

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：83907

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670343

研究課題名(和文) 曝露評価に活用できる食事からのネオニコチノイド系殺虫剤の高感度系統分析法の開発

研究課題名(英文) Development of a high sensitive and systematic analytical method of neonicotinoid insecticides in dietary intake which can utilize for exposure assessment

研究代表者

渡邊 美奈恵 (WATANABE, MINAE)

愛知県衛生研究所・衛生化学部医薬食品研究室・主任研究員

研究者番号：90525768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ネオニコチノイド系殺虫剤は、農薬だけでなく日用品にも汎用されている生活に密着した化学物質であり、特に、食事からの日常的な曝露による健康影響が懸念されている。そこで、予冷式ドライアイス凍結粉碎法、酢酸酸性下でのn-ヘキサン/アセトニトリル混液を用いたホモジナイズ抽出法、ゲル浸透クロマトグラフと固相ミニカラムを用いた精製法及び液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計を用いた測定法を組み合わせた高感度分析法を開発した。

研究成果の概要(英文)：Neonicotinoid insecticides (NEO) are one of the chemicals that are connected with the daily life closely, and widely used for daily necessities as well as agriculture. The daily exposure through the meal is concerned about adversely affect health caused by the characteristic property. Therefore, we studied the high sensitive analytical method of NEO which can utilize for exposure assessment. As a result, pre-freezing and cryogenic milling with powdered dry ice adopted of the method of crushing, and the obtained sample was homogenized with acetic acid aqueous solution, and extracted with n-hexane and acetonitrile. Co-extractives were clean up with GPC and SAX/PSA mini-column solid-phase extraction (SPE). The prepared sample solution was measured using LC-MS/MS.

研究分野：医歯薬学

キーワード：食品衛生 ネオニコチノイド系殺虫剤 食品分析 食事

### 1. 研究開始当初の背景

ネオニコチノイド系殺虫剤 (NEO) は、有機リン系殺虫剤に代わる新たな殺虫剤として 1990 年代から使用が始まり、人畜に対して低毒性で残効性に優れていることから、その使用量が増加傾向にあり、農薬としてだけでなく、日用品 (家庭用殺虫剤)、建築材等にも幅広く使用されている生活に密着した化学物質の一つである。その特徴は浸透移行性であり、植物の根や葉から植物体内に取り込まれ、使用後も長期間効力を持続し、土壌、水中にも長期間残留するとされている。当所での農産物における実態調査では検出頻度が増加傾向を示しており、農作物にかなりの量が使用されている可能性が示唆されている。近年のミツバチ大量死の原因の一つではないかとされ、また、子供への健康影響に関する報告書を読む限りにおいては、これまでに十分なリスク評価がされているとは言い難い。最近では、有機リン系農薬と子供における注意欠陥多動性障害 (ADHD) との関連性について検討した論文が発表され、類似の作用機序をもつ NEO についても、その可能性は否定できない。未だ十分に確立されているとは言い難い個人レベルでの曝露評価を正確に行うため、主な曝露経路と推定される食事からの摂取量を迅速かつ精密に測定できる高感度分析法の開発が急務とされている。

### 2. 研究の目的

NEO は、農薬等に汎用されている殺虫剤の一つである。近年、有機リン系薬剤との複合影響や子供への健康影響が示唆されており、実際の食事からの摂取量に基づいた、より精密な曝露評価法が必要とされている。研究者らは、これまでに様々な性状を有する食品中の残留成分を対象として、アセトニトリル等を用いた抽出法、ゲル浸透クロマトグラフ (GPC) と各種固相ミニカラムを用いた精製法、ガスクロマトグラフ/タンデム質量分析計 (GC-MS/MS) や液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) 等を用いた分離・検出法を組み合わせた多成分系統分析法を構築してきた。本研究では、本系統分析法をベースにして、様々な食品が混在した食事からの摂取状況の把握および曝露評価に活用できる NEO 及び代謝物の高感度分析法を開発することにした。

### 3. 研究の方法

本研究では、研究者らがこれまでに構築してきた農産物、畜水産物及びこれらの加工品中の残留農薬等の系統分析法をベースとし、単一食品だけでなく、それらが混在した食事からの NEO 及び代謝物を同時に検出可能とする高感度分析法を開発する。次に、厚生労働省ガイドラインに従って開発した分析法の妥当性評価を行い、選択性、真度、併行精度および室内精度が目標値に適合していることを確認する。さらに、農産物等の分析に応用し、市場調査及び加工調理による減少効果を調査し、個人レベルにおける曝露評価法としての有効性について検証

する。

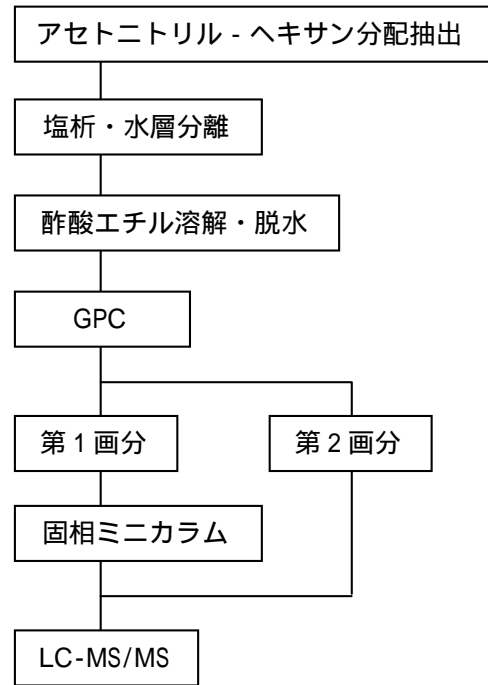


図1 分析法の概要

### 4. 研究成果

#### (1) 高感度分析法の開発

10 種の NEO (アセタミプリド、イミダクロプリド、チアトキサム、クロチアニジン、ニテンピラム、チアクロプリド、ジノテフラン、フロニカミド、フィプロニル、エチプロール) 及び 5 種の代謝物 (チアクロプリドアミド、IM-2-1、CPF、TFNA-AM、6-クロロニコチン酸) を対象とし、それらを高感度に検出できる LC-MS/MS を選択して同時分析法を検討した。

#### 測定条件の検討

カラムには、比較的水溶性の高い化合物の保持に優れた資生堂製 Capcell Pak C18 AQ を採用し、移動相には、ネガティブモードでも感度良く測定可能な中性条件として 5 mM 酢酸アンモニウム溶液とアセトニトリルによるグラジエント溶出を検討した。なお、水溶性が高く、カラム保持の弱い代謝物に対して、グラジエント初期の溶媒組成を 5 mM 酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル (99:1) に設定して 1 分間保持させた後、直ちにアセトニトリルの割合を 10% とし、さらに 25 分間で 95% (リニアグラジエント) とすることで、6-クロロニコチン酸等を良好に分離させるとともに、ポジティブモードで十分な感度を得ることができた。また、6-クロロニコチン酸等を確認するための別条件として、カラム保持を強くでき、イオン化促進も期待できる酸性条件として、0.05% ギ酸溶液とアセトニトリルによるグラジエント溶出も確立した。

#### 試料の粉碎・均一化の検討

食品中の残留農薬の分布は不均一なことが多い。特に、様々な食品が混在した食事では、できる限り均一な試料を調製することが信頼性の高い結果を得るために必要不可欠である。こ

のため、試料調製法として、ドライアイスで試料を予冷したのち、粉碎時にもドライアイスを加え、試料を凍結した状態のまま均一化(微粉末化)できる予冷式ドライアイス凍結粉碎法を採用した。通常の粉碎では炊飯白米が塊になってしまい、均一化が困難な弁当類も、微細なパウダー状に均一に粉碎できたことから、試料採取量を10gと少量にすることができた。これにより、抽出溶媒量を削減でき、濃縮時間が短縮されるなど前処理全般において、その有効性が確認された。

#### 抽出及び精製法の検討

畜産物の脂肪組織等を溶解しながら、NEOとともに水溶性の高い代謝物を効率よく抽出する方法を検討した結果、酢酸酸性下で *n*-ヘキサン及びアセトニトリルを用いたホモジナイズ抽出が有効であった。また、GPC を用いた脱脂精製後の SAX/PSA 固相ミニカラムを用いた脂肪酸等の除去精製において、6-クロロニコチン酸が SAX/PSA に吸着して溶出されないことが判明した。ギ酸酸性下での溶出も試みたが、十分に溶出されない上に夾雑物の一部が溶出した。そこで、GPC からの溶出液を2分画し、脂肪酸等が溶出する第1画分のみ SAX/PSA 固相ミニカラム精製を行い、6-クロロニコチン酸が溶出する第2画分はミニカラム精製を行わない方法としたところ、すべての対象化合物において良好な回収率を得ることができた。

#### (2) 妥当性評価

開発した分析法について、厚生労働省から通知されている残留農薬等試験法の妥当性評価ガイドラインに従って、市販の弁当を試料とした妥当性評価(1日2併行で5日間の枝分かれ試験)を実施した。その結果、試料中濃度 0.01 µg/g において、真度(回収率)81.7~97.5%、併行精度 2.0~6.3%、室内精度 3.1~10.5%とすべての成分においてガイドラインにおける目標値を満たすことができた。

#### (3) 市場調査

平成26年4月から平成28年8月までに愛知県内を流通していた農産物51種類143検体(国産125検体・野菜95件、果実30件、輸入18検体:野菜1件、果実17件)について残留実態調査を行った。そのうち19種類37検体から NEO が検出されたが、基準値を超過した検体はなかった。検出頻度は、ジノテフランの15検体(検出率10.5%)が最も多く、次いで、クロチアニジンの11検体(検出率:7.7%)、アセタミプリドの10検体(検出率:7.0%)であり、野菜では、にら、ほうれんそう及びトマト、果実では、いちご、ぶどう及びメロンの順で多かった。なお、ジノテフランは、2002年に登録された比較的新しい農薬であるが、広範な害虫に防除効果を示し、安全性が高いことから、その使用量が増加しており、農林水産省の国内産農産物における農薬の残留状況調査結果では、平成24年から3年連続で最も多く検出されていた。今回の調査でも同様の結果が得られ、種々の農産物に幅広く使用されている実態が明らかとなった。国産品125検体

のうち殺虫剤が残留していた農産物は54検体であり、そのうちの37検体から NEO が検出された。検出濃度は、基準値の10%以下がほとんどであり、その残留レベルは一日摂取許容量(ADI)と比較して十分に低く、健康に悪影響を与えないものと考えられるが、様々な農産物から同時に複数の農薬が検出されたことから、今後も引き続き継続的な調査を行い、その残留実態を把握することが重要であると考えられる。これらの結果より、NEO が日本の主要な農薬の一つになりつつある実態が明らかとなった。

加えて、アセタミプリドが痕跡以上のレベルで残留する26検体について、その代謝物である IM-2-1 の残留を調査した。その結果、アセタミプリドの残留量が痕跡レベルであったほうれんそう、いちじく及びえだまめから、IM-2-1 が定量下限値(0.01 mg/kg)以上で検出された。この結果から、残留分析の対象成分にその代謝物を含める必要性が示唆された。本事例は例数が少ないため、今後も引き続き調査を行い、データを蓄積していくことが必要であると考えられる。

#### (4) 玄米中ジノテフランの加工調理による減少効果

ジノテフランは浸透移行性が高く、吸汁昆虫に対して有効であるため、水稻で汎用されており、玄米中から検出されることの多い農薬となっている。今回、ジノテフランが検出された市販玄米を試料とし、精米、米とぎ及び炊飯後のジノテフランの減少効果を調査した。玄米25検体中10検体からジノテフランが検出(濃度範囲:0.01~0.15 mg/kg)されたが、残留基準値(2 mg/kg)と比較して十分に低い値であった。各調理過程後のジノテフランの残存率(%) (玄米を100%として換算)の平均値は、精米後の白米75%、米とぎ後の洗米61%、炊飯後の炊飯白米40%であった。日本人の食品摂取量が多い玄米におけるジノテフランの検出率は高く、精米による米ぬかの除去、あるいは炊飯といった加工調理による減少が非浸透移行性農薬よりも期待できないこと、長期残効性を有することから継続的な曝露についても考慮が必要であることが示唆された。炊飯白米中のジノテフラン濃度は最大で0.021 mg/kg であり、ADIの0.05%以下であることから、現在の日本人における米からのジノテフラン曝露量は十分に低いものと推定された。今後も引き続き、残留実態調査を実施し、個人レベルの曝露評価に活用できる実用的なデータを収集することが重要であると考えられる。

本分析法は、食事にも適用可能な頑健性のある分析法であり、実際の食事からのより精密な曝露評価法としての活用が期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計5件)

上野英二、渡邊美奈恵、梅村優子、井上知美、猪飼誉友、LC-MS/MSによる農産

物中の残留農薬一斉分析法の妥当性評価、食品衛生学雑誌、査読有、55 巻、2014、290-296

上野英二、井上知美

複数の分離・検出法を併用した食品中残留農薬の多成分系統分析、食品衛生学雑誌、査読無、55 巻、2014、J-121-J-128

上野英二

農産物中残留農薬の多成分系統分析法の開発及び普及、日本農薬学会誌、査読無、40(2)巻、2015、178-187

Eiji Ueno

Development and diffusion of a systematic method for determining multiple pesticide residues in agricultural products、Journal of Pesticide Science、査読無、2015、40(3)、165-172

渡邊美奈恵、上野英二、梅村優子、市川義多加、戸塚昌子、棚橋高志、猪飼誉友、皆川洋子、愛知県内に流通する農産物中のネオニコチノイド系殺虫剤の実態調査、愛知県衛生研究所報、査読無、67、2017、31-38

〔学会発表〕(計 13 件)

Eiji Ueno、Tomomi Inoue、Riki Kitano、Masato Takakura、Haruhiko Miyagawa、Isao Saito、Multi-residue analysis of pesticides in foods using dual-column GC-MS and an interactive database、10th European Pesticide Residue Workshop、2014.6.30-7.3、Dublin、Ireland

上野英二、「残留農薬分析の現状」愛知県衛生研究所における残留農薬検査について、日本農薬学会第 37 回農薬残留分析研究会、2014.10.16、仙台市

井上知美、上野英二、梅村優子、渡邊美奈恵、猪飼誉友、牛乳中の残留農薬一斉分析法の検討、第 51 回全国衛生化学技術協議会年会、2014.11.21、別府市

渡邊美奈恵、上野英二、梅村優子、井上知美、猪飼誉友、上山 純、齋藤 勲 LC-MS/MS による畜水産食品中ネオニコチノイド系農薬の多成分分析、第 108 回日本食品衛生学会学術講演会、2014.12.5、金沢市

上野英二

農産物中残留農薬の多成分系統分析法の開発及び普及、日本農薬学会第 40 回

大会、2015.3.18、町田市

渡邊美奈恵、上野英二、市川義多加、戸塚昌子、梅村優子、棚橋高志、猪飼誉友、上山 純、齋藤 勲、LC-MS/MS による食品中のネオニコチノイド系農薬の多成分分析、日本農薬学会第 38 回農薬残留分析研究会、2015.10.15-16、犬山市

梅村優子、上野英二、市川義多加、戸塚昌子、渡邊美奈恵、棚橋高志、猪飼誉友、齋藤 勲、ドライアイス凍結粉碎法を用いた GC-MS/MS による農産物中残留農薬の一斉分析、日本農薬学会第 38 回農薬残留分析研究会、2015.10.15-16、犬山市

市川義多加、戸塚昌子、梅村優子、渡邊美奈恵、棚橋高志、猪飼誉友、上野英二、齋藤勲、農産物中の残留農薬分析における前処理法の検討、第 52 回全国衛生化学技術協議会年会、2015.12.4、静岡市

上野英二、梅村優子、渡邊美奈恵、猪飼誉友、山崎 貢、27 種類の安定同位体標識農薬を内標準に用いたデュアルカラム GC-MS による食品中残留農薬の多成分分析、日本農薬学会第 41 回大会、2016.3.18、松江市

渡邊美奈恵、上野英二、梅村優子、市川義多加、戸塚昌子、棚橋高志、猪飼誉友、上山 純、齋藤 勲、愛知県内に流通する農産物中のネオニコチノイド系殺虫剤の実態調査、日本農薬学会第 39 回農薬残留分析研究会、2016.10.13-14、姫路市

上野英二、渡邊美奈恵、梅村優子、棚橋高志、猪飼誉友、高柳浩二、中野武史、ジルコニアコート化シリカゲル/C18 混合ミニカラムを用いた GC-MS/MS による畜水産物中の残留農薬等の一斉分析、第 112 回日本食品衛生学会学術講演会、2016.10.27、函館市

上野英二、渡邊美奈恵、梅村優子、棚橋高志、猪飼誉友、高柳浩二、中野武史、ジルコニアコート化シリカゲル/C18 混合ミニカラムを用いた LC-MS/MS による畜水産物中の残留農薬等の一斉分析、第 112 回日本食品衛生学会学術講演会、2016.10.27-28、函館市

上野英二、農薬等のポジティブリスト制度と一斉分析法、第 53 回全国衛生化学技術協議会年会、2016.11.18、青森市

6. 研究組織  
(1)研究代表者

渡邊美奈恵 (WATANABE, Minae)  
愛知県衛生研究所・衛生化学部・主任研究員  
研究者番号：90525768

(2)研究分担者

上野英二 (UENO, Eiji)  
愛知県衛生研究所・衛生化学部・室長  
研究者番号：90450866

(3)連携研究者

上山 純 (UEYAMA, Jun)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：00397465

(4)研究協力者

斎藤 勲 (SAITO, Isao)