

令和元年6月7日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05259

研究課題名(和文) 低用量殺虫剤曝露の代謝物プロファイリング：エクスポソーム導入へのマイルストーン

研究課題名(英文) Metabolite profiling of low-level exposure to insecticides: a milestone in the course of introduction of exposome measuring

研究代表者

上島 通浩 (Kamijima, Michihiro)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80281070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：環境中で使用される殺虫剤は、時代とともに変化している。低用量での殺虫剤曝露のリスク評価手法のひとつに、個人単位での曝露量を尿中の殺虫剤由来物質の測定により評価する方法がある。本研究では、有機リン系殺虫剤を中心に、曝露が相対的に多い散布職域での殺虫剤の個人曝露状況の経年的評価、尿中の新規曝露マーカーの開発、一般生活環境下における尿中曝露マーカーの個人内変動の検討、実験動物を用いての尿中有機リン系殺虫剤代謝物量とエステラーゼ活性阻害との関係解明を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

個人の化学物質の体内負荷量を客観的に知る方法のひとつに、その物質由来の特定の物質等を生体試料中で測定する生物学的モニタリング(またはバイオモニタリング)と呼ばれる手法があるが、新規化学物質を含め、さまざまな物質への曝露を網羅的に評価することが望まれている。体内摂取後、尿中に排泄される時間が半日程度と短い殺虫剤は、新しく導入される薬剤の測定法開発とともに、1回の採尿により日々変動する排泄量の評価が正確にできるかも課題となっている。本研究ではこれらの課題に取り組み、殺虫剤のリスク評価や衛生基準設定に資する成果を得た。

研究成果の概要(英文)：Insecticides used in the environment have been changed in the course of technical innovation. One of the risk assessment components of low-level exposure to insecticides is biological monitoring (or biomonitoring) in the exposed individuals. This research project determined the change in the insecticide use in an occupationally exposed population, analytical methods of urinary exposure markers of insecticides, intra-individual variations of metabolite concentrations of organophosphoate insecticides, and the relationship between the urinary concentrations and the esterase activity inhibition. It is expected that these results contribute to the risk assessment of insecticide exposure in the individuals.

研究分野：衛生学、公衆衛生学、労働衛生学、環境毒性学

キーワード：殺虫剤 曝露評価 リスク評価 尿中代謝物

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

時代とともに環境中に放出される化学物質は変化し、ヒトが環境から受ける曝露も変化する。農薬類を例にとれば、既存の殺虫剤に抵抗性を獲得した昆虫に対し、作用機序の新しい新規殺虫剤が開発されると、国が規定する安全性(毒性)試験、環境負荷の評価等を経て農薬登録される。このような環境経路曝露の変化に関し、研究代表者らは、1994年から2011年の期間に一般住民健康診断で採取された尿中の、有機リン系殺虫剤(OP)代謝物及びネオニコチノイド系殺虫剤の量を経年比較した。その結果、OP代謝物であるジメチルリン酸の尿中量は減少している一方、別のOP代謝物ジエチルリン酸の量は横ばいであり、また、ネオニコチノイドの量は増加していることが明らかになった(Ueyama et al, 2015)。愛知県内で実施した横断研究でも、近年、ネオニコチノイドは7割を超える対象者で尿中に検出される(Ueyama et al, 2014)が、検出される量全体としては依然としてOPが多い(Ueyama et al, 2012)。野菜や果物に残留する農薬類は、十分大きい不確実係数を用いた一日許容摂取量(ADI)や、作物への使用状況をふまえた残留基準の設定により、健康リスクが管理されているが、一般住民の個人曝露は時代とともに変化しつつある実態が明らかになってきている。

研究代表者らは、殺虫剤散布職域においても、従業者を対象とした健康調査を長年にわたり行っている。調査対象職域では防除用薬剤として、OPであるフェニトロチオン(FNT)とジクロロポス(DDVP)の組み合わせが頻用されたが、最近、DDVPはほとんど使用されなくなり、より低毒性のOPや、OPとは異なる作用機序を持つ食毒剤の使用が増えている。健康調査では、主要なOPの共通代謝物である4種類のジアルキルリン酸の尿中濃度を、ピレスロイド系殺虫剤代謝物である3-フェノキシ安息香酸とともに測定しているが、これらの代謝物に代謝されない物質の使用が増えている印象がある。すなわち、限られた物質の測定のみでは、もはや散布作業個人曝露の全体像さえつかめなくなっている。したがって、化学構造・作用機序の多様な農薬類を網羅的に測定し、リスク評価を行う発想に切り替えるべき時期が到来している。このことは、こうした薬剤使用後の環境中で生活を送る一般住民にもあてはまる。

曝露評価に当たっては、マーカ物質の個人内変動(日内・日間変動)とともに、体内での代謝や生体影響との関係にも目を向ける必要がある。OPについては、パラオキシソナーゼ1(PON1)により加水分解され、アルキルリン酸と個々のOP特有の官能基が尿中に排泄される。その解毒代謝活性は、基質となるOPの種類により大きく異なり、フェニトロチオンに対する活性はクロルピリホスの約1/1000に過ぎない。そして、代謝活性の個人差はフェニトロチオンで最大65倍、クロルピリホスで8倍と大きい(Sato et al, 2016)。個人差の理由はPON1の遺伝子多型だけでは説明できず、また、個人の健康リスク評価にあたっては、尿中マーカによる曝露評価結果を有害影響のリスク評価に結びつけるべきであるが、ほとんどのOPについて、最も基本的な情報である尿中代謝物量とコリンエステラーゼ活性の関係は不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、主に以下の2点の解明を目指した。第1に、曝露量が相対的に多い薬剤散布作業者の使用薬剤の中から、これまで個人曝露量が測定されていない薬剤を選定し、その尿中曝露マーカ開発を目指した。また、国内生産・使用量の多い農薬類の網羅的な測定法を開発するとともに、尿中代謝物量の個人変動を明らかにした。散布職域では経年的に調査に協力してきた作業者を対象に、個人の農薬類への曝露状況を過去に遡って解明することを目指した。第2に、尿中検出率・量ともに多いOPについて、代謝物量や急性神経毒性機序であるアセチルコリンエステラーゼ活性阻害の関連解明を目指した。さらに、OPの生体作用機序であるエステラーゼ阻害は、神経系以外でも健康影響の原因となる可能性があるという視点から、精巢および精巢上体においてフォスホリパーゼ活性阻害と精子指標との関連を調べた。

### 3. 研究の方法

(1) ヒトでの調査：殺虫剤の個人曝露状況の経年的評価と新規曝露マーカの開発、及び、尿中曝露マーカの個人内変動の検討

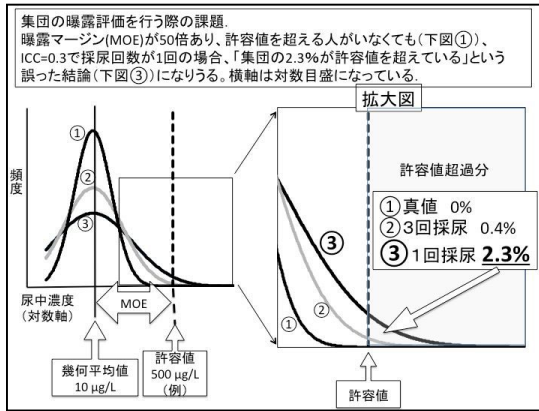
(1-1) 殺虫剤の個人曝露状況の経年的評価と新規曝露マーカの開発

散布作業者集団の過去10年間(のべ930人)の散布薬剤について調査し、尿中代謝物の測定結果と比較した。また、現在測定している代謝物では曝露評価できない薬剤を対象に、新たな曝露マーカの測定法の開発・検討を行った。

(1-2) 尿中曝露マーカの個人内変動の検討

一般に農薬類の体内半減期は数時間と短く、尿中濃度の日内変動・日間変動が大きい。OP代謝物(ジメチルリン酸)を例として(幾何平均10 µg/L、幾何標準偏差7 µg/L)最大無毒性量由来の参照値を500 µg/L(幾何平均値の50倍)、級内相関係数(ICC)を0.3と仮定した時の尿中代謝物濃度の分布を、次頁図に示す。

参照値と比較可能な個人の真値がの分布を示し、全員が参照値以下の曝露とする。しかし、1回の採尿による測定結果( )からは、約2%が「参照値を超える」と誤って評価され、3回採尿した平均濃度を用いると( )平均への回帰により誤分類がほぼなくなる。このように、体内半減期の短い環境化学物質の集団のリスク評価を正しく行うために、ICCの解明を行う必



ンエステラーゼ活性、尿中代謝物量をそれぞれ測定した。また、OP 高用量曝露による精子毒性機序の解明のために、FNT および代謝物 3-メチル-4-フェノールを対照群以外に各 2 段階の用量で週 4 日 9 週間投与したラットを用い、精巣および精巣上体のリン脂質濃度測定、分泌型フォスホリパーゼ A2(sPLA2)活性の測定、病理組織標本の評価を行った。

#### 4. 研究成果

(1) ヒトでの調査：殺虫剤の個人曝露状況の経年的評価と新規曝露マーカーの開発、および、尿中曝露マーカーの個人内変動の検討

(1-1) 殺虫剤の個人曝露状況の経年的評価と新規曝露マーカーの開発

散布作業員集団において使用頻度が上位の薬剤は、プロピタンホス、フェントリン、フェントロチオン、ヒドラメチルノン、シフェントリン、ペルメトリンであった。有機リン系殺虫剤については、ジアルキルリン酸に代謝される薬剤の使用が減少傾向にあること、一方、ジアルキルリン酸に代謝されないプロピタンホス(PPT)の使用が相対的に増えていることが明らかになった。従来、有機リン剤の尿中曝露マーカーを用いた生物学的モニタリングは、世界的にジアルキルリン酸の定量を中心に行われていることから、本調査結果に基づき、曝露マーカー候補物質であるメチルエチルホスホロアミドサイオエート (MEPT) の委託合成を行った。

GC-MS 法による尿中代謝物の分析精度に関し、検出限界・定量限界はそれぞれ 0.59 ng/ml、1.78 ng/ml であった。添加回収率は 100%前後となった。測定値の日内・日間変動はそれぞれ概ね 20%を下回る (n=7) 結果であった。検量線の決定係数は 0.983 であった。PPT 散布者 8 名および非散布者 2 名の尿を用いて尿中 MEPT を測定したところ、採尿日の一週間前以内に PPT を撒いていた 8 名の作業員では尿中 MEPT 濃度の平均値は 13.7 ng/ml (検出率 75%) であったのに対し、PPT を散布しなかった作業員では、ともに検出限界値未満であった。また、最終曝露からの経過時間が長くなると、尿中 MEPT 濃度も低くなる傾向であった。一方、これらの PPT 非散布作業員の尿中にはジアルキルリン酸が検出された。GC-MS 法による尿中 MEPT 測定が PPT の生物学的曝露モニタリング指標として有用であることが示唆された。さらに、高速液体クロマトグラフ-高分解能質量分析計システムおよび化学構造推定ソフトを用い、プール尿から特定の保持時間で検出された OP 関連物質のフラグメントイオンの精密質量情報をもとに、34 種類の OP および 238 種類の OP 分解物のいずれに該当するか照合し、33 種類の分解物を検出した。

(1-2) 尿中曝露マーカーの個人内変動の検討

一回採尿によるジアルキルリン酸のクレアチニン補正濃度の ICC は 0.4 を超え、Landis と Koch 基準に照らすと「moderate (中等度)」に該当した。全体に、午後の随時尿の ICC は早朝尿の ICC より高い結果となった。サロゲートカテゴリー分析の結果、濃度を 4 分位に分けた場合、誤分類の確率はジメチルジチオリン酸のクレアチニン補正濃度を除き、概して 10%未満であることが判明した。

(2) 動物実験：尿中 OP 代謝物量とエステラーゼ活性阻害との関係の解明、及び、精子指標とエステラーゼ活性阻害との関係の解明

FNT の最大無毒性量 (NOEL) は、脳および赤血球コリンエステラーゼ活性については Middle 群の 1.0 mg/kg/日、血漿コリンエステラーゼ活性では Low 群の 0.2 mg/kg/日と考えられた。脳および赤血球コリンエステラーゼ活性は、High 群において Control 群に対して約 4~5 割の減少、血漿 ChE では middle 群および High 群で約 2~4 割の減少を認めた。また、DDVP の NOEL については、全てのコリンエステラーゼ活性について Middle 群の 1.0 mg/kg/day となった。脳、赤血球および血漿コリンエステラーゼ活性は High 群にて約 4~5 割の減少をそれぞれ認めた。

両薬剤について、コリンエステラーゼ活性と尿中代謝物量との関係を非線形モデルにて推定し、コリンエステラーゼ活性が 20%抑制される際の尿中代謝物量 (nmol/24h 尿) を求めた。FNT・DDVP を比較すると、脳、赤血球、血漿で 2~4 倍程度の違いが見られた。薬剤ごとに健康影響をベースとした尿中代謝物量の評価が可能であることが示唆されたが、実際の現場で起きてい

要がある。このため、妊娠中の女性 62 人 (平均年齢 33.6 ± 4.8 歳) を対象に 5 日間連続採取した早朝尿および午後の随時尿を用いて、OP の代謝物ジアルキルリン酸 6 種を測定し、マーカーごとの ICC を算出した。

(2) 動物実験：尿中 OP 代謝物量とエステラーゼ活性阻害との関係の解明、及び、精子指標とエステラーゼ活性阻害との関係の解明

FNT および DDVP を Wistar ラットに経口投与した。投与量は Control (溶媒対照群), Low, Middle, High の 4 用量とした。最終投与後から 24 時間尿を集め、採尿終了後翌日に麻酔下にて腹腔大動脈採血を行い、臓器を採取した。コリ

る複合曝露による影響や、薬剤ごとの代謝経路などの違いを考慮して検討を進める必要性があると考えられた。

また、精巣及び精巣上体のコリンエステラーゼ活性に関しては、FNT および 3-メチル-4-フェノールを投与したラットの精巣、精巣上体においてリン脂質の蓄積、FNT 投与群の精巣上体の sPLA2 活性の低下、精巣上体管上皮における sPLA2G3 免疫染色陽性細胞の減少と空胞変性の増加を認めた。さらに、精巣上体の sPLA2 活性と精子運動性、形態、成熟との有意な関連を認め、OP 高用量曝露による精子毒性との関連が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

< 欧文 (査読あり) >

- (1) Hioki K, Ito Y, Oya N, Nakayama SF, Isobe T, Ebara T, Shibata K, Nishikawa N, Nakai K, Kamida T, Ueyama J, Sugiura-Ogasawara M, Kamijima M. Intra-individual variations of organophosphate pesticide metabolite concentrations in repeatedly collected urine samples from pregnant women in Japan (2019). Environmental Health and Preventive Medicine. 24:7. DOI: 10.1186/s12199-019-0761-4
- (2) Miyake M, Ito Y, Suzuki H, Tomizawa M, Sato H, Liu M, Okamura A, Nakajima T, Ohtani K, Takino H, Inagaki H, Kamijima M. Epididymal phospholipidosis is a possible mechanism for spermatotoxicity induced by the organophosphorus insecticide fenitrothion in rats (2018). Toxicology Letters 285: 27-33. DOI: 10.1016/j.toxlet.2017.12.023
- (3) Oya N, Ito Y, Kamijima M. Organophosphorus insecticide dichlorvos inhibits fatty acid amide hydrolase in the male reproductive organs of rats (2017). Fundamental Toxicological Sciences. 4: 201-205. DOI: org/10.2131/fts.4.201

< 和文 >

- (1) 上島通浩 少子化対策としての生殖毒性研究. 日本衛生学雑誌、査読有、73 巻、2018、330-337. DOI: org/10.1265/jjh.73.330
- (2) 上島通浩. 農薬・殺虫剤. 日本医師会雑誌、査読無、146 巻、2017、S217-S220.

[学会発表](計 13 件)

< 国際学会 >

- (1) Sato H, Ito Y, Bundo I, Hanai C, Nishimura M, Ueyama J, Kamijima M. Nonlinear model analyses of urinary metabolite levels of organophosphate pesticides corresponding to cholinesterase activity inhibition in rats. The ISES ISIAQ 2019 Joint Annual Meeting (2019)
- (2) Sato H, Ito Y, Hanai C, Nishimura M, Ueyama J, Kamijima M. Non-linear model analysis of the relationship between cholinesterase activities in rats exposed to 2, 2-dichlorovinyl dimethylphosphate and its metabolite concentrations in urine. The ISES-ISEE 2018 Joint Annual Meeting (2018)

< 国内学会 >

- (1) 佐藤博貴、伊藤由起、上山純、上島通浩. 有機リン系殺虫剤の健康影響を考慮した尿中代謝物の曝露基準値の検討. 第 92 回日本産業衛生学会 (2019)
- (2) 湊京子、佐藤博貴、伊藤由起、三宅美緒、大矢奈穂子、上山純、齋藤勲、五藤雅博、柴田英治、上島通浩. 殺虫剤散布従事者の保護具使用・作業時の症状と有機リン系尿中代謝物との関連について. 第 92 回日本産業衛生学会 (2019)
- (3) 佐藤博貴、伊藤由起、上山純、五藤雅博、三宅美緒、大矢奈穂子、湊京子、齋藤勲、柴田英治、上島通浩. 尿中メチルエチルホスホロアミドチオエートを用いた有機リン系殺虫剤プロピタンホスの曝露評価法の検討. 平成 30 年度日本産業衛生学会東海地方会学会 (2018)
- (4) 湊京子、佐藤博貴、伊藤由起、三宅美緒、大矢奈穂子、上山純、齋藤勲、五藤雅博、柴田英治、上島通浩. 殺虫剤散布使用薬剤の推移と作業従事者の保護具使用と自覚症状について. 平成 30 年度日本産業衛生学会東海地方会学会 (2018)
- (5) 佐藤博貴、伊藤由起、文堂生深、花井ちなみ、西村正也、上山純、上島通浩. 非線形回帰モデルによる有機リン系殺虫剤尿中代謝物のリスク評価 - 急性毒性の異なる薬剤間での比較検討. 第 46 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会 (2018)
- (6) 佐藤博貴、伊藤由起、花井ちなみ、西村正也、上山純、上島通浩. DDVP 投与 Wistar ラットにおけるコリンエステラーゼ活性と尿中代謝物の非線形モデル解析. 第 91 回日本産業衛生学会 (2018)
- (7) 佐藤博貴、上山純、伊藤由起、五藤雅博、三宅美緒、大矢奈穂子、近藤高明、齋藤勲、柴田英治、上島通浩. 殺虫剤散布作業・関連業務従事者の薬剤使用品目および尿中代謝物量の変遷. 第 90 回日本産業衛生学会 (2017)

- (8) 佐藤博貴、伊藤由起、花井ちなみ、上島通浩。Wistar ラットを用いたジメチル-2, 2-ジクロロビニルホスフェイト (DDVP) の影響評価におけるベンチマークドーズ法の適用。第 45 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会 (2017)
- (9) 佐藤博貴、伊藤由起、花井ちなみ、上島通浩。Wistar ラットを用いた DDVP 投与による コリンエステラーゼ活性抑制と尿中代謝物量の関係の検討。平成 28 年度日本産業衛生学会 東海地方会学会 (2017)
- (10) 上島通浩、伊藤由起、上山純。生体試料を用いた環境化学物質の個人曝露量評価の意義と課題。日本分析化学会第 66 年会特別シンポジウム 9 『未来を育む暮らしの安全・安心と分析化学』(2017、招待講演)
- (11) 上島通浩、伊藤由起、上山純。生物学的モニタリングによる殺虫剤の個人曝露量の解明。第 89 回日本産業衛生学会 (2016、招待講演)

〔図書〕(計 2 件)

- (1) 上島通浩、南山堂、シンプル衛生公衆衛生学(6-2 環境の把握とその評価) 2017、143-149 および 2018、143-149 および 2019、145-151
- (2) 上島通浩、南山堂、産業保健マニュアル改訂第 7 版(化学的健康障害要因とその対策 32. 臭化メチル、沃化メチル) 2017、274-275

〔産業財産権〕

- 出願状況(計 0 件)  
取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/hygiene.dir/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：上山 純  
ローマ字氏名：UEYAMA Jun  
所属研究機関名：名古屋大学  
部局名：大学院医学系研究科  
職名：准教授  
研究者番号(8桁)：00397465

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：伊藤 由起  
ローマ字氏名：ITO Yuki

研究協力者氏名：中山 祥嗣  
ローマ字氏名：NAKAYAMA Shoji

研究協力者氏名：柴田 英治  
ローマ字氏名：SHIBATA Eiji

研究協力者氏名：佐藤 博貴  
ローマ字氏名：SATO Hirotaka

研究協力者氏名：大矢 奈穂子  
ローマ字氏名：OYA Naoko

研究協力者氏名：三宅 美緒  
ローマ字氏名：MIYAKE Mio

研究協力者氏名：湊 京子  
ローマ字氏名：MINATO Kyoko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。