

学位論文の要約

氏名

橋本 扶美

学位論文題目

殺虫剤イミダクロプリドの環境変化体の生態リスク評価

第1章 緒論

(1.1) 農薬

農薬は古くから積極的に使用され、我々と密接に関係している化学物質である¹⁻³⁾。今日までに様々な農薬が開発・販売されており⁴⁻⁶⁾、その安全性は、農薬取締法（以下、農取法）⁷⁾で厳しく管理されている。農取法の中心となっているのが、農薬の登録制度であり、日本国内において、農薬を製造、加工または輸入する場合、農林水産大臣の登録が必要である。登録を受けるためには、製造者または輸入者は、農薬登録申請書、薬効・薬害・毒性・残留性に関する試験成績等の資料を、独立行政法人農林水産消費安全技術センター（以下、「センター」という）を経由して大臣に提出しなければならない。センターでは、提出された試験成績に基づいて、登録申請された農薬を総合的に検査し、農林水産省にその結果を報告する。農林水産省は、この結果から、その農薬を登録するか否か判断する（図1-1²⁾）。これらの試験方法は農取法で細かく定められており⁸⁻¹⁴⁾、人畜のみならず、有用昆虫および鳥類に対する影響も検査することが定められている¹⁵⁾。

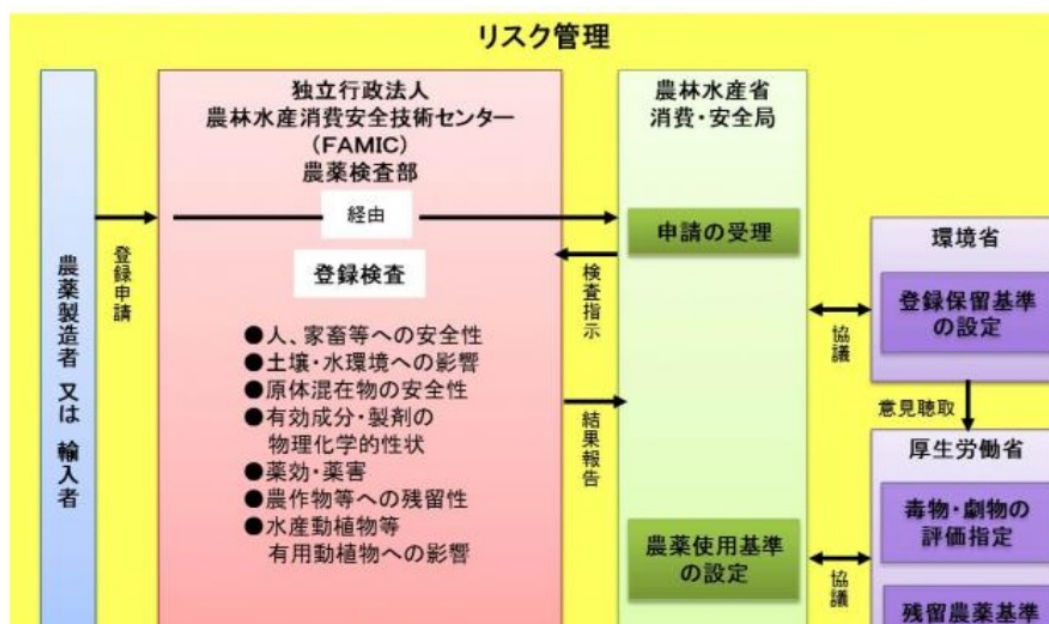


図1-1 農薬登録の仕組み（農林水産省HP²⁾より抜粋）

(1.2) 環境変化体

農薬は、環境中に暴露された後、加水分解、生分解、光分解等の過程を経て、別の物質に変化している可能性がある。本研究では、水環境中での変化に着目し、環境変化体をPesticide Transformation Products in Water environments (PTPWs)と定義した。

農薬は残留性が低くなるように設計されているため、ひとつの農薬から多数の環境変化体が生成することが予測される。しかし、環境変化体の環境中濃度または生態リスク評価に関する研究例は少なく、また対象物質が限定的である（表1-1, 図1-2）¹⁶⁻²⁴⁾。また、本研究で対象とするイミダクロプリドについては、報告されている環境変化体が27物質であるのに対し、入手可能な環境変化体は、わずか9物質である（表1-2）²⁵⁻³¹⁾。水中から1 µg/L以下の濃度で検出報告される物質の分析には、高感度液体クロマトグラフィー三連四重極質量分析機器（LC-MS/MS）が必要であり、その分析には標準物質が必要不可欠である。また、標準物質は、毒性試験においても必要不可欠である。これらのことから、変化体の標準物質が入手困難であるために、変化体の環境モニタリングや生態リスク評価に関する情報が少ないことが考えられる。親農薬よりも環境変化体の毒性が高く現われた研究例が報告されており³²⁾、環境変化体の生態リスクは無視できないと考えられる。上述した農取法において、環境変化体についての試験は、主要代謝物に限られており¹⁵⁾、環境変化体に関する規制では、不十分である可能性が考えられる。

表1-1 水稲農薬環境変化体の河川水中濃度/生態リスク評価に関する研究例¹⁶⁻²⁴⁾

Parent pesticide	Transformation products	Maximum concentration in environment (ug/L)				Risk quotient ^{b)}		Reference				
Bromobutide		13.7	0.813	-	-	<0.004 ^{c)}	<0.008 ^{e)}	27	31	-	-	27
	Bromobutide desbromo	0.318	0.296	-	-	<0.001 ^{c)}	<0.001 ^{e)}	27	31	-	-	27
Cafenstrole		1.6	0.586	-	-	<0.002 ^{c)}	0.053 ^{e)}	30	31	-	-	27
	Cafenstrole-descarbamoyl	no data ^{a)}	0.335	-	-	<0.001 ^{c)}	<0.001 ^{e)}	30	31	-	-	27
Carbosulfan		<0.001	no data ^{a)}	0.23	-	0.008 ^{d)}	0.004 ^{f)}	31	26	30	-	27
Benfuracarb		0.004	-	-	-	0.018 ^{d)}	0.010 ^{f)}	31	-	-	-	27
	Carbofuran	0.257	-	3.4	157	0.209 ^{d)}	0.224 ^{f)}	31	-	30	33	27
	Carbofuran-3-hydroxy	0.001	-	-	-	<0.001 ^{d)}	<0.001 ^{f)}	31	-	-	-	27
	Carbofuran phenol	-	no data ^{a)}	-	-	no data ^{a)}	no data ^{a)}	-	26	-	-	27
Clomeprop		0.073	0.1	-	-	<0.003 ^{c)}	<0.003 ^{e)}	27	31	-	-	27
	Clomeprop propionic acid	0.925	1.54	-	-	<0.001 ^{c)}	<0.001 ^{e)}	27	31	-	-	27
Diazinon		0.013	1.34	-	-	0.337 ^{d)}	0.384 ^{f)}	31	33	-	-	27
	Diazinon oxon	<0.001	no data ^{a)}	-	-	0.002 ^{d)}	0.008 ^{f)}	31	33	-	-	27
Fenitrothion		0.387	-	-	-	0.813 ^{d)}	27.41 ^{f)}	31	-	-	-	27
	Fenitrothion oxon	0.004	-	-	-	0.014 ^{d)}	0.052 ^{f)}	31	-	-	-	27
Fenthion		0.043	-	-	-	0.256 ^{d)}	0.409 ^{f)}	31	-	-	-	27
	Fenthion oxon	0.003	-	-	-	0.014 ^{d)}	0.011 ^{f)}	31	-	-	-	27
	Fenthion sulfone	0.016	-	-	-	0.043 ^{d)}	0.156 ^{f)}	31	-	-	-	27
Fipronil		0.158	-	-	-	0.092 ^{d)}	0.117 ^{f)}	31	-	-	-	27
	Fipronil	6.41	-	-	-	0.391 ^{d)}	0.001 ^{f)}	32	-	-	-	27
	Fipronil carboxamide	-	-	-	-	0.001 ^{d)}	<0.001 ^{f)}	-	-	-	-	27
Molinate		1.54	-	-	-	0.064 ^{d)}	0.001 ^{f)}	32	-	-	-	27
	Fipronil sulfide	0.507	-	-	-	0.565 ^{d)}	0.001 ^{f)}	32	-	-	-	27
	Fipronil sulfone	0.282	-	-	-	0.191 ^{d)}	0.004 ^{f)}	32	-	-	-	27
	Molinate	0.475	-	-	-	-	-	33	-	-	-	27
Propanil		no data ^{a)}	-	-	-	-	-	29	-	-	-	27
	3,4-dichloroaniline	no data ^{a)}	-	-	-	-	-	29	-	-	-	27
Pyrazolynate		0.009	-	-	-	<0.002 ^{c)}	<0.002 ^{e)}	31	-	-	-	27
	Pyrazolynate destosyl	0.108	-	-	-	<0.001 ^{c)}	<0.001 ^{e)}	31	-	-	-	27
Tefuryltrione		N. D. ^{g)}	-	-	-	-	-	28	-	-	-	27
	CMTBA	0.35	-	-	-	-	-	28	-	-	-	27
Terbufos		0.05	no data ^{a)}	-	-	-	-	25	26	-	-	27
	Terbufos-sulfone	no data ^{a)}	no data ^{a)}	-	-	-	-	25	26	-	-	27

a) No concentration data in text. b) PEC/AEC. c) *Mayamaea atomus*, d) *Cheumatopsyche brevilineata*, e) *Pseudokirchneriella subcapitata*, f) *Daphnia magna* g) not detected. 1) Takashi I., 2018. 2) Keiya I. et al., 2011. 3) Takashi I. et al., 2010. 4) Scott V. et al., 2008. 5) Joseph D., 1996. 6) Emmanouil D. et al., 2012. 7) Motoyuki K. et al., 2017. 8) Silvia E. A. et al., 2018. 9) Robert A. R. et al., 2018.

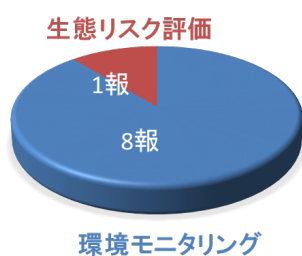


表 1-2 ネオニコチノイド系農薬の環境変化体まとめ²⁵⁻³¹⁾

Neonicotinoid pesticide	Number of PTPWs	Available in market on April 2019
Acetamiprid	2	0
Clothianidin	8	3
Dinotefuran	7	1
Imidacloprid	27	9
Nitenpyram	0	0
Thiacloprid	0	0
Thiamethoxam	11	2

図 1-2 環境変化体の研究数¹⁶⁻²⁴⁾

そこで本研究では、親農薬に加えて、環境変化体も環境モニタリングすることの必要性を示すことを目的とした。研究戦略としては、はじめに、標準物質の代わりに環境サンプルを用いる高感度分析方法を開発し、環境モニタリングに適用した。次に、環境変化体の毒性評価を行った。最後に、環境変化体の環境モニタリング結果と毒性値を比較し、生態リスク評価を行った。

参考文献

- 1) 乾公正, 農薬の安全性 一食の安心につながる話, FFI JOURNAL, 224(3) (2019) 276-285.
- 2) 農林水産省, 農薬の基礎知識 詳細, https://www.maff.go.jp/j/nouyaku/n_tisiki/tisiki.html#kisol, (accessed 24 December 2019).
- 3) 大田博樹, 日本の農薬産業技術史—農薬のルーツを探訪する—, 日本農薬学会誌, 38(2) (2013) 161-166. <https://doi.org/10.1584/jpestics.W13-02>.
- 4) 中島稔, 農薬の将来, 化学と生物, 12(10) (1974) 690-694. <https://doi.org/10.1271/kagakutoseibutsu1962.12.690>.
- 5) 勝田純郎, ピレスロイド化学最近の発展, 化学と生物, 7(9) (1969) 517-525. <https://doi.org/10.1271/kagakutoseibutsu1962.7.517>.
- 6) 福永一夫, 農薬のあゆみ, 日本農薬学会誌, 学会設立記念号 (1975) 29-32. <https://doi.org/10.1584/jpestics.1975.29>.
- 7) 農林水産省, 農薬取締法, https://www.maff.go.jp/j/nouyaku/n_kaisei/attach/pdf/index-1.pdf, 2018 (accessed 24 December 2019).
- 8) 環境省, 農薬登録基準について, http://www.env.go.jp/water/dojo/noyaku/touroku_kijun.html, (accessed 24 December 2019).
- 9) 厚生労働省, 残留農薬, https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/zanryu/faq.html, (accessed 24 December 2019).
- 10) 環境省, 土壌残留に係る農薬登録基準について, http://www.env.go.jp/water/dojo/noyaku/dojo_kijun/index.html, (accessed 24 December 2019).
- 11) 環境省, 土壌残留に係る農薬登録基準についての概念図, http://www.env.go.jp/water/dojo/noyaku/dojo_kijun/kijun-schematic.pdf, (accessed 25 December 2019).
- 12) 環境省, 水産動植物の被害防止に係る農薬登録基準について, <http://www.env.go.jp/water/sui-kaitei/kijun-index.html>, (accessed 24 December 2019).
- 13) 環境省, 平成 28 年 3 月 3 日 中央環境審議会土壌農薬部会農薬小委員会 (第 50 回) 資料 資料4 環境大臣が定める水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準の設定における種の感受性差の取扱いについて (案), <https://www.env.go.jp/council/10dojo/y104-55/siryuu4.pdf>, (accessed 25 December 2019).
- 14) 環境省, 水質汚濁に係る農薬登録基準, http://www.env.go.jp/water/dojo/noyaku/odaku_kijun/kijun.html#rv, (accessed 24 December 2019).
- 15) 農林水産省, 農薬の登録申請において提出すべき資料について, https://www.maff.go.jp/j/nouyaku/n_touroku/attach/pdf/index-34.pdf, 2019 (accessed 24 December 2019).
- 16) Silvia Echeverría-Sáenz, Freylan Mena, María Arias-Andrés, Seiling Vargas, Clemens Ruepert, Paul J. Van den Brink, Luisa E. Castillo, Jonas S. Gunnarsson, In situ toxicity and ecological risk assessment of agro-pesticide runoff in the Madre de Dios River in Costa Rica(Article), Environ Sci Pollut Res., 25 (2018) 13270-13282. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7817-4>.
- 17) Robert A. Rämö, Paul J. van den Brink, Clemens Ruepert, Luisa E. Castillo, Jonas S. Gunnarsson, Environmental risk assessment of pesticides in the River Madre de Dios, Costa Rica using PERPEST, SSD, and msPAF models, Environ Sci Pollut Res., 25 (2018) 13254-13269. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7375-9>.
- 18) Takashi Iwafune, Studies on the behavior and ecotoxicity of pesticides and their transformation products in a river, Journal of Pesticide Science, Society Awards 2018. <https://doi.org/10.1584/jpestics.J18-01>.

- 19) Motoyuki Kamata, Mari Asami, Yoshihiko Matsui, Presence of the β -triketone herbicide tefuryltrione in drinking water sources and its degradation product in drinking waters, *Chemosphere.*, 178 (2017) 333-339. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.016>.
- 20) Emmanouil D. Tsochatzis, Roxani Tzimou-Tsitouridou, Urania Menkissoglu-Spiroudi, Dimitrios G. Karpouzas, Maria Papageorgiou, Development and validation of an HPLC-DAD method for the simultaneous determination of most common rice pesticides in paddy water systems, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry.*, 92(5) (2012) 548-560. <https://doi.org/10.1080/03067310903229943>.
- 21) Keiya Inao, Toshihiko Hojyo, Hirochika Annoh, Satoe Miyazaki, Takeshi Saito, Ho-Dong Park, Predicting the behavior of paddy pesticides in a river basin using a simulation model (PADDY-Large): Application to a tributary of the Chikuma River under rice cultivation, *Journal of Pesticide Science.*, 36(3), 413-427 (2011). <https://doi.org/10.1584/jpestics.W11-15>.
- 22) Takashi Iwafune, Keiya Inao, Takeshi Horio, Nobusuke Iwasaki, Atsushi Yokohama, Takashi Nagai, Behavior of paddy pesticides and major metabolites in the Sakura River, Ibaraki, Japan, *J. Pestic. Sci.*, 35(2) (2010) 114-123. <https://doi.org/10.1584/jpestics.G09-49>.
- 23) Scott V. Mize, Stephen D. Porter, Dennis K. Demcheck, Influence of fipronil compounds and rice-cultivation land-use intensity on macroinvertebrate communities in streams of southwestern Louisiana, USA, *Environmental Pollution.*, 152 (2008) 491-503. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.03.021>.
- 24) Joseph Domagalski, Pesticides and pesticide degradation products in stormwater runoff: Sacramento River Basin, California, *WATER RESOURCES BULLETIN.*, 32(5) (1996) 953-964. <https://doi.org/10.1111/j.1752-1688.1996.tb04065.x>.
- 25) 関東化学株式会社, <https://www.kanto.co.jp/>, (accessed 25 December 2019).
- 26) シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社, <https://www.sigmaaldrich.com/japan.html>, (accessed 25 December).
- 27) 富士フイルム 和光純薬株式会社, <http://ffwk.fujifilm.co.jp/>, (accessed 25 December).
- 28) Hiroyasu Aizawa, *Metabolic Maps: Pesticides, Environmentally Relevant Molecules and Biologically Active Molecules*, Academic Press, USA, 2001.
- 29) Moza P.N., Hustert K., Feicht E., Kettrup A., PHOTOLYSIS OF IMIDACLOPRID IN AQUEOUS SOLUTION, *Chemosphere*, 36(3) (1998) 497-502. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00359-7](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00359-7).
- 30) Tao Ding, David Jacobs, Barry K. Lavine, Liquid chromatography-mass spectrometry identification of imidacloprid photolysis products, *Microchem. J.*, 99 (2011) 535-541. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2011.07.005>.
- 31) Terry R. Roberts, David H. Hutson, *Metabolic Pathways of Agrochemicals: Part 2: Insecticides and Fungicides*, Royal Society of Chemistry, UK, 1999.
- 32) Motohiro Tomizawa, John E. Casida, Minor structural changes in nicotinoid insecticides confer differential subtype selectivity for mammalian nicotinic acetylcholine receptors, *Br. J. Pharmacol.*, 127 (1999) 115-122. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702526>.

第2章 水田に隣接する小規模河川水中のイミダクロプリド-ニトログアニジン体の消長

本研究で対象としたイミダクロプリドの河川水中濃度については多くの研究がなされており¹⁻⁵⁾、環境変化体に関する研究例についても比較的多く確認できる^{2,6)}。また、昆虫のアセチルコリン受容体に対する重要な結合部分として、ニトロ基のような電子吸引基が報告されており⁷⁻⁹⁾、本章で対象としたイミダクロプリド-ニトログアニジン体（以下、「ニトログアニジン体」という）のように、同様のニトロ基を保有する環境変化体が、いくつか報告されている¹⁰⁻¹²⁾。しかし、これらの環境変化体については、未だに河川水から検出されていない。一方で、これらの環境変化体は標準物質が無く、上述したように LC-MS/MS による分析が困難である。そこで本章では、近年の農薬の研究に利用されている¹³⁻¹⁶⁾高分解能質量分析機器（High resolution mass spectrometry; HRMS）に着目し、LC-HRMS と LC-MS/MS を組み合わせ、標準物質の代わりに田面水サンプルを用いて選択反応モニタリング条件（Selected Reaction Monitoring; SRM）を決定した。決定した条件は、最終的に合成したニトログアニジン体で確認した。本章の最終目的は、決定した SRM 条件を用いてニトログアニジン体の河川水中濃度を明らかにすることとした。

イミダクロプリドが施用された田面水を採取し、固相抽出法により 100 倍濃縮したサンプルを LC-HRMS で分析し、ニトログアニジン体の探索を行った。多種類のアダクトタイプによる抽出イオンクロマトグラムの描写（図 2-1）、同位体パターン解析による分子式推定（図 2-2 (a)）、MS/MS 測定による構造推定（図 2-2 (b)）から、田面水サンプルからニトログアニジンを検出した。ニトログアニジン体が検出された田面水サンプルを LC-MS/MS で分析し、同様の RT に検出されるピークを選択し、SRM 条件を決定した。決定した SRM を用いて、共同研究者の合成により得られたニトログアニジン体の標準物質を SRM 測定したところ、田面水サンプル中のニトログアニジン体と同じ RT にピークが描かれ、したがって、標準物質を用いずに、田面水サンプルを用いて SRM 条件を決定することができた。

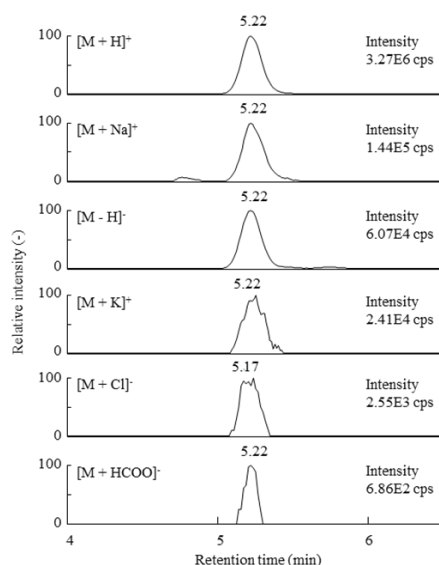


図 2-1 多種類のアダクトタイプによる抽出イオンクロマトグラム

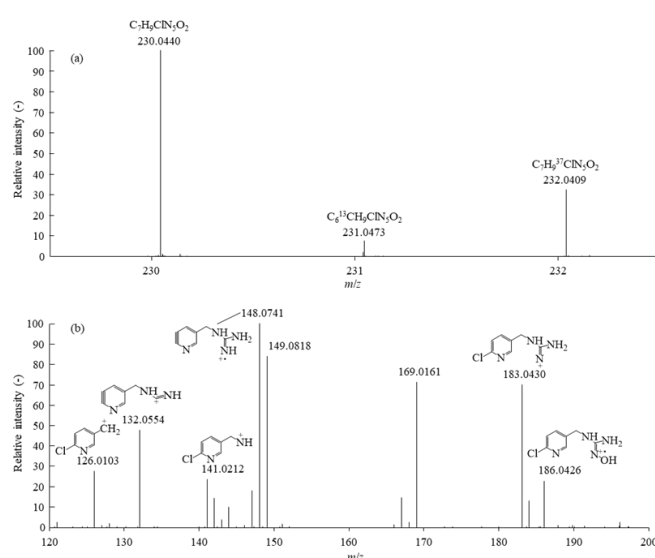


図 2-2 ニトログアニジン体のマスペクトル (a) プリカーサーイオンスキャン, (b) MS/MS 測定

得られた SRM 条件を用いて、イミダクロプリドおよびニトログアニジン体の河川水中濃度を分析した。河川水サンプルは固相抽出法により 300 倍濃縮された。イミダクロプリドは、苗の移植時に高濃度で検出される傾向が見られ、育苗箱施用剤であることが大きな要因であることが考えられた（図 2-3）¹⁷⁾。また、イミダクロプリドは田植え前から継続的に検出されることが明らかとなり、前年までに施用されたイミダクロプリドが、半減期の比較的長い土壤中で残留し、代かきによって土を掘り起こされた際に流出したと考えられた。

ニトログアニジン体は、田植えが始まる前から継続的に検出された。ニトログアニジン体を河川水中から検出した例は、本研究が初めてである。また、ニトログアニジン体はイミダクロプリドの土壤

分解生成物である¹⁰⁻¹²ことから、検出されたニトログアニジン体は前年度に施用されたイミダクロプリドから生成したと考えられた。以上のことから、土壌分解により生成する環境変化体は、田植え前からモニタリングする必要があることが示唆された。

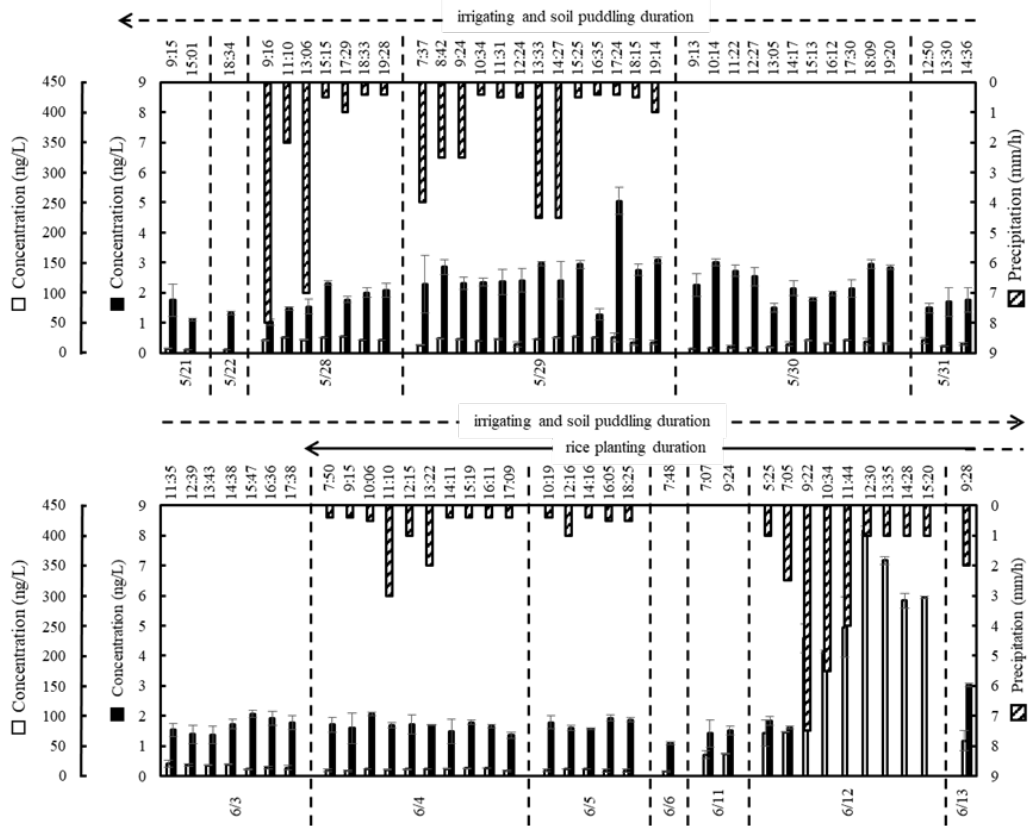


図2-3 イミダクロプリド/イミダクロプリド-ニトログアニジン体の濃度と降水量の関係性
 ■ イミダクロプリド-ニトログアニジン体, □ イミダクロプリド

参考文献

- 1) Takashi Iwafune, Keiya Inao, Takeshi Horio, Nobusuke Iwasaki, Atsushi Yokohama, Takashi Nagai, Behavior of paddy pesticides and major metabolites in the Sakura River, Ibaraki, Japan, *J. Pestic. Sci.*, 35(2) (2010) 114-123. <https://doi.org/10.1584/jpestics.G09-49>.
- 2) Takeshi Hano, Katsutoshi Ito, Nobuyuki Ohkubo, Hideo Sakaji, Akio Watanabe, Kei Takashima, Taku Sato, Takuma Sugaya, Kosuke Matsuki, Toshimitsu Onduka, Mana Ito, Rei Somiya, Kazuhiko Mochida, Occurrence of neonicotinoids and fipronil in estuaries and their potential risks to aquatic invertebrates, *Environ. Pollut.*, 252 (2019) 205-215. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.067>.
- 3) Keith Starner, Kean S. Goh, Detections of the Neonicotinoid Insecticide Imidacloprid in Surface Waters of Three Agricultural Regions of California, USA, 2010–2011, *Bull Environ Contam Toxicol*, 88 (2012) 316-321. <https://doi.org/10.1007/s00128-011-0515-5>.
- 4) Francisco Sánchez-Bayo, Ross V. Hyne, Detection and analysis of neonicotinoids in river waters – Development of a passive sampler for three commonly used insecticides, *Chemosphere*, 99 (2014) 143-151. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.10.051>.
- 5) Juan Manuel Montiel-León, Gabriel Munoz, Sung Vo Duy, Dat Tien Do, Marc-Antoine Vaudreuil, Ken Goery, François Guillemette, Marc Amyot, Sébastien Sauvé, Widespread occurrence and spatial distribution of glyphosate, atrazine, and neonicotinoids pesticides in the St. Lawrence and tributary rivers, *Environ. Pollut.*, 250 (2019) 29-39. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.125>.
- 6) Juan Manuel Montiel-León, Sung Vo Duy, Gabriel Munoz, Marc Amyot, Sébastien Sauvé, Evaluation of on-line concentration coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry for the quantification of

- neonicotinoids and fipronil in surface water and tap water, *Anal. Bioanal. Chem.*, 410 (2018) 2765-2779. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0957-2>.
- 7) Shinzo Kagabu, Studies on the Synthesis and Insecticidal Activity of Neonicotinoid Compounds, *J. Pept. Sci.*, 21 (1996) 231-239. <https://doi.org/10.1584/jpestics.21.231>.
- 8) X. Xu, H. Bao, X. Shao, Y. Zhang, X. Yao, Z. Liu, Z. Li, Pharmacological characterization of *cis*-nitromethylene neonicotinoids in relation to imidacloprid binding sites in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, *Insect Mol. Biol.*, 19(1) 2010 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.04.005>.
- 9) Xusheng Shao Haiyan Lu, Haibo Bao, Xiaoyong Xu, Zewen Liu, Zhong Li, The mode of action of a nitroconjugated neonicotinoid and the effects of target site mutation Y151S on its potency, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 41 (2011)440-445. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.04.005>.
- 10) Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC). <https://www.acis.famic.go.jp/syouroku/imidacloprid/index.htm>, 2017 (accessed 26 September 2019).
- 11) Hiroyasu Aizawa, *Metabolic Maps: Pesticides, Environmentally Relevant Molecules and Biologically Active Molecules*, Academic Press, USA, 2001.
- 12) Terry R. Roberts, David H. Hutson, *Metabolic Pathways of Agrochemicals: Part 2: Insecticides and Fungicides*, Royal Society of Chemistry, UK, 1999.
- 13) Gerardo Martínez-Domínguez, Roberto Romero-González, Antonia Garrido Frenich, Determination of toxic substances, pesticides and mycotoxins, in ginkgo biloba nutraceutical products by liquid chromatography Orbitrap-mass spectrometry, *Microchem. J.*, 118 (2015) 124-130. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2014.09.002>.
- 14) Hirokazu Takanashi, Kazuya Abiru, Tomohiro Hama, Yuta Shinfuku, Tsunenori Nakajima, Akira Ohki, Takehiko Ueda, Takashi Kondo, Taku Matsushita, Takashi Kameya, Identification of a mutagenic chlorination by-product produced from (*E*)-1, 3-dichloropropene (a component of nematocide DD) by using high resolution LC/MS and multivariate analysis, *Water Res.*, 146 (2018) 187-196. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.09.024>
- 15) Xin Wang, Ruibao Jia, Yan Song, Mingquan Wang, Qinghua Zhao, Shaohua Sun, Determination of pesticides and their degradation products in water samples by solid-phase extraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry, *Microchem. J.*, 149 (2019) 104013. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104013>.
- 16) Hongling Deng, Haibo Wang, Minhua Liang, Xinguo Su, A novel approach based on supramolecular solvent microextraction and UPLC-Q-Orbitrap HRMS for simultaneous analysis of perfluorinated compounds and fluorine-containing pesticides in drinking and environmental water, *Microchem. J.*, 151 (2019) 104250. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104250>.
- 1714) Keiya Inao, Takashi Iwafune, Takeshi Horio, Ikuko Kitayama, Behavior of isoprothiolane and fipronil in paddy water, soil, and rice plants after nursery-box or submerged applications, *J. Pestic. Sci.*, 43(2) (2018) 132-141. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D17-083>.

第3章 イミダクロプリドおよび環境変化体の毒性評価

ネオニコチノイド系農薬はニコチン性アセチルコリン受容体に作用する殺虫剤であり、オオミジンコに比べ、他の甲殻類および昆虫類の感受性が高いことが報告されている¹⁾。イミダクロプリドも例外ではなく、節足動物や水生昆虫に対して高い毒性を示すことが明らかとなっている²⁻⁴⁾。また、イミダクロプリドの環境変化体の中には、昆虫のアセチルコリン受容体に対する重要な結合部分であるニトロ基⁵⁻⁷⁾を保有する物質が複数報告されている⁸⁻¹⁰⁾。しかし、環境変化体の水生昆虫に対する毒性評価については、報告例を確認できていない。そこで本章では、イミダクロプリドとその環境変化体 7 物質の水生昆虫に対する生態影響を評価することを目的とした。

標準物質を購入または共同研究者の合成により入手した 7 物質の環境変化体とイミダクロプリドは、セスジユスリカとオオミジンコに対して、農薬取締法および OECD のテストガイドラインに準拠して試験された。試験の結果、イミダクロプリドのセスジユスリカに対する毒性がオオミジンコより

も 1,000 倍高くなることが明らかとなり、これまでの報告例と同様の結果が確認された（表 3-1）。また、セスジユスリカに対する毒性について、イミダクロプリドと同程度の毒性値を示す環境変化体が存在することが確認された。この物質は、上述したニトロ基を保有する物質であることが、イミダクロプリドと同程度の毒性値が得られたと考えられた。また、オオミジンコに対するエンドポイントを致死にした場合に、イミダクロプリドでは観察されなかった幼体の死体が、ある環境変化体で確認された。このことから、物質および生物によって、親農薬とは異なる作用機構を持つことが示唆された。

表 3-1 イミダクロプリドおよび環境変化体の急性毒性

compounds	<i>Chironomus yoshimatsui</i>	<i>Daphnia magna</i>	
	immobilization 48h-EC ₅₀ (mg/L)	immobilization 48h-EC ₅₀ (mg/L)	lethal 48h-LC ₅₀ (mg/L)
imidacloprid	0.021	25	>86
PTPWs 1	5.0	34	38
PTPWs 2	33	20	>52
PTPWs 3	>180	>180	>180
PTPWs 4	53	>200	>200
PTPWs 5	3.3	>55	>55
PTPWs 6	0.018	>36	>36
PTPWs 7	13	>97	>97

参考文献

- 1) 環境省, H28.3.3 中央環境審議会土壌農薬部会農薬小委員会（第 50 回）資料 4, <https://www.env.go.jp/council/10dojo/y104-55/siryoku4.pdf>. (accessed 17 October 2019).
- 2) Takashi Nagai and Atsushi Yokoyama, Comparison of ecological risks of insecticides for nursery-box application using species sensitivity distribution., *J. Pestic. Sci.*, 37(3) (2012) 233-239.
- 3) A.A. Camp and D.B. Buchwalter, Can't take the heat: Temperature-enhanced toxicity in the mayfly *Isonychia bicolor* exposed to the neonicotinoid insecticide imidacloprid., *Aquatic Toxicology.*, 178 (2016) 49-57.
- 4) Naveen Njattuvetty Chandran, Dana Fojtova, Lucie Blahova, Eliska Rozmankova, Ludek Blaha, Acute and (sub)chronic toxicity of the neonicotinoid imidacloprid on *Chironomus riparius*., *Chemosphere.*, 209 (2018) 568-577.
- 5) Shinzo Kagabu, Studies on the Synthesis and Insecticidal Activity of Neonicotinoid Compounds, *J. Pept. Sci.*, 21 (1996) 231-239. <https://doi.org/10.1584/jpestics.21.231>.
- 6) X. Xu, H. Bao, X. Shao, Y. Zhang, X. Yao, Z. Liu, Z. Li, Pharmacological characterization of cis-nitromethylene neonicotinoids in relation to imidacloprid binding sites in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, *Insect Mol. Biol.*, 19(1) 2010 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.04.005>.
- 7) Xusheng Shao Haiyan Lu, Haibo Bao, Xiaoyong Xu, Zewen Liu, Zhong Li, The mode of action of a nitroconjugated neonicotinoid and the effects of target site mutation Y151S on its potency, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 41 (2011)440-445. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.04.005>.
- 8) Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC). <https://www.acis.famic.go.jp/syouroku/imidacloprid/index.htm>, 2017 (accessed 26 September 2019).
- 9) Hiroyasu Aizawa, *Metabolic Maps: Pesticides, Environmentally Relevant Molecules and Biologically Active Molecules*, Academic Press, USA, 2001.
- 10) Terry R. Roberts, David H. Hutson, *Metabolic Pathways of Agrochemicals: Part 2: Insecticides and Fungicides*, Royal Society of Chemistry, UK, 1999.

第4章 イミダクロプリドおよび環境変化体-O体の生態リスク評価

これまでの章において、環境変化体の環境モニタリングや生態リスク評価についての研究例が限定的であることを示してきた。一方、第3章において、親農薬と同程度の毒性を示す環境変化体が、存在することが明らかとなり、環境変化体のリスクが無視できない可能性が考えられた。この環境変化体（以下、「O体」という）は、土壌分解により生成することが報告されており¹⁻³⁾、第2章で述べたニトログアニジン体と似た傾向を示す可能性が考えられる。しかし、O体の河川水中濃度を測定した例は、我々の調査するところで1報しか確認されておらず⁴⁾、未検出という結果である。そこで本章では、O体の河川水中濃度を測定し、第3章で得られた毒性値と比較することで、セスジユスリカに対する生態リスク評価を行った。

イミダクロプリドが散布された付近の河川水 75 サンプルを固相抽出法により 300 倍濃縮し、LC-MS/MS 測定を行った。第2章を参考に、田植え前からサンプリングを行い、イミダクロプリドおよびO体は、いずれも検出率 100%であった。土壌分解生成物は田植え前から継続的に検出されることが確認され、第2章と同様の結果が得られた（図4-1）。また、O体は、耕起・代かき期よりも田植え期の方が、河川水中濃度が高くなることが観察され、前年度までに施用されたイミダクロプリドのみならず、今年度使用され、育苗箱中で生成したO体が、苗の移植と共に河川へ流出したことが考えられた⁵⁾。他にも、降雨や耕起・代かき・田植えのタイミング等がイミダクロプリドおよびO体の河川水中濃度の上昇に関係している可能性を示唆することができた⁶⁻⁷⁾。

イミダクロプリドおよびO体の河川水中の生態リスクは、第3章で得られた毒性値を用いて、欧州食品安全機関（European Food Safety Authority, EFSA）による農薬の水域生態リスク評価のガイダンス⁸⁾に基づき、セスジユスリカの急性毒性値である EC₅₀ を不確実係数（Assessment Factor; AF）100 で割った値を管理目標濃度（Regulatory Acceptance Concentration; RAC）とし、河川水中濃度と比較することで評価した。イミダクロプリドは、複数のサンプルで RAC を超える濃度で検出された。また、O体は河川水中最高濃度として、RAC の 1/6 の濃度で検出された。これらのことから、親農薬のみならず、環境変化体の生態リスクが無視できない事例を示すことができた。

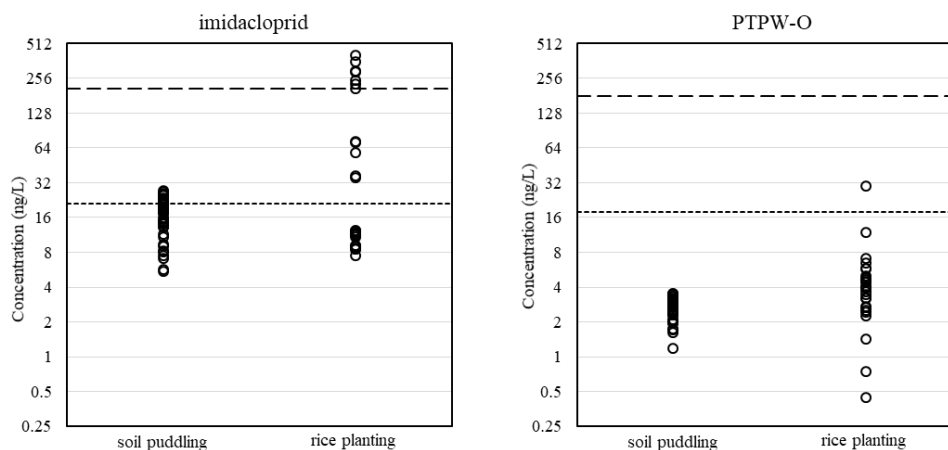


図4-1 イミダクロプリドおよびO体の河川水中濃度
（---各物質の RAC、.....各物質の 1/10 RAC）

参考文献

- 1) Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC). <https://www.acis.famic.go.jp/syouroku/imidacloprid/index.htm>, 2017 (accessed 26 September 2019).
- 2) Hiroyasu Aizawa, Metabolic Maps: Pesticides, Environmentally Relevant Molecules and Biologically Active Molecules, Academic Press, USA, 2001.
- 3) Terry R. Roberts, David H. Hutson, Metabolic Pathways of Agrochemicals: Part 2: Insecticides and Fungicides, Royal Society of Chemistry, UK, 1999.
- 4) E.P. Benton, J.F. Grant, T.C. Mueller, R.J. Webster, R.J. Nichols, Consequences of imidacloprid treatments for hemlock woolly adelgid on stream water quality in the southern Appalachians, Forest. Ecol. Manag., 360

(2016) 152-158. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2015.10.028>.

- 5) Takashi Iwafune, Keiya Inao, Takeshi Horio, Nobusuke Iwasaki, Atsushi Yokohama, Takashi Nagai, Behavior of paddy pesticides and major metabolites in the Sakura River, Ibaraki, Japan, *J. Pestic. Sci.*, 35(2) (2101) 114-123. <https://doi.org/10.1584/jpestics.G09-49>.
- 6) John Struger, Josey Grabuski, Steve Cagampan, Ed Sverko, Daryl McGoldrick, Christopher H. Marvin, Factors influencing the occurrence and distribution of neonicotinoid insecticides in surface waters of southern Ontario, Canada, *Chemosphere*, 169 (2017) 516-523. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.036>.
- 7) María José Climent, Eliseo Herrero-Hernández, María Jesús Sánchez-Martín, María Sonia Rodríguez-Cruz, Pablo Pedreros, Roberto Urrutia, Residues of pesticides and some metabolites in dissolved and particulate phase in surface stream water of Cachapoal River basin, central Chile, *Environ. Pollut.*, 251 (2019) 90-101. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.117>.
- 8) European Food Safety Authority, EFSA, Guidance on tiered risk assessment for plant protection products for aquatic organisms in edge-of-field surface waters, <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2013.3290>. 11(7) 2013 3290 (accessed 18 October 2019).

第5章 イミダクロプリドの環境変化体の環境モニタリングおよび生態リスク評価

これまでの章で、これまで検出されなかった環境変化体を河川水から検出し、親農薬と同程度の毒性を示す環境変化体の存在を明らかにしてきたことをふまえ、当時入手可能な環境変化体¹⁻³⁾について、環境モニタリングを行った。得られた濃度は、第3章で得られたセスジユスリカに対する毒性値と比較し、生態リスクを評価した。

第2章および第4章で研究した2物質に加え、8物質の環境変化体の河川水中濃度を測定した。河川水は、イミダクロプリドが散布された付近の河川の5地点から採取した。河川水サンプルは、物性に合わせて2種類の固相抽出により300倍濃縮され、LC-MS/MSで分析された。実河川水サンプルを添加回収試験により、回収率が30~150%を超えた場合は欠測としたところ、2地点のサンプルを除いて、すべての物質の回収率が30~137%であった。環境変化体の河川水中濃度は、これまでの章で報告した2物質を除いて、6物質の環境変化体が河川水から検出され、回収率は5.5%~93.9%であった(図5-1)。環境変化体の中には、親農薬よりも高濃度で検出される物質も存在した。

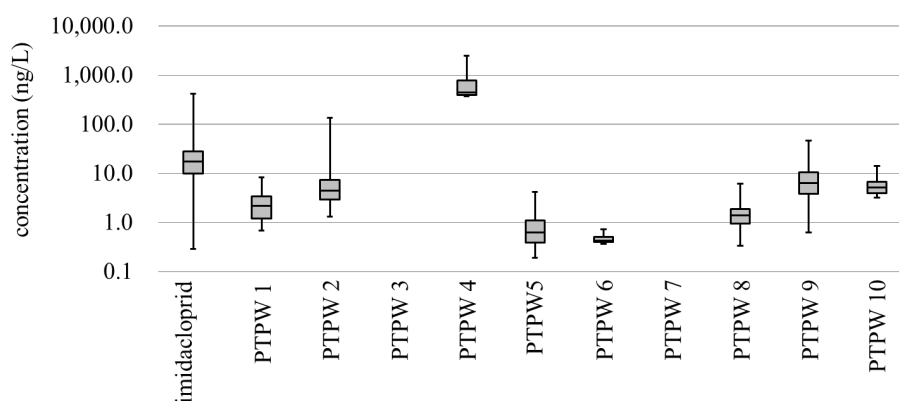


図5-1 イミダクロプリドおよび環境変化体の河川水中濃度分布

生態リスク評価は、セスジユスリカに対して、第4章と同様の方法で行われた(表5-1)⁴⁾。第4章で報告した物質以外に、生態リスクが懸念される物質は存在しなかった。しかし、ひとつの親農薬から生成する多数の環境変化体を様々な濃度分布で検出することができた。したがって、親農薬のみならず、環境変化体の環境モニタリングの必要性を示すことができた。

表 5-1 イミダクロプリドおよび環境変化体の生態リスク評価

Compounds	Frequency (%) (<i>n</i>)	EC ₅₀ (μg/L)	RAC (ng/L)	max conc. (ng/L)
imidacloprid	99.1 (211)	21	210	415.88
PTPW 1	79.9 (211)	>180,000	>1,800,000	8.36
PTPW 2	93.9 (261)	33,000	330,000	135.13
PTPW 3	<LOQ (212)	5,000	50,000	<LOQ
PTPW 4	8.8 (102)	53,000	530,000	2,535.02
PTPW 5	75.5 (212)	-	-	4.26
PTPW 6	5.5 (207)	-	-	0.73
PTPW 7	<LOQ (210)	-	-	<LOQ
PTPW 8	85.5 (211)	3,300	33,000	6.18
PTPW 9	88.6 (214)	18	180	46.37
PTPW 10	9.7 (212)	13,000	130,000	14.03

参考文献

- 1) Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC). <https://www.acis.famic.go.jp/syouroku/imidacloprid/index.htm>, 2017 (accessed 26 September 2019).
- 2) Hiroyasu Aizawa, Metabolic Maps: Pesticides, Environmentally Relevant Molecules and Biologically Active Molecules, Academic Press, USA, 2001.
- 3) Terry R. Roberts, David H. Hutson, Metabolic Pathways of Agrochemicals: Part 2: Insecticides and Fungicides, Royal Society of Chemistry, UK, 1999.
- 4) European Food Safety Authority, EFSA, Guidance on tiered risk assessment for plant protection products for aquatic organisms in edge-of-field surface waters, <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2013.3290>. 11(7) 2013 3290 (accessed 18 October 2019).

第6章 総括

本研究では、殺虫剤イミダクロプリドを対象に、その変化体の環境中濃度および毒性評価の比較による生態リスク評価を行い、環境変化体の環境モニタリングを実施する必要性について述べた。また、入手可能な環境変化体が少ないことを考慮し、標準物質を用いない高感度分析法を開発し、環境モニタリングに適用した。

第1章において、農薬および農薬に関する法律について整理し、農薬の環境変化体に関する安全性評価が不十分である可能性を指摘した。また、環境変化体に関する研究例を調査し、農薬によっては環境モニタリングおよび生態リスク評価の研究例が少ないことを明らかにし、標準物質が入手困難であるためにこれらの研究例が乏しいことを示唆した。

そこで、第2章において、高分解能LC-MSと高感度LC-MS/MSを組み合わせることにより、高感度LC/MS/MSの測定条件を定める際に必要な標準物質の代わりに、田面水サンプルを利用する技術を開発した。開発した技術は、イミダクロプリドの環境変化体である、イミダクロプリド-ニトログアニジン体に適用し、河川水から検出されることを確認した。親農薬であるイミダクロプリドは、田植に伴って隣接する河川に流出する物質であるが、イミダクロプリド-ニトログアニジン体は、田植前から定常的に検出されることが明らかとなったことから、土壌分解により生成する環境変化体は、田植前から環境モニタリングすべきであることを提案した。

第3章においては、イミダクロプリドおよびその環境変化体のオオミジンコおよびセスジユスリカへの急性毒性試験を行った。イミダクロプリドについて、種差によりオオミジンコよりもセスジユスリカに対する毒性が非常に高くなることが明らかとなった。また、試験した7物質の環境変化体のうち、ある環境変化体（第3章におけるO体）については、セスジユスリカに対する毒性が、イミダクロプリド

と同程度であることを明らかにした。さらに、とある環境変化体については、親農薬に見られなかった、オオミジンコの致死毒性を示すことを明らかにした。これらの結果から、環境変化体に毒性が認められる事例を明らかにし、環境変化体の毒性評価の必要性を述べた。

第4章においては、第2章で開発した分析技術を適用して、第3章で親農薬と同程度の毒性が認められた土壌分解生成物であるO体の生態リスク評価を行った。その結果、O体の最高濃度は欧州食品安全機関における管理目標濃度の6分の1程度の濃度で検出された。リスクは認められなかったが、管理目標濃度の10%を超えたため、継続的監視が望ましい物質であった。また、第2章と同様に、O体も、田植え前から河川水等で定常的に検出されたことを明らかにした。これらのことから、環境変化体の生態リスク評価の必要性を述べた。

第5章では、上記で環境モニタリングした環境変化体を含む10物質の変化体の環境モニタリングを行った。その結果、第2および4章で報告した2物質を除く6物質について、5.5～93.9%の検出率で検出された。また、検出された環境変化体のセスジユスリカに対する生態リスクを評価したところ、生態リスクは認められなかった。しかし、ひとつの親農薬から生成した多数の環境変化体が、実河川から検出される事例を明らかにした。全章を通して、環境変化体の生態リスクは無視できない場合があることを述べ、親農薬に加え、環境変化体の環境モニタリングを実施することの必要性を示した。