

の IC₂₀ 値は求めることができない結果であった (詳細な結果は未掲載)。これは、チオノ型やジチオ型の構造ではアセチルコリンエステラーゼの結合部位に対する結合力が低く、酵素活性を阻害することができなかったことによると考えられる。ADI 値は、シアノホス (殺虫剤) が 0.001mg/kg 体重/日、アニロホス (殺虫剤) が 0.001mg/kg 体重/日、メチダチオン (殺虫剤) が 0.001mg/kg 体重/日、フェントエート (殺虫剤) が 0.0029mg/kg 体重/日、クロルピリフォスメチル (殺虫剤) が 0.01mg/kg 体重/日 (JMPR;FAO/WHO 合同残留農薬専門家会議)、ジメトエート (殺虫剤) が 0.002mg/kg 体重/日 (JMPR)、マラチオン (殺虫剤) が 0.3mg/kg 体重/日、ピリミホスメチル (殺虫剤) が 0.03mg/kg 体重/日、ホキシム (殺虫剤) が 0.004mg/kg 体重/日 (JMPR)、エチルチオメトン (殺虫剤) が 0.0003mg/kg 体重/日、トリクロロン (殺虫剤) が 0.002mg/kg 体重/日、イソフェンホス (殺虫剤) が 0.001mg/kg 体重/日 (JMPR) と報告されている。

チオノ型やジチオ型 17 種については、ホスフェート型もしくはチオール型の活性型 (オキソン体) に変換された構造体 9 種について、*In vitro* 試験系迅速試験による活性阻害濃度を調べた結果が得られている。クロルピリフォス (殺虫剤) の ADI 値が 0.001mg/kg 体重/日に対して IC₂₀ 値は 0.0011mg/L、ダイアジノン (殺虫剤) の ADI 値が 0.005mg/kg 体重/日 (JMPR) に対して IC₂₀ 値は 0.0089mg/L、フェントロチオン (殺虫剤) の ADI 値が 0.006mg/kg 体重/日 (JMPR) に対して IC₂₀ 値は 0.33mg/L、ブタミホス (殺虫剤) の ADI 値が 0.008mg/kg 体重/日に対して IC₂₀ 値は 0.14mg/L、EPN (殺虫剤) の ADI 値が 0.0014mg/kg 体重/日に対して IC₂₀ 値は 0.14mg/L と報告されている。イソキサチオン (殺虫剤)、プロチオホス (殺虫剤) およびトリクロホスメチル (殺虫剤) については、ADI 値の報告はないが、*In vitro* 試験系迅速試験による活性阻害として、それぞれ IC₂₀ 値は 0.0013mg/L、0.13mg/L および 5.09mg/L と報告されている。-(CH₃O)₂ や

-C₂H₅O、の側鎖をもつ農薬に大別できるが、ここでグループ化した農薬の範囲では結論を導くことはできなかった。しかし、フェントロチオンとフェンチオンの構造では、

-(CH₃O)₂ 側鎖を共通にもち、他の側鎖にエステル結合でベンゼン環が結合している。ベンゼン環の側鎖としてメチル基が同位置に結合し、やはり同位置に -NO₂ と -SCH₃ が結合している。ADI 値は 0.006 mg/kg 体重/日と 0.0023 mg/kg 体重/日と類似した値となっている。この差は、側鎖の立体的大きさや電子吸引性に基づくアセチルコリンエステラーゼの結合部位に対する結合力、前述した吸収・分布・代謝・排泄の過程に係る相違が影響していると推測された。ピリミホスメチルとダイアジノンの構造は、-(CH₃O)₂ や -C₂H₅O の側鎖の違いと、-N(C₂H₅)₂ と -CH(CH₃)₂ の側鎖が異なっている。ADI 値は 0.03 mg/kg 体重/日と 0.005 mg/kg 体重/日と約 6 倍異なっている。一方、クロルピリホスメチルとクロルピリホスの構造は、

-(CH₃O)₂ や -C₂H₅O の側鎖の違いのみである。ADI 値は 0.01mg/kg 体重/日と 0.001 mg/kg 体重/日と 10 倍の差がある。ピリミホスメチル、ダイアジノン、ピリミホスメチルおよびダイアジノンの 4 種の農薬の構造と ADI 値の比較から、-C₂H₅O の側鎖の方が -(CH₃O)₂ の方に比べ毒性に及ぼす作用が強く出る可能性が推測される。さらに、ピリミホスメチルとダイアジノンの -N(C₂H₅)₂ や -CH(CH₃)₂ 等の側鎖が毒性発現に影響を及ぼしている可能性が推測される。一方、エチルチオメトンとホサロンでは、-C₂H₅O の側鎖が共通で、他方の側鎖が異なる結果、ADI 値は 0.0003mg/kg 体重/日と 0.002 mg/kg 体重/日と約 15 倍の差が生じている。

これらの結果から、構造の類似に基づくカテゴリー化による化学物質の類別化が毒性の発現予測に有効であり、構造の相違から作用の強弱の推測が可能であることを示唆する一例を提示することができた。今後、カテゴリー化をするために多種多様な化学物質の中から抽出する方法の確立と、カテゴリー化の対象とする毒性の選択、毒性作用

の発現に寄与する構造と毒性の寄与に対する数値化の手法の確立が課題となる。さらに、毒性の強弱を予測した際の検証をするための試験法の確立も必要である。

ADI 値は、前述した吸収・分布・代謝・排泄の過程を経るとしても、チオノ型やジチオ型の有機リン系農薬類がホスフェート型もしくはチオール型の活性型に体内で代謝され、標的タンパク質であるアセチルコリンエステラーゼと相互作用をした、総合的な結果に基づいて算出された数値と仮定すると、*In vitro* 試験系迅速試験によるセチルコリンエステラーゼ活性阻害濃度と ADI 値との間に何らかの関係があると想定される。*in vitro* 試験系迅速試験により得られた IC₂₀ 値と ADI 値の関係を調べると、必ずしも高い相関関係は見られなかった。しかし、特異的に高い IC₂₀ 値と ADI 値を除くと相関が認められ、カテゴリー化による毒性評価の結果を補填することや、予測を評価することに有効な手段であることが示唆された (図 2)。

4. 神経系細胞に対する毒性評価試験の確立

4. 1 神経系細胞に対する毒性評価

本研究で検討しているカテゴリー化による毒性予測手法や QSAR による予測は、毒性予測により様々な効率化がもたらされる有用性ととも、スクリーニングとして次の段階に進む判断基準に適用することができ、実験動物の使用を減らすことに有効な手法として利用できる。*In vitro* 試験法は、部分的であっても毒性を評価できる代替試験法として、毒性予測のための基礎情報を提供し、カテゴリー化による予測を評価する上でも、広範囲な適用が可能な重要で有効な方法である。それらの観点から、神経系への毒性を評価できる *in vitro* 試験系の確立も並行して進めた。

ラットの副腎髄質由来の褐色細胞腫 PC12 細胞 (独立行政法人 医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンクより購入) は、神経増殖因子 (NGF) を暴露すると、神経系細胞に分化する。この性質を利用して、神経系細胞に対する細胞毒性、神経系細胞への分化過程における影響、分泌するアセチルコリ

ン量に対する影響など、神経系細胞とその一部の機能に対する影響評価ができる *in vitro* 試験系を確立し、対象となる化学物質を用いた試験結果を、本研究のカテゴリー化による毒性予測手法の情報として供する。

4. 2 ミトコンドリアの活性障害を指標とする細胞毒性試験系の確立

テトラゾリウム塩 (WST-1) は、ミトコンドリアの呼吸鎖に存在して、生存している細胞にのみ活性が維持されているコハク酸塩テトラゾリウム還元酵素によりニコチンアミドアデニンジヌクレオチド還元型 (NADH) が酸化型 (NAD⁺) に酸化する反応とあわせて、ホルマザン色素に分解される⁶⁾。すなわち、生存細胞数の増加に依存してミトコンドリア脱水素酵素群全体の活性が増加することになり、ミトコンドリア脱水素酵素群に属するコハク酸塩テトラゾリウム還元酵素により、培地中に生成してくるホルマザン色素の量の増加を導くことになる。したがって、生細胞数と培地中のホルマザン色素量が直線的な関係のある範囲では、ホルマザン色素生成量を測定することにより、生細胞数を測定することができる。この原理を利用して、以下の *in vitro* 試験系を確立した。

分化しない状態の PC12 細胞に対しては、24 時間作用の場合には 1.5×10^5 cells/mL 単細胞浮遊液を、48 時間作用の場合には 1.0×10^5 cells/mL 単細胞浮遊液を、培養液を用いて調製し、96 ウェルマイクロプレートにウェル当り 100 μ L 植え、37°C、CO₂ インキュベータ中で、培養する。試験は、濃度毎に 3 ウェルで実施し、平均値を用いることとした。1 日培養後、被験物質の入った培養液を 10 μ L 加えて、37°C、CO₂ インキュベータ中で、24 時間もしくは 48 時間、培養する。被験物質は、DMSO (ジメチルスルホキシド; 和光純薬工業 (株)) に溶解し、最高最終濃度を 1mg/mL とし、公比 2 の濃度希釈系列、1mg/mL、0.5mg/mL、0.25mg/mL、0.125mg/mL、0.0625mg/mL、0.03125mg/mL、0.015625mg/mL、溶媒対照 (DMSO)、DMSO 濃度を 0.5% として試験を実施する。神経細胞に分化誘導した状態の細胞に対しては、 1.25×10^5

cells/mL単細胞浮遊液を、培養液を用いて調製し、96ウェルマイクロプレートにウェル当り100 μ L植え、37°C、CO₂インキュベータ中で、培養する。

1日培養後、マウス神経成長因子(7S ; Alomone labs 社)を最終濃度が50ng/mLになるように600ng/mL溶液を10 μ L添加し、37°C、CO₂インキュベータ中で2日間、培養した。試験は、濃度毎に3ウェルで実施し、平均値を用いることとした。被験物質の入った培養液を10 μ L加えて、37°C、CO₂インキュベータ中で、24時間もしくは48時間、培養する。被験物質は、DMSOに溶解し、最高最終濃度を1mg/mLとし、公比2の濃度希釈系列、1mg/mL、0.5mg/mL、0.25mg/mL、0.125mg/mL、0.0625mg/mL、0.03125mg/mL、0.015625mg/mL、溶媒対照(DMSO)、DMSO濃度を0.5%として試験を実施する。

試験は、使用する製品キット(Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System ; Takara社)のマニュアルに従い行う。マニュアルに示されているMTTアッセイ用反応液を、分化しない状態のPC12細胞に対する試験では11 μ L、神経細胞に分化誘導した状態の細胞に対する試験では12 μ Lを添加し、37°C、CO₂インキュベータ中で3時間保温する。反応後、マイクロプレートリーダー(コロナ電気株式会社製、型式 : MTP-810Lab/880Lab)を用いて、450 nmの吸光度を測定し、対照群の生細胞に対する被験化学物質を暴露した生細胞数の割合を求めて細胞毒性を評価する。

4. 3 作用効果の評価

細胞数を計測する際に、400細胞を計測したとして、最大の誤差として5%は無視できない。試験初日に各試験間に5%の誤差があったとして、3日後には最大約14%の誤差が生じる恐れが生じると見積られる。したがって、本試験系では、対照とした試験に対して $\pm 20\%$ 以下の測定値は判断基準としないこととした。すなわち、対照に対して80%以下の測定値が出た結果を用いて、影響を評価することとした。

D. 結論

限られた既報の結果を有効に利用して、実際の試験を実施せずに、環境中運命、生態影響、人の健康に及ぼす影響を予測できる方法を確立することを目的として、神経系に対する毒性について、カテゴリー化による手法(カテゴリーアプローチ)をとり、検討を進めることとした。

有機リン系殺虫剤を対象物質として、アセチルコリンエステラーゼ活性阻害を指標とした神経系への毒性に関して、作用と構造の関係を検討した。

ホスフェート型の6種では、対象農薬数が少ないこともあり、ADI値と*In vitro*試験法から得られたIC₂₀値の間には相関性は認められなかったが、 $-(\text{CH}_3\text{O})_2$ と $-\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$ の側鎖の相違については差がみられずADI値とIC₂₀値の両方が低い傾向が認められた。一方、 $-(\text{CH}_3)_2\text{CHO}$ と側鎖が長く、かつ立体構造が大きくなると毒性が低くなる傾向がみられた。他方の側鎖の $-\text{CH}(\text{OH})-\text{C}-\text{Cl}_3$ 、 $-\text{O}-\text{CH}=\text{CH}_2$ と $-(\text{S}-\text{C}_6\text{H}_5)_2$ の3種については、構造と阻害活性の間に関連を見出すには至らなかったが、側鎖の構造の長さや立体構造の大きさが作用と関連していることが示唆され、アセチルコリンエステラーゼの結合部位に結合する能力として側鎖の構造が寄与していると考えられた。チオノ型やジチオ型17種では、 $-(\text{CH}_3\text{O})_2$ や $-\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$ の側鎖をもつ農薬に大別できるが、ここでグルーブ化した農薬の範囲では結論を導くことはできなかった。しかし、フェントロチオンとフェンチオンを比較した場合、側鎖の立体的大きさや電子吸引性に基づく相違が影響していると推測された。ピリミホスメチルとダイアジノン、クロルピリホスメチルとクロルピリホスの比較では、 $-\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$ の側鎖の方が $-(\text{CH}_3\text{O})_2$ の方に比べ毒性に及ぼす作用が強く出る可能性が推測された。さらに、別の側鎖が毒性発現に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

これらの結果から、構造の類似に基づくカテゴリー化による化学物質の類別化が毒性の発現予測に有効であり、構造の相違から作用の強弱の推測が可能であることを示唆する一例を提示することができた。今後、カテゴリー化をするために多種

多様な化学物質の中から抽出する方法の確立と、カテゴリー化の対象とする毒性の選択、毒性作用の発現に寄与する構造と毒性の寄与に対する数値化の手法の確立などの課題の重要性と必要性が抽出できた。

in vitro 試験系迅速試験によるセチルコリンエステラーゼ活性阻害濃度と ADI 値との間に何らかの関係があると想定される。*In vitro* 試験系迅速試験により得られた IC₂₀ 値と ADI 値の関係を調べると、必ずしも高い相関関係は見られなかった。しかし、特異的に高い IC₂₀ 値と ADI 値を除くと、相関が認められ、カテゴリー化による毒性評価の結果を補填することや、毒性の強弱などの予測を検証評価することに有効な手段であることが示唆され、*In vitro* 試験法の確立が必要であることも明らかとなった。

それらの観点から、ラットの副腎髄質由来の褐色細胞腫 PC12 細胞に NGF を暴露して神経系細胞に分化する系を用いた *in vitro* 試験系を確立した。本年度は、神経系細胞に対する細胞毒性を評価できる系を確立した。今後、この試験系を用いた対象とする化学物質の細胞毒性の評価と、神経系細胞への分化過程における影響、分泌するアセチルコリン量に対する影響など、神経系細胞とその一部の機能に対する影響評価ができる *in vitro* 試験系の確立をすすめ、対象とする化学物質の試験結果を、本研究のカテゴリー化による毒性予測手法の精緻化のために情報として供する予定である。

E. 参考文献

- 1) 農薬ハンドブック 2011 年版：社団法人日本植物防疫協会編集・発刊、平成 23 年 2 月
- 2) Tahara, M., Kubota, R., Nakazawa, H., Tokunaga, H., Nishimura, T. (2005) Use of Cholinesterase activity as an indicator for the effects of combinations of organophosphorus pesticides in water from environmental sources. *Water Res.*, 39, 5112-5118.
- 3) Tahara, M., Kubota, R., Nakazawa, H., Tokunaga, H., Nishimura, T. (2006) Analysis of active oxon forms of organophosphorus pesticides in water samples using gas chromatography with mass spectrometric detection. *J. Health Sci.*, 52, 313-319.
- 4) 田原麻衣子, 久保田領志, 中澤裕之, 徳永裕司, 西村哲治 (2008) 塩素反応生成物を含めた有機リン系農薬のための水道水の安全性評価, 用水と排水 50(6), 483-487.
- 5) 国立医薬品食品衛生研究所 農薬等 ADI 関連情報データベース ; http://www.nihs.go.jp/hse/food-info/pest_res/
- 6) Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System マニュアル ; TaKaRa

F. 健康危機情報

なし。

G. 成果発表

1. 論文発表
なし。
2. 学会発表
なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

1. 特許取得
該当なし。
2. 実用新案登録
該当なし。
3. その他
該当なし。

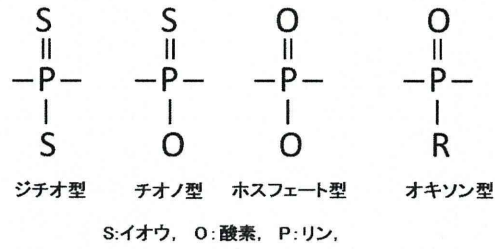


図1 有機リン系農薬の基本骨格構造

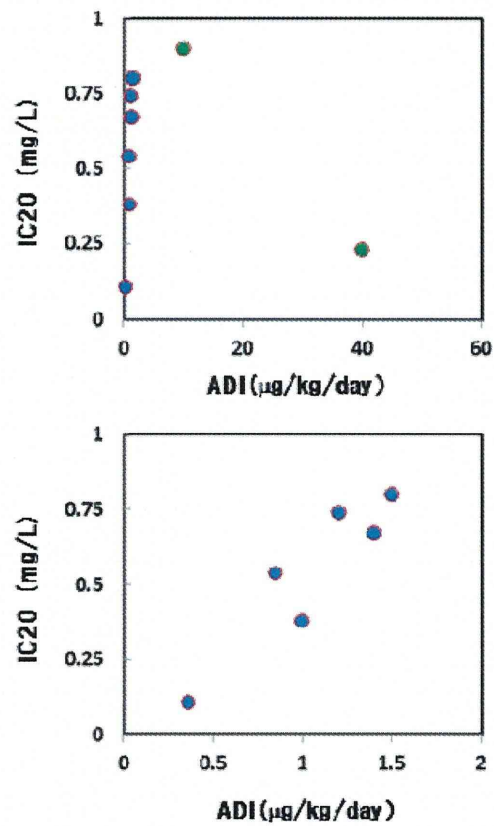


図2 一日摂取許容量と in vitro 試験系迅速試験法の結果との関係

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

別紙 4

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
本間正充	変異原性の予測—医薬品中に存在する不純物の評価—	小島肇夫	In vitro毒性・動態評価の最前線	シーエムシー出版	東京	2013	36-43
小野 敦	化学物質の内分泌攪乱性の予測評価	小島肇夫	In vitro毒性・動態評価の最前線	シーエムシー出版	東京	2013	29-35
森田 健	GHSにおける代替法の基準および規制の動向	小島肇夫	動物実験代替安全性試験プロトコル集	シーエムシー出版	東京	2013	11-15
本間正充	哺乳類細胞を用いたin vitro小核試験	小島肇夫	動物実験代替安全性試験プロトコル集	シーエムシー出版	東京	2013	169-186
小野 敦	BG1Luc細胞を用いるエストロゲン受容体転写活性化試験	小島肇夫	動物実験代替安全性試験プロトコル集	シーエムシー出版	東京	2013	221-242

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hironao Takasawa, Rie Takashima, Akiko Hattori, Kazunori Narumi, Kazufumi Kawasako, Takeshi Morita, Makoto Hayashi, Shuichi Hamada	Development of a repeated-dose liver micronucleus assay using adult rats (II), Further investigation of 1,2-dimethylhydrazine and 2,6-diaminotoluene	Mutation Research	751	12-18	2013
Hayashi M, Honma M, Takahashi M, Horibe A, Tanaka J, Tsuchiya M, Morita T	Identification and Evaluation of Potentially Genotoxic Agricultural and Food-related Chemicals	Food Safety	1	32-42	2013
Matsumoto, M., Yamaguchi, M., Yoshida, Y., Senuma, M., Takashima, H., Kawamura, T., Kato, H., Takahashi, M., Hirata-Koizumi, M., Ono, A., Yokoyama, K., Hirose, A.	An antioxidant, N,N'-diphenyl-p-phenylenediamine (DPPD), affects labor and delivery in rats: A 28-day repeated dose test and reproduction/developmental toxicity test.	Food Chem Toxicol	56	290-296	2013
Takahashi, M., Ishida, S., Hirata-Koizumi, M., Ono, A., Hirose, A	Repeated dose and reproductive/developmental toxicity of perfluoroundecanoic acid in rats	J Toxicol Sci.	39	97-108	2014
Y. Mirokuji, H. Abe, H. Okamura, K. Saito, F. Sekiya, S. Hayashi, S. Maruyama, A. Ono, M. Nakajima, M. Degawa, S. Ozawa, M. Shibutani T., Maitani	The JFFMA assessment of flavoring substances structurally related to menthol and uniquely used in Japan.	Food Chem Toxicol,	64	314-321	2013
T. Yamada, R. Hasegawa, S. Nishikawa, Y. Sakuratani, J. Yamada, T. Yamashita, K. Yoshinari, Y. Yamazoe, E. Kamata, A. Ono, A. Hirose, M. Hayashi	A new parameter that supports speculation on the possible mechanism of hypothyroidism induced by chemical substances in repeated-dose toxicity studies.	J Toxicol Sci,	38	291	2013
小野 敦	化学物質の安全性評価におけるin silico評価手法の利用について	ILSI Japan	115	8-14	2013

高橋美加, 松本真理子, 宮地繁樹, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 長谷川隆一, 平田睦子, 小野敦, 鎌田 栄一, 広瀬明彦	OECD化学物質対策の動向 (第23報) - 第2回OECD 化学物質共同評価会議 (20 12年パリ)	化学生物総合 管理	9	241-247	2013
高橋美加, 松本真理子, 宮地繁樹, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 長谷川隆一, 平田睦子, 小野敦, 鎌田 栄一, 広瀬明彦	OECD化学物質対策の動向 (第22報) - 第1回OECD 化学物質共同評価会議 (20 11年パリ)	化学生物総合 管理	9	112-118	2013
松本真理子, 宮地繁樹, 菅谷芳雄, 広瀬明彦	OECD化学物質共同評価プ ログラム: 第1回化学物質共 同評価会議概要	化学物質総合 管理	9	92-99	2013
松本真理子, 宮地繁樹, 菅谷芳雄, 広瀬明彦	OECD化学物質共同評価プ ログラム: 第2回化学物質共 同評価会議概要	化学物質総合 管理	9	100-111	2013
松本真理子, 宮地繁樹, 菅谷芳雄, 広瀬明彦	OECD化学物質共同評価プ ログラム: 第3回化学物質共 同評価会議概要	化学物質総合 管理	9	222-231	2013
松本真理子, 宮地繁樹, 菅谷芳雄, 広瀬明彦	OECD化学物質共同評価プ ログラム: 第4回化学物質共 同評価会議概要	化学物質総合 管理	9	232-240	2013

IV. 研究成果の刊行物・別刷