

表2. 同種の農薬剤の反復経口投与による複合暴毒性影響 - 成癩性ラットにおけるパラチオンとメタリドホスとの複合暴毒性影響

用量 (mg/kg/day)	Parathion 0.6	Parathion 1.2	Metamidothios 0.8	Metamidothios 1.6	Parathion 0.3+ Metamidothios 0.4	Parathion 0.6+ Metamidothios 0.8
死亡率	0/16	3/8	0/8	0/8	0/8	0/8
神経症状	-	振戦++ 警戒性低下++	-	振戦+ 警戒性低下+	-	振戦+ 警戒性低下+
自発運動量	-	-	-	-	-	-
運動バーン	-	後半増加	-	後半増加	-	後半増加
瞳孔径	-	低下	低下	低下	低下	低下
十字迷路 開採時間	-	-	-	-	-	-
架間移動回数	-	-	-	-	-	低下
血漿ChE活性	- (86%)	低下 (38%)	- (87%)	低下 (43%)	低下 (54%)	低下 (39%)
脳ChE活性	- (92%)	低下 (49%)	- (91%)	低下 (68%)	低下 (79%)	低下 (55%)

死亡率; 死亡動物数/供試動物数

ChE活性の数値は摂食の値に対するパーセンテージ。通常80%未満に低下した場合を有害作用とする。

(平成20及び21年度実験結果から要約)

表3. 同種の農薬剤の反復経口投与による複合暴毒性影響 - 若齢雄ラットにおけるパラチオンとメタクトスの複合暴毒性影響

用量 (mg/kg/day)	Parathion 0.6	Parathion 1.2	Metamidophos 0.8	Metamidophos 1.6	Parathion 0.3+ Metamidophos 0.4	Parathion 0.6+ Metamidophos 0.8
死亡率	0/8	3/8	0/8	0/8	0/8	0/8
神経発症状	-	振戦++	-	振戦+	-	振戦±
自発運動量	-	-	-	-	-	-
運動パターン	-	後半増加	-	後半増加	-	後半増加
瞳孔径	-	低下	低下	低下	低下	低下
明暗時間	-	-	-	-	-	-
箱間移動回数	-	-	-	-	±増加	-
血漿ChE活性	-(97%)	低下(68%)	低下(80%)	低下(57%)	低下(79%)	低下(50%)
脳ChE活性	-(103%)	低下(70%)	-(91%)	-(86%)	-(95%)	-(83%)

死亡率 死亡動物数/供試動物数  
ChE活性の数値は対照群の値に対するパーセンテージ。通常80%未満は低下した場合を有害作用とする。

(平成1年度実施結果から要約)

表 4. 同種の農薬の剤の反復経口投与による複合暴露毒性影響  
 - 成獣及び若齢雌マウスにおけるパラチオンとメチドホスの複合暴露の比較

パラメータ	パラチオン単剤	メチドホス単剤	複合暴露
神経症状			
振戦	成獣 ++ 若齢 ++	成獣 + 若齢 +	成獣 + 若齢 +
警戒性低下	成獣 ++ 若齢 -	成獣 + 若齢 -	成獣 + 若齢 -
ChE活性阻害			
血漿:	成獣 > 若齢 0.73	成獣 = 若齢 0.92	成獣 > 若齢 0.65
脳:	成獣 > 若齢 0.80	成獣 = 若齢 0.91	成獣 > 若齢 0.63
瞳孔径			
投与4日:	成獣 = 若齢 0.86	成獣 > 若齢 0.82	成獣 = 若齢 1.09
投与8日:	成獣 = 若齢 0.93	成獣 = 若齢 1.03	成獣 < 若齢 1.21
投与12日:	成獣 < 若齢 1.23	成獣 < 若齢 1.34	成獣 < 若齢 1.30
自発運動量			
投与4日:	成獣 = 若齢 1.03	成獣 < 若齢 1.46	成獣 = 若齢 1.06
投与8日:	成獣 > 若齢 0.82	成獣 = 若齢 1.07	成獣 = 若齢 1.01
投与12日:	成獣 = 若齢 0.95	成獣 = 若齢 0.92	成獣 = 若齢 1.10

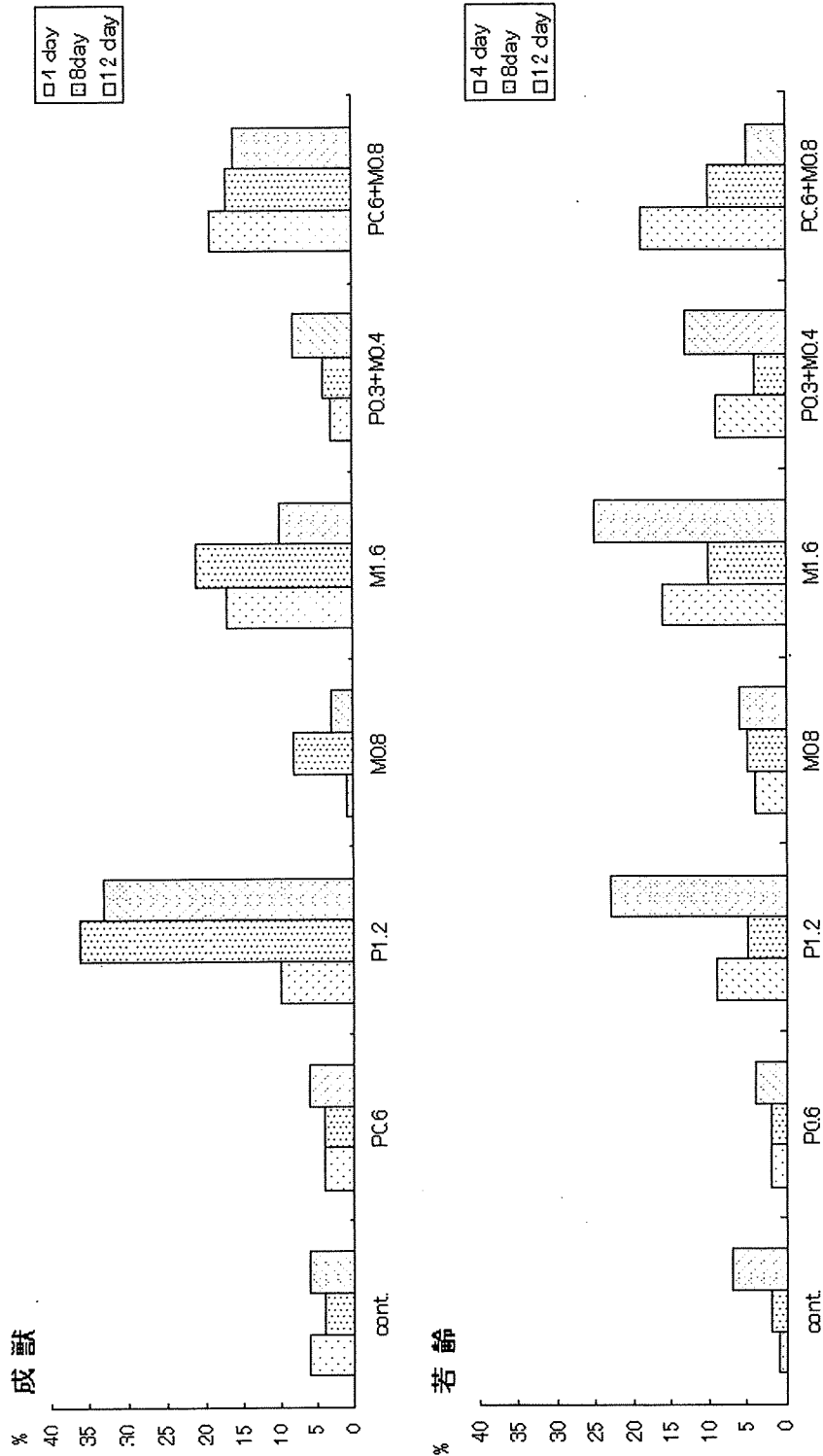
数値は対照群を100とした相対値を元に算出した、成獣と若齢の効果比の平均値。

備考:

ChE活性阻害、瞳孔径及び自発運動量は、有機リン剤による影響が強いと低値になるため、効果比が1前後であれば成獣、若齢ともに同程度の毒性であり、1未満は成獣で毒性が強く、1以上は若齢で毒性が強いことを示している。表では1.2倍以上の差がある場合を不等号で示した。

(平成20及び21年度実施結果に基づいて作成)

図 1. 同種の農薬2剤の反復経口投与による複合暴露毒性影響 - 成獣及び若齢雄マウスにおけるパラチオンとメタミドホスの複合暴露影響の比較  
後半20分間の運動量が60分間の総運動量に占める割合



cont.: 対照群, P: パラチオン, M: メタミドホス, 数値は用量 (mg/kg/day)

(平成20及び21年度実施結果に基づいて作成)

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）  
分担総合研究報告書

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

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

農薬の複合暴露による免疫毒性を明らかにするため、雌性ラットあるいはマウスを用いて以下の3つの実験を実施した。

実験1：有機リン剤のパラチオンとカーバメート剤のMPMCを、8週齢の雌性ラットに2週間にわたり反復経口投与し、免疫毒性関連項目を指標に相加・相乗毒性の有無を検索した。その結果、胸腺及び脾臓のリンパ球サブセット解析において、パラチオン単剤暴露群でB細胞の増加が、MPMC単剤暴露群ではヘルパーT細胞の減少がそれぞれ観察されたが、複合暴露群では特に影響は認められず、本実験条件下では、パラチオンとMPMCの反復複合投与によって免疫毒性関連項目に対しては増強効果を示さないことが示唆された。

実験2：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8週齢の雌性ラットに2週間にわたり反復経口投与し、免疫毒性関連項目を主な指標として複合暴露影響を検索した。その結果、胸腺の細胞数測定及びリンパ球サブセット解析において著変は認められなかった。

実験3：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。その結果、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（<sup>3</sup>H-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。

以上の結果、本試験条件下ではリン剤パラチオンとカーバメート剤 MPMC 及びパラチオンとメタミドホスの組み合わせでは雌性ラットの免疫系に対する複合暴露影響は特に認められなかった。一方、雌性マウスを用いた免疫毒性試験では、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、実験上およ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。

本研究では、免疫系への影響を検索することを目的とした 3 つの複合暴露実験を実施した。実験 1 では雌性ラットを用い有機リン剤パラチオンとカーバメート剤 MPMC の複合暴露影響を、実験 2 ではパラチオンとメタミドホスの複合暴露影響を、胸腺あるいは脾臓のリンパ球サブセット解析によりそれぞれ検索した。また、実験 3 では雌性マウスを用い有機リン剤パラチオンと有機塩素系農薬メトキシクロル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、アレルギー性反応に対する増強効果の有無を検索した。

#### B. 研究方法

実験 1: 8 週齢の雌性ラットに標的作用部位が同一である 2 種の農薬（有機リン系農薬パラチオン及びカーバメート系農薬 MPMC）を 2 週間反復経口投与し、免疫毒性を指標に複合暴露による毒性影響を検索した。

実験 2: 8 週齢の雌性ラットに同種の農薬 2 剤（有機リン系農薬パラチオン及びメタミドホス）を 2 週間にわたり反復経口投与し、免疫毒性を指標にして複合暴露による毒性影響を検索した。

実験 3: 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）」<sup>1)</sup>に従い、実施した。

##### 1. 被験物質

実験 1 及び 2: 有機リン系農薬 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)

カーバメート系農薬 MPMC (Xylylcarb、  
3-4-Xylyl Methylcarbamate、98.9%、和光純  
薬工業株式会社)

実験 3：被験物質として、パラチオン (実  
験 1 と同じ)、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-Dichloro  
phenoxyacetic acid-butyl、2,4-D-butyl、  
98%>) 及び殺菌剤オイゲノール (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

実験 1 及び 2：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]) の雌性動物  
を用いた。

実験 3：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) の雌性  
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<sup>2)</sup>、Guideline により  
使用が定められている動物種である。

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

実験 1：標的作用部位が同一である 2 種の  
農薬の反復経口投与による複合暴露毒性影  
響の検討には、以下の 4 群を設定した。

- ・対照群 (コーンオイル + 1%Tween80 水  
溶液)
- ・パラチオン 0.5 mg/kg/day 単剤暴露群
- ・MPMC 60 mg/kg/day 単剤暴露群
- ・パラチオン 0.25 mg/kg/day + MPMC 30  
mg/kg/day 複合暴露群

実験 2：以下の 9 群を設定した。

- ・対照群 (コーンオイル + 1%Tween80 水  
溶液)
- ・パラチオン 0.6 mg/kg/day 単剤暴露群
- ・パラチオン 1.2 mg/kg/day 単剤暴露群
- ・メタミドホス 0.8 mg/kg/day 単剤暴露群
- ・メタミドホス 1.6 mg/kg/day 単剤暴露群
- ・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
- ・パラチオン 0.6 mg/kg/day + メタミドホ  
ス 0.2 mg/kg/day 複合暴露群
- ・パラチオン 0.6 mg/kg/day + メタミドホ  
ス 0.4 mg/kg/day 複合暴露群
- ・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

実験 3：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  
性及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

実験1及び2:パラチオンはコーンオイルに溶解して、メタミドホス及びMPMCは1%Tween80水溶液に懸濁して、調製した。投与容量は実験1では5 mL/kg、実験2では4 mL/kgとし、胃ゾンデを用いて強制経口投与した。

実験3: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。

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

実験1:パラチオンはコーンオイルに溶解して、MPMCは1%Tween80水溶液に懸濁して、雌性ラットに強制経口投与した。

実験2:パラチオンはコーンオイルに溶解して、メタミドホスは1%Tween80水溶液に懸濁して、雌性ラットに強制経口投与した。

実験3: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

実験1-3:全動物について、経口投与開始直前、投与後1週間毎および最終解剖日に体重を測定した。

#### 7. 組織採取

実験1,2:各群の動物について2週間反復投与終了後に、全生存動物の胸腺及び脾臓を採取し、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。

実験3:最終解剖予定時刻の5時間前に20 µCiの放射性<sup>3</sup>H-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。<sup>3</sup>H-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

実験1,2:胸腺及び脾臓の半量を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。脾臓細胞については、0.85%塩化アンモニウム水溶液に懸濁し、



室温で10分間静置し、赤血球を溶解させた。総合血液学検査装置アドヴィア 120 (Bayer Corporation) を用いて胸腺および脾臓細胞数を計測した。

次に、反応抗体との非特異的結合を防ぐため、約  $1 \times 10^7$  の胸腺ないし脾臓細胞を20%山羊血清添加PBSにて4°Cで10分間培養した。 $1 \times 10^6$  の胸腺ないし脾臓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°C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、FITC標識抗ラットCD3抗体、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。B細胞の解析ではCy-Chrome標識抗ラットCD45RA抗体を、NK細胞の解析ではPE標識抗ラットNKR P1A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。

実験3: 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  $\mu$ mメッシュ) 上で搗りつぶし、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1mLの5%トリクロロ酢酸溶液にて懸濁した。

#### 9. リンパ球サブセットの解析 (実験1,2)

胸腺リンパ球サブセット解析においては、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。脾臓リンパ球サブセット解析においては、汎T細胞 (CD3+)、汎B細胞 (CD45RA+)、ヘルパーT細胞 (CD4+CD8-)、細胞傷害性T細胞 (CD4-CD8+) 及びNatural killer細胞 (NK細胞; NKR P1A+) 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、フロー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。

#### 10. リンパ球細胞増殖活性測定 (実験3)

5%トリクロロ酢酸溶液に懸濁した1mLのリンパ球細胞懸濁液に9mL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<sup>3</sup>H-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。また、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EC<sub>3</sub>濃度 (SI=3となる濃度) を求めた。

#### 11. 有意差検定

実験1, 2: 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、胸腺及び脾臓の細胞数、フローサイトメーターによるリンパ球、臓器重量のデ

ータについて、Student の 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。

実験 3: 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 および 1% レベルで解析した。

体重、臓器重量及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意差の有無を判定した。

### C. 研究結果

実験 1: パラチオン単独投与群では、脾臓細胞数に有意な増加及び胸腺細胞数に増加傾向が観察され、MPMC 単独投与群では胸腺細胞数に減少傾向が観察された。

胸腺のリンパ球サブセット解析において、MPMC 単独投与群では成熟胸腺細胞のヘルパー T 細胞の有意な減少及び未成熟胸腺細胞のダブルポジティブ細胞 (CD4+CD8+) の減少傾向が観察された。脾臓のリンパ球サブセット解析において、パラチオン単独投与群では、

汎 B 細胞の有意な増加が観察された。

パラチオンと MPMC の複合投与群では、いずれの検査項目においても有意な変化は認められなかった。

実験 2: フローサイトメトリーを用いた測定の結果、いずれの投与群においても胸腺の細胞数測定及びリンパ球サブセット解析に著変は認められなかった。

実験 3: 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 <sup>3</sup>H-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 <sup>3</sup>H-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、雌性ラットあるいはマウスを用い有機リン剤パラチオンとメタミドホス、カーバメート剤 MPMC 及び有機塩素系農薬メトキシクロルを組み合わせ 3 つの実験を実施し、免疫系への複合暴露影響を検索した。

実験 1 では、パラチオンと MPMC を雌性ラットの成熟動物に複合投与したが免疫系への複合暴露影響は認められなかった。

実験 2 では、パラチオンとメタミドホスを雌性ラットの成熟動物に複合投与したが

免疫系への複合暴露影響は認められなかった。

実験 3 では、パラチオン及びメトキシクロロルを 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) を用いて検索した。

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<sup>13)</sup>、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<sup>4)</sup>、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<sup>5)</sup>。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 (<sup>3</sup>H-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こり、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<sup>6)</sup>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

雌性ラットの成熟動物にパラチオンと MPMC あるいはメタミドホストを組み合わせ反復投与した結果、免疫系に対する複合暴露影響は認められなかった。

一方、パラチオン及びメトキシクロルと、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、パラチオンないしメトキシクロルを 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、パラチオン及びメトキシクロルの若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 (N/ZB × N/ZW)F1 Mice *Environ. Health Persp.*, 113, 323-328, 2005.

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Fukuyama T, Ueda H, Hayashi K, Tajima Y, Shutoh Y, Saito TR, Harada T, Kosaka T. Use of long term dermal sensitization followed by intratracheal challenge method to identify low-dose chemical-induced respiratory allergic responses in mice. *Toxicol Lett.*, 181, 163-70, 2008.
- 2) 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.
- 3) 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. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

Table 1. Results of LLNA performed with Parathion and 2,4-D-butyl.

Treatment at 4wk (Parathion)	Dose of LLNA (2,4-D-butyl)	Final BW (g; mean $\pm$ SD)	Lymph node weight (mg; mean $\pm$ SD)	$^3\text{H}$ -TdR incorporation	
				dpm (mean $\pm$ SD)	SI <sup>a</sup>
0 mg/kg	0 %	20.8 $\pm$ 1.2	3.85 $\pm$ 0.90	134 $\pm$ 40	1.0
	2.5 %	21.1 $\pm$ 3.2	4.48 $\pm$ 1.27	222 $\pm$ 52*	1.7
	5 %	21.7 $\pm$ 2.6	4.70 $\pm$ 0.70	322 $\pm$ 49**	2.4
	10 %	21.4 $\pm$ 1.6	6.26 $\pm$ 1.02**	461 $\pm$ 42**	3.5
0.4 mg/kg	0 %	21.0 $\pm$ 1.1	3.20 $\pm$ 0.80	130 $\pm$ 38	1.0
	2.5 %	21.4 $\pm$ 1.6	5.58 $\pm$ 0.87*	601 $\pm$ 252	4.6
	5 %	20.9 $\pm$ 1.6	6.75 $\pm$ 1.55**	1054 $\pm$ 294	8.1
	10 %	21.8 $\pm$ 1.1	9.66 $\pm$ 0.81**	2107 $\pm$ 832**	16.1
1.2 mg/kg	0 %	20.9 $\pm$ 1.6	3.88 $\pm$ 0.22	129 $\pm$ 52	1.0
	2.5 %	21.2 $\pm$ 1.1	8.45 $\pm$ 1.19**	816 $\pm$ 367	6.3
	5 %	21.0 $\pm$ 1.1	11.56 $\pm$ 1.86**	2106 $\pm$ 683**	16.3
	10 %	21.5 $\pm$ 1.6	12.52 $\pm$ 2.22**	2957 $\pm$ 243**	22.9

<sup>a</sup>SI is the ratio of the mean of the measurements of the treatment group to that of the vehicle control group. The criterion for a positive response in the standard LLNA was an SI of 3 or greater.

Values for treatment and control groups were compared by Dunnett's multiple comparison test. \*p < 0.05; \*\* p < 0.01.

Table 2. Results of LLNA performed with Parathion and Eugenol.

Treatment at 4wk (Parathion)	Dose of LLNA (Parathion)	Final BW (g; mean $\pm$ SD)	Lymph node weight (mg; mean $\pm$ SD)	$^3\text{H}$ -TdR incorporation	
				dpm (mean $\pm$ SD)	SI <sup>a</sup>
0 mg/kg	0 %	20.3 $\pm$ 2.5	3.85 $\pm$ 1.14	304 $\pm$ 208	1.0
	5 %	20.7 $\pm$ 1.4	5.28 $\pm$ 0.77	593 $\pm$ 159	2.0
	10 %	20.8 $\pm$ 1.2	6.15 $\pm$ 0.62	2287 $\pm$ 705	7.5
	25 %	20.5 $\pm$ 1.6	10.54 $\pm$ 1.93**	8964 $\pm$ 2588**	29.5
0.4 mg/kg	0 %	20.6 $\pm$ 1.3	3.70 $\pm$ 0.48	205 $\pm$ 133	1.0
	5 %	20.2 $\pm$ 1.5	4.35 $\pm$ 1.41	972 $\pm$ 448	4.7
	10 %	20.7 $\pm$ 1.9	8.03 $\pm$ 0.99**	2931 $\pm$ 1843	14.3
	25 %	20.5 $\pm$ 1.5	12.44 $\pm$ 1.80**	11492 $\pm$ 2841**	56.1
1.2 mg/kg	0 %	20.8 $\pm$ 1.8	4.50 $\pm$ 1.14	302 $\pm$ 170	1.0
	5 %	20.7 $\pm$ 1.3	7.58 $\pm$ 1.72	2648 $\pm$ 1392	8.8
	10 %	21.2 $\pm$ 1.1	11.46 $\pm$ 3.20**	6947 $\pm$ 3184**	23.0
	25 %	20.0 $\pm$ 1.2	14.76 $\pm$ 2.64**	13775 $\pm$ 2869**	45.6

<sup>a</sup>SI is the ratio of the mean of the measurements of the treatment group to that of the vehicle control group. The criterion for a positive response in the standard LLNA was an SI of 3 or greater.

Values for treatment and control groups were compared by Dunnett's multiple comparison test. \*p < 0.05; \*\* p < 0.01.



Table 3. Results of LLNA performed with Methoxychlor and 2,4-D-butyl.

Treatment at 4wk (Methoxychlor)	Dose of LLNA (2,4-D-butyl)	Final BW (g; mean $\pm$ SD)	Lymph node weight (mg; mean $\pm$ SD)	<sup>3</sup> H]-TdR incorporation	
				dpm (mean $\pm$ SD)	SI <sup>a</sup>
0 mg/kg	0 %	21.4 $\pm$ 1.5	4.63 $\pm$ 0.47	134 $\pm$ 76	1.0
	2.5 %	21.7 $\pm$ 1.9	4.98 $\pm$ 0.24	254 $\pm$ 34	1.9
	5 %	21.3 $\pm$ 1.8	4.55 $\pm$ 0.70	334 $\pm$ 26	2.5
	10 %	21.2 $\pm$ 2.0	6.84 $\pm$ 1.23**	592 $\pm$ 249**	4.4
100 mg/kg	0 %	21.8 $\pm$ 1.7	4.08 $\pm$ 0.19	122 $\pm$ 43	1.0
	2.5 %	21.5 $\pm$ 2.1	5.80 $\pm$ 1.02	230 $\pm$ 58	1.9
	5 %	21.2 $\pm$ 1.5	9.20 $\pm$ 3.04**	721 $\pm$ 248**	5.9
	10 %	21.6 $\pm$ 1.4	9.60 $\pm$ 1.34**	1705 $\pm$ 208**	14.0
300 mg/kg	0 %	21.3 $\pm$ 2.3	4.18 $\pm$ 0.76	129 $\pm$ 13	1.0
	2.5 %	21.7 $\pm$ 2.6	7.80 $\pm$ 2.52*	616 $\pm$ 360	4.8
	5 %	21.3 $\pm$ 2.2	9.00 $\pm$ 1.41**	843 $\pm$ 188*	6.5
	10 %	21.2 $\pm$ 2.1	12.50 $\pm$ 1.35**	1942 $\pm$ 555**	15.1

<sup>a</sup>SI is the ratio of the mean of the measurements of the treatment group to that of the vehicle control group. The criterion for a positive response in the standard LLNA was an SI of 3 or greater.

Values for treatment and control groups were compared by Dunnett's multiple comparison test. \*p < 0.05; \*\* p < 0.01.

Table 4. Results of LLNA performed with Methoxychlor and Eugenol.

Treatment at 4wk (Methoxychlor)	Dose of LLNA (Eugenol)	Final BW (g; mean $\pm$ SD)	Lymph node weight (mg; mean $\pm$ SD)	$^3\text{H}$ -Tdr incorporation	
				dpm (mean $\pm$ SD)	SI <sup>a</sup>
0 mg/kg	0 %	20.9 $\pm$ 1.7	3.65 $\pm$ 0.32	192 $\pm$ 113	1.0
	5 %	21.1 $\pm$ 1.3	5.48 $\pm$ 1.85	1208 $\pm$ 1336	6.3
	10 %	21.0 $\pm$ 1.1	9.60 $\pm$ 0.53**	3029 $\pm$ 1776*	15.8
	25 %	21.2 $\pm$ 1.9	11.42 $\pm$ 1.76**	9476 $\pm$ 1707**	49.4
100 mg/kg	0 %	21.9 $\pm$ 2.3	4.38 $\pm$ 1.13	389 $\pm$ 428	1.0
	5 %	21.7 $\pm$ 2.5	9.90 $\pm$ 0.44*	4209 $\pm$ 935	10.8
	10 %	21.5 $\pm$ 1.2	12.75 $\pm$ 3.71**	8087 $\pm$ 2839**	20.8
	25 %	21.8 $\pm$ 1.7	14.92 $\pm$ 2.32**	16157 $\pm$ 4083**	41.5
300 mg/kg	0 %	20.8 $\pm$ 1.6	3.85 $\pm$ 0.37	167 $\pm$ 113	1.0
	5 %	21.0 $\pm$ 1.8	8.63 $\pm$ 1.85*	2911 $\pm$ 1096	17.4
	10 %	20.8 $\pm$ 1.4	10.85 $\pm$ 3.93**	8434 $\pm$ 3324**	50.5
	25 %	21.2 $\pm$ 1.8	15.56 $\pm$ 1.95**	17085 $\pm$ 2995**	102.3

<sup>a</sup>SI is the ratio of the mean of the measurements of the treatment group to that of the vehicle control group. The criterion for a positive response in the standard LLNA was an SI of 3 or greater.

Values for treatment and control groups were compared by Dunnett's multiple comparison test. \*p < 0.05; \*\* p < 0.01.

Table 5. EC3 values.

	Parathion Treatment at 4wk			Methoxychlor Treatment at 4wk		
	0 mg/kg	0.4 mg/kg	1.2 mg/kg	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg
EC3 values of 2,4-D-butyl	7.73	1.39	0.94	6.32	3.19	1.32
EC3 values of Eugenol	5.28	2.66	0.83	1.89	0.53	0.61

EC3 value was an estimation of the amount of the test solution required in LLNA to induce a SI of 3.

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）

分担総合研究報告書

分担研究課題： 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 CYP1A および 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 薬学部講師

研究要旨

本研究では、食品に含まれる化学物質として4種の食品添加物（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）、没食子酸プロピル（PG））に着目し、これら化合物をそれぞれ単独あるいはCYP誘導剤との複合暴露した場合のヒトCYP1AおよびCYP3Aサブファミリー酵素発現に及ぼす影響について検討した。

まず、芳香族炭化水素受容体（AhR）リガンド検索用細胞株であるHepG2-A10に対して各化合物を単独あるいはAhRリガンドである3-メチルコラントレン（MC）との複合暴露がAhR活性化およびCYP1Aサブファミリー酵素誘導（遺伝子および酵素活性）に及ぼす影響を検討した。その結果、用いた化合物のうちTBZにのみ単独でAhR活性化作用認められ、また、TBZおよびCUR、PGにはMCによるAhR活性化を増強する作用が認められた。次に、ヒトプレグナンX受容体（PXR）リガンド検索用細胞株であるHepG2-PXRLucA3を樹立し、各化合物単独あるいはPXRリガンドであるリファンピシン（RIF）との複合暴露がPXR活性化およびCYP3Aサブファミリー酵素誘導（遺伝子および酵素活性）に及ぼす影響を検討した。その結果、TBZは単独あるいはRIFとの複合暴露により弱いながらPXR活性化を促進した。また、CUR、PG及びBHTにはそれ自身にはPXR活性化作用は見られず、RIFとの複合暴露ではRIFのPXR活性化作用を抑制した。

以上、本研究で用いた4種の食品添加物（CUR、TBZ、BHT、PG）のうち、TBZにはそれ自身でAhRやPXRを活性化する作用があり、さらに、MCによるAhR活性化やRIFによるPXR活性化を増強する作用があることが示された。

A. 研究目的

肝シトクロムP450（CYP）分子種のうち、CYP1やCYP3ファミリー酵素は、外来異物に対する解毒代謝反応の中心を担っている。その一方で、これら酵素は時とし

て、異物の代謝活性化による発がんや肝障害などの毒性発現にも関与することが明らかとなっている。したがって、食品中の化学物質による異物代謝酵素の発現様式を予測することは、これら化学物質の安全性を評