

3 研究内容（別紙）

研究課題名：ニホンザル試料を用いたネオニコチノイド系殺虫剤の生体曝露実態と母子間移行メカニズムの解明

共同研究者名：コリンズ ニマコ（北海道大学大学院獣医学研究院）、一瀬 貴大（北海道大学大学院獣医学研究院）、平野 哲史（富山大学研究推進機構）、市川 剛（獨協医科大学小児科）

研究目的：

バイオハザードコントロール、即ち健康の維持・食料確保のために病原体を制圧すること、病原体を媒介する害虫・害獣を駆除することは、人類が地球環境で生存するうえで重要な課題で、殺虫剤は、バイオハザードコントロールに大きな役割を果たしている。しかし、殺虫剤の使用量増加や使用用途の拡大により、ケミカルハザード、即ち標的生物の抵抗性獲得、ヒトを含む非標的生物に対する有害作用の問題が存在するのも事実である。

ネオニコチノイド系殺虫剤（ネオニコチノイド）は、現在世界で最も多く広範囲に使用されている農薬の一つである。かつて日本では、有機リン系殺虫剤が多用されたが、耐性が生じやすいこと、作用持続が短く頻回な施用が必要で農業従事者の作業負担が大きいこと、農業従事者や近隣住民の中毒が多発したことなどから、1990年代後半から徐々にネオニコチノイドに置き換わった。現在国内で8種が年間計約400トン出荷され、140種類以上の農作物に使われている。ネオニコチノイドの特徴は、浸透性と長時間作用性である。根や葉面、実に施用すると、植物全体に行き渡り、殺虫効果が必要とされる成長期の葉や実の表面だけでなく、収穫期の可食部にも残留する。洗っても取り除くことができず、摂食すればほぼ全量が吸収され、大部分が生物活性のある原体または代謝物として排泄される。

日本は、ネオニコチノイドの食品中の最大残留基準値(MRL)が他国に対して高く、例えばキュウリにおいてCODEXと比較し100倍もの高い値が設定されている（日本2 ppm > CODEX 0.02 ppm）。また、日本では2015年にはアセタミプリドとクロチアニジンの残留基準値が引き上げられ、例えばカブ類の葉について0.02 ppmから40 ppmに上げられるなど、他国が使用を制限する中、使用を奨励する政策を行っている。即ち、日本人は他国に比べネオニコチノイドによる曝露量が多い傾向にある。

そこで、申請者らは日本人のネオニコチノイドによる曝露実態を明らかにするため3～6歳の幼児を対象とした疫学調査を2016年に実施した（Ikenaka et al. ET&C, 2019）。その結果、全ての幼児の尿中から単一又は複数のネオニコチノイドおよびその代謝産物が検出される事を明らかにした。また、これら尿データを基に、曝露評価を実施した結果、本地域

に住む幼児は ADI(許容一日摂取量)に対し 5~10%程度の曝露を受けている事、また、その摂取経路は主に食品や飲料を介している事を明らかにした。ネオニコチノイドが摂取後 1~4 日で半減期を迎える事を考えると、日本人は幼少期から継続的・日常的にネオニコチノイドによる曝露を受け続けていることを示唆する結果であった。

更に、申請者らは幼児よりもさらに感受性が高いと考えられる生後 48 時間以内の新生児の尿を入手し、同様の分析を実施した結果、約 50%のサンプルからネオニコチノイドが検出されることを明らかにした。当該結果は、ネオニコチノイドがヒトにおいても母子間移行し、胎児期において既に曝露されている事を示すものであった。しかし、胎児が母体内で曝露を受けているのか、それとも出生後母乳を介して曝露を受けているのか、その詳細は新生児尿を用いた検査だけでは不明である。

そこで、当該研究の目的は、ヒトと同様に野菜や果物からオニコチノイドへの曝露を受けていると考えられるニホンザルに注目し、その曝露実態の解明、詳細な臓器分布の解明を実施する。更に、胎児を有する個体には特に注目し、母体と胎児の血液、胎盤、各臓器を詳細に分析することで、ネオニコチノイドおよびその代謝産物の母子間移行メカニズムを明らかにする。また、マウスをモデル実験動物とし、投与実験により詳細な母子間移行メカニズムを明らかにすることである。

研究内容：

① ニホンザル試料を用いたフィールドモニタリング研究

分析に先立ち、組織中のネオニコチノイドおよびその代謝産物を定量するための Method の構築を実施した。

研究用試料として、愛媛大学生態環境試料バンクに保存されているニホンザル胎児個体を用い、血液、胎盤、脳に蓄積するネオニコチノイドおよびその代謝物の分析を実施した。

② 妊娠マウスへの *in vivo* 投与による母子間移行メカニズム研究

妊娠マウスに対して、クロチアニジン (CLO) 65 mg/kg/day を投与した。妊娠 18.5 日に投与し、その 1、3、6 時間、4 日および 9 日後にそれぞれ母獣(後大静脈)および胎子(心臓)から採血を行った。血液サンプルは上記構築した Method を用いて分析を実施した。

研究成果：

1) 組織中のネオニコチノイドおよびその代謝産物の分析法の開発

本研究では、組織中に蓄積するネオニコチノイドおよびその代謝産物を定量するため、新たに分析法を開発した。各組織約 50 mg を秤量後、メタノールおよび 1%ギ酸アセトニトリルを用いることで効率的に抽出が行えることを明らかにした。抽出産物は、リン脂質の除去のための Inertsep Phospholipid remover (GL Science) および陰イオン成分の除去のため Inertsep PSA (GL Science) の 2 種のカートリッジを用いることで効率的に精製が可能となった。特に、ネオニコチノイドの標的組織の一つと考えられている脳は脂質含量が多く、LC/MS 分析におけるイオン化妨害を強く受けることが知られているが、本分析法は脳組織においてもイオン化妨害を最小限に抑えることが可能となった。分析は、トリプル四重極型 LC/MS/MS (Agilent6495B) で実施した。

2) ニホンザル試料を用いたフィールドモニタリング研究

Table : ニホンザルの胎児から検出されたネオニコチノイドおよびその代謝産物 (単位 : ng/kg)

ID	Name	1-Methyl-3-nitroguanidine	Clothianidin	dm-Clothianidin	Dinotefuran	dm-Dinotefuran	Dinotefuran-urea	Nitenpyram	dm-Nitenpyram	Thiacloprid	Thiamethoxam
Placenta	DF(%)	100	86	100	57	43	43	100	86	100	43
	Min	198.7	<LOD	8790.1	<LOD	<LOD	<LOD	6.0	<LOD	0.1	<LOD
	Max	13466.6	8.8	40199.2	65.0	45.0	16.4	1240.9	63.3	12.3	15.0
	Average	8385.3	1.7	21823.8	26.5	10.3	2.9	247.0	26.7	3.9	3.6
	Median	8616.1	0.5	22450.0	8.3	<LOD	<LOD	30.4	30.0	2.7	<LOD
Brain	DF(%)	100	71	100	29	57	29	100	86	71	43
	Min	318.9	<LOD	4046.6	<LOD	<LOD	<LOD	15.8	<LOD	<LOD	<LOD
	Max	14345.8	7.0	31951.8	68.6	212.3	30.3	429.3	95.9	5.0	3.2
	Average	4626.0	3.2	11159.8	13.0	41.6	4.5	114.5	45.2	1.7	0.6
	Median	563.6	3.3	6129.7	<LOD	1.8	<LOD	40.3	25.3	0.6	<LOD
Blood	DF(%)	100	100	100	71	43	43	100	100	43	57
	Min	258.6	3.7	3011.3	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	18.3	<LOD	<LOD
	Max	8462.6	7.3	31177.3	1385.4	26.2	40.0	120.0	117.3	71.6	91.8
	Average	2420.1	5.3	14727.6	209.6	6.2	12.7	39.2	49.5	23.0	20.7
	Median	776.0	5.2	10840.3	10.2	<LOD	<LOD	17.0	33.0	2.0	1.8

ニホンザル胎児の胎盤、脳および血液に蓄積するネオニコチノイドおよびその代謝産物の分析を実施した。胎盤、脳および血液のいずれの試料からもこれら化学物質が検出され、特に Clothianidin とその代謝産物である dm-Clothianidin および 1-Methyl-3-nitroguanidine が主に検出された。Clothianidin は母体が摂取した後速やかに代謝され、その代謝産物が血液—胎盤関門を通過し、胎児から検出されたと考えられた。他にも、Dinotefuran、Nitenpyram、Thiacloprid および Thiamethoxam が検出され、胎児は母体を介して複数のネオニコチノイドに曝露されている事が明らか

かになった。即ち、胎児は妊娠期間中に母体を通じて曝露されている事、特に代謝産物の曝露量が多い事が明らかになった。

3) 妊娠マウスへの in vivo 投与による母子間移行メカニズム研究

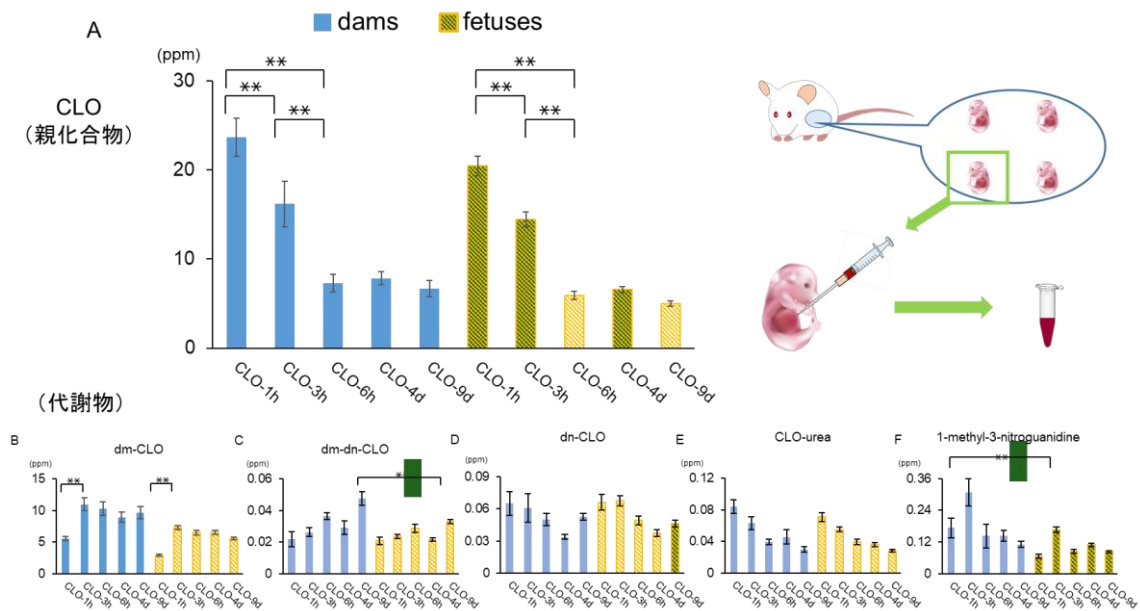


Fig. 1 : 母体および胎児で検出されたクロチアニジンおよびその代謝産物

妊娠マウスにクロチアニジンを投与し、胎児への移行を観察した。その結果、クロチアニジンや今回測定した5種の代謝産物がすべて胎児からも検出された。すなわち、クロチアニジンは母体で速やかに代謝されたあと、血液—胎盤関門を通過し、胎児に移行することが明らかになった。移行した代謝産物では、脱メチル体である dm-Clothianidin が最も多く検出された。

成果発表

1) 第27回環境化学討論会 2018年5月22日～25日

池中 et al. ネオニコチノイド系殺虫剤のヒト健康影響評価問題点の整理と今後の研究課題

2) 第45回日本毒性学会学術年会 2018年7月18日～20日

池中、石塚. ネオニコチノイド系殺虫剤の日本人における曝露実態

3) 第 161 回獣医学会学術集会 2018 年 9 月 11 日～13 日

大野、池中、星 et al. 浸透性農薬およびその代謝産物の胎児移行に関する研究

4) 第 21 回環境ホルモン学会研究発表会 2018 年 12 月 15 日～16 日

大野、池中、星 et al. 母子間移行における浸透性農薬およびその代謝産物の定量的な解明

今後の問題点

本研究により、霊長類モデルとして注目した野生妊娠ニホンザル個体の胎児から、ネオニコチノイドが検出された。また、実験的にクロチアニジン投与した妊娠マウスの胎児からも親化合物のみでなくその代謝産物が検出された。すなわち、ネオニコチノイドは母体から摂取された後、一部は代謝され、血液—胎盤関門を通過して胎児に曝露されることが明らかになった。

今後の課題として、代謝産物の毒性評価が挙げられる。特に今回検出された Clothianidin の代謝産物の一つである脱ニトロ体、dn-Clothianidin は哺乳類のニコチン性アセチルコリン受容体への結合力が高いことが予測されており、正確な毒性を明らかにする必要がある。