

令和 3 年 4 月 19 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19414

研究課題名(和文)有機リン系殺虫剤バイオモニタリングへの個体間差の導入：代謝酵素活性による影響解明

研究課題名(英文)Introducing inter-individual differences into the biological monitoring of organophosphorus pesticide: Elucidating the effects of metabolic enzyme activity to the amount of urinary metabolite.

研究代表者

佐藤 博貴 (Sato, Hirotaka)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・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)：有機リン系殺虫剤(OP)は生体内に入ると肝臓のシトクロムP450により酸化され、活性型のオキソン体となり神経系のアセチルコリンエステラーゼ(AChE)を阻害して毒性を発揮する。オキソン体を代謝分解するパラキソナーゼ1(PON1)の酵素活性には著明な個人差が報告されており、尿中代謝物の排泄量やAChE活性の抑制程度に影響している可能性がある。したがって、これらのアウトカムを用いたリスク評価指標を検討する際には、PON1の影響を踏まえて個人の代謝分解能を反映させた指標として設定することで、薬剤感受性の個体差を考慮した労働衛生対策を提案することが可能になる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、OP曝露量に応じたPON1活性への影響を検証しOP解毒作用の個体差に踏み込んだリスク評価手法の開発を目指すことに学術的意義がある。すなわち、PON1活性と曝露評価指標である尿中DAP量との関連性に基づいた参照値によるリスク管理が可能となる。

また、このようなリスクマネジメント手法は斬新であり、同様に代謝経路の個体差が想定される他の化学物質への応用可能性や、曝露状況が一律ではない労働環境における個人曝露評価の重要性が改めて示され、さらに個体差を反映した「個人リスク評価モデル」の提案が可能となる。他の化学物質についても応用できる新しいリスク評価の概念となる社会的意義のある研究である。

研究成果の概要(英文)：When an organophosphate pesticide (OP) enters the body, it is oxidized by cytochrome P450 in the liver to form an active oxon-form, which inhibits acetylcholinesterase (AChE) in the nervous system. Significant individual differences in the enzymatic activity of paraoxonase 1 (PON1), which metabolizes oxon-form, have been reported and may influence the excretion amount of urinary OP metabolites and the inhibition rate of AChE activity. Therefore, when examining risk assessment indices using these outcomes, it is possible to propose occupational health measures that consider individual differences in sensitivity to the OP by setting the index reflecting individual metabolic ability based on the effects of PON1.

研究分野：労働衛生、環境衛生

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

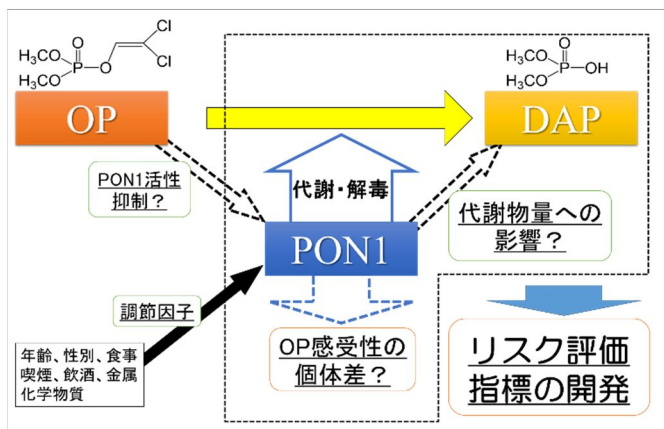
1. 研究開始当初の背景

有機リン系殺虫剤 (OP) は生体内に入ると肝臓のシトクロム P450 により酸化され、活性型のオキソン体となり神経系のアセチルコリンエステラーゼ (AChE) を阻害して毒性を発揮する。オキソン体を代謝分解する主要な酵素はパラオキシナーゼ 1 (PON1) であり、OP のエステル結合を加水分解し、それぞれの OP に特有の脱離基と、共通代謝物であるジアルキルリン酸類 (DAP) へと代謝することで解毒する。PON1 の酵素活性は個人差や年齢による違いが顕著であり、成人間で最大 40 倍、新生児と成人において最大 65 倍異なることが知られている (Richter et al, 1999; Furlong et al, 2006)。また、OP 感受性の高い PON1 ノックアウトマウスに精製 PON1 (ヒト・ウサギ由来) を静脈・腹腔内・経皮的にそれぞれ投与すると、いずれも OP 曝露後の健康影響を軽減できることも報告されている (Costa et al, 1999; Furlong et al, 1998)。

PON1 には触媒作用を規定する Q192R や血漿 PON1 蛋白量に関連する L55M・C-108T などの一遺伝子多型 (SNPs) が報告されており、これらの SNPs に基づく触媒能や血漿蛋白量の違いが、PON1 活性の違いに寄与していると考えられている。しかし、実際には同一の SNPs 集団内でも活性の著明な個体差が存在するため、PON1 活性の評価には SNPs (質的活性) と実際の血漿 PON1 蛋白量 (量的活性) とを組み合わせた「PON1 status」という考え方が提唱された (Richter et al, 1999)。この概念により Furlong ら (2006) は 130 組の母子の母体血および臍帯血中の PON1 status を明らかにし、OP 感受性が高い若年者のリスク管理の重要性を説いた。しかし、個人レベルでのリスク評価手法の開発までには至っていない。

研究代表者は殺虫剤使用作業者の集団において、OP のフェニトロチオンに対する PON1 活性値が個人間で最大 64.7 倍の差を持ち、さらに尿中 DAP 量との間に関連性が認められることを報告し、OP のリスク評価手法として PON1 活性そのものを用いる必要性を明らかにしたところである (Sato et al, 2016)。OP 解毒機構の中核を担う PON1 活性に基づく個人リスク評価手法が実現すれば、殺虫剤使用作業者に対して感受性の個体差を考慮した労働衛生対策を立案・運用することが可能となる。また、一般環境でのリスク評価にも応用できるため、OP の曝露評価に関する疫学研究での参照値としても活用できると考えられる。

PON1 活性への影響因子には、年齢、性別、喫煙、飲酒、環境中の金属類や、ある種の治療薬などがすでに報告されている (Costa et al, 2010)。加えて、Zhang ら (2014) は OP 製造工場にて長期曝露した作業者の PON1 活性が非曝露群より低下していることを報告した。すなわち、OP 曝露自体が PON1 活性を阻害し OP 感受性を高めている可能性が示唆されており、このことを動物実験で確かめる必要がある。さらに PON1 活性ごとの尿中代謝物排泄率や健康影響の違いを明らかにすることで、個人の代謝分解能を反映したリスク評価指標の設定が可能となる。これらの知見より PON1 status の概念を応用・発展させた、OP の革新的なリスク評価手法の開発に貢献できる (右図)。



PON1活性の個体間変動を組み込んだ
OPリスク評価指標の開発

2. 研究の目的

本研究では、以下の2点を目的とした。

- 1) ラットを用いた動物実験で、OP 曝露による PON1 活性への影響を解明する。
- 2) PON1 活性による OP 感受性の個体差を考慮した、尿中 DAP 量の参照値を設定する。

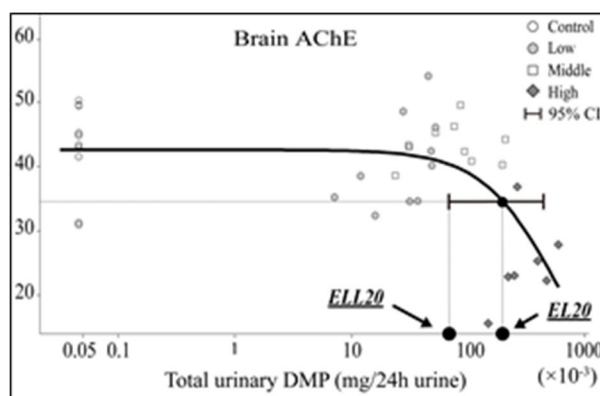
3. 研究の方法

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、H30M-02) に行った。40 匹のラットを 4 群に分け、対照群を含む 4 用量 (0、0.2、1.0、5.0 mg/kg/日) にて OP の反復強制経口投与を 2 週間行った。投与する OP は、急性毒性の異なる 2 種類の薬剤 (ジクロルボス (DDVP); LD50=56-80 mg/kg、フェニトロチオン (FNT); LD50=330-800 mg/kg) を用いた。最終投与後に解剖し、大動脈血より血漿を採取した。PON1 は抗凝固剤である EDTA により阻害されるため、ヘパリン採血管を用いた。さらに、中程度の急性毒性を持つ OP 薬剤 (トリクロルホン (TCF); LD50=136-173mg/kg) の投与実験を追加し実施した (5 用量 (0、4.0、12.0、36.0、108.0 mg/kg/日))。また、それぞれの OP 薬剤を混合投与した場合の影響も確認するための投与実験も行った。これらの実験を追加したことにより、PON1 の酵素活性および蛋白量測定については、研

究期間内では未実施となった。

最終投与後 6 時間・12 時間・24 時間ごとに採尿し、各時点の尿中 DAP 排泄量および 24 時間総排泄量をガスクロマトグラフ質量分析計にて測定した。これらの測定結果から OP 曝露量や種類による DAP 排泄量の違いについて解析した。

解析については、ベンチマークドーズ法にて投与量と AChE 活性との関係を確認した。また、我々は以前の研究で 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 と新たに定義した非線形回帰分析により AChE 活性と尿中のジメチル系代謝物の総和 (DMP) との関連を、それぞれの OP 別に明らかにした (Sato et al, 2021) (右図)。今回の研究結果についても、この手法を用いて DDVP、FNT それぞれについて 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) 薬剤投与による ChE 活性への影響

脳・赤血球・血漿中の各 ChE 活性を表 1 に示す。Dunnet の多重比較検定により、DDVP・TCF・FNT の各最小無毒用量 (NOAEL, mg/kg/日) は、脳 AChE 活性において 1.0、36.0、1.0、赤血球 AChE 活性において 1.0、12.0、1.0、および血漿 ChE 活性において 1.0、設定できず、0.2 とそれぞれ確認できた。FNT 投与実験の一部のラットのみ、薬剤投与後に顔面筋の痙攣を起こした個体を認めたが、全体としてコリン中毒症状は認められなかった。

表 1 薬剤投与による ChE 活性への影響

	対照群	投与群A	投与群B	投与群C	投与群D
脳AChE活性 (nmol/mg protein/min)					
DDVP	43.0 (6.9)	40.7 (7.1)	43.4 (3.2)	24.8 (6.5)	-
TCF	41.2 (5.0)	42.6 (5.7)	41.7 (5.0)	37.3 (5.9)	24.5 (3.4)
FNT	35.5 (5.4)	37.5 (6.0)	36.6 (2.8)	20.7 (3.8)	-
混合投与	34.3 (4.8)	33.4 (7.0)	33.1 (4.3)	32.3 (4.3)	34.4 (3.8)
赤血球AChE活性 (μmol/ml/min)					
DDVP	2.0 (0.4)	2.0 (0.3)	1.8 (0.2)	0.9 (0.1)	-
TCF	2.1 (0.4)	2.2 (0.4)	2.1 (0.2)	1.8 (0.2)	1.2 (0.3)
FNT	3.1 (0.5)	3.1 (0.5)	2.9 (0.5)	1.5 (0.3)	-
混合投与	1.9 (0.2)	1.9 (0.2)	1.7 (0.2)	1.6 (0.2)	1.6 (0.1)
血漿ChE活性 (μmol/ml/min)					
DDVP	0.6 (0.1)	0.5 (0.1)	0.5 (0.0)	0.4 (0.1)	-
TCF	0.5 (0.1)	0.5 (0.1)	0.5 (0.1)	0.5 (0.1)	0.4 (0.0)
FNT	0.7 (0.1)	0.7 (0.1)	0.6 (0.1)	0.5 (0.1)	-
混合投与	0.5 (0.1)	0.5 (0.1)	0.4 (0.1)	0.4 (0.1)	0.5 (0.0)

平均 (標準偏差)、太字下線はDunnetの多重比較検定で有意差あり (P < 0.05)

DDVPとFNTでは、投与群A, B, Cがそれぞれ0.2 (Low)、1.0 (Middle)、5.0 (High) mg/kg/day の各投与群に該当

TCFでは、投与群A, B, C, Dがそれぞれ4.0 (Very low)、12.0 (Low)、36.0 (Middle)、108.0 (High) mg/kg/dayに該当

混合投与では投与群A, B, C, DがそれぞれTCF単独投与群、TCF+DDVP投与群、TCF + DDVP+FNT投与群、TCF+DDVP+FNT+DMP投与群に該当

混合投与実験では、後述する ELL20 を参考に、ChE 活性が 10% 低下すると推定される ELL10 を算出し、対応する各 OP の投与量 (DDVP ; 0.7、TCF ; 13.7、FNT ; 0.2 mg/kg/) を計算して混合投与を行った。したがって一般環境中の低濃度混合曝露に近い条件であり、ChE 活性への影響も赤血球のみの軽微な結果になったと考えられる。

(2) 尿中代謝物指標について

得られた DMP の ELL10 と ELL20 について、一般的に使用されている指標との比較を表 2 に示す。他の指標は投与用量で設定されているため、各 EL10 および ELL20 はそれぞれの実験系において尿中代謝物量と投与用量の換算式を作成し、変換した。これらの結果からは、急性毒性の強さの順番と必ずしも同じになるわけではなく、急性参照用量 (ARfD) や一日耐容摂取量 (ADI) と近い値をとることが明らかとなった。もともと ELL は、点推定値である EL の信頼区間下限値を使用しており、設定された健康影響 (表 2 では ChE 活性の 10% および 20% 低下) が起き得る

可能性が小さいと考えられる指標である。したがって、この指標に不確実係数を適用することで、ADI に類似する性質のガイドライン値が設定できると考えられる。また、ベンチマークドーズ法で算出した値との比較でも、結果は類似していた（データ未掲載）。

表 2 脳 ChE 活性に対する尿中代謝物指標（DMP）と他の指標の比較

薬剤	ELL10 (mg/day)	ELL20 (mg/day)	ELL10 推定投与量 (mg/kg/day)	ELL20 推定投与量 (mg/kg/day)	LD50 (mg/kg, oral)	ARfD (mg/kg/day)	ADI (mg/kg/day)
ジクロロボス (DDVP)	0.058	0.146	0.7	2.0	56-80^{a)}	0.008^{a)}	0.0005^{a)}
トリクロルホン (TCF)	0.031	0.179	8.2	17.2	136-173^{b)}	2.5^{b)}	0.002^{b)}
フェントロチオン (FNT)	0.012	0.025	0.3	1.1	330-800^{c)}	0.13^{d)}	0.0013^{c,d)}

a) US EPA: Reregistration Eligibility Decision for Dichlorvos (DDVP), 2006

b) US EPA: Reregistration Eligibility Decision for Trichlorfon, 2006

c) US EPA: Reregistration Eligibility Decision for Fenitrothion, 1995

d) US EPA: Reregistration Eligibility Decision for Fenitrothion, 2006

(3) まとめ

本研究では、それぞれの薬剤を単剤投与した場合には尿中代謝物を用いた健康影響指標が作成できる可能性が示唆された。混合投与実験からは、低濃度の混合曝露では ChE 活性に一部軽微な影響が認められるものの薬剤数と酵素活性の間には弱い量反応関係しか認められず、環境中の OP 量が適切に管理されていれば、少なくとも今回使用した 3 剤の混合曝露では重大な影響は認められないと考えられた。これらの結果を補強するために、本研究で実施出来なかった PON1 による影響を今後確認する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sato Hiroataka, Ito Yuki, Hanai Chinami, Nishimura Masaya, Ueyama Jun, Kamijima Michihiro	4. 巻 450
2. 論文標題 Non-linear model analysis of the relationship between cholinesterase activity in rats exposed to 2, 2-dichlorovinyl dimethylphosphate (dichlorvos) and its metabolite concentrations in urine	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxicology	6. 最初と最後の頁 152679 ~ 152679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tox.2021.152679	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐藤博貴、伊藤由起、上山純、上島通浩
2. 発表標題 薬剤間比較による有機リン系殺虫剤尿中代謝物の基準値設定の検討
3. 学会等名 第93回日本産業衛生学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroataka Sato, Yuki Ito, Ikumi Bundo, Chinami Hanai, Masaya Nishimura, Jun Ueyama, Michihiro Kamijima
2. 発表標題 Nonlinear model analyses of urinary metabolite levels of organophosphate pesticides corresponding to cholinesterase activity inhibition in rats
3. 学会等名 ISES-ISIAQ2019 Joint meeting of the International Society of Exposure Science and the International Society of Indoor Air Quality and Climate (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤博貴、伊藤由起、上山純、上島通浩
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第92回日本産業衛生学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	上島 通浩 (Kamijima Michihiro)		
研究協力者	伊藤 由起 (Ito Yuki)		
研究協力者	上山 純 (Ueyama Jun)		

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