

令和4年度

生産資材安全確保対策委託事業
(蜜蜂への新たな影響評価の充実のためのデータ収集)

報 告 書

2023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	1
II.	業務の概要	5
III.	調査結果	
	1. 試験場所	8
	2. 供試作物および耕種概要	8
	3. 調査期間	9
	4. 調査内容	9
	5. 分析の方法	13
	6. 試験結果および考察	14
IV.	資料	
	1. 試験期間中の気温	30
	2. 分析方法の詳細	32
V.	関連試験成績（日本植物防疫協会自主研究）	
	・野菜類の花粉・花蜜残留試験－だいず－（2021年）	68
	・野菜類の花粉・花蜜残留試験－かぼちゃ－（2020年2021年）	83
	・野菜類の花粉・花蜜残留試験－なす－（2021年）	94
	・野菜類の花粉・花蜜残留試験－ピーマン－（2021年）	104
	・果樹類の花粉・花蜜残留試験－うめ・もも・すもも－（2022年）	112
	・総合考察	157

I. 仕様書

1 名称

令和4年度生産資材安全確保対策委託事業（蜜蜂への新たな影響評価の充実のためのデータ収集）

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5年3月14日（火）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。

また、本事業においては、次の5～6に掲げる内容を実施すること。

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。）を東京近郊（港区、千代田区等）で2回以上開催（WEB形式による開催も可能）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。

6 花粉・花蜜残留試験法の検討・残留傾向の検証

農薬のミツバチへの影響を評価するため、マメ科作物の花粉・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（花で代替する手法も含む）
- ・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

広く栽培されており、露地栽培のあるマメ科作物から、2種類以内を選定する。

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。

採取手法の検討の結果、花粉・花蜜の採取が困難な場合は花で代替しても可とする。

試験は供試植物・農薬毎に3反復（3カ所）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。

*2 4回程度。散布当日は必ず含むものとする。

4. 分析

3. の試験で採取した花粉・花蜜あるいは花の残留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・花蜜あるいは花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5年3月14日（火）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1部を提出すること。

提出期限は、令和5年3月14日（火）までとする。

9 応札者の条件

本事業を受託しようとする者は以下に掲げる事項を証明する書類等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に示す場所へ期限までに提出すること

受託者は、農薬 GLP 基準（生態毒性等に関する試験分野）に適合した試験施設を有している者であること。（証明する書類の例：農林水産省による GLP 適合確認結果通知）

10 その他

- (1) 受託者が、本仕様書から逸脱した方法を採用又は農産安全管理課による指示に反する等の明らかな欠陥があり、再実行の必要が認められる場合には、農産安全管理課と協議を行った上で、再実行することとする。なお、これに係る経費は受託者の負担とする。

- (2) 契約締結後、受託者は速やかに、業務実施体制表（担当者氏名、役割及び連絡先等）を農産安全管理課に提出すること。
- (3) 本仕様書に記載のない事項及び疑義が生じた事項については、農産安全管理課と受託者が協議の上処理すること。
- (4) 報告に際しては、受託者が、必要に応じ本事業外の成果・知見を加え考察することも可能とするが、内容については農産安全管理課と協議すること。
- (5) 本事業の実施に当たり対象となる経費は、別紙1に掲げるものとする。
- (6) 本事業における人件費の算定等に当たっては、別紙2の「委託事業における人件費の算定等の適正化について」（平成22年9月27日付け22経第961号農林水産省大臣官房経理課長通知）によるものとする。
- (7) 複数の団体が本委託事業の受託のために組織した共同事業体（民法（明治29年法律第89号）上の組合に該当するもの。以下同じ。）による参加も可とする。共同事業体を構成する場合は、代表者を決め、他のものは構成員として参加するものとし、代表者及び構成員は令和4・5・6年度農林水産省競争参加資格（全省庁統一資格）の「役務の提供等」の「A」、「B」、「C」、「D」等級に格付けされた競争参加資格を有している者であること。
また、代表者は入札参加申込書（共同事業体）（入札説明書別紙様式第4号）を提出し、共同事業体として本入札に参加し、落札した場合は、共同事業体の業務分担及び実施体制等について明確にした結成・運営等に関する協定書（又はこれに準ずる書類）等を契約締結前までにする必要がある。
なお、共同事業体に参加する者は、本入札において他の共同事業体の構成員となること又は単独で参加することはできない。

II. 業務の概要

1. 目的

農薬登録に係るミツバチへの影響評価の精緻化を目的として、マメ科作物の花粉・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

本事業の実施に当たり、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（5月および翌2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）
- ・中村 純（玉川大学 農学部 先端食農学科 食品科学領域 教授）
- ・細谷 和重（茨城県県南農林事務所 稲敷地域農業改良普及センター センター長）

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 本部が中核となり、同茨城研究所（茨城県牛久市）、同高知試験場（高知県香南市）および同宮崎試験場（宮崎県宮崎市）の3場所で圃場試験を実施し、同茨城研究所において残留分析を実施する。

4. 試験計画

（1）供試植物

仕様書に基づき、代表的なマメ科作物としてえんどうを選定し供試する。降雨による影響を避けるため、試験は施設栽培で実施する。

（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成分はそれぞれに残留分析を行う。

（3）調査方法

1) 効率的な採取方法の検討

茨城研究所において検討する。十分な面積の試験区を準備し、花粉の採取方法は、葯に振動を与え花粉を落とし回収する方法等、最適な手法を検討する。花蜜の採取方法は、シリンジを使用して採取する方法等、最適な手法を検討する。また、複数品種を比較し、花粉・花蜜の採取に適した品種を検討する。

2) 農薬の残留傾向の検討

茨城研究所、高知試験場および宮崎試験場において検討する。十分な面積の試験区を準備し、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。散布は開花期に行い、散布当日から数日おきに4回（散布当日、3日後、7日後、14日後）採取することを目標とする。採取方法は、1)の試験において適切な方法を検討したうえで決定する。検討の結果、花粉・花蜜の採取が困難な場合は、花を代替試料とする。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

えんどうの花粉・花蜜（又は花）における農薬ごとの残留濃度の経時的な推移を整理する。また、効率的な採取方法、花あたり採取量および必要な花数等についても考察する。その際、必要に応じて他作物の知見も交えて考察を行う。

5. 工程表

	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月
	第1回 検討会									第2回 検討会	最終 報告
採取方法の検討	←→ 茨城										
残留試験 (試料採取)						←→ 茨城	←→ 高知	←→ 宮崎			
分析						←→ 茨城					

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	富田 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	取りまとめ ・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	茨城研究所	柑本 俊樹 029(872)5172 kohjimot@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	福元 義人 0985(73)4198 fukumoto@jppa.or.jp	試料調製

Ⅲ. 調査結果

マメ科のえんどうについて、供試作物の品種検討、花粉花蜜の採取方法の検討および花粉花蜜での残留調査を行った。

1. 試験場所および担当者

(1) とりまとめ

一般社団法人 日本植物防疫協会 調査企画部
舟木勇樹、冨田恭範

(2) 圃場試験

同茨城研究所 (以下、茨城) : 品種、採取方法の検討、残留調査 (試料調製)

柑本俊樹、川北充彦、河野敏郎、宮川直也、宮本由子、大久保薫、横島悟、天野昭子

同高知試験場 (以下、高知) : 残留調査 (試料調製)

松村栄一、高芝和明、内藤覚、谷山頼清、守田航馬、浜田拓弥、長岡広行

同宮崎試験場 (以下、宮崎) : 残留調査 (試料調製)

福元義人、日高正浩、八丁昭龍、和田倉誠也、小川和己、生田目直樹、伊藤拓摩

(3) 残留分析

同茨城研究所

荒井雄太、六原智子、島崎祐樹

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、調査期間中の施設内気温は「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	品種	播種日	面積 (畝間×畝長×畝数)	株間 (cm)	株数	開花始め
茨城 (春)	成駒三十日	2022年3月9日	8.4 m ² (1.2m×7.0m×1)	10	70	4月21日
	ニムラ赤花 きぬさや2号		8.4 m ² (1.2m×7.0m×1)	10	70	4月19日
	グルメ		8.4 m ² (1.2m×7.0m×1)	10	70	4月21日
	ニムラサラダ スナップ		8.4 m ² (1.2m×7.0m×1)	10	70	4月21日

茨城 (秋)	ニムラ赤花 きぬさや2号	2022年9月9日	76.8 m ² (1.6m×16.0m×3)	10	480	10月5日
高知		2022年9月26日	121.5 m ² (1.5m×27.0m×3)	10	810	10月20 日
宮崎		2022年9月29日	106.6 m ² (1.2m×22.2m×4)	15	592	11月上旬

3. 調査期間

茨城：春作：2022年4月27日～5月23日（品種、採取方法の検討）

秋作：2022年10月7日～11月21日（残留調査）

高知：2022年11月28日～12月14日（残留調査）

宮崎：2022年12月5日～12月23日（残留調査）

4. 調査内容

(1) 品種の検討および花粉・花蜜の採取方法

①開花数の調査

茨城の春作で栽培した成駒三十日、ニムラ赤花きぬさや2号、グルメおよびニムラサラダスナップを対象に、2022年4月27日から5月23日まで、特定の10株について開花している花の数を2～4日間隔で計測した。また、9月に播種した茨城のニムラ赤花きぬさや2号についても10月7日から11月20日まで同様の調査を行った。

②花の構造

茨城の春作で栽培した成駒三十日、ニムラ赤花きぬさや2号、グルメおよびニムラサラダスナップを対象に、花の大きさを比較するため各々10花の旗弁の幅を定規で計測した。また、ニムラ赤花きぬさや2号は花を解体し、花の構造を調査した。

③開花の経過観察

茨城の春作で栽培した4品種と、残留調査用に栽培した茨城、高知、宮崎のニムラ赤花きぬさや2号について特定の蕾にマーキングを行い経過日数ごとに開花の状況を記録した。

④採取方法の検討

さやえんどうは図1に示した通り開花前に開葎していたが、花粉採取は開花した花を採取し、ピンセット等で舟弁を開いて採取する方法を検討した。花蜜は子房に溜まることから目視で確認出来たため、注射針等で吸引し採取する方法を検討した。



図 1. ニムラ赤花きぬさや 2 号の開葯時期

⑤花粉・花蜜の採取量

成駒三十日、ニムラ赤花きぬさや 2 号、グルメおよびニムラサラダスナップを対象に、前述の採取方法を用いて花粉花蜜を採取し、採取量を調査した。調査回数と調査花数は表 2 に示したとおりである。なお、花蜜の分泌を促すため採取日前日もしくは採取前に灌水を実施した。

表 2. 調査回数と調査花数

品種	花粉		花蜜	
	調査期間※ (調査回数)	調査花数	調査期間※ (調査回数)	調査花数
ニムラ赤花きぬさや 2 号	4/27～ 5/17(11)	30～113	5/2～5/17(9)	60～113
成駒三十日	5/6～5/13(6)	40～51	5/6～5/13(6)	41～61
ニムラサラダスナップ	4/28～5/19(5)	15～39	5/16～5/19(3)	26～36
グルメ	5/11～5/19(4)	34～44	5/16～5/19(3)	34～41

(2) 花粉花蜜の残留調査

①薬剤処理方法

ジノテフラン 20%顆粒水溶剤（アルバリン顆粒水溶剤、Lot No. AAC162）およびペルメトリン 20%乳剤（アディオオン乳剤、Lot No. 17S50025）をそれぞれ 2000 倍希釈で混用し、狭角コーンノズルを装着した背負式電動噴霧機で散布した。表 3 に処理条件を示した。また、図 2, 3 および 4 に 3 場所における散布時の作物体の状況と図 5 に茨城の散布作業時の様子および散布後の作物体の状況を示した。

表 3. 薬剤処理条件

試験場所	散布日	散布時刻	散布量	天候	散布時草丈
茨城	2022年11月7日	7:02	150L/10a	晴	約80cm
高知	2022年11月30日	7:10	150L/10a	曇	100-120cm
宮崎	2022年12月9日	7:14	159L/10a	晴	110-120cm



図 2. 薬剤処理時のさやえんどう（茨城）の状況



図 3. 薬剤処理時のさやえんどう（高知）の状況



図 4. 薬剤処理時のさやえんどう（宮崎）の状況



図 5. 薬剤処理と薬剤処理後のさやえんどう（茨城）の状況

②試料採取および送付方法

花粉と花蜜試料は検討した方法によりそれぞれ採取した。茨城、高知および宮崎ともに、花粉と花蜜はコンタミを避けるため、それぞれ別の花から採取を行った。高知は花蜜の採取量が目標量に達しなかった時のみ花粉採取後試料から花蜜を追加で採取した。また、3場所ともに各採取日の前日に灌水を実施した。なお、調査期間中に摘花作業を行った（表 5）。

花粉試料は、清浄な葉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°C 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採取当日に冷蔵便で分析場所に送付した。なお、茨城は花粉試料、花蜜試料ともに採取当日に分析担当者に直接手渡した。表 4 に試料採取日程を、表 5 に実際に花を採取した日を示し

た。

表 4. 試料採取日程と試料番号

試験区名	処理薬剤	採取時期	採取部位 試料番号		採取量
			花粉 Pollen	花蜜 Nectar	
処理区 A	アルバリン 顆粒水溶剤 アディオ ン 乳剤	処理当日	P-A-1	N-A-1	各 400mg 以上
		処理 3 日後	P-A-2	N-A-2	
		処理 7 日後	P-A-3	N-A-3	
		処理 14 日後	P-A-4	N-A-4	
無処理区 B	—	A-1 採取と同 日かそれ以前	P-B	N-B	各 400mg 以上

表 5. 3 場所における花の採取日

採取時期	採取日		
	茨城	高知	宮崎
処理前（無処理）	2022/11/4	2022/11/29	2022/12/ 5
処理当日	11/7	11/30	12/ 9
処理 3 日後	11/10	12/ 3	12/12
処理 7 日後	11/14	12/ 8	12/16
処理 14 日後	11/21	12/15	12/23

5. 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。

(1) 磨砕均一化

①花粉試料

試料に超純水を加え、約 1,000rpm に設定したイボ付き仕様の攪拌ぼうを取り付けた攪拌機で 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花蜜試料

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、花蜜ともに以下の方法を用いた。なお、詳細な分析法および回収率等の結果は「IV. 資料」に示した。

①ジノテフラン（花粉試料）

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、およ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0.005mg/kgとした。

②ペルメトリン（花粉試料）

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0.005mg/kgとした。

③ジノテフラン・ペルメトリン（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。塩析およ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。

6. 試験結果および考察

(1) 品種比較と花粉花蜜の採取方法

①開花数調査

成駒三十日、ニムラ赤花きぬさや2号、グルメおよびニムラサラダスナップの4品種間における開花数調査の結果を図6に、茨城で秋に実施したニムラ赤花きぬさや2号の開花数調査の結果を図7に示した。4品種間の比較では、ニムラ赤花きぬさや2号が最も早く開花し、開花数も最も多かった。ニムラサラダスナップはニムラ赤花きぬさや2号と比較すると、1、2日遅れて開花し、花数もやや少なかった。成駒三十日とグルメは前述の2品種と比較して節間が徒長し、開花数は少なかったが、成駒三十日においては側枝からの開花が見られた。秋作は春作と比較して開花数で劣ったが、試験実施には十分な花数が得られた。また春作と同様に開花期間は1ヶ月程度継続した。

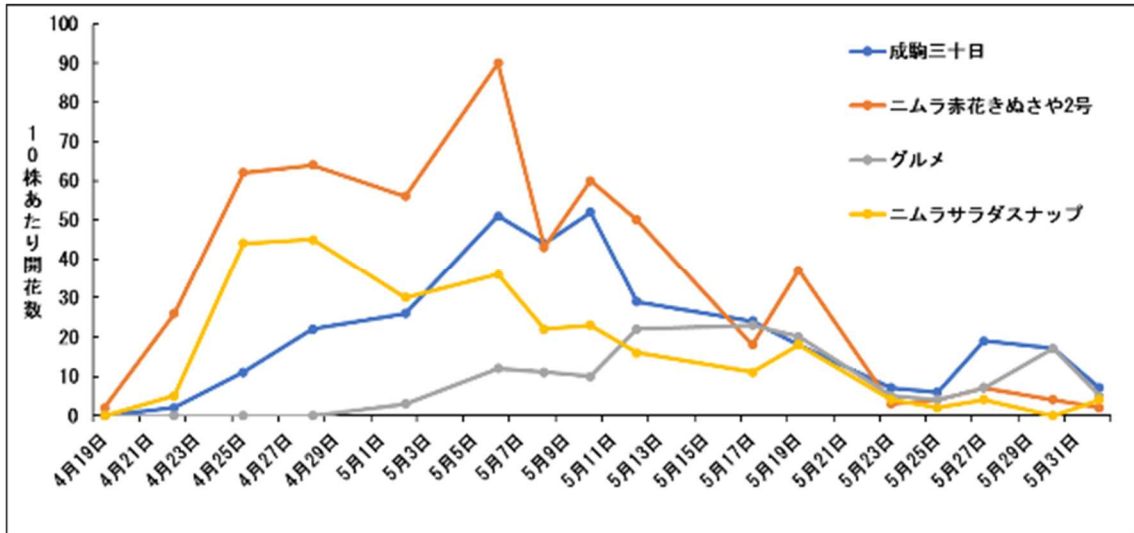


図 6. 各品種の開花数の推移(10株あたりの開花数)

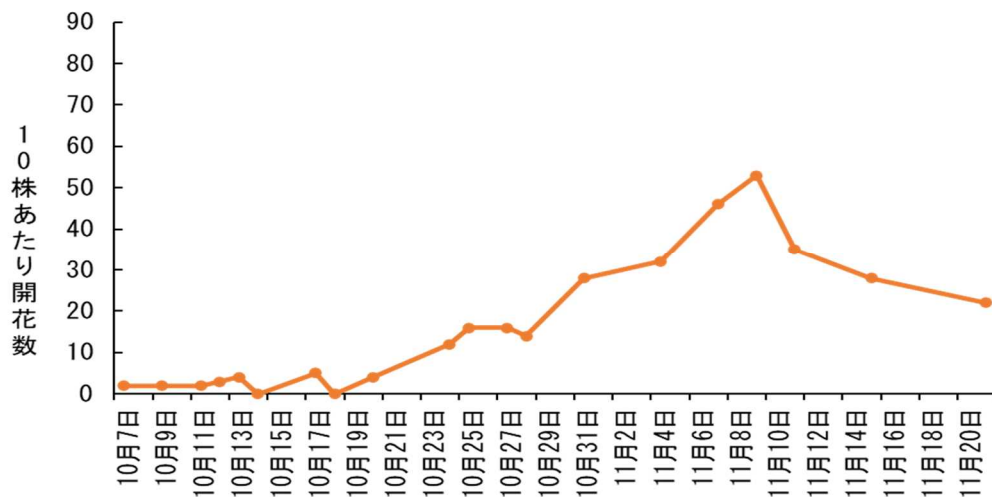


図 7. ニムラ赤花きぬさや2号の開花数推移(10株あたりの開花数)

②花の構造

表 6 に各品種の花の大きさを、図 8 に各品種の開花時の花の状態を示した。同品種でも個体により差があったが、平均的な大きさの花を比較した結果、旗弁幅は 4 品種間で大差はなかった。1 花あたりの重量についてはニムラサラダスナップが最も重く、ニムラ赤花きぬさや 2 号が最も軽くなったがその差は 2 倍程度であった。

また、ニムラ赤花きぬさや 2 号の花の形態について図 9 に、葯および花蜜について図 10 に示した。花は両性で雄蕊・雌蕊を持ち、雄蕊は花柱を取り囲むようになっていた。他の多くのマメ類と同様、開花時に花弁がすべて開いても雌雄蕊が露出することは無かった。

開葯は旗弁内で起こり、花粉はめしべに付着するか舟弁内にこぼれ落ちていた。花蜜は子房の根元に溜まっているのが確認された。

表 6. 各品種の花の大きさ(品種ごと 5 花調査)

品種	旗弁幅(mm)	1 花あたり重量(mg)
成駒三十日	27.32±1.31	226.7
ニムラ赤花きぬさや 2 号	23.57±1.56	160.6
グルメ	26.89±1.30	307.9
ニムラサラダスナップ	29.92±1.33	341.3



成駒三十日



ニムラ赤花きぬさや 2 号



グルメ



ニムラサラダスナップ

図 8. 各品種の開花時の写真



開花直後 (翼弁は開ききっていない)



翼弁と舟弁

図9. ニムラ赤花きぬさや2号の花の形状

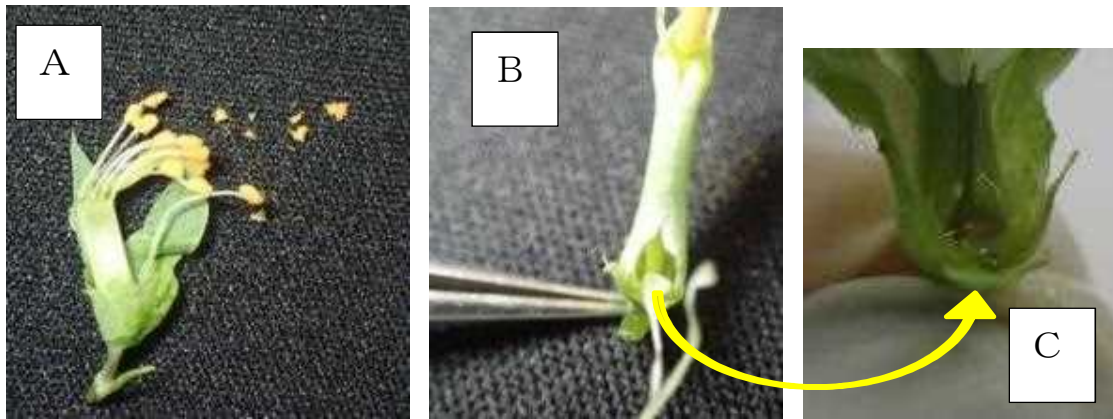


図10. 葯 (A) と花蜜 (B、C)

③開花の経過観察

茨城の春作で実施した成駒三十日は概ね2日、ニムラ赤花きぬさや2号は概ね2日、グルメは概ね2日、ニムラサラダスナップは概ね2日開花状態を保った。茨城の秋作で調査したニムラ赤花きぬさや2号は概ね2日、高知で概ね3~4日、宮崎で概ね2日開花状態を保った。各々の開花状態を図11~17に示した。



図11. 茨城 成駒三十日の開花経過の一例



図 12. 茨城 ニムラ赤花きぬさや 2 号の開花経過の一例

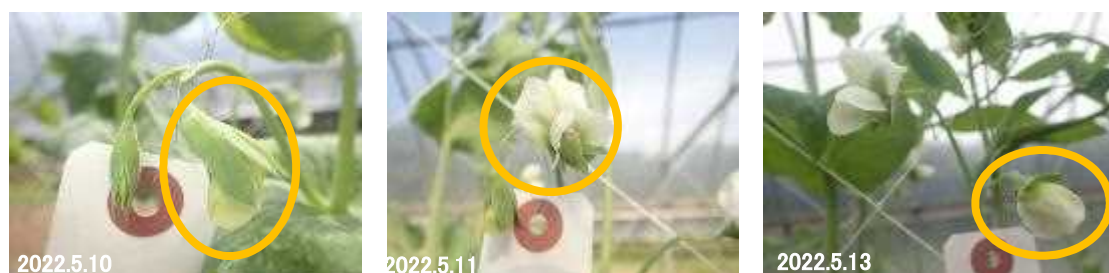


図 13. 茨城 グルメの開花経過の一例



図 14. 茨城 ニムラサラダスナップの開花経過の一例



図 15. 茨城 (秋) ニムラ赤花きぬさや 2 号の開花経過の一例

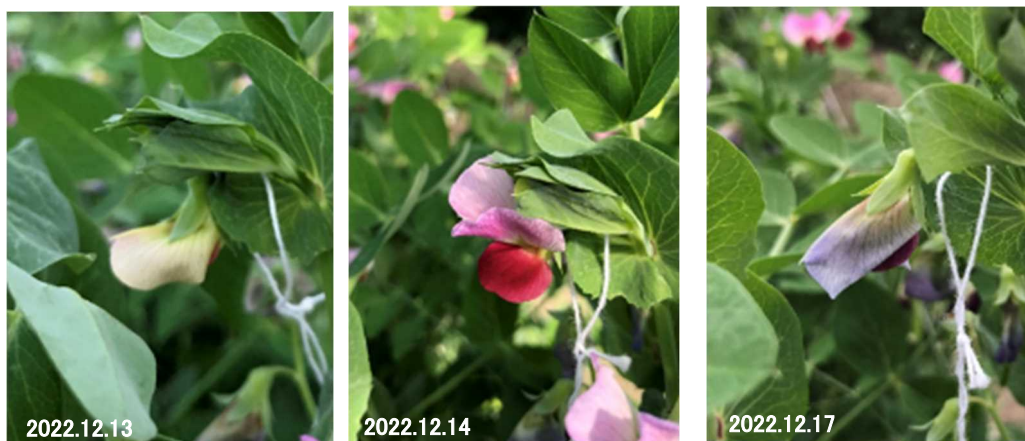


図 16. 高知 ニムラ赤花きぬさや 2 号の開花経過の一例



図 17. 宮崎 ニムラ赤花きぬさや 2 号の開花経過の一例

④花粉・花蜜採取方法の検討

花粉の採取はピンセットを用いて閉じている舟弁を開き舟弁内から取り出した。
また、花蜜の採取は子房の元に溜まっている花蜜を図 18 に示した注射器と注射針を用いて採取した。



図 18. 注射器と注射針（内径 0.20mm, 針長 13mm）

花粉と花蜜の採取方法について、一連の操作を図 19-1 および図 19-2 に図解して示す。

図 19-1 花粉の採取方法

	<p><花の採取> 清浄なピンセットを用いて、花柄ごと花を採取する。 ※花柄を長めに残して採取した方が採取作業時に持ちやすい。</p>
	<p>清浄な手袋を装着して、手または清浄なピンセットを用いて旗弁・翼弁を取り外す。取り外す際は子房側から斜め上に取り外す。上方から子房側に取り外すと舟弁まで外れるため注意する。</p>
	<p>舟弁の隙間に清浄なピンセットを入れ半開きにする。ここで使用するピンセットは旗弁と翼弁を取り外したものは使用しないように注意する。この過程で花粉がこぼれ落ちるため、作業は清浄な薬包紙の上で行う。</p>
	<p>葯に花粉がついている場合は、清浄なピンセットを用いて静かに落とす。</p>
<div style="text-align: center;">  <p>開花終わり 開花 開花始め</p> </div> <p>開花始めの花(図右)は、花粉は出来ているが、舟弁の中にはあまりこぼれ落ちておらず、葯についでいる花粉をピンセット等で落とす作業が多い。開花した花(図中央)は葯から花粉が落ちている割合が多く、一番花粉が採取出来る。開花終わりの花(図左)は子房が伸長しており、花粉は採取できるが質が悪い。</p>	

図 19-2 花蜜の採取方法

	<p>花粉と同様の方法で旗弁・翼弁を取り外す。</p>
	<p>清浄なハサミで雄蕊・雌蕊を含む舟弁ごと切り取る。</p>
	<p>清浄なピンセットを用いて子房の根元を開く。</p>
	<p>子房部分に注射針を入れ花蜜採取する。この際注射針を植物体に突き刺さないように注意する。</p>

⑤花粉花蜜採取量の調査

各品種における1花当たりの花粉採取重量を表7に示した。加えて1花当たりの花粉採取重量を基に、残留分析に最低限必要な400mgを採取するのに必要な花数と、1人で作業した場合の作業時間も示した。1花当たりの花粉重量はニムラサラダスナップが最も多く、グルメが最も少なかった。

また、各品種における1花当たりの花蜜採取重量を表8に示した。加えて1花当たり

の花蜜採取重量から、残留分析に最低限必要な 400mg を採取するのに必要な花数と、1 人で作業した際の作業時間も示した。1 花当たりの花蜜重量は、成駒三十日が最も多くなった。ニムラサラダスナップとグルメは今回の調査では花蜜が極めて微量のため十分量を採取できなかった。

表 7. 花粉採取量と 400mg 採取する場合の花数および採取時間

品種	1 花あたり 花粉重量(mg)	花粉 400mg 採取 に必要な花数(花)	花粉 400mg 採取に 必要な時間 (1 人の場合)
ニムラ赤花きぬさや 2 号	0.79±0.17	506	5 時間
成駒三十日	0.60±0.14	667	6 時間半
ニムラサラダスナップ	1.08±0.13	370	3 時間
グルメ	0.56±0.02	714	7 時間

表 8. 花蜜採取量と 400mg 採取する場合の花数および採取時間

品種	1 花あたり 花蜜重量(mg)	花蜜 400mg 採取 に必要な花数(花)	花蜜 400mg 採取に 必要な時間 (1 人の場合)
ニムラ赤花きぬさや 2 号	1.40±0.39	286	3 時間
成駒三十日	3.24±1.04	123	1 時間半
ニムラサラダスナップ	-	-	-
グルメ	0.09	-	-

⑥残留試験のための品種の選定

前述のとおり花粉と花蜜の両試料が採取出来たのは成駒三十日とニムラ赤花きぬさや 2 号であり、花数が多く安定して確保できるのはニムラ赤花きぬさや 2 号であった。また、花粉が多く採取出来たのはニムラ赤花きぬさや 2 号、花蜜は成駒三十日であった (表 7,8)。農薬の付着が影響する花の大きさは両品種に大きな差はなかった (表 6)。このことから、残留試験にはニムラ赤花きぬさや 2 号を供試品種とすることとした。

⑦残留試験のための栽培株数

ニムラ赤花きぬさや 2 号を供試した場合、花粉および花蜜を 400mg 採取するのに必要な花数は花粉が約 600 花、花蜜が約 300 花であった。花蜜への花粉のコンタミを避けるために別々の花から採取するため、1 回の採取に約 900 花以上が必要と試算される。ニムラ赤

花きぬさや 2 号は定植 1 ヶ月後から開花が始まり、定植 2 ヶ月以降には 1 ヶ月間安定した開花（10 株当たり 20 花以上）が確認された。このことから、残留試験実施にあたって栽培株数は 1 区 450 株以上が必要であると試算された。

（2）花粉花蜜の残留調査

①試料採取量

残留調査用に栽培したニムラ赤花きぬさや 2 号を対象に、採取花数、作業人数および作業時間を実施場所別に表 9、12、15 に示した。また、それぞれの花粉・花蜜の採取量、採取した人員、作業時間について茨城は表 10、11 に、高知は表 13、14 に、宮崎は表 16、17 に示した。

1 花当たりの花粉採取重量は 0.318～1.043mg、1 花当たりの花蜜採取重量は 0.316～2.167mg であった。

1 花当たりの花の採取時間は 2.9～11.0 秒、花粉の採取は 13.7～85.4 秒、花蜜の採取は 17.5～76.2 秒であった。

1 花当たりの花粉および花蜜の採取重量を場所間で比較すると、花粉は 3 倍、花蜜は 7 倍の差がみられた。調査期間内の施設内平均温度は場所間で大きな差はなく、日照時間などが影響した可能性もあるが原因は定かではない。また、花粉花蜜ともに本調査で検討した採取方法により、コンタミなく十分量が採取できたが、採取の回を重ねるごとに作業時間が短縮されたことから、効率的に採取作業を行うには事前に十分な訓練を要すると思われる。

なお、残留調査期間中、花粉試料を餌とするアザミウマ、訪花昆虫による被害は 3 場所とも認められなかった。

表 9. 茨城の採取花数、作業人員数および作業時間

時期	採取日	天候	花採取時間		採取 花数	作業 人員	作業時間 (分)	1 花当た り(秒)
処理前	11 月 4 日	晴	9:17	9:40	600	4	75	7.5
処理 0 日後	11 月 7 日	晴	10:46	11:53	900	3	165	11.0
処理 3 日後	11 月 10 日	晴	9:07	9:27	900	4	69	4.6
処理 7 日後	11 月 14 日	晴	9:08	9:40	900	4	81	5.4
処理 14 日後	11 月 21 日	雨	9:05	9:52	900	3	80	5.3

表 10. 茨城の花粉採取量、作業人員数および作業時間

時期	採取日	花粉採取時間		花粉採取 量(g)	花粉採 取 花数	1花当たり 花粉量(mg)	作業 人員	作業時 間(分)	1花当た り(秒)
処理前	11月4日	9:47	11:35	0.477	600	0.795	4	388	38.8
処理0日後	11月7日	13:10	15:09	0.418	556	0.752	4	312	33.7
処理3日後	11月10日	9:36	11:15	0.587	605	0.970	4	257	25.5
処理7日後	11月14日	9:34	11:20	0.586	562	1.043	2	158	16.9
処理14日後	11月21日	9:30	11:15	0.416	657	0.633	3	150	13.7

表 11. 茨城の花蜜採取量、作業人員数および作業時間

時期	採取日	花蜜採取時間		花蜜採取 量(g)	花蜜採取 花数	1花当たり 花蜜量(mg)	作業 人員	作業時 間(分)	1花当た り(秒)
処理前	11月4日	13:15	14:28	0.954	600	1.590	4	260	26.0
処理0日後	11月7日	13:00	14:15	0.580	297	1.953	2	150	30.3
処理3日後	11月10日	9:39	10:32	0.512	295	1.736	2	100	20.3
処理7日後	11月14日	9:34	11:20	0.700	330	2.121	2	146	26.5
処理14日後	11月21日	9:30	10:24	0.649	357	1.818	2	104	17.5

処理前、処理14日後は花粉採取した花からも花蜜採取を行った。

表 12. 高知の採取花数、作業人員数および作業時間

時期	採取日	天候	花採取時間		採取花数	作業 人員	作業時間 (分)	1花当た り(秒)
処理前	11月28日	晴	10:10	10:25	1100	8	120	6.5
処理0日後	11月30日	曇	13:05	13:20	1200	9	135	6.8
処理3日後	12月3日	曇	13:00	13:15	1200	7	105	5.3
処理7日後	12月7日	晴	13:10	13:25	1200	10	150	7.5
処理14日後	12月14日	晴	13:15	13:35	1200	9	180	9.0

表 13. 高知の花粉採取量、作業人員数および作業時間

時期	採取日	花粉採取時間		花粉採取 量(g)	花粉採取 花数	1花当たり 花粉量(mg)	作業 人員	作業時間 (分)	1花当た り(秒)
処理前	11月28日	10:35	12:25	0.420	850	0.494	11	1210	85.4
処理0日後	11月30日	13:30	15:10	0.430	800	0.538	11	1100	82.5
処理3日後	12月3日	13:25	15:10	0.420	800	0.525	8	840	63.0
処理7日後	12月7日	13:30	15:00	0.450	900	0.500	10	900	60.0
処理14日後	12月14日	13:45	15:00	0.460	900	0.511	10	750	50.0

表 14. 高知の花蜜採取量、作業人員数および作業時間

時期	採取日	花蜜採取時間		花蜜採取 量(g)	花蜜採取 花数	1花当たり 花蜜量(mg)	作業 人員	作業時間 (分)	1花当た り(秒)
処理前	11月28日	13:05	14:20	0.460	650	0.708	11	825	76.2
処理0日後	11月30日	15:20	16:00	0.520	500	1.040	11	440	52.8
処理3日後	12月3日	15:20	16:40	0.450	1200	0.375	9	720	36.0
処理7日後	12月7日	15:10	15:30	0.650	300	2.167	10	200	40.0
処理14日後	12月14日	15:10	15:30	0.570	300	1.900	10	200	40.0

処理前、処理0日後、処理3日後は花粉採取した花からも花蜜採取を行った。

表 15. 宮崎の採取花数、作業人員数および作業時間

時期	採取日	天候	花採取時間		採取花数	作業 人員	作業時間 (分)	1花当た り(秒)
処理前	12月5日	曇	8:32	10:51	1500	4	105	4.2
処理前(花蜜のみ)	12月7日	晴	8:40	8:59	800	4	47	3.5
処理0日後	12月9日	晴	10:34	10:58	1600	4	94	3.5
処理3日後	12月12日	晴	9:07	9:41	1600	4	82	3.1
処理7日後	12月16日	曇	8:40	9:08	1600	4	78	2.9
処理14日後	12月23日	晴	8:40	11:30	2300	4	121	3.2

表 16. 宮崎の花蜜採取量、作業人員数および作業時間

時期	採取日	花粉採取時間		花粉採取 量(g)	花粉採取 花数	1花当たり 花粉量(mg)	作業 人員	作業時 間(分)	1花当た り(秒)
処理前	12月5日	9:13	12:00	0.404	815	0.496	4	643	47.3
処理0日後	12月9日	11:04	14:38	0.512	942	0.544	4	546	34.8
処理3日後	12月12日	9:35	12:02	0.483	1108	0.436	5	730	39.5
処理7日後	12月16日	9:11	11:15	0.430	1118	0.385	5	612	32.8
処理14日後	12月23日	9:10	12:15	0.397	1248	0.318	5	800	38.5

表 17. 宮崎の花蜜採取量、作業人員数および作業時間

時期	採取日	花蜜採取時間		花蜜採取 量(g)	花蜜採取 花数	1花当たり 花蜜量(mg)	作業 人員	作業時 間(分)	1花当た り(秒)
処理前1	12月5日	9:30	13:50	0.194	614	0.316	2	347	33.9
処理前2	12月7日	9:30	12:00	0.448	728	0.615	3	409	33.7
処理0日後	12月9日	11:05	13:53	0.469	350	1.340	2	185	31.7
処理3日後	12月12日	9:38	11:45	0.635	400	1.588	2	249	37.4
処理7日後	12月16日	9:10	11:14	0.498	364	1.368	2	226	37.3
処理14日後	12月23日	9:11	14:00	0.483	784	0.616	3	393	30.1

②分析結果

1) 回収率および保存安定性

回収率と併行再現性の試験結果を「IV. 資料」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 70 日（花粉）、ペルメトリンは最長 73 日（花粉）の保存後において良好な回収率が得られた。

2) 花粉の残留濃度

3 場所におけるジノテフランおよびペルメトリンの花粉試料の分析結果を表 18、19 および 20 に示した。

ジノテフランおよびペルメトリンともに 3 場所の試料すべてで処理直後の濃度が最も高く、ジノテフランは茨城 0.500mg/kg、高知 0.343mg/kg、宮崎 0.138mg/kg であり、ペルメトリンは茨城 0.117mg/kg、高知 0.062mg/kg、宮崎 0.068mg/kg であった。ジノテフランおよびペルメトリンともに処理直後の濃度における 3 場所間でのばらつきは、一般の作物残留試験で示される程度の範囲であり大きな差ではなかった。ジノテフランおよびペルメトリンともにいずれの場所も処理 3 日後以降は濃度の減衰が示された。なおいずれの試料もペルメトリンよりジノテフランの方が高い濃度を示した。

えんどうの葯は舟弁に包まれ、この中で開葯するため花粉が外部へ露出することはない。このため、散布薬剤が直接花粉に暴露する可能性は低く、分析において検出される可能性は低いと予測していたが、結果は 3 場所全ての試料から供試薬剤が検出された。この要因として、開花後に露出している舟弁に薬液が付着し、浸達又は浸透移行したと考えられる。特に、浸透移行性を有するジノテフランの濃度がペルメトリンよりも高いことからこの点がうかがえる。薬剤濃度の推移は、ジノテフランおよびペルメトリンともに処理 3 日以降は減衰を示した。えんどうの花の開花期間は 2~4 日であり、処理 3 日後の試料は、薬剤処理時に開花していた花と開花してない蕾の状態であった花が混在しており、舟弁に薬液が直接かかった花が少なかったことが要因と考えられる。処理 7 および 14 日以降の試料は、薬剤処理時には蕾もしくは蕾が抽出する前の状態であったため、さらに薬液浸達の影響は低く、その分残留濃度が低くなったと推測される。このため、浸透移行性が無いペルメトリンでは、処理 7 日後の濃度が定量限界未満 (<0.005mg/kg) になる試料も認められた。浸透移行性を有するジノテフランは、処理 14 日後まで検出されたが、処理直後からは大きく減衰を示した。

表 18. 花粉の残留濃度（茨城）

花数	受領重量 (g)	経過日数	ジノテフラン				ペルメトリン			
			分析値 ①	分析値 ②	差	平均値 (mg/kg)	分析値 ①	分析値 ②	差	平均値 (mg/kg)
600	0.477	処理前	<0.005	<0.005	—	<0.005	<0.005	<0.005	—	<0.005
556	0.418	0	0.501	0.498	0.003	0.500	0.118	0.116	0.002	0.117
605	0.512	3	0.033	0.031	0.002	0.032	0.015	0.015	0.000	0.015
562	0.586	7	0.065	0.063	0.002	0.064	<0.005	<0.005	—	<0.005
657	0.649	14	0.017	0.016	0.001	0.016	<0.005	<0.005	—	<0.005

表 19. 花粉の残留濃度（高知）

花数	受領重量 (g)	経過日数	ジノテフラン				ペルメトリン			
			分析値 ①	分析値 ②	差	平均値 (mg/kg)	分析値 ①	分析値 ②	差	平均値 (mg/kg)
850	0.414	処理前	<0.005	<0.005	—	<0.005	<0.005	<0.005	—	<0.005
800	0.415	0	0.344	0.342	0.002	0.343	0.063	0.062	0.001	0.062
800	0.412	3	0.144	0.142	0.002	0.143	0.017	0.016	0.001	0.016
800	0.450	7	0.027	0.027	0.000	0.027	0.008	0.007	0.001	0.008
900	0.456	14	0.007	0.006	0.001	0.006	<0.005	<0.005	—	<0.005

表 20. 花粉の残留濃度（宮崎）

花数	受領重量 (g)	経過日数	ジノテフラン				ペルメトリン			
			分析値 ①	分析値 ②	差	平均値 (mg/kg)	分析値 ①	分析値 ②	差	平均値 (mg/kg)
815	0.404	処理前	<0.005	<0.005	—	<0.005	<0.005	<0.005	—	<0.005
942	0.512	0	0.140	0.136	0.004	0.138	0.071	0.065	0.006	0.068
1108	0.483	3	0.038	0.038	0.000	0.038	0.009	0.009	0.000	0.009
1118	0.439	7	0.017	0.017	0.000	0.017	<0.005	<0.005	—	<0.005
1248	0.397	14	0.015	0.015	0.000	0.015	<0.005	<0.005	—	<0.005

3) 花蜜の残留濃度

3 場所におけるジノテフランおよびペルメトリンの花蜜試料の分析結果を表 21、22 および 23 に示した。

ジノテフランは 3 場所ともに処理 3 日後の濃度が最も高くなり、茨城 1.32mg/kg、高知 0.239mg/kg、宮崎 0.552mg/kg であった。茨城の濃度がやや高くなったが、処理 3 日後濃度の 3 場所間でのばらつきは、一般の作物残留試験で示される程度の範囲であり大きな差はなかった。ジノテフランは、処理 7 日後以降、いずれの場所の試料も減衰が示された。ペル

メトリンは、3場所ともにいずれの試料も定量限界未満 (<0.001mg/kg) となった。なお、ジノテフランは花粉よりも花蜜の方が残留濃度は高い傾向にあった。

えんどうの花蜜は顎の内側にある子房の根元に分泌され、花粉よりも散布した薬液が直接暴露する可能性は低いと予測とした。しかしながらジノテフランのみ検出が認められ、先の花粉と同様に浸透移行によるものと推測された。ペルメトリンは処理直後の試料でも検出されず、花蜜が存在する子房の根元までは浸達しなかったためと考えられた。また、本試験では花蜜の分泌を促すために試料採取前日に灌水を行った。このため、水溶性の高いジノテフランはより移行しやすい状態だったと推察される。

表 21. 花蜜の残留濃度 (茨城)

花数	受領重量 (g)	経過日数	ジノテフラン				ペルメトリン			
			分析値①	分析値②	差	平均値 (mg/kg)	分析値①	分析値②	差	平均値 (mg/kg)
600	0.954	処理前	<0.001	<0.001	—	<0.001	<0.001	<0.001	—	<0.001
297	0.580	0	0.025	0.020	0.005	0.022	<0.001	<0.001	—	<0.001
295	0.587	3	1.32	1.31	0.01	1.32	<0.001	<0.001	—	<0.001
330	0.700	7	0.301	0.283	0.018	0.292	<0.001	<0.001	—	<0.001
357	0.416	14	0.057	0.051	0.006	0.054	<0.001	<0.001	—	<0.001

表 22. 花蜜の残留濃度 (高知)

花数	受領重量 (g)	経過日数	ジノテフラン				ペルメトリン			
			分析値①	分析値②	差	平均値 (mg/kg)	分析値①	分析値②	差	平均値 (mg/kg)
650	0.446	処理前	<0.001	<0.001	—	<0.001	<0.001	<0.001	—	<0.001
500	0.489	0	0.061	0.057	0.004	0.059	<0.001	<0.001	—	<0.001
1200	0.391	3	0.245	0.233	0.012	0.239	<0.001	<0.001	—	<0.001
300	0.634	7	0.246	0.222	0.024	0.234	<0.001	<0.001	—	<0.001
300	0.535	14	0.027	0.023	0.004	0.025	<0.001	<0.001	—	<0.001

表 23. 花蜜の残留濃度 (宮崎)

花数	受領重量 (g)	経過日数	ジノテフラン				ペルメトリン			
			分析値 ①	分析値 ②	差	平均値 (mg/kg)	分析値 ①	分析値 ②	差	平均値 (mg/kg)
614	0.194	処理前	<0.001	<0.001	—	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	
350	0.469	0	0.010	0.010	0.000	0.010	<0.001	<0.001	—	<0.001
400	0.635	3	0.552	0.551	0.001	0.552	<0.001	<0.001	—	<0.001
364	0.498	7	0.063	0.063	0.000	0.063	<0.001	<0.001	—	<0.001
784	0.483	14	0.010	0.010	0.000	0.010	<0.001	<0.001	—	<0.001