

C. 研究成果

CYP3A4 レポーター安定発現細胞株の単離

in vitro で CYP3A4 誘導能を評価する実験系を構築するために、CYP3A4 遺伝子プロモーターとレポーターのルシフェラーゼ遺伝子を結合させた *CYP3A4* レポーター遺伝子を安定的に発現する細胞株の単離を行なった。薬物による CYP3A4 遺伝子の転写活性化作用は核内受容体 PXR を介していることが知られているので、本研究では PXR を高発現しているヒト肝癌由来細胞株の HepG2 細胞を使用した。図 1 に示した方法で *CYP3A4* レポーター発現細胞株を単離し、得られたクローンのうち 12 クローンについて典型的な CYP3A4 誘導物質である rifampicin と clotrimazole に対する応答性を調べた (表 1)。その結果、クローン間で両薬物に対する応答性は大きく異なり、rifampicin では最大 84 倍、clotrimazole では最大 251 倍の差が認められた。また、rifampicin に対する応答性と clotrimazole に対する応答性には強い相関は認められなかった。なお、3-1-10 細胞株が最も強い rifampicin 応答性を示したことから、以下の実験ではこの細胞を用いることにした。

農薬の CYP3A4 誘導能の評価: 3-1-10 細胞株を用いて、20 種の農薬の *CYP3A4* レポーター活性化能を測定したところ、いくつかの化合物は強い誘導作用を示した。代

表的な結果を図 2 に示した。このうち、pyributicarb は 1 μM 以下の濃度では rifampicin よりも強い誘導能を示した。この pyributicarb の強い CYP3A4 誘導能は HepG2 細胞を用いた一過性発現系のレポーターアッセイによっても確認された (データ示さず)。また、HepG2 細胞における CYP3A4 mRNA レベルは、3 μM pyributicarb、10 μM isoxathion および 10 μM *o*-ethyl *o*-4-nitrophenyl phenylphosphonothioate (EPN) 処理により、10 μM rifampicin 処理と同程度まで増加した (データ示さず)。

CYP3A4 誘導における PXR の寄与: 次に、ヒト PXR の siRNA を発現するアデノウイルスを用いて、pyributicarb、isoxathion および EPN による CYP3A4 誘導における PXR の関与を解析した。図 3 に示したように、いずれの農薬添加時においても PXR 発現量の抑制の程度に応じて *CYP3A4* レポーター活性が低下した。さらに、HepG2 細胞における農薬添加に伴う CYP3A4 mRNA レベルの増加は、ヒト PXR の siRNA 発現アデノウイルスの感染によりほぼ消失した (データ示さず)。以上の結果より、これら農薬による CYP3A4 の誘導は PXR を介していることが示唆された。

マウス個体における CYP3A4 誘導能の評価: 培養細胞では CYP などの薬物代謝酵素の発現レベルが著しく低いいため、培養細胞において誘導能を示した化合物でも

in vivo においては代謝を受けて不活性化され誘導能を示さない可能性がある。そこで次に、*CYP3A4* レポーターを発現するアデノウイルスをマウスに接種し、in vivo レポーターアッセイを行なった。なお、PXR のリガンド選択性には著しい種差が認められるため、本実験ではヒト PXR 発現アデノウイルスを同時に接種した。図4に示したように、ヒト PXR 非発現時には pyributicarb 投与による *CYP3A4* レポーター活性の上昇は認められなかったが、ヒト PXR を発現させた場合には約 4 倍のレポーター活性の上昇が認められた。この結果は、pyributicarb はマウス PXR をほとんど活性化せずにヒト PXR を選択的に活性化することを示唆しており、そして、本 in vivo レポーターアッセイを用いることで、そのようなヒト PXR 選択的な *CYP3A4* 誘導物質の検出も可能となることを示している。

D. 考察および展望

本研究成果により、*CYP3A4* レポーター安定発現培養細胞を用いた in vitro レポーターアッセイとマウス個体を用いた in vivo レポーターアッセイを組み合わせることで、ヒト *CYP3A4* 誘導性を示す化合物のスクリーニングシステムを確立することができた。また、このシステムに PXR の siRNA 発現アデノウイルスを応用することで、これら化学物質による *CYP3A4* 誘導における PXR の寄与の解析も可能であることが示唆された。

近年、新規医薬品の開発にあたり CYP 誘導能の評価は欠くことができない過程となっているが、農薬に関してはよく調べられていないものが多い。そこで本研究では、in vitro レポーターアッセイを用いて 20 種類の農薬の *CYP3A4* 誘導能を測定したところ、pyributicarb が比較的強い *CYP3A4* 誘導性を有することが明らかになった。この農薬は in vivo レポーターアッセイにおいてもヒト PXR 存在下でレポーター活性を上昇させたことから、ヒトにおいても *CYP3A4* 誘導作用を示すことが強く示唆された。さらに、PXR は *CYP3A4* だけではなく *CYP2A* や *CYP2B*、*CYP2C* サブファミリーの分子種の発現調節にも関わっていることから、本研究で同定された PXR 活性化作用を有する農薬はヒトにおいて複数の CYP 分子種を誘導する可能性が考えられた。

CYP3A4 誘導の評価系に加えて、我々は既に、*CYP1A1* および *CYP1A2* 遺伝子の転写活性化能を in vitro で同時に評価可能なシステムを構築している。*CYP1A1/1A2* は多環式芳香族炭化水素などの発がん前駆物質の代謝的活性化に関わっていることが知られており、化学発癌促進作用を有する化合物のスクリーニングに応用可能と考えられる。今後、本研究で確立した *CYP3A4* 誘導の in vitro レポーターアッセイシステムと *CYP1A1/1A2* レポーターアッセイシステムを用いて、農薬だけではなく、食品成分や食品添加物などヒトが摂取する可能性のある化学物質の CYP 誘導

能を明らかにすることができると考えられる。これらの研究により、複数の化学物質の同時摂取により発現する予期しない薬理効果や毒性発現の分子機序が明らかになると考えられる。

E. 結論

CYP3A4 レポーター安定発現培養細胞を用いた in vitro レポーターアッセイとマウス個体を用いた in vivo レポーターアッセイを組み合わせた、ヒト CYP3A4 誘導物質のスクリーニングシステムを確立した。

F. 研究発表

1. 論文発表

W Noracharttiyapot, Y Nagai, T Matsubara, M Miyata, M Shimada, K Nagata, Yamazoe Y: Construction of several human-derived stable cell lines displaying distinct profiles of CYP3A4 induction. *Drug Metab Pharmacokinet* (2006) 21, 99-108.

R Ueda, H Iketaki, K Nagata, S Kimura, FJ Gonzalez, K Kusano, T Yoshimura, Y Yamazoe: A common regulatory region functions bidirectionally in transcriptional activation of the human CYP1A1 and CYP1A2 genes. *Mol Pharmacol* (2006) 69, 1924-1930.

T Matsubara, W Noracharttiyapot, T Toriyabe, K Yoshinari, K Nagata, Y Yamazoe: Assessment of human pregnane X receptor-involvement in pesticide-mediated activation of CYP3A4 gene. *Drug Metab Dispos* (2007) 35, 728-33.

2. 学会発表

Y Yamazoe, W Noracharttiyapot, T Matsubara, K Nagata: Agrochemical induction of human cytochrome P450 and the prediction. IUPAC Pesticide 2006年8月(神戸)

T Matsubara, T Toriyabe, K Yoshinari, K Nagata, and Y Yamazoe: A herbicide pyributicarb is more potent inducer of CYP3A4 expression interacting with pregnane X receptor than rifampicin. 第21回日本薬物動態学会年会 2006年11月29日(東京)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

表1 *CYP3A4*レポーター遺伝子安定発現細胞株の薬物応答性

Cell number	Rifampicin (% of control)	Clotrimazole (% of control)
2-1-2	310	107
2-1-12	223	100
2-2-4	110	260
2-2-12	264	36
2-2-13	320	236
3-1-9	1677	1196
3-1-10	5961	1911
3-1-20	1576	9036
3-2-5	884	132
3-2-24	465	168
4-1-2	71	307
4-1-19	191	207

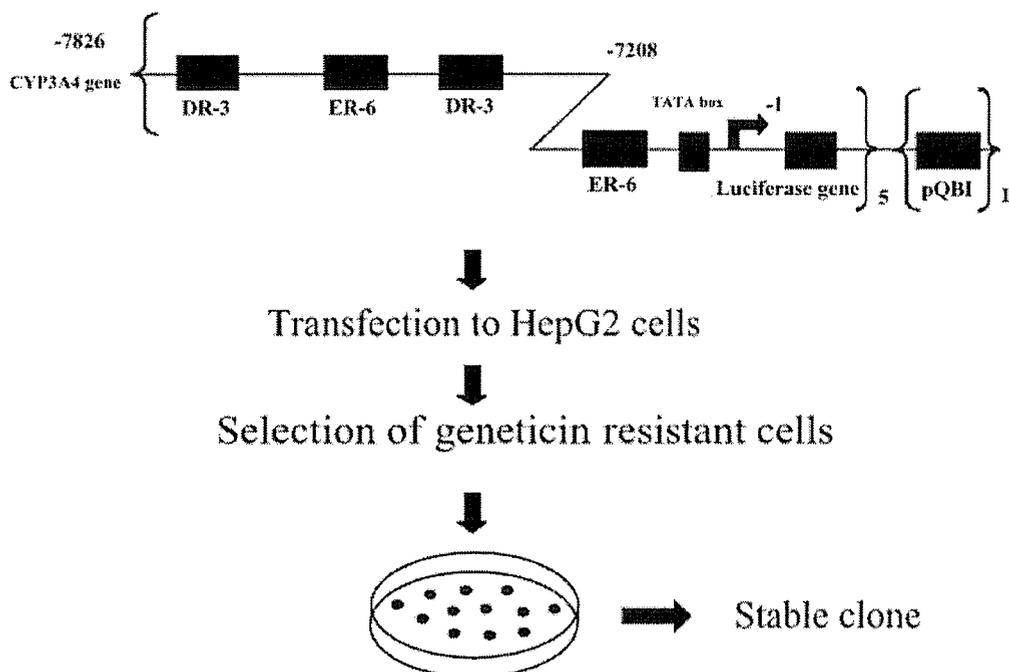


図1. *CYP3A4*レポーター遺伝子安定発現細胞株の単離方法の概略図

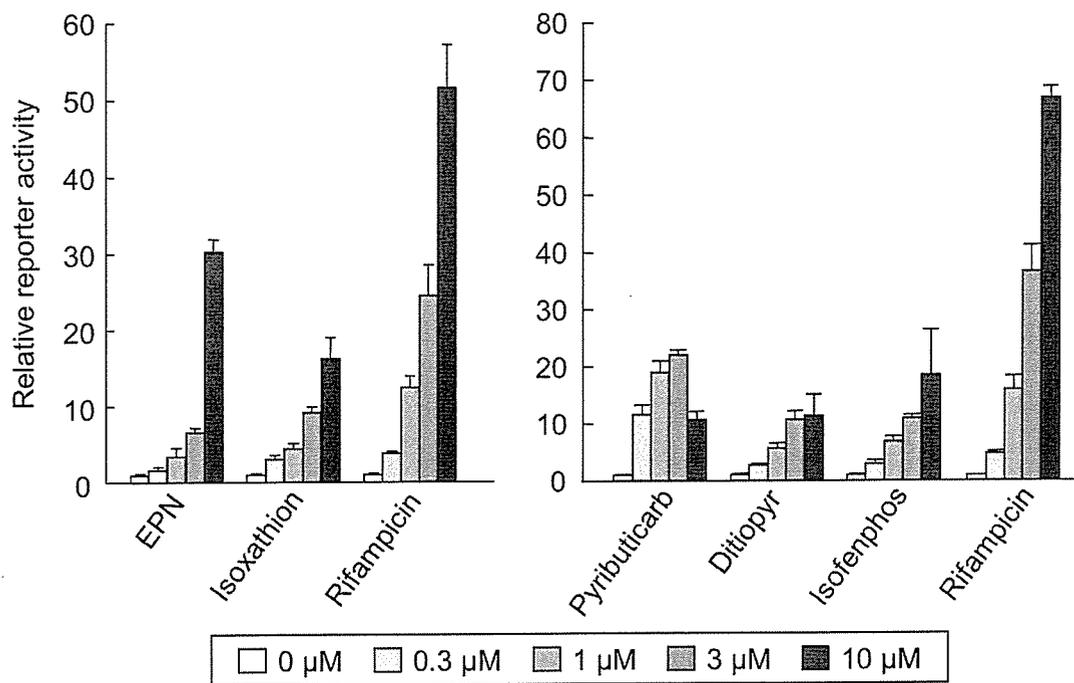


図 2. *CYP3A4* レポーター安定発現細胞を用いた農薬の *CYP3A4* 誘導能の評価

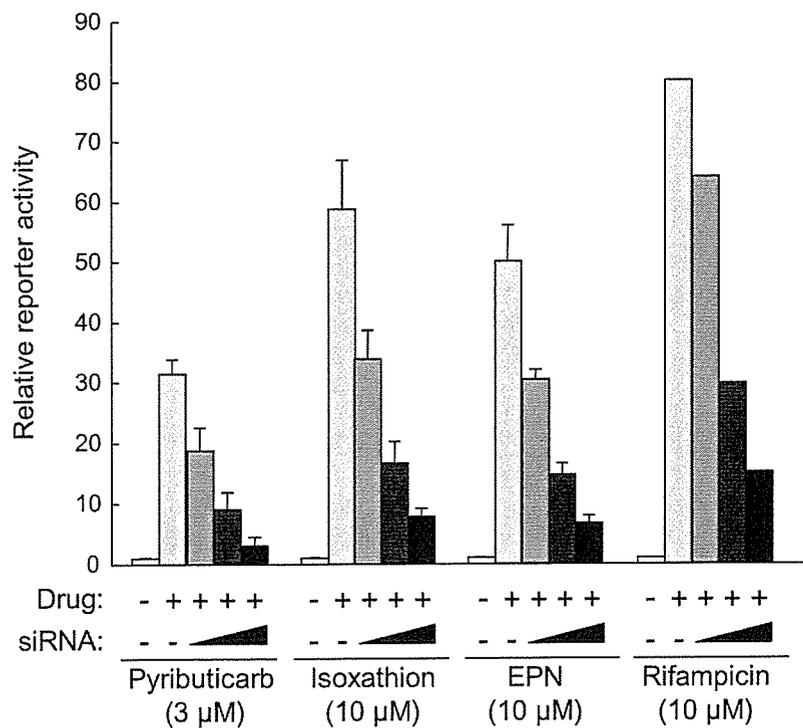


図 3. 農薬の *CYP3A4* 誘導における PXR の寄与の解析

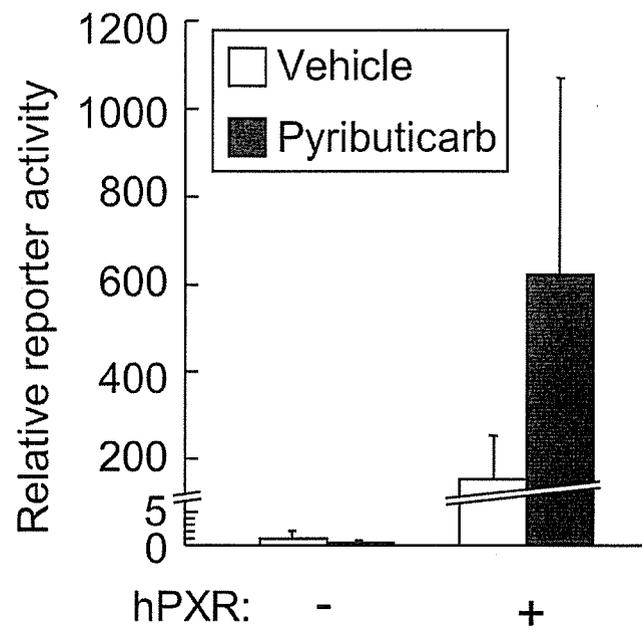


図 4. マウス個体を用いた pyributicarb の CYP3A4 誘導能の評価

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

環境中の発がん物質とその代謝活性化酵素の活性を変化させる化学物質とを複合暴露した場合、その発がん性は大きく変化すると予想されることから、環境中にある多数の化学物質の複合作用を検討することは化学物質の安全性を評価する際に極めて重要である。本研究は、食事に含まれるヘテロサイクリックアミンで肝発がん物質である MeIQx に的を絞って、その代謝活性化に関わるシトクローム p450 系 (CYP) の活性を左右する化学物質が、MeIQx の肝発がん性をどの様に修飾するかを追究した。

MeIQx の肝発がん性を修飾する既知の化合物を用いて、ラット肝における CYP の変動を指標に検索したところ、既知の発がん修飾作用の結果と、CYP1A1/1A2 (CYP1A1/2) の変動は必ずしも相関しなかった。次に、CYP1A1/2 を強く誘導することが確認された α -Naphthoflavone (ANF) または β -Naphthoflavone (BNF) と MeIQx との複合投与による肝発がん性の修飾作用を、肝中期発がん試験法を用いて検討した結果、これらの化合物による相加・相乗作用は認められなかった。さらに、CYP1A1/2 免疫染色を行い CYP1A1/2 の発現強度を肝小葉の領域ごとに検索した結果、肝全体の CYP1A1/2 の発現強度は、western blotting の結果と相関していたが、領域別では CYP1A1/2 の誘導される領域が化合物により異なっていた。また MeIQx 単独投与で発現強度が上昇した Zone 3 における CYP の発現強度は、MeIQx と ANF, BNF との複合投与によっても発現強度の上昇はみられなかった。

以上の結果から、食品中に含まれる発がん物質と、その発がん物質の代謝活性化酵素の誘導・阻害作用をもつ化学物質との複合投与による発がん性の修飾は、代謝活性化酵素のレベルに単純に依存しないことが示された。今後、発がん物質の活性化機構の部位特異性やその発癌機構との関連、および解毒酵素の変動などが複雑に関与していることが示唆される。

A. 研究目的

我々は、環境中にある多数の化学物質に同時に暴露している。発がん物質は生体内で代謝活性化・解毒されるが、この作用に重要な働きを担う

のが、薬物代謝酵素のシトクローム p450 系 (CYP) である。CYP の発現を誘導・抑制する化学物質も報告されている。

食事に含まれる発がん物質と、その代謝活性

化に関わる酵素活性を変化させる化学物質とを、同時に暴露した場合、発がん性は大きく変化すると予想される。従って、このような複合作用を検討することは、ヒトにおける化学物質の安全性あるいはリスクを評価する際に極めて重要である。

本研究の目的は食品中に存在する複数の化学物質の体内での複合作用を検討することであり、CYP を介した代謝活性化・解毒に関わる酵素の活性を左右する化学物質が、ある種の化学物質の発がん性をどのように修飾するかを追究することにある。そこで本研究では、食事に含まれるヘテロサイクリックアミンで、肝発がん物質である MeIQx に着目し、代謝活性化に係わる CYP の活性を左右する化学物質が、MeIQx の肝発がん性をどのように修飾するかを追究した。目的達成のために実験を大きく3つにわけて行った。

実験 1) MeIQx の肝発がん性を CYP の誘導あるいは阻害を介して修飾する化合物をスクリーニングする目的で、MeIQx 肝発がん性を修飾する作用が知られている化合物について、ラット肝における CYP の変動をタンパク質レベルで追究した。

実験 2) 実験 1 で MeIQx を代謝活性化する CYP1A1/2 を誘導した ANF および BNF を用い、MeIQx と同時または単独で混餌投与し、MeIQx の発がん性に対する修飾作用を、ラット肝発がん性試験法を用いて検索した。

実験 3) 化学物質の代謝には、肝臓の領域 (Zone) 特異性が存在することが知られているので、実験 2) で作成した肝組織標本に CYP1A1/2 の免疫染色を行い、MeIQx, ANF, BNF の単独およびそれぞれの複合同じた際の CYP1A1/2 の発現量の変化を肝臓の領域ごとに検索した。

B. 研究方法

実験 1) : MeIQx と同時投与により肝発がんを抑制することがすでに報告されている BHA (1%),

促進するとされる ferulic acid (1%), curucumine (1%), CYP1A1/2 を誘導するが修飾作用を示さない caffeine (0.1%), CYP1A1/2 を誘導するが MeIQx 肝発がんに対する修飾作用の報告がない ANF (0.02%), BNF (0.02%, 1%) を用いた。

6 週齢の雄 F344 ラットに これらの化合物をそれぞれ混餌投与し、2 週間後に剖検屠殺を行った。肝組織を採取し、タンパク質を抽出、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。

実験 2) : 6 週齢の F344 雄ラット 90 匹を用い、N-diethylnitrosoamine (DEN) を 200mg/kg の濃度で 1 回腹腔内投与後、その 2 週間より MeIQx (200ppm) と 0.02% ANF, または BNF を単独あるいは複合で混餌投与した。実験開始 3 週間目に肝部分切除を行った。実験開始後 8 週めに屠殺剖検し、肝臓の組織切片を作成、前癌病変のマーカーである GST-P の免疫染色し、その単位面積あたりの個数と大きさを計測した。

実験 3) : CYP1A1/2 抗体を用いて免疫染色を行い、画像解析装置を用いてグリソン鞘 (Zone 1)、中心静脈周辺 (Zone 3) およびその中間の Zone 2 における CYP1A1/2 の陽性領域および吸光度を測定し、MeIQx, ANF, BNF の単独およびそれぞれの複合同じた際の Zone ごとの CYP1A1/2 の発現量の変化を検索した。さらに GST-P および CYP1A1/2 染色の連続切片を作成し、前がん病変である GST-P 陽性細胞巣と GST-P 陰性である正常肝組織における CYP1A1/2 の発現強度の差異も検索した。
(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

実験 1) : MeIQx 肝発がんを抑制作用のある BHA

と促進作用のある ferulic acid では、CYP1A2 の増加、CYP2B1 と 3A2 の低下が共通して認められた (図 1, 図 2)。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 (図 1)。これらのことより、検索した 10 種の CYP のタンパク質の変動と、MeIQx の肝発がんに対する修飾作用との間に、明らかな相関は認められなかった。MeIQx の代謝活性化に関与するとされる CYP1A1 および 1A2 の肝におけるタンパク量が増加していたのはそれぞれ、BNF 投与群および caffeine, ANF, BNF 投与群であった (図 1, 図 2)。

実験 2) : ANF と BNF による、MeIQx の肝発がん性の修飾作用を、肝中期発がん試験法を用いて検討した結果、MeIQx 単独、ANF 単独、BNF 単独投与により、DEN による肝発がんが有意に促進されることが確認された (表 1)。しかし、MeIQx と ANF あるいは BNF との同時投与では、GST-P 陽性細胞巢の発生頻度はそれぞれの単独投与群に比較して増加せず、これらの化合物の相加・相乗作用は認められなかった (表 1)。

実験 3) : 次に実験 2) で得られた組織標本を用いて CYP1A1/2 免疫染色を行い、CYP1A1/2 の発現強度を領域ごとに検索した結果、肝全体の CYP1A1/2 の発現強度は、western blotting の結果と相関していたが、領域別にみると、化合物によって CYP1A1/2 の誘導される領域が異なり、MeIQx 単独投与群では Zone3 優位、ANF, BNF 単独投与群では Zone1 優位であった (図 3)。さらに、Zone 1 における CYP の発現強度は、MeIQx と ANF および BNF との複合投与群で、MeIQx 単独投与と比較して発現強度は有意に上昇した (図 4)。また MeIQx 群で発現強度が上昇した Zone 3 における CYP の発現強度は、MeIQx と ANF, BNF との複合

投与によっても発現強度の上昇はみられなかった (図 5, 図 6)。

D. 考察

MeIQx 肝発がんを修飾する作用が既に知られている化合物 6 種類について CYP 系酵素の変動を検討したところ、必ずしもは次がん修飾作用が、CYP1A1/2 の誘導を介したものではないことがあきらかとなった。逆に、CYP1A1/2 を誘導する化合物 2 種類と MeIQx と同時に投与しても、MeIQx の発がん性は変化せず、薬物代謝酵素の変動のみで発がん性の強度への変化を論ずることは困難であることが明らかとなった。最後に行った実験より、肝においては、CYP の発現強度が上昇する領域が化合物により異なったことから、発がん性に関与する発がん物質の代謝活性化機構は単純なものではないことが示唆された。従って、発がん修飾には、活性化酵素の変動のみでなく、変動した部位や解毒酵素の変動等が複雑に関与していることが示唆され、また前癌病変での酵素の変動も十分考慮すべき現象のひとつである。

E. 結論

食品中に存在するヘテロサイクリックアミンの MeIQx と、発がん物質の第 1 相代謝酵素である CYP を変動する化学物質との複合投与による発がん性の修飾作用を検討した。化学物質の投与により多くの CYP が変動し、複合投与による発がん修飾作用が予想されたが、化学物質により CYP の発現部位および強度が異なり、発がん修飾作用の結果と、CYP の変動は必ずしも相関しなかった。このように、食品中に含まれる発がん物質と、その発がん性に関与する代謝活性化酵素の誘導・阻害作用をもつ化学物質との複合投与による発がん性の修飾作用は、代謝活性化酵素に単純に依存しないことが示唆された。

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Tsutsumi, T., Ichihara, T., Kawabe, M., Yoshino, H., Asamoto, M., Suzuki, S. and Shirai, T. Renal toxicity induced by folic acid is associated with the enhancement of male reproductive toxicity of di(n-butyl) phthalate in rats. *Reprod. Toxicol.* 18: 35-42, 2004

Kuribayashi, M., Asamoto, M., Suzuki, S., Hokaiwado, N., Ogawa, K. and 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 influences. *Cancer Lett.* 232; 289-299, 2006.

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

難波江恭子、土井悠子、中島弘尚、市原敏夫、竹下健太郎、朝元誠人、白井智之 MeIQx と α -および β -naphthoflavone 同時投与による肝発がん修飾作用の検討 第 23 回日本毒性病理学会、東京、2007 年 1 月

G. 知的所有権の取得状況

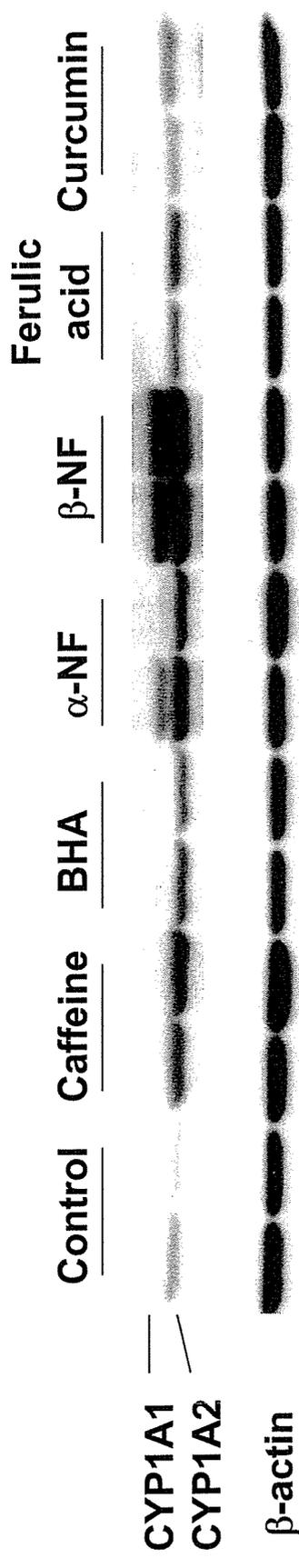
1. 特許取得

該当なし

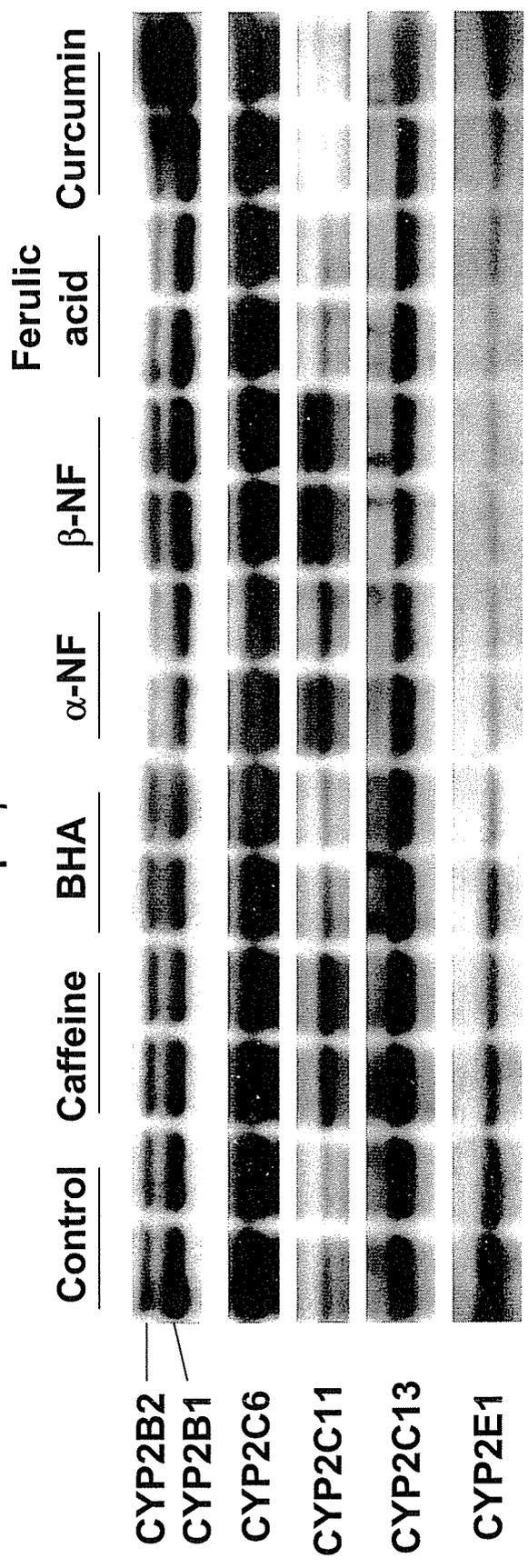
2. 実用新案登録

3. その他

該当なし

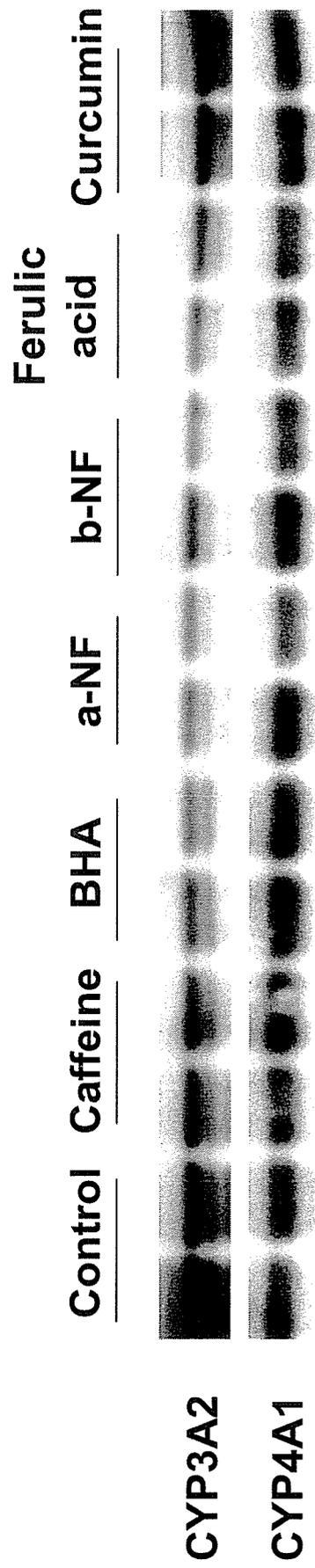


CYP 1A2 ----- Up : Caffeine, α-NF, β-NF
 CYP 1A1 ----- Up : β-NF



CYP2B2 ----- Down : α-NF
 CYP2C11 ----- Up : Caffeine, α-NF, β-NF
 CYP2E1 ----- Down : Caffeine, BHA, α-NF, β-NF

Figure 1 CYP1A, 2B, C, E expressions



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

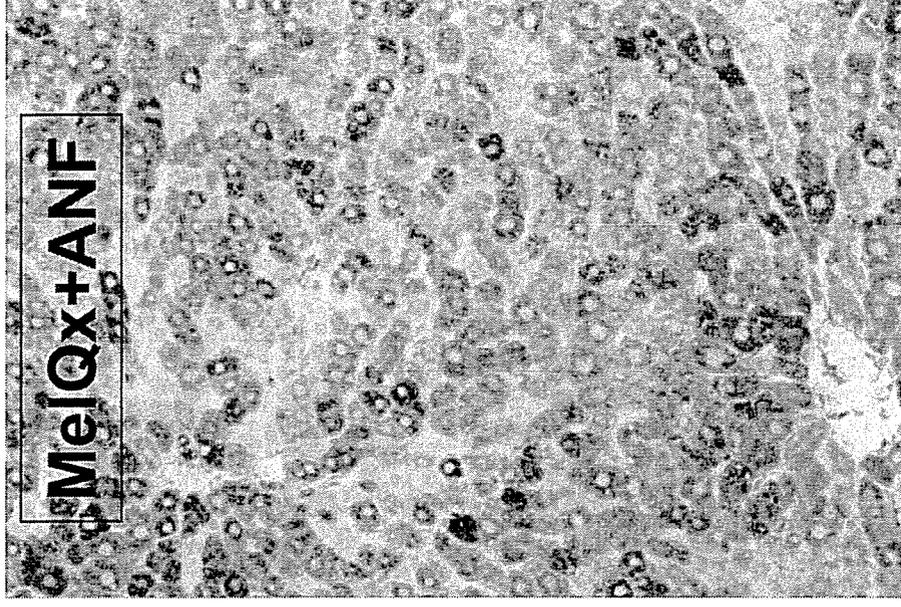
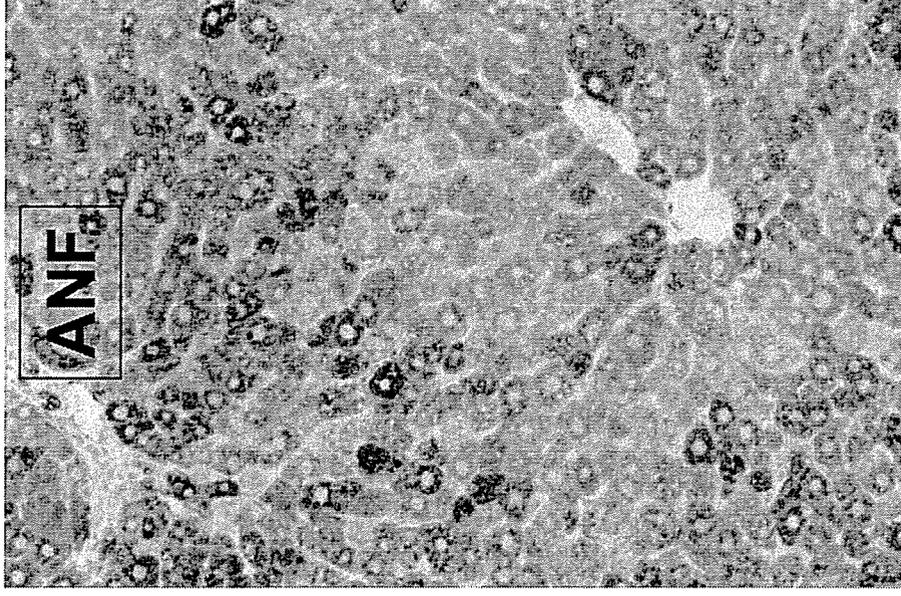
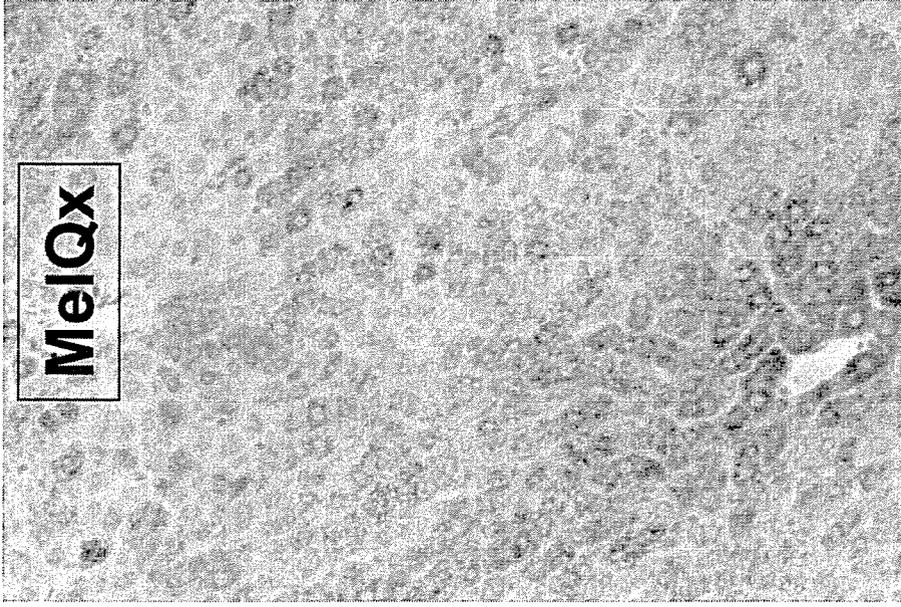
图2. CYP3A and 4A expression

表1. Analysis of GST-P Positive Foci

Test chemical DEN →	No. of examined	GST-P positive foci	
		Number (No. / cm ²)	Area (mm ² / cm ²)
—	14a	3.274 ± 1.156	0.213 ± 0.097
MeIQx	15	5.842 ± 1.551**	0.397 ± 0.166**
MeIQx + α-naphthoflavone	13	5.774 ± 1.557**	0.402 ± 0.151**
MeIQx + β-naphthoflavone	15	5.345 ± 1.708**	0.390 ± 0.198**
α-naphthoflavone	15	4.269 ± 1.291*	0.295 ± 0.101*
β-naphthoflavone	15	5.536 ± 2.037**	0.512 ± 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.



MeIQx単独群では、小葉中心性(zone 3)に染色濃度が高かった。
ANFでは、グリソソ鞘周囲(zone 1)に染色濃度が高かった。
MeIQx+ANF複合投与では、ANF優位な染色性を示した。

図3. α -NF投与によるCYP1A1/2 発現のZone特異性

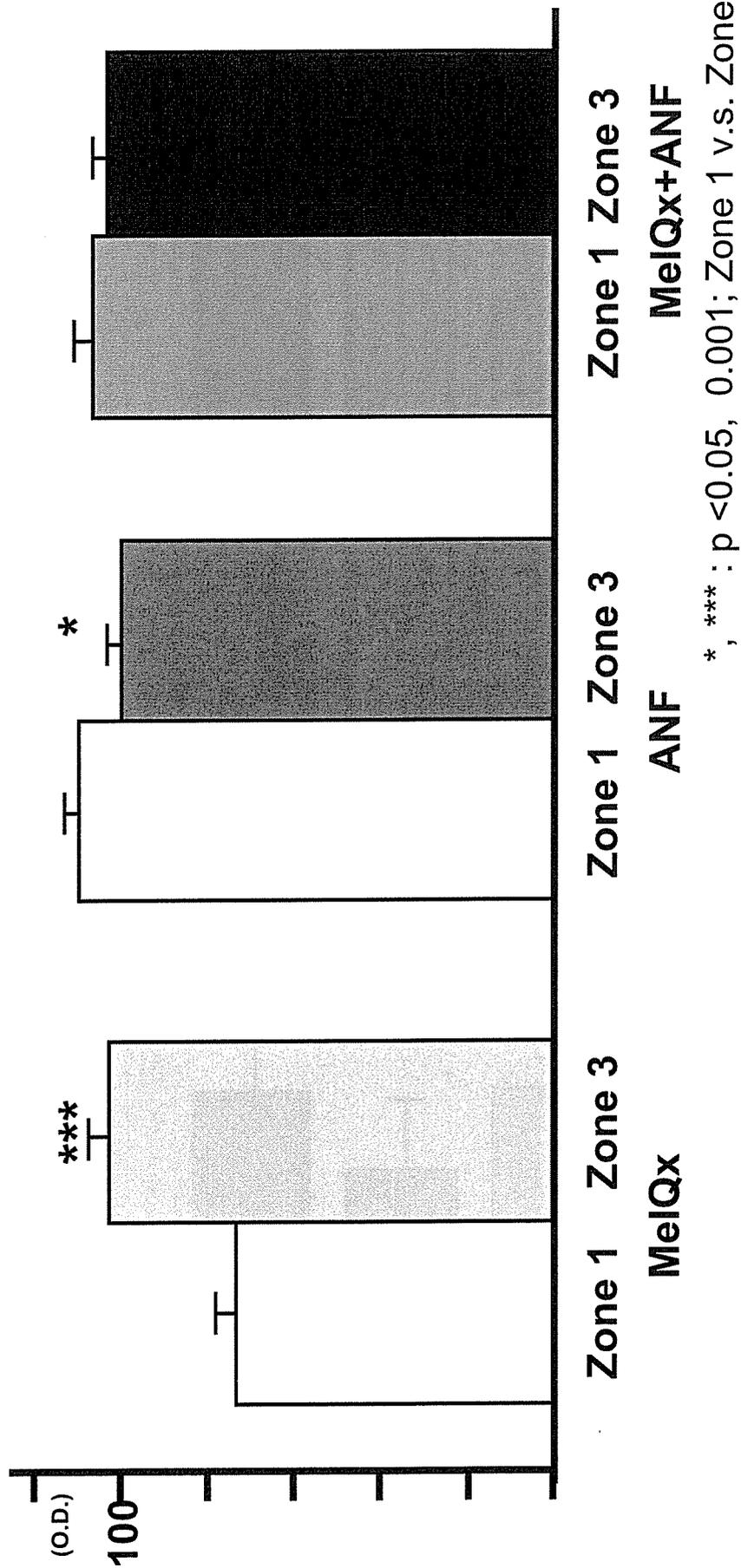


図4. α -NF投与した肝の非腫瘍部におけるCYP1A1/2の染色濃度

**Quantitative analysis of
GST-P positive foci**

**CYP1A1/2
expression**

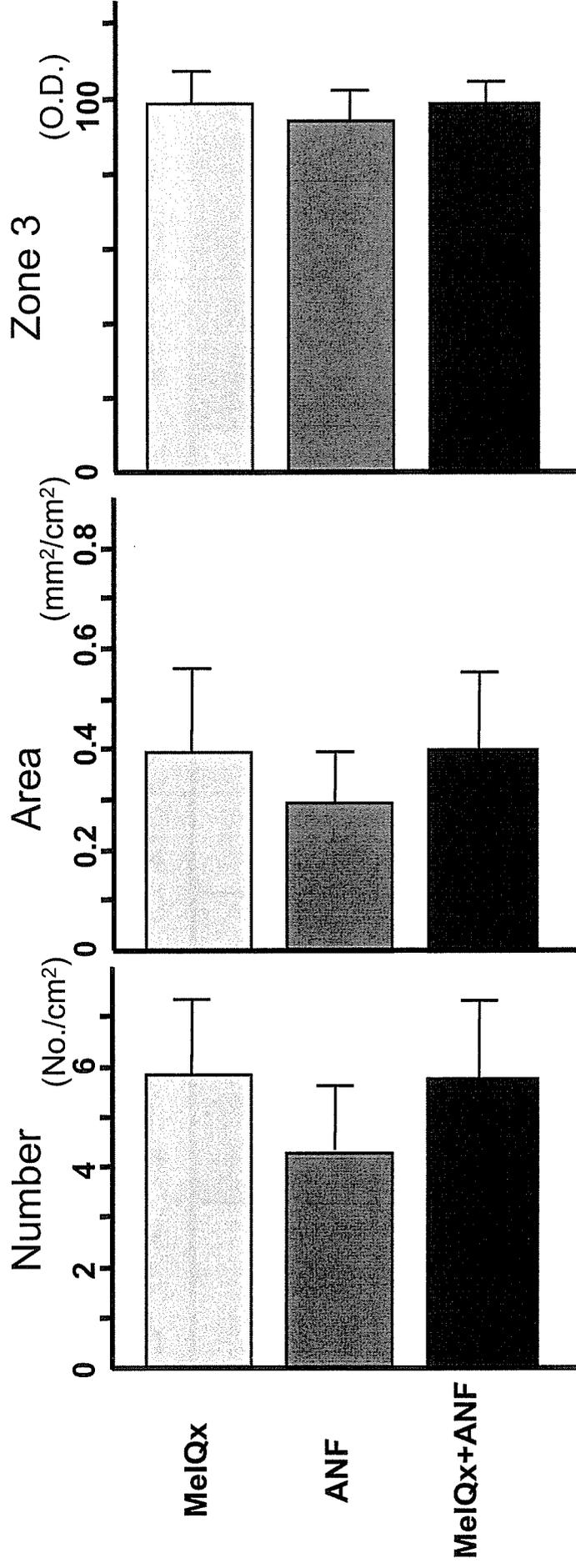


図5. α -NF投与した肝のZone 3におけるGST-P 細胞巢の出現とCYPの発現との関係

**Quantitative analysis of
GST-P positive foci**

**CYP1A1/2
expression**

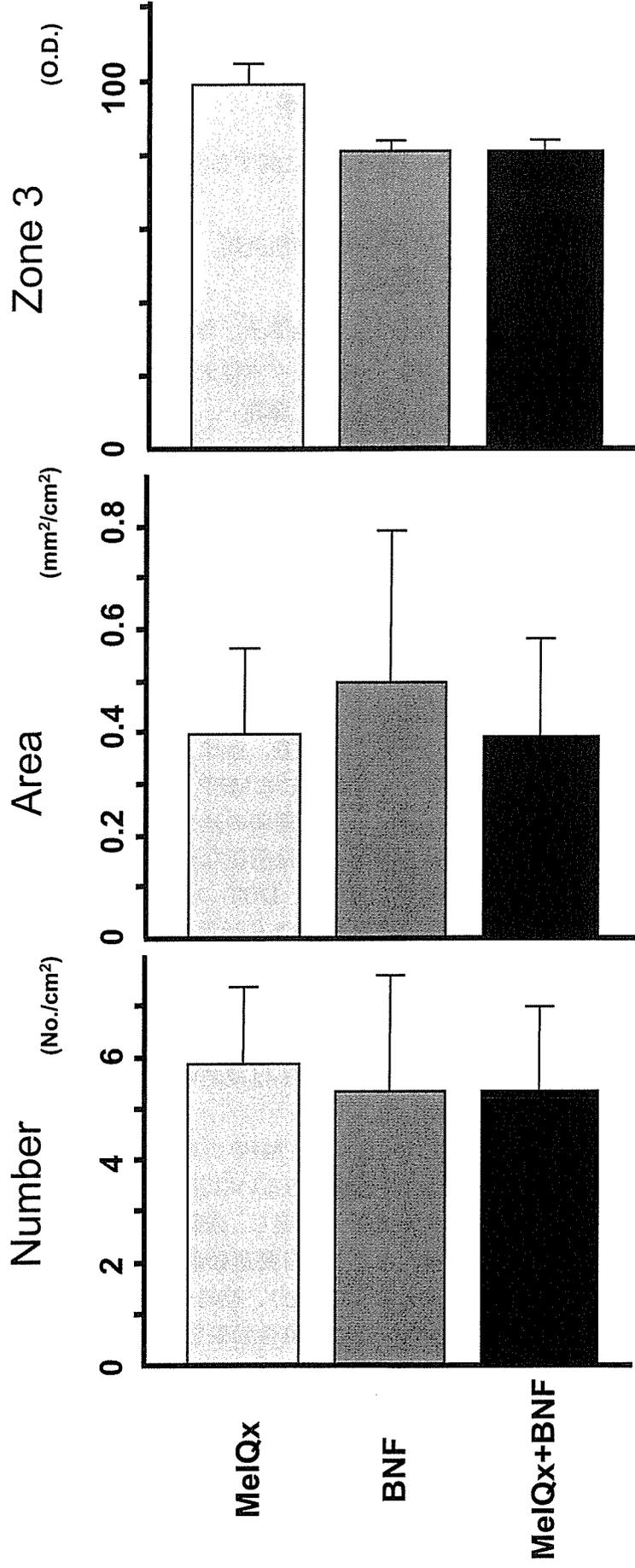


図6. β -NF投与した肝のZone 3におけるGST-P細胞巢の出現とCYPの発現との関係

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
総合研究報告書

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 （財）残留農薬研究所

毒性部神経毒性研究室 首藤康文、齋島淳子、藤江秀彰、林豊

毒性部病理研究室 小嶋五百合、佐々木淳矢、富田真理子

毒性部分子毒性研究室 武田眞記夫、大塚亮一、山口悟

研究要旨

農薬の複合毒性を明らかにするため、雌雄のラットを用いて以下の2つの実験を実施した。

実験1：雌性ラットを用い単回投与による農薬の複合毒性を検索した。被験物質として、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、成熟(8週齢)あるいは幼若(3週齢)動物に複合的に単回経口投与し、臨床症状、死亡率、自発運動量及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、成熟動物ではMPPとMPMCの複合投与群において死亡率の増加、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たが、その他の複合投与群では明確な毒性効果の増強は認められなかった。一方、幼若動物ではMPPとDDTの複合投与により、成熟動物でみられなかった自発運動量の増加とChE活性の回復遅延が認められた。また、MPMC単独投与では、成熟動物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。これらの結果から、有機リン剤とカーバメート剤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、同効果は成熟動物に比べ幼若動物の方がより顕著であることが判明した。

実験2：雄性ラットを用いDDTの反復投与とMPPの単回投与の組み合わせによる複合毒性を検索した。幼若期(3週齢)あるいは若齢期(5週齢)の動物にDDTを14日間反復経口投与した後に休薬し、成熟期(10週齢)にMPPを単回経口投与して、臨床症状、死亡率、自発運動量、ChE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検索した。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その後に休薬期間を置いた後でも、有機リン剤である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った。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。

結論:有機リン剤とカーバメート剤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、同効果は成熟動物に比べ幼若動物の方がより顕著であることが判明した。また、時間差を置いた DDT の反復投与とリン剤の単回投与による複合曝露においても、幼若動物の方が毒性影響を受け易いことが判明した。これらの結果は、極めて高い用量での曝露影響であり、実際の生活環境下での危険性を直接示すものではないが、幼年期に有機塩素系農薬の曝露経歴がある場合には、特に有機リン剤曝露には留意する必要があることが示唆された。

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集積することを目的とした。

B. 研究方法

実験 1: 雌性ラットを用い、有機リン系農薬 MPP (Fenthion)、有機塩素系農薬 DDT (*p,p'*-DDT)、カーバメート系農薬 MPMC (Xylylcarb) の 3 種類の殺虫剤を組み合わせ、幼若 (3 週齢) あるいは成熟 (8 週齢) 動物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。

実験 2: 雄性ラットを用い、幼若 (3 週齢)

あるいは若齢 (5 週齢) 動物に有機塩素系農薬 DDT を 14 日間反復経口投与し、休薬期間を置いた後、成熟期 (10 週齢) に有機リン系農薬 MPP を単回経口投与して、時間差を置いた複合曝露による毒性影響を検索した。

1. 被験物質

有機リン系農薬 ; MPP (Fenthion: *O,O*-Dimethyl *O*-4-Methylthio-*m*-tolyl Phosphorothioate)、和光純薬工業株式会社 (大阪府)

カーバメート系農薬 ; MPMC (Xylylcarb: 3-4-Xylyl Methylcarbamate)、和光純薬工業株式会社 (大阪府)

有機塩素系農薬 ; DDT(*p,p'*-DDT: 1-trichloro

-2,2-bis(*p*- chlorophenyl) ethane)、シグマ社 (SIGMA Chemical Company、USA)

MPP は蒸留水に乳化して、MPMC は 1% Tween80 水溶液に懸濁して、DDT はコーンオイルに溶解して調製した。投与容量は 5 mL/kg とし、胃ゾンデを用いて強制経口投与した。

2. 供試動物

Wistar Hannover 系 SPF ラット (BrIHan:WIST@Jcl[GALAS])、日本クレア株式会社 富士生育場 (静岡県)

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)および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)に基づいて投与用量を決定した。

実験 1：単回投与複合毒性には、以下の 7 群を設定した。

- 対照群 (蒸留水+コーンオイル)
- MPP 単独投与群 (MPP+コーンオイル)
- DDT 単独投与群 (蒸留水+DDT)
- MPMC 単独投与群 (蒸留水+MPMC)
- MPP + MPP 複合投与群
- MPP + DDT 複合投与群
- MPP + MPMC 複合投与群

実験 2：時間差を置いた複合毒性には、以下の 6 群を設定した。

- 対照群 (コーンオイル反復 + MPP 単回)
- MPP 単独投与群 (コーンオイル反復 + MPP 単回)
- DDT 15 mg/kg/day 反復 + MPP 単回
- DDT 30 mg/kg/day 反復 + MPP 単回
- DDT 60 mg/kg/day 反復 + MPP 単回
- DDT 単独投与群 (DDT 60 mg/kg/day 反復 + 蒸留水単回)

4. 検査項目

一般状態 (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、縮瞳、流涎、流涙等)、体温、排泄物等の状態) の観察 (実験 1、2)

体重測定 (実験 1、2)

自発運動量測定 (実験 1、2)

コリンエステラーゼ活性測定：血漿、赤血球および脳 (実験 1、2)

生化学および分子生物学的解析 (実験 2)：血漿 DDE/DDT 濃度測定、肝薬物代謝酵素活性 (CYP2B1 および CYP3A2 濃度)、肝臓および脳の酸化ストレス (過酸化脂質濃度)

C. 研究結果および考察

実験 1：単回投与による複合毒性 (表 1)

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。2 種の有機リン剤の単回投与による複合暴露影響については、Dubois が複合曝露した 43 組のうち、相加作用が 21 組、拮抗作用が 18 組、相乗作用が 4 組という結果を報告している (Dubois KP., Adv. Pest. Control Res., 4: 117-151, 1961)。この報告は、腹腔内投与によるものであるが、相加作用を示した 2 組および拮抗作用を示した 1 組ついて (財) 残留農薬研究所が経口投与による確認試験を実施し、その結果に差がないことを確認している。そこで、有機リン剤と他種の農薬の複合毒性を確認するため、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、成熟ラットおよび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。以下に、各剤の単独投与毒性および複合投与毒性に