

平成 29 年度調査研究報告書

植物における農薬等有機化合物の代謝・動態に関する基礎研究：
水耕栽培法を利用した $[^{14}\text{C}]$ 有機化合物の作物根部からの
吸収，移行及び代謝に関する研究

試験番号：IET 15-1003

平成 30 年 3 月 30 日
一般財団法人残留農薬研究所
化学部

| | |
|-----------------|--|
| 室名及び担当者 | 化学部代謝第1研究室及び第2研究室 林 靖 (研究総括), 上田 洸平 |
| 課題名 | 植物における農薬等有機化合物の代謝・動態に関する基礎研究: 水耕栽培法を利用した ¹⁴ C有機化合物の作物根部からの吸収, 移行及び代謝に関する研究 |
| 目的 | 土壌中に残留する農薬が次の栽培作物 (後作物) へ移行, 残留して, 農薬の残留基準値を超えて検出される事例がある。農薬が後作物へ残留するメカニズムには, 植物根部からの吸収, 移行及び代謝の要因が関与するが, 各要因の基礎的な知見が少ないため後作物への残留メカニズムを科学的に説明する事が難しく未解明な部分が多い。本研究では, 適切なモデル有機化合物を用い植物根部からの吸収, 移行及び代謝を含む化合物の挙動を調査し, 農薬の後作物残留のメカニズムの解明を支援する基礎的データを得ることを目的とする。 |
| 調査研究期間 | 平成 27 年 4 月 1 日から平成 30 年 3 月 31 日→平成 32 年 3 月 31 日まで 2 年間延長 3 年計画の 3 年目→延長により 5 年計画の 3 年目 |
| 前年度までの調査研究結果の概要 | <p>平成 27 年度は一年生の農作物を選択し, 水耕栽培により種子から幼植物へ栽培する方法の確立を目指した。その結果, 約 20 種類の農作物について水耕栽培による生育方法を確立することができた。また水耕栽培液に溶解した被験物質の幼植物根部からの吸収, 移行性を検討するため, 早期に栽培法を確立できた 2 種類の幼植物 (コマツナ及びキュウリ) について 3 種類のモデル有機化合物を用いて調査を行った。各被験物質を約 100 ppb の濃度となるよう水耕栽培液に溶解した後, 幼植物体の根部に 24 時間暴露した。</p> <p>・¹⁴Cビスフェノール A (BPA) : 両作物共に根部より被験物質を吸収し, その放射能濃度は, 地上部でコマツナが約 330 µg eq./kg, キュウリが約 94 µg eq./kg であり, 根部では, コマツナが約 18,000 µg eq./kg, キュウリが約 5,900 µg eq./kg であった。両部位共にコマツナでの放射能濃度がキュウリに比べて 3 倍以上高かった。未変化体の各部位での%TRR 値 (% of Total Radioactive Residue) は, コマツナ及びキュウリでそれぞれ 3.6 (根部) - 5.3 (地上部) %TRR 及び 3.3 (根部) - 8.7 (地上部) であり大部分が代謝物に変換された。地上部の抽出効率 (85%以上) に比べ根部のそれ (30%未満) は低かった。両作物共にマスバランスは良好であった (95% applied radioactivity (AR) 以上)。</p> <p>・²⁻¹⁴C2-アミノ-4,6-ジメトキシピリミジン (DMP) : 両作物共に根部</p> |

より被験物質を吸収し、その放射能濃度は、地上部でコマツナが約 850 $\mu\text{g eq./kg}$ 、キュウリが約 530 $\mu\text{g eq./kg}$ であり、根部では、コマツナが約 620 $\mu\text{g eq./kg}$ 、キュウリが約 250 $\mu\text{g eq./kg}$ であった。両部位共にコマツナの放射能濃度が高かった。また両作物とも地上部濃度が根部に比べて高く他の 2 化合物と異なる結果であった。未変化体の各部位での%TRR 値は、コマツナ及びキュウリでそれぞれ 6.0 (地上部) ~29.6 (根部) 及び 87.7 (根部) - 89.9 (地上部) %TRR であり、コマツナでは代謝物が認められたが、キュウリでは代謝物がほとんど認められなかった。地上部及び根部の抽出効率 は 75%以上と良好であった。両作物共にマスバランスも良好であった (94%AR 以上)。

・ $[^{14}\text{C}]2,4$ -ジクロロフェノール (DCP) : 両作物共に根部より被験物質を吸収し、その放射能濃度は、地上部でコマツナが約 140 $\mu\text{g eq./kg}$ 、キュウリが約 67 $\mu\text{g eq./kg}$ であり、根部ではコマツナが約 28,000 $\mu\text{g eq./kg}$ 、キュウリが約 7,300 $\mu\text{g eq./kg}$ であった。両部位共にコマツナの放射能濃度が高かった。未変化体の各部位での%TRR 値は、コマツナ及びキュウリでそれぞれ 0 (根部) - 1.4 (地上部)%TRR 及び 1.9 (根部) - 8.1 (地上部) %TRR であり、両植物体内で代謝されやすい化合物であった。吸収された放射能の大部分が代謝物に変換された結果、一部試料では代謝により被験物質を検出できなかった。地上部の抽出効率 (80%以上) に比べ根部のそれ (50 - 60%) は低かった。マスバランスは他の 2 化合物と比較して低く、90%AR 未満であった。

試験した 3 化合物の地上部での放射能濃度及び未変化体濃度は DMP が最も高く、次いで BPA, DCP の順であった。また、作物間の比較では地上部放射能濃度はいずれの化合物ともコマツナ > キュウリであったが、地上部未変化体濃度は、BPA ではコマツナ > キュウリ、DMP 及び DCP ではコマツナ < キュウリとなり、放射能濃度での傾向とは異なる結果となった。

平成 28 年度は 8 種の作物 (ズッキーニ, ダイコン, ダイズ, ラッカセイ, トマト, ナス, トウモロコシ及びコムギ) の幼植物根部に $[^{14}\text{C}]$ DMP を暴露し、幼植物根部からの吸収, 移行及び代謝について調査を行った。平成 27 年度に調査したキュウリ及びコマツナを含む 10 種の作物間において全植物体の放射能濃度は 253.7 - 822.5 $\mu\text{g eq./kg}$ と植物種により大きな差が見られたが、一部を除き同一の科では比較的近い濃度であった。蒸散量当たりの $[^{14}\text{C}]$ DMP の全植物体への取込量は、コムギで最低値 62.8 $\mu\text{g/L}$ 、ラッカセイで最高値 101.6 $\mu\text{g/L}$ であり、植物間差は最大で 2 倍以

| | |
|----------------------|---|
| | <p>内であった。また、蒸散量 (mL) と$[^{14}\text{C}]$DMP 取込量 ($\mu\text{g eq.}$) には正の相関関係があった。これらの結果から DMP の取込みは、植物種による選択的なメカニズムに依るものではなく、蒸散量が DMP 取込量に大きく影響すると示唆された。地上部及び根部の放射能濃度についての比較ではそれぞれ 208.3 – 1044.4 $\mu\text{g eq./kg}$, 179.8 – 622.5 $\mu\text{g eq./kg}$ と科によって大きな差が認められたが、一部を除き同一の科では近い濃度であった。マメ科植物のみ根部放射能濃度が地上部を上回っていた。地上部蒸散流中の放射能濃度はウリ科, アブラナ科, ナス科植物で約 70 $\mu\text{g eq./L}$ であったのに対し, マメ科, イネ科植物では約 50 $\mu\text{g eq./L}$ であった。さらにウリ科, アブラナ科, ナス科植物において吸収した放射エネルギーの約 80% 以上が地上部に分布していたが, マメ科, イネ科植物ではそれぞれ約 55%, 約 69% であった。したがって DMP の根部から地上部への移行性は科によって差があり, 移行性の差が地上部及び根部放射能濃度に影響すると考えられた。作物残留試験で調査される可食部は多くの場合地上部であり, 植物種間での移行性の差は化合物の残留濃度に影響する可能性が考えられた。</p> <p>地上部及び根部試料中の未変化$[^{14}\text{C}]$DMP の%TRR 値はそれぞれ 4.5 – 90.8%TRR 及び 29.6 – 87.7%TRR であり, 同一の科では比較的近い値であった。また, アブラナ科植物 (ダイコン及びコマツナ) の%TRR 値は 4.5 – 6.0%TRR 及び 29.6 – 39.8%TRR と低く, ウリ科植物では 81.6 – 90.8%TRR 及び 82.2 – 87.7%TRR と高い値であった。植物種間で共通と考えられる代謝物が数個確認できたが, 代謝物の有無や量的関係には違いが認められた。さらにコムギ及びダイズ根部にのみ DMP よりも低極性の代謝物が確認された。したがって植物種や科によって代謝能力に差があり, この代謝能力の差は後作物中の化合物の残留分析値に大きく影響する可能性が高いと考えられた。</p> <p>本試験結果より DMP ($\log P_{ow}$ が小さく, 水溶解度が高い化合物) では蒸散量と植物体重量が残留濃度に影響する可能性が示唆された。また, 一部を除き同一の科の植物において有機化合物の作物中濃度や移行性, 代謝能力は類似する傾向にある可能性が示唆された。</p> |
| <p>本年度の調査研究結果の概要</p> | <p>平成 29 年度は, 更に 9 種の幼植物 (カボチャ, カリフラワー, キャベツ, ゴボウ, スナップエンドウ, タマネギ, チンゲンサイ, ブロッコリー, 及びハウレンソウ) を用いて $[^{14}\text{C}]$DMP の吸収・移行・代謝を調査し, 過年度の 10 作物を含めた計 19 作物について, 吸収・移行・代謝に関するパラメータを比較した。各植物における水耕液の取込量は 29.3 ~</p> |

| | |
|---------|---|
| | <p>113.1 mLであった。また, $[^{14}\text{C}]\text{DMP}$ の取込量は 1.76 ~ 9.61 $\mu\text{g eq.}$であった。水耕液の取込量と$[^{14}\text{C}]\text{DMP}$ 取込量に高い正の相関があり, DMP は水の取込に伴って植物へ吸収されると考えられた。植物の各部位の放射能濃度について地上部が 210.8 ~ 1254.8 $\mu\text{g eq./kg}$, 根部が 164.7 ~ 622.5 $\mu\text{g eq./kg}$ であり, 一部の植物を除き, ほとんどの植物で地上部の放射能濃度の方が高かった。また, 全ての植物において取り込まれた放射能は地上部に多く分布した。$[^{14}\text{C}]\text{DMP}$ の各部位中の%TRR はアブラナ科作物で低く (地上部: 3.9 ~ 8.0 %, 根部: 29.6 ~ 49.0 %), ウリ科作物, タマネギ, ゴボウ及びホウレンソウで高かった (地上部: 79.8 ~ 92.5 %, 根部: 60.3 ~ 87.7 %)。%TRR 値はマメ科を除き同一科で類似した値を示した。以上の結果は, 昨年度までの内容と同様の傾向であり, さらに充実した情報量に基づく解析結果を得ることができた。</p> <p>平成 29 年度には, 上記の他, 平成 28 年度に実施した$[^{14}\text{C}]2,4\text{-ジクロロフェノール}$ ($[^{14}\text{C}]\text{DCP}$) のキュウリでの動態試験の補遺実験を行い, 4 種類の糖抱合化代謝物の推定構造を提示したうえ, その他の代謝物として 2,4-ジクロロアニソール (DCA) が植物体中に存在する事を確認した。また, これらの代謝物のうち最も極性の低い DCA のみが, 根部より水耕液中へ滲出されるとの知見を得た。その他に$[^{14}\text{C}]\text{フタル酸ジブチル}$ ($[^{14}\text{C}]\text{DBP}$) を被験物質として用い 2 植物種 (キュウリ及びコマツナ) での予備的な調査を実施した。詳細は, 報告書本文参照。</p> |
| 今後の試験方針 | <p>平成 30 年度は, $[^{14}\text{C}]\text{フタル酸ジブチル}$ ($[^{14}\text{C}]\text{DBP}$) を被験物質として選択し, 吸収移行及び代謝について調査を行う。なお前年度, $[^{14}\text{C}]\text{DBP}$ を用い 2 植物種 (キュウリ及びコマツナ) について水耕液処理下での動態を予備的に検討したところ水耕液中に多量の分解物が認められた。このことから, 根部からの化合物の吸収に関する評価実験に$[^{14}\text{C}]\text{DBP}$ を使用することが適切ではない場合も想定される。そこで$[^{14}\text{C}]\text{ビスフェノール A}$ (BPA) を追加の候補化合物として$[^{14}\text{C}]\text{DBP}$ と共に検討を行う (根部試料の抽出効率が低い点に問題有)。$[^{14}\text{C}]\text{DBP}$ (または$[^{14}\text{C}]\text{BPA}$) と$[^{14}\text{C}]\text{DMP}$ の結果を比較し, 水溶解度の異なる化合物間での吸収移行性の差について調査を進める。</p> |
| 成果の公表 | <p>(1) 主な誌上発表 なし</p> <p>(2) 主な口頭発表 (学会等) 日本農薬学会第 42 回大会 日本農薬学会第 43 回大会 (予定)</p> |

[研究体制]

| ② 研究者名 | ② 分担する研究項目 | ③ 現在の専門 | ④ 所属及び職名 |
|--------|---------------------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| 林 靖 | 研究総括 | 農薬の動物/作物代謝及び 環境中動態に関する研究 | 化学部代謝第1研究室 兼第2研究室長 |
| 上田 洸平 | 有機化合物の作物根 部からの吸収, 移行及 び代謝に関する研究 | 同上 | 化学部代謝第1研究室 研究員補 |

一般財団法人残留農薬研究所 毒性部

平成 29 年度調査研究報告書

平成 30 年 3 月 30 日

平成 29 年度調査研究報告書

課題 1

| | |
|---------|---|
| 室名及び担当者 | 生殖・発生毒性研究室 青山博昭 (研究総括), 北條 仁, 高橋研, 遠藤直子, 佐藤 旭, 西岡 康 |
| 課題名 | 農薬等の毒性に関する基礎的研究: 毒性試験に用いる実験動物の遺伝学的基盤の整備 |
| 目的 | <p>農薬等のヒトに対する毒性 (有害性) の有無を予測するために実施される様々な毒性試験では, ヒトの集団が遺伝的に均一ではないことを考慮して, ある程度の遺伝的多型性を保持するアウトブリード・ストックの実験動物 (いわゆるクローズドコロニー系統の動物) が用いられる。これらの動物集団は, マウスであれラットであれ, ゲノム全体の10~15%の遺伝子座 (およそ3000~4500遺伝子座) に遺伝子多型が存在すると考えられている。このため, 動物生産業者から供給された外見が正常な動物の中にも何らかの先天異常を引き起こす劣性突然変異遺伝子をヘテロに持つ個体が一定の頻度で含まれており, 生殖・発生毒性試験を実施する過程で, 投与した化合物により誘発されたものと誤解されるような自然発生奇形がしばしば児動物に現れる。また, これらの動物を用いた種々の毒性実験では, 同じ化合物を同じ量投与したにもかかわらず, その化合物に対する反応にしばしば大きな個体差がみられることも経験的に知られており, 様々な化合物に対する感受性を修飾する遺伝子座に多型が存在する可能性が強く示唆される。しかし, マウスを用いた研究では約33%で, ラットを用いた研究では実にその約85%でアウトブリード・ストックに由来する動物が用いられながら, これらの動物には遺伝的要因に基づく個体差が存在する可能性を考慮した上で結果が解釈されている事例はむしろ稀であり, 我々が知る限り, 動物集団に潜在する遺伝学の問題を系統的かつ詳細に解析した研究も過去にはほとんど例がない。そこで, 毒性実験に汎用されるアウトブリード・ストックに由来する動物集団に保持される様々な劣性突然変異や遺伝子多型に着目して, ①動物実験の結果を解釈する上で支障となるような (被験物質の投与に起因すると誤解される恐れのある) 突然変異遺伝子や種々の内的・外的因子 (内在性ホルモンや曝露された被験物質等) に対する感受性を修飾する遺伝子多型を可能な限り同定し, ②これらの変異や多型を遺伝子レベルで診断する技術を確立することにより, 毒性実験に使用される実験動物 (ラットおよびマウス) の遺伝学的基盤を整備することを継続事業の課題と</p> |

| | |
|---------------|--|
| | <p>した。一方、これらの成果として発見された突然変異には、化合物の投与により誘発される奇形等の異常所見に酷似した表現型を引き起こすものが少なくない。そこで、先に述べた遺伝学的基盤の整備と共に、継続事業として取り組むべき新たな課題を育成するため、特に毒性学の観点から興味深い突然変異を取り上げ、表現型の発症機序を理解することに努めた。</p> |
| 調査研究期間 | <p>平成 29 年 4 月 1 日から平成 32 年 3 月 31 日 3 年計画の 1 年目</p> |
| 前年度までの結果の概要 | <p>課題 1: Wistar ラットの集団から発見された多指症誘発突然変異 <i>pd</i> の解析に関しては、奇形発症の原因と疑われる有力な突然変異の検出と、その検証を目的とした <i>Ift140</i> KO ラットを利用する相補性検定の実施に向けて、5 年間にわたって解析を進めた。その結果、<i>Ift140</i> KO ラットを用いた交配実験により、<i>pd</i> 遺伝子と <i>Ift140</i> 遺伝子との間に相補性が存在することを確認することができた。すなわち、多指症誘発突然変異 <i>pd</i> の本態が、<i>Ift140</i> 遺伝子のイントロン領域に生じたレトロトランスポゾンの挿入変異であることを証明することができた。さらに、<i>pd</i> と <i>Ift140</i> とのコンパウンドヘテロ個体には <i>pd/pd</i> ホモ個体にみられない表現型も観察されることが明らかとなり、これらのラットが奇形発症メカニズムを研究する上で有用なモデルであることが示された。</p> <p>課題 2: SD ラットに由来する突然変異の解析では、ポジショナルクローニングと表現型観察の双方に取り組むことにより、本研究で取り上げた 4 遺伝子うち、<i>syll</i> と <i>mgpd</i> の 2 遺伝子について、それぞれの責任遺伝子候補 (<i>Lama5</i> および <i>Rpgrip1l</i>) に突然変異を検出することができた。これらの突然変異は、フレームシフトを誘発し得る一塩基の挿入変異 (<i>syll</i>) または遺伝子のほぼ全長に亘る欠失 (<i>mgpd</i>) であることから、いずれも遺伝子機能に重篤な影響を及ぼすことが明白である。さらに、本研究で解析した突然変異ラットとそれぞれの遺伝子の KO マウスには複数の共通した表現型が観察されることから、検出した突然変異が奇形発症の原因であることはほぼ証明されたと考えられる。本研究では、その他にも <i>clest</i> 遺伝子に有力な責任遺伝子候補 (<i>Meox1</i>) を見出すことができた。</p> |
| 調査研究方法の概要 | <p>別紙報告書本文参照</p> |
| 調査研究結果の概要及び考察 | <p>① アウトブレッドラットの代表的な 2 集団に潜在する先天異常誘発突然変異の探索および解析</p> <p>先に述べた如く、我が国で市販されている代表的なアウトブレッドラットの集団から発見された様々な先天異常誘発突然変異を対象に、原因</p> |

遺伝子を同定してDNAレベルで簡便に突然変異遺伝子の有無を診断する技術の開発と、奇形発症の機序を明らかにすることに主眼を置いた表現型解析の双方に取り組んだ。

これらのうち、SD ラットに由来する *mgpd* 遺伝子の解析では、これまでの研究で得られた *Rpgrip11* 遺伝子を含む欠失であるとの成果に加え、本年度の取り組みにより欠失の正確な塩基配列の特定と遺伝子診断技術の開発に成功した。

新たに解析の対象とした遺伝性と推測される 5 種類の先天異常に関しては、遺伝形質であることの確認を目的とした交配実験に取り組んだ。しかし、先行して結果の得られた 2 形質に関しては、ホモ型個体の出現が期待される交配を複数回繰り返しても、これらが遺伝形質である証拠（表現型を持つ児動物）を得ることができなかった。

今年度は、Wistar Hannover GALAS ラットの集団に潜在する呼吸異常症の原因解明にも新たに取り組んだ。本形質は、胎児や出生児にみられる形態学的な先天異常（いわゆる奇形）とは異なり、比較的週齢の高い動物で発症のみられる生体機能に関する先天異常症であると考えられる。今年度は、症状の特徴から推測される原因遺伝子の候補として、ヒトやイヌの ALS の原因遺伝子の一つである *SOD1* 遺伝子に注目して変異解析を行った。しかし、当該遺伝子のエクソンとそれらの周辺領域に症状の発症に関連するような多型を発見することはできなかった。

前事業でも優先して解析を進めた多指症誘発突然変異 *pd* に関しては、アレルの組み合わせにより表現型が大きく変化する現象が化学物質の催奇形性作用を理解する上で有益な知見をもたらすと期待されたため、奇形発症機序の解明に焦点を当てた解析を継続して、*pd* と *Ift140*⁻コンパウンドヘテロ個体に現れる外表と内臓の異常を詳細に観察した。その結果、高口蓋や臍帯ヘルニアといった表現型の発現を確認した。また、間接的ではあるものの、*Ift140*⁻/*Ift140*⁻の遺伝子型を持つ胚が子宮内で死亡していることを確認した。本検討の結果とこれまでに得られた知見を総合すると、表現型の変化は *Ift140* 遺伝子の遺伝子量効果によるものと考えられると共に、本遺伝子の発現低下に対して最も感受性が高いと考えられる部位は、*pd pd* 個体で異常のみられる四肢、精巣および脾臓であると推測される。

② 近交系マウスの保有するステロイドホルモンに対する反応性を修飾する遺伝子要因の解析

エストロゲン投与後の子宮肥大反応にみられる系統差と *Aqp12* 遺伝子

| | |
|---------------|---|
| | <p>のSNPとの関連を調べるため、ゲノム編集技術を利用した<i>Aqp12</i> 変異マウスの作製に取り組んだ。その結果、目的とするC3H型のSNPを持つラインと共に、この遺伝子をロックアウトしたラインを作製することができた。注目するSNPは子宮の実質重量に影響を及ぼす遺伝子多型の有力な候補であることから、我々の仮説が正しければ、このSNPを保有するB6 マウスではエストロゲンによる子宮肥大反応が野生型の個体よりも軽減されると期待される。</p> |
| 試験条件および具体的データ | 別紙報告書本文参照 |
| 今後の課題及び対応方針 | <p>① SD ラットに由来する <i>mgpd</i> 遺伝子に関しては、開発した遺伝子診断技術を応用して、本突然変異の市販集団中における遺伝子頻度を調査すると共に、得られた成果の早期公表を目指す。</p> <p>② 多指症誘発突然変異 <i>pd</i> に関しては、残り半数の胎児から作製した骨格標本を観察してコンパウンドヘテロ個体に現れる骨格奇形を詳細に調べると共に、可能な限り <i>Ift140</i> の発現量を部位ごとに調べて、奇形発症との関連を探る予定である。また、解析の進捗状況によっては、<i>Ift140</i>^{-/+}または <i>pd</i>⁺個体にレチノイン酸などの催奇形物質を投与して、本遺伝子突然変異が催奇形作用に何らかの影響を及ぼすか否かについても検討したいと考えている。</p> <p>③ ステロイドホルモンに対する感受性を修飾する遺伝子群の探索については、作製したラインから十分な数の離乳児を用意し、EE を皮下投与した後に剖検して子宮を摘出して、子宮の実質重量を始めとする各種指標を調べる予定である。また、この遺伝子多型によりエストロゲンに対する子宮の反応性に差の生ずることが確認できた場合は、市販のアウトブリード集団 (ICR, CF-1 など) におけるこの遺伝子多型の実態を調査する。さらに、B6x129 リコンビナント・インブリードマウスを用いた QTL 解析により示唆されたエストロゲンに対する子宮の応答能を修飾する可能性のある領域についても、可能であれば候補遺伝子の探索に着手する。</p> |
| 成果の公表 | <p>1. 佐藤旭ら：アウトブリードラットの集団に由来する先天異常誘発突然変異の遺伝学的解析，第 57 回日本先天異常学会学術集会（2017 年）。</p> |

| | |
|--|---|
| | <ol style="list-style-type: none"><li data-bbox="438 280 1388 403">2. 西岡康ら：SD ラット集団内に潜在する周辺領域を含む <i>Rpgr11</i> 遺伝子の欠失によって生じる内臓および骨格の異常，第 57 回日本先天異常学会学術集会（2017 年）。<li data-bbox="438 414 1388 492">3. 青山博昭ら：マウスを用いたエストロゲンに対する感受性を修飾する遺伝要因の解析，第 57 回日本先天異常学会学術集会（2017 年）。 |
|--|---|