

24時間蓄尿を、摂取後の連続した4日間に亘り集めた(図1)。非重水素標識ネオニコチノイド(2 $\mu$ gの単回経口投与)を使用して、健康成人12人でモデルを検証するために負荷試験を実施した。24時間蓄尿を摂取前後の日に回収した後、随時尿試料を摂取後168時間まで24時間毎に採取した。

健康な男女373名の随時尿試料(2009年から2014年)を、宇治市、京都市で収集し、また京都大学生体試料バンクに保存されている試料を使用した。年齢、喫煙習慣、家庭での農薬使用量、前日の野菜の消費量を、自記式質問紙を用いて記録した(表1)。

尿試料は、京都大学生体試料バンクで分析まで-30 $^{\circ}$ Cで保管した。

書面によるインフォームドコンセントを、すべての被験者から研究への参加前に得た。研究計画書は京都大学の倫理委員会によって審査、承認された(E25およびE2166)。

#### ・試薬

アセタミプリド、イミダクロプリド、チアクロプリド、チアメトキサム、ニテンピラムはAccuStandard(ニューヘブレン、CT、USA)から入手した。クロチアニジン、ジノテフラン、およびチアクロプリドアミドは和光純薬(大阪、日本)から入手した。デスメチル-アセタミプリドおよびデスメチル-チアメトキサムは、Sigma-Aldrich社(セントルイス、MO、USA)から入手した。重水素標識アセタミプリド(アセタミプリド-d6)は林純薬(大阪、日本)から入手した。重水素標識アセタミプリド-d3、クロチアニジン-d3、イミダクロプリド-d4、およびチアメトキサム-d4は、Dr. Ehrenstofer社(アウグスブルク、ドイツ)から入手した。重水素標識ジノテフラン-d3とチアクロプリ

ド-d4は、それぞれ、@rtMolecule(ポワティエ、フランス)とCDN isotopes(ケベック州、カナダ)から入手した。

・尿試料中のネオニコチノイドの抽出  
尿試料1mLと回収率サロゲート(アセタミプリド-d3、クロチアニジン-d3、イミダクロプリド-d4、チアクロプリド-d4、およびチアメトキサム-d4は0.2 ng、ジノテフラン-d3は2ng)を合わせ、珪藻土カラムにロードした(InertSep K-solute 2mL、ジーエルサイエンス、東京、日本)(図2)。負荷後10分、標的分析対象をジクロロメタン25mLで2分間溶出した。溶出液を約10mLにロータリーエバポレーターで減少させ、さらに窒素気流下で約1mLにした。溶液をSupelclean ENVIcarb-II/PSA固相カートリッジに通した(A500 mg、B500mg、Sigma-Aldrich社)。標的分析対象を、10分間で、10mLの20%ジクロロメタン/アセトニトリル(v/v)を用いてチューブに溶出した。溶液を窒素気流を用いて乾燥するまで蒸発させ、30%メタノール水中に再溶解した。

#### ・機器分析

分析は、島津Nexeraシステム(島津製作所、京都、日本)と6500トリプル四重極MS/MS装置(AB SCIEX、MA、USA)で陽イオンモード大気圧エレクトロスプレーインターフェースを用いて行った。分離は、Atlantis T3(100mm、2.1 mm、3 $\mu$ m、Waters、MA、USA)で行った。カラムは、40 $^{\circ}$ Cに維持した。注入容量は10 $\mu$ Lであり、流速は200 $\mu$ L/minとした。勾配プログラムは、0.1%ギ酸/10 mM酢酸アンモニウム水とアセトニトリルからなる二つの移動相を用いた(表2)。各分析物に対して最適化されたパラメータ

を有する多重反応モニタリングプログラムで、各物質2つの生成物イオンの測定に使用した(表2)。

装置検出限界(IDL)がSN比3のピークを生成する分析物の質量として定義された(表3)。回収率の平均は64%から100%となった(表3)。変動係数は最大で21%であった。

ストック溶液を希釈し、少なくとも7点検量線のために使用した(表3)。

#### ・質保証

アセタミプリド、クロチアニジン、ジノテフラン、イミダクロプリド、チアクロプリド、およびチアメトキサムの定量は、重水素標識化合物を用いた内部標準法を用いて行った。他の標的分析物のために、外部標準法を使用した。尿試料の回収率は表2に記載されている。操作ブランクはそれぞれ16個のサンプルごとに評価し、検出可能なネオニコチノイド汚染はなかった(N=29)。

#### ・統計分析

全ての統計分析は、JMPソフトウェア(SASインスティテュート社)を用いて行った。p < 0.05の値は統計的有意性を示すと考えられた。検出限界以下の濃度は、0とした。平均値間の差異は、分散分析(ANOVA)により行った。

#### ・薬物動態学的モデリング

尿中代謝動態を記述するために、クロチアニジン、イミダクロプリドおよびジノテフランについては1コンパートメントモデル、アセタミプリドについては2コンパートメントモデルの薬物動態学的モデルを導入した。薬物動態学的モデルを開発するために、重水素標識ネオニコチノイドが、経口摂取

され、尿中動態を追跡した試験を実施した。この試験では、標識されたネオニコチノイドのボーラス投与として扱われ、投与後に瞬間的に体内に入ることができるかと仮定した(図3)。この試験では、投与後の尿試料を24時間ごとに収集した。

統計解析では、それらの化合物の薬物動態学的挙動が開発した薬物動態学的モデルに従うと仮定して、クロチアニジン、イミダクロプリド、ジノテフランおよびアセタミプリドの統計的特性を分析した(Koizumi, 1983)。さらに、これらの化合物の毎日の摂取量は、繰り返しボーラス投与計画で近似できると仮定した。

標識クロチアニジン、イミダクロプリド、ジノテフランおよびアセタミプリドのための薬物動態モデル

#### 1.1コンパートメント薬物動態モデル

クロチアニジン、イミダクロプリドおよびジノテフランについては、投与量の大部分は、親化合物として尿中に排泄されることが報告されている。そこで1コンパートメントモデルを適用した(図4)。以下のように24時間の尿中排泄量を算出する。

$$V \frac{dc}{dt} = M \times r - k \times c \quad \text{----- Eq1}$$

Vは分布体積であり、cは濃度であり、Mは、単一のボーラス投与量であり、rはコンパートメント分布する割合、kがクリアランスである(図4)。投与は、ボーラスを与えられていることから、M × rはEq1から消える。

$$V \frac{dc}{dt} = -k \times c \quad \text{----- Eq2}$$

初期条件は次式  $c(0) = \frac{M \times r}{V}$  で与えられる。

$$U(N) = \int_{24(N-1)}^{24N} k \times c \, dt \quad \text{-----Eq3}$$

$$U(N) = M \times r \times \left\{ e^{-\alpha \times 24(N-1)} - e^{-\alpha \times 24N} \right\} \quad \text{-----Eq4}$$

$\alpha$  は、 $\frac{k}{V}$  に等しい。

U (N) はN-1日目とN日の間、尿中に排泄されるネオニコチノイドの量である (Nは1以上)。

### a. 2コンパートメント薬物動態モデル

2コンパートメントモデルでは、第一コンパートメントは親化合物、第二コンパートメントは代謝産物の動態速度を示している。モデルは、アセタミプリドおよびその代謝物であるデスメチルアセタミプリドの速度を示している。つまり2つの微分方程式を有する (図4)。

$$V1 \frac{dc1}{dt} = M \times r - k1 \times c1 - k2xc1 \quad \text{-----Eq5}$$

$M \times r$ は投与後、すぐに消える。

$$V1 \frac{dc1}{dt} = -k1 \times c1 - k2xc1 \quad \text{-----Eq6}$$

$$V2 \frac{dc2}{dt} = -k2 \times c1 - k3 \times c2 \quad \text{-----Eq7}$$

初期条件は $c1(0) = \frac{M \times r}{V1}$  および $c2(0) = 0$ をとることができる。次のように尿中排泄が与えられる。

$$U1(N) = \int_{24(N-1)}^{24N} k1 \times c1 \, dt$$

$$U1(N) = M \times r \times \frac{k1}{k1+k2} \times \left( e^{-\frac{k1+k2}{V1} \times 24(N-1)} - e^{-\frac{k1+k2}{V1} \times 24N} \right) \quad \text{-----Eq8}$$

同様に、尿中代謝物の排泄量を得られる。

$$U2(N) = \left( \frac{M \times r \times k2}{k3 \times V1 - (k1+k2) \times V1^2} \right) \times \left[ \frac{k3 \times V1}{k1+k2} \times \left( e^{-\frac{(k1+k2) \times 24(N-1)}{V1}} - e^{-\frac{(k1+k2) \times 24N}{V1}} \right) - V2 \times \left( e^{-\frac{k1 \times 24(N-1)}{V1}} - e^{-\frac{k1 \times 24N}{V1}} \right) \right]$$

Eq9に上記の式を簡素化することができる。

$$= \frac{(k2 \times k3 \times M \times r)}{k3 \times V1 + k2^2} \times \frac{1}{\left(\frac{1}{V1} - \beta\right)} \times \left[ \frac{1}{\alpha} \left( e^{-\alpha \times 24(N-1)} - e^{-\alpha \times 24N} \right) - \frac{1}{\beta} \left( e^{-\alpha \times 24(N-1)} - e^{-\beta \times 24N} \right) \right]$$

$$\text{Where } \alpha = \frac{k1+k2}{V1}, \beta = \frac{k3}{V2}$$

N日の総尿中排泄は下記のようになる。

$$U(N) = U1(N) + U2(N) \quad \text{-----Eq10}$$

When  $k1 \ll k2$ , then  $U1 \ll U2$  and thus  $U \approx U2$ . Thus we will obtain Eq11.

$$U(N) = \frac{M \times r}{\alpha - \beta} \left[ \frac{1}{\alpha} \left( e^{-\alpha \times 24(N-1)} - e^{-\alpha \times 24N} \right) - \frac{1}{\beta} \left( e^{-\beta \times 24(N-1)} - e^{-\beta \times 24N} \right) \right] \quad \text{-----Eq11}$$

実際には、アセタミプリドの大部分は、デスメチルアセタミプリドとして排泄される。

### b. クロチアニジン、イミダクロプリド、ジノテフランおよびアセタミプリドの統計的特性

#### 1.前提

i番目の個人がM (i, j) の一日摂取量とj番目のサンプリングでU (i, j) の尿中排泄量を持つと仮定する。M (i, j) はE [M (i, j) ]とV [M (i, j) ]を持つと仮定する。

i および j にかかわらず、E [M (i, j) ]=E (M) 、 V [M (i, j) ]=V (M) とする。

これらの仮定は、単に毎日の摂取量は、任意の日ですべての被験者に共通の単一の平均と分散を持っていることを意味する。反復投与における毎日の尿中排泄量 (定常状態下での尿中排

泄)  $USt$  を、導入する。この仮説のもと、以下の関係を得ることができる。

$$E [USt (i, j)] = E (USt) \text{ と } V [USt (i, j)] = V (USt)$$

$USt$  は、 $M$  に等しい摂取量に対応する尿中排泄に対応する。以下の議論では、 $E (USt)$  と  $V (USt)$  で、 $E (M)$  と  $V (M)$  を相関させることができる方法を検討する。

### c. 1コンパートメントモデルにおける平均と分散推定

統計的特性を調べるために、確率過程を定義し、

$$M_0, \dots, M_j, \dots, M_i, \dots, M_0,$$

$M_0$  は0日目、すなわち、サンプリング日の摂取量を意味し、 $M_j$  をサンプリングする  $j$  日前を示す。

下記方程式となる。

$$USt = M_0 \times r \times (1-a) + M_1 \times r \times (1-a)a + \dots + M_i \times r \times (1-a)a^i + \dots$$

$$M_j \times r \times (1-a)a^j + \dots$$

$$USt = \sum_0^{\infty} M_j r (1-a) \times a^j$$

Eq12

$a = e^{-aT}$ 、 $M_i \times r \times (1-a)a^i$ 、または  $M_j \times r \times (1-a)a^j$  は、採尿前  $i$  または  $j$  日の食事摂取に起因するキャリーオーバーを表す。 $M_i$  と  $M_j$  は独立した確率変数である。毎日の摂取量が関心である場合、 $T$  は24 (時間) に等しい。Eq12 から、以下の式を得ることができる。

$$E[USt] = E$$

$$(Mr(1-a) \sum_0^{\infty} a^i) = r \times E[M] \quad Eq13$$

次に摂取量の分散を考慮する。観察

により尿中排出量の分散を得ることができる。以下の議論では、摂取量の分散と、尿中排泄量の分散の関係を得る。

$USt$  の分散  $V[USt]$  は、

$$V(USt) = \left( \sum_0^{\infty} r^2 (1-a)^2 \times a^{2j} \right) \times V(M)$$

$$= r^2 \times (1-a)^2 \times \frac{1}{(1-a^2)} \times V(M)$$

$$= r^2 \times \frac{1-a}{1+a} \times V(M) \quad Eq14$$

$$a = e^{-aT}$$

と与えられる ( $M_j$ 、 $M_i$  は独立)。したがって、

$$V(M) = \frac{1+e^{-aT}}{r^2(1-a^2)} V(USt) \quad Eq15$$

薬物動態が1コンパートメントモデルに従うネオニコチノイドは、Eq15 から  $V (M)$  の分散を推定することができる。

### d. 2コンパートメントモデル分散推定

同様の論理は2コンパートメントモデルで  $E [USt]$  に適用することができる。

$$E[USt] = r \times E[M]$$

分散について、以下の確率過程を検討する。

アセタミプリドの尿中排泄は微量であることから

$$USt = M_0 \times r \times \left( \frac{1}{L} \right) \times \left[ \frac{1}{a} \times (1-a) - \frac{1}{b} (1-b) \right] + \dots$$

$$M_i \times r \times \left( \frac{1}{L} \right) \times \left[ \frac{1}{a} \times (1-a)a^i - \frac{1}{b} (1-b)b^i \right] + \dots + M_j \times r \times \left( \frac{1}{L} \right) \times \left[ \frac{1}{a} \times (1-a)a^j - \frac{1}{b} (1-b)b^j \right] + \dots \quad Eq16$$

ここで、

$$L =$$



$$\frac{1}{\alpha} - \frac{1}{\beta} \text{ and } \alpha = \frac{k_1+k_2}{v_1}, \beta = \frac{k_3}{v_2}, a = e^{-\alpha T} \text{ and}$$

bは $e^{-\beta T}$ である。

$$V[US_t] = V\left[\sum_{i=0}^{\infty} (M_i \times r \times \left(\frac{1}{L}\right) \times \left[\frac{1}{\alpha} \times (1-a)\alpha^i - \frac{1}{\beta}(1-b)b^i\right])\right]$$

$$= \left\{ \sum_{i=0}^{\infty} \left( r \times \left(\frac{1}{L}\right) \times \left[ \frac{1}{\alpha} \times (1-a)\alpha^i - \frac{1}{\beta}(1-b)b^i \right] \right)^2 \right\} V(M)$$

$$= \left\{ \frac{r^2}{L^2} \left( \frac{1}{\alpha^2} \left( \frac{1-e^{-\alpha T}}{1+e^{-\alpha T}} \right) + \frac{1}{\beta^2} \left( \frac{1-e^{-\beta T}}{1+e^{-\beta T}} \right) - \frac{2}{\alpha\beta} \frac{(1-e^{-\alpha T})(1-e^{-\beta T})}{(1-e^{-\alpha T}-\beta T)} \right) \right\} V(M)$$

..... Eq17

$$V(M) = \frac{V[US_t]}{\left\{ \frac{r^2}{L^2} \left( \frac{1}{\alpha^2} \left( \frac{1-e^{-\alpha T}}{1+e^{-\alpha T}} \right) + \frac{1}{\beta^2} \left( \frac{1-e^{-\beta T}}{1+e^{-\beta T}} \right) - \frac{2}{\alpha\beta} \frac{(1-e^{-\alpha T})(1-e^{-\beta T})}{(1-e^{-\alpha T}-\beta T)} \right) \right\}}$$

..... Eq18

薬物動態が2コンパートメントモデルに従うネオニコチノイドは、Eq18からV(M)の分散を推定することができる。

### C. 研究結果

#### ・体内動態パラメータと摂取量推定

標識化ネオニコチノイド5 $\mu$ g瞬時投与後96時間で観察された尿中排泄をEq3、Eq10に当てはめてパラメータr, a, bを得た(表4、図5)。

2 $\mu$ g瞬時投与前後24時間で観察された尿中排泄をモデル化されたものと比較し、有意な相関(表5と図6)が見られた。投与前が定常状態と仮定すると、クロチアニジン、イミダクロプリド、ジノテフラン、およびデスメチルアセタミプリドの毎日の摂取量は、Eq13、Eq15、およびEq18に基づいて推定1.26 $\pm$ 1.12、1.58 $\pm$ 3.37、5.18 $\pm$ 6.40、および2.93 $\pm$ 12.4 $\mu$ gのようになった。

#### ・健康な男女での尿中排出量と推定摂取量

クロチアニジン、ジノテフラン、イミダクロプリド、チアメトキサム、デスメチルアセタミプリドは半分以上の試料で検出された(表6)。平均排出量としてはジノテフランが3.29

$\mu$ g/day、デスメチルアセタミプリドが1.14  $\mu$ g/day、クロチアニジンが0.51  $\mu$ g/dayとなり、ついでイミダクロプリドが0.07  $\mu$ g/dayであった。分布としては正規分布に従わず、大きく裾を引いた形となった(図7)。

これを摂取量に換算するとジノテフランが3.66  $\mu$ g/day、アセタミプリドが1.94  $\mu$ g/day、クロチアニジンが0.86  $\mu$ g/dayとなり、ついでイミダクロプリドが0.53  $\mu$ g/dayであった。本研究の対象者でもっとも高いのはジノテフランで64.5 $\mu$ gであった。これは農薬評価書の推定平均値10%程度であり、一日許容摂取量の1%未満であった。

#### ・ネオニコチノイド濃度と関連する要因の探索

ここでは、検出される割合の高い5物質について検討した。クロチアニジン、デスメチルアセタミプリド、ジノテフラン、チアメトキサムは年齢、出産回数と相関していた(表7)。前日の食品摂取量との関係では、クロチアニジン、デスメチルアセタミプリド、ジノテフラン、イミダクロプリドが果実類と相関していた。野菜類とは、ジノテフラン、イミダクロプリドが相関していた。またジノテフランは穀類摂取量とも相関していた。茶類の摂取量、殺虫剤使用数とは有意な相関はなかった。性別との関連は見られなかった。野菜類の摂取習慣が多い群で尿中排出が高い傾向があったが有意ではなかった。クロチアニジン、ジノテフラン、イミダクロプリドが飲酒、喫煙習慣と関連があったが、理由は分からなかった。

#### ・ネオニコチノイド農薬の間での相関関係

相関係数は最大で0.54でクロチアニ

ジンとデスメチルアセタミプリドの間、またジノテフランとニテンピラムの間で0.49、チアクロプリドとニテンピラムの間で0.49と比較的高い相関が見られた(表8)。アセタミプリドはイミダクロプリド、デスメチルアセタミプリドと弱い相関が見られた。クロチアニジンはチアメトキサム、イミダクロプリド、チアクロプリドと弱い相関が見られた。

#### D. 考察

体内動態試験では、クロチアニジンは3日以内、ジノテフランは1日で大部分が未変化体として回収された。イミダクロプリドについては、未変化体の排泄が少なく、アセタミプリドについては、未変化体はごく僅かであり、代謝物である脱メチルアセタミプリドがあり、排出速度も他の化合物よりも遅かった。尿中濃度ではイミダクロプリド、アセタミプリドは低いが、摂取量はクロチアニジンに並ぶ。

体内動態試験を行った4物質以外では、チアメトキサムが多くの試料で検出されたが濃度は低かった。ニテンピラム、チアクロプリドはほとんど検出されなかったが、使用量、摂取量が少ないのか、体内で代謝されているのかは今後の検討が必要である。

ネオニコチノイド排出量と関連する要因に年齢があったが、野菜などの摂取量と交絡していると考えられた。相関した食材が農薬ごとに差異が見られたのは、農薬使用パターン、残留度合いに違いがあったためと考えられた。ジノテフランは家庭用殺虫剤で多く使用されているが、相関は見られなかった。

ネオニコチノイドの中で相関が見られたが、アセタミプリド、デスメチルアセタミプリドは親化合物、代謝物

という関係である。クロチアニジンはそれ自体が農薬として使用されているが、チアメトキサムの代謝物でもあるため、今回見られたクロチアニジンのいくらかはチアメトキサムに由来すると考えられた。チアメトキサムからデスメチルチアメトキサムへの代謝はほとんどないと考えられた。その他、代謝物の関係にない相関関係については、混用あるいは土壌で残留していた可能性が考えられた。

#### E. 結論

ネオニコチノイド4種の体内動態モデルを確立することができた。

一般集団で、ネオニコチノイドの曝露量を推定でき、現時点で大きなリスクはないと考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表・その他

原田浩二、新添多聞、田中恵子、坂本裕子、今中美栄、大島匡世、草川浩一、奥田裕子、小林果、小泉昭夫、ヒトにおけるネオニコチノイド農薬の体内動態の検討、第85回日本衛生学会学術総会(2015年3月26-28日 和歌山)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## I. 文献

EU commission, Amending Implementing Regulation (EU) No 540/2011, as regards the conditions of approval of the active substances clothianidin, thiamethoxam and imidacloprid, and prohibiting the use and sale of seeds treated with plant protection products containing those active substances.

COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) No 485/2013 of 24 May 2013

EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues. Scientific Opinion on the developmental neurotoxicity potential of acetamiprid and imidacloprid. EFSA Journal 2013;11(12):3471.

Koizumi A. Development of

methodological and theoretical basis for preventive toxicology with special reference to hepatotoxicity. Ph. D thesis, Tohoku University. 1983;

<http://hdl.handle.net/10097/19566>.

食品安全委員会. 農薬評価書アセタミプリド2008年8月, イミダクロプリド2007年6月, チアメトキサム (第2版) 2012年3月, クロチアニジン (第5版) 2014年1月, ジノテフラン(第5版) 2013年12月

<https://www.fsc.go.jp/fsciis/evaluationDocument/list?itemCategory=001>

**Table 1.** Demographic characteristics and vegetable intake of the study participants

	<i>n</i>	Total 373 mean±SDrange	Male 45 mean±SDrange	Female 328 mean±SD range
Age	(yr)	37.9±23.3 18–87	48.2±23.5 21–85	36.5±23.0 18–87
Height	(cm)	158.2±7.3 120–185	169.5±6.4 156–185	156.7±5.9 120–171
Weight	(kg)	52.9±8.7 34–87	66.2±7.6 50–87	51.0±7.1 34–80
Parity		- -	- -	0.6±1.0 0–4
Food consumption	(g/day)			
	cereal	245±155 0–720	253±144 0–540	244±157 0–720
	potato	25±54 0–600	39±51 0–150	23±54 0–600
	vegetable	245±207 0–1338	297±290 0–1338	239±196 0–1265
	fruits	57±105 0–545	113±167 0–545	50±94 0–520
	tea	143±250 0–1500	231±289 0–1000	133±244 0–1500
Insecticide use	(No. of items)	0.3±0.8 0–5	0.2±0.7 0–3	0.3±0.8 0–5
		%	%	%
Vegetable eating habit <sup>a</sup>	often	74.7%	73.9%	74.8%
	sometimes	25.3%	26.1%	25.2%
Drinking	current drinker	34.6%	75.6%	28.9%
	ex-drinker	4.1%	11.1%	3.1%
	non-drinker	61.4%	13.3%	68.0%
Smoking	current smoker	0.8%	0.0%	0.9%
	ex-smoker	7.3%	40.0%	2.8%
	non-smoker	91.9%	60.0%	96.3%

<sup>a</sup> 'often' means eating vegetable at least once a day.



**Table 2.** LC-MS/MS conditions for the determination of neonicotinoids

Liquid chromatography					
Instrument	SHIMADZU Nexera				
Column	Atlantis T3 (2.1 mm(i.d.)×100 mm, 3 μm) (Waters)				
Column temperature	40°C				
Mobile phase	A: 0.1% formic acid/10 mM ammonium acetate in water B: Acetonitrile				
Mobile phase gradient	0–4 min	A95		B5	
	4–15 min	A95>50		B5>50	
	15–18 min	A50>0		B50>100	
	18–23 min	A0		B100	
	23–30 min	A90		B10	
Mobile phase flow	0.2 mL min <sup>-1</sup>				
Injection volume	10 μL				
Mass spectrometer					
Instrument	TripleQuad 6500 (AB SCIEX)				
Ionization	Electrospray positive ionization (multiple reaction monitoring)				
Monitored ion (m/z)			Declustering	Collision	Retention
		Quantification	Confirmation	potential (V)	energy (V) (min)
Acetamiprid	223.0 > 126.0	223.0 > 90.0	71	29	12.7
Clothianidin	249.9 > 169.0	249.9 > 132.0	21	19	11.7
Dinotefuran	203.0 > 129.0	203.0 > 114.1	1	17	8.4
Imidacloprid	256.0 > 175.1	256.0 > 209.0	56	25	12.1
Nitenpyram	271.0 > 99.0	271.0 > 125.9	51	39	9.7
Thiacloprid	252.9 > 125.9	252.9 > 90.0	76	29	13.9
Thiamethoxam	291.8 > 211.1	291.8 > 181.0	41	17	10.7
Desmethyl-acetamiprid	209.1 > 125.9	209.1 > 90.0	61	25	11.9
Desmethyl-thiamethoxam	278.0 > 132.0	278.0 > 174.0	36	25	12.6
Thiacloprid amide	271.0 > 125.9	271.0 > 73.0	31	35	11.8
Acetamiprid-d3	226.0 > 126.0		71	31	12.7
Acetamiprid-d6	226.0 > 126.0		71	31	12.7
Clothianidin-d3	253.0 > 172.1		1	19	11.7
Dinotefuran-d3	206.1 > 132.1		56	19	8.4
Imidacloprid-d4	260.1 > 179.1		26	25	12.1
Thiacloprid-d4	296.0 > 215.0		91	29	13.9
Thiamethoxam-d4	296.0 > 215.0		41	17	10.7
Desmethyl-acetamiprid-d3	212.1 > 125.9		61	25	11.9

**Table 3.** Calibration curves, detection limits, and recoveries for neonicotinoids analyses

Target analytes	Range (ng mL <sup>-1</sup> )	Calibration curves (Y=ax+b) <sup>a</sup>		Linearity (r)	Detection limit <sup>b</sup> (ng mL <sup>-1</sup> )	Recovery % (RSD%) <sup>c</sup> (n=7)
		Slope (a)	Intercept (b)			
Acetamiprid	0.005-2	0.886	0.00529	0.9999	0.005	91 (10)
Clothianidin	0.02-5	0.905	-0.00721	0.9999	0.020	100 (15)
Dinotefuran	0.01-10	1.29	0.00201	0.9999	0.010	64 (21)
Imidacloprid	0.01-1	0.881	0.0168	0.9999	0.010	97 (17)
Nitenpyram	0.01-2	7.87E+05	1.04E+03	0.9999	0.010	72 (6)
Thiacloprid	0.005-2	1.02	0.00442	0.9999	0.005	80 (5)
Thiamethoxam	0.01-1	0.909	0.00396	0.9999	0.010	89 (16)
Desmethyl-acet amiprid	0.005-2	1.66E+06	8.55E+03	0.9999	0.005	72 (12)
Desmethyl-thia methoxam	0.02-2	2.43E+05	2.30E+03	0.9999	0.020	75 (4)
Thiacloprid amide	0.005-2	4.24E+06	1.30E+04	0.9999	0.005	69 (8)

<sup>a</sup> Y and X are Area counts and Concentration (ng/mL), respectively, for external standard method; and are Analyte Area / IS Area ratio and Analyte Conc. / IS Conc. Ratio, respectively, for internal standard method.

<sup>b</sup> 1-mL sample

<sup>c</sup> RSD: relative standard deviation

Table 4. The model parameters in Eq3 and Eq10 determined based on the observed urinary excretion of labeled compounds after instantaneous dosing.  $R^2$  values indicate correlation of the observed excretions and the modeled ones.

	$r$	$\alpha$ (day <sup>-1</sup> )	$\beta$ (day <sup>-1</sup> )	$n$	$R^2$
Clothianidin	0.596	1.20	—	31	0.88
Imidacloprid	0.133	0.479	—	34	0.46
Dinotefuran	0.899	4.20	—	15	0.96
Desmethyl-acetamiprid	0.586	3.08	0.419	32	0.42

Table 5. The estimated daily intake  $M$  (Mean  $\pm$  SD) based on Eq13, Eq15, and Eq18 assuming steady state conditions before 2  $\mu\text{g day}^{-1}$  of instantaneous dosing.  $R^2$  values indicate correlation of the observed excretions and the modeled ones.

	$M$ ( $\mu\text{g day}^{-1}$ )	$n$	$R^2$
Clothianidin	1.26 $\pm$ 1.12	90	0.20 ( $p << 0.05$ )
Imidacloprid	1.58 $\pm$ 3.37	89	0.11 ( $p = 0.0012$ )
Dinotefuran	5.18 $\pm$ 6.40	83	0.077 ( $p = 0.011$ )
Desmethyl-acetamiprid	2.93 $\pm$ 12.4	93	0.057 ( $p = 0.021$ )

**Table 6.** Levels of urinary excretion of neonicotinoids and estimated daily intake.

	Urinary excretion (ug/day) <sup>a</sup>					
	n>LOD	mean±SD	median	75%ile	90%ile	max
Acetamiprid	91	0.02±0.09	n.d.	n.d.	0.04	1.38
Clothianidin	360	0.51±0.95	0.27	0.53	1.15	12.3
Dinotefuran	348	3.29±5.80	1.02	4.20	8.63	57.9
Imidacloprid	286	0.07±0.20	0.03	0.06	0.14	2.59
Nitenpyram	44	0.07±0.34	n.d.	n.d.	0.01	3.62
Thiacloprid	29	0.004±0.019	n.d.	n.d.	n.d.	0.22
Thiamethoxam	343	0.18±0.36	0.07	0.16	0.41	3.64
Desmethyl-acetamiprid	373	1.14±2.07	0.40	1.16	2.92	20.48
Desmethyl-thiamethoxam	4	0.0004±0.0040	n.d.	n.d.	n.d.	0.06
Thiacloprid amide	0	-	-	-	-	-

	Intake (ug/day) <sup>b</sup>					
	mean±SD	median	75%ile	90%ile	max	
Acetamiprid	1.94±3.53	0.67	1.97	4.98	34.9	
Clothianidin	0.86±1.59	0.46	0.89	1.93	20.7	
Dinotefuran	3.66±6.45	1.13	4.67	9.60	64.5	
Imidacloprid	0.53±1.52	0.19	0.43	1.06	19.5	

<sup>a</sup> Urinary excretion was calculated assuming that daily creatinine excretion was 1.5 g for males and 1 g for females.

<sup>b</sup> Intake was calculated based on portion distributed in the compartment 'r', derived from dosing study.

**Table 7.** Association between urinary excretion of neonicotinoids and participants characteristics

		Clothianidin		Desmethyl-acetamiprid	
		r	p value <sup>a</sup>	r	p value <sup>a</sup>
Age		0.21	<.0001	0.19	0.0002
Height		0.01	0.79	-0.01	0.81
Weight		0.01	0.88	0.01	0.81
Parity		0.25	<.0001	0.24	<.0001
Food consumption					
	cereal	0.06	0.28	-0.05	0.41
	potato	0.03	0.58	0.004	0.94
	vegetable	0.09	0.14	0.06	0.28
	fruits	0.14	0.02	0.14	0.02
	tea	0.10	0.10	0.05	0.40
Insecticide use		-0.05	0.38	-0.05	0.37
		mean±SD	p value <sup>a</sup>	mean±SD	p value
Sex	male	0.7±1.8	0.16	1.3±3.1	0.48
	female	0.5±0.8		1.1±1.9	
Vegetable eating habit <sup>b</sup>	often	0.6±1.1	0.08	1.2±2.2	0.055
	sometimes	0.3±0.3		0.6±1.0	
Drinking	current drinker	0.5±0.6	0.02	1.2±1.8	0.20
	ex-drinker	1.2±3.1		2.0±5.2	
	non-drinker	0.5±0.8		1.0±1.8	
Smoking	current smoker	0.13±0.15	0.77	0.31±0.31	0.70
	ex-smoker	0.5±0.5		1.3±1.2	
	non-smoker	0.5±1.0		1.1±2.1	

<sup>a</sup> ANOVA.

<sup>b</sup> 'often' means eating vegetable at least once a day.



**Table 7. (continued)**

Dinotefuran		Imidacloprid		Thiamethoxam	
r	p value <sup>a</sup>	r	p value <sup>a</sup>	r	p value <sup>a</sup>
0.21	<.0001	0.23	<.0001	0.06	0.23
0.05	0.29	-0.10	0.06	0.01	0.90
0.08	0.15	-0.10	0.07	-0.05	0.40
0.24	<.0001	0.17	0.004	0.07	0.24
0.18	0.002	-0.02	0.74	0.02	0.71
0.04	0.47	-0.007	0.91	-0.05	0.36
0.12	0.03	0.27	<.0001	0.03	0.56
0.14	0.02	0.17	0.005	0.004	0.94
0.10	0.13	0.11	0.09	0.04	0.55
-0.07	0.24	0.01	0.81	-0.004	0.94
mean±SD	p value	mean±SD	p value	mean±SD	p value
4.1±9.0	0.34	0.07±0.20	0.98	0.17±0.23	0.86
3.2±5.2		0.07±0.20		0.18±0.37	
3.2±4.4	0.12	0.06±0.10	0.07	0.19±0.43	0.07
2.3±3.1		0.03±0.06		0.09±0.11	
3.9±8.1	0.23	0.11±0.31	0.02	0.21±0.42	0.29
4.0±4.6		0.03±0.03		0.21±0.23	
2.9±4.1		0.05±0.11		0.15±0.33	
0.07±0.12	0.005	0.05±0.04	0.66	0.04±0.04	0.72
6.7±11.6		0.11±0.25		0.15±0.19	
3.1±5.0		0.07±0.20		0.18±0.37	

**Table 8.** Parametric correlation coefficients among neonicotinoids.

	Acetamiprid	Clothianidin	Dinotefuran	Imidacloprid	Nitenpyram	Thiacloprid	Thiamethoxam	Desmethyl-acetamiprid	Desmethyl-thiamethoxam
Acetamiprid	1								
Clothianidin	<b>0.15</b>	1							
Dinotefuran	0.09	<b>0.19</b>	1						
Imidacloprid	<b>0.31</b>	<b>0.26</b>	<b>0.12</b>	1					
Nitenpyram	<b>0.11</b>	<b>0.13</b>	<b>0.49</b>	<b>0.30</b>	1				
Thiacloprid	0.07	<b>0.21</b>	<b>0.26</b>	<b>0.30</b>	<b>0.49</b>	1			
Thiamethoxam	0.04	<b>0.33</b>	<b>0.15</b>	0.09	0.07	0.05	1		
Desmethyl-acetamiprid	<b>0.30</b>	<b>0.54</b>	<b>0.14</b>	<b>0.26</b>	0.05	0.07	<b>0.18</b>	1	
Desmethyl-thiamethoxam	-0.02	-0.02	0.02	-0.03	-0.02	-0.02	-0.03	-0.04	1

Bold figures indicate statistical significance (p<0.05).

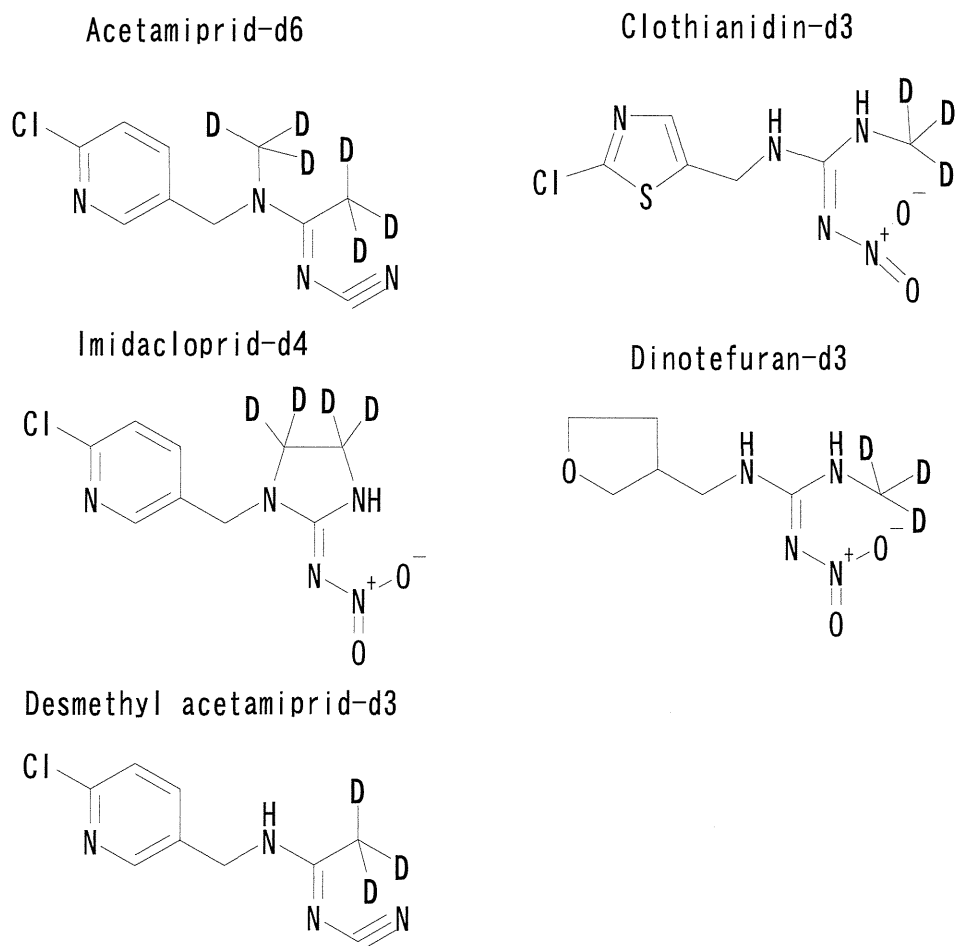


図1 負荷試験に用いた重水素標識ネオニコチノイド

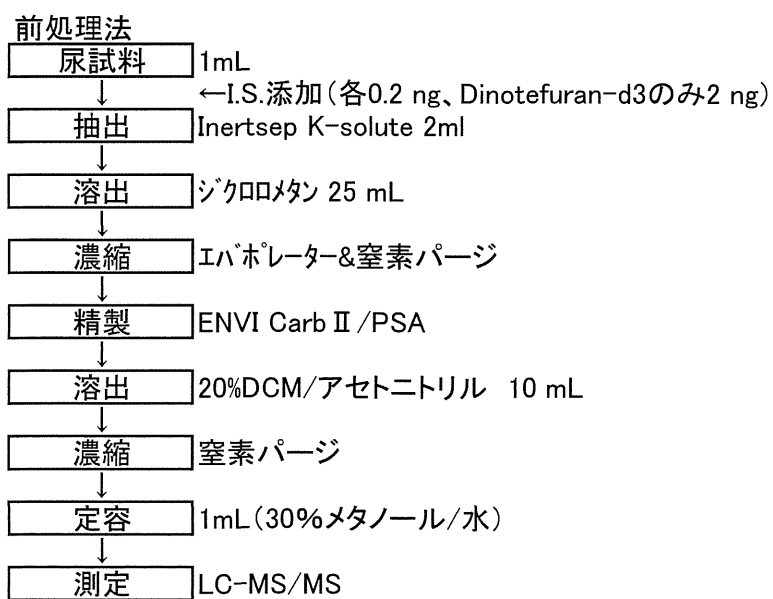


図2 尿試料の前処理フロー

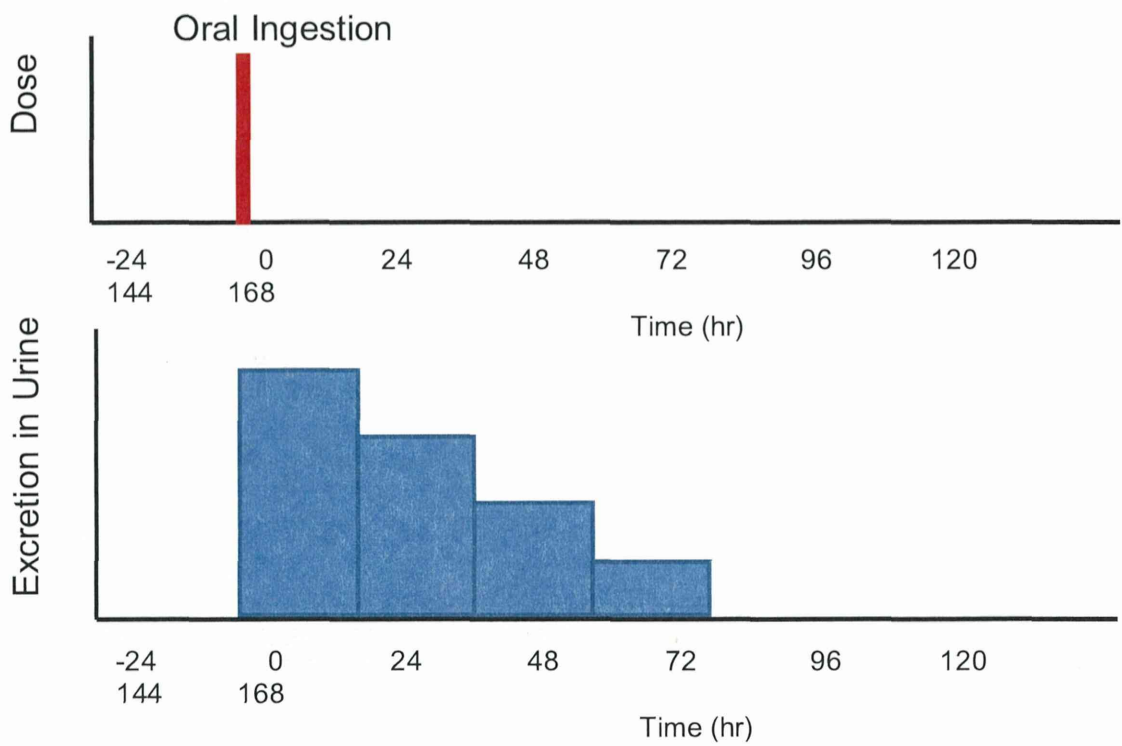
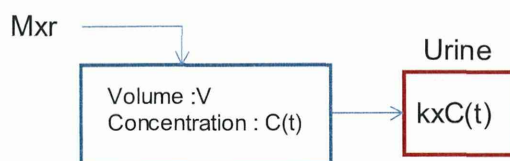


図3 標識ネオニコチノイド負荷試験におけるポラス投与の仮定

A. One compartment model



B. Two compartment model

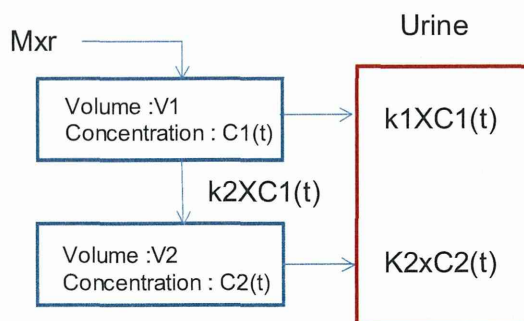
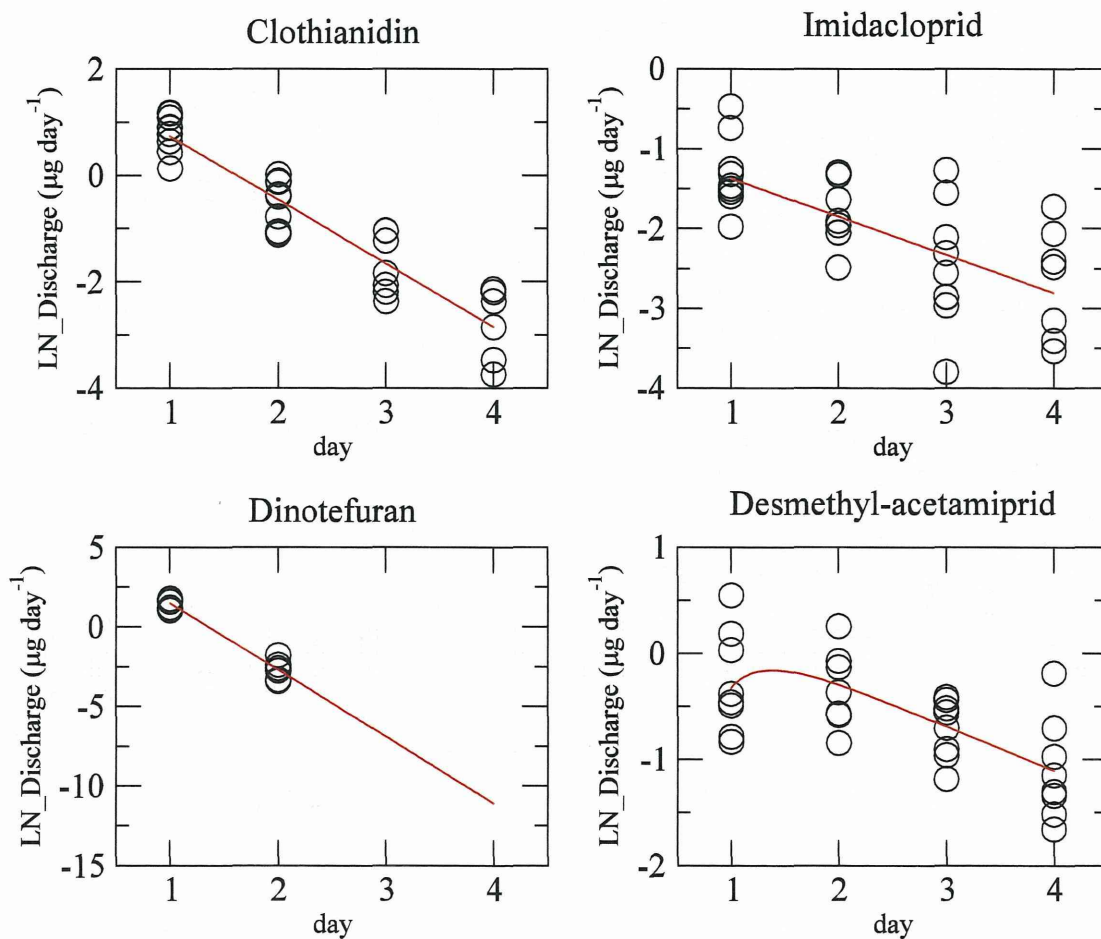


図4 薬物動態のコンパートメントモデル



⊠ 5. The observed urinary excretion ( $\mu\text{g day}^{-1}$ ) of labeled compounds in every 24hours after instantaneous dosing (circles) and the modeled ones (lines).



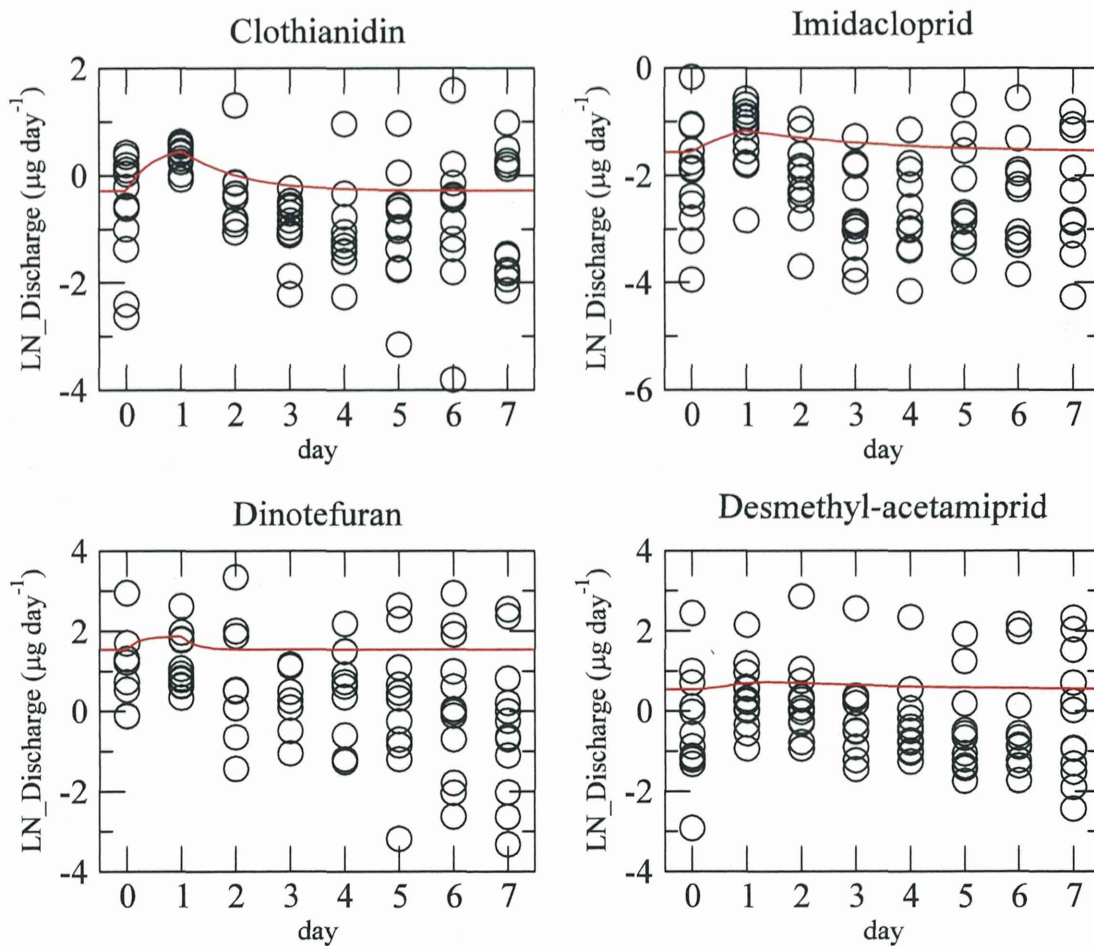


Figure 6. The observed urinary excretion in every 24 hours before (day 0) and after  $2 \mu\text{g day}^{-1}$  of instantaneous dosing (circles) and the modeled ones (lines).

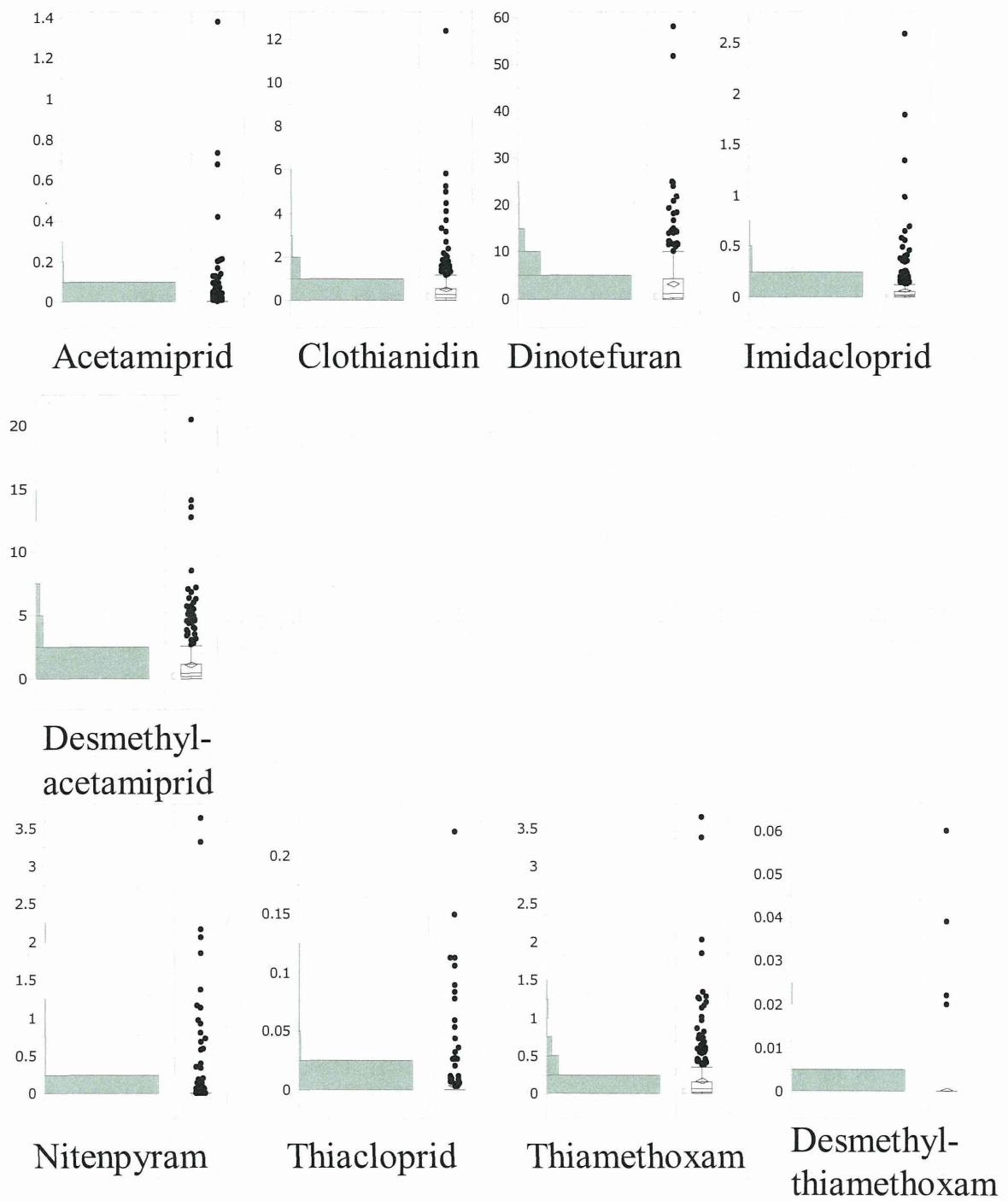


図7 健康な男女の尿中ネオニコチノイド排出量の分布 (単位  $\mu\text{g/day}$ )