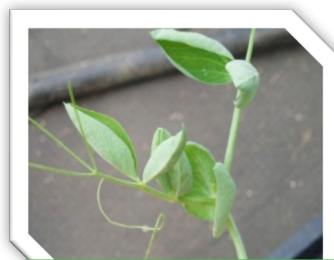


飼料及び堆肥に残留する除草剤(クロピラリド)の 簡易判定法と被害軽減対策マニュアル (第2版)



トマトの葉と果実の障害



サヤエンドウの葉の障害



キクの頂芽の変形



ヒヤクニチソウの花の障害

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構
農業環境変動研究センター
中央農業研究センター
畜産研究部門
野菜花き研究部門
宮崎県総合農業試験場



2020年11月

本マニュアルは、2009年に発行した初版「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」(独)農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所、長野県中信農業試験場、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、(独)農業環境技術研究所編の改訂版です。

改訂履歴

2009 年 3 月 「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」初版〔(独) 農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所、長野県中信農業試験場、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、(独) 農業環境技術研究所〕発行

2020 年 11 月 「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」第2版〔国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構農業環境変動研究センター、中央農業研究センター、畜産研究部門、野菜花き研究部門、宮崎県総合農業試験場〕発行

主な変更点

- ・ P. 4 クロピラリドの土壌中半減期の実測値を追加
- ・ P. 6 一部の作物のクロピラリドに対する耐性を変更（ナス、キク等）
- ・ P. 7～9 農林水産省 7 課長通知「牛等の排せつ物に由来する堆肥中のクロピラリドが原因と疑われる園芸作物等の生育障害の発生への対応について」（平成 30 年 7 月 20 日改正）の発出に伴い、「堆肥施用可・不可のフローシート」を「クロピラリドによる生育障害を回避するための堆肥の活用フローチャート」へ変更するとともに、それに伴い内容を変更
- ・ P. 32～38 堆肥を利用する耕種農家が行うことの内容を変更。
- ・ P. 45 野菜・花きの初期生育に及ぼす影響・データ集に関する説明の追加
- ・ P. 47～50 堆肥を生産する畜産農家などが行うことの内容を変更
- ・ P. 72～76 堆肥残留分析法（2）の追加
- ・ P. 77～78 関連情報取得のためのリンク集の変更

免責事項

本マニュアルは発行時点での情報に基づいて作成しています。農研機構および宮崎県総合農業試験場は、本マニュアルに掲載された情報をご利用になったことにより損害が生じても、一切の責任を負いません。

目次

はじめに	1
クロピラリドによる生育障害って何だろう？	2
クロピラリドによる生育障害を回避するための堆肥の活用フローチャート	8
第Ⅰ章 堆肥、土壌残留の生物検定法	10
A. サヤエンドウを用いた生物検定法	11
B. キクを用いた生物検定法	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法	26
第Ⅱ章 堆肥利用者のための対策マニュアル	31
A. 生育障害の発生を未然に防ぐために	32
B. 生育障害が発生してしまったら	35
C. クロピラリドによる生育障害の特徴	39
第Ⅲ章 堆肥生産者のための対策マニュアル	46
A. 飼料購入時や飼養管理時に注意すること	47
B. 堆肥由来のクロピラリドによる生育障害の発生を防止するためには	48
C. 園芸農家などに堆肥を渡すときにすべきこと	50
第Ⅳ章 残留分析法	51
A. 飼料分析法	53
B. 作物残留分析法	60
C. 堆肥残留分析法	68
参考資料	77
関連情報取得のためのリンク集	77

はじめに

2000 年代に入り、トマトやキクの栽培において原因不明の生育障害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園芸作物等の生育障害に関する研究「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）が 2006 年度～2008 年度の 3 年間にわたり新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業のリスク管理型研究として行われました。

研究の中では、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、園芸作物等の生育障害発生防止のリスク管理措置の根拠となる科学的情報を得ることができました。これら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、2009 年に「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（初版）」を作成しました。

しかし、その後もクロピラリドによると疑われるトマト等の生育障害の報告が続いたことから、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業（緊急対応研究課題）として 2016 年度には「堆肥中クロピラリドの高感度分析法の開発」（課題番号：28045C）、2017 年度には「作物被害低減のためのクロピラリド動態解明」（課題番号：29030C）が行われました。さらに、令和元年度からは、安全な農林水産物安定供給のためのレギュラトリーサイエンス研究委託事業「堆肥中のクロピラリドによる生育障害を防ぐための技術開発」（課題番号：3101）が行われています。

今回の第 2 版は、初版を踏襲して生物検定法、堆肥利用者のための対策マニュアル、堆肥生産者のための対策マニュアル、残留分析法の 4 つの内容で構成し、2016 年度以降に行った研究により得られた科学的情報を追加しました。さらに、農林水産省 7 課長通知「牛等の排せつ物に由来する堆肥中のクロピラリドが原因と疑われる園芸作物等の生育障害の発生への対応について」（平成 30 年 7 月 20 日改正。以下「7 課長通知」）に記載されている情報もマニュアルに盛り込みました。

本マニュアルが、農家や堆肥センターなどの農業現場において、生育障害の発生防止に役立つことができれば幸いです。

クロピラリドによる生育障害って何だろう？

作物の**生育障害**が起きていませんか？「**クロピラリド**」とよばれる除草剤による生育障害は、主に成長点や葉に発生する傾向にあります。

トマトの葉の萎縮が典型的な例です（**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**）。

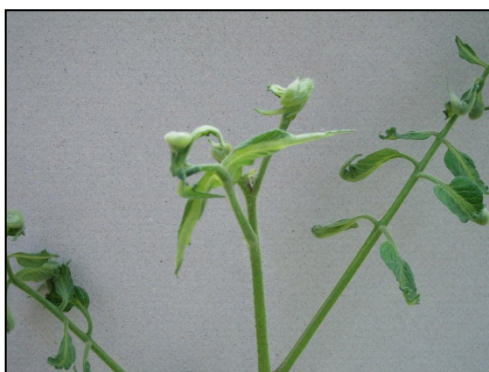


写真1 トマトの葉の萎縮

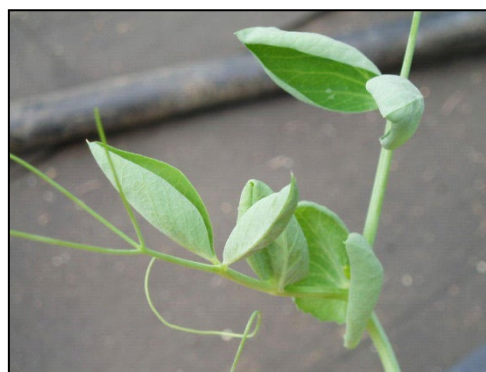


写真2 カップ状になったサヤエンドウの葉

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**）などに障害が見られます。



写真3 ミニトマト果実の変形



写真4 キクの頂芽の変形



写真5 キクの摘心部の肥大

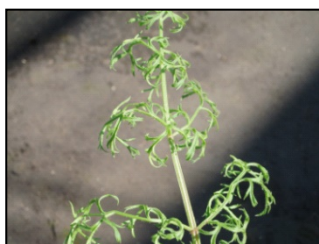


写真6 ニンジンの萎縮



写真7 ダイズの葉の変形



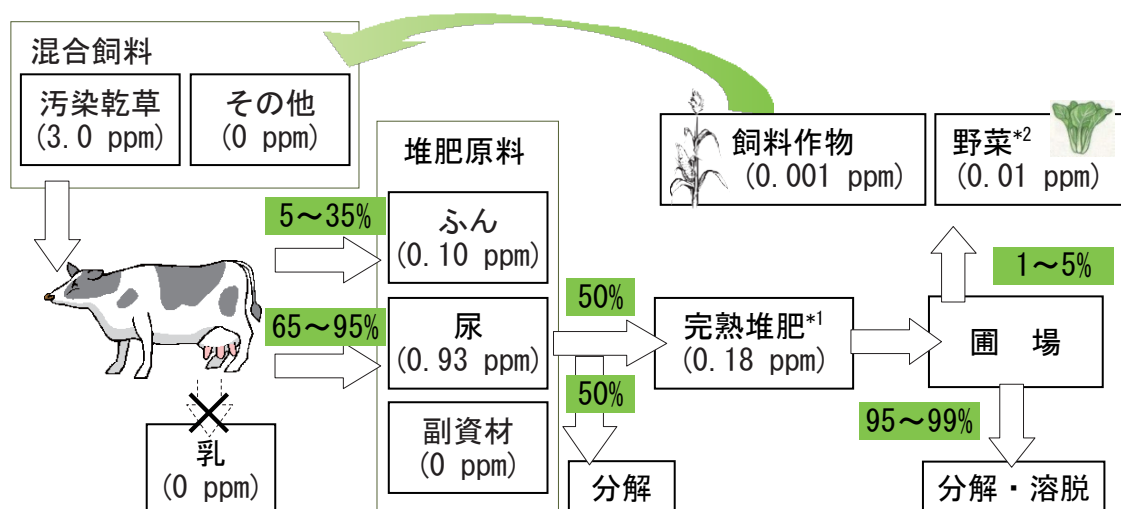
(左から、無添加、8.7 μ g、87 μ g 添加)

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、ふん尿の堆肥化過程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、植物の生育障害が起きることがあります。



- | | |
|------------------------------|----------------------------------|
| ①汚染乾草クロピラリド濃度 = 3.0 ppm | ⑪堆肥用副資材投入量 = 27.3 kg/day |
| ②混合飼料の乾物率 = 93 % | ⑫堆肥用副資材水分率 = 10 % |
| ③混合飼料の乾物消化率 = 65 % | ⑬堆肥原料水分 = 65 % |
| ④混合飼料摂取量 = 24 kg/day | ⑭完熟堆肥水分 = 60 % |
| ⑤混合飼料中汚染乾草含有率 = 25 % | ⑮堆肥化による乾物消失率 = 40 % |
| ⑥ふん排泄量 = 52.1 kg/day (②③④より) | ⑯堆肥化によるクロピラリド分解率 = 50 % |
| ⑦ふん水分率 = 85 % | ⑰施肥量 = 3000 kg/10a/year |
| ⑧尿量排泄量 = 13.5 kg/day | *1 腐熟が進み昇温せずに数か月以上経た状態の堆肥 |
| ⑨ふんへのクロピラリド移行率 = 30 % | *2 文献 (Saito 2010) では、最大のハウレンソウで |
| ⑩尿へのクロピラリド移行率 = 70 % | 0.02 ppm (ハウレンソウ暫定基準値 : 5 ppm) |

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のシミュレーション結果で、農林水産省の研究事業で得られたデータや文献調査をもとに試算。ふん、尿、完熟堆肥の数値は枠内に示した条件で以下の計算式により算出したクロピラリド濃度の予想値 (ppm=mg/kg)

肉牛のふんや尿についても、汚染した濃厚飼料から同様に移行することを確認。

$$\text{ふん中濃度: } 0.10 \text{ ppm} = \frac{① \times ④ \times ⑤}{100} \times \frac{⑨}{100} \div ⑥$$

$$\text{尿中濃度: } 0.93 \text{ ppm} = \frac{① \times ④ \times ⑤}{100} \times \frac{⑩}{100} \div ⑧$$

$$\text{完熟堆肥濃度 } 0.18 \text{ ppm} = \frac{① \times ④ \times ⑤}{100} \times \frac{⑬}{100} \div ((⑥+⑧+⑪) \times (1-⑬/100) \times (1-⑮/100) \div (1-⑭/100))$$

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 AgroScience 社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、トウモロコシ、テンサイ、アスパラガスなどに登録があります。わが国では農薬登録がなく、販売されていません。クロピラリドは図 2 のように化学構造からピリジンカルボン酸系に分類され、化学名は 3,6-dichloro-2-pyridinecarboxylic acid です。

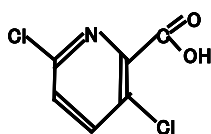


図 2 クロピラリドの化学構造

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、大雨等により堆肥や土壌からクロピラリドが溶脱する可能性があります。

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

*The Pesticide Manual 13th Edition (2003) より引用

クロピラリドは難分解性で、外国での調査によると、土壌中半減期は、施用量・土壌・気象条件等の違いにより、2 日から 435 日*とかなり幅がありました。我々が行った国内土壌を用いた試験でも、土壌中での半減期は 10 日から 200 日程度でした。露地栽培を想定した野外試験よりも施設栽培を想定した室内試験で土壌中半減期が長くなる傾向にありました。また、試験期間中に水の移動が生じない容器内試験での半減期が最も長くなる傾向にありました (表 1)。

*The Pesticide Manual 13th Edition (2003) より引用

表 1 国内土壌中 (砂丘未熟土、灰色低地土、黒ボク土) におけるクロピラリドの半減期 (日)

	屋外試験	屋内試験	容器内試験
砂丘未熟土	11	88	黒ボク土(5°C) 170
灰色低地土	24	113	黒ボク土(20°C) 194
黒ボク土	45	83	黒ボク土(35°C) 167

試験条件

屋外試験：クロピラリド添加堆肥を混和した土壌 (土壌：堆肥=99:1、土壌中クロピラリド濃度 100 µg/kg 乾重) を 1L ディスポカップ (底穴あり) に 1kg を充填。土壌水分を最大容水量の 60~80% となるように適宜灌水。試験期間中の平均気温 24.1°C。土壌試料は 0、1、3、7、14、28、56、112 日後に採取。

屋内試験 (屋根付きの網室)：底穴なしのディスポカップを使用した以外は屋外試験と同じ

容器内試験：土壌中濃度が 100 µg/kg 乾重となるようにクロピラリドを添加した黒ボク土 10g を 50mL ガラス製遠沈管に充填。土壌水分を最大容水量の 60~80% に維持。

一般的な堆肥化では、クロピラリドが分解されたとしても、堆肥の有機物も同時に分解されるため、堆肥中のクロピラリド濃度は相対的にほとんど変化しません（図3）。

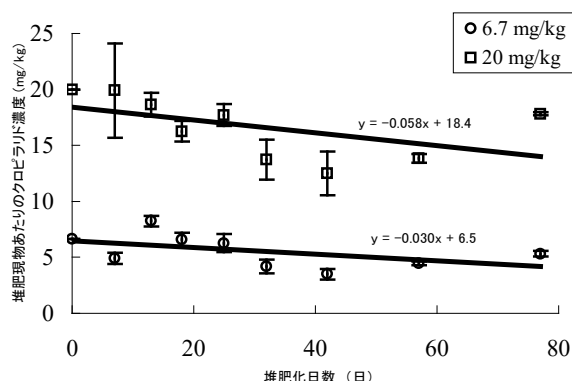


図3 堆肥化開始時にクロピラリドを 6.7、20 mg/kg になるように添加した場合における堆肥中クロピラリド濃度 (mg/kg 現物) の経時変化

クロピラリドは揮発しにくく、空気を介して汚染が広がることはありません〔融点は 151～152℃、蒸気圧 1.33 mPa (25℃の条件下)]*。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。 *The Pesticide Manual 13th Edition (2003) より引用

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。人間やほ乳動物に対するクロピラリドの急性毒性 (※) は低く、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

クロピラリドの急性毒性 (LD₅₀) は体重 1kg あたり経口 2000 mg 以上*です。

LD₅₀ とは 50 % lethal dose の略で、50 %致死量です。化学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。毒物はマウスへの経口投与で 50 mg/kg 以下、劇物は経口投与で 50～300 mg/kg にあるものを目安とします。

*The Pesticide Manual 13th Edition (2003) より引用

クロピラリドによる植物の生育障害の現れ方は**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に生育障害を発生させます（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にくいと考えられます。さらに他の作物別の詳しい影響については、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：	トマト類** ^{1,2} 、ダイズ ¹ 、エダマメ ^{1,2} 、サヤエンドウ ^{1,2} 、ソラマメ ^{1,2} 、スイートピー ^{1,2} 、クリムゾンクローバー ^{1,2} 、キク ^{1,2} 、ヒマワリ ^{1,2} 、マリーゴールド ^{1,2} 、コスモス ^{1,2} 、アスター ^{1,2} 、ダリア ²
弱：	ナス ^{1,2} 、ピーマン ^{1,2} 、シシトウ ¹ 、ペチュニア ^{1,2} 、サヤインゲン ¹ 、エンダイブ ¹ 、トレビス ¹ 、シュンギク ¹ 、レタス類*** ^{1,2} 、フキ ¹ 、ヒャクニチソウ ^{1,2} 、ニンジン ¹
中：	バレイショ ¹ 、タバコ ¹ 、ラッカセイ ¹ 、アズキ ¹ 、リョクトウ ² 、ササゲ ¹ 、ルピナス ¹ 、ゴボウ ¹ 、ベニバナ ¹ 、オステオスペルマム ¹ 、セルリー ¹ 、パセリ ¹ 、イタリアンパセリ ¹ 、ミツバ ¹ 、キュウリ ^{1,2} 、メロン ¹ 、トウガン ¹ 、ニガウリ ^{1,2} 、スイカ ¹ 、ズッキーニ ² 、ソバ ¹ 、オクラ ¹ 、モロヘイヤ ¹ 、ツルムラサキ ¹ 、ヒユナ ¹
強：	アブラナ科 ^{1,2} 、ユリ科 ¹ 、ヒユ科**** ^{1,2} 、シソ科 ¹ 、ナデシコ科 ¹ 、ヒルガオ科 ¹ 、バラ科 ¹ 、トルコギキョウ ² 、パンジー ² 、プリムラ ² 、キンギョソウ ²
極強：	イネ科 ^{1,2}

*各作物種の耐性評価は品種により変動する場合があります。

**トマト類：ミニトマト、中玉トマト、大玉トマト

***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

****初版ではクロンキスト分類体系に従いアカザ科としていたが、第2版ではAPGIV分類体系に従いヒユ科とした。

¹初版で供試した作物

²第2版で供試した作物

注：ppb（ピーピービー）とは10億分の1の濃度の単位です。例えば、1トンのトマトに、10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場合10 ppbとなり、**非常に微量な濃度**を表しています。

生育障害の発生を未然に防ぐには、まず、堆肥中の**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章**で構成されています。第Ⅰ章 堆肥、土壌残留の生物検定法、第Ⅱ章 堆肥利用者のための対策マニュアル、第Ⅲ章 堆肥生産者のための対策マニュアル、第Ⅳ章 残留分析法です。「7 課長通知」に基づいて、マニュアルをどのように活用するかを記載しました。クロピラリドの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。

図3のフローチャートのように、まずは、適正な堆肥の施用量・施用方法を守ることが重要であり、3t/10a以上の過剰施用はしないことが重要です。また、堆肥の入手先を変えるなどクロピラリドによる生育障害発生の可能性に変化が生じることが想定される場合には十分に留意し、堆肥や培土の提供者から、原材料や生物検定の結果などの情報を受けることも重要になります。

ナス科、キク科、マメ科などクロピラリドに対する耐性が弱い作物について、ポットによる苗生産を行う場合は家畜ふん尿由来堆肥の利用を控えるようにしましょう。利用する場合は生物検定等を行い生育障害が発生しないことを確認し、土壌とよく混和して利用するようにしましょう。施設栽培の場合は、生物検定等を行い生育障害が発生しないことを確認し、投入量を低減するとともに土壌とよく混和して利用するようにしましょう。その他の場合（露地栽培等）は、生物検定等を行い生育障害が発生しないことを確認し、土壌とよく混和して利用するようにしましょう。

クロピラリドによる生育障害を回避するための堆肥の活用フローチャート

* 農林水産省 7 課長通知「牛等の排せつ物に由来する堆肥中のクロピラリドが原因と疑われる園芸作物等の生育障害の発生への対応について」
(平成30年7月20日改正) に準拠

□ 堆肥を作る（畜産農家など）

堆肥化におけるクロピラリド残留の低減化については第Ⅰ章、第Ⅲ章、第Ⅳ章を参照

□ 堆肥を使う（園芸農家など） 第Ⅰ章、第Ⅱ章、第Ⅳ章を参照

基本事項

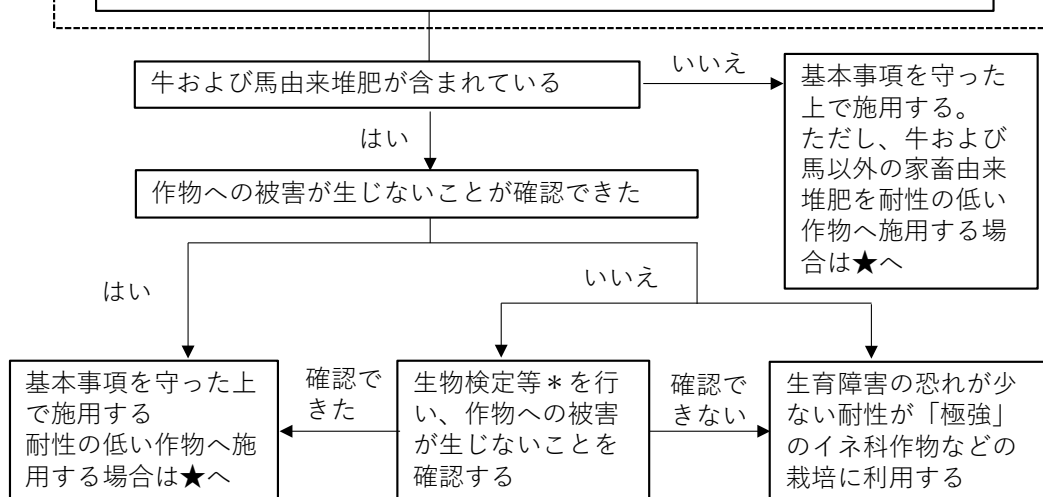
○適正な堆肥の施用量・施用方法を守る（各都道府県の施用基準等に則する）

○クロピラリドによる生育障害発生の可能性に変化が生じることが想定される場合は、堆肥の取扱いに十分に留意する

例えば

- ・堆肥の購入先から「輸入飼料の購入先を切り替えた」の情報を受けた
- ・堆肥の施用量を増やす
- ・栽培する作物の品目・品種を変える

○堆肥や培土の提供者から、原材料や生物検定の結果などの情報を受ける



★特にクロピラリドへの耐性の低い作物（ナス科、キク科、マメ科等）を栽培する場合

	牛・馬由来堆肥	左記以外の家畜由来堆肥
ポット栽培	・利用を抑える（利用する場合は生物検定等を実施し被害が生じないことを確認するとともに、土壌とよく混和し利用する）	
施設栽培	・生物検定等を実施し被害が生じないことを確認 ・投入量を低減するとともに、土壌とよく混和し利用	・投入量を低減するとともに、土壌とよく混和し利用
その他の栽培（露地栽培等）	・生物検定等を実施し被害が生じないことを確認 ・土壌とよく混和し利用	・土壌とよく混和し利用

* 生物検定（第Ⅰ章を参照）、実際の栽培条件での試し栽培、堆肥中クロピラリド濃度の定量（第Ⅳ章を参照）がある。

図3 クロピラリドによる生育障害の発生を回避するための堆肥の活用フローチャート

また、クロピラリドが原因と疑われる生育障害が発生した場合は、「7 課長通知」に準じて都道府県に速やかに報告する、堆肥など提供者に対し伝達する等の対応をしてください（**図 4**）。

☆もしも生育障害が発生した場合☆

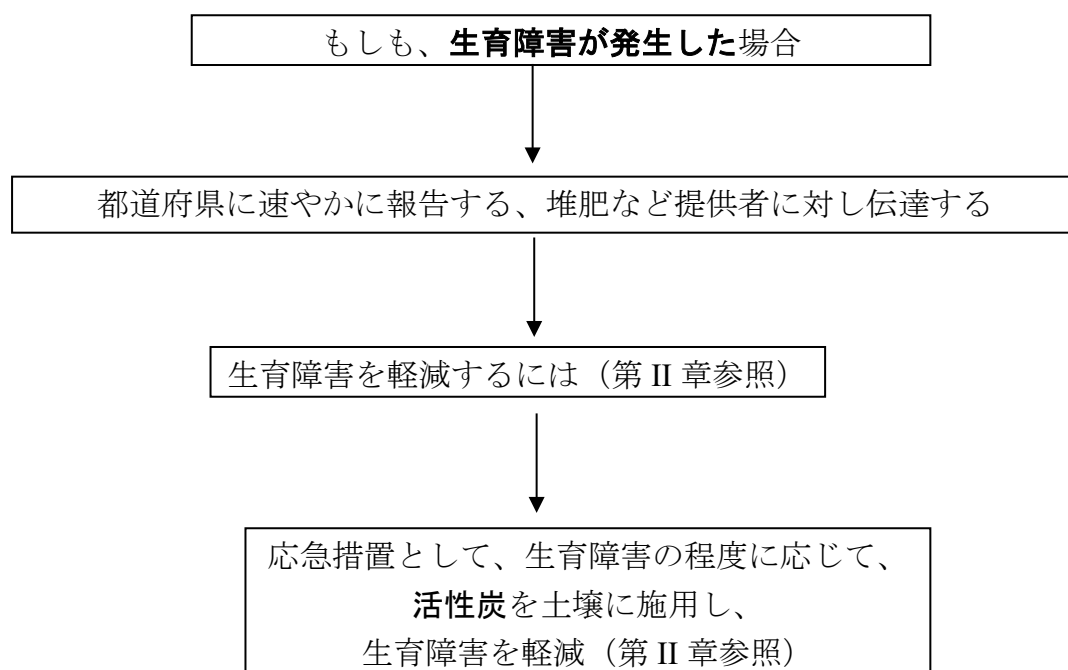


図4 クロピラリドにより生育障害が発生した場合のフローチャート

第Ⅰ章 堆肥、土壌残留の 生物検定法

生物検定法は、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。

本章では、堆肥を土壌混合し**サヤエンドウ**を用いて検定する方法を基準として、牧草や土壌の検定にも使用できます。また、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。

なお、豚ふんや鶏ふんを原料とする堆肥の場合は、堆肥の混合割合等を実際の栽培条件に合わせて、実際に栽培する作物について、カップで試し栽培を行い、初期生育を観察することにより生育障害が発生しないかどうかをご確認ください。

A. サヤエンドウを用いた生物検定法（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. 材料

- ①堆肥：良く混合された状態で 500 mL 程度
- ②乾草：良く混合された状態で 50 g 程度
- ③土壌：良く混合された状態で 1 L 程度
- ④サヤエンドウ種子：「あずみ野 30 日絹爽 PMR」または「兵庫絹爽」
- 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/kg 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）
- ⑥500 mL のポリディスカップ（底穴のないもの）、
- ⑦目盛り付き 100 mL 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

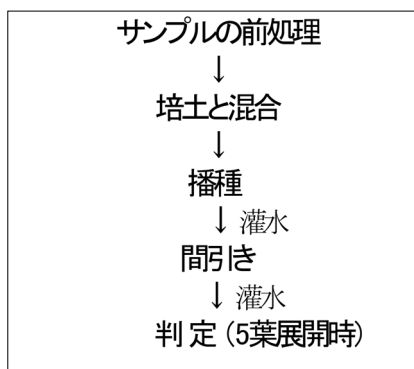


図 I - 1 サヤエンドウを用いた検定法のフローチャート

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 600 mL をカップに入れます。（比較対照区とする）
- (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 100 mL と培土 500 mL 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 2～3 cm 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 600 mL 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 600 mL を入れます。

(4) 充実した種子をカップあたり 2 粒ずつ 2 カ所に播種し、1 cm 程度覆土後、100 mL 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. 症状と判定

(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障害の状態について写真 I－1、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。

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

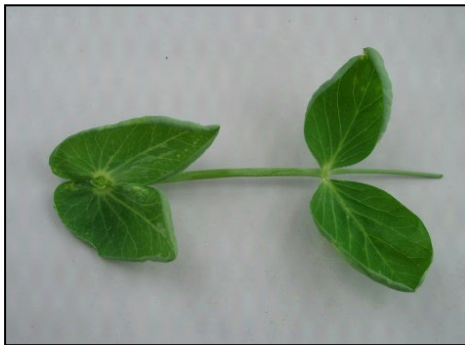
写真 I－1の残留指数の計算 (0×5＋0×4＋0×3＋0.5×2＋1.0×1)／5＝0.4



障害なし = 0



わずかにカップ状 = 0.5



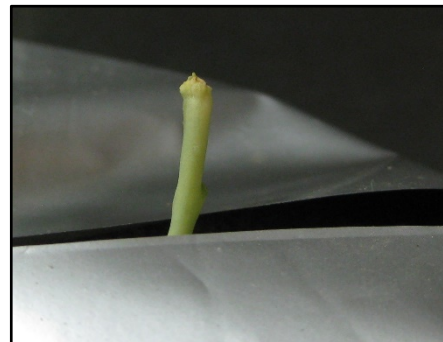
明らかにカップ状 = 1



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（芯止まり） = 4

成長点がつぶれ、本葉（第1葉）から
展開していない例

写真 I - 2 生育障害の数値化基準

(2) 残留指数から表 I-1、表 I-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断基準

残留指数	クロピラリド耐性 (表 I-2 参照)				<堆肥施用量*>
	極弱	弱	中	強	
～ 0.5 未満	◎	◎	◎	◎	◎ : 3t/10a 以下を推奨
0.5 ～ 1.0 未満	○	◎	◎	◎	○ : 2t/10a 以下を推奨
1.0 ～ 2.0 未満	△	○	◎	◎	△ : 1t/10a 以下を推奨
2.0 ～	×	×	×	×	× : 堆肥施用を見合わせる

*堆肥施用後にナス科、キク科、マメ科等作物を栽培する場合は、堆肥施用量をさらに低減することが望ましい。

表 I-2 クロピラリドに対する耐性*

極弱 :	トマト類** ^{1,2} 、ダイズ ¹ 、エダマメ ^{1,2} 、サヤエンドウ ^{1,2} 、ソラマメ ^{1,2} 、スイートピー ^{1,2} 、クリムゾンクローバー ^{1,2} 、キク ^{1,2} 、ヒマワリ ^{1,2} 、マリーゴールド ^{1,2} 、コスモス ^{1,2} 、アスター ^{1,2} 、ダリア ²
弱 :	ナス ^{1,2} 、ピーマン ^{1,2} 、シシトウ ¹ 、ペチュニア ^{1,2} 、サヤインゲン ¹ 、エンダイブ ¹ 、トレビス ¹ 、シュンギク ¹ 、レタス類*** ^{1,2} 、フキ ¹ 、ヒヤクニチソウ ^{1,2} 、ニンジン ¹
中 :	バレイショ ¹ 、タバコ ¹ 、ラッカセイ ¹ 、アズキ ¹ 、リョクトウ ² 、ササゲ ¹ 、ルピナス ¹ 、ゴボウ ¹ 、ベニバナ ¹ 、オステオスペルマム ¹ 、セルリー ¹ 、パセリ ¹ 、イタリアンパセリ ¹ 、ミツバ ¹ 、キュウリ ^{1,2} 、メロン ¹ 、トウガン ¹ 、ニガウリ ^{1,2} 、スイカ ¹ 、ズッキーニ ² 、ソバ ¹ 、オクラ ¹ 、モロヘイヤ ¹ 、ツルムラサキ ¹ 、ヒユナ ¹
強 :	アブラナ科 ^{1,2} 、ユリ科 ¹ 、ヒユ科**** ^{1,2} 、シソ科 ¹ 、ナデシコ科 ¹ 、ヒルガオ科 ¹ 、バラ科 ¹ 、トルコギキョウ ² 、パンジー ² 、プリムラ ² 、キンギョソウ ²
極強 :	イネ科 ^{1,2}

*各作物種の耐性評価は品種により変動する場合があります。

**トマト類 : ミニトマト、中玉トマト、大玉トマト

***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

****初版ではクロンキスト分類体系に従いアカザ科としていたが、第2版では APGIV 分類体系に従いヒユ科とした。

¹ 初版で供試した作物

² 第2版で供試した作物

(3) 乾草の検定において、残留指数が 0.5 以上であれば、明らかにクロピラリドが残留していると考えられます。この乾草を給与した家畜から産出される堆肥にはクロピラリドが残留する可能性がありますので、生物検定により確認することを推奨します。

(4) 農業用活性炭によっては、堆肥に混合することで生育障害の発生を軽減できることが確認されています。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 %以上の混合割合であれば軽減効果を確認できました (表 I-1 では残留指数 2 以上で園芸作物等への堆肥の施用を見合わせるようになっていいますので、残留指数 2 以上の混合割合の数値は試験的に実施した参考値です)。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。

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 °C 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. 実施する上での注意事項

(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 サヤエンドウの品種特性の比較

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製のデイスポーザブルカップ（商品名 ポリデイスカップ）が便利です。底穴が無いものを使用します（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) 生育中は土壌を乾燥させないように適宜給水しますが、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（表 I-4）、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ため、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。炭や活性炭、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。

(10) 農研機構ホームページ上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。

(<http://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/nilgs/contents/files/kentei-sheet.xls>)

B. キクを用いた生物検定法

キクがクロピラリドを吸収することで示す反応を利用して、堆肥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。

《本法の特徴》

長所： ①キクへ生育障害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. 材料

①キクの発根苗：栽培予定の品種が好ましい。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：200 mL 程度の目盛付容器とする。

2. 方法と手順（写真 I－5）

（1）用意した園芸用培土のみを5号鉢に1,000 mL（200 mL×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します。

（2）調べたい堆肥 200 mL と園芸用培土 800 mL（200 mL×4カップ）を別の容器で十分に混合した後、5号鉢に詰めます。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鉢以上用意します。



4 カップの園芸用培土と
1 カップの堆肥



混合



5 号鉢に詰める

写真 I－5 園芸用培土と堆肥の混合手順

(3) 用意した鉢に、キクの発根苗を1株ずつ植え付けます(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、切断面を平滑にします。



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灌水します(クロピラリドは水に溶けやすいため流亡を防止する)。受皿に水が出た場合は、再び鉢内へ戻します。

(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います。

(6) 栽培はキクの生育に好適な温度や日照が確保できる場所で行います。

3. 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(写真I-8)に図I-2のような特徴的な症状が現れます。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ます。

(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)

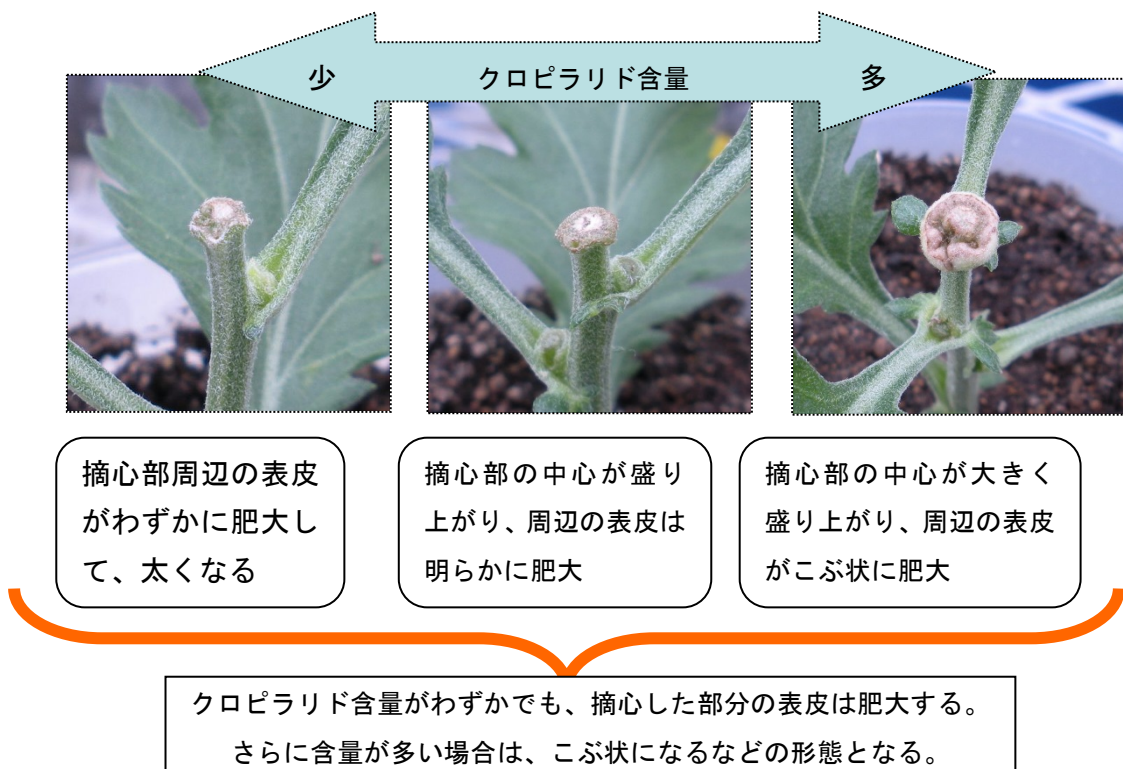


写真I-8 キクの摘心部

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す。

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、生育障害（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 1-2 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）

4. 実施する上での注意事項

(1) 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。

(2) 栽培環境

- ①夏季高温時は適度な遮光を行います。冬季では15℃以上の温度を確保できる場所が望ましいです。
- ②降雨の影響がない場所とします。
- ③風当たりが激しく、鉢用土の乾燥が著しい場所は避けます。

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) 検出可能な濃度と検定に必要な期間

- ①検出可能な濃度：抽出液中濃度として約 5 ppb 以上（冬季では 10 ppb 以上）。
- ②検定に必要な期間：約 1 週間（冬季の条件下では 2 週間を要する）。
※：発根苗調整期間を含めると 2 週間

(2) 長所

- ①吸収力の旺盛な発根苗を用い、検定開始から発症までの期間が短いです。
- 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す。
- 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ます。

(3) 短所

- ①検定期間と発根苗の調整期間及び手間が必要となります。
※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ですが、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ります。
- ②低濃度のクロピラリドによる障害は判定困難です。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場合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います。また、検定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ません。
※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法」の利用を推奨します。
- ③堆肥の状態によっては、根部の酸素不足による成長抑制が発生するおそれがあります。
- ④堆肥等からクロピラリドが 100% 抽出されるわけではないため、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ません。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方法です。



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

2. 材料

(1) 用意するもの

- ①供試堆肥等：塊は細かく砕いて、よく混ぜておきます。
- 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します。
- 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・発根させておきます。
- ④水：蒸留水が好ましいが、水道水でも可。
- 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 50 mL 容ディスポーザブル遠沈管を利用
- ⑦EC メーター：抽出液の電気伝導度（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省略可

3. 方法と手順

- (1) 堆肥の一定量（10 g）を振とうビンに入れ、水（100 mL）を加えます。
※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きます。

(2) 振とうビンをシェーカーで 30 分程度振とうします。手で振とうする場合は、間隔を開けながら激しく振とうを繰り返します。

(3) 抽出液を二重ガーゼでろ過しながら栽培容器に移します。

※EC メーターがあればここで測定し、抽出液が検定に使用可能(概ね 3 dS/m 未満)かどうかを確認します。

※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です。

(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きます。

(5) 上記発根苗を栽培容器に入れた抽出液に浸します。

※誤差をさけるため反復を設けます。比較のため、水のための容器を用意してこれにも苗を浸し栽培を行います。

(6) 温室等の屋内で栽培を行い、環境温度は 25～30 ℃程度が望ましいですが、最低温度で 10 ℃を下回らないようにします。

※：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早めに結果が出ます。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、判定が困難となります。

(7) 栽培開始時の液量を記録し(容器に印を付けておくと良い)、適宜減少分を補給します。

4. 症状と判定

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)で判断します。障害の症状は土に播種した場合とほぼ同様です。

この際、クロピラリド以外の堆肥等成分による障害と区別するため、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します。なお、心止まりにより生長が停止した個体については、クロピラリドにより生じた症状と判断します。

障害の著しいものについては植え付け後 3 日程度で症状が認められます。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ようにします。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

と良いです（写真 I-10～写真 I-13 参照）。また、低温による生長への影響の有無を把握する場合は、水のみで栽培した適温時（夏季の温暖期）の伸長量と比較する方法（あらかじめ適温期の伸長量を測定しておく）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方法があります。



写真 I-10 正常な苗



写真 I-11 典型的なクロピラリドによる障害例



写真 I-12 堆肥成分による障害（葉の変形）例
（クロピラリド含有せず）



写真 I-13 クロピラリドによる障害例
（発症の初期段階や軽度の障害の場合）

5. 実施する上での注意事項

堆肥抽出液の EC が高いと（概ね 3 mS/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ります。高い EC 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します。

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ります。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します。

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用困難です。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りますが、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ります。そのような場合には、土壌を利用した標準的手法で実施することが適当です。

D. コスモスを用いた迅速生物検定法

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. 材料

(1) 用意するもの

- ①堆肥：良く混合された状態で 500 mL 程度
- ②乾草：良く混合された状態で 50 mL 程度
- ③土壌：良く混合された状態で 1 L 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 50～200 mg/kg 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）
- ⑥500 mL のポリディスカップ（底穴のないもの）、
- ⑦目盛り付き 100 mL 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 600 mL 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 100 mL と培土 500 mL 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 2～3 cm 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 4 g と培土 600 mL 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 600 mL を入れます。

(4) 充実した種子を2粒ずつ4カ所に播種し、5 mm 程度覆土後、100 mL 程度をゆっくり灌水し、十分湿らせます。2日～3日に出芽するので、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ないます。

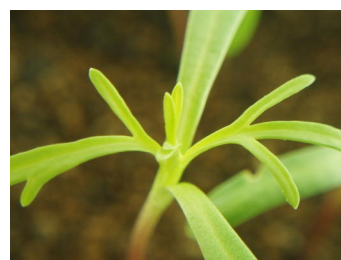


写真 I-14 残留程度: 無

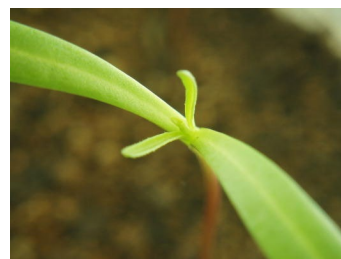


写真 I-15 残留程度: 低 (糸葉状、カップング)



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)

3. 症状と判定

(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、**写真Ⅰ－１４～写真Ⅰ－１７**を参照して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。

(2) 残留程度から**表Ⅰ－５**と**表Ⅰ－６**により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断基準

残留程度	クロピラリド耐性（表Ⅰ-2 参照）				<堆肥施用量*>
	極弱	弱	中	強	
無	◎	◎	◎	◎	◎：3t/10a 以下を推奨
低	○	◎	◎	◎	○：2t/10a 以下を推奨
中	△	○	◎	◎	△：1t/10a 以下を推奨
高	×	×	×	×	×：堆肥施用を見合わせる

*堆肥施用後にナス科、キク科、マメ科等作物を栽培する場合は、堆肥施用量をさらに低減することが望ましい。

表 1-6 クロピラリドに対する耐性*

極弱：	トマト類** ^{1,2} 、ダイズ ¹ 、エダマメ ^{1,2} 、サヤエンドウ ^{1,2} 、ソラマメ ^{1,2} 、スイートピー ^{1,2} 、クリムゾンクローバー ^{1,2} 、キク ^{1,2} 、ヒマワリ ^{1,2} 、マリーゴールド ^{1,2} 、コスモス ^{1,2} 、アスター ^{1,2} 、ダリア ²
弱：	ナス ^{1,2} 、ピーマン ^{1,2} 、シシトウ ¹ 、ペチュニア ^{1,2} 、サヤインゲン ¹ 、エンダイブ ¹ 、トレビス ¹ 、シュンギク ¹ 、レタス類*** ^{1,2} 、フキ ¹ 、ヒヤクニチソウ ^{1,2} 、ニンジン ¹
中：	バレイショ ¹ 、タバコ ¹ 、ラッカセイ ¹ 、アズキ ¹ 、リョクトウ ² 、ササゲ ¹ 、ルピナス ¹ 、ゴボウ ¹ 、ベニバナ ¹ 、オステオスペルマム ¹ 、セルリー ¹ 、パセリ ¹ 、イタリアンパセリ ¹ 、ミツバ ¹ 、キュウリ ^{1,2} 、メロン ¹ 、トウガン ¹ 、ニガウリ ^{1,2} 、スイカ ¹ 、ズッキーニ ² 、ソバ ¹ 、オクラ ¹ 、モロヘイヤ ¹ 、ツルムラサキ ¹ 、ヒユナ ¹
強：	アブラナ科 ^{1,2} 、ユリ科 ¹ 、ヒユ科**** ^{1,2} 、シソ科 ¹ 、ナデシコ科 ¹ 、ヒルガオ科 ¹ 、バラ科 ¹ 、トルコギキョウ ² 、パンジー ² 、プリムラ ² 、キンギョソウ ²
極強：	イネ科 ^{1,2}

*各作物種の耐性評価は品種により変動する場合があります。

**トマト類：ミニトマト、中玉トマト、大玉トマト

***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

****初版ではクロンキスト分類体系に従いアカザ科としていたが、第2版では APGIV 分類体系に従いヒユ科とした。

¹ 初版で供試した作物

² 第2版で供試した作物

(3) 乾草の検定において、残留程度が中以上であれば、明らかにクロピラリドが残留していると考えられます。この乾草を給与した家畜から産出される堆肥にはクロピラリドが残留する可能性がありますので、生物検定により確認することを推奨します。

5. 実施する上での注意事項

(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 製のデイスポーザブルカップ（商品名 ポリディスカップ）が便利です。底穴がないものを

使用します（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）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。

第 II 章 堆肥利用者のための 対策マニュアル

生育障害の発生を未然に防ぐために、耕種農家が使用する堆肥や培土について、家畜由来排泄物の使用の有無を提供元に確認することや、生物検定法等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、堆肥を利用する耕種農家が行うことについて記載しています。

A. 生育障害の発生を未然に防ぐために

使用する堆肥や培土について、提供元に原材料に関する情報提供を受けることが大切です。

特に以下の情報を求め、生育障害が発生する可能性の有無を確認することが重要です。

- ① 堆肥の原料に、牛ふん・馬ふんが使われていないか。培土の原料に、牛ふん堆肥・馬ふん堆肥が使われていないか。
- ② ①の場合、生物検定またはこれ以外の試験的な栽培を行っているか。その結果、生育障害の可能性はあるかどうか。

クロピラリドによる生育障害の可能性がある場合は、生物検定等を行い、堆肥や培土を用いても生育障害が生じないことを確認します。

堆肥や培土の提供元から情報が入手できない場合や、牛ふん・馬ふんに由来する原料が含まれていることが明らかなものの、入手した情報からは生育が悪くなるかどうか判断できない場合などには、堆肥や培土を用いて作付けを行う前に、以下の対策を行ってください。

- ① クロピラリドの残留を確認するために、サヤエンドウなどを用いた生物検定を行う。
- ② 作物や土壌と堆肥の混合割合などを、実際の栽培条件に合わせて試しに栽培し、クロピラリドの影響がないことを確認する。

生物検定法については、第Ⅰ章を参照してください。

なお、クロピラリドに対する感受性が高い作物（ナス科、キク科、マメ科など）を栽培する場合は、生育障害が発生するリスクが高いため、牛ふん・馬ふんに限らず、豚ふんや鶏ふんなどを含む家畜ふん堆肥全般について、以下のような注意が必要です。

- ① ポットによる苗生産で家畜ふん堆肥を使用する場合は、必ず事前に生物検定や試し栽培により、生育障害が発生する可能性がないことを確認してください。確認ができない場合は、家畜ふん堆肥の利用は控えてください。
- ② 施設栽培で家畜ふん堆肥を使用する場合は、投入量を低減する、土壌とよく混和するといった生育障害の発生リスクを低減させる取組が必要です。また、牛ふん・馬ふんが含まれる可能性のある堆肥を使用する場合には、上述のように事前に生物検定や試し栽培により、生育障害が発生する可能性がないことを確認してください。
- ③ 家畜ふん堆肥を利用する場合は土壌とよく混和し利用してください。

もし、事前にクロピラリドの影響がないことが確認できない場合は、イネ科など、クロピラリドに耐性のある作物の栽培に利用してください。

クロピラリドによる生育障害発生の可能性に変化が生じることが想定される場合は、家畜ふん堆肥や培土の取扱いに十分に留意してください。

クロピラリドによる生育障害発生の可能性に変化が生じることが想定される場合としては、①堆肥や培土の購入先を切り替えた場合、②堆肥又は培土の購入先から「輸入飼料の購入先を切り替えた」等の情報の伝達があった場合、③堆肥の散布量を増やす場合、④栽培する作物の品目・品種を変える場合等があります。

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。

大量に施用すると、高塩濃度など、クロピラリド以外の要因により、作物に生育障害を及ぼす可能性があります。各都道府県の施用基準などに沿って、適正な堆肥の施用量・施用方法を守ることが大切です。

土壌消毒を行う場合は、小麦ふすまの施用は控え、クロピラリドを含む可能性のない資材を利用する、あるいは太陽熱消毒を行うなど、代替手法を用いてください。

輸入小麦のふすまにはクロピラリドが残留している可能性があるため、米ぬか、糖蜜、低濃度エタノールなどを利用した土壌還元消毒や太陽熱消毒を行ってください。

B. 生育障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。

第Ⅱ章の「クロピラリドによる生育障害の特徴」及び農研機構ホームページ上の「画像データライブラリー」（44 ページ参照）や「土壌中クロピラリドの野菜・花きの初期生育に及ぼす影響・データ集」（45 ページ参照）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ってください。

クロピラリドが原因と疑われる生育障害の発生を確認した場合は、都道府県（普及指導センター等）に速やかに報告するとともに、堆肥などの提供者に対し伝達します。

生育障害が発生した作物残査は、必ず圃場外に持ち出すことと、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、生育障害が再発する可能性があるためです。

生育障害が発生した圃場では、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。

重大な生育障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、大量の堆肥施用を行わない限り生育障害の発生の可能性は低いと考えられます。

表Ⅱ－１ クロピラリドに対する耐性*

極弱：	トマト類** ^{1,2} 、ダイズ ¹ 、エダマメ ^{1,2} 、サヤエンドウ ^{1,2} 、ソラマメ ^{1,2} 、スイートピー ^{1,2} 、クリムゾンクローバー ^{1,2} 、キク ^{1,2} 、ヒマワリ ^{1,2} 、マリーゴールド ^{1,2} 、コスモス ^{1,2} 、アスター ^{1,2} 、ダリア ²
弱：	ナス ^{1,2} 、ピーマン ^{1,2} 、シシトウ ¹ 、ペチュニア ^{1,2} 、サヤインゲン ¹ 、エンダイブ ¹ 、トレビス ¹ 、シュンギク ¹ 、レタス類*** ^{1,2} 、フキ ¹ 、ヒャクニチソウ ^{1,2} 、ニンジン ¹
中：	バレイショ ¹ 、タバコ ¹ 、ラッカセイ ¹ 、アズキ ¹ 、リョクトウ ² 、ササゲ ¹ 、ルピナス ¹ 、ゴボウ ¹ 、ベニバナ ¹ 、オステオスペルマム ¹ 、セルリー ¹ 、パセリ ¹ 、イタリアンパセリ ¹ 、ミツバ ¹ 、キュウリ ^{1,2} 、メロン ¹ 、トウガン ¹ 、ニガウリ ^{1,2} 、スイカ ¹ 、ズッキーニ ² 、ソバ ¹ 、オクラ ¹ 、モロヘイヤ ¹ 、ツルムラサキ ¹ 、ヒユナ ¹
強：	アブラナ科 ^{1,2} 、ユリ科 ¹ 、ヒユ科**** ^{1,2} 、シソ科 ¹ 、ナデシコ科 ¹ 、ヒルガオ科 ¹ 、バラ科 ¹ 、トルコギキョウ ² 、パンジー ² 、プリムラ ² 、キンギョソウ ²
極強：	イネ科 ^{1,2}

*各作物種の耐性評価は品種により変動する場合があります。

**トマト類：ミニトマト、中玉トマト、大玉トマト

***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

****初版ではクロンキスト分類体系に従いアカザ科としていたが、第２版では APGⅣ分類体系に従いヒユ科とした。

¹初版で供試した作物

²第２版で供試した作物

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基準値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では注意が必要です。

表 11-2 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	
らっかせい		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
ばれいしょ		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(長いもをいう)		きゅうり		かき	
こんにゃくいも		(ガーキンを含む)		バナナ	
その他のいも類		かぼちゃ (スカッシュを含む)		キウイ	
てんさい	2	しろり		パパイヤ	
さとうきび		すいか		アボカド	
だいこん類 (ラティッシュを含む)の根		メロン類果実		パイナップル	
だいこん類 (ラティッシュを含む)の葉		まくわうり		グアバ	
かぶ類の根	1	その他のうり科野菜		マンゴー	
かぶ類の葉	4	ほうれんそう	5	パッションフルーツ	
西洋わさび		たけのこ		なつめやし	
クレソン		オクラ		その他の果実	
はくさい	2	しょうが		ひまわりの種子	
キャベツ	2	未成熟えんどう		ごまの種子	
芽キャベツ	2	未成熟いんげん		べにばなの種子	
ケール		えだまめ		綿実	
こまつな		マッシュルーム		なたね	2
きょうな		しいたけ		その他のオイルシード	2
デンゲンサイ	1	その他のきのこ類		ぎんなん	
カリフラワー	2	その他の野菜	4	くり	
ブロッコリー	2	みかん		ペカン	
その他のあぶらな科野菜	5	なつみかん		アーモンド	
ごぼう		なつみかんの外果皮		くるみ	
サルシフィー		なつみかんの果実全体		その他のナッツ類	
アーティチョーク		レモン		茶	
チコリ		オレンジ (ネーブルオレンジを含む)		コーヒー豆	
エンダイブ		グレープフルーツ		カカオ豆	
しゅんぎく		ライム		ホップ	5
レタス (サラダ菜及びちしやを含む)		その他のかんきつ類果実		サンショウの果実	
その他のきく科野菜		りんご		みかんの果皮	
たまねぎ		日本なし		その他のスパイス	4
		西洋なし		スペアミント	
				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。ただし、「その他の〇〇」に含まれる食品については、下記、公益財団法人日本食品化学研究振興財団ホームページなどでご確認ください。

農産物等の食品分類表 <https://www.ffcr.or.jp/zanryu/reference-list/post-88.html>

注 2) 基準値は、令和 2 年 9 月現在のものであり、今後改正される場合がありますので、下記、公益財団法人日本食品化学研究振興財団ホームページなどでご確認ください。

残留農薬基準値検索システム <http://db.ffcr.or.jp/front/>

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、乾燥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。他に水分条件などが分解速度に影響を与えるとの報告があり、土壌が乾燥した状態では分解が進まないとされています。露地栽培の場合は十分に降雨にさらし、乾燥を防ぐため適宜散水するなどして適湿を保つようにします。施設栽培の場合は、十分な灌水を繰り返し、その後、土壌水分を維持するように適宜灌水して土壌を乾燥させないようにします。ポットによる苗生産についても、十分な灌水を繰り返し、その後、土壌水分を維持するように適宜灌水して土壌を乾燥させないようにします。

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（粉状または粒状）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、第Ⅰ章「サヤエンドウを用いた生物検定法」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法」による残留指数に基づく活性炭施用量は残留指数 1 未満で 20 kg/10 a 以上、残留指数 1～1.5 未満で 40 kg/10 a 以上、残留指数 1.5～2.0 で 80 kg/10 a 以上施用にあたっては、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、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 200 kg/10 a 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生育障害は、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、農研機構ホームページ上の「画像データライブラリー」や「土壌中クロピラリドの野菜・花きの初期生育に及ぼす影響・データ集」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）。

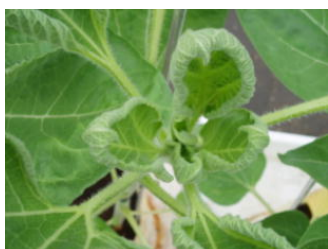
また、農薬の薬害として一般的な症状（葉縁部のネクロシス、斑点、葉脈間の黄化等）や、ウィルス病に認められるような症状（モザイク症状、黄化、壊症斑、節間の短縮）は起こしませんが、葉脈透過が認められる場合があります（写真Ⅱ－１、４、８）。



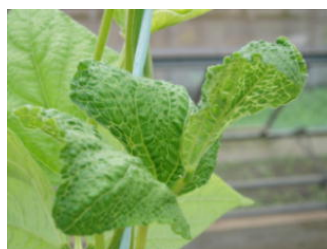
写真Ⅱ-1 トマト



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



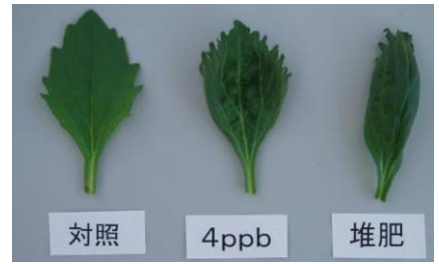
Ⅱ-5 エダマメ



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 トレピス



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 キク摘芯部の障害



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、ヒャ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 ヒャクニチソウ



写真Ⅱ-26 ヒマワリ



写真Ⅱ-27 輪ギクの花弁の障害



写真Ⅱ-28 スプレーギクの花首(ガク)の障害

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、変形果や単為結果を生じます(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、あまり認められません。



対象区

25 ppb

写真Ⅱ-29 ミニトマト（品種：アイコ）



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-3 1)。また、高濃度では単為結果します。



写真Ⅱ-3 1 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-3 2)。



写真Ⅱ-3 2 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

汚染土壌での生育障害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。

(<http://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/nilgs/contents/database/clopyralid/index.html>)

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

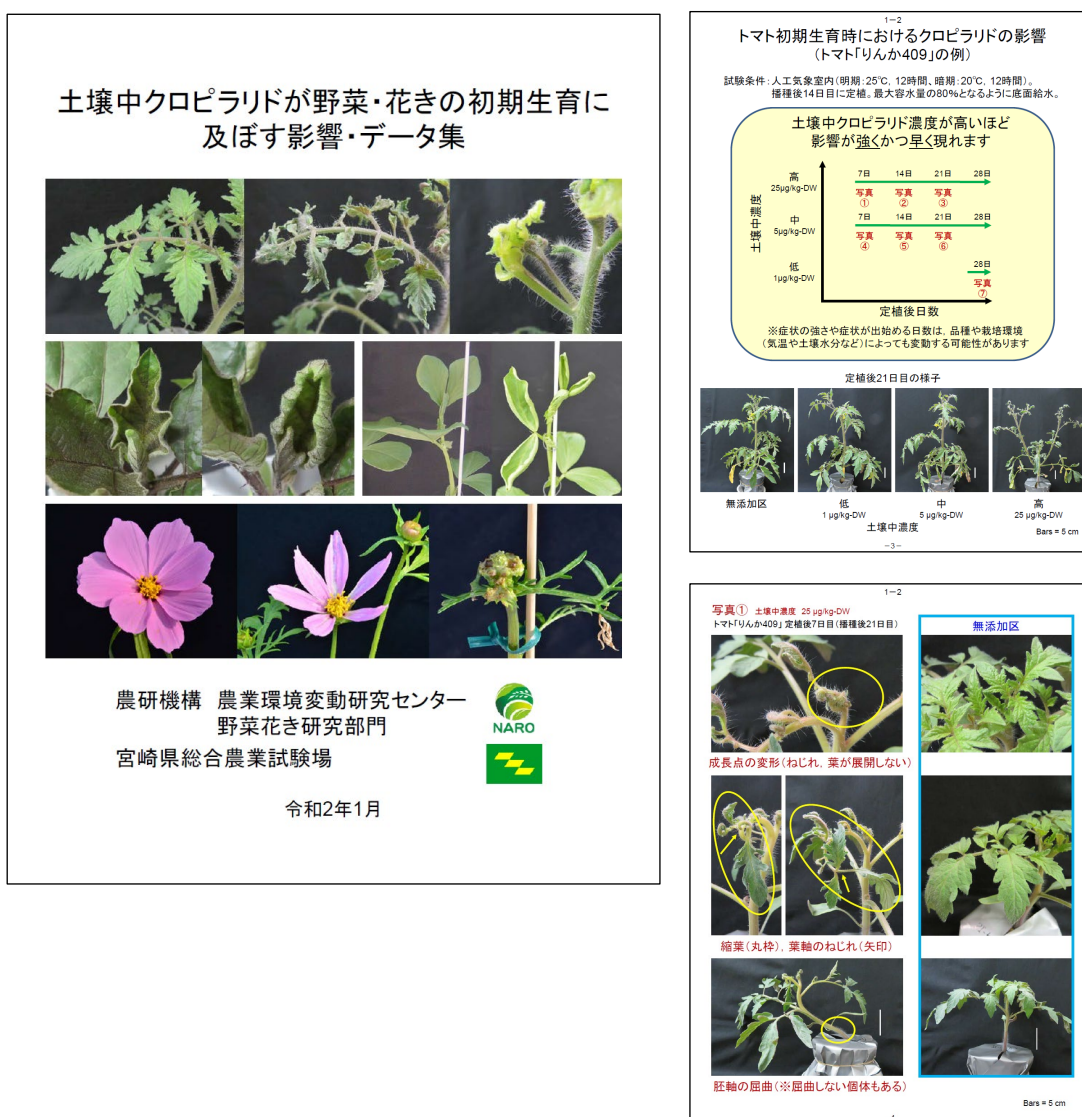
品目ごとにフォルダを作成し、品種間差異について検討した品目に関しては、更に品種ごとにフォルダを作成しました。

(3) 「野菜・花きの初期生育に及ぼす影響・データ集」について

野菜 17 品目、花き 12 品目の初期生育時におけるクロピラリドの影響を画像を中心に示すものです(図Ⅱ-1)。クロピラリドを添加した堆肥を土壌と混合し、ポットでこれらの作物を栽培した場合に、クロピラリドが作物の初期生育へ与える影響を濃度毎、経時的に示しています。

栽培初期にクロピラリドによる生育障害であるか否かの確認の参考として使用できます。

(https://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/pamphlet/tech-pamph/133546.html)



図Ⅱ-1 野菜・花きの初期生育に及ぼす影響・データ集

第Ⅲ章

堆肥生産者のための 対策マニュアル

堆肥生産者である畜産農家がクロピラリドによる生育障害の発生を防止するために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障害は、クロピラリドが残留した輸入飼料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、家畜排せつ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などが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－家畜－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・購入および家畜排せつ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。

また、畜産農家以外の堆肥生産者や堆肥を利用した培土製造業者へも有用な情報を記載しています。

ここでは、堆肥を生産する畜産農家などが行うことについて記載しています。

A. 飼料購入時や飼養管理時に注意すること

飼料販売元からクロピラリドに関する情報を入手することが大切です。

クロピラリドは、国内での使用は認められていませんが、乾草や穀物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作物用の除草剤として使用されている場合があります。

農林水産省による実態調査によると、輸入飼料中のクロピラリド濃度は、乾草などの粗飼料ではごく低濃度のものがほとんどですが、ごく一部に高濃度のものが認められています。また濃厚飼料のうち穀類についても同様の傾向にありますが、特に、小麦ふすまや大麦ぬかは濃度が高い傾向にあります。

農林水産省は、飼料の輸入業者や製造業者に対し、輸入する飼料へのクロピラリドの使用状況を知り、必要に応じてクロピラリド濃度の分析を行うなど、それぞれの事業者が実施可能な範囲で可能な限りクロピラリド濃度の低減に努めるよう通知を発出しています。

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、生物検定又は残留分析により残留の有無を確認することができます。

生物検定法については第Ⅰ章を、残留分析法については第Ⅳ章を参照して下さい。

飼料へのクロピラリドの残留が確認された場合は、給与した家畜の排せつ物に由来する堆肥にもクロピラリドが残留している可能性があります。堆肥へのクロピラリドの残留は生物検定により確認することができます。

なお、クロピラリドが残留した飼料を家畜に給与しても、ほぼ全量がふん・尿中に排せつされるため、家畜の健康や畜産物の品質および安全性には影響がないと考えられます。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いため、クロピラリドを含むふん尿や堆肥を散布しても、生育にはほとんど影響しません。

また、家畜の体内に入ったクロピラリドは、給与中止後2週間を経過すればほぼ全て排せつされてしまいますので、その後クロピラリドを含まない飼料を給与すると、排せつ物にはクロピラリドがほぼ含まれないことになります。

B. 堆肥由来のクロピラリドによる生育障害の発生を防止するためには

生物検定や残留分析を行い、堆肥にクロピラリドが残留しているか否かを確認することができます。

生物検定法については第 I 章を、残留分析法については第 IV 章を参照して下さい。

堆肥原料中に含まれるクロピラリドは、堆肥化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。

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。

農業用活性炭によっては、堆肥に混合することで生育障害の発生を防止できることが確認されています。

活性炭の施用量は、残留濃度に応じて増やす必要があり、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 % 以上でした (表 I - 1 では残留指数 2 以上で園芸作物等への堆肥の施用を見合わせるようになっていますが、ここでは試験的に実施しました)。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、クロピラリドの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。

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、揮発して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〔融点は 151～152 °C、蒸気圧 1.33 mPa（25°Cの条件下）〕*。

*The Pesticide Manual 13th Edition (2003)より引用

C. 園芸農家などに堆肥を渡すときにすべきこと

堆肥に残留したクロピラリドによる生育障害が生じないように、クロピラリドに関する情報を確実に伝えることが大切です。

以下の事項について情報を確実に伝えてください。

- ① 牛ふん堆肥又は馬ふん堆肥にはクロピラリドが含まれている可能性があること
- ② 特に肥育牛の排せつ物を多く含む堆肥には、高い濃度でクロピラリドが含まれている可能性があること
- ③ 堆肥原料に関する情報の収集や、作付け前の試し栽培などの対策をとることで、生育への影響を防ぐことができること
- ④ トマト（ナス科）、スイートピー（マメ科）、キク（キク科）など、クロピラリドに感受性の高い作物をポットで栽培する場合は、家畜ふん堆肥の施用を控えること
- ⑤ クロピラリドに感受性の高い作物を施設において栽培する場合は、投入量を低減することや、土壌とよく混和すること

また、堆肥やその由来する家畜へ給与した飼料について生物検定等を実施した場合は、その結果も併せて堆肥を渡すときに伝えてください。

第Ⅳ章 残留分析法

第Ⅳ章では、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4種類提示します。生物検定法（第Ⅰ章）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、生育障害の原因物質すなわちクロピラリドを理化学機器により測定するものです。生育障害の原因がクロピラリドであると確定する必要性が生じた時、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性が生じた時に参考にして下さい。

4 種類の分析方法（A：飼料分析法、B：作物残留分析法、C：堆肥残留分析法は 2 種類）の特徴を下表に示しています。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。なお、肥料等試験法（2020）に収蔵されている高速液体クロマトグラフタンデム質量分析法（1：クロピラリド等 3 成分同時分析法、2：微量クロピラリド分析法（1）、3：微量クロピラリド分析法（2））も堆肥の分析に適用できます。

肥料等試験法（2020）：<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub9.html>

表 提示する 4 種類の機器分析法

	A：飼料分析法	B：作物残留分析法	C：堆肥残留分析法
適用媒体	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。	（1）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。 （2）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、HLB カラムおよび液液分配により精製を行ない、LC-MS/MS で測定する。定量下限値は 2 µg/kg 乾物であり、牛ふん堆肥、豚ふん堆肥、鶏ふん堆肥に適用可能である。

IV. 残留分析法

A. 飼料分析法

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

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 mm 膜厚 0.25 μ m）

キャリアーガス : He（1.0 mL/min）

試料導入法 : スプリットレス（60 s）

試料導入部温度 : 280 $^{\circ}$ C

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

イオン源温度 : 230 °C

イオン化電圧 : 70 eV

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 µg/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 °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。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 µg/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

(1) 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、更にメタノールで正確に 200 mL にする。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 °C 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。

(2) 液液分配による精製

(1) 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。

(3) 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。(2) 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。

(4) メチルエステル化

(3) 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 分開放置しメチルエステル化を行う。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。ヘキサン 4 mL を加えて残留物を溶かす。

(5) ミニカラムによる精製②

(4) 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 °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。

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。

(6) GC/MS による定量

(5) 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。

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

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

試料 10g

- ← 水40mLを加え、30分間放置
- ← 20w/v%水酸化ナトリウム水溶液1mL及びメタノール100mLを加える
- ← 30分間振とう
- ← 吸引ろ過 (5種B)
- ← メタノール50mLで容器及び残渣を洗浄

ろ液

- ← メタノールで200mLに定容後、300mLのなす形フラスコに40mLを分取
- ← pH9以上であることを確認
- ← 10mL以下まで減圧濃縮 (40℃以下)

液液分配

- ← 試料溶液を300mL分液漏斗Aに加える
- ← 10w/v%塩化ナトリウム水溶液10mLで容器を洗浄 (2回)
- ← 10w/v%塩化ナトリウム水溶液80mL及びジエチルエーテル50mLを加える
- ← 5分間振とう

ジエチルエーテル層 (上層) 捨てる

水層 (下層)

300mL分液漏斗B

- ← 硫酸 (1+17) 5mLを加え、pH5以下であることを確認
- ← ジエチルエーテル50mLを加える
- ← 5分間振とう

ジエチルエーテル層 (上層)

水槽 (下層)

300mL分液漏斗C

- ← ジエチルエーテル50mLを加える
- ← 5分間振とう

ジエチルエーテル層 (上層)

水層 (下層) 捨てる

200mL共栓三角フラスコ

- ← 硫酸ナトリウム (無水) 適量
- ← ろ過 (5種B)

200mLなす形フラスコ

- ← 減圧濃縮 (40℃以下) 後、窒素ガス乾固
- ← メタノール1mL及び0.1w/v%炭酸水素ナトリウム水溶液9mLを加える

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

(1) 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 (RSDr 及び RSDR) 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	添加回収率	室内繰返し精度	室間再現精度	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

(2) 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

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、レタス及びハウレンソウ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 (200 mg)

GFP ろ紙：GFP 60 mmcp

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

フードプロセッサー

ホモジナイザー（100 mL 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 3 μ m）

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

カラム温度：25 °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：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 °C、
デソルベーション温度: 300 °C、モニターイオン: 189.90→
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、20 mg/L) を調製する。これらの標準溶液各 5 µL 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

フードプロセッサ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。

(2) カートリッジカラム (Oasis HLB) による精製 1

(1) 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 ((3) 項も同様)。

(3) カートリッジカラム (Oasis HLB) による精製 2

(2) 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。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 3 mL) 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。

(4) LC-MS/MS による定量

(3) 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。

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

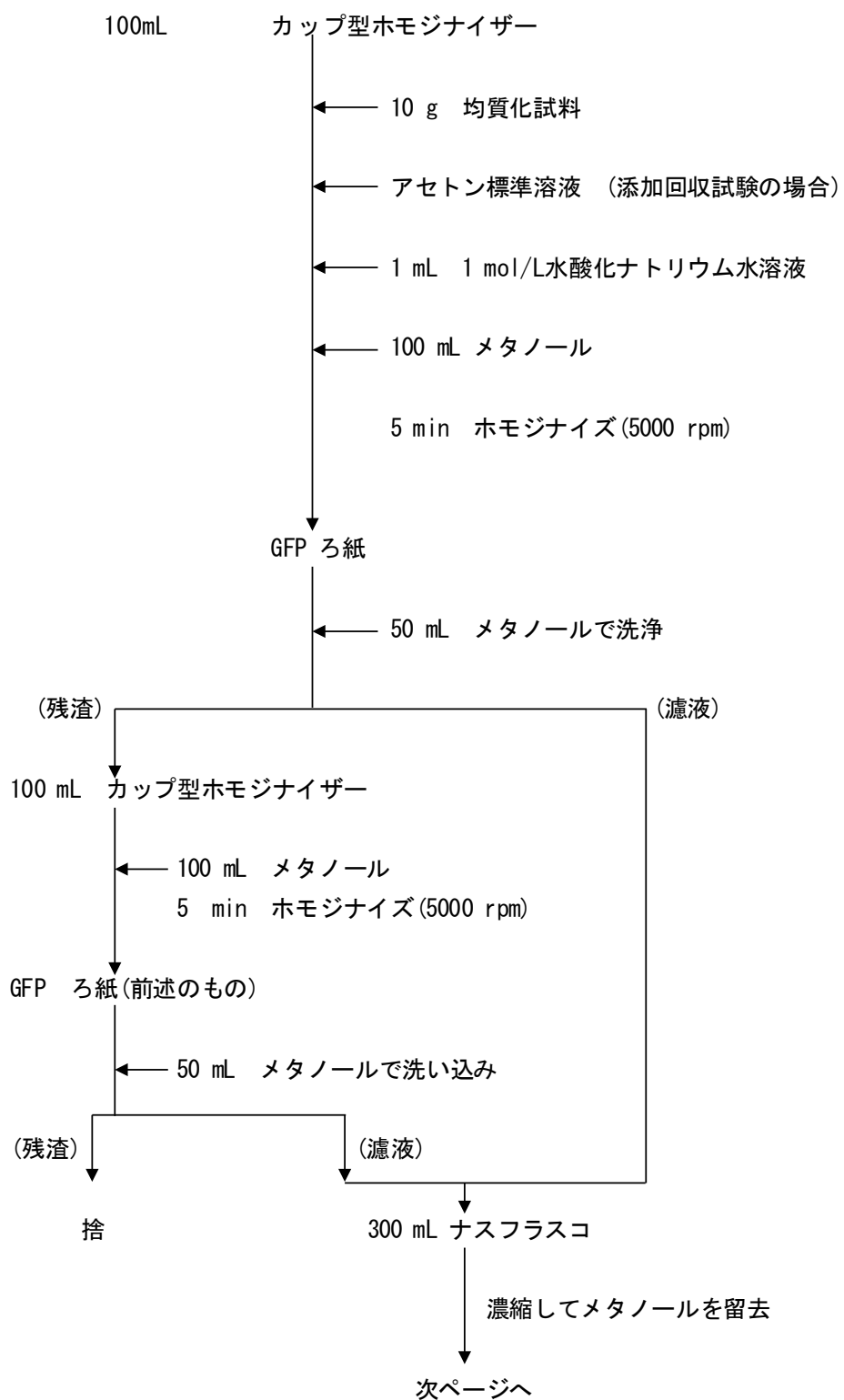
(5) 定量限界および検出限界

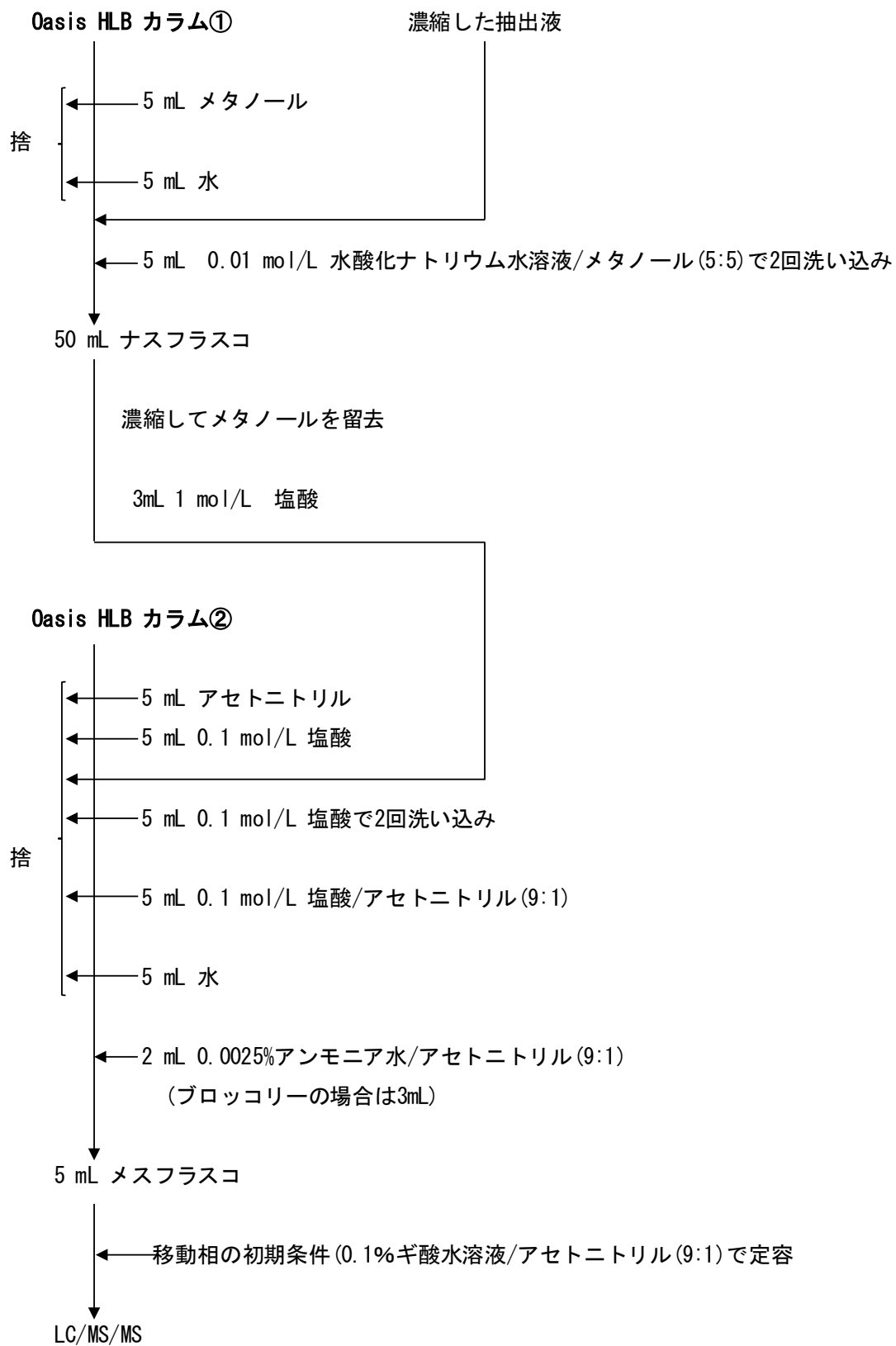
添加回収試験から最小定量可能量を 0.1 ng、検量線溶液の最低濃度から最小検出量を 0.05 ng とした。試料量を 10 g、最終液量を 5 mL、注入量を 5 μ L とすると定量限界は 0.01 ppm、検出限界は 0.005 ppm となる。

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

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

クロピラリド作物残留分析 前処理法フロー





6. 前処理法の検討資料

(1) 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 300 mL
約 0 %	ENVI-Carb	酢酸エチル 20 mL
約 0 %	ENVI-Carb	アセトン 20 mL
約 0 %	ENVI-Carb	ジクロロメタン 20 mL
約 60～70 %	Oasis HLB	ジクロロメタン 10 mL
約 80 %	Oasis HLB	酢酸エチル 5 mL
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) 2 mL
約 100 %	Oasis HLB	0.0025 %アンモニア水／アセトニトリル (90:10) 2 mL

→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。

(2) 作物抽出試験

①酸性化アセトン抽出

酸性下アセトン抽出では、濃縮したろ液に残渣が残り、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、濃縮液に溶かして HLB アンモニア溶出
×	Oasis HLB	濃縮液をジエチルエーテル／水液々分配後、濃縮して HLB アンモニア溶出

③ 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、濃縮ろ液の残渣を除去し、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
残漬が詰まった	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) 5 mL で溶出
約 50 %	Oasis HLB	0.01 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液/メタノール (1:9、9:1) 5 mL で溶出後、1 mol/L 塩酸 3 mL を加え HLB アンモニア溶出
約 75 %	Oasis HLB	0.01 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液/メタノール (5:5) 5 mL で溶出後、1 mol/L 塩酸 3 mL 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、0.01 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液/メタノール (5:5) 5 mL で溶出後、1 mol/L 塩酸 3 mL 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	
らっかせい		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
ばれいしょ		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(長いもをいう)		きゅうり		かき	
こんにゃくいも		(ガーキンを含む)		バナナ	
その他のいも類		かぼちゃ (スカッシュを含む)		キウイ	
てんさい	2	しろり		パパイヤ	
さとうきび		すいか		アボカド	
だいこん類 (ラティッシュを含む)の根		メロン類果実		パイナップル	
だいこん類 (ラティッシュを含む)の葉		まくわうり		グアバ	
かぶ類の根	1	その他のうり科野菜		マンゴー	
かぶ類の葉	4	ほうれんそう	5	パッションフルーツ	
西洋わさび		たけのこ		なつめやし	
クレソン		オクラ		その他の果実	
はくさい	2	しょうが		ひまわりの種子	
キャベツ	2	未成熟えんどう		ごまの種子	
芽キャベツ	2	未成熟いんげん		べにばなの種子	
ケール		えだまめ		綿実	
こまつな		マッシュルーム		なたね	2
きょうな		しいたけ		その他のオイルシード	2
デンゲンサイ	1	その他のきのこ類		ぎんなん	
カリフラワー	2	その他の野菜	4	くり	
ブロッコリー	2	みかん		ペカン	
その他のあぶらな科野菜	5	なつみかん		アーモンド	
ごぼう		なつみかんの外果皮		くるみ	
サルシフィー		なつみかんの果実全体		その他のナッツ類	
アーティチョーク		レモン		茶	
チコリ		オレンジ (ネーブルオレンジを含む)		コーヒー豆	
エンダイブ		グレープフルーツ		カカオ豆	
しゅんぎく		ライム		ホップ	5
レタス (サラダ菜及びちしやを含む)		その他のかんきつ類果実		サンショウの果実	
その他のきく科野菜		りんご		みかんの果皮	
たまねぎ		日本なし		その他のスパイス	4
		西洋なし		スペアミント	
				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。ただし、「その他の〇〇」に含まれる食品については、下記、公益財団法人日本食品化学研究振興財団ホームページなどでご確認ください。

農産物等の食品分類表 <https://www.ffcr.or.jp/zanryu/reference-list/post-88.html>

注2) 基準値は、令和2年9月現在のものであり、今後改正される場合がありますので、下記、公益財団法人日本食品化学研究振興財団ホームページなどでご確認ください。

残留農薬基準値検索システム <http://db.ffcr.or.jp/front/>

C. 堆肥残留分析法（１）

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：理化学用または家庭用

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 μm 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 μm)

カラム温度 : 40 $^{\circ}\text{C}$

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) $\rightarrow$ 15 % A (5 min) $\rightarrow$ 80 % A (10 min) $\rightarrow$
15 % A (15 min)

流速 : 0.2 mL/min

注入量 : 5 μL

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、146.0
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 10 g を秤量し、ホモジナイザー（ミキサー）内に精製水 100 mL で流し込む。軽くホモジナイズした後に、1 mol 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、16 hr 放置する。ろ紙（5 種 B）にセライトを敷きろ過する。残渣に、精製水 100 mL 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。2 mol/L 塩酸で抽出液を pH 2 にする。その後、酢酸エチル 150 mL 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 5 mL、0.01 mol L⁻¹ 塩酸で順次コンディショニングを行なった Sep-Pack C18 に負荷する。0.01 mol L⁻¹ 塩酸 5 mL で洗浄後、50 %メタノール水溶液 5 mL 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. 堆肥中の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・定量を行った

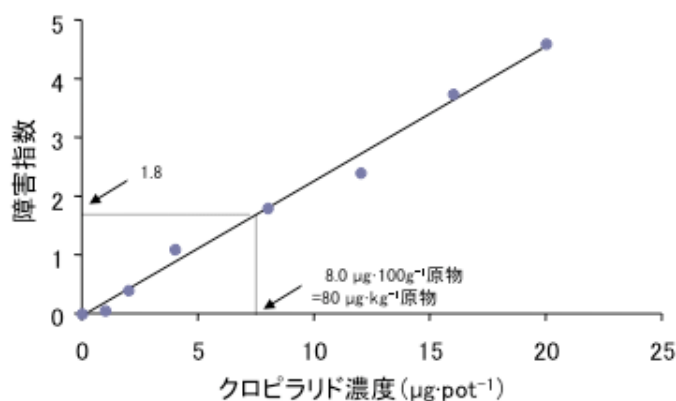
※2：N. D. は検出せず

(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）と本定量法を比較し検証を行なった。

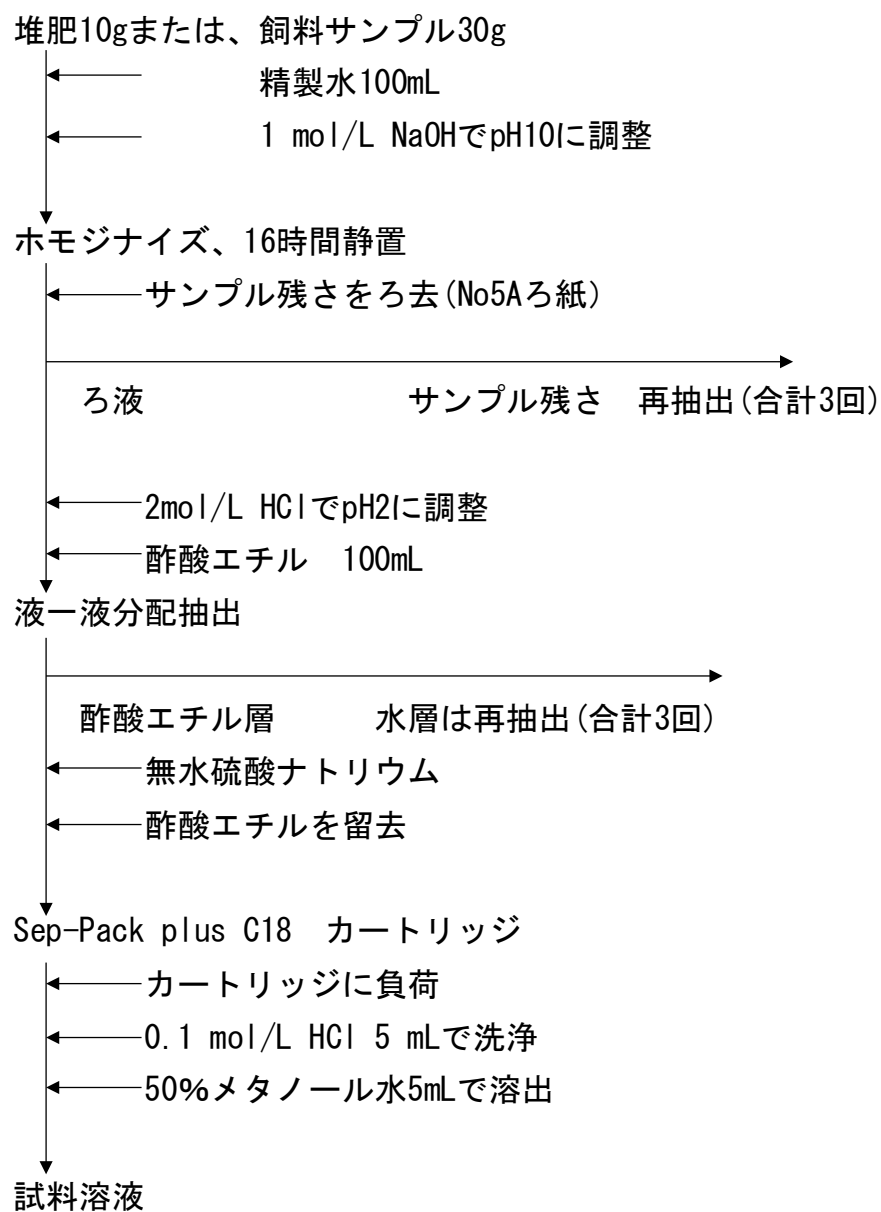
まず、生物検定法により堆肥中のクロピラリドの濃度の推定を行なった結果、サヤエンドウにクロピラリドの特徴的な障害が認められ、障害指数からクロピラリドの濃度を推定したところ、 $80 \mu\text{g}/\text{kg}$ であった（図IV-1）。次に、同じ堆肥を本定量法で定量を行なった結果、定量値は、 73 ppb ($n=4$, $\text{SE}=3.9$)であった。また、この堆肥には、他の除草剤（ピクロラム、アミノピラリド）の混入は認められていない。

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IV-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

堆肥残留分析法(1)フロー



C. 堆肥残留分析法（2）

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、アルカリ性下含水メタノールで抽出を行ない、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固相抽出カートリッジ（コポリマーカラム）および液液溶媒抽出により精製し、LC-MS/MS により測定する方法である。本分析法の定量下限値は 2 µg/kg 乾物であり、牛ふん堆肥、豚ふん堆肥、鶏ふん堆肥に適用可能である。

※ 本分析法は農研機構により牛ふん堆肥中クロピラリドの分析法として開発されました。その後、独立行政法人農林水産消費安全技術センターにより適用媒体の拡大が検討され、牛ふん堆肥、豚ふん堆肥、鶏ふん堆肥に適用できる高速液体クロマトグラフタンデム質量分析法（微量クロピラリド試験法（1））として肥料等試験法（2020）に収蔵されています。

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、ジクロロメタン、メタノール： 残留農薬試験用および LC/MS 測定用

アンモニア水、塩酸、水酸化ナトリウム、硫酸： 特級

ギ酸： HPLC 測定用

コポリマーカートリッジ（Oasis HLB 225 mg）

ガラス繊維製ろ紙（GFP）

遠心ろ過チューブ（PVDF membrane 0.22 µm）

振とう機

遠心分離機

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

ロータリーエバポレーター

LC-MS/MS

3. 機器の条件

高速液体クロマトグラフ：

カラム： Waters ACQUITY UPLC HSS TS (内径 2.1 mm、長さ 50 mm、粒径 1.8 µm)

流量 : 0.4 mL/min
溶離液 : A: 0.1%ギ酸 B: メタノール
グラジエント : 0 min (5 % B) → 2 min (5% B) → 7 min (60 % B) → 8 min (95% B)
→ 8.5 min (5% B) → 10 min (5% B)
カラム恒温槽 : 40°C
注入量 : 5 µL
質量分析計 :
イオン化法 : エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法
モード : ポジティブ
キャピラリー電圧 : 1.0 kV
コーン電圧 : 20 V
コリジョンエネルギー : 20 eV (定量) 30 eV (確認)
イオン源温度 : 120 °C
デソルベーション温度 : 400 °C
プリカーサーイオン : m/z 192 (定量) m/z 192 (確認)
プロダクトイオン : m/z 146 (定量) m/z 110 (確認)

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 0.1% ギ酸水溶液で希釈し、0.001、0.003、0.01、0.03、0.1、0.3 mg/L 標準溶液を調製する。これらの標準溶液各 5 µL 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

分析試料 5 g (乾物) をネジ付三角フラスコ (200~300 mL 容) に秤量する。メタノール/1M 水酸化ナトリウム水溶液 (99 : 1) 50 mL を加え、振とう機で約 30 分間振り混ぜる。静置後、上澄みを 50 mL 容ガラス遠心沈殿管に移し、2000 rpm で 10 分間遠心分離する。上清をメスフラスコ (100 mL 容) に移し、遠心沈殿管内の残渣をメタノール/1M 水酸化ナトリウム水溶液 (99:1) 20 mL×2 で洗浄する。洗浄液をネジ付三角フラスコに移し、再度振とう機で約 30 分間振り混ぜる。ガラス繊維製ろ紙 (GFP) で吸引ろ過、三角フラスコ内をメタノール/1M 水酸化ナトリウム水溶液 (99 : 1) 5 mL で洗浄し、洗液を吸引ろ過する。ろ液および洗液をメスフラスコに移し、メタノール/1M 水酸化ナトリウム水溶液 (99 : 1) で正確に 100 mL にする。

(2) カートリッジカラム (Oasis HLB) による精製 1

固相抽出カートリッジ (コポリマーカラム Oasis HLB、225 mg) を予めメタノール 5 mL および水 5 mL で洗浄する。ナスフラスコ (100 mL 容) をカートリッジの下に置き、抽出液 10 mL をホールピペット等で正確にカートリッジカラムに負荷し、液面が充填剤の上端に達するまで流出させる。0.01 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液/メタノール (1 : 1) 10 mL (5 mL×2 回) をカートリッジに負荷し、溶出液を回収する。突沸防止のため回収した溶出液に 5 mL 程度のメタノールを加え、液量が 5 mL 程度になるまでロータリーエバポレーターにて 40℃の湯浴中で減圧濃縮する。次いで 1 mol/L 塩酸を 3 mL 加え、濃縮液を酸性にする。

(3) カートリッジカラム (Oasis HLB) による精製 1

固相抽出カートリッジ (コポリマーカラム Oasis HLB、225 mg) を予めアセトニトリル 5 mL および 0.1 mol/L 塩酸 5 mL で洗浄する。濃縮液をカートリッジに負荷し、液面が充填剤の上端に達するまで流出させる。0.1 mol/L 塩酸 10 mL でナスフラスコを洗い込み (5 mL×2 回)、カートリッジに加え、同様に流出させる。次いで 0.1 mol/L 塩酸/アセトニトリル (9 : 1) 5 mL および水 5 mL でカートリッジを洗浄する。遠心沈殿管 (10 mL 容) をカートリッジの下に置き、0.0028w/v%アンモニア水/アセトニトリル (9 : 1) 4 mL をカートリッジに加え、溶出液を回収する。

(4) マイクロ液液抽出

(3) で得た溶出液に 1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液 0.1 mL を加え、ボルテックスで 5 秒程度攪拌する。ジクロロメタン 2 mL を加え、ボルテックスで 30 秒程度攪拌する。遠心分離 [740×g (2000 rpm) 3 分間] 後、下層 (ジクロロメタン相) をマイクロシリンジ等で吸い上げ、除去する。再びジクロロメタン 2 mL を加え、攪拌、遠心分離、下層の除去を同様に行う。次いで 12 mol/L 硫酸 0.15 mL を加え、ボルテックスで 5 秒程度攪拌する。ジクロロメタン 2 mL を加え、ボルテックスで 30 秒程度攪拌する。遠心分離 [740×g (2000 rpm) 3 分間] 後、下層 (ジクロロメタン相) をマイクロシリンジ等で吸い上げ、回収する。攪拌、遠心分離、下層の回収の操作を計 2~3 回行う。回収した下層をナスフラスコ (50~100 mL 容) に移し、ロータリーエバポレーターにて 40℃の湯浴中で減圧濃縮する。ナスフラスコ内をアセトン 2 mL で 2 洗い込み、これを試験管に移し窒素気流化で乾固するまで濃縮する。

(5) 最終検液の調製

(4) で得た濃縮液を乾固させた試験管に 0.1 % ぎ酸水溶液 0.2~2 mL (LC-MS/MS におけるクロピラリドの検出感度に応じて添加量を決定する) を加え、超音波処理を 3 分間行い、クロピラリドを再溶解させる。これを遠心ろ過チューブ (PVDF membrane 0.22 μm) に移し、遠心分離 [1700 $\times g$ (10000 rpm) 5 分間] して得られたろ液を最終検液とする。

6. 検討資料

(1) 定量下限及び検出下限の検討と回収試験

本法の定量下限及び検出下限を確認するため、牛ふん堆肥にクロピラリドを 2 $\mu\text{g/kg}$ 乾物相当量になるように添加した試料を本法で定量した (7 点併行試験)。得られた濃度から標準偏差を算出した結果、定量下限は 0.7 $\mu\text{g/kg}$ 乾物と推定した。

牛ふん堆肥にクロピラリドを 2、10 および 50 $\mu\text{g/kg}$ 乾物相当量になるように添加した試料を本法で定量した (5 点併行試験)。その結果、平均回収率は 71~79% (RSD $\leq 5\%$) であった。

堆肥残留分析法(2)フロー

牛ふん堆肥試料 5 g-DW

← メタノール/1M 水酸化ナトリウム (99:1) 50 mL

振とう抽出 (30分間)

遠心分離 [740×g (2000rpm) 10分間]

上清を回収

メタノール/1M 水酸化ナトリウム (99:1) 20 mL × 2回で洗い込み

振とう抽出 (30分間)

吸引ろ過

メタノール/1 M 水酸化ナトリウム (99:1) 5 mLで洗い込み

抽出液を合わせ100mLに定容

抽出液10 mL (堆肥試料0.5 g相当量)を分取

クリーンアップ① [コポリマーカラム (Oasis HLB 225mg)]

予備洗浄 : メタノール5mL, 水5mL

抽出液負荷

溶出 : メタノール/0.01M 水酸化ナトリウム (1:1) 10 mL

減圧濃縮・pH調整

← 1M 塩酸 3mL

クリーンアップ② [コポリマーカラム (Oasis HLB 225mg)]

予備洗浄 : アセトニトリル5mL, 0.1M 塩酸 5mL

濃縮液負荷

洗浄1 : 0.1M 塩酸 5mL × 2回 (減圧濃縮に使用したナス フラスコの洗い込み)

洗浄2 : 0.1M 塩酸/アセトニトリル(9:1) 5mL

洗浄3 : 水 5mL

溶出 : 0.0028%アンモニア水/アセトニトリル (9:1) 4mL

マイクロ液液抽出

← 1M 水酸化ナトリウム 0.1mL

ボルテックスで5秒攪拌

← ジクロロメタン 2mL

ボルテックスで30秒攪拌

遠心分離 [740×g (2000rpm) 3分間]

下相をマイクロシリンジ等で除去

計
2
回

← 12M 硫酸 0.15mL

ボルテックスで5秒攪拌

← ジクロロメタン 2mL

ボルテックスで30秒攪拌

遠心分離 [740×g (2000rpm) 3分間]

下相をマイクロシリンジ等で回収

計
2~3
回

← アセトン 4mL

減圧濃縮・窒素乾固

← 0.1%ギ酸水溶液 0.2~2 mL※ ※LC-MS/MSにおけるクロピラリドの
超音波処理 検出感度に応じて添加量を決定する

遠心ろ過 (PVDF membrane 0.22 μm) [1700×g(10000rpm) 5分間]

LC-MS/MS測定

参考資料

● 関連情報取得のためのリンク集 (2020 9.25 確認)

農研機構 生物検定ワークシート

<http://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/nilgs/contents/files/kentei-sheet.xls>

農研機構 「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」 画像データライブラリー

<http://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/nilgs/contents/database/clopyralid/index.html>

農研機構 土壌中クロピラリドが野菜・花きの初期生育に及ぼす影響・データ集

http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/pamphlet/tech-pamph/133546.html

農研機構 牛ふん堆肥中クロピラリドの高感度分析法(参考法)

http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/pamphlet/tech-pamph/078229.html

農林水産省 クロピラリド関連情報

<http://www.maff.go.jp/j/seisan/kankyo/clopyralid/clopyralid.html>

独立行政法人農林水産消費安全技術センター (FAMIC) 肥料等試験法(2020)

<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub9.html>

公益財団法人日本食品化学研究振興財団 農産物等の食品分類表

<https://www.ffcr.or.jp/zanryu/reference-list/post-88.html>

公益財団法人日本食品化学研究振興財団 残留農薬基準値検索システム

<http://db.ffcr.or.jp/front/>

EFSA Scientific Report (2005) 50, 1–65,

<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2006.50r>

Washington State University

<https://puyallup.wsu.edu/soils/clopyralid/>

Corteva Agriscience

<https://www.corteva.us/>

<https://www.corteva.us/products-and-solutions/crop-protection/stinger.html>

Weed Control Methods Handbook

<https://www.invasive.org/gist/products/handbook/11.Clopyralid.pdf#search=%27Clopyralid%27>

研究担当者等の情報

●初版関係

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

資金制度：新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業

実施年度：平成 18～20 年度

課題番号：18011

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) 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) 農林水産消費安全技術センター 農薬検査部 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

●第2版関係

課題名：堆肥中クロピラリドの高感度分析法の開発

資金制度：農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業（緊急対応研究課題）

実施年度：平成28年度

課題番号：28045C

研究担当者：

農研機構 農業環境変動研究センター

清家伸康、渡邊栄喜、並木小百合

課題名：作物被害低減のためのクロピラリド動態解明

資金制度：農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業（緊急対応研究課題）

実施年度：平成29年度

課題番号：29030C

研究担当者：

農研機構 農業環境変動研究センター

清家伸康、渡邊栄喜、並木小百合

農研機構 畜産研究部門

阿部佳之、小島陽一郎、神谷裕子、樋口幹人

農研機構 野菜花き研究部門

稲本勝彦、森川クラウジオ健治

宮崎県総合農業試験場

福田武美、杉田浩一、郡司孝幸、起汐一広

課題名：堆肥中のクロピラリドによる生育障害を防ぐための技術開発

資金制度：農林水産業 安全な農林水産物安定供給のためのレギュラトリーサイエンス研究委託事業

実施年度：令和元年度～令和2年度

課題番号：3101

研究担当者：

農研機構 農業環境変動研究センター

清家伸康、渡邊栄喜、並木小百合、稲生圭哉

農研機構 野菜花き研究部門

稲本勝彦

宮崎県総合農業試験場

永井浩幸、有簾隆男

飼料及び堆肥に残留する除草剤（クロピラリド）の簡易判定法と被害軽減対策マ
ニュアル（第2版）

編集者： 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構
農業環境変動研究センター 清家 伸康
中央農業研究センター 阿部 佳之

本マニュアルに関する問合せ先：

農研機構 農業環境変動研究センター 研究推進部 研究推進室

電子メール niaes_manual@ml.affrc.go.jp