

を経て尿中ないし胆汁中に排泄される。一方、そうした機構で処理できない過剰銅は、MTにより処理される。MTは、重金属イオンに対して高い親和性を持つシステインを多く含む蛋白で、生体の対金属防御機構に関与し、一次的な処理機構で処理しきれないレベルの過剰金属に対する二次的処理機構として機能する。銅と結合したMTは、そのほとんどが肝細胞の細胞質小胞体に移行した後に胆汁中に排泄されるが、それ以外にも、顆粒状にいくつもの分子が重合して細胞内にとどまったり、血中に分泌されたりする。本実験の肝においては、1000 ppm群で既にわずかといえどもロダニン染色陽性所見が観察され、同時にMT蛋白の発現が検出されており、比較的低いこの用量での暴露によっても、既に肝において銅負荷がかかりはじめ、MTの誘導による防御機構が働き出していることが示唆された。3000 ppm群では、黒色便が観察されており、腸管での非吸収や胆汁を介した肝からの排泄などによる過剰銅の体外への排除が、この用量での暴露により顕著になったことを示す。6000 ppm群では肝の銅レベルが増加し、12000 ppm群ではそのさらなる増加と共に血清および尿の銅レベルも増加した。すなわち、6000 ppmでの暴露は肝における排出機構の能力を超える銅過負荷を将来し、12000 ppmの暴露では肝の収容能力をも超える重篤な銅過負荷状態に立ち至ったものと判断された。

肝における種々の毒性学的変化が概ね6000 ppm以上群で顕れたことは、前段落で考察したような肝における銅過負荷に基く現象であるものと考えられた。すなわち、肝細胞壊死は銅による直接的な細胞障害に起因したもので、肉芽腫の出現は銅に対する異物反応による炎症という側面と壊死肝細胞の除去反応という側面によるものと判断された。先天的な銅代謝異常を有するLECラットは、肝において恒常的に200-300 $\mu\text{g/wet.g}$ (今回の結果では、6000 ppm群で252.4 $\mu\text{g/wet.g}$, 12000 ppm群で453.2 $\mu\text{g/wet.g}$)の銅が蓄積し、重篤な肝炎や肝細胞がんを自然発症することが知られている。LECラットにおける肝炎・肝細胞がんの発生機構には8-oxoG誘発を含む酸化性ストレスが重要な役割を果し、食餌性銅欠乏や銅キレーターとの投与はこのラットにおける酸化性ストレスとそれに基づく肝炎・肝細胞がんの発生を防御する。今回の結果は、通常のラット(ただし複数の発がん物質投与下)においても、肝の処理能力を超えるグルコン酸銅の暴露により、肝毒性が誘発されることを示唆するものである。さらに、12000 ppm群における

GST-P陽性前がん病変の個数の増加は、グルコン酸銅が、少なくとも高用量暴露の場合に、肝発がん性を発揮する可能性を示した。また、6000 ppm以上群の肝において8-oxoGの誘発が増強されたことより、肝に対するグルコン酸銅の毒性・発がん性の発現機構には、LECラットと同様の酸化性ストレスが関与するものと示唆された。一方、肝細胞増殖活性の6000 ppm以上群における増強は、肝毒性(特に肝細胞壊死)に対する再生性の変化と考えられた。

E. 結論

以上の結果より、グルコン酸銅は、複数の発がん物質を投与した条件下ながら、比較的低い用量より単独でも肝に影響を及ぼすことが判明した。また、グルコン酸銅の暴露が肝における排出機構の能力を超えることが明らかとなる用量は、6000 ppmであるものと判断された。

本研究においては、今回の成果を基に、BrlHan:WIST@Jcl(GALAS)系雄性ラット(6週齢)を用い、ラット中期多臓器発がん性試験のプロトコルに基いた29週間の実験を行った。被検物質は、グルコン酸銅(10・300・3000・6000 ppm混餌投与)とカテキン(サンフェノン100S, 太陽化学株式会社より供与, 5000 ppm混水投与)で、それらを単独または併用投与した。本実験は、動物実験を終了し、組織学的検索と適切な免疫組織化学的マーカー等を用いた前がん病変発生に関する検索を遂行中であり、その結果として見出される変化の発生機構を適切な手法により検索する予定である。来年度以降は、カテキンとグルコン酸銅の単独または複合投与による遺伝子発現の変化について、短期投与実験を行い、酸化性ストレス関連遺伝子・炎症関連遺伝子・アポトーシス関連遺伝子等を標的として検索する。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Summary for the quantitative data

Group	Dietary concentration of copper gluconate (ppm)	Effective number of rats	Final body weight (g)	Absolute liver weight (g)	Relative liver weight (g/100 g body weight)	Copper level		GST-P-positive lesions		8-oxoG positive index (%)	PCNA positive index (%)	
						Serum (µg/dL)	Urine (µg/dL)	Liver (µg/wet.g)	Number/cm ²			Mean Area (mm ²)
1	0	3	356 ± 18 ^a	8.49 ± 0.78	2.38 ± 0.17	120 ± 6	26 ± 12	4.3	0.15 ± 0.08	0.015 ± 0.006	7.5 ± 1.2	2.5 ± 1.2
2	1000	3	342 ± 13	7.90 ± 0.32	2.31 ± 0.01	109 ± 6	55 ± 16	NE	0.09 ± 0.10	0.017 ± 0.008	7.9 ± 1.8	2.4 ± 0.7
3	3000	3	386 ± 35	8.43 ± 0.42	2.19 ± 0.09	100 ± 11	44 ± 17	5.4	0.07 ± 0.05	0.008 ± 0.002	8.2 ± 2.0	3.2 ± 0.7
4	4800	3	358 ± 42	8.77 ± 1.18	2.45 ± 0.05	104 ± 10	61 ± 17	NE	0.15 ± 0.05	0.019 ± 0.010	9.1 ± 1.8	3.8 ± 1.4
5	6000	3	336 ± 44	8.71 ± 0.75	2.36 ± 0.01	137 ± 16	78 ± 36	252.4 ^c	0.15 ± 0.02	0.011 ± 0.002	17.4 ± 3.2 ^b	8.5 ± 2.2 ^b
6	12000	1	367	13.70 ^d	3.73 ^e	287 ^f	199 ^g	453.2 ^g	0.27 ^f	0.019	22.5 ^e	16.7 ^f

^aValues are presented as means ± standard deviations, but the group 6 values and the liver copper level values are the 1 sample data.

^bSignificantly larger than the group 1 value.

^cLarger than the group 1 value but without statistical significance.

NE implies "not examined".

厚生労働科学研究補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

食品中化学物質の毒性発現に及ぼす諸要因に関する調査研究

分担研究者： 大野泰雄 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部
協力研究者 山添 康（東北大学薬学部） 紅林秀雄（国立医薬品食品衛生研究所薬理部）

研究要旨

CYP3A4 レポーター遺伝子安定発現株を用い、種々の農薬の CYP3A4 誘導能評価を行った。その結果、誘導の程度には大きな差があるが、すべての被験農薬によって CYP3A4 が誘導された。3-1-10 の細胞では IBP, o,p'-DDD, permethrin で特に強い誘導がみられ、3-1-20 の細胞では permethrin, kepone, o,p'-DDD で特に強い誘導がみられた。Alanycarb, ethiofencarb, ametryn, prometryn, CNP, IBP, MCC, permethrin は分析用標準品と農業用製品の 2 通りについて評価を行ったが両者の結果に差異は認められず、農業用製品でも標準品と同等の誘導能を示したことから、CYP3A4 の誘導はこれらに含まれている不純物質や分解物質によるものではないと考えられる。本研究で用いた *in vitro* CYP3A4 誘導評価系は、農薬の CYP3A4 誘導能を良好に評価できたと考えられる。

A. 研究目的>

農薬は、農作物等を害する生物の防除に用いられる殺菌剤、殺虫剤、除草剤その他の化学物質、および農作物等の生理機能の調節に用いられる化学物質をいう。農薬の使用により、ヒトにおける偶発的曝露が起こることが予想される。すなわち、農業従事者等は農薬に接する機会が多いため職業的に農薬に曝露されやすく、また、一般大衆においても野菜等の農作物に残留する農薬を摂取する可能性がある。このような農薬の曝露により強力に CYP3A4 が誘導された場合、薬物療法上の問題が生じうる。そのため、農薬の CYP3A4 誘導能評価を行うことは重要な課題である。

一方、ヒトへの投与を意図して開発される医薬品と異なり、このような低濃度かつ非意図的な農薬の曝露によるヒトへの生物学的影響はほとんど分かっていない。また、ヒトと実験動物間で誘導を引き起こす薬物は必ずしも同じでないために、実験動物を用いた予測からヒトで起こりうる誘導を予測することは難しい。さらに、ヒトを対象とした長期的な農薬の集団曝露実験を行うのは困難である。したがって、ヒトでの CYP3A4 誘導を簡便に予測できる系を用いて、農薬の CYP3A4 誘導能を評価することが求められる。

そこで、本研究では、ヒトにおける誘導を簡便に評価できるレポーターアッセイ法を用い、*in vitro* での農薬の CYP3A4 誘導能評価を行うことを目的とした。

B. 実験方法

1. 細胞

CYP3A4 レポーター遺伝子安定発現株 (clone number 3-1-10, 3-1-20) は当研究室にて樹立した細胞株を継代、維持して使用した。

CYP3A4 レポーター遺伝子安定発現株は 0.35% glucose, 0.4% NaHCO₃, 2 mM L-glutamine (和光純薬), Antibiotic-Antimycotic (100 U/ml penicillin G sodium, 100 µg/ml streptomycin sulfate, 0.25 µg/ml amphotericin B (GIBCO BRL), MEM Non-essential amino acids solution (GIBCO BRL) および 10% fetal calf serum (Boehringer) を添加した DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, 日本製薬) 中で培養した。

培養は 5% CO₂-95% 空気を気相とし、37°C の CO₂ インキュベーター内で行った。

2. 被験薬物

Rifampicin, clotrimazole, o,p'-DDD (99+%) は Sigma より入手した。Alanycarb standard (99.5%), ethiofencarb standard (99.7%), ametryn standard (100.0%), prometryn standard (98.9%), CNP standard (100.0%), IBP standard (100.0%), MCC standard (99.8%), *cis*-permethrin standard (99.2%), p,p'-DDE standard は和光純薬より入手した。Kepone は Supelco より入手した。Alanycarb (94.2%), ethiofencarb (98.1%), ametryn (97.1%), prometryn (97.0%), CNP (99.0%), IBP, MCC (98.6%), permethrin (91.6%) の農業用製品は国立医薬品食品衛生研究所より供与

されたものを使用した。誘導実験は各薬物を dimethyl sulfoxide (DMSO, 和光純薬) に溶解し、DMSO の最終濃度が 0.1% となるよう培地に添加した。

3. ルシフェラーゼ活性の測定

細胞を PBS で回収した後、Reporter Lysis Buffer (Promega) 100 μ l で溶解し、細胞溶解液 20 μ l に 35 μ l のルシフェラーゼ基質 (Luciferase Assay System, Promega) を加え、ルミノメーター (TD-20/20, Promega) によりルシフェラーゼ活性を測定した。測定は室温で 30 秒間行った。得られた値はタンパク濃度により補正し、薬物無処置群の平均に対する百分率で表した。タンパク濃度は Bradford 法により測定した。

C. 実験結果

1. 誘導評価を行う農薬について

誘導評価を行った農薬は alanycarb, ethiofencarb, ametryn, prometryn, CNP (chlornitrofen), IBP (iprobefos), MCC, permethrin, kepone, p,p'-DDE, o,p'-DDD である。なお、農業用製品に含まれると予想される不純物質や分解物質による影響を加味した評価を行うために、alanycarb, ethiofencarb, ametryn, prometryn, CNP, IBP, MCC, permethrin については、分析用標準品と農業用製品の2通りの評価を実施した。Permethrin 標準品は cis-permethrin を用いた。また、ポジティブコントロールとして rifampicin, clotrimazole を用いた。

2. CYP3A4 誘導評価系について

今回用いた CYP3A4 レポーター遺伝子安定発現株 (clone number 3-1-10, 3-1-20) は、ヒト肝ガン由来の培養細胞である HepG2 細胞より作製された細胞である。HepG2 細胞は、肝臓細胞のモデルとして汎用されているが、CYP3A4 のタンパク自体の発現は認められていない。しかし、CYP3A4 の転写活性化に強く関与しているとされる PXR の発現が認められている。したがって CYP3A4 レポーター遺伝子を導入した場合、誘導応答を示すため CYP3A4 誘導実験において広く用いられている。

今回用いた CYP3A4 レポーター遺伝子安定発現株に導入されているレポーターコンストラクトはヒト CYP3A4 遺伝子の約-160bp 付近に存在する PXR 結合配列 (ER-6) を含む-

362bp から+11bp までのプロモーター領域と、約-7.7kbp 付近に存在する PXR 結合配列 (dNR1) を含む-7836bp から-7200bp までのエンハンサー領域をつないだ配列の 3'-下流域に、ホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子を付加したものである。この CYP3A4 レポーター遺伝子安定発現株は、外来性プロモーターを用いず、目的遺伝子の固有プロモーターを使用しているため、*in vivo* 組織での遺伝子発現と同等な様相を示すことが期待できる。また、強く誘導すると報告されている薬物には強い誘導応答を示し、弱く誘導すると報告されている薬物には弱い誘導応答を示すことがすでに確認されており、誘導評価系として用いるには適していると考えられる。

3. 種々の農薬の CYP3A4 誘導能評価

実験は Fig. 2-2 に示したように行った。すなわち、1 ウェルあたり 3.3×10^4 個の細胞を 24 ウェルプレートに播き、その 24 時間後から薬物処置を行い、処置時間 48 時間で細胞を回収した。回収した細胞は Reporter Lysis Buffer (RLB) を用いて溶解し、その細胞溶解液を用いルシフェラーゼ活性の測定を行った。

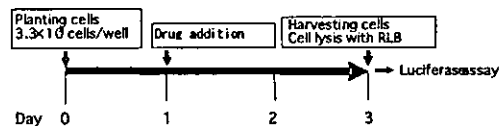


Fig. 2-2 Protocol for luciferase assay in the cloned 3-1-10 and 3-1-20

Rifampicin および clotrimazole についての結果は、3-1-10 の細胞では薬物濃度 10 μ M において、rifampicin 処置で約 32 倍、clotrimazole 処置で約 4 倍の誘導率を示した。一方、3-1-20 の細胞では薬物濃度 10 μ M において、rifampicin 処置で約 10 倍、clotrimazole 処置で約 23 倍の誘導率を示した。この結果より、各クローンは薬物により応答性が異なり、3-1-10 の細胞では rifampicin でより強い誘導を示し、3-1-20 の細胞では clotrimazole でより強い誘導を示すことが確認できる。

種々の農薬についての結果は Fig. 2 に示すとおりである。3-1-10 の細胞では IBP で最も強い誘導応答を示し、薬物濃度 10 μ M では約 8 倍の誘導率が示された。次いで強い誘導応答を示したのは o,p'-DDD であり約 6 倍の誘導率が示された。以下 permethrin (約 5.9

倍), kepone (約 4.6 倍), prometryn (約 4.5 倍), CNP (約 3.7 倍), p,p'-DDE (約 3.2 倍) の順であった。Ethiofencarb (約 1.9 倍), alanycarb (約 1.3 倍), ametryn (約 1.2 倍), MCC (約 1.3 倍) は他の被験農薬と比較すると低い誘導率を示した。

3-1-20 の細胞では permethrin, kepone で最も強い誘導応答を示し、薬物濃度 10 μM では約 3.5 倍の誘導率が示された。以下 o,p'-DDD (約 3.2 倍), IBP (約 2.7 倍), p,p'-DDE (約 2.6 倍), CNP (約 2.5 倍) の順であった。Ametryn (約 1.6 倍), prometryn (約 1.3 倍), MCC (約 1.3 倍), alanycarb (約 1.2 倍), ethiofencarb (約 1.2 倍) は他の被験農薬と比較すると弱い誘導率を示した。

D. 考察

本章では CYP3A4 レポーター遺伝子安定発現株を用い、種々の農薬の CYP3A4 誘導能評価を行った。その結果、誘導の程度には大きな差があるが、すべての被験農薬によって CYP3A4 が誘導された。3-1-10 の細胞では IBP, o,p'-DDD, permethrin で特に強い誘導がみられ、3-1-20 の細胞では permethrin, kepone, o,p'-DDD で特に強い誘導がみられた。Alanycarb, ethiofencarb, ametryn, prometryn, CNP, IBP, MCC, permethrin は分析用標準品と農業用製品の 2 通りについて評価を行ったが両者の結果に差異は認められず、農業用製品でも標準品と同等の誘導能を示したことから CYP3A4 の誘導はこれらに含まれている不純物質や分解物質によるものではないと考えられる。

本実験で設定した 1~10 μM の薬物濃度ではすべての被験農薬で濃度依存的に誘導率が上昇した。1~10 μM という濃度は、通常ヒト血中で検出される農薬濃度より高いと考えられる。しかし、残留性の農薬は、脂肪組織に蓄積しやすいため、肝細胞においても取り込まれやすいことがいわれている。したがって、各種条件によっては必ずしも普遍的に血中の農薬が低濃度であるとは限らない。そのため、本研究で得られた結果は有用であると考えられる。また、permethrin, o,p'-DDD では、処置濃度 1, 3 μM の場合では誘導の程度が比較的低いにもかかわらず、10 μM では顕著に誘導率が増加した。一方、IBP では、処置濃度 1, 3 μM においてもある程度の誘導率が示されており、1~10 μM での誘導率の増加勾配は permethrin, o,p'-DDD の場合と比べ小さい。このことから、誘導剤にはそれぞれ誘導開始

点となるような濃度域が存在することが考えられる。

今回用いた CYP3A4 レポーター遺伝子安定発現株は、薬物の種類によりクローン間で誘導応答性が異なることが確認されている。つまり、rifampicin と clotrimazole による誘導応答を比較した場合、3-1-10 の細胞では clotrimazole に比べ rifampicin でより強力に誘導され、一方 3-1-20 の細胞では clotrimazole でより強力に誘導されるという特性を持つ。これは、DNA コンストラクトが導入された位置が異なっていたり、導入によって転写因子の発現の変動などが起こったりしたためであると考えられる。本研究でポジティブコントロールとして用いた rifampicin, clotrimazole においても同様な結果となった。被験農薬のうち prometryn, CNP, IBP, permethrin, kepone, p,p'-DDE, o,p'-DDD では 3-1-20 の細胞に比べ、3-1-10 の細胞で高い誘導率が示され、特に IBP および prometryn ではその傾向が顕著であった。これらの農薬では、このようにクローンの違いによる誘導応答の違いが rifampicin と類似していたため、これらの農薬が rifampicin と同様の、あるいは類似した分子機構で CYP3A4 を誘導している可能性が考えられる。

一方、有機塩素系農薬は以前よりヒトへの生物学的影響が懸念されている。また、DDT やその類似体はラット肝の薬物代謝酵素 (CYP2B, CYP3A を) 誘導することが報告されており、chlordane, dieldrin, endosulfan はヒト肝細胞で hPXR を活性化し CYP3A4 を誘導することが報告されている。このように、有機塩素系農薬は以前から CYP の誘導に関与することが示唆されている。本研究で評価した農薬のうち、有機塩素系農薬は kepone, p,p'-DDE, o,p'-DDD である。これら 3 種の農薬は本実験系において比較的強く CYP3A4 を誘導することが示された。また、本研究では有機リン系農薬の IBP、およびピレスロイド系農薬の permethrin で、有機塩素系農薬と同等、あるいはそれ以上の誘導率を示す結果となった。

E. 結論

本研究では、レポーターアッセイ法を用い、*in vitro* での農薬の CYP3A4 誘導能を評価した。その結果、すべての被験農薬で CYP3A4 誘導がみられた。そのうち IBP, permethrin, kepone, p,p'-DDE, o,p'-DDD で比較的高い誘

導率が示された。

本研究で用いた *in vitro*CYP3A4 誘導評価系は、ヒトでの CYP3A4 誘導を予測でき、多種多様な化学物質を対象にできる CYP3A4 誘導初期スクリーニング方法として有効であると考えられている。この評価系を用い、本研究では良好に農薬の CYP3A4 誘導能を評価できたと考えられる。

農薬などの生体異物による生体への影響を正確に知るためには、吸収、分布、代謝、排泄といった体内動態による影響を考慮することが必要である。したがって、今後は、薬物の体内動態を考慮した動物個体中での CYP3A4 誘導能評価が必要であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

T. Takada, K. Nagata, M. Ogino, M. Miyata and Y. Yamazoe. Differences in transactivation between rat CYP3A1 and human CYP3A4 genes by human pregnane X receptor. *Drug Metab. Pharmacokin.* 19: 103-113, 2004.

M. Miyata, H. Takano, L.Q. Guo, K. Nagata and Y. Yamazoe. Grapefruit juice intake does not enhance but rather protects against aflatoxin B1-induced liver DNA damage through a reduction in hepatic CYP3A

activity. *Carcinogenesis* 25: 203-220, 2004.

T. Matsubara, H.J. Kim, M. Miyata, M. Shimada, K. Nagata and Y. Yamazoe. Isolation and characterization of a new major intestinal CYP3A form, CYP3A62, in rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 309: 1282-1290, 2004.

M. Shimada, R. Terazawa, Y. Kamiyama, W. Honma, K. Nagata and Y. Yamazoe. Unique properties of a renal sulfotransferase, S1d1 in dopamine metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310: 808-814, 2004.

T. Shiraga, T. Niwa, Y. Ohno, A. Kagayama. Interindividual variability in 2-hydroxylation, 3-sulfation, and 3-glucuronidation of ethynylestradiol in human liver. *Biol. Pharm. Bull.* 27: 1900-1906, 2004.

2. 学会発表

なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし。

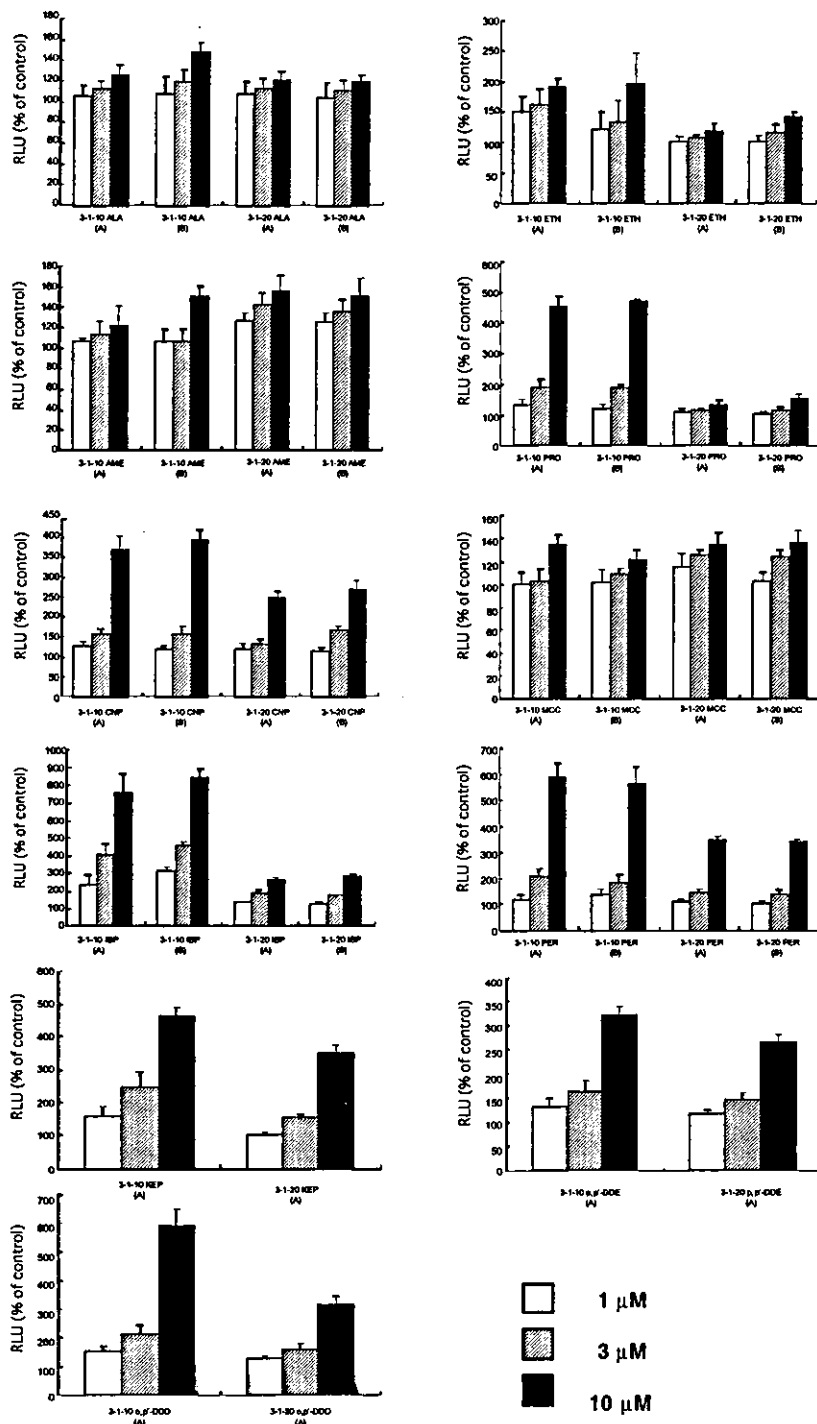


Fig. 2 Influence of various pesticides on luciferase activity in the cloned 3-1-10 and 3-1-20

Cloned 3-1-10 and 3-1-20 were seeded at 3.3×10^4 cells/well tissue culture plates with 500 μ l of DMEM 1 day before drugs addition. The cells were treated with alanycarb (ALA), ethiofencarb (ETH), ametryn (AME), prometryn (PRO), chlormitrofen (CNP), iprobenfos (IBP), MCC, permethrin (PER), kepone (KEP), p,p'-DDE, o,p'-DDD at 1,3 and 10 μ M for 2 days and the lysates were used for the assay of luciferase activity and protein concentration. Luciferase activity was normalized by the protein concentration and the values were expressed as the percentage of the mean for the control treated with 0.1% DMSO. The columns represent the means of 5-6 experiments and error bars are the standard deviations. (A) represents a standard for research use. (B) represents a product for use in agriculture.

食品中化学物質相互の酵素誘導を介した発がんリスクに関する実験的研究

分担研究者 白井智之 名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学 教授

研究要旨

ヘテロサイクリックアミン (HCA) 発がんに対する食品中化学物質の *in vivo* での発がん修飾作用の予測系を確立するため、ヘテロサイクリックアミンである MeIQx 肝発がんに対する修飾作用が既に報告されている物質をラットに 2 週間混餌投与し、如何にシトクローム P450 分子種が誘導または抑制されるかを Western Blotting 法を用いてタンパク質レベルで追究した。その結果、MeIQx 肝発がんを抑制する BHA と促進する ferulic acid では CYP1A2 の増加、CYP2B1 と 3A2 の低下が共通して認められた。また ferulic acid と同様に MeIQx 肝発がんを促進する curcumin では各種 CYP の大きな変動は見いだされなかった。肝発がんを修飾しない caffeine では CYP1A2 と 2C11 の発現上昇が認められた。このことより各種 CYP の誘導と発がん修飾作用との直接の相関性は乏しい事が明らかとなった。一方、 β -naphthoflavone が CYP1A1 を顕著に誘導したことから、HCA の発がんを修飾する可能性が示唆される。

A. 研究目的

食品中の最も重要な発がん物質であるヘテロサイクリックアミン (HCA) 類は、生体内で他の食品中化学物質により、複雑に代謝活性化あるいは解毒を受け、発がんが増強されたり、逆に抑制される場合がある。HCA の代謝活性化に重要な働きを担うのが、薬物代謝酵素の CYP1A1/1A2 であるが、食品中化学物質による CYP1A1/1A2 の誘導・阻害作用と、複合投与した場合の発がんの促進・抑制は必ずしも相関しないといわれている。そこで、HCA 発がんに対する食品中化学物質の *in vivo* での発がん修飾作用の予測系

を確立するため、既に HCA の 1 種である MeIQx 肝発がんに対する抑制作用が明らかにされている butylated hydroxyanisole (BHA)、促進作用を有する ferulic acid と curcumin、PhIP 乳腺発がんを抑制するが、MeIQx 肝発がんに対しては影響のない caffeine、及び CYP1A1/1A2 を誘導するが、MeIQx 肝発がんに対しては効果の分かっていない α -naphthoflavone、 β -naphthoflavone をラットに 2 週間混餌投与し、如何に P450 分子種が誘導または抑制されるかを Western Blotting 法を用いてタンパク質レベルで追究した。

B. 研究方法

6週令雄F344ラットにBHA 1%, ferulic acid 1%, curcumine 1%, caffeine 0.1%, α -naphthoflavone 0.02%, β -naphthoflavone 0.02%を混餌投与し、2週間後に剖検屠殺を行った。無処置の対照群も設けた。BHA, ferulic acid, curcumine, caffeineの投与量は、ラット中期肝発がん試験法における投与量に準じた。屠殺後、肝組織を採取し、タンパク質を抽出、常法に従いWestern blotting法により、CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1, CYP2B2, CYP2C11, CYP2C13, CYP2E1, CYP3A2, CYP4A1のタンパク発現変動を β -actinを対照として検討した。

(倫理面への配慮)

実験は動物愛護の精神を十分に尊重して行った。

C. 研究結果

HCAを代謝活性化するCYP1A1/1A2の誘導あるいは阻害を指標として、HCA発がんを修飾する食品中化学物質を評価する系を確立することを目的として研究を行った。MeIQx肝発がんを抑制することが既に知られているBHAと促進するferulic acidではCYP1A2の増加、CYP2B1と3A2の低下が共通して認められた。またferulic acidと同様にMeIQx肝発がんを促進するcurcuminでは各種CYPの大きな変動は見いだされなかった。肝発がんを修飾しないcaffeineではCYP1A2と2C11の発現上昇が認められた。また、 β -naphthoflavoneはCYP1A1/1A2を顕著に誘導し、 α -naphthoflavoneはCYP1A2を誘導した (Fig. 1-3)。

D. 考察

MeIQx肝発がんを抑制するBHAではCYP1A1/1A2の阻害は認められず、促進するferulic acidではCYP1A2の増加が見られたものの、同じく促進するcurcuminではCYP1A1/1A2の変動は認められなかった。caffeineはPhIPによる乳腺発がんを抑制し、逆に大腸発がんを促進することが知られているが、MeIQx肝発がんに対しては影響しない。しかし、CYP1A2を誘導した。他のCYPに関しても、発がんの抑制や促進と相関するものはなかった。これらの結果は、食品中化学物質によるCYP1A1/1A2の変動は、必ずしもHCA発がん修飾の指標にはならないことを示唆している。

HCAはCYP1A1/1A2により代謝活性化を受けた後、acetyltransferaseによる活性化、さらにグルクロン酸抱合による解毒を受ける。また、P450 reductaseにより、あるいは活性化されたN-OH体は自動酸化され、活性酸素を産生し、酸化的DNA傷害を起こすことも知られている。従って、CYP1A1/1A2などのphase I酵素のみでなく、解毒系のphase II酵素の変動などを総合的に検討する必要があると考えられる。

今回、 β -naphthoflavoneや α -naphthoflavoneがCYP1A1を顕著に誘導したことから、HCAの発がんを修飾する可能性が示唆された。

E. 結論

HCAの代謝活性化酵素であるCYP1A1/1A2の、食品中化学物質による誘導や阻害は必ずしもHCA発がんを修飾する指標とはなら

なかった。今後 Phase II 酵素等の遺伝子発現解析を含め総合的に検討する必要があると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kuribayashi, M., Asamoto, M., Suzuki, S., Hokaiwado, N., Ogawa, K., Shirai, T. Lack of modification of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) rat hepatocarcinogenesis by caffeine, a CYP1A2 inducer, points to complex counteracting influence. *Cancer Lett.*, 2005, in press.

2. 学会発表

栗林正伯、朝元誠人、鈴木周五、外岩戸尚美、白井智之、薬物代謝酵素 CYP1A2 誘導物質である caffeine による MeIQx 肝発がんの修飾作用、第 63 回日本癌学会学術総会、福岡、2004 年 9 月。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

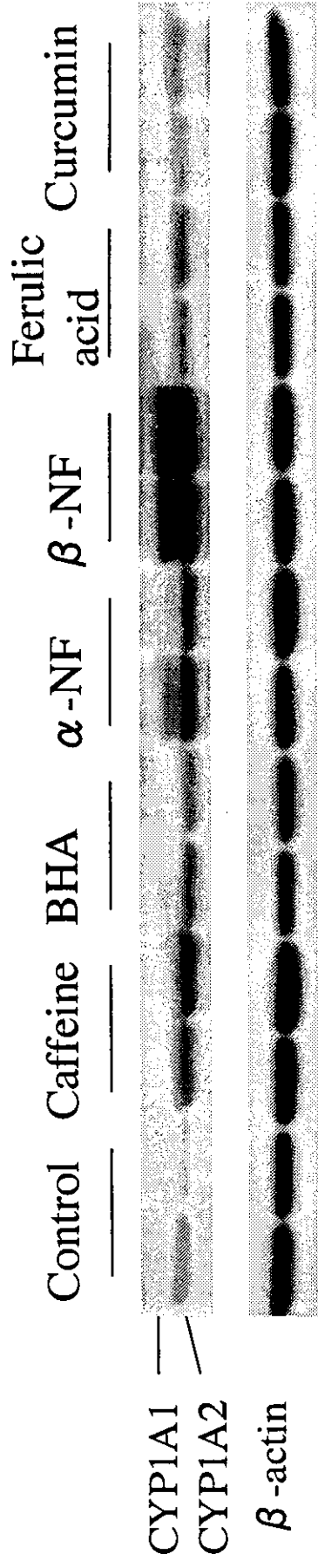
特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

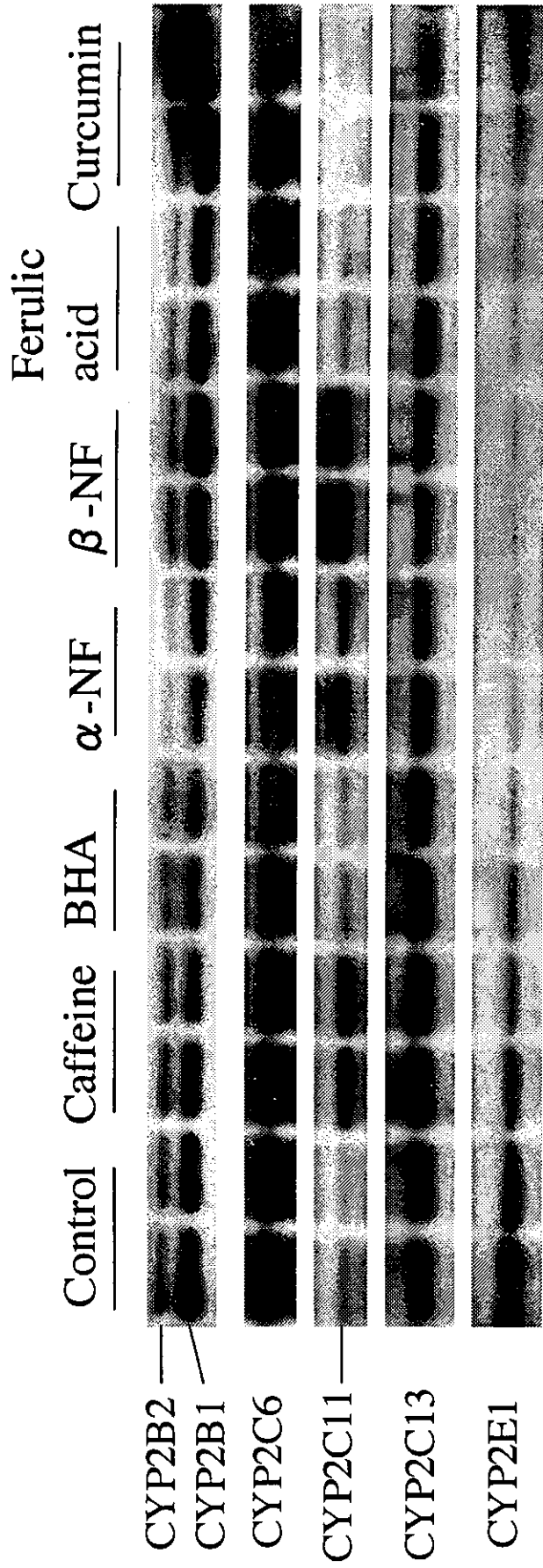
3. その他

特になし。



CYP 1A2 : Up ; Caffeine, α -NF, β -NF
 CYP 1A1 : Up ; β -NF

Fig. 1. CYP1A protein expression in rat liver

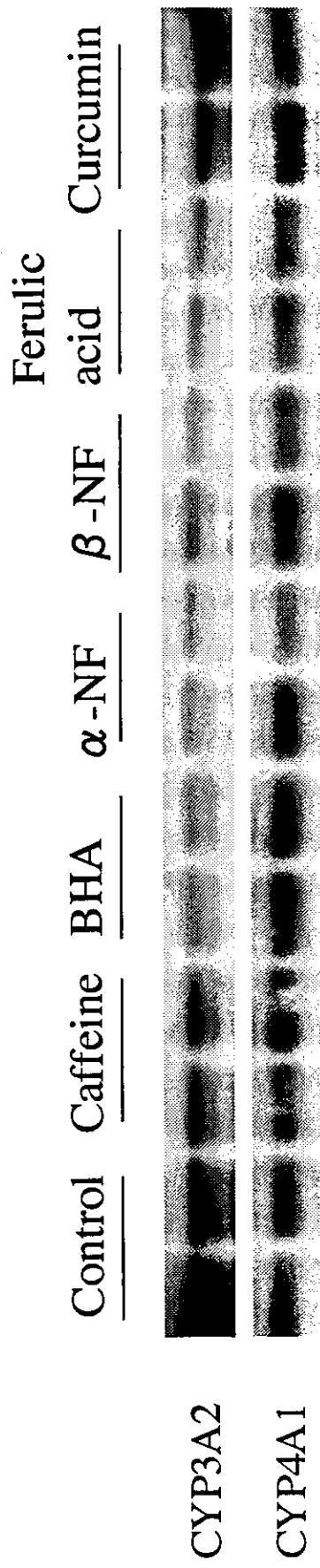


CYP2B2 : Down ; α -NF

CYP2C11 : Up ; Caffeine, α -NF, β -NF

CYP2E1 : Down ; Caffeine, BHA, α -NF, β -NF

Fig. 2. CYP2B, C and E protein expressions in rat liver



CYP3A2 : Down ; BHA, α -NF, β -NF, Ferulic acid

Fig. 3. CYP3A and 4A protein expressions in rat liver

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）
食品中化学物質の複合毒性に関する実験的研究
平成 16 年度分担研究報告書

残留農薬等の相加・相乗毒性に関する実験的研究

分担研究者	原田 孝則	(財) 残留農薬研究所	毒性部長
協力研究者	首藤 康文	(財) 残留農薬研究所	毒性部神経毒性研究室
	藤江 秀彰	(財) 残留農薬研究所	毒性部神経毒性研究室
	松本 力	(財) 残留農薬研究所	毒性部神経毒性研究室
	小嶋五百合	(財) 残留農薬研究所	毒性部病理研究室
	佐々木淳矢	(財) 残留農薬研究所	毒性部病理研究室

研究要旨

有機リン系(MPP)、有機塩素系(DDT)およびカーバメート系(MPMC)の3種類の殺虫剤を組み合わせ、8週齢の雌性ラットに複合的に単回経口投与し、臨床症状、死亡率、自発運動量およびコリンエステラーゼ活性（血漿、血球、脳）を指標に相加・相乗毒性を検索した。その結果、MPPとMPMCの複合投与群では、死亡率の増加、神経症状の発現期間の延長、自発運動量の減少等が認められ、ラットに有機リン剤とカーバメート剤を複合投与すると相加的毒性効果が発現することが示唆された。一方、その他の複合投与群（MPP + MPPあるいはMPP + DDT）では、明確な毒性作用の増強は認められなかった。以上の結果から、今回用いた実験手法は有機リン剤を中心とした農薬の複合影響を検出するのに有効な手段のひとつであり、本手法を他の農薬の複合単回投与試験にも適用し、反復投与試験と併用して実施すれば、農薬の相加・相乗毒性に関するリスク評価に有益な毒性情報が得られるものと結論された。

A. 研究目的

農薬の複合毒性については、評価上の困難性もあり、未解決な点が多く、これを解明することは食の安全を担保する上にも極めて重要である。特に現在世界的に懸念されている乳幼児や子供の発育・成長に対する有機リン剤等の複合的曝露影響を明らかにすることは社会的にも意義は大きい。従って、本研究においては有機リン剤を中心として、リン剤と同様に神経毒性が示唆されている有機塩素系あ

るいはカーバメート系農薬に対し複合的に曝露された場合の神経系への影響を明らかにし、リスク評価に必要な基礎的毒性情報を得る事を目的とした。

B. 研究方法

研究計画に従って平成 16 年度は有機リン系、有機塩素系およびカーバメート系の3種類の殺虫剤を組み合わせ、8週齢の雌性ラットに複合的に単回経口投与し、種々の毒性指標を評価基準にして相加・相乗毒

性を検索した。被験物質として、有機リン剤は MPP (Fenthion)、有機塩素剤は DDT (*p,p'*-DDT)、カーバメート剤は MPMC (Xylycarb) をそれぞれ選択し使用した。

1. 被験物質

今回の実験研究に使用した被験物質の入手先は、有機リン剤の MPP (Fenthion: O,O-Dimethyl O-4-Methylthio-*m*-tolyl Phosphorothioate) およびカーバメート剤の MPMC (Xylycarb: 3-4-Xylyl Methylcarbamate) については和光純薬工業株式会社 (大阪府) より入手した。また、有機塩素系農薬の DDT (*p,p'*-DDT: 1-trichloro-2,2-bis(*p*-chlorophenyl)ethane) は、シグマ社 (SIGMA Chemical Company, USA) より入手した。これらの被験物質は、試験期間中、冷蔵暗所 (約 4°C の冷蔵庫) で保管した。

2. 試験動物

日本クレア株式会社の富士生育場 (静岡県) で生産された Wistar Hannover 系 SPF ラット (BrlHan:WIST@Jcl[GALAS]) の雌性動物を用いた。供試動物は、7 週齢で購入し、7 日間試験環境に馴化した後、8 週齢にて試験に供した。動物は温度 22 ± 3°C、湿度 50 ± 20%、換気回数 10 回以上/時間 (オールフレッシュエアー方式)、照明時間 12 時間/日 (午前 7 時点灯、午後 7 時消灯) に設定された動物飼育室で飼育した。個体識別は被毛の一部を染色することで行なった。飼料には保証飼料 MF 固型 (オリエンタル酵母工業株式会社、東京都) を用い、ステンレス鋼製バスケット型給餌器に入れて動物に自由に摂取させた。

飲料水は、急速濾過・活性炭吸着装置を通した後、次亜塩素酸ナトリウムによって殺菌した井戸水を、プラスチック製給水びんに入れて動物に自由に摂取させた。なお、動物の取り扱いに関しては試験研究実施機関である財団法人残留農薬研究所に定める倫理規定に従い実施した。

3. 投与用量および試験群

各被験物質の文献調査による半数致死量 (LD50 値) は、MPP が 125-615 mg/kg¹⁻⁵⁾、DDT が 113-300 mg/kg^{1,3,4,6,7)}、MPMC が 290-389 mg/kg^{2,3,8)} であった。また、当該研究実施機関である残留農薬研究所におけるラットの単回投与予備実験による最大耐量 (LD0 値) は、MPP が雄 200 mg/kg、雌 800 mg/kg、DDT が雌雄とも 200 mg/kg、MPMC が雌雄とも 375 mg/kg であった。

これらの情報から、2 剤複合投与しても死亡が認められないと予想され、且つ、何らかの神経症状発現が期待される用量として、MPP 200 mg/kg、DDT 60 mg/kg、MPMC 75 mg/kg の投与用量を設定した。

試験群は、蒸留水とコーンオイルを投与する対照群 (Control 群)、MPP とコーンオイルを投与する MPP 単独投与群 (MPP 群)、蒸留水と DDT を投与する DDT 単独投与群 (DDT 群)、蒸留水と MPMC を投与する MPMC 単独投与群 (MPMC 群)、MPP を 2 回投与する群 (MPP + MPP 複合投与群)、MPP と DDT を投与する群 (MPP + DDT 複合投与群) および MPP と MPMC を投与する群 (MPP + MPMC 複合投与群) の 7 群を設定した。供試動物数は、対照群には 24 匹、その他の実験群には各群 12 匹の動物を使用し、投与後 1 日に半数、投与後 7 日に残

りの半数を計画的に屠殺した。

4. 被験物質投与液の調製

各被験物質の投与液調製では、MPP は蒸留水（大塚注射用水；大塚化学株式会社、東京都）に乳化して、DDT はコーンオイル（有限会社 林ケミカル、東京都）に溶解して、MPMC は 1%Tween80（ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレエート；和光純薬工業株式会社）水溶液に懸濁して用時調製した。投与容量は 5 mL/kg とした。

5. 投与方法

投与前日の夕方から投与約 3 時間後まで絶食したラットに、胃ゾンデを用いて各被験物質を単回強制経口投与した。複合投与では、1 剤目と 2 剤目の投与間隔は 30 分間とした。

6. 一般状態の観察

全動物について、投与日は投与後 1 時間から 4 時間、その後の観察期間中は少なくとも 1 日 1 回、死亡の有無および動物の外貌、姿勢、行動、呼吸、神経毒性兆候（攣縮、震顫、縮瞳、流涎、流涙）、体温、排泄物等の状態について詳細に観察した。

7. 体重

全動物について、投与直前および計画屠殺前あるいは死亡発見時に体重を測定した。

8. 自発運動量の測定

遠赤外線方式の検出器（SUPER MEX®）を装着した自発運動測定システム（室町機械株式会社）を使用して 10 分間隔で計 1 時間測定した。

9. コリンエステラーゼ活性の測定

投与後 1 日あるいは 7 日に、計画殺した全動物について血漿、血球および脳のコリンエステラーゼ（ChE）活性を測定した。動物をエーテル麻酔下で開腹し、後大静脈よりヘパリン処理を施した注射筒を用いて採血を行った。得られた血液試料から血漿を分離した。また、各動物から脳を摘出し、重量を測定した後、ChE 活性測定に供した。

ChE 活性の測定は、ヨウ化アセチルチオコリンを基質とした DTNB 法により行った。血漿については、JCA-BM1250 自動分析装置（日本電子株式会社、東京都）を用いて ChE 活性を測定した。脳については、20%w/v 脳ホモジネートを調製し、JCA-BM1250 自動分析装置を用いて ChE 活性を測定した。測定用試料の調製および ChE 活性の測定は、採血あるいは採材後、速やかに実施した。

10. 有意差検定

各検査項目について、対照群と各被験物質投与群間の統計学的有意差の有無を危険率 5%および 1%レベルで解析した。

自発運動量、体重およびコリンエステラーゼ活性については、Studentのt検定を用いて対照群と各投与群間における平均値の有意差の有無を判定した。

死亡率ならびに一般状態の観察所見の発生頻度については、Fisherの直接確率計算法を用いて解析した。

C. 研究結果

1. 臨床症状および死亡率（表 1）

死亡率では、表 1 に示すように各剤の単

独投与では死亡例はなかったが、有機リン剤の MPP とカーバメート剤の MPMC を複合投与した場合において 12 例中 4 例が死亡した。しかし、その他の組み合わせ (MPP + MPP あるいは MPP + DDT) による複合投与では単独投与と同様に死亡例はみられなかった。

臨床症状では、各剤の単独投与群に比べ、MPP + DDT 複合投与群では差はなかったが、MPP + MPP 複合投与群では単独投与でみられた縮瞳に加え攣縮も観察された。また、MPP+MPMC 複合投与群では単独投与に比べ症状発現の質的差異はなかったが、神経症状 (攣縮、震顫、縮瞳、流涎、流涙) の発現期間の延長がみられた。しかし、投与後 2 日経過した時点では全ての症状が回復し、長期間残存することはなかった。

2. 体重変化

投与後 1 日および 7 日における生存動物の体重は、いずれの投与群においても対照群と比べ有意差はなかった。

3. 自発運動量 (表 2)

投与後 1 日の自発運動量は、表 2 に示すように MPP および DDT の単独投与では対照群に比べ有意に増加したが、MPP + MPMC 複合投与群では逆に大幅に減少した。その他の単独 (MPMC) あるいは複合 (MPP + MPP、MPP + DDT) 投与群では、対照群と同等であった。

投与後 7 日の自発運動量は、MPMC 単独投与群、MPP + DDT および MPP + MPMC 複合投与群において有意に増加し、特に MPP + MPMC 複合投与群での増加が顕著であった。なお、MPP 単独および MPP +

MPP 複合投与群では対照群との間に差はみられなかった。

4. コリンエステラーゼ活性 (表 3)

投与後 1 日の ChE 活性の測定では、有機リン剤 MPP の単独および MPP とその他の剤との複合 (MPP + MPP、MPP + DDT、MPP + MPMC) 投与群において ChE 活性の有意な低下がみられ、対照群の値に比べ血漿では 9%~13%、赤血球で 27%~52%、脳では 49%~60%低下した。これらの ChE 活性低下について、上記の投与群間で比較した場合、リン剤同士の (MPP + MPP) 複合投与群においてより低値を示す傾向にあった。その他の投与群では、カーバメート剤の MPMC 単独投与群において軽度ながら (対照群に比べ 12%) 赤血球の ChE 活性の有意な低下がみられたが、DDT 単独投与群ではいずれの項目においても有意な変化は認められなかった。

投与後 7 日の ChE 活性測定では、投与後 1 日目に低下した投与群はいずれも回復傾向を示し、血漿では対照群の 71%~98%、赤血球で 62%~76%、脳で 78%~85%までそれぞれ回復し、特に血漿での回復が早かった。ただし、MPP + MPMC の複合投与群では、血漿の ChE 活性は赤血球および脳と同様に 7 日目においても有意に低い値を示した。また、DDT 単独投与群では投与後 1 日目には有意な変化はなかったが、投与後 7 日の測定では赤血球の ChE 活性値が対照群に比べ軽度 (15%) ながら有意に低い値を示した。

D. 考察

農薬の複合投与毒性 (相加・相乗毒性) に

関する情報は、従来から社会的にもその必要性が認識されているが、実際の報告は比較的少なく、依然として情報量に乏しい。既に報告されている毒性情報について、いくつかの例をあげると、ラットに有機リン剤である MPP (Fenthion) と DDVP (Dichlorvos) を混合投与すると相加毒性を示し⁹⁾、クロルピリフォス (Chlorpyrifos) とパラチオン (Parathion) は、クロルピリフォスを先に投与すると、パラチオンを先に投与した場合よりも毒性が強まることが報告されている¹⁰⁾。また、毒性軽減例として有機塩素剤である DDT に予め曝露されたラットは肝臓の薬物代謝酵素が活性化され、有機リン剤の毒性が弱まることが知られている⁷⁾。さらに、有機リン剤のフェニトロチオン (Fenitrothion) とカーバメート剤の BPMC をマウスに混合投与すると、予想される致死量の 2 倍の毒性を示し¹¹⁾、さらにフェニトロチオンを BPMC に先行して投与することによって致死量は 5 倍にまで高まることが報告されている¹²⁾。これは、2 剤の代謝経路が競合することによると考えられている¹³⁾。この様に複合毒性は、多種類の農薬について様々な曝露状況が想定され、相加的、相乗的あるいは抑制的に多様な相互作用を示すため、実験計画および実施方法が複雑となり評価が難しい。さらに、一般的に抵抗性が弱いと考えられる幼児あるいは高齢者といった人々に対する毒性影響の探索も求められている。従って、複合毒性のリスク評価のためには、幅広い実験研究を実施し、多くの情報を集積することが重要である¹⁴⁾。今回の実験では、有機リン剤である MPP に有機塩素剤である DDT あるいはカーバメート剤の MPMC を組み合わせ、ラットに複合的に単回投与し、臨床症状、死亡率、自発

運動量、コリンエステラーゼ活性 (血漿、赤血球、脳) を指標にして相加・相乗毒性の有無を検索した。その実験成績を以下に要約する。

リン剤とリン剤の複合投与 (MPP + MPP) : MPP は有機リン系の農薬で主に ChE 活性を阻害することによって神経毒性を引き起こす⁵⁾。今回の MPP + MPP 複合投与群は、短時間での 2 回投与のため、基本的には MPP の倍量投与であり、MPP + DDT 複合投与群および MPP + MPMC 複合投与群の成績と比較する目的で設けた。しかしながら、実験成績は MPP 単独投与群と比べ毒性症状発現において若干の増強効果はあったものの、内容的にはほぼ同様であった。また、ChE 活性抑制においても複合投与群の方が低い値を示したが、その差はわずかであり、また回復の程度にも単独投与群と比べ大きな違いはなかったことから、高用量域では、用量の増加に伴う ChE 活性抑制作用はプラトーに達するものと推測された。

リン剤と有機塩素剤の複合投与 (MPP + DDT) : 有機塩素系の農薬である DDT は、有機リン剤である MPP と同じく神経毒性を発現するが、その作用点は異なり、主に神経細胞膜のイオン透過性に変化を及ぼすことによって神経毒性を引き起こすことが知られている⁶⁾。また、致死量未満では ChE 活性の低下を生じないことが報告されている¹⁵⁾。今回の DDT と MPP の複合投与群では、それぞれの単独投与群に比べ臨床症状および ChE 活性において特に差はなく、明確な複合影響は認められなかった。自発運動量においても、MPP および DDT 単独投与でみられた投与後 1 日の増加は認

められず、投与後 7 日において初めて増加した。MPP および DDT の単独投与と MPP + MPP 複合投与では、投与後 1 日と比較して投与後 7 日に低下傾向を示したため、複合投与による影響である可能性も考えられたが、結論を出すにはさらに検討が必要である。

リン剤とカーバメート剤の複合投与 (MPP + MPMC) :カーバメート系の農薬である MPMC は、有機リン剤の MPP と同様に ChE 活性を阻害することによって神経毒性を引き起こすことが知られている⁹⁾。今回の MPP と MPMC の複合投与群では、死亡率の増加、種々の神経症状 (攣縮、震顫、縮瞳、流涎、流涙) の発現期間の延長、投与後 1 日目における自発運動量の大幅な減少がみられ、各剤の単独投与群に比べ明らかに毒性発現の増強効果 (相加作用) が認められた。ChE 活性の測定では、単独投与群に比べ MPP + MPMC 複合投与群において血漿 ChE 活性低下の回復が遅い傾向にあったが、このことを除き複合投与の影響はほとんど認められなかった。しかし、中毒症状 (神経症状) の発現時間と死亡動物の発生時間から、投与後数時間以内に両剤の相加作用によって顕著な ChE 活性低下が惹起された可能性も考えられ、今後投与直後から数時間以内の ChE 活性動態を確認する必要がある。

次に、今回認められた ChE 活性低下と神経毒性症状および自発運動量との相関性について以下のように考察した。

ChE 活性と神経毒性症状 :有機リン剤やカーバメート剤の最も特徴的な毒性指標は ChE 活性阻害であり、通常の毒性試験では

血清 (血漿)、血球 (赤血球) および脳の ChE 活性が測定される。毒性学的には脳の ChE 活性低下の意義 (重要度) が高く、次いで血球 (赤血球) の順である。最も測定し易い血清 ChE 活性は、その生理的機能は不明で、神経毒性とは無関係であるため、曝露証拠にはなるが毒性の指標とはならないとされている。赤血球 ChE 活性については、その生理機能は不明であるものの、シナプスにおける ChE 阻害をある程度反映していることから、脳の ChE 活性データがない場合には、その代行的毒性指標として用いられる。赤血球および脳の ChE 活性阻害に関して、有害な毒性変化として判断する基準は、対照群の値に対して 20% を超える低下であるとされている¹⁶⁾。ただし、一般に脳よりも血中の方が薬剤の到達が容易であるため、赤血球は脳よりも ChE 活性が阻害され易く、回復が遅いという特徴がある¹⁷⁾。また、60% 程度まで脳 ChE 活性が低下すると神経症状が認められると報告¹⁸⁾されているが、有機リン剤のパラオクソン (Paraoxon) では 26% の低下で神経毒性症状¹⁹⁾が、カーバメート剤のアルジカルブ (aldicarb) では 30~40% の低下で著しい行動変化が認められたという報告²⁰⁾もある。今回の実験結果では、ほぼ全試験群で神経症状が消失した投与後 1 日目における脳の ChE 活性低下は最大で対照群の 50% 程度であり、60% 程度の脳 ChE 活性低下によって神経症状が認められるという知見と合致していた。

ChE 活性と自発運動量 :自発運動量は、コリン作動薬や ChE 活性阻害剤の投与によって低下し、抗コリン作動薬の投与によって増加する²¹⁾。また、DDT を始めとする有

機塩素剤の曝露によっても自発運動量が増加することが知られている⁶⁾。今回の実験結果では、投与後1日のMPP + MPMC複合投与群における低下以外は、ほぼ全試験群で増加傾向が認められた。ChE活性阻害剤であるMPPおよびMPMCを投与した群における自発運動量の増加は、投与後に激しいChE活性の阻害が生じてアセチルコリンに対する抑制制御が生じた後にChE活性が回復した結果として、アセチルコリンの作用が一時的に弱まった可能性が考えられた。また、MPP + MPMC複合投与群における投与後1日の自発運動量の低下は、臨床症状の回復の遅れを反映した結果であると推察された。

E. 結論

本実験条件下では、有機リン剤のMPPとカーバメート剤のMPMCをラットに複合投与すると相加的毒性効果が発現することが示唆された。一方、その他の複合投与群(MPPとMPPあるいはMPPと有機塩素剤のDDT)では、明確な毒性作用の増強は認められなかった。

以上の結果から、今回用いた実験手法は農薬の特に有機リン剤を中心とした複合毒性を検出するためのひとつの手段として有効であることが判明した。従って、本手法を用いて同様に幼弱動物での毒性発現を検索することにより成獣と幼若動物のリン剤等の複合投与に対する感受性の差異を明らかにすることができる。また、本手法をその他の農薬の複合単回投与試験にも適用し、反復投与試験も併用して実施すれば、農薬の相加・相乗毒性に関するリスク評価に有益な毒性情報が得られるものと結論された。

F. 引用文献

- 1) 鈴田幸雄 宮本純之(1977) 最新農薬概論 廣川書店
- 2) In: Pesticide manufacturing and toxic materials control encyclopedia. (1980). Sittig M. (ed.), Noyes data corporation, NJ, USA.
- 3) In: The pesticide manual. 8th ed. (1987). Worthing, R. C. (ed.), British Crop Protection Council, Suffolk, UK.
- 4) In: The Merk index., 10th ed. (1983). Windholz, M., (ed.), Merck & Co., Inc., NJ, USA.
- 5) WHO (1976). Data sheets on pesticides. No. 23 Fenthion, Geneva.
- 6) WHO (1976). Data sheets on pesticides. No. 21 DDT, Geneva.
- 7) 松藤元 (1977) 農薬の衛生学と毒物学 講談社サイエンティフィック
- 8) WHO (1986). International programme on chemical safety. Environmental health criteria 64. Carbamate pesticides: a general introduction, Geneva.
- 9) WHO (1972). Pesticide Residue Series, No. 1, Fenthion, Geneva.
- 10) Karanth, S., Olivier, K. Jr., Liu, J., and Pope, C. (2001). In vivo interaction between chlorpyrifos and parathion in adult rats: sequence of administration can markedly influence toxic outcome. Toxicol. Appl. Pharmacol. 177, 247-255.
- 11) Miyaoka, T., Tsuda, S., and Shirasu, Y. (1980). Evaluation of interactions among pesticides. Folia Pharmacol. Japon. 76, 148P.
- 12) Takahashi, H., Miyaoka, T., Tsuda, S.,