

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

ネオニコチノイド農薬による陸域昆虫類に対する影響評価研究

(5-1407)

平成26年度～平成28年度

Impact Assessment of Neonicotinoid Insecticides on Terrestrial Insects

千葉大学

国立研究開発法人国立環境研究所

国立研究開発法人森林総合研究所

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

# ネオニコチノイド農薬による陸域昆虫類に対する影響評価研究

(5-1407)

I. 成果の概要	.....	i
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) 陸域昆虫類のネオニコチノイド感受性の種間差および生態リスクに関する研究.....		1
(千葉大学)		
要旨	.....	1
1. はじめに	.....	1
2. 研究開発目的	.....	2
3. 研究開発方法	.....	2
4. 結果及び考察	.....	7
5. 本研究により得られた成果	.....	19
6. 国際共同研究等の状況	.....	20
7. 研究成果の発表状況	.....	20
8. 引用文献	.....	21
(2) マルハナバチ類に対する影響評価.....		23
(国立研究開発法人国立環境研究所)		
要旨	.....	23
1. はじめに	.....	23
2. 研究開発目的	.....	24
3. 研究開発方法	.....	25
4. 結果及び考察	.....	27
5. 本研究により得られた成果	.....	43
6. 国際共同研究等の状況	.....	44
7. 研究成果の発表状況	.....	44
8. 引用文献	.....	46
(3) ニホンミツバチ野生個体群に対する影響評価.....		49
(国立研究開発法人森林総合研究所)		
要旨	.....	49
1. はじめに	.....	49
2. 研究開発目的	.....	50
3. 研究開発方法	.....	50
4. 結果及び考察	.....	54
5. 本研究により得られた成果	.....	64
6. 国際共同研究等の状況	.....	65
7. 研究成果の発表状況	.....	65
8. 引用文献	.....	66
III. 英文Abstract	.....	69

課題名 5-1407 ネオニコチノイド農薬による陸域昆虫類に対する影響評価研究  
課題代表者名 中牟田 潔 (千葉大学大学院園芸学研究所生物生産環境学領域 教授)  
研究実施期間 平成26~28年度  
累計予算額 92,112千円(うち平成28年度:29,143千円)  
予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード 急性毒性、種の感受性分布、ネオニコチノイド系農薬、セイヨウオオマルハナバチ、クロマルハナバチ、トラマルハナバチ、ニホンミツバチ、コロニー、花粉、分布情報

#### 研究体制

- (1)陸域昆虫類のネオニコチノイド感受性の種間差および生態リスクに関する研究(千葉大学)
- (2)マルハナバチ類に対する影響評価(国立研究開発法人国立環境研究所)
- (3)ニホンミツバチ野生個体群に対する影響評価(国立研究開発法人森林総合研究所)

#### 研究概要

##### 1. はじめに(研究背景等)

近年、ネオニコチノイド系殺虫剤を代表とする浸透移行型殺虫剤による生態系影響が大きな環境問題として注目を集めている。浸透移行型殺虫剤は植物の根から吸収されて、植物体内に移行するという特性をもち、日本・東南アジアでは水稻の箱苗処理剤として1990年代より広く使用されている。また欧米でも畑作物の種子処理剤として普及してきた。本剤は、OECDテストガイドラインに基づく水生生物急性毒性試験では、極めて毒性が低いことが示されることから、生態影響の低い薬剤と判定されていた。しかし、我が国では近年になって、本系統剤による水田および周辺の節足動物群集に対する悪影響が懸念されるようになり、室内毒性試験やメソゾム試験により極めて低濃度でも水生生物に対して毒性が高いことが示されている。一方、欧米では本剤による家畜ミツバチに対する影響が注目され、北米で問題となっている蜂群崩壊症候群CCDの原因物質として疑われている。また、野生マルハナバチの急速な減少についても本剤との関連性が議論されている。こうした状況の中、我が国では家畜ミツバチに対する実環境における低濃度暴露の影響評価は進んでいない。また野生マルハナバチについても、全国的にその数が減少傾向にあるとされるが、農薬との関係は不明である。2013年5月EUがハチに対する生態リスクからネオニコチノイド農薬3剤の使用規制を発表し、わが国においても本系統薬剤の影響実態を緊急に明らかにする必要がある。

##### 2. 研究開発目的

日本では、浸透移行型殺虫剤の陸域生物に対する評価は進んでいないことから、本系統剤の陸域昆虫類に対する生態影響の実態を明らかにする(図1)。農業環境周辺に生息する様々な昆虫類やクモ類に対する浸透移行型殺虫剤の室内毒性試験を実施して影響濃度を求める。対照薬剤として有機リン剤など既存の他系統薬剤との比較を行う。農薬を処理した実験圃場を設定し、周辺エリアにおける節足動物群集の動態を調査し、暴露影響を評価する。マルハナバチ類および野生ニホンミツバチのワーカー個体による室内急性毒性試験を行い、感受性変異を調査する。飼育コロニーを用いて室内およびハウスレベルでコロニー成長・次世代生産数を評価ポイントとして、花粉や花蜜を介した農薬のコロニー影響試験を行う。各ハナバチ類の寄生生物相を調査して、病原体の分離を行うとともに、PCR診断による病原特定方法を開発する。また各ハナバチ野生個体群の分布情報を収集しデータベース化して、個体群減少エリアを特定し、空間構造との関係を調べる。

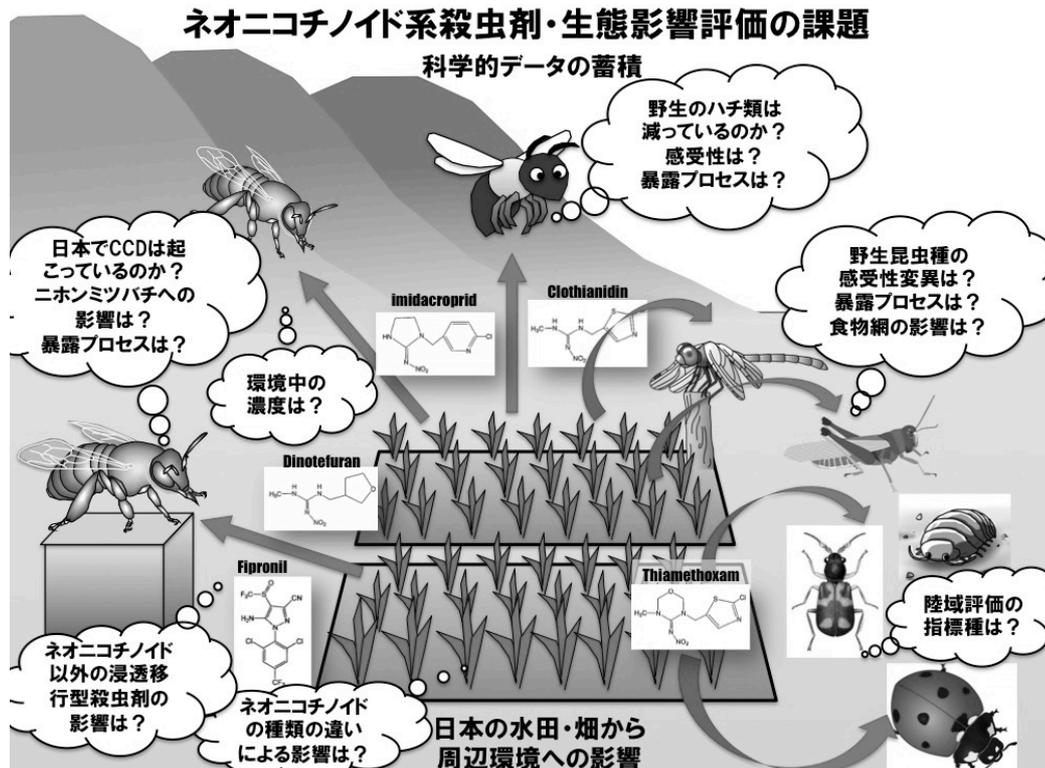


図1 本研究において取り組む課題

### 3. 研究開発の方法

#### (1) 陸域昆虫類のネオニコチノイド感受性の種間差および生態リスクに関する研究(千葉大学)

##### 1) 経皮急性毒性試験

ネオニコチノイド系農薬6剤、フェニルピラゾール系農薬2剤、有機リン系農薬3剤、カーバメート系農薬1剤、合成ピレスロイド系農薬1剤、ジアミド系農薬1剤を用いて、陸域節足動物24種に対する経皮毒性試験を行った。各農薬の原体を有機溶媒に溶解させて対象とする節足動物種に塗布し、2日後に生死を判定した。この時苦悶虫はその後回復せずに死亡した場合、苦悶しはじめた時点で死亡したと判断した。塗布する農薬量(dose)は2-4倍の間隔で、ほとんどの個体が生存する量とほとんどの個体が死亡する量の間で十分な反復(15-30)がとれるよう適宜調整した。上記の方法で収集したデータを用いて各薬剤、各節足動物の組み合わせで半数致死量(LD50)をロジスティック回帰によって計算し、それらの値を薬剤ごとに対数正規分布に適合させて種の感受性分布(SSD: Species Sensitivity Distribution)を作成した。この時LD50値が高すぎて計算できなかった種については、試験した最大値の10倍の値をLD50と仮に設定した。生態リスク評価では、全体の5%の種が影響を受ける濃度(HC5: 5% Hazardous Concentration)を計算することが一般的であるが、選択性が高い薬剤ほどSSDの傾きが緩やかになり、HC5の値が小さくなる傾向があるため、全体の50%が影響を受ける濃度HC50も併せて計算した。

##### 2) 圃場試験

圃場におけるネオニコチノイド系薬剤の生態影響を調べるため、国立環境研究所谷田部圃場(茨城県つくば市)内の農薬使用履歴がない圃場において圃場試験を行った。9m×9mの敷地を10区画用意し、内部に3m×3mのナス圃場を設けた。2014年9月、2015年5月、2015年8月の計3作期ナス苗を定植する時に、イミダクロプリド、クロチアニジン、フィプロニル、ダイアジノンに株元処理した。無処理のコントロールを含む調査区をそれぞれ2反復ずつ設置した。生物相調査はナス植物体上の見取り調査と、圃場周辺の植物体上でスリーピング調査を行った。ナス植物体上の見取り調査において出現した種は、アブラムシ、アリ、クモ、アザミウマ、コナジラミ、その他の6つのカテゴリーに分類した。その他を除く各カテゴリーの出現個体数が農薬の影響を受けるかどうかを調べるため、階層ベイズモデルを用いて統計モデリングを行った。スリーピング調査の結果では、植物被度の影響を考慮したモデルを用いて各薬剤との相関を判断した。農薬の残留を調査するため、3m四方の畑の縁から0m, 1mの位置にある土壌を深さ5 cmで、1m, 2mの位置にある

草本種数種の植物体を各場所で採取した。採取したサンプルはLC/MS-MS法にて各農薬の残留値を求めた。このとき、検出限界値以下の値は0.001 $\mu$ gに統一した

## (2) マルハナバチ類に対する影響評価(国立研究開発法人国立環境研究所)

### 1) 野生マルハナバチ類急性毒性試験

**a 接触毒性試験**：供試虫としてトラマルハナバチ、コマルハナバチおよびクロマルハナバチの働きバチを用いた。試験区として、等比級数的に少なくとも5葉量区、被験物質を含まない無処理対照区、及び少なくとも3葉量の基準物質(ジメトエート等)区を設けた。1区3頭以上(3回復以上)で実施した。暴露方法及び飼育方法として、被験物質はアセトンに溶解し、供試虫の胸部背面に被験物質を一頭当たり5 $\mu$ l局所施用した。処理後25 $^{\circ}$ C $\pm$ 2 $^{\circ}$ C、湿度50~70%RH程度、暗黒条件で飼育し、4、24、48、72、および96時間後に各個体の生存、死亡及び異常を記録した。

**b 経口毒性試験**：供試虫および試験区は接触毒性試験と同様である。暴露方法及び飼育方法として、被験物質を50%(W/V)シヨ糖溶液に溶解又は分散し、供試虫1頭当たり150 $\mu$ lを原則として4時間給餌した。その後の飼育管理、及び影響判定は接触毒性試験と同様である。

### 2) ミニコロニーを用いた生殖影響試験

**a 経皮毒性試験**：セイヨウオオマルハナバチ市販コロニーより、女王蜂および蛹室を取り除き、ワーカーも20匹のみ残して、他個体はすべて除去したミニコロニーを作成した。24時間室内環境に順化後、ワーカー10匹を取り出し、クロチアニジンもしくはイミダクロプリド0.2ppm(200ppb)アセトン溶液を散布して、風乾後、巣に戻した。対象区として農薬処理をしていない無処理区を設定した。薬剤処理後3週間に巣を室内飼育して、その後、巣を解体して巣内のカースト構造および個体数を計測した。

**b 経口毒性試験**：透明なプラスチックケースに、蛹繭を台座として設置して、セイヨウオオマルハナバチ・ワーカーを5匹入れて、ワーカー産卵を誘導してミニコロニーを生産させた。ミニコロニー生産開始1W後からイミダクロプリド1ppbおよび10ppbを含有したシヨ糖液を与え、巣の成長および次世代の羽化数を計測した。

### 3) ハウス内コロニーレベル生殖影響試験

アリスタライフサイエンス社製の乾燥花粉にイミダクロプリドのアセトン溶液を定量吸収させ、ミキサー粉碎によって濃度を均一化した花粉ベイトを作成した。花粉中濃度200ppbおよび20ppbに調整した。国立環境研究所内ガラス室内(高さ2.5m $\times$ 幅8m $\times$ 8m)を2式設営し、ワーカー数を30匹に統一したクロマルハナバチ市販コロニーを1コロニーずつ設置した。設置後1日後より毎日朝9時にベイト花粉(無処理区は無農薬花粉)を9g設置し、夕方17時に回収して、花粉重量を計測することでマルハナバチの花粉回収量を算出した。またハウス内で落下している死亡個体を回収して個体数を計測した。1ヶ月間、ハウス内飼育を行ったあと、巣を回収・解体して巣内の齢構成を調べた。

### 4) マルハナバチ分布実態調査

全国の在来および外来マルハナバチの分布情報を収集するとともに、全国のネオニコチノイド系農薬の使用量の情報を収集し、マルハナバチの分布と土地利用、気候条件、そして農薬の使用量との相関関係を解析した。マルハナバチの分布に対して気候、土地利用、ネオニコチノイド系農薬使用が与える影響をMaxentモデルによる解析を行い、生息適地推定を行った。これらの解析と同時に、一般化線形モデル(GLM)による解析を行い、同様に農薬の使用量の影響を調べた。

### 5) 野生マルハナバチにおける病原寄生生物の感染状況調査

**a 微孢子虫調査**：2014年度は、北海道上川郡美瑛町にてセイヨウオオマルハナバチおよび在来マルハナバチの採集を行った。対照調査区として、セイヨウオオマルハナバチが野生化していない東京都八王子市東京薬科大学キャンパスおよび長野県南佐久郡川上村において在来マルハナバチを採集した。2015年度は北海道標津郡中標津町および北海道網走郡大空町にてセイヨウオオマルハナバチおよび在来マルハナバチの採集を行った。対照調査区として、セイヨウオオマルハナバチが野生化していない長野県南佐久郡川上村および山梨県富士吉田市において在来マルハナバチを採集した。採集したサンプルは、顕微鏡下で胞子を観察するとともにPCR診断により、*Nosema bombi*の有病率を求めた。また*N. bombi*が検出されたサンプルについては、ダイレクトシーケンス解析を行った。

**b ポリプダニ調査**：北海道全域より在来種エゾオオマルハナバチおよびトラマルハナバチ、および外来種セイヨウオオマルハナバチのワーカー個体を採集し、国立環境研究所の冷凍庫にて保管した。保管したサンプルを順次解剖し、胸部および腹腔内に寄生するダニ*Locustacarus buchneri*の成体、幼体、卵の有無を観察した。さらに目視で確認がされなかった個体については、

胸部・腹部を1.5mLエッペンドルフ・チューブ内でホモジェナイズしてGoka et al. (2000)の方法に準じてDNAを抽出し、*L. buchneri*特異的プライマーを用いてミトコンドリアDNAチトクロームCオキシダーゼ遺伝子領域を増幅して、増幅産物の有無によって、寄生を判定した。

### (3) ニホンミツバチ野生個体群に対する影響評価 (国立研究開発法人森林総合研究所)

#### 1) 個体レベルの急性毒性試験

ネオニコチノイド系5剤 (アセタミプリド、イミダクロプリド、クロチアニジン、ジノテフラン、チアメトキサム)、フェニルピラゾール系1剤 (フィプロニル)、有機リン系2剤 (ダイアジノン、フェニトロチオン (MEP))、新規アントラニルジアミド系1剤 (クロラントラニリプロール)、ピレスロイド系1剤 (エトフェンプロックス)、カーバメート系1剤 (カルバリル) を用いて急性経皮毒性試験を行った。これらに加えて、エチプロール (フェニルピラゾール系)、アセフェート (有機リン系) とフルベンジアミド (ジアミド系) の3剤を用いて急性経皮毒性試験も行った。

#### 2) コロニーに対する低濃度曝露試験

春から初夏にかけて、ニホンミツバチの分蜂群を捕獲し、専用の木製巣箱に移動させた後、茨城県つくば市にある森林総合研究所構内にて飼育試験を行った。試験には無農薬区 (農薬希釈用に添加したアセトンのみ) として6コロニー、ネオニコチノイド区 (ジノテフラン) として4コロニー、非ネオニコチノイド系農薬のピレスロイド区 (エトフェンプロックス) として4コロニーを用いた。8月初旬から2週間、上記の薬剤入り人工飼料 (ビーハッチャー) を巣箱内に投与し摂食させた。人工飼料中の農薬濃度については、日本におけるセイヨウミツバチと農薬に関する既存の調査結果 (Kimura et al 2014 Journal of Apicultural Research) で報告されている働き蜂によって採集された花粉中濃度を参考にした。本既存調査で報告されている範囲の最大の値とし、ジノテフランは301.8ng/g、エトフェンプロックスは25.4ng/gを投与した。

#### 3) 分布状況調査

全国より採集したニホンミツバチの訪花地と営巣地の情報をもとに、ネオニコチノイド系農薬 (イミダクロプリド、クロチアニジン、ジノテフラン、チアクロプリド、チアメトキサム、ニテンピラム) の総使用量に加えて土地利用と気候を環境変数として、訪花地と営巣地それぞれの分布モデルを作成した (表(3)-1)。ネオニコチノイド系農薬使用量は、都道府県毎における各種農薬の使用量データ、さらには都道府県毎における各種農薬の用途別使用量データ (谷地ら2016日本農薬学会誌) から上記の土地利用率をもとにして計算した水田と畑地の1km<sup>2</sup>辺りの使用量を用いた。土地利用データはJAXA日本域高解像度土地利用土地被覆図ver. 16.09 ([http://www.eorc.jaxa.jp/ALOS/lulc/jlulc\\_jpn.htm](http://www.eorc.jaxa.jp/ALOS/lulc/jlulc_jpn.htm)) を1km<sup>2</sup>内の土地利用比率で求めたものを使用した。気候データはWorldClim ([www.worldclim.org](http://www.worldclim.org)) より月ごとの気温と降水量の1km<sup>2</sup>スケールデータをもとに生物の分布に重要と考えられる気候データBioclimaticを計算したものを利用した。以上の環境変数を用い、訪花地と営巣地のそれぞれの分布モデルをMaxEnt (ver. 3.3.3k) (Phillips et al 2006 Ecological Modelling) で構築した。

#### 4) 感染症状況調査

上述のニホンミツバチコロニーに対する低濃度曝露試験において、各区の巣のニホンミツバチ働き蜂を対象に、アカリンダニ、ノゼマ微胞子虫、黒色女王蜂児ウイルス (BQCV)、翅形態不全ウイルス (DWV)、サックブルード病ウイルス (SBV) の感染率を調査した。

## 4. 結果及び考察

### (1) 陸域昆虫類のネオニコチノイド感受性の種間差および生態リスクに関する研究 (千葉大学)

#### 1) 経皮急性毒性試験

求めたLD50値をもとに種の感受性分布曲線 (SSD) を描いた結果、ネオニコチノイド系農薬はSSDの傾きが小さくなる傾向を示した。すなわち、ネオニコチノイド系農薬は、従来の農薬よりも感受性幅が広く、影響を受けやすい種と受けにくい種が存在した。したがって数少ない指標種のみによるリスク評価では適切な評価が難しいと思われる。また、フェニルピラゾール系農薬はネオニコチノイド系農薬よりもSSDの傾きがさらに小さくなった。したがって、フェニルピラゾール系農薬のリスク評価はさらに難しいと思われる。

#### 2) 圃場試験

a 昆虫相への影響: ナスを3作期繰り返し作付けし、その都度粒剤を株元に施用しナス株上、および圃場周辺の植物体上の昆虫相を調査した結果、ナス株元に施用したイミダクロプリド、クロチアニジン、フィプロニル、ダイアジノンの何れの薬剤においても、薬剤による周辺植物体上

の昆虫相への明確な負の影響は検出されなかった。

**b 農薬の残留：**イミダクロプリド、クロチアニジン、フィプロニル、ダイアジノンのそれぞれが畑の縁から0m、1m地点の土壌から検出された。また、ナス、および圃場周辺雑草の残留分析でもそれぞれの薬剤の残留が検出されたが、雑草サンプルの残留値はナスサンプルの100分の1程度の値であった。

## (2) マルハナバチ類に対する影響評価（国立研究開発法人国立環境研究所）

### 1) 野生マルハナバチ類急性毒性試験

いずれの薬剤も、接触・経口ともにセイヨウミツバチとほぼ同等の毒性を示し、また時間経過とともに、毒性発現が強くなっていることが示された。急性毒性値には、顕著な種間差は認められなかったが、急性経口毒性で、イミダクロプリドがトラマルハナバチに対して遅効的であることが示された。以上の結果から、ネオニコチノイド系農薬は在来種マルハナバチ類成虫に対しても強い急性毒性を有することが明らかとなった。

### 2) ミニコロニーを用いた生殖影響試験

**a 経皮毒性試験：**クロチアニジンおよびイミダクロプリドのミニコロニー毒性試験をそれぞれ2回繰り返して行った。薬剤処理後、3週目の巣内構造を薬剤処理区および無処理区間で比較した結果、ワーカー数、蛹数、幼虫数など各ステージの個体数に、薬剤処理による有意な減少は2回の試験とも認めることができなかったが、2回の試験とも、全体の個体数は処理区の方が大きくなる傾向が示された。この結果から、野外における暴露濃度よりも遥かに高い濃度のクロチアニジンにワーカーが暴露しても、巣の崩壊が起こるほど顕著なコロニー毒性が生じることはないと考えられた。

**b 経口毒性試験：**イミダクロプリド1ppbシヨ糖水ではワーカー死亡数および幼虫死亡数はControl区と同じ動態を示したが羽化数はcontrol区よりも有意に少なかった。一方10ppb処理区はワーカー死亡数、幼虫死亡数はcontrol区および1ppb処理区のいずれよりも大きく、羽化数も有意に小さく、ほぼ全個体が羽化に失敗した。これらの結果から、10ppbのイミダクロプリドをワーカーに経口投与するとコロニーが崩壊することが示された。

### 3) ハウス内コロニーレベル生殖影響試験

2015年度の試験では、イミダクロプリド200ppb処理区では、無処理区と比較して花粉消費量が極端に低下しており、1ヶ月間の消費量は無処理区が56.3gに対して処理区は28.3gに半減していた。また1ヶ月後の巣内構造を調査した結果、処理区では卵室数がゼロになっており、新女王およびオスが生産されていないことが示された。一方、20ppb（環境中実濃度）処理区では、花粉消費量は、無処理区との間に有為な差はなかった。1ヶ月後の巣内構造においても、処理区・無処理区間で顕著な卵室数、および新女王・オス数の減少は認められなかった。ただし、イミダ20ppb処理区においては死亡卵が有意に増加するとともに巣内の総個体数が増加している傾向が示された。

2016年度試験では、40日間の試験中にハウス内にみられる個体数を計測した結果、イミダクロプリド200ppb処理区とコントロール区との間でワーカー数に大きな差はみられなかった。しかし200ppb試験の1回目および2回目のコントロール区でオスと新女王が出現した一方、イミダクロプリド処理区ではどちらも出現しなかった。一方、20ppb含有花粉を与えた試験でも、ワーカー数に大きな違いはみられなかった。オス成虫はコントロール区でのみ出現した。40日観察後巣内構造において、200ppb処理区ではいずれの試験でもコントロール区に比べて生存個体数が減少しており、特に生存幼虫数が少なかった。一方、20ppb処理区では、生存総個体数および生存幼虫数ともに大きな違いはみられなかった。

以上の結果から、マルハナバチのコロニー生産、特に次世代繁殖虫である新女王の生産に影響が出るイミダクロプリド花粉中濃度閾値は20~200ppbの間にあると示唆された。

### 4) マルハナバチ分布実態調査

解析に用いたマルハナバチの分布情報は在来マルハナバチ10種および外来マルハナバチ1種（セイヨウオオマルハナバチ）であった。農薬使用量の情報を説明変数として、Maxentモデルを用いてマルハナバチの生息適地推定（出現確率）を行った。いずれの種も農薬使用量を含む説明変数によって分布情報がよく説明された。農薬使用量に対する出現確率の反応曲線を検討した結果、多くのマルハナバチ類において単位面積当たりの農薬使用量の寄与率が高く、マルハナバチの出現確率は県別農地あたり農薬使用量に対して概ね正の相関がある事が判明した。それぞれのグリッドにおける出現確率を目的変数とし、説明変数を独立とした一般化線形モデル（GLM）による解析を行った結果、マルハナバチ類の分布に対する農薬使用の負の影響はほとんどみられな

かった。以上の結果から、県別農地あたりの農薬使用量が増えるほど、多くのマルハナバチ種の出現確率が高くなることがわかった。

#### 5) 野生マルハナバチにおける病原寄生生物の感染状況調査

**a 微孢子虫調査**：PCR診断による北海道における *N. bombi* 有病率は、セイヨウオオマルハナバチ、エゾオオマルハナバチ、エゾトラマルハナバチ間で佐賀見られた。長野県でもトラマルハナバチ、ミヤママルハナバチ間で有病率に差があった。塩基配列解析の結果、エゾオオマルハナバチから検出された *N. bombi* は、ヨーロッパ系統に属すること、エゾトラマルハナバチ、トラマルハナバチ、ミヤママルハナバチの3種から検出された *N. bombi* は、アジア系統に属することが明らかになった。以上の結果から、北海道には外来種由来のノゼマ病原虫が分布していると考えられ、感染率に地理的変異があることが示された。今回得られた有病率と上記の【マルハナバチの分布実態調査】で得られた農薬使用量データを照合したが、データ数が十分でないため、有意な関係性を検出することはできなかった。今後、この *N. bombi* の有病率動態と農薬使用量の変動を調査することで、病原体と農薬との関係に付いて情報が得られると期待された。

**b ポリプダニ調査**：北海道各地より収集したエゾオオマルハナバチ、トラマルハナバチおよびセイヨウオオマルハナバチ（外来種）のワーカー個体における *Locustacarus buchneri* の感染率を解剖およびDNA検査によって調査した結果、エゾオオマルハナバチおよびセイヨウオオマルハナバチから寄生が認められた。セイヨウオオマルハナバチについては20%近い個体が寄生されていた。エゾオオマルハナバチについては、地点間で寄生率に変異が認められた。一方、トラマルハナバチについては全サンプルで寄生率0%であった。エゾオオマルハナバチ個体群間における感染率の変異と農薬使用量の関係については、サンプル数が小さいため統計的に有意な関係性は見られなかった。一方、寄生に係る種間差が、生態特性に起因する農薬暴露量の差と関係がある可能性は今後、検証していく必要があると考えられた。

#### (3) ニホンミツバチ野生個体群に対する影響評価（国立研究開発法人森林総合研究所）

##### 1) 個体レベルの急性毒性試験

ネオニコチノイド系、フェニルピラゾール系、有機リン系、ジアミド系、ピレスロイド系、カーバメート系の11薬剤を用いたニホンミツバチの個体レベルの急性経皮毒性試験では、またどの薬剤のLD50値においてもニホンミツバチの方がセイヨウミツバチよりも低い向を示した。

##### 2) コロニーに対する低濃度曝露試験

巣の生存率、巣の重量、巣板に形成された蜂児面積について調査をしている。巣の生存率について、無農薬区における給餌後生存率は12月まで減少傾向が確認され、ネオニコチノイド区およびピレスロイド区ではいずれにおいても、給餌した後の9月に至るまでは変化がなかったものの、その後生存率は減少した。生存コロニーにおける巣の重量および蜂児面積については、無農薬区、ネオニコチノイド区、ピレスロイド区のいずれの区間にも明確な相違は確認されなかった。

##### 3) 分布状況調査

全国より採集したニホンミツバチの訪花地と営巣地の情報をもとに、ネオニコチノイド系農薬（イミダクロプリド、クロチアニジン、ジノテフラン、チアクロプリド、チアメトキサム、ニテンピラム）の総使用量に加えて土地利用と気候を環境変数として、訪花地と営巣地それぞれの分布モデルを作成した。結果、訪花個体群を用いて作成されたモデルはニホンミツバチの訪花地が確認された場所をそれ以外の場所から比較的高い確率で峻別する事が可能であり、営巣個体群を用いて作成されたモデルもニホンミツバチの営巣地が確認された場所をそれ以外の場所から比較的高い確率で峻別する事が可能であった。

##### 4) 感染症状況調査

ニホンミツバチコロニーに対する低濃度曝露試験に付随して感染状況を調査した。ノゼマ微孢子虫、黒色女王蜂児ウイルス（BQCV）、翅形態不全ウイルス（DWV）、サックブルード病ウイルス（SBV）については、無農薬区、ネオニコチノイド区、ピレスロイド区のいずれにおいても感染率が低く、区間による明確な相違はみられなかった。アカリンダニの寄生率については、無農薬区、ネオニコチノイド区、ピレスロイド区のいずれにおいても給餌をした後の9月に至るまで感染率は上昇する傾向がみられたものの、区による明確な違いを確認するには至らなかった。

#### 5. 本研究により得られた主な成果

##### (1) 科学的意義

- 1) 室内毒性試験結果をもとに描いた種の感受性分布を見ると、ネオニコチノイド系薬剤は選択性が高く、大きく影響を受ける昆虫種と、ほとんど影響を受けない昆虫種に分かれる傾向が

- ある。
- 2) 圃場試験における残留分析の結果、圃場周辺土壌中や周辺雑草中にネオニコチノイド系薬剤が残留していることが明らかとなった。さらに、連続使用によりその濃度が上昇する傾向も明らかになった。
  - 3) ネオニコチノイド系殺虫剤の花粉を介したマルハナバチ・コロニーレベルの毒性試験法を開発した。
  - 4) 次世代の新女王の生産をエンドポイントとしたコロニー生産阻害のイミダクロプリド花粉中濃度の閾値が20~200ppbの間にあることを明らかにした。
  - 5) マルハナバチの分布情報とネオニコチノイド農薬の使用量に関する地図情報を統計的に統合し、農薬使用量がマルハナバチの分布頻度に少なくとも負の影響を及ぼしてはいるという傾向はないことを示した。
  - 6) マルハナバチの病原寄生生物の検出法を確立するとともに、これら寄生生物の寄生率には地理的変異や宿主の種間差が存在することが明らかとなった。
  - 7) これまで困難であったニホンミツバチにおける個体レベルの急性毒性試験について試験方法を確立した。
  - 8) 概してニホンミツバチはセイヨウミツバチよりも農薬への感受性が高いことを示した。
  - 9) これまで採集や維持が困難であったニホンミツバチを対象としたコロニーレベルの試験に関して単年度であるものの実施可能であることを示した。
  - 10) ニホンミツバチ全国分布の解析により、ネオニコチノイド系農薬の使用が、ニホンミツバチの存在確率に正または負の影響を与える可能性を示唆した。
  - 11) 現実的な濃度を用いてネオニコチノイド系農薬によるコロニーレベルでの感染症影響について調査したが、明確な影響は確認されなかった。

## (2) 環境政策への貢献

### <行政が既に活用した成果>

環境省「農薬の昆虫類への影響に関する検討会」において、研究成果を提供して、今後の野生ハナバチにおける農薬生態影響実態の調査および対策に係る提言を行った（第1回検討会：2016年11月14日、第2回検討会：2017年2月8日）。さらに、本研究成果に基づき、生物多様性及び生態系サービスに関する政府間科学政策プラットフォーム（IPBES）の Deliverable 3(a): Thematic assessment of pollinators, pollination and food production において、Leading Authorとして参画し、農薬による生態影響について情報提供を行った。（" Summary for Policy Makers of the thematic assessment of Pollinators, Pollination and Food Production" :

[http://www.ipbes.net/sites/default/files/downloads/pdf/spm\\_deliverable\\_3a\\_pollination\\_20170222.pdf](http://www.ipbes.net/sites/default/files/downloads/pdf/spm_deliverable_3a_pollination_20170222.pdf)、" Individual chapters and their executive summaries of the thematic assessment on pollinators, pollination and food production" (Laid out; posted on 5 March 2017) : [http://www.ipbes.net/sites/default/files/downloads/pdf/individual\\_chapters\\_pollination\\_20170305.pdf](http://www.ipbes.net/sites/default/files/downloads/pdf/individual_chapters_pollination_20170305.pdf))

### <行政が活用することが見込まれる成果>

- ・マルハナバチ毒性試験およびリスク評価手法、ニホンミツバチの農薬感受性の結果は農薬による生態リスク評価システムの高度化に貢献できる。
- ・生物多様性及び生態系サービスに関する政府間科学政策プラットフォーム（IPBES）の Deliverable 3(a): Thematic assessment of pollinators, pollination and food production において、執筆者として花粉媒介者への農薬影響についてこれまでの科学的知見を取りまとめた。
- ・殺虫剤のリスク管理を考慮する場合、異なるネオニコチノイド系薬剤を単にネオニコチノイド系として扱うことは避け、セイヨウミツバチとは異なる戦略がニホンミツバチに必要であることが示唆された。

## 6. 研究成果の主な発表状況（※別添. 報告書作成要領参照）

### (1) 主な誌上発表

#### <査読付き論文>

- 1) Sanchez-Bayo F & Goka K 2014. Pesticide Residues and Bees - A Risk Assessment. PLoS ONE,

e94482

- 2) 前田太郎, 坂本佳子, 岡部貴美子, 滝久智, 芳山三喜雄, 五箇公一, 木村澄 2015. ミツバチに寄生するアカリンダニ -分類、生態から対策まで-. 日本応用動物昆虫学会誌 59:109-126.
- 3) Sanchez-Bayo F, Goulson D, Pennacchio F, Nazzi F, Goka K & Desneux N 2016. Are bee diseases linked to pesticides? Environmental International 89-90:7-11.
- 4) Nagamitsu T, Yasuda M, Saito-Morooka F, Inoue MN, Nishiyama M, Goka K, Sugiura S, Maeto K, Okabe K, Taki H 2016. Genetic structure and potential environmental determinants of local genetic diversity in Japanese honeybees (*Apis cerana japonica*). PLOS ONE 11, e0167233.
- 5) Yasuda M, Sakamoto Y, Goka K, Nagamitsu T, Taki H (in press) Insecticide susceptibility in Asian honey bees *Apis cerana* and implications for wild honey bees in Asia. Journal of Economic Entomology.
- 6) Taki H, Ikeda H, Nagamitsu T, Yasuda M, Sugiura S, Maeto K, Okabe K, (in press) Stable nitrogen and carbon isotope ratios in wild native honeybees: the influence of land use and climate. Biodiversity and Conservation.

### <査読付論文に準ずる成果発表>

該当なし

### (2) 主な口頭発表 (学会等)

- 1) 笠井 敦: 第30回個体群生態学会大会 (2014)  
「Two serious problems in agroecosystems; invasive alien species and chemical pesticides」
- 2) 笠井 敦・林 岳彦・五箇公一: 第59回日本応用動物昆虫学会大会 (2014)  
「野生マルハナバチ類に対する残留ネオニコチノイドの影響」
- 3) 五箇公一: 日本自然保護協会シンポジウム「ネオニコチノイド系農薬の生態系影響」 (2015)  
「ネオニコチノイド系農薬の生態リスク評価および実態」
- 4) 五箇公一: 福井県「有機・生き物 米づくり推進大会」 (2015)  
「水田の生物多様性とネオニコチノイド農薬」
- 5) 相澤章仁・野村昌史・中牟田潔: 第59回日本応用動物昆虫学会大会 (2015)  
「陸域昆虫類におけるネオニコチノイド系農薬感受性の種間差」
- 6) 五箇公一: 登米市「環境保全型農業セミナーin登米」 (2016)  
「水田の生物多様性とこれからの環境保全型農業のあり方について」
- 7) 五箇公一・滝久智: 日本生態学会第63回大会 (2016)  
「ポリネーターの国際評価を行う意義」
- 8) 五箇公一: JSEDR 第30回環境ホルモン学会講演会 (2016)  
「ネオニコチノイド農薬の生態系影響評価」
- 9) 五箇公一: IUCN 浸透性殺虫剤タスクフォース (TFSP) 国際シンポジウム (2016)  
「Ecological Risk Assessment of Systemic Insecticide in Japan- its progress and challenges」
- 10) 五箇公一: 平成28年度富山県立大学環境講演会 (2016)  
「ネオニコチノイド農薬による 生態影響評価~農薬と農業と私たちの生活~」
- 11) 五箇公一: 一般社団法人日本環境化学会25周年記念講演会 (2016)  
「ネオニコチノイドに代表される現代農薬の生態リスク評価および対策」
- 12) 滝久智, 安田美香, 永光輝義: 日本生態学会第63回大会 (2016)  
「ネオニコチノイド農薬のニホンミツバチ生態リスク」
- 13) 五箇公一, 滝久智: 日本生態学会第63回大会  
「ポリネーターの国際評価を行う意義」
- 14) 安田美香, 永光輝義, 滝久智: 日本生態学会第63回大会 (2016)  
「森林はニホンミツバチの営巣場所として機能しているか?」
- 15) 永光輝義, 安田美香, 滝久智, 岡部貴美子, 五箇公一: 日本生態学会第63回大会 (2016)  
「ニホンミツバチ (*Apis cerana japonica*) の遺伝的多様性に影響する景観要因と遺伝構造」
- 16) 安田美香, 坂本佳子, 五箇公一, 永光輝義, 滝久智: 日本昆虫学会第76回大会・第60回日本応用動物昆虫学会大会合同大会 (2016)

「ニホンミツバチに対する各種殺虫剤の急性経皮毒性試験」

17) 相澤章仁, 野村昌史, 中牟田潔: 日本昆虫学会第76回大会・第60回日本応用動物昆虫学会大会合同大会(2016)

「陸域昆虫類のネオニコチノイド系薬剤に対する感受性の種間差について」

18) 滝久智, 安田美香, 永光輝義: 日本昆虫学会第76回大会・第60回日本応用動物昆虫学会大会合同大会(2016)

「ネオニコチノイド農薬のニホンミツバチに対する影響評価」

19) 五箇公一: 東北ブロック環境保全型農業推進コンクール表彰式・講演会(2017)

「農薬リスクと生物多様性～これからの環境保全型農業のあり方について～」

20) 五箇公一: 日本生態学会第64回全国大会(2017)

「日本における浸透性殺虫剤の生態リスク評価～その進歩と挑戦」

21) 滝久智, 池田紘士, 永光輝義, 安田美香, 杉浦真治, 前藤薫, 岡部貴美子: 第64回日本生態学会大会(2017)

「全国調査で明らかとなったニホンミツバチの窒素と炭素の安定同位体比」

22) 滝久智, 安田美香, 永光輝義: 第61回日本応用動物昆虫学会大会(2017)

「ニホンミツバチへの農薬影響」

23) 中牟田潔, 相澤章仁, 野村昌史: 第61回日本応用動物昆虫学会大会(2017)

「ナス圃場におけるネオニコチノイド系殺虫剤の動態と生態影響」

## 7. 研究者略歴

課題代表者: 中牟田 潔

名古屋大学大学院農学研究科博士後期課程単位取得大学、農学博士、森林総合研究所昆虫生理研究室長、現在千葉大学教授

研究分担者

1) 野村 昌史

東京農工大学大学院連合農学研究科修了、農学博士、現在千葉大学准教授

2) 五箇 公一

京都大学大学院農学研究科修了、宇部興産株式会社農薬研究部研究員、現在、国立環境研究所生物・生態系環境研究センター 生態リスク評価・対策研究室長

3) 林 岳彦

東北大学院理学研究科終了、テネシー大学進化生態学科ポストドクター研究員、産業技術総合研究所環境リスク研究センター特別研究員、現在、国立環境研究所環境リスク・研究センター生態毒性研究室 主任研究員

4) 滝 久智

ゲルフ大学大学院修了、PhD、現在森林総合研究所主任研究員

5) 永光 輝義

京都大学大学院修了、理学博士、現在森林総合研究所北海道支所グループ長

**5-1407          ネオニコチノイド農薬による 陸域昆虫類に対する影響評価研究**

(1) 陸域昆虫類のネオニコチノイド感受性の種間差および生態リスクに関する研究

国立大学法人千葉大学

大学院園芸学研究科生物生産環境学領域

中牟田 潔・野村 昌史

平成 26(開始年度)～28 年度累計予算額：33,548 千円（うち平成 28 年度：11,052 千円）

**[要旨]**

近年、ネオニコチノイド系殺虫剤を代表とする浸透移行型殺虫剤による生態系影響が大きな環境問題として注目を集めている。我が国でも水生昆虫への生態影響が詳しく調べられているが、陸域昆虫への影響は、ハナバチ類を除くとほとんど未解明である。また、ネオニコチノイド系殺虫剤の生態影響が既存の有機リン剤、カーバメート剤あるいは合成ピレスロイド剤と比べてどうなのかも不明である。そこで、本課題では、まず陸域節足動物 24 種を用いた経皮毒性試験によりネオニコチノイド系農薬 6 剤、フェニルピラゾール系農薬 2 剤、有機リン系農薬 3 剤、カーバメート系農薬 1 剤、合成ピレスロイド系農薬 1 剤、ジアミド系農薬 1 剤の半数致死量 (LD50 値) を求め、種の感受性分布曲線(SSD)を描いた。その結果、ネオニコチノイド系農薬は SSD の傾きが小さくなる傾向を示した。すなわち、ネオニコチノイド系農薬は、従来の農薬よりも感受性幅が広く、影響を受けやすい種と受けにくい種が存在した。したがって数少ない指標種のみによるリスク評価では適切な評価が難しい。また、フェニルピラゾール系農薬はネオニコチノイド系農薬よりも SSD の傾きがさらに小さくなった。したがって、フェニルピラゾール系農薬のリスク評価はさらに難しいと思われる。さらに、実用濃度による生態影響を明らかにすべく、ネオニコチノイド系農薬 2 剤、フェニルピラゾール系農薬 1 剤、有機リン農薬 1 剤の粒剤を、農薬使用履歴のないモデルナス圃場に施用し周辺植物体上の昆虫相への影響、植物体および土壌中への残留農薬を調べた。3 作期繰り返し施用し調査した結果、周辺植物体上の昆虫相への明確な負の影響はいずれの農薬でも検出されなかった。また、3 作期連続施用すると、農地外の土壌中および周辺植物体から残留農薬が検出されたが、その濃度は農地内の濃度と比べると土壌、植物体とも 1/10～1/1,000 程度であり、低濃度であることが示された。

**[キーワード]**

経皮毒性試験、種の感受性分布、圃場試験、ネオニコチノイド系農薬、フェニルピラゾール系農薬、残留、生態影響

**1. はじめに**

近年、ネオニコチノイド系殺虫剤を代表とする浸透移行型殺虫剤による生態系影響が大きな環境問題として注目を集めている<sup>1,2,3,4)</sup>。浸透移行型殺虫剤は植物の根から吸収されて、植物体内に移行するという特性をもち、日本・東南アジアでは水稻の箱苗処理剤として 1990 年代より広く使用されている。また欧米では畑作物の種子処理剤として普及してきた。本剤は、OECD テストガイドラインに基づく水生生物急性毒性試験では、毒性が極めて低いことが示されることか

ら、生態影響の低い薬剤と判定されていた。しかし、我が国では近年になって、本系統剤による水田および周辺の節足動物群集に対する悪影響が懸念されるようになり、室内毒性試験やメソコズム試験により水生生物に対して極めて低濃度でも毒性が高いことが示されている<sup>5)</sup>。また、これまで国内外でセイヨウミツバチに対する影響がクローズアップされてきている<sup>6)</sup>が、その他の陸域野生昆虫類に対する影響はよくわかっていない<sup>7)</sup>。とくに農業生態系における、無害・無益な、いわゆる、「ただの虫」への影響は不明である。さらに、ネオニコチノイド系殺虫剤が既存の殺虫剤よりも生態影響が強いのかについても科学的根拠が明確ではない。

## 2. 研究開発目的

本課題では、農業環境周辺に生息する様々な昆虫類やクモ類に対する浸透移行型殺虫剤の室内毒性試験を実施して影響濃度を求める。さらに農薬を処理した実験圃場を設定し、周辺エリアにおける節足動物群集の動態および土壌中、植物体への残留農薬を調査し、暴露影響を評価する。経皮毒性試験においては、ネオニコチノイド系農薬以外に既存の有機リン剤、カーバメート剤、合成ピレスロイド剤など 14 剤を用いて、合計 24 種の陸域昆虫種に対する半数致死量 (lethal dosage 50: LD50) を求める。得られた毒性値に基づき、種の感受性分布 species sensitivity distribution: SSD を描き、生物種間の感受性の違いおよび薬剤間の生態影響の違いを明らかにする。さらに、農薬を処理した実験圃場を設定し、周辺エリアにおける節足動物群集の動態および土壌中、植物体への残留農薬を調査し、暴露影響を評価する。

## 3. 研究開発方法

### (1) 室内毒性試験

ネオニコチノイド系農薬の生態リスク評価を行うため、14 種類の薬剤 (表(1)-1) を用いて節足動物 24 種 (表(1)-2) への経皮暴露試験を試みた。各農薬の原体を有機溶媒に溶解させて対象とする節足動物種に塗布し、2 日後に生死を判定した。この時苦悶虫はその後回復せずに死亡した場合、苦悶しはじめた時点で死亡したと判断した。塗布する農薬量 (dose) は 2-4 倍の間隔で、ほとんどの個体が生存する量とほとんどの個体が死亡する量の間で十分な反復 (15-30) がとれるよう適宜調整した。上記の方法で収集したデータを用いて各薬剤、各節足動物の組み合わせで半数致死量 (LD50) をロジスティック回帰によって計算した。ロジスティック回帰は応答変数に各個体の生死を 1, 0 で表したものを用い (死亡が 1)、説明変数に農薬量と生重量を設定した (式 1, 2)。応答変数の誤差はベルヌーイ分布を仮定した。

$$\text{death rate} \sim \text{Bernoulli}(y) \quad (\text{式 1})$$

$$\text{logit}(y) = \beta_0 + \beta_1 * (\text{dose}) \quad (\text{式 2})$$

death rate: 死亡率 (各個体の生死)、dose: 農薬量、 $\beta_{0,1}$ : パラメータ

式 1 において death rate が 0.5 になる時は式 2 の右辺が 0 となる時であるため、推定したパラメータから以下の式で LD50 を求めることができる (式 3)。

$$\text{LD}_{50} = -\beta_0 / \beta_1 \quad (\text{式 3})$$

得られた LD50 値を薬剤ごとに対数正規分布に適合させて種の感受性分布 (SSD: Species Sensitivity Distribution)<sup>8)</sup>を作成した。この時 LD50 値が高すぎて計算できなかった種については、試験した最大値の 10 倍の値を LD50 と仮に設定した。なお、トラマルマルハナバチとクロ

マルハナバチ、およびニホンミツバチとセイヨウミツバチの LD50 値は、それぞれサブテーマ 2 と 3 の結果を用いた。生態リスク評価では、全体の 5% の種が影響を受ける薬量 (HD5: 5% Hazardous Dose) を計算することが一般的であるが、選択性が高い薬剤ほど SSD の傾きが緩やかになり、HD5 の値が小さくなる傾向があるため、全体の 50% が影響を受ける濃度 HD50 も併せて計算した

最後に、得られたデータの一部を用いて nMDS 法による序列化を行い、各薬剤の殺虫スペクトルを明らかにした。この時感受性が高い種が高い値を持つように、LD50 の逆数を用いた。

表(1)-1 毒性試験に用いた薬剤

1	薬剤の系統	薬剤名	対象種数
ネオニコチノイド系	ネオニコチノイド系	イミダクロプリド	20
ネオニコチノイド系	フェニルピラゾール系	フィプロニル	19
新規浸透移行薬剤	アントラニックジアミド系	クロラントラニリプロール	17
従来薬剤	有機リン系	ダイアジノン	17
従来薬剤	ピレスロイド系	エトフェンプロックス	15
従来薬剤	カーバメート系	カルバリル (NAC)	12
ネオニコチノイド系	ネオニコチノイド系	クロチアニジン	11
ネオニコチノイド系	ネオニコチノイド系	チアメトキサム	9
ネオニコチノイド系	ネオニコチノイド系	アセタミプリド	8
従来薬剤	有機リン系	フェントロチオン (MEP)	9
従来薬剤	有機リン系	ジメトエート	8
ネオニコチノイド系	ネオニコチノイド系	ジノテフラン	6
ネオニコチノイド系	ネオニコチノイド系	ニテンピラム	5
ネオニコチノイド系	フェニルピラゾール系	エチプロール	5

表(1)-2 経皮暴露試験対象種一覧

目	和名	学名
バッタ目	オンブバッタ	<i>Atractomorpha lata</i>
バッタ目	エンマコオオロギ	<i>Teleogryllus emma</i>
バッタ目	スズムシ	<i>Homoeogryllus japonicu</i>
カメムシ目	マルシラホシカメムシ	<i>Eysarcoris guttigerus</i>
カメムシ目	ホソハリカメムシ	<i>Cletus punctiger</i>
カメムシ目	オオメナガカメムシ	<i>Geocoris varius</i>
カメムシ目	ヨコヅナサシガメ (幼虫)	<i>Agriosphodrus dohrni</i>
カメムシ目	ホオズキカメムシ (成虫)	<i>Acanthocoris sordidus</i>
アミメカゲロウ目	カオマダラクサカゲロウ (幼虫)	<i>Mallada desjardinsi</i>
コウチュウ目	コアオハナムグリ	<i>Oxycetonia jucunda</i>
コウチュウ目	ナミテントウ (幼虫)	<i>Harmonia axyridis</i>
コウチュウ目	ダンダラテントウ	<i>Cheilomenes sexmaculat</i>
コウチュウ目	アズキゾウムシ	<i>Callosobruchus chinensi</i>
チョウ目	アメリカシロヒトリ (幼虫)	<i>Hyphantria cunea</i>
チョウ目	キクキンウワバ (幼虫)	<i>Thysanoplusia intermixta</i>
チョウ目	ハスモンヨトウ (幼虫)	<i>Spodoptera litura</i>
ハチ目	トラマルハナバチ	<i>Bombus diversus diversu</i>
ハチ目	コマルハナバチ	<i>Bombus ardens ardens</i>
ハチ目	クロマルハナバチ	<i>Bombus ignitus</i>
ハチ目	セイヨウミツバチ	<i>Apis florea</i>
ハチ目	ニホンミツバチ	<i>Apis cerana japonica</i>
ハチ目	トビイロシワアリ	<i>Tetramorium tsushimae</i>
ハチ目	アミメアリ	<i>Pristomyrmex punctatus</i>
ワラジムシ目	オカダンゴムシ	<i>Armadillidium vulgare</i>

## (2) 圃場試験

フィールドにおけるネオニコチノイド系薬剤の生態影響を調べるため、圃場試験を行った。2014年9月30日、2015年5月14日、2015年8月20日の計3回、国立環境研究所谷田部圃場（茨城県つくば市）においてナス苗（千両二号）を対象薬剤の粒剤1gと共に定植した。9m×9mの敷地を10区画用意し、ダントツ（イミダクロプリド1%）、アドマイヤー（クロチアニジン0.5%）、プリンス（フィプロニル1%）、ダイアジノン（ダイアジノン5%）、コントロールの調査区をそれぞれ2反復ずつ設置した（図(1)-1）。なお、本圃場は本試験を行うまで農薬の使用履歴がないことを確認している。

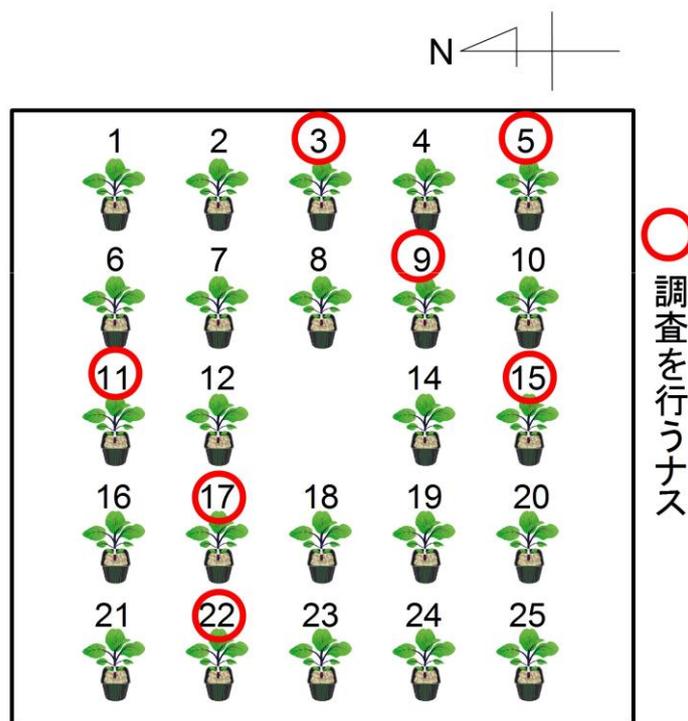
各区では中央の3m×3mを畑として、その周囲3mはバッファゾーンとした。畑には50cm間隔でナス苗24本を植えた（図(1)-2、中心の1本は除く）。

1) 生物相調査：ナス定植後8週にわたって毎週ナス植物体上の見取り調査（各調査区において図(1)-2で指定した7株が対象）と、バッファゾーンのスリーピング調査を行った。ナス

植物体上の見取り調査において出現した種は、アブラムシ、アリ、クモ、アザミウマ、コナジラミ、その他の6つのカテゴリー種に分類した。



図(1)-1 圃場試験における各薬剤の配置



図(1)-2 各プロット内におけるナス苗の配置と調査した苗の位置

その他を除く各カテゴリー種の出現個体数が農薬から影響を受けるかどうかを調べるため、階層ベイズモデルを用いて統計モデリングを行った。ナス個体上の各種の個体数をポワソン分布によって表し

(式4)、切片、薬剤の違い、調査者・調査週によるランダム効果を線形予測子の変数として設定した(式5)。

$$(\text{number}) \sim \text{Poisson}(y) \quad (\text{式4})$$

$$\log(y) = \beta_{00} + \sum (\beta_{0i} * (\text{pesticide}_i)) + \varepsilon_{\text{researcher}} + \varepsilon_{\text{week}} \quad (\text{式5})$$

number: 個体数、pesticide<sub>i</sub>: 薬剤の種類、 $\varepsilon_{\text{researcher}}$ : 調査者によるランダム効果、 $\varepsilon_{\text{week}}$ : 調査週によるランダム効果、 $\beta_{0,i}$ : パラメータ

各薬剤の係数はコントロールを基準値0とおいて計算した。95%信用区間に0が含まれるかどうかで各薬剤がコントロールと比較して対象生物の出現確率が高いか低いかを判断した。各パラメータの事前分布は無情報事前分布を設定した。

スリーピング調査の結果では、同様の式に植物の被度の影響を考慮したモデルを用いて各薬剤との相関の有無を判断した。ただし、スリーピング調査の解析では、バッファゾーンにある程度の植物が生育しはじめた4週目以降のデータを用いて解析を行った。

**2) 農薬の残留分析:** 農薬の残留を調査するため、3m四方の畑の縁から0m, 1mの位置にある土壌を深さ5cmで、1m, 2mの位置にある草本種(雑草)数種の植物体を各場所で採取した。採取はナス定植後1, 2, 4, 8週目に行った。採取した植物体、土壌について各薬剤の残留分析をLC/MSMSを用いて行った。試料の調整方法、LC/MSMSの分析条件は下記のとおりである。なお、検出限界値以下の値は0.001 $\mu$ に統一した。

#### <植物体試料の調整>

植物体試料を細断し、50 ml 遠心管に分取し重量を測定した。この植物体試料にアセトニトリル:水(90:10)の混液を10 ml 加え、超音波槽にて10分間、往復振盪器にて180 rpm、10分間振盪抽出を行った。抽出後、6,000rpm、10分間遠心分離を行なった。この抽出液を遠心ろ過ユニット(Millipore Ultrafree 0.20  $\mu$ m)でろ過し分析用の試験液とした。この試験液を用いてLC/MSMSにて測定を行った。

#### <土壌試料の調整>

採取した土壌試料をプラスチック製のバットに広げ、暗所にて風乾した。得られた乾燥土壌を10 g ずつ50 ml 遠心管に分取した。この土壌試料にアセトニトリル:水(90:10)の混液を10 ml 加え、超音波槽にて10分間、往復振盪器にて180 rpm、10分間振盪抽出を行った。抽出後、6,000rpm、10分間遠心分離を行なった。この抽出液を遠心ろ過ユニット(Millipore Ultrafree 0.20  $\mu$ m)でろ過し分析用の試験液とした。この試験液を用いてLC/MSMSにて測定を行った。

#### <分析機器と条件>

液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(LC/MSMS: Waters Xevo-TQ)

カラム : GL Sciences InertSustain C18 HP 3 $\mu$ m 2.1 $\times$ 150 mm

カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C

移動相 : メタノール:5mM 酢酸アンモニウム水溶液 混液(直線濃度勾配)

移動相濃度条件 : メタノール 5%  $\rightarrow$  18.75%/min  $\rightarrow$  95%

流速 : 0.5 ml/min

試料注入量 : 1~50  $\mu$ l

キャピラリー電圧 : 0.25 kV  
ソース温度 : 150°C  
脱溶媒温度 : 550°C

### (3) 国内外におけるネオニコチノイド系殺虫剤の生態リスク評価・管理に関する情報収集・整備

欧州食品安全機関 EFSA のデータベース、および関連学術論文に基づき、生態リスク評価・管理に関する各種情報収集および整理を行った。また、とくに訪花性昆虫類に対するリスク評価手法開発を目的として欧米や、南米、インドにおけるネオニコチノイド農薬およびその他の系統剤 29 剤の花蜜・花粉中の残留濃度調査事例を収集し、さらにミツバチおよびマルハナバチ類の毒性試験データを US-EPA が管理する ECOTOX データベースからデータマイニングして、得られたデータセットを用いてハチ類の暴露影響評価を行うとともに、残留農薬の蓄積による生体リスクの評価を試みた。

## 4. 結果及び考察

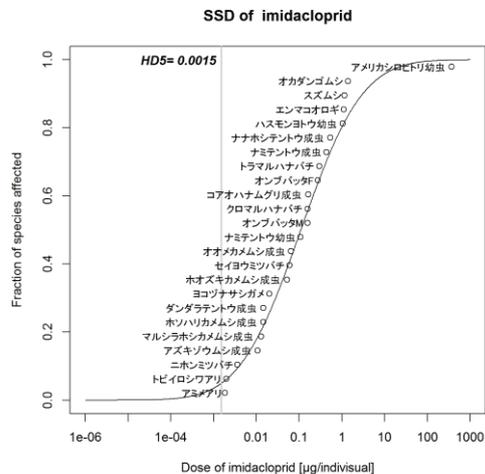
### (1) 室内毒性試験

各薬剤について、最低限の反復が得られた種を用いて SSD を作成した (図(1)-3)。ネオニコチノイド系薬剤であるイミダクロプリド、クロチアニジン、チアメトキサム、アセタミプリド、ジノテフラン、およびフェニルピラゾール系薬剤のフィプロニルは HD5 および HD50 共に従来薬剤よりも概ね低い値を示しており (図(1)-4、(1)-5)、多くのネオニコチノイド系薬剤は従来薬剤よりも毒性値が高いと言える。ただし、HD50 の差は HD5 の差よりも小さい傾向にあり、ネオニコチノイド系薬剤では SSD の傾きが緩やかであることを示している。従って、ネオニコチノイド系薬剤は選択性が高く、大きく影響を受ける種と、まったく影響を受けない種に分かれることが予測される。逆に従来の薬剤は取りうる LD50 のレンジも狭く (図(1)-6)、SSD の傾きが比較的急であるため (図(1)-7)、濃度が高くなると影響を受ける種が急激に増加することとなる。すなわち、ネオニコチノイド系薬剤は、選択性をうまく利用して濃度を低く抑えて使えば、従来薬剤よりも環境影響を低下させることも可能であると考えられる。

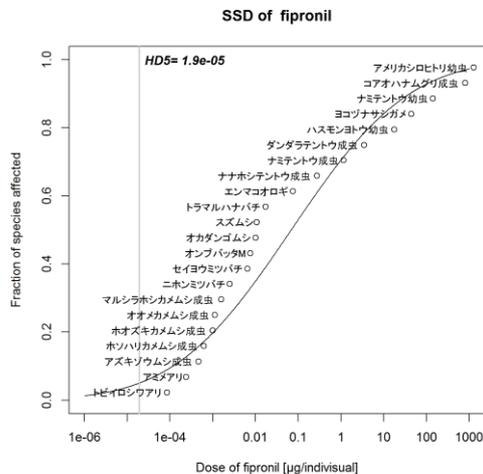
ネオニコチノイド系薬剤やフェニルピラゾール系薬剤は、SSD の傾きが既存の有機リン剤、カーバメート剤、合成ピレスロイド剤などに比べると小さいため (図(1)-7)、基準となる指標種のみによるリスク評価では的確な評価が難しい可能性がある。また、浸透移行性を示す薬剤のなかでもフェニルピラゾール系薬剤はネオニコチノイド系薬剤よりもさらに SSD が寝る傾向があり (図(1)-8)、リスク評価はネオニコチノイドよりも難しいと考えられる。

1) ハチ類に関する評価: 近年ネオニコチノイド系薬剤による影響が特に懸念されるハチ類について、図(1)-1 の SSD から、影響を受ける種の 20% 以下にプロットされているものを取り上げると、ニホンミツバチがイミダクロプリド、クロラントラニリプロール、ダイアジノン、エトフェンプロックス、カルバリル、クロチアニジン、チアメトキサム、ジノテフラン、エチプロールで、セイヨウミツバチがエトフェンプロックス、エチプロールで特に感受性が高いことがわかった。トラマルハナバチ、クロマルハナバチはいくつかのネオニコチノイド系薬剤について試験が行われたが、20% 以下にプロットされることはなかった。ニホンミツバチは多く

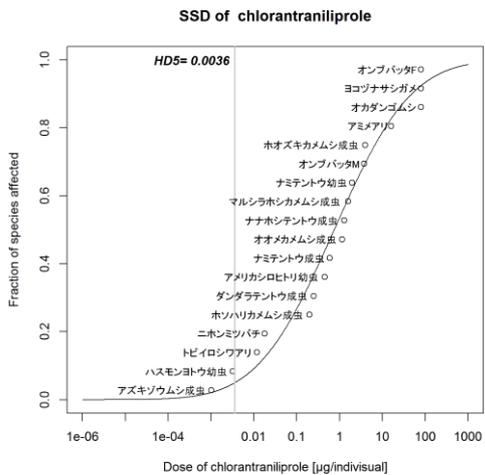
の薬剤の感受性が高いことがわかったが、特にネオニコチノイド系のみ高い訳ではなく、エトフェンプロックスやカルバリルなどでも感受性が高いことが明らかとなった。



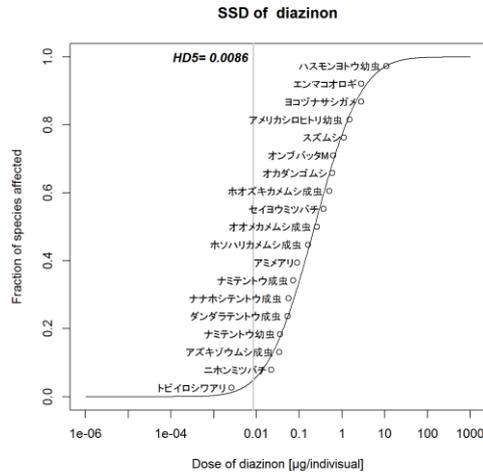
イミダクロプリド



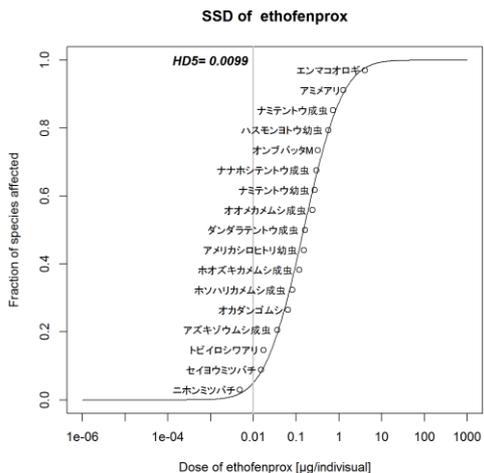
フィプロニル



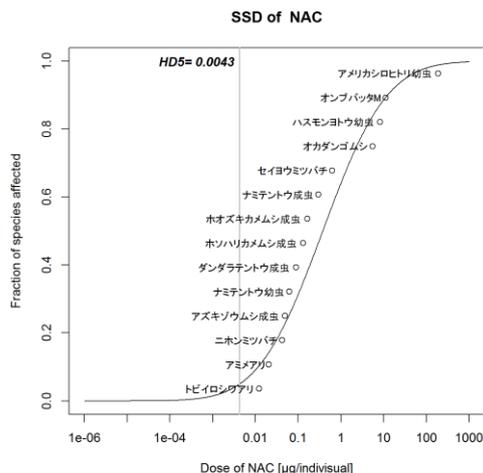
クロラントラニプロール



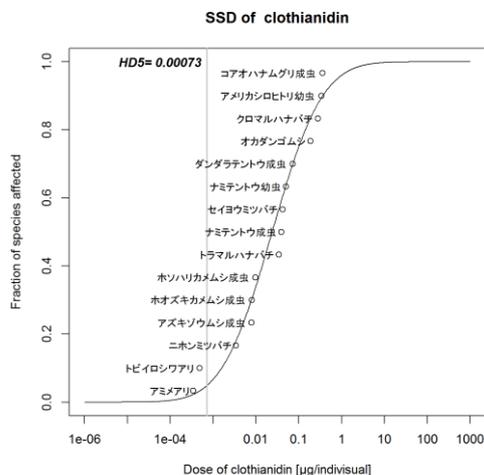
ダイアジノン



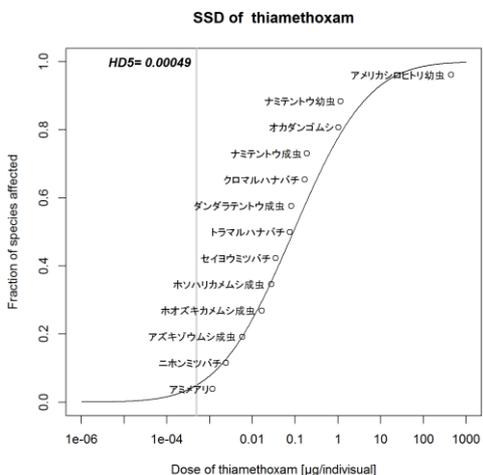
エトフェンプロックス



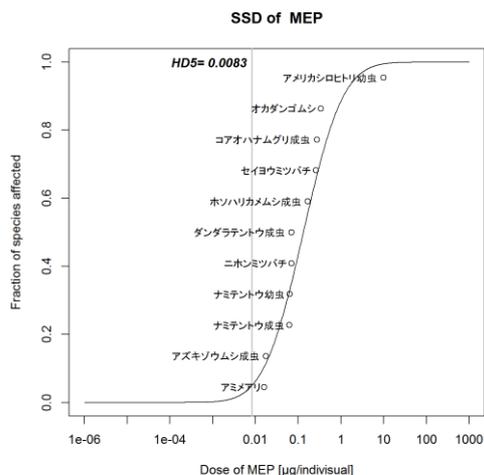
カルバリル(NAC)



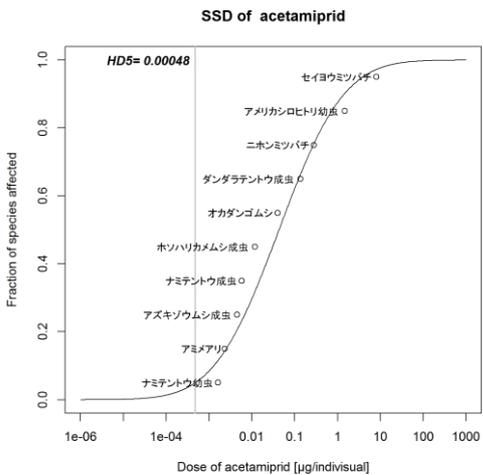
クロチアニジン



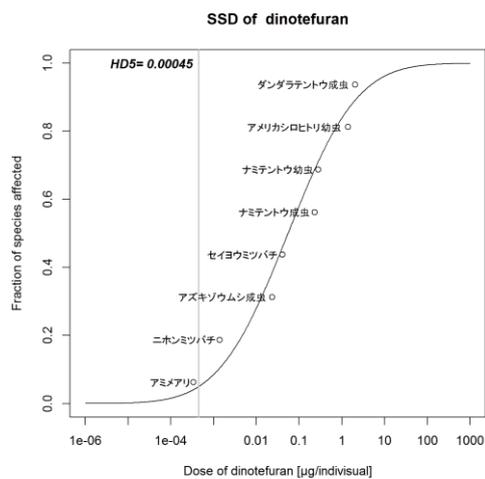
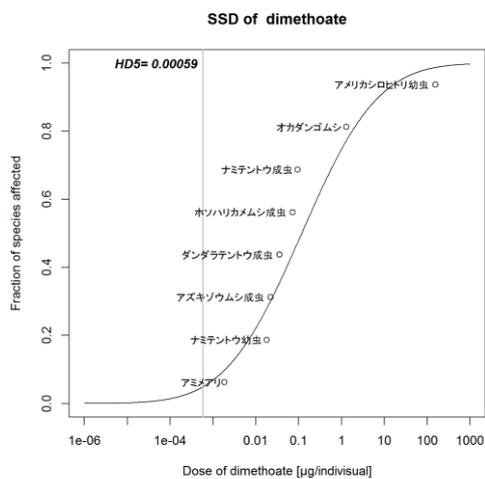
チアメトキサム



フェニトロチオン(MEP)

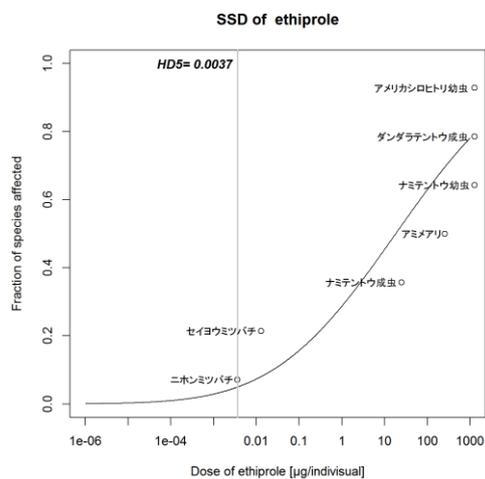
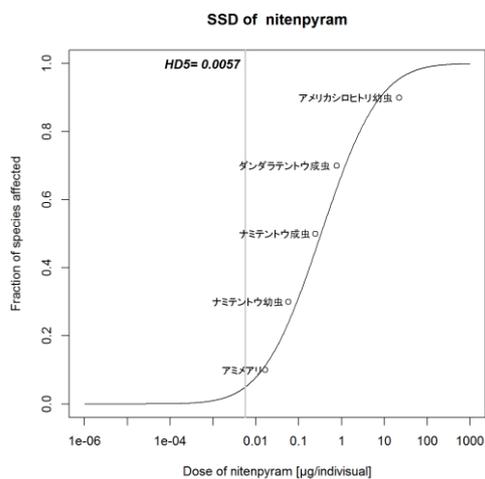


アセタミプリド



ジメトエート

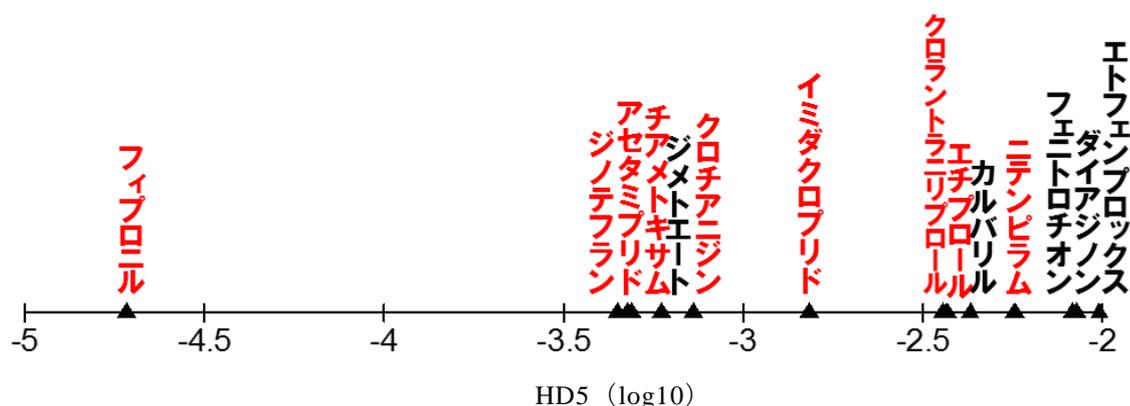
ジノテフラン



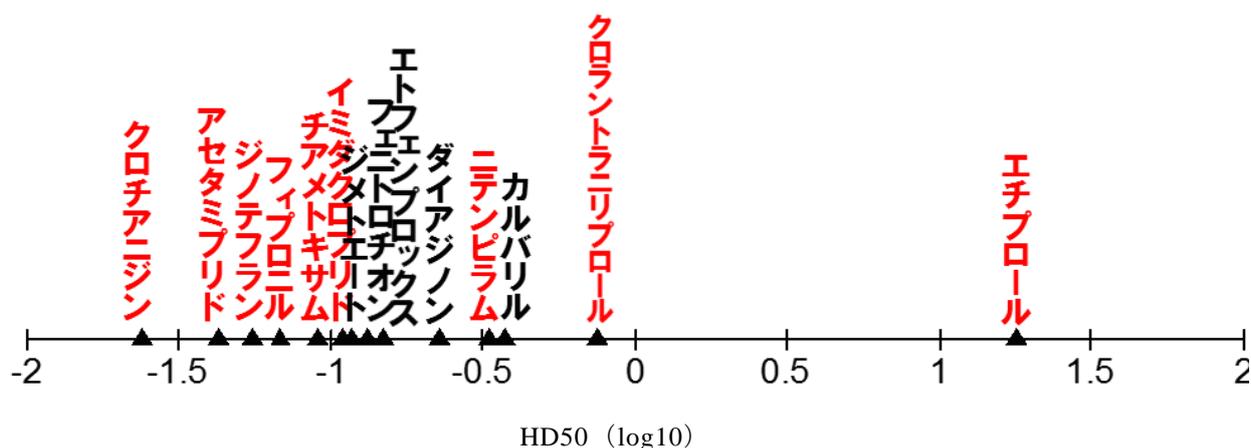
ニテンピラム

エチプロール

図(1)-3 各薬剤における種の感受性分布 (SSD)

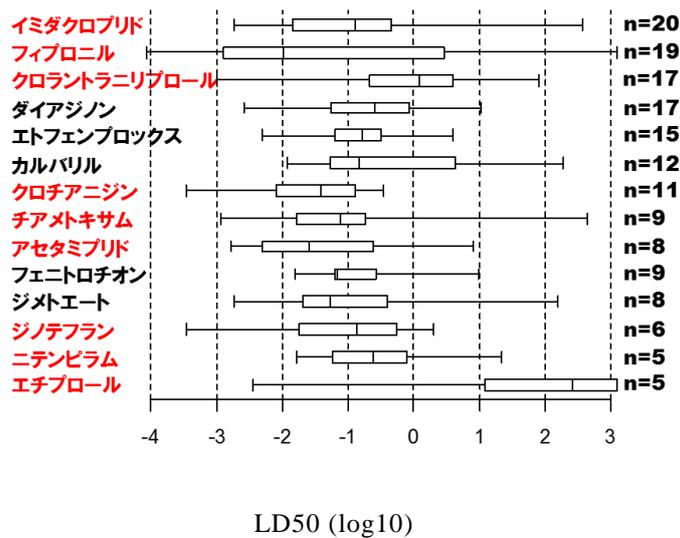


図(1)-4 各薬剤の HD5 の値（赤字はネオニコチノイド系および新規薬剤を示し、黒字は新規薬剤を示す。）

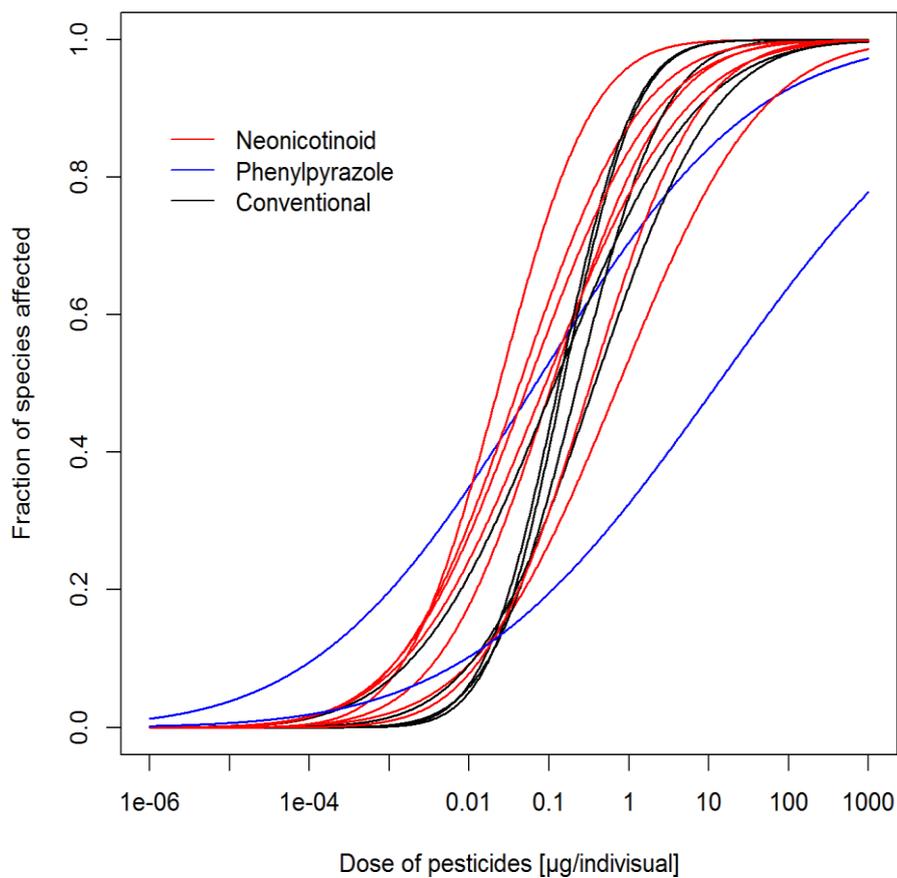


図(1)-5 各薬剤の HD50 の値（赤字はネオニコチノイド系および新規薬剤を示し、黒字は新規薬剤を示す。）

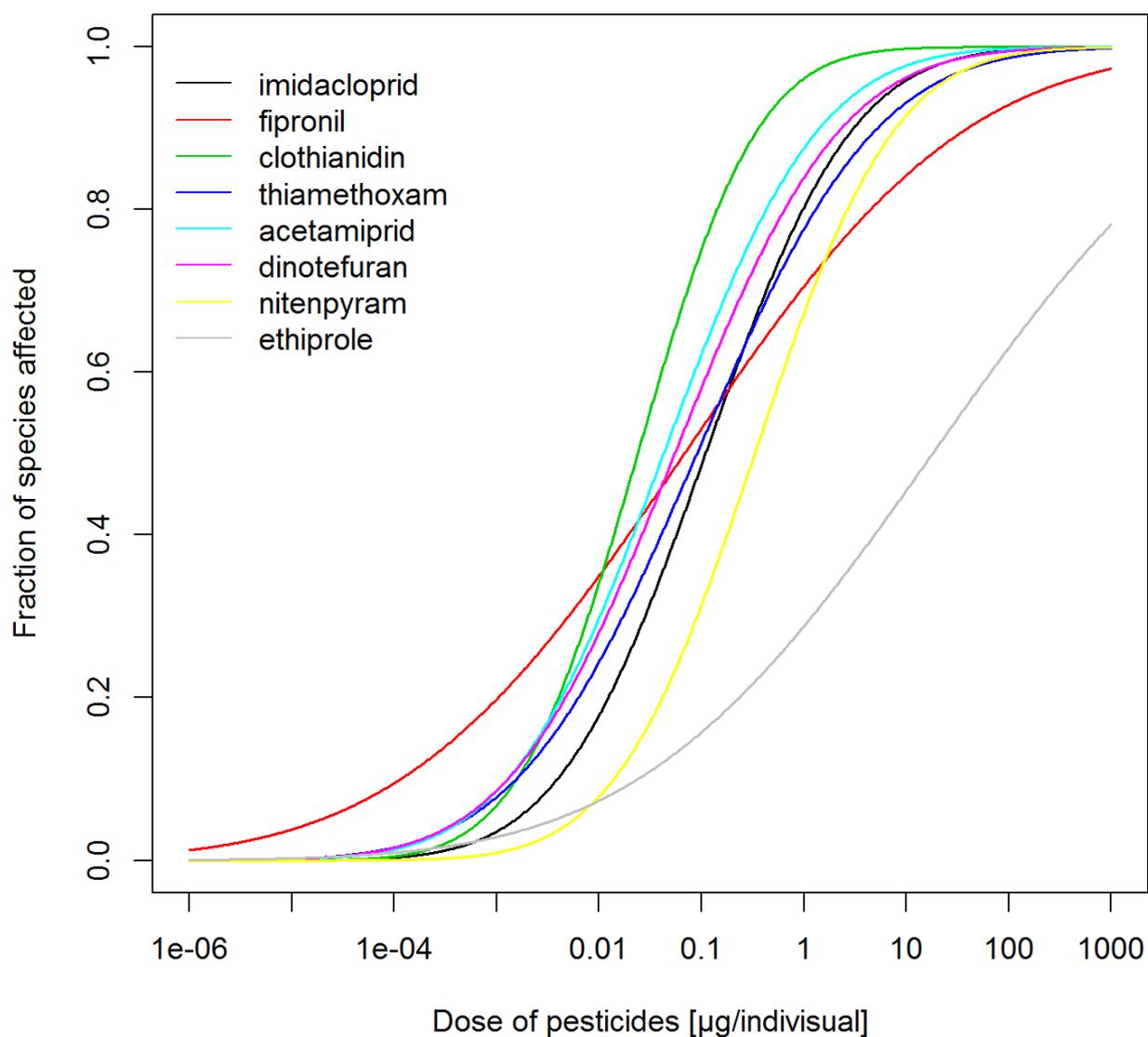
2) 各薬剤の殺虫スペクトルの違い：イミダクロプリド、フィプロニル、クロラントラニプロール、ダイアジノン、エトフェンプロックス、カルバリルの薬剤についてのナミテントウ成虫、ナミテントウ幼虫、ダングラテントウ、アズキゾウムシ、ホオズキカメムシ、ホソハリカメムシ、オンブバッタ、アメリカシロヒトリ幼虫、ハスモンヨトウ幼虫、オンブバッタ（オス）、ニホンミツバチの LD50 値の逆数を用いて nMDS 法による序列化を行った（図(1)-9）。2次元の nMDS 平面に各薬剤と共試虫がプロットされた結果、第1軸はフィプロニルと強い相関が見られ、カメムシ類、アリ類、オンブバッタ（オス）やオカダンゴムシの感受性が高いことが見受けられた。第2軸は正の方向にイミダクロプリド、負の方向にエトフェンプロックス、クロラントラニプロールの相関が見られた。エトフェンプロックス、クロラントラニプロールはチョウ目幼虫の感受性が高いことが示唆された。ダイアジノン、カルバリルは第一平面方向に矢印が示され、テントウムシ類の感受性が高いことが示された。



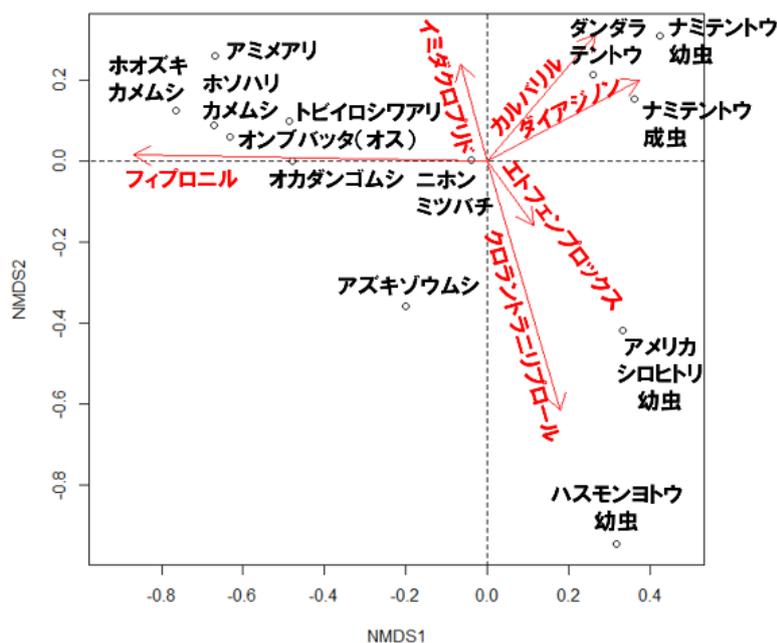
図(1)-6 各薬剤における LD50 のばらつき。ボックスの肩は第1 第3 四分位数、ボックス内の縦線は中央値、エラーバーは最大値、最小値をそれぞれ示している。



図(1)-7 従来薬剤(Conventional)とネオニコチノイド系薬剤およびフェニルピラゾール系薬剤の SSD



図(1)-8 浸透移行性示すネオニコチノイド系薬剤(imidacloprid, clothianidin, thiamethoxam, acetamiprid, dinotefuran, nitenpyram)とフェニルピラゾール系薬剤(fipronil, ethiprole)の SSD



図(1)-9 nMDS 法による序列化の結果

## (2) 圃場試験

1) 生物相調査：ナス株上の見取り調査の結果を用いた統計モデリングの結果、薬剤により効果の程度は違うものの、各節足動物種の出現個体数への影響は概ね同様の傾向があることが明らかとなった（表(1)-3）。害虫種に関しては、アブラムシ spp.、アザミウマ spp.、ウンカ・ヨコバイ spp.に対して4種の薬剤の切片すべてがコントロール区よりも低い95%信用区間を持つことが示された。コントロールとの差の程度については種群によって違いが見られたが、この3つの種群に対しては、イミダクロプリドでもっとも大きな負の相関が示された。イミダクロプリド、クロチアニジン、フィプロニルの3剤はダイアジノンよりも農薬の薬剤濃度が5-10倍低いにも関わらず、同等もしくはそれ以上の効果が現れていることから、その毒性の高さがうかがえる。ハムシ spp.では、他の3薬剤が負の値を示すのに対し、フィプロニルのみが相関なしと判断された。フィプロニルは上述の急性毒性試験においても感受性の高低が2分されることが示されているが、コウチュウ目は感受性が低いものが多く、ハムシ spp.に対しても効果を発揮しなかった可能性が考えられる。ハダニ spp.、コナジラミ spp.に関しては、コントロール区よりもすべての薬剤区で正の値が示された。ハダニはネオニコチノイド剤の影響下で増加することが先行研究においても示されているが、その理由をはっきりとは示されていない。ハダニやコナジラミの天敵種、あるいは競争種の減少などの生物的要因が関係しているものと考えられる。チョウ目幼虫 spp.に関しては、急性毒性ではチョウ目幼虫の感受性が低かったイミダクロプリド、フィプロニルが負の値を示した。チョウ目でも感受性の高い種と低い種がいる可能性もあり、今後さらなる検討が必要である。捕食寄生者については、肉食カメムシに対してすべての薬剤が、アリに対してネオニコチノイド系3薬剤が負の影響を与えていた。これらの捕食者は株間の移動ができるだけの

移動能力を持っているため、薬剤の直接的な致死効果ではなく、餌となるアブラムシやアザミウマの減少を介した間接効果であると考えられる。

表(1)-3 各分類群のナス株上の個体数に影響を与えた薬剤の係数（中央値）

	分類群名	薬 剤				
		イミダクロプリド	クロチアニジン	フィプロニル	ダイアジノン	
応答変数	害虫	アブラムシ spp.	-3.32 (a)	-3.20 (a)	-0.60 (b)	-0.56 (b)
		アザミウマ spp.	-1.65 (a)	-0.97 (b)	-1.43 (a)	-0.28 (c)
		ウンカ・ヨコバイ spp.	-1.25 (a)	-1.88 (a)	-0.41 (c)	-0.79 (b)
		ハダニ spp.	2.57 (c)	3.11 (d)	1.99 (b)	0.35 (a)
		コナジラミ spp.	0.62 (b)	1.22 (d)	1.01 (c)	0.20 (a)
		ハムシ spp.	-1.20	-1.64	n. s.	-0.54
		チョウ目幼虫 spp.	-1.00	n. s.	-0.84	n. s.
	捕食寄生者	肉食テントウムシ成虫 spp.	0.81	n. s.	n. s.	n. s.
		肉食カメムシ spp.	-1.51	-1.01	-0.74	-0.75
		寄生蜂・寄生バエ spp.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
		徘徊性クモ spp.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
		造網性クモ spp.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
		アリ spp.	-1.97 (a)	-2.26 (a)	-2.26 (a)	0.40 (b)

数値はベイズモデルによる推定の係数（中央値）を表す。n. s. はコントロール区と 95% 信用区間が重なる係数を示す。()内のアルファベットの違いは 95%信用区間に重ならない変数を表している。アルファベットは係数の値の低いものから順につけている。

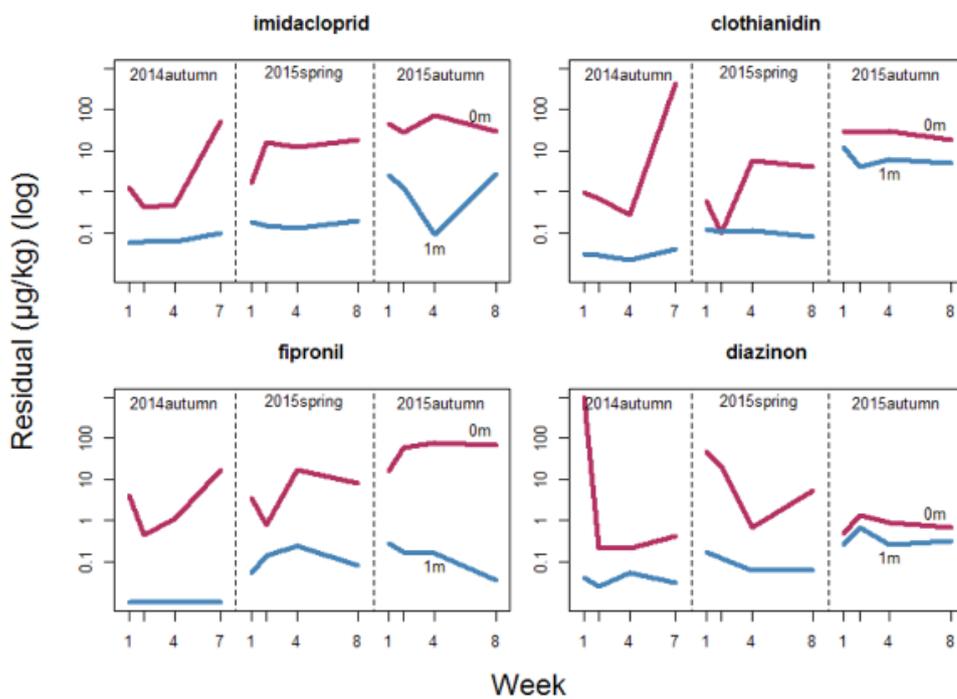
バッファゾーンにおけるスリーピング結果を用いた統計モデリングでは、ナス株上の見取り調査の結果とは違い、各節足動物種の出現個体数への影響は薬剤によって様々なパターンをとることがわかった（表(1)-4）。フィプロニルとダイアジノンは3つの分類群と負の相関があったが、イミダクロプリドでは1つの分類群に留まり、クロチアニジンでは負の相関をとる分類群はひとつもなかった。イミダクロプリドとクロチアニジンはバッファゾーンの植物における農薬残留値が低い傾向にあり、ダイアジノンは高い傾向にあるため、これら3剤の結果については残留値によってある程度の説明がなされうる。しかし、フィプロニルに関しては残留値が低いにも関わらず、ダイアジノンと同様の3種で負の相関が見られることは特筆すべきことである。フィプロニルはアブラムシ spp. がとくに少ない傾向にあり、それが間接効果を介して他種に影響を与えている可能性もある。急性毒性試験ではフィプロニルは選択性が高く、フィプロニルの感受性の高い種はとくに LD50 が低い傾向にあることが示されている。この様な場合は非常に低い残留値でも特定の種に大きな影響を与え、それを介してさらに他の種に影響を与える可能性が考えられる。

表(1)-4 各分類群のスケーリング時の個体数に影響を与えた薬剤の係数（中央値）

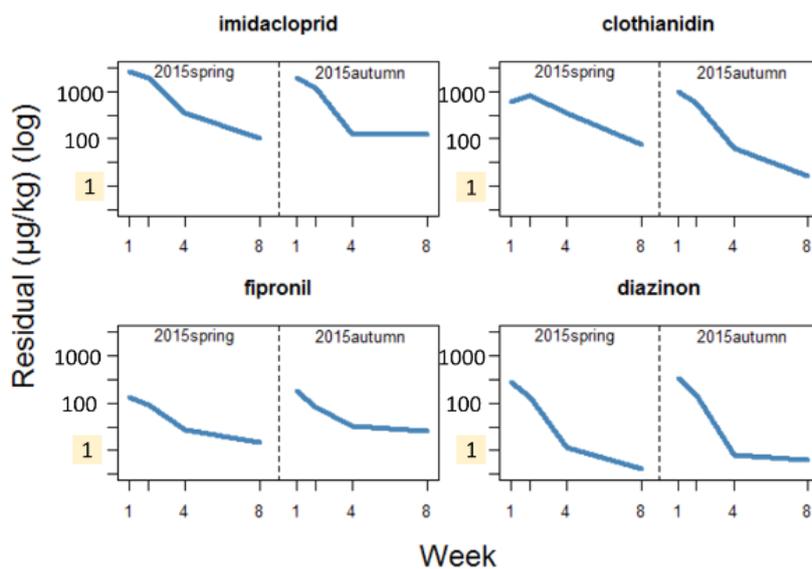
	分類群名	薬 剤				被度	
		イミダクロプリド	クロチアニジン	フィプロニル	ダイアジノン		
応答変数	害虫	アブラムシ spp.	-0.81 (b)	1.28 (c)	-3.21 (a)	n. s. (b)	0.028
		アザミウマ spp.	n. s. (ab)	2.23 (c)	0.49 (b)	-0.94 (a)	0.005
		ウンカ・ヨコバイ spp.	0.57	n. s.	n. s.	n. s.	0.020
	天敵	草食性カメムシ spp.	n. s. (b)	n. s. (ab)	n. s. (ab)	-1.47 (a)	0.008
		寄生蜂・寄生バエ spp.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	0.018
		造網性クモ spp.	n. s. (ab)	0.71(b)	-0.69 (a)	n. s. (a)	0.021
	その他	アリ spp.	n. s. (ab)	0.65 (b)	n. s. (ab)	-0.69 (a)	n. s.
		ハチ目 spp.	2.01 (b)	n. s. (b)	-13.4 (a)	n. s. (b)	n. s.
		ハエ目 spp.	0.66 (ab)	1.07 (b)	0.47 (a)	0.47 (a)	0.007
		バッタ目 spp.	1.27	1.11	1.73	1.11	0.021

数値はベイズモデルによる推定の係数（中央値）を表す。n. s. はコントロール区と 95% 信用区間が重なる係数を示す。()内のアルファベットの違いは 95%信用区間に重なりのない変数を表している。アルファベットは係数の値の低いものから順につけている。

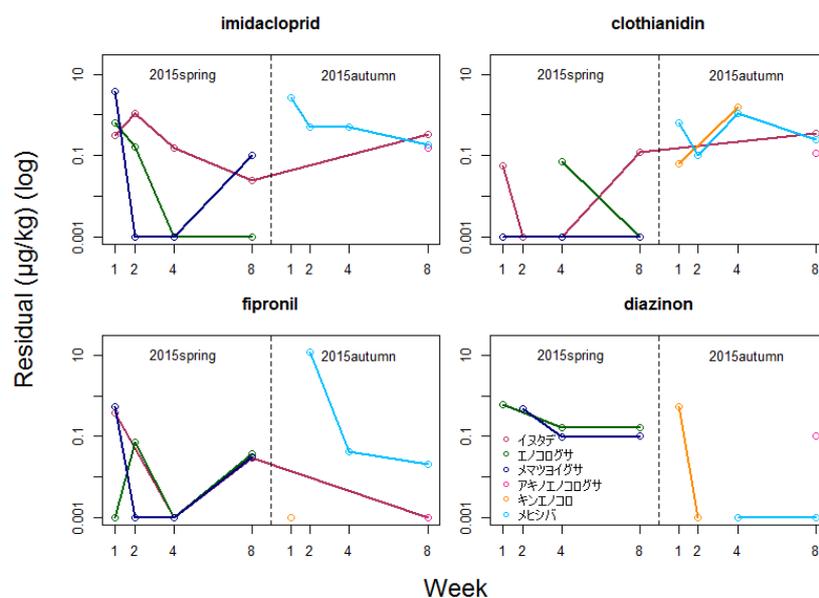
2) 農薬の残留分析：土壌試料の残留分析の結果、イミダクロプリド、クロチアニジン、フィプロニル、ダイアジノンのそれぞれが畑の 0m、1m 地点から検出された（図(1)-10）。フィプロニルが 1 回目施用時に 1m 地点でまったく検出されなかったこと以外は季節や施用回数による明らかな傾向の違いは見当たらなかった。ナス（図(1)-11）、バッファゾーン内の植物（図(1)-12）の残留分析でもそれぞれの薬剤の残留が検出されたが、雑草の残留値はナスの 100 分の 1 程度の値であった。



図(1)-10 土壌中への残留



図(1)-11 圃場内ナスへの残留



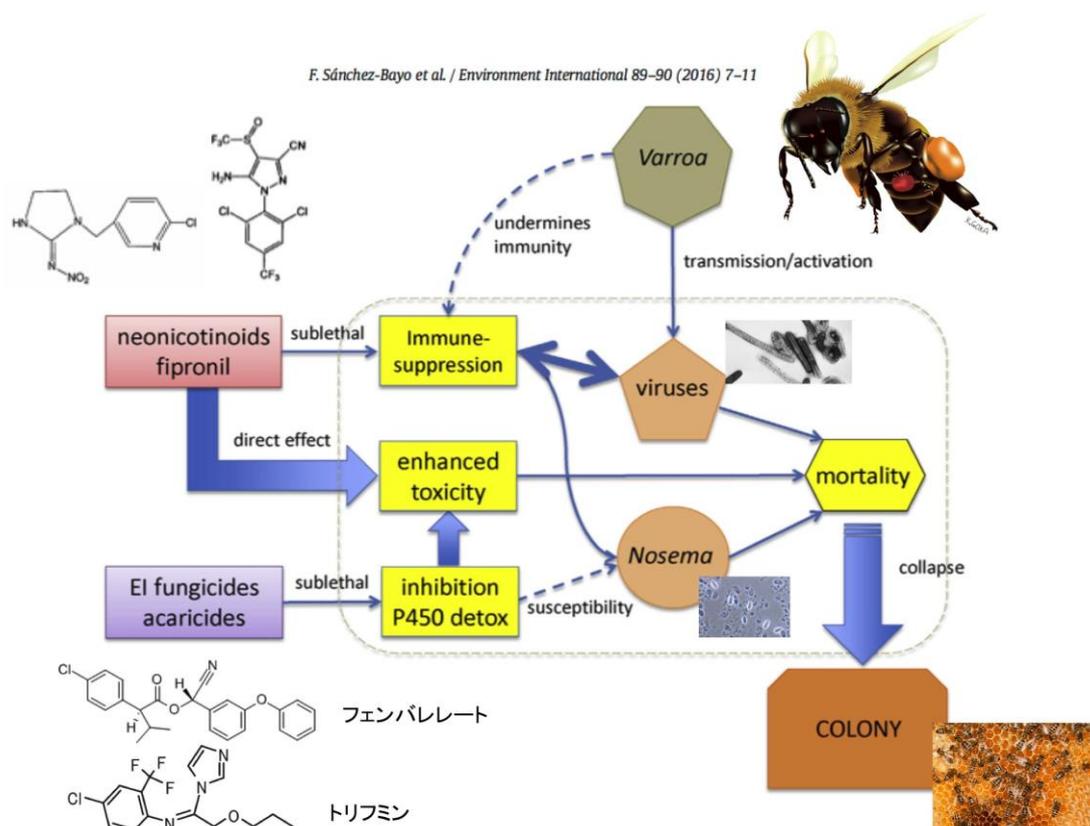
図(1)-12 バッファーズーンから採取した植物体への残留

### (3) 国内外におけるネオニコチノイド系殺虫剤の生態リスク評価・管理に関する情報収集・整備

2010年から2016年までのネオニコチノイド系農薬の昆虫類に対する生態リスク評価に関する論文情報36件をレビューした。その結果、概要は以下のとおりである。

- ミツバチコロニーよりマルハナバチコロニーの方が低濃度の農薬で繁殖率に悪影響が出るということが実験的に確かめられている<sup>4, 9, 10</sup>。このことから生態影響評価として野生ハナバチ類の動態を調査する必要がある。
- オランダでは、イミダクロプリドの表層水濃度が高いエリアほど食虫性鳥類の個体群成長率が低下しているという相関関係が示されている<sup>3</sup>。しかし、本論文では相関関係のみ論じており、因果関係を証明するデータは一切示されていない。
- 養蜂群数の世界的統計を調査した結果、飼育ミツバチの群数（コロニー数）は増加傾向にあり、ネオニコチノイド農薬が登場した以降も減少はしていない<sup>11</sup>など
- 減少しているのは一部の欧米諸国のみ（オーストリア、ドイツ、スウェーデン、アメリカ合衆国）<sup>11</sup>など
- アメリカ合衆国においても、ミツバチ養蜂群数の減少は、ネオニコチノイド農薬登場以前から続いており、ネオニコチノイド農薬との相関は認められない。
- 日本においてもセイヨウミツバチの養蜂群数はネオニコチノイド農薬が上市された以降も増加している<sup>12</sup>。

- ・病原体や寄生性ダニの感染・寄生率と農薬の関係はミツバチを対象としたものがメインで、マルハナバチに関するものはわずか3本しか論文がなく、さらにネオニコチノイド農薬に関する記述はなかった。
- ・ミツバチで論じられるネオニコチノイド農薬の病原体・ダニ類の感染・寄生率に対する影響メカニズムは、免疫機能の不全によるものであり、特に殺菌剤や殺ダニ剤とネオニコチノイド農薬の共力作用（Synergism）が感染・寄生率を上昇させることが報告されている。
- ・マルハナバチの感染症・寄生生物と農薬の関係を調査する上で、ネオニコチノイド農薬だけではなく、殺菌剤・殺ダニ剤等、他系統農薬の複合影響についても検討が必要と考えられる（図(1)-13）



図(1)-13 ハナバチにおける農薬と感染症の関係概念図

## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

- 1) 室内毒性試験結果をもとに描いた種の感受性分布を見ると、ネオニコチノイド系薬剤は選択性が高く、大きく影響を受ける昆虫種と、ほとんど影響を受けない昆虫種に分かれる傾向がある。

- 2) 圃場試験における残留分析の結果、圃場周辺土壌中や周辺雑草中にネオニコチノイド系薬剤が残留していることが明らかとなった。さらに、連続使用によりその濃度が上昇する傾向も明らかになった。

## (2) 環境政策への貢献

特に記載すべき事項はない。

### <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>

種の感受性分布解析の結果、ネオニコチノイド系およびフェニルピラゾール系農薬は、従来の農薬に比べて感受性幅が広く、影響を受けやすい種と受けにくい種が存在した。したがって、既存の指標種のみによらないリスク評価法の検討が望まれる。

## 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。

#### <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) 相澤章仁・野村昌史・中牟田潔(2015年3月)陸域昆虫類におけるネオニコチノイド系農薬感受性の種間差。(小集会「ネオニコチノイド農薬の陸域昆虫類に対する影響の評価」、第59回日本応用動物昆虫学会大会、山形大学小白川キャンパス)
- 2) 相澤章仁, 野村昌史, 中牟田潔(2016)陸域昆虫類のネオニコチノイド系薬剤に対する感受性の種間差について、日本昆虫学会第76回大会・第60回日本応用動物昆虫学会大会合同大会、堺。(小集会「ネオニコチノイド農薬による生態影響～何が、どこまで分かったのか?」[W142])
- 3) 中牟田潔、相澤章仁、野村昌史: 第61回日本応用動物昆虫学会大会(2017)  
「ナス圃場におけるネオニコチノイド系殺虫剤の動態と生態影響」

### (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) Godfray HCJ, Blacquière T, Field LM, Hails RS, Petrokofsky G, Potts SG, Raine NS, Vanbergen AJ and McLean AR (2014) A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators; 2014. *Proceedings of the Royal Society B*, 281: 20140558.
- 2) Godfray HCJ, Blacquiere T, Field LM, Hails RS, Potts SG, Raine NS, Vanbergen AJ and McLean AR (2015) A restatement of recent advances in the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. *Proceedings of the Royal Society B*, 282: 20151821.
- 3) Hallman CA, Ruud P. B. Foppen, Chris A. M. van Turnhout, Hans de Kroon & Eelke Jongejans (2014) Declines in insectivorous birds are associated with high neonicotinoid concentrations. *Nature* 511:341-343.
- 4) Rundlöf M, Andersson GKS, Bommarco R, Fries I, Hederström V, Herbertsson L, Jonsson O, Klatt BK, Pedersen TR, Yourstone J and Smith HG (2015) Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. *Nature* 521: 77-80.
- 5) Hayasaka D, Korenaga T, Suzuki T, Saito F, Sánchez-Bayo Fand Goka K. (2012) Cumulative ecological impacts of two successive annual treatments of imidacloprid and fipronil on aquatic communities of paddy mesocosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80:355-362.
- 6) Kimura K, Yoshiyama M, Saito K, Nirasawa K and Ishizaka M (2014) Examination of mass honey bee death at the entrance to hives in a paddy rice production district in Japan: the influence of insecticides sprayed on nearby rice fields. *Journal of Apicultural Research* 53: 599-606.
- 7) Pisa LW, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin JM, Downs CA, Goulson D, Kreutzweiser DP, Krupke C, Liess M, McField M, Morrissey CA, Noome DA, Settele J, Simon-Delso N, Stark JD,

Van der Sluijs JP, Van Dyck H and Wiemers M (2015) Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ Sci Pollut Res* 22:68–102.

8) Posthuma L, Suter GW & Traas TP (2001) *Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology*, pp 616, CRC Pres

9) Stanley DA, Smith KE and Raine NE (2015) Bumblebee learning and memory is impaired by chronic exposure to a neonicotinoid pesticide. *Scientific Reports*, 5:16508, DOI: 10.1038/srep16508

10) Whitehorn PR, O'Connor S, Wackers FL and Goulson D (2012) Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science* 336: 351-352.

11) vanEngelsdorp D and Meixner MD (2010) A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J. Invertebrate Pathology* 103: S80-S95.

12) 農林水産省生産局畜産部 (2016) 「養蜂をめぐる情勢」、  
<http://www.maff.go.jp/j/chikusan/kikaku/lin/sonota/attach/pdf/bee-3.pdf>

## (2) マルハナバチ類に対する影響評価

国立研究開発法人国立環境研究所

生物・生態系環境研究センター

環境リスク・健康研究センター

五箇 公一

林 岳彦

平成 26(開始年度)～28 年度累計予算額：31,405 千円（うち平成 28 年度：9,499 千円）

### [要旨]

近年、ネオニコチノイド系殺虫剤を代表とする浸透移行型殺虫剤による野生ハナバチ類に対する生態系影響が大きな環境問題として注目を集めている。我が国でも野生マルハナバチ個体群が全国的に減少傾向にあるとされるが、農薬との関係は不明である。そこで本課題では、まず、在来野生マルハナバチのネオニコチノイド農薬および他系統殺虫剤の急性毒性値を調査した。その結果、いずれのネオニコチノイド系殺虫剤も在来マルハナバチのワーカーに対してセイヨウミツバチと同等の低い急性毒性値を示したが、従来の有機リン系殺虫剤およびピレスロイド系殺虫剤の急性毒性値と比較して、極端に低いということはなく、むしろピレスロイド剤の方が、急性毒性が強いことが示された。次に、室内飼育のミニ・コロニー（ワーカーのみで形成したコロニー）を用いて、ワーカーに経皮（200ppb 水溶液）・経口（20ppb ショ糖液）でイミダクロプリドあるいはクロチアニジンを投与した場合、経皮投与ではコロニー生産に影響は出なかったが、経口投与ではわずか 20ppb でもコロニー生産に有害な影響が生じることが示された。続いて、ビニルハウス内で商品コロニーを用いて、花粉を介したイミダクロプリド暴露影響を試験した結果、20～200ppb の花粉中濃度でコロニー生産に悪影響が生じることが示された。国内外の植物の花粉中濃度測定データを収集して分析した結果、野外では花粉中に 10～100ppb の濃度で検出されることが示されたことから野外環境中における暴露影響は農薬残留花粉の持ち帰り量で決まるものと推定された。国内の野生マルハナバチ類の地理的分布情報を整備し、農薬使用量の地理的データと統合して解析した結果、ネオニコチノイド農薬使用量はむしろマルハナバチ出現頻度に対して正の寄与率を示した。以上の結果から、今後、野外におけるマルハナバチ分布規定要因を詳細に分析するとともに、農薬の曝露実態を調査して、上記の試験結果と統合して、生態影響を評価する必要があると結論された。

### [キーワード]

セイヨウオオマルハナバチ、クロマルハナバチ、トラマルハナバチ、イミダクロプリド、クロチアニジン、急性毒性、コロニー、花粉、分布情報、寄生生物

## 1. はじめに

近年、ネオニコチノイド系殺虫剤を代表とする浸透移行型殺虫剤による野生ハナバチ類に対する生態系影響が大きな環境問題として注目を集めている。北米では 1970 年代と比較して、2000

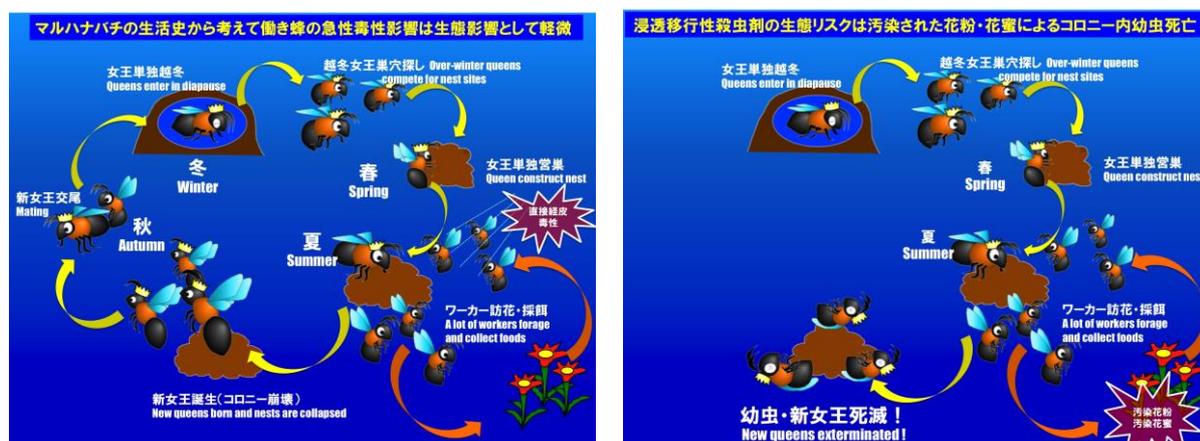
年代におけるマルハナバチ類の多様性が著しく低下しており、絶滅した個体群も複数存在すると報告されている。原因の一つに農薬も疑われている 1) 2)。

特にマルハナバチ類は、農耕地周辺でネズミ等の哺乳類がつくる土壌中の巣穴を利用して営巣することが知られており、農耕作物の花粉媒介にも貢献する分、浸透移行性殺虫剤が残留した花粉の曝露も受けやすいことが懸念される。3)

一方で、これまで世界的にもマルハナバチに対するネオニコチノイド農薬の生態リスク評価は進んでおらず、限られた試験データしか報告されていない。ワーカー（働き蜂成虫）に対する急性毒性試験の結果から、ネオニコチノイド系農薬およびフィプロニルはすべて、マルハナバチ類に対して高い毒性を示すことが報告されているが 4) 5) 6) 7) 8) 9)、この毒性値はワーカーが直接ネオニコに曝露した際のリスク評価にしか反映されない。マルハナバチ類の適応度は、コロニーにおける次世代生殖虫（新女王・オス）の生存率で評価されるべきであり、農薬による生態リスクのエンドポイントも、コロニーの新女王・オスの生産数となる（図(2)-1）。

これまでに、セイヨウオオマルハナバチ *Bombus terrestris* の室内ミニ・コロニー試験では 6～36ppb のネオニコチノイド農薬を投与しても影響が見られない 10) 11) という報告の一方、1ppb で増殖に影響がでるという報告もある 12)。また、イミダクロプリドやチアメトキサムの環境中曝露の予測濃度をセイヨウオオマルハナバチに投与することでコロニー成長および飛翔行動に異常が生じるとする報告がある 13) 14) 15)。いずれの試験も、次世代繁殖虫の生産までは評価できておらず、個体群動態に及ぼす影響は不明とされる。

日本国内においてもマルハナバチ類減少が懸念されているが、具体的な個体群動態データは乏しく、農薬による生態リスク評価も進んでいない。



図(2)-1. マルハナバチの農薬影響エンドポイントの考え方

## 2. 研究開発目的

本課題ではネオニコチノイド農薬によるマルハナバチ類に対する生態リスク評価を行うとともにマルハナバチ類の分布実態と農薬との関係を明らかにする。マルハナバチ類のワーカー個体による室内急性毒性試験を行い、感受性変異を調査する。飼育コロニーを用いて室内およびハウ

スレベルでコロニー成長・次世代生産数を評価ポイントとして、花粉や花蜜を介した農薬のコロニー影響試験を行う。各ハナバチ類の寄生生物相を調査して、病原体の分離を行うとともに、PCR診断による病原特定方法を開発する。また各ハナバチ野生個体群の分布情報を収集しデータベース化して、農薬使用量との関係を調べる。

### 3. 研究開発方法

#### (1) 野生マルハナバチ類急性毒性試験

1) **接触毒性試験**：トラマルハナバチおよびコマルハナバチの供試虫は野外で採集した働きバチを、クロマルハナバチの供試虫はナチュポール®・ブラックもしくはミニポール・ブラック（アリストライフサイエンス）の働きバチを用いた。供試虫は処理日の3日前までに採集・個別飼育し、試験開始まで試験期間と同じ条件で管理し馴化した。試験区として、等比級数的に少なくとも5薬量区、被験物質を含まない無処理対照区、及び少なくとも3薬量の基準物質（ジメトエート等）区を設けた。1区3頭以上（3反復以上）で実施した。暴露方法及び飼育方法として、被験物質はアセトンに溶解し、供試虫の胸部背面に被験物質を一頭当たり5 $\mu$ L局所施用した。飼育管理は25 $^{\circ}$ C $\pm$ 2 $^{\circ}$ C、湿度50~70%RH程度、暗黒条件でおこなった。暴露開始4、24、48、72、および96時間後に生存、死亡及び異常の各個体数を記録した。暴露を開始して4時間後から24時間おきに、1 mLの50%(w/v)ショ糖溶液を入れたチューブを餌として与えた。

2) **経口毒性試験**：供試虫は接触毒性試験と同様である。投与前4時間は絶食させた。試験区として、等比級数的に少なくとも5薬量区、被験物質を含まない無処理対照区及び少なくとも3薬量の基準物質（ジメトエート等）区を設けた。1区3頭以上（3反復以上）で実施した。暴露方法及び飼育方法として、被験物質を50%（W/V）ショ糖溶液に溶解又は分散し、供試虫1頭当たり150 $\mu$ Lを原則として4時間給餌した。その後の飼育管理、及び影響判定は接触毒性試験と同様である。

#### (2) ミニコロニーを用いた生殖影響試験

1) **経皮毒性試験**：セイヨウオオマルハナバチ市販コロニーより、女王蜂および蛹室を取り除き、ワーカーも20匹のみ残して、他個体はすべて除去したミニコロニーを作成した。24時間室内環境に順化後、ワーカー10匹を取り出し、クロチアニジンもしくはイミダクロプリド0.2ppm（200ppb）アセトン溶液を散布して、風乾後、巣に戻した。この200ppbという濃度は、野外の花蜜・花粉の残留濃度の10~100倍の大きさにあたる。対象区として農薬処理をしていない無処理区を設定した。薬剤処理後、3週間巣を室内飼育して、その後、巣を解体して巣内のカースト構造および個体数を計測した。

2) **経口毒性試験**：透明なプラスチックケースに、蛹繭を台座として設置して、セイヨウオオマルハナバチ・ワーカーを5匹入れて、ワーカー産卵を誘導してミニコロニーを生産させた（図(2)-2）。ミニコロニー生産開始1W後からイミダクロプリド1ppbおよび10ppbを含有したショ糖液を与え、巣の成長および次世代の羽化数を計測した。



図(2)-2. マルハナバチのワーカーのみによるミニコロニー飼育風景

### (3) ハウス内コロニーレベル生殖影響試験

アリスライフサイエンス社製の乾燥花粉にイミダクロプリドのアセトン溶液を定量吸収させ、ミキサー粉砕によって濃度を均一化した花粉ベイトを作成した。花粉中濃度 200ppb および 20ppb に調整した。

国立環境研究所内ガラス室内（高さ 2.5 m×幅 8 m×8 m）を 2 式設営し、ワーカー数を 30 匹に統一したクロマルハナバチ市販コロニーを 1 コロニーずつ設置した（図(2)-3）。設置後 1 日後より毎日朝 9 時にベイト花粉（無処理区は無農薬花粉）を 9g 設置し、夕方 17 時に回収して、花粉重量を計測することでマルハナバチの花粉回収量を算出した。またハウス内で落下している死亡個体を回収して個体数を計測した。1 ヶ月間、ハウス内飼育を行ったあと、巣を回収・解体して巣内の年齢構成を調べた。これらのデータを無処理花粉区と薬剤処理花粉区の間で比較することで、イミダクロプリドの生殖影響を調査した。



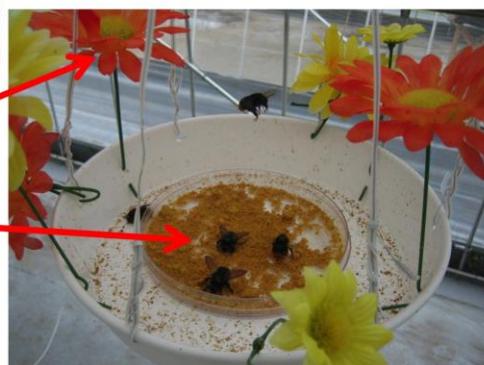
**クロマルハナバチ商品コロニー**  
Commercial colony of the Japanese bumblebee,  
*Bombus ignitus*

※ワーカー数・コロニーサイズを統一  
Unifying the worker number and colony size

**100均の造花**  
Imitation flowers

**イミダクロプリド混入花粉**  
Imidacprid contaminated pollen

**200ppb or 20ppb**



図(2)-3. ハウス内マルハナバチのコロニー毒性試験風景

#### (4) マルハナバチ分布実態調査

全国の在来および外来マルハナバチの分布情報を収集するとともに、全国のネオニコチノイド系農薬の使用量の情報を収集し、マルハナバチの分布と土地利用、気候条件、そして農薬の使用量との相関関係を解析した。マルハナバチの分布情報はマルハナバチ全国調査のデータ（東北大学、河田雅圭教授、大野ゆかり研究員）を使用した。農薬使用量の情報は化学物質データベース（Webkis-plus, 国立環境研究所）内の農薬データベースおよび谷地ら（2016, 日本農薬学会誌 41:1-10）のデータを、気候データは WorldClim を（<http://www.worldclim.org/>）、土地利用データは高解像度土地利用土地被覆図（[http://www.eorc.jaxa.jp/ALOS/lulc/lulc\\_jindex\\_v1402.htm](http://www.eorc.jaxa.jp/ALOS/lulc/lulc_jindex_v1402.htm)）を使用した。まずマルハナバチの分布に対して気候、土地利用、ネオニコチノイド系農薬使用が与える影響を Maxent モデルによる解析を行い、生息適地推定を行った。これらの解析と同時に、一般化線形モデル（GLM）による解析を行い、同様に農薬の使用量の影響を調べた。

#### (5) 野生マルハナバチにおける病原寄生生物の感染状況調査

1) 微生物調査：2014 年度は、北海道上川郡美瑛町にてセイヨウオオマルハナバチおよび在来マルハナバチの採集を行った。対照調査区として、セイヨウオオマルハナバチが野生化していない東京都八王子市東京薬科大学キャンパスおよび長野県南佐久郡川上村において在来マルハナバチを採集した。2015 年度は北海道標津郡中標津町および北海道網走郡大空町にてセイヨウオオマルハナバチおよび在来マルハナバチの採集を行った。対照調査区として、セイヨウオオマルハナバチが野生化していない長野県南佐久郡川上村および山梨県富士吉田市において在来マルハナバチを採集した。採集したサンプルは、顕微鏡下で胞子を観察するとともに PCR 診断により、*Nosema bombi* の有病率を求めた。また *N. bombi* が検出されたサンプルについては、ダイレクトシーケンス解析を行った。

2) ポリプダニ調査：北海道全域より在来種エゾオオマルハナバチおよびトラマルハナバチ、および外来種セイヨウオオマルハナバチのワーカー個体を採集し、国立環境研究所の冷凍庫にて保管した。保管したサンプルを順次解剖し、胸部および腹腔内に寄生するダニ *Locustacarus buchneri* の成体、幼体、卵の有無を観察した。さらに目視で確認がされなかった個体については、胸部・腹部を 1.5mL エッペンドルフ・チューブ内でホモジェナイズして Goka et al.(2000)の方法に準じて DNA を抽出し、*L. buchneri* 特異的プライマーを用いてミトコンドリア DNA チトクローム C オキシダーゼ遺伝子領域を増幅して、増幅産物の有無によって、寄生を判定した。

#### (6) 国外におけるマルハナバチ類生態影響情報収集整備

マルハナバチに対するネオニコチノイド農薬生態影響の関連文献を検索・収集し、整理した。

### 4. 結果及び考察

#### (1) 野生マルハナバチ類急性毒性試験

いずれの薬剤も、接触・経口ともにセイヨウミツバチとほぼ同等の毒性を示し、また時間経過とともに、毒性発現が強くなっていることが示された。急性毒性値には、顕著な種間差は認められなかったが、急性経口毒性で、イミダクロプリドがトラマルハナバチに対して遅効的であるこ

とが示された（表（2）-1）。以上の結果から、ネオニコチノイド系農薬は在来種マルハナバチ類成虫に対しても強い急性毒性を有することが明らかとなった。

表(2)-1. トラマルハナバチ、及びクロマルハナバチの急性経皮・経口毒性試験から算出した LD<sub>50</sub>。上段：48 時間後、下段：72 時間後の値。薬剤名の下に括弧の数値はセイヨウミツバチ LD<sub>50</sub>（48 時間後）の値。単位はすべて µg/bee。

接触試験LD <sub>50</sub>	トラマル	クロマル	経口試験LD <sub>50</sub>	トラマル	クロマル
イミダクロプリド (0.081)	0.296 0.0973	0.159 0.140	イミダクロプリド (0.037)	140 0.469	3.90 0.493
クロチアニジン (0.04426)	0.0344 0.0287	(0.282) (0.282)	クロチアニジン (0.00379)	0.00336 0.00305	0.00738 0.00738
チアメトキサム (0.024)	0.0756 0.0719	0.166 0.136	チアメトキサム (0.005)	0.00512 0.00512	0.0224 0.0224
フィプロニル (0.00593)	0.0171 0.00946	— (0.152)	フィプロニル (0.00417)	0.00812 0.00521	0.0125 0.00740

一方、代表的な有機リン剤およびピレスロイド剤のマルハナバチに対する急性経皮毒性データを文献調査により整理すると、急性毒性値（LD<sub>50</sub>）はネオニコチノイド農薬とこれらの既存剤の間で大きく異なるものではなく、むしろピレスロイド剤の方が、急性毒性が高いものが含まれることが示された（表（2）-2）。

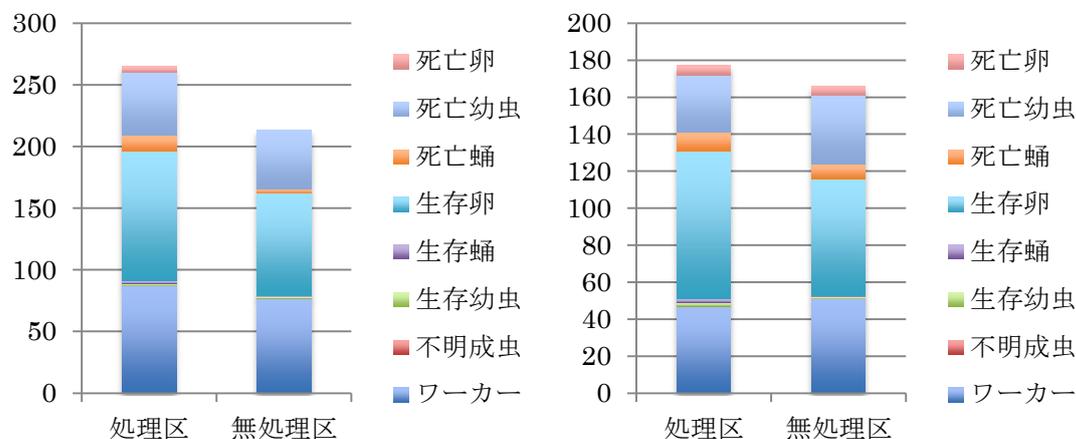
表（2）-2. セイヨウオオマルハナバチに対する有機リン剤およびピレスロイド剤の経皮 LD<sub>50</sub> 値

有機リン剤 Organophosphate	ピレスロイド剤 Pyrethroid
<b>Dimethoate 0.015 µg/bee</b>	<b>Esfenvalerate 0.015 µg/bee</b>
<b>Chlorpyrifos 0.07 µg/bee</b>	<b>Z-cypermethrin 0.002 µg/bee</b>
<b>Methyl parathion 0.011 µg/bee</b>	<b>Permethrin 0.008 µg/bee</b>

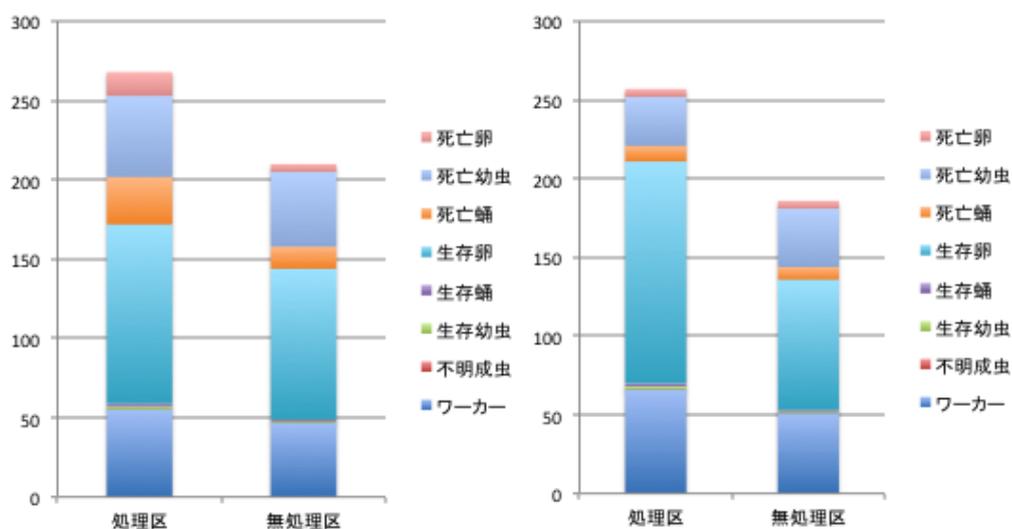
## （2）ミニコロニーを用いた生殖影響試験

1) 経皮毒性試験：クロチアニジンおよびイミダクロプリドのミニコロニー毒性試験をそれぞれ2回繰り返して行った。薬剤処理後、3週目の巣内構造を薬剤処理区および無処理区間で比較した結果、ワーカー数、蛹数、幼虫数など各ステージの個体数に、薬剤処理による有意な減少は2回の試験とも認めることができなかったが、2回の試験とも、全体の個体数は処理区の方が大きくなる傾向が示された（図(2)-4、および(2)-5）。この結果から、野外における暴露濃度よりも遥かに高い濃度のクロチアニジンにワーカーが暴露しても、巣の崩壊が起こるほど顕著なコロニー毒性が生じることはないと考えられた。ただし、ミニコロニーでは女王が除去されているた

め、卵や幼虫の増加はワーカー産卵によるものであるが、ネオニコチノイド農薬の低濃度暴露が産卵にかかる生理作用に影響を及ぼしていることも示唆された。

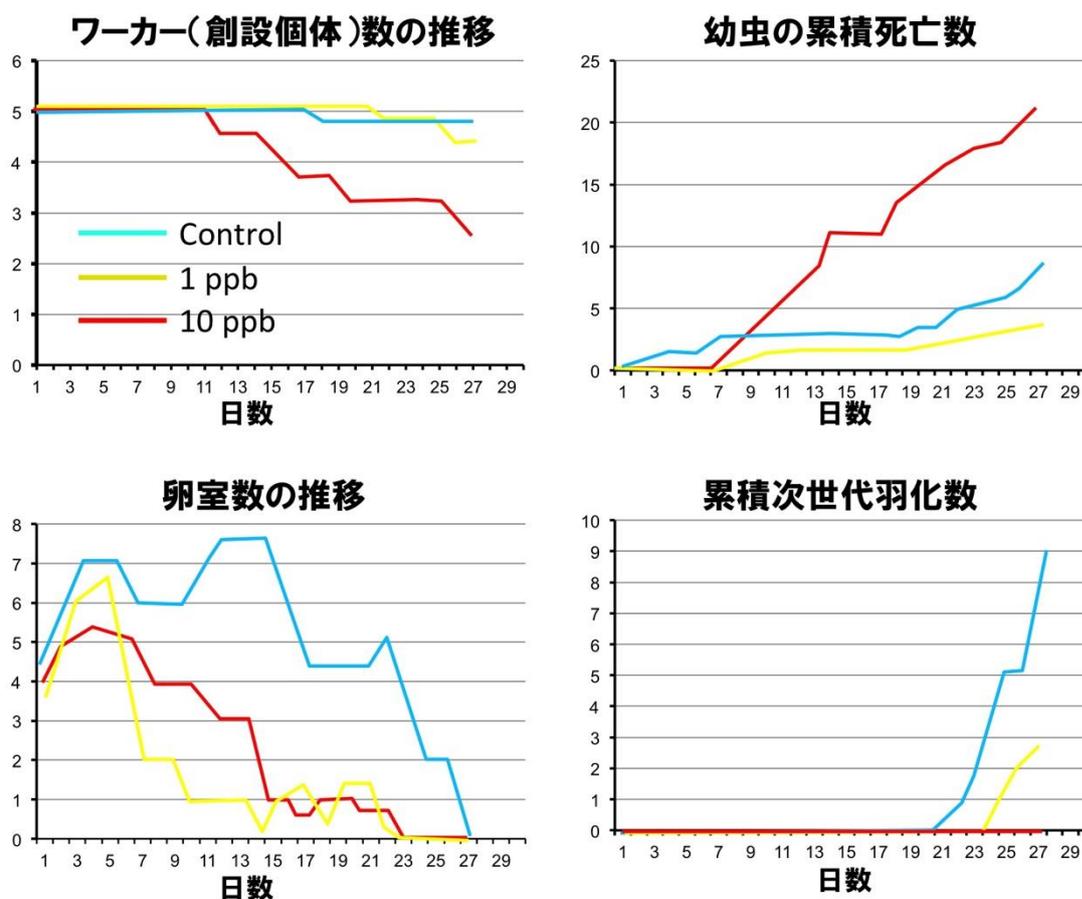


図(2)-4. クロチアニジン処理したミニコロニーの3週後の巣内ステージ別個体数（1回目と2回目）



図(2)-5. イミダクロプリド処理したミニコロニーの3週後の巣内ステージ別個体数（1回目と2回目）

2) 経口毒性試験：イミダクロプリド1 ppb ショ糖水ではワーカー死亡数および幼虫死亡数はControl区と同じ動態を示したが羽化数はcontrol区よりも有意に少なかった。一方10ppb処理区はワーカー死亡数、幼虫死亡数はcontrol区および1ppb処理区のいずれよりも大きく、羽化数も有意に小さく、ほぼ全個体が羽化に失敗した(図(2)-6)。これらの結果から、10ppbのイミダクロプリドをワーカーに経口投与するとコロニーが崩壊することが示された。

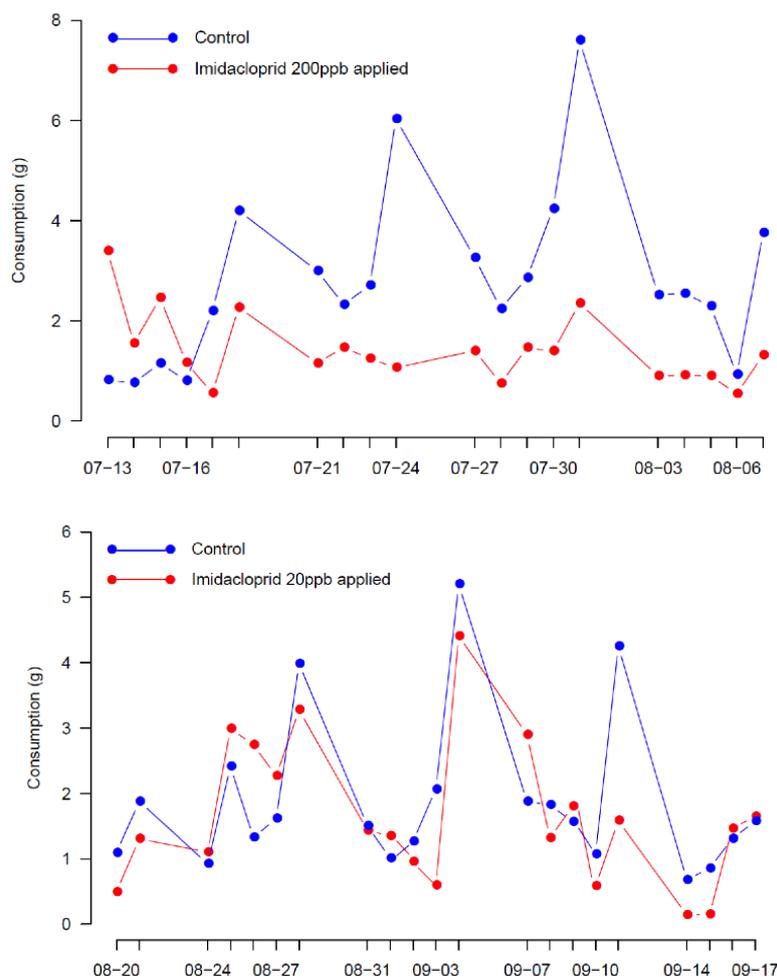


図(2)-6. ミニコロニー毒性試験によるコロニー内ワーカー数、幼虫累積死亡数、卵室数、累積羽化数の動態

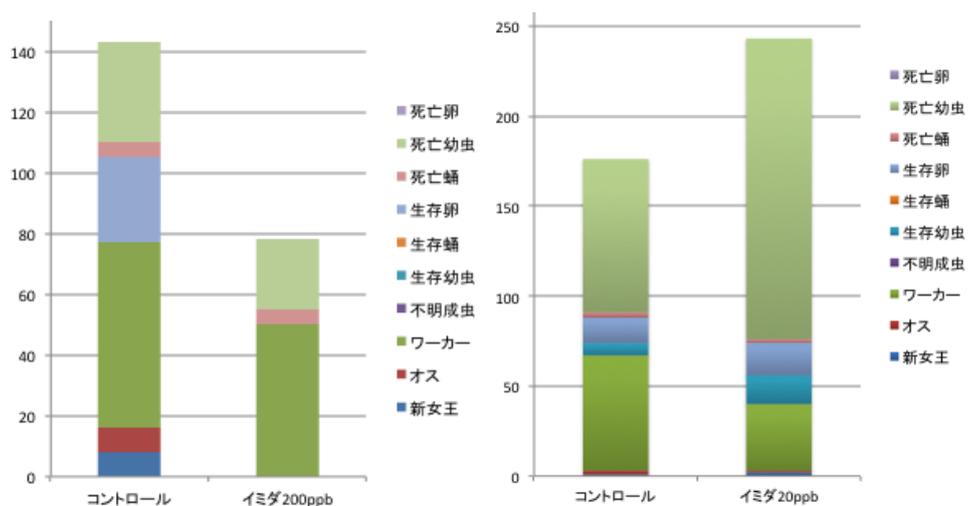
### (3) ハウス内コロニーレベル生殖影響試験

2015年度の試験では、イミダクロプリド 200ppb 処理区では、無処理区と比較して花粉消費量が極端に低下しており、1ヶ月間の消費量は無処理区が 56.3g に対して処理区は 28.3g に半減していた。また1ヶ月後の巣内構造を調査した結果、処理区では卵室数がゼロになっており、新女王およびオスが生産されていないことが示された。

イミダクロプリド 20ppb (環境中実濃度) 処理区では、花粉消費量は、無処理区との間に有為な差はなかった。1ヶ月後の巣内構造においても、処理区・無処理区間で顕著な卵室数、および新女王・オス数の減少は認められなかった。ただし、イミダ 20ppb 処理区においては死亡卵が有意に増加するとともに巣内の総個体数が増加している傾向が示された (図(2)-7 および(2)-8)。



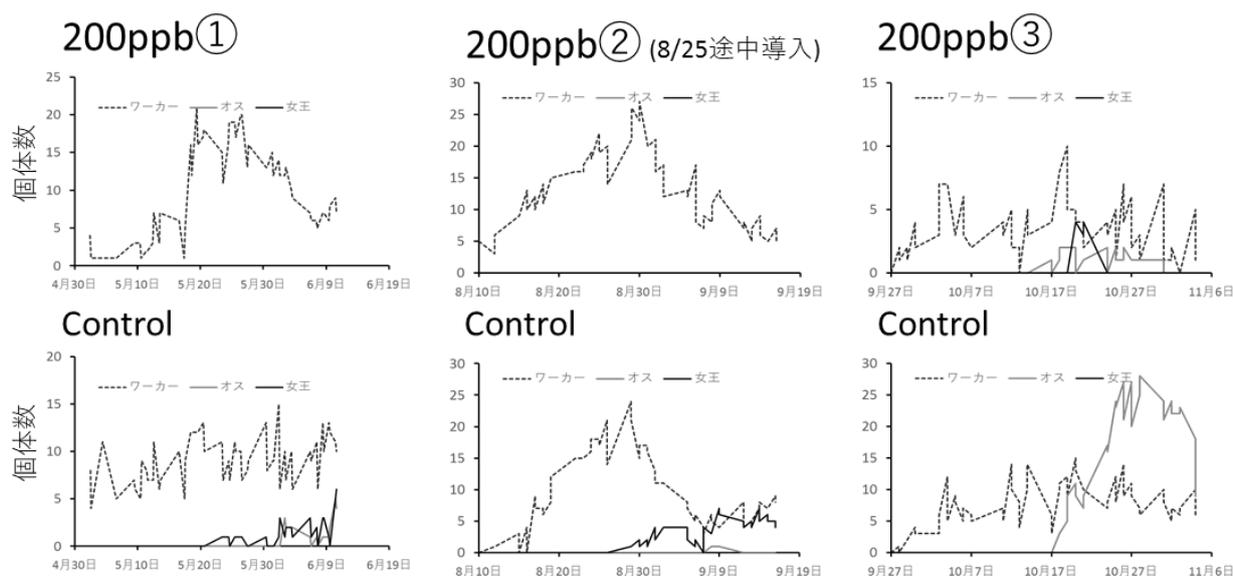
図(2)-7. イミダクロプリド 200ppb (上) および 20ppb (下) 花粉処理区、および無処理区の花  
粉消費量の日変化



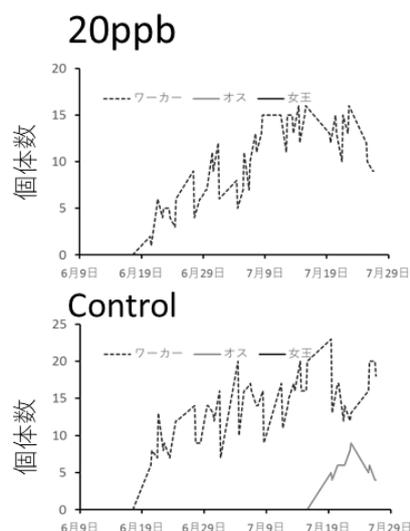
図(2)-8. イミダクロプリド 200ppb (左) および 20ppb (右) 花粉処理区、および無処理区の巣  
内構造

2016年度試験では、40日間の試験中にハウス内（コロニー外）にみられる個体数を計測した結果、イミダクロプリド 200ppb 処理区とコントロール区との間でワーカー数に大きな差はみられなかった（図(2)-9）。しかしイミダクロプリド 200ppb 試験の1回目および2回目のコントロール区でオスと新女王が出現した一方、イミダクロプリド処理区ではどちらも出現しなかった。3回目の試験ではイミダクロプリド処理区、コントロール区いずれでもオス個体が出現し、オス個体数はコントロール区のほうが多かった。またこの試験ではイミダクロプリド処理区で新女王が少数出現した一方、コントロール区では新女王が出現しなかった。3回目の試験結果が1, 2回目の試験結果と異なるのは、本来のクロマルハナバチの活動期ではない9月終旬に開始したこと、気温が低かったこと、などが考えられた。したがって本来の活動時期である1, 2回目のイミダクロプリド処理区でオスと新女王がでなかったのはイミダクロプリドによる影響が強く作用したためと考えられる。

イミダクロプリド 20ppb 含有花粉を与えた試験でも、ワーカー数に大きな違いはみられなかった（図(2)-10）。オス成虫はコントロール区でのみ出現し、新女王はいずれの処理区でも出現しなかった。コントロール区で新女王が出現しなかったのは夏の高温のためと考えられた。

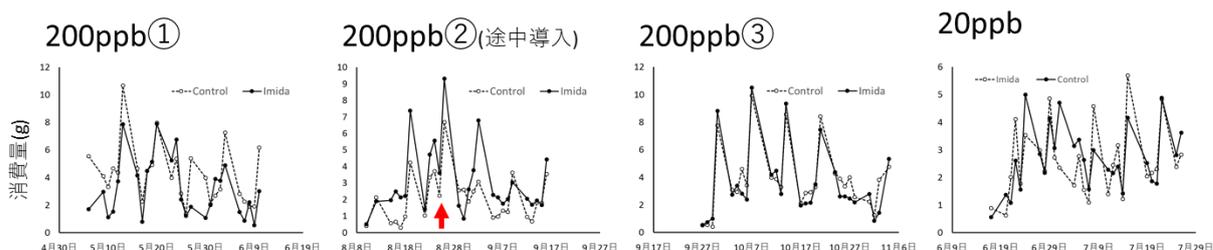


図(2)-9. クロマルハナバチにイミダクロプリド 200ppb 含有花粉を与えたときのハウス内（コロニー外）の個体数の推移。



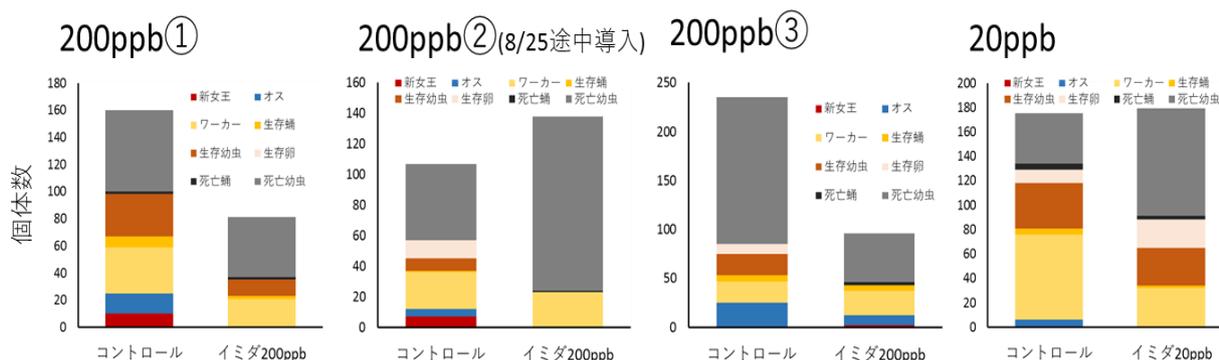
図(2)-10. クロマルハナバチにイミダクロプリド 20ppb 含有花粉を与えた時のハウス内（コロニー外）の個体数の推移

花粉消費量をイミダクロプリド 200ppb 処理区とコントロール区で比較したところ、あまり大きな違いはみられなかった（図(2)-11）。しかし 1 回目および 3 回目の試験では花粉の総消費量はイミダクロプリド処理区でより少なかった。この結果は昨年と矛盾しない。しかし 2 回目の試験では花粉の消費量はイミダクロプリド処理区でむしろ多かった。2 回目の試験ではイミダクロプリド含有花粉を試験開始後 2 週間後から与え始めたため、その影響によるものと考えられた。一方イミダクロプリド 20ppb 処理区とコントロール区では花粉消費量に違いはみられなかった。



図(2)-11. クロマルハナバチにイミダクロプリド 200ppb および 20ppb 含有花粉を与えた時の花粉消費量の推移。赤矢印はイミダクロプリド含有花粉の途中導入日を示す。

40 日観察後にコロニーを解体して内部を調べた結果、イミダクロプリド 200ppb 処理区ではいずれの試験でもコントロール区に比べて生存している総個体数が少なかった（図(2)-12）。カーストや生育ステージ別にみると、イミダクロプリド処理区ではコントロール区に比べて生存する幼虫数が少なかった。特に 2 回目、3 回目の試験では生存幼虫がいなかった。一方、イミダクロプリド 20ppb 処理区では、生存総個体数および生存幼虫数ともにあまり違いはみられなかった。これらの結果から、イミダクロプリド 200ppb 含有花粉はコロニーの総個体数を減らし、特に花粉を多く摂取する幼虫期の死亡率を上昇させることが示唆された。



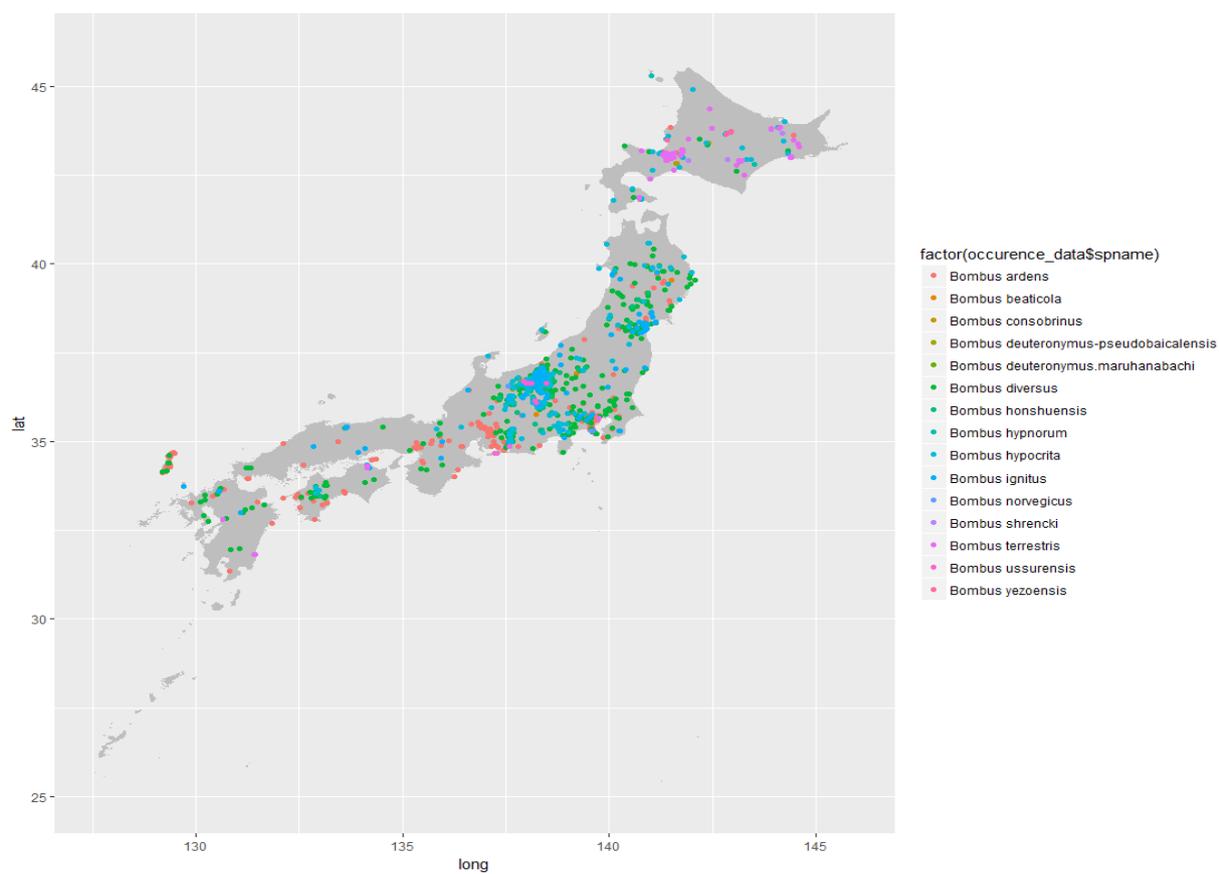
図(2)-12. クロマルハナバチにイミダクロプリド 200ppb 含有花粉を与えた時の花粉消費量の推移

以上の結果から、マルハナバチのコロニー生産、特に次世代繁殖虫である新女王の生産に影響が出るイミダクロプリド花粉中濃度閾値は 20～200ppb の間にあると示唆された。

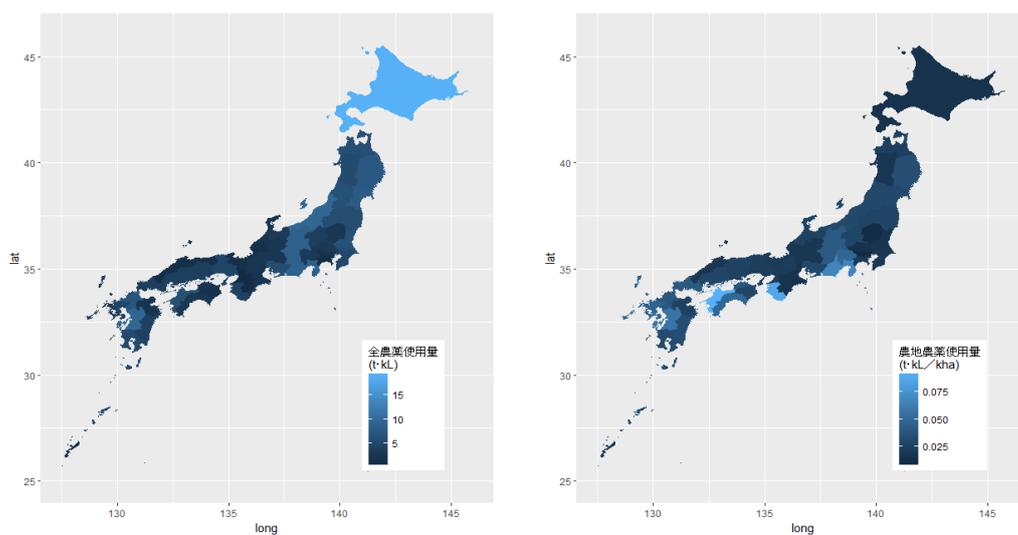
#### (4) マルハナバチ分布実態調査

解析に用いたマルハナバチの分布情報は在来マルハナバチ 10 種および外来マルハナバチ 1 種 (セイヨウオオマルハナバチ) であった。在来マルハナバチのうち、コマルハナバチ *Bombus ardens ardens* はエゾコマルハナバチ *B. a. sakagamii* およびツシマルハナバチ *B. a. tsushmanus* を含む。ヒメマルハナバチ *B. beaticola beaticola* はアイヌヒメマルハナバチ *B. b. moshkarareppus* を含む。トラマルハナバチ *B. diversus diversus* エゾトラマルハナバチ *B. d. tersatus* を含む。ミヤママルハナバチ *B. honshuensis honshuensis* はエゾミヤママルハナバチ *B. h. tkalcui* を含む。オオマルハナバチ *B. hypocrita hypocrita* はエゾオオマルハナバチ *B. h. sapporoensis* を含む。マルハナバチの写真が撮影された位置情報を分布情報として用いた。解析に用いた総地点数は 1881 地点であった。地図上にプロットすると図(2)-13 のようになる。ほぼ全国的に観察記録が得られているものの、地域的な偏りがあり、たとえば東日本に比べて西日本で観察地点数が少ない。また札幌、仙台、長野等に観察地点が集中していることがみてとれた。ハイイロマルハナバチ *B. deuteronymus* とニセハイイロマルハナバチ *B. pseudobaicalensis* は写真では区別できないためこれらを 1 種として扱った。

谷地ら (2016) の県別目的別農薬使用量から 1995 年から 2010 年まで 5 年おきのネオニコチノイド系農薬 (フィプロニル含む) を抽出し、それらの総使用量の年あたり平均値を地図に示すと図(2)-14 (左) のようになる。次に各県の農地面積と農薬使途対象を考慮し、農地 1km<sup>2</sup> 当たりの農薬使用量に変換して示すと図(2)-14 (右) のようになる。県全体の農薬使用量では北海道が最大であり、面積あたり農薬使用量では、和歌山、愛媛、熊本県、静岡県が上位となった。

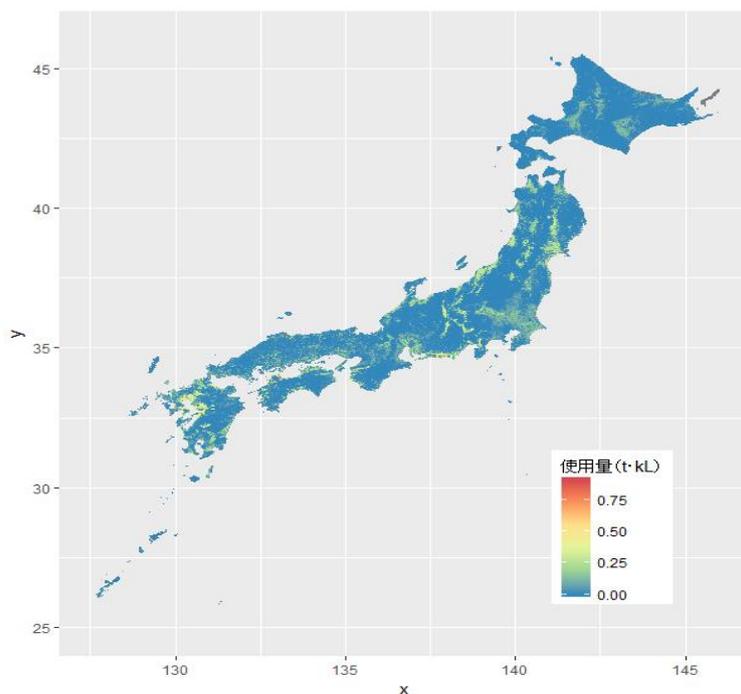


図(2)-13. マルハナバチの分布情報のプロット



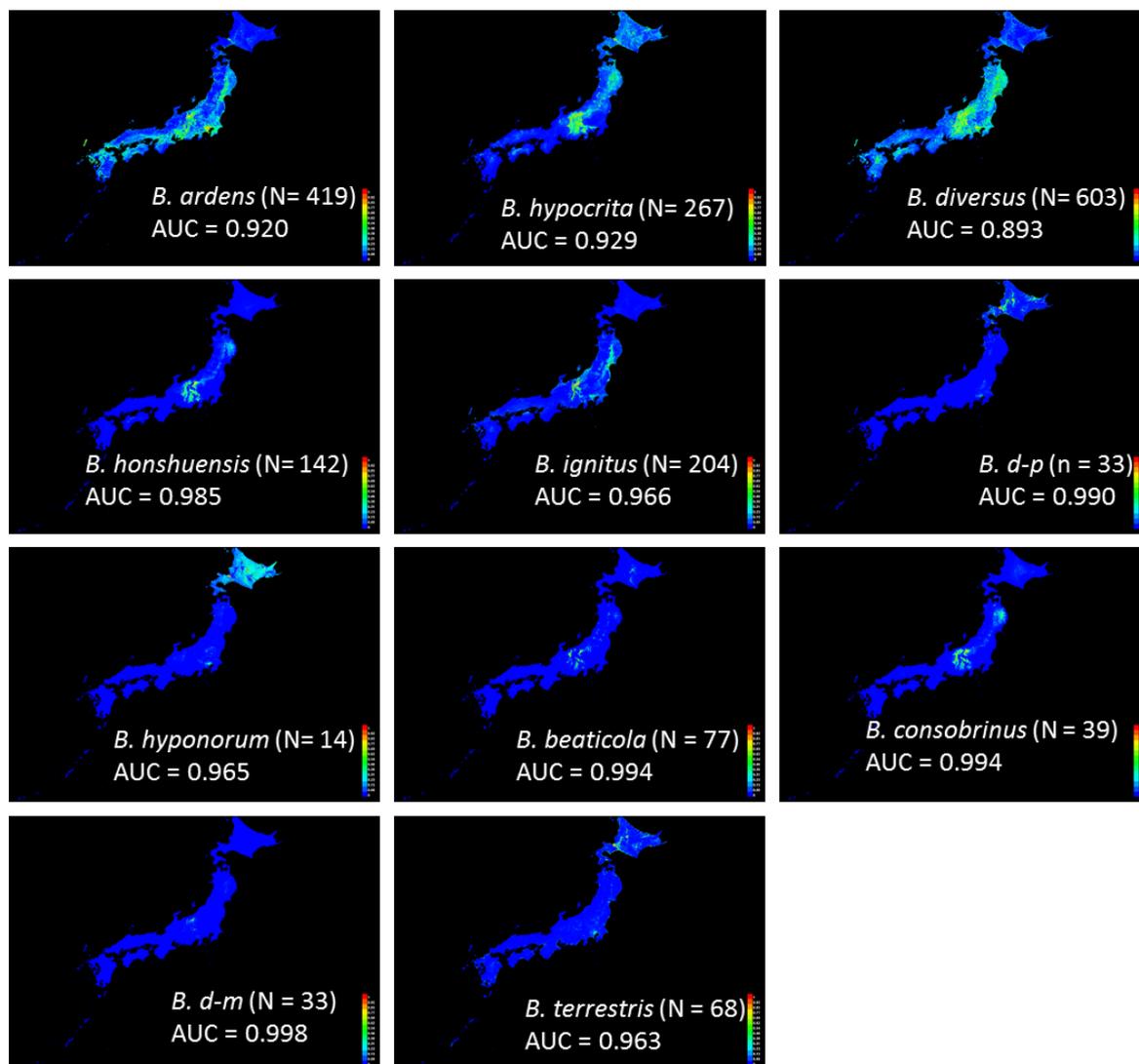
図(2)-14. ネオニコチノイド系農薬の県別総使用量の年あたり平均値 (t×kL, 左)、およびその農地あたり使用量 (t×kL/km<sup>2</sup>, 右)

県別目的別ネオニコ使用量（水田、畑、箱施用、空中散布）を3次メッシュ（単位グリッド：1km×1km）にみられる農地分布（水田・畑）の比率に応じて分配したところ、日本全国の農薬使用量の推定分布がプロットできた（図(2)-15）。この図から、農薬使用量が多い地域は、静岡県、和歌山県、愛媛県、熊本県の沿岸部であることが示された。



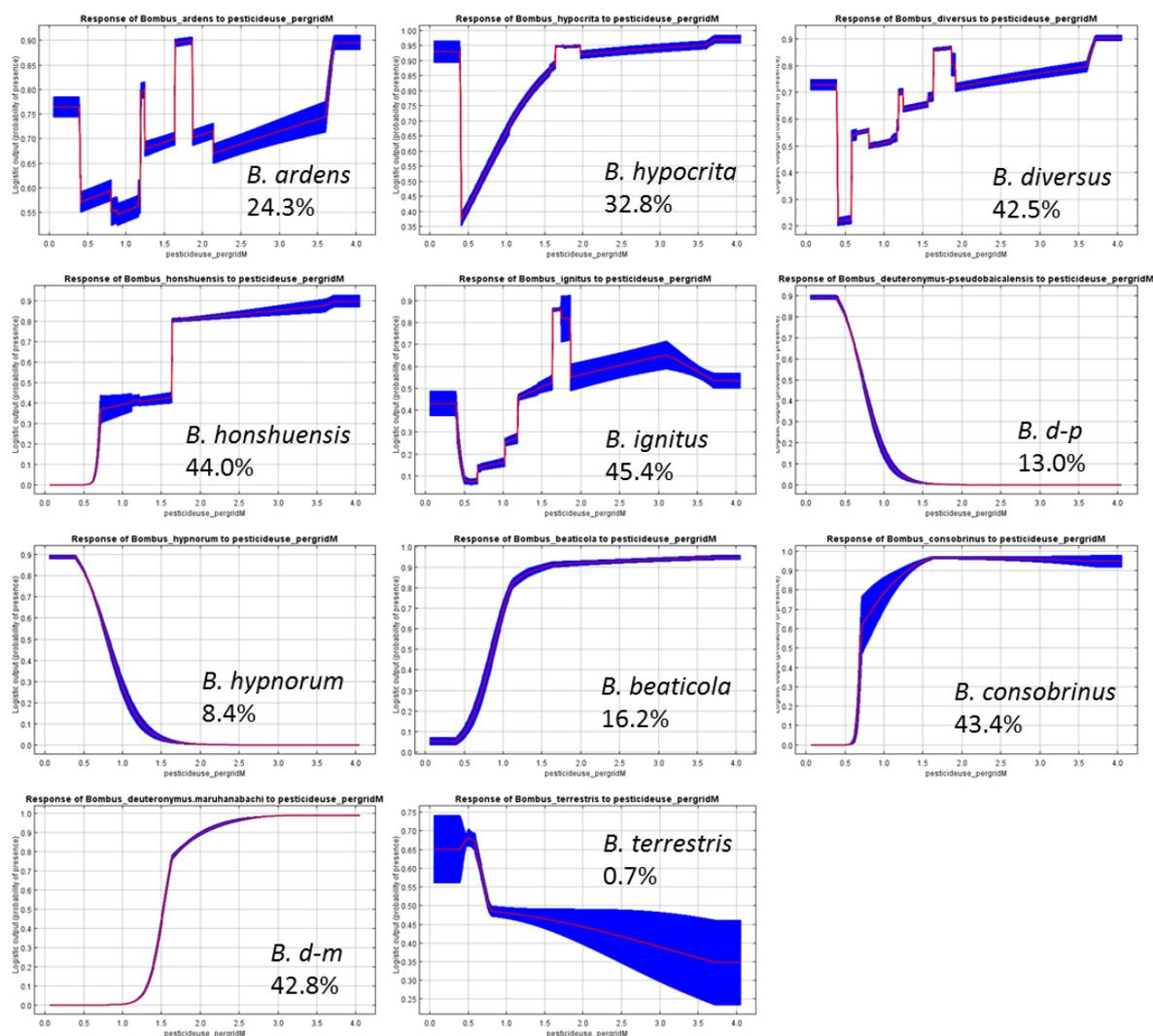
図(2)-15. 3次メッシュの農地情報を考慮したネオニコチノイド系農薬の使用量（PU/1km<sup>2</sup>）

次に、このようにして得た農薬使用量の情報を説明変数として、Maxentモデルを用いてマルハナバチの生息適地推定（出現確率）を行った。いずれの種もモデル評価の指標である Area Under the Curve（AUC）の値は高かった（図(2)-16）。すなわち農薬使用量を含む説明変数によってマルハナバチの分布情報がよく説明された。しかもこれらの結果はそれぞれのマルハナバチ種の実際の分布域にも近い。ただし部分的に実際の分布域との乖離もみられる。たとえばクロマルハナバチ（*B. ignitus*）の実際の分布域は推定された分布域よりもはるかに広い。セイヨウオオマルハナバチ（*B. terrestris*）は東京都周辺で出現確率がやや高まるが、実際には分布しない。主な要因は、観察情報の偏りや農薬使用量の推定方法等が考えられた。



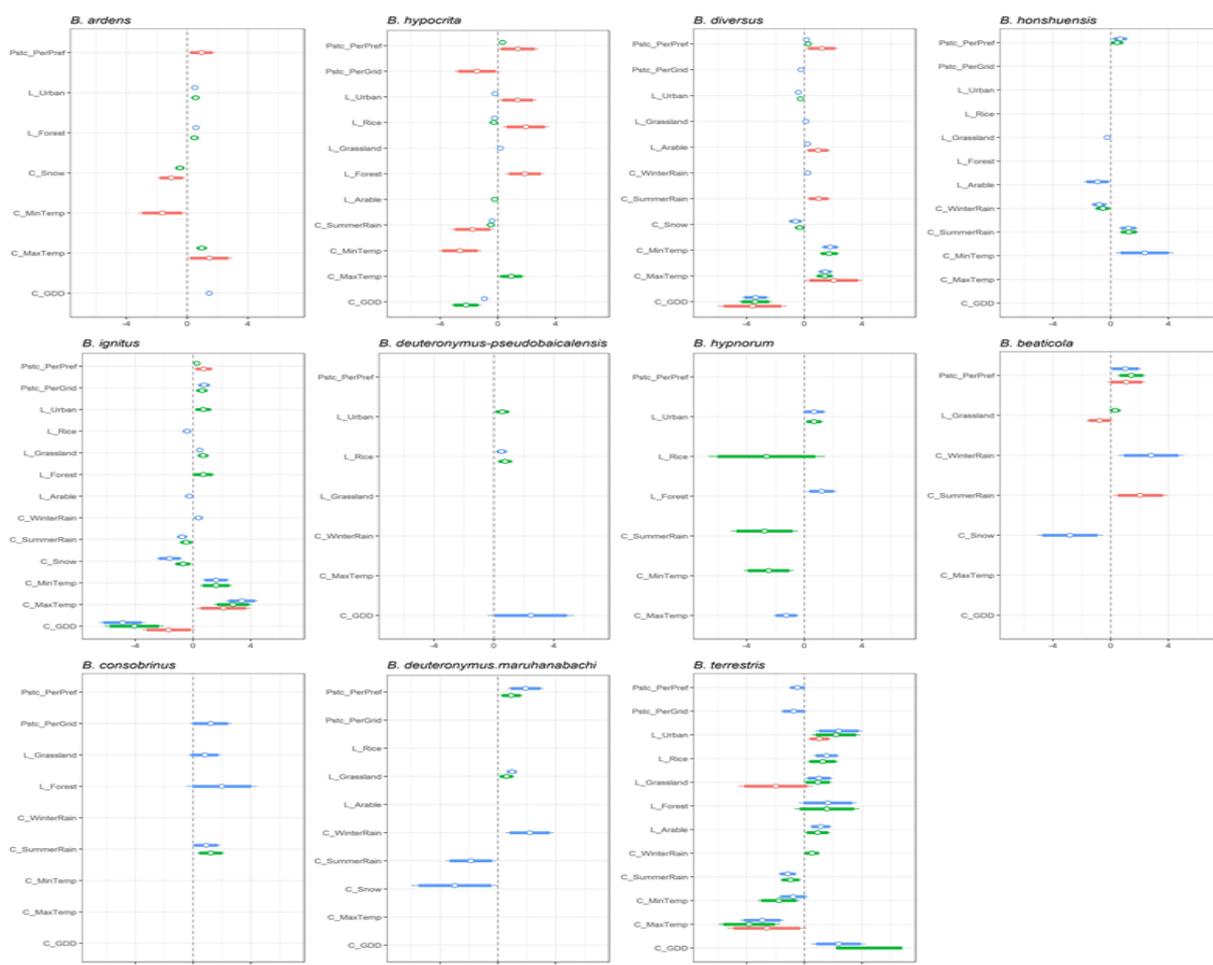
図(2)-16. マルハナバチ類の Maxent モデルの結果

Maxent モデルから得られた結果のうち、農薬使用量に対する出現確率の反応曲線を検討した(図(2)-17)。各説明変数の寄与率を分析した結果、多くのマルハナバチ類において単位面積当たりの農薬使用量の寄与率が高く(11種中7種でもっとも重要な説明変数)、マルハナバチの出現確率は県別農地あたり農薬使用量に対して概ね正の相関がある事が判明した。すなわち農薬使用量が多いほど、出現確率が上昇した。一部の種(ハイイロマルハナバチ *B. d-p*・アカマルハナバチ *B. hyponorum*)では負の相関がみられたが、これらの種の農薬使用量の寄与率は低く(ハイイロ 13.0% アカマル 8.4%)、またこれらの種の観測データ数も限られていた(n=15、n=14)。セイヨウオオマルハナバチでは出現確率に対する農薬使用量の寄与率はほとんど検出されなかった。



図(2)-17. マルハナバチ出現確率に対する県別単位面積当たりの農薬使用量の影響（寄与率：図中の％）と反応曲線

それぞれのグリッドにおける出現確率を目的変数とし、説明変数を独立とした一般化線形モデル（GLM）による解析を行った（図(2)-18）。その結果、農薬使用量が出現確率に有意な負の影響を与えていると判断できる種は100km<sup>2</sup>メッシュにおけるオオマルハナバチ *B. hypocrita* のみだった（ $p < 0.05$ ）。一方、農薬使用量が出現確率に有意な正の影響を与えていると判断できる種は、1km<sup>2</sup>、10km<sup>2</sup>メッシュにおけるクロマルハナバチのみであった（ $p < 0.05$ ）。ほかのいずれの種、いずれのグリッド単位でも農薬使用量による正あるいは負の影響は検出されなかった。すなわち、マルハナバチ類の分布に対する農薬使用の負の影響はほとんどみられなかった。この結果は、Maxentモデルによる結果と矛盾しない。



図(2)-18. 各要因がマルハナバチ類の出現確率に与える効果の GLM による解析結果

バーの色は単位グリッドの大きさに応じて異なる（青：1km<sup>2</sup>、緑：10km<sup>2</sup>、赤：100km<sup>2</sup>）

以上の結果から、県別農地あたりの農薬使用量が増えるほど、多くのマルハナバチ種の出現確率が高くなることがわかった。しかしこの結果は当然のことながら、農薬の使用によってマルハナバチが増加することを示していない。むしろ、多くのマルハナバチが農地周辺を好適な生息地として利用した結果、農薬使用量との間に正の相関がみられたと考えられる。実際のところ、正の相関がみられた種はいずれも農耕地周辺の草地植生を主な生息地としており、一方、負の相関がみられた3種はいずれも山地等の自然植生に生息する。したがって今回の結果は少なくとも、ネオニコチノイド系農薬の使用によるマルハナバチの野外分布への負の影響は検出されなかったといえる。ただし、マルハナバチに対するネオニコチノイド系農薬の影響を結論するには不十分であり、今後、農地面積の影響を除いた解析等が必要である。

## (5) 野生マルハナバチにおける病原寄生生物の感染状況調査

1) 微胞子虫調査：PCR 診断による北海道における *N. bombi* 有病率は、セイヨウオオマルハナバチで低かったのに対して、エゾオオマルハナバチでは 6.1~12.5%であった(表(2)-3)。また、エゾトラマルハナバチからも *N. bombi* が検出された。一方、長野県ではトラマルハナバチで *N.*

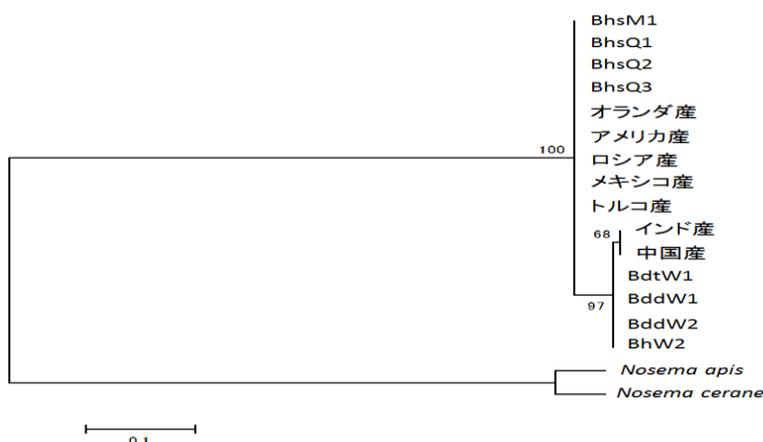
*bombi* 有病率が非常に高く、ミヤママルハナバチも高い傾向があった。PCR 診断で *N. bombi* 陽性マルハナバチ 25 個体中 10 個体で、検鏡による *Nosema spp.* 胞子が確認された。

塩基配列解析の結果、エゾオオマルハナバチから検出された *N. bombi* は、ヨーロッパ系統に属することが明らかになった（図(2)-19）。一方、エゾトラマルハナバチ、トラマルハナバチ、ミヤママルハナバチの3種から検出された *N. bombi* は、アジア系統に属することが明らかになった。以上の結果から、北海道には外来種由来のノゼマ病原虫が、本州には在来のノゼマ原虫が分布していると考えられ、感染率に地理的変異があることが示された。

今回得られた有病率と上記の【マルハナバチの分布実態調査】で得られた農薬使用量データを照合したが、データ数が十分でないため、有意な関係性を検出することはできなかったが、今後、この *N. bombi* の有病率動態と農薬使用量の変動を調査することで、病原体と農薬との関係に付いて情報が得られると期待された。

表(2)-3. 調査地点で採集したマルハナバチ各種における *N. bombi* 有病率

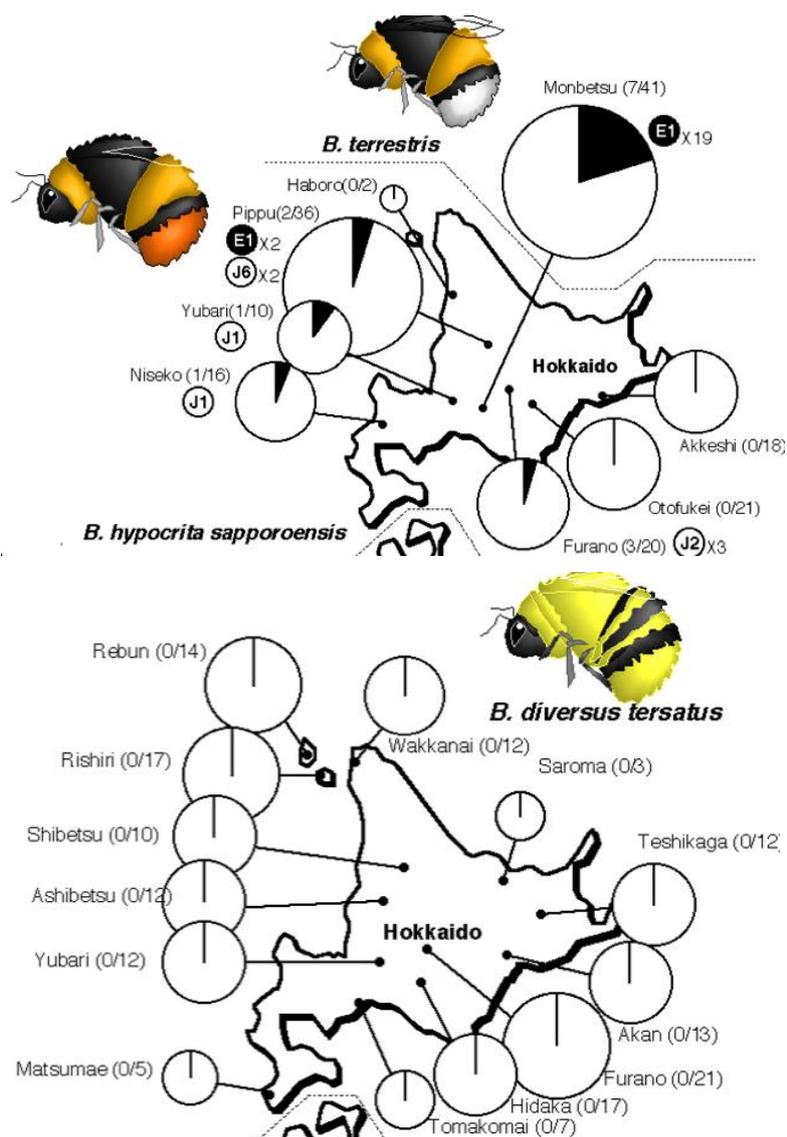
調査地	種名	カースト	供試個体数	有病率(%)
北海道	セイヨウオオマルハナバチ	女王	79	1.3
		ワーカー	30	0.0
	エゾオオマルハナバチ	女王	106	10.4
		ワーカー	19	12.5
		オス	33	6.1
	エゾトラマルハナバチ	ワーカー	1	100.0
東京都	コマルハナバチ	女王	2	0.0
		ワーカー	21	0.0
長野県	トラマルハナバチ	ワーカー	17	100.0
		オス	5	100.0
	ミヤママルハナバチ	ワーカー	8	12.5
		オス	5	0.0



図(2)-19. 系統解析結果

16S rRNA 領域 304 塩基対を用いた北海道および本州産マルハナバチから検出された *N. bimbi* の最尤法による系統解析を行った。ブートラップ値 (1,000 反復) を示す。個体番号は、それぞれ BhsM=エゾオオマルハナバチのワーカー、BhsQ=エゾオオマルハナバチの女王、BdtW=エゾトラマルハナバチのワーカー、BddW=トラマルハナバチのワーカー、BhW=ミヤママルハナバチのワーカーを示す。外群として、*N. apis* および *N. ceranae* を用いた。

**2) ポリプダニ調査:** 北海道各地より収集したエゾオオマルハナバチ、トラマルハナバチおよびセイヨウオオマルハナバチ (外来種) のワーカー個体における *Locustacarus buchneri* の感染率を解剖および DNA 検査によって調査した。その結果、エゾオオマルハナバチおよびセイヨウオオマルハナバチから寄生が認められた (図(2)-20)。特にセイヨウオオマルハナバチについては 20% 近い個体が寄生されていた。エゾオオマルハナバチについては、地点間で寄生率に変異が認められた。一方、これら 2 種と同所的に生息するとされるトラマルハナバチについては全サンプルで寄生率 0% であった。エゾオオマルハナバチ個体群間における感染率の変異と農薬使用量の関係については、サンプル数が小さいため統計的に有意な関係性は見られなかった。一方、農耕地営巣性が強いエゾオオマルハナバチで寄生が認められ、森林内営巣性が強いトラマルハナバチで寄生が認められなかったという、寄生に係る種間差が、生態特性に起因する農薬暴露量の差と関係がある可能性は今後、検証していく必要があると考えられた。



図(2)-20. エゾオオマルハナバチおよびセイヨウオオマルハナバチ地域個体運における *L. buchneri* 感染率（上）およびトラマルハナバチ地域個体群における感染率（下）。円グラフの黒が感染率を示す。

#### (6) 国外におけるマルハナバチ類生態影響情報収集整備

2000年から2016年までのマルハナバチ類に対するネオニコチノイド系農薬の生態リスク評価に関する学術論文情報をレビューした。その結果、33件の原著論文が該当した。概要は以下の通りである。

- ・北米では1970年代と比較して、2000年代におけるマルハナバチ類の多様性が著しく低下しており、絶滅した個体群も複数存在すると報告されている。原因の一つに農薬も疑われている<sup>1)2)</sup>。
- ・マルハナバチ類は働き蜂の飛翔範囲はセイヨウミツバチよりも狭いため、農業環境において営巣しているコロニーについては、農薬処理された餌資源に依存する割合が高くなり、また土壤中に営巣することから、土壌を介した影響も考慮する必要があると考察されている<sup>16)</sup>。

- ・急性毒性試験の結果から、ネオニコチノイド系農薬およびフィプロニルはすべて、マルハナバチ類に対して高い毒性を示す<sup>4) 5) 6) 7) 8) 9)</sup>。
- ・室内ミニコロニー試験では6~36ppbのネオニコチノイド農薬を投与しても影響が見られない<sup>10) 11)</sup>という報告の一方、1ppbで増殖に影響がでるとする報告もある<sup>12)</sup>。
- ・イミダクロプリドやチアメトキサムの環境中暴露の予測濃度をセイヨウオオマルハナバチに投与することでコロニー成長および飛翔行動に異常が生じるとする報告がある<sup>13) 14) 15)</sup>。
- ・野外暴露レベルの濃度(2.1ppb)のイミダクロプリドやクロチアニジンをセイヨウオオマルハナバチに摂食させると脳内に4~10nMの薬剤が移行することが示される。さらにセイヨウオオマルハナバチの神経培養細胞に1~10nMのイミダクロプリドやクロチアニジンを暴露するとアセチルコリン受容体のアセチルコリン感受性が増大する。以上のことから、ネオニコチノイド農薬の低濃度暴露の行動異常のメカニズムを推定している<sup>17)</sup>。

以上の文献調査から、ミツバチに比べてマルハナバチ類に対する生態影響評価については、定量的データを示した科学的調査事例数は少ない。特に、コロニーレベルの影響については実験によって、結果に差がある。今後、実験系の精査を行い、安定した試験システムの検討を行う必要があると考えられた。

## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

- 1) ネオニコチノイド系殺虫剤の花粉を介したマルハナバチ・コロニーレベルの毒性試験法を開発した。
- 2) 次世代の新女王の生産をエンドポイントとしたコロニー生産阻害のイミダクロプリド花粉中濃度の閾値が20~200ppbの間にあることを明らかにした。
- 3) マルハナバチの分布情報とネオニコチノイド農薬の使用量に関する地図情報を統計的に統合し、農薬使用量がマルハナバチの分布頻度に少なくとも負の影響を及ぼしてはいるという傾向はないことを示した。
- 4) マルハナバチの病原寄生生物の検出法を確立するとともに、これら寄生生物の寄生率には地理的変異や宿主の種間差が存在することが明らかとなった。

### (2) 環境政策への貢献

- 1) 環境省「農薬の昆虫類への影響に関する検討会」において、本研究課題で得られたネオニコチノイド農薬によるマルハナバチ類に対するリスク評価研究成果を提供して、今後の野生ハナバチにおける農薬生態影響実態の調査および対策に係る助言を行った。(第1回検討会：2016年11月14日、第2回検討会：2017年2月8日)
- 2) 本研究成果に基づき、生物多様性及び生態系サービスに関する政府間科学政策プラットフォーム(IPBES)のDeliverable 3(a): Thematic assessment of pollinators, pollination and food productionにおいて、Leading Authorとして参画し、世界規模での花粉媒介者と食糧生産についてこれまでの傾向や対策について既存報告を取りまとめた。("Summary for Policy Makers of the thematic assessment of Pollinators, Pollination and Food Production" :

[http://www.ipbes.net/sites/default/files/downloads/pdf/spm\\_deliverable\\_3a\\_pollination\\_2017022\\_2.pdf](http://www.ipbes.net/sites/default/files/downloads/pdf/spm_deliverable_3a_pollination_2017022_2.pdf)、”Individual chapters and their executive summaries of the thematic assessment on pollinators, pollination and food production” (Laid out; posted on 5 March 2017) :  
[http://www.ipbes.net/sites/default/files/downloads/pdf/individual\\_chapters\\_pollination\\_20170305.pdf](http://www.ipbes.net/sites/default/files/downloads/pdf/individual_chapters_pollination_20170305.pdf))

#### <行政が既に活用した成果>

該当無し

#### <行政が活用することが見込まれる成果>

マルハナバチのコロニーレベル毒性試験および野外植物の花粉中濃度に基づく曝露評価を組み合わせたリスク評価システムは今後、環境省の農薬による生物多様性影響調査事業において有効活用される。

### 6. 国際共同研究等の状況

ネオニコチノイドの農薬生態影響情報整備

カウンターパート : Francisco Sanchez-bayo

所属 : Faculty of Agriculture and Environment, The University of Sydney, Eveleigh, NSW, Australia

参加・連携状況 : 国内外文献データの収集・分析・論文発表

国際的な位置づけ : IPBES への情報提供

### 7. 研究成果の発表状況

#### (1) 誌上発表

#### <論文(査読あり)>

- 1) Sanchez-Bayo F & Goka K: PLoS ONE, e94482 (2014), Pesticide Residues and Bees – A Risk Assessment.
- 2) Sanchez-Bayo F, Goulson D, Pennacchio F, Nazzi F, Goka K & Desneux N: Environmental International 89-90:7-11. (2016), Are bee diseases linked to pesticides?

#### <その他誌上発表(査読なし)>

- 1) 五箇公一 : 昆虫と自然、2014年10月号、2. (2014)  
「近年問題視されているネオニコチノイド系殺虫剤の生態影響評価の課題」
- 2) 笠井 敦 : 昆虫と自然 2014年10月号、3-6 (2014)  
「ハチ類に対する残留ネオニコチノイドの影響」
- 3) 五箇公一 : 昆虫と自然、2014年10月号、16-21 (2014)  
「ナス畑のメソコズムを利用したネオニコチノイド殺虫剤の影響評価」
- 4) 五箇公一 : 科学、岩波書店、85、11、1035-1038 (2015)

「科学通信 近年問題視されているネオニコチノイド系殺虫剤の生態影響評価の現状と課題」

## (2) 口頭発表 (学会等)

- 1) 笠井 敦：第 30 回個体群生態学会大会 (2014)  
「Two serious problems in agroecosystems; invasive alien species and chemical pesticides」
- 2) 笠井 敦・林 岳彦・五箇公一：第 59 回日本応用動物昆虫学会大会 (2014)  
「野生マルハナバチ類に対する残留ネオニコチノイドの影響」
- 3) 五箇公一：日本自然保護協会シンポジウム「ネオニコチノイド系農薬の生態系影響」(2015)  
「ネオニコチノイド系農薬の生態リスク評価および実態」
- 4) 五箇公一：福井県「有機・生き物 米づくり推進大会」(2015)  
「水田の生物多様性とネオニコチノイド農薬」
- 5) 五箇公一：登米市「環境保全型農業セミナーin 登米」(2016)  
「水田の生物多様性とこれからの環境保全型農業のあり方について」
- 6) 五箇公一・滝久智：日本生態学会第 63 回大会 (2016)  
「ポリネーターの国際評価を行う意義」
- 7) 五箇公一：JSEDR 第 30 回環境ホルモン学会講演会 (2016)  
「ネオニコチノイド農薬の生態系影響評価」
- 8) 五箇公一：IUCN 浸透性殺虫剤タスクフォース(TFSP)国際シンポジウム (2016)  
「Ecological Risk Assessment of Systemic Insecticide in Japan- its progress and challenges」
- 9) 五箇公一：平成 28 年度富山県立大学環境講演会 (2016)  
「ネオニコチノイド農薬による 生態影響評価~農薬と農業と私たちの生活~」
- 10) 五箇公一：一般社団法人日本環境化学会 25 周年記念講演会 (2016)  
「ネオニコチノイドに代表される現代農薬の生態リスク評価および対策」
- 11) 五箇公一：東北ブロック環境保全型農業推進コンクール表彰式・講演会 (2017)  
「農薬リスクと生物多様性~これからの環境保全型農業のあり方について~」
- 12) 五箇公一：日本生態学会第 64 回全国大会 (2017)  
「日本における浸透性殺虫剤の生態リスク評価~その進歩と挑戦」

## (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

- 1) 国立環境研究所公開シンポジウム「ネオニコチノイド系農薬と生物多様性 ~何がどこまで分かっているか? 今後の課題は何か?~」(主催:国立環境研究所、2015年7月15日、国立環境研究所・大山ホール、観客約209名)にて成果紹介
- 2) 国立環境研究所「夏の大大公開2015」(2015年7月18日、来場者約5000名)にて成果紹介

- 3) エコライフフェア 2016（主催：環境省、2016年6月4日～5日、代々木公園、来場者数約80,000名）にて成果紹介、環境大臣説明



- 4) 国立環境研究所「夏の公開 2016」（2016年7月23日、来場者約5000名）にて成果紹介

(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) Colla SR & Packer L (2008) Evidence for decline in eastern North America bumblebee (Hymenoptera: Apidae), with special focus on *Bombus affinis* Cresson. *Biodiversity and Conservation* 17: 1379-1391.
- 2) Cameron SA, Lozier JD, Strange JP, Koch JB, Cordes N, Solter LF & Griswold TL (2010) Patterns of widespread decline in North American bumble bees. *PNAS* 108: 662-667.
- 3) Osborne JL (2012) Bumblebees and pesticides. *Nature* doi:10.1038/nature11637
- 4) Scott-Dupree CD, Conroy L & Harris CR (2009) Impact of currently used or potentially useful insecticides for canola agroecosystems on *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae), *Megachile rotundata* (Hymenoptera: Megachilidae), and *Osmia lignaria* (Hymenoptera: Megachilidae) *Journal of Economic Entomology*. 102:177-182.
- 5) Valdovinos-Núñez J, Quezada-Euán JG, Ancona-Xiu P, Moo-Valle H, Carmona A, Sanchez ER (2009) Comparative toxicity of pesticides to stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *J Econ Entomol* 102:1737-1742

- 6) Gradish AE, Scott-Dupree CD, Shipp L, Harris CR, Ferguson G (2010) Effect of reduced risk pesticides for use in greenhouse vegetable production on *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae). *Pest Manag Sci* 66:142–146
- 7) Mommaerts V, Reynders S, Boulet J, Besard L, Sterk G, Smagghe G (2010) Risk assessment for side-effects of neonicotinoids against bumblebees with and without impairing foraging behavior. *Ecotoxicology* 19:207–215
- 8) Tomé HVV, Martins GF, Lima MAP, Campos LAO, Guedes RNC (2012) Imidacloprid-induced impairment of mushroom bodies and behavior of the native stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *PLoS One* 7:e38406
- 9) Cresswell JE, Page CJ, Uygun MB, Holmbergh M, Li Y, Wheeler JG, Laycock I, Pook CJ, De Ibarra NH, Smirnoff N, Tyler CR (2012b) Differential sensitivity of honey bees and bumble bees to a dietary insecticide (imidacloprid). *Zoology* 115:365–371
- 10) Tasei JN, Lerin J, Ripault G (2000) Sub-lethal effects of imidacloprid on bumblebees, *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae), during a laboratory feeding test. *Pest Manag Sci* 56:784–788
- 11) Morandin LA, Winston ML (2003) Effects of novel pesticides on bumble bee (Hymenoptera: Apidae) colony health and foraging ability. *Environ Entomol* 32:555–563
- 12) Laycock I, Lenthall KM, Barratt AT, Cresswell JE (2012a) Effects of imidacloprid, a neonicotinoid pesticide, on reproduction in worker bumble bees (*Bombus terrestris*). *Ecotoxicology* 21:1937–1945
- 13) Whitehorn PR, O'Connor S, Wackers FL, Goulson D (2012) Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science* 336:351–352
- 14) Elston C, Thompson HM, Walters KFA. 2013. Sub-lethal effects of thiamethoxam, a neonicotinoid pesticide, and propiconazole, a DMI fungicide, on colony initiation in bumblebee (*Bombus terrestris*) micro-colonies. *Apidologie* 44(5):563–574
- 15) Feltham H, Park K, Goulson D (2014) Field realistic doses of pesticide imidacloprid reduce bumblebee pollen foraging efficiency. *Ecotoxicology* 37:301–308
- 16) Pisa LW, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin JM, Downs CA, Goulson D, Kreutzweiser DP, Krupke C, Liess M, McField M, Morrissey CA, Noome DA, Settele J, Simon-Delso N, Stark JD,

Van der Sluijs JP, Van Dyck H & Wiemers M (2015) Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ Sci Pollut Res* 22:68–102.

- 17) Moffat C, Pacheco JG, Sharp S, Samson AJ, Bolland KA, Huang J, Buckland ST, Connolly CN. (2015) Chronic exposure to neonicotinoids increases neuronal vulnerability to mitochondrial dysfunction in the bumblebee (*Bombus terrestris*). *FASEB J.* 29, 2112 – 2119.

### (3) ニホンミツバチ野生個体群に対する影響評価

国立研究開発法人森林総合研究所

森林昆虫研究領域 昆虫生態研究室 滝 久智  
北海道支所 森林育成研究グループ 永光 輝義

平成 26(開始年度)～28 年度累計予算額：27,159 千円（うち平成 28 年度：8,592 千円）

#### [要旨]

日本では、浸透移行型殺虫剤の陸域生物に対する評価は進んでいないことから、本系統剤の陸域昆虫類に対する影響実態を明らかにする。対照薬剤として有機リン剤など他系統薬剤との比較を行う。本サブテーマでは、まず、野生ニホンミツバチのワーカー個体による室内急性毒性試験を行い、感受性変異を調査した。次に、飼育環境下にて野生ニホンミツバチ個体群のコロニーを用いて野外実験を試み、花粉を介した農薬のコロニー影響試験を行った。さらに、ニホンミツバチの野生個体群の分布情報を収集およびデータベース化した上で、個体群情報を整理して空間構造との関係を調べた。また、ニホンミツバチにおける寄生者の殺虫剤の影響を調査した。その結果、個体レベルの急性毒性試験により、ネオニコチノイド系農薬といえども感受性に差異があること、概してニホンミツバチはセイヨウミツバチよりも農薬への感受性が高いことを示した。現実的な濃度を用いて調査したコロニーレベルの試験ではネオニコチノイド系農薬の明確な影響は確認されなかった。ニホンミツバチ全国分布の解析では、ネオニコチノイド系農薬の使用が、ニホンミツバチの存在確率に正または負の影響を与える可能性を示唆した。オニコチノイド系農薬によるコロニーレベルでの感染症影響について調査したが、明確な影響は確認されなかった。

#### [キーワード]

ニホンミツバチ、トウヨウミツバチ、急性毒性、コロニー、農薬

#### 1. はじめに

近年、ネオニコチノイド系殺虫剤を代表とする浸透移行型殺虫剤による生態系影響が大きな環境問題として注目を集めている。浸透移行型殺虫剤は植物の根から吸収されて、植物体内に移行するという特性をもち、日本・東南アジアでは水稻の箱苗処理剤として 1990 年代より広く使用されている。また欧米でも畑用作物の種子処理剤として普及してきた。本剤は、OECD テストガイドラインに基づく水生生物急性毒性試験では、極めて毒性が低いことが示されることから、生態影響の低い薬剤と判定されていた。しかし、我が国では近年になって、本系統剤による水田および周辺の節足動物群集に対する悪影響が懸念されるようになり、室内毒性試験やメソコズム試験により極めて低濃度でも水生生物に対して毒性の高いことが示されている。一方、欧米では本剤による家畜ミツバチに対する影響が注目され、現在、北米で問題となっている蜂群崩壊症候群 (CCD) の原因物質として疑われている。こうした状況の中、我が国でも家畜ミツバチに対する影響評価が進められつつある。しかし、これまでの研究は、比較的高い濃度での急性毒性、亜急性毒性試験がほとんどであり、実環境における低濃度暴露の影響評価は進んでいない。2013 年 5

月に EU がハチに対する生態リスクからネオニコチノイド農薬 3 剤の使用規制を発表し、日本でも本系統剤の影響実態を緊急に明らかにする必要がある。こうした点からも、日本唯一の在来ミツバチ種であるニホンミツバチに着目し、本系統剤の影響実態を明らかにする必要がある。

## 2. 研究開発目的

日本では、浸透移行型殺虫剤の陸域生物に対する評価は進んでいないことから、本系統剤の陸域昆虫類に対する影響実態を明らかにする。対照薬剤として有機リン剤など他系統薬剤との比較を行う。本サブテーマでは、野生ニホンミツバチのワーカー個体による室内急性毒性試験を行い、感受性変異を調査する。飼育環境下にて野生ニホンミツバチ個体群のコロニーを用いて野外実験を試み、コロニー生育や成長を評価ポイントとして、花粉を介した農薬のコロニー影響試験を行う。またニホンミツバチの野生個体群の分布情報を収集およびデータベース化した上で、個体群情報を整理して空間構造との関係を調べる。ニホンミツバチの寄生生物相を調査して、病原体の分離を行うとともに、検鏡や PCR 診断による病原特定方法を開発し、ニホンミツバチにおける寄生者の殺虫剤の影響を調査する。

## 3. 研究開発方法

### (1) 既存報告の整理

国内外におけるミツバチ類に対する毒性影響情報の収集と整備として、*Apis* 属のハナバチに関する既存研究報告を収集し再検討した。なお、本情報は下記の試験をする上で設定環境を整えるために利用した。

### (2) 個体レベルの急性毒性試験

ネオニコチノイド系 5 剤（アセタミプリド、イミダクロプリド、クロチアニジン、ジノテフラン、チアメトキサム）、フェニルピラゾール系 1 剤（フィプロニル）、有機リン系 2 剤（ダイアジノン、フェニトロチオン（MEP））、新規アントラニルジアミド系 1 剤（クロラントラニリプロール）、ピレスロイド系 1 剤（エトフェンプロックス）、カーバメート系 1 剤（カルバリル）を用いて急性経皮毒性試験を行った。方法は OECD のセイヨウミツバチに対する試験ガイドラインを参考にしたが、ニホンミツバチように適用を試みた（図(3)-1）。羽化後 2 日までの働き蜂個体の背面にアセトンで希釈した対象薬剤を投与し、4、24、48、72 時間後までの生死を確認した。薬剤の濃度設定においては昨年度の予備実験で得られたおおよその半数致死量（LD50）値を参考にした。これらに加えて、エチプロール（フェニルピラゾール系）、アセフェート（有機リン系）とフルベンジアミド（ジアミド系）の 3 剤を用いて急性経皮毒性試験も行った。



図(3)-1. OECD のセイヨウミツバチに対する試験ガイドラインに準じて開発したニホンミツバチ用試験の様子

### (3) コロニーに対する低濃度曝露試験

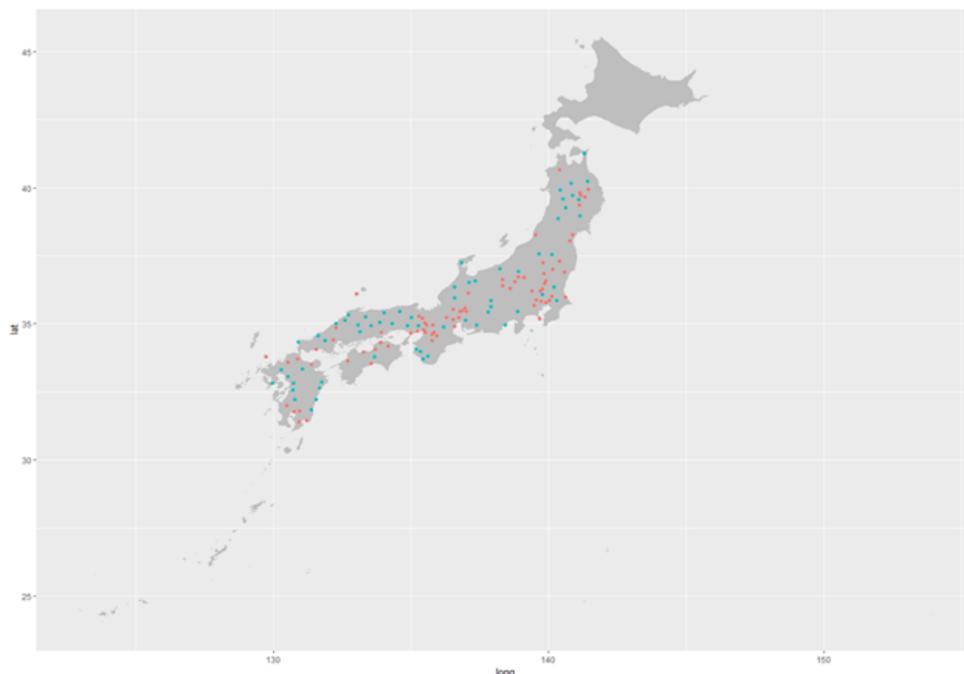
春から初夏にかけて、ニホンミツバチの分蜂群を捕獲し、専用の木製巣箱に移動させた後、茨城県つくば市にある森林総合研究所構内にて飼育試験を行った(図(3)-2)。試験には無農薬区(農薬希釈用に添加したアセトンのみ)として6コロニー、ネオニコチノイド区(ジノテフラン)として4コロニー、非ネオニコチノイド系農薬のピレスロイド区(エトフェンプロックス)として4コロニーを用いた。この地域のイネの出穂時期かつ本田における農薬使用が見込まれる8月初旬から2週間、上記の薬剤入り人工飼料(ビーハッチャー)を巣箱内に投与し摂食させた。人工飼料中の農薬濃度については、日本におけるセイヨウミツバチと農薬に関する既存の調査結果(Kimura et al 2014 Journal of Apicultural Research)で報告されている働き蜂によって採集された花粉中濃度を参考にした。本既存調査で報告されている範囲の最大の値とし、ジノテフランは301.8ng/g、エトフェンプロックスは25.4ng/gを投与した。投与前から巣の生存、重量、蜂児面積について計測を開始し、投与後それらの動態を調査した。



図(3)-2. ニホンミツバチのコロニーレベル試験の様子

#### (4) 分布状況調査

ニホンミツバチの分布が確認されている北海道を除く本州以南の 139 地点から花および巣から直接採集をした個体群を用いた (図(3)-3)。ニホンミツバチ女王は他コロニーで産出された複数の雄と交尾をした後に働き蜂を産出する。そのため、採集した働き蜂の遺伝的多様性を調査することから、採集地におけるニホンミツバチの分布情報の指標のひとつとなり得る親の遺伝的多様性を推定した。採集個体の 14 遺伝子座のマイクロサテライトを候補として調査し、うち多型が確認でき増幅に成功した 6 遺伝子座を分析に用いた。得られた個体群の遺伝的多様性から推定された父親の遺伝的多様性を応答変数、地形や気候などの説明変数に加えて、農薬が使用されていると考えられる水田や畑地などの農耕地の土地利用情報を説明変数にして解析を試みた。



図(3)-3. ニホンミツバチの採集地。青色は訪花地、橙色は営巣地を示す。

さらには、全国より採集したニホンミツバチの訪花地と営巣地の情報をもとに（図(3)-1）、ネオニコチノイド系農薬（イミダクロプリド、クロチアニジン、ジノテフラン、チアクロプリド、チアメトキサム、ニテンピラム）の総使用量に加えて土地利用と気候を環境変数として、訪花地と営巣地それぞれの分布モデルを作成した（表(3)-1）。ネオニコチノイド系農薬使用量は、都道府県毎における各種農薬の使用量データ、さらには都道府県毎における各種農薬の用途別使用量データ（谷地ら 2016 日本農薬学会誌）から上記の土地利用率をもとにして計算した水田と畑地の  $1\text{km}^2$  辺りの使用量を用いた。土地利用データは JAXA 日本域高解像度土地利用土地被覆図 ver.16.09 ([http://www.eorc.jaxa.jp/ALOS/lulc/jlulc\\_jpn.htm](http://www.eorc.jaxa.jp/ALOS/lulc/jlulc_jpn.htm)) を  $1\text{km}^2$  内の土地利用比率で求めたものを使用した。気候データは WorldClim ([www.worldclim.org](http://www.worldclim.org)) より月ごとの気温と降水量の  $1\text{km}^2$  スケールデータをもとに生物の分布に重要と考えられる気候データ Bioclimatic を計算したものを利用した。以上の環境変数を用い、訪花地と営巣地のそれぞれの分布モデルを MaxEnt(ver.3.3.3k) (Phillips et al 2006 Ecological Modelling) で構築した。

表(3)-1.使用した環境変数

環境変数名	情報源
1km2 辺りの都市率 (0-10000)	JAXA 高解像度土地利用土地被覆図(var. 16.09)
1km2 辺りの水田率 (0-10000)	JAXA 高解像度土地利用土地被覆図(var. 16.09)
1km2 辺りの畑地率 (0-10000)	JAXA 高解像度土地利用土地被覆図(var. 16.09)
1km2 辺りの草地率 (0-10000)	JAXA 高解像度土地利用土地被覆図(var. 16.09)
1km2 辺りの森林率 (0-10000)	JAXA 高解像度土地利用土地被覆図(var. 16.09)
夏季3ヶ月の最高平均気温	Wordclim より計算
冬季3ヶ月の最低気温	Wordclim より計算
夏季3ヶ月の降水量	Wordclim より計算
冬季3ヶ月の降水量	Wordclim より計算
温量指数(気温5℃以上の積算日)	Wordclim より計算
降雪量	Wordclim より計算
1km2 辺りのネオニコ使用量	谷内ら(2016) 農薬要覧より計算(2005-2010)
県別ネオニコ使用量	谷内ら(2016)農薬要覧より計算(2005-2010)

#### (5) 感染症状況調査

上述のニホンミツバチコロニーに対する低濃度曝露試験において、各区の巣のニホンミツバチ働き蜂を対象に、アカリンダニ (*Acarapis woodi*)、ノゼマ微胞子虫 (*Nosema spp.*)、黒色女王蜂児ウイルス (BQCV)、翅形態不全ウイルス (DWV)、サックブルード病ウイルス (SBV) の感染率を調査した。各コロニーから、農薬入り餌を投与する前さらには投与後に働き蜂を複数個体採集し、それら採集個体を検体にするこで感染率を調査した。アカリンダニについては働き蜂を解剖し、虫体内部に寄生するダニの有無を確認し、微胞子虫およびウイルスについては分子生物学的手法を用いた遺伝子診断により寄生の有無を確認した。

## 4. 結果及び考察

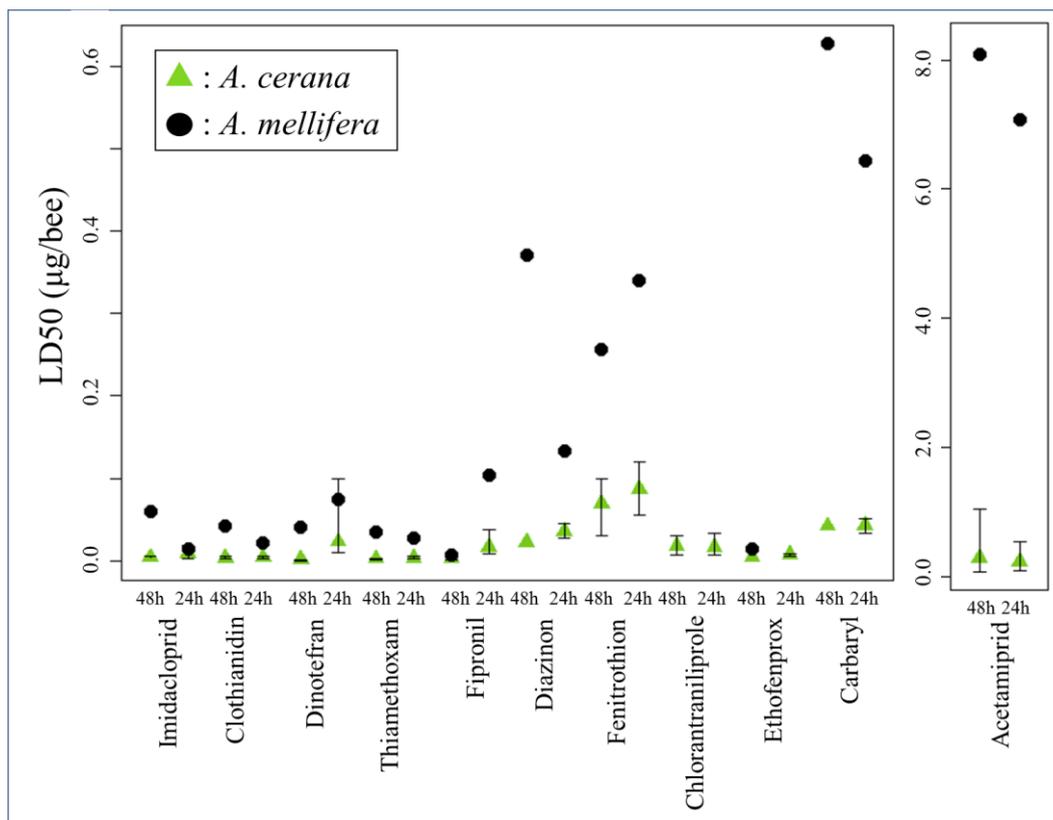
### (1) 既存報告の整理

既存研究報告の再検討による国内外におけるミツバチ類に対する毒性影響情報の収集と整備により、*Apis* 属のミツバチに対する毒性試験についてのこれまでの報告は、セイヨウミツバチ (*Apis mellifera*) 中心でありニホンミツバチに対する試験報告はほぼ存在しないことが明らかとなった。これまで報告されているセイヨウミツバチにおける毒性試験の結果の一部を記すと、低濃度のチアメトキサム、イミダクロプリド、クロチアニジンなどの投与によって働き蜂の行動やコロニーの成長に異常が生じることが報告されている (Henry et al. 2012 Science; Lu et al. 2014 Bulletin of Insectology など)。一方で、ネオニコチノイド系といえども各薬剤によってセイヨウミツバチに対する毒性は異なり、アセタミプリドとチアクロプリドについては低毒性が指摘されている (Iwasa et al. 2004 Crop Protection)。直接的な毒性試験の報告に加え、間接的な効果としてイミダクロプリド、チアクロプリド、フィプロニルの低濃度曝露によって、セイヨウミツバチの病原体となるノゼマへの感染率が高くなることが報告されている (Alaux et al. 2010 Environmental Microbiology; Vidau et al. 2011 PLoS One; Pettis et al. 2012 Naturwissenschaften) うえ、クロチアニ

ジンをを用いた試験ではセイヨウミツバチの免疫に異常が生じて病原の影響を受けやすくなる機構についても報告されている (Di Prisco et al. 2013 PNAS)。こうした国外での事例に加え、我が国のセイヨウミツバチの事例に目を向けると、ジノテフランおよびクロチアニジンを実用薬量の10倍から100倍に希釈した濃度で投与した結果、コロニー成長に異常が生じるという報告がある (Yamada et al. 2012 Japanese Journal of Clinical Ecology) が、実験で使用されている薬量は野外環境中にて報告されている値を上回るものであり、濃度を再検討し、ネオニコチノイド系以外の薬剤を含めた上で、環境中暴露による影響を検証する必要があるだろう。また、北日本の斑点米カメムシ対策として殺虫剤を使用している水田地帯において、セイヨウミツバチが巣門前で大量に死亡している現象が報告されている。死亡個体から LD50 値を下回るもののクロチアニジンとジノテフランに加え、フェニルピラゾール系のエチプロール、合成ピレスロイド系のエトフェンプロックス、有機リン系のフェントエートが検出されており、イネ開花時に水田で散布される殺虫剤に花粉を収集するために訪れた働き蜂が曝露され大量死につながった可能性が高いとされる (Kimura et al. 2014 Journal of Apicultural Research)。なお、セイヨウミツバチを主として一部マルハナバチなどに対するネオニコチノイド系農薬の影響については、Godfray et al. 2014. Proceedings B および Godfray et al. 2015. Proceedings B による総説内で、既存報告の整理とその科学的妥当性の評価がなされていることを確認した。

## (2) 個体レベルの急性毒性試験

ネオニコチノイド系、フェニルピラゾール系、有機リン系、新規アントラニルジアミド系、ピレスロイド系、カーバメート系の11薬剤を用いたニホンミツバチの個体レベルの急性経皮毒性試験では、ニホンミツバチに対する試験薬剤の LD50 値の最小と最大は、いずれもネオニコチノイド系薬剤から得られた。またどの薬剤の LD50 値においてもニホンミツバチの方がセイヨウミツバチよりも低い傾向を示した (図(3)-4)。

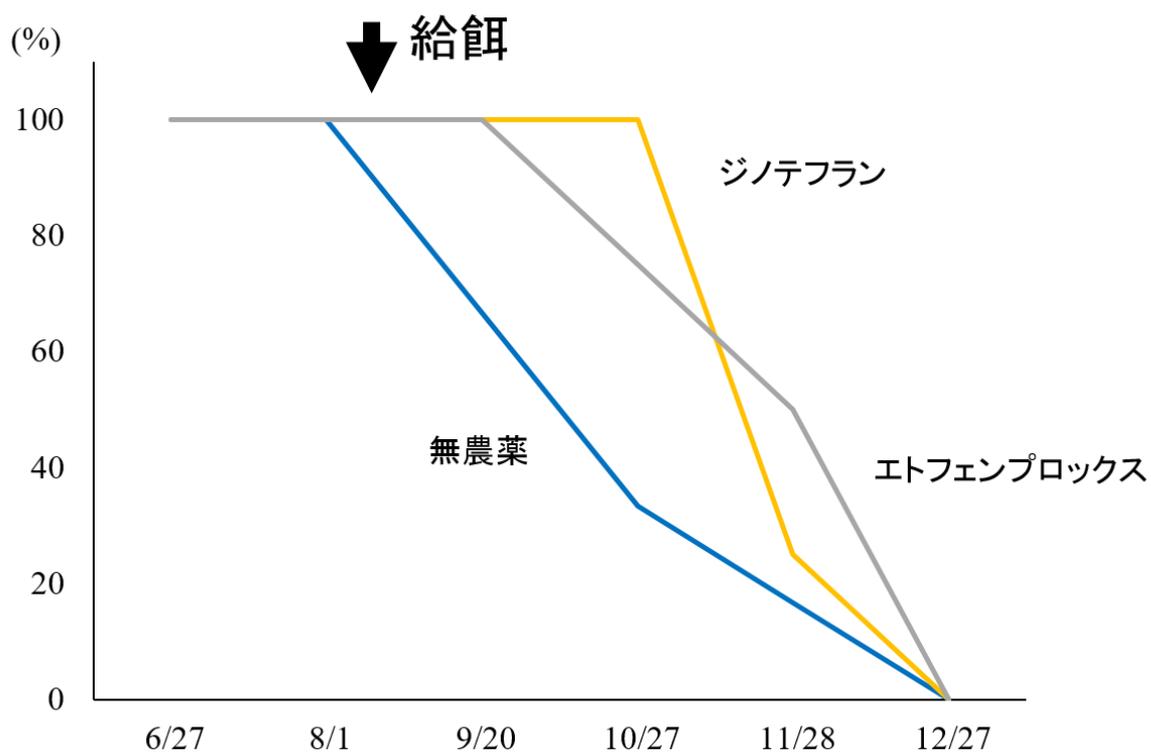


図(3)-4. ニホンミツバチとセイヨウミツバチに対する各種農薬の LD50 値 (μg/bee)

さらに追加試験した各農薬のニホンミツバチに対する LD50 値を求めたところ、エチプロールは  $0.0036 \mu\text{g}/\text{bee}$ 、アセフェートは  $0.11 \mu\text{g}/\text{bee}$  を示した。フルベンジルアミドについては  $100 \mu\text{g}/\text{bee}$  を与えても致死個体は観察されなかった。既存報告によると、セイヨウミツバチにおいて、エチプロールは  $0.013 \mu\text{g}/\text{bee}$ 、アセフェートは  $1.8 \mu\text{g}/\text{bee}$  であり、上記試験まで明らかになった各種農薬の LD50 値の傾向と同様に、ニホンミツバチから得られる LD50 は低い値を示した。

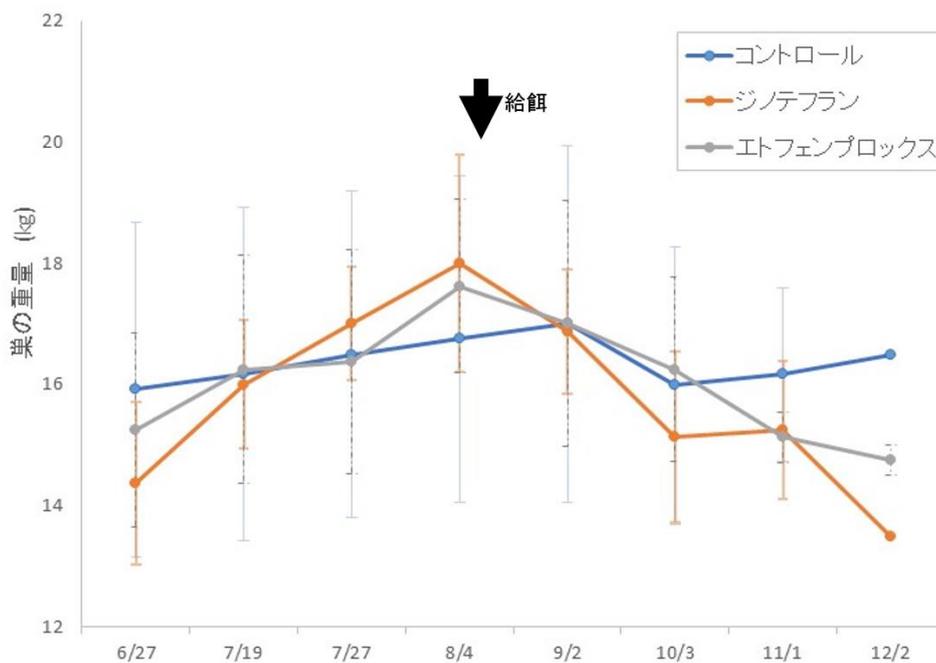
### (3) コロニーに対する低濃度曝露試験

巣の生存率、巣の重量、巣板に形成された蜂児面積について調査した。巣の生存率について、無農薬区における給餌後生存率は 12 月まで減少傾向が確認され、ネオニコチノイド区およびピレスロイド区ではいずれにおいても、給餌した後の 9 月に至るまでは変化がなかったものの、その後生存率は減少した (図(3)-5)。すべての巣において、12 月には消失に至り、冬越し可能なコロニーは得られなかった。

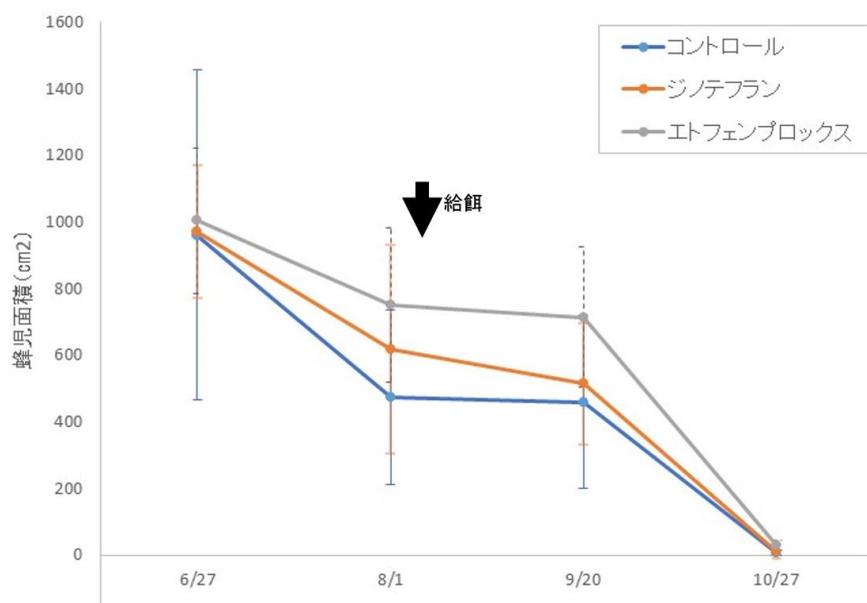


図(3)-5. ニホンミツバチのコロニーにおける巣生存率の経時的変化

生存コロニーにおける巣の重量については、給餌後いずれの区においても減少傾向がみられたが、無農薬区、ネオニコチノイド区、ピレスロイド区いずれの区間にも明確な相違は確認されなかった（図(3)-6）。生存コロニーにおける巣板に形成された蜂児面積についても、給餌後いずれの区においても減少傾向がみられたが、無農薬区、ネオニコチノイド区、ピレスロイド区いずれの区間にも明確な相違は確認されなかった（図(3)-7）。



図(3)ー6. ニホンミツバチのコロニーにおける巣重量の経時的変化

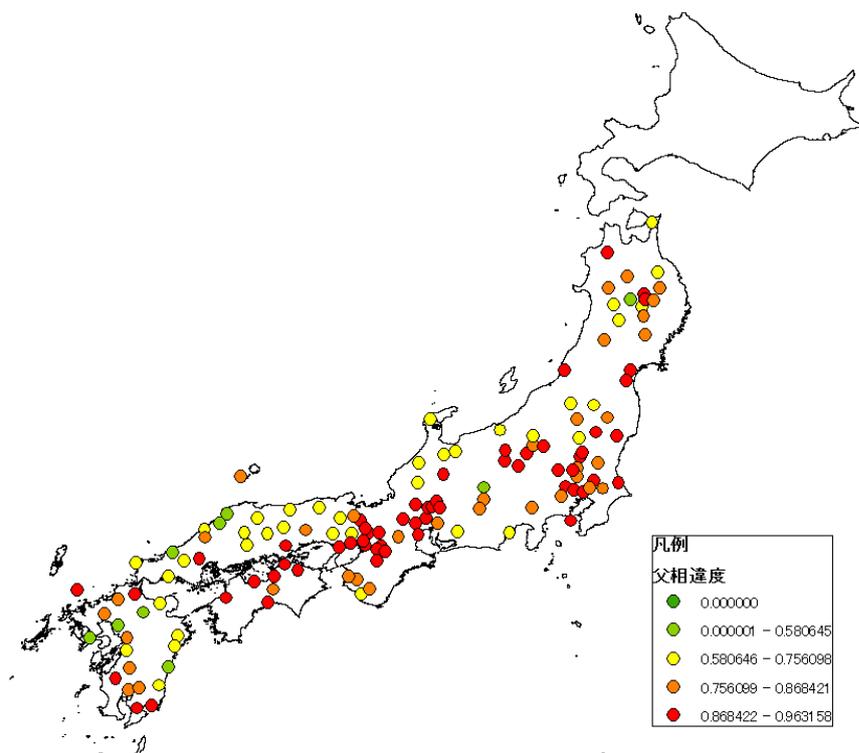


図(3)ー7. ニホンミツバチのコロニーにおける蜂児面積の経時的変化

#### (4) 分布状況調査

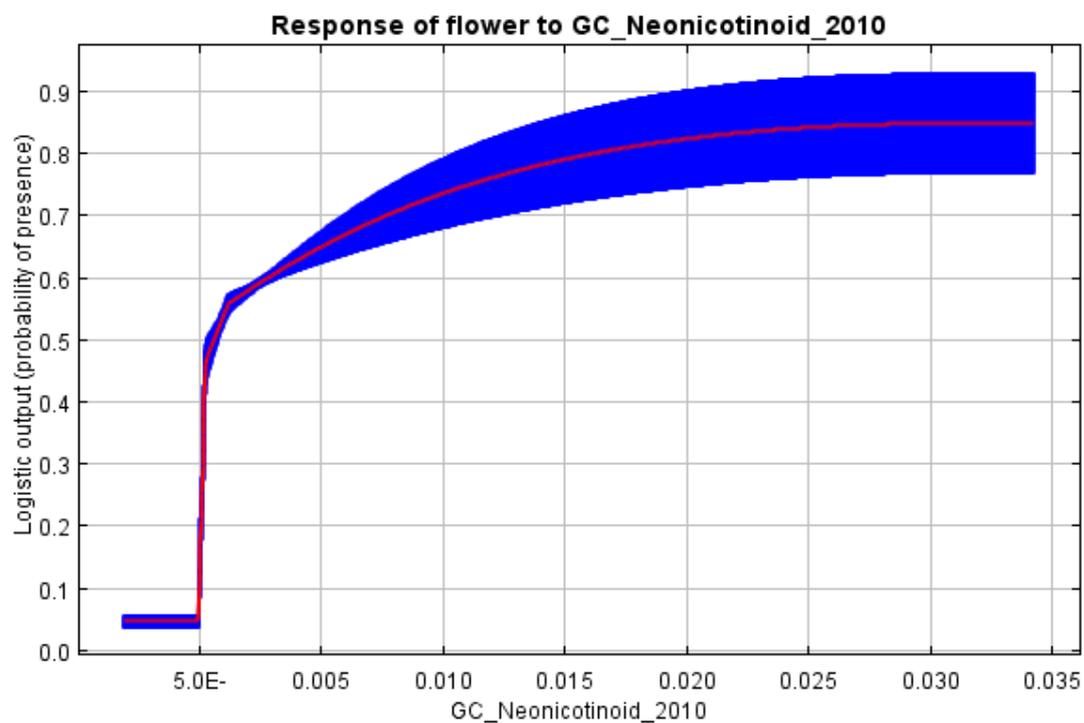
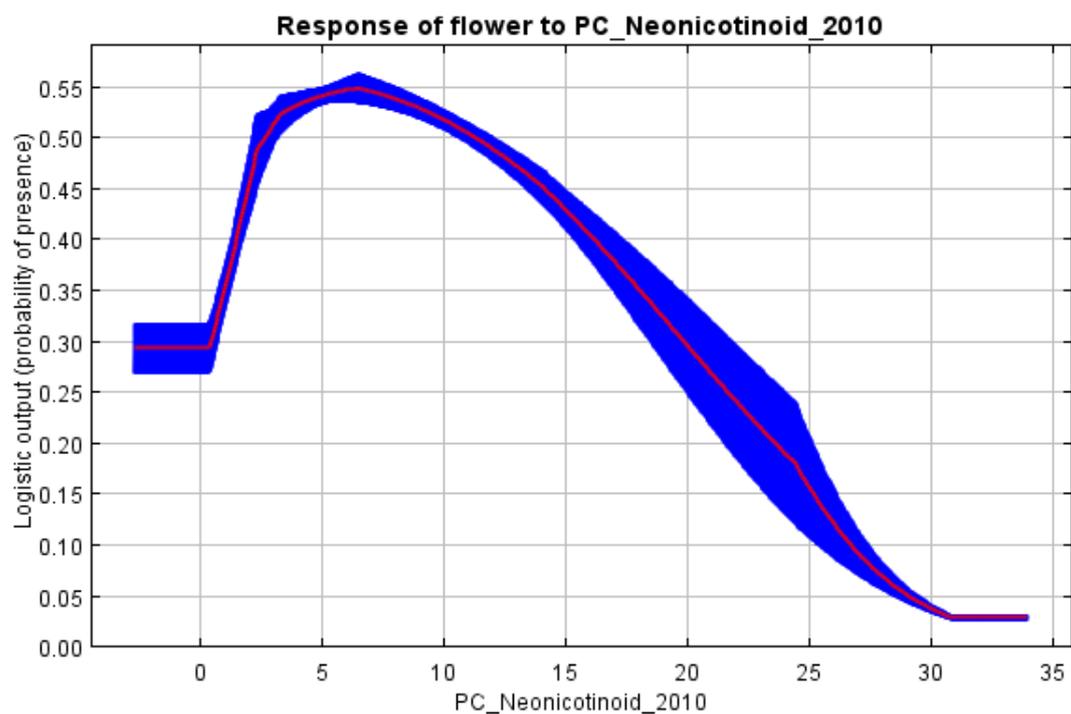
まず、野生ニホンミツバチの分布情報の生息地推定については、父親の相違度を応答変数として解析した結果、地形や気候では、経度、降水量、気温、日照時間の影響が確認された。土地利用の効果としては、農薬全般の使用が想定される水田と畑地の効果は検出されず、農

耕地がニホンミツバチの遺伝的多様性に負の効果をもたらしていることを支持しなかった（図(3)-8）。

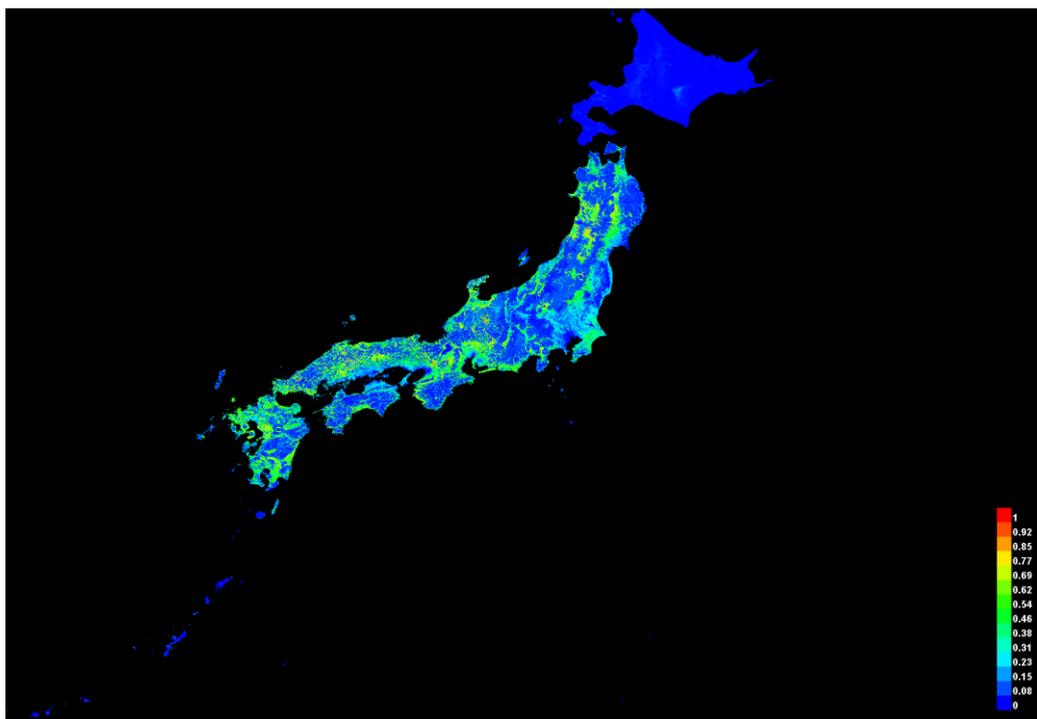


図(3)-8. 採集個体の遺伝子型をもとに解析して得られた父親相達度

続いて、全国より採集したニホンミツバチの訪花地と営巣地の情報をもとに、ネオニコチノイド系農薬（イミダクロプリド、クロチアニジン、ジノテフラン、チアクロプリド、チアメトキサム、ニテンピラム）の総使用量に加えて土地利用と気候を環境変数として、訪花地と営巣地それぞれの分布モデルを作成した。結果、訪花個体群を用いて作成されたモデルはニホンミツバチの訪花地が確認された場所をそれ以外の場所から比較的高い確率で峻別する事が可能であった（AUC：0.817）。環境変数を用いた解析によると、ニホンミツバチの訪花地は水田率、都道府県別および1km<sup>2</sup>グリッド毎のネオニコチノイド使用量、そして冬季の降水量により説明される事が示された。都道府県別のネオニコ使用量に対して訪花地は最初存在確率が上昇するもののその後使用量が増えるほど減少することが確認された一方で、1km<sup>2</sup>グリッド辺りのネオニコ使用量に対して最初は急激にその後緩やかに上昇する傾向がある事が示唆された（図(3)-9）。また本モデルによって予測されるニホンミツバチの訪花地の予測存在確率地図によると北海道を除いた平野部に多く分布している傾向が見られた（図(3)-10）。

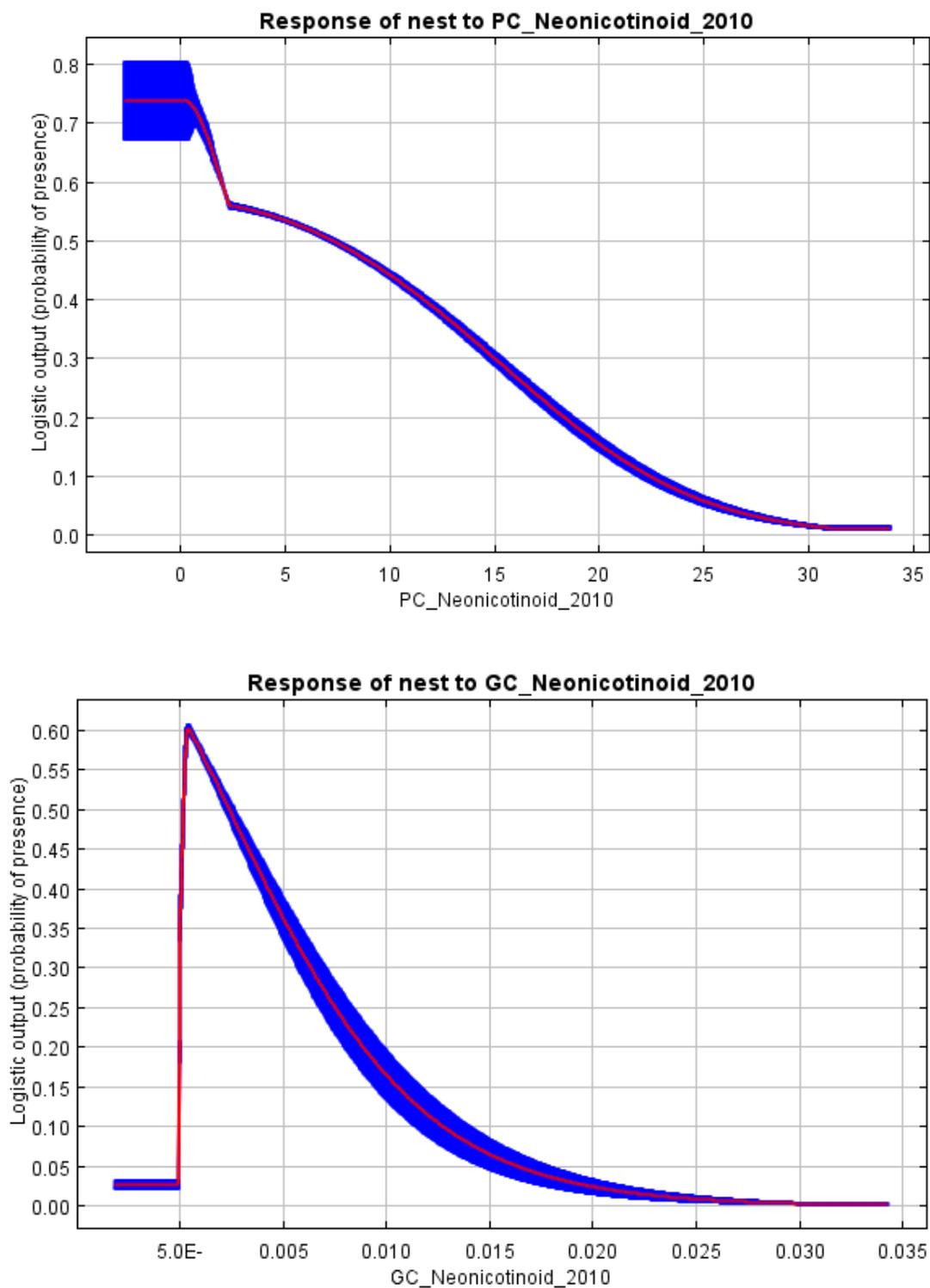


図(3)－9. ネオニコチノイド使用量単独でモデルを作成した場合における訪花地の予測存在確率の変化（上：都道府県別、下：1km<sup>2</sup>グリッド毎）

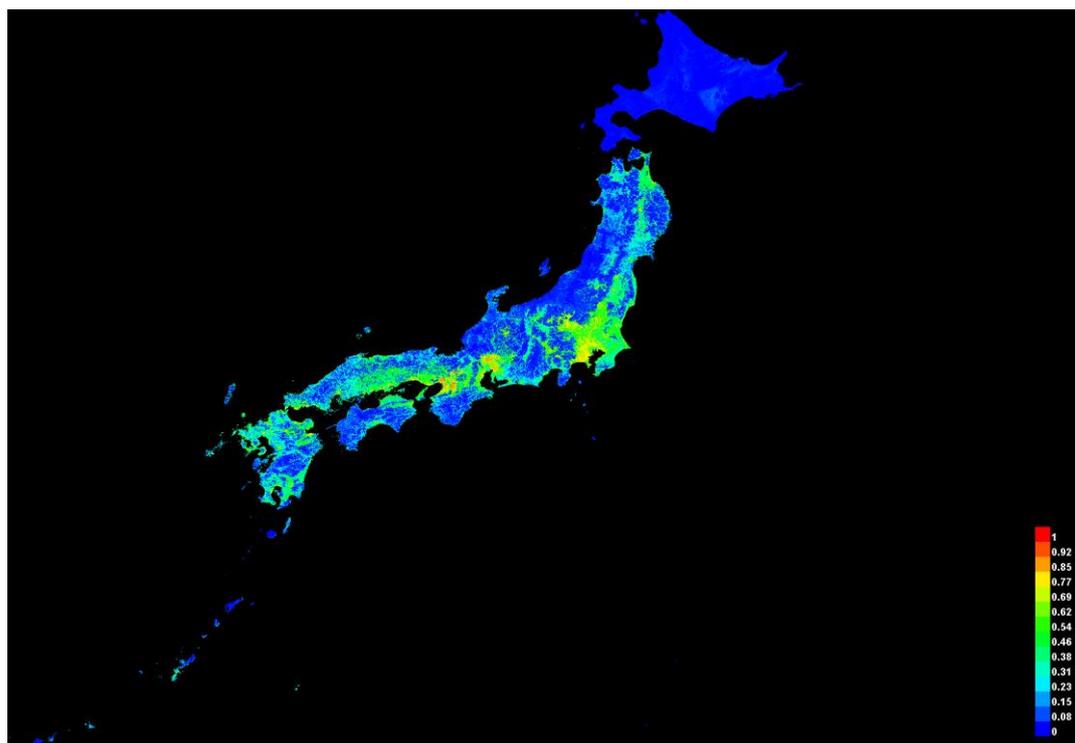


図(3)－10. 訪花地の分布確率予測図

営巣個体群を用いて作成されたモデルもニホンミツバチの営巣地が確認された場所をそれ以外の場所から比較的高い確率で峻別する事が可能であった（AUC：0.832）。環境変数を用いた解析によると、ニホンミツバチの営巣地はネオニコチノイドの県別およびグリッド  $1\text{km}^2$  毎の使用量、都市と森林率によって説明された。県別および  $1\text{km}^2$  毎のグリッド毎のネオニコチノイド使用量については、反応曲線によると営巣地の存在確率に対してともに負の影響を与える事が示された（図(3)－11）。また営巣地の存在確率の分布地図によると、訪花地の分布予測図に比べて太平洋側への分布の偏りが認められた（図(3)－12）。



図(3)-11. ネオニコチノイド使用量単独でモデルを作成した場合における営巣地の予測存在確率の変化（上：都道府県別、下：1km<sup>2</sup>グリッド毎）



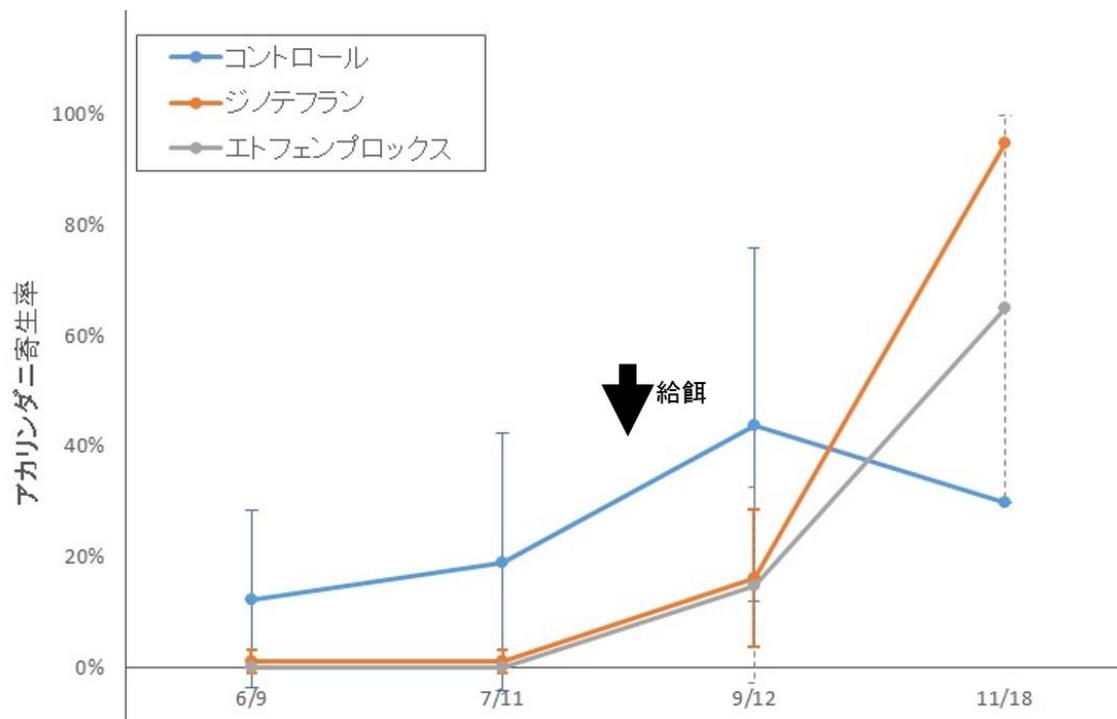
図(3)－12. 営巣地の分布確率予測図

以上の結果は、ニホンミツバチの訪花地および営巣地の存在確率はともにネオニコチノイド農薬の正あるいは負の影響を受けることを示唆している。MaxEnt は環境変数間の相関関係を取り除いて評価する事が可能でありその予測力には一定の評価がある。しかし、分布・環境データ自体にデータの偏りが存在する場合はその解析や予測も偏ったものになる可能性が高い。例えば、営巣の採集データは太平洋側に偏っていたため、営巣地の存在確率の分布は訪花地の分布予測図に比べて太平洋側への偏りが認められた可能性がある。したがって、今後偏りが少ない分布データの収集および抽出を行い、厳選された説明変数を用いる事でモデルの予測精度を高めていく必要がある。また、本解析ではネオニコチノイド系農薬の総使用量にのみ着目したが、今後農薬全般の使用量を加味した上での解析結果やネオニコチノイド系農薬個別での解析結果から議論をすすめていく必要性もある。

#### (5) 感染症状況調査

ニホンミツバチコロニーに対する低濃度曝露試験に付随して感染状況を調査した。ノゼマ微胞子虫 (*Nosema* spp.)、黒色女王蜂児ウイルス (BQCV)、翅形態不全ウイルス (DWV)、サックブルード病ウイルス (SBV) については、無農薬区、ネオニコチノイド区、ピレスロイド区のいずれにおいても感染率が低く、区間による明確な相違はみられなかった。アカリダニの寄生率については、無農薬区、ネオニコチノイド区、ピレスロイド区のいずれにおいても給餌をした後の9月に至るまで感染率は上昇する傾向がみられたものの、区による明確な違いを確認するには至らなかった(図(3)－13)。ネオニコチノイド区とピレスロイド区とは異なり、11月には無農薬区のみ感染率が減少する傾向がみられたものの、この時期まで

に試験ニホンミツバチのコロニー数の減少が著しく、同月の無農薬区は1コロニーから得られた結果であることに留意する必要がある。



図(3)-13. ニホンミツバチのコロニーにおけるアカリンダニ寄生率の経時的変化

## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

- ・これまで困難であったニホンミツバチにおける個体レベルの急性毒性試験について試験方法を確立した。
- ・概してニホンミツバチはセイヨウミツバチよりも農薬への感受性が高いことを示した。
- ・これまで採集や維持が困難であったニホンミツバチを対象としたコロニーレベルの試験に関して単年度であるものの実施可能であることを示した。
- ・ニホンミツバチ全国分布の解析により、ネオニコチノイド系農薬の使用が、ニホンミツバチの存在確率に正または負の影響を与える可能性を示唆した。
- ・現実的な濃度を用いてネオニコチノイド系農薬によるコロニーレベルでの感染症影響について調査したが、明確な影響は確認されなかった。

### (2) 環境政策への貢献

- 1) 環境省「農薬の昆虫類への影響に関する検討会」において、成果の一つであるニホンミツバチの農薬影響について説明した。

<行政が既に活用した成果>

・本研究成果に基づき、生物多様性及び生態系サービスに関する政府間科学政策プラットフォーム（IPBES）の Deliverable 3(a): Thematic assessment of pollinators, pollination and food production において、Leading Author として参画し、世界規模での花粉媒介者と食糧生産についてこれまでの傾向や対策について既存報告を取りまとめた。

#### <行政が活用することが見込まれる成果>

・殺虫剤のリスク管理を考慮する場合、異なるネオニコチノイド系薬剤を単にネオニコチノイド系として扱うことは避け、セイヨウミツバチとは異なる戦略がニホンミツバチに必要であることが示唆された。

#### 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）誌上发表

##### <論文（査読あり）>

- 1) 前田太郎, 坂本佳子, 岡部貴美子, 滝久智, 芳山三喜雄, 五箇公一, 木村澄, 2015. ミツバチに寄生するアカリンダニ -分類、生態から対策まで-. 日本応用動物昆虫学会誌 59, 109-126.
- 2) Nagamitsu T, Yasuda M, Saito-Morooka F, Inoue MN, Nishiyama M, Goka K, Sugiura S, Maeto K, Okabe K, Taki H, 2016. Genetic structure and potential environmental determinants of local genetic diversity in Japanese honeybees (*Apis cerana japonica*). PLOS ONE 11, e0167233.
- 3) Yasuda M, Sakamoto Y, Goka K, Nagamitsu T, Taki H, (2017) Insecticide susceptibility in Asian honey bees *Apis cerana* and implications for wild honey bees in Asia. Journal of Economic Entomology, 110:447-452.
- 4) Taki H, Ikeda H, Nagamitsu T, Yasuda M, Sugiura S, Maeto K, Okabe K, (in press) Stable nitrogen and carbon isotope ratios in wild native honeybees: the influence of land use and climate. Biodiversity and Conservation.

##### （2）口頭発表（学会等）

- 1) 滝久智, 安田美香, 永光輝義, 2016.03. ネオニコチノイド農薬のニホンミツバチ生態リスク. 日本生態学会第 63 回大会. 仙台. (企画集会「ネオニコチノイド農薬による生態影響～何が、どこまで分かったのか？」林岳彦, 五箇公一主催)
- 2) 五箇公一, 滝久智, 2016.03. ポリネーターの国際評価を行う意義. 日本生態学会第 63 回大会. 仙台. (自由集会「IPBES アセスメントから示唆される生物多様性と生態系サービス研究の将来展望」鮫島弘光主催)
- 3) 安田美香, 永光輝義, 滝久智, 2016.03. 森林はニホンミツバチの営巣場所として機能しているか? 日本生態学会第 63 回大会. 仙台.

- 4) 永光輝義, 安田美香, 滝久智, 岡部貴美子, 五箇公一, 2016.03. ニホンミツバチ(*Apis crane japonica*)の遺伝的多様性に影響する景観要因と遺伝構造. 日本生態学会第 63 回大会. 仙台.
- 5) 安田美香, 坂本佳子, 五箇公一, 永光輝義, 滝久智, 2016.03. ニホンミツバチに対する各種殺虫剤の急性経皮毒性試験. 日本昆虫学会第 76 回大会・第 60 回日本応用動物昆虫学会大会合同大会. 堺.
- 6) 滝久智, 安田美香, 永光輝義, 2016.03. ネオニコチノイド農薬のニホンミツバチに対する影響評価. 日本昆虫学会第 76 回大会・第 60 回日本応用動物昆虫学会大会合同大会. 堺. (小集会「ネオニコチノイド農薬による生態影響～何が、どこまで分かったのか?」中牟田潔, 五箇公一主催)
- 7) 滝久智, 池田紘士, 永光輝義, 安田美香, 杉浦真治, 前藤薫, 岡部貴美子, 2017.03. 全国調査で明らかとなったニホンミツバチの窒素と炭素の安定同位体比. 第 64 回日本生態学会大会.
- 8) 滝久智, 安田美香, 永光輝義, 2017.03. ニホンミツバチへの農薬影響. 第 61 回日本応用動物昆虫学会大会.

### (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) Kimura K, Yoshiyama M, Saito K, Nirasawa K and Ishizaka M (2014) Examination of mass honey bee death at the entrance to hives in a paddy rice production district in Japan: the influence of insecticides sprayed on nearby rice fields. *Journal of Apicultural Research* 53: 599-606.
- 2) 谷地俊二, 永井孝志, 稲生圭哉 (2016) 水田使用殺虫剤の用途別使用量の簡便な推定方法の開発. *日本農薬学会誌* 41: 1-10.
- 3) Phillips SJ, Anderson RP and Schapire RE (2006) Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190: 231-259.

- 4) Henry M, Béguin M, Requier F, Rollin O, Odoux J-F, Aupinel P, Aptel J, Tchamitchian S and Decourtye A (2012) A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* 336: 348-350.
- 5) Lu C, Warchol KM and Callahan RA (2014) Sub-lethal exposure to neonicotinoids impaired honey bees winterization before proceeding to colony collapse disorder. *Bulletin of Insectology* 67: 125-130.
- 6) Iwasa T, Motoyama N, Ambrose JT and Roe RM (2004) Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protection* 23: 371-378.
- 7) Alaux C, Brunet JL, Dussaubat C, Mondet F, Tchamitchan S, Cousin M, Brillard J, Baldy A, Belzunces LP and Le Conte Y (2010) Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental microbiology* 12: 774-782.
- 8) Vidau C, Diogon M, Aufauvre J, Fontbonne R, Viguès B, Brunet JL, Texier C, Brion DG, Blot N, Alaoui HE, Belzunces LP and Delbac F (2011) Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *PLoS ONE* 6: e21550.
- 9) Pettis JS, Johnson J and Dively G (2012) Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften* 99: 153-158.
- 10) Di Prisco G, Cavaliere V, Annoscia D, Varricchio P, Caprio E, Nazzi F, Gargiulo G and Pennachio F (2013) Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 18466-18471.
- 11) Yamada T, Yamada K, Wada N (2012) Influence of dinotefuran and clothianidin on a bee colony. *Japanese Journal of Clinical Ecology* 21: 10-23.
- 12) Godfray HCJ, Blacquière T, Field LM, Hails RS, Petrokofsky G, Potts SG, Raine NS, Vanbergen AJ and McLean AR (2014) A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators; 2014. *Proceedings of the Royal Society B*, 281: 20140558.

- 13) Godfray HCJ, Blacquiere T, Field LM, Hails RS, Potts SG, Raine NS, Vanbergen AJ and McLean AR (2015) A restatement of recent advances in the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. *Proceedings of the Royal Society B*, 282: 20151821.

## III. 英文 Abstract

**Impact Assessment of Neonicotinoid Insecticides on Terrestrial Insects**

Principal Investigator: Kiyoshi NAKAMUTA

Institution: Chiba University  
648 Matsudo, Matsudo, Chiba 271-8510, JAPAN  
Tel: +81-47-308-8830 / Fax: +81-47-308-8830  
E-mail: nakamuta@faculty.chiba-u.jp

Cooperated by: National Institute for Environmental Studies, Forestry and Forest Products Research Institute

[Abstract]

Key Words: Bumblebee, Environmental impact, Japanese honeybee, Neonicotinoid insecticide, Terrestrial insect

To explore the ecological impact of neonicotinoid insecticides (hereafter, neonics) on terrestrial insects, we conducted toxicity tests and assessed the effects of treatment with a range of neonics and non-neonics on insect communities. We also inspected the ecological impacts of neonics on bumblebees and on the Japanese honeybee, *Apis cerana japonica*.

We conducted dermal toxicity tests of 14 insecticides on 24 terrestrial arthropod species to determine the species sensitivity distributions (SSDs). The slopes of the SSDs of neonics tended to be more moderate than those of non-neonics; because these neonics have higher selective toxicity it is difficult to use typical species to evaluate the risks they pose.

We assessed the terrestrial arthropod communities in a field of eggplant and its surrounding buffer zone after treatment with a granular formulation of neonics and an organophosphate insecticide. Both of them affected the communities in the eggplant field. In the buffer zone, pesticide residues were detected and accumulated with increasing frequency of treatment, but these residues did not affect the arthropod communities.

We tested the acute toxicity of each insecticide to Japanese native bumblebees, *Bombus ignitus* and *Bombus diversus*, in the laboratory. There was little difference between the acute toxicity of neonics and those of conventional insecticides. We also performed colony toxicity tests in a greenhouse to elucidate the colony growth-inhibition effects of the insecticides via pollen residues. In the greenhouse, the threshold

concentrations of neonics in pollen for growth inhibition were between 20 and 200 ppb, whereas in the field the pollen residue concentrations of neonics were between 10 and 100 ppb. Therefore, at least on the basis of our current data, the effect of exposure to pollen residues was likely not critical. There was no correlation between wild bumblebee distribution and the amounts of neonics used per unit area.

We also examined the effects of neonics and other insecticides on the Japanese honeybee *Apis cerana japonica*. Tests of the acute toxicity showed that in general the Japanese honeybees showed greater susceptibility to any insecticides, including neonics, than the European honeybees *Apis mellifera*. Colony development did not differ between conventional insecticides and neonics. Analyses of the nationwide distribution of Japanese honeybees suggested that the use of neonics could have either a positive or a negative influence on the probability of the existences. There was no clear indication that the neonics at realistic concentrations affected the occurrence of diseases at the colony level.