

Table 16

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

Dose groups (mg/kg/day)	Day		PND 25±2			
			Stage (N)			
			PPI BC	PPI BH	PPI Low	PPI Middle
1% Tween80 0	Mean	0.0906	0.7373	0.6159	0.5158	0.4515
	S.D.	0.0323	0.2474	0.1968	0.1779	0.1589
Parathion 0.3 + Methamidophos 0.4	Mean	0.0785	0.7522	0.6870	0.6395	0.6142
	S.D.	0.0293	0.2439	0.1972	0.1691	0.1480
Parathion 0.6 + Methamidophos 0.8	Mean	0.0729	0.4975	0.4755	0.4938	0.3825
	S.D.	0.0214	0.1283	0.1965	0.2149	0.1480
Dose groups (mg/kg/day)	Day		PND 60-70			
			Stage (N)			
			PPI BC	PPI BH	PPI Low	PPI Middle
1% Tween80 0	Mean	0.1517	3.3176	3.0213	2.6916	2.3300
	S.D.	0.0625	1.4627	1.3146	1.2230	1.1748
Parathion 0.3 + Methamidophos 0.4	Mean	0.1585	3.0132	2.9645	2.6268	2.3894
	S.D.	0.0664	0.8387	1.3226	1.3349	1.4175
Parathion 0.6 + Methamidophos 0.8	Mean	0.1674	3.1529	3.2931	2.7347	2.4901
	S.D.	0.0510	1.4397	1.2267	1.7506	1.2863

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 17

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

Dose groups (mg/kg/day)	Day	PND 25±2				
				Stage (N)		
		PPI BC	PPI BH	PPI Low	PPI Middle	PPI High
1% Tween80 0	Mean	0.0855	0.7763	0.6267	0.6656	0.5804
	S.D.	0.0257	0.2147	0.1455	0.1650	0.1801
Parathion 0.3 + Methamidophos 0.4	Mean	0.0768	0.6248	0.5016	0.5159	0.4811
	S.D.	0.0390	0.2243	0.1524	0.1493	0.1456
Parathion 0.6 + Methamidophos 0.8	Mean	0.0803	0.5396	0.3956	0.3511 *	0.3249
	S.D.	0.0357	0.1428	0.1146	0.0564	0.0516
Dose groups (mg/kg/day)	Day	PND 60-70				
				Stage (N)		
		PPI BC	PPI BH	PPI Low	PPI Middle	PPI High
1% Tween80 0	Mean	0.1403	2.8025	2.7103	2.2345	2.0711
	S.D.	0.0530	1.3471	1.4935	1.6283	1.4113
Parathion 0.3 + Methamidophos 0.4	Mean	0.1411	2.0689	2.2236	1.8881	1.6950
	S.D.	0.0473	0.9758	0.8115	0.7754	0.8669
Parathion 0.6 + Methamidophos 0.8	Mean	0.1451	2.2058	1.3862	1.3258	0.9633
	S.D.	0.0139	0.7160	0.3404	0.3186	0.1855

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 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	-2	0	0
0	-1	0	0
	0	8	7
	1	0	1
	2	0	0
Parathion 0.3	-2	0	0
+	-1	0	0
Methamidophos 0.4	0	8	8
	1	0	0
	2	0	0
Parathion 0.6	-2	0	0
+	-1	0	0
Methamidophos 0.8	0	3	3
	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	-2	0	0
0	-1	0	0
	0	8	4
	1	0	4
	2	0	0
Parathion 0.3	-2	0	0
+	-1	1	0
Methamidophos 0.4	0	7	5
	1	0	3
	2	0	0
Parathion 0.6	-2	0	0
+	-1	0	0
Methamidophos 0.8	0	3	2
	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

(counts)								
Dose groups (mg/kg/day)	PND							
	13							Total
	min	0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	
1% Tween80 0	Mean	73	136	140	154	169	52	722
	S.D.	110	235	247	192	265	82	1062
Parathion 0.3 +	Mean	127	102	62	14	8	15	326
	S.D.	129	149	134	34	10	25	421
Methamidophos 0.4								
Parathion 0.6 +	Mean	105	65	165	108	9	1	454
	S.D.	75	82	274	170	9	2	585
Methamidophos 0.8								
Dose groups (mg/kg/day)	PND							
	17							Total
	min	0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	
1% Tween80 0	Mean	230	225	114	63	33	21	685
	S.D.	161	148	145	116	83	47	535
Parathion 0.3 +	Mean	267	224	108	29	39	46	713
	S.D.	84	162	155	52	61	131	379
Methamidophos 0.4								
Parathion 0.6 +	Mean	400	340	461 *	337	417	252	2206
	S.D.	71	246	401	320	459	421	1699
Methamidophos 0.8								

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 20 - 2

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

(counts)								
Dose groups (mg/kg/day)	PND							
	21							Total
	min	0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	
1% Tween80	Mean	477	141	26	47	17	1	710
0	S.D.	342	161	44	87	38	2	597
Parathion 0.3	Mean	234	96	43	11	12	21	416
+	S.D.	141	135	88	18	31	58	402
Methamidophos 0.4								
Parathion 0.6	Mean	487	213	60	4	32	2	798
+	S.D.	278	140	52	6	55	3	482
Methamidophos 0.8								
Dose groups (mg/kg/day)	PND							
	60-70							Total
	min	0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	
1% Tween80	Mean	1658	1036	843	720	615	601	5472
0	S.D.	302	423	577	327	423	393	2013
Parathion 0.3	Mean	1756	1078	740	853	681	443	5550
+	S.D.	240	476	347	176	276	377	1438
Methamidophos 0.4								
Parathion 0.6	Mean	1640	838	439	539	245	285	3986
+	S.D.	367	351	300	278	190	272	1272
Methamidophos 0.8								

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

(counts)								
Dose groups (mg/kg/day)	PND							
	min	13						Total
		0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	
1% Tween80 0	Mean	105	75	69	35	9	1	294
	S.D.	79	73	90	57	19	2	294
Parathion 0.3 + Methamidophos 0.4	Mean	120	66	74	62	16	11	350
	S.D.	84	126	97	91	29	27	336
Parathion 0.6 + Methamidophos 0.8	Mean	32	42	32	4	27	25	162
	S.D.	30	66	49	8	38	43	181

Dose groups (mg/kg/day)	PND							
	min	17						Total
		0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	
1% Tween80 0	Mean	398	395	231	153	110	120	1406
	S.D.	182	147	157	218	143	218	829
Parathion 0.3 + Methamidophos 0.4	Mean	257	262	197	131	32	73	951
	S.D.	197	198	260	165	82	153	942
Parathion 0.6 + Methamidophos 0.8	Mean	450	299	206	56	17	20	1048
	S.D.	483	234	170	93	23	28	970

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

(counts)								
Dose groups (mg/kg/day)	PND							
	21							Total
	min	0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	
1% Tween80	Mean	404	134	88	74	50	8	756
0	S.D.	166	92	94	150	106	21	390
Parathion 0.3	Mean	230	151	48	18	13	3	463
+	S.D.	154	103	46	32	30	8	222
Methamidophos 0.4								
Parathion 0.6	Mean	337	95	34	29	1	0	497
+	S.D.	157	86	57	25	2	0	276
Methamidophos 0.8								
Dose groups (mg/kg/day)	PND							
	60-70							Total
	min	0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	
1% Tween80	Mean	1791	1245	997	894	807	611	6345
0	S.D.	452	454	431	342	369	483	1972
Parathion 0.3	Mean	1681	1022	657	664	558	745	5326
+	S.D.	387	536	268	242	334	310	1503
Methamidophos 0.4								
Parathion 0.6	Mean	1816	1273	1189	1118	862	338	6597
+	S.D.	394	446	800	744	704	307	2887
Methamidophos 0.8								

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

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% Tween80	6	Mean	986
0		S.D.	85
Parathion 0.3	4	Mean	874
+		S.D.	108
Methamidophos 0.4			
Parathion 0.6	3	Mean	785 *
+		S.D.	116
Methamidophos 0.8			

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 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% Tween80	6	Mean	312
0		S.D.	54
Parathion 0.3	4	Mean	311
+		S.D.	37
Methamidophos 0.4			
Parathion 0.6	2	Mean	356
+		S.D.	42
Methamidophos 0.8			

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% Tween80 0	8	Mean	695
		S.D.	102
Parathion 0.3 + Methamidophos 0.4	8	Mean	741
		S.D.	123
Parathion 0.6 + Methamidophos 0.8	3	Mean	676
		S.D.	88

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% Tween80 0	7	Mean	245
		S.D.	109
Parathion 0.3 + Methamidophos 0.4	8	Mean	206
		S.D.	56
Parathion 0.6 + Methamidophos 0.8	3	Mean	199
		S.D.	79

S.D.: Standard deviation.

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

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% Tween80 0	8	Mean	630
		S.D.	152
Parathion 0.3 +	8	Mean	551
Methamidophos 0.4		S.D.	106
Parathion 0.6 +	3	Mean	603
Methamidophos 0.8		S.D.	35

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% Tween80 0	8	Mean	407
		S.D.	43
Parathion 0.3 +	8	Mean	456 *
Methamidophos 0.4		S.D.	15
Parathion 0.6 +	3	Mean	481 *
Methamidophos 0.8		S.D.	50

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 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% Tween80	2	Mean	876
0		S.D.	11
Parathion 0.3	5	Mean	836
+		S.D.	31
Methamidophos 0.4			

S.D.: Standard deviation.

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% Tween80	2	Mean	316
0		S.D.	18
Parathion 0.3	5	Mean	300
+		S.D.	37
Methamidophos 0.4			

S.D.: Standard deviation.

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% Tween80	8	Mean	745
0		S.D.	105
Parathion 0.3	8	Mean	717
+		S.D.	200
Methamidophos 0.4			
Parathion 0.6	1	Mean	716
+		S.D.	-
Methamidophos 0.8			

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% Tween80	7	Mean	214
0		S.D.	84
Parathion 0.3	7	Mean	192
+		S.D.	72
Methamidophos 0.4			
Parathion 0.6	1	Mean	101
+		S.D.	-
Methamidophos 0.8			

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% Tween80 0	8	Mean	2516
		S.D.	662
Parathion 0.3 + Methamidophos 0.4	7	Mean	2581
		S.D.	781
Parathion 0.6 + Methamidophos 0.8	2	Mean	2028
		S.D.	154

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% Tween80 0	8	Mean	403
		S.D.	38
Parathion 0.3 + Methamidophos 0.4	7	Mean	441
		S.D.	43
Parathion 0.6 + Methamidophos 0.8	2	Mean	521
		S.D.	54

S.D.: Standard deviation.

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

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」

3. 免疫毒性に関する研究

パラチオン、メトキシクロルあるいはピペロニルブトキシド反復投与後の Picryl chloride
複合暴露によるアトピー性皮膚炎の増強効果に関する研究

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
	福山朋季	(財) 残留農薬研究所	毒性部免疫・急性毒性研究室

研究要旨

有機リン剤（パラチオン）、有機塩素剤（メトキシクロル）及び植物調整剤（ピペロニルブトキシド）のアレルギー反応に及ぼす影響を調査すべく、アトピー性皮膚炎に着目し検討を行った。実験では、アトピー性皮膚炎発症モデルとして使用される雌性 NC/Nga マウスに各被験物質を 5 日間反復経口投与し、4 週間後にアトピー性皮膚炎を惹起する Picryl chloride を反復経皮暴露して、アトピー性皮膚炎反応の増強影響を検索した。

パラチオン、メトキシクロルないしはピペロニルブトキシドを前投与したマウスにおいて、アトピー性皮膚炎で見られる皮膚所見や投与部位の皮膚厚（耳介部）が用量相関性に有意に増加した。また、アトピー性皮膚炎に特徴的に認められる、血清中 IgE 量、リンパ節中 IgE 陽性 B 細胞数、リンパ節中サイトカイン産生量および耳介中サイトカイン遺伝子発現量が対照群と比較して用量依存性に有意に増加し、パラチオン、メトキシクロル及びピペロニルブトキシドの前投与によるアトピー性皮膚炎反応の増強効果が認められた。

これらの結果から、本試験条件下ではパラチオン、メトキシクロル及びピペロニルブトキシドの反復投与は、NC/Nga マウス及び Picryl chloride で惹起されるアトピー性皮膚炎反応を増強する可能性が示唆された。

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、実験上及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。

今年度の研究では、免疫系への影響が示唆されている有機リン剤（パラチオン）、有機塩素剤（メトキシクロル）及び植物調整剤（ピペロニルブトキシド）を幼若期に反復経口投与した後、4 週間後にアトピー性

皮膚炎を惹起する Picryl chloride を反復経皮暴露し、アトピー性皮膚炎反応の増強影響を検索した。

B. 研究方法

本研究では、有機リン剤（パラチオン）、有機塩素剤（メトキシクロル）ないしは植物調整剤（ピペロニルブトキシド）を雌性の NC/Nga 系マウスに 5 日間反復経口投与し、4 週間休薬後にアトピー性皮膚炎を惹起する Picryl chloride を反復経皮暴露し、皮膚所見や各種免疫学的因子測定など、アトピー性皮膚炎反応の増強影響を検索した。

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、99.6%、和光純薬工業株式会社、大阪府）、有機塩素剤のメトキシクロル（Methoxychlor、97%、和光純薬工業株式会社）、植物調整剤のピペロニルブトキシド（Piperonyl Butoxide、98%、和光純薬工業株式会社）、および Picryl chloride（100.2%、東京化成工業株式会社）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（NC/NgaTndCrlj）の雌動物を用いた。NC/Nga マウスはアトピー性皮膚炎モデルとして良く用いられている動物種である。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 ± 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。経口投与（パラチオン、メトキシクロルないしピペロニルブトキシド）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。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薬研究所で定める倫理規定に従い実施した。

3. 試験群

パラチオン、メトキシクロル及びピペロニルブトキシドは、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 10 にて、パラチオンは 1.5、0.15、及び 0 mg/kg、メトキシクロルとピペロニルブトキシドは 300、30 及び 0 mg/kg の各 3 用量を設定した。Picryl chloride は経皮経路にて毒性、皮膚刺激性および死亡の起こらない濃度を最高用量として選択し、感作に 1%、惹起に 0.5%を設定した。

4. 被験物質投与液の調製

パラチオン、メトキシクロル及びピペロニルブトキシド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。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。

Picryl chloride 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、メトキシクロルおよびピペ

ロニルブトキシドは、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。Picryl chloride 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感作1回、惹起9回（週1～2回）を経皮投与した。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感作は刈毛後の腹部に100 μ L、惹起は左右の耳介後方に25 μ L ずつ投与実施した。

6. 耳介厚および皮膚所見

Picryl chloride 感作後に週1回（8～12週齢）、耳介の厚さおよび皮膚所見を測定した。

7. 組織採取および各種測定

最終惹起の翌日、全生存動物についてペントバルビタール麻酔下で後大静脈より採血し、両側の耳介リンパ節および耳介を採材した。血液からは血清を分離し、ELISA法により総IgE およびIgG_{2a} 量を定量した。耳介リンパ節はリンパ球細胞の細胞懸濁液を調製した。耳介からはmRNA を分離し、リアルタイムPCR 法による各種サイトカイン遺伝子発現解析（IL-4, 5, 12b, 13, 17A, IFN γ ）に供した。

8. 耳介リンパ節の解析

両側の耳介リンパ節は、10%牛胎児血清含有RPMI1640 メディウムを用いて、ナイロンメッシュ（75 μ m メッシュ）上で揺りつぶし、単細胞懸濁液を得た。細胞懸濁液の一部はフローサイトメーターを用いてIgE 陽性B細胞数を測定した。また、CD3 およびCD28 抗体と24ないし96時間共培養することでT細胞から放出されるサイトカイン量（IL-4, 5, 6, 13, 17A, IFN γ ）を定量した。

9. 有意差検定

各検査項目について、対照群と各被験物質（パラチオン、メトキシクロル、ピペロニルブトキシド）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。

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

試験結果を表1～2 および図1～5に示す。

1. 耳介厚および皮膚所見（表1～2、図1）

いずれの投与群においても用量相関性の耳介厚の増加及び皮膚所見の亢進が9～12週齢時に認められた。耳介厚については、溶媒対照群（被験物質の前投与はなく、アトピー性皮膚炎のみを惹起）と比較して有意な増加が各被験物質投与群で認められた。

2. 血清中IgE およびIgG_{2a} 量（図2）

血清中IgE およびIgG_{2a} 量のいずれも、各被験物質投与群で用量相関性の溶媒対照群と比較して有意な増加が認められた。特にメトキシクロルおよびパラチオンのIgG_{2a} 量でその増加が顕著であった。

3. リンパ節中IgE 陽性B細胞数（図3）

各被験物質投与群で用量相関性の溶媒対照群と比較して有意な増加が認められた。高用量群では各被験物質ともに溶媒対照群の約2倍の反応が認められた。

4. リンパ節中サイトカイン産生量（図4）

リンパ節中のリンパ球をCD3 および

CD28 抗体と共培養することによって、アトピー性皮膚炎発症や増悪に関与する Th1 (IFN γ)、Th2 (IL-4, 5, 6, 13) および Th3 (IL-17) 型サイトカインの産生量を調査したが、皮膚所見や各組織中の IgE 量結果と同様に各被験物質投与群で溶媒対照群と比較して用量相関性の有意な増加が認められた。

5. 耳介皮膚中サイトカイン遺伝子発現量 (図 5)

皮膚所見を裏付けるべく、アトピー性皮膚炎が惹起されている耳介部の皮膚組織から mRNA を分離し、アトピー性皮膚炎発症や増悪に関与する Th1 (IFN γ)、Th2 (IL-4, 5, 6, 13) および Th3 (IL-17) 型サイトカインの産生量を調査した。結果、皮膚所見、各組織中の IgE 量、リンパ節中サイトカイン産生量と同様に各被験物質投与群で溶媒対照群と比較して用量相関性の有意な増加が認められた。

D. 考察

本研究では、有機リン剤のパラチオン、有機塩素剤のメトキシクロルないし植物調整剤のピペロニルブトキシドを 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、Picryl chloride を反復経皮投与することによってアトピー性皮膚炎を惹起し、アトピー性皮膚炎症状の変化を評価した。

有機リン剤、有機塩素剤および植物調整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¹⁻⁴⁾、本研究で用いたパラチオン、メトキシクロルおよびピペロニルブトキシドの胸腺細胞アポトーシス誘発作用が報告されており⁵⁾、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。著者らは、上記化学物質の免疫抑制作用や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、アトピー性皮膚炎増強作用誘発を指標とした検査を実施した。

本研究では、免疫抑制作用を有するパラチオン、メトキシクロルないしピペロニルブトキシドを幼若期に投与し、その後 Picryl chloride を反復経皮投与することによってアトピー性皮膚炎を惹起した結果、アトピー性皮膚炎様皮膚所見や耳介の厚さ、各組織中の IgE 量、サイトカイン産生量がコントロール軍と比較して有意に増加し、アトピー性皮膚炎反応に対する増強効果が認められた。上記結果より、免疫抑制作用およびアポトーシス誘発作用を有するパラチオン、メトキシクロルおよびピペロニルブトキシド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⁶⁾は自己免疫疾患モデル動物の (NZB $\times$ 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

有機塩素剤 (メトキシクロル)、有機リン剤 (パラチオン) および植物調整剤 (ピペロニルブトキシド) のアトピー性皮膚炎に対する影響を検索した。メトキシクロル、パラチオンないしピペロニルブトキシドを 4 週齢時の雌性 NC/Nga マウスに 5 日間反復経口投与し、4 週間休薬した後、Picryl chloride を経皮投与することでアトピー性

皮膚炎を惹起し、アトピー性皮膚炎反応を皮膚所見、耳介厚、IgE 量および寒冷サイトカイン産生量を測定することにより被験物質の影響を調査した。その結果、メトキシクロル、パラチオンおよびピペロニルブトキシドの若週齢における反復投与は、アトピー性皮膚炎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) Carson, D. S., Tribble, P. W., and Weart, C. W. Pyrethrins combined with piperonyl butoxide (RID) vs. 1% permethrin (NIX) in the treatment of head lice. Am. J. Dis. Child

142:768-769, 1988..

- 5) 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.

- 6) Sobel ES, Gianini J, Butfiloski EJ, Croker BP, Schiffenbauer J, Roberts SM.

Acceleration of Autoimmunity by Organochlorine Pesticides in (NZB × NZW)F1 Mice Environ. Health Persp., 113, 323-328, 2005.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fukuyama, T., Kosaka, T., Tajima, Y., Hayashi, K., Shutoh, Y., and Harada, T. (2011). Detection of thymocytes apoptosis in mice induced by organochlorine pesticides methoxychlor. Immunopharmacol Immunotoxicol 33, 193-200.

2. 学会発表

なし

II. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

図1 皮膚所見

