

みつばちへのクロチアニジンの暴露 ー表面増強ラマン分光法を用いた農薬の分析ー

角田 英男¹⁾, 玄 大雄²⁾, 上元 好仁³⁾, 堀川 洋⁴⁾

(受付 : 2011年4月28日, 受理 : 2011年7月7日)

Honey bee exposure to clothianidin -analysis of agrochemicals using surface enhanced Raman spectroscopy-

Hideo Kakuta¹⁾, Masao Gen²⁾, Yoshihito Kamimoto³⁾, Yoh Horikawa⁴⁾

摘 要

銀ナノ粒子・基板を用い、みつばち体表に付着している農薬のクロチアニジン(Clothianidin)のラマンスペクトル(表面増強ラマンスペクトル, Surface Enhanced Raman Spectrum : SERS)による検出・測定を行った。北海道の上川支庁管内(旭川市近郊)で採取したみつばち試料等の殆どからクロチアニジンが検出され、みつばちが約1~4ng/匹のクロチアニジンに暴露されていることが明らかにされた。この結果から、同農薬がみつばちの健康に影響を与えている可能性が示唆された。

キーワード : みつばち, クロチアニジン, 表面増強ラマン分光法

緒 言

1990年代頃から世界的にみつばち大量死(蜂群崩壊症候群 : CCD)が問題となり、国内でも報告され(木村ら, 2010), 農畜産業・環境上の大きな問題となっている。日本でも北海道, 東北地方から九州にいたるまで全国各地でその

現象が報告され, 例えば北海道上川支庁管内でも報道されている(日本農業新聞, 2008年9月2日)。その要因の一つとして考えられるのがネオニコチノイド系殺虫剤のクロチアニジンである(William, 2008)。クロチアニジンの分析は, HPLC や LC-MS などを用いる化学分析方法や ELISA 法などの免疫測定法などで行われている。そ

¹⁾ 植物情報物質研究センター(北海道恵庭市)

Plant Ecochemicals Research Center (Eniwa, HOKKAIDO)

²⁾ 東京農工大学大学院(東京都小金井市)

Graduate School of BASE, Tokyo University of Agriculture & Technology (Koganei, Tokyo)

³⁾ 神奈川県産業技術センター(神奈川県海老名市)

Kanagawa Industrial Technology Center (Ebina, Kanagawa)

⁴⁾ 帯広畜産大学地域環境学研究部門

Department of Agro-Environmental Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

れらは精確ではあるが煩雑であり日数を必要とする場合が多く、分析費用が高価なのが現状である。一方、ラマン分光分析法は、迅速で簡単かつ非破壊的(あるいは微侵襲的)な操作でラマン散乱スペクトルを計測し、農薬の分析を行うことが可能である。特に金属ナノ粒子や金属基板を用いた表面増強ラマン分光法(SERS)は、化学物質の高感度な分光分析法として注目され農薬の検出分析などへの応用が試みられている(角田ら, 2009, 2010, Jitraporn V. et al., 2010)。

本研究では、ミツバチのクロチアニジンへの暴露状態を、独自の高感度なラマン分光分析技術を応用し、迅速・簡便・高感度な測定・評価を試みたので、その結果を報告する。

実験方法

1. 試薬と銀ナノ粒子・基板および分析法

標準試薬に用いたクロチアニジン(Clothianidin)は、残留農薬分析用試薬(和光純薬工業株式会社, 99.0%, HPLC 用)を入手して用いた。本試薬を用い100ppmの標準液を調製し、必要に応じて超純水を用い10ppb程度に希釈・調製して用いた。増感用の銀ナノ粒子(平均粒径 $\sim 50\text{nm}$, AG01)および銀基板(HKA-01, スライドガラス状銀基板, $26\text{mm} \times 76\text{mm} \times 1\text{mm}$)は市販(Nanoplantex LLC, 社製)のものを入手して用いた。銀ナノ粒子は、前報(角田, 2010)に記載のガスデポジション法により作製され、作製後1ヶ月以内のものを使用した。銀基板は、超微粒子試料作成装置PJ-930KK(アルバックマテリアル社(旧真空冶金株)製; 略称ガスデポジション装置)により、加熱・蒸発させた銀ナノ粒子をエアロゾルのまま成膜室まで運び、テクスチャー処理をしたシリコン基板表面に吹きつけて成膜され、その一片($5\text{mm} \times 5\text{mm}$)を切り出してスライドガラスに貼り付けてあるものを用いた(角田, 2010)。みつばち等の試料のうち体表面洗浄液はHPLC(外部委託試験)で、みつばちをホモジナイズした抽出試料についてはLC-MS/MS(外部委託試験)によりクロチアニジン濃度の定量分析を実施し、ラマン分光(SERS)による半定量

的測定結果と比較検討した。

2. ラマンおよび表面増強ラマン分光(SERS)測定

ラマンスペクトルおよび表面増強ラマン(SERS)スペクトルの測定は、デスクトップタイプの大型ラマン分光装置(顕微ラマン分光装置, 日本電子製 JRS-SYSTEM2000, 分解能 1cm^{-1} , 励起波長 632.8nm , 最大出力 30mW)と小型ラマン装置(785nm , 出力 $\sim 150\text{mW}$; RP-M1あるいはR3000)を用いた。クロチアニジン標準試薬のラマンスペクトルは、その水溶液を基板に滴下し風乾後に測定した。SERS スペクトル測定には、増感用の銀ナノ粒子(平均粒径 $\sim 50\text{nm}$)と銀基板とを用いて行った。希釈されたみつばち等の試料液は、等量の銀ナノ粒子溶液と混和後、5 \sim 10分間程度静置してからその $1\sim 3\mu\text{l}$ を取り、銀基板に滴下・風乾後にラマンスペクトルおよびSERS スペクトル測定に供した。また、必要に応じてラマン振動モードの解析のため、Gaussian によるラマンスペクトルの計算を実施し、実測スペクトルとの比較検討を行った。

3. みつばち等の試料採取

みつばちおよび水田表面水、排水溝、水田近傍等の試料水および水田近傍の雑草などは、ネオニコチノイド系農薬が散布される時期の2011年8月に北海道の上川支庁管内の養蜂場(W町)や水田付近(S市)で採取した。また、十勝支庁管内のK町でもみつばちを、ネオニコチノイド系農薬(クロチアニジン)が散布されていないと考えられる同年10月に採取した。みつばち洗浄液は、あらかじめ洗浄した50mlのポリプロピレン製蓋付き容器にみつばちを最大30匹程度を入れ、3mlから30ml程度の水で体表面を洗浄することにより調製した。その後、体表洗浄液はポリプロピレン製注射器に移し、 $0.45\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターでろ過し冷蔵して研究室に持ち帰り、フリーザー(-20°C)に保存し、必要に応じてそれを希釈してラマン分光分析およびHPLC分析等に供した。また、大量に採取した100g程度のみつばち死骸は、ビニール袋に入れて冷凍状態で実験室に持ち帰り、そのまま冷凍保存し必要に応じて分析に用いた。また、一部のみつば



Fig.1. Honey bee hives at West Mountain in W town (left) and many dead honey bees (right).



Fig.2. Aerial spraying of pesticides by helicopter in the S city neighboring W town.

ち試料は水の代わりにメタノール・水混合液(メタノール：水，3：7)を用いて抽出し分析に用いた。水田表面水や排水溝の試料水については，同様にろ過後にポリプロピレン容器に移して持ち帰り冷凍保存した。水田近傍の雑草は，約50～100gを採取してビニール袋に入れ，冷蔵して持ち帰り冷凍保存した。同試料は必要に応じて100～300mlの水で洗浄・希釈し分析に供した。

実験結果および考察

1. みつばち等の試料採取

近年，ネオニコチノイド系農薬のクロチアニジンについて，西洋ミツバチに対する急性経皮毒性が強いことが報告(岩佐，2008)され，西洋ミツバチの大量失踪の原因物質ではないかとの疑念をもたれている。クロチアニジンは，水溶性であり植物体内への移行蓄積が容易で，殺虫力が持続し広い殺虫スペクトルを有している。このため稲作のカメムシ対策などとしてよく用いられている。その作用機構は，昆虫神経細胞の接合部においてニコチン作動性ア

セチルコリン受容体に結合し，神経の異常興奮を引き起こし昆虫を死に至らしめるとされている。日本で農薬被害が疑われるみつばち検体をELISA法により測定した結果，殆どの検体がクロチアニジンに暴露(1匹あたり約1ng～30ng程度)されているとの報告(木村ら，2010)がある。そこで，夏季にネオニコチノイド系農薬のクロチアニジン(商品名：ダントツなど)が用いられている北海道地区で，みつばちおよび養蜂場近隣の農薬散布が行われた水田近傍から試料の採取を行った。農薬散布直後のみつばち試料等の採取は，その散布日時が気象条件や個々の農家の農作業スケジュールに依存して変わるため困難であった。そこで，クロチアニジン散布直後の試料は，散布状況が明瞭に判断可能な無人ヘリコプターによる農薬散布現場近傍(Fig.1参照，左側はかぼちゃ畑へ，右側是水田への農薬散布を実施している，S市)で採取した。みつばち試料は，農薬による影響と推定されるみつばち大量死が起こり始めた日の午前中早期に養蜂場で採取を行った。Fig.2に典型的な養蜂場(西山，W町)の一例を示す。巣箱の入口および巣箱側面に数百～数千匹単位で大量死

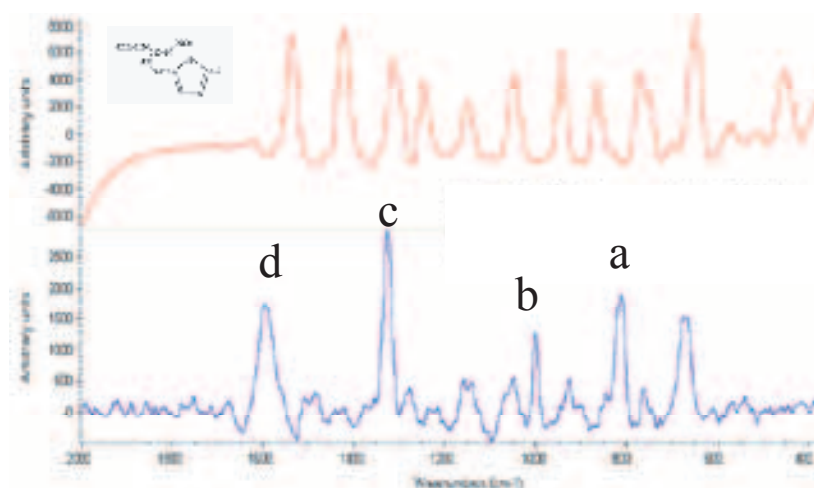


Fig.3. Raman (Solid state) spectra of clothianidin (above). SERS (Surface Enhanced Raman Spectrum) of honey bee extracts (washing) contained clothianidin (below).

したみつばち(西洋みつばち)が認められた。一方、十勝管内(K町)の養蜂場ではこのような大量死は全く観察されなかった。これは、クロチアニジン散布が行われていないためであると考えられた。

2. 採取試料のラマンスペクトル(SERS)検出測定結果

チラム(Thiram: tetramethylthiuram disulfide)のようにS元素を含む化学物質は、銀ナノ粒子・銀基板などに吸着することにより SERS 効果が顕著に現れることが知られている。また、ニトロ基のようなN元素を含む化学物質も特有の増強スペクトルプロファイルを示すことが認められている。このことから、通常のラマン分光分析では殆ど困難な、ppb レベルのクロチアニジンを高感度にラマンスペクトル(SERS)を用いて検出測定できると考えられた。デスクトップタイプの顕微ラマン分光装置を用いた実験の結果、既報(角田, 2010)では1ppm 程度と報告したクロチアニジンの LOD(Limit of Detection)が0.1ppb レベル以上に達することが明らかになった。

みつばちに含まれるクロチアニジン総量を測定することをねらいとして、大量死したみつばち約50g 程度を集め、ホモジナイズした試料について LC-MS/MS 分析(外部委託試験, LOD: 2ppb)を数回試みたが、クロチアニジンの

有無について明瞭な結果が得られなかった。抽出工程に何らかの問題がありその工夫が必要であることが示唆された。みつばち試料が大量に必要であり分析コストがかかりすぎるので、以後 HPLC 分析法(LOD: ~20ppb)を工夫してみつばち体表面洗浄液の定量分析を行った。また、みつばち体表面の洗浄には水の代わりにメタノール・水混合液(メタノール: 水, 3: 7)を用いた方が抽出効率が高いため、HPLC を用いた定量が容易になるので以後この混合液を用いた。最初に、希釈したみつばち体表面洗浄液で HPLC 分析を行い、痕跡程度のクロチアニジンが認められた試料については、希釈しない体表面洗浄液を用いて HPLC 分析を行った。また、野外の現場や車両内などでの運用が可能な小型ラマン分光装置を用いてその LOD について検討した。Fig. 3上部にはクロチアニジン標準試薬(粉状固体)のスペクトルを、下部にはみつばち体表面洗浄液中のクロチアニジンの SERS スペクトルの一例を示す。同図のクロチアニジンの特有の SERS プロファイルには、ニトロ基のN元素等が関与していると考えられる、およそ820~840cm⁻¹(a), 1005cm⁻¹(b), 1350~1400cm⁻¹(c), 1540~1560cm⁻¹および1590~1600cm⁻¹(d)付近の強いピーク振動などが認められる。1005cm⁻¹の振動ピークは環状構造由来であると考えられ、再現性良く

Table 1. Detection of residual clothianidin in honey bee and paddy field nearby

Kamikawa area (W town, honey bee hives)	West mountain	+
	East hill	+
	Riverside	+
Kamikawa area (S city, paddy field nearby)	Foot of the West mountain	+
Kamikawa area (S city, paddy field after aerial spraying by helicopter)	Drainage	+
Tokachi area (K town, honey bee hives)	Roadside weed near drainage	n.d.**

*~10ppb clothianidin in washings **not detected

認められる。1350~1400 cm^{-1} 付近にある強いピークは、五員環中に含まれるS元素由来の振動ピークであると考えられる。あるいは、 NO_2 に由来する1350~1385 cm^{-1} 付近の対称伸縮のピークが現れていると考えられる。およそ1590 cm^{-1} 付近のSERSピークは、 >C=N+ の不飽和アミン塩が低波数シフトした可能性と、 NO_2 に由来する逆対称伸縮によるピークの両者の可能性が考えられる。これは、励起レーザー波長が異なる場合の測定結果(Genら, 2011)ともプロファイルの傾向が良く一致していた。これらの振動ピークプロファイルから、クロチアニジンの五員環のNとSの部分が銀ナノ粒子表面に強く吸着していることが示唆される。一方、SERSプロファイルが変動する結果や異なる測定ポイントでピーク波数および強度が変化する場合も認められた。これはクロチアニジンの銀ナノ粒子への吸着状態が必ずしも全て同じではないことを示していると考えられる。特定のピーク高さ強度が変動することが認められたが、低濃度領域では主要なピークの濃度依存性が示されたので、半定量的な測定が可能であることが示された。このような結果をもとにして、特に増強効果が大きく現れるニトロ基由来の特徴ある振動ピークプロファイルに着目し、そのほか五員環や環状構造由来などの振動ピーク等を判別して、みつばち体表面洗浄液やその他の試料中のクロチアニジンの有無を判定した。予備試験から1005 cm^{-1} 、1350~1400 cm^{-1} および1590~1600 cm^{-1} 付近のSERS特有のピーク振動高さと標準液のクロチアニジン濃度との間に正の相関関係が認められた。そこで、比較的感受度高く検出される1590~1600 cm^{-1} 付近のSERS特有のピーク振動に着目し、1ppb~100ppbの濃度範囲のクロチアニジン標準溶液を用いて検量線を作成した($Y=6.641X+1097.3$; $R^2:0.75$; X :

クロチアニジン濃度 [ppb], Y : ピーク高さ [カウント数], $n=9$)。この検量線を用い、試料溶液中のクロチアニジンの有無やおよその濃度を求め、およそ10ppb以上のクロチアニジンが検出された場合を+とし、その痕跡が認められない場合をn. d.として整理した結果を、Table1. に示す。十勝管内から採取したみつばち試料を除いた全てのみつばち試料と排水や水田近傍の雑草にクロチアニジンが含まれていることが明らかになった。ヘリコプターによる農薬散布が行われていた水田近傍からは、比較的高濃度のクロチアニジン(~5ppm)が検出された。これは空中散布する際に高濃度の農薬原液を用いているためと考えられる。当日の気象条件や操縦技術などにより、水田周辺へのドリフトがあることが示された。また、農薬のエアゾルのプルームが周辺地区に拡散する可能性についても想定され、このような農薬散布法がみつばちの大量死と関係がある場合があると推定された。西山(W町)養蜂場の下に位置する水田からもクロチアニジンが検出され、近隣で検出されたことからみつばちへの影響があったのかもしれない。この因果関係については今後の実証的な検討が必要と考えられる。同地で採取されたみつばちには、1匹当たり1~5ngのクロチアニジンが検出された。この体表に付着していたクロチアニジンは、その量が多い場合には経口的なLD50値(Memorandum 044309, 2010)にほぼ匹敵した。このように本研究では、養蜂場における大量死したみつばち試料の場合は、その全てからクロチアニジンが検出された。このような結果から、農薬散布と対応して迅速な農薬の検出・測定を行うことで、環境中に放出された農薬のみつばちへの直接的影響について正確に評価できると考えられる。

本研究において小型ラマン分光装置によるSERSスベ

クトルの測定を行い、みつばち大量死への影響が懸念される農薬のクロチアニジン[®]を、高感度かつ簡単に検出することができた。今後、このようなラマン分光分析法が野外の現場で活用され、現場での簡便な化学物質分析法として普及することが期待される。

謝 辞

本研究に協力いただいた良知健氏(神奈川県産業技術センター)や協力いただいた神奈川県産業技術センターの研究員諸氏に深く感謝いたします。また、みつばち試料等のHPLC分析にご助言とご協力いただいた八田純人氏(農民連食品分析センター)に謝意を表します。

引用文献

- 岩佐孝男, 2008. モスピラン(アセタミプリド)のミツバチに対する低毒性機構, 農薬時代, 190, pp. 30-35
- 角田英男, 上元好仁, 堀川 洋 2009. 表面増強ラマン分光法による化学物質の検出, 帯広畜産大学学術研究報告, 30, pp. 71-77
- 角田英男, 玄大雄, 上元好仁, 深澤宜行, 堀川 洋 2010. 表面増強ラマン分光法によるクロチアニジンの分析, 帯広畜産大学学術研究報告, 31, pp. 40-48
- 木村 澄, プレスリリース 2010. ミツバチ不足に対する調査研究報告書, 平成22年4月13日, 畜産草地研究所
- 日本農業新聞 2008, 9月2日
- Jitraporn Vongsvivut, Evan G. Robertson, Don McNaughton 2010. Surface-enhanced Raman spectroscopic analysis of fonofos pesticide adsorbed on silver and gold nanoparticles, Journal of Raman Spectroscopy, 36, Published Online, 26 Jan 2010
- Gen Masao, Kakuta Hideo, Kamimoto Yoshihito, Lenggoro Wuled, 2011. A colloidal route to detection of organic molecules based

on surface-enhanced spectroscopy using nanostructured substrate derived from aerosols, Special Issue (Paper no. 11D-8-59) Jpn. J. Appl. Phys., in press

Memorandum 044309, 2010. Office of Chemical Safety and Pollution Prevention, United States Environmental Protection Agency.

William Quarles, 2008. Pesticides and honey bee colony collapse disorder, The IPM Practitioner, XXX (9/10), September/ October, ppl

Abstract

We conducted experiments to detect clothianidin on body surface of honey bee using silver nanoparticle-substrate by surface enhanced Raman spectroscopy (SERS). Most of the honey bee samples, collected from bee hives near Kamikawa area in Hokkaido, were exposed to about 1 to 4 ng clothianidin / bee on body surface. These results suggest that clothianidin residue found on body surface possibly affect the health of honey bee colonies.

[Keywords]

honey bee, clothianidin, surface enhanced Raman spectroscopy