

令和元年6月12日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04962

研究課題名(和文)ネオニコチノイド系農薬の海産甲殻類への種特異的毒性機構の解明と沿岸生態リスク評価

研究課題名(英文)Occurrence of neonicotinoid insecticides in estuaries and their potential risks to marine crustaceans

研究代表者

羽野 健志 (Takeshi, Hano)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・瀬戸内海区水産研究所・主任研究員

研究者番号：30621057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ネオニコチノイド系農薬(NNIs)が海産甲殻類に及ぼす影響を調べ、その潜在リスクを評価することを目的として行った。瀬戸内海での採水調査により、7種のNNIsのうち5種を検出した。また、海産甲殻類3種(クルマエビ、ウリタエビジャコ、アミ)への影響を調べた結果、ウリタエビジャコが他2種に比してNNIsに対し強い耐性を示した。その理由としてOxygenaseの関与が推察された。NNIsが混在する実環境下での各海産甲殻類への影響を評価した結果、感受性の最も高いアミで最大0.75%(1000尾中7.5尾)が影響を受けていると試算されたものの、そのリスクは検出できないほど低いことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NNIsは他の農薬と同様、その害虫駆除効果により農作物の安定生産に寄与してきた。一方、本来意図しない非標的生物への影響の懸念は、陸上昆虫や淡水水生昆虫の研究事例により高まっている。NNIsは河川を介し沿岸河口域に達するものの、その濃度や海産甲殻類への影響を調べた研究事例は皆無であった。3年以上にわたる現場調査の結果、NNIsによる海産甲殻類へのリスク影響は極めて低いと推察された。生死につながる重篤な指標のみに基づいてリスクが換算されている点は考慮されなければいけないが、本研究のアウトプットは、人類と農薬との共存の在り方を議論する材料として有効的に活用されることでその意義はより大きいものとなる。

研究成果の概要(英文)：This study was performed to evaluate potential risks of seven neonicotinoid insecticides (NNIs) on estuary-resident marine crustaceans. Estuarine water samples were collected at the Seto Inland Sea of Japan, and the insecticide levels were measured. Five NNIs were successfully identified, and their occurrence varied temporally. Marine crustaceans were simultaneously harvested and three predominant crustacean species, kuruma prawn (*Penaeus japonicus*), sand shrimp (*Crangon uritai*), and mysid (*Neomysis awatschensis*), were captured. A 96-h laboratory toxicity study with the insecticides indicated that sand shrimp had higher tolerance to NNIs than to the other two crustaceans, which could be explained by involvement of oxygenase. Using both toxicity data and occurrence of NNIs, the potential risks on the three marine crustaceans were quantified and the outcome was calculated to be less than 0.8%, which is likely to be too low to indicate adverse effects caused by NNIs.

研究分野：環境毒性学

キーワード：ネオニコチノイド系農薬 海産甲殻類 種特異的毒性 沿岸生態リスク

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ネオニコチノイド系農薬 (NNIs) は、昆虫の神経伝達系に作用して強力な殺虫効果を発揮する。現在 7 物質が国内で販売され、120 カ国以上で登録・使用されている。近年、NNIs による陸生昆虫 (ミツバチ) や淡水水生昆虫などの非標的昆虫への影響が懸念されており (Gill et al. *Nature* 2012 他)、陸域や水田・河川生態系におけるリスク影響評価が進められている。水田が海岸線に沿って散在する地域では、NNIs は河川を介して沿岸域に流入すると予想される。沿岸域で農薬のリスク評価を行うことの必要性は、申請者らの先行研究からも明らかとなっているものの (Hano et al. *Chemosphere* 2015)、NNIs と沿岸干潟域、及び当該海域に生息する海産甲殻類との関係に着目したリスク評価研究はこれまで全く行われてこなかった。

2. 研究の目的

沿岸干潟域における NNIs の濃度実態を明らかにするとともに、海産甲殻類への毒性及び種特異的毒性機構を明らかにし、NNIs の沿岸干潟域における生態リスク (生物や生態系に対する潜在的危険性) を評価することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 被験物質

ネオニコチノイド系農薬 (NNIs): ニコチン様の構造を持つ農薬の総称。7 成分 (アセタミプリド (Ace)、イミダクロプリド (Imi)、クロチアニジン (Clo)、ジノテフラン (Din)、ニテンピラム、チアクロプリド、チアメトキサム (Thm)) を対象とした。

(2) 試験対象種

沿岸干潟域で採捕されたクルマエビ (*Penaeus japonicus*)、エビジャコ (ウリタエビジャコ) (*Crangon uritai*) の 2 種の試験を優先的に行い、さらにクロイサザアミ (*Neomysis awotschensis*) を検討した。

(3) 計画 1) NNIs の沿岸干潟域濃度分布調査

NNIs の濃度分布を明らかにするため、瀬戸内海西部沿岸干潟域において採水調査を行った。採水した海水は研究所に持ち帰り速やかに前処理を行い、液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS/MS) を用いて分析を行った。

(4) 計画 2) 沿岸干潟域での生物量調査

計画 1) と並行して海産甲殻類の採捕を定量的に行い、沿岸干潟域での種別の生物量を調べた。

(5) 計画 3) 海産甲殻類を用いた毒性試験

沿岸干潟域で観察される海産甲殻類種 (クルマエビ、エビジャコ) を用い、毒性試験を行った。エビジャコは、沿岸干潟域で採取・選別後、研究所内の流水式飼育施設で馴致後、試験に供した。毒性試験は海産生物毒性試験指針 (2010、水産庁) に準じて行い、種間で感受性の差が顕著な NNI を選定し、計画 4) に供した。

(6) 計画 4) 感受性の種間差が生じるメカニズムの解明

RI 標識 NNI による体内分布の種間比較: 農薬の殺虫効果は、標的器官への蓄積の多寡に依存する (標的器官に農薬が蓄積する生物種ほどよく効く) ことが報告されている (Nyman et al., *Environ. Sci. Technol.* 2014)。よって、本計画では、放射性同位体 (RI) ^{14}C でラベル化した NNI の取込試験を行い、NNI の体内分布を RI により可視化・定量化する。

アセチルコリンレセプター (AChR) の種間比較: 陸上昆虫では、NNI への高感受性種と低感受性種間で AChR 結合部位の Loop D 領域の配列に差異が生じていることが明らかになっている (Erdmanis et al. *Biochemistry* 2011)。そこで、これらの現象が NNI の感受性が異なる海産甲殻類種で生じているかを確認するため、当該領域の塩基配列を決定する。

、種間差が認められない場合には、薬物代謝酵素との関連を考察するなど、様々な視点から感受性の種間差が生じるメカニズムの解明を試みる。

(7) 計画 5) 沿岸域における NNIs のリスク評価

計画 1) - 4) を取りまとめ、NNIs の沿岸干潟域における生態リスク評価を行う。

4. 研究成果

(1) 計画 1) NNIs の沿岸干潟域濃度調査

沿岸干潟域において 4 地点計 178 検体を、また当所所有の調査船を用いた当該調査沿岸域の沖合調査により 4 地点計 48 検体を採取した。調査に先立ち、NNIs 7 成分に加え、分解生成物 5 成分を含む計 12 成分を海水中から高感度に検出する分析方法を確立した。分析の結果、NNIs は農薬頻用期 (6 - 9 月) に高頻度かつ高濃度で検出され、Din > Imi > Clo の順であった (表 - 1)。特に、NNIs の中で使用量の多い Din が高濃度・高頻度で検出され、Din は沿岸沖合 10km の表層水でも検出された。

表 - 1 NNIs の干潟濃度分布

	Salinity 0-10			Salinity ≥10		
	n	% Detection	Max Conc. (µg/L)	n	% Detection	Max Conc. (µg/L)
Acetamiprid	24	21%	0.002	154	12%	0.004
Clothianidin	24	96%	0.057	154	27%	0.061
Dinotefuran	24	100%	0.866	154	98%	1.055
Imidacloprid	24	100%	0.267	154	27%	0.213
Nitenpyram	24	0%		154	0%	
Thiacloprid	24	0%		154	0%	
Thiamethoxam	24	92%	0.020	154	10%	0.0133

(2) 計画2) 沿岸干潟域での生物量調査

調査に先立ち、海産甲殻類を効率的に採捕する漁具を開発した。3種の甲殻類(クルマエビ、エビジャコ、クロイサザアミ)について、沿岸干潟域での出現変動を調べた結果、クルマエビは8-10月に、エビジャコは6-8月に多く観察される季節変動を示した(図-1)。

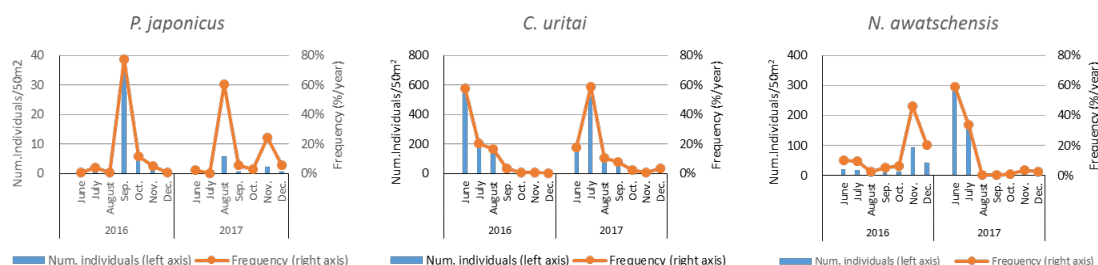


図-1 海産甲殻類の出現頻度

(3) 計画3) 海産甲殻類を用いた毒性試験

当初試験対象種として検討したクロイサザアミは、確保された生物量が不十分であったため、代替種として海産アミ(Americamysis bahia)を用いた。海産甲殻類3種(クルマエビ、エビジャコ、アミ)を用い、NNIs毒性試験により96時間半数影響濃度(96-h EC₅₀)を算出した。その結果、Thmを除きNNIsに対する耐性はエビジャコで最も高く、クルマエビ、アミはほぼ同等であった。また、毒性値と各NNIsの物理的性状(Log Kow)の間には負の相関、すなわち親油性が高い物質ほど毒性が強いことを明らかにした。

表-2 海産甲殻類3種の毒性値

	96 h-EC ₅₀ (µg/L)		
	<i>P. japonicus</i>	<i>C. uritai</i>	<i>A. bahia</i>
Acetamidrid	31	3500	19
Clothianidin	14	260	48
Dinotefuran	530	4300	410
Imidacloprid	50	570	92
Nitenpyram	490	5200	880
Thiacloprid	20	490	47
Thiamethoxam	940	820	4100

(4) 計画4) 感受性の種間差が生じるメカニズムの解明

体内動態分布の種間比較: RIラベル化NNIには、計画3)でクルマエビとエビジャコの2種間で最も毒性値に差がみられたAce、及びクルマエビに最も強い毒性を示したCloを選定した(図-2(A)(B))。特に、AceのRI標識部位については、事前に調査した代謝物の毒性を考慮して決定した。クルマエビの96-h EC₅₀を参考に、30 µg/L、15 µg/Lにそれぞれ調製したAce、Cloに両種を曝露するとともに、実験で新たに感受性差には薬物代謝酵素阻害剤(PBO)の関与が示唆されたことから、PBO添加の有無による差異も体内分布で見られるかも併せて調べた。曝露個体の一部でパラフィン切片を作成し、鉛製の遮蔽体内で21日間イメージングプレートに露出後、イメージングアナライザーで画像を取得した。得られた画像からRI相対強度を数値化し統計解析に供したが、種間、処理区間で差は見られず、体内分布の差異の検出には至らなかった(図-2(C))。

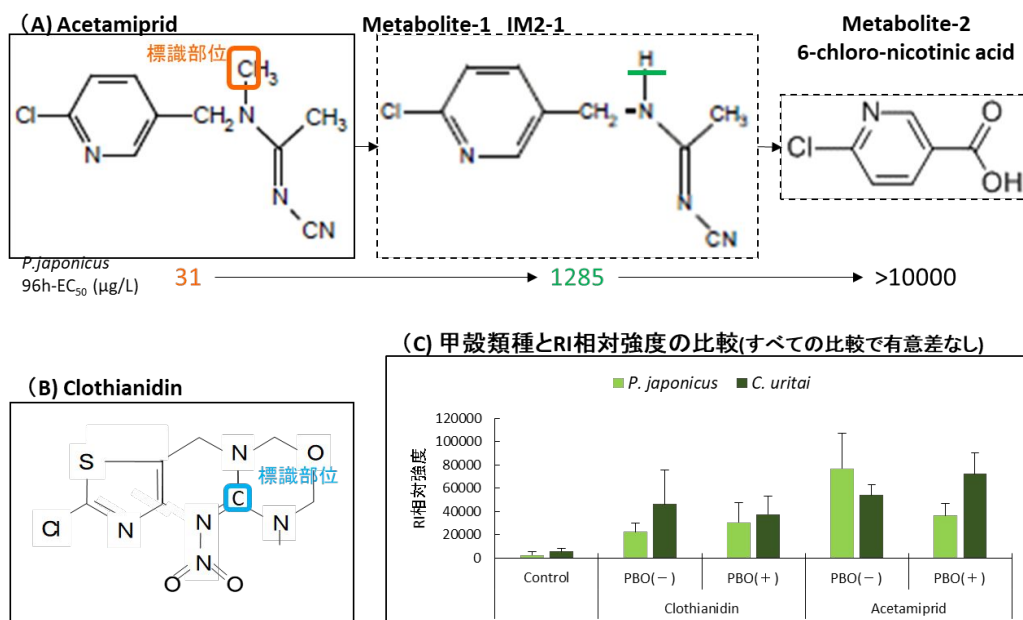


図-2 (A)Ace及び(B)CloのRI標識部位、および(C)海産甲殻類への取込

さらに、質量顕微システム（iMScope）を用いて、（RI 未標識の）NNI に曝露した海産甲殻類の体内から NNI を測定することを試みた。種々の予備検討から、被験物質は Acp、3000 μg/L に曝露されたエビジャコから得た 80 μm 厚の凍結切片試料を用い、得られた知見をもとに、阻害剤曝露の有無と体内濃度との関係を調べた。検出対象のイオンは Acp のプリカーサーイオン 223.0745 から生じたフラグメントイオン 126.01 とした。エビ類では、胸脚、腹肢に沿って体軀腹側に沿って神経系が分布している。凍結切片試料から Acp が検出されたものの、当初予測した Acp の組織局在性は観察されなかった（図-3）。

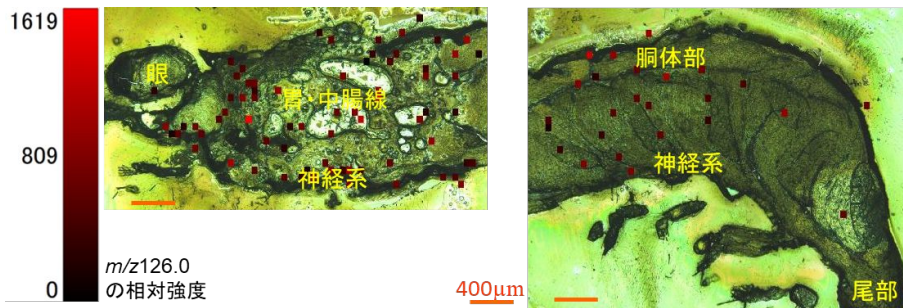


図-3 質量顕微システムで得られた Ace、スポットは検出された Ace を示す。

AChR の種間比較：陸上昆虫の既往研究に基づき、クルマエビ、エビジャコ、海産アミの AChR の D-loop 領域の塩基配列を調べた。その結果、3 種とも高感受性種の配列と一致していた。以上の結果から、当該領域の配列からは、クルマエビ、エビジャコ、海産アミは高感受性種に分類されることが分かった。

表-3 AChR D-loop 領域の種間比較

	Sequence alignment of the Loop D region of nAChR	Result
<i>I. Scapularis</i> (マダニ)	WLQLVW	低感受性種 ¹
<i>D. Melanogaster</i> (キロシヨウジョウバエ)	WLRLVW	高感受性種 ¹
<i>P. japonicus</i>	WLRLVW	本研究で高感受性種と一致と判明
<i>C. uritai</i>	WLRLVW	本研究で高感受性種と一致と判明
<i>A. bahia</i>	WLRLVW	本研究で高感受性種と一致と判明

¹: Erdmanis et al (2012) *Biochemistry*

代謝酵素の関与：種間差と薬物代謝酵素の関係を明らかにするため、薬物代謝に関わる酵素（酸化酵素）阻害剤（ピペロニルブトキシド：PBO）と NNI（Ace、Clo）を混溶させ曝露した（24 尾/処理区）。設定濃度はクルマエビでは 96 -h EC₅₀ 近傍、エビジャコでは 96 -h EC₅₀ の 1/10 とした。クルマエビでは PBO の有無で生存に差はなかったが、エビジャコでは PBO との共曝露のみで死亡率が有意に増加した（図-4）。すなわち、エビジャコにのみ NNI の代謝・解毒に関与する酸化酵素の関与が示唆された。

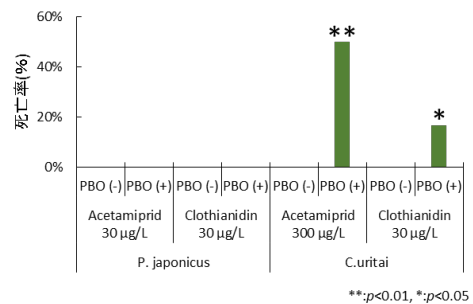


図-4 阻害剤添加と死亡率の関係

以上、海産甲殻類で生じた NNIs に対する感受性の種間差は、体内分布の差異、及び AChR の差異からでは解明には至らなかったが、河口干潟域に接岸時の各生物種において NNIs の代謝・解毒に関与する酵素群の関与が示唆された。

(5) 計画5) 生態リスク評価：本研究の採水調査で得られた沿岸干潟域の海水サンプルのうち塩分濃度 10 以上の 154 検体、及び沖合サンプル 48 検体の分析結果を用い、実環境下での予測影響割合を試算した。その結果、クルマエビ 0.72%、エビジャコ 0.03%、アミ 0.75% と算出され、最大 1000 尾中 7.5 尾（0.75%）が影響を受けていると試算されたものの（アミ）、そのリスクは検出できないほど低いことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

表-4 予測影響割合の月別変化 太字は種毎の最大値を示す。

	May	June	July	Aug.	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.
<i>P. Japonicus</i>	0.00%	0.72%	0.14%	0.38%	0.21%	0.15%	0.03%	0.00%
<i>C. Uritai</i>	0.00%	0.03%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>A. bahia</i>	0.05%	0.75%	0.22%	0.14%	0.10%	0.00%	0.04%	0.04%

〔雑誌論文〕(計4件)

Hano T, Ito K, Ohkubo N, Sakaji H, Watanabe A, Takashima K, Sato T, Sugaya T, Matsuki K, Onduka T, Ito M, Somiya R, Mochida M. (2019) Occurrence of neonicotinoids and fipronil in estuaries and their potential risks to aquatic invertebrates. *Environ. Pollut.* (252), 205-215
阪地英男、羽野健志、渡邊昭生、伊藤克敏、大久保信幸、松木康祐、高橋誠(2019) 干潟で甲殻類を採集するえびかきソリネット *Cancer* (印刷中)
阪地英男、羽野健志、伊藤克敏、大久保信幸、菅谷琢磨、佐藤琢、松木康祐、渡邊昭生(2017) 2015,2016年の瀬戸内海河原津干潟におけるクルマエビ稚エビの出現状況 黒潮の資源海洋研究,19, 2018, 87-92
Hano T, Ohkubo N, Ito M, Onduka T, Ito K, Sakaji H. (2017) Comparative toxicity of seven neonicotinoid insecticides and their two metabolites to juveniles of the marine crustacean kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicas*) *Japanese J. Environ. toxicol.* 20(1), 35-48.

〔学会発表〕(計7件)

羽野健志、伊藤克敏、大久保信幸、伊藤真奈、隠塚俊満、阪地英男、松木康祐、高島景、渡邊昭生 河口干潟域におけるネオニコチノイド系農薬の濃度分布とクルマエビに対するリスク影響 平成31年度日本水産学会春季大会 2019年
Takeshi Hano, Katsutoshi Ito, Nobuyuki Ohkubo, Hideo Sakaji, Akio Watanabe, Taku Sato, Takuma Sugaya, Toshimitsu Onduka, Mana Ito, Kazuhiko Mochida Seasonal alterations in the effects of neonicotinoid insecticide mixture toxicity on the prevalence of marine crustaceans in estuarine areas SETAC North America Annual Meeting 2018年
阪地英男、羽野健志、伊藤克敏、大久保信幸、菅谷琢磨、佐藤琢、松木康祐、渡邊昭生 2015・2016年の瀬戸内海河原津干潟におけるクルマエビ稚エビの出現状況 平成29年度中央ブロッコ資源海洋調査研究会 2017年
羽野健志、大久保信幸、伊藤真奈、伊藤克敏、阪地英男 干潟域に生息する海産甲殻類2種で観察されたネオニコチノイド系農薬に対する感受性の種間差とその要因の推定 第23回日本環境毒性学会研究発表会 2017年
阪地英男、羽野健志、伊藤克敏、大久保信幸、菅谷琢磨、佐藤琢、松木康祐、渡邊昭生 瀬戸内海河原津干潟におけるクルマエビ稚エビの出現状況 平成29年度日本水産学会春季大会 2017年
羽野健志、大久保信幸、伊藤真奈、伊藤克敏、隠塚俊満、阪地英男、菅谷琢磨、佐藤琢、松木康祐、渡邊昭生 沿岸域に生息する海産甲殻類2種で見られたネオニコチノイド系農薬に対する感受性の種間差 平成29年度日本水産学会春季大会 2017年
羽野健志、伊藤克敏、大久保信幸、伊藤真奈、隠塚俊満、阪地英男、河野公栄 ネオニコチノイド系農薬の河口域における水中濃度と海産甲殻類への影響 第22回日本環境毒性学会研究発表会 2016年

〔図書〕 なし

〔産業財産権〕 なし

〔その他〕ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：三木 志津帆

ローマ字氏名：Miki Shizuho

所属研究機関名：国立研究開発法人

水産研究・教育機構

部局名：中央水産研究所

職名：任期付研究員

研究者番号(8桁)：80780577

研究分担者氏名：伊藤 克敏

ローマ字氏名：Ito Katsutoshi

所属研究機関名：国立研究開発法人

水産研究・教育機構

部局名：瀬戸内海区水産研究所

職名：主任研究員

研究者番号(8桁)：80450782

(2)研究協力者

研究協力者氏名：阪地 英男、大久保 信幸、伊藤 真奈、隠塚 俊満、河野 久美子、
持田 和彦、宗宮 麗、渡邊 昭生、高島 景、松木 康祐、藤本 賢、
原田 隆範

ローマ字氏名：Sakaji Hideo, Ohkubo Nobuyuki, Ito Mana, Onduka Toshimitsu, Kono Kumiko,
Mochida Kazuhiko, Somiya Rei, Watanabe Akio, Takashima Kei,
Matsuki Kosuke, Fujimoto Ken, Harada Takanori

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。