

Table 2 - 5 Body weight - Individual values in female rats
58 mg/kg (M 5.3mg/kg + P 0.57mg/kg + X 52mg/kg) (g)

Dose (mg/kg)	Animal number	Before administration	Days after administration	
			1	7
Without antidotal treatment	501	150	153	175
	502	155	150	192
	503	144	148	174
	504	144	147	175
	505	150	151	181
	Mean	149	150	179
S.D.	5	2	8	
Activated charcoal	506	152	164	192
	507	148	163	185
	508	149	162	180
	509	153	169	194
	510	147	162	189
	Mean	150	164	188
S.D.	3	3	6	
Atropine	511	159	166	194
	512	149	162	186
	513	153	160	189
	514	147	153	185
	515	161	166	188
	Mean	154	161	188
S.D.	6	5	4	
PAN	516	147	158	184
	517	154	164	196
	518	146	153	175
	519	147	156	185
	520	143	149	175
	Mean	147	156	183
S.D.	4	6	9	
Barbital	521	149	159	179
	522	151	164	183
	523	151	155	177
	524	151	159	178
	525	146	(148)	
	Mean	150	159	179
S.D.	2	4	3	

S.D.: Standard deviation.

(): Body weight at death, which was eliminated from the calculation for the mean value.

Table 2 - 6 Body weight - Individual values in female rats

44 mg/kg (M 3.8 mg/kg +P 0.41 mg/kg +N 40 mg/kg)

(g)

Dose (mg/kg)	Animal number	Before administration	Days after administration	
			1	7
Without antidotal treatment	601	156	160	186
	602	151	160	187
	603	155	142	178
	604	148	146	181
	605	145	142	180
	Mean	151	150	182
S.D.	5	9	4	
Activated charcoal	606	148	156	184
	607	154	158	189
	608	147	161	176
	609	148	157	175
	610	143	152	172
	Mean	148	157	179
S.D.	4	3	7	
Atropine	611	147	150	168
	612	155	158	196
	613	152	157	177
	614	154	149	187
	615	171	174	208
	Mean	156	158	187
S.D.	9	10	16	
PAM	616	152	154	181
	617	149	153	179
	618	145	152	183
	619	151	155	182
	620	150	149	181
	Mean	149	153	181
S.D.	3	2	1	
Barbital	621	153	164	190
	622	150	152	184
	623	157	171	191
	624	163	(141)	
	625	152	162	190
	Mean	155	162	189
S.D.	5	8	3	

S.D.: Standard deviation.

(): Body weight at death, which was eliminated from the calculation for the mean value.

Table 2 - 7 Body weight - Individual values in female rats
70 mg/kg (M 3.3 mg/kg + X 32 mg/kg + N 34 mg/kg) (g)

Dose (mg/kg)	Animal number	Before administration	Days after administration	
			1	7
Without antidotal treatment	701	154	(156)	
	702	143	150	170
	703	155	166	187
	704	144	154	182
	705	150	156	179
	Mean	149	157	180
S.D.	6	7	7	
Activated charcoal	706	150	163	183
	707	148	156	175
	708	153	161	187
	709	142	150	178
	710	139	146	168
	Mean	146	155	178
S.D.	6	7	7	
Atropine	711	140	150	171
	712	158	166	193
	713	147	160	184
	714	137	152	163
	715	150	151	183
	Mean	146	156	179
S.D.	8	7	12	
PAN	716	143	(145)	
	717	139	149	170
	718	140	151	180
	719	143	153	178
	720	137	(139)	
	Mean	149	151	176
S.D.	3	2	5	
Barbital	721	154	168	182
	722	153	164	195
	723	150	165	182
	724	140	153	171
	725	147	165	182
	Mean	149	163	182
S.D.	6	6	9	

S.D.: Standard deviation.

(): Body weight at death, which was eliminated from the calculation for the mean value.

Table 2 - 8 Body weight - Individual values in female rats
62 mg/kg (P 0.33 mg/kg + X 30 mg/kg + N 32 mg/kg) (g)

Dose (mg/kg)	Animal number	Before administration	Days after administration	
			1	7
Without antidotal treatment	801	143	165	178
	802	149	(152)	
	803	156	141	192
	804	146	(148)	
	805	157	169	197
	Mean	150	158	189
S.D.	6	15	10	
Activated charcoal	806	147	154	170
	807	144	158	180
	808	141	154	177
	809	159	171	196
	810	142	153	175
	Mean	147	158	180
S.D.	7	8	10	
Atropine	811	150	167	184
	812	154	165	200
	813	144	155	177
	814	144	154	176
	815	151	161	185
	Mean	149	160	184
S.D.	4	6	10	
PAN	816	154	164	189
	817	140	(141)	
	818	153	168	193
	819	146	157	179
	820	154	168	182
	Mean	149	164	186
S.D.	6	5	6	
Barbital	821	147	(151)	
	822	146	(150)	
	823	153	166	186
	824	142	152	175
	825	143	155	179
	Mean	146	158	180
S.D.	6	7	6	

S.D.: Standard deviation.

(): Body weight at death, which was eliminated from the calculation for the mean value.

Table 2 - 9 Body weight - Individual values in female rats
67 mg/kg (M 3.1 mg/kg + P 0.34mg/kg + X 31mg/kg + N 33 mg/kg) (g)

Dose (mg/kg)	Animal number	Before administration	Days after administration	
			1	7
Without antidotal treatment	901	152	(156)	
	902	151	152	176
	903	145	(149)	
	904	159	168	203
	905	151	159	185
	Mean	152	160	188
S.D.	5	8	8	
Activated charcoal	906	141	153	172
	907	148	155	179
	908	150	157	182
	909	151	158	184
	910	153	154	182
	Mean	149	155	180
S.D.	5	2	5	
Atropine	911	139	149	173
	912	144	148	174
	913	154	157	184
	914	147	(151)	
	915	154	165	186
	Mean	148	155	179
S.D.	7	8	7	
PAM	916	160	169	201
	917	157	166	194
	918	138	141	168
	919	145	(147)	
	920	148	162	189
	Mean	150	160	188
S.D.	9	13	14	
Barbital	921	165	178	196
	922	143	(146)	
	923	153	161	184
	924	154	(158)	
	925	143	154	171
	Mean	152	164	184
S.D.	9	12	13	

S.D.: Standard deviation.

(): Body weight at death, which was eliminated from the calculation for the mean value.

Table 3 - 1 Body weight gains - Individual values in female rats

Antidotal treatment	Animal number	Days after administration	
		0-1	1-7
M 10.2 mg/kg (g)			
Without antidotal treatment	101	-	
	102	-9	22
	103	1	19
	104	-	
	105	-	
	Mean	-4	21
	S.D.	7	2
Activated charcoal	106	-6	31
	107	-12	32
	108	-3	33
	109	-4	26
	110	6	20
	Mean	-4	28
	S.D.	6	5
Atropine	111	-4	19
	112	5	19
	113	6	29
	114	1	30
	115	4	25
	Mean	2	24
	S.D.	4	5
PAM	116	8	22
	117	10	26
	118	10	32
	119	9	29
	120	7	21
	Mean	9	26
	S.D.	1	5
Barbital	121	5	19
	122	9	24
	123	8	15
	124	0	23
	125	5	31
	Mean	5	22
	S.D.	4	6

S.D.: Standard deviation.

Table 3 - 2 Body weight gains - Individual values in female rats

P 1.1mg/kg		(g)	
Antidotal treatment	Animal number	Days after administration	
		0-1	1-7
Without antidotal treatment	201	4	12
	202	11	11
	203	15	17
	204	12	13
	205	-7	34
	Mean	7	17
	S.D.	9	10
Activated charcoal	206	16	22
	207	13	24
	208	14	16
	209	16	15
	210	16	19
	Mean	15	19
	S.D.	1	4
Atropine	211	16	17
	212	17	19
	213	16	15
	214	11	23
	215	18	26
	Mean	16	20
	S.D.	3	4
PAM	216	7	26
	217	16	19
	218	13	34
	219	14	29
	220	13	9
	Mean	13	23
	S.D.	3	10
Barbital	221	8	29
	222	8	24
	223	9	18
	224	-	
	225	-	
	Mean	8	24
	S.D.	1	6

S.D.: Standard deviation.

Table 3 - 3 Body weight gains - Individual values in female rats

X 101 mg/kg

(g)

Antidotal treatment	Animal number	Days after administration	
		0-1	1-7
Without antidotal treatment	301	-	
	302	-	
	303	-	
	304	13	26
	305	8	32
	Mean	11	29
	S.D.	4	4
Activated charcoal	306	17	18
	307	19	26
	308	18	13
	309	14	20
	310	14	15
	Mean	16	18
	S.D.	2	5
Atropine	311	5	31
	312	7	19
	313	5	26
	314	-	
	315	8	20
	Mean	6	24
	S.D.	2	6
PAN	316	11	20
	317	7	23
	318	4	27
	319	14	19
	320	-	
	Mean	9	22
	S.D.	4	4
Barbital	321	-	
	322	-	
	323	-	
	324	-	
	325	1	26
	Mean	1	26
	S.D.		

S.D.: Standard deviation.

Table 3 - 4 Body weight gains - Individual values in female rats

N 107 mg/kg		(g)	
Dose (mg/kg)	Animal number	Days after administration	
		0-1	1-7
Without antidotal treatment	401	3	14
	402	3	20
	403	-7	27
	404	2	23
	405	-2	42
	Mean	0	25
	S.D.	4	11
Activated charcoal	406	5	23
	407	8	21
	408	-2	31
	409	2	25
	410	8	24
	Mean	4	25
	S.D.	4	4
Atropine	411	-	
	412	-3	19
	413	-	
	414	5	23
	415	-1	22
	Mean	0	21
	S.D.	4	2
PAM	416	-6	27
	417	4	29
	418	-1	26
	419	-3	20
	420	-1	23
	Mean	-1	25
	S.D.	4	4
Barbital	421	-4	23
	422	-	
	423	0	26
	424	-	
	425	-	
	Mean	-2	25
	S.D.	3	2

S.D.: Standard deviation.

Table 3 - 5 Body weight gains - Individual values in female rats
58 mg/kg (M 5.3mg/kg + P 0.57mg/kg + X 52mg/kg) (g)

Dose (mg/kg)	Animal number	Days after administration	
		0-1	1-7
Without antidotal treatment	501	3	22
	502	-5	42
	503	4	26
	504	3	28
	505	1	30
	Mean	1	30
	S.D.	4	8
Activated charcoal	506	12	28
	507	15	22
	508	13	18
	509	16	25
	510	15	27
	Mean	14	24
	S.D.	2	4
Atropine	511	7	28
	512	13	24
	513	7	29
	514	6	32
	515	5	22
	Mean	8	27
	S.D.	3	4
PAN	516	11	26
	517	10	32
	518	7	22
	519	9	29
	520	6	26
	Mean	9	27
	S.D.	2	4
Barbital	421	10	20
	422	13	19
	423	4	22
	424	8	19
	425	-	
	Mean	9	20
	S.D.	5	2

S.D.: Standard deviation.

Table 3 - 6 Body weight gains - Individual values in female rats
 44 mg/kg (M 3.8 mg/kg +P 0.41 mg/kg +N 40 mg/kg) (g)

Dose (mg/kg)	Animal number	Days after administration	
		0-1	1-7
Without antidotal treatment	601	4	26
	602	9	27
	603	-13	36
	604	-2	35
	605	-3	38
	Mean	-1	32
	S.D.	8	6
Activated charcoal	606	8	28
	607	4	31
	608	14	15
	609	9	18
	610	9	20
	Mean	9	22
	S.D.	4	7
Atropine	611	3	18
	612	3	38
	613	5	20
	614	-5	38
	615	3	34
	Mean	2	30
	S.D.	4	10
PAM	616	2	27
	617	4	26
	618	7	31
	619	4	27
	620	-1	32
	Mean	3	29
	S.D.	3	3
Barbital	621	11	26
	622	2	32
	623	14	20
	624	-	
	625	10	28
	Mean	9	27
	S.D.	5	5

S.D.: Standard deviation.

Table 3 - 7 Body weight gains - Individual values in female rats
70 mg/kg (M 3.3 mg/kg + X 32 mg/kg + N 34 mg/kg) (g)

Dose (mg/kg)	Animal number	Days after administration	
		0-1	1-7
Without antidotal treatment	501	-	
	502	7	20
	503	11	21
	504	10	28
	505	6	23
	Mean	9	23
	S.D.	2	4
Activated charcoal	506	13	20
	507	8	19
	508	8	26
	509	8	28
	510	7	22
	Mean	9	23
	S.D.	2	4
Atropine	511	10	21
	512	8	27
	513	13	24
	514	15	11
	515	1	32
	Mean	9	23
	S.D.	5	8
PAN	516	-	
	517	10	21
	518	11	29
	519	10	25
	520	-	
	Mean	10	25
	S.D.	1	4
Barbital	421	14	14
	422	11	31
	423	15	17
	424	13	18
	425	18	17
	Mean	14	19
	S.D.	3	7

S.D.: Standard deviation.

Table 3 - 8 Body weight gains - Individual values in female rats

62 mg/kg (P 0.33 mg/kg + X 30 mg/kg + N 32 mg/kg)

(g)

Dose (mg/kg)	Animal number	Days after administration	
		0-1	1-7
Without antidotal treatment	801	22	13
	802	-	
	803	-15	51
	804	-	
	805	12	28
	Mean	6	31
	S.D.	19	19
Activated charcoal	806	7	16
	807	14	22
	808	13	23
	809	12	25
	810	11	22
	Mean	11	22
	S.D.	3	3
Atropine	811	17	17
	812	11	35
	813	11	22
	814	10	22
	815	10	24
	Mean	12	24
	S.D.	3	7
PAN	816	10	25
	817	-	
	818	15	25
	819	11	22
	820	14	14
	Mean	13	22
	S.D.	2	5
Barbital	821	-	
	822	-	
	823	13	20
	824	10	23
	825	12	24
	Mean	12	22
	S.D.	2	2

S.D.: Standard deviation.

Table 3 - 9 Body weight gains - Individual values in female rats
67 mg/kg (M 3.1 mg/kg + P 0.34mg/kg + X 31mg/kg + N 33 mg/kg) (g)

Dose (mg/kg)	Animal number	Days after administration	
		0-1	1-7
Without antidotal treatment	901	-	
	902	1	24
	903	-	
	904	9	35
	905	8	26
	Mean	6	28
	S.D.	4	6
Activated charcoal	906	12	19
	907	7	24
	908	7	25
	909	7	26
	910	1	28
	Mean	7	24
	S.D.	4	3
Atropine	911	10	24
	912	4	26
	913	3	27
	914	-	
	915	11	21
	Mean	7	25
	S.D.	4	3
PAM	916	9	32
	917	9	28
	918	3	27
	919	-	
	920	14	27
	Mean	9	29
	S.D.	5	2
Barbital	921	13	18
	922	-	
	923	8	23
	924	-	
	925	11	17
	Mean	11	19
	S.D.	3	3

S.D.: Standard deviation.

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」

2. 発達神経毒性に関する研究

妊娠あるいは非妊娠成熟雌性ラットに対するメタミドホスとパラチオンの複合暴露影響

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
研究分担者	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
	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
	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
	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
	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
	大塚亮一	一般財団法人残留農薬研究所	毒性部分子毒性研究室
	山口 悟	一般財団法人残留農薬研究所	毒性部分子毒性研究室
	小嶋五百合	一般財団法人残留農薬研究所	毒性部病理研究室
	相馬克美	一般財団法人残留農薬研究所	毒性部病理研究室
	高橋尚文	一般財団法人残留農薬研究所	毒性部病理研究室
	吉田敏則	一般財団法人残留農薬研究所	毒性部病理研究室

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、メタミドホスとパラチオンの 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た平成 23 年度の実験では、妊娠母動物において非妊娠成熟雌ラットでは顕著な変化がみられなかった用量でも死亡及び重篤な神経症状発現が認められた。このことを考慮して、平成 24 年度では、さらに非妊娠成熟ラットと妊娠ラットにおける複合暴露による毒性発現の違いについて検討を加えた。また、平成 23 年度に採取した児動物の脳組織を対象に定性的及び定量的病理組織学的検索を実施した。

その結果、妊娠ラットでは非妊娠成熟ラット に比べ重篤な神経症状が観察され、死亡動物や体重増加抑制も認められた。また、血清及び脳の ChE 活性が有意に低下した。さらに、有機リン酸塩を加水分解する Paraoxonase1 (PON1) 活性が妊娠 14 日 (GD14) で低下し、GD21 では有意な低下を示したことから、PON1 活性の低下が神経毒性を増強した可能性が示唆された。平成 23 年度の実験において哺育 22 日 (PND22) 及び PND60-70 に採取した児動物の脳の病理組織学的検査では、通常定性的形態観察では変化は認められなかったが、定量的計測病理解析（肉眼的・組織学的形態計測）の結果、PND22 の雄の児動物において小脳虫部長軸長及び小脳の高さが有意に低下し、小脳分子

層の菲薄化が観察された。

これらの結果から、妊娠期間中の PON1 活性の低下が、母動物に対するパラチオン及びメタミドホスの複合反復経口投与による毒性発現を増強し、また、有機リン系農薬の投与による母動物の生理学的あるいは行動学的変化が、児動物の発達に影響を及ぼす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母動物及び成熟期の雌ラットに対し複合投与し、異なる時期の暴露が毒性発現に影響を及ぼすかを調査した。

平成 24 年度では、2 種類の有機リン剤（パラチオン及びメタミドホス）を複合的に母動物には妊娠 6 日目から哺育 3 日まで、非妊娠成熟雌ラットには 14 日間反復経口投与をし、異なる状況下（妊娠、非妊娠）での暴露が毒性発現にどのような影響を及ぼすかを再検討した。また、平成 23 年度の実験において採取した児動物の脳組織について定性的及び定量的病理組織学的検索を実施した。

B. 研究方法

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、母動物に対

しは妊娠 6 日目から哺育 3 日まで、非妊娠成熟雌ラットに対して 14 日間反復経口投与した。尚、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。

また、平成 23 年度の実験で複合暴露を受けた母親から生まれた児動物の脳を対象に、通常の病理組織学的検索（定性解析）及び形態計測（定量解析）を実施した。

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°C）で、メタミドホスは冷凍庫（-20°C）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 25 匹、雌を 54 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、雌のスミアを採取した。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 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、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。

妊娠 0 日 (GD0) に体重を測定し、順番に各試験群に 6 匹ずつ配分し、動物は個別に収容した。尚、6 匹の成熟雌ラットは 3 匹ずつ収容し、馴化後 2 週目より投与を開始した。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動物実験規程に従い実施した (動物実験委員会承認番号; AC12011)。

3. 試験群

平成 23 年度に実施したパラチオンおよびメタミドホス複合反復経口投与発達毒性試験²⁾の結果から、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示す用量であるパラチオン 0.6 mg/kg、メタミドホス 0.8 mg/kg を複合投与した。但し、本用量は非妊娠成熟雌ラットでは死亡あるいは重篤な神経症状を示さない用量である。³⁾また、対照群として溶媒対照群 (0 mg/kg/day) を設けた。さらに母動物に対する投与そのものが影響を与えるのではないかと考え、未処置群を設置した。よって母動物は 3 群、非妊娠成熟雌ラットでは複合投与群のみで実験を行った。

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 0.30 mg/mL (用量 0.6 mg/kg) に調製し、メタミドホスは 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°C) 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、妊娠 6 日 (GD6) から哺育 3 日 (PND3:離乳日) までとした。尚、非妊娠成熟雌ラットの投与期間は 14 日間とし、投与開始は妊娠ラットの投与開始時週齢に合わせた。この投与期間は妊娠 6 日から妊娠 21 日 (ラットの妊娠期間は 21 日間) の日数に相当する。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. 母動物及び成熟雌動物の観察

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。また無処置の母動物を除く全ての投与群に対し、投与期間中は少なくとも 2 回 (投与前後) に攣縮、振戦及び流涎を観察した。

5.2. 母動物及び非妊娠成熟雌動物の体重

妊娠期間中は GD0、GD6、GD9、GD13、GD16、GD19、GD20 に、哺育期間中は

PND0 (出産日) 及び PND4 に、母動物の体重を測定した。尚、非妊娠成熟雌ラットは投与開始時 (0 日)、投与 7 日、投与 14 日及び最終解剖日に測定した。

5.3. 母動物及び非妊娠成熟雌動物の血圧測定

母動物は GD6、GD13、GD20 及び PND3 に、非妊娠成熟雌ラットでは投与 0 日、投与 7 日及び投与 14 日に血圧を測定した。

5.4. 剖検及び組織採取

母動物は GD14 および GD21、PND4 にイソフルラン吸入麻酔下で開腹し、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 (セパラビット S; 積水化工業) に移し、遠心分離し (2000g×4°C×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、児動物はイソフルラン吸入麻酔下で後大静脈及び腹大動脈を切断し、安楽殺を行った。

5.5. 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 (左) 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。

5.6. Paraoxonase 1 測定

各剖検日において採取した血清を用いて、

有機リン酸塩を加水分解する酵素として知られる Paraoxonase 1 (PON1) を測定した。測定には、測定にはパラオキシナーゼ (PON-1: Arylesterase 活性) 測定キット (日研ザイル株式会社) を用いた。

5.7. 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、身体発育の指標検査の一つである、耳介展開を PND3 に測定した。

5.8. 児動物の体重

出生時 (PND0) 及び PND4 に産腹ごとの総体重を雌雄別に測定した。

5.9. 病理組織学的検索

平成 23 年度の実験で採取した、雌雄の児動物の脳を対象に定性的及び定量的病理組織学的検索を行った。溶媒対照群、P0.3+M0.4 mg/kg および P0.6+M0.8 mg/kg 投与群の母動物より産出した児動物の脳を PND22 及び PND60-70 に採取した。PND22 の脳は 10%中性緩衝ホルマリンに浸漬固定し、PND60-70 の脳はペントバルビタール (64.8 mg/kg) 全身麻酔後、0.1%リン酸緩衝 1%グルタルアルデヒド・2%パラフォルムアルデヒド灌流固定液で全身灌流固定後、脳を採取し、10%中性緩衝ホルマリンに浸漬固定した。固定後、肉眼的形態計測を IPAP-WIN 画像解析ソフト (住化テクノサービス) を用いて実施した。続いて、特定の部位を切り出しし、パラフィン包埋切片を作製後、ヘマトキシレン・エオジン (H.E) 染色で組織学的検索 (定性解析) を行った。さらに、組織学的形態計測

(定量解析)としてクリューバー・バレラ染色を施し、画像解析ソフトを用いて測定を実施した。

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、または P0.6+M0.8 mg/kg 投与の非妊娠成熟雌動物と母動物、対照群と未処置妊娠ラット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、Student's *t*-test を実施して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。病理組織学的検索における形態計測では、Dunnet 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、必要に応じて Student's *t*-test あるいは Aspin-Welch test を実施した。

C. 研究結果

1. 母動物及び非妊娠成熟雌動物

1.1. 死亡動物数

P0.6+M0.8 mg/kg 投与の母動物では 4 例、非妊娠成熟雌動物では 1 例の死亡が認められた。

1.2. 一般状態 (表 1A-3D)

試験期間中、溶媒対照群及び無処置の母動物では異常は認められなかった。P0.6+M0.8 mg/kg 投与の母動物及び非妊娠成熟雌動物では攣縮、振戦及び流涎が認められた。

本文表 1.

		母動物		非妊娠成熟雌ラット
症状	程度	妊娠期	哺育期	
攣縮	局所性	14	3	5
	全身性	13	0	3
振戦	局所性	1	0	1
	全身性	1	0	0
流涎	軽度	1	0	0
	中程度	0	0	1

1.3. 体重 (表 4A-4C)

母動物では溶媒対照群、無処置群及び P0.6+M0.8 mg/kg 投与群間に有意差は認められなかったが、P0.6+M0.8 mg/kg 投与群では体重増加抑制が認められた。

1.4. 血圧 (表 5A, 5B)

試験期間中、各試験群における全ての生存動物では、血圧に統計学的有意差は認められなかった。

本文表 2.

[母動物]	(mmHg)			
	GD6	GD13	GD20	PND3
無処置				
溶媒対照群	117±16	126±15	121±13	129±7
P0.6+M0.8	113±13	120±15	123±16	127±10

(平均値±標準偏差)

[非妊娠成熟雌動物]	(mmHg)		
	投与前	投与後 7 日	投与後 14 日
P0.6+M0.8	113±7	137±16	134±18

(平均値±標準偏差)

1.5. 剖検

生存する無処置群では異常は認められなかったが、溶媒対照群の母動物では軽度の胸腺萎縮が 2 例認められた。一方、P0.6+M0.8 mg/kg 投与群の母動物では、胸腺の軽度から中程度の萎縮が 6 例、脾臓の軽度の小型化が 2 例、脳の軽度腫大 3 例、また肝臓の軽度小型化 1 例、副腎あるいは子宮膜の水腫が各 1 例、認められた。死亡

した母動物の肉眼所見を以下に示す。

被毛の汚れ (口周囲部) : 4 例

胸腺萎縮 : 2 例

肺の赤色化 : 2 例

気管内泡沫状物質貯留 : 1 例

肝臓の暗調化 : 2 例

腺胃の糜爛 : 2 例

腺胃の潰瘍 : 1 例

胃及び小腸内赤色液状内容物貯留 : 3 例

小脳の軽度腫大 : 2 例

尚、非妊娠成熟雌動物では被験物質投与に起因する変化は認められなかった。

1.6. ChE 活性 (表 6A-6D)

ChE 活性の測定結果を表 6A-6D に示す。

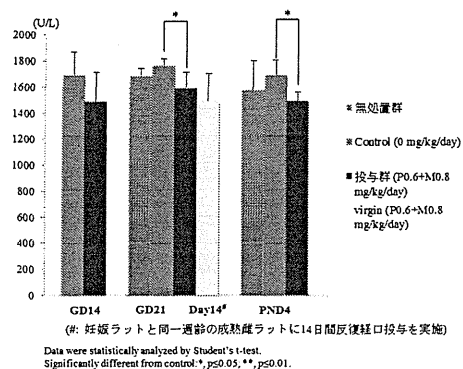
各測定時点における母動物の血清及び脳の ChE 活性は、P0.6+M0.8 mg/kg 群において統計学的有意な低下が認められた (溶媒対照群の 45-68%低下)。

P0.6+M0.8 mg/kg 投与の母動物及び非妊娠成熟雌動物では、脳の ChE 活性が母動物で統計学的有意な低下を示した。

1.7. Paraoxonase 1 (PON 1) 活性

有機リン酸塩を加水分解する酵素である PON1 の活性は、P0.6+M0.8 mg/kg 投与群の母動物において、溶媒対照と比較して GD21 及び PND4 で統計学的有意な低下を認めた。

本文図 1.



2. 児動物

2.1. 児動物の一般状態

PND0 (出生日) から PND4 (哺育 4 日) までの間に、無処置群、溶媒対照群及び P0.6+M0.8 mg/kg 投与群の母動物から生まれた児動物に異常は認められなかった。

2.2. 身体発育

身体発育の指標として、PND0 及び PND4 に体重を測定し、PND3 に耳介展開を検査した。尚、体重は各群各性の平均値とした。

本文表 3.

[児動物体重] (g)

	PND 0		PND 4	
	雄	雌	雄	雌
無処置群	5.7±0.2	5.5±0.2	10.1±0	9.8±0.1
溶媒対照群	6.3±0.6	6.1±0.4	10.9±1.1	10.9±1.0
P0.6+M0.8	6.3±1.1	6.0±0.6	10.1±3.0	10.3±2.4

(平均値±標準偏差)

[耳介展開] (%)

	雄	雌
無処置群	100	100
溶媒対照群	100	96
P0.6+M0.8	83	93

3. 病理組織学的検索

平成 23 年度に採取した PND22 および 60-70 の雌雄ラットの脳を対象に定性的及び定量的病理学的検索を行った。採取した