

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460799

研究課題名(和文)尿中化学物質の網羅的分析による農薬類曝露マーカーの探索と分析法の開発

研究課題名(英文)Methods for the determination of urinary biomarkers of exposure to pesticides

研究代表者

上山 純(Ueyama, Jun)

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：平成27年度までに測定法を確立した。平成28年度までに職業的農薬類曝露群の尿サンプルを合計90検体、そのコントロール群を74サンプル収集した。また、殺虫剤散布職域従事者の尿サンプルを合計281サンプル収集した。また、健康診断受診者の尿サンプルをコントロールサンプルとして収集を新たに開始している。これらのサンプルを利用して、メタボローム分析とターゲット分析を施した。その結果、メタボローム分析によって5つの農薬類に関連する新規バイオマーカー候補を検出した。また、ネオニコチノイド系およびピレスロイド系殺虫剤の尿中曝露マーカーの検出を可能とした。

研究成果の概要(英文)：We have developed the determination method for urinary metabolites of pesticides. Ninety and 74 urine samples have been collected from farmers and the control group, respectively. The numbers of urine samples obtained from pest control operators were 281. We are collecting a lot of urine samples from general population continuously. These samples have been analyzed by metabolome and chemical-target analysis. Five potential biomarkers have been detected at this time. The exposure biomarker for neonicotinoid and pyrethroid exposure were measured from the collected urine samples.

研究分野：環境分析化学

キーワード：殺虫剤 網羅的解析 ターゲット分析 高感度分析 職業的殺虫剤曝露

1. 研究開始当初の背景

世界中で汎用されている農薬類(殺菌剤、除草剤および殺虫剤等)は、農産物の安定的な市場への提供や衛生害虫の管理に必要な不可欠な物質である。我が国における農薬散布等による急性中毒の事故例は年間10件程度(農林水産省「過去5ヶ年の事故及び被害の発生状況」より)とされているが、近年は慢性的あるいは低用量の農薬等曝露が及ぼす健康影響に関する研究成果が相次いで報告されている。

- 1) Lifetime Pesticide Use and Telomere Shortening among Male Pesticide Applicators in the Agricultural Health Study, Hou et al., Environ Health Perspect. 121: 919-24 (2013) 殺虫剤や除草剤などの農薬の長期的な使用により、テロメア長(buccal cell DNA)が短くなる可能性を示唆している。
- 2) Oxidative stress, hematological and biochemical alterations in farmers exposed to pesticides. Wafa et al., J Environ Sci Health B. 48: 1058-69 (2013) コホート調査によって農業従事者における長期の農薬曝露は、脂質代謝や酸化ストレスの誘導等に起因する血管系疾患と関連していることを示唆。原因となる農薬は同定されていない。

ヒトでのこのような研究成果は、動物実験で問題となる種差の不確定係数を考慮する必要がない点で優れるが、農薬曝露量を農業従事者の薬剤使用履歴等から評価しており、曝露と生体反応との用量反応関係を十分に示し得ていない。しかし、近年、尿中排泄される農薬類やその代謝物の高感度分析法が開発されるようになり、個人の曝露レベルの精密なモニタリングが可能かつ容易になった。そして、生体影響に関する用量反応関係解析の試みが進みつつある。

2. 研究の目的

申請者のこれまでの研究の特色は、尿中農薬代謝物のバイオモニタリング手法を開発し、職域集団および一般生活者集団を対象とした詳細調査を行うことで農薬曝露評価に関する各種問題の顕在化およびその解決に向けた取り組みを積み重ねていることである。具体的には有機リン系殺虫剤(Organophosphorus insecticide, OP)、ピレスロイド系殺虫剤(pyrethroid insecticide, PYR)およびネオニコチノイド系殺虫剤(neonicotinoid insecticide, NEO)の尿中代謝物を高感度測定できる分離分析法を確立し(業績集1, 2, 15)、農業従事者や殺虫剤散布職域従事者を含めた日本人成人の尿中代謝物濃度の分布、季節変動、職域間差および国際間比較を行ってきた(業績集4)。これらの成果はOP, PYRおよびNEOの曝露評価に妥当性と信頼性を付加し、今後の日本人におけるOP, PYRおよびNEOのリスク評価の発展に大きく貢献できるものと思われる。また、日本における農薬使用量が世界的にトップレベルであることも考慮すれば、当該研究は日本が積極的に取り組むべき比較的使用量が多く、有害性に関する情報の蓄積が多いため、申請者はOPおよびPYRに着目して研究を進めてきた。農業従事者や殺虫剤散布職

域従事者が扱う化学物質はOPやPYR以外の殺虫剤、除草剤、殺菌剤、忌避剤、展着剤など多岐におよび、曝露量や曝露した化学物質種に関する情報が少ない場合、前述した研究報告のように生体影響の原因となる農薬の特定が困難となる。今後はこれまでの農薬曝露モニタリング手法に加えて、網羅的に農薬曝露を評価する方法を開発し、農薬類のリスク評価を推進する必要がある。

本研究では下の2点を目的とした。

1) 農業従事者および衛生害虫防除従事者の尿中に特異的に排泄される農薬類やそれらの代謝物を分離分析・質量分析を用いて同定し(メタボロミクス解析)、使用薬剤履歴と併せて解析することで新規の曝露マーカー候補物質を抽出し、動物実験等で有用性を検証すること。

2) 新規および既存の曝露マーカーの系統的高感度測定法の開発し、標準物質がなくとも容易に同定・半定量できるスクリーニングデータベースを構築すること。

3. 研究の方法

農業従事者(n=200 検体)および衛生害虫防除従事者(200 検体)から採取した尿検体を、ガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)を用いて網羅的に尿中有機物を検出しライブラリー検索による同定を行う。この物質情報と農薬あるいは殺虫剤の散布履歴とを照合し、曝露マーカーの候補物質を抽出する。このマーカーの検証作業は、動物実験を用いた代謝試験による曝露マーカーの基本的特徴の把握(抱合体化物等の検索および効率的な検出に向けたサンプル前処理法の検討等)およびケースコントロール調査(ターゲットとする化学物質使用群 vs. 未使用群)にて行う。近年使用量が急増しているネオニコチノイド系殺虫剤の代謝物、文献的に曝露マーカーとして使用歴のある除草剤および殺菌剤有効成分を新規マーカーに加えて、GC-MSおよび液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS/MS)を用いた系統的な同時測定法を開発する。

4. 研究成果

成果1) 代謝物抽出操作手順を以下の6ステップで決定した。NIST AMDISを用いて、デコンボリューションを行い、重なり合ったピークの中からも単一成分のピークを抽出する。MPP ピークアライメント(許容誤差範囲内のピークをまとめて、1つのEntity(化合物)とした。) サンプルのグルーピング。信頼性が低いピークを排除。ID Browserによる化合物推定と登録。視覚的解析(主成分分析、クラスタ分析、SIM クロマトピークの比較)。

衛生害虫防除従事者から得られた尿をいわゆるメタボローム解析を施し、そのうち数名から特徴的な測定結果を示すことが判明

し(図 1)、曝露マーカー候補となる物質を幾つか抽出した(図 2)。

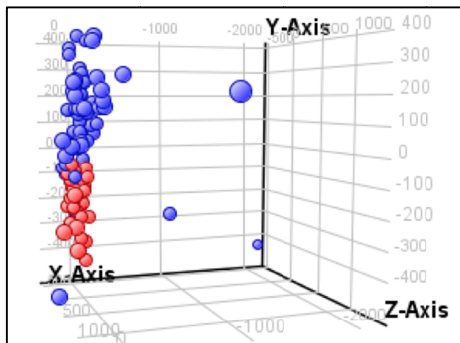


図1. 第3主成分まで考慮した3Dスコアプロットでいくつかのサンプルは特異的な代謝物を有することが判明した。

赤:コントロール群
青:殺虫剤散布作業者

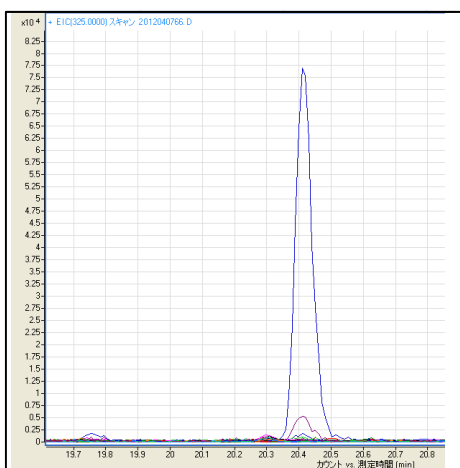


図2. 殺菌剤使用者で特異的に検出された尿中化合物

ライブラリー検索したところこの物質は、PHENOL, 4,4'-METHYLENEBIS[2-(1,1-DIMETHYLETHYL)-6-METHYL-]である可能性が高かった。一部の殺菌剤に似た構造であり、この対象者は採尿前日に殺菌剤類をしようしていたことから、その曝露とこの代謝物の関係があることが予想できた。その他、ベンゾインが他の対象者から検出されるなど、職業を反映した化学物質曝露を顕在化することに成功している。現在は、これらのデータを蓄積して、労働衛生学分野、衛生学分野、法医学分野で利用できるようにデータベースの構築を目指している。

成果 2) ヒト尿中殺虫剤代謝物の高感度検出を行った。職業的に NEOs を散布する機会がある花卉栽培業者(Flower, n=61)および殺虫剤散布職域従事者(PCO, n=50)および職業的に NEOs を使用していない食品配送業者(FD, n=51)の 3 群を対象として、7 種の NEO を対象とした曝露モニタリングを試みた。NEO7 種の総計である NEO の中央値は FD 群で 0.46, PCO 群で 1.24 および Flower 群で 7.52 nmol/g

creatinine、最大値はそれぞれ 124, 78 および 777 nmol/g creatinine であり、尿中 NEO 濃度には幅広い個人間差が見られた。thiamethoxam, dinotefuran および NEO では Flower 群が他の 2 群に比べて有意に高値を示した(いずれも $p < 0.001$)。尿中 NEO の濃度域は各群ともに幅広いことが明らかになり、作業環境や生活環境における NEO 曝露量には大きな個人間差があることを示した。

成果 3) 小さな子どもからも尿サンプルを容易に回収できるように、使用済みオムツから尿を抽出する方法を開発応用した。3 名の 3 歳児から採取した尿を用いてプール尿を作成し、すべての基礎的検討に供した。オムツから有機溶媒を用いて抽出された尿は窒素ガスにて濃縮操作され、ガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)サンプルとして供せるように既報(Bouatra ら、2013)に従って誘導体化などの前処理を施した。Agilent Fiehn ライブラリーを用いて物質の推定および判定量を行った。オムツからの尿抽出に最適な溶媒および pH を最適化し、オムツの種類による分析結果への影響を検討した。オムツからの尿抽出作業には抽出溶媒であるアセトン、ジエチルエーテル、酢酸エチル、tert-ブチルメチルエーテルおよびヘキサンのうちアセトンで最も良好な回収率・再現性が得られた。アセトン中の pH の調整(pH2, 7, 9)により、代謝物の回収率に違いは見られなかった。また、国内で市販されている 6 種類のオムツ(オムツ A-F)を対象に、本分析に最適なオムツを選定した。6 種類のオムツのうち有機酸代謝物分析ではオムツ A が、水溶性物質分析ではオムツ D が安定して検出される物質数が多い結果となった。本研究ではオムツ A および D のうちオムツからのポリマー回収作業の容易さや分析コスト等を考慮し、オムツ A を最適とした。最適条件でのオムツ抽出尿において 181 物質が安定して検出された。回収された代謝物の構成比はおよそアミノ酸代謝物類 45%、芳香族化合物/ステロイド類 6%、糖類 22%、脂肪族化合物類 18%、その他有機酸 10%であった。

本研究で開発したオムツからの尿サンプル抽出法により、GC-MS を用いた尿中代謝物の網羅的分析の可能性が示唆された。オムツを使用した採尿はバイオモニタリングを用いた乳幼児の各種調査の実施に有用であり、疾患バイオマーカーの探索への応用も可能であると考えられる。

成果 4) ラットを用いて殺虫剤アセタミプリドおよび代謝物の血中および尿中動態を検討した。アセタミプリド(acetamiprid, ACE)はネオニコチノイド系殺虫剤の一種で、安定的で効率的な農産物生産に使用されているだけでなく、ガーデニングや林業(松枯れ防除等)にも用いられており、身近な化学物質として生活環境中に存在している。近年、バ

イオモニタリング手法を用いた ACE 曝露評価の試みが進んでいる。すなわち、尿中に排泄される ACE およびその代謝物を定量分析し、曝露量推定を実施するという試みである。ACE 曝露量と尿中排泄量の関係は不明な点もあり、本研究ではラットを用いた ACE およびその代謝物の体内動態、特に尿中排泄動態の把握を目的とした。

ラット(n=6)に ACE を頸静脈内投与および経口投与し(7.1 mg/kg, 2年間慢性毒性/発がん性併合試験の無毒性量 7.1 mg/kg 体重/日を参考)、経時的に採尿および採血を行った。採取検体から ACE および代謝物である desmethyl-ACE (des-ACE) を液体クロマトグラフ 四重極質量分析計、6-Chloronicotinic Acid (6CN) をガスクロマトグラフ 質量分析計で測定し、動態解析を行った。

静脈内投与と実験で得られた ACE の血中半減期 ($t_{1/2}$) は 3.0 ± 0.4 hr であり、血中薬物濃度-時間曲線下面積より生物学的利用率は 82% と算出された。経口投与とされた ACE は 168 時間以内に尿中(mol 換算)に未変化体として約 5%、des-ACE は約 18% および 6CN は約 10% が排泄され、バラツキはそれぞれ 23%、32% および 37% (CV%) であった。投与後の最高尿中濃度時間は ACE 6 hr 以内、des-ACE および 6CN で 6 hr から 12 hr であった。未変化体は代謝物に比べて尿中に排泄される割合は小さいが、排泄量のバラツキが少ないこと、比較的早期に尿中に排泄されるという体内動態の特徴を明らかにした。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 12 件)

Quantitative analysis of organophosphate insecticide metabolites in urine extracted from disposable diapers of toddlers in Japan. Oya N, Ito Y, Hioki K, Asai Y, Aoi A, Sugiura Y, Ueyama J, Oguri T, Kato S, Ebara T, Kamijima M. *Int J Hyg Environ Health*. 2017 220(2 Pt A):209-216. 査読有り

Effects of Paraoxonase 1 gene polymorphisms on organophosphate insecticide metabolism in Japanese pest control workers. Sato H, Ito Y, Ueyama J, Kano Y, Arakawa T, Gotoh M, Kondo T, Sugiura Y, Saito I, Shibata E, Kamijima M. *J Occup Health*. 2016;58(1):56-65 査読有り

Exposure characterization of three major insecticide lines in urine of young children in Japan-neonicotinoids, organophosphates, and pyrethroids. Osaka A, Ueyama J, Kondo T, Nomura H, Sugiura Y, Saito I, Nakane K, Takaishi A, Ogi H, Wakusawa S, Ito Y, Kamijima M. *Environ Res*, 147 巻(頁: 89-96), 2016 年 査読有り

Temporal Levels of Urinary

Neonicotinoid and Dialkylphosphate Concentrations in Japanese Women Between 1994-2011. Ueyama J, Harada KH, Koizumi A, Sugiura Y, Kondo T, Saito I and Kamijima M. *Environ Sci Technol*, 49 巻 24 号(頁: 14522-14528), 2015 年 査読有り

Comparison of different urine pretreatments for biological monitoring of pyrethroid insecticides. Toshima H, Yoshinaga J, Shiraishi H, Ito Y, Kamijima M, Ueyama J. *J Anal Toxicol*, 39 巻 2 号(頁: 133-136), 2015 年 査読有り

Biological Monitoring Method for Urinary Neonicotinoid Insecticides Using LC-MS/MS and Its Application to Japanese Adults. Ueyama J, Nomura H, Kondo T, Saito I, Ito Y, Osaka A, Kamijima M. *J Occup Health*, 56 巻(頁: 461-468), 2015 年 査読有り

Effects of Paraoxonase 1 gene polymorphisms on organophosphate insecticide metabolism in Japanese pest control workers. Sato H, Ito Y, Ueyama J, Kano Y, Arakawa T, Gotoh M, Kondo T, Sugiura Y, Saito I, Shibata E, Kamijima M. *J Occup Health*, 58 巻 1 号(頁: 56-65), 2015 年 査読有り

Lack of contribution of multidrug resistance-associated protein and organic anion-transporting polypeptide to pharmacokinetics of Regorafenib, a novel multi-kinase inhibitor, in rats. Hotta K, Ueyama J, Tatsumi Y, Tsukiyama I, Sugiura Y, Saito H, Matsuura K, Hasegawa T. *Anticancer Res*, 35 巻 9 号(頁: 4681-4689), 2015 年 査読有り

A revised method for determination of serum mercaptalbumin and nonmercaptalbumin by high performance liquid chromatography coupled with post-column bromocresol green reaction. Ueyama J, Ishikawa Y, Kondo T, Motoyama M, Matsumoto H, Matsushita T. *Ann Clin Biochem*. 52 巻(頁: 144-150), 2015 年 査読有り

A revised method for determination of dialkylphosphate levels in human urine by solid-phase extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry: application to human urine samples from Japanese children. Ueyama J, Saito I, Takaishi A, Nomura H, Inoue M, Osaka A, Sugiura Y, Hayashi Y, Wakusawa S, Ogi H, Inuzuka K, Kamijima M, Kondo T. *Environ Health Prev Med*, 19 巻 6 号(頁: 405-413), 2014 年 査読有り

Contribution of plasma proteins, albumin and alpha 1-acid glycoprotein, to pharmacokinetics of a multi-targeted receptor tyrosine kinase inhibitor,

sunitinib, in analbuminemic rats. Toyama Y, Ueyama J, Nomura H, Tsukiyama I, Saito H, Hisada T, Matsuura K, Hasegawa T. Anticancer Res, 34 巻 5 号(頁: 2283-2289), 2014 年 査読有り

A non-invasive biomonitoring method for assessing levels of urinary pyrethroid metabolites in diapered children by gas chromatography-mass spectrometry. Saito S, Ueyama J (This author contributed equally as first author), Kondo T, Saito I, Shibata E, Gotoh M, Nomura H, Wakusawa S, Nakai K, Kamijima M. J Expo Sci Environ Epidemiol, 24 巻 2 号(頁: 200-7), 2014 年 査読有り

〔学会発表〕(計 15 件)

日本人妊婦の尿中ネオニコチノイド系農薬濃度, 飴田 玲伽, 青井 亜里沙, 上山純, 西浜 柚季子, 吉永 淳, 久田 文, 下平 和久, 加藤 進昌, 環境ホルモン学会第 19 回研究発表会, 2016 年 12 月つくば市, 口頭(一般)

ラットを用いた殺虫剤アセタミプリドおよび代謝物の血中および尿中動態, 生田勇太郎, 上山純, 青井亜里沙, 近藤高明, 涌澤伸哉, 伊藤由起, 上島通浩, 齋藤勲, 第 86 回日本衛生学会学術総会, 2016 年 5 月旭川市, ポスター(一般)

使用済みオムツを用いた 1 歳半児における尿中有機リン系殺虫剤曝露量の測定, 大矢奈穂子, 伊藤由起, 日置啓介, 浅井祐哉, 青井愛里沙, 上山純, 小栗朋子, 加藤沙耶香, 榎原毅, 上島通浩, 第 86 回日本衛生学会学術総会, 2016 年 5 月旭川市, ポスター(一般)

尿中有機リン系殺虫剤代謝物測定の個人間変動と施設間差についての検討, 伊藤由起, 上山純, 中山祥嗣, 磯部友彦, 佐藤博貴, 大矢奈穂子, 仲井邦彦, 上島通浩, 第 86 回日本衛生学会学術総会, 2016 年 5 月旭川市, ポスター(一般)

Measurement of concentrations of organophosphate insecticide metabolites in urine extracted from used diapers in 1.5-year-old children, Naoko Oya, Yuki Ito, Keisuke Hioki, Yuya Asai, Arisa Aoi, Yuka Sugiura, Jun Ueyama, Tomoko Oguri, Sayaka Kato, Takeshi Ebara, Michihiro Kamijima, 2nd international conference on human biomonitoring, 2016 年 4 月ドイツベルリン, ポスター(一般) Concentration s of urinary pyrethroid metabolites in Japanese women between 1994-2011, Jun Ueyama, Kouji H Harada, Akio Koizumi, Yutaro Ikuta, Takaaki Kondo, Isao Saito, Michihiro Kamijima, 2nd international conference on human biomonitoring, 2016 年 4 月ドイツベルリン, ポスター(一般) Interlaboratory and intraindividual

variability analysis in measurements of urinary metabolites of organophosphorus insecticides, Yuki Ito, Jun Ueyama, Shoji Nakayama, Tomohiko Isobe, Hirotaka Sato, Naoko Oya, Koichi Yoshimasu, Kanami Tsuno, Nozomi Tatsuta, Kunihiko Nakai, Michihiro Kamijima, 2nd international conference on human biomonitoring, 2016 年 4 月ドイツベルリン, ポスター(一般)

バイオモニタリング手法を用いたネオニコチノイド系殺虫剤の曝露評価, 上山純, 末永隆次郎, 永美大志, 夏川周介, 柴田英治, 近藤高明, 上島通浩, 齋藤勲, 平成 27 年度日本産業衛生学会 東海地方会, 2015 年 10 月名古屋市, 口頭(一般)

有機リン系殺虫剤分解酵素活性と尿中代謝物の関連, 佐藤博貴, 伊藤由紀, 上山純, 加納裕也, 荒川朋弥, 五藤雅博, 近藤高明, 杉浦友香, 齋藤勲, 柴田英治, 上島通浩, 平成 27 年度日本産業衛生学会 東海地方会, 2015 年 10 月名古屋市, 口頭(一般)

使用済みオムツを利用した尿中代謝物一斉分析法の開発, 杉浦友香, 上山純, 上田裕子, 伊藤由起, 涌澤伸哉, 上島通浩, 第 43 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会, 2015 年 10 月知多市, 口頭(一般)

尿中有機リン系殺虫剤代謝物測定の施設間、個人間変動についての検討, 伊藤由起, 上山純, 中山祥嗣, 磯部友彦, 佐藤博貴, 仲井邦彦, 上島通浩, 第 43 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会, 2015 年 10 月知多市, 口頭(一般)

殺虫剤類の個人曝露量測定と健康リスク評価, 上島通浩, 伊藤由起, 上山純, 第 42 回日本毒性学会学術年会 シンポジウム, 2015 年 6 月金沢市, 口頭(一般)

3 歳児における尿中殺虫剤曝露指標の相関関係, 上山純, 大坂彩, 野村洗司, 齋藤勲, 近藤高明, 黄木弘子, 高石亜有子, 伊藤由起, 上島通浩, 第 85 回日本衛生学会学術総会, 2015 年 3 月和歌山市, ポスター(一般)

使い捨てオムツを用いた尿中低分子代謝物類の網羅的分析, 杉浦友香, 上山純, 上田裕子, 涌澤伸哉, 上島通浩, 第 85 回日本衛生学会学術総会, 2015 年 3 月和歌山市, ポスター(一般)

日本人における尿中殺虫剤曝露指標濃度の過去 20 年間の経年推移, 上山純, 原田浩二, 杉浦友香, 大坂彩, 小泉昭夫, 上島通浩, 第 85 回日本衛生学会学術総会, 2015 年 3 月和歌山市, 口頭(一般)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上山純 (UEYAMA Jun)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：00397465

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

近藤高明 (KONDO Takaaki)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00195900
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

(4) 研究協力者

斉藤勲 (SAITO Isao)
当会コープ商品安全検査センター・顧問
研究者番号：なし