

Table 14

Learning and memory - Passive avoidance test in F1 male rats on postnatal day

Dose groups (mg/kg/day)		PND 25±2		PND 60-70	
		1-trial	2-trial	1-trial	2-trial
		Percentage of reach a learning (%)	Percentage of reach a learning (%)	Percentage of reach a learning (%)	Percentage of reach a learning (%)
1% Tween80 0	total	100	-	100	-
Parathion 0.3	total	100	-	100	-
Methamido phos 1.0	total	100	-	100	-

-: No examined because all animals had been reach a learning by 1-trial.

Data were statistically analyzed by Dunnett's test following one-way ANOVA or Dunnett-type test following Kruskal-Wallis test.

Table 15

Learning and memory - Passive avoidance test in F1 female rats on postnatal day

Dose groups (mg/kg/day)		PND 25±2		PND 60-70	
		1-trial	2-trial	1-trial	2-trial
		Percentage of reach a learning (%)	Percentage of reach a learning (%)	Percentage of reach a learning (%)	Percentage of reach a learning (%)
1% Tween80 0	total	100	-	100	-
Parathion 0.3	total	80	100	100	-
Methamido phos 1.0	total	88	100	100	-

-: No examined because all animals had been reach a learning by 1-trial.

Data were statistically analyzed by Dunnett's test following one-way ANOVA or Dunnett-type test following Kruskal-Wallis test.

Table 16 Sensory function - Auditory startle habituation in F1 male rats on postnatal day

Dose groups (mg/kg/day)	Day	PND 25±2				
		PPI BC	PPI BH	Stage (N)		
				PPI Low	PPI Middle	PPI High
1% Tween80 0	Mean	0.0875	0.7316	0.6370	0.5960	0.5588
	S.D.	0.0346	0.3106	0.2500	0.2927	0.2988
Parathion 0.3	Mean	0.1018	0.6709	0.5544	0.4636	0.5350
	S.D.	0.0350	0.1826	0.1785	0.1408	0.1751
Methamidophos 1.0	Mean	0.1564	0.7767	0.6871	0.6264	0.6266
	S.D.	0.2188	0.2424	0.1927	0.1458	0.1536

Dose groups (mg/kg/day)	Day	PND 60-70				
		PPI BC	PPI BH	Stage (N)		
				PPI Low	PPI Middle	PPI High
1% Tween80 0	Mean	0.1225	2.1565	1.8019	1.5280	1.5336
	S.D.	0.0742	0.5108	0.6371	0.5142	0.6976
Parathion 0.3	Mean	0.1259	3.4274 **	3.1686 **	2.9717 **	2.6167 *
	S.D.	0.0592	0.5613	0.5707	0.8709	0.7652
Methamidophos 1.0	Mean	0.1225	1.9890	1.9380	1.7133	1.4307
	S.D.	0.0297	0.7095	0.6990	0.7852	0.7149

S.D.: Standard deviation.

Data were statistically analyzed by Dunnett's test following one-way ANOVA or Dunnett-type test following Kruskal-Wallis test.

Significantly different from control: *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$.

Table 17 Sensory function - Auditory startle habituation in F1 female rats on postnatal day

Dose groups (mg/kg/day)	Day	PND 25±2				
		PPI BC	PPI BH	Stage (N)		
				PPI Low	PPI Middle	PPI High
1% Tween80 0	Mean	0.0779	0.5433	0.4846	0.4423	0.4401
	S.D.	0.0349	0.1373	0.1428	0.1887	0.1949
Parathion 0.3	Mean	0.1032	0.7745	0.5167	0.5210	0.5328
	S.D.	0.0285	0.2062	0.2182	0.2093	0.2430
Methamidophos 1.0	Mean	0.1564	0.7767	0.6871	0.6264	0.6266
	S.D.	0.2188	0.2424	0.1927	0.1458	0.1536

Dose groups (mg/kg/day)	Day	PND 60-70				
		PPI BC	PPI BH	Stage (N)		
				PPI Low	PPI Middle	PPI High
1% Tween80 0	Mean	0.1346	1.7732	1.4398	1.3615	1.1859
	S.D.	0.0851	0.6783	0.7691	0.7710	0.6648
Parathion 0.3	Mean	0.1382	2.6563	2.2634	2.1041	1.7326
	S.D.	0.0789	1.6514	2.1771	2.0865	1.7936
Methamidophos 1.0	Mean	0.1151	2.2510	1.9775	1.9193	1.4852
	S.D.	0.0473	0.6906	0.9579	0.8017	0.6613

S.D.: Standard deviation.

Data were statistically analyzed by Dunnett's test following one-way ANOVA or Dunnett-type test following Kruskal-Wallis test.

Table 18

Sensory function - Extensor thrust response in F1 male rats on postnatal day

Dose groups (mg/kg/day)	Score	PND25±2	PND60-70
1% Tween80 0	-2	0	0
	-1	0	0
	0	8	8
	1	0	0
	2	0	0
Parathion 0.3	-2	0	0
	-1	0	0
	0	5	5
	1	0	0
	2	0	0
Methami dophos 1.0	-2	0	0
	-1	0	0
	0	8	8
	1	0	0
	2	0	0

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

Table 19

Sensory function - Extensor thrust response in F1 female rats on postnatal day

Dose groups (mg/kg/day)	Score	PND25±2	PND60-70
1% Tween80 0	-2	0	0
	-1	0	0
	0	8	8
	1	0	0
	2	0	0
Parathion 0.3	-2	0	0
	-1	0	0
	0	5	5
	1	0	0
	2	0	0
Methami dophos 1.0	-2	0	0
	-1	0	0
	0	8	7
	1	0	1
	2	0	0

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

Table 20 - 1

Motor activity - Summary data in F1 male rats on postnatal day

		PND						(counts)
Dose groups (mg/kg/day)	min	13						Total
		0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	
1% Tween80 0	Mean	106	79	71	49	24	25	354
	S.D.	85	72	58	41	23	23	217
Parathion 0.3	Mean	173	181	63	33	15	12	478
	S.D.	194	236	74	55	11	16	562
Methami dophos 1.0	Mean	184	100	41	22	22	18	387
	S.D.	176	133	41	26	51	40	370

		PND						
Dose groups (mg/kg/day)	min	17						Total
		0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	
1% Tween80 0	Mean	213	217	122	85	92	6	734
	S.D.	136	213	144	137	159	10	690
Parathion 0.3	Mean	247	315	128	51	1	1	742
	S.D.	209	224	151	82	2	1	567
Methami dophos 1.0	Mean	449	472	336	157	74	60	1548
	S.D.	297	336	235	198	114	164	1138

Data were statistically analyzed by Dunnett's test following one-way ANOVA or Dunnett-type test following Kruskal-Wallis test.

Table 20 - 2

Motor activity - Summary data in F1 male rats on postnatal day

		PND							(counts)
Dose groups (mg/kg/day)	min	21						Total	
		0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60		
1% Tween80 0	Mean	431	237	78	34	117	5	903	
	S.D.	196	87	60	67	262	13	348	
Parathion 0.3	Mean	429	299	36	2	3	2	771	
	S.D.	168	154	32	3	4	2	339	
Methami dophos 1.0	Mean	547	220	111	24	0	1	903	
	S.D.	194	124	74	42	1	2	339	

		PND							(counts)
Dose groups (mg/kg/day)	min	56						Total	
		0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60		
1% Tween80 0	Mean	1353	917	353	269	198	80	3169	
	S.D.	303	266	211	326	233	90	850	
Parathion 0.3	Mean	1339	575	439	397	211	235	3197	
	S.D.	284	208	174	198	215	218	583	
Methami dophos 1.0	Mean	1532	749	369	361	198	183	3390	
	S.D.	201	235	236	352	302	211	1190	

Data were statistically analyzed by Dunnett's test following one-way ANOVA or Dunnett-type test following Kruskal-Wallis test.

Table 21 - 1

Motor activity - Summary data in F1 female rats on postnatal day

		PND							(counts)
Dose groups (mg/kg/day)	min	13						Total	
		0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60		
1% Tween80 0	Mean	153	181	114	81	52	23	605	
	S.D.	157	166	145	108	81	42	594	
Parathion 0.3	Mean	88	66	65	88	60	29	395	
	S.D.	53	61	93	103	117	50	417	
Methami dophos 1.0	Mean	113	51	54	60	50	10	338	
	S.D.	110	68	49	47	52	12	212	

		PND							(counts)
Dose groups (mg/kg/day)	min	17						Total	
		0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60		
1% Tween80 0	Mean	293	263	153	212	138	147	1206	
	S.D.	216	229	184	269	246	274	1109	
Parathion 0.3	Mean	417	403	328	103	16	1	1267	
	S.D.	262	269	237	120	30	2	805	
Methami dophos 1.0	Mean	345	324	84	6	16	43	819	
	S.D.	244	283	110	15	23	80	629	

Data were statistically analyzed by Dunnett's test following one-way ANOVA or Dunnett-type test following Kruskal-Wallis test.

Table 21 - 2

Motor activity - Summary data in F1 female rats on postnatal day

		PND							(counts)
Dose groups (mg/kg/day)	min	21						Total	
		0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60		
1% Tween80 0	Mean	433	203	94	125	52	78	985	
	S.D.	132	108	180	330	146	192	949	
Parathion 0.3	Mean	426	224	149	45	4	3	849	
	S.D.	87	60	109	38	4	2	153	
Methami dophos 1.0	Mean	367	268	43	28	3	1	710	
	S.D.	191	153	62	79	6	1	283	

		PND							
Dose groups (mg/kg/day)	min	56						Total	
		0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60		
1% Tween80 0	Mean	1126	608	311	261	237	182	2725	
	S.D.	298	309	267	223	237	188	990	
Parathion 0.3	Mean	1332	990	675	438	521	377	4333 *	
	S.D.	180	205	272	285	248	243	644	
Methami dophos 1.0	Mean	1224	702	419	427	152	242	3165	
	S.D.	252	300	372	267	168	222	1265	

Data were statistically analyzed by Dunnett's test following one-way ANOVA or Dunnett-type test following Kruskal-Wallis test.

Significantly different from control: *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$.

Table 22A - 1 Cholinesterase activity - Group mean values in F1 male rats on postnatal day 4

Dose groups (mg/kg/day)	No. of animals examined		Serum (U/L)
1% Tween 80 0	6	Mean	827
		S.D.	99
Parathion 0.3	7	Mean	787
		S.D.	67
Methamido phos1.0	8	Mean	747
		S.D.	90

S.D.: Standard deviation.

Data were statistically analyzed by Student's *t* test or Aspin-Welch test.

Table 22A - 2 Cholinesterase activity - Group mean values in F1 male rats on postnatal day 4

Dose groups (mg/kg/day)	No. of animals examined		Brain (U/L)
1% Tween 80 0	6	Mean	203
		S.D.	18
Parathion 0.3	6	Mean	195
		S.D.	17
Methamido phos1.0	8	Mean	208
		S.D.	24

S.D.: Standard deviation.

Data were statistically analyzed by Student's *t* test or Aspin-Welch test.

Table 22B - 1 Cholinesterase activity - Group mean values in F1 male rats on postnatal day 22

Dose groups (mg/kg/day)	No. of animals examined		Serum (U/L)
1% Tween 80 0	8	Mean	779
		S.D.	83
Parathion 0.3	6	Mean	714
		S.D.	98
Methamido phos1.0	10	Mean	771
		S.D.	155

S.D.: Standard deviation.

Data were statistically analyzed by Student's *t* test or Aspin-Welch test.

Table 22B - 2 Cholinesterase activity - Group mean values in F1 male rats on postnatal day 22

Dose groups (mg/kg/day)	No. of animals examined		Brain (U/L)
1% Tween 80 0	8	Mean	186
		S.D.	27
Parathion 0.3	6	Mean	265 *
		S.D.	59
Methamido phos1.0	10	Mean	209
		S.D.	44

S.D.: Standard deviation.

Data were statistically analyzed by Student's *t* test or Aspin-Welch test.

Significantly different from control: *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$.

Table 22C - 1 Cholinesterase activity - Group mean values in F1 male rats on postnatal day 60-70

Dose groups (mg/kg/day)	No. of animals examined		Serum (U/L)
1% Tween 80 0	8	Mean	524
		S.D.	57
Parathion 0.3	5	Mean	514
		S.D.	73
Methamido phos1.0	8	Mean	559
		S.D.	90

S.D.: Standard deviation.

Data were statistically analyzed by Student's *t* test or Aspin-Welch test.

Table 22C - 2 Cholinesterase activity - Group mean values in F1 male rats on postnatal day 60-70

Dose groups (mg/kg/day)	No. of animals examined		Brain (U/L)
1% Tween 80 0	8	Mean	341
		S.D.	51
Parathion 0.3	5	Mean	321
		S.D.	44
Methamido phos1.0	8	Mean	334
		S.D.	27

S.D.: Standard deviation.

Data were statistically analyzed by Student's *t* test or Aspin-Welch test.

Table 23A - 1 Cholinesterase activity - Group mean values in F1 female rats on postnatal day 4

Dose groups (mg/kg/day)	No. of animals examined		Serum (U/L)
1% Tween 80 0	6	Mean	828
		S.D.	109
Parathion 0.3	7	Mean	841
		S.D.	105
Methamido phos1.0	7	Mean	738
		S.D.	74

S.D.: Standard deviation.

Data were statistically analyzed by Student's *t* test or Aspin-Welch test.

Table 23A - 2 Cholinesterase activity - Group mean values in F1 female rats on postnatal day 4

Dose groups (mg/kg/day)	No. of animals examined		Brain (U/L)
1% Tween 80 0	6	Mean	201
		S.D.	26
Parathion 0.3	7	Mean	205
		S.D.	14
Methamido phos1.0	7	Mean	200
		S.D.	43

S.D.: Standard deviation.

Data were statistically analyzed by Student's *t* test or Aspin-Welch test.

Table 23B - 1 Cholinesterase activity - Group mean values in F1 female rats on postnatal day 22

Dose groups (mg/kg/day)	No.of animals examined		Serum (U/L)
1% Tween 80 0	8	Mean	859
		S.D.	84
Parathion 0.3	6	Mean	834
		S.D.	62
Methamido phos1.0	10	Mean	756
		S.D.	152

S.D.: Standard deviation.

Data were statistically analyzed by Student's *t* test or Aspin-Welch test.

Table 23B - 2 Cholinesterase activity - Group mean values in F1 female rats on postnatal day 22

Dose groups (mg/kg/day)	No.of animals examined		Brain (U/L)
1% Tween 80 0	8	Mean	213
		S.D.	40
Parathion 0.3	6	Mean	245
		S.D.	70
Methamido phos1.0	10	Mean	222
		S.D.	74

S.D.: Standard deviation.

Data were statistically analyzed by Student's *t* test or Aspin-Welch test.

Table 23C - 1 Cholinesterase activity - Group mean values in F1 female rats on postnatal day 60-70

Dose groups (mg/kg/day)	No. of animals examined		Serum (U/L)
1% Tween 80 0	8	Mean	2756
		S.D.	839
Parathion 0.3	5	Mean	2347
		S.D.	469
Methamido phos1.0	8	Mean	2726
		S.D.	892

S.D.: Standard deviation.

Data were statistically analyzed by Student's *t* test or Aspin-Welch test.

Table 23C - 2 Cholinesterase activity - Group mean values in F1 female rats on postnatal day 60-70

Dose groups (mg/kg/day)	No. of animals examined		Brain (U/L)
1% Tween 80 0	8	Mean	315
		S.D.	33
Parathion 0.3	5	Mean	362
		S.D.	44
Methamido phos1.0	8	Mean	363 *
		S.D.	41

S.D.: Standard deviation.

Data were statistically analyzed by Student's *t* test or Aspin-Welch test.

Significantly different from control: *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$.

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

3. 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暴露後の
環境中アレルギー性物質複合暴露によるアレルギー性影響

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	小坂忠司	(財) 残留農薬研究所	毒性部
	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

農薬を複合暴露した際のアレルギー性増強影響を検索する目的で、有機リン剤（パラチオン）及び有機塩素剤（メトキシクロル）をそれぞれ雌性マウスに5日間反復経口投与（前処置）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）のアレルギー性反応の増強影響を Local Lymph Node Assay (LLNA 法) 及び免疫担当細胞 (T 細胞) の解析により検索した。

2,4-D-butyl 及びオイゲノールの LLNA 法において、前処置したパラチオン及びメトキシクロルの用量に依存してリンパ球細胞増殖活性 (^3H -methyl thymidine 取込量) の増加が認められた。感作性反応強度の指標となる EC3 濃度は、パラチオン及びメトキシクロル前処置群で用量相関性に低下し、農薬暴露による感作反応の増強が示唆された。また、LLNA 法において得られたリンパ球細胞について、フローサイトメーターを用いた T 細胞のリンパ球解析（ヘルパー T 及び細胞傷害性 T 細胞）と T 細胞由来サイトカイン (IFN- γ 、TNF- α 及び IL-17) 産生量を測定した結果、いずれの測定値においてもパラチオン及びメトキシクロル前処置群で用量相関性の増加が認められた。

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 ないし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で調査し、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。

平成 22 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及び有機塩素系農薬を幼若期にそれぞれ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）ないし有機塩素剤（メトキシクロル）を 4 週齢の雌性 CBA/J マウス及び Balb/c 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 3 日間耳介後方の皮膚に経皮投与し、Local Lymph Node Assay (LLNA 法) を実施した。CBA/J マウスを用いた LLNA 法は、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)」に従い、以下の条件にて実施した。Balb/c マウスを用いた詳細解析では、LLNA 法と同様のスケジュールにて投与を実施した後、耳介リンパ節について、T 細胞解析と T 細胞由来サイトカイン産生量測定を行った。

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%以上、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%以上) 及び殺菌剤のオイゲノール (Eugenol、4-Allyl-2-Methoxyphenol、95%以上、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/JnCrIj 及び Balb/cAnNCrIj) の雌性動物を用いた。CBA/Jn マウスは LLNA 試験ガイドラインで定められている系統動物であり、Balb/c マウスは免疫・アレルギー研究での使用に適している系統動物である。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 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、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 週間休業後の経皮感作投与（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業研究所で定める倫理規定に従い実施した。

3. 試験群

前処置投与のパラチオン及びメトキシクロルは、経口経路にて毒性およ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。LLNA 法に供試する 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選択し、2,4-D-butyl では 10、5、2.5 及び 0 %、オイゲノールでは 25、10、5 及び 0 % の各 4 濃度を設定した。Balb/c マウスを用いた詳細解析では、両剤ともに 5% を選択し、解析を実施した。

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のみとした。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 週間毎および最終解剖日に体重を測定した。

7. 組織採取

LLNA 法では、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。

詳細解析では、 ^3H -Methyl Thymidine の投与は行わず、耳介リンパ節を採取し、リンパ球細胞の細胞懸濁液を調製した。

8. LLNA 法

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、日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) 上で搗りつぶし、単細胞懸濁液を得た。細胞懸濁液を PBS にて 2 度洗浄した後、3 mL の 5%トリクロロ酢酸溶液 (TCA、和光純薬工業株式会社) にて細胞懸濁液とした。4°C 及び遮光条件下にて 18 時間静置し、細胞を裸化させた。18 時間後、遠心分離し、再度 TCA にて 1 mL の細胞懸濁液とした。得られた細胞懸濁液をシンチレーションバイアルに移し、Atomlight (株式会社パーキンエルマージャパン) を 9 mL 加えてよく攪拌した。この細胞懸濁液について、液体シンチレーションカウンター (LC-5100、アロカ株式会社) により ^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。

細胞増殖活性測定データについて、その平均値をもとに、Stimulation index (SI)

及び EC3 濃度を求めた。LLNA 試験では SI 値が 3 以上の反応を示す濃度及び物質を陽性と規定している。SI 値は各投与群と溶媒対照群の平均値の比で表され、EC3 濃度は SI 値が 3 になる濃度を指す。

9. 詳細解析

耳介リンパ節を 5%牛胎児血清 (FCS、ライフテクノロジーズジャパン株式会社) 添加 RPMI1640 培地 (ライフテクノロジーズジャパン株式会社) にて、ナイロンメッシュ (75 μm メッシュ) 上で搗りつぶし、単細胞懸濁液を得た。細胞懸濁液を遠心した後、5%FCS 添加 RPMI1640 培地で洗浄し、細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液中のリンパ球数は、コールターカウンター Z2 (ベックマン・コールター株式会社) を用いて測定した。

リンパ球サブセットの解析：

得られた細胞懸濁液について、ヘルパー T 細胞 (CD3+CD4+) 及び細胞傷害性 T 細胞 (CD3+CD8+) を染色するため、FITC 標識抗マウス CD3 抗体、PE 標識抗マウス CD4 抗体及び PE-Cy5 標識抗マウス CD8 抗体を使用した (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社)。反応抗体との非特異的結合を防ぐため、20%山羊血清添加 5%FCS-PBS にて 4°C で 10 分間培養した。5%FCS 添加 RPMI1640 培地にて洗浄後、上記の蛍光標識抗マウス細胞膜表面抗原の抗体を用いて 4°C 遮光下で 30 分間培養して染色した。染色後、PBS で洗浄した後、FACS を用いて解析を実施した。解析はリンパ球中の各細胞集団の細胞数 (リンパ球数で補正) で評価した。

サイトカイン産生量測定：

T 細胞が活性化されることにより産生されるサイトカインを測定する目的で、得られた細胞懸濁液について、抗 CD3 抗体 (2 µg/mL) による刺激培養を実施した。単離リンパ球細胞 (1×10⁶細胞/well) は抗 CD3 抗体含有 10%FCS 添加 RPMI1640 培養液で、37°C、5%CO₂ 条件下で 24 時間培養した。培養上清中の各種サイトカイン (IFN-γ、TNF-α および IL-17) 産生量は BD Cytometric Bead Array (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) を用いて測定した。

10. 有意差検定

各検査項目について、対照群と各被験物質 (2,4-D-butyl およびオイゲノール) 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。

最初に各データについて 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を判定した。

C. 研究結果

試験結果を表 1~5 及び図 1・2 に示す。

1. LLNA 法 (表 1~5)

パラチオン前処置群：

2,4-D-butyl の LLNA 試験において、溶媒対照群のリンパ節重量は、2,4-D-butyl 高濃度の 10%濃度で有意な増加がみられ、パラチオン 0.4 及び 1.2 mg/kg 前処置群のリンパ節重量は、いずれも 2,4-D-butyl の 2.5%濃度から用量依存性でかつ顕著な増加が認められた。SI 値は、溶媒対照群で 2,4-D-butyl の 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 前処置群で 4.6、8.1 及び 16.1、そして 1.2 mg/kg 前処置群で 6.3、16.3 及び 22.9 であった。2,4-D-butyl の EC₃ 濃度は、対照群 (100%) と比較してパラチオン 0.4 及び 1.2 mg/kg 前処置群でそれぞれ 18%及び 12%と顕著に低下し、パラチオン前処置による低濃度での 2,4-D-butyl の感作性誘発が認められた。

オイゲノールの LLNA 試験において、溶媒対照群のリンパ節重量は、オイゲノール高濃度の 25%濃度で有意な増加がみられ、パラチオン 0.4 及び 1.2 mg/kg 前処置群のリンパ節重量は、いずれもオイゲノールの 10%濃度から用量相関的でかつ顕著な増加が認められた。SI 値は、溶媒対照群でオイゲノールの 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 前処置群で 4.7、14.3 及び 56.1、そして 1.2 mg/kg 前処置群で 8.8、23.0 及び 45.6 であった。オイゲノールの EC₃ 濃度は、対照群 (100%) と比較してパラチオン 0.4 及び 1.2 mg/kg 前処置群でそれぞれ 50%及び 16%と低下し、パラチオン前処置による低濃度でのオイゲノールの感作性誘発が認められた。

メトキシクロル前処置群：

2,4-D-butyl の LLNA 試験において、溶媒対照群のリンパ節重量は、2,4-D-butyl 高濃度の 10%濃度で有意な増加がみられ、メトキシクロル 100 mg/kg 及び 300 mg/kg 前処置群のリンパ節重量は、それぞれ 2,4-D-butyl の 5% 及び 2.5%濃度から用量相関的でかつ顕著な増加が認められた。SI 値は、溶媒対照群で 2,4-D-butyl の 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 前処置群で 1.9、5.9 及び 14.0、そして 300 mg/kg 前処置群で 4.8、6.5 及び 15.1 であった。2,4-D-butyl の EC3 濃度は、対照群 (100%) と比較してメトキシクロル 100 及び 300 mg/kg 前処置群でそれぞれ 50%及び 21%と低下し、メトキシクロル前処置による低濃度での 2,4-D-butyl の感作性誘発が認められた。

オイゲノールの LLNA 試験において、溶媒対照群のリンパ節重量は、オイゲノールの 10% 及び 25%濃度で有意な増加がみられ、メトキシクロル 100 及び 300 mg/kg 前処置群のリンパ節重量は、いずれもオイゲノールの 5%濃度から用量相関的でかつ顕著な増加が認められた。SI 値は、溶媒対照群でオイゲノールの 5、10 及び 25%濃度の順にそれぞれ 2.1、5.2 及び 24.2、100 mg/kg 前処置群で 4.2、14.1 及び 42.1、そして 300 mg/kg 前処置群で 5.3、20.4 及び 56.5 であった。オイゲノールの EC3 濃度は、対照群 (100%) と比較してメトキシクロル 100 及び 300 mg/kg 前処置群でそれぞれ 49%及び 36%と低下し、メトキシクロル前処置による低濃度でのオイゲノールの感作性誘発が認められた。

2. 詳細解析 (図 1 および 2)

ヘルパーT 及び細胞傷害性 T 細胞群：

溶媒 (アセトン/オリーブオイル) 感作では、パラチオン及びメトキシクロル投与群のいずれもコントロールと比較して変化は認められなかった。

LLNA 法による 2,4-D-butyl の感作では、パラチオン及びメトキシクロル前処置群のいずれも、ヘルパーT 及び細胞傷害性 T 細胞が用量相関性に増加した。ヘルパーT 細胞はパラチオン 1.2 mg/kg 前処置群及びメトキシクロル 300 mg/kg 前処置群で、細胞傷害性 T 細胞はパラチオン 0.4 及び 1.2 mg/kg 前処置群、メトキシクロル 300 mg/kg 前処置群で対照群と比較して有意に増加した。

オイゲノールの感作では、パラチオン及びメトキシクロル前処置群のいずれも、ヘルパーT 及び細胞傷害性 T 細胞群が用量相関性に増加した。ヘルパーT 細胞はパラチオンの 0.4 及び 1.2 mg/kg 前処置群、メトキシクロルの 300 mg/kg 前処置群で、細胞傷害性 T 細胞はパラチオン 0.4 及び 1.2 mg/kg 前処置群、メトキシクロル 300 mg/kg 前処置群で対照群と比較して有意に増加した。

サイトカイン産生量：

溶媒 (アセトン/オリーブオイル) 感作では、パラチオン及びメトキシクロル投与群のいずれもコントロールと比較して変化は認められなかった。

LLNA 法による 2,4-D-butyl の感作では、パラチオン及びメトキシクロル前処置群のいずれも、サイトカイン産生量が用量相関性に増加した。IFN- γ はパラチオン 1.2 mg/kg 前処置、メトキシクロル 100 及び 300