

〈学位論文の要約〉

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

鹿児島大学大学院理工学研究科博士後期課程
総合理工学専攻 大葉 佐世子

第1章 緒論

農薬¹⁾の使用により、日本の農業は飛躍的に発展した。一方で、戦後に導入された一部の農薬で、使用中の事故が多発し社会問題となった。現代の農薬は、残留性が低く、易分解性の新しい農薬が多種設計・開発されており、農薬取締法²⁾に基づき、厳重な管理の下で使用されている。また、施用された農薬は、易分解性の農薬であっても二酸化炭素のような無機化合物まで分解されず、農薬由来の構造を有する分解物(有機化合物)として残留している例³⁾もあり、植物中や土壌中で分解されて生成する主要な分解物についても安全性評価が行われている⁴⁾。しかし、安全性が確認された分解物についても浄水場で水と共に塩素処理される過程で変異原性を示す物質に変換される可能性がある⁵⁾。

本研究では、農薬が水環境中で酸化や加水分解などの様々な分解を受けて変化した別の物質を、環境変化体(Pesticide Transformation Products in Water environments : (PTPWs)と定義し、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(Table 1)⁶⁾、農薬より環境変化体の実環境中濃度が高い報告例⁷⁾が認められることなどが明らかとなった(Fig. 1)。

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⁸⁾への親和性に基いて評価している研究例⁹⁾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。

Table 1 イミダクロプリドとその環境変化体の毒性値の比較⁷⁾

	Imidacloprid	Imidacloprid _olefin
48h-EC ₅₀ [*] (ng/L)	21,000	18,000

*セスジユスリカ遊泳阻害濃度

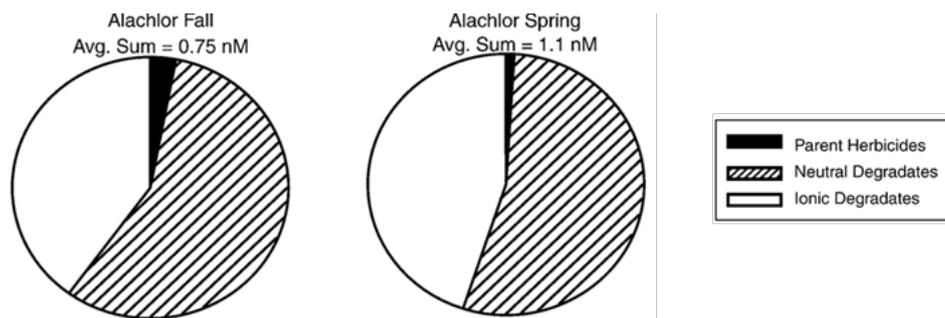


Fig. 1 アラクロールとその環境変化体の存在比⁹⁾

参考文献

- 1) 佐藤仁彦, 宮本徹 (2005) 農薬学, 朝倉書店, 1
- 2) 農薬取締法 農林水産省消費・安全局農産安全管理課農薬対策室.
- 3) 金沢純, 1994. 農薬の環境科学. 合同出版, 東京.
- 4) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター, 農薬抄録及び評価書 <http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/index.htm> (2019年12月時点).
- 5) Kishida, M., Takanashi, H., Kofune, H., Nakajima, T., and Ohki, A. 2008. Mutagen Formation Potential of Composite Samples Prepared by Biodegradation of Agricultural Chemicals, *J. Wat. and Environ. Technol.*, 6(1), 19-33.
- 6) 高梨啓和, 門川淳一, 宮本信一, 石川英律, 2017. ネオニコチノイド系農薬の環境変化体の探索とその生態影響の調査(5-1406). 環境省環境研究総合推進費終了研究等成果報告書. 鹿児島大学, 鹿児島島.

- 7) Hladik, ML., Bouwer, EJ., Roberts, AL., 2008. Neutral chloroacetamide herbicide degradates and related compounds in Midwestern United States drinking water sources. *Science of the Total Environment*. 390, 155-165.
- 8) 宮澤淳夫, 藤吉好則, 2004. ニコチン性アセチルコリン受容体の構造と機能. 蛋白質核酸酵素 49(1), 1-10.
- 9) Shahsavar, A., Gajhede, M., S. Kastrup, J., and Balle, T., 2016. Structural Studies of Nicotinic Acetylcholine Receptors: Using Acetylcholine-Binding Protein as a Structural Surrogate. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 118, 399-407.

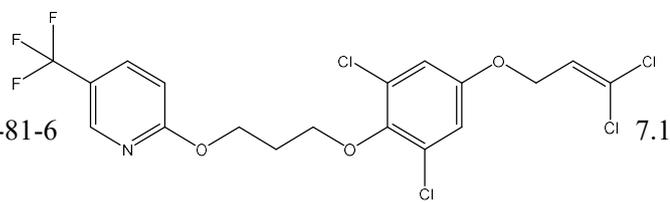
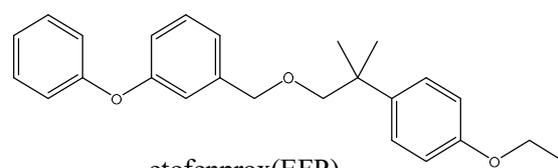
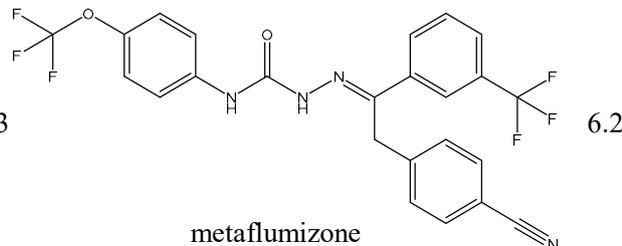
第2章 河川水中のエトフェンプロックスとその環境変化体の一斉分析方法

第1章で述べたように、環境変化体の生態リスクが懸念されるが、親農薬と環境変化体を同時に環境モニタリングおよび毒性試験し、生態リスクの評価を実施している報告例は少ない。また、リスク評価には標準物質が必要だが、環境変化体の市販は少なく、入手は困難である。また、河川水中濃度を一斉分析する際にも問題が生じる。**Table 2**に、いくつかの農薬と、その環境変化体の水-オクタノール分配係数の予測値 (XLogP3¹⁾) を示した。**Table 2**より、未変化体より親水性が高い環境変化体を持つ農薬があることがわかる。すなわち、疎水性の高い親農薬から親水性の高い環境変化体が生成する可能性がある。日本の水質基準に基づいた農薬の検査方法²⁾はGC/MSやLC/MSを用いる分析方法が主流であり、その多くは固相抽出法によって環境試料の前処理を行っている。分析方法の選択は疎水性をはじめとする分析種の物理化学的性質によるところが大きく、親農薬と同じ方法でPTPWsを同時に分析するのは困難な場合があると予想できる。また、一般的な固相抽出法は疎水性相互作用を利用しており、親農薬とPTPWsを同時に効率よく回収できるような新たな発想の前処理方法が必要となる。

そこで本研究では、鹿児島県で水稻航空防除されており、疎水性が高いピレスロイド系殺虫剤エトフェンプロックス (EFP, XLogP3 = 7.0) を対象に、EFPおよびその環境変化体の一斉分析による環境モニタリングおよび毒性試験結果に基づくリスク評価を試みた。分析対象物質は親農薬EFP (**1**) とその環境変化体計4物質とした^{3,4,5)}。この3物質についてもEFPと同時に分析している報告例を見つけることはできない。また、EFP-エステル体 (**2**) の市販は確認できず、入手困難であったため、EFP-エステル体の合成戦略を策定し、合成した。次に、疎水性が高くGC-MSでの分析例^{6,7)}が多く報告されているEFPと、EFP-アルコール体とEFP-カルボン酸体のような親水性官能基を有する環境変化体を同時に分析するために、対象の4物質を液体クロマトグラフ-高質量精度分析計を用いて同時にselected reaction monitoring (SRM) 測定する条件および固相抽出 (solid phase extraction: SPE) を用いて河川水からLC/MS/MSサンプルを調製する前処理条件を検討し、2種類の樹脂を使用することで、各物質を高収率かつ良好な再現性 (CV%) で回収する手法を確立した。最後に、確立した分析メソッドを用いて環境水中のEFPおよびその環境変化体の環境モニタリングを実施し、実環境試料からの検出確認および河

川水中濃度を求めた。また、農薬取締法に基づいた甲殻類等に対する生態リスクを評価するために、共同研究者より提供された4物質の毒性試験結果⁸⁾から甲殻類等の急性影響濃度 (Acute Effect Concentration : AECd) を算出し、河川水中最高濃度と比較することで、甲殻類等に対するリスク評価を行った。その結果、リスクは認められなかった。

Table 2 親農薬と PTPWs の疎水性の比較 (抜粋)

parent pesticide			PTPWs	
CAS RN	name and structure	XLogP3	CAS RN	XLogP3
179101-81-6	 pyridalyl	7.1	3039-55-2	1.3
			1561-20-2	1.5
			141-82-2	-0.8
			33252-63-0	0.6
80844-07-1	 etofenprox(EFP)	7	83493-63-4	2.7
			117252-00-3	6.5
			3739-38-6	3.9
139968-49-3	 metaflumizone	6.2	146653-56-7	3.8
			619-56-8	1.6
			144172-28-1	1.7
			105-07-7	1.2

本章の引用文献

- 1) National center for biotechnology information, Chemical and physical properties; computed properties. URL. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (2019年12月時点).
- 2) 厚生労働省健康局, 水質基準に関する省令の制定及び水道法施行規則の一部改正等について <https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000028346.pdf> (2019年12月時点).
- 3) 内閣府食品安全委員会, 2018. 農薬評価書 エトフェンプロックス. URL. <http://www.fsc.go.jp/fsciis/evaluationDocument/list?itemCategory=001> (2019年12月時点).
- 4) 三井化学アグロ株式会社, 2018. 農薬抄録 エトフェンプロックス. URL.

<http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/index.htm> (2019年12月時点).

5) Rong, T., Eto, M., (1990). Photolytic and chemical oxidation reactions of the insecticide ethofenprox. *Journal of Pesticide Science*, 15(3), 405-411.

6) Añasco, N., Uno, S., Koyama, J., Matsuoka, T., & Kuwahara, N. (2010). Assessment of pesticide residues in freshwater areas affected by rice paddy effluents in Southern Japan. *Environmental monitoring and assessment*, 160(1-4), 371.

7) Kameya, T., Yamazaki, K., Kobayashi, T., & Fujie, K. (2010). Ecological assessment of water quality by three-species acute toxicity test and GC/MS analysis-A case study of agricultural drains. *Journal of Water and Environment Technology*, 8(3), 223-230.

8) 高梨啓和, 門川淳一, 宮本信一, 石川英律, 2017. ネオニコチノイド系農薬の環境変化体の探索とその生態影響の調査(5-1406). 環境省環境研究総合推進費終了研究等成果報告書. 鹿児島大学, 鹿児島.

第3章 ジノテフラン未知環境変化体の探索・構造推定とアセチルコリン受容体への結合親和性評価

農薬の環境変化体の中には、河川水中の濃度が農薬よりも高濃度な物質や、農薬と同程度の薬理活性を有する物質が報告されている¹⁾。このため、環境変化体の水生生物に対する影響の検証が重要だが、ネオニコチノイド系殺虫剤ジノテフランについては、環境変化体の構造や殺虫活性の検討例が少ない^{2,3)}。

そこで本研究では、ジノテフラン水溶液にクセノンランプ光を照射し、高分解能 LC/MS を用いて、生成した環境変化体を探索した。その結果、2物質の未知環境変化体を発見した。その2物質の構造を推定したところ、28物質（立体異性体として82物質）が推定された。推定された構造の物質の中から、殺虫活性を保持している可能性があり検討の優先順位が高い物質を選定した。選定は、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⁴⁾への結合親和性評価により行った。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^{5,6)}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^{7,8)}）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（Fig. 2）。

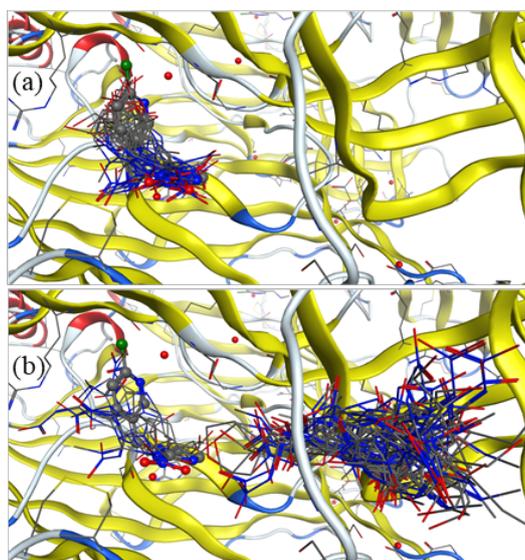


Fig. 2 錯体中のイミダクロプリドの配置と構造推定したジノテフラン未知 PTPWs のシミュレーション結果（配置）の比較 ((a)錯体中のイミダクロプリドと同じ位置に同じ配置方向で結合した異性体, (b) その他の異性体)

本章の引用文献

- 1) 高梨啓和, 門川淳一, 宮本信一, 石川英律, 2017. ネオニコチノイド系農薬の環境変化体の探索とその生態影響の調査(5-1406). 環境省環境研究総合推進費終了研究等成果報告書. 鹿児島大学, 鹿児島.
- 2) 内閣府食品安全委員会, 2017. 農薬・動物用医薬品評価書 ジノテフラン. URL. <http://www.fsc.go.jp/fsciis/evaluationDocument/list?itemCategory=001> (2019年12月時点).
- 3) 三井化学アグロ株式会社, 2015. 農薬抄録 ジノテフラン. URL. <http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/index.htm> (2019年12月時点).
- 4) Smit, A., Syed, N., Schaap, D., Minnen, J., Klumperman, J., Kits, K., Lodder, H., Schors, R., Elk, R., Sorgedraeger, B., Brejc, K., Sixma, T., Geraerts, W., 2001. A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. *Nature* 411, 261-268.
- 5) 内閣府食品安全委員会, 2016. 農薬評価書 イミダクロプリド. URL. <http://www.fsc.go.jp/fsciis/evaluationDocument/list?itemCategory=001> (2019年12月時点).
- 6) バイエルクロップサイエンス株式会社, 2013. 農薬抄録 イミダクロプリド. URL. <http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/index.htm> (2019年12月時点).
- 7) Wakita, T., Kinoshita, K., Yasui, N., Yamada, E., Kawahara, N., Kodaka, K., 2004. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Dinotefuran Derivatives: Modification in the Nitroguanidine Part. *Journal of Pesticide Science* 29(4), 348-355.

- 8) Wakita, T., Kinoshita, K., Kodaka, K., Yasui, N., Naoi, A., Banba, S., 2004. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Dinotefuran Derivatives: Modification in the Tetrahydro-3-furyl-methyl Part. *Journal of Pesticide Science* 29(4), 356-363.

第4章 ジノテフラン新規環境変化体の合成と河川水からの検出

第3章で、ジノテフランの未知環境変化体を探索し、構造推定した28物質の構造異性体の中から、未変化体と同程度以上の殺虫活性を保持している可能性があり検討の優先順位が高い物質を20物質選定した¹⁾。本章では、この20物質のうちのひとつ、TPs Aに着目した。TPs Aは、ジノテフランと同じトキシコフォアを保持しているため、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いるため、実環境中から検出される可能性が高い。さらに、昆虫のニコチン性アセチルコリン受容体への結合に重要な構造とされる部分構造²⁾を保存しており、優先的に検討すべきと考えられる。

TPs Aの市販が確認できなかったため、ジノテフランの合成経路²⁾や種々の官能基変換反応^{3,4)}を参考に合成経路を策定し、TPs Aを合成した。合成物を標準物質として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 (selected reaction monitoring, SRM) 条件およびLC分離条件を求めた。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TPs Aが検出されることを確認した (Fig. 3)。

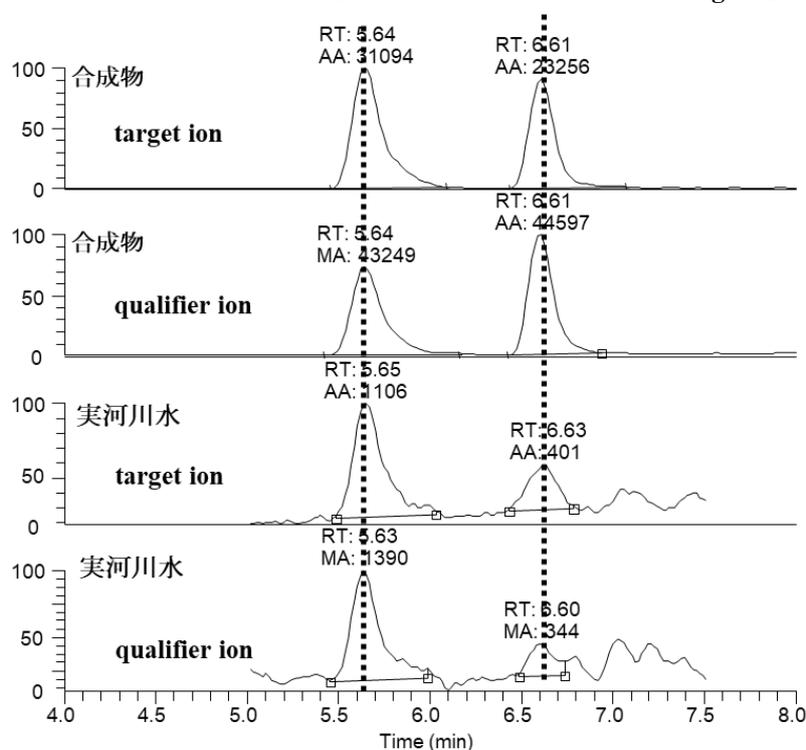


Fig. 3 合成した新規環境変化体 (TPs A) の河川水からの検出

本章の引用文献

- 1) 大葉佐世子, 桐原晃希, 大土橋真希, 高梨啓和, 中島常憲, 上田岳彦, 門川淳一, 石川英律, 宮本信一, 2020. モノヒドロキシジノテフランおよびその異性体のアセチルコリン受容体への結合親和性評価. 水環境学会誌 43(1), 1-7.
- 2) Wakita, T., Kinoshita, K., Yamada, E., Yasui, N., Kawahara, N., Naoi, A., Nakaya, M., Ebihara, K., Matsuno, H., Kodaka, K., 2003. The discovery of dinotefuran: a novel neonicotinoid. *Pest Management Science* 59, 1016-1022.
- 3) Wakita, T., Kinoshita, K., Yasui, N., Yamada, E., Kawahara, N., Kodaka, K., 2004. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Dinotefuran Derivatives: Modification in the Nitroguanidine Part. *Journal of Pesticide Science* 29(4), 348-355.
- 4) Wakita, T., Kinoshita, K., Kodaka, K., Yasui, N., Naoi, A., Banba, S., 2004. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Dinotefuran Derivatives: Modification in the Tetrahydro-3-furyl-methyl Part. *Journal of Pesticide Science* 29(4), 356-363.

第5章 総括

第1章では、我が国における農薬の管理状況を確認し、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分離方法では、高く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、毒性試験結果より算出した AECd と環境中濃度を比較したところ、甲殻類等に対する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、ジノテフラン光照射サンプル中の未知環境変化体を液体クロマトグラフー高分解能質量分析計を用いて探索し、未知変化体を 2 物質発見した。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 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。

以上のように、親農薬と環境変化体を同時にリスク評価するための 4 つの問題点の解決を試みた。その結果、ニコチン性アセチルコリン受容体への親和性を有する、すなわち、毒性が懸念される未知環境変化体を実環境中に存在することを証明した。このような事例を示したことで、親農薬に加えて環境変化体もリスク評価することの必要性を示すことができた。

今後、日本の農業および農薬開発技術の発展に伴って、新しい農薬が多種開発されることだろう。その際に、親農薬だけでなく環境変化体についても常に着目し、人々が安心して食物を口に、安心して生活できるよう、農薬環境変化体の研究が活発になることを望む。