

って、半量混合剤の推定半数致死量を投与した際の死亡率が、50%を上回る場合は相乗的作用、下回る場合は拮抗的作用を持つと考えられる。さらに、等価毒性比で用量段階的に3ないし4剤を混合して混合剤のLD₅₀値を求め、推定半数致死量との比で複合毒性の強度を表した。

作用機序が類似する農薬を組合せて実施した今回の試験結果から、複合毒性強度に基づいて毒性影響を考察した。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た。

メタミドホス+パラチオン+キシリルカルブ；複合毒性強度 0.64

有機リン剤であるメタミドホスおよびパラチオンとカーバメート剤のキシリルカルブとの組合せでは拮抗的に作用した。有機リン剤中毒の予防的措置としてカーバメート剤が有効であることは良く知られており⁹⁾、この阻害影響は、2剤の混合時と同様にアセチルコリンエステラーゼとの結合部位において競合が生じた結果であると考えられた。

これらのうち2剤を組み合わせた際の複合毒性強度は、メタミドホス+パラチオンが0.80、メタミドホス+キシリルカルブが0.58、パラチオン+キシリルカルブが0.47で、平均値および中央値は0.62および0.64であり、3剤を混合投与して得られた複合毒性強度0.64と一致した。

メタミドホス+パラチオン+50%硫酸ニコチン水溶液；複合毒性強度 0.90

パラチオンと50%硫酸ニコチン水溶液との2剤複合投与では、パラチオンがニコチンレセプターと結合してアゴニスト作用を抑制する有機リン剤のひとつであることから⁹⁾、ニコチン製剤に対する拮抗作用が認められた。3剤混合においてもパラチオンによるnAChRの阻害

が生じたと推測されるが、メタミドホスと50%硫酸ニコチン水溶液との2剤複合投与では軽微な相乗効果が生じるため、その阻害影響は軽度であったと思われた。

これらのうち2剤を組み合わせた際の複合毒性強度は、メタミドホス+パラチオンが0.80、メタミドホス+50%硫酸ニコチン水溶液が1.13、パラチオン+50%硫酸ニコチン水溶液が0.59で、平均値および中央値は0.84および0.86であり、3剤を混合投与して得られた複合毒性強度0.90とほぼ一致した。

メタミドホス+キシリルカルブ+ 50%硫酸ニコチン水溶液；複合毒性強度 1.04

前述の通り有機リン剤であるメタミドホスとカーバメート剤であるキシリルカルブの2剤混合では拮抗的に作用する。一方、キシリルカルブは神経筋作用が比較的強い¹⁰⁾ため、50%硫酸ニコチン水溶液との複合投与では、筋緊張低下に対する作用の亢進が生じると考えられ、軽度ながら相乗効果がみられる。よって、これらの3剤複合投与では（特に筋緊張低下）が比較的強い¹⁰⁾ためそれぞれが打消しあって、ほぼ相加的に影響したと考えられた。

これらのうち2剤を組み合わせた際の複合毒性強度は、メタミドホス+キシリルカルブが0.58、メタミドホス+50%硫酸ニコチン水溶液が1.13、キシリルカルブ+50%硫酸ニコチン水溶液が1.21で、平均値および中央値は0.97および0.90であり、3剤を混合投与して得られた複合毒性強度1.04とほぼ一致した。

パラチオン+キシリルカルブ+ 50%硫酸ニコチン水溶液；複合毒性強度 1.12

この組み合わせも有機リン剤のパラチオンとカーバメート剤であるキシリルカルブの2剤混合による拮抗作用と、キシリルカルブと50%硫酸ニコチン水溶液との複合投与による

神経筋作用の亢進が生じ、ほぼ相加的に影響したと考えられた。

これらのうち 2 剤を組み合わせた際の複合毒性強度は、パラチオン+キシリルカルブが 0.47、パラチオン+50%硫酸ニコチン水溶液が 0.59、キシリルカルブ+50%硫酸ニコチン水溶液が 1.21 で、平均値および中央値は 0.76 および 0.84 であった。3 剤を混合投与して得られた複合毒性強度は 1.12 で、多少の相違はあったがいずれもほぼ相加的影響を示した。

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；複合毒性強度 0.82

4 剤全てを混合した剤の複合投与では、軽度の拮抗作用を示した。この結果は各剤の相互作用を反映したもので、相乗的な毒性の増強は認められなかった。

これらのうち 2 剤を組み合わせた際の複合毒性強度は、メタミドホス+パラチオンが 0.80、メタミドホス+キシリルカルブが 0.58、メタミドホス+50%硫酸ニコチン水溶液が 1.13、パラチオン+キシリルカルブが 0.47、パラチオン+50%硫酸ニコチン水溶液が 0.59、キシリルカルブ+50%硫酸ニコチン水溶液が 1.21 で、平均値および中央値は 0.80 および 0.84 であり、4 剤を混合投与して得られた複合毒性強度 0.82 と良く一致した。さらにこれらのうち 3 剤を組み合わせた際の複合毒性強度は、メタミドホス+パラチオン+キシリルカルブが 0.64、メタミドホス+パラチオン+50%硫酸ニコチン水溶液が 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が 1.04、パラチオン+キシリルカルブ+50%硫酸ニコチン水溶液が 1.12 で、平均値および中央値は 0.93 および 0.88 であり、4 剤を混合投与して得られた複合毒性強度 0.82 とほぼ一致した。(図 1)

E. 結論

今回用いた農薬の 3 剤ないし 4 剤の複合暴露試験では、2 剤暴露と比較して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 ないしは 4 剤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。この結果から、多剤複合暴露影響の予測には、2 剤複合毒性情報が有用である可能性が示唆された。

F. 参考文献

- 1) Dubois KP. (1961) Potentiation of toxicity of organophosphorus compounds. Adv. Pest. Control Res., 4: 117-151
- 2) 財団法人残留農薬研究所 (2011): 厚生労働科学研究費補助金(食品の安全性高度化推進研究事業)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 平成 22 年度分担研究報告書『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』
- 3) Takahashi H., Miyaoka T., Tsuda S., and Shirasu Y. (1982). Combined toxicity of malathion and carbamate insecticides in mice and rats. J. Pesticide Sci., 8, 41-45.
- 4) WHO (1972). Pesticide Residue Series, No. 1, Fenthion, Geneva.
- 5) Takahashi H., Miyaoka T., Tsuda S., and Shirasu Y. (1984). Potential toxicity of 2-sec-butyl

methylcarbamate (BPMC) by O,O-dimethyl O-(3-Methyl-4-nitrophenyl) phosphorothioate (Fenitrothion) in mice; relationship between acute toxicity and metabolism of BPMC. Fundam. Appl. Toxicol. 4, 718-723.

- 6) Miyaoka T., Takahashi H., Tsuda S., and Shirasu Y. (1984). Potentiation of acute toxicity of 2-*sec*-butyl methylcarbamate (BPMC) by fenthion in mice. Fundam. Appl. Toxicol. 4, 802-807.
- 7) Yamamoto I., Yabuta G., Tomizawa M., Saito T., Miyamoto T., and Kagabu S. (1994). Molecular mechanism for selective toxicity of nicotinoids and neonictinoids. J. Pesticide Sci. 20, 33-40.
- 8) Albuquerque E.W., Pereira E.F.R., Aracava Y., Fawcett W.P., Oliveira M., Randall W.R., Hamilton T.A., Kan R.K., Romano Jr. J.A., and Adler M. (2006). Effective countermeasure against poisoning by organophosphorus insecticides and nerve agents. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 13220-13225.
- 9) Smulders C.J.G.M., Bueters T.J.H., Vailati S., van Kleef R.G.D.M., and Vijverberg H.P.M. (2004). Block of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by organophosphate insecticides. Toxicological Sciences 82, 545-554.

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 有機リン剤とカーバメート剤及びニコチン製剤のラットにおける急性経口複合投与影響：首藤康文、齋島淳子、藤江秀彰、小松豊、青山博昭、原田孝則 第151回日本獣医学会学術集会（東京、2011）
- 2) 有機リン剤とカーバメート剤及びニコチン製剤のラットにおける急性経口複合毒性-3ないし4剤混合投与による影響：首藤康文、齋島淳子、藤江秀彰、小松豊、青山博昭、原田孝則 第153回日本獣医学会学術集会（大宮、2012）

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

なし

Table 1-1 LD₅₀ value - Individual pesticide

Methamidophos (M)	Parathion (P)	Xylycarb (X)	50% Nicotine Sulfate WS (N)
10.2 mg/kg	1.1 mg/kg	101 mg/kg	107 mg/kg

Table 1-2 LD₅₀ value - Mixture

Mixture	Observed LD ₅₀ value	Expected LD ₅₀ value	Expected/Observed
M + P	6.9 mg/kg	5.6 mg/kg	0.80
M + X	95 mg/kg	56 mg/kg	0.58
M + N	52 mg/kg	59 mg/kg	1.13
P + X	108 mg/kg	51 mg/kg	0.47
P + N	91 mg/kg	54 mg/kg	0.59
X + N	86 mg/kg	104 mg/kg	1.21
M + P + X	58 mg/kg	37 mg/kg	0.64
M + P + N	44 mg/kg	39 mg/kg	0.90
M + X + N	70 mg/kg	73 mg/kg	1.04
P + X + N	62 mg/kg	70 mg/kg	1.12
M + P + X + N	67 mg/kg	55 mg/kg	0.82

Table 2 - 1 Clinical observation (Methamidophos + Parathion + Xylycarb)

Dose (mg/kg)	Signs	Time after administration									
		1	3	6 hrs	1	2	3	4	5	6	7 days
37 _b (M3.4 + P0.35 + X33.5)	Mortality	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Twitch	2.00 _a	0.60	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tremor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Convulsion	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Miosis	-1.80	0	-0.60	0	0	0	0	0	0	0
	Salivation	1.80	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Muscle tone	-1.80	-0.40	-0.40	0	0	0	0	0	0	0
	Hypothermia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
56 (M5.1 + P0.53 + X50.3)	Mortality	2/5	2/5	2/5	2/5	2/5	2/5	2/5	2/5	2/5	2/5
	Twitch	2.00	2.00	1.00	0	0	0	0	0	0	0
	Tremor	0.33	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Convulsion	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Miosis	-2.00	-2.00	-1.67	0	0	0	0	0	0	0
	Salivation	2.00	2.67	0	0	0	0	0	0	0	0
	Muscle tone	0.33	-1.33	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hypothermia	-0.33	0	0	0	0	0	0	0	0	0
84 (M7.7 + P0.80 + X75.5)	Mortality	4/5	5/5								
	Twitch	1.00	-								
	Tremor	2.00	-								
	Convulsion	0	-								
	Miosis	-2.00	-								
	Salivation	3.00	-								
	Muscle tone	-2.00	-								
	Hypothermia	-1.00	-								

Mortality: Cumulative number of animals found dead / number of animals treated.

a: Group mean score.

b: Expected LD₅₀.

Table 2 - 2 Clinical observation (Methamidophos + Parathion + 50%Nicotine sulfate WS)

Dose (mg/kg)	Signs	Time after administration									
		1	3	6 hrs	1	2	3	4	5	6	7 days
26 (M2.3 + P0.23 + N23.7)	Mortality	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Twitch	0 _a	1.20	0.60	0	0	0	0	0	0	0
	Tremor	0	0.40	0	0	0	0	0	0	0	0
	Convulsion	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Miosis	-0.40	-1.20	-1.00	0	0	0	0	0	0	0
	Salivation	0.40	0.20	0	0	0	0	0	0	0	0
	Muscle tone	-0.80	-1.20	-0.60	0	0	0	0	0	0	0
	Hypothermia	-0.80	-0.40	0	0	0	0	0	0	0	0
39 _b (M3.4 + P0.35 + N35.6)	Mortality	0/5	2/5	2/5	2/5	2/5	2/5	2/5	2/5	2/5	2/5
	Twitch	1.60	2.00	1.00	0	0	0	0	0	0	0
	Tremor	0.60	0.67	0.33	0	0	0	0	0	0	0
	Convulsion	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Miosis	-1.80	-1.33	-1.67	-0.33	0	0	0	0	0	0
	Salivation	0.20	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0
	Muscle tone	-0.60	-1.00	-1.33	0	0	0	0	0	0	0
	Hypothermia	-0.80	-0.67	-0.67	0	0	0	0	0	0	0
59 (M5.1 + P0.53 + N53.4)	Mortality	1/5	4/5	4/5	4/5	4/5	4/5	4/5	4/5	4/5	4/5
	Twitch	1.00	1.00	2.00	0	0	0	0	0	0	0
	Tremor	0.50	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0
	Convulsion	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Miosis	-1.50	-2.00	-2.00	-1.00	-1.00	0	0	-1.00	-1.00	0
	Salivation	0.25	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0
	Muscle tone	-1.25	-2.00	-2.00	0	0	0	0	0	0	0
	Hypothermia	-0.75	0	-1.00	0	0	0	0	0	0	0

Mortality: Cumulative number of animals found dead / number of animals treated.

a: Group mean score.

b: Expected LD₅₀.

Table 2 - 3 Clinical observation (Methamidophos + Xylcarb + 50%Nicotine sulfate WS)

Dose (mg/kg)	Signs	Time after administration									
		1	3	6 hrs	1	2	3	4	5	6	7 days
33 (M1.5 + X15.0 + N16.0)	Mortality	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Twitch	1.00 ^a	0.80	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tremor	0.60	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Convulsion	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Miosis	-1.20	-1.00	-0.60	0	0	0	0	0	0	0
	Salivation	0.40	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Muscle tone	-1.00	-0.60	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hypothermia	0.80	-0.40	0	0	0	0	0	0	0	0
48 (M2.3 + X22.5 + N24.0)	Mortality	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Twitch	1.00	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tremor	0.80	0.80	0	0	0	0	0	0	0	0
	Convulsion	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Miosis	-2.00	-1.20	-0.80	0	0	0	0	0	0	0
	Salivation	0.80	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Muscle tone	-1.00	-1.00	-0.60	0	0	0	0	0	0	0
	Hypothermia	-1.00	-1.00	0	0	0	0	0	0	0	0
73 ^b (M3.4 + X33.8 + N36.0)	Mortality	3/5	3/5	3/5	3/5	3/5	3/5	3/5	3/5	3/5	3/5
	Twitch	1.00	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tremor	1.00	1.50	0	0	0	0	0	0	0	0
	Convulsion	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Miosis	-2.00	-2.00	-1.00	0	0	0	0	0	0	0
	Salivation	0.50	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Muscle tone	-1.00	-1.50	-1.00	0	0	0	0	0	0	0
	Hypothermia	-1.00	-1.00	0	0	0	0	0	0	0	0
109 (M5.1 + X50.6 + N54.0)	Mortality	4/5	4/5	5/5							
	Twitch	1.00	2.00	-							
	Tremor	2.00	2.00	-							
	Convulsion	0	0	-							
	Miosis	-2.00	-2.00	-							
	Salivation	1.00	1.00	-							
	Muscle tone	0	0	-							
	Hypothermia	-1.00	-1.00	-							

Mortality: Cumulative number of animals found dead / number of animals treated.

a: Group mean score.

b: Expected LD₅₀.

Table 2 - 4 Clinical observation (Parathion + Xylylcarb + 50%Nicotine sulfate WS)

Dose (mg/kg)	Signs	Time after administration									
		1	3	6 hrs	1	2	3	4	5	6	7 days
31 (P0.15 + X15.0 + N16.0)	Mortality	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Twitch	1.00 ^a	0.60	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tremor	0.60	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Convulsion	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Miosis	-1.40	-0.40	-0.20	0	0	0	0	0	0	0
	Salivation	0.60	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Muscle tone	-1.00	-0.60	0	0	0.20	0	0	0	0	0
	Hypothermia	-0.60	-0.60	0	0	0	0	0	0	0	0
46 (P0.23 + X22.5 + N24.0)	Mortality	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Twitch	0.80	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tremor	0.40	0.20	0	0	0	0	0	0	0	0
	Convulsion	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Miosis	-1.60	-0.80	-0.40	0	0	0	0	0	0	0
	Salivation	0.40	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Muscle tone	-1.40	-1.00	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hypothermia	-0.60	-0.80	0	0	0	0	0	0	0	0
70 ^b (P0.35 + X33.8 + N36.0)	Mortality	4/5	4/5	4/5	4/5	4/5	4/5	4/5	4/5	4/5	4/5
	Twitch	1.00	2.00	1.00	0	0	0	0	0	0	0
	Tremor	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0
	Convulsion	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Miosis	-2.00	-2.00	-1.00	0	0	0	0	0	0	0
	Salivation	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Muscle tone	-2.00	-2.00	-1.00	0	0	0	0	0	0	0
	Hypothermia	-1.00	-1.00	0	0	0	0	0	0	0	0
105 (P0.53 + X50.6 + N54.0)	Mortality	5/5									
	Twitch	-									
	Tremor	-									
	Convulsion	-									
	Miosis	-									
	Salivation	-									
	Muscle tone	-									
	Hypothermia	-									

Mortality: Cumulative number of animals found dead / number of animals treated.

a: Group mean score.

b: Expected LD₅₀.

Table 2 - 5 Clinical observation
(Methamidophos + Parathion + Xylycarb + 50%Nicotine sulfate WS)

Dose (mg/kg)	Signs	Time after administration									
		1	3	6 hrs	1	2	3	4	5	6	7 days
25 (M1.13 + P0.13 + X11.3 + N12.0)	Mortality	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Twitch	0.80 ^a	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tremor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Convulsion	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Miosis	-0.60	-0.40	-0.20	0	0	0	0	0	0	0
	Salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Muscle tone	-0.60	-0.20	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hypothermia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36 (M1.69 + P0.19 + X16.9 + N18.0)	Mortality	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Twitch	1.00	0.60	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tremor	0.40	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Convulsion	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Miosis	-1.60	-0.80	-0.20	0	0	0	0	0	0	0
	Salivation	0.80	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Muscle tone	-1.20	-1.00	-0.20	0	0	0	0	0	0	0
	Hypothermia	-0.60	-0.60	0	0	0	0	0	0	0	0
55 ^b (M2.54 + P0.29 + X25.4 + N27.0)	Mortality	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Twitch	1.00	1.00	0.20	0	0	0	0	0	0	0
	Tremor	0.40	0.60	0	0	0	0	0	0	0	0
	Convulsion	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Miosis	-2.00	-1.00	-0.80	0	0	0	0	0	0	0
	Salivation	0.20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Muscle tone	-2.00	-1.40	-0.20	0	0	0	0	0	0	0
	Hypothermia	-1.00	-0.80	0	0	0	0	0	0	0	0
83 (M3.81 + P0.44 + X38.1 + N40.5)	Mortality	5/5									
	Twitch	-									
	Tremor	-									
	Convulsion	-									
	Miosis	-									
	Salivation	-									
	Muscle tone	-									
123 (M5.72 + P0.66 + X57.2 + N60.8)	Mortality	5/5									
	Twitch	-									
	Tremor	-									
	Convulsion	-									
	Miosis	-									
	Salivation	-									
	Muscle tone	-									
	Hypothermia	-									

Mortality: Cumulative number of animals found dead / number of animals treated.

a: Group mean score.

b: Expected LD₅₀.

Table 3 - 1 Body weight - Group mean value
(Methamidophos + Parathion + Xylycarb)

(g)

Dose (mg/kg)		Before administration	7 days after administration
37 (M3.4 + P0.35 + X33.5)	Mean	155	188
	S.D.	7	7
	N	5	5
56 (M5.1 + P0.53 + X50.3)	Mean	149	176
	S.D.	6	7
	N	5	3
84 (M7.7 + P0.80 + X75.5)	Mean	148	
	S.D.	7	
	N	5	

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals.

Table 3 - 2 Body weight - Group mean value
(Methamidophos + Parathion + 50%Nicotine sulfate WS)

(g)

Dose (mg/kg)		Before administration	7 days after administration
26 (M2.3 + P0.23 + N23.7)	Mean	148	177
	S.D.	7	10
	N	5	5
39 (M3.4 + P0.35 + N35.6)	Mean	148	186
	S.D.	6	2
	N	5	3
59 (M5.1 + P0.53 + N53.4)	Mean	149	203
	S.D.	9	
	N	5	1

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals.

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

(g)

Dose (mg/kg)		Before administration	7 days after administration
33 (M1.5 + X15.0 + N16.0)	Mean	149	179
	S.D.	9	10
	N	5	5
48 (M2.3 + X22.5 + N24.0)	Mean	156	186
	S.D.	9	9
	N	5	5
73 (M3.4 + X33.8 + N36.0)	Mean	153	184
	S.D.	5	8
	N	5	2
109 (M5.1 + X50.6 + N54.0)	Mean	156	
	S.D.	2	
	N	5	

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals.

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

				(g)
Dose (mg/kg)		Before administration	7 days after administration	
31 (P0.15 + X15.0 + N16.0)	Mean	152	180	
	S.D.	7	12	
	N	5	5	
46 (P0.23 + X22.5 + N24.0)	Mean	153	181	
	S.D.	9	8	
	N	5	5	
70 (P0.35 + X33.8 + N36.0)	Mean	153	177	
	S.D.	7		
	N	5	1	
105 (P0.53 + X50.6 + N54.0)	Mean	150		
	S.D.	7		
	N	5		

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals.

Table 3 - 5 Body weight - Group mean value
(Methamidophos + Parathion + Xylycarb + 50%Nicotine sulfate WS)

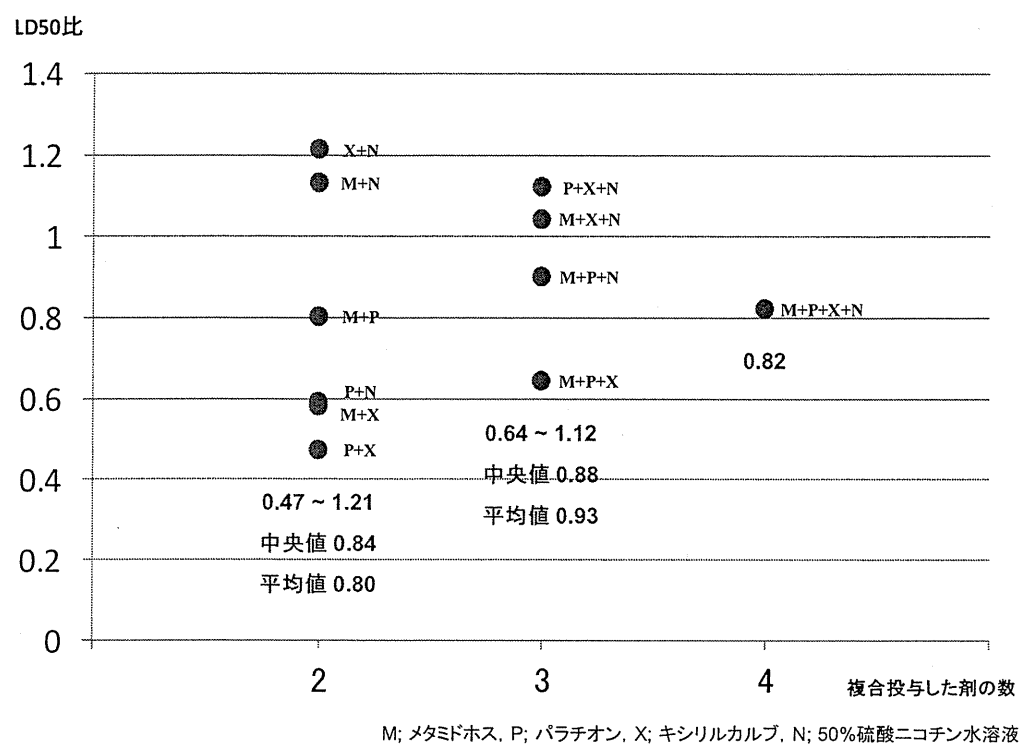
(g)

Dose (mg/kg)		Before administration	7 days after administration
25 (M1.13 + P0.13 + X11.3 + N12.0)	Mean S.D. N	159 5 5	188 5 5
36 (M1.69 + P0.19 + X16.9 + N18.0)	Mean S.D. N	159 6 5	189 11 5
55 (M2.54 + P0.29 + X25.4 + N27.0)	Mean S.D.	149 4 5	182 8 5
83 (M3.81 + P0.44 + X38.1 + N40.5)	Mean S.D. N	156 5 5	
123 (M5.72 + P0.66 + X57.2 + N60.8)	Mean S.D. N	157 7 5	

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals.

図 1. 複数の剤を混合した際の LD50 比 (LD50 期待値/LD50 実測値)



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」

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の複合反復経口投与による発達神経毒性

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	元村淳子	（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
	坂真智子	（財）残留農薬研究所	化学部残留第 2 研究室

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の 2 種類の有機リン系農薬を混合して妊娠 6 日より哺育 21 日まで複合反復経口投与し、児動物の発達に及ぼす影響を検索した。

その結果、高用量のパラチオン及びメタミドホスを複合暴露した母動物では、妊娠期間中あるいは哺育期間中に、死亡または重篤な神経症状が認められた。高用量群及び低用量群の血清 ChE 活性は有意に低下した。児動物では、高用量群における雌雄で観察期間に有意な体重増加抑制及び身体発達の遅延が認められた。さらに、雄動物では哺育 4 日の血清 ChE 活性が有意に低下した。また、被験物質投与群では、連続的な探索行動、自発運動の有意な増加、驚愕反応の軽度抑制が認められた。

乳汁中のパラチオン、メタミドホス及びその代謝物の化学分析を行った結果、いずれも検出限界以下であった。

パラチオン及びメタミドホスを複合反復投与すると単剤暴露に比べ相加的に毒性が強く発現し、さらに生理学的変化の著しい妊娠期では、その症状や毒性は増強される傾向にあった。児動物に対する影響に関しては、パラチオン及びメタミドホスの直接的な作用ではなく、母動物の投与に伴う生理学的及び行動学的変化が児動物の身体発達、衝動性や多動性などの行動に影響を及ぼしたものと推察された。

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み合わせテ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調査する。

平成 23 年度は 2 種類の有機リン剤（パラチオン及びメタミドホス）を複合的に妊娠 6 日目より哺育 21 日まで反復経口投与し、母動物および児動物の発達に及ぼす影響を検索した。

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 種類の有機リン系殺虫剤のパラチオン及びメタミドホスを混合して、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℃）で、メタミドホスは冷凍庫（-20℃）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。試験環境に 7 日間馴化させた。馴化期間中、生死の確認を含む一般状態の観察を毎日実施した。そして妊娠動物を得るため、雌のスメアを採取した。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とし、この日を妊娠 0 日 (GD0) とした。動物は温度 22 ± 2℃、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。なお、電気使用制限等規則に関する経済産業大臣通知書（平成 23・05・25 資第 43 号、平成 23 年 6 月 1 日付）に従って消費電力を抑制するため 2011 年 7 月 1 日から 10 月 1 日までの期間は、室温 23±2℃、湿度 60±20%、換気回数 8 回/時間（オールフレッシュエアー方式）に設定した環境下で飼育した。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

平成 22 年度に実施したパラチオンおよびメタミドホス単剤強制経口投与発達毒性試験の結果から、複合投与実験では母動物の死亡あるいは哺育に支障をきたすような重篤な神経症状を呈さない用量であり、また児動物になんらかの影響を及ぼす可能性のある用量としてパラチオン 0.6 mg/kg/day、メタミドホス 0.8 mg/kg/day を高用量に設定した。また、神経症状を含む一般状態への影響が認められないと予想される用量として、パラチオン 0.3 mg/kg/day、メタミドホス 0.4 mg/kg/day を低用量に設定した。また、対照群として溶媒対照群 (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) にてパラチオンを濃度 0.15 mg/mL (用量 0.3 mg/kg) 及び 0.30 mg/mL (用量 0.6 mg/kg) に調製し、メタミドホスは 0.20 mg/mL (用量 0.4 mg/kg) 及び 0.40 mg/mL (用量 0.8 mg/kg) に調製した。調製後、各調製液を 1:1 で混合し各投与液は小分けし、冷蔵・遮光 (5℃) 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 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 (セバラビット S; 積水化学工業) 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。尚、PND4 の Litter 調整時に対象動物を断頭後、血液および脳を採取した。また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。

5.7. 乳汁中のパラチオン、メタミドホスおよびパラオクソン化学分析

PND4 の Litter 調整時に対象動物から採取した胃内容物の乳汁を精製した後、ガスクロマトグラム (GC-NPD) に注入し、パラチオン、メタミドホスおよびパラチオンの代謝物であるパラオクソンの化学分析を行った。

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。尚、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. 死亡動物数

母動物では高用量群において妊娠期間中に 7 例、哺育期間中に 1 例の死亡が認められた。

児動物では低用量群において離乳前に雄 8 例、雌 9 例、離乳後には雌 1 例の死亡が認められた。高用量群では離乳前に雄 9 例、雌 6 例の死亡が認められた。

2. 母動物

2.1. 一般状態 (表 1A, 1B)

試験期間中、溶媒対照群および低用量群

では異常は認められなかった。高用量群では妊娠期間中に攣縮 (1 例) および筋緊張低下 (5 例) が認められた。尚、表には示していないが、投与直後の観察において、低用量群では妊娠期間中に攣縮 (2 例) が認められ、高用量群では妊娠期間中に全ての動物に攣縮 (14 例) が認められ、さらに哺育期間中にも攣縮が認められた。

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 および PND6、PND19 に実施した。

妊娠期間中の詳細な症状観察において、低用量群では警戒性低下 (7 例)、探索行動亢進 (14 例) および瞳孔径低下 (5 例) が認められた。高用量群では警戒性低下 (9 例)、探索行動亢進 (11 例) あるいは探索行動の有意な低下 (5 例)、筋緊張低下 (1 例)、取扱いに対する反応低下 (2 例) および瞳孔径低下 (3 例) が認められた。哺育期間中における観察では、低用量群では警戒性低下 (4 例)、探索行動低下 (1 例)、筋緊張低下 (2 例) および瞳孔径低下 (2 例) が認められた。高用量群では警戒性低下 (4 例)、探索行動亢進 (2 例)、筋緊張低下 (1 例) および瞳孔径低下 (1 例) が認められた。

各観察時点の結果を以下に記す。

[GD6]

警戒性低下：溶媒対照群 (3 例)

低用量群 (4 例)

高用量群 (4 例)

探索行動亢進：溶媒対照群 (11 例)

低用量群 (11 例)

高用量群 (10 例)

筋緊張亢進：溶媒対照群 (2 例)

低用量群 (3 例)

筋緊張低下：高用量群 (1 例)

瞳孔径低下：溶媒対照群 (1 例)

低用量群 (3 例)

高用量群 (3 例)

[GD19]

警戒性低下：溶媒対照群 (4 例)

低用量群 (3 例)

高用量群 (5 例)

探索行動亢進：溶媒対照群 (6 例)

低用量群 (3 例)

高用量群 (1 例)

探索行動低下：高用量群 (5 例)

筋緊張亢進：溶媒対照群 (3 例)

低用量群 (4 例)

取扱いに対する反応低下

：高用量群 (2 例)

瞳孔径低下：低用量群 (2 例)

[PND6]

警戒性亢進：高用量群 (1 例)

警戒性低下：溶媒対照群 (1 例)

低用量群 (2 例)

高用量群 (1 例)

探索行動亢進：溶媒対照群 (1 例)

高用量群 (2 例)

探索行動低下：低用量群 (1 例)

筋緊張低下：低用量群 (2 例)

高用量群 (1 例)

瞳孔径低下：溶媒対照群 (1 例)

低用量群 (2 例)

[PND19]

警戒性低下：低用量群 (2 例)

高用量群 (3 例)

探索行動亢進：溶媒対照群 (1 例)

瞳孔径低下：溶媒対照群 (1 例)

高用量群 (1 例)

2.3. 体重 (表 3A, 3B)

妊娠期間中における体重では、GD16、19、20 および PND4 に高用量群において有意な体重減少が認められたが、Litter 調整後、体重は回復し順調に増加した。溶媒対照群および低用量群では妊娠期間中およ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。

妊娠期間中または哺育期間中に死亡した動物では、流涎によると思われる口周囲部被毛の汚れ、胸腺萎縮、肺の赤色化、副腎腫大、胃内液状内容物貯留などが認められた。また脳の軽度腫大も認められた。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

胃内液状内容物貯留 : 3 例

胃粘膜赤色斑散在 : 2 例

腸管内液状内容物貯留 : 4 例

脾臓腫大 : 1 例

脾臓萎縮 : 1 例

副腎腫大 : 4 例

脳の軽度腫大 : 1 例

2.5. 脳重量

各試験群における全ての生存動物において、脳重量に統計学的有意差は認められな

かった。

本文表 1

	脳重量 (mg)
V.C.	1788±58
P0.3+M0.4	1819±69
P0.6+M0.8	1834±44

V.C.; Vehicle Control

(平均値±標準偏差)

2.6. 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および脳の ChE 活性を測定した。

血清 ChE 活性は低用量群および高用量群で有意差を認め、対照群の 36%、58%低下した。脳の ChE 活性に有意差は認められなかったが、対照群と比較して低用量群は 23%、高用量群は 46%低下した。

3. 児動物

3.1. 一般状態 (表 5, 6)

離乳までに低用量群および高用量群において体温低下および発育不良の動物が認められた。離乳後、低用量群の雌 1 例において消瘦、鎮静、体温低下、鼻周囲部被毛の汚れ、呼吸緩徐およびよろめき歩行が認められた。高用量群では雌雄各 2 例に発育不良が認められた。

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。

詳細な観察における流涙、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、観察期間中、活発な探索行動が認められた。