

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580200

研究課題名(和文) 養殖魚のポジティブリスト制対応型農薬残留リスク監視技法の開発

研究課題名(英文) Developing the positive list-responsive techniques for monitoring the risk of pesticide residues in farmed fish

研究代表者

舞田 正志(MAITA MASASHI)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・教授

研究者番号：60238839

研究成果の概要(和文)：平成18年5月にポジティブリスト制が導入されて以降、生産者の意図しない農薬の残留リスクをどのようにモニタリングするかが重要な課題となっている。本研究では、魚類の農薬曝露に対する生物学的反応を利用した、安価で簡便な農薬類曝露履歴監視システムの構築を目指した。その結果、MDR1タンパク質がティラピアにおいて有機塩素系農薬の残留をモニタリングする上でのバイオマーカーとなりうる可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Since enforcement of positive list system on May 2006, how to monitor the unexpected contamination of pesticide has been an important issue. Here, we tried to develop the simple and moderate system to monitor the pesticide residues using the biological response in farmed fish. In this study, we found the possibility that the level of MDR1 protein was the potential biomarker to monitor organochlorine pesticide residues in tilapia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：ポジティブリスト制, 農薬残留, 薬物代謝酵素

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 食品の安全性確保は我が国のみならず世界的に重要性が増してきている。特に、養殖魚は食のグローバル化を背景に輸入生産物が増加しつつある一方で、安全性を新たな付加価値として国内生産養殖魚の輸出増大を目指した国の施策がなされているところである。そのため、より一層の養殖魚生産における安全性の確保が求められている。我が国では、食品中に残留する有害化学物質について、平成18年5月にポジティブリスト制

が導入され、全ての農薬類に残留基準が設定されたことにより、動物用医薬品のみならず、水産養殖では使用されることがない農薬についても残留の管理を行う必要が生じている。食品安全性の確保・監視にあたっては、適切なモニタリングが不可欠である。厚生労働省は農薬の残留分析では、LC-MSやGC-MSによる通知試験法を公表しているが、分析費用が高価であり、検査機関において検出感度が低いことやカラムの寿命が短いなどの問題が発生し、十分なモニタリングが実施しに

くい状況にある。そのため、より簡便で安価なモニタリング法を開発し、農薬残留リスクをスクリーニングする必要がある。

(2) 平成 18 年 5 月に導入されたポジティブリスト制では、残留についてはこれまで配慮されてこなかった農薬についても残留基準が設定された。既に輸入養殖ウナギから殺菌剤エンドスルファンの残留が検出されている。厚生労働省は水産物について農薬の残留検査を義務付けてはいないが、このような事件が報道されると、養殖生産者は農薬の残留についても残留検査の実施を求められることになる。また、風評被害が起こることが多い。農薬は、養殖生産の過程で養殖魚の疾病対策として直接使用されることはない。しかし、生産者が農薬を使用していないことが明らかでない場合でも、例えば、大雨などによる農地やゴルフ場からの河川への流出や飼・餌料の汚染による経口的な蓄積は、生産者の意図しない生産物への農薬の蓄積を引き起こす可能性がある。このような生産者が意図しない残留は、我が国の養殖カンパチでロイコマラカイドグリーンが残留した事件で十分起こりえることが実証されている。EU は、加盟国に輸入される水産物に対して農薬類のモニタリング検査を義務付けるとともに、生産段階での適切なリスク管理を求めている。国産養殖魚の安全性確保や輸入養殖魚の違反による風評被害防止、さらには、国産養殖魚の輸出振興を図るためには、農薬の残留検査に伴うコストを削減するとともに、安全性の確保においては十分な監視がなされていることを保証するシステムを確立することが緊急の課題である。

(3) 農薬の残留分析は、LC-MS や GC-MS などの機器分析による方法が一般的であるが、その前処理に手間がかかり、質量分析装置が高額な機器であるため、モニタリングを頻繁に行うことは難しい。その問題を解決する方法として、曝露を受ける宿主側の薬物代謝酵素群の遺伝子発現を残留モニタリング指標として利用することを考えた。農薬の曝露と魚類の薬物代謝酵素 CYPs の mRNA 発現に関する研究は数多く行われており、例えば、多くの化学物質の曝露で発現する P450 ファミリーは CYP1A1 であり、有機塩素系農薬では CYP2A の発現が有用な指標になること、また、近年、CYP3A サブファミリーの発現が農薬への曝露によって誘導されるなどの報告がある。このように、魚類における農薬への曝露と薬物代謝酵素群の発現に関する研究は、主として、環境汚染のバイオマーカーの確立を目的として行われているため定性的なもので、定量性が求められる残留モニタリング法への応用を念頭においたものは皆無である。残留モ

ニタリングの指標として遺伝子発現量を応用するためには、農薬に曝露した魚類の薬物代謝酵素群の発現を定量的に測定し、農薬の体内濃度の経時変化との関係を明らかにすることが必要である。

## 2. 研究の目的

(1) 農薬などの有害化学物質の曝露を受けた魚類では、シトクローム P450 (CYP) などの薬物代謝酵素の誘導が起こるが、このような生体反応を、遺伝子の発現量を定量的に測定し、農薬の体内動態との関連性を明らかにすることで、農薬の残留リスクをモニタリングする手法を確立することが本研究の目的である。本研究は、ポジティブリスト制に対応する養殖魚における農薬残留リスク管理に欠かせない残留監視体制を構築することにつながる。

(2) いくつかの系統の農薬に曝露した魚類の肝臓における薬物代謝関連遺伝子の発現をリアルタイム PCR で経時的にモニタリングして、その発現上昇あるいは抑制パターンを調べることで、農薬への曝露履歴や系統の識別に有効なパラメーターの選定を行うとともに、農薬残留量を定量する。それらの結果を解析することで、機器分析をする必要があるか否かを判断する基準を策定する。このことよって、モニタリング頻度を増やし、機器分析の負荷を低減することができるので、農薬の残留リスク管理がより確実なものとなる。

(3) 遺伝子の発現と実際のタンパク質の合成にはタイムラグがあるので、農薬の代謝に関連する遺伝子発現量や発現パターンと農薬の薬物動態学的解析を組み合わせ、農薬が残留している間は有意に発現量が増加または減少している遺伝子をマーカーとして、農薬の残留検査を行うべきか否かを判断することができるような農薬曝露監視システムの構築に必要な基礎的知見を得ることが可能であるという着想のもとに本研究を遂行する。このような研究は、文献検索の結果では他に見つかっておらず、本研究の独創的なところである。

## 3. 研究の方法

(1) ティラピアを様々な濃度の有機リン系農薬マラチオンまたは有機塩素系農薬エンドスルファンでそれぞれ曝露し、経時的に供試魚を取り上げ、肝臓および筋肉を採取した。採取された組織は、RNA later (Ambion) および -80°C で以降の解析まで保存した。

(2) 採取した肝臓および筋肉からtotal RNAを抽出し、HighCapacity RNA to cDNA kit (Applied Biosystem) により第1鎖cDNAを合成した。合成したcDNAを鋳型として、Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystem) を用いたリアルタイムPCR法により薬物代謝酵素遺伝子の発現量を定量した。内部標準には ribosomal protein L32 ( GenBank : AB307036) を用い、比較C<sub>T</sub>法により相対発現量を求めた。

(3) 農薬曝露により発現量に変化する遺伝子を PCR-Select cDNA Subtraction Kit (Clontech) を用いて SSH (Suppression subtractive hybridization) 法により網羅的にスクリーニングした。2次スクリーニングはディファレンシャルスクリーニング法により行った。得られた陽性クローンの塩基配列を決定し、BLASTにより相同性検索を行った。

(4) Cooper *et al.* (1996) の方法に従い、組織からタンパク質を抽出した。BCA法によりタンパク質の濃度を測定し、20 μg を SDS-PAGE により電気泳動した。泳動後、セミドライ法により PVDF 膜に転写し、0.3% スキムミルクによるブロッキング後、Monoclonal Antibody to P-glycoprotein (C219) (Alexis Biochemicals) を一晩反応させた。検出には ECL-Plus (GEヘルスケア) を用い、FLA-900 (Fujifilm) で解析した。定量は ImageJ 1.44 (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) を用いて行った。

(5) 農薬残留量の測定は、ELISA法またはガスクロマトグラフィーの外部委託により行った。

#### 4. 研究成果

(1) ゼブラフィッシュを2.0 ppmの有機リン系農薬マラチオンで3時間曝露した後、経時的にサンプリングし、薬物代謝酵素遺伝子の相対発現量をリアルタイムPCRにより解析した。その結果、CYP2A, CYP3A, UGT, PXR, MDR1の発現量が経時的または一時的に増加または減少傾向を示した。また、いくつかの曝露パターンで上記の遺伝子の発現量を解析したところ、肝臓においてはCYP3A, PXR, MDR1が、筋肉においてはPXR, MDR1遺伝子が、曝露条件により異なる発現パターンを示した。さらに、PXRとMDR1の変動が類似していたことから、この2遺伝子を有力なバイオマーカー候補として選定した。しかしながら、ゼブラフィッシュは魚体が小さいため、実際の体内濃度を測定することが困難であり、MDR1, PXR 遺伝子の発現量と農薬の体内濃度との相

関を明らかにすることはできなかった。

(2) 15 ± 5 gのティラピアを1.0 ppmのマラチオンで3時間または24時間浸漬曝露し、曝露時間の違いによるMDR1およびPXR遺伝子の発現の変動をリアルタイムPCR法により解析した。その結果、曝露時間が長いほどMDR1およびPXRの発現が上昇する傾向が見られ、農薬の体内濃度に影響を受けて変動している可能性が示唆されたが、個体差も大きかった。またPXR遺伝子の発現は微増であり、農薬残留のバイオマーカーとして十分な感度とはいえなかった。

次に、1.0 ppmのマラチオンを添加した飼料を、総魚体重の1.5%程度ティラピアに単回経口投与し、3時間、1, 2, 3, 4, 8, 12, 16日後の肝臓および筋肉でのMDR1遺伝子の発現を解析した。その結果、浸漬曝露に比べてMDR1の発現量が高い傾向を示したが、個体差も非常に大きかった。

そこで、マラチオンの体内濃度との相関を検討するため、MDR1遺伝子の発現が高い個体と低い個体をそれぞれプールし、ガスクロマトグラフィーでマラチオンの残留量を測定したが、検出限界(0.01 ppm)以下であった。

確実に体内に残留すると考えられる20.0 ppm相当のマラチオンを飼料に添加して55 ± 5 gのティラピアに16日間経口投与し、1, 2, 4, 8, 16日後にサンプリングし、魚体中のマラチオン濃度を定量した。その結果、全ての試料においてマラチオンは検出限界を下回った。リアルタイムPCR法によるMDR1遺伝子のmRNA量およびウェスタンブロット法によるMDR1タンパク質の定量を行ったが、いずれも有意な上昇は見られなかった。このことから、ティラピアではマラチオンの消失が早く、素早く代謝され排出されてしまうことが考えられた。

したがって、MDR1は少なくともマラチオンの曝露履歴のマーカーにはならず、マラチオンをはじめとする有機リン系農薬の曝露履歴マーカーを新たに探索し直す必要性が生じた。

(3) (2)の結果を受け、ゼブラフィッシュにおいて、マラチオンの曝露を受けた区と、非曝露区間で発現に差のある遺伝子をSSH法により網羅的にスクリーニングした。しかし、単離された遺伝子は、SSHに用いたサンプルにおいては有意な発現変動を示したが、新たに曝露した別個体のサンプルでは再現できなかった。

(4) 65 ± 5 gのティラピアに10 ppmおよび50 ppmのエンドスルファンを含む飼料を魚体重の1.5%程度、1日1回3日間連続投与し、給餌3日目から24時間後と48時間後に肝臓

と筋肉をサンプリングした。

MDR1 遺伝子の発現量を測定したところ、48 時間後の筋肉において、エンドスルファンの曝露濃度に依存して発現量が増加する傾向が見られた。ガスクロマトグラフィーによりエンドスルファンの残留量を分析したところ、10 ppm の曝露区ではエンドスルファンは検出されず、代謝物であるエンドスルファンスルフェートのみが検出され、50 ppm の曝露区ではエンドスルファンと、エンドスルファンスルフェートの両方が検出された。なお、24 時間後と 48 時間後では検出濃度に差は見られなかった。ウェスタンブロット法により MDR1 タンパク質量を測定したところ、魚体内のエンドスルファンおよび代謝物エンドスルファンスルフェートの両方に高い相関を示した (図 1)。

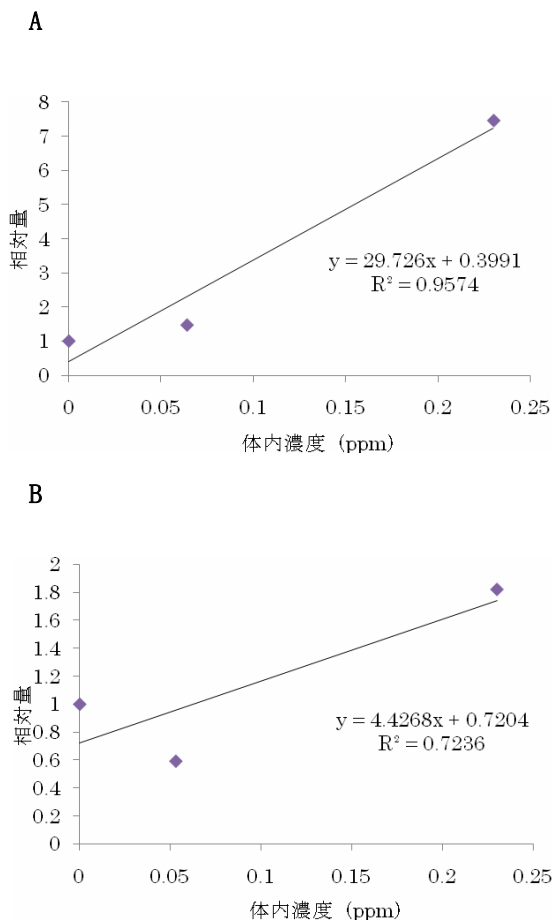


図 1 MDR1 タンパク質量と筋肉中エンドスルファンスルフェート濃度の相関性。(A) 24 時間後。(B) 48 時間後。

以上の結果から、MDR1 タンパク質は、魚体内の有機塩素系農薬の残留をモニタリングする上でのバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。また、本研究では、現在残留規制されていないエンドスルファンスル

フェートの残留が親化合物であるエンドスルファンよりも長いことも明らかとなった。エンドスルファンスルフェートの毒性評価に関する報告は極めて少なく、今後危険性が明らかになった場合、本研究でのモニタリング手法が重要となってくる。

なお、MDR1 は、筋肉でダイナミックな発現変動を見せたが、発現量自体は肝臓に比べて低かった。このことから MDR1 は、通常時は筋肉での発現量は肝臓に比べて少ないが、農薬曝露時のみに顕著な発現上昇を示すと考えられる。このような傾向は偽陽性が少ないため、農薬曝露のバイオマーカーとして非常に有用であるといえる。

(6) 本研究において、低濃度での曝露試験では、高濃度での曝露試験に比べ MDR1 遺伝子の発現量の個体差が大きくなる傾向にあった。このことから、農薬が魚体に残留しない程度の被曝状態の場合に個体差が出やすく、結果がばらつくことが推測された。

そこで今後は、高濃度曝露を受け実際に農薬が体内に残留している個体と、非曝露区間のサンプルを用いて SSH を行うことで、農薬残留時に真に高発現し、なおかつその変動の再現性が高い遺伝子を探索することが課題となる。このようなバイオマーカー候補を複数選抜し、それらの発現変動を一度に解析できるシステムを作ることで、より精度の高い曝露履歴の監視が可能となる。

また、選定した遺伝子の特性に応じて、血液検査やタンパクレベルでの変動解析に応用できることが理想的である。今回は相対定量を行ったが、今後は ELISA を応用した絶対定量も視野に入れ、タンパク定量の精度を向上させる必要がある。

なお本研究では、曝露条件や曝露農薬の種類により MDR1 遺伝子の発現パターンに様々な違いが見られた。MDR1 遺伝子の一塩基多型により発現量が影響を受けるという報告もあり (植田, 2005)、発現の個体差が薬物の消化吸収性を左右する可能性が考えられる。今後は以上のようなことを踏まえ、農薬類曝露履歴監視システムの精度を高めていく必要がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Kunihiro Futami, Search for biomarkers to monitor the pesticide residues in fish, JSPS-NRCT International Symposium Joint Seminar 2009 in Fisheries Science, 2009 年 12 月 14 日,

Rayong Province in Thailand

- ② 橋本明菜, 養殖魚の農薬残留モニタリングのための指標の検索, 日本水産学会秋季大会, 2009年10月1日, 岩手県民情報交流センター・アリーナ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

舞田 正志 (MAITA MASASHI)  
東京海洋大学・海洋科学技術研究科・教授  
研究者番号: 60238839

(2) 研究分担者

片桐 孝之 (KATAGIRI TAKAYUKI)  
東京海洋大学・海洋科学技術研究科・助教  
研究者番号: 50361811  
二見 邦彦 (FUTAMI KUNIHICO)  
東京海洋大学・海洋科学技術研究科・助教  
研究者番号: 00513459

(3) 連携研究者 なし