

令和3年度

農薬の蜜蜂への影響評価の充実のための
データ収集委託事業
(花粉・花蜜残留試験法の検討・検証)

報 告 書

2022年3月8日

一般社団法人日本植物防疫協会

目 次

I. 仕様書	2
II. 業務の概要	4
III. 調査結果	
1. 試験場所	7
2. 供試作物および耕種概要	7
3. 農薬の処理方法	8
4. 花粉・葯・花蜜の採取手法	11
5. 試料採取日、当日の諸条件および採取試料	17
6. 試料の送付	17
7. 分析の方法	18
8. 試験結果	19
9. 考察	28
IV. 資料	
1. 試験期間中の気温等	35
2. 分析方法の詳細	37
3. 開葯操作中の農薬安定性の確認	99

I. 仕様書

1 名称

令和3年度農薬の蜜蜂への影響評価の充実のためのデータ収集委託事業
(花粉・花蜜残留試験法の検討・検証)

2 事業の目的

欧米において、ミツバチをはじめとする花粉媒介者の減少が報告されており、その要因解明と減少を抑える取組が進められている。

要因として、ダニ等の寄生虫や害虫、病気、栄養不足等が挙げられているがその一つに農薬がある。

米国や欧州等においては、農薬による被害を軽減することを目的に、急性影響だけでなく、農薬使用現場での実態を反映したミツバチへの暴露の影響や、巣に持ち帰った花粉や花蜜を通じた幼虫を含む蜂群への暴露の影響を評価するため、新たに成虫での反復毒性試験や、幼虫での試験の要求が始まっている。国際的にも、経済協力開発機構（OECD）において、ミツバチに対しての、各国の農薬の登録審査のための要求試験のもとになるガイドラインやガイダンスの策定が進められている。

我が国においても、農薬登録に係るミツバチへの影響評価を、農薬の暴露経路を考慮し、幼虫への影響や成虫への反復影響、蜂群への影響を評価するための、段階制の評価法とデータ要求の導入を行うこととしている。導入する評価法の第1段階においては、花粉・花蜜残留試験のデータによる評価の精緻化の過程があるが、当該試験は、国際的なガイドラインが存在せず、手法が確立していない。

そのため、花粉・花蜜残留試験に資する効率的な手法の検討・検証を行う。

3 事業の実施期間

契約締結日から令和4年3月14日（月）までとする。

4 事業の概要

欧米のガイダンス（指針）及び論文における農薬のミツバチへのリスク評価に用いる花粉・花蜜残留試験の我が国での効率的な実施のため、試験法の検討・検証を行う。また、事業推進検討委員会を開催するとともに、事業の成果を報告書に取りまとめる。

5 事業推進検討委員会の設置

事業の実施にあたり、農薬のミツバチへの影響に関する知見等を有する3名の外部機関の専門家及び農林水産省消費・安全局農産安全管理課（以下「農産安全管理課」という。）

等からなる 20 名程度の事業推進検討委員会（以下「検討会」という。）を原則、東京近郊で 2 回以上開催（事業計画の検討時、事業取りまとめ時には必ず開催）すること。専門家の選定に当たっては、農産安全管理課と協議の上、選定すること。

なお、検討会に要する費用（会場借料、謝金、旅費等、一切の経費を含む。）は、受託者が負担すること。

また、新型コロナウイルスの感染状況等を踏まえ、農産安全管理課に相談の上、ウェブ会議等での開催を可能とする。

6 花粉・花蜜残留試験法の検討・検証

農薬のミツバチへの影響を評価するため、果樹の花粉・花蜜残留試験に係る手法の検討・検証及び残留傾向を検証する。

下記の採取手法および試験法の検討・検証に関する具体的な実施方法等については、必ず農産安全管理課と協議すること。

(1) 花粉・花蜜の効率的な採取手法の検討

花粉・花蜜採取の効率化に係る手法を検討する。手法には以下を含むものとする。

- ・ 効率的な花粉・花蜜の採取手法
- ・ 採取可能量と必要な花数

(2) 花粉・花蜜残留試験

1. 供試農薬

農薬（殺虫剤）2 種類以上を対象とする（浸透移行性を有するものを 1 種類必ず含むものとする）。

2. 供試植物

全国的に広く栽培されており、露地栽培のある果樹類から、常緑果樹 1 種類、落葉果樹 1 種類の作物を選定する。

3. 試験方法

試験は、供試植物を栽培し*1、慣行の使用量で農薬（殺虫剤）を茎葉散布し、経時的に*2 花粉・花蜜を採取する。

試験は供試植物・農薬毎に 3 反復以上行うものとする。

なお、処理区間における農薬の飛散が生じないように十分注意すること。

*1 施設でも可であるが、その場合は事前に農産安全管理課と協議すること。

*2 散布当日は必ず含むものとする。

4. 花粉、花蜜の分析

3. の試験で採取した花粉・花蜜の農薬成分濃度を分析する。

分析は 2 連で、供試植物及び農薬毎に行い、農産安全管理課が指定する方法に従うこと。

5. 結果の解析

作物毎の花粉・花蜜の経時的な農薬の分析結果について、残留濃度傾向の比較解析を行う。

7 報告

検討会及び調査の結果を取りまとめた事業報告書を、令和4年3月14日（月）までに農産安全管理課宛て10部提出（うち3部は電子媒体とする）すること。

事業の推進状況については、四半期毎を目処に農産安全管理課に報告すること。

なお、電子媒体については、CD-R 又は DVD-R のいずれかとし、ウイルスチェックを行った上で、ウイルス対策に関する情報（ウイルス対策ソフト名、ウイルス定義及びチェック年月日）を記載したラベルを添付すること。

8 事業実績報告書

受託者は、本事業が終了したとき（本事業を中止したとき、又は廃止した時を含む。）は、事業実績報告書を提出すること。

提出期限は、令和4年3月14日（月）までとする。

9 応札者の条件

受託者は、農薬 GLP 基準（残留性に関する試験分野）に適合した試験施設を有している者であること。

なお、上記を証明する書類を農産安全管理課へ提出し、確認を受けた後、入札説明書の6に示す場所に提出期限までに提出すること。

10 その他

（略）

II. 業務の概要

1. 目的

農薬のミツバチへの影響を評価するため、果樹の花粉・花蜜残留試験に係る手法の検討・検証及び残留傾向を検証する。

2. 事業推進検討委員会の設置

本事業の推進に当たり、農薬のミツバチへの影響に関する知見等を有する3名の外部機関の専門家及び農林水産省消費・安全局農産安全管理課等からなる20名程度の事業推進検討委員会を都内で2回（4月および翌1月頃）開催する。

<検討委員（五十音順、敬称略）>

- ・ 稲生圭哉（農研機構 農業環境研究部門 化学物質リスク研究領域 有機化学物質グループ 主席研究員）
- ・ 清水 明（公益社団法人 茨城県農林振興公社 園芸振興部 次長）
- ・ 中村 純（玉川大学 農学部 先端食農学科 食品科学領域 教授）

3. 事業の実施体制

本事業は、一般社団法人日本植物防疫協会山梨試験場（山梨県山梨市）、同高知試験場（高知県香南市）、同宮崎試験場（宮崎県宮崎市）および再委託先として一般社団法人岩手県植物防疫協会（岩手県盛岡市）、公益社団法人福島県植物防疫協会（福島県福島市）を含む5場所で圃場試験を実施し、残留分析は日本植物防疫協会茨城研究所において実施する。

4. 試験計画

(1) 供試植物

仕様書に基づき、代表的な落葉果樹としてりんご、常緑果樹としてかんきつ類（温州みかん、日向夏、不知火）を選定し供試する。りんごは露地栽培で試験を実施するが、かんきつ類は降雨による影響を避けるため施設栽培で試験を実施する。りんごは日植防山梨試験場、岩手県植物防疫協会、福島県植物防疫協会の3場所で開催し、かんきつ類は日植防山梨試験場（温州みかん）、日植防高知試験場（日向夏）、日植防宮崎試験場（不知火）の3場所で開催する。

(2) 供試農薬

浸透移行性の高い農薬としてジノテフラン水溶剤、浸透移行性の低い農薬としてペルメトリン乳剤を選定し、それぞれを所定濃度で混用し、慣行の方法により処理を行う。2

成分の同時分析により残留分析を行う。

(3) 調査方法

各作物について十分な面積の処理区及び無処理区を準備し、処理区に供試農薬を処理したのち、経時的に花粉および花蜜を採取する。花粉の採取法は、開花した花から卓上クリーナーを用いて花粉を吸引する方法を中心に、開花直前の花から葯を採取し、室内で開葯させ花粉を分離する方法についても検討する。花蜜の採取法は、開花した花の蜜溜まりから注射器等を使用して採取する。

採取時期及び回数は、開花率 20～30%の頃から数日おきに 3 回採取することを目標とする。残留分析は、各試料と供試農薬の組合せ毎に十分な回収率と精度が確保できる方法を予め確立し、各 2 連で実施する。

(4) 結果の整理

作物ごと農薬ごとの花粉・花蜜における残留濃度の経時的な推移を整理する。また、花あたり採取量および必要な花数さらに所要時間等から効率的な採取方法について検討する。

5. 工程表

	4月			5月			6月-12月	1月	2月	3月
	上旬	中旬	下旬	上旬	中旬	下旬				
検討会	第1回 検討会							第2回 検討会		最終報告
リンゴ		← 圃場試験 →								
かんきつ類		← 圃場試験 →								

※残留分析は随時実施し、12月末までに終了させる。

令和3年度農薬の蜜蜂への影響評価の充実のためのデータ収集委託事業
 (花粉・花蜜残留試験法の検討・検証)

一般社団法人日本植物防疫協会 業務実施体制 (主たる担当者)

役割	所属	氏名・連絡先	分担内容
事業責任者	調査企画部	冨田 恭範 03(5980)2182 tomita@jppa.or.jp	事業計画 ・取りまとめ
試験責任者	調査企画部	舟木 勇樹 03(5980)2182 funaki@jppa.or.jp	試験実施 ・結果解析
試験担当者	茨城研究所	荒井 雄太 029(872)5172 arai@jppa.or.jp	残留分析
試験担当者	山梨試験場	坂野 真平 0553(20)1570 banno@jppa.or.jp	試料調製
試験担当者	高知試験場	松村 栄一 0887(56)1414 matsumura@jppa.or.jp	試料調製
試験担当者	宮崎試験場	井園 佳文 0985(73)4198 izono@jppa.or.jp	試料調製
(再委託) 試験担当者	一般社団法人 岩手県植物防疫協会	鈴木 敏男 019(656)5707 iwate-syokubou@ec3.technowave.ne.jp	試料調製
(再委託) 試験担当者	公益社団法人 福島県植物防疫協会	佐々木 正剛 024(572)6801 syokubou3@aurora.ocn.ne.jp	試料調製

Ⅲ. 調査結果

果樹における農薬残留調査の試験方法を確立するため、代表的な落葉果樹としてりんご、代表的な常緑果樹として温州みかん、日向夏および不知火を選定し、花粉及び花蜜の効率的な採取方法および農薬の残留傾向を検討した。

1. 試験場所

(1) 試験場所および担当者

- ・一般社団法人 日本植物防疫協会 調査企画部
富田恭範（事業責任者）、舟木勇樹（試験責任者）、富田俊介
- ・一般社団法人 日本植物防疫協会 山梨試験場（以下、山梨）
中西秀明、坂野真平、後藤直人、丸山直哉、秋山空隆
- ・一般社団法人 日本植物防疫協会 高知試験場（以下、高知）
松村栄一、飯干浩美、内藤覚、有波友紀、谷山頼清、浜田拓弥、高芝和明、竹内繁治
- ・一般社団法人 日本植物防疫協会 宮崎試験場（以下、宮崎）
井園佳文、小川和己
- ・一般社団法人 岩手県植物防疫協会（以下、岩手）
佐々木正剛
- ・公益社団法人 福島県植物防疫協会（以下、福島）
鈴木敏男

(2) 分析場所および担当者

- ・一般社団法人 日本植物防疫協会茨城研究所
荒井雄太、島崎祐樹、六原智子、林直人、天野昭子

2. 供試作物および耕種概要

試験場所ごとの供試作物および耕種概要を表 1 に示した。なお、試験期間中の気温、降水量は「Ⅳ.資料」に掲載した。

表1. 供試作物および耕種概要

試験場所	作物名 品種	樹齢	栽培条件	栽植密度	樹高	開花 始期 ¹⁾	満開期 ²⁾	樹数
山梨	りんご つがる	12年生	露地栽培 わい化栽培	6.0×2.5m	約2.5m	4/5	4/15	31樹
				67樹/10a				
				4.0×2.0m 125樹/10a				
福島	りんご ふじ	16年生	露地栽培 わい化栽培	3.0×6.0m 56樹/10a	約3.5m	4/16	4/24	8樹
岩手	りんご ふじ	10年生,15 年生	露地栽培 わい化栽培	2.5×4.0m 100樹/10a	約3m	4/29	5/8	12樹
山梨	かんきつ(温州みかん) 青島温州	16年生	施設栽培 ポット栽培	2.0×2.0m 250樹/10a	約2m	4/24	5/7	16樹
高知	かんきつ(日向夏) 在来種	9年生	施設栽培	2.0×3.0m 170樹/10a	約2.8m	4/20	4/30	6樹
宮崎	かんきつ(不知火) 在来種	17年生	施設栽培 ポット栽培	2.0×2.5m 200樹/10a	約2m	4/6	4/21	6樹

1)連続して1～2花開花した日

2)りんご：頂芽の70～80%が開花した日。かんきつ：全体の70～80%が開花した日。

3. 農薬の処理方法

ジノテフラン 20%顆粒水溶剤（アルバリン顆粒水溶剤、Lot No.06S40022）およびペルメトリン 20%乳剤（アディオオン乳剤、Lot No.WAA755）をそれぞれ 2000 倍希釈で混用し、背負い式電動噴霧機で散布した。農薬散布は処理直後試料採取前日の夕刻に行った（ただし、岩手のみ処理直後試料採取当日の午前中に散布）。農薬処理条件を表 2 に示した。本試験における処理量は花が十分に濡れる十分量散布であった。なお、山梨および福島のりんご試験では、農薬処理区とは別に無処理区をそれぞれ 4 樹および 2 樹設けた。その他の試験は農薬散布前に試験区全体から無処理区試料を採取し、その後試験区全体に農薬を散布した。また、農薬散布時の状況を図 1～6 に示した。

表2. 薬剤処理条件

試験場所	作物	散布面積 樹数	開花 始期	散布日	満開期	散布量	処理時の 生育ステージ
山梨	りんご	186㎡ 27樹	4/5	4/7	4/15	333L/10a 2L/樹	開花率20%
福島	りんご	108㎡ 6樹	4/16	4/19	4/24	333L/10a 6L/樹	開花率20-30%
岩手	りんご	120㎡ 12樹	4/29	5/6	5/8	417L/10a 4.2L/樹	開花率25-30%
山梨	温州みかん	64㎡ 16樹	4/24	4/28	5/7	300L/10a 1.2L/樹	開花率20%
高知	日向夏	36㎡ 6樹	4/20	4/23	4/30	500L/10a 3L/樹	開花率20-30%
宮崎	不知火	30㎡ 6樹	4/6	4/18	4/21	400L/10a 2L/樹	開花率50%



図1 農薬処理時のりんご（山梨）の状況



図2 農薬処理時のりんご（福島）の状況



図3 農薬処理時のりんご（岩手）の状況



図4 農薬処理時の温州みかん（山梨）の状況



図5 農薬処理時の日向夏（高知）の状況



図6 農薬処理時の不知火（宮崎）の状況

4. 花粉・葯・花蜜の採取手法

各試料の採取手法は(1)~(3)のとおり行い、これらの操作には清浄な器具を用い、コンタミが生じないように留意した。

(1) 花粉の採取手法

①吸引採取法：開花した花から卓上クリーナーを用いて花粉を吸引採取（りんご、温州みかん、日向夏、不知火）

圃場において、吸引ホースの先端にナイロンメッシュと花粉フィルター（市販品のマスクの捕集フィルター）をとりつけた卓上クリーナー（図7~9）を使用し、ホースの先端ができるだけ花弁に触れないように注意しながら、開花した花より花粉を吸引採取した。なお、花粉を採取した花は除去せず樹に残したため、開花期間中は同一花から複数回採取することもあったが、採取花数はのべ数としてカウントした。



図7 捕集フィルターとナイロンメッシュ（目開き 600 μ m, りんご花粉用）



図8 使用した卓上クリーナー



図9 先端（吸引）部分

②葯分離法：開花直前の花から手作業で葯を分離し、室内で開葯させ、花粉を分離採取（りんご）

開花直前のバルーン状の花を採取して室内へ持ち帰り、ハサミもしくはピンセットで花弁を取り除いた後、花弁の除去に用いたものとは別の清浄なピンセットを用

いて葯を分離し、それらを 25℃恒温器（LPH-241S, 株式会社日本医化機械製作所製）内に 1 日間置き開葯させ、篩（80 メッシュ）で花粉を分離した。

③葯採取機法：開花直前の花から葯採取機で葯を分離し、室内で開葯させ、花粉を分離採取（りんご）

開花直前のバルーン状の花を採取して室内へ持ち帰り、葯採取機（POPP SX 2 型、株式会社ミツワ製、図 1 0）を用いて葯を分離し、それらを 25℃恒温器（LPH-241S, 株式会社日本医化機械製作所製）内に 1 日間置き開葯させ、篩で花粉を分離した。



図 1 0 葯採取機

(2) 葯の採取手法

かんきつ（温州みかん、日向夏、不知火）については花粉の代替として葯を試料とすることを想定し、葯の採取方法も検討した。葯採取は、開花後の花を採取して室内へ持ち帰り、ピンセットまたはハサミを用いて花卉を取り除いた後、花卉の除去に用いたものとは別の清浄なピンセットを用いて葯を分離した。

(3) 花蜜の採取手法

開花後の花を採取し、花粉が花蜜へ極力混入しないようにその場で花を下向きにしてハサミで花糸を切り落とした。それを室内へ持ち帰り、パスツールピペット（日向夏）または注射器（日向夏以外）（図 1 1）を使用して蜜溜まりから花蜜を採取した。



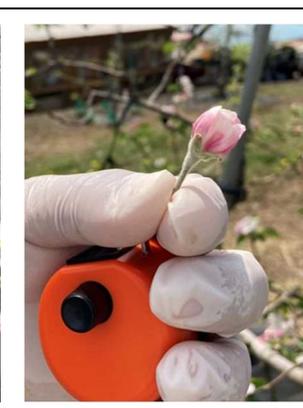
図 1 1 注射器と注射針（内径 0.20mm, 針長 13mm）

(図解) 花粉と花蜜の採取方法の手順

(1)-①りんご・かんきつ花粉吸引採取法

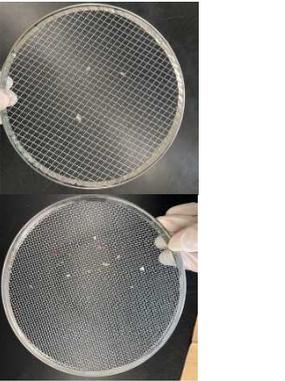
		<p>ナイロンメッシュと花粉フィルター（回収装置）をとりつけた卓上クリーナーを葯に近づけ花粉を吸引し回収する。先端が花弁等に極力触れないよう注意する。日向夏では花粉に粘度があるため目の粗いメッシュを用いる（写真右）。</p>
		<p>採取後、ナイロンメッシュをはずし、花粉フィルターに付着している花粉を葉包紙に移す。ナイロンメッシュ上のゴミ等が花粉にコンタミしないよう注意する。</p>

(1)-②りんご花粉葯分離法

		<p>清浄なハサミを用いて、開花直前のバルーン状の花を採取する。</p>
---	---	--------------------------------------

		<p>ハサミもしくはピンセットで花弁を取り除いた後、花弁を取り除いたものとは別の清浄なピンセットを用いて葯を分離する。花弁が葯に触れないよう注意する。</p>
		<p>分離した葯は 25℃恒温器内に 1 日間置き開葯させた後、清浄な筆と篩を用いて花粉を分離する。</p>

(1)-③りんご花粉葯採取機法

		<p>清浄なハサミを用いて、開花直前のバルーン状の花を採取する。 採取した花を上部矢印に 1 掴み入れ、5 秒ほど葯採取機にかけて葯を分離する。 使用前と各試験区終了ごとに葯採取機はコンプレッサーとアセトンで清浄化する。</p>
		<p>葯採取機から取り出した葯を大ききの違う篩に複数回かけて混入している植物片などを取り除き、葯だけの状態にする。</p>

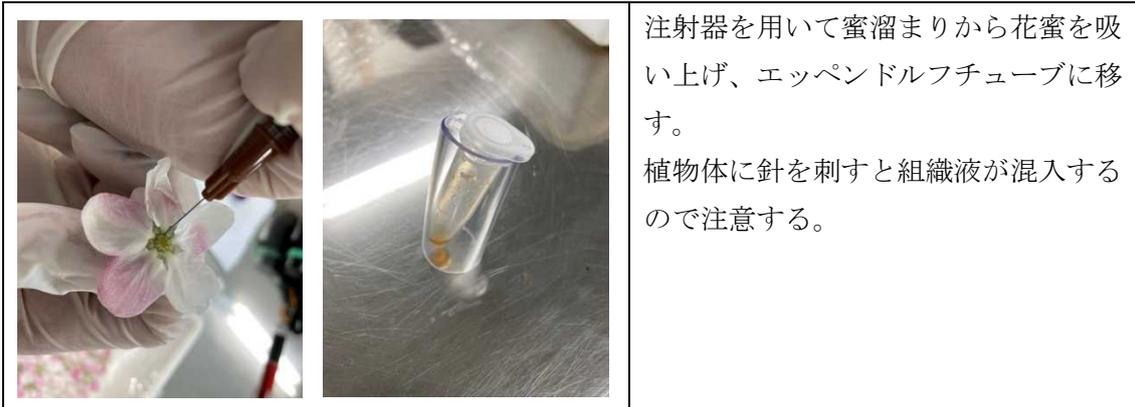
	<p>分離した葯は 25℃恒温器内に 1 日間置き開葯させた後、清浄な筆と篩を用いて花粉を分離する。</p>
---	--

(2)かんきつ(日向夏)葯

	<p>開花後の花を採取して室内へ持ち帰り、ピンセットで花弁を取り除いた後、花弁を取り除いたものとは別の清浄なピンセットを用いて葯を分離する。花弁が葯に触れないよう注意する。</p>
--	--

(3)-a.りんご、かんきつ(不知火、温州みかん)花蜜

	<p>開花後の花を採取し、花粉が花蜜へ極力混入しないようにその場で花を下向きにしてハサミで花糸を切り落とす。花は乾燥を防ぐためビニル袋へ入れる。</p>
---	--



(3)-b.かんきつ(日向夏)花蜜



5. 試料採取日、当日の諸条件および採取試料

試験場所毎の試料採取日と当日の条件（天候、開花率）および採取試料を表3に示した。

表3. 試料採取時の条件および採取試料

試験場所 作物	区	薬剤 処理後 日数	採取日	天気	開花率	採取試料（採取時の花の状態）				
						花粉				
						吸引採取 法 (開花)	薬分離法 (ハルーン状)	薬採取機 法 (ハルーン状)	薬 (開花)	花蜜 (開花)
山梨 りんご	無処理区	—	4/7	晴れ	20%	○*	○	—*	—	—
	処理区	直後**	4/8	晴れ	20%	○	○	○	—	○
	無処理区	—	4/9	晴れ	30%	—	—	—	—	○
	処理区	3日後	4/10	晴れ	30%	○	○	—	—	○
福島 りんご	無処理区	—	4/22	晴れ	80%	○	—	—	—	○
	処理区	直後**	4/20	晴れ	40%	○	—	—	—	○
	処理区	3日後	4/22	晴れ	80%	○	—	—	—	○
		5日後	4/24	晴れ	90-100%	○	—	—	—	○
岩手 りんご	無処理区	—	5/4	晴れ	10%-20%	○	—	—	—	○
	処理区	直後**	5/6	晴れ	30%-40%	○	—	—	—	○
	処理区	2日後	5/8	晴れ	70%-80%	○	—	—	—	○
		5日後	5/11	晴時々曇り	90%以上	○	—	—	—	○
山梨 温州みかん	無処理区	—	4/28	くもり	20%	○	—	—	○	○
	処理区	直後**	4/29	雨	20%	—	—	—	○	○
	処理区	3日後	5/1	晴れ	40%	—	—	—	○	○
		5日後	5/3	晴れ	40%	—	—	—	○	○
高知 日向夏	無処理区	—	4/23	晴れ	20-30%	○	—	—	○	○
	処理区	直後**	4/24	晴れ	30%	○	—	—	○	○
	処理区	3日後	4/26	晴れ	50%	○	—	—	○	○
		7日後	4/30	晴れ	80%	○	—	—	○	○
宮崎 不知火	無処理区	—	4/16	晴れ	50%	○	—	—	—	—
		—	4/18	晴れ	50%	—	—	—	○	○
	処理区	直後**	4/19	晴れ	60%	—	—	—	○	○
		3日後	4/21	晴れ	70%	—	—	—	○	○
		7日後	4/25	晴れ	90%	—	—	—	○	○

*○は実施したことを示し、—は実施していないことを示す

**処理直後は処理24時間以内（岩手は午前中散布-同日午後採取、岩手以外は午後散布-翌午前中採取）を示す。

6. 試料の送付

花粉試料と薬試料は、清浄な薬包紙に包んでアルミ袋に入れ、これを保冷ボックスに収容し、ボックス内を-20℃に保冷できる保冷剤（アイスバッテリー）を同梱して冷凍便で分析場所に送付した。発送まで時間を要する場合は、冷凍庫で保管した。

花蜜試料はエッペンドルフチューブに採取し、これをアルミ袋に入れ、ダンボール箱

に収容して冷蔵便で分析場所へ送付した。発送まで時間を要する場合は、冷蔵庫で保管した。

7. 分析の方法

各試料と供試農薬の組み合わせごとに十分な回収率と精度が確保できる方法を事前に確立した後、各 2 連で分析を実施した。ただし、採取量の少なかつたりんご花粉の無処理区試料（吸引採取法、薬分離法）及び処理直後試料（薬採取機法）は各 1 連もしくは供試試料を半量にして実施した。

（1）磨砕均一化

1) 花粉試料（りんご、日向夏）：

試料に超純水を加え、約 1,000rpm に設定した攪拌機で 3 分間磨砕した。磨砕後、ボルテックスで試料をよく攪拌してから 50mL 容遠心管に必要量を分取した。なお、試料は有姿で保管し、分析直前に磨砕均一化を行った。

2) 薬試料（温州みかん、日向夏、不知火）：

試料に超純水を加え、約 1,000rpm に設定した攪拌機で 3 分間磨砕した。通常の攪拌棒を用いた場合は磨砕が出来なかったため、薬試料均一化時はイボ付き仕様の攪拌棒を使用した。磨砕後、ボルテックスで試料をよく攪拌してから 50mL 容遠心管に必要量を分取した。なお、試料は有姿で保管し、分析直前に磨砕均一化を行った。

3) 花蜜試料（りんご、温州みかん、日向夏、不知火）：

磨砕均一化操作は実施せず、試料受領後にボルテックスでよく攪拌してから 50mL 容 PP 製遠心管に必要量を分取し、抽出操作を行うまで冷凍保管した。

（2）抽出・精製・定量操作

花粉、花蜜、薬ともに以下の方法を用いた。なお、詳細な分析法及び回収率等の結果は「IV. 資料 2. 分析方法の詳細」に示した。

1) ジノテフラン（全分析試料）

秤量した試料に含水アセトニトリルを加え振とう抽出した。塩析、アセトニトリル／ヘキサン分配、及び連結ミニカラムによる精製を行った後、液体クロマトグラフ／タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）を用いて定量した。定量限界は 0.001mg/kg とした。

2) ペルメトリン (りんご花粉、花蜜試料)

秤量した試料に含水アセトニトリルを加え振とう抽出した。塩析、フロリジルミニカラムによる精製を行った後、LC-MS/MS を用いて定量した。定量限界は花蜜試料が 0.001mg/kg とし、りんご花粉は分析法検討用の購入花粉試料から検出された妨害ピークの影響を抑えるため 0.005mg/kg とした。

3) ペルメトリン (温州みかん薬、日向夏薬、日向夏花粉、不知火薬試料)

秤量した試料に含水アセトニトリルを加え振とう抽出した。塩析及び連結ミニカラムによる精製を行った後、LC-MS/MS を用いて定量した。定量限界は 0.001mg/kg とした。

8. 試験結果

(1) 効率的な採取方法の検討

花粉、薬および花蜜の各採取方法の特徴を比較し、採取の効率を評価した。比較条件として試料 250mg を 1 人で採取するのに必要な時間を示した。

1) りんご花粉

りんご花粉の 3 種類の採取法ごとの結果を表 4~6 に示した。

吸引採取法は、開花状況によって採取量が大きく変動し、特に開花初期は 1 花あたりの採取できる量が少なかった (0.07mg~0.35mg/花)。採取時間もそれにともない変動が大きく、1 人あたり 1~6 時間程度かかり、開花初期に特に時間がかかった (表 4)。開花初期は開花数が少ないため、採取可能な花を探すことにも時間を要した。

薬分離法は、吸引採取法に比べて採取時期による 1 花あたりの採取量の差は少なかった (0.27mg~0.62mg/花)。採取時間は早くても 1 人あたり約 6.5 時間、最大で約 19 時間を要した (表 5)。採取作業のうち、薬の分離に多大な時間を要し、作業時間の 8 割を占めた。

薬採取機法は、薬の分離は機器を用いるため 30 分程度で済むものの、ロスが生じるため手作業で行う薬分離法に比べて多くの花数を必要とし、1 人あたり約 7 時間かかった (表 6)。必要とする花数が多く採取に時間を要したため、花採取が作業時間の 9 割を占めた。

3 種類の採取方法を比較すると、1 花あたりの花粉採取量は、薬分離法 ≧ 吸引採取法 ≧ 薬採取機法の順で効率がよかった。採取に要する時間は、吸引採取法 > 薬採取機法 ≧ 薬分離法の順で効率がよかった。ただし薬採取機法は、1 回調査のみの結果である。

表4. りんご花粉の吸引採取法による採取の結果

試験場所	採取日	開花割合	1花あたり 花粉重量 (mg)	花粉250mg 採取に必要な 花数(花)*	花粉250mg 採取に必要な 時間(1人 当たり)	備考
山梨	4/7	20%	0.07	3,571	6:07	
	4/8	20%	0.11	2,273	5:53	
	4/10	30%	0.24	1,042	1:53	
	4/12	40%	0.21	1,190	1:48	
	平均		0.16	2,019	3:55	
福島	4/20	40%	0.12	2,083	3:41	
	4/22	80%	0.21	1,190	2:17	
	4/24	90-100%	0.33	758	1:23	
	平均		0.22	1,344	2:27	
岩手	5/4	10%-20%	0.05	5,000	12:54	開花率が低く、さらに霜害による被害花が多かった。
	5/6	30%-40%	0.12	2,083	3:40	
	5/8	70%-80%	0.10	2,500	2:55	
	5/11	90%以上	0.35	714	0:48	
	平均**		0.19	1,766	2:28	
3場所平均			0.19	1,710	3:02	

*同一花からの複数回採取も含まれ、のべ数として計数した。

**5/4は霜害の影響が大きいため平均値の算出から除外した。

表5. りんご花粉の薬分離法による採取の結果

試験場所	採取日	開花割合	1花あたり 薬重量(mg)	1花あたり 花粉重量 (mg)	花粉250mg 採取に必要な 花数(花)	花粉250mg 採取に必要な 時間(1人 当たり)
山梨	4/7	20%	15.9	0.43	581	12:46
	4/8	20%	15.8	0.27	926	19:02
	4/10	30%	19.4	0.54	463	8:27
	4/12	40%	19.3	0.62	403	6:27
	平均		17.6	0.47	533	10:14

表6. りんご花粉の薬採取機法による採取の結果

試験場所	採取日	開花割合	1花あたり 薬重量(mg)	1花あたり 花粉重量 (mg)	花粉250mg 採取に必要な 花数(花)	花粉250mg 採取に必要な 時間(1人 当たり)
山梨	4/7	20%	19.3	0.14	1,786	6:52

2) りんご花蜜

結果を表7に示した。

樹全体の開花が進むと花蜜量が増える傾向がみられた (1.3mg~5.2mg/花)。

詳細なデータはとれていないため条件は確定できないが、天気がよく湿度が低い場合や風がある場合は花蜜採取量が少ない傾向がみられた。

採取時間は日によってばらつきはあるが、平均1人あたり2時間程度を要した。

表7. りんご花蜜採取の結果

試験場所	採取日	開花割合	1花あたり 花蜜重量 (mg)	花蜜250mg 採取に必要な 花数(花)	花蜜250mg採 取に必要な時 間(1人当たり)
山梨	4/8	20%	1.8	141	2:57
	4/9	30%	3.8	65	1:00
	4/10	30%	3.1	80	2:07
	4/12	40%	4.9	52	1:08
	平均		3.4	85	1:48
福島	4/20	40%	1.4	179	3:57
	4/22	80%	4.6	55	0:43
	4/24	90-100%	2.9	86	2:03
	平均		3.0	106	2:15
岩手	5/4	10%-20%	1.3	190	3:38
	5/6	30%-40%	1.9	134	3:16
	5/8	70%-80%	4.4	57	0:44
	5/11	90%以上	5.2	48	0:26
	平均		3.2	107	2:01
3場所平均			3.4	99	2:00

3) かんきつ花粉

結果を表8に示した。

「温州みかん」および「不知火」は、花粉をほとんど採取できなかった。「日向夏」は1花あたりの花粉量が多く (1.7mg~2.6mg/花)、りんごの10倍程度採取できた。採取時間は1時間程度であった。

表 8. かんきつ花粉の吸引採取法による採取の結果

試験場所 作物	採取日	開花割合	1花あたり 花粉重量 (mg)	花粉250mg 採取に必要な 花数(花)	花粉250mg採 取に必要な時 間(1人当たり)
山梨 温州みかん	4/28	20%	0	—	—
	4/23	20-30%	1.7	146	1:02
高知 日向夏	4/24	30%	2.5	98	1:16
	4/26	50%	2.0	126	1:30
	4/30	80%	2.6	98	0:58
		平均	2.2	117	1:11
宮崎 不知火	4/16	50%	≦0.002	—	—

4) かんきつ薬

結果を表 9 に示した。

1 花当たりの薬採取量は、「不知火」(15.8mg~26.0mg/花) > 「日向夏」(10.6mg~12.3mg) > 「温州みかん」(8.0mg~9.5mg/花) の順で多かった。

採取時間は 20 分(不知火) ~ 1 時間(温州みかん) 程度であった。

表 9. かんきつ薬の採取結果

試験場所 作物	採取日	開花割合	1花あたり薬 重量(mg)	薬250mg採取に 必要な花数(花)	薬250mg採取に必要 な時間(1人当たり)
山梨 温州みかん	4/28	20%	8.5	30	1:18
	4/29	20%	9.5	26	1:16
	5/1	40%	8.0	31	1:11
	5/3	40%	8.0	31	0:56
				8.5	29.5
高知 日向夏	4/23	20-30%	12.3	20	0:47
	4/24	30%	12.0	21	0:44
	4/26	50%	11.2	22	0:39
	4/30	80%	10.6	24	0:43
				11.5	21.8
宮崎 不知火	4/18	50%	18.0	14	0:19
	4/19	60%	19.9	13	0:13
	4/21	70%	26.0	10	0:11
	4/25	90%	15.8	16	0:25
				19.9	13.0

5) かんきつ花蜜

結果を表 10 に示した。

1 花当たりの花蜜量は「日向夏」(11.3mg~47.8mg/花) > 「温州みかん」(6.9mg~

17.0mg/花) > 「不知火」 (3.0mg~6.3mg/花) の順が多かった。

採取時間は約 10 分 (日向夏) ~1 時間 30 分 (不知火) 程度であった。

表 1 0. かんきつ花蜜採取の結果

試験場所 作物	採取日	開花割合	1花あたり 花蜜重量 (mg)	花蜜250mg 採取に必要な 花数(花)	花蜜250mg採取 に必要な時間 (1人当たり)
山梨 温州みかん	4/28	20%	11.9	21	0:42
	4/29	20%	17.0	15	0:34
	5/1	40%	9.6	26	0:51
	5/3	40%	6.9	36	1:12
		平均	11.3	24.6	0:50
高知 日向夏	4/23	20-30%	47.8	5	0:06
	4/24	30%	34.3	7	0:05
	4/26	50%	11.3	22	0:22
	4/30	80%	29.7	8	0:06
		平均	30.8	10.7	0:10
宮崎 不知火	4/18	50%	3.0	84	2:03
	4/19	60%	3.3	76	1:58
	4/21	70%	6.3	40	1:03
	4/25	90%	5.7	44	0:53
		平均	4.5	61.0	1:29

(2) 農薬残留調査

1) 回収率及び保存安定性

回収率と併行再現性の試験結果を「IV.資料 2. (7)」に示した。各試料からの各農薬の回収率は 70-120%の範囲にあり、検量線の直線性は良好であった。また、保存安定性の結果は「IV.資料 2. (8)」に示した。ジノテフランは最長 87 日 (りんご花蜜)、ペルメトリンは最長 81 日 (りんご花粉、かんきつ薬) の保存後において良好な回収率が得られた。

2) 分析結果

試験ごとの試料重量および分析結果を表 1 1 ~ 表 2 5 に示した。

① りんご花粉

吸引採取法による処理直後の花粉残留濃度は、3 場所とも近似した値を示し、ジノテフランは 8.19mg/kg~20.2mg/kg、ペルメトリンは 17.3mg/kg~24.6mg/kg であった。

処理 5 日後の残留濃度は、ジノテフランは 1.18mg/kg~5.01mg/kg、ペルメトリンは 1.26mg/kg~4.48mg/kg であり、両農薬の残留濃度は同程度となった(表 11~13)。

薬分離法による処理直後の花粉残留濃度は吸引採取法と比べると、ジノテフランは約 1/10、ペルメトリンは約 1/100 と低い値を示し、特にペルメトリンは顕著に低かった。処理 3 日後、5 日後の残留濃度は、処理直後の 23～50%程度であった（表 14）。

薬採取機法による花粉残留濃度は、薬分離法に比べてジノテフランで約 6 倍、ペルメトリンで約 22 倍高かった（表 14、15）。

なお、薬分離法と薬採取機法では薬を恒温器（25℃設定）に 1 晩おいたため、各農薬の安定性について確認した。ジノテフラン及びペルメトリンともに恒温条件下での顕著な減衰はなかった。詳細は「IV.資料 3.」に示した。

表 1 1. りんご花粉（吸引採取法）・山梨

花数	受領重量 (g)	経過日数	ジノテフラン (mg/kg)				ペルメトリン (mg/kg)			
			分析値①	分析値②	差	平均値	分析値①	分析値②	差	平均値
3416	0.173	無処理	<0.001	-	-	<0.001※	<0.005	-	-	<0.005※
3414	0.325	直後	14.0	13.7	0.3	13.8	20.5	20.2	0.3	20.4
2518	0.554	3 日後	4.58	4.54	0.04	4.56	6.25	5.81	0.44	6.03
1982	0.418	5 日後	1.55	1.54	0.01	1.54	1.88	1.80	0.08	1.84

※受領量が少なかったため 1 連分析で実施した。

表 1 2. りんご花粉（吸引採取法）・福島

花数	受領重量 (g)	経過日数	ジノテフラン (mg/kg)				ペルメトリン (mg/kg)			
			分析値①	分析値②	差	平均値	分析値①	分析値②	差	平均値
2659	0.223	無処理	0.012	0.011	0.001	0.012	<0.005	<0.005	-	<0.005
2394	0.241	直後	20.5	19.9	0.6	20.2	25.6	23.7	1.9	24.6
1460	0.293	3 日後	3.47	3.46	0.01	3.46	4.24	4.15	0.09	4.20
1100	0.326	5 日後	5.04	4.98	0.06	5.01	4.54	4.43	0.11	4.48

表 1 3. りんご花粉（吸引採取法）・岩手

花数	受領重量 (g)	経過日数	ジノテフラン (mg/kg)				ペルメトリン (mg/kg)			
			分析値①	分析値②	差	平均値	分析値①	分析値②	差	平均値
5069	0.230	無処理	<0.001	<0.001	-	<0.001	<0.005	<0.005	-	<0.005
3153	0.324	直後	8.24	8.14	0.10	8.19	17.3	17.3	0	17.3
3227	0.310	2 日後	3.35	3.34	0.01	3.34	5.39	5.20	0.19	5.30
1664	0.562	5 日後	1.22	1.14	0.08	1.18	1.28	1.23	0.05	1.26

表 1 4. りんご花粉（薬分離法）・山梨

花数	受領重量 (g)	経過日数	ジノテフラン (mg/kg)				ペルメトリン (mg/kg)			
			分析値 ①	分析値 ②	差	平均値	分析値 ①	分析値 ②	差	平均値
407	0.106	無処理	<0.001	-	-	<0.001 ※1	<0.005	-	-	<0.005 ※1
601	0.119	直後	1.37	1.30	0.07	1.34 ※2	0.215	0.204	0.011	0.210 ※2
600	0.308	3日後	0.313	0.309	0.004	0.311	0.085	0.085	0	0.085
600	0.345	5日後	0.374	0.365	0.009	0.370	0.108	0.100	0.008	0.104

※1：受領した試料量が少なかったため1連分析で実施した。

※2：受領した試料量が少なかったため分析試料を半量（0.025g）にして2連分析で実施した。

表 1 5. りんご花粉（薬採取機法）・山梨

花数	受領重量 (g)	経過日数	ジノテフラン (mg/kg)				ペルメトリン (mg/kg)			
			分析値 ①	分析値 ②	差	平均値	分析値 ①	分析値 ②	差	平均値
600	0.058	直後	7.85	-	-	7.85※	4.58	-	-	4.58※

※受領した試料量が少なかったため分析試料を半量（0.025g）にして1連分析で実施した。

② りんご花蜜

処理直後の花蜜残留濃度は、ジノテフランは1.37mg/kg～6.08mg/kg、ペルメトリンは0.181mg/kg～0.852mg/kgとペルメトリンの方が低い残留濃度を示した。その後の減少はペルメトリンの方が大きく、福島は3日後および岩手の2日後には0.006mg/kgとなった。ただし、山梨の3日後では0.467mg/kgと福島、岩手と比べて高い値を示した（表16～18）。これは、低温のため開花速度が遅く、散布時に開花していた花が採取時に残存していた可能性が考えられた。

表 1 6. りんご花蜜・山梨

花数	受領重量 (g)	経過日数	ジノテフラン (mg/kg)				ペルメトリン (mg/kg)			
			分析値 ①	分析値 ②	差	平均値	分析値 ①	分析値 ②	差	平均値
100	0.465	無処理	<0.001	<0.001	-	<0.001	<0.001	<0.001	-	<0.001
300	0.503	直後	6.14	6.02	0.12	6.08	0.896	0.808	0.088	0.852
141	0.397	3日後	2.17	2.16	0.01	2.17	0.487	0.447	0.040	0.467
120	0.561	5日後	0.447	0.436	0.011	0.442	0.038	0.037	0.001	0.038

表 17. りんご花蜜・福島

花数	受領重量 (g)	経過日数	ジノテフラン (mg/kg)				ペルメトリン (mg/kg)			
			分析値 ①	分析値 ②	差	平均値	分析値 ①	分析値 ②	差	平均値
121	0.309	無処理	<0.001	<0.001	-	<0.001	<0.001	<0.001	-	<0.001
200	0.325	直後	1.38	1.36	0.02	1.37	0.187	0.175	0.012	0.181
112	0.496	3日後	0.268	0.265	0.003	0.266	0.007	0.006	0.001	0.006
141	0.326	5日後	0.440	0.437	0.003	0.438	0.009	0.009	0	0.009

表 18. りんご花蜜・岩手

花数	受領重量 (g)	経過日数	ジノテフラン (mg/kg)				ペルメトリン (mg/kg)			
			分析値 ①	分析値 ②	差	平均値	分析値 ①	分析値 ②	差	平均値
560	0.714	無処理	<0.001	<0.001	-	<0.001	<0.001	<0.001	-	<0.001
239	0.424	直後	2.03	2.02	0.01	2.02	0.554	0.512	0.042	0.533
170	0.730	2日後	1.00	1.00	0	1.00	0.007	0.005	0.002	0.006
267	1.369	5日後	0.973	0.921	0.052	0.947	0.004	0.003	0.001	0.004

③ かんきつ薬・花粉

処理直後の薬残留濃度は、6.12mg/kg (ジノテフラン/「日向夏」) ~13.8mg/kg (ペルメトリン/「不知火」) といずれも近い値を示した。その後の減少傾向は、「温州みかん」と「日向夏」は近似していたが、「不知火」はやや高い値を示した。いずれの樹種もペルメトリンの方が大きく減少した (表 19~21)。

なお、「日向夏」の花粉と薬の残留濃度はごく近い値を示した (表 20、22)。

表 19. かんきつ (温州みかん) 薬・山梨

花数	受領重量 (g)	経過日数	ジノテフラン (mg/kg)				ペルメトリン (mg/kg)			
			分析値 ①	分析値 ②	差	平均値	分析値 ①	分析値 ②	差	平均値
80	0.645	無処理	0.001	0.001	0	0.001	<0.001	<0.001	-	<0.001
80	0.755	直後	7.86	7.29	0.57	7.58	8.28	8.13	0.15	8.20
80	0.622	3日後	1.08	1.05	0.03	1.06	1.20	1.19	0.01	1.20
80	0.624	5日後	0.112	0.111	0.001	0.112	0.005	0.004	0.001	0.004

表 2 0. かんきつ（日向夏）薬・高知

花数	受領重量 (g)	経過日数	ジノテフラン (mg/kg)				ペルメトリン (mg/kg)			
			分析値 ①	分析値 ②	差	平均値	分析値 ①	分析値 ②	差	平均値
53	0.635	無処理	<0.001	<0.001	-	<0.001	<0.001	<0.001	-	<0.001
20	0.624	直後	6.15	6.10	0.05	6.12	7.58	7.51	0.07	7.54
50	0.562	3日後	1.13	1.11	0.02	1.12	0.170	0.170	0	0.170
50	0.515	7日後	0.123	0.119	0.004	0.121	0.004	0.004	0	0.004

表 2 1. かんきつ（不知火）薬・宮崎

花数	受領重量 (g)	経過日数	ジノテフラン (mg/kg)				ペルメトリン (mg/kg)			
			分析値 ①	分析値 ②	差	平均値	分析値 ①	分析値 ②	差	平均値
30	0.529	無処理	<0.001	<0.001	-	<0.001	<0.001	<0.001	-	<0.001
30	0.586	直後	10.5	10.3	0.2	10.4	14.2	13.4	0.8	13.8
30	0.767	3日後	1.56	1.52	0.04	1.51	2.01	1.97	0.04	1.99
25	0.391	7日後	0.802	0.789	0.013	0.796	0.625	0.609	0.016	0.617

表 2 2. かんきつ（日向夏）花粉・高知

花数	受領重量 (g)	経過日数	ジノテフラン (mg/kg)				ペルメトリン (mg/kg)			
			分析値 ①	分析値 ②	差	平均値	分析値 ①	分析値 ②	差	平均値
240	0.458	無処理	<0.001	<0.001	-	<0.001	<0.001	<0.001	-	<0.001
185	0.467	直後	8.10	8.05	0.05	8.08	15.7	15.4	0.3	15.6
166	0.359	3日後	0.835	0.821	0.014	0.828	0.399	0.371	0.028	0.385
180	0.453	7日後	0.096	0.094	0.002	0.095	0.039	0.038	0.001	0.038

④ かんきつ花蜜

処理直後の花蜜残留濃度は、「日向夏」<「温州みかん」<「不知火」の順となり、ジノテフランは 0.212、1.15 および 7.22mg/kg、ペルメトリンは 0.009、0.102 および 10.6mg/kg であり、樹種によるばらつきが大きかった。これは 1 花あたりの花蜜量が少ないほど残留濃度が高い結果となった。

その後の減少傾向は、ジノテフランよりもペルメトリンの方が大きく、処理 7 日後（「温州みかん」は 5 日後）には 3 樹種とも残留濃度は 0.003~0.006mg/kg と低下した（表 23~25）。

表 2 3. かんきつ（温州みかん）花蜜・山梨

花数	受領重量 (g)	経過日数	ジノテフラン (mg/kg)				ペルメトリン (mg/kg)			
			分析値 ①	分析値 ②	差	平均値	分析値 ①	分析値 ②	差	平均値
50	0.582	無処理	<0.001	<0.001	-	<0.001	<0.001	<0.001	-	<0.001
50	0.839	直後	1.16	1.14	0.02	1.15	0.104	0.101	0.003	0.102
50	0.465	3日後	0.684	0.653	0.031	0.668	0.001	0.001	0	0.001
50	0.326	5日後	0.547	0.544	0.003	0.546	0.003	0.003	0	0.003

表 2 4. かんきつ（日向夏）花蜜・高知

花数	受領重量 (g)	経過日数	ジノテフラン (mg/kg)				ペルメトリン (mg/kg)			
			分析値 ①	分析値 ②	差	平均値	分析値 ①	分析値 ②	差	平均値
40	1.923	無処理	<0.001	<0.001	-	<0.001	<0.001	<0.001	-	<0.001
30	1.104	直後	0.213	0.210	0.003	0.212	0.009	0.008	0.001	0.009
30	0.316	3日後	0.190	0.182	0.008	0.186	0.005	0.005	0	0.005
35	1.014	7日後	0.082	0.077	0.005	0.080	0.003	0.002	0.001	0.003

表 2 5. かんきつ（不知火）花蜜・宮崎

花数	受領重量 (g)	経過日数	ジノテフラン (mg/kg)				ペルメトリン (mg/kg)			
			分析値 ①	分析値 ②	差	平均値	分析値 ①	分析値 ②	差	平均値
140	0.408	無処理	<0.001	<0.001	-	<0.001	<0.001	<0.001	-	<0.001
100	0.316	直後	7.24	7.19	0.05	7.22	10.9	10.3	0.6	10.6
80	0.483	3日後	2.23	2.21	0.02	2.22	0.413	0.399	0.014	0.406
70	0.374	7日後	0.472	0.460	0.012	0.466	0.006	0.006	0	0.006

9. 考察

りんご試験における開花については、山梨では、開花前は温かく開花が例年より早まったものの、開花後は低温で推移し、開花の進みは緩慢であった。福島では、温暖な日が続く開花の進みは早かった。岩手では、試験前の着蕾期に降霜があり、中心花の多くは霜害を受け、初回の花蜜採取（無処理区）に多大な影響を及ぼした。開花後の進みは平年並みであった。また、山梨、福島では試験期間中降雨はなく、岩手では農薬散布前日と4日後に2.0～2.5mmの降雨があったのみで、試験に対する降雨の影響はほとんどないと考えられる。

かんきつ試験における開花については、山梨の温州みかんは、平年と同時期に十分な着花がみられた。また開花始めから満開期まではやや緩やかに進んだが、その後の進みは平年並みであった。高知の日向夏および宮崎の不知火は、開花前は暖かく例年よりやや早い開花では

あったが十分な着花がみられた。その後の開花後の進みは平年並みであった。また、3 試験場所とも施設栽培であるため降雨の影響はなかった。

(1) 試料の確保について

花粉・花蜜の農薬残留試験を実施する場合、無処理区と処理区を設定する必要がある。一般的な作物残留試験では無処理区試料を用いて添加回収試験および保存安定性試験を行うが、本試験では十分量の無処理区試料を採取することが困難であったことから、市販品の国産りんご花粉および人口花蜜（スクロース、グルコース、フルクトース液）で代用した。これに基づいて、ここでは添加回収試験および保存安定性試験に必要な試料は考慮せず、1 農薬の分析に必要な花粉・花蜜の量を、それぞれ無処理区で 250mg、処理区で 250mg とし、これを採取するのに必要な試験区について以下に考察する。

1) りんご

花粉の吸引採取法を用いた場合、開花ステージにより採取量は大きく異なり、採取量の少ない開花初期は 1 区あたり 2000～3600 花程度の開花した花を必要とした（霜害の影響を受けた岩手の試験では 5000 花）（表 4）。ただし、同一の花から 2 回程度採取することが多く（多少時間をあけると重ね採取してもある程度採取できる）、のべ花数としてカウントしたため、実際の花数はこの半数程度の 1000～1800 花程度と考えられる。

薬分離法を用いた場合、1 区あたり 400～1000 花程度のバルーン状の花を必要とした（表 5）。

花蜜は最大で 1 区あたり 200 花程度必要であった（表 7）。

全ての花が一斉には開花しないため、例えば開花率 30%の時期に採取を行う場合は、総花数としてはこの 3 倍強の花数（花粉の吸引採取法+花蜜：4000～7000 花程度/区、花粉の薬分離法+花蜜：2000～4000 花程度/区）が必要と考えられる。

上記は 1 処理区あたりの必要花数となる。農薬処理前に無処理区試料を採取する場合は同試験区から採取可能である。別途無処理区を設ける場合は、これと同規模の圃場を準備する必要がある。なお、必要な樹数は、樹の樹齢、仕立てによって大きく異なることとなる。

2) かんきつ

日向夏では、花粉採取に 1 区あたり最大 150 花程度、薬採取に最大 25 花程度、花蜜採取に最大 25 花程度を必要とした（表 8～10）。

温州みかんでは、薬採取に 1 区あたり最大 35 花程度、花蜜採取に 40 花程度を必要とした（表 9、10）。

不知火では、薬採取に 1 区あたり最大 20 花程度、花蜜採取に 90 花程度を必要とし

た（表 9、10）。

りんごと同様に、例えば開花率 30%の時期に採取を行う場合は、総花数としてはこの 3 倍強の花数（日向夏の花粉+花蜜：600 花程度/区、日向夏の葯+花蜜：200 花程度/区、温州みかんの葯+花蜜：300 花程度/区、不知火の葯+花蜜：400 花程度/区）が必要と考えられる。

上記は 1 処理区あたりの必要花数となる。農薬処理前に無処理区試料を採取する場合は同試験区から採取可能である。別途無処理区を設ける場合は、これと同規模の圃場を準備する必要がある。なお、必要な樹数は、樹の樹齢、仕立てによって大きく異なることとなる。

(2) りんご花粉の 3 種類の採取方法における採取効率と農薬の残留傾向

りんご花粉の採取方法として、吸引採取法、葯分離法、葯採取機法の 3 種類の方法について採取効率と農薬の残留傾向を検討した。ただし、葯採取機法については無反復である。

採取の時間効率では吸引採取法が最もよく、葯分離法の 3~6 倍効率がよかった。ただし、吸引採取法においても、特に開花初期は 1 花当たりの採取量が少ないため多くの労力を要した（1 人あたり最大 6 時間）。一方、1 花当たりの量的効率では葯分離法が最もよく、吸引採取法の 3 倍程度採取が可能となった（表 4、5）。

続いて、りんごの花粉・花蜜における農薬残留濃度を表 26 に示す。

3 場所の農薬残留濃度は概ね近似しており、全体として一般の作物残留試験で示されるばらつきの範囲にあった。

いずれも処理直後の残留濃度が最も高く、処理 5 日後にかけ減衰する傾向が示されている。これは、散布後の時間経過に伴う農薬の消失に加え、今回の試験では散布時には開花しておらず農薬暴露量が少なかった花が順次開花したためと考えられる。

本試験では開花期に農薬処理を行い、吸引採取法は開花した花から花粉を採取するため、処理直後の採取試料は農薬に直接暴露していると考えられる。そのため、バルーン状の花から採取する採取法に比べて処理直後は高い残留濃度を示した。処理 5 日後の残留濃度は、処理直後に比べてジノテフランで 11~25%、ペルメトリンで 7~18%程度で、残留濃度は低下しているものの急激な低下とはいえなかった。また、農薬の違いによる大きな差は認められなかった。処理 5 日後に開花している花は農薬処理時には開花しておらず、浸透移行性の低いペルメトリンの花粉残留濃度は極めて微量になることが予想される。しかし、浸透移行性の高いジノテフランと残留濃度は変わらないことから、採取におけるコンタミが含まれていると考えられる。これは 3 場所とも同様の傾向を示しており、本採取法の特性と考慮される。

一方、葯分離法および葯採取機法による花粉採取は、農薬処理時に未開花であった花（葯は未開葯）から採取しており、処理直後の採取であっても、葯の農薬暴露は少なく、

花粉は直接暴露していないと考えられる。そのため、薬分離法による花粉残留濃度は吸引採取法と比べると、処理直後の残留濃度はジノテフランで約 1/10、ペルメトリンで約 1/100 の低い値を示した。

同条件の花粉を採取対象とする薬分離法と薬採取機法の花粉残留濃度を比較すると後者の方が値が高く、この差はコンタミによるものと考えられる。後者は採取した花を薬採取機内で攪拌して薬を分離するため、その際にコンタミが生じるものと考えられる。

また、処理 3 日後のバルーン状の花は処理 4~5 日後には開花していると思われるが、処理 5 日後の吸引採取法（開花した花から採取）での残留濃度は、処理 3 日後の薬分離法（バルーン状の花から採取）での残留濃度に比べて高いことから、処理 5 日後の吸引採取法ではコンタミが生じていると考えられる。このことから、薬分離法はもっともコンタミのリスクが低い採取法と考えられる。

表 2.6. りんごの花粉・花蜜における農薬残留濃度

試験場所	処理後 日数	残留濃度(mg/kg) []内は処理直後の値に対する割合							
		花粉:吸引採取法		花粉:薬分離法		花粉:薬採取機法		花蜜	
		ジノテフラン	ペルメトリン	ジノテフラン	ペルメトリン	ジノテフラン	ペルメトリン	ジノテフラン	ペルメトリン
山梨	無処理	<0.001*	<0.005*	<0.001*	<0.005*	-	-	<0.001	<0.001
	処理直後	13.8	20.4	1.34	0.21	7.85	4.58	6.08	0.852
	同3日後	4.56	6.03	0.31	0.09	-	-	2.17	0.467
		[33.0%]	[29.6%]	[23.2%]	[40.5%]			[35.7%]	[54.8%]
	同5日後	1.54	1.84	0.370	0.104	-	-	0.442	0.038
	[11.2%]	[9.0%]	[27.6%]	[49.5%]			[20.4%]	[8.1%]	
福島	無処理	0.012	<0.005	-	-	-	-	<0.001	<0.001
	処理直後	20.2	24.6	-	-	-	-	1.37	0.181
	同3日後	3.47	4.19	-	-	-	-	0.267	0.006
		[17.2%]	[17.0%]					[19.5%]	[3.3%]
	同5日後	5.01	4.49	-	-	-	-	0.439	0.009
	[24.8%]	[18.3%]					[32%]	[5%]	
岩手	無処理	<0.001	<0.005	-	-	-	-	<0.001	<0.001
	処理直後	8.19	17.3	-	-	-	-	2.03	0.533
	同2日後	3.34	5.29	-	-	-	-	1.00	0.006
		[40.8%]	[30.6%]					[49.3%]	[1.1%]
	同5日後	1.18	1.25	-	-	-	-	0.947	0.004
	[14.4%]	[7.2%]					[46.7%]	[0.8%]	
3場所平均	処理直後	14.1	20.8	-	-	-	-	3.16	0.52
	同3日後	3.79	5.17	-	-	-	-	1.15	0.16
		[26.9%]	[24.9%]					[36.3%]	[30.6%]
	同5日後	2.58	2.53	-	-	-	-	0.61	0.02
	[18.3%]	[12.2%]					[19.3%]	[3.3%]	

以上のことから、りんご花粉の採取方法の選定にあたっては、まずは想定する農薬処理時の開花状況を考慮する必要がある。開花期散布の最大残留濃度を調査する場合は、暴露シナリオを考慮して吸引採取法が適切である。開花前散布の場合は、吸引採取法または薬採取法どちらも可能だが、前者はコンタミリスクがあり、多くの花を必要とする

ものの時間効率は比較的よい。後者はコンタミリスクが比較的低く、花数も前者ほどは必要としないものの、時間と手間が非常にかかる（1人あたり最大19時間）。

（3）りんご花蜜の採取作業効率と農薬の残留傾向

花蜜採取は、花粉採取に比べると1花あたりの採取量は多く、必要な花数は少なく、所要時間も比較的短かった（表7）。しかし開花初期は採取量が少なく、1人あたり3～4時間かかることもあり、相応の労力を必要とした。

りんご花蜜の農薬残留濃度は、3場所とも概ね近似し、花粉と同様、処理直後から時間経過とともに低下した。両農薬の有効成分投下量は同等であるが、処理直後のペルメトリン残留濃度はジノテフランに比べて低かった。またジノテフランは比較的緩慢に低下したのに対して、ペルメトリンは処理3日後から急激に低下した。これは農薬の水溶性および浸透移行性の違いによるものと考えられる。

花蜜の農薬残留濃度は花粉に比べて低く、その傾向はペルメトリンにおいてより顕著であった（表26）。

（4）かんきつ花粉または葯の採取作業効率と農薬の残留傾向

かんきつの花粉または葯の採取作業は、1人あたり1時間前後で行うことができ、必要な花数、労力ともにりんごの花粉採取と比べて効率が高かった。

次に、かんきつの花粉・葯・花蜜における農薬残留濃度を表27に示す。

いずれも処理直後の残留濃度が最も高く、処理5日後にかけて減少する傾向が示されている。これは、りんごと同様、散布後の時間経過に伴う農薬の消失に加え、今回の試験では散布時には開花しておらず農薬暴露量が少なかった花が順次開花したためと考えられる。

温州みかん、日向夏および不知火の葯における農薬残留濃度はいずれも比較的近似した値を示した。また、日向夏においては、花粉と葯の農薬残留濃度は比較的近似していることから、葯を花粉の代替とする可能性が示唆された。

日向夏の花粉における処理3日後および7日後の残留濃度は、処理直後と比較するとジノテフランで10.2%および1.2%、ペルメトリンで2.5%および0.3%と経時的に減少し、りんご花粉の吸引採取法よりも減少率は大きかった。また、両農薬を比較すると、ジノテフランに比べて浸透移行性の低いペルメトリンの方が減少率はより大きく、浸透移行性の違いを示す結果と考えられた。

表 2.7. かんきつ花粉・葯・花蜜における農薬残留濃度

試験場所 作物	処理後 日数	残留濃度(mg/kg) []内は処理直後の値に対する割合					
		花粉		葯		花蜜	
		ジノテフラン	ペルメトリン	ジノテフラン	ペルメトリン	ジノテフラン	ペルメトリン
山梨 温州みかん	無処理	-	-	0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	処理直後	-	-	7.58	8.21	1.15	0.102
	同3日後	-	-	1.07	1.20	0.668	0.001
				[14.1%]	[14.6%]	[58.1%]	[1%]
	同5日後	-	-	0.112	0.005	0.546	0.003
			[1.5%]	[0.1%]	[47.5%]	[2.9%]	
高知 日向夏	無処理	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	処理直後	8.08	15.6	6.13	7.55	0.212	0.009
	同3日後	0.828	0.385	1.12	0.170	0.186	0.005
		[10.2%]	[2.5%]	[18.3%]	[2.3%]	[87.7%]	[55.6%]
	同7日後	0.095	0.039	0.121	0.004	0.080	0.003
	[1.2%]	[0.3%]	[2.0%]	[0.1%]	[37.7%]	[33.3%]	
宮崎 不知火	無処理	-	-	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	処理直後	-	-	10.4	13.8	7.22	10.6
	同3日後	-	-	1.51	1.99	2.22	0.406
				[14.5%]	[14.4%]	[30.7%]	[3.8%]
	同7日後	-	-	0.796	0.617	0.466	0.006
			[7.7%]	[4.5%]	[6.5%]	[0.1%]	

(5) かんきつ花蜜の採取作業効率と農薬の残留傾向

かんきつ花蜜採取は、花数、労力ともにりんごの花蜜採取と比べて効率が高く、特に日向夏は花蜜量が多く、極めて効率的に採取することができた (表 10)。

かんきつ花蜜における処理直後の農薬残留濃度は、日向夏<温州みかん<不知火の順で、1花あたりの花蜜量が多いほど残留濃度は低く、花蜜による希釈がその一因として考えられた (表 10、27)。

3種のかんきついずれも、花蜜における農薬の残留傾向はりんごとほぼ同様で、処理直後のペルメトリン残留濃度はジノテフランに比べて低く、ペルメトリンはより急激に残留濃度が低下した。また、花蜜の残留濃度は花粉に比べて低く、その傾向は、ペルメトリンにおいてより顕著であった。不知火の処理直後の残留濃度が温州みかん、日向夏に比べて顕著に高い原因としては、1つ目は花蜜量が他に比べて少ないこと、2つ目は花の構造による薬液の付着程度の違いが影響した可能性が考えられる。温州みかん、日向夏と比較すると、不知火の花はおしべが開き子房部分が露出しており花蜜への農薬暴露量が多くなったことが推察された (図 10、11)。



図10. 向日夏の花の様子

図11. 不知火の花の様子

(出典：<https://orange-sea.com/2012/05/13/%E3%83%87%E3%82%B3%E3%83%9D%E3%83%B3%E3%81%AE%E8%8A%B1%E3%80%80513/>)

りんごと3種かんきつの処理直後の残留濃度を比較すると、りんご花蜜と温州みかん花蜜は比較的近い値を示している。また、りんご花粉（吸引採取法）と温州みかん薬の値を比較すると比較的近い値を示している。さらに、前述のとおりりんご花粉の吸引採取法ではコンタミの懸念が示唆されており、かんきつではそれに比べるとコンタミのリスクは低い傾向が認められた。

(6) 果樹における花粉花蜜残留試験の留意点について

りんごの1花あたり花粉採取量は、開花初期（個別の花ではなく、樹全体として）は少ない傾向が見られ、開花初期に花粉を採取する場合は開花盛期の2～3倍の花を必要とすることがあり、かつ開花数が少ない時期であるため、相当数の樹を準備する必要がある。また、開花直前～開花期に霜害を受けると花粉、花蜜ともに採取不能となるため、その懸念がある場合はさらに多くの樹を準備する必要がある。

りんごの花蜜採取量は、湿度の低い晴天時や風のある条件では少ない傾向がみられ、場合によってはほとんど採取できないこともあった。これは花蜜が蒸散してしまうためと考えられた。そのため、花を採取した後は速やかにビニル袋にいれ、口を閉じて室温で1～2時間おくと採取しやすくなる。

向日夏の花粉は湿り気があるため吸引ホース先端のメッシュ目が細かすぎるとうまく採取できない。りんごで使用するものよりも粗い目のメッシュを使用する必要があると考える。