

Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

5-1851

有機リン化合物曝露評価指標としての尿中ジアルキルリン酸の有効性の検証
(J P M E E R F 2 0 1 8 5 0 5 1)

平成30年度～令和2年度

Validation of Effectiveness of Urinary Dialkylphosphates as Markers for Exposure Assessment of
Organophosphorus Compounds

〈研究代表機関〉

公立大学法人 名古屋市立大学

〈研究分担機関〉

該当なし

〈研究協力機関〉

該当なし

○図表番号の付番方法について

「Ⅰ．成果の概要」の図表番号は「0．通し番号」としております。なお、「Ⅱ．成果の詳細」にて使用した図表を転用する場合には、転用元と同じ番号を付番しております。

「Ⅱ．成果の詳細」の図表番号は「サブテーマ番号．通し番号」としております。なお、異なるサブテーマから図表を転用する場合は、転用元と同じ図表番号としております。

令和3年5月

目次

I. 成果の概要	1
1. はじめに（研究背景等）	
2. 研究開発目的	
3. 研究目標	
4. 研究開発内容	
5. 研究成果	
5－1. 成果の概要	
5－2. 環境政策等への貢献	
5－3. 研究目標の達成状況	
6. 研究成果の発表状況	
6－1. 査読付き論文	
6－2. 知的財産権	
6－3. その他発表件数	
7. 国際共同研究等の状況	
8. 研究者略歴	
II. 成果の詳細	
II－1 有機リン化合物曝露評価指標としての尿中ジアルキルリン酸の有効性の検証 （公立大学法人 名古屋市立大学）	13
要旨	
1. 研究開発目的	
2. 研究目標	
3. 研究開発内容	
4. 結果及び考察	
5. 研究目標の達成状況	
6. 引用文献	
III. 研究成果の発表状況の詳細	29
IV. 英文Abstract	31

I. 成果の概要

課題名 5-1851 有機リン化合物曝露評価指標としての尿中ジアルキルリン酸の有効性の検証

課題代表者名 上島 通浩 (名古屋市立大学 教授)

重点課題 主：【重点課題⑭】化学物質等の包括的なリスク評価・管理の推進に係る研究

副：【重点課題⑮】大気・水・土壌等の環境管理・改善のための対策技術の高度化及び評価・解明に関する研究

行政要請研究テーマ（行政ニーズ） (5-3) 子どもへの化学物質のばく露評価及び健康影響検出に係る先進的研究

研究実施期間 平成30年度～令和2年度

研究経費 (千円)

	契約額	実績額 (前事業年度繰越分支出額含む)
平成30年度	28,800	28,800
令和元年度	32,000	32,000
令和2年度	32,000	32,000
合計額	92,800	92,800

本研究のキーワード 殺虫剤、有機リン化合物、曝露、尿中代謝物、ジアルキルリン酸、生物学的モニタリング（バイオモニタリング）、コリンエステラーゼ

研究体制

(サブテーマ1) 有機リン化合物曝露評価指標としての尿中ジアルキルリン酸の有効性の検証
(名古屋市立大学)

他のサブテーマは無い。

研究代表者 上島 通浩 名古屋市立大学大学院医学研究科 教授

研究分担者 榎原 毅 同 准教授

研究分担者 伊藤 由起 同 准教授

研究分担者 佐藤 博貴 同 助教

研究協力者

大矢 奈穂子・野正 夏鈴・Nayan Chandra Mohanto 名古屋市立大学大学院医学研究科 大学院生
湊 京子 同 技術職員

加藤 沙耶香・松本 太郎・玉田 葉月・金子 佳世 同 特任助教

斎藤 勲 東海コープ事業連合商品検査センター 技術顧問

土山 智之 名古屋市衛生研究所食品部 研究員

勝原 美紀 同 研究員（平成30年度研究協力者）

研究協力機関はない。

1. はじめに（研究背景等）

化学物質への曝露量を個人単位で評価する手法として、生物学的モニタリング（バイオモニタリング、以下BM）がある。生体試料より測定されるバイオマーカーは、通常、尿中や血中の化学物質やその代謝物であり、単一の評価対象物質に由来するマーカーと複数物質に由来するマーカーとに分けられる。後者の場合、そのマーカーがどの曝露物質（親化合物）を反映しているか特定できない場合がある。例えば、尿中の馬尿酸は食品添加物である安息香酸の代謝物でもあるため、職場環境中の親化合物であるトルエン曝露のマーカーとは必ずしもいえない問題は、労働安全衛生法上の健診で行われるBMの現場で良く知られている。同じ課題が小児環境保健領域にも存在する。

2010年、米国の8-15歳を対象とした横断調査で、有機リン系殺虫剤（以下、OP）のBMマーカーである尿中ジアルキルリン酸（以下、DAP）濃度が対象集団の中央値以上になると、注意欠陥多動性障害（ADHD）のリスクが約2倍になると報告され¹⁾、大きな話題となった。しかし、DAPに代謝されるOPは約50種類あり、これらの半数致死量(LD50)は物質間で100倍以上異なる。また、尿中のDAP濃度にはOPの摂取量に加え、OPが環境中で分解されて生成するDAP自体の摂取量も寄与すると指摘されている²⁾。さらに、DAPの親化合物が有機リン系殺菌剤や難燃剤など、OP以外の有機リン化合物の場合もありうる（図0.1）。

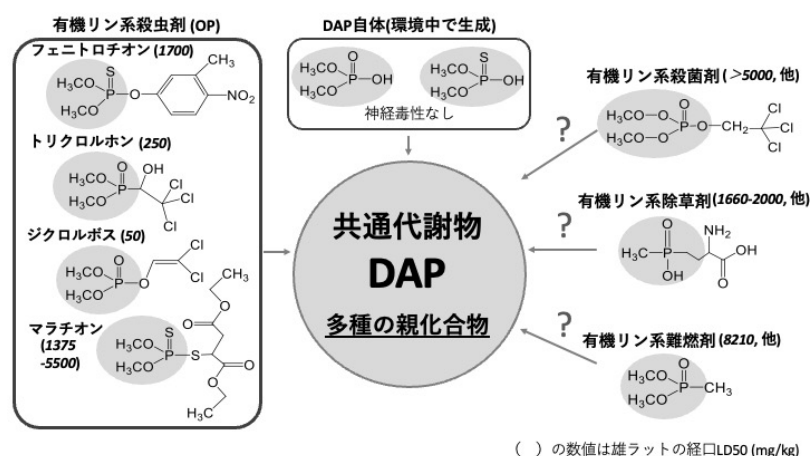


図0.1 尿中 DAPと親物質の関係

したがって、OPの使用状況が米国とは異なる日本のBMデータが必要であり、大規模出生コホート研究である環境省「子どもの健康と環境に関する全国調査（エコチル調査）」をはじめ、環境疫学研究においては、リスクの懸念のあるOPの曝露評価は重要な課題である。このための曝露マーカーとしては標準的な6種のDAP（ジメチルリン酸、以下DMP；ジメチルチオリン酸、以下DMTP；ジメチルジチオリン酸、以下DMDTP；ジエチルリン酸、以下DEP；ジエチルチオリン酸、以下DETP；ジエチルジチオリン酸、以下DEDTP）が測定されることが多いが、親化合物の候補が多岐にわたる。したがって、BMによる研究結果からOPのリスクの管理が必要とされても、現状では対象物質を特定できない。

2. 研究開発目的

DAPは毒性の強さが異なる各種のOPの共通代謝物であるだけでなく、体外の自然環境中でもOPの加水分解物として生成される。このため、ヒト尿中に排泄されるDAPの曝露親化合物は、OPとDAP自体の両者である可能性が指摘されている。したがって、エコチル調査等の疫学調査において、尿中DAPを測定した結果によりOPのリスク管理が必要とされた場合に、対象となる化合物を特定する方法が必要である。また、健康リスクを判定するための尿中DAP濃度のガイドライン値を設定可能か、解明が望まれている。

したがって、本研究では3つの目的を設定し、それぞれに対応するアプローチを行うことで、OPの曝露評価指標としての尿中DAPの有効性を検証することをめざした。

- （1）尿中に排泄されるOP代謝物のノンターゲット（以下、NT）分析法を開発する。開発した方法を用いて、尿中に検出されるDAPの候補親化合物を明らかにする。

- (2) 主曝露源である飲食物中のOP及びDAPと、実際に尿中で検出されるOP代謝物とを対比し、尿中のDAPが特定のOPへの曝露を反映しているか明らかにする。
- (3) 動物実験により、OPの最大無毒性量(NOEL)に相当する尿中DAP量を、また、OPおよびDAPへの複合曝露時の尿中DAP増加量を明らかにする。それにより、OPのリスク判定のための尿中DAPのガイドライン濃度が設定可能か明らかにする。

3. 研究目標

全体目標	疫学試料を用いて、尿中に検出されるOPの共通代謝物であるDAPの親物質を推定し、さらに主曝露源とされる飲食物中のOPおよびDAP量を分析する。また、動物実験により尿中DAP濃度を用いたリスク判定のためのガイドライン値を推定する。これらの結果をふまえ、尿中DAPによるリスク管理の可能性を明らかにする。
------	--

サブテーマ1	有機リン化合物曝露評価指標としての尿中ジアルキルリン酸の有効性の検証
サブテーマリーダー /所属機関	上島通浩／名古屋市立大学
目標	「子どもの健康と環境に関する全国調査（エコチル調査）」愛知ユニットセンターにおける妊婦 600 人の尿中 DAP を測定し、うち比較的 DAP 濃度が高い 200 人について尿のノンターゲット (NT) 分析により親物質を推定する。 - 成人女性 60 人から収集した陰膳および尿について、陰膳試料中の OP および DAP 測定を行うと共に、尿試料について NT 分析を完了し結果を対比させる。 - ラットに OP および DAP を経口投与し、尿中 DAP 量と脳・赤血球・血漿中のコリンエステラーゼ (ChE) 活性との関係をそれぞれ確認する。ChE 活性をアウトカムとした場合の最大無毒性量に相当する尿中 DAP 量、および OP と DAP に複合曝露した時の尿中 DAP の増加量を明らかにする。

4. 研究開発内容

上記目標 1～3 に対応する以下の 3 つのアプローチを設定した。

【アプローチ 1】尿中に検出されるDAPの親物質の解明

【アプローチ 2】飲食物に含まれる尿中DAP親物質の解明

【アプローチ 3】尿中DAP排泄量と神経影響との量反応関係の解明およびOPとDAPへの複合曝露時の尿中DAP排泄量の解明

【アプローチ 1】尿中に検出されるDAPの親物質の解明

本アプローチは、①OPのNT分析法の開発およびその妊婦集団への適用と、②妊婦集団の尿中DAPの測定から成る。名古屋市立大学の倫理審査委員会の承認（承認番号 70-00-0134）および動物実験委員会の承認（承認番号H29M-37）を得た後に実施した。

以下、それぞれについて述べる。

① OP関連親物質のNT分析戦略と検討内容

まず、ヒト尿中に検出されるDAPの親物質は、残留農薬として食品中に検出される頻度の高い薬剤である可能性が高いと仮定し、BMとしてのNT分析条件検討のための対象物質を選定した。行政による残留農薬分析にて、輸入および国内産の野菜・果物から検出の報告があった薬剤の主要分解物を調査し、8化合物をNT分析条件検討のための対象物質とした。

そして、これらの定量分析条件（分析カラム、移動相、試料の前処理方法）を検討した。分析

には、高速液体クロマトグラフ-高分解能質量分析計 (Liquid chromatography-High resolution/mass spectrometry; 以下、LC-HR/MS、Thermo Fisher Scientific社製、Ultimate 3000-Q Exactive Focus) を用いた。

解析には、化学構造推定ソフト (Compound Discoverer 3.0 (Thermo Fisher Scientific社製)) を用いた。尿中に存在する可能性のあるOP関連親物質の分解物に焦点を当て、日本国内で出荷報告のある35種類のOPの想定される代謝物238物質を登録した。決定した分析条件のもと、実際に尿中で検出されたピーク物質の同位体存在比から計算される、精密質量情報より予測される組成式について、まず、米国環境保護庁が公開している農薬データベース10種類 (52種類のOPが登録) の登録化合物に一致するか、そして次に、上記の化学構造推定ソフトへの登録化合物と一致するか照合した。組成式がデータベース上の化合物に一致した場合、標準品が入手可能であれば、尿試料で検出されたピーク物質の保持時間とフラグメントイオンが標準品のものと一致するか、確認することとした。最初に、同意の得られた6名の成人のプール尿試料を分析した。

しかし、組成式が一致しても多くの異性体が存在すること、また「II. 成果の詳細」で後述するように、利用可能な公開データベース上には多種類のOPそれぞれの大半の代謝物の情報が存在しないこと、まして、BMに必須である代謝物由来のピークの保持時間やフラグメントイオンのライブラリが実質的に存在しないことから、ヒト尿試料を測定して得られる情報のみを用いてNT分析を行うのは不可能であることが判明した。このため、マウスを用いた実験を行ってNT分析 (曝露する可能性のあるOPの網羅的分析) が可能なデータセットを自作することとした。

まず、マウスに35種類のOPの半数致死量 (LD50) の1/2量および1/4量を、コーンオイルを溶媒として経口投与し、代謝ケージを用いて24時間尿を採尿した。そして、前処理後、LC-HR/MS分析により得られたクロマトグラムピークのうち、OP投与により高くなるピーク物質を代謝物候補とみなして解析対象とした。そして、ピーク物質の精密質量が登録化合物の精密質量と一致し、フラグメントイオンスペクトルが得られた場合に、ライブラリソフト (mzVault™ 2.3 (Thermo Fisher Scientific社製)) に仮登録した。以下、この仮登録したデータセットを「マウスデータ」と呼ぶ。

ヒト集団の疫学試料 (尿) のピーク物質がマウスデータに一致した場合、その物質の標準品を入手 (市販品がない場合は委託合成) し、標準品の保持時間およびフラグメントイオンスペクトルと一致するかを確認した。この解析を、②で述べる妊婦200人および【アプローチ2】で調査した成人女性73人で行い、曝露しているOPを明らかにした。

以上の網羅的分析手法のワークフローを図0. 2に、ヒト尿中から検出されたピークのレベル識別のためのフローチャートを図1. 2に示した。

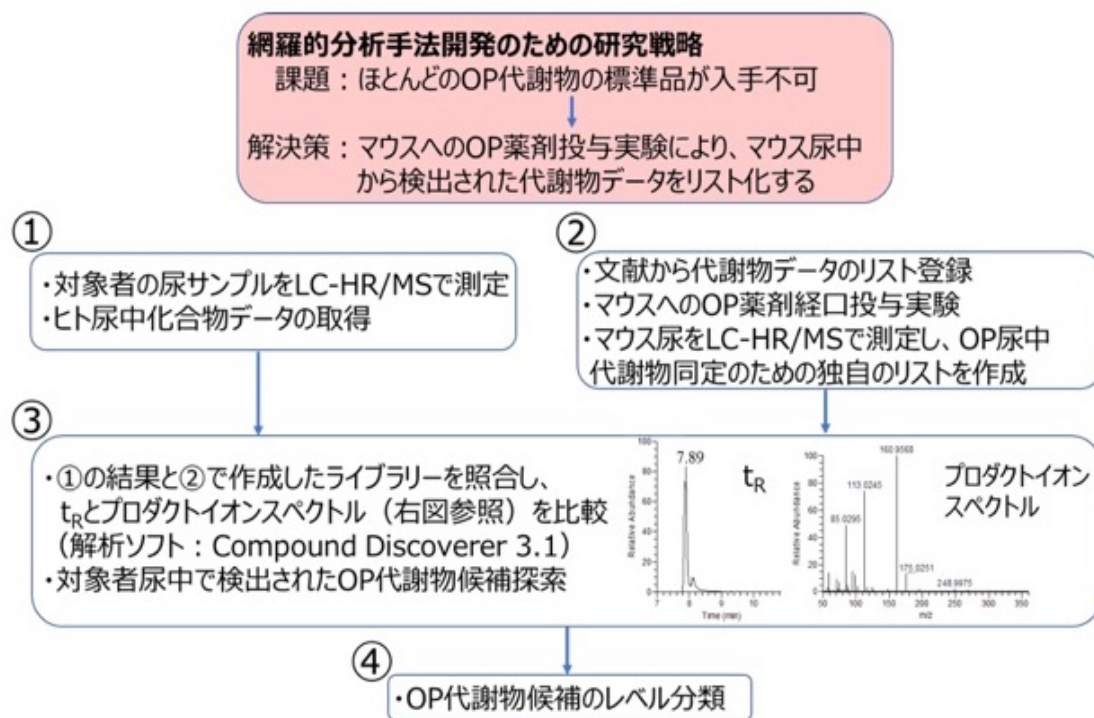


図0. 2 OP尿中代謝物の網羅的分析手法のワークフロー

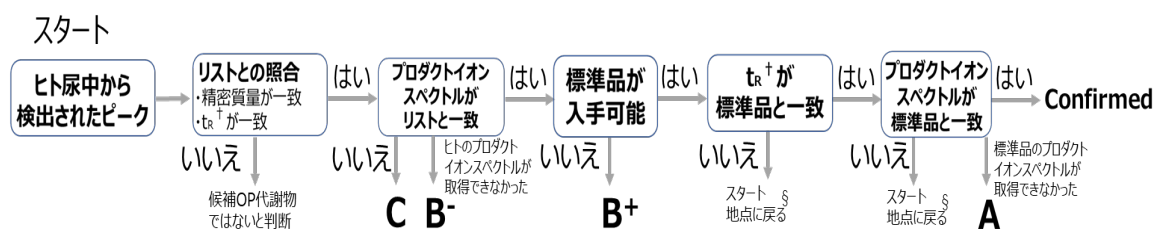


図1. 2 ヒト尿中から検出されたピークのレベル識別のためのフローチャート

t_R , 保持時間（誤差許容範囲 ± 0.3 分）
§ この時、ヒト尿中から検出されたピークは標準品とは違う物質と判断し、スタート地点に戻ってもう一度レベルの識別を行う。最終的にはレベルB代謝物として識別される。

② 妊婦の尿中DAPの測定

調査への協力に同意したエコチル調査愛知ユニットセンター参加妊婦集団2159人のうち、1歳半、3歳時点で尿中のDAP濃度の測定結果がある児の母親805人から、尿収集時期の早い順に600人をDAP測定対象者として選定した。そして、研究期間の各年度に、200人ずつDAP分析によるBMを行った。測定には液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計（以下、LC-MS/MS, Waters社製, ACQUITY I class-Xevo-TQS）を用いた。測定対象物質は6種類のDAP（DMP, DMTP, DMDTP, DEP, DETP, DEDTP）とした。測定値を、メチル系代謝物の総和（DMP+DMTP+DMDTP, Σ DMAP）、エチル系代謝物の総和（DEP+DETP+DEDTP, Σ DEAP）、6種類のDAPの総和（ Σ DMAP+ Σ DEAP, Σ DAP）として評価した。このうち濃度の高い200人については、開発したNT分析法（①を参照）を適用して親化合物を検索した。

【アプローチ2】飲食物に含まれる尿中DAP親物質の解明

本アプローチは、成人女性集団の陰膳および尿の収集と、各試料の分析（陰膳試料については含

有する個別OPおよびDAP（体外環境中で分解反応により生じるDAP）の定量、尿試料はOP代謝物のNT分析）、そして同一人の陰膳試料と尿試料の分析結果の対比から成る。名古屋市立大学の倫理審査委員会の承認を得た後に実施した（承認番号 60-18-0021）。

以下、それぞれについて述べる。

① 陰膳・尿試料の収集と処理

某大学4年生の女子学生78人に調査への参加協力を依頼し、73人の同意を得た。同意者からは、連続2日間の飲食物全て、喫食した食事記録表と食事写真、調理水と問診票の提出を得た。3日目の早朝に採尿した。各食事をRobot Coupe Blixer-3D（FMI社製）にて粉碎し、秤量、予備冷凍後、凍結乾燥した。残りは密閉袋に移し、 -80°C で保存した。食事時以外に飲んだ飲料と、調理水、早朝尿は -80°C で冷凍し、未開封の市販飲料は冷蔵下で保存した。

② 陰膳試料中のOPおよび分解物の分析

平成29年国民健康栄養調査における20歳以上の年齢階級での食品群別摂取量をもとに、分析法検討用のモデル食事を検討し、実際に調理して準備した。陰膳試料と同様に凍結乾燥させ、分析に供した。凍結乾燥試料中のOP85種類、その分解物5種類およびDAP6種類の分析を、ガスクロマトグラフ-タンデム型質量分析計（以下、GC-MS/MS, Agilent社製, 7890B-7010）およびLC-MS/MS（Waters社製, ACQUITY I class plus-Xevo-TQXS）を用いて行った。

③ 陰膳提供者の尿中OP代謝物のNT分析

【アプローチ1】で開発した方法を用い、73人の尿中OP代謝物のNT分析を行った。

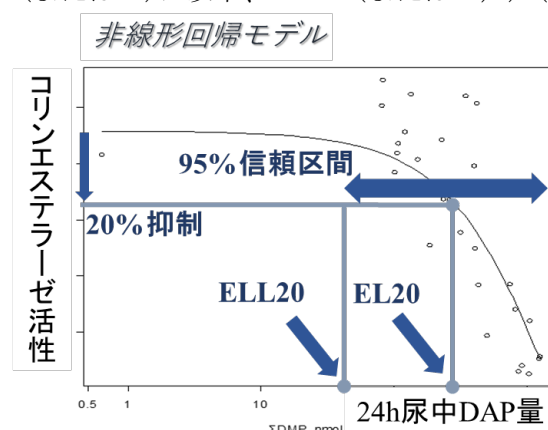
【アプローチ3】尿中DAP排泄量と神経影響との量反応関係の解明およびOPとDAPへの複合曝露時の尿中DAP排泄量の解明

本アプローチは、大きく2つの実験研究から成る。まず、①神経毒性の強さが異なる3種類のOP、すなわちジクロロボス（以下、DDVP）、トリクロロホン（以下、TCF）、フェニトロチオン（以下、FNT）について、作用機序であるコリンエステラーゼ（以下、ChE）活性をそれぞれ20%（または10%）抑制する投与量における、尿中DAPの排泄量（Exposure Limit of urinary dimethyl phosphate at 20%（または10%） inhibition of cholinesterase activity; 以下、EL20）の95%信頼区間下限値（Lower limit of 95% confidence interval of EL20（または10）; 以下、ELL20（または10））（図0.3）を求めた。その後、②これら3薬剤とDAPの複合投与時のChE活性及び尿中DAP排泄量を求めた。実験は動物実験委員会の承認（承認番号H30M-02）を得た後に実施した。

以下、それぞれについて述べる。

① 神経毒性の強さが異なる3種類のOP個々のEL20（およびEL10）・ELL20（ELL10）の算出

FNT（経口LD50 1700 mg/kg）およびTCF（同250 mg/kg）をそれぞれ用量段階別にラットに投与し、尿中DMP排泄量と血液・脳のChE活性を測定した。次に、別の研究で同様の実験を行なったDDVP（同LD50 50 mg/kg）についての結果を利用して、EL20とELL20の算出法を検討した。同じ方法をFNT、TCFに適用し、同様にEL20（EL10）、ELL20（ELL10）を求めた（図0.3）。



EL20 : ChE 20%抑制に対応する24h尿中DAP量
ELL20 : EL20の95%信頼区間下限値

drc package ver. 3.0-1 (R拡張パッケージ; Ritz et al, 2015)

図0.3 24時間尿中DAP排泄量とChE活性阻害との関係

② 3種のOPおよびDAPの複合曝露時のDAP排泄量に与える影響の解明

ChE活性とともに尿中DAP濃度が、複合曝露下でどのように影響を受けるかを検討するために、対照群、TCF、TCF+DDVP、TCF+DDVP+FNT、TCF+DDVP+FNT+DMPの投与5群を設定した。OP3薬剤は各ELL10に相当する経口量を投与し、EL20を求めた。

【各アプローチ相互の関係】（図0.4）

【アプローチ1】により、尿試料の代謝物分析により曝露するOP親化合物を明らかにするNT分析法を開発し、妊婦および成人女性集団に適用した。また、【アプローチ2】では尿中代謝物とともに陰膳中のOPおよびDAPを測定し、尿中排泄される、すなわちOP摂取量への食事経路曝露の寄与の程度を検討した。一方、ヒトは実生活において神経毒性の強さの異なるOPおよびDAPに複合曝露していることに鑑み、エコチル調査をはじめ環境疫学研究でBMが行われる尿中DAP量（または濃度）について、健康リスクベースの参照値が設定可能かを、動物実験により検討した（【アプローチ3】）。実験では、神経毒性の強さの異なる3種のOPを個々に投与した時の尿中DAP量を調べるとともに、OPとDAPを混合投与した時の尿中DAP量を調べた。そして、3つのアプローチからの結果を総合して、尿中DAPのBM結果をOPのリスク管理にどのように活かすかを考察した。

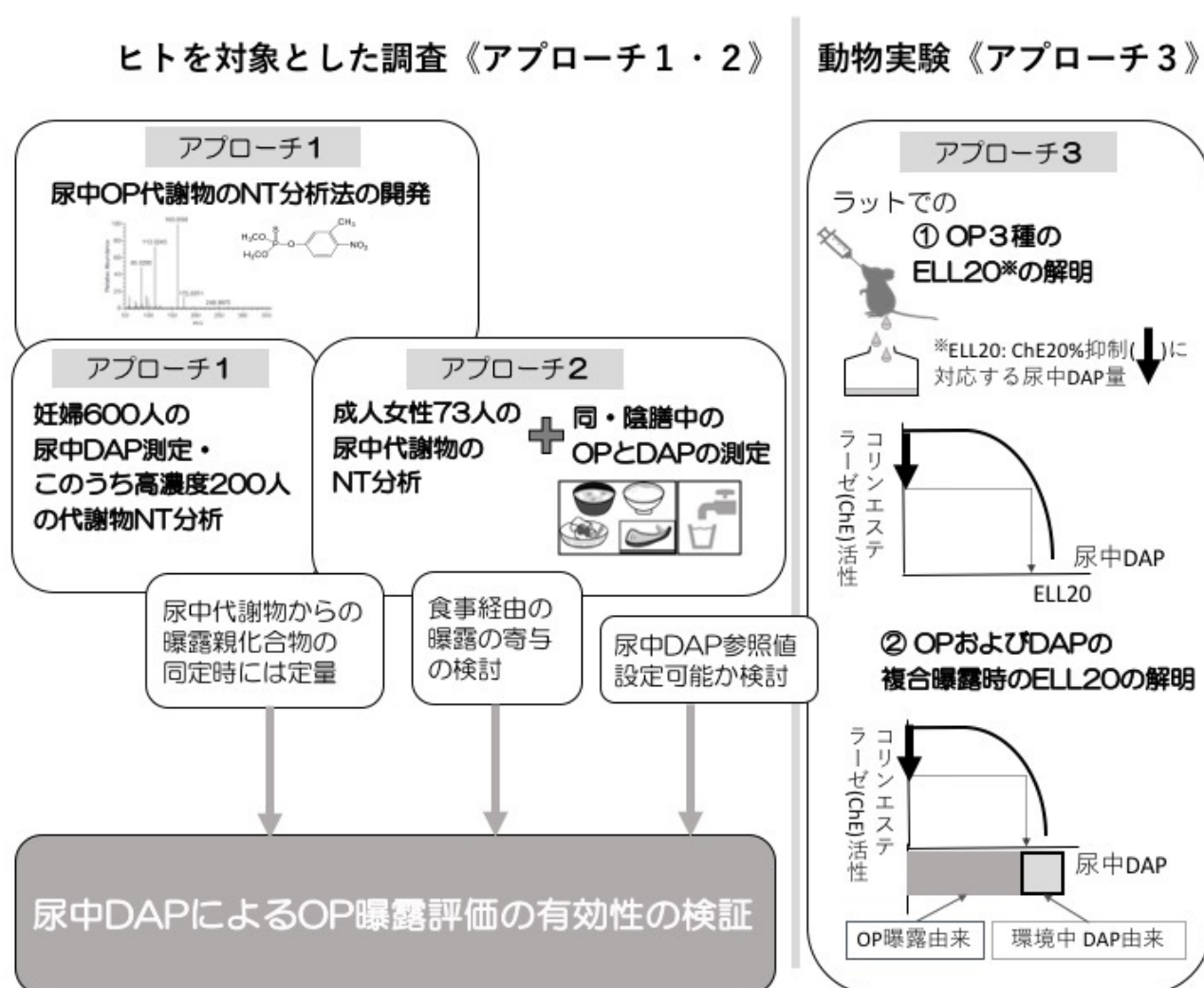


図0.4 3つのアプローチの関係

5. 研究成果

5-1. 成果の概要

設定した3つのアプローチにより、以下のアウトプットを得た。

- (1) 【アプローチ1】では、公表されているデータベースはOPの尿中代謝物のNT分析には実質的に役立たないことを確認するとともに、本研究でオリジナルに作成したマウスデータを用い、有効なNT分析戦略を開発した。すなわち、NT分析に不可欠な、国内で使用実態のある34種類のOPおよび有機リン化合物の網羅的なマウスデータを得た。開発した方法を適用し、エコチル調査参加妊婦200人および女子大生73名の尿試料から、DAPに代謝されないOPとしてはプロチオホス (confirmed) を検出した。ただし、NT分析で同定された尿中代謝物の中に、存在するはずのDAPがDETP以外には含まれなかったこと、グリホサートのマウスデータを作成できなかったことから、用いた前処理法 (QuEChERS法)、測定機器が有機リン化合物の全ての代謝物検出に適しているわけではないことも明らかになった。今後、開発した方法をリスク管理の必要な物質同定に使う際には、この点に留意する必要がある。前処理方法のさらなる改良が必要と考えられる。
- (2) 【アプローチ2】では、陰膳試料中のOPの検出頻度は最大15%程度であること、また、DAPが高い頻度で検出されることを明らかにした。ヒトがDAPを経口的に摂取している可能性は、OPのBMを行った論文の多くで言及されてきたが、これを実証した研究はきわめて限られる。本研究では、食事中に検出されるDAPの濃度は残留するOPの濃度に比べて圧倒的に高いことが初めて証明された。
- (3) 【アプローチ2】では、陰膳試料中のOP量について、1日目と2日目の推定摂取量の間に有意な相関が見られた。すなわち、摂取量には食事のちがいに由来する個人差があるが、連続する二日間で見た時、同一人の摂取量には食事内容が変わっても一定の傾向があることが示唆された。
- (4) 【アプローチ2】では、一部の有機リン化合物について、2日目の食事中量と、3日目の起床後第一尿のクレアチニン補正後の濃度との間の相関係数が0.4以上であったが、有意ではなかった。陰膳試料中のDMP量とDMTP量が、ともに尿中DMTP濃度と関連した。一方、検出率が比較的高かったクロルピリホスメチル、フェニトロチオン、クロルピリホス、ピリミホスメチル、マラチオンに関して、フェニトロチオン、ピリミホスメチル以外は尿中のNT分析で検出されなかった。また、尿中で同定された代謝物から推定された親化合物は、陰膳中に検出されたOPと一致しなかった。
- (5) 【アプローチ2】では、84種類のOPすべてについて飲食物中濃度が検出下限値未満であった11名の尿中DAP濃度の中央値と、飲食物からの摂取量が上位10% (7人) の尿中DAP濃度の中央値との間には、有意差が認められなかった。すなわち、OPを相対的に多く含む飲食物を喫食しても尿中のDAP濃度には反映しにくいことが示唆された。ただし、本解析の対象となった集団は、尿中DAP濃度が低い集団であることに留意する必要がある。
- (6) 【アプローチ2】で食事からの有機リン化合物摂取量の総量 ($\Sigma OP + \Sigma DAP$) が尿中排泄量に占める比率を見た時、半数以上の人は8割未満であった。尿中で同定されたOP代謝物の親化合物が必ずしも陰膳試料中に検出されなかったこととあわせ、OPおよびDAPの曝露源として、飲食物以外の摂取経路の寄与が無視できない程度にある可能性を示唆する結果である。

- (7) 【アプローチ3】では、神経毒性の強さの異なる3つのOPについて、EL20（または10）、ELL20（または10）を明らかにした。動物実験のデータを用いて、曝露するOPの構成比などいくつか前提条件を置くことで、ヒト疫学調査から尿中DAP濃度と健康リスクとの関係が明らかになるまでの間、健康リスク判定のための尿中DAPのガイドライン濃度を仮決めすることは、可能であると考えられる。
- (8) 以上をまとめると、エコチル調査等で尿中DAP濃度と健康リスク上昇との正の関連を認めた時に、尿中に排泄されるOPの親化合物を、本研究で開発した手法により追求できるようになった。また、OPによるChE阻害という健康リスクの観点からの、尿中DAPの参照濃度設定のための基礎データを得ることができた。

5-2. 環境政策等への貢献

本研究は、申請時点における行政ニーズ「(5-3) 子どもへの化学物質のばく露評価及び健康影響検出に係る先進的研究」に応えるべく計画した。以下の4点で環境政策に貢献する。

第1の貢献は、BMによるOP曝露評価法の発展である。OPは神経伝達物質であるアセチルコリンの分解酵素（アセチルChE）阻害を作用機序として殺虫活性を発揮することから、神経系が発達段階にある子どもへの健康影響が懸念されてきた。BMの標準法（従来法）ではOPの共通代謝物である6種類のDAPを測定し、親物質はこれらのいずれかに代謝される「薬剤群」として評価される。したがって、仮にエコチル調査等の結果からリスクに寄与するOPの解明が必要とされた場合、従来は管理の対象となる化合物を特定できなかった。しかし、本研究により尿中に排泄されるOPの親化合物を明らかにする手法を開発した。BMを行った集団でDAPの親化合物を絞り込むことができれば、こういった環境対策が有効か検討する糸口となる。ただし、これまで農薬類の主要な曝露源と考えられてきた食事については、陰膳中に検出したDAPと尿中DAP濃度との間に弱い関連を見いだしたものの、陰膳中のOPと尿中代謝物から同定された親化合物との対応ははっきりしなかった。これら親化合物の主要な曝露源が飲食物以外にあるのか、あるいは現状での検出感度の限界のためなのかは、今後の研究を待つ必要がある。また、本研究で用いた尿試料の前処理法が、有機リン化合物の全ての代謝物検出に適しているわけではないことも明らかになったため、開発した方法をリスク管理の必要な物質同定に使う際には、分析法の限界にも留意する必要がある。

第2の貢献は、本研究のアプローチ2と3により、ChE阻害という健康リスクの観点からの尿中DAP濃度の参照値設定のための基礎データを得たことである。世界的に見た時、ドイツやカナダ等ではポピュレーションベースの参照値を設定しているが、リスクベースの参照値はまだ存在しない。しかし、本研究で得た結果を用いれば、一定の前提・条件のもとで参照値を仮決めできる可能性がある。環境省の事業「化学物質の人へのばく露モニタリング調査」では尿中DAPを測定しているが、参照値の仮決めが実現すれば、このような調査対象者のOP曝露の多少を、健康リスクの観点から評価できることが見込まれる。

第3の貢献は、課題代表者および研究分担者が委員として参画する、エコチル調査における曝露評価の検討に、本研究を通じて得た尿中DAPのBMに関する深い理解が役立つことである。

第4の貢献は、エコチル調査に参加している愛知ユニットセンターの妊婦600人の尿中DAP濃度が本研究で明らかになったため、このデータを今後活用してエコチル調査の中心仮説検証に利用できることである。

以上より、本研究は令和元年5月に環境大臣により決定された「環境研究・環境技術開発の推進戦略」のうち、安全確保領域の【重点課題15】「化学物質等の包括的なリスク評価・管理の推進に係る研究」に直接該当する。また、【重点課題16】「大気・水・土壌等の環境管理・改善のための対策技術の高度化及び評価・解明に関する研究」とも関連している。

＜行政等が既に活用した成果＞

課題代表者は平成30（2018）年度にエコチル調査の曝露評価専門委員会委員長として、令和元（2019）年度からはエコチル調査の運営委員会委員長（研究代表者）として、OPを含む中心仮説の検討および曝露評価に関わっている。研究分担者（伊藤）は、令和元（2019）年度より曝露評価専門委員会委員として、OPを含む曝露評価に関わっている。本研究を通じて得た尿中DAPのBMに関する深い理解は、エコチル調査における曝露評価の向上に活用されている。

＜行政等が活用することが見込まれる成果＞

- 1）将来、エコチル調査の成果をよりよいものとする上で本研究の成果が役立つ可能性がある。エコチル調査では全国10万人の参加者の中から、より詳しく曝露評価や健康アウトカム測定を行う「詳細調査」に参加する約5,000人において、胎児期の母体尿中のDAP測定によるBMを実施している。このデータを利用して今後発表される中心仮説論文により、尿中DAP濃度と健康リスクとの関連の有無が解析される。尿中濃度とリスク上昇との正の関連が明らかになり、リスクに寄与する物質の解明が必要となった場合、本研究で開発されたOPの網羅的分析法を追加的に実施することで、DAP濃度に寄与の大きいOPを明らかにできる可能性がある。薬剤が特定されれば、リスク管理法を検討する上での有力なエビデンスとなる。
- 2）本研究では動物実験により、尿中DAP濃度とコリンエステラーゼ阻害の程度との関係を明らかにした。また、食事から摂取する残留OP量とDAP量についても実測データを得た。この結果を用いることで、いくつか前提条件を置くことにより、神経毒性のリスクベースのDAP参照値を仮決めできる可能性がある。これが実現した場合、「化学物質の人へのばく露モニタリング調査」などの調査におけるBM対象者のOP曝露の多少を、健康リスクの観点から評価できることが見込まれる。
- 3）本研究を通じて深まったOPの個人曝露量評価に関する理解は、エコチル調査における中心仮説の検証や、農林水産省農業資材審議会（農薬分科会農薬使用者安全評価部会）での審議に貢献することが期待できる。

5－3．研究目標の達成状況

本研究の目標達成状況は以下のとおりである。

	掲げた内容	目標達成状況
全体目標	疫学試料を用いて、尿中に検出される有機リン系殺虫剤（OP）の共通代謝物であるジアルキルリン酸（DAP）の親物質を推定する。	目標を達成した（DAPのBMによりリスク管理が必要とされた場合に、開発したNT分析法により管理の対象となるOPを絞り込む道が開かれた）。
	主曝露源とされる飲食物中のOPおよびDAP量を分析する。	目標を達成した（サブテーマ1目標の記載参照）。
	動物実験により尿中DAP濃度を用いたリスク判定のためのガイドライン値を推定する。	目標を達成した（サブテーマ1目標の記載参照）。

	これらの結果をふまえ、尿中DAPによるリスク管理の可能性を明らかにする。	神経毒性リスクベースの参照値を一定の前提のもとで仮決め可能であることを示した。
--	--------------------------------------	---

サブテーマ1 目標	1. 「子どもの健康と環境に関する全国調査（エコチル調査）」愛知ユニットセンターにおける妊婦600人の尿中DAPを測定し、うち比較的DAP濃度が高い200人について尿のノンターゲット（NT）分析により親物質を推定する。	目標を達成した。
	2. 成人女性60人から収集した陰膳および尿について、陰膳試料中のOPおよびDAP測定を行うと共に、尿試料についてNT分析を完了し結果を対比させる。	目標を超え、73人の陰膳および尿試料の分析を実施した。
	3. ラットにOPおよびDAPを経口投与し、尿中DAP量と脳・赤血球・血漿中のコリンエステラーゼ（ChE）活性との関係をそれぞれ確認する。ChE活性をアウトカムとした場合の最大無毒性量に相当する尿中DAP量、およびOPとDAPに複合曝露した時の尿中DAPの増加量を明らかにする。	目標を達成した。

6. 研究成果の発表状況

6-1. 査読付き論文

<件数>

3件

<主な査読付き論文>

- 1) K. NOMASA, N. OYA, Y. ITO, T. TERAJIMA, T. NISHINO, NC. MOHANTO, H. SATO, M. TOMIZAWA and M. KAMIJIMA: J Occup Health, 63, 1, e12218 (2021) (IF: 2.289) Development of a strategic approach for comprehensive detection of organophosphate pesticide metabolites in urine: Extrapolation of cadusafos and prothiofos metabolomics data of mice to humans.
- 2) H. SATO, Y. ITO, C. HANAI, M. NISHIMURA, J. UYAMA and M. KAMIJIMA: Toxicology, 450, 152679 (2021) (IF: 4.099) 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.
- 3) T. EBARA, Y. YAMADA, N. SHOJI, Y. ITO, A. NAKAGAWA, T. MIYACHI, Y. OZAKI, T. OMORI, S. SUZUKI, M. KOJIMA, J. UYAMA, M. TOMIZAWA, S. KATO, T. OGURI, T. MATSUKI, H. SATO, N. OYA, M. SUGIURA-OGASAWARA, S. SAITOH and M. KAMIJIMA: BMJ Open, 9, e028105 (2018) (IF: 2.496) Cohort profile: Aichi regional sub-cohort of the Japan Environment and Children's Study (JECS-A).

6－2．知的財産権

特に記載すべき事項はない。

6－3．その他発表件数

査読付き論文に準ずる成果発表	0 件
その他誌上発表（査読なし）	0 件
口頭発表（学会等）	4 件
「国民との科学・技術対話」の実施	4 件
マスコミ等への公表・報道等	0 件
本研究に関連する受賞	2 件

7．国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

8．研究者略歴

研究代表者

上島 通浩

東北大学医学部医学科卒業、名古屋大学大学院単位取得退学、博士(医学)、現在、名古屋市立大学大学院医学研究科教授

研究分担者

1) 榎原 毅

神奈川大学工学部卒業、名古屋市立大学大学院単位取得退学、博士(医学)、現在、名古屋市立大学大学院医学研究科准教授

2) 伊藤 由起

名古屋大学医学部保健学科卒業、名古屋大学大学院修了、博士(医学)、現在、名古屋市立大学大学院医学研究科准教授

3) 佐藤 博貴

産業医科大学医学部医学科卒業、名古屋市立大学大学院中途退学、博士(医学)、名古屋市立大学大学院医学研究科助教（令和3年3月まで）

Ⅱ．成果の詳細

Ⅱ－１ 有機リン化合物曝露評価指標としての尿中ジアルキルリン酸の有効性の検証

公立大学法人 名古屋市立大学

大学院医学研究科 環境労働衛生学

上島 通浩

榎原 毅

伊藤 由起

佐藤 博貴

〈研究協力者〉

名古屋市立大学大学院医学研究科

大矢 奈穂子

同

野正 夏鈴

同

Nayan Chandra Mohanto

同

湊 京子

同

加藤 沙耶香

同

松木 太郎

同

玉田 葉月

同

金子 佳世

東海コープ事業連合商品検査センター

斎藤 勲

名古屋市衛生研究所食品部

土山 智之

同

勝原 美紀（平成30年度研究協力者）

〔要旨〕

有機リン系殺虫剤（以下、OP）の健康リスク評価を行う小児環境保健疫学研究においては、生物学的モニタリング（バイオモニタリング、以下BM）によるOPの曝露評価指標として尿中ジアルキルリン酸（以下、DAP）が広く測定されている。しかし、DAPは特定のOPに特異的な代謝物ではないため、尿中DAP濃度上昇に伴うリスクの上昇が示されOPのリスク管理が求められた時に、管理対象となる化合物を特定する手法が必要である。また、尿中DAP濃度の健康リスクベースでの参照値は、世界的に設定されていない。

そこで本研究では、尿中OP代謝物から曝露親化合物を同定するためのノンターゲット（以下、NT）分析法を開発した。そして、エコチル調査参加600人中、尿中DAP濃度が相対的に高い200人について、開発した方法を用いて曝露OPを明らかにした。また、成人女性の集団で陰膳調査と採尿を行い、NT分析により尿中OP代謝物の親化合物を同定するとともに、主曝露源とされる飲食物中のOP及びOPの環境中での分解により生成されるDAPを測定し、これらと尿中DAP濃度とを対比した。さらに、動物実験によって、ジクロロボス、トリクロロホン、フェニトロチオンそれぞれについて、脳、赤血球、血漿コリンエステラーゼ（以下、ChE）阻害と尿中DAP排泄量との関係を明らかにし、ChEの活性を20（または10）%抑制する投与量における尿中DAPの排泄量（以下、EL20（またはEL10））およびその95%信頼区間下限値（以下、ELL20（またはELL10））を求めた。そして、これら3薬剤とDAPの複合投与時のChE活性及びDAP排泄量についても明らかにした。これにより、ヒト疫学調査から尿中DAP濃度と健康リスクとの関係が明らかになるまでの間、ヒトにおいてOP曝露のリスク判定のための尿中DAPのガイドライン濃度を仮決めることが可能になったと考えられる。

1．研究開発目的

OPの健康リスク評価を行う小児環境保健疫学研究においては、OPの曝露評価指標として尿中のDAP濃度を測定する。しかし、DAPは毒性の強さが異なる多種類のOPの共通代謝物であることに加え、体外の自然環境中でもOPの加水分解物として生成される。すなわち、尿中に排泄されるDAPは、摂取した多種のOP及びDAPそれ自体の両者に由来すると指摘されている。したがって、環境省エコチル調査

等の疫学研究において尿中DAP濃度上昇に伴うリスクの上昇が示され、OPのリスク管理の必要性が示されたとしても、現状では対象となる化合物を特定できない。また、このような性格を持つ尿中DAP濃度について、健康リスクを判定するためのガイドライン値を設定可能か、解明が望まれている。

そこで本研究では3つの目的を設定し、それぞれに対応するアプローチを実施することで、BMに基づくOPの曝露評価と、リスク管理対象物質の同定を含む測定結果の活用に関する知見を、革新的に前進させることを目指した。

- (1) 尿中に排泄されるOP代謝物のNT分析法を開発する。開発した方法を用いて、尿中に検出されるDAPの候補親物質を明らかにする。
- (2) 主曝露源である飲食物中のOP及びDAPと、実際に尿中で検出されるOP代謝物とを対比し、尿中のDAPが特定のOPへの曝露を反映しているか明らかにする。
- (3) 動物実験により、特定のOPの最大無毒性量(以下、NOAEL)に相当する尿中DAP量を明らかにする。また、OPおよびDAPへの複合曝露時の尿中DAP増加量を明らかにする。そうして、OPのリスク判定のための尿中DAPのガイドライン濃度が設定可能か明らかにする。

2. 研究目標

＜全体目標＞

疫学試料を用いて、尿中に検出されるOPの共通代謝物であるDAPの親物質を推定し、さらに主曝露源とされる飲食物中のOPおよびDAP量を分析する。また、動物実験により尿中DAP濃度を用いたリスク判定のためのガイドライン値を推定する。これらの結果をふまえ、尿中DAPによるリスク管理の可能性を明らかにする。

＜サブテーマ1の目標＞

- 1) 「子どもの健康と環境に関する全国調査（エコチル調査）」愛知ユニットセンターにおける妊婦 600 人の尿中 DAP を測定し、うち比較的 DAP 濃度が高い 200 人について尿の NT 分析により親物質を推定する。
- 2) 成人女性 60 人から収集した陰膳および尿について、陰膳試料中の OP および DAP 測定を行うと共に、尿試料について NT 分析を完了し結果を対比させる。
- 3) ラットにOPおよびDAPを経口投与し、尿中DAP量と脳・赤血球・血漿中のコリンエステラーゼ（ChE）活性との関係をそれぞれ確認する。ChE活性をアウトカムとした場合の最大無毒性量に相当する尿中DAP量、およびOPとDAPに複合曝露した時の尿中DAPの増加量を明らかにする。

3. 研究開発内容

研究目標達成のために、以下の3つのアプローチを設定した。

【アプローチ1】尿中に検出されるDAPの親物質の解明

【アプローチ2】飲食物に含まれる尿中DAP親物質の解明

【アプローチ3】尿中DAP排泄量と神経影響との量反応関係の解明およびOPとDAPへの複合曝露時の尿中DAP排泄量の解明

以下、アプローチごとに具体的に記述する。

【アプローチ1】尿中に検出されるジアルキルリン酸（DAP）の親物質の解明

本アプローチは、①OPのNT分析法の開発およびその妊婦集団への適用と、②妊婦集団の尿中DAPの測定から成る。名古屋市立大学の倫理審査委員会の承認（承認番号 70-00-0134）および動物実験委員会の承認（承認番号H29M-37）を得た後に実施した。

以下、それぞれについて述べる。

① 有機リン系殺虫剤（OP）関連親物質のNT分析戦略と検討内容

まず、ヒト尿中に検出されるDAPの親化合物は、残留農薬として食品中に検出される頻度の高い薬剤である可能性が高いと仮定し、BMとしてのNT分析条件検討のための対象物質を選定した。

そして、これらの定量分析条件（分析カラム、移動相、試料の前処理方法）を検討した。分析には、高速液体クロマトグラフ-高分解能質量分析計（Liquid chromatography-High resolution/mass spectrometry; 以下、LC-HR/MS、Thermo Fisher Scientific社製、Ultimate 3000-Q Exactive Focus）を用いた。分析用のカラムは、C18系カラムであるHypersil Gold, 100×2.1 mm, 1.9 μ m およびHydrophilic Interaction Chromatography (HILIC) 系カラムであるHypersil Gold™ HILIC, 100×2.1 mm, 1.9 μ m（どちらもThermo Scientific社）を用いて検討した。移動相は、溶出溶媒としてアセトニトリル、メタノール、添加剤はギ酸および酢酸について検討した。前処理方法は、QuEChERS（Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe）法（図1. 1）で行った。しかし、既報では尿試料の使用量が5 mLと多かったため、使用する塩の量を5分の1にし、尿試料を1 mL使用することとした。

サンプル作成手順: QuEChERS法

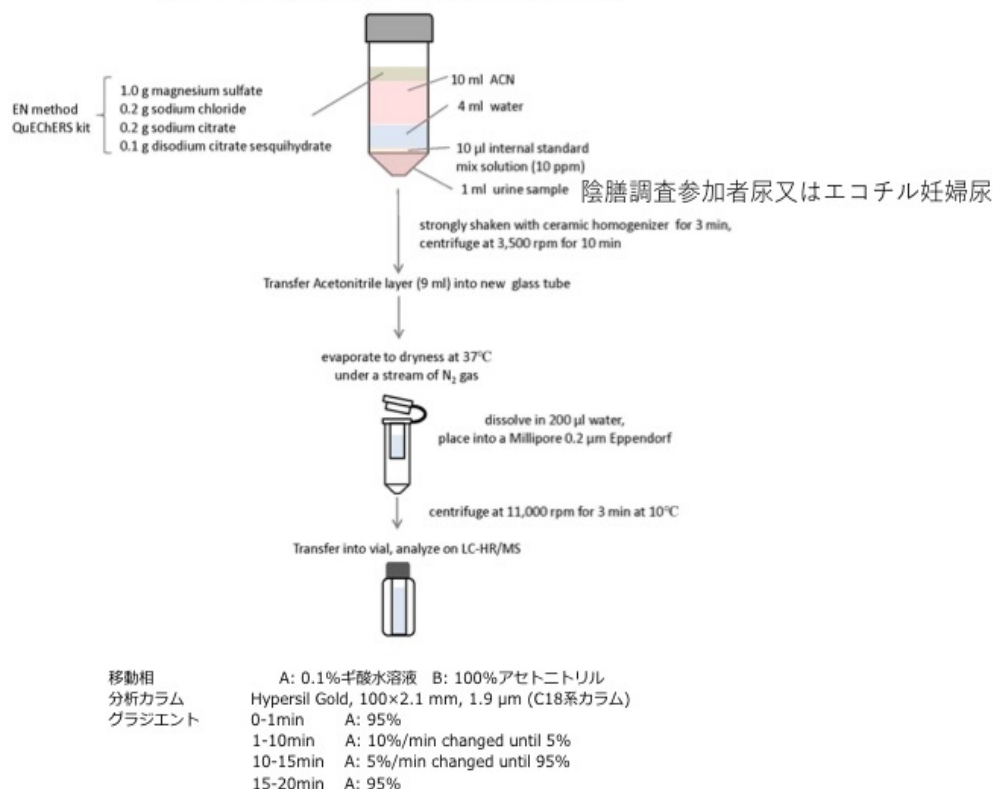


図1. 1 尿試料前処理のためのQuEChERS法³⁾

分析用試料は以下のように作成した。硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム、クエン酸二ナトリウム1.5水和物の入った遠沈管に、尿を加えた。そこに、アセトニトリルを加え、混合し振とうさせた。遠心後、アセトニトリル層を新しいチューブに分取し、窒素ガスで乾固させた。乾固後、アセトニトリルに溶解させ、遠心ろ過後、ろ液をLC-HR/MSで分析した。

物質同定は化学構造推定ソフト（Compound Discoverer 3.0（Thermo Fisher Scientific社製））を用いて、以下の2つの方法を検討した。

1つめの方法は、ヒト尿試料のLC-HR/MS分析で得られたピーク物質のイオンスペクトルを同ソフトに読み込み、同位体存在比から計算される精密質量情報より予測される組成式が、米国環境保護庁が公開している農薬データベース10種類（52種類のOPが登録。Pesticide Chemical Search Database, Swiss Pesticides and Metabolites, Pesticide Screening List for Luxembourg, Natural Product Insecticides, Office of Pesticide Programs Information Network, PESTACTIVES, List of Inert Ingredients Food and Nonfood Use, Pesticide Properties DataBase, Swiss Pesticides and Transformation Products, TOXCAST_PhaseI-EPA ToxCast Screening Library [Phase I subset]）の登録化合物に一致するか照合する方法である。

2つめの方法は、OP関連親物質から予想される尿中代謝物について質量分析用のオリジナルデータベースを作成し、照合する方法である。日本国内で出荷報告（国立環境研究所 化学物質データベース 2016年）のある35種類の有機リン化合物の代謝マップを文献調査し、該当するOPの代謝物を拾い上げた。情報が十分ない場合は想定される代謝物をリストに加え、合計238物質を化学構造推定ソフトの解析対象物質リストに登録した。同ソフトには、登録化合物からの生成が考えられる各種分解化合物の推定機能があり、推定された物質が尿試料中に検出されれば、登録化合物が試料中に存在する可能性を考えることができる。そこで、マウスを用いた実験を行った。

上記35種類のOP関連親物質の半数致死量（LD50）の1/2量および1/4量をコーンオイルに溶解し、マウスに経口投与した。代謝ケージにより24時間尿を採取し、前処理後、LC-HR/MS分析した。得られたクロマトグラムピークのうち、1/2量および1/4量投与下でのピークの高さが溶媒のみ投与時のピークより高い場合に、このピーク物質を代謝物候補とし、精密質量、保持時間（ t_R ）、フラグメントイオンスペクトルをライブラリソフト（mzVault™ 2.3（Thermo Fisher Scientific社製））に仮登録した。以下、この仮登録したデータセットを「マウスデータ」と呼ぶ。

そして、ヒト尿から得たピーク物質の精密質量（候補組成式）と保持時間がマウスデータ仮登録化合物と一致した場合、フラグメントイオンスペクトルと一致するか調べた。標準品が得られる時は標準品からの情報に照合した。これらの結果より同定の程度をレベル付けした（図1. 2）。

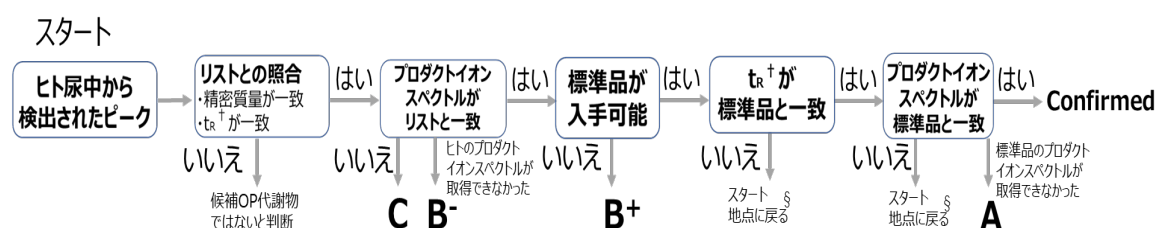


図1. 2 ヒト尿中から検出されたピークのレベル識別のためのフローチャート

[†] t_R , 保持時間（誤差許容範囲 ± 0.3 分） § この時、ヒト尿中から検出されたピークは標準品とは違う物質と判断し、スタート地点に戻ってもう一度レベルの識別を行う。最終的にはレベルB代謝物として識別される。

この解析を、②で述べる妊婦200人および【アプローチ2】で調査した成人女性73人で行い、曝露しているOPを明らかにした。

② 妊婦の尿中DAPの測定

調査への協力に同意したエコチル調査愛知ユニットセンター参加妊婦2159人のうち、妊娠中2時点（1時点目 T1、2時点目 T2）の尿がいずれも3.5 mL以上ある2132人を選定した。さらにそのうち、1歳半、3歳時点で尿中のDAP濃度の測定結果がある児（平成27－29年度環境研究総合推進費「脳の発達臨界期にあたる幼児期の殺虫剤ばく露量モニタリング（5-1551）」）の母親805人から、尿収集時期の早い順に600名をDAP測定対象者として選定した。研究期間の各年度に、200人ずつDAP分析によるBMを行った。液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計（以下、LC-MS/MS、Waters社製、ACQUITY I class-Xevo-TQS）を用い、6種類のDAP（DMP, DMTP, DMDTP, DEP, DETP, DEDTP）を測定した（検出下限値はDMP 0.14 µg/L、DMTP 0.10 µg/L、DMDTP 0.29 µg/L、DEP 0.29 µg/L、DETP 0.04 µg/L、DEDTP 0.08 µg/L）。測定値を、メチル系代謝物の総和（DMP+DMTP+DMDTP, Σ DMAP）、エチル系代謝物の総和（DEP+DETP+DEDTP, Σ DEAP）、6種類のDAPの総和（ Σ DMAP+ Σ DEAP, Σ DAP）として評価した⁴⁾。このうち濃度の高い200人については、開発したNT分析法（①を参照）を適用して親物質を検索した。

【アプローチ2】飲食物に含まれる尿中DAP親物質の解明

本アプローチは、成人女性集団の陰膳および尿の収集と各試料の分析（陰膳試料については含有する個別OPおよびDAP（体外環境中で分解反応により生じるDAP）の定量、尿試料はOP代謝物のNT分析）、そして同一人の陰膳資料と尿試料の分析結果の対比から成る。名古屋市立大学の倫理審査委員会の承認を得た後に実施した（承認番号 60-18-0021）。以下、それぞれについて述べる。

① 陰膳・尿試料の収集と処理

某大学4年生の女子学生に調査への参加協力を依頼した。同意者からは、連続2日間の朝・昼・夕食および間食、食事記録表と食事写真、調理水、問診票の提出を得た。食事は、一食ごとに密閉袋に分けて入れ、提出まで冷蔵保存とした。食事とともに摂取した飲料は食事と同じ袋に、それ以外の飲料は専用のボトルに入れて収集した。3日目の早朝に採尿し、2日目の食事と共に回収した（図1. 3）。各食事をRobot Coupe Blixer-3D（FMI社製）にて粉碎した。約250 gを秤量し、予備冷凍後、完全に乾燥するまで凍結乾燥装置FDU-2110（東京理化器械（株）製）で処理した。残りの60 gは密閉袋に移し、-80℃で保存した。食事時以外に飲んだ飲料はボトルのまま-80℃で、また、未開封の市販品飲料は冷蔵下で保存した（開封済みのもの、野菜・果物飲料はボトル中で-80℃で冷凍）。調理水も-80℃で保存した。早朝尿は、2 mLチューブに分注し、-80℃で冷凍した。

【対象】某大学4年生の女子生徒 73名（78名リクルート）

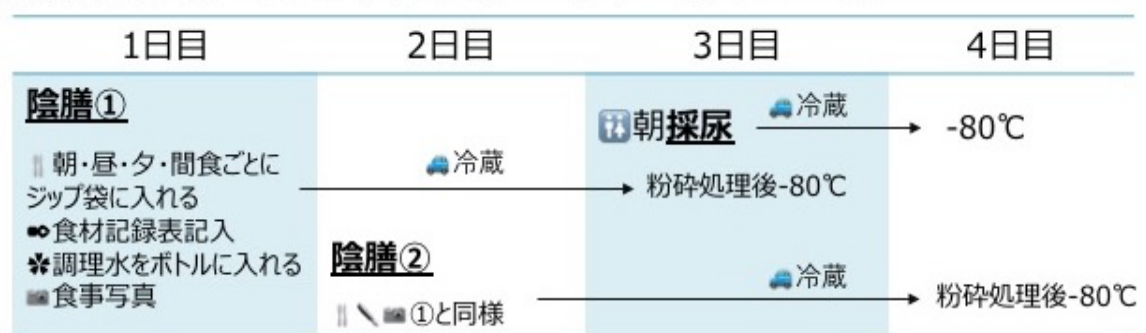


図1. 3 陰膳調査の概要

② 陰膳試料中のOPおよび分解物の分析

平成29年国民健康栄養調査における20歳以上の年齢階級での食品群別摂取量をもとに、分析法

検討用のモデル食事を検討し、実際に調理したものを試料として分析条件を検討した。

凍結乾燥試料中のOP85種類、その分解物5種類およびDAP6種類の分析を、ガスクロマトグラフ・タンデム型質量分析計（以下、GC-MS/MS, Agilent社製, 7890B-7010）およびLC-MS/MS（Waters社製, ACQUITY I class plus-Xevo-TQXS）を用いて行った。

凍結乾燥試料2.5 gに内部標準物質（6種のDAP、アセフェート、メタミドホス）、水、アセトニトリルおよびヘキサンを加え、よく混合した。遠心後、ヘキサン層および水・アセトニトリル層を分取した（分取液①）。残渣にアセトニトリルと水の混合液を加え混合し、超音波抽出した。遠心後、水・アセトニトリル層を分取した（分取液②）。ヘキサン層にアセトニトリルを加え、振とうし、アセトニトリル層を分取した（分取液③）。分取液①～③をすべて合わせ、水とアセトニトリルを加え、抽出液の濃度が凍結乾燥試料0.1 g/mLの濃度となるまでメスアップした。抽出液を遠沈管に移し、グラファイトカーボンを加え、振とうし、遠心した。その後の操作は、GC-MS/MSとLC-MS/MS測定用途に分けて行った。

【GC-MS/MS測定用試料】

遠心後、上清を分取し、硫酸マグネシウムおよび塩化ナトリウムを加えて脱水した。その上清を採取し、エバポレーターで濃縮乾固させた。乾固後、アセトンを加え、超音波で残渣を溶解し、0.2 μmのフィルターに通し不溶物を除去した。通過液を採取し、アセトンを加え、GC-MS/MSで分析した。分析用カラムにはVF-5MS, 30 m×0.25 mm×0.25 μm（Agilent社製）を用いた。

【LC-MS/MS測定用試料】

遠心後、上清を分取し、10%ギ酸、ヘキサンを加え振とうした。ヘキサン層を除去し、エバポレーターで濃縮し、水とアセトニトリルを加え定容した。この溶液を分取し、MonoSpin SCX（GLサイエンス社製）に負荷し、遠心した。通過液を0.2 μmのフィルター付き遠心ろ過フィルターに移し、ろ液をLC-MS/MSで分析した。分析カラムには、CAPCELL PAK C18 AQ, 150×2 mm, 3 μm（大阪ソーダ社製）（メタミドホス、アセフェート、DMP、DMTP、DEP、DEDTP）およびScherzo SM-C18, 150×2 mm, 3 μm（インタクト社製）（DMDTPおよびDETP）を用いた。

添加回収試験は、凍結乾燥処理前の試料に添加したDAPの濃度が1 ppbと5 ppb、OPおよび分解物の濃度が5 ppbと20 ppbになるように標準品を加えた際の回収率を求めた。また、凍結乾燥処理後の試料に添加したDAPの濃度が5 ppbと20 ppb、OPおよび分解物の濃度が1 ppbと4 ppbになるように標準品を加えた際の回収率を求めた（凍結乾燥前の添加濃度は、凍結乾燥処理により、8割程度の水分が蒸発するため、1/5の濃度を添加した）。5回の分析結果の平均値により評価した。6種類のDAP、アセフェート、メタミドホスは内部標準物質により値を補正した。

陰膳試料および飲料中に検出された各OPおよびDAPの濃度から1日目、2日目の摂取量を求め、検出率、濃度分布、尿中DAP濃度との相関、推定尿中排泄量に占める割合を計算した。

③ 陰膳提供者の尿中OP代謝物のNT分析

【アプローチ1】で開発した方法を用い、73人の尿中OP代謝物のNT分析を行った。

【アプローチ3】尿中DAP排泄量と神経影響との量反応関係の解明およびOPとDAPへの複合曝露時の尿中DAP排泄量の解明

本アプローチは、大きく2種類の実験研究から成る。まず、①毒性の強さが異なる3種類のOPについて、それぞれ**コリンエステラーゼ**（以下、**ChE**）の活性を20（または10）%抑制する投与量における尿中DAPの排泄量（Exposure Limit of urinary dimethyl phosphate at 20（または10）% inhibition of cholinesterase activity；以下、**EL20**（または10））の95%信頼区間下限値（Lower limit of 95% confidence interval of EL20（またはEL10）；以下、**ELL20**（またはELL10））（図0.3）を求めた。その後、②これら3薬剤とDAPの複合投与時のChE活性及びDAP排泄量を求めた。実験は動物実験委員会の承認（承認番号H30M-02）を得て実施した。以下、各実験について述べる。

- ① 神経毒性の強さが異なる3種類のOP
個々のEL20（またはEL10）・ELL20
（またはELL10）の算出

フェニトロチオン（以下、FNT；経口LD50 1700 mg/kg）およびトリクロルホン（以下、TCF；同250 mg/kg）をそれぞれ用量段階別にラットに投与し、尿中DMP排泄量と血液・脳のChE活性を測定した。そして、別の研究で同様の実験を行なったジクロルボス（以下、DDVP；同LD50 50 mg/kg）についての結果を利用して、EL20と

ELL20の算出法を検討した。同じ方法をFNT、TCFに適用した。

米国環境保護庁（EPA）の行政文書⁵⁾では、Sprague-Dawleyラットの雌雄にFNTを13週間混餌投与した結果、1.70 mg/kg/day群で雌ラットの脳・赤血球および血漿ChE活性が非投与群に対して統計学的に有意に抑制されたと報告されている。同文書では、雄ラットでは1.96 mg/kg/day群で赤血球および血漿ChE活性が同様に低下したとされ、また、雌ラットでは血漿ChE活性に影響のない投与量は0.282 mg/kg/dayであった。同様にTCFでは、Fischer 344 ラットへの24か月間の混餌投与で、脳・赤血球ChE活性の最小毒性用量が13.3 mg/kg/dayと報告されている⁶⁾。これらの情報より、本アプローチでは投与用量をFNTではControl、Low、Middle、Highの4群に、TCFではControl、Very low、Low、Middle、Highの5群として設定した。10週齢のWistar雄性ラット40（FNT）または50匹（TCF）を1週間ケージ内で馴化させ、各用量群に10匹ずつ振り分けた。FNTはコーンオイル、TCFはクエン酸緩衝液（pH 5.5）に溶解し、強制経口投与した。自由飲水・摂餌とした。図1．4にFNTの実験プロトコルを示す。実験期間は2週間で、5日を1クールとし、2日の休薬を挟んで2クール投与した。投与後1時間は症状観察を毎回行った。

最終投与直後より代謝ケージに動物を移し、6、12、24時間後の各時点で採尿した。尿検体は－80℃で保管した。採尿終了後（最終投与翌日）に麻酔下で大動脈血（ヘパリン処理）および脳を採取した。血液は全血と血漿に分け、その日のうちに赤血球および血漿ChE活性を測定した。脳は液体窒素で直ちに凍結後、－80℃で保管し、後日、脳ChEを測定した。各ChE活性の測定は、Voss and Sachsse の変法⁷⁾を用いた。FNT投与尿ではDMPおよびDMTPを、TCF投与尿ではDMPをガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）で既報⁸⁾に従い測定した。

近年、量反応関係を評価する手法としてベンチマークドーズ（以下、BMD）法が用いられようになり、離散量として設定する用量間の曝露と反応の関係性について曝露量を連続変数として評価することが可能となった⁹⁾。まず、別研究で測定したDDVP投与ラットのChE活性と尿中DMP量について、BMD法と同様に数理モデルをあてはめ、EL20、ELL20を求めた（図0．3）。そして、これらの指標をFNTおよびTCFの単独投与実験、DDVP・FNT・TCF・DMPの混合投与実験についても算出した。解析には統計解析ソフトRの拡張パッケージである drc package（version 3.0-1）を用いた。対照群では、尿中DAP値をゼロとして解析を行った。

EL20およびELL20と既存のBMD指標との関係を調べるために、ChE活性と各OP投与用量の関係について、ChE活性の20%抑制に対応する指標であるBMD₂₀およびBMDL₂₀を求めた。BMD解析にはオランダ国立公衆衛生環境研究所のPROASTソフトウェア（version 65.5）および米国環境保護庁のベンチマークドーズソフト（BMDS version 2.7.0.4）を使用した。DDVP投与用量と尿中代謝物量の関係より換算式を求め、同式を用いてELL20を与える各OP投与量を算出してBMDL₂₀と比較した。この算出値にはBMDL₂₀と明らかな乖離は認められなかった。

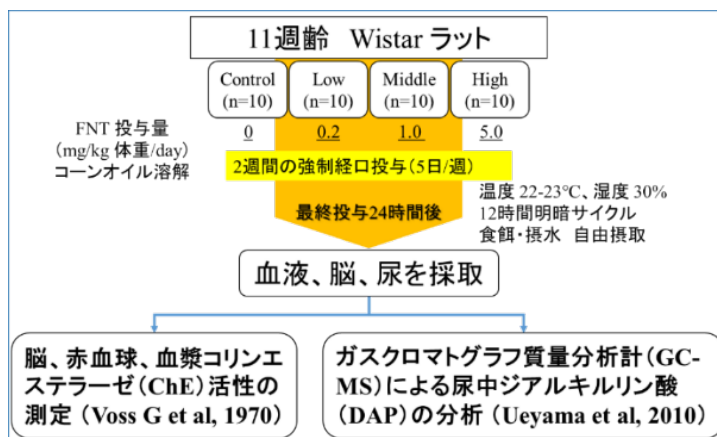


図1．4 実験プロトコル（FNTの場合）

② 3 薬剤と環境中分解物であるDMPとの混合投与実験

ラットを5群に分け（対照群、TCF単独投与群、TCF+DDVP投与群、TCF+DDVP+FNT投与群、TCF+DDVP+FNT+DMP投与群）、複合曝露がChE活性と尿中DAP濃度に与える影響を調べた。各OPの投与用量は、ELL10相当の尿中DMP量をもたらす推定薬剤量とした。DMPについては、アプローチ2の陰膳分析結果を参考に定めた。

4. 結果及び考察

【アプローチ1】尿中に検出されるジアルキルリン酸（DAP）の親物質の解明

① 有機リン系殺虫剤（OP）関連親物質のNT分析

分析法の検討の結果、HILICカラムではフタラミン酸の検出感度が悪く、また、複数の物質の検出時間が重なったため、C18カラムを選択した。移動相は、メタノールで溶出した場合、メタミドホスのピークが割れたため、アセトニトリルを選択した。添加剤は、酢酸をアセトニトリルに加えた場合、ギ酸を加えた場合に対して、3-メチル-4-ニトロフェノール（MNP）および4-ニトロフェノール（4NP）の標準品無添加90%アセトニトリルサンプルでのArea面積が大きかったため、ギ酸を選択した。

以下、2通りの分析戦略による結果について述べる。

陰膳調査参加73人の尿試料について、LC-HR/MS分析で得られたピーク物質の精密質量情報より予測される組成式を米国環境保護庁の公開農薬データベース10種類に照合した結果は以下のとおりである。

全体で43991ピークが検出され、うち5191ピークの組成式がデータベース登録化合物にヒットした。52種の登録OPに着目すると、25種の親化合物および代謝物の組成式と一致したが、ピーク保持時間が標準品と一致したのは、安息香酸と2,4-ジクロロフェノールのみであった。安息香酸は3人に、2,4-ジクロロフェノールは16人の尿から検出された。DAPはこの方法ではどの試料からも同定されなかった。なお、安息香酸は食品保存料として使われるため、尿中での検出がOPへの曝露を必ずしも意味しない。

このように、公開データベースを用いたNT分析で安息香酸と2,4-ジクロロフェノールが同定されたものの、これらデータベース上に登録されているOP代謝物の数は限られているために、BMによるNT分析への公開データベースの利用可能性はきわめて限定されることが明らかになった。

一方、2つめの方法である、質量分析用のオリジナルデータベース（マウスデータ）と照合する方法では、陰膳調査参加者73人からは、マウスデータとの一致の確認後、入手した標準品によりプロチオホスの3種類の代謝物が同定され、プロチオホスへの曝露が推定された（表1. 1）。検量線を作成して尿中濃度を定量した結果、5人に検出された3,4,5-trihydroxy-6-(2,4-dichloro phenoxy) oxane-2-carboxylic acidの濃度は7-100 ppb、3人に検出された2,4-dichlorophenolの濃度は10-15 ppb、4人に検出された(2,4-dichlorophenyl) hydrogen sulfateの濃度は10 ppb未満であった。

エコチル調査参加妊婦200人の解析では、1種類のDAP（DETP）が標準品と一致するレベルで同定され、この他に、6種類の親化合物曝露に関連付けられる9種類の化合物が同定された（表1. 2）。

表1. 3に、2つの対象集団において同定レベルB+（検出ピークの精密質量、保持時間、プロダクトイオンがマウスデータと一致するものの標準品が入手できず確定できなかった化合物）以上の代謝物の検出結果を示す。

表1. 1 陰膳調査対象者で検出された代謝物とその親化合物

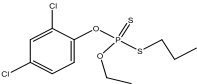
OP compound	Chemical structure	Expected metabolite	Formula	Ionization mode	t _R [†] (min)		Exact mass		
					Mouse	Human	Predicted	Mouse	Human
Prothiofos		3,4,5-trihydroxy-6-(2,4-dichloro phenoxy) oxane-2-carboxylic acid	C ₁₂ H ₁₂ Cl ₂ O ₇	ESI-	7.9	7.9	337.996	337.997	337.99632 – 337.99678
		2,4-dichlorophenol	C ₆ H ₄ Cl ₂ O	ESI-	10	9.9	161.964	161.964	161.96422 – 161.96437
		(2,4-dichlorophenyl) hydrogen sulfate	C ₆ H ₄ Cl ₂ O ₄ S	ESI-	8.1	8.2	241.921	241.921	241.92090 – 241.92111

表 1. 2 エコチル調査参加妊婦で検出された OP 関連代謝物とその親化合物

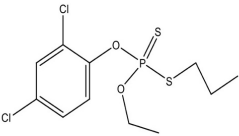
OP compound	Chemical structure	Expected metabolite	Formula	Ionization mode	t _R [†] (min)		Exact mass		
					Mouse	Human	Predicted	Mouse	Human
Prothiofos		3,4,5-trihydroxy-6-(2,4-dichlorophenoxy)oxane-2-carboxylic acid	C ₁₂ H ₁₂ Cl ₂ O ₇	ESI-	7.9	7.9	337.996	338	337.99656 — 337.99714
		2,4-dichlorophenol	C ₆ H ₄ Cl ₂ O	ESI-	10	9.9–10.0	161.964	161.96	161.96426 — 161.96446

表 1. 3 同定レベルB+以上のOP代謝物の検出結果

親OP薬剤	候補OP代謝物	化学式	保持時間 (分)	分類レベル	妊婦	陰膳
プロチオホス	2,4-dichloro phenol以外	C6 H4 Cl2 O	7.6	B+	○	○
	2,4-dichloro phenol	C6 H4 Cl2 O	10	confirmed	○	○
	2,4-dichloro phenyl sulfate	C6 H4 Cl2 O4 S	8.1	confirmed	○	○
	2,4-dichloro phenolのグルクロン酸抱合体	C12 H12 Cl2 O7	7.6	confirmed	○	○
	2,4-dichloro phenolのグルクロン酸抱合体	C12 H12 Cl2 O7	7.9	confirmed	○	×
	2,4-dichloro phenolのグルクロン酸抱合体	C12 H12 Cl2 O7	7.8	confirmed	○	×
	2,4-dichloro phenolのグルクロン酸抱合体	C12 H12 Cl2 O7	7.7	confirmed	○	×
	3,5-dichlorocatecholのグルクロン酸抱合体	C12 H12 Cl2 O8	7.9	B+	○	×

② 妊婦の尿中DAPの測定

検出率およびパーセンタイル値、最大値を表 1. 4 に示す。2時点の測定値に関し、各パーセンタイル値は概ね近い濃度であった。

表 1. 4 妊婦の尿中DAP濃度の分布 (n=600)

		LOD	<LOD (n)	検出率 (%)	パーセンタイル				最大値
					25	50	75	95	
T1	DMP (μg/L)	0.14	60	90.0	0.80	1.9	4.6	16.1	94.8
	DM TP (μg/L)	0.1	72	88.0	0.77	2.7	8.4	38.3	222
	DMD TP (μg/L)	0.29	382	36.3	0.20	0.20	0.42	1.6	37.5
	DEP (μg/L)	0.29	85	85.8	0.69	1.9	4.5	12.0	257
	DETP (μg/L)	0.04	41	93.2	0.15	0.30	0.7	3.0	171
	DED TP (μg/L)	0.08	347	42.2	0.05	0.05	0.3	1.6	6
	ΣDM AP (nmol/L)	—	—	—	15.5	40.8	108	374	1990
	ΣDEAP (nmol/L)	—	—	—	6.3	17.4	36.1	109	1683
ΣDAP (nmol/L)		—	—	—	29.8	66.9	147	467	2091
T2	DMP (μg/L)	0.14	74	87.7	0.57	1.7	4.5	12.2	48.9
	DM TP (μg/L)	0.1	77	87.2	0.63	2.6	7.9	31.9	164
	DMD TP (μg/L)	0.29	388	35.3	0.20	0.20	0.46	1.5	26.4
	DEP (μg/L)	0.29	76	87.3	0.69	1.9	3.9	12.3	89.7
	DETP (μg/L)	0.04	49	91.8	0.15	0.27	0.59	2.4	13.7
	DED TP (μg/L)	0.08	340	43.3	0.05	0.05	0.27	1.4	11.3
	ΣDM AP (nmol/L)	—	—	—	13	37.5	95	296	1547
	ΣDEAP (nmol/L)	—	—	—	7	15.4	33.5	92	584
	ΣDAP (nmol/L)	—	—	—	26.2	58.7	132	425	1675

アプローチ1の成果をまとめると、以下のようになる。

- (1) 現状ではOPの尿中代謝物のNT分析に利用可能なデータベースは実質的に存在しないことが、確認された。本研究では、ヒト尿試料で検出されたピーク物質情報をオリジナルに作成したマウスデータと照合することで、DAPに代謝されるOPに加え、それ以外のOPが初めて検出された。すなわち、本研究で開発したNT分析戦略は有効であることが示された。
- (2) エコチル調査参加妊婦200人および女子大生73名の尿試料の解析により、DAPに代謝されないOPとしてはプロチオホスの代謝物が検出された。
- (3) 一方、マウスデータ作成を試みた35種の有機リン化合物のうち、除草剤グリホサートのみはクロマトピークを得ることができず、この物質の物性が特異的であることがその原因である可能性が考えられた。また、本NT分析では同定された尿中化合物にDETP以外のDAPが含まれなかった。これらの事実は、用いた前処理法（QuEChERS法）が条件検討に用いた8種のOP代謝物には適していても、有機リン化合物の全ての代謝物に適するわけではないことを示すと考えられる。
- (4) このように、全ての代謝物を等しく高感度で検出するNT法は難しいにしても、今回開発した方法により、国内で使用実態のある34種類のOP・有機リン化合物の網羅的なマウスデータを得ることができた。そして、実際にヒト尿試料を分析してマウスデータに相当するピーク物質を得た場合は、その物質を同定するフローを確立した。すなわち、エコチル調査等で尿中DAP濃度と健康リスクとの有意な関連が認められ、リスクに寄与する物質の解明が必要な場合には、曝露親物質を本研究のアプローチで追求可能であることを示した。

【アプローチ2】飲食物に含まれる尿中 DAP 親化合物の解明

① 陰膳・尿試料の収集と処理

78名に参加の声掛けを行い、同意を得た73名から2018年6月～7月に陰膳および尿試料を収集した（5名は、医薬品を服用中であったため不参加）。収集した食事489食全てを凍結乾燥処理した。凍結乾燥前の重量のうち、平均80%分の水分が蒸発した。

② 陰膳試料中のOPおよび分解物の分析

OP26種およびOP分解物5種の添加回収試験結果は、概ね60～130%の間に収まり良好であったが、食事試料中のマトリックスの影響により、回収率が60%を下回る、または130%を上回る物質があった。また、標準品を凍結乾燥処理前に添加した時には、後に添加したもの比べDAPと同じく回収率が低く、処理による喪失があった。

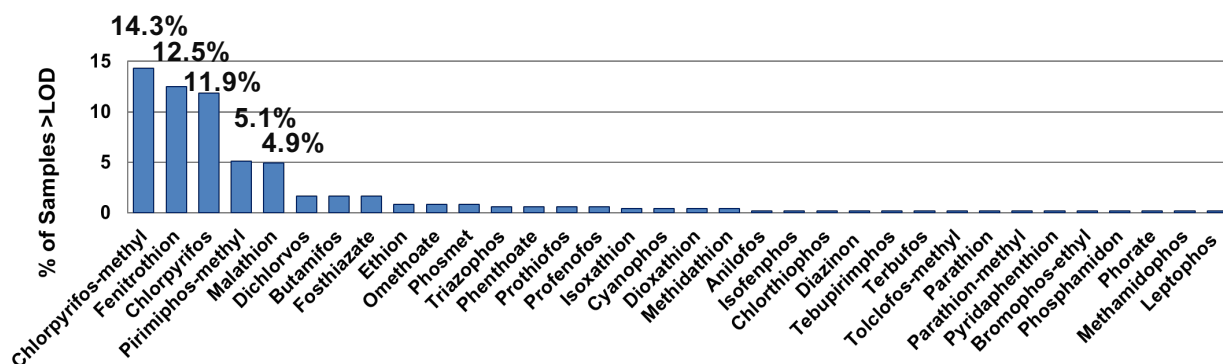


図1. 5 各陰膳試料（n=489）からのOP検出率

全陰膳試料からのOPの検出状況を図1. 5及び図1. 6に示す。検出された主なOPは、検出率が高い順に、クロルピリホスメチル、フェニトロチオン、クロルピリホス、ピリミホスメチル、マラチオン、DDVP、ブタミホス、フォスチアゼートであった（図1. 5）。食事時以外の飲料から検出されたOPはクロルピリホス、シアノホス等であった（図1. 6）。また、DAPの検出状況を図1. 7に示す。DAPは高頻度に陰膳試料中から検出され、DMP、DEP、DMTPの検出頻度が高かった。

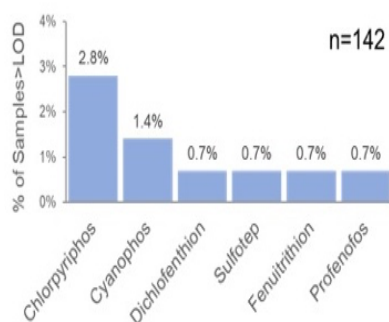


図1. 6 食事時以外の飲料からのOP検出率

0.05のものは見られなかった。尿中排泄量に対して2日目の食事の占める割合(%)は図1. 9に示した。

尿中DAP濃度との相関が1日目に比べ良好だった2日目の陰膳中OP、DAPの濃度分布を表1. 5（注：1日あたりの総摂取量を解析する視点から3食分の合計データを用いた）に示した。1日目と2日目の推定OP摂取量間の有意な相関については、図1. 8に示した。2日目の喫食物中OPまたはDAP濃度と尿中DAP濃度との相関（False Discovery Rateを補正した $q < 0.05$ のもののみ示す）は表1. 6に示した。食事中OPと尿中DAP濃度の間には $q <$

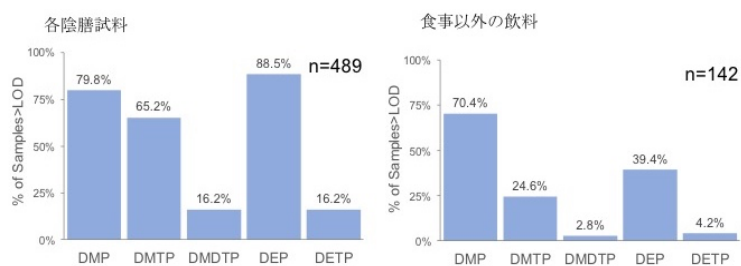


図1. 7 陰膳試料・飲料におけるDAP検出率

- ③ 陰膳提供者の尿中OP代謝物のNT分析
【アプローチ1】の①において結果を述べた。

表1. 5 2日目の陰膳中OP, DAPの分布

	DMP	DMTP	DM DTP	DEP	DETP	DE DTP	クロルピリ ホスメチル	フェニトロ チオン	クロルピリ ホス	ピリミホス メチル	馬拉チ オン	ジクロ ルボス	ブタミホス	ホスチア ゼート	ダイアジ ノン	2-Isopropyl- 6-methyl-4- pyrimidinol
min.	0.08	<LOD	<LOD	0.28	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
25%ile	0.82	0.47	<LOD	0.90	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
50%ile	1.68	0.76	<LOD	1.82	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
75%ile	3.15	1.53	0.05	3.80	0.04	<LOD	0.01	0.01	0.01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
95%ile	7.00	4.35	0.22	13.80	0.18	<LOD	0.03	0.04	0.04	0.10	0.02	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.00
max.	30.35	30.20	1.26	87.52	0.25	<LOD	0.28	0.18	0.08	0.65	0.04	0.01	0.05	0.79	0.06	0.02

単位：ppb
LOD, 検出下限値未満

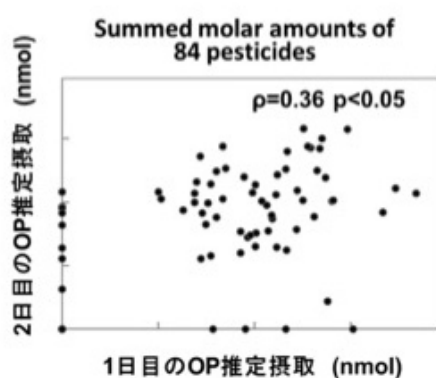


図1. 8 1日目、2日目のOP推定摂取量の関係

表1. 6 2日目の喫食物中OPまたはDAPと尿中DAPの相関

2日目食事中量	尿中DAP濃度 (μg/g Cr)	Spearman's ρ	q値
DMP	logDMTP	0.451	0.012
DMTP	logDMTP	0.462	0.012

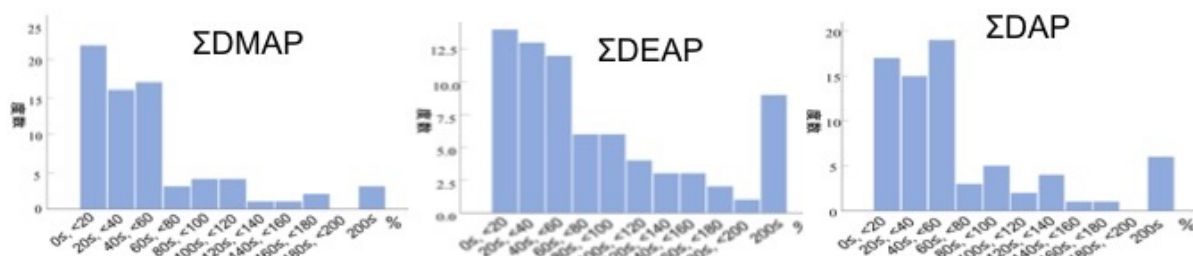


図1. 9 尿中排泄量に対して2日目の食事の占める割合(%)

アプローチ2の結果をまとめると以下のようになる。

- (1) 陰膳試料中のOPの検出頻度は、最大15%程度である。2日目に摂取した飲食物中で84種類のOPのうち、いずれかのOPが検出下限値以上であった対象者は、62名(85%)であった。
 - (2) 陰膳試料中からはDAPが高い頻度で検出される。すなわち、ヒトはDAPを経口的に摂取している。尿中DAPのBMを測定した環境疫学研究のほぼ全ての論文の考察で、このことは可能性として言及されてきたが、実証した研究はきわめて限られる。検出される濃度についても、DAPの濃度はOPに比べて圧倒的に高いことが明らかになった。
 - (3) 陰膳試料中のOP量に関し、1日・2日目の推定摂取量の間には有意な相関が見られた。すなわち、摂取量には食事のちがいに由来する個人差があるが、連続する二日間で見たと、同一人の摂取量には食事内容が変わっても一定の傾向のあることが示唆された。
 - (4) 2日目の摂取量と3日目の起床後第一尿の尿中濃度との間には、一部のDAPについて相関係数0.4以上で有意な関連が見られた。関連が有意であった陰膳中の化合物は、DMP(尿中物質はDMTP)とDMTP(尿中物質はDMTP)であった。また、陰膳試料中で検出率が比較的高かったクロルピリホスメチル、フェニトロチオン、クロルピリホス、ピリミホスメチル、マラチオンに関して、フェニトロチオン(レベルB+)、ピリミホスメチル(レベルB+)以外は尿中のNT分析で検出されなかった。また、尿中で同定された代謝物から推定された親化合物は、陰膳中に検出されたOPと一致しなかった。
 - (5) 2日目に喫食した飲食物中で、84種類のOPすべてが検出下限値未満であった11名の尿中DAP濃度の中央値(最大値)は、DMP 1.9(8.8) µg/L、DMTP 2.3(21.7) µg/L、DMDTP 0.35(3.1) µg/L、DEP 2.9(8.4) µg/L、DETP 0.22(0.59) µg/L、DEDTP 0.11(2.9) µg/Lであった。一方、OP摂取量が上位10%(7人)の尿中DAP濃度の中央値(最大値)は、DMP 4.1(4.7) µg/L、DMTP 1.6(14.2) µg/L、DMDTP 0.34(0.66) µg/L、DEP 1.5(19.4) µg/L、DETP 0.18(0.64) µg/L、DEDTP 0.04(1.6) µg/Lであり、両群間に有意差は認められなかった。すなわち、OPを相対的に多く含む飲食物を喫食しても尿中のDAP濃度には反映しにくいことが示唆された。
- (4)で述べた結果と総合すると、本陰膳調査の対象集団において、農薬として食事に残留するOPの量は環境中でOPが分解して食事にDAPとして存在する量に比べてごくわずかであり、尿中のDAP量に寄与するほどではないことがうかがわれた。ただし、本解析対象の女子大学生は、尿中DAP濃度の中央値(最大値)がそれぞれ、DMP 2.7(45.4) µg/L、DMTP 2.1(30.1) µg/L、DMDTP 0.21(3.1) µg/L、DEP 2.4(19.4) µg/L、DETP 0.22(2.0) µg/L、DEDTP 0.04(2.9) µg/Lであり、濃度が低い集団であることに留意する必要がある。
- (6) OPの体内半減期が一般に数時間オーダーであることに鑑み、2日目の食事からの有機リン化合物摂取量の総量(ΣOP+ΣDAP)が尿中排泄量(1日尿量1.5Lと仮定)に占める比率を見た時、半数以上の人は8割未満であった。尿中で同定されたOP代謝物の親化合物は、必ずしも陰膳試料中に検出されなかったこととあわせ、OPおよびDAPの曝露源として、飲食物以外の摂取経路の寄与が無視できない程度にある可能性を示唆すると考えられる。

【アプローチ3】尿中 DAP 排泄量と神経影響との量反応関係の解明および OP と DAP への複合曝露時の尿中 DAP 排泄量の解明

① 神経毒性の強さが異なる3種のOP個々のEL20（およびEL10）・ELL20（およびELL10）の算出

FNT投与のHigh群2匹において、1クール目の3日目と2クール目の1日目に顔面の痙攣を認めた（投与30分後より約5分継続）。また、1クール目の4-5日目に体幹の震えを認めた個体が1匹見られた（投与50分後、3分程度持続）。他の個体・群では、コリン作動性様症状と思われる所見（震え、流涎、落涙など）は投与期間中に観察されなかった。FNTに対する感受性の個体差の存在が示唆されたが、症状出現はHigh群に限られていた。TCF投与ラットでは、各群ともにコリン作動性様症状は認められなかった。

FNTおよびTCF投与期間中の体重変化、飲水・摂餌量および、投与終了後の尿量を表1. 7、1. 8に示す。一元配置分散分析では、TCF投与ラットの肝重量を除き投与群間に有意な差は認められなかった（ $P>0.05$ ）。FNT、TCF投与ともに各群の摂餌量に変化はなく、体重増加にも影響は無かった。

表1. 7 FNT及び溶媒投与ラットにおける体重・尿量

	Control	Low	Middle	High	p.value
匹数	10	10	10	10	
最終体重	300.9 (9.1)	306.1 (13.0)	300.7 (8.4)	302.6 (11.8)	0.66
体重増加率 (%)	5.0 (1.3)	6.1 (2.1)	5.3 (2.1)	5.2 (2.3)	0.57
飲水量 (ml/日)	28.4 (2.1)	28.8 (3.9)	28.2 (2.5)	27.5 (2.9)	0.78
摂餌量 (g/日)	17.0 (0.9)	17.3 (1.5)	16.5 (1.0)	17.3 (1.7)	0.46
24時間尿総量 (μl)	6231 (2228)	5656 (1101)	6660 (2636)	5318 (869)	0.39
0 - 6h尿量 (μl)	1081 (481)	1138 (725)	1377 (878)	1071 (556)	0.72
6 - 12h尿量 (μl)	1202 (392)	1196 (315)	1377 (423)	1119 (222)	0.41
12 - 24h尿量 (μl)	3948 (1532)	3322 (730)	3906 (1636)	3128 (705)	0.35

表1. 8 TCF及び溶媒投与ラットにおける体重・尿量

	Control	Very low	Low	Middle	High	p.value
匹数	10	10	10	10	10	
最終体重	290.3 (10.4)	289.6 (13.9)	290.0 (13.3)	293.6 (6.4)	292.8 (13.9)	0.93
体重増加率 (%)	9.4 (4.5)	9.2 (7.4)	10.0 (8.0)	9.1 (6.3)	11.4 (7.0)	0.94
飲水量 (ml/日)	27.1 (2.5)	26.3 (2.1)	26.0 (3.7)	26.9 (2.8)	28.8 (7.6)	0.62
摂餌量 (g/日)	17.7 (1.7)	18.0 (1.7)	17.7 (1.7)	17.4 (1.4)	17.7 (1.3)	0.95
24時間尿総量 (μl)	7002 (2002)	7375 (1735)	8350 (1922)	7350 (1592)	9397 (6128)	0.48
0 - 6h尿量 (μl)	2189 (711)	2160 (820)	2255 (650)	2185 (617)	2523 (1481)	0.90
6 - 12h尿量 (μl)	1136 (335)	1231 (579)	2068 (565)	1284 (346)	1952 (1202)	0.01
12 - 24h尿量 (μl)	3677 (1111)	3984 (843)	4027 (1173)	3881 (989)	4923 (3582)	0.64

各薬剤での投与群ごとの脳、赤血球および血漿のChE活性は、Dunnettの多重比較検定により、単剤投与では脳および赤血球ChE活性で各薬剤とも投与群CまたはDにおいて、それぞれ対象群に対して統計学的に有意な差（ $P<0.05$ ）を認めた。DDVP投与による値は、別研究で同一プロトコールで実

施した実験のデータを表1. 9に示した。本実験にて得られた各薬剤のNOAELの値は、EPA（1995, 1997）の報告と矛盾しない値であった。

表1. 9 投与薬剤によるChE活性

	対照群	投与群A	投与群B	投与群C
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)
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)
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)

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)

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

次に、DMP、DMTPおよびΣ DMAPごとに、各ChE活性の10%および20%低下に相当するELおよびELLを算出した。TCFについては、赤血球および血漿ChEにおいて高用量投与群の活性低下が小さかったことでモデル推定が収束せず、ELおよびELLは算出できなかった。今回用いた神経毒性の強さの異なる3薬剤について、単剤投与下ではそれぞれのChE活性の抑制程度に応じた、尿中DAPの評価値を設定できる可能性が示された。なお、脳ChEについてのEL10、EL20はともに、FNT<DDVP<TCFの順に大きく、LD50値の順序DDVP<TCF<FNTとは一致しなかった。

② 3 薬剤と環境中分解物であるDMPとの混合投与実験結果

全ての個体で症状はほぼ観察されなかった（体重等の詳細データは掲載せず）。赤血球ChE活性においてのみ、投与群C及びD（3剤投与および3剤＋DMP投与群）において統計学的有意に抑制（各16%）された。脳および血漿ChE活性には用量依存的な抑制は認められなかった。

3剤を各ELL10相当の用量で混合投与した時には、投与薬剤数の増加により尿中代謝物量も増加し、3剤＋DMP群で最も高くなった（Jonckheere-Terpstraの傾向検定でp<0.01）。以上の結果は、一般生活環境でOPに複合曝露する場合に、神経毒性としては各薬剤の影響が加算されること、環境分解物としてのDAPとの混合曝露が生じる場合には、ChE抑制の程度は変わらずにBMとして測定される尿中DAPは上乘せされることを示唆している。

この混合投与実験でのOPの投与量は、実際の一般生活環境下の曝露量にできるだけ近い条件を意識して、ELL10をもとに最大無毒性量(NOAEL)以下の用量とした。そのため、単剤投与の実験系と異なり、有意なChE抑制は一部にしか認められなかった。モデル推定が収束しない、あるいは信頼区間下限値が負の値をとるなど、モデルの不安定さが現れたものの、この条件でモデル推定を行った。

本混合投与実験では、アプローチ2の陰膳分析の結果から、DMPの投与用量を定めた。投与したOPのうちFNTとDDVPは、陰膳試料中で比較的検出率の高かった薬剤である。したがって、本実験データをもとに、曝露するOPの構成比などいくつか前提条件を置くことで、ヒト疫学調査から尿中DAP濃度と健康リスクとの関係が明らかになるまでの間、ヒトにおいてOPのリスク判定のための尿中DAPのガイドライン濃度を仮決めすることは、可能であると考えられる。

5. 研究目標の達成状況

本研究の目標を達成するために設定した、各アプローチの目標達成状況は以下のとおりである。

【アプローチ1】尿中に検出されるDAPの親物質の解明→「目標どおりの成果をあげた」

- ✓ NT分析方法を確立し、論文 (Nomasa et al., 2021)として発表した。
- ✓ DAPに代謝されるOP3種、それ以外のOP2種を同定し、エコチル調査で尿中DAP濃度が健康リスクと関連がある場合に、曝露親物質を本研究のアプローチで追求可能となった。

【アプローチ2】飲食物に含まれる尿中DAP親化合物の解明→「目標を上回る成果をあげた」

- ✓ 調査負担の大きい2日連続の陰膳調査に目標を上回る73人の協力を得た。
- ✓ 尿試料のNT分析より代謝物を同定した。
- ✓ 尿中DAP濃度と前日のOP摂取量との間には有意な関連が見られず、尿中検出頻度が高い薬剤の曝露経路は食事以外の可能性も考慮する必要があると考えられた。
- ✓ DAPは食事からの摂取量が多く、0~60%は前日の食事由来であることが示唆された。

【アプローチ3】尿中DAP排泄量と神経影響との量反応関係の解明およびOPとDAPへの複合曝露時の尿中DAP排泄量の解明→「目標どおりの成果をあげた」

- ✓ 単剤曝露 (論文業績 Sato et al., 2021)、混合曝露のいずれの場合にも尿中DAP量とコリンエステラーゼ活性阻害との関係を明らかにした。
- ✓ 曝露するOPの構成比などいくつかの条件を置くことで、尿中DAPのガイドライン濃度を仮決めできる可能性がある。

以上より、本研究の目標は達成したと考える。

6. 引用文献

- 1) Bouchard, M. F., et al., 2010. Pediatrics, 125, e1270-7.
- 2) Sudakin, D. L., Stone, D. L., 2011. Clin Toxicol (Phila) 49, 771-81.
- 3) Roca, M., et al., 2014. J Chromatogr 1374, 66-76.
- 4) Oya, N., et al., 2017. Int J Hyg Environ Health 220, 209-216.
- 5) US EPA. 1995. Reregistration Eligibility Decision (RED) Fenitrothion.
- 6) US EPA. 1997 Reregistration Eligibility Decision (RED) Trichlorfon.
- 7) Voss, G., Sachsse, K., 1970. Toxicol Appl Pharmacol 16, 764-72.
- 8) Ueyama, J., et al., 2010. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 878, 1257-63.
- 9) Crump, K. S. 1984. Fundam Appl Toxicol 4, 854-71.

Ⅲ. 研究成果の発表状況の詳細

(1) 誌上発表

<査読付き論文>

【サブテーマ1】

- 1) K. NOMASA, N. OYA, Y. ITO, T. TERAJIMA, T. NISHINO, NC. MOHANTO, H. SATO, M. TOMIZAWA and M. KAMIJIMA: J Occup Health, 63, 1, e12218 (2021) (IF: 2.289) Development of a strategic approach for comprehensive detection of organophosphate pesticide metabolites in urine: Extrapolation of cadusafos and prothiofos metabolomics data of mice to humans.
- 2) H. SATO, Y. ITO, C. HANAI, M. NISHIMURA, J. UYAMA and M. KAMIJIMA: Toxicology, 450, 152679 (2021) (IF: 4.099) 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.
- 3) T. EBARA, Y. YAMADA, N. SHOJI, Y. ITO, A. NAKAGAWA, T. MIYACHI, Y. OZAKI, T. OMORI, S. SUZUKI, M. KOJIMA, J. UYAMA, M. TOMIZAWA, S. KATO, T. OGURI, T. MATSUKI, H. SATO, N. OYA, M. SUGIURA-OGASAWARA, S. SAITOH and M. KAMIJIMA: BMJ Open, 9, e028105 (2018) (IF: 2.496) Cohort profile: Aichi regional sub-cohort of the Japan Environment and Children's Study (JECS-A).

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表（学会等）

【サブテーマ1】

- 1) 大矢奈穂子、伊藤由起、榎原毅、佐藤博貴、日置啓介、上山純、加藤沙耶香、松木太郎、杉浦真弓、齊藤伸治、上島通浩：第46回産業中毒・生物学的モニタリング研究会（2018）
「神経発達期における縦断的な有機リン系殺虫剤曝露評価」
- 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：第46回産業中毒・生物学的モニタリング研究会（2018）
「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―」
- 3) 野正夏鈴、大矢奈穂子、伊藤由起、佐藤博貴、北森一哉、大島志織、峰松明也子、湊京子、榎原毅、上島通浩：東海公衆衛生学会第65回学術大会（2019）
「陰膳調査における女子大学生の食事摂取状況について」
- 4) 野正夏鈴、伊藤由起、大矢奈穂子、寺島健仁、西野隆祐、Nayan Chandra Mohanto、佐藤博貴、富澤元博、上島通浩：2020年度産業衛生学会東海地方会（2020）
「有機リン系殺虫剤（OP）尿中代謝物網羅的分析法の開発」

(3) 「国民との科学・技術対話」の実施

【サブテーマ1】

- 1) 高校生対象の「大学丸ごと研究室体験」（主催：名古屋市立大学、2018年7月30日、名古屋市

立大学、参加者6名)にて、参加者自身の尿を用いて殺虫剤代謝物の測定を実際に体験し、健康リスクの考え方を討論

- 2) エコチル調査 公開講座2019 (主催: 名古屋市立大学母と子どもの健康・環境総合研究センター (エコチル調査愛知ユニットセンター)、2019年1月27日、JRゲートタワー16Fホール、参加者約60名)にて、陰膳調査に関する特別展示コーナーを設置
- 3) 高校生対象の「大学丸ごと研究室体験」 (主催: 名古屋市立大学、2019年7月31日、名古屋市立大学、参加者6名)にて、参加者自身の尿を用いて殺虫剤代謝物の測定を実際に体験し、健康リスクの考え方を討論
- 4) 研究室ホームページ上にて研究内容を紹介 (内容についてメールによる問い合わせ1件)
 衛生学の研究への誘い(<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/hygiene.dir/posts/news1.html>)
 衛生学の研究への誘い(5)-殺虫剤のバイオモニタリング-
<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/hygiene.dir/img/5-2.pdf>
 衛生学の研究への誘い(6)-有機リン系殺虫剤のバイオモニタリングの課題と研究-
<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/hygiene.dir/img/6-1.pdf>

(4) マスコミ等への公表・報道等>

特に記載すべき事項はない。

(5) 本研究費の研究成果による受賞

伊藤由起 2020年度名古屋市立大学学長表彰

伊藤由起 日本産業衛生学会 産業衛生技術部会 2021年度奨励賞

IV. 英文Abstract

Validation of Effectiveness of Urinary Dialkylphosphates as Markers for Exposure Assessment of Organophosphorus Compounds

Principal Investigator: Michihiro KAMIJIMA

Institution: Nagoya City University, Nagoya City, JAPAN

Tel: +81-52-853-8171 / Fax: +81-52-859-1228

[Abstract]

Key Words: Organophosphate insecticide, Exposure, Urinary metabolite, Dialkylphosphate, Biological monitoring (Biomonitoring), Cholinesterase

Exposure assessment of organophosphate insecticides (OPs) is an important aspect of children's environmental health. Urinary dialkylphosphates (DAPs), metabolites of OPs, are primary exposure markers measured in human biomonitoring studies. However, DAPs are non-specific biomarkers common to major OPs, and the risk management strategy for OP calls for a method to identify the parent compounds of DAPs in the population of concern when increased health risk was revealed by epidemiological studies. In addition, no health-based guideline values of DAPs have been globally established. Thus, we developed an exposomic approach to identify urinary metabolites of OPs using an original metabolome dataset generated from animal experiments. Using this method, we identified the parent OPs in 200 pregnant women in Japan who showed higher DAP concentrations among 600 women. Another population to which the developed method was applied included 73 female university students who provided duplicate diets. We measured OPs and DAPs in their diets and explored the association of their dietary concentrations with urinary DAP concentrations. Moreover, using data derived from animal studies in which dichlorvos, trichlorfon, or fenitrothion was administered, we clarified the relationship between urinary DAP concentrations and brain/red blood cell/plasma cholinesterase inhibitions. The non-linear model estimation was applied to the various relationships, and exposure limits of urinary DAPs at 20% inhibition of cholinesterase activity (EL20) along with their lower limits of 95% confidence intervals (ELL20) were determined. Furthermore, the exposure scenario of the combined exposures of OPs and DAP that could be generated from the parent OP in the environment was simulated in the animal study. The obtained data could be used to set a temporal guideline value of urinary DAP before the availability of more conclusive data from human epidemiological studies.