

Fig. 6. Time-course for recovery of GJIC in WB cells after treatment with 20 or 40  $\mu\text{M}$  PCP for 24 h. A value less than 1.0 represents inhibition of GJIC. Each point represents an average of three replicates  $\pm$  SD.

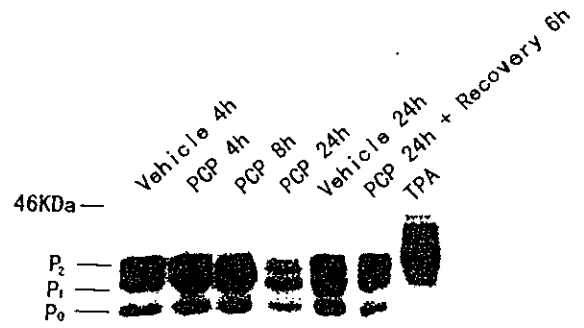


Fig. 7. Changes in CX43 expression after treatment with 40  $\mu\text{M}$  PCP for up to 24 h. CX43 was detected by Western blotting analysis as described in Section 2. The P<sub>0</sub> band represents non-phosphorylated CX43 and the P<sub>2</sub> band represents much higher phosphorylated CX43 than the P<sub>1</sub> band.

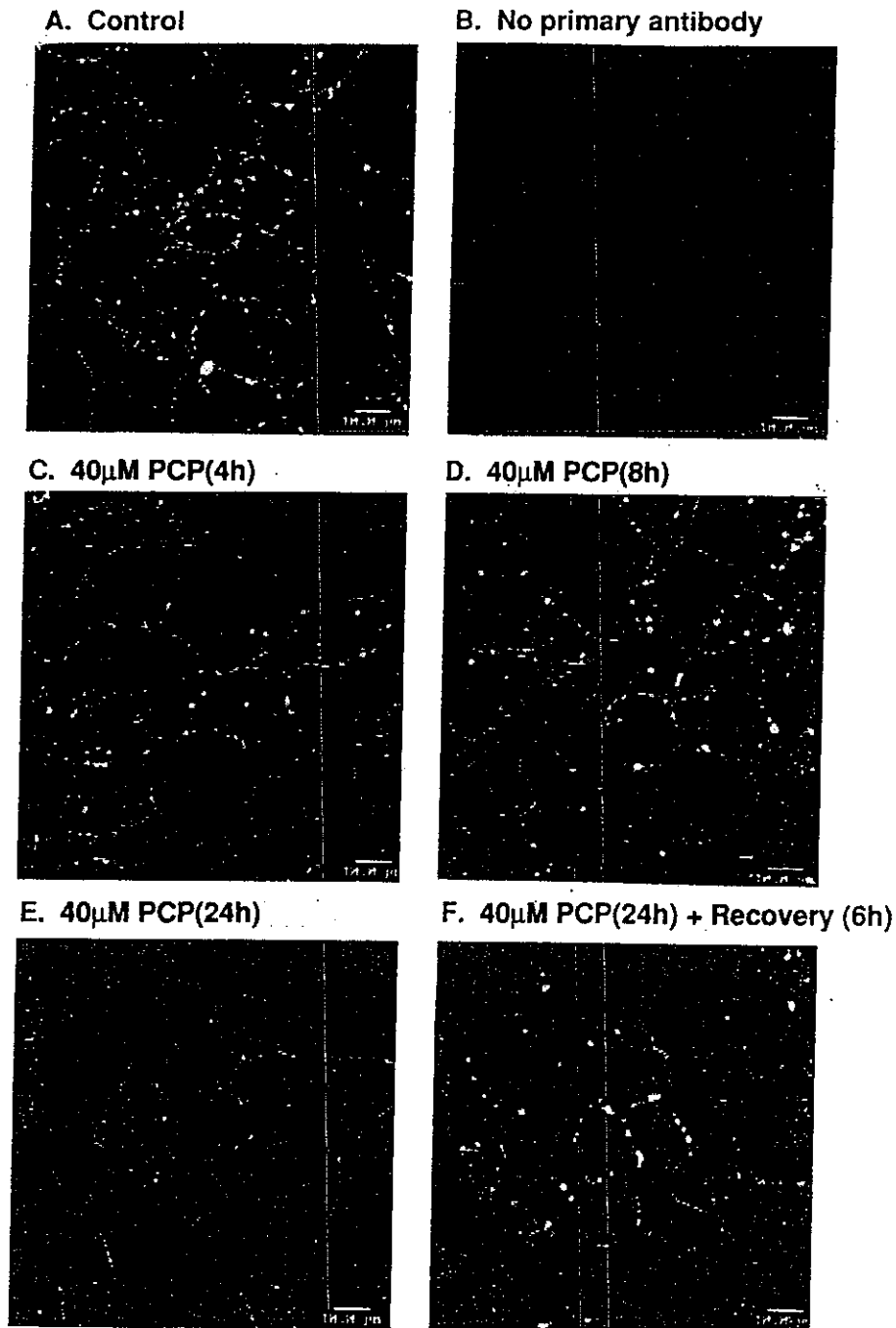


Fig. 8. Localization of CX43 in WB cells after treatment with 40  $\mu\text{M}$  PCP for up to 24 h. CX43 plaque was detected by immunostaining as described in Section 2 after treatment with vehicle (control) for 4 h (A), with no primary antibody (B), with PCP for 4 h (C), 8 h (D) or 24 h (E) and after the recovery time of 6 h after 24 h of treatment (F). Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ .

## 分担研究報告書

### 食品中化学物質の相互作用等に関する調査研究

分担研究者 大野泰雄、国立医薬品食品衛生研究所、  
安全性生物試験研究センター、薬理部長  
協力研究者 山添 康、東北大学薬学部衛生化学教室  
杉山雄一、東京大学大学院薬学系研究科

#### 研究要旨

in vitro 実験から予測されたように、ラットで CYP3A 阻害剤ケトコナゾールを前投与すると有機リン系農薬 IBP の AUC および血中半減期( $t_{1/2}$ )の上昇が見られることを示した。また、ラット尿中代謝物として、脱ベンジル化した DITP、脱チオベンジル化した DIHP、及び脱イソプロピル化した TBIP を同定し、IBP のトリエステル切断箇所が三種類あることを示し、IBP の代謝には CYP3A 以外の酵素エステラーゼ等の作用も考慮する必要があると考えられた。また、mechanism-based inhibition による in vivo の相互作用を in vitro 試験から定量的に予測することを目的に、CYP3A による triazolam 代謝におよぼす erythromycin (EM) の阻害を例に、 $k_{inact}$  と  $K'_{app}$  に表される阻害の kinetic parameter を求めた。これらの値と文献情報より得られた triazolam と EM の薬物動態パラメータを用いて、生理学的フローモデルにより in vivo の相互作用を定量的に予測した結果、in vivo における報告値とよく一致した。次に農薬による薬物代謝酵素誘導を調べる系を確立する目的で、CYP3A の誘導に関与する核内レセプター (PXR) の cDNA を単離した。アミノ酸配列の相同性を比較したところ、すでに明らかとなっているマウスの mPXR に対して rPXR は、DNA 結合領域と考えられている部分で 100%、リガンド結合領域と考えられている部分で 97% の高い相同性が認められた。一方 hPXR に対しては、それぞれ 95.5% および 77% の相同性を示し、リガンド結合部位の相同性がマウスおよびラットと比べ低い値であった。

#### A. 研究目的

残留農薬の安全性評価においては従来より実験動物を用いた単品での毒性試験結果に基づいて行われている。しかし、我々は医薬品や環境中に存在する化学物質に曝されており、それらとの間に相互作用が起こり、いわゆる相乗毒性が起こるのでは無いかと危惧されて

いる。一方、医薬品での相互作用事例や毒性発現機構に関する研究の蓄積から、相互作用発現機序が整理され、薬物動態の関係する相互作用に関しては、かなりのところまで予測が可能となってきた。即ち、代謝阻害および誘導による相互作用が相互作用発現事例の多くを占めており、それぞれの薬物のヒトでの

代謝に関与する酵素の種類と酵素阻害、および酵素誘導の特性を明らかにすることにより、薬物動態の関係する相互作用の多くについて、定性的に予測することが可能である。しかし、ヒトでの酵素誘導能の評価および定量的な相互作用の予測手法に関しては更に研究が必要などころが残っている。そこで我々はそれらの理論を残留農薬や生活関連物質との相互作用に適用するとともに、相互作用予測手法を更に改善するために、1) ヒト肝臓由来標本およびヒト型代謝酵素を用いた残留農薬および生活関連物質の代謝に関与する酵素とその kinetics に関する研究、2) ヒト型酵素誘導能検索系の開発に関する研究、3) *in vitro* あるいは実験動物を用いた結果からヒトでの相互作用を定量的に予測する手法に関する研究を行った。具体的には、1) については国立医薬品食品衛生研究所の大野が担当し、農薬および生活関連物質の代謝を動物及びヒト組織、細胞、また発現系ヒト型 P-450 等を用いて検討し、*in vivo* での相互作用をシミュレーションすることを目的に、今年度は代表的有機リン系農薬である IBP (iprofenfos) の代謝をラット及びヒト肝マイクロソームおよび細胞系あるいは各種発現系を用いた *in vitro* の代謝試験を行うとともに、ラットでの尿中代謝物の検討及び静注時の血中薬物動態における薬物相互作用の可能性を評価した。2) については東北大学の山添が担当し、ヒトの酵素誘導、殊にヒト P450 の中で最も酵素誘導を受けやすく、しかも実験動物との種差が著しい CYP3A4 誘導を簡単に調べることが可能な培養細胞系を確立する目的で、マウスにおいて本酵素誘導への関与が報告されている核内レセプター (PXR) cDNA を単離することにした。3) については東京大学の杉山が担当し、重篤な薬物相互作用を起こす可能性の

ある mechanism-based inhibition に基づく薬物間相互作用を *in vitro* 試験から定量的に予測する方法論の検討を行った。

## B. 研究方法

B-1: ヒト肝臓由来標本およびヒト型代謝酵素を用いた残留農薬および生活関連物質の代謝に関与する酵素とその kinetics に関する研究

ラット肝マイクロソームは SD 系雄性ラットの肝臓から常法により調整した。ヒト肝マイクロソームは米国 ILM 社より購入した。ラット肝細胞は未処理 SD 系雄性ラットからコラゲナーゼ法により調整した。IBP のマイクロソーム等による代謝は 0.1M 磷酸緩衝液 (pH=7.4) 中 NADPH 共存下で行った。これら代謝活性は IBP の減少量より算出した。

SD 系雄性ラット(8-11 週令)を用いて血中動態試験を行った。前処理ラットには 1-2 時間前にケトコナゾール(10-20mg/5ml/kg)をコーン油で経口投与した。約 90 分経過後、IBP をジメチルスルフォキシドに溶解し、下肢大静脈より静注投与(12.5mg/0.25ml DMSO/kg)し、投与後 6 時間まで頸静脈より経時的に血液を採取し、遠心器で血漿を分離し凍結保存した。その血漿から酢酸エチル抽出したサンプルをガスクロマトグラフィー(島津 GC-4CM、10%SE52、1m のガラスカラム)検出器 FPD(P)を用いて定量した。

尿中代謝物は、IBP を経口投与(288mg/kg)した雄性ラットの 6 時間尿より塩酸酸性下酢酸エチル抽出したサンプルをジアゾメタンでメチル化した後、ガスクロマトグラフ-質量分析装置(HP 5970B GC-MS)で定性分析し、定量はガスクロマトグラフィー-FPD(P)を用いた。

薬物動態解析のデータ解析は2コンパートメントモデルを仮定して最小2乗法を用いて行った。投与後6時間までの血中薬物濃度下面積(AUC)は台形法で計算した。

#### B-2: ヒト型酵素誘導能検索系の開発に関する研究

CYP2C19によるオメプラゾールの代謝活性の測定は反応試験管にリン酸緩衝液、ミクロソームおよび蒸留水を加え、さらにオメプラゾールを加えた後、予備反応を37℃で5分間行った。農薬は、それぞれ0.001, 0.01, 0.1および1mMの容量加えた。反応はNADPH生成系を加え37℃で30分間行い、酢酸エチルエステルを加えて停止させた。これに内部標準物質としてDMSOに溶かした50mMのフェナセチンを水で200倍希釈したものを加えて攪拌し、生成物、未変化体および内部標準物質を抽出した。その後、15,000rpmで5分間遠心した後有機層を回収した。回収した有機層を窒素ガスを用いて留去し、HPLC移動層バッファーを加えて再溶解し、これをサンプルとして、このうち15μlをHPLCに付して分析した。

CYP2C9によるトルブタミドの代謝活性の測定は、Minersらの方法に従って行った<sup>1)</sup>。酵素反応に使用した酵素源はヒト肝ミクロソーム300mgであり、反応は37℃で25分間行った。

代謝酵素誘導に関係する核内レセプターcDNAの単離に関しては、まず、ヒトPXR(hPXR)は、すでに報告されているcDNAをもとにしてプライマーを合成し、ヒト肝cDNAからPCRによりhPXRの全翻訳領域が含まれるDNAフラグメントを単離した。プライマーとしては、5'-primer: CGGGAAGCTTCCACCAAGCAGTCCAAGAGGおよ

び3'-primer:

TTCCCTAGGAGGTGTCAACCAAGGGCAGCを用いた。PCRの生成物は、pBluescriptIIプラスミドのHindIIIおよびBamHIサイトに組み込みサブクローニングした。

ラットPXR(rPXR)は、5'-primer: GCAAGCTTATGAGACCTGAGGAGAGCTG、および3'-primer:

GCTCTAGATCAGCCATCTGTGCTGCTAAAを用いてマウス肝cDNAよりマウスPXR(mPXR)cDNA断片を得、これをプローブとしてラットcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより単離した。単離したファージクローン(17個)の2つについては、プラスミドにサブクローニングした。サブクローニングしたcDNAは、シークエンスを行い塩基配列を確認した。

#### B-3: in vitroあるいは実験動物を用いた結果からヒトでの相互作用を定量的に予測する手法に関する研究

In vitro代謝阻害試験においては、阻害剤(EM)の濃度を変化させ、NADPH存在下、酵素(ヒト肝ミクロソーム)とEMを適当な時間preincubationした。Preincubation後、残存している酵素活性を測定するために、基質(triazolam)と酵素を混合し、反応初速度を測定した。この反応時間の間に生じる阻害剤と酵素の反応を最小限に抑えるために、反応時間は3分間と非常に短くして測定を行った。個々の阻害剤濃度存在下において、酵素活性とpreincubation時間を片対数プロットし、阻害の初速度がみられている領域の傾きからみかけの酵素不活化速度定数(kobs)を求めた。さらに、ここで得られたkobsの値と阻害剤初濃度(Io)との関係を以下の式

に当てはめ、非線形最小二乗法により阻害に関する kinetic パラメータ (kinact と K'app) を求めた。

$$k_{obs} = k_{inact} \cdot I_0 / (K'_{app} + I_0) \quad (1)$$

ここで、kinact は最大不活化速度定数、K'app は酵素と阻害剤のみかけの解離定数である。

生理学的モデルに基づく in vivo 相互作用の予測に関しては以下のように行った。即ち、肝臓内の活性型酵素 (CYP3A4) 量 (Eact) および不活型酵素量 (Einact) については、次のような微分方程式を書くことができる。

$$dE_{act}/dt = - (k_{inact} \cdot E_{act} \cdot fb \cdot I_{liver}/K_p) / (K'_{app} + fb \cdot I_{liver}/K_p) + k_{deg}(E_0 - E_{act}) \quad (2)$$

$$dE_{inact}/dt = (k_{inact} \cdot E_{act} \cdot fb \cdot I_{liver}/K_p) / (K'_{app} + fb \cdot I_{liver}/K_p) - k_{deg} \cdot E_{inact} \quad (3)$$

ここで、kdeg: 酵素の分解速度定数 (turnover rate), Kp: EMの肝臓中/血中濃度比, fb: EMの血中非結合同分率, Iliver: 肝臓中 EM 濃度, E0: 酵素の総濃度。

Triazolam の肝代謝における Vmax は活性型酵素量と比例するものとし、triazolam および EMについて、Fig. 1 の perfusion model に基づいて以下の微分方程式をたてた。

Triazolam について

$$V_{liver} \cdot (dC_{liver}/dt) = Q \cdot C_{pv} - Q \cdot C_{liver}/K_p - fb \cdot (CL_{int,1} + CL_{int,2}) \cdot C_{liver}/K_p \quad (4)$$

ここで

$$CL_{int,1} = V_{max,1} / (K_{m,1} + fb \cdot C_{liver}/K_p) \quad (5)$$

$$V_{max,1} = V_{max,1(0)} \cdot E_{act,1}/E_0 \quad (6)$$

$$CL_{int,2} = V_{max,2} / (K_{m,2} + fb \cdot$$

$$C_{liver}/K_p) \quad (7)$$

$$V_{max,2} = V_{max,2(0)} \cdot E_{act,2}/E_0 \quad (8)$$

$$V_{pv} \cdot (dC_{pv}/dt) = Q \cdot C_{sys} + V_{abs} - Q \cdot C_{pv} \quad (9)$$

$$V_{abs} = k_a \cdot Dose \cdot F_a \cdot e^{-k_a \cdot t} \quad (10)$$

$$V_{sys} \cdot (dC_{sys}/dt) = Q \cdot C_{liver}/K_p - Q \cdot C_{sys} \quad (11)$$

EM について

$$V_{liver} \cdot (dI_{liver}/dt) = Q \cdot I_{pv} - Q \cdot I_{liver}/K_p - fb \cdot CL_{int} \cdot I_{liver}/K_p \quad (12)$$

$$V_{pv} \cdot (dI_{pv}/dt) = Q \cdot I_{sys} + V_{abs} - Q \cdot I_{pv} \quad (13)$$

$$V_{abs} = k_a \cdot Dose \cdot F_a \cdot e^{-k_a \cdot t} \quad (14)$$

$$V_{sys} \cdot (dI_{sys}/dt) = Q \cdot I_{liver}/K_p - Q \cdot I_{sys} \quad (15)$$

ここで、Vliver, Vpv: 肝臓および門脈内容積, Vsys: 分布容積, Cliver: 肝臓中濃度, Cpv, Ipv: 門脈血中濃度, Csys, Isys: 循環血中濃度, Q: 血流速度, CLint: 代謝固有クリアランス, Vmax: 最大代謝速度, Km: Michaelis 定数, Vabs: 吸収速度, ka: 一次吸収速度定数, Fa: 消化管吸収率。添え字の 1 および 2 は、それぞれ α 位および 4 位水酸化経路を表わす。

これらの式に triazolam および EM の体内動態パラメータの報告値と in vitro 試験で得られた kinact および K'app の値を代入し、数値的に解くことにより、EM (1 g/day, t.i.d) を 3 日間経口投与したときの活性型酵素量および triazolam 経口投与後の血中濃度の経時変化をシミュレーションした。

C. 研究結果 :

C-1: ヒト肝臓由来標本およびヒト型代謝酵素を用いた残留農薬および生活関連物質の代謝に関与する酵素とその kinetics に関する研究

C-1-1: ラット及びヒト肝ミクロソームでの代謝

IBP のラット肝ミクロソームでの代謝を確認し、その代謝活性はデキサメサゾンで誘導したラットの肝ミクロソームで高いこと、ケトコナゾールによって阻害されることが確認された。

更に、IBP はヒト肝ミクロソームで代謝され、この代謝は CYP3A4 の特異的阻害剤ケトコナゾールの低濃度で阻害されることが判明した。数種類の P-450 含量と IBP の代謝速度をヒト肝ミクロソーム 11 サンプルで調べたところ CYP3A 活性含量との間で高い相関性が得られた。また、発現型 P-450 の中では CYP3A4 による代謝活性が一番高いことが確認された。

C-1-2: ラット及びヒト肝細胞での代謝

ラット及びヒト肝細胞での IBP の代謝が確認され、そのケトコナゾールによる阻害効果が確認されたが、その阻害はミクロソームでの代謝阻害と比べてやや低いこと、また、この肝細胞における代謝はエステラーゼ阻害剤により抑制されたことから、CYP3A 以外の酵素エステラーゼによる代謝の寄与も示唆された。

C-1-3: コントロールラットの血中動態の検討

未処理ラットに IBP 12.5mg/kg を静注した時の血中濃度の低下は 2 相性を示した。この血中 IBP 濃度の半減期は第一相近辺では 0.211 hr、第二相の半減期は 0.882 hr であった。また、第一相の分布容積は 0.61 l、AUC は 7.37  $\mu$ M.hr であった。

C-1-4: ケトコナゾール前処理ラットの血中動態の検討

前処理として 1-2 時間前にケトコナゾール(10mg/kg)を経口投与したラットに IBP (12.5mg/kg)を静注したときの血中薬物濃度変化も対数グラフ上で 2 相性を示した。上記と同様に計算し、この血中 IBP 濃度の半減期は第一相で 0.273 hr、また、第二相で 1.14 hr であった。その第一相から得られた分布容積は 0.62 l であった。AUC は 11.59  $\mu$ M.hr であった。即ち、前処理としてケトコナゾールを経口投与することにより、静注投与した IBP (12.5 mg/kg)の AUC は未処理ラットの約 1.6 倍(AUC=7.37 →11.59  $\mu$ M.hr)に上昇した。また、血中 IBP 濃度の半減期は第一相( $t_{1/2}$ =0.211 →0.273 hr)及び第二相( $t_{1/2}$ =0.882→1.14 hr)と共に増加傾向が見られた。静注投与した IBP はラットの腸管ないし肝臓中で、先に投与されたケトコナゾールによる代謝阻害を受けたため血中 IBP 濃度の減少に遅れがみられたものと考えられる。

C-1-5: ラット尿中代謝物の検討

IBP を雄性 SD 系ラットに経口投与したときの尿中代謝物をガスクロマトグラフ並びに GC-MS を用いて検討した。ラット 6 時間尿を塩酸酸性下で酢酸エチル抽出し、メチル化したサンプルをガスクロマトグラフ FPD(P)で定量した結果、ピーク面積の 64% を占め、主代謝物と考えられる大きなピークは IBP が脱ベンジル化された代謝物、ジエステルフォスフェート(DITP)のピークとリテンションタイムが一致した。ガスクロマト上でその少し前に検出される約 16% の面積を占めるピークは脱チオベンジル化したジエステルフォスフェート(DIHP)のピークと保持時間が一致した。またガスクロマト上で IBP の少し前に約 20% の面積を占めるピークが現れたが

その標品は無く同定できなかつた。そこで、上記尿サンプルをメチル化し GC-MS を用いてそれらの構造について検討した。主代謝物と考えられたピークには DITP の親ピーク M+212 及びフラグメントピーク 170,155,129,128,111 があり、標品のマススペクトルと一致した(Fig.6)。ガスクロマト上でその少し手前に検出されるピークには標品 DIHP のフラグメントピーク 139,113 があることからその存在が確認された。ガスクロマト上で IBP の少し前に出るピークのマススペクトルにはマスピーク 260,218,123,91 があり、親ピーク M+260 と考えるとフラグメントピーク 218 は脱イソプロピル体で 91 はベンジルのフラグメントピークと考えると脱イソプロピル化されたジエステルフォスフェート(thiobenzyl isopropyl phosphate: TBIP)と予想された。この三種類の代謝物から IBP のトリエステルフォスフェートのエステル切断箇所が三種類あることが判明した。この三種類のエステル切断がどの酵素系で代謝されているのかが今後の課題の一つである。

#### C-2: ヒト型酵素誘導能検索系の開発に関する研究

##### C-2-1: CYP2C19 によるオメプラゾールの代謝活性に及ぼす農薬の影響

各種農薬の代謝阻害作用を検討したが、1 mM 容量ではオメプラゾールの代謝活性の阻害は認められなかつた。10 mM 容量では、Alanicarb、Permethrin、IBP および Chloronitrofen で約 20-30% ほどの活性阻害が認められた。これらの中で Alanicarb および IBP では、100 mM で 80% 以上のオメプラゾールの代謝活性阻害が認められたが、Permethrin および Chloronitrofen では、60%

程度の阻害であり、1 mM に増やしてもそれ以上の阻害効果は認められなかつた。他の農薬については、Swep が容量を増やせば強い阻害を示し、100 mM で約 65%、1 mM で 90% 以上の阻害を示した。また、Ethiofencarb、Ametryn および Permethrin では、添加量を増やせば阻害効果は認められたが、その程度は弱かつた。

##### C-2-2: CYP2C9 によるトルブタミドの代謝活性に及ぼす農薬の影響

活性阻害の最も強いものは、Alanicarb と Chloronitrofen であった。100 mM で 85% 以上の阻害を示し、特に Chloronitrofen では 10 mM 容量で約 60% ほどの阻害を示した。またその阻害作用は、オメプラゾールの代謝活性阻害作用よりも強かつた。一方、オメプラゾールの代謝活性に強い阻害を示した IBP および Swep は、トルブタミドの代謝活性にはそれほど強い阻害は示さなかつた。殊に IBP は、100 mM で 75% ほどの阻害強度を示したが、容量依存的ではなかつた。

##### C-2-3: 核内レセプター cDNA の単離

サブクローニングされたヒトの hPXR は、2 種の長さのクローンが得られた。これらの塩基配列を解析した結果、長い方のクローンには一部のイントロン様配列が含まれていた。またコーディング領域の塩基配列は、報告されているものと同アミノ酸配列をコードし 434 個のアミノ酸より構成されていた。ラット PXR についても 2 種の長さ (1,792 bp (rPXR-1) および 2656 bp (rPXR-2)) のクローンが得られた。両クローンの塩基配列を解析した結果、長い rPXR-2 の方には、イントロンが含まれており、また 3'-noncoding 領域が約 800bp ほど rPXR-1 に比べ長い配

列を含んでいた。rPXR-1 は、431 アミノ酸をコードしており、その数は先に報告された mPXR と同じであった。ラット、ヒトおよびマウスの PXR のアミノ酸配列の相同性を比較したところ、DNA 結合領域においていずれの間でも高い相同性が認められた。ラットとマウスの間で 100%、ヒトとマウスの間で 95.5% であった。一方リガンド結合領域のアミノ酸配列の相同性は、ラットとマウスの間で 97% の非常に高い相同性を示したが、DNA の結合領域とは異なり、ヒトとマウスの間では 77% ほどの相同性しか認められなかった。

C-3: in vitro あるいは実験動物を用いた結果からヒトでの相互作用を定量的に予測する手法に関する研究

#### C-3-1: In vitro 代謝阻害試験

Triazolam の  $\alpha$  位および 4 位水酸化代謝ともに、preincubation : 0 min では EM による阻害効果はほとんど認められなかったが、preincubation することによりその時間と EM 濃度に依存した阻害が観察された。この結果から、EM の阻害には競合阻害の影響はほとんど認められず、その大部分が mechanism-based inhibition によることが示唆された。

阻害初速度がみられている 10 分までのデータから算出した阻害に関する kinetic パラメータ (kinact および  $K'_{app}$ ) は、 $\alpha$  位水酸化代謝でそれぞれ  $0.0644 \text{ min}^{-1}$ 、 $19.3 \mu\text{M}$ 、4 位水酸化代謝でそれぞれ  $0.0584 \text{ min}^{-1}$ 、 $22.2 \mu\text{M}$  であった。

#### C-3-2: In vivo 薬物間相互作用の予測

Fig. 2 に示すように、EM の投与に従い、活性型酵素量は次第に減少していくことがわかった。そして、triazolam を投与すると EM を投与していない control と比較して、血中

からの消失に遅延が認められ、AUC は約 1.8 倍に増加するという結果が得られた。

#### D. 考察:

D-1: ヒト肝臓由来標本およびヒト型代謝酵素を用いた残留農薬および生活関連物質の代謝に関する酵素とその kinetics に関する研究

有機リン系農薬、IBP がラット及びヒトにおいて薬物動態の関係する薬物相互作用を起こしうるか否か検討することを目的とし、IBP の代謝についてラット及びヒト肝ミクロソームおよび肝細胞での代謝、およびラットで血中動態を検討した。その結果、ヒトおよびラットの肝ミクロソームや肝細胞を用いた in vitro 実験で IBP の代謝速度はヒトおよびラットでかなり速いことが示された。また、静注されたラットでも IBP 血中濃度の減少がかなり速いことが確認された。IBP 代謝の in vitro 実験から予測されたように、ラットで CYP3A 阻害剤ケトコナゾールを前投与した場合には静注した IBP の AUC および血中半減期 ( $t_{1/2}$ ) の上昇が見られた。これは静注投与した IBP の腸管ないし肝臓中での代謝がケトコナゾールにより阻害を受けたためと考えられる。CYP3A の阻害剤としてはケトコナゾール以外にも多くの薬物やグレープフルーツジュース成分が知られており、これらが農薬として投与された IBP の代謝を阻害し、その毒性を増強する可能性が示された。

ラット尿中代謝物を検討した結果、主代謝物は脱ベンジル化した DITP が 64%、脱チオベンジル化した DIHP が 16%、脱イソプロピル化した TBIP が 20% であった。IBP のトリエステル切断箇所が三種類あることが判明した。

In vitro での IBP 代謝は、肝ミクロソームにおける CYP3A の寄与が考えられ、細胞におい



では CYP3A 以外の酵素エステラーゼ等の作用も考慮する必要性があると考えられた。IBP の三種類のエステル切断がどの酵素系で代謝されているのか特定すること、またそれぞれの酵素系への薬物相互作用の可能性とその *in vivo* での検討が課題となった。

#### D-2: ヒト型酵素誘導能検索系の開発に関する研究

今回のヒト CYP2C 分子種の代謝活性阻害実験の結果と今までに報告してきた CYP2D6 および CYP3A4 の結果と比較すると、CYP2C 分子種の方がより強く活性阻害を受けていた。CYP2D6 はいずれの農薬によっても強い阻害を受けず、CYP3A4 は IBP のみに比較的強い阻害が認められた。しかし、CYP2C19 の代謝活性は、SWEP, Alanicarb および IBP で強く阻害され、また CYP2C9 は、Alanicarb および Chloronitrofen で強い阻害が認められた。また他の農薬も CYP2C 分子種の活性阻害を示した。今回の結果より農薬による P450 の阻害様式は分子種間で大きく異なっていることが明らかとなった。またこのような阻害の特性から、個々の農薬がどの P450 によって代謝を受けるかを予測することが可能となる。おそらく Alanicarb は、CYP2C9 および CYP2C19 によりまた IBP は、CYP3A4 と CYP2C19 により代謝を受けるものと予測される。また SWEP と Chloronitrofen は、CYP2C19 および CYP2C9 によってそれぞれ代謝されると考えられる。

一方、今回 CYP3A4 の酵素誘導に関与していると考えられている PXR の cDNA を、ヒトおよびラットから単離することに成功した。特にラットの PXR の cDNA の単離は、今回が初めてのものである。塩基配列から得られた PXR のアミノ酸配列をマウス、ラットおよびヒト

と比較したところ、DNA 結合領域と考えられている 36 番目から 107 番目のアミノ酸間で非常に高い相同性が認められ、またリガンド結合部位と考えられている 103 番目から C-末端の部位でラットとマウスでは高い相同性が認められたが、ヒトの間では 77% ほどの相同性しか認められなかった。ところで誘導剤による CYP3A 分子種の応答性がヒトと実験動物間で異なっていることが報告されている。今回の PXR の一次構造の比較より、その応答性の違いは誘導剤が結合する PXR のリガンド結合部位の蛋白の立体構造が、ラットあるいはマウスとヒトの間で大きく異なることに原因があるのではないかと考えられた。

今後の研究計画として他のヒト P450 の代謝活性に対する農薬の阻害作用をさらに検討すると共に、新たな農薬についてもヒト P450 に対する影響を検討をする予定である。また酵素誘導については、ヒト PXR 恒常的に発現する培養細胞系を樹立し、この系を用いて農薬の酵素誘導を検討する。

#### D-3: *in vitro* あるいは実験動物を用いた結果からヒトでの相互作用を定量的に予測する手法に関する研究

EM の併用による triazolam の AUC 上昇率は 2 倍と報告されているのに対し、本研究ではヒト肝ミクロソームを用いた *in vitro* 試験の結果から、1.8 倍の上昇が予測された。したがって、EM- triazolam の相互作用に関しては、本方法により *in vivo* での AUC 上昇率の定量的な予測が可能であることがわかった。

この予測のために、阻害剤の肝臓中非結合型濃度が正しく見積もられることが重要となるが、特にヒトにおいてそれを実測することはできない。阻害剤の血中濃度推移は測定さ

れているケースが多いので、それを良く fit できるように、ある程度動態パラメータを決定することができる。しかし、例えば Kp 値などは測定されていない。また、酵素の turnover rate はヒトの値が報告されていないため、上記のシミュレーションにおいてはラット P450 の turnover rate を用いた。こうした不確定なパラメータはある範囲の枠で変動させてシミュレーションを行うことにより、範囲をつけて予測することが重要となる。

#### E. 結論 :

我々は日常の生活のなかで意図的あるいは非意図的に多くの化学物質により暴露されているが、それらが相互作用により思いがけない相乗毒性を示す可能性が危惧されているが、現在までに得られた知見に基づいた実験的検討と考察によりその多くが予見可能である。今回の検討によっても IBP の代謝に関与する P450 分子種(CYP3A)を明らかにすることにより、in vivo でケトコナゾールとの相互作用を予測することが可能であった。CYP3A の阻害剤としてはケトコナゾール以外にも多くの薬物やグレープフルーツジュース成分が知られており、これらが農薬として投与された IBP の代謝を阻害し、その毒性を増強する可能性がある。今後は他の農薬あるいは生活関連物質の代謝に関与する薬物代謝酵素を明らかにし、相乗毒性の可能性を検討する。また、今回示した方法論により、重篤な薬物相互作用を起こす可能性のある mechanism-based inhibition に基づく薬物間相互作用について、in vitro 試験から in vivo の相互作用の予測が可能であることが示唆された。今後、invasive な実験が可能となる動物実験を行い、より精度の高い予測を試みることにより、こ

の予測法の validity を確認していきたい。また、ヒトと実験動物との間に誘導のパターンに著明な差のある CYP3A の誘導に関して、その酵素誘導に関与すると考えられている PXR の cDNA を、ヒトおよびラットから単離することに成功し、今後のヒト型の誘導の検討が可能な試験系の開発のめどがたった。

#### F. 研究発表 :

##### 1. 論文発表

- 1) Y. Ohno, M. Sunouchi, A. Miyajima, Y. Ogawa, T. Umemura, T. Inoue, K. Nagamatsu. Lack of preneoplastic changes and induction of CYP2B11 in the liver of dogs treated with CNP. *Reviews in Toxicol.* 2, 47-51 (1998)
- 2) K. Ito, T. Iwatsubo, S. Kanamitsu, Y. Nakajima, Y. Sugiyama. Quantitative prediction of in vivo drug clearance and drug interactions from in vitro data on metabolism together with binding and transport. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38, 461-499 (1998)
- 3) K. Ito, T. Iwatsubo, S. Kanamitsu, K. Ueda, H. Suzuki, Y. Sugiyama. Prediction of pharmacokinetic alterations caused by drug-drug interactions: Metabolic interaction in the liver. *Pharmacol. Rev.* 50 (3), 387-411 (1998)

##### 2. 学会発表

- 1) 紅林秀雄、小澤正吾、宮島敦子、藤内桃子、韓晶、引間知広、酒見和枝、津田充宥、大野 泰雄:ジフェニルのラットおよび BDF1 マウスでの代謝(1)。日本薬学会第 118 年会 (1998.3)
- 2) Y. Ohno, A. Miyajima, and M. Sunouchi,

Alternative methods for mechanistic studies in toxicology. (Evaluation of hepatotoxicity of insecticide by using hepatocytes), International Congress on Toxicology, (1998,7)

3) 紅林秀雄、大野泰雄 IBP (iprofenfos)の代謝(1) ラット及びヒト肝ミクロソームを用いた代謝. 日本薬学会第 119 年会 (1999.3.30)

4) 金光真一、伊藤清美、奥田晴宏、小倉健

一郎、C. E. Green、C. A. Tyson、島田典招、室 圭、渡部 烈、杉山雄一: 薬物間相互作用の定量的予測: Mechanism-based inhibition に基づいた薬物代謝阻害. 第 13 回日本薬物動態学会年会 (1998. 11)

G. 知的所有権の取得状況:

なし

Fig. 1 Physiological model for the description of the time-profiles of triazolam and erythromycin concentrations in humans.

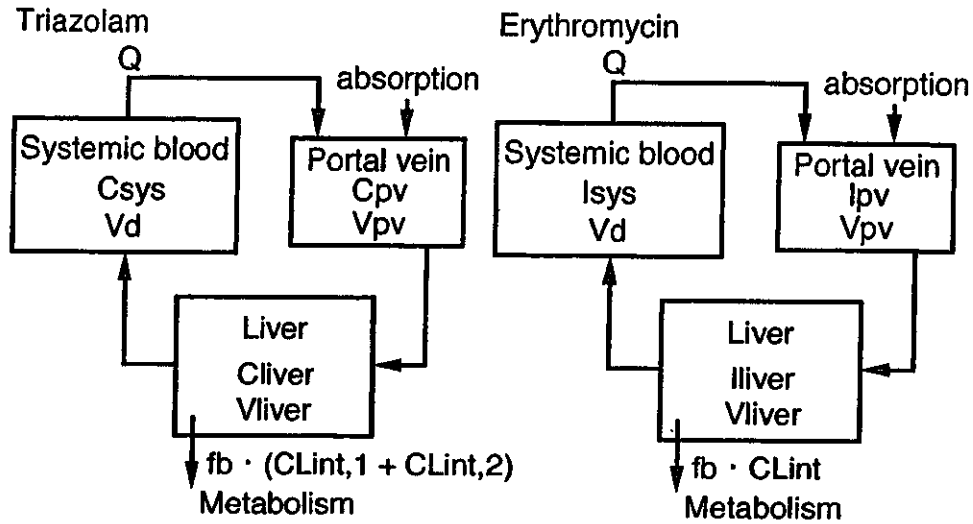
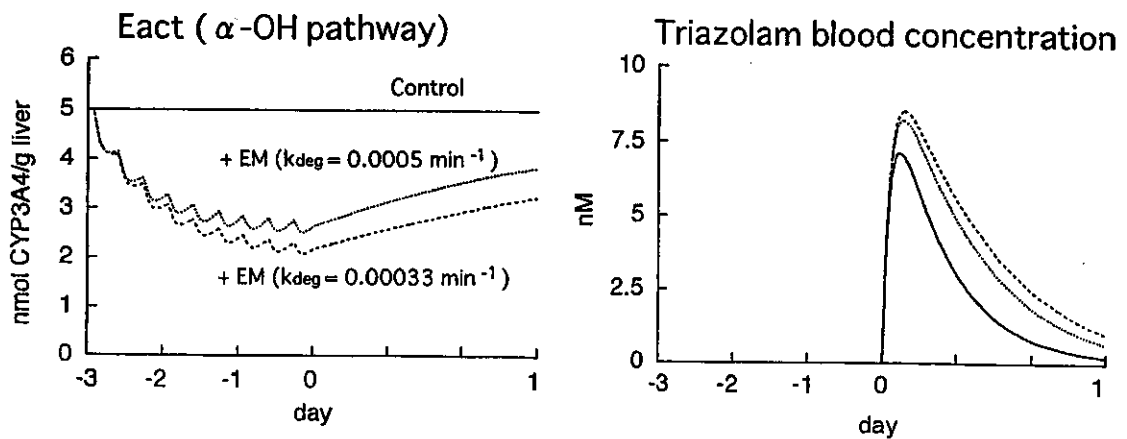


Fig. 2 Simulation of erythromycin effects on the hepatic CYP3A4 content (Eact) and blood concentration of triazolam in humans. Solid lines, control; broken lines, co-administration of erythromycin.



厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

複数農薬の残留実態に関する調査研究

分担研究者 豊田 正武 国立医薬品食品衛生研究所食品部長

## 研究要旨

食品衛生法では現在 179 農薬の残留基準値が定められているが、残留基準値設定に際しては複数農薬を同時使用した場合の影響はほとんど評価されていない。本年度は国内産農作物 356 検体について、197 農薬の複数汚染実態を調査した。その結果、国内産農作物の食用菊、春菊、トマト、きゅうり、いちご、ぶどう、ピーマンから 6 種、りんごから 5 種農薬が同時に検出されることが明らかとなった。今後輸入農作物及び各個別の農作物について更に詳細に検討を予定している。

協力研究者：永山敏廣 東京都立衛生研究所、辻正彦 兵庫県立衛生研究所、前田憲二 横浜検疫所輸入食品・検疫検査センター

## A. 研究目的

食品衛生法では現在 179 農薬の残留基準値が定められているが、残留基準値設定に際しては複数農薬を同時使用した場合の影響はほとんど評価されていない。しかし、現実には殺菌剤、殺虫剤、除草剤等が同時に使用される結果、複数農薬の残留が生じうる。そこで、本研究の目的は多数農薬の同時分析法を用いて主に市場で流通している農作物を分析することによって複合汚染の実態を把握し、食品中残留農薬の相互作用のリスク評価に資することである。

## B. 研究方法

厚生省通知の迅速スクリーニング法または一斉分析法を用いて、国産農作物 356 検体中の複数農薬の残留実態を調査した。表 1 に調査対象国内産農産物の一覧を示した。22 種有機塩素系農薬、17 種ピレスロイド系農薬、61 種有機リン系農薬及び 72 種含窒素系農薬等は ECD、FPD または FTD を装着したガスクロマトグラフを用いて測定し、15 種 N-メチルカーバメート系農薬はポストカラム高速液体クロマトグラフで測定した。表 2 に調査対象農薬群を示した。

### C. 研究結果

本研究課題の初年度は国産農産物について、代謝物も含め 197 種農薬の残留実態調査を実施した。その結果、表 3 に示すように最近 3 年間に検査した国産農作物 356 検体中、171 検体 (48%) から農薬が検出され、98 検体 (28%) から複数農薬が検出された。穀類では米、芋類ではジャガイモ、野菜ではキュウリ、トマト、ピーマン、レタス、食用菊で複数検出率が高く、果実ではミカン、スイカ、栗以外のいずれも複数農薬の検出率が高い。表 4 に国産農作物中多数農薬同時検出の例を示した。複数検出農薬としてはクロルピリホス、アセフェート等有機リン系殺虫剤、ペルメトリン等ピレスロイド系殺虫剤とイプロジオン、トリフルミゾール等含窒素系殺菌剤の組み合わせ例が多い。

### D. 考察

食品別に複数農薬の検出傾向を調べると、複数農薬検出率の高い食用菊では、有機リン系農薬のジクロロボス (DDVP)、クロルピリホス、フェニトロチオン (MEP)、マラチオンまたはクロロタロニル (TPN) と含窒素系農薬のイプロジオンまたはプロシミドンとの同時検出が見られた。またトマトでは、有機リン系農薬のイソキサチオン、メタミドホスまたはアセフェートとピレスロイド系農薬のエトフェンプロックス、シペルメトリンまたはペルメトリンとの同時検出が見られた。一方ニンジン、ジャガイモ、ハウレン草及びキュウリでは、有機リン系農薬のアセフェートとメタミドホスとの同時検出例が多い。またピーマンでは N-メチルカーバメート系農薬のメソミルを主体に、含窒素系農薬のプロシ

ミドンまたはピンクロズリン、或いは有機塩素系農薬のエンドスルファン或いは有機リン系農薬のプロチオホスが同時に検出された。更に日本ナシでは、含窒素系農薬のイプロジオンを主体に、N-メチルカーバメート系農薬のカルバリル或いは有機塩素系農薬のジコホールが同時に検出された。ブドウでは、やはり含窒素系農薬のイプロジオンを主体に、ピレスロイド系農薬のシフルトリンまたはペルメトリン、或いは有機リン系農薬のジクロルボスが同時に検出された。

## E. 結論

食品衛生法では現在 179 農薬の残留基準値が定められているが、残留基準値設定に際しては複数農薬を同時使用した場合の影響はほとんど評価されていない。本年度は国内産農作物について、複数農薬の汚染実態を調査した。その結果、国内産農作物の食用菊、春菊、トマト、キュウリ、イチゴ、ブドウ、ピーマンから 6 種、りんごから 5 種農薬が同時に検出されることが明らかとなった。引き続き輸入農作物について調査を実施することとしている。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Y.Akiyama, N.Yoshioka, M.Tsuji: Studies on pesticide degradation products in pesticide residue analysis, J.Food Hyg.Soc.Japan, 39(5), 303-309(1998)

### 2. 学会発表

表1 調査対象国内産農作物

穀類	米、小麦、そば
芋類	サツマイモ、ジャガイモ
豆類	大豆
野菜類	オクラ、カボチャ、キャベツ、ゴボウ、シイタケ 春菊、食用菊、小菊、大根、玉葱、茶、トマト、ミニトマト ナス、ニンジン、ネギ、白菜、ピーマン、ハウレン草、キュウリ 小松菜、マッシュルーム、インゲン、レタス、ワサビ
果実類	イチゴ、柿、栗、スイカ、梨、ブドウ、ミカン メロン、桃、リンゴ

表2 調査対象農薬群

種類	親化合物数	代謝物数	総数
有機リン系農薬	51	10	61
有機塩素系農薬	16	6	22
ピレスロイド系農薬	17	0	17
N-メチルカーバメート系農薬	15	0	15
含窒素系農薬	66	6	72
その他の農薬	10	0	10

表3 国内産農産物中残留農薬の検出率

農産物名	検体数	農薬検出数 (検出率)	複数農薬検出数 (検出率)
全体	356	171(48%)	98(28%)
米	23	9(39%)	6(26%)
ジャガイモ	13	6(46%)	4(31%)
キュウリ	11	7(64%)	4(36%)
トマト	16	11(73%)	8(50%)
ピーマン	14	13(93%)	10(71%)
レタス	29	19(66%)	10(34%)
食用菊	12	11(92%)	6(50%)
柿	7	6(86%)	5(71%)
日本梨	9	7(78%)	5(56%)
ブドウ	8	6(75%)	6(75%)
リンゴ	9	7(78%)	6(67%)
桃	13	10(77%)	2(15%)



表4 国産農作物中多数農薬同時検出例(その1)

農産物名	検出数	農薬名(ppm)
キュウリ	6	有機リン系農薬 アセフェート(0.08)、メタミドホス(0.02)
		有機塩素系農薬 キャプタン(0.11)、ディルドリン(0.03)
		含窒素系農薬 トリフルミゾールメチル(tr.)、イプロジオン(tr.)
春菊	6	有機リン系農薬 ダイアジノン(0.94)、ジメトエート(1.26)、オメトエート(0.25)、イソキサチオン(4.62)、イソキサチオンオキソン(0.02)
		ピレスロイド系農薬 ペルメトリン(0.52)
食用菊	6	有機リン系農薬 DDVP(0.75)、MEP(0.01)、ダイアジノン(0.03)、マラチオン(0.13)、TPN(tr.)、
		含窒素系農薬 プロシミドン(0.04)
トマト	6	ピレスロイド系農薬 エトフェンプロックス(0.01)、イソキサチオン(0.03)
		含窒素系農薬 イプロジオン(0.05)、ジクロフルアニドメチル(0.06)、ブプロフェジン(0.01)、プロシミドン(0.07)
ピーマン	6	有機塩素系農薬 $\beta$ -エンドスルファン(0.01)、
		含窒素系農薬 イプロジオン(0.12)、TPN(0.03)、トリアジメノール(0.01)チオジカルブ(0.01)、メソミル(0.14)

表4 国産農作物中多数農薬同時検出例(その2)

農産物名	検出数	農薬名(ppm)
イチゴ	6	有機リン系農薬 DDVP(0.09)
		ピレスロイド系農薬 フルバリネート(0.11)
		含窒素系農薬 ビテルタノール(0.16)、トリフルミゾール(0.27)、トリフルミゾールメチル(0.08)、プロシミドン(0.08)
ブドウ	6	有機リン系農薬 ホサロン(0.11)、アセフェート(0.01)、メタミドホス(tr.)
		ピレスロイド系農薬 ペルメトリン(0.09)
		含窒素系農薬 トリフルミゾール(tr.)、トリフルミゾールメチル(0.05)
リンゴ	5	有機リン系農薬 クロルピリホス(0.01)
		ピレスロイド系農薬 フルシトリネート(0.04)
		カーバメート系農薬 カルバリル(0.05)
		含窒素系農薬 テブフェンピラド(0.06)
		その他農薬 プロパルギート(0.32)

平成 10 年度厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）  
分担研究報告書

「食品中化学物質の相互作用等に関する調査研究」  
アレルギーモデル系を用いた化学物質の複合投与に関する研究

分担研究者 小野 宏 （財）食品薬品安全センター秦野研究所 所長

研究協力者 澤田 純一、手島 玲子 国立医薬品食品衛生研究所、  
小島 幸一、金澤 由基子、安達 智子、古谷 真美、  
松岡 千明 （財）食品薬品安全センター秦野研究所

### 研究要旨

アレルギー増悪作用の有無を調べることを目的として、*in vitro* および *in vivo* のアレルギーモデル系の確立を行った。*in vitro* の系では、マラチオンおよびその代謝活性化物であるマラオキソンによるラットがん化好塩基球 (RBL-2H3) 細胞、および骨髄由来マスト細胞 (BMMC) からの脱顆粒およびサイトカインである TNF- $\alpha$  の産生を検討した。RBL-2H3 細胞からの脱顆粒 ( $\beta$ -hexosaminidase) 遊離では、マラチオンの代謝産物マラオキソン 10-100  $\mu$ g/mL で抗原刺激に伴う弱い増強効果がみられた。BMMC を用いた抗原刺激に伴う  $\beta$ -hexosaminidase 遊離実験においてもほぼ同様の実験結果が得られ、高濃度のマラチオンでは弱い抑制効果が、高濃度のマラオキソンでは、弱い増強効果が得られた。BMMC からの TNF- $\alpha$  の遊離に関しては、マラチオンは、ほとんど無影響であったが、マラオキシソンの場合、10  $\mu$ g/mL 前後で、弱い増強効果がみられた。

NC/Nga マウスを用いた *in vivo* の系では、OVA の感作投与により、脾臓重量の増加、血清 IgE 濃度の上昇が認められた。一方、スギ花粉抽出物の感作投与では、血清 IgE 濃度の上昇、脾臓および胸腺細胞の LTT のうち、脾臓細胞の PHA および LPS に対する反応と胸腺細胞の LPS に対する反応の増大が認められた。この LTT の反応は FTN の複合投与により抑制された。脾臓細胞培養上清中のサイトカインの測定では、OVA 感作投与群で IFN- $\gamma$ 、スギ花粉抽出物感作投与群で IL-4 の産生が認められた。これらの変化は、フェニトロチオン (FTN) の複合投与により抑制された。

遅延型アレルギー反応モデルでは、脾臓重量の増加および胸腺重量の減少が認められた。Ear Swelling Test では、DNCB の感作により明らかに耳厚が肥厚した。これらの変化は FTN の複合投与に影響されなかった。

以上の結果より、RBL-2H3 細胞、および BMMC からの脱顆粒および TNF- $\alpha$  の測定、NC/Nga マウスを用いた種々の免疫機能の測定はアレルギーモデルとして有用であると考えられた。

## A. 研究目的

アレルギー疾患が近年増加する傾向が認められているが、環境汚染物質の影響がその原因の一つとして疑われている。これらの環境汚染物質曝露によるアレルギー疾患増悪の有無を明らかにすることが急務とされるものの、簡便かつ適切な評価系に乏しいのが現状である。食品中には原材料が有する食品成分に加えて、多くの化学物質が種々の目的のために添加されている。従って、今後食品を摂取することによる多種類の化学物質の複合作用の起因する疾患の発生が一層問題となるものと考えられる。本研究ではアレルギーモデル系を確立するとともに、その試験法を用いて、複数の化学物質の相互作用によるアレルギーの増悪作用を明らかにすることを目的としている。今年度は食品とともに摂取される可能性の高い有機リン系農薬に焦点を当て、マラチオンおよびその代謝活性化物であるマラオキソンによるラットがん化好塩基球(RBL-2H3)細胞、および骨髄由来マスト細胞(BMMC)からの脱顆粒およびサイトカインである TNF- $\alpha$  の産生を検討した。また、*in vivo* のアレルギーモデルとして、NC/Nga マウスを用いる系について、種々のアレルギー反応試験に対する反応性を調べるとともに、有機リン系農薬の一つであるフェニトロチオン (FTN) による影響についても検討した。

## B. 研究方法

### 1. *in vitro* アレルギーモデル系の検討

(1) 試薬の調製：マラチオン、マラオキソン(和光純薬)は、100mg/mL の濃度に DMSO で溶解し、2%FCS を含む

Dulbecco's MEM(DMEM) 培養液を用いて所定の薬物濃度に調製し、DMSO 濃度は 0.5%として細胞に作用させた。

(2) 脱顆粒反応の測定：24 ウェルのマイクロタイタープレートの各ウェルに、10% FCS を含む DMEM に  $1 \times 10^5$  cells/mL の濃度に浮遊した RBL-2H3 細胞または、IL-3 存在下で 1 か月以上分化させた BMMC を 1mL ずつ加え、37°C で 16 時間、試料溶液共存下、CO<sub>2</sub> インキュベータ中で培養した。上清を除き、2% FCS を含む DMEM にて 500 倍に希釈した DNP 特異的マウスモノクローナル IgE 抗体溶液を加え、37°C で 60 分インキュベーションした。上清を除き、細胞を 2% FCS-DMEM にて洗浄した後、10  $\mu$ g/mL の抗原(DNP<sub>7</sub>-BSA)溶液を加え、試料溶液共存下、37°C、3 時間刺激後、上清を分取した。上清中に放出された  $\beta$ -hexosaminidase の活性は基質を用いて比色法にて測定し、上清中に放出された TNF- $\alpha$  活性は、ELISA 法にて測定を行った。細胞に残った酵素量は、細胞から 0.2% Triton-X 100 処理で溶出させ比色法にて測定し、抗原刺激によって放出された酵素量の割合 (%) を計算した。

2. *in vivo* アレルギーモデル系の検討  
動物は、4 週齢の雄 NC/Nga マウスを使用した。即時型アレルギーの実験では、オプアルブミン (OVA: シグマアルドリッチジャパン) 0.1mg を Freund's Complete Adjuvant (FCA: Difco Lab.) とともに皮下に、あるいはスギ花粉抽出物 (LSL) 0.1 mg を水酸化アルミニウムゲル (Alum; LSL) とともに腹腔内に週 1 回、計 3 回投与した。各群の半数の動物には、FTN  $1.2 \times 10^{-6}$  mg を感作投与時に腹腔内投与した。群構成を以下に示した。

1 群：無処置群

2 群：無処置+FTN 投与群

- 3 群：OVA 投与群
- 4 群：OVA+FTN 投与群
- 5 群：スギ花粉抽出物投与群
- 6 群：スギ花粉抽出物+FTN 投与群

最終感作投与の 5 日後に、尾静脈より採血し、血清中 IgE 濃度をマウス IgE ELISA キットヤマサ（生化学工業）を用いて測定した。また、最終感作投与の 15 日後に解剖し、脾臓および胸腺重量の測定、フィトヘマグルチニン A (PHA) およびリポポリサッカライド (LPS) をマイトジェンとして用いたリンパ球幼若化反応 (LTT) および脾臓細胞の分泌するサイトカイン (IL-4, IFN- $\gamma$ ) 濃度の測定 (マウス IL-4, IFN- $\gamma$  ELISA キット：バイオソース) を行った。LTT では、脾臓および胸腺細胞を RPMI-1640 (10%FCS 含有) 培地に  $5 \times 10^6$  個/mL となるように浮遊液を調製した。U 底 96 穴マイクロプレートに、細胞浮遊液 200  $\mu$ L、10mg/mL PHA 20  $\mu$ L、1 mg/mL LPS 20  $\mu$ L あるいは 0.2mg/mL OVA またはスギ花粉抽出物溶液 20  $\mu$ L を加え、CO<sub>2</sub> インキュベータ内で 72 時間培養した。培養終了 18 時間前に <sup>3</sup>H-チミジンを加え、液体シンチレーションカウンタで <sup>3</sup>H-チミジンの細胞内取込み量を測定した。リンパ球の活性化は、マイトジェンあるいは抗原を添加しない場合をコントロールとして増加率 (SI) で表した。

遅延型アレルギーの実験では、ジニトロクロロベンゼン (DNCB：和光純薬) 0.1 mg を第 1 回の感作投与では FCA とともに皮下投与し、第 2、3 回の感作投与では 0.1% エタノール溶液 0.1 mL を腹部に塗布した。一部の動物には、FTN  $1.2 \times 10^6$  mg を感作投与時に腹腔内投与した。群構成を以下に示した。

- 1 群：無処置群 (動物数：10)
- 2 群：FCA+コーン油投与群 (10)

- 3 群：FCA + FTN 投与群 (10)
- 4 群：DNCB+コーン油 投与群 (5)
- 5 群：DNCB+FTN 投与群 (5)

最終感作投与の 7 日後に、尾静脈より採血し、血清中 IgE 濃度をマウス IgE ELISA キットヤマサを用いて測定した。また、最終感作投与の 12 日後に、1~3 群の半数と 4 および 5 群の全例について遅延型アレルギー反応試験として Ear Swelling Test を行った。すなわち、5% DNCB アセトン溶液 20  $\mu$ L を左耳に、対照としてアセトン 20  $\mu$ L を右耳に塗布し、48 時間後に耳厚をデジタルシックネスゲージ (三豊製作所) で測定した。最終感作投与の 15 日後に解剖し、脾臓および胸腺重量の測定を行った。

統計学的処理には Student's t 検定を用いた。

### C. 研究結果

(1) in vitro アレルギーモデル系の検討  
表 1 に示すように、RBL-2H3 細胞からの脱顆粒 ( $\beta$ -hexosaminidase) 遊離は、0.1-100  $\mu$ g/mL のマラチオンの影響を調べたところ、むしろ 10-100  $\mu$ g/mL で抗原刺激に伴う  $\beta$ -hexosaminidase 遊離に弱い抑制がかかるという傾向がみられた。この現象は、昨年、有機リン系農薬フェニトロチオンの影響を調べた結果とほぼ同様の傾向であった。一方、マラチオンの代謝産物マラオキシソンの場合は、10-100  $\mu$ g/mL で抗原遊離に伴う  $\beta$ -hexosaminidase 遊離に対し弱い増強効果がみられた。表 2 に示すように、ほぼ同様の実験結果が、BMMC を用いた抗原刺激に伴う  $\beta$ -hexosaminidase 遊離実験においても得られ、マラチオンでは、高濃度で、弱い抑制効果が、マラオキシソンでは、高濃度で、弱い増強効果が得られた。表 3 に示すように、BMMC からの TNF- $\alpha$  の遊離に関