

Table 5 Body weight - Group mean values in young female rats (Experiment 1)

Group	Day	1 (g)	4 (g)	8 (g)	12 (g)	14 (g)
Paration 0 mg/kg/day +	Mean	63	81	109	131	149
Metamidophos 0 mg/kg/day (Vehicle Control)	S.D.	3	3	5	7	9
Paration 0.6 mg/kg/day +	Mean	63	82	109	131	146
Metamidophos 0 mg/kg/day	S.D.	3	4	6	8	9
Paration 1.2 mg/kg/day +	Mean	63	80	105	125	138 *
Metamidophos 0 mg/kg/day	S.D.	3	4	6	6	9
Paration 0 mg/kg/day +	Mean	63	81	107	130	145
Metamidophos 0.8 mg/kg/day	S.D.	3	3	4	5	10
Paration 0 mg/kg/day +	Mean	63	81	107	130	144
Metamidophos 1.6 mg/kg/day	S.D.	3	4	6	6	7
Paration 0.3 mg/kg/day +	Mean	63	80	105	127	142
Metamidophos 0.4 mg/kg/day	S.D.	3	4	4	5	6
Paration 0.6 mg/kg/day +	Mean	63	80	105	130	142
Metamidophos 0.8 mg/kg/day	S.D.	3	3	4	5	7

S.D.; Standard deviation.

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

Table 6 Cholinesterase activity - Group mean values in young female rats (Experiment 1)

Group		Plasma (U/L)	Brain (U/L)
Paration 0 mg/kg/day	Mean	1099	351
+			
Metamidophos 0 mg/kg/day (Vehicle Control)	S.D.	247	17
Paration 0.6 mg/kg/day	Mean	1063	361
+	%	97	103
Metamidophos 0 mg/kg/day	S.D.	80	35
Paration 1.2 mg/kg/day	Mean	732 *	245 **
+	%	67	70
Metamidophos 0 mg/kg/day	S.D.	166	27
Paration 0 mg/kg/day	Mean	883	318 **
+	%	80	91
Metamidophos 0.8 mg/kg/day	S.D.	228	23
Paration 0 mg/kg/day	Mean	628 **	303 **
+	%	57	86
Metamidophos 1.6 mg/kg/day	S.D.	86	25
Paration 0.3 mg/kg/day	Mean	864	332
+	%	79	95
Metamidophos 0.4 mg/kg/day	S.D.	190	35
Paration 0.6 mg/kg/day	Mean	700 **	292 **
+	%	64	83
Metamidophos 0.8 mg/kg/day	S.D.	65	22

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 7 Organ weight - Group mean values in young female rats (Experiment 1)

Group			Body weight (g)	Brain (mg)	Liver (g)
Paration 0 mg/kg/day +	Organ weight	Mean	149	1573	7.21
		S.D.	9	49	0.63
Metamidophos 0 mg/kg/day (Vehicle Control)	Relative weight	Mean		1.06	4.85
		S.D.		0.06	0.18
Paration 0.6 mg/kg/day +	Organ weight	Mean	146	1568	6.89
		S.D.	9	44	0.59
Metamidophos 0 mg/kg/day	Relative weight	Mean		1.08	4.72
		S.D.		0.06	0.20
Paration 1.2 mg/kg/day +	Organ weight	Mean	138 *	1585	6.38 *
		S.D.	9	46	0.65
Metamidophos 0 mg/kg/day	Relative weight	Mean		1.15 *	4.61 *
		S.D.		0.09	0.20
Paration 0 mg/kg/day +	Organ weight	Mean	145	1588	6.70
		S.D.	10	44	0.78
Metamidophos 0.8 mg/kg/day	Relative weight	Mean		1.10	4.61
		S.D.		0.07	0.29
Paration 0 mg/kg/day +	Organ weight	Mean	144	1569	6.88
		S.D.	7	40	0.40
Metamidophos 1.6 mg/kg/day	Relative weight	Mean		1.09	4.77
		S.D.		0.07	0.25
Paration 0.3 mg/kg/day +	Organ weight	Mean	142	1589	6.65
		S.D.	6	33	0.41
Metamidophos 0.4 mg/kg/day	Relative weight	Mean		1.12 *	4.69
		S.D.		0.04	0.17
Paration 0.6 mg/kg/day +	Organ weight	Mean	142	1602	6.81
		S.D.	7	19	0.79
Metamidophos 0.8 mg/kg/day	Relative weight	Mean		1.13 *	4.78
		S.D.		0.05	0.36

Relative weight; Organ weight / body weight x 100

S.D.; Standard deviation.

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

Table 8 Detailed clinical observation - Mortality and group mean score in adult female rats (Experiment 1)

Group	Signs	Day 4	Day 8	Day 12
Paration 0 mg/kg/day	Mortality	0/16 a	0/16	0/16
+				
Metamidophos 0 mg/kg/day	Tremor	0.00 b	0.00	0.00
(Vehicle Control)	Alertness	0.06	-0.06	0.00
Paration 0.6 mg/kg/day	Mortality	0/8	0/8	0/8
+				
Metamidophos 0 mg/kg/day	Tremor	0.00	0.00	0.00
	Alertness	0.00	0.13	-0.13
Paration 1.2 mg/kg/day	Mortality	0/8	3/8	3/8
+				
Metamidophos 0 mg/kg/day	Tremor	1.75 **	1.80 **	1.80 **
	Alertness	-0.75 **	-0.80 **	-0.60 **
Paration 0 mg/kg/day	Mortality	0/8	0/8	0/8
+				
Metamidophos 0.8 mg/kg/day	Tremor	0.00	0.00	0.00
	Alertness	0.00	0.00	0.00
Paration 0 mg/kg/day	Mortality	0/8	0/8	0/8
+				
Metamidophos 1.6 mg/kg/day	Tremor	0.38	0.25	0.00
	Alertness	-0.13	-0.25	-0.50 *
Paration 0.3 mg/kg/day	Mortality	0/8	0/8	0/8
+				
Metamidophos 0.4 mg/kg/day	Tremor	0.00	0.00	0.00
	Alertness	0.00	-0.38	-0.25
Paration 0.6 mg/kg/day	Mortality	0/8	0/8	0/8
+				
Metamidophos 0.8 mg/kg/day	Tremor	0.50	0.75	0.75
	Alertness	-0.25	-0.38	-0.50 *

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 9 Motor activity - Group mean values in adult 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	1794	83	1790	88	1734	88	
		S.D.	803		679		725		
	20 - 40 minutes	Mean	252	12	163	8	114	6	
		S.D.	420		271		120		
	40 - 60 minutes	Mean	121	6	75	4	113	6	
		S.D.	306		158		221		
	Total	Mean	2168		2028		1960		
		S.D.	1289		900		904		
	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 1.2 mg/kg/day + Metamidophos 0 mg/kg/day		Start - 20 minutes	Mean	1039 *	77	476 **	42	730 **	39
			S.D.	655		231		236	
	20 - 40 minutes	Mean	181	13	246	22	518	28	
		S.D.	272		227		363		
	40 - 60 minutes	Mean	132	10	402 **	36	604	33	
		S.D.	164		358		482		
	Total	Mean	1352		1124		1852		
		S.D.	856		443		808		
	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		
Paration 0 mg/kg/day + Metamidophos 1.6 mg/kg/day		Start - 20 minutes	Mean	1606	64	1192 **	70	1022 **	74
			S.D.	480		275		161	
	20 - 40 minutes	Mean	487	19	162	9	222	16	
		S.D.	626		171		315		
	40 - 60 minutes	Mean	416	17	359 *	21	141	10	
		S.D.	679		313		242		
	Total	Mean	2508		1713		1385		
		S.D.	1591		568		638		
	Paration 0.3 mg/kg/day + Metamidophos 0.4 mg/kg/day	Start - 20 minutes	Mean	1971	83	1444	90	1200	83
			S.D.	994		535		612	
20 - 40 minutes		Mean	313	13	108	7	126	9	
		S.D.	454		194		289		
40 - 60 minutes		Mean	78	3	57	4	112	8	
		S.D.	134		42		132		
Total		Mean	2362		1610		1438		
		S.D.	1438		675		557		
Paration 0.6 mg/kg/day + Metamidophos 0.8 mg/kg/day		Start - 20 minutes	Mean	1371	63	1317	67	1357	70
			S.D.	599		471		528	
	20 - 40 minutes	Mean	374	17	325	16	290 *	15	
		S.D.	306		350		168		
	40 - 60 minutes	Mean	419 *	19	330 *	17	305	16	
		S.D.	415		260		228		
	Total	Mean	2164		1972		1951		
		S.D.	1041		1001		681		

%; Period mean value / Total mean value x 100

S.D.; Standard deviation.

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

Table 10 Pupil size - Group mean values in adult 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	0.9
		S.D.	0.1	0.1	0.1
+ Metamidophos 0 mg/kg/day (Vehicle Control)	Right	Mean	1.0	1.0	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	89
+ Metamidophos 0 mg/kg/day	Right	Mean	0.8 *	0.9	0.9
		S.D.	0.2	0.1	0.1
		%	80	90	100
Paration 1.2 mg/kg/day	Left	Mean	0.4 **	0.2 **	0.4 **
		S.D.	0.2	0.1	0.2
		%	44	22	44
+ Metamidophos 0 mg/kg/day	Right	Mean	0.4 **	0.3 **	0.6 **
		S.D.	0.1	0.2	0.3
		%	40	30	67
Paration 0 mg/kg/day	Left	Mean	0.4 **	0.3 **	0.6 **
		S.D.	0.1	0.1	0.1
		%	44	33	67
+ Metamidophos 0.8 mg/kg/day	Right	Mean	0.4 **	0.3 **	0.7 **
		S.D.	0.1	0.1	0.2
		%	40	30	78
Paration 0 mg/kg/day	Left	Mean	0.2 **	0.2 **	0.2 **
		S.D.	0.1	0.1	0.1
		%	22	22	22
+ Metamidophos 1.6 mg/kg/day	Right	Mean	0.3 **	0.3 **	0.3 **
		S.D.	0.1	0.2	0.1
		%	30	30	33
Paration 0.3 mg/kg/day	Left	Mean	0.4 **	0.4 **	0.6 **
		S.D.	0.1	0.1	0.1
		%	44	44	67
+ Metamidophos 0.4 mg/kg/day	Right	Mean	0.5 **	0.4 **	0.7 **
		S.D.	0.1	0.1	0.1
		%	50	40	78
Paration 0.6 mg/kg/day	Left	Mean	0.3 **	0.2 **	0.2 **
		S.D.	0.1	0.1	0.1
		%	33	22	22
+ Metamidophos 0.8 mg/kg/day	Right	Mean	0.4 **	0.2 **	0.2 **
		S.D.	0.1	0.1	0.1
		%	40	20	22

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 11 Elevated plus-maze - Group mean values in adult female rats (Experiment 1)

Group		Open time (%)	Movement between arms (counts)
Paration 0 mg/kg/day	Mean	61	3.6
+ Metamidophos 0 mg/kg/day (Vehicle Control)	S.D.	29	1.8
Paration 0.6 mg/kg/day	Mean	43	4.0
+ Metamidophos 0 mg/kg/day	S.D.	23	1.4
Paration 1.2 mg/kg/day	Mean	29	2.6
+ Metamidophos 0 mg/kg/day	S.D.	31	2.1
Paration 0 mg/kg/day	Mean	53	3.9
+ Metamidophos 0.8 mg/kg/day	S.D.	25	1.2
Paration 0 mg/kg/day	Mean	72	3.0
+ Metamidophos 1.6 mg/kg/day	S.D.	30	1.5
Paration 0.3 mg/kg/day	Mean	71	2.9
+ Metamidophos 0.4 mg/kg/day	S.D.	24	1.9
Paration 0.6 mg/kg/day	Mean	59	2.1 *
+ Metamidophos 0.8 mg/kg/day	S.D.	39	1.2

S.D.; Standard deviation.

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

Table 12 Cholinesterase activity - Group mean values in adult female rats (Experiment 1)

Group		Plasma (U/L)	Brain (U/L)
Paration 0 mg/kg/day	Mean	2452	347
+			
Metamidophos 0 mg/kg/day (Vehicle Control)	S.D.	731	36
Paration 0.6 mg/kg/day	Mean	2118	318
+	%	86	92
Metamidophos 0 mg/kg/day	S.D.	323	34
Paration 1.2 mg/kg/day	Mean	944 **	171 **
+	%	38	49
Metamidophos 0 mg/kg/day	S.D.	82	7
Paration 0 mg/kg/day	Mean	2127	317
+	%	87	91
Metamidophos 0.8 mg/kg/day	S.D.	434	24
Paration 0 mg/kg/day	Mean	1050 **	237 **
+	%	43	68
Metamidophos 1.6 mg/kg/day	S.D.	263	17
Paration 0.3 mg/kg/day	Mean	1323 **	275 **
+	%	54	79
Metamidophos 0.4 mg/kg/day	S.D.	140	27
Paration 0.6 mg/kg/day	Mean	952 **	191 **
+	%	39	55
Metamidophos 0.8 mg/kg/day	S.D.	199	18

S.D.; Standard deviation.

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

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

Bold; Less than 80% of control value.

Table 13 Motor activity - Group mean values in adult female rats (Experiment 2)

Group	Period		Day 4	%	Day 8	%	Day 12	%
Paration 0 mg/kg/day	Start - 20 minutes	Mean	1695	95	2134	84	1094	91
		S.D.	661		842		642	
+ Metamidophos 0 mg/kg/day (Vehicle Control)	20 - 40 minutes	Mean	67	4	322	13	80	7
		S.D.	97		585		132	
	40 - 60 minutes	Mean	27	2	74	3	31	3
		S.D.	44		145		61	
	Total	Mean	1790		2530		1205	
		S.D.	694		1185		635	
<hr/>								
Paration 0.6 mg/kg/day	Start - 20 minutes	Mean	1679	69	1656	69	740	54
		S.D.	640		593		288	
+ Metamidophos 0.8 mg/kg/day	20 - 40 minutes	Mean	575 *	18	506	21	240	18
		S.D.	485		382		295	
	40 - 60 minutes	Mean	382 *	12	252 *	10	381 *	28
		S.D.	399		183		431	
	Total	Mean	2636		2414		1360	
		S.D.	1385		857		824	
<hr/>								
	Start - 20 minutes	Mean	NA		4194 **	44	3224 **	64
		S.D.			387		1212	
TMT 10 mg/kg (Positive control)	20 - 40 minutes	Mean	NA		3681 **	39	413	8
		S.D.			531		525	
	40 - 60 minutes	Mean	NA		1605 **	17	1407 *	28
		S.D.			1117		1618	
	Total	Mean	NA		9480 **		5044 **	
		S.D.			1847		2207	

%; 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).

NA: Not assesment.

Table 14 Hot plate test - Group mean values in adult female rats (Experiment 2)

Group		Reaction latency (sec.)	
Paration 0 mg/kg/day	mean		5.4
+			
Metamidophos 0 mg/kg/day (Vehicle Control)	S.D.		1.6
Paration 0.6 mg/kg/day	mean		4.3
+			
Metamidophos 0.8 mg/kg/day	S.D.		0.9
TMT 10 mg/kg	mean		5.2
(Positive control)	S.D.		2.2

S.D.; Standard deviation.

There were no significantly different from vehicle control group (Student *t*-test).

Table 15 Morris water maze - Group mean values in adult female rats (Experiment 2)

Training trial			
Group		Success rate (%)	Escape latency (sec.)
Paration 0 mg/kg/day + Metamidophos 0 mg/kg/day (Vehicle Control)	1st day	63	40
	2nd day	88	21
	3rd day	85	18
	4th day	97	11
Paration 0.6 mg/kg/day + Metamidophos 0.8 mg/kg/day	1st day	60	41
	2nd day	91	26
	3rd day	94	20
	4th day	100	17
TMT 10 mg/kg (Positive control)	1st day	38	47
	2nd day	75	31
	3rd day	100	20
	4th day	100	21
Probe trial			
		Stay within target area (sec.)	Approach to target area (count)
Paration 0 mg/kg/day + Metamidophos 0 mg/kg/day (Vehicle Control)	mean	25	12
	S.D.	5	3
Paration 0.6 mg/kg/day + Metamidophos 0.8 mg/kg/day	mean	28	13
	S.D.	5	4
TMT 10 mg/kg (Positive control)	mean	19 *	10
	S.D.	3	3
Cue test			
		Escape latency (sec.)	
Paration 0 mg/kg/day + Metamidophos 0 mg/kg/day (Vehicle Control)	mean	7	
	S.D.	3	
Paration 0.6 mg/kg/day + Metamidophos 0.8 mg/kg/day	mean	7	
	S.D.	3	
TMT 10 mg/kg (Positive control)	mean	14	
	S.D.	13	

S.D.; Standard deviation.

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

Table 16 Glutathion assay - Group mean values in adult female rats (Experiment 2)

Group		Total glutation (pmol/well)	Oxidized glutation (pmol/well)	Rate of oxidized glutation (%)
Paration 0 mg/kg/day	mean	61.4	21.8	36
+				
Metamidophos 0 mg/kg/day (Vehicle Control)	S.D.	3.4	5.9	
Paration 0.6 mg/kg/day	mean	79.7 **	30.7	39
+				
Metamidophos 0.8 mg/kg/day	S.D.	15.1	10.6	
TMT 10 mg/kg (Positive control)	mean	70.3	31.5 *	45
	S.D.	18.6	5.1	

S.D.; Standard deviation.

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

Table 17 Body weight - Group mean values in adult female rats (Experiment 2)

Group	Day	1 (g)	4 (g)	8 (g)	12 (g)	14 (g)
Paration 0 mg/kg/day + Metamidophos 0 mg/kg/day (Vehicle Control)	Mean	209	212	222	228	235
	S.D.	12	11	13	13	15
Paration 0.3 mg/kg/day + Metamidophos 0.4 mg/kg/day	Mean	209	214	225	231	236
	S.D.	12	12	10	12	12
TMT 10 mg/kg (Positive control)	Mean	208	191*	221	252**	263**
	S.D.	11	14	12	6	11

S.D.; Standard deviation.

Significantly different from vehicle control group: *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$ (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）
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

II. 免疫毒性に関する研究

パラチオンあるいはメトキシクロル反復投与後の2,4-ジクロロフェノキシ酢酸ブチルあるいはオイゲノール複合暴露によるマウスアレルギー反応の増強効果に関する研究

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	小坂忠司	(財) 残留農薬研究所	毒性部免疫・急性毒性研究室
	首藤康文	(財) 残留農薬研究所	毒性部神経毒性研究室
	上田英夫	(財) 残留農薬研究所	毒性部免疫・急性毒性研究室
	福山朋季	(財) 残留農薬研究所	毒性部免疫・急性毒性研究室
	林 宏一	(財) 残留農薬研究所	毒性部免疫・急性毒性研究室

研究要旨

有機リン剤（パラチオン）及び有機塩素剤（メトキシクロル）のアレルギー性反応への免疫修飾作用を検索するため、雌性マウスに5日間反復経口投与し、4週間後にアレルギー反応が示唆されるフェノキシ酢酸系除草剤（2,4-ジクロロフェノキシ酢酸ブチル、2,4-D-butyl）ないし殺菌剤（オイゲノール）を反復経皮暴露して、アレルギー性反応（Local Lymph Node Assay, LLNA 法）の増強影響を検索した。

2,4-D-butyl 及びオイゲノールの LLNA 法において、パラチオン及びメトキシクロルの投与用量相関性にリンパ球細胞増殖活性（³H-methyl thymidine 取り込み量）の増加が認められた。感作性反応の指標となる EC3 濃度は、パラチオン 1.2 mg/kg 投与群では対照群と比較して2,4-D-butyl で12%、オイゲノールで16%の顕著な低下がみられ、メトキシクロル 300 mg/kg 投与群では2,4-D-butyl で21%、オイゲノールで32%の低下がみられた。EC3 濃度の低下は、パラチオン及びメトキシクロルの投与による感作反応の増強を示唆していた。

これらの結果から、本試験条件下ではパラチオン及びメトキシクロルの反復投与は2,4-D-butyl 及びオイゲノールのアレルギー性反応に対して増強効果を示すことが示唆された。

- A. 研究目的
- 農薬の複合毒性については、社会的関心
- は高いものの、実験上及び評価上の困難性
などの理由から毒性情報の蓄積が不足し

ており、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も有意義なことと考えられる。本研究においては、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免疫系への影響を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な基礎的毒性情報を収集する事を目的とした。

今年度の研究では、免疫系への影響が示唆されている有機リン剤系および有機塩素系農薬を幼若期に反復経口投与した後、4週間後にアレルギー反応が示唆されるフェノキシ酢酸系除草剤ないし殺菌剤を反復経皮暴露し、アレルギー性反応の増強影響を検索した。

B. 研究方法

本研究では、殺虫剤の有機リン剤（パラチオン）ないしは有機塩素剤（メトキシクロル）を雌性のCBA/J系マウスに5日間反復経口投与し、4週間休薬後にフェノキシ酢酸系除草剤（2,4-ジクロロフェノキシ酢酸ブチル、2,4-D-butyl）ないし殺菌剤（オイゲノール）を用いたLocal Lymph Node Assay（LLNA法）を実施した。LLNA法は2002年4月24日付け経済協力開発機構の毒性試験指針「OECD Guideline for the testing of chemicals. Guideline 429: Skin sensitization- Local Lymph Node Assay）」¹⁾に従い、以下の条件にて実施した。

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 Phosphorothiate、99.6%、和光純薬工業株式会社）、有機塩素剤のメトキシクロル（Methoxychlor、2,2-Bis(p-Methoxyphenyl)-1,1,1-Trichloroethane、97%>、和光純薬工業株式会社、大阪府）、フェノキシ酢酸系除草剤の2,4-ジクロロフェノキシ酢酸ブチル（2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-butyl、2,4-D-butyl、98%>）及び殺菌剤のオイゲノール（Eugenol、4-Allyl-2-Methoxyphenol、95%>、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

日本チャールス・リバー株式会社厚木飼育センター（神奈川県）で生産された近交系SPFマウス（CBA/JnCrj）の雌動物を用いた。CBA/Jnマウスは接触性過敏症研究に良く用いられ²⁾、Guidelineにより使用が定められている動物種である。試験動物は3週齢にて購入し、6日間試験環境に馴化した後、4週齢で試験に用いた。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。経口投与（パラチオンないしメトキシクロル）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により群分けを実施した。4週間休薬後の経皮感作投与（2,4-D-butylないしオイゲノール）開始日にも同様の方法にて群分けを実施した。基礎飼料には保証飼料MF固型（オリ

エンタル酵母工業株式会社)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(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

パラチオン及びメトキシクロルは、経口経路にて毒性及び死亡の起こらない用量を最高用量として選択し、それぞれ公比3にて、パラチオンは1.2、0.4、及び0 mg/kg、メトキシクロルは300、100及び0 mg/kgの各3用量を設定した。2,4-D-butyl及びオイゲノールは経皮経路にて毒性、皮膚刺激性および死亡の起こらない濃度を最高用量として選択し、2,4-D-butylは10、5、2.5及び0%、オイゲノールは25、10、5及び0%の各4濃度を設定した。

4. 被験物質投与液の調製

パラチオン及びメトキシクロルは各用量の被験物質調製時に純度換算を行い、投与容量は10 mL/kgとした。所定量の被験物質を秤量した後、コーン油にて溶解あるいは懸濁させた。対照群の投与液はコーン油とした。各用量の投与液は小分けし、冷蔵・遮光(5°C)条件下にて保存した。投与液は投与直前に室温に戻して使用した。

2,4-D-butyl及びオイゲノールは用時調製とした。各濃度の被験物質調製時に純度換算を行い、所定量の被験物質を秤量した後、アセトン/オリーブオイル(アセトン(和光純薬工業株式会社):オリーブオイル(和光純薬工業株式会社)=4:1)にて溶解させた。

対照群の投与液はアセトン/オリーブオイルとした。

5. 被験物質の投与

パラチオン及びメトキシクロルは、各用量の被験物質投与液を4週齢時に5日間連続経口投与した。2,4-D-butyl及びオイゲノールは各濃度の被験物質投与液を最終経口投与の4週間後に両耳後方に3日間経皮投与した。被験物質投与液をスターラー等で攪拌して均質な状態に保ち、経口経路はゾンデを用いて、経皮経路はピペットを用いて左右の耳介後方に25 µLずつ投与実施した。

6. 体重

全動物について、経口投与開始直前、投与後1週間毎及び最終解剖日に体重を測定した。

7. 組織採取

最終解剖予定時刻の5時間前に20 µCiの放射性³H-Methyl Thymidine(20 µCi/250 µLリン酸緩衝液、株式会社パーキンエルマージャパン、東京)を動物の尾静脈内に投与した。³H-Methyl Thymidine投与の5時間後、全生存動物についてエーテルの麻酔下で放血屠殺し、各動物より両側の耳介リンパ節を採取した。両側の耳介リンパ節は重量測定後、リンパ球細胞の細胞懸濁液を調製した。

8. 細胞懸濁液の調製

リン酸緩衝液(PBS)に浸水したリンパ節をナイロンメッシュ(75 µmメッシュ)上で揺りつぶし、単細胞懸濁液を得た。次

に細胞懸濁液を PBS にて 2 回洗浄し、洗浄後 5%トリクロロ酢酸溶液(和光純薬工業株式会社)にて懸濁させた後、冷蔵庫(5°C)にて約 18 時間静置した。翌日(約 18 時間後)、遠心分離後に沈渣を 1 mL の 5%トリクロロ酢酸溶液にて懸濁した。

9. リンパ球細胞増殖活性測定

5%トリクロロ酢酸溶液に懸濁した 1 mL のリンパ球細胞懸濁液に 9 mL の液体シンチレーター (AtomLight、株式会社パーキンエルマージャパン)を加えて混和した後、液体シンチレーションカウンター (LSC-5100、株式会社アロカ、東京)にて ^3H -methyl thymidine の放射エネルギーを測定した。DPM (disintegrations per minute) で表された個体ごとの放射エネルギーをリンパ球細胞増殖活性とした。

10. 有意差検定

各検査項目について、対照群と各被験物質 (2,4-D-butyl 及びオイゲノール) 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、臓器重量およびリンパ球細胞増殖活性のデータについては、まず Bartlett の等分散検定を行なった。この検定によって全用量群における分散が均一であるという判定が出た場合には、一元配置分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べた。その結果群間に有意差が認められた時は、Dunnett の多重比較法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。Bartlett の等分散検定で各群の分散が等しくないという判定が出た場合は、Kruskal-Wallis のノンパラメトリックな分

散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べた。その結果群間に有意差が認められた時は、Dunnett 型の多重比較法を用いて対照群と各投与群間における平均順位の有無の有無を判定した。

11. 試験結果の評価

リンパ球細胞増殖活性について SI 値 (Stimulation Index) を次式にて被験物質投与群の用量群ごとに求め、SI 値を基に、2,4-D-butyl 及びオイゲノールの EC3 濃度 (SI=3 となる濃度) を求めた。

C. 研究結果

試験結果を表 1~5 に示す。

1. 体重 (表 1~4)

いずれの投与群においても被験物質投与の影響と考えられるような体重減少は認められなかった。

2. リンパ節重量

パラチオン投与群 (表 1,2) :

2,4-D-butyl の LLNA 試験において、0 mg/kg 投与群では高濃度の 10%濃度にリンパ節重量の有意な増加がみられた。パラチオン 0.4 mg/kg 及び 1.2 mg/kg 投与群ではいずれも 2.5%濃度より用量相関的で顕著なリンパ節重量の増加が認められた。

オイゲノールの LLNA 試験において、0 mg/kg 投与群では高濃度の 25%濃度にリンパ節重量の有意な増加がみられた。パラチオン 0.4 mg/kg 及び 1.2 mg/kg 投与群ではいずれも 10%濃度より用量相関的で顕著なリンパ節重量の増加が認められた。

メトキシクロル投与群 (表 3,4) :

2,4-D-butyl の LLNA 試験において、0

mg/kg 投与群では高濃度の 10%濃度にリンパ節重量の有意な増加がみられた。メトキシクロル 100 mg/kg 投与群では 5%濃度より、300 mg/kg 投与群では 2.5%濃度よりいずれも用量相関的で顕著なリンパ節重量の増加が認められた。

オイゲノールの LLNA 試験において、0 mg/kg 投与群では 10%濃度よりリンパ節重量の有意な増加がみられた。メトキシクロル 100 mg/kg 及び 300 mg/kg 投与群ではいずれも 5%濃度より用量相関的で顕著なリンパ節重量の増加が認められた。

3. リンパ球細胞増殖活性測定

パラチオン投与群 (表 1, 2) :

いずれの投与群の LLNA 試験においても、2,4-D-butyl 及びオイゲノールの経皮暴露に対する近傍リンパの ³H-methyl thymidine 取り込み量には用量相関的な増加が認められた。

2,4-D-butyl の LLNA 試験において、SI 値は 0 mg/kg 投与群で 2.5、5 及び 10%濃度の順にそれぞれ 1.7、2.4 及び 3.5、0.4 mg/kg 投与群で 4.6、8.1 及び 16.1、そして 1.2 mg/kg 投与群で 6.3、16.3 及び 22.9 であった。

オイゲノールの LLNA 試験において、SI 値は 0 mg/kg 投与群で 5、10 及び 25%濃度の順にそれぞれ 2.0、7.5 及び 29.5、0.4 mg/kg 投与群で 4.7、14.3 及び 56.1、そして 1.2 mg/kg 投与群で 8.8、23.0 及び 45.6 であった。

メトキシクロル投与群 (表 3, 4) :

いずれの投与群の LLNA 試験においても、2,4-D-butyl 及びオイゲノールの経皮暴露に対する近傍リンパの ³H-methyl thymidine 取り込み量には用量相関的な増加が認められた。

2,4-D-butyl の LLNA 試験において、SI 値は 0 mg/kg 投与群で 2.5、5 及び 10%濃度の順

にそれぞれ 1.9、2.5 及び 4.4、100 mg/kg 投与群で 1.9、5.9 及び 14.0、そして 300 mg/kg 投与群で 4.8、6.5 及び 15.1 であった。

オイゲノールの LLNA 試験において、SI 値は 0 mg/kg 投与群で 5、10 及び 25%濃度の順にそれぞれ 6.3、15.8 及び 49.4、100 mg/kg 投与群で 10.8、20.8 及び 41.5、そして 300 mg/kg 投与群で 17.4、50.5 及び 102.3 であった。

4. EC3 濃度 (表 5)

パラチオン投与群において、2,4-D-butyl に対する EC3 濃度は対照群と比較して 0.4 及び 1.2 mg/kg 投与群でそれぞれ 18 及び 12%の顕著な低下が観察され、オイゲノールに対する EC3 濃度は対照群と比較して 0.4 及び 1.2 mg/kg 投与群でそれぞれ 50 及び 16%の用量相関性の低下がみられ、いずれの感作物質に対しても感作能の増強が認められた。高濃度の 1.2 mg/kg 投与群の EC3 濃度は 2,4-D-butyl で 0.94、オイゲノールで 0.83 であった。

メトキシクロル投与群において、2,4-D-butyl に対する EC3 濃度は対照群と比較して 100 及び 300 mg/kg 投与群でそれぞれ 50 および 21%の用量相関性の低下が観察され、オイゲノールに対する EC3 濃度は対照群と比較して 100 及び 300 mg/kg 投与群でそれぞれ 28 及び 32%の低下がみられ、いずれの感作物質に対しても感作能の増強が認められた。高濃度の 300 mg/kg 投与群の EC3 濃度は 2,4-D-butyl で 1.32、オイゲノールで 0.61 であった。

D. 考察

本研究では、有機リン剤のパラチオン及び有機塩素剤のメトキシクロルを 4 週齢時の雌性マウスに 5 日間反復経口投与し、4 週間休

薬した後、フェノキシ酢酸系除草剤の2,4-ジクロロフェノキシ酢酸ブチル (2,4-D-butyl) 及び殺菌剤のオイゲノールに対するアレルギー性反応の変化を Local Lymph Node Assay (LLNA 法) を用いて評価した。

有機リン剤及び有機塩素剤の免疫系への影響については、反復経口投与による特異的抗体価の抑制作用¹³⁾、本研究で用いたパラチオン及びメトキシクロルの胸腺細胞アポトーシス誘発作用が報告されており⁴⁾、免疫抑制作用を主体とした免疫毒性が共通して考えられている。一方、2,4-D-butyl 及びオイゲノールは皮膚感作性が認められ、2,4-D-butyl については気道過敏症発現の可能性も報告されている⁵⁾。以上のように異なった免疫毒性作用を示す農薬を複合投与することにより、特定の免疫毒性作用のみを増強させる報告はあまりない。著者らは、パラチオン及びメトキシクロルの胸腺細胞アポトーシス誘発作用に着目し、幼若時の免疫攪乱作用がその後の発達段階における異常免疫担当細胞出現を誘起する可能性を仮説とした。本研究では、異常免疫担当細胞が引き起こす影響を検出する手法として、アレルギー反応増強作用誘発を指標とした検査を実施した。

本研究では、胸腺細胞アポトーシス誘発作用を有するパラチオンを幼若期に投与し、その後2,4-D-butyl 及びオイゲノールの LLNA 法を実施した結果、リンパ球細胞増殖活性 (³H-methyl thymidine 取り込み量) が投与群で顕著に増加し、パラチオン高用量投与群での EC3 濃度は2,4-D-butyl で8倍、オイゲノールで6倍の低濃度となり、2,4-D-butyl 及びオイゲノールのアレルギー性反応に対する増強効果が認められた。メトキシクロルについても同様の手法を用いて検査を実施した

結果、2,4-D-butyl 及びオイゲノールのアレルギー性反応に対する増強効果が認められた。上記結果より、アポトーシス誘発作用を有するパラチオン及びメトキシクロルの幼若期投与により免疫攪乱が起り、その後の免疫系に何らかの影響を及ぼす異常免疫担当細胞が出現する可能性が示唆された。本研究におけるアレルギー性増強作用と同様の事例として、農薬を暴露することにより誘発される自己免疫疾患の発症が報告されている。Sobel 等⁶⁾は自己免疫疾患モデル動物の (NZB×NZW) F1 マウスを用いた実験で、メトキシクロル、*o,p'*-DDT 及びクロルデコンの慢性投与が膜性糸球体腎炎誘発及び自己 DNA に反応する抗体の産生を引き起こすことを報告しており、農薬投与による免疫攪乱が、自己免疫疾患を引き起こす異常免疫担当細胞を出現させる可能性を示唆している。Sobel 等の報告は、本研究における仮説及び結果を裏付ける材料の一つであると考えられた。

E. 結論

殺虫剤の有機塩素剤 (メトキシクロル) 及び有機リン剤 (パラチオン) と、殺菌剤のオイゲノール及びフェノキシ酢酸系除草剤の2,4-D-butyl の複合暴露影響を明らかにするため、メトキシクロルないし有機リン剤のパラチオンを4週齢時の雌性 CBA/JN マウスに5日間反復経口投与し、4週間休薬した後、オイゲノール及び2,4-D-butyl に対するアレルギー性反応の変化を LLNA 法を用いて評価した。その結果、メトキシクロル及びパラチオンの若週齢における反復投与は、オイゲノール及び2,4-D-butyl のアレルギー性反応に対して増強効果を示すことが示唆された。

F. 引用文献

- 1) Saha S and Banerjee BD. Effect of sub-chronic Lindane exposure on humoral and cell-mediated immune responses in albino rats. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 51, 795-802, 1993.
- 2) Banerjee BD, Remachandran and Hussain QZ. Sub-chronic effect of DDT on humoral immune response in mice. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 37, 433-440, 1986.
- 3) Crittenden PL, Carr R and Prurtt SB. Immunotoxicological assessment of Methyl parathion in female B6C3F1 mice. Journal of Toxicology and Environmental Health Part A, 54, 1-20, 1998.
- 4) Fukuyama T, Tajima Y, Ueda H, Hayashi K, Shutoh Y, Harada T, Kosaka T. Apoptosis in immunocytes induced by several types of pesticides. J Immunotoxicol. 7, 39-56, 2010.
- 5) Fukuyama T, Tajima Y, Ueda H, Hayashi K, Shutoh Y, Harada T, Kosaka T. Allergic reaction induced by dermal and/or respiratory exposure to low-dose phenoxyacetic acid, organophosphorus, and carbamate pesticides. Toxicology., 261, 152-161, 2009.
- 6) Sobel ES, Gianini J, Butfiloski EJ, Croker BP, Schiffenbauer J, Roberts SM. Acceleration of Autoimmunity by Organochlorine Pesticides in (NZB × NZW)F1 Mice Environ. Health Persp., 113, 323-328, 2005.
- T. Allergic reaction induced by dermal and/or respiratory exposure to low-dose phenoxyacetic acid, organophosphorus, and carbamate pesticides. Toxicology., 261, 152-161, 2009.
- 2) Fukuyama T, Tajima Y, Ueda H, Hayashi K, Shutoh Y, Harada T, Kosaka T. Apoptosis in immunocytes induced by several types of pesticides. J Immunotoxicol. 7, 39-56, 2010.

2. 学会発表

- 1) 福山朋季, 田島由香里, 林宏一, 上田英夫, 首藤康文, 原田孝則, 小坂忠司: 化学物質による気道過敏症検出法の検討 第16回日本免疫毒性学会学術大会, 2009年
- 2) 福山朋季, 田島由香里, 上田英夫, 林宏一, 首藤康文, 小坂忠司, 原田孝則: 各首農薬の呼吸器アレルギー反応検出検討 第36回日本トキシコロジー学会学術年会, 2009年

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

- 1) Fukuyama T, Tajima Y, Ueda H, Hayashi K, Shutoh Y, Harada T, Kosaka