

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03888

研究課題名(和文)有機リン殺虫剤による脂質代謝かく乱：生殖・神経発達への新奇標的の寄与

研究課題名(英文)Organophosphorus insecticide-induced lipid metabolism disruption in reproductive or neurodevelopmental toxicity

研究代表者

伊藤 由起 (Ito, Yuki)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授

研究者番号：80452192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：有機リン系(OP)殺虫剤は、神経のアセチルコリンエステラーゼ(AchE)と同様の触媒構造をもつ酵素にも作用することが近年分かってきた。そこで本研究では、OP殺虫剤による神経発達毒性がヒトで観察されるか？に焦点を当てて研究を展開した。疫学研究において、7.5歳と8歳時に精神神経発達に関する質問紙調査を実施し、それぞれ約2600名の結果を集計した。粗解析の結果、幼児期のOP曝露濃度とその時点の発達影響との関連は見られなかったが、今後調整すべき共変量等を十分に検討した上で、関連を解析する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

OP殺虫剤は作物保護や衛生害虫駆除に汎用されている。幼児におけるOP殺虫剤曝露は世界的に見ても殆ど報告がなく、幼児期のOP殺虫剤曝露と神経発達影響を明らかにすることができるのは現時点で我々のチームだけである。さらに、本研究では大規模コホート研究の一部の参加者を対象に実施しており、幼児期のOP殺虫剤曝露だけではなく、今後学童期のOP曝露との関係も明らかにすることができる。

研究成果の概要(英文)：Organophosphorus (OP) insecticides inhibit acetylcholine esterase (AchE) by phosphorylation and exert neurotoxic effects in insects. Recently, it has been reported that OP insecticides also affect the serine residue in other enzymes. The objective of this study is to clarify whether OP insecticides induce neurodevelopmental adverse effects in humans. In the prospective cohort study, we conducted questionnaire surveys on children's neurodevelopment at 7.5 and 8 years of age and the responses were approximately 2600. In a crude analysis, no relationship between OP insecticide exposure levels in toddlers and neurodevelopmental outcomes at the same point was shown. We will reanalyze the association by adjusting for some potential confounders.

研究分野：衛生学

キーワード：有機リン系殺虫剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

殺虫剤は衛生的な環境と安定した食物生産の維持に重大な役割を果たしている。その一方、神経系を毒性作用点として設計されている為、昆虫への高い選択毒性を有する現行の薬剤においてもなお、次世代影響も含めた生殖機能や感受性の高い子供の神経発達への影響に関心が集まっている。

我々はこれまでに、殺虫剤曝露と男性生殖影響について、疫学研究、実験研究の両面から多数報告してきた (Kamijima et al., 2004; Okamura et al., 2005; Zhang et al., 2007; Zhang et al., 2008; Okamura et al., 2009; Wang et al., 2012; Ito et al., 2014)。殺虫剤は、その殺虫機序によっていくつかの種類に分かれているが、中でも有機リン系 (OP) 殺虫剤に着目している。その理由としては、殺虫剤散布作業者の精液質に関する調査において夏季に精子形態異常の増加、精子運動性の低下が観察されたが、彼らの大半が OP 殺虫剤を使用していたためである (Kamijima et al., 2004)。その精液質調査時に使用の多かった OP 殺虫剤であるジクロロボス、ダイアジノン、フェントロチオンをそれぞれラットに投与した場合、精子形態異常の増加、精子運動性の低下等が観察されている (Okamura et al., 2005; Okamura et al., 2009; Ito et al., 2014)。また、海外においては、OP 殺虫剤使用者の精子の染色体異常性 (Padungtod et al., 1999)、精子クロマチン変性 (Sanchez-Pena et al., 2004)、精子 DNA 損傷の上昇 (Meeker et al., 2004)、精液濃度の低下 (Perry et al., 2007) が報告されている。

このような OP 殺虫剤の精子毒性の機序として、脂質代謝に関与する内因性カンナビノイド (EC) システムのかく乱作用が考えられることを我々は明らかにしてきた (Noro et al., 2013; Suzuki et al., 2013; Ito et al., 2014; Oya et al., 2017)。OP 殺虫剤は体内に入ると、酸化的脱硫反応を経て、活性型 OP 殺虫剤 (オキソン体) となる。そして活性型 OP 殺虫剤は神経シナプスのアセチルコリンエステラーゼ (AChE) をリン酸化阻害させ、コリン作動性症状をもたらす。ところが、近年 AChE 以外にも、セリン加水分解酵素が 2 次標的になることが示唆されている (Casida and Quistad, 2004)。これらの酵素の中には、生殖機能調節に重要な役割を果たす EC 分解酵素等が存在している。

また、このような OP 化合物による EC システムのかく乱は、生殖器だけではなく脳においても観察されている。注意欠陥・多動性障害 (ADHD) のモデル動物である自然発症高血圧ラット (SHR) に合成カンナビノイドの WIN55212-2 を投与すると、CB1 受容体を活性化し、ADHD 症状を引き起こすことが報告されている (Pandolfo et al., 2007)。我々は、FAAH 阻害作用のある OP 化合物が注意欠陥や多動性といった ADHD 症状を誘発することを既に動物実験で確かめている (研究開始時未発表データ、後の Ito et al., 2020)。

OP 殺虫剤による神経発達影響については、2010 年に殺虫剤に直接触れない一般環境居住児童を対象とした横断研究で、尿中の OP 殺虫剤代謝物濃度が高い小児に ADHD と診断される者が多いことが報告されている (Bouchard et al., 2010)。これを契機に、本邦では食品安全委員会がヒトの発達障害と農薬に関する情報収集を行ったが、OP 殺虫剤曝露が ADHD のリスクになりうるかについて判断可能なデータは乏しいことが明らかになった。環境省が 2011 年より開始した大規模出生コホート調査、「子どもの健康と環境に関する全国調査 (エコチル調査)」では、殺虫剤曝露と ADHD をはじめとした発達障害発症との関連の解明は主な命題の 1 つとなっている。

2. 研究の目的

本研究では、動物実験で観察された OP 殺虫剤による精子毒性と神経発達毒性が、実際にヒトでも観察されるかを明らかにすることを目的として、研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 前向きコホートにおける OP 殺虫剤代謝物量の測定と精神神経発達

エコチル調査愛知ユニットセンターに登録されている児の尿を用いて、OP 殺虫剤代謝物量を測定した。また、採血を行い、EC 分解酵素や EC 合成酵素活性の測定に必要な膜タンパクの回収を実施した。さらに、エコチル調査愛知ユニットセンターの参加者が 7~8 歳の時点で、保護者に AQ 日本語版自閉症スペクトラム指数 (AQ) および日本版感覚プロファイル SP (SP) の回答をお願いした。AQ は総合点のカットオフ・スコアを、SP は「高い」の各カットオフ・スコアを基に各象限、セクション、因子別に集計をし、2 乗検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

(2) 殺虫剤散布作業者の精液調査

既存の精液の使用について、倫理審査委員会の承認後、オプトアウト方式で再同意を得た。殺虫剤散布作業者の精液中の EC 分解酵素 (FAAH と MAGL) と EC 合成酵素活性をアナンダミド (AEA)、2-オレイルグリセロール (2-アラキドノイルグリセロール(2-AG)の代替) 等のラジオアイソトープ標識したものを用いて測定した。また、EC である AEA と 2-AG の測定を超高速液体クロマトグラフ - タンデム四重極質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて行った。

(3) 小児 ADHD 患者の症例対照研究

小児発達外来にて、小児 ADHD 患者と性・年齢をマッチさせた対照者から血液と尿、ADHD 症状に関する質問紙を回収し、OP 殺虫剤尿中代謝物である尿中ジアルキルリン酸量の測定を行った。参加者には交通費として 500 円相当の謝礼をお渡しする他、インセンティブとしてアレルギー検査を実施した。また、EC 量測定の検討を行った。

4. 研究成果

(1) 前向きコホートにおける OP 殺虫剤代謝物量の測定と精神神経発達

これまでに、7-8 歳児 1446 名から血液を採取し、その約 8 割から膜タンパクの抽出を完了し、今後 EC 分解・合成酵素の活性を測定する予定である。

前向きコホート参加児が 7.5 歳と 8 歳時に精神神経発達に関する質問紙調査を実施し、それぞれ約 2600 名の結果を集計した。SP の「高い」又は「非常に高い」の割合は各象限、セクション、因子で男児の方が有意に多いか女児と同程度であった。質問紙標準化サンプルの結果と比較して「高い」又は「非常に高い」の割合が男女ともに多かった項目は、セクション「調整」の下位項目「活動レベルに影響する運動の調整機能」と因子「不注意・散漫性」であった。

さらに、両方の回答の得られた 1457 人のうち、回答漏れを除いた 1265 人分 (男児 638 人、女児 627 人、 7.8 ± 0.6 歳) を対象とした場合、125 名が AQ の総合点のカットオフ・スコア以上であった。この ASD 傾向児の方が、SP の何れの象限、セクション、因子においても「高い」のカットオフ・スコア以上の割合が多かった。他方、これまでに ASD と診断されたと回答のあった児 26 名のうち 11 名は、AQ の下位項目の 1 つ以上がカットオフ・スコア以上であったが、総合点はカットオフ・スコア未満であり、総合点のみの判断には注意が必要であった。

SP で明らかになる非定型の感覚特性は 8 歳前後に最も顕著であるとされているが、大規模調査の報告が乏しいため、本研究費終了後も調査を継続していく必要がある (2022 年度内に全ての児が 8 歳に到達する)。その上で、今後これらの指標をアウトカムにした解析をする必要がある。

本研究では、幼児期の OP 曝露濃度とその時点での Age Stage Questionnaire (エコチル調査の本調査にて実施) のカットオフ以上との関連は、粗解析の結果見られなかった。今後調整すべき共変量等を十分に検討した上で、関連を解析する必要がある。

OP 殺虫剤の代謝物量として、今回尿中ジアルキルリン酸を測定したが、尿中のジアルキルリン酸は既に食事中にジアルキルリン酸として存在しているものを反映している可能性が、我々の研究から明らかになった (Tsuchiyama et al., 2022)。尿中のジアルキルリン酸濃度は、OP 殺虫剤の共通骨格由来の代謝物であり、OP 殺虫剤の共通代謝物として、OP 殺虫剤の曝露評価に汎用されている。今後はこの尿中ジアルキルリン酸に加え、各 OP 殺虫剤の特異的代謝物の測定をした上で、OP 殺虫剤曝露と神経発達影響の関連を明らかにしていく必要がある。

(2) 殺虫剤散布作業者の精液調査

長期の保存検体であり、EC 分解酵素の測定に十分なタンパク量が得られなかった。また、検体量も僅かであり、EC 量も現在の測定方法では定量に十分な感度が得られなかったため、測定方法の改良を行っている。

(3) 小児 ADHD 患者の症例対照研究

新型コロナウイルス感染症流行の影響もあり、小児 ADHD 患者 21 名と対象者 7 名の参加にとどまった。年齢、性別、参加時の身長・体重、出生時体重、社会経済的要因には群間の差は見られなかった。参加時点の AQ、診断時の ADHD-Rating Scale のスコアは患者群が有意に高かった ($p < 0.05$)。OP の尿中殺虫剤代謝物濃度総和は 2 群間に有意な差は見られなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ito Y, Tomizawa M, Suzuki K, Shirakawa Y, Ono H, Adachi K, Suzuki H, Shimomura K, Nabeshima T, Kamijima M.	4. 巻 68
2. 論文標題 Organophosphate agent induces ADHD-like behaviors via inhibition of brain endocannabinoid-hydrolyzing enzyme(s) in adolescent male rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Agric Food Chem	6. 最初と最後の頁 2547-2553
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jafc.9b08195	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤由起、加藤沙耶香、玉田葉月、松木太郎、大矢奈穂子、野正夏鈴、金子佳世、佐藤博貴、榎原毅、上島通浩
2. 発表標題 エコチル調査参加学童児の感覚特性の分布
3. 学会等名 第91回日本衛生学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤由起、富澤元博、鈴木和貴、白川雄一、大野弘真、足立圭司、鈴木日美子、下村健司、鍋島俊隆、上島通浩
2. 発表標題 有機リン系化合物曝露後の内因性カンナビノイド系を介した幼若ラットのADHD 様行動
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会 Web開催
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤由起、富澤元博、上島通浩
2. 発表標題 有機リン化合物曝露ラットのADHD様行動
3. 学会等名 第90回日本衛生学会 誌上発表
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤由起、富澤元博、上島通浩
2. 発表標題 有機リン系化合物曝露後の幼若ラットのADHD様行動
3. 学会等名 第22回環境ホルモン学会 若手の会シンポジウム「中枢神経系への影響評価のための学際的な取り組みについて」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤由起、上島通浩
2. 発表標題 環境化学物質の曝露の低減に向けて：食事調査から分かってきたこと
3. 学会等名 第92回日本衛生学会学術総会シンポジウム4「環境化学物質の健康影響研究の知見と今後の展望」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤由起、加藤沙耶香、金子佳世、玉田葉月、松木太郎、榎原毅、上島通浩
2. 発表標題 自閉スペクトラム症傾向と感覚特性の関係
3. 学会等名 第92回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	富澤 元博	東京農業大学・生命科学部・教授	
	(Tomizawa Motohiro)		
	(20621808)	(32658)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------