

(報告書別紙)

研究課題名

尿試料を用いたインドにおけるネオニコチノイド系農薬汚染モニタリング

Monitoring Survey of Neonicotinoid Insecticides in Urine Sample from India

研究組織

磯部友彦(国立環境研究所)、国末達也(愛媛大学)

1. 背景と目的

ネオニコチノイド系農薬はクロロニコチニル系殺虫剤の総称であり、ニコチン性アセチルコリン受容体に結合して昆虫に対して選択的に毒性を示すことから、特に 1990 年代以降に農業用や家庭用等として世界中で使用が拡大している。蜂群崩壊症候群(CCD)との関連など生態系への影響が懸念され、欧州等では使用規制に関する議論が進んでいる。また、ヒトの曝露や影響についても報告されていることから社会的関心が高まっており^(1, 2)、広域的なバイオモニタリングと疫学調査等による影響評価が求められている。現在、国立環境研究所では、大規模疫学調査における化学物質曝露評価に適用することを想定して、様々な化学物質について生体試料を対象とした分析法の最適化を進めており、ネオニコチノイド系農薬も評価対象の 1 つに挙げられている。大規模疫学調査における化学物質曝露評価では、膨大な検体数の分析が必要であるが、調査参加者から得られる試料の種類や量、試料保管のためのスペースや費用など、様々な制約もあるため、高感度でありながら簡便、ハイスループットな生体試料分析法が不可欠である。そこで本研究では、新規環境汚染物質として社会的懸念の高まっている 7 種のネオニコチノイド系農薬について、尿試料を対象とした迅速分析法の確立を目的とした研究を 2017 年度より進めている。

一方で、ネオニコチノイド系農薬は世界 100 ヶ国以上で使用されているにもかかわらず、バイオモニタリングが実施されているのは日本をはじめとした先進国に限られ、アジア-太平洋地域における汚染の拡大やヒトの曝露レベルに関する情報は非常に限られるのが現状である。とくに、1990 年代以降に使用が拡大したことから新興国での使用が急速に増加していると考えられるため、アジア-太平洋地域の新興国における曝露実態の解明を目的とし、なかでも近年の人口急増と

それに伴う環境汚染が深刻化しているインドに着目して共同研究を進めている。

2. 試料と方法

分析対象物質は、アセタミプリド、チアクロプリド、チアメソキサム、ジノテフラン、クロチアニジン、イミダクロプリド、ニテンピラムの 7 種のネオニコチノイド系農薬親化合物と代謝物のチアクロプリドアミドとし、親化合物についてはそれぞれ重水素ラベルされた内部標準を用いて補正した。チアクロプリドアミドはチアクロプリドの内部標準で補正した。尿試料は -80°C で凍結保存し、測定前日に 4°C 設定の冷蔵庫に移して溶解させた。室温に戻した尿を遠心分離 ($1500\times\text{g}$, 2 min) し、上澄み $100\ \mu\text{L}$ をマイクロピペットで分取して内部標準溶液 $10\ \mu\text{L}$ および $10\ \text{mM}$ 酢酸アンモニウム溶液 $0.4\ \text{mL}$ を添加して軽く混合したものを試料溶液とした。操作ブランク試料については、尿試料の代わりにミリ Q 水を用いて同様の操作を行った。本研究では、固相抽出に全自動固相抽出装置 Extrahera (Biotage) を使用することで、前処理のスループット向上と処理の自動化による検体取り違えの防止を目指した。Extrahera に Oasis HLB PRiME ($30\ \text{mg}/1\ \text{mL}$) を装着し、メタノール $0.9\ \text{mL}$ および $10\ \text{mM}$ 酢酸アンモニウム溶液 $0.9\ \text{mL}$ を通液して固相をコンデューションしたのちに、上述の試料溶液を通液して固相にネオニコチノイド系農薬を保持させた。固相は水/メタノール ($95:5$, v/v) $0.9\ \text{mL}$ で洗浄後、メタノール/水 ($80:20$, v/v) $0.6\ \text{mL}$ でネオニコチノイド系農薬を溶出させた。溶出液は遠心エバポレータで乾固し、 $0.1\ \%$ ギ酸含有 $10\ \text{mM}$ 酢酸アンモニウム水溶液/メタノール ($95:5$, v/v) $0.2\ \text{mL}$ で再溶解して、そのうち $10\ \mu\text{L}$ を高速液体クロマトグラフタンデム質量分析装置 (LC-MS/MS) に導入して分析した。LC-MS/MS は LCMS-8060 (島津製作所)、分析カラムには ACQUITY UPLC HSS C18 ($2.1\ \text{mm I.D.}\times 100\ \text{mm}$, $1.8\ \mu\text{m}$, Waters) を用いた。

3. 結果と考察

最適化された LC-MS/MS の MRM 測定条件を表 1 に示す。尿試料中の妨害成分により、一部の物質については確認イオンの再選択が必要となったが、1 回の測定で 7 種のネオニコチノイド系農薬を 15 分程度で測定可能な方法を確立することができた。今回確立した前処理工程では、QC 検体やブランクに加えて 1

日あたり約 40 検体程度処理することができ、これらの検体を同日中に LC-MS/MS 測定することが可能な測定時間となった。本手法をルーチン化した場合には、1 ラインあたり年間およそ数千検体の測定が見込めることとなり、今後大規模疫学調査への適用が期待できる。

表 1. 分析対象としたネオニコチノイド系農薬の MRM 条件

	Quantifier				Qualifier				Dwell (msec)	Ionization	Ret. Time	Internal standard
	Precursor	Product	DP (V)	CE (eV)	Precursor	Product	DP (V)	CE (eV)				
Acetamiprid	223.2	126.0	50	50	223.2	90.1	28	45	50	Positive	11.57	Acetamiprid-d ₃
Thiacloprid	253.0	126.0	40	40	253.0	90.1	27	50	50	Positive	12.75	Thiacloprid-d ₄
Thiamethoxam	292.0	211.0	30	30	292.0	181.1	17	30	50	Positive	8.51	Thiamethoxam-d ₃
Dinotefuran	203.2	114.2	35	30	203.2	58.1	18	50	50	Positive	6.36	Dinotefuran-d ₃
Clothianidin	249.9	169.2	35	35	249.9	132.0	17	21	50	Positive	10.22	Clothianidin-d ₃
Imidacloprid	256.3	209.1	35	35	256.3	175.2	21	26	50	Positive	10.43	Imidacloprid-d ₄
Nitenpyram	271.2	237.1	60	60	271.2	99.1	25	20	50	Positive	7.67	Nitenpyram-d ₃
Thiacloprid amide	271.0	126.0	20	20	271.0	228.0	32	19	50	Positive	10.83	Thiacloprid-d ₄

次に、QC 検体を用いて分析精度パラメータを取得した(表 2)。QC 検体には、妊婦のボランティアから採取した尿をプールして均質化し、分注したものをを用いた。その結果、物質により感度差はあるものの、検出下限値が 0.0080–0.026 ng/ml となり、概ね既存の報告と同等か高感度で測定することが可能となった。QC 検体中に一部のネオニコチノイド系農薬が検出されたため、2 段階の濃度で添加回収試験を実施し、85–112 %と良好な結果を得た。ジノテフランについては、QC 検体中濃度が 1.11 ng/mL と高かったため低レベル添加実験における回収率を得ることができなかったが、高レベル添加実験では 92 %であり問題はないと考えられる。また、これらの添加試料を用いて日内および日間変動を算出した。7 回の繰り返し分析における日内変動は RSD として 1.1–7.2 %、5 日間の日間変動の RSD は 1.6–6.1 %といずれも 10 %未満であり、安定的な測定結果が得られた。さらに、その間の内部標準の回収率は 89–120 %であり、定量分析としては十分な範囲に収まった。内部標準の回収率は、検量線溶液と試料中の内部標準の面積値から算出しているため、マトリクス効果を含む回収率を示している。今回、十分な回収率が得られたことから、固相抽出による前処理で試料中の夾雑成分を効率良く除去できていることが確認された。

表 2. 検量線範囲、検出下限値 (MDL)、定量下限値 (MQL)、QC 検体中濃度と添加回収率、標準添加 QC 検体の日内および日間変動、内部標準回収率

	Calibration		MDL (ng/mL)	MQL (ng/mL)	Concentration ± SD (ng/mL)	Recovery of spiked sample (%, n=7)		Intra-day precision (RSD%, n=7)		Inter-day precision (RSD%, n=7,5 days)		IS recovery (%, n=21)
	Range(ng/mL)	r ²				Non-spiked	0.25 ng/mL*	1 ng/mL*	0.25 ng/mL*	1 ng/mL*	0.25 ng/mL*	
Acetamiprid	0.0025-5	0.995	0.0080	0.024	0.016±0.002	93±3	93±3	2.7	3.3	4.7	2.9	89±5
Thiacloprid	0.0025-5	0.997	0.0052	0.016	<MDL	100±2	97±1	2.7	1.1	4.4	1.6	92±6
Thiamethoxam	0.0025-5	0.996	0.0043	0.013	0.086±0.016	94±2	96±2	2.9	1.7	3.9	2.4	106±4
Dinotefran	0.01-5	0.998	0.011	0.033	1.11±0.22	NA	92±5	3.5	2.4	8.5	7.3	94±5
Clothianidin	0.025-5	0.995	0.026	0.078	0.285±0.062	85±7	99±3	3.4	2.3	6.8	5.2	108±6
Imidacloprid	0.01-5	0.997	0.015	0.045	0.041±0.008	92±3	95±4	5.3	3.7	4.5	4.7	120±7
Nitenpyram	0.01-5	0.998	0.018	0.053	<MDL	102±4	98±4	7.2	4.6	6.1	4.5	95±6
Thiacloprid amide	0.01-5	0.996	0.011	0.034	<MDL	122±3	119±3	3.1	2.1	6.1	2.8	92±5

* Spiked levels of neonicotinoid standards

4. まとめと今後の課題

前年度の検討で実試料測定時に一部の精度管理パラメータが安定しないことがあったが、今年度モニターイオン及び分析カラムを変更したことで改善され、実試料の分析が可能となった。なお、尿試料についても一部測定を実施したが、発表前データのためここでの掲載は控える。現在、インド人のスポット尿試料の分析を進めており、次年度以降にその結果を踏まえてアジア-太平洋地域における曝露実態やその要因等について解析する。

【引用文献】

- (1) Ueyama, J et al., (2014) J Occup Health 56 461-468
- (2) Marfo, JT et al., (2015) PLoS One 10(11) e0142172.