

Fig. 3. 高脂肪食およびMeIQx投与 *gpt delta* マウスにおける絶対肝重量
 $*p < 0.05$ v. s control group, $\#p < 0.05$ v. s MeIQx group

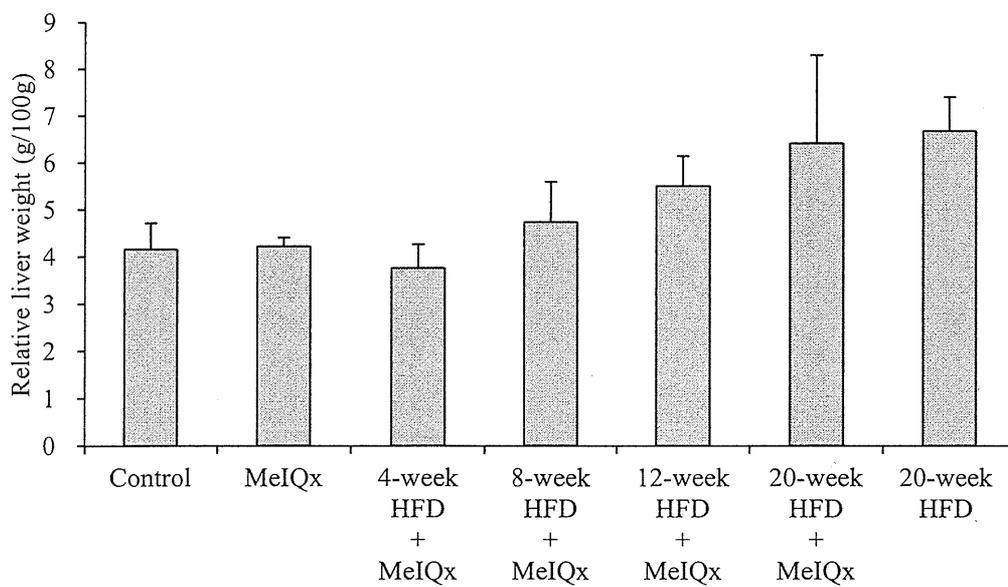


Fig. 4. 高脂肪食およびMeIQx投与 *gpt delta* マウスにおける相対肝重量

Table 1. 高脂肪食およびMeIQx投与*gpt* deltaマウスにおける*gpt*変異体頻度

Treatment	Animal No.	Cm ^R colonies (x 10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant frequency (x10 ⁻⁵)	Mean ± S.D.
Control	1	11.4	4	0.35	0.44 ± 0.08
	2	11.1	5	0.45	
	3	7.7	4	0.52	
MeIQx	11	7.7	13	1.69	1.28 ± 0.35
	12	14.9	16	1.07	
	13	11.1	12	1.08	
4-week HFD + MeIQx	61	12.1	6	0.50	0.88 ± 0.40
	62	7.0	9	1.29	
	63	18.7	16	0.86	
8-week HFD + MeIQx	21	14.1	17	1.21	1.11 ± 0.56
	22	5.9	3	0.51	
	23	15.4	25	1.62	
12-week HFD + MeIQx	31	9.2	10	1.09	0.92 ± 0.20
	32	16.3	16	0.98	
	33	10.0	7	0.70	
20-week HFD + MeIQx	41	9.2	11	1.20	0.87 ± 0.29
	42	11.7	9	0.77	
	43	11.0	7	0.64	
20-week HFD	51	13.5	7	0.52	0.56 ± 0.06
	52	15.7	10	0.64	
	53	11.2	6	0.54	

Table 2. 高脂肪食およびMeIQx投与*gpt delta*マウスにおけるSpi-変異体頻度

Treatment	Animal No.	Plaues within XL-1 Blue MRA (x10 ⁵)	Plaque within WL95 (P2)	Mutant frequency (x10 ⁻⁵)	Mean ± S.D.
Control	1	20.6	6	0.29	0.40 ± 0.25
	2	50.9	11	0.22	
	3	20.3	14	0.69	
MeIQx	11	21.3	12	0.56	0.44 ± 0.12
	12	23.9	8	0.33	
	13	24.1	10	0.41	
4-week HFD + MeIQx	61	28.3	12	0.42	0.50 ± 0.33
	62	19.1	4	0.21	
	63	25.4	22	0.87	
8-week HFD + MeIQx	21	26.9	9	0.33	0.33 ± 0.04
	22	50.9	15	0.29	
	23	32.7	12	0.37	
12-week HFD + MeIQx	31	15.7	11	0.70	0.42 ± 0.25
	32	24.4	9	0.37	
	33	19.9	4	0.20	
20-week HFD + MeIQx	41	15.8	5	0.32	0.26 ± 0.08
	42	28.9	5	0.17	
	43	38.8	11	0.28	
20-week HFD	51	12.2	4	0.33	0.26 ± 0.08
	52	32.4	9	0.28	
	53	17.6	3	0.17	

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）
平成 27 年度分担研究報告書

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： 食品中残留農薬の複合暴露影響に関する研究

1. ラットにおける有機リン剤の複合投与神経毒性
ライフステージによる有機リン剤の複合暴露に対する感受性

分担研究者	原田孝則	(一財) 残留農薬研究所	
協力研究者	元村淳子	(一財) 残留農薬研究所	毒性部神経毒性研究室
	首藤康文	(一財) 残留農薬研究所	毒性部神経毒性研究室
	武田眞記夫	(一財) 残留農薬研究所	毒性部分子毒性研究室
	藤江秀彰	(一財) 残留農薬研究所	毒性部神経毒性研究室
	林 宏一	(一財) 残留農薬研究所	毒性部神経毒性研究室
	小松 豊	(一財) 残留農薬研究所	毒性部神経毒性研究室
	田島 均	(一財) 残留農薬研究所	毒性部神経毒性研究室
	大塚亮一	(一財) 残留農薬研究所	毒性部分子毒性研究室
	山口 悟	(一財) 残留農薬研究所	毒性部分子毒性研究室

研究要旨

異なる 2 種類の有機リン系農薬のパラチオン (P) とメタミドホス (M) を P0.3+M0.4 mg/kg/day、P0.6+M0.8 mg/kg/day の用量で若齢期、成熟期及び妊娠中期 (投与期間: GD6-GD13)、後期 (投与期間: GD6-GD20) に反復経口投与すると、妊娠中期では死亡を含む重篤な神経症状を示し、その毒性は成熟期、若齢期の順に減弱することを平成 26 年度の調査研究で明らかにした。当該試験では、平成 26 年度の試験で得られた肝臓および血清を用いて、酸化ストレスのバイオマーカーである過酸化脂質、有機リン酸塩を加水分解する酵素 (Paraoxygenase-1:PON1)、有機リン剤の代謝に関与する薬物代謝酵素として *cyp1a2* および *cyp3a23*、さらに *pon1* の mRNA 発現量を RT-PCR 法により検討した。一般状態の観察では用量相関性、暴露時期による症状の発現に違いがあることを確認したが、当該試験の測定結果からは、暴露時期による薬物代謝酵素発現の明確な差を確認することは出来なかった。しかし、妊娠中期の過酸化脂質の増加と *pon1* mRNA 発現量の低下に相関性を認め、酸化ストレスが *pon1* 発現量の低下に影響を及ぼすことが示唆された。また、妊娠中に低下する *cyp1a2* の遺伝子発現量は、妊娠中期に低下した。一方、パラチオンを活性代謝物のパラオクソンに代謝する *cyp3a23* は妊娠中期に高いことを確認した。*cyp3a23* によって代謝されたパラオクソンは *pon1* の低下によって無毒化できず、また *cyp1a2* の発現量の低下

によって、2種類の有機リン剤を代謝・分解出来ないため妊娠中期に重篤な神経症状が認められたものと推察した。尚、*pon1* 遺伝子発現量と、血清 PON1 活性との明らかな相関性は認められなかった。

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、これまでに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若齢期、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。成熟期及び妊娠期における毒性は、単剤よりも複合投与された成熟期の雌ラットでは死亡を含む重篤な神経毒性症状を示さないのに対し、妊娠期の暴露は死亡を含む重篤な神経毒性症状を示した。若齢期の雌ラットは、成熟期よりも発現する神経症状の程度は低かった。毒性発現に影響する因子として、種差、性差あるいは年齢等がある。He XJ.らは妊娠期あるいは哺乳期では、薬物代謝酵素の発現レベルが異なることを報告している^{1),2)}。また、平成 25 年度の本事業³⁾において、複合暴露に対するライフステージによる感受性変化に影響を与えている要因について無処置の若齢期、成熟期及び妊娠中期・後

期の雌ラットを用いて検討したところ、妊娠後期で有機リン酸塩を加水分解する酵素 Paraoxogenase-1 (PON-1)、薬物代謝酵素の CYP1A および 3A の有意な低下を認めた。またストレス因子の Corticosterone (CORT) は妊娠中期で高い値を示した。妊娠期の各種代謝酵素の変化やストレスが薬物に対する感受性に影響を及ぼしていることを報告した。

平成 26 年度はパラチオン及びメタミドホスを若齢期、成熟期及び妊娠期(妊娠中期/後期)の雌ラットに複合反復経口投与をし、神経症状の発現とそれに関連する因子を測定した。また、妊娠期における重篤な神経症状の発現は、妊娠初期から後期に掛けた体重増加に伴い投与量が多くなることに起因するという可能性を検討した。

平成 27 年度は平成 26 年度の試験で得られたサンプルを用いて、酸化ストレスのバイオマーカーである過酸化脂質、有機リン酸塩を加水分解する酵素 Paraoxogenase-1 (PON1) 代謝活性、*pon1*、有機リン系農薬の代謝に関わるとされる *cyp1a2* および *cyp3a23* の遺伝子発現量を測定した。

B. 研究方法

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-DiethylO-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. 試験試料

平成 26 年度に実施した「1. ラットにおける有機リン剤の複合投与と神経毒性 ライフステージによる有機リン剤の複合暴露に対する感受性」¹⁾ (動物実験委員会承認番号: AC14056) で得られた、若齢、成熟期、妊娠中期および後期の Wistar Hannnover 系 SPF ラット [CrI:WI (Han)] (日本チャールス・リバー株式会社日野生産所 (滋賀県) の肝臓および血清を用いた。

3. 試験群、投与用量および投与方法

これまでに我々は若齢期、成熟期および妊娠期中における雌動物のパラチオンおよびメタミドホスの複合毒性影響について検討してきた。若齢期(A群)、成熟期(B群)、妊娠期中 [中期(C群)/後期(D群)] を設け、さらに妊娠期間中の生理学的変化が発現する毒性を増強すると考え、偽妊娠動物 (妊娠中期[(C'群)/妊娠後期(D'群)]) を設置した。

若齢期は 3 週齢、成熟期は 7 週齢で購入し、各々試験環境下で 4 日間、あるいは 7 日間馴化させた。馴化期間中は生死の確認を含む、一般状態の観察を毎日実施した。

7 日間の馴化後、成熟期の雌の一部を妊娠および偽妊娠動物を得るため、スメアを採取して交配適期を確認した。交配適期と確認された雌動物は雄動物と 1:1 で一晩同居をさせ、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、妊娠 0 日 (GD0) とした。一方、偽妊娠動物は交配適期を確認した後、夕方 (18:00) にガラス棒および綿棒を用いて子宮膣部をタッピングして刺激を与えた。その後スメアを採取し、3 日間の休止期を確認した動物を偽妊娠成立 (PD0) とした。

投与用量は妊娠中に死亡を含む重篤な神経症状を示す、パラチオン (P) 0.6 mg/kg、メタミドホス (M) 0.8 mg/kg を混合したものを高用量 (P 0.6+M 0.8 mg/kg/day) とした。また、死亡はないが何らかの神経症状の発現が予想される用量として、P 0.3 mg/kg および M 0.4 mg/kg を混合したものを低用量 (P 0.3+M 0.4 mg/kg/day) とし、溶媒を投与する対照群 (0 mg/kg/day) を設置した。投与経路は胃ゾンデを用いた反復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、またヒト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、若齢期および成熟期は 14 日間、妊娠中期および偽妊娠中期は GD6-GD13/PD6-PD13、妊娠後期および偽妊娠後期は GD6-GD20/PD6-PD20 とした。

4. 被験物質投与液の調製

各用量群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% Tween 80 水溶液 (Tween80、和光純薬工業株式会社) にてパラチオンを濃度 0.15 mg/mL (用量 0.3 mg/kg) および 0.30 mg/mL (用量 0.6 mg/kg) に調製し、メタミドホスは 0.20 mg/mL (用量 0.4 mg/kg) および 0.40 mg/kg (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、投与前に室温に戻して使用した。

5. 測定項目

5.1. 過酸化脂質

酸化ストレス指標の過酸化脂質を、肝臓を用いた TBA 法 (2-thiobarbituric acid 法) で測定した。ホモジネートした肝臓に 1% Phosphoric Acid (和光純薬工業株式会社) を加え、0.67% TBA を加え、混合。沸騰水浴中で加熱 (95°C、10 分間) 後、氷冷水槽で冷却した。1-Butanol (和光純薬工業株式会社) を加え、振盪抽出し、遠心分離 (1600×g, 4°C, 10 分間) した。上清を分光光度計 [吸光度 535nm および 520nm] で測定した。

5.2. Paraoxonase 1 測定

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 Paraoxonase1 (PON1) を測定した。測定にはパラオキソナーゼ (PON-1: Paraoxonase 活性) 測定キット (日研ザイル株式会社) を用いた。尚測定には、若齢期、成熟期および妊娠中期の血清サンプルを用いた。

5.3. *pon1*, *cyp1a2*, *cyp3a23* mRNA 発現

肝臓を用いて *pon1*, *cyp1a2*, *cyp3a23* の mRNA 発現量を測定した。mRNA を定量化するため、肝臓をホモジネートし、real-time PCR 法でそれぞれの遺伝子と GAPDH を増幅し、発現量を GAPDH との相対的定量法で算出した。

6. 有意差検定

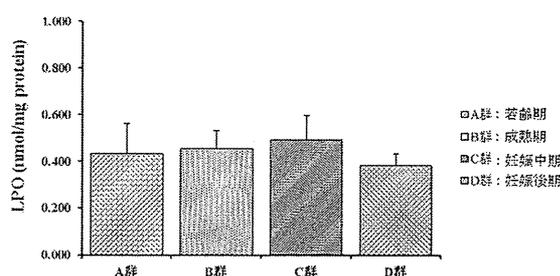
各測定項目の結果は、成熟期との統計学的有意差を危険率5および1%レベルで解析し、Student's *t*-test を実施して有意差の有無を判定した。

C. 研究結果

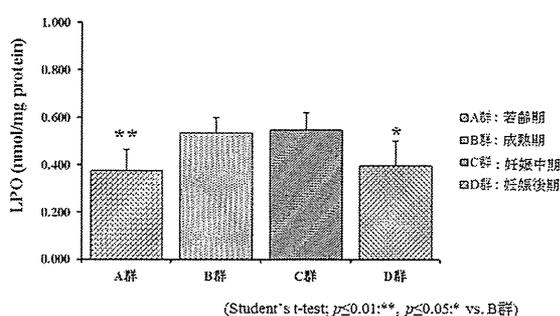
1. 過酸化脂質

酸化ストレス指標の過酸化脂質は、0 mg/kg/day では各試験群間における統計学的有意差は認められなかった。P0.3+M0.4 mg/kg/day では若齢期および妊娠後期で成熟期と比較して有意な低値を示した。P0.6+M0.8 mg/kg/day においても若齢期および妊娠後期で低い値を示した。一方、妊娠中期は、0 mg/kg/day で僅かに高い値を示し、さらに P0.3+M0.4 mg/kg/day および P0.6+M0.8 mg/kg/day では、用量相関性に高い値を示した。偽妊娠動物では、成熟期と妊娠中期と同程度であった。

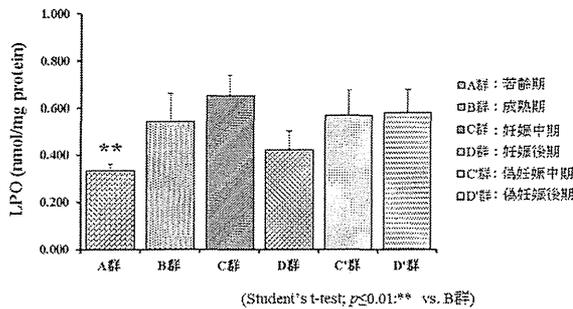
【0 mg/kg/day】本文図 1-1



【P0.3+M0.4 mg/kg/day】本文図 1-2



【P0.6+M0.8 mg/kg/day】 本文図 1-3

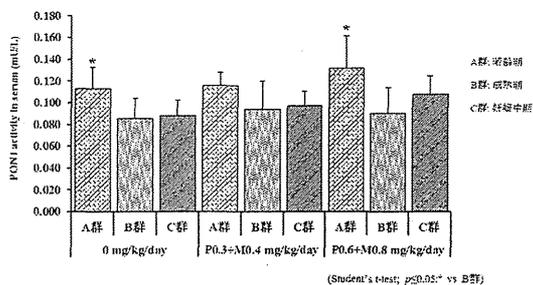


2. 血清 PON1 活性

死亡を含む重篤な神経症状が認められた妊娠中期における PON1 活性について血清を用いて測定した。また、ライフステージによる違いを検討するため、若齢期および成熟期についても検討した。

若齢期では活性は有意に高く、用量相関性に高い値を示した。成熟期では投与に起因する変化は認められなかったが、妊娠中期では、用量相関性に PON1 が活性することを確認した。

【血清 PON1】 本文図 2



3. *pon1*, *cyp1a2*, *cyp3a23* mRNA 発現

pon1, *cyp1a2* および *cyp3a23* mRNA の発現量を定量解析した。

pon1 の発現量は、0 mg/kg/day では若齢期および妊娠中期で低く、P0.3+M0.4 mg/kg/day では、妊娠中期および妊娠後期

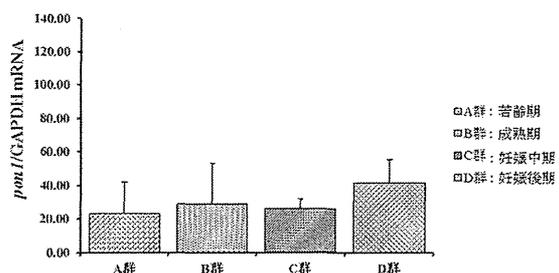
で有意な低値を示した。P0.6+M0.8 mg/kg/day では妊娠および偽妊娠動物で有意に高かった。

cyp1a2 の発現量は、0 mg/kg/day では若齢期および妊娠中期で低く、P0.3+M0.4 mg/kg/day では妊娠後期で有意に高い。P0.6+M0.8 mg/kg/day では若齢期および妊娠中期で成熟期よりも有意な低値を示すが、P0.3+M0.4 mg/kg/day よりも高い値を示すことから、用量相関性に発現量が多いことが分かる。

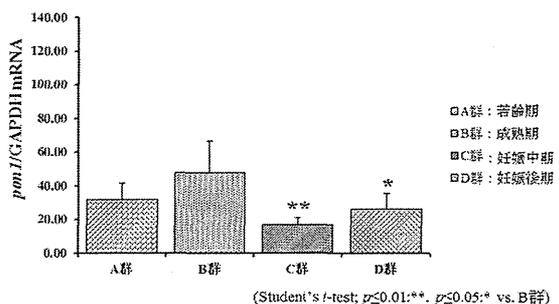
cyp3a23 の発現量は、0 mg/kg/day および P0.3+M0.4 mg/kg/day で若齢期および妊娠中期で有意に高い値を示したが、ほぼ同程度の発現量であった。P0.6+M0.8 mg/kg/day では各試験群で有意差を認めないが、各試験群で P0.3+M0.4 mg/kg/day と同程度あるいは僅かな増減を示した。

pon1 本文図 2.1-2.3

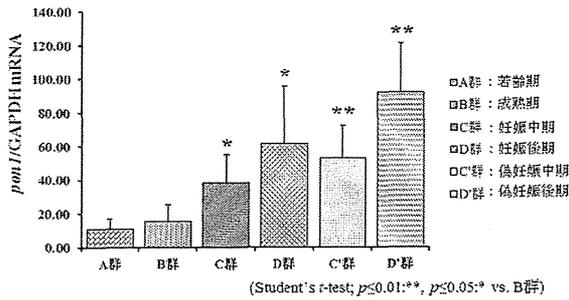
【0 mg/kg/day】



【P0.3+M0.4 mg/kg/day】

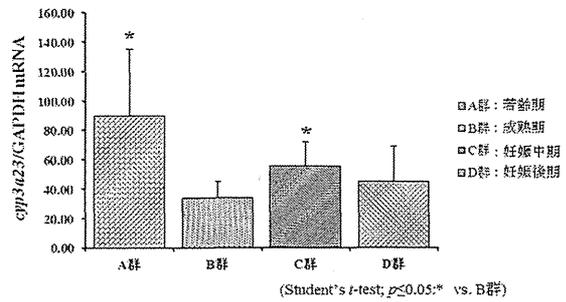


【P0.6+M0.8 mg/kg/day】



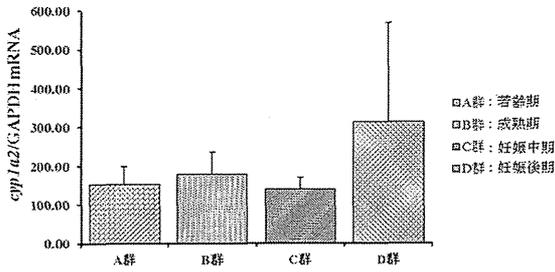
cyp3a23 本文図 2.7-2.9

【0 mg/kg/day】

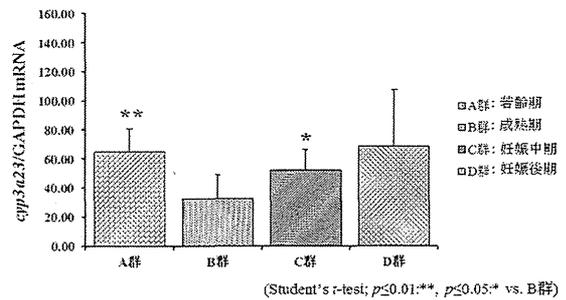


cyp1a2 本文図 2.4-2.6

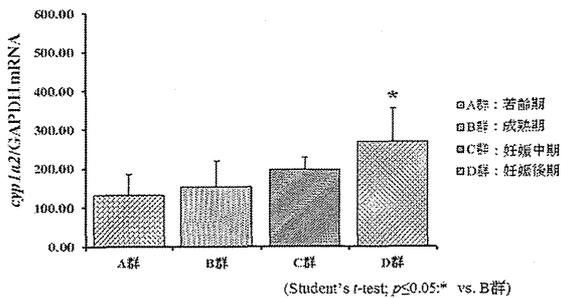
【0 mg/kg/day】



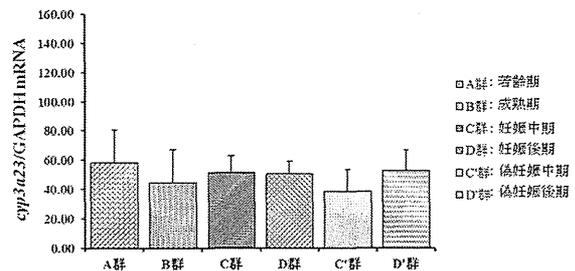
【P0.3+M0.4 mg/kg/day】



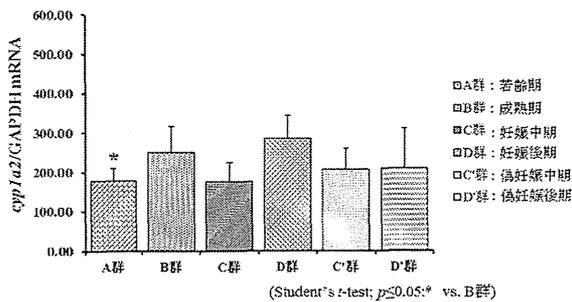
【P0.3+M0.4 mg/kg/day】



【P0.6+M0.8 mg/kg/day】



【P0.6+M0.8 mg/kg/day】



D. 考察

1. 過酸化脂質

酸化ストレスのバイオマーカーである過酸化脂質は、活性酸素による細胞膜の脂質が酸化されることによって生じ、細胞機能に影響を及ぼす。

身体的・精神的ストレスによって分泌される Corticosterone (CORT) は妊娠初期で

は経時的に増加し、出産直後では妊娠初期の20倍以上に上昇するが、出産後5日までに正常範囲内に低下する²⁾。一方、CORTは出生直後、ストレス反応減少期であるため、一般的にストレスによる上昇が少ないとされている。

当該試験では0 mg/kg/dayの妊娠中期で僅かに過酸化脂質の上昇が認められ、用量相関性に高い値を示すことから、妊娠による胎児の発育に伴う生理活性学的変化に伴うストレスに加え、被験物質投与に起因する生体への影響により、過酸化脂質が上昇したと考える。一方、若齢期では0 mg/kg/day、P0.3+M0.4 mg/kg/day および P0.6+M0.8 mg/kg/day でいずれも他の試験群よりも低く、さらに同程度であった。これは、若齢期のストレスに対する感受性が低いこと、また被験物質投与による一般状態が他の試験群よりも極軽微であったためと考える。

2. 血清 PON1 活性

血清を用いた Paraoxonase (PON1) 活性から、血清における PON1 を測定した。PON1 は妊娠期で低下することが報告され^{3), 4)}、また離乳前の動物では日齢に応じて Cholinesterase (ChE) や PON1 などの活性が高くなることが報告されている。そのため、妊娠期や離乳前の動物では毒性が強くと発現する、あるいは生体に強い影響を及ぼすことが知られている^{5), 6), 7)}。当該試験では、PON1 活性の妊娠期における低下が認められず、さらに若齢期における活性が成熟期よりも高く、週齢に相関した PON1 活性の変化は認められなかった。

3. *pon1*, *cyp1a2*, *cyp3a23*mRNA 発現

有機リン剤の代謝に関わるとされている各種薬物代謝酵素の mRNA 発現について検討をした。

pon1 は 0 mg/kg/day では若齢期および妊娠中期で低く、P0.3+M0.4 mg/kg/day においても、同様であった。P0.6+M0.8 mg/kg/day では若齢期で最も低く、妊娠中期および後期で高い値を示した。偽妊娠動物では成熟期よりも有意に高く、特に偽妊娠後期では非常に高い値を示した。0 mg/kg/day で認められた妊娠中期における低い発現量は、妊娠期に PON1 活性が低下するという報告^{3), 4)}と一致する。さらに、妊娠期の PON1 活性の低下は、酸化ストレスによる生体内の酸化還元バランスが崩れることによると報告されている⁸⁾。一方、エストロゲンによって PON1 活性が増加するという報告がある⁹⁾。エストロゲンは、妊娠期に卵巣と胎盤からの分泌が多くなり増大する。偽妊娠動物は、交尾後の妊娠動物と同様に完全生殖周期と考えられ、非妊娠動物よりも多くエストロゲンが分泌されたことによって、偽妊娠動物における *pon1* の高い発現量が示されたと考えた。一方、*pon1* 発現量が妊娠期で低下するという点については明らかにできなかったが、妊娠中期の過酸化脂質が高い事を確認し、妊娠に伴う酸化ストレスが *pon1* の発現量に僅かに影響すると思った。しかし、P0.6+M0.8 mg/kg/day における高い *pon1* の発現量については、明確にできなかった。

cyp1a2 および *cyp3a23* がパラチオンやクロルピリホスの代謝に関与すると報告され¹⁰⁾、また、CYP3A23 がパラチオンの活性代謝物であるパラオクソンを産生するこ

とが報告¹¹⁾されていることから、*cyp1a2* および *ctp3a23* の遺伝子発現量について検討した。*cyp1a2* は妊娠中に低下することが報告されており¹²⁾、0 mg/kg/day の妊娠中期では低い値を示した。*cyp3a23* は 0 mg/kg/day および P0.3+M0.4 mg/kg/day で若齢期および妊娠中期で有意に高い発現量を示すが、P0.6+M0.8 mg/kg/day では各試験群で有意な変化は認めなかった。当該試験では妊娠中期に *cyp1a2* の発現量が僅かに低下することを確認した。妊娠期における薬物代謝酵素活性の変化が胎児や母体に対する影響が示唆されているが¹³⁾、今回の実験では確認出来なかった。

E. 結論

対照群（投与用量 0 mg/kg/day）では、妊娠中期に *pon1* および *cyp1a2* mRNA 発現量が低下することを確認した。一方、複合投与群では *cyp3a23* は高い値を示したことから、*cyp3a23* によってパラチオンの活性代謝物であるパラオクソンを *pon1* の低下によって、無毒化できず、さらに、有機リン剤の代謝に関与する *cyp1a2* の低下がメタミドホスの代謝に影響を与えた結果、妊娠中期に死亡を含む重篤な神経症状が認められたと考えた。そして、妊娠中期には酸化ストレスのバイオマーカーである過酸化脂質が僅かに増加していたことから、胎児の発育に伴う母体の生理学的変化は生体に対するストレスとなり、抗酸化物質でもある *pon1* の低下に影響しているものと推察した。但し、今回の実験では *pon1* mRNA 発現量と血清 PON1 活性との明らかな関連性は認められなかった。また、P0.3+M0.4 mg/kg/day および P0.6+M0.8 mg/kg/day における各試験群の薬物代謝酵

素の発現量についての用量相関性及び投与の影響に明確な差違は認められなかった。

F. 参考文献

- 1) 一般財団法人残留農薬研究所: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）食品中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 26 年度分担研究報告書『ラットにおける有機リン剤の複合投与神経毒性ライフステージによる有機リン剤の複合暴露に対する感受性』、2014 年
- 2) Noguchi, M. Change in human serum corticosterone and cortisol during pregnancy, Labor and delivery. Nihon sanko fujinka gakkai zasshi 40, 14-20, 1988.
- 3) Ferre' N., Camps, J., Fernandez-Ballart, J., Arija, V., Murphy, M., Marsillach, J., and Joven, J. Longitudinal changes in serum paraoxonase-1 activity throughout normal pregnancy. Clin. Chem. Lab. Med. 44, 880-882, 2006.
- 4) Fortin, M., C., Aleksunes, L., M., and Richardson, J., R.. Alteration of expression of pesticide metabolizing enzymes in pregnant mice: potential role in the increased vulnerability of the developing brain. Drug Mrtab. Dispos. 41, 326-331, 2013.
- 5) Timchalk, C., Poet, T., S., and Kousba,

- A., A. Age-dependent pharmacokinetic and pharmacodynamics response in preweanling rats following oral exposure to the organophosphorus insecticide chlorpyrifos. *Toxicology* 220, 13-25, 2006.
- 6) Engel, S., M., Wetmur, J., Chen, J., Zhu, C., Barry, D., B., Canfield, R., L., and Wolff, M., S. Prenatal exposure to organophosphates, paraoxonase 1, and cognitive development in childhood. *Environ. Health Perspect.* 119, 1182-1188, 2011.
- 7) Peiris-John, R., J., and Wickremasinghe, R. Impact of low-level exposure to organophosphates on human reproduction and survival. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102, 239-245, 2007.
- 8) Stefanovic' A., Ardalic, D., Kotur-Stevuljelic' J., Vujovic' A., Spasic, A., Spasojevic'-Kalimanovska, V., Jelic-Ivanovic, Z., Mandic-Markovic, V., Mikovic, Z., and Cerovic, N. Longitudinal changes in pon1 activity, pon1 phenotype distribution and oxidative status throughout normal pregnancy. *Reproductive Toxicology* 33, 20-26, 2012.
- 9) Ahmad, S., and Scott, J., F. Estradiol enhances cell-associated paraoxonase 1 (PON1) activity in vitro without altering PON1 expression. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 397, 441-446, 2010.
- 10) Butler, A., M., and Murray, M. Biotransformation of parathion in human liver: participation of CYP3A4 and its inactivation during microsomal parathion oxidation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280, 966-973, 1997.
- 11) Hurh, E., Lee, E., Lee, A., Kim, Y., Kim, S., Kim, S., and Lee, M. Effects of enzyme inducers or inhibitors on the pharmacokinetics of intravenous parathion in rats. *Biopharm Drug Dispos.* 21, 193-204, 2000.
- 12) He, X., J., Ejiri, N., Nakayama, H., and Doi, K. Effects of pregnancy on CYPs protein expression in rat liver. *Exp. Mol. Pathol.* 78, 64-70, 2005.
- 13) Fortin, M., C., Aleksunes, L., M., and Richardson, J., R. Alteration of expression of pesticide-metabolizing enzymes in pregnant mice: potential role in the increased vulnerability of the developing brain. *Drug Metab. Dispos.* 41, 326-331, 2013.

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 元村 淳子、首藤 康文、林 宏一、藤江 秀彰、小松 豊、田島 均、大塚 亮一、山口 悟、牧野 絵美、小嶋 五百合、青山 博昭、原田 孝則：有機リン剤の複合暴露の Life stage

による変化-ChE と PON1 活性の影響評価-
第 42 回日本毒性学会 2015 年 7 月

H. 知的財産権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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： 「食品中の残留農薬の複合暴露影響に関する研究」

II. 免疫毒性に関する研究

研究分担者： 原田孝則 （一財） 残留農薬研究所
研究協力者： 田食里沙子 （一財） 残留農薬研究所 毒性部免疫・急性毒性研究室
福山朋季 （一財） 残留農薬研究所 毒性部免疫・急性毒性研究室
渡部優子 （一財） 残留農薬研究所 毒性部免疫・急性毒性研究室
黒澤好 （一財） 残留農薬研究所 毒性部免疫・急性毒性研究室
小坂忠司 （一財） 残留農薬研究所 試験事業部

研究要旨

これまで我々は、成獣に対する複合農薬暴露による免疫毒性影響を調査し、有用な結果を得てきた。当該研究では、農薬複合暴露が各ライフステージ、特に免疫機能発達期にどのように影響を及ぼすかに着目し実験を行った。初年度の平成 25 年度では候補農薬の選定とマウスを用いた吸入アレルギー実験系の確立を、平成 26 年度では候補農薬を含む各種化学物質の母動物への単剤暴露による次世代の吸入アレルギー影響の確認を目的に実験を行い、それぞれ有用な結果を得た。平成 27 年度では、候補農薬の中から多環芳香族炭化水素化合物（ベンゾ[a]ピレン）、有機塩素系化合物（メトキシクロル）および有機リン系化合物（パラチオン）を選択し、各被験物質を妊娠後期の母動物に単剤、もしくは複合暴露後、生まれてきた児動物の呼吸器アレルギーに及ぼす影響を調査した。その結果、メトキシクロルないしパラチオンを母動物に単剤投与した児動物において、リンパ節中サイトカイン産生量が対照群と比較し有意に増加した。ベンゾ[a]ピレン投与群では、反応が有意でなかったものの、他 2 剤と同様に呼吸器アレルギー反応の増強が認められた。また、メトキシクロルとパラチオンを母動物に複合投与した児動物において、炎症性細胞数およびケモカイン産生量、リンパ節中サイトカイン産生量が各単剤を母動物に投与された群と比較して有意に増加した。従って、ベンゾ[a]ピレン、メトキシクロルおよびパラチオンの妊娠期における投与は、呼吸器アレルギー反応に対して増強効果を示し、さらにメトキシクロルとパラチオンを複合投与することにより、その作用が相乗的に増加することが示唆された。

A. 研究目的

食品中に残存する農薬の安全性について、単剤における評価は、登録時に十分になされておらず、問題とはならない。しかし、農薬の複合毒性については、社会的関心は高いものの、実験上およ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。我々の実験班ではこれまでに、有機塩素剤や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で調査し、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してきた。

本研究では、初年度（平成 25 年度）に候補農薬の選定およびマウスを用いた吸入アレルギー実験系の確立をおこなった。2 年目（平成 26 年度）には候補農薬の母動物への単剤暴露による次世代の吸入アレルギー影響の確認を行い、被験物質の母動物への投与が児動物の呼吸器アレルギー反応を悪化させることが判明した。本年度は、複合暴露による影響を調査するため、免疫系への影響が示唆される有機塩素系農薬および有機リン系農薬を対象に、妊娠期に複合的に反復経口投与した際の児動物への吸入アレルギー疾患に及ぼす影響を調査した。

B. 研究方法

本研究では多環芳香族炭化水素化合物（ベンゾ[a]ピレン）、有機塩素系化合物（メトキシクロル）および有機リン系化合物（パラチオン）を妊娠 13 日目の雌性 BALB/c マウスに 5 日間反復経口投与し、生まれてきた児動物の 8 週齢時に呼吸器アレルギーを発症する TMA を用いて呼吸器アレルギーを惹起した後に各種免疫学的因子測定を行い、呼吸器アレルギー反応の増強影響を検索した。

1. 被験物質

使用した被験物質情報を下記に示す。供給元は和光純薬工業株式会社（大阪府）ないしシグマ アルドリッチジャパン合同会社（東京都）であった。

名称： メトキシクロル標準品
純度： 97.0%以上
分子量： 345.65
外観： 白色結晶性粉末
保管条件： 冷蔵暗所

名称： パラチオン
純度： 97.0%以上
分子量： 291.26
外観： 無色透明
保管条件： 冷蔵暗所

名称： ベンゾ[a]ピレン
純度： 96.0%以上
分子量： 252.31
外観： 白色結晶性粉末
保管条件： 冷蔵暗所

名称： トリメリト酸無水物
 (Trimellitic anhydride)
純度： 97.0%以上
分子量： 192.13
CAS 番号： 552-30-7
外観： 白色~わずかにうすい黄色
保管条件： 室温暗所

2. 試験動物

日本クレア株式会社富士生育場（静岡県）で生産された近交系 SPF マウス (BALB/cAJcl) の雌動物を用いた。Balb/c マウスは免疫・アレルギー研究での使用に適している系統動物である。試験動物は妊娠 8 日目（10-13 週齢）にて購入し、5 日間試験環境に馴化した後、7 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 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、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。

3. 試験群

ベンゾ[a]ピレン、メトキシクロルおよびパラチオンは、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、パラチオンは、0.15 mg/kg、メトキシクロルとベンゾ[a]ピレンは 10 mg/kg を設定した。また媒体のみを投与する媒体対照群を設定した。複合投与においては、上記濃度に調製した投与液を等量ずつ混合して作成した。TMA 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、感作には 0.3%濃度で動物に投与を、惹起（吸入暴露）には 0.5mg/L 濃度を設定した。媒体対照群の動物は、成熟後にさらに TMA を投与しない無処置群（Intact）と対照群（Control）の 2 群に区別した。

4. 被験物質投与液の調製

初回投与直前に調製した。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。目標濃度となるよう、コーンオイルを用いて調製し、必要に応じて超音波処理やマグネチックスターラー等での混合を実施した。投与液の調製時に均一性を目視により確認した。また、投与終了時の残余液について、調製直後と比べて変化していないことを目視にて確認してから廃棄した。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。

経皮感作用の TMA 溶液は用時調製とした。純度換算は行わず、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。吸入惹起用の TMA は暴露前に平均粒子径が 2 µm 以下となるように粉碎処理を行い、吸入ダストとして暴露を行った。投与量を表 1 に示した。

5. 被験物質の投与

ベンゾ[a]ピレン、メトキシクロルおよびパラチオンは、各用量の被験物質投与液を妊娠 13 日目から 5 日間にわたって強制経口投与した。経口による暴露はヒトで予想される本被験物質の主たる暴露経路に一致する。強制経口投与方法は反復経口投与毒性試験で通常用いられている方法である。被験物質の投与液をスターラー等で攪拌して均質な状態に保ち、注射筒内に吸い上げ、胃ゾンデを用いて強制経口投与した。

6. 被験物質投与方法およびスケジュール

TMA による経皮感作は、産まれて来た仔動物の 8 週齢時より開始し、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、ピペットを用いて左右の耳介後方に 25 µL ずつ解放経皮投与した。吸入暴露は、投与毎に同一チャンバー内で 30 分の連続暴露を行った。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マウス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。暴露システムの概要および動物の装着部位を図 1 に示した。被験物質等ダストの発生は、空気流動型鼻部暴露チャンバーおよびターンテーブル型ダストフィーダー（DF-3、ターンテーブル TA32、柴田科学株式会社、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ダストフィーダーに供給した。暴露チャンバーへの空気供給は、ダストフィーダーのエジェクター流量が 20 L/min になるように調整することで行った。排気はプロアー（TFO-K4P、株式会社日立製作所、東京都）で行い、バグフィルター、ヘパフィルターおよ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。ダストフィーダーのエジェクター

流量が 20 L/min に保たれていることを暴露中確認した。上記条件下では、暴露チャンバー内に被験物質等ダストが安定的に充填するまでの時間 (t₉₅) は 5 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。投与スケジュールは図 2 に示した。

Group	投与量		
	妊娠動物	児動物	
	(mg/kg/day)	(mg/animal/day)	(mg/animal/day)
BaP	10		
MXC	10		
PARA	0.15	0.15	0.5
BaP+MXC	5+5		
BaP+PARA	5+0.075		
MXC+PARA	5+0.075		

表 1 投与量

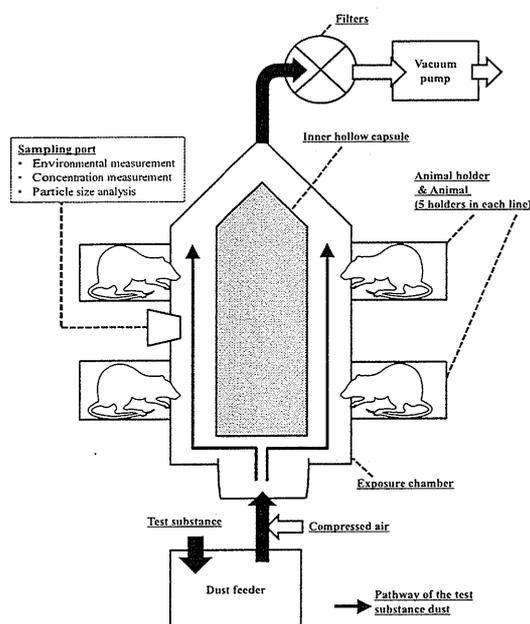


図 1 吸入暴露システム



図 2 被験物質投与スケジュール

7. 観察および検査項目

7.1. 死亡および臨床症状の観察

全動物について、投与期間中少なくとも 1 日 1 回、臨床症状、瀕死状態ないし死亡の有無をケージサイドから観察した。

7.2. 組織採取

最終吸入惹起の翌日、全動物についてペントバルビタール注射麻酔下で後大静脈から採血の後に安楽殺し、肺胞洗浄液 (BALF) および肺門リンパ節を採材した。血液は遠心して血清を分離し、一部を ELISA 法 (BD OptEIA mouse IgE Set) による血清中の IgE 産生量測定に用いた。BALF はフローサイトメトリー法による各種細胞数解析 (好酸球、肥満細胞、抗塩基球) に供した。肺門リンパ節は、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 μm メッシュ) 上で播りつぶし、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。細胞懸濁液の一部はフローサイトメーターを用いて記憶ヘルパー T 細胞数および記憶傷害性 T 細胞数を測定した。また、CD3 および CD28 抗体と 24 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、9、17A) を定量した。

7.3. BALF の解析

BALF 中細胞分画測定はフローサイトメーターを用いて実施した。解析には、APC 標識抗マウス CD49b 抗体、PE 標識抗マウス CD49d 抗体、PerCp-Cy5.5 標識抗マウス Gr-1 抗体、APC-Cy7 標識抗マウス CD11c 抗体、PE-Cy7 標識抗マウス CD117 抗体および FITC 標識抗マウス FCRI 抗体 (全て日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) を用い、好中球および好酸球を染色した。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、フローサイトメーターを用いて解析を実施した。

7.4. 肺門リンパ節細胞の解析

肺門リンパ節中細胞分画測定は、フローサイトメーターを用いて実施した。解析には APC 標識抗マウス CD3 抗体、PE-Cy7 標識抗マウス CD4 抗体、APC-Cy7 標識抗マウス CD8 抗体および PE 標識抗マウス CD62L 抗体（全て日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）を用い、記憶ヘルパー T 細胞数および記憶傷害性 T 細胞数を測定した。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、フローサイトメーターを用いて解析を実施した。

また、無菌化で調製した肺門リンパ節細胞 5×10^5 個について、48 穴培養プレート上で CD3 および CD28 抗体 (Dynabeads Mouse T-Activator CD3/CD28) と共に CO₂ インキュベーター (37°C、5%CO₂) で 24 時間共培養し、細胞上清中のサイトカイン産生量 (IL-4、5、9、13、17A) を測定した。

8. 有意差検定

各検査項目について、対照群と各被験物質投与群間の統計学的有意差の有無を危険率 5 および 1% レベルで解析した。

最初に各データについて 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動物実験規程に基づき、国際実験動物ケア評価認証協会 (AAALAC International) 認証の試験施設において実施した (動物実験委員会承認番号; AC15006)。

C. 研究結果

1. 血清中 IgE 量

血清中 IgE 産生量測定結果を図 3 に示す。パラチオンとベンゾ[a]ピレンを複合投与した群にのみ対照群に比べて血清中 IgE 量の有意な増加が認められた。

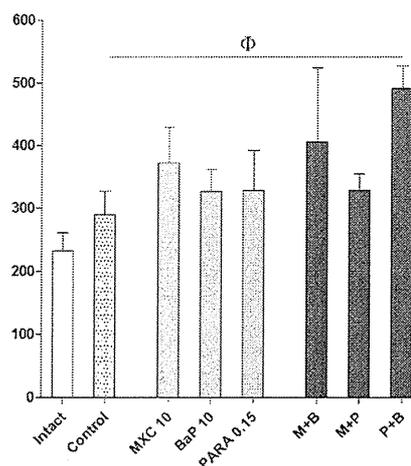


図 3 血清中 IgE 産生量

2. 肺胞洗浄液の解析

肺胞洗浄液中の好酸球数、肥満細胞数および好塩基球数測定結果を図 4 に示す。好酸球数および好塩基球は、パラチオンを単剤投与した群で媒体対照群と比べて増加が認められた。またメトキシクロルとパラチオンを複合投与した群において、各単剤投与に比べて有意な増加が認められた。肥満細胞数は、メトキシクロルとパラチオンの複合投与群、およびパラチオンとベンゾ[a]ピレンの複合投与群において、各単剤投与群と比較して有意な増加が認められた。

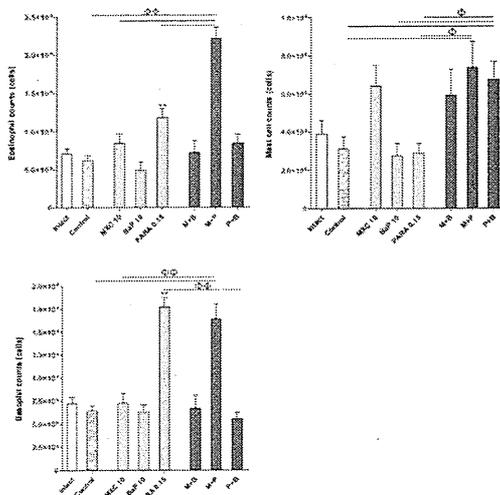


図 4 肺胞洗浄液の解析

3. 肺門リンパ節の解析

肺門リンパ節中の記憶ヘルパーT 細胞数および各サイトカイン量 (IL-4、-5、-6、-9、-17A) 測定結果を図 5 に示す。記憶ヘルパーT 細胞数は、血清中の IgE 産生量と同様に、各投与群で媒体対照群と比較して増加が認められた。各サイトカイン産生量は、メトキシクロルとベンゾ[a]ピレン、ないしはメトキシクロルとパラチオンを複合投与した群において、各単剤の投与群に比べて増加が認められた。

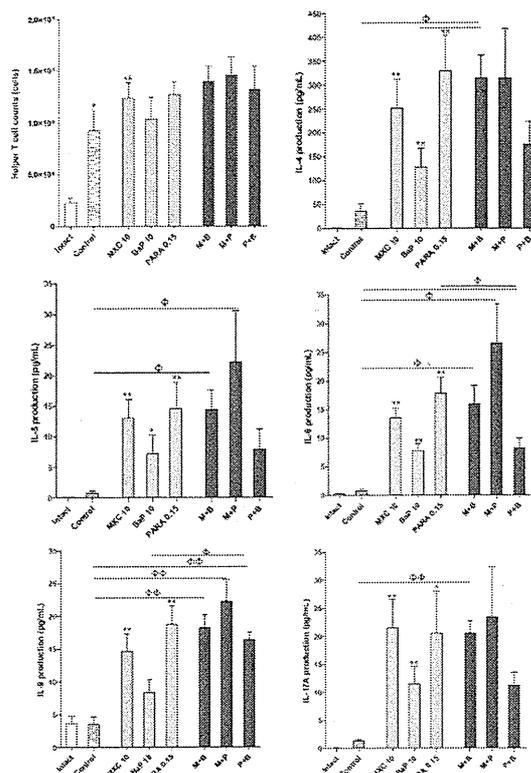


図 5 肺門リンパ節の解析

D. 考察

平成 27 年度の本研究では、平成 25 年度および 26 年度に選定した候補農薬の中から多環芳香族炭化水素化合物 (ベンゾ[a]ピレン)、有機塩素系化合物 (メトキシクロル) および有機リン系化合物 (パラチオン) を選択し、各被験物質を妊娠後期の母動物に複合暴露した後に生まれてきた児動物の、呼吸器アレルギーに及ぼす影響を調査した。

多環芳香族炭化水素化合物、有機塩素系化合物および有機リン系化合物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⁾、本研究で用いたメトキシクロルおよびパラチオンの胸腺細胞アポトーシス誘発作用が報告されている⁵⁾。本研究では、上記化学物質の免疫抑制作用に着目し、妊娠期の免疫攪乱作用が児動物の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と仮定し、呼吸器アレルギー増強作用を指標とした検査を実施した。具体的には、成熟後の児動物にトリ

メリト酸無水物を経皮感作投与および吸入惹起暴露することによって呼吸器アレルギーを惹起させた。平成 26 年度の研究では、各種化学物質の母動物への単剤暴露による次世代の吸入アレルギー影響調査した結果、単剤暴露が児動物の呼吸器アレルギー反応を増強させる結果を得た。そこで本研究では、免疫抑制作用を有するベンゾ[a]ピレン、メトキシクロルないしパラチオンを妊娠動物に複合的に投与し、生まれてきた児動物の免疫機能を調査することで、各被験物質の免疫攪乱作用が複合暴露によりどのように作用するかを調査した。

その結果、単剤投与群および複合投与群において肺門リンパ節や肺胞洗浄液中のリンパ球数、炎症採細胞数、サイトカイン産生量がコントロール群と比較して有意に増加するだけでなく、メトキシクロルとパラチオンの複合投与群では、呼吸器アレルギー反応に対する増強効果が各単剤投与群に比べて有意に認められた。上記結果より、ベンゾ[a]ピレン、メトキシクロルおよびパラチオンの妊娠動物への投与により免疫攪乱が起これ、児動物の免疫系に免疫亢進作用を及ぼす異常免疫担当細胞が出現し、さらにその増強作用は、メトキシクロルとパラチオンを複合的に投与されることで相乗的に増加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⁹⁾は自己免疫疾患モデル動物の (NZB×NZW) F1 マウスを用いた実験で、メトキシクロル、o,p'-DDT 及びクル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。また、著者らの以前の研究⁷⁾では、幼若期の免疫攪乱作用が成熟後の卵白アルブミン誘発吸入アレルギーの増悪に繋がるだけでなく、その免疫攪乱作用

は複合暴露されることで相乗的に増強することを示している。

これらの報告は、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

平成 27 年度の本研究では、農薬の複合暴露による免疫攪乱影響を調査するため、各ライフステージ、特に発達期の影響に着目し、多環芳香族炭化水素化合物 (ベンゾ[a]ピレン)、有機塩素系化合物 (メトキシクロル) および有機リン系化合物 (パラチオン) を選択し、各被験物質を妊娠後期の母動物に単剤ないしは複合暴露後、生まれてきた児動物の呼吸器アレルギーに及ぼす影響を初年度に確立した吸入アレルギー実験系を用いて調査した。

肺門リンパ節や肺胞洗浄液中のリンパ球数、炎症採細胞数、サイトカイン産生量を測定した結果、ベンゾ[a]ピレン、メトキシクロルおよびパラチオンの妊娠期における反復単剤投与は、呼吸器アレルギー反応に対して増強効果を示し、さらにメトキシクロルとパラチオンを複合的に反復投与すると、その増強作用が相乗的に増加することが示唆された。

F. 参考文献

- 1) Dean JH, Luster MI, Boorman GA, Lauer LD, Leubke RW, L Lawson, Selective immunosuppression resulting from exposure to the carcinogenic congener of benzopyrene in B6C3F1 mice. Clin Exp Immunol. 52(1): 199–206, 1983.
- 2) Takeuchi Y, Kosaka T, Hayashi K, Takeda M, Yoshida T, Fujisawa H, Teramoto S, Maita K, Harada T, Thymic atrophy induced by methoxychlor in rat pups. Toxicol. Lett. 135, 199–207, 2002.