

称号及び氏名	博士（応用生命科学）	矢吹 芳教
学位授与の日付	平成30年3月31日	
論文名	水環境中の農薬のパッシブサンプラーによる効果的な分析手法の構築	
論文審査委員	主査	谷森 紳治
	副査	北村 進一
	副査	秋山 康紀

論文要旨

世界的な人口増加に伴い食糧確保のための農作物の安定的な栽培の重要性は増しており、そのための農薬使用は現在では不可欠となっている。農薬は、動植物、昆虫および細菌等の生理機能に作用し殺虫・殺菌、ならびに除草効果を示すことから、少なからず環境中の生物への影響を考慮する必要がある。農薬は散布後に農作物体に吸着されるだけでなく、一部は土壌に保持され、降雨等により河川や湖沼等の水環境に非意図的に放出されることから、環境に負荷を与えず持続的な農業を行うためには、農薬が意図せずに環境中に放出された場合の安全性も確保しなければならない。日本国内あるいは全世界的に多量に使用されて、環境中に排出されている農薬の人体あるいは生態系へのリスクを管理するためには、農薬使用実態に基づく環境予測あるいはモニタリング調査を行い濃度の実態を正確に把握する必要がある。しかしながら、現在の水環境中の農薬をモニタリングする手法、すなわちグラブサンプリング法（グラブ法）は試料を採取した瞬間の数値を捉えているに過ぎないため、農薬による生態系へのリスクを見積もるためには不十分であるなど、様々な課題を抱えている。

第1章では、農耕地に施肥された農薬の水環境中のグラブ法、および受容相

(吸着剤)へ積分的に吸着した化学物質質量から設置期間中の水中の化学物質の時間加重平均濃度 (TWA) を求められるパッシブサンプリング法 (パッシブ法) に関する既往の研究について国内外の研究を概観した。水環境中の農薬を含む化学物質の濃度は、いわゆるスポットサンプリングであるグラブ法によって観測されてきた。この方法は、現地で水をガラスあるいはポリ容器等に一定量採取し、実験室に持ち帰った後にろ過、樹脂への吸着あるいは液液分配による濃縮および分析妨害成分の除去を行った後、ガスクロマトグラフや液体クロマトグラフなどの分析機器により定量を行う。この手法は、ある瞬間の化学物質濃度を正確に測定することに最適であるが、短期間だけ水環境中へ流出し検出される農薬の実態を捉えることはグラブ法では難しい。一方で、パッシブ法は、金属や無機態イオン、親水性有機化学物質 (極性農薬や医薬品など)、疎水性有機化学物質 (非極性農薬, PAHs および PCB など) を含む、幅広い分析対象物質の水環境中の濃度のモニタリングに使用することが可能である。パッシブ法の主なものとして、polar organic chemical integrative samplers (POCIS), semipermeable membrane device (SPMD), そして Chemcatcher が挙げられる。この中で、POCIS は広い範囲のオクタノール/水分配係数 ($\log P_{ow}$) を持つ化学物質に対して適用が検討されており汎用性が高い。パッシブ法に影響を与える環境因子としては、水温、溶存有機物濃度、pH および流速などが挙げられる。この中で、水温が POCIS の見かけ上の吸着速度定数であるサンプリングレート (R_s) にどのように影響するかについての知見は不十分であった。

第 2 章では、第 1 章までの概観から明らかとすべき課題として抽出された POCIS の水温依存性について室内実験により検証した。1 L 容のガラスビーカーに 72 種の農薬混合標準液を添加し 0.5 $\mu\text{g/L}$ に調整した試験溶液を入れ、その中に POCIS を浸漬させた。このビーカーを 18, 24 および 30 日、暗条件の培養室内で 100 rpm で攪拌しながら 7, 14, 21 および 28 日後に POCIS を回収し、受容相への農薬の蓄積量を測定した。POCIS への農薬のキャリブレーション実験を実施した結果、農薬の分析法が確立できた 57 種の農薬のうち 48 種の農薬について、サンプラーの受容相への 28 日間の直線的な取り込みが明らかになり R_s を算出できた。それらの農薬の R_s は 18, 24 および 30 日で、それぞれ 0.00676~0.262, 0.00603~0.312 および 0.00426~0.603 L day^{-1} の範囲であった。また、実験時の水温の上昇に伴い 48 種の農薬中 43 種の農薬の R_s が上昇し、5 種の農薬の R_s は低下した。農薬の樹脂への吸着量は通常水温が低下すれば増加し、水温が上昇すれば減少する。多くの農薬が水温の上昇に伴い R_s が増加した要因として、水温上昇による PES 膜内での農薬の拡散速度の上昇が、水温低下による受容相へ

農薬吸着量の上昇よりも R_s に大きく影響したためと推察された。 R_s の水温依存性はアレニウス式で説明することができ、これらで得られた係数から R_s の水温補正式を導き出すことができた。同様の方法で親水性の高いネオニコチノイド系殺虫剤の R_s の算出を試みたが、ジノテフランなど特に親水性の高い農薬については R_s が算出できなかった。これはジノテフランの $\log P_{ow}$ が -0.66 であり非常に親水性が高いため、POCIS の受容相である HLB では保持できなかったためであると推察された。

第3章では、第2章で測定した R_s を用いて、グラブ法と POCIS を用いたパッシブ法の現地での測定値の比較検証を行うため、大阪府内の河川における農薬濃度のモニタリングを実施した。調査は2年間にわたり延べ6か所で実施し、POCIS を14日間河川に浸漬し、同じ期間に7~8回の高頻度のグラブ法によるモニタリングも実施した。調査は6月と8月に実施した。その結果、グラブ法では延べ84種の農薬が検出され、パッシブ法では延べ98種が検出された。グラブ法によって検出されたすべての農薬は1種類の農薬（パッシブ法では定量下限値未満であったが、ピークは検出）を除き、パッシブ法によって検出できた。さらに、パッシブ法では、グラブ法によって検出されなかった農薬が述べ15種検出された。この結果から、グラブ法の定量下限値未満で推移した微量な農薬、あるいはグラブ法では捕捉できなかった短期間での農薬の流出をパッシブ法により検出できたことが示唆された。濃度調査期間中にパッシブ法とグラブ法の両方によって検出された農薬の平均濃度を比較した結果、おおむね1:1の関係（傾き = 1.00, $r = 0.897$, $n = 79$ ）が得られた。これらの関係を濃度域で比較すると、 $0.01 \mu\text{g/L}$ より高濃度域では、両者による近似直線の傾きは1.00, r は0.938 ($n = 32$) であったのに対し、ごく低濃度域 ($< 0.01 \mu\text{g/L}$) では、近似直線の傾きは2.28, r は0.369 ($n = 47$) であり、両者の間に違いが見られた。これは、グラブ法による農薬濃度の平均値がごく低濃度の領域では農薬の一時的な流出に対して過小評価あるいは過大評価していることが要因として挙げられる。

第4章では、第2章で得られた R_s を用いて、農薬の $\log P_{ow}$ と R_s との関係を解析した結果、両者の間には弱い負の相関 ($r = 0.42$) しか見られず、明確な関係は得られなかった。また、既報により、複雑な人工ニューラルネットワーク (ANN) を用いた各農薬の主要官能基と R_s との関係を解析した例があるものの、正確な R_s を算出するに至っていない。

本研究により、多くの農薬の R_s が算出でき、パッシブ法によりモニタリングできる農薬の種類を大幅に増加させることができた。また、既往の研究では得られていなかった R_s の水温補正式を算出することができ、水環境中の水温に応

じで適切な R_s を計算できるため、より正確なデータの測定に寄与できる。現地測定の結果から、パッシブ法とグラブ法の平均濃度はおおむね一致することが示唆され、POCIS を用いたパッシブ法は現地河川における農薬モニタリング法として適用可能であることが明らかとなった。一方で、農薬の物性と R_s との明確な関係性は示せず、現状としては煩雑なキャリブレーション試験を省略できないこと、親水性の高い農薬に対して対応できる受容相（吸着樹脂）を検討するなどの課題も抽出された。

審査結果の要旨

農作物の安定的な栽培のために使用されている農薬の、環境中における人体あるいは生態系へのリスクを管理するためには、モニタリング調査を行い実際の濃度を正確に把握することが重要である。しかしながら、現在の水環境中の残留農薬をモニタリングする手法であるグラブサンプリング法（GS 法）は試料を採取した瞬間の数値をスナップショット的に捉えているに過ぎず、残留農薬による生態系へのリスクを見積もるためには不十分であるなど、様々な課題を抱えている。本研究では、まず農耕地に施肥された農薬の水環境中の GS 法、および受容相（吸着剤）へ積分的に吸着した化学物質から設置期間中の水中の化学物質の時間加重平均濃度（TWA）を求められるパッシブサンプリング法（PS 法）に関する国内外の既往の研究について概観した。その結果から抽出された PS 法の課題として、農薬のサンプリングレート（ R_s ; 見かけ上の吸着速度定数）の算出および温度依存性に関する研究が十分ではなかった。本研究ではこれらを明らかにするとともに、これまで検討されていなかった農薬の物性と R_s の関係を解析した。この R_s を用いて、PS 法による環境水中の残留農薬の検出傾向を GS 法と比較検証した。

第 1 章では、国内における水田施用農薬の河川モニタリングの現状について概観した。水環境中の農薬を含む化学物質の濃度は、スポットサンプリングである GS 法によって算出されてきた。しかし、農薬は田植の時期に集中的に施用される剤や、病害虫の発生を見て散布する剤のように様々な使われ方をする。また地域によって気象条件や散布の方法なども異なるため、スパイク的に短期間だけ水環境中へ流出し検出される農薬の実態を捉えることは GS 法では困難である。

PS 法は、極性ならびに非極性有機化合物を含む、幅広い分析対象物の水環境中の濃度のモニタリングに使用することが可能であり、サンプラーとして様々

なタイプのものが開発されているが、この中で POCIS (polar organic chemical integrative samplers) は広範囲のオクタノール-水分配定数 ($\log P_{ow}$) を持つ残留農薬に対して適用が可能である。PS 法に影響を与える環境因子としては、水温、溶存有機物濃度、pH および流速などが挙げられる。この中で、水温が POCIS の R_s にどのように影響するかについての知見は不十分であった。

第 2 章では、パッシブサンプリング法による環境水モニタリングのための農薬の R_s の算出および温度依存性について検討した。POCIS への農薬のキャリブレーション実験を実施した結果、農薬の分析法が確立できた 57 種類の農薬のうち 48 種類の農薬について、サンプラーの受容相への 28 日間の直線的な取り込みが明らかになり R_s を算出できた。それらの農薬の R_s は 18、24 および 30°C で、それぞれ 0.00676~0.262、0.00603~0.312 および 0.00426~0.603 L/s の範囲であった。この成果により、多くの農薬の R_s が得られ、環境水中の農薬モニタリングに利用できるようになった。また、実験時の水温の上昇に伴い 48 農薬中 43 農薬の R_s が上昇し、5 種の農薬の R_s は低下した。多くの農薬について、水温の上昇に伴って R_s が上昇する傾向が確認されたが、この要因として、水温上昇によるポリエーテルスルホン (PES) 膜内での農薬の拡散速度の上昇が、水温低下による受容相へ農薬吸着量の上昇よりも R_s に大きく影響したためと推察された。 R_s の水温依存性はアレニウス式で説明することができ、これらで得られた係数から R_s の水温補正式を導き出すことができた。この R_s の水温補正式を用いることにより、環境水中の農薬のより正確な測定が期待できる。

第 3 章では、PS 法による環境水中農薬の検出傾向について探求した。第 2 章で測定した R_s を用いて、GS 法と POCIS を用いた PS 法の現地での測定値の比較検証を行うため、大阪府内の河川における農薬濃度のモニタリングを実施した。その結果、GS 法では延べ 84 種の農薬が検出され、PS 法では延べ 98 種が検出された。GS 法によって検出されたすべての農薬は、1 農薬を除き PS 法によって検出された。さらに PS 法では、GS 法によって検出されなかった農薬が述べ 15 種検出された。この結果から、GS 法の定量下限値未満で推移した微量な農薬、あるいは GS 法では捕捉できなかった短期間での農薬の流出を PS 法により検出できたことが示唆された。濃度調査期間中に PS 法と GS 法の両方によって検出された農薬の平均濃度を比較した結果、おおむね 1:1 の関係が得られた。これらの関係を濃度域で比較すると、0.01 $\mu\text{g/L}$ より高濃度域では、両者による近似直線の傾きは 1.00、 r は 0.938 ($n=32$) であったのに対し、低濃度域 (<0.01 $\mu\text{g/L}$) 以下では、近似直線の傾きは 2.28、 r は 0.369 ($n=47$) であり、両者の間に違いが見られた。これは、GS 法による農薬濃度の平均値が低濃度の領域では、農薬の一時的な流出に対して過小評価あるいは過大評価していることが要因として挙げられる。また、プロモブチド、プレチラクロールあるいはフェノブカルブのように調査期間中に GS 法での濃度が減少し続けた農薬、上昇し続けた農薬、あるいは一度だけ検出した農薬があったが、これらの農薬の GS 法および PS 法で得られた農薬の平均濃度はほぼ同じ値を示したことから、PS 法は河川中の農薬の濃度変動にも十分に対応できるものと推察された。

第 4 章では、パッシブサンプラー受容相への吸着特性に及ぼす測定対象化合物の化学的・構造的特性の影響について考察した。第 2 章で得られた R_s を用いて、農薬の $\log P_{ow}$ と R_s の関係を解析した結果、両者の間には弱い負の相関 ($r=0.42$) しか見られず、明確な関係は得られなかった。また、第 2 章と同様の方法で親水性の高いネオニコチノイド系殺虫剤の R_s の算出を試みたが、ジノテフランなど特に親水性の高い農薬については R_s が算出できなかった。これはジノテフランの $\log P_{ow}$ が -0.66 であり非常に親水性が高いため、POCIS の受容相である HLB 樹脂では保持できなかったためであると推察された。また、各農薬の主要官能基と R_s との関係を解析したものの、明確な傾向は見られず、 R_s と農薬の化学的・構造的特性との関係性の解明には、他のアプローチが必要であると考えられた。

以上、本研究により多くの農薬の R_s を算出し、水相 PS 法によりモニタリングできる農薬の種類を大幅に増加させた。また、 R_s の水温依存性を明らかにし、かつアレニウス式から R_s の水温補正式を算出した。この成果から、水環境中の水温に応じて適切な R_s を計算できるため、より正確なデータの測定に寄与できる。また現地測定の結果から、PS 法と GS 法の平均濃度はおおむね一致することが示唆され、POCIS を用いた PS 法は現地河川における農薬モニタリング法として十分適用可能であることが明らかにした。この研究成果は、応用生命科学、分析化学分野とりわけ、環境水中の微量残留農薬の簡便で正確な化学分析の発展に貢献するものであると判断する。よって、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士 (応用生命科学) の学位を授与することを適当と認める。