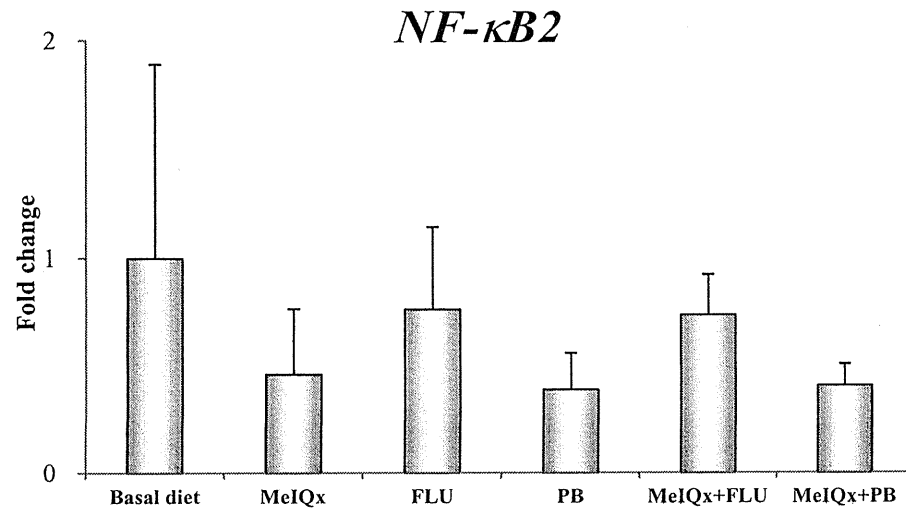
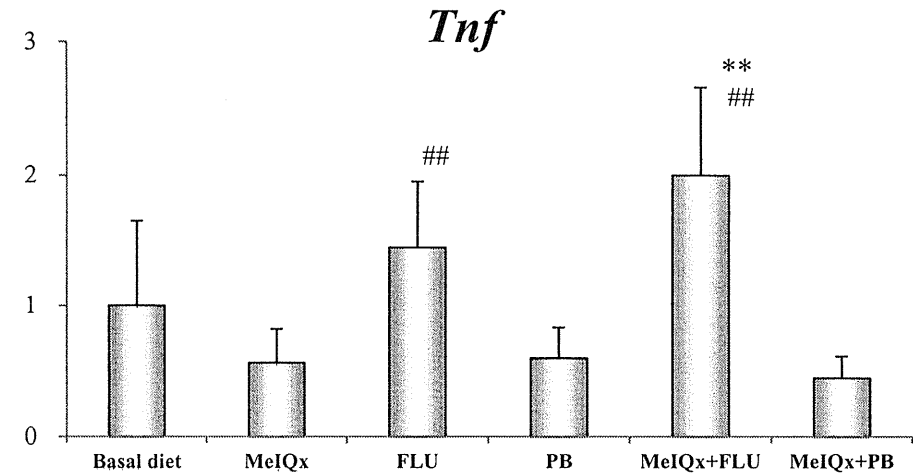
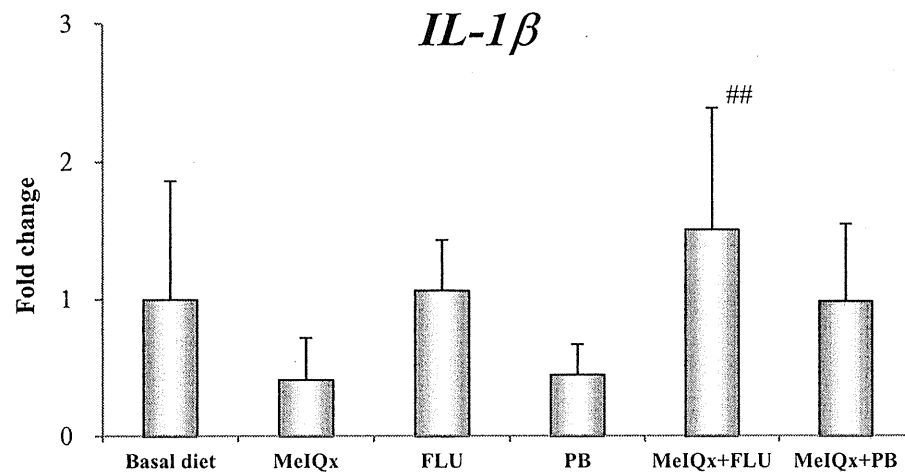
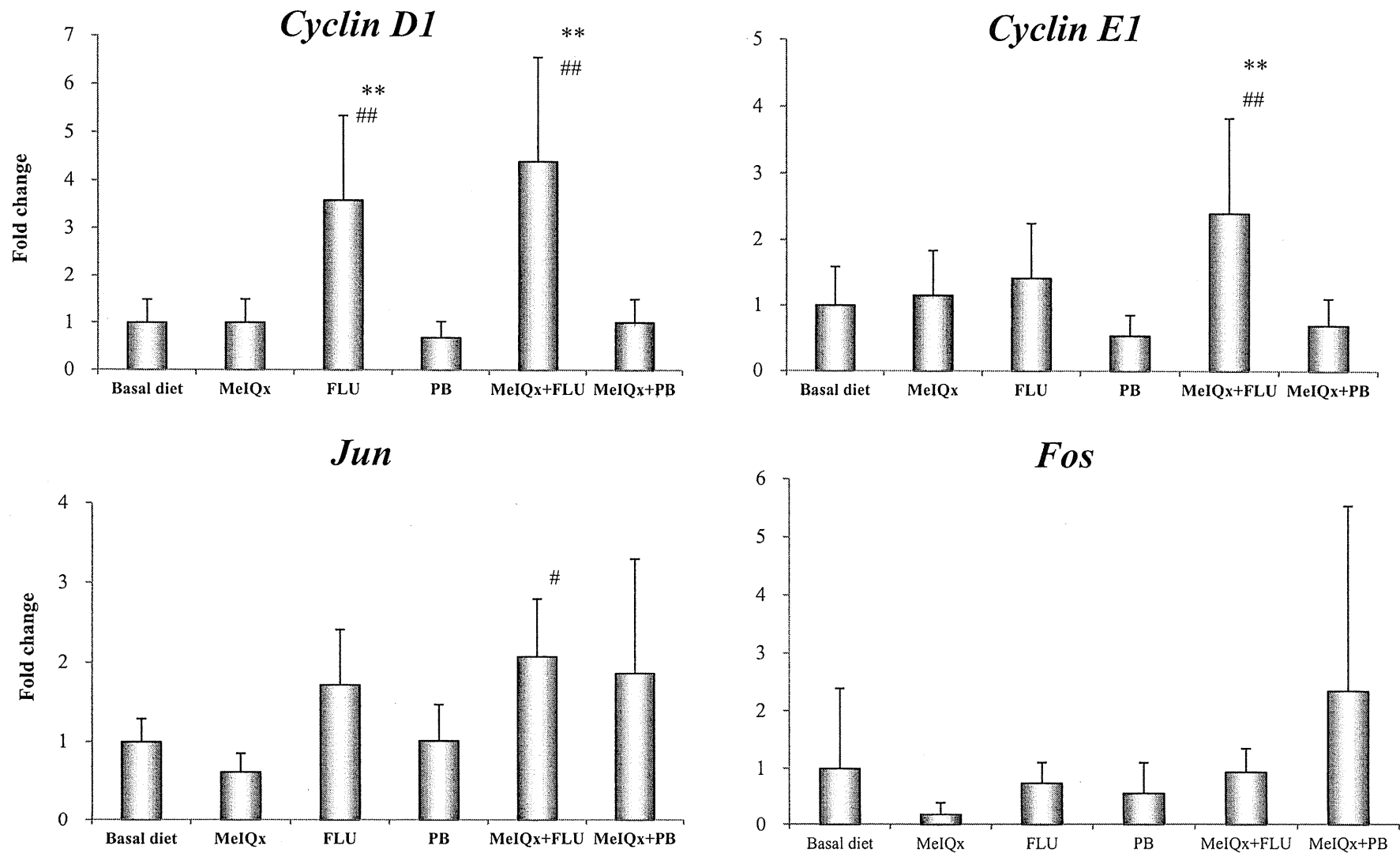


Fig. 4-1 Quantitative mRNA expression analysis using real-time PCR
(inflammation-related genes)



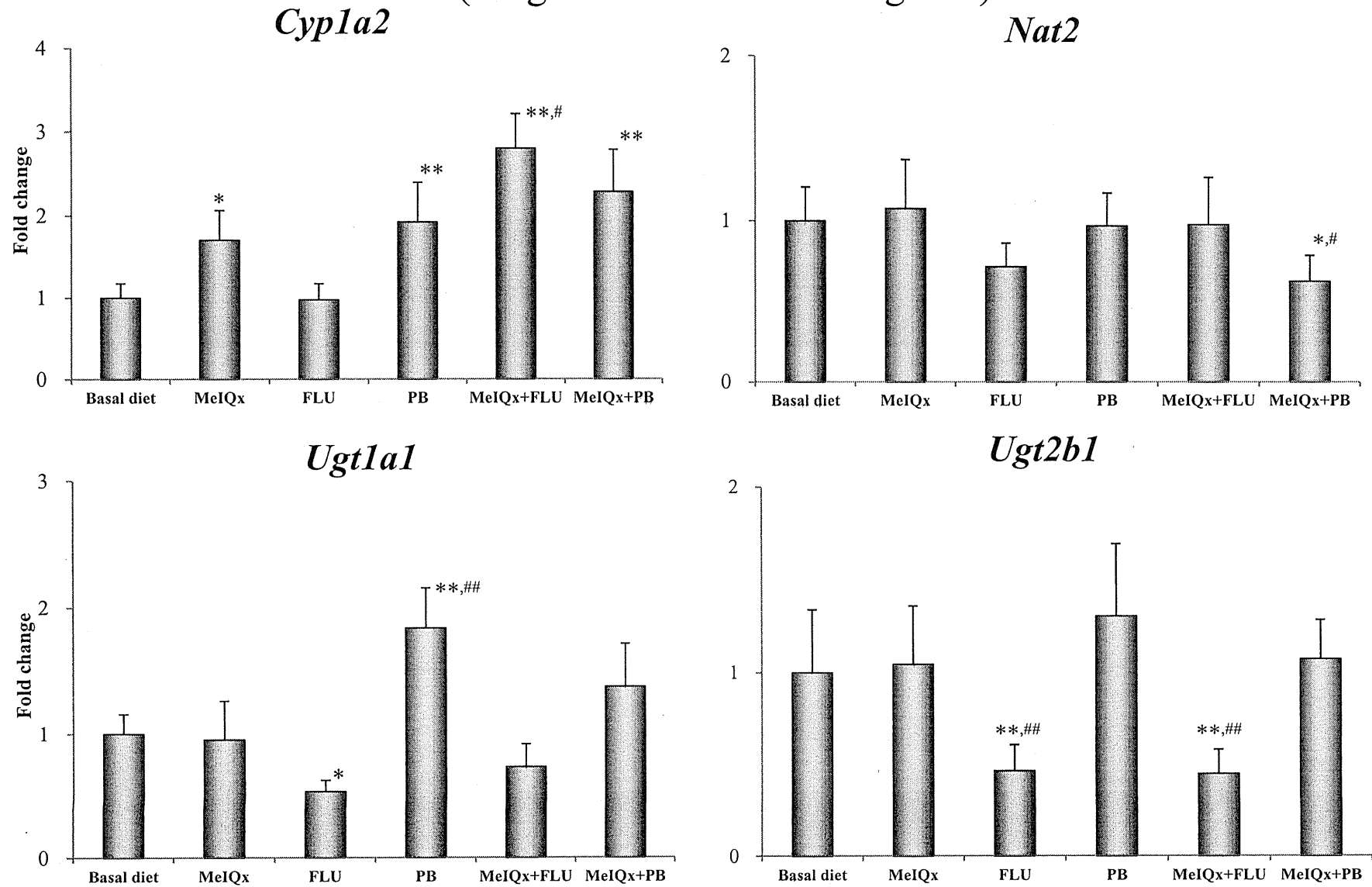
** : p<0.05, 0.01 vs Basal diet
##: p<0.01 vs MeIQx

Fig. 4-2 Quantitative mRNA expression analysis using real-time PCR
(cell cycle-related genes)



*, **: $p < 0.05$, 0.01 vs Basal diet
#, ##: $p < 0.05$, 0.01 vs MeIQx

Fig. 4-3 Quantitative mRNA expression analysis using real-time PCR
(drug metabolism-related genes)



*, **: $p < 0.05, 0.01$ vs Basal diet

#, ##: $p < 0.05, 0.01$ vs MeIQx

Table.1 Final body weight and liver weight of *gpt* delta mice treated with MeIQx, FLU and PB

Group	Final body weight (g)	Liver weight	
		Absolute (g)	Relative (g/100g BW)
Basal diet	32.7 ± 3.9	1.40 ± 0.2	4.28 ± 4.3
MeIQx	35.4 ± 4.4	1.63 ± 0.2	4.62 ± 4.7
FLU	31.1 ± 1.7	1.60 ± 0.2	5.14 ± 5.2**
PB	32.4 ± 2.9	1.57 ± 0.1	4.86 ± 4.9*
MeIQx+FLU	26.4 ± 2.1*	1.33 ± 0.1	5.02 ± 5.0**
MeIQx+PB	31.7 ± 2.2	1.64 ± 0.2	5.19 ± 5.3**

*, ** : p<0.01 vs Basal diet

Table 2 *gpt* mutant frequencies in the liver of *gpt* delta mice treated with MeIQx, FLU and PB

Group	Animal No.	Cm ^R colonies (× 10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant Frequency (× 10 ⁵)	Mean ± SD
Basal diet	1	26.7	4	0.15	0.20 ± 0.12
	2	12.5	3	0.24	
	3	26.7	2	0.07	
	4	26.2	0	0.00 ^a	
	5	0.7	9	0.34	
MeIQx	6	3.2	3	4.33	5.47 ± 2.03
	7	3.5	18	5.56	
	8	2.3	10	2.85	
	9	3.1	19	8.18	
	10	25.6	20	6.44	
FLU	11	20.2	7	0.27	0.29 ± 0.15
	12	20.4	8	0.40	
	13	22.4	10	0.49	
	14	7.9	4	0.18	
	15	26.6	1	0.13	
PB	16	17.2	4	0.15	0.24 ± 0.12
	17	23.9	7	0.41	
	18	18.5	7	0.29	
	19	22.4	2	0.11	
	20	3.0	5	0.22	
MeIQx+FLU	21	3.4	21	7.11	11.92 ± 6.26 ^{**} , [#]
	22	5.1	37	10.93	
	23	1.9	28	5.51	
	24	1.0	29	15.06	
	25	5.7	20	20.96	
MeIQx+PB	26	3.2	5	0.88	2.57 ± 2.60
	27	5.3	7	2.17	
	28	2.3	7	1.32	
	29	1.3	3	1.33	
	30	26.7	9	7.14	

a: excepted from calculation

^{**}: p<0.01 vs Basal diet [#]: p<0.05 vs MeIQx

Table 3 Mutation spectra of *gpt* mutant colonies in the liver of *gpt* delta mice treated with MeIQx, FLU and PB

Mutation	Control		MeIQx		FLU	
	Number(%)	Specific MF ($\times 10^5$)	Number (%)	Specific MF ($\times 10^5$)	Number (%)	Specific MF ($\times 10^5$)
Transversions						
GC-TA	4(22.2)	0.03 ± 0.05^a	36(51.4)	2.85 ± 0.77	6(20.0)	0.05 ± 0.05
GC-CG	0	0	2(2.9)	0.15 ± 0.21	1(3.3)	0.01 ± 0.02
AT-TA	1(5.6)	0.01 ± 0.02	3(4.3)	0.19 ± 0.28	0	0
AT-CG	0	0	1(1.4)	0.06 ± 0.14	2(6.7)	0.02 ± 0.03
Transitions						
GC-AT	9(50.0)	0.08 ± 0.05	2(2.9)	0.35 ± 0.63	9(30.0)	0.10 ± 0.06
AT-GC	0	0	0	0	3(10.0)	0.03 ± 0.03
Deletion						
Single bp	3(16.7)	0.04 ± 0.07	22(31.4)	1.55 ± 1.24	6(20.0)	0.06 ± 0.06
over 2bp	0	0	1(1.4)	0.09 ± 0.19	2(6.7)	0.02 ± 0.03
Insertion	0	0	2(2.9)	0.15 ± 0.21	1(3.3)	0.01 ± 0.02
Complex	1(5.6)	0.01 ± 0.02	1(1.4)	0.09 ± 0.19	0	0
Total	18	0.20 ± 0.12	70	5.47 ± 2.03	30	0.29 ± 0.15

^a : Mean $\pm$ SD

** : $p < 0.01$ vs Basal diet

#: $p < 0.05$ vs MeIQx

Mutation	PB		MeIQx+FLU		MeIQx+PB	
	Number (%)	Specific MF ($\times 10^5$)	Number (%)	Specific MF ($\times 10^5$)	Number (%)	Specific MF ($\times 10^5$)
Transversions						
GC-TA	6(24.0)	0.05 ± 0.06	74(54.8)	$6.90 \pm 4.36^{**,\#}$	16(51.6)	1.21 ± 1.15
GC-CG	1(4.0)	0.01 ± 0.02	2(1.5)	0.14 ± 0.23	1(3.2)	0.04 ± 0.08
AT-TA	0	0	5(3.7)	$0.48 \pm 0.34^*$	0	0
AT-CG	0	0	0	0	0	0
Transitions						
GC-AT	13(52.0)	0.13 ± 0.11	11(8.1)	0.77 ± 0.83	7(22.6)	0.67 ± 0.98
AT-GC	3(12.0)	0.03 ± 0.03	0	0	0	0
Deletion						
Single bp	2(8.0)	0.02 ± 0.03	37(27.4)	$3.14 \pm 1.36^{**,\#}$	5(16.1)	0.50 ± 0.63
over 2bp	0	0	1(0.7)	0.21 ± 0.47	0	0
Insertion	0	0	2(1.5)	0.12 ± 0.26	1(3.2)	0.06 ± 0.14
Complex	0	0	3(2.2)	0.16 ± 0.26	1(3.2)	0.09 ± 0.20
Total	25	0.24 ± 0.12	135	11.92 ± 6.26	31	2.57 ± 2.60

Table 4 Spi⁻ mutant frequencies in the liver of *gpt* delta mice treated with MeIQx, FLU and PB

Group	Animal No.	Plaques within XL-1 Blue MRA ($\times 10^5$)	Plaques within WL95 (P2)	Mutant Frequency ($\times 10^{-5}$)	Mean $\pm$ SD
Basal diet	1	34.6	8	0.23	0.15 $\pm$ 0.07
	2	14.9	1	0.07	
	3	49.4	8	0.16	
	4	6.0	2	0.33	
	5	21.1	3	0.14	
MeIQx	6	3.2	4	1.27	3.53 $\pm$ 1.97*
	7	5.7	12	2.12	
	8	7.3	24	3.28	
	9	9.6	58	6.07	
	10	12.0	59	4.91	
FLU	11	39.8	6	0.15	0.17 $\pm$ 0.03
	12	25.6	5	0.20	
	13	31.3	5	0.16	
	14	41.4	6	0.14	
	15	20.2	4	0.20	
PB	16	46.6	7	0.15	0.20 $\pm$ 0.09
	17	45.7	8	0.17	
	18	30.4	4	0.13	
	19	17.3	6	0.35	
	20	32.9	7	0.21	
MeIQx+FLU	21	4.9	27	5.48	7.66 $\pm$ 3.02**, ##
	22	5.5	30	5.49	
	23	8.0	43	5.40	
	24	6.5	70	10.80	
	25	4.0	44	11.11	
MeIQx+PB	26	7.2	3	0.42	1.72 $\pm$ 1.74
	27	5.7	4	0.71	
	28	8.3	7	0.84	
	29	6.0	12	1.99	
	30	3.0	14	4.64	

* : p<0.01 vs Basal diet ##: p< 0.01 vs MeIQx

Table. 5 Genes upregulated in the liver of *gpt* delta mouse treated with MeIQx+FL compared with those treated with MeIQx, as revealed by cDNA microarray analysis

ProbeName	Fold change	Gene Symbol	EntrezGeneID	GeneName
A_51_P325914	4.0608997	Jun	16476	Jun oncogene
A_51_P385099	4.3520584	Tnf	21926	tumor necrosis factor
A_51_P481920	3.7173762	Ccna2	12428	cyclin A2
A_52_P202770	12.690764	Ccnb1	268697	cyclin B1
A_51_P457528	4.0135555	Ccnb2	12442	cyclin B2
A_51_P262766	3.07193	Ccnd1	12443	cyclin D1
A_51_P450033	8.618808	Cdk1	12534	cyclin-dependent kinase 1
A_51_P326502	3.1513314	Chek1	12649	checkpoint kinase 1 homolog (S. pombe)
A_51_P279693	23.493624	Cyp1a1	13076	cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1
A_52_P472486	6.2167873	Cyp2b10	13088	cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 10
A_51_P286737	19.594444	Ccl2	20296	chemokine (C-C motif) ligand 2
A_51_P140710	9.334176	Ccl3	20302	chemokine (C-C motif) ligand 3
A_51_P509573	7.6185546	Ccl4	20303	chemokine (C-C motif) ligand 4
A_51_P436652	10.162387	Ccl7	20306	chemokine (C-C motif) ligand 7
A_51_P245989	3.715756	Ccr2	12772	chemokine (C-C motif) receptor 2
A_51_P420229	3.6572735	Ccr7	12775	chemokine (C-C motif) receptor 7
A_51_P363187	8.520724	Cxcl1	14825	chemokine (C-X-C motif) ligand 1
A_52_P262219	8.042881	Fos	14281	FBJ osteosarcoma oncogene
A_51_P239984	6.6679573	Exo1	26909	exonuclease 1
A_51_P148105	5.4005227	Rad51	19361	RAD51 homolog (S. cerevisiae)
A_51_P480855	2.4338448	Rad18	58186	RAD18 homolog (S. cerevisiae)
A_51_P454217	1.8203729	Nfkb2	18034	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2, p49/p100
A_52_P251366	2.4742742	Neil3	234258	nei like 3 (E. coli)
A_51_P475523	1.8469572	Brcal	12189	breast cancer 1

厚生労働科学研究費補助金（食品の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：食品中化学物質の発がん修飾に関する複合影響

研究分担者：西川 秋佳 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター

研究協力者：高須 伸二 国立医薬品食品衛生研究所 病理部

研究要旨

発がん過程において認められる遺伝子やタンパクの発現異常などの変化に着目した化学物質の複合影響を検討するために、フラン投与により発生した肝前がん病変における部位特異的な Nrf2 関連因子の遺伝子発現解析を行った。結果、フラン誘発 GST-P 陽性細胞巣では、周囲の GST-P 陰性領域に比較して、Nrf2 の標的遺伝子である *Nqo1* の mRNA 発現の程度が高かった。さらに細胞周期調節に関与する *Cyclin E1* の発現も GST-P 陽性細胞巣で高値を示した。以上より、フラン誘発 GST-P 陽性細胞巣では、Nrf2 経路が活性化している可能性が示唆され、フランと Nrf2 経路活性化物質の発がんに与える複合影響を検討する必要があると考えられた。

A. 研究目的

発がんには遺伝子変異を含む様々なイベントが関与していると考えられている。本研究では、その発がん過程や前がん病変などにおいて認められる遺伝子やタンパクの発現異常に着目した化学物質の複合影響を検討することを目的とする。本年度は、食品中に含まれる可能性があるフランの発がん機序と、それを修飾するような化学物質との複合影響の可能性を検討する。

フランは香料として使用されているフラン誘導体の基本骨格であり、げっ歯類において肝発がん性が確認されている（NTP, 1993）。また、これまでの *gpt delta* ラットを

用いた *in vivo* 変異原性の検討の結果、フラン投与による肝臓の *gpt* 遺伝子突然変異頻度に著差は認められないことから、フランの肝発がん機序には遺伝毒性は関わっておらず、フランは非遺伝毒性肝発がん物質であると考えられている。しかしながら、フランの遺伝毒性を介さない発がん機序の詳細は未だ不明な点が多い。そこで、本年度は第二相酵素や抗酸化酵素の発現を制御する Nrf2 経路の発がん過程における役割に注目し研究を行った。

Nrf2 は親電子性物質や活性酸素などにより活性化される転写因子であり、glutathione S-transferase や NAD(P)H dehydrogenase,

quinone 1 (Nqo1)などの異物代謝酵素群や、glutathione synthetase や hemeoxygenase-1 などの酸化ストレス防御遺伝子群などの遺伝子の発現を誘導し、細胞の種々のストレスに対する恒常性維持機構として働いている。Nrf2 経路のこのような作用から、Nrf2 経路の活性化は発がん物質や酸化ストレスに起因するがんに対して、抑制的に作用すると考えられている。

しかし、一方ではヒトがん組織やがん細胞株において、Nrf2 活性化にいたるような遺伝子変異が認められることが報告されていることから、Nrf2 経路は正常な細胞の恒常性維持に関わるのみならず、病巣の生存にも関与し、病巣形成にも重要である可能性が示唆されている。しかし、発がん過程における Nrf2 経路の詳細な役割や、活性化される発がんステージなど、不明な点が多い。

本研究では、フランの発がん過程において認められる変化に着目した化学物質の複合影響を検討するために、フラン発がん過程における Nrf2 経路の活性化状態を精査した後に、フランと Nrf2 経路活性化物質との複合的なリスク評価を検討する。本年度は、フランを投与したラット肝臓を用いて、肝前がん病変マーカーである GST-P の発現を参照にした部位特異的な Nrf2 関連因子の遺伝子発現解析を行った。また、肝発がん過程における Nrf2 経路の活性化がフランと異なる機序を持つ発がん物質においても認められるかを検討するために、遺伝毒性発がん物質である diethylnitrosamine (DEN) 投与ラット肝臓の GST-P 陽性細胞巣においても同様の検討を行った。

B. 研究方法

6週齢の雄性 F344 *gpt delta* ラット(日本 SLC)にコーンオイル(和光純薬)に懸濁させたフラン(和光純薬)を 8 mg/kg 体重の用量で、週 5 日、13 週間強制経口投与、または DEN を 10 ppm の濃度で 16 週間飲水投与した。肝臓の未固定新鮮凍結サンプルから作製した連続切片を用いて、抗 GST-P ポリクローナル抗体(医学生物学研究所)を用いた免疫組織科学的染色および 0.05% トルイジンブルー染色を行った。GST-P 免疫組織科学的染色標本を参照しながら、0.05% トルイジンブルー染色標本において GST-P 陽性細胞巣または GST-P 陰性領域に対応するそれぞれの部位をレーザーマイクロダイセクション法により切除し、切除切片より RNeasy Plus micro kit (QIAGEN)を用いて Total RNA を抽出した。cDNA 合成は High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)を用いて行った。リアルタイム PCR は、Nrf2 関連因子として *glutathione S-transferase pi 1* (*Gstp1*)、*Nrf2* および *Nqo1*、細胞周期関連遺伝子として、*Cyclin D1* および *Cyclin E1* について、TaqMan® Gene Expression Assays を用いて行った。内在性コントロールには、*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (*GAPDH*)を用いた。

(倫理面への配慮)

本試験は「国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規定」に基づき、動物実験計画書を作成し、国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会による審査を受けた後、実施した。また、DNA 組み換え動

物の使用についても、「国立医薬品食品衛生研究所遺伝子組換え実験安全管理規則」に従い、遺伝子組換え実験計画書を作成し、審査を受けた。

C. 研究結果

フラン誘発 GST-P 陽性細胞巢および DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巢における Nrf2 関連遺伝子および細胞周期関連遺伝子の発現解析の結果を、それぞれ Fig. 1 および Fig. 2 に示す。

フラン誘発 GST-P 陽性細胞巢内では、周囲の GST-P 陰性領域に比較して、*Gstp1*、*Nqo1* の mRNA 発現の程度が有意に高かった。しかし、*Nrf2* の mRNA 発現は GST-P 陽性細胞巢と GST-P 陰性領域間において、顕著な差は認められなかった。一方、DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巢内では、*Gstp1*、*Nqo1* および *Nrf2* のいずれも mRNA 発現に顕著な差は認められなかった。

細胞周期関連因子では、フラン誘発 GST-P 陽性細胞巢内では、*Cyclin E1* の mRNA 発現が周囲の GST-P 陰性領域に比較して有意に高かったものの、DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巢では mRNA 発現に差は認められなかった。

D. 考察

今回、フランの肝発がん性に対する複合影響の可能性を検索する目的で、フラン投与により発生した GST-P 陽性細胞巢内における Nrf2 経路の活性化状態を検討した。

その結果、フラン誘発 GST-P 陽性細胞巢内においては、*Gstp1* および *Nqo1* の mRNA 発現が亢進していることが明らかとなった。

過去の LEC ラットやラット肝細胞腺腫細胞株を用いた研究では、ラット肝発がん過程において Nrf2 が GST-P 遺伝子上流に位置する GPE1 配列を介して、GST-P の発現を制御することが報告されている (Ikeda, 2004)。また、*Nqo1* は代表的な Nrf2 標的遺伝子であり、その転写制御に Nrf2 が関与していることが知られている。以上より、フラン誘発 GST-P 陽性細胞巢内において Nrf2 経路が活性化されている可能性が示唆された。

一方、遺伝毒性肝発がん物質である DEN の投与で発生した GST-P 陽性細胞巢では、*Gstp1* および *Nqo1* の mRNA 発現に顕著な差は見られなかった。この結果より、DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巢内では Nrf2 経路は活性化されておらず、ラット肝発がん過程における Nrf2 経路の活性化は、発がん物質の種類や機序により異なると考えられた。

しかし、DEN 投与に加えて 2-acetylaminofluorene 投与および 2/3 肝部分切除処置を行ったラット肝 GST-P 陽性細胞巢における網羅的遺伝子発現解析の結果では、GST-P 陽性細胞巢において発現が上昇した遺伝子として *Nqo1* が報告されていることから (Suzuki, *et al*, 2004)、GST-P 陽性細胞巢内における Nrf2 経路の活性化は、細胞増殖刺激などの発がんプロモーション作用にも相関する可能性が考えられた。実際に、今回の研究では、フラン誘発 GST-P 陽性細胞巢内において *Cyclin E1* の mRNA 発現が高く、一方、DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巢内においては *Cyclin E1* の mRNA 発現に著差は認められなかった。今後は肝発がん過程における各ステージと Nrf2 経路活性化状態の検討が重要であると考えられた。

本研究では、フラン誘発 GST-P 陽性細胞
巢では、Nrf2 経路が活性化している可能性
が示された。今後は、フランと Nrf2 経路活
性化物質との発がんを与える複合影響を検
討することにより、発がん過程における
Nrf2 活性化の意義を明らかにするとともに、
Nrf2 活性化物質の複合影響を予測する基礎
的なデータを提供できるものとする。

E. 結論

フランの肝発がん性に対する複合影響の可
能性を検索する目的で、フラン投与により
発生した GST-P 陽性細胞巢内における Nrf2
経路の活性化を検討した結果、フラン誘発
GST-P 陽性細胞巢内において Nrf2 経路が活
性化されている可能性が示唆され、フラン
と Nrf2 経路活性化物質との発がんに与える
複合影響を検討する必要があると考えられ
た。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

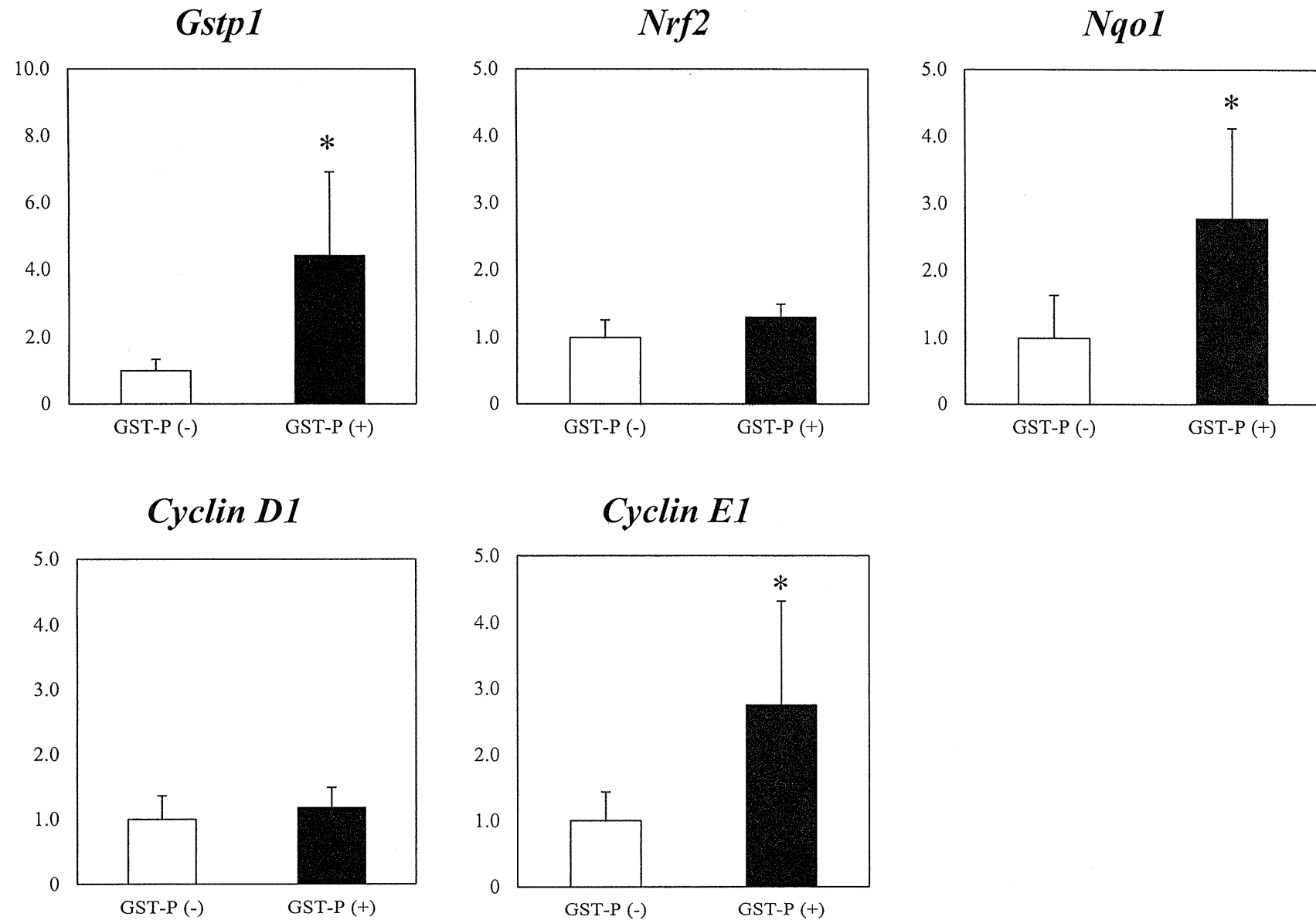


Fig. 1. The mRNA expression levels of Nrf2 target genes and cell cycle related genes in GST-P positive lesions and negative areas in the liver rat treated with furan.

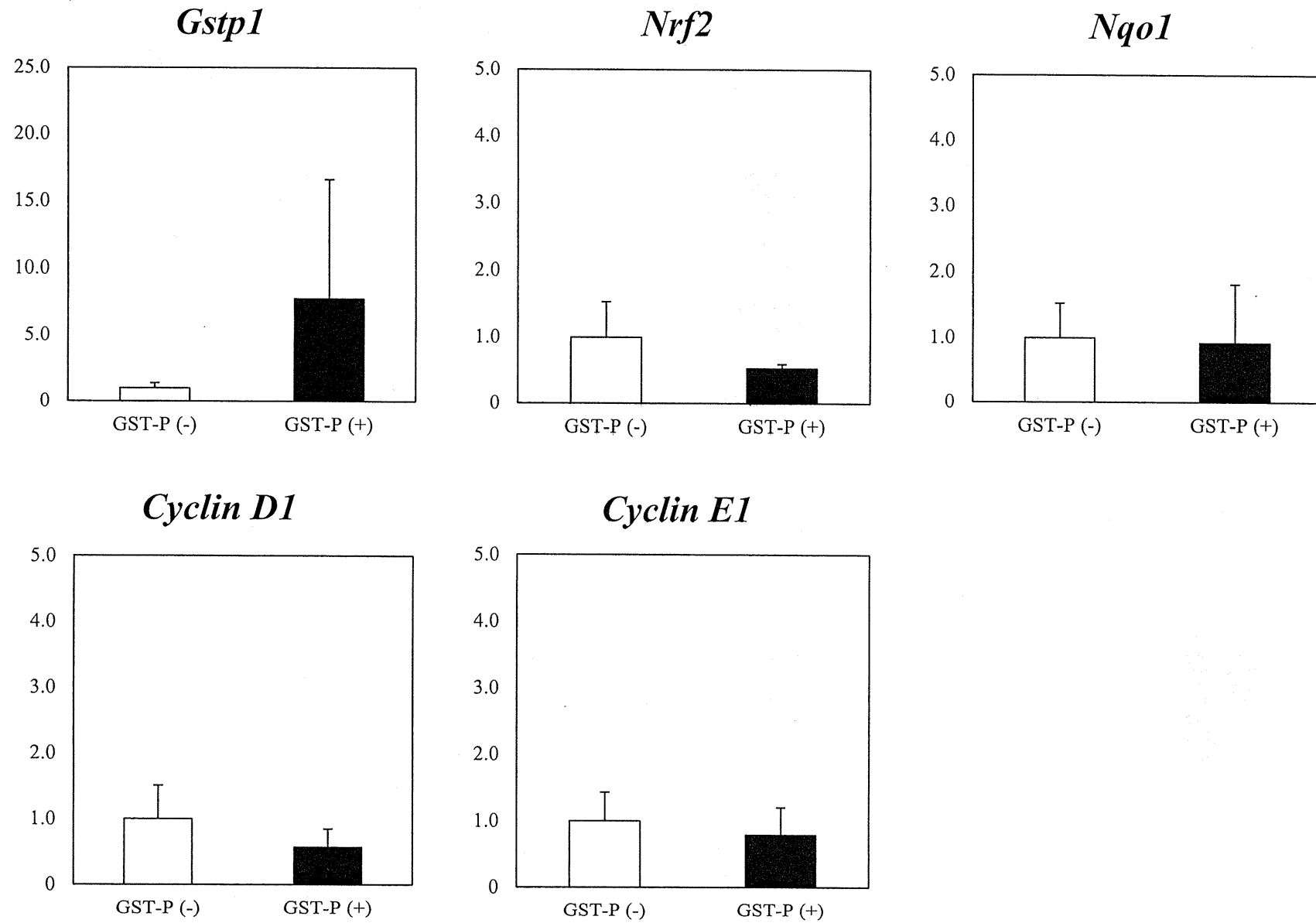


Fig. 2. The mRNA expression levels of Nrf2 target genes and cell cycle related genes in GST-P positive lesions and negative areas in the liver rat treated with DEN.

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
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

平成 23 年度分担研究報告書

「食品中残留農薬の複合暴露影響に関する研究」

1. 急性神経毒性に関する研究

有機リン剤（メタミドホス、パラチオン）とカーバメート剤（キシリルカルブ）あるいは
ニコチン製剤（硫酸ニコチン）との組合せによる単回複合投与の影響

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
	元村淳子	（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

研究要旨

類似の作用機序を持つ農薬群の単回複合経口投与による急性毒性影響を検索するため、8 週齢の雌性ラット(BrlHan:WIST@Jcl(GALAS)) に有機リン剤（メタミドホス、パラチオン）、カーバメート剤（キシリルカルブ）、ニコチン製剤（50%硫酸ニコチン水溶液）のうち 3 剤あるいは 4 剤を複合投与した。Dubois らの方法を参考に投与用量を決定し複合投与試験を行い、先に実施した単剤投与試験で得られた各剤の LD₅₀ 値に基づく推定半数致死量（LD₅₀ 期待値）と複合投与の半数致死量（LD₅₀ 実測値）を比較することによって複合暴露による毒性効果(複合毒性強度；LD₅₀ 期待値/LD₅₀ 実測値)を確認した。

その結果、有機リン剤 2 剤にカーバメート剤あるいはニコチン製剤を加えた 3 剤の複合暴露影響は拮抗的（複合毒性強度 0.64-0.90）であったが、有機リン剤、カーバメート剤およびニコチン製剤各 1 剤ずつの 3 剤組合せでは相加的（複合毒性強度 1.04-1.12）であった。4 剤すべての複合暴露による毒性強度値は 0.82 で、やや拮抗的結果であった。今回の 3 剤ないし 4 剤の複合暴露試験では、単剤毒性から予想される複合毒性強度の変化（拮抗あるいは増強作用）が 2 剤暴露に比べより軽度であった。

さらに、先に実施した 2 剤の複合投与による毒性強度と今回の結果を比較したところ、3 ないし 4 剤の複合投与による毒性強度は、構成する 2 剤の複合毒性強度の中央値及び平均値とほぼ一致した。これらの結果から、多剤の複合暴露影響の予測には、2 剤の複合毒性情報が有用である可能性が示唆された。

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同一あるいは類似の作用機序を有する農薬を組合せて雌性ラットの成獣に複合投与し、その毒性効果を検索した。

平成 23 年度は有機リン剤のメタミドホス及びパラチオン、カーバメート剤のキシリルカルブ、ニコチン製剤である 50%硫酸ニコチン水溶液から 3 ないしは 4 剤を組合せて単回強制経口投与し、Dubois らの方法¹⁾を参考にして、単剤投与と複合投与の半数致死量 (LD₅₀ 値) を比較することによって複合暴露による毒性効果を確認した。さらに、先に実施した 2 剤の複合投与における複合毒性強度と今回の結果を比較し、多剤混合毒性影響の予測における 2 剤複合毒性情報の有用性を検討した。

B. 研究方法

1. 被験物質

本試験の被験物質として以下の剤を使用した。

有機リン剤：

メタミドホス (Methamidophos、*O,S*-Dimethyl Phosphoramidothioate、

99.7%、和光純薬工業株式会社)

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)

カーバメート剤：

キシリルカルブ (Xylylcarb、3-4-Xylyl Methylcarbamate、98%、和光純薬工業株式会社)

ニコチン製剤：

50%硫酸ニコチン水溶液 (50%Nicotine sulfate WS、関東化学株式会社)

メタミドホスは冷凍庫 (-20°C) で、パラチオン及びキシリルカルブは冷蔵庫 (1-10°C) で、50%硫酸ニコチン水溶液は室温 (23°C) でそれぞれ保管した。

2. 被験物質投与液の調製及び投与方法

投与実施の直前に、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) にて溶解、懸濁あるいは希釈して被験物質投与液を調製した。投与容量は 20 mL/kg とした。

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。

3. 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、7 週齢の Wistar Hannover 系 SPF 雌性ラット (BrlHan:WIST@Jcl [GALAS]) を購入した。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。

試験環境に 7 日間馴化させた後に体重を測定し、5 匹/用量で被験物質混合液を投与した。基礎飼料には保証飼料 MF 固形（オリエンタル酵母工業株式会社）を用い、前日の夕方から投与 3 時間後の絶食期間を除いて、ステンレス鋼製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。

4. 観察方法

全生存動物について、瀕死状態及び死亡の確認に加え、以下の項目について神経毒性症状を観察しスコア化して記録した。

観察項目：攣縮、振戦、痙攣、縮瞳、流涎、筋緊張、体温下降

これらの観察は、投与日は投与 1、3、6 時間後に、翌日から投与 7 日後までは少なくとも 1 日 1 回、実施した。

また、投与直前及び観察期間終了時あるいは死亡発見時に、体重を測定した。

観察期間終了時の生存動物は、エーテル麻酔により安楽殺した。

5. 半数致死量(LD₅₀ 値)の算出

半数致死量は、Moving Average 法を用いて算出した。

C. 研究結果

1. 試験群

混合剤の単回投与による毒性兆候と半数致死量を検索するために複合投与試験を実施した。複合投与液中の 3 剤あるいは 4 剤の混合率は、Dubois の方法¹⁾ に準じて、以

下に示す単剤投与における LD₅₀ 値(表 1-1)の比（等価毒性比）とした。

被験物質	略号	LD ₅₀ 値
メタミドホス	M	10.2 mg/kg
パラチオン	P	1.1 mg/kg
キシリルカルブ	X	101 mg/kg
50%硫酸ニコチン水溶液	N	107 mg/kg

(平成 22 年度報告書²⁾より)

試験群及び複合投与用量(単剤当たりの用量)は以下の通りとした。

[メタミドホス+パラチオン+キシリルカルブ投与群]

用量 37 (M 3.4+P 0.35+X 33.5)、56 (M 5.1+P 0.53+X 50.3)、84 (M 7.7+P 0.80+X 75.5) mg/kg

[メタミドホス+パラチオン+50%硫酸ニコチン水溶液投与群]

用量 26 (M 2.3+P 0.23+N 23.7)、39 (M 3.4+P 0.35+N 35.6)、59 (M 5.1+P 0.53+N 53.4) mg/kg

[メタミドホス+キシリルカルブ+ 50%硫酸ニコチン水溶液投与群]

用量 33 (M 1.5+X 15.0+N 16.0)、48 (M 2.3+X 22.5+N 24.0)、73 (M 3.4+X 33.8+N 36.0)、109 (M 5.1+X 50.6+N 54.0) mg/kg

[パラチオン+キシリルカルブ+ 50%硫酸ニコチン水溶液投与群]

用量 31 (P 0.15+X 15.0+N 16.0)、46 (P 0.23+X 22.5+N 24.0)、70 (P 0.35+X 33.8+N 36.0)、105 (P 0.53+X 50.6+N 54.0) mg/kg

[メタミドホス+パラチオン+キシリルカルブ+ 50%硫酸ニコチン水溶液投与群]

用量 25 (M 1.13+P 0.13+X 11.3+N 12.0)、36 (M 1.69+P 0.19+X 16.9+N

18.0)、55(M 2.54+P 0.29+X 25.4+N 27.0)、83 (M 3.81+P 0.44+X 38.1+N 40.5)、123 (M 5.72+P 0.66+X 57.2+N 60.8) mg/kg

2. 死亡率及びLD₅₀ 値 (表 1-2、表 2)

各試験群における死亡率(死亡動物数/投与動物数)及びLD₅₀ 値を以下に示す(下線は推定半数致死量)。

メタミドホス+パラチオン+キシリルカルブ

用量 (mg/kg)	死亡率	LD ₅₀ 値 (95%信頼限界)
<u>37</u>	0%	58 mg/kg (46-73 mg/kg)
56	40%	
84	100%	

メタミドホス+パラチオン+50%硫酸ニコチン水溶液

用量 (mg/kg)	死亡率	LD ₅₀ 値 (95%信頼限界)
26	0%	44 mg/kg (31-61 mg/kg)
<u>39</u>	40%	
59	80%	

メタミドホス+キシリルカルブ+ 50%硫酸ニコチン水溶液

用量 (mg/kg)	死亡率	LD ₅₀ 値 (95%信頼限界)
33	0%	70 mg/kg (52-74 mg/kg)
48	0%	
<u>73</u>	60%	
109	100%	

パラチオン+キシリルカルブ+ 50%硫酸ニコチン水溶液

用量 (mg/kg)	死亡率	LD ₅₀ 値 (95%信頼限界)
31	0%	62 mg/kg (56-87 mg/kg)
46	0%	
<u>70</u>	80%	
105	100%	

メタミドホス+パラチオン+キシリルカルブ+ 50%硫酸ニコチン水溶液

用量 (mg/kg)	死亡率	LD ₅₀ 値 (95%信頼限界)
25	0%	67 mg/kg (算出不能)
36	0%	
<u>55</u>	0%	
83	100%	
123	100%	

3. 神経毒性症状 (表 2)

[メタミドホス+パラチオン+キシリルカルブ投与群]

投与1時間から6時間後にかけて、攣縮、振戦、縮瞳、流涎、筋緊張亢進/低下、体温下降が認められた。

[メタミドホス+パラチオン+50%硫酸ニコチン水溶液投与群]

投与1時間から6時間後にかけて、攣縮、振戦、流涎、筋緊張低下、体温下降が認められた。さらに縮瞳は投与1時間から6日後まで断続的に発現した。

[メタミドホス+キシリルカルブ+50%硫酸ニコチン水溶液投与群]

投与1時間から6時間後にかけて、攣縮、振戦、縮瞳、流涎、筋緊張低下、体温下降が認められた。

[パラチオン+キシリルカルブ+50%硫酸ニコチン水溶液投与群]

投与1時間から6時間後にかけて、攣縮、振戦、流涎、筋緊張低下、体温下降が認められた。さらに投与2日後に筋緊張亢進が認められた。

[メタミドホス+パラチオン+キシリルカルブ+50%硫酸ニコチン水溶液投与群]

投与1時間から6時間後にかけて、攣縮、振戦、縮瞳、流涎、筋緊張低下、体温下降が認められた。

4. 体重（表 2）

投与 7 日後における全生存動物の体重は順調に増加した。

5. 複合毒性の評価

複合投与した剤の毒性が加算的である場合には、LD₅₀ 値を複合する剤数で除した用量を混合して投与した場合の死亡率が 50% になると推定し（推定半数致死量）、混合剤における推定半数致死量での死亡率が 50% を上回る場合は相乗的、下回る場合は拮抗的に作用を持つと判断した。

さらに、混合剤の LD₅₀ 値（実測値）を求め、推定半数致死量（期待値）との比によって複合毒性強度を表した。

LD₅₀ の期待値と実測値及びその比を以下に示す。

メタミドホス+パラチオン+キシリルカルブ

期待値 (mg/kg)	実測値 (mg/kg)	複合毒性強度 (期待値/実測値)
37	58	0.64

メタミドホス+パラチオン+50%硫酸ニコチン水溶液

期待値 (mg/kg)	実測値 (mg/kg)	複合毒性強度 (期待値/実測値)
39	44	0.90

メタミドホス+キシリルカルブ+ 50%硫酸ニコチン水溶液

期待値 (mg/kg)	実測値 (mg/kg)	複合毒性強度 (期待値/実測値)
73	70	1.04

パラチオン+キシリルカルブ+ 50%硫酸ニコチン水溶液

期待値 (mg/kg)	実測値 (mg/kg)	複合毒性強度 (期待値/実測値)
70	62	1.12

メタミドホス+パラチオン+キシリルカルブ
+ 50%硫酸ニコチン水溶液

期待値 (mg/kg)	実測値 (mg/kg)	複合毒性強度 (期待値/実測値)
55	67	0.82

D. 考察

類似の作用機序を持つ農薬群の単回複合経口投与による急性毒性影響を確認するため、有機リン剤のメタミドホス及びパラチオン、カーバメート剤のキシリルカルブ、ニコチン製剤である 50%硫酸ニコチン水溶液を 8 週齢の雌性ラット (BrlHan:WIST@Jcl(GALAS)) に複合投与した。これらの剤の主要な毒性発現機序は次の通りである。

有機リン剤及びカーバメート剤は、共に副交感神経における神経伝達物質であるアセチルコリンを分解する酵素（アセチルコリンエステラーゼ；AChE）の活性を阻害することによって、コリン作動性神経の過興奮を惹起させる。アセチルコリンに対するレセプターはムスカリンレセプターとニコチンレセプターに大別されるが、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤による副交感神経系に対する影響は、ムスカリンレセプターを介する作用が優位である。一方、ニコチン製剤はニコチンレセプターと特異的に結合して副交感神経系に作用するが、ニコチンレセプターは交感神経節及び神経筋接合部に多数存在し、これらの部位における神経伝達との関連性が高い。そのため、ニコチン製剤は交感神経作動性の作用と神経筋接合部における脱分極性の筋緊張低下を招く（図 1 及び 2）。

2 種の有機リン剤あるいは有機リン剤とカーバメート剤を組合せた単回複合投与の影響についてはいくつかの報告があり、その組合せにより拮抗（例 Prathion と Marathion¹⁾、Marathion と Xylilcarb³⁾等）、相加（例 Fention

と DDVP⁴⁾、Marathion と XMC³⁾等)、相乗の様々な効果が認められている。相乗効果では、単剤 LD₅₀ 値との比較して毒性が数倍に増強されることが報告されている (Marathion と BPMC で 5.4 倍³⁾、Marthion と Dipterex で 2.2 倍¹⁾、Fenitorothion と BPMC で 5.5 倍⁵⁾、Fenthion と BPMC で 1.6 倍⁶⁾ 等)。

一方、ネオニコチノイド及びニコチン製剤と有機リン剤あるいはカーバメート剤との *in vivo* における複合投与毒性の報告は殆どない。今回使用した 50%硫酸ニコチン水溶液は、最近まで農薬登録が存在していた古典的なニコチノイドである。現在農薬として広く用いられているネオニコチノイドは、ニコチンの分子構造を元にして、昆虫に対して薬効が高く哺乳類には低毒性となるように開発されてきた⁷⁾。よって、50%硫酸ニコチン水溶液と有機リン剤及びカーバメート剤との複合投与影響の検討は、ネオニコチノイドの複合暴露影響を推測する上での有用な情報となる。

平成 22 年度に実施した単剤投与試験²⁾の結果、複合投与液の混合比を決定する根拠になる各被験物質の LD₅₀ 値は次の通りであった。

メタミドホス； 10 mg/kg

パラチオン； 1.1 mg/kg

キシリルカルブ； 101 mg/kg

50%硫酸ニコチン水溶液； 107 mg/kg

また、同じく 22 年度に実施した、4 剤のうち 2 剤を組み合わせた単回複合投与試験の結果、各被験物質混合剤の LD₅₀ 値及び複合毒性強度は次の通りだった。

メタミドホス + パラチオン；

6.9 mg/kg、0.80

メタミドホス + キシリルカルブ；

95 mg/kg、0.58

メタミドホス + 50%硫酸ニコチン水溶液；

52 mg/kg、1.13

パラチオン + キシリルカルブ；

108 mg/kg、0.47

パラチオン + 50%硫酸ニコチン水溶液；

91 mg/kg、0.59

キシリルカルブ + 50%硫酸ニコチン水溶液； 86 mg/kg、1.21

今年度は、4 剤のうち 3 剤及び 4 剤全てを組み合わせた単回複合投与を実施した。投与液は、Dubois の方法¹⁾に準じて LD₅₀ 値の比 (等価毒性比) で 3 ないし 4 剤の混合率を決定して調製した。

3 ないし 4 剤の複合投与における各組合せにおいても、単剤あるいは 2 剤複合同様にコリンエステラーゼ活性阻害に起因する典型的な副交感神経系の興奮を示唆する症状が認められた。これらの症状は、投与直後から認められ、生存動物では投与後 7 日以内に回復し、投与 7 日後における全生存動物の体重も増加した。

3 ないし 4 剤の被験物質混合剤の LD₅₀ 値は次の通りだった。

メタミドホス+パラチオン+キシリルカルブ； 58 mg/kg

メタミドホス+パラチオン+50%硫酸ニコチン水溶液； 44 mg/kg

メタミドホス+キシリルカルブ+ 50%硫酸ニコチン水溶液； 70 mg/kg

パラチオン+キシリルカルブ+ 50%硫酸ニコチン水溶液； 62 mg/kg

メタミドホス+パラチオン+キシリルカルブ + 50%硫酸ニコチン水溶液； 67 mg/kg

単回複合投与毒性の評価

Dubois の方法では、3 ないし 4 剤の毒性が加算的である場合は、それぞれ LD₅₀ 値の 1/3 あるいは 1/4 量を混合して投与した致死率が 50%になると推定する (推定半数致死量)。よ