

表 1

EFFECTS OF α - OR β -NAPHTHOFLAVONE ON MeIQ_x-INDUCED HEPATOCARCINOGENESIS
FINAL BODY AND LIVER WEIGHT DATA (G, MEAN \pm S.D.)
STUDY NO. 0528

GROUP NO.	DEN	TREATMENT TEST CHEMICAL	LEVEL (%)	NO. OF EXAMINED	FINAL B.W. (g)	LIVER	
						ABSOLUTE (g)	RELATIVE (%)
1	+	-	-	14a	264.5 \pm 14.3	7.8192 \pm 0.5326	2.9552 \pm 0.0951
2	+	MeIQ _x	0.01	15	262.4 \pm 7.0	8.4288 \pm 0.4117	3.2112 \pm 0.1005
3	+	MeIQ _x + α -naphthoflavone	0.01+0.02	13	260.7 \pm 13.5	8.9746 \pm 0.5482	3.4435 \pm 0.1394
4	+	MeIQ _x + β -naphthoflavone	0.01+0.02	15	271.1 \pm 34.9	9.1759 \pm 1.4877	3.3755 \pm 0.1530
5	+	α -naphthoflavone	0.02	15	268.1 \pm 15.0	8.5750 \pm 0.5701	3.1994 \pm 0.1222
6	+	β -naphthoflavone	0.02	15	265.0 \pm 12.4	8.3331 \pm 0.5323	3.1427 \pm 0.0802

** : Significantly different from control group 1 at P<0.01.
\$, \$\$: Significantly different from control group 2 at P<0.05, 0.01, respectively.
a : One rat was omitted from the statistical analysis due to human error at partial hepatectomy.

表 2

EFFECTS OF α - OR β -NAPHTHOFLAVONE ON MeIQ_x-INDUCED HEPATOCARCINOGENESIS
QUANTITATIVE DATA FOR GST-P POSITIVE FOCI (MEAN \pm S.D.)

GROUP NO.	DEN	TREATMENT TEST CHEMICAL	LEVELS IN DIET (%)	NO. OF EXAMINED	NUMBER (NO./cm ²)	GST-P POSITIVE FOCI	
						AREA (mm ² /cm ²)	AREA (mm ² /cm ²)
1	+	-	-	14a	3.274 \pm 1.156	0.213 \pm 0.097	
2	+	MeIQ _x	0.01	15	5.842 \pm 1.551	0.397 \pm 0.166	**
3	+	MeIQ _x + α -naphthoflavone	0.01+0.02	13	5.774 \pm 1.557	0.402 \pm 0.151	
4	+	MeIQ _x + β -naphthoflavone	0.01+0.02	15	5.345 \pm 1.708	0.390 \pm 0.198	
5	+	α -naphthoflavone	0.02	15	4.269 \pm 1.291	0.295 \pm 0.101	*
6	+	β -naphthoflavone	0.02	15	5.536 \pm 2.037	0.512 \pm 0.283	**

*, ** : Significantly different from control group 1 at P<0.05, 0.01, respectively.
a : One rat was omitted from the statistical analysis due to human error at partial hepatectomy.

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

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
	小嶋五百合	(財) 残留農薬研究所	毒性部病理研究室
	一 島 淳子	(財) 残留農薬研究所	毒性部神経毒性研究室
	佐々木淳矢	(財) 残留農薬研究所	毒性部病理研究室
	藤江 秀彰	(財) 残留農薬研究所	毒性部神経毒性研究室
	林 豊	(財) 残留農薬研究所	毒性部神経毒性研究室

研究要旨

農薬の複合毒性を明らかにするため、ラットを用い以下の2つの実験を実施した。実験1では、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、3週齢の幼若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(ChE)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、幼若ラットではMPPとDDTの複合投与により、成熟ラットでみられなかった自発運動量の増加(興奮作用の増強)とChE活性の回復遅延が認められた。また、MPMC単独投与では、成熟ラットで死亡がみられなかった用量で死亡例が生じ、MPMCとMPPの複合投与では全例が死亡した。このことから、MPMCは幼若ラットに対して強い毒性を示し、MPPとの複合毒性の増強効果も成熟ラットに比べ顕著であることが判明した。実験2では、雄性ラットを用い若齢期(5週齢)にDDTを反復経口投与(前処理)した後に休薬し、成熟期(10週齢)にMPPを単回経口投与し、実験1と同様な諸検査を実施した。その結果、DDTの前処理群では、MPPの毒性が増強され、神経症状がより長期間にわたり残存した。これらの実験結果から、幼若動物は成獣に比べ殺虫剤の複合暴露の影響を受け易いこと、また、若齢期に塩素剤を暴露された動物が成熟後にリン剤に暴露された場合、その毒性効果が増強される可能性が示唆された。

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暴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暴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ことを目的とした。

B. 研究方法

研究計画に従って、平成 17 年度では有機リン系、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、3 週齢の雌性ラット（実験 1）あるいは 5 週齢の若齢雄性ラット（実験 2）に複合的に経口投与し、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。実験 1 では、有機リン剤 MPP (Fenthion)、有機塩素剤 DDT (*p,p'*-DDT)、カーバメート剤 MPMC (Xylylcarb) を組み合わせ、幼若ラットに複合的に単回投与し、その毒性影響について成獣の場合と比較検討した。実験 2 では、若齢時 (5 週齢) に DDT を反復投与 (前処理) したラットに対し、休薬期間を置いた後の成熟時 (10 週齢) に MPP を単回投与し、その毒性発現を検索した。

1. 被験物質

使用した被験物質は、MPP (Fenthion: *O,O*-Dimethyl *O*-4-Methylthio-*m*-tolyl Phosphorothioate) と MPMC (Xylylcarb: 3-4-Xylyl Methylcarbamate) については和光純薬工業株式会社 (大阪府) より、DDT (*p,p'*-DDT: 1-trichloro-2,2-bis(*p*-chlorophenyl)ethane) はシグマ社 (SIGMA Chemical Company, USA) より、それぞれ入手した。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. 供試動物

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]) の雌性あるいは雄性動物を用いた。供試動物は、実験 1 では 3 週齢で購入し、2 日間試験環境に馴化した後、3 週齢にて試験に供した。実験 2 では 4 週齢で購入し、7 日間試験環境に馴化した後、5 週齢にて試験に供した。動物は温度 $22 \pm 3^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 20\%$ 、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成獣の半数致死量 (LD50 値) は、MPP が $125-615 \text{ mg/kg}^{1-5}$ 、DDT が $113-300 \text{ mg/kg}^{1,3,4,6,7}$ 、MPMC が $290-389 \text{ mg/kg}^{2,3,8}$ であった。また、当該研究実施機関である財団法人残留農薬研究所における成熟ラットの単回投与

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。

実験 1：被験物質を 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 50 mg/kg、DDT 75 mg/kg、MPMC 60 mg/kg の投与用量を設定したが、MPP と MPMC を複合投与したところ、全例が死亡したため、MPMC の用量を 30 mg/kg に下げて実施した(表 1 参照)。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、対照群および MPP 群には 30 匹、その他の実験群には各群 18 匹の動物を使用し、投与後 1 時間、1 日および 7 日目に計画的に屠殺した。

実験 2：DDT は連続投与しても臨床症状が生じないと予想される 60 mg/kg/day と、その 1/2 である 30 mg/kg/day および 1/4 である 15 mg/kg/day の 3 用量を設定した。各用量の DDT を 5 週齢時から 14 日間連続経口投与した後、4 週間休薬し、10 週齢時に 200 mg/kg の MPP を単回経口投与した。さらに対照として、DDT の溶媒であるコーンオイルと、MPP の乳化基剤である蒸留水を投与する対照群 (Control 群)、

コーンオイルと MPP を投与する MPP 単独投与群 (MPP 群)、DDT と蒸留水を投与する DDT 単独投与群 (DDT 群) の 6 群を設定した。供試動物数は、各群 6 匹 (DDT 単独群は 5 匹) を使用し、MPP 投与後 3 日目に計画的に屠殺した。

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

胃ゾンデを用いて各被験物質を単回強制経口投与した。実験 1 では、投与前日の夕方から投与約 3 時間後まで絶食し、1 剤目と 2 剤目の投与間隔は 30 分間とした。実験 2 では、投与前の絶食は行わなかった。

6. 一般状態の観察

実験 1 および実験 2 における全動物について、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

実験 1 および実験 2 における全動物について、投与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

実験 1 および実験 2 における自発運動量の測定には、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

各実験の計画殺動物全例を対象に、実験 1 では血漿、血球および脳のコリンエステラーゼ (ChE) 活性を、実験 2 では血漿および脳の 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。血球については、エゼリン添加および非添加の 20% (v/v) 赤血球浮遊液を、オートアナライザー II (Bayer Corp) で測定し、得られた測定値の差 (エゼリン (-) - エゼリン (+)) を赤血球 ChE 活性とした。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。

なお、実験 2 では、後に分子生物学的解析を実施するためのサンプルとして大脳および肝臓の一部を採材し、凍結保存した。

11. 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

C-1. 実験 1

1-1. 臨床症状および死亡率 (表 2)

有機リン剤の MPP とカーバメート剤の MPMC 複合投与群において、18 例中 3 例が死亡した。しかし、各剤の単独投与およびその他の組み合わせ (MPP + MPP あるいは MPP + DDT) による複合投与による死亡はみられなかった。

臨床症状では、各剤の単独投与群と比べて、MPP + MPP 複合投与群および MPP + DDT 複合投与群ではほとんど差がなかった。MPP+MPMC 複合投与群では、単独投与に比べて症状発現の質的差異はなかったが、投与後 1 時間における震顫および流涎の発現頻度が増加し、神経症状の程度もより重篤であった。しかし、生存動物における神経症状は投与後 4 時間では軽減し、MPP の単独投与群よりも速やかに回復した。

1-2. 体重変化 (表 3)

投与後 1 日および 7 日目における生存動物の体重は、MPP 単独、DDT 単独、MPP + MPP

複合および DDT + MPP 複合投与群で対照群と比較して減少したが、MPMC 単独および MPP + MPMC 複合投与群では対照群と比べて有意な低下はなかった。

1-3. 自発運動量 (表 4)

投与後 1 日目の自発運動量は、表 4 に示すように MPP + DDT 複合投与群でのみ対照群に比べ有意に増加した。

投与後 7 日目の自発運動量は、全ての群で有意な変化は認められなかった

1-4. コリンエステラーゼ活性 (表 5)

投与後 1 時間の ChE 活性測定では、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、対照群の値と比べて血漿では 32%~36%、赤血球では 8%~12%、脳では 29%~33% とほぼ同程度に低下した。一方、カーバメート剤である MPMC の単独投与群では、血漿、赤血球および脳の ChE 活性は、それぞれ 63%、42%、64% と軽度な低下であった。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 1 日目の ChE 活性測定では、有機リン剤 MPP の単独および MPP + MPP 投与群において対照群の値と比べて血漿では 29%、赤血球では 45%~52%、脳では 57%~67% のレベルに回復していた。しかしながら、MPP + DDT 投与群では、血漿、赤血球および脳の ChE 活性は、それぞれ 19%、39% および 49% とやや回復が遅れ、MPP + MPMC 投与群では、それぞれ 43%、57%、91% と速やかに回復する傾向がみられた。MPMC の単独投与群では、全ての項目で対照群と同程度まで回復してい

た。

投与後 7 日目の ChE 活性測定では、MPP を投与した全ての群で赤血球の ChE 活性が対照群の 72~79% とやや低かった他は、全項目において対照群と同程度に回復した。

C-2. 実験 2

2-1. 臨床症状および死亡率 (表 6)

有機塩素剤 DDT を若齢期に 60 mg/kg/day の用量で反復投与 (前処理) し、その後の成熟期に有機リン剤 MPP 200 mg/kg を複合投与した群において、6 例中 1 例の死亡が認められた。DDT あるいは MPP の単独投与、DDT 15 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg 複合投与および DDT 30 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg の複合投与では、いずれも死亡例はみられなかった。

DDT 14 日間連続投与期間および休薬期間では、全ての動物で臨床症状の異常は認められなかった。

単独・複合を問わず MPP 200 mg/kg を投与した各群の動物全例に鎮静、攣縮、振戦、縮腫などの症状が認められたが、MPP 単独投与群では投与後 48 時間までに症状の回復と軽減が認められた。一方、DDT で前処理した後に MPP 200 mg/kg を投与した群では、DDT の用量に依存して強い神経症状が投与後 72 時間まで継続して認められた。

2-2. 体重変化 (表 7)

MPP 投与後 72 時間の体重測定では、MPP 単独および DDT 前処理後の MPP の複合投与群で、対照群と比較して有意な減少が認められた。体重抑制の程度は、DDT と MPP の複合投与群でより顕著であった。

2-3. 自発運動量

MPP 投与後 72 時間の自発運動量測定では、MPP 単独および DDT 前処理後の MPP の複合投与群で、対照群と比較して有意な減少が認められたが、単独・複合投与群間で差はなく、DDT 前処理の影響は特に認められなかった。

2-4. コリンエステラーゼ活性 (表 8)

MPP 投与後 72 時間の ChE 活性測定では、血漿および脳ともに MPP 単独および DDT と MPP の複合投与群で、対照群の値に比べて血漿では 37%~45%、脳では 61%~67%に低下した。しかしながら、単独・複合投与群間で差はなく、DDT 前処理の影響は特に認められなかった。

D. 考察

農薬の複合毒性(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。そこで、被験物質として有機リン系、カーバメート系および有機塩素系の 3 種類の殺虫剤を組み合わせ、今年度(平成 17 年度)は幼若ラットを用い複合的に単回経口投与し、臨床症状、死亡率、自発行動量、コリンエステラーゼ(ChE)活性(血漿、血球、脳)を毒性指標にして検索し、昨年度(平成 16 年度)実施した成熟ラットにおける実験結果と比較した(実験 1)。さらに、若齢期に塩素剤を反復経口投与したラットに対し成熟期にリン剤を単回経口投与し、時間差のある複合暴露影響についても同様の毒性指標を用いて検討した(実験 2)。

実験 1 では、幼若動物を用い有機リン剤

(MPP)、有機塩素剤(DDT)およびカーバメート剤(MPMC)の組み合わせによる単回経口複合投与毒性について検索し、成獣における実験結果と比較検討した。その結果、幼若ラットにおいてもリン剤とカーバメート剤の複合投与では相加毒性が認められ、その増強効果は成熟ラットに比べ明らかに顕著であった。リン剤と塩素剤の複合投与では、相加作用はほとんど認められなかった。以下に、各剤の単独投与毒性あるいは複合投与毒性について考察を加えた。

リン剤(MPP)、塩素剤(DDT)あるいはカーバメート剤(MPMC)の単回単独投与毒性：
幼若と成熟ラットの農薬に対する感受性の違いは、主に哺乳期と成熟期の LD50 値の比較という形で以前から報告されており、有機リン剤およびカーバメート剤は成熟ラットに比べて幼若ラットより強い毒性を示し、有機塩素剤では逆に毒性が弱まる剤が多い⁹⁾。しかしながら、有機リン剤では、LD50 値の成獣に対する幼若動物比で Dialifos の 0.62¹⁰⁾と幼若で弱毒性を示すものから Malathion の 3.99¹¹⁾と強毒性を示すものまで、その毒性は剤によって大きく異なる。これは、それぞれの剤の化学構造による生体内解毒機構の違いが原因していると考えられる⁹⁾。今回は有機リン剤である MPP と有機塩素剤 DDT およびカーバメート剤 MPMC を、より現実的な暴露状況を考慮して、幼若ラットが自ら飼料を経口摂取し始める離乳直後に死亡が発現しない程度の用量で強制経口投与し、神経症状および ChE 活性抑制の程度を主要な指標として単剤による暴露影響を検索した。その結果、幼若ラットにおける単剤投与では、同用量の MPP あるいは DDT の投与によって、成熟ラットでは見られなかった攣縮あるいは震顫や流涎が幼若ラットでは認められ、

神経症状は幼若ラットの方が成熟動物よりやや強く発現した。特に DDT は LD50 値の成獣/幼若（哺乳期）の比で 0.44 と哺乳ラットに対して弱毒であるという報告¹¹⁾があるが、解毒酵素が未熟であると考えられる幼若ラットでは、一過性の急性症状がやや強く発現することが示唆された。さらに、幼若ラットにおける MPMC の単独投与では、成熟ラットでは死亡がみられなかった用量で死亡が生じ、カーバメート剤に対する幼若動物の感受性の高さを裏付ける結果となった。

リン剤とリン剤の (MPP + MPP) の単回複合投与毒性：成熟ラットでは、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¹²⁾、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¹³⁾。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り、ChE 活性抑制およびその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。この結果は成熟ラットと同様であり、幼若ラットにおいても高用量域では、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 (MPP + DDT) の単回複合投与毒性：成熟ラットにおいては、有機塩素剤である DDT に予め暴露された場合、肝臓の薬物代謝酵素が活性化されて有機リン剤

の毒性が弱まることが報告されている⁷⁾。今回の幼若ラットにおける DDT と MPP の複合投与では、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、成熟ラットと同様に明確な複合影響は認められなかった。ただし、投与後 1 日目の自発運動量は対照群と比較して有意に増加し、複合投与によって興奮作用が増強された可能性が考えられた。ChE 活性の低下は、MPP 単独投与とほぼ同程度であったが、投与後 1 日目における回復がやや遅れた。

リン剤とカーバメート剤 (MPP + MPMC) の単回複合投与毒性：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¹⁴⁾、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¹⁵⁾。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¹⁶⁾。MPP と MPMC の複合投与群では、死亡率の増加および神経症状の増強が認められ、成熟ラットと同様に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。投与後 1 時間の ChE 活性の低下は、MPP あるいは MPMC の単独投与と同程度であった。しかしながら、症状および ChE 活性の回復が MPP 単独投与群と比べて速やかだった点が、症状発現期間の延長および血漿 ChE 活性低下の回復遅延傾向が認められた成熟ラットの複合投与結果と異なっていた。

実験 2 では、若齢期に有機塩素剤 DDT を反復投与（前処理）したラットに対し、休薬期間を置いた後の成熟期にリン剤 MPP を単回投与し、その複合投与の影響について検索した。

有機塩素系殺虫剤のひとつである DDT は、安価で効果的な残効性の高い殺虫剤で、1940 年代半ばから世界的に大量に使用されてきたが、環境中での難分解性および生態蓄積性が明になるにつれ、生態系への影響が懸念され、環境毒性という観点からその使用が問題になった。そのため、わが国では 1971 年から製造、使用が禁止されている。また、近年では内分泌攪乱作用を保有することが指摘されている。しかしながら、現在でもマalaria 感染症が多発する地域では、媒介昆虫である蚊の駆除のために使用されている^{17,18,19)}。このように DDT はほぼ全世界的に製造および使用が制限されており、先に述べたように幼若期毒性も弱いとされていることから、急性毒性そのものが問題になることは考え難い。しかしながら、環境中や生体内での長期残留、生態系濃縮による影響が考えられるため、幼若期に限定した感受性の違いだけではなく、内分泌系や中枢神経系に対する成長期の一過性の影響が成熟後に現れることが危惧されている^{20,21)}。そこで今回は、成長期の子供が食物を介して中期的に DDT の暴露を受け、成人後に有機リン剤に単回大量暴露された場合を想定して実験を行った。

具体的には、単独投与では体重増加抑制および神経症状が認められない用量の DDT を成長期（若齢時）のラットに反復投与（前処理）し、その後休薬期間において、成熟後に MPP を単回投与した結果、顕著な体重増加抑制、神経症状の増強および回復遅延がみられ、DDT 前処理の影響（MPP の毒性発現に対する増強効果）が確認された。なお、DDT 60 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg 群では 6 例中 1 例が死亡した。ただし、自発

行動量および ChE 活性には複合暴露の影響はみられなかった。

E. 結論

今回の幼若ラットにおける単回複合暴露実験では、成熟ラットと同様に有機リン剤 MPP と MPP および MPP と有機塩素剤 DDT の複合投与による明確な症状の悪化は認められなかった。しかしながら、MPP と DDT の複合投与では、成熟ラットには認められなかった興奮作用の増強と ChE 活性の回復遅延が観察された。また、MPP とカーバメート剤 MPMC を幼若ラットに複合投与した場合には、相加的毒性効果が発現し、質的には成熟ラットと同様であった。しかしながら、幼若動物においては、成熟ラットで死亡がみられない用量の MPMC の単独投与で死亡例が生じ、MPP との複合投与では全例が死亡した。このことから、MPMC は幼若ラットに対して強い毒性を示し、MPP との複合毒性の増強効果が成熟ラットに比べて顕著であることが明らかとなった。一方、若齢期に DDT を反復経口投与（前処理）したラットに対し成熟期に MPP を単回経口投与した実験では、成長期において毒性症状が認められない程度の DDT に短期連続暴露されてからある程度の期間を経過した後でも、有機リン剤である MPP に大量暴露された場合にはその毒性を憎悪させる可能性が示唆された。

結論として、成獣と比べて幼若動物の方が複合暴露の影響を受け易いこと、また、若齢期に塩素剤を暴露された動物が成熟後にリン剤に暴露された場合、その毒性効果が増強される可能性が示唆された。

F. 引用文献

- 1) 鈴木幸雄 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) 財団法人 残留農薬研究所 (1997) 「胎仔あるいは幼若動物における農薬の毒性評価法の確立 農薬の急性毒性における検索」 農薬残留安全評価技術確立事業 幼若生体毒性評価技術開発事業
- 10) Goldenthal, E. I. (1971) A compilation of LD50 values in newborn and adult animals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 18, 185-207.
- 11) Lu, F. C., Jessup, D. C., and Lavalley, A. (1965). Toxicity of pesticides in young versus adult rats. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 3, 591-596.
- 12) WHO (1972). Pesticide Residue Series, No. 1, Fenthion, Geneva.
- 13) 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.
- 14) Miyaoka, T., Tsuda, S., and Shirasu, Y. (1980). Evaluation of interactions among pesticides. *Folia Pharmacol. Japon.* 76, 148P.
- 15) Takahashi, H., Miyaoka, T., Tsuda, S., and Shirasu, Y. (1984). Potential toxicity of 2-sec-Butyl Methylcarbamate (BPMC) by O,O-Dimethyl O-(3-Methyl-4-nitrophenyl)phosphorothioate (Fenthion) in mice; relationship between acute toxicity and metabolism of BPMC. *Fundam. Appl. Toxicol.* 4, 718-723.
- 16) Miyaoka, T., Takahashi, H., Tsuda, S., and Shirasu, Y. (1984). Potentiation of acute toxicity of 2-sec-Butyl Methylcarbamate (BPMC) by Fenthion in mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* 4, 802-807.
- 17) WHO (1979). DDT and its derivatives. International programs on chemical safety, Environmental health criteria 9, Geneva.
- 18) Smith A.G. (1991). Chlorinated hydrocarbon insecticides. In: Handbook of pesticide toxicology, Hayes W.J., Jr. and Laws E.R., Jr. (eds.), Academic Press, Inc., San Diego, 731-916.
- 19) Ecobicon, D.J. (2001). Toxic effects of pesticides. In: Toxicology (6th ed.), Klassen, C.D. (ed.), McGraw-Hill, New York, 763-810.
- 20) Eriksson, T. A. and Fredriksson, A. (1990). Altered behaviour in adult mice exposed to a single low dose of DDT

and its fatty acid conjugate as neonates.
Brain Res. 514, 141-142

- 21) McMeen, B. (1998). EPA proposes requirement for chemicals affecting neurological system of insects. Chemical Regulation Reporter 22, 731-732.

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

有機リン剤と有機塩素剤あるいはカーバメート剤のラットにおける単回投与複合：首藤康文、配島淳子、小嶋五百合、佐々木淳矢、藤江秀彰、松本力、林豊、上田英夫、小坂忠司、原田孝則、第 141 回日本獣医学会学術集会（つくば国際会議場、2006 年）

有機塩素系および有機リン系農薬の複合暴露を受けたラット脳における網羅的遺伝子解析：配島淳子、首藤康文、武田真記夫、大塚亮一、藤江秀彰、松本力、林豊、原田孝則第 141 回日本獣医学会学術集会（つくば国際会議場、2006 年）

H. 知的財産権の出願・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

Table 1 Mortality and clinical signs of MPMC 60 mg/kg treatment groups in female rats
- (Reference data of Experiment 1)

Group	Signs	1 hour	4 hours	1 day
MPMC	Mortality	0/6 ^a	1/6	0/5
	Tremor	6/6	0/5	0/5
	Miosis	5/6	3/5	0/5
	Salivation	6/6	0/5	0/5
MPP+MPMC	Mortality	6/6		

a ;Number of animals noted / number of animals examined.

Table 2 General conditions in female rats - Mortality and clinical signs (Experiment 1)

Group	Signs	1 hour	4 hours	1 day	2-7 days		
Control	Mortality	0/24 ^a	0/18	0/18	0/6		
	Twitches	0/24	0/18	0/18	0/6		
	Tremor	0/24	0/18	0/18	0/6		
	Miosis	0/24	0/18	0/18	0/6		
	Salivation	0/24	0/18	0/18	0/6		
MPP	Mortality	0/24	0/18	0/18	0/6		
	Twitches	6/24	6/18	0/18	0/6		
	Tremor	0/24	0/18	0/18	0/6		
	Miosis	17/24	14/18	0/18	0/6		
	Salivation	1/24	0/18	0/18	0/6		
DDT	Mortality	0/18	0/12	0/12	0/6		
	Twitches	0/18	1/12	0/12	0/6		
	Tremor	0/18	8/12	**	0/12	0/6	
	Miosis	0/18	1/12	**	0/12	0/6	
	Salivation	0/18	0/12	0/12	0/12	0/6	
MPMC	Mortality	0/18	0/12	0/12	0/6		
	Twitches	6/18	0/12	*	0/12	0/6	
	Tremor	9/18	**	0/12	0/12	0/6	
	Miosis	18/18	*	0/12	**	0/12	0/6
	Salivation	4/18	0/12	0/12	0/12	0/6	
MPP+MPP	Mortality	0/18	0/12	0/12	0/6		
	Twitches	0/18	0/12	*	0/12	0/6	
	Tremor	0/18	0/12	0/12	0/12	0/6	
	Miosis	15/18	12/12	0/12	0/12	0/6	
	Salivation	0/18	0/12	0/12	0/12	0/6	
MPP+DDT	Mortality	0/18	0/12	0/12	0/6		
	Twitches	0/18	1/12	0/12	0/6		
	Tremor	0/18	5/12	**	0/12	0/6	
	Miosis	13/18	11/12	1/12	0/12	0/6	
	Salivation	2/18	0/12	0/12	0/12	0/6	
MPP+MPMC	Mortality	3/18	0/12	0/12	0/6		
	Twitches	0/18	1/12	0/12	0/6		
	Tremor	16/18	**	0/12	0/12	0/6	
	Miosis	18/18	*	5/12	0/12	0/6	
	Salivation	13/18	**	0/12	0/12	0/6	

a ;Number of animals noted / number of animals examined.

Significantly different from MPP group: *, p <= 0.05; **, p <= 0.01 (Fisher's exact probability test).

Table 3 Body weight - Group mean values in female rats (Experiment 1)

Dose		Before treatment (g)	Time after treatment		
			1 day (g)	7 days (g)	
Control	Mean	34	41	75	
	S.D.	3	3	4	
MPP	Mean	35	39	67	**
	S.D.	4	5	4	
DDT	Mean	33	36	65	**
	S.D.	4	3	3	
MPMC	Mean	35	39	74	
	S.D.	4	10	10	
MPP + MPP	Mean	35	33	68	*
	S.D.	4	3	4	
MPP + DDT	Mean	33	35	69	**
	S.D.	4	2	9	
MPP + MPMC	Mean	36	37	74	
	S.D.	4	4	10	

S.D. : Standard deviation.

Significantly different from control : *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$ (Student t-test).

Table 4-1 Motor activity in female rats - 1 day after treatment (Experiment 1)

Group	Counts/10 min.						Total	
	0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60		
Control	mean	350	78	7	11	6	66	518
	S.D.	259	104	19	31	16	117	350
MPP	mean	311	60	13	27	14	23	448
	S.D.	101	87	29	55	45	42	209
DDT	mean	477	24	1	59	87	0	648
	S.D.	256	27	1	84	202	1	396
MPMC	mean	229	79	0	0	10	1	319
	S.D.	126	83	1	1	24	2	198
MPP + MPP	mean	371	34	1	48	0	55	509
	S.D.	271	44	2	71	0	134	386
MPP + DDT	mean	433	193	49	142	90	62	969 *
	S.D.	134	165	114	219	114	142	511
MPP + MPMC	mean	401	48	23	31	26	42	570
	S.D.	170	94	37	75	61	54	265

S.D.: Standard deviation.

Significantly different from control: *, $p \leq 0.05$ (Student's *t*-test).

Table 4-2 Motor activity in female rats - 7 days after treatment (Experiment 1)

Group	Counts/10 min.						Total	
	0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60		
Control	mean	712	237	164	84	182	154	1531
	S.D.	206	147	85	139	228	303	536
MPP	mean	746	232	122	160	60	11	1330
	S.D.	196	160	116	168	143	16	249
DDT	mean	807	464	175	68	80	8	1602
	S.D.	427	253	180	76	196	16	751
MPMC	mean	959	370	181	69	83	162	1823
	S.D.	532	273	252	116	163	231	722
MPP + MPP	mean	874	299	187	109	89	77	1635
	S.D.	353	152	163	213	138	174	909
MPP + DDT	mean	1020	408	200	113	97	57	1895
	S.D.	630	285	308	203	235	88	1589
MPP + MPMC	mean	919	274	50	30	27	72	1371
	S.D.	278	205	76	59	60	109	357

S.D.: Standard deviation.

Table 5 Cholinesterase activity in female rats (Experiment 1)

Group	Time after treatment		Seram (U/L)		Erythrocyte (U/mL)		Brain (U/L)	
Control	1 hour	mean	809		0.47		567	
		S.D.	68		0.05		56	
	1 day	mean	778		0.47		570	
		S.D.	109		0.04		71	
	1 week	mean	844		0.38		532	
		S.D.	77		0.03		42	
MPP	1 hour	mean	271	**	0.04	**	188	**
		S.D.	14		0.00		16	
	1 day	mean	228	**	0.21	**	380	**
		S.D.	80		0.06		85	
	1 week	mean	907		0.28	**	496	
		S.D.	135		0.03		29	
DDT	1 hour	mean	846		0.41		580	
		S.D.	151		0.04		14	
	1 day	mean	733		0.53		497	
		S.D.	115		0.06		50	
	1 week	mean	871		0.37		566	
		S.D.	91		0.02		30	
MPMC	1 hour	mean	510	**	0.20	**	402	**
		S.D.	128		0.05		64	
	1 day	mean	790		0.51		672	
		S.D.	120		0.05		29	
	1 week	mean	921		0.38		553	
		S.D.	209		0.03		39	
MPP + MPP	1 hour	mean	289	**	0.04	**	169	**
		S.D.	59		0.00		9	
	1 day	mean	224	**	0.24	**	322	**
		S.D.	20		0.05		21	
	1 week	mean	944		0.30	**	515	
		S.D.	167		0.04		28	
MPP + DDT	1 hour	mean	260	**	0.04	**	166	**
		S.D.	30		0.01		23	
	1 day	mean	149	**	0.18	**	277	**
		S.D.	28		0.03		22	
	1 week	mean	965		0.30	**	504	
		S.D.	183		0.02		22	
MPP + MPMC	1 hour	mean	263	**	0.06	**	165	**
		S.D.	25		0.02		27	
	1 day	mean	332	**	0.27	**	516	
		S.D.	79		0.06		67	
	1 week	mean	828		0.30	**	507	
		S.D.	51		0.01		28	

S.D.: Standard deviation.

Significantly different from control: **, $p < 0.01$ vs control (Student -test).

Table 6 General conditions in male rats - Mortality and clinical signs (Experiment 2)

Group	Signs	1 hour	5 hours	24 hours	48 hours	72 hours
DDT 0 mg/kg/day + MPP 0 mg/kg (Control)	Mortality	0/6 ^a	0/6	0/6	0/6	0/6
	Sedation	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	Twitches	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	Trmor	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	Miosis	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	Salivation	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	Lacrimation	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
DDT 0 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	Mortality	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	Sedation	0/6	5/6	3/6	0/6	0/6
	Twitches	5/6	4/6	0/6	1/6	0/6
	Trmor	0/6	0/6	2/6	2/6	2/6
	Miosis	6/6	6/6	5/6	0/6	0/6
	Salivation	0/6	1/6	0/6	0/6	0/6
	Lacrimation	0/6	2/6	0/6	0/6	0/6
DDT 15 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	Mortality	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	Sedation	0/6	5/6	6/6	3/6	3/6
	Twitches	5/6	5/6	0/6	0/6	0/6
	Trmor	0/6	1/6	2/6	1/6	6/6 *
	Miosis	6/6	6/6	6/6	0/6	0/6
	Salivation	2/6	5/6	2/6	0/6	0/6
	Lacrimation	0/6	3/6	0/6	0/6	0/6
DDT 30 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	Mortality	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	Sedation	0/6	6/6	3/6	6/6 **	4/6 *
	Twitches	6/6	6/6	0/6	0/6	0/6
	Trmor	0/6	1/6	0/6	5/6	4/6
	Miosis	6/6	6/6	6/6	0/6	0/6
	Salivation	3/6	5/6	0/6	0/6	0/6
	Lacrimation	1/6	5/6	0/6	0/6	0/6
DDT 60 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	Mortality	0/6	0/6	1/6	0/5	0/5
	Sedation	0/6	5/6	5/6	4/5 *	3/5
	Twitches	5/6	5/6	0/6	0/5	0/5
	Trmor	0/6	1/6	1/6	2/5	4/5
	Miosis	6/6	6/6	5/6	0/5	0/5
	Salivation	5/6	4/6	5/6 **	0/5	0/5
	Lacrimation	1/6	0/6	0/6	0/5	0/5
DDT 60 mg/kg/day + MPP 0 mg/kg	Mortality	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Sedation	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Twitches	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Trmor	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Miosis	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Salivation	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Lacrimation	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

a ; Number of animals noted / number of animals examined.

Significantly different from DDT 0 mg/kg/day+MPP 200 mg/kg group: *, p <= 0.05; **, p <= 0.01 (Fisher's exact probability test).

Table 7 Body weight - Group mean values in male rats (Experiment 2)

Dose		Before MPP treatment (g)	Time after MPP treatment 72 hours (g)	
DDT 0 mg/kg/day +	Mean	350	362	
MPP 0 mg/kg (Control)	S.D.	34	39	
DDT 0 mg/kg/day +	Mean	361	322	**
MPP 200 mg/kg	S.D.	25	23	
DDT 15 mg/kg/day +	Mean	370	318	**
MPP 200 mg/kg	S.D.	21	18	
DDT 30 mg/kg/day +	Mean	367	321	**
MPP 200 mg/kg	S.D.	16	17	
DDT 60 mg/kg/day +	Mean	356	309	**
MPP 200 mg/kg	S.D.	21	14	
DDT 60 mg/kg/day +	Mean	360	363	
MPP 0 mg/kg	S.D.	12	13	

S.D. : Standard deviation.

Significantly different from control : **, $p \leq 0.01$ (Student t-test).

Table 8 Cholinesterase activity - Group mean values in male rats (Experiment 2
After 72 hours of MPP treatment

Dose		Plasma (U/L)	Brain (U/L)
DDT 0 mg/kg/day + MPP 0 mg/kg (Control)	Mean S.D.	671 199	332 22
DDT 0 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	Mean S.D.	245 ** 43	203 ** 19
DDT 15 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	Mean S.D.	283 ** 54	206 ** 20
DDT 30 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	Mean S.D.	279 ** 42	215 ** 14
DDT 60 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	Mean S.D.	302 ** 76	223 ** 22
DDT 60 mg/kg/day + MPP 0 mg/kg	Mean S.D.	687 277	337 45

S.D. : Standard deviation.

Significantly different from control : *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$ (Student t-test).

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Ishii Y., Umemura T., Kanki K., Kuroiwa Y., Nishikawa A., Ito R., Saito K., Nakazawa H., Hirose M.	Possible involvement of NO-mediated oxidative stress in induction of rat forestomach damage and cell proliferation by combined treatment with catechol and sodium nitrite.	Arch. Biochem. Biophys.	447	127-135	2006
Ishii Y., Iijima M., Umemura T., Nishikawa A., Iwasaki Y., Ito R., Saito K., Hirose M	Determination of nitrotyrosine and tyrosine by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry and immunohistochemical analysis in livers of mice administered acetaminophen.	J. Pharm. Biomed. Anal.			In press
Ichihara T Miyashita K, Kawabe M, Imaida K, Asamoto M, Ogiso T, Tamano S, Hirose M, Shirai T.	Lack of combination hepatocarcinogenicity of harman, norharman and amitrol when given with NaNO ₂ in the rat.	J. Toxicol. Sci.	30	1-6	2005
Sugaira S, Asamoto M, Hokaiwado N, Hirose M, Shirai T.	Harman and norharman suppressed but NaNO ₂ enhanced the development of preneoplastic liver cell foci in 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinixaline (MeIQx)-treated rats.	J Toxicol Pathol.	18	99-104	2005
Kitamura Y, Umemura T, Okazaki K, Kanki K, Imazawa T, Yanai T, Masegi T,	Enhancing effects of combined treatment with IQ and sodium nitrite on rat liver, colon and Zymbal's	Int. J. Cancer	118	2399-2404	2006