

発現への影響

I3C と Hes の単独投与群と複合投与群により、血清の GOT、GPT 値の減少がみられたが、体重、肝重量変化、および肝・腎の病理組織学的異常所見は観察されなかった。

Microarray 解析により変動した遺伝子数は単独投与群と比較して、複合投与群に多かった(高濃度複合投与群 408 個、低濃度複合投与群 259 個、I3C 単独投与群 87 個、Hes 単独投与群 109 個)。複合投与において変動の大きかったアポトーシス関連遺伝子は、Ghrl、Cish、Shh、Hhip、Fgf8、Mapk8 の発現上昇、Bcl6、Cyp26b1、Trib3、Bach2、Snai2、Igfbp1 の発現低下であった。また、薬物代謝関連遺伝子は Lpo、Mt3 の発現上昇が観察された。

(2) Q と C mix の複合投与による影響

Q と C mix の低濃度複合投与により、コレステロール値上昇をみたが、体重、肝重量変化、および肝・腎の病理組織学的異常所見は観察されなかった。

変動遺伝子数の変化は単独投与群と複合投与群間で大きな差はなかった。複合投与において変動の大きかったストレス・毒性関連遺伝子は、Mt1、Mt2 の発現上昇、Hspa1b の発現低下であった。CYP 関連遺伝子では CYP26b1 の発現低下を認めた。アポトーシス関連遺伝子は、Fos、Cidea、Nr4a1 の発現上昇、Hspa1a の発現低下を認めた。

D. 考察

前年度に引き続き、2 種類の化学物質を複合投与した際のマウス肝臓におけるストレス・毒性、薬物代謝酵素の発現についてマイクロアレイを用いて解析した。

I3C はアブラナ科の植物に含有しており、アポトーシス誘導作用や、抗腫瘍活性(乳がん、前立腺がん、肝がん、膵臓がん)、免疫賦活活性などが報告されている。一方、Hes はポリフェノールの一種で柑橘類の皮などに含有しており、

主に血管系に関する生理作用が報告されている。この両者の複合投与により、単独投与時に比べて変動遺伝子数は著しく、変動した遺伝子に関しては、細胞の増殖、分化、アポトーシス、ストレス応答に係わる Mapk8、成長ホルモンの分泌や摂食に係わる Ghrl の発現上昇や、細胞の分化、増殖、アポトーシス、DNA 損傷修復の制御に係わる癌原遺伝子 Bcl6 や、Akt (インスリン作用) 活性阻害因子である Trib3、レチノイン酸分解酵素である Cyp26b1、骨成長の促進、細胞増殖・分化促進、タンパク質同化に係わる Igfbp1 などの発現低下が観察された。複合投与によるこれらの遺伝子変動が、生体にどのような効果を及ぼすかさらなる検討が必要であるが、単独投与と比較して異なる効果が得られることが考えられた。

Q はケッパー(1,800 mg/kg)、タマネギ(350 mg/kg)、プロッコリー、ブドウなど野菜や果物に多く含有しており、抗酸化作用、抗炎症作用、抗腫瘍作用などが報告されている。一方、catechin は緑茶の渋み成分として含有量は EGCg>EGC>ECg>EC の順で、実験においてはこれら 4 種の混合物を用いた。Catechin においては抗酸化作用、抗癌作用、血中コレステロール低下作用、抗菌作用、抗アレルギー作用が報告されている。これら両者の複合および単独投与による変動遺伝子数には変化が見られなかった。抗酸化活性の強い catechin (EGCG) は、ある種の抗がん剤と複合投与するとその効力を阻害する可能性があるとの報告がある (Blood. 113:5927-5937, 2009)。さらに quercetin についても同様の報告がされている (Blood 112: 3835-3846, 2008)。本実験においては、両者の複合投与による変動遺伝子数に及ぼす影響は見られなかったが、単独で強い生理活性を示す Catechin や quercetin などのフラボノイドにおける複合での使用は様々な面を考慮しなければならないことが示唆された。

E. 結論

二つの実験の複合投与による血液生化学的、病理学的変化は認められなかった。

I3C と Hes の実験に関しては、I3C に比べ Hes 投与によるマウス肝ストレス・毒性、薬物代謝、アポトーシスに係る遺伝子発現の変動は顕著でなく、両物質の生理活性の相違によるものと推察された。しかし、複合投与することによってそれらの遺伝子変動が増加したことから、両物質の複合投与の発がん（抑制）を含む健康への影響が示唆された。

Q と C mix の実験に関しては、マウス肝ストレス・毒性、薬物代謝、アポトーシスに係る遺伝子発現の変動は、単独投与群と複合投与群間に差はなく、単独で強い抗酸化作用や生理作用を有する両物質においては、複合投与における影響は乏しいと推察された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 田中卓二、尾山 武：大腸発がんにおける炎症反応。分子細胞治療 8: 175-181 (2009).
- 2) Yumiko Yasui, Mihye Kim, Takeru Oyama, and Takuji Tanaka: Colorectal carcinogenesis and suppression of tumor development by inhibition of enzymes and molecular targets. *Curr. Enzyme Inhibition*, 5: 1-26 (2009).
- 3) Takeru Oyama, Yumiko Yasui, Shigeyuki Sugie, and Takuji Tanaka: Preclinical assays for identifying natural cancer chemopreventive agents. *Scholarly Research Exchange*, vol. 2009, Article ID 475963, doi:10.3814/2009/475963 (2009).
- 4) Daniel W. Rosenberg, Charles Giardina, and Takuji Tanaka: Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 30: 183-196 (2009).
- 5) Takuji Tanaka: Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. *J. Carcinogenesis* 8: 5 (2009).
- 6) Takeru Oyama, Yumiko Yasui, and Takuji Tanaka: Breast cancer chemoprevention: current perspectives. *Curr. Enzyme Inhibition*, 5: 198-208 (2009).
- 7) Takuji Tanaka, Yumiko Yasui, Mayu Tanaka, Takahiro Tanaka, Takeru Oyama, and KM Wahidur Rahman: Melatonin suppresses AOM/DSS-induced large bowel oncogenesis in rats. *Chem.-Biol. Interact.*, 177: 128-136 (2009).
- 8) Mihye Kim, Shingo Miyamoto, Yumiko Yasui, Takeru Oyama, Akira Murakami, and Takuji Tanaka: Zerumbone, a tropical ginger sesquiterpene, inhibits colon and lung carcinogenesis in mice. *Int. J. Cancer*, 124: 264-271 (2009).
- 9) Masahito Shimizu, Yohei Shirakami, Junpei Iwasa, Makoto Shiraki, Yoichi Yasuda, Kazuya Hata, Yoshinobu Hirose, Hisashi Tsurumi, Takuji Tanaka, and Hisataka Moriwaki: Supplementation with branched-chain amino acids inhibits azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in male C57BL/KsJ-db/db mice. *Clin. Cancer Res.*, 15: 3068-3075 (2009).
- 10) Michiko Yasuda, Takashi Nishizawa, Hajime Ohigashi, Takuji Tanaka, De-Xing Hou, Nancy H. Colburn, and Akira Murakami: Linoleic acid metabolite suppresses skin inflammation and tumor promotion in mice: Possible roles of programmed cell death 4 induction. *Carcinogenesis*, 30: 1209-1216 (2009).
- 11) Takeshi Toyoda, Tetsuya Tsukamoto, Shinji Takasu, Naoki Hirano, Hisayo Ban, Liang Shi, Toshiko Kumagai, Takuji Tanaka and

Masae Tatematsu: Pitavastatin fails to lower serum lipid levels or inhibit gastric carcinogenesis in Helicobacter pylori-infected rodent models. *Cancer Prev. Res.*, 2: 751-758 (2009).

12) Yumiko Yasui and Takuji Tanaka: Protein expression analysis of inflammation-related colon carcinogenesis. *J. Carcinogenesis*, 8: 10 (2009).

13) Kazuto Yoshimi, Takuji Tanaka, Akiko Takizawa, Megumi Kato, Masumi Hirabayashi, Tomoji Mashimo, Tadao Serikawa, and Takashi Kuramoto: Enhanced colitis-associated colon carcinogenesis in a novel Apc-mutant rat. *Cancer Sci.*, 100: 2022-2027 (2009).

14) Takeru Oyama, Yumiko Yasui, Shigeyuki Sugie, Mamoru Koketsu, Kunitomo Watanabe, and Takuji Tanaka: Dietary tricetin suppresses inflammation-related colon carcinogenesis in male Crj: CD-1 mice. *Cancer Prev. Res.*, 2: 1031-1038 (2009).

2. 著書

1) 安井由美子、田中卓二：予防医学とカロテノイド。カロテノイドの科学と最新応用技術、宮下和夫監修、東京、シーエムシー出版, pp. 153-160 (2009).

2) Takuji Tanaka: Toxicological carcinogenesis. In: Manfred Schwab (Ed.), *Encyclopedia of Cancer*, 2nd Edition, Vol. 4 (Q-Z), Springer-Verlag, Berlin, pp. 3008-3010 (2009).

3) Yumiko Yasui, Mihye Kim, and Takuji Tanaka: Metabolic syndrome and cancer development In: Olatunde Farombi (Ed.), *Nutritional Antioxidants in Cancer and Degenerative Diseases*, in press, Research Signpost, Kerala (India), in press (2009).

3. 学会発表

1) 尾山 武、安井由美子、杉江茂幸、渡邊邦友、田中卓二：Tricinによる炎症関連大腸発がん抑制効果。第25回日本毒性病理学会、浜松、(2009年1月)

2) 豊田武士、塚本徹哉、高須伸二、時 亮、田中卓二、立松正衛：Helicobacter pylori感染動物モデルにおけるピタバスタチンの胃発癌および血清脂質動態への影響。第25回日本毒性病理学会、浜松、(2009年1月)。

3) 杉江茂幸、尾山 武、安井由美子、田中卓二：MelQx投与後長期飼育におけるF344ラットの心臓病変。第25回日本毒性病理学会、浜松、(2009年1月)

4) Takeru Oyama, Yumiko Yasui, Miharuru Kamide, Sotoe Yamamoto, Shigeyuki Sugie, and Takuji Tanaka: A flavone, tricetin, suppresses colitis-associated mouse colon carcinogenesis. 9th Korea-Japan Symposium on Cancer and Ageing Research. DamYang Resort, South Korea, (2009年3月)

5) Mihye Kim, Shingo Miyamoto, Yumiko Yasui, Takeru Oyama, Akira Murakami, Shigeyuki Sugie, and Takuji Tanaka: Dietary zeranolone inhibits colon and lung carcinogenesis in mice. 9th Korea-Japan Symposium on Cancer and Ageing Research. DamYang Resort, South Korea, (2009年3月)

6) Takuji Tanaka: Preclinical bioassays for chemoprevention studies on inflammation- and obesity-related colonic oncogenesis. International Conference on Dietary and Chemical Cancer Prevention: Basic Research and Clinical. Taipei, (2009年4月)

7) 中田有香、緒方 衝、片山博徳、前田昭太郎、佐藤勝明、尾山 武、田中卓二、卜部省悟、横山繁生、河合俊明：腹腔原発 Deciduioid

- mesothelioma (DCM)の4例.第98回日本病理学会総会、京都、(2009年5月)
- 8) 尾山 武、安井由美子、杉江茂幸、田中卓二 : Tricinによる炎症関連大腸発がん抑制とその機序の検討. 第98回日本病理学会総会、京都、(2009年5月)
 - 9) 田中卓二: 合同シンポジウム2-食道化学予防の基礎研究.がん予防大会2009愛知(第16回日本がん予防学会、第32回日本がん疫学研究会、第10回日本がん分子疫学研究会)、(2009年6月)
 - 10) 村上 明、古川育代、宮本真吾、田中卓二、大東 肇 : ターメリック成分 turmerones と curcumin のマウス大腸発がん抑制作用. がん予防大会2009愛知(第16回日本がん予防学会、第32回日本がん疫学研究会、第10回日本がん分子疫学研究会)、(2009年6月)
 - 11) 塚本徹哉、時 亮、豊田武士、高須伸二、斎藤典子、斎藤亜弓、山本昌美、平田暁大、立松正衛、田中卓二. Cyclooxygenase-2 阻害剤 Etodolac による DSS 誘発 Min マウス大腸腫瘍の抑制効果. がん予防大会2009愛知(第16回日本がん予防学会、第32回日本がん疫学研究会、第10回日本がん分子疫学研究会)、(2009年6月)
 - 12) 尾山 武、安井由美子、杉江茂幸、田中卓二、渡邊邦友 : Tricin による炎症関連大腸発がん抑制とその分子機構の検討. がん予防大会2009愛知(第16回日本がん予防学会、第32回日本がん疫学研究会、第10回日本がん分子疫学研究会)、(2009年6月)
 - 13) 三好規之、安井由美子、若尾陽平、鈴木あずさ、田中卓二、大島寛史. 「ヤムイモ」(山薬) およびその含有成分ジオスゲニンによる大腸がん発がんの予防. がん予防大会2009愛知(第16回日本がん予防学会、第32回日本がん疫学研究会、第10回日本がん分子疫学研究会)、(2009年6月)
 - 14) 安井由美子、田中卓二、三上奈々、細川雅史、宮下和夫. Astaxanthin による炎症を背景としたマウス大腸発がん抑制効果. がん予防大会2009愛知(第16回日本がん予防学会、第32回日本がん疫学研究会、第10回日本がん分子疫学研究会)、(2009年6月)
 - 15) 島崎猛夫、石垣靖人、夏 啓勝、中谷直喜、友杉直久、田中卓二、川上和之、源 利成、元雄良治 : GSK3 β 阻害剤と塩酸ゲムシタピンの併用による膵癌の新規治療戦略と分子基盤. 第40回日本膵臓病学会大会、東京、(2009年7月)
 - 16) 細川雅史、安井由美子、三瓶雄司、三上奈々、宮下和夫、田中卓二 : アスタキサンチンの DSS 誘発性マウス大腸炎および大腸発がんに対する抑制効果 ; 第23回カロテノイド研究談話会、仙台、(2009年9月)
 - 17) Masahito Shimizu, Junperi Iwasa, Takuji Tanaka, and Hisataka Moriwaki: Supplementation with branched-chain amino acids suppresses diethylnitrosamine-induced liver carcinogenesis in obese mice. 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, (2009年10月)
 - 18) Miki Katsurano, Tohru Niwa, Satoshi Yamashita, Takuji Tanaka, and Toshikazu Ushijima: Ulcerative colitis induces aberrant DNA methylation in mouse colonic epithelia and develops an epigenetic field defect. 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, (2009年10月)
 - 19) Yoichi Yasuda, Masahito Shimizu, Hiroyasu Sakai, Yohei Shirakami, Takuji Tanaka, and Hisataka Moriwaki: Supplementation with branched-chain amino acids suppresses obesity and diabetes-related mouse colon carcinogenesis. 68th Annual Meeting of the

- Japanese Cancer Association, (2009年10月)
- 20) Takuji Tanaka, Yumiko Yasui, Takeru Oyama, and Shigeyuki Sugie: Colorectal cancer chemoprevention by beta-cyclodextrin inclusion compounds of auraptene and 4'-geranyloxyferulic acid. 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, (2009年10月)
- 21) Tetsuya Tsukamoto, Ling Shi, Takashi Toyoda, Shinji Takasu, Noriko saito, Ayumi Saito, Moriaki Kusakabe, Takuji Tanaka, and Masae Tatematsu: Prevention of inflammation-associated colonic tumorigenesis in Min mice with a cyclooxygenase-2 inhibitor. 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, (2009年10月)
- 22) Hiroyuki Kohno and Takuji Tanaka: Suppression of inflammation-related colon carcinogenesis in the Apc^{Min/+} mice by a COX-2 inhibitor and a PPAR ligand. 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, (2009年10月)
- 23) Takeru Oyama, Yumiko Yasui, Shigeyuki Sugie, Kunitomo Watanabe, and Takuji Tanaka: Dietary flavonoid tricetin suppresses colitis-associated mouse colon carcinogenesis. 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, (2009年10月)
- 24) Yumiko Yasui, Masashi Hosokawa, Kazuo Miyashita, and Takuji Tanaka: Astaxanthin inhibits colitis-related colon carcinogenesis in mice. 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, (2009年10月)
- 25) Shigeyuki Sugie, Takeru Oyama, Yumiko Yasui, and Takuji Tanaka: Effect of BITC and PEITC on BBN-induced urinary bladder carcinogenesis in male F344 rats. 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, (2009年10月)
- 26) 田中卓二: 特別講演 消化器癌からみた機能性食品. 第7回日本機能性食品医用学会, 広島, (2009年12月)
- 27) 田中卓二: 特別講演 炎症関連大腸発がんモデルの作出とその発がん・化学予防研究への活用. 関西実験動物研究会・第104回研究会, 京都, (2009年12月)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
該当無し。
 2. 実用新案登録
該当無し。
 3. その他
該当無し。

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

食品中の複数の化学物質による健康影響に関する調査研究

分担研究課題： 残留農薬の複合影響による神経・免疫毒性に関する研究

I. 神経毒性に関する研究

若齢ラットにおける有機リン系農薬パラチオン及びメタミドホスの複合暴露影響

| | | | |
|-------|-------|-------------|---------------|
| 研究分担者 | 原田孝則 | (財) 残留農薬研究所 | 毒性部 |
| 研究協力者 | 首藤康文 | (財) 残留農薬研究所 | 毒性部神経毒性研究室 |
| | 葩島淳子 | (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 |
| | 小松豊 | (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 |
| | 富田真理子 | (財) 残留農薬研究所 | 毒性部病理研究室 |
| | 小坂忠司 | (財) 残留農薬研究所 | 毒性部免疫・急性毒性研究室 |

研究要旨

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3週齢の若齢雌性ラットに2週間にわたり反復経口投与し、神経毒性関連項目を指標に複合暴露影響を検索した。その結果、パラチオン高用量群で体重抑制及び肝臓重量減少といった全身状態の低下が示唆された。パラチオン、メタミドホス、複合暴露とも高用量で中枢コリンエステラーゼ (ChE) 活性阻害作用が認められたが、複合暴露による増強はなく、毒性は相加的であると判断された。若齢と成獣ラットにおける成績を比較すると、単剤、複合暴露ともに毒性の質的差はないと考えられた。しかしながら、神経症状の発現及び ChE 活性の阻害は若齢の方が軽度であった。投与期間を通じた瞳孔径の推移から、若齢では有機リン剤暴露に対する耐性が生じ難いと思われた。60 分間の自発運動量減少の割合から、成獣と同様に若齢でも単剤の高用量暴露群及び複合暴露群における落着き難さが認められた。さらに、成獣及び若齢動物における単剤の高用量暴露群及び複合暴露群で認められた落着き難さの原因を精査するために、成獣の高用量複合暴露群について追加検査を実施した。その結果、中枢における酸化ストレスが増加していたが、学習能力及び知覚神経機能に障害が無いことを確認した。

- A. 研究目的
- 農薬の複合毒性に対する社会的関心は高
- いものの、実験及び評価が困難であるという理由から毒性情報の蓄積が不足している。

特に近年懸念されている食品中の残留農薬の乳幼児・子供への累積暴露影響に関しては不明な点が多く、今後の研究課題である。従って、これらの課題を解明することは社会的かつ医学的に有意義であると考えられる。本研究は、有機リン剤などの殺虫剤を対象に、食品中の残留農薬が複合的に反復暴露された場合の一般毒性影響、神経系及び免疫系への影響について実験動物を用いて調査し、ヒト健康影響へのリスク評価に必要の基礎的毒性情報を収集する事を目的とした。平成21年度では、社会的に話題となっている2種の有機リン剤を若齢動物に複合的に反復暴露し、神経毒性関連項目を指標に相加・相乗毒性の有無を検索した。

B. 研究方法

本研究では、2種の有機リン系殺虫剤のパラチオンとメタミドホスを組合せ、若齢雌性ラットに複合的に2週間反復経口投与し、以下の実験条件下で神経毒性関連項目を指標として複合暴露影響を検索した(実験1)。尚、成獣と幼若における用量群を対応させて毒性影響の差を検討するために、成獣に対する追加用量群の投与を、実験1に併せて実施した。

さらに本年度は、行動変化の原因を精査するために、成熟雌性ラットの高用量複合暴露群について追加検査を実施した(実験2)。

実験1

1. 被験物質

本試験の被験物質として、有機リン剤のパラチオン (Parathion、O,O-Diethyl O-4-Nitrophenyl Phosphorothioate、99.6%、

和光純薬工業株式会社) 及びメタミドホス (Methamidophos、O,S-Dimethyl Phosphoramidothioate、99.7%、和光純薬工業株式会社) を使用した。被験物質は受領後冷蔵庫(許容範囲1~10°C)で保管した。

2. 試験動物

日本クレア株式会社富士生育場(静岡県)で生産されたWistar Hannover系SPFラット(BrlHan:WIST@Jcl[GALAS])の雌を試験に用いた。実験1では3週齢にて60匹購入し、試験環境に3日間馴化させた後、投与を開始した。馴化期間中毎日一般状態を観察した。動物は温度 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、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。投与開始日に全ての動物の体重を測定し、体重値に基づいた層別無作為抽出法で各用量群に8匹ずつ配分し、群分けを実施した。群分け後の個体識別は耳鑑札法で行なった。基礎飼料には保証飼料MF粉末(オリエンタル酵母工業株式会社)を用い、ステンレス鋼製粉末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(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残留農薬研究所で定める倫理規定に従い実施した。

3. 試験群

有機リン剤の主作用であるコリンエステラーゼ活性阻害に対する神経毒性学的最大耐量は、血漿中活性が20%を超えて低下し、そして脳内活性の低下が20%未満になる用

量に相当すると考えられる。成獣（8週齢）雌性 Wistar Hannover 系 SPF ラットを用いた予備実験から、パラチオン 0.6 mg/kg/day、メタミドホス 0.8 mg/kg/day がこれにあたりと判断した。また、この用量による複合投与によって脳内コリンエステラーゼ活性の低下が引き起こされることも確認した。これらの実験結果に基づいて、若齢（3週齢）ラットに対する複合暴露群として、パラチオン 0.3 mg/kg/day とメタミドホス 0.4 mg/kg/day 及びパラチオン 0.6 mg/kg/day とメタミドホス 0.8 mg/kg/day の 2 用量を設けて複合毒性変化を確認した。対照群としては、媒体対照群（0 mg/kg/day）、パラチオン 0.6 mg/kg/day あるいは 1.2 mg/kg/day 単剤暴露群及びメタミドホス 0.8 mg/kg/day あるいは 1.6 mg/kg/day 単剤暴露群の 5 群を設け、合計 7 群で実験を行った。

さらに、成獣と若齢の暴露影響を比較するために、媒体対照群（0 mg/kg/day）、パラチオン 1.2 mg/kg/day 単剤暴露群、メタミドホス 1.6 mg/kg/day 単剤暴露群及びパラチオン 0.3 mg/kg/day とメタミドホス 0.4 mg/kg/day を平成 20 年度に実施した成獣（8週齢）における暴露影響の追加実験として実施した。（実験方法は平成 20 年度報告書参照）

4. 被験物質投与液の調製

各用量の被験物質投与液を週に 1 回調製し、投与容量は 4 mL/kg とした。所定量の被験物質を秤量した後、パラチオンはコーン油にて 0、0.15、0.3、0.6 mg/mL の濃度に、メタミドホスは 1% Tween80 水溶液（Tween80、和光純薬工業株式会社）にて 0、0.2、0.4、0.8 mg/mL の濃度に溶解あるいは

懸濁させ、この 2 液を 1:1 にてスターラーで懸濁して、各実験群の投与液を調製した。各投与液は小分けし、冷蔵・遮光（5°C）条件下にて保存し、投与直前に室温に戻して使用した。

5. 一般状態の観察

全動物について、投与期間中 1 日 1 回瀕死状態ないし死亡の有無を観察した。

6. 機能検査

全動物について、投与 4 日、8 日及び 12 日に詳細な症状の観察を実施した。観察は、ケージ内あるいは外（オープンフィールド）で、成獣にて変化が認められた以下の項目を対象に実施し、それらの程度をスコアリングして記録した。

詳細な症状の観察項目：振戦、警戒性、筋緊張、取り扱いに対する反応

また、観察終了後に、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 1 時間、自発運動量を測定した。測定結果は前、中、後半の各 20 分間及び 1 時間合計値を集計した。

さらに、自発運動量測定後に、目盛付き拡大鏡（Spiegel measure）を用いて左右の瞳孔径を測定した。

7. 明暗箱検査

全動物について、投与 2 週時に、狭い暗箱と広い明箱で構成されている受動回避試験装置（SHUTAVOID, Panlab. s.l.）を利用して明暗箱検査を実施した。明暗箱検査では、暗箱及び明箱の滞在時間と移動回数を測定して抗不安や危険判断能力について評

価した。

8. 体重

全動物について、投与開始時（0日）、投与4日、8日、12日及び殺処分前に、体重を測定した。

9. 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、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（日本電子株式会社）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。

10. 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、肝臓

11. 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、肝臓

12. 有意差検定

各検査項目について、対照群と各被験物質暴露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、明暗箱検査項目、ChE活性、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暴露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暴露群間における平均順位の有無を判定した。

実験2

1. 被験物質

本試験の被験物質として、有機リン剤のパラチオン（Parathion、O,O-Diethyl O-4-Nitrophenyl Phosphorothioate、99.6%、和光純薬工業株式会社）及びメタミドホス（Methamidophos、O,S-Dimethyl Phosphoramidothioate、99.7%、和光純薬工業株式会社）を使用した。被験物質は受領後冷蔵庫（許容範囲1~10°C）で保管した。

2. 試験動物

日本クレア株式会社富士生育場（静岡県）で生産されたWistar Hannover系SPFラット（BrlHan:WIST@Jcl[GALAS]）の雌を試験に用いた。7週齢にて20匹購入し、試験環境に6日間馴化した後、8週齢で投与を開始した。馴化期間中毎日一般状態を観察した。動物は温度22 ± 2°C、湿度50 ±

20%、換気回数 10 回以上/時間（オールフレッシュエア方式）、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。投与開始日に全ての動物の体重を測定し、体重値に基づいた層別無作為抽出法で複合暴露群と溶媒対照群に 8 匹ずつ、学習検査陽性対照群に 4 匹配分し、群分けを実施した。群分け後の個体識別は被毛染色法で行なった。基礎飼料には保証飼料 MF 粉末（オリエンタル酵母工業株式会社）を用い、ステンレス鋼製粉末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（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残留農薬研究所で定める倫理規定に従い実施した。

3. 試験群

パラチオン 0.6 mg/kg/day とメタミドホス 0.8 mg/kg/day の高用量複合暴露群と媒体対照群（0 mg/kg/day）を設けた。また、学習検査の陽性対照として、投与開始日にトリメチルスズ（TMT）10 mg/kg を単回投与した TMT 群を設けた。

4. 被験物質投与液の調製

被験物質投与液を週に 1 回調製した。投与容量は 4 mL/kg とした。所定量の被験物質を秤量した後、パラチオンはコーン油にて 0、0.3 mg/mL の濃度に、メタミドホスは 1% Tween80 水溶液（Tween80、和光純薬工業株式会社）にて 0、0.4 mg/mL の濃度に溶解あるいは懸濁させ、この 2 液を 1:1 にてスターラーで懸濁して、各実験群の投与液を調製した。各投与液は小分けし、冷蔵・

遮光（5°C）条件下にて保存し、投与直前に室温に戻して使用した。TMT 群の投与液は投与開始日に TMT を 2 mg/mL の濃度となるように 0.5%メチルセルロースナトリウム水溶液に溶解して調製し、5 mL/kg の容量で投与した。

5. 一般状態の観察

全動物について、投与期間中 1 日 1 回瀕死状態ないし死亡の有無を観察した。

6. 機能検査

投与 4 日、8 日及び 12 日に、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 1 時間、自発運動量を測定した。測定結果は前、中、後半の各 20 分間及び 1 時間合計値を集計した。

さらに、投与 13 日に 60°C に設定した熱板式鎮痛効果測定装置（HOT PLATE ANALGESIA METER MK-350、室町機械株式会社）を用いて知覚（痛覚）検査を行った。

7. 学習記憶検査

投与 2 週にモーリス水迷路検査を実施した。投与 8 日から 1 日 4 回、4 日間連続して学習試行を行い、プラットホームへの到達時間と 60 秒以内での到達率を測定した。さらに、5 日目にはプラットホームを取り去って、プラットホームが存在した 4 分円区域（標的領域）での滞在時間と侵入回数を測定して学習記憶機能について評価した。

8. 体重

全動物について、投与開始時（0 日）、投

与4日、8日、12日及び殺処分前に、体重を測定した。

9. 中枢神経の酸化ストレス検査

中枢神経系における酸化ストレス検査として、2週間反復投与終了後の全動物の海馬について、グルタチオン濃度測定を実施した。エーテル麻酔下で開腹し、後大静脈より放血した各動物から脳を摘出し、左右に切り分けた後、右脳から海馬を摘出して重量を測定した。この海馬について HT Glutathione Assay Kit (TREVIGEN Inc.) を用いて総グルタチオン及び酸化型グルタチオン濃度を測定して、中枢神経における酸化ストレスを評価した。

さらに病理組織学的検索の必要性を考慮して、左脳は10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

10. 有意差検定

各検査項目について、対照群と各被験物質暴露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、明暗箱検査項目、学習記憶機能検査項目、中枢神経の酸化ストレス検査項目について、Student-*t* 検定を実施して対照群と各暴露群間における有意差の有無を判定した。

C. 研究結果

実験1

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 単剤暴露群、メタミドホス 0.8 mg/kg/day 単剤暴露群及びパラチオン 0.3 mg/kg/day+メタミドホス 0.4 mg/kg/day 複合暴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 1.2 mg/kg/day 単剤暴露群では投与4日から12日、メタミドホス 1.6 mg/kg/day 単剤暴露群では投与4日から8日、パラチオン 0.6 mg/kg/day+メタミドホス 0.8 mg/kg/day 複合暴露群では投与4日に振戦が認められた。各観察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、メタミドホス 1.6 mg/kg/day 単剤暴露群では投与4日の測定において前半(測定開始-20分)の運動量が有意に減少した。また、測定の後半(40-60分)における運動量は、投与4日から12日におけるメタミドホス 1.6 mg/kg/day 単剤暴露群及び投与4日におけるパラチオン 0.6 mg/kg/day+メタミドホス 0.8 mg/kg/day 複合暴露群で有意に増加した。さらに有意差は認められなかったものの、投与12日におけるパラチオン 1.2 mg/kg/day 単剤暴露群でも23%と高い行動活性が認められた。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 単剤暴露群では、投与期間を通して媒体対照群とほぼ同様であった。その他の全暴露群では有意な縮瞳が認められ、メタミドホス 1.6 mg/kg/day 単剤暴露群及びパラチオン 0.6 mg/kg/day+メタミドホス 0.8 mg/kg/day 複合暴露群で重篤だった。各実験群における縮瞳の程度は投与期間を通して変化しなかった。瞳孔径の測定結果は表3に示す。

3. 明暗箱検査 (表4)

明箱滞在時間において、投与に関連すると思われる変化及び有意差は認められなかった。明暗箱間の移動回数では、パラチオン 0.3 mg/kg/day+メタミドホス 0.4 mg/kg/day 複合暴露群で移動回数が有意に増加したが、パラチオン 0.6 mg/kg/day+メタミドホス 0.8 mg/kg/day 複合暴露では対照群と同程度であったため、偶発的な変動であると考えられた。明暗箱検査の結果は表4に示す。

4. 体重測定 (表5)

パラチオン 1.2 mg/kg/day 単剤暴露群は軽度な増加抑制を示し、投与14日では溶媒対照群と比較して有意差が認められた。その他の試験群では、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. コリンエステラーゼ(ChE)活性 (表6)

血漿の ChE 活性は、パラチオン 1.2 mg/kg/day 及びメタミドホス 1.6 mg/kg/day 単剤暴露群、パラチオン 0.6 mg/kg/day+メタミドホス 0.8 mg/kg/day 複合暴露群において有意差が認められ、溶媒対照群の 80% 未満に低下した。パラチオン 0.3 mg/kg/day+メタミドホス 0.4 mg/kg/day 複合暴露群では有意差は認められなかったが、対照群の 79%に低下した。

脳の ChE 活性は、パラチオン 1.2 mg/kg/day 単剤暴露群において溶媒対照群の 80%未満に低下し、有意差も認められた。メタミドホス 0.8 mg/kg/day 及び 1.6 mg/kg/day 単剤暴露群、パラチオン 0.6 mg/kg/day+メタミドホス 0.8 mg/kg/day 複

合暴露群では有意差は認められたが、その値は対照群の 80%以上だった。ChE 活性の測定結果は表7に示す。

6. 臓器重量 (表7)

脳重量測定の結果、パラチオン 1.2 mg/kg/day 単剤暴露群とパラチオン 0.3 mg/kg/day+メタミドホス 0.4 mg/kg/day 及びパラチオン 0.6 mg/kg/day+メタミドホス 0.8 mg/kg/day 複合暴露群の相対重量が有意に増加した。肝臓重量は、パラチオン 1.2 mg/kg/day 単剤暴露群で絶対及び相対値とも有意に増加した。臓器重量の測定結果は表7に示す。

7. 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。

実験2

1. 一般状態

溶媒対照群及びパラチオン 0.6 mg/kg/day+メタミドホス 0.8 mg/kg/day 複合暴露群ともに、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13及び14)

パラチオン 0.6 mg/kg/day+メタミドホス 0.8 mg/kg/day 複合暴露群の自発運動量測定の結果、投与4日から12日にかけて測定後半(40-60分)における運動量が有意に増加した。陽性対照群として設定した TMT10 mg/kg 単回暴露群では、投与後8日及び12日とも60分間の測定期間を通して高度な運動量増加が認められた。測定結果は表13に示す。

知覚機能への影響を調べるために熱板式鎮痛効果測定装置を用いて実施したホットプレート検査の結果、パラチオン 0.6 mg/kg/day+メタミドホス 0.8 mg/kg/day 複合暴露群及びTMT10 mg/kg 単回暴露群ともに溶媒対照群と比較して有意な影響は認められなかった。ホットプレート検査の結果は表 14 に示す。

3. 学習記憶検査 (表 15)

学習記憶能力への影響を調べるために実施したモーリス水迷路検査の結果、パラチオン 0.6 mg/kg/day+メタミドホス 0.8 mg/kg/day 複合暴露群では、記憶の獲得能力を測定する Training trial、記憶の保持能力を測定する Probe trial、遊泳能力による検査結果への影響を確認する Cue test のいずれにおいても溶媒対照群と比較して有意な影響は認められなかった。モーリス水迷路検査の結果は表 15 に示す。

4. 中枢神経の酸化ストレス検査 (表 16)

中枢神経系における酸化ストレスへの影響を調べるために実施した海馬のグルタチオン濃度測定の結果、パラチオン 0.6 mg/kg/day+メタミドホス 0.8 mg/kg/day 複合暴露群では、溶媒対照群と比較して総グルタチオン濃度が有意に増加していた。酸化グルタチオン濃度は有意差は認められなかったが、陽性対照であるTMT 10 mg/kg 単回暴露群と同程度まで増加していた。グルタチオン濃度の測定結果は表 16 に示す。

5. 体重測定 (表 17)

投与期間を通して、パラチオン 0.6 mg/kg/day+メタミドホス 0.8 mg/kg/day 複

合暴露群と溶媒対照群の体重に有意な変化は認められなかった。TMT 10 mg/kg 単回暴露群では投与 4 日に有意な減少が、投与 8 日及び 14 日には有意な増加が認められた。体重の測定結果は表 17 に示す。

D. 考察

実験 1

農薬の複合毒性（相加・相乗毒性）に関する情報の必要性について、従来から社会的に認識されている。そして近年、食品中の残留農薬の成長期の子供への累積暴露影響が懸念され、農薬の反復複合暴露影響調査の重要性が注目されている。特に、有機リン剤の複合毒性は、それらの暴露状況により相加的あるいは相乗的に多様に作用することが知られている¹⁻⁴⁾。

農薬の複合毒性に関する情報のさらなる蓄積が求められているものの、その実験及び評価が困難であること、また未解決な問題点が多いことなどの理由から、情報の収集・蓄積が不足している。

そこで昨年度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 8 週齢の成熟ラットに 2 週間反復経口投与し、複合暴露影響を評価した。本研究では、昨年度と同一条件で 3 週齢のラットに 2 週間反復経口投与し、成獣で影響が強く認められた神経毒性関連項目を主な指標として、ヒトの成長期にあたる若齢ラットに対する複合暴露影響を評価した。

その結果、パラチオン高用量群で体重抑制及び肝臓重量減少といった全身状態の低下が示唆された。パラチオン、メタミドホス、複合暴露とも高用量で中枢 ChE 活性阻害作用が認められたが、複合暴露による増

強はなく、毒性は相加的であると判断された。脳重量測定における相対重量の有意な増加は、体重の変動によるものであり、神経系への作用とは無関係であると考えられた。

今回の若齢ラットにおける成績と平成20年度及び本年度に実施した成獣ラットにおける成績(表8~12)を比較すると、単剤、複合暴露ともに発現する症状は若齢と成獣でほぼ同一であり毒性の質的差はないと考えられた。しかしながら、神経症状の発現は若齢の方が軽度であり、パラチオンの1.2 mg/kg/day単剤暴露では成獣において8例中3例の死亡が生じたが若齢の死亡は認められなかった。血漿及び脳におけるChE活性の阻害も若齢の方が軽度であった。投与期間を通じた瞳孔径の推移から、成獣の単剤及び低用量の複合暴露群で認められた耐性が若齢においては生じ難いと思われた。60分間の自発運動量減少の割合からは、成獣と同様に若齢でも単剤の高用量暴露群及び複合暴露群における落ち着き難さが認められた。

実験2

成獣及び若齢動物における単剤の高用量暴露群及び複合暴露群で、自発運動量の測定後半になっても高い行動活性が残存していた。この落ち着き難さの原因として、有機リン剤の各種エステラーゼ抑制作用⁶⁾あるいは急性ストレスによる注意力あるいは作業空間記憶に対する影響⁷⁾が考えられた。よって、これらの影響を精査するために、成獣の高用量複合暴露群についてモーリス水迷路を用いて空間認知と学習記憶機能を検査すると共に、海馬の組織を採取してグ

ルタチオン濃度測定を実施し中枢の酸化ストレス活性を調べた。また、知覚神経機能に対する影響を確認するために温熱板検査を実施した。

モーリス水迷路検査による学習記憶検査では、陽性対照として設けたTMT10 mg/kg単回暴露群では、Training testの初期における記憶獲得の遅れ、Probe trialにおける標的領域滞在時間の有意な低下が認められ、学習記憶能力への影響が検出された。さらにCue testの逃避潜時も延長していたことから、学習記憶能力及び運動能力双方への障害の検出が可能であることが確認された。一方、複合暴露群ではTraining trial、Probe trial、Cue testのいずれにおいても溶媒対照群と比較して有意な差は認められず、記憶獲得、記憶保持、遊泳の各能力への影響はないと判定された。

海馬のグルタチオン濃度測定による中枢神経の酸化ストレス検査では、複合暴露群の総グルタチオン濃度及び酸化グルタチオン濃度が増加していた。総グルタチオン濃度に占める酸化型の割合は対照群と同程度であったことから、酸化ストレスに対する生体防御反応としてグルタチオンの生成が亢進したと考えられた。

有機リン剤は、エステラーゼの一種である脂肪酸アミノ脱水素酵素(FAAH)の活性阻害作用を示すことが知られている。FAAHは脳内マリファナ類似物質である内在性カンナビノイドの制御に係る⁶⁾。カンナビノイド系の失調は、認知機能障害を引き起こすことが知られており⁸⁾、また、FAAH欠損マウスにおける内在性カンナビノイドは15倍高く、痛覚閾値も高いことが報告されている⁹⁾。今回の熱板式鎮痛効果測定装置を

用いて実施したホットプレート検査では、知覚機能への影響は認められなかったことから、複合暴露群が FAAH の阻害を介したカンナビノイド系の失調を引き起こした可能性は低いと考えられた。

以上の追加検査の成績から、中枢神経における酸化ストレスは明らかに増加していたが、学習能力及び知覚神経機能の障害が成獣及び若齢動物における単剤の高用量暴露群及び複合暴露群の落ち着き難さの原因である可能性は低いことが示唆された。

E. 結論

3 週齢の雌性ラットに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組み合わせ、2 週間反復経口投与し、神経毒性関連項目を指標に複合暴露影響を調査した。その結果、複合暴露による増強はなく、毒性は相加的であると判断された。

若齢と成獣ラットにおける成績を比較すると、単剤、複合暴露ともに毒性の質的差違はないと考えられた。しかしながら、神経症状の発現及び ChE 活性の阻害は若齢の方が軽度であった。投与期間を通じた瞳孔径の推移から、成獣の単剤及び低用量の複合暴露群で認められた耐性は若齢において生じ難いと思われた。60 分間の自発運動量減少の割合から、成獣と同様に若齢でも単剤の高用量暴露群及び複合暴露群における落ち着き難さが認められた。

さらに、成獣及び若齢動物における単剤の高用量暴露群及び複合暴露群で認められた落ち着き難さの原因を精査するために、成獣の高用量複合暴露群について追加検査を実施した。その結果、中枢における酸化ストレスが増加していたが、学習能力及び知覚神経機

能に障害が無いことを確認した。

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) Keranth, 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) Casida J. E. and Nomura D. K., Vose S. D., and Fujioka K. (2008). Organophosphate - Sensitive lipases modulate brain lysophospholipids, ether lipids and endocannabinoids. *Chem. Biol. Interact.* 175: 355-364.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 11471-11476.
- 8) 山本経之 (2007) カンナビノイド受容

体-中枢神経系における役割. Folia. 懇話会 (浦和、2010)
Pharmacol. Jpn. 130, 135-140.

- 9) Benjamin F. Cravatt, Kristin Demarest, Matthew P. Patricelli, Michael H. Bracey, Dan K. Giang, Billy R. Martin, and Aron H. Lichtman (2001). Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 9371-9376.
- H. 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

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及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)

2) 有機リン化合物の複合毒性: 若齢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、齋島 淳子、藤江 秀彰、小松 豊、小嶋 五百合、富田 真理子、小坂 忠司、青山 博昭、原田 孝則 第149回日本獣医学会学術集会 (東京、2010)

3) 有機リン剤の複合暴露におけるコリンエステラーゼ活性と瞳孔径の測定: 藤江 秀彰、小松 豊、齋島 淳子、富田 真理子、小嶋 五百合、首藤 康文、青山 博昭、原田 孝則 日本実験動物技術者協会関東支部総会第35回

Table 1 Detailed clinical observation - Mortality and group mean score in young female rats (Experiment 1)

| 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 |
| | Tremor | 0.00 b | 0.00 | 0.00 |
| | Alertness | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | Muscle tone | 0.13 | 0.13 | 0.13 |
| | 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 |
| | Tremor | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | Alertness | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | Muscle tone | 0.13 | 0.13 | 0.13 |
| | Reactivity of handling | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| Paration 1.2 mg/kg/day + Metamidophos 0 mg/kg/day | Mortality | 0/8 | 0/8 | 0/8 |
| | Tremor | 0.50 * | 0.25 | 0.63 * |
| | Alertness | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | Muscle tone | 0.25 | 0.00 | 0.63 |
| | 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 |
| | Tremor | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | Alertness | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | Muscle tone | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | Reactivity of handling | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| Paration 0 mg/kg/day + Metamidophos 1.6 mg/kg/day | Mortality | 0/8 | 0/8 | 0/8 |
| | Tremor | 0.63 * | 0.25 | 0.00 |
| | Alertness | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | Muscle tone | 0.00 | 0.13 | 0.13 |
| | Reactivity of handling | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| Paration 0.3 mg/kg/day + Metamidophos 0.4 mg/kg/day | Mortality | 0/8 | 0/8 | 0/8 |
| | Tremor | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | Alertness | 0.00 | 0.00 | 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 |
| | Tremor | 0.38 | 0.00 | 0.00 |
| | Alertness | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | Muscle tone | 0.38 | 0.13 | 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: *, $p \leq 0.05$ (Mann-Whitney *U*-test).

Table 2 Motor activity - Group mean values in young female rats (Experiment 1)

| Group | Period | | Day 4 | % | Day 8 | % | Day 12 | % | |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|--------------------|-------|-------|-------|------|--------|------|----|
| Paration 0 mg/kg/day + Metamidophos 0 mg/kg/day (Vehicle Control) | Start - 20 minutes | Mean | 1788 | 90 | 1876 | 92 | 2165 | 81 | |
| | | S.D. | 724 | | 711 | | 587 | | |
| | 20 - 40 minutes | Mean | 182 | 9 | 138 | 7 | 332 | 12 | |
| | | S.D. | 289 | | 193 | | 327 | | |
| | 40 - 60 minutes | Mean | 12 | 1 | 35 | 2 | 178 | 7 | |
| | | S.D. | 24 | | 75 | | 273 | | |
| | Total | Mean | 1982 | | 2050 | | 2675 | | |
| | | S.D. | 858 | | 800 | | 913 | | |
| | Paration 0.6 mg/kg/day + Metamidophos 0 mg/kg/day | Start - 20 minutes | Mean | 1292 | 87 | 1538 | 89 | 1920 | 86 |
| | | | S.D. | 515 | | 534 | | 658 | |
| 20 - 40 minutes | | Mean | 171 | 11 | 154 | 9 | 235 | 10 | |
| | | S.D. | 226 | | 275 | | 308 | | |
| 40 - 60 minutes | | Mean | 28 | 2 | 30 | 2 | 88 | 4 | |
| | | S.D. | 71 | | 46 | | 131 | | |
| Total | | Mean | 1490 | | 1723 | | 2244 | | |
| | | S.D. | 717 | | 573 | | 623 | | |
| Paration 1.2 mg/kg/day + Metamidophos 0 mg/kg/day | | Start - 20 minutes | Mean | 1165 | 84 | 1563 | 80 | 1599 | 64 |
| | | | S.D. | 601 | | 718 | | 762 | |
| | 20 - 40 minutes | Mean | 97 | 7 | 291 | 15 | 316 | 13 | |
| | | S.D. | 114 | | 361 | | 288 | | |
| | 40 - 60 minutes | Mean | 119 | 9 | 107 | 5 | 569 | 23 | |
| | | S.D. | 171 | | 98 | | 500 | | |
| | Total | Mean | 1382 | | 1961 | | 2484 | | |
| | | S.D. | 716 | | 772 | | 1076 | | |
| | Paration 0 mg/kg/day + Metamidophos 0.8 mg/kg/day | Start - 20 minutes | Mean | 1178 | 83 | 1531 | 86 | 1802 | 83 |
| | | | S.D. | 531 | | 578 | | 575 | |
| 20 - 40 minutes | | Mean | 177 | 13 | 157 | 9 | 238 | 11 | |
| | | S.D. | 287 | | 204 | | 559 | | |
| 40 - 60 minutes | | Mean | 60 | 4 | 92 | 5 | 139 | 6 | |
| | | S.D. | 74 | | 164 | | 258 | | |
| Total | | Mean | 1416 | | 1780 | | 2179 | | |
| | | S.D. | 645 | | 617 | | 1042 | | |
| Paration 0 mg/kg/day + Metamidophos 1.6 mg/kg/day | | Start - 20 minutes | Mean | 987 * | 69 | 1451 | 78 | 1688 | 55 |
| | | | S.D. | 559 | | 548 | | 380 | |
| | 20 - 40 minutes | Mean | 206 | 14 | 228 | 12 | 611 | 20 | |
| | | S.D. | 198 | | 358 | | 577 | | |
| | 40 - 60 minutes | Mean | 235 * | 16 | 190 * | 10 | 760 * | 25 | |
| | | S.D. | 257 | | 166 | | 614 | | |
| | Total | Mean | 1428 | | 1869 | | 3059 | | |
| | | S.D. | 853 | | 926 | | 1125 | | |
| | Paration 0.3 mg/kg/day + Metamidophos 0.4 mg/kg/day | Start - 20 minutes | Mean | 1392 | 67 | 1816 | 81 | 1890 | 71 |
| | | | S.D. | 258 | | 515 | | 496 | |
| 20 - 40 minutes | | Mean | 491 | 24 | 357 | 16 | 430 | 16 | |
| | | S.D. | 521 | | 617 | | 447 | | |
| 40 - 60 minutes | | Mean | 185 | 9 | 80 | 4 | 352 | 13 | |
| | | S.D. | 426 | | 183 | | 421 | | |
| Total | | Mean | 2068 | | 2253 | | 2672 | | |
| | | S.D. | 948 | | 1036 | | 1063 | | |
| Paration 0.6 mg/kg/day + Metamidophos 0.8 mg/kg/day | | Start - 20 minutes | Mean | 1283 | 69 | 1295 | 85 | 1578 | 87 |
| | | | S.D. | 643 | | 582 | | 722 | |
| | 20 - 40 minutes | Mean | 231 | 12 | 80 | 5 | 146 | 8 | |
| | | S.D. | 182 | | 170 | | 235 | | |
| | 40 - 60 minutes | Mean | 344 * | 19 | 151 | 10 | 94 | 5 | |
| | | S.D. | 386 | | 176 | | 185 | | |
| | Total | Mean | 1858 | | 1526 | | 1819 | | |
| | | S.D. | 877 | | 680 | | 862 | | |

%; Period mean value / Total mean value x 100

S.D.; Standard deviation.

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

Table 3 Pupil size - Group mean values in young female rats (Experiment 1)

| 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 | 0.2 |
| | | % | | | |
| Metamidophos 0 mg/kg/day (Vehicle Control) | Right | Mean | 1.0 | 0.9 | 0.8 |
| | | S.D. | 0.1 | 0.2 | 0.1 |
| | | % | | | |
| Paration 0.6 mg/kg/day + | Left | Mean | 0.8 | 0.7 | 0.7 |
| | | S.D. | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| | | % | 89 | 78 | 88 |
| Metamidophos 0 mg/kg/day | Right | Mean | 0.9 | 0.8 | 0.7 |
| | | S.D. | 0.2 | 0.1 | 0.2 |
| | | % | 90 | 89 | 88 |
| Paration 1.2 mg/kg/day + | Left | Mean | 0.4 ** | 0.4 ** | 0.4 ** |
| | | S.D. | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| | | % | 44 | 44 | 50 |
| Metamidophos 0 mg/kg/day | Right | Mean | 0.5 ** | 0.4 ** | 0.4 ** |
| | | S.D. | 0.1 | 0.1 | 0.2 |
| | | % | 50 | 44 | 50 |
| Paration 0 mg/kg/day + | Left | Mean | 0.5 ** | 0.4 ** | 0.4 ** |
| | | S.D. | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| | | % | 56 | 44 | 50 |
| Metamidophos 0.8 mg/kg/day | Right | Mean | 0.5 ** | 0.3 ** | 0.4 ** |
| | | S.D. | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| | | % | 50 | 33 | 50 |
| Paration 0 mg/kg/day + | Left | Mean | 0.3 ** | 0.2 ** | 0.3 ** |
| | | S.D. | 0.2 | 0.0 | 0.2 |
| | | % | 33 | 22 | 38 |
| Metamidophos 1.6 mg/kg/day | Right | Mean | 0.3 ** | 0.2 ** | 0.3 ** |
| | | S.D. | 0.2 | 0.1 | 0.2 |
| | | % | 30 | 22 | 38 |
| Paration 0.3 mg/kg/day + | Left | Mean | 0.5 ** | 0.3 ** | 0.5 ** |
| | | S.D. | 0.1 | 0.1 | 0.2 |
| | | % | 56 | 33 | 63 |
| Metamidophos 0.4 mg/kg/day | Right | Mean | 0.5 ** | 0.4 ** | 0.4 ** |
| | | S.D. | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| | | % | 50 | 44 | 50 |
| 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 | 0.3 ** | 0.2 ** | 0.2 ** |
| | | S.D. | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| | | % | 30 | 22 | 25 |

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 Light and dark box test - Group mean values in young female rats (Experiment 1)

| Group | | Light time (%) | Movement between boxes (counts) |
|-------------------------------------------------------|------|----------------|---------------------------------|
| Paration 0 mg/kg/day | Mean | 39 | 8.4 |
| + Metamidophos 0 mg/kg/day (Vehicle Control) | S.D. | 15 | 3.2 |
| Paration 0.6 mg/kg/day | Mean | 51 | 9.3 |
| + Metamidophos 0 mg/kg/day | S.D. | 9 | 1.3 |
| Paration 1.2 mg/kg/day | Mean | 45 | 9.1 |
| + Metamidophos 0 mg/kg/day | S.D. | 6 | 2.0 |
| Paration 0 mg/kg/day | Mean | 44 | 9.6 |
| + Metamidophos 0.8 mg/kg/day | S.D. | 13 | 2.6 |
| Paration 0 mg/kg/day | Mean | 46 | 10.4 |
| + Metamidophos 1.6 mg/kg/day | S.D. | 14 | 3.4 |
| Paration 0.3 mg/kg/day | Mean | 48 | 11.8 * |
| + Metamidophos 0.4 mg/kg/day | S.D. | 8 | 3.0 |
| Paration 0.6 mg/kg/day | Mean | 45 | 8.0 |
| + Metamidophos 0.8 mg/kg/day | S.D. | 10 | 2.5 |

S.D.; Standard deviation.

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