残留農薬研究所 化学部

2020年度調査研究報告書

2021年3月31日

[継続事業の概要]
当法人は、「農薬等の残留及び毒性に関する各種試験及び調査研究等を行うことにより、その安全性の確保を図り、もって人の健康の保護及び環境の保全に寄与すること」を目的として、農薬等の残留及び毒性に関する調査研究を実施するとともに、調査研究成果を普及する広報の一環としてIETセミナーを開催しています。

[事業内容]
農薬は、農薬取締法により農林水産大臣の登録を受けなければこれを製造若しくは加工し、又は輸入してはならないと定められており、登録の申請には、農薬の毒性、残留性等に関する試験成績の提出が求められています。これらの試験は、“農薬の登録申請において提出すべき資料について(以下「テストガイドライン」という。)”に基づいて実施されていますが、テストガイドラインは、毒性学や科学技術の発展等により、逐次、改善・向上が図られるべきものであるとされています。当法人が実施する調査研究は、テストガイドラインの逐次、改善・向上が図られるべきものであるとの趣旨を達成することを主な目的として行われ、農薬等の安全性の確保と、人の健康の保護及び環境の保全に寄与してきました。また、その成果は、論文等で、また、学会、研究会、及びIETセミナー等で発表するとともに、当法人のホームページを通じて、広く一般に公開しています。なお、本事業において対象とする調査研究は、自ら実施する調査研究とし、補助金又は委託費を受けて実施する調査研究は含みません。また、毎年度の調査研究計画及び成果は、大学等、外部研究機関の専門家（毒性部門と化学部門各3名）で構成する調査研究検討会で検討頂き、そのご意見を伺って最終化しております。

[事業報告]
＜調査研究＞
2020 年度に実施した本事業の調査研究の成果及び調査研究検討会の開催実績は以下の通りです。

化学部門：
課題名「水稲関連試料における残留農薬分析値の変動に関する研究－飼料用稲の均一化における変動要因解析－」
担当者名：長田 拓也，土橋 ひかり
目的及び成果の概要：水稲関連試料の均一化工程に由来する残留分析値の変動要因の解析結果に基づき，分析操作上の課題を整理して技術向上を図ることを目的とし，本年度は飼料用稲（稲 WCS: whole crop silage）について，主に3つの課題を検討した。稲 WCS の実残留試料は，茨城圃場で5種農薬（箱処理剤：農薬 A，農薬 B，茎葉散布剤：農薬 C，農薬 D，農薬 E）を処理して調製した。そして，現行標準操作に従った常温で粉砕した調

製試料の均一性確認（常温粉砕法の均一性），凍結粉砕法の適用性の検討（凍結粉砕法の適用性）ならびに稲 WCS 植物体の部位別残留農薬分布（部位別の残留農薬濃度）を調査した。その際の均一化工程では，通常粉砕試料に加えて粗粉砕試料も調製して，ミキサー内の均一状況を比較した。

課題 1 常温粉砕法での均一性：ミキサー内の任意の 6 箇所から採取した試料中の各農薬の分析値の変動係数（CV: coefficient of variation）は，粗粉砕で 9～16%，通常粉砕で 1～4%であり，現行操作での均一性に問題は無いことを確認した。しかしながら，稲 WCS は繊維質の茎葉と硬い穂部を含んでいるため，通常の作物に比べて粉砕時間が長くなり，試料温度は比較的高温（約 50℃）となった。また，粉砕の程度は，茎葉部と穂部で異なり，1～4 mm 程度の試料が混在しており，必ずしも均一な状態ではないため，ドライアイスを用いた凍結粉砕による改善を検討した。なお，農薬 B は定量限界未満であったため，解析対象から除外した。

課題 2 凍結粉砕法での適用性：試料に等量のドライアイスを加え，常温粉砕と同様に凍結粗粉砕試料と凍結微粉砕試料を調製し，ミキサー内の均一性を評価した。両試料とも試料温度は−20℃以下であり，微粉砕試料は 1 mm 程度の微細な試料であった。嵩高い常温通常粉砕試料よりも，凍結微粉砕試料の方が微粉末となった。各農薬の分析値の CV は，粗粉砕で 4～10%，微粉砕で 2～4%であった。これらの結果から，凍結粉砕の方が，常温通常粉砕よりも均一な粉砕試料の調製に適していることを確認した。

課題 3 部位別の残留農薬濃度：稲 WCS 植物体を上部，中間部，下部に重量ベースで 3 分割し，部位別に残留農薬濃度を求めた。農薬 A の残留濃度は，下部＞中間部＞上部の順となり，最大で 7 倍の違いが見られた。農薬 C の残留濃度は，下部＜中間部＜上部の順となり，最大で 2 倍程度の違いが見られた。農薬 D および農薬 E の残留濃度は，どちらも上部＜下部＜中間部の分布傾向となり，2 倍程度の違いが見られた。各部位の残留濃度をそれぞれの水分量（上部 34%，中間部 58%，下部 65%）で補正した乾燥重量当たりの残留濃度の傾向は，農薬 A では変化が認められなかったが，農薬 C は 3 部位でほぼ等しくなり，農薬Dおよび農薬Eは上部の残留濃度が他部位より低い傾向であった。これらの結果から，箱処理剤農薬 A は主に土壌に近い株元付近に残留し，水溶解度が高く浸透移行性を有する農薬 C は植物体の水分量に相応して全体に残留し，農薬 D および農薬 E は植物体の比表面積に相応して全体に残留し相対重量の重い穂部付近の残留濃度が低くなると推察された。

以上のことから，農薬の散布方法や物理的化学的性質，稲 WCS の部位別の水分量の違いにより，稲 WCS 内の残留農薬濃度が異なることが明らかとなり，稲 WCS の試料調製には凍結粉砕が最適な方法であることが示唆された。

調査研究検討会：化学部会開催

新型コロナウィルス蔓延防止のため、外部委員による審議と意見書の受領は、いずれも 2020 年 5 月にメールを用いて実施した。

[継続事業の概要]

当法人は、「農薬等の残留及び毒性に関する各種試験及び調査研究等を行うことにより、その安全性の確保を図り、もって人の健康の保護及び環境の保全に寄与すること」を目的として、農薬等の残留及び毒性に関する調査研究を実施するとともに、調査研究成果を普及する広報の一環としてIETセミナーの開催を行っています。

[事業内容]

農薬は、農薬取締法により農林水産大臣の登録を受けなければこれを製造若しくは加工し、又は輸入してはならないと定められており、登録の申請には、農薬の毒性、残留性等に関する試験成績の提出が求められています。これらの試験は、“農薬の登録申請において提出すべき資料について(以下「テストガイドライン」という。)”に基づいて実施されていますが、テストガイドラインは、毒性学や科学技術の発展等により、逐次、改善・向上が図られるべきものであるとされています。当法人が実施する調査研究は、テストガイドラインの逐次、改善・向上が図られるべきものであるとの趣旨を達成することを主な目的として行われ、農薬等の安全性の確保と、人の健康の保護及び環境の保全に寄与してきました。また、その成果は、論文等で、また、学会、研究会、及び次に示すIETセミナー等で発表するとともに、当法人のホームページを通じて、広く一般に公開しています。なお、本事業において対象とする調査研究は、自ら実施する調査研究とし、補助金又は委託費を受けて実施する調査研究は含みません。また、毎年度の調査研究計画及び成果は、大学等、外部研究機関の専門家（毒性部門と化学部門各3名）で構成する調査研究検討会で検討頂き、そのご意見を伺って最終化しております。

[事業報告]

＜調査研究＞

2020年度に実施した本事業の調査研究の成果及び調査研究検討会の開催実績は、以下の通りです。

化学部門：

課題名「水稲関連試料における残留農薬分析値の変動に関する研究－籾米および稲わらの均一化における変動要因解析－」

担当者名：長田拓也、土橋ひかり、曳埜忍、横瀬千春

目的及び成果の概要：水稲関連の実残留試料、稲WCS (Whole Crop Silage)、籾米および稲わらを用いた試料均一化～抽出工程に由来する残留分析値の変動要因の解析結果に基づき、当該試料に対する分析操作上の課題を整理し、残留農薬分析技術の向上を図ることを目的とする。2020年度は、圃場で栽培した稲WCS (箱処理剤：農薬A、農薬B、茎葉散布剤：農薬C、農薬D、農薬E) を用いて、常温粉砕法での均一性、凍結粉砕法の適用性、部

位別の残留農薬濃度を調査した。

常温粉砕法での均一性：ミキサー内の任意の 6 箇所から採取した試料中の各農薬の分析値の変動係数（CV: coefficient of variation）は、粗粉砕で 9～16%、通常粉砕で 1～4%であり、現行操作での均一性に問題は無いことを確認した。しかしながら、稲 WCS は繊維質の茎葉と硬い穂部を含んでいるため、通常の作物に比べて粉砕時間が長くなり、試料温度は比較的高温（約 50℃）となった。また、粉砕の程度は、茎葉部と穂部で異なり、1～4 mm 程度の試料が混在しており、必ずしも均一な状態ではないため、凍結粉砕の適用を検討した。なお、農薬 B は定量限界未満であったため、解析対象から除外した。

凍結粉砕法の適用性：稲 WCS 試料に等量のドライアイスを加え、常温粉砕と同様に凍結粗粉砕試料と凍結微粉砕試料を調製し、ミキサー内の均一性を評価した。両試料とも試料温度は−20℃以下で、微粉砕試料は 1 mm 程度の微細な試料であり、嵩高い常温通常粉砕試料よりも凍結微粉砕試料の方が微粉末であった。各農薬の分析値の CV は、粗粉砕で 4～10%、微粉砕で 2～4%であった。これらの結果から、凍結粉砕の方が、常温粉砕よりも均一で微粉末に稲 WCS を粉砕出来ることを確認した。

部位別の残留農薬濃度：稲 WCS 植物体を上部、中間部、下部に重量ベースで 3 分割し、部位別に残留農薬濃度を求めた。農薬 A の残留濃度は、下部＞中間部＞上部の順となり、最大で 7 倍の違いが見られた。農薬 C の残留濃度は、下部＜中間部＜上部の順となり、最大で 2 倍程度の違いが見られた。農薬 D および農薬 E の残留濃度は、どちらも上部＜下部＜中間部の分布傾向となり、2 倍程度の違いが見られた。各部位の残留濃度をそれぞれの水分量（上部 34%、中間部 58%、下部 65%）で補正した乾燥重量当たりの残留濃度の傾向は、水分量補正前の結果と比べ農薬 A では変化が認められなかったが、農薬 C は 3 部位でほぼ等しくなり、農薬 D および農薬 E は上部の残留濃度が他部位より低い傾向であった。これらの結果から、箱処理剤農薬 A は主に土壌に近い株元付近に残留し、水溶解度が高く浸透移行性を有する農薬 C は植物体の水分量に相応して全体に残留し、農薬 D および農薬 E は植物体の比表面積に相応して全体に残留し相対重量の重い穂部付近の残留濃度が低くなると推察された。

以上のことから、農薬の散布方法や物理的化学的性質、稲 WCS の部位別の水分量の違いにより、稲 WCS 内の残留濃度が異なることが明らかとなり、稲 WCS の試料調製には凍結粉砕が最適な方法であることが示唆された。

調査研究検討会：化学部会開催

新型コロナウィルス蔓延防止のため、外部委員による審議と意見書の受領は、いずれも 2020 年 5 月にメールを用いて実施した。

毒性部門：

課題名「農薬等の毒性に関する基礎的研究：毒性試験に用いる実験動物の遺伝学的基盤の整備」

担当者名：佐藤　旭、西岡　康、遠藤　直子、浦川　千鶴、高橋　研、北條　仁、加藤　由隆、高橋　尚史、青山　博昭

目的及び成果の概要：本研究は、実験動物が持つ様々な遺伝子多型のうち、特に毒性実験を実施する上で支障となるような遺伝的変異や多型（種々の先天異常を誘発する突然変異や内因性・外因性シグナルに対する感受性を修飾するような遺伝子多型）に着目して、表現型や遺伝様式といった基礎的な知見を収集すると共に原因遺伝子の同定と遺伝子診断技術の開発に努め、得られた成果を毒性実験の精度向上に資する遺伝学的な基盤情報として広く一般に公開することを目的としたものである。また、こうした取り組みを通じて発見された突然変異のうち、毒性学の観点から興味深い形質を誘発するものに関しては、それらをモデルとして積極的に利用して異常の発症機序の解明に努めることにより、毒性学の発展にも貢献できるような知見の取得を目指して研究に取り組んだ。

課題 1：本年度は、我が国で市販されている代表的なアウトブレッドラットである Wistar Hannover GALAS ラットの集団から発見された呼吸異常症（CACK）と腎欠損（AK）の 2 形質を対象に、昨年度の解析で検出した有力な突然変異候補領域の検証を進めた。その結果、呼吸異常症を引き起こす *cack* 変異については、重複が疑われる *Reep1* 遺伝子の接合点のリシーケンス及びリアルタイム PCR 法によるゲノムコピー数の計測により、当該遺伝子内部に約 80kb の重複が発生したとする作業仮説に矛盾のない結果を得ることが出来た。すなわち、i) *cack/cack* 個体の保有するキメラ配列は *Reep1* 遺伝子の第 5 イントロン内 g.99,708,055 に位置するチミンの下流に第 1 イントロン内 g.99,621,361 に位置するシトシン以降の配列が順方向に繋がったものであること、および ii) *cack/cack* 個体および+/*cack* 個体のゲノムコピー数は重複の内側（エクソン 5）でそれぞれ 4 コピーおよび 3 コピーであることの 2 点が確認された。また、この成果を Wistar Hannover GALAS ラットの生産者と共有し、2021 年 3 月 22 日をもって生産コロニーからこの突然変異遺伝子を除去することに成功した。一方、腎欠損を引き起こす *ak* 変異については、有力な候補突然変異である *Lrp1* のインフレーム欠失を標的とした遺伝子診断法により、*ak* 変異が浸透度の不完全な潜性変異であると解釈される結果を得た。今後は、特に腎発生の過程で *Lrp1* 遺伝子がどの様な役割を持つかといった点に注目して、この突然変異形質の特性を検証することとする。

課題 2：マウスを用いて実施した *Aqp12* 遺伝子多型が性周期に伴う子宮の重量変化に及ぼす影響の解析では、野生型と考えられる C57BL/6JJcl マウス（*Aqp12* 遺伝子について+/+）と比較して、C3H 型の遺伝子多型を導入したマウス（KI マウス）とこの遺伝子をノックアウトしたマウス（KO マウス）の両者で、前期発情期および後期発情期に限って子宮の実質重量または湿重量と実質重量の有意な増加が観察された。マウスの子宮では、湿重量、実質重量および子宮腔内に貯留する水分量のいずれもが発情前期に最大値を示し、前期発情期か

ら後期発情期にかけて次第に減少する。今回の実験では、発情前期における KI および KO マウスの子宮重量は野生型（+/+）とほぼ同じであったことから、*Aqp12* 遺伝子は子宮実質からの水分排泄に関与する可能性が示唆された。今後は、採材した子宮の組織学的および免疫組織学的検査を実施すると共に、血清中のエストロゲン（estradiol 17β）濃度を測定して、*Aqp12* 遺伝子多型が性周期に伴う子宮の重量変化に及ぼす影響をより詳細に検討することとする。

調査研究検討会：毒性部会開催

新型コロナウイルス感染拡大防止のため、外部委員による審議と意見書の受領は、いずれも 2020 年 5 月にメールを用いて実施した。

＜IET セミナーの開催＞

新型コロナウイルス感染拡大防止のため、2020 年度のセミナーは開催を中止した。