briggs ら³⁾および Dettenmier ら⁴⁾の研究において、

疎水性が高い、すなわちオクタノール/水分分配係数(以下「log P_{ow}」という)が4以上の化学物質の場合には水耕液から茎葉部への移行性は大きく低下することが示されている。さらに、化学物質が植物体内に取り込まれた後は代謝分解されるが、代謝分解のし易さは化学物質の構造や作物の代謝能力に大きく依存する⁵⁾。

このように、農薬の後作物における残留量は土壤、作物および農薬の種類によって大きく異なることが想定されことから、作物における残留性を正確に評価するためには、農薬の有効成分投下量、土壤中での減衰、土壤から作物への移行性および作物体内における代謝分解等の様々な要因を複合的に考慮する必要がある。

本調査では農薬の後作物残留に係る新たな評価法の導入に向けて、後作物残留に係る国内外の知見を整理した。海外の知見については、新評価法の参考となる評価スキームに関する情報を収集した。また、我が国では、後作物残留に係る調査事業が過去10年近くに渡って実施されている⁶⁻¹⁶⁾。当該データを取りまとめることにより、後作物残留が起りやすい条件を整理するとともに、DT₅₀に代わる新たな後作物残留試験の要求トリガーを検討した。

1 諸外国における後作物残留リスク評価制度の概要

目 的

現在、農薬登録制度の国際基準との調和が求められており、我が国の後作物残留リスク評価制度においても、国際的な動向を踏まえながら見直しを進めることが重要である。そこで、諸外国にお

ける後作物残留リスク評価制度を調査し、我が国における制度との比較整理を行った。

材料および方法

経済開発協力機構（以下「OECD」という）、欧州連合および米国の法令およびガイダンス文書を調査し、それぞれ概要を整理した。

欧州連合については、現行の制度に基づいて評価された農薬の評価書を調査し、試験要求の実態についても確認を行った。評価書は2016-2018年に発行された化学農薬の評価書を対象とし、EFSA Journal¹⁷⁾で公表されているものを利用して調査した。

結果および考察

1.1 OECD

OECDでは、後作物残留に関するテストガイドライン（Test guideline; 以下「TG」という）として、後作物代謝試験（TG502）¹⁸⁾および後作物残留試験（TG504）¹⁹⁾が策定されており、後作物残留リスク

評価の考え方を整理したガイダンス文書（Guidance document; 以下「GD」という）としてGD No.64²⁰⁾およびGD No.279²¹⁾が公開されている。

OECDにおける後作物残留リスク評価制度の概要として、米国の要求要件をベースに作成されたGD No.64における評価スキームを図1に示す。後作物作付けの可能性がある場合には、第1段階として後作物代謝試験が要求される。後作物代謝試験の結果、全放射性残留量（TRR）が0.01 mg/kg以上であり、リスク評価を要する残留物質が認められた場合、第2段階として圃場における後作物残留試験が要求される。第2段階の後作物残留試験の結果、残留物質が0.01 mg/kg以上であり、各加盟国の規制当局よりMaximum Residue Limits（以下「MRL」という）の設定を要求された場合、第3段階としてMRL設定を目的とした後作物残留試験が要求される。第3段階では、表1に示す12区分のサブ作物グループから各1種類以上の供試作物を選択し、各作物について4または8の試験例数が必要となる。

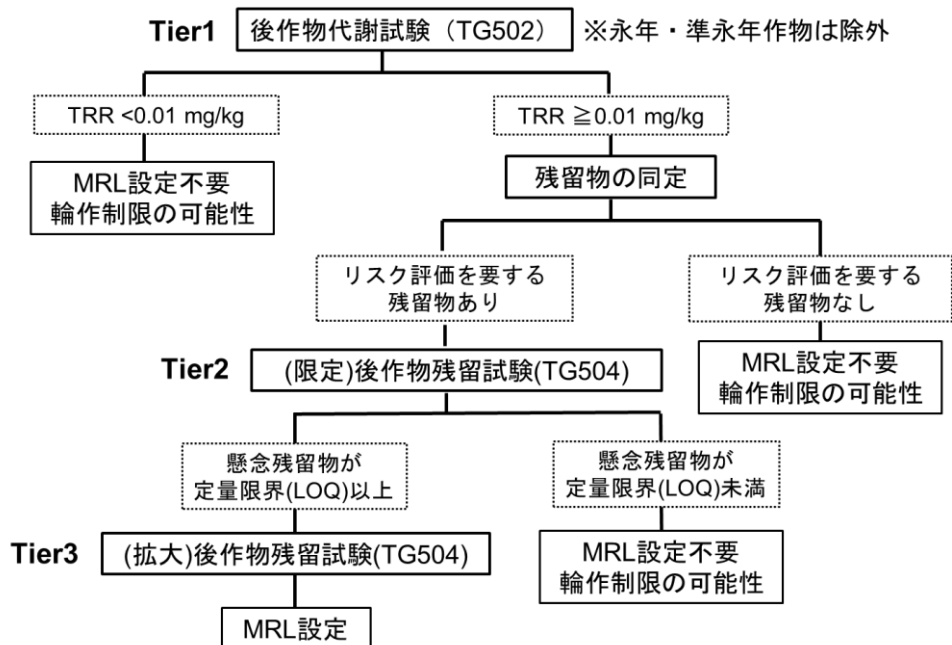


図 1. OECD GD No.64 (2009) における評価スキーム

MRL の設定要件は OECD 加盟国間において一様ではなく、GD No.279 においても、MRL を設定する代わりに Plant Back Interval（後作物作付け禁止期間、以下「PBI」という）などのラベル表示による使用制限を行うことで、圃場での後作物残留試験を免除する方法も示されている。

後作物残留に係る TG の概要を表 2 に示す。TG502 では標識化合物を用いて土壌から植物体内への吸収移行と主要代謝経路を確認することが目的となる。供試土壌は砂壤土を用いて作期最大施用量を処理し、場面に応じたエージング期間後に、

葉菜類、根菜類および穀類の 3 種類からそれぞれ代表作物を作付けし、収穫期まで試験を実施する。PBI は 3 パターンの中から適宜設定することとされている。最短のパターンは 7-30 日間であり、これは生育不良等により作付けし直しとなる事態も想定したものである。典型的なパターンでは 60-270 日間、隔年輪作を想定した長期のパターンでは 270-360 日間となっている。TG504 の試験条件は概ね TG502 と同様であり、異なる点は被験物質および試験場所である。

表 1. OECD GD No.279 (2018) における作物グループ (Tier3)

スーパー作物グループ	サブ作物グループ	試験例数
根菜類	ニンジン, ラディッシュ, サトウダイコン, その他のビート	4
	ジャガイモ (オプション)	4
球根, 茎野菜	ニラ, セロリ	4
穀類	小麦, 大麦 (小粒穀物: 小麦, 大麦, ライコムギ, オートムギ, ライムギ)	8
	トウモロコシ (トウモロコシと他の穀類, サトウキビ)	8
葉菜類, アブラナ科	レタス, ホウレンソウ (アブラナ科を除く葉菜類, ハーブ, スパイスの葉部, 花部)	4
	キャベツ, ケール (結球アブラナ科, 非結球アブラナ科, アブラナ科飼料作物)	4
	ブロッコリー, カリフラワー (花蕾を食用とするアブラナ科)	4
油糧種子, 豆類	菜種, 大豆 (油糧種子, 未成熟大豆, 乾燥大豆)	8
	乾燥豆, 乾燥エンドウ豆 (マメ科野菜 (未成熟大豆を除く), 豆類 (乾燥大豆を除く))	4
果物, 果菜類	イチゴ	4
	キュウリ (果菜類, 小型品種: 果菜類, 果物, 種子, ハーブ, スパイスの果実)	4
合計		60

表 2. OECD TG における試験条件

	TG502 後作物代謝試験	TG504 後作物残留試験
被験物質	標識化合物	製剤
試験場所	ポット又は圃場	異なる地域の2圃場
供試土壌	砂壤土 (ラベル指定がない場合)	
施用方法	作期最大量を前作物又は土壌に処理	
供試作物	3種 (根菜類, 葉菜類, 穀類)	
採取部位	RACs (農産物 (食用・飼料部位))	
植付間隔 (PBI)	3パターン (7-30, 60-270, 270-365日)	

1.2 米国

米国における農薬規制制度を規定する法律は「米国連邦殺虫剤殺菌剤殺鼠剤法（The Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act: FIFRA）」であり、農薬の評価に係る試験要求の条件および TG が Code of Federal Regulation（CFR）²²⁾に規定されている。米国における後作物残留リスク評価に係る法令およびテストガイドライン^{23,24)}の概要

を図 2 に示す。米国を参考に OECD の TG および GD が作成された経緯もあり、米国と OECD の評価スキームは概ね同様である。ただし、OECD 加盟国のほとんどの国では主要作物と後作物で共通の MRL を設定しているのに対し、米国では主要作物とは別に後作物用の MRL を設定している。

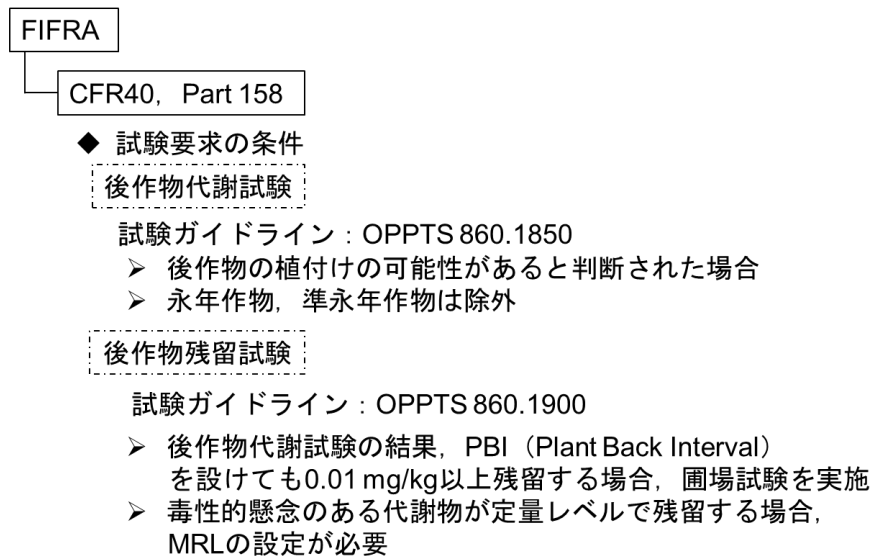


図 2. 米国における後作物残留リスク評価に係る法令の概要

1.3 欧州連合

欧州連合における農薬登録に係る制度は 2009 年に「植物防疫剤の販売ならびに理事会指令 79/117EEC および 91/414EEC の廃止に関する欧州議会および理事会規則（EC）No 1107/2009」²⁵⁾（以下「規則 1107/2009」という）において改正されている。改正前は「植物防疫剤の販売に関する理事会指令 91/414/EEC, Annex II part A, Appendix C」²⁶⁾（以下「旧ガイドライン」という）において後作物残留試験の試験要求の条件および評価スキームが示されていた。その概要を図 3 に示す。旧ガイドラインでは、OECD や米国のように原則的に後作物代謝試験を要求するのではなく、土壌残留性試験より求めた 90%消失期間（以下「DT₉₀」という）、土壌中推定残留量および作物中推定残留量のパラメータが段階的に要求トリガーとして利用されており、後作物代謝試験の要否において農薬の土壌残留性および植物への移行性が考慮されている。

制度改正後の欧州連合における後作物残留リスク評価に係る法令概要を図 4 に示す。試験要求の条件および TG の一覧は規則 1107/2009 の下位法令により定められている。現行では、旧ガイドラインと置き換わるようなガイドラインは欧州委員会では定められておらず、OECD の TG および GD に準ずる形になっている。

欧州連合の現行制度に基づいて評価された農薬の評価書について、後作物代謝試験の実施の要否を調査した結果を表 3 に示す。調査した全 67 剤のうち 9 剤で後作物代謝試験の実施が不要とされていた。そのうち 4 剤は、室内試験および圃場試験における DT₉₀ が 100 日未満であることについて後作物代謝試験を実施不要とする根拠としていた。このことから、欧州連合では後作物代謝試験の要求トリガーとして、図 3 に示す旧ガイドラインが運用として用いられていることが推測された。

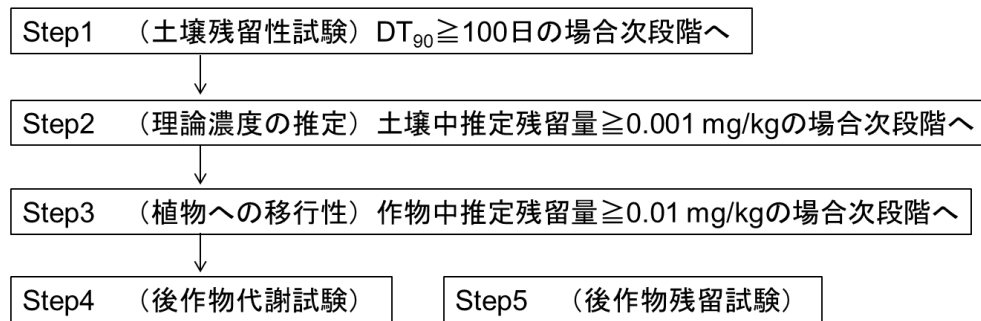


図 3. 欧州連合の旧ガイドラインにおける評価スキーム

表 3. 欧州連合の評価書（2016-2018）における後作物代謝試験の実施状況

要否	不要とする根拠	剤数
要	—	58 剤**
不要	DT ₉₀ < 100日*	4 剤
	永年作物, 使用方法	5 剤

*室内試験（好氣的土壌, 嫌氣的土壌）及びほ場試験の結果が対象.

**代謝物のみ要とされた2剤を含む.

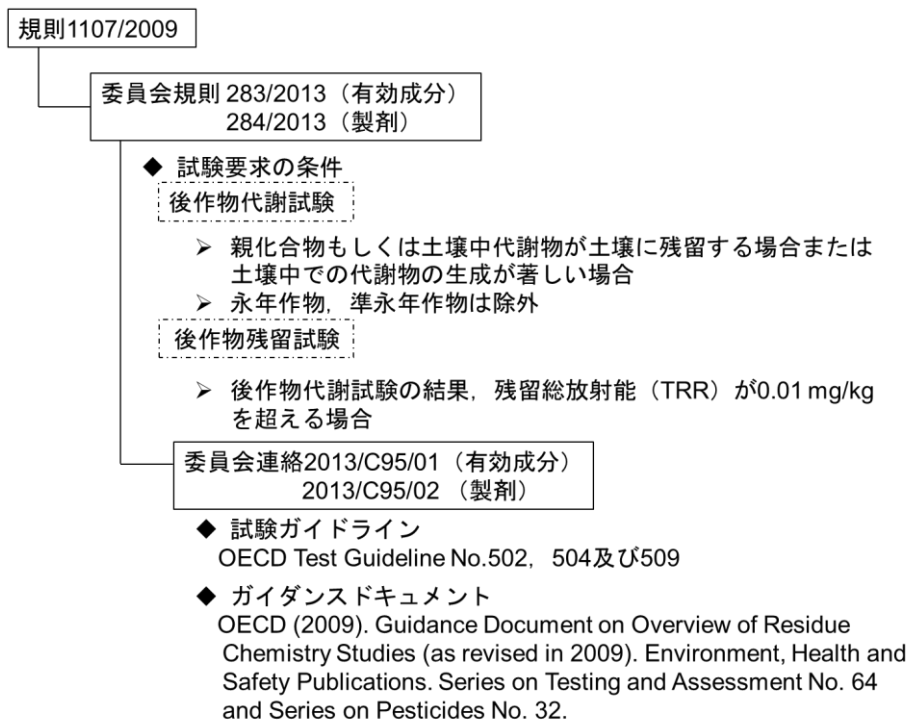


図 4. 欧州連合における現行の後作物残留リスク評価に係る法令概要

1.4 諸外国と我が国の後作物残留リスク評価制度の比較

諸外国および日本の後作物残留リスク評価制度を比較した結果を表4に示す。日本では後作物残留試験の要求トリガーとして、農薬のDT₅₀を用いており、農薬の土壌残留性に基づいてスクリーニングしている点は欧州連合と共通している。日本で要求されている後作物残留に係る試験成績は、圃場における後作物残留試験のみであり、試験結

果は後作物における農薬の残留量が基準値を超過しないことを確認するために使用される。これに対し欧米では、第1段階として後作物代謝試験を要求し、その結果に応じて第2段階の圃場における後作物残留試験の要否が判断される。また、欧米では後作物残留評価のスキームの中にPBI設定またはMRL設定といったリスク管理が設けられているが、日本においてはこれらのリスク管理が設けられていない。

表4. 欧米および日本の後作物残留リスクの評価法の比較

		日本	欧州連合	米国
根拠規定		30消安6278号	委員会規則 283/2013, 284/2013	CFR40, 158.290
除外要件		永年, 準永年作物 DT ₅₀ <100日	永年, 準永年作物 DT ₉₀ <100日* 土壌中推定残留量<0.001 ppm* 作物中推定残留量<0.01 ppm*	永年, 準永年作物 -
要求試験	後作物代謝	×	○	○
	後作物残留	○	○	○
リスク管理	ラベル制限 (PBI, 植付作物)	×	○	○
	MRL設定	×	△**	○

*評価書の調査結果より、運用として用いられていることが推測される。

**欧州連合ではMRL設定に係る条項はなく、加盟国ごとに要件が異なる。

2 日本国内の後作物残留関連調査事業の知見の整理 —後作物残留に影響を及ぼす要因の解析—

目的

DT₅₀に代わる新たな後作物残留試験の要求トリガーの検討等に資するため、日本国内の後作物残留関連調査事業等で得られた知見を整理するとともに、得られた知見と後作物残留に影響を及ぼす要因の関係について調査を行った。

材料および方法

2.1 日本国内の後作物残留関連調査事業で得られた知見の整理および本知見と後作物残留に影響を及ぼす要因との関係に関する解析

環境省において実施された農薬残留対策総合調査⁶⁾(以下「環境省事業」という)および農林水産省において実施された農薬の後作物残留調査事業⁷⁾⁶⁾(以下「農水省事業」という)を対象とし、過年度の調査結果を整理した。これらの事業の調査概要を表5に示す。

土壌中濃度と後作物中濃度がそろっているデータを採用することとし、環境省事業では1156例、農水省事業では638例を解析した。下記(1)式により、後作物から0.01 ppm以上の濃度で農薬が検出された試験数を全試験数で除することで検出率を求めた(以下「検出率」という)。この検出率と農薬の後作物残留へ影響を及ぼす各種要因(農薬種、作物種、有効成分投下量、DT₅₀、土壌吸着定数(以下「K_{oc}」という)、log P_{ow}、PBI等)との関係について解析した。

検出率(%)

$$= \frac{\text{後作物から0.01 ppm以上の農薬が検出された試験数}}{\text{全試験数(カテゴリ別)}} \quad (1)$$

表 5. 各事業の調査概要

	環境省農薬残留対策総合調査	農林水産省農薬の後作物残留調査事業
試験実施機関	各都道府県の農業試験場 ^{a)}	一般社団法人日本植物防疫協会研究所 ^{b)}
調査実施年度	平成18-29年度	平成21-26および29年度
供試農薬の選定	土壌への混入もしくは落下が確実に見込まれる農薬またはオクタノール/水分配係数に基づいて環境省が作成した農薬リストから選定	農薬の土壌残留性および物理化学性を考慮して選定
調査圃場の土壌分類	黒ボク土, 灰色低地土, 黄色土等	黒ボク土および砂丘未熟土 ^{c)}
試験を設計する上で考慮された要因	有効成分投下量, PBI ^{d)} , 作物種等	

a) 各年度, 15前後の農業試験場の圃場で実施.

b) 牛久圃場および宮崎圃場で実施.

c) 黒ボク土: 牛久圃場, 砂丘未熟土: 宮崎圃場.

d) PBI: Plant back interval (農薬の最終散布から後作物の作付けまでの期間).

2.2 作物の収穫から後作物の作付けまでの期間および茎葉散布した農薬の土壌への落下率に関する調査事業で得られた知見の整理

平成 27 年度の農水省事業¹³⁾において実施された作物の収穫から後作物の作付けまでの期間に関する JA へのアンケート調査の結果を用いて, 農薬が残留しやすい葉菜類を後作物として栽培する場合の作付け期間をとりまとめた.

平成 28 年度の農水省事業¹⁴⁾において実施された散布農薬の土壌落下率に関する調査の結果を用いて, コマツナおよびキュウリに散布した農薬の土壌落下率をとりまとめた.

結果および考察

2.1 日本国内の後作物残留関連調査事業で得られた知見の整理および本知見と後作物残留に影響を及ぼす要因との関係に関する解析

2.1.1 農薬の違い

環境省事業⁶⁾および農水省事業^{7-12,15,16)}の結果を用いて算出した農薬種別の検出率を表 6 に示す. 農薬種別の検出率と各種変動要因 (農薬の有効成分投下量, DT_{50} , $\log P_{ow}$, $\log K_{oc}$ の相関を確認した結果 (図 5), 現在の後作物残留試験の要求トリガーである DT_{50} との間に有意な相関は見られなかった. 一方, 検出率と $\log P_{ow}$ および $\log K_{oc}$ との間で有意な相関 ($p < 0.01$) が確認されたが, いずれも弱い相関 ($R^2 < 0.4$) であり, 個別のみ要因では後作物残留性を評価できないことが示された.

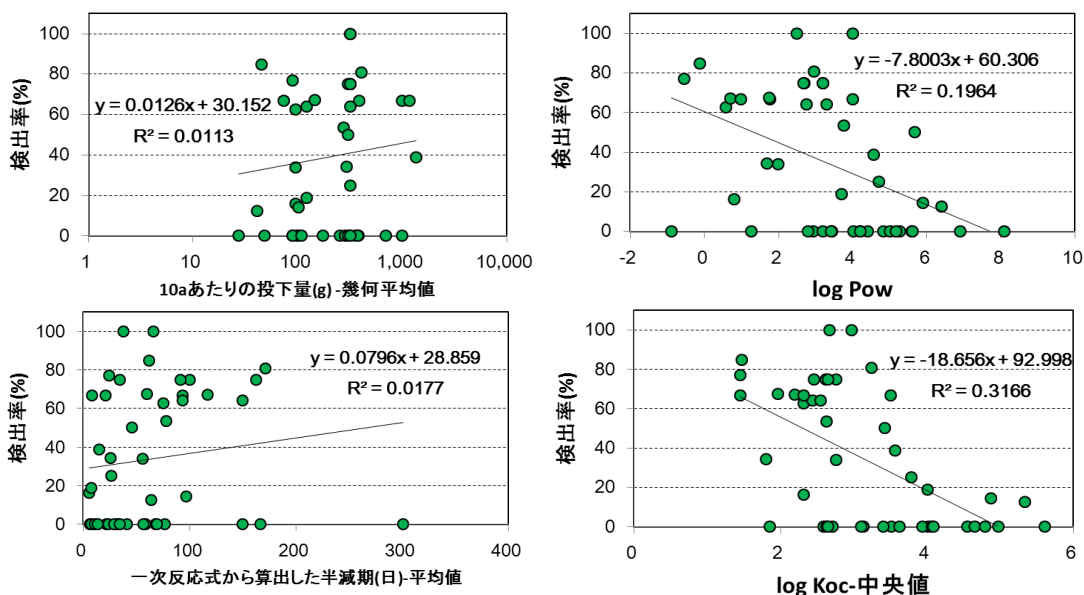


図 5. 農薬種別の検出率と各種変動要因の相関

左上: 有効成分投下量, 右上: オクタノール/水分配係数 ($\log P_{ow}$)

左下: 土壌中半減期, 右下: 土壌吸着定数 ($\log K_{oc}$)

表 6. 農薬種別の検出率 (%)

農薬名	環境省事業		農水省事業	
	試験数*1	検出率	試験数*2	検出率
BPMC	1	0.0		
TPN	8	0.0		
アセタミプリド	161	16.1		
アセフェート	7	0.0		
アゾキシストロビン			4	100.0
アトラジン	1	0.0		
アミスロプロム			4	0.0
イソキサチオン	16	18.8		
イプロジオン	1	0.0		
イミダクロプリド	35	51.4	32	75.0
エトフェンプロックス			18	0.0
カルバリル	1	0.0		
クレソキシムメチル	16	0.0		
クロチアニジン	120	64.2	110	70.0
クロマフェノジド			4	75.0
クロラントラニリプロール	8	50.0	92	65.2
クロールピリホス			4	25.0
クロールフェナピル	13	0.0		
クロールフルアズロン	3	0.0	4	25.0
クロールプロファミ	2	0.0		
シアゾファミド	8	0.0	18	0.0
シエノピラフェン			4	0.0
ジノテフラン	177	74.6	18	100.0
シベルメトリン	1	0.0		
シメコナゾール			4	75.0
ジメテナミド	2	0.0		
ジメトエート	3	66.7		
ジメトモルフ			4	75.0
ダイアジノン	9	0.0		
チアクロプリド	2	0.0	18	0.0
チアメトキサム*3	49	83.7	4	100.0
チオファネートメチル	1	0.0		
テフルトリン	8	12.5		
トリフルラリン	4	0.0		
トルクロホスメチル	67	47.8	18	5.6
トルフェンピラド	1	0.0	4	0.0
ニテンピラム	2	100.0		
ヒドロキシイソキサゾール	1	0.0		
ピメトロジン	2	0.0		
ピリダリル	4	0.0		
ピリミホスメチル	3	0.0		
フィプロニル	1	0.0	4	100.0
フェナリモル	1	0.0		
フェンピロキシメート(E体)			4	0.0
フルアジナム	4	0.0	4	0.0
フルオルイミド	1	0.0		
フルスルファミド			4	0.0
フルトラニル	46	45.7	92	57.6
フルフェノクスロン	2	0.0	18	66.7
フルベンジアミド	4	0.0		
プロシミドン	110	64.5	4	50.0
プロチオホス			4	50.0
プロピザミド	1	0.0		
プロベナゾール	3	66.7		
ベルメトリン	1	0.0		
ベンチアバリカルブイソプロピル	2	50.0		
ベンチオピラド			4	75.0
ベンディメタリン	5	0.0		
ボスカリド	10	100.0	110	79.1
ホスチアゼート	69	31.9	4	75.0
マイクロブタニル	50	14.0	18	88.9
メタラキシル	106	67.9	4	50.0
メプロニル	1	0.0		
レナシル	2	0.0		

*1:合計 1156 例. *2:合計 638 例.

*3:代謝物クロチアニジンが検出された場合を含む.

2.1.2 作物の違い

作物種別の検出率を表7に示す。作物種別の検出率は葉菜類>根菜類(葉部)>根菜類(根部)>果菜類の順となり、葉菜類については、検出率が最も高く、農薬が残留しやすいと考えられた。葉菜類の中ではシュンギクの検出率が高く、根菜類の中では栽培期間の短いカブや二十日ダイコンの検出率が高い傾向にあった。

2.1.3 PBIの違い

PBIの長短と検出率の関係を検討した(表8)。PBIが長いほど検出率が低下する傾向は認められたものの、70日間以上のPBIを設けた場合においても3割以上の試験区の作物から0.01 ppm以上農薬が検出された。

表7. 作物種別の検出率(%)

分類	作物名	環境省事業		農水省事業	
		試験数	検出率	試験数	検出率
葉菜類	コマツナ	347	56.8	74	48.6
	ホウレンソウ	262	40.1	200	58.5
	シュンギク	56	66.1	272	76.1
	チンゲンサイ	32	50.0		
	非結球レタス	18	38.9		
	ミズナ	15	40.0		
	シロナ	4	25.0		
	ハタケナ	4	0.0		
花菜類	ブロッコリー	2	0.0		
根菜類	カブ葉	114	59.6	20	35.0
	カブ根	114	36.8	20	15.0
	二十日ダイコン葉	34	61.8		
	二十日ダイコン根	34	50.0		
	ニンジン葉	30	43.3	8	37.5
	ニンジン根	34	23.5	8	25.0
	ダイコン間引き・つまみ菜	6	0.0		
	ダイコン葉	7	28.6		
	ダイコン根	14	14.3		
果菜類	ナス	2	0.0		
	キュウリ	3	0.0	16	0.0
	メロン	4	0.0		

表8. Plant back interval (PBI) 別の検出率(%)

PBI(日)	環境省事業		農水省事業	
	試験数	検出率	試験数	検出率
0-7	518	56.8	0	-
8-30	274	48.2	534	61.4
31-70	293	34.8	62	58.1
71-100	42	33.3	42	45.2

2.1.4 土壌の違い

土壌種別の検出率を表 9 に示す。土壌種別の検出率は有機炭素含量が少ない砂丘未熟土、黄色土および褐色森林土で高い傾向にあり、有機炭素含量が多い黒ボク土では低い傾向にあった。有機炭素含量が多い黒ボク土は農薬に対する吸着が強いため、土壌中の可給態農薬量が少ないことが推察された²⁾。

2.1.5 施設と露地の違い

環境省事業⁹⁾の結果を用いて、施設（トンネル栽培を含む）と露地の違いが検出率に及ぼす影響を検討した（表 10）。露地よりも施設の検出率が高い傾向を示したものの、その差は小さかった。

2.2 作物の収穫から後作物の作付けまでの期間および茎葉散布した農薬の土壌への落下率に関する調査事業で得られた知見の整理

2.2.1 作物の収穫から後作物の作付けまでの期間

平成 27 年度の農水省事業¹³⁾において実施され

た作物の収穫から後作物の作付けまでの期間に関する JA へのアンケート調査の結果のうち、農薬が残留しやすい葉菜類を後作物として栽培する場合の作付け期間を表 11 に示す。作物種によって差はあるものの、葉菜類の作付け期間は概ね 20 日間程度（後作物間の幾何平均で 22 日間）であった。

2.2.2 農薬の土壌落下率

平成 28 年度の農水省事業¹⁴⁾で得られた知見のうち、コマツナおよびキュウリを対象として、散布農薬の土壌落下率について調査された結果を表 12 に示す。土壌落下率は散布液量によって異なるが、10a あたり 300 L を散布した場合、コマツナ、キュウリともに散布農薬の最大で 6 割程度が土壌へ落下している。

表 9. 土壌種別の検出率 (%)

土壌群名(有機炭素含量)	環境省事業		農水省事業	
	試験数	検出率	試験数	検出率
砂丘未熟土(0.14-0.81%)	16	62.5	240	72.1
黄色土(0.4-2.7%)	129	59.7		
褐色低地土(0.97-1.2%)	113	37.2		
褐色森林土(1.1-2.2%)	63	73.0		
灰色低地土(0.12-4.8%)	487	46.8	27	66.7
黒ボク土(3.9-9.5%)	272	44.5	371	51.8

表 10. 施設と露地の検出率 (%) の違い

圃場	環境省事業	
	試験数	検出率
施設(トンネル栽培を含む)	405	52.3
露地	681	46.5

表 11. 作物収穫から後作物として葉菜類の作付けまでの期間（日間）に関する調査結果

前作物	後作物	回答数	最長	最短	幾何 平均値	作物内 幾何平均値	作物間 幾何平均値
スイカ		1	10	10	10		
トマト		1	50	50	50		
サヤインゲン	コマツナ	1	80	80	80	19	
シュンギク		1	7	7	7		
ピーマン		1	10	10	10		
トマト	シュンギク	1	30	30	30	30	
コマツナ	チンゲンサイ	1	20	20	20	20	
イネ		1	14	14	14		
キュウリ		1	10	10	10		
ニンジン		1	100	100	100		
コマツナ		1	30	30	30		22
チンゲンサイ		1	30	30	30		
エダマメ	ハウレンソウ	4	90	30	52	35	
カブ		1	15	15	15		
シュンギク		1	70	70	70		
ショウガ		1	30	30	30		
メロン		1	30	30	30		
サトイモ		1	150	150	150		
ハウレンソウ		1	30	30	30		
コマツナ	ミズナ	2	7	4	5	12	
チンゲンサイ		1	10	10	10		

表 12. 農薬の土壌落下率

作物名	農薬名	栽培初期		栽培中期		収穫期		
		適量散布*	一定量散布*	適量散布*	一定量散布*	適量散布*	一定量散布*	
コマツナ	ジノテフラン	散布量(L/10a)	100	300	150	300	180	300
	土壌落下率(%)	36.3	63.1	14.8	37.7	28.1	35.4	
コマツナ	シアントラニプロール	散布量(L/10a)	100	300	150	300	180	300
	土壌落下率(%)	44.7	66.7	15	38.1	19.3	33.3	
キュウリ	ジノテフラン	散布量(L/10a)	150	300	235	300	-**	300
	土壌落下率(%)	46.4	53.6	30.8	57.4	-**	38	
	シアントラニプロール	散布量(L/10a)	150	300	235	300	-**	300
	土壌落下率(%)	53.9	53.2	19.9	53.9	-**	35.4	

*N=1で実施. ** - : 未実施.

以上より、農薬の検出率は、作物別では葉菜類、土壌別では有機炭素含量が少ない土壌（砂丘未熟土、褐色森林土等）で高いことが示された。また、検出率と各種要因（有効成分投下量、DT₅₀、K_{oc}、log P_{ow}等）との間に強い相関は確認されず、これら単独では後作物残留性を評価できないことが示唆された。後作物における残留のし易さを正確に

評価するためには、複数の要因を考慮した後作物残留濃度の推定手法の構築が必要である。また、後作物の作付けまでの期間および土壌落下率に関する調査結果は、当該推定方法を構築する上で有益な情報になるものと考えられた。

3 後作物中の残留農薬濃度の推定手法の構築と推定精度の検証

目 的

前章において、個別の要因のみでは後作物残留性を評価できないと考えられたことから、複数の要因を考慮した後作物中の残留農薬濃度（以下「後作物中濃度」という）を推定する手法の構築を試みた。当該手法の構築にあたって、作物の収穫日における土壌中の残留農薬濃度および農薬の土壌から作物への移行係数（以下「TF」という）を用いて後作物中濃度の推定を行った。

土壌残留農薬の分析にあたっては、通常、抽出力の強いアセトン等の有機溶媒が使用され、その概ね全量が抽出されている。しかし、これまでの研究により、作物中の農薬濃度は土壌中から有機溶媒を用いて抽出・定量された農薬濃度（以下「土壌中濃度」という）よりも水や0.01M塩化カルシウム水溶液を用いて抽出・定量された農薬濃度（以下「水抽出濃度」という）とより高い正の相関を示すことが示されていることから^{2,27)}、後作物中濃度の推定を行うにあたって、土壌中の残留農薬濃度として水抽出濃度を用いる手法を検討した。

後作物中濃度の推定に関しては、これまでに農薬の植物による取り込み量を予測する複数の数理モデルが開発されているが²⁸⁾、当該数理モデルによって予測結果を得るためには様々なパラメータを収集する必要がある。そこで、欧州連合の旧ガイドライン²⁹⁾で採用されているTFを用いてより簡易的に後作物中濃度を推定する手法を検討した。TFは植物の蒸散流量、農薬の $\log P_{ow}$ 、 K_{oc} および代謝速度等様々な要因によって変動する値であるため、本調査では環境省事業⁹⁾および農水省事業^{7-12,15,16)}の結果を用いて700試験以上における実測値を算出し、その確率分布を調査した。加えて、TFと $\log P_{ow}$ との関係を検討することにより、後作物中濃度の推定に用いるTF値の検討を行った。さらに、当該調査事業の結果を用いて土壌中濃度および後作物中濃度の推定精度の検証を行った。

材料および方法

3.1 データ解析

環境省事業（平成18年度-29年度）⁹⁾および農

水省事業^{7-12,15,16)}におけるデータを使用した。後作物への残留リスクが高いと考えられる葉菜類（コマツナ、シュンギク、チンゲンサイ、ホウレンソウおよびミズナ）を対象とし、 $\log P_{ow}$ が-0.9-8.1の59種類の農薬および有機炭素含量が0.1-9.5%の土壌（砂丘未熟土、黄色土、褐色森林土、褐色低地土、灰色低地土および黒ボク土）の結果を含む約1200試験のデータをTFの変動解析および各種推定値の精度の検証に供した。

3.2 葉菜類におけるTFの分布特性

環境省事業および農水省事業におけるデータから、2種類のTFを算出した。後作物中濃度を作物収穫日の土壌中濃度で除することで TF_t を算定した（(2)式）。また、後述する「3.4 水抽出濃度および後作物中濃度の推定」の方法により作物収穫日の水抽出濃度を推定し、当該推定値を用いて TF_w を算定した（(3)式）。

$$TF_t = \frac{\text{後作物中濃度}}{\text{土壌中濃度}} \quad (2)$$

$$TF_w = \frac{\text{後作物中濃度}}{\text{水抽出濃度(推定値)}} \quad (3)$$

3.3 土壌中濃度の推定

環境省事業および農水省事業の各試験における有効成分投下量、農薬の登録申請にあたり提出された土壌試験に基づく土壌中の減衰速度および農薬の最終散布から後作物収穫までの経過日数から、作物の収穫日における土壌中濃度を推定した。算定方法の概要を図6に示す。経過日数は各試験における最終散布から作付けまでの期間に、後作物である葉菜類の栽培期間として30日間を足し合わせた期間とした。

3.4 水抽出濃度および後作物中濃度の推定

「3.3 土壌中濃度の推定」で求めた土壌中濃度を農薬の登録申請にあたり提出された試験成績のデータ（以下「登録データ」という）の K_{oc} および試験圃場の土壌有機炭素含量を用いて水抽出濃度に変換し（図7）、水抽出濃度にTFを乗じることによって後作物中濃度を推定した。

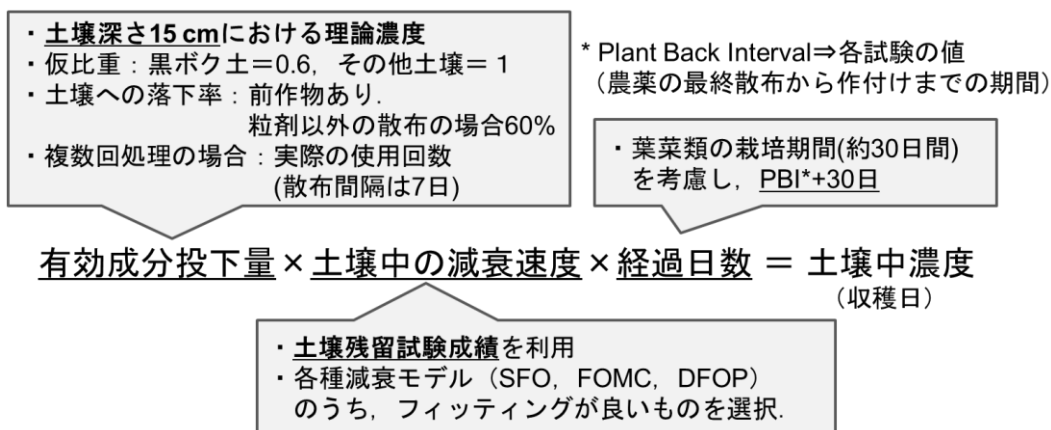


図 6. 土壌中濃度の推定方法の概要

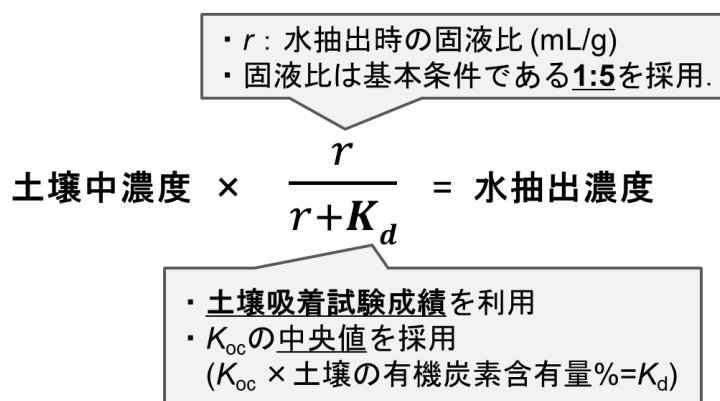


図 7. 水抽出濃度の推定式

結果および考察

3.1 葉菜類における移行係数の分布特性

TF_tおよびTF_wの分布特性を図8に示す。両TFの確率分布は対数正規分布で近似できることが示された。TF_tとTF_wを比較すると、TF_wの方が標準偏差(SD)が小さく、ばらつきが少ないことが確認された。TF_wの中央値は0.34、95パーセンタイル値は4.6、平均値+2SDは6.4であった。

続いてTF_wを農薬のlog P_{ow}別に確認した。log P_{ow}の各範囲におけるTF_wの中央値を図9に示す。log P_{ow}が高い農薬ほどTF_wは低い傾向を示した。しかし、log P_{ow}が2-5の範囲においてはほぼ同じ値を示し、log P_{ow}が4以上の農薬であってもある程度の移行性を有することが確認された。また、

清家らの報告²⁹⁾では、根菜類、特にニンジンではlog P_{ow}が高い農薬でTFが高くなることが示されている。よって、農薬のlog P_{ow}に応じて異なるTFを用いた場合、後作物中濃度を過小評価する可能性があると考えられた。

3.2 土壌中濃度の推定および検証

環境省事業および農水省事業における有効成分投下量および登録データの土残試験の減衰速度を用いて、作物の収穫日における土壌中濃度を推定した。農薬の登録申請において、土残試験は2例以上の提出が求められていることから、そのDT₅₀が長い区および短い区のそれぞれについて推定値と実測値を比較した(図10)。

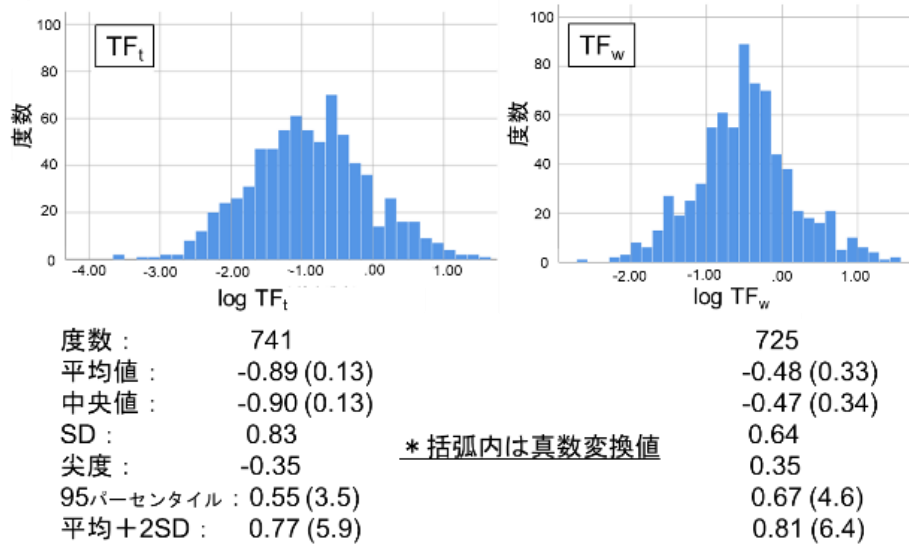


図 8. 有機溶媒抽出濃度および水抽出濃度から算定した移行係数 (TF_tおよび TF_w) の分布特性)

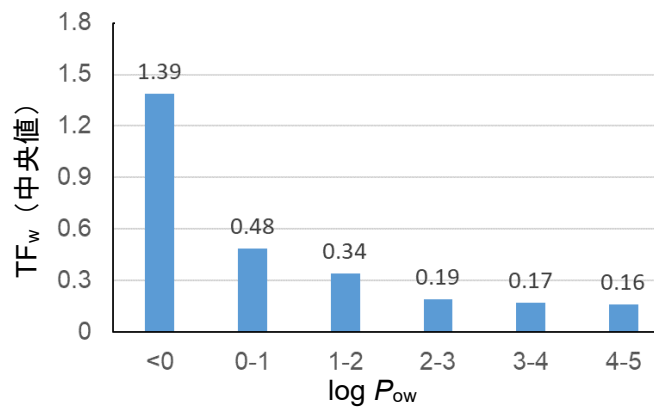


図 9. 水抽出濃度から算定した移行係数 (TF_w) の log P_{ow} 別の比較

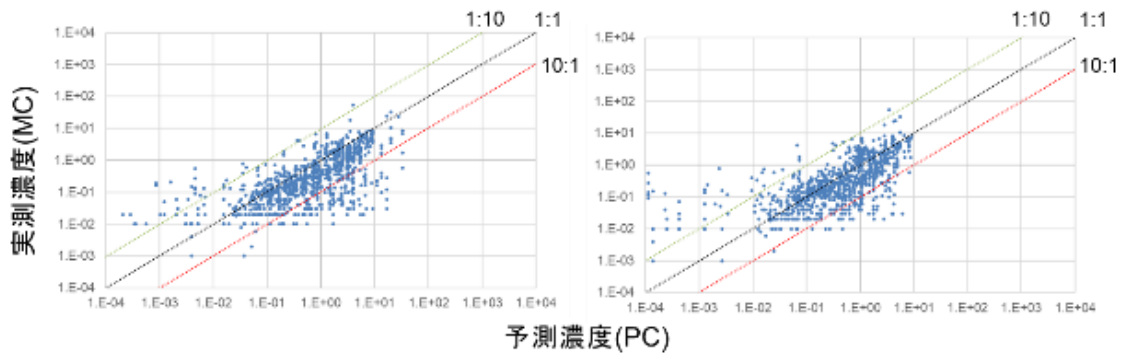


図 10. 土壌中濃度の予測濃度 (PC) と実測濃度 (MC) の比較
 左 : DT₅₀ が長い土残試験のデータで推定, 右 : DT₅₀ が短い土残試験のデータで推定
 破線は上から順に PC と MC の比が 1:10, 1:1, 10:1 を示す.

推定精度をより視覚的に確認しやすくするため、推定値と実測値の比（以下「PC/MC」という）を求めて分布特性を確認した（図 11）。DT₅₀が短い区のデータを用いて推定した場合、PC/MC の 25、50 および 75 パーセンタイル値はそれぞれ 0.6、1.3 および 3.0 であった。従って、解析に供した 1057 試験のうち、3/4 の約 750 試験において推定値と実測値の差は 3 倍の範囲に収まることが明らかとなった。

3.3 後作物中濃度の推定

「3.2 土壤中濃度の推定および検証」で算定した土壤中濃度の推定値を用いて水抽出濃度の推定値を算出し、水抽出濃度の推定値に TF_w を乗じることで後作物中濃度を推定した。TF_w の値は、「3.1 葉菜類における移行係数の分布特性」で得られた TF_w の中央値 (0.34) を用いた。推定値と実測値を比較するとともに（図 12）、PC/MC の分布特性も確認した（図 13）。

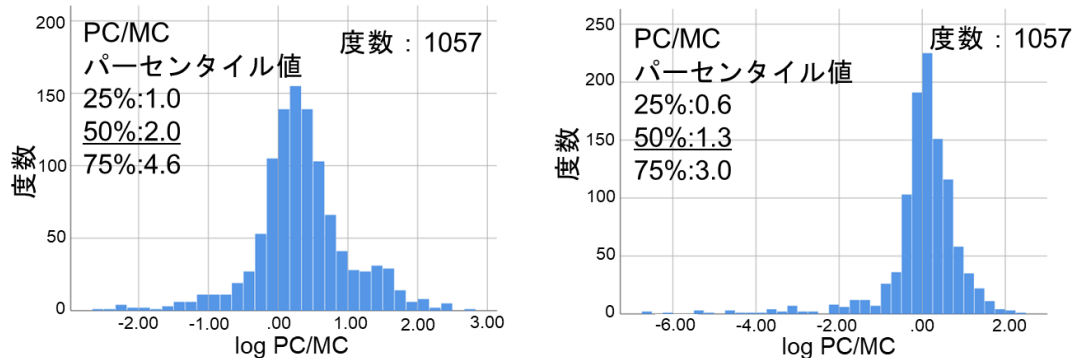


図 11. 土壤中濃度の推定濃度 (PC) と実測濃度 (MC) の比 (PC/MC) の分布特性
左: DT₅₀ が長い土残試験のデータで推定, 右: DT₅₀ が短い土残試験のデータで推定

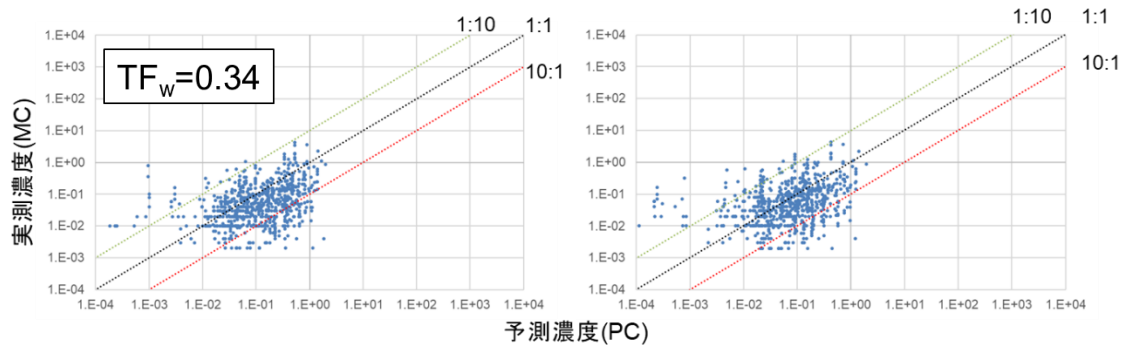


図 12. 後作物中濃度の推定値 (PC) と実測値 (MC) の比較
左: DT₅₀ が長い土残試験のデータで推定, 右: DT₅₀ が短い土残試験のデータで推定
破線は上から順に PC と MC の比が 1:10, 1:1, 10:1 を示す。

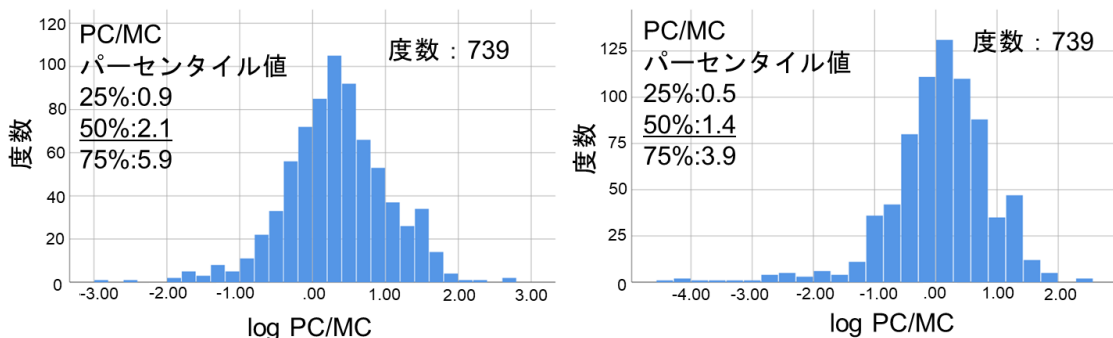


図 13. 後作物中濃度の推定値 (PC) と実測値 (MC) の比 (PC/MC) の分布特性
左: DT₅₀ が長い土残試験のデータで推定, 右: DT₅₀ が短い土残試験のデータで推定

DT₅₀ が短い区のパラメータを用いて推定した場合、PC/MC の 25, 50 および 75 パーセンタイル値はそれぞれ 0.5, 1.4 および 3.9 であった。従って、解析に供した 739 試験のうち、3/4 の約 550 試験において推定値と実測値の差は 4 倍の範囲に収まる事が明らかとなった。

後作物中濃度の推定値を DT₅₀ に代わる新たな後作物残留試験等の要求トリガーとして使用する場、より安全サイドに立った評価を行うために、推定値は実測値よりも過大に算定される必要がある。「3.1 葉菜類における移行係数の分布特性」の結果、TF_w の確率分布は対数正規分布で表現され、95 パーセンタイル値は 4.6、平均値+2SD は 6.4 であった。この結果を踏まえて、TF_w を 5 および 10 とした場合の後作物中濃度を算定し、推定値と実測値を比較した (図 14)。DT₅₀ が長い区のパラメータを用いて推定した場合、解析に供した 739 の試

験のうちほとんどの試験において推定値が実測値を上回った。推定値が実測値を下回ったのは、TF_w を 5 とした場合で 22 例 (3.0%)、TF_w を 10 とした場合で 11 試験 (1.5%) であり、いずれの場合もその数はわずかであった。そのうち、TF_w を 5 とした場合の 16 試験、TF_w を 10 とした場合の 10 試験は同一有効成分の農薬を供試した試験であった。当該有効成分の推定値が低くなった要因として、登録データから算出した DT₅₀ はいずれの試験においても 1 日未満であり、このデータを用いて算定した土壤中濃度の推定値が実測値よりも顕著に低かったことが考えられた。よって、TF_w を 5 とした場合でも 97% 以上の試験において予測濃度が実測濃度を上回ったことから、後作物中濃度の推定にあたって TF_w の値は一律で 5 を用いることとした。

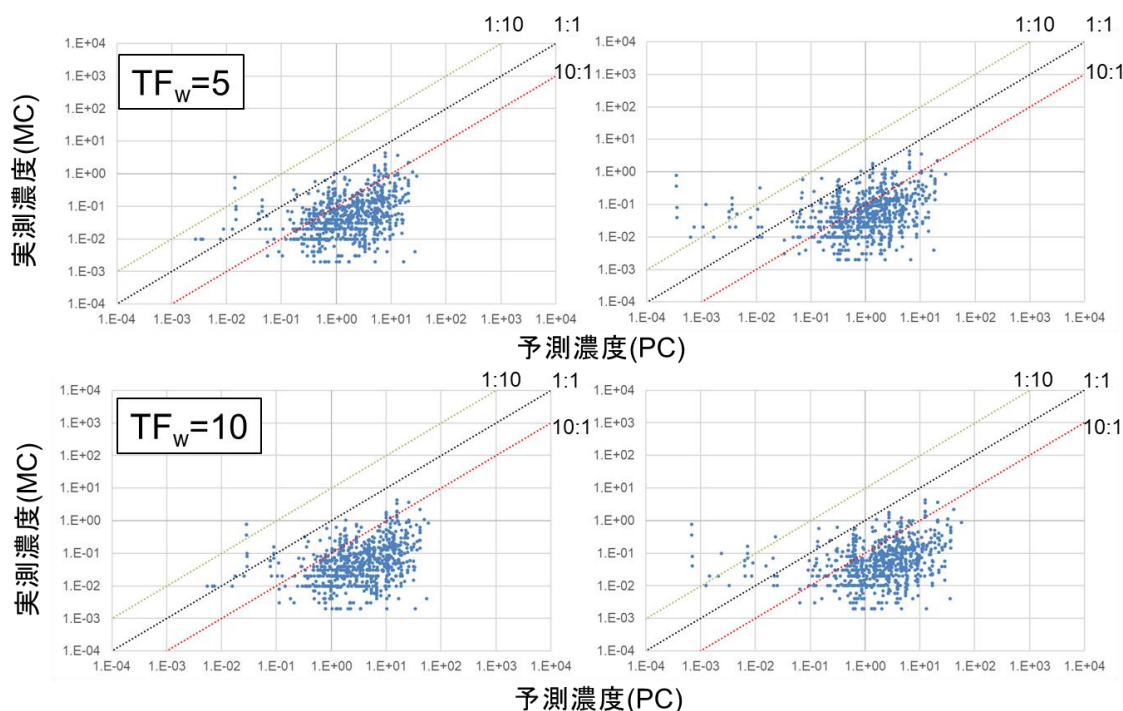


図 14. 後作物中濃度の推定値 (PC) と実測値 (MC) の比較
 上段が TF_w=5, 下段が TF_w=10 として算定した結果であり、それぞれ
 左: DT₅₀ が長い土残試験のデータで推定, 右: DT₅₀ が短い土残試験のデータで推定
 破線は上から順に PC と MC の比が 1:10, 1:1, 10:1 を示す。

4 後作物中濃度の簡易推定法の農薬登録審査への導入可否に係る検討

目 的

前章において後作物中濃度の簡易推定手法を構築するとともに、これによって得られた推定値と実測値を比較することにより、当該手法の推定精度について検証を行った。我が国の登録農薬を対象とし、適用作物の種類に応じた計算シナリオを作成の上、本推定手法により後作物中濃度を算出した。推定した後作物中濃度を一律基準と比較し、推定値が一律基準未満となる農薬の割合について調査を行った。

材料および方法

4.1 国内登録農薬の推定値の調査

国内の登録農薬の適用内容および前章において構築した簡易推定手法から後作物中濃度を算出し、国内の登録農薬の推定値の傾向を調査した。調査は、畑地適用のある有効成分 299 成分、水田適用のある有効成分 123 成分および育苗箱処理（粒剤のみ）適用のある有効成分 31 成分について行った。推定を行う適用は、同一有効成分を含む農薬のうち、総使用回数が最も多い適用作物または総有効成分投下量が最も大きい適用作物の適用内容

とした。ただし、後作物代謝試験に係る OECD テストガイドライン¹⁸⁾において当該試験の除外対象となっている作物に加え、茶、芝および樹木類（ツツジ類等低木を含む）についても永年作物または準永年作物に該当するとみなし、推定の除外対象とした。推定を行う適用の有効成分投下量、登録データの土壌試験の減衰速度および当該適用の種類に応じた計算シナリオから後作物収穫日における土壌中濃度を算出し、登録データの K_{oc} を用いて水抽出濃度に変換後、TF 値を乗じて後作物中濃度を推定した。TF 値としては前章の検討結果に基づきデフォルト値として 5 を採用した（図 15）。登録データの土壌試験が複数ある場合は、 DT_{50} が最も長い試験のデータを使用した。

推定に用いた有効成分投下量、 K_{oc} 、現在後作物残留試験の要求トリガーとして用いられている DT_{50} および欧州連合における後作物代謝試験の要求トリガーである DT_{90} の 4 要素について、畑地適用および水田適用の有効成分を推定値が一律基準以上の区と一律基準未満の区に分け、各要素の条件別の割合を調査し、現在の要求トリガーが有効か否かについて検討した。

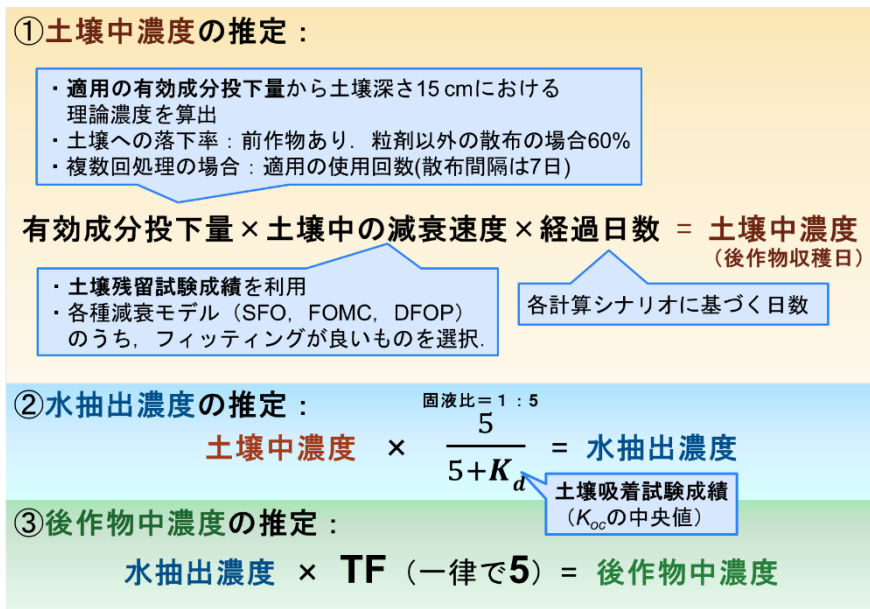


図 15. 後作物中濃度推定手法の概要

4.2 畑地作物の適用における計算シナリオ

畑地作物の適用における計算シナリオを図 16 に示す。国内の登録農薬の適用情報を参考にして、農薬の最終散布から収穫までの日数（以下「収穫前日数」という）は7日間とした。また「2.6 作物の収穫から後作物の作付けまでの期間」の結果を参考にして、畑地作物における収穫から後作物の作付けまでの日数は21日間とした。前作物の作付けから生育期の初回散布までの期間は30日間とし、生育期の散布は7日間ごとに推定を行う適用の回数が行われることとした。PBIは最終散布から収穫までの7日間および収穫から後作物作付けまでの21日間を足し合わせた28日間、後作物の栽培期間は葉菜類を想定し30日間とした。

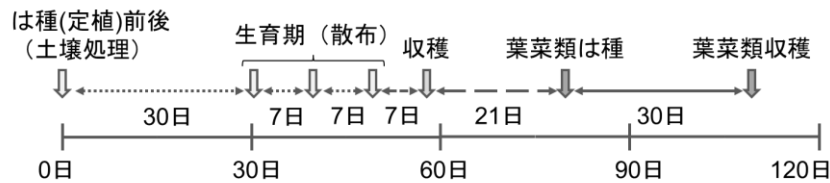
4.3 水田作物の適用における計算シナリオ

水田作物の適用における計算シナリオを図 17 および図 18 に示す。水稻の生育期間は120日間とした。国内登録農薬の水稻の適用情報を参考にして、収穫前日数は殺虫剤および殺菌剤で14日間、

除草剤で60日間とした。また、平成27年度の農水省事業¹³⁾の結果(表13)を参考にして稲(水稻および陸稲)の収穫から後作物作付けまでの日数を決定した。後作物作付けまでの日数は平均値で概ね40日間程度であったが、20日間未満の作物も一部存在することから畑地作物と同様に21日間とした。

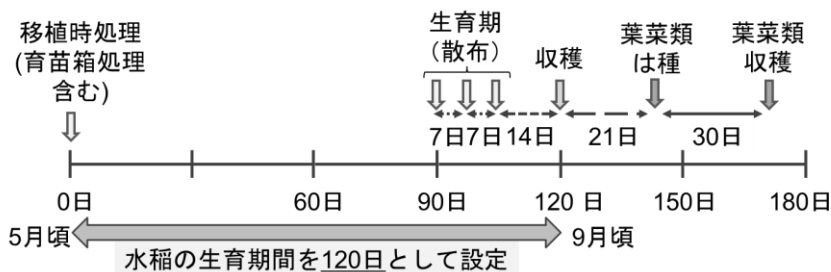
殺虫剤および殺菌剤においては、育苗箱処理は移植時処理とみなし、生育期の散布は7日間ごとに推定を行う適用の回数が行われることとした。PBIは最終散布から収穫までの14日間および収穫から後作物作付けまでの21日間を足し合わせた35日間とした。

除草剤においては、初期剤は生育期間の0日目、中期剤は20日目、後期剤は60日目に散布されるものとし、後期剤が複数回使用される適用の場合は20-60日目の間で均等に散布されると仮定した。PBIは後期剤が散布されてから収穫までの60日間および収穫から後作物作付けまでの21日間を足し合わせた81日間とした。



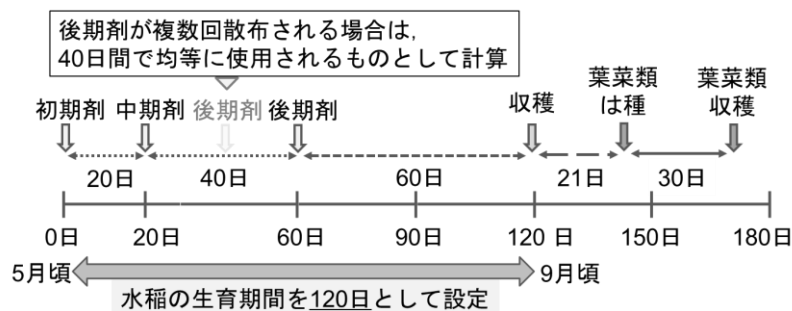
- ・は種から生育期散布(1回目)までの間隔：30日間
 - ・生育期の散布間隔：7日間
 - ・最終散布から収穫までの期間：7日間
 - ・収穫から後作物は種までの期間：21日間
 - ・後作物(葉菜類)栽培期間：30日間
- } PBIとして28日間

図 16. 畑地作物の適用における計算シナリオ



- ・移植から収穫までの間隔：120日間
 - ・生育期の散布間隔：7日間
 - ・最終散布から収穫までの期間：14日間
 - ・収穫から後作物は種までの期間：21日間
 - ・後作物(葉菜類)栽培期間：30日間
- } PBIとして35日間

図 17. 水田作物(殺虫剤および殺菌剤)の適用における計算シナリオ



- ・ 初期剤処理から収穫までの間隔：120日間
 - ・ 中期剤処理から収穫までの間隔：100日間
 - ・ 後期剤処理から収穫までの期間：60日間
 - ・ 収穫から後作物は種までの期間：21日間
 - ・ 後作物(葉菜類)栽培期間：30日間
- PBIとして81日間

図 18. 水田作物（除草剤）の適用における計算シナリオ

表 13. 水田作物における作物収穫から後作物作付けまでの期間（日数）に関する調査結果

前作物	後作物	回答数	最長	最短	幾何平均	作物内 幾何平均
稲 (水稲及び陸稲)	大豆	2	200	180	190	42
	大麦	2	30	20	25	
	なばな	1	30	30	30	
	さといも	1	220	220	220	
	ハウレンソウ	1	14	14	14	
	小麦	1	50	50	50	
	カリフラワー	1	10	10	10	

4.4 水稲育苗ハウスにおける計算シナリオ

育苗箱処理に関しては、育苗箱を設置する水稲育苗ハウスにおいても後作物残留性の懸念があることから、水稲育苗ハウスのシナリオについても検討を行った。岡らの報告³⁰⁾では、育苗箱への粒剤処理後、育苗箱の下部から水が約 200 mL 溶出する程度の灌水を処理当日および処理 5 日目から 27 日目までの 23 日間行い、育苗箱からの農薬溶出率を調査した。水溶解度の 1/2 の濃度の農薬を含む水が育苗箱下部から 1 日当たり 200 mL、23 日間溶出したと仮定して累積溶出量を推定したところ、岡らの報告における実測値平均と概ね同等-3 倍程度の推定値となった（表 14）。また、佐山ら^{31,32)}は、育苗箱にプロベナゾール・クロラントラニプロロール粒剤またはアミスルブロム顆粒水和剤を処理した際の育苗ハウスにおける後作物残留性を調査した。農薬処理後の育苗期間中、水溶解度

の 1/2 の濃度の農薬を含む水が育苗箱下部から 1 日当たり 200 mL 溶出し、溶出後育苗ハウスの土壌中で土壌試験の減衰速度に従い消失したと仮定して土壌中の農薬濃度を推定した。当該推定値を佐山らの調査における実測値と比較した結果、クロラントラニプロロール粒剤の推定値は実測値と同程度、または実測値を多少下回る結果となった。一方、アミスルブロム顆粒水和剤の推定値は実測値の 1/10-1/200 以下と大きく下回った（表 15 および表 16）。よって、水和剤の処理については過小評価となることが想定されるため、粒剤に限った水稲育苗ハウスのシナリオを図 19 のように設定した。育苗箱への処理から撤去までを 30 日間と設定し、その期間中は水溶解度の 1/2 の濃度の農薬を含む水が育苗箱下部から 1 日当たり 200 mL 溶出すると仮定した。育苗箱を撤去してから後作物作付けまでの日数は 21 日間とした。

表 14. 水稲育苗ハウスシナリオ検討における文献実測値および推定値の比較（累積溶出量）

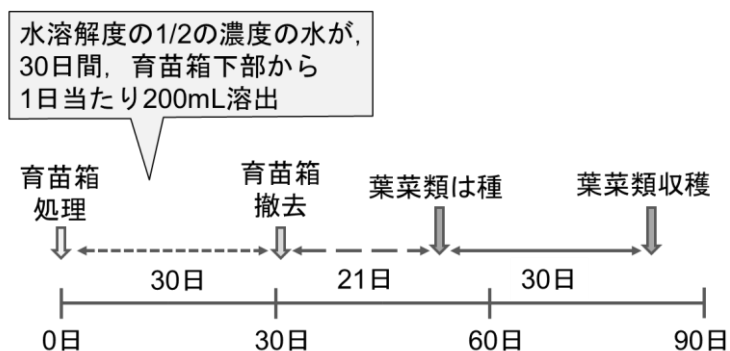
累積溶出量(%) (施用量=100)	水溶解度	実測値	推定値
農薬A	510 mg/L	74%	100%
農薬B	6.38 mg/L	1.40%	1.02%
農薬C	1.9 mg/L	1.20%	0.91%
農薬D	225 mg/L	8.90%	27%

表 15. 水稲育苗ハウスシナリオ検討における文献実測値および推定値の比較
（粒剤処理後の育苗ハウス土壤中濃度）

実施年	プロベナゾール		クロラントラニリプロール	
	実測値	推定値	実測値	推定値
2011年	<0.025 ppm	0.070 ppm	0.23-0.29 ppm	0.191 ppm
2012年	<0.025 ppm	0.174 ppm	0.36-0.47 ppm	0.201 ppm

表 16. 水稲育苗ハウスシナリオ検討における文献実測値および推定値の比較
（顆粒水和剤処理後の育苗ハウス土壤中濃度）

実施年	アミスルブロム	
	実測値	推定値
2013年	0.058-1.08 ppm	0.004 ppm



- ・ 育苗箱処理から撤去までの間隔：30日間
- ・ 撤去から後作物は種までの期間：21日間
- ・ 後作物(葉菜類)栽培期間：30日間

図 19. 水稲育苗ハウス（粒剤のみ）における計算シナリオ

結果および考察

4.1 国内登録農薬の推定値の調査

各適用の有効成分における後作物中濃度の推定結果を図 20 に示す。畑地適用の有効成分において、推定値が一律基準以上の有効成分は 59 % (177 成分)、一律基準未満の有効成分は 20 % (60 成分)、適用が永年作物または準永年作物のみであり除外となった有効成分は 21 % (62 成分) であった。そのうち、一律基準未満である有効成分は殺虫剤が 62 % を占めていた。水田適用の有効成分において、推定値が一律基準以上の有効成分は 64 % (79 成分)、一律基準未満の有効成分は 36 % (44 成分) であった。そのうち、一律基準未満である有効成分は除草剤が 61 % を占めていた。本推定手法によって得られた後作物中濃度の推定値を DT₅₀ に代わる新たな後作物残留試験等の高次試験の要求トリガーとして用いて、当該試験の要求条件を当該推定値が一律基準以上とした場合、畑地適用および水田適用の有効成分どちらについても、約 4 割が当該試験の実施を除外できる結果となった。一方、育苗箱処理（粒剤のみ）の適用の有効成分では、推定した全成分（31 成分）で推定値が一律基準以上となったことから、原則、全ての育苗箱処理剤について使用上の注意事項を付す等のリスク管理措置が必要と考えられた。

畑地適用および水田適用の有効成分の推定結果を基に、推定に用いた有効成分投下量、K_{oc}、DT₅₀ および DT₉₀ の 4 要素について、各要素の条件別の割合を調査した結果を図 21-24 に示す。各要素において、ある条件における一律基準以上の区の割

合と一律基準未満の区の割合の差が大きいほど、推定値が一律基準以上と未満のどちらになるかを判断できる条件とみなすことができ、当該推定値が一律基準を超過するリスクの判断に対して、その要素が有効と言える。有効成分投下量および K_{oc} については、有効成分投下量 < 100 g/10 a および K_{oc} > 1500 の場合に一律基準以上の区と一律基準未満の区の割合の差がそれぞれ 37 % および 30 % と最も大きくなった（図 21 および図 22）。DT₅₀ については、現在 100 日以上となった際に後作物残留試験が要求されるが、DT₅₀ < 100 日の場合の一律基準以上の区と一律基準未満の区の割合の差は 15 % と小さく、現在の要求条件は後作物残留試験を要求するトリガーとしてあまり有効ではない可能性が考えられた（図 23）。一方、DT₉₀ については、欧州連合において 100 日を超える際に後作物代謝試験が要求されるが、DT₉₀ < 100 日の場合の一律基準以上の区と一律基準未満の区の割合の差は 41 % であり、解析した要素の中で最も大きくなった（図 24）。

以上のように、前章で構築した簡易推定手法を用いて各シナリオにおける国内登録農薬の後作物中濃度の算定を行ったところ、約 4 割の農薬について推定値が一律基準未満となった。後作物残留試験等の高次試験の要求条件を本推定手法によって得られた後作物中濃度の推定値が一律基準以上とした場合、一定の割合で当該試験の実施を省略できることが示されたことから、当該推定値が DT₅₀ に代わる新たな後作物残留試験等の高次試験の要求トリガーとして利用できると考えられた。

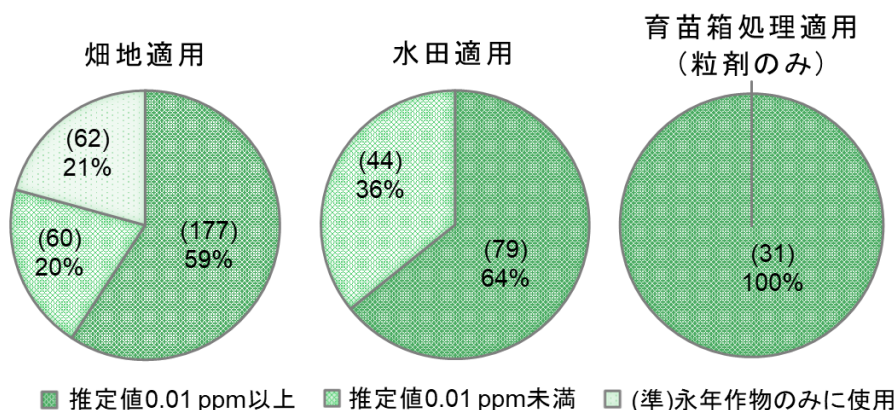


図 20. 国内登録農薬の後作物中濃度推定結果
(括弧内の数字は有効成分数を示す)

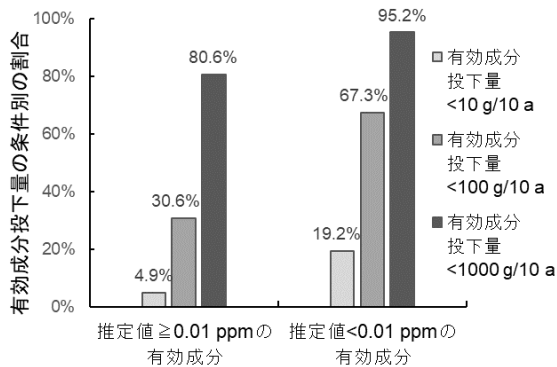


図 21. 推定値 0.01 ppm 以上の有効成分（左）と推定値 0.01 ppm 未満の有効成分（右）における推定に用いた有効成分投下量の条件別の割合

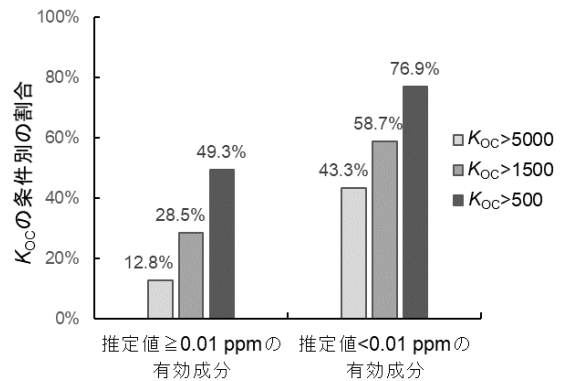


図 22. 推定値 0.01 ppm 以上の有効成分（左）と推定値 0.01 ppm 未満の有効成分（右）における推定に用いた K_{oc} の条件別の割合

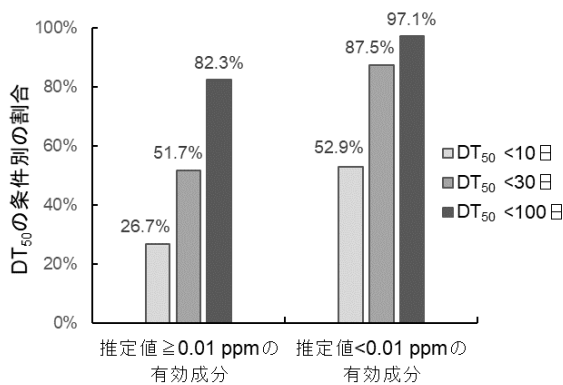


図 23. 推定値 0.01 ppm 以上の有効成分（左）と推定値 0.01 ppm 未満の有効成分（右）における DT_{50} の条件別の割合

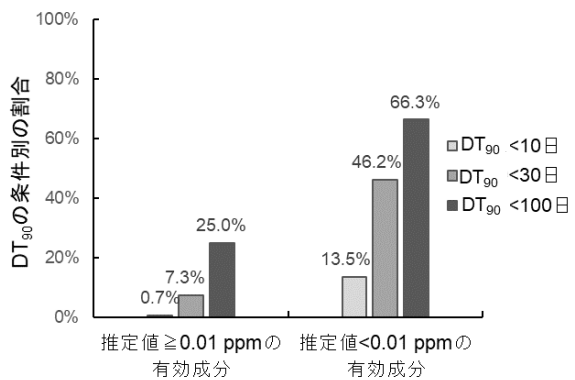


図 24. 推定値 0.01 ppm 以上の有効成分（左）と推定値 0.01 ppm 未満の有効成分（右）における DT_{90} の条件別の割合

5 おわりに

本調査では農薬の後作物残留に係る新たな評価法の導入に向けて、海外における評価スキームに関する情報を整理した。欧米の評価スキームは第1段階として後作物代謝試験を要求し、その結果に応じて第2段階の圃場における後作物残留試験の要否が判断される。一方、日本においては、後作物代謝試験は要求していないが、植物代謝試験および土壌中動態試験を要求しており、農薬の植物体内や土壌中での代謝分解については把握することが可能である。しかし、植物代謝試験は、通常、散布剤であれば被験物質を葉面散布や葉面塗布することにより実施されるため、根から取り込

まれた農薬の代謝分解については評価されていない。後作物における農薬の代謝分解を正確に評価するためには、後作物代謝試験の実施が必要と考えられる。後作物代謝試験を要求した場合、当該試験で検出された主要代謝物は後作物残留試験における分析対象物質となることが想定されるが、この他、規制対象物質および暴露評価対象物質の選定にあたって当該試験結果がどのように取り扱われるのか、今後、十分に検討する必要がある。

次に、国内の環境省事業および農水省事業のデータを取りまとめた結果、農薬の後作物への残留のし易さは、有効成分投下量、 DT_{50} 、 K_{oc} 、 $\log P_{ow}$ 等の個別の要因のみでは説明できないことが示さ

れた。そこで、TFを用いた後作物中濃度の簡易推定法を構築した。本推定手法によって得られた後作物中濃度の推定値をDT₅₀に代わる新たな後作物残留試験等の高次試験の要求トリガーとして用いた場合、国内の登録農薬については約4割の農薬(適用が準永年作物または永年作物のみであり、試算を除外した農薬を含む)が、高次試験の実施を除外できると判断された。本推定法については、今後、計算シナリオの妥当性等について精査していく必要はあるが、DT₅₀に代わる新たな高次試験の要求トリガーとしての利用が期待される。

最後に、環境省事業および農水省事業のデータは、有機炭素含量が少ない土壌において、播種から収穫までの期間が短い葉菜類を栽培した場合、特に後作物残留が起こりやすいことを示している。TG504では有機炭素含量が少ない砂壤土で葉菜類を栽培することが求められていることから、今後日本においてTG504が導入され、当該ガイドラインに準じて試験をした場合、一律基準以上の農薬が検出される事例が多くなる可能性がある。これらを見据えて、まだ日本では導入されていないPBIによるリスク管理や後作物残留基準値の設定については重点的に議論を進めていく必要があると考えられる。

引用文献

- 1) 谷川元一: インターネット等で公表された情報からみた残留基準を超過した農薬の状況. 日本農薬学会誌, 35(4), 537-541 (2010).
- 2) Y. Motoki, T. Iwafune, N. Seike, T. Otani and Y. Akiyama: Relationship between plant uptake of pesticides and water-extractable residue in Japanese soils. *Journal of Pesticide Science*, 40(4), 175-183(2015).
- 3) Briggs, G. G., Bromilow, R. H., and Evans, A. A.: Relationships between lipophilicity and root uptake and translocation of non-ionised chemicals by barley. *Pesticide science*, 13(5), 495-504 (1982).
- 4) Dettenmaier, E. M., Doucette, W. J. and Bugbee, B.: Chemical hydrophobicity and uptake by plant roots. *Environmental science & technology*, 43(2), 324-329 (2008).
- 5) Van Eerd, L. L., Hoagland, R. E., Zablotowicz, R. M., and Hall, J. C.: Pesticide metabolism in plants and microorganisms. *Weed science*, 51(4), 472-495 (2003).
- 6) 環境省: 農薬残留対策総合調査(河川モニタリング, 後作物残留等)の結果について. <https://www.env.go.jp/water/dojo/noyaku/zanryutai>
- saku.html (URL のリンクについての確認は、2023年9月28日に実施)
- 7) 一般財団法人残留農薬研究所: 平成 21 年度農産資材安全確保推進事業 —農薬の後作物残留調査事業—, 最終報告書. (2010).
- 8) 一般財団法人残留農薬研究所: 平成 22 年度生産資材安全確保推進事業 —農薬の後作物残留調査事業—, 最終報告書. (2011).
- 9) 一般財団法人残留農薬研究所: 平成 23 年度生産資材安全確保推進事業 —農薬の後作物残留調査事業—, 最終報告書. (2012).
- 10) 一般財団法人残留農薬研究所: 平成 24 年度生産資材安全確保推進事業 —農薬の後作物残留調査事業—, 最終報告書. (2013).
- 11) 一般財団法人残留農薬研究所: 平成 25 年度生産資材安全確保推進事業 —農薬の後作物残留調査事業—, 最終報告書. (2014).
- 12) 一般財団法人残留農薬研究所: 一般社団法人日本植物防疫協会: 平成 26 年度農薬等安全確保強化対策事業 —農薬の後作物残留調査事業—, 最終報告書. (2015).
- 13) 株式会社三菱化学テクノロジー: 平成 27 年度農薬の後作物残留調査報告書. (2016).
- 14) 一般社団法人日本植物防疫協会: 平成 28 年度農薬の後作物残留調査委託事業報告書. (2017).
- 15) 一般社団法人日本植物防疫協会: 平成 29 年度農薬の後作物残留調査委託事業(連作)事業報告書. (2018).
- 16) 株式会社食環境衛生研究所: 平成 29 年度農薬の後作物残留調査委託事業(剤形)試験報告書. (2018).
- 17) European Food Safety Authority (EFSA): *EFSA Journal* <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/journal/18314732> (URL のリンクについての確認は、2023年9月28日に実施)
- 18) OECD: Test No. 502: Metabolism in Rotational Crops. (2007).
- 19) OECD: Test No. 504: Residues in Rotational Crops (Limited Field Studies). (2007).
- 20) OECD: Guidance Document on Overview of Residue Chemistry Studies, Series on testing and assessment No. 64 and Series on pesticides No. 32. (2009).
- 21) OECD: Guidance Document on Residues in Rotational Crops, Series on Pesticides No. 97 and Series on Testing & Assessment No. 279. (2018).
- 22) ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY 40

CFR Part 158

- 23) U.S. EPA: OPPTS Harmonized Test Guideline 860.1850. Confined Accumulation in Rotational Crops. EPA Report No. 712-C-96-188, August 1996. (1996).
- 24) U.S. EPA: OPPTS Harmonized Test Guideline 860.1900. Field Accumulation in Rotational Crops. EPA Report No. 712-C-96-189, August 1996. (1996).
- 25) Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC
- 26) Council Directive 91/414/EEC of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market
- 27) Y. Motoki, T. Kato, Y. Akiyama, N. Seike and T. Iwafune: Relationship between the vertical distribution of pesticides, including neonicotinoids, in soils and their uptake by *Brassica rapa* L. var. *peruviridis*. ACS Agricultural Science & Technology, 1(4), 362-371(2021).
- 28) 藤澤卓生: 農薬の植物による取り込みモデル. Journal of Pesticide Science, 27(3), 279-286 (2002).
- 29) 清家伸康: 農薬の後作物残留を未然に防止する登録制度の提案. 平成 29 年度-令和元年度環境研究総合推進費終了研究成果報告書. (2020).
- 30) 岡美和, 伊藤和男, 斎藤玲奈, 池長宙, 北村恭朗, 西岡暢彦, 山田邦彦, 元木裕: 土壌を経由した後作物への農薬残留に関する調査研究. 農林水産消費安全技術センター農薬調査研究報告. 1, 14-18(2010).
- 31) 佐山玲, 篠田光江, 藤井直哉: 水稻育苗期にプロベナゾール・クロラントラニリプロール粒剤を使用した際の後作葉菜類の黒ボク土における農薬残留. 日本農薬学会誌, 41(2), 153-159(2016).
- 32) 佐山玲, 篠田光江, 藤井直哉: 水稻育苗期にアミスルブロム顆粒水和剤を使用したときの育苗ハウス後作野菜における農薬残留. 北日本病虫研報, 66, 27-30(2015)

令和4年度学会等での発表実績一覧

1. 誌面発表

なし

2. 口頭・ポスター発表

	学会名	題目	発表者名
1	第39回農薬環境科学 研究会(2022年9月29 日(木)～30日 (金))	投下量の違いが土壌中農薬 の減衰に及ぼす影響(第1 報)	<u>鈴木万智</u> , <u>元木裕</u> , <u>岩船敬</u>
2	第41回農薬製剤・施 用法シンポジウム (2022年10月14日 (金))	2022年CIPAC関係会議の 概要	<u>渡辺高志</u> , <u>大島雄</u> , <u>染谷潔</u>

アンダーラインが引かれた者が、FAMIC 農薬検査部職員

【技術レポート】

残留農薬分析業務における分析法の検討

LC-MS/MS を用いたミニトマト中の残留農薬一斉試験法の妥当性評価…………… 7 3

残留農薬分析業務における分析法の検討

LC-MS/MS を用いたミニトマト中の残留農薬一斉試験法の妥当性評価

坂部亮介*¹, 山本謙吾*¹, 大原 望*²

中村健二*², 臼井裕一*³, 野村哲也*³

*¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター農薬検査部

*² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター横浜事務所

*³ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) を用いたミニトマト中の残留農薬一斉試験法について、11 農薬を対象とし、厚生労働省通知の「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」に基づき、3 試験室において妥当性評価を行った。その結果、7 農薬については、すべての試験室において、妥当性評価の性能パラメータがガイドラインに示された目標値に適合していた。

Keywords : 残留農薬, ミニトマト, 妥当性評価, 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計

結 言

独立行政法人農林水産消費安全技術センター農薬実態調査課 (以下、センター) では、農林水産省の指示に基づき、国内産農産物における農薬の使用状況および残留状況について調査を行っている。農産物に使用される農薬は、作物や栽培地域によって異なることから、調査においては、農薬を効率よく分析することが重要である。

令和 5 年度に予定されている「ミニトマト」は、センターの初調査となることから、調査対象農薬の拡大と分析の効率化を図るため、センターの分析対象としていない 11 農薬 (以下、新規対象農薬) について、厚生労働省通知¹⁾の「GC/MS・LC/MS による農薬等の一斉試験法 (野菜・果実類)」 (以下、一斉法) に基づき検討を行った。

試験法については、抽出および精製は一斉法に準じ、測定は LC-MS/MS に変更した。

妥当性は「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について」^{2,3)} (以下、ガイドライン) に基づき、試験室毎に評価した。

材料および方法

1. 試験室

以下の 3 試験室で実施した。

- ・農薬検査部農薬実態調査課 (以下、小平)
- ・横浜事務所農薬実態調査課 (以下、横浜)
- ・神戸センター農薬実態調査課 (以下、神戸)

2. 新規対象農薬

ミニトマトに使用されている農薬を事前調査し、使用実績のある次の 11 農薬を対象とした。

イソピラザム, イプロジオン, シアントラニリプロール, ジノテフラン, ピリベンカルブ, フェンピラザミン, フルキサメタミド, フルチアニル, フロニカミド, ミルベメクチン, レピメクチン

3. 試料および添加濃度

3.1. 試料

小平にて栽培・収穫し、新規対象農薬が検出されないことを確認したミニトマト (以下、ブランク試料) を各試験室で試料として用いた。

3.2. 添加濃度

新規対象農薬の中で最も低いフルチアニルおよびミルベメクチンの基準値に相当する 0.2 mg/kg (以下、高濃度) およびその 10 分の 1 にあたる 0.02 mg/kg (以下、低濃度) の 2 濃度とした。

4. 試薬および器具

4.1. 標準品

農薬標準品 : イソピラザム (syn 体および anti 体の混合物) は林純薬工業株式会社, イプロジオン, イプロジオン代謝物, シアントラニリプロール, ピリベンカルブ, ピリベンカルブ代謝物, フェンピラザミン, フルキサメタミド, フルチアニル, フロニカミドおよびレピメクチン (A3 および A4

の混合物)は富士フィルム和光純薬株式会社製の標準品を使用した。各農薬標準品をアセトニトリルで溶解し 500 µg/mL の標準原液を調製した。ジノテフランは林純薬工業株式会社製の標準液 (1000 µg/mL) , ミルベメクチン A3 および A4 は Dr.Ehrenstorfer 製の標準液 (各 10 µg/mL) を使用した。

混合標準液：標準原液を混合し 20 µg/mL のアセトニトリル溶液となるように調製した。

添加回収試験用標準液および検量線用標準液：混合標準液、ジノテフラン標準液ならびにミルベメクチン A3 および A4 標準液をアセトニトリルで適宜希釈・混合して調製した。

4.2. 試薬

アセトニトリル(残留農薬試験用および液体クロマトグラフ質量分析計(LC/MS)用), アセトン(残留農薬試験用), トルエン(残留農薬試験用), n-ヘキサン(残留農薬試験用), メタノール(液体クロマトグラフ質量分析計(LC/MS)用), 塩化ナトリウム(残留農薬試験用), リン酸水素二カリウム(特級), リン酸二水素カリウム(特級), 無水硫酸ナトリウム(残留農薬試験用), 酢酸アンモニウム溶液(高速液体クロマトグラフィー(HPLC)用)およびケイソウ土(セライト545)を使用した。水は超純水製造装置(Merck Millipore製)で製造した超純水を使用した。

4.3. 調製試薬

0.5 mol/L リン酸緩衝液(pH 7.0)：リン酸水素二カリウム 52.7 g およびリン酸二水素カリウム 30.2 g を量り採り、水約 500 mL に溶解し、1 mol/L 水酸化ナトリウムまたは 1 mol/L 塩酸を用いて pH 7.0 に調製した後、水を加えて 1 L とした。

4.4. ろ紙

桐山ロート用ろ紙 No.5A-60

4.5. 固相抽出ミニカラム

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(以下、グラファイトカーボンミニカラム)は、Sigma-Aldrich 製 ENVI-Carb/LC-NH2 (500 mg/500 mg) をアセトニトリル・トルエン (3:1) 10 mL でコンディショニングしたものを用いた。

5. 装置

5.1. ホモジナイザー

日本精機製作所製 エースホモジナイザー

5.2. 高速液体クロマトグラフタンデム型質量分析計

LC 部：島津製作所製 Nexera

MS 部：島津製作所製 LCMS-8045

6. 前処理方法

6.1. 抽出

図 1 の分析法フローチャートに従い、分析試料から農薬をアセトニトリルで抽出し、抽出液に塩化ナトリウムおよび 0.5 mol/L リン酸緩衝液(pH7.0)を加えて振とうしたのち、水層を分離除去した。

添加回収試験は、ホモジナイザー用容器に採取した試料に添加回収試験用標準液を添加し 30 分放置した後に抽出を開始した。

6.2. 精製

無水硫酸ナトリウムを用いて脱水したアセトニトリル層をグラファイトカーボンミニカラムで精製したのち、アセトン・n-ヘキサン (1:1) 混液に溶解し正確に 1 mL 定容したものを試験溶液とした。

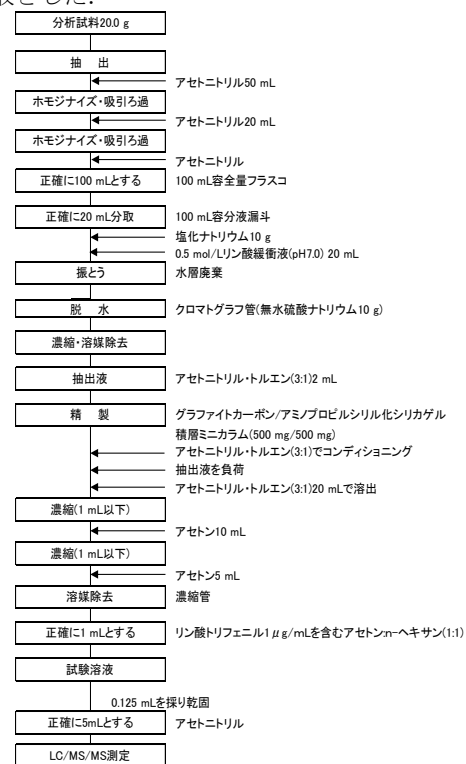


図1. 一斉試験法(野菜)フローチャート

6.3. LC-MS/MS 測定用試験溶液

試験溶液 0.125 mL から溶媒を除去し、残留物

をアセトニトリルで 5 mL としたものを LC-MS/MS 測定用試験溶液とした。

7. 測定条件

LC-MS/MS による測定イオンおよび測定条件は、表 1 から表 3 のとおりとした。

表 1. LC-MS/MS 測定イオン

農薬名	測定モード	モニターイオン	モニターイオン
		(定量) m/z	(定性) m/z
イソピラザム	+	360 > 244	360 > 320
イブロジオン	-	328 > 243	330 > 245
イブロジオン代謝物	-	328 > 141	330 > 141
シアントラニリブロール	+	475 > 286	475 > 444
ジノテフラン	+	203 > 129	203 > 114
ピリベンカルブ	+	362 > 239	362 > 207
ピリベンカルブ代謝物	+	362 > 239	362 > 122
フェンピラザミン	+	332 > 230	332 > 189
フルキサメタミド	+	474 > 400	475 > 401
フルチアニル	+	427 > 192	427 > 411
フロニカミド	+	230 > 203	230 > 148
ミルベメクチン A3	+	546 > 511	546 > 147
ミルベメクチン A4	+	560 > 525	560 > 507
レビメクチン A3	+	724 > 510 (小平・神戸) 723 > 509 (横浜)	723 > 153
レビメクチン A4	+	738 > 524 (小平・神戸) 738 > 523 (横浜)	738 > 167

表 2. LC-MS/MS 測定条件

LC/MS名	: 島津製 LCMS-8045
カラム	: Wako製 Wakopak Ultra C18-2 内径 2.1 mm、長さ100 mm、ODS粒径2 μm
流量	: 0.2 mL/min
オープン温度	: 40 °C
注入量	: 2 μL
移動相	A液 : 5 mmol/L酢酸アンモニウム水溶液 B液 : 5 mmol/L酢酸アンモニウムメタノール溶液
イオン化モード	: エレクトロスプレーイオン化法 (ESI+, ESI-)
分析モード	: 多重反応モニタリング法 (MRM)
インターフェイス温度	: 200 °C
DL温度	: 150 °C
ネブライザーガス流量	: 3.00 L/min
ヒーティングガス流量	: 10.00 L/min
ヒートブロック温度	: 200 °C
ドライビングガス流量	: 10.00 L/min (小平、横浜)、 5.00L/min (神戸)

表 3. グラジエント条件

時間 (min)	A液:B液 (比)		A液:B液 (比)
0 ~ 0.51	85:15	→	60:40
~ 2.17			60:40
~ 3.85	60:40	→	50:50
~ 5.17	50:50	→	45:55
~11.51	45:55	→	5:95
~17.65			5:95

8. 妥当性評価

8.1. 枝分かれ試験

ガイドラインに示された実験例に基づき、各試験室において低濃度および高濃度の添加回収試験をそれぞれ 2 併行で、異なる実施日または実施者で 5 回繰り返した。

8.2. 選択性の確認

ブランク試料を 6. 前処理方法に従って調製し、その試験溶液 (以下、ブランク試料溶液) を LC-MS/MS で測定して新規対象農薬の定量を妨害するピークの有無を確認した。

8.3. 検量線の直線性の確認

新規対象農薬を混合した検量線用標準液 (0.0005, 0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05 および 0.1 μg/mL) を LC-MS/MS に注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積から検量線を作成した。各対象農薬の検量線について、相関係数 (r) が 0.995 以上であることをもって、検量線の直線性を確認した。

8.4. 検出限界および定量限界の確認

定量限界の目標値を 0.02 mg/kg (新規対象農薬の中で最も低いフルチアニルおよびミルベメクチンの基準値 0.2ppm の 10 分の 1 に相当)、検出限界の目標値を 0.01 mg/kg とした。

各試験室において、標準液を測定して得られたピークの高さ (S) とピーク近傍のノイズ (N) の高さから S/N 比 3 相当および 10 相当の濃度を求め、試料中濃度換算したものをそれぞれ検出限界および定量限界とした。

8.5. 真度および精度の確認

ガイドラインに従い、低濃度は真度 (回収率) が 70~120 %, 併行精度が 15 % 未満、室内精度が 20 % 未満、高濃度は真度が 70~120 %, 併行精度が 10 % 未満、室内精度が 15 % 未満を目標値 (表 4 参照) とした。

表 4. ガイドラインに示された真度および精度の目標値

濃度 (ppm)	真度 (%)	併行精度 (RSD %)	室内精度 (RSD %)
≤0.001	70~120	30>	35>
0.001 < ~ ≤0.01	70~120	25>	30>
0.01 < ~ ≤0.1	70~120	15>	20>
0.1 <	70~120	10>	15>

結果および考察

9. 妥当性評価結果

新規対象農薬について、ガイドラインに定められた選択性、真度、精度、定量限界に加え、検出限界および検量線の直線性の評価を行った。

9.1. 選択性

ブランク試料溶液を分析したところ、いずれの新規対象農薬も定量の妨害となるピークは認められず、選択性に問題がないことを確認した。

9.2. 検量線の直線性

各試験室で作成した検量線の相関係数 (r) は表 5 に示すとおりであり、すべての新規対象農薬

について、0.0005~0.1 μg/mL, または 0.001~0.1 μg/mL の範囲で直線性 (相関係数 (r) が 0.995 以上) が確認された。

9.3. 検出限界および定量限界

各試験室の検出限界および定量限界の結果を表 6 に示した。イプロジオンおよびミルベメクチンを除く 9 種の新規対象農薬について、目標値を満たした。

9.4. 真度および精度

各試験室の真度 (回収率) の平均値および精度 (併行精度および室内精度) の結果を表 7 に示した。イプロジオン、ジノテフランおよびレピメクチンを除く 8 種の新規対象農薬について、ガイドラインに示された真度および精度の目標値を満たした。

9.5. 空間再現性 (参考)

3 試験室それぞれに行った枝分かかれ試験結果から求めた試験室間の真度 (回収率) および精度 (併行精度および室内精度) を表 8 に示した。

表 5. 直線性の範囲と相関係数

農薬名	小平		横浜		神戸	
	直線性の範囲 (μg/mL)	相関係数 (r)	直線性の範囲 (μg/mL)	相関係数 (r)	直線性の範囲 (μg/mL)	相関係数 (r)
イソピラザム	0.0005-0.1	0.9988	0.0005-0.1	0.9997	0.0005-0.1	0.9986
イプロジオン	0.0005-0.1	0.9999	0.0005-0.1	1.0000	0.001-0.1	1.0000
イプロジオン代謝物	0.0005-0.1	0.9997	0.0005-0.1	0.9997	0.0005-0.1	1.0000
シアントラニリプロール	0.0005-0.1	0.9981	0.0005-0.1	0.9996	0.0005-0.1	0.9999
ジノテフラン	0.0005-0.1	0.9986	0.0005-0.1	0.9996	0.0005-0.1	0.9982
ピリベンカルブ	0.0005-0.1	0.9996	0.0005-0.1	0.9997	0.0005-0.1	0.9989
ピリベンカルブ代謝物	0.0005-0.1	0.9995	0.0005-0.1	0.9997	0.0005-0.1	0.9987
フェンピラザミン	0.0005-0.1	0.9983	0.0005-0.1	0.9989	0.0005-0.1	0.9983
フルキサメタミド	0.0005-0.1	0.9997	0.0005-0.1	1.0000	0.0005-0.1	0.9998
フルチアニル	0.0005-0.1	0.9997	0.0005-0.1	0.9997	0.0005-0.1	0.9998
フロニカミド	0.0005-0.1	0.9981	0.0005-0.1	0.9999	0.0005-0.1	1.0000
ミルベメクチン A3	0.0005-0.1	0.9996	0.0005-0.1	0.9999	0.0005-0.1	0.9999
ミルベメクチン A4	0.0005-0.1	0.9996	0.0005-0.1	1.0000	0.0005-0.1	1.0000
レピメクチン A3	0.0005-0.1	0.9999	0.0005-0.1	0.9995	0.001-0.1	0.9997
レピメクチン A4	0.0005-0.1	0.9999	0.0005-0.1	0.9999	0.0005-0.1	0.9999

表 6. 検出限界および定量限界

農薬名 (目標値)	検出限界 (mg/kg)			定量限界 (mg/kg)		
	小平	横浜	神戸	小平	横浜	神戸
イソピラザム	0.00005	0.00017	0.00049	0.00017	0.00056	0.00164
イプロジオン	0.00006	0.00104	0.00612	0.00020	0.00346	0.02041
イプロジオン代謝物	0.00004	0.00019	0.00119	0.00015	0.00063	0.00397
シアントラニプロール	0.00011	0.00013	0.00024	0.00038	0.00043	0.00081
ジノテフラン	0.00088	0.00095	0.00163	0.00293	0.00318	0.00543
ピリベンカルブ	0.00061	0.00010	0.00060	0.00204	0.00033	0.00201
ピリベンカルブ代謝物	0.00056	0.00040	0.00161	0.00186	0.00133	0.00538
フェンピラザミン	0.00008	0.00006	0.00096	0.00026	0.00020	0.00321
フルキサメタミド	0.00003	0.00021	0.00144	0.00012	0.00069	0.00479
フルチアニル	0.00016	0.00041	0.00088	0.00053	0.00136	0.00292
フロニカミド	0.00007	0.00013	0.00127	0.00023	0.00043	0.00422
ミルベメクチン A3	0.00275	0.00135	0.01190	0.00916	0.00449	0.03967
ミルベメクチン A4	0.00116	0.00114	0.00537	0.00386	0.00380	0.01790
レピメクチン A3	0.00007	0.00100	0.00491	0.00023	0.00333	0.01637
レピメクチン A4	0.00020	0.00050	0.00209	0.00067	0.00166	0.00696

※目標値を満たさなかった数値を網掛け

表 7. 新規対象農薬の回収率, 併行精度および室内精度

農薬名		回収率 (%) n=10		併行精度 RSD (%)		室内精度 RSD (%)	
		低濃度	高濃度	低濃度	高濃度	低濃度	高濃度
イソピラザム	小平	101.5	105.3	7.6	3.5	9.6	5.4
	横浜	96.5	96.2	3.3	0.4	3.7	1.4
	神戸	93.9	95.9	9.4	6.3	10.2	6.7
イプロジオン	小平	86.2	103.8	6.8	2.4	9.0	6.8
	横浜	99.2	98.4	6.0	1.4	6.0	1.8
	神戸	98.3	96.7	9.4	5.5	20.3	6.9
イプロジオン代謝物	小平	98.8	99.1	5.3	1.6	6.4	4.0
	横浜	89.2	98.2	7.1	2.1	7.1	2.2
	神戸	97.2	93.1	6.1	6.1	11.2	12.2
シアントラニプロール	小平	94.2	91.9	3.4	5.3	6.8	5.5
	横浜	99.0	97.0	3.3	0.8	3.8	1.9
	神戸	91.4	89.9	5.1	3.6	11.7	7.5
ジノテフラン	小平	77.8	76.7	4.5	1.3	4.5	4.2
	横浜	70.1	74.2	2.5	0.6	5.7	2.1
	神戸	69.4	67.2	5.5	3.2	17.9	6.7
ピリベンカルブ	小平	98.9	99.2	4.4	3.2	5.1	5.1
	横浜	98.8	97.9	1.9	0.6	2.2	0.7
	神戸	97.2	92.3	4.1	4.5	8.7	8.6
ピリベンカルブ代謝物	小平	98.1	97.9	5.8	2.5	14.6	3.8
	横浜	96.2	96.0	1.7	0.7	2.4	1.8
	神戸	93.7	95.0	8.2	2.8	15.1	8.1

フェンピラザミン	小平	95.5	97.9	3.3	3.3	9.1	7.4
	横浜	98.8	98.9	2.9	0.7	2.9	1.8
	神戸	93.3	95.1	4.6	4.3	8.7	6.1
フルキサメタミド	小平	92.9	98.6	10.3	4.5	10.3	5.1
	横浜	100.9	97.6	2.6	2.2	3.7	2.3
	神戸	96.3	92.4	8.6	8.0	10.8	11.6
フルチアニル	小平	99.9	99.7	4.9	2.5	5.0	4.7
	横浜	97.6	97.3	6.0	1.2	6.0	1.6
	神戸	97.7	95.1	5.1	6.1	8.7	9.0
フロニカミド	小平	97.6	99.6	7.4	2.8	7.4	3.6
	横浜	93.3	95.8	4.1	1.1	5.0	1.8
	神戸	84.3	87.9	7.3	3.6	10.0	8.1
ミルベメクチン A3	小平	94.9	102.3	6.0	2.6	8.3	6.0
	横浜	95.6	95.4	1.4	1.3	2.1	2.5
	神戸	95.0	92.9	6.6	4.7	9.2	5.8
ミルベメクチン A4	小平	94.7	99.1	5.7	1.5	6.5	3.9
	横浜	100.9	97.1	1.4	1.1	2.4	2.1
	神戸	89.1	92.4	8.4	3.4	12.6	3.9
レピメクチン A3	小平	99.9	97.4	9.8	9.0	10.7	9.0
	横浜	99.9	99.0	6.9	2.3	9.3	3.3
	神戸	94.6	95.2	27.9	5.7	27.9	11.6
レピメクチン A4	小平	92.1	96.3	3.9	4.1	11.1	6.6
	横浜	99.4	94.7	3.2	2.5	3.4	2.9
	神戸	90.9	91.3	6.5	5.6	8.7	7.3

※表4の目標値を満たさなかった数値を網掛け

表 8. 3 試験室の回収率, 併行精度および室間精度

農薬名	回収率 (%) n=30		併行精度 RSD (%)		室間精度 RSD (%)	
	低濃度	高濃度	低濃度	高濃度	低濃度	高濃度
イソピラザム	97.3	99.1	7.2	4.1	8.7	6.6
イブロジオン	94.5	99.6	7.6	3.5	14.2	6.3
イブロジオン代謝物	95.0	96.8	6.1	3.8	9.1	7.4
シアントラニリプロール	94.8	92.9	4.0	3.7	8.1	6.0
ジノテフラン	72.4	72.7	4.4	1.9	11.4	7.1
ピリベンカルブ	98.3	96.5	3.7	3.1	5.6	6.2
ピリベンカルブ代謝物	96.0	96.3	5.9	2.2	11.6	5.0
フェンピラザミン	95.8	97.3	3.6	3.1	7.3	5.5
フルキサメタミド	96.7	96.1	7.7	5.3	9.0	7.4
フルチアニル	98.4	97.3	5.4	3.8	6.2	5.9
フロニカミド	91.7	94.4	6.4	2.7	9.5	7.1
ミルベメクチン A3	95.1	96.8	5.2	3.2	6.9	6.4
ミルベメクチン A4	94.9	96.2	5.7	2.2	9.1	4.4
レピメクチン A3	98.1	97.2	17.0	6.3	17.0	8.0
レピメクチン A4	94.1	94.1	4.6	4.2	8.7	6.0

10. まとめ

新規対象農薬 11 種類について、LC-MS/MS 測定によるミニトマトの一斉法妥当性評価を行った。この結果、イプロジオン、ジノテフラン、ミルベメクチンおよびレピメクチンを除くイソピラザム、シアントラニリプロール、ペリベンカルブ、フェンピラザミン、フルキサメタミド、フルチアニルおよびフロニカミドの 7 種の農薬は、すべての試験室で妥当性評価のパラメータがガイドラインの目標値に適合した。

イプロジオン、ミルベメクチンおよびレピメクチンは定量限界または低濃度における精度が目標値を満たさなかったが、真度および高濃度における精度は良好な結果が得られていることから、測定機器の感度不足が原因の一つと考えられる。一方、ジノテフランは真度が目標値を下回ったが、精度は問題ないことから、抽出工程においてうまく回収できなかったことが原因の一つと考えられる。

これらの結果から、7 農薬についてミニトマトの一斉法による分析が可能であることが確認された。(表 9)

参考文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について、平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号。
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：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の一部改正について、平成 22 年 12 月 24 日付け食安発 1224 第 1 号。
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長通知：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に関する質疑応答集 (Q&A) について、平成 23 年 12 月 8 日付け食安基発 1208 第 1 号。

表 9. 結果のまとめ

農薬名	選択性	真度	精度 (併行)	精度 (室内)	定量 限界	判定
イソピラザム	○	○	○	○	○	○
イプロジオン	○	○	○	×	×	×
イプロジオン代謝物	○	○	○	○	○	
シアントラニリプロール	○	○	○	○	○	○
ジノテフラン	○	×	○	○	○	×
ペリベンカルブ	○	○	○	○	○	○
ペリベンカルブ代謝物	○	○	○	○	○	
フェンピラザミン	○	○	○	○	○	○
フルキサメタミド	○	○	○	○	○	○
フルチアニル	○	○	○	○	○	○
フロニカミド	○	○	○	○	○	○
ミルベメクチン A3	○	○	○	○	×	×
ミルベメクチン A4	○	○	○	○	○	
レピメクチン A3	○	○	×	×	○	×
レピメクチン A4	○	○	○	○	○	

農林水産消費安全技術センター
農薬調査研究報告（第15号）

令和6年3月発行

発行： 独立行政法人 農林水産消費安全技術センター
農薬検査部

〒187-0011 東京都小平市鈴木町 2-772

電話：050-3797-1865

