

令和 2 年 11 月 25 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15852

研究課題名（和文）有機リン系殺虫剤の尿中マーカーガイドライン値設定 - リスク評価のパラダイムシフト -

研究課題名（英文）Examination of the guidance value using urinary biomarker for organophosphorus pesticides - Paradigm shift in risk assessment -

研究代表者

佐藤 博貴 (SATO, Hirotaka)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70775965

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：わが国における有機リン系殺虫剤（OP）のリスク評価は使用量や摂取量に基づく推定値が用いられており、実際に体内に入った農薬量の分析によるリスク管理は行われていない。EUなどでは生物学的モニタリング（BM）指標としてOP尿中代謝物が用いられているが、一般集団における分布より算出した参照値による評価に留まっている。そこで、我々はラットにOPを2週間にわたり経口投与し、神経影響の指標であるアセチルコリンエステラーゼ活性の抑制に対応する尿中代謝物量の算出を試みることで、健康影響に基づいたOPのBM指標の検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、衛生害虫の駆除などで広く使用されている有機リン系殺虫剤について、体内への取り込みによる健康影響に対応した尿中の代謝物量を動物実験によって明らかにした。実験に使用した2種類の薬剤について、薬剤ごとに尿中代謝物を用いたリスク評価を行うことは可能であることが示唆された。しかし、尿中代謝物の排泄率が薬剤間で異なることから、実際の評価値として利用するためには、さらなる検討が必要と考えられた。

研究成果の概要（英文）：To date, the risk assessment of organophosphate pesticide (OP) in Japan has been performed by estimated value based on the amount of usage or intake in Japan, although urinary OP metabolite was not used. EU uses urinary OP metabolites as the biomonitoring (BM) index, while guidance values are based on the distribution of urinary OP metabolites in general population was only used. To clarify the association between health effect and urinary OP metabolite, rats were orally administered OPs for 10 days with a 2-day interruption after the first 5 days in this study. The amount of urinary OP metabolite corresponding to the 20% inhibition of ChE activity was elucidated.

研究分野：労働衛生

キーワード：有機リン系殺虫剤 尿中代謝物 生物学的モニタリング ベンチマークドーズ 労働衛生 ガイドライン値 バイオマーカー コリンエステラーゼ

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、研究者個人に帰属されます。

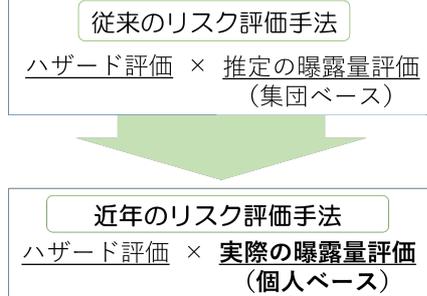
様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

農薬のリスク評価では、高用量曝露による急性中毒と、低用量曝露による慢性影響についてそれぞれ検討することが重要である。環境影響評価では、動物実験で得られた最大無毒性用量 (NOAEL) から設定されたヒト基準値と、摂取経路などから推定される曝露量とを比較する方法がとられている。しかし、この手法では吸収や代謝の個人差を NOAEL に定数 (不確実係数という) を除することで一律に評価するため、個人にあわせて曝露量を検証しリスクを正確に評価することは極めて難しい。

わが国では 1980 年代に職域化学物質の一部に生物学的モニタリング (BM) 指標が導入され、世界に先駆け個人曝露量を評価する取り組みが始まった。しかし、その後は対象物質の範囲が増えず、農薬については適用そのものがない。一方、海外では BM で個人の曝露量評価をすることが潮流となってきた (Den Hond et al, 2015)。特に EU では、2014 年より始まった科学技術・イノベーション政策において BM 情報をデータベース化するプロジェクトが提案された。このような背景から、わが国は世界標準のリスク評価および管理手法 (右図) に乗り遅れてしまう懸念がある。

化学物質リスク評価のパラダイムシフト



わが国では、一般生活環境における低用量曝露には急性参照用量 (ARfD; 24 時間以内に有害影響を及ぼさない量) や、一日許容摂取量 (ADI; 一生涯に有害影響を及ぼさない量) が設定され、有害な影響が予防されている。EU では、新しい概念として作業者が健康に有害な影響を受けない最大量を示した作業者曝露許容量 (AOEL) が設定され、職域でのリスク管理がなされつつある。これらの指標は使用量や摂取量に基づく推定値であり、実際に体内に入った農薬量の分析によるリスク管理はわが国では行われていない。近年では一般環境中に有機リン系殺虫剤 (OP) が検出され、神経発達障害との関連について報告されていることから、BM に基づく OP の個人リスク評価システムの構築は緊急の課題である。

OP は体内で分解され一部がジアルキルリン酸 (DAP) として尿中に排泄される。したがって OP の NOAEL (または最小毒性用量; LOAEL) に対応する尿中 DAP 量 ($\mu\text{g/g cre}$) のガイドライン値 (リスク予防のための基準値) を設定することができれば、個人の曝露量を反映し、健康影響も考慮した形でのリスク管理手法の提案が可能となるはずである。

2. 研究の目的

本研究では、以下の 3 点を目的とした。

- (1) OP の健康リスク評価に利用できる BM 参照値 (ガイドライン値) を設定するために動物実験を行い、OP 投与量と尿中代謝物量及び生体影響の用量反応関係を解明する。
- (2) 動物とヒトとの間の不確実係数を用いてガイドライン値を算出する。
- (3) OP を散布する職域集団で健康調査と曝露量調査を行い、算出された値を実際に適用してリスク評価を行う。

3. 研究の方法

本研究は、名古屋市立大学動物実験規程に基づく承認後 (H28M-43) に行った。

OP のジクロルボス (DDVP) およびフェニトロチオン (FNT) の投与用量を検討するため、予備実験を行った。10 週齢の雄性 Wistar ラット 4 匹を 1 週間馴化させ、濃度段階別に 4 群に分けて強制経口投与実験を行った。5 日間を 1 クールとして、2 日間の休薬期間を挟み、2 クールを実施した (合計 12 日間)。最終投与後に代謝ケージにラットを移し、6 時間後・12 時間後・24 時間後の各時点尿を採集した。尿試料は -80 で保管した。採尿終了後、ペントバルビタール下に大動脈採血を行い安楽死させ、血液・脳・肝臓を採取した。

保管した尿試料については、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた測定法により (Ueyama et al, 2010)、DDVP ではジメチルリン酸 (DMP) を、FNT では DMP とジメチルチオリン酸 (DMTP) を、それぞれの尿中代謝物として測定した。尿中代謝物濃度が検出下限値 (LOD) 未満の場合には LOD の $1/2$ を代入し解析した。

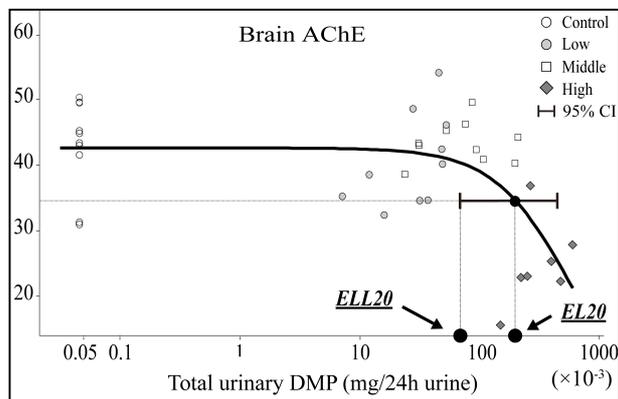
血液についてはエルマン試薬を用いた Voss and Sachsse (1970) の変法により、解剖後速やかに赤血球および血漿中のコリンエステラーゼ (ChE) 活性を測定した。脳については -80 で保管し、後日に ChE 活性を測定した。

予備実験の結果から、設定用量段階中に NOAEL と LOAEL が含まれていることが確認できた。DDVP、FNT とともに 0 (control)、0.2 (low)、1.0 (middle) および 5.0 (high) mg/kg/day が投与用量として設定された。本実験として、40 匹の雄性 Wistar ラットを各群 10 匹に群分けし、予備実験と同様の手順で連続強制経口投与および生体試料の分析を行った。

得られたデータより、ChE 活性をアウトカムとして、ベンチマークドーズ (BMD) 法を用いて OP 投与量との関係を求めた。ChE 活性が 20% 抑制された場合を健康影響ありとし、ベンチマークレスポンスを 20% とした場合の BMD (BMD₂₀) を求め、BMD₂₀ の 95% 信頼区間下限値を BMDL₂₀ と

した。また、非線形モデル解析により ChE 活性と尿中の DMP およびジメチル系代謝物の総和 (DMAP) との関連を、それぞれの OP 別に解析した。ChE 活性の 20% 抑制に対応する尿中代謝物量を Exposure Limit (EL20) とし、EL20 の 95% 信頼区間下限値を ELL20 と新たに定義した (右図)。

DDVP、FNT それぞれについて新たに設定された ELL20 と、従来の評価指標である NOAEL や BMDL₂₀ の値とを比較し、その妥当性について確認した。



4. 研究成果

(1) OP 投与量による ChE 活性への影響

各 ChE 活性をアウトカムとして、Dunnett の多重比較法により、各 OP 投与群の control 群に対する統計学的有意差を確認した。その結果、ChE 活性の NOAEL (mg/kg/day) は、脳・赤血球・血漿の順に、DDVP では 1.0・1.0・1.0、FNT では 1.0・1.0・0.2 となった。また、BMDL₂₀ (mg/kg/day) については、同様に DDVP で 2.2・0.8・0.3、FNT で 2.1・1.3・0.7 と推定された。

両薬剤ともに high 群の ChE 活性は、脳よりも赤血球のほうが強く阻害されていた。脳血液関門による保護作用があったと考えられた。

(2) OP 投与量と尿中代謝物量

DDVP の代謝物である DMP の 24 時間尿中量 (nmol/day) は、control、low、middle、high 群の順にそれぞれ、LOD 未満、259、717、2647 となった。FNT については DMAP の 24 時間尿中量を評価したところ、同様にそれぞれ LOD 未満、140、261、1105 であった。DDVP および FNT ともに、投与用量と尿中代謝物量の間には量 - 反応関係を認めた。

また、尿採集開始前の最終投与量に対する 24 時間尿中排泄率 (%) は、low、middle、high 群ごとに、DDVP でそれぞれ 99、63、40、FNT でそれぞれ 52、29、16 となった。両薬剤とも用量依存的に排泄率が低下する傾向にあり、OP 投与量による代謝経路への変化が起きているのか、連続投与による代謝能の疲弊が起きているのか、確認する必要性が示唆された。

(3) ChE 活性を考慮した尿中代謝物指標

各薬剤の ELL20 (nmol/day) は、DDVP・FNT について、各 ChE 活性に対してそれぞれ 1156・261 (脳)、481・262 (赤血球)、735・315 (血漿) となった。尿中代謝物量の実測値は DDVP よりも FNT のほうが小さい値であったため、ELL20 の推定値についても同様の結果になったと考えられた。

OP 投与用量と尿中代謝物量の関係から換算式を求め、得られた ELL20 を OP 投与用量へ換算したところ、換算値 (mg/kg/day) は、DDVP・FNT において、それぞれ 2.0・1.1 (脳)、0.7・1.1 (赤血球)、1.2・1.5 (血漿) となった。

(4) ELL20 の妥当性

ELL20 より換算した OP 投与用量と、NOAEL および BMDL₂₀ の比較を行った。各 ChE において、3 つの手法間で推定された値は、ほぼ同様の値を示した。一方、2 つの薬剤間で尿中代謝物量の排泄率に差があることから、ELL20 についても同様に差を認めたと考えられた。薬剤間で評価値が大きく異なる可能性が示唆されたことに加え、実際の現場では複合曝露が起きていると考えられるため、さらなる検討が必要である。

(5) まとめ

本研究では 2 種類の OP について、健康影響を考慮した尿中代謝物量の評価値を推定した。実際にヒトに用いるガイドライン値を設定し、ヒト集団において検証を行うためには、OP 投与による代謝経路への影響や代謝能の変化について、さらに確認していく必要があることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 7 件)

1. [Hirota Sato](#), Yuki Ito, Ikumi Bundo, Chinami Hanai, Masaya Nishimura, Jun Ueyama, Michihiro Kamijima. Nonlinear model analyses of urinary metabolite levels of organophosphate pesticides corresponding to cholinesterase activity inhibition in rats. The ISES ISIAQ 2019 Joint Annual Meeting. 2019 年 8 月 18 日 ~ 8 月 22 日 Zalgoris Arena, Kaunas (Lithuania)

2. 佐藤博貴、伊藤由起、文堂生深、花井ちなみ、西村正也、上山純、上島通浩. 有機リン系殺虫剤の健康影響を考慮した尿中代謝物の曝露基準値の検討. 第92回日本産業衛生学会 2019年5月22日~25日 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)
3. 佐藤博貴、伊藤由起、文堂生深、花井ちなみ、西村正也、上山純、上島通浩. 非線形回帰モデルによる有機リン系殺虫剤尿中代謝物のリスク評価 - 急性毒性の異なる薬剤間での比較検討 -. 第46回産業中毒・生物学的モニタリング研究会 2018年11月30日~12月1日 北九州市国際会議場(福岡県・北九州市)
4. Hiroataka Sato, Yuki Ito, Chinami Hanai, Masaya Nishimura, Jun Ueyama, Michihiro Kamijima. Non-linear model analysis of the relationship between cholinesterase activities in rats exposed to 2, 2-dichlorovinyl dimethylphosphate and its metabolite concentrations in urine. The ISES-ISEE 2018 Joint Annual Meeting. 2018年8月26日~8月30日 Shaw Centre, Ottawa (Canada)
5. 佐藤博貴、伊藤由起、花井ちなみ、西村正也、上山純、上島通浩. DDVP 投与 Wistar ラットにおけるコリンエステラーゼ活性と尿中代謝物の非線形モデル解析. 第91回日本産業衛生学会 2018年5月16日~5月19日 熊本市国際交流会館(熊本県・熊本市)
6. 佐藤博貴、伊藤由起、花井ちなみ、西村正也、上山純、上島通浩. Wistar ラットを用いた DDVP 投与によるコリンエステラーゼ活性抑制と尿中代謝物量の関係の検討. 平成29年度日本産業衛生学会東海地方会学会 2017年11月11日 名古屋市立大学(愛知県・名古屋市)
7. 佐藤博貴、伊藤由起、花井ちなみ、上島通浩. Wistar ラットを用いたジメチル-2, 2-ジクロロビニルホスフェイト(DDVP)の影響評価におけるベンチマークドーズ法の適用. 第45回産業中毒・生物学的モニタリング研究会 2017年10月6日~10月7日 鶴岡メタバロームキャンパス(山形県・鶴岡市)

〔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〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/hygiene.dir/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名: 上島 通浩

ローマ字氏名:(KAMIJIMA, Michihiro)

研究協力者氏名: 伊藤 由起

ローマ字氏名:(ITO, Yuki)

研究協力者氏名: 上山 純

ローマ字氏名:(UEYAMA, Jun)

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、研究者個人に帰属されます。