

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10450

研究課題名(和文) バイオモニタリングによる除草剤のヒト曝露実態の理解とリスク評価への応用

研究課題名(英文) Understanding of herbicide exposure level by biomonitoring and its application to the risk assessment

研究代表者

上山 純 (Jun, Ueyama)

名古屋大学・医学系研究科(保健)・准教授

研究者番号：00397465

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題の目的は、大量のヒト尿サンプルに応用可能な尿中除草剤曝露マーカー測定法を世界に先駆けて開発し、既存の尿サンプル(小児、一般健康成人、農業従事者等)への大規模応用により、集団ごとの曝露レベルの分布(個人間変動)、個人内変動、地域差、経年変化などの変動要因を解明するとともに、バイオモニタリングデータによるリスク評価指標を算出することである。研究の結果、1)世界的にも分析のスループットに優位性のある尿中グリホサート測定法を開発し、2)日本人グリホサート曝露レベルを初めて明らかにした。本研究により、農薬のリスク評価の基盤となる技術と情報を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、将来の農薬のリスク評価に疫学研究の設計やその考察の基盤となる情報として貢献できるだけでなく、安全・安心を求める国民のニーズに対して応えることができ、EUや欧米とは異なる農業形態・生活様式のアジア圏で初めての取り組みであった。

規模が大きくかつ種類の採取デザインで得た既存のヒト尿サンプルをHBMに利用することから、経済性に優れたHBMを実施し、除草剤の曝露マーカーの特徴を多角的に理解できた。将来の慢性的な低濃度農薬曝露リスクを追求める環境疫学・労働衛生学研究、衛生行政の発展に大きく貢献しうる研究成果である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop a world-leading urinary herbicide exposure marker assay that can be applied to a large volume of human urine samples, and to apply it to existing urine samples to elucidate the distribution of exposure levels in each population (interindividual variation), intraindividual variation, regional differences, and factors of variation over time. The research aims to elucidate the factors of variation in the distribution of exposure levels (inter-individual variation), intra-individual variation, regional differences, and changes over time, and to calculate risk assessment indices based on biomonitoring data. As a result of the research, 1) a urinary glyphosate assay method was developed that has a worldwide advantage in analytical throughput, and 2) the Japanese glyphosate exposure level was clarified for the first time.

研究分野：環境衛生学

キーワード：除草剤 バイオモニタリング

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

我々は化学物質の持つ利便性を生かした様々な製品に囲まれており、化学物質のリスク(化学物質が人体に入り、健康に影響する可能性を示す)への対応が必要である。内閣府の調査「平成22年身近にある化学物質に関する世論調査」では、「日常生活において、化学物質の安全性に不安を感じるもの」の問いに対して、最も高い割合62%を示したのは「農薬/殺虫剤/防虫剤」であった。これらのリスク評価は食品経由の曝露(摂取)では食品安全委員会等、職業的曝露では厚生労働省や産業衛生学会等が担い、国民の健康に影響しないようリスク管理も実践している。リスク評価に必要な曝露評価(化学物質曝露量の把握)は、食品・水・空気中などの化学物質を定量することや、化学物質の環境中への排出量等で評価されていたが、近年は、生体試料中の化学物質を超高感度に定量することで、職業的曝露のみならず、小児や妊婦の個人曝露レベルでの把握が可能となった(Human Biomonitoring, HBM)。これを応用し、中毒症状を示さないような低濃度の農薬曝露が及ぼす不顕性の健康影響に関する疫学研究が飛躍的に進んでいる。その報告例を下に2例示す。

Richardson et al., FASEB J. 2015;29(5):1960-72. 約2,000名の未成年からPYR曝露マーカーである尿中3-phenoxybenzoic acid (3-PBA)を測定し、高PYR曝露群(cut off値は0.1 µg/L)は低曝露群[Referent]と比べて注意欠陥多動性障害と診断されているオッズ比が2.3倍高い[95% CI:1.4-3.9; P=0.002]ことを示した。その他アメリカ、ドイツ、中国等から報告が増えつつある。

申請者はこれまで、HBM手法を用いた日本人における有機リン系、ピレスロイド系およびネオニコチノイド系殺虫剤の尿中曝露マーカー濃度の特徴を理解すべく、高感度分析法の確立、経年的な濃度変化、季節変動、一般成人・小児・高齢者・農家のマーカー濃度分布を明示し、HBMによるリスク評価や環境疫学の発展に微力ながら貢献してきた。特にネオニコチノイド系および蚊取り線香等に使用されるピレスロイド系殺虫剤に関する取り組みは世界をリードしている。しかし将来的には複合的な農薬の曝露評価が求められることが強く予想されるため、殺虫剤以外の農薬リスク評価あるいはそれに貢献する技術(HBM等)を進展させなくてよいのだろうかという疑問にたどり着いている。

2. 研究の目的

いわゆる農薬曝露を包括的に把握するには、「殺虫剤」だけでなく、もっとも出荷量が多い「除草剤」の曝露に着目する必要があるが、これまでは主に殺虫剤のHBMを用いた曝露評価が発展してきた。殺虫剤が有する神経毒性は、理論的にはヒト(動物)にも当てはめることができ、健康への懸念が比較的強いことが理由の一つである。一方で除草剤の代表格であるグリホサートの除草機序(主にシキミ酸合成経路阻害でこれは動物にはない)から、人への影響は少ないとされていたが、近年の疫学研究により、急性中毒症状を示さないような低濃度除草剤曝露による健康影響に関する学術的な知見が報告されている(HBMは未実施)。

Ehrenstein et al., BMJ. 2019;364:1962. 調査地域はカリフォルニア州、グリホサート曝露レベルは出生地におけるグリホサート使用量を採用、アウトカムを知的障害のある自閉症スペクトラムとして、case 351名およびcontrol 26660名の後ろ向き研究が実施された。ロジスティック回帰分析により、出生前の妊婦の曝露は1.3倍[95% CI:1.05-1.69]リスクが上昇することが示唆された。限界として、バイオモニタリングが実施されていないなど、曝露評価に不確かさが残る。

グリホサートに代表される除草剤は、雑草等の防除を目的として農業分野や林業分野のみならず一般家庭でも使用されている身近な化学物質であり、その生体影響に関する懸念が近年増加している。本研究課題の目的は、大量のヒト尿サンプルに応用可能な尿中除草剤曝露マーカー測定法を世界に先駆けて開発し、既存の尿サンプル(小児、一般健康成人、農業従事者)への大規模応用により、集団ごとの曝露レベルの分布、地域差、経年変化などの変動要因を解明するとともに、バイオモニタリングデータによるリスク評価指標を算出することである。本研究は、将来の農薬のリスク評価に疫学研究の設計やその考察の基盤となる情報として貢献できるだけでなく、安全・安心を求める国民のニーズに対して応える、EUや欧米とは異なる農業形態・生活様式のアジア圏で初めての取り組みである。

3. 研究の方法

3-1 尿中グリホサート測定法の確立

グリホサートを主として、国内出荷量が多く市販標準物質が存在し、構造および既報からHBMの実現可能性が高いと判断した物質を対象とする(優先順:グリホサート、グリホシネート)。測

定法は高感度および信頼性を再重視し、高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計(LC-MS/MS)あるいはガスクロマトグラフ-タンデム質量分析計(GC-MS/MS)を用いて開発を検討した。既報を参考に、50%程度の一般健康人からターゲット物質が検出される0.1から1 µg/L程度を目標感度とする。可能な限り同時分析法とするが、感度等の問題によりHBMへの応用が難しい場合は個別分析法で対応する。基本的には米国FDAの再現性評価ガイドラインに従って分析法を評価し、精度保証という観点からサンプル中の対象物質の安定性試験も追加した。

3 - 2 測定法の応用

農業に従事する10名(年齢44から72歳、男性8名および女性2名、ただし除草剤の取り扱い履歴不明)の随時尿を8月に採取し、そのコントロール群として九州地区の一般健康診断に参加した男女(男性14名、女性10名、年齢の範囲31-63)の随時尿を対象に、尿中グリホサート濃度を測定した。また、愛知県内の自治体で実施している3歳児健診の残余尿を20検体(男児10名、女児10名)を収集し、尿中グリホサート濃度を測定した。

2006、2011及び2015年に収集した各50検体(愛知県在住の子供4-6歳、経年変化調査群)ならびに2012年8-9月及び2013年2月に収集した各42検体(愛知県在住の子供3歳、季節変動調査群)とした。

一般生活者38名(69±10歳、平均値±標準偏差)を対象に、尿と便サンプルの収集および生活習慣に関するアンケートを実施した。アンケートで得られる共変量も加味した統計的解析を施すことで、曝露評価値(尿中グリホサート濃度や他の農薬曝露指標)と腸内環境評価値の間に関連があるかどうかを確認した。

4. 研究成果

4 - 1 尿中グリホサート測定法の確立

尿1 mLに対して、固相抽出カラム(強陽イオン交換および弱陰イオン交換)による前処理を行った。これらの処理にはオープントロン社製の自動分注装置OT2やBiotage社製の自動固相抽出装置を用いて、ハイスループット化を実現した。グリホサートは金属配位性化合物のため、分離カラム等への吸着対策を各種施した。すなわち、LC流路のリン酸コーティングおよびアジレントテクノロジー社製のピークシャープナーを移動相に添加することが、液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計での定量分析感度を向上させる要因の一つとなった(検出下限値0.17 µg/g creatinine)。既報にはない固相抽出法およびLC条件でプール尿を用いた場合は良好な再現性を得ることができたものの、10名から得られた尿サンプルで検討したところ、マトリックスファクター(MF)のばらつきは42%(CV)となった。我々は固相抽出前に尿サンプルをクレアチニン濃度0.05 g/Lに精製水で調整すること(Creatinine-Matching Dilution, CreMD法と呼称)により、このMFを13%まで改善することを見出し、回収率、リテンションタイムのばらつき、測定感度のサンプル間差を軽減した。最終的には、0.33 µg/Lにおける平均日内変動と平均日間変動は相対標準偏差(relative standard deviation, %RSD)15%以下、検出下限値は0.1 µg/Lであった。検出下限値は既報の測定法と同程度またはそれ以下となり、農業従事者、一般成人、3歳児のうち32名(59%)から尿中グリホサートが検出され、中央値および最大値は0.25および1.99 µg/Lであった。検出率の面からも一般生活者の尿中グリホサート濃度測定に適応可能な感度であった。なお、上記定量値は、他国のそれと比較して同等か低濃度であった。また、男女差や顕著な年齢差は見られなかった。

2006年、2011年、2015年の日本人小児の尿からのグリホサート測定を行った結果、検出率は2006年で18%、2011年で30%、2015年で50%と年々上昇しており、2011年と2015年の尿中グリホサート濃度は、2006年に比べて有意に高いという結果が得られた。また2006年から2015年にかけて尿中グリホサート濃度は増加する傾向を示し、過去20年間の日本におけるグリホサートの国内出荷量の増加と相関があることが示された。一方で、季節間(夏と冬)や性別によるグリホサート曝露レベルの差は認められず、さらに有機リン系殺虫剤、ピレスロイド系殺虫剤およびネオニコチノイド系殺虫剤の尿中曝露マーカーとの相関も観察されなかった。2015年に採取された尿のうち、最も高い尿中グリホサート濃度を示したのから、グリホサートの推定1日摂取量を算出したところ1.2 µg/kg bw/dayとなった。これは、日本食品安全委員会の定める1日摂取許容量1 mg/kg bw/dayの0.12%未満であり、対象とした日本人小児のグリホサート曝露レベルは、人体に影響を及ぼす程度の量ではないことが示された。

グリホサート、有機リン系殺虫剤(OP)およびピレスロイド系殺虫剤(PYR)の農薬曝露マーカーとして、尿中ジアルキルリン酸類(DAP)、ジメチルリン酸類(DMAP)、ジエチルリン酸類(DEAP)、3-フェノキシ安息香酸(3PBA)、グリホサートを高齢者を対象に測定した。さらに、同じ対象者から便を採取し、便中代謝物類として短さ脂肪酸およびポリアミン類をそれぞれ高感度定量分析した。中央値をカットオフ値として農薬の高濃度曝露群および低濃度曝露群に群分けし、便中代謝物類を比較(マンホイットニー-U検定)したところ、DAPおよびDMAPの高濃度群では便中酢酸(p=0.046)および乳酸濃度(p=0.033)の有意な低下が見られた。一方で、農薬曝露マーカーと便中プロピオン酸、酪酸、吉草酸、コハク酸、ポリアミン類、pHとの関連性は認められなかった。

尿中 DAP 濃度($\mu\text{mol/g creatinine}$)と便中酢酸濃度($r = -0.345$)および乳酸濃度($r = -0.391$)の間に有意な負の相関($p < 0.05$, Spearman の順位相関係数)がみられた。さらに、ステップワイズ重回帰分析(変数増減法)にて、便中酢酸濃度濃度(mg/g)の予測に寄与する説明変数を探索したところ、尿中 DAP 濃度(調整済み $R^2 = 0.751$, $p < 0.001$, $\beta = -24.0$, $SE = 4.9$, $t = -4.9$)および一部の野菜摂取頻度が統計的に有意に検出された。OP 曝露とある種の食事との関連を示唆する報告もあるが、本研究では尿中 DAP 濃度と野菜摂取頻度との間に有意な相関関係は検出されなかった。除草剤と腸内環境との関連も一切検出されなかった。これらの知見は、除草剤であるグリホサートは関連しないが、OP 曝露が独立して便中酢酸レベルの低下と関連し、中高年群の健康リスクに寄与している可能性を示唆するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nomura H, Hamada R, Wada K, Saito I, Nishihara N, Kitahara Y, Watanabe S, Nakane K, Nagata C, Kondo T, Kamijima M, Ueyama J.	4. 巻 242
2. 論文標題 Temporal trend and cross-sectional characterization of urinary concentrations of glyphosate in Japanese children from 2006 to 2015	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Hyg Environ Health	6. 最初と最後の頁 113963
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijheh.2022.113963	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 -

1. 著者名 Nomura Hiroshi, Hamada Risa, Saito Isao, Nakane Kunihiko, Sawa Ritsuko, Ukai Miwa, Shibata Eiji, Sato Mitsuo, Kamijima Michihiro, Ueyama Jun	4. 巻 25
2. 論文標題 Optimization and validation of a highly sensitive method for determining glyphosate in human urine by solid-phase extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry: a methodological study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environmental Health and Preventive Medicine	6. 最初と最後の頁 83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12199-020-00918-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ueyama Jun, Hayashi Mai, Hirayama Masaaki, Nishiwaki Hiroshi, Ito Mikako, Saito Isao, Tsuboi Yoshio, Isobe Tomohiko, Ohno Kinji	4. 巻 20
2. 論文標題 Effects of Pesticide Intake on Gut Microbiota and Metabolites in Healthy Adults	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Environmental Research and Public Health	6. 最初と最後の頁 213～213
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijerph20010213	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 野村 洸司、和田 恵子、齋藤 勲、渡邊 悟、西原 奈波、白石 愛深、藪本 奈那、永田 知里、上島 通浩、上山 純
2. 発表標題 LC-MS/MSを用いた生物学的モニタリング手法による日本人小児のグリホサート曝露レベルの特徴
3. 学会等名 第46回日本医用マスペクトル学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上山純
2. 発表標題 日常的に使用する殺虫剤や忌避剤のばく露を把握する
3. 学会等名 第91回日本衛生学会市民公開講座（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北原 悠吾、野村洸司、浜田梨沙、藤原 有花、斎藤勲、上山純
2. 発表標題 尿中曝露マーカー測定におけるクレアチニン調整希釈法の有用性の検討
3. 学会等名 第91回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ueyama J, Wada K, Nomura H, Nakane K, Nishihara N, Kitahara Y, Watanabe S, Nagata C, Kamijima M, Saito I
2. 発表標題 Temporal trend and cross-sectional characterization of urinary concentrations of glyphosate in Japanese children from 2006 to 2015
3. 学会等名 International society of exposure science annual meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mai Hayashi, Masaaki Hirayama, Nanami Nishihara, Yugo Kitahara, Taka Kondo, Mikako Ito, Kinji Ohno, Jun Ueyama
2. 発表標題 A preliminary study on the effect of pesticide intake on gut microbiota and metabolites in middle-aged and elderly Japanese.
3. 学会等名 International society of exposure science annual meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Exposure substance and Marker Linkage -Pesticide-
<https://c0hbr361.caspio.com/dp/e6b4900034c866ac455643edbde2>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------