

【研究課題名】

農薬類・抗菌剤等の曝露が及ぼすヒト腸内環境への影響

Effects of pesticide intake on gut microbiota and metabolites

【共同研究者名】

田島稔基、上山純(名古屋大学大学院)、国末達也、田上瑠美(愛媛大学・沿岸環境科学研究センター)

【研究目的】

腸管内細菌叢に関する研究は、この 10 年で急速に研究が蓄積されており、肥満、免疫、動脈硬化、精神疾患など、従来の想定以上にヒトの健康に関わっていることが明らかになってきた。今後も疾病発症から、治療、予防までを含めた幅広い領域での研究の発展が加速すると予想される。最新の研究によると、アンケートで収集できる情報のうち、便の性状スケール、性別、年齢、排便頻度が腸内細菌叢の変動因子として抽出されたが、個人差を 10%程度しか説明できず、他の変動因子の存在が強く考えられる。一方で、動物実験では化学物質曝露による腸内環境への影響を示す結果が次々に報告されている。したがって、日常的に曝露する化学物質がヒト腸内環境の変動因子の一つである可能性があること、研究者のみならず国民にとっても腸内環境への関心は少なくないこと、ヒトを対象にした情報はごく限られてことから、今後は化学物質が及ぼす腸内環境への影響を疫学的アプローチで明らかにすることが求められている。

研究の大目標は、腸内環境の決定因子として化学物質曝露が関連しているかどうかを明らかにするために、生体試料分析による曝露評価(農薬や殺菌剤等)と腸内細菌叢および代謝物量との関係を疫学調査で観察することである。

我々はこれまでに、一般生活者 38 名から尿と便を収集し、尿中の農薬代謝物等を測定することで曝露レベルを評価し(バイオモニタリング)、腸内細菌叢や代謝物濃度との関連解析を行った結果、有機リン系殺虫剤の曝露マーカーとして知られる尿中ジアルキルリン酸濃度と便中酢酸およ

び乳酸濃度との間に統計的有意に負の相関が検出された。このうち、食事や生活習慣で調整した多変量解析でも、尿中ジアルキルリン酸濃度は便中酢酸濃度の有意な説明変数として検出された。作用機序は未解明であるが、日常的な有機リン系殺虫剤の曝露が、腸管免疫制御などに寄与している便中酢酸濃度に影響することを示唆する結果を得た初めての調査であり、さらなる詳細調査の実施が強く期待される成果となったが、短鎖脂肪酸(SCFA)の代謝系に影響するかどうかは不明なままであった。

近年、ビタミンが SCFA 産生菌に不可欠な基質であり、プロバイオティクスの注目物質として研究が進められている。本申請で実施する研究は、このうち便中ビタミン B 群に注目して、その測定法確立と予備的な化学物質曝露との関連を調査することを目的とする。

【研究方法】

便中のビタミン B 群は、チアミン、リボフラビン、ニコチン酸、パントテン酸、ピリドキシン、ピリドキサミン、ピリドキサール、ビオチン、葉酸、アデノシルコバラミン、シアノコバラミン、ヒドロキソコバラミン、メチルコバラミンの 13 物質を分析対象とした。便中のビタミン B 群測定法には、凍結乾燥処理を施した便サンプル 20 mg を 2%ギ酸で酸性化した後、固相抽出法 (EVOLUTE® EXPRESS ABN, ポリマー製固相抽出カラム)を用いて抽出した。抽出後、高速液体クロマトグラフータンデム質量分析計を用いて、15 分以内に分離分析を行った(図 1)。この測

定法を使用し、便中ビタミン B 群と SCFA の関係を観察するため、日本人成人 262 名を対象に解析を行なった。統計解析にはスピアマンの順位相関係数を使用し、関係性を評価した。また、便中ビタミン B 群と農薬類の関係を観察するため、日本人高齢者 29 名を対象に解析を行なった。農薬類の濃度を中央値で 2 群(Low 群 14 名、High 群 15 名)にわけ、Mann-

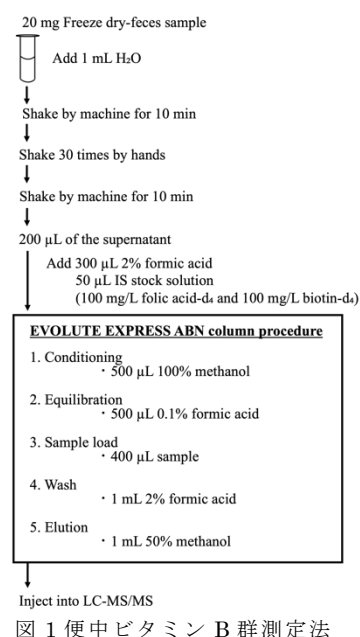


図 1 便中ビタミン B 群測定法

Whitney U test による統計解析を行なった。

【研究成果】

・ 便中ビタミン B 群測定法開発

測定法の妥当性試験の結果は、検出下限値は 0.03-152 µg/gFD、抽出回収率は 52-114%、日内変動は 3.5-13.2%RSD を示した(表 1)。絶対回収率が低くなる物質は存在するものの、マトリックスをマッチさせた検量線を作成することで、測定値への影響を軽減した。併行精度の結果は良好であり、ヒト検体への応用が可能な測定法であると判断できる。

表 1 便中ビタミン B 群測定法の妥当性試験

	Concentration (mg/L)	n	Results							
			B1	B2	B3	B5	B6	B7	B9	B12
Absolute recovery rate (%)	100		52	93	75	83	114	86	73	97
Within-run precision (%RSD)	25	6	7.2	5.8	3.5	4.6	13.2	4.7	4.4	6.0
LOD (µg/gFD, S/N=3)			0.73	0.52	73.4	4.81	152	5.21	0.04	0.03
LLOQ (µg/gFD)			2.42	1.74	245	16.0	509	17.4	0.14	0.08

n, number of observations; RSD, relative standard deviation; LOD, limit of detection; LLOQ, lower limit of quantification; S/N, signal to noise ratio; B1, thiamine; B2, riboflavin; B3, nicotinic acid; B5, pantothenic acid; B6, pyridoxine; B7, biotin; B9, folic acid; B12, cyanocobalamin

・ ヒト便中ビタミン B 群の濃度

確立した測定法を使用し日本人成人 262 名の便中ビタミン B 群を測定した(表 2)。検出率は最も低いものが葉酸(43.5%)で、最も高いものはパントテン酸(100%)であった。日本人成人の糞便中には幅広いビタミン B 群が含まれ、その濃度には個人差があることが示唆された。

表 2 日本人成人 262 人の便中ビタミン B 群濃度

	Detection rate (%)	Concentrations		
		Median	Mean ± SD	Range
Thiamine (mg/g)	99.6	2.3	4.9 ± 12.2	<LOQ-98.2
Riboflavin (µg/g)	99.2	23.8	30.8 ± 39.5	<LOQ-545
Nicotinic acid (mg/g)	73.3	0.61	0.92 ± 1.08	<LOQ-7.6
Pantothenic acid (µg/g)	100	95	160.1 ± 169.2	5.0-935.1
Pyridoxine (mg/g)	88.2	0.24	0.99 ± 2.17	<LOQ-17.2
Pyridoxamine (mg/g)	90.8	0.64	1.89 ± 4.06	<LOQ-33.9
Pyridoxal (mg/g)	56.9	7.64	14.8 ± 25.6	<LOQ-266
Biotin (µg/g)	98.1	16.1	19.7 ± 16.5	<LOQ-162
Folic acid (µg/g)	43.5	0.0	0.9 ± 1.7	<LOQ-14.3
Cyanocobalamin (µg/g)	60.7	0.3	1.1 ± 2.2	<LOQ-18.8
Methylcobalamin (mg/g)	84.4	0.15	0.31 ± 0.42	<LOQ-2.8
Hydroxocobalamin (µg/g)	55.7	0.2	1.5 ± 5.0	<LOQ-54.1
Adenosylcobalamin (µg/g)	61.1	0.7	5.3 ± 11	<LOQ-69.7

・ 便中ビタミン B 群と便中 SCFA との関係

便中ビタミン B 群濃度と SCFA 濃度との関係をノンパラメトリック検定 (スピアマン順位相関係数) にて観察した。相関係数 0.3 以上の結果の一覧を表 3 に示した。チアミンはイソ酪酸およびイソ吉草酸と正の相関を示した。パントテン酸とプロピオン酸、ビオチンとイソ酪酸およびイソ吉草酸に正の相関が見られた。一方、ビオチンは酢酸および酪酸と負の相関を示した。

表 3 便中ビタミン B 群と糞便中代謝物との有意な相関関係 (スピアマンの順位相関係数)

B vitamins	Fecal metabolites	Correlation Coefficient	p-Value
Thiamine	Iso-butyrate	0.409	0.0002
Thiamine	Iso-valeric acid	0.449	0.0009
Pantothenic acid	Propionate	0.300	0.0171
Biotin	Acetate	-0.657	<.0001
Biotin	Butyrate	-0.521	<.0001
Biotin	Iso-butyrate	0.554	<.0001
Biotin	Iso-valeric acid	0.690	<.0001

・便中ビタミン B 群と農薬類との関係

ジアルキルリン酸塩(DAP)曝露とビタミン B 群の関連は示さなかったことから、既報の有機リン系農薬(OP)による SCFAs 濃度低下に、ビタミン B 群の関連は低い可能性が示唆された (図 2)。一方で、グリホサートは、高曝露群で便中葉酸濃度の有意な低下がみられた。便中の葉酸は、腸内細菌の多様性に関連しており、大腸では葉酸トランスポーター発現が多く、血中葉酸濃度に影響している可能性が高い。

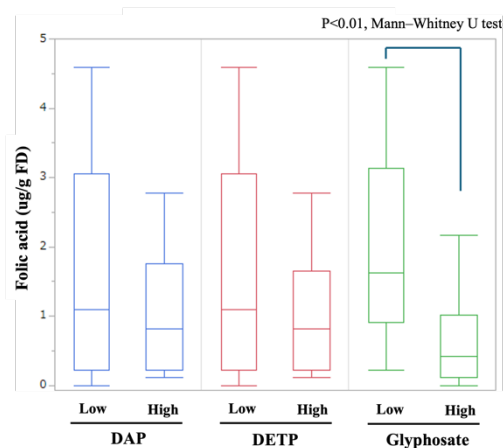


図 2 便中ビタミン B と農薬類との関係

【今後の課題】

本研究では便中ビタミン B 群 13 種類の測定法を確立し、日本人成人への応用を行なった。また、便中ビタミン B 群と農薬類との関係を観察し、原因は不明であるものの、グリホサート曝露量と便中葉酸濃度の関連を明らかにした。また、これらの腸内代謝物へ農薬の影響が、健康影響にどの程度寄与しているかどうか、疾患と関連があるのかは不明である。今後、ビタミン B 群、便中代謝産物、化学物質曝露、疾患の関係をさらに深く理

解するために、ケースコントロール研究など臨床研究の発展が必要である。