

## 研究課題名

尿試料を用いたアジア地域のネオニコチノイド系農薬汚染のバイオモニタリング  
Biomonitoring of Neonicotinoid Insecticides in Urine Sample from Several Asian Countries

## 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

タイでは農業の近代化が急速に進行しており、過去 10 年間で農薬の年間輸入量は 2008 年の 11 万トンから 2017 年には 20 万トンと約 1.8 倍に増大している(1)。国内労働力の約 3 割は農業に従事しており、農産物の輸出はタイの主要産業であるが、ほとんどの場合従事者が保護具をつけることなく作業しており、農薬曝露が懸念されている。有機リン系農薬はタイでも広範囲に使用されており、最も輸入量が多いのはクロロピリフォスである。最近の研究で、タイ人の尿中のジアルキルリン酸塩(DAP; 有機リン系農薬代謝物)について、地域や作物によって様々なレベルで検出されたという報告がある(2,3)。胎児期の有機リン系農薬曝露により、出生時の体重や頭囲、その後の ADHD や精神神経発達などに影響することが報告されている(4-8)。一方で、ネオニコチノイド系農薬は、昆虫に対して選択的に毒性を示し、哺乳類に対する毒性が比較的低いことから、有機リン系農薬やカーバメート系農薬、ピレスロイド系農薬の代替物として使用量が増加している。ネオニコチノイド系農薬の約 6 割がトウモロコシ、綿花、柑橘類、コメ、大豆などの作物の種子や作付け土壌に使用されている。胎児期のネオニコチノイド系農薬曝露の影響として、出生体重の低下や ASD などが報告されている(9,10)。タイでは、上述のように有機リン系農薬曝露に関する報告はあるものの、ネオニコチノイド系農薬に関する情報は皆無であり、モニタリングが必須である。本 LaMer 課題では、これまでに尿中ネオニコチノイド系農薬の分析法を確立し、es-BANK に保存されている尿試料を測定することで、アジア-太平洋地域における広域モニタリングの必要性を示してきた。今年度は、タイ国 Chiang Mai 州の 2 つの農業地域で実施した、妊娠可能世代の農作業従事者における有機リン系農薬およびネオニコチノイド系農薬の曝露実態について報

告する。

## 2. 試料と方法

### 2.1. 調査地域と試料採取

2018年2月にタイ国 Chiang Mai 州の Fang (FA)および Chom Thong (CT)の2つの農業地域で調査を実施した。図1に示す通り、FAはChiang Mai市から約150km北側、CTは約70km南側に位置している。それぞれの地域で25組ずつ計50組、当該地域で半年以上農業に従事している妊娠可能世代(18~40歳)の夫婦を対象とし、女性については妊娠していない方を対象としてリクルートした。全ての調査協力者から試料採取前に書面で同意書を得ている。随時尿を約50ml採取し、10mlもしくは5mlのチューブに分注後、氷冷下でChiang Mai大学に輸送し、 $-20^{\circ}\text{C}$ で保管した。つくば市の国立環境研究所に輸送後は、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保管した。本研究は、Chiang Mai大学および国立環境研究所の倫理審査委員会それぞれ承認を得て実施した。

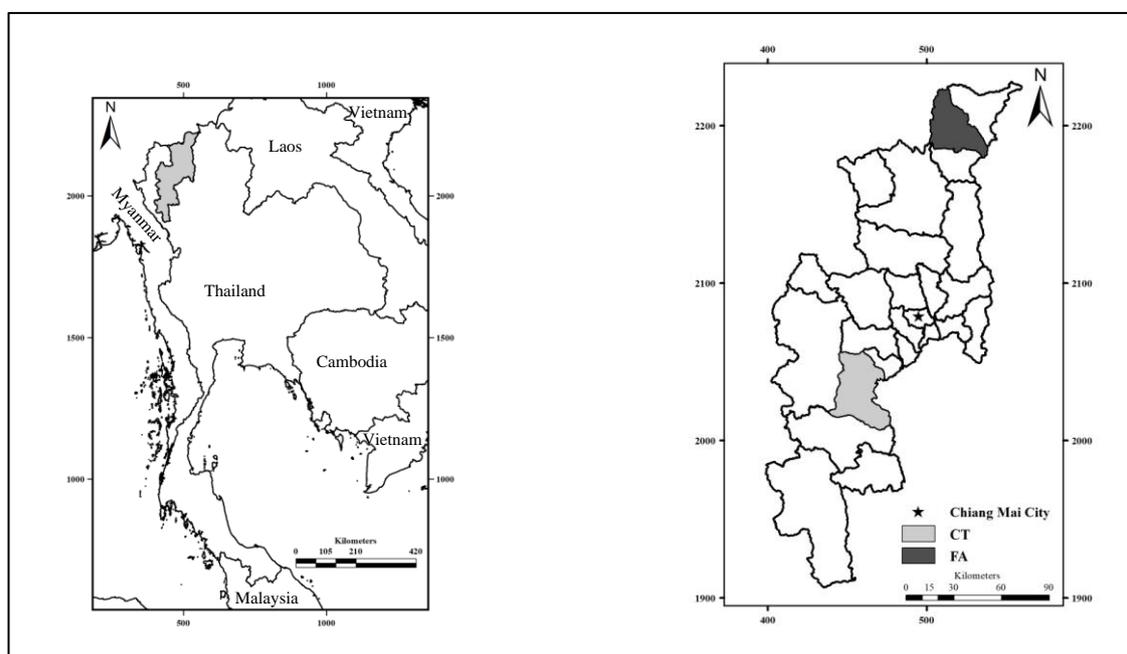


図1. 調査地域概要

### 2.2. 化学分析

有機リン系農薬代謝物(DAP)は、dimethylphosphate (DMP)、dimethylthiophosphate (DMTP)、diethylphosphate (DEP)、

diethylthiophosphate (DETP)、and diethyldithiophosphate (DEDTP) を対象とし、ガスクロマトグラフ-炎光光度検出装置(GC-FPD)で測定した(11)。50 $\mu$ l の 125mg/l dibutyl phosphate (DBP)を内部標準として 5ml の尿試料に添加し、NaCl を 2g 加えた。6M HCl を 1ml 添加したのちに、酢酸エチル:アセトン(1:1, v/v)溶液を 5ml 加えて攪拌した。攪拌後、2000 x g で 3 分間遠心分離して上澄を分取し、さらに酢酸エチルを 5ml 加えて抽出し、抽出液を合わせた。抽出液に 20mg の K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> を添加して 37°C で蒸発乾固した。蒸発残渣をアセトニトリルでガラス製試験管に移し、PFBB<sub>r</sub> を添加して 50°C で 15 時間誘導体化した。誘導体化物は超純水とヘキサンで抽出後、蒸発乾固して 50 $\mu$ l のトルエンで再溶解した。最終溶液は Agilent 社製 6890 GC-FPD で測定した。

ネオニコチノイド系農薬は、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、フィプロニル、フロニカミド、エチプロール、スルホキサフロルおよびそれらの代謝物とし、高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析装置(LC-MS/MS)で測定した。尿試料 100 $\mu$ l に内部標準溶液 10 $\mu$ l を添加し、アセトニトリル 600 $\mu$ l を加えてタンパクを沈殿させ、遠心分離して上澄を得た。上澄は予め 100 $\mu$ l のアセトニトリルで洗浄した Isolute Hydro DME +400mg プレート(Biotage)に添加し、2000 x g で 1 分間遠心分離して溶出液を得た。溶出液は 45°C で 15 分間窒素ガスを吹き付けて蒸発乾固し、0.1%ギ酸入り 10mM 酢酸アンモニウム:メタノール(95:5, v/v)溶液 200 $\mu$ l で再溶解し、島津社製 LCMSMS-8060 で測定した。

### 3. 結果と考察

今回測定に供試したタイ人の尿試料 100 検体の有機リン系農薬代謝物およびネオニコチノイド系農薬の測定結果の概要を表 1 に示す。有機リン系農薬代謝物 6 物質のうち、DEP と DETP については全ての検体から検出された。また、DETP は幾何平均濃度 (8.9  $\mu$ g/g-creatinine) および最大値 (261  $\mu$ g/g-creatinine) が最も高かった。DEP と DEDTP の幾何平均濃度はそれぞれ 6.7  $\mu$ g/g-creatinine および 7.3  $\mu$ g/g-creatinine だった。一方で、DMP、DMTP、DMDTP の検出率はいずれも 50%未満で、半数以上の検体が定量下限未満だった。今回対象とした検体では、ジエチル体が大半の検体から検出されたのに対してジメチル体の検出率が低く、日本や米国などの状況と異なる傾向を示

した。これは、日本や米国ではフェンチオンやメタミドホスなどのジメチル体の DAP を生成する農薬が主に使用されているのに対し、タイではクロロピリホス、エチオン、プロフェノホスなどエチル体の DAP を生成する農薬が使用されているためと考えられる。しかしながら、DAP は共通代謝物のため、個別の農薬使用量を反映しているかどうか特定できず、今後個別の農薬曝露を評価する手法の開発が求められる。

ネオニコチノイド系農薬は、アセタミプリド-デスメチル(N-dm-ACE)の検出率が 99%と最も高く、続いてイミダクロプリド(IMI)が 94%、チアメトキサム(THX)が 69%、クロチアニジン(CLO)が 59%、イミダクロプリド-オレフィン(Of-IMI)が 50% の検体から検出された。他の物質はいずれも検出率は低値を示した。幾何平均濃度は IMI が 8.7  $\mu\text{g/g-creatinine}$  と最も高く、続いて N-dm-ACE が 7.3  $\mu\text{g/g-creatinine}$ 、THX が 4.3  $\mu\text{g/g-creatinine}$ 、Of-IMI が 2.6  $\mu\text{g/g-creatinine}$ 、CLO が 2.4  $\mu\text{g/g-creatinine}$  だった。最大濃度は Of-IMI が 296  $\mu\text{g/g-creatinine}$  を示した。タイ人の尿からネオニコチノイド系農薬を検出した例は今までになく、本研究が初めての報告である。N-dm-ACE のレベルは女性と比べて男性で低い傾向を示し、N-dm-ACE の親化合物である ACE に対する比も女性が高値を示したことから、体内でのアセタミプリドの代謝に性差が影響していると考えられる。IMI レベルは、米国(12)や日本(13)の報告よりも高値であり、タイにおける農業従事者の職業曝露を示唆する結果だったが、中国における報告(14)と比べて低値だった。

質問票データ等から、有機リン系農薬およびネオニコチノイド系農薬の曝露要因について多変量解析により評価した。年齢、性別、BMI、調査地域、教育歴、世帯収入、業務形態、住居用農薬使用の有無、野菜と果物の消費量、飲料水を共変量としたモデルを作成したところ、尿中の有機リン系農薬代謝物およびネオニコチノイド系農薬レベルに最も影響していたのは井戸水の使用であり、井戸水の飲用を介した農薬曝露が示唆された。

表 1. 尿試料中有機リン系農薬代謝物およびネオニコチノイド系農薬測定結果概要

Compounds ( $\mu\text{g/g Cr}$ )	Reproductive-age farmworkers (N=100)							
	%> MDL	GM	GSD	95%CI	P50	P75	P95	Max.
DAP								
DMP	15.0	-	-	-	-	-	17.3	91.2
DMTP	36.0	-	-	-	-	1.5	9.3	239

DMDTP	11.0	-	-	-	-	-	1.5	102
DEP	100.0	6.7	2.4	5.7-8.0	4.3	7.6	20.4	126
DETP	100.0	8.9	3.2	7.1-11.3	3.7	10.2	30.5	261
DEDTP	65.0	7.3	5.7	5.2-10.2	1.1	2.1	9.4	125
<u>NEO/m</u>								
ACE	34.0	-	-	-	-	0.008	0.05	0.3
CLO	59.0	2.4	2.5	2.0-2.8	0.06	0.1	0.4	1.2
DIN	9.0	-	-	-	-	-	0.06	0.3
IMI	94.0	8.7	4.2	6.6-11.6	0.3	0.7	2.7	75.3
NIT	0.0	-	-	-	-	-	-	-
THX	69.0	4.3	4.2	3.2-5.7	0.04	0.1	1.3	6.6
THI	0.0	-	-	-	-	-	-	-
FLN	2.0	-	-	-	-	-	-	0.2
N-dm-ACE	99.0	7.3	2.6	6.0-8.8	0.3	0.7	2.6	5.6
N-dm-THX	0.0	-	-	-	-	-	-	-
OH-IMI	0.0	-	-	-	-	-	-	-
Of-IMI	50.0	2.6	3.5	2.0-3.3	1.2	3.4	13.3	297
SUF	2.0	-	-	-	-	-	-	1.0
THIAM	3.0	-	-	-	-	-	-	0.01
TFNA-AM	0.0	-	-	-	-	-	-	-
TZNG	5.0	-	-	-	-	-	-	0.5
Fipronil	0.0	-	-	-	-	-	-	-
Fipronil sulphide	0.0	-	-	-	-	-	-	-
Fipronil sulphone	8.0	-	-	-	-	-	0.02	0.05
Ethiprole	0.0	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: MDL, method detection limit;  $\mu\text{g/g}$ , micrograms per gram; Cr, creatinine; GM, geometric mean; GSD, geometric standard deviation; CI, confidence Interval; P50, 50th percentile; P75, 75th percentile; P95, 95th percentile; Max., maximum concentration; DAP, dialkylphosphate; DMP, dimethylphosphate; DMTP, dimethylthiophosphate; DMTDP, dimethyldithiophosphate; DEP, diethylphosphate; DETP, diethylthiophosphate; DETDP, diethyldithiophosphate; NEO/m, neonicotinoid and their metabolites; ACE, acetamiprid; CLO, clothianidin; DIN, dinotefuran; IMI, imidacloprid; NIT, nitenpyram; THI, thiacloprid; THX, thiamethoxam; SUF, sulfoxafloor; FLN, flonicamid; N-dm-ACE, N-desmethyl-ACE; THI-AM, thiacloprid-amide; Of-IMI, imidacloprid-olefin; TFNA-AM, trifluoromethyl-nicotinamide; OH-IMI, hydroxy-IMI; N-dm-THX, N-desmethyl-THX; -, values under MDLs. Note: MDLs were 2.5  $\mu\text{g/L}$  for DMP; 1.0  $\mu\text{g/L}$  for Of-IMI; 0.2  $\mu\text{g/L}$  for DMTP, DMDTP, DEP, DEDTP, and TZNG; 0.1  $\mu\text{g/L}$  for DETP, FLN, N-dm-THX, OH-IMI, TFNA-AM, and fipronil; 0.05  $\mu\text{g/L}$  for CLO, DIN, IMI, NIT, and N-dm-ACE; 0.02  $\mu\text{g/L}$  for THX, fipronil sulphide, fipronil sulfone, and ethiprole; 0.01  $\mu\text{g/L}$  for THIAM; and 0.005  $\mu\text{g/L}$  for ACE, THI, and SUF.

#### 4. まとめと今後の課題

本研究により、タイ国の妊娠可能世代の農作業従事者が広く有機リン系農薬およびネオニコチノイド系農薬に曝露していることが示された。今回は 1 回の随時尿サンプルで評価したが、いずれの農薬も体内半減期が短く ICC が低いため、代表的な曝露の状況をとらえ切れていない可能性がある。今後、蓄尿や複数回の尿試料採取など ICC を考慮した上で、ポピュレーションアプローチによる

バイオモニタリングを実施する必要がある。

#### 【引用文献】

1. World Bank. Available online: <https://data.worldbank.org/> (accessed on 19 October 2020).
2. Hanchenlaksh, C.; Povey, A.; O'Brien, S.; De Vocht, F. Urinary DAP metabolite levels in Thai farmers and their families and exposure to pesticides from agricultural pesticide spraying. *Occup. Environ. Med.* 2011, 68, 625–627.
3. Wongta, A.; Sawarng, N.; Tongchai, P.; Sutan, K.; Kerdnoi, T.; Prapamontol, T.; Hongsisong, S. The Pesticide Exposure of People Living in Agricultural Community, Northern Thailand. *J. Toxicol.* 2018, 2018 Article ID 4168034, 7 pages.
4. Whyatt, R.M.; Rauh, V.; Barr, D.B.; Camann, D.E.; Andrews, H.F.; Garfinkel, R.; Hoepner, L.A.; Diaz, D.; Dietrich, J.; Reyes, A.; et al. Prenatal insecticide exposures and birth weight and length among an urban minority cohort. *Environ. Health Perspect.* 2004, 112, 1125–1132.
5. Naksen, W.; Prapamontol, T.; Mangklabruks, A.; Chantara, S.; Thavornnyutikarn, P.; Srinual, N.; Panuwet, P.; Barry Ryan, P.; Riederer, A.M.; Barr, D.B. Associations of maternal organophosphate pesticide exposure and PON1 activity with birth outcomes in SAWASDEE birth cohort, Thailand. *Environ. Res.* 2015, 142, 288–296.
6. Berkowitz, G.S.; Wetmur, J.G.; Birman-Deych, E.; Obel, J.; Lapinski, R.H.; Goldbold, J.H.; Holzman, I.R.; Wol, M.S. In Utero pesticides exposure, maternal paraoxonase activity, and head circumference. *Environ. Health Perspect.* 2004, 112, 388–391.
7. Bouchard, M.F.; Bellinger, D.C.; Wright, R.O.; Weisskopf, M.G. Attention-deficit/hyperactivity disorder and urinary metabolites of organophosphate pesticides. *Pediatrics* 2010, 125.
8. Zhang, Y.; Han, S.; Liang, D.; Shi, X.; Wang, F.; Liu, W.; Zhang, L.; Chen, L.; Gu, Y.; Tian, Y. Prenatal exposure to organophosphate pesticides and neurobehavioral development of neonates: A birth cohort study in Shenyang, China. *PLoS ONE* 2014, 9.
9. Cimino, A.M.; Boyles, A.L.; Thayer, K.A.; Perry, M.J. Effects of neonicotinoid pesticide exposure on human health: A systematic review. *Environ. Health Perspect.* 2017, 125, 155–162.
10. Ichikawa, G.; Kuribayashi, R.; Ikenaka, Y.; Ichise, T.; Nakayama, S.M.M.; Ishizuka, M.; Taira, K.; Fujioka, K.; Sairenchi, T.; Kobashi, G.; et al. LC-ESI/MS/MS analysis of neonicotinoids in urine of very low birth weight infants at birth. *PLoS ONE* 2019, 14, 1–11.
11. Prapamontol, T.; Sutan, K.; Laoyang, S.; Hongsisong, S.; Lee, G.; Yano, Y.; Hunter, R.E.; Ryan, P.B.; Barr, D.B.; Panuwet, P. Cross validation of gas chromatography-flame photometric detection and gas chromatography-mass spectrometry methods for measuring dialkylphosphate metabolites of organophosphate pesticides in human urine. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2014, 217, 554–566.

12. Li, A.J.; Martinez-Moral, M.P.; Kannan, K. Variability in urinary neonicotinoid concentrations in single-spot and first-morning void and its association with oxidative stress markers. *Environ. Int.* 2020, 135, 105415.
13. Ueyama, J.; Nomura, H.; Kondo, T.; Saito, I.; Ito, Y.; Osaka, A.; Kamijima, M. Biological monitoring method for urinary neonicotinoid insecticides using LC-MS/MS and its application to Japanese adults. *J. Occup. Health* 2014, 56, 461–468.
14. Tao, Y.; Phung, D.; Dong, F.; Xu, J.; Liu, X.; Wu, X.; Liu, Q.; He, M.; Pan, X.; Li, R.; et al. Urinary monitoring of neonicotinoid imidacloprid exposure to pesticide applicators. *Sci. Total Environ.* 2019, 669, 721–728.