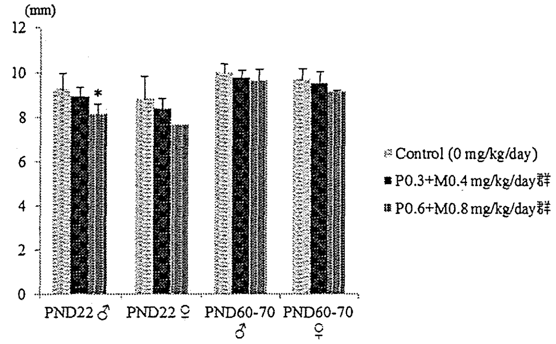
全ての脳において定性的病理組織学的検査では変化は認められなかった。

一方、肉眼的形態計測（定量解析）では、PND22 の P0.6+M0.8 mg/kg 投与群の雄の児動物において、小脳虫部の長軸長が対照群と比較して、有意な低値を示した。さらに、組織学的形態計測では、PND22 の被験物質投与群の雄において、小脳の高さが対照群よりも有意な低値を示した。尚、統計学的有意差は認められなかったが、P0.6+M0.8 mg/kg 投与群の PND22 の雌においても、小脳長軸長および小脳の高さが低値を示した。PND60-70 における雌雄の児動物の脳では、肉眼的・組織学的形態計測において変化は認められなかった。

被験物質投与群における PND22 の雄の児動物で認められた小脳の高さの低値について、小脳の分子層、顆粒層および白質に分けて詳細に検討した。統計学的有意差は認められなかったが、P0.6+M0.8 mg/kg 投与群において分子層の菲薄化が顕著であった。

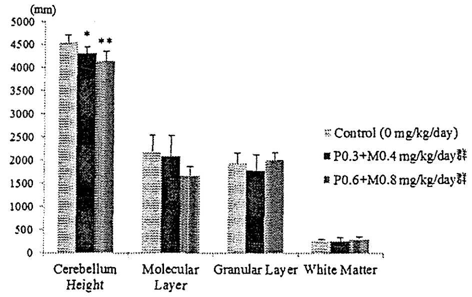
本文図 2.

[小脳虫部長軸長]



Data were statistically analyzed by Dunnett-type test following Kruskal-Wallis test or Student's t-test.
Significantly different from control:*, p≤0.05; **, p≤0.01.

[児動物雄 (PND22) 小脳の高さと小脳各部位の高さ]



Data were statistically analyzed by Dunnett's test following one-way ANOVA.
Significantly different from control:*, p≤0.05; **, p≤0.01.

D. 考察

近年、妊娠期における母動物を介した農薬の暴露が胎児および出生児に与える影響、あるいは出生児への直接暴露による影響が検討されている。しかし、環境中に存在する農薬に曝露される機会は複合的であるため、その正確な評価は極めて困難である。

平成 22 年~23 年度において我々は、異なる2種類の有機リン系農薬のパラチオン及びメタミドホスを、幼若期あるいは成熟期の妊娠・非妊娠雌ラットに反復強制経口投与をして、OECD 発達神経毒性試験ガイドライン (TG426) に可能な限り準拠して評価を行ってきた[2)]。

平成 23 年度では、平成 22 年度の結果を考慮し、幼若期あるいは成熟期の非妊娠雌ラットに複合反復暴露をしても神経症状及び ChE 活性測定において影響が認められなかった用量 (パラチオン 0.3 mg/kg/day+メタミドホス 0.4 mg/kg/day) と、振戦及び縮瞳などの神経症状に加え、ChE 活性値の有意な低下が認められた用量 (パラチオン 0.6 mg/kg/day+メタミドホス 0.8 mg/kg/day) を用いて、妊娠ラットに投与し、母動物及び児動物の神経系に対する影響を評価した。その結果、パラチオン 0.6 mg/kg とメタミドホス 0.8 mg/kg を複合投与した母動物では妊娠期

間及び哺育期間中に、死亡または重篤な神経症状が認められた。さらに、血清 ChE 活性の有意な低下は、パラチオン 0.3 mg/kg とメタミドホス 0.4 mg/kg を複合投与した母動物にも認められた。児動物では、パラチオン 0.6 mg/kg 及びメタミドホス 0.8 mg/kg 複合投与群における雌雄で、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 活性が有意な低下が認められた。また被験物質を投与した母動物より出生した児動物では、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などが認められた。これらの変化の要因として、被験物質の乳汁移行によるものと推測し、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が、いずれも検出されなかった。これらの成績から、パラチオン及びメタミドホスを複合反復投与すると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。また児動物に対する影響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すことが示唆された。妊娠中の生理学的変化が母体に様々な影響を及ぼす事が報告されている [4), 5), 6)]。

平成 24 年度では、上記の結果を考慮して、母動物及び非妊娠成熟雌ラットにパラチオン及びメタミドホスを反復複合経口投与し、一般状態、血圧、脳及び血清 ChE 活性、有機リン酸塩を加水分解する酵素 Paraoxonase 1 (PON1) を毒性指標として妊娠・非妊娠状況下での暴露影響の差異について比較検討した。尚、母動物の試験群には溶媒を投与する対照群 (0 mg/kg/day) 及び無処置群を設置した。被験物質投与群はパラチオン 0.6 mg/kg/day とメタミドホス 0.8 mg/kg/day を 1:1 の割合で混合した複合投与液を反復経口投与した。その結果、死亡動物数は母動物で 4 例、非妊娠成熟雌ラットでは 1 例認められた。さらに、攣縮、振戦及び流涎を主とする神経症状観察において、母動物及び非妊娠成熟雌ラットで全ての神経症状が認められた。特に妊娠期中の攣縮及び振戦は、非妊娠成熟雌ラットよりもやや強く発現した。また体重は、被験物質投与の母動物及び非妊娠成熟雌ラットにおいて増加抑制が認められた。脳及び血清 ChE 活性は母動物では溶媒対照群と比較して 45-68%低下し、さらに脳の ChE 活性が非妊娠成熟雌ラットと比較して有意な低下を示した。尚、血圧には変化が認められなかった。

有機リン酸塩を加水分解する酵素である Paraoxonase 1 (PON1) 活性は被験物質投与群の母動物において、溶媒対照群の母動物よりも GD21 及び PND4 で統計学的有意な低下を認めた。PON1 は有機リン系農薬の解毒及びアテローム硬化症予防に重要な役割を果たす高密度リポタンパク質に結合して存在する。また、estradiol (E2) によって調整されることが知られている [7)]。妊娠期間中に有機リン系農薬である malathion と estradiol-17β または progesterone の暴露を受けると、malathion による AChE 活性の低下が estradiol-17β で増強される。一方、progesterone は AChE 活性の低下を抑制することが報告されている [8)]。マウスの妊娠期間及び哺育期間中、また非妊娠雌マウスの PON1 活性を肝臓、血清を用いて測定したところ、血清中の PON1 活性は、GD10 及び 18 において非妊娠動物よりも有意な低下を示し、PND10 には増加を示したが PND20

までに非妊娠動物のレベルには回復しなかった[9]。さらに、GD7、11、14及び17、PND1、15及び30における肝臓中のPON1 mRNAはGD14で最も低く、またPON1活性は非妊娠動物よりも有意に低かった[10]。有機リン剤やカーバメートなどの殺虫剤の解毒に関与する薬物代謝酵素のCyps (Cyp1a2、Cyp2d22、Cyp2c37、Cyp2c50、Cyp2c54及びCyp3a11) 及びCrboxylesterases (Ces)のmRNAもまた有意な低下を示した[10]。妊娠期間中に有機リン剤の暴露を受けた動物では、非妊娠動物よりも血清及び脳ChE活性の低下が著しく、また死亡を含む神経症状も重篤であることが報告されている[9]。

病理組織学的検査に関しては、平成23年度の実験でPND22及び60-70に採取した児動物の脳を対象に実施した。全ての動物おいて、通常の病理組織学的検査（定性解析）では変化は認められなかった。しかしながら、計測病理学的定量解析（肉眼的・組織学的形態計測）を実施したところ、パラチオン0.6 mg/kg及びメタミドホス0.8 mg/kgを複合投与した母動物から出生したPND22の児動物の雄の脳では、小脳虫部長軸長及び小脳の高さが有意に低いことが判明した。尚、PND60-70では対照群と比較して、有意差は認められなかった。上記のPND22で有意な変化が認められた雄ラットの小脳について、さらに詳細に検討した結果、小脳皮質の高さが有意に低く、特に分子層の菲薄化が顕著であった。児動物では被験物質投与用量に相関する、統計学的有意な体重増加抑制や切歯萌芽の遅れが認められた[2]。このことから、身体発育遅延に伴う、神経細胞の未分化、顆粒細胞の軸索及びプルキンエ細胞の樹状突起の分子層でのシナプス形成など、神経細胞ネットワーク構築の遅延による小脳発育不全が疑われた。そこで、免疫組織学的検索法のProliferating cell nuclear antigen (PCNA)、Nestin、Doublecortin、Neurofilament、Synaptophysin及びTUNEL染色を加え検索した。しかし、明らかな陽性反応は認められず、統計学的有意な低値を示した小脳虫部長軸長及び小脳の高さの原因を明らかにすることは出来なかった。

以上の成績から、母動物で認められた死亡を含む重篤な神経症状や血清及び脳ChE活性の有意な低下は、妊娠期間中のPON1活性の低下に伴った有機リン剤の代謝活性の低下に起因する可能性が示唆された。また、パラチオン0.6 mg/kg及びメタミドホス0.8 mg/kg 複合投与の母動物より出生した児動物の統計学的有意な身体発育の遅延、小脳虫部長軸長及び面積で認められた有意な変化は、妊娠期の薬物代謝酵素活性の低下を含む母動物の生理学的変化あるいは投与に起因した行動学的変化による児動物の発達遅延に起因すると判断した。

E. 結論

平成22年～23年度では、パラチオン及びメタミドホスの反復経口投与試験において、幼若期と成熟期では発現する毒性の程度が異なる事を確認し、またOECD発達神経毒性ガイドライン (TG426) に準拠して実施した複合反復経口投与試験では、非妊娠動物に比べ妊娠動物（母動物）では毒性がさらに増強されることを確認した。平成24年度では、上記の結果を考慮し、さらに母動物及び非妊娠成熟雌ラットにパラチオン0.6 mg/kg、メタミドホス0.8 mg/kgの混合投与液を反復経口投与して、妊娠・非妊娠状況下での暴露影

響の差異について比較検討した。非妊娠成熟雌ラットと比較して、母動物では死亡を含む重篤な神経症状の発現に加え、血清及び脳ChE 活性の有意な低下が認められた。また、有機リン酸塩を加水分解する Paraoxonase1 (PON1) 活性の有意な低下もみられたことから、妊娠期間中の PON1 活性低下がパラチオン及びメタミドホスの代謝低下に繋がり、毒性を増強させた可能性が示唆された。また、平成 23 年度の実験で採取した PND22 および PND60-70 の児動物の脳について、通常の病理組織学的検査を実施した結果、全ての動物において定性的変化は特に認められなかった。しかしながら、定量的計測病理学的解析（肉眼的・組織学的形態計測）を行った結果、パラチオン 0.6 mg/kg およびメタミドホス 0.8 mg/kg を複合反復経口投与した母動物より出生した児動物の PND22 の脳において、小脳虫部長軸長及び面積に有意な低下が認められた。さらに雄では小脳の高さが有意に低く、小脳分子層の菲薄化が顕著であった。これらの変化は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に起因する児動物の発達遅延の影響であると解釈した。

F. 参考文献

1) OECD (2007). OECD guideline for the testing of chemicals 426 Developmental neurotoxicity study.

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 23 年度分担研究報告書『ラットにおけるパラチオンとメタミドホスの複合経口投与による発達神経毒性』

3) 財団法人残留農薬研究所 (2010): 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神経・免疫毒性に関する研究 平成 21 年度分担研究報告書『若齢ラットにおける有機リン系農薬パラチオン及びメタミドホスの複合暴露影響』

4) Makino I., Shibata K., Makino Y., Kangawa K. and Kawarabayashi T. (1999). Potentiation of the hypotensive effect of adrenomedullin in pregnant rats.: Eur. J. Pharmacol. 385(2-3), 129-136.

5) Di Iori R., Marinoni E., Letizia C., Villaccio B., Alberini A. and Cosmi EV. (1999). Adrenomedullin production is increased in normal human pregnancy.: Eur. J. Endocrinol. 140 (3), 201-206.

6) Guvenc Tuna B., Ozturk N., Comelekoglu U. and Yilmaz BC. (2011). Effects of organophosphate insecticides on mechanical properties of rat aorta.: Physiol. Res. 60(1), 39-46.

7) Ahmad A. and Scott JE. (2010). Estradiol enhances cell-associated paraoxonase 1 (PON1) activity in vitro without altering PON1 expression.: Biochem Biophys Res Commun., 397(3), 441-446.

8) Mathews MS. And Devi KS. (1993). Effect

of malathion, estradiol-17-beta and progesterone on ascorbic acid metabolism in prenatal rats and their pups.: Vet. Hum. Toxicol., 35(1), 6-10.

9) Weitman SD, Vodicnik MJ and Lech JJ. (1983). Influence of pregnacy on parathion toxicity and disposition.: Toxico. App. Pharmacol., 71(2), 215-224.

10) Fortin MC, Aleksunes LM and Richardson JR. (2013). Alteration of the expression of pesticide-metabolizing enzymes in pregnant mice: potential role in the increased vulnerabillity of the developing brain.: Drug Metab. Dispos., 41(2), 326-331.

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) パラチオンおよびメタミドホスの複合反復経口投与による発達神経毒性：元村 淳子、首藤 康文、藤江 秀彰、小松 豊、富田 真理子、小嶋 五百合、坂 真智子、青山 博昭、原田 孝則　第 39 回　日本毒性学会学術年会 (仙台、2012)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Table 1-A Detailed clinical observations - Summary data in maternal rats on gestation day

Home cage: Twitch

Dose groups (mg/kg/day)	Score	GD 6		7		8		9		10		11		12		13		14		15	
		before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after
1% Tween80	0	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	12	12	12
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Parathion 0.6	0	18	18	18	17	18	12	18	14	17	15	17	10	17	10	15	6	15	5	9	6
+	1	0	0	0	1	0	3	0	2	0	1	0	3	0	1	0	6	0	2	0	2
Methamidophos 0.8	2	0	0	0	0	0	3	0	1	0	1	0	4	0	4	0	3	0	2	0	1
													*				**				

Data were statistically analyzed by Mann-Whitney *U* test.
Significantly different from control: *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$.

Table 1-B Detailed clinical observations - Summary data in maternal rats on gestation day

Home cage: Twitch

Dose groups (mg/kg/day)	Score	GD 16		17		18		19		20		21		22	
		before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after
1% Tween80	0	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6	5	5
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Parathion 0.6	0	9	6	9	5	9	3	9	1	9	0	9	0	3	2
+	1	0	1	0	2	0	2	0	3	0	3	0	1	0	0
Methamidophos 0.8	2	0	2	0	2	0	4	0	5	0	6	0	3	0	1
							**		**		**		**		

Data were statistically analyzed by Mann-Whitney *U* test.
Significantly different from control: *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$.

Table 1-C Detailed clinical observations - Summary data in maternal rats on postnatal day

Home cage: Twitch

Dose groups (mg/kg/day)	Score	PND 0		1		2		3		4	
		before	after	before	after	before	after	before	after	before	after
1% Tween80	0	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Parathion 0.6	0	4	4	4	2	4	3	4	4	4	
+	1	0	0	0	2	0	1	0	0	0	
Methamidophos 0.8	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Data were statistically analyzed by Mann-Whitney *U* test.

Table 1-D Detailed clinical observations - Summary data in virgin rats

Home cage: Twitch

Dose groups (mg/kg/day)	Score	Day 1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
		before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after
Parathion 0.6	0	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	12	12	12
+	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Methamidophos 0.8	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Dose groups (mg/kg/day)	Score	Day 11		12		13		14		15		16	
		before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after
Parathion 0.6	0	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
+	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Methamidophos 0.8	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 2 - A Detailed clinical observations - Summary data in maternal rats on gestation day

Home cage: Tremors

Dose groups (mg/kg/day)	Score	GD 6		7		8		9		10		11		12		13		14		15	
		before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after
1% Tween80	0	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	12	12	12
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Parathion 0.6	0	18	18	18	18	18	17	18	17	17	17	17	16	17	15	15	15	15	9	9	9
+	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Methamidophos 0.8	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Data were statistically analyzed by Mann-Whitney *U* test.

Table 2 - B Detailed clinical observations - Summary data in maternal rats on gestation day

Home cage: Tremors

Dose groups (mg/kg/day)	Score	GD 16		17		18		19		20		21		22	
		before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after
1% Tween80	0	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6	5	5
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Parathion 0.6	0	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	4	3	3
+	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Methamidophos 0.8	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Data were statistically analyzed by Mann-Whitney *U* test.

Table 2 - C Detailed clinical observations - Summary data in maternal rats on postnatal day

Home cage: Tremors

Dose groups (mg/kg/day)	Score	PND 0		1		2		3		4	
		before	after	before	after	before	after	before	after	before	after
1% Tween80	0	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Parathion 0.6	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
+	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Methamidophos 0.8	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Data were statistically analyzed by Mann-Whitney *U* test.

Table 2 - D Detailed clinical observations - Summary data in virgin rats

Home cage: Tremors

Dose groups (mg/kg/day)	Score	Day 1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
		before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after
Parathion 0.6	0	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5	6	5	5	5	5	5	5
+	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Methamidophos 0.8	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Dose groups (mg/kg/day)	Score	Day 11		12		13		14		15		16	
		before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after
Parathion 0.6	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
+	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Methamidophos 0.8	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 3 - A Detailed clinical observations - Summary data in maternal rats on gestation day

Home cage: Salivation

Dose groups (mg/kg/day)	Score	GD 6		7		8		9		10		11		12		13		14		15	
		before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after
1% Tween80	0	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	12	12	12
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Parathion 0.6	0	18	18	18	18	18	18	18	17	17	17	17	16	17	15	15	15	15	9	9	9
+	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Methamidophos 0.8	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Data were statistically analyzed by Mann-Whitney *U* test.

Table 3 - B Detailed clinical observations - Summary data in maternal rats on gestation day

Home cage: Salivation

Dose groups (mg/kg/day)	Score	GD 16		17		18		19		20		21		22	
		before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after
1% Tween80	0	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6	5	5
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Parathion 0.6	0	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	4	3	3
+	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Methamidophos 0.8	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Data were statistically analyzed by Mann-Whitney *U* test.

Table 3 - C Detailed clinical observations - Summary data in maternal rats on postnatal day

Home cage: Salivation

Dose groups (mg/kg/day)	Score	PND 0		1		2		3		4	
		before	after	before	after	before	after	before	after	before	after
1% Tween80	0	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Parathion 0.6	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
+	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Methamidophos 0.8	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Data were statistically analyzed by Mann-Whitney *U* test.

Table 3 - D Detailed clinical observations - Summary data in virgin rats

Home cage: Salivation

Dose groups (mg/kg/day)	Score	Day 1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
		before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after
Parathion 0.6	0	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5	6	5	5	5	5	5	5
+	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Methamidophos 0.8	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Dose groups (mg/kg/day)	Score	Day 11		12		13		14		15		16	
		before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after
Parathion 0.6	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
+	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Methamidophos 0.8	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 4 - A Body weight - Group mean values in maternal rats on gestation day

(g)

Dose groups (mg/kg/day)	GD[a)]	0	6	10	13	17	20
1% Tween80	Mean	191	215	223	236	260	288
0	S.D.	13	16	16	17	23	32
	N	18	18	18	18	12	12
Parathion 0.6	Mean	189	213	214	224	244	260
+	S.D.	12	14	16	18	24	30
Methamidophos 0.8	N	18	18	17	15	9	9
無処置	Mean	187	210	220	232	260	294
	S.D.	15	15	15	15	14	15
	N	6	6	6	6	6	6

a): Gestation day (GD) 0 is the day on which a vaginal plug and/or sperm are observed.
S.D.: Standard deviation.
N: Number of animals examined.
Data were statistically analyzed by Dunnett's test following one-way ANOVA or Dunnett-type test following Kruskal-Wallis test.

Table 4 - B Body weight - Group mean values in maternal rats on postnatal day

(g)

Dose groups (mg/kg/day)	PND[a)]	0	4
1% Tween80	Mean	223	242
0	S.D.	14	24
	N	6	6
Parathion 0.6	Mean	214	218
+	S.D.	15	7
Methamidophos 0.8	N	4	4
無処置	Mean	206	241
	S.D.	21	22
	N	3	3

a): Postnatal day (PND) 0 is the day on delivery.
S.D.: Standard deviation.
N: Number of animals examined.
Data were statistically analyzed by Dunnett's test following one-way ANOVA or Dunnett-type test following Kruskal-Wallis test.

Table 4 - C Body weight - Group mean values in virgin rats

(g)

Dose groups (mg/kg/day)	Day	0	7	14
Parathion 0.6	Mean	192	192	200
+	S.D.	9	12	13
Methamidophos 0.8	N	6	5	5

S.D.: Standard deviation.
N: Number of animals examined.

Table 5 - A Effects on cardiovascular system - Group mean values in maternal rats

Dose groups (mg/kg/day)		Systolic blood pressure (mmHg)			
		GD6	GD13	GD20	PND3
1% Tween80	Mean	117	126	121	129
0	S.D.	16	15	13	7
	N	18	18	12	6
Parathion 0.6	Mean	113	120	123	127
+	S.D.	13	15	16	10
Methamidophos 0.8	N	18	15	9	4
無処置	Mean	115	122	124	140
	S.D.	10	16	14	26
	N	6	6	6	3

S.D.: Standard deviation.
N: Number of animals examined.
Data were statistically analyzed by Dunnett's test following one-way ANOVA or Dunnett-type test following Kruskal-Wallis test.

Table 5 - B Effects on cardiovascular system - Group mean values in virgin rats

Dose groups (mg/kg/day)		Systolic blood pressure (mmHg)		
		Day 1	Day 8	Day 14
Parathion 0.6	Mean	113	137	134
+	S.D.	7	16	18
Methamidophos 0.8	N	6	5	5

S.D.: Standard deviation.
N: Number of animals examined.

Table 6 - A Cholinesterase activity - Group mean values in maternal rats on gestation day 14

Dose groups (mg/kg/day)	No.of animals examined		Serum (U/L)	Brain (U/L)
1% Tween80	6	Mean	3185	401
0		S.D.	619	58
Parathion 0.6	5	Mean	1489 **	219 **
+		S.D.	107	44
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 ≤ 0.05; **, p ≤ 0.01.

Table 6 - B Cholinesterase activity - Group mean values in maternal rats on gestation day 21

Dose groups (mg/kg/day)	No.of animals examined		Serum (U/L)	Brain (U/L)
1% Tween80	6	Mean	3423	388
0		S.D.	462	47
Parathion 0.6	5	Mean	1465 **	176 **
+		S.D.	776	20
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 ≤ 0.05; **, p ≤ 0.01.

Table 6 - C   Cholinesterase activity - Group mean values in maternal rats on postnatal day 4

Dose groups (mg/kg/day)	No.of animals examined		Serum (U/L)	Brain (U/L)
1% Tween80	6	Mean	3089	394
0		S.D.	887	37
Parathion 0.6	4	Mean	979 **	200 **
+		S.D.	222	33
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 ≤ 0.05; **, p ≤ 0.01.

Table 6 - D   Cholinesterase activity - Group mean values in virgin rats vs. maternal rats on gestation day 21

Dose (mg/kg/day)	group	No.of animals examined		Serum (U/L)	Brain (U/L)
	Virgin	5	Mean	1267	212
			S.D.	355	26
Parathion 0.6					
+	Dams	5	Mean	1465	176 *
Methamidophos 0.8			S.D.	776	20

S.D.: Standard deviation.
Data were statistically analyzed by Student's *t* test or Aspin-Welch test.
Significantly different from control: *, p ≤ 0.05; **, p ≤ 0.01.

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」

3. 免疫毒性に関する研究

免疫毒性を有する農薬の複合暴露による免疫攪乱及び獲得免疫に対する影響

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
研究協力者：　福山朋季　　一般財団法人残留農薬研究所　毒性部免疫・急性毒性研究室
　　　　　　　西野里沙子　一般財団法人残留農薬研究所　毒性部免疫・急性毒性研究
　　　　　　　小坂忠司　　一般財団法人残留農薬研究所　試験事業部

研究要旨

免疫毒性を有する農薬の複合暴露による獲得免疫及び免疫攪乱（アレルギー喘息）に及ぼす影響を調査すべく、有機リン剤（パラチオン）、有機塩素剤（メトキシクロル）及び殺虫剤用共力剤（ピペロニルブトキシド）を用いて検討を行った。獲得免疫抑制検出実験では、雌性 Balb/c マウスに各投与液を 5 日間反復経口投与し、最終投与翌日に採血および脾臓を採取し、獲得免疫に関与する IgM 抗体産生能および免疫担当細胞数を検索した。アレルギー喘息検出実験では、雌性 Balb/c マウスに各投与液を 5 日間反復経口投与し、4 週間後にアレルギー喘息を惹起する OVA を反復吸入暴露して、アレルギー喘息の増強影響を検索した。

獲得免疫抑制検出実験では、メトキシクロルとパラチオンを複合投与したマウスにおいて、単剤暴露と比較して IgM 抗体産生能、T 細胞および B 細胞数の相乗的な抑制が、メトキシクロルとピペロニルブトキシドを複合投与したマウスにおいて、単剤暴露と比較して IgM 抗体産生能及び B 細胞数の相乗的な抑制が認められた。

アレルギー喘息検出実験では、メトキシクロルとパラチオン及びメトキシクロルとピペロニルブトキシドを複合暴露したマウスにおいて、アレルギー喘息で特徴的に認められる、肺門リンパ節中 IgE 陽性 B 細胞数、肺胞洗浄液中の細胞数及びケモカイン量が単剤暴露群と比較して相乗的に増加した。

これらの結果から、本試験条件下では、メトキシクロルとパラチオン及びメトキシクロルとピペロニルブトキシドの複合暴露により、獲得免疫能が相乗的に抑制され、アレルギー喘息作用が相乗的に増悪することが示唆された。また、その組合せにより作用点に違いがある事も明らかとなった。

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のあることと考えられる。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。

平成24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）及び殺虫剤用共力剤（ピペロニルブトキシド）を反復複合経口投与した後、獲得免疫能及びアレルギー性皮喘息反応に及ぼす影響について調査した。

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）ないしは殺虫剤用共力剤（ピペロニルブトキシド）を雌性のBalb/cマウスに5日間反復複合経口投与し、羊赤血球細胞に対する獲得免疫能への影響をIgM抗体産生能及び免疫担当細胞数を測定することで検索した。また、上記と同様に被験物質を反復複合経口投与後、アレルギー喘息を惹起する卵白アルブミン（OVA）を反復吸入暴露し、肺胞洗浄液中や肺門リンパ節中の各種免疫学的因子測定など、アレルギー喘息反応への影響を検索した。

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）、殺虫剤用共力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）、及び卵白アルブミン（OVA、シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社、東京都）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（Balb/cAnCrlj）の雌動物を用いた。Balb/cマウスは免疫・アレルギー実験に良く用いられる系統である。獲得免疫抑制検出実験では、試験動物を6週齢にて購入し、9日間試験環境に馴化した後、7週齢で試験に用いた。アレルギー喘息検出実験では、試験動物を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。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、東京都）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。

3.　試験群

被験物質の投与濃度として、パラチオンは1.0 mg/kg、メトキシクロルとピペロニルブトキシドは100 mg/kgを設定した。獲得免疫抑制検出実験では単剤暴露群（メトキシクロル、パラチオン、ピペロニルブトキシド）及び複合暴露群（メトキシクロル

＋パラチオン、パラチオン＋ピペロニルブトキシド、ピペロニルブトキシド＋メトキシクロル)、アレルギー喘息検出実験では単剤暴露群（メトキシクロル、パラチオン、ピペロニルブトキシド）及び複合暴露群（メトキシクロル＋パラチオン、ピペロニルブトキシド＋メトキシクロル）を設定した。OVA は感作濃度に 10 μg/マウス、惹起濃度に 0.1%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調製時に純度換算を行った。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、コーン油にて溶解させた。複合暴露群は各被験物質調製液を半量ずつ混合することで投与液を作成した（被験物質濃度は単剤暴露群の半分)。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（4°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。

OVA は用時調製とした。感作暴露時には、所定量の OVA を秤量した後、PBS（GIBCO、東京）及び ALUM（コスモバイオ株式会社、東京）に懸濁させた。惹起暴露時には、所定量の OVA を秤量した後、PBS に溶解させた。

5.　被験物質の投与

各被験物質投与液を獲得免疫抑制検出実験では、7 週齢時に、アレルギー喘息検出実験では 4 週齢時に 5 日間連続経口投与した。アレルギー喘息検出実験では OVA を最終経口投与の 4 週間後に腹腔投与にて感作 3 回、吸入暴露にて惹起 6 回行った。各被験物質投与液はスターラー等で攪拌して均質な状態に保ち、投与を実施した。アレルギー喘息検出実験の投与スケジュールは Figure 4 に示す。

6.　吸入暴露方法

吸入暴露装置概要を Figure 5 に示す。アレルギー喘息検出実験では惹起暴露ごとに 30 分の連続暴露を 1 回行った。動物の鼻部のみが暴露チャンバー内に露出されるようにラットを個別にアニマルホルダー（トキワ科学器械株式会社，東京都）に収容し，空気流動型鼻部暴露チャンバー（気積 31.2 L，トキワ科学器械株式会社）に装着した。OVA の発生は、空気流動型鼻部暴露チャンバー及びアトマイザー（株式会社いけうち、東京都）を用いて行った。発生用空気は，コンプレッサー（ES4AD-5，KOBELCO，東京都）で発生させ、その後超高性能フィルター（F3000-10-Y，CKD 株式会社，愛知県）で清浄化した圧搾空気をアトマイザーに供給した。暴露チャンバーへの空気供給は、面積流量計（NSPO-4，日本フローセル、東京都）が 20 L/min になるように調整することで行った。排気はブロアー（TFO-K4P, 株式会社日立製作所, 東京都）で行い、グラスウールフィルター、ミストトラップ及び活性炭フィルターからなる排気処理装置(トキワ科学器械株式会社）で浄化した後大気中に放出した。上記条件下では，暴露チャンバー内に被験物質等ミストが安定的に充填するまでの時間（t_{95}）は 2 分以内と算出されるため暴露の起点は暴露開始時とした。暴露中の OVA 実測濃度は 5 mg/L、粒子径は 4 μm 以下であった。

7.　免疫グロブリン抗体産生量の測定

獲得免疫抑制検出実験では、採血・解剖の 4 日前に、2×10^{8}個のヒツジ赤血球細胞（SRBC, Seep Red Blood Cell, ㈱日本生物材料センター、東京都）をマウスに 0.2 mL 静脈内投与した。採血はイソフルラン吸入麻酔下で後大静脈より行い，血清を採取した後、測定時まで凍結保存（-70℃以下）した。安楽殺後に脾臓を採材し、測定まで冷 PBS 中で保存した。

血清中の SRBC 特異的免疫グロブリン M クラス抗体価は Temple[1)]らの方法に従い、酵素免疫測定法（ELISA）で測定した。測定には BD OptEIATM Reagent Set B (BD,

東京）を使用した。まず、ヒツジ赤血球を溶解したCoating bufferを抗原液として，マイクロプレートの各ウェルに100 μLずつ入れ、1時間室温で培養後、冷蔵庫にて一晩静置した。翌日200 μLのAssay Bufferを用い2時間室温で培養してブロッキングを行った後、各血清試料の希釈液を各ウェルに100 μLずつ入れ、2時間室温で培養した。各個体の血清はアッセイ希釈液を用い4倍希釈で7段階希釈した（4～16384倍希釈）。次に15000倍希釈のアフィニティ精製ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラットIgM抗体（Rockland Inc., PA, USA）を各ウェルに100 μLずつ入れ，2時間室温で培養した。TMB発色液を各ウェルに100 μLずつ入れ、30分間室温に静置後、50 μLの反応停止液を添加して反応を停止した。マイクロプレートリーダー（Spectra MAX 190, Molecular Devices株式会社，大阪府）を用い450 nmのフィルターでマイクロプレートの吸光度を測定した。なお、コーティングの段階から発色溶液注入の各段階まで洗浄液（0.05%Tween20添加リン酸緩衝液）を用いて3～7回洗浄した。抗体価は，吸光度が0.5を示す血清の希釈倍率をもって表した。

脾臓中のSRBC特異的免疫グロブリンMクラス抗体反応はJerne, N. K., and Nordin, A. A.[2]の方法に従い、Plaque forming cell assay（PFC法）で測定した。まず､脾臓は､10%牛胎児血清含有Modified eagle medium（MEM）を用いて、ステンレスメッシュ上で擂りつぶし，ナイロンメッシュ（75 μmメッシュ）にて濾過し、単細胞懸濁液を作成した。細胞懸濁液50 μLに10 %SRBC懸濁液を50 μL、乾燥補体液を50 μL加え、よく撹拌し、40 μLずつCunninghamチャンバーに添加した。チャンバーをパラフィルムで密封し，CO_2インキュベーター（37℃，5%CO_2）で90分間培養した。培養後、チャンバーからパラフィルムを取り外し、実体顕微鏡下でコロニーカウンターを用いてPFC数を計測した。脾臓細胞1×10^6個あたりのプラーク数を算出し、測定値とした（1 mLあたりのプラーク数/PFC反応液中の細胞数）。

8. 脾臓のフローサイトメトリー解析

7.で得た細胞懸濁液の一部を用いて、FACSVerse（FACS，日本ベクトン･ディッキンソン株式会社）を用いたT細胞数（総T細胞、ヘルパーT細胞、細胞障害性T細胞）及びB細胞数（総B細胞、胚中心陽性B細胞）測定を実施した。FACS解析には，T細胞を染色する目的でallo-phycocyanin標識抗マウスCD3抗体、ヘルパーT細胞を染色する目的でphycoerythrin -cyanin-7標識抗マウスCD4抗体､細胞傷害性T細胞を染色する目的でallo-phycocyanin-cyanin-7標識抗マウスCD8抗体、B細胞を染色する目的でperidinin chlorphyll protein-Cy5.5標識抗マウスCD19抗体、肺中心陽性B細胞を染色する目的でFluorescein isothiocyanate（FITC）標識抗マウスPNA抗体を用いた（全て日本ベクトン･ディッキンソン株式会社)。反応抗体との非特異的結合を防ぐため，1 μg Mouse BD Fc Block™（日本ベクトン･ディッキンソン株式会社）にて4°Cで10分間培養後、上記の蛍光標識抗マウス細胞膜表面抗原の抗体を用いて4°C遮光下で30分間培養して染色した。染色後、PBSで洗浄した後、FACSを用いて解析を実施した。

9. アレルギー喘息検出実験詳細解析

アレルギー喘息検出実験では、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、肺胞洗浄液（BALF）および肺門リンパ節を採材した。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。BALFはフローサイトメトリー法による各種細胞数解析（好中球、好酸球、リンパ球、マクロファージ）およびケモカイン量測定（RANTES、MIP-1β、KC）に供した。肺

門リンパ節はは、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 μmメッシュ）上で擂りつぶし、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, IFNγ)を定量した。

10. BALFの解析

BALF中の細胞数は、コールターカウンターZ2（ベックマン･コールター株式会社, 東京都）を用いて測定した。細胞分画測定はFACSを用いて実施した。FACS解析には、好中球を染色する目的でFITC標識抗マウスGr-1抗体、マクロファージ及び好酸球を染色する目的でPhycoerythrin標識抗マウスCD11c抗体を用いた（全て日本ベクトン･ディッキンソン株式会社）。反応抗体との非特異的結合を防ぐため、1 μg Mouse BD Fc Block™にて4°Cで10分間培養後、上記の蛍光標識抗マウス細胞膜表面抗原の抗体を用いて4°C遮光下で30分間培養して染色した。染色後，PBSで洗浄した後，FACSを用いて解析を実施した。BALF上清中の各種ケモカイン(RANTES、MIP-1β、KC）量測定はBD Cytometric Bead Array（日本ベクトン･ディッキンソン株式会社）を用いて実施した。

11. 肺門リンパ節細胞の調製

肺門リンパ節を5%FCS添加RPMI1640培地にて氷冷下で浸した後、ペトリ皿上にてナイロンメッシュ（75 μmメッシュ）上で擂りつぶし、単細胞懸濁液を得た。細胞懸濁液を遠心した後、5%FCS添加RPMI1640培地で洗浄し、細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液中のリンパ球数は、コールターカウンターZ2を用いて測定した。

12. 肺門リンパ節細胞の染色及びFACS解析

IgE陽性細胞を染色する目的でFITC標識抗マウスIgE抗体、B細胞を染色する目的でallo-phycocyanin標識抗マウスCD45R/B220抗体を使用した（全て日本ベクトン･ディッキンソン株式会社）。反応抗体との非特異的結合を防ぐため、1 μg Mouse BD Fc Block™にて4°Cで10分間培養後、上記の蛍光標識抗マウス細胞膜表面抗原の抗体を用いて4°C遮光下で30分間培養して染色した。染色後、PBSで洗浄した後、FACSを用いて解析を実施した。解析は、IgE陽性B細胞（B220+IgE+）について実施し、リンパ球中の各細胞集団の細胞数で評価した。

13. 有意差検定

各検査項目について、各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。

（倫理面への配慮）

動物の取り扱いに関しては一般財団法人残留農薬研究所で定める倫理規定に従い実施した。

C．研究結果

試験結果をFigure 1～8に示す。

1. 獲得免疫抑制検出実験（SRBC特異的

IgM 抗体産生能、Figure 1）

図の左列が脾臓中 SRBC 特異的 IgM 抗体産生能（PFC 法）、右列が血清中の SRBC 特異的 IgM 抗体価測定結果を示す。脾臓中 PFC 法については、単剤暴露でも溶媒対照群と比較して著しい反応の抑制が認められたが、単剤暴露と比較して、メトキシクロル＋パラチオン、メトキシクロル＋ピペロニルブトキシドの複合暴露についてはさらに有意な抑制反応が認められた。血清中抗体価測定については、単剤暴露では溶媒対照群と比較して変化が認められなかったが、PFC 法と同様に単剤暴露と比較してメトキシクロル＋パラチオン、メトキシクロル＋ピペロニルブトキシドの複合暴露については有意な抑制反応が認められた。

PFC 法及び血清中抗体価測定のいずれもパラチオン＋ピペロニルブトキシドの組み合わせでは単剤暴露と比較して変化は認められなかった。

2. 獲得免疫抑制検出実験（B 細胞数、Figure 2）

図の左列が総 B 細胞数、右列が胚中心陽性 B 細胞数測定結果を示す。総 B 細胞数については、単剤暴露では溶媒対照群と比較して変化は認められなかったが、単剤暴露と比較して、メトキシクロル＋パラチオン、メトキシクロル＋ピペロニルブトキシドの複合暴露では細胞数の減少が認められた。胚中心陽性 B 細胞数については、単剤暴露でも溶媒対照群と比較して細胞数の減少が認められたが、単剤暴露と比較してメトキシクロル＋ピペロニルブトキシドの複合暴露ではさらに有意な抑制反応が認められた。

総 B 細胞数及び胚中心陽性 B 細胞数のいずれもパラチオン＋ピペロニルブトキシドの組み合わせでは単剤暴露と比較して変化は認められなかった。

3. 獲得免疫抑制検出実験（T 細胞数、Figure 3）

図の左列から総 T 細胞数、ヘルパーT 細胞数、細胞障害性 T 細胞数測定結果を示す。総 T 細胞数、ヘルパーT 細胞数、細胞障害性 T 細胞数のいずれも、単剤暴露では溶媒対照群と比較して変化は認められなかったが、単剤暴露と比較して、メトキシクロル＋パラチオンの複合暴露では細胞数の有意な減少が認められた。

一方、パラチオン＋ピペロニルブトキシド及びメトキシクロル＋ピペロニルブトキシドの組み合わせでは単剤暴露と比較して変化は認められなかった。

4. アレルギー喘息検出実験（BALF 中各種細胞数、Figure 6）

図の左列より、好酸球、リンパ球、好中球、マクロファージ数測定結果を示す。いずれのパラメーターについても、単剤暴露では溶媒対照群と比較して変化は認められなかったが、メトキシクロル＋パラチオン、及びメトキシクロル＋ピペロニルブトキシドの複合暴露では、単剤暴露とは比較して有意な増加が認められた。

5. アレルギー喘息検出実験（BALF 中ケモカイン量、Figure 7）

図の左列より、RANTES、MIP-1ß、KC 測定結果を示す。BALF 中細胞数と同様、いずれのパラメーターについても、単剤暴露では溶媒対照群と比較して変化は認められなかったが、メトキシクロル＋パラチオン及びメトキシクロル＋ピペロニルブトキシドの複合暴露では、単剤暴露とは比較して有意な反応の増加が認められた。

6. アレルギー喘息検出実験（肺門リンパ節中 IgE 陽性 B 細胞数、Figure 8）

上記 2 種類のパラメーターと同様、単剤暴露では溶媒対照群と比較して大きな変化は認められなかったが、メトキシクロル＋パラチオン及びメトキシクロル＋ピペロニルブトキシドの複合暴露では、単剤暴露とは比較して有意な反応の増加が認められた。

D．考察

本研究では、有機塩素剤（メトキシクロル）、有機リン剤（パラチオン）及び殺虫剤用共力剤（ピペロニルブトキシド）の複合暴露による獲得免疫抑制能及びアレルギー性喘息に及ぼす影響を検索した。有機リン剤、有機塩素剤及び殺虫剤用共力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[3-6]、本研究で用いたパラチオン、メトキシクロル及びピペロニルブトキシドの胸腺細胞アポトーシス誘発作用が報告されており[7]、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。我々は、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、複合暴露による免疫抑制作用の増強、さらに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て、アレルギー性喘息増強作用誘発を指標とした検査を実施した。

獲得免疫抑制検出実験では、メトキシクロル、パラチオン及びピペロニルブトキシドの単独ないし複合投与を7週齢時の雌性Balb/cマウスに5日間反復経口投与し、最終投与翌日に特異的IgM抗体産生能及び関連免疫担当細胞数を測定した。その結果、メトキシクロルとパラチオンないしピペロニルブトキシドを複合投与したマウスにおいて、単剤暴露と比較してIgM抗体産生能が抑制され、免疫抑制反応については相乗的な影響があることが示唆された。免疫抑制反応についてはいずれの組み合わせでもほぼ同等であったが、メトキシクロルとパラチオンの組み合わせでT細胞への影響が主であったのに対し、メトキシクロルとピペロニルブトキシドの組み合わせではB細胞への影響が主であり、その作用点については両者で異なることが考えられた。

獲得免疫抑制検出実験において獲得免疫能が単剤暴露と比較して相乗的に抑制された組み合わせ（メトキシクロル＋パラチオン、メトキシクロル＋ピペロニルブトキシド）について、投与後の免疫系撹乱に及ぼす影響を調査する目的で、アレルギー喘息検出実験を実施した。アレルギー喘息検出実験では、メトキシクロル、パラチオン及びピペロニルブトキシドの単独ないし複合投与を4週齢時の雌性Balb/cマウスに5日間反復経口投与し、4週間休薬した後、OVAを感作・惹起することでアレルギー性喘息を惹起し、アレルギー喘息反応をBALFおよび肺門リンパ節中の関連細胞数、サイトカイン産生量を測定することにより調査した。その結果、メトキシクロルとパラチオン及びメトキシクロルとピペロニルブトキシドを複合暴露したマウスにおいて、アレルギー喘息で特徴的に認められる肺門リンパ節中IgE陽性B細胞数、肺胞洗浄液中の細胞数及びケモカイン量が単剤暴露群と比較して相乗的に増加していた。

これらの結果から、本試験条件下ではメトキシクロルとパラチオン及びメトキシクロルとピペロニルブトキシドの複合暴露により、獲得免疫能が相乗的に抑制され、アレルギー喘息作用が相乗的に増悪することが示唆された。平成23年度までの本研究において、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、免疫抑制作用及びアポトーシス誘発作用を有するパラチオン、メトキシクロル及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、本年度の複合暴露の結果もその仮説をより強く示唆するものと思われた。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