

Table 4 - 1 Body weight - Group mean value (Methamidophos + Parathion)

(g)

Dose (mg/kg)		Before administration	7 days after administration
3.8 (M3.4 + P0.4)	Mean	144	175
	S.D.	8	9
	N	5	5
5.7 (M5.1 + P0.6)	Mean	143	174
	S.D.	6	6
	N	5	4
8.5 (M7.7 + P0.8)	Mean	145	173
	S.D.	5	
	N	5	1

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals.

Table 4 - 2 Body weight - Group mean value (Methamidophos + Xylycarb)

(g)

Dose (mg/kg)		Before administration	7 days after administration
56 (M5.1 + X51)	Mean	151	182
	S.D.	3	9
	N	5	5
84 (M7.7 + X76)	Mean	151	176
	S.D.	9	14
	N	5	4
126 (M12 + X114)	Mean	156	
	S.D.	3	
	N	5	

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals.

Table 4 - 3 Body weight - Group mean value (Methamidophos + 50%Nicotine sulfate WS)

(g)

Dose (mg/kg)		Before administration	7 days after administration
26 (M2.2 + N24)	Mean	142	175
	S.D.	6	7
	N	5	5
39 (M3.4 + N36)	Mean	141	172
	S.D.	4	6
	N	5	4
59 (M5.1 + N54)	Mean	141	163
	S.D.	3	5
	N	5	2
89 (M7.7 + N81)	Mean	147	
	S.D.	5	
	N	5	

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals.

Table 4 - 4 Body weight - Group mean value (Parathion + Xylycarb)

(g)

Dose (mg/kg)		Before administration	7 days after administration
52 (P0.6 + X51)	Mean	152	185
	S.D.	5	5
	N	5	5
77 (P0.8 + X76)	Mean	148	175
	S.D.	6	10
	N	5	5
115 (P1.2 + X114)	Mean	148	164
	S.D.	4	5
	N	5	2

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals.

Table 4 - 5 Body weight - Group mean value (Parathion + 50%Nicotine sulfate WS)

(g)

Dose (mg/kg)		Before administration	7 days after administration
36 (P0.4 + N36)	Mean	146	179
	S.D.	12	18
	N	5	5
55 (P0.6 + N54)	Mean	146	175
	S.D.	6	6
	N	5	5
82 (P0.8 + N81)	Mean	141	161
	S.D.	2	9
	N	5	4
122 (P1.2 + N121)	Mean	139	
	S.D.	3	
	N	5	
183 (P1.9 + N181)	Mean	140	
	S.D.	2	
	N	5	

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals.

Table 4 - 6 Body weight - Group mean value (Xylycarb + 50%Nicotine sulfate WS)

(g)

Dose (mg/kg)			Before administration	7 days after administration
31 (X15 + N16)	Mean		145	177
	S.D.		7	11
	N		5	5
47 (X23 + N24)	Mean		148	183
	S.D.		4	15
	N		5	5
70 (X34 + N36)	Mean		146	182
	S.D.		2	5
	N		5	5
105 (X51 + N54)	Mean		145	
	S.D.		6	
	N		5	
157 (X76 + N81)	Mean		142	
	S.D.		7	
	N		5	

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals.

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：食品中残留農薬の複合暴露影響に関する研究

2. 発達神経毒性に関する研究

ラットにおけるパラチオンとメタミドホス単剤の反復経口投与による予備検討

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	齋島淳子	(財) 残留農薬研究所	毒性部神経毒性研究室
	首藤康文	(財) 残留農薬研究所	毒性部神経毒性研究室
	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

研究要旨

OECD 発達神経毒性試験ガイドライン (TG 426) に準拠して、パラチオン及びメタミドホスを各々単剤で、妊娠6日より哺育21日まで反復経口投与し、児動物の発達に及ぼす影響を検索するとともに、複合暴露する際の用量設定を目的として実験を行った。

その結果、パラチオン (用量: 当初 1.0 mg/kg/day に設定、後に 0.8、0.6、0.3 mg/kg/day に順次変更) ないしメタミドホス (1.0 mg/kg/day) を投与した母動物において、妊娠期間中あるいは哺育期間中に重篤な神経症状が認められ、パラチオン投与群では平均 0.7 mg/kg/day 以上の用量で死亡例がみられた。また、メタミドホス投与群では血清 ChE 活性が有意に低下した。一方、児動物においては一般状態、身体発育及び性成熟、初期行動発達、学習及び記憶への影響はみられず、血清及び脳 ChE 活性にも影響はなかった。ただし、これらの児動物では連続的かつ執拗な探索行動、自発運動量及び強音刺激に対する反応性の増加が確認され、衝動性や多動性などの行動に影響を及ぼす可能性が示唆された。

以上の結果から、パラチオンとメタミドホスの複合投与実験を行う際には、母動物に死亡や重篤な神経症状がみられず、児動物に何らかの影響を及ぼすと予測される用量 (パラチオン 0.6 mg/kg/day、メタミドホス 0.8~1.0 mg/kg/day) を高用量に、また、低用量としてパラチオン 0.3 mg/kg/day、メタミドホス 0.4 mg/kg/day を設定するのが妥当であろうと考えられた。

A. 研究目的

食品中に残留する農薬は個々のレベルでは微量で安全性に問題はないが、類似の作用機序を有する複数の農薬に複合的に暴露された場合での影響が懸念されている。この問題を解決するため、米国 EPA や欧州食品安全機関では、ある特定の農薬群を対象に累積リスク評価法を導入し検討が進められている。この点を考慮し、本研究では発達期における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ことを目的として、米国 EPA における累積リスク評価法の基盤農薬のひとつであるメタミドホスと他の有機リン剤を組合せてラットの母動物に複合投与し、経胎盤・経乳汁暴露を受けた児動物の発達神経系への影響を、機能学的及び形態学的手法を用いて検索した。

平成 22 年度では、2 種類の有機リン剤(メタミドホス及びパラチオン)を各々単剤で、妊娠 6 日目より哺育 21 日まで反復経口投与し、児動物の発達に及ぼす影響を検索するとともに、複合暴露する際の適切な用量を検出することを目的に実験を行った。

B. 研究方法

本研究は OECD 発達神経毒性試験ガイドライン (TG 426)¹⁾ に準拠して実施した。2 種類の有機リン剤系殺虫剤のパラチオン及びメタミドホスを各々、妊娠 6 日目の雌性ラットに対し、哺育 21 日まで反復経口投与した。

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 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。パラチオンは冷蔵庫 (1-10°C) で、メタミドホスは冷凍庫 (-20°C) においてそれぞれ保管した。

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 9 週齢の雄を 26 匹、雌を 42 匹購入した。入荷後、全動物を試験環境に 7 日間馴化させ、馴化期間中に生死の確認を含む一般状態の観察を毎日実施した。その後、妊娠動物を得る目的で、雌のスメアを採取し、交配適期と判断された雌動物を雄と 1:1 で終夜同居させた。翌朝、膣栓あるいはスメア内に精子が認められた動物を交配成立動物とし、この日を妊娠 0 日とした。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。妊娠 0 日 (GD0) に体重を測定し、順番に各試験群に 14 匹ずつ配分し、動物は個別に収容した。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

成獣（9週齢）非妊娠雌性 Wistar Hannover系 SPF ラットを用いた予備試験において、パラチオン及びメタミドホス各 1.0 mg/kg/day を混合して反復経口投与したところ 5 例中 2 例の死亡が認められた。また、攣縮、振戦、縮瞳、流涎、筋緊張低下及び体温下降などの症状が認められた。パラチオン及びメタミドホス各 0.8 mg/kg/day の混合液では死亡は無く、症状も認められなかった。

上記の結果を考慮して、本研究ではパラチオン及びメタミドホスの複合投与試験実施に先立ち、各被験物質単剤での発達神経毒性影響を検索することを目的に、パラチオン投与群（用量：当初 1.0 mg/kg/day を設定、後に 0.8、0.6、0.3 mg/kg/day に順次変更）、メタミドホス投与群（1.0 mg/kg/day）及び対照群として媒体対照群（0 mg/kg/day）を設け、合計 3 群で実験を行った。

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、1% Tween80 水溶液（Tween80、和光純薬工業株式会社）にてパラチオン及びメタミドホスを濃度 0.25 mg/mL（用量 1.0 mg/kg）に調製した。パラチオン投与群において、投与開始 2 日（GD8）で 1 例の死亡と重篤な神経症状が認められたため、濃度を 0.20 mg/mL（用量 0.8 mg/kg）として調製した。さらに 2 例の死亡が認められたため、0.15 mg/mL（0.6 mg/kg）に調製を行ったが、3 例の死亡と神経症状が継続して認められたことから、濃

度を 0.075 mg/mL（0.3 mg/kg）に調製し投与を継続した。その後、死亡及び重篤な神経症状は認められなかった。

調製後、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。

投与方法は胃ゾンデを用いた強制経口投与とした。経口投与は毒性試験で汎用されている方法であり、また人の暴露経路に一致することから、この方法を採用した。

投与期間はガイドラインに従い、妊娠 6 日（GD6）から哺育 21 日（PND21：離乳日）までとした。投与時、重篤な神経症状を含む一般状態を示す動物に対しては、その日の投与は実施しなかった。

5. 検査項目

5.1. 母動物の観察

全動物について観察期間中、一般状態を含む瀕死状態及び死亡を 1 日 1 回観察した。また妊娠期間中及び哺育期間中に少なくとも 2 回、神経毒性症状を含む詳細な症状観察を実施した。

5.2. 母動物の体重

妊娠期間中は GD0、GD6、GD9、GD13、GD16、GD19、GD20 に、哺育期間中は週 2 回、母動物の体重を測定した。

5.3. 児動物の観察

全動物について観察期間中、一般状態を含む瀕死状態及び死亡の有無を 1 日 1 回観察した。さらに、以下に示す各種検査[実施時期]を行った。

・神経毒性症状を含む詳細な症状観察 [PND13、25、40、60~70]

- ・身体発育 (耳介展開 [PND3]、眼瞼開裂 [PND11]、切歯萌出 [PND14])
- ・性成熟 (包皮分離 [PND35~]、膻開口 [PND28~])
- ・初期行動発達 (正向反射 [PND7]、背地走性 [PND11])
- ・学習と記憶 (E 型水迷路、受動回避) [PND25±2、60~70]
- ・感覚機能 (聴覚驚愕反応、伸筋スラスト) [PND25±2、60~70]
- ・自発運動量測定 [PND13、17、21、56]

5.4. 児動物の体重

出生時には産腹ごとの総体重を雌雄別に測定した。生後 4 日に各母動物の哺育児数を 8 匹に調整した後は、毎週 1 回、個体別に体重を測定した。

5.5. 剖検及び組織採取

母動物は離乳後に、児動物は PND4 の哺育児数調整時、PND22 及び PND60~70 にエーテル麻酔下で開腹し、後大静脈より血液を採血した後に剖検した。血液は分離剤入り試験管 (セパラビット S; 積水化工業) に移し、遠心分離し (2000g×4℃×10 分間)、その上清を血清サンプルとした。また、各動物から脳を摘出し全脳重量を測定した。PND4 の児動物については、胃内容物も可能な限り採取した。

採取した各組織及びサンプルは後の検査に備えて適切な処置を実施し、浸漬固定あるいは凍結保存した。

5.6. コリンエステラーゼ(ChE)活性の測定

剖検時に採取した血清及び脳の ChE 活性を測定した。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。血清については、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。

6. 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。

各データは、Dunnett 検定に基づいたパラメトリックあるいはノンパラメトリックの多重比較法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。なお、ChE 活性については Student' s *t*-test あるいは Aspin-Welch test を実施した。

C. 研究結果

1. 投与用量及び死亡率

母動物では妊娠期間中にパラチオン投与群のみに、6 例の死亡が認められた。死亡した動物の平均投与用量は 1.0~0.7 mg/kg/day であった

児動物では哺育 4 日 (PND4) までにパラチオン投与群の 1 腹において、母動物に重篤な神経症状が発現したことによる、哺育困難によって全児動物が死亡した。PND4 に実施した Litter 調整後、全試験群における児動物の死亡は確認されなかった。

2. 母動物

2.1. 一般状態 (表 1A, 1B)

試験期間中、溶媒対照群では異常は認められなかった。パラチオン投与群では妊娠

期間中に攣縮(8例)、振戦(5例)、縮瞳(3例)、流涙(1例)および鼻周囲部被毛の汚れ(1例)が認められた。哺育期間中は筋緊張低下(1例)および皮膚色蒼白化(1例)が認められた。メタミドホス投与群では、妊娠期間中に攣縮(5例)が認められた。哺育期間中では筋緊張低下(3例)、眼周囲部赤色物付着(1例)、鼻周囲部被毛の汚れ(1例)が認められた。

一般状態の結果を表 1A および 1B に示す。

2.2. 詳細な症状の観察 (表 2A, 2B)

詳細な症状の観察結果を表 2A および 2B に示す。

母動物に対する詳細な症状観察を GD6、GD19 及び PND6、PND19 に実施した。

妊娠期間中の詳細な症状観察において、縮瞳がパラチオン及びメタミドホス投与群で認められた。またパラチオン投与群では瞳孔機能の低下も認められた。これらの症状はパラチオンあるいはメタミドホス投与に起因するものと判断した。哺育期間中における観察では、メタミドホス投与群にのみ、被験物質投与に起因する振戦が認められた。また溶媒対照群(0 mg/kg/day)を含む全ての群で筋緊張の低下が認められたが、メタミドホス投与群において高頻度に認められたことから、被験物質投与に起因する症状であると考えられた。

各観察時点の結果を以下に記す。

[GD6]

探索行動亢進：溶媒対照群 (8例)

パラチオン投与群 (3例)

メタミドホス投与群 (7例)

[GD19]

警戒性低下：溶媒対照群 (1例)

パラチオン投与群 (1例)

メタミドホス投与群 (3例)

探索行動亢進：溶媒対照群 (3例)

パラチオン投与群 (1例)

メタミドホス投与群 (2例)

探索行動低下：溶媒対照群 (3例)

パラチオン投与群 (3例)

メタミドホス投与群 (1例)

瞳孔径の低下：

パラチオン投与群 (1例)、

メタミドホス投与群 (3例)

瞳孔機能の低下：

パラチオン投与群 (1例)

[PND6]

振戦：メタミドホス投与群(2例)

警戒性低下：溶媒対照群 (3例)

パラチオン投与群 (1例)

メタミドホス投与群 (5例)

探索行動亢進：溶媒対照群 (2例)

パラチオン投与群 (1例)

メタミドホス投与群 (2例)

探索行動低下：溶媒対照群 (1例)

パラチオン投与群 (4例)

メタミドホス投与群 (3例)

筋緊張低下：溶媒対照群 (2例)

パラチオン投与群 (1例)

メタミドホス投与群 (3例)

瞳孔径の低下：溶媒対照群 (1例)

パラチオン投与群 (1例)

[PND19]

振戦：メタミドホス投与群 (2例)

警戒性低下：溶媒対照群 (2例)

パラチオン投与群 (3例)

メタミドホス投与群 (5例)

探索行動亢進：溶媒対照群 (4例)

パラチオン投与群 (3例)

メタミドホス投与群 (3例)

筋緊張低下：溶媒対照群（1例）

パラチオン投与群（1例）

メタミドホス投与群（2例）

2.3. 体重（表 3A, 3B）

妊娠期間中における体重変化では、GD9 にパラチオン投与群で 2 g の体重減少が認められた。その後体重は回復し、哺育期間中を含め順調に増加した。対照群及びメタミドホス投与群では妊娠期間中及び哺育期間中の体重は、順調に増加した。

体重測定の結果を表 3A および 3B に示す。

2.4. 剖検

各試験群における全ての生存動物には、肉眼的異常は認められなかった。

妊娠期間中に死亡したパラチオン投与群では流涎によると思われる口周囲部被毛の汚れ、胸腺萎縮、副腎腫大、胃及び腸管内液状内容物の貯留などが認められた。また、脳の軽度腫大も認められた。パラチオン投与群における死亡動物の肉眼所見を以下に示す。

被毛の汚れ（口周囲部）：3例

被毛の汚れ（眼周囲部）：1例

胸腺萎縮：4例

肺の赤色化：5例

肝臓の暗調化：2例

腺胃部赤色斑散在：2例

胃および腸管内液状内容物貯留：4例

脾臓腫大：1例

脾臓萎縮：1例

脳の軽度腫大：1例

2.5. ChE 活性（表 4）

ChE 活性測定の結果を表 4 に示す。

離乳時、各試験群における血清及び脳の ChE 活性を測定した。

血清の ChE 活性はメタミドホス投与群において有意差が認められ、対照群の 32% に低下した。

脳の ChE 活性は各投与群で統計学的に有意な変化は認められなかったが、メタミドホス投与群では対照群の 21% に低下した。

3. 児動物

3.1. 一般状態（表 5, 6）

哺育 4 日齢（PND4）までにメタミドホス投与群において 1 例に体温低下が認められた。溶媒対照群では雄 1 例に左後肢の黒色化が認められた。Litter 調整後、対照群における 1 例のみに、PND26 から試験終了時まで継続して眼周囲部赤色物付着が認められた。

Litter 調整後の一般状態の観察結果を表 5 および 6 に示す。

3.2. 詳細な症状の観察（表 7, 8）

詳細な症状の観察の結果を表 7, 8 に示す。

詳細な観察において流涙、眼球突出、眼瞼閉鎖、瞳孔径および瞳孔機能については PND25 より観察を開始した。対照群を含む全ての投与群における雌雄で、観察時間中の活発な探索行動が認められたが、雌ではパラチオンあるいはメタミドホス投与群において連続的で執拗な探索行動が認められた。また、PND13 における観察ではパラチオン投与群の雄 2 例に筋緊張の有意な低下が認められた。

3.3. 身体発育

身体発育の指標として、体重ならびに発

育指標の各々について各検査日に観察した。結果をその時点における発生率で評価した。

なお、体重測定の結果を表 9~11 に示す。

耳介展開

耳介展開は PND3 に検査した。溶媒対照群及びパラチオン投与群では雌雄共に 100%、メタミドホス投与群では雄で 99%、雌では 100%の耳介展開であった。

切歯萌出

切歯萌出は PND11 に検査した。溶媒対照群では雄で 100%、雌では 88%であった。パラチオン投与群では雌雄共に 100%であった。一方、メタミドホス投与群では雄で 88%、雌では 81%の切歯萌出であった。

眼瞼開裂

眼瞼開裂は PND14 に検査した。溶媒対照群では雄で 88%、雌で 91%であった。パラチオン投与群では雄で 70%、雌で 80%であった。メタミドホス投与群では雄で 72%、雌で 84%の眼瞼開裂であった。

体重 (表 9, 10, 11)

各投与群における全ての動物で、観察期間中、体重は順調に増加した。PND28 におけるメタミドホス投与群の雌では、溶媒対照と比較して有意な増加を示した。

3.4. 性成熟

性成熟を雄では包皮分離、雌では膣開口で評価した。

包皮分離

溶媒対照群では PND43±2、パラチオン投与群では PND43±1、メタミドホス投与群では PND41±1 に包皮分離が確認された。

膣開口

溶媒対照群を含む全ての試験群における膣の平均開口哺育日齢は、PND33±2 であった。

3.5. 初期行動発達

初期行動発達の結果を本文表 1 に示す。

正向反射

PND7 に実施した正向反射では、対照群と比較して有意差は認められなかった。

本文表 1-1 正向反射

(sec)

	Male	Female
V.C.	1.9±0.2	1.8±0.4
Parathion	1.9±0.5	2.2±0.4
Methamidophos	1.8±0.3	2.2±0.4

V.C.; Vehicle Control

(平均値±標準偏差)

背地走性

PND11 に実施した背地走性では、対照群と比較して有意差は認められなかった。

本文表 1-2 背地走性

(sec)

	Male	Female
V.C.	9.6±2.7	9.3±1.7
Parathion	8.4±2.5	9.6±2.4
Methamidophos	9.6±2.5	10.1±2.4

V.C.; Vehicle Control

(平均値±標準偏差)

3.6. 学習と記憶 (表 12, 13, 14, 15)

学習及び記憶に関する検査結果を表 12~15 に示す。

E 型水迷路 (表 12 及び 13)

PND25±2 および PND60~70 に実施した E 型水迷路検査では、各被験物質投与群において有意差は認められなかった。

受動回避 (表 14 及び 15)

PND25±2 及び PND60~70 に実施した受動回避検査では、各被験物質投与群において有意差は認められなかった。

3.7. 感覚機能 (表 16, 17, 18, 19)

聴覚驚愕反応

聴覚驚愕反応検査の結果を表 16 および 17 に示す。

PND25±2 及び PND60~70 で聴覚驚愕反応検査を実施した。検査は強い音刺激 (100db) を与える前に、微弱な音刺激 (低 : 75db ; 中 : 77db ; 高 : 79db) を与えることで驚愕反応の抑制(プレパルス抑制)を評価した。当該試験では、対照群を含む全ての試験群においてプレパルス抑制が認められた。但し、PND60~70 におけるパラチオン投与群の雄では刺激音に対する反応が対照群と比べて有意に高く、また雌では有意差は認められないが高い反応性を示した。

伸筋スラスト

伸筋スラスト反応の結果を表 18 及び 19 に示す。

PND25±2 及び PND60~70 で実施した伸筋スラスト反応において、雄では対照群を含む全ての試験群において異常は認められなかった。一方、雌において PND60~70 にメタミドホス投与群における 1 例に軽度の亢進が認められた。

3.8. 自発運動量 (表 20, 21)

自発運動量測定の結果を表 20 及び 19 に示す。

PND13, 17, 21 および 56 に自発運動量を測定した。雄では全ての観察時点で対照群と比較して、有意差は認められなかった。

一方、雌では PND56 におけるパラチオン投与群の雌において、60 分間の総運動量が有意に増加した。

3.9. 剖検

各試験群児童物の剖検において肉眼的異常は認められなかった。

3.10. 脳重量

PND4, 22 及び 60~70 における脳重量を測定した結果、各被験物質投与群において有意差は認められなかった。

脳重量の結果を本文表 2 に示す。

本文表 2 脳重量

Male (mg)

	PND4	PND22	PND60-70
V.C.	455±34	1512±54	1938±29
Parathion	476±12	1467±31	1930±51
Methamidophos	463±28	1467±57	1891±70

Female (mg)

	PND4	PND22	PND60-70
V.C.	474±24	1472±52	1826±46
Parathion	481±24	1436±29	1801±33
Methamidophos	447±35	1419±55	1798±30

V.C.; Vehicle Control

(平均値±標準偏差)

3.11. ChE 活性 (表 22A, 22B, 22C, 23A, 23B, 23C)

ChE 活性の測定結果を表 22A~23C に示す。

PND4 における血清及び脳の ChE 活性には有意差は認められず、また ChE 活性の低下も認められなかった。

PND22 では脳の ChE 活性において、パラチオン投与群の雄で有意差が認められた (溶媒対照群の 142%)。その他の投与群ならびに血清 ChE 活性では有意差は認めら

れなかった。

PND60~70 では脳の ChE 活性において、メタミドホス投与群の雌で有意差が認められた (溶媒対照群の 115%)。その他の投与群ならびに血清 ChE 活性では有意差は認められなかった。

D. 考察

母動物

当該試験は、パラチオン及びメタミドホスの経胎盤・経乳汁暴露を受けた児動物の発達神経影響を検索するために実施した。試験は OECD 発達神経毒性試験ガイドライン (TG 426) に準拠して実施した。パラチオン及びメタミドホスを 1% Tween80 水溶液で所定の濃度に溶解・懸濁したものを、GD6 から PND21 まで妊娠ラットに反復強制経口投与した。投与容量は 4 mL とした。パラチオン及びメタミドホスの濃度は 0.25 mg/mL (1.0 mg/kg) とした。しかし、パラチオンでは GD8 で 1 例の死亡及び攣縮、振戦、縮瞳、流涙などの重篤な神経症状が認められ、0.20 mg/mL (0.8 mg/kg) に変更したが 2 例の死亡、さらに 0.15 mg/mL (0.6 mg/kg) では 3 例の死亡が認められた。その後、濃度を 0.075 mg/mL (0.3 mg/kg) に調製し投与を継続したところ、死亡が無く、症状も認められなかった。なお、死亡した母動物の平均投与用量を算出した結果、0.7 mg/kg/day 以上であることが判明し、0.6 mg/kg/day 以下では死亡は起こらないものと推察された。一方、メタミドホス投与群では、妊娠期間中に痙攣が、また、哺育期間中に筋緊張の低下などの神経症状が認められた。一般に妊娠あるいは授乳期間中は、薬物の代謝・吸収・排泄などの薬物動態に関連した顕著な生理学的変化が生じるため、パラチオン及びメタミドホス投与群では、死亡あ

るいは重篤な神経症状の発現が招来されたものと推測された。

母動物の詳細な症状観察では、GD6、GD19 にパラチオン及びメタミドホス投与に起因すると考えられる縮瞳、瞳孔機能の低下が認められた。PND6 及び PND19 では溶媒対照群を含む全ての試験群で筋緊張の低下、さらにパラチオン及びメタミドホス投与群では縮瞳が認められた。また、メタミドホス投与群にのみ振戦が認められた。筋緊張低下はメタミドホス投与群で多く認められる事から、投与に関連した症状であると判断した。パラチオンあるいはメタミドホス投与群で認められた縮瞳および瞳孔機能の低下、振戦などは有機リン系薬剤投与による特徴的な症状であることから、被験物質投与に関連した症状と判断した。

試験期間中の体重は GD9 におけるパラチオン投与群を除いて、順調な増加を示した。

剖検時、パラチオン投与群の死亡動物では流涎を原因とする口周囲部被毛の汚れ、胸腺萎縮、副腎腫大など免疫系組織への影響、あるいは急性毒性変化を示す肺の赤色化などが認められた。また、軽度の脳の腫大が認められた。これらの肉眼所見は被験物質投与に関連したものと判断した。一方、生存動物ではいずれの個体にも肉眼的異常は認められなかった。

パラチオンあるいはメタミドホス投与群における脳重量に、有意差は認められなかった。

ChE 活性測定において、メタミドホス投与群では血清 ChE 活性が溶媒対照群と比較して 32% の有意な低下を示した。さらに脳の ChE 活性では有意差は認められなかったが、溶媒対照群よりも 21% の低下を示した。有機リン系薬剤は ChE を阻害するため、メタミドホス投与群で認められた低下は、投与に起因した変化であると判断した。

児動物

PND4 に Litter 調整を実施した。試験に供した全ての児動物において死亡あるいは重篤な神経症状は認められなかった。

詳細な観察を PND13、25、40 および 60~70 で実施したところ、溶媒対照群を含む全ての試験群で活発な探索行動が認められた。被験物質投与群における雌では、連続的あるいは執拗な探索行動が認められた。

体重測定を含む身体発育は、全ての試験群で概ね順調な発育を示した。性成熟についても溶媒対照群を含む全ての試験群で、順調な発達を確認した。正向反射および背地走性試験による初期行動発達において、被験物質投与群に有意差を認めなかった。

学習及び記憶への影響を PND25±2、PND60~70 に E 型水迷路、受動回避試験から評価した。その結果、各観察時点におけるいずれの試験でも、溶媒対照群との間に有意差は認められなかった。

感覚機能への影響について、PND25±2 および PND60~70 に聴覚驚愕反応及び伸筋スラスト反応から評価した。伸筋スラスト反応は PND60~70 のメタミドホス投与群の雌で 1 例、軽度なスラストの亢進が認められたが、溶媒対照群を含む全ての試験群で正常な範囲である事が確認された。聴覚驚愕反応では PND25±2 及び PND60~70 の対照群を含む全ての試験群で、プレパルス抑制が確認された事から、聴覚機能あるいは環境に対する注意力は正常である事が示唆された。しかし、PND60~70 におけるパラチオンあるいはメタミドホス投与群では、強い刺激音に対する反応が著しく高い傾向を示した。特に、パラチオン投与群では雄において溶媒対照群と比較して有意に高い反応を示し、一方、雌では有意差は認められないも

のの高い反応性を示した。

パラチオン投与群の雌では、PND56 における 60 分間総運動量が対照群よりも、有意に増加した。

児動物の脳重量は各測定時点で、有意差は認められなかった。

ChE 活性を PND4、PND22 及び PND60-70 に測定した。PND22 における脳の ChE 活性において、パラチオン投与群の雄では対照群の 42% という有意な高値を示した。PND60~70 における脳の ChE 活性は、メタミドホス投与群の雌で対照群の 15% という有意な高値を示した。これらの有機リン剤による作用に反する ChE 活性増加の毒性的意義は不明であり、偶発的な変化である可能性が高いと考えられた。

E. 結論

OECD 発達神経毒性ガイドライン (TG426) に準拠して、濃度 0.25~0.075 mg/mL (1.0~0.3 mg/kg) のパラチオン及び濃度 0.25 mg/mL (1.0 mg/kg) のメタミドホスを各々 GD6 から PND21 まで母動物に反復強制経口投与した結果、母動物において重篤な神経症状が発現し、パラチオン投与群では平均 0.7 mg/kg/day 以上の用量で死亡例が認められた。一方、児動物では一般状態、身体発育及び性成熟、初期行動発達、学習及び記憶に対する影響は確認されなかった。ただし、詳細な症状観察及び自発運動量測定、聴覚驚愕反応検査から、児動物の衝動性あるいは多動性という行動に影響を及ぼす可能性が示唆された。児動物の ChE 活性は全く抑制されなかったことから、パラチオンあるいはメタミドホスそのものが経胎盤・経乳汁移行をした可能性は低いが、代謝物の移行や母動物の行動変化等が児動物に影響を及ぼした可能性が考

えられた。

なし

以上の結果から、パラチオンとメタミドホスの複合投与実験を実施する際には、母動物の死亡や哺育に支障をきたすような重篤な神経症状を発現せず、かつ、児動物に何らかの影響を及ぼす可能性のある用量（パラチオン 0.6 mg/kg/day、メタミドホス 0.8 mg/kg/day）を高用量に、また、無毒性量として予測される用量（パラチオン 0.3 mg/kg/day、メタミドホス 0.4mg/kg/day）を低用量に設定することが妥当であろう考えられた。

F. 参考文献

- 1) OECD (2007). OECD guideline for the testing of chemicals 426 Developmental neurotoxicity study.

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

- 1) 化学物質の発達神経毒性評価手法について-溶媒による妊娠および児動物への影響-：藤江 秀彰、小松 豊、齋島 淳子、首藤 康文、青山 博昭、原田 孝則 第 44 回日本実験動物技術者協会総会（旭川、2010）

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

Table 1A General health condition - Incidence of signs in maternal rats on gestation day

Clinical signs	Dose groups (mg/kg/day)	1% Tween80 0	Parathion 0.3	Methamidophos 1.0
No abnormalities detected		14	4	9
Consciousness/Nervous system: Twitch		0	10 **	5 *
Consciousness/Nervous system: Tremor		0	5 *	0
Eye/Eyelid (eye): Miosis		0	3	0
Eye/Eyelid (eye): Lacrimation		0	1	0

Data were statistically analyzed by Fisher's exact probability test.
Significantly different from control: *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$.

Table 1B General health condition - Incidence of signs in maternal rats on postnatal day

Clinical signs	Dose groups (mg/kg/day)	1% Tween80 0	Parathion 0.3	Methamidophos 1.0
No abnormalities detected		8	5	5
Consciousness/Nervous system: Flaccidity		0	0	3
Skin (periocular region): Red adhesive substance		0	0	1
Fur (perinasal region): Soiled fur		0	0	1

Data were statistically analyzed by Fisher's exact probability test.

Table 2A - 1

Detailed clinical observations - Summary data in maternal rats on gestation day

Home cage: Body position/posture

Dose groups (mg/kg/day)	Score	GD	
		6	19
1% Tween80	0	14	14
0	1	0	0
Parathion	0	14	10
0.3	1	0	0
Methami	0	14	14
dophos	1	0	0
1.0			

Data were statistically analyzed by Dunnett-type test following Kruskal-Wallis test.

Table 2A - 2

Detailed clinical observations - Summary data in maternal rats on gestation day

Home cage: Respiratory pattern

Dose groups (mg/kg/day)	Score	GD	
		6	19
1% Tween80	0	14	14
0	1	0	0
	2	0	0
	3	0	0
Parathion	0	14	10
0.3	1	0	0
	2	0	0
	3	0	0
Methami	0	14	14
dophos	1	0	0
1.0	2	0	0
	3	0	0

Data were statistically analyzed by Dunnett-type test following Kruskal-Wallis test.

Table 2A - 3

Detailed clinical observations - Summary data in maternal rats on gestation day

Home cage: Twitch

Dose groups (mg/kg/day)	Score	GD	
		6	19
1% Tween80	0	14	14
0	1	0	0
	2	0	0
Parathion	0	14	10
0.3	1	0	0
	2	0	0
Methami	0	14	14
dophos	1	0	0
1.0	2	0	0

Data were statistically analyzed by Dunnett-type test following Kruskal-Wallis test.

Table 2A - 4

Detailed clinical observations - Summary data in maternal rats on gestation day

Home cage: Tremors

Dose groups (mg/kg/day)	Score	GD	
		6	19
1% Tween80	0	14	14
0	1	0	0
	2	0	0
Parathion	0	14	10
0.3	1	0	0
	2	0	0
Methami	0	14	14
dophos	1	0	0
1.0	2	0	0

Data were statistically analyzed by Dunnett-type test following Kruskal-Wallis test.

Table 2A - 5

Detailed clinical observations - Summary data in maternal rats on gestation day

Home cage: Convulsions

Dose groups (mg/kg/day)	Score	GD	
		6	19
1% Tween80	0	14	14
0	1	0	0
	2	0	0
Parathion	0	14	10
0.3	1	0	0
	2	0	0
Methami	0	14	14
dophos	1	0	0
1.0	2	0	0

Data were statistically analyzed by Dunnett-type test following Kruskal-Wallis test.

Table 2A - 6

Detailed clinical observations - Summary data in maternal rats on gestation day

Handling: Alertness

Dose groups (mg/kg/day)	Score	GD	
		6	19
1% Tween80	-2	0	0
0	-1	0	2
	0	14	12
	1	0	0
	2	0	0
Parathion	-2	0	0
0.3	-1	1	2
	0	13	8
	1	0	0
	2	0	0
Methami	-2	0	0
dophos	-1	0	5
1.0	0	14	9
	1	0	0
	2	0	0

Data were statistically analyzed by Dunnett-type test following Kruskal-Wallis test.

Table 2A - 7

Detailed clinical observations - Summary data in maternal rats on gestation day

Handling: Aggression

Dose groups (mg/kg/day)	Score	GD	
		6	19
1% Tween80	0	14	14
0	1	0	0
	2	0	0
	3	0	0
Parathion	0	14	10
0.3	1	0	0
	2	0	0
	3	0	0
Methami	0	14	14
dophos	1	0	0
1.0	2	0	0
	3	0	0

Data were statistically analyzed by Dunnett-type test following Kruskal-Wallis test.

Table 2A - 8

Detailed clinical observations - Summary data in maternal rats on gestation day

Open field: Stereotypies

Dose groups (mg/kg/day)	Score	GD	
		6	19
1% Tween80	0	14	14
0	1	0	0
	2	0	0
	3	0	0
Parathion	0	14	10
0.3	1	0	0
	2	0	0
	3	0	0
Methami	0	14	14
dophos	1	0	0
1.0	2	0	0
	3	0	0

Data were statistically analyzed by Dunnett-type test following Kruskal-Wallis test.