

測定項目(略号): アルカリホスファターゼ(ALP)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ(GGTP)、クレアチニン(Creat)、尿素窒素(BUN)、総蛋白(TP)、アルブミン(Alb)、グロブリン(Glob)、アルブミン/グロブリン比(A/G ratio)、血糖(Gluc)、総コレステロール(T.Chol)、トリグリセライド(TG)、総ビリルビン(T.Bil)

10. コリンエステラーゼ(ChE)活性の測定

2週間反復投与終了後の全生存動物について、血漿及び脳の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した。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、左右に切り分けた後、全脳重量及び右脳重量を測定した。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法により行なった。血漿については、JCA-BM1250自動分析装置を用いてChE活性を測定した。脳については、半脳(右)で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。

11. 免疫学的検査

2週間反復投与終了後に、全生存動物の胸腺について、フローサイトメトリー解析(リンパ球サブセット解析)を実施した。胸腺の半量を5%FCS(牛胎児血清)添加のPBS(Phosphate Buffered Saline)に氷冷下で浸し、時計皿上でステンレス鋼製のメッシュを用いて細胞懸濁液を調製した。総合血液学検査装置アドヴィア 120

(Bayer Corporation)を用いて胸腺細胞数を計測した。

次に、反応抗体との非特異的結合を防ぐため、約 1×10^7 の胸腺細胞を20%山羊血清添加PBSにて4℃で10分間培養した。 1×10^6 の胸腺細胞について以下の蛍光標識抗ラット細胞膜表面抗原の抗体(BD Pharmingen)を用いて4℃で30分間培養・染色した。T細胞のリンパ球サブセットの解析では、PE標識抗ラットCD8抗体及びCy-Chrome標識抗ラットCD4抗体を使用した。染色後、PBSで洗浄した後、FACS Calibur(日本ベクトン・ディッキンソン株式会社)を用いてリンパ球サブセットを解析した。サブセットは、未成熟胸腺細胞のダブルネガティブ細胞(CD4-CD8-)及びダブルポジティブ細胞(CD4+CD8+)について、また成熟胸腺細胞のヘルパーT細胞(CD4+CD8-)及び細胞傷害性T細胞(CD4-CD8+)について解析した。各リンパ球サブセットの対象細胞集団は、フロサイトメーターの解析で得られた各細胞集団の統計値(%)に細胞数を乗じて、対象細胞集団の細胞数として表した。

12. 臓器重量

2週間反復投与終了後の全生存動物について剖検し、以下の臓器の固定前の重量(絶対重量)を測定して最終体重から比体重値(相対重量)を算出した。

測定項目: 脳、胸腺、肝臓、腎臓(両側)、脾臓、副腎(両側)

13. 剖検及び組織採取

2週間反復投与終了後の全生存動物について、エーテルの深麻酔下で腹大動脈・後大

静脈を切断して放血により安楽死させた後に剖検した。さらに病理学的精査が必要となる可能性を考慮して、剖検時に全動物から以下の臓器及び組織を採取し、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

採取した臓器：脳、胸腺、肝臓、脾臓、副腎（両側）

14. 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及び1%レベルで解析した。

体重、自発運動量、高架式十字迷路検査項目、血液学的検査項目、血液生化学的検査項目、胸腺及び脾臓の細胞数、フローサイトメトリーによるリンパ球、臓器重量のデータについて、Student-t 検定を実施して対照群と各投与群間における有意差の有無を判定した。詳細な症状の観察所見のスコアについては、ノンパラメトリック手法を用いた Mann・Whitney-U 検定を用いて対照群と各投与群間における平均順位の有意差の有無を判定した。

C. 研究結果

1. 一般状態（表1）

死亡率を表1に示す。

いずれの試験群においても死亡あるいは瀕死状態の動物は認められなかった。

2. 機能検査（表1、2及び3）

詳細な症状の観察の結果、パラチオン 0.6 mg/kg/day 単独投与群、メタミドホス 0.8 mg/kg/day 単独投与群及びパラチオン 0.6 mg/kg/day+メタミドホス 0.2 mg/kg/day 複合曝露群におけるスコアは媒体対照群と同

様であった。パラチオン 0.6 mg/kg/day とメタミドホス 0.4 あるいは 0.8 mg/kg/day の複合曝露では、曝露4日から8日にかけて筋緊張低下が、曝露8日から12日にかけて振戦が認められた。さらに、パラチオン 0.6 mg/kg/day+メタミドホス 0.8 mg/kg/day 複合曝露群では、投与期間の経過に伴い警戒性の低下傾向が認められた。スコアに変動が認められた項目における平均スコアは表1に示す。

自発運動量測定の結果、散発的に認められた有意差は偶発性であると思われた。測定の後半（40-60分）における運動量は、パラチオン 0.6 mg/kg/day 単独投与群、メタミドホス 0.8 mg/kg/day 単独投与群及びパラチオン 0.6 mg/kg/day+メタミドホス 0.2 mg/kg/day 複合曝露群では媒体対照群と同様に全運動量の10から数パーセントだったが、パラチオン 0.6 mg/kg/day とメタミドホス 0.4 あるいは 0.8 mg/kg/day の複合曝露では20%前後の高い行動活性が残った。測定結果は表2に示す。

瞳孔径測定の結果、パラチオン 0.6 mg/kg/day 単独投与群では、投与期間を通して媒体対照群とほぼ同様であったが、メタミドホス 0.8 mg/kg/day 単独投与群では有意に縮瞳した。全てのパラチオンとメタミドホスの複合曝露群でも有意な縮瞳が認められ、その程度はパラチオン 0.6 mg/kg/day+メタミドホス 0.2 mg/kg/day 複合曝露群においてメタミドホス 0.8 mg/kg/day 単独曝露と同程度で、パラチオン 0.6 mg/kg/day とメタミドホス 0.4 あるいは 0.8 mg/kg/day の複合曝露では、パラチオン 0.8 mg/kg/day 単独曝露よりも重篤になった。また、パラチオン 0.8 mg/kg/day

単独曝露及びパラチオン 0.6 mg/kg/day+メタミドホス 0.2 mg/kg/day 複合曝露群では、曝露終盤の 12 日では縮腫の回復が認められたのに対して、パラチオン 0.6 mg/kg/day とメタミドホス 0.4 あるいは 0.8 mg/kg/day の複合曝露では、回復傾向はみられなかった。瞳孔径の測定結果は表 3 に示す。

3. 高架式十字迷路検査 (表 4)

開架滞在時間において、曝露に関連付けられる変化及び有意差は認められなかった。開架閉架間の移動回数では、パラチオン 0.6 mg/kg/day 単独投与群、メタミドホス 0.8 mg/kg/day 単独投与群及びパラチオン 0.6 mg/kg/day+メタミドホス 0.2 mg/kg/day 複合曝露群のスコアは媒体対照群と同様であった。パラチオン 0.6 mg/kg/day とメタミドホス 0.4 mg/kg/day 複合曝露群では移動回数が減少し、パラチオン 0.6 mg/kg/day とメタミドホス 0.8 mg/kg/day 複合曝露では有意差が認められた。高架式十字迷路検査の結果は表 4 に示す。

4. 体重測定 (表 5)

いずれの試験群においても、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な有意な体重変化はみられなかった。体重の測定結果は表 5 に示す。

5. 血液生化学的検査 (表 6)

いずれの試験群においても、全ての測定項目で溶媒対照群と比較して統計学的に有意な変化はみられなかった。血液生化学的検査の結果は表 6 に示す。

6. コリンエステラーゼ(ChE)活性 (表 7)

全ての有機リン曝露群で血漿の ChE 活性が対照群と比較して 80% 未満に減少し、有意差が認められた。脳の ChE 活性低下も、全ての有機リン曝露群で対照群と比較して有意差がみられたが、パラチオン 0.6 mg/kg/day 単独投与群及びメタミドホス 0.8 mg/kg/day 単独投与群における低下は 90% と僅かであった。一方、パラチオン 0.6 mg/kg/day とメタミドホス 0.2、0.4 あるいは 0.8 mg/kg/day の複合曝露では、51~62% に低下した。ChE 活性の測定結果は表 7 に示す。

7. 免疫学的検査 (表 8)

免疫学的検査の結果、散発的に認められた有意差は偶発性であると思われた。免疫学的検査の結果は表 8 に示す。

8. 臓器重量 (表 9)

臓器重量測定の結果、パラチオン 0.6 mg/kg/day とメタミドホス 0.8 mg/kg/day 複合曝露群の腎臓相対重量、パラチオン 0.6 mg/kg/day とメタミドホス 0.4 mg/kg/day 複合曝露の副腎重量及び全複合曝露群の副腎相対重量が有意に増加した。臓器重量の測定結果は表 9 に示す。

9. 剖検所見

いずれの試験群でも肉眼的異常は観察されなかった。

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、実験上及び評価上の困難性などもあって未解決な問題点が多

く、今後さらなる毒性情報の集積が求められている。2種の有機リン剤の単回投与による複合曝露影響については、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²⁾。さらに有機リン剤の複合投与影響について記載されている文献には、MPP (Fenthion) と DDVP (Dichlorvos) の混合投与による相加毒性作用³⁾、クロルピリフォス (Chlorpyrifos) の先行投与および同時投与によるパラチオン (Parathion) の神経毒性作用増強⁴⁾、フェニトロチオン (Fenitrothion) とカーバメート剤のBPMCの混合投与による致死量の低下⁵⁾などが報告されている。このように、有機リン剤の複合毒性は、それらの曝露状況により相加的あるいは相乗的に多様に作用する可能性が示唆されている。また、近年食品中の残留農薬の成長期の子供への累積曝露影響が懸念され、農薬の反復複合曝露影響調査の重要性が高まっている。そこで本研究では、有機リン剤のパラチオンとメタミドホスの混合剤を調製してラットに2週間反復経口投与し、一般毒性、神経毒性及び免疫毒性関連項目を指標にして両在による複合曝露影響を評価した。

その結果、今回検査した一般毒性指標 (体重、摂餌量、血液生化学的検査、剖検結果) および免疫毒性指標 (胸腺の細胞数測定およびリンパ球サブセット) に著変は認められなかった。

神経毒性学的検査では、パラチオンとメタミドホスの複合曝露によってChE活性阻害作用が増強され、有機リン曝露における鋭敏な臨床指標である縮瞳 (ヒトの代表的自覚症状) の重篤化がみられた。この増強

効果は、パラチオンとの複合曝露下においてはメタミドホスの用量が低下しても明確に認められた。また、筋緊張の低下のような末梢神経性の症状は、速やかに発現して反復投与による耐性が比較的早期に生じ、振戦のような中枢性の症状はやや遅れて発現する傾向が認められた。

自発運動量の測定において複合曝露により測定の後半 (40-60分) でも高い行動活性が残存することが確認された。これはスコポラミンやトリメチル錫によって記憶が障害されたラットの運動パターン⁶⁾に類似するが、記憶障害に伴って通常認められる運動量の増加はみられなかった。よって、ChE活性阻害による副交感神経作用の発現に伴う運動量の低下⁷⁾と、認知機能低下による運動量の増加の相反する作用が混在している可能性が考えられた。症状観察において警戒性低下が認められたことから、さらに認知機能低下について検討するために高架式十字迷路検査を実施した。その結果、抗不安作用を示す薬剤によって増加するといわれる開架滞在時間への影響⁸⁾は認められなかったが、開架/閉架間の移動回数が減少した。このことから、注意力あるいは作業空間記憶に対する複合曝露の影響が疑われた。また、剖検時の臓器重量の測定において、急性ストレスに対する生体反応のひとつである副腎の重量増加が複合曝露によって認められた。急性ストレスがコルチコステロン増加を介して海馬におけるグルタミン酸放出を引き起こし、空間記憶検索に障害を与えるという指摘もあり⁹⁾、複合曝露によるストレスが副腎を活性化して認知行動に影響を与えた可能性も考えられた。

E. 結論

パラチオンとメタミドホスの2種類の有機リン系農薬を2週間にわたり8週齢の雌性ラットに反復経口投与し、一般毒性、神経毒性及び免疫毒性関連項目を指標に複合曝露影響を調査した。その結果、パラチオンとメタミドホスは、それぞれの単独曝露では毒性を示さない用量でも、複合的に反復曝露された場合には神経毒性の発現が増強される可能性が示唆された。

F. 引用文献

- 1) Dubois K. P. (1961). Potentiation of toxicity of organophosphorus compounds. *Adv. Pest. Control Res.*, 4, 117-151.
- 2) WHO (1972). *Pesticide Residue Series*, No.1, Fenthion, Geneva.
- 3) Keranath, 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.
- 4) Miyaoka, T., Tsuda, S., and Shirasu, Y. (1980). Evaluation of interactions among pesticides. *Folia Pharmacol. Jpn.* 76, 148P.
- 5) 財団法人 残留農薬研究所 (2001年) 農林水産省 農薬残留安全評価技術確立事業 農薬相加影響評価技術開発事業「相加毒性評価パラメーターとしての自発運動量測定に関する基礎検討」
- 6) Ymaguchi T., Togashi H., Matsumoto M., and Yoshioka M. (2005). Evaluation of anxiety-related behavior in elevated plus-maze test

and its applications. *Folia Pharmacol. Jpn.* 126, 99-105.

- 7) Wong T. P., Howland J. G., Robillard J. M., Ge Y., Yu W., Titterness A. K., Brebner K., Liu L., Weinberg J., Christie B. R., Phillips A. G., and Wang Y. T. (2007). Hippocampal long-term depression mediates acute stress-induced spatial memory retrieval impairment. *PNAS* 104, 11471-11476.

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 有機リン化合物の複合毒性：ラットにおけるパラチオンおよびメタミドホス混合剤の反復経口投与毒性：首藤 康文、福山 朋季、藤江 秀彰、小嶋 五百合、富田 真理子、小坂 忠司、原田 孝則 第36回日本トキシコロジー学会学術年会（盛岡、2009 演題登録済）

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 Detailed clinical observation - Mortality and group mean score in female rats

Group	Signs	Day 4	Day 8	Day 12
Paration 0 mg/kg/day + Metamidophos 0 mg/kg/day (Vehicle Control)	Mortality	0/8 a	0/8	0/8
	Trmor	0.00 b	0.00	0.00
	Alertness	0.00	0.00	0.00
	Muscle tone	0.13	0.38	0.25
	Reactivity of handling	0.00	0.00	0.00
Paration 0.6 mg/kg/day + Metamidophos 0 mg/kg/day	Mortality	0/8	0/8	0/8
	Trmor	0.00	0.00	0.00
	Alertness	0.00	0.13	-0.13
	Muscle tone	0.38	0.38	0.38
	Reactivity of handling	0.00	0.00	0.00
Paration 0.6 mg/kg/day + Metamidophos 0.2 mg/kg/day	Mortality	0/8	0/8	0/8
	Trmor	0.00	0.00	0.00
	Alertness	0.13	0.13	-0.13
	Muscle tone	0.13	0.13	0.13
	Reactivity of handling	0.13	0.00	0.00
Paration 0.6 mg/kg/day + Metamidophos 0.4 mg/kg/day	Mortality	0/8	0/8	0/8
	Trmor	0.25	0.00	0.75
	Alertness	-0.38	-0.13	0.00
	Muscle tone	-0.13	0.00	-0.13
	Reactivity of handling	0.00	0.00	0.00
Paration 0.6 mg/kg/day + Metamidophos 0.8 mg/kg/day	Mortality	0/8	0/8	0/8
	Trmor	0.50	0.75	0.75 *
	Alertness	-0.25	-0.38	-0.50
	Muscle tone	-0.38	-0.25	0.00
	Reactivity of handling	0.00	0.00	0.00
Paration 0 mg/kg/day + Metamidophos 0.8 mg/kg/day	Mortality	0/8	0/8	0/8
	Trmor	0.00	0.00	0.00
	Alertness	0.00	0.00	0.00
	Muscle tone	0.13	0.38	0.13
	Reactivity of handling	0.00	0.00	0.00

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

b; Mean score

Significantly different from vehicle control group: *, $p <= 0.05$ (Mann-Whitney *U*-test).

Table 2 Motor activity - Group mean values in female rats

Group	Time		Day 4	%	Day 8	%	Day 12	%
Paration 0 mg/kg/day + Metamidophos 0 mg/kg/day (Vehicle Control)	Start - 20 minutes	Mean	1642	76	1717	82	1797	84
		S.D.	886		459		568	
	20 - 40 minutes	Mean	283	13	255	12	158	7
		S.D.	476		357		146	
	40 - 60 minutes	Mean	231	11	121	6	197	9
		S.D.	415		218		297	
Total	Mean	2155		2092		2152		
	S.D.	1539		927		942		
Paration 0.6 mg/kg/day + Metamidophos 0 mg/kg/day	Start - 20 minutes	Mean	1784	94	1801	81	1759	74
		S.D.	715		489		588	
	20 - 40 minutes	Mean	44	2	337	15	477 *	20
		S.D.	62		449		296	
	40 - 60 minutes	Mean	79	4	88	4	140	6
		S.D.	119		196		190	
Total	Mean	1907		2227		2376		
	S.D.	775		902		787		
Paration 0.6 mg/kg/day + Metamidophos 0.2 mg/kg/day	Start - 20 minutes	Mean	1821	82	1651	78	1468	70
		S.D.	634		615		491	
	20 - 40 minutes	Mean	186	8	241	11	538 **	26
		S.D.	182		261		289	
	40 - 60 minutes	Mean	217	10	221	10	78	4
		S.D.	330		362		125	
Total	Mean	2224		2113		2083		
	S.D.	740		695		585		
Paration 0.6 mg/kg/day + Metamidophos 0.4 mg/kg/day	Start - 20 minutes	Mean	1375	72	1369	68	1161 *	61
		S.D.	573		291		421	
	20 - 40 minutes	Mean	432	23	307	15	276	15
		S.D.	253		320		306	
	40 - 60 minutes	Mean	363	19	340 *	17	464	24
		S.D.	400		160		405	
Total	Mean	1907		2016		1901		
	S.D.	775		628		897		
Paration 0.6 mg/kg/day + Metamidophos 0.8 mg/kg/day	Start - 20 minutes	Mean	1371	72	1317	67	1357	70
		S.D.	599		471		528	
	20 - 40 minutes	Mean	374	20	325	16	290	15
		S.D.	306		350		168	
	40 - 60 minutes	Mean	419	22	330	17	305	16
		S.D.	415		260		228	
Total	Mean	1907		1972		1951		
	S.D.	775		1001		681		
Paration 0 mg/kg/day + Metamidophos 0.8 mg/kg/day	Start - 20 minutes	Mean	1770	87	1593	74	1286	76
		S.D.	694		688		702	
	20 - 40 minutes	Mean	229	11	394	18	367	22
		S.D.	429		637		572	
	40 - 60 minutes	Mean	27	1	176	8	45	3
		S.D.	43		402		103	
Total	Mean	2027		2163		1697		
	S.D.	988		1582		1241		

%; Mean value / Total value x 100

S.D.; Standard deviation.

Significantly different from vehicle control group: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ (Student *t*-test).

Table 3 Pupil size - Group mean values in female rats

Group	Side		Day 4 (mm)	Day 8 (mm)	Day 12 (mm)
Paration 0 mg/kg/day +	Left	Mean	0.9	0.9	0.8
		S.D.	0.1	0.1	0.1
Metamidophos 0 mg/kg/day (Vehicle Control)	Right	Mean	0.9	0.9	0.9
		S.D.	0.1	0.1	0.1
Paration 0.6 mg/kg/day +	Left	Mean	0.8	0.9	0.8
		S.D.	0.2	0.1	0.1
		%	89	100	100
Metamidophos 0 mg/kg/day	Right	Mean	0.8 *	0.9	0.9
		S.D.	0.2	0.1	0.1
		%	89	100	100
Paration 0.6 mg/kg/day +	Left	Mean	0.5 **	0.6 **	0.6
		S.D.	0.1	0.1	0.2
		%	56	67	75
Metamidophos 0.2 mg/kg/day	Right	Mean	0.5 **	0.6 **	0.7 *
		S.D.	0.2	0.1	0.2
		%	56	67	78
Paration 0.6 mg/kg/day +	Left	Mean	0.4 **	0.4 **	0.3 **
		S.D.	0.1	0.1	0.1
		%	44	44	38
Metamidophos 0.4 mg/kg/day	Right	Mean	0.4 **	0.4 **	0.3 **
		S.D.	0.2	0.2	0.1
		%	44	44	33
Paration 0.6 mg/kg/day +	Left	Mean	0.3 **	0.2 **	0.2 **
		S.D.	0.1	0.1	0.1
		%	33	22	25
Metamidophos 0.8 mg/kg/day	Right	Mean	0.4 **	0.2 **	0.2 **
		S.D.	0.1	0.1	0.1
		%	44	22	22
Paration 0 mg/kg/day +	Left	Mean	0.4 **	0.3 **	0.6 **
		S.D.	0.1	0.1	0.1
		%	44	33	75
Metamidophos 0.8 mg/kg/day	Right	Mean	0.4 **	0.3 **	0.7 **
		S.D.	0.1	0.1	0.2
		%	44	33	78

S.D.; Standard deviation.

%; Mean value of the group / Mean value of control group x 100

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

Table 4 Elevated plus-maze - Group mean values in female rats

Group		Open time (%)	Movement between arms (counts)
Paration 0 mg/kg/day	Mean	44	3.6
+ Metamidophos 0 mg/kg/day (Vehicle Control)	S.D.	27	1.2
Paration 0.6 mg/kg/day	Mean	43	4.0
+ Metamidophos 0 mg/kg/day	S.D.	23	1.4
Paration 0.6 mg/kg/day	Mean	20	3.4
+ Metamidophos 0.2 mg/kg/day	S.D.	12	1.6
Paration 0.6 mg/kg/day	Mean	35	2.3
+ Metamidophos 0.4 mg/kg/day	S.D.	27	1.4
Paration 0.6 mg/kg/day	Mean	59	2.1 *
+ Metamidophos 0.8 mg/kg/day	S.D.	39	1.2
Paration 0 mg/kg/day	Mean	53	3.9
+ Metamidophos 0.8 mg/kg/day	S.D.	25	1.2

S.D.; Standard deviation.

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

Table 5 Body weight - Group mean values in female rats

Group	Day	1 (g)	4 (g)	7 (g)	10 (g)	14 (g)
Paration 0 mg/kg/day + Metamidophos 0 mg/kg/day (Vehicle Control)	Mean	228	237	244	249	258
	S.D.	12	8	8	11	12
Paration 0.6 mg/kg/day + Metamidophos 0 mg/kg/day	Mean	229	232	239	247	254
	S.D.	13	15	15	15	19
Paration 0.6 mg/kg/day + Metamidophos 0.2 mg/kg/day	Mean	229	232	240	242	249
	S.D.	14	15	14	13	14
Paration 0.6 mg/kg/day + Metamidophos 0.4 mg/kg/day	Mean	229	231	236	241	248
	S.D.	15	12	11	17	19
Paration 0.6 mg/kg/day + Metamidophos 0.8 mg/kg/day	Mean	229	228	236	244	251
	S.D.	15	14	17	18	18
Paration 0 mg/kg/day + Metamidophos 0.8 mg/kg/day	Mean	228	231	237	241	250
	S.D.	12	15	15	18	18

S.D.; Standard deviation.

Table 6 Blood biochemistry - Group mean values in female rats

Group		ALP (U/L)	AST (U/L)	ALS (U/L)	GGTP (U/L)	Creat (mg/dL)	BUN (mg/dL)	TP (g/dL)	Alb (g/dL)	Glob (g/dL)	A/G ratio	Gluc (mg/dL)	T.Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)	T.Bil (mg/dL)
Paration 0 mg/kg/day +	Mean	542	84	44	1	0.30	19.5	6.04	4.40	1.65	2.70	156	61	82	0.05
Metamidophos 0 mg/kg/day (Vehicle Control)	S.D.	77	83	44	1	0.02	3.8	0.13	0.15	0.17	0.33	7	7	36	0.02
Paration 0.6 mg/kg/day +	Mean	553	60	29	1	0.29	19.6	6.11	4.49	1.62	2.78	258	64	75	0.05
Metamidophos 0 mg/kg/day	S.D.	102	9	5	1	0.02	1.4	0.20	0.13	0.08	0.10	7	6	36	0.01
Paration 0.6 mg/kg/day +	Mean	60	26	1	0	0.30	19.1	6.10	4.42	1.69	2.63	156	67	47	0.06
Metamidophos 0.2 mg/kg/day	S.D.	84	4	3	0	0.03	1.2	0.19	0.16	0.13	0.22	10	8	19	0.01
Paration 0.6 mg/kg/day +	Mean	622	63	27	1	0.29	19.0	5.95	4.42	1.53	2.90	153	63	60	0.06
Metamidophos 0.4 mg/kg/day	S.D.	98	5	4	1	0.02	1.7	0.15	0.09	0.12	0.24	13	6	31	0.01
Paration 0.6 mg/kg/day +	Mean	673	61	28	1	0.27	17.8	5.92	4.26	1.66	2.57	156	67	53	0.06
Metamidophos 0.8 mg/kg/day	S.D.	112	5	3	1	0.03	1.2	0.15	0.11	0.07	0.11	10	9	10	0.01
Paration 0 mg/kg/day +	Mean	543	55	28	1	0.28	18.6	6.13	4.47	1.66	2.71	152	65	65	0.05
Metamidophos 0.8 mg/kg/day	S.D.	79	6	4	1	0.04	1.8	0.19	0.13	0.11	0.18	6	6	28	0.01

S.D.; Standard deviation.

Table 7

Cholinesterase activity - Group mean values in female rats

Group		Plasma (U/L)	Brain (U/L)
Paration 0 mg/kg/day	Mean	2817	354
+ Metamidophos 0 mg/kg/day (Vehicle Control)	S.D.	726	20
Paration 0.6 mg/kg/day	Mean	2118 *	318 *
+ Metamidophos 0 mg/kg/day	%	75	90
	S.D.	323	34
Paration 0.6 mg/kg/day	Mean	1308 **	219 **
+ Metamidophos 0.2 mg/kg/day	%	46	62
	S.D.	283	37
Paration 0.6 mg/kg/day	Mean	1204 **	180 **
+ Metamidophos 0.4 mg/kg/day	%	43	51
	S.D.	261	15
Paration 0.6 mg/kg/day	Mean	952 **	191 **
+ Metamidophos 0.8 mg/kg/day	%	34	54
	S.D.	199	18
Paration 0 mg/kg/day	Mean	2127 *	317 **
+ Metamidophos 0.8 mg/kg/day	%	76	90
	S.D.	434	24

S.D.; Standard deviation.

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

%; Mean value of the group / mean value of control group x 100

Bold; Less than 80% of control value.

Table 8

Flow cytometric analysis of thymic lymphocyte - Group mean values in female rats

Group		Cellularity /rat ($\times 10^7$)	Number of thymic lymphocyte ($\times 10^7$ /rat)			
			Immature cells		Mature cells	
			DN cell (CD4-8-)	DP cell (CD4+8+)	helper-Tcell (CD4+CD8-)	Cytotoxic-Tcell (CD4-CD8+)
Paration 0 mg/kg/day +	Mean	4.6	2.5	240.0	33.8	12.9
Metamidophos 0 mg/kg/day (Vehicle Control)	S.D.	1.4	0.9	85.4	11.7	3.7
Paration 0.6 mg/kg/day +	Mean	4.2	2.8	219.1	27.6	10.5
Metamidophos 0 mg/kg/day	S.D.	1.0	0.7	63.0	7.0	2.3
Paration 0.6 mg/kg/day +	Mean	5.8	3.8 *	315.5	36.4	12.5
Metamidophos 0.2 mg/kg/day	S.D.	1.5	0.9	82.8	9.7	2.8
Paration 0.6 mg/kg/day +	Mean	5.2	5.3 **	268.5	36.2	11.8
Metamidophos 0.4 mg/kg/day	S.D.	1.5	1.8	81.4	15.2	4.4
Paration 0.6 mg/kg/day +	Mean	4.5	3.6	220.4	28.8	8.6 *
Metamidophos 0.8 mg/kg/day	S.D.	2.0	1.6	102.5	16.5	3.9
Paration 0 mg/kg/day +	Mean	4.7	4.0	236.4	32.9	9.0
Metamidophos 0.8 mg/kg/day	S.D.	1.3	1.7	64.3	15.7	5.0

S.D.; Standard deviation.

Significantly different from vehicle control group: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ (Student *t*-test).

Table 9 Organ weight - Group mean values in female rats

Group			Body weight (g)	Brain (mg)	Thymus (mg)	Spleen (mg)	Liver (g)	Kidney (mg)	Adrenals (mg)
Paration 0 mg/kg/day	Organ weight	Mean	258	1813	416	708	9.44	1696	82.7
		S.D.	12	84	72	79	0.88	101	7.8
+									
Metamidophos 0 mg/kg/day (Vehicle Control)	Relative weight	Mean		0.704	0.161	0.275	3.66	0.657	0.0321
		S.D.		0.048	0.026	0.032	0.28	0.041	0.0031
+									
Paration 0.6 mg/kg/day	Organ weight	Mean	254	1773	385	683	9.01	1744	88.3
		S.D.	19	101	64	140	1.02	163	10.3
+									
Metamidophos 0 mg/kg/day	Relative weight	Mean		0.701	0.151	0.268	3.55	0.687	0.0348
		S.D.		0.036	0.019	0.043	0.25	0.027	0.0026
+									
Paration 0.6 mg/kg/day	Organ weight	Mean	249	1808	440	666	8.79	1749	90.4
		S.D.	14	80	67	71	0.80	149	7.5
+									
Metamidophos 0.2 mg/kg/day	Relative weight	Mean		0.729	0.177	0.268	3.53	0.705	0.0365 *
		S.D.		0.050	0.025	0.022	0.16	0.059	0.0030
+									
Paration 0.6 mg/kg/day	Organ weight	Mean	248	1828	425	721	8.67	1712	92.7 *
		S.D.	19	50	63	81	0.71	137	10.1
+									
Metamidophos 0.4 mg/kg/day	Relative weight	Mean		0.740	0.172	0.292	3.50	0.691	0.0376 *
		S.D.		0.047	0.024	0.035	0.09	0.035	0.0050
+									
Paration 0.6 mg/kg/day	Organ weight	Mean	251	1849	451	701	8.80	1833	89.2
		S.D.	18	79	111	68	1.02	186	8.5
+									
Metamidophos 0.8 mg/kg/day	Relative weight	Mean		0.741	0.179	0.281	3.51	0.730 **	0.0357 *
		S.D.		0.058	0.035	0.032	0.18	0.028	0.0030
+									
Paration 0 mg/kg/day	Organ weight	Mean	250	1801	436	662	8.98	1736	82.6
		S.D.	18	83	96	89	0.84	207	5.4
+									
Metamidophos 0.8 mg/kg/day	Relative weight	Mean		0.724	0.173	0.265	3.59	0.695	0.0332
		S.D.		0.057	0.030	0.029	0.14	0.073	0.0028

Relative weight; Organ weight / body weight x 100

S.D.; Standard deviation.

Significantly different from vehicle control group: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ (Student *t*-test).

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）
平成 20 年度分担研究報告書

食品中化学物質の複合影響に及ぼす代謝活性化に関する研究
「種々食品中化学物質の CYP3A サブファミリー酵素誘導能の評価」

研究分担者 出川 雅邦 静岡県立大学 薬学部教授
研究協力者 関本 征史 静岡県立大学 薬学部助教

研究要旨

ヒト肝臓の薬物代謝において中心的な役割を占める CYP3A4 酵素は、核内受容体であるプレグナン X 受容体 (PXR) の活性化を介して誘導されることが知られており、PXR 活性化能を有する化合物の検索解する上で重要である。そこで、本研究では、ヒト PXR 活性化物質検索用レポーター細胞株 (HepG2-PXRLucA3) を樹立し、これを用いて 4 種の食品添加物の PXR 活性化能を検索した。

まず、ヒト CYP3A4 遺伝子プロモーターの PXR 結合配列を含む領域のルシフェラーゼレポーターベクターを作成し、ヒト PXR 強制発現ベクターと共にヒト肝がん細胞株 HepG2 に導入することでヒト PXR 活性化物質レポーター細胞株 HepG2-PXRLucA3 を樹立した。この HepG2-PXRLucA3 は、PXR 活性化をルシフェラーゼアッセイにより、CYP3A4 遺伝子発現を RT-PCR 法により、CYP3A 酵素活性を p450-Glo assay によりそれぞれ測定することができる。また、本樹立細胞株では、検体化合物による PXR の活性化と CYP3A 酵素誘導との間に高い相関性が得られることより、PXR の活性化を指標とすることで検体化合物のヒト CYP3A 酵素誘導能を予測できる。

そこで、HepG2-PXRLucA3 株を用いて、食品添加物（クルクミン (CUR)、チアベンダゾール (TBZ)、没食子酸プロピル (PG)、ブチルヒドロキソトルエン (BHT)) のヒト PXR 活性化に対する影響について検討した。また、既知のヒト PXR 活性化物質としては、リファンピシン (PIF) を使用した。その結果、用いた 4 種の食品添加物のうち TBZ のみに、弱い PXR 活性化能が見られた。また、TBZ は RIF との同時処理により、濃度依存的に PXR 活性化を促進した。一方、CUR、PG あるいは BHT は、RIF による PXR 活性化をそれぞれ濃度依存的に阻害した。以上、本研究で用いた 4 種の食品添加物はいずれもヒト PXR 活性化、さらに、CYP3A 酵素の発現誘導に影響を及ぼすことを示した。

A. 研究目的

プレグナン X 受容体 (PXR) は、異物や一部の医薬品によって活性化される核内受容体型転写因子の一種であり、薬物代謝酵素シトクロム P450 (CYP) 3A4 や薬物排泄トランスポーターMDR1 など、薬物動態に関わる遺伝子の発現調節に重要な役割を果たしている。CYP3A4 や MDR1 の発現変動は薬物相互作用の原因となることから、食品中の化学物質による PXR 活性化能の明らかとすることは、これら化学物質の安全性を評価する上で重要である。

本研究では、PXR の活性化を予測できるレポーター細胞株を樹立し、その有用性を確認した。さらに、この新規レポーター細胞株を用いて食品添加物の CYP3A 酵素誘導能を評価した。

B. 研究方法

1) 試験細胞株の樹立

ヒト CYP3A4 遺伝子プロモーターに存在する PXR 結合配列を含んだ 2 か所の転写調節領域 (-7836 ~ -7208、-362 ~ +53) を、ルシフェラーゼ遺伝子の 5' 上流に組み込んだレポータープラスミドを作成し、ヒト PXR 強制発現プラスミドとともにヒト肝がん由来の培養細胞株 HepG2 に導入した。薬剤によるセレクションおよび細胞のクローニングを行って得られたクローンに、既知のヒト PXR リガンドであるリファンピシン (RIF) を処理し、PXR の活性化をルシフェラーゼアッセイにより測定した。その結果、最も高い反応性を示したクローン A3 をヒト PXR レポーター細胞株 HepG2-PXRLucA3 として樹立した。

2) 被検化合物

本研究では、ヒト PXR リガンドとしてリファンピシン (RIF) およびクロトリマゾール (CLO) を、齧歯類の PXR リガンドとしてデキサメタゾン (DEX) およびプレグネノロン 16 α -カルボニトリル (PCN) を用いた (図 1A、1B)。また、HepG2-PXRLucA3 の有用性の確認のため、CYP3A 酵素を誘導することが知られる化合物として、フェノバルビタール (PB)、ニカルジピン (NIC)、ニフェジピン (NIF)、タモキシフェン (TAM)、トログリタゾン (TRO)、オメプラゾール (OME)、ヒドロコルチゾン (HC) を使用した (図 1C)。

また、肝薬物代謝酵素を誘導することが知られている 4 種の食品添加物として、クルクミン (CUR)、チアベンダゾール (TBZ)、ブチルヒドロキシトルエン (BHT) および没食子酸プロピル (PG) を被検体とし (図 1D)、PXR 活性化能および CYP3A 酵素誘導能を測定した。

なお、各化合物はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して使用した。

3) PXR 活性化能の測定

HepG2-PXRLucA3 細胞を 2×10^4 cell/cm² となるように 24 穴プレートに播種し、48 時間前培養した。前培養後、被検物質を添加し、一定時間培養した。その後、Reporter Lysis Buffer (Promega) を用いて細胞を溶解した。この細胞溶解液にルシフェラーゼ基質液 (東洋インキ) を添加し、生じた発光をルミネッセンス PSN (ATTO) により測定した。また、BCA-protein assay kit (PIERCE) を用いて細胞溶解液中のタンパク濃度を測

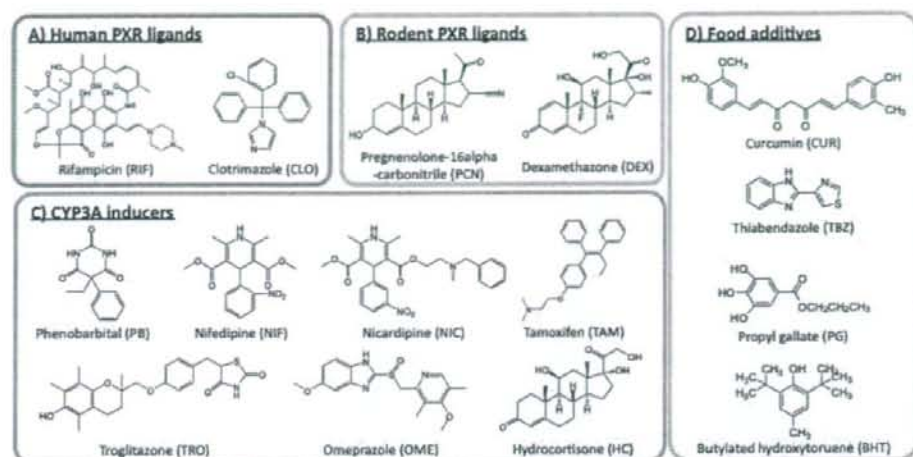


図1 本研究で使用した化合物

定し、タンパクあたりの発光強度を算出した。

4) CYP3A 遺伝子発現量の測定

HepG2-PXRLucA3 細胞を 60mm dish で培養し、化合物を添加して一定時間培養後、Total RNA を ISOGEN (ニッポンジーン) により単離した。この Total RNA より、ランダムヘキサマーと MMLV-逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。この cDNA に、ヒト CYP3A4 またはヒト GAPDH プライマーセット、および SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) を添加し、7300/7500 Real Time PCR system (Applied Biosystems) によりリアルタイム PCR を行った。さらに、CYP3A4 遺伝子の発現量を GAPDH 遺伝子の発現量で除することにより標準化した。

5) CYP3A 酵素アッセイ

本研究では、CYP3A 酵素活性を p450-Glo CYP3A4 assay kit (Promega 社) により測定した。本キットは、CYP3A4、

CYP3A5 および CYP3A7 の基質となる Luciferin-6'-pentafluorobenzyl ether の脱アルキル化を酵素活性の指標とするものである。

HepG2-PXRLucA3 細胞を 96well plate で培養し、化合物を添加して一定時間培養した。細胞を洗浄後、50 μ M の基質を含む無血清培地を 60 μ L/well の割合で加え、37°C で 4時間培養した。その後、上清 50 μ L をとり、50 μ L の Luciferin Detection Reagent と混合し、代謝物に由来する発光を測定した。また、各 well に残存した細胞の細胞溶解液を調製し、蛋白質濃度を測定することにより、タンパク質 1mg 当たりの酵素活性を算出した。

6) 倫理面への配慮

申請者ならびに研究協力者の健康保持のため、本研究で使用する化合物、各実験で使用する薬品は、安全キャビネット等で厳重に注意して取り扱った。また、使用した薬品のうち有害物質を含むものについては、環境への拡散がないように注意した。

C. 研究結果

1) ヒト PXR リガンド処理時の濃度依存的な PXR 活性化および CYP3A 酵素誘導

HepG2PXR-LucA3 に対し、リファンピシン (RIF) を処理し、PXR 活性化の経時的变化を解析したところ、24 時間後に最も強く PXR 活性化が見られた。この有意な PXR 活性化は 0.3 μM 以上の RIF を処理した場合に認められた。また、RIF 処理 24 時間後の CYP3A4 遺伝子発現、または 72 時間後の CYP3A 酵素活性の RIF 濃度依存性について検討したところ、CYP3A4 遺伝子発現は 1 μM より、CYP3A 酵素活性は 10 μM より、濃度依存的な増加が認められた。

次に、RIF 処理時の PXR 活性化と CYP3A4 遺伝子発現量および CYP3A 酵素活性との相関関係を解析したところ、それぞれ正の相関が見られた。このことから、RIF 処理時には、ルシフェラーゼ活性の誘導を指標として CYP3A 酵素の誘導を簡便かつ迅速に予測可能であることが示された。

2) 種々 CYP3A 酵素誘導剤処理時の PXR 活性化および CYP3A 酵素誘導

次に HepG2-PXRLucA3 を用いて、ヒトまたはラット CYP3A 酵素を誘導することが報告されている、図 1 に示した 11 種の化合物について、PXR 活性化能を評価した。その結果、ヒト PXR 活性化剤 (RIF、CLO) および用いた全ての CYP3A 酵素誘導剤でヒト PXR の活性化が確認された。一方、ラット CYP3A 酵素誘導剤 (DEX、PCN) によるヒト PXR 活性化は認められなかった。さらに、これら 11 化合物の CYP3A 遺伝子発現量を測定したところ、PXR 活性化誘導バ

ターンと類似した CYP3A4 遺伝子の発現誘導が観察された。

次に、各化合物処理時の PXR 活性化と CYP3A4 遺伝子発現量との相関関係を解析したところ、両パラメータは正の相関を示した。このことから、RIF だけでなく、ルシフェラーゼ活性の誘導を指標として被検化合物の CYP3A 酵素誘導能を簡便かつ迅速に予測可能であることが示された。

3) PXR 活性化に及ぼす食品添加物の影響

HepG2-PXRLucA3 細胞株が化学物質のヒト肝における PXR 活性化能ならびに CYP3A 酵素誘導能を予測する上で極めて有用であることが確認されたため、代表的な食品添加物として知られる CUR、TBZ、PG、BHT の 4 化合物のヒト PXR 活性化に及ぼす影響について検討した。

CUR 単独処理では、用いたいずれの濃度でも PXR の活性化に影響を及ぼさなかった。一方、10 μM CUR を RIF と同時処理すると、RIF による PXR 活性化を有意に抑制した。なお、100 μM の CUR 処理により顕著な細胞死が認められた。

TBZ は、10 μM あるいは 100 μM の濃度で単独処理することで、わずかではあるが有意に PXR 活性化を惹起した。RIF による PXR 活性化は、1 μM 以上の TBZ と同時処理することで、添加した TBZ の濃度に依存して増強された。

PG や BHT は、いずれの濃度で単独処理しても PXR の活性化を引き起こさなかった。RIF による PXR 活性化は、10 μM 以上の PG あるいは BHT と同時処理することで、抑制された。

D. 考察

本研究にて樹立したレポーター細胞株 HepG2-PXRLucA3 は、ヒト CYP3A4 遺伝子の PXR 結合領域とルシフェラーゼ遺伝子を連結させたレポーター細胞株としてヒト PXR の発現プラスミドと共に HepG2 細胞に導入することで得られたクローンである。

HepG2-PXRLucA3 のリガンド応答性について、各種濃度の RIF を用いて検討したところ、PXR 活性化では 0.3 μM から、CYP3A4 遺伝子発現では 1 μM から、また CYP3A 酵素活性では 10 μM から濃度依存的な誘導が確認でき、PXR 活性化と CYP3A 酵素誘導との間には強い相関関係が認められた。種々 CYP3A 酵素誘導剤を用いた検討からも、PXR 活性化と CYP3A 酵素誘導の間には強い相関関係が見られたことから、本細胞株を用いたレポーター活性の変動を指標として CYP3A 酵素誘導を予測できることが可能と考えられた。

これまでに、PXR 活性化物質を検索できるレポーター細胞株として、DPX-2 細胞 (Yueh MF, 2005 ; Trubetskoy O, 2005) や 3-1-10 細胞 (Noracharttiyapot W 2006 ; Matsubara T, 2007) が樹立されている。これら細胞株と今回樹立した HepG2-PXRLucA3 細胞株の PXR リガンドに対する応答性を、有意なルシフェラーゼ活性を示す最低濃度で比較したところ、DPX-2 では 0.1 μM 、3-1-10 では 1 μM であるのに対して、HepG2-PXRLucA3 では 0.3 μM であり、本細胞株は既存の細胞株と比較しても遜色のない感度を有することが確認された。

また、DPX-2 については、本細胞と同様に遺伝子発現、酵素活性の誘導が確認さ

れているが、DPX-2 における CYP3A4 遺伝子の発現誘導は最大で 5 倍に過ぎず、他の CYP3A サブファミリー酵素の発現も確認されていない。これらの点から、HepG2-PXRLucA3 は PXR 活性化、CYP3A サブファミリー酵素遺伝子発現、あるいは CYP3A 酵素活性を感度よく、かつ一斉に分析することができる優れた細胞株であると考えられる。

HepG2-PXRLucA3 を用いて、CYP3A 酵素誘導に対する食品添加物 (CUR, TBZ, PG および BHT) の影響について検討したところ、TBZ は単独で PXR 活性化能を示し、かつ RIF による PXR 活性化を増強したのに対し、他の化合物はいずれも単独作用はなく、RIF による PXR 活性化を抑制するといった結果が得られた。

これまでに、TBZ の単独処理によるヒト CYP3A 酵素誘導や PXR 活性化については既に報告されており、本研究の結果はこれを支持するものであった。また、RIF による PXR 活性化に対する TBZ の増強作用についてはこれまで全く報告されておらず、本研究で見られた現象は非常に興味深い。

CUR については、最近ヒト初代肝細胞において CYP3A4 遺伝子の誘導作用を示すことや、PXR 活性化を惹起することが報告されている一方で、誘導及び活性化は見られないとする報告もあり、統一した見解が得られていない。特に CUR については毒性が強いため、毒性との関わりを考えた検討が必要であると考えられた。

また、RIF による PXR 活性化に対して、CUR, PG および BHT はいずれも抑制作用を示した。RIF による PXR 活性化に対する

食品添加物の複合影響について検討した例はなく、本研究結果は非常に興味深いものと思われた。

E. 結論

本研究ではヒト CYP3A 酵素誘導を簡便に予測できるレポーター細胞株 HepG2-PXRLucA3 を樹立し、この細胞を用いて4種の食品添加物 (CUR, TBZ, PG および BHT) のヒト CYP3A4 酵素誘導への影響を検討した。その結果、各食品添加物には CYP3A4 酵素の発現誘導に影響及ぼす性質があることが示唆された。

今後さらに、他の食品添加物についても、CYP3A4 酵素の発現誘導に及ぼす影響を検討することが必要であり、複合影響を踏まえた安全性評価系の構築が重要と考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

佐野慎亮、関本征史、矢部香織、根本清光、出川雅邦：ヒト PXR 活性化物質検索用レポーター細胞株 HepG2-PXRLucA3 の樹立

日本薬学会 129 年会 (京都)、
2009 年 3 月 28 日

佐野慎亮、関本征史、矢部香織、根本清光、出川雅邦：ヒトプレグナン X 受容体活性化物質検索用レポーター細胞株の樹立

平成 20 年度日本薬学会東海支部例会
(静岡)、2008 年 12 月 5 日

関本征史、根本清光、西川秋佳、出川雅邦：3-メチルコラントレンによる HepG2 細胞での CYP1A 酵素誘導に及ぼす食品添加物の影響。

第 35 回日本トキシコロジー学会(東京)、
2008 年 6 月 26 日

G. 知的財産権の出願

(予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし