

# 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

岩佐 孝男

Takao Iwasa

## はじめに

モスピラン(アセタミプリド)は、幅広い殺虫スペクトルを有する反面、ミツバチやマルハナバチに影響が小さいのが生物活性面での特長である。このミツバチ毒性が低い特長は、一部の選択性殺虫剤にはみられるものの、有機リン剤・カーバメート剤・ピレスロイド剤などの広スペクトル殺虫剤では稀な特長であり、近年大幅に栽培面積が拡大している訪花昆虫を用いたイチゴやトマト等の施設栽培において、モスピランが害虫防除の基幹剤となっている大きな要因である。

本稿では、①各種ネオニコチノイド系殺虫剤の局所施用法による毒性比較の結果、②代謝酵素阻害の共力

効果試験の結果、③共力作用が極めて高かったDMI系殺菌剤とモスピランの実用場面における影響について調査した結果<sup>1)、2)</sup>について紹介する。

## ネオニコチノイド系殺虫剤の 西洋ミツバチに対する毒性比較

ネオニコチノイド系殺虫剤7剤の西洋ミツバチ働き蜂に対する急性経皮毒性を室内試験により比較し、結果を表1に示した<sup>1)</sup>。

イミダクロプリドの毒性が最も高く、LD<sub>50</sub>値が0.0179 μg/beeであった。ニトロイミン・ニトロメチレン構造を有するネオニコチノイド剤は総じて西洋ミツバチに毒性が高く、LD<sub>50</sub>値は0.0179 μg/beeから

表1. ネオニコチノイド系殺虫剤およびモスピラン代謝物の西洋ミツバチに対する急性経皮毒性

ネオニコチノイド系殺虫剤 またはモスピラン代謝物	供試個体数	LD <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μg/bee)	95%信頼限界	Chi-square	傾き(±SE)
モスピラン	465	7.07	4.57 - 11.2	0.826	1.77 ± 0.105
イミダクロプリド	137	0.0179	0.0092 - 0.0315	0.303	1.70 ± 0.176
チアクロプリド	195	14.6	9.53 - 25.4	0.480	2.73 ± 0.371
ニテンピラム	132	0.138	0.0717 - 0.259	1.17	1.77 ± 0.105
クロチアニジン	174	0.0218	0.0102 - 0.0465	2.22	2.60 ± 0.259
ジノテフラン	133	0.0750	0.0628 - 0.0896	0.0704	2.28 ± 0.076
チアメトキサム	144	0.0299	0.0208 - 0.0429	0.1619	3.06 ± 0.201
IM-2-1	57	>50(0%)	-	-	-
IC-0	50	>50(0%)	-	-	-
IM-0	50	>50(0%)	-	-	-

薬剤のエタノール溶液 1 μl を内勤蜂の胸部背面に局所施用し、処理24時間後に生死判定を行った。

<sup>a</sup>24時間後に生死判定を行い、無処理区との比較から補正死亡率を算出した。プロビット法でLD<sub>50</sub>値を算出した。( )内の0%は、最大処理薬量50 μgで死亡率が0%であったことを示す。

0.138  $\mu\text{g}/\text{bee}$ の10倍以内の値を示した。一方、シアノイミン構造を有するモスピランとチアクロプリドのミツバチに対する毒性は相対的に低く、LD<sub>50</sub>値はそれぞれ7.07  $\mu\text{g}/\text{bee}$ と14.6  $\mu\text{g}/\text{bee}$ で、イミダクロプリドのLD<sub>50</sub>値と比較してそれぞれ395倍、816倍大きな値を示した。化学構造とミツバチ毒性の関係を図1に示した。

モスピランの主要な動植物代謝物<sup>3)</sup>であるIM-2-1、IC-0、IM-0の試験結果を図2に示したが、いずれも50  $\mu\text{g}/\text{bee}$ の処理で殺虫率0%であり、西洋ミツバチに対する毒性は低かった。モスピランは根からの吸収移行性が高い殺虫剤であるので、経皮毒性だけでなく経口毒性も重要である。EPPOガイドライン<sup>4)</sup>条件下で試験が行われており、最高薬量39.2  $\mu\text{g}/\text{bee}$ で補正死亡率は50%以下であることが明らかとなっている<sup>5)</sup>。

なお作用点であるニコチン性アセチルコリン受容体における化合物間の結合活性が、西洋ミツバチ頭部膜画分を用いて報告されている。 $\alpha$ -BGTX<sup>6)</sup>H<sup>3</sup>-imidacloprid<sup>7)</sup>のどちらをリガンドとした場合にも、

イミダクロプリドとモスピランは、受容体に対する親和性に大きな差が無く、作用点レベルではネオニコチノイド系殺虫剤間のミツバチに対する毒性の違いは説明できない。

## 代謝酵素阻害剤の共力効果

モスピランがミツバチに毒性が低い原因として、解毒代謝が関与する可能性を解析するため、一般的な代謝酵素阻害剤(酸化酵素:PBO、加水分解酵素:DEF、グルタチオンS-転移酵素:DEM)の共力効果を調べた。同時にDMI系殺菌剤はピレスロイド系殺虫剤のミツバチに対する毒性を高めることが報告されているため<sup>8), 9)</sup>、DMI系殺菌剤や類似構造の植調剤も検討に加えた。試験に用いた共力剤の構造式を図3に示した。

表2に試験結果を示したが、一般的な代謝酵素阻害剤の中ではPBOの共力係数が最も大きくその値は6.04であった。DMI系殺菌剤は期待した以上に高い共力効果を示し、トリフミンで217、プロピコナゾールで

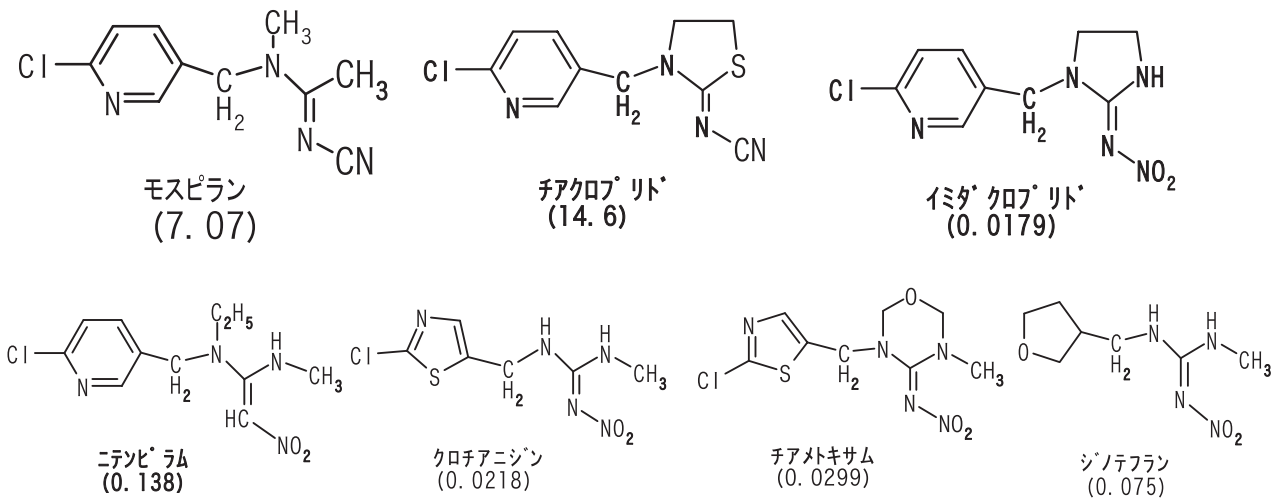


図1. ネオニコチノイド系殺虫剤の化学構造と西洋ミツバチに対する毒性 (局所施用LD<sub>50</sub>  $\mu\text{g}/\text{bee}$ )

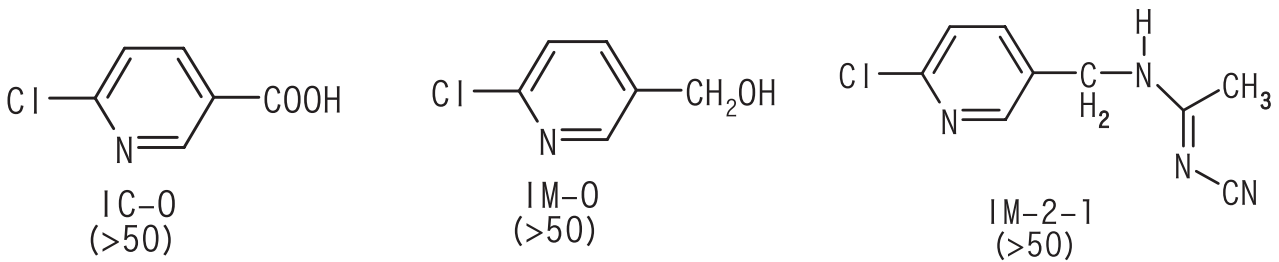


図2. モスピランの主な代謝物と西洋ミツバチに対する毒性 (局所施用LD<sub>50</sub>  $\mu\text{g}/\text{bee}$ )

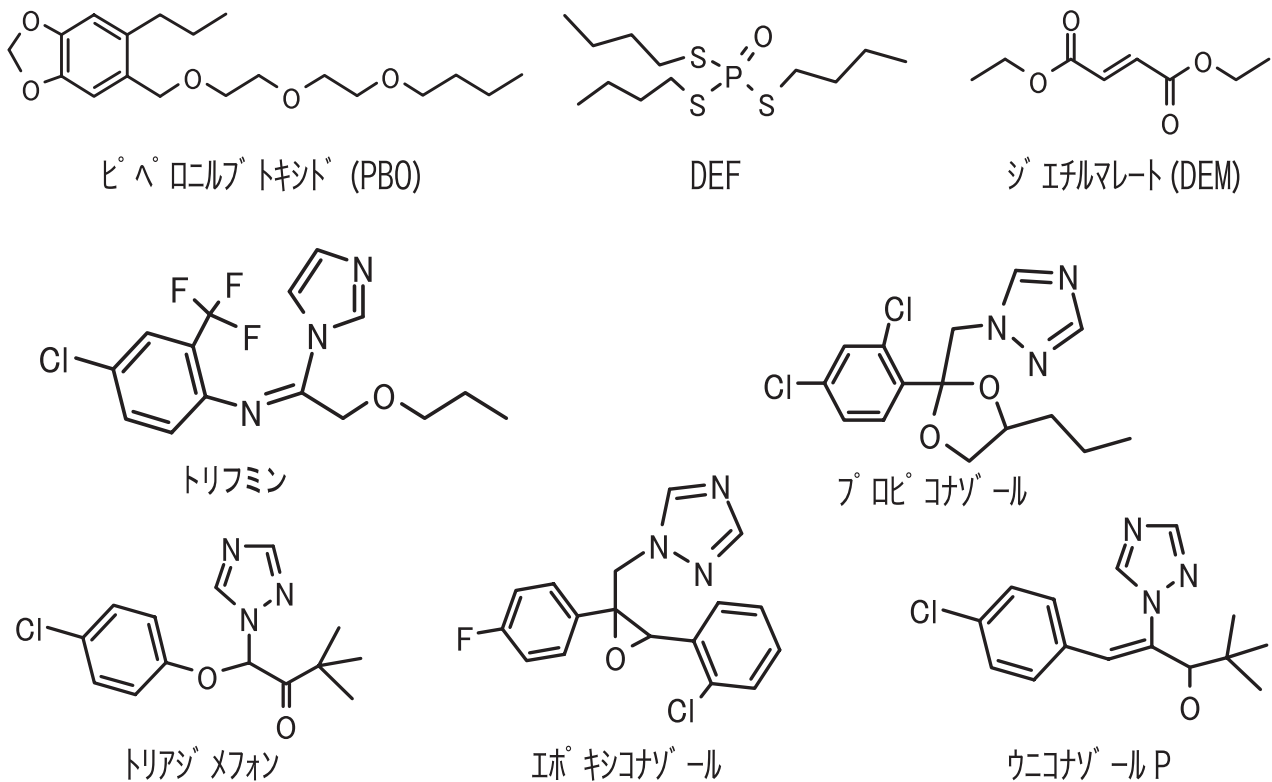


図3. 試験に用いた共力剤、DMI系殺菌剤、および植調剤

表2. 代謝酵素阻害剤、DMI - 殺菌剤、植調剤の前処理によるネオニコチノイド系殺虫剤ミツバチ毒性の変化

ネオニコチノイド系殺虫剤	供試数	LD <sub>50</sub> <sup>b</sup> (μg/bee)	95%信頼限界	Chi-square	傾き(±SE)	共力係数 <sup>c</sup>	95%信頼限界
<b>モスピラン</b>							
(単剤)	465	7.07	4.57 - 11.2	0.826	1.77 ± 0.105	1	4.29 - 8.51
PBO	202	1.17	0.342 - 3.79	1.18	1.55 ± 0.181	6.04	1.83 - 4.76
DEF	124	2.39	0.278 - 12.4	5.85	2.96 ± 0.736	2.96	0.783 - 1.33
DEM	123	6.94	4.10 - 13.2	0.278	1.46 ± 0.140	1.02	171 - 347
トリフミン	215	0.029	0.0080 - 0.102	3.46	1.91 ± 0.240	244	76.7 - 143
プロピコナゾール	201	0.0675	0.0231 - 0.197	2.63	2.30 ± 0.242	105	64.2 - 110
トリアジメフオン	131	0.0844	0.0431 - 0.176	0.693	2.05 ± 0.198	83.8	10.0 - 20.0
エポキシコナゾール	156	0.500	0.156 - 1.66	4.42	2.74 ± 0.404	14.1	4.22 - 9.45
ユニコナゾールP	156	1.12	0.270 - 4.96	3.66	2.05 ± 0.349	6.31	
<b>イミダクロプリド</b>							
(単剤)	137	0.0179	0.0092 - 0.0315	0.303	1.70 ± 0.176	1	1.29 - 2.26
PBO	152	0.0105	0.0061 - 0.0172	0.0889	1.66 ± 0.112	1.7	1.67 - 3.09
トリフミン	125	0.0097	0.0052 - 0.0168	0.694	2.76 ± 0.284	1.85	1.04 - 2.24
プロピコナゾール	145	0.0118	0.0038 - 0.0303	1.01	2.12 ± 0.272	1.52	
<b>チアクロプリド</b>							
(単剤)	158	14.6	9.53 - 25.4	0.480	2.73 ± 0.371	1	
PBO	193	0.0948	0.0406 - 0.211	0.424	1.64 ± 0.134	154	115 - 207
トリフミン	160	0.0128	0.0031 - 0.0415	1.66	2.32 ± 0.363	1,141	752 - 1,740
プロピコナゾール	159	0.0261	0.0083 - 0.0690	1.05	2.27 ± 0.298	559	388 - 811

<sup>a</sup>共力剤10 μgを西洋ミツバチ胸部背面に局所施用し、1時間後に各薬量の殺虫剤を投与した。

<sup>b</sup>24時間後に生死判定を行い、無処理区との比較から補正死亡率に変換し、プロビット法でLD<sub>50</sub>値を算出した。

<sup>c</sup>共力係数(SR), 殺虫剤単剤のLD<sub>50</sub>値/協力剤処理区のLD<sub>50</sub>値。

109の共力効果を示した。これらDMI系殺菌剤は、チトクロームP450に結合して酸化的代謝を阻害することが昆虫でも報告されており<sup>10)</sup>、ミツバチにおける共力効果は、これらのDMI系殺菌剤がミツバチの酸化酵素を阻害しモスピランの解毒代謝を阻害した結果と推察される。

PBO、トリフミンおよびプロピコナゾールの共力効果を、イミダクロプリドとチアクロプリドとの組み合わせについて検討した。その結果、イミダクロプリドでは、これら共力剤の前処理ではLD<sub>50</sub>値の変化は2倍以内と小さく、ミツバチ体内で解毒を受けにくいと推察された。一方、チアクロプリドにおける共力係数はモスピランよりも高い値を示しPBOで154、トリフミンで1141、プロピコナゾールで559となり、ネオニコチノイド殺虫剤3剤を比較すると、ミツバチに対する毒性と酸化酵素阻害剤の共力係数の間には高い相関性が認められた。

以上の結果から、ネオニコチノイド系殺虫剤のミツバチ毒性の違いには、ミツバチの酸化酵素による解毒が大きく関与していると推察された。

## 実用場面におけるモスピランとDMI系殺菌剤との混合処理による西洋ミツバチに対する影響

モスピランとDMI系殺菌剤の間にみられた高い共力効果が、実用場面のミツバチに対して起こることが危惧されたため、欧米でのモスピランとトリフミンの最高登録薬量で、EPPOのガイドラインに基づいて2種類のセミフィールド試験が実施されている。

薬剤散布後に切取った地上部を、実験室でミツバチに暴露する試験が、2000年7月～8月に米国マサチューセッツ州Warehamで、アルファルファを用いて実施された。モスピラン(168gai./ha)単剤とモスピラン同薬量とトリフミン(280gai./ha)の混合処理は、24時間後の死亡率が2%以下で無処理区と差が無かった<sup>1)</sup>。

さらに、より現実の使用場面での影響を長期間観察するため、2002年の4月～5月に、スペインのValenciaでトンネル試験(1区12m×5m)が実施された。試験作物はハゼリソウ科ファセリア属の1年草タナセティフォリア*phacelia tanacetifolia*で、以下の試

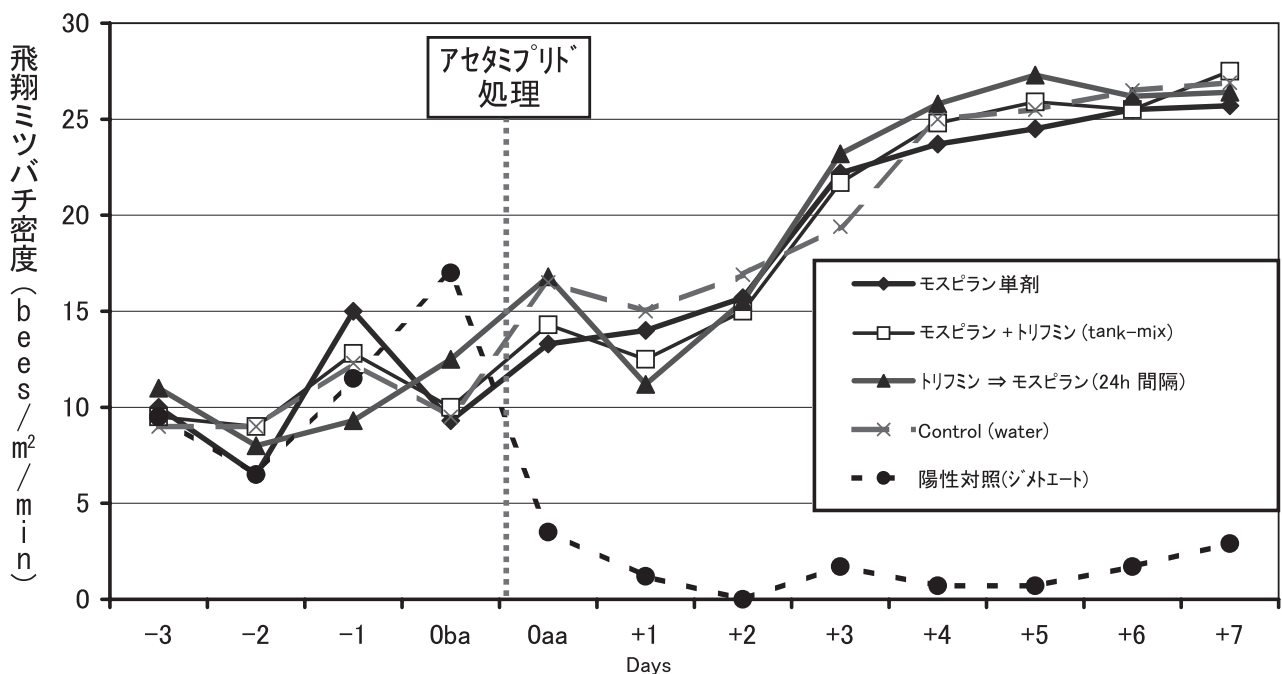


図4. モスピランとトリフミン混合処理のミツバチに対する影響(1)  
散布前後の働き蜂の訪花活動の変化 (2002年、スペイン)

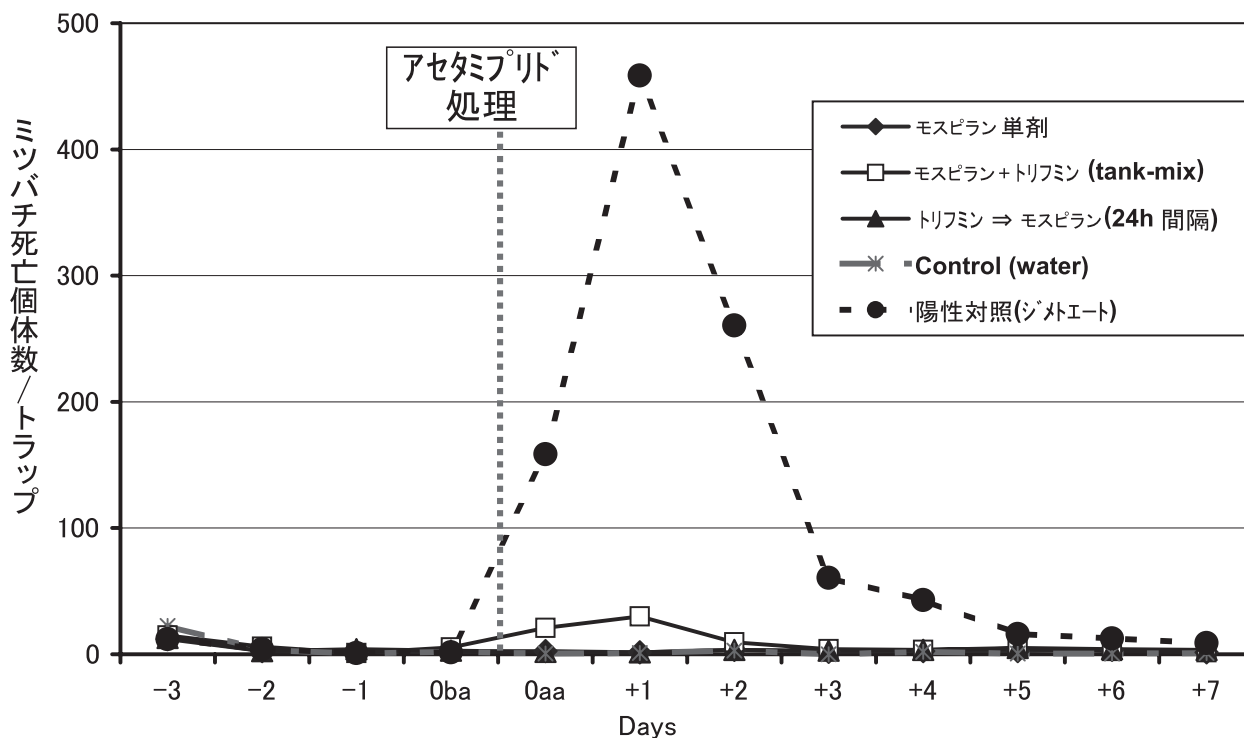


図5. モスピランとトリフミン混合処理のミツバチに対する影響(2)  
 散布前後の巣箱入口トラップで捕獲された死亡個体数の変化 (2002年、スペイン)

験区(2反復、300L/ha)で試験を実施した<sup>11)</sup>。

- ① モスピラン単剤(168gai./ha)
- ② モスピラン/トリフミン混合(168g+561gai./ha)
- ③ トリフミン前日処理(561gai./ha)+モスピラン処理(168gai./ha)
- ④ 無処理(水300L/ha)
- ⑤ 陽性対照(ジメトエート 400g/L、680g製剤/ha)

モスピラン処理の3日前から7日後まで訪花活動の強度(bees/min/m<sup>2</sup>)を観察し、処理38日後に巣箱内のコロニーの状態と未成熟個体の発育状態(卵、幼虫、蛹の割合)を調べた。図4に処理3日前から7日後までの11日間の訪花活動の観察結果を、図5に同期間に巣箱入り口に設置したトラップで採集された死亡個体数を示した。結果より、モスピラン単剤区とトリフミン前日散布区は訪花行動に全く影響を示さず、混合散布区では散布当日と散布1日後にジメトエート区に比較して極少数の死亡個体が採集されたが、その影響は短期間の一過性の影響であった。

散布38日後の巣箱内の観察結果では、①-③の全てのモスピラン処理区で、健全な女王と各生育段階(卵、

幼虫、蛹)の次世代が多数観察され、無処理区と差は認められなかった。

### <sup>14</sup>Cラベル-モスピランを用いた *in vivo, in vitro*代謝試験

放射能標識したモスピランを用いて、セイヨウミツバチにおけるモスピランの動態試験、代謝試験を行った。以下に得られた概要を示す。

#### (1). 局所施用したモスピランの体内動態試験

LD<sub>50</sub>相当の<sup>14</sup>Cラベル-モスピランを胸部背面に局所投与して、経時的に体内および排泄物の放射能の定性分析を行ない、親化合物と代謝物の割合を調べた。

体表の放射能は半減期4~8時間で比較的速やかに吸収され、24時間で約25%が体外に排泄された。48時間後の体内放射能は殆どが直腸に存在し、その3/4がクロロニコチン酸(IC-O)、残りがクロロピリジルメチルアルコール(IM-O)とN-脱メチル体(IM-2-1)で、親化合物は1%以下であった。排泄物中には直腸内と同じ代謝物が観察された。

なお、タバコガやハスモンヨトウなどチョウ目害虫では、N-脱メチル体(IM-2-1)のみが代謝物として検出されており、昆虫種により代謝パターンが異なる点

が興味深い。

## (2). モスピランを代謝する組織の特定

モスピランを解毒分解する組織を特定するため、西洋ミツバチ働き蜂から各種組織を分離培養し、<sup>14</sup>C-モスピランを添加して組織別の分解活性を調べた。タンパク質量当たりの活性で比較すると、マルピーギ管と前腸の活性が最も高いことが明らかとなっている。なお、これら培養組織における代謝物は虫体に投与した場合と同じ物質である。

西洋ミツバチの酸化酵素についてGilbertとWilkinsonは、epoxidase, hydroxylaseおよびO-demethylase活性が主に中腸に分布しており、組織を磨碎すると活性が完全に失われることを示したが<sup>12)</sup>、本研究で得られた結果は、GilbertとWilkinsonの報告した西洋ミツバチの酸化酵素活性の分布と全く異なる点で興味深い。さらに前腸における高い分解活性は、モスピランを花蜜から経口的に摂取した場合の毒性を低下させるだけでなく、巣箱内のコロニーへの影響を小さくすることが期待できる点から重要と考えられる。

## (3). ミクロゾーム画分を用いたモスピラン分解試験

西洋ミツバチ働き蜂の前腸とマルピーギ管から細胞画分を調整し、<sup>14</sup>C-モスピランの分解活性も調べた。その結果、ミクロゾーム画分の活性が最も高く補酵素としてNADPHを要求することからチトクロームP450による分解反応であることが明らかとなった。

PBOやDMI系殺菌剤をミクロゾーム反応液に添加し、モスピラン代謝物の定性分析を行った。結果、親化合物の割合のみ増加し、中間体の蓄積が認められないことから、P450によるN-脱アルキル反応が解毒代謝の第一段階であると判断した。

## おわりに

本研究は、筆者が1999年から2000年にかけて米国ノースカロライナ州立大学に客員研究員として滞在中に行なったものである。共同研究者であるノースカロライナ州立大学昆虫学部Roe教授、Ambrose教授、毒物学部Rose教授、千葉大学園芸学部 本山直樹教授に改めて感謝致します。

(日本曹達㈱ 農業化学品事業部開発グループ)

## 引用文献

- 1) T. Iwasa, N. Motoyama, J. Ambrose, R. M. Roe, Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*, *Crop Protection* 23, 371-378 (2004)
- 2) T. Iwasa, J. Ambrose, R. Rose, N. Motoyama, R. M. Roe, Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*, *15<sup>th</sup> International Plant Protection Congress, Beijing, Abstracts*, p176 (2004)
- 3) M. Tokieda, M. Ozawa, S. Kobayashi, T. Gomyo, Method to determination of total residues of the insecticide acetamiprid and its metabolites in crop by gas chromatography. *J. Pestic. Sci.* 22, 77-83 (1997)
- 4) EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). Guideline on Test Methods for Evaluating the Side-effects of Plant Protection Products on Honeybees (No. 170) *EPPO Bulletin* 22: 203-215 (1992)
- 5) Research Report (Unpublished), NI-25 (acetamiprid) : Laboratory Oral and Contact Toxicity Test with the Honeybee, *Apis mellifera*, based on the EPPO Guideline 170. 50pp (1996)
- 6) M. Tomizawa, H. Otsuka, T. Miyamoto, M. Eldefrawi, I. Yamamoto, Pharmacological characteristics of insect nicotinic acetylcholine receptor with its ion channel and the comparison of the effect of nicotinoids and neonicotinoids. *J. Pesticide Sci.* 20, 57-64 (1995)
- 7) R. Nauen, U. Ebbinghaus-Kintscher, R. Schmuck, Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Pest. Manag. Sci.* 57, 577-586 (2001)
- 8) M. Colin, L. Belzunces, Evidence of synergy between prochloraz and deltamethrin in *Apis mellifera* L: a convenient biological approach. *Pestic. Sci.* 36, 115-119 (1992)
- 9) E. Pilling, P. Jepson, Synergism between EBI fungicides and a pyrethroid insecticide in the

- honeybee (*Apis mellifera*). *Pestic. Sci.* 39, 293-297 (1993)
- 10) L. Brattsten, D. Berger, L. Dungan, *In vitro* inhibition of midgut microsomal P450s from *Spodoptera eridania* caterpillars by demethylation inhibitor fungicides and plant growth regulators, *Pestic. Biochem. Physiol.* 49, 234-243 (1994)
- 11) Research Report (Unpublished), A Semi-Field Study on the Effect on Honey Bees (*Apis mellifera* L.) of ASSAIL 70WP (EXP61842A Acetamiprid 70%) Straight and in Combination with the Fungicide PROCURE 50WS (Triflumizole 50%). 54pp (2003)
- 12) M. Gilert, C. Wilkinson, Microsomal oxidases in the honey bee, *Apis mellifera* (L.). *Pestic. Biochem. Physiol.* 4, 56-66 (1974)

