

E. 結論

遺伝毒性を示さないが細胞増殖能を有する食品中の化学物質は、食品中遺伝毒性発がん物質の遺伝毒性を増強する可能性が明らかとなり、この種の組み合わせによる食品中化学物質の複合影響検索の必要性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Suzuki, Y., Umemura, T., Hibi, D., Inoue, T., Jin, M., Ishii, Y., Sakai, H., Nohmi, T., Yanai, T., Nishikawa, A., Ogawa, K. Possible involvement of genotoxic mechanisms in estragole-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Arch. Toxicol.* 86, 1593-1601, 2012.

2) Suzuki, Y., Umemura, T., Ishii, Y., Hibi, D., Inoue, T., Jin, M., Ssakai, H., Kodama, Y., Nohmi, T., Yanai, T., Nishikawa, A., Ogawa, K. Possible involvement of sulfotransferase 1A1 in estragole-induced DNA modification and carcinogenesis in the livers of female mice. *Mutat. Res.* 749, 23-28, 2012.

3) Kuroda, K., Kijima, A., Ishii, Y., Takasu, S., Jin, M., Matsushita, K., Kodama, Y., Umemura, T. Flumequine enhances the in vivo mutagenicity of MeIQx in the mouse liver. *Arch. Toxicol.* (in press)

2. 学会発表

1) 石井雄二、木島綾希、高須伸二、松下幸平、黒田 顕、児玉幸夫、小川久美子、梅村隆志：
gpt delta マウスを用いた臭素酸カリウムの in vivo 変異原性の検索とニトリロ三酢酸併用投与の影響 第 29 回日本毒性病理学会 2013 年 1 月

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

該当なし。

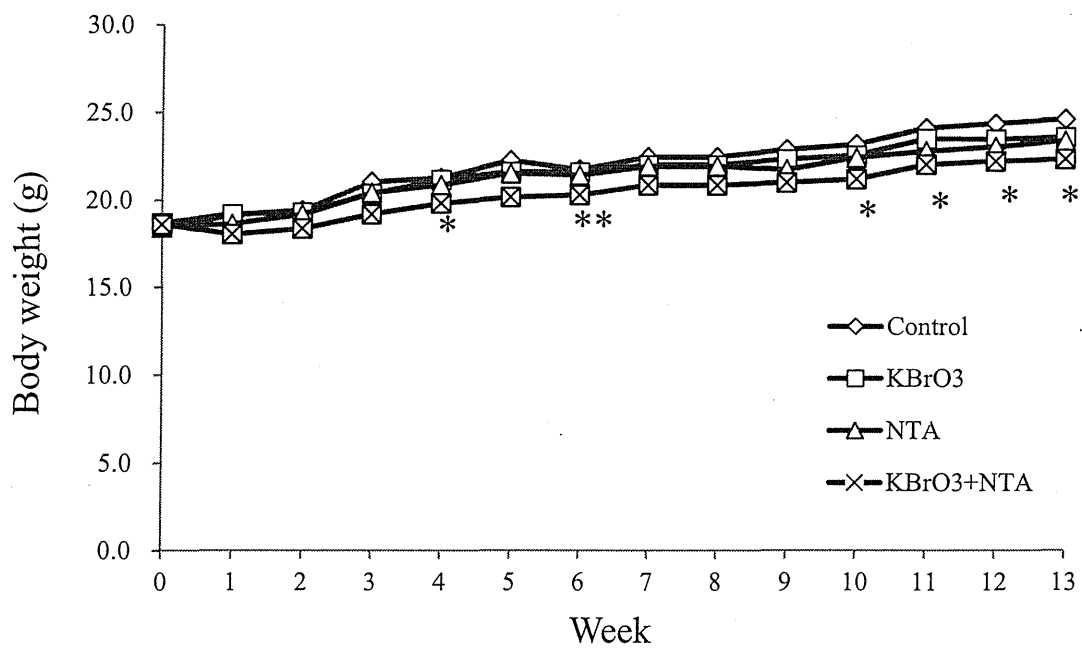


図1 体重の推移

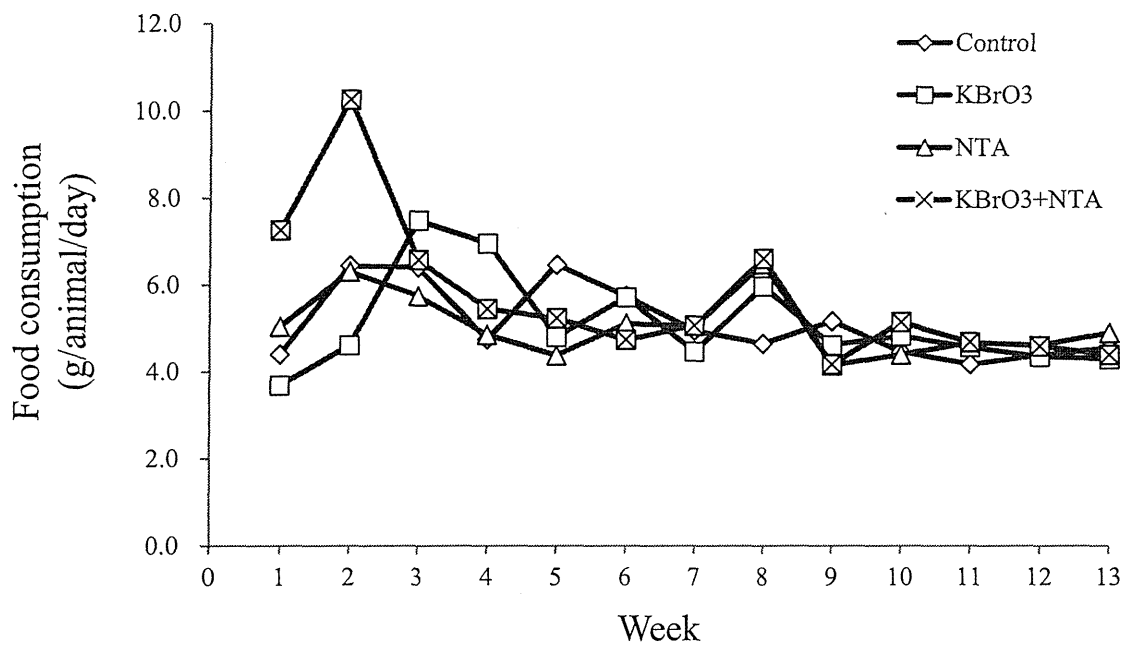


図2 摂餌量の推移

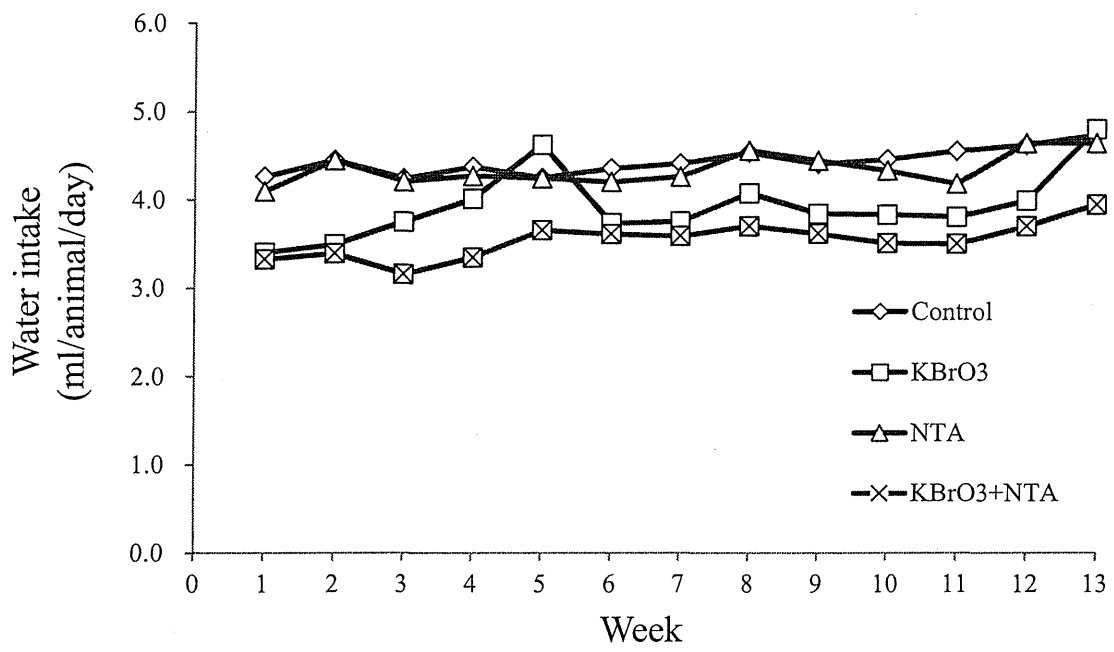


図3 飲水量の推移

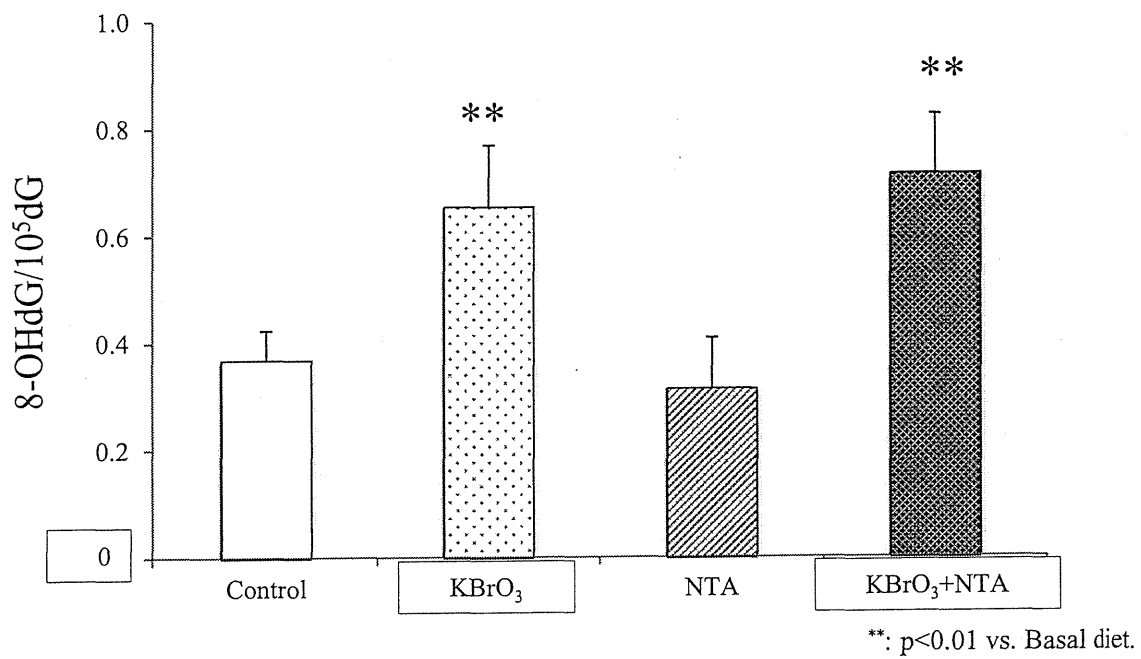


図4 腎DNA中8-OHdGレベル

表1 最終体重と腎重量

	Control	KBrO ₃	NTA	KBrO ₃ +NTA
No. of animals	10	10	10	10
Body weight (g)	24.6 ± 2.50	23.4 ± 2.10	23.1 ± 1.40	22.3 ± 1.10 ^{*,#}
Absolute kidneys weight (g)	0.29 ± 0.03	0.30 ± 0.03	0.31 ± 0.02	0.29 ± 0.02
Relative kidneys weight (g%)	1.17 ± 0.08	1.27 ± 0.05 [*]	1.36 ± 0.07 ^{**,##}	1.32 ± 0.08 ^{**,#}

*,**: p<0.05, 0.01 vs. Control group. #,##: P<0.05, 0.01 vs. KBr3 group.

表2 *gpt*遺伝子突然変異頻度

Treatment	Animal No.	Cm ^R colonies (x 10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± SD (After clonal correction)
Basal diet	6	9.2	2	0.22	0.26 ± 0.09
	7	21.7	6	0.28	
	8	9.7	4	0.41	
	9	43.4	8	0.18	
	10	31.5	7	0.22	
KBrO ₃	16	20.5	13	0.63	0.97 ± 0.42 *
	17	4.8	3	0.62	
	18	22.2	17	0.77	
	19	20.4	27	1.32	
	20	20.4	31	1.51	
NTA	26	11.4	6	0.52	0.35 ± 0.19
	27	13.6	8	0.59	
	28	17.1	5	0.29	
	29	14.6	3	0.21	
	30	18.9	3	0.16	
KBrO ₃ + NTA	36	5.1	11	2.14	1.50 ± 0.57 **
	37	17.9	17	0.95	
	38	13.0	22	1.70	
	39	20.8	25	1.20	
	40	14.5	11	0.76	

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

表3 *gpt*変異体の変異スペクトラム

	Control	KBrO ₃	NTA	KBrO ₃ + NTA
Base substitution				
Transversions				
GC-TA	0.01 ± 0.01	0.08 ± 0.07	0.06 ± 0.07	0.21 ± 0.13 ^{**}
GC-CG	0	0.02 ± 0.03	0.01 ± 0.02	0.01 ± 0.02
AT-TA	0.02 ± 0.05	0.07 ± 0.11	0.02 ± 0.04	0.09 ± 0.08
AT-CG	0.01 ± 0.02	0.01 ± 0.02	0	0.01 ± 0.03
Transition				
GC-AT	0.13 ± 0.04	0.17 ± 0.16	0.13 ± 0.05	0.30 ± 0.11
AT-GC	0.04 ± 0.05	0.01 ± 0.02	0.01 ± 0.03	0.02 ± 0.03
Deletion				
Single bp	0.04 ± 0.04	0.49 ± 0.11	0.10 ± 0.09	0.30 ± 0.21 [*]
Over 2bp	0.02 ± 0.02	0.09 ± 0.11	0	0.28 ± 0.22 [*]
Insertion	0	0.04 ± 0.05	0.01 ± 0.03	0.08 ± 0.09
Complex	0	0	0	0.05 ± 0.08

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

表4 *red/gam* 遺伝子突然変異頻度

Treatment	Animal No.	Cm ^R colonies (x 10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± SD
Basal diet	6	2.3	1	0.44	0.28 ± 0.17
	7	22.7	1	0.04	
	8	2.3	1	0.44	
	9	44.8	9	0.22	
	10	18.0	5	0.28	
KBrO ₃	16	30.0	20	0.67	0.88 ± 0.23 **
	17	7.1	9	1.27	
	18	12.8	11	0.86	
	19	12.2	10	0.82	
	20	25.5	20	0.79	
NTA	26	27.2	11	0.40	0.21 ± 0.14
	27	32.8	4	0.12	
	28	8.2	1	0.12	
	29	31.1	3	0.10	
	30	6.1	2	0.33	
KBrO ₃ + NTA	36	—	—	—	0.99 ± 0.46 **
	37	15.7	21	1.34	
	38	6.4	3	0.47	
	39	15.5	18	1.16	
	40	—	—	—	

** : p<0.01 vs. Basal diet.

表5 Spi-変異体の変異スペクトラム

		Control		KBrO ₃		NTA		KBrO ₃ +NTA	
1bp deletion									
Simple									
	Guanine	0.01	±0.02	0.10	±0.12		0	0.06	±0.09
	Adenine	0.01	±0.02	0.12	±0.05	0.01	±0.02	0.06	±0.07
In run									
	Guanine	0.01	±0.02	0.09	±0.10		0	0.15	±0.11
	Adenine	0.06	±0.08	0.22	±0.09	0.10	±0.06	0.21	±0.24
Large deletion		0.02	±0.03	0.15	±0.11	0.05	±0.08	0.23	±0.20*
Base substitution			0	0.10	±0.08		0	0.03	±0.04
Insertion		0.01	0.01	0.02	±0.02	0.01	±0.01		0

*: p<0.05 vs. Basal diet.

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

これまで、非遺伝毒性発がん物質フランにより誘発された GST-P 陽性巣内では、NRF2 経路が活性化しており、遺伝毒性発がん物質 DEN 誘発の GST-P 陽性巣内ではそのような変化は認められないことを報告してきた。そこで今回、外因性の NRF2 経路活性化が腫瘍性病変に及ぼす修飾作用を明らかにするために、食品中化学物質であり、NRF2 経路活性化作用を有するスルフォラファン (SFN) を用いて、フランおよび DEN 投与により誘発した GST-P 陽性細胞巣に対する NRF2 経路活性化の影響を検討した。結果、SFN はフラン誘発 GST-P 陽性細胞巣の進展に影響を与えなかったが、DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巣に対してはその数および面積を有意に増加させた。以上の結果から、SFN 投与による NRF2 経路の活性化は遺伝毒性発がん物質により誘導された変異細胞巣の進展に対して促進的に作用する可能性が示唆された。また、外因性の NRF2 経路の活性化に対する GST-P 陽性細胞巣の反応は GST-P 陽性細胞巣内における元々の NRF2 経路の活性化状態により異なる可能性が示唆された。

A. 研究目的

化学発がん過程には遺伝子変異を含む様々なイベントが多段階的に関与していると考えられている。本研究では、その発がん過程の中で異型形質獲得の初期段階と考えられる前がん病変に着目し、その時点での遺伝子やタンパクの発現異常を把握し、さらにそれらに対する化学物質の影響を検討して、発がん過程後期の化学物質の複合影響を明らかにすることを目的としている。

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非遺伝毒性肝発がん物質である。昨年度、我々は、フラン投与により誘導した GST-P 陽性細胞巣内において *Gstp1* および *Nqo1* の mRNA 発現が亢進していること、一方、遺伝毒性肝発がん物質である diethylnitrosamine (DEN) 投与により誘導した GST-P 陽性細胞巣内においては、*Nqo1* の mRNA 発現に顕著な差は見られなかったことを見出し、GST-P 陽性細胞巣において NRF2 経路の活性化状態

は発がん物質により異なっている可能性を明らかにした。

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 (GST) や NAD(P)H dehydrogenase quinone 1 (NQO1) などの異物代謝酵素や、glutathione synthetase や hemeoxygenase-1 (HO1) などの酸化ストレス防御蛋白をコードする遺伝子発現を誘導し、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。従って一般的に、NRF2 経路の活性化は発がん物質や酸化ストレスにより誘導される発がん過程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、ヒトがん組織やがん細胞株において NRF2 経路の恒常的活性化に寄与する遺伝子変異が近年報告され、NRF2 経路活性化の腫瘍組織内における役割については、現在、多くの注目を集めている。

本研究では、フランおよび DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巢内の NRF2 経路活性化状態の差異に着目し、外因性の NRF2 経路の活性化がそれぞれの化学物質の肝発がん過程後期に与える修飾作用を、NRF2 経路活性化物質であるスルフォラファン (SFN) を用いて検討した。実験 1 として、これまでに報告されていないラット肝臓における SFN 混餌投与時の NRF2 経路活性化作用を、既に報告されているマウスの投与濃度を参照に検討した。その後、実験 1 の結果を踏まえ、実験 2 としてフランおよび DEN 投与後における SFN 投与の GST-P 陽性細胞巢に与える影響を検討した。

B. 研究方法

実験 1

6 週齢の雄性 F344 ラット (日本 SLC) に SFN (Toronto Research Chemicals) を 300、600 および 1200 ppm の濃度で 2 週間混餌投与した。対照群には基礎食を投与した。投与終了後に肝臓から蛋白を抽出し、抗 NQO1 ポリクローナル抗体 (abcam) および抗 HO1 ポリクローナル抗体 (abcam) を用いたウェスタンブロット法にて、NRF2 標的遺伝子の蛋白発現を解析した。

実験 2

6 週齢の雄性 F344 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 (東京化成工業) を 10 ppm の濃度で 13 週間飲水投与した。

その後、1 週間の休薬期間を設けたのちに、SFN を 1200 ppm の濃度で 6 週間混餌投与した。対照群には基礎食を同様に投与した。SFN 投与終了後に肝臓を摘出し、抗 GST-P ポリクローナル抗体 (医学生物学研究所) を用いた免疫組織化学的染色を行い、GST-P 陽性細胞巢の定量的解析を行った。

(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。

C. 研究結果

実験 1

SFN 投与ラット肝臓における NQO1 および HO1 蛋白発現の結果を Fig. 1 に示す。SFN 投与ラット肝臓における NRF2 標的遺伝子の蛋白発現を検討した結果、1200 ppm の濃度で SFN を投与したラット肝臓において NQO1 および HO1 の蛋白発現の程度が対照群に比較して上昇した。

実験 2

GST-P 定量的解析の結果を Fig. 2 に示す。DEN 投与後に SFN を投与した群では、GST-P 陽性細胞巢の数および面積ともに対照群に比較して有意に増加した。一方、フラン投与後に SFN を投与した群の GST-P 陽性細胞巢の数および面積は対照群と比較して、有意な変化は認められなかった。

D. 考察

今回、フランおよび DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巢内の NRF2 経路活性化状態の差異に着目し、外因性の NRF2 経路活性化がそれぞれの発がん物質により誘導された GST-P 陽性細胞巢の進展にどのような影響を与えるかを検討した。実験 1 より、SFN は 1200 ppm の濃度でラットに混餌投与すると、肝臓において NQO1 や HO1 の蛋白発現を誘導したことから、本条件下において、SFN はラット肝臓においても NRF2 経路活性化作用を有することが明らかとなった。

DEN 投与後に SFN を投与した結果、GST-P 陽性細胞巢の数および面積は有意に上昇したことから、外因性の NRF2 経路活性化は DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巢の形成を促進することが明らかとなった。NRF2 は薬物代謝第二相酵素や抗酸化タンパク質などの発現

を誘導する転写因子であり、酸化ストレスや化学物質等に起因する細胞ストレスに対し防御的に作用し、細胞の恒常性維持に重要であると考えられている。実際、NRF2 経路活性化作用を有する oltipraz は、肝発がん物質である aflatoxin B1 投与と同時期にラットに投与することにより、GST の発現誘導を介した GST-P 陽性細胞巢の形成抑制作用を示すことが報告されている (Primiano, 1995)。しかしながら、肺がんをはじめとするヒトがん細胞などでは NRF2 経路が恒常的に活性化されていることが報告されており (Padmanabhan, 2006)、NRF2 経路は正常な細胞の恒常性維持に関わるのみならず、腫瘍組織内にて何らかの役割を演じている可能性が示唆されている。今回の研究では、DEN 投与により GST-P 陽性細胞巢を誘発させたのちに SFN を投与した。従って、本実験結果は、ラット肝臓における NRF2 経路の活性化が発がん物質により既に形成された GST-P 陽性細胞巢の進展に促進的に作用していることを示唆している。

一方、フラン投与後に SFN を投与したラット肝臓における GST-P 陽性細胞巢の数および面積は対照群と比較して有意な変化は認められなかったことから、NRF2 経路の活性化はフラン誘発 GST-P 陽性細胞巢の形成には影響を与えないと考えられた。フランはレポーター遺伝子導入動物である *gpt delta* ラットを用いた *in vivo* 変異原性の検討結果から、非遺伝毒性肝発がん物質であると考えられている。一方、DEN は遺伝毒性を有する肝発がん物質であることから、NRF2 経路の活性化は遺伝毒性発がん物質により誘導された GST-P 陽性細胞巢の形成には促進的に作用するが、非遺伝毒性肝発

がん物質により誘導された GST-P 陽性細胞巢には影響を与えない可能性が示唆され、NRF2 経路の活性化が肝発がん性に与える影響は発がん物質の発がん機序により異なると考えられた。しかし、F344 ラットに DEN と同様に遺伝毒性肝発がん物質である aflatoxin B1 を投与した 1 週間後から oltipraz を投与した結果、GST-P 陽性細胞巢の形成には影響を与えなかったとの報告もあることから (Maxuitenko, 1993)、NRF2 経路の発がん修飾作用は発がん物質の種類や発がんステージによっても異なる可能性が考えられた。

昨年度の研究において、我々はフラン投与により発生した GST-P 陽性細胞内では NRF2 経路は活性化しているが、DEN 投与により発生した GST-P 陽性細胞巢内においては、NRF2 経路は活性化されていないことを報告した。この結果から、フラン誘発 GST-P 陽性細胞の形成は NRF2 経路依存的であり、DEN 誘発 GST-P 陽性細胞の形成は NRF2 経路非依存的である可能性が考えられた。しかし、今回の研究より外因性の NRF2 の活性化は、NRF2 経路が活性化されていない DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巢内に対して促進作用を示し、外因性の NRF2 経路の活性化に対する GST-P 陽性細胞巢の反応は、GST-P 陽性細胞内の NRF2 経路の活性化状態により異なる可能性が考えられた。

本研究結果より、SFN は遺伝毒性発がん物質により誘導された変異細胞巢の進展に対して促進的に作用する可能性が示唆され、食品中に含まれる発がん物質の種類や発がん機序、発がんのステージによっては、SFN など NRF2 経路活性化物質と発がん物質と

の複合的な発がん促進作用が発現する可能性が考えられた。今後、SFN の NRF2 経路活性化を介した発がん促進機序の精査が必要であると考えられるが、本研究は食品中発がん物質と NRF2 活性化物質との複合影響に関して基礎的なデータを供与できるものとする。

E. 結論

NRF2 活性化状態の異なるフランおよび DEN 誘発肝前がん病変の進展に対する SFN の影響を検討したところ、SFN は DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巢の形成を促進したことから、SFN は遺伝毒性発がん物質により誘導された変異細胞巢の進展に対して促進的に作用する可能性が示唆された。また、外因性の NRF2 経路の活性化に対する GST-P 陽性細胞巢の反応は、GST-P 陽性細胞内の NRF2 経路の活性化状態により異なる可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

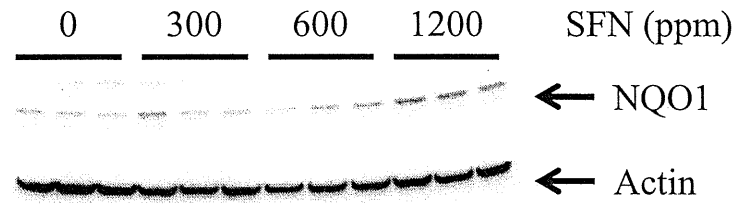
2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

NQO1



HO1

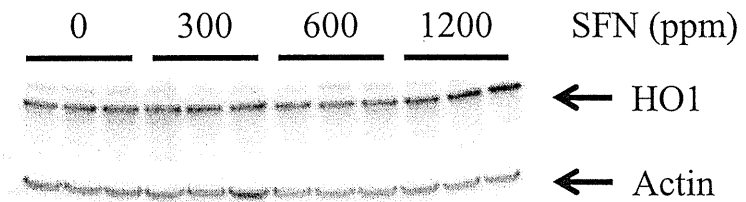
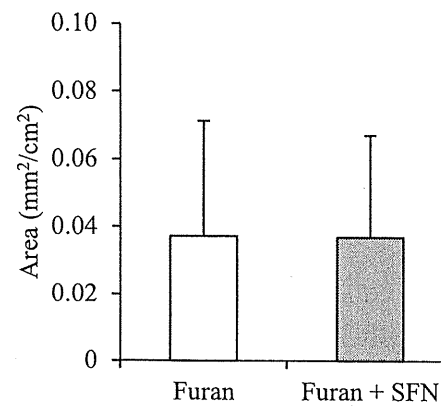
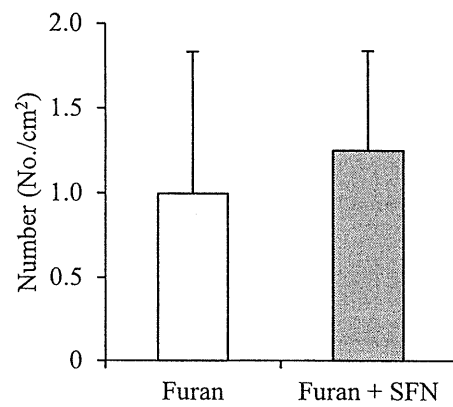
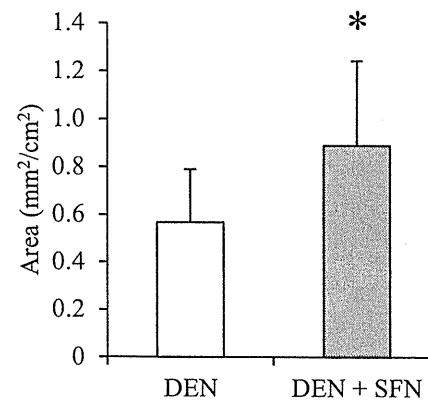
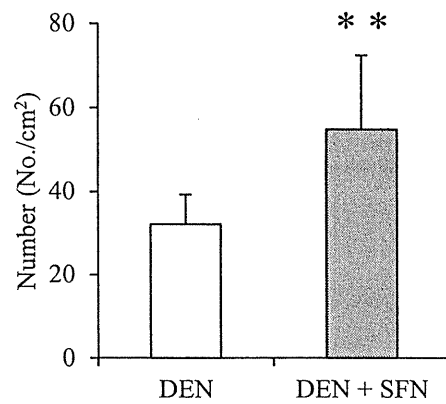


Fig. 1

フラン



DEN



*, **: $p < 0.05, 0.01$ vs. DEN group,

Fig. 2

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 24 年度分担研究報告書

「食品中の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

有機リン剤と類似化合物の複合暴露による急性毒性発現に対する解毒方法の検討

研究分担者	原田孝則	一般財団法人残留農薬研究所	毒性部
研究協力者	首藤康文	一般財団法人残留農薬研究所	毒性部神経毒性研究室
	元村淳子	一般財団法人残留農薬研究所	毒性部神経毒性研究室
	藤江秀彰	一般財団法人残留農薬研究所	毒性部神経毒性研究室
	林宏一	一般財団法人残留農薬研究所	毒性部神経毒性研究室
	小松豊	一般財団法人残留農薬研究所	毒性部神経毒性研究室

研究要旨

農薬は複数の有効成分を混合した製剤として使用あるいは単剤を現地で複数混合して適用する場合が多々あるが、混合剤の毒作用の強度は混合する農薬の組合せによって左右されることがこれまでの研究で明らかにされた。この結果から、一般に使用される解毒剤が混合剤の毒性に対しても有効か否かを確認することは、食品の安心・安全を担保する上で重要であると考えられる。本研究では、神経系を標的とした有機リン剤（メタミドホス、パラチオン）及び類似化合物（カーバメート剤のキシリルカルブ、ニコチン製剤の 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、その直後に生理食塩水に懸濁した活性炭の経口投与、硫酸アトロピンの皮下注射、PAM の皮下注射及びバルビタールの経口投与を行い、類似の作用機序を持つ農薬群の複合暴露影響（急性毒性）に対する、代表的な解毒剤の効果を確認した。

その結果、農薬の経口暴露後早期であれば、剤の種類及び単剤、混合剤に係わらず活性炭による吸着除去の解毒効果が高いことが確認された。アトロピンはニコチン製剤の単独暴露では禁忌だが、ニコチン製剤と有機リン剤及びカーバメート剤との混合暴露時には有効であった。PAM は有機リン剤の特効的解毒剤であり、有機リンを含む混合剤の中毒に対しては一定の効果が期待できることが確認された。一方、バルビタールはメタミドホスには有効だが、他のほとんどの組合せで不適であり、複合暴露による痙攣あるいは振戦に対して使用する場合には、慎重を期す必要があることが示唆された。

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 24 年度では、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 4 剤を組合せて、ラットに半数致死が予想される用量を単回強制経口投与した後に代表的な解毒剤である活性炭、硫酸アトロピン、プラリドキシムヨウ化メチル及びバルピタールを投与して、複合暴露中毒時の応急処置に役立つための解毒方法を検討した。

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. 解毒剤

以下の解毒剤を使用した。解毒剤の選択及び用量については「農薬中毒の症状と治療法」¹⁾及び「Clinical Toxicology」²⁾を参考にした。

粉末活性炭 (和光純薬工業株式会社)

投与用量；1 g/kg

投与容量；20 mL/kg

投与経路；経口投与

媒体；生理食塩水

アトロピン硫酸塩 (田辺三菱製薬株式会社、

調製済み医薬品 濃度 0.5 mg/1 mL)

投与用量 ; 0.1 mg/kg

投与容量 ; 0.2 mL/kg

投与経路 ; 皮下注射

プラリドキシムヨウ化物 (PAM) (大日本住友製薬株式会社、調製済み医薬品 濃度 500 mg/20 mL)

投与用量 ; 50 mg/kg

投与容量 ; 2 mL/kg

投与経路 ; 皮下注射

フェノバルビタール「ホエイ」(バルビタール) (マイライン製薬株式会社)

投与用量 ; 50 mg/kg

投与容量 ; 20 mL/kg

投与経路 ; 経口投与

媒体 ; 生理食塩水

4. 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/実験群で被験物質混合液及び解毒剤を投与した。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、当該実験は一般財団法人残留農薬

研究所動物実験規程に基づいて実施した (動物実験委員会承認番号 ; AC12005)。

5. 試験群及び使用動物数

単剤及び 3 剤あるいは 4 剤を混合した際の解毒方法の有効性を調べた。混合剤には、平成 24 年度の実験結果から得られた LD50 値相当の mixture を投与した。

実験群、被験物質投与用量及び使用動物数は以下の通り。

被験物質 ; メタミドホス単剤 (略号 ; M)

投与用量 10.2 mg/kg

解毒処置	動物数
対照群 (処置なし)	5
活性炭投与群	5
アトロピン投与群	5
PAM 投与群	5
バルビタール投与群	5

被験物質 ; パラチオン (略号 ; P)

投与用量 1.1 mg/kg

解毒処置	動物数
対照群 (処置なし)	5
活性炭投与群	5
アトロピン投与群	5
PAM 投与群	5
バルビタール投与群	5

キシリルカルブ (略号 ; X)

投与用量 101 mg/kg

解毒処置	動物数
対照群 (処置なし)	5
活性炭投与群	5
アトロピン投与群	5
PAM 投与群	5
バルビタール投与群	5

50%硫酸ニコチン水溶液(略号 ; N)

投与用量 107 mg/kg

解毒処置	動物数
対照群 (処置なし)	5
活性炭投与群	5
アトロピン投与群	5
PAM 投与群	5
バルビタール投与群	5

メタミドホス、パラチオン、キシリルカルブ混合剤(略号 ; MPX)

投与用量 58 mg/kg (M5.3 + P0.57 + X52)

解毒処置	動物数
対照群 (処置なし)	5
活性炭投与群	5
アトロピン投与群	5
PAM 投与群	5
バルビタール投与群	5

メタミドホス、パラチオン、50%硫酸ニコチン水溶液混合剤(略号 ; MPN)

投与用量 44 mg/kg (M3.8 + P0.41 + N40)

解毒処置	動物数
対照群 (処置なし)	5
活性炭投与群	5
アトロピン投与群	5
PAM 投与群	5
バルビタール投与群	5

メタミドホス、キシリルカルブ、50%硫酸ニコチン水溶液混合剤(略号 ; MXN)

投与用量 70 mg/kg (M3.3 + X32 + N34)

解毒処置	動物数
対照群 (処置なし)	5
活性炭投与群	5
アトロピン投与群	5
PAM 投与群	5
バルビタール投与群	5

パラチオン、キシリルカルブ、50%硫酸ニコチン水溶液混合剤(略号 ; PXN)

混合剤投与用量 62 mg/kg (P0.33 + X30 + N32)

解毒処置	動物数
対照群 (処置なし)	5
活性炭投与群	5
アトロピン投与群	5
PAM 投与群	5
バルビタール投与群	5

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混合剤(略号 ; MPXN)

投与用量 67 mg/kg (M3.1 + P0.34 + X31 + N33)

解毒処置	動物数
対照群 (処置なし)	5
活性炭投与群	5
アトロピン投与群	5
PAM 投与群	5
バルビタール投与群	5

6. 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、投与後 1 日及び投与後 7 日の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、ペントバルビタール深麻酔下 (64.8 mg/kg, 腹腔内投与) で放血して安楽殺した。