

学位論文の要旨

氏名

大葉 佐世子

学位論文題目

殺虫剤環境変化体の活性推定と一斉分析方法の開発

本論文は、殺虫剤から生成する環境変化体の生態リスクが懸念される状況に鑑み、毒性が懸念される未知環境変化体 (pesticide transformation products:TPs) が環境中に存在する事例を探索し、農薬に加えてその環境変化体の生態リスクを検討する必要性を示したものである。

第1章では、殺虫剤環境変化体の調査研究例を整理した。その結果、未知環境変化体が多数存在すると考えられる殺虫剤が施用されていること、未変化体である農薬と同程度の毒性を示す既知環境変化体が存在すること、農薬より環境変化体の実環境中濃度が高い報告例が認められることなどが明らかとなった。また、農薬などの殺虫活性の評価方法を整理した結果、ニコチン性アセチルコリン受容体への親和性に基づいて評価している研究例が多いことが確認された。そこで本研究においても、環境変化体の殺虫活性の評価に、ニコチン性アセチルコリン受容体への親和性評価を用いることとした。これらのことから、ニコチン性アセチルコリン受容体への親和性を有すると考えられる未知環境変化体が存在するとの研究仮説を設定し、これを証明することを研究の目的とした。この目的を達成するために、1) 高感度検出が可能なLC/MS/MSを用いた親農薬と環境変化体の同時分析方法の検討、2) 高分解能LC/MSを用いた未知環境変化体の探索、3) ドッキングシミュレーションを活用した毒性高懸念環境変化体のスクリーニング、4) 合成した毒性高懸念物質を用いる河川水からの検出確認の4項目を検討することとした。

第2章では、疎水性の強いピレスロイド系殺虫剤エトフェンプロックス(EFP)をモデル物質として、その環境変化体(3物質)とあわせて一斉に分析する方法を検討し、実河川水に適用して生態リスクを評価した。これらの物質は、水-オクタノール分配係数(LogPow)が大きく異なる。各物質のLogPowは、最も大きなEFPで7.0、その環境変化体であるEFP-エステル体は6.5、EFP-カルボン酸体は3.9、EFP-アルコール体は2.7である。このため、河川水中の夾雑物との分離をLogPowに基づいて行う通常の方法では、高安定した回収率を得るのは困難と考えられた。そこで本検討では、疎水性の異なる官能基を持つ2種類の樹脂を用いてこの問題を解決した。はじめに、市販の確認できないEFP-エステル体を合成した。次に、LC/MS/MSを用いた4物質同時分析方法を確立した。また、河川水からのサンプル濃縮方法を検討し、河川水からEFP、EFP-エステル体、EFP-カルボン酸体、EFP-アルコール体を高収率かつ良好な再現性(CV%)で回収した。以上より、4物質を河川水から同時に効率よく回収可能なサンプル濃縮方法を確立

した。確立した手法を用いて農薬散布後の河川水を調査し、対象4物質の環境中濃度を明らかにし、高感度分析可能なことを確認した。また、4物質の毒性試験結果と比較検討したところ、生態リスクは認められなかった。

第3章では、ネオニコチノイド系殺虫剤ジノテフランを対象に、未知環境変化体を高分解能LC/MSを用いて探索し、これを発見した。発見した未知変化体の構造を、未変化体や既知変化体の構造および推定された分子式に基づいて推定した。推定された構造は、28物質(立体異性体として82物質)であった。これらの物質を対象に、ニコチン性アセチルコリン受容体への親和性を評価した。評価は、ヨーロッパモノアラガイのグリア細胞由来のアセチルコリン結合タンパク質を用いたドッキングシミュレーションにより行った。まず、ドッキングシミュレーション条件の妥当性を検証した。検証は、生物に対する毒性強度が既知な農薬イミダクロプリドとその環境変化体、およびジノテフランとその構造改変体(構造異性体として72物質、立体異性体として160物質)を用いて行った。その結果、親農薬と同程度以上の殺虫活性を保持しているすべての物質の結合親和性が高いと確認された。この条件を推定した28物質に適用した結果、殺虫活性を保持している可能性がある物質が20物質選定され、これらの物質を優先して環境モニタリングすべき物質と判断した。

第4章では、第3章で毒性が懸念された未知変化体のうち、ジノテフランと同様の殺虫活性が発現される可能性があり、他の未知変化体よりも安定な構造を有しており、実環境中から研究される可能性の高い1物質(TPs **A**)に着目した。対象物質の市販が確認できなかったため、これを合成し、LC/MS/MSを用いた高感度分析に必要な選択反応モニタリング(SRM)条件を求めた。求めたSRM条件を用いて、航空防除によりジノテフランが散布された地域を流れる河川水中から対象物質が検出されることを確認した。

第5章では、本研究で得られた成果を総括した。

Summary of Doctoral Dissertation

Title of Doctoral Dissertation:

Nicotinic Acetylcholine Receptor Binding Affinity Evaluation and Environmental Monitoring of Pesticides and Their Transformation Products

Name: Oba, Sayoko

This thesis mainly discusses the need of ecological risk assessments of pesticide transformation products (TPs) as well as their intact pesticides due to their possible ecological risks.

Chapter 1 marshaled previous studies on pesticides' TPs. As a result, there are pesticides that are expected to have a number of unknown TPs. Additionally, there are some reports that their pharmacological activities are comparable to that of a parent pesticide. Thus, it was hypothesized that unknown TPs would exhibit high binding affinity for nicotinic acetylcholine receptor. The objective of this study is to corroborate the hypothesis shown above. Inspection into the following four subjects were performed to achieve this: 1) to develop a simultaneous analytical method for determining their trace concentrations using highly sensitive LC/MS/MS, 2) to explore unknown TPs using high-resolution LC/MS, 3) to screen TPs having high toxicity by docking simulation, 4) to confirm their presence in actual river waters by using synthesized toxic TPs.

Chapter 2 described the development of a simultaneous analytical method for determining etofenprox and its TPs in actual river water, and discussed their ecological risk assessments. Etofenprox is a very hydrophobic pyrethroid (LogPow = 7.0). Simultaneously recovering etofenprox and its TPs (etofenprox-alcohol, LogPow = 2.7; etofenprox-ester, LogPow = 6.5; etofenprox-carboxylic acid, LogPow = 3.9) from river water will be difficult. In this study, the problem was overcome using two hydrophobic resin. First, the synthesis of the ester was conducted because it was not available in the market. Second, a simultaneous analytical method for these analytes was developed using highly sensitive LC/MS/MS. Recovery tests of these analytes were performed with the optimized procedure and showed sufficient recoveries (70~100%) and repeatabilities (CV = 2.2~4.5%). The procedure was applied to the analyses of actual river water taken from a basin into which etofenprox had been sprayed. The LOQ values obtained by the analyses of these analytes were in the range of 0.18-0.68 ng/L, indicating that a sensitive analytical method to detect them were developed. They did not pose ecological risks to *Chironomus yoshimatsui* or *Daphnia magna* in this study.

Chapter 3 discussed the binding affinity evaluation of unknown dinotefuran's TPs and its isomers to a nicotinic acetylcholine receptor. Dinotefuran's TPs were explored using high-resolution LC/MS. This resulted in the discovery of two unknown TPs. Structural elucidations of these two

compounds suggested 28 and 82 chemical structures in terms of structural isomers and steric isomers, respectively. Their binding affinities for a glia-derived acetylcholine-binding protein of *Lymnaea stagnalis* were simulated to estimate their insecticidal activities. Out of 28 candidates, 20 were judged to have significant insecticidal activities. It can be concluded that to evaluate binding affinities of multiple substances, the so-called docking simulation, is a promising way to screen a large number of candidate substances; a substance with high binding affinity probably should be monitored preferentially.

Chapter 4 focused on TPs **A** among the 20 candidates determined in Chapter 3. It was synthesized in our laboratory because it was not available in the market. Its selected reaction monitoring (SRM) transitions were optimized. LC/MS/MS analyses performed with the optimized method detected it in actual river water.

Chapter 5 summarized the remarkable points in this study.