

Environment Research and Technology Development Fund

環境省環境研究総合推進費終了研究等成果報告書

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)

平成26年度～平成28年度

Transformation Products of Neonicotinoid Pesticides and their Ecotoxicity

鹿児島大学大学院理工学研究科
いであ株式会社環境創造研究所

平成29年5月

環境省
総合環境政策局総務課環境研究技術室
環境保健部環境安全課環境リスク評価室
地球環境局総務課研究調査室

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)

I. 成果の概要

1. はじめに (研究背景等)
2. 研究開発目的
3. 研究開発の方法
4. 結果及び考察
5. 本研究により得られた主な成果
6. 研究成果の主な発表状況
7. 研究者略歴

II. 成果の詳細

(1) 精密質量解析による環境変化体の探索と半定量技術の開発 (鹿児島大学大学院理工学研究科)	1
要旨	1
1. はじめに	2
2. 研究開発目的	3
3. 研究開発方法	3
4. 結果及び考察	1 4
5. 本研究により得られた成果	4 6
6. 国際共同研究等の状況	4 6
7. 研究成果の発表状況	4 6
8. 引用文献	5 2
(2) 環境変化体の合成と精製 (鹿児島大学大学院理工学研究科)	5 5
要旨	5 5
1. はじめに	5 5
2. 研究開発目的	5 6
3. 研究開発方法	5 6
4. 結果及び考察	6 0
5. 本研究により得られた成果	7 3
6. 国際共同研究等の状況	7 4
7. 研究成果の発表状況	7 4
8. 引用文献	7 4
(3) 環境変化体の生態毒性の調査 (いであ株式会社)	7 6
要旨	7 6
1. はじめに	7 7
2. 研究開発目的	7 7
3. 研究開発方法	7 7
4. 結果及び考察	9 0
5. 本研究により得られた成果	1 0 2
6. 国際共同研究等の状況	1 0 2
7. 研究成果の発表状況	1 0 2
8. 引用文献	1 0 3

III. 英文Abstract	1 0 5
-----------------	-------

課題名 5-1406 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

課題代表者名 高梨 啓和（鹿児島大学大学院理工学研究科
化学生命・化学工学専攻環境化学研究室准教授）

研究実施期間 平成26～28年度

累計予算額 162,655,000千円（うち平成28年度：51,462,000千円）
予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード 農薬、環境変化体、甲殻類、セスジユスリカ、LC/MS/MS、モニタリング、合成・精製

研究体制

- (1) 精密質量解析による環境変化体の探索と半定量技術の開発（国立大学法人鹿児島大学）
- (2) 環境変化体の合成と精製（国立大学法人鹿児島大学）
- (3) 環境変化体の生態毒性の調査（いであ株式会社）

研究概要

1. はじめに（研究背景等）

農薬は、環境中で速やかに分解されて検出されないことが望ましいとされ、分解性が高い農薬が開発されてきた。しかし、ここでいう分解は一次分解であり、完全分解ではない場合がある。このため、図1に示すように、環境水中から農薬の環境変化体（Pesticide Transformation Products in Water environments: PTPWs）が検出される場合がある。このような場合には、親農薬の生態リスクに加えて、PTPWsの生態リスクを調査する必要がある。しかし、親農薬と比較すると、水環境中でのPTPWsの濃度測定結果や生態毒性試験の結果は報告例が少なく、現状では生態リスクを評価することが困難である。報告例が少ない理由として、PTPWsの標準物質が市販されていない場合が多いこと、測定方法が検討されていない場合が多いことがあげられる。また、どのようなPTPWsが生成するのかが十分に明らかになっていない場合があると考えられる。

これらの傾向は、ネオニコチノイド系農薬（NNI）などの初回登録年が新しい農薬で顕著である。NNIによるミツバチ等の陸生昆虫への生態影響について一般の関心が高まる中、日本においてはNNIが水稻航空防除で使用されていることから水生昆虫への影響が懸念されるが、NNIのPTPWsに着目した環境中濃度測定や生態毒性の検討はほとんど行われていない。

2. 研究開発目的

本研究では、高分解能質量分析計などを用いてNNIのPTPWsを探索するとともに、PTPWs等の測定方法を検討・開発した。開発した技術を用いて、PTPWs等の検出率や表流水中濃度を測定した。また、NNIの一種であるイミダクロプリドを中心に、市販が確認できないPTPWsを合成して急性毒性試験を実施した。以上により、NNI等のPTPWsの生態リスクを評価することを本研究の目的とした。

この目的を達成するために、3つのサブテーマを設定して検討を行った。すなわち、サブテーマ（1）では、日本で登録されているNNI等を対象として、そのPTPWsを探索して一部の物質の構造を推定した。また、表流水中の親農薬類と様々なPTPWsの濃度を網羅的、包括的かつ迅速、安価に分析する技術を開発して、PTPWs等による表流水の汚染が進んでいる事例を探索した。サブテーマ（2）では、NNIの一種であるイミダクロプリドのPTPWsを中心に合成を検討した。その際、親農薬のトキシコフォアが保存されていると考えられるPTPWsを中心に検討した。合成に成功したPTPWsは、サブテーマ（1）およびサブテーマ（3）に供給した。サブテーマ（3）では、NNIやその既知・市販PTPWs、サブテーマ（1）および（2）で構造推定・合成したPTPWsを対象に、水生生物のユスリカおよびオオミジンコを用いた急性毒性試験を実施し、試験生物に対するPTPWs等の致死および亜致死の毒性影

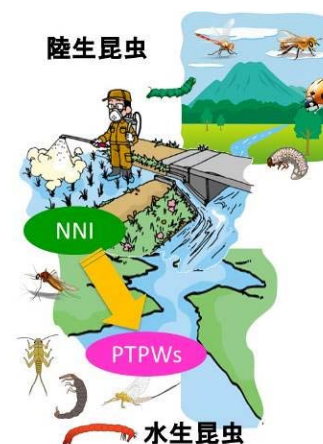


図1 農薬環境変化体（PTPWs）の水生昆虫への曝露、NNI：ネオニコチノイド系農薬

響を調査した。さらに、得られた有害性情報をサブテーマ(1)で調査した環境濃度と比較することにより、PTPWs等の生態リスクを評価した。

3. 研究開発の方法

(1)精密質量解析による環境変化体の探索と半定量技術の開発(国立大学法人鹿児島大学)

NNIの一種であるイミダクロプリドとジノテフランを対象に、模擬太陽光を用いた光照射実験を行った。得られた光照射サンプルに含まれる未知PTPWsを高分解能LC/MSなどを用いて探索し、発見された物質の構造を推定した。また、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、従来は必須であった標準試薬を用いることなく、LC/MS/MSでPTPWsを高感度検出可能な技術(半定量LC/MS/MS測定技術)を開発した。開発された技術を用いて、未知PTPWsなどのSRM条件を検討した。さらに、同技術を用いて親農薬とPTPWsの同時一斉分析を実施し、環境基準点から採取した河川水や一般河川の河川水などにおけるPTPWsの検出率、濃度を明らかにした。

(2)環境変化体の合成と精製(国立大学法人鹿児島大学)

構造が既知な環境変化体のうち、市販が確認されず親農薬のトキシコフォアが保存されているイミダクロプリド環境変化体5物質の合成を目的に、安価な物質から高効率反応による合成経路を構築し、目的物質の合成を目指した。合成、精製を達成した物質は、サブテーマ(1)および(3)に供給した。また、ジノテフランの既知環境変化体のうち、市販されていないデニトロ体およびウレア体の合成を行った。すなわち、ジノテフランを酸性水溶液で処理するとニトログアニジン部位が加水分解を受けて、デニトロ体およびウレア体が生成すると予想し反応を行った。詳細な分析により、合成したデニトロ体と同じ分子式をもつジノテフランの光照射変化体の構造を比較検討した。さらに、ネオニコチノイド系農薬の対称農薬として選定したピレスロイド系殺虫剤エトフェンプロックスの構造が既知の環境変化体3物質のうち市販が確認されていないエステル誘導体について、定法に従ってカルボン酸塩化物とアルコールのエステル化反応により行った。

(3)環境変化体の生態毒性の調査(いであ株式会社)

トキシコフォアが保存されていると考えられる市販のイミダクロプリドPTPWs、サブテーマ(2)で合成したイミダクロプリド合成PTPWs、対照農薬エトフェンプロックス合成PTPWsの合計10物質他について、農薬取締法に準拠した急性毒性試験を実施した。供試生物としてセスジユスリカ(*Chironomus yoshimatsui*)およびオオミジンコ(*Daphnia magna*)を用い48h-EC50および48h-LC50を調査した。各PTPWsについて、セスジユスリカおよびオオミジンコの48h-EC50の最小値を不確実係数10で除して、農薬取締法に基づく甲殻類急性影響濃度(Acute Effect Concentration: AECd)を算出し、河川水中の実測濃度と比較することにより、甲殻類等に対するPTPWsの生態リスクを評価した。イミダクロプリドPTPWsの河川水濃度は、サブテーマ(1)において、平成28年5月から6月の田植え時期に鹿児島県内のイミダクロプリドを施用した水田に隣接する河川から環境基準点を含む5地点で採水した271サンプルについて、LC/MS/MSで測定した結果を用いた。エトフェンプロックスPTPWsについては、平成26年度に鹿児島県および宮崎県内で有人ヘリコプターによる水稻航空防除が実施された地域を流れる一般河川(13地点)から採取した49サンプル、同じく環境基準点(3地点)から採取した21サンプルについて、LC/MS/MSで測定した結果を用いた。

4. 結果及び考察

(1)精密質量解析による環境変化体の探索と半定量技術の開発(国立大学法人鹿児島大学)

高分解能LC/MSを用いてイミダクロプリド光照射サンプルに含まれる未知PTPWsを探索した結果、すでに報告されているPTPWs以外に、トキシコフォアを保存している可能性があるPTPWsは発見できなかった。そこで、ジノテフランについて同様の検討を行ったところ、トキシコフォアを保存している可能性があるPTPWsを8物質発見した。それらは構造異性体と考えられ、その構造を推定した。

また、半定量LC/MS/MS測定技術を検討した結果、農薬光照射サンプルや田面水サンプルなどの高濃度・混合サンプルを入手することができれば、これまでは必須であった標準試薬の代わりにこれらのサンプルを用いることによってLC/MS/MS測定に必要なSRM条件を定められることを実証した。同技術を用いて、NNIを含む14種の農薬、合成した6種類のPTPWsを含む28種類のPTPWsについて、LC/MS/MSを用いた一斉分析のメソッドを開発した。これにより、他の研究者も汎用器機でPTPWsを検出できるようになった。

さらに、開発した方法を用いて河川水などにおけるNNI、そのPTPWsなどの濃度測定を実施した結果、セスジユスリカへの毒性が強いイミダクロプリド-オレフィン体を含む数多くのPTPWsが実環境中から検出されること、エトフェンプロックスのPTPWsの中には親農薬よりも高濃度で検出されるPTPWが存在し、その濃度は親農薬の登録保留基準と同程度であることなどを明らかにした。

(2)環境変化体の合成と精製(国立大学法人鹿児島大学)

イミダクロプリド環境変化体のうち環開裂体については、文献記載の手法に従い良好な収率で合成を達成した。

また、オレフィン体については、文献記載の手法では合成が出来なかったが、他の文献記載の手法を参考に合成方法を構築することで合成を達成した。ジオール体については、オレフィン体のオスミウム酸化反応の条件を最適化することで合成を達成した。オレフィン体の水和反応によりモノヒドロキシ体の異性体混合物の合成を検討したところ、ウール・PdCl₂錯体を触媒に用いた系でのみ目的物質が生成していることが、反応混合物のMRおよびMS測定により確認された。

ジノテフランのPTPWsであるデニトロ体およびウレア体の合成は、ジノテフランを塩酸水溶液で処理することで行った。中和の後、固相抽出でNaClを除去してから、HPLCにより目的物質を分取精製した。高分解能LC/MSによりデニトロ体およびウレア体の単離、精製を確認した。合成したデニトロ体と同じ分子式をもつジノテフランの光照射変化体の構造を比較検討したところ、お互いに異性体の関係にあることが分かった。さらに一次プロダクトイオンのフラグメンテーションパスイェイ解析から光照射サンプルの構造を推定した。これらのことから、光照射と同様な条件下で生成すると考えられる実環境中での変化体が、これまで報告されてきた構造と異なり新規な環境変化体であることを見出した。

また、エトフェンプロックスのエステル変化体の合成のため、まず、3-フェノキシ安息香酸を塩化チオニルで処理してカルボン酸塩化物に変換した。次に対応するアルコールとトリエチルアミン存在下、反応させてエステル化反応を行った。HPLCを用いて分取することで生成物を単離した。単離生成物の¹H-NMR、MS測定結果から合成が確認された。

(3)環境変化体の生態毒性の調査(いであ株式会社)

イミダクロプリドのセスジユスリカに対する48h-EC50は、21 µg/Lであった。イミダクロプリドのPTPWであるオレフィン体の48h-EC50は18 µg/Lであり、親農薬と同程度の強度の毒性を保持することが明らかになった。また、オオミジンコに対する6-chloronicotinaldehydeの急性毒性試験を実施したところ、親農薬ではみられなかった致死毒性を有することを確認した。イミダクロプリドおよびオレフィン体に対する感受性は、オオミジンコよりもセスジユスリカの方が高かった。その他のイミダクロプリドおよびエトフェンプロックスのPTPWsでは、いずれも生物種間に毒性の顕著な差は認められなかった。

本研究で検討したPTPWsのAECdは河川水中の最大濃度を下回っており、農薬取締法に基づいた甲殻類等に対する生態リスクは認められなかった。欧州食品安全機関(European Food Safety Authority: EFSA)が2013年に公表した農薬の水域生態リスク評価に関する新たなガイダンスでは、試験生物の急性毒性データを用いて有害性を推定する場合、国内の農薬取締法よりも10倍大きな不確実係数100を適用してRAC(Regulatory Acceptable Concentration)を算出することとしており、国際的にはより安全側での農薬の有害性評価にシフトしている。親農薬と同程度の強度の急性毒性を保持しているイミダクロプリド-オレフィン体については、農薬取締法に基づいた甲殻類等に対する生態リスクは認められなかったが、河川水から継続的に高い濃度で検出され、その最大濃度はAECdの約1/40、RACの約1/4であったことから、PTPWsが生態系に及ぼすリスクをより詳細に評価していくためには、今後もPTPWsの継続的な監視が必要と考えられる。

5. 本研究により得られた主な成果

(1)科学的意義

NNIを含む14種の農薬、合成した6種類のPTPWsを含む28種類のPTPWsについて、LC/MS/MSを用いた一斉分析のメソッドを開発した。NNIのPTPWsについては、LC/MS/MSを用いた高感度測定方法がほとんど報告されていないため、同情報は、多くの研究者がNNIのPTPWsを環境モニタリングするのに有効と考えられる。同情報は、無料公開されている学会の公式実測マススペクトルデータベースへの収録が予定されていることから、国内外へ広く周知されることが期待される。

さらに、市販されていないなどの理由により試薬を入手できない場合でも、農薬原体などの親化合物から調製した混合試料、田面水などの高濃度試料があれば、LC/MS/MSを用いた高感度分析が可能になった。これまで、新たな環境汚染物質の存在が疑われるたびに標品を合成・精製し、実環境中からの検出を確認する必要があった。確認の結果、実環境中からほとんど検出されない場合には、時間、労力とコストを要する標品の合成・精製が徒労に終わる場合があった。しかし、本研究開発の成果により、標品を合成・精製することなく、親化合物から調製した変化体などの未精製の物質を用いて実環境試料の高感度分析が可能となり、実環境中からの検出実態を確認してから標品の合成・精製を行えるようになった。今後益々多様化すると考えられる環境汚染物質、中でも変化体の環境研究に貢献する技術と考えられる。同技術の内容を紹介する講演会を学会主催で開催することが決まっており、広く周知されることが期待される。

また、既報の合成手法を改良するなどして、市販が確認されないPTPWsの合成・精製を行った。PTPWsを合成した研究例はほとんど発見することができないため、本研究が契機となり、有機合成化学者の合成対象物質としてPTPWsが着目され、新たな分野が開拓されると期待される。

さらに、NNIの一種であるイミダクロプリド、ジノテフランおよびイミダクロプリドのPTPWsについて、水生昆虫のユ

スリカおよび標準試験生物種のオオミジンコに対する急性毒性を調査した。また、NNIの比較対象農薬として殺虫スペクトラムが広いピレスロイド系殺虫剤エトフェンプロックスに着目し、農薬およびPTPWsについて急性毒性を調査した。農薬の生態影響については、これまでに数多くの報告があるが、PTPWsの水生生物に対する有害性を調べた報告はほとんどないため、科学的意義が深い。とくに、一部のPTPWsがオオミジンコに対して農薬とは異なる毒性作用をもつ可能性を示したこと、農薬原体と同程度の強度の毒性を有することを発見したことは着目される。本研究でPTPWsの毒性を明らかにしたことにより、農薬のみならず、そのPTPWsも考慮した農薬の環境リスク評価が必要となる可能性を示したことは、科学的な意義が大きいと考えられる。

(2) 環境政策への貢献

＜行政が既に活用した成果＞

特に記載すべき事項はない。

＜行政が活用することが見込まれる成果＞

ネオニコチノイド系農薬の生態系への影響が懸念されている中、代表的なネオニコチノイド系農薬であり、日本における使用量が比較的多いイミダクロプリドおよびジノテフランを対象に、セスジユスリカを用いた遊泳阻害試験を実施した。その結果、オオミジンコへの遊泳阻害および致死と比較してセスジユスリカへの遊泳阻害が強いことを明らかにしている。このように、イミダクロプリドおよびジノテフランはオオミジンコへの毒性は低いがセスジユスリカへの毒性が高いことを示しているが、その毒性強度は、ピレスロイド系殺虫剤エトフェンプロックスと比較して弱いことを明らかにしており、農薬の環境安全管理に資することが期待される。

農薬を含めた様々な化学物質の環境安全管理は、生態系に対する影響を定量的に評価して行う必要がある。しかし、現在の環境安全管理のほとんどは、親農薬などの親化合物に着目した管理と言っても過言ではない。そのような中、本研究の成果は、親化合物と同程度の毒性強度を有する環境変化体が存在すること、親化合物とは異なる毒性作用を有する環境変化体が存在することを示している。さらに、環境変化体が親化合物と同程度以上の濃度レベルで検出される事例があること、また、親農薬の登録保留基準と同程度の濃度で環境変化体が検出される事例があることを示しており、環境変化体のさらなる環境モニタリングの必要性を示している。これらの成果は、親化合物を対象とした現在の環境安全管理のあり方を環境変化体に拡張する必要性を示す可能性があり、環境政策への貢献が期待される。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

＜査読付き論文＞

特に記載すべき事項はない。

＜査読付論文に準ずる成果発表＞

特に記載すべき事項はない。

(2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) 高梨啓和: 日本分析化学会機器分析ワークショップ in 福岡(2014)
「高分解能・高質量精度LC/MSによる未知物質の探索方法」
- 2) 高梨啓和: 日本分析化学会機器分析ワークショップ in 鹿児島(2014)
「高分解能・高質量精度LC/MSによる未知物質の探索方法」
- 3) 高梨啓和: 化学工学会第46回秋季大会(2014)
「高分解能・高質量精度LC/MSを用いた微量汚染物質の構造推定」
- 4) 高梨啓和、有島由紀子、橋本扶美、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、宮本信一、石川英律: 第17回日本水環境学会シンポジウム(2014)
「高分解能・高質量精度LC/MSを用いた農薬の環境変化体(PTPWs)の探索」
- 5) 安田侑右、岡村哲郎、石川英律、宮本信一、田畑彰久、門川淳一、高梨啓和: 第20回日本環境毒性学会研究発表会(2014)
「ネオニコチノイド系農薬の環境変化体の水生生物に対する急性毒性」
- 6) 橋本扶美、有島由紀子、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、宮本信一、石川英律: 平成26年度日本水環境学会九州沖縄支部研究発表会(2015)
「未知環境変化体(PTPWs)の構造推定と半定量分析: ネオニコチノイド系殺虫剤imidaclopridを例として」
- 7) 福岡悠史郎、藤木健司、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、宮本信一、石川英律: 平

- 成26年度日本水環境学会九州沖縄支部研究発表会(2015)
「標準物質の入手が困難な環境汚染物質の半定量分析」
- 8) 藤木健司、福崎悠史郎、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、宮本信一、石川英律：平成26年度日本水環境学会九州沖縄支部研究発表会(2015)
「ネオニコチノイド系農薬とその環境変化体(PTPWs)の定量分析」
- 9) 有島由紀子、橋本扶美、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、宮本信一、石川英律：平成26年度日本水環境学会九州沖縄支部研究発表会(2015)
「未知環境変化体(PTPWs)の構造推定方法の検討：ネオニコチノイド系農薬dinotefuranを例として」
- 10) 高梨啓和、藤木健司、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、宮本信一、石川英律：平成26年度日本水環境学会九州沖縄支部研究発表会(2015)
「タンデムLC分析によるhigh through put LC/MS/MS分析」
- 11) 野邊詩緒里、一宮利恵、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、宮本信一、石川英律：平成26年度日本水環境学会九州沖縄支部研究発表会(2015)
「有機リン系殺虫剤フェントロチオン光照射サンプルからの未知生成物の分離」
- 12) 橋本扶美、有島由紀子、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、宮本信一、石川英律：第49回日本水環境学会年会(2015)
「未知環境変化体(PTPWs)の構造推定と半定量分析：ネオニコチノイド系農薬imidaclopridを例として」
- 13) 高梨啓和、福崎悠史郎、藤木健司、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、宮本信一、石川英律：第49回日本水環境学会年会(2015)「標準物質の入手が困難な環境汚染物質のLC/MS/MS測定」
- 14) 藤木健司、福崎悠史郎、榎園直樹、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、宮本信一、石川英律：第49回日本水環境学会年会(2015)
「ネオニコチノイド系農薬とその環境変化体(PTPWs)の同時定量分析」
- 15) 有島由紀子、橋本扶美、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、宮本信一、石川英律：第49回日本水環境学会年会(2015)
「未知環境変化体(PTPWs)の構造推定方法の検討：ネオニコチノイド系農薬を例として」
- 16) 安田侑右、岡村哲郎、石川英律、山本潤、宮本信一、田畑彰久、門川淳一、高梨啓和：第49回日本水環境学会年会(2015)
「ユスリカに対するイミダクロプリド環境変化体(PTPWs)の急性毒性」
- 17) 石川英律、岡村哲郎、安田侑右、山本潤、宮本信一、田畑彰久、門川淳一、高梨啓和：第49回日本水環境学会年会(2015)
「ミジンコに対するイミダクロプリド環境変化体(PTPWs)の急性毒性」
- 18) F.HASHIMOTO, H.TAKANASHI, Y.ARISHIMA, T.NAKAJIMA, A.OHKI, T.UEDA, J.KADOKAWA, H.ISHIKAWA AND N.MIYAMOTO:Proc. The Water and Environment Technology Conference 2015.
“Exploring Transformation Products of Imidacloprid, a Neonicotinoid Insecticide”
- 19) 安田侑右、岡村哲郎、石川英律、宮本信一、田畑彰久、門川淳一、高梨啓和：第21回日本環境毒性学会研究発表会(2015)
「分解によるイミダクロプリドの毒性の変化」
- 20) 石川英律、安田侑右、岡村哲郎、宮本信一、田畑彰久、門川淳一、高梨啓和：第21回日本環境毒性学会研究発表会(2015)
「合成したイミダクロプリド環境変化体の水生生物に対する急性毒性」
- 21) 高梨啓和、橋本扶美、有島由紀子、中島常憲、大木章、上田岳彦、門川淳一、石川英律、宮本信一：第18回日本水環境学会シンポジウム(2015)
「ネオニコチノイド系農薬imidacloprid光照射サンプル中の変化体の網羅的探索」
- 22) 橋本扶美、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、石川英律、宮本信一：第18回日本水環境学会シンポジウム(2015)
「ネオニコチノイド系農薬imidaclopridとその環境変化体(PTPWs)の河川水中濃度測定」
- 23) 橋本扶美、有島由紀子、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、石川英律、宮本信一：環境科学会 2015年会(2015)
「農薬環境変化体の環境モニタリング～親農薬と変化体のリスク比較～」
- 24) 高梨啓和、有島由紀子、橋本扶美、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、宮本信一、石川英律：環境科学会2015年会(2015)
「ネオニコチノイド系農薬ジノテフランの環境変化体の探索」
- 25) 橋本扶美、有島由紀子、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、宮本信一、石川英律：平

成27年度廃棄物資源循環学会研究発表会(2015)

「高分解能・高質量精度LC/MSを用いた環境サンプル中の未知物質の探索」

- 26) F.HASHIMOTO, H.TAKANASHI, R.KITANOSONO, T.NAKAJIMA, A.OHKI, T.UEDA, J.KADOKAWA, H.ISHIKAWA AND N.MIYAMOTO:Proc. the 24th Korea-Japan Symposium on Water Environment 2015, Seoul, 2015.
“Unknown exploring of pesticide transformation products in water environments (PTPWs)”
- 27) T. UEDA AND H.TAKANASHI:The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, USA, 2015.
“Prediction of MS signal intensities of pesticide transformation products over a range of analyte cation concentration basing on a novel ionization kinetic model of ESI with electrostatic field effects”
- 28) 高梨啓和、玉島由美子、有島由紀子、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、石川英律、宮本信一：日本水環境学会九州沖縄支部研究発表会(2016)
「衝突断面積測定による未知環境汚染物質の構造推定」
- 29) 有島由紀子、玉島由美子、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、石川英律、宮本信一：日本水環境学会九州沖縄支部研究発表会(2016)
「イオン移動度質量測定による農薬の未知環境変化体(PTPWs)の構造推定」
- 30) 橋本扶美、北之園龍介、有島由紀子、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、石川英律、宮本信一：日本水環境学会九州沖縄支部研究発表会(2016)
「イミダクロプリドおよびジノテフランとその環境変化体(PTPWs)の河川水からの検出」
- 31) 高梨啓和、玉島由美子、有島由紀子、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、石川英律、宮本信一：第50回日本水環境学会年会(2016)
「衝突断面積解析による未知環境汚染物質の構造推定」
- 32) 有島由紀子、玉島由美子、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、石川英律、宮本信一：第50回日本水環境学会年会(2016)
「イオン移動度質量分析による農薬の未知環境変化体(PTPWs)の構造推定」
- 33) 橋本扶美、北之園龍介、有島由紀子、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、石川英律、宮本信一：第50回日本水環境学会年会(2016)
「イミダクロプリドおよびジノテフランとその環境変化体(PTPWs)の河川水中濃度測定」
- 34) 安田侑右、岡村哲郎、山本 潤、石川英律、宮本信一、田畑彰久、高梨啓和、上田岳彦、門川淳一：第50回日本水環境学会年会(2016)
「合成した農薬変化体(PTPWs)の水生生物に対する急性毒性」
- 35) 上土井太治、下吹越理子、山元和哉、上田岳彦、高梨啓和、門川淳一、宮本信一、石川英律：日本化学会第96春季年会(2016)
「イミダクロプリドのジオール型環境変化体の合成」
- 36) 高梨啓和、橋本扶美、北ノ園龍介、有島由紀子、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、石川英律、宮本信一：日本質量分析学会第64回質量分析総合討論会(2016)
「高分解能LC/MSとLC/MS/MSを用いた実環境試料からの未知農薬変化体の検出」
- 37) 高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦：日本質量分析学会第64回質量分析総合討論会(2016)
「高分解能LC-MS、LC-IMS-MSおよび多変量解析を用いた未知環境汚染物質の探索」
- 38) 安田侑右、山本潤、岡村哲郎、石川英律、宮本信一、田畑彰久、上田岳彦、門川淳一、高梨啓和：第22回日本環境毒性学会研究発表会(2016)
「イミダクロプリドの環境変化体(PTPWs)の水生生物に対するリスク評価」
- 39) F.HASHIMOTO, R.KITANOSONO, Y.ARISHIMA, H.TAKANASHI, T.NAKAJIMA, A.OHKI, T.UEDA, J.KADOKAWA, H.ISHIKAWA, N.MIYAMOTO:The Water and Environment Technology Conference 2016 (2016)
“Occurrence of Dinotefuran and Its Transformation Products in River Waters”
- 40) 高梨啓和、橋本扶美、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、石川英律、宮本信一：環境科学会2016年会(2016)
「衝突断面積に基づいた未知物質の構造推定」
- 41) 橋本扶美、北之園龍介、有島由紀子、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、石川英律、宮本信一：環境科学会2016年会(2016)
「ネオニコチノイド系農薬とその環境変化体(PTPWs)の河川水中濃度測定」
- 42) 高梨啓和、橋本扶美、大葉佐世子、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、石川英律、宮本信一：第

- 19回日本水環境学会シンポジウム(2016)
「イオン移動度分析と分子動力学計算に基づいた未知変化体の構造推定」
- 43) 橋本扶美、北ノ園龍介、有島由紀子、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、石川英律、宮本信一：第19回日本水環境学会シンポジウム(2016)
「ネオニコチノイド系農薬ジノテフランおよびその環境変化体の河川水中濃度」
- 44) F.HASHIMOTO, H.TAKANASHI, T.NAKAJIMA, A.OHKI, T.UEDA, J.KADOKAWA, H.ISHIKAWA and M.MIYAMOTO: The 25th Japan-Korea Symposium on Water Environment(2016)
“A technique for detecting trace transformation products in water environments without authentic standard compounds”
- 45) 橋本扶美、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、石川英律、宮本信一：第51回日本水環境学会年会(2017)
「標準物質を入手できない農薬環境変化体の環境モニタリング」
- 46) 大葉佐代子、橋本扶美、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、石川英律、宮本信一：第51回日本水環境学会年会(2017)
「殺虫剤環境変化体の合成と環境モニタリング」
- 47) 高梨啓和、大葉佐世子、橋本扶美、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、石川英律、宮本信一：第51回日本水環境学会年会(2017)
「農薬変化体の構造を推定するための衝突断面積測定方法の検討」
- 48) 上田岳彦、高梨啓和、門川淳一：日本化学会第97春季年会(2017)
「農薬の環境変化体イオンのESI気化速度の推定」
- 49) 高梨啓和、上田岳彦：第6回イオン移動度研究会、日本質量分析学会第68回イオン反応研究会・第157回質量分析関西談話会合同研究会開催(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 イオン移動度質量分析法によるアプローチ」
- 50) 高梨啓和：分析化学会九州支部機器分析ワークショップ in 長崎(2017)
「高分解能フーリエ変換型質量分析計(Orbitrap)と超高感度三連四重極型質量分析計LC-MS/MSを組み合わせた無標準LC-MS/MS測定」
- 51) 宮本信一、石川英律、岡村哲郎、山本 潤、田畑彰久、安田侑右、橋本扶美、大葉佐世子、上田岳彦、門川淳一、高梨啓和：環境化学会第26回環境化学討論会(2017)
「イミダクロプリド環境変化体の生態リスク」
- 52) 橋本扶美、大葉佐世子、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、石川英律、宮本信一：環境化学会第26回環境化学討論会(2017)
「未知環境変化体の構造推定のための衝突断面積解析技術の開発」

7. 研究者略歴

課題代表者：高梨 啓和

横浜国立大学工学部卒業、博士(工学)、現在、鹿児島大学准教授

研究分担者

1) 門川 淳一

東北大学工学部卒業、博士(工学)、現在、鹿児島大学教授

2) 宮本 信一

近畿大学農学部卒業、博士(農学)、現在、いであ株式会社 環境創造研究所 副所長

3) 石川 英律

筑波大学第二学群農林学類卒業、学術博士、金沢大学工学部助手、現在、いであ株式会社 環境創造研究所 管理部 品質管理課

5-1406 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

(1) 精密質量解析による環境変化体の探索と半定量技術の開発

鹿児島大学

大学院理工学研究科化学生命・化学工学専攻 環境化学研究室 高梨 啓和

〈研究協力者〉

鹿児島大学

大学院理工学研究科化学生命・化学工学専攻 ハイブリッド材料研究室 上田 岳彦

平成26(開始年度)～28年度累計予算額：132,341千円（うち平成28年度：45,112千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

農薬は、環境中で速やかに分解されて検出されないことが望ましいとされ、分解性が高い農薬が開発されてきた。しかし、ここでいう分解は一次分解であり、完全分解ではない場合があるため、環境水中から農薬の環境変化体(Pesticide Transformation Products in Water environments: PTPWs)が検出される場合がある。そのような場合、PTPWsの生態リスクを調査する必要があるが、未知PTPWsが数多く存在すること、多くのPTPWsは標準物質が市販されていないこと、測定方法が検討されていない場合が多いことから、環境濃度情報を得ることが困難な状況にある。

そこで本研究では、農薬光照射サンプルを用いて未知PTPWsを探索し、親農薬のトキシコフォア(毒性を惹起する部分構造)を保存していると考えられるPTPWsを発見し、その構造を推定した。また、従来は必須であった標準試薬を用いることなく、LC/MS/MSにてPTPWsを高感度検出する技術を確立した。これにより、合成する前に環境中からの検出実態を確認できるため、労力などを費やしてPTPWsを合成しても、構造推定の誤りなどの理由により環境中から検出されないことを回避でき、類似研究を含めて研究効率の向上が期待される。

さらに、同技術を用いて、本研究で発見した3物質の未知PTPWsを含む28物質のPTPWsなどを対象に、LC/MS/MSを用いて環境分析する際に必要なSRM条件を明らかにした。これにより、多くの研究者がこれらのPTPWsの濃度を測定することが可能になった。同成果は、学会の公式実測マスペクトルデータベースへの収録が予定されていることから、国内外に広く周知されることが期待される。

さらに、明らかにしたSRM条件を用いて環境モニタリングを実施した結果、セスジユスリカへの毒性が強いイミダクロプリド-オレフィン体を含む数多くのPTPWsが実環境中から検出されること、エトフェンプロックスのPTPWsの中には親農薬よりも高濃度で検出されるPTPWが存在し、その濃度は親農薬の登録保留基準と同程度であることなどを明らかにした。

[キーワード]

農薬、環境変化体、LC/MS、モニタリング、構造推定

1. はじめに

農薬は、環境中で速やかに分解されて検出されないことが望ましいとされ、近年は分解性が高い農薬が開発されてきた。例えば、初回登録年が1949年の γ -リンデンは、水（詳細不明）に ^{14}C -リンデンを0.64 mg/Lとなるように添加した溶液、または、水もしくはアセトンを1.8 v/v%となるように添加した水に γ -リンデンを1.3 mg/Lとなるように添加した溶液を調製し、米国において野外太陽光下で28日間太陽光を照射する水中光分解試験を実施した結果、 γ -リンデンはアセトンの存在下および非存在下にかかわらず安定で、光分解物は検出されなかったと報告¹⁾されている。一方、初回登録年が2002年であるジノテフランは、濾過滅菌田面水を用いて調製した $\text{Tf-}^{14}\text{C}$ -ジノテフランまたは $\text{Gu-}^{14}\text{C}$ -ジノテフランの2 mg/L水溶液に、25°Cで16時間キセノン光（600 W/m²、測定波長：300～800 nm）を照射した結果として、3～4時間（東京、春の屋外条件に換算した場合に1日）の半減期が報告²⁾されている。

この例のように、近年開発された農薬は分解性がよい場合が多いが、ここでいう分解は一次分解であり、水や二酸化炭素などの最終安定分解生成物まで分解する完全分解ではない場合がある。このため、加水分解物などの変化体が環境中で生成すると考えられる。以前、著者らは、農薬の水中無触媒光分解生成物、加水分解物、および水環境中から検出事例がある変化体（以後、農薬の環境変化体、Pesticide Transformation Products in Water environments: PTPWsという）の文献研究³⁾を実施し、ひとつの農薬から数多くのPTPWsが生成するのが一般的であることを明らかにした。この文献研究では、ネオニコチノイド系農薬を調査していなかったため、アセタミプリド⁴⁾、イミダクロプリド⁵⁻⁸⁾、クロチアニジン⁹⁾、ジノテフラン²⁾、チアクロプリド、チアメトキサム^{10, 11)}、ニテンピラムを対象として、改めて同様の文献研究を実施した。その結果、これらの農薬からそれぞれ2、27、8、7、0、11、0物質のPTPWsが報告されていることが確認された。報告物質数が0物質のネオニコチノイド系農薬を中心に数多くの未知PTPWsが存在すると考えられる。

環境中でPTPWsが生成して蓄積したとしても、PTPWsに有害性が認められなければ問題はない。殺虫剤を開発する際には、数多くのビルディングブロックを合成して、殺虫活性の高い物質を探索するのが一般的と考えられる。このため、PTPWsが強い殺虫活性を有する可能性は高くない。しかし、報告されているPTPWsの構造を見ると、親農薬のトキシコフォア（毒性を惹起する部分構造）を保存している可能性があるPTPWsが複数報告されている。例えば、イミダクロプリドのPTPWsとして(E)-1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-2-nitroguanidin¹²⁾が、チアメトキサムのPTPWsとして(E)-1-((2-chlorothiazol-5-yl)methyl)-3-methyl-2-nitroguanidine¹⁰⁾がそれぞれ報告されている。また、PTPWsの毒性試験結果についても報告例が認められる。著者らが本研究を開始した2013年8月時点において、トキシコフォアを保存しているPTPWsの生態影響試験結果は発見できなかったが、イミダクロプリド-デニトロ体のMale albino Swiss-Webster miceに対する急性毒性（24h-LD₅₀）が親農薬であるイミダクロプリドより強いという報告¹³⁾や、イミダクロプリドなどのクロロニコチル基を有する農薬に多く共通するPTPWsである6-クロロニコチン酸の藻類増殖への影響を検討した結果、親農薬であるイミダクロプリドよりも感受性が高いという報告¹⁴⁾などの報告が認められる。このように、生態影響を有する未知PTPWsが存在する可能性が指摘されていることから、高分解能LC/MSなどを用いた精密質量解析による探索が必要と言える。

以上のように、ほ場などで施用された農薬の一部は、田面水中や水田土壌中で光分解、加水分解、生分解などを受けて生態影響を有するPTPWsに変化する可能性がある。ほ場では、止水などの

環境汚染防止対策が講じられているが、降雨などの影響により、農薬・PTPWsの一部が隣接する水環境に流出すると考えられるため、河川水などの環境水中のPTPWsの濃度に興味をもたれる。そこで、ネオニコチノイド系農薬のPTPWsについて、水環境中でのPTPWsの濃度測定結果を文献調査したところ、農薬原体（親農薬）については測定結果の報告例¹⁵⁾が数多く見受けられたが、PTPWsについては、水環境中における濃度測定結果を報告している例に乏しく、PTPWsの一種であるオレフィン体イミダクロプリドについて米国Great Smoky Mountains National Parkで測定した不検出であった事例¹⁶⁾など、一部の事例に限られている。報告例が少ない理由として、前述のように、どのようなPTPWsが生成するのかが十分に明らかになっていないことがあげられるが、これに加えて、標準物質が市販されていないPTPWsが多いこと、測定方法が検討されていないPTPWsが多いことがあげられる。このため、網羅的探索により発見され、構造が推定されたPTPWs、および市販が確認できない既知PTPWsを合成・精製し、測定方法を検討して環境モニタリングを行う必要がある。

しかし、PTPWsの合成・精製には、多くの労力、時間とコストを必要とすることがある。多くの労力などを費やして合成・精製したPTPWsが、構造推定の誤りなどが原因で実環境中から検出されなかった場合には、費やした労力などが徒労に帰すことになり、研究効率が低い。この対策として、合成対象物質が実環境中から検出されることを高分解能LC/MSを用いて確認することが考えられるが、探索研究に用いる高分解能LC/MSの検出感度は、実環境中のPTPWsの濃度を測定するのに必要な感度より低い。例えば、イミダクロプリド-オレフィン体の場合、高分解能LC/MSの検出感度は、本研究で環境モニタリングに使用したLC/MS/MSと比較して10,000分の1程度である。感度不足を補うために実環境試料の濃縮倍率を高くすると、エレクトロスプレーイオン化（ESI）を用いてイオン化した際に大きなイオン化抑制を受け、分析種の検出が困難になる。このため、合成・精製した標準試薬を用いずに、高感度LC/MS/MSにて実環境試料からPTPWsを検出する技術開発（半定量技術開発）の必要性が高い。

2. 研究開発目的

本研究では、ネオニコチノイド系農薬の中で初回登録年が古く、育苗箱施用剤であるイミダクロプリド、および初回登録年が新しく有人ヘリコプターでの航空防除剤であるジノテフランを対象として、トキシコフォアを保存している可能性がある新規PTPWsを探索し、その構造を推定した。また、新規PTPWsの詳細検討を実施する必要性を判断するために、半定量技術を開発して実環境サンプルに適用した。さらに、合成した既知PTPWsおよび親農薬の実環境中濃度を測定し、PTPWsによる環境汚染が進行している事例を探索するとともに、甲殻類等に対する生態リスクを評価するための曝露情報を得ることを目的とした。なお、実環境中濃度の測定は、イミダクロプリドおよびジノテフランに加えて、フィプロニル、エトフェンプロックス、およびそれらの既知PTPWsについても対象とした。

3. 研究開発方法

(1) 試薬

イミダクロプリド標準品（98%、残留農薬試験用）、6-chloronicotinic acid、6-chloronicotinaldehyde、(6-chloropyridin-3-yl)methanamine（5-(aminomethyl)-2-chloropyridine）、6-chloro-*N*-methylnicotinamide、

N-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)acetamide、エトフェンプロックス（標準物質）、フィプロニル（標準物質）、フィプロニルスルホン（標準物質）、6-aminochrysene (95%)、1-aminopyrene、水（LC/MS用）、メタノール（LC/MS用）、酢酸（LC/MS用）、ギ酸（LC/MS用、和光純薬工業、大阪）、1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)imidazolidin-2-one（イミダクロプリド-ウレア体、LGC Standards、ジノテフラン（標準物質）、1-naphthylamine（特級、関東化学、東京）、1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)imidazolidin-2-imine（イミダクロプリド-デニトロ体）、酢酸アンモニウム（for mass spectrometry、99.999% trace metals basis）、acridine（97%、シグマアルドリッチジャパン、東京）、Wesel, Germany）、3-フェノキシ安息香酸（98%）、2-(4-ethoxyphenyl)-2-methylpropanol（98%）、carbazole（EP、東京化成、東京）、caffeine（trimethyl-¹³C₃、99%、Cambridge Isotope Laboratories、MA、USA）をそれぞれ購入して試験に供した。

（２）器具

Sep-Pak PS-2、Sep-Pak AC-2、Oasis HLB、Oasis WCX（日本ウォーターズ、東京）、L-column 2 ODS（2 μm、2.1 x 75 mm）、L-column 2 C6-phenyl（5 μm、6.0 x 250 mm、CERI、東京）、InertSustain AQ-C18（3 μm、2.1 x 75 mm）、InertSustain AQ-C18（1.9 μm、2.1 x 50 mm、ジーエルサイエンス、東京）、HyperSil Gold（5 μm、2.1 x 50 mm、Thermo Fisher Scientific）FC-ODS（3 μm、4.6 x 150 mm）、TORAST Disc（GLCTD-NY1322、島津ジーエルシー、東京）、グラスファイバーフィルター（GC-50、アドバンテック東洋、東京）を購入して試験に供した。

（３）機器

ロングパスフィルター（WG295）、クセノンショートアークランプ（SX-UI501XQ、ウシオ電機、東京）、全自動固相抽出装置（AquaTrace ASPE899、ジーエルサイエンス）、高速液体クロマトグラフィー三連四重極型質量分析計（UltiMate DGP-3600SD Dual-Gradient Standard Pump-TSQ Quantiva）、高速液体クロマトグラフィー高分解能質量分析計（UltiMate HPG-3400SD-LTQ Orbitrap XL、Thermo Fisher Scientific、MA、USA）、高速液体クロマトグラフィーイオン移動度－高分解能質量分析計（ACQUITY UPLC H-Class-Synapt G2 Si HDMS、Waters、MA、USA）を用いた。質量分析計のイオン源は、ESIを用いた。

（４）解析用ソフトウェア

高速液体クロマトグラフィー三連四重極型質量分析計および高速液体クロマトグラフィー高分解能質量分析計で得られた測定結果は、Xcalibur 3.0.63、TraceFinder 3.2.368.22、FreeStyle 1.1 SP1を用いて解析した。解析のうち、差異解析についてはCompound Discoverer 2.0（Thermo Fisher Scientific）またはProgenesis QI 2.3.6275.47962（Waters）、スペクトル解析についてはMass Frontier 7.0 SR3（Thermo Fisher Scientific）を用いた。高速液体クロマトグラフィーイオン移動度－高分解能質量分析計で得られた測定結果は、MassLynx v4.1 SCN916、Drift Scope v2.7（Waters）を用いて解析した。分子軌道計算、分子動力学計算、量子化学計算は、SCIGRESS MO Compact（富士通、東京）、Gaussian & GaussView（Gaussian、CT、USA）を用いて行った。

（５）精密質量解析による未知環境変化体の探索と構造推定

１）イミダクロプリド光照射サンプルからの新規環境変化体の探索

メタノールを5 v/v%含む水を用いてイミダクロプリドの1 mM溶液を調製し、光路長12.5 mm、内容積4 mL、直方体の石英セルに入れ、波長290～800 nmの光を主に透過するロングパスフィルターを取り付けたクセノンショートアークランプの光を照射した。照射は、石英セル面に対して直角に

照射した。照射した光強度は51.2～51.8 W/m²、照射時間は9時間、温度20.0～21.0℃であった。得られたサンプルは、水で10倍に希釈して、高速液体クロマトグラフー高分解能質量分析計を用いた探索に供した。同様の操作を、ジノテフランを添加せずに実施し、得られたサンプルをブランクサンプルとして同時に分析した。イオン化は、ESI positive ion modeとした。プリカーサーイオン分析のスキャンレンジは、110～320 Daとした。イオン化におけるVaporizer Tempは380℃、Sheath Gas Flow、Auxiliary Gas Flow、Sweep Gas Flowはそれぞれ60、20、0 arbitrary unit、Capillary Tempは400℃、Source Voltageは3.0 kVとした。HPLCのカラムには、FC-ODSカラムを用いた。カラム温度は40℃、注入量は20 μLとした。移動相Aは水、移動相Bはメタノール+水5 v/v%で、両相にバッファーとして1 mMの酢酸および1 mMの酢酸アンモニウムを添加した。最適化された分離条件は、以下のとおりである。流速；0.7 mL/min；split比1:1（ESI:waste）；移動相B%；5（0-0.2 min）、60（20 min）、65（20-22 min）、5（22 min）、5（22-30 min）。

2) ジノテフラン光照射サンプルからの新規環境変化体の探索

ジノテフランを用いて1 mMの水溶液を調製し、光路長12.5 mm、内容積4 mL、直方体の石英セルに入れ、波長290～800 nmの光を主に透過するロングパスフィルターを取り付けたクセノンショートアークランプの光を照射した。照射は、石英セル面に対して直角に行った。照射した光強度は52.4～57.8 W/m²、照射時間は16時間、温度は17.4～23.7℃であった。得られたサンプルは、水で10倍に希釈して、高速液体クロマトグラフー高分解能質量分析計を用いた探索に供した。同様の操作を、ジノテフランを添加せずに実施し、得られたサンプルをブランクサンプルとして同時に分析した。プリカーサーイオン分析のスキャンレンジは、100～450 Daとした。イオン化におけるVaporizer Tempは380℃、Sheath Gas Flow、Auxiliary Gas Flow、Sweep Gas Flowはそれぞれ60、20、0 arbitrary unit、Capillary Tempは400℃、Source Voltageは3.0 kVとした。HPLCのカラムには、C6-phenylカラムを用いた。カラム温度は40℃、注入量は20 μLとした。移動相Aは水、移動相Bはメタノール+水5 v/v%で、両相にバッファーとして1 mMの酢酸および1 mMの酢酸アンモニウムを添加した。最適化された分離条件は、以下のとおりである。流速；1.5 mL/min；split比1:2（ESI:waste）；移動相B%；5（0-0.5 min）、65（10 min）、65（10-20 min）、5（20 min）、5（20-40 min）。

3) ジノテフラン光照射サンプル中の新規環境変化体の構造推定

a. フラグメンテーション解析による構造推定

構造を推定するイオンが、ESIや差動排気部で非意図的に生成するプロダクトイオンでないことを確認するために、positive ion modeとnegative ion modeの両モードで測定した。構造解析を目的としたフラグメンテーションスペクトル（一次プロダクトイオンスペクトル）の取得は、リニアイオントラップを用いた衝突誘起解離（CID）により行った。コリジョンガスには、ヘリウムを用いた。CID測定時のプリカーサーイオンのisolation widthは1.5 Da、Activation Timeは30 msec、コリジョンエネルギーの設定値は35%とした。イオン化におけるVaporizer Tempは400℃、Sheath Gas Flow、Auxiliary Gas Flow、Sweep Gas Flowはそれぞれ60、20、2 arbitrary unit、Capillary Tempは380℃、Source Voltageは2.5 kVとした。HPLCのカラムには、L-column 2 ODSを用いた。カラム温度は40℃、注入量は5 μLとした。移動相Aは水、移動相Bはメタノールで、0.05 w/w%になるようにギ酸を添加した。流速は0.4 mL/minとして、アイソクラティック分析（B%=2）で測定した。

一次プロダクトイオンのフラグメンテーションパスイオン解析は、測定結果から得られたニューートラルロスと、仮定したプリカーサーイオンの極限構造に基づいて、charge siteを起点としたイ

オン開裂が主に起こると仮定し、charge siteや水素の転位、McLafferty rearrangementなどの各種転位反応を考慮して解析した。解析は、強度の強いイオンを中心に、 m/z が大きく、プリカーサーイオンの部分構造を保持しているイオンを対象として実施した。解析結果は、スペクトル解析支援ソフトウェアを用いて確認した。

b. 衝突断面積解析による構造推定

位置異性体の構造解析を目的として、衝突断面積解析を行った。構造推定の対象物質として、ジノテフランのPTPWsである $C_7H_{14}N_4O_4$ に着目し、高速液体クロマトグラフィーイオン移動度－高分解能質量分析計を用いた衝突断面積（Collision Cross Section、CCS）測定を行った。イオン化におけるSampling Cone Voltageは40V、Source Offset Voltageは80 V、Source Gas Flowは0 mL/min、Cone Gas Flowは50 L/h、Desolvation Gas Flowは1,200 L/h、Nebuliser Gas Flowは4.0 Bar、Desolvation Temperatureは600°C、Capillary Voltageは1.0 kV、プリカーサーイオン分析のスキャンレンジは80～1000 Daとした。HPLCのカラムには、C6-phenylカラムを用いた。カラム温度は40°C、注入量は10 μ Lとした。移動相Aは水、移動相Bはメタノールで、両相にバッファーとして0.05 w/w%になるようにギ酸を添加した。流速は2.0 mL/minとして、アイソクラティック分析(B%=2)でスプリット比を1:3(ESI:waste)として行った。CCSの校正は、acridine、6-aminochrysene、1-aminopyrene、carbazoleおよび1-naphthylamineを用いて行った。

CCS測定と並行して、分子動力学計算の一種である軌道法（Trajectory Method、TM）^{17, 18)}によりCCS推算値を求め、実測値と比較することによって構造を推定した。TMによるCCS推算値の算出は、想定されるPTPWsの立体配座を仮定し、イオンおよびバッファガスの温度を298.15～700.00 K、軌道計算する窒素分子数を $4 \times 10^2 \sim 4 \times 10^6$ particlesとし、点電子密度が-0.4 electron以下のヘテロ原子にプロトンを付加し、 sp^3 窒素の立体反転は考慮せずにすべての極限構造を対象に行った。その際、グアニジンの共鳴構造および互変異体はすべての極限構造を仮定した。また、すべての極限構造の標準生成熱 ΔH_f° を、SCIGRESS MO Compactを用いてハミルトニアンPM6で求めた。共鳴構造、互変異体の極限構造、プロトン付加位置が異なる物質はすべて同一物質としてMaxwell-Boltzmann分布を仮定して平均値を算出し、CCS推算値とした。

（6）半定量LC/MS/MS測定技術の開発

1) 汎用型分析技術の開発と環境変化体の検出

a. 対象物質

既知PTPWsの物質数が最も多いネオニコチノイド系農薬はイミダクロプリドであり、その数は27物質である。これらのPTPWsのうち、購入できたのは6-chloronicotinic acid、6-chloronicotinaldehyde、(6-chloropyridin-3-yl)methanamine (5-(aminomethyl)-2-chloropyridine)、6-chloro-*N*-methylnicotinamide、*N*-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)acetamide、1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)imidazolidin-2-imine（イミダクロプリド - デニトロ体）および1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)imidazolidin-2-one（イミダクロプリド - ウレア体）であった。なお、現在は、イミダクロプリドのオレフィン体が購入可能である。

本技術の原理を確認するために、市販されているPTPWsのうち、実験に用いたイミダクロプリド光照射サンプル（光照射時間9 h）から検出された5-(aminomethyl)-2-chloropyridine、6-chloronicotinaldehyde、イミダクロプリド - デニトロ体、イミダクロプリド - ウレア体、6-chloronicotinic acidの5物質について、光照射サンプルを用いた実験を行った。

また、ジノテフランの光照射サンプルから比較的強度の高いピークとして発見され、トキシコフ

オアを保存している可能性があるPTPWsについても、同様の実験を行った。

b. サンプルの調製

イミダクロプリドの光照射サンプルは、5 v/v%のメタノールを含む水を用いてイミダクロプリドの1 mM溶液を調製し、光路長12.5 mm、内容積4 mL、直方体の石英セルに入れ、波長290～800 nmの光を主に透過するロングパスフィルターを取り付けたクセノンショートアークランプの光を照射した。照射は、石英セル面に対して直角に照射した。照射した光強度は51.2～51.8 W/m²、照射時間は9時間、温度20.0～21.0℃であった。

ジノテフランの光照射サンプルは、ジノテフランを用いて1 mMの水溶液を調製し、光路長12.5 mm、内容積4 mL、直方体の石英セルに入れ、波長290～800 nmの光を主に透過するロングパスフィルターを取り付けたクセノンショートアークランプの光を照射した。照射は、石英セル面に対して直角に照射した。照射した光強度は50.6～51.3 W/m²、照射時間は16時間であった。採取したサンプルは、水で10倍に希釈されて分析に供された。

c. 高速液体クロマトグラフー高分解能質量分析計による付加体イオンの確認、カラム保持時間の検討およびプロダクトイオンの検討

イミダクロプリド光照射サンプルの測定は、イオン化におけるVaporizer Tempを380℃、Sheath Gas Flow、Auxiliary Gas Flow、Sweep Gas Flowをそれぞれ60, 20, 0 arbitrary unit、Capillary Tempは450℃、Source Voltageを3.0 kV、プリカーサーイオン分析のスクランレンジを110～550 Daとして行われた。イオン化モードは、positive ion modeとした。HPLCのカラムには、InertSustain AQ-C18 (1.9 μm, 2.1 x 50 mm) を用いた。カラム温度は40℃、注入量は1 μLとした。移動相Aは水、移動相Bはメタノールで、両相にバッファーとして0.05 w/w%ギ酸を添加した。最適化された分離条件は、以下のとおりである。流速；0.5 mL/min、移動相B%；20 (0-8 min)。

ジノテフランの光照射サンプルの測定は、イオン化におけるVaporizer Tempを380℃、Sheath Gas Flow、Auxiliary Gas Flow、Sweep Gas Flowをそれぞれ60, 20, 2 arbitrary unit、Capillary Tempは400℃、Source Voltageを2.5 kV、選択イオンモニタリング分析のモニタリングレンジを140～400 Daとして行われた。イオン化モードは、positive ion modeとした。HPLCのカラムには、L-column 2 ODSを用いた。カラム温度は40℃、注入量は5 μLとした。移動相Aは水、移動相Bはメタノールで、両相にバッファーとして0.05 v/v%ギ酸を添加した。最適化された分離条件は、以下のとおりである。流速；0.4 mL/min、移動相B%；2 (0-5 min)。

d. 高速液体クロマトグラフー三連四重極型質量分析計による選択反応モニタリング条件の検討

SRM条件の検討は、分析種毎に、RFレンズの電圧、定量イオンと確認イオンのコリジョンエネルギーを最適化し、定量イオンと確認イオンのm/zを定めた。測定は、イオン化におけるVaporizer Tempを450℃、Sheath Gas Flow、Auxiliary Gas Flow、Sweep Gas Flowをそれぞれ50, 10, 0 arbitrary unit、Capillary Tempを300℃、Source Voltageを0.5 kV、Q1とQ3の質量分解能を0.7 Da、CIDの窒素ガス圧を1.5 mTorr、Scan Rateを1,000 Da/secとして行われた。LCの分離条件は、高速液体クロマトグラフー高分解能質量分析計を用いて付加体イオンの確認、カラム保持時間の検討、プロダクトイオンの検討を行ったときと同一とした。試料の注入量は、0.1または1 μLとした。

2) 半定量技術の開発

標準物質の市販が確認できない既知PTPWsの環境中からの検出濃度を推定する技術を開発するために、ESIにおけるイオン化機構モデルを検討してモデル物質の量子化学計算を実施した。この

際、検証可能なモデル物質として、試薬が市販されているイミダクロプリド・デニトロ体を用いた。まず、SCIGRESS MO compactを用いて、ハミルトニアンにPM6を用いて、数多くあるモデル物質の立体配座の中で鏡像体および安定に存在できない立体配座を除去した。残りの立体配座のGibbsの自由エネルギーを、Gaussianのb3lyp/6-311+G(2d,p)で求めた。同様の検討を、モデル物質のプロトン付加体についても行った。その際のプロトン付加位置は、b3lyp/6-31G(d)で求めた点電荷に基づき、モデル物質がもつlone pairの部分電荷が負であることを確認して決定した。以上の真空中での計算と同様の計算を、水中でも行った。

これらの計算により求めた液相・気相における分析種の共役酸の酸解離定数、液滴から気相への分析種のfluxより、気相中の分析種カチオンの濃度を推算し、質量分析計における応答とした。その際、気相の誘電率は真空の誘電率と等しいと仮定した。また、等温等圧過程であると仮定した。液滴から気相へのanalyteのfluxは、Fenn¹⁹⁾のモデルに従い、式(1)-1により算出されると仮定した。

$$k_{MH^+} = k_{MH^+}^0 \exp\left(\frac{-G_{MH_g^+} + G_{MH_s^+}}{RT}\right) \quad \text{式(1)-1}$$

ここで、 k_{MH^+} はanalyteカチオンの揮発速度定数、 $k_{MH^+}^0$ はFennの定数、 G はGibbsの自由エネルギー、 R は気体定数、 T は温度である。また、 k^0 は物質によらず一定と仮定した。

計算結果と比較するために、イミダクロプリド・デニトロ体の検量線を測定した。測定は、三連四重極型LC/MS/MSを用いたSRMにより行った。イオン化におけるVaporizer Tempを450°C、Sheath Gas Flow、Auxiliary Gas Flow、Sweep Gas Flowをそれぞれ50, 10, 0 arbitrary unit、Capillary Tempを300°C、Source Voltageを0.5 kV、Q1とQ3の質量分解能を0.7 Da、CIDの窒素ガス圧を1.5 mTorr、Scan Rateを1,000 Da/secとして行われた。イオン化モードは、positive ion modeとした。HPLCのカラムには、HyperSilGoldを用いた。カラム温度は40°C、注入量は1または10 μ Lとした。移動相Aは水、移動相Bはメタノール+水5 v/v%で、両相にバッファーとして1 mMの酢酸および1 mMの酢酸アンモニウムを添加した。最適化された分離条件は、以下のとおりである。流速; 0.5 mL/min、移動相B%; 15 (0-5 min)。

(7) 環境変化体の河川水中濃度測定

1) 施用情報の収集

イミダクロプリド、ジノテフラン、エトフェンプロックスの製剤名²⁰⁻²³⁾、適用作物、施用方法、サンプリング対象地域における施用時期を農薬ハンドブック²⁴⁾、農薬適用一覧表²⁵⁾および当該地域における農薬使用の手引きを用いて調査した。さらに、詳細な散布日、散布場所を把握し、製剤名を確認するために、サンプリング地域の自治体のホームページや広報を調査するとともに、農家や知人の協力を得て情報を収集した。さらに、農家や知人の協力を得て、有人ヘリコプターや無人ヘリコプターを用いた航空防除が実施される日時、場所および散布される製剤名の情報を収集した。

2) 田面水中のイミダクロプリド環境変化体の確認

イミダクロプリドを施用した地域の農家の協力を得て、2県2市町村、2014年6月7日～6月15日に117サンプルの田面水を採取した。また、当該水田地域を流れる水路や小規模河川の水を6サンプル採取した。採取は、田植えの1～7日前、田植え当日または翌日、田植え約7日後に採取し、それぞれをブランクサンプル、施用確認用のサンプル、PTPWs測定用サンプルとした。これらのサンプルは、一般環境ではなく、水耕栽培の生産現場環境として捉え、環境変化体の確認に用い、濃度測定

は行わなかった。

3) 表流水中のイミダクロプリド環境変化体の濃度測定

a. サンプルング地域の検討

サンプルング地域を検討する目的で、1県1市町村、2014年6月7日～6月15日に、イミダクロプリド航空防除地域を流れる河川および水路から22サンプルを採取した。採取は、ブランクサンプルとして農薬散布の1～7日前に1回、散布確認用サンプルとして散布当日に1回、PTPWsの測定用サンプルとして散布日から7日後に1回実施した。

b. サンプルング時期の検討

サンプルング時期を検討する目的で、2015年5月26日～6月24日に、イミダクロプリド施用地域を流れる河川から72サンプルを採取した。そのうち、環境基準点から採取したサンプルは18サンプルであった。

c. 河川水中濃度の測定

河川水中濃度を測定する目的で、2016年5月21日～6月13日に、イミダクロプリド施用地域を流れる河川から273サンプルを採取した。そのうち、環境基準点から採取したサンプルは41サンプルであった。サンプルング地点の名称、種類、緯度（北緯）および経度（東経）を表(1)-1に示す。

4) 表流水中のジノテフラン環境変化体の濃度測定

a. サンプルング地域の検討

サンプルング地域を検討する目的で、1県3市町村、2014年7月1日～9月13日に、ジノテフラン航空防除地域を流れる河川および水路から107サンプルを採取した。そのうち、環境基準点、調査点、監視点から採取したサンプルはそれぞれ9、9、10サンプルであった。採取は、ブランクサンプルとして農薬散布の1～4日前に1回、散布確認用サンプルとして散布の当日または翌日に1回、PTPWs測定用サンプルとして散布後9日以内に数回実施した。さらに、散布された地域の上流の河川水を採取し、空間的なブランクサンプルを採取した。また、親農薬とPTPWsの消長を詳細に検討するために、8地点（環境基準点と監視点を1地点ずつ含む）については、散布日から5日間連続で1日1回のサンプルングを実施し得た。

b. サンプルング時期の検討

サンプルング時期を検討する目的で、2015年8月18日～22日に、ジノテフラン航空防除地域を流れる河川から26サンプル、その下流の環境基準点から採取したサンプルは10サンプルであった。採取は、ブランクサンプルとして農薬散布の1日前に1回、散布確認用サンプルとして散布の当日に1回、PTPWs測定用サンプルとして散布日から4日間連続で1日1回実施した。

c. 河川水中濃度の測定

河川水中濃度を測定する目的で、2016年7月2日～3日に、ジノテフラン航空防除地域を流れる河川から131サンプルを採取した。そのうち、環境基準点、監視点から採取したサンプルはそれぞれ33、64サンプルであった。サンプルング地点の名称、種類、緯度（北緯）および経度（東経）を表(1)-2に示す。

5) 表流水中のエトフェンプロックス環境変化体の濃度測定

a. サンプルング地域・時期の検討

サンプルング地域および時期を検討する目的で、1県3市町村、2014年6月22日～8月26日に、エトフェンプロックス航空防除地域を流れる水路から24サンプルを採取した。

b. 河川水中濃度の測定

河川水中濃度を測定する目的で、2014年6月22日～8月26日に、エトフェンプロックス航空防除地域を流れる河川から70サンプルを採取した。そのうち、環境基準点から採取したサンプルは21サンプルであった。同様に、2015年8月17日～24日に、エトフェンプロックス航空防除地域を流れる河川から57サンプルを採取した。そのうち、環境基準点から採取したサンプルは36サンプルであった。サンプリング地点の名称、種類、緯度（北緯）および経度（東経）を表(1)-3に示す。

6) 表流水中のフィプロニル環境変化体の濃度測定

フィプロニルおよびそのPTPWsは、エトフェンプロックス環境変化体の濃度を測定する際に同時一斉分析した。

7) 前処理

a. サンプリングの地域および時期の検討における前処理

2014年度および2015年度に、サンプリングの地域および時期を検討する目的で採取したサンプルは、グラスファイバーフィルターで吸引ろ過された後、直列に接続されたSep-Pak PS-2とSep-Pak AC-2に減圧通水された。この際、PS-2からAC-2の順序で180 mLが通水され、サンプル中の農薬およびPTPWsが吸着された。Sep-Pak PS-2とSep-Pak AC-2は、使用前に洗浄・コンディショニングされた。洗浄・コンディショニングは、約10 mL/minの下向流で、カートリッジ1個あたりエタノールを10 mL、ジクロロメタン、アセトニトリル、純水をそれぞれこの順序で20 mL通液した。吸着された農薬およびPTPWsの脱離は、純水を10 mL通水して樹脂間隙に残留している試料水を除去した後にカートリッジを約10分間吸引乾燥し、バックフラッシュ法によりメタノール2 mL、アセトニトリル2 mL、ジクロロメタン1.5 mL通液して行った。ジクロロメタン画分は、35℃、窒素吹付で完全乾固し、メタノール画分およびアセトニトリル画分と混合した後、さらに窒素吹付で溶媒を除去した。その際、メタノール：アセトニトリル＝50：50 v/vの有機溶媒で容器壁面を洗浄しながら除去し、90 μ Lとした。その後、純水で1.8 mLまでメスアップし、濃縮倍率を88～100倍とした。得られた濃縮サンプルは、-20℃で密栓保存され、測定前にTORAST Discでろ過した後

表(1)-1 河川中濃度測定のための
サンプリング地点(イミダクロプリド)

名称	種類	北緯	東経
大丸橋	一般河川	32.05918	130.23816
石之丸橋	一般河川	32.05745	130.23571
平田橋	一般河川	32.05768	130.23006
陣之尾橋	一般河川	32.05882	130.22869
田島橋	環境基準点	32.06270	130.21276

表(1)-2 河川中濃度測定のための
サンプリング地点(ジノテフラン)

名称	種類	北緯	東経
串良橋	環境基準点	31.39812	130.96113
堅田橋	監視点	31.37948	130.96402
俣瀬橋	監視点	31.36108	130.97426
サイトA	一般河川	31.40434	131.00836
弁天橋	一般河川	31.36908	131.00010

表(1)-3 河川中濃度測定のための
サンプリング地点(エトフェンプロックス)

名称	種類	北緯	東経
大浦橋	一般河川	31.36963	130.23496
恋島橋	一般河川	31.39527	130.22569
新割田橋	環境基準点	31.67263	131.02487
竹ノ下橋	一般河川	31.72003	131.05182
小八ヶ代橋	一般河川	31.71271	130.94441
新亀甲橋	一般河川	31.70958	130.97647
下鶴橋	一般河川	31.72020	130.98422
標札	一般河川	31.72156	130.98915
宝来橋	環境基準点	31.74177	131.01474
いまでら橋	一般河川	31.76152	131.06495
中谷橋	環境基準点	31.77253	130.98052
サイトB	一般河川	31.63161	130.87099
サイトC	一般河川	31.63258	130.87522
サイトD	一般河川	31.63086	130.88328
サイトE	一般河川	31.63020	130.88818
サイトF	一般河川	31.62184	130.83567
松田橋	一般河川	31.62103	130.84346
サイトG	一般河川	31.61909	130.85100

に分析に供した。一連の操作は、シラン処理したガラス器具または不活性ガラスを用いて行った。

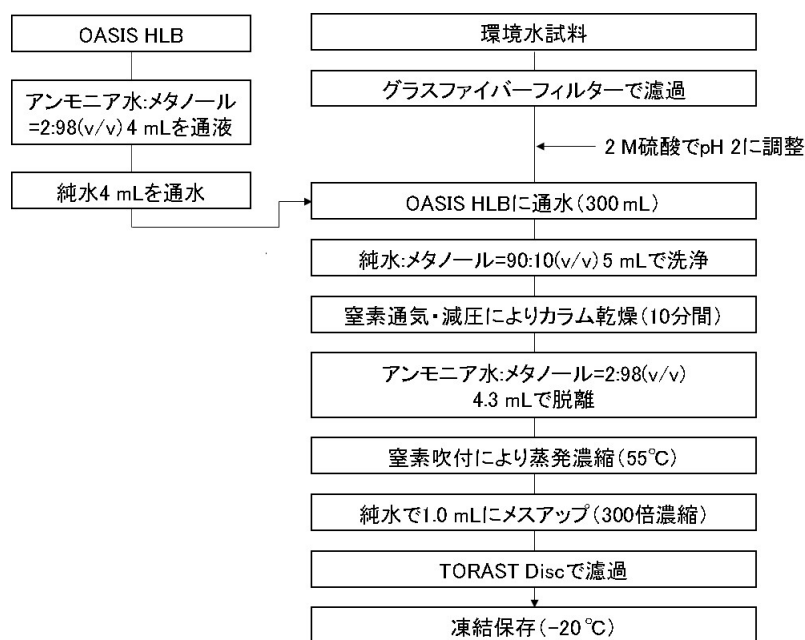
b. 河川水中濃度測定における前処理

2016年度に河川水中の濃度を測定する目的で採取したサンプルは、分析種により最適化した前処理方法を用いて処理した。イミダクロプリド、6-chloronicotinic acid、6-chloro-*N*-methylnicotinamide、*N*-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)acetamideについてはOasis HLBを、イミダクロプリド-デニトロ体、6-chloronicotinaldehyde、5-(aminomethyl)-2-chloropyridine、イミダクロプリド-ウレア体、1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-2-nitroguanidine、イミダクロプリド-オレフィン体、*N*-(1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-4,5-dihydroxyimidazolidin-2-ylidene)nitramideについてはOasis WCXを、ジノテフランおよびそのPTPWsについてはSep-Pak PS-2とSep-Pak AC-2を用いて処理した。吸着カートリッジの洗浄・コンディショニングおよび濃縮操作は、全自動固相抽出装置を用いて行った。無極性・弱極性吸着樹脂Oasis HLBを用いてイミダクロプリドおよびそのPTPWsを濃縮した手順・条件を図(1)-1、弱陽イオン交換基で部分置換した無極性・弱極性吸着樹脂Oasis WCXを用いてイミダクロプリドPTPWsを濃縮した手順・条件を図(1)-2、無極性吸着樹脂Sep-Pak PS-2と活性炭Sep-Pak AC-2を用いてジノテフランおよびそのPTPWsを濃縮した手順・条件を図(1)-3、Sep-Pak PS-2とSep-Pak AC-2を用いてエトフェンプロックスおよびそのPTPWsを濃縮した手順・条件を図(1)-4に示す。なお、エトフェンプロックスおよびそのPTPWsの濃縮には、全自動固相抽出装置を用いなかった。得られた濃縮サンプルは、 -20°C で密栓保存され、測定前にTORAST Discでろ過した後、シリジンスパイクとしてcaffeine-(trimethyl- $^{13}\text{C}_3$)が5 ppbになるように添加して分析に供した。一連の操作は、シラン処理したガラス器具または不活性ガラスを用いて行った。

c. 高速液体クロマトグラフィー三連四重極型質量分析計による定量分析

i. 高速液体クロマトグラフ

本研究では、図(1)-5に示すタンデムLCシステムを構築し、分析と洗浄・平衡化を並行して行えるようにする

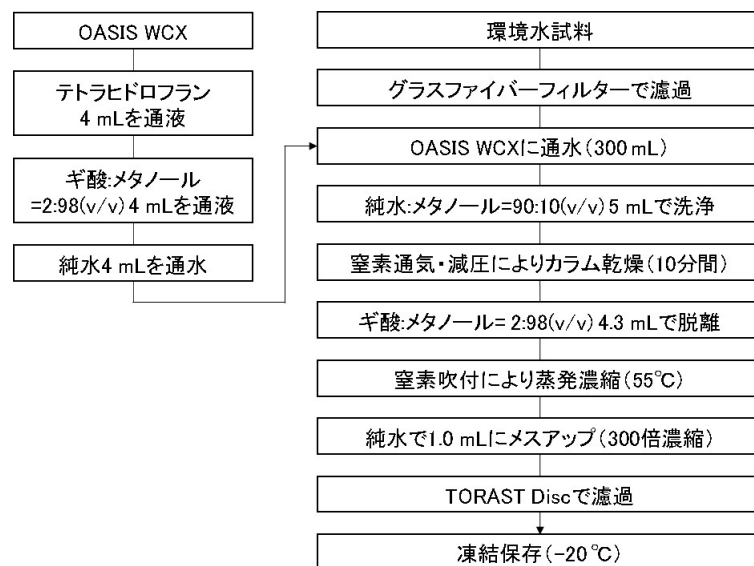


図(1)-1 無極性・弱極性吸着樹脂を用いた
イミダクロプリドおよびその環境変化体の濃縮・精製

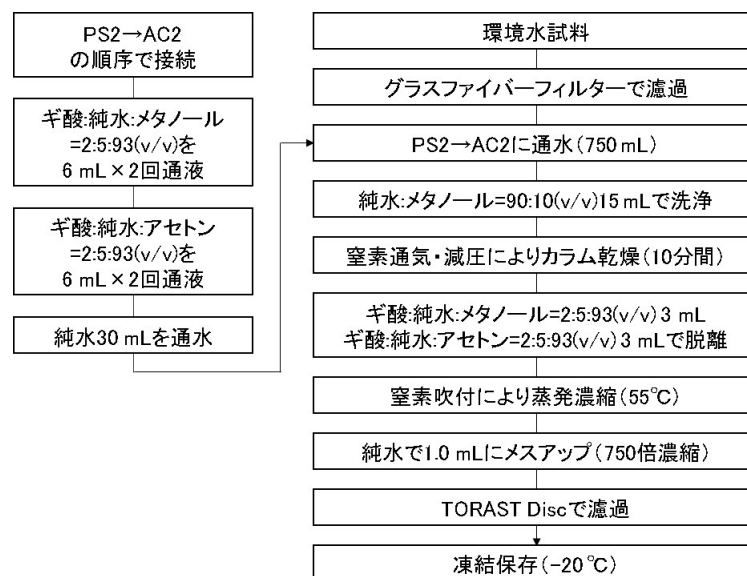
ことで、high through put分析を実施した。同システムでは、同様のLCカラムを2本、2-position 10-port valveを2個用い、同一の内径、長さのラインを用いてシステムを構築することによって、分析種のカラム保持時間に差が生じないようにした。

i i . イミダクロプリドおよびその環境変化体

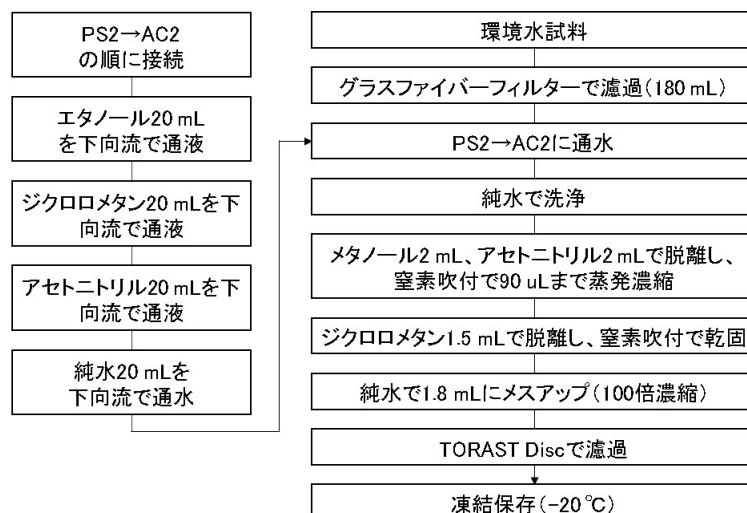
イミダクロプリドおよびそのPTPWsの測定は、イオン化モードをpositive ion mode、Vaporizer Tempを450°C、Sheath Gas Flow、Auxiliary Gas Flow、Sweep Gas Flowをそれぞれ50、10、0 arbitrary unit、Capillary Tempを300°C、Source Voltageを0.5 kVとして行った。HPLCカラムにはInertSustain



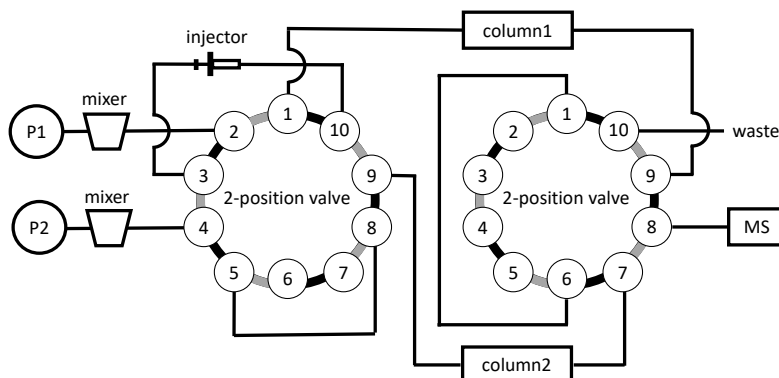
図(1)-2 弱陽イオン交換基で部分置換した無極性・弱極性吸着樹脂を用いた
イミダクロプリド環境変化体の濃縮・精製



図(1)-3 無極性吸着樹脂と活性炭を用いた
ジノテフランおよびその環境変化体の濃縮・精製



図(1)-4 無極性吸着樹脂と活性炭を用いた
エトフェンプロックスおよびその環境変化体の濃縮・精製



図(1)-5 タンデムLCシステムのフロー

AQ-C18 (3 μm 、2.1 x 75 mm)、移動相Aには水、移動相Bにはメタノールを用い、移動相両相にはバッファーとして0.05 w/w%になるようにギ酸を添加した。カラム温度は40°C、注入量は1または10 μL とした。最適化された分離条件は、以下のとおりである。流速；0.5 mL/min；split比1:2 (ESI:waste)；移動相B%；2.5 (0-0.25 min)、10 (0.75 min)、30 (7.25 min) 2.5 (7.5 min)、2.5 (7.5-8 min)。

i i i . ジノテフランおよびその環境変化体

ジノテフランおよびそのPTPWsの測定は、イオン化モードをpositive ion mode、Vaporizer Tempを450°C、Sheath Gas Flow、Auxiliary Gas Flow、Sweep Gas Flowをそれぞれ50、10、0 arbitrary unit、Capillary Tempを300°C、Source Voltageを0.5 kVとして行った。HPLCカラムにはInertSustain AQ-C18 (3 μm 、2.1 x 75 mm)、移動相Aには水、移動相Bにはメタノールを用い、移動相両相にはバッファーとして0.05 w/w%になるようにギ酸を添加した。カラム温度は40°C、注入量は1または10 μL とした。最適化された分離条件は、以下のとおりである。流速；0.5 mL/min；移動相B%；1 (0-0.5 min)、10 (3 min)、40 (4 min)、40 (4-5.5 min)、1 (5.51 min)、1 (5.51-6 min)。

i v . エトフェンプロックス、フィプロニルおよびその環境変化体

エトフェンプロックスおよびそのPTPWsである2-(4-ethoxyphenyl)-2-methylpropan-1-ol、2-(4-

ethoxyphenyl)-2-methylpropyl 3-phenoxybenzoateの測定は、positive ion modeで測定した。フィプロニルおよびそのPTPWs、エトフェンプロックスPTPWである3-phenoxybenzoic acidについては、negative ion modeで測定した。イオン化におけるVaporizer Tempは450°C、Sheath Gas Flow、Auxiliary Gas Flow、Sweep Gas Flowはそれぞれ50、10、0 arbitrary unit、Capillary Tempは300°C、Source Voltageは0.5 kVとした。HPLCカラムにはL-column 2 ODS (3 μ m、2.1 x 75 mm) を用いた。カラム温度は40°C、注入量は1または10 μ Lとした。移動相Aは水、移動相Bはメタノール+水5 v/v%で、両相にバッファーとして1 mMの酢酸および1 mMの酢酸アンモニウムを添加した。Positive ion modeでの測定において最適化された分離条件は、以下のとおりである。流速；0.4 mL/min；移動相B%；77 (0-0.5 min)、97 (9 min)、100 (9.01 min)、100 (9.01-10 min)。Negative ion modeでの測定において最適化された分離条件は、以下のとおりである。流速；0.5 mL/min；移動相B%；65 (0-0.5 min)、100 (4 min)、100 (4-5 min)、65 (5.01 min)、100 (5.01-5.5 min)。

d. 前処理における回収率、再現性、ESIにおけるマトリックス効果の検討

固相抽出により試料水を前処理した際の回収率、およびESIにおけるマトリックス効果を検討するために、グラスファイバーフィルターで試料をろ過する前に既知濃度の分析種混合液を既知量添加するサンプリングスパイク、固相抽出およびメンブレンフィルターを用いたろ過の後に既知濃度の分析種混合液を既知量添加するシリジンスパイイクの2種類のスパイク実験を行った。得られたコントロールサンプル、添加1サンプル、添加2サンプルを三連四重極質量分析計を用いて同一条件で測定し、添加2サンプルに含まれる分析種の濃度から添加1サンプルに含まれる分析種の濃度を引き、シリジンスパイイクにより添加した濃度で除すことによってマトリックス効果 β [-]を求めた。次に、添加サンプル1に含まれる分析種の濃度からコントロールサンプルに含まれる分析種の濃度を引き、サンプリングスパイクより添加した濃度、前処理における濃縮倍率および β で除すことによって回収率 α [-]を求めた。

4. 結果及び考察

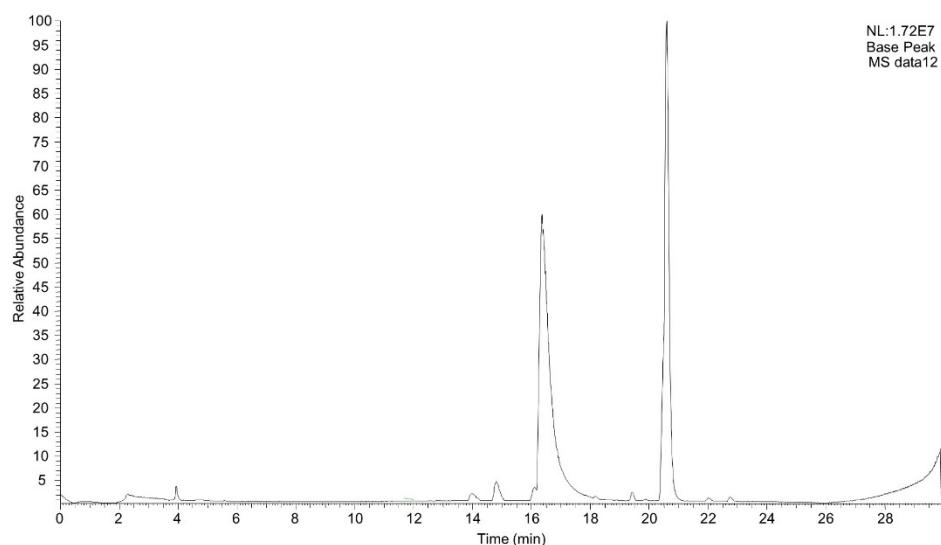
(1) 精密質量解析による未知環境変化体の探索と構造推定

1) イミダクロプリド光照射サンプルからの新規環境変化体の探索

得られた基準ピーククロマトグラム (BPC) を図(1)-6に示す。目視で確認できるピークが2つあることが分かる。その他の微小なピークを発見するため、溶媒付加体イオン、アルカリ金属付加体イオン、およびその組み合わせを仮定して解析した。その結果、解析を実施した2015年春時点で既知だった22物質 (表(1)-4) のイミダクロプリドPTPWsの中で、20物質については、既知PTPWsと同一の分子式が推定されるイオンを発見することができた。発見できなかった物質は、6-chloro-N-methylnicotinamideおよびN-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)acetamideであった。これらの発見できなかった物質を探索するため、光照射時間を144時間まで延長したが、両物質は発見されなかった。

さらに、未知PTPWsを探索した結果、付加体イオンを解析しても既知PTPWsと分子式が一致しない物質を6物質発見した。それらの物質うち2物質は推定された分子式が同一であり、異性体と考えられる。発見された物質を表(1)-5に示す。発見された6物質のうち1物質は、土壌表面および土壌中での変化体として報告^{1,2)} されているが、水中光照射実験では報告例が発見されていない物質 ((E)-N-(1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-5-hydroxyimidazolidin-2-ylidene)nitramide) であった。

本研究の目的は、トキシコフォアを保存している可能性がある新規PTPWsを探索し、その構造を



図(1)-6 イミダクロプリド照射サンプルの基準ピーククロマトグラムの例

推定することである。イミダクロプリドのトキシコフォアは、十分に明らかになっているとはいえないが、クロロピリジル基とニトロ基がニコチン性アセチルコリンレセプターへの結合に重要^{2 6-3 3)}と考え、両官能基に加えて両官能基を結合する構造が保存されている $C_7ClN_3O_2$ 以上で構成されている物質であり、かつ、多量化していない物質を対象に検討した。*(E)-N*-(1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-5-hydroxyimidazolidin-2-ylidene)nitramideを除いて $C_7ClN_3O_2$ 以上で構成されている物質を発見することはできなかった。このため、これ以上の探索は困難と考え、実施しなかった。

2) ジノテフラン照射サンプルからの新規環境変化体の探索

得られた基準ピーククロマトグラム(BPC)を図(1)-7に示す。目視で確認できるピークを数多く発見することができた。その他の微小なピークを含めて探索するため、溶媒付加体イオン、アルカリ金属付加体イオン、およびその組み合わせを仮定して解析した。その結果、7物質ある既知PTPWsのうち6物質について、既知PTPWsと同一の分子式が推定されるイオンを発見することができた。発見された既知PTPWsを表(1)-6に示す。発見できなかった物質は、2-methylguanidine(分子量=73)であり、本研究のプリカーサーイオン分析のスキャンレンジが100~450 Daであり、スキャンレンジ外であったことが原因と考えられる。

さらに、未知PTPWsを探索した結果、付加体イオンを解析しても既知PTPWsと分子式が一致しない物質を41物発見した。それらの物質うち17物質は推定された分子式が同一であり、異性体と考えられる。発見された物質を表(1)-7に示す。ジノテフランのトキシコフォアは、十分に明らかになっているとはいえないが、フラン環とニトロ基がニコチン性アセチルコリンレセプターへの結合に重要^{2 6-3 3)}と考え、両官能基に加えて両官能基を結合する構造が保存されている $C_6N_4O_3$ 以上で構成されている物質であり、かつ、多量化していない物質を検討した。その結果、 $C_7H_{15}O_4N_4$ 、 $C_7H_{15}O_5N_4$ および $C_9H_{21}O_3N_6$ が発見された。これらの物質のうち、 $C_7H_{15}O_4N_4$ は既知PTPW²⁾である*(Z)-N*-(6-hydroxy-5-(2-hydroxyethyl)-1-methyltetrahydropyrimidin-2(1*H*)-ylidene)nitramideのプロトン付加体と考えられるが、異性体と考えられるピークが少なくとも2個検出されており、それらは新

規PTPWsと考えられる。そこで本研究では、それらの異性体を対象に構造推定することとした。

3) ジノテフラン光照射サンプル中の新規環境変化体の構造推定

a. フラグメンテーション解析による構造推定

表(1)-4 イミダクロプリド光照射サンプルから発見された発見された物質の推定分子式と
同一の分子式を持つ環境変化体

物質名	構造	物質名	構造
6-chloro-N-methylnicotinamide		6-chloronicotinic acid	
N-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)acetamide		(6-chloropyridin-3-yl)methanamine *(6-chloropyridin-3-yl)methanamine	
N-(2-aminoethyl)-6-chloronicotinamide		1-(6-chloronicotinyl)-4-hydroxy-1,3-dihydro-2H-imidazol-2-one	
6-chloronicotinaldehyde 2-Chloro-5-pyridinecarbaldehyde		N-((1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl)hydroxylamine	
1-((6-chloronicotinyl)imidazolidin-2-one		N-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-N-methylformamide	
1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)imidazolidin-2-one		1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-2-iminoimidazolidin-4-ol	
1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)imidazolidin-2-imine		3-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-2-iminoimidazolidin-4-ol	
1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-1,3-dihydro-2H-imidazol-2-imine		1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-2-iminoimidazolidin-4-one	
1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-4,5-dimethylimidazolidin-2-imine		3-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-2-iminoimidazolidin-4-one	
1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)guanidine		4,8-bis((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-10-hydroxy-1,4,6,8,11,12-hexaazaspiro[4.14]dodecan-2-one	
N-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)formamide		4-(6-chloropyridin-3-ylmethyl)-4,5-dihydro-2H-[1,2,4]triazine-3-one	

表 (1)-5 イミダクロプリド光照射サンプルから発見された新規環境変化体

分子量関連イオン <i>m/z</i>	カラム保持 時間[<i>min</i>]	分子式 (付加イオンを含む)	強度 [<i>cps</i>]
190.0823	4.10	C6 H12 O4 N3	1.34E+05
197.1034	4.45	C8 H13 O2 N4	7.88E+04
	5.58		2.83E+04
207.0877	4.90	C9 H11 O2 N4	6.67E+04
272.0545	13.99	C9 H11 O3 N5 Cl	5.36E+04
226.0742	17.65	C10 H13 O N3 Cl	1.35E+05

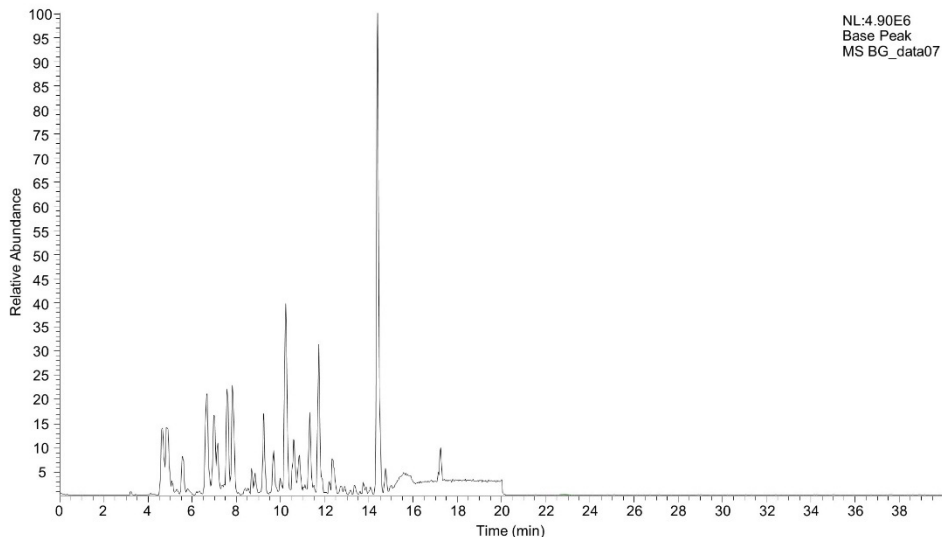


図 (1)-7 ジノテフラン光照射サンプルの基準ピーククロマトグラムの例

表 (1)-6 ジノテフラン光照射サンプルから発見された発見された物質の推定分子式と同一の分子式を持つ環境変化体

物質名	構造式
1-methyl-3-(oxolan-3-ylmethyl)urea	
1-methyl-3-((tetrahydrofuran-3-yl)methyl)guanidine	
<i>N</i> -methyl-1,4,4a,5,6,7a-hexahydrofuro[2,3- <i>d</i>]pyrimidin-2-amine	
1-((3-hydroxytetrahydrofuran-3-yl)methyl)-3-methylguanidine	
1-((2-hydroxytetrahydrofuran-3-yl)methyl)-3-methylguanidine	
(<i>Z</i>)- <i>N</i> -(6-hydroxy-5-(2-hydroxyethyl)-1-methyltetrahydropyrimidin-2(1 <i>H</i>)-ylidene)ratramide	

フラグメンテーション解析による構造推定を実施するに際してLCの分離条件を再検討したところ、発見された異性体の数が2物質から3物質に増えた。発見されたPTPWsをカラム保持時間の早い順にPTPW-a, -b, -c, -dとした。これらのイオンがプロダクトイオンではなく、分子量関連イオンであることを確認するために、positive ion modeおよびnegative ion modeで測定した。例として、PTPW-aの測定結果を図(1)-8、9に示す。Positive ion modeで測定したプロトン付加体の分子式と、negative ion modeで測定した脱プロトン体の分子式が一致したことから、同componentが分子量関連イオンであることが確認され、その分子式は $C_7H_{14}N_4O_4$ と決定された。同様にPTPWs-b～dの分子式を検討した結果、 $C_7H_{14}N_4O_4$ と決定され、PTPWs-a～dが互いに異性体の関係にあることが明らかになった。

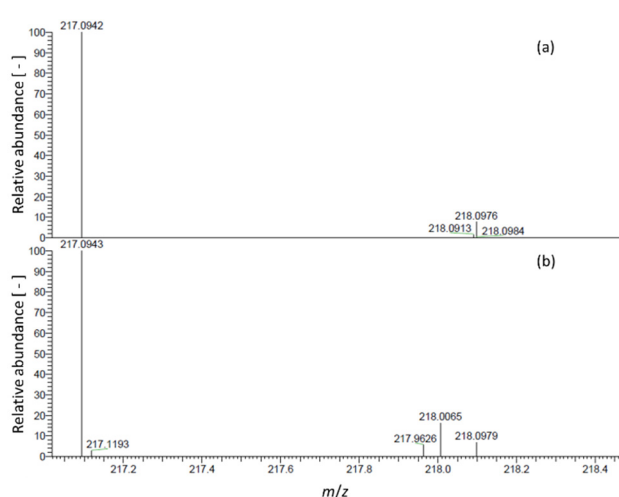
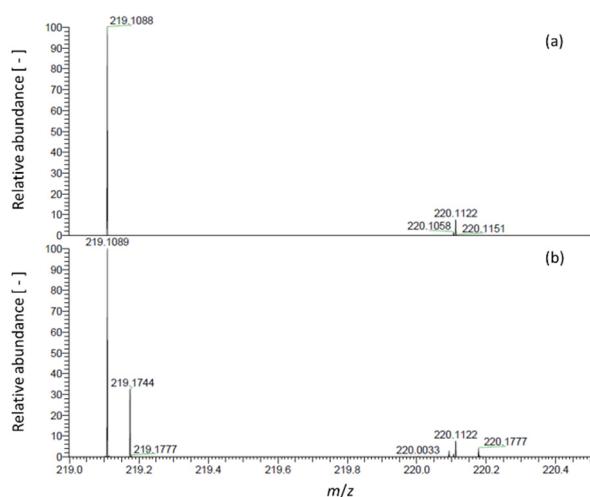
分子式が決定されたので、PTPWs-a～dの一次プロダクトイオンを測定した。その結果、図(1)-10に示すように、異なるスペクトルが得られ、異性体であることが支持された。複数のプロダクトイオンが観察された。観察されたプロダクトイオンをまとめ、表(1)-8に示す。なお、異性体の構造を推定することが目的なので、表(1)-8にまとめる際、PTPWs-a～dに共通して観察されたプロダクトイオンは除外し、 1×10^4 cps以上の強度で観察されたプロダクトイオンをまとめた。得られたプロダクトイオンの構造を推定するために、ジノテフランの二次元構造とPTPWs-a～dの分子式に基づいてPTPWs-a～dの二次元構造を一次推定し、推定されたPTPWs-a～dの二次元構造から生成する可能性があるプロダクトイオンを推定した。

一次推定されたPTPWs-a～dの二次元構造を図(1)-11に示す。ジノテフランとPTPWs-a～dの分子式を比較すると、PTPWs-a～dは酸素が1原子増えている。このため、PTPWs-a～dの二次元構造と

表(1)-7 ジノテフラン光照射サンプルから発見された新規環境変化体

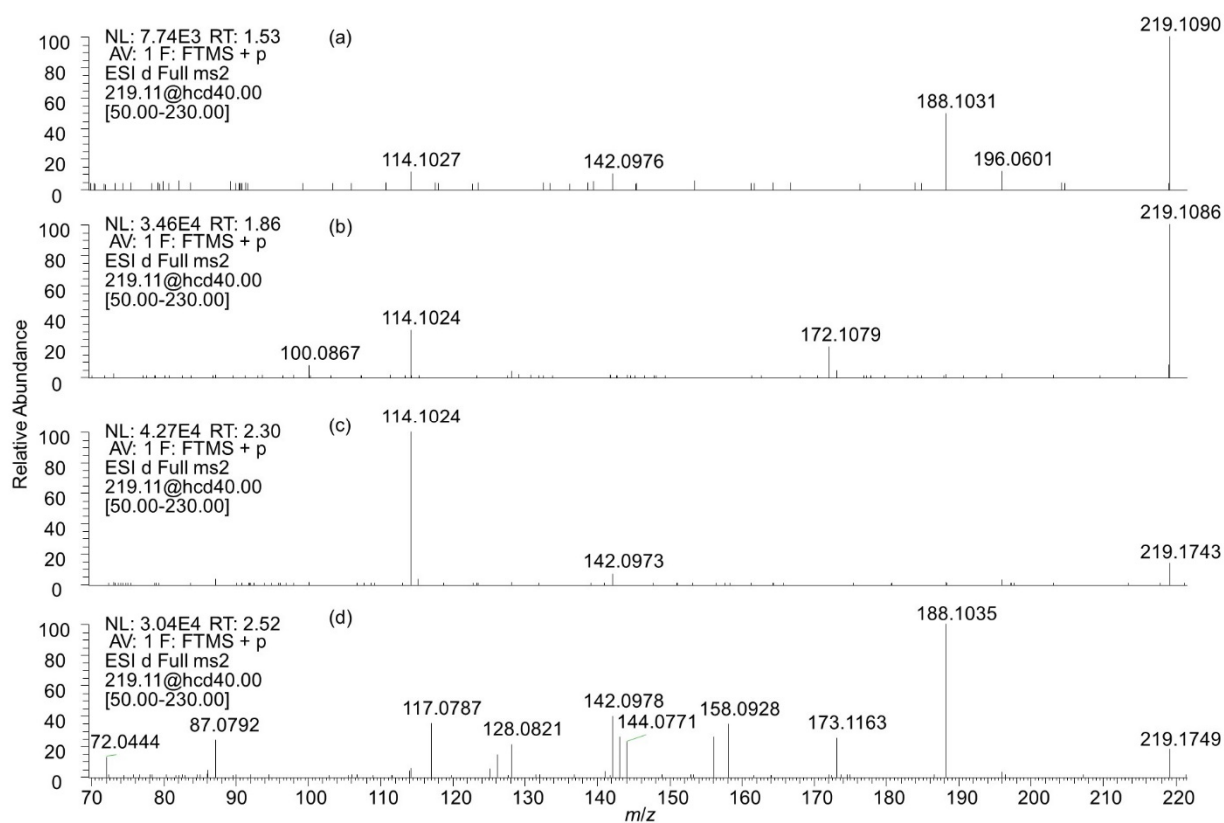
分子量関連イオン m/z	分子式 (付加イオンを含む)	異性体の数	既知PTPWsと分子式が 一致する物質
156.1131	$C_7H_{14}ON_3$	2	○
158.1288	$C_7H_{16}ON_3$	1	○
159.1128	$C_7H_{15}O_2N_2$	1	○
172.1079	$C_7H_{14}O_2N_3$	3	
172.1444	$C_8H_{18}ON_3$	2	
174.1237	$C_7H_{16}O_2N_3$	1	○
188.1029	$C_7H_{14}O_3N_3$	1	
190.1185	$C_7H_{16}O_3N_3$	2	
200.1030	$C_8H_{14}O_3N_3$	0	
204.1342	$C_8H_{18}O_3N_3$	0	
213.1346	$C_9H_{17}O_2N_4$	1	
217.1659	$C_9H_{21}O_2N_4$	2	
219.1088	$C_7H_{15}O_4N_4$	2	○
229.1546	$C_{11}H_{21}O_3N_2$	0	
235.1035	$C_7H_{15}O_5N_4$	0	
245.1722	$C_9H_{21}O_2N_6$	0	
261.1666	$C_9H_{21}O_3N_6$	0	
283.1764	$C_{13}H_{23}O_3N_4$	0	
285.1920	$C_{13}H_{25}O_3N_4$	1	
286.1397	$C_{12}H_{20}O_5N_3$	0	
296.2081	$C_{14}H_{26}O_2N_5$	2	
299.2077	$C_{14}H_{27}O_3N_4$	0	
311.2190	$C_{14}H_{27}O_2N_6$	1	
327.2140	$C_{14}H_{27}O_3N_6$	0	

○：該当する物質が報告されている場合；空欄：該当する物質の報告を発見できない場合



図(1)-8 Positive ion mode で測定した PTPW-a の
マススペクトル (a:シミュレーション ; b:実測)

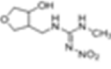
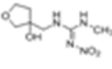
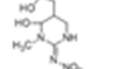
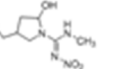
図(1)-9 Negative ion mode で測定した PTPW-a の
マススペクトル (a:シミュレーション ; b:実測)



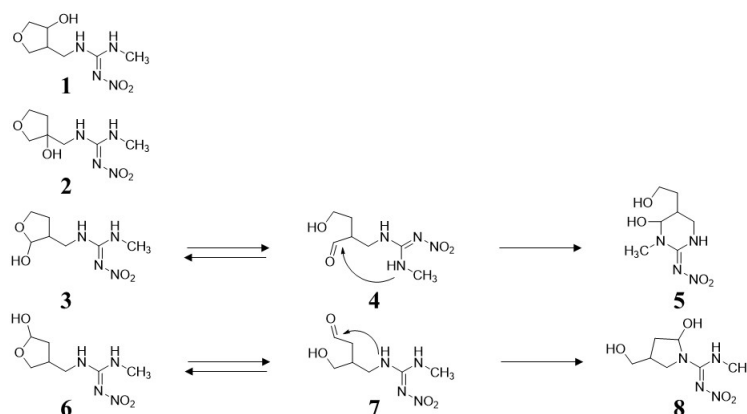
図(1)-10 観察されたプロダクトイオン (a: PTPW-a ; b: PTPW-b ; c: PTPW-c ; d: PTPW-d)

して、ジノテフランのフラン環にヒドロキシ基が置換した構造を仮定した。ヒドロキシ基の置換位置として4カ所が考えられるが、図(1)-11のPTPW3および6の位置に置換された構造はヘミアセタール構造であり、一般的に不安定なため、速やかにフラン環が開環してPTPW4または7に異性化すると考えられる。PTPW4および7には不安定な構造は見当たらないが、ジノテフランPTPWとして

表(1)-8 PTPWs-a～d のプロダクトイオンと
一次推定された構造から生成が予測されるプロダクトイオンの比較

<i>m/z</i>	PTPW-a	PTPW-b	PTPW-c	PTPW-d				
188.1022		○		○				
172.1076	○				○	○	○	○
145.1203		○	○		○	○	○	○
142.0968			○	○	○	○	○	○
129.1256	○				○	○	○	○
128.1182	○				○	○	○	○
128.0817			○		○	○	○	○
115.1098		○	○		○	○	○	○
114.1022	○	○	○		○	○	○	○
100.0865	○		○		○	○	○	○
87.0787	○		○		○	○	○	○

○：プロダクトイオンが観察された場合、または生成が予測された場合

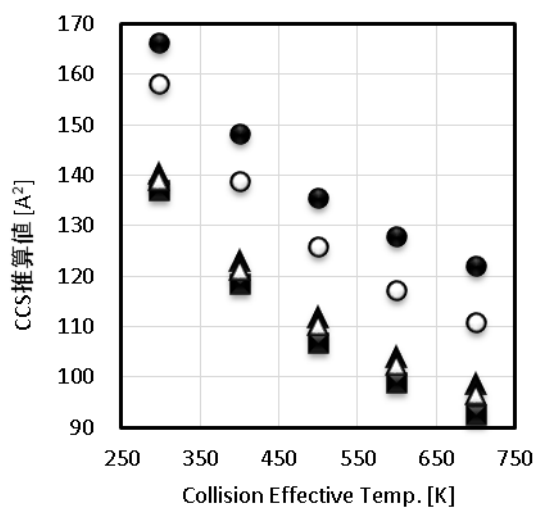


図(1)-11 一次推定された PTPWs-a～d の二次元構造

PTPW5が報告²⁾されていることから、PTPW4はさらにPTPW5に異性化すると考えられる。PTPW5は、ヘミアミナル構造であり、一般的に不安定と考えられるが、安定生成物との報告²⁾があるため、PTPW7も同様にPTPW8に異性化すると考えられる。そこで、PTPW1、2、7、8の構造を仮定して、どのようなプロダクトイオンが得られるのかを推定した結果、表(1)-8に示したように、生成し得るプロダクトイオンに差が認められなかった。また、*m/z*188.1022を除き、観測されたすべてのプロダクトイオンがすべての二次元構造から生成し得ることが明らかとなった。これらのことから、これらの異性体のフラグメンテーション解析による構造推定は困難と判断した。なお、異性体のフラグメンテーション解析が困難な場合があることはよく知られており、例えば農薬メトラクロールの光照射産物の構造を推定している論文では、ヒドロキシ基の位置を特定できていない場合が報告^{3 5)}されている。その他にも、(2-(piperidin-1-yl)ethyl)phenol誘導体を対象としてフラグメンテーション解析を実施した結果、類似したマススペクトルが報告^{3 6)}されている。

b. 衝突断面積解析による構造推定

衝突断面積解析による構造推定を実施する際にLCの分離条件を再検討したところ、9個以上の異性体に分離することができた。現在予想している異性体の物質数は中間体を含めて8物質（図(1)-11）であり、検出されている物質数の方が多いことから、予想できていない異性体の存在が示唆さ

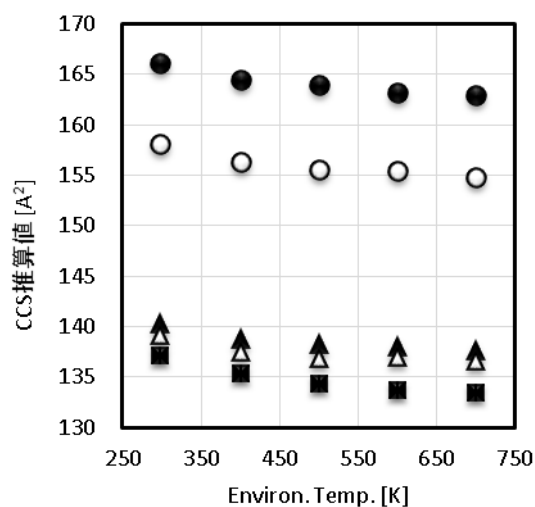


■ 1-aminonaphthalene ○ 1-aminopyrene
● 6-aminochrysene ▲ acridine
△ carbazole

図(1)-12 CCS 推算値に対するイオンの温度影響

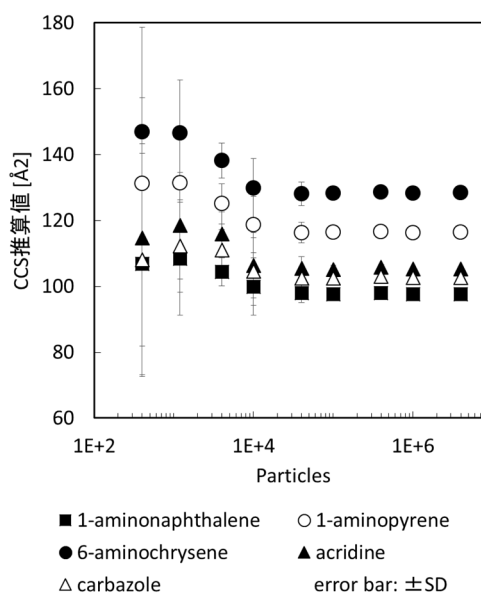
れた。しかし、本研究の目的は、生成しうるすべての PTPWs の構造を推定することではなく、環境中から高頻度・高濃度で検出される PTPWs の構造を推定することであり、イオン強度の強い物質の構造を推定することが重要と考え、これ以上の検討は実施しなかった。また、検出されたクロマトピークのうちとくに微小なピークについては、ジノテフラン PTPWs と無関係な物質が質量分析機の内部で非意図的に開裂して生成したピークの可能性があるが、同様の理由から検討は行わなかった。

初期段階での CCS 推定方法では衝突断面積解析による構造推定が困難であったため、衝突断面積の予測方法を再検討した。すなわち、TM により CCS 推算値を求める際のイオンおよびバッファガスの温度を 298.15~700.00 K、軌道計算する窒素分子数を $4 \times 10^2 \sim 4 \times 10^6$ particles とし、それぞれの影響を検討した。まず、イオンの温度の影響を検討した結果、図(1)-12に示すようにその影響は大きく、CCS校正曲線を得る際の校正物質の CCS 推算値と分析種の CCS 推算値を得る際のイオンの温度を統一することの重要性が明らかになった。また、ドリフトチューブ内を飛行するイオンの温度が物質毎に異なる可能性があるため、CCS校正物質と分析種で、電荷数、CCS、振動モードの数（構成原子数、不飽和度）を可能な限り統一して、電場およびバッファガスから CCS校正物質または分析種が受け取るエネ



■ 1-aminonaphthalene ○ 1-aminopyrene
● 6-aminochrysene ▲ acridine
△ carbazole

図(1)-13 CCS 推算値に対する
バッファガスの温度影響

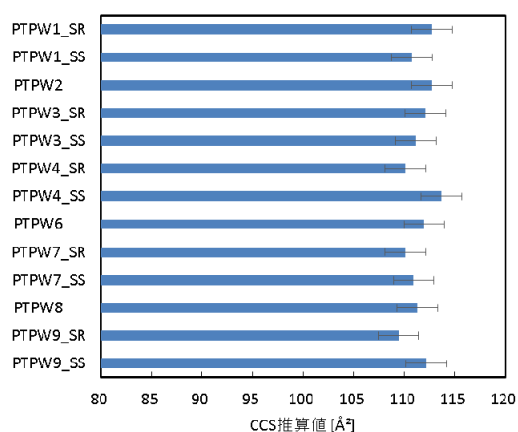


図(1)-14 CCS 推算値に対する
繰り返し計算回数の影響

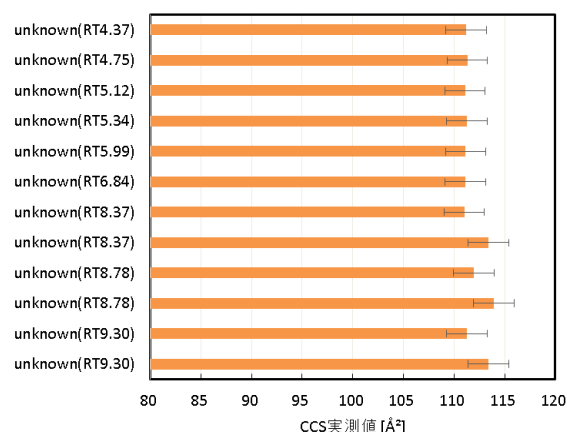
ルギーを統一することが重要と考えられる。次に、バッファガスの温度の影響を検討した。その結果、図(1)-13に示すように、イオンの温度よりも影響は小さいものの、一定程度の影響があることが明らかになった。このため、TOFモードからIMモードに変更した際には、バッファガスの圧力・温度が一定になるまで安定化させることの重要性が確認された。最後に、軌道計算する際の窒素分子数（繰り返し計算回数）の影響を検討した。その結果、図(1)-14に示すように、CCS推算値に対する繰り返し計算回数の影響は大きいことが確認された。さらに、CCS推算値の算術平均値に対する繰り返し計算回数の影響が認められ、安定したCCS推算値を得るためには 1×10^4 particles以上の窒素分子数が必要になったことが明らかになった。

CCS推算値の算出方法が定まったので、図(1)-11に示した異性体の立体配座を仮定し、CCSを推算した。その結果、図(1)-15に示すように、異性体の間でCCS推算値に有意差は認められなかった。なお、ここで言う有意差は、TMによるCCS推算値の標準偏差ではなく、CCS実測値の日間変動が概ね $\pm 2 \text{ \AA}^2$ であることから、 $\pm 2 \text{ \AA}^2$ を信頼限界として有意差の有無を判断した。異性体間でCCS推算値に有意差が無いことが明らかになったが、CCS実測値でも同様に有意差がないかを確認した。測定モードをTOFモードからIMモードに変更して同一のサンプルを同一の分離条件で測定した。その結果、バッファガスによるイオン透過率低下の影響で微小なピークが観察されなくなったが、9個のクロマトピークを観察することができた。観察されたピークのドリフトグラムからイオン移動度を求め、CCS校正曲線からそれぞれの分析種のCCS実測値を求めたところ、図(1)-16に示すように異性体間でCCS実測値に有意な差が認められなかった。また、RT8.37, 8.78, 9.30 minの物質には、ODSカラムでは分離できないが、イオン移動度分析で得られたドリフトグラム上のピークのシンメトリーが低く、ジアステロマーが存在している可能性が示された。図(1)-11に示したように、現在予想している異性体の中でジアステロマーは5物質であり、検出された3物質よりも多い。検出されなかった理由として、ジアステロマー間でCCSに差が無く、ピークのシンメトリーを低下させなかった可能性が考えられる。

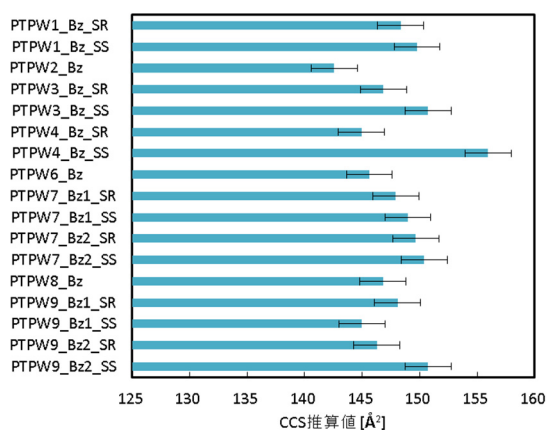
以上のように、CCS値の推算方法を再検討しても構造推定が困難であったため、衝突断面積による解析に誘導体化を組み合わせることを検討した。誘導体化として、検討対象であるPTPWsがヒドロキシ基を有していることに着目し、ヒドロキシ基を修飾可能と考えられるbenzoyl chloride、4-(4,5-diphenyl-imidazol-2-yl)benzoyl chloride、anthraquinone-2-carbonyl chlorideまたは1-naphthoyl chlorideを用いることとした。また、実際に誘導体化反応を実施する前に、誘導体化物のCCS推算値を求めて誘導体化の効果を検証することが有効と考え、推算することとした。その際、図(1)-14より、TMで計算する際の窒素分子数は 1×10^4 particlesとするのが効率的と考えた。Benzoyl chloride、4-(4,5-diphenyl-imidazol-2-yl)benzoyl chloride、anthraquinone-2-carbonyl chlorideまたは1-naphthoyl chlorideで誘導体化した場合のCCS推算値をそれぞれ図(1)-17～20に示す。誘導体化に伴い、CCS推算値の値が全体的に大きくなり、異性体間の差も大きくなった。図(1)-17に示したように、benzoyl chlorideで誘導体化することによって、PTPW4のSS体と他の異性体を区別できるようになった。同様に、4-(4,5-diphenyl-imidazol-2-yl)benzoyl chloride、anthraquinone-2-carbonyl chlorideで誘導体化することにより、それぞれPTPW1のSS体（図(1)-18）、PTPW4のSR体（図(1)-19）を区別できるようになった。しかし、1-naphthoyl chlorideで誘導体化しても、新たに区別できる物質はなかった。2-naphthoyl chlorideで誘導体化した場合でも、同様に新たに区別できる物質はなかった（データ未掲載）。



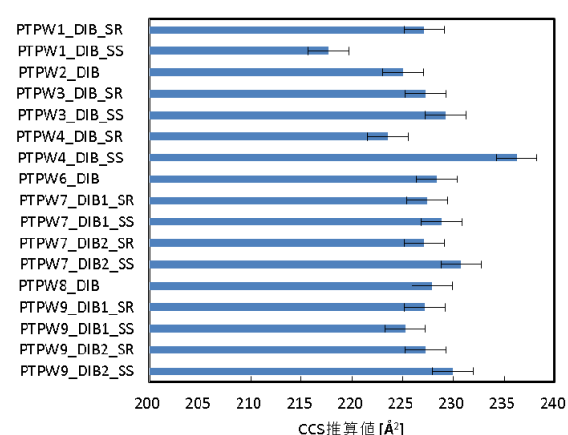
図(1)-15 Trajectory method による
dinotefuran PTPWs の CCS 値推定結果



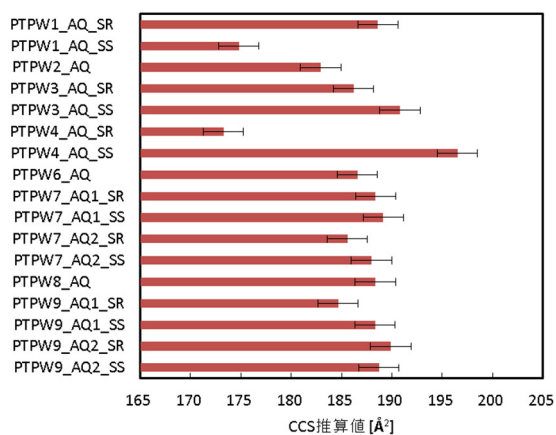
図(1)-16 IMS による dinotefuran
PTPWs の CCS 値実測結果



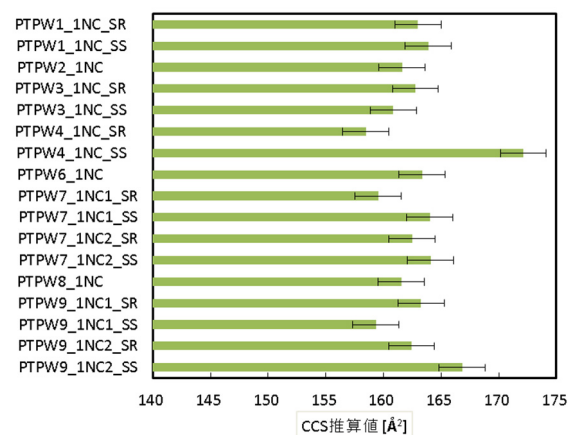
図(1)-17 Benzoyl chloride 誘導体の
CCS 値推定結果



図(1)-18 4-(4,5-diphenyl-imidazol-2-yl)
benzoyl chloride 誘導体の CCS 値推定



図(1)-19 Anthraquinone-2-carbonyl
chloride 誘導体の CCS 値推定結果



図(1)-20 1-naphthoyl chloride 誘導体
の CCS 値推定結果

これら3物質以外は直接的に区別することができなかったが、複数の誘導体化の結果を組み合わせることにより区別できる場合があった。誘導体化により直接的に区別できなかったPTPW2を例に検討した結果を以下に示す。まず、benzoyl chlorideによるPTPW2誘導体のCCS推算値と有意差がないPTPWs誘導体をあげると、図(1)-17に示したPTPW9_Bz1_SS、PTPW4_Bz_SR、PTPW6_BzおよびPTPW9_Bz_SRの4物質であった。これら4物質の4-(4,5-diphenyl-imidazol-2-yl)benzoyl chlorideによる誘導体のCCS推算値を見ると、図(1)-18に示したようにPTPW2_DIBとPTPW9_DIB2_SSを区別できることが分かる。次に、anthraquinone-2-carbonyl chlorideによる誘導体のCCS推算値を見ると、図(1)-19に示したようにPTPW4_AQ_SRを区別できることが分かる。最後に、1-naphthoyl chlorideによる誘導体を見ると、図(1)-20に示したようにPTPW6_INCを区別でき、PTPW2を特定できることが分かる。

以上のように、衝突断面積解析に誘導体化を組み合わせることにより、異性体の構造推定が可能になることが明らかになった。しかし、実際に誘導体化するためには、異性体を個別分取する必要がある、期間内に検討を完了することができなかった。このため、ジノテフラン光照射サンプル中で高いイオン強度で検出され、実環境中からの検出率が100%であったRT=6.84 minのピークに着目し、優先的に合成を検討する対象物質として解析した。その結果、衝突断面積解析により同物質がエナンチオマーと推定されたこと、光照射実験結果および実環境試料の測定結果から安定して生成すると推定されたこと、トキシコフォアを保存している可能性があることから、PTPW2の合成を検討することとした。また、以上の推定を確認するため、PTPW6の合成も検討することとした。ただし、これらの物質の合成・精製は完了しなかったため、サブテーマ（2）の報告書には記載していない。

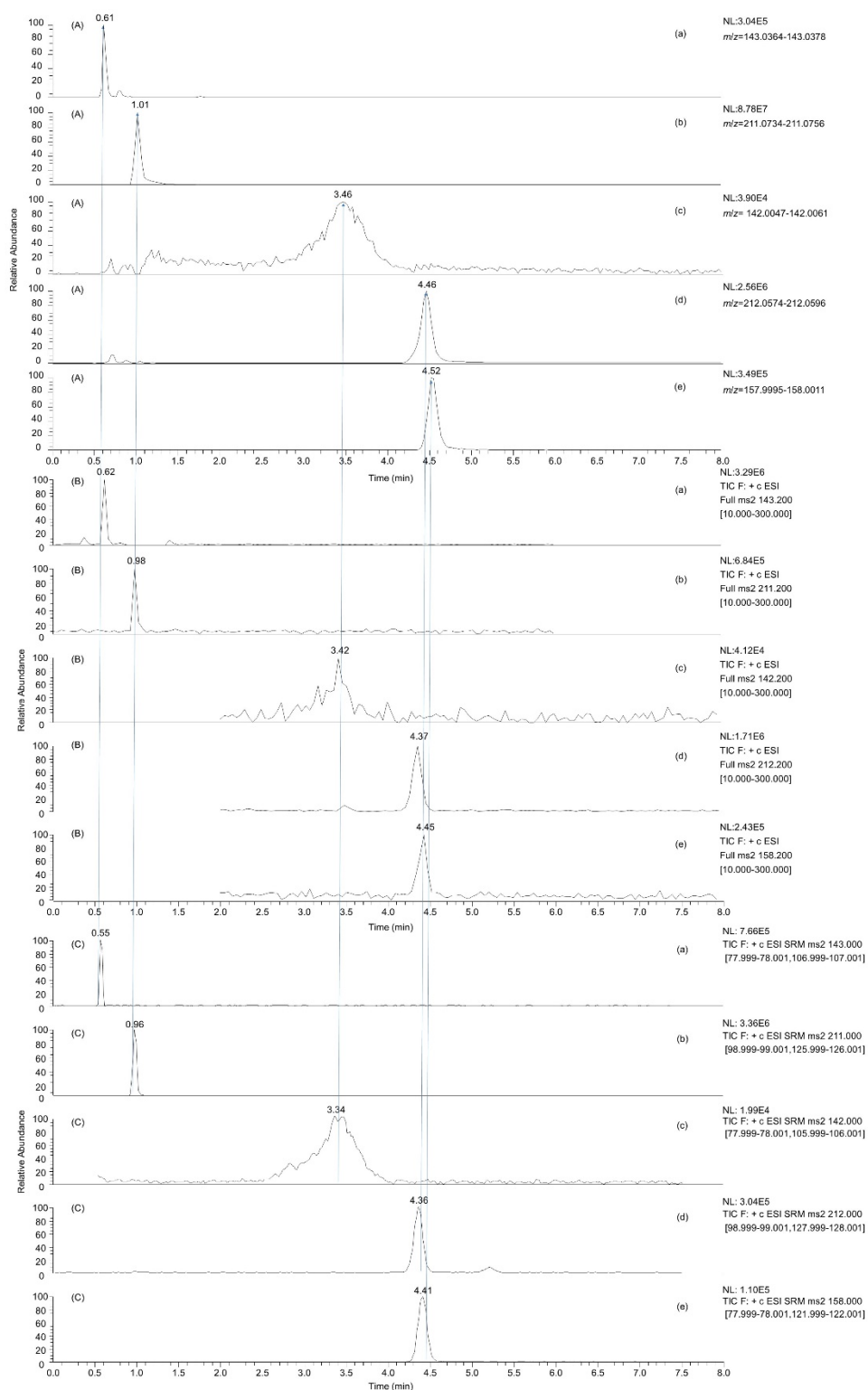
（2）半定量LC/MS/MS測定技術の開発

1）汎用型分析技術の開発と環境変化体の検出

イミダクロプリド光照射サンプルを高速液体クロマトグラフィー高分解能質量分析計を用いて測定し、5-(aminomethyl)-2-chloropyridine、6-chloronicotinaldehyde、イミダクロプリド-デニトロ体、イミダクロプリド-ウレア体、6-chloronicotinic acidの5物質について、カラム保持時間と付加体イオンの種類を検討した。その結果、図(1)-21(A)に示すように、すべての分析種についてプロトン付加体イオンのEICを描くことができ、本条件におけるカラム保持時間を明らかにすることができた。次に、各分析種のEICのピークトップにおけるマスペクトルを確認したところ、すべての分析種において、基準ピークがプロトン付加体であった。

以上の結果をもとに、高速液体クロマトグラフィー三連四重極型質量分析計を用いて、得られたプロトン付加体イオンをプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンを行い、全イオン電流（TIC）クロマトグラムを描いた。その結果、図(1)-21(B)に示すように、すべての分析種についてピークを描くことができた。得られたピークのカラム保持時間を確認したところ、高分解能質量分析計で測定されたカラム保持時間と同一の保持時間が得られた。

三連四重極型質量分析計による測定の際のカラム保持時間が確認されたため、標準試薬を用いた通常の検討と同じ手順でSRM条件を定めた。定めた結果を表(1)-9に示す。すべての分析種について、SRM条件を定めることができた。表(1)-9に示したSRMが正しいことを確認するために、標準試薬を用いて、通常の手順でSRM条件を検討した。その結果、図(1)-21(C)および表(1)-10に示すように、標準試薬を用いて定めたカラム保持時間およびSRM条件と、光照射サンプルを用いて定



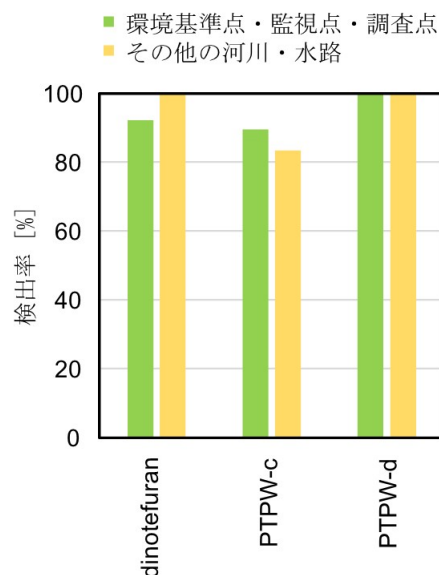
図(1)-21 標準物質を用いない選択反応モニタリング測定技術の原理確認(A: 高分解能 LC/MSによるイミダクロプリド光照射サンプルの分析結果; B: LC/MS/MSによるイミダクロプリド光照射サンプルの分析結果、C: LC/MS/MSによる標準試薬の測定結果、a: 5-(aminomethyl)-2-chloropyridine ; b: イミダクロプリド-デニトロ体 ; c: 6-chloronicotinaldehyde ; d: イミダクロプリド-ウレア体 ; e: 6-chloronicotinic acid)

表(1)-9 イミダクロプリド光照射サンプルを用いて決定したSRM条件

分子式	precursor ion	target ion	qualifier ion
	<i>m/z</i>	<i>m/z</i>	<i>m/z</i>
付加イオン	RF lens [V]	CE [V]	CE [V]
C ₆ H ₇ ClN ₂	143	78	107
[M+H] ⁺	50	28	22
C ₉ H ₁₁ ClN ₄	211	126	99
[M+H] ⁺	60	26	40
C ₆ H ₄ ClNO	142	78	106
[M+H] ⁺	80	23	18
C ₉ H ₁₀ ClN ₃ O	212	128	99
[M+H] ⁺	60	21	21
C ₆ H ₄ ClNO ₂	158	122	78
[M+H] ⁺	28	19	23

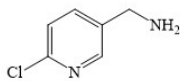
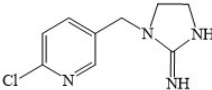
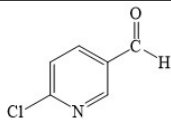
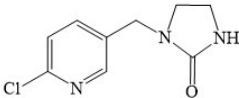
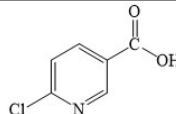
めたカラム保持時間およびSRM条件が一致した。このことから、本技術の原理を確認できたと判断した。

原理が確認できたため、ジノテフラン光照射サンプル中のC₇H₁₄N₄O₄のうち、ピークエリアが大きかったPTPW-cと-dを対象としてSRM条件を決定し、実環境サ

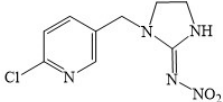
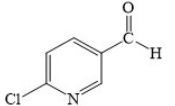
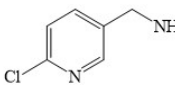
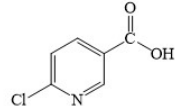
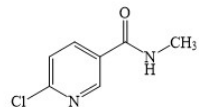
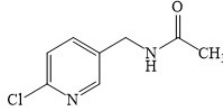
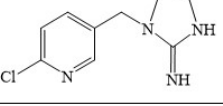
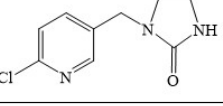
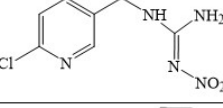
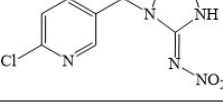
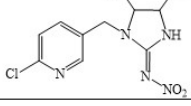


図(1)-22 ジノテフランの新規環境変化体の検出率

表(1)-10 標準試薬を用いたイミダクロプリド環境変化体のSRM条件の確認

物質名	CAS RN	構造式	分子式	precursor ion	target ion	qualifier ion
			付加イオン	<i>m/z</i>	<i>m/z</i>	<i>m/z</i>
			RF lens [V]	CE [V]	CE [V]	CE [V]
5-(aminomethyl)-2-chloropyridine	97004-04-1		C ₆ H ₇ ClN ₂	143	78	107
			[M+H] ⁺	50	28	22
1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)imidazolidine-2-imine	127202-53-3 (115970-17-7)		C ₉ H ₁₁ ClN ₄	211	126	99
			[M+H] ⁺	60	26	40
6-chloronicotininaldehyde	23100-12-1		C ₆ H ₄ ClNO	142	78	106
			[M+H] ⁺	80	23	18
1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)imidazolidine-2-one	120868-66-8		C ₉ H ₁₀ ClN ₃ O	212	128	99
			[M+H] ⁺	60	21	21
6-chloronicotinic acid	5326-23-8		C ₆ H ₄ ClNO ₂	158	122	78
			[M+H] ⁺	28	19	23

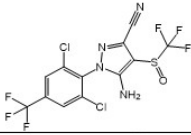
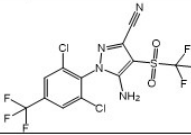
表(1)-11 イミダクロプリドおよびその環境変化体のSRM条件（まとめ）

物質名	CAS RN	構造式	分子式 付加イオン	precursor ion <i>m/z</i>	target ion <i>m/z</i>	qualifier ion <i>m/z</i>
				RF lens [V]	CE [V]	CE [V]
imidacloprid	138261-41-3		C ₉ H ₁₀ ClN ₃ O ₂	256	175	209
			[M+H] ⁺	40	20	18
6-chloronicotinaldehyde	23100-12-1		C ₆ H ₄ ClNO	142	78	106
			[M+H] ⁺	80	23	18
5-(aminomethyl)-2-chloropyridine	97004-04-1		C ₆ H ₇ ClN ₂	143	78	107
			[M+H] ⁺	50	28	22
6-chloronicotinic acid	5326-23-8		C ₆ H ₄ ClNO ₂	158	122	78
			[M+H] ⁺	28	19	23
6-chloro-N-methylnicotinamide	54189-82-1		C ₇ H ₇ ClN ₂ O	171	78	142
			[M+H] ⁺	33	26	21
N-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)acetamide	175424-74-5		C ₈ H ₉ ClN ₂ O	185	126	107
			[M+H] ⁺	34	19	22
1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)imidazolidine-2-imine	127202-53-3 (115970-17-7)		C ₉ H ₁₁ ClN ₄	211	126	99
			[M+H] ⁺	60	26	40
1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)imidazolidine-2-one	120868-66-8		C ₉ H ₁₀ ClN ₃ O	212	128	99
			[M+H] ⁺	60	21	21
1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-2-nitroguanidine	-		C ₇ H ₈ ClN ₅ O ₂	230	186	148
			[M+H] ⁺	31	11	13
N-(1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-1,3-dihydro-2H-imidazol-2-ylidene)nitramide	115086-54-9		C ₉ H ₈ ClN ₅ O ₂	254	171	236
			[M+H] ⁺	40	18	10
N-(1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-4,5-dihydroxyimidazolidin-2-ylidene)nitramide	-		C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₄	288	241	207
			[M+H] ⁺	33	22	18

ンプルに適用した。その結果、図(1)-22に示すように、83～100%の高い検出率で両物質とも検出されることを確認した。このため、両物質の合成を検討することとした。ただし、前述のように、これらの物質の合成・精製は完了しなかったため、サブテーマ（2）の報告書には記載していない。

購入することができた農薬およびPTPWs、合成・精製が完了したPTPWsについて、最終的に決定したSRM条件をまとめて表(1)-11～14に示す。すべての物質のカラム保持時間、定量イオンおよび

表(1)-14 フィプロニルおよびその環境変化体のSRM条件（まとめ）

物質名	CAS RN	構造式	分子式	precursor ion	target ion	qualifier ion
				<i>m/z</i>	<i>m/z</i>	<i>m/z</i>
			付加イオン	RF lens [V]	CE [V]	CE [V]
fipronil	120068-37-3		C ₁₂ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₄ OS	435	250	330
			[M-H] ⁻	80	20	16
fipronil sulfone	120068-36-2		C ₁₂ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₄ O ₂ S	451	282	244
			[M-H] ⁻	60	30	50

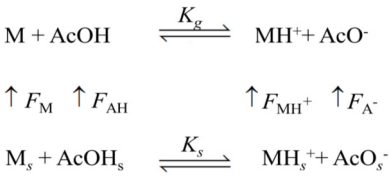
ことができた。ただし、異性体が存在する場合には、誤検出に留意する必要がある。

2）量子化学計算による検量線勾配の推定

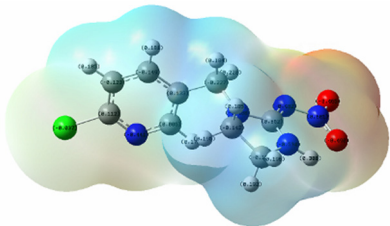
ESIレスポンスは、分析種（の共役酸）の酸解離平衡および脱溶媒効率の影響を受ける。そこで、分析種のイオン化効率および脱溶媒効果を記述したイオン化モデルを構築した。構築したイオン化モデルを図(1)-23に示す。ESIでスプレーされた液滴中の分析種は、modifierから供給されるプロトンによりカチオン化されると仮定した。本研究では、modifierとして広く用いられている酢酸を仮定した。カチオン化する際のプロトンの付加位置を検討した結果の例を図(1)-24に示す。サンプル中の分析種濃度と酸解離平衡定数で定まる分析種カチオンの濃度に正比例するfluxで気相に移行した分析種カチオンは、液相から同様に供給される分析種の中性分子等と気相で解離平衡が成立すると仮定した。以上の仮定に基づき算出される気相中の分析種カチオン（MH⁺）の濃度がESIレスポンスに正比例すると仮定した。

以上の計算を行うために、各コンポーネントのGibbsの自由エネルギーを算出し、式(1)-1により分析種カチオンの濃度を算出した。また、算出されるESIレスポンスはコリジョンセルで開裂される前のprecursor ionのイオン量であり、三連四重極型質量分析計で測定したピークエリアより大きい。そこで、SIM測定とSRM測定を実施し、両者のピークエリア比を求めて補正した。また、MSの差動排気部でのイオンの消失等を考慮する必要があるため、イオン化モデルから算出されるピークエリアと実測されたピークエリアを補正する装置定数が必要となる。そこで、イミダクロプリドのモデル計算と検量線の実測を行い、装置定数を定めた。

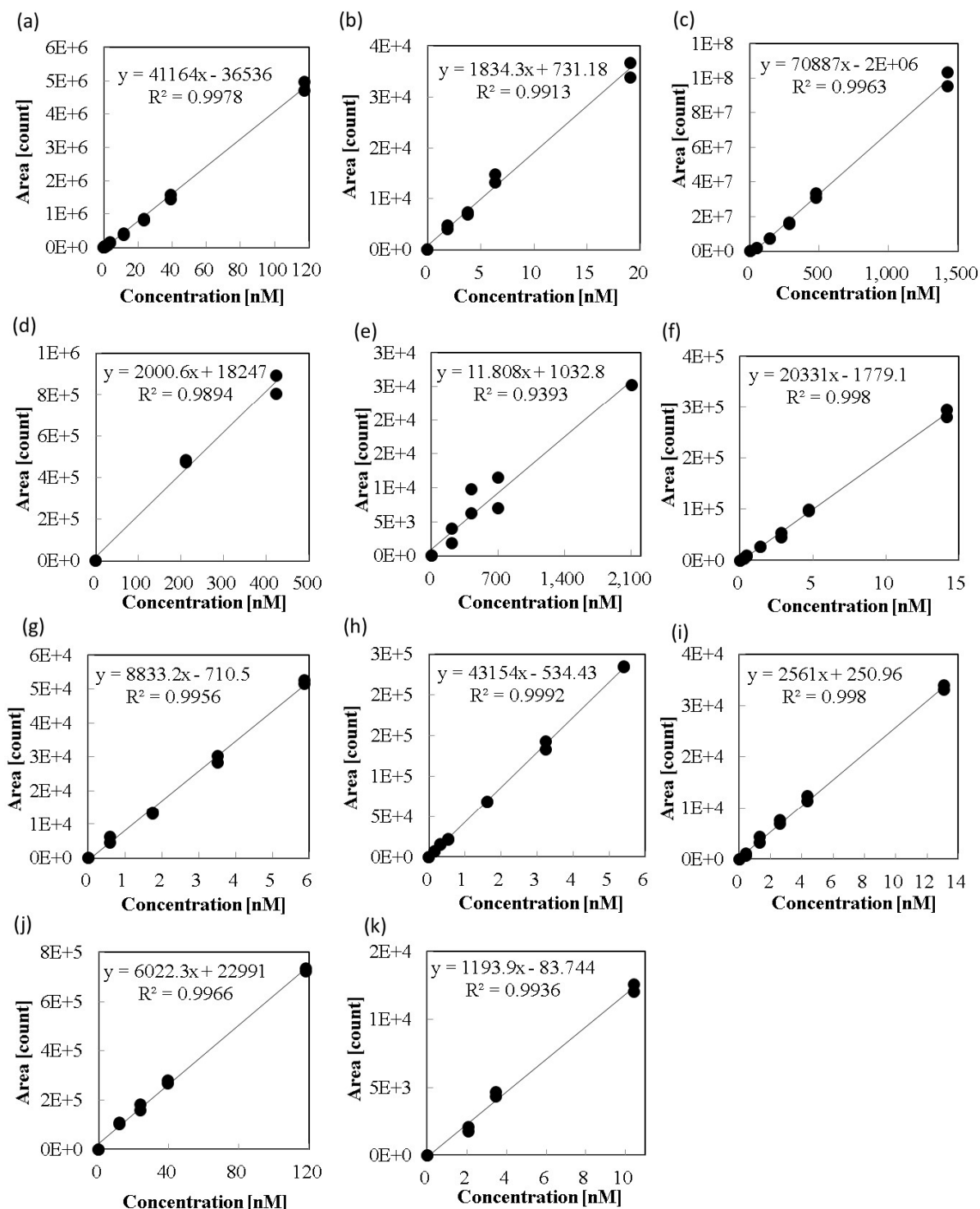
求めた装置定数等を用いて、イミダクロプリドの実測検量線と予測検量線が一致するか確認したところ、両者はよく一致していた。次に、求めた装置定数とイオン化モデル、量子化学計算で得られた自由エネルギーから、標準物質が市販されていないPTPWの検量線を予測した。予測結果を



図(1)-23 構築したイオン化モデル



図(1)-24 量子化学計算によるプロトン付加位置の算出例（部分電荷が負値であることを確認し、lone pairにプロトンを付加）



図(1)-25 イミダクロプリドおよびその環境変化体の検量線 (a: imidacloprid; b 6-chloronicotinic acid; c: 1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)imidazolidin-2-imine; d: 6-chloronicotinaldehyde; e: 5-(aminomethyl)-2-chloropyridine; f: 1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)imidazolidin-2-one, g: 6-chloro-*N*-methylnicotinamide; h: *N*-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)acetamide; i: 1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-2-nitroguanidine; j: *N*-(1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-1,3-dihydro-2H-imidazol-2-ylidene)nitramide; k: *N*-(1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-4,5-dihydroxyimidazolidin-2-ylidene)nitramide

検証するために、同物質をサブテーマ（２）で合成し、検量線を実測した。その結果、検量線の勾配の比は実測値と予測値で3.9であった。

この誤差を評価するため、合成品を含めたPTPWsの入手物質数が多いイミダクロプリドおよびそのPTPWsを対象として、検量線を実測（図(1)-25）してその勾配を比較（表(1)-15）した。測定した物質の検量線の勾配には、同一条件で測定したにも関わらず、大きな違いが認められた。グアニジン骨格を保存している物質同士で比較したところ59倍、グアニジン骨格を保存しておらず6-クロロピリジン骨格を保存している物質同士で3,657倍、全体で比較すると6,007倍であり、本研究での予測値との誤差である3.9倍と比較して15倍以上大きな誤差を有していた。このため、標準物質の利用が困難なPTPWsの濃度を三連四重極型質量分析

計で半定量する技術を確立することができたと判断した。

（３）環境変化体の河川水中濃度測定

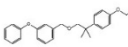
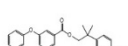
１）装置検出下限値および定量下限界値の検討

環境省のモニタリング調査マニュアル³⁶⁾に従って、装置検出下限界値（IDL）を求めた。なお、ジノテフラン-デニトロ体、ジノテフラン-ウレア体およびフィプロニルとそのPTPWについては、IDLを求めている。また、標準物質を入手できたすべての分析種について、定量下限界値（LOQ）を求めた。LOQは、当該分析種の検量線において、直線性が認められる最低濃度とした。求めたIDLとLOQ、検量線の決定係数を表(1)-16に示す。検討したすべての分析種についてIDLを求めることができた。求めたIDLは0.3～382 pptであった。本研究における濃縮倍率の最低値である100倍で濃縮されたサンプルでも、3.82 ppt以上の感度を期待することができる。一方、サブテーマ（３）で測定して得られた急性影響濃度AECdの最低値は21 pptであることから、十分な測定感度を有す

表(1)-15 イミダクロプリドおよびその環境変化体の検量線勾配

compound	slope of regression line [count/fmol]	
	guanidine derivatives	chloropyridine derivatives
imidacloprid	41,164	
6-chloronicotinic acid		1,834
1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)imidazolidin-2-imine	70,887	
6-chloronicotinaldehyde		2,001
5-(aminomethyl)-2-chloropyridine		12
1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)imidazolidin-2-one		
6-chloro-N-methylnicotinamid		8,833
N-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)acetamide		43,154
1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-2-nitroguanidine	2,561	
N-(1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-1,3-dihydro-2H-imidazol-2-ylidene)nitramide	6,022	
N-(1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-4,5-dihydroxyimidazolidin-2-ylidene)nitramide	1,194	
max	70,887	43,154
min	1,194	12
ratio	59	3,657

表(1)-16 装置検出下限値、定量化限界値および検量線の決定係数

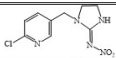
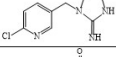
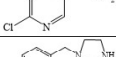
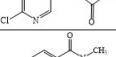
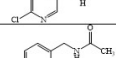
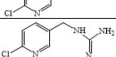
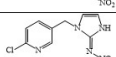
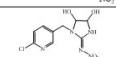
compound	structure	IDL [ppt]	LOQ as Environ. Conc. [ppt]	coefficient of determination in cal. Curve	remark	compound	structure	IDL [ppt]	LOQ as Environ. Conc. [ppt]	coefficient of determination in cal. Curve	remark
imidacloprid		0.3	0.2-0.4	0.9987						0.9984	100-1,000 ppt
6-chloronicotinic acid		2.7	0.6-0.8	0.9989		<i>N</i> -(1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-1,3-dihydro-2H-imidazol-2-ylidene)nitramide		67	0.2-0.3	0.9986	100-5,999 ppt for retry
1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)imidazolidine-2-imine		71	0.1-0.2	0.9946	100-9,999 ppt					0.9969	6,000-30,000 ppt for retry
				0.9997	10,000-30,000 ppt	<i>N</i> -(1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-4,5-dihydroimidazolidin-2-ylidene)nitramide		71	2.9-3.4	0.9838	
6-chloronicotinamide		52	132.0-174.0	0.9831		etofenprox		433	21.9	0.9992	
5-(aminomethyl)-2-chloropyridine		35	370.0	0.9934		2-(4-ethoxyphenyl)-2-methylpropan-1-ol		136	6.4	0.9963	
1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)imidazolidine-2-one		11	0.2	0.9976		2-(4-ethoxyphenyl)-2-methylpropyl 3-phenoxybenzoate		155	9.9	0.9972	
6-chloro-N-methylnicotinamide		6	0.4	0.9958		3-phenoxybenzoic acid		382	1.8	0.9973	
<i>N</i> -(1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)acetamide		11	0.1	0.9980		dinotefuran		44	0.3-26.7	0.9946	
1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-2-nitroguanidine		51	0.3	0.9973							

ることが期待された。次に、実際に測定を実施して決定されたサンプル毎の希釈倍率、最適試料注入量に基づいて求めたLOQを見ると0.1～370 pptであり、すべての検討対象物質のAECdと比較して低く、十分な感度を有していることが確認された。ただし、エトフェンプロックスに関しては、LOQとAECdの比が100倍しかなく、サンプルを10倍以上希釈して測定する場合には注意が必要である。このため、エトフェンプロックスは希釈せずに測定した。なお、実サンプルを測定した結果、濃度がLOQ未満であった場合には、LOQの値で整理した。また、検量線の決定係数を見ると最も小さい係数でも0.9831であり、十分な直線性が得られたと判断した。

2) 前処理における回収率、再現性、ESIにおけるマトリックス効果の検討

回収率、再現性およびマトリックス効果の検討結果を表(1)-17～25に示す。イミダクロプリドとそのPTPWsについては、WCXとHLBの2種類の吸着カートリッジで検討した結果を示す。これらの結果を、ガイドライン^{3 7)}に準じて評価した。イミダクロプリドおよびエトフェンプロックスとそれらのPTPWsについては、回収率は、分析種による違い、サンプリング地点による違い、吸着カートリッジによる違いが大きかった。ジノテフランについては、親農薬の検討のみを実施したが、サンプリング地点による影響は他の分析種と比較して小さかった。再現性を評価するために、analytical replicate=2または3、technical replicate=3で繰り返し実験を実施し、変動係数(CV)を求めた。イミダクロプリドのPTPWsについては、用いた吸着カートリッジによっては15%より大きな変動係数が得られたが、その他の分析種では15%以下の良好な再現性が得られた。また、イミダクロプリドのPTPWsについても、適切な吸着カートリッジを用いることにより、すべての分析種で

表(1)-17 固相抽出操作におけるイミダクロプリドおよびその環境変化体の回収率

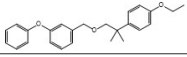
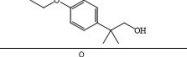
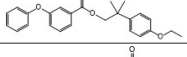
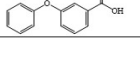
分析種	構造式	大丸橋		石之丸橋		平田橋		陣之尾橋		田島橋	
		WCX	HLB	WCX	HLB	WCX	HLB	WCX	HLB	WCX	HLB
imidacloprid		0.495	0.44	0.776	0.74	0.694	0.611	0.0828	0.0285	0.0371	0.0259
6-chloronicotinic acid		NM	1.18	NM	1.37	NM	1.14	NM	0.0719	NM	0.0697
1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)imidazolidine-2-imine		1.04	-0.139	0.972	0.0198	1.17	0.0189	0.811	-0.00121	0.733	0.00245
6-chloronicotinaldehyde		0.423	0.256	0.304	0.193	0.464	0.31	0.0248	-0.00518	0.0136	-0.00503
5-(aminomethyl)-2-chloropyridine		0.339	0.174	0.417	0.142	1.27	0.139	0.572	-0.00954	0.356	0.000477
1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)imidazolidine-2-one		0.639	0.854	0.686	0.676	0.648	0.797	0.0327	0.00506	0.0221	0.0104
6-chloro-N-methylnicotinamide		0.499	0.77	0.505	0.767	0.609	0.791	0.0271	0.00315	0.0175	0.0058
N-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)acetamide		0.855	0.722	0.911	0.684	1.08	0.754	0.0472	0.002	0.0281	0.00209
1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-2-nitroguanine		0.688	0.806	0.684	0.761	0.781	0.796	0.0842	0.0217	0.074	0.0161
N-(1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-1,3-dihydro-2H-imidazol-2-ylidene)nitramide		0.694	0.801	0.729	0.866	0.767	0.862	0.0672	0.012	0.0766	0.0124
N-(1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-4,5-dihydroxyimidazolidin-2-ylidene)nitramide		0.771	0.54	0.61	0.344	0.688	0.619	0.0385	0.00247	0.0202	-0.0311

NM: Not Measured

表(1)-18 固相抽出操作におけるジノテフランの回収率

分析種	構造式	串良橋	堅田橋	俣瀬橋	弁大橋
dinotefuran		0.956	1.02	0.872	0.744

表(1)-19 固相抽出操作におけるエトフェンプロックスおよびその環境変化体の回収率

分析種	構造式	回収率[-]
etofenprox		0.259
2-(4-ethoxyphenyl)-2-methylpropan-1-ol		0.845
2-(4-ethoxyphenyl)-2-methylpropyl 3-phenoxybenzoate		0.228
3-phenoxybenzoic acid		0.792

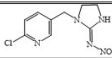
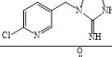
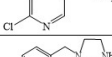
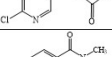
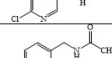
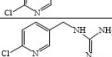
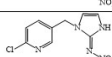
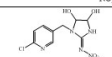
15%以下の良好な再現性が得られた。このため、すべての分析種についてマトリックス効果を確認し、回収率とマトリックス効果の補正係数を決定した。なお、田島橋など、回収率が悪かった（30%未満または150%より大きい）場合には、測定は行ったがデータは採用しなかった（測定結果を空欄とした）。

3）表流水中のイミダクロプリド環境変化体の濃度測定

イミダクロプリドおよびそのPTPWsの濃度測定結果を図(1)-26に示す。Technical replicate=2で測定したが、ほぼすべてのサンプルについて、高い再現性が得られた。

6-chloronicotinaldehyde、N-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)acetamideについては、2016年度に採取したサンプルからはほとんど検出されず、2014年度および2015年度の測定結果と異なっていた。これは、2014年度および2015年度のサンプル採取時期が田植え直後から1週間以内程度だったのに対して、2016年度は田植え前までにサンプル採取をほぼ終えたことが原因と考えられる。2016年度のサンプル採取時期を変更したのは、2016年度の濃度測定目的をイミダクロプリドーオレフィン体の

表(1)-20 固相抽出操作の再現性(イミダクロプリドおよびその環境変化体、単位: %)

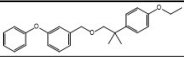
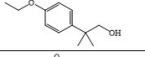
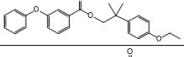
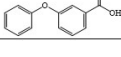
分析種	構造式	大丸橋		石之丸橋		平田橋		陣之尾橋		田島橋	
		WCX	HLB	WCX	HLB	WCX	HLB	WCX	HLB	WCX	HLB
imidacloprid		5.10	1.52	2.19	2.19	2.69	2.84	5.00	2.10	2.70	4.14
6-chloronicotinic acid		NM	0.979	NM	2.26	NM	2.08	NM	2.57	NM	4.01
1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)imidazolidine-2-imine		3.25	2.40	1.98	1.90	1.33	2.15	4.15	1.62	1.16	4.48
6-chloronicotinaldehyde		4.04	4.76	6.89	5.90	4.53	6.52	8.15	7.16	3.05	4.83
5-(aminomethyl)-2-chloropyridine		20.8	4.47	14.4	5.10	17.2	4.21	23.2	8.09	12.3	6.00
1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)imidazolidine-2-one		6.29	1.37	1.97	2.06	3.34	2.01	3.37	2.20	1.59	2.76
6-chloro-N-methylnicotinamide		4.49	1.64	2.01	1.77	2.38	2.92	5.86	2.66	2.78	3.05
N-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)acetamide		4.88	1.46	2.21	1.66	2.36	2.28	5.57	2.23	2.42	3.10
1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-2-nitroguanidine		5.53	1.69	1.89	1.22	3.12	1.75	7.45	1.92	3.14	3.90
N-(1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-1,3-dihydro-2H-imidazol-2-ylidene)nitramide		3.53	2.01	2.73	2.68	2.97	1.73	6.44	4.40	2.52	3.31
N-(1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-4,5-dihydroxyimidazolidin-2-ylidene)nitramide		3.24	9.08	3.09	19.7	5.38	11.1	5.75	2.88	6.07	6.14

NM: Not Measured

表(1)-21 固相抽出操作の再現性(ジノテフラン、単位: %)

分析種	構造式	串良橋	堅田橋	俣瀬橋	弁天橋
dinotefuran		4.83	2.91	1.74	2.58

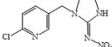
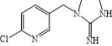
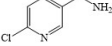
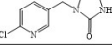
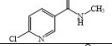
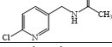
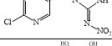
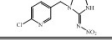
表(1)-22 固相抽出操作の再現性(エトフェンプロックスおよびその環境変化体、単位: %)

分析種	構造式	CV [%]
etofenprox		3.19
2-(4-ethoxyphenyl)-2-methylpropan-1-ol		14.9
2-(4-ethoxyphenyl)-2-methylpropyl 3-phenoxybenzoate		4.30
3-phenoxybenzoic acid		10.1

定量分析を主にしたためである。すなわち、2014年度および2015年度の検討結果に基づいて、2016年度は、土壤中での生分解代謝物であるイミダクロプリド-オレフィン体を採用しやすい田植え前の耕起および代掻きの際に採取した。

平田橋における2016年6月12日7時5分と9時22分の(E)-1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-2-nitroguanidineの測定結果はサンプリング時刻が1時間17分異なるだけで極端な差が現れるとは考えにくく、とくに後から採取したサンプル中の濃度が急に減少するのは不自然である。そこで測定条件を確認したところ、後から採取したサンプルを測定した際に、100倍希釈してから測定していたため、MSに注入したサンプル中の分析種の濃度がIDLを下回ってしまったことが原因であった。サンプルを希釈したのは、共存する高濃度物質により測定装置に劣化や不具合が生じることを防ぐためである。この例のようなケースがいくつか認められたが、前述のように、本研究における検出感度はAECdと比較して十分に低く、リスク評価するのに問題はなかった。

表(1)-23 イミダクロプリドおよびその環境変化体を測定する際のマトリックス効果

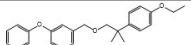
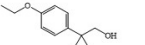
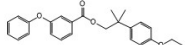
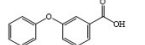
分析種	構造式	大丸橋		石之丸橋		平田橋		陣之尾橋		田島橋	
		WCX	HLB	WCX	HLB	WCX	HLB	WCX	HLB	WCX	HLB
imidacloprid		1.25	1.18	1.30	1.13	1.25	1.18	1.20	0.90	1.29	0.91
6-chloronicotinic acid		NM	1.10	NM	1.15	NM	1.12	NM	1.09	NM	1.12
1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)imidazolidine-2-imine		2.65	1.67	2.45	1.82	1.88	1.61	2.55	1.74	2.15	1.88
6-chloronicotinaldehyde		1.76	1.02	1.89	0.91	1.63	0.98	2.02	1.51	2.05	1.56
5-(aminomethyl)-2-chloropyridine		0.688	0.168	0.648	0.089	0.410	0.158	0.477	0.308	0.649	0.283
1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)imidazolidine-2-one		1.40	1.20	1.50	1.34	1.40	1.25	1.33	1.04	1.49	1.07
6-chloro-N-methylnicotinamide		1.63	1.20	1.61	1.23	1.51	1.17	1.54	1.16	1.55	1.15
N-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)acetamide		0.891	1.27	0.870	1.36	0.790	1.27	0.837	1.17	0.840	1.19
1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-2-nitroguanidine		1.54	1.55	1.61	1.53	1.59	1.56	1.54	1.37	1.57	1.35
N-(1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-1,3-dihydro-2H-imidazol-2-ylidene)nitramide		1.81	1.72	1.83	1.82	1.85	1.68	1.69	1.55	1.81	1.50
N-(1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-4,5-dihydroxyimidazolidin-2-ylidene)nitramide		0.841	0.217	0.974	0.279	1.00	0.194	0.894	0.937	0.960	0.944

NM: Not Measured

表(1)-24 ジノテフランを測定する際のマトリックス効果

分析種	構造式	串良橋	堅田橋	俣瀬橋	弁天橋
dinotefuran		0.979	0.967	1.04	1.16

表(1)-25 エトフェンプロックスおよびその環境変化体を測定する際のマトリックス効果

分析種	構造式	マトリックス効果 [-]
etofenprox		0.883
2-(4-ethoxyphenyl)-2-methylpropan-1-ol		0.927
2-(4-ethoxyphenyl)-2-methylpropyl 3-phenoxybenzoate		0.888
3-phenoxybenzoic acid		1.42

高濃度で検出されたサンプルを分析種毎に確認した。例えば、イミダクロプリドは平田橋において2016年6月12日12時30分に採取したサンプルから高濃度で検出されているが、同サンプルに前後して採取したサンプルなどからも継続的に安定して検出されており、信頼性の高い結果と考えられる。一方、石之丸橋において6月12日10時30分に採取したサンプルから高濃度のイミダクロプリドが検出されているが、前後して採取されたサンプルからはその数分の1程度の濃度しか検出されていない。そこで、測定条件を確認したところ、同サンプルは高濃度な物質が共存していたので100倍希釈して測定されていたが、前後して採取されたサンプルは希釈せずに測定されていた。希釈して測定した結果得られた定量値がLOQの10倍程度であったため、測定感度には問題がない。しかし、マトリックス効果の受け方が他のサンプルと比較して大きくことになったことが影響して誤差を生じたと考えられる。このように、継続して安定的な検出が確認され、希釈せずに測定した結果のみでリスク評価を行うなど、今後課題を残したが、イミダクロプリドのPTPWsにおいて

リスクが懸念されたのはイミダクロプリド・オレフィン体のみであり、リスク評価の対象となるサンプルについて希釈倍率を確認した結果、すべてのサンプルの希釈倍率は1倍であり、問題はなかった。

分析種間で検出挙動に関連性が認められるか否かを検討した。その結果、イミダクロプリドが比較的高濃度で検出されたサンプルからはイミダクロプリド・オレフィン体も比較的高濃度で検出される傾向が認められたが、その他の分析種の間には顕著な関連性は認められなかった。これは、本研究で採取したサンプルが田植え前の時期であったため、過年度に施用されたイミダクロプリドが土壤中に残留し、その一部が土壌微生物によりオレフィン体に変化したためと考えられる。

また、これまで土壌微生物による代謝物および土壌表面における光照射産物としか報告されていない^{1,2)} オレフィン体が、実水環境試料から88.6%の検出率で検出され、オレフィン体による水生生物への曝露が懸念されることを明らかにした。なお、オレフィン体が高濃度で検出された2016年6月12日7時は、直前の3時間の合計雨量が1.5 mm（鹿児島県阿久根）であり、降雨の影響を受けていないと考えられる。今後、降雨が影響を受けたサンプルを代掻き作業の時期に採取してオレフィン体の濃度を測定する必要があると考えられる。

4) 表流水中のジノテフラン環境変化体の濃度測定

ジノテフランおよびそのPTPWsの濃度測定結果を図(1)-27に示す。Technical replicate=2で測定したが、ほぼすべてのサンプルについて、高い再現性が得られた。ジノテフランの未知PTPWsであるPTPW-cと-dについては、標準試薬を入手できなかったため、ジノテフランの検量線を用いて濃度を算出して示した。また、デニトロ体については、検出されたピークのカラム保持時間が、サブテーマ（2）で合成・精製した標準試薬を用いた測定結果とカラム保持時間が異なっており、光照射サンプル中から発見された異性体と同じであった。異性体の標準物質も入手できなかったため、ジノテフラン・デニトロ体の検量線を用いて濃度を算出して示した。

研究室内でジノテフランに模擬太陽光を照射して得たPTPWs-c、-dを、環境基準点または監視点から採取した実環境試料中から100%、その他の一般河川から採取した実環境試料中からも100%の検出率で検出した。また、デニトロ体の構造異性体についても同様に、環境基準点または監視点から採取した実環境試料中から100%、その他の一般河川から採取した実環境試料中からも100%の検出率で検出した。一方、デニトロ体については、環境基準点または監視点から採取した実環境試料中から不検出、その他の一般河川から採取した実環境試料中からも不検出であった。

イミダクロプリドと異なり、ジノテフランとそのPTPWsの検出挙動は明瞭であった。これは、ほ場の土壤中に残留していたイミダクロプリドやそのPTPWsが、ほ場毎に異なるタイミングで行われた代掻き作業に伴って流出したのに対して、ジノテフランは有人ヘリコプターによる空中散布で施用され、なおかつ光照射産物なので迅速に変化して生成したことが理由と考察される。

なお、サンプルを採取した2016年7月2日～4日の合計降水量（鹿児島県内之浦）は0 mmであり、降雨の影響を受けていないと考えられる。今後、航空防除が行われた後に降雨の影響を受けたサンプルを採取してPTPWsの測定を行う必要があると考えられる。

5) 表流水中のエトフェンプロックスおよびフィプロニルの環境変化体の濃度測定

エトフェンプロックスおよびそのPTPWsの濃度測定結果を図(1)-28に、フィプロニルおよびそのPTPWの濃度測定結果を図(1)-29に示す。Technical replicate=2で測定したが、ほぼすべてのサンプルについて、高い再現性が得られた。エトフェンプロックスについては、各サンプリング地点で高濃

図(1)-26 イミダクロプリドおよびその環境変化体の濃度測定結果

[illegible]

[illegible]

図(1)-26 イミダクロプリドおよびその環境変化体の濃度測定結果（続き）

sampling date and site	imidacloprid	6-chloronicotinic acid	1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)imidazolidine-2-imine	6-chloronicotin aldehyde	5-(aminomethyl)-2-chloropyridine	imidacloprid-urea	6-chloro-N-methylnicotin amide	N-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)acetamide	1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-2-nitroguanidine	imidacloprid-olefin	N-((1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-4,5-dihydroxyimidazolidin-2-ylidene)nitramide
2016/6/5/10/22/陣之尾橋											
2016/6/5/12/26/陣之尾橋											
2016/6/5/14/22/陣之尾橋											
2016/6/5/16/10/陣之尾橋											
2016/6/5/18/30/陣之尾橋											
2016/6/6/10/0/陣之尾橋											
2016/6/6/11/47/陣之尾橋											
2016/6/11/7/11/陣之尾橋											
2016/6/11/9/29/陣之尾橋											
2016/6/12/5/32/陣之尾橋											
2016/6/12/9/36/陣之尾橋											
2016/6/12/10/37/陣之尾橋											
2016/6/12/11/9/陣之尾橋											
2016/6/13/9/37/陣之尾橋											

度で検出されたのは、有人ヘリコプターによる水稻航空防除が実施された当日（2014年7月24日、25日および8月20日、21日）であった。最高濃度を観測した翌日以降はLOQ以下の濃度に低下していた。これは、エトフェンプロックスの疎水性が高く（LogPow=6.9（20℃））³⁹⁾、水溶解度が低い（22.5 ug/L（20℃））³⁹⁾ためと考えられる。

PTPWsの検出挙動を見ると、2-(4-ethoxyphenyl)-2-methylpropan-1-olと3-phenoxybenzoic acidは、航空防除が行われる前から検出され、航空防除後に濃度が高くなる傾向が認められた。航空防除が実施される前から検出されたことより、航空防除以外の施用が考えられる。また、エトフェンプロックス以外の物質から生成している可能性も考えられる。また、上流から下流（こやげしろ橋、新亀甲橋、下鶴橋、標札、宝来橋）の順に濃度が上昇する傾向が認められた。一方、2-(4-ethoxyphenyl)-2-methylpropyl 3-phenoxybenzoateについては、中谷橋（環境基準点）で最高濃度525.2 ppt（1,345 pM）が観察されたが、中谷橋以外のサンプリング地点からは新割他橋（環境基準点）からのみ検出され、その他のサンプリング地点からは検出されなかった。同物質のLOQが高いことが原因の1つと考えられるが、継続的な監視により、検出を確認する必要がある。しかし、中谷橋における検出は、同地点で採取したすべてのサンプルから検出されており、LOQ付近の値を含めて7回連続（8月18日～25日）で検出されていることから、信頼性は高いと考えられる。また、検出された最高濃度は、親農薬であるエトフェンプロックスのモル基準の濃度より高濃度であり、そのモル濃度は、エトフェンプロックスの登録保留基準値のモル濃度と同程度であった。

なお、2-(4-ethoxyphenyl)-2-methylpropyl 3-phenoxybenzoateが高濃度で検出された2014年8月20日の降水量（都城）は0 mmであり、降雨の影響を受けていないと考えられる。今後、航空防除が行われた後に降雨の影響を受けたサンプルを採取してPTPWsの測定を行う必要があると考えられる。

フィプロニルについては、散布情報が得られなかったので、エトフェンプロックスを対象としたサンプリングで得られたサンプルを分析した。その結果、サイトB～Eより継続的に検出された。また、フィプロニルが検出されたサンプルから比較的高濃度なPTPWが検出されており、検出挙動の関連性が明確であった。

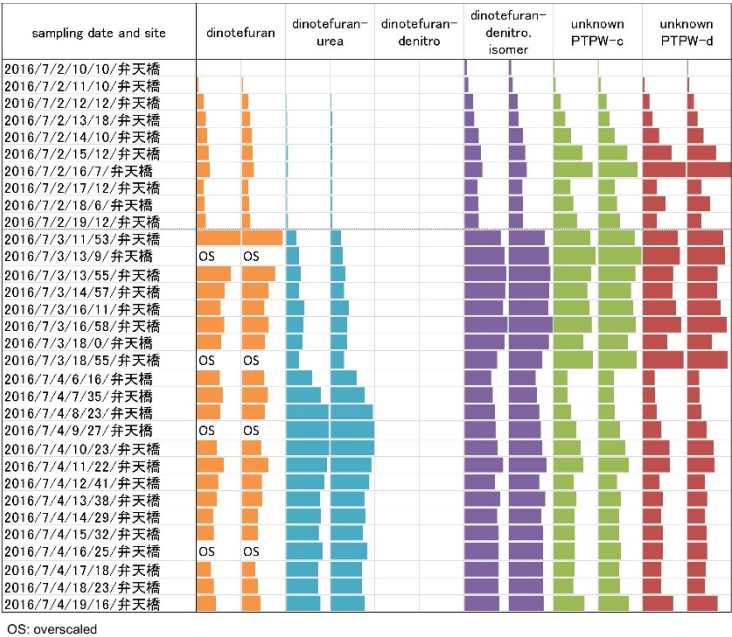
6）まとめ

以上のように、本研究で注目すべきPTPWsはイミダクロプリド・オレフィン体とエトフェンプロックスPTPWである2-(4-ethoxyphenyl)-2-methylpropyl 3-phenoxybenzoateであった。その検出挙動

図(1)-27 ジノテフランおよびその環境変化体の濃度測定結果

sampling date and site	dinotefuran	dinotefuran- urea	dinotefuran- denitro	dinotefuran- denitro, isomer	unknown PTPW-c	unknown PTPW-d
2016/7/3/11/18/俣瀬橋						
2016/7/3/12/5/俣瀬橋						
2016/7/3/13/19/俣瀬橋						
2016/7/3/14/5/俣瀬橋						
2016/7/3/15/9/俣瀬橋						
2016/7/3/16/20/俣瀬橋						
2016/7/3/17/8/俣瀬橋						
2016/7/3/18/7/俣瀬橋						
2016/7/3/19/9/俣瀬橋						
2016/7/4/6/43/俣瀬橋						
2016/7/4/7/45/俣瀬橋						
2016/7/4/8/36/俣瀬橋						
2016/7/4/9/17/俣瀬橋						
2016/7/4/9/40/俣瀬橋						
2016/7/4/10/14/俣瀬橋						
2016/7/4/10/39/俣瀬橋						
2016/7/4/11/13/俣瀬橋						
2016/7/4/11/32/俣瀬橋						
2016/7/4/12/33/俣瀬橋						
2016/7/4/12/52/俣瀬橋						
2016/7/4/13/25/俣瀬橋						
2016/7/4/13/46/俣瀬橋						
2016/7/4/14/18/俣瀬橋						
2016/7/4/14/38/俣瀬橋						
2016/7/4/15/23/俣瀬橋						
2016/7/4/15/45/俣瀬橋						
2016/7/4/16/16/俣瀬橋						
2016/7/4/16/36/俣瀬橋						
2016/7/4/17/8/俣瀬橋						
2016/7/4/17/27/俣瀬橋						
2016/7/4/18/13/俣瀬橋						
2016/7/4/18/31/俣瀬橋						
2016/7/4/19/7/俣瀬橋						
2016/7/4/19/33/俣瀬橋						
2016/7/2/9/42/串良橋						
2016/7/2/10/46/串良橋						
2016/7/2/11/53/串良橋						
2016/7/2/12/57/串良橋						
2016/7/2/13/50/串良橋						
2016/7/2/14/49/串良橋						
2016/7/2/15/48/串良橋						
2016/7/2/16/50/串良橋						
2016/7/2/17/47/串良橋						
2016/7/2/18/48/串良橋						
2016/7/3/8/59/串良橋						
2016/7/3/12/23/串良橋						
2016/7/3/13/40/串良橋						
2016/7/3/14/27/串良橋						
2016/7/3/15/31/串良橋						
2016/7/3/16/40/串良橋						
2016/7/3/17/28/串良橋						
2016/7/3/18/30/串良橋						
2016/7/3/19/28/串良橋						
2016/7/4/5/48/串良橋						
2016/7/4/6/55/串良橋						
2016/7/4/8/6/串良橋						
2016/7/4/9/3/串良橋						
2016/7/4/10/1/串良橋						
2016/7/4/10/59/串良橋						
2016/7/4/12/20/串良橋						
2016/7/4/13/12/串良橋						
2016/7/4/14/6/串良橋						
2016/7/4/15/10/串良橋						
2016/7/4/16/5/串良橋						
2016/7/4/16/57/串良橋						
2016/7/4/17/59/串良橋						
2016/7/4/18/55/串良橋						
2016/7/2/9/59/かただ橋						
2016/7/2/10/55/かただ橋						
2016/7/2/12/0/かただ橋						
2016/7/2/13/7/かただ橋						
2016/7/2/13/59/かただ橋						
2016/7/2/14/59/かただ橋						
2016/7/2/15/56/かただ橋						
2016/7/2/17/2/かただ橋						
2016/7/2/17/56/かただ橋						
2016/7/2/19/1/かただ橋						
2016/7/3/12/14/かただ橋						
2016/7/3/13/28/かただ橋						
2016/7/3/14/14/かただ橋						
2016/7/3/15/19/かただ橋						
2016/7/3/16/30/かただ橋						
2016/7/3/17/18/かただ橋						
2016/7/3/18/19/かただ橋						
2016/7/3/19/20/かただ橋						
2016/7/4/7/58/かただ橋						
2016/7/4/8/53/かただ橋						
2016/7/4/9/51/かただ橋						
2016/7/4/10/49/かただ橋						
2016/7/4/11/43/かただ橋						
2016/7/4/15/2/かただ橋						
2016/7/4/13/57/かただ橋						
2016/7/4/14/48/かただ橋						
2016/7/4/15/55/かただ橋						
2016/7/4/16/47/かただ橋						
2016/7/4/17/38/かただ橋						
2016/7/4/18/43/かただ橋						

図(1)-27 ジノテフランおよびその環境変化体の濃度測定結果（続き）



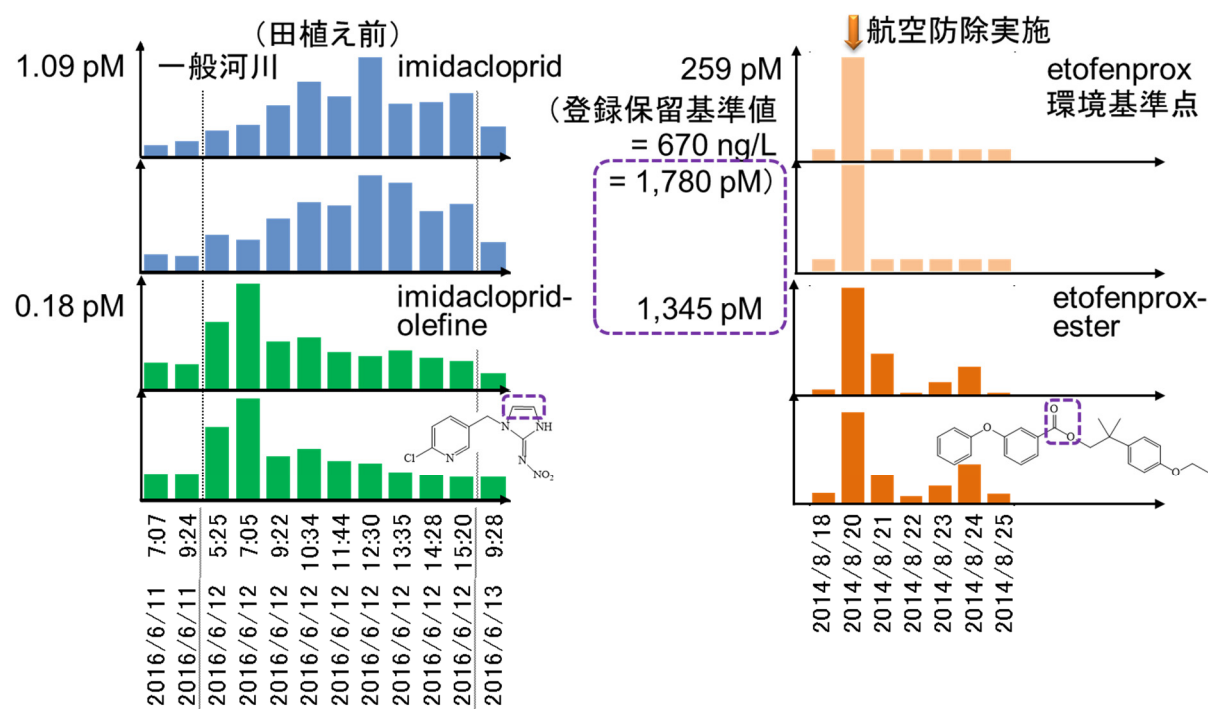
のハイライト部分を図(1)-30に示す。また、本研究で検討したすべてのPTPWsについて、検出率や最高濃度をまとめた資料を表(1)-26に示す。

図(1)-28 エトフェンプロックスおよび
その環境変化体の濃度測定結果

sampling data and site	etofenprox	2-(4-ethoxy phenyl)- 2-methyl propan-1-ol	2-(4-ethoxy phenyl)-2- methylpropyl 3-phenoxy benzoate	3-phenoxy benzoicacid
2014/6/30/大浦橋				
2014/7/7/大浦橋				
2014/6/22/恋島橋				
2014/6/30/恋島橋				
2014/7/7/恋島橋				
2014/8/20/小八ヶ代橋				
2014/8/21/小八ヶ代橋				
2014/8/22/小八ヶ代橋				
2014/8/23/小八ヶ代橋				
2014/8/24/小八ヶ代橋				
2014/8/18/新亀甲橋				
2014/8/20/新亀甲橋				
2014/8/21/新亀甲橋				
2014/8/22/新亀甲橋				
2014/8/23/新亀甲橋				
2014/8/24/新亀甲橋				
2014/8/25/新亀甲橋				
2014/8/26/新亀甲橋				
2014/8/18/下鶴橋				
2014/8/20/下鶴橋				
2014/8/21/下鶴橋				
2014/8/22/下鶴橋				
2014/8/23/下鶴橋				
2014/8/24/下鶴橋				
2014/8/25/下鶴橋				
2014/8/26/下鶴橋				
2014/8/18/表札				
2014/8/20/表札				
2014/8/21/表札				
2014/8/22/表札				
2014/8/23/表札				
2014/8/24/表札				
2014/8/25/表札				
2014/8/26/表札				
2014/8/18/宝来橋				
2014/8/20/宝来橋				
2014/8/21/宝来橋				
2014/8/22/宝来橋				
2014/8/23/宝来橋				
2014/8/24/宝来橋				
2014/8/25/宝来橋				
2014/8/18/中谷橋				
2014/8/20/中谷橋				
2014/8/21/中谷橋				
2014/8/22/中谷橋				
2014/8/23/中谷橋				
2014/8/24/中谷橋				
2014/8/25/中谷橋				
2014/8/18/新割田橋				
2014/8/20/新割田橋				
2014/8/21/新割田橋				
2014/8/22/新割田橋				
2014/8/23/新割田橋				
2014/8/24/新割田橋				
2014/8/25/新割田橋				
2014/7/22/サイトB				
2014/7/30/サイトB				
2014/7/22/サイトC				
2014/7/25/サイトC				
2014/7/30/サイトC				
2014/7/22/サイトD				
2014/7/25/サイトD				
2014/7/22/サイトE				
2014/7/25/サイトE				
2014/7/22/サイトF				
2014/7/25/サイトF				
2014/7/30/サイトF				
2014/7/30/松田橋				
2014/7/25/サイトG				
2014/7/30/サイトG				

図(1)-29 フィプロニルおよび
その環境変化体の濃度測定結果

sampling data and site	fipronil	fipronil sulfone
2014/6/30/大浦橋		
2014/7/7/大浦橋		
2014/6/22/恋島橋		
2014/6/30/恋島橋		
2014/7/7/恋島橋		
2014/8/20/小八ヶ代橋		
2014/8/21/小八ヶ代橋		
2014/8/22/小八ヶ代橋		
2014/8/23/小八ヶ代橋		
2014/8/24/小八ヶ代橋		
2014/8/18/新亀甲橋		
2014/8/20/新亀甲橋		
2014/8/21/新亀甲橋		
2014/8/22/新亀甲橋		
2014/8/23/新亀甲橋		
2014/8/24/新亀甲橋		
2014/8/25/新亀甲橋		
2014/8/26/新亀甲橋		
2014/8/18/下鶴橋		
2014/8/20/下鶴橋		
2014/8/21/下鶴橋		
2014/8/22/下鶴橋		
2014/8/23/下鶴橋		
2014/8/24/下鶴橋		
2014/8/25/下鶴橋		
2014/8/26/下鶴橋		
2014/8/18/表札		
2014/8/20/表札		
2014/8/21/表札		
2014/8/22/表札		
2014/8/23/表札		
2014/8/24/表札		
2014/8/25/表札		
2014/8/26/表札		
2014/8/18/宝来橋		
2014/8/20/宝来橋		
2014/8/21/宝来橋		
2014/8/22/宝来橋		
2014/8/23/宝来橋		
2014/8/24/宝来橋		
2014/8/25/宝来橋		
2014/8/18/中谷橋		
2014/8/20/中谷橋		
2014/8/21/中谷橋		
2014/8/22/中谷橋		
2014/8/23/中谷橋		
2014/8/24/中谷橋		
2014/8/25/中谷橋		
2014/8/18/新割田橋		
2014/8/20/新割田橋		
2014/8/21/新割田橋		
2014/8/22/新割田橋		
2014/8/23/新割田橋		
2014/8/24/新割田橋		
2014/8/25/新割田橋		
2014/7/22/サイトB		
2014/7/30/サイトB		
2014/7/22/サイトC		
2014/7/25/サイトC		
2014/7/30/サイトC		
2014/7/22/サイトD		
2014/7/25/サイトD		
2014/7/22/サイトE		
2014/7/25/サイトE		
2014/7/22/サイトF		
2014/7/25/サイトF		
2014/7/30/サイトF		
2014/7/30/松田橋		
2014/7/25/サイトG		
2014/7/30/サイトG		



図(1)-30 イミダクロプリド-オレフィン体およびエトフェンプロックスPTPWの検出

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

ネオニコチノイド系農薬（NNI）を含む14種の農薬、合成した6種類の環境変化体（PTPWs）を含む28種類のPTPWsについて、LC/MS/MSを用いた一斉分析のメソッドを開発した。NNIのPTPWsについては、LC/MS/MSを用いた高感度測定方法がほとんど報告されていないため、同情報は、多くの研究者がNNIのPTPWsを環境モニタリングするのに有効と考えられる。同情報は、無料公開されている学会の公式実測マスペクトルデータベースへの収録が予定されていることから、国内外へ広く周知されることが期待される。

さらに、市販されていないなどの理由により試薬を入手できない場合でも、農薬原体などの親化合物から調製した混合試料、田面水などの高濃度試料があれば、LC/MS/MSを用いた高感度分析が可能になった。これまでは、新たな環境汚染物質の存在が疑われるたびに標品を合成・精製し、実環境中からの検出を確認する必要があった。確認の結果、実環境中からほとんど検出されない場合には、時間、労力とコストを要する標品の合成・精製が徒労に終わる場合があった。しかし、本研究開発の成果により、標品を合成・精製することなく、親化合物から調製した変化体などの未精製の物質を用いて実環境試料の高感度分析が可能となり、実環境中からの検出実態を確認してから標品の合成・精製を行えるようになった。今後益々多様化すると考えられる環境汚染物質、中でも変化体の環境研究に貢献する技術と考えられる。同技術の内容を紹介する講演会を学会主催で開催することが決まっており、広く周知されることが期待される。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

農薬を含めた様々な化学物質の環境安全管理は、生態系に対する影響を定量的に評価して行う必要がある。しかし、現在の環境安全管理のほとんどは、親農薬などの親化合物に着目した管理と言っても過言ではない。そのような中、本研究の成果は、親化合物と同程度の毒性強度を有する環境変化体の実環境中から検出されることを示している。さらに、環境変化体が親化合物と同程度以上の濃度レベルで検出される事例があること、また、親農薬の登録保留基準と同程度の濃度で環境変化体が発見される事例があることを示しており、環境変化体のさらなる環境モニタリングの必要性を示している。これらの成果は、親化合物を対象とした現在の環境安全管理のあり方を環境変化体に拡張する必要性を示す可能性があり、環境政策への貢献が期待される。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

特に記載すべき事項はない。

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない。

（２）口頭発表（学会等）

- 1) 高梨啓和：日本分析化学会機器分析ワークショップ in 福岡(2014)
「高分解能・高質量精度LC/MSによる未知物質の探索方法」
- 2) 高梨啓和：日本分析化学会機器分析ワークショップ in 鹿児島(2014)
「高分解能・高質量精度LC/MSによる未知物質の探索方法」
- 3) 高梨啓和：化学工学会第46回秋季大会(2014)
「高分解能・高質量精度LC/MSを用いた微量汚染物質の構造推定」
- 4) 高梨啓和、有島由紀子、橋本扶美、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、宮本信一、石川英律：第17回日本水環境学会シンポジウム(2014)
「高分解能・高質量精度LC/MSを用いた農薬の環境変化体(PTPWs)の探索」
- 5) 橋本扶美、有島由紀子、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、宮本信一、石川英律：平成26年度日本水環境学会九州沖縄支部研究発表会(2015)
「未知環境変化体(PTPWs)の構造推定と半定量分析：ネオニコチノイド系殺虫剤imidaclopridを例として」
- 6) 福崎悠史郎、藤木健司、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、宮本信一、石川英律：平成26年度日本水環境学会九州沖縄支部研究発表会(2015)
「標準物質の入手が困難な環境汚染物質の半定量分析」
- 7) 藤木健司、福崎悠史郎、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、宮本信一、石川英律：平成26年度日本水環境学会九州沖縄支部研究発表会(2015)
「ネオニコチノイド系農薬とその環境変化体(PTPWs)の定量分析」
- 8) 有島由紀子、橋本扶美、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、宮本信一、石川英律：平成26年度日本水環境学会九州沖縄支部研究発表会(2015)
「未知環境変化体(PTPWs)の構造推定方法の検討：ネオニコチノイド系農薬dinotefuranを例として」
- 9) 高梨啓和、藤木健司、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、宮本信一、石川英律：平成26年度日本水環境学会九州沖縄支部研究発表会(2015)
「タンデムLC分析によるhigh through put LC/MS/MS分析」
- 10) 野邊詩緒里、一宮利恵、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、宮本信一、石川英律：平成26年度日本水環境学会九州沖縄支部研究発表会(2015)
「有機リン系殺虫剤フェントロチオン光照射サンプルからの未知生成物の分離」
- 11) 橋本扶美、有島由紀子、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、宮本信一、石川英律：第49回日本水環境学会年会(2015)
「未知環境変化体(PTPWs)の構造推定と半定量分析：ネオニコチノイド系農薬imidaclopridを例として」

- 12) 高梨啓和、福崎悠史郎、藤木健司、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、宮本信一、石川英律：第49回日本水環境学会年会(2015)「標準物質の入手が困難な環境汚染物質のLC/MS/MS測定」
- 13) 藤木健司、福崎悠史郎、榎園直樹、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、宮本信一、石川英律：第49回日本水環境学会年会(2015)
「ネオニコチノイド系農薬とその環境変化体(PTPWs)の同時定量分析」
- 14) 有島由紀子、橋本扶美、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、宮本信一、石川英律：第49回日本水環境学会年会(2015)
「未知環境変化体(PTPWs)の構造推定方法の検討：ネオニコチノイド系農薬を例として」
- 15) F. HASHIMOTO, H. TAKANASHI, Y. ARISHIMA, T. NAKAJIMA, A. OHKI, T. UEDA, J. KADOKAWA, H. ISHIKAWA AND N. MIYAMOTO: Proc. The Water and Environment Technology Conference 2015.
“Exploring Transformation Products of Imidacloprid, a Neonicotinoid Insecticide”
- 16) 高梨啓和、橋本扶美、有島由紀子、中島常憲、大木章、上田岳彦、門川淳一、石川英律、宮本信一：第18回日本水環境学会シンポジウム(2015)
「ネオニコチノイド系農薬imidacloprid光照射サンプル中の変化体の網羅的探索」
- 17) 橋本扶美、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、石川英律、宮本信一：第18回日本水環境学会シンポジウム(2015)
「ネオニコチノイド系農薬imidaclopridとその環境変化体(PTPWs)の河川水中濃度測定」
- 18) 橋本扶美、有島由紀子、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、石川英律、宮本信一：環境科学会 2015年会(2015)
「農薬環境変化体の環境モニタリング～親農薬と変化体のリスク比較～」
- 19) 高梨啓和、有島由紀子、橋本扶美、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、宮本信一、石川英律：環境科学会2015年会(2015)
「ネオニコチノイド系農薬ジノテフランの環境変化体の探索」
- 20) 高梨啓和、浜 知広、中島常憲、大木 章、上田岳彦、亀屋隆志、近藤貴志、松下 拓：環境科学会2015年会(2015)
「多変量解析と高分解能質量分析による変異原の探索」
- 21) 橋本扶美、有島由紀子、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、宮本信一、石川英律：平成27年度廃棄物資源循環学会研究発表会(2015)
「高分解能・高質量精度LC/MSを用いた環境サンプル中の未知物質の探索」
- 22) F. HASHIMOTO, H. TAKANASHI, R. KITANOSONO, T. NAKAJIMA, A. OHKI, T. UEDA, J. KADOKAWA, H. ISHIKAWA AND N. MIYAMOTO: Proc. the 24th Korea-Japan Symposium on Water Environment 2015, Seoul, 2015.
“Unknown exploring of pesticide transformation products in water environments (PTPWs)”
- 23) T. UEDA AND H. TAKANASHI: The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, USA, 2015.
“Prediction of MS signal intensities of pesticide transformation products over a

range of analyte cation concentration basing on a novel ionization kinetic model of ESI with electrostatic field effects”

- 24) 高梨啓和、玉島由美子、有島由紀子、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、石川英律、宮本信一：日本水環境学会九州沖縄支部研究発表会（2016）
「衝突断面積測定による未知環境汚染物質の構造推定」
- 25) 有島由紀子、玉島由美子、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、石川英律、宮本信一：日本水環境学会九州沖縄支部研究発表会（2016）
「イオン移動度質量測定による農薬の未知環境変化体（PTPWs）の構造推定」
- 26) 橋本扶美、北之園龍介、有島由紀子、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、石川英律、宮本信一：日本水環境学会九州沖縄支部研究発表会（2016）
「イミダクロプリドおよびジノテフランとその環境変化体(PTPWs)の河川水からの検出」
- 27) 高梨啓和、玉島由美子、有島由紀子、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、石川英律、宮本信一：第50回日本水環境学会年会（2016）
「衝突断面積解析による未知環境汚染物質の構造推定」
- 28) 有島由紀子、玉島由美子、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、石川英律、宮本信一：第50回日本水環境学会年会（2016）
「イオン移動度質量分析による農薬の未知環境変化体（PTPWs）の構造推定」
- 29) 橋本扶美、北之園龍介、有島由紀子、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、石川英律、宮本信一：第50回日本水環境学会年会（2016）
「イミダクロプリドおよびジノテフランとその環境変化体(PTPWs)の河川水中濃度測定」
- 30) 高梨啓和、橋本扶美、北ノ園龍介、有島由紀子、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、石川英律、宮本信一：日本質量分析学会第64回質量分析総合討論会（2016）
「高分解能LC/MSとLC/MS/MSを用いた実環境試料からの未知農薬変化体の検出」
- 31) 高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦：日本質量分析学会第64回質量分析総合討論会（2016）
「高分解能LC-MS、LC-IMS-MSおよび多変量解析を用いた未知環境汚染物質の探索」
- 32) F. HASHIMOTO, R. KITANOSONO, Y. ARISHIMA, H. TAKANASHI, T. NAKAJIMA, A. OHKI, T. UEDA, J. KADOKAWA, H. ISHIKAWA, N. MIYAMOTO: The Water and Environment Technology Conference 2016（2016）
“Occurrence of Dinotefuran and Its Transformation Products in River Waters”
- 33) 高梨啓和、橋本扶美、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、石川英律、宮本信一：環境科学会2016年会（2016）
「衝突断面積に基づいた未知物質の構造推定」
- 34) 橋本扶美、北之園龍介、有島由紀子、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、石川英律、宮本信一：環境科学会2016年会（2016）
「ネオニコチノイド系農薬とその環境変化体(PTPWs)の河川水中濃度測定」
- 35) 高梨啓和、橋本扶美、大葉佐世子、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、石川英律、宮本信一：第19回日本水環境学会シンポジウム（2016）
「イオン移動度分析と分子動力学計算に基づいた未知変化体の構造推定」

- 36) 橋本扶美、北ノ園龍介、有島由紀子、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、石川英律、宮本信一：第19回日本水環境学会シンポジウム（2016）
「ネオニコチノイド系農薬ジノテフランおよびその環境変化体の河川水中濃度」
- 37) F. HASHIMOTO, H. TAKANASHI, T. NAKAJIMA, A. OHKI, T. UEDA, J. KADOKAWA, H. ISHIKAWA and M. MIYAMOTO : The 25th Japan-Korea Symposium on Water Environment (2016)
“A technique for detecting trace transformation products in water environments without authentic standard compounds”
- 38) 橋本扶美、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、石川英律、宮本信一：第51回日本水環境学会年会（2017）
「標準物質を入手できない農薬環境変化体の環境モニタリング」
- 39) 大葉佐代子、橋本扶美、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、石川英律、宮本信一：第51回日本水環境学会年会（2017）
「殺虫剤環境変化体の合成と環境モニタリング」
- 40) 高梨啓和、大葉佐世子、橋本扶美、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、石川英律、宮本信一：第51回日本水環境学会年会（2017）
「農薬変化体の構造を推定するための衝突断面積測定方法の検討」
- 41) 上田岳彦、高梨啓和、門川淳一：日本化学会第97春季年会（2017）
「農薬の環境変化体イオンのESI気化速度の推定」
- 42) 高梨啓和、上田岳彦：第6回イオン移動度研究会、日本質量分析学会第68回イオン反応研究会・第157回質量分析関西談話会合同研究会開催（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 イオン移動度質量分析法によるアプローチ」
- 43) 高梨啓和：分析化学会九州支部機器分析ワークショップ in 長崎（2017）
「高分解能フーリエ変換型質量分析計（Orbitrap）と超高感度三連四重極型質量分析計LC-MS/MSを組み合わせた無標準LC-MS/MS測定」
- 44) 橋本扶美、大葉佐世子、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、門川淳一、石川英律、宮本信一：環境化学会第26回環境化学討論会（2017）
「未知環境変化体の構造推定のための衝突断面積解析技術の開発」

（３）知的財産権

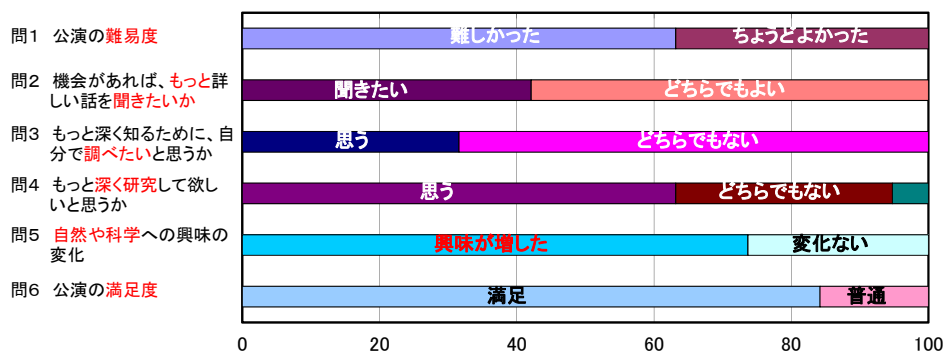
- 1) 高梨啓和、上田岳彦、門川淳一：国立大学法人鹿児島大学；「濃度推定方法」、特願2015-36501、2015年2月26日出願

（４）「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 福岡県立筑前高等学校における特別授業「農薬の安全性について考える」（平成26年6月23日、聴講者19名）

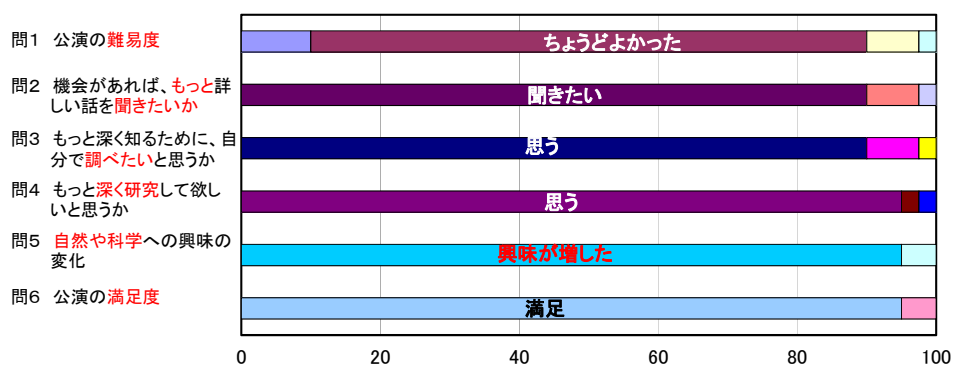
演者：高梨啓和

図(1)-31 国民との科学・技術対話（平成26年6月23日実施分）のアンケート調査結果



2) 鹿児島大学工学部公開（平成26年8月2日、参加人数40名）にて成果紹介

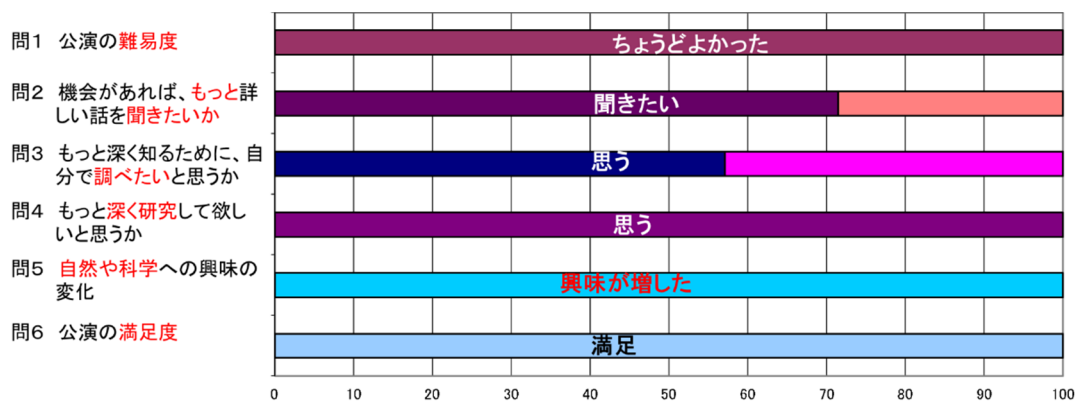
場所：鹿児島大学工学部、公演タイトル：農薬の安全性について考える、演者：高梨啓和



図(1)-32 国民との科学・技術対話（平成26年8月2日実施分）のアンケート調査結果

3) 平成27年度教員免許状更新講習（平成27年9月26日、参加人数7名）にて成果紹介

場所：鹿児島大学工学部、公演タイトル：最新鋭の質量分析技術を用いて環境中の農薬類を分析する際の原理と測定結果、演者：高梨啓和



図(1)-33 国民との科学・技術対話（平成27年9月26日実施分）のアンケート調査結果

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

1) 学生ポスター発表賞（最優秀賞）

橋本扶美：第49回日本水環境学会年会(2015)

「未知環境変化体（PTPWs）の構造推定と半定量分析：ネオニコチノイド系農薬imidaclopridを例として」

2) 学生優秀発表賞

有島由紀子：平成27年度日本水環境学会九州沖縄支部研究発表会(2016)

「イオン移動度質量測定による農薬の未知環境変化体（PTPWs）の構造推定」

3) 学生優秀発表賞

橋本扶美：日本水環境学会第50回日本水環境学会年会(2016)

「イミダクロプリドおよびジノテフランとその環境変化体（PTPWs）の河川水中濃度測定」

4) The WET Excellent Presentation Award

F.HASHIMOTO: The Water and Environment Technology Conference 2016 (2016)

“Occurrence of Dinotefuran and Its Transformation Products in River Waters”

8. 引用文献

- 1) 内閣府食品安全委員会農薬専門調査会、2013、農薬評価書（案） γ -BHC（リンデン）、URL. <http://search.e-gov.go.jp/servlet/PcmFileDownload?seqNo=0000095972>(2017年4月時点)
- 2) 内閣府食品安全委員会、2005、農薬評価書 ジノテフラン、URL. <http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/index.htm>（2011年5月時点）
- 3) 高梨啓和、浜崎賢太、加藤雄介、中島常憲、大木 章、近藤貴志、亀屋隆志、松下 拓、2013、水環境中で生成する農薬変化体の文献研究、水環境学会誌、36(2)、29-38.
- 4) 内閣府食品安全委員会、2008、農薬評価書 アセタミプリド、URL. <http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/index.htm>（2011年5月時点）
- 5) 内閣府食品安全委員会、2007、農薬評価書 イミダクロプリド、URL. <http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/index.htm>（2011年5月時点）
- 6) Hiroyasu Aizawa, 2009. Metabolic maps, Pesticides, Environmentally Relevant molecules and biologically active molecules, Academic Press, MA, USA, p.330.
- 7) Moza,P.N., Hustert,K, Feicht, Kettrup,A., 1998. Photolysis of imidacloprid in aqueous solution, Chemospher. 36(3), 497-592.
- 8) Tao Ding, David Jacobs and Barry K.Lavine, 2011. Liquid chromatography-mass spectrometry identification of imidacloprid photolysis products. Microchemical Journal 99(2), 535–541.
- 9) 内閣府食品安全委員会、2006、農薬評価書（第2版） クロチアニジン、URL. <http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/index.htm>（2011年5月時点）
- 10) 内閣府食品安全委員会、2008、農薬評価書 チアメトキサム、URL. <http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/index.htm>（2011年5月時点）
- 11) de Urzedo AP, Diniz ME, Nascentes CC, Catharino RR, Eberlin MN, Augusti R., 2007. Photolytic degradation of the insecticide thiamethoxam in aqueous medium monitored by direct infusion

- electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 42(10), 1319-25.
- 12) Terence Roberts and David Herd Hutson (Eds.) 1999. *Metabolic pathways of agrochemicals: Insecticides and fungicides*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
 - 13) Shirley Lee Chao and John E. Casida, 1997. Interaction of imidacloprid metabolites and analogs with the nicotinic acetylcholine receptor of mouse brain in relation to toxicity. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 58, 77–88.
 - 14) Olga Malev, Roberta Sauerborn Klobučar, Elsa Fabbretti, Polonca Trebše, 2012. Comparative toxicity of imidacloprid and its transformation product 6-chloronicotinic acid to non-target aquatic organisms: Microalgae *Desmodesmus subspicatus* and amphipod *Gammarus fossarum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 104, 178-186.
 - 15) Francisco Sánchez-Bayo, Ross V. Hyne, 2014. Detection and analysis of neonicotinoids in river waters-Development of a passive sampler for three commonly used insecticides. *Chemosphere* 99, 143–151.
 - 16) E.P. Benton, J.F. Grant, T.C. Mueller, R.J. Webster, R.J. Nichols, 2016. Consequences of imidacloprid treatments for hemlock woolly adelgid on stream water quality in the southern Appalachians. *Forest Ecology and Management* 360, 152–158.
 - 17) M.F.Mesleh, J.M.Hunter, A.A.Shvartsburg, G.G.Schants and M.F.Jarrold, 1996. Structural information from ion mobility measurements: effects of the long-range potential. *The Journal of Physical Chemistry*, 100, 16082-16086; Erratum, 1997. *The Journal of Physical Chemistry A*, 101, 968.
 - 18) Iain Campuzano, Matthew F.Bush, Carol V.Robinson, Claire Beaumont, Keith Richardson, Hyungjun Kim and Hugh I.Kim, 2012. Structural Characterization of Drug-like Compounds by Ion Mobility Mass Spectrometry: Comparison of Theoretical and Experimentally Derived Nitrogen Collision Cross Sections. *Analytical Chemistry*, 84 (2), 1026–1033.
 - 19) Fenn, J.B., 1993. Ion formation from charged droplets: roles of geometry, energy, and time. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 4, 524-535.
 - 20) 一般社団法人日本植物防疫協会編、2014. 農薬要覧－2014－、一般社団法人日本植物防疫協会、東京、 pp.757.
 - 21) 一般社団法人日本植物防疫協会編、2015. 農薬要覧－2015－、一般社団法人日本植物防疫協会、東京、 pp.767.
 - 22) 一般社団法人日本植物防疫協会編、2016. 農薬要覧－2016－、一般社団法人日本植物防疫協会、東京、 pp.774.
 - 23) 一般社団法人日本植物防疫協会編、2013. 農薬作用機構分類一覧、一般社団法人日本植物防疫協会、東京、 pp.117.
 - 24) 社団法人日本植物防疫協会編、2011. 農薬ハンドブック 2011年版、社団法人日本植物防疫協会、東京、 pp.689.
 - 25) 一般社団法人日本植物防疫協会編、2014. 農薬適用一覧表 2014年版、一般社団法人日本植物防疫協会、東京、 pp.966.
 - 26) 利部伸三、1996、ネオニコチノイド系化合物の合成と殺虫活性に関する研究、日本農薬学

会誌 21(2)、231-239.

- 27) Izuru Yamamoto, Goro Yabuta, Motohiro Tomizawa, Takayuki Saito, Toru Miyamoto and Shinzo Kagabu, 1995. Molecular Mechanism for Selective Toxicity of Nicotinoids and Neonicotinoids. *Journal of Pesticide Science* 20(1), 33–40.
- 28) Kazuhisa Kiriya, Kazuko Iwaya, Shinzo Kagabu and Keiichi Nishimura, 2001. Relationship between Insecticidal and Nerve Activities of an Imidacloprid-related Nitromethylene Compound and Its N-Alkyl Congeners. *Journal of Pesticide Science* 26(1), 55–59.
- 29) Takeo Wakita, Katsutoshi Kinoshita, Eiichi Yamada, Naoko Yasui, Nobuyuki Kawahara, Atsuko Naoi, Michihiko Nakaya, Koichi Ebihara, Hirozumi Matsuno and Kenji Kodaka, 2003. The discovery of dinotefuran: a novel neonicotinoid. *Pest Management Science* 59(9), 1016–1022.
- 30) Takeo Wakita, 2011. Molecular Design of Dinotefuran with Unique Insecticidal Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(7), 2938–2942.
- 31) 脇田健夫、2008、ネオニコチノイド系殺虫剤ジノテフランの創出、有機合成化学協会誌 66(7)、716-720.
- 32) Takeo Wakita, Katsutoshi Kinoshita, Kenji Kodaka, Naoko Yasui, Atsuko Naoi and Sinichi Banba, 2004. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Dinotefuran Derivatives: Modification in the Tetrahydro-3-furylmethyl Part. *Journal of Pesticide Science* 29(4), 356–353.
- 33) Takeo Wakita, Katsutoshi Kinoshita, Naoko Yasui, Eiichi Yamada, Nobuyuki Kawahara and Kenji Kodaka, 2004. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Dinotefuran Derivatives: Modification in the Nitroguanidine Part. *Journal of Pesticide Science* 29(4), 348–355.
- 34) Édith Nicol, Christophe Genty, Stéphane Bouchonnet, Sophie Bourcier, 2015. Structural elucidation of metolachlor photoproducts by liquid chromatography/high-resolution tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 29(23), 2279–2286.
- 35) Filip Cuyckens, Carola Wassvik, Russell J. Mortishire-Smith, Gary Tresadern, Iain Campuzano and Jan Claereboudt, 2011. Product ion mobility as a promising tool for assignment of positional isomers of drug metabolites. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 25(23), 3497–3503.
- 36) 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課、2005、平成16年度(2004年度)版「化学物質と環境」、平成16年度版資料編、モニタリング調査マニュアル、環境省、URL. <https://www.env.go.jp/chemi/kurohon/http2004/02moni-manu/02pdf/sec2-02.pdf> (2017年5月時点)
- 37) 厚生労働省医薬食品局審査管理課長、医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン、URL. <https://www.pmda.go.jp/files/000157722.pdf> (2017年5月時点)
- 38) 気象庁、2017. 各種データ・資料、過去の気象データ検索、1時間ごとの値、URL. http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/hourly_s1.php?prec_no=88&block_no=47823&year=2016&month=06&day=12&view=p1 (2017年5月時点)
- 39) 環境省、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関する資、エトフェンプロックス、URL. http://www.env.go.jp/water/sui-kaitei/kijun/rv/a08_etofenprox.pdf (2017年5月時点)

(2) 環境変化体の合成と精製

鹿児島大学

大学院理工学研究科化学生命・化学工学専攻 機能高分子化学研究室 門川 淳一

平成26～平成28年度累計予算額 15,135千円（うち平成28年度2,850千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

ネオニコチノイド系農薬の一種であるイミダクロプリドのトキシコフォアが保存された既知の環境変化体5物質の合成を行った。5物質とも合成が確認され、そのうち3物質は精製まで達成し、サブテーマ（1）および（3）に供給することで質量分析の標準物質および急性毒性試験に用いられた。また、同じネオニコチノイド系農薬の一種であるジノテフランの既知環境変化体のうち、市販されていないデニトロ体、ウレア体の合成、精製を簡便な手法で達成した。さらに、詳細な分析により、合成したデニトロ体と同じ分子式をもつジノテフランの光照射変化体の構造を比較検討したところ、お互いに異性体の関係にあることが分かった。また、一次プロダクトイオンのフラグメンテーションパスイェイ解析により光照射サンプルの構造を推定した。これらのことから、光照射と同様な条件下で生成すると考えられる実環境中での変化体が、これまで報告されてきた構造と異なり新規環境変化体であることを見出した。さらにネオニコチノイド系農薬の対象農薬として選定したピレスロイド系殺虫剤エトフェンプロックスの市販されていない環境変化体の合成、精製も達成した。

[キーワード]

環境変化体、標準物質、トキシコフォア、ネオニコチノイド、有機合成

1. はじめに

農薬は、環境中で速やかに分解されて検出されないことが望ましいとされ、分解性が高い農薬が開発されてきた。しかし、ここでいう分解は一次分解であり、完全分解ではない場合がある。このため、環境水中から農薬の環境変化体（Pesticide Transformation Products in Water environments: PTPWs）が検出される場合がある。このような場合には、親農薬の生態リスクに加えて、PTPWsの生態リスクを調査する必要がある。しかし、親農薬と比較すると、水環境中でのPTPWsの濃度測定結果や生態毒性試験の結果は報告例が少なく、現状では生態リスクを評価することが困難である。報告例が少ない理由として、PTPWsの標準物質が市販されていない場合が多いこと、測定方法が検討されていない場合が多いことがあげられる。また、どのようなPTPWsが生成するのかが十分に明らかになっていない場合があると考えられる。

これらの傾向は、ネオニコチノイド系農薬(NNI)などの初回登録年度が新しい農薬で顕著である。NNIによるミツバチ等の陸生昆虫への生態影響について一般の関心が高まる中、日本においてはNNIが水稻航空防除で使用されていることから水生昆虫への影響が懸念されるが、NNIのPTPWsに着目した環境中濃度測定や生態毒性の検討はほとんど行われていない。

2. 研究開発目的

NNIの一種であるイミダクロプリドやジノテフランを中心に、市販が確認できないPTPWsを合成、精製し、質量分析の標準物質や急性毒性試験のために供給することを目的とした。合成を達成した物質は、サブテーマ (1) および (3) に供給した。特にイミダクロプリドのPTPWsについては親農薬のトキシコフォアが保存されている物質の合成を目的とし、安価な物質から高効率反応による合成経路を構築することで目的物質の合成を目指した。合成、精製を達成した物質は、サブテーマ (1) および (3) に供給した。また、ジノテフランの既知PTPWsのうち、市販されていないPTPWsの合成を行い、光照射による変化体との構造の比較を検討した。さらに、NNIの対照農薬として選定したエトフェンプロックスの構造が既知のPTPWs3物質のうち市販が確認されていない物質の合成を行った。

3. 研究開発方法

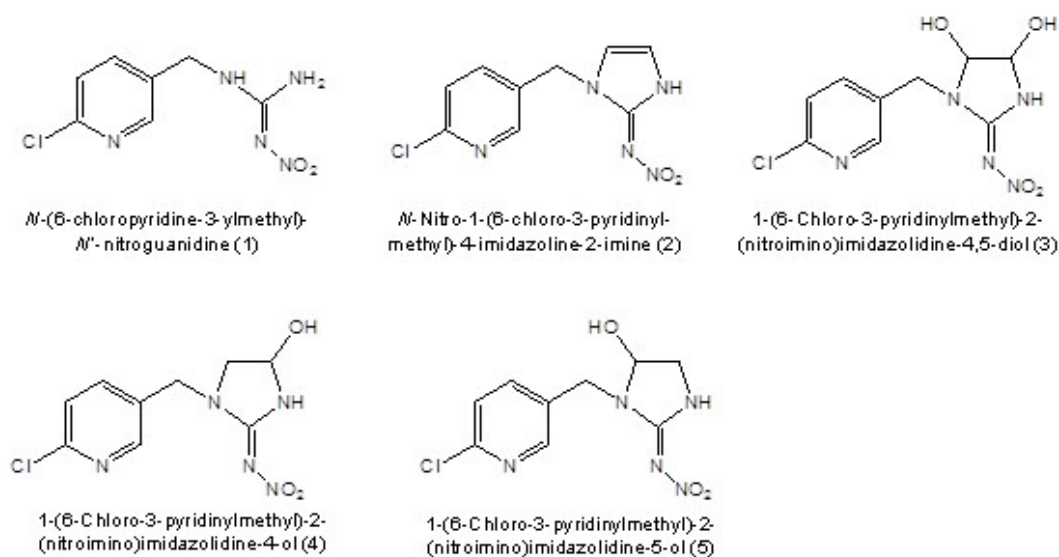
(1) イミダクロプリド環境変化体の合成と精製

構造が既知なPTPWsのうち、市販が確認されず、親農薬のトキシコフォアが保存されているイミダクロプリドPTPWs5物質 (1-5) の合成と精製を検討した(図(2)-1)。

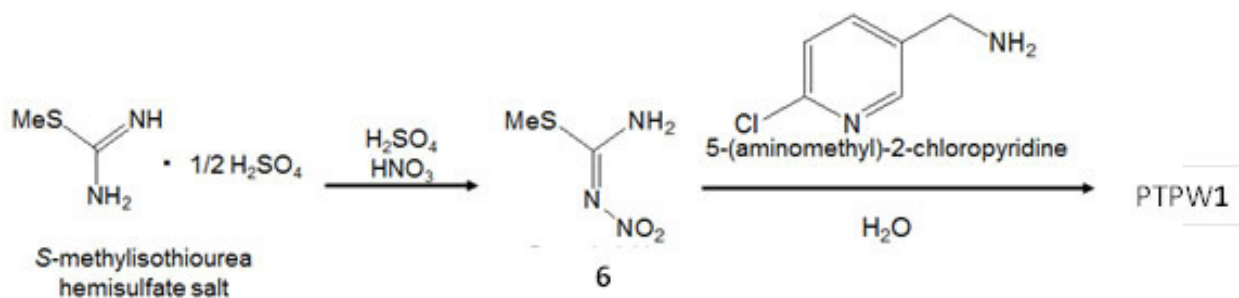
1) *N*-(6-クロロピリジン-3-イルメチル)-*N'*-ニトログアニジン(1、環開裂体) の合成と精製

N-(6-クロロピリジン-3-イルメチル)-*N'*-ニトログアニジン(1) の合成に関する論文に従い、PTPW1 の合成を検討した(図(2)-2) ¹⁾。まず、*S*-メチルイソチオ尿素ヘミ硫酸塩を硝酸/硫酸を用いてニトロ化し、*S*-メチル-*N*-ニトロイソチオウレア(6) を合成した²⁾。その後、化合物6 と、5-(アミノメチル)-2-クロロピリジンとの求核置換反応によりPTPW1 を合成した。

2) *N*-ニトロ-1-(6-クロロ-3-ピリジニルメチル)-4-イミダゾリン-2-イミン(2、オレフィン体) の合成と精製



図(2)-1 トキシコフォアが保存されているイミダクロプリドの PTPWs



図(2)-2 PTPW1 の合成経路

化合物6を原料とする*N*-ニトロ-1-(6-クロロ-3-ピリジニルメチル)-4-イミダゾリン-2-イミン(2)の合成に関する文献に従いPTPW2の合成を検討した³⁾。まず、化合物6とアミノアセトアルデヒドジエチルアセタールを反応させて、*N*-(2,2-ジエトキシエチル)-*N'*-ニトロウレア(7)を合成後、2-クロロ-5-(クロロメチル)ピリジンと反応させて前駆体混合物(8+9)を合成し、脱アセタール化反応により、PTPW2の合成を検討した(図(2)-3 Route 1)。また、最後に6-クロロ3-ピリジニルメチル基を導入する方法も報告されていたため⁴⁾、まず化合物7の脱アセタール化反応を行い、2-ニトロイミノ-4-イミダズジン(10)を合成した後に、化合物8と2-クロロ-5-(クロロメチル)ピリジンを反応させる方法も検討した(図(2)-3 Route 2)。

3) 1-(6-クロロ-3-ピリジニルメチル)-2-(ニトロイミノ)イミダゾリジン-4,5-ジオール (3、ジオール体) の合成と精製

図(2)-4に従いPTPW2を出発材料にしてオレフィン部分のオスミウム酸化により1-(6-クロロ-3-ピリジニルメチル)-2-(ニトロイミノ)イミダゾリジン-4,5-ジオール (3)の合成を検討した⁵⁾。

4) 1-(6-クロロ-3-ピリジニルメチル)-2-(ニトロイミノ)イミダゾリジン-4-オール (PTPW4、モノヒドロキシ体)、1-(6-クロロ-3-ピリジニルメチル)-2-(ニトロイミノ)イミダゾリジン-5-オール (PTPW5、モノヒドロキシ体) の合成と精製

PTPW2を原料とする水和反応を行うことでPTPW4とPTPW5の合成を検討した(図(2)-5)。今回は、酸触媒水和反応、ヒドロホウ素化・酸化反応、ウール・塩化パラジウム錯体およびShvo's触媒／塩化パラジウムを触媒とした水和反応を検討し、特にオレフィン水和に関する文献を参考に^{6,7)}、パラジウム触媒を用いて水和反応を詳細に検討した。粗生成物の¹H NMR、MS測定からPTPW4、PTPW5の生成の確認を行った。

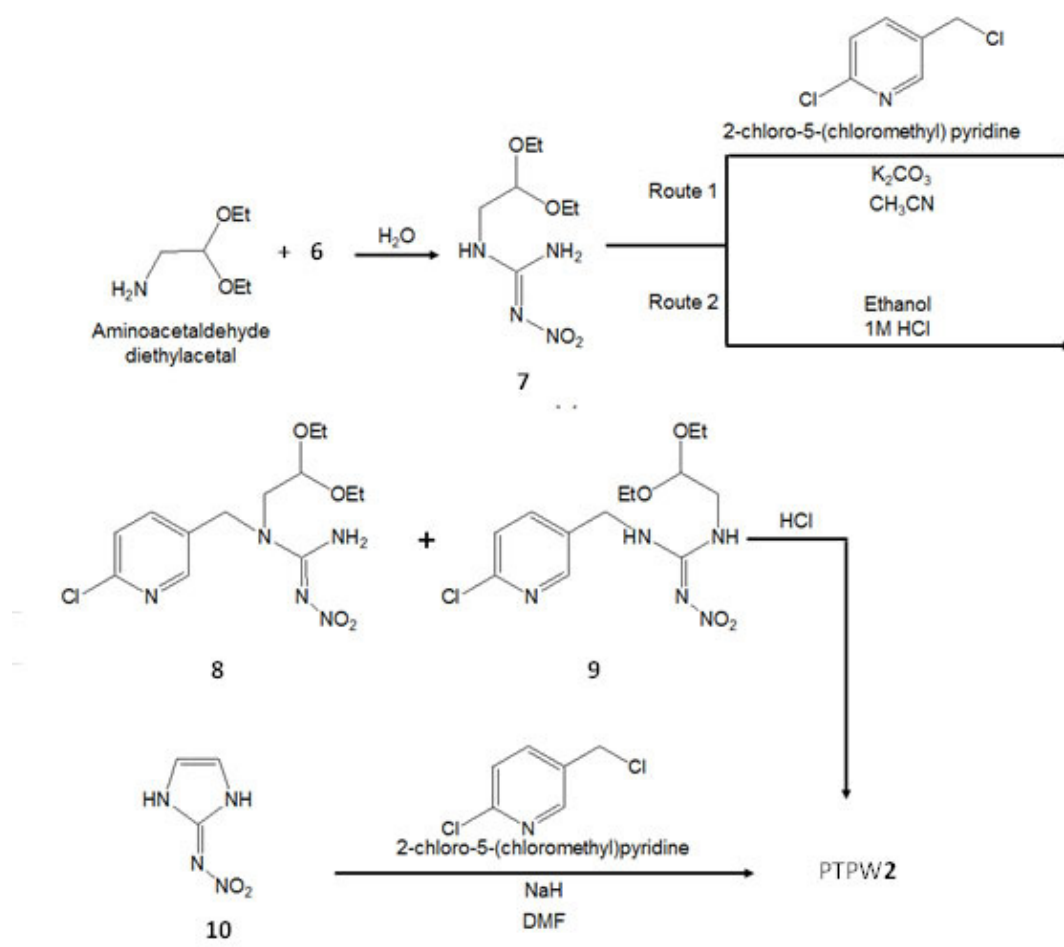
(2) ジノテフラン環境変化体の合成と精製

1) ジノテフランの酸加水分解

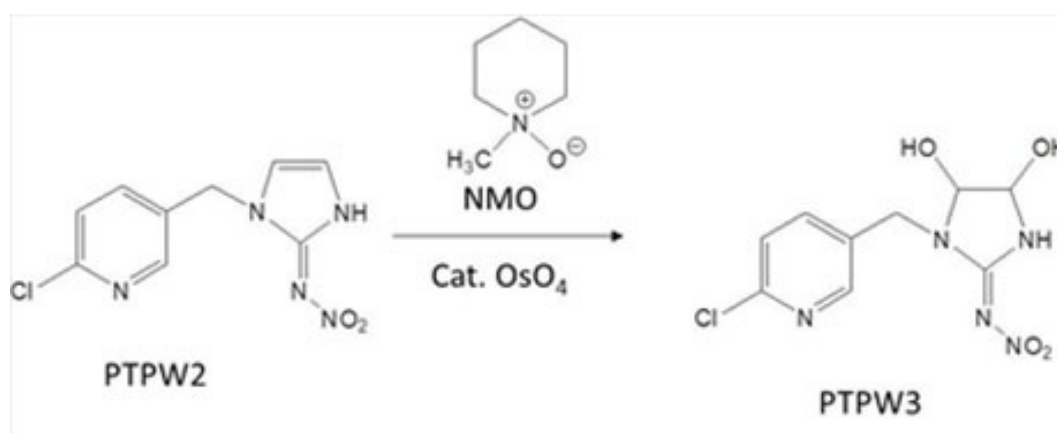
ジノテフランの既知PTPWsのうち、市販されていない1-メチル-3-((テトラヒドロフラン-3-イル)メチル)グアニジン(デニトロジノテフラン、11)および1-メチル-3-((テトラヒドロフラン-3-イル)メチル)ウレア(ウレア体、12)の合成を行った。すなわち、ジノテフランを酸性水溶液で処理するとニトログアニジン部位が加水分解を受けて、デニトロ体(11)およびウレア体(12)が生成すると予想し反応を行った(図(2)-6)。

2) デニトロジノテフランの詳細な合成確認と実環境サンプルからの検出⁸⁻¹²⁾

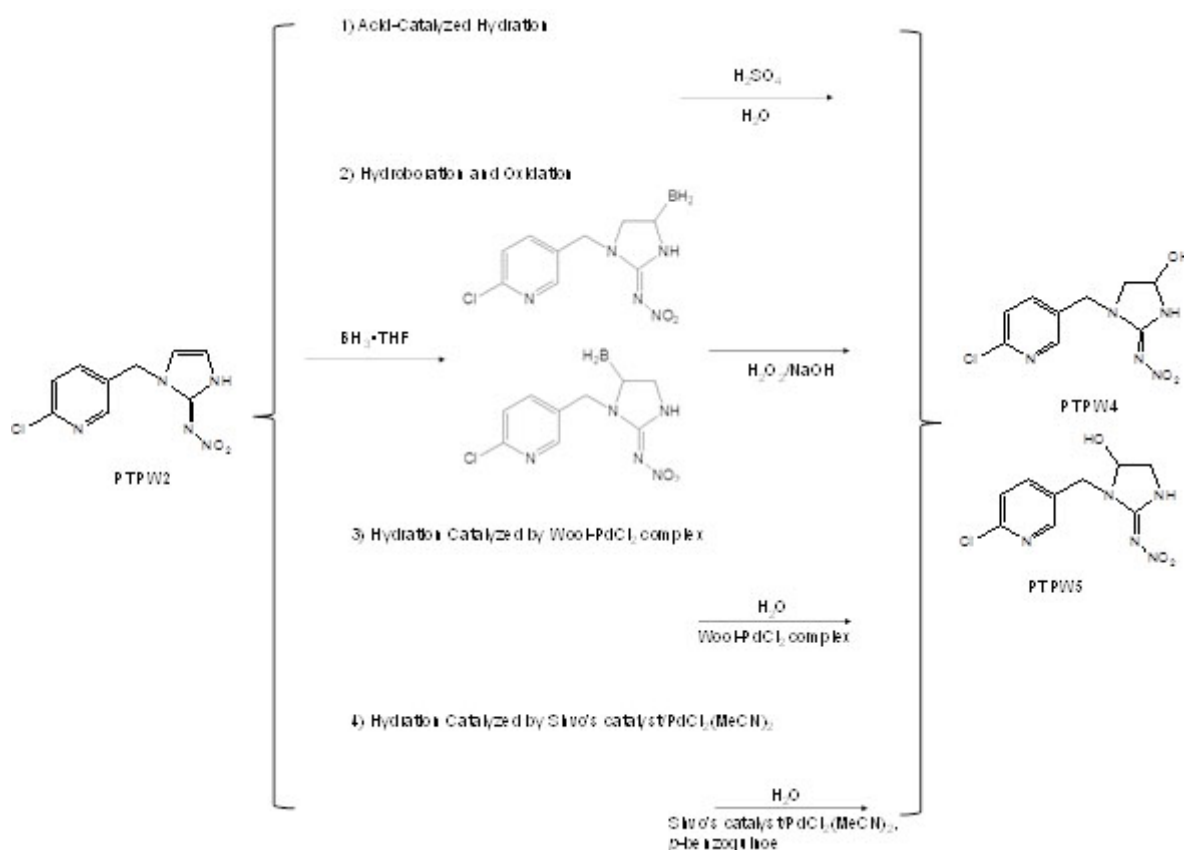
ジノテフランを酸加水分解して得たデニトロジノテフランの合成を確認した。試料として、ODSカラムを用いて分取・精製したデニトロジノテフラン水溶液(100 μM)を用いた。この際のデニ



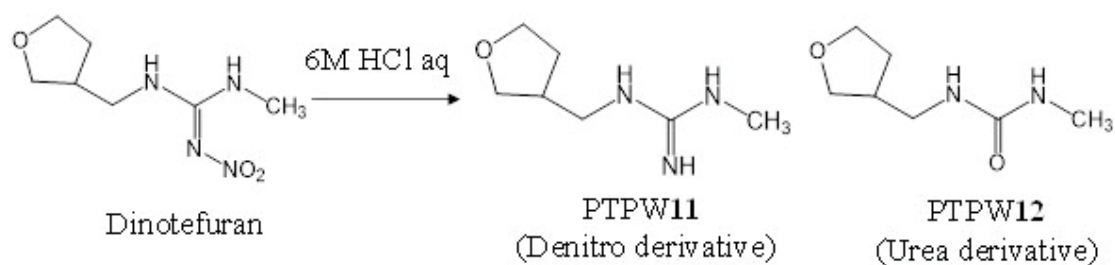
図(2)-3 PTPW2 の合成経路



図(2)-4 PTPW3 の合成経路



図(2)-5 PTPW4, PTPW5 の合成経路



図(2)-6 PTPW11, PTPW12 の合成経路

トロジノテフランの濃度は、精製後の純度を100%と仮定して求めた。合成の確認は、高分解能 LC/MS (UltiMate HPG-3400SD-LTQ Orbitrap XL, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて行った。LC/MSのイオン化モードはポジティブイオン化モードとし、ESIを用いてイオン化した。イオン化における Vaporizer Tempは380°C、Sheath Gas Flow、Auxiliary Gas Flow、Sweep Gas Flowはそれぞれ60, 20, 0 arbitrary unit、Capillary Tempは450°C、Source Voltageは2.5 kVとした。HPLCのカラムには、ODSカラム (Inert Sustain AQ-C18, 3 μ m, 2.1 x 75 mm, ジーエルサイエンス、東京) を用いた。カラム温度は40°C、注入量は1 μ Lとした。移動相Aは水 (LC/MS用、和光純薬工業、大阪)、移動相Bはメタノール (LC/MS用、和光純薬工業) で、両相にバッファーとして0.05 w/w%になる

ようにギ酸（LC/MS用、和光純薬工業）を添加した。最適化された分離条件は、以下のとおりである。流速；0.5 mL/min, 移動相B%；2 (0-0.5 min)、10 (4 min)、10 (4-5 min)、2 (5.1 min)、2 (5.1-10 min)。

一次プロダクトイオンスpekトルの取得は、リニアイオントラップを用いた衝突誘起解離（CID）により行った。コリジョンガスは、ヘリウムを用いた。CID測定時のプリカーサーイオンのisolation widthは、1.5 Da、Activation Timeは30 msec、コリジョンエネルギーの設定値は35%とした。

また、ジノテフランを酸加水分解して得たデニトロジノテフランと比較するために、ジノテフラン光照射サンプルおよびジノテフランの航空防除が実施された地域から採取した河川水濃縮サンプル中の同一 m/z の物質を同様に測定した。ジノテフラン光照射サンプルは、ジノテフラン標準品（和光純薬工業）を用いて調製した1 mMジノテフラン水溶液に、ロングパスフィルターWG295（ウシオ電機、東京）を透過したクセノンショートアークランプ（SX-UI501XQ、ウシオ電機）光を20.0～22.1℃で30時間照射し、水（LC/MS用、和光純薬工業）で10倍に希釈して得た。河川水濃縮サンプルは、鹿児島県肝属郡東串良町で採取した河川水をグラスファイバーフィルター（GC-50、アドバンテック東洋、東京）で減圧濾過した後、予め洗浄・コンディショニングしたSep-Pak PS-2とSep-Pak AC-2（日本ウォーターズ、東京）に750 mL通水し、3 mLのギ酸:水：メタノール=2:5:93 v/vおよび3 mLのギ酸:水：アセトン=2:5:93 v/vを用いて脱離し、窒素気流下で溶媒を除去して水に転溶して得た。水に転溶したサンプルの濃縮倍率は、750倍とした。濃縮したサンプルは、孔径0.22 μm のナイロン製メンブレンフィルター（島津ジーエルシー、東京）を用いてろ過した後、高分解能LC/MSでの測定に供した。

一次プロダクトイオンのフラグメンテーションパスウェイ解析は、測定結果から得られたニューートラルロスと、仮定したプリカーサーイオンの極限構造に基づいて、charge siteを起点としたイオン開裂が主に起こると仮定し、charge siteや水素の転位、McLafferty rearrangementなどの各種転位反応を考慮して解析した。解析は、強度の強いイオンを中心に、 m/z が大きく、プリカーサーイオンの部分構造を保持しているイオンを対象として実施した。解析結果は、スペクトル解析支援ソフトウェア（Mass Frontier 7.0 SR3, Thermo Fisher Scientific）を用いて確認した。フラグメンテーションパスウェイ解析により妥当性が確認された分析種の構造は、半経験的分子軌道計算ソフトウェア（SCIGRESS MO Compact、富士通、東京）を用いてハミルトニアンをPM6として最適化し、標準生成熱 ΔH_f を求めて安定性を評価した。

（3）エトフェンプロックス環境変化体（13）の合成と精製

ピレスロイド系殺虫剤エトフェンプロックスの構造が既知のPTPWs3物質のうち市販が確認されていない3-フェノキシ安息香酸2-(4-エトキシフェニル)-2-メチルプロピル（PTPW13）について、3-フェノキシ安息香酸に塩化チオニルを作用させて対応するカルボン酸塩化物に変換した後、2-(4-エトキシフェニル)-2-メチルプロパン-1-オールとのエステル化反応により合成を検討した(図(2)-7)。

4. 結果及び考察

（1）イミダクロプリド環境変化体の合成と精製

1) *N*-(6-クロロピリジン-3-イルメチル)-*N'*-ニトログアニジン(1、環開裂体) の合成と精製

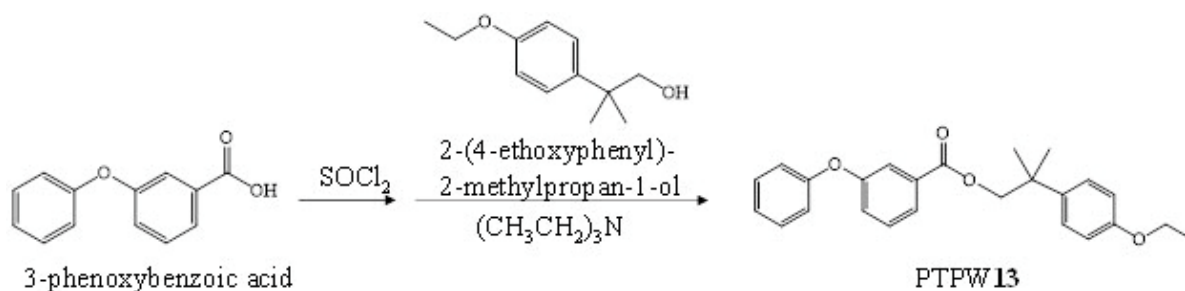
PTPW1 を合成するため、*S*-メチルイソチオ尿素ヘミ硫酸塩のニトロ化を行った。*S*-メチルイソ

チオ尿素ヘミ硫酸塩を硝酸/硫酸(1/3 (v/v)) に添加し0℃ で3時間攪拌した。反応液を冷水から再沈殿することにより生成物を単離し、¹H NMR 測定により化合物**6** の構造を確認した(図(2)-8); δ 2.61 (CH₃-S-)。

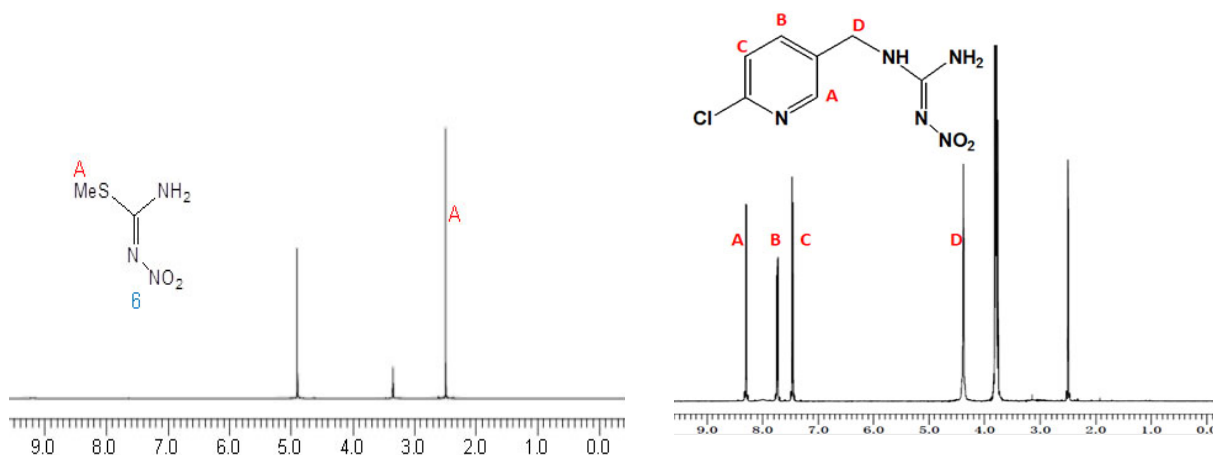
次に、エタノールを溶媒に用い化合物**6** と5-(アミノメチル)-2-クロロピリジンとを混合し、80℃ で反応させたところ低収率(1%) であった。そこで反応条件を検討したところ、溶媒に水を用いた場合に反応が促進され、室温で24時間攪拌後、得られた生成物をメタノールで洗浄することで単離した生成物の収率が58% であった。単離した生成物の¹H NMRおよびMS測定結果によりPTPW1 の構造を確認した(図(2)-9、図(2)-10); δ 8.35 (-N-CH-C-), 7.77 (- (CCl)-C-CH-C-), 7.52 (-C-CH-(CCl)-), 4.42 (-CH₂-), m/z 230.0441 (C₇H₉O₂N₃Cl)。得られたPTPW1 をサブテーマ (1) および (3) に供給した。

2) *N*-ニトロ-1-(6-クロロ-3-ピリジニルメチル)-4-イミダゾリン-2-イミン(2、オレフィン体) の合成と精製

水に分散させた化合物**6**にアミノアセトアルデヒドジエチルアセタールを滴下して、室温で3時間攪拌し、沈殿した生成物を減圧乾燥により単離した。得られた生成物の¹H NMR 測定より化合物**7** の構造を確認した(図(2)-11); δ 4.56(-O-CH(CH₂)-O-), δ 3.78, 3.68 (-CH₂-O-), 3.45 (-CH₂-N-), 1.24 (-CH₃)。

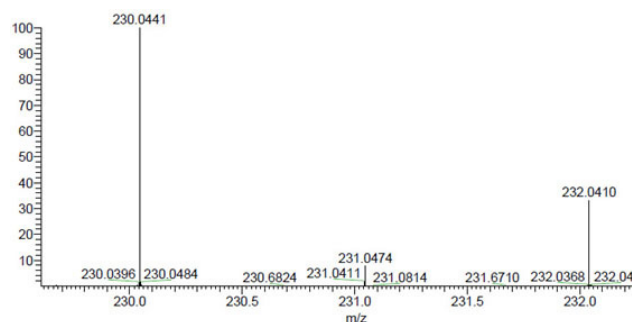


図(2)-7 PTPW13 の合成経路

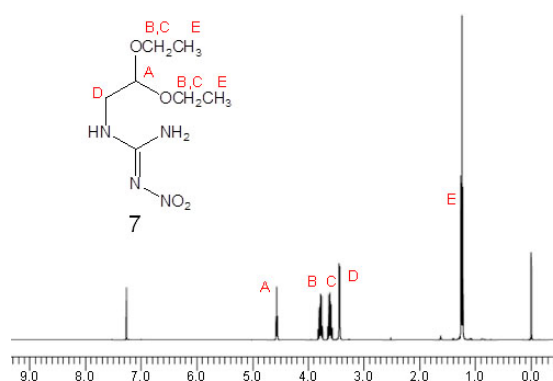
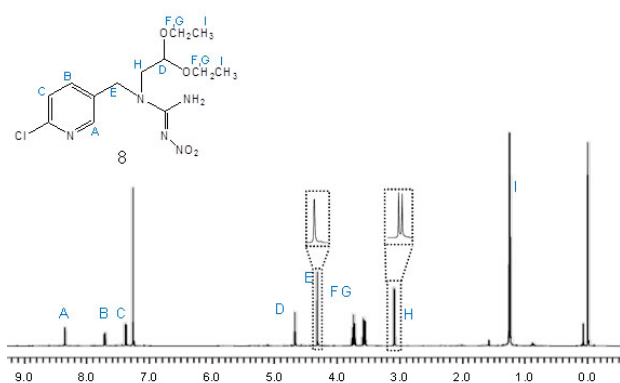
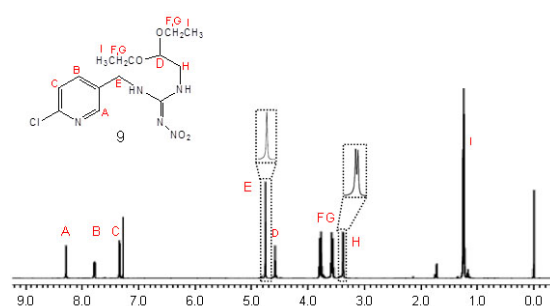


図(2)-8 化合物 **6** の ¹H NMR 測定結果(CD₃OD)

図(2)-9 PTPW1 の ¹H NMR 測定結果
(DMSO-*d*₆)

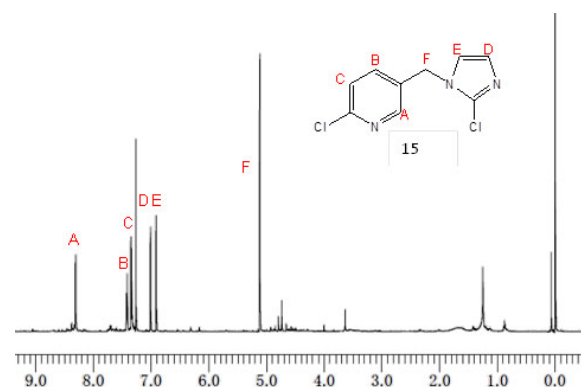


図(2)-10 PTPW1 の MS 測定結果

図(2)-11 化合物 7 の ^1H NMR 測定結果 (CDCl_3)図(2)-12 化合物 8 の ^1H NMR 測定結果(CDCl_3)図(2)-13 化合物 9 の ^1H NMR 測定結果(CDCl_3)

次に、化合物7と2-クロロ-5-(クロロメチル)ピリジンをアセトニトリルに溶解させ、炭酸カリウム存在下アルゴン雰囲気下で24時間還流した。反応後、炭酸カリウムをろ別し、溶液を濃縮後、得られた粗生成物からカラムクロマトグラフィ(酢酸エチル/ヘキサン 1/1(v/v))を用いて2種類の前駆体をそれぞれ単離した。単離後の生成物の ^1H NMR 測定結果から、前駆体の構造を確認した(図(2)-12、図(2)-13);前駆体8; δ 8.35 (-N-CH-C-), 7.72 (-CCl)-C-CH-C-), 7.38 (-C-CH-(CCl)-), 4.68 (-O-CH(CH₂)-O-), 4.32 (-C-CH₂-N-), 3.74, 3.57 (-CH₂-O-), 3.09 (-C-CH₂-N-), 1.24 (-CH₃), 前駆体9; δ 8.28 (-N-CH-C-), 7.76 (-CCl)-C-CH-C-), 7.33 (-C-CH-(CCl)-), 4.75 (-C-CH₂-N-), 4.58 (-O-CH(CH₂)-O-), 3.78, 3.57 (-CH₂-O-), 3.38 (-C-CH₂-N-), 1.24 (-CH₃)。

単離した前駆体に濃塩酸を添加し、20℃で60時間攪拌した。反応後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で中和し、クロロホルムにより抽出することで生成物を単離した。単離した生成物の ^1H NMR 測定よりアセタール基由来のピークの消失とHC=CH 由来のピークの生成が確認されたこ

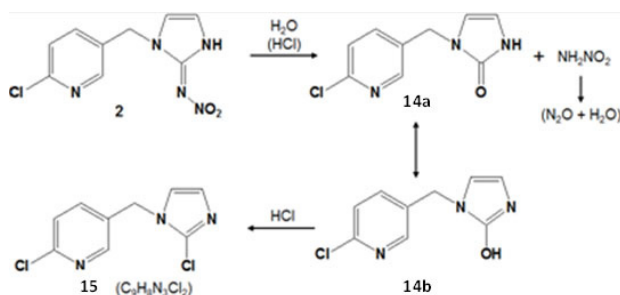
図(2)-14 化合物 15 の ^1H NMR 測定結果(CDCl_3)

とから、脱保護が完全に進行したことが分かった(図(2)-14); δ 8.42 (-N-CH-C-), 7.35 (- (CCl)-C-CH-C-), 7.26 (-C-CH-(CCl)-), 6.98, 6.85 (-N-CH-C-), 5.05 (-C-CH₂-N-)。しかし、生成物のMSの結果、 m/z 228.0089であり、理論値(253.0367)と異なっており、分子式がC₉H₈N₃Cl₂と推定され、化合物**15**の生成が示唆された。

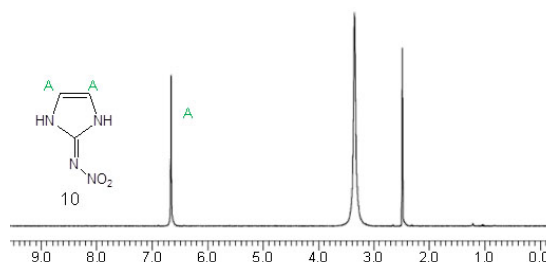
そこで、より穏やかな条件で脱アセタール反応を行ったところ、MS およびIR 測定よりウレア誘導体(**14a**)の形成が確認された。また前駆体**8+9**のIR 測定においてC=N結合由来の吸収が見られたため、互変異性を示さず塩基性が強いことが示唆された。したがって、前駆体**8+9**はアセタール基の脱保護の際にニトロアミン部位が酸加水分解しウレア誘導体(**14a**)に変化し、塩素と置換したと考えられた(図(2)-15)。

そこで、互変異性を有し塩基性が弱い化合物**7**のアセタール基の脱保護を先に行い、その後、2-クロロ-5-(クロロメチル)ピリジンと反応させPTPW**2**の合成を検討した。エタノールに溶解させた化合物**7**に1M 塩酸水溶液を添加し20℃で24時間撹拌した。反応液をクロロホルムで洗浄し、濃縮後さらにエタノールで抽出することで生成物を単離した。単離した生成物の¹H NMR 測定より、アセタール基由来のピークの消失とHC=CH由来のピークの生成が確認されたことから、アセタール基の脱保護が完全に進行したことが確認された(図(2)-16); δ 6.67 (-C-CH-N-)。

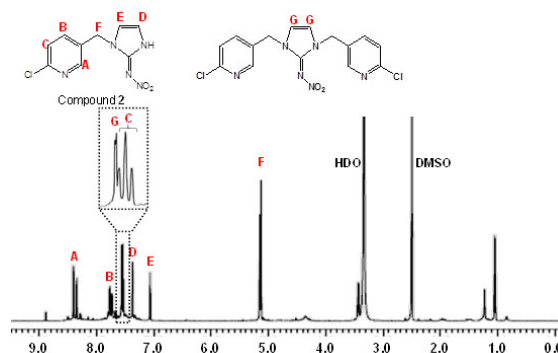
得られた化合物**10**をDMFに溶解させ水素化ナトリウム存在下で2-クロロ-5-(クロロメチル)ピリジンを添加し20℃で18時間撹拌した。反応後、水素化ナトリウムをろ別し、ろ液を80℃で減圧乾燥した。反応物の¹H NMR およびMS測定結果から目的変化体**2**の合成が示唆された(図(2)-17、図(2)-18);



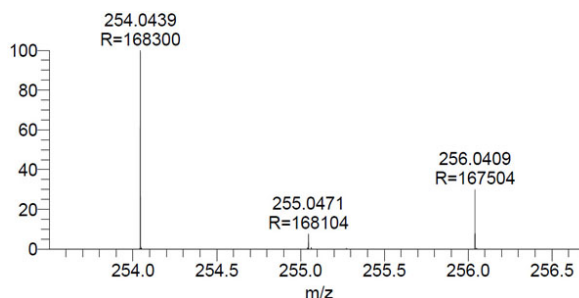
図(2)-15 MS 測定から推定される反応機構



図(2)-16 化合物**10**の¹H NMR 測定結果



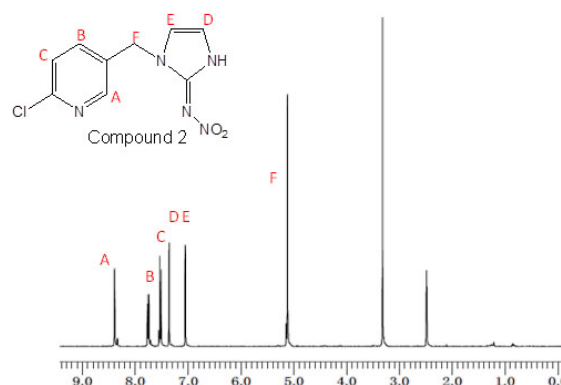
図(2)-17 PTPW**2** 合成混合物の¹H NMR 測定結果(DMSO-*d*₆)



図(2)-18 PTPW**2** 合成混合物のMS 測定結果

m/z 254.0439 ($C_9H_9O_2N_5Cl$)。

しかし、NMR 測定からは、2置換体も同時に存在していることも示唆された。そこでシリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒：クロロホルム/メタノール = 50/1）により目的PTPW2フラクションを単離した。その 1H NMR 測定結果から変化体2の構造が確認された(図(2)-19); δ 8.35 (-N-CH-C-), 7.76 (-C-CH-C-), 7.56 (-C-CH-(CCl)-), 7.37 (-N-CH-C-), 7.07 (-C-CH-N-), 5.13 (-C-CH₂-N-)。得られたPTPW2 をサブテーマ (1) および (3) に供給した。



図(2)-19 単離した PTPW2 の 1H NMR 測定結果(DMSO- d_6)

3) 1-(6-クロロ-3-ピリジニルメチル)-2-(ニト

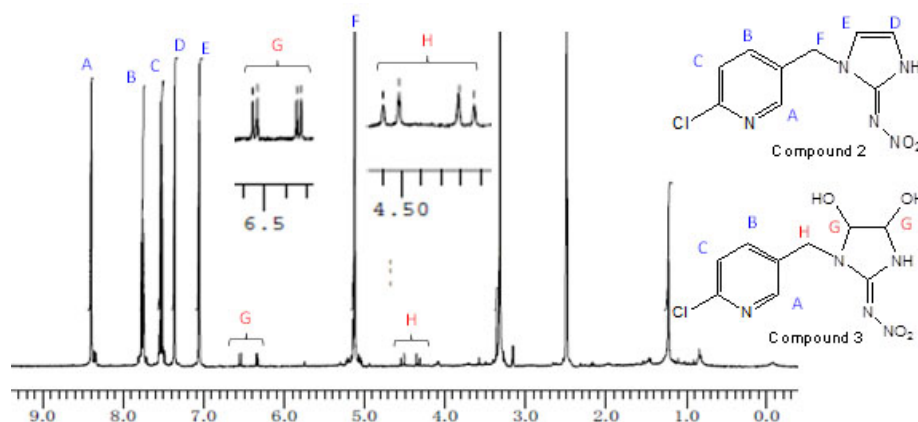
ロイミノ)イミダゾリジン-4,5-ジオール (3、ジオール体) の合成と精製

PTPW2を原料に用い、水/アセトン混合溶媒中、触媒量のOsO₄およびN-メチルモルホリンN-オキシド(NMO)を用いて室温で30分反応させてオレフィン部分の酸化によるPTPW3の合成を検討した。反応粗生成物の 1H NMR測定より、PTPW2由来のシグナルに加えて、わずかながらPTPW3由来の二種類のヘミアミナルメチンピーク(δ 6.34, 6.55 (-CH(-OH)-N-)) ,および隣接するヘミアミナル不斉炭素の影響による複数のベンジルピーク (δ 4.32-4.55) が観測され(図(2)-20)、PTPW3の生成が示唆された。

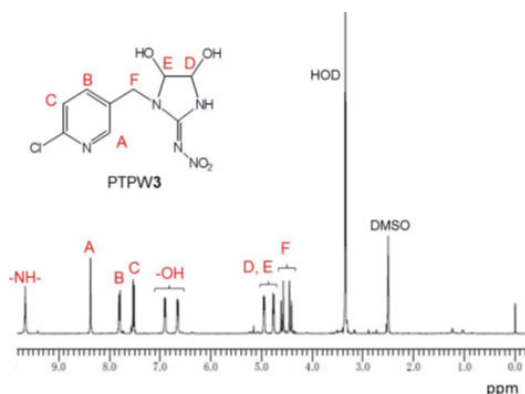
そこで、より高収率での合成のため様々な条件で検討を行った。一例として、PTPW2をアセトン/アセトニトリル混合溶媒に溶解し、OsO₄を加えた後、NMOの水溶液を加えて60°Cで1.5時間攪拌することで反応させた。1 mol/L NaHSO₃水溶液を加えて室温で10分間処理することで反応を停止し、反応液を濃縮した。上記では濃縮残査に水と有機溶媒を加えて抽出を行ったが、生成物は水溶性が高く、ほとんど有機溶媒で抽出されないことが分かった。そこで、濃縮残査にメタノールを加え無機塩等をろ別した後、ろ液をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し（展開溶媒：クロロホルム/メタノール=25/1）、生成物を単離した（単離収率27.4%）。単離生成物の 1H NMR 測定結果において

PTPW2 の -CH=CH-

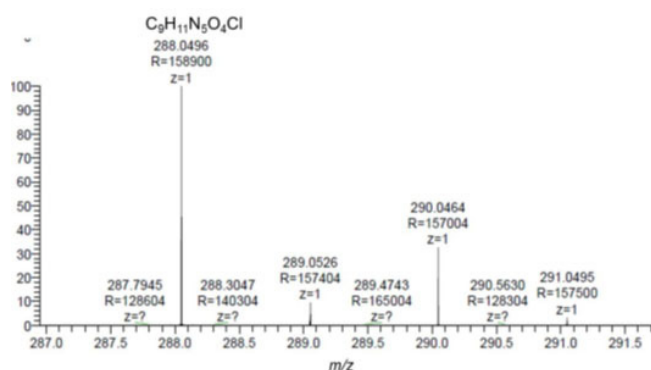
に由来するピークは観測されず、新たに-CHOHに由来するピークが観測され、さらに不斉炭素の生成の影響により-CH₂N-のピークが分裂していたことからPTPW3の構造が支持された(図(2)-21)。また、



図(2)-20 PTPW2 のオスミウム酸化による PTPW3 合成の反応混合物の 1H NMR 測定結果(DMSO- d_6)



図(2)-21 PTPW3 の ^1H NMR 測定結果
(DMSO- d_6)



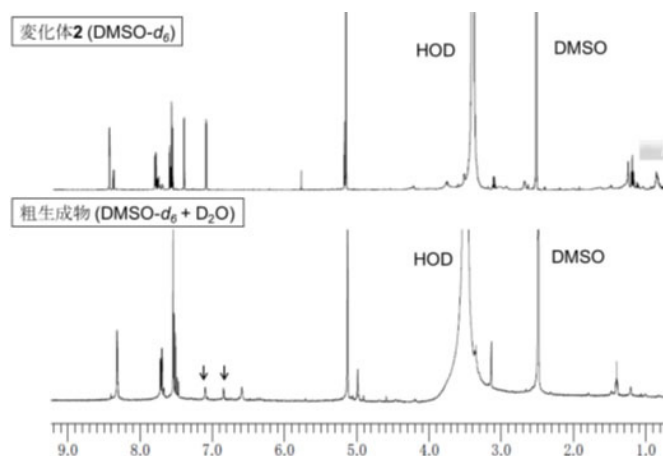
図(2)-22 PTPW3 の MS 測定結果

MS測定結果においてPTPW3の明確な分子量ピークが観測されたことから構造が支持された(図(2)-22)。 ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 451 (dd, CH_2 , 2H), 4.77, 4.95 (d, CH-OH , 2H), 6.66, 6.91 (d, OH, 2H), 7.53 (d, C-CH-(CCl), 1H), 7.80 (q, (CCl)-C-CH-C, 1H), 8.37 (d, -N-CH-C-, 1H), (s, NH, 1H); MS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 288.0496$ ($\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_4\text{Cl}$)。得られたPTPW3 をサブテーマ (1) および (3) に供給した。

4) 1-(6-クロロ-3ピリジニルメチル)-2-(ニトロイミノ)イミダゾリジン-4-オール (PTPW4、モノヒドロキシ体)、1-(6-クロロ-3ピリジニルメチル)-2-(ニトロイミノ)イミダゾリジン-5-オール (PTPW5、モノヒドロキシ体) の合成と精製

まず最も一般的な硫酸によるPTPW2の水和反応を検討した。PTPW2に31 wt%硫酸を加えて室温で15分間攪拌した。反応後炭酸水素ナトリウムを加えて中和し、反応液を濃縮して粗生成物を得た。得られた粗生成物の ^1H NMR 測定結果より、 $\text{HC}=\text{CH}$ 由来のピークが観測されオレフィンの水和反応が進行していないことが分かった。また、 $\text{HC}=\text{CH}$ 由来のピークが高磁場側へシフトしていることから、上記のように、酸によるニトロアミン部位が外れる副反応が起こっていることも示唆された。

そこで酸を用いない水和反応を検討した。具体的にはPTPW2のボラン・THF錯体を用いたヒドロホウ素化反応を行い、その後水酸化ナトリウム水溶液と過酸化水素水を用いて酸化反応を行なった。反応はPTPW2にTHFとボラン・THF錯体を加えて0℃で2時間攪拌し、メタノールを加えて反応を停止した後、反応液を濃縮して粗生成物を得た。得られた粗生成物の ^1H NMR 測定結果より、 $\text{HC}=\text{CH}$ 由来のピークの積分比が相対的に小さくなったことからヒドロホウ素化反応が進行したことが考えられた(図(2)-23、矢印)。そこで、この粗生成物



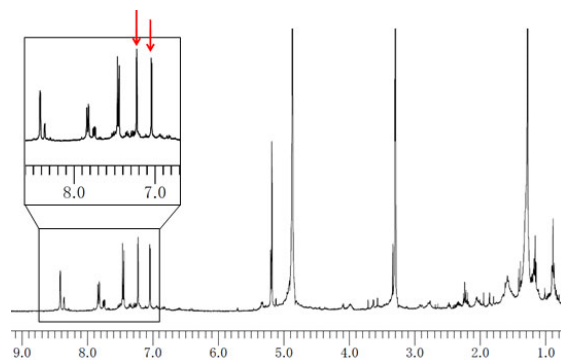
図(2)-23 ヒドロホウ素化反応前後 の ^1H NMR 測定結果(DMSO- d_6 (+ D_2O))

を用いて次の酸化反応を行なった。粗生成物に氷冷しながら3 M水酸化ナトリウム水溶液と30 %過酸化水素水を加えて50 °Cで2時間攪拌後、1 M塩酸を加えて中和し濃縮した。その後、エタノールを加えて沈殿物をろ別し、ろ液を濃縮・減圧乾燥を行うことで粗生成物を得た。しかし得られた粗生成物の¹H NMR及びMS 測定結果より、目的のPTPW4、PTPW5の構造は確認できなかった。

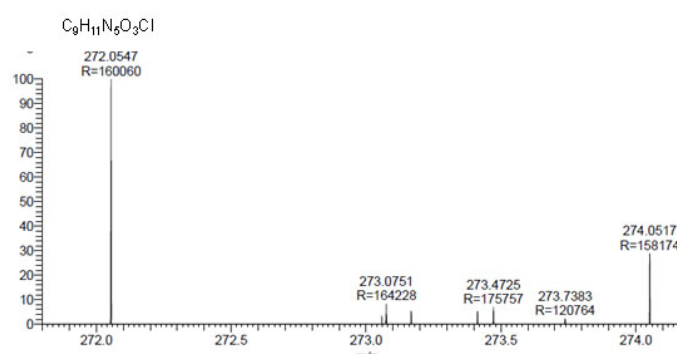
次に、Pd触媒を用いたPTPW2からの水和によるPTPW4、PTPW5の合成を行うため、まず、ウールに塩化パラジウムを担持させた触媒を調製した。ウールとPdCl₂をエタノール中で混合し、70°Cで5時間攪拌した。ろ過により残査を取り出し、乾燥させることでウール・PdCl₂錯体を調製した。

得られたウール・PdCl₂錯体触媒によるPTPW2の水和反応を種々の条件で検討した。一例として、PTPW2にエタノール、水、ウール・PdCl₂錯体、シクロヘキサノンおよび酢酸を加え、アルゴン雰囲気下、70 °Cで24時間攪拌した。反応後、ウール・PdCl₂錯体をろ別し、ろ液を濃縮することで粗生成物を得た。得られた粗生成物の¹H NMR測定結果より、PTPW2の-CH=CH- 由来のピークの積分比が相対的に小さくなり、目的の水和反応が進行したことが考えられた(図(2)-24、矢印)。そこで粗生成物のMS測定を行った結果(図(2)-25)、PTPW4、PTPW5の分子量ピークが観測されたことから、水和反応が進行しPTPW4、PTPW5が合成できていると考えられた(MS: [M+H]⁺ *m/z* = 272.0547 (C₉H₁₁N₅O₃Cl))。現在のところ、PTPW4、PTPW5のどちらか一方、あるいは両方が生成しているのか明らかでないが、原料のPTPW2構造からは位置選択的な水和が起こることは予想されにくく、両方が生成していると考えられる。

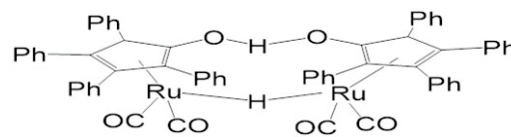
上記のようにパラジウム触媒による水和反応がPTPW4、5の合成に有効であることが分かったの



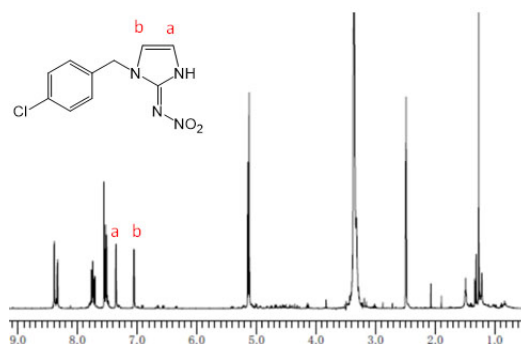
図(2)-24 PTPW2 のウール・PdCl₂ 錯体による水和反応素生成物の ¹H NMR 測定結果(CD₃OD)



図(2)-25 PTPW2 の水和反応粗生成物の MS 測定結果



図(2)-26 Shvo's 触媒



図(2)-27 PTPW2 の Shvo's 触媒／塩化パラジウム系による水和反応素生成物の ¹H NMR 測定結果(DMSO-*d*₆)

で、より有効な水和触媒として報告されているShvo's触媒／塩化パラジウム（図(2)-26）を用いた種々の条件でのPTPW2の水和反応によるPTPW4、5の合成を検討した。

一例として、PTPW2にp-ベンゾキノン、メタノール、2-プロパノール、水、上記触媒を加え、室温で2時間攪拌した。反応後ろ過し、ろ液を濃縮することで粗生成物を得た。しかし、得られた粗生成物の¹H NMR測定結果から、PTPW2の-CH=CH-由来のピークに変化が見られず、目的の水和反応が進行していないことが考えられた（図(2)-27）。すなわち、この触媒系でのPTPW4、PTPW5の合成は困難であることが示唆された。

（2）ジノテフラン環境変化体の合成と精製

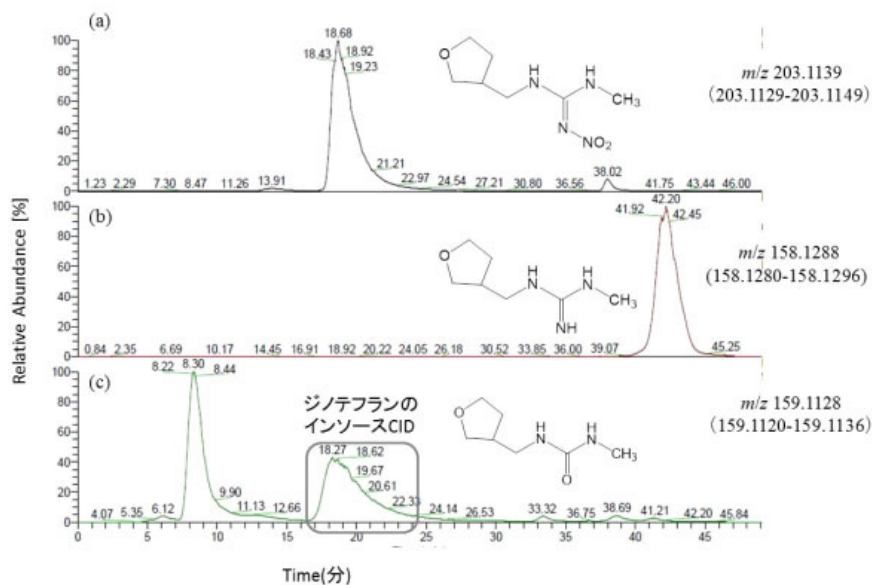
1）ジノテフランの酸加水分解

ジノテフラン水溶液に6M塩酸水溶液（80当量）を加え、室温で20分攪拌した後、98℃で32時間攪拌した。反応液を濃縮して水を留去した後、水酸化ナトリウム水溶液でpH10に調整した。得られた粗生成物水溶液からSep-Pak PS-2 PlusとSep-Pak AC-2 Plus（日本ウォーターズ）を直列に連結して固相抽出を行い、NaClを除去した。分取精製には、HPLC（LC-6A、島津製作所）－LTQ Orbitrap XL（Thermo Scientific, USA）を用いた。高分解能LC/MSによりPTPW11およびPTPW12の単離、精製を確認した（図(2)-28）。なお、図(2)-28(c)に観測されている20分付近のピークは、ジノテフランのピークとRTが同じであることから未反応の原料がMSのイオン源および差動排気部で開裂（インソースCID）して生成した物質のピークと考えられた。

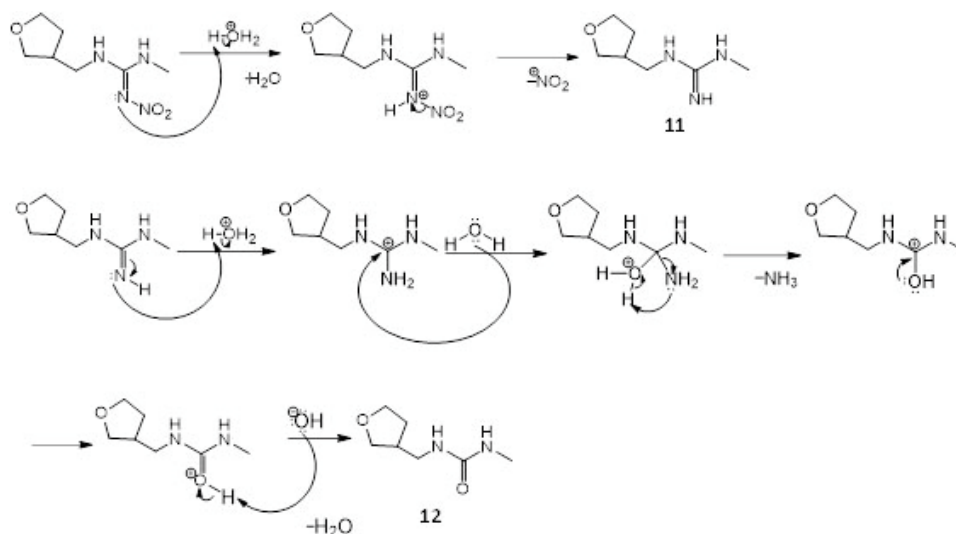
ジノテフランニトログアニジン部位の酸加水分解によるデニトロ体（11）およびウレア体（12）生成の推定される反応機構を図(2)-29に示す。

2）デニトロジノテフランの詳細な合成確認と実環境サンプルからの検出

ジノテフランを酸加水分解して得たデニトロジノテフランの高分解能マスペクトルを図(2)-30(a)に示す。質量分解能を7,500（FWHM）に設定して測定した結果、モノアイソトピックイオン



図(2)-28 LC/MS 測定結果:(a) ジノテフラン、(b) PTPW11、(c) PTPW 12

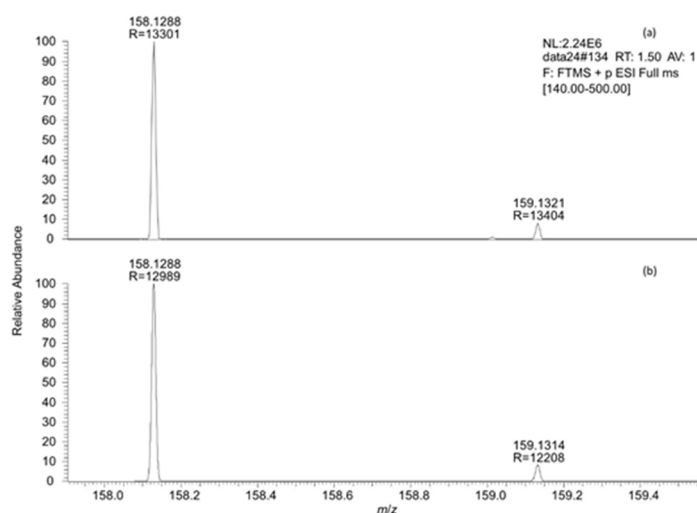


図(2)-29 推定されるジノテフランニトログアニジン部位の酸加水分解機構

の m/z として158.1288が得られ、 ^{13}C の第一同位体イオンとして $\Delta\text{mass}=1.0033\text{ Da}$ のピークが相対強度8%で観察された。相対強度が8%であったことから、モノアイソトピックイオンに含まれる炭素数は7～8個と推定された。また、当該イオンがESIによるイオン化で生成したイオンであり、また m/z の nominal 値が偶数であったことから、窒素ルールに基づき、当該イオンを構成する窒素の原子数を奇数と判断した。さらに、得られたモノアイソトピックイオンの m/z から分子式を推定した結果、質量誤差0.261 ppmの精度

で $\text{C}_7\text{H}_{16}\text{ON}_3$ が得られた。この分子式は、デニトロジノテフランのプロトン付加体の分子式と一致していた。得られた分子式のマスペクトルをシミュレートしたところ、図(2)-30(b)に示すように、実測されたマスペクトルと一致した。これらのことから、ジノテフランを酸加水分解して得たデニトロジノテフランの合成を確認した。

次に、ジノテフランを酸加水分解して得たデニトロジノテフランと比較するために、ジノテフラン照射サンプル中の同一 m/z の物質を対象として、質量分解能を7,500 (FWHM) に設定して測定した。図(2)-31(a)に酸加水分解して得たデニトロジノテフランのマスペクトルを、図(2)-31(b)にジノテフラン照射サンプル中の同一 m/z の物質のマスペクトルを示す。図(2)-31(b)に示すよう



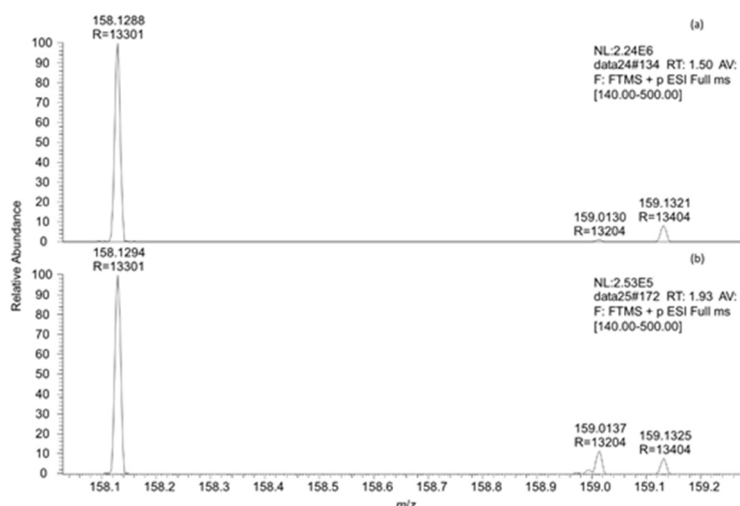
図(2)-30 高分解能質量分析によるデニトロジノテフランの合成確認 (a: 酸加水分解により得たデニトロジノテフランのマスペクトル; b: $\text{C}_7\text{H}_{16}\text{ON}_3^+$ のマスペクトルシミュレーション結果)

に、モノアイソトピックイオンの m/z として 158.1294 が得られ、 ^{13}C の第一同位体イオンとして $\Delta\text{mass}=1.0031$ Da のピークが観察された。得られたモノアイソトピックイオンの m/z から分子式を推定した結果、質量誤差 3.613 ppm の精度で $\text{C}_7\text{H}_{16}\text{ON}_3$ が得られた。この分子式は、ジノテフランを酸加水分解して得たデニトロジノテフランの分子式と一致していた。

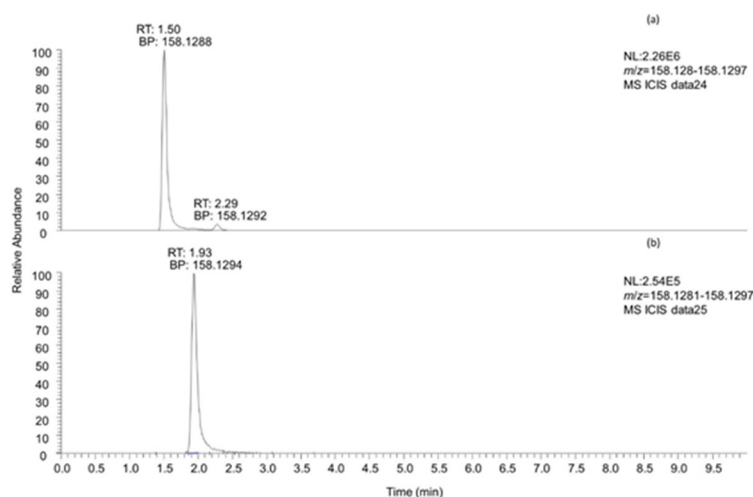
そこで次に、ODS で分離した際のカラム保持時間を確認したところ、図(2)-32 に抽出イオンクロマトグラム (EIC) を示すように、ジノテフランを酸加水分解して得たデニトロジノテフランのカラム保持時間は 1.50 min、光照射サンプル中の物質は 1.93 min と、両者のカラム保持時間が異なっていた。同一の分離条件で測定した両者のカラム保持時間が異なっていたことから、両者は異性体の関係にあると考えられる。

これを確認するために、これらの物質の一次プロダクトイオンスペクトルを取得した。その際のクロマトグラムを図(2)-33 に示す。プリカーサーイオン分析とプロダクトイオン分析における抽出クロマトグラムを比較した結果、カラム保持時間の再現性が高いことが確認された。得ら

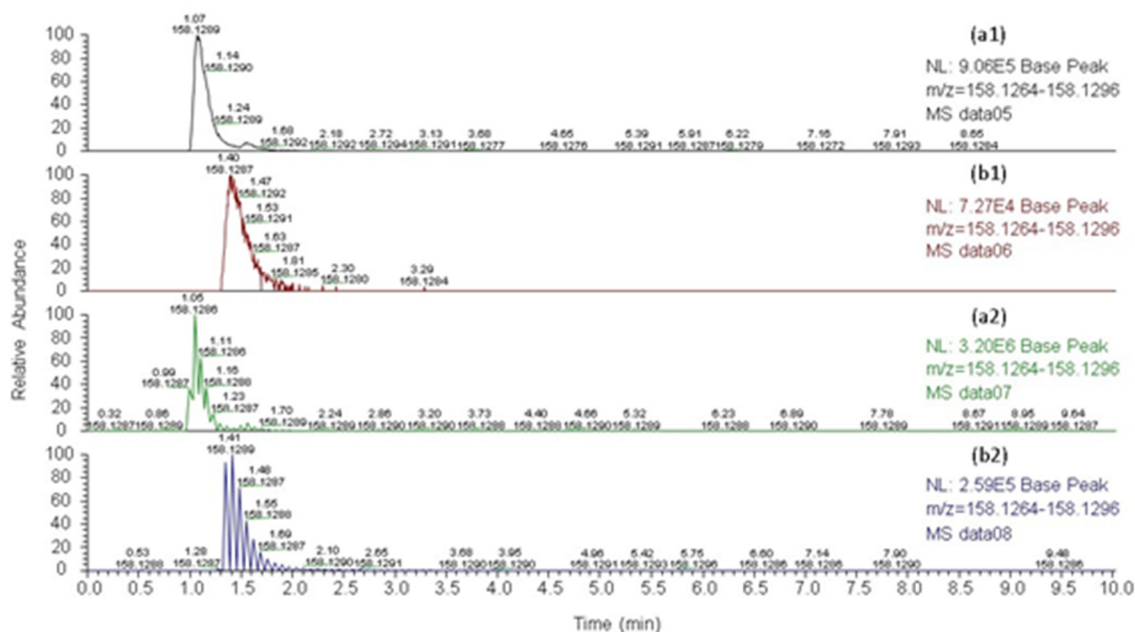
れた一次プロダクトイオンスペクトルを比較したところ、図(2)-34 に示すように、両者のスペクトルが異なった。すなわち、酸加水分解物の測定結果では、本実験による測定条件ではほとんど解離せずにプリカーサーイオンが残り、相対強度 6% で m/z 127.0861 が、9% で m/z 102.0909 が生成した以外に目立った強度のプロダクトイオンが得られなかった。これに対してジノテフラン光照射サンプルに含まれる物質の場合には、同一の衝突条件で測定したが、プリカーサーイオンが 8% しか残らず、ベースピークとして m/z 102.0911 が、相対強度 6% で m/z 71.0602 が、相対強度 3% で m/z 141.1021 が生成した。



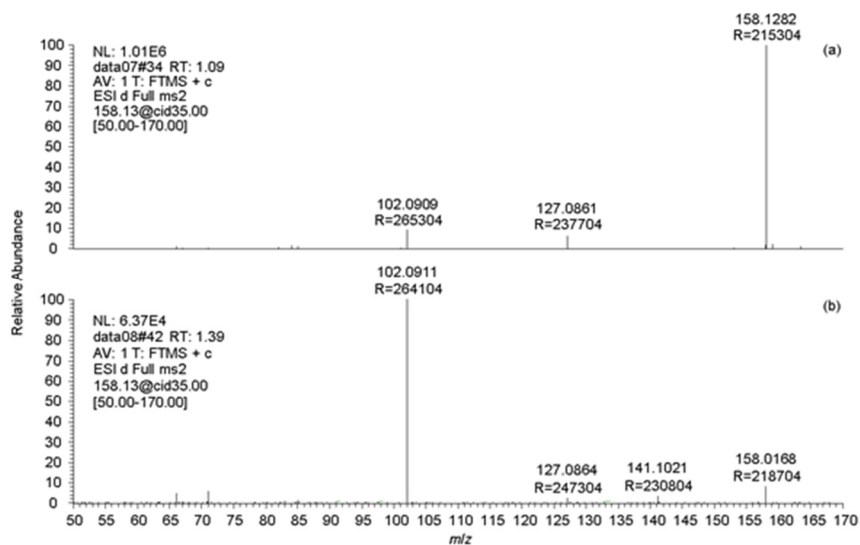
図(2)-31 酸加水分解により得たデニトロジノテフラン (a) とクセノンランプ光照射により得た同一 m/z の物質 (b) のマススペクトル



図(2)-32 酸加水分解により得たデニトロジノテフラン (a) とクセノンランプ光照射により得た同一 m/z の物質 (b) の抽出イオンクロマトグラム



図(2)-33 酸加水分解により得たデニトロジノテフラン (a) とクセノンランプ光照射により得た同一 m/z の物質(b)の抽出イオンクロマトグラム (枝番号 1 はプリカーサーイオン分析結果、枝番号 2 は一次プロダクトイオン分析結果)



図(2)-34 酸加水分解により得たデニトロジノテフラン (a) とクセノンランプ光照射により得た同一 m/z の物質(b)の一次プロダクトイオンスペクトル

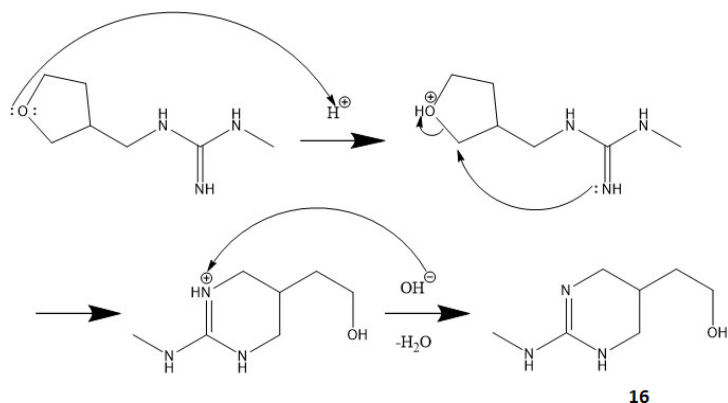
得られた一次プロダクトイオンのフラグメンテーションパスウェイ解析を行った。ジノテフラン光照射サンプル中の同一 m/z の物質として、図(2)-35に生成反応の予測結果を示す構造異性体**16**を仮定した。解析した結果、図(2)-36および37に示すように、上記の主なプロダクトイオンの生成を予測することができた。デニトロジノテフランと構造異性体の ΔH_f を求めたところ、-113および-161 kJ/molとなり、構造異性体の方が安定と予測された。これらのことから、ジノテフラン光照射

により生成した物質は、デニトロジノテフランではなく、図(2)-35に示す物質**16**であると考えられる。この構造異性体はこれまで報告例を発見できず、新規な環境変化体と考えられる。この物質の生成を確認するためには、当該異性体を合成する必要があるが、研究の趣旨と異なるために実施しなかった。

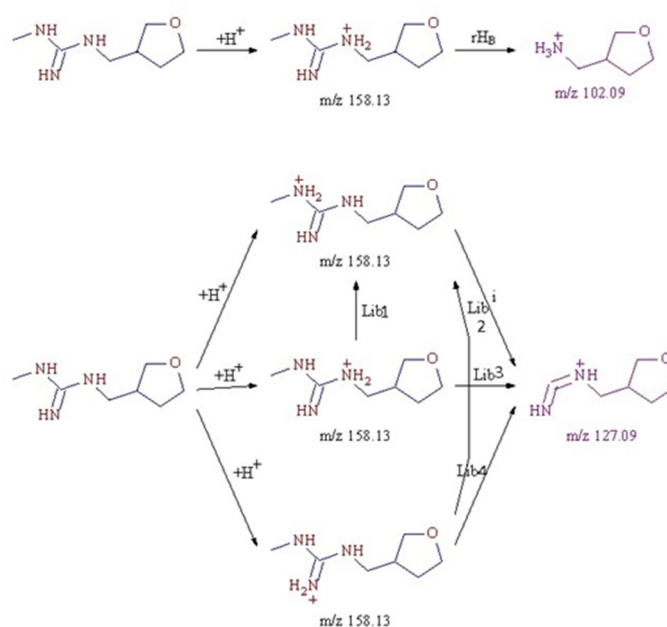
次に、この構造異性体の実環境からの検出率を検討した。検討結果の例を図(2)-38に示す。実環境サンプルから検出されたイオン、酸加水分解により合成したデニトロジノテフランのイオン、およびジノテフラン照射サンプルから発見した新規環境変化体のカラム保持時間は、それぞれ1.64、1.20、1.72 minであった。実環境サンプル中に含まれる物質の濃度が低いため、ピーク形状が悪化して明確なカラム保持時間を測定できなかったが、デニトロジノテフランとは明らかにカラム保持時間が異なった。一方、構造異性体（新規環境変化体）とはカラム保持時間がほぼ一致した。これらのことから、本研究において実環境サンプルから検出されたのは、酸加水分解により合成したデニトロジノテフランではなく、ジノテフラン照射サンプルから発見した新規環境変化体と考えられる。

(3) エトフェンプロックス環境変化体(13)の合成と精製

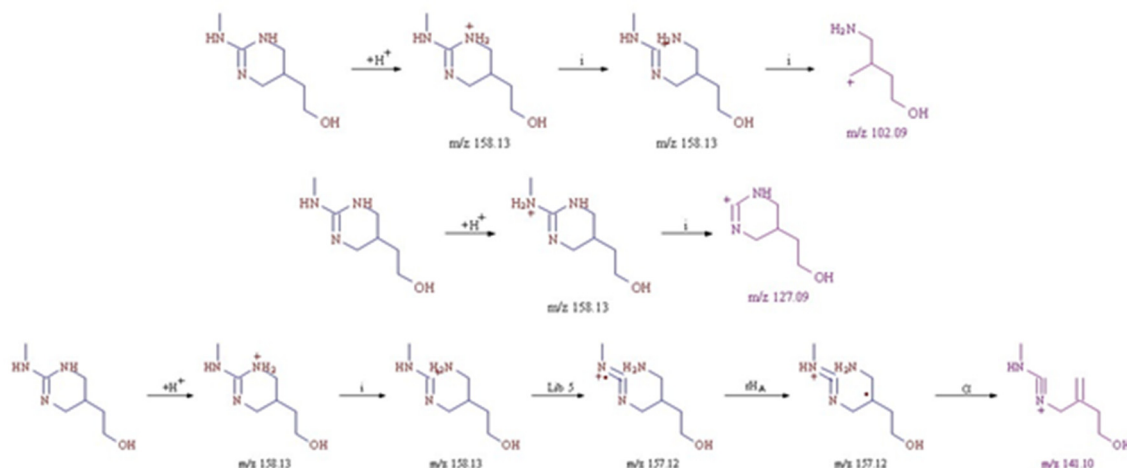
3-フェノキシ安息香酸のトルエン溶液に塩化チオニルおよび触媒量のDMFを加え40℃で2時間攪拌し、カルボン酸塩化物に変換した。生成物を90℃で加熱することにより揮発成分を留去した後、トルエンを用いて共沸操作を行った。次に2-(4-エトキシフェニル)-2-メチルプロパン-1-オールとトリエチルアミンのジエチルエーテル溶液を加え、室温で90分攪拌しエステル化反応を行った。沈殿として生成した塩化トリエチルアンモニウムをろ別した後、ろ液に水を加え洗浄した。有機層を濃縮した後、HPLCを用いて分取することで生成物を単離した。単離生成物の¹H NMR、MS測定



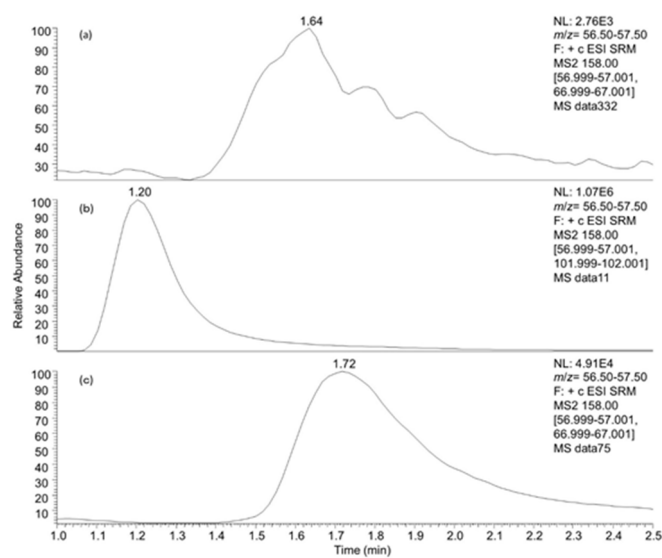
図(2)-35 クセノンランプ照射により生成した新規環境変化体の生成反応予測結果



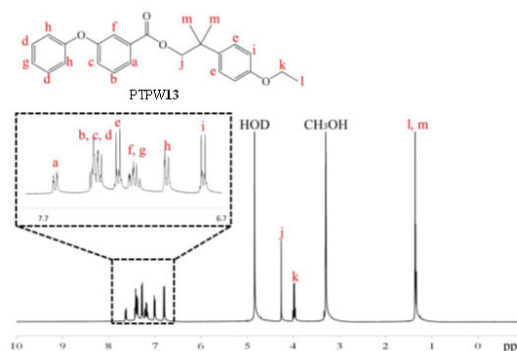
図(2)-36 酸加水分解により得たデニトロジノテフランのプロダクトイオン推定結果 (rHB: α,β -charge-site rearrangement; i: inductive cleavage)



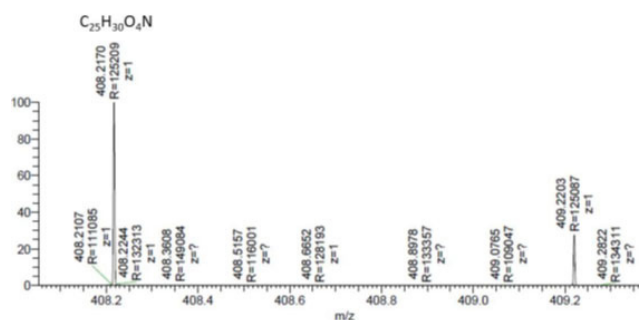
図(2)-37 クセノンランプ照射により得た同一 m/z の物質のプロダクトイオン推定結果
(i : inductive cleavage ; rH_A : radical-site rearrangement; α : α -bond dissociation)



図(2)-38 デニトロジノテフランおよびその構造異性体の実環境サンプルからの検出 (a: 実環境サンプル ; b: デニトロジノテフラン ; c : 構造異性体 (新規環境変化体))



図(2)-39 PTPW13 の ^1H NMR 測定結果
(CD_3OD)



図(2)-40 PTPW11 の MS 測定結果

結果からPTPW13の構造が支持され、合成が確認できた(図(2)-39、図(2)-40)。 ^1H NMR (CD_3OD): δ 1.33 (s, t, CH_3 , 9H), 3.98 (q, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$, 2H), 4.24 (s, CCH_2O , 2H), (m, Ar, 13H); MS: $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ m/z = 413.2169 ($\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_4\text{N}$)。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

NNIの一種であるイミダクロプリドやジノテフランを中心に、市販が確認できないPTPWsの合成を検討した。既報の合成手法の改良や新規な合成手法の構築により種々のPTPWsの合成・精製を行った。サブテーマ(1)に供給することで、質量解析によるPTPWsの探索を行う際のより精密な質量解析の標準物質として用いることができた。また、サブテーマ(3)に供給することで、PTPWsの生態系への影響を評価する研究を行うことができた。さらに、合成したデニトロジノテフランと光照射サンプルの比較から、実環境中での変化体が、これまで報告されてきた構造と異なり、新規PTPWであることを見出した。

PTPWsを合成した研究例はほとんど報告されていないため、本研究が契機となり、有機合成化学者の合成対象物質としてPTPWsが着目され、新たな分野が開拓されると期待される。

(2) 環境政策への貢献

環境リスク評価を行う際には、変化体の暴露量を環境モニタリングデータにより測定することが重要となる。環境モニタリングを行う際には、一般的に測定対象物質の標準物質が必要となるが、変化体の多くは標準試薬が市販されておらず、変化体を合成する必要がある。しかし、膨大な数の変化体を合成することは非現実的である。本研究では、合成した環境変化体の測定結果をもとに、標準物質を用いることなく環境中からの検出率や大まかな濃度を推定する技術を開発しており、変化体の効率的な環境モニタリングに道を開くものとして環境政策への貢献が期待される。

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

公的な報告書で報告されている環境変化体を合成した結果、実環境試料中からは検出されず、

その構造異性体が高頻度で検出された。同物質は、親農薬の構造および類似農薬の環境変化体の生成情報から判断すると、生成が容易に予想される物質である。そのような場合であっても、合成して確認することの重要性が示されたと考えられる。今回の場合には、同物質が毒性を有しているとは考えにくい。しかし、別の農薬の場合などで毒性を有している可能性がある物質を見落としていることがないか、慎重に確認することが望ましい。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況（※別添.報告書作成要領参照）

（1）誌上発表

<論文（査読あり）>

特に記載すべき事項はない。

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない。

（2）口頭発表（学会等）

1) 上土井太治、下吹越理子、山元和哉、上田岳彦、高梨啓和、門川淳一、宮本信一、石川英律：日本化学会第96春季年会(2016)

（3）知的財産権

特に記載すべき事項はない。

（4）「国民との科学・技術対話」の実施

特に記載すべき事項はない。

（5）マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

（6）その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) Maienfisch, P., Huerlimann, H., Haettenschwiler, J., 2000. A novel method for the preparation of N,N-disubstituted-N'-nitroguanidines, including a practical synthesis of the neonicotinoid insecticide clothianidin. Tetrahedron Letters 4, 7187-7191.
- 2) Hu, Y., Chen, X., Yang, W., Lei, Z., Zhao, C., 2010. Thermal behavior and nucleation kinetics of 1,5-dimethyl-2-nitroimino-1, 3, 5-triazine crystal. Journal of Physics and Chemistry of Solids 71, 170-174.
- 3) Novák, L., Hornyánszky, G., Király, I., Rohály, J., Kolonits, P., Szántay, C., 2001. Preparation of new imidacloprid analogues. Heterocycles 55, 45-58.
- 4) Kagabu, S., Kato, C., Nishimura, K., 2004. Insecticidal and neuroblocking activities toward american

- cockroach (*Periplaneta americana* L.) of imidacloprid metabolites, 5-hydroxy-, 4,5-dihydroxy- and 4,5-dehydroimidacloprid. 29, 376-379.
- 5) Kaldor, S.W., Hammond, M., 1991. A mild, osmium tetroxide-catalyzed method for the oxidation of sulfides to sulfones. *Tetrahedron Letters*, 32, 5043-5046.
 - 6) Wang, X., Sui, D., Huang, M., Jiang, Y., 2006. Highly effective hydration of olefins using a wool-palladium complex as a catalyst. *Polymers for Advanced Technologies* 17, 163-167.
 - 7) Yang, Y., Guo, J., Ng, H., Chen, Z., Teo, P., 2014. Formal hydration of non-activated terminal olefins using tandem catalysts. *Chemical Communications* 50, 2608-2611.
 - 8) Gavin E. Reid, Richard J. Simpson, Richard A.J. O' Hair, 1999. Probing the fragmentation reactions of protonated glycine oligomers via multistage mass spectrometry and gas phase ion molecule hydrogen/ deuterium exchange. *International Journal of Mass Spectrometry* 190/191, 209–230.
 - 9) Be ´ la Paizs and Sa ´ ndor Suhail, 2004. Fragmentation Pathways of Protonated Peptides. *Mass Spectrometry Reviews* 24, 508-548.
 - 10) Gottfried J. Feistner, 1995. Liquid Chromatography-electrospray Tandem Mass Spectrometry of Dansylated Polyamines and Basic Amino Acids. *Journal of Mass Spectrometry* 30(11), 1546–1552.
 - 11) B.T.Chait, William C.Agosta and F.H.Field 1981. Fission Fragment Ionization (252Cf) Mass Spectrometry. Positive and Negative Spectra and Decomposition Mechanisms for Seven Compounds. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics* 39, 339-366.
 - 12) Thomas A.Brettell, 1983. Analysis of N-Mono-trifluoroacetyl Derivatives of Amphetamine Analogues by Gas Chromatography and Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography*, 257, 45-52.

5-1406 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

(3) 環境変化体の生態影響の調査

いであ株式会社

環境創造研究所 環境リスク研究センター

宮本信一

環境創造研究所 管理部品質管理課

石川英律

<研究協力者>

いであ株式会社

環境創造研究所 リスク評価部

安田侑右・岡村哲郎

環境創造研究所 環境化学部

山本 潤

経営情報本部

田畑彰久

平成26(開始年度)～28年度累計予算額：15,179千円（うち平成28年度：3,500千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

水田等に散布された農薬は、様々な分解・代謝過程を経て環境変化体（Pesticide Transformation Products in Water environments: PTPWs）として環境中に存在しており、親農薬に加えてPTPWsの生態リスクが懸念される。ネオニコチノイド系農薬であるイミダクロプリドのトキシコフォアが保存されていると考えられる市販のPTPWs 4物質に、サブテーマ（2）で新規に合成したPTPWs 3物質を加えた合計7物質のPTPWsについて、農薬取締法に基づく水生生物のセスジユスリカおよびオオミジンコを用いた急性毒性試験を実施し、試験生物に対するPTPWsの致死および亜致死の毒性影響（LC50、EC50）を調べた。さらに、NNIの対照農薬として想定したエトフェンプロックスについて、トキシコフォアが保存されていると考えられる市販のPTPWs 2物質に、サブテーマ（2）で新規に合成したPTPW 1物質を加えた合計3物質のPTPWsについて、同様に水生生物に対する急性毒性を調べた。得られたPTPWsの急性毒性値から甲殻類等の急性影響濃度（AECd）を算出し、河川水濃度と比較することにより、PTPWs等の生態リスク評価を試みた。その結果、イミダクロプリドおよびエトフェンプロックスの多くのPTPWsにおいて、その急性毒性は親農薬よりも低下していた。しかし、PTPWsのイミダクロプリドオレフィン体のセスジユスリカに対する48h-EC50は18 µg/Lであり、親農薬（48h-EC50: 21 µg/L）と同程度の高い毒性（遊泳障害）を有するPTPWが存在することが明らかになった。また、イミダクロプリドアルデヒド体には、オオミジンコに対して親農薬ではみられなかった致死毒性を確認した。農薬の散布時期に測定したイミダクロプリドおよびエトフェンプロックスのPTPWsの河川水濃度は、いずれもセスジユスリカおよびオオミジンコの急性毒性値から算出した甲殻類等のAECdを下回った。両者の差が最も小さく、河川水から高頻度、高濃度で検出されたPTPWsのイミダクロプリドオレフィン体については継続的な監視が必要であると考えられた。

[キーワード]

ネオニコチノイド系農薬、環境変化体、急性毒性、リスク評価、ユスリカ

1. はじめに

水田等に散布された農薬は、様々な分解・代謝過程を経て環境変化体（Pesticide Transformation Products in Water environments: PTPWs）として環境中に存在しており¹⁾、親農薬に加えてPTPWsの生態リスクが懸念される。しかし、どのようなPTPWsが生成するのか多くが未解明であり、親農薬と比較するとPTPWsの有害性情報および暴露情報のいずれについても既存の知見は乏しく、PTPWsの生態影響を評価することは困難である。

ネオニコチノイド系農薬（NNI）については、トキシコフォア（毒性を惹起する構造）が保存されているPTPWsの水中での生成が報告されている。日本においてはNNIが水稻防除で使用されていることから、ミツバチ等の陸生昆虫への生態影響に加えて、水生昆虫に対する影響が懸念されるが、NNIのPTPWsに着目した生態影響評価はほとんど検討されていない。

2. 研究開発目的

本研究では、NNIの一種であるイミダクロプリド等のPTPWsについて、水生昆虫に対する生態影響を調べ、PTPWsの水生昆虫に対する生態リスクを評価することを目的とした。

この目的を達成するために、NNIやその既知・市販のPTPWs、サブテーマ（1）および（2）で構造推定・合成したPTPWsを対象として、水生生物のユスリカおよびオオミジンコを用いた急性毒性試験を実施し、試験生物に対するPTPWs等の致死および亜致死の毒性影響を調査した。さらに、得られた有害性情報をサブテーマ（1）で調査した表流水中の濃度と比較することによって、PTPWs等の生態リスクを評価した。

3. 研究開発方法

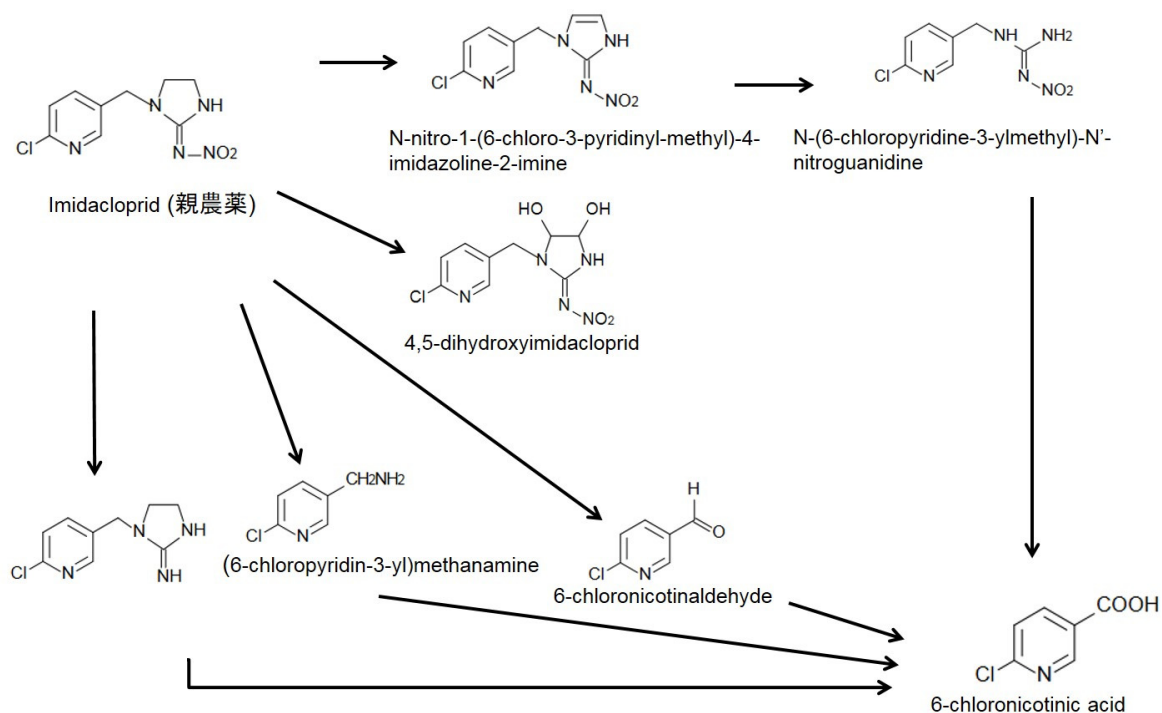
(1) 被験物質

1) イミダクロプリド

イミダクロプリドは、2013年12月からEUでは使用が制限されているが、日本では水稻防除に広く用いられている。NNIの中では比較的使用実績が高く、生態影響に関する学術研究が豊富である。

イミダクロプリドは図(3)-1のように水環境において光分解され、種々のPTPWsを形成することが知られている²⁾。本研究では、親農薬であるイミダクロプリドのPTPWsの中から、毒性を惹起する構造のトキシコフォアが保存されている、市販のPTPWs 4物質 [1-((6-クロロピリジン-3-イル)メチル)イミダゾリジン-2-イミン、(6-クロロピリジン-3-イル)メタンアミン、6-クロロニコチン酸および6-クロロニコチンアルデヒド]に加えて、サブテーマ（2）で新規に合成したPTPWs 3物質 [N-(6-クロロピリジン-3-イルメチル)-N'-ニトログアニジン、N'-ニトロ-1-(6-クロロ-3-ピリジニルメチル)-4-イミダゾリン-2-イミン、4,5-ジヒドロキシ-イミダク

ロプリド]を加えた合計7物質のPTPWsを選定した。



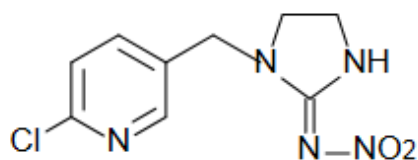
図(3)-1 イミダクロプリドの分解過程

イミダクロプリドおよびそのPTPWsの物性および供試試料を以下に示した。

a. イミダクロプリド

i. 名称、構造、物理化学的性状

- | | | |
|---------|---|--|
| ① 分類 | : | 親農薬 |
| ② 別名 | : | 1-(6-クロロ-3-ピリジルメチル)-N-ニトロイミダゾリジン-2-イリデンアミン |
| ③ CAS番号 | : | 138261-41-3 |
| ④ 構造式 | : | |



- | | | |
|------------------|---|--|
| ⑤ 分子式 | : | C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂ |
| ⑥ 分子量 | : | 255.7 |
| ⑦ 常温における性状 | : | 無色結晶、弱い特異臭 |
| ⑧ 対水溶解度 | : | 4.8×10 ⁵ μg/L(20℃) |
| ⑨ 1-オクタノール/水分配係数 | : | 0.57(21℃) |

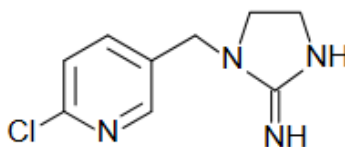
ii. 供試試料

① ロット番号	:	DCF1116
② 純度	:	99.7%(HPLC)
③ 供給者	:	和光純薬工業株式会社
④ 入手量	:	200 mg × 2本
⑤ 入手日	:	2014年 7月 2日、8月6日

b. 1-((6-クロロピリジン-3-イル)メチル)イミダゾリジン-2-イミン

i. 名称、構造、物理化学的性状

① 分類	:	市販PTPW
② 別名	:	1-(2-Chloro-pyridin-5-yl-methyl)-2-imino-imidazolidine hydrochloride
③ CAS番号	:	127202-53-3
④ 構造式	:	



⑤ 分子式	:	C ₉ H ₁₁ ClN ₄ ·HCl
⑥ 分子量	:	247.12
⑦ 常温における性状	:	無色の結晶
⑧ 対水溶解度	:	データなし
⑨ 1-オクタノール/水分配係数	:	データなし

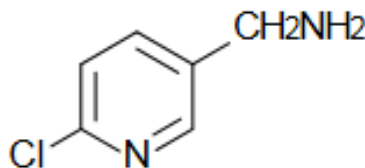
ii. 供試試料

① ロット番号	:	SZBC124XV
② 純度	:	99.8 area%(HPLC)
③ 供給者	:	Sigma-Aldrich
④ 入手量	:	25 mg
⑤ 入手日	:	2014年 9月 2日

c. (6-クロロピリジン-3-イル) メタンアミン

i. 名称、構造、物理化学的性状

① 分類	:	市販PPTPW
② 別名	:	5-(Aminomethyl)-2-chloropyridine
③ CAS番号	:	97004-04-1
④ 構造式	:	



⑤ 分子式	:	C ₆ H ₇ ClN ₂
-------	---	--

⑥ 分子量	:	142.59
⑦ 常温における性状	:	白色～黄褐色の固体または液体
⑧ 対水溶解度	:	データなし
⑨ 1-オクタノール/水分配係数	:	0.667

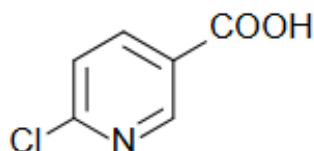
ii. 供試試料

① ロット番号	:	KPM0971
② 純度	:	98.2%(HPLC)
③ 供給者	:	和光純薬工業株式会社
④ 入手量	:	1 g
⑤ 入手日	:	2014年 7月 14日

d. 6-クロロニコチン酸

i. 名称、構造、物理化学的性状

① 分類	:	市販PPTPW
② 別名	:	6-Chloronicotinic acid
③ CAS番号	:	5326-23-8
④ 構造式	:	



⑤ 分子式	:	C ₆ H ₄ ClNO ₂
⑥ 分子量	:	157.55
⑦ 常温における性状	:	白色～黄色の結晶～粉末
⑧ 対水溶解度	:	2g/L(20℃)
⑨ 1-オクタノール/水分配係数	:	1.33

ii. 供試試料

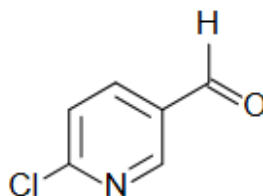
① ロット番号	:	AWF1376
② 純度	:	100.0%(qNMR)
③ 供給者	:	和光純薬工業株式会社
④ 入手量	:	100 mg × 3本
⑤ 入手日	:	2014年 7月 14日、9月30日

e. 6-クロロニコチンアルデヒド

i. 名称、構造、物理化学的性状

① 分類	:	市販PTPW
② 別名	:	6-Chloro-3-pyridinecarboxaldehyde ¹⁾
③ CAS番号	:	23100-12-1

④ 構造式 :



⑤ 分子式 : C_6H_4ClNO
 ⑥ 分子量 : 141.56
 ⑦ 常温における性状 : 結晶～粉末、ごくうすい黄色～うすい黄色
 ⑧ 対水溶解度 : データなし
 ⑨ 1-オクタノール/水分配係数 : データなし

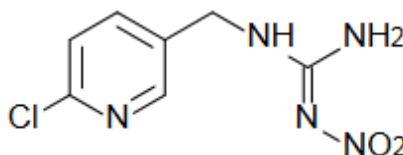
ii. 供試試料

① ロット番号 : DCQ0990
 ② 純度 : 99.9%(GC)
 ③ 供給者 : 和光純薬工業株式会社
 ④ 入手量 : 1 g
 ⑤ 入手日 : 2014年 7月 14日

f. *N*-(6-クロロピリジン-3-イルメチル)-*N'*-ニトログアニジン (PTPW 1)

i. 名称、構造、物理化学的性状

① 分類 : 合成PTPW
 ② 別名 : 1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-2-nitroguanidine
 ③ CAS番号 : —
 ④ 構造式 :



⑤ 分子式 : $C_7H_8ClN_3O_2$
 ⑥ 分子量 : 201.61
 ⑦ 常温における性状 : 結晶、粉末
 ⑧ 対水溶解度 : —
 ⑨ 1-オクタノール/水分配係数 : —

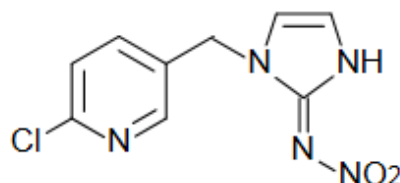
ii. 供試試料

① ロット番号 : データなし
 ② 純度 : データなし
 ③ 供給者 : サブテーマ (2) (鹿児島大学 門川淳一)
 ④ 入手量 : 50.3 mg
 ⑤ 入手日 : 2015年 12月 17日

g. *N*-ニトロ-1-(6-クロロ-3-ピリジニルメチル)-4-イミダゾリン-2-イミン (PTPW 2)

i. 名称、構造、物理化学的性状

- ① 分類 : 合成PTPW
 ② 別名 : *N*-(1-(((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-1,3-dihydro-2*H*-imidazol-2-ylidene)nitramide、Imidacloprid-olefin
 ③ CAS番号 : 115086-54-9
 ④ 構造式 :



- ⑤ 分子式 : C₉H₈ClN₅O₂
 ⑥ 分子量 : 253.65
 ⑦ 常温における性状 : 結晶粉末
 ⑧ 対水溶解度 : データなし
 ⑨ 1-オクタノール/水分配係数 : データなし

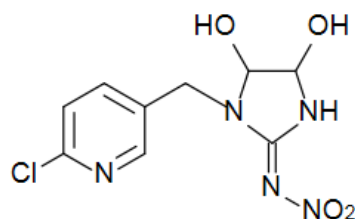
ii. 供試試料

- ① ロット番号 : データなし
 ② 純度 : データなし
 ③ 供給者 : サブテーマ (2) (鹿児島大学 門川淳一)
 ④ 入手量 : 64.2 mg (36.6 mg、27.6 mgの2ロット)
 ⑤ 入手日 : 2015年 6月 17日

h. 4,5-ジヒドロキシ-イミダクロプリド (PTPW 3)

i. 名称、構造、物理化学的性状

- ① 分類 : 合成PTPW
 ② 別名 : *N*-(1-(((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-4,5-dihydroxyimidazolin-2-ylidene)nitramide
 ③ CAS番号 : —
 ④ 構造式 :



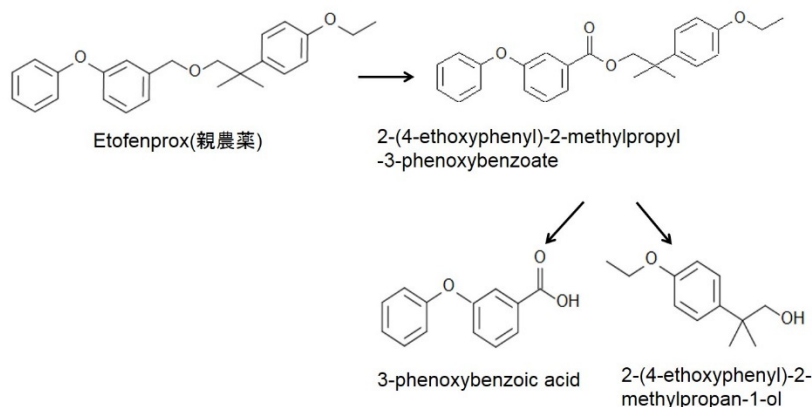
- ⑤ 分子式 : C₉H₁₀ClN₅O₄
 ⑥ 分子量 : 287.66
 ⑦ 常温における性状 : 結晶粉末
 ⑧ 対水溶解度 : データなし
 ⑨ 1-オクタノール/水分配係数 : データなし

ii. 供試試料

① ロット番号	:	データなし
② 純度	:	データなし
③ 供給者	:	サブテーマ（２）（鹿児島大学 門川淳一）
④ 入手量	:	50 mg
⑤ 入手日	:	2015年 12月 7日

2) エトフェンプロックス

水稻用殺虫剤の中で比較的使用量が多く、イミダクロプリドと類似した殺虫スペクトルをもつエトフェンプロックスをNNIの対照農薬として選定した。エトフェンプロックスは水環境において、**図(3)-2**のように分解され、種々のPTPWsを形成することが知られている。本研究では、親農薬であるエトフェンプロックスのPTPWsの中から、毒性を惹起する構造のトキシコフォアが保存されていると考えられる、市販のPTPWs 2物質（3-フェノキシ安息香酸および2-(4-エチルフェニル)-2-メチルプロパン-1-オール）、サブテーマ（２）で合成したPTPWs 1物質（2-(4-エトキシフェニル)-2-メチルプロピル-3-フェノキシベンゾエイト）の合計3物質のPTPWsを毒性試験の被験物質とした。



図(3)-2 エトフェンプロックスの分解過程

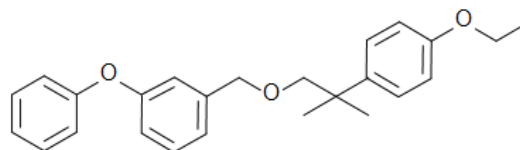
エトフェンプロックスおよびそのPTPWsの物性および供試試料を以下に示した。

a. エトフェンプロックス

i. 名称、構造、物理化学的性状

① 分類	:	親農薬
② 別名	:	[2-(4-エトキシフェニル)-2-メチルプロピル]3-フェノキシベンジルエーテル
③ CAS番号	:	80844-07-1

④ 構造式 :



⑤ 分子式 : $C_{25}H_{28}O_3$
 ⑥ 分子量 : 376.49
 ⑦ 常温における性状 : 白色、結晶～粉末
 ⑧ 対水溶解度 : 22.5 $\mu\text{g/L}$ (20°C)
 ⑨ 1-オクタノール/水分配係数 : $\log P_{ow} = 6.9$ (20°C)

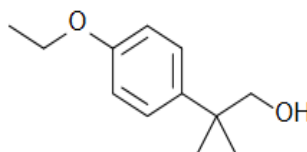
ii. 供試試料

① ロット番号 : KPE0624
 ② 純度 : 99.3%(HPLC)
 ③ 供給者 : 和光純薬工業株式会社
 ④ 入手量 : 200 mg × 2本
 ⑤ 入手日 : 2015年 1月 21日

b. 2-(4-エチルフェニル)-2-メチルプロパン-1-オール

i. 名称、構造、物理化学的性状

① 分類 : 市販PTPW
 ② 別名 : 2-(4-Ethoxyphenyl)-2-methylpropanol
 ③ CAS番号 : 83493-63-4
 ④ 構造式 :



⑤ 分子式 : $C_{12}H_{18}O_2$
 ⑥ 分子量 : 194.27
 ⑦ 常温における性状 : 結晶～粉末
 ⑧ 対水溶解度 : データなし
 ⑨ 1-オクタノール/水分配係数 : データなし

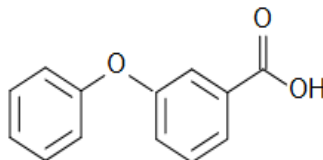
ii. 供試試料

① ロット番号 : JXDKA-LE
 ② 純度 : >98.0%(GC)
 ③ 供給者 : 東京化成工業株式会社
 ④ 入手量 : 5 g
 ⑤ 入手日 : 2015年 1月 21日

c. 3-フェノキシ安息香酸

i. 名称、構造、物理化学的性状

- ① 分類 : 市販PTPW
 ② 別名 : 3-Phenoxybenzoic Acid
 ③ CAS番号 : 3739-38-6
 ④ 構造式 :



- ⑤ 分子式 : $C_{13}H_{10}O_3$
 ⑥ 分子量 : 214.22
 ⑦ 常温における性状 : 結晶～粉末
 ⑧ 対水溶解度 : データなし
 ⑨ 1-オクタノール/水分配係数 : データなし

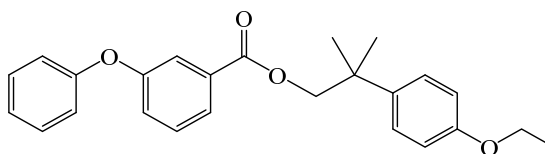
ii. 供試試料

- ① ロット番号 : —
 ② 純度 : >98.0%
 ③ 供給者 : シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社
 ④ 入手量 : 5 g
 ⑤ 入手日 : 2015年 1月 30日

d. 2-(4-エトキシフェニル)-2-メチルプロピル-3-フェノキシベンゾエイト

i. 名称、構造、物理化学的性状

- ① 分類 : 合成PTPW
 ② 別名 :
 ③ CAS番号 : 117252-00-3
 ④ 構造式 :



- ⑤ 分子式 : $C_{25}H_{26}O_4$
 ⑥ 分子量 : 390.47
 ⑦ 常温における性状 : 結晶～粉末
 ⑧ 対水溶解度 : データなし
 ⑨ 1-オクタノール/水分配係数 : データなし

ii. 供試試料

- ① ロット番号 : データなし

② 純度	:	データなし
③ 供給者	:	サブテーマ（２）（鹿児島大学 門川淳一）
④ 入手量	:	300 mg
⑤ 入手日	:	2015年 10月 19日

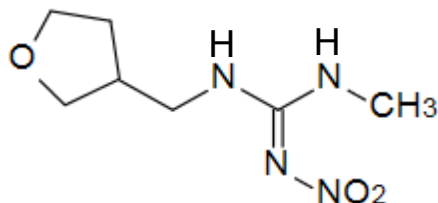
3) ジノテフラン

イミダクロプリドと同じNNIに属するジノテフランについても毒性試験の被験物質とした。ジノテフランの物性および供試試料について、以下に示した。

a. ジノテフラン

i. 名称、構造、物理化学的性状

① 分類	:	親農薬
② 別名	:	(RS)-1-メチル-2-ニトロ-3-(テトラヒドロ-3-フリルメチル)グアニジン
③ CAS番号	:	165252-70-0
④ 構造式	:	



⑤ 分子式	:	C ₇ H ₁₄ N ₄ O ₃
⑥ 分子量	:	202.21
⑦ 常温における性状	:	白色、結晶～粉末
⑧ 対水溶解度	:	4.0×10 ⁷ μg/L (pH6.98、20℃)
⑨ 1-オクタノール/水分配係数	:	logPow = -0.549(25℃)

ii. 供試試料

① ロット番号	:	KPK2755、TLJ5196
② 純度	:	99.9%(HPLC)
③ 供給者	:	和光純薬工業株式会社
④ 入手量	:	100 mg× 3本
⑤ 入手日	:	2014年 11月 5日（1本）、2015年 10月 14日（2本）

(2) 試験生物

1) セスジユスリカ

急性毒性試験の試験生物として、NNIに対する感受性が高い水生昆虫のセスジユスリカを用いた。セスジユスリカは、飼育が比較的容易であり、OECD TG 235³⁾や農薬取締法においてユスリカ幼虫急性遊泳阻害試験等の試験法が確立されている。セスジユスリカは、（独）国立環境研究所から入手した卵塊を施設内で孵化させた幼虫もしくは自家繁殖させた幼虫を使用した。試験に供試した生物の飼育条件等を以下に示す。

セスジユスリカの飼育条件

学名	: <i>Chironomus yoshimatsui</i>
入手先	: (独) 国立環境研究所
入手時の状態	: 卵塊 (約500個/塊)
供試齢	: 孵化24時間齢未満の1齢幼虫
飼育水	: Elendt M4培地
飼育温度	: 23±1 °C
照明	: 室内光、500～1,000 Lux、16時間明/8時間暗
餌	: テトラミン

2) オオミジンコ

本研究では、セスジユスリカに加えて、オオミジンコも急性毒性試験の試験生物として使用した。オオミジンコは、水生昆虫と同じ無脊椎動物に分類され、農薬登録の標準試験生物種であり、その有害性情報が豊富にあることから、親農薬とPTPWsとの毒性対比が容易である。また、セスジユスリカの試験結果と比較することで生物種間の対比も可能となる。

オオミジンコは、施設内で自家繁殖している個体が産んだ幼体を使用した。試験に供試した生物の飼育条件等を以下に示す。

オオミジンコの飼育条件

学名	: <i>Daphnia magna</i>
入手先	: (独) 国立環境研究所
入手日	: 1997年8月4日
入手後の管理	: 継代飼育 (世代更新迄の飼育期間: 2～4週間、換水頻度: 週2 回)
供試齢	: 生後24時間未満の幼体
飼育水	: Elendt M4培地
飼育温度	: 20±1°C
照明	: 室内光、16時間明/8時間暗 (飼育容器付近の照明: 9～15 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)
餌	: 単細胞緑藻類 <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>

(3) PTPWs等の急性毒性試験

NNIのイミダクロプリドおよびそのPTPWs 7物質、対照農薬のエトフェンプロックスおよびそのPTPWs 3物質、ならびにジノテフランを被験試料として、ユスリカおよびオオミジンコに対する急性毒性を調べた。

1) セスジユスリカ幼虫の急性遊泳阻害試験

セスジユスリカの幼虫を用いた急性遊泳阻害試験は農薬取締法およびOECD TG 235に準拠した。表(3)-1にその試験条件を示した。

本試験では、換水による生物へのストレスを避けるために、止水式で暴露した。被験物質の

光分解を抑制するために、試験は暗条件で実施した。また、幼虫の液面へのトラップを防ぐため、試験用水にTween80を添加した。各被験物質の試験濃度は、濃度設定のための予備試験により決定した。エンドポイントとして遊泳阻害を観察した。試験液中の被験物質濃度は、暴露開始時および暴露終了時にLC/MS/MSにより測定し、その平均を用いて48h-EC50を算出した。5-(アミノメチル)-2-クロロピリジンは設定濃度により評価した。

表(3)-1 セスジユスリカ幼虫の急性遊泳阻害試験の条件

暴露方式	止水式
暴露期間	48時間
試験液量	20 mL／容器（試験容器：50mL容ビーカー）
連数	4容器／試験区
供試生物数	20匹／試験区 各容器に5匹ずつ供試
試験温度	23±1℃（恒温室内を制御）
照明	暗条件
溶存酸素濃度	暴露期間中の溶存酸素濃度は3 mg/L以上とする。
pH	6.0～9.0、1.5以内の変動とする。
給餌	無給餌
試験用水	Elendt M4培地（飼育水と同じ）+Tween80 2 µL/L

2) ミジンコの急性遊泳阻害試験

オオミジンコを用いた急性遊泳阻害試験は農薬取締法およびOECD TG 202に準拠した。表(3)-2にその試験条件を示した。

表(3)-2 オオミジンコの急性遊泳阻害試験の条件

暴露方式	止水式
暴露期間	48時間
試験液量	20 mL／容器（試験容器：30 mL容ビーカー）
連数	4容器／試験区
供試生物数	20頭／試験区 各容器に5頭ずつ供試
試験温度	20±1℃（恒温室内を制御）
照明	暗条件
溶存酸素濃度	暴露期間中の溶存酸素濃度は3 mg/L以上とする。
pH	6.0～9.0、1.5以内の変動とする。
給餌	無給餌
試験用水	Elendt M4培地（飼育水と同じ）

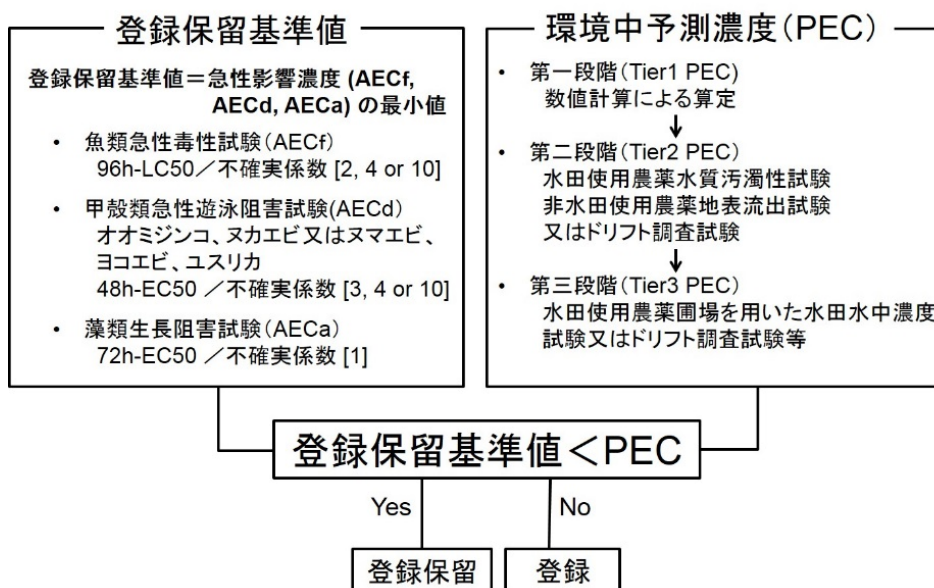
本試験では、セスジユスリカと同じ条件である暗条件の止水式で暴露した。各被験物質の試験濃度は、濃度設定のための予備試験により決定した。また、エンドポイントとして遊泳阻害に加えて死亡も観察した。試験液中の被験物質濃度は、暴露開始時および暴露終了時にLC/MS/MSにより測定し、その平均を用いて48h-EC50および48h-LC50を算出した。5-(アミノメチル)-2-クロロピリジンは設定濃度により評価した。

(4) ユスリカ幼虫急性遊泳阻害試験法の妥当性確認

既存の試験法ガイドラインの一部の条件を変更（試験用水へのTween80の添加、暗条件）して設計したユスリカ急性遊泳阻害試験の妥当性を予め確認するために、基準物質である無機化合物の塩化カリウムおよび有機化合物の3,5-ジクロロフェノールを用いて上述の条件で急性毒性試験を実施した。エンドポイントとして遊泳阻害を観察し、設定濃度に基づき、統計的手法により暴露終了時（48時間後）の50%影響濃度（48h-EC50）を算出し、試験法ガイドラインに記載された48h-EC50の適正範囲と比較することによって試験法の妥当性を確認した。

(5) PTPWsの甲殻類等に対するリスク評価

農薬取締法では生態系を保全する観点から、農薬の登録保留の判断に水生生物に対するリスク評価を取り入れている⁴⁾（図(3)-3）。農薬の水生生物に対するリスクは、成分物質ごとに魚類急性毒性試験、ミジンコ類急性遊泳阻害試験および藻類生長阻害試験等を行い、急性毒性値（EC50、LC50）を生物種間の感受性差に関する不確実係数で除して各生物種の急性影響濃度（Acute effect concentration, AEC）を算出し、それらの最小値を登録保留基準値として、公共用水域における環境中予測濃度（Predictive environment concentration, PEC）と比較することにより判定される。このとき、PECが登録保留基準値を上回ればリスクが懸念されるため登録保留となり、下回ればリスクの恐れはないと判定され登録となる。



図(3)-3 農薬登録における生態リスク評価フロー

イミダクロプリドについては、合計6物質のPTPWs〔N-(6-クロロピリジン-3-イルメチル)-N'-ニトログアニジン（イミダクロプリドグアニジン体）、N-ニトロ-1-(6-クロロ-3-ピリジニルメチル)-4-イミダゾリン-2-イミン（イミダクロプリドオレフィン体）、4,5-ジヒドロキシ-イミダクロプリド（イミダクロプリドジオール体）、1-((6-クロロピリジン-3-イル)メチル)イミダゾリジン-2-イミン（イミダクロプリドデスニトロ体）、(6-クロロピリジン-3-イル)メタンアミン、6-クロロニコチン酸〕をリスク評価の対象とした。また、NNIの対照農薬として選定したエトフェンプロックスについては、合計3物質のPTPWs〔2-(4-エチルフェニル)-2-メチルプロパン-1-オール、3-フェノキシ安息香酸、2-(4-エトキシフェニル)-2-メチルプロピル-3-フェノキシベンゾエイト〕をリスク評価の対象とした。

本研究では、農薬取締法に基づくケーススタディとして、甲殻類等に属するセスジユスリカおよびオオミジンコのうち最も感受性の高い試験生物の急性毒性値を不確実係数で除して甲殻類等の急性影響濃度（AECd）を算出した。このとき、甲殻類等について2種類の生物種の急性毒性値を用いているため、不確実係数には10を採用した。次いで、AECdをPTPWsの河川水の実測濃度と比較することにより、甲殻類等に対するPTPWsのリスク評価を試みた。

PTPWsの河川水中濃度は、サブテーマ（1）で測定した結果を用いた。イミダクロプリドPTPWsの河川水濃度は、平成28年度に鹿児島県内のイミダクロプリドを施用した水田に隣接する一般河川（4地点）から採水した230サンプル、および環境基準点（1地点）の河川水41サンプルについて測定した結果を用いた。エトフェンプロックスPTPWsについては、平成26年度に有人ヘリコプターによる水稻航空防除が実施された地域（鹿児島県および宮崎県）を流れる一般河川（13地点）から採取した49サンプル、同じく環境基準点（3地点）から採取した21サンプルについて測定した結果を用いた。

4. 結果および考察

(1) ユスリカ幼虫急性遊泳阻害試験法の妥当性確認

基準物質の塩化カリウムおよび3,5-ジクロロフェノールを用いたセスジユスリカの急性毒性試験の結果を表(3)-3に示した。

表(3)-3 セスジユスリカの感受性試験の結果

基準物質	Test No.	48h-EC50(mg/L)	48h-EC50適正範囲 (mg/L)
塩化カリウム	#1	1,000	600－2,100
	#2	1,100	
3,5-ジクロロフェノール	#1	1.5	0.50－3.6
	#2	1.4	

塩化カリウムおよび3,5-ジクロロフェノールのセスジユスリカに対する48h-EC50は、それぞれ1,000～1,100 mg/Lおよび1.4～1.5 mg/Lであり、いずれもOECD TG 235に示された適正範囲内にあることが確認された。これらの結果から、試験用水へのTween80の添加および試験期間を通した遮光の条件が試験生物に及ぼす影響は軽微であり、当施設で実施するユスリカ

幼虫の急性遊泳阻害試験法は妥当であると考えられた。

(2) PTPW s 等の急性毒性

1) イミダクロプリドのPTPWs等の急性毒性

親農薬のイミダクロプリドおよびそのPTPWs 7物質のセスジユスリカおよびオオミジンコを用いた急性毒性試験の結果を表(3)- 4に示した。

表(3)-4 イミダクロプリドおよびそのPTPWsの急性毒性

ネオニコチノイド系農薬 (NNI)	セスジユスリカ	オオミジンコ	
	遊泳阻害	遊泳阻害	致死
	48h-EC50 (mg/L)	48h- EC50 (mg/L)	48h-LC50 (mg/L)
イミダクロプリド (親農薬)	0.021	25	>86
<i>N</i> -ニトロ-1-(6-クロロ-3-ピリジニルメチル)-4-イミダゾリン-2-イミン (イミダクロプリドオレフィン体)	0.018	>36	>36
<i>N</i> -(6-クロロピリジン-3-イルメチル)- <i>N'</i> -ニトログアニジン (イミダクロプリドグアニジン体)	3.3	>55	>55
4,5-ジヒドロキシ-イミダクロプリド (イミダクロプリドジオール体)	13	>97	>97
1-((6-クロロピリジン-3-イル)メチル)イミダゾリジン-2-イミン (イミダクロプリドデスニトロ体)	33	20	>52
(6-クロロピリジン-3-イル) メタンアミン	53	>200	>200
6-クロロニコチン酸	>180	>180	>180
6-クロロニコチンアルデヒド	5	34	38

遊泳阻害の急性毒性に関して、セスジユスリカでは、親農薬のイミダクロプリドの48h-EC50は0.021 mg/Lであったのに対して、*N*-ニトロ-1-(6-クロロ-3-ピリジニルメチル)-4-イミダゾリン-2-イミンは18 µg/L であり、親農薬と同程度の高い急性毒性が認められた。その他の6種類のPTPWsの48h-EC50は、3.3～>180 mg/Lの範囲にあり、PTPWsの急性毒性は親農薬の1/10,000～1/150に低下した。オオミジンコでは、親農薬のイミダクロプリドの48h-EC50が25 mg/Lであるのに対して、7種のPTPWsの48h-EC50は20～>200 mg/Lの範囲にあり、6-クロロニコチンアルデヒドおよび1-((6-クロロピリジン-3-イル)メチル)イミダゾリジン-2-イミンでは親農薬と同程度の急性毒性が、また、6-クロロニコチン酸および(6-クロロピリジン-3-イル)メタンアミンでは親農薬と比較して急性毒性の低下が認められた。

急性毒性の生物種間の比較では、親農薬のイミダクロプリドおよび*N*-ニトロ-1-(6-クロロ-3-ピリジニルメチル)-4-イミダゾリン-2-イミンの毒性は、オオミジンコよりもユスリカで約10,000倍高かった。これにより、セスジユスリカのような新規の試験生物に対して従来の農薬の標準試験生物種であるオオミジンコよりも高い毒性を示すPTPWsが確認された。一方、その他のPTPWsでは、いずれもセスジユスリカの急性毒性はオオミジンコとほぼ同程度もしくはセスジユスリカでわずかに高く、生物種間で毒性の顕著な違いは認められなかった。

オオミジンコの急性毒性試験において、死亡をエンドポイントとした場合、2-クロロ-5-ピリジニカルバルデヒドでは、オオミジンコで遊泳阻害が観察された濃度範囲において親農薬

では観察されなかった幼体の死亡が観察され、親農薬よりも高い致死毒性が認められた。このことから、PTPWsの中には、親農薬のイミダクロプリドとは作用機作が異なり、致死作用を有する物質が存在することが示された。ネオニコチノイド系農薬は、昆虫の中枢神経系の神経伝達を阻害する作用をもつことが知られている⁵⁾。本研究では、親農薬と一部のPTPWsでオオミジンコの48h-EC50がほぼ同じ値となったが、それらの毒性に關与する作用機構は異なる可能性が考えられた。

イミダクロプリドおよびそのPTPWs 7物質について実施した、セスジユスリカおよびオオミジンコの急性毒性試験結果の概要を以下に示した。

a. イミダクロプリド

i. セスジユスリカ

- ① 設定濃度 : 0.0031、0.0068、0.0150、0.0330、0.0726 mg/L(公比 ; 2.2)、対照区
- ② 分析方法 : LC/MS/MS
- ③ 実測濃度 : 暴露開始時は設定濃度に対して102~109%、
暴露48時間後は設定濃度に対して102~113%の範囲
- ④ 48h-EC50 : 0.021 mg/L (95%信頼区間 : 0.017~0.027 mg/L) Probit法

ii. オオミジンコ

- ① 設定濃度 : 17.8、26.7、40、60、90 mg/L(公比 ; 1.5)、対照区
- ② 分析方法 : LC/MS/MS
- ③ 実測濃度 : 暴露開始時は設定濃度に対して94~99%、
暴露48時間後は設定濃度に対して92~102%の範囲
- ④ 48h-EC50 : 25 mg/L (95%信頼区間 : 20~30 mg/L) Probit法
- ⑤ 48h-LC50 : >86 mg/L (95%信頼区間 : 算出不能)

b. 1-((6-クロロピリジン-3-イル)メチル)イミダゾリジン-2-イミン

i. セスジユスリカ

- ① 設定濃度 : 4.27、9.39、20.7、45.4、100 mg/L(公比 ; 2.2)、対照区
- ② 分析方法 : LC/MS/MS
- ③ 実測濃度 : 暴露開始時は設定濃度に対して99~105%、
暴露48時間後は設定濃度に対して99~110%の範囲
- ④ 48h-EC50 : 33 mg/L (95%信頼区間 : 27~42 mg/L) Probit法

ii. オオミジンコ

- ① 設定濃度 : 8.0、12.8、20.5、32.8、52.4 mg/L(公比 ; 1.6)、対照区
- ② 分析方法 : LC/MS/MS

- ③ 実測濃度 : 暴露開始時は設定濃度に対して99～104%、
暴露48時間後は設定濃度に対して101～107%の範囲
- ④ 48h-EC50 : 20 mg/L (95%信頼区間: 17～24 mg/L) Probit法
- ⑤ 48h-LC50 : >52 mg/L (95%信頼区間: 算出不能)

c. (6-クロロピリジン-3-イル) メタンアミン

i. セスジユスリカ

- ① 設定濃度 : 4.27、9.39、20.7、45.5、100 mg/L(公比 ; 2.2)、対照区
- ② 分析方法 : —
- ③ 実測濃度 : —
- ④ 48h-EC50 : 53 mg/L (95%信頼区間: 40～78 mg/L) Probit法

ii. オオミジンコ

- ① 設定濃度 : 200 mg/L、対照区
- ② 分析方法 : —
- ③ 実測濃度 : —
- ④ 48h-EC50 : >200 mg/L (95%信頼区間: 算出不能)
- ⑤ 48h-LC50 : >200 mg/L (95%信頼区間: 算出不能)

d. 6-クロロニコチン酸

i. セスジユスリカ

- ① 設定濃度 : 25.0、50.0、100、130、200 mg/L(公比 ; 2.0)、対照区
- ② 分析方法 : LC/MS/MS
- ③ 実測濃度 : 暴露開始時は設定濃度に対して90～104%、
暴露48時間後は設定濃度に対して92～102%の範囲
- ④ pH : 高濃度域における試験溶液のpHが試験生物の適用下限である6.0
を下回ったため、pHを対照区と同程度に調整した
- ⑤ 48h-EC50 : >180 mg/L

ii. オオミジンコ

- ① 設定濃度 : 12.5、25.0、50.0、100、200 mg/L(公比 ; 2.0)、対照区
- ② 分析方法 : LC/MS/MS
- ③ 実測濃度 : 暴露開始時は設定濃度に対して77～86%、
暴露48時間後は設定濃度に対して81～90%の範囲
- ④ 48h-EC50 : >180 mg/L (95%信頼区間: 算出不能)
- ⑤ 48h-LC50 : >180 mg/L (95%信頼区間: 算出不能)

e. 6-クロロニコチンアルデヒド**i. セスジユスリカ**

- ① 設定濃度 : 4.10、9.10、20.0、44.0および97.0 mg/L(公比 ; 2.2)、対照区
- ② 分析方法 : LC/MS/MS
- ③ 実測濃度 : 暴露開始時の実測濃度は設定濃度に対して113~120%
暴露48時間後の実測濃度は設定濃度に対して0.14~120%の範囲
- ④ 48h-EC50 : 5.0 mg/L (95%信頼区間 : 2.7~8.8 mg/L) Probit法

ii. オオミジンコ

- ① 設定濃度 : 6.30、12.5、25.0、50.0、100 mg/L(公比 ; 2.0)、対照区
- ② 分析方法 : LC/MS/MS
- ③ 実測濃度 : 暴露開始時の実測濃度は設定濃度に対して111~118%
暴露48時間後の実測濃度は設定濃度に対して58~114%の範囲
- ④ 48h-EC50 : 34 mg/L (95%信頼区間 : 21~45 mg/L) Probit法
- ⑤ 48h-LC50 : 38 mg/L (95%信頼区間 : 31~42 mg/L) Probit法

f. N-(6-クロロピリジン-3-イルメチル)-N'-ニトログアニジン (PTPW 1)**i. セスジユスリカ**

- ① 設定濃度 : 0.0025、0.0050、0.010、0.020、0.040、0.080 mg/L(公比 ; 2.0)、対照区
- ② 分析方法 : LC/MS/MS
- ③ 実測濃度 : 暴露開始時は設定濃度に対して118~128%、
暴露48時間は設定濃度に対して103~110%の範囲
- ④ 48h-EC50 : 0.018 mg/L (95%信頼区間 : 0.015~0.0244 mg/L) Probit法

ii. オオミジンコ

- ① 設定濃度 : 30 mg/L、対照区
- ② 分析方法 : LC/MS/MS
- ③ 実測濃度 : 暴露開始時は設定濃度に対して126%
暴露48時間後は設定濃度に対して115%
- ④ 48h-EC50 : >36 mg/L (95%信頼区間 : 算出不能)
- ⑤ 48h-LC50 : >36 mg/L (95%信頼区間 : 算出不能)

g. N-ニトロ-1-(6-クロロ-3-ピリジニルメチル)-4-イミダゾリン-2-イミン (PTPW 2)**i. セスジユスリカ**

- ① 設定濃度 : 0.43、0.94、2.1、4.5、10 mg/L(公比 ; 2.2)、対照区
- ② 分析方法 : LC/MS/MS
- ③ 実測濃度 : 暴露開始時は設定濃度に対して95～105%、
暴露48時間後は設定濃度に対して106～112%の範囲
- ④ 48h-EC50 : 3.3 mg/L (95%信頼区間 : 2.6～4.4 mg/L) Probit法

ii. オオミジンコ

- ① 設定濃度 : 50 mg/L、対照区
- ② 分析方法 : LC/MS/MS
- ③ 実測濃度 : 暴露開始時は設定濃度に対して112%、
暴露48時間後は設定濃度に対して110%
- ④ 48h-EC50 : >55 mg/L (95%信頼区間 : 算出不能)
- ⑤ 48h-LC50 : >55 mg/L (95%信頼区間 : 算出不能)

h. 4,5-ジヒドロキシ-イミダクロプリド (PTPW 3)

i. セスジユスリカ

- ① 設定濃度 : 6.25、12.5、25.0、50.0、100 mg/L(公比 ; 2.0)、対照区
- ② 分析方法 : LC/MS/MS
- ③ 実測濃度 : 暴露開始時は設定濃度に対して92～113%、
暴露48時間後は設定濃度に対して95～112%の範囲
- ④ 48h-EC50 : 13 mg/L (95%信頼区間 : 10～16 mg/L) Probit法

ii. オオミジンコ

- ① 設定濃度 : 100 mg/L、対照区
- ② 分析方法 : LC/MS/MS
- ③ 実測濃度 : 暴露開始時は設定濃度に対して96%、
暴露48時間後は設定濃度に対して98%
- ④ 48h-EC50 : >97 mg/L (95%信頼区間 : 算出不能)
- ⑤ 48h-LC50 : >97 mg/L (95%信頼区間 : 算出不能)

2) エトフェンプロックスおよびPTPW s の急性毒性

エトフェンプロックスおよびそのPTPWsのセスジユスリカおよびオオミジンコを用いた急性毒性試験の結果を表(3)- 5に示す。

セスジユスリカでは、エトフェンプロックスの48h-EC50は0.21 µg/Lであったのに対して、3種のPTPWsの48h-EC50は >22～>47,000 µg/Lの範囲にあり、いずれのPTPWsにおいても親農薬と比較して急性毒性の顕著な低下が認められた。オオミジンコでは、エトフェンプロックスの48h-EC50および48h-LC50は、いずれも0.43 µg/Lであったのに対して、3種類のPTPWsの

48h-EC50およびLC50は >12～>109,000 µg/Lの範囲にあり、いずれの PTPWsも親農薬と比較して急性毒性の低下が認められた。生物種間の比較では、親農薬およびPTPWsのいずれについても、ユスリカとオオミジンコの毒性値に顕著な差は認められなかった。

表(3)-5 エトフェンプロックスおよびそのPTPWsの急性毒性

被験物質	セスジユスリカ	オオミジンコ	
	遊泳阻害	遊泳阻害	死亡
	48-EC50 (µg/L)	48h-EC50 (µg/L)	48h-LC50 (µg/L)
エトフェンプロックス（親農薬）	0.21	0.43	0.43
2-(4-エトキシフェニル)-2-メチルプロピル-3-フェノキシベンゾエイト	>22	>12	>12
3-フェノキシ安息香酸	>47,000	30,000	30,000
2-(4-エチルフェニル)-2-メチルプロパン-1-オール	17,000	>109,000	>109,000

エトフェンプロックスおよびそのPTPWs 3物質について実施した、セスジユスリカおよびオオミジンコの急性毒性試験の結果概要を以下に示した。

a. エトフェンプロックス

i. セスジユスリカ

- ① 設定濃度 : 0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00 µg/L(公比 ; 2.0)、対照区
- ② 分析方法 : LC/MS/MS
- ③ 実測濃度 : 暴露開始時は設定濃度に対して50～103%、
暴露48時間後は設定濃度に対して11～32%の範囲
- ④ 48h-EC50 : 0.21 µg/L (95%信頼区間 : 0.00017～0.00026 mg/L) Probit法

ii. オオミジンコ

- ① 設定濃度 : 0.25、0.50、1.00、2.00、4.00 µg/L(公比 ; 2.0)、対照区
- ② 分析方法 : LC/MS/MS
- ③ 実測濃度 : 暴露開始時は設定濃度に対して49～180%、
暴露48時間後は設定濃度に対して48～82%の範囲
- ④ 48h-EC50 : 0.43 µg/L (95%信頼区間 : 0.30～0.59 mg/L) Probit法
- ⑤ 48h-LC50 : 0.43 µg/L (95%信頼区間 : 0.30～0.59 mg/L) Probit法

b. 2-(4-エトキシフェニル)-2-メチルプロパン-1-オール

i. セスジユスリカ

- ① 設定濃度 : 6.25、12.5、25、50、100 µg/L(公比 ; 2.0)、対照区
- ② 分析方法 : LC/MS/MS
- ③ 実測濃度 : 暴露開始時は設定濃度に対して86～100%、
暴露48時間後は設定濃度に対して88～98%の範囲
- ④ 48h-EC50 : 17 mg/L (Binominal法)

ii. オオミジンコ

- ① 設定濃度 : 12.5、25、50、75、100 µg/L(公比 ; 2.0)、対照区
- ② 分析方法 : LC/MS/MS
- ③ 実測濃度 : 暴露開始時は設定濃度に対して103～110%、
暴露48時間後は設定濃度に対して106～110%の範囲
- ④ 48h-EC50 : >109 mg/L (95%信頼区間 : 算出不能)
- ⑤ 48h-LC50 : >109 mg/L (95%信頼区間 : 算出不能)

c. 3-フェノキシ安息香酸

i. セスジユスリカ

- ① 設定濃度 : 50 mg/L、対照区
- ② 分析方法 : LC/MS/MS
- ③ 実測濃度 : 暴露開始時は設定濃度に対して95%、
暴露48時間後は設定濃度に対して97%
- ④ 48h-EC50 : >47 mg/L (95%信頼区間 : 算出不能)

ii. オオミジンコ

- ① 設定濃度 : 3.13、6.25、12.5、25、50 µg/L(公比 ; 2)、対照区
- ② 分析方法 : LC/MS/MS
- ③ 実測濃度 : 暴露開始時は設定濃度に対して93～101%、
暴露48時間後は設定濃度に対して95～101%の範囲
- ④ 48h-EC50 : 30 mg/L (Binominal法)
- ⑤ 48h-LC50 : 30 mg/L (Binominal法)

d. 2-(4-エトキシフェニル)-2-メチルプロピル-3-フェノキシベンゾエイト

i. セスジユスリカ

- ① 設定濃度 : 100 µg/L、対照区
- ② 分析方法 : LC/MS/MS

- ③ 実測濃度 : 暴露開始時は設定濃度に対して28%、
暴露48時間後は設定濃度に対して12%
④ 48h-EC50 : >22 µg/L (95%信頼区間：算出不能)

ii. オオミジンコ

- ① 設定濃度 : 100 µg/L、対照区
② 分析方法 : LC/MS/MS
③ 実測濃度 : 暴露開始時は設定濃度に対して28%、
暴露48時間後は設定濃度に対して4.9%
④ 48h-EC50 : >12 µg/L (95%信頼区間：算出不能)
⑤ 48h-LC50 : >12 µg/L (95%信頼区間：算出不能)

3) ジノテフランの急性毒性

ジノテフランのセスジユスリカおよびオオミジンコを用いた急性毒性試験の結果を表(3)-6に示す。ジノテフランのセスジユスリカに対する48h-EC50は41 µg/Lであった。一方、オオミジンコの48h-EC50および48h-LC50は、いずれも200,000 µg/Lであり、既存の報告5)と同様にジノテフランのオオミジンコに対する毒性は低かった。

表(3)-6 ジノテフランの急性毒性

ネオニコチノイド系農薬 (NNI)	セスジユスリカ	オオミジンコ	
	遊泳阻害	遊泳阻害	致死
	48h-EC50 (µg/L)	48h-EC50 (µg/L)	48h-LC50 (µg/L)
ジノテフラン (親農薬)	41	200,000	200,000

セスジユスリカおよびオオミジンコを用いたジノテフランの急性毒性試験の結果概要を以下に示した。

a. ジノテフラン

i. セスジユスリカ

- ① 設定濃度 : 19.8、29.6、44.4、66.7、100 µg/L(公比；1.5)、対照区
② 分析方法 : LC/MS/MS
③ 実測濃度 : 暴露開始時は設定濃度に対して116～126%、
暴露48時間後は設定濃度に対して120～131%の範囲
④ 48h-EC50 : 41 µg/L (95%信頼区間：37～47 mg/L) Probit法

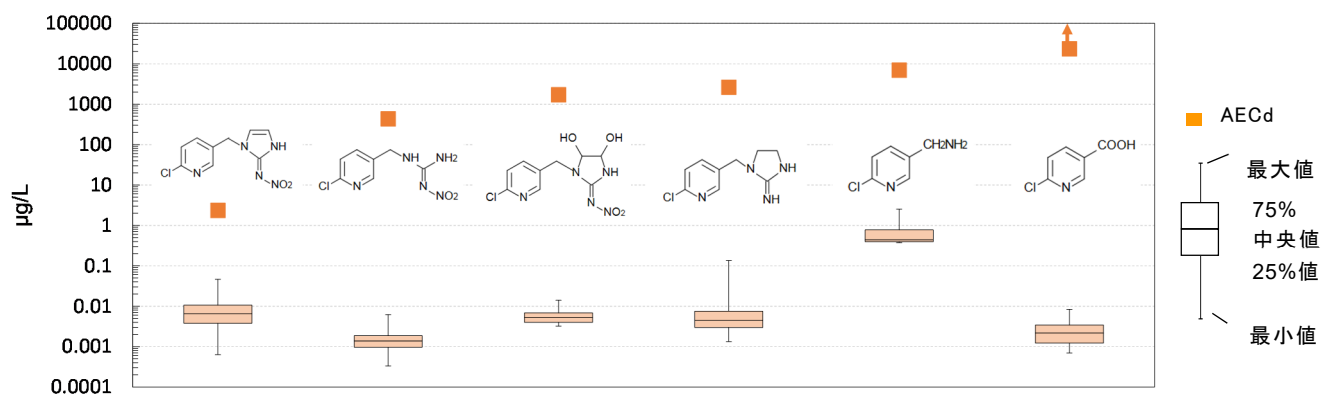
ii. オオミジンコ

- ① 設定濃度 : 200 mg/L、対照区
- ② 分析方法 : LC/MS/MS
- ③ 実測濃度 : 暴露開始時は設定濃度に対して106%、
暴露48時間後は設定濃度に対して94%
- ④ 48h-EC50 : >200 mg/L (95%信頼区間：算出不能)
- ⑤ 48h-LC50 : >200 mg/L (95%信頼区間：算出不能)

(3) PTPWsの甲殻類等に対するリスク評価

1) イミダクロプリド

イミダクロプリドのPTPWs 6物質について、セスジユスリカおよびオオミジンコに対する遊泳阻害の急性毒性値から算出したAECdおよびサブテーマ（1）から提供されたこれらのPTPWsの河川水濃度を表(3)-7に、また両者の比較を図(3)-4示した。



図(3)-4 イミダクロプリドPTPWsの甲殻類等のAECdと河川水最大濃度の比較

イミダクロプリドのPTPWs である*N*-ニトロ-1-(6-クロロ-3-ピリジニルメチル)-4-イミダゾリン-2-イミン、*N*-(6-クロロピリジン-3-イルメチル)-*N'*-ニトログアニジン、4,5-ジヒドロキシ-イミダクロプリド、1-((6-クロロピリジン-3-イル)メチル)イミダゾリジン-2-イミン、(6-クロロピリジン-3-イル)メタンアミンおよび6-クロロニコチン酸について、セスジユスリカおよびオオミジンコの48h-EC50の最小値を不確実係数10で除して算出したAECdは、それぞれ1.8 µg/L、330 µg/L、130 µg/L、3,300 µg/L、530 µg/Lおよび>18,000 µg/Lであった。

一方、サブテーマ（1）から提供されたこれらのPTPWsの河川水中濃度は、それぞれ0.00063~0.046 µg/L（中央値0.0065 µg/L）、0.00033~0.0062 µg/L（中央値0.0014 µg/L）、0.0032~0.014 µg/L（中央値0.0052 µg/L）、0.0013~0.14 µg/L（中央値0.0045 µg/L）、0.37~2.5 µg/L（中央値0.44 µg/L）および0.00069~0.0084 µg/L（中央値0.0022 µg/L）の範囲であった。

AECdと河川中濃度の最大値を比較したところ、いずれのPTPWsについても河川水中濃度の最大値はAECdを下回り、農薬取締法に基づいた甲殻類等に対する生態リスクは認められなかった。甲殻類等に対する毒性が最も高かったPTPWsである*N*-ニトロ-1-(6-クロロ-3-ピリジニルメチル)-4-イミダゾリン-2-イミンの河川水中濃度の最大値は、AECdの約1/40であった。

表(3)-7 イミダクロプリドPTPWsの甲殻類等の急性影響濃度AECdおよび河川最大濃度

イミダクロプリドPTPWs	ユスリカ 48h-EC50 (μg/L)	ミジンコ 48h-EC50 (μg/L)	AECd (μg/L) [a]	河川濃度(μg/L)			河川濃度(最大値) AECd [b/a]
				最小値	中央値	最大値 [b]	
<i>N</i> -ニトロ-1-(6-クロロ-3-ピリジニルメチル)-4-イミダゾリン-2-イミン	18	>36,000	1.8	0.00063	0.0065	0.046	0.026
<i>N</i> -(6-クロロピリジン-3-イルメチル)- <i>N'</i> -ニトログアニジン	3,300	>55,000	330	0.00033	0.0014	0.0062	1.9E-5
4,5-ジヒドロキシ-イミダクロプリド	13,000	>97,000	130	0.0032	0.0052	0.014	1.1E-4
1-((6-クロロピリジン-3-イル)メチル)イミダゾリン-2-イミン	33,000	20,000	3,300	0.0013	0.0045	0.14	4.2E-5
(6-クロロピリジン-3-イル)メタンアミン	53,000	>200,000	530	0.37	0.44	2.5	0.0047
6-クロロニコチン酸	>180,000	>180,000	>18,000	0.00069	0.0022	0.0084	<4.7E-7

甲殻類等について2生物種の急性毒性値を用いたため、AECdの算出に不確実係数10を適用した

表(3)-8 エトフェンプロックスPTPWsの甲殻類等の急性影響濃度AECdおよび河川最大濃度

エトフェンプロックスPTPWs	ユスリカ 48h-EC50 (μg/L)	ミジンコ 48h-EC50 (μg/L)	AECd (μg/L) [a]	河川濃度(μg/L)			河川濃度(最大値) AECd [b/a]
				最小値	中央値	最大値 [b]	
2-(4-エトキシフェニル)-2-メチルプロピル-3-フェノキシベンゾエイト	>22	>12	>1.2	0.017	0.082	0.53	0.44
2-(4-エチルフェニル)-2-メチルプロパン-1-オール	17,000	>109,000	1,700	0.006	0.012	0.057	3.3E-4
3-フェノキシ安息香酸	>47,000	30,000	3,000	0.002	0.007	0.075	1.9E-5

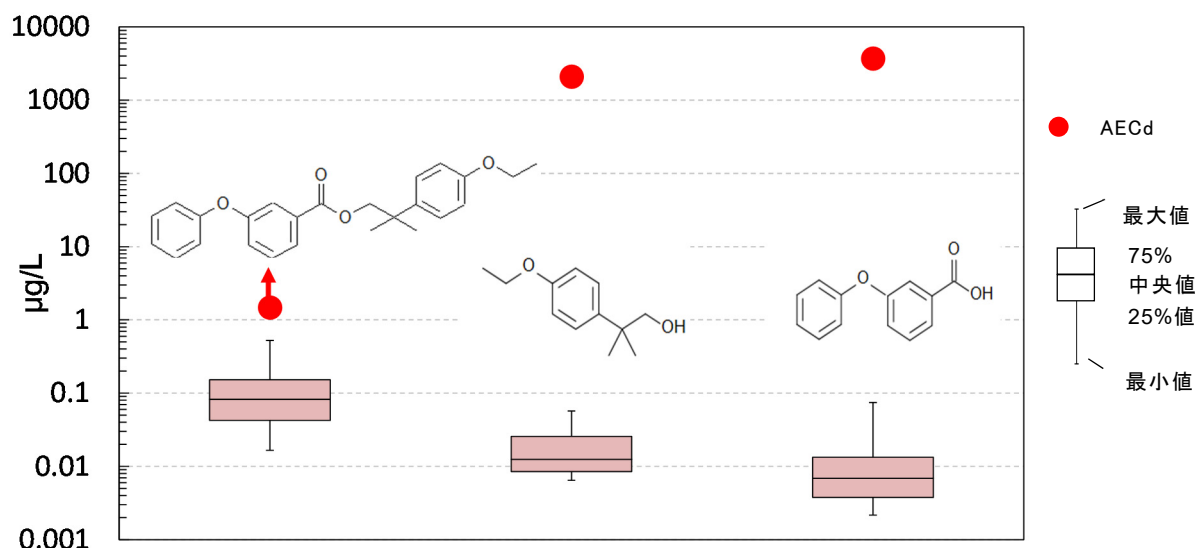
甲殻類等について2生物種の急性毒性値を用いたため、AECdの算出に不確実係数10を適用した

2) エトフェンプロックス

エトフェンプロックスのPTPWs 3物質について、セスジユスリカおよびオオミジンコに対する急性毒性値から算出したAECdおよびサブテーマ（1）から提供されたPTPWsの河川水中濃度を表(3)-8に、また両者の比較を図(3)-5に示した。

エトフェンプロックスのPTPWsである2-(4-エトキシフェニル)-2-メチルプロピル-3-フェノキシベンゾエイト（エトフェンプロックスエステル）、2-(4-エチルフェニル)-2-メチルプロパン-1-オールおよび3-フェノキシ安息香酸について、ユスリカおよびオオミジンコの48h-EC50の最小値を不確実係数10で除して求めたAECdは、それぞれ $>1.2 \mu\text{g/L}$ 、 $1,700 \mu\text{g/L}$ および $3,000 \mu\text{g/L}$ であった。

一方、河川水中のPTPWsの濃度は、それぞれ $0.017 \sim 0.53 \mu\text{g/L}$ （中央値 $0.082 \mu\text{g/L}$ ）、 $0.006 \sim 0.057 \mu\text{g/L}$ （中央値 $0.012 \mu\text{g/L}$ ）および $0.002 \sim 0.075 \mu\text{g/L}$ （中央値 $0.007 \mu\text{g/L}$ ）の範囲であった。いずれのPTPWsについても、河川水中濃度の最大値はAECdを大きく下回り、農薬取締法に基づいた甲殻類等に対する生態リスクは認められなかった。



図(3)-5 エトフェンプロックスPTPWsの甲殻類等のAECdと河川最大濃度濃度の比較

欧州食品安全機関（European Food Safety Authority：EFSA）が2013年に公表した農薬の水域生態リスク評価に関する新たなガイダンス⁶⁾では、試験生物の急性毒性データを用いて有害性を推定する場合、より大きな不確実係数100を適用することとしており、国際的にはより安全側での農薬の有害性評価が進められている。親農薬と同程度の高い急性毒性をもつPTPWsのN-ニトロ-1-(6-クロロ-3-ピリジニルメチル)-4-イミダゾリン-2-イミンについては、農薬取締法に基づいた甲殻類等に対する生態リスクは認められなかったが、河川水から継続的に高い濃度で検出されたことから、PTPWsが生態系に及ぼすリスクをより詳細に評価していくためには、今後も継続的な監視が必要であると考えられる。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

一部の特定のPTPWsを除き、水生生物への毒性に関する科学的な知見に乏しいのが現状である。例えば、NNIのPTPWsについて文献研究を実施した結果、発見された文献数は8報であった。そのうちの1報がイミダクロプリドのPTPWsの一種である6-クロロニコチン酸のヨコエビに対する毒性を報告していたが、他の文献では親農薬の光照射サンプルの毒性試験を実施しており、変化体のリスク評価が困難な状況にある。同様に、環境モニタリングデータについても、親農薬についてのデータは豊富に存在するが、PTPWsについての学術的な情報は乏しい。

本研究では、ユスリカに対して親農薬と同程度の高い毒性（遊泳阻害）を有するPTPWやオオミジンコに対して親農薬ではみられなかった致死毒性（死亡）を有するPTPWが存在することを明らかにした。また、どのようなPTPWsが生成し得るのか、高濃度・高検出頻度で検出されるPTPWsは何かを明らかにし、PTPWsを考慮した親農薬の生態リスク評価が必要となる可能性を示しており、その科学的意義は大きい。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

農薬を含めた様々な化学物質の環境安全管理のほとんどは、親農薬などの親化合物に着目した管理と言っても過言ではない。しかし、近年、親化合物に加えて変化体のリスク評価が検討されている。本研究の成果は、INNのPTPWsが高い濃度で検出される可能性や、親農薬と同程度の高い毒性作用を有するPTPWsが存在する可能性、そしてセスジユスリカのような新規の試験生物種に対して従来の農薬の標準試験生物種であるオオミジンコよりも高い感受性を示すPTPWsが存在する可能性を示している。将来に向けて農薬登録時の試験生物種として従来の標準試験生物種（メダカ、オオミジンコ、緑藻等）のみでよいのか、また、評価対象物質として親農薬のみでよいのか等の問題を提起し、親化合物を対象とした従来の環境安全管理のあり方をPTPWsまで拡張する必要性を示せる可能性があり、環境政策への貢献が期待される。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表（学会等）

1) 安田侑右、岡村哲郎、石川英律、宮本信一、田畑彰久、門川淳一、高梨啓和：第20回日本環境

毒性学会研究発表会(2014)

「ネオニコチノイド系農薬の環境変化体の水生生物に対する急性毒性」

- 2) 安田侑右、岡村哲郎、石川英律、山本潤、宮本信一、田畑彰久、門川淳一、高梨啓和：第49回日本水環境学会年会(2015)

「ユスリカに対するイミダクロプリド環境変化体(PTPWs)の急性毒性」

- 3) 石川英律、岡村哲郎、安田侑右、山本潤、宮本信一、田畑彰久、門川淳一、高梨啓和：第49回日本水環境学会年会(2015)

「ミジンコに対するイミダクロプリド環境変化体(PTPWs)の急性毒性」

- 4) 安田侑右、岡村哲郎、石川英律、宮本信一、田畑彰久、門川淳一、高梨啓和：第21回日本環境毒性学会研究発表会（2015）

「分解によるイミダクロプリドの毒性の変化」

- 5) 石川英律、安田侑右、岡村哲郎、宮本信一、田畑彰久、門川淳一、高梨啓和：第21回日本環境毒性学会研究発表会（2015）

「合成したイミダクロプリド環境変化体の水生生物に対する急性毒性」

- 6) 安田侑右、岡村哲郎、山本潤、石川英律、宮本信一、田畑彰久、高梨啓和、上田岳彦、門川淳一：第50回日本水環境学会年会（2016）

「合成した農薬変化体（PTPWs）の水生生物に対する急性毒性」

- 7) 安田侑右、山本潤、岡村哲郎、石川英律、宮本信一、田畑彰久、上田岳彦、門川淳一、高梨啓和：第22回日本環境毒性学会研究発表会（2016）

「イミダクロプリドの環境変化体（PTPWs）の水生生物に対するリスク評価」

- 8) 宮本信一、石川英律、岡村哲郎、山本潤、田畑彰久、安田侑右、橋本扶美、大葉佐世子、上田岳彦、門川淳一、高梨啓和：環境化学会第26回環境化学討論会(2017)

「イミダクロプリド環境変化体の生態リスク」

(3) 知的財産権

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

特に記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) Kameya T. *et al.*, 2012. Journal of Water Environment Technology, 10(4), 427-436.
- 2) Fossen, M., 2006. <http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/Imidclprdfate2.pdf>. (2015年

3月時点)

- 3) OECD, 2011. Test No. 235: *Chironomus* sp., Acute Immobilisation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2.
- 4) 環境省, 2005. 水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準の仕組み,
<http://www.env.go.jp/water/sui-kaitei/kijun.html>. (2017年5月現在)
- 5) 利部伸三, 1996. 日本農薬学会誌 21(2), 231-239.
- 6) European Food Safety Authority, 2013. EFSA Journal, 11(7), 3290.

Transformation Products of Neonicotinoid Pesticides and their Ecotoxicity

Principal Investigator: Hirokazu TAKANASHI

Institution: Kagoshima University
1-21-40 Korimoto, Kagoshima-City, Kagoshima 890-0065, JAPAN
Tel: +81-99-286-8336 / Fax: N.A.
E-mail: takanashi@apc.kagoshima-u.ac.jp

Cooperated by: Idea Consultants, Ltd.

[Abstract]

Key Words: Pesticide, Transformation Product, Crustacean, *Chironomus yoshimatsui*, LC/MS/MS, Monitoring, Synthesis

Pesticides may undergo various reactions such as hydrolysis, photolysis and biodegradation in water environments, producing pesticides transformation products in water environments (PTPWs). Furthermore, some of them and their parent pesticides have adverse effect on aquatic microorganisms. These two facts mean that a PTPW which has not been reported in previous studies may be produced and it is possibly necessary to monitor PTPWs as well as their parent pesticides, respectively. However, qualification, quantification, and monitoring of PTPWs are generally hard to be achieved because of their limited availability. For this reason it is difficult to say that measurement conditions for PTPWs are sufficiently developed.

Thus in this study we utilized cutting-edge mass spectrometers and conducted 1) exploration of unknown PTPWs produced from imidacloprid or dinotefuran, 2) development of a technique for detecting PTPWs w/o using authentic standards, 3) determination of the PTPW concentrations in surface waters, 4) synthesis of PTPWs, and 5) evaluation of ecotoxicity of the PTPWs, for the purpose of overcoming the above-mentioned problem.

Five PTPWs known as the toxicophore-containing derivatives of imidacloprid were synthesized and the four products were purified further. Furthermore, two PTPWs of dinotefuran, denitro and urea derivatives, were synthesized by acid treatment of dinotefuran. The analysis of the denitro derivative and the photo-irradiation product of dinotefuran indicated that these compounds are structural isomers. From this result, we propose that the PTPW of dinotefuran as the denitro derivative, reported in the previous literature, has the different structure. On the other hand, the ester PTPW of etofenprox, a pyrethroid pesticide, was efficiently synthesized by common esterification reaction of the

corresponding acid chloride and alcohol.

Acute immobilization tests of PTPWs were carried out with *Chironomus yoshimatsui* and *Daphnia magna* in order to evaluate ecotoxicity of the PTPWs. The median effect concentration (48 hr-EC50) of imidacloprid-olefin for chironomus larva was determined to be 18 µg/L. On comparison, it became clear that imidacloprid-olefin is as toxic as imidacloprid, whose 48 hr-EC50 is 21 µg/L. The test results showed the lethal toxicity of 6-chloronicotinaldehyde, one of the PTPWs of imidacloprid, to *Daphnia*. The PTPW concentrations in the river water, measured during the periods of spraying, were lower than the acute effect concentration for crustacea estimated from the 48 hr-EC50. These results indicated that monitoring of PTPWs with high toxicity and high environmental concentration, such as imidacloprid-olefin, are of importance to assess the ecotoxicity risk of PTPWs.