

令和元年5月27日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K00559

研究課題名(和文) 亜急性・慢性ネオニコチノイド中毒の診断法の開発と病態発生機序の解明

研究課題名(英文) Development of diagnostic methods for subacute and chronic neonicotinoids intoxication and investigation of the pathogenesis of neonicotinoids intoxication

研究代表者

平 久美子 (Taira, Kumiko)

東京女子医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：10163148

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)：ウサギにネオニコチノイド7種を投与し12-48時間後の尿を採取し、LC-TOF/MSと代謝物のスクリーニングソフトMetabolite Pilotを用い網羅的解析を行い、主要代謝物を見出し市販されていないものについて構造解析と有機合成を行った。LC-ESI/MS/MSを用いた高感度分析法により親化合物7種、内部標準物質7種に加え代謝産物20種の定量が、尿など液体試料と、組織や全血などマトリクスが多い試料で可能となった。この方法を用い、フィールドレベルで随時尿を収集し分析したところ、親化合物とともに、脱メチルアセタミプリド、脱メチルニテンピラム、水酸化イミダクロプリドが定量検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年のネオニコチノイド系殺虫剤の使用増加に伴い、食品や飲料、空気を介したネオニコチノイド系殺虫剤の慢性環境曝露による健康影響、例えば発達障害、記憶障害、振戦、辺縁性脳炎、慢性腎臓病、不整脈、免疫不全、不妊、不育、肥満、乳がんへの懸念が高まっている。曝露の指標としての、ネオニコチノイドの代謝物を抽出し、標準物質を合成し、定量できるようにしたことで、フィールドレベルで、随時尿を用いたネオニコチノイド系殺虫剤7種の曝露評価が可能となった。さらにネオニコチノイド系殺虫剤の全血や組織での定量法も確立することができたので、今後、ネオニコチノイド系殺虫剤の薬物動態や病態生理の研究への貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Seven neonicotinoids were separately administered to female NZ white rabbits; and the urine samples were collected after 12-48 hours. More than 20 metabolites, such as hydroxy-imidacloprid, N-desmethyl-acetamiprid, N-desmethyl-colthianidin, N-desmethyl-nitenpyram, and N-desmethyl-dinotefuran, were qualitatively detected from the urine samples by LC-TOFMS. We synthesized 13 metabolites, which were not commercially available, as standards substances and developed quantitative bioanalytical methods using LC-MS/MS. Then we collected urine samples from the general population, e.g. 46 from three- to six-year-old children in Nagano; 102 from Sri Lankan people, some with chronic kidney disease; and 78 from people in Ghana. The following compounds, imidacloprid, acetamiprid, thiacloprid, nitenpyram, thiamethoxam, clothianidin, dinotefuran, hydroxy-imidacloprid, N-desmethyl-acetamiprid, N-desmethyl-colthianidin, and N-desmethyl-nitenpyram were quantitatively detected from those urine samples.

研究分野：環境医学

キーワード：ネオニコチノイド 殺虫剤 慢性腎臓病 バイオマーカー 尿 記憶障害 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

ネオニコチノイド系殺虫剤(以下ネオニコチノイド)は、1990年代以降、次々と上市された昆虫のニコチン性アセチルコリン受容体に作用する合成化学物質の一群で、現在世界で最も多く用いられている殺虫剤である。2015年の時点で、日本では7種類の有効成分、イミダクロプリド、アセタミプリド、ニテンピラム、チアクロプリド、クロチアニジン、チアメトキサム、ジノテフランが農薬登録されている。

2006年頃から、果物、野菜、茶飲料の連続摂取に伴う中毒の事例が報告されるようになり、患者尿からネオニコチノイド代謝物が検出された[1]。その後2007年から2015年にかけて年間出荷量はアセタミプリドが75tから51t、イミダクロプリドが75tから66t、ニテンピラムが8tから6tに減少したものの、クロチアニジンは51tから75t、チアメトキサムは34tから49t、ジノテフランは153tから167tに増加し、多くの一般人は、常に食品や飲料からの低用量慢性曝露を受けていると推定される。その健康影響を調べるためには、適切な曝露指標物質(バイオマーカー)を見出す必要がある。

バイオマーカー選定にあたり問題となるのは、第一に、ネオニコチノイドが特異的に結合する部位が神経細胞やその他の組織の細胞であるので、組織濃度は血中や尿中の濃度と必ずしも相関しないことである。一般人の農薬曝露モニタリングの標準的媒体は随時尿であるので、慢性曝露で尿中出现しやすい物質を見出す必要がある。第二に、ネオニコチノイドにより腎尿細管障害が生じた場合、尿の濃縮障害のため随時尿中の濃度は低下することである。そのため高感度の分析法が必要とされる。第三に、ネオニコチノイド7種の代謝物は100種類以上あり[1]、大半は市販の標準物質がないことである。過去に中毒症状のある患者の尿から数ppbのN-desmethyl-acetamipridとともに5-hydroxy imidacloprid、N-desmethyl clothianidinが検出されたが、標準物質が入手できず定量できなかった[1]。第四に、生成する代謝物には種差と性差があることである[2]。その差は代謝酵素の活性の違いによるとされているため代謝物の検索にはヒトと代謝が似ている実験動物を用いることが有用である。ウサギはヒトと同様、アルデヒドオキシターゼの活性が比較的強く、毒性の強い還元代謝産物ができやすいかもしれない[3]。

2. 研究の目的

ウサギにネオニコチノイドを投与し、尿を網羅的に分析し、尿中出现する親化合物またはその代謝産物を選別する。

ネオニコチノイド代謝物を委託合成し、得られた代謝物を液体クロマトグラフィ/タンデム質量分析法(LC/MS/MS)により定量分析する方法を確立する。

一般人の随時尿について、ネオニコチノイド及びその代謝物の定量分析を行い、出現率の高いものをバイオマーカー候補とし、健康影響との関連を検討する。

3. 研究の方法

ニュージーランドホワイト(NZW)2か月齢のメス(体重約3kg)に、ニテンピラム(100mg)、クロチアニジン(100mg)、イミダクロプリド(25mg)、アセタミプリド(25mg)、チアメトキサム(50mg)、ジノテフラン(100mg)、チアクロプリド(100mg)を個別に投与し、代謝ケージを用いてその尿を回収した。尿は、アセトニトリル添加および遠心による除タンパク後、LC-TOF/MS(TripleTOF 5600+ System, SCIEX)により分析した。得られたデータをMetabolite Pilot™ソフトウェア(SCIEX)により解析し、代謝物の網羅的スクリーニングを行った。

ウサギ尿のスクリーニングで得られた結果をもとに、市販されていない代謝物の標準物質を東邦大学で合成した。市販品の親化合物7種と代謝物の標準物質と併せて、LC/MS/MSによる定量分析法の確立を目指し、血漿、及び全血、尿、茶葉抽出物からの抽出法の検討を行った。

倫理委員会の承認を得て、フィールドレベルで随時尿を収集し、LC/MS/MSによりネオニコチノイドおよび代謝産物を定量分析した。一部、毛髪も同時に採取し、スイス・ヌーシャテル大学においてネオニコチノイド5種(イミダクロプリド、アセタミプリド、チアメトキサム、

クロチアニジン、チアクロプリド)のLC-ESI/MS/MSによる定量分析を実施した。

4. 研究成果

イミダクロプリドから水酸化物 5-Hydroxy-imidaclopridのほか4-Hydroxy-imidaclopridなど5種が検出された。アセタミプリドからN-desmethyl-acetamipridが検出された。ニテンピラムから脱メチル体ほか6種が検出された。チアクロプリドから水酸化物 4-hydroxy-thiaclopridのほか THI-ole-NHなど5種が検出された。クロチアニジンから親化合物と脱メチル体が同程度検出されたほか脱ニトロ体も検出された。チアメトキサムから親化合物のほかクロチアニジンとその脱メチル体が検出された。ジノテフランから親化合物のほか脱メチル体、脱ニトロ体、Dinotefuran-ureaが確認された。

-1. 新規に代謝物 13 種 (N-acetyl-acetamiprid, N-acetyl-des- methyl-acetamiprid, N-descyano-acetamiprid, N-desmethyl-clothianidin, N-desmethyl-clothianidin urea, N-desnitro-clothianidin, clothianidin urea, N-desmethyl-desnitro-clothianidin, N-desmethyl- dinotefuran, dinotefuran-urea, N-desmethyl-nitenpyram, thiacloprid- amide, N-descyano-dehydro-thiacloprid)が合成された。これら新規代謝物 13 種、市販されている代謝物 6 種 N-desmethyl-acetamiprid、N-desnitro-imidacloprid、N-desmethyl-thiamethoxam、CPF、CPMA、CPMF と、Hypha Discovery社に委託合成した Hydroxy-imidacloprid の計 20 種および内部標準 7 種について、内部標準 7 種を用いた LC-ESI-MS/MS (LC-8040、Shimadzu)を用い、血漿、全血、尿、茶葉、茶飲料の一斉定量分析法を確立した。血漿では、全親化合物と代謝物 10 種、全血では、全親化合物と代謝物 9 種、尿では全親化合物と代謝物 12 種で、70%以上の回収率を得た。定量限界 (以下 LQ) は血漿、尿ともに全化合物で 0.05-2.5 ppb だった。茶抽出物では全親化合物と代謝物 16 種で、50%以上の回収率を得、茶飲料の LQ は 0.05-1.25 ppb、茶葉の LQ は 1.33-33.33 ng/g だった。

-2. 上記の方法を用い、2016 年 5 月に購入した国産茶葉 39 種、ペットボトル緑茶 9 種と、2015 年 12 月にスリランカで購入した住民が日常的に飲用する紅茶の茶葉 30 種を分析した。国産茶葉から全ての親化合物が検出され、最大濃度はジノテフランの 3004 ng/g だった。代謝物は 10 種検出され、検出頻度が高かったのは、Dinotefuran-urea (92%) thiacloprid-amide (89%)、最大濃度は Clothianidin-urea (100 ng/g)だった。

-1. 群馬県内の某診療所に、2012 年 9 月から 2014 年 3 月に受診した患者の随時尿を採取し、イミダクロプリド、アセタミプリド、ニテンピラム、チアクロプリド、チアメトキサム、クロチアニジン、N-desmethyl-acetamiprid を定量した。典型的な症状 (近時記憶障害と手指振戦と 6 つの自覚症状 (頭痛、全身倦怠、動悸または胸痛、腹痛、筋痛または筋脱力または筋攣縮、咳)のうち 5 つ以上を同時に有する典型群 19 人と、前記の症状を幾つか有する非典型群 16 人、前記の症状が全くない無症状群 50 人で比較したところ、N-desmethyl-acetamiprid (定性限界、以下 LOD=0.59ppb)は、典型群で 47.4%、最大 6.0ppb、次いで非典型群で 12.5%、最大 4.4ppb、無症状群で 6.0%、最大 2.2ppb 検出されたが、アセタミプリドは検出さなかった。チアメトキサム (LOD=0.13ppb)は、典型群で 31.6%、最大 1.4ppb と非典型群で 6.3%、最大 1.9ppb でのみ検出された。ニテンピラム (LOD=0.19ppb)は典型群 10.5%、最大 1.2ppb、非典型群 6.3%、LQ 未満、無症状群 2.0%、LQ 未満で検出された。クロチアニジン (LOD=0.24ppb)は、非典型群 6.3%、定量下限未満、無症状群 2.0%、最大 1.6ppb のみで検出された。チアクロプリド (LOD=0.02ppb)は非典型群 6.3%、0.1ppb のみで検出された。典型群で N-desmethyl-acetamiprid 及びチアメトキサムが検出された人の年齢は、それぞれ 5-62 歳、13-62 歳だった。尿中 N-desmethyl-acetamiprid 検出は、典型的症状の有病率上昇と関連していた (オッズ比 14、95%信頼区間 3.5-57)。

-2. 長野県の 3-6 歳の幼児 46 人の早朝尿を 2016 年 5 月、6 月、7 月に 3 回採取し分析した。各月とも N-desmethyl-acetamiprid が 87-93%、最大 18.7 ppb、ジノテフランが 43-54%、最大 72.3 ppb、クロチアニジンが 41-52%、最大 6.0 ppb、チアメトキサムが 28-47%、最大 1.92 ppb、チアクロプリドが 28-33%、最大 0.13 ppb、アセタミプリドが 9-11%、最大 1.34 ppb、ニテンピラムが 0-30%、最大 10.83 ppb が検出された。何も検出されない検体は 5 月の 1 検体のみで、

80%以上の幼児から複数のネオニコチノイドが最大6種類同時に検出された。

-3. 原因不明の慢性尿細管障害(CKDu)の多発が社会問題となっているスリランカにおいて、CKDu多発地域のCKDu患者、CKDu患者の家族、健常者と非多発地域の健常者の随時尿を、殺虫剤散布時期の2015年5月と、非散布時期の同12月に採取し、合計102検体の随時尿を分析した。最大濃度は、チアメトキサム 0.51 ppb、クロチアニジン 0.13 ppb、イミダクロプリド 0.03 ppb、N-desmethyl-nitenpyram 0.128 ppb、4-Hydroxy-imidacloprid 0.10 ppb、N-desmethyl-acetamiprid 0.07 ppb だった。CKDu多発地域において、5月(n=26)と12月(n=27)を比較すると、イミダクロプリド(8検体 vs 1検体、p=0.034)とN-desmethyl-acetamiprid(23検体 vs 15検体、p<0.001)が高率に定性検出された。非多発地域における5月(n=8)と12月(n=31)の比較では、イミダクロプリド(1検体 vs 0検体)、N-desmethyl-acetamiprid(5検体 vs 10検体)ともに有意差がなかった。

-4. 2016年11月に、イタリアのパドバを訪れた23人の非農業従事者の成人ボランティア、M/F=15/8、年齢30代から70代、住所地は欧州17人、その他の地域(北米、オーストラリア、アジア)7人、の早朝尿と毛髪を採取した。毛髪を十分量を採取することができた19検体からの検出率は、チアクロプリド73%、イミダクロプリド68%、アセタミプリド53%、チアメトキサム21%、クロチアニジン16%で、欧州とその他の地域で差がなかった。尿からの検出率は全体的に毛髪より低く、N-desmethyl-acetamipridが2検体、最大0.39 ppb、チアメトキサムが1検体、0.05 ppb 検出された。

-4. ガーナでは重要農産物のカカオに数種のネオニコチノイド使用が認められている。都市近郊のボランティア78人、M/F=19/57、年齢13-80歳の早朝尿を採取し、イミダクロプリド、ジノテフラン、クロチアニジン、チアメトキサム、ニテンピラム、アセタミプリド、N-desmethyl-acetamipridについて分析したところ、アセタミプリドを除きすべて検出された。

引用文献

1. Taira K, Fujioka K, Aoyama Y. PLoS One 2013; 8: e80332
2. Tami L, et al. Toxicol Sci 133(1), 22–28 2013
3. Green T, et al. Toxicol Sci. 2005 Jul;86(1):48-55.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1. Ikenaka Y, Nakayama S, Tohyama C, et al. Exposures of children to neonicotinoids in pine wilt disease control areas. Environ Toxicol Chem. 査読有38(1):71-79. 2019 doi: 10.1002/etc.4316.
2. Ikenaka Y, Fujioka K, Kawakami T, Nakayama MM. S, Taira K, Arizono K, et al. Contamination by neonicotinoid insecticides and their metabolites in Sri Lankan black tea leaves and Japanese green tea leaves. Toxicology Reports 査読有 5, 744–749, 2018 <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.06.008>
3. Marfo JT, Fujioka K, Ikenaka Y, Nakayama SMM, Aoyama Y, Taira K, et al. Relationship between Urinary N-Desmethyl- Acetamiprid and Typical Symptoms including Neurological Findings: A Prevalence Case-Control Study. PLoS ONE 10(11): e0142172. 2015 査読有 doi:10.1371/journal.pone.0142172

〔学会発表〕(計24件)

1. 平久美子. 化学物質過敏症と殺虫剤の環境暴露. 平成30年室内環境学会学術大会、分科会セミナー、東京、東京工業大学大岡山キャンパス、2018
2. John Richard Ponsford, Kumiko Taira. Some Unintended Consequences of Neonicotinoid Insecticides. Society of British Neurological Surgeons and Association of British Neurologists Joint meeting, London, UK, 2018

3. Kumiko Taira, Annual report of TFSP Public Health working group 2017-2018, 11th TFSP Working Meeting, Paris, France, 2018
4. 平久美子. 第45回日本毒性学会学術年会、シンポジウム5、日本中毒学会合同シンポジウム：コリン作動性の中枢・末梢神経毒性の基礎と臨床、ニコチン性アセチルコリン受容体に競合的変調作用を有する浸透性殺虫剤－ヒトの健康と神経発達に対する新たな脅威、大阪、2018
5. Taira K, Kawakami T, Ikenaka Y, Fujioka K, Aoyama Y, Bonmatin JM, et al. Biomarkers of Human Exposure to Neonicotinoid Insecticides— Two Recent International Cooperative Studies —. 第27回日本臨床環境医学会学術集会、津、三重、2018
6. Kumiko Taira, Recent Memory Loss and Human Neonicotinoid Exposure. 2018 Taiwan Scientific Symposium on the Impact of & Alternatives to Systemic Pesticides (2018TSS-IASP), Taipei, Taiwan, 2018
7. Kumiko Taira, Systemic insecticides with neuronal receptor competitive modulator action –an emerging risk for human health and neurodevelopment. International Scientific Symposium on the Impact of and Alternative to Systemic Pesticide, Davao, Philippine, 2018
8. Kumiko Taira, Systemic insecticides with neuronal receptor competitive modulator action: an emerging risk for human health and neurodevelopment, The 1st meeting of the Asia Oceania IUCN Task Force on Systemic Pesticides, TFSP East Asia coordination meeting, Manila, Philippine, 2018
9. 池中良徳、中山翔太、有蘭幸司ら. ネオニコチノイド系殺虫剤のヒト健康影響評価問題点の整理と今後の研究課題. 第27回環境化学討論会, 2018
10. Kumiko Taira, Final report on human health and neonicotinoids project. Review Meeting Task Force on Systemic Pesticide/Public Health Working Group, Padova, Italy, 2017
11. Kumiko Taira, Mini-review of the health effect of neonicotinoids; Final report on human health and neonicotinoids project, Padova University, Review Meeting Task Force on Systemic Pesticide/Public Health Working Group, Padova, Italy, 2017
12. Kumiko Taira, Do neonicotinoid insecticides cause neurodevelopmental disorder by environmental exposure? Symposium on Systemic Pesticides, York University, Toronto, Canada, 2017
13. 一瀬貴大、池中良徳、藤岡一俊、平久美子、中山翔太、有蘭幸司ら. ヒト生体試料を用いたネオニコチノイドおよびネオニコチノイド代謝物の分析方法. 第26回環境化学討論会 2017
14. 平久美子. 人が居住している住宅の床下へのネオニコチノイド系殺虫剤含有防蟻剤の散布は安全か？-事例に学ぶ危険回避への提言-. 日本臨床環境医学会第21回学術集会、東海大学高輪校舎、東京、2017
15. Kumiko Taira, May neonicotinoid insecticides cause neurodevelopmental disorder by environmental exposure? The 10th Annual World Congress on Pediatrics, Pediatric Gastroenterology and Nutrition, Orland, US, 2017
16. 平久美子, Neonicotinoids and Human Health: Our Strategy, The Task Force on Systemic Pesticides Working Meeting 2016, Padova University, Padova, Italy, 2016
17. 池中良徳、藤岡一俊、平久美子、中山翔太、有蘭幸司、加藤恵介、川上智規ら. ヒト尿中のネオニコチノイドおよびその代謝産物の分析法の確立とヒトへの曝露評価, 第25回環境化学討論会, 2016
18. 池中良徳ら. ヒト尿中ネオニコチノイドおよびその代謝産物の高感度分析による曝露実態の解明, 第43回日本毒性学会学術年会, 2016
19. Kumiko Taira, Human Health Impacts of Exposure to Neonicotinoid Insecticides: Recent Memory Loss and Neo-nicotinic Symptoms, Post-Neonics What Next ? Symposium, 早稲田大学、東京 2016
20. Ikenaka Y, Neonicotinoid metabolism in experimental animals and humans. Post-Neonics What Next ? Symposium, 早稲田大学、東京 2016
21. Kumiko Taira. Human health impacts of exposure to neonicotinoid insecticides: recent memory loss and human neonicotinoid symptoms. Symposium on impacts of and alternatives to systemic pesticides: a science-policy forum with Philippine and International Researchers, De La Salle University, Manila, Philippine, 2016

22. Kumiko Taira. Human health impacts of exposure to neonicotinoid insecticides: recent memory loss and human neonicotinoid exposure. Symposium on impacts of and alternatives to systemic pesticides: a science-policy forum, York University, Toronto, Canada, 2016
23. Kumiko Taira, Human health impacts of exposure to neonicotinoid insecticides: recent memory loss and human neonicotinoid exposure. Symposium on impacts of and alternatives to systemic pesticides: a science-policy forum, Montreal University, Montreal, Canada, 2016
24. 平久美子. ネオニコチノイド系殺虫剤環境暴露と近時記憶障害. 日本毒性学会, 金沢, 2015

〔図書〕(計1件)

ネオニコチノイド研究会. 日本の農薬登録制度：その仕組みと背景、問題点. 一般社団法人アクト・ビヨンド・トラスト 発行. 2017.3.1 電子出版

https://www.actbeyondtrust.org/wp-content/uploads/2017/02/Pesticide_Laws.pdf

〔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 なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：池中良徳

ローマ字氏名：IKENAKA, yoshinori

所属研究機関名：北海道大学

部局名：獣医学研究院

職名：准教授

研究者番号(8桁)：40543509

研究分担者氏名：中山翔太

ローマ字氏名：NAKAYAMA, shota

所属研究機関名：北海道大学

部局名：獣医学研究院

職名：助教

研究者番号(8桁)：90647629

(2)研究協力者

研究協力者氏名：小森万希子

ローマ字氏名：KOMORI, makiko

研究協力者氏名：藤岡一俊

ローマ字氏名：FUJIOKA, kazutoshi

研究協力者：川上智規

ローマ字氏名：KAWAKAMI, tomonori

研究協力者：有園幸司

ローマ字氏名：ARIZONO, kouji