ISSN 2185-0348

農薬調査研究報告

第１３号

令和３年

Research Report of Agricultural Chemicals

Vol. 13
2021

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

農林水産消費安全技術センター（FAMIC)は、農林水産省所管の独立行政法人であり、農薬取締法、肥料法、飼料安全法、JAS 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。

2018(平成 30)年の農薬取締法改正により導入された登録農薬の再評価制度は、全ての既登録農薬について、最新の科学的知見に基づく安全性等の評価が行われることとされており、先ずは 2024(令和 6)年までに延べ 46 有効成分の再評価を行うことが決められています。また、農薬の蜜蜂への影響や農薬使用者への影響などに関する新たな評価が始まっており、農薬に関する新たな技術的知見の必要性が更に高まっている状況です。

このような中、2020(令和 2)年度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 13 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、農林水産省との協力により、農薬登録の国際調和を進める上で必要な技術情報等を収集し、分析した結果を提供するといった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を分析・考察する調査や論考についても含めたものとしています。また、調査研究の成果は、関係学会等での発表を通じて公表に努めています。

本報告書が関係者の皆様の業務の参考になりますことを期待しています。また、調査研究には、広範な情報を収集・解析した上での課題設定や、データに基づく科学的考察の徹底、結果に基づく施策の提案など、定型的な業務では得がたい貴重な OJT 提供の場となっている側面もあることから、農薬検査部では、今後も積極的に取り組んでいくこととしています。農薬検査部の調査研究の充実のため、引き続き皆様からのご指導をお願い申し上げます。

2022(令和 4)年 2 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

発達神経毒性の欧米での評価状況及び in vitro 発達神経毒性試験の検討状況調査
藤原愛仁……１

ミツバチの田面水を介した農薬暴露実態の解明
－半野外環境下でのトレーサーを用いた検証－
市原直登、加藤貴央、髙野優美、木村　穣、石原　悟……１４

農薬製剤の品質の検査方法の改良
村上賢太、栗山　泰、原田日路香、田渕友梨……２４

An estimation of agrochemicals spray amount on vegetables in Japan
Tomonori Fujita, Masaki Kamiya and Chishio Sasaki……２９

令和２年度学会等での発表実績一覧……４８

【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 を用いたきゅうり中の残留農薬一斉試験法の妥当性評価)
坂部亮介、篠田隆祥、友成真菜、岸田繁二、小塚健志、塚田政範、野村哲也、
竹村浩一……４９

【他誌掲載論文要旨】
Effects of temperature on the dissipation of total- and water-extractable pesticides in Japanese soils
(*Journal of Pesticide Science* 45(2), 86 ～ 94 (2020))
Yutaka Motoki, Takashi Iwafune, Nobuyasu Seike, Keiya Inao……５５

Studies on the sorption behavior and plant uptake of pesticides in Japanese soils
(*Journal of Pesticide Science* 45(3), 159 ～ 165 (2020))
Yutaka Motoki……５６

農薬の土壌吸着特性と植物移行性に関する研究
（日本農薬学会誌　第 45 巻　第 2 号，81 ～ 82（2020 年））
元木　裕‥‥５７

発達神経毒性の欧米での評価状況及び *in vitro* 発達神経毒性試験の検討状況調査

藤原愛仁

独)農林水産消費安全技術センター　農薬検査部

発達神経毒性試験は 1998 年に米国でテストガイドラインが導入されて以降，農薬の評価に活用されるようになり，2007 年には OECD からガイドライン「TG426」が発出されています．我が国では 30 消安第 6278 号農林水産省消費・安全局長通知の発行に伴い，2019 年度より農薬の登録申請において要求条件を満たした場合に提出すべき資料として位置づけられています．TG426 は主にラットを用いる *in vivo* 試験ですが，近年，国際的に，毒性試験全体をとおして，可能な限り *in vivo* 試験を *in vitro* 試験で代替しようとする機運が高まっています．そうしたなか，2017 年から EFSA を中心に DNT の *in vitro* 試験法の開発及び *in vitro* 試験を用いた評価法の確立に向けた検討が進められています．

先行して発達神経毒性の評価を導入している欧米における評価状況を，神経毒性作用を有する化学物質に対象を絞って調査・分析した結果，その評価の難しさが明らかになりました．また，*in vitro* 試験の検討状況について調査・分析した結果，現在の発達神経毒性の評価にはいくつかの課題があること，その課題解決の具体策がヒト由来細胞を用いた *in vitro* 発達神経毒性試験法の開発であること，その開発は有害性発現経路の解明を重要視しつつ統合的毒性評価のアプローチに基づき進められていること，及び，ヒト由来細胞を用いた *in vitro* 発達神経毒性試験法の確立・活用が間近であることが明らかとなりました．

Keywords；発達神経毒性，DNT，IATA，AOP，*in vitro*，試験バッテリー

緒　言

胎児・乳幼児・子供の神経発達に関するリスク評価を導入・実行するにあたり，既に評価法が導入されている欧米の状況を把握することが重要です．そこで本調査では，まず大まかな全体像を把握するため，農薬の評価を行っている欧米当局のウェブサイトにて公表されている評価書の情報から，発達神経毒性試験の評価状況を調査しました．次に，ヒト由来細胞を用いた *in vitro* 試験バッテリーの内容を調査しました．

1. はじめに

1.1. 発達神経毒性の概要

DNT（Developmental Neurotoxicity；発達神経毒性）とは，重金属や化学物質等の暴露による，胎児期あるいは生後発達期の神経系の構造及び機能に対する有害影響と定義されています．メチル水銀による胎児性水俣病やエタノールによる発達障害は，その例としてよく知られています．最近，LD（学習障害），ADHD（注意欠陥・多動性障害），自閉症等の疾病を有する児童が増加していると報告されています．また，子供のいじめ，ひきこもり，自殺等の心の問題は社会問題となっています．これらの原因については明らかにされておらず，その原因のひとつに身の回りの化学物質の暴露による DNT が疑われています[1]．

1.2. 欧米における規制状況

米国では，FQPA（Food Quality Protection Act of 1996；食品品質保護法）に基づき食品中の残留農薬の幼児・子供への健康影響を配慮し，出生前出生後の影響がないという信頼できる完全なデータがない場合には通常の安全係数 100 に対してさらに 10 倍の安全率を適用する等の措置をとることとしています．欧州においては，規則 No 1107/2009 の Annex II にて脆弱な特定グループの保護，及び，DNT のような重大な影響に対する追加の安全率適用の必要性を明記しています．このように，DNT が重要な課題のひとつとして捉えられていることがうかがえます．

そのため，農薬の DNT に関するテストガイドラインとして，1998 年に米国 EPA（Environmental Protection Agency；環境保護庁）により OPPTS 876.6300 が制定されました．2007 年には，OECD（Organisation for Economic Co-operation and Development；経済協力開発機構）により TG426 が制定されています．ともに，実験動物を用いる *in vivo* 試験です．

OECD TG426 は，基本的に OPPTS 876.6300 を踏襲していますが，投与期間延長，新生児に対する各検査項目のサンプル数増加等，細部にわたり改善が加えられています．概要を表 1 に示します．

表 1. OECD TG426 の概要

動物種	ラットが望ましい
暴露期間	妊娠および授乳期間中
評価項目	妊娠期間および出産結果. 身体的および機能的成熟. 中枢および末梢神経系の作用による行動変化. 脳重量および神経病理学的検査.

OPPTS 870.6300 又は OECD TG 426 に準拠して DNT 試験が実施された農薬のうち，その試験成績が審査当局に提出されたものは，米国において 2006 年段階で 69 有効成分[2]，欧州において 2020 年段階で 35 有効成分[3]であると報告されています．なお，米国における 2008 年段階での承認農薬数は約 1150 有効成分†, 欧州においては 2020 年段階で 479 有効成分[3]とのことです. DNT 試験が網羅的に実施されていない理由は各当局の要求条件（表 2）によりますが，「1.3. DNT 試験法の課題」で述べるように DNT 試験の実施ハードルは相当高く，これも一因となっているかもしれません.

表 2. 欧米の DNT 要求条件

米国	
根拠	40CFR Part158.500
条件	① 成獣動物を用いた試験で, 投与に関連する神経学的影響（例えば，神経毒性症状，神経病理学的所見，機能又は行動影響）が認められる場合 ② 出生前又は出生後の暴露により, 発達中の動物に投与に関連する神経学的影響（例えば，神経系の奇形，神経障害，脳重量変化，機能又は行動変化）が認められる場合 ③ ヒトの疫学的研究において, 暴露と神経学的悪影響との間に因果関係が認められる場合 ④ 神経系の発達に悪影響を及ぼすメカニズムを有すると考えられる場合（既知の神経毒性物質との構造活性相関）
欧州	
根拠	規則 No 283/2013 PartA 5.6.2
条件	他の試験での観察又は作用機序から，発達神経毒性に関する補足試験又は情報が要求される場合がある.

† Cumulative Assessment of Risk from Pesticides https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/cumulative-asses sment-risk-pesticides

1.3. DNT 試験法の課題

DNT 試験法の課題として, 以下の指摘がなされています.

- 試験方法が複雑であり，煩雑な側面を有し，試験実施機関の現場にとっては多大な労力が要求される[2].
- 化学物質の高濃度暴露による中毒だけが子供たちの脳発達に対する懸念を引き起こすのではなく，特に化学物質の混合物の低濃度暴露もまた，現在観察される神経発達上の障害の発病率増加に貢献していると考えられている．そのため，より多くの農薬及び化学物質に対して DNT 試験を実施すべきであるが，以下の理由のために現在の DNT ガイドライン試験ではその実行性は乏しい[3].
  - ①試験コストが膨大である（1 年/化合物，最高で € 1.000.000）.
  - ②1 つの化合物を試験するために約 140 匹の雌親と 1000 匹の児動物が必要とされるため倫理的に疑わしい.
  - ③方法論, 評価および規制において不確実性がある.
  - ④ヒトと齧歯動物との間の発達のタイミングや薬理/毒性動力学の違いのため，ヒトの脳の防御に対する予測性は疑わしい.
- 子供たちの脳を保護するため，ヒトに関連し，より速く，より安く，正確な DNT 評価を可能とする試験法が，現在の DNT ガイドライン試験の代わりに必要である[3].

このような状況のなか，2017 年より，OECD においてヒト由来細胞を用いた DNT *in vitro* 試験バッテリー開発プロジェクトが EFSA（European Food Safety Authority；欧州食品安全機関）を中心に進行しています.

2. DNT 試験の欧米における評価状況

2.1. 調査対象

大まかな全体像を把握するため，神経毒性作用を有する化学物質に対象を絞って調査しました．具体的には，IRAC（Insecticide Resistance Action Committee；殺虫剤抵抗性対策委員会）の作用機構分類体系[4]に基づき，有機リン系，カーバメート系，有機塩素系，ピレスロイド系，フェンピラゾール系，DDT，ネオニコチノイド系，スピノシン系，アベルメクチン系，ネライストキシン類縁体，ジアミド系及びその他の 174 有効成分を調査しました.

2.2. 調査結果

米国で評価書が公表されている 95 有効成分のうち，毒性参照用量の設定根拠になっているものは 6 有効成分, 不確実係数の追加等の根拠になっているものは 22

有効成分，他の試験に比べて毒性が弱い又は DNT なしと結論付けられたものは 34 有効成分，審査当局に DNT 試験が提出されていないものは 33 有効成分でした [5].

欧州で評価書が公表されている 67 有効成分のうち，毒性参照用量の設定根拠になっているものは 8 有効成分，不確実係数の追加等の根拠になっているものは 5 有効成分，他の試験に比べて毒性が弱い又は DNT なしと結論付けられたものは 15 有効成分，審査当局に DNT 試験が提出されていないものは 39 有効成分でした [6] (図 1).

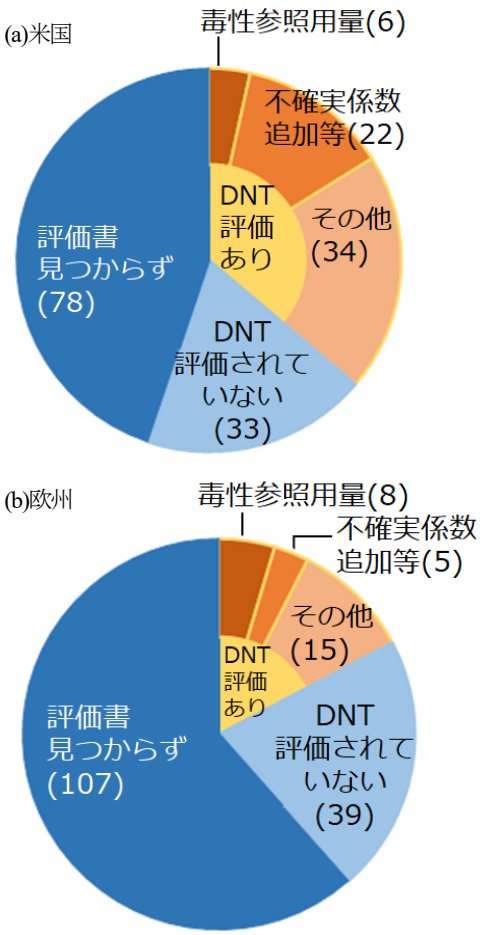


図 1. 174 有効成分の欧米の DNT 評価状況.
括弧内の数字は有効成分の数を示す.

公表されている評価書の具体的な内訳を表 3 にまとめました.

表 3. 評価書が発見できた有効成分と分類

米国	
分類	有効成分名
毒性参照用量の設定根拠になっているもの	(有機リン系) クロルピリホス
	(ネオニコチノイド系) アセタミプリド，チアメトキサム
	(ジアミド系) フルベンジアミド
	(その他) ピメトロジン，スルホキサフロル
不確実係数の追加等の根拠になっているもの	(有機リン系) アセフェート，クロルエトキシホス，クロルピリホスメチル，クマホス，ダイアジノン，ジクロルボス，ジクロトホス，ジメトエート，エトプロホス，フェニトロチオン，イソフェンホス，マラチオン，メビンホス，ナレッド，ホレート，ホスメット，ピリミホスメチル，プロフェノホス，テブピリムホス，レトラクロルビンホス，トリクロルホン
	(その他) アミトラズ
他の試験に比べて毒性が弱い又は DNT なしと結論付けられたもの	(有機リン系) アジンホスメチル，ジスルホトン，EPN，フェナミホス，メタミドホス，パラチオンメチル，テルブホス
	(カーバメート系) アルジカルブ，カルバリル，カルボフラン
	(フェンピラゾール系) フィプロニル
	(ピレスロイド系) アレスリン，α-シペルメトリン，β-シフルトリン，ビフェントリン，シフルトリン，シペルメトリン，デルタメトリン，エトフェンプロックス，フェンプロパトリン，フルメトリン，γ-シハロトリン，λ-シハロトリン，トランスフルトリン，ζ-シペルメトリン
	(DDT) DDT
	(ネオニコチノイド系) クロチアニジン，ジノテフラン，イミダクロプリド，チアクロプリド

	(アルベメクチン系) アバメクチン，エマメクチン
	(その他) フルピラジフロン，インドキサカルブ，メタフルミゾン
審査当局にDNT試験が提出されていないもの	(有機リン系) ホスチアゼート，メチダチオン，オキシジメトンメチル，ホサロン，プロペタムホス，テメホス
	(カーバメート系) メチオカルブ，メソミル，オキサミル，プロポキスル，チオジカルブ
	(フェンピラゾール系) エチプロール
	(ピレスロイド系) シフェノトリン，エスフェンバレレート，イミプロトリン，ペルメトリン，フェノトリン，プラレトリン，ピレトリン，レスメトリン，τ-フルバリネート，テフルトリン，テトラメトリン，トラロメトリン
	(スピノシン系) スピネトラム
	(ジアミド系) クロラントラニリプロール，シアントラニリプロール，シクラニリプロール，テトラニリプロール
	(その他) アフィドピロペン，ブロフラニリド，フロニカミド，ピリフルキナゾン
欧州	
分類	有効成分名
毒性参照用量の設定根拠になっているのも	(フェンピラゾール系) フィプロニル
	(ピレスロイド系) α-シペルメトリン，β-シペルメトリン，シペルメトリン
	(ネオニコチノイド系) アセタミプリド，イミダクロプリド
	(アベルメクチン系) アバメクチン
	(ジアミド系) フルベンジアミド

不確実係数の追加等の根拠になっているもの	(有機リン系) クロルピリホス，クロルピリホスメチル，ジメトエート，エトプロホス
	(カーバメート系) メチオカルブ
他の試験に比べて毒性が弱い又はDNTなしと結論付けられたもの	(有機リン系) フェナミホス，マラチオン，メタミドホス
	(カーバメート系) カルバリル
	(ピレスロイド系) β-シフルトリン，ビフェントリン，エトフェンプロックス，λ-シハロトリン，ζ-シペルメトリン
	(ネオニコチノイド系) クロチアニジン，チアクロプリド
	(アルベメクチン系) エマメクチン
	(その他) フルピラジフロン，インドキサカルブ，メタフルミゾン
審査当局にDNT試験が提出されていないもの	(有機リン系) カズサホス，ダイアジノン，ジクロルボス，フェニトロチオン，フェンチオン，ホスチアゼート，オキシジメトンメチル，パラチオン，パラチオンメチル，ホサロン，ホスメット，ピリミホスメチル，テブピリムホス，トリクロルホン
	(カーバメート系) ベンフラカルブ，カルボフラン，カルボスルファン，ホルメタネート，メソミル，オキサミル，ピリミカーブ，チオジカルブ
	(有機塩素系) エンドスルファン
	(ピレスロイド系) アクリナトリン，シフルトリン，デルタメトリン，エスフェンバレレート，γ-シハロトリン，ペルメトリン，ピレスリン，τ-フルバリネート，テフルトリン
	(ネオニコチノイド系) チアメトキサム
	(スピノシン系) スピネトラム

	(ジアミド系) クロラントラニリプロール，シアントラニリプロール，シクラニリプロール
	(その他) フロニカミド，ピメトロジン

本調査により，米国と欧州とで評価結果は一致しておらず, DNT 評価に対するアプローチの段階からすでに明白な差異が現れているものもある，ということがわかりました．また，不確実性を残していることから不確実係数を追加しているものも散見されました．このことについて以下にまとめます．

① 有機リン系

EPA では, 2015 年に有機リン系農薬の疫学調査の文献レビューを行った結果を公表しており，胎児や子供に発達神経学的影響が認められることを示唆していると結論付け，種差 10，個体差 10 による安全係数 100 に加えてFQPA からの10倍の不確実係数を追加する，と決定されました[7]．また，本調査時点で，DNT 試験により FQPA からの追加の不確実係数 10 倍が見直された事例はありませんでした．よって，疫学調査の文献レビュー及び DNT 試験の両視点から不確実性を残している状態です．

EFSAにおいては，EPAのような包括的な検討はなされていません．例えば，2018年，エトプロホスの再評価ではその不確実性から2倍の不確実係数が追加されました．2019年，クロルピリホスの再評価においては証拠不足により安全性を担保できないと結論付けられ，後に登録失効となっています．

② カーバメート系

EPAでは, 2007年に提出されている3つのN-メチルカーバメート系農薬（アルジカルブ，カルバリル，カルボフラン）のDNT試験とCCA（comparative cholinesterase assay；比較コリンエステラーゼ分析）のレビューを行った結果を公表しており，CCAがDNT試験よりも感度が10～100倍高い，と決定されました[8]．そのため，メチオカルブ，メソミル，オキサミル，プロポキスル，チオジカルブの再評価において，CCAが要求されており，DNT試験は要求されていません．なお，カーバメート系や有機リン系農薬のDNT試験では，コリンエステラーゼ活性阻害が有力な指標として評価されていますが，その他の農薬においては自発運動量，学習・記憶能力，聴覚性驚愕，脳重量，脳計測病理など様々です[2]．

EFSAにおいては，EPAのような包括的な検討はなされていません．カルバリル及びメチオカルブのみDNTの評価が行われています．2006年，カルバリルにおいては発達神経毒性はないとの結論である一方，2018年，メチオカルブの再評価においてはDNTに関する情報不足をカバーするために10倍の不確実係数が追加されました．

③ ピレスロイド系

EPA では, 2010 年に提出されている 6 つのピレスロイド系農薬（ビフェントリン，シフルトリン，シハロトリン，シペルメトリン，フェンプロパトリン，デルタメトリン）の DNT 試験のレビューを行った結果を公表しており, DNT はピレスロイド系農薬のリスク評価において感度の高いエンドポイントではなく，同様の影響は他のガイドライン試験でも認められること，また 6 つの DNT 試験で結果が類似しており，これらの DNT 試験から得られた結論は他のピレスロイド系農薬にも適用できる十分な情報があるとみなせるため，他のピレスロイド系農薬について DNT 試験を実施する価値はほとんどない，と決定されました[9]．この決定後，ピレスロイド系農薬には DNT 試験は要求されていません（この決定前に実施された上記 6 有効成分以外の DNT 試験は存在します）．

EFSA においては，DNT の可能性を確かめる試験が行われるべきとの姿勢がとられています．例えば，2018 年，シペルメトリンの再評価では DNT 試験を評価し，DNT 試験を根拠に ADI，ARfD，AOEL が下方修正されました．

④ ネオニコチノイド系

EPA では，申請された有効成分はすべてにおいて DNT 試験が評価されています．そのうち，2017 年，アセタミプリド，チアメトキサムの再評価では DNT 試験を根拠に aRfD が設定されています．

EFSA においては，2012 年に「アセタミプリドおよびイミダクロプリドは，発達過程のヒトの脳に悪影響を与える可能性がある」とする論文[10]が公表されたことを受け，2013 年に既存 DNT 試験を改めて精査し，ヒトの神経系への影響を再評価しました．発端となった論文は規制決定のためには証拠不十分としつつも，既存 DNT 試験の再評価により毒性参照用量を下方修正すべきと結論付けられました[11]．

⑤ 個別具体例

・アバメクチン

EPA では，2017 年の再評価の際，ラットで DNT 影響が観察されたがこれは出生後 28 日まで P-グリコプ

ロテインが十分に発達しないことによる影響であり，ヒトは胎児期に P-グリコプロテインが十分に発達するため，ヒトにおいてはDNTの影響は予期されない，と評価されました．

EFSA においては，2020 年の再評価の際，DNT LOAEL を 0.12 mg/kg bw/day と評価し，これを根拠に ADI，ARfD，AOEL が下方修正されました．

・アセタミプリド

EPA では，2017 年の再評価の際，DNT NOAEL を 10 mg/kg bw/day と評価しました．

EFSA においては，2016 年の再評価の際，DNT NOAEL を 2.5 mg/kg bw/day と評価しました．

・ビフェントリン

EPA では，2020 年の再評価の際，DNT NOAEL を 3.6 mg/kg bw/day と評価しました．

EFSA においては，2011 年の再評価の際，DNT はない，と評価しました．

2.3. 考察

以上の調査結果は，DNT試験を適切に実施すること，及び，得られたデータを適切に評価することが非常に難しいことを示すとともに，DNT評価において十分な信頼性を有した評価体系が構築されていないことも示していると考えます．OECD TG426内においても，試験デザイン，統計解析およびデータの生物学的意義が相互に複雑に関連しているため，DNTデータの適切な解釈には専門的判断が必要である，と言及されています．また，先述のとおり，既存のDNT試験は申請される有効成分において網羅的に実施されておらず，今回の調査対象以外を含めた有効成分総数に対して換算すると，既存のDNT試験の実施割合は小さいです．言い換えますと，その事例が少ない．これもまた既存のDNT試験データの解釈を困難にしている要因と考えられます．これらから，「既存のDNT試験」のみに基づくDNT評価には大きな不確実性があるのではないかと思われます．

3. DNT *in vitro* 試験の検討状況

3.1. 背景

EFSA の PPR パネル（Panel on Plant Protection Products and their residues；植物保護製剤及びそれらの残留物に関する科学パネル）は，アセタミプリドの再評価において，DNT 試験には不確実性が残っており，この不確実性をはっきりさせるべきである，と強調しました．さらに，OECD TG426 に含まれる *in vivo* 分析と相補的で統合された *in vitro* 神経毒性試験戦略の開発を推奨しました[11]．また，近年，国際的に，毒性試験全体をとおして，可能な限り *in vivo* 試験を *in vitro* 試験で代替しようとする機運が高まっています．このような状況のなか，2017 年より，OECD の WNT（Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines; テストガイドラインプログラム各国調整官作業グループ）において，DNT *in vitro* 試験バッテリー開発プロジェクトが EFSA を中心に進められています[12]．

3.2. IATA アプローチ

DNT *in vitro* 試験法の開発・検討について調査した結果，IATA（Integrated Approach to Testing and Assessment；試験及び評価のための統合的手法）及び AOP（Adverse Outcome Pathway ;有害性発現経路）の概念を積極的に取り入れていることがわかりました．

IATA とは，化学物質の毒性等を総合的に評価するために使われるアプローチです．より具体的に表現すると，ハザード及びリスクに関する規制上の意思決定に必要な情報を得るために，複数の情報源（物理化学的性状，*in silico*，グループ化と類推，*in vitro*，*in vivo*，ヒトのデータ）からのデータの組み合わせに基づき，全ての関連する既存の証拠の統合及び重み付けにより反復的に評価を行うアプローチと説明でき，必要な場合には，新たに生成すべきデータの絞り込みにも役立てることができます[13]．

AOPとは，化学物質の曝露によって引き起こされる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であり，毒性発現メカニズム解明の基礎となります．AOPの概念は，以下のことを可能とします．

(a) 利用可能な既存の情報の体系的な評価を行うことによって，既存の情報からハザードに関して結論付ける可能性がある．
(b) 特定のハザードの根拠に関して信頼レベルを上昇させるためにどのようなタイプの情報が必要か同定して，作成する．
(c) 繰り返しプロセスの中で，規制決定のためにどの情報が必要かを示唆する．

そのため，AOPはIATAを発展させる枠組みに適用できると考えられています[14]．

AOPを適用したIATAの枠組みを図2に示します．

in vitro 試験法が開発されることで AOP 情報が更新され，証拠の重みが増し，IATA の枠組みにおける評価の信頼性が向上することが期待されます．これを実現することが *in vitro* 試験法開発の目的である，と捉えることができます．

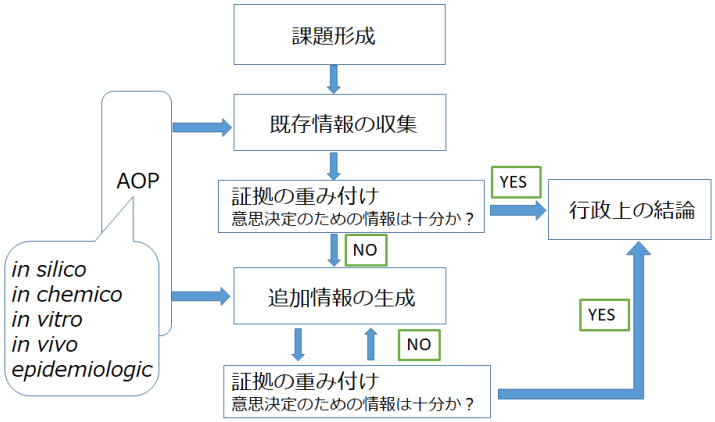


図 2. AOP を適用した IATA の枠組み
（引用文献 14 掲載の図を基に作成）

3.3. DNT *in vitro* 試験バッテリー

2017 年から OECD の WNT にてヒト由来細胞を用いた *in vitro* 試験のガイドライン化の検討が進められており，（2020 年時点からみて）数年以内にガイダンスが発出される予定です．また，検討の進捗の都度，報告書が公開されています．本調査時点においては，哺乳類の胎児期と出生後の脳発達にとって不可欠な鍵となる神経発達上のプロセスを調べることができる，信頼性の確認された 8 種類の *in vitro* 試験をバッテリー（一連の試験）として組み合わせて実施することで神経発達過程への影響を評価できるとの想定が公開されています [3]．具体的には増殖のプロセスへの影響を確認するための NPC1，移動のプロセスへの影響を確認するための NPC2 と UKN2，分化のプロセスへの影響を確認するための NPC3 と NPC5，神経突起伸長のプロセスへの影響を確認するための NPC4 と UKN4 と UKN5 の組み合わせが紹介されます．概略を図 3 に示します．

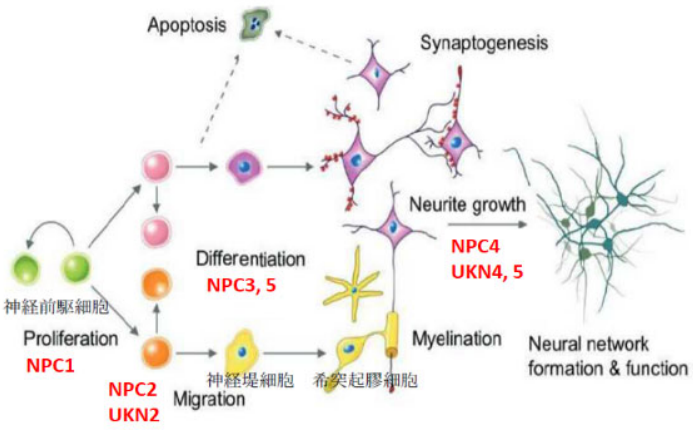


図 3. DNT *in vitro* 試験バッテリーの概略
（引用文献 15 掲載の図を基に作成）

以下，各試験の詳細を記載します．

① NPC1

英名：Primary hNPC proliferation assay

和訳：初期 hNPC（ヒト神経前駆細胞）増殖分析

試験システム

- Lonza Verviers SPRL(Verviers, Belgium)から購入した 4人の男性由来hNPC (Lot no. : 0000391398 (GW19), 0000549062 （GW16）, 0000516385 （GW16）, 0000553745 (GW16)) を使用.
- 種々増殖因子を加えた増殖媒体 (B27) の中で，ヒト NPCは浮かぶ神経球として培養される.
- 培養は，37°C，5%CO2 pH 7.2-7.6で72時間維持される.
- 96ウェルU-底プレートで, 条件毎に5つのウェルを用い, 7濃度の連続希釈 (1:3) と溶媒コントロール (SC) で，各化合物は試験される.
- また，以下のコントロールを設ける.

  陽性コントロール (PC;成長因子を除いた B27 媒体)

  BrdU 背景コントロール (BGBrdU; BrdU 標識化試薬を追加しない B27 媒体)

  溶解コントロール（LC; 分析終了の 30 分前に溶解した細胞)

  背景コントロール（BG; 細胞を加えない B27 媒体)
- 各球のサイズは，高内容画像形成装置(ArrayScan VTI; Thermo Fisher Scientific)を用いてbrightfield顕微鏡検査によって毎日測定され，ピクセル領域の増加は，間接的な細胞増殖測定として計算される.
- 56時間後，BrdU標識化溶液が加え，細胞増殖の指標として，DNA合成（BrdU結合として）が測定される (Cell Proliferation ELISA)
- 一般的な細胞毒性（膜完全性）と細胞生存能力（ミトコンドリア活動）に対する影響を評価するために, 72時間後, 乳酸脱水素酵素 (LDH) 分析(CytoTox-ONE membrane integrity Assay; Promega) 及びalamar blue （CTB）分析(CellTiter-Blue Assay; Promega)が，それぞれ実行される.

エンドポイント評価

- 領域による増殖（NPC1a）: 0h，24h，48hと72hの球サイズ増加（ピクセル量）
- BrdUによる増殖（NPC1b）: BrdU結合を化学ルミネセンス信号（相対的な発光単位）として測定
- 生存能力 : resorufinへと減少したresazurinの量を計ることによるミトコンドリア活動として評価
- 細胞毒性 : resorufinへのLDH依存的resazurinの減少測定による膜完全性として評価

② NPC2
英名：Primary hNPC migration assay
和訳：初期 hNPC 移動分析
試験システム
・NPCを試験実施前に培養液中に少なくとも3〜4週間保つ.
・直径 0.3mm の球がランダムに選択され試験に用いられる.
・96 ウェル平底プレートの分化媒体（N2）の中に入る.
・72 時間，37°C，5%CO2，pH 7.2〜7.6 に保つ.
・NPCs は 5 日間移動して，それによって放射神経膠細胞，ニューロン，希突起膠細胞及び星状細胞に分化する.
・条件毎に 5 つのウェルを用い，各化合物は 7 濃度の連続希釈（1:3）と溶媒コントロール（SC）で試験される.
・また，以下のコントロールを設ける.
溶解コントロール（LC; 分析終了の 45 分前に溶解した細胞）
背景コントロール（BG; 細胞を加えない B27 媒体）
・直径 0.3mm の球がランダムに選択され試験に用いられる.
・処理 72 時間後，高内容画像形成装置を用いて brightfield 顕微鏡検査で放射神経膠細胞移動（NPC2a）を測定.
・72 時間後，細胞は，試験溶液の半分を新たに用意された試験溶液と入れ替える
・除かれた媒体は，LDH 分析で細胞毒性を評価.
・プレートは，48 時間，37°C，5%CO_2 で維持.
・120 時間後，細胞毒性分析と一般的な細胞生存能力に対する影響を評価するための alamar blue (CTB)分析を実施し，免疫細胞化学的（ICC）染色のために 4%のパラホルムアルデヒドで固定して終了.
エンドポイント評価
・移動距離放射神経膠（NPC2a）: 72 時間後，brightfield イメージ上で，球のコアから放射移動を手動で測定
・移動距離放射神経膠（NPC2a）: 120 時間後，蛍光イメージ上の Hoechst で染色した核の各球の移動領域を自動的に確認することによって評価
・移動距離ニューロン（NPC2b）: 球のコアの端から各ニューロンの位置へのすべてのニューロンの平均距離
・移動距離希突起膠細胞（NPC2c）: 球のコアの端から各希突起膠細胞の位置へのすべての希突起膠細胞の平均距離
・細胞数※：120 時間後の各球からの蛍光イメージ上で検出された移動エリアの Hoechst 陽性対象の数として測定
・生存能力（移動/分化）※：マルチプレートリーダーの蛍光信号（相対的な蛍光単位）として resorufin へと減る resazurin の量を計ることによるミトコンドリア活動として評価
・細胞毒性（移動）※：マルチプレートリーダーの蛍光信号として，resorufin への resazurin の LDH 依存的な減少を測定することによる膜完全性として評価
・細胞毒性（移動/分化）※：マルチプレートリーダーの蛍光信号（相対的な蛍光単位）として，resorufin への resazurin の LDH 依存的減少を測定することによる膜完全性として評価

③ NPC3
英名：Primary hNPC neuronal differentiation assay
和訳：初期 hNPC 神経細胞分化分析
試験システム
・②と同じ.
エンドポイント評価
・ニューロン分化（NPC3）: 分化 120 時間後の移動地域の中の Hoechst 陽性核の量のパーセントで，全ての TUBB3 陽性細胞数として検出
・②の※も評価.

④ NPC4
英名 : Neuronal morphology (neurite number, average and total neurite length, neurite branching) of young neurons differentiated from fetal hNPC
和訳 : ヒト胎児神経前駆細胞から分化した若いニューロンの形態学（神経突起数，平均/総神経突起長，枝分かれ）
試験システム
・②と同じ.
エンドポイント評価
・神経突起の長さ（NPC4）: あらかじめ定義された閾値に到達する各ニューロンの骨格化に基づき，μm で神経突起の長さとして評価
・神経突起エリア（NPC4）: 骨格化された各ニューロンに対するピクセルの量の領域として評価
・②の※も評価.

⑤ NPC5
英名：Oligodendrocyte differentiation
和訳：希突起膠細胞の分化

試験システム
・②と同じ.
エンドポイント評価
・希突起膠細胞分化（NPC5）：分化 120 時間後の移動地域の中のすべての Hoechst 陽性核の量のパーセントで，O4 陽性細胞数として検出
・②の※も評価.

⑥ UKN2
英名：The cMINC neural crest cell migration assay
和訳：cMINC 神経堤細胞移動分析
試験システム
・神経堤細胞（NCCs）は，ヒト誘導多能性幹細胞（hiPSC）から以下の条件で分化される.
・10μM Rock 抑制剤と 10ng/ml FGF2 を含んでいる調整された KCM に，20 000 細胞/cm²の密度で，Matrigel をコートした 6-ウェルプレートに hiPSC を再接種することによって，NCCs の生成は分化の 3 日前(DoD-3)に始められる.
・DoD -3 から DoD11 までの細胞は，24h 後，毎日媒体を交換して，37°C，5%CO2 で培養される.
・DoD11 から DoD39 までの細胞は 37°C，5%CO_2 で培養され，毎週の分割によって広げられる.
・細胞は更なる使用まで液体窒素に保管される.
・UKN2 分析は以下の条件で実行される.
・移動-1 日目（DoM-1）に解凍されて，96 ウェルプレートのストッパーの周囲へ接種される.
・24 時間後，ストッパーは取り外される.
・DoM1 において，細胞は被験物質に 24h 暴露される.
・DoM2 において，H-33342 と calcein -AM で染色され，高内容画像化顕微鏡を用いて生存能力と移動を評価するために画像化される.
エンドポイント評価
・移動抑制：ストッパー除去の 48 時間後と化合物処理開始 24 時間後，無細胞領域へ移動した細胞の数を定量化して評価される.
・細胞生存能力：同じウェルの移動領域の外側で測定される.

⑦ UKN4
英名：The NeuriTox neurite outgrowth of CNS neurons test
和訳：中枢神経系ニューロンの神経突起伸長試験
試験システム
・Lund human mesencephalic (LUHMES)細胞を使用.
・分化 0 日目（DoD0），分化プロセスを活性化させるために，テトラサイクリンを含有する媒体に交換される.
・DoD2，細胞は 96 ウェルプレートに接種される.
・付着 1 時間後，被験物質を 24 時間暴露.
・H-33342 と calcein-AM で染色され，高内容画像顕微鏡によって画像化される.
エンドポイント評価
・神経突起伸長：被験物質暴露 24 時間後，自動化したアルゴリズムで神経突起領域を特定して評価.
・細胞生存能力：自動化したアルゴリズムで H-33342 単独にポジティブな細胞（すべての細胞）に対する H-33342 と calcein にダブルポジティブな細胞（生存細胞）の数を特定して評価.

⑧ UKN5
英名：The PeriTox neurite outgrowth of neural crest cell test
和訳：神経堤細胞の末梢神経系における神経突起伸長試験
試験システム
・hiPSC ライン SBAD2 を知覚ニューロンへ分化させる.
・知覚ニューロンへ分化した細胞は，使用まで液体窒素中に保管される.
・解凍細胞は，96 ウェルプレートに接種 1 時間後，被験物質に 24 時間暴露される.
・H-33342 と calcein-AM で染色されて，高内容画像化顕微鏡によって画像化される.
エンドポイント評価
・⑦と同じ.

○評価方法
コントロール，生存能力や細胞毒性との比較で，被験物質は「特異的DNT ヒット」,「非特異的」,「境界線」,「ヒットなし」に分類される.

「特異的 DNT ヒット」：DNT 作用あり.
「非特異的」：DNT 作用はないが，細胞毒性がある.
「境界線」：上記２つのどちらに分類するかはっきりしない（多くの偽陰性を生み出さないための手段として重要）
「ヒットなし」：毒性検出されず.

3.4. まとめ
現在開発中のヒト由来細胞を用いた DNT *in vitro* 試験バッテリーは，*in vivo* 試験の神経病理学的検査と相補的であると思われます．また，各試験に重複性はないことが確認されているので，8 種類全ての試験を実施することでより信頼性の高い神経発達過程への影

響評価が可能である，とのことです．さらに，条件検討の結果, DNT ハザードについて十分に特性が明らかにされた化合物で評価した場合，バッテリーの性能は感度が 82.7%，特異性は 88.2%であり，DNT ハザード特定の非常に期待できるアプローチである，と最新の報告書はまとめています[3]．ただし，*in vitro* 試験濃度を *in vivo* 暴露量へ変換する手法の開発の必要がある等の課題も残されています．

4. 新試験法の活用

ヒト由来細胞を用いた DNT *in vitro* 試験バッテリーをどのように評価に組み込むかは定まってはいませんが，IATA に基づいて開発すると明記されていることや AOP を適用した IATA の枠組みが OECD で重要視されていることから，以下のような活用例が考察できます．

4.1. Tier 制の評価

Tier 制の評価シナリオの検討が最新の報告書で紹介されています[3]．

Tier1：毒性動態学モデル

物理的化学的性状や特定のタンパク質との反応といった情報から，発育中の脳へ暴露するか否かを判断する．確実に否定できればさらなる考慮の必要はない．確実に否定できない場合は Tier2 へ進む．

Tier2：ヒト *in vitro* 試験バッテリー

ヒト由来細胞を用いた DNT *in vitro* 試験バッテリーを実施して特異的 DNT ヒットを示すか否かを判断する．確実に否定できれば DNT の懸念はない．確実に否定できない場合は Tier3 へ進む．

Tier3：ラット *in vitro* 試験

Tier2 で最も敏感であった試験を，今度はラット由来細胞を用いて実施し，特異的 DNT ヒットを示すか否かを判断する．特異的 DNT ヒットを示さなければここまでの情報を根拠として総合的に評価する．特異的 DNT ヒットを示す場合は Tier4 へ進む．

Tier4：ラット *in vivo* 試験

OECD TG426 を実施し，すべての結果を総合的に評価する．

Tier1 及び Tire2 はスクリーニングの意味合いが強いと言えるかもしれません．また，Tire2 のヒト由来細胞を用いた DNT *in vitro* 試験バッテリーを実施することで完全に危険性なしと評価できれば，現状と比べ，ヒトに関連し，より速く，より安く，科学的根拠を基に評価を終了することができます．ヒト由来細胞を用いた DNT *in vitro* 試験バッテリーは強力なスクリーニングツールと言えるのかもしれません．

一方，ヒト由来細胞を用いた DNT *in vitro* 試験バッテリーを実施した結果，危険性ありとなった場合は，どれだけ時間とコストをかけても，危険性をできる限り詳しく調べないといけないので，ラットを用いた試験を実施することになります．また，ヒトとラットでは神経の発達のタイミングなどは完全には一致しないこと，薬理学的にヒトとラットで同じ悪影響がでるとは限らないことから，*in vivo* 試験を実施するか否かを科学的根拠を基に判断するために Tire3 が設けられています．

なお，毒性動態学モデルの構築，及び，ラット *in vitro* 試験の条件検討は完了しておらず，その進捗が待たれます．概略を図 4 に示します．

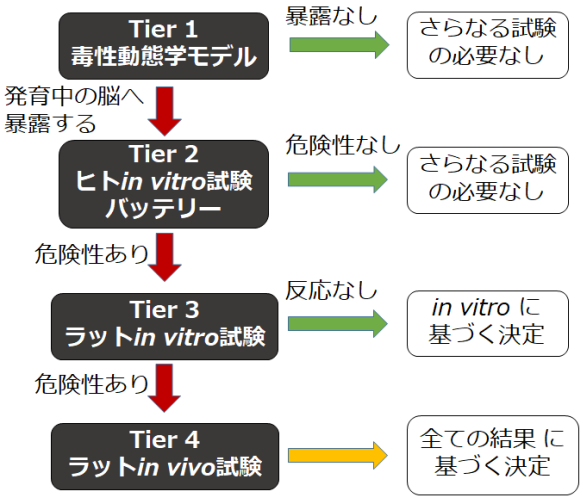


図 4. Tier 制の評価の概略
（引用文献 3 掲載の図を基に作成）

まとめますと，この Tier 制評価を行うことで，複数の情報源を組み合わせ，証拠の重み付けを行い，新たなデータの必要性を決定し，規制上の意思決定に至ることとなります．つまり，IATA に基づいた評価シナリオであると考えられます．

なお，この Tier 制評価はあくまで 2020 年時点において OECD が提案するシナリオの 1 つでしかありません．正式に運用される際には，そのかたちを変えている可能性は十分にあり，また，実際にはケースバイケースで柔軟に評価が行われるだろうと予測できます. 例えば, Tier2 ないし Tier3 までの情報を用いて AOP を構築し，場合によっては「リードアクロス（類推）」（後述参照）も用いて十分な証拠の重みを有した信頼性の高い毒性考察を審査当局に提出することが可能となるかもしれません．これにより，ラット DNT *in vivo* 試験を実施することなく評価が完了すれば，評価の信頼性を十分に確保しつつ動物実験の削減及びコストカットも併せて実現するのではないでしょうか．

また，仮に Tier4 に進んだとしても，*in vitro* 試験で得られたデータも活用することで，闇雲に *in vivo* 試験を実施するよりも，効率的かつより精度の高い評価ができるのではないでしょうか．具体的には，Tier3 までの情報を基に，ある特定の評価項目にのみ限定した試験設計が可能となるかもしれません．これにより，スケールダウンしたラット DNT *in vivo* 試験の実施が可能となれば，評価の信頼性の向上とともに動物実験の縮小及びコストカットが実現する可能性は高いでしょう．

このように，現時点では様々なケースが想定されますが，ヒト由来細胞を用いた DNT *in vitro* 試験バッテリーの追加によって，評価の信頼性を確保しつつ動物実験の縮小及びコストカットも実現する見込みは確実に得られます．これは特に，「1.3. DNT 試験の課題」で示した「ヒトに関連し，より速く，より安く，正確な DNT 評価を可能とする試験法が，現在の DNT ガイドライン試験の代わりに必要である」という課題の解決策として有効でしょう．

4.2. DNT 試験実施済み有効成分の再評価

「2. DNT 試験の欧米における評価状況」で示したとおり，ラット DNT *in vivo* 試験の DNT データはあるが不確実性を残している農薬有効成分は散見されます．また，ネオニコチノイド系農薬で示したように，公表論文から考慮すべき懸念があると報告されたことをきっかけとして，既存の DNT 試験を再度精査した事例もあります．これら農薬有効成分の再評価の際，ヒト由来細胞を用いた DNT *in vitro* 試験バッテリーの DNT データも追加することで，より適切な結論が導かれることが期待されます．言い換えると，「3.2. IATA アプローチ」で示した評価の信頼性の向上であり，これは特に，「既存の DNT 試験」のみに基づく DNT 評価には大きな不確実性がある，という現状の問題の解決策として有効でしょう．

4.3. DNT 試験を実施していない，または，情報が限定的な物質の有害性予測

未試験化学物質の有害性を類似物質の試験データから予測することを「リードアクロス（類推）」といい，グループ化もその手法のひとつです．化学構造が類似する物質のグループ化は頻繁に行われますが，構造類似性のみを根拠としたグループ化では信頼性は十分とはみなされません．信頼性の高いグループ化を行うアプローチとして AOP に基づくことが推奨されています[16]．ヒト由来細胞を用いた DNT *in vitro* 試験バッテリーがガイドライン化されれば，必然的にその実績が積み重なり，DNT に関する AOP 情報の蓄積速度は増加すると考えられます．つまり，グループ化に基づくリードアクロスの信頼性を高めるという観点からも，ヒト由来細胞を用いた DNT *in vitro* 試験バッテリーは有効でしょう．グループ化によって，より広範囲の化学物質に対して効率的かつ効果的な DNT 予測を実施できるようになれば，ごく限られた化学物質についてのみ DNT 評価が実施されている現状が改善されます．これは特に，「1.3. DNT 試験の課題」で示した「より多くの農薬及び化学物質に対して DNT 試験を実施すべき」という課題の解決策として有効でしょう．

4.4. DNT 試験要求条件の変更

ヒト由来細胞を用いた DNT *in vitro* 試験バッテリーがガイドライン化されれば，表 2 で示した DNT 試験要求条件が修正されるのは明らかでしょう．そのうえ，AOP 情報の蓄積が進めば，DNT の評価において注目すべき観点がより明確になるのではないか，と考えられます．近い将来，新しい観点から DNT 試験が要求・評価されるかもしれません．DNT に関する評価方法が今後どのように変遷するにしても，身の回りの化学物質によって胎児期あるいは生後発達期の神経系が有害影響を受ける可能性がある以上，これを防ぐためのより適切なリスク評価体系の構築が望まれます．

5. おわりに

欧米において，ヒトの発達過程の毒性がリスク管理すべき問題として明示され，発達過程の神経毒性に対する評価が実施されています．しかし，適切な評価を妨げるいくつもの課題が存在し，その解決が模索されています．レギュラトリーサイエンスにおいて，試験・評価の方法を絶えず検討・更新することは必然ですが，DNT 評価の課題に対する具体的な対応策は，既存試験法の改良ではなく，ヒト由来細胞を用いた *in vitro* 試験法の開発でした．これは何を意味するのでしょうか．動物愛護のためか，コストカットのためか，メカニズム解明のためか．いずれも間違ってはいないでしょうが，核心は，それらを包括したうえでのより適切な評価の実現，というのが本調査を通して筆者が感じた結論です．加えて，OECD において従来の動物実験データに基づく毒性評価法そのものの抜本的な見直しが着実に進められている，といった情勢も受け取れるのではないでしょうか．実際，先行して IATA に基づく評価法が導入されている皮膚又は眼刺激性試験においては，既存のデータを最大限利用し，資源を効率的に使い，動物実験の必要性を最小にする一方でヒトの安全を確保することが理想である，とされています．より具体的には，利用可能な情報および適切に選択した *in vitro*／*ex vivo* 試験方法の戦略的組合せの実施を強調し，さらなるデータが必要と判断される場合であっても，OECD 非採択 *in vitro* 試験法の実施も検討する

こととされており，そして，OECD 採択 *in vivo* 試験法の実施は最終手段として位置づけられています [17), 18)]. このことからも毒性評価法の国際的潮流がみてとれます．今後も国際標準の最新情報を的確に把握することが重要であると考えます.

欧米では 1990 年代から DNT 評価の取り組みが始まっており，それのみならず，新たな評価法による評価開始目前です．一方，我が国においては，2019 年 3 月 29 日付け 30 消安第 6278 号農林水産省消費・安全局長通知が発行されたことにより，要求条件を満たした場合に OECD TG426 が要求されているところです. DNT 評価に関して先行している欧米から，学ぶべきことや取り入れるべきことは多いと考えます．もっとも，より俯瞰的な「胎児・乳幼児・子供の保護」という観点において，欧米ではその必要性・方向性を FQPA や規則 No 1107/2009 Annex II にて明確にした上で評価を実行している一方，我が国はその必要性・方向性を示していません．この整備も併せて行うことが建設的であると考えます．そうしたなか，本稿の内容が国内における胎児・乳幼児・子供の神経発達に関する農薬のリスク評価の充実化につながれば幸いです.

引用文献

1) 化学物質の発達神経毒性： 辻　良三 2014
https://www.jstage.jst.go.jp/article/toxpt/41.1/0/41.1_S9-1/_article/-char/ja/

2) 化学物質の発達神経毒性評価手法に関する情報収集調査報告書：財団法人 残留農薬研究所 2009
https://www.fsc.go.jp/fsciis/attachedFile/download?retrievalId=cho20090140001&fileId=001

3) Establishment of an a priori protocol for the implementation and interpretation of an in-vitro testing battery for the assessment of developmental neurotoxicity doi:10.2903/sp.efsa.2020. EN-1938
https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/sp.efsa.2020.EN-1938

4) IRAC作用機構分類体系 IRAC International作用機構作業部会
https://www.jcpa.or.jp/labo/pdf/2020/mechanism_irac02.pdf

5) EPA の評価書は下記ウェブサイトより入手可能
https://www.regulations.gov/

6) EFSA の評価書は下記ウェブサイトより入手可能
https://www.efsa.europa.eu/en/publications

7) Literature Review on Neurodevelopment Effects & FQPA Safety Factor Determination for the Organophosphate Pesticides EPA-HQ-OPP-2008-0119-0015
https://www.regulations.gov/document?D=EPA-HQ-OPP-2008-0119-0015

8) Revised *N*-Methyl Carbamate Cumulative Risk Assessment U.S. Environmental Protection AgencyOffice of Pesticide Programs
https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/nmc_revised_cra.pdf

9) Pyrethroids: Evaluation of Data from Developmental Neurotoxicity Studies and Consideration of Comparative Sensitivit EPA-HQ-OPP-2010-0378-0010
https://beta.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPP-2010-0378-0010

10) Nicotine-Like Effects of the Neonicotinoid Insecticides Acetamiprid and Imidacloprid on Cerebellar Neurons from Neonatal Rats February 2012 | Volume 7 | Issue 2 | e32432
http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download;jsessionid=84D5BC055B379579B3A69609F99A9F0B?doi=10.1.1.272.2329&rep=rep1&type=pdf

11) Scientific Opinion on the developmental neurotoxicity potential of acetamiprid and imidacloprid EFSA Journal 2013;11(12):3471
https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2013.3471

12) 30th Meeting of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme ENV/JM/TG (2018) 25
https://one.oecd.org/document/ENV/JM/TG(2018)25/en/pdf

13) GUIDANCE DOCUMENT ON THE REPORTING OF DEFINED APPROACHES TO BE USED WITHIN INTEGRATED APPROACHES TO TESTING AND ASSESSMENT ENV/JM/MONO(2016)28
http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2016)28&doclanguage=en

14) GUIDANCE DOCUMENT FOR THE USE OF ADVERSE OUTCOME PATHWAYS IN DEVELOPING INTEGRATED APPROACHES TO TESTING AND ASSESSMENT (IATA) ENV/JM/MONO(2016)67

http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2016)67&docLanguage=En

15) Reference compounds for alternative test methods to indicate developmental neurotoxicity (DNT) potential of chemicals: example lists and criteria for their selection and use doi:10.14573/altex.1604201.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5250586/pdf/nihms822748.pdf

16) グルーピングの概要 （独）製品評価技術基盤機構 化学物質管理センター安全審査課
https://www.nite.go.jp/data/000097924.pdf

17) NEW GUIDANCE DOCUMENT ON AN INTEGRATED APPROACH ON TESTING AND ASSESSMENT (IATA) FOR SKIN CORROSION AND IRRITATION ENV/JM/MONO(2014)19
https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264274693-en.pdf?expires=1629875229&id=id&accname=guest&checksum=F841CD4EA42EF1635FA74BE4251A8327

18) GUIDANCE DOCUMENT NO 263 ON INTEGRATED APPROACHES TO TESTING AND ASSESSMENT (IATA) FOR SERIOUS EYE DAMAGE AND EYE IRRITATION ENV/JM/MONO(2017)15/REV1
https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2017)15/REV1&docLanguage=En

（全 URL のリンクについての確認は，2021 年 7 月 30 日に実施.）

ミツバチの田面水を介した農薬暴露実態の解明
－半野外環境下でのトレーサーを用いた検証－

市原直登*，加藤貴央*，髙野優美*，木村　穣**，石原　悟**

*独)農林水産消費安全技術センター 農薬検査部
**農林水産省　消費・安全局

ミツバチの田面水を介した農薬暴露実態を解明するため，半野外環境下で蜂群を維持し，農薬成分および蛍光物質をトレーサーとして物質の動態調査を行った．農薬成分をトレーサーとした調査では，調査時期を問わずミツバチ幼虫から農薬成分は検出されず，水を介して幼虫が農薬に暴露するリスクは低いことが示唆された．蛍光物質をトレーサーとした調査では，調査時期によって巣材へのトレーサーの付着状況が異なり，水に含まれる物質の巣箱内での動態が，採水の目的の違いによって異なることが確認された.排泄物から農薬成分および蛍光物質が確認されたことから，水に含まれるトレーサーの一部は巣箱内に持ち込まれずに排泄物として巣箱外へ排出されていることが示唆された．

Keywords：ミツバチ，蜜蜂，ポリネーター，リスク評価，田面水，半野外試験，トレーサー

緒　　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 つの経路がある．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．そのため，経口暴露の主な暴露源は花粉・花蜜とされている．ミツバチの摂餌量と花粉・花蜜の残留農薬濃度から科学的根拠に基づく経口暴露量の推定が可能であり，リスク評価が行われている．

水も花粉・花蜜と同様にミツバチの蜂群の維持に必要であり [1]，蜂蜜を幼虫に給餌するための希釈，ローヤルゼリーの生産，気化熱による巣箱内の温度調節など多様な目的で使用されている．外勤蜂の主な仕事は餌となる花粉や花蜜の採取であるが，一部の外勤蜂が，水集めを専門の仕事としていることが知られている [2]．ミツバチの水利用に関しては一定の知見があるが，水を介した農薬暴露実態を定量的に示した知見は少ない．

評価の先行している欧米においても水を介した農薬のミツバチに対するリスク評価手法は完全には確立していない [3),4)]．しかしながら，日本の農地はおよそ半分が水田であり，農薬を施用した水田の水をミツバチが利用する可能性が高いため，田面水を介したミツバチに対する農薬暴露実態を把握・解明することは意義深い．また，暴露実態を反映した水経由の農薬暴露についてリスク評価導入の要否を今後検討する必要がある．

前報 [5)]では実際の養蜂現場周辺の水田における採水状況の調査のほか，閉鎖空間における蜂群の飼育方法を検討した結果を報告した．本報では，前報で検討した蜂群の飼育方法を用いて，農薬成分および蛍光物質をトレーサーに用いて蜂群内における水を介した物質の動態を 2019 年および 2020 年に調査した結果を報告する．

材料および方法

前報で検討した手法 [5)] で蜂群を閉鎖空間内（簡易テント内）で維持し，トレーサー（農薬成分）を含んだ脱塩素水をミツバチに採水させ，採水蜂，外勤蜂，内勤蜂，幼虫中に含まれるトレーサーを経時的に分析することで階層別にトレーサーの暴露状況を調査した．また，蛍光物質をトレーサーとした調査では，蛍光物質の巣材への付着状況を視覚的に調査した．

1. 供試生物

2019 年の調査では花粉交配用のセイヨウミツバチ（*Apis mellifera* L.）群（巣板 4 枚群（約 8000 頭）,1 群）を，2019 年 7 月 11 日に秋田屋本店（岐阜県岐阜市）から購入し用いた．

2020 年の調査においても同様に花粉交配用のセイヨウミツバチ群を 2020 年 3 月 31 日に秋田屋本

店から 3 群購入し用いた.

2. 飼育方法

巣箱は購入後すぐに農薬検査部敷地内に設置した簡易テント（FIELDOOR 社製，製品名：スクリーンテント，3.0 m×3.0 m×2.2 m（W×D×H））内に設置し，翌日巣門を開け飼育を開始した．餌として果糖ブドウ糖液糖（Brix 糖度約 70 %，製品名：はちまんま）および代用花粉（製品名：ローヤルビー）を与えた.

3. 給水方法

前報で検討した，脱脂綿で蓋をしたメディウム瓶を天井から逆さまにして吊り下げる方法で給水を行った.

4. トレーサーの暴露

4.1. 使用した農薬成分

表 1 および表 2 に示す農薬成分をトレーサーとして用いた.暴露溶液は表 1 および表 2 に示した濃度となるようアセトンを助剤として分析用標準品を脱塩素水に溶解して調製した. 暴露溶液中のアセトン濃度はミツバチ成虫単回経口毒性試験の OECD テストガイドライン [6]で定められている 1%を超えないよう調製した. 暴露溶液の調製は暴露開始日前日に行い，暴露直前までスターラーで撹拌し，不溶物を除去するために濾過した. トレーサーとして用いた農薬成分はミツバチに対する急性毒性が弱いことが明らかな成分を選定した.

表 1. 2019 年の調査で用いた農薬成分

有効成分名	logPow*	水溶解度 (mg/L)	暴露溶液中濃度 (mg/L)	定量下限値 (ng/bee)
ﾄﾘｼｸﾗｿﾞｰﾙ	1.41	596	5.0	1.0
ｼﾒﾄﾘﾝ	2.14	428	5.0	2.0
ﾌﾞﾛﾓﾌﾞﾁﾄﾞ	3.46	3.54	3.0	0.4
ﾌﾞﾀｸﾛｰﾙ	4.42	16	3.0	1.0

*農薬ハンドブック（2016）

表 2. 2020 年の調査に用いた農薬成分

有効成分名	logPow*	水溶解度 (mg/L)	暴露溶液中濃度 (mg/L)	定量下限値 (ng/bee)
ﾄﾘｼｸﾗｿﾞｰﾙ	1.41	596	5.0	1.0
ｼﾒﾄﾘﾝ	2.14	428	5.0	2.0
ﾋﾟﾗｸﾛﾆﾙ	2.18	50	5.0	2.0
ｼﾞﾒﾀﾒﾄﾘﾝ	3.2	20	5.0	0.4
ﾌﾞﾛﾓﾌﾞﾁﾄﾞ	3.46	3.54	3.0	0.4
ﾌﾟﾚﾁﾗｸﾛｰﾙ	3.9	74	5.0	0.4
ﾌﾞﾀｸﾛｰﾙ	4.42	16	5.0	1.0

*農薬ハンドブック（2016）

4.2. 使用した蛍光物質

オレンジ色の蛍光塗料（シンロイヒ株式会社製，型番 SW-114）をトレーサーとして用いた．暴露溶液は脱塩素水で蛍光物質を 50 倍に希釈したものを用いた.

4.3. 暴露方法

暴露溶液を入れた給水器を簡易テント内に設置することで暴露開始とした. 農薬成分をトレーサーとした調査では，採水量を測定するために，暴露溶液は午前 9 時に設置し，午後 3 時に回収した．これを 7 日間繰り返し,その後，トレーサーを含まない脱塩素水に切り替えた.

蛍光物質をトレーサーとした調査では，暴露溶液を入れた給水器を簡易テント内に設置することで暴露開始とし，暴露期間が終わるまで設置した.

4.4. 暴露期間

2019 年の調査は，農薬成分をトレーサーとした暴露は 2019 年 8 月 6 日から 8 月 12 日まで行った. 蛍光物質をトレーサーとした暴露は 2019 年 8 月 28 日から 9 月 9 日まで行った.

2020 年の調査では，農薬成分をトレーサーとした暴露は 2020 年 5 月 26 日から 6 月 1 日まで行った．蛍光物質をトレーサーとした暴露は 2020 年 8 月 12 日から 8 月 18 日まで行った.

5. 調査項目

5.1. 死虫数および蜂群強度

飼育期間中は休日を除く毎朝巣箱外で確認された死虫数を計測し，日ごとの死虫率を算出した．また，定期的に巣箱内部を確認（内検）し．巣板両面を写真撮影（図 1）して生存成虫総数（蜂群強度）を推定した. 巣板片面をミツバチが覆っている状態を 1000 頭と仮定して推定した．蜂群強度と死虫率を蜂群状態の指標とした.

図 1. 生存成虫数推定に用いた写真の一例

5.2. 採水量

採水量は前報で報告した方法と同様に，給水器の設置前後の重量差と，ミツバチが採水できないようにした別の容器を用いて算出した蒸発量との差から，ミツバチが採水した水の量を算出した．また，ミツバチが給水器を訪れる回数（採水回数）を午前・午後の 3 回それぞれ 15 分間観察し，暴露時間中の採水回数を推定した．採水した水の総量と採水回数から，1 回当たりの採水量を算出し，Visscher ら（1996）が報告した採水量（30-58 mg）[7]と比較した．

5.3. 試験環境

暴露期間中の気象条件および巣箱内温度を測定した．天候および最高最低気温はアメダス（観測地点：東京都府中市），巣箱内温度は巣箱内に設置した温度計（アズワン株式会社製，型番 RX-350TH）を用いて記録した．

5.4. 暴露溶液中の農薬成分濃度

暴露開始時，暴露 4 日後，暴露終了時に給水器から採水した．採水した暴露溶液をアセトニトリルで 100 倍に希釈した溶液を測定試料とし，LC-MS/MS を用いて測定した．また，ブロモブチドは分解物（ブロモブチド-デブロム）も測定対象とした．

5.5. 虫体中の農薬成分量

巣箱内の採水蜂，外勤蜂，内勤蜂および幼虫を，暴露開始前，暴露終了 1 日後，暴露終了 3 日後および暴露終了 7 日後に採取した．採水蜂は，暴露開始前にあらかじめ，給水容器から採水していたミツバチをマーキングすることで識別した．採取後，ミツバチ 1 頭を試料とした前処理を行い，LC-MS/MS を用いて分析を行った．また，ブロモブチドは分解物（ブロモブチド-デブロム）も測定対象とした．

5.6. 排泄物中の農薬成分量

2020 年の調査では，排泄物中の農薬成分を測定した．暴露終了 1 日後，4 日後，7 日後の各日，簡易テント内に直径 9 cm のろ紙を 3 枚設置し排泄物を採取した．その後，排泄物の付着箇所（図 2）を切り取り，虫体中の農薬成分分析と同様の手順で分析を行った．

5.7. 虫体や巣材に付着した蛍光物質の観察

暴露終了翌日，成虫，幼虫および巣板にブラックライト（アルファーミラージュ社製，型番：ABL-3Z，波長：375 nm）を照射して蛍光物質の付着箇所を確認した．

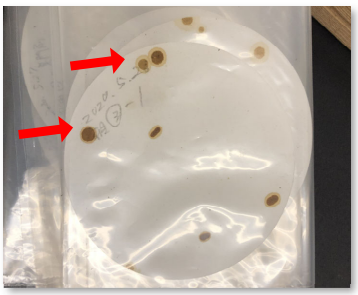


図 2. 採取したミツバチの排泄物

結果

1. 2019 年の調査

1.1. 蜂群の状態

農薬成分をトレーサーとして用いた調査において，暴露中（8 月 6 日～8 月 12 日）の日ごとの死虫率は 1.6～3.2 %であった．

蛍光物質をトレーサーとして用いた調査では，暴露中（8 月 28 日～9 月 9 日）の日ごとの死虫率は，9 月 6 日までは 2.4～8.2 %で安定していたが，9 月 7 日以降は 10～13 %となった．

1.2. 採水量

農薬成分をトレーサーとして用いた調査における暴露期間中のミツバチ 1 匹が 1 回に採水する水量を図 3 に示す．

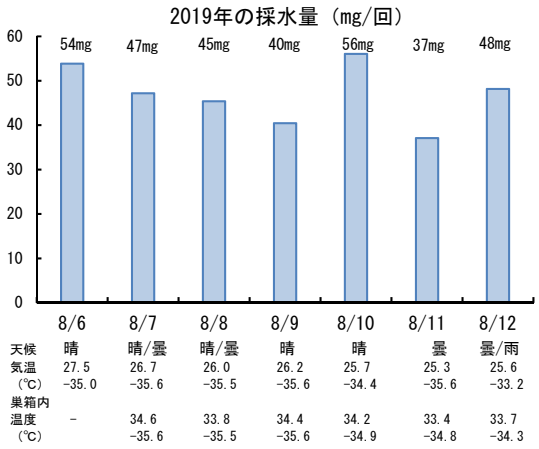


図 3. 1 回当たりの採水量（2019 年）

ミツバチ 1 匹が 1 回に採水する水量は 37-56 mg（平均値±SD：47±6.3 mg）と推定された．なお，暴露期間中の総採水量は 693 mg だった．

1.3. 暴露溶液中の農薬成分濃度

暴露溶液中の農薬成分濃度を図 4 に示す.

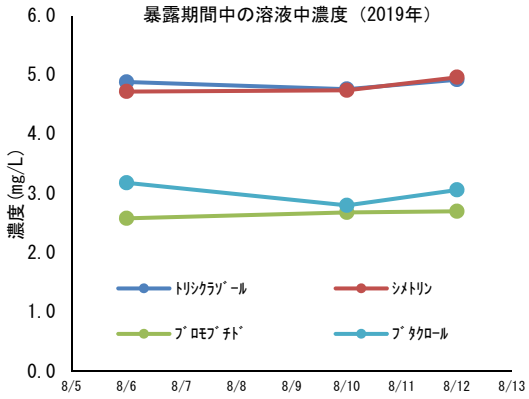


図 4. 暴露溶液中の農薬成分濃度（2019 年）

暴露溶液中の農薬成分濃度は暴露期間を通して安定しており，減衰も認められなかった．また，ブロモブチド - デブロムは検出されなかった.

1.4. 虫体中の農薬成分量

虫体中のトレーサー残留量を図 5 に示す. 成虫に関しては, すべての階層から調査に用いた成分が定量下限値以上で検出された. 成虫から検出された成分のうち, トリシクラゾールおよびブタクロールが高頻度, 多量に検出された. すべての階層において, 暴露終了 1 日後の試料で検出される農薬成分量が多く, 時間経過に伴って減衰する傾向が認められた. なお, 外勤蜂に関しては, 暴露終了 7 日後の試料は採取できなかった. 一方で, 幼虫に関しては, いずれの成分も定量下限値以上の検出はされなかった. また, ブロモブチド-デブロムは成虫および幼虫のいずれの試料からも検出されなかった.

1.5. 巣材等に付着した蛍光物質

蛍光物質をトレーサーとして水を介して暴露した後, 成虫を採取し, ブラックライトを照射して観察した（図 6）.

虫体の腹部から蛍光が観察され, 体内に蛍光物質が取り込まれていることが確認された. 一方で, 虫体外部への蛍光物質の付着は確認されなかった.

巣板にブラックライトを照射し観察した結果の一例を図 7 に示す.

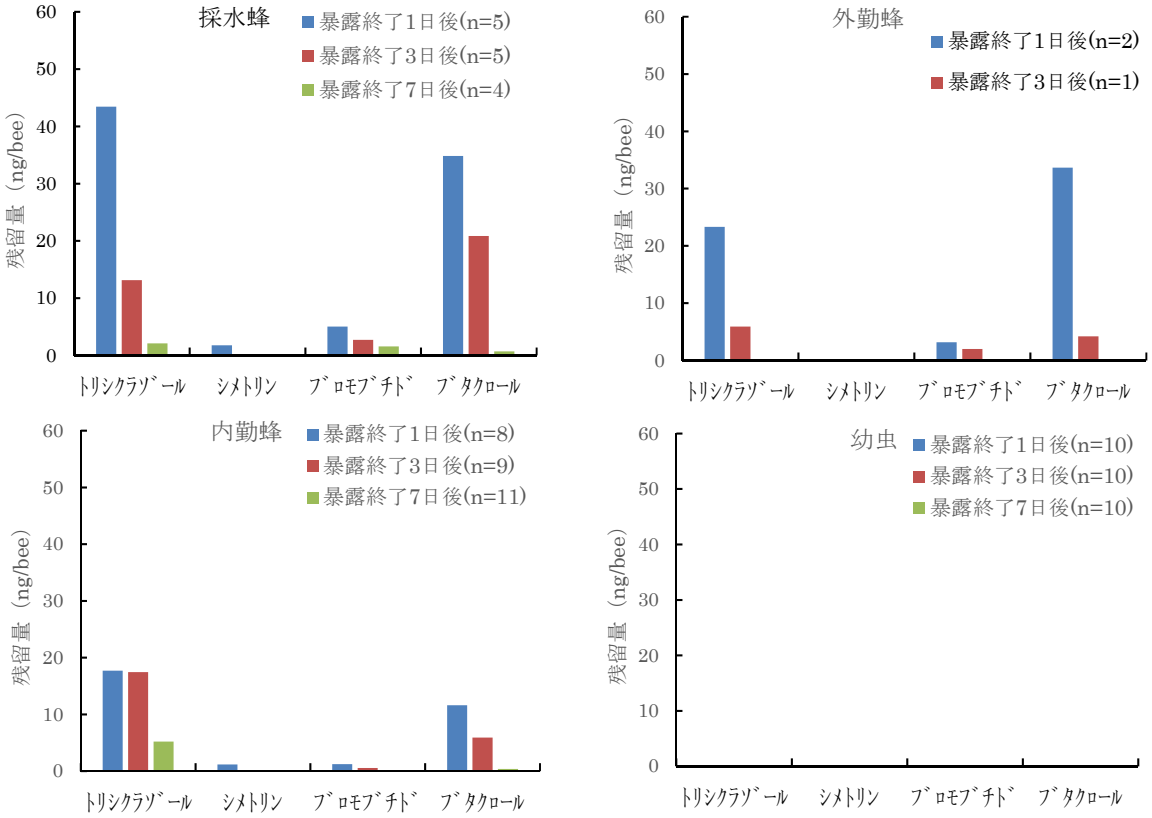


図 5. 虫体中のトレーサー平均残留量（2019 年）

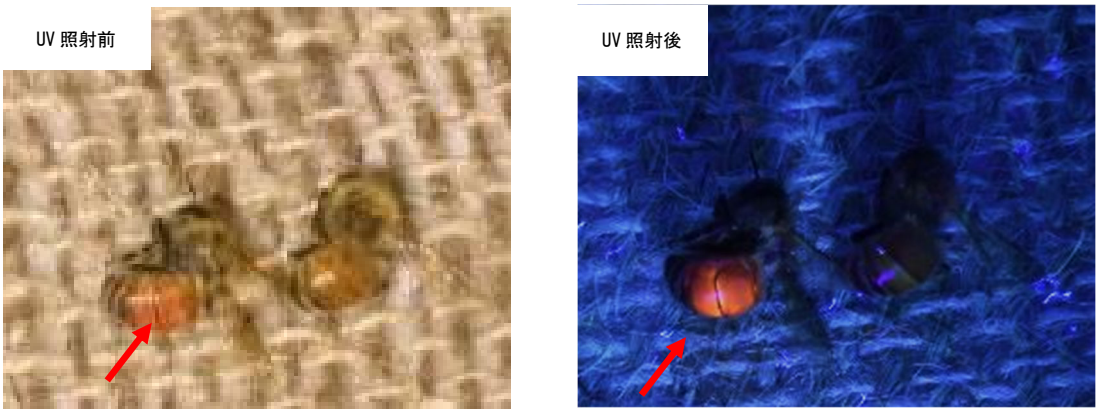


図 6. 虫体中から確認された蛍光成分（2019 年）
左：UV 照射前，右：UV 照射後

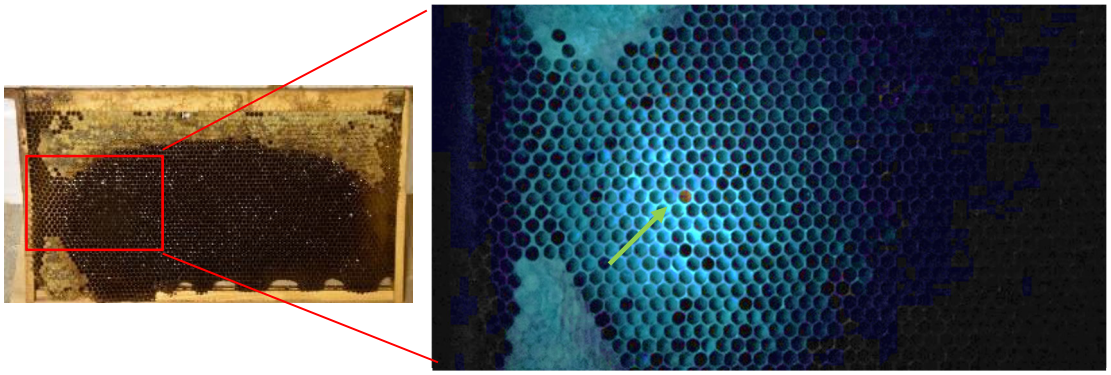


図 7. 巣板から確認された蛍光成分（2019 年）
左：巣板全景，右：拡大・ブラックライト照射

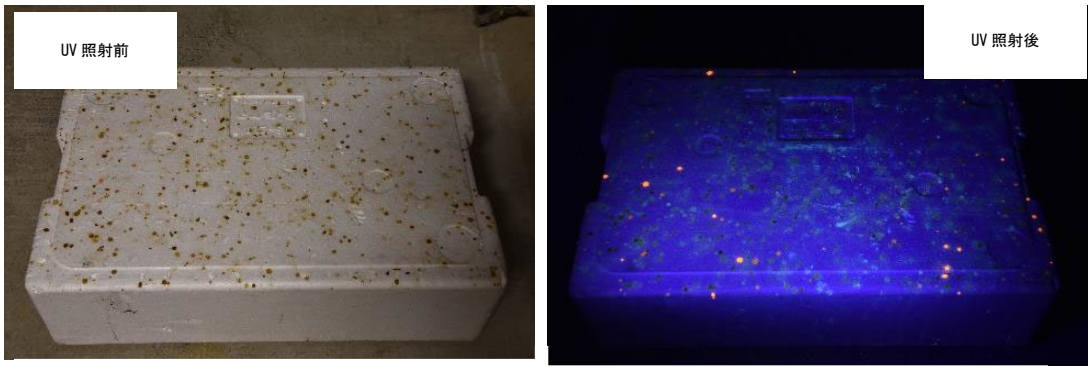


図 8. 巣箱外から確認された蛍光成分（2019 年）
写真は巣箱外に設置した発泡スチロールに付着した排泄物．左：UV 照射前，右：UV 照射後

一部の巣房でのみ蛍光が観察され，その他の場所から蛍光は認められなかった．

巣箱外のミツバチの排泄物にブラックライトを照射した結果，一部の排泄物から蛍光が観察され（図 8），ミツバチが水を介して体内に取り込んだ蛍光物質の一部を体外へ排出することが確認された．

2. 2020 年の調査

2.1. 蜂群の状態

農薬成分をトレーサーとして用いた調査において，暴露中（5 月 26 日～6 月 1 日）の日ごとの死虫率は 2.3～4.7 %であった．

蛍光物質をトレーサーとして用いた調査では，暴露中（8 月 12 日～18 日）の日ごとの死虫率は 1.2～4.9 %であった．

2.2. 採水量

農薬成分をトレーサーとして用いた調査における暴露期間中のミツバチ 1 匹が 1 回に採水する水量を図 9 に示す．

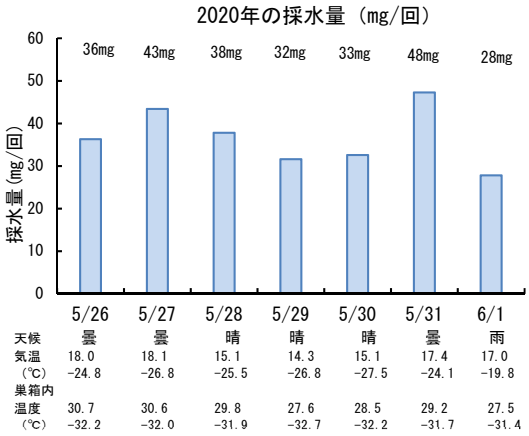


図 9. 1 回当たりの採水量（2020 年）

ミツバチ 1 匹が 1 回に採水する採水量は 28-48 mg（平均±SD：36.7±6.3 mg）と推定された．また，暴露期間中の総採水量は 169 mg だった．

2.3. 暴露溶液中の農薬成分濃度

暴露溶液中の農薬成分濃度を図 10 に示す．

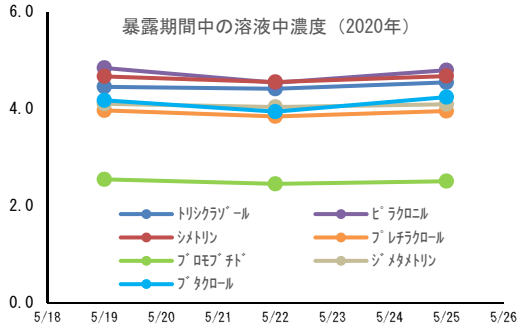


図 10. 暴露溶液中の農薬成分濃度（2020 年）

暴露溶液中の農薬成分濃度は暴露期間を通して安定しており，減衰も認められなかった．また，ブロモブチド分解物は検出されなかった．

2.4. 虫体中の農薬成分量

虫体中の農薬成分量を図 11 に示す．成虫に関しては，すべての階層から調査に用いた成分が検出された．成虫から検出された成分のうち，ピラクロニルが最も多量に検出されたが，検出されたのは 1 匹からのみで，検出頻度は低かった．ピラクロニル以外では，トリシクラゾール，ジメタメトリンおよびブタクロールが高頻度，多量に検出された．また，ほとんどの成分で暴露終了 1 日後の量が多く，時間経過に伴って減衰する傾向がみられた．

幼虫に関しては，2019 年の調査と同様，定量下限値以上で検出される成分はなかった．

ブロモブチド-デブロムは，成虫および幼虫のいずれの試料からも検出されなかった．

採水蜂に関しては，暴露終了 1 日後の試料からピラクロニルが最も多量に検出された．外勤蜂に関しては，暴露終了 1 日後の試料からジメタメトリンが最も多量に検出され，内勤蜂に関しては，暴露終了 4 日後の試料からトリシクラゾールが最も多量に検出された．また，ブタクロールを除くすべての成分で時間経過に伴い減衰する傾向が認められた．幼虫に関しては，定量下限値以上の検出は認められなかった．ブロモブチド-デブロムに関しては，2019 年同様，いずれの試料からも検出されなかった．

2.5. 排泄物中の農薬成分量

採取した排泄物中に含まれる農薬成分を分析した結果を，図 12 に示す．排泄物中からは，3 成分（トリシクラゾール，ジメタメトリンおよびプレチラクロール）が検出された．最も高い濃度は，暴露終了 7 日後の試料から検出されたジメタメトリンで，1.4 ng/排泄物であった．

2.6. 巣材等に付着した蛍光物質

蛍光成分をトレーサーとした調査の暴露終了後に巣板および虫体を観察した結果の一例を図 13 および図 14 に示す．

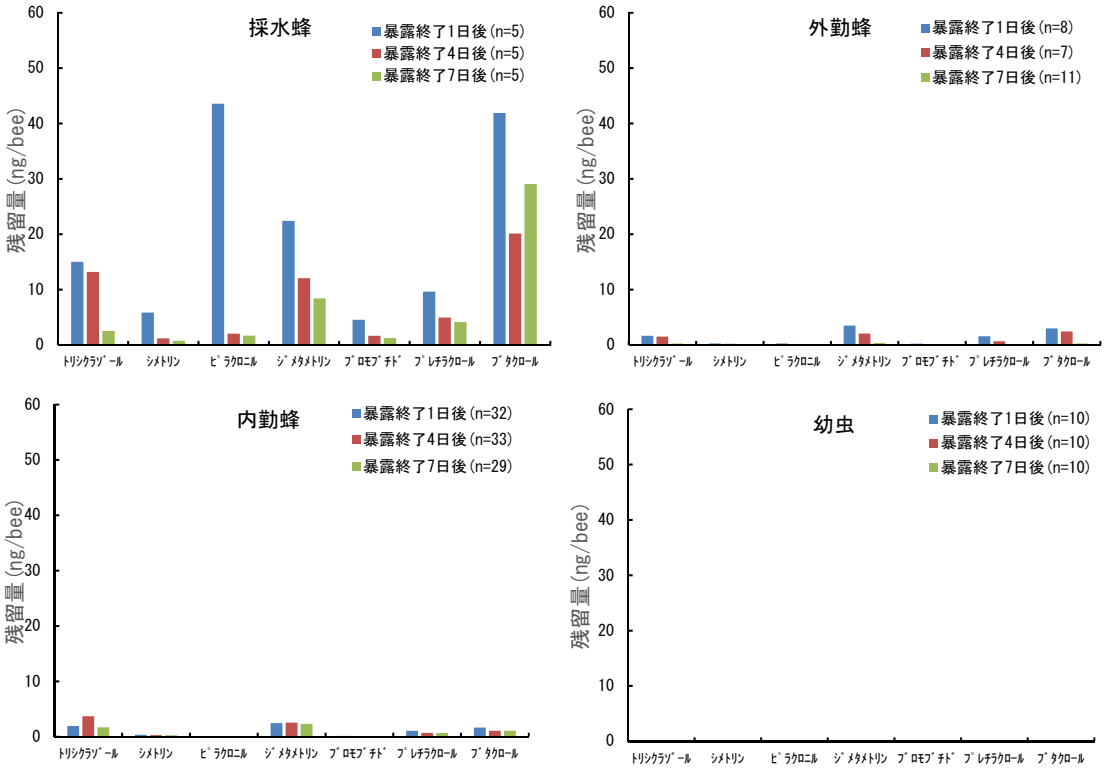


図 11. 虫体中の農薬成分量（2020 年）

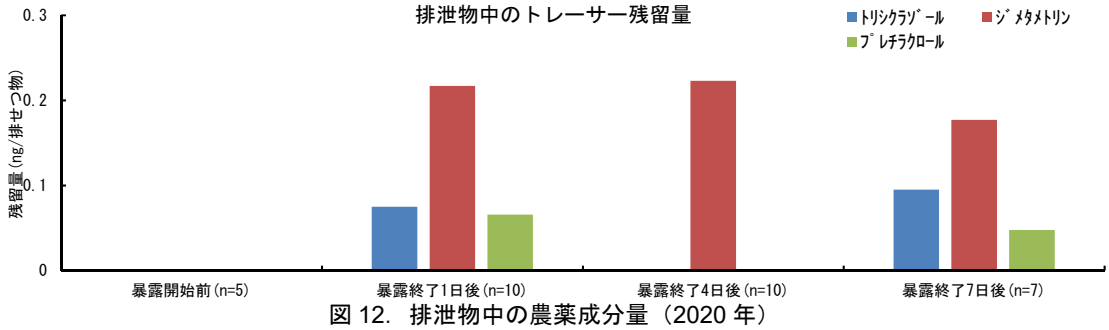


図 12. 排泄物中の農薬成分量（2020 年）

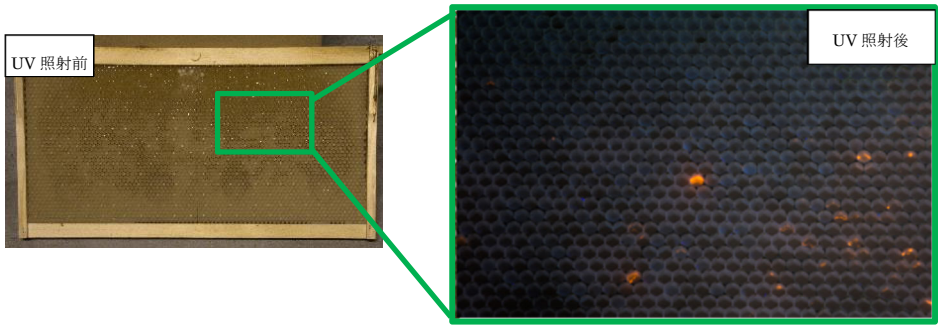


図 13. 巣材から確認された蛍光成分（2020 年）
左：UV 照射前・全景，右：UV 照射後・拡大図

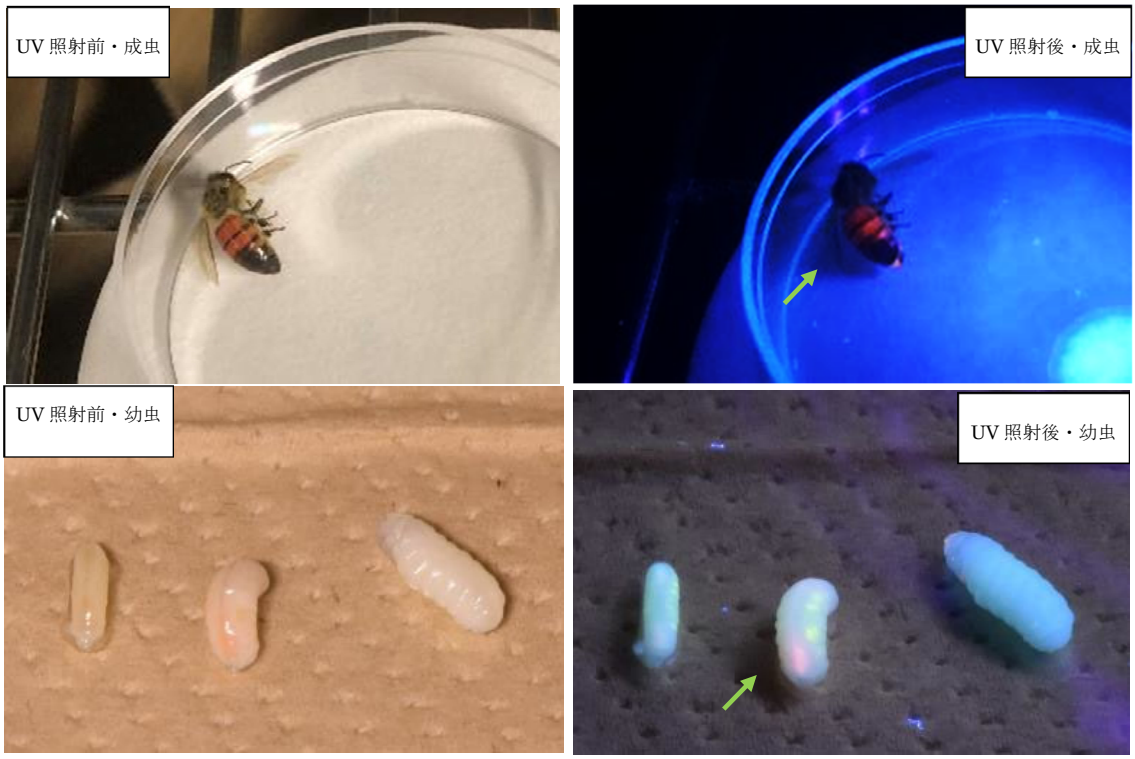


図 14. 虫体中から確認された蛍光成分（2020 年）
左：UV 照射前，右：UV 照射後・拡大図，上段：成虫，下段：幼虫

考察

1. 蜂群状態と採水活動

本調査は，トレーサー物質を含んだ水をミツバチに採取させ，蜂群内に持ち込ませた後，成虫，幼虫，巣材などに含まれる成分を分析，観察することでトレーサーの巣箱内における動態を調べることを目的とした．我々はこれまでにミツバチを試料とした残留農薬分析法を確立していることから，定量可能な農薬成分をトレーサー物質として利用した．調査ではミツバチに対する急性毒性が低い成分を選定して用いた．また，農薬成分は一般に環境水中やミツバチの採餌物に含まれる可能性があることから，このような不特定要素を排除するために，閉鎖空間内で調査を行った．一般にミツバチは閉鎖空間内で長期間飼育することは困難だが，短期間であれば蜂群を維持することが可能である [5]．2019 年の調査で，蛍光物質をトレーサーとした調査において，暴露終了前の 3 日間で死虫率が 10%を上回った．これは，前報でも考察しているが，秋に近づくと雄蜂が蜂群からいなくなり，雄蜂を好んで寄生していたミツバチヘギイタダニが，一斉に働き蜂に寄生したため，死虫率が上昇したと考えられた．一方で，暴露終了前の 3 日間以外の暴露期間では死虫率は 10%を下回っており，蜂群は安定していた．2020 年に行った調査においても，日ごとの死虫率は 10%を下回っており，蜂群は維持できていたと考えられた．また，ミツバチ 1 匹の 1 回の採水量についても文献値 [7]と同等であったことから，適切にトレーサーを含んだ水を蜂群へ暴露させることができたと考えられた．

2. 農薬成分をトレーサーとした調査における虫体中の農薬成分量

2019 年における調査は，夏期の高温期に調査を行った．暴露期間中に暴露溶液中のトレーサー濃度に減衰が認められず（図 4），ミツバチに一定の濃度でトレーサーを蜂群内に持ち帰らせることができた．暴露終了後には，採水蜂，外勤蜂および内勤蜂からトレーサーが検出された（図 5）．虫体中のトレーサー量は水を持ち帰る採水蜂で多くなる傾向が

あり，その他の外勤蜂や内勤蜂からは，採水蜂より少なくなる傾向が認められた．一方で，幼虫からは定量下限値以上のトレーサーは検出されなかった．これは，夏期の高温期に調査を行ったため，給餌目的での水利用が少なかった可能性が考えられた．そのため，2020 年の調査では，水利用の主目的が幼虫への給餌となる春期に調査を行った．また，2019 年の調査では，4 種類の農薬成分をトレーサーとして用いたが，水溶解度の高いトリシクラゾールと水溶解度の低いブタクロールが他の成分と比較し高い濃度で検出される傾向が認められ，水溶解度と虫体中濃度に関連は認められなかったことから，より詳細に logPow と水溶解度の関係性を調べるため，供試成分数を増やして調査した．

2020 年の調査においても，暴露期間中に暴露溶液中のトレーサー濃度は一定で減衰は認められなかった（図 10）．虫体中のトレーサーは，2019 年の調査と同様に採水蜂，外勤蜂および内勤蜂から検出された（図 11）．虫体中のトレーサー量についても 2019 年と同様に採水蜂で多くなる傾向が認められたが，その差は 2019 年より大きかった．この要因として，2019 年の調査は水を巣箱の温度調整のため多く消費する夏期に行ったことから，採水蜂以外の蜂も採水を行っていた可能性が示唆された．

2020 年は，幼虫への給餌が主な水利用の目的と考えられる春期において調査を行ったが，2019 年の調査と同様に，幼虫からはトレーサーは検出されなかった．調査時期に関わらず，幼虫へトレーサーが移行する可能性は低いことが示唆された．

2019 年の調査では 4 成分をトレーサーとして用いたが，水溶解度と虫体からの検出の傾向に関係は認められなかった．2020 年の調査ではトレーサー成分を 7 成分に増やしたが，水溶解度および logPow と虫体からの検出傾向に一定の関係は認められなかった．

また，ブロモブチドについてはトリシクラゾールおよびブタクロールと比較して虫体から検出される量は少なかったが，分解物であるブロモブチド-デブロモが検出されないことから，虫体から検出される量が少ないのは分解以外が要因と考えられた．

3. 農薬成分の分析値から推定した採水量

検出された農薬成分量からミツバチが蜂群内に持ち帰った水の量を推定した．2019 年は採水蜂中に最も多く認められたトリシクラゾール（平均残留量：43 ng/bee）から，ワーストケースとして蜂群内の 8000 頭の成虫が採水したと仮定して推定した水量は 71 mL であった．2020 年は採水蜂中に最も多く認められたピラクロニル（平均残留量：44 ng/bee）から推定した水量は 75 mL であった．

一方で，暴露期間中に持ち帰った水の総量は，給水器の重量を量ることにより実測しており（図 3 および図 9），2019 年および 2020 年でそれぞれ 693 mL および 169 mL であり，虫体中のトレーサー分析値から推定した量と大きな差が認められた．持ち帰った水の量について実測値と推定値に差があることから，ミツバチが採水した水に含まれるトレーサーの一部を虫体外へ排出していることが示唆された．

4. 蛍光物質の付着

虫体外に排出される水を観察するために，蛍光物質をトレーサーとして水に含ませ，虫体中の蛍光物質を観察した結果，2019 年には成虫の腹部から，2020 年には成虫の腹部および幼虫から蛍光が確認された．幼虫から定量下限値以上の農薬成分は検出されなかったが，蛍光物質を用いた試験では確実に視認できるように 50 倍希釈という高濃度で調査を行ったため，農薬成分を用いた調査とは異なり，幼虫からトレーサーが確認されたと考えられる．

一方で，巣材等への付着状況は，2019 年の調査では巣板のごく一部の巣房で蛍光が確認されるのみだったが，2020 年の調査では巣板の複数箇所から蛍光が確認された（図 6，7，13，14）．

この違いは，調査時の水利用目的の違いによるものと考えられた．一般にミツバチの育児適温は 35℃程度であり [8]，巣箱内の温度が育児の適温の超えると水を利用して温度を調節するものと考えられる．2019 年の調査時には巣箱内の温度を測定していなかったため，気温からの推察になるが，暴露期間である 2019 年 8 月 27 日から 9 月 8 日の間，最高気温が 35℃を超えることはなく，30℃前後と比較的低温だったことから，温度調節のための水利用が少なく巣材への付着が少なかったと推察された．2020 年の蛍光トレーサーを用いた調査は 8 月中旬から開始し，巣箱内の温度が育児適温である 35℃を超えたことを確認した．従って，温度調節のために巣房内で水を利用したことから，複数箇所で蛍光が確認されたと考えられた．

5. 排泄物中のトレーサーの分析

2019 年の蛍光物質をトレーサーとした調査では，

巣箱外のミツバチの排泄物中から蛍光トレーサーが確認された（図 8）. 排泄物から蛍光が認められたことはミツバチがトレーサーを体外に排出していることを裏付ける結果であったことから，2020 年の農薬成分をトレーサーとした調査では, 排泄物中のトレーサー量の分析も行った.

ろ紙を用いて排泄物を採取し分析を行った結果, 一部のトレーサーが検出されたが, その最高量はジメタメトリンの 1.4 ng/排泄物であった. ろ紙の面積（63.6 cm^2×3 枚）と 1 日でろ紙に付着した排泄物の平均個数（9 個）から，1 日の簡易テント内の排泄物の平均個数を推定すると，4246 個/日となり，水の量を推定すると，1.2 mL となった．しかし，虫体中のトレーサー量から推定される水の量と合わせてもその量は 76.2 mL であり, 実測した水量（169 mL）とは差が認められた. 今回採取した排泄物は，排泄物と認識しやすい黄色い固形物が含まれたものを採取し分析に供した. 排泄物の黄色い固形物は花粉に起因するものであり, 花粉を食糧とする内勤蜂の排泄物である可能性が高いと考えられた. 内勤蜂中のトレーサー量は採水蜂と比較して少なかったことから, 排泄物中のトレーサー量から推定した採水量を過小に推定していることが考えられた. 水に含まれるトレーサーの排泄について, より精緻な解析を行うには採水蜂の排泄物中に含まれるトレーサー量を明らかにする必要があると考えられた.

まとめ

農薬成分および蛍光物質をトレーサーとして蜂群内における水を介した物質の動態を調査した結果, 農薬成分をトレーサーとした調査では, 採水蜂, 外勤蜂および内勤蜂からトレーサーが検出されたが，幼虫からは検出されなかった．この傾向はミツバチの水の利用目的が異なる時期を問わず同じであり，幼虫へトレーサーが移行する可能性は低く，幼虫への水を介した農薬暴露のリスクは低いことが示唆された．また，成虫から検出されたトレーサーの量は，採水蜂が最も多く，その他の外勤蜂や内勤蜂は採水蜂よりも少ない傾向がみられた.

蛍光物質をトレーサーとした調査では, ミツバチの水の利用目的の異なりにより巣板へのトレーサーの付着状況が異なり, 水を巣箱内の冷却に用いる時期に巣箱内の広範にトレーサーが拡散していることが確認された．また，排泄物から蛍光が確認されたこと, 農薬成分をトレーサーとした調査で排泄物中からトレーサーが検出されたことから, ミツバチが巣箱外に水に含まれる農薬の成分を排泄物とともに排出していることが示唆された.

蜂群内に持ち込まれた水の量を, 採水蜂および排泄物から検出されたトレーサー量から推定した結果, 実測した水の消費量と推定値に大きな差が認められた. 採水により採水蜂が体内に取り込んだトレーサーが本調査で確認した経路の他どのような経路で消失しているか明らかにすることが，ミツバチが採取した水に含まれる農薬の巣箱内での動態解明に重要と考えられた.

引 用 文 献

1)Seeley, T.D.(1995):THE WISDOM OF THE HIVE. The Social Physiology of Honey Bee Colonies,HARVARD UNIVERSITY PRESS,

2)Robinson,G.E., et al.(1984): A highly specialized water-collecting honey bee, Apidologie 15:355-358

3) EFSA(2013): EFSA Guidance Document on the risk assessment of plant protection products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees).p60

4)U.S.EPA(2014): Guidance for Assessing Pesticide Risks to Bees.

5)市原直登，加藤貴央，木村穣，石原悟(2019) : 農薬調査研究報告第 12 号，p12

6)OECD(1998): OECD TG 213 Honeybees, Acute Oral Toxicity.

7)Visscher,P.K. et al.(1996):How do honey bees (*Apis mellifera*) fuel their water foraging flights?,Jounal of Incect Physiology 42:1089 - 1094

8) フォーガス・チャドウィック，スティーブ・オールトン，エマ・サラ・テナント，ビル・フィツモーリス，ジュディー・アール(2017):ミツバチの教科書，株式会社エクスナレッジ.p42

9)木村　澄，松山　茂，中村　純，浅田研一，荻原麻理(2019) : 養蜂技術指導手引書Ⅴ 養蜂における衛生管理ダニ防除技術，一般社団法人日本養蜂協会，p.10

10)Visscher,P.K. et al.(1996):How do honey bees (*Apis mellifera*) fuel their water foraging flights?,Jounal of Incect Physiology 42:1089 - 1094

農薬製剤の品質の検査方法の改良

村上賢太*，栗山　泰**，原田日路香**，田渕友梨*

*　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

国際農薬分析法協議会（Collaborative International Pesticides Analytical Council，以下，CIPAC）では，抽出方法や測定条件を変更することなく，複数の有効成分および製剤へ適用可能な分析法である MAIMM（Multi Active Ingredient and Matrix Methods）の検討が進められている．本調査研究では，国内で登録されている有効成分および農薬製剤について，高速液体クロマトグラフ（HPLC）を用いた MAIMM の適用可能性を検討した．有効成分 8 種，延べ 10 種の農薬製剤を MAIMM で分析したところ，3 回反復注入の併行精度，直線性および 5 回反復分析の併行精度は良好であった．また，検討対象とした 10 種の農薬製剤について，新規申請時に提出された妥当性を確認済みの分析法（以下，見本検査法）を用いて分析し，MAIMM の分析結果と比較したところ，有効成分含有濃度および併行精度はおおむね同程度であった．従って，検討対象とした有効成分および農薬製剤について，MAIMM は適用可能と考えられた．

Keywords：農薬，製剤分析，CIPAC，MAIMM

緒　　言

FAMIC 農薬検査部は，品質不良農薬や無登録農薬等の流通を防止するため，農薬取締法[1]に基づき，農林水産大臣の指示により農薬製造者への立入検査を実施している．立入検査では農薬製剤を集取しており，製造された農薬製剤中の有効成分含有濃度が登録された内容から逸脱していないかを検査している．当該検査で用いられる見本検査法は，登録申請ごとに申請者が提案するため，使用する装置，カラム，試料溶液の調製，測定条件などが製剤ごとに異なり，効率的な検査の妨げとなっている．

一方，CIPAC においては，アイルランドが 2016 年に分析方法・測定条件を変更することなく複数の有効成分および製剤へ適用することを目的とした MAIMM を提案して以来，検討が進められている．2018 年会合において MAIMM の要件等がベルギーより提案され，2019 年 6 月の会合において，具体的な分析方法および共同試験の結果が報告されている[2]．MAIMM は，農作物中の残留農薬の一斉分析法と同様に，一つの分析条件で複数の有効成分と製剤を対象とする分析手法であり，製剤ごとにカラム，溶媒等の測定条件の切り替えを必要としない．また，見本検査法では通常 4〜5 濃度の検量線を用いて定量するのに対し，MAIMM では各分析試料の前後に標準溶液を注入し定量するブラケット法を採用していることから，立入検査で集取した農薬製剤の分析に MAIMM を利用できれば分析時間の短縮と試薬の購入コストの節約が見込まれる．

しかし，MAIMM は，EU を中心に適用可能性の検討が進められているため，EU で登録のない有効成分や製剤は適用の可否が検討されていない．

本調査研究では，CIPAC において適用可能性が検討されていない農薬製剤について，測定装置に HPLC を用いた MAIMM への適用可能性を検討するとともに，分析結果を見本検査法と比較することにより，立入検査で集取した農薬製剤の分析法を見本検査法から MAIMM に変更可能であるかを検討した．

材料および方法

1. 材料

1.1. 供試製剤

国内で登録のある農薬製剤の中から，MAIMM の試験結果が報告されていない 8 種の有効成分（農薬製剤として 10 製剤）を選定した．各農薬製剤の有効成分濃度，許容される濃度範囲（以下，中央値管理幅）および剤型を表 1 に示した．

表 1. 供試製剤

	有効成分濃度 (中央値管理幅)	剤型
農薬 1	A：30.0 % (28.50〜31.50 %)	水和剤

農薬 2	B：0.50 % (0.425〜0.575 %)	粉剤
農薬 3	C：19.5 % (18.33〜20.67 %)	液剤
農薬 4	D：5.0 % (4.50〜5.50 %)	水和剤
農薬 5	E：2.6 % (2.34〜2.86 %) F：25.0 % (23.50〜26.50 %) X：25.0 %	水和剤
農薬 6	G：10.0 % (9.00〜11.00 %)	乳剤
農薬 7	G：0.50 % (0.425〜0.575 %)	粉剤
農薬 8	G：20.0 % (18.80〜21.20 %)	乳剤
農薬 9	H：0.50 % (0.425〜0.575 %)	粉剤
農薬 10	H：6.0 % (5.40〜6.60 %) Y：0.75 %	粒剤

X, Y：分析対象外の有効成分

2. 分析方法

2.1. MAIMM

2.1.1. 直線性確認用標準溶液の調製

1.1 に示した 8 種の有効成分の標準品をアセトニトリルで溶解して 50 mg/L，75 mg/L，100 mg/L，125 mg/L および 150 mg/L の直線性確認用標準溶液を調製した.

2.1.2. 定量用標準溶液の調製

1.1 に示した 8 種の有効成分の標準品 10 mg を 100 mL メスフラスコにはかり取り，アセトニトリルで溶解・定容して定量用標準溶液を調製した．これを 2 点作成した（以下，標準溶液 C_A および標準溶液 C_B）.

2.1.3. 試料溶液の調製

有効成分として 9〜11 mg 相当量の試料を 100 mL メスフラスコにはかり取った. 懸濁液剤の場合は分散させるためさらに水を 5 mL 加えた．これにアセトニトリル約 70 mL 加え，必要であれば超音波照射した．室温に戻したのち，アセトニトリルで定容した．この溶液を 0.45 µm メンブランフィルターでろ過し，分析試料とした.

2.1.4. 測定条件

CIPAC で提案されている MAIMM の HPLC 測定条件を使用機器に適合させ, 表 2 および表 3 のとおりとした.

表 2. HPLC 測定条件

装置	：島津製作所製 LC-20AD
検出器	：フォトダイオードアレイ検出器 島津製作所製 SPD-M20A
カラム	：phenomenex 製 Kinetex XB-C18 (内径 4.6 mm×長さ 100 mm, 粒径 2.6 µm)
カラム温度	：40℃
移動相　A 液	：0.1 % (v/v) リン酸水溶液
B 液	：アセトニトリル（グラジエント条件：表 3）
流速	：1.0 mL/min
測定波長	：220〜290 nm
注入量	：5 µL

表 3. グラジエント条件

時間 （min）	A 液：B 液 （比）		A 液：B 液 （比）
0 〜 0.01	65:35	→	65:35
〜 10.0	65:35	→	15:85
〜 16.0		→	15:85
〜 16.4	15:85	→	65:35
〜 25.0		→	65:35

2.1.5. システムの平衡化

標準溶液 C_A の 2 回連続注入により得られる保持時間の変動が 1.0 %以内, ピーク面積の変動が 1.0 %以内になるまで注入を繰り返した.

2.1.6. 測定

定量用標準溶液および試料溶液をブラケット法（試料溶液の前後に定量用標準溶液を注入する方法）にて注入し，ピーク面積を求めた（例：標準溶液 C_A，試料溶液，標準溶液 C_B，試料溶液，標準溶液 C_A，…）.

2.1.7. 計算

次式により試料溶液前後の定量用標準溶液における個々のレスポンスファクターを求め, 試料中の有効成分含有濃度を計算した.

$$fi = (s \times P)/H_S$$

$$\text{有効成分含有濃度}(\%) = (f \times H_W)/w \times 100$$

fi　= 個々のレスポンスファクター

f　= 試料溶液前後の標準溶液のレスポンスファクターの平均値

H_S = 標準溶液中の有効成分のピーク面積値

H_W = 試料溶液中の有効成分のピーク面積値

s　= 標準溶液中の標準品量（mg）

w　= 供試した試料量（mg）
P　= 標準品の純度（%）

2.2. 見本検査法

申請者より報告されている見本検査法（表 4）に準じた．なお，分析方法の詳細は提出した企業の知的財産に該当するため，記載は省略した．

表 4. 見本検査法における HPLC 測定条件

	カラム	検出波長	定量法
農薬 1	C_{18}	280 nm	内部標準法
農薬 2	C_{18}	254 nm	内部標準法
農薬 3	C_{18}	280 nm	内部標準法
農薬 4	C_{18}	260 nm	内部標準法
農薬 5	C_{18}	240 nm	内部標準法
農薬 6	C_{18}	275 nm	内部標準法
農薬 7	C_{18}	275 nm	内部標準法
農薬 8	C_{18}	275 nm	内部標準法
農薬 9	C_8	270 nm	内部標準法
農薬 10	C_{18}	290 nm	内部標準法

3. 有効成分への MAIMM の適用要件の確認

選定した表 1 の有効成分 8 種・農薬 10 製剤について，MAIMM の要件を参考に，以下の評価項目で MAIMM への適用可能性を確認した．

3.1. 反復注入の併行精度

2.1.2 に従って調製した標準溶液 C_A を HPLC に 3 回繰り返し注入し，得られたクロマトグラムにおけるピーク面積の変動係数（RSD）が 1 %以内になることを確認した．

3.2. 直線性

2.1.1 に従って調製した直線性確認用標準溶液を HPLC に 2 回繰り返し注入し，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．作成した検量線の相関係数（r）が 0.99 以上になることを確認した．

3.3. 反復分析の併行精度

2.1.3 に従って調製した試料溶液 5 点を 2.1.6 の方法により HPLC で測定し，得られたクロマトグラムから算出される試料中の有効成分含有濃度の RSD が 5 %以内になることを確認した．

4. MAIMM と見本検査法による分析結果の比較

4.1. 測定された製剤中の有効成分含有濃度の比較

表 1 の供試製剤 10 剤について，MAIMM および見本検査法を用いて 5 反復分析を行い，製剤中の有効成分含有濃度の平均値（以下，分析値）を比較した．

4.2. 反復分析の併行精度

4.1 の 5 反復分析結果から RSD を求めた．この RSD と，試料濃度に基づく Horwitz 式から求められる相対標準偏差（RSDr）との比（HORRATr）を比較し，2 以下になることを確認した [3]．

$$RSDr\ (\%) = 2^{(1-0.5\times \log C)} \times 0.67$$

C：分析対象製剤の有効成分含有濃度（次元のない質量比）

$$HORRATr = RSD/RSDr$$

結果および考察

1. 有効成分への MAIMM の適用要件の確認

いずれの有効成分とも反復注入の RSD は 1 %以内，検量線の相関係数は 0.99 以上，反復分析の RSD は 5 %以内であり，MAIMM の適用要件を満たしていた（表 5）．

表 5. MAIMM の適用可能性の検討結果

有効成分	反復注入の RSD (%)	相関係数	反復分析の RSD (%)
A	0.02	0.9999	0.96
B	0.03	1.0000	0.18
C	0.31	1.0000	0.27
D	0.07	1.0000	0.32
E	0.14	0.9996	0.27
F	0.05	1.0000	0.71
G（3 製剤）	0.04	1.0000	0.90 – 1.81
H（2 製剤）	0.00	1.0000	0.26 – 0.72

2. MAIMM と見本検査法による分析値の比較

分析値は，MAIMM と見本検査法のいずれも有効成分含有濃度の中央値管理幅の範囲内であった（表 6）．見本検査法による分析値を 100 %とした場合の MAIMM による分析値の相対値を算出したところ，98.1～114.1 %となり，MAIMM 法と見本検査法の分析値はおおむね同程度の値が得られた．農薬 5 の MAIMM のクロマトグラムの例を図 1，見本検査法のクロマトグラムの例を図 2 に示す．

試料を 5 点分析した併行精度は，HORRATr が，MAIMM では 0.06～1.06，見本検査法では 0.07～1.38 と，いずれの農薬でも 2 以下であり同程度の結果になった．

結論

検討対象とした有効成分 8 種，農薬製剤 10 剤について，MAIMM の適用可能性が示唆された．立入検査の集取農薬の分析への MAIMM の導入により，業務の効率化およびコストダウンが可能となることが期待される．ただし，集取農薬の分析に MAIMM を採用するためには，分析対象の有効成分に対する MAIMM の適用可否を事前に検証しなければならない点に留意する必要がある．

参考文献

1) 農薬取締法（昭和 23 年 7 月 1 日法律第 82 号），https://elaws.e-gov.go.jp/document?lawid=323AC0000000082
2) MULTI-ACTIVE METHOD FOR THE ANALYSIS OF ACTIVE SUBSTANCES IN FOURMULATED PRODUTS TO SUPPORT QUALITY CONTROL, https://www.cipac.org/images/MAM%20Method%20Rev%202.1%20June%202020.pdf
3) FAO/WHO: GUIDELINES ON ANALYTICAL TERMINOLOGY (CAC/GL 72-2009), http://www.fao.org/input/download/standards/11357/cxg_072e.pdf

表 6. 試料の分析結果

分析	対象	方法	分析値 (%)						RSD	HORRATr
			1	2	3	4	5	平均		
農薬 1	A	MAIMM	31.46	30.91	31.69	31.27	31.12	31.29	0.96	0.60
		見本検査法	29.25	29.39	29.77	29.86	29.78	29.61	0.92	0.57
		相対値*						105.7		
農薬 2	B	MAIMM	0.528	0.530	0.530	0.530	0.529	0.529	0.18	0.06
		見本検査法	0.525	0.525	0.526	0.527	0.524	0.525	0.22	0.07
		相対値*						100.8		
農薬 3	C	MAIMM	20.16	20.16	20.29	20.19	20.21	20.20	0.27	0.16
		見本検査法	19.53	19.48	19.51	19.55	19.53	19.52	0.14	0.08
		相対値*						103.5		
農薬 4	D	MAIMM	5.03	5.08	5.06	5.04	5.04	5.05	0.32	0.15
		見本検査法	5.16	5.15	5.14	5.14	5.16	5.15	0.19	0.09
		相対値*						98.1		
農薬 5	E	MAIMM	2.67	2.67	2.65	2.67	2.66	2.66	0.27	0.12
		見本検査法	2.64	2.64	2.61	2.61	2.61	2.62	0.63	0.27
		相対値*						101.5		
	F	MAIMM	26.04	25.81	25.57	25.68	25.67	25.75	0.71	0.43
		見本検査法	25.13	24.69	24.78	24.78	24.73	24.82	0.71	0.43
		相対値*						103.7		
農薬 6	G	MAIMM	10.56	10.35	10.44	10.34	10.50	10.44	0.90	0.48
		見本検査法	10.23	10.28	10.32	10.31	10.33	10.29	0.39	0.21
		相対値*						101.5		
農薬 7	G	MAIMM	0.467	0.481	0.468	0.471	0.460	0.470	1.58	0.53
		見本検査法	0.454	0.452	0.450	0.452	0.446	0.451	0.67	0.23
		相対値*						104.2		
農薬 8	G	MAIMM	20.75	21.72	21.26	20.85	21.20	21.16	1.81	1.06
		見本検査法	19.72	20.07	19.26	20.26	19.24	19.71	2.35	1.38
		相対値*						107.4		
農薬 9	H	MAIMM	0.565	0.558	0.555	0.563	0.558	0.560	0.72	0.24
		見本検査法	0.491	0.490	0.492	0.493	0.488	0.491	0.39	0.13
		相対値*						114.1		
農薬 10	H	MAIMM	5.93	5.95	5.96	5.93	5.93	5.94	0.26	0.13
		見本検査法	5.96	5.93	5.96	5.94	5.94	5.95	0.23	0.11
		相対値*						99.8		

*：(MAIMM での分析値 / 見本検査法での分析値) ×100 (%)

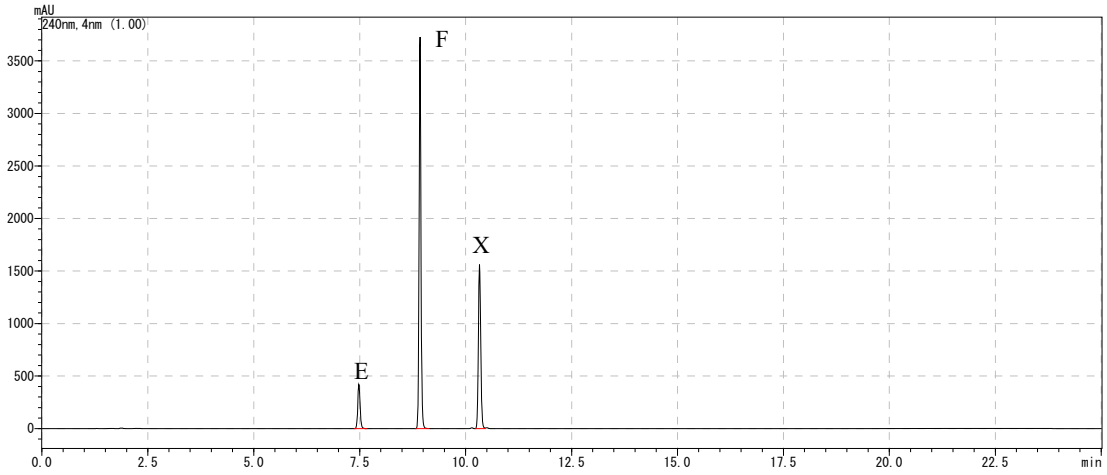


図 1. 農薬 5 の MAIMM のクロマトグラムの例

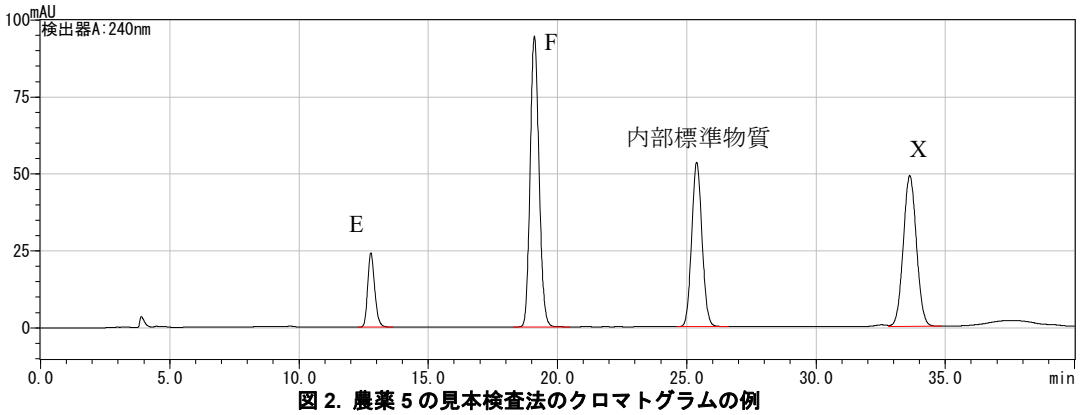


図 2. 農薬 5 の見本検査法のクロマトグラムの例

An estimation of agrochemicals spray amount on vegetables in Japan

Tomonori Fujita, Masaki Kamiya and Chishio Sasaki

Independent administrative institution, Food and agricultural materials inspection center,

Agricultural chemicals inspection station

Abstract

Spray amount (especially, the minimum which is effective to pests) in vegetable fields were estimated mainly for evaluation of exposure to operators. The spray amounts on 5 crops were measured in 2 years. Consequently, when crop height or crop wall area (= row length × crop height) was over 1.7 m or 20 m^2, respectively, the spray volume might be exceed registered upper limit (300 L/10a). The information of spray volume of the tests which conducted in the past were collected. As a result, the spray volume tend to increase in a small scale experiment, in efficacy and phyto-toxycity tests. Tests on residues in crops did not appropriate to estimate requiring spray amount because the amount might be set following the registered range. In addition, efficacy of chlorothalonil against pumpkin powdery mildew was evaluated in the field at 4 different concentrations and spray amounts with the same active substance application rate. In conclusion, efficacy was the lowest in the smallest spray volume treatment. Judging from the mechanism of action, coverage of spraying may important factor such as protective fungicides.

Keywords: agrochemical, fungicide, efficacy, phyto-toxicity, spray amount, residues in crops, powdery mildew, chlorothalonil, mechanism of action, protective, systemic

1. Introduction

Ministry of agriculture, forestry and fisheries (MAFF) introduced the 2 new evaluation factors in the process of agrochemicals registration, in 2019[1)]. The first one is the evaluation of agrochemicals exposure against users. The other one is the evaluation of adverse effects of agrochemicals on honeybees (*Apis* spp.). In the United States, already started the evaluation of agrochemicals exposure to the operators[2)]. Similarly, in the European Union, guidance document on plant protection products exposure to operators and others was published in 2014[3)]. The guidance documents are available on the evaluation of bees[4, 5)]. These evaluations are urgent issue and amount of spraying against crops is a critical factor.

Nowadays, registered spray amount in Japan is generally 60-150 L/10a on cereals, 100-300 L/10a on vegetables and 200-700 L/10a on fruits trees. These ranges were determined from common Japanese agricultural practices in 1990s. The users may regulate spray amount based on size, growth stage and cultural practices of target crops in the ranges of stated above. However, recent common spray amounts in Japanese fields are unclear. In particular, the minimum spray amount which has significant

effectiveness to pests is an important information to evaluate exposure against the users and honeybees. Though, it is expected that there are many difficulties to determine the effective minimum spray amount because many factors affect the spray amount and effectiveness in actual fields. There were a few studies on the effective minimum spray amount of agrochemicals. In the previous study, the impact on the effectiveness of spray machines difference was investigated in vine field in the United States [6]. Although, from the aspect of the registration of agrochemicals in Japan, case studies of spray amount in Japan might be more important than foreign data because crop cultural practices are different in each country or region.

Main factors which affect spray amount might be crop height and numbers of leaves (or leave area). These factors are varied by variation of crops, climate, cultural practices and/or other conditions. Therefore, as a case study, the spray amount against some vegetables were investigated in this report. In addition, to estimate the minimum effective spray amount, effectiveness of chlorothalonil (TPN) under a certain condition was evaluated.

The aims of this study were (1) to determine a common spray amount on some vegetables and (2) to investigate the minimum effective spray amount against a disease.

2. Materials and methods

2.1. Estimation of common spray amount on vegetables in Japan

The spray amounts on some vegetables were quantified in the field of Food and Agricultural Materials Inspection Center, Agricultural Chemicals Inspection Station (Kodaira city, Tokyo, Japan), for 2 years (2019-2020). In the first year, cucumber (*Cucumis sativus*, cv. 'VR-natsu-suzumi', TAKII & Co., Ltd., Japan), eggplant (*Solanum melongena*, cv. 'Togenashi-senryo-nigou', TAKII & Co., Ltd., Japan) and okra (*Abelmoschus esculentus*, cv. 'Early-five', TAKII & Co., Ltd., Japan) were grown[7]. In the second year, eggplant (cv. 'Chikuyou', TAKII & Co., Ltd., Japan), sweet pepper (*Capsicum annuum*, cv. 'Kyo-hikari', TAKII & Co., Ltd., Japan) and tomato (*Solanum lycopersicum*, cv. 'CF-puti-puyo', WATANABE SEED Co., Ltd., Japan) were cultivated. All the crops were grown until the harvest stage (Table 1). Five liters (5 kg) of the water containing spreading agent (Gramin S, Mitsui Chemicals Agro, Inc., Japan; diluted in 0.1 mL/L water) was filled in a battery-powered sprayer (MUS153D, Makita Corporation, Japan) and the spray nozzle with 3 heads (ring shape, NAGATA SEISAKUSYO Co., Ltd., Japan) was applied.

Table. 1. Summary of the crops conditions in 2020.

Crop	Growth Stage	Crop height (m)	Row width (m)	Row length (m)	Number of crops/row	Date of spraying	Days after planting
Tomato	Beginning of harvest	1.7	0.7	10.6	25	26, June	45
Eggplant	Beginning of harvest	1.1	0.7	10.3	17	20, July	67
Sweet pepper	Middle of harvest	1.0	0.7	10.0	20*	20, July	67

* In 1 row, 19 was planted because of the lacking.

In the first year, spraying was done with 5, 5 and 4 replicates (operators), in cucumber, eggplant and okra, respectively. In the second year, spraying was done with 5, 3 and 3 replicates (operators), in tomato, eggplant and sweet pepper, respectively. In each spraying, an "adequate amount" of the water was sprayed, and in this report "adequate" means the water amount dripping from leaves after spraying. The spraying was done on the each rows and the remaining water amount was measured. Then the actual spray amount was calculated by subtracting the remaining water volume from the initial water volume. After that, based on the width and length of the fields, spray amount on the fields were estimated. The unit of spraying amount for a certain area is expressed with "L/10a", following Japanese agrochemicals registration system. In addition, the crop in a row was regarded as a wall and the areas of the wall (crop wall area; CWA) was calculated by the length of row and each crop height. Pieces of Water sensitive paper (Teejet® Technologies, the United States) were placed on 2 to 3 points in each rows with 2 to 3 vertical position in order to check spraying heterogeneity. There was no remarkable heterogeneity of the spraying by visual observation.

2.2. Investigation of spray amount in test results

The spray amounts in the test results which were conducted in the past were investigated. The information were collected from the tests for efficacy and phyto-toxicity and residues in crops those of conducted in Japan. The investigated crops were pumpkin (*Cucurbita* spp.), sweet pepper and tomato (these crops were the same as served for the field experiments in 2020). The results from 2013 to 2019, and the results from 1970 to 2015 were collected on the test of efficacy and phyto-toxicity, and on the test of residues in crops, respectively, but in some year, tests on these crops were not conducted. The crops formerly surveyed[7)] were not researched again.

2.3. Estimation of the minimum effective spray amount against pumpkin powdery mildew

The effect of chlorothalonil (TPN) in different spray amount with the same amount of

active substance was evaluated. As a formulation, ST Daconil 1000 (TPN 40.0%, Sumitomo Chemical company, Ltd., Japan) was used. Pumpkin (cv. 'Kuribou', SAKATA SEED Corporation, Japan) were grown in concrete frames (0.7 × 0.7 m). Five treatments were established with 3 replicates in each and placed following randomized block design. Treatments were (1) 2000 fold dilution and 200 L/10a spray, (2) 1000 fold dilution and 100 L/10a spray, (3) 500 fold dilution and 50 L/10a spray, (4) 250 fold dilution and 25 L/10a spray, and (5) untreated control (Fig. 1). The treatment (2) is the registered minimum amount on pumpkin in Japan, and the amount of active substance per unit area was equivalent to 40.0 g/10a. Eventually, the amount of active substance in the unit area was the same in all the treatments. Spraying was done by using a pressure sprayer (No. 4130, FURUPURA Co., Ltd., Japan) with 1 L tank. Five hundred mili liter of the each dilution was filled in the sprayer and pressure was adjusted at ca. 330 kPa. The spraying rate of the sprayer was 4.08 mL/s (average of 3 measurements), thus the spraying time was determined as 24 seconds in treatment (1), 12 seconds in (2), 6 seconds in (3) and 3 seconds in (4). The spraying was conducted twice at August 5 and 12, 2020. The efficacy was evaluated 7 days after the second treatment (19 August, 2020).

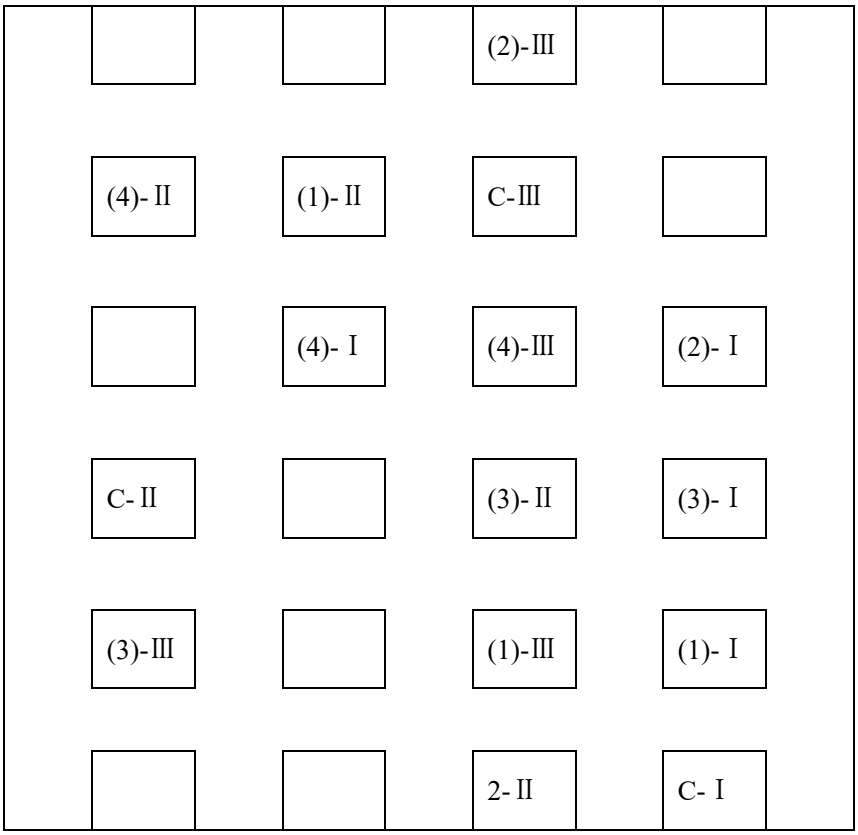


Fig. 1. The layout of the experimental plots. The roman numerals mean replicate number, numbers in parenthesis mean each treatment and "C" means untreated control.

Powdery mildew (naturally occurred and the species was unknown) was already occurred at the beginning of the experiment and diseased leaves were not removed. The effectiveness was evaluated based on disease index (DI). The index was determined based on the proportion of denoting area of symptoms on the leaves (0: No symptoms, 1: less than 5%, 2: 5-25%, 3: 25-50%, and 4: more than 50%). Ten leaves (with disease indices 0 or 1) were marked in each plots and observation of progress of the disease was conducted on these leaves. Disease severity (%) and disease suppression rate (DSR; %) was calculated with the following equation.

Disease severity (%) = Σ (Disease index × The number of investigated leaves) / (The number of investigated leaves × 4) × 100

DSR (%) = 100 – (The disease severity in the treatments / The disease severity in the untreated control) × 100

2.4. Statistical analysis

The free software R (ver. 4.0.3) was used for statistical analysis.

On the results of investigation 2.2, the data containing crop height were extracted and the relationship between the height and the spray amount was analyzed. At first, normality of the data was checked by the Shapiro-Wilk test. The Pearson correlation coefficient was calculated when the data indicate normality, otherwise, the Spearman's rank correlation coefficient was determined. In the case of correlation was observed, test of correlation was done ($p = 0.05$).

On the results of experiment 2.3, disease severity was submitted for statistical analysis. At first, to check normality of the data, the Shapiro-Wilk test was done on the disease severity of each treatment. As a result, all of the data was not normally distributed, therefore the Kruskal-Wallis test was applied ($p = 0.05$). When significance was detected in the Kruskal-Wallis test, the Steel-Dwass test was employed ($p = 0.05$).

3. Results and discussion

3.1. Estimation of common spray amount on vegetables in Japan

3.1.1. Results of the spray amount on each crops and the prediction of spray amount

The maximum, the minimum and the average spray amounts are shown in Table 2. Cucumber, eggplant (in 2019[7]) and tomato needed the spray amounts above the registered range (100-300 L/10a; Fig. 2). On cucumber, 4 of 5 operators sprayed more than 300 L/10a[7], however on tomato, only 2 of 5 operators exceeded for 300 L/10a. Based on this result, crop height of ca. 1.7 m with tomato-like shape was considered to be the upper limit which can be uniformly sprayed with the 300 L/10a spray volume.

Table 2. The maximum, the minimum and the average spray amounts on each crops.

Crop	Spray amount		
	Maximum	Minimum	Average
Tomato	372.3 L/10a	282.0 L/10a	310.1 L/10a
Eggplant	147.0 L/10a	105.1 L/10a	134.1 L/10a
Sweet pepper	167.7 L/10a	116.1 L/10a	139.7 L/10a

Even though, the spray amount for eggplant with 1.2 m height in 2019 was exceeded the upper limit[7]. The spray amounts on eggplant was 314.6 L/10a in 2019[7] but 134.1 L/10a in 2020. Their heights were similar in these 2 years (1.2 m in 2019[7] and 1.1 m in 2020). The area of the field was larger for 0.9 m^2 in 2020 than in 2019[7] and this was from the length of rows (+1.3 m). The decrease of the spray amount may be caused by the difference of the number of leaves. The number of leaves in all the field were 3760 (actually counted) and 3468 (estimated from a photo), thus the leaves was 292 (-7.8%) less in 2020 than in 2019. The difference of the number of leaves was not obvious, but operators got the impression that the number of leaves (and stems) were less in 2020 than in 2019 by visual observation. Especially, the horizontal area which stems were exiting seemed to be smaller in 2020 than in 2019. Compared to the conditions in 2019, it was decreased that the necessity to move the spray nozzle horizontally in 2020, and this might lead the reduction of the spray amount.

The spray amount for sweet pepper was within registered range. The height of sweet pepper was 1.0 m, and shorter than the other crops. Main stem of sweet pepper was along a pole and 2 lateral stems were pulled up with wires thus stems grew vertically. These agricultural practices cause decrease of the horizontal area to spray and the spray amount.

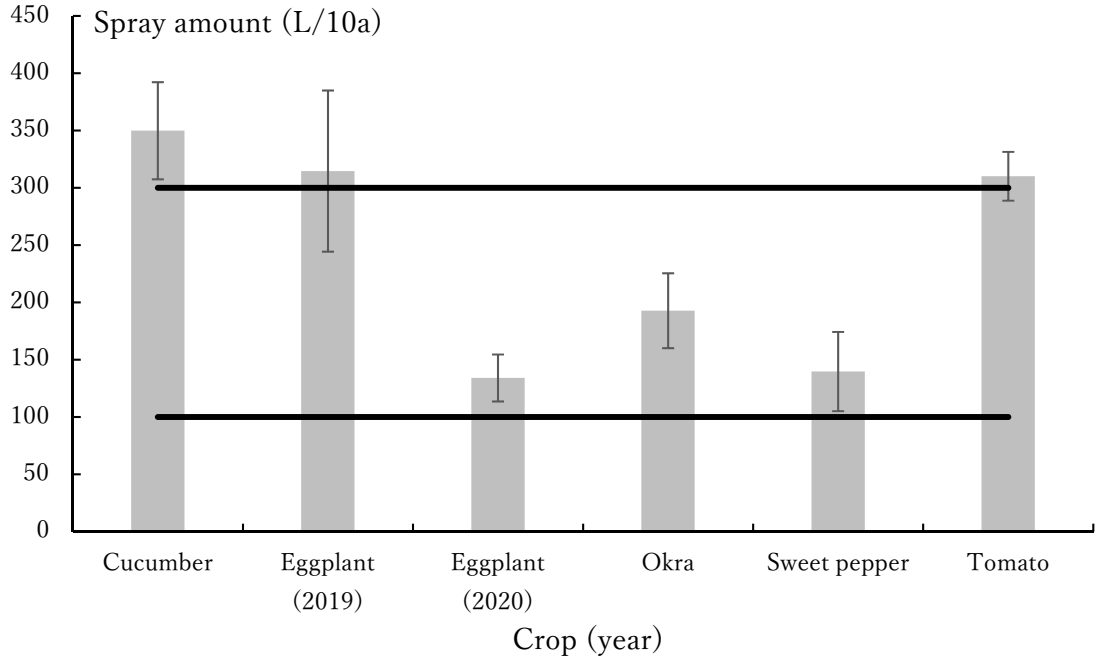


Fig. 2. The spray amounts on each crops in 2 years experiments. Error bars indicate standard deviation, upper line and bottom line means 300 L/10 and 100 L/10a, respectively (the range of spray amounts in registration).

The spray amount can be predicted by crop height and crop wall area (CWA) in some cases. Based on the obtained results, in the case of crop height is taller than 1.7 m (e.g. cucumber and tomato; Fig. 3) or CWA is over 20 m^2 (e.g. cucumber; Fig. 4), the spray amount will possibly exceed 300 L/10a.

Although the spray amount was more than 300 L/10a on eggplant in 2019, even the height was 1.2 m and CWA was 10.8 m^2. Therefore, the spray amount may not be predictable for all the crops based on height and CWA. The number of leaves or total leaf area might be related to the spray amount on eggplant-like shape crops with horizontally spread leaves. The spray amounts for eggplant were varied in 2019 and 2020, and this may be caused by the difference of the number of leaves. This indicated that it is effective to predict the spray amount by the number of leaves or total leaf area for eggplant-like shape crops.

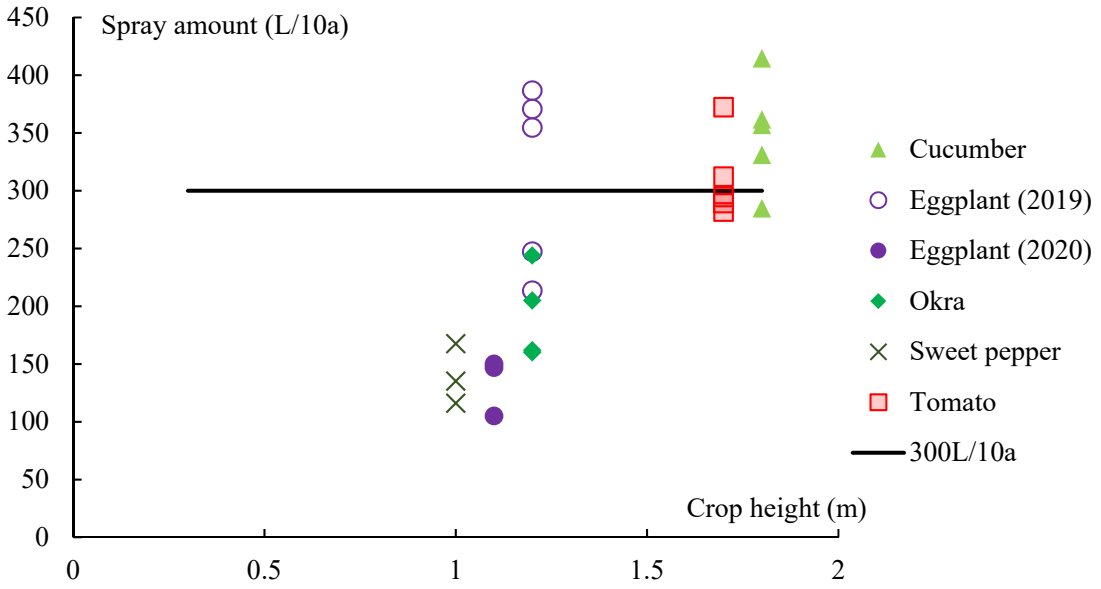


Fig. 3. The relationship between crop height (m) and spray amount.

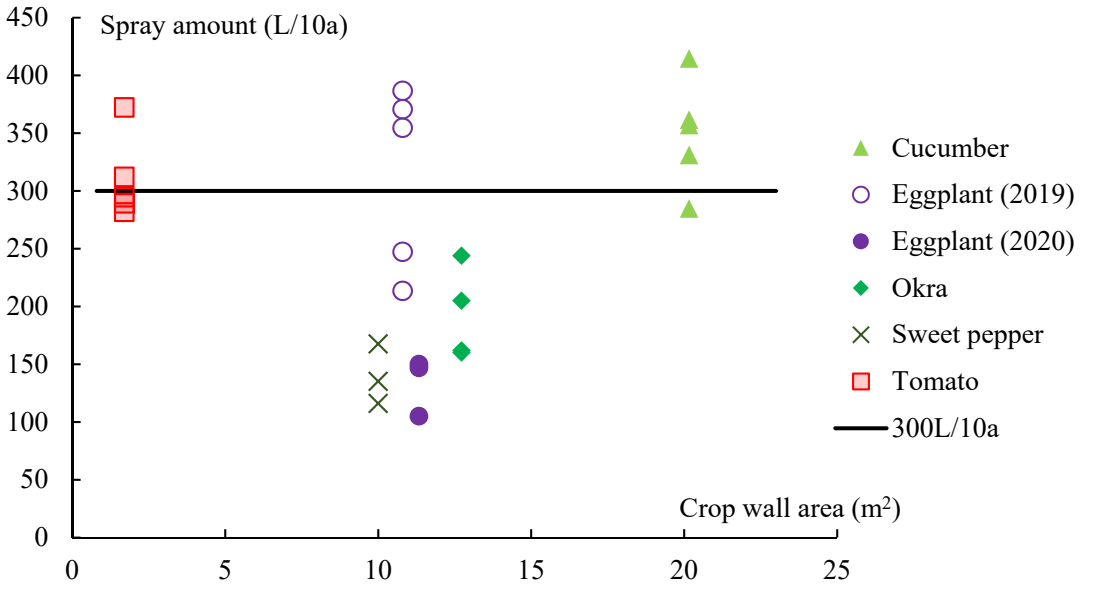


Fig. 4. The relationship between crop wall area (CWA) and spray amount.

As a conclusion, in the case of crops grown in vertically using poles, nets or wires, crop height or CWA may be effective to predict the spray amount. On the other hand, in the case of crops with horizontally spread stems, like eggplant, crop height and CWA should not be applicable to predict spray amount but the number of leaves or leaf area might be useful to predict the spray amount. Inversely, when crops of which height is shorter than 1.6 m and leaves are extending vertically, it is predicted that the spray amount unlikely to exceed 300 L/10a. Further investigation is necessary to reveal the relationship between the number of leaves (total

leaf area) and the spray amount.

3.2. Investigation of spray amount in test results

3.2.1. Tests on efficacy and phyto-toxicity

The numbers of tests on efficacy and phyto-toxicity for investigation were 149, 444 and 575, for pumpkin, sweet pepper and tomato, respectively. The maximum, the minimum and the average spray amounts on each crops are shown in Table 3.

Table 3. The numbers of tests, the maximum, the minimum and the average spray amounts on each crops from the tests on efficacy and phyto-toxicity.

Crop	The number of tests	Spray amount		
		Maximum	Minimum	Average
Pumpkin	149	500 L/10a	36.0 L/10a	185.4 L/10a
Sweet pepper	444	510 L/10a	50 L/10a	235.1 L/10a
Tomato	575	500 L/10a	55.6 L/10a	268.6 L/10a

The most frequently applied spray amount range for pumpkin was 151-200 L/10a (Fig. 4). Three of one hundred forty nine tests exceeded 300 L/10a. The results containing the information of crop height were extracted and there was no normality of the data, thus the Spearman's rank correlation coefficient was determined from the test results of pumpkin. The weak correlation was observed between pumpkin height and spray amount, but the correlation was not significant (Fig. 7, $r = 0.46$, $p = 2.0 \times 10^{-5}$).

Among the tests for sweet pepper, the most frequently sprayed volume was 251-300 L/10a (Fig. 5). Based on the Spearman's rank coefficient correlation, a little coefficient was observed and there was no significance (Fig. 8, $r = 0.28$, $p = 2.0 \times 10^{-3}$).

For the tests for tomato, 251-300 L/10a spraying range was the most frequently appeared (Fig. 6). Judging from the average spray amount, most of the tests for tomato were conducted between 100-300 L/10a range. Similarly with the other crops, the Spearman's rank correlation coefficient was determined. There was weak correlation between tomato height and spray amount but the correlation was not significant (Fig. 9, $r = 0.46$, $p = 2.8 \times 10^{-11}$).

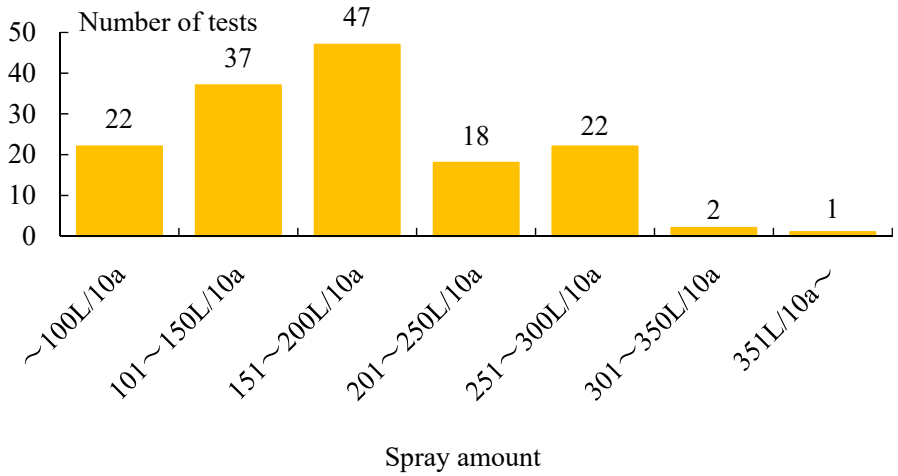


Fig. 4. The number of tests of pumpkin on efficacy and phyto-toxicity. The numbers above the graphs indicate the number of tests which were conducted with the spray amount range written in the bottom.

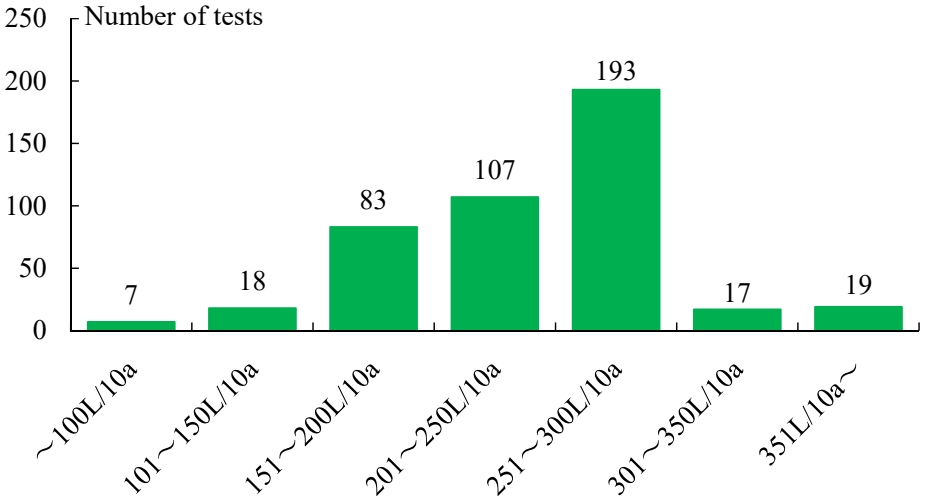


Fig. 5. The number of tests of sweet pepper on efficacy and phyto-toxicity. The numbers above the graphs indicate the number of tests which were conducted with the spray amount range written in the bottom.

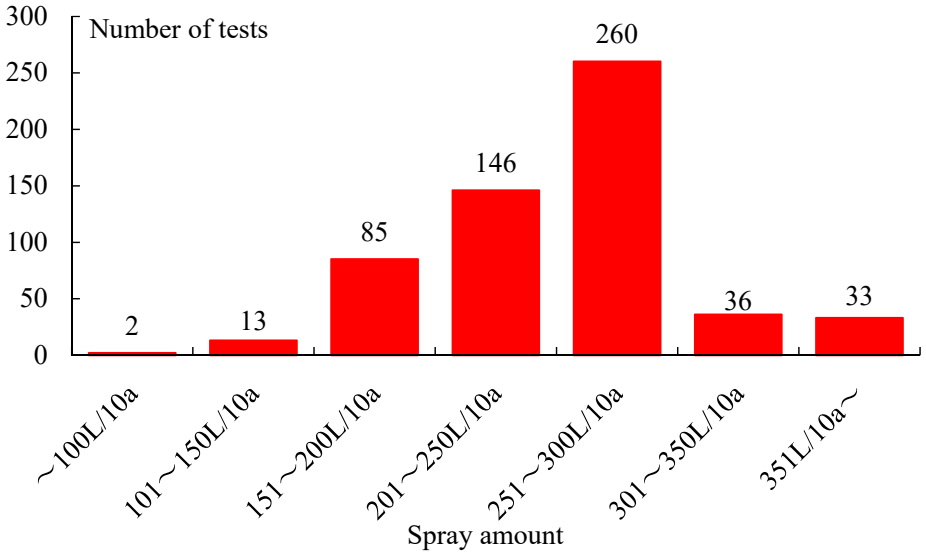


Fig. 6. The number of tests of tomato on efficacy and phyto-toxicity. The numbers above the graphs indicate the number of tests which were conducted with the spray amount range written in the bottom.

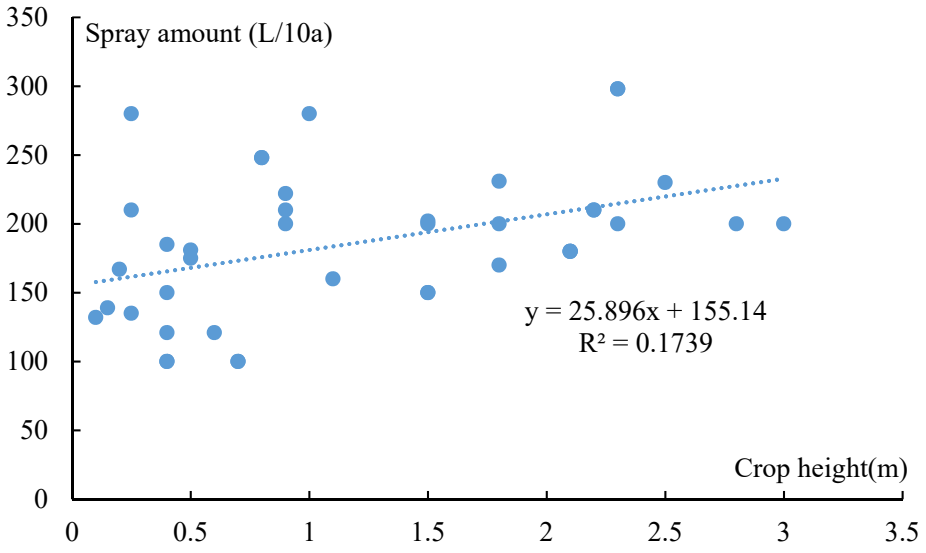


Fig. 7. The relationship between crop height and spray amount on pumpkin.

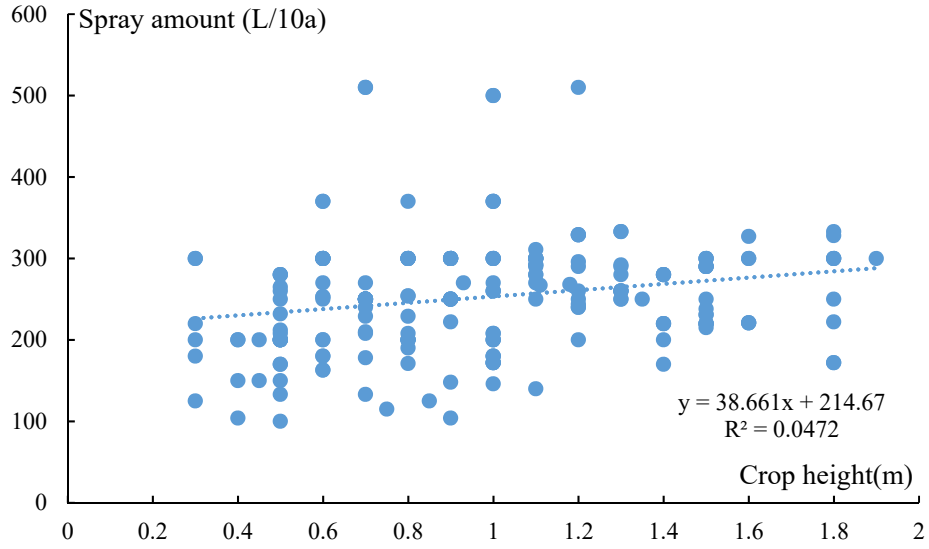


Fig. 8. The relationship between crop height and spray amount on sweet pepper.

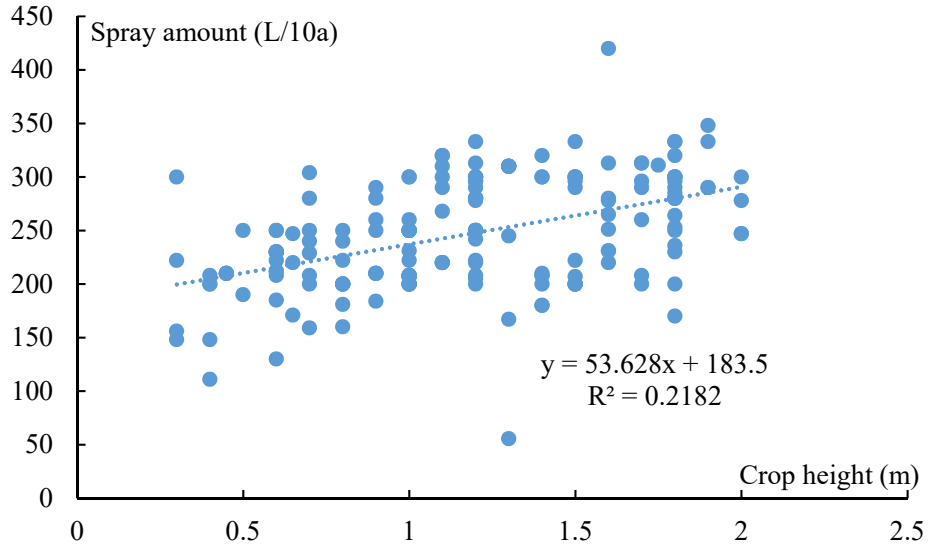


Fig. 9. The relationship between crop height and spray amount on tomato.

In most cases, spray amounts for the tests on efficacy and phyto-toxicity presumed to be determined by crop size (e.g. height) but there was no significant correlation between crop height and the spray amount in this survey. One of the main purpose of these tests is to confirm effectiveness of the novel agrochemicals thus spray amounts may set more than the required minimum amount. To avoid the test failure caused by such as heterogeneity of spraying, possibly investigator may apply much more amount of agrochemicals dilution than the required minimum amount. Therefore, it was difficult to determine the minimum spray amount based on the data from efficacy and phyto-toxicity test.

Possible causes were explored why more than 300 L/10a of spray amount was needed in

some of the examinations. Firstly, on tomato, it is tend to increase the spray amount in the case of the small experimental plot area (less than 7 m^2, Fig. 12). Especially, equivalent to 500 L/10a water volume was sprayed in the 2 tests conducted in 1.5 m^2 plots. These experiments were done in the smallest area but the spray volume was the largest among the tests which experimental areas were stated. In general, it may be more difficult to spray in small area uniformly than in large area because of decline of the total liquid volume.

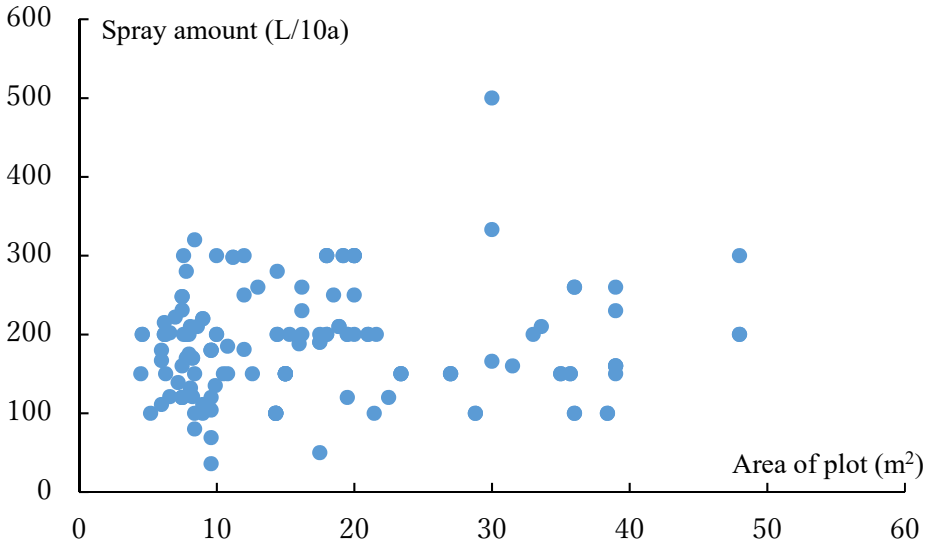


Fig. 10. The relationship between the area of plots and the spray amounts of pumpkin on the efficacy and phyto-toxicity tests.

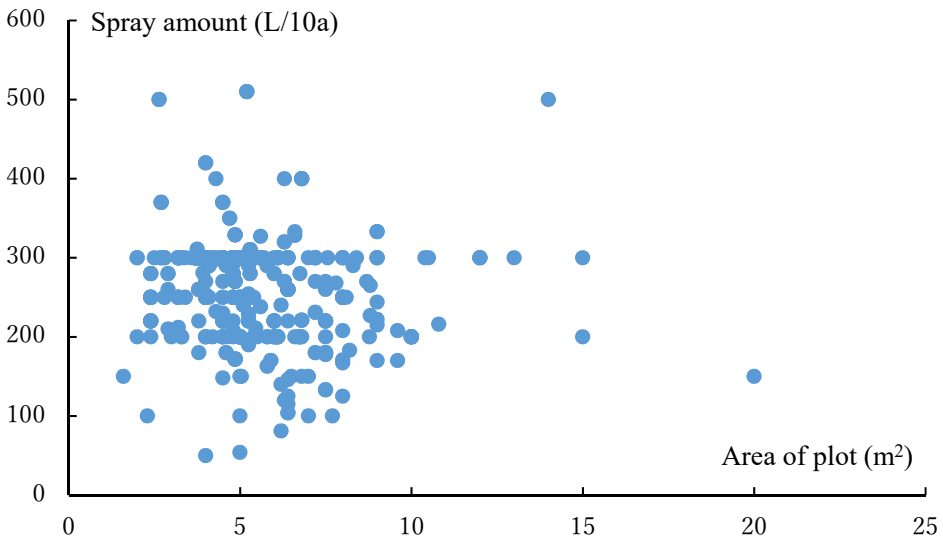


Fig. 11. The relationship between the area of plots and the spray amounts of sweet pepper on the efficacy and phyto-toxicity tests.

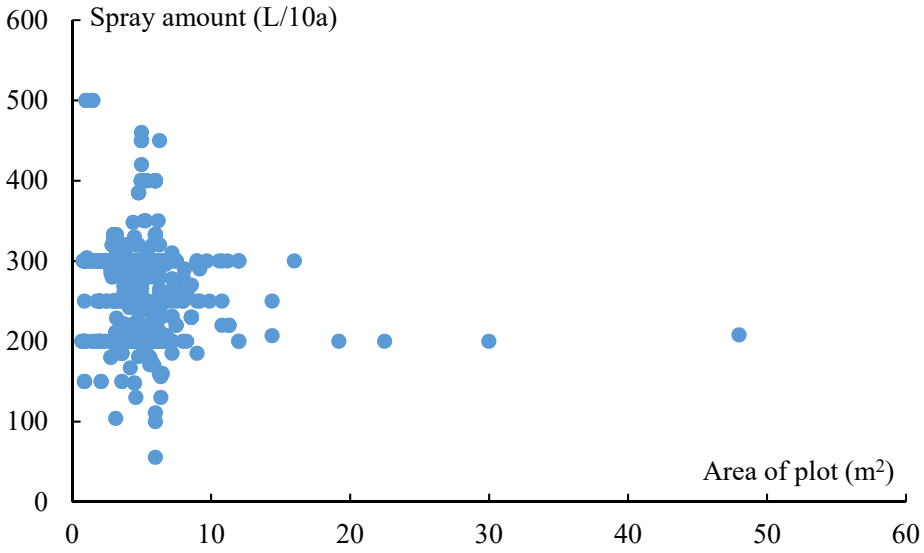


Fig. 12. The relationship between the area of plots and the spray amounts of tomato on efficacy and phyto-toxicity tests.

The battery-powered sprayer which used in our experiment ejects ca. 580 mL/min. As an example, in the case to spray 3 L water in 10 m^2 by using this sprayer, required spraying time is about 5.2 minutes. This time is considered enough to spray for all of the examination area uniformly. However, in the case to spray 0.3 L water in 1 m^2, required spraying time is about 31 seconds. It may difficult to spray uniformly in a small plot using common battery- or gasoline-powered sprayer. To prevent heterogeneity of spraying, it is required to increase the total spraying volume and this might be the main cause of the excess spraying. When the test is conducted in small experimental area, specific sprayer (e.g. small amount spraying applicable) or some other techniques may be necessary.

Among the tests on sweet pepper, the minimum experimental area was 2.7 m^2. Similarly to the tests of tomato, a main factor of the increase of the spray amount may be the area of experimental plots. On the other hand, among the tests on pumpkin, the minimum experimental area was 4.5 m^2 and relatively larger than tomato (1.5 m^2) and sweat pepper (2.7 m^2). Thus, the experimental area was not considered as a main factor of the increase of the spray amount on the tests of pumpkin. The reason of the increase of the spray volume in pumpkin was still unclear.

3.2.2. Tests of residues in crops

The numbers of tests of residues in crops are shown in Fig. 13～15, and the maximum, the minimum and the average spray amounts are stated in Table 4. As a result, 1 of 149 tests exceeded 300 L/10a in pumpkin. Similarly, 1 of 217 tests and 8 of 370 tests applied more than the upper limit in sweet pepper and tomato, respectively. In these tests, only a few of them stated crop height thus the relationship between the height and the spray volume could not be evaluated. All of the tests exceeding 300 L/10a were conducted before 2003, and the difference of the test rules between the past and the present

must be the main factor of the increase of the spray volume.

It was indicated that the spray amount in tests of residues in crops may be set following the registration range (100-300 L/10a). Therefore, it may be not effective to refer these tests to determine spray amounts on each crops.

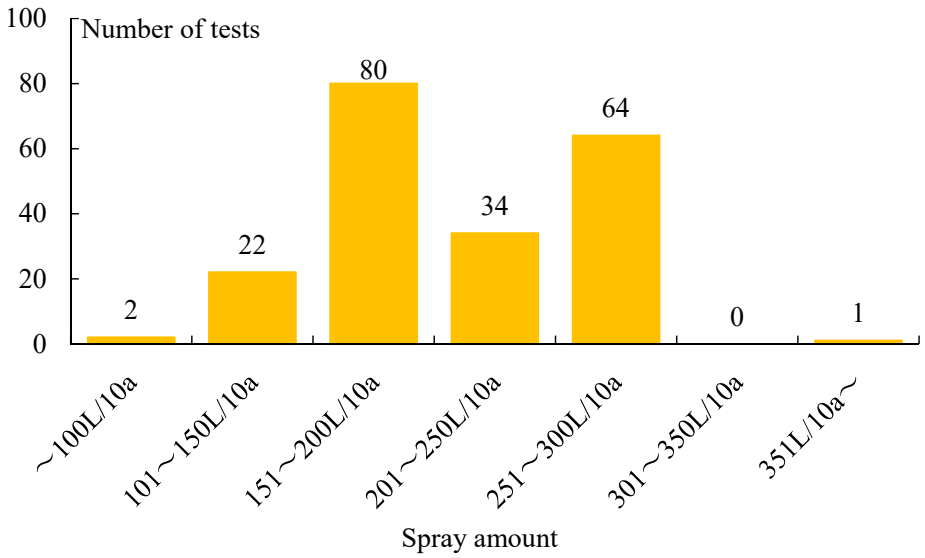


Fig. 13. The number of tests of pumpkin on residues in crops. The numbers above the graphs indicate the number of tests which were conducted with the spray amount range written in the bottom.

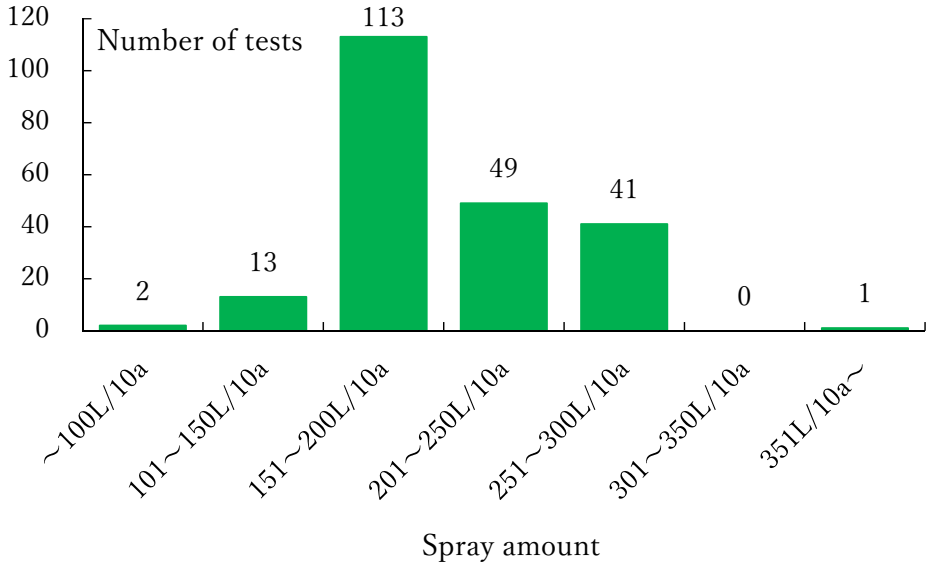


Fig. 14. The number of tests of sweet pepper on residues in crops. The numbers above the graphs indicate the number of tests which were conducted with the spray amount range written in the bottom.

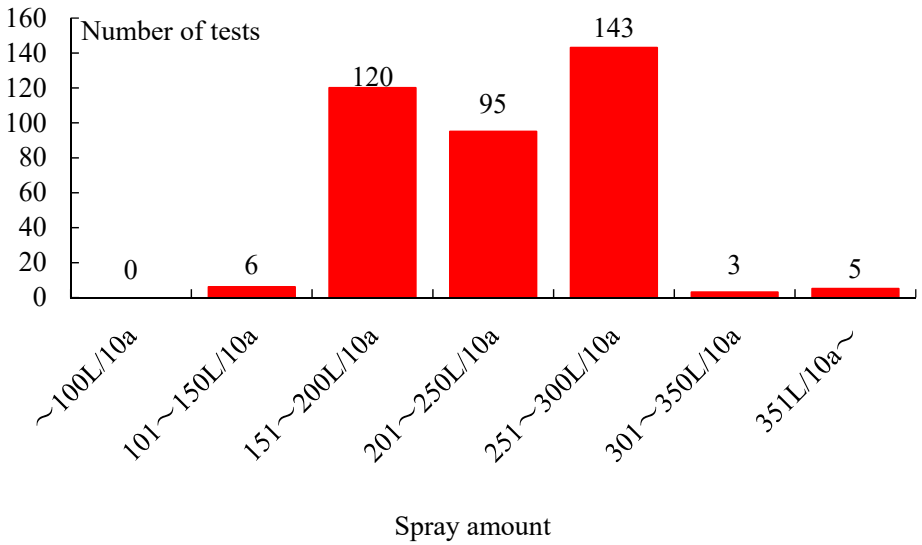


Fig. 15. The number of tests of tomato on residues in crops. The numbers above the graphs indicate the number of tests which were conducted with the spray amount range written in the bottom.

Table 4. The numbers of tests, the maximum, the minimum and the average spray amounts on each crops from the tests on residues in crops.

Crop	The number of tests	Spray amount		
		Maximum	Minimum	Average
Pumpkin	203	400 L/10a	50 L/10a	229.6 L/10a
Sweet pepper	219	400 L/10a	70 L/10a	224.0 L/10a
Tomato	372	500 L/10a	144 L/10a	251.2 L/10a

3.3. Estimation of the minimum effective spray amount against pumpkin powdery mildew

The result is shown in Table5. In the untreated control, the average of DI was 4. The suppression rate was similar in the treatment (1), (2) and (3), but lowered in (4). Significant difference was observed by the Kruskal-Wallis test among the treatments ($p = 0.046$) however there was no significance by the Steel-Dwass test ($p > 0.05$, among all the treatments).

Table 5. The result of the experiment on the effect of TPN against pumpkin powdery mildew (The evaluation of effectiveness was conducted in 7 days after the second treatment).

Treatment	Replicate	The number of investigated leaves	Disease index					Disease Severity (%)	Disease suppression rate (DSR, %)
			0	1	2	3	4		
Treatment (1) ×2000 200 L/10a	I	10	5	3	2	0	0	17.5	
	II	10	5	5	0	0	0	12.5	
	III	10	2	6	2	0	0	25.0	
	Average							**18.3**	**70.3**
Treatment (2) ×1000 100 L/10a	I	10	0	6	4	0	0	35.0	
	II	10	2	8	0	0	0	20.0	
	III	10	4	6	0	0	0	15.0	
	Average							**23.3**	**64.9**
Treatment (3) ×500 50 L/10a	I	10	3	6	1	0	0	20.0	
	II	10	2	6	2	0	0	25.0	
	III	10	5	5	0	0	0	12.5	
	Average							**19.2**	**68.9**
Treatment (4) ×250 25 L/10a	I	10	1	6	3	0	0	30.0	
	II	10	3	4	3	0	0	25.0	
	III	10	0	9	0	1	0	30.0	
	Average							**28.3**	**54.1**
Untreated control	I	10	0	0	5	4	1	65.0	
	II	10	0	0	2	3	5	82.5	
	III	10	0	6	3	1	0	40.0	
	Average							**61.7**	—

Though the applied active substance amounts in each plots were the same, DSR was lower in the treatment (4) by 10.8 points compared to the treatment (2), i.e. the approved application method. This means the spray volume, more specifically, coverage of spray affected effectiveness. In addition, in the treatment (1), the concentration of the dilution was half against the approval application method but the efficacy was almost the same level as the treatment (2). Therefore, coverage of spray may be more important on the effectiveness of TPN

than concentration. Based on this result, at least 50 L/10a spraying proportion may be required for a certain control level, in the tested conditions. Although, it should be noted that this experiment conducted in exceedingly small area thus reliability is much lower than common effectiveness tests.

Wise et al. (2010)[6] studied on the impact of sprayer type and spray volume against efficacy of 2 fungicides (ziram and azoxystrobin) in the United States vine field. According to this report, spray volume of the airblast sprayer significantly affected fungicide performance against foliar powdery mildew of vine (*Vitis labrusca*) with 468 L/ha (high water volume) being better than 187 L/ha (low water volume). This was most apparent in the case of ziram[6]. The effectiveness of azoxystrobin with 187 L/ha and 468 L/ha did not show significant difference. Ziram is protective fungicide but azoxystrobin is systemic fungicide. This result indicates the spray amount is important factor especially in protective fungicide. Additionally, in the above study, the type of fungicide affected disease control more than did water volume, in general[6].

In this study, TPN was applied to pumpkin powdery mildew, and TPN is protective fungicide[8]. In the previous study[6], the amounts of active substance were different among the treatments. Whereas in this study, the amounts of active substance in each treatments were the same but the effectiveness was weaken in the least spray volume treatment. As a conclusion, mechanism of action should be included in consideration to establish proper application method as well as dilution rate or spray volume. Specifically, protective fungicides or spiracle-blocking insecticides may require relatively much amount of the spraying. In contrast, agrochemicals with systemic action can be effective at the low application rate. Further study is necessary to evaluate the effectiveness of each active substances at different level of spray volume.

References

1) Ministry of agriculture, forestry and fisheries: Data requirements for registration of agricultural chemicals. (2020). (in Japanese)
2) United States Environmental protection Agency: Series 875 – Occupational and Residential Exposure Test Guidelines. (1996).
3) European Food Safety Authority: Guidance on the assessment of exposure of operators, workers, residents and bystanders in risk assessment for plant protection products. (2014).
4) European Food Safety Authority: Guidance on the risk assessment of plant protection products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees). (2013).
5) United States Environmental protection Agency: Series 850 – Ecological Effects Test Guidelines – 850.3020 – Honey Bee Acute Contact Toxicity and 850 – 3030 – Honey Bee Toxicity of Residues on Foliage. (2012).
6) J. C. Wise, P. E. Jenkins, A. M. C. Schilder, C. Vandervoort, R. Isaacs: Spray type and water volume influence pesticide deposition and control of insect pests and diseases in juice grapes. *Crop Prot.* **29**, 378-385 (2010).
7) M. Kamiya, T. Fujita, C. Sasaki: Investigation

of the reality of the agrochemicals spray amount in Japan. *Res. Rep. Agric. Chem*. **12**, 6-11 (2020) (in Japanese).
8) Japan Plant Protection Association: 14 TPN〔Chlorothalonil〕. In "Nouyaku Handbook." Ed. By Japan Plant Protection Association, Jyohoku-insatsu-syo, Tokyo, pp. 499-501, (2016) (in Japanese).

日本における農薬の散布液量実態調査

藤田智紀，神谷昌希，佐々木千潮
独)農林水産消費安全技術センター

摘要

農薬使用者への曝露評価に資することを主な目的として，野菜類に対する散布液量を推定した．特に，病害虫に対して効果を得られる最小量に着目した．2 か年で 5 作物に対する散布液量を評価した．この結果，作物の草丈が 1.7 m を超える場合や，畝の長さと草丈を乗算して求められる散布壁面積が 20 m^2 を超えるような場合に，登録上の上限値である 300 L/10a を超える散布液量を要することが示唆された．また，過去に実施された薬効・薬害試験及び作物残留試験における散布液量の情報収集を行った．この結果．薬効・薬害試験においては，小面積で実施された試験では散布液量が増加する傾向がみられた．作物残留試験では，登録上の使用液量を前提として散布液量が設定されていると思われ，散布液の必要量を推定する資料とするには不適であると考えられた．さらに，かぼちゃのうどんこ病を対象として，クロロタロニル(TPN)の効果を評価した．異なる 4 段階の希釈液を調製し，有効成分投下量が全ての処理区で同等となるよう散布を実施した．この結果，散布液量を最小とした処理区(250 倍液，25 L/10a 相当を散布)において，最も効果が低かった．保護殺菌剤のような作用性をもつ農薬においては，散布液の付着範囲は効果に影響を及ぼすことが示唆された．

令和２年度学会等での発表実績一覧

1. 誌面発表

	誌名	課題名	発表者名
1	Journal of Pesticide Science (2020, vol. 45 (2), pp. 86-94)	Effects of temperature on the dissipation of total- and water-extractable pesticides in Japanese soils	**Yutaka Motoki, Takashi Iwafune**, Nobuyasu Seike, Keiya Inao
2	Journal of Pesticide Science (2020, vol. 45 (3), pp. 159-165)	Studies on the sorption behavior and plant uptake of pesticides in Japanese soils	**Yutaka Motoki**
3	日本農薬学会誌(2020, vol. 45 (2), pp. 81-82)	農薬の土壌吸着特性と植物移行性に関する研究	元木裕

2. 口頭・ポスター発表

	学会名	題目	発表者名
1	日本農薬学会第 46 回大会(2021 年 3 月 8 日（月）～10 日（水）)	農薬の土壌吸着特性と植物移行性に関する研究	元木裕

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 を用いたきゅうり中の残留農薬一斉試験法の妥当性評価）・・・・・・・・・・・・・４９

残留農薬分析業務における分析法の検討

LC-MS/MS を用いたきゅうり中の残留農薬一斉試験法の妥当性評価

坂部亮介*1，篠田隆祥*1，友成真菜*1，岸田繁二*2
小塚健志*3，塚田政範*3，野村哲也*3，竹村浩一*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）を用いたきゅうり中の残留農薬一斉試験法について，5 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，4 農薬については，全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等に適合していた．

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

緒　　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．

今回，令和 3 年度に予定されているきゅうりの調査（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））において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 5 農薬（以下，新規対象農薬）について検討を行った．

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

きゅうり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 5 農薬を対象とした．

エタボキサム，ピリベンカルブ，フェンピラザミン，フルチアニル，ミルベメクチン

3. 試料および添加濃度

3.1. 試料

新規対象農薬が検出されていない国産きゅうり（以下，ブランク試料）を用いた．小平にて粉砕した 3 種類の試料を，各試験室 1 種類ずつ使用した．

3.2. 添加濃度

新規対象農薬の中で最も基準値の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：エタボキサム，ピリベンカルブ，ピリベンカルブ代謝物 B，ミルベメクチン A3 およびミルベメクチン A4 は林純薬工業株式会社，フェンピラザミンおよびフルチアニルは富士フイルム和光純薬株式会社製の粉末標準品をそれぞれ使用した．

混合標準液:エタボキサムおよびフェンピラザミンをアセトン, その他の粉末標準品をアセトニトリルにそれぞれ溶解して 500 µg/mL の標準溶液を調製後，これらを混合し，20 µg/mL となるようアセトニトリルで希釈した.

添加回収試験用標準液および検量線用標準液:混合標準液をアセトニトリルで適宜希釈して調製した.

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)，リン酸トリフェニル（1級)，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）で製造した超純水または超純水（LC/MS用）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（500mg/500 mg）をアセトニトリル・トルエン（3:1）10mL 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. 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計

LC 部：Waters 製　ACQUITY UPLC System（小平，神戸，横浜）

MS 部：Waters 製　Premier XE（小平，神戸）

：Waters 製　ACQUITY TQD（横浜）

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, 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, リン酸トリフェニル 1 µg/mL を含むアセトン・n-ヘキサン（1:1）混液に溶解したものを試験溶液とした.

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.

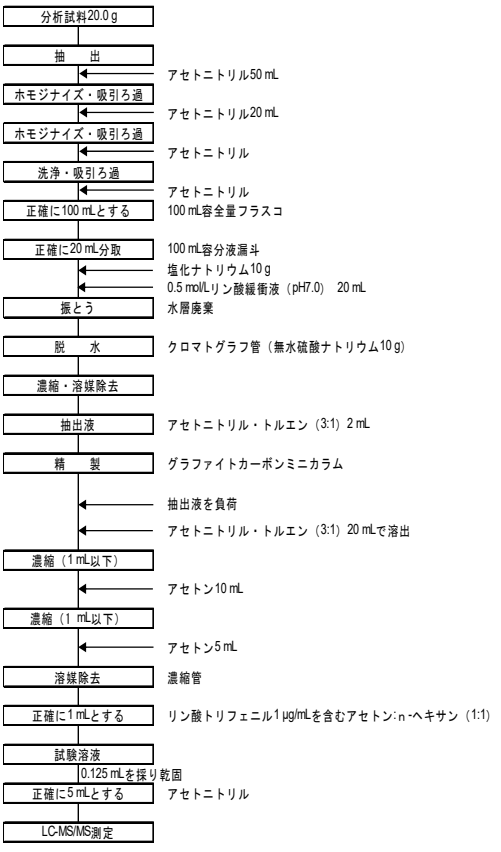


図1. LC-MS/MSによる一斉試験法（野菜・果実類）フローチャート

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（定量） m/z	モニターイオン（定性） m/z
エタボキサム	＋	321 > 200	321 > 183
ピリベンカルブ	＋	362 > 207	362 > 239
ピリベンカルブ代謝物	＋	362 > 207	362 > 239
フェンピラザミン	＋	332 > 230	332 > 189
フルチアニル	＋	427 > 411（小平・神戸） 427 > 192（横浜）	427 > 192（小平・神戸） 427 > 132（横浜）
ミルベメクチン A3	＋	546 > 511	511 > 113（小平・神戸） 546 > 113（横浜）
ミルベメクチン A4	＋	560 > 525	525 > 507（小平） 560 > 507（横浜） 525 > 109（神戸）

表 2. LC-MS/MS 測定条件

LC部	:	Waters製　ACQUITY UPLC System
MS部	:	Waters製　Premier XE(小平，神戸)，ACQUITY TQD(横浜)
カラム	:	Wako製 Wakopak Ultra C18-2 内径 2.1 mm，長さ100 mm，2 μm
流量	:	0.2 mL/min(小平，横浜) 0.353 mL/min(神戸)
カラム温度	:	40 ℃
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（グラジエント条件：表3）
イオン化法	:	エレクトロスプレーイオン化法（ESI＋）
測定法	:	多重反応モニタリング法（MRM）
イオン源温度	:	120 ℃
脱溶媒ガス温度	:	250 ℃
脱溶媒ガス流量	:	900 L/hr

表 3. グラジエント条件

	時間（min）	A 液:B 液（比）		A 液:B 液（比）
小平	0 ～ 0.51	85:15	→	60:40
横浜	～ 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
神戸	0 ～ 0.29	85:15	→	60:40
	～ 1.23			60:40
	～ 2.18	60:40	→	50:50
	～ 2.93	50:50	→	45:55
	～ 6.52	45:55	→	5:95
	～ 8.52			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た試験溶液（以下，ブランク試料溶液）について，LC-MS/MS で測定し，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溶液（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，検出限界の目標値を 0.01 mg/kg とした.

各試験室において，標準溶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

ブランク試料の分析を行ったところ，いずれの新規対象農薬において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，全ての新規対象農薬について，0.0005～0.1 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．新規対象農薬について，目標値を満たしていたことから，検出限界を 0.01 mg/kg，定量限界を 0.02 mg/kg とした．

9.4. 真度および精度

新規対象農薬について，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．エタボキサムを除く 4 種の新規対象農薬については，ガイドラインの目標値（表 4）を満たした．

9.5. 室間再現性（参考）

新規対象農薬について，全ての結果（3 試験室それぞれにおいて 1 回当たり 2 併行，異なる実施日または異なる実施者で 5 回繰り返しの枝分かれ試験）から求めた真度（回収率）および精度（併行精度および室間精度）を表 8 に示した．この結果についてもエタボキサムを除く 4 種の新規対象農薬でガイドラインの目標値（表 4）を満たした．

表 5. 直線性の範囲と相関係数

農薬名	直線性の範囲	相関係数（r）		
	(μg/mL)	小平	横浜	神戸
エタボキサム	0.0005–0.1	0.9959	0.9993	0.9996
ピリベンカルブ	0.0005–0.1	0.9999	0.9999	0.9993
ピリベンカルブ代謝物	0.0005–0.1	0.9997	0.9999	0.9999
フェンピラザミン	0.0005–0.1	0.9998	0.9998	1.0000
フルチアニル	0.0005–0.1	0.9997	1.0000	0.9999
ミルベメクチン A3	0.0005–0.1	0.9989	0.9999	1.0000
ミルベメクチン A4	0.0005–0.1	0.9991	0.9997	1.0000

表 6. 検出限界および定量限界

農薬名	検出限界（mg/kg）			定量限界（mg/kg）		
	小平	横浜	神戸	小平	横浜	神戸
エタボキサム	0.00040	0.00007	0.00026	0.00132	0.00023	0.00086
ピリベンカルブ	0.00076	0.00010	0.00033	0.00252	0.00032	0.00110
ピリベンカルブ代謝物	0.00080	0.00032	0.00026	0.00266	0.00106	0.00086
フェンピラザミン	0.00028	0.00019	0.00015	0.00094	0.00064	0.00051
フルチアニル	0.00150	0.00027	0.00037	0.00498	0.00091	0.00123
ミルベメクチン A3	0.00208	0.00102	0.00370	0.00693	0.00339	0.01235
ミルベメクチン A4	0.00145	0.00113	0.00218	0.00483	0.00375	0.00726

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
エタボキサム	小平	38.0	37.4	5.1	7.0	50.4	44.8
	横浜	53.7	41.9	4.7	7.1	26.7	27.9
	神戸	70.1	69.1	7.8	9.4	22.1	16.2
ピリベンカルブ	小平	99.6	96.8	3.0	1.3	4.0	5.8
	横浜	101.1	99.1	3.9	0.6	3.9	2.2
	神戸	93.8	94.5	5.5	6.8	5.5	6.8
ピリベンカルブ代謝物	小平	98.0	97.7	3.5	3.1	4.8	6.2
	横浜	102.3	97.2	6.4	2.0	6.4	2.4
	神戸	95.9	93.5	4.9	5.5	7.0	5.7
フェンピラザミン	小平	96.8	96.8	2.7	0.7	5.6	5.7
	横浜	96.6	102.8	3.7	1.5	4.2	1.6
	神戸	92.7	95.3	2.5	7.5	4.4	7.5
フルチアニル	小平	96.6	97.6	2.9	1.1	6.0	6.2
	横浜	96.4	96.3	4.0	1.6	4.0	2.1
	神戸	94.9	94.8	4.2	5.9	4.4	5.9
ミルベメクチン A3	小平	93.0	93.3	2.8	2.5	12.5	7.0
	横浜	94.7	87.9	3.5	2.1	4.0	3.6
	神戸	90.1	89.6	7.2	6.4	8.4	6.4
ミルベメクチン A4	小平	105.1	93.6	2.1	1.4	8.2	5.9
	横浜	100.9	90.8	5.4	3.0	10.2	3.0
	神戸	93.6	89.9	5.2	6.9	10.9	6.9

※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
エタボキサム	53.9	49.5	6.8	8.9	37.9	38.7
ピリベンカルブ	98.2	96.8	4.2	3.9	5.3	5.2
ピリベンカルブ代謝物	98.7	96.1	5.1	3.8	6.2	5.2
フェンピラザミン	95.3	98.3	3.0	4.3	4.9	5.9
フルチアニル	96.0	96.3	3.7	3.6	4.5	4.9
ミルベメクチン A3	92.6	90.2	4.8	4.1	8.7	6.0
ミルベメクチン A4	99.9	91.4	4.4	4.3	10.4	5.3

※表 4 の目標値を満たさなかった数値を網掛け

10. まとめ

新規対象農薬 5 種類について, LC-MS/MS 測定による一斉法（きゅうり）の妥当性評価を行った. この結果，エタボキサムを除く 4 種の農薬は，全ての試験室で妥当性評価のパラメータが目標値等に適合した. エタボキサムは光により変質するおそれがあることが報告されており [5]，目標値等に適合しなかった原因として, 標準液中または抽出工程における分解の影響が考えられる.

これらの結果から，4 農薬について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.

4）JIS K 0136 : 2015，高速液体クロマトグラフィー質量分析通則.

5）富士フィルム和光純薬，エタボキサム標準品安全データシート https://labchem-wako.fujifilm.com/sds/W01W0105-0847JGHEJP.pdf （2021 年 10 月時点）

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
エタボキサム	○	×	○	×	○	×
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	○	○	○	○	○	○
フルチアニル	○	○	○	○	○	○
ミルベメクチン A3	○	○	○	○	○	○
ミルベメクチン A4	○	○	○	○	○	○

【他誌掲載論文要旨】

J. Pestic. Sci. **45(2), 86–94 (2020)**
DOI: 10.1584/jpestics.D19-072

Title: Effects of temperature on the dissipation of total- and water-extractable pesticides in Japanese soils

Authors: Yutaka Motoki,[1,*] Takashi Iwafune,[1] Nobuyasu Seike[2] and Keiya Inao[2]

[1] *Food and Agricultural Materials Inspection Center, Agricultural Chemicals Inspection Station, 2–772 Suzuki-cho, Kodaira, Tokyo 187–0011, Japan*

[2] *Institute for Agro-Environmental Sciences, NARO, 3–1–3 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305–8604, Japan*

Abstract: We investigated the dissipation of 27 pesticides in five Japanese soils at three temperatures and the variability of activation energies (E_a). The dissipation of total pesticides extracted sequentially using water and acetone was fitted to a single first-order (SFO) model. The E_a values calculated from the dissipation rate constants of the SFO model showed a normal distribution with a median of 61.1 kJ mol^{-1}. The dissipation of water-extractable pesticides (*i.e.*, phytoavailable pesticides) was fitted to a double first-order in parallel model with two dissipation rate constants: k_1 and k_2. The E_a values calculated from k_1 and k_2 showed normal or lognormal distribution, and the medians of the normal distribution calculated from k_1 and k_2 were 62.8 and 45.2 kJ mol^{-1}, respectively. Furthermore, the method for estimating the biphasic dissipation of phytoavailable pesticides at different temperatures by using the median E_a values of the laboratory experiment was demonstrated in a field experiment.

本論文の全文は、下記の URL からダウンロード可能です。
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jpestics/45/2/45_D19-072/_html/-char/ja

J. Pestic. Sci. **45(3), 159–165 (2020)**
DOI: 10.1584/jpestics.J20-05

Title: Studies on the sorption behavior and plant uptake of pesticides in Japanese soils

Authors: Yutaka Motoki*

Agricultural Chemicals Inspection Station, Food and Agricultural Materials Inspection Center,

2–772 Suzuki-cho, Kodaira, Tokyo 187–0011, Japan

Abstract: To estimate pesticide residue levels in succeeding crops based on those in soils, the relationship between pesticide concentrations in komatsuna (*Brassica rapa* var. *perviridis*) and the concentrations extracted sequentially from soils using water and acetone was investigated. The concentrations of many pesticides in komatsuna shoots showed higher positive correlation with water-extractable concentrations (*C*W) than total-extractable concentrations in soils, so that the *C*W was available for evaluating the phytoavailability of pesticides in the soil. As a result of examining the dissipation behavior of the *C*W, the dissipation of the *C*W was able to be predicted by considering time-dependent soil sorption, which could be estimated using the sorption coefficients (*K*d) measured by a standard batch method. Furthermore, the present study showed that the properties of soil organic carbon such as black carbon content and the molecular structure of pesticides were important for estimating the *K*d values more accurately.

本論文の全文は、下記の URL からダウンロード可能です。
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jpestics/45/3/45_J20-05/_article/-char/ja

日本農薬学会誌　45(2),81-82（2020）
DOI: 10.1584/jpestics.W20-20

題目：農薬の土壌吸着特性と植物移行性に関する研究

著者名：元木 裕

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

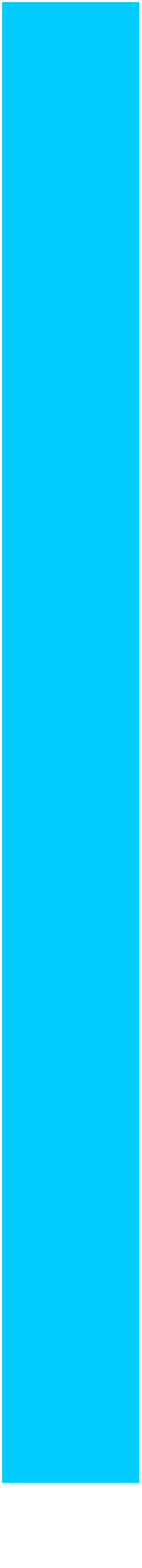
概要：学会賞受賞論文要約のため概要なし。

本論文の全文は、下記の URL からダウンロード可能です。
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjpestics/45/2/45_W20-20/_article/-char/ja/

農林水産消費安全技術センター

農薬調査研究報告（第 13 号）

令和４年２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　FAX：042-385-3361

印刷：　○○○