

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 は哺乳ラットに対して弱毒であるという報告があるが、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：短時間での MPP2 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：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：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。

以上の結果から、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幼若ラットで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。

実験 2：時間差を置いた複合毒性（表 2）

DDT は、ほぼ全世界的に製造および使用が制限されているが、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。DDT は、成熟/幼若（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はなく、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。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、時間差を置いた複合曝露影響について検討した結果、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 曝露による毒性を変化させることを確認した。そこで、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。以下にその結果を示し、考察を加えた。

MPP 単独投与群および DDT + MPP 複合曝露群：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、MPP 投与により肝薬物代謝酵素の CYP2B1 および CYP3A2 が減少する傾向が認められた。

DDT 単独投与群：幼若期あるいは若齢期において DDT の 14 日間反復投与のみを行った DDT 単独投与群では、臨床症状に異常はみられなかったが、肝薬物代謝酵素の CYP2B1 および CYP3A2 の誘導が確認された。

DDT + MPP 複合曝露群：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で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ことが示唆された。

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があった。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 濃度（代謝物 DDE を含む）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 単独投与群よりも低値を示した。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。

DDT と MPP の複合投与によ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、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。

E. 結論

実験1：単回投与複合毒性

幼若あるいは成熟ラットにおける単回複合曝露実験では、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。

実験2：時間差を置いた複合毒性

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憎悪させ、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、リン剤とカーバメート剤の複合曝露により相加毒性が認められ、成獣と比べて幼若動物の方がその効果はより顕著であった。また、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。

以上の結果は、各農薬とも高用量曝露した実験によるものであり、生活環境下での危険性を直接示すわけではない。しかしながら、幼年期の有機リン剤とカーバメート剤の単回複合曝露および幼年期に有機塩素剤の反復曝露経歴がある場合の有機リン剤曝露には、特に留意する必要性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 有機リン剤と有機塩素剤あるいはカ

カーバメート剤のラットにおける単回投与複合毒性評価：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）

3. その他
なし

2) 幼若および成熟ラットにおける有機リン剤と有機塩素剤あるいはカーバメート剤の単回投与複合毒性の比較：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）

3) 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）

4) 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

表 1. 実験 1 - 単回投与複合毒性実験結果

第 1 剤	第 2 剤	成獣(8 週齢) 症状	幼若(3 週齢) 症状	成獣と幼若の毒性比較
有機リン MPP(fenthion)	—	+	++	幼若で毒性がやや強い
有機塩素 <i>p-p'</i> DDT	—	—	+	幼若で毒性がやや強い
カーバメート MPMC	—	++	+++	幼若で毒性が強い
有機リン MPP(fenthion)	有機リン MPP(fenthion)	++ やや悪化	++ ほぼ同等	成獣, 幼若ともほぼ同等
有機リン MPP(fenthion)	有機塩素 <i>p-p'</i> DDT	++ 相加的	++ 相加的	成獣, 幼若ともほぼ同等
有機リン MPP(fenthion)	カーバメート MPMC	+++ 相乗的	++++ 相乗的	幼若で特に増強

表 2. 実験 2 - 時間差を置いた複合毒性実験結果

第 1 剤 有機塩素 14 日間投与	第 2 剤 有機リン 単回投与	若齢(5 週齢) 開始群	幼若(3 週齢) 開始群	若齢と幼若の毒性比較
<i>p-p'</i> DDT 60 mg/kg/day	—	—	—	若齢・幼若とも症状なし (自発行動量微増)
—	MPP(fenthion) 200 mg/kg	+	+	幼若の方が症状発現が 早く、頻度も高い
<i>p-p'</i> DDT 15 mg/kg/day	MPP(fenthion) 200 mg/kg	+	++	若齢では増強なし 幼若で軽度増強
<i>p-p'</i> DDT 30 mg/kg/day	MPP(fenthion) 200 mg/kg	++	++	若齢, 幼若とも増強
<i>p-p'</i> DDT 60 mg/kg/day	MPP(fenthion) 200 mg/kg	++	+++	若齢で増強 幼若では特に増強

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
Ichihara T, Miyashita K, Kawabe M, Imaida K, Asamoto M, Ogiso T, Tamano S, Hirose M	Lack of combination hepatocarcinogenicity of harman, norharman and amitrol when given with NaNO ₂ in the rat.	J. Toxicol. Sci.	30	1-6	2005
Matsuo S, Okamura M, Takizawa T, Imai T, Mitsumori K, Hirose M.	Lack of modifying effects of combined treatment of <i>t</i> -butylhydroquinone and sodium nitrite on forestomach carcinogenesis in ras H2 mice initiated with N-ethyl-N-nitrosourea.	J. Toxicol Pathol.	18	111-116	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-dimethylimidaz o [4, 5- <i>f</i>] quinoxaline (MeIQx)-treated rats.	J. Toxicol Pathol.	18	99-104	2005
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	J. Pharm. Biomed. Anal.	41	1325-1331	2006

	analysis in livers of mice administered acetaminophen.				
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 K, Imazawa T, Yanai T, Masegi T, Nishikawa A, Hirose M.	Enhancing effects of combined treatment with IQ and sodium nitrite on rat liver, colon and Zymbal's gland carcinogenesis after initiation with diethylnitrosamine (DEN) and 1,2-dimethylhydrazine (DMH).	Int. J. Cancer	118	2399-2404	2006
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	Cancer Lett.	235	69-74	2006

	carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats.				
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 <i>N</i> -methyl- <i>N</i> '-nitro- <i>N</i> '-nitrosoguanidine.	Cancer Sci.	98	949-957	2007
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]quinoline (MeIQx) rat hepatocarcinogenesis by caffeine, a CYP1A2 inducer, points to complex counteracting influences.	Cancer Lett.	232	289-299	2006
M. Murata, S. Ohnishi, K. Seike, K. Fukuhara, N. Miyata, and S. Kawanishi.	Oxidative DNA damage induced by carcinogenic dinitropyrenes in the presence of P450 reductase.	<i>Chem. Res. Toxicol.</i>	17	1750-1756	2004
K. Sakano, Y. Inagaki, S. Oikawa, Y. Hiraku, and S. Kawanishi.	Copper-mediated oxidative DNA damage induced by eugenol: possible involvement of <i>O</i> -demethylation.	Mutat. Res.	565	35-44	2004
K. Seike, M. Murata, K. Hirakawa, Y. Deyashiki, and S. Kawanishi.	Oxidative DNA damage induced by benz[<i>a</i>]anthracene dihydrodiols in the presence of dihydrodiol dehydrogenase.	<i>Chem. Res. Toxicol.</i>	17	1445-1454	2004
H. Kobayashi, S. Oikawa, K. Hirakawa, and S. Kawanishi.	Metal-mediated oxidative damage to cellular and isolated DNA by gallic acid, a metabolite of antioxidant propyl gallate.	Mutat. Res.	558	111-120	2004

Y. Hiraku, A. Sekine, H. Nabeshi, K. Midorikawa, M. Murata, Y. Kumagai, and S. Kawanishi.	Mechanism of carcinogenesis induced by a veterinary antimicrobial drug, nitrofurazone, via oxidative DNA damage and cell proliferation.	Cancer Lett.	215	141-150	2004
M. Murata, K. Midorikawa, M. Koh, K. Umezawa, and S. Kawanishi.	Genistein and daidzein induce cell proliferation and their metabolites cause oxidative DNA damage in relation to isoflavone-induced cancer of estrogen-sensitive organs.	Biochemistry	43	2569-2577	2004
Sakano K, Mizutani M, Murata M, Oikawa S, Hiraku Y, Kawanishi S.	Procyanidin B2 has anti- and pro-oxidant effects on metal-mediated DNA damage.	Free Radic. Biol. Med.	39	1041-1049	2005
Piao F, Ma N, Hiraku Y, Murata M, Oikawa S, Cheng F, Zhong L, Yamauchi T, Kawanishi S, Yokoyama K.	Oxidative DNA damage in relation to neurotoxicity in the brain of mice exposed to arsenic at environmentally relevant levels.	J. Occup. Health.	47	445-449	2005
Kawanishi S, Oikawa S, Murata M.	Evaluation for safety of antioxidant chemopreventive agents.	Antioxid. Redox. Signal.	7	1728-1739	2005
Oikawa S, Ito T, Iwayama M, Kawanishi S.	Radical production and DNA damage induced by carcinogenic 4-hydrazinobenzoic acid, an ingredient of mushroom <i>Agaricus bisporus</i> .	Free Radic. Res.	40	31-39	2006
Oikawa S, Nagao E, Sakano K, Kawanishi S.	Mechanism of oxidative DNA damage induced by capsaicin, a principal ingredient of hot chili pepper.	Free Radic. Res.	40	966-973	2006
Kawanishi S, Murata M.	Mechanism of DNA damage induced by bromate differs from general types of oxidative stress.	Toxicology	221	172-178	2006

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
Abe M, Suzuki N, Yoshida M, Igarashi M, Usuda K, Furukawa S, Maekawa A, Juneja LR, Okubo T and Nakae D.	Preliminary evaluation of toxicologic and carcinogenic risks of copper gluconate in rats given multiple carcinogens.	J. Toxicol. Pathol.	19	129-135	2006
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
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 Metabolism and Pharmacokinetics	21	99-108	2006
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.	Molecular Pharmacology	69	1924-1930	2006
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 Metabolism and Disposition	33	728-733	2007