

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18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
	齧島 淳子	(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
	林 豊	(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
	富田真理子	(財) 残留農薬研究所	毒性部病理研究室
	武田眞記夫	(財) 残留農薬研究所	毒性部分子毒性研究室
	大塚 亮一	(財) 残留農薬研究所	毒性部分子毒性研究室
	山口 悟	(財) 残留農薬研究所	毒性部分子毒性研究室

研究要旨

農薬の複合毒性を検索するため、雄性ラットを用い以下の実験を実施した。ラットの幼若期（3週齢）あるいは若齢期（5週齢）に有機塩素系農薬 DDT を 14 日間反復経口投与した後に休薬し、成熟期（10週齢）で有機リン剤 MPP を単回経口投与し、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、脳）、血漿中 DDT 濃度（代謝物 DDE を含む）、薬物代謝酵素活性（肝臓）および酸化ストレス（肝臓、脳）を指標に毒性効果を比較検討した。その結果、幼年期において毒性症状が認められない程度の DDT に短期間連続曝露した後に休薬期間を置き、動物が成熟期を迎えた時点で有機リン剤 MPP に曝露された際の毒性は DDT に曝露されていない場合と比較して重篤になり、その程度は若齢期よりも離乳直後の幼若期から DDT に曝露された方が MPP の毒性効果がより顕著であった。この結果から、塩素剤とリン剤の時間差を置いた複合曝露においても、若齢動物と比べて幼若動物の方が曝露影響を受け易いと考えられ、時間差を置いた複合曝露についても留意する必要性が示唆された。

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ことを目的とした。

B. 研究方法

研究計画に従って、平成 18 年度では有機リン系および有機塩素系の殺虫剤を組み合わせ、3 週齢あるいは 5 週齢の雄性ラットに、時間差を置いて複合的に経口投与し、種々の毒性指標を評価基準にして毒性影響の差異を検索した。実験概要は、幼若期（3 週齢）あるいは若齢期（5 週齢）に有機塩素剤 DDT (*p,p'*-DDT) を 14 日間反復投与したラットに対し、休薬期間を置いた後、成熟期（10 週齢）に有機リン剤 MPP (Fenthion) を単回投与し、その毒性発現を比較検討した。

1. 被験物質

有機リン剤の MPP (Fenthion: *O,O*-Dimethyl *O*-4-Methylthio-*m*-tolyl Phosphorothioate) は和光純薬工業株式会社 (大阪府) より、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、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 (Br1Han:WIST@Jcl[GALAS]) の雄性動物を用いた。幼若動物は、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、若齢動物は、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、市上水 (茨城県常総市) 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 mg/kg¹⁻⁵⁾、DDT が 113-300 mg/kg^{1,3,4,6,7)} 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 であった。

DDT について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 を幼若開始群では 3 週齢、

若齡開始群では5週齡時から14日間連続強制経口投与した後、それぞれ6週間あるいは4週間休薬し、10週齡時に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10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、DDTはコーンオイル(有限会社 林ケミカル、東京都)に溶解して週1回7日分を調製した。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、用時調製した。投与容量はいずれも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強制経口投与した。DDT連続投与では、投与前の絶食は行わなかった。MPP単回投与では、投与前日の夕方から投与約3時間後まで絶食した。

6. 一般状態の観察

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(鎮静、攣縮、震顫、縮腫、流涎、流涙等)、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、観察期間中毎週1回と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

自発運動量の測定は、各実験の計画殺直前に全生存動物を対象に、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、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。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. 生化学および分子生物学的解析

生化学あるいは分子生物学的解析を実施するために、サンプルとして血漿、大脳および肝臓の一部を採材し、凍結保存した。

血漿についてはELISA法によりDDT濃

度（代謝物 DDE を含む）を測定した。

肝臓についてはウエスタンブロット法による薬物代謝酵素活性（CYP2B1 および CYP3A2 濃度）ならびに TAB 法による酸化ストレスマーカー過酸化脂質濃度を測定した。

脳については酸化ストレスマーカー過酸化脂質濃度を測定した。

11. 有意差検定

各検査項目について、幼若開始群と若齢開始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、コリンエステラーゼ活性、薬物代謝酵素活性および過酸化脂質濃度については、Student の *t* 検定を用いて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. 臨床症状および死亡率（表 1）

若齢開始群における DDT 60 mg/kg/day 群において、10 例中 1 例（10%）の死亡が認められたが、幼若開始群の DDT 60 mg/kg/day 群では死亡率が 50% にまで増加した。その他の群では、若齢開始群の DDT 30 g/kg/day 群および幼若開始群の MPP 単独投与群において、それぞれ 10 例中 1 例の死亡が認められた以外に、死亡例はみられなかった。

幼若期および若齢期の DDT 14 日間連続投与期間およびそれに続く休薬期間では、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 を投与した群の全例に、鎮静、攣縮、振戦、縮瞳など

の症状が認められたが、これらの症状は若齢開始群よりも幼若開始群で MPP 投与後の症状発現が速やかで、発現頻度も高かった。

C-2. 体重変化（表 2）

MPP 投与前から投与後 72 時間の体重変化において、幼若開始群では DDT 15、30、および 60 mg/kg/day 群で MPP 投与後の体重が投与前と比べて減少した。若齢開始群では DDT 30 および 60 mg/kg/day 群で体重減少がみられた。

C-3. 自発運動量（表 3）

MPP 投与後 72 時間の自発運動量測定では、幼若開始群、若齢開始群とも DDT と MPP を複合投与群した全ての群で自発運動量の減少が認められたが、特に DDT 15 mg/kg/day 投与群において幼若開始群と若齢開始群の間に有意な差が認められ、幼若開始群の行動抑制がより顕著であった。

C-4. コリンエステラーゼ(ChE)活性（表 4）

MPP 投与後 72 時間の ChE 活性測定では、幼若開始群、若齢開始群ともに、血漿および脳とも MPP を投与した全例で低下した。また、抑制の割合は血漿および脳ともに、DDT の用量に相関して低下する傾向にあった。

血漿 ChE 活性では、DDT 15 および 30 mg/kg/day 投与群の、幼若開始群と若齢開始群の間に有意差が認められ、幼若開始群でやや強めに抑制が生じる可能性が示唆された。

MPP の神経系への影響を示す脳の ChE 活性は、若齢開始群よりも幼若開始群で抑制率がやや高かったが、その差は僅かだった。

C-5. 生化学および分子生物学的解析

C-5-1. 血漿中の DDT (代謝物 DDE を含む) 濃度 (表 5)

幼若開始群と若齢開始群では DDT (代謝物 DDE を含む) の血中濃度が異なり、幼若開始群では DDT を投与した全群の血漿中に DDT が検出されたのに対して、若齢開始群の DDT 15mg/kg/day 群では検出限界以下であった。半数が死亡した幼若開始群の DDT 60 mg/kg/day 群では、DDT が高いレベルで検出されたが、生体機能への影響が全く認められなかった DDT 単独投与群よりも DDT 濃度は低値を示した。

C-5-2. 肝薬物代謝酵素 (表 6)

DDT 単独反復投与群 (60 mg/kg/day) では、CYP2B1 および CYP3A2 の誘導がみられ、同酵素の誘導は幼若よりも若齢開始群においてより顕著であった。これに対し MPP 単独単回投与群では CYP2B1 および CYP3A2 とともに無処置対照群に比べ低値を示した。一方、DDT と MPP の複合投与群では、若齢開始群において CYP2B1 は DDT の用量に応じて増加したが、CYP3A2 は DDT の高用量群 (60 mg/kg/day) においてのみ増加がみられ、その他の用量群ではむしろ減少傾向を示した。幼若開始複合投与群では、CYP2B1 および CYP3A2 とともに増加はみられず、無処置対照群に比べ同じか、むしろ低値を示す傾向にあった。

C-5-3. 酸化ストレス (表 7)

酸化ストレスマーカーである過酸化脂質濃度を測定したところ、肝臓では MPP あるいは DDT の単独投与群ではほとんど変化しなかったが、複合曝露によって増加した。

その増加量は、若例開始群より幼若開始群で高く、幼若開始群では DDT 15mg/kg/day 以上の用量で、若齢開始群では 30 mg/kg/day 以上の用量からそれぞれ変化が認められた。

脳における過酸化脂質濃度は、幼若開始群、若齢開始群とも全群で対照群と同程度であり、酸化ストレス反応は認められなかった。

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、平成 16 年度は成熟ラット、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た。さらに、平成 17 年度は若齢期に塩素剤 DDT を反復経口投与したラットに対し成熟期にリン剤 MPP を単回経口投与し、時間差を置いた複合曝露影響について検討した。その結果、若齢期における臨床症状を発現しない用量の DDT 曝露が、成熟後の MPP 曝露により毒性発現を変化させることが判明した。そこで、本年度 (平成 18 年度) では離乳直後 (3 週齢) の幼若動物に 14 日間 DDT を反復投与した群と若齢時 (5 週齢) に 14 日 DDT を反復投与した群を設け、DDT 曝露開始時期による成熟後 (10 週齢) の MPP 単回投与における毒性発現の違いを比較検討した。

有機塩素系農薬のひとつである 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らかになるにつれ、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。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。そのため、我が国では1971年から製造、使用が禁止されている。しかしながら、現在でもマラリア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おり、2006年にはWHOがDDTの室内散布による蚊の防除を推奨するアナウンスを行った^{8,9,10,11}。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、成獣/幼若動物(哺乳期)のLD50値比で0.44と哺乳ラットに対して弱毒であるという報告¹²があり、幼若期毒性は弱いとされていることから、子供に対する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なく、内分泌系や中枢神経系に対する幼年期の曝露による影響が、成熟後に現れることが危惧されている^{13,14}。そこで今回は、離乳期あるいは成長期の子供が経口経路で中期的にDDTの曝露を受け、成人後に有機リン剤に単回大量曝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を離乳期(3週齢;幼若時)あるいは成長期(5週齢;若齢時)のラットに反復投与し、その後休薬期間において、成熟後に明らかな臨床症状を発現する用量のMPPを単回投与した。

その結果、MPPを投与した全ての群で典型的な有機リン剤による神経症状が認められ、血漿および脳のChE活性低下が確認された。また、肝薬物代謝酵素に関してはMPP投与によりCYP2B1およびCYP3A2がともに減少傾向を示した。

一方、幼若期あるいは若齢期においてDDTを14日間反復投与のみを行ったDDT単独投与群では、臨床症状に異常は認められなかったが、肝薬物代謝酵素のCYP2B1およびCYP3A2の誘導¹⁵が認められた。

DDTとMPPの複合曝露では、神経症状、自発運動量および体重増加抑制のいずれも若齢開始群より幼若開始群においてより顕著に認められたことから、生体機能への影響はDDTに曝露される時期が早くなるほど重篤になると推察された。

血中および脳のChE活性は、DDTの投与用量に相関して低下する傾向にあった。特に、MPPの神経系への影響を示す脳のChE活性は、若齢開始群より幼若開始群でやや低下したが、その差は僅かであり、生体機能への影響の違いがChE活性阻害の程度に起因する可能性は低いと考えられた。

血中のDDT(代謝物DDEを含む)濃度は、幼若開始群においてより高濃度で検出されたが、生体機能への影響が全く認められなかったDDT 60mg/kg/day単独投与群との比較ではより低値を示した。このことは、複合曝露による生体機能への影響は、DDTの毒性の再発現ではなく、幼若期のDDT曝露が、成熟後におけるMPPの毒性を修飾したことを示すものと考えられた。なお、この血中における濃度の違いが成長による脂肪蓄積量の差に起因する可能性も考えられたため、DDT投与期間の体重増加量を確認したが、

幼若開始群と若齢開始群との間に差は認められなかった。

DDTとMPPの複合投与群における肝薬物代謝酵素誘導に関しては、DDTの投与時期により異なる結果が得られた。すなわち、DDT投与の若齢開始群では、CYP2B1はDDTの用量に依存して増加したが、CYP3A2はDDTの高用量群(60 mg/kg/day)においてのみ増加がみられ、その他の用量群ではむしろ減少傾向を示した。一方、幼若開始複合投与群では、CYP2B1およびCYP3A2ともに増加はみられず、無処置対照群に比べ同じか、むしろ低値を示す傾向にあった。これらの結果から、DDTに関連した肝薬物代謝酵素(CYP2B1/CYP3A2)の誘導は、MPP投与により抑制される可能性が示唆された。その作用機序については不明であるが、MPPのP-450系における主要な代謝酵素がCYP1A1であることを考慮すると¹⁰⁾、CYP1A1の増加による相対的な減少である可能性も疑われた。また、幼若開始群と若齢開始群では反応が明らかに異なることから、幼年期における代謝系の反応は曝露時期により大きく異なる可能性が推察された。

酸化ストレスマーカーである過酸化脂質濃度は、脳では対照群と比較して変化がなかったが、肝臓では幼若開始群で顕著に増加し、各用量群における過酸化脂質濃度と生体機能への影響は良く一致していた。

今回の実験において、若齢成獣である5週齢でDDTの投与を開始した場合にも成熟後のMPP投与の毒性は強く現れたが、離乳直後の3週齢からDDTの投与を開始するとMPPの毒性はより増強された。このことから、幼年期におけるDDT曝露時期によって、成熟後のMPP投与の毒性影響が変化す

ることが明らかとなり、その違いは代謝能力が未熟な時期の曝露によるDDT蓄積量の違い、あるいは幼若動物の肝臓機能が潜在的な障害を受けることによって、成熟後の酸化ストレス除去能力が減弱することによって起因する可能性が高いと考えられた。しかしながら、幼年期のDDT曝露による脳血液関門や神経系における脂質代謝あるいは神経細胞のイオンチャンネルへの影響など、脳神経系に対する直接的な障害に起因する可能性も考えられるため、幼若期のDDT曝露が成熟後のMPP曝露による毒性増強メカニズムの解明にはさらなる検討を要する。

E. 結論

今回の、幼若あるいは若齢期にDDTを反復経口投与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、幼年期において毒性症状が認められない程度のDDTに短期連続曝露されてから休業し、ある程度の期間を経過した後でも、有機リン剤であるMPPに大量曝露された場合にはその毒性を増悪させ、その程度はDDTに曝露される時期によって異なる可能性が示唆された。

結論として、幼年期に塩素剤を曝露された動物が成熟後にリン剤に曝露された場合、若齢期よりも離乳直後から塩素剤に曝露された方がリン剤の毒性効果がより増強された。よって、塩素剤とリン剤の時間差を置いた複合曝露においても、若齢動物と比べて幼若動物の方が複合曝露の影響を受け易いと考えられた。

今回のDDTの曝露量は、ヒトにおける無毒性量(0.06 mg/kg/day)の250~1000倍、経口投与による推定最小中毒量(2.5

mg/kg/day)¹⁷⁾の6~24倍という高用量曝露での実験結果であり、実際の生活環境下での危険性を直接示すものではない。しかしながら、有機塩素剤の反復曝露経歴がある場合には、有機リン剤の曝露による症状が発現し易くなる可能性があり、時間差を置いた複合曝露についても留意する必要性が確認された。

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 Merck 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 (1979). DDT and its derivatives. International programs on chemical safety, Environmental health criteria 9, Geneva.
- 9) 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.
- 10) Ecobicon, D.J. (2001). Toxic effects of pesticides. In: Toxicology (6th ed.), Klassen, C.D. (ed.), McGraw-Hill, New York, 763-810.
- 11) WHO (2006). WHO gives indoor use of DDT a clean bill of health for controlling malaria WHO promotes indoor spraying with insecticides as one of three main interventions to fight malaria, Geneva.
- 12) Lu, F. C., Jessup, D. C., and Lavalley, A. (1965). Toxicity of pesticides in young versus adult rats. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 3, 591-596.
- 13) 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
- 14) McMeen, B. (1998). EPA proposes requirement for chemicals affecting neurological system of insects. *Chemical Regulation Reporter* 22, 731-732.
- 15) Harada, T., Yamaguchi, S., Ohtsuka, R., Takeda, M., Fujisawa, H., Yoshida, T., Enomoto, A., Chiba, Y., Fukumori, J., Kojima, S., Tomiyama, N., Saka, M., Ozaki, M., and Maita, K. (2003). Mechanisms of promotion and progression of preneoplastic lesions in hepatocarcinogenesis by DDT in F344 rats. *Toxicologic Pathology.* 31, 87-98.
- 16) Kitamura, S., Suzuki, T., Kadota, T., Yoshida, M., Ohahi, K., and Ohta, S. (2003). In vitro metabolism of

fenthion and fenthion sulfoxide by liver preparations of sea bream, goldfish, and rats. Drug Metab. Dispos. 31, 179-186.

3. その他
なし

- 17) 環境省環境保健部環境リスク評価室 (2002)「化学物質の環境リスク評価 第1巻」[20] p,p'-DDT, 254-265.

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 有機塩素系および有機リン系農薬の複合曝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）

2) 有機塩素系および有機リン系農薬の複合曝露がラットの中樞神経系におよぼす影響：配島淳子、首藤康文、大塚亮一、山口悟、藤江秀彰、松本力、林豊、武田真記夫、原田孝則、第33回日本トキシコロジー学会学術年会（名古屋国際会議場、2006）

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

Table 1 General conditions in male rats - Mortality and clinical signs

Time after MPP treatment		1 hour		5 hours		24 hours		48 hours		72 hours	
Group	Signs	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
DDT 0 mg/kg/day + MPP 0 mg/kg (Control)	Mortality	0/10a	0/10a	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	Sedation	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	Twitches	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	Tremor	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	Convulsion	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	Miosis	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	Salivation	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	Lacrimation	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
DDT 0 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	Mortality	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10
	Sedation	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10	0/10	0/9	0/10
	Twitches	1/10	0/10	10/10	7/10	2/10	0/10	0/10	0/10	0/9	0/10
	Tremor	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	2/10	0/10	0/9	0/10
	Convulsion	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/9	0/10
	Miosis	6/10	1/10 *	10/10	10/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/9	0/10
	Salivation	0/10	0/10	1/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/9	0/10
	Lacrimation	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/9	0/10
DDT 15 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	Mortality	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	Sedation	0/10	0/10	7/10	0/10 **	4/10	0/10 *	8/10	0/10 **	7/10	0/10 **
	Twitches	7/10	0/10 **	10/10	10/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	Tremor	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	5/10	0/10 *	5/10	0/10 *
	Convulsion	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	Miosis	10/10	2/10 **	10/10	10/10	1/10	2/10	2/10	0/10	0/10	0/10
	Salivation	0/10	0/10	4/10	0/10 *	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	Lacrimation	0/10	0/10	2/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
DDT 30 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	Mortality	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10	0/9
	Sedation	1/10	0/10	7/10	0/10 **	1/10	6/10 *	10/10	3/9 **	9/10	3/9 *
	Twitches	8/10	0/10 **	10/10	9/10	1/10	0/10	2/10	0/9	0/10	0/9
	Tremor	0/10	0/10	1/10	0/10	0/10	0/10	5/10	0/9 *	7/10	2/9
	Convulsion	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/9	0/10	0/9
	Miosis	10/10	4/10 **	10/10	10/10	1/10	6/10 *	3/10	0/9	0/10	0/9
	Salivation	1/10	0/10	1/10	4/10	0/10	0/10	0/10	0/9	0/10	0/9
	Lacrimation	0/10	0/10	1/10	3/10	0/10	0/10	1/10	0/9	0/10	0/9
DDT 60 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	Mortality	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10	2/10	0/10	5/10	1/10
	Sedation	0/10	0/10	9/10	0/10 **	3/9	4/10	8/8	4/10 *	5/5	3/9 *
	Twitches	9/10	2/10 **	10/10	7/10	1/9	0/10	0/8	0/10	0/5	0/9
	Tremor	0/10	0/10	0/10	0/10	0/9	0/10	8/8	2/10 **	4/5	3/9
	Convulsion	0/10	0/10	0/10	1/10	0/9	0/10	0/8	0/10	0/5	0/9
	Miosis	10/10	5/10 **	10/10	10/10	0/9	5/10 *	3/8	1/10	0/5	0/9
	Salivation	0/10	0/10	2/10	1/10	0/9	0/10	2/8	0/10	0/5	0/9
	Lacrimation	2/10	0/10	1/10	3/10	0/9	0/10	0/8	0/10	0/5	0/9
DDT 60 mg/kg/day + MPP 0 mg/kg	Mortality	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	Sedation	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	Twitches	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	Tremor	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	Convulsion	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	Miosis	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	Salivation	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	Lacrimation	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

A, B; Animals had been exposed to DDT at immature age (A) or at young adult age (B).

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

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

Table 2 Body weight - Group mean values in male rats
At 72 hours after MPP treatment

Dose		Before		At 72 hours after		Body weight gain	
		MPP treatment (g)		MPP treatment (g)		(g)	
		A	B	A	B	A	B
DDT 0 mg/kg/day + MPP 0 mg/kg (Control)	Mean	315	315	343	344	29	29
	S.D.	19	28	19	31	6	5
DDT 0 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	Mean	308	301	323	314	15	15
	S.D.	16	19	21	22	11	9
DDT 15 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	Mean	295	321	283	332	- 12	11 **
	S.D.	19	24	29	32	14	14
DDT 30 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	Mean	303	312	285	300	- 18	- 11
	S.D.	20	24	18	22	15	20
DDT 60 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	Mean	305	297	281	301	- 20	- 3
	S.D.	18	37	9	15	19	18
DDT 60 mg/kg/day + MPP 0 mg/kg	Mean	308	310	325	337	18	27
	S.D.	26	26	16	27	32	3

A, B; Animals had been exposed to DDT at immature age (A) or at young adult age (B).

S.D. : Standard deviation.

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

Table 3 Motor activity - Group mean values in male rats
At 72 hours after MPP treatment

Dose	Time interval (minutes)	A		B		
		mean	S.D.	mean	S.D.	
DDT 0 mg/kg/day + MPP 0 mg/kg (Control)	0-10	808a	313	684	297	
	10-20	278	264	157	117	
	20-30	37	51	127	157	
	30-40	105	234	44	97	
	40-50	74	123	14	22	
	50-60	58	113	51	109	
	0-60	1360	561	1077	420	
DDT 0 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	0-10	619	375	579	308	
	10-20	134	108	181	162	
	20-30	55	69	11	19	
	30-40	26	52	26	38	
	40-50	34	37	34	50	
	50-60	41	71	79	113	
	0-60	909	426	910	441	
DDT 15 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	0-10	167	170	565	276	**
	10-20	65	86	107	216	
	20-30	57	87	59	100	
	30-40	31	56	114	129	
	40-50	76	157	69	121	
	50-60	19	25	47	89	
	0-60	416	342	961	546	*
DDT 30 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	0-10	133	107	227	219	
	10-20	58	77	89	87	
	20-30	38	50	22	45	
	30-40	41	60	31	57	
	40-50	26	48	35	65	
	50-60	42	53	0	1	*
	0-60	338	221	406	311	
DDT 60 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	0-10	137	78	237	174	
	10-20	66	82	78	116	
	20-30	68	96	71	124	
	30-40	47	48	16	31	
	40-50	40	44	25	57	
	50-60	61	80	12	19	
	0-60	383	390	438	365	
DDT 60 mg/kg/day + MPP 0 mg/kg	0-10	1148	261	967	409	
	10-20	400	206	255	168	
	20-30	64	68	79	140	
	30-40	94	143	79	92	
	40-50	8	12	68	131	
	50-60	26	40	15	33	
	0-60	1739	553	1462	645	

A, B; Animals had been exposed to DDT at immature age (A) or at young adult age (B).

a; counts/time interval

S.D. : Standard deviation.

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

Table 4 Cholinesterase activity - Group mean values in male rats
At 72 hours after MPP treatment

Dose		Plasma (U/L)		Brain (U/L)	
		A	B	A	B
DDT 0 mg/kg/day + MPP 0 mg/kg (Control)	Mean	626	652	344	356
	S.D.	118	123	34	29
DDT 0 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	Mean	342	338	232	235
	S.D.	72	163	28	46
DDT 15 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	Mean	323	411 *	221	243
	S.D.	104	67	33	26
DDT 30 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	Mean	238	339 *	199	216
	S.D.	95	85	39	38
DDT 60 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	Mean	216	306	180	214
	S.D.	76	101	16	38
DDT 60 mg/kg/day + MPP 0 mg/kg	Mean	663	625	382	353
	S.D.	177	136	48	53

A, B; Animals had been exposed to DDT at immature age (A) or at young adult age (B).
S.D. : Standard deviation.

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

Table 5 DDT concentration (including DDE) in plasma - Group mean values in male rats
At 72 hours after MPP treatment

Dose		A (ppm)	B (ppm)
DDT 0 mg/kg/day + MPP 0 mg/kg (Control)	Mean S.D.	< 2.0 -	< 2.0 -
DDT 0 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	Mean S.D.	< 2.0 -	< 2.0 -
DDT 15 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	Mean S.D.	2.5 0.8	< 2.0 -
DDT 30 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	Mean S.D.	2.4 0.6	2.4 0.8
DDT 60 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	Mean S.D.	5.0 1.3	2.2 0.6
DDT 60 mg/kg/day + MPP 0 mg/kg	Mean S.D.	6.0 1.3	2.5 0.7

A, B; Animals had been exposed to DDT at immature age (A) or at young adult age (B).
S.D. : Standard deviation.

Table 6 Hepatic microsomal cytochrome P-450 isozyme content - Group mean values in male rats
At 72 hours after MPP treatment

Dose		CYP2B1 (pmol/mg protein)		CYP3A2 (pmol/mg protein)	
		A	B	A	B
DDT 0 mg/kg/day + MPP 0 mg/kg (Control)	Mean	24.1	23.3	13.3	14.0
	S.D.	3.7	7.2	2.8	2.1
DDT 0 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	Mean	13.7	14.0	9.4	11.3
	S.D.	2.4	6.8	1.0	4.4
DDT 15 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	Mean	15.6	42.7 *	5.5	11.5 *
	S.D.	9.1	19.9	1.9	4.4
DDT 30 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	Mean	23.5	61.1 **	4.2	11.7 **
	S.D.	7.3	27.2	3.3	2.1
DDT 60 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	Mean	23.0	76.4 *	8.2	17.5 **
	S.D.	12.6	37.6	2.6	5.9
DDT 60 mg/kg/day + MPP 0 mg/kg	Mean	42.3	99.8 **	15.5	16.7 **
	S.D.	9.6	38.2	4.0	1.4

A, B; Animals had been exposed to DDT at immature age (A) or at young adult age (B).

S.D. : Standard deviation.

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

Table 7 Lipid peroxide content - Group mean values in male rats
At 72 hours after MPP treatment

Dose		Brain (nmol/g tissue)		Liver (nmol/g tissue)	
		A	B	A	B
DDT 0 mg/kg/day + MPP 0 mg/kg (Control)	Mean S.D.	280 21	266 24	114 14	124 26
DDT 0 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	Mean S.D.	278 28	245 42	153 31	121 16 *
DDT 15 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	Mean S.D.	281 24	233 47 **	694 484	140 39 **
DDT 30 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	Mean S.D.	279 24	274 38	677 674	480 595
DDT 60 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	Mean S.D.	285 24	251 22 *	1002 559	393 383 *
DDT 60 mg/kg/day + MPP 0 mg/kg	Mean S.D.	274 32	251 20	119 15	121 12

A, B; Animals had been exposed to DDT at immature age (A) or at young adult age (B).
S.D. : Standard deviation.

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

Table 7 Lipid peroxide content - Group mean values in male rats
After 72 hours of MPP treatment

Dose		Brain (nmol/g tissue)		Liver (nmol/g tissue)		
		A	B	A	B	
DDT 0 mg/kg/day + MPP 0 mg/kg (Control)	Mean S.D.	280 21	266 24	114 14	124 26	
DDT 0 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	Mean S.D.	278 28	245 42	153 31	121 16	*
DDT 15 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	Mean S.D.	281 24	233 47	694 484	140 39	**
DDT 30 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	Mean S.D.	279 24	274 38	677 674	480 595	
DDT 60 mg/kg/day + MPP 200 mg/kg	Mean S.D.	285 24	251 22	1002 559	393 383	*
DDT 60 mg/kg/day + MPP 0 mg/kg	Mean S.D.	274 32	251 20	119 15	121 12	

A, B; Animals had been exposed to DDT at immature age (A) or at young adult age (B).

S.D. : Standard deviation.

Significantly different from the group A : *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$ (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.	41	1325-1331	2006
Ishii Y., Iijima M., Umemura T., Nishikawa A., Iwasaki Y., Ito R., Saito K., Hirose M., Nakazawa H.	Development of quantitative analysis of 8-nitroguanine concomitant with 8-hydroxydeoxyguanosine formation by liquid chromatography with mass spectrometry and glyoxal derivatization.	J. Pharm. Biomed. Anal.	43	1737-1747	2007
Ishii Y., Ogara A., Katsumata T., Umemura T., Nishikawa A., Iwasaki Y., Ito R., Saito K., Hirose M., Nakazawa H.	Quantification of nitrated tryptophan in proteins and tissues by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry.	J. Pharm. Biomed. Anal.	44	150-159	2007
Kitamura Y, Umemura T, Okazaki K, Kanki	Enhancing effects of combined treatment with IQ	Int. J. Cancer	118	2399-2404	2006

K, Imazawa T, Yanai T, Masegi T, Nishikawa A, Hirose M.	and sodium nitrite on rat liver, colon and Zymbal's gland carcinogenesis after initiation with diethylnitrosamine (DEN) and 1,2-dimethylhydrazine (DMH).				
Okazaki K, Ishii Y, Kitamura Y, Maruyama S, Umemura T, Miyauchi M, Yamagishi M, Imazawa T, Nishikawa A, Yoshimura Y, Nakazawa H, Hirose M.	Dose dependent promotion of forestomach carcinogenesis by combined treatment with sodium nitrite and ascorbic acid after initiation with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine - Possible contribution of nitric oxide- associated oxidative DNA damage.	Cancer Sci.	97	175-182	2006
Kitamura Y, Yamagishi M, Umemura T, Nishikawa A, Hirose M.	Lack of enhancing effects of sodium nitrite on 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5- <i>b</i>] pyridine (PhIP)-induced mammary carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats.	Cancer Lett.	235	69-74	2006
Kuroiwa Y, Ishii Y, Umemura T, Kanki K, Mitsumori, K, Nishikawa A, Nakazawa H, Hirose M.	Combined treatment with green tea catechins and sodium nitrite selectively promotes rat forestomach carcinogenesis after initiation with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine.	Cancer Sci.	98	949-957	2007
Fujita N., Horiike S., Sugimoto R., Tanaka H., Iwasa M., Kobayashi Y., Hasegawa K., Ma N., Kawanishi S., Adachi Y., Kaito M.	Hepatic oxidative DNA damage correlates with iron overload in chronic hepatitis C patients.	Free Radic. Biol. Med.	42	353-362	2007
Oikawa S., Nagao E., Sakano K.,	Mechanism of oxidative DNA damage induced by	Free Radic. Res.	40	966-973	2006