

飼料及び堆肥に残留する除草剤の簡易判定法 と被害軽減対策マニュアル



トマトの葉と実の異常



サヤエンドウの葉の異常



キクの摘心部の肥大



キクの頂芽の変形

新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業 (先端技術を活用した農林水産研究高度化事業)

課題番号：18011 平成18～20年度

課題名「飼料及び堆肥に残留する除草剤の簡易判定法と被害軽減対策の確立」

実施機関

- (独) 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所
長野県 (長野県中信農業試験場)
愛知県 (愛知県農業総合試験場)
- (独) 農林水産消費安全技術センター 肥飼料安全検査部 (旧 (独) 肥飼料検査所)
- (独) 農林水産消費安全技術センター 農薬検査部 (旧 (独) 農薬検査所)
- (独) 農業環境技術研究所 (平成18年度のみ、以降は畜産草地研究所)

はじめに

近年、トマトやキクの栽培において原因不明の異常生育が発生する事例が全国的に報告されました。その原因を調査した結果、給与飼料および牛ふん堆肥から、国内で使用されていないホルモン型除草剤のクロピラリドが検出されました。

そこで、クロピラリドによる被害軽減対策を確立する目的で研究が行われました。2006年度～2008年度の3年間にわたって行われた「飼料及び堆肥に残留する除草剤の簡易判定法と被害軽減対策の確立」（課題番号：18011）です。この研究は農林水産省農林水産技術会議による、新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業（旧 先端技術を活用した農林水産研究高度化事業）のリスク管理型研究の一環として行われたものです。

研究の中では、クロピラリドによる汚染原因を究明し被害軽減対策を確立するために、多くの研究成果が得られています。例えば、クロピラリドの飼料・家畜・ふん尿における動態を明らかにし、多くの作物に対するクロピラリドの影響を調べるなかで、サヤエンドウを用いた生物検定法を確立するなど、農産物の被害発生防止のリスク管理措置の根拠となる科学的情報が得ることができました。

以上の研究成果を農家や堆肥センターなどの現場において役立たせるために、総合対策マニュアルを作成しました。マニュアルは、生物検定法、被害軽減対策、残留低減化、残留分析法の4つの内容から構成されています。本マニュアルが、農家や堆肥センターなどの現場において、被害軽減対策に役立つことができれば幸いです。

目 次

はじめに

クロピラリドによる異常生育って何だろう？	1
クロピラリド残留堆肥の見分け方と堆肥施用可・不可のフローシート	6
I. 堆肥、土壌中残留の生物検定法マニュアル（マニュアル I）	
A. サヤエンドウを用いた生物検定マニュアル	11
B. キクを用いた生物検定マニュアル	18
C. 堆肥抽出液とキヌサヤエンドウ発根苗による簡易生物検定法	21
D. コスモスを用いた迅速な生物検定マニュアル	26
II. 被害軽減対策マニュアル（マニュアル II）	
A. 被害を未然に防ぐために	33
B. 被害が発生してしまったら	33
C. クロピラリドによる生育障害の特徴	36
III. 飼料の配合、堆肥化法における残留低減化マニュアル（マニュアル III）	
A. 飼料購入時に注意すること	45
B. 飼料中にクロピラリドが残留していると分かたら	45
C. 堆肥にクロピラリドが残留している可能性がある分かたら	46
IV. 残留分析法マニュアル（マニュアル IV）	
A. 飼料分析法マニュアル	51
B. 作物残留分析法マニュアル	58
C. 堆肥残留分析法マニュアル	66
おわりに	70
参考資料 関連情報取得のためのリンク集	71
研究担当者	73
付録・目次	75

クロピラリドによる異常生育って何だろう？

作物の**異常生育**が起きていませんか？ 異常生育の特徴は、成長点が異常生育したり、葉が変形します。異常生育の原因には色々ありますが、その中の1つに「**クロピラリド**」とよばれる除草剤によるものがあります。

トマトの異常葉が典型的な例です（**写真1**）。また、**サヤエンドウ**のように葉がカップ状になるパターンが多く見られます（**写真2**）。



写真1 トマトの葉の異常



写真2 サヤエンドウの葉の異常

ミニトマトの果実は長細く変形し（**写真3**）、**キク**では、頂芽の変形（**写真4**）、摘心部の肥大（**写真5**）、その他に**ニンジン**（**写真6**）、**ダイズ**の葉（**写真7**）、**メロン果実**（**写真8**）などの異常が見られます。



写真3 ミニトマトの異常



写真4 キクの頂芽の変形



写真5 キクの摘心部の肥大



写真6 ニンジンの異常



写真7 ダイズの葉の変形



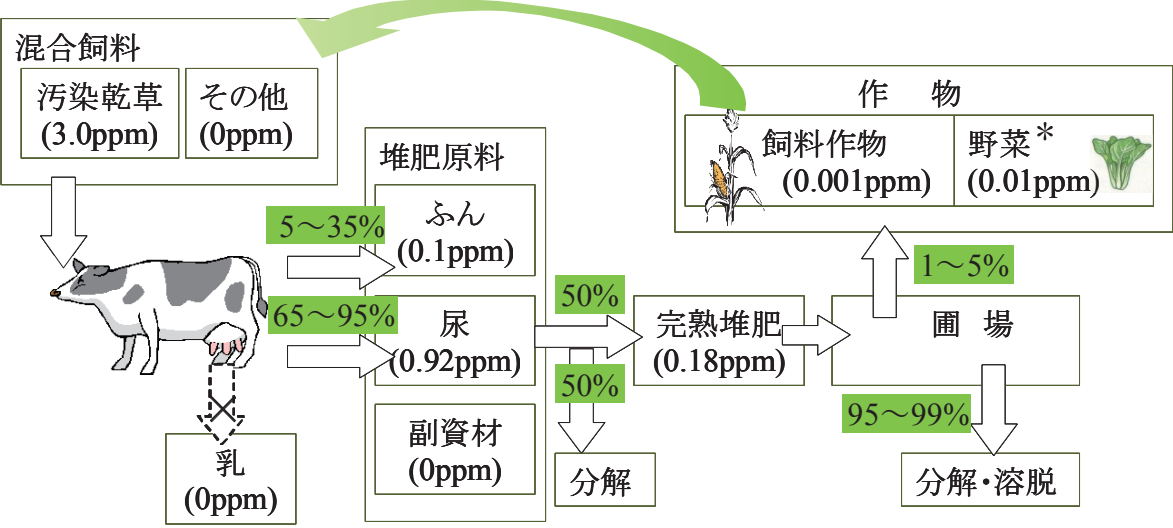
(左から、無添加、8.7 μ g、87 μ g 添加)

写真8 メロン果実の変形
(イエローキング)

クロピラリドは日本国内では使用されていません。クロピラリド残留の原因は、その除草剤を使用している外国から入ってくる飼料です。

クロピラリドを含む除草剤が散布された畑で栽培された干し草（乾草）や穀物は、クロピラリドで汚染されている可能性が高く、それを食べた家畜のふん尿から検出されることがあります（図1）。牛乳へは移行しません。

クロピラリドは、他の除草剤と異なり、堆肥化での分解が非常に遅いという特徴があり、堆肥に残留することになります。そして、クロピラリドが残留した堆肥を畑にまくと、植物の異常生育が起きることがあります。



汚染乾草クロピラリド濃度=3ppm
 混合飼料の乾物率=93%
 混合飼料の乾物消化率=65%
 混合飼料摂取量=24kg/day
 混合飼料中汚染乾草含有率=25%
 ふん水分率=85%尿量=13.5kg/day

堆肥用副資材水分率=10%
 堆肥原料水分=65%
 完熟堆肥水分=60%
 堆肥化による乾物消失率=40%
 堆肥化による有機物分解率=50%
 施肥量=3000kg/10a/year
 *コマツナ、カブ（葉部）、ホウレンソウ

図1 クロピラリドの流れ

(クロピラリド汚染乾草を乳牛用飼料として用いた場合の農業生産系内におけるクロピラリド動態、カッコ内数値は図中に示した条件下での予想濃度(ppm=mg/kg))

クロピラリド (clopyralid) は、主にアザミ、クローバー、タンポポなどの広葉雑草を枯らす選択性**除草剤**成分の慣用名です。

日本国内では農薬登録がありませんが、Dow AgroSciences で開発された植物ホルモン様除草剤で、Transline、Stinger、Confront、Lontrel 等の商品名で販売されています。アメリカ、カナダ、オーストラリア等では、麦類、牧草、とうもろこし、テンサイ、ミント、アスパラガスなどに登録があります。図2のように化学構造からピリジン系に分類され、化学名は3,6-dichloro-2-pyridinecarboxylic acid です。

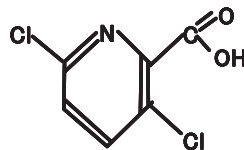


図2 クロピラリドの化学構造

クロピラリドは難分解性で、米国での調査によると、土壌中での半減期は、施用量・土壌・気象条件等により、8日から250日とかなり幅があります。日本の土壌では以下の結果でした(表1)。堆肥化しても分解が進まず、堆肥中のクロピラリド濃度はほとんど変化しません(図3)。

表1 日本の黒ボク土、褐色低地土を培養した時におけるクロピラリド半減期

添加した クロピラリド 濃度 mg/kg	培養温度 °C	半減期(日)	
		黒ボク土	褐色低地土
1.5	20	68	97
	30	49	25

実験条件： 土壌水分は圃場容水量の60%、
3ヶ月間、暗所で培養

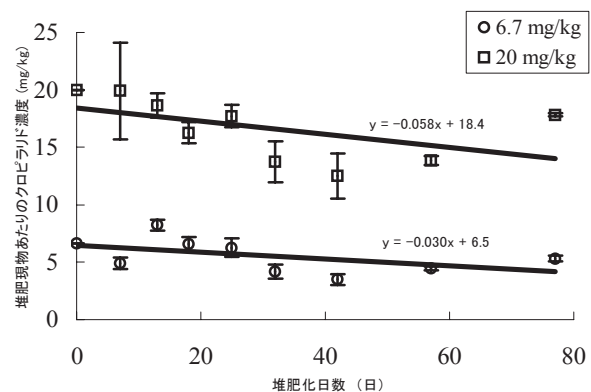


図3 堆肥化開始時にクロピラリドを6.7、20mg/kg添加した場合における堆肥現物あたりのクロピラリド濃度の経時的変化

クロピラリドは水溶性が高いため、堆肥化過程で出てくるれき汁からクロピラリドが検出されます。また、堆肥を野積みすると降雨によってクロピラリドがただちに溶脱します。

水溶解度：7.85 (蒸留水), 118 (pH 5), 143 (pH 7), 157 (pH 9) (g/L, 20 °C)

クロピラリドは空気を介して汚染が広がることはありません。したがって、近くの圃場でクロピラリドが混入した堆肥が使用された場合でも直接的な影響は考慮しなくても良いと考えられます。

クロピラリドが自然環境や食品を通じて人間の健康に影響する危険性はほとんどありません。

この除草剤からの主な脅威は、感受性の高い一部の植物に対する障害です。人間あるいは哺乳動物に対するクロピラリドの急性毒性（※）は低いことが報告されており、これまでに作物や堆肥で検出されたレベルで人間や家畜の健康に影響を及ぼす危険性はありません。しかし、長期に施用された場合の生態系への影響などについては予測が困難であることから、慎重に対処する必要があります。

※急性毒性

急性毒性 (LD₅₀) は体重 1kg あたり経口 5000 mg 以上, 皮下注射 2000 mg 以上です。

LD₅₀ とは 50% lethal dose の略で、50%致死量です。薬物などのある物質をマウスなどの動物に投与した場合、試験に用いた動物の 50%が死亡する用量をいいます。毒薬はマウスへの皮下注射で LD₅₀ が 20mg/kg 以下、劇薬は経口投与で 30~300mg/kg, 皮下注射で 20~200mg/kg, 静脈注射で 10~100mg/kg の範囲にあるものを目安とします。

クロピラリドによる植物の異常生育の現れ方は**品目**によって違います。

クロピラリドは、非常に低い濃度（数 ppb 注参照）でトマト、ピーマン、ダイズ、エンドウ、インゲン、ニンジン、ヒマワリ、キク、コスモス、アスターのような敏感な植物を異常生育させます（表 2）。最も敏感な植物は、主にナス科、マメ科、キク科、セリ科に属します。いっぽう、イネ科の麦・牧草・トウモロコシ、アブラナ科のキャベツ、ブロッコリー、ハクサイ、果樹類などには影響しません。さらに他の作物別の詳しい異常や変形については、本文や参考資料を参照して下さい。

表2 クロピラリドに対する耐性*

極弱：トマト、ダイズ、エダマメ、サヤエンドウ、ソラマメ、ヒマワリ、コスモス、アスター、スイートピー、クリムゾンクローバー
弱：ニンジン、エンダイブ、トレビス、シュンギク、フキ、サヤインゲン、ピーマン、シシトウ、キク、ヒヤクニチソウ
中：レタス類**、セルリー、パセリ、イタリアンパセリ、キュウリ、メロン、トウガン、ニガウリ、スイカ、ナス、バレイショ、ラッカセイ、アズキ、ササゲ、ソバ、オクラ、ゴボウ、モロヘイヤ、ツルムラサキ、ヒユナ、ミツバ、タバコ、ペチュニア、マリーゴールド、ベニバナ、ルピナス、オステオスペルマム
強：アブラナ科、ユリ科、アカザ科、シソ科、ナデシコ科、ヒルガオ科、バラ科
極強：イネ科

* 品種により耐性評価のランクが変動する場合があります

** レタス類：結球レタス、サニーレタス、グリーンリーフ、ロメインレタス、チマサンチュ、サラダ菜、ステムレタス

注：**ppb（ピーピービー）**とは10億分の1の濃度の単位です。パーセント（%：100分の1の単位）と比べると、1%は1000万ppbに当たりますから、1ppbは**非常に微量な濃度**を表しています。例えば、1トンのトマトに、20ミリグラム（耳かきにほんの少し）のクロピラリドが入っている濃度が20ppbです。したがって、害の起きる数ppbとは非常に微量です。単位の表し方として、1ppb=1μg/kg=1mg/tは同じです。

異常生育の被害を未然に防ぐには、まず、飼料や堆肥の中の**残留量を確認し、堆肥の施用量を適正**に守ることです。

本マニュアルは、**4つのマニュアル**で構成されています。I. 堆肥、土壌中残留の生物検定法マニュアル、II. 被害軽減対策マニュアル、III. 飼料の配合、堆肥化法における残留低減化マニュアル、IV. 残留分析法マニュアルです。このマニュアルにもとづく、「クロピラリド残留堆肥の見分け方と堆肥施用のフローシート」を参照して下さい。残留量を確認する詳しい分析法、生物検定法、さらに堆肥施用量などについては本文を参照して下さい。

☆クロピラリド残留堆肥の見分け方と堆肥施用可・不可のフローシート☆

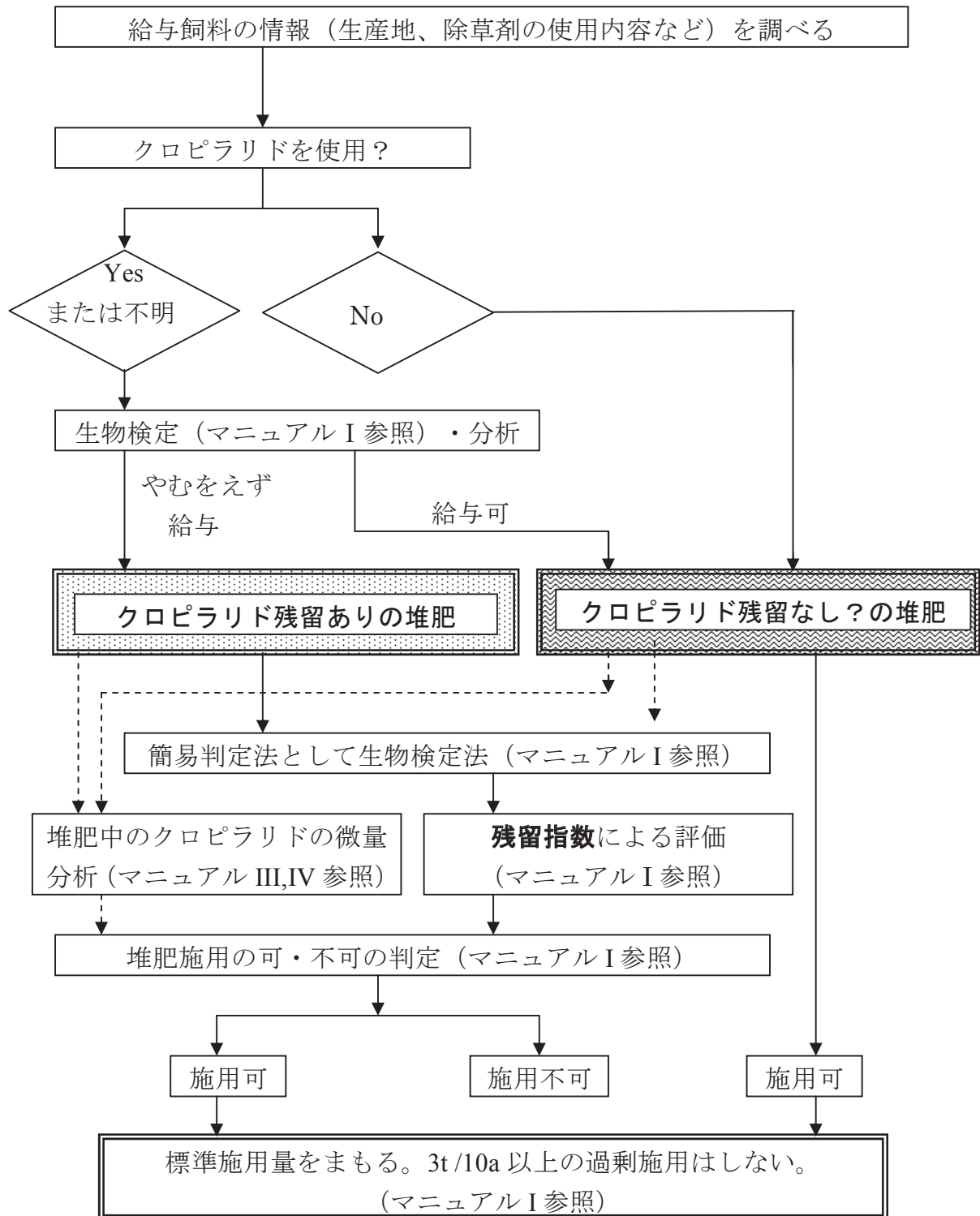


図3 クロピラリド残留堆肥の見分け方と堆肥施用可・不可のフローシート

図3のフローシートのように、クロピラリド残留堆肥を見分けるために、まず、給与飼料の生産地、除草剤の使用内容などを調べます。外国産の飼料ならば、飼料作へのクロピラリドの使用の有無を調査する必要があります。クロピラリドを使用(Yes)または不明の場合には、生物検定法や化学分析法によってクロピラリド残留量を明らかにします。

国産の飼料ならば、クロピラリドは使用していませんが(No)、国内でクロピラリド汚染堆肥を飼料作に使用している可能性は否定できません。すでにクロピラリド汚染飼料が国内で牛に給与され、そのふん尿から製造した堆肥中にクロピラリドが残留しており、その堆肥を使用した飼料作では、飼料への移行が起きる可能性があるからです。

したがって、国産の飼料でも、クロピラリド汚染堆肥を使用しているかいないかが不明ならば、生物検定法や飼料分析法によってクロピラリド残留量を明らかにする必要があるでしょう。クロピラリド汚染堆肥を使用していなければ、「クロピラリド残留なしの堆肥」で、施用可と判断していいと思います。

いっぽう、「クロピラリド残留ありの堆肥」は、その残留量を明らかにし、堆肥の施用量を適正に守ることが必要です。また、堆肥全般について、標準施用量をまもり、3t/10a以上の過剰施用はしないことです。

もしも被害が出た場合、応急措置として、被害の強度に応じて、**活性炭**を土壤に施用し、被害を軽減(マニュアルII参照)することができます(図4)。

☆もしも被害が出た場合☆

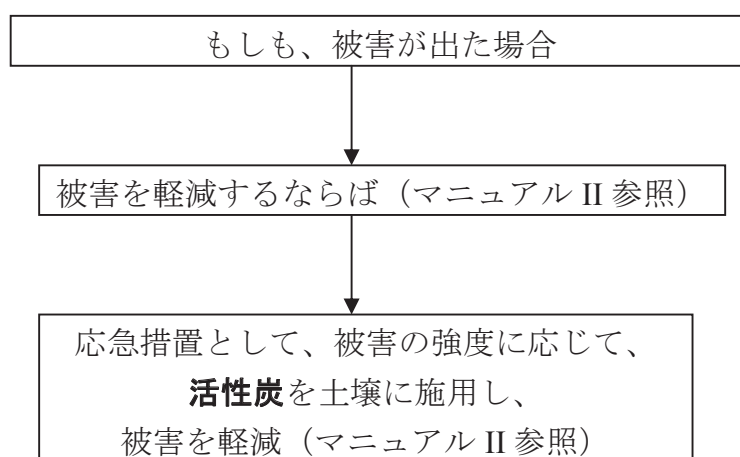


図4 クロピラリド残留堆肥の被害が出た場合のフローシート

1. 生物検定マニュアル (マニュアルⅠ)

生物検定は、生物の反応を用いて、ある特定の物質の量などを測定する方法で、現在、様々な分野で利用されており、作物への影響を総合的に直接判定できる方法です。もし仮に全く別の物質による影響であったとしても、その堆肥に何らかの問題があることだけは、確実に判断できます。また、高度な分析機器がない現場でも容易かつ低コストで実施でき、かつ検出感度は機器分析と遜色ないなどの利点があります。

しかし、結果が出るまでに時間を要すること、生物反応であるため温度など栽培環境の影響を受けることや、定量的に把握しにくいなどの欠点があります。

本マニュアルでは、**サヤエンドウ**を用い土壌混合する方法を基準としていますが、迅速性などの必要条件に応じて選択できるよういくつかの方法を開発しました。クロピラリドに対して感受性が高く、特異的に反応する作物ならば検定に利用できますが、種子の入手や栽培が容易なものを状況に応じて選択してください。

A. サヤエンドウを用いた生物検定マニュアル（標準法）

サヤエンドウがクロピラリドにより特徴的な症状を示すことを利用した生物検定法です。種子の入手や栽培の容易さ、検出感度、判定のしやすさなども考慮し、サヤエンドウを用いる方法を採用しました。堆肥、乾草類、土壌について、それぞれ検定が可能です。感度が高く、検出限界は、土壌中濃度で1～2 ppbです。

1. 用意するもの

- ①堆肥：良く混合された状態で500g程度
- ②乾草：良く混合された状態で50g程度
- ③土壌：良く混合された状態で1kg程度
- ④サヤエンドウ種子：「あずみ野30日絹莢PMR」または「兵庫絹莢」
- ⑤培土（野菜育苗用培土で三要素を適度に含有し、窒素成分で50～200 mg/L程度含有するもの。山土などを主体としたものでもよい。家畜ふん堆肥を含んでいないもの）
- ⑥500mLのポリディスクアップ（底穴のないもの）、
- ⑦目盛り付き100mLビーカー、
- ⑧混合用の容器、⑨ビニールテープ、⑩マジックペン、⑪ビニール手袋

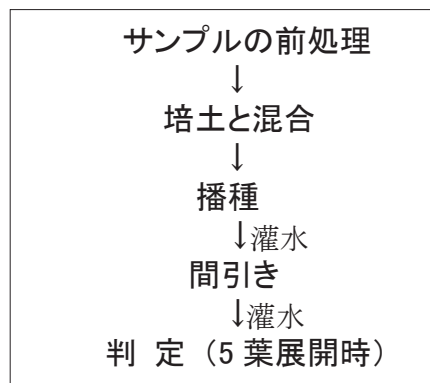


図 I - 1 生物検定のフローチャート

2. 方法と手順（図 I - 1）

- (1) 各カップにラベルを貼り、試料名などを記入します。
- (2) 何も混合しない培土600mlをカップに入れます。（比較対照区とします）
- (3) 検定を行なう対象サンプルの前処理を行い培土と混合します。

①堆肥の場合

堆肥は、できるだけ細かく砕き、均質化します。目盛り付きビーカーを用いて、堆肥 100mL と培土 500mL をそれぞれ量り取り、別容器内で均一

に混合し、カップに入れます。

②乾草の場合

乾草は、ハサミなどで2～3cm程度に裁断し良く混合します。次にその一部を電動コーヒミルなどで粗粉碎しておきます。乾草4gと培土600mLを別容器内で均一に混合し、カップに入れます。

③土壌の場合

礫や雑草などを取り除き、カップに600mLを入れます。

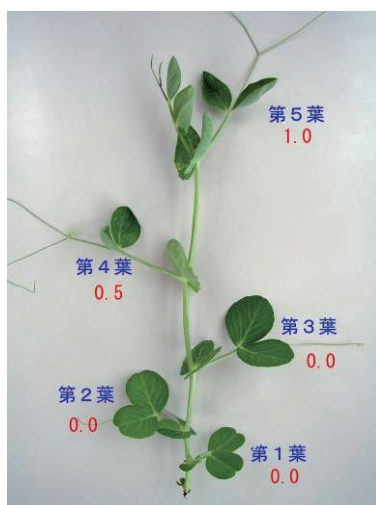
(2) 充実した種子を2粒ずつ2カ所に播種し、1cm程度覆土後、100mL程度をゆっくり灌水（かんすい）し、十分湿らせます。出芽後に間引きを行い、2本立てとします。

その後は、平均気温が20～25℃となるような日当たりが良く雨の当たらない場所に置き、乾燥させないように作物の生育に応じて、適宜給水します。底穴がないので、過湿にならないように注意します。比較対照区の第5葉が完全に展開するまで栽培を行ないます。

3. 障害の評価

- (1) クロピラリドが残留していれば特徴的な生育障害がみられます。展開した5枚の葉それぞれの生育状況について写真I-2の基準により数値化し、2株の平均値から式1により残留指数を算出します。付録DVDの専用ワークシートファイル（生物検定ワークシート.xls）が利用できます。

式1... 残留指数 = (第1葉×5 + 第2葉×4 + 第3葉×3 + 第4葉×2 + 第5葉×1) / 5



写真I-1 残留指数の算出法

写真I-1の残留指数の計算例 $(0 \times 5 + 0 \times 4 + 0 \times 3 + 0.5 \times 2 + 1.0 \times 1) / 5 = 0.4$



障害なし=0



わずかにカップ状=0.5



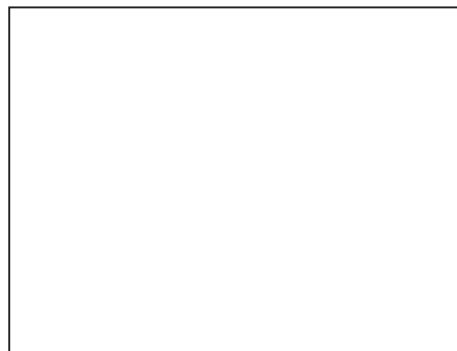
明らかにカップ状=1



カップ状から更に変形=2



ひどく変形し原型を留めない=3



展葉なし(心止まり)=4

写真 I - 2 生育障害の数値化基準

(2) 残留指数から表 I-1、2 により堆肥施用量を判定します。

表 I-1 残留指数に基づく堆肥施用量の判定基準

残留指数	クロピラリド耐性*				<堆肥施用量>
	極弱	弱	中	強	
～0.5未満	◎	◎	◎	◎	◎: 3t/10a以下なら問題ない
0.5～1.0未満	○	◎	◎	◎	○: 2t/10a以下なら問題ない
1.0～2.0未満	△	○	◎	◎	△: 1t/10a以下なら問題ない
2.0～	×	×	×	×	×: 堆肥施用を見合わせる

表 I-2 クロピラリドに対する耐性*

極弱: トマト、ダイズ、エダマメ、サヤエンドウ、ソラマメ、ヒマワリ、コスモス、アスター、スイートピー、クリムゾンクローバー
弱: ニンジン、エンダイブ、トレビス、シュンギク、フキ、サヤインゲン、ピーマン、シシトウ、キク、ヒャクニチソウ
中: レタス類**、セルリー、パセリ、イタリアンパセリ、キュウリ、メロン、トウガン、ニガウリ、スイカ、ナス、バレイショ、ラッカセイ、アズキ、ササゲ、ソバ、オクラ、ゴボウ、モロヘイヤ、ツルムラサキ、ヒユナ、ミツバ、タバコ、ペチュニア、マリーゴールド、ベニバナ、ルピナス、オステオスペルマム
強: アブラナ科、ユリ科、アカザ科、シソ科、ナデシコ科、ヒルガオ科、バラ科
極強: イネ科

* 品種により耐性評価のランクが変動する場合があります

** レタス類: 結球レタス、サニーレタス、グリーンリーフ、ロメインレタス、チマサンチュ、サラダ菜、ステムレタス

(3) 堆肥に農業用活性炭を混合して、被害を防止することが可能です。混合割合 (w/w%) は、残留指数 1 未満で 0.4%以上、残留指数 3 未満で 0.8%以上、残留指数 3 以上で 1.6%以上とするのが適当です。効果を十分に発揮するには、堆肥と良く混合することが必要です。既にアスパラガスの改植時に用いる農業用粒状活性炭が 225 円/kg 程度で販売されていますので、JA などに問い合わせてください。

また、木炭でも効果が認められるものがあります。しかし、木炭の吸着性能は、炭化温度により大きく異なり、800℃程度のかかなり高温でないと効果がありません。何れにしても事前に性能評価を行う必要があります。

(4) 乾草の検定において、残留指数が 0.5 以上（明らかに残留）であった場合は、産出される堆肥にクロピラリドが残留する可能性が高いので給与しない

のが望ましいのですが、やむを得ず給与する場合は、産出される堆肥については、必ず生物検定を行い残留度を調査します。

4. 留意事項

- (1) 使用するサヤエンドウの品種については、表 I-3 を参考に 2 品種のどちらかを選択します。基本的には「あずみ野30日絹莢PMR」を標準品種として用います。「兵庫絹莢」は、展葉速度が速く徒長しにくいですが、検出感度に対する温度の影響がやや大きいので冬季に陽光恒温器などを使用し検定を行う場合に適しています。

表 I-3 さやえんどうの品種特性の比較

品種名	種苗会社	展葉速度	温度の影響	節間長	耐倒伏性	耐暑性
あずみ野30日絹莢PMR	サカタのタネ	やや遅い	小	長	弱	高
兵庫絹莢	〃	早い	大	やや短	中	中



写真 I-3 あずみ野30日絹莢PMR



写真 I-4 兵庫絹莢

- (2) カップは、半透明で土壌水分や根の伸長状況が目視できるPE製のディスプレイポータブルカップ（商品名 ポリディスクップ）が便利です。底穴は不要です（対象物質は水溶性が高く土壌吸着性が低いため、底穴があいていると漏出してしまうため）。

- (3) 乾燥させないように作物の生育に応じて、適宜給水しますが、サヤエンドウは、湿害に弱いため、過湿にならないよう特に注意します。

(4) 平均20℃未満の気温では、蒸散量の減少に伴い検出感度が低下しやすく、また、検定に要する期間が非常に長くなるため、低温期に検定する場合には、十分な保温対策を行います。検定にあたっては、20℃以上の温度を確保するようにしてください。

表 I-4 平均気温と検定期間の関係

平均気温	品 種	
	あずみ野30日絹莢PMR	兵庫絹莢
25℃	21日	17日
20℃	24日	21日
15℃	30日	27日

(ガラス温室内)

(5) 陽光恒温器を用いても検定が可能です。その場合、設定温度を25℃、照明12時間周期、湿度60%以上とします。

(6) 一般的にサヤエンドウの栽培適温は、比較的低い(15~20℃)とされていますが、幼苗期は比較的耐暑性が高いため、高温でも茎葉がやや黄化するものの検定は可能です。しかし、最高気温が35℃を超える様な条件では、黄化し生育不良になりやすいので遮光するなどして、なるべく気温が上がらないようにしてください。

(7) 使用する培土について、一般的に既耕地の作土は、雑草種子や各種資材の残留の問題があるため好ましくありません。ピートモスを主体とした培土は、根系の発達が良好であり、保水性が高いため栽培管理が容易です。バーク堆肥を多く含む培土は、感度が低くなる恐れがあるので避けます。

(8) 戻し堆肥などで塩類濃度が高い堆肥の場合、生育が遅れ判定までの期間が伸びることがあります。一週間以上経過しても回復しない時は、養分含有量の少ない培土を用いてやり直します。

(9) 同一場所の堆肥及び土壌は、サンプルを数カ所から採取します。また、ロットの異なる乾草がある場合も、混合せずにそれぞれについて検定を行ってください。

5. 購入物品

- ・ サヤエンドウ種子

(あずみ野30日絹莢PMR、兵庫絹莢：サカタのタネ、JA、ホームセンターなどで購入可能)

- ・ 500mLポリデイスカップ
- ・ 園芸用培土

B. キクを用いた生物検定マニュアル

キクが「クロピラリド」を吸収することで示す生育異常反応を利用して、堆肥の中に「クロピラリド」が含まれているかを検定する簡易な方法です。

《マニュアルの特徴》

長所：①キクへの被害程度が軽い濃度でも検定が可能。

②特殊な道具を必要とせず、管理も容易。

短所：①キクの発根苗が必要。

②検定条件（品種、苗質、検定温度など）により、反応程度にある程度の幅があるため、クロピラリドの有無は検定できるが、含量の正確な定量は難しい。

1. 用意するもの

①キクの発根苗---栽培予定の品種が好適。よく揃ったものを準備する。

②調べたい堆肥---塊は細かく砕いて、よく混ぜておく。

③園芸用培養土---家畜ふん堆肥を含んでいないものを使用する。

④5号鉢と受皿---鉢はプラスチックまたはビニール製とする。

⑤計量用カップ---200mL程度の目盛付容器とする。

2. 手順

①用意した園芸用培養土のみを5号鉢に1,000mL（200mL×5カップ）詰め、クロピラリドが含まれていない場合のサンプルとする。

②調べたい堆肥 200mLと園芸用培養土 800mL（200mL×4カップ）を別の容器で十分に混合した後、5号鉢に詰める。調べたい堆肥サンプルのそれぞれについて、できるだけ3鉢以上用意する。



4カップの園芸用培養土と堆肥 → 混合 → 5号鉢に詰める

写真I-5 園芸用培養土と堆肥の混合手順

- ③用意した鉢に、キクの発根苗を1株ずつ植え付ける（写真I-6）。キクの苗は、茎の中程で摘心する（写真I-7）。摘心はハサミやカッターなどを用い、切断面を平滑にする。



写真I-6 キク苗の植え付け



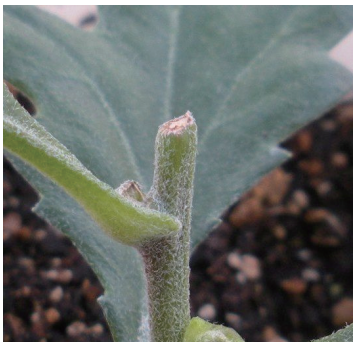
写真I-7 摘心

- ④定植後は、鉢の底から水が漏れないように気をつけてかん水する（クロピラリドは水に溶解やすいため流亡を防止する）。受皿に水が出た場合は、再び鉢内へ戻す。
- ⑤定植から2週間程度管理を続けた後、症状による検定を行う。
3. 検定までの栽培環境
- ①キクの生育に好適な温度や日照が確保できる場所。冬季でも15℃以上の温度が望ましい。夏季高温時は適度な遮光を行う。
- ②降雨の影響がない場所とする。
- ③風当たりが激しく、鉢用土の乾燥が著しい場所は避ける。

4. 症状と判定

堆肥にクロピラリドが含まれていると、キクの摘心部に図 I-3のような特徴的な症状が現れる。その症状からクロピラリド含有の有無が判定できるため、堆肥の実用性を施用前に把握することができる。

- ①クロピラリドが含まれていない場合の症状（定植・摘心2週間後）

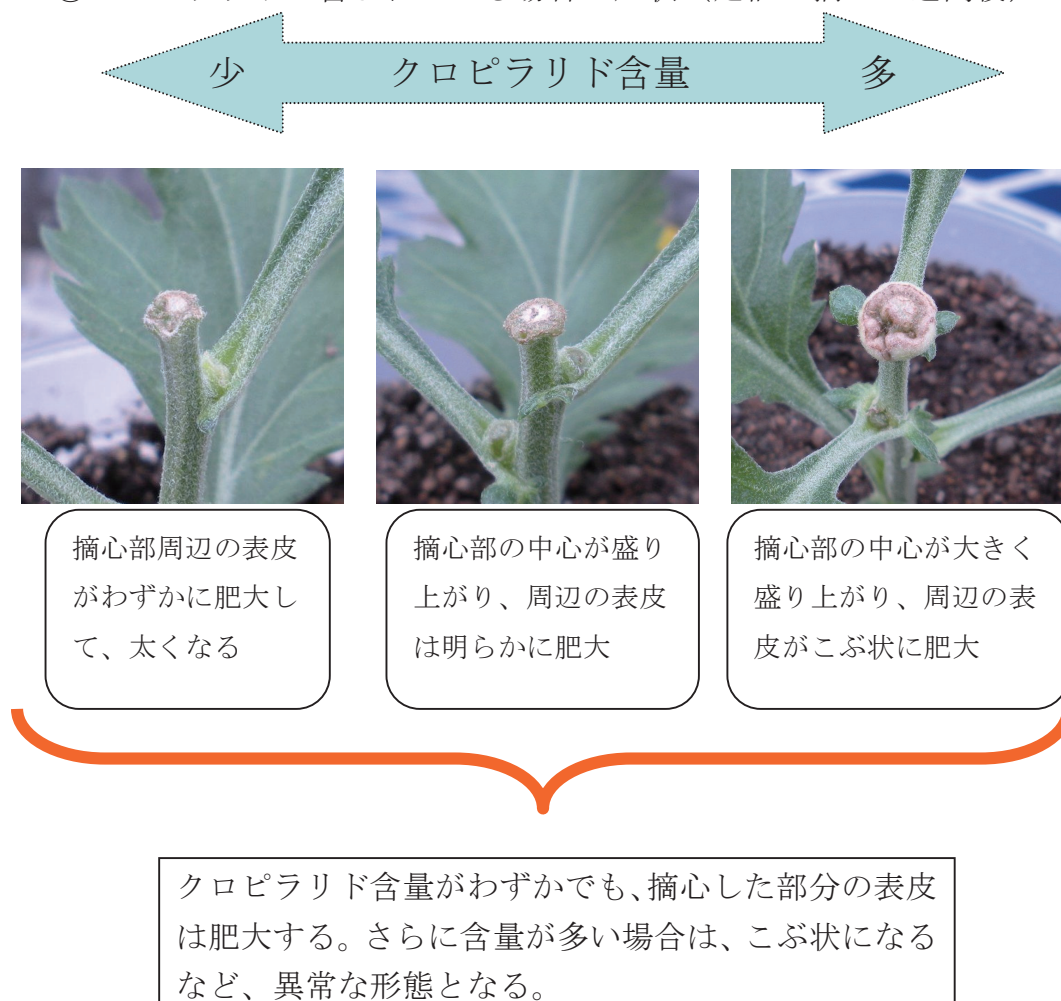


写真I-8 キクの摘心部

摘心した部分の太さは、その下の茎の太さに比べて縮小するか、もしくは同じぐらいの太さである。

判定：堆肥は通常どおり使用可能です

②クロピラリドが含まれている場合の症状（定植・摘心2週間後）



判定：堆肥にはクロピラリドが含まれています。

クロピラリド含量が比較的少ない堆肥を利用してキクを栽培した場合、生育異常（葉の奇形など）は初期のみで、生育に従って症状は緩和し、最終的には正常な開花に至る場合もありますが、クロピラリドが含有しているとわかった堆肥は、原則としてキク栽培には利用しないようにします。

図 I-3 クロピラリドが含まれている場合の摘心部の症状（品種：神馬）

5. 注意事項

検定に用いるキク苗の質（品種、太さなど）、園芸培土、検定温度などにより、症状の発現程度にはある程度の幅があります。

C. 堆肥抽出液とキヌサヤエンドウ発根苗による簡易生物検定法

クロピラリドの生物検定において簡易かつ迅速に検定する手法として、堆肥抽出液とキヌサヤエンドウ発根苗を利用した生物検定法です。

1. 基本性能

- ①検出可能濃度：抽出液中濃度として約 5ppb 以上（冬季では 10ppb 以上）
- ②検定所用期間：約 1 週間（冬季の条件下では延長され 2 週間を要する）
※：発根苗調整期間を含めると 2 週間

(1)長 所

- ①吸収力の旺盛な発根苗を用いるため、検定開始から発症までの期間が短い
- ②品質にバラツキのある培土でなく、水を培地として使用するため安定した結果が得やすい
- ③省スペースで実施可能であるとともに、終了後の処分も簡易である
- ④発芽済みの苗を使用するため、種子の不具合による問題を回避できる

(2)短 所

- ①あらかじめ発根苗を調整するため、検定期間とは別にこの調整期間及び手間が必要となる。
※：生物検定が日常作業としてルーチン化されているような場合には有効だが、急に実施しようとした場合には期間的なメリットは少なくなる。
- ②低濃度のクロピラリドによる障害は判定困難。特に塩類濃度の高い堆肥では土壌のような干渉能が無いいため希釈倍率を上げる必要があり、検出限界がより高濃度になってしまう。また、開始以前の苗段階での成長部分があるため、培土を用いた生物検定の評価をそのまま適用することはできない。
※：低濃度域で安定した結果を得るには「A. サヤエンドウを用いた生物検定マニュアル」の利用を推奨する。
- ③堆肥の状態によっては、根部の酸素不足による問題が発生するおそれがある。
- ④堆肥等からの抽出液を用いるため（水で 100%抽出されるわけではない）、堆肥に含まれているクロピラリドの全量を判断することはできない。クロピラリドが一定レベル以上に含まれているか否かを定性的に示すだけである。



写真 I-9 50mL 容遠沈管を栽培容器として利用した状況（栽培 7 日後）

2. 検定実施方法

用意するもの

- ①供試堆肥等：バラツキの無いように採取する。
- ②振とうビン：しっかりとフタのできるポリ容器
※：十分振とうさせるため、堆肥と水を入れて 1/3 以上空間の空く容器を用意する。
- ③キヌサヤエンドウ発根苗：検定の 1 週間前程度に種まき培土等に播種し発芽・発根させておく。
- ④水：蒸留水が好ましいが、水道水でもかまわない。
- ⑤ガーゼ：抽出液のろ過に利用。
- ⑥栽培容器：抽出液と発根苗を入れても余裕のある容器であれば何を利用して
も良い。
※：写真 I-9 では 50mL 容ディスポーザブル遠沈管を利用
- (⑦ EC メーター：抽出液の EC を測定して検定に利用できるかを判断する)
(※：概ねの数値が過去の実績等で把握できていれば無くても可)

操作

- ①堆肥の一定量(10g)を振とうビンに入れ、水(100mL)を加える。
※：堆肥量と水量は状況（栽培容器の大きさや堆肥の EC）に応じて変更可能
その際、混合比を記録しておく。
- ②振とうビンをシェーカー又は手で激しく振る。
※：シェーカーならば 30 分程度。手で振る場合には、間隔を開けながら振とうを繰り返す。

③抽出液を二重ガーゼでろ過しながら栽培容器に移す。

※：EC メーターがあればここで測定して使用可能(概ね 3dS/m 未満)かどうかを確認する。

※：塩類障害等による判定のあいまいさを回避するため、抽出液を 2～4 倍希釈したものを併せて行うことが望ましい。

④発根苗を苗床から回収し、水でよく洗って根に付着した土を取り除く。

⑤上記発根苗を栽培容器に入れた抽出液に浸す。

※：誤差をさけるため反復を設ける。比較のため、水だけの容器を用意してこれにも苗を浸し栽培を行う。

検定を行う場所

温室等の屋内で行う。環境温度は 25～30℃程度の高温条件が望ましいが、最低温度で 10℃を下回らないようにする。

※：十分な日照及び温度があると、水の吸い上げ量が増えるため結果が出やすい。温度が不足すると低濃度での反応消失や反応期間の長期化が生じ、判定が困難となる。

水管理

開始時液量を記録（容器に印を付けておくと良い）し、適宜減少分を補給する。

判 定

開始後 1 週間経過した時点における新芽（開始後の伸長部分）で判断する。

障害の症状は土に播種した場合とほぼ同様である。

この際、明確にクロピラリド障害の心止まり症状による生長停止のもの以外については、水のみで栽培したものと同等以上の生長が得られた個体について判定を実施する（堆肥等成分による障害と区別するため）。

※：障害の著しいものについては植え付け後 3 日程度で異常が認められる。

症状が軽微で判断の付きかねる検体については、さらに 1 週間栽培を続けて反応を見る。早期に判定するためには展開前の葉の兆候等を観察すると良い（写真 I-10～13 参照）。また、低温による生長への影響の有無を把握するため、水のみのもについて適温時（夏季の温暖期）の伸長量をあらかじめ測定しておき比較する方法や、容器内の液量減少量で植物体の吸い上げ量を確認して、植物体が適正に生長しているかを確認すること。



写真 I-10 正常な苗



写真 I-11 典型的な障害発生苗



写真 I-12 堆肥による障害で変形した例
(クロピラリド含有せず)



写真 I-13 発症の初期
または軽度の
障害例

注意事項

堆肥抽出液の EC が高いと（概ね 3mS/cm 以上で危険性あり）植物体が塩類障害をおこして正常な発育をしなくなる。EC の高いことが予想される（抽出液の EC を測定することが好ましい）場合には、段階的に希釈したものも併せて調査する。

塩類による障害によって葉がカップング様の症状を示すこともある。軽微な

障害の場合水で栽培したものと比較して、同等以上の発育状況であることを確認して判断する。

堆肥以外の試料についても水抽出が可能であれば適用できるため、乾草の調査にも応用可能であるが、低濃度クロピラリドに対する検出能力が劣ることを考慮すると土壌の調査には適応困難である。同様に、「短所」の項で記したように高 EC 堆肥では植物体への塩類による障害を回避するため希釈倍率を上げる必要があるが、相対的に抽出液中のクロピラリド濃度が低下するため、希釈倍率によっては必要とする堆肥中濃度での検出が出来なくなるおそれがある。これらの危険性が高い場合には土壌を利用した標準的手法で実施することが適当である。

D. コスモスを用いた迅速生物検定マニュアル

本法は、コスモスがクロピラリドにより特徴的な症状を示すことを利用した方法です。サヤエンドウによる方法と比較して、定量性、検出感度は劣りますが迅速性に優れていますので、できるだけ早急に結果が知りたい場合などに適します。また、比較的高温に強いので夏季の検定にも適しています。

1. 用意するもの

- ①堆肥：良く混合された状態で500g程度
- ②乾草：良く混合された状態で50g程度
- ③土壌：良く混合された状態で1kg程度
- ④コスモス種子：「ハッピーリング」
- ⑤培土（野菜育苗用の培土で三要素を適度に含有し、窒素成分で50～200mg/L程度含有するもの。山土などを主体としたものでもよい。家畜ふん堆肥が混合されていないもの）
- ⑥500mLのポリディスカップ（底穴のないもの）、⑦目盛り付き100mLビーカー、
- ⑧混合用の容器、⑨ビニールテープ、⑩マジックペン、⑪ビニール手袋

2. 方法と手順

- (1) 各カップにラベルを貼り、試料名などを記入します。
- (2) 何も混合しない培土600mLをカップに入れます。（比較対照区とします）
- (3) 検定を行なう対象サンプルの前処理を行い培土と混合します。
 - ①堆肥の場合
堆肥は、できるだけ細かく砕き、均質化する。目盛り付きビーカーを用いて、堆肥100mLと培土500mLをそれぞれ量り取り、別容器内で均一に混合し、カップに入れます。
 - ②乾草の場合
乾草は、ハサミなどで2～3cm程度に裁断し良く混合します。次にその一部を電動コーヒミルなどで粗粉碎しておきます。乾草4gと培土600mlを別容器内で均一に混合し、カップに入れます。
 - ③土壌の場合
礫や雑草などを取り除き、カップに600mLを入れます。
- (4) 充実した種子を2粒ずつ4カ所に播種し、5mm程度覆土後、100mL程度をゆっくり灌水し、十分湿らせます。2日～3日で出芽するので、間引きを行います。その後は、平均気温が20～30℃となるような日当たりが良く雨

の当たらない場所に置き、乾燥させないように作物の生育に応じて、適宜給水します。底穴がないので、過湿にならないように注意します。比較対照区の本葉が完全に展開するまで栽培を行いません。

3. 残留の評価

- (1) クロピラリドが残留していれば特徴的な生育障害がみられます。それぞれの生育状況について、下記の写真と比較し残留程度を判断します。コスモスは、比較的個体差が大きいため、低濃度ではバラツキが多くなりますので注意してください。



写真 I-14 残留程度：無



写真 I-15 残留程度：低 (糸葉状、カッピング)



写真 I-16 残留程度：中 (カギ爪状に変形)

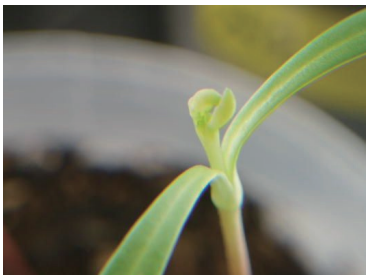


写真 I-17 残留程度：高 (心止まり、極度の変形)

(2) 残留程度から堆肥施用量を判定します。

表 I-5 残留程度に基づく堆肥施用量の判定基準

残留程度	クロピラリド耐性*				<堆肥施用量> ◎: 3t/10a以下なら問題ない ○: 2t/10a以下なら問題ない △: 1t/10a以下なら問題ない ×: 堆肥施用を見合わせる
	極弱	弱	中	強	
無	◎	◎	◎	◎	
低	○	◎	◎	◎	
中	△	○	◎	◎	
高	×	×	×	×	

表 I-6 クロピラリドに対する耐性*

極弱: トマト、ダイズ、エダマメ、サヤエンドウ、ソラマメ、ヒマワリ、コスモス、アスター、スイートピー、クリムゾンクローバー
弱: ニンジン、エンダイブ、トレビス、シュンギク、フキ、サヤインゲン、ピーマン、シシトウ、キク、ヒャクニチソウ
中: レタス類**、セルリー、パセリ、イタリアンパセリ、キュウリ、メロン、トウガン、ニガウリ、スイカ、ナス、バレイショ、ラッカセイ、アズキ、ササゲ、ソバ、オクラ、ゴボウ、モロヘイヤ、ツルムラサキ、ヒユナ、ミツバ、タバコ、ペチュニア、マリーゴールド、ベニバナ、ルピナス、オステオスペルマム
強: アブラナ科、ユリ科、アカザ科、シソ科、ナデシコ科、ヒルガオ科、バラ科
極強: イネ科

* 品種により耐性評価のランクが変動する場合があります

** レタス類: 結球レタス、サニーレタス、グリーンリーフ、ロメインレタス、チマサンチュ、サラダ菜、ステムレタス

(3) 乾草の検定において、残留程度が中以上であった場合は、産出される堆肥にクロピラリドが残留する可能性が高いので給与しないのが望ましいのですが、やむを得ず給与する場合は、産出される堆肥については、必ず生物検定を行い残留程度を調査します。

5. 留意事項

(1) 使用するコスモスの品種については、基本的に「ハッピーリング」を用いますが、他の品種でも可能です。

(2) カップは、半透明で土壌水分や根の伸長状況が目視できるPE製のディスプレイポータブルカップ（商品名 ポリディスクカップ）が便利です。底穴は不要（対象物質は水溶性が高く土壌吸着性が低いため、底穴があいていると漏出してしまうため）。

(3) 播種してから本葉が展開するまでの期間は、温度の影響を受けます。平均気温25℃で約7日、20℃で約9日必要です。また、平均20℃未満の気温では、

蒸散量の減少に伴い検出感度が低下しやすく、また、検定に要する期間が長くなります。

表 I-7 気温の影響

気温	出芽揃い	出芽期間*	検定期間
20℃	△	5日	9日
25℃	◎	3日	7日
30℃	○	3日	6日

*播種から出芽揃いまでに要した日数

(4) 陽光恒温器を用いても検定が可能です。その場合、温度25～30℃、照明12時間周期、湿度60%以上の条件とします。

(5) 使用する培土について、土壌一般的に既耕地の作土は、雑草種子や各種資材の残留の問題があるため好ましくありません。ピートモスを主体とした培土は、根系の発達が良好で、保水性が高いため栽培管理が容易です。バーク堆肥を多く含む培土は、感度が低くなる恐れがあるので避けます。

(6) 同一場所の堆肥及び土壌は、サンプルを数カ所から採取します。また、ロットの異なる乾草がある場合も、混合せずにそれぞれについて検定を行って下さい。

6. 購入物品

- ・コスモス種子

(ハッピーリング：サカタのタネ、JA、ホームセンターなどで購入可能)

- ・500mLポリデイスカップ
- ・園芸用培土

II. 被害軽減対策マニュアル

(マニュアル II)

被害を未然に防ぐために、耕種農家が使用する堆肥について、生物検定法により残留がないことを確認することが重要です。

ここでは、耕種農家が行うべき事項について記載しています。

A. 被害を未然に防ぐために

使用する堆肥について、生物検定法により残留がないことを確認することが重要です。

堆肥生産者は、有害なレベルのクロピラリドが残留していないか検定する必要がありますが、もし行われていない場合は、生物検定などによってクロピラリドの残留がないことを確認することが重要です。生物検定法については、「マニュアルⅠ」を参照してください。

残留の有無に関わらず地下水汚染防止の観点からも堆肥の施用は、地域の基準を守り、大量の施用は行わないことが大切です。育苗時に培土と混合する場合には、容量で20%以下とします。

大量に施用したり、育苗時の混合比率が高いと、たとえ低濃度であっても生育障害が発生する可能性があります。

B. 被害が発生してしまったら

本当にクロピラリドによるものか確認することが重要です。クロピラリドによる障害と、ウィルスなどによる病害や他の障害などと混同される事例があります。

マニュアルⅡの「クロピラリドによる生育障害の特徴」及び付録の「画像データライブラリー」を参考にして判断します。また、使用された堆肥や土壌の生物検定による確認を行なってください。

被害にあった作物残渣は、必ず圃場外に持ち出し、鋤込んだりしないように注意する必要があります。

作物体中に残留したものが次作において放出され、被害が再発する可能性があるためです。

被害の出た圃場では、クロピラリドが分解するまでマメ科、ナス科、キク科、セリ科等の作物は作らないようにします。

重大な被害が発生した圃場では、その後すぐにマメ科、ナス科、キク科、セリ科の作物は作らないようにします。表Ⅱ-1に示したように品目により感受性が異なりますが、特に耐性が弱い品目は、クロピラリドが分解するまでの期間

は、生育障害が発生しやすいため栽培できません。

イネ科、アブラナ科、ユリ科、アカザ科、シソ科、ナデシコ科、ヒルガオ科、バラ科については、生育障害の発生はないと考えられます。

表Ⅱ-1 クロピラリドに対する耐性*

極弱:	トマト、ダイズ、エダマメ、サヤエンドウ、ソラマメ、ヒマワリ、コスモス、アスター、スイートピー、クリムゾンクローバー
弱:	ニンジン、エンダイブ、トレビス、シュンギク、フキ、サヤインゲン、ピーマン、シシトウ、キク、ヒヤクニチソウ
中:	レタス類**、セルリー、パセリ、イタリアンパセリ、キュウリ、メロン、トウガン、ニガウリ、スイカ、ナス、パレイショ、ラッカセイ、アズキ、ササゲ、ソバ、オクラ、ゴボウ、モロヘイヤ、ツルムラサキ、ヒユナ、ミツバ、タバコ、ペチュニア、マリーゴールド、ベニバナ、ルピナス、オステオスペルマム
強:	アブラナ科、ユリ科、アカザ科、シソ科、ナデシコ科、ヒルガオ科、バラ科
極強:	イネ科

* 品種により耐性評価のランクが変動する場合があります

** レタス類: 結球レタス、サニーレタス、グリーンリーフ、ロメインレタス、チマサンチュ、サラダ菜、ステムレタス

表Ⅱ-2 クロピラリドの基準値(耐性を有する品目のみ抜粋)

品目	基準値: ppm (暫定基準)	品目	基準値: ppm (暫定基準)
米(玄米)	2	こまつな	
小麦	2	きょうな	
大麦	2	チンゲンサイ	1
ライ麦	2	カリフラワー	2
とうもろこし	2	ブロッコリー	2
そば	2	その他のあぶらな科野菜	5
その他の穀類	2	たまねぎ	
さといも類(やつがしらを含む)		ねぎ(リーキを含む)	
かんしょ		にんにく	
やまいも(長いもをいう)		にら	
こんにゃくいも		アスパラガス	1
その他のいも類		わけぎ	
てんさい	2	その他のゆり科野菜	
さとうきび		ほうれんそう	5
だいこん類(ラディッシュを含む)の根		おくら	
だいこん類(ラディッシュを含む)の葉		しょうが	
かぶ類の根	1	マッシュルーム	
かぶ類の葉	4	その他のきのこ類	
西洋わさび		その他の野菜	4
はくさい	2	いちご	1
キャベツ	2	ごまの種子	
芽キャベツ	2	べにばなの種子	
ケール		なたね	2

注) 記載のない作物には一律基準(0.01ppm)が適用されます。

基準値は、平成21年2月現在のものであり、今後改正される場合があります

しかし、これらの品目においては、正常な生育に伴いクロピラリドを吸収・蓄積することになり、残留濃度の高い堆肥が大量に施用された場合などでは、食品衛生法における作物残留の一律基準 0.01ppm を超える可能性があります（表Ⅱ-2）。特に、コマツナ等の生育期間が短い品目は注意が必要です。

土壌中での分解を促進させるため、地温を高く維持し、灌水などを行ってなるべく適湿を保ち、乾湿のサイクルを避ける必要があります。

クロピラリドは土壌中において、好氣的条件下で微生物により分解されるとされています。表Ⅱ-3 に示したように土壌種類や地温が半減期（50%分解されるまでにかかる日数）に影響します。他に水分条件などが分解速度に影響を与えたとの報告があり、条件が悪いと分解が大幅に遅れると推測されます。米国での調査では、土壌中での半減期は、土壌・気象条件等により 8 日から 250 日とかなり幅があり、平均 25 日となっています。

表Ⅱ-3 クロピラリドの半減期(日)

培養温度	黒ボク土	褐色低地土
20℃	68	97
30℃	49	25

*1.5mg/kg添加 圃場容水量の60%

クロピラリドに対して、活性炭の施用で軽減効果が認められます。

活性炭により土壌中に残留した化学物質を吸着し、生育障害を軽減する事例はいくつか報告されており、クロピラリドに対しても、活性炭の施用で軽減効果が認められています。

活性炭の施用量は、残留濃度に応じて増やす必要があります、マニュアルⅠ：「サヤエンドウを用いた生物検定」により施用量を判断することができます。「サヤエンドウを用いた生物検定」による残留指数に基づく粒状活性炭施用量の基準は、残留指数 1 未満で 20kg/10a 以上、残留指数 1～1.5 未満で 40kg/10a 以上、残留指数 1.5～2.0 で 80kg/10a 以上とするのが適当です。

既にアスパラガスの改植時などに用いる農業用粒状活性炭が 225 円/kg 程度で販売されていますので、JA などに問い合わせてください。

施用に当たっては、作土とムラなく混合することが重要です。なお、施用直後に農薬を土壌処理した場合、相互に効果が低下する恐れがあるので注意する必要があります。

また、木炭でも 200kg/10a 以上の施用で効果が認められるものがあります。しかし、木炭の吸着性能は、炭化温度により大きく異なり、800℃程度のかかなり高温でないと効果がありません。何れにしても事前に性能評価を行う必要があります。

C. クロピラリドによる生育障害の特徴

クロピラリドによる異常生育は、品目によって症状は大きく異なります。また、同一の品種であっても、クロピラリドの濃度、作物体の栄養条件や環境要因の差などで障害の状況などが異なり、その症状は一定ではありません。

(1) 部位別特徴

部位別に分類整理し、各作物での症状を把握しておくことは、他の障害と混同しないためにも大変重要ですから、付録の画像データと併せて参考にしてください。

① 葉

クロピラリドによる障害で最も特徴的なのは、葉が奇形化することです(写真Ⅱ-1~16)。従来から知られている合成オーキシン系の除草剤で認められるような、ホルモン様症状(柳葉、カップ状葉、縮葉など)の奇形を生じます。一見、正常葉でも、左右対称性が失われている場合もあります(写真Ⅱ-11)。葉がカップ状に変形するのは、葉縁部と中央部の生育速度に差が生じたためで、大部分は上向きのカップ状(写真Ⅱ-3,5,9,10,12,13)となりますが、下向きのカップ状(写真Ⅱ-4,8)になることもあります。葉が順調に展開できないとき、葉が厚く固くなる(写真Ⅱ-13)ことがあります。この奇形葉は、残留濃度や生育状態、環境要因の差などで症状がかなり異なるので注意が必要です(写真Ⅱ-2)。

また、農薬の薬害として一般的な症状(葉縁部のネクロシス、斑点、葉脈間の黄化等)や、ウイルス病に認められるような症状(モザイク症状、黄化、壊疽斑、節間の短縮)は起こしませんが、葉脈透過が認められる場合があります(写真Ⅱ-1,4,8)。



写真Ⅱ-1 トマト



写真Ⅱ-2 ミニトマト



写真Ⅱ-3 ヒマワリ



写真Ⅱ-4 サヤインゲン



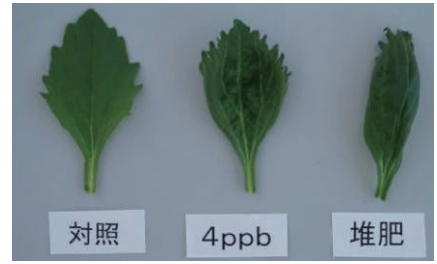
写真Ⅱ-5 エダマメ



写真Ⅱ-6 コスモス



写真Ⅱ-7 ニンジン



写真Ⅱ-8 マイクロアスター



写真Ⅱ-9 シシトウ



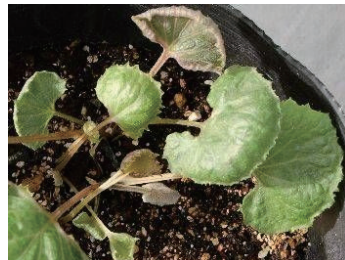
写真Ⅱ-10 トレビス



写真Ⅱ-11 エンダイブ



写真Ⅱ-12 モロヘイヤ



写真Ⅱ-13 フキ



写真Ⅱ-14 シュンギク



写真Ⅱ-15 キク上位葉 (1)



写真Ⅱ-16 キク上位葉 (2)

② 茎

比較的影響は少なく、低濃度では、ほとんど影響がないものの、高濃度では、わん曲したり(写真Ⅱ-17, 19) 心止まり状態となり、時間の経過とともにネクロシスが生じる場合もあります(写真Ⅱ-18, 20)。 輪ギクでは、摘蕾跡が異常肥大することがあります(写真Ⅱ-21)。

クロピラリドは、土壌中では徐々に分解されていくので、濃度が比較的低い場合には、生育が回復してくることがあります。また、心止まりとなっても、かなり後から生長した腋芽の障害程度は、比較的軽くなります(写真Ⅱ-23)。



写真Ⅱ-17 サヤエンドウ



写真Ⅱ-18 トマト



写真Ⅱ-19 サヤインゲン



写真Ⅱ-20 コスモス



写真Ⅱ-21 キク摘心部の異常



写真Ⅱ-22 キク



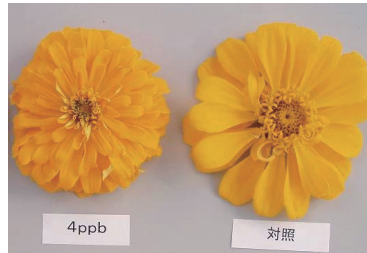
写真Ⅱ-23 キク

③ 花

高濃度では、激しく奇形化し正常に開花しない場合が多いです(写真Ⅱ-24)。低濃度では、ほとんど影響しないことが多いですが、ヒヤクニチソウは花弁が、ヒマワリはガクの部分が奇形化します(写真Ⅱ-25,26)。



写真Ⅱ-24 トマト



写真Ⅱ-25 ヒヤクニチソウ



写真Ⅱ-26 ヒマワリ



写真Ⅱ-27 輪ギクの花弁の異常



写真Ⅱ-28 スプレーギクの花首(ガク)の異常

④ 果実

トマトでは単為結果しやすくなり、ミニトマトなどでは、変形果を生じます(写真Ⅱ-29)。単為結果については、試験した全てのトマトで発生したため、共通の症状であると考えられますが、発生程度には品種間差があります。また、単為結果は、葉の奇形を伴って発生し、単為結果のみが発生することはありません。ただし、濃度が低い場合は、葉の奇形のみが発生することがあります。

変形果は、大玉や中玉よりミニトマトで発生しやすく、また、品種により変形に違いが見られます(写真Ⅱ-30)。フェノキシ系化合物で報告があるような果実の先端が著しく尖る症状は、一部の品種において高濃度の場合に発生することがあります。



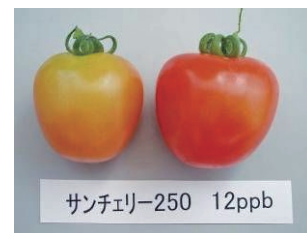
写真Ⅱ-29 ミニトマト（千果）



サンチェリー-250 対照



サンチェリー-250 4ppb



サンチェリー-250 12ppb



第2花房
小桃 対照



第2花房
小桃 4ppb



第2花房
小桃 12ppb



アイコ 対照



アイコ 4ppb



アイコ 12ppb



桃太郎フイト 対照



桃太郎フイト 4ppb



桃太郎フイト 12ppb

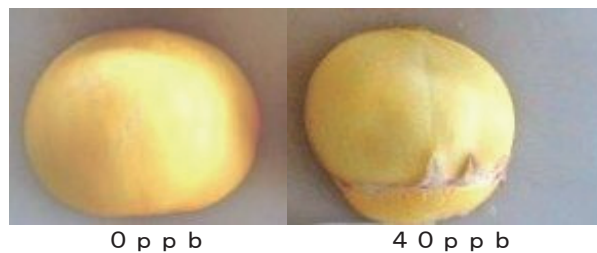
写真Ⅱ-30 クロピラリドがトマトの果実に及ぼす影響

ピーマンやシシトウは、やや細長い形状になることがあります(写真Ⅱ-31)。また、高濃度では単為結果します。



写真Ⅱ-31 クロピラリドがピーマンの果実に及ぼす影響

メロン‘イエローキング’は、高濃度では花がトマトの花のように長く大きく変形し、そのような花が開花、結実した場合、果実の肥大に伴って花痕部が大きく広がりそこに亀裂が入る場合もあります(写真Ⅱ-32)。



写真Ⅱ-32 クロピラリドがメロン‘イエローキング’の果実に及ぼす影響

(2) 画像データライブラリーについて (付録 DVD)

汚染土壌での異常生育の発生程度に基づく感受性の検定を行い、クロピラリドに対して感受性が認められた品目について、生育障害を記録した画像データを収録しました。

① 野菜

ウリ科、キク科、セリ科、ナス科、マメ科、その他についてフォルダを作成し、更に品目ごとにフォルダを作成しました。品種間差異について検討した品目に関しては、更に品種ごとにフォルダを作成しました。

②) 花き

品目ごとにフォルダを作成し、品種間差異について検討した品目に関しては、更に品種ごとにフォルダを作成しました。

III. 飼料の配合、堆肥化法における 残留低減化マニュアル

(マニュアル III)

飼料の配合、堆肥化法において、堆肥生産者（＝畜産農家）が行うことが述べられています。

これまでに日本国内において発生したクロピラリドによる農作物の生育被害は、クロピラリドが残留した輸入乾草から作られた堆肥が原因だと考えられています。堆肥の流通を促進し、家畜排泄物が環境汚染の一因とならないようにするためには、堆肥を生産する畜産農家はその安全性に配慮する必要があります。

このマニュアルでは、土壌－飼料作物－乳牛－堆肥という一連におけるクロピラリドの動態に関する研究結果に基づいて、家畜に給与する飼料の生産・購入および家畜排泄物の堆肥化において、堆肥のクロピラリド残留を避けるために留意すべき点と、残留の可能性がある場合の対策を示しています。

ここでは、畜産農家が行うことについて記載しています。

A. 飼料購入時に注意すること

輸入粗飼料を購入する際には、「クロピラリド不使用」であることを販売業者に確認します。

クロピラリドは、国内での使用は認められていませんが、乾草の主な輸入先であるアメリカ・オーストラリア・カナダ等ではイネ科牧草用の除草剤として使用されている場合があります。また、牧草栽培時にはクロピラリド不使用であっても、過去数年内にクロピラリドを使用したことのある圃場では、土壌中に残留したクロピラリドが牧草に吸収されている可能性があります。

購入した飼料にクロピラリドが残留している可能性がある場合は、残留量測定又は生物検定を行います。

生物検定についてはマニュアルⅠを、作物残留量の測定法についてはマニュアルⅣを参照して下さい。

B. 飼料中にクロピラリドが残留していると分かったら

飼料のクロピラリド残留が確認された場合は、環境中にクロピラリドが蔓延しないよう、家畜の飼料としてだけでなく、敷料や肥料原料としても使用しないようにします。

クロピラリドの残留した飼料を家畜に給与しても、ほぼ全量がふん・尿中に排泄されるため、家畜の健康や畜産物の品質および安全性にはほとんど影響がありません。また、イネ科牧草やトウモロコシ等の飼料作物は、クロピラリドに対する感受性が低く生育にはほとんど影響しません。

特に耕種農家への販売を目的とした堆肥およびその原料には、クロピラリドが残留している飼料や、それを摂取した家畜の排泄物を使用しないよう注意します。

クロピラリドは、飼料作物には全く影響のない濃度でも、トマトやダイズなどの作物に生育異常を引き起こします。堆肥原料中に含まれるクロピラリドは、熟成過程においてある程度分解されますが、堆肥乾物重量当たりのクロピラリド含有量はほとんど変化しません。また、排泄物の固液分離によって堆肥原料から除去することが可能なクロピラリド量は50%程度にすぎません。

クロピラリドの残留した飼料を家畜に給与した場合、給与を中止してから2週間目までの排泄物は堆肥原料として使用しないようにします。

給与中止後2週間を経過すれば、家畜の体内に入ったクロピラリドはほぼ全て排泄されてしまいますので、その後はクロピラリド残留のない排泄物として堆肥原料に使用することができます。

C. 堆肥にクロピラリドが残留している可能性があると思ったら

生物検定を行い、堆肥にクロピラリドが残留しているか否かを確認します。

生物検定法についてはマニュアル I を参照して下さい。

クロピラリドが混入した堆肥に土壌を混ぜると、クロピラリドが分解しやすくなります。

完熟した堆肥の中ではクロピラリドはほとんど分解しませんが、土壌と接触させておくことで、土壌中の微生物により徐々に分解されます。そのように処理した堆肥が利用できるようになったかどうかは、生物検定を行って判断します。

堆肥に農業用活性炭を混合して、被害を防止することが可能です。

活性炭の施用量は、残留濃度に応じて増やす必要があり、混合割合（w/w%）は、「サヤエンドウを用いた生物検定法」による残留指数1未満で0.4%以上、残留指数3未満で0.8%以上、残留指数3以上で1.6%以上とするのが適当です。効果を十分に発揮するには、堆肥と良く混合することが必要です。

クロピラリドにバーク堆肥等の障害性低減効果の確認された資材を混合し熟成させることで、分解を促進することができます。

バーク堆肥にはクロピラリドを分解する作用が確認されています。この作用は生物的なもので、適当な水分と空気のある条件で緩やかに進みます。バーク堆肥とクロピラリド残留堆肥を混合することで、堆肥のみの状態で置いておくより分解が促進されます。この際、堆肥は発酵が十分終了している（二次発酵も終了し製品となったもの、最低でも三ヶ月以上経過した品温上昇の無い完熟状態）ことが必要です。

※：実験では完熟した堆肥とバーク堆肥の等量混合では10週間後には堆肥のみの場合に比べてクロピラリド含量が70%程度減少しましたが、一次発酵を終了（堆肥化開始4週間後）した段階のものでは、10%程度しか減少しませんでした。

ただし、このバーク堆肥による効果は生物的作用による分解ですので、上で示した堆肥の腐熟程度以外にも、利用する資材（バーク堆肥）や堆肥の性状、環境温度などの条件によって効果が異なる可能性がありますので、注意が必要です。

クロピラリドが混入した堆肥を用いて作物を栽培した場合、作物残渣を土壤還元する前に作物残留量の測定を行います。

クロピラリドが混入した堆肥を用いて栽培した作物は、たとえ生育に異常が認められなくても、植物体内にはわずかながらクロピラリドが吸収されていますので、それらの作物残渣を大量に圃場に戻すと、クロピラリドが土壌中に残留する恐れがあります。作物残留量の測定法についてはマニュアルⅣを参照して下さい。

近くの圃場でクロピラリドが混入した堆肥が使用された場合でも、空気を介して汚染が広がる可能性はほとんどありません。

IV. 残留分析法マニュアル

(マニュアル IV)

マニュアル IV では、飼料（輸入乾牧草等）、作物（野菜等）、堆肥中に混入したクロピラリドの機器分析方法を 3 種類提示します。生物検定法（マニュアル I）は、生物の反応を用いて作物への影響を総合的に直接判定するのに対して、当該残留分析法は、被害を起こす原因物質すなわちクロピラリドの濃度を理化学機器を用いて測定するものです。被害の原因がクロピラリドであると確定する必要が生じた時、あるいは、クロピラリドが混入している疑いのある堆肥を施用して栽培した作物中の残留濃度を測定する必要が生じた時に参考にして下さい。

3 種類の分析方法（A：飼料分析法マニュアル、B：作物残留分析法マニュアル、C：堆肥残留分析法マニュアル）は、それぞれ下表のような特徴があります。媒体や装備されている機器に応じて適宜選択して下さい。

表. 提示する 3 種類の機器分析法の特徴

	A：飼料分析法マニュアル	B：作物残留分析法マニュアル	C：堆肥残留分析法マニュアル
適応媒体	飼料（乾牧草類）	野菜類	堆肥、飼料（高水分牧草類）
使用機器	GC/MS	LC/MS/MS	LC/MS/MS
概要	試料中のクロピラリドを、アルカリ性下含水メタノールで抽出し、液液分配および 2 種類のカートリッジカラムによる精製を行なった後、メチルエステル化を行ない、GC/MS で測定する。	試料中のクロピラリドを、アルカリ性下含水メタノールで抽出し、2 回の HLB カラムによる精製を行ない、LC/MS/MS で測定する。	試料中のクロピラリドを、アルカリ性下水で抽出し、液液分配および ODS カートリッジで精製を行ない、LC/MS/MS で測定する。

IV. 残留分析法マニュアル

A. 飼料分析法マニュアル

1. 特徴

本分析法は、GC/MS を用いた飼料分析法である。試料に残留するクロピラリドを含水塩基性メタノールで抽出し、液液分配及びミニカラムによる精製を行った後、メチルエステル化を行い、GC/MS により定量する。

適用範囲は粗飼料（主に乾牧草）である。

定量下限は 0.01 mg/kg、検出下限は 0.003 mg/kg 程度である。

2. 試薬および機器

クロピラリド標準品

アセトニトリル、ジエチルエーテル、ヘキサン、メタノール、酢酸エチル、無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用

ジエチレングリコール、塩化ナトリウム、塩酸、水酸化ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、硫酸：特級

トリメチルシリルジアゾメタン溶液（2 mol/L in Hexane）

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg）：Supelclean LC-18

トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム（1,000 mg）：Mega Bond Elut SAX

ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（200 mg）：Oasis HLB

シリカゲルミニカラム（690 mg）：Sep-Pak Plus Silica

吸引ろ過装置

吸引マニホールド

純粋製造装置

振とう機

天秤

ロータリーエバポレーター

GC/MS

3. 機器の条件

GC/MS の条件

カラム：Rtx-1701（内径 0.25 mm 長さ 30 m 膜厚 0.25 μm）

キャリアーガス：He（1.0 mL/min）

試料導入法：スプリットレス（60s）

試料導入部温度：280°C

カラム槽温度：初期温度 70℃（1 分保持）→昇温 25℃/min→150℃→昇温 3℃/min→170℃→昇温 15℃/min→280℃（10 分保持）

検出器：四重極質量分析計

インターフェース温度：250℃

イオン源温度：230℃

イオン化電圧：70eV

イオン化法：電子衝撃イオン化（EI）法^{注)}

モニターイオン：定量イオン m/z 205、確認イオン m/z 147、176

保持時間：約 11 min

注) 試料中のクロピラリドが低濃度（0.05 mg/kg 未満）の場合は、イオン化法を負化学イオン化（NCI）法とする。なお、モニターイオンは、定量イオン m/z 205、確認イオン m/z 207 とする。

4. 検量線の作成

クロピラリド標品の 500 $\mu\text{g/mL}$ アセトニトリル溶液を調製する。この溶液 200 μL を窒素ガスで乾固し、メタノール 1 mL を加えて残留物を溶かす。トリメチルシリルジアンメタン溶液 150 μL を加えて 30 分間放置しメチルエステル化を行う。40℃以下の水浴上でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。ヘキサン 10 mL を加えて残留物を溶かす。この溶液をヘキサンの希釈し、0.002、0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2 $\mu\text{g/mL}$ 標準溶液を調製する。これらの標準溶液各 1 μL を前述の条件の GC/MS に注入し、クロピラリド誘導体のピーク面積を測定する。ピーク面積を縦軸に、重量を横軸に取り、最小二乗法により検量線を作成する。

5. 分析操作

(a) 抽出

試料 10 g を秤取し、水 40 mL を加えて 30 分間放置する。20 w/v%水酸化ナトリウム水溶液 1 mL 及びメタノール 100 mL を加えて 30 分間振り混ぜて抽出する。内容物をろ紙（5 種 B）で吸引ろ過し、残渣をメタノール 50 mL で洗浄・ろ過してろ液を合わせ、更にメタノールで 200 mL に定容する。ろ液 40 mL を分取（pH が 9 未満の場合は、20 w/v%水酸化ナトリウム水溶液 1 mL を加える。）し、40℃以下の水浴上で液量が 10 mL 以下になるまで減圧濃縮する。

(b) 液液分配による精製

(a)項で得られた濃縮液を分液漏斗 A に入れ、更に 10 w/v%塩化ナトリウム

水溶液 10 mL で容器を洗浄して分液漏斗 A に入れる操作を 2 回繰り返す。分液漏斗 A に 10 w/v%塩化ナトリウム水溶液 80 mL 及びジエチルエーテル 50 mL を加えて 5 分間振り混ぜた後、水層を別の分液漏斗 B に入れる。

分液漏斗 B に硫酸 (1+17) 5 mL を加えて pH が 5 以下であることを確認する。ジエチルエーテル 50 mL を加えて 5 分間振り混ぜた後、水層を別の分液漏斗 C に入れる。ジエチルエーテル層を分取し、三角フラスコに入れる。分液漏斗 C にジエチルエーテル 50 mL を加えて同様に操作し、ジエチルエーテル層を先の三角フラスコにあわせる。三角フラスコに適量の無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した後、ろ過 (5 種 B) する。ろ液を 40°C 以下の水浴上でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。メタノール 1 mL を加えて残留物を溶かし、0.1 w/v%炭酸水素ナトリウム水溶液 9 mL を加えて混合する。

(c) ミニカラムによる精製①

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの下にトリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムを連結し、予めメタノール 5 mL 及び水 5 mL で順次洗浄する。(b)項で得られた試料溶液をオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムに負荷し、更に 0.1 w/v%炭酸水素ナトリウム水溶液-メタノール (9+1) 5 mL で容器を洗浄してオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムに負荷する操作を 2 回繰り返す。流下した後に空気を圧注する。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを取り外し、トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムにメタノール 10 mL を加え、流下した後に空気を圧注する。

トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムの下に、予めアセトニトリル 5 mL 及び塩酸 (1+100) 5 mL で順次洗浄したジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムを連結し、トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムに塩酸 (1+100) 30 mL を加え、流下させる。

トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムを取り外し、ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムに塩酸 (1+100)-アセトニトリル (9+1) 5 mL を加え、流下した後に空気を圧注する。同様に水 5 mL を加え流下した後に空気を圧注し、窒素ガスで通気乾燥する。

ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムの下に脱水用ミニカラム (6 mL 容のフリット付きリザーバーに無水硫酸ナトリウム 5~6 g を充てんし、上部にフリットをかぶせたもの。) を連結し、酢酸エチル 20 mL をジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムに加

えてクロピラリドを溶出させる。40℃以下の水浴上でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。メタノール 1 mL を加えて残留物を溶かす。

(d) メチルエステル化

(c)項で得られた試料溶液に、トリメチルシリルジアゾメタン溶液 150 μL を加えて 30 分間放置しメチルエステル化を行う。40℃以下の水浴上でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。ヘキサン 4 mL を加えて残留物を溶かす。

(e) ミニカラムによる精製②

(d)項で得られた試料溶液を、予めヘキサン 5 mL で洗浄したシリカゲルミニカラムに負荷し、更にヘキサン 4 mL で容器を洗浄してシリカゲルミニカラムに負荷する操作を 2 回繰り返す。ヘキサノージエチルエーテル(19+1) 25 mL をシリカゲルミニカラムに加えて、クロピラリド誘導体を溶出させる。

溶出液にアセトノージエチレングリコール (49+1) 0.2 mL を加えて、40℃以下の水浴上でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

ヘキサン 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、GC/MS による定量に供する最終溶液とする。

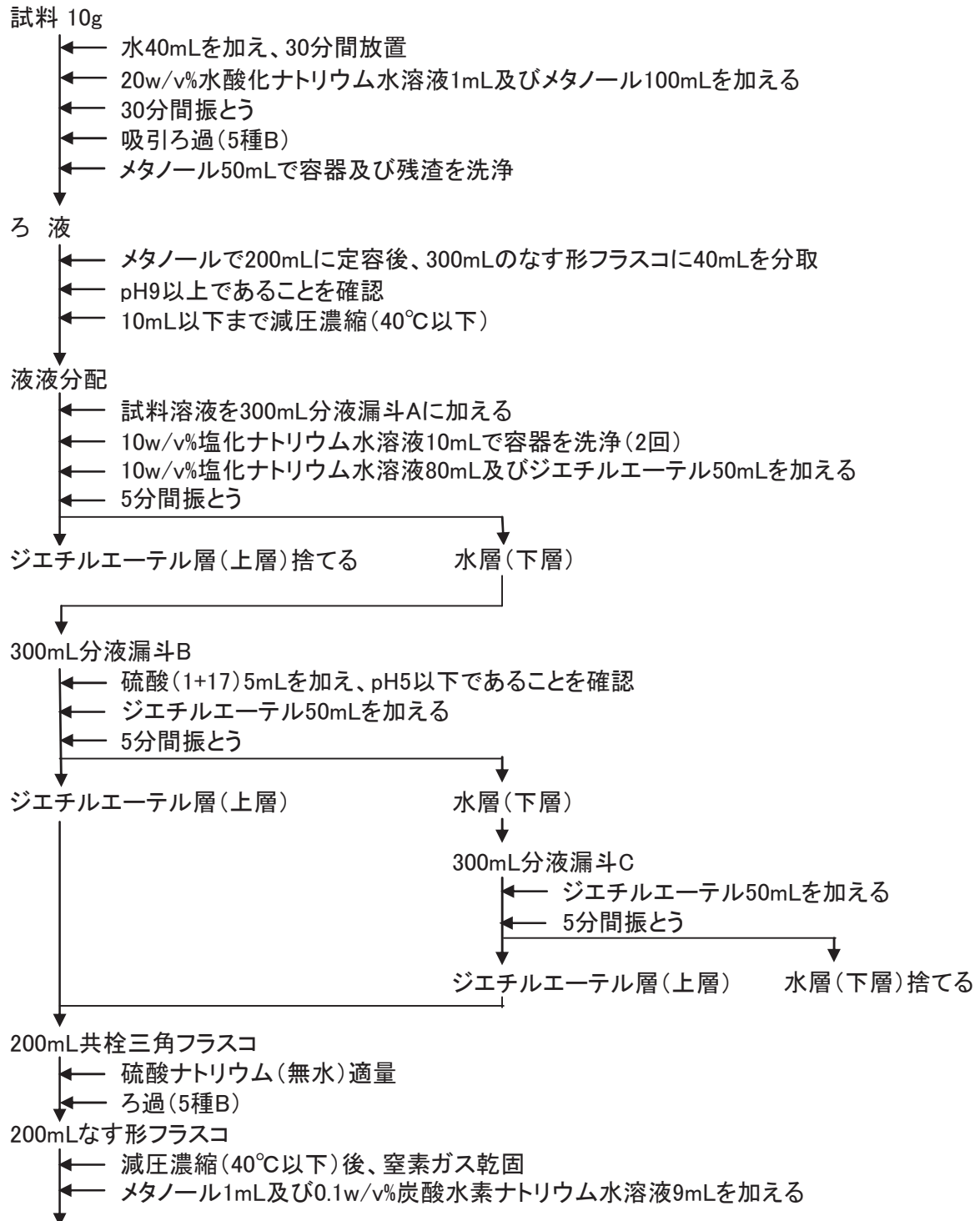
(f) GC/MS による定量

(e)項で得られた最終溶液 1 μL を、前述の条件の GC/MS に注入する。クロピラリド誘導体のピーク面積を測定し、あらかじめ作成した検量線よりクロピラリドの重量を求め、残留量を次式より算出する。

$$\text{残留量 (mg/kg)} = \frac{\text{クロピラリドの検出量 (ng)} \times \text{最終液量 (mL)} \times 5}{\text{注入量 (}\mu\text{L)} \times \text{試料量 (g)}}$$

定量下限：試料中 0.01 mg/kg (3. において、負化学イオン化 (NCI) 法を用いた場合)

飼料分析法 フローシート



ミニカラム処理 I

- ← Supelclean LC-18ミニカラムの下にMega Bond Elut SAXミニカラムを連結する
- ← メタノール5mL及び水5mLで順次コンディショニング
- ← 試料溶液を負荷(流下速度1mL/min以下)
- ← 容器を0.1w/v%炭酸水素ナトリウム水溶液-メタノール(9+1)5mLで洗浄・負荷(2回)
- ← 流下後、空気を圧注
- ← Supelclean LC-18ミニカラムを取り外す
- ← Mega Bond Elut SAXミニカラムをメタノール10mLで洗浄(流下速度2mL/min以下)
- ← 流下後、空気を圧注
- ← Mega Bond Elut SAXミニカラムの下にOasis HLBミニカラム(アセトニトリル5mL及び塩酸(1+100)5mLで順次コンディショニングしたもの)を連結する
- ← 塩酸(1+100)30mLを加え、クロピラリドをMega Bond Elut SAXミニカラムからOasis HLBミニカラムに移動させる(流下速度2mL/min以下)
- ← Mega Bond Elut SAXミニカラムを取り外す
- ← Oasis HLBミニカラムを塩酸(1+100)-アセトニトリル(9+1)5mLで洗浄(流下速度2mL/min以下)
- ← 流下後、空気を圧注
- ← 水5mLで洗浄(流下速度10mL/min以下)
- ← 流下後、空気を圧注
- ← Oasis HLBミニカラムに窒素ガスを通じて約1分間乾燥
- ← Oasis HLBミニカラムの下に脱水用ミニカラムを連結する
- ← 酢酸エチル20mLを加えクロピラリドを溶出(流下速度1mL/min以下)
- ← 減圧濃縮(40°C以下)後、窒素ガス乾固
- ← メタノール1mLで溶解

メチルエステル化

- ← トリメチルシリルジアゾメタン溶液150 μ Lを加える
- ← 栓をした後、室温で30分間放置
- ← 減圧濃縮(40°C以下)後、窒素ガス乾固
- ← ヘキサン4mLで溶解

ミニカラム処理 II

- ← Sep-Pak Plus Silicaミニカラムをヘキサン5mLでコンディショニング
- ← 試料溶液を負荷
- ← 容器をヘキサン4mLで洗浄・負荷(2回)
- ← ヘキサン-ジエチルエーテル(19+1)25mLでクロピラリド誘導体を溶出
- ← アセトン-ジエチレングリコール(49+1)0.2mLを加える
- ← 減圧濃縮(40°C以下)後、窒素ガス乾固
- ← ヘキサン2mLで溶解

最終溶液

↓
GC/MS

6. 検討資料

【共同試験】

2種類の乾牧草にクロピラリドとして 50 µg/kg 相当量を添加した試料を用いて、10 試験室で共同分析を実施した。その結果、平均回収率は 104~105 % であり、室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD_r 及び RSD_R) として 6.3~8.7 % 及び 10~14 % であり、HorRat は 0.47~0.62 であった。

試料の種類	試験室数	添加濃度 (µg/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
フェスクストロー	10	50	104	8.7	14	0.62
ライグラスストロー	10	50	105	6.3	10	0.47

【定量下限及び検出下限の検討】

本法の定量下限及び検出下限を確認するため、2種類の乾牧草にクロピラリドとして 10 µg/kg 相当量を添加した試料を用いて、本法を用いて定量し、得られたピークの SN 比を求めた。その結果、得られたピークの SN 比が 10 となる濃度は 10 µg/kg であったことから、定量下限は 10 µg/kg と考えられた。なお、その平均回収率は 82.4~106 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 17.8 % 以下であった。また、検出下限は SN 比が 3 となる濃度から 3 µg/kg と見積もられた。

B. 作物残留分析法マニュアル

1. 特徴

本分析法は、LC/MS/MS を用いた作物残留分析法である。試料に残留するクロピラリドを塩基性下メタノール抽出し、酸性と塩基性で HLB カラムにおける溶出挙動が変わることを利用して精製し、LC/MS/MS で定量する。

この分析法によって、かぶ（根、葉）、キャベツ、こまつな、ブロッコリー、レタス及びほうれんそうにおいて良好に分析できることが確認されている。

なお、定量限界は 0.01 ppm、検出限界は 0.005 ppm である。

2. 試薬および機器

クロピラリド標準品

アセトニトリル、アセトン、メタノール：残留農薬試験用

25%アンモニア水、塩酸：精密分析用

ギ酸、水酸化ナトリウム：特級

カートリッジカラム：Oasis HLB 6cc(200mg)

GFP ろ紙：GFP 60 mmφ

シリンジフィルター：クロマトディスク 水系／非水系 0.45μm 13P

フードプロセッサ

ホモジナイザー（100mL カップ型）

吸引ろ過装置

真空ポンプ

吸引マニホールド

純水製造装置

天秤

ロータリーエバポレーター

LC/MS/MS

3. 機器の条件

カラム：Atlantis dC18(内径 2.1 mm 長さ 150 mm 粒子径 3μm)

ガードカラム：Atlantis dC18 Guard Column(内径 2.1 mm 長さ 20 mm 粒子径 3μm)

カラム温度：25℃

移動相：A アセトニトリル、B 0.1% ギ酸水溶液

グラジエント：10%A(0.5 min) →(8.5 min) →70%A →(4 min) →95%A(5 min)

流 速 : 0.2 mL/min

注 入 量 : 5 μ L

MS/MS 条件 : イオン化法:ESI、キャピラリー電圧:2.80 kV、コーン電圧:20 V、コリジョンエネルギー:10 eV、ソース温度:110 $^{\circ}$ C、デソルベーション温度:300 $^{\circ}$ C、モニターイオン:189.90 \rightarrow 146.00

保 持 時 間 : 9 min

4. 検量線の作成

クロピラリド標品の 1000 mg/L アセトニトリル溶液を調製する。この溶液をアセトニトリルで希釈し、検量線用標準溶液(0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20mg/L)を調製する。これらの標準溶液各 5 μ L を前述の条件の LC/MS/MS に注入し、クロピラリドのピーク面積を測定する。ピーク面積を縦軸に、重量を横軸に取り、最小二乗法により検量線を作成する。

5. 分析操作

(a) 抽出

フードプロセッサーにて磨砕均質化した試料 10 g を秤取し、(添加回収試験の場合はクロピラリド標品のアセトン溶液を加え、)1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液を約 1 mL、メタノールを 100 mL 加え、カップ型ホモジナイザーで 5 分間混合して抽出する。内容物を GFP ろ紙で吸引ろ過し、残渣をメタノール 50 mL で洗浄・ろ過してろ液を合わせる。残渣に再度メタノールを 100 mL 加えて同様の操作を繰り返し、それぞれのろ液を合わせてメタノールを留去する。

(b) カートリッジカラム (Oasis HLB) による精製 1

(a)項で得られた濃縮液を、予めメタノール 5 mL 及び蒸留水 5 mL で順次洗浄した HLB カラムに負荷する。更に 0.01 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液/メタノール(5:5) 約 5 mL で容器を洗浄してカラムに負荷する操作を 2 回繰り返す。これらの溶出液を捕集し、メタノールを留去する。なお、カートリッジカラムの洗浄および抽出は、真空ポンプを繋いだ吸引マニホールドを用い、滴下速度は調整せず、速やかに行う((c)項も同様)。

(c) カートリッジカラム (Oasis HLB) による精製 2

(b)項で得られた濃縮液に 1 mol/L 塩酸 3 mL を加えた後、予めアセトニトリル 5 mL 及び 0.1 mol/L 塩酸 5 mL で順次洗浄した HLB カラムに負荷する。更に 0.1 mol/L 塩酸 約 5 mL で容器を洗浄してカラムに負荷する操作を 2 回繰り返す。

返す。次に 0.1 mol/L 塩酸／アセトニトリル(9:1) 5 mL、蒸留水 5 mL を順次カラムに負荷し、これまでの溶出液は廃棄する。次に 0.0025%アンモニア水／アセトニトリル(9:1) 2 mL (ブロッコリーの場合は 3mL) でクロピラリドを溶出させ、5 mL メスフラスコにて溶出液を捕集する。これに LC/MS/MS の移動相の初期条件である 0.1%ギ酸水溶液／アセトニトリル(9:1)を加え、5 mL に定容する。

(d) LC/MS/MS による定量

(c)項で得られた最終溶液をシリンジフィルターに通した後、前述の条件の LC/MS/MS に注入する。ピーク面積を測定し、あらかじめ作成した検量線よりクロピラリドの重量を求め、残留量を次式より算出する。

$$\text{残留量}(\mu\text{g/g}) = \frac{\text{クロピラリドの検出量 (ng)} \times \text{最終液量 (mL)}}{\text{注入量}(\mu\text{L}) \times \text{試料量 (g)}}$$

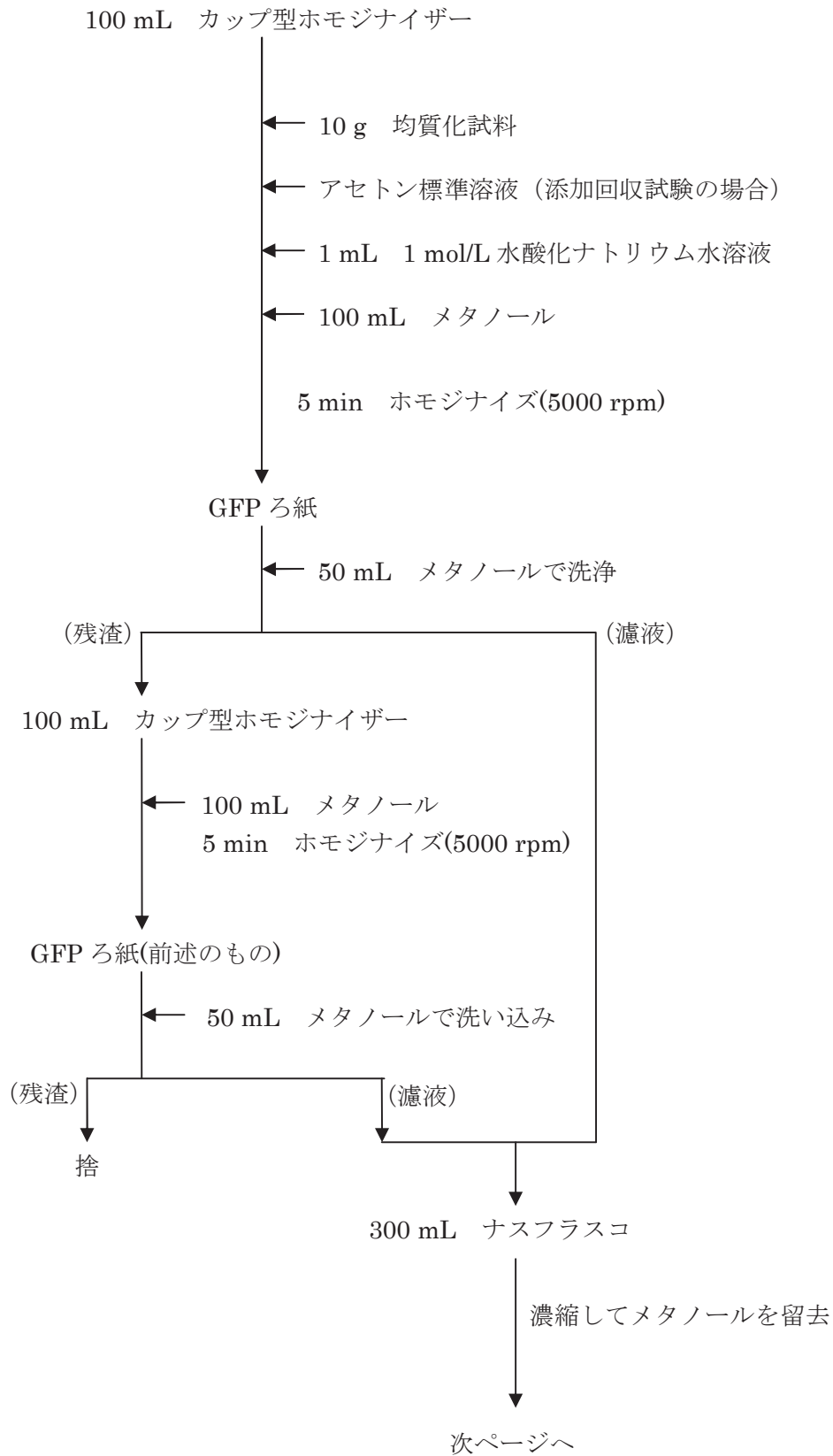
(e) 定量限界および検出限界

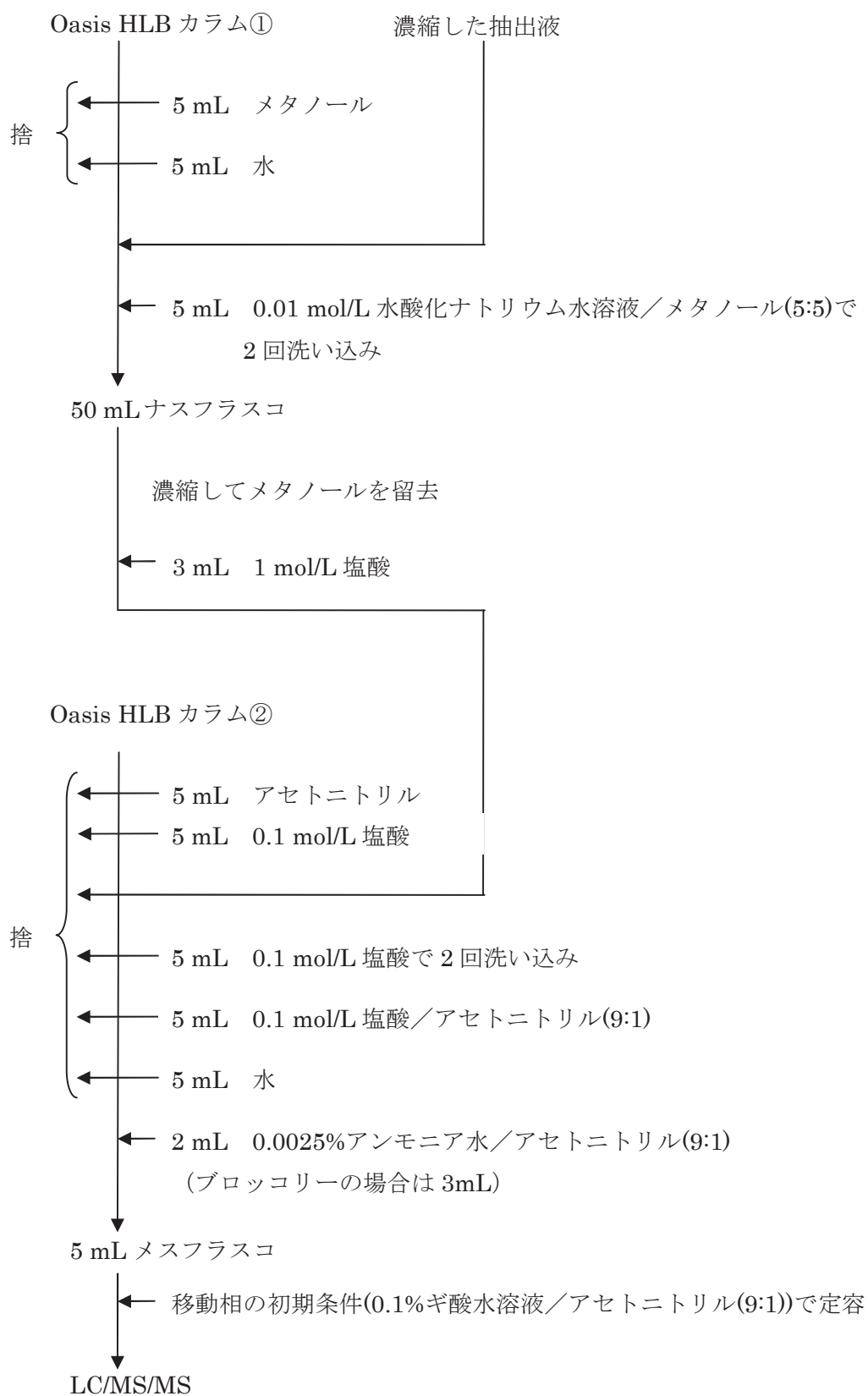
添加回収試験から最小定量可能量を 0.1 ng、検量線溶液の最低濃度から最小検出量を 0.05 ng とした。試料量を 10 g、最終液量を 5 mL、注入量を 5 μL とすると定量限界は 0.01 ppm、検出限界は 0.005 ppm となる。

$$\text{定量限界} = \frac{\text{最小定量可能量 (0.1 ng)} \times \text{最終液量 (5 mL)}}{\text{注入量 (5 } \mu\text{L)} \times \text{試料量 (10 g)}} = 0.01 \text{ ppm}$$

$$\text{検出限界} = \frac{\text{最小検出量 (0.05 ng)} \times \text{最終液量 (5 mL)}}{\text{注入量 (5 } \mu\text{L)} \times \text{試料量 (10 g)}} = 0.005 \text{ ppm}$$

クロピラリド残留分析試験 前処理法フローシート





6. 前処理法の検討資料

【カラム溶出試験】

ケムエルトや、ENVI-Carb では、十分な回収率が得られなかったが、Oasis HLB を用いて約 100%の回収率を得ることができた。

回収率	カラム	抽出溶媒
約25%	ケムエルト	酸性下アセトン抽出→濃縮液を負荷→10分放置→酢酸エチル300mL
約0%	ENVI-Carb	酢酸エチル20mL
約0%	ENVI-Carb	アセトン20mL
約0%	ENVI-Carb	ジクロロメタン20mL
約60～70%	Oasis HLB	ジクロロメタン10mL
約80%	Oasis HLB	酢酸エチル5mL
約90%	Oasis HLB	0.0025%アンモニア水/アセトニトリル(95:5、85:15、80:20)2mL
約100%	Oasis HLB	0.0025%アンモニア水/アセトニトリル(90:10)2mL

→最下段の方法を、「HLB アンモニア溶出」とする。

※ なお、ブロッコリーを用いた添加回収試験では、他の作物に比べて回収率が低かった。そこで、HLB アンモニア溶出における 0.0025%アンモニア水/アセトニトリル(9:1)の量を 2 mL から 3 mL にしたところ、回収率が改善された。他の作物では、3 mL での溶出は試みていない。

【作物抽出試験】

<<酸性化アセトン抽出>>

酸性下アセトン抽出では、濃縮した濾液に残渣が残り、クロピラリドを精製できなかった。

また、ジエチルエーテル/水液々分配を試みたが、残渣を除去することはできなかった。

回収率	カラム	精製の条件
約10～40%	Oasis HLB	濃縮濾液をHLBアンモニア溶出
約40%	Oasis HLB	標準溶液を窒素乾固し、濃縮濾液に溶かしてHLBアンモニア溶出
×	Oasis HLB	濃縮濾液をジエチルエーテル/水液液分配後、濃縮してHLBアンモニア溶出

<<塩基性下メタノール抽出>>

塩基性下メタノール抽出に変更し、Oasis HLB カラムを 2 本用いることで、濃縮濾液の残渣を除去し、精製することができた。

なお、添加回収試験において添加用標準溶液をアセトニトリル溶液にすると、有機溶媒を留去する際、アセトニトリルが残ってしまうためか回収率が悪かったが、アセトン溶液にすることで改善がみられた。

回収率	カラム	精製の条件
残渣が詰まった	C18ミニカラム	0.1%炭酸水素ナトリウム水溶液/メタノール(9:1)5mLで溶出
約50%	Oasis HLB	0.01mol/L水酸化ナトリウム水溶液/メタノール(1:9, 9:1)5mLで溶出後、1mol/L塩酸3mLを加えHLBアンモニア溶出
約75%	Oasis HLB	0.01mol/L水酸化ナトリウム水溶液/メタノール(5:5)5mLで溶出後、1mol/L塩酸3mLを加えHLBアンモニア溶出
約90~95%	Oasis HLB	標準溶液の溶媒を アセトニトリルからアセトンに変更し 、0.01mol/L水酸化ナトリウム水溶液/メタノール(5:5)5mLで溶出後、1mol/L塩酸3mLを加えHLBアンモニア溶出

→最下段の方法を、クロピラリド残留分析試験の前処理法として採用した。

【参考試料：クロピラリドの暫定基準値】

食品名	基準値:ppm (暫定基準)	食品名	基準値:ppm (暫定基準)	食品名	基準値:ppm (暫定基準)
米(玄米)	2	ねぎ(リーキを含む)		マルメロ	
小麦	2	にんにく		びわ	
大麦	2	にら		もも	0.5
ライ麦	2	アスパラガス	1	ネクタリン	0.5
とうもろこし	2	わけぎ		あんず(アブリコットを含む)	0.5
そば	2	その他のゆり科野菜		すもも(ブルーンを含む)	0.5
その他の穀類	2	にんじん		うめ	
大豆		パースニップ		おうとう(チェリーを含む)	0.5
小豆類		パセリ		いちご	1
えんどう		セロリ		ラズベリー	
そら豆		みつば		ブラックベリー	
らつかせい		その他のせり科野菜		ブルーベリー	
その他の豆類		トマト		クランベリー	4
ばれいしよ		ピーマン		ハuckleベリー	
さといも類(やつがしらを含む)		なす		その他のベリー類果実	
かんしょ		その他のなす科野菜		ぶどう	
やまいも(長いものをいう)		きゅうり		かき	
こんにやくいも		(ガーキンを含む)		バナナ	
その他のいも類		かぼちや		キウイ	
てんさい	2	(スカッシュを含む)		パパイヤ	
さとうきび		しろり		アボカド	
だいこん類 (ラディッシュを含む)の根		すいか		パイナップル	
だいこん類 (ラディッシュを含む)の葉		メロン類果実		グアバ	
かぶ類の根	1	まくわうり		マンゴー	
かぶ類の葉	4	その他のうり科野菜		パッションフルーツ	
西洋わさび		ほうれんそう	5	なつめやし	
クレソン		たけのこ		その他の果実	
はくさい	2	オクラ		ひまわりの種子	
キャベツ	2	しょうが		ごまの種子	
芽キャベツ	2	未成熟えんどう		べにばなの種子	
ケール		未成熟いんげん		綿実	
こまつな		えだまめ		なたね	2
きょうな		マッシュルーム		その他のオイルシード	2
チンゲンサイ	1	しいたけ		ぎんなん	
カリフラワー	2	その他のきのこ類		くり	
ブロッコリー	2	その他の野菜	4	ペカン	
その他のあぶらな科野菜	5	みかん		アーモンド	
ごぼう		なつみかん		くるみ	
サルシフィー		なつみかんの外果皮		その他のナッツ類	
アーティチョーク		なつみかんの果実全体		茶	
チコリ		レモン		コーヒー豆	
エンダイブ		オレンジ (ネーブルオレンジを含む)		カカオ豆	
しゆんぎく		グレープフルーツ		ホップ	5
レタス (サラダ菜及びちしやを含む)		ライム		サンショウの果実	
その他のきく科野菜		その他のかんきつ類果実		みかんの果皮	
たまねぎ		りんご		その他のスパイス	4
		日本なし		スペアミント	
		西洋なし		ペパーミント	
				その他のハーブ	5

注1) 記載のない作物には一律基準(0.01ppm)が適用されます。

注2) 基準値は、平成21年2月現在のものであり、今後改正される場合があります。

C. 堆肥残留分析法マニュアル

1. 特徴

本分析法は、LC/MS/MS を用いた堆肥残留分析法である。試料中のクロピラリドを、アルカリ性下で水抽出を行ない、クロピラリドが pH に依存して溶出挙動が変化することを利用して抽出・精製を行ない、LC/MS/MS により測定する方法である。また堆肥の他に、高水分の飼料にも適用可能である。

2. 試薬および機器

クロピラリド標準品

アセトニトリル、メタノール : 残留農薬試験用

25%アンモニア水、塩酸 : 精密分析用

ギ酸 : LC/MS 用

水酸化ナトリウム : 特級

ホモジナイザーまたはミキサー : 理科学用または家庭用

吸引ろ過装置

セライト

カートリッジカラム : Sep-Pack C18

pH メーター

シリンジフィルター : クロマトディスク水系／非水系 0.45 μ m
13P

純水製造装置

天秤

ロータリーエバポレーター

LC/MS/MS

3. 機器の条件

カラム : ODS 系カラム

例 Waters X-bridge (内径 2.1 mm 長さ 150 mm 粒子径 3 μ m)

カラム温度 : 40 °C

移動相 : A アセトニトリル、B 0.1% ギ酸水溶液

グラジエント : 15%A(0 min) → 15%A(5 min) → 80%A(10 min) → 15%A(15 min)

流速 : 0.2 mL/min

注入量 : 5 μ L

MS/MS 条件 : イオン化法 ESI⁺ (ESIでも測定可)、キャピラリー電圧:3.5 kV、コーン電圧:18 V、コリジョンエネルギー:13 eV、モニ

ターイオン：192.0 → 146.00

保持時間：4 min

4. 検量線の作成

クロピラリド標品の 1000 mg/L アセトニトリル溶液を調製する。この溶液をアセトニトリルで希釈し、0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 mg/L 標準溶液を調製する。これらの標準溶液各 5 μ L を前述の条件の LC/MS/MS に注入し、クロピラリドのピーク面積を測定する。ピーク面積を縦軸に、重量を横軸に取り、最小二乗法により検量線を作成する。

5. 分析操作

(1) 抽出

堆肥（高水分飼料）試料 10g を秤量し、ホモジナイザー（ミキサー）内に精製水 100mL で流し込む。軽くホモジナイズした後に、1mol L⁻¹ 水酸化ナトリウム水溶液で pH を 10 に調製する。その後、さらにホモジナイズし、16hr 放置する。ろ紙（No5B）にセライトを敷きろ過する。残渣に、精製水 100mL を加えて抽出を行なう（合計 3 回）。すべてのろ液をあわせて分液ロートへ移す。2N-塩酸で抽出液を pH2 にする。その後、酢酸エチル 150mL で抽出する（3 回）。すべての有機層を合わせて、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルを濃縮する。

(2) カートリッジカラム（Sep-Pack C18）による精製

(1)項で得られた濃縮液を、予めメタノール 5mL、0.01 mol L⁻¹ 塩酸で順次コンデューションを行なった Sep-Pack C18 に負荷する。0.01 mol L⁻¹ 塩酸 5mL で洗浄後、50%メタノール水溶液 5mL で溶出する。

(3) LC/MS/MS による定量

(2)項で得られた最終溶液をシリンジフィルターに通した後、前述の条件の LC/MS/MS に注入する。ピーク面積を測定し、あらかじめ作成した検量線よりクロピラリドの重量を求め、残留量を次式より算出する。

$$\text{残留量}(\mu\text{g/g}) = \frac{\text{クロピラリドの検出量 (ng)} \times \text{最終液量 (mL)}}{\text{注入量}(\mu\text{L}) \times \text{試料量 (g)}}$$

6. 検討資料

(1) 抽出溶媒の検討

堆肥中のクロピラリドは、標準品での添加回収実験での回収率が良好であっても、実際には抽出不完全が疑われる条件があった（表 1）。この中から、アルカリ性下水抽出が適当であると判断した。

表 1. 堆肥中クロピラリドの抽出溶媒の検討

抽出溶媒	液性	添加回収実験での回収率(%)	堆肥中濃度($\mu\text{g}/\text{kg}$)
メタノール	未調整	80	N.D.
アセトン	アルカリ性	33	20
メタノール	酸性	50	-
水	アルカリ性	80	57

※1: 堆肥は、クロピラリド混入が認められているものを使用して、抽出・定量行なった。

※2: N.D.は検出せず

(2)抽出溶媒と定量方法の妥当性の検証

抽出溶媒と定量方法の妥当性の検証するため、クロピラリドが混入している堆肥を使用して、生物検定法{サヤエンドウを用いた生物検定法マニュアル(マニュアルIA)}と本定量法(堆肥分析法マニュアル)を比較し検証を行なった。

まず、生物検定法により堆肥中のクロピラリドの濃度の推定を行なった結果、サヤエンドウにクロピラリドの特徴的な障害が認められ、障害指数からクロピラリドの濃度を推定したところ、 $80\mu\text{g}/\text{kg}$ であった(図1)。次に、同じ堆肥を本定量法で定量を行なった結果、定量値は、 73ppb ($n=4$, $\text{SE}=3.9$)であった。また、この堆肥には、他の除草剤(ピクロラム、アミノピラリド)の混入は認められていない。

両者の数値はほぼ一致していた。したがって、本定量法(堆肥分析法マニュアル)は、生物活性と比較して同程度であるため、妥当な定量法であると考えた。

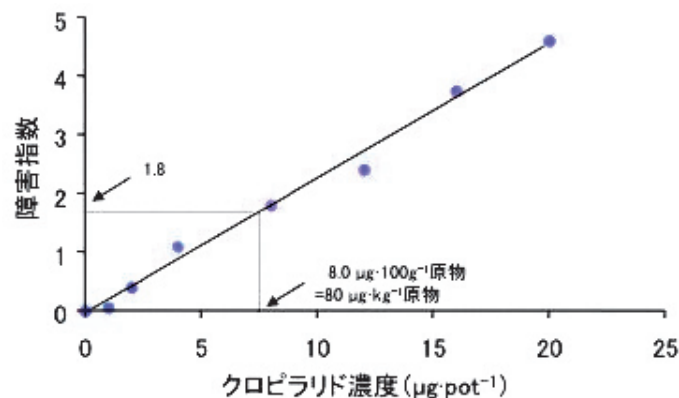


図 1. 生物検定によるクロピラリド混入堆肥中クロピラリドの濃度推定

おわりに

クロピラリドによる作物の異常生育は、日本で使用されていない除草剤に起因する被害であり、極めて異例のことといえます。

幸い、現在のクロピラリドの濃度では人体や家畜への被害は認められないものの、園芸作物への被害が出たことによって、この事態に迅速に対応し、科学的データを集約した本マニュアルは、クロピラリド被害解決に寄与すると思っています。参考となれば幸いです。

参考資料

- 関連情報取得のためのリンク集 (2009.1.21 確認)

Washington State University

<http://www.puyallup.wsu.edu/soilmgmt/Clopyralid.htm>

Dow AgroSciences

<http://www.dowagro.com/usag/prod/index.htm>

Washington State Department of Agriculture

<http://csanr.wsu.edu/whatsnew/PNW-v2-n4.pdf>

BioCycle Journal of Composting & Organics Recycling

<http://www.biocycle.net/BCArticles/2001/070125.html>

<http://www.biocycle.net/BCArticles/2001/070132.html>

<http://www.biocycle.net/BCArticles/2001/1201661.html>

<http://www.biocycle.net/BCArticles/2002/020251.html>

<http://www.biocycle.net/BCArticles/2002/020257.html>

<http://www.jgpress.com/BCArticles/2003/020328B.html>

<http://www.jgpress.com/BCArticles/2003/020330B.html>

Weed Control Methods Handbook

<http://tncinvasives.ucdavis.edu/products/handbook/11.Clopyralid.pdf>

Clopyralid Sampling & Testing Report

<http://www.metrokc.gov/dnrp/swd/composting/documents/KCSPUClopyralidTestingReport.pdf>

Extension Fact Sheet

Clopyralid and Other Pesticides in Composts

<http://ohioline.osu.edu/aex-fact/pdf/0714.pdf>

Herbicide Persistence in Finished Compost Products:

A Case Study from Penn State.

<http://www.abe.psu.edu/extension/ompec/ICSpaper.pdf>

Oregon Department of Environmental Quality Oregon Department of h
<http://www.deq.state.or.us/lq/sw/compost/clopyralids.html>lids.htvvironmental ity
<http://www.deq.state.or.us/lq/pubs/docs/sw/compost/ClopyralidStudy.pdf>

The University of New South Wales Australia
Persistent Herbicides Risk Management Program
<http://www.recycledorganics.com/publications/reports/riskmgtprog/persistherbRMP.pdf>

Agrichemical and Environmental News
<http://aenews.wsu.edu/Oct00AENews/Oct00AENews.htm#anchor5301120>

Minnesota Crop eNews
<http://www.extension.umn.edu/cropenews/2005/pdfs/05MNCN43.pdf>

PAN Pesticides Database - California Pesticide Use
http://www.pesticideinfo.org/Search_Use.jsp - Field%20Crops

Composting News
<http://www.recycle.cc/2004-0225clopyralid.htm>
<http://www.woodsend.org/pdf-files/2003CNSeptemberClopyralid.pdf>
<http://www.woodsend.org/pdf-files/mcentee.pdf>

Others
http://www.pesticideinfo.org/Detail_ChemReg.jsp?Rec_Id=PC36017#ChemReg
http://www.pesticideinfo.org/List_Products.jsp?Rec_Id=PC36017&Chem_Name=Clopyralid&PC_Code=117403&ProdStatus=Active%2CInactive&offset=0

研究担当者

(独) 農研機構 畜産草地研究所

羽賀清典

鈴木一好

須藤まどか

上垣隆一 (2007.4～)

江波戸宗大

(独) 農業環境技術研究所

上垣隆一 (～2007.3)

長野県中信農業試験場 畑作栽培部

重盛 勲

佐藤 強

愛知県農業総合試験場 畜産研究部

加藤泰之 (～2007.3)

石井憲一 (2007.4～2008.3)

野田賢治 (2008.4～)

近藤 一 (～2007.3)

原田英雄 (2007.4～)

増田達明

中谷 洋

愛知県農業総合試験場 園芸研究部

小出隆子

愛知県農業総合試験場 東三河農研

加藤博美 (～2007.3)

近藤満治 (2007.4～2008.3)

野村浩二 (2008.4～)

(独) 肥飼料検査所 (～2007.3)

(独) 農林水産消費安全技術センター 肥飼料安全検査部 (2007.4～)

菅野 清(～2007.3)

早川俊明(2007.4～)

野崎友春（2007.4～2008.3）

小野雄造（2008.4～）

（独）農薬検査所（～2007.3）

（独）農林水産消費安全技術センター農薬検査部（2007.4～）

山下幸夫

池長 宙（2007.4～）

<乳牛飼養試験協力>

長野県畜産試験場 酪農部

群馬県畜産試験場 牛飼養技術グループ

千葉県畜産総合研究センター 生産技術部乳牛研究室

栃木県酪農試験場 酪農技術部 飼養技術研究室

愛知県農業総合試験場 畜産研究部 牛グループ

東京都農林総合研究センター 生産技術科

山梨県酪農試験場 乳肉用牛科

新潟県農業総合研究所畜産研究センター 酪農肉牛科

付録 DVD 目次

1. 画像データライブラリー 愛知県

- (1) ウリ科 (スイカ、トウガン、ニガウリ、メロン)
- (2) キク科 (ゴボウ、シュンギク、フキ)
- (3) セリ科 (セルリー、ミツバ)
- (4) ナス科 (タバコ、トマト)
- (5) マメ科 (インゲン、ササゲ、ソラマメ、ラッカセイ)
- (6) その他 (ツルムラサキ、ヒユナ、モロヘイヤ)
- (7) 花き (スイートピー、ヒマワリ、スプレーギク、輪ギク)

2. 画像データライブラリー 長野県

- (1) ウリ科 (キュウリ、スイカ、メロン)
- (2) キク科 (エンダイブ、ゴボウ、サラダ菜、ステムレタス、チマサンチュ、トレビス、ロメインレタス、結球レタス)
- (3) セリ科 (パセリ、イタリアンパセリ、セルリー、ニンジン)
- (4) ナス科 (ピーマン、シシトウ、トマト、ナス、バレイショ)
- (5) マメ科 (インゲン、クローバー、サヤエンドウ、ソラマメ、アズキ、ダイズ、ラッカセイ)
- (6) 花き (アスター、コスモス、ヒマワリ、ペチュニア、ベニバナ、マリーゴールド、ルピナス、ヒヤクニチソウ、輪ギク)

3. 生物検定ワークシート.xls

生物検定ワークシート.xls

判 定 例								
品種		播種日	判定日	期間				
あずみ野30日		9/1	9/19	18				
		結果						
NO.	サンプル名	第1葉	第2葉	第3葉	第4葉	第5葉	指数	判定
1					0.5	1	0.4	疑い
2					1	2	0.8	残留
3				0.5	1	3	1.3	高濃度
4			0.5	1	2	3	2.4	超高濃度
5			0.5	2	3	4	3.6	超高濃度

品種		播種日	判定日	期間				
				0				
		結果						
NO.	サンプル名	第1葉	第2葉	第3葉	第4葉	第5葉	指数	判定
1							0	残留なし
2							0	残留なし
3							0	残留なし
4							0	残留なし
5							0	残留なし
6							0	残留なし
7							0	残留なし
8							0	残留なし
9							0	残留なし
10							0	残留なし
11							0	残留なし
12							0	残留なし
13							0	残留なし
14							0	残留なし
15							0	残留なし
16							0	残留なし
17							0	残留なし
18							0	残留なし
19							0	残留なし
20							0	残留なし
21							0	残留なし
22							0	残留なし
23							0	残留なし
24							0	残留なし
25							0	残留なし

資料の取扱について

本資料掲載の研究成果等については、未公開のものもあるので、複製、転載及び引用の際は、必ず原著者の了承を得たうえで利用されたい。

飼料及び堆肥に残留する除草剤の簡易判定法と被害軽減対策マニュアル

編集・発行 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
畜産草地研究所 企画管理部 業務推進室

〒305-0901 茨城県つくば市池の台2

発行日 平成21年3月

印刷所 筑波印刷情報サービスセンター協同組合

本資料に関する問合せ先（平成29年1月より）

農研機構畜産研究部門 企画管理部 企画連携室

お問い合わせの際は、農研機構ウェブサイトの「お問い合わせ」フォームをご利用ください。

<https://www.naro.affrc.go.jp/inquiry/index.html>