

マウスを用いたピペロニルブトキシドの
後世代に及ぼす影響に関する研究

2011.02

田 中 豊 人

マウスを用いたピペロニルブトキシドの
後世代に及ぼす影響に関する研究

2011 年

田中豊人

目次

緒言	1
第1章 ピペロニルブトキシドの次世代マウスに及ぼす影響	
1. 序文	5
2. 材料と方法	7
2-1. 試料	7
2-2. 動物と飼育条件	7
2-3. 実験計画	7
2-4. 生殖試験	7
2-5. 行動発達試験	8
2-6. 多様式 T 型水迷路試験	9
2-7. オープンフィールド試験	9
2-8. 統計解析	9
3. 結果	11
3-1. 飼料及び薬物摂取量	11
3-2. F ₀ マウスに対する影響	11
3-2-1. 交配前	11
3-2-2. オープンフィールド試験	11
3-2-3. 妊娠期	11
3-2-4. 授乳期	11
3-3. F ₁ マウスに対する影響	12
3-3-1. 生殖に及ぼす影響	12
3-3-2. 行動発達に及ぼす影響	12
3-3-3. 離乳後	12
3-3-4. 多様式 T 型水迷路試験	13
3-3-5. オープンフィールド試験	13
4. 考察	14
5. 小括	16
6. 図表	17
第2章 ピペロニルブトキシドの 3 世代毒性研究における生殖及び行動発達に及ぼす影響	
1. 序文	28
2. 材料と方法	30

2-1. 試料	30
2-2. 動物と飼育条件	30
2-3. 実験計画	30
2-4. 生殖試験	30
2-5. 行動発達試験	30
2-6. 統計解析	30
3. 結果	31
3-1. 飼料及び薬物摂取量	31
3-2. F_0 マウスに対する影響	31
3-2-1. 交配前	31
3-2-2. 妊娠期	31
3-2-3. 授乳期	31
3-3. F_1 マウスに対する影響	32
3-3-1. 生殖に及ぼす影響	32
3-3-2. 行動発達に及ぼす影響	32
3-3-3. 離乳後から交配前	32
3-3-4. 妊娠期	32
3-3-5. 授乳期	33
3-4. F_2 マウスに対する影響	33
3-4-1. 生殖に及ぼす影響	33
3-4-2. 行動発達に及ぼす影響	33
4. 考察	34
5. 小括	36
6. 図表	37

第3章 マウスにおけるピペロニルブトキシドの発生毒性評価

1. 序文	50
2. 材料と方法	51
2-1. 試料	51
2-2. 動物と飼育条件	51
2-3. 実験計画	51
2-4. 解剖と観察	51
2-5. 統計解析	51
3. 結果	53
3-1. 母体に対する影響	53
3-2. 胎子に関する影響	53
3-2-1. 胎子に対する影響	53

3-2-2. 外表奇形	53
4. 考察	55
5. 小括	57
6. 図表	58

第4章 混餌法によるピペロニルブトキシドのマウスの生殖及び行動発達に及ぼす影響

1. 序文	61
2. 材料と方法	62
2-1. 試料	62
2-2. 動物と飼育条件	62
2-3. 実験計画	62
2-4. 生殖試験	62
2-5. 行動発達試験	62
2-6. 多様式 T 型水迷路試験	62
2-7. 探査行動の測定	62
2-8. 統計解析	63
3. 結果	64
3-1. 飼料及び薬物摂取量	64
3-2. F ₀ マウスに対する影響	64
3-2-1. 交配前	64
3-2-2. 探査行動に及ぼす影響	64
3-2-3. 妊娠期	64
3-2-4. 授乳期	64
3-3. F ₁ マウスに対する影響	65
3-3-1. 生殖に及ぼす影響	65
3-3-2. 行動発達に及ぼす影響	65
3-3-3. 離乳後	65
3-3-4. 多様式 T 型水迷路試験	66
3-3-5. 探査行動に及ぼす影響	66
4. 考察	67
5. 小括	69
6. 図表	70

第5章 ピペロニルブトキシドの次世代マウスの自発行動に及ぼす影響

1. 序文	76
2. 材料と方法	77
2-1. 試料	77

2-2.	動物と飼育条件	77
2-3.	実験計画	77
2-4.	生殖試験	77
2-5.	行動発達試験	77
2-6.	多様式 T 型水迷路試験	77
2-7.	探査行動の測定	78
2-8.	自発行動の測定	78
2-9.	統計解析	78
2-10.	ガイドライン	78
3.	結果	79
3-1.	飼料及び薬物摂取量	79
3-2.	F ₀ マウスに対する影響	79
3-2-1.	交配前	79
3-2-2.	探査行動に及ぼす影響	79
3-2-3.	妊娠期	79
3-2-4.	授乳期	79
3-3.	F ₁ マウスに対する影響	80
3-3-1.	生殖に及ぼす影響	80
3-3-2.	行動発達に及ぼす影響	80
3-3-5.	探査行動に及ぼす影響	80
3-3-3.	離乳後	81
3-3-4.	多様式 T 型水迷路試験	81
3-3-6.	自発行動に及ぼす影響	81
4.	考察	82
5.	小括	84
6.	図表	85
総括		94
謝辞		97
引用文献		98
主論文及び参考論文リスト		105
和文要旨		107
英文要旨		112

緒言

今日、私たちの生活環境には様々な化学的合成物が存在し、それらの物質に恒常的に曝露されることによって、私たちの健康が何らかの影響を受けることが予想される。日本では非常に多くの化学的合成物が食品添加物として使用されている。また、合成添加物の代わりに天然添加物の使用も増加している。さらに、輸入食品には輸送中の腐敗などを防ぐために収穫後に農薬その他の化合物が使用されることが予想される。近年、これらの化学物質による免疫機能、子供の脳の発達、生殖機能などへの影響が数多く報告されており、社会的関心が高まっている。しかし、生殖や次世代の神経系や運動機能の発達に及ぼす影響に関する研究は時間や経費などがかかることもあり、これまで十分に行なわれてこなかった。

東京都健康安全研究センター（旧・東京都立衛生研究所）では、従来からこれらの毒性情報の少ない化学物質について慢性毒性試験や催奇形性試験などを組織的に行ない、その安全性の再評価をしてきた。また、毒性部薬理研究科（当時）では1990年以降、自主的に対象物質の選定し、後世代への影響を含んだ体系的な毒性評価を行なう体制が敷かれてきた。そうした中、日本では主食である米を含む穀類に対する防虫剤として食品添加物に登録されていて、諸外国ではポストハーベスト農薬として使用されているピペロニルブトキシドに着目して総合的な毒性の再評価を行なうこととなった。

ピペロニルブトキシド [CAS No. 51-03-6] は淡黄～淡褐色の透明な油状の液体で、水に溶けずエタノールやベンゼンなどの有機溶剤に混和し¹⁾、光及び熱に対して高い安定性を示す²⁾。ピレスリンなどの殺虫剤の効果を高めるために用いられる農薬の共力剤として、日本では1952年に殺虫剤として登録されたが、1961年には失効している。また、日本では1955年に食品添加物の防虫剤として認可

されている。さらに、植物成長調整剤としても 1981 年に登録されたが、2004 年には失効している。ピペロニルブトキシドは諸外国では、果実・野菜・穀類などの貯蔵や保存のためにポストハーベスト農薬として用いられており³⁻⁴⁾、アメリカ、オーストラリア及び韓国では独自にピペロニルブトキシドの残留基準が設けられ、アフリカ及びヨーロッパ諸国でも使用が認められている。FAO/WHO 食品規格によるピペロニルブトキシドの残留基準は、広範な農産物及び畜産物に対して設定されている⁵⁾。日本ではピペロニルブトキシドは、食品添加物として主食である穀類 1 kg に対して 0.024 g (24 ppm) 以下の使用が認められている。また、WHO が定める 1 日あたりの許容摂取量 (ADI) は、体重 1 kg 当たり 0.20 mg となっている⁶⁾。

ピペロニルブトキシドの生体内動態については、¹⁴C で標識したピペロニルブトキシドをラット及びマウスに経口投与すると、速やかに尿または糞中へ排泄されることが報告されている⁷⁾。また、¹⁴C で標識したピペロニルブトキシドをラットに静脈注射すると体内に広く分布し、代謝物の胆汁及び尿中への排泄は遅く、肺と脂肪組織にのみ未変化体が認められたと報告されている⁸⁾。さらに、ラットに経口投与すると、尿及び糞中にはほとんど未変化体としては排泄されず、24 時間後には脂肪組織にのみ未変化体が残存すると報告されている⁹⁾。また、¹⁴C で標識したピペロニルブトキシドをラットに経口投与した場合に、25 種類以上の代謝物が生成することが確認されている¹⁰⁾。

ピペロニルブトキシドの毒性については Sarles と Vandegrift がラットの第 2 世代及び第 3 世代に対して特に影響が見られなかったと報告しており¹¹⁾、また肝臓に対する発ガン性も認められないと報告している。Cardy らは発ガン試験において、雌でリンパ腫が増加するが発ガン性は明らかでないと報告している³⁾。Mackawa らはラットで回盲部の潰瘍が増加するが、発ガン性は認められないと報告している¹²⁾。しかしながら東京都健康安全研究センターの我々のグループ

では、高い濃度（0.6–2.4%）のピペロニルブトキシドはラットの肝臓に対し発ガン性を示し¹³⁾、マウスにおいても同様に肝臓に対し発ガン性を示すことを報告している¹⁴⁻¹⁵⁾。これらの研究結果を基に、ピペロニルブトキシドの発ガンリスクが明らかになり、不確実係数が減ったことなどにより、WHO が定める 1 日あたりの許容摂取量 (ADI) は、1995 年にイヌでの無毒性量 (NOAEL) の 16mg/kg に安全係数 100 をかけて、それまでの体重 1 kg 当たり 0.03 mg から体重 1 kg 当たり 0.20 mg へと更新されている⁶⁾。

また、生殖発生毒性については Kennedy らがピペロニルブトキシドはラットに対して催奇形性を示さないと報告し⁴⁾、Khera らも同様にラットに対して催奇形性及び母体毒性を示さないと報告している¹⁶⁾。しかしながら、東京都立衛生研究所（当時）の先行調査において、ピペロニルブトキシドはマウスに対し前肢の奇形を誘発する可能性が示唆されたことから、母体から胎盤を通して胎子に影響を及ぼす可能性が高い化学物質であると考えられる。

また、ピペロニルブトキシドの神経行動毒性に関しては Ater らが雄マウスにおいて神経毒性と抗痙攣活性を示すことを見いだしている¹⁷⁾。木村らはピペロニルブトキシドの経口及び静脈内投与で、ラットの脳への分布が認められたことを報告している⁹⁾ ことから、ピペロニルブトキシドが中枢神経系へ何らかの影響を及ぼすことが懸念される。ピペロニルブトキシドは主食である穀類の保存のために添加することが認められており、非意図的に食品から摂取される可能性が高いことから、潜在的な健康被害のリスクが高い化学物質と考えられる。また、東京都の輸入食品の残留農薬調査でベビーフードから 0.33 ppm と少量ながらピペロニルブトキシドが検出されたことがあり、市販のピレスロイド系防虫シートに共力剤としてピペロニルブトキシドが添加されている製品も見つかっている¹⁸⁾。したがって、ピペロニルブトキシドを食品から摂取するほか、家庭用品から曝露する機会が日常的に存在すると考えられる。そこで今回、母体

から胎盤を通して胎子に移行する可能性が高く、中枢神経系への影響が示唆されるピペロニルブトキシドについて、潜在的なリスクがより大きいと考えられる母胎内及び授乳期曝露による後世代に及ぼす影響について以下に掲げる 5 つの研究を行ない、ピペロニルブトキシドが後世代に及ぼす影響について検討した。

まず、はじめにピペロニルブトキシドが後世代に及ぼす影響について、まず 2 世代の行動発達毒性研究を行ない、生殖と行動発達に及ぼす影響について検討した。次に、マウスを用いた 2 世代の行動発達毒性研究の結果を受けて、より幅広い濃度を含む 3 世代毒性研究を行ない、ピペロニルブトキシドの生殖と行動発達に及ぼす影響の再現性と複数世代を経た影響について検討した。さらに、マウスを用いた 3 世代の行動発達毒性研究において、ピペロニルブトキシド 0.4% 投与群で四肢の奇形を有する雌子マウスが確認されたことから、マウスの発生に対する影響について、特に四肢の奇形に重点を置いて検討した。また、マウスを用いた 2 世代及び 3 世代毒性研究の結果を受けて、前述の研究より低濃度のピペロニルブトキシドによる行動発達毒性研究を行ない、ピペロニルブトキシドの生殖と行動発達に及ぼす影響のより低濃度における再現性について検討した。最後に、前述のマウスを用いた低濃度による行動発達毒性研究において、行動発達と探索行動に対してピペロニルブトキシドの投与による変化が見られたため、自発行動の測定を含む行動発達毒性研究を行ない、ピペロニルブトキシドの行動発達と探索行動に及ぼす影響の再現性と自発行動に及ぼす影響について検討した。

第1章 ピペロニルブトキシドの次世代マウスに及ぼす影響

1. 序文

ピペロニルブトキシド (α -[2-(2-butoxyethoxy)ethoxy]-4,5-methylenedioxy-2-propyltoluene) (Fig.1-1) はピレスリンなどの殺虫剤の効果を高めるために用いられる農薬の共力剤で、日本では1955年に食品添加物の防虫剤として認可されている。ピペロニルブトキシドは諸外国では、果実・野菜・穀類などの貯蔵や保存のためにポストハーベスト農薬として用いられており³⁻⁴⁾、FAO/WHO 食品規格によるピペロニルブトキシドの残留基準は、Table 1-1 にあるように広範な農産物及び畜産物に設定されている⁵⁾。日本ではピペロニルブトキシドは、食品添加物として穀類 1 kg に対して 0.024 g (24 ppm) 以下の使用が認められている。また、WHO が定める1日あたりの許容摂取量 (ADI) は、体重 1 kg 当たり 0.20 mg となっている⁶⁾。

ピペロニルブトキシドが後世代に及ぼす影響については、Kennedy らがピペロニルブトキシドはラットに対して催奇形性を示さないと報告し⁴⁾、Khera らも同様にラットに対して催奇形性及び母体毒性を示さないと報告している¹⁶⁾ が、次世代の行動を含む発達に対する影響を検討した研究はほとんど見られない。そこで、まずピペロニルブトキシドの2世代の行動発達毒性研究を行ない、生殖と行動発達に及ぼす影響について検討した¹⁹⁾。投与濃度は同時期に開始したラットを用いた慢性毒性試験¹³⁾に先行して行なわれたラットの亜急性毒性試験²⁰⁾で体重及び摂餌量に影響を及ぼさなかった0.6%を最高濃度として3段階の濃度を設定した。

なお、本稿作成にあたり、本論文発表以降の統計解析手法の発展・普及に伴い、多重性を考慮した多重比較検定やカテゴリカル・データの検定が利用可能

になったことから、科学的により適切な統計解析手法を用いてデータの再解析を行なった。

2. 材料と方法

2-1. 試料

ピペロニルブトキシドは（ロット番号 DZ01）は東京化成工業株式会社より購入し、その純度は 95%以上であった。

2-2. 動物と飼育条件

マウスは 4 週齢の Crj:CD-1 (ICR) の雌雄を日本チャールス・リバー（株）から購入し、そのうち一般状態の良好なマウスを実験に供した。マウスは温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ・相対湿度 $55 \pm 5\%$ に調節された飼育室においてプラスチックケージで 1 匹ずつ飼育し、給水瓶によりフィルターを通した水道水と実験飼料を自由摂取させた。

2-3. 実験計画

ピペロニルブトキシドを標準粉末飼料に混入し成形した混餌法により、1 群雌雄各 10 匹ずつ 0.15、0.30、0.60%の濃度(W/W)で、5 週齢より投与した。対照群として雌雄各 10 匹ずつ実験期間中に標準固形飼料（日本クレア（株）CE-2）を投与した。各マウスの摂餌量を、交配前（5 週齢から交配まで [30 日間]）、交配期（5 日間）、妊娠期（交配終了から出産まで [14 日間]）、授乳期（出産から離乳まで [28 日間]）、離乳後（4-9 週齢）の 5 期に分けて測定した。

2-4. 生殖試験

マウスは交配前に実験開始日（5 週齢）を 0 日として 0、2、4、7、14、21、28、30 日目に体重を測定した。9 週齢に同じ処置群の雌雄を各 1 匹ずつ 5 日間同居交配させ、膣栓の存在により交尾の有無を確認し、5 日後に雌雄を分離した。交配後、妊娠した雌は自然分娩させ、その子を哺育させた。新生子については、その出生時に産子数・1 腹子の重さ及び性比を測定した。出生子の取扱は Paget と Thomson の非臨床試験標準操作手順書²¹⁾に従い、同腹子数の調整をしない手

法を選択した。出生日を0日齢とし、0、4、7、14、21日齢に子マウスの体重を測定した。3週齢のオープンフィールド試験の終了後、4週齢に子マウスを母親マウスから離乳させた。F₁世代の離乳後は4-9週齢に週に一回体重を測定した。

2-5. 行動発達試験

授乳期間中に行なった子マウスの行動発達に関するテストの測定項目は正向反射（4、7日齢）、背地走性（4、7日齢）、断崖回避（7日齢）、遊泳試験（4、14日齢）、嗅覚性指向反応（14日齢）であり、各パラメーターは下記に示すカテゴリー分類による得点法〔（）内がスコア〕により、その発生頻度を分析した²²⁾。行動発達の測定は、測定時に生存している子マウスの全個体を対象に行なった。

1. 正向反射²³⁻²⁴⁾ 子マウスの背部をなめらかな平面につけ、起きあがるまでの時間を測定した。1秒未満（2）、1秒以上2秒未満（1）、2秒以上（0）
2. 背地走性²³⁻²⁵⁾ 子マウスを30°の傾斜面に頭部を下にして置き、頭部を上に向けるまでの時間を測定した。30秒未満（2）、30秒以上60秒未満（1）、60秒以上（0）
3. 断崖回避²³⁻²⁵⁾ 子マウスを高さ10 cmのプラットフォームの縁に前肢と鼻を外に出すように置き、断崖を回避するまでの時間を測定した。20秒以上（0）、20秒未満で後退により回避（1）、20秒未満で回転により回避（2）
4. 遊泳試験²³⁻²⁴⁾ 水温23±1℃の水を張った水槽の水面に子マウスを置き、遊泳能力を測定した。方向：直進（3）、回転（2）、浮遊（1）。頭角度：耳が全部水面上（4）、耳が半分水面上（3）、鼻と頭頂部が水面上（2）、頭部を水面上に維持不能（1）。四肢の動き：四肢全てを使う（1）、後肢のみ（2）。
5. 嗅覚性指向反応²⁵⁻²⁷⁾ 子マウスを2つの部屋を通路でつないだ装置の通

路部分に置き、行動を観察した。一方の部屋には子マウスのいたケージの床敷を入れ、もう一方には新しい床敷を入れた。子マウスのいた床敷のある部屋に入るまでの時間を測定した。90 秒以上 (0)、90 秒未満で新しい床敷の部屋経由 (1)、90 秒未満で直行 (2)。

2-6. 多様式 T 型水迷路試験

F₁ 世代の 6 週齢に、雌雄のマウス全個体について多様式 T 型水迷路試験を 1 日 1 回 3 日間連続で行なった。装置は Biel が考案したもの²⁸⁾ をマウス用に改変したもの²⁹⁾ を用い、水温は 18±1℃に調製し、所要時間と錯誤回数を測定した。最大測定時間を 120 秒とし、120 秒以上かかったものについては 120 秒として扱った²⁹⁾。

2-7. オープンフィールド試験

F₀ 及び F₁ 世代の 8 週齢に、雌雄のマウス全個体について底面を 25 区画に分割された 40×40×20 cm のオープンフィールドで 3 分間行動を観察した。また、F₁ 世代の 3 週齢に、各腹子から雌雄各 1 匹ずつをランダムに選定し、底面を 25 区画に分割された 30×30×20 cm のオープンフィールドで 3 分間行動を観察した。測定項目は移動量 (区画横切り回数)・立ち上がり回数・排便数・排尿数及び毛繕い回数とした。

2-8. 統計解析

出生時の性比・授乳期間中の生存率及び行動発達のデータは χ^2 検定により解析し、多様式 T 型水迷路試験及びオープンフィールド試験のデータは Steel-Dwass の多重比較検定により解析した³⁰⁾。その他のデータは Bartlett の等分散検定の後、有意でなければ一元配置分散分析を行なった後に、Bonferroni の多重比較検定のパラメトリック版、有意ならば Kruskal-Wallis の順位の分散分析を行なった後に、Bonferroni の多重比較検定のノンパラメトリック版により解析した。また、用量反応性の解析は累積 χ^2 検定または Jonckheere の傾向検定により

解析した。有意水準は各検定とも 0.05 以下とした。

3. 結果

3-1. 飼料及び薬物摂取量

実験期間中の飼料の摂取量は、授乳期間を除いてピペロニルブトキシドの投与によって変化しなかった (Table 1-2)。授乳期間中、母親マウスの摂餌量は 0.6% 投与群で有意に抑制された。したがって、薬物摂取量は授乳期間を除いて用量依存的に増加し、全期間を通じ摂取量の逆転は見られなかった。

3-2. F₀ マウスに対する影響

3-2-1. 交配前

親動物の平均体重の推移は、ピペロニルブトキシドの投与によって変化しなかった。また、親動物の一般状態にピペロニルブトキシドの投与による影響は見られなかった。

3-2-2. オープンフィールド試験

ピペロニルブトキシドの投与により 8 週齢の雄マウスの移動量が 0.6% 投与群で有意に用量依存的に抑制された (Fig. 1-2)。また、立ち上がり回数も用量依存的に抑制される傾向が見られた。その他の項目では雌雄ともにピペロニルブトキシドの投与による変化は見られなかった。

3-2-3. 妊娠期

対照群の雌 1 匹と 0.6% 投与群の雌 2 匹は妊娠に至らなかった (Table 1-3)。また、0.15% 投与群の雌 1 匹は流産した。妊娠マウスの平均体重の推移は、投与群で抑制される傾向が見られたが、有意な差は認められなかった。期間中、妊娠マウスの一般状態にピペロニルブトキシドの投与による影響は見られなかった。

3-2-4. 授乳期

対照群、0.3% 及び 0.6% 投与群各群 2 匹の計 6 匹の母親マウスが、授乳期の第 1 週に乳腺の発達不良を示した。また、0.6% 投与群の母親マウス 1 匹が、授乳期

の第2週に死亡した。死亡例を解剖した結果、明らかな病変は見られなかった。母親マウスの平均体重の推移は、投与群で抑制される傾向が見られ、0.6%投与群で有意に抑制された。期間中、生存している母親マウスの一般状態にピペロニルブトキシドの投与による影響は見られなかった。

3-3. F₁ マウスに対する影響

3-3-1. 生殖に及ぼす影響

出生時の産子数・1腹子の重さ及び性比には、ピペロニルブトキシドの投与による変化は見られなかった (Table 1-3)。授乳期間中の平均子体重の増加は投与群で有意に抑制され、特に 0.6%投与群において増加が強く抑制された (Table 1-4)。対照群、0.3%及び 0.6%投与群各群 2 腹子の計 6 腹子が、母親マウスの乳腺の発達不良が原因で授乳期の第1週に全て死亡した。0.6%投与群の1腹子は、母親マウスの死亡が授乳期の第2週に確認された後に、餓死を避けるために安楽死させた。全個体が死亡した腹子を除いて計算した生存率は、0.3%投与群で有意に増加し、0.6%投与群で有意に減少した (Table 1-5)。

3-3-2. 行動発達に及ぼす影響

授乳期における子マウスの行動発達のテストでは、7日齢の正向反射が 0.6%投与群で有意に抑制され、その影響は用量依存的であった (Fig. 1-3)。4日齢の背地走性も 0.6%投与群で有意に抑制され、その影響は用量依存的であった (Fig. 1-3)。14日齢の嗅覚性指向反応は、全投与群で有意に抑制され、その影響は用量依存的であった (Fig. 1-3)。4日齢の遊泳試験では、方向が 0.6%投与群で、頭角度が 0.15%及び 0.6%投与群で有意に抑制され、これらの影響は用量依存的であった (Fig. 1-4)。14日齢の遊泳試験では、四肢の動きが 0.3%及び 0.6%投与群で有意に抑制され、その影響は用量依存的であった (Fig. 1-4)。その他の測定項目には変化は見られなかった。

3-3-3. 離乳後

F₁ マウスの平均体重の推移には、ピペロニルブトキシドの投与による変化は見られなかった。

3-3-4. 多様式 T 型水迷路試験

6 週齢の多様式 T 型水迷路試験において、雄の 2 回目の試行で所要時間が 0.15% 及び 0.6% 投与群で有意に短縮されたが、その他の項目では雌雄ともにピペロニルブトキシドの投与による変化は見られなかった (Table 1-6)。

3-3-5. オープンフィールド試験

3 週齢のオープンフィールド試験において雄子マウスの移動量が用量依存的に抑制される傾向が見られた (Fig. 1-5)。その他の測定項目には雌雄ともに変化は見られなかった。8 週齢においては雌雄ともにピペロニルブトキシドの投与による変化は見られなかった。

4. 考察

本研究において、親マウスの交配前での平均体重の推移と平均摂餌量に、ピペロニルブトキシドの投与による変化は見られなかったため、ピペロニルブトキシドは交配前にはマウスの一般状態にはほとんど影響を及ぼさないものと思われる。しかしながら、オープンフィールド試験において 8 週齢の雄マウスの移動量と立ち上がり回数が用量依存的に抑制されたことから、ピペロニルブトキシドが中枢神経系に何らかの影響を及ぼしているものと思われる。

授乳期に、母親マウス当たりの平均摂餌量が 0.6% 投与群で減少しているが、子マウスの平均体重が抑制され、1 腹子数も減少していることから、授乳期間中の 1 腹当たりの平均摂餌量は各群同程度であるのかも知れない。しかし、授乳期に母体は通常よりも 3 倍近い餌を摂取することから、0.6% 投与群では母体に対する負荷が非常に大きいものと思われる。また、子マウスの体重抑制と 1 腹子数の減少はピペロニルブトキシドの投与による影響と考えられることから、授乳期の 0.6% 投与群では母体及び子マウスに対する毒性が強く現れていると考えられる。

行動発達のいくつかの項目が高濃度投与群で抑制されているが、授乳期間中の母親マウスの摂餌量が 0.6% 投与群で減少していることから、これらの子マウスは栄養不良であったかも知れない。したがって、0.6% 投与群で見られた行動発達の遅延は、成長の阻害によるものかも知れない。しかしながら、Smart と Dobbing はラットの実験で、栄養不良がラットの正向反射・背地走性及び断崖回避に影響を与えないことを見いだした³¹⁾。嗅覚性指向反応と遊泳試験の四肢の動きは 0.15% 及び 0.3% 投与群でも有意に抑制され、その他の抑制された項目も用量依存的にピペロニルブトキシドの影響を受けていることから、これらの影響はピペロニルブトキシドの投与によるものと思われる。

また、オープンフィールド試験において 3 週齢の雄子マウスの移動量が用量依存的に抑制されたことから、授乳期においてもピペロニルブトキシドが中枢神経系に何らかの影響を及ぼしていることと思われる。Ottinger と Tanabe はラットの試験で、栄養不良が子ラットのオープンフィールド試験に影響を与えないことを見いだしている³²⁾ので、この授乳期におけるオープンフィールド試験に見られる影響も栄養不良が原因ではなく、ピペロニルブトキシドの投与によるものと思われる。

多様式 T 型水迷路試験において、2 回目の試行で雄の所要時間が 0.15%及び 0.6%投与群で有意に短縮されたが、3 日目の試行では対照群との差はなくなり、用量反応性も見られないことから、これらの変化はピペロニルブトキシドの投与の影響ではないと考えられる。

以上の結果から、本研究で用いられた用量のピペロニルブトキシドは、親動物の一般状態にはあまり影響を及ぼさないが、生殖と行動発達に対しては抑制的に影響することが確認された。しかしながら、特に影響の大きかった授乳期間中のピペロニルブトキシドの摂取量は、0.15%投与群でも約 800 mg/kg と非常に高い濃度であり、ピペロニルブトキシドの日本における推定摂取量は、大人 1 人当たり 1.77 µg (体重 1kg 当たり 0.0354 µg) と報告されており³³⁾、この値は人間の ADI の 0.20 mg に較べるとはるかに少ないので、日常生活での食品から摂取されるピペロニルブトキシドの量は、ほとんど人体に影響を及ぼさないであろう。しかしながら、ピペロニルブトキシドは生殖と行動発達に対して、用量依存的な影響を及ぼしたことから、多世代にわたって摂取した場合の影響を検討する必要がある。

5. 小括

第 1 章において、ピペロニルブトキシドが後世代に及ぼす影響について、まず 2 世代の行動発達毒性研究を行ない、生殖と行動発達に及ぼす影響について検討した。

ピペロニルブトキシドを、0 (対照群)、0.15、0.30、0.60%の濃度で、マウスに F_0 世代の 5 週齢から F_1 世代の 9 週齢まで 2 世代にわたって投与した。その結果、オープンフィールド試験において親マウスの 8 週齢の移動量と立ち上がり回数と子マウスの 3 週齢の移動量が雄の投与群で用量依存的に抑制された。また、授乳期間中の子マウスの体重は投与群で有意に抑制された。子マウスの行動発達では 7 日齢の正向反射と 4 日齢の背地走性、及び 14 日齢の嗅覚性指向反応が投与群で用量依存的に抑制された。また、4 日齢の遊泳試験では方向、頭角度、四肢の動きともに投与群で用量依存的に抑制された。

以上の結果から、本研究で用いられた用量のピペロニルブトキシドは、親動物の一般状態にはあまり影響を及ぼさないが、生殖と行動発達に対しては抑制的に影響することが確認された。

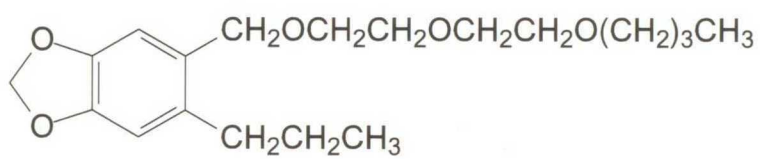
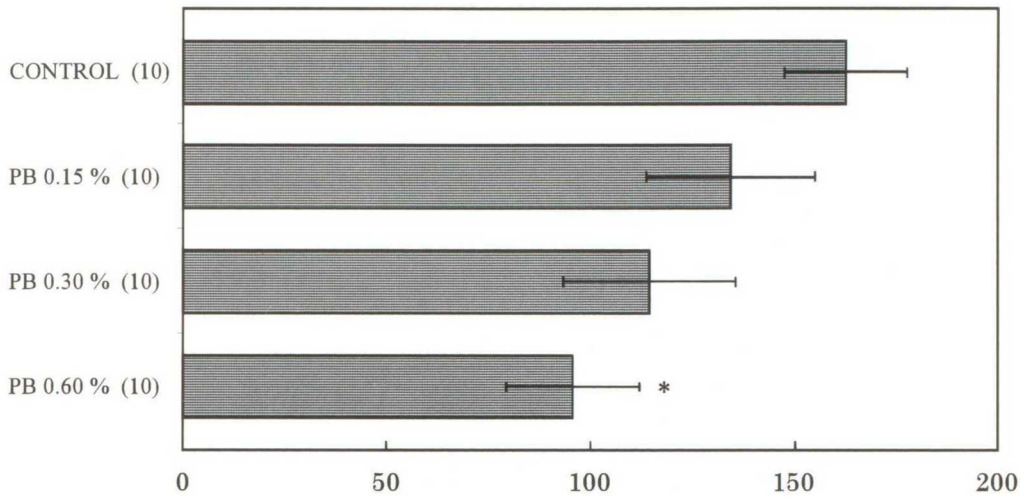


Fig. 1-1. Chemical structure of piperonyl butoxide (α -[2-(2-butoxyethoxy)ethoxy]-4,5-methylenedioxy-2-propyltoluene).

MALE MICE

Ambulation



Rearing

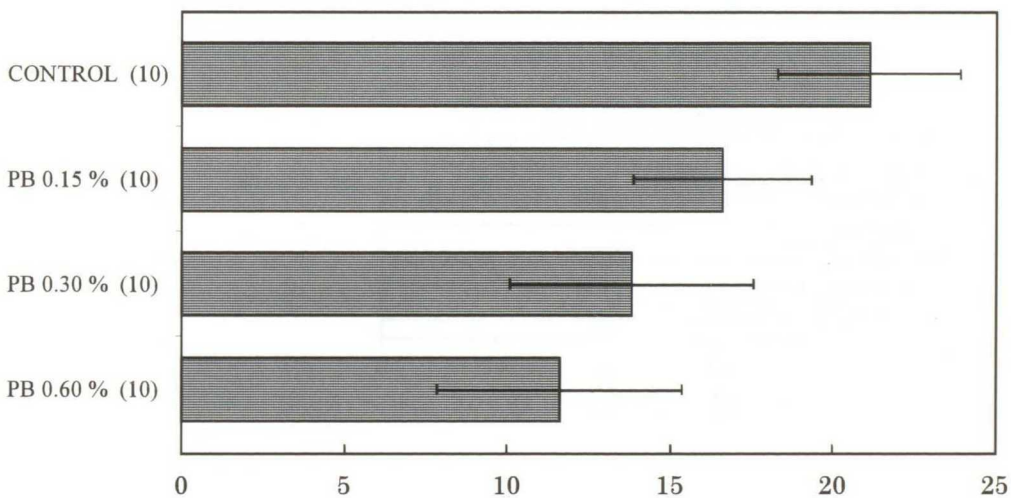


Fig. 1-2. Open-field test results in F_0 generation male mice administered piperonyl butoxide (PB) at 8 weeks of age. Each value represents the mean \pm SE: number of mice in parentheses after group name. Significant different from controls: * $P < 0.05$.

MALE AND FEMALE OFFSPRING

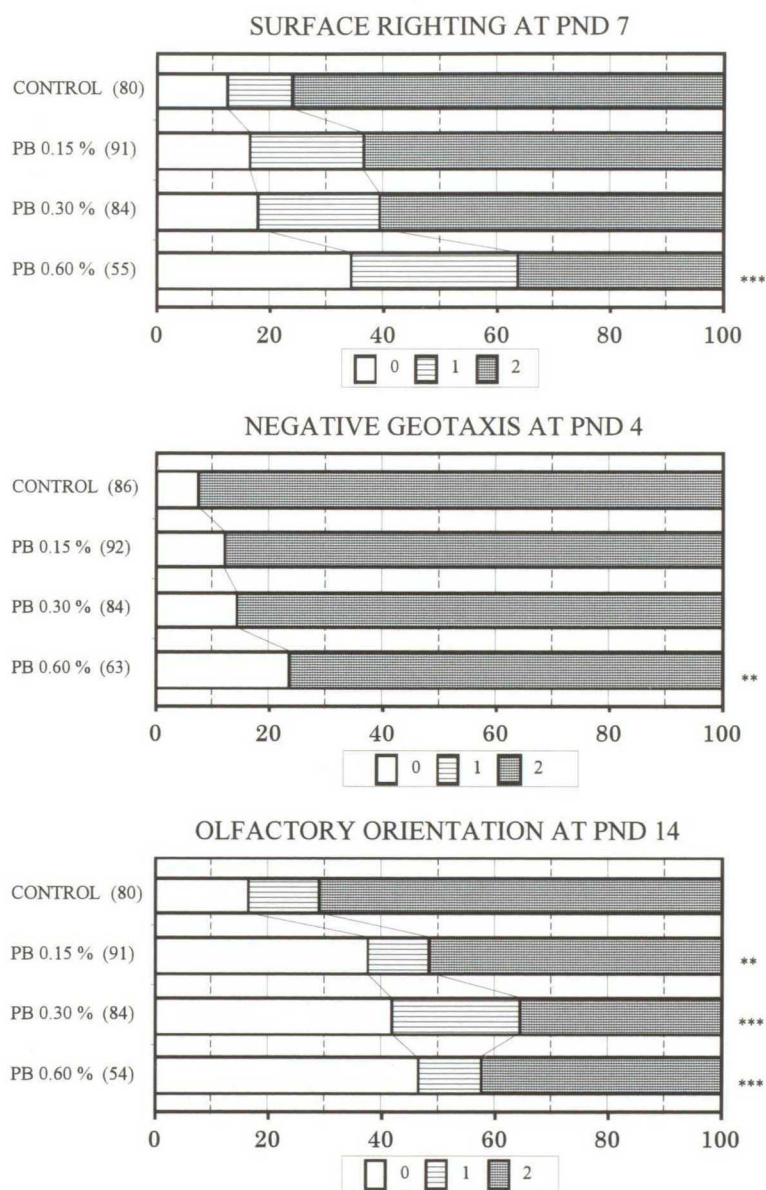


Fig. 1-3. Score frequencies of behavioural development during the lactation period in a two-generation toxicity study of piperonyl butoxide (PB) administered to mice (1). Each value represents rate of each score: number of mice in parentheses after group name. Significant different from controls: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

MALE AND FEMALE OFFSPRING

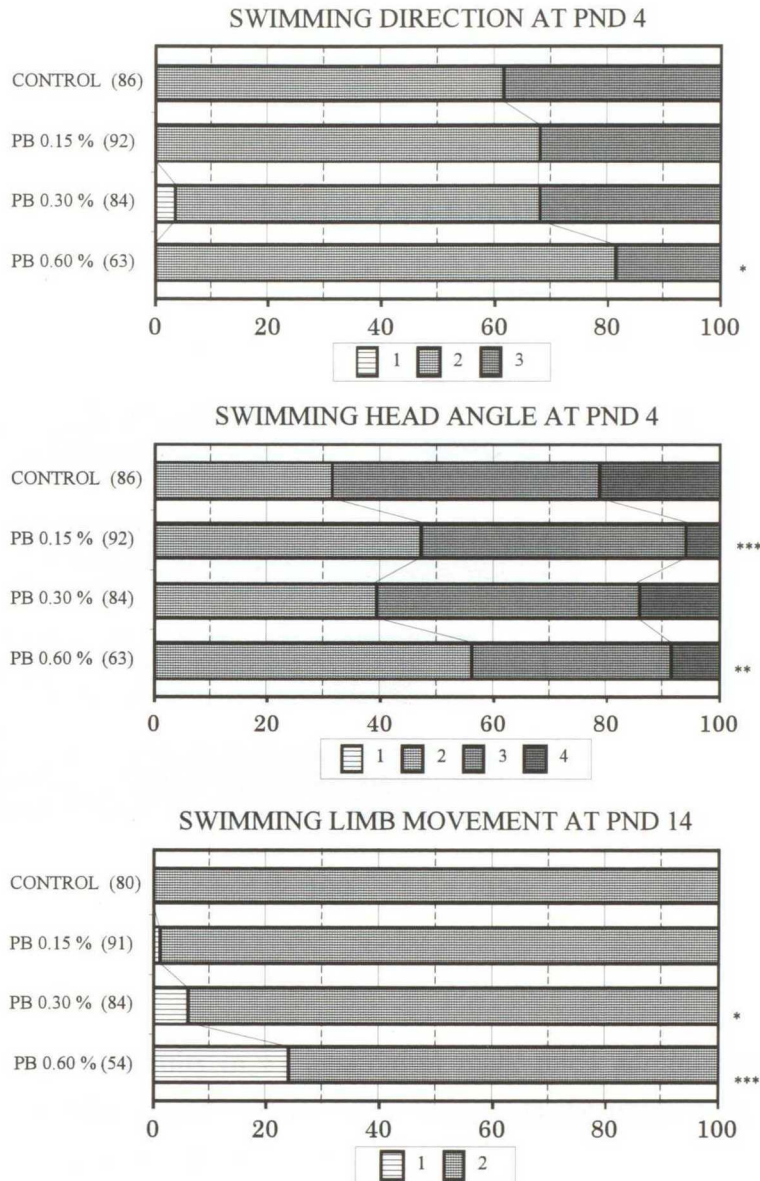


Fig. 1-4. Score frequencies of behavioural development during the lactation period in a two-generation toxicity study of piperonyl butoxide (PB) administered to mice (2). Each value represents rate of each score: number of mice in parentheses after group name. Significant different from controls: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

MALE OFFSPRING

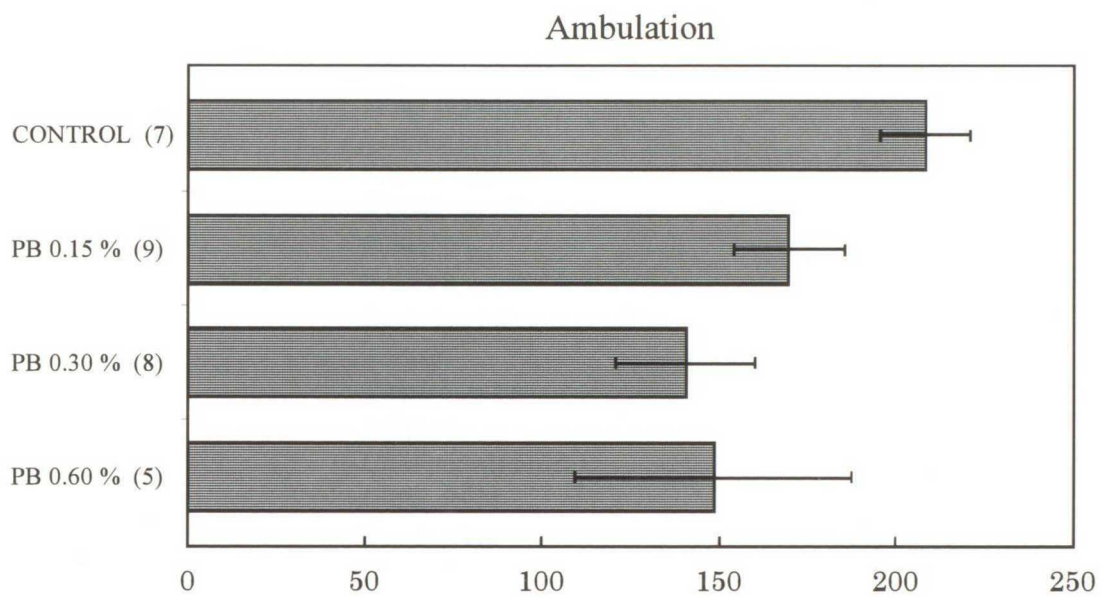


Fig. 1-5. Open-field test results in F₁ generation male mice administered piperonyl butoxide (PB) at 3 weeks of age. Each value represents the mean \pm SE: number of mice in parentheses after group name.

Table 1-1. Summary of Maximum Residue Limits (MRLs) of Piperonyl Butoxide in Food on Codex Alimentarius

		MRLs (ppm)
Cereal grains	Wheat whole meal	30
	Wheat flour	10
	Wheat bran (unprocessed)	80
	Wheat germ	90
	Other cereal grains	30
Legumes	Peanuts (whole)	1
	Other legumes	0.2
Vegetable	Lettuce leaf	50
	Mustard greens	50
	Radish leaves	50
	Spinach	50
	Fruiting vegetables	1
	Root and tuber vegetables	0.5
	Tomato	2
	Tomato juice	0.3
	Peppers	2
	Chili peppers (dry)	20
	Citrus fruits	5
	Citrus juice	0.05
Fruits	Dried fruits	0.2
	Maize oil (crude)	80
Oil		
Eggs	Eggs	1
Meat	Cattle	5
	Other mammalian meat	2
Liver	Cattle	1
	Goats, Pigs & Sheep	1
Kidney	Cattle	0.3
	Goats, Pigs & Sheep	0.2
Milk	Cattle	0.2
	Others	0.05
Poultry	Meat	7
	Edible offal of	10
Grass	Pea hay or pea fodder (dry)	200

Table 1-2. Average daily food and chemical intake of mice administered piperonyl butoxide in a two-generation toxicity study.

		Dose Levels (%)			
		0	0.15	0.3	0.6
Food intake (g/kg/day)					
F ₀ generation					
preconception					
		10	10	10	10
male		173.1 ± 11.4	165.4 ± 8.1	163.7 ± 9.7	168.5 ± 13.0
		10	10	10	10
female		209.0 ± 36.1	198.0 ± 27.1	207.9 ± 21.0	186.7 ± 34.0
		10	10	10	10
mating		171.8 ± 19.0	162.1 ± 17.4	165.3 ± 19.0	168.2 ± 10.3
		9	10	10	8
gestation		162.3 ± 34.9	155.2 ± 29.7	160.0 ± 17.0	148.8 ± 19.8
		7	9	8	5
lactation		581.5 ± 96.1	526.7 ± 70.9	546.4 ± 55.2	377.4 ± 36.4*
F ₁ generation					
		7	9	8	4
male		178.2 ± 9.7	185.1 ± 8.0	184.0 ± 8.7	202.4 ± 16.1*
		7	9	8	3
female		204.9 ± 8.4	212.2 ± 19.3	204.3 ± 10.2	207.8 ± 8.9
Chemical intake (mg/kg/day)					
F ₀ generation					
preconception					
		-	10	10	10
male		-	248.1 ± 12.2	491.0 ± 29.2	1011.2 ± 77.7
		-	10	10	10
female		-	297.0 ± 40.6	623.7 ± 63.1	1120.4 ± 203.7
		-	10	10	10
mating		-	243.1 ± 26.1	495.9 ± 57.0	1008.9 ± 61.9
		-	10	10	8
gestation		-	232.9 ± 44.6	480.0 ± 51.0	892.5 ± 118.8
		-	9	8	5
lactation		-	790.0 ± 106.4	1639.0 ± 165.5	2264.4 ± 218.5
F ₁ generation					
		-	9	8	4
male		-	277.6 ± 12.0	551.9 ± 26.2	1214.4 ± 96.6
		-	9	8	3
female		-	318.3 ± 29.0	613.0 ± 30.5	1246.6 ± 53.3

Each value represents number of mice and daily intake during each period (mean ± SD).
Significantly different from controls: *P<0.01.

Table 1-3. Summary of data of litters at birth in a two-generation toxicity study of piperonyl butoxide administered to mice.

	Dose Levels (%)			
	0	0.15	0.3	0.6
No. of females examined	10	10	10	10
No. of pregnant females	9	9	10	8
No. of litters	9	9	10	8
No. of offspring	101	98	105	87
Average litter size	11.2 ± 3.4	10.9 ± 2.7	10.5 ± 2.2	10.9 ± 2.6
Average litter weight (g)	17.78 ± 4.38	16.14 ± 3.85	15.88 ± 3.13	14.94 ± 3.63
Sex ratio (male/female)	0.98 (50/51)	1.04 (50/48)	1.33 (60/45)	1.29 (49/38)

Each value represents the mean ± SD.

Table 1-4. Summary of average body weight of offspring during the lactation period in a two-generation toxicity study of piperonyl butoxide administered to mice.

	Dose Levels (%)			
	0	0.15	0.3	0.6
PND 0	101 1.58 ± 0.21	98 1.48 ± 0.12**	105 1.51 ± 0.15	87 1.37 ± 0.09**
PND 4	86 2.73 ± 0.58	92 2.68 ± 0.44	84 2.75 ± 0.41	63 2.08 ± 0.41**
PND 7	80 4.23 ± 0.62	91 4.11 ± 0.69	84 3.87 ± 0.70**	55 2.98 ± 0.62**
PND 14	80 6.67 ± 0.93	91 6.54 ± 1.01	84 5.85 ± 0.89**	54 4.49 ± 0.82**
PND 21	80 9.76 ± 1.64	91 9.66 ± 2.32	84 9.08 ± 1.90	45 5.75 ± 1.91**

Each value represents number of offspring and the mean ± SD. Significantly different from controls: **P<0.01.
PND = postnatal day.

Table 1-5. Summary of number of offspring and survival index (%) during the lactation period in a two-generation toxicity study of piperonyl butoxide administered to mice.

	Dose Levels (%)			
	0	0.15	0.3	0.6
PND 0	101 (100.0)	98 (100.0)	105 (100.0)	87 (100.0)
PND 4	86 (85.1)	92 (93.9)*	84 (98.8)**	63 (72.4)*
PND 7	80 (89.9)	91 (92.9)	84 (98.8)*	55 (76.4)*
PND 14	80 (89.9)	91 (92.9)	84 (98.8)*	54 (75.0)*
PND 21	80 (89.9)	91 (92.9)	84 (98.8)*	45 (75.0)*

Each value represents number of offspring: survival index (%) in parentheses. Survival indices are calculated except for the dead litters. Significantly different from controls:

*P<0.05, **P<0.001.

PND = postnatal day.

Table 1-6. Multiple-T water maze performance of F₁ generation mice administered piperonyl butoxide at 6 weeks of age.

	Dose Levels (%)			
	0	0.15	0.3	0.6
No. of males examined	7	9	8	4
No. of errors				
1st day	3.3 ± 0.4	4.7 ± 1.0	3.4 ± 0.5	4.0 ± 0.7
2nd day	7.0 ± 1.1	2.9 ± 0.8	4.1 ± 0.9	2.8 ± 0.9
3rd day	1.7 ± 0.4	4.4 ± 1.0	4.5 ± 1.1	3.0 ± 1.2
Time taken (s)				
1st day	78.9 ± 15.2	80.6 ± 13.9	87.5 ± 14.6	77.3 ± 16.3
2nd day	74.4 ± 7.6	38.9 ± 6.00*	65.3 ± 15.4	27.3 ± 4.4*
3rd day	37.4 ± 6.9	63.7 ± 13.6	57.4 ± 12.3	34.0 ± 10.3
No. of females examined	7	9	8	3
No. of errors				
1st day	4.4 ± 0.5	2.9 ± 0.4	4.8 ± 0.5	4.3 ± 2.3
2nd day	4.4 ± 0.8	3.6 ± 0.9	4.5 ± 1.0	2.0 ± 0.6
3rd day	3.3 ± 0.6	2.6 ± 0.6	3.8 ± 0.9	2.3 ± 0.3
Time taken (s)				
1st day	104.6 ± 11.5	87.7 ± 11.6	112.9 ± 5.6	63.3 ± 19.9
2nd day	89.0 ± 13.2	66.6 ± 13.2	88.1 ± 12.7	40.3 ± 10.2
3rd day	69.7 ± 17.8	47.4 ± 14.2	73.0 ± 14.4	39.0 ± 5.5

Each value represents mean ± SE. Significantly different from controls: *P<0.05.

第2章 ピペロニルブトキシドの3世代毒性研究における生殖 及び行動発達に及ぼす影響

1. 序文

第1章において、ピペロニルブトキシドが後世代に及ぼす影響について、まず2世代の行動発達毒性研究を行ない、生殖と行動発達に及ぼす影響について検討した結果、オープンフィールド試験において親マウスの8週齢の移動量と立ち上がり回数、子マウスの3週齢の移動量が雄の投与群で用量依存的に抑制された。また、授乳期間中の子マウスの体重は投与群で有意に抑制された。子マウスの行動発達では7日齢の正向反射と4日齢の背地走性、及び14日齢の嗅覚性指向反応が投与群で用量依存的に抑制された。また、4日齢の遊泳試験では方向、頭角度、四肢の動きともに投与群で用量依存的に抑制された。以上の結果から、第1章で用いられた用量（0.15–0.6%）のピペロニルブトキシドは、親動物の一般状態にはあまり影響を及ぼさないが、生殖と行動発達に対しては抑制的に影響することが確認された。

そこで、第2章ではより幅広い濃度を含むピペロニルブトキシドの3世代毒性研究を行ない、ピペロニルブトキシドの生殖と行動発達に及ぼす影響の再現性と複数世代を経た影響について検討した³⁴⁾。世代を重ねた場合の毒性発現の強弱を検討するため、投与濃度は第1章で影響の見られなかった0.15%より低い濃度と、次世代の発達に影響を及ぼした0.6%より高い濃度を含む4段階の濃度を設定した。

なお、本稿作成にあたり、本論文発表以降の統計解析手法の発展・普及に伴い、多重性を考慮した多重比較検定やカテゴリカル・データの検定が利用可能になったことから、科学的により適切な統計解析手法を用いてデータの再解析

を行なった。

2. 材料と方法

2-1. 試料

ピペロニルブトキシドは第 1 章と同様のものを用いた。

2-2. 動物と飼育条件

マウス及びその飼育条件は第 1 章と同様のものを用いた。

2-3. 実験計画

ピペロニルブトキシドを混餌法により、1 群雌雄各 10 匹ずつ 0.1、0.2、0.4、0.8%の濃度で、5 週齢より投与した。対照群として雌雄各 10 匹ずつ実験期間中に標準固形飼料を投与した。各マウスの摂餌量を、 F_0 世代は第 1 章と同様に、 F_1 世代は交配前（離乳から交配まで [37 日間]）、交配期（5 日間）、妊娠期（交配終了から出産まで [14 日間]）、授乳期（出産から離乳まで [28 日間]）の 4 期に分けて測定した。

2-4. 生殖試験

F_0 世代の実験開始から F_1 世代の離乳までは第 1 章と同様に行なった。 F_1 世代の離乳時に各群雌雄各 10 匹となるよう調整した。 F_1 世代の離乳後は 4-9 週齢に週に一回体重を測定した。 F_1 世代の交配から F_2 世代の離乳までは F_0 世代と同様に行なった。

2-5. 行動発達試験

授乳期間中の子マウスの行動発達に関するテストは F_1 世代及び F_2 世代とも第 1 章と同様に行なった。

2-6. 統計解析

取得したデータの解析には第 1 章と同様の手法を用いた。

3. 結果

3-1. 飼料及び薬物摂取量

実験期間中の飼料の摂取量は、授乳期間を除いてピペロニルブトキシドの投与による変化は見られなかった (Table 2-1)。授乳期間中、母親マウスの摂取量は 0.8%投与群で抑制される傾向が見られた。したがって、薬物摂取量は授乳期間を除いて用量依存的に増加し、全期間を通じ摂取量の逆転は見られなかった。

3-2. F₀ マウスに対する影響

3-2-1. 交配前

親動物の平均体重の推移には、ピペロニルブトキシドの投与による変化は見られなかった。また、親動物の一般状態にピペロニルブトキシドの投与による影響は見られなかった。

3-2-2. 妊娠期

0.2 及び 0.4%投与群の雌各 1 匹と 0.8%投与群の雌 2 匹の計 4 匹は妊娠に至らなかった (Table 2-2)。また、0.8%投与群の雌 2 匹が流産した。妊娠マウスの平均体重の推移は、投与群で抑制される傾向が見られ、0.4%及び 0.8%投与群で有意に抑制された。期間中、妊娠マウスの一般状態にピペロニルブトキシドの投与による影響は見られなかった。

3-2-3. 授乳期

対照群及び 0.1%投与群各群 1 匹と 0.4%投与群 2 匹の計 4 匹の母親マウスが、授乳期の第 1 週に乳腺の発達不良を示した。また、0.1%投与群の母親マウス 1 匹が、授乳期の第 3 週に死亡した。死亡例を解剖した結果、明らかな病変は見られなかった。母親マウスの平均体重の推移は、投与群で抑制される傾向が見られ、0.4%及び 0.8%投与群で有意に抑制された。期間中、生存している母親マウスの一般状態にピペロニルブトキシドの投与による影響は見られなかった。

3-3. F₁ マウスに対する影響

3-3-1. 生殖に及ぼす影響

出生時の産子数及び性比には、ピペロニルブトキシドの投与による変化は見られなかったが、1 腹子の重さは 0.8%投与群で有意に抑制された (Table 2-2)。授乳期間中の平均子体重の推移は、投与群で有意に抑制され、特に 0.8%投与群で顕著であった (Table 2-3)。0.1%投与群の 1 腹子が、母親マウスの乳腺の発達不良が原因で授乳期の第 1 週に全て死亡した。全個体が死亡した腹子を除いて計算した生存率は、0.8%投与群で減少する傾向が見られた (Table 2-4)。

3-3-2. 行動発達に及ぼす影響

授乳期における F₁ マウスの行動発達のテストでは、7 日齢の正向反射が 0.4 及び 0.8%投与群で有意に抑制され、その影響は用量依存的であった (Fig. 2-1)。4 日齢の背地走性も 0.8%投与群で有意に抑制され、その影響は用量依存的であった (Fig. 2-1)。14 日齢の嗅覚性指向反応は、0.4%及び 0.8%投与群で有意に抑制され、その影響は用量依存的であった (Fig. 2-1)。4 日齢の遊泳試験では、頭角度が 0.1%及び 0.8%投与群で有意に抑制された (Fig. 2-2)。14 日齢の遊泳試験では、頭角度及び四肢の動きが 0.8%投与群で有意に抑制された (Fig. 2-2)。その他の測定項目には変化は見られなかった。

3-3-3. 離乳後から交配前

F₁ マウスの平均体重の推移には、ピペロニルブトキシドの投与による変化は見られなかった。また、親動物の一般状態にピペロニルブトキシドの投与による影響は見られなかった。

3-3-4. 妊娠期

対照群、0.2%、0.4%及び 0.8%投与群の雌各 1 匹の計 4 匹は妊娠に至らなかった (Table 2-5)。また、0.8%投与群の雌 1 匹は流産した。妊娠マウスの平均体重の推移は、投与群で抑制される傾向が見られ、0.4%及び 0.8%投与群で有意に抑

制された。期間中、妊娠マウスの一般状態にピペロニルブトキシドの投与による影響は見られなかった。

3-3-5. 授乳期

授乳期間中に母親マウスに対してピペロニルブトキシドの投与による変化は見られなかった。母親マウスの平均体重の推移は、投与群で抑制される傾向が見られ、0.8%投与群で有意に抑制された。期間中、生存している母親マウスの一般状態にピペロニルブトキシドの投与による影響は見られなかった。

3-4. F₂ マウスに対する影響

3-4-1. 生殖に及ぼす影響

出生時の性比には、ピペロニルブトキシドの投与による変化は見られなかったが、産子数及び1腹子の重さは0.4及び0.8%投与群で有意に抑制された (Table 2-5)。授乳期間中の平均子体重の推移は、投与群で有意に抑制され、特に 0.8%投与群で顕著であった (Table 2-6)。0.8%投与群の1腹子が、授乳期の第1週に全て死亡した。0.4%投与群で四肢全ての第5指が欠損している雌子マウスが1匹確認された。全個体が死亡した腹子を除いて計算した生存率は、0.8%投与群で減少する傾向が見られた (Table 2-7)。

3-4-2. 行動発達に及ぼす影響

授乳期における F₂ マウスの行動発達のテストでは、4日齢及び7日齢の正向反射が投与群で有意に抑制され、その影響は用量依存的であった (Fig. 2-3)。4日齢の背地走性も投与群で有意に抑制され、その影響は用量依存的であった (Fig. 2-4)。7日齢の背地走性は0.8%投与群で抑制された (Fig. 2-4)。7日齢の断崖回避及び14日齢の嗅覚性指向反応は投与群で有意に抑制され、その影響はで用量依存的であった (Fig. 2-5)。4日齢の遊泳試験では、方向と頭角度が投与群で有意に抑制された (Fig. 2-6)。14日齢の遊泳試験では、頭角度が0.8%投与群で有意に抑制された (Fig. 2-6)。その他の測定項目には変化は見られなかった。

4. 考察

本研究において、ピペロニルブトキシドがマウスの生殖に及ぼす影響は、特に産子数と1腹子の重さについては、F₁世代に比べF₂世代の方が強く表れている。しかしながら、対照群の1腹子の重さがF₁世代に比べF₂世代の方がかなり大きく、0.1–0.4%の3投与群における1腹子の重さはF₁世代とF₂世代で差がないために、0.1–0.4%の3投与群で見られる影響はピペロニルブトキシドの投与によるものではないかも知れない。しかし、F₂世代の母親マウスの摂餌量は、交配前及び妊娠期において全ての群で差が見られないことから、F₂世代の1腹子の重さに見られる影響はピペロニルブトキシドの投与によるものと考えられる。

7日齢の正向反射や断崖回避のように、授乳期における行動発達のいくつかの項目がF₁世代よりもF₂世代で抑制されているが、行動発達の項目の中には用量相関関係を示さないものもあった。授乳期間中の母親マウスの摂餌量が高濃度投与群で減少していることから、これらの子マウスは栄養不良であったかも知れない。したがって、高濃度投与群で見られた行動発達の遅延は、成長の阻害によるものかも知れない。しかしながら、Smart と Dobbing はラットの研究で、栄養不良がラットの正向反射・背地走性及び断崖回避に影響を与えないことを見いだした³¹⁾。また、著者はマウスを用いた食用赤色2号の2世代毒性研究で、子マウスの体重に影響ない場合でも、嗅覚性指向反応が抑制されることを報告している³⁵⁾。さらに、木村らはピペロニルブトキシドの経口及び静脈内投与で、ラットの脳への分布が認められたことを報告している⁹⁾。本研究において、すべての投与群において行動発達が抑制されていることから、これらの行動発達の变化は栄養失調による成長の阻害ではなく、ピペロニルブトキシドによる中枢神経系への影響によるものと考えられる。行動発達のいくつかの項目がF₁世代よりもF₂世代でより低い濃度で抑制されていることから、ピペロニルブトキシ

ドによる影響は世代を経るとより強く表れることが示唆される。

以上の結果から、本研究で用いられた用量のピペロニルブトキシドは、生殖と行動発達に対しては抑制的に影響することと、その影響の再現性が確認された。しかしながら、特に影響の大きかった授乳期間中のピペロニルブトキシドの摂取量は、0.1%投与群でも約 650 mg/kg と高い濃度であり、ピペロニルブトキシドの日本における推定摂取量は、大人 1 人当たり 1.77 μg （体重 1kg 当たり 0.0354 μg ）と報告されており³³⁾、この値は人間の ADI の 0.20 mg に較べるとはるかに少ないので、ピペロニルブトキシドは日常生活での食品からの摂取量ではほとんど人体に影響を及ぼさないであろう。しかしながら、ピペロニルブトキシド 0.4%投与群で四肢の奇形を有する雌子マウスが確認されたことから、ピペロニルブトキシドのマウスを用いた発生に及ぼす毒性学的な影響を検討する必要がある。また、ピペロニルブトキシドは生殖と行動発達に対して、用量依存的な影響を及ぼすことから、より低濃度のピペロニルブトキシドを摂取した場合の影響を検討する必要がある。

5. 小括

第2章では、第1章のマウスを用いた2世代の行動発達毒性研究の結果を受けて、より低濃度を含む3世代毒性研究を行ない、ピペロニルブトキシドの生殖と行動発達に及ぼす影響の再現性と複数世代を経た影響について検討した。

ピペロニルブトキシドを、0（対照群）、0.1、0.2、0.4、0.8%の濃度で、マウスにF₀世代の5週齢からF₂世代の離乳時まで3世代にわたって投与した。その結果、産子数と一腹子の重さが各世代とも0.8%投与群で減少した。授乳期間中の子マウスの体重は各世代とも投与群で有意に抑制され、3週齢の生存率は0.8%投与群で減少した。また、0.4%投与群で四肢全ての第5指が欠損している雌子マウスが1匹確認された。子マウスの行動発達ではF₁世代の7日齢の正向反射及び背地走性、14日齢の嗅覚性指向反応が投与群で用量依存的に抑制され、遊泳試験での14日齢の頭角度及び四肢の動きが0.8%投与群で抑制された。F₂世代では4日齢及び7日齢の正向反射、4日齢の背地走性、7日齢の断崖回避及び14日齢の嗅覚性指向反応が投与群で用量依存的に抑制された。

以上の結果から、本研究で用いられた用量のピペロニルブトキシドは、生殖と行動発達に対しては抑制的に影響することと、その影響の再現性が確認された。

MALE AND FEMALE OFFSPRING

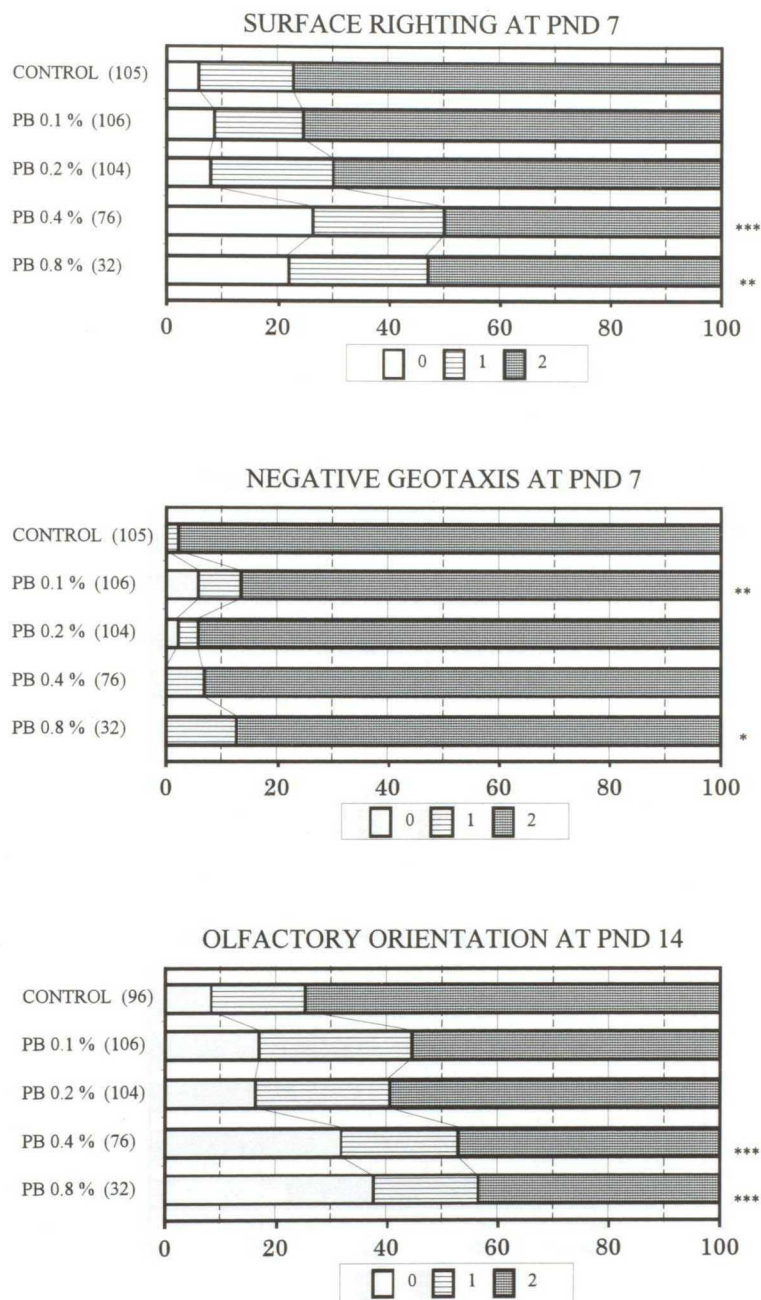


Fig. 2-1. Score frequencies of behavioural development in F₁ generation during the lactation period in a three-generation toxicity study of piperonyl butoxide (PB) administered to mice (1). Each value represents rate of each score: number of mice in parentheses after group name. Significant different from controls: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

MALE AND FEMALE OFFSPRING

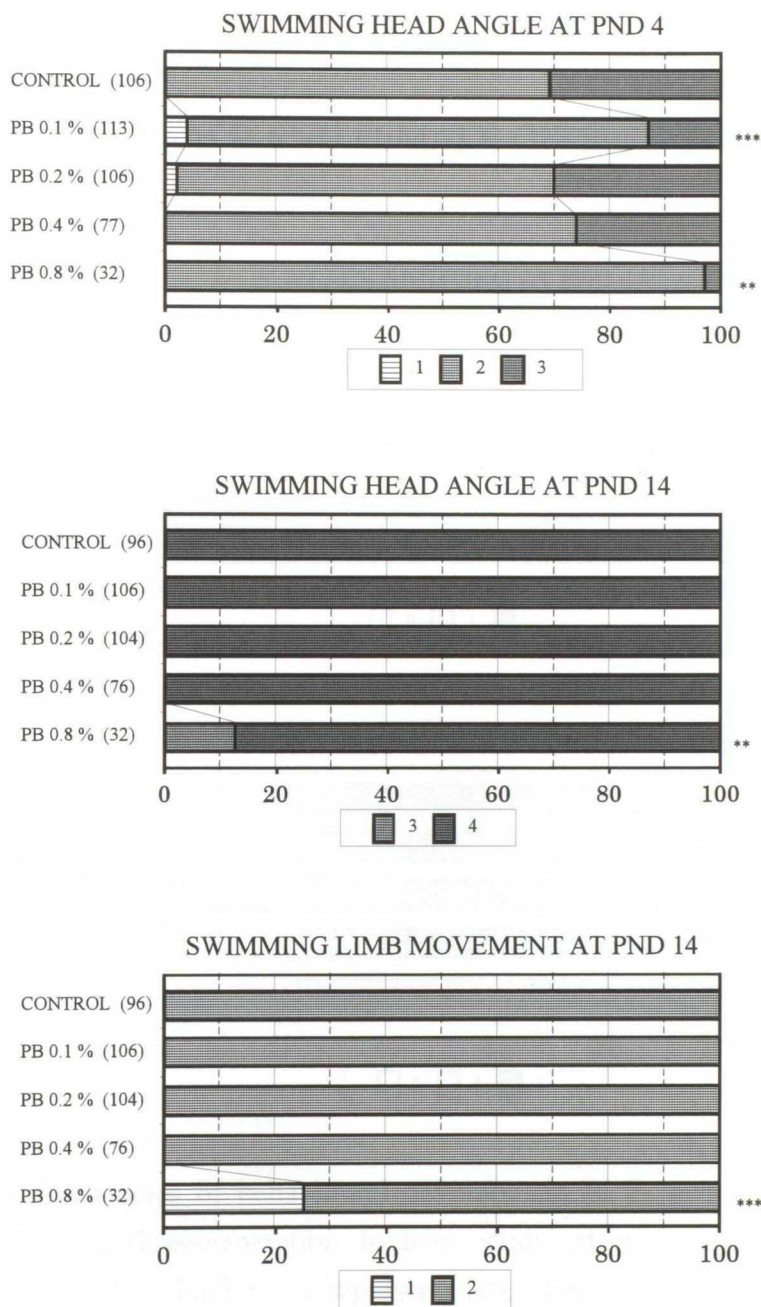


Fig. 2-2. Score frequencies of behavioural development in F₁ generation during the lactation period in a three-generation toxicity study of piperonyl butoxide (PB) administered to mice (2). Each value represents rate of each score: number of mice in parentheses after group name. Significant different from controls: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

MALE AND FEMALE OFFSPRING

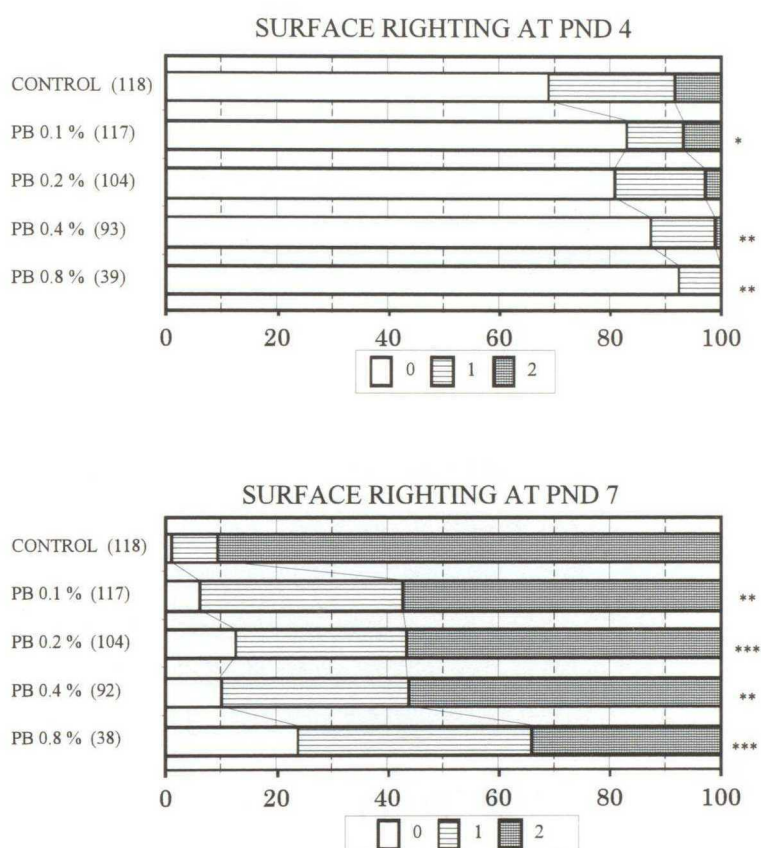


Fig. 2-3. Score frequencies of behavioural development in F₂ generation during the lactation period in a three-generation toxicity study of piperonyl butoxide (PB) administered to mice (1). Each value represents rate of each score: number of mice in parentheses after group name. Significant different from controls: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

MALE AND FEMALE OFFSPRING

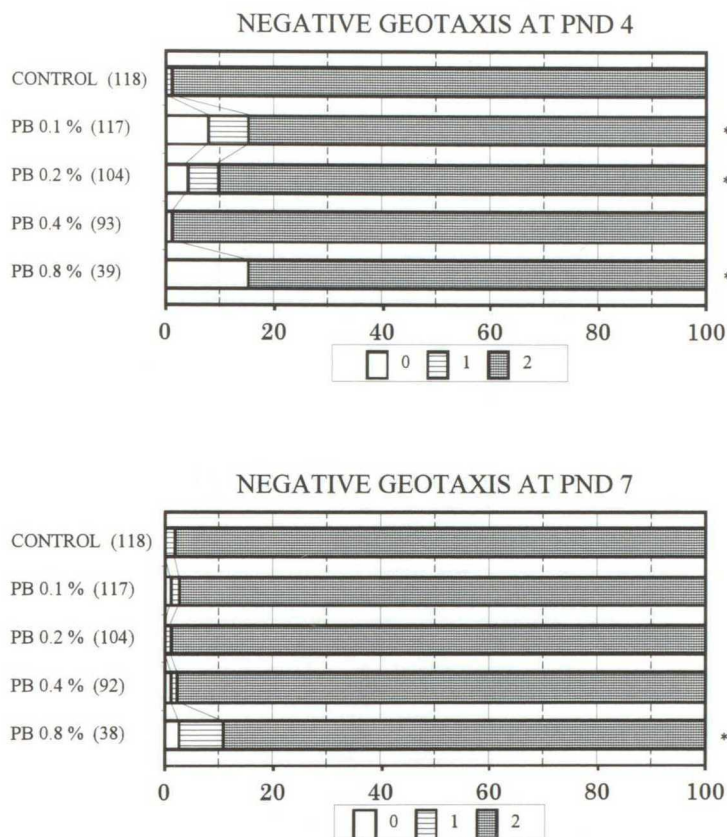


Fig. 2-4. Score frequencies of behavioural development in F₂ generation during the lactation period in a three-generation toxicity study of piperonyl butoxide (PB) administered to mice (2). Each value represents rate of each score: number of mice in parentheses after group name. Significant different from controls: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

MALE AND FEMALE OFFSPRING

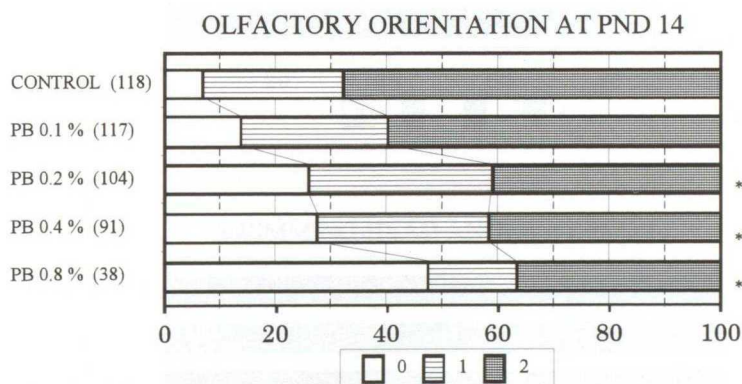
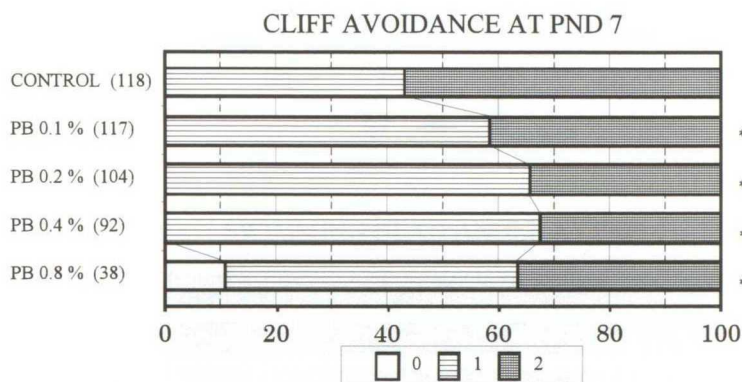


Fig. 2-5. Score frequencies of behavioural development in F₂ generation during the lactation period in a three-generation toxicity study of piperonyl butoxide (PB) administered to mice (3). Each value represents rate of each score: number of mice in parentheses after group name. Significant different from controls: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

MALE AND FEMALE OFFSPRING

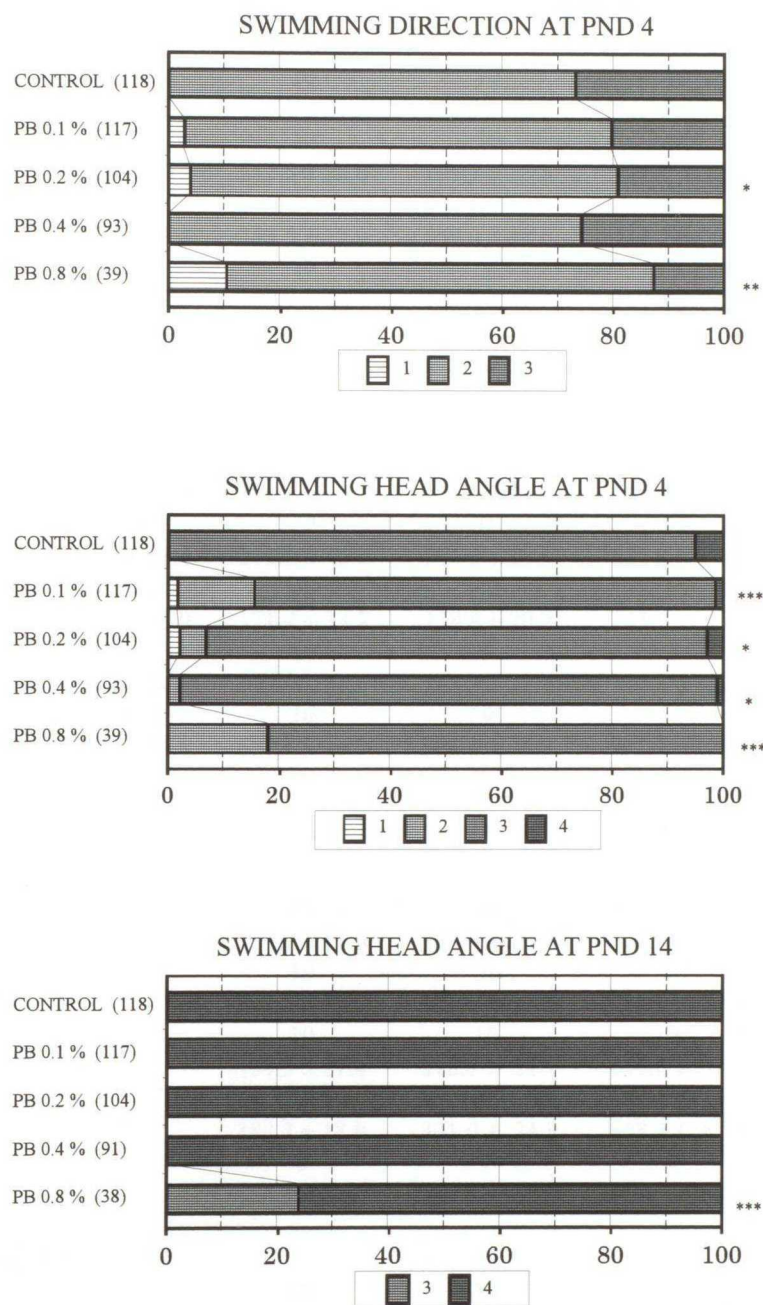


Fig. 2-6. Score frequencies of behavioural development in F₂ generation during the lactation period in a three-generation toxicity study of piperonyl butoxide (PB) administered to mice (4). Each value represents rate of each score: number of mice in parentheses after group name. Significant different from controls: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Table 2-1. Average daily food and chemical intake of mice administered piperonyl butoxide in a three-generation toxicity study.

		Dose Levels (%)				
		0	0.1	0.2	0.4	0.8
Food intake (g/kg/day)						
F ₀ generation						
preconception						
male	10	10	10	10	10	
	160.6 ± 6.6	169.1 ± 11.6	166.9 ± 12.9	156.8 ± 10.3	146.2 ± 10.6*	
female	10	10	10	10	10	
	196.9 ± 27.5	212.5 ± 29.0	191.7 ± 13.8	186.6 ± 19.4	164.8 ± 16.4*	
mating	10	10	10	10	10	
	152.0 ± 15.4	159.5 ± 17.0	159.0 ± 10.6	161.7 ± 9.5	154.5 ± 15.2	
gestation	10	10	9	9	5	
	165.6 ± 10.8	182.7 ± 18.9	165.5 ± 12.4	167.1 ± 17.0	152.7 ± 12.7	
lactation	9	8	9	9	4	
	650.8 ± 63.0	648.5 ± 57.6	622.5 ± 51.0	507.9 ± 40.0**	378.6 ± 18.7**	
F ₁ generation						
preconception						
male	10	10	10	10	10	
	163.4 ± 10.9	172.3 ± 9.4	172.7 ± 11.6	167.9 ± 6.7	179.2 ± 14.7*	
female	10	10	10	10	10	
	191.1 ± 31.4	211.5 ± 40.8	198.5 ± 20.5	182.8 ± 13.6	180.6 ± 12.3	
mating	10	10	10	10	10	
	156.5 ± 19.9	171.4 ± 33.2	158.8 ± 20.2	165.7 ± 16.4	172.8 ± 27.2	
gestation	9	10	9	9	8	
	159.2 ± 24.3	173.4 ± 21.6	166.3 ± 23.2	162.7 ± 16.3	158.1 ± 20.2	
lactation	9	10	9	9	7	
	637.1 ± 74.8	637.4 ± 49.5	584.6 ± 76.5	533.3 ± 72.0*	339.4 ± 36.7**	
Chemical intake (mg/kg/day)						
F ₀ generation						
preconception						
male	-	10	10	10	10	
	-	169.1 ± 11.6	333.8 ± 25.8	627.3 ± 41.2	1169.6 ± 84.9	
female	-	10	10	10	10	
	-	212.5 ± 29.0	383.4 ± 27.5	746.5 ± 77.8	1318.3 ± 131.1	
mating	-	10	10	10	10	
	-	159.5 ± 17.0	318.1 ± 21.1	646.8 ± 31.2	1236.1 ± 121.8	
gestation	-	10	9	9	5	
	-	182.7 ± 18.9	331.0 ± 24.8	668.4 ± 67.9	1221.5 ± 101.4	
lactation	-	8	9	9	4	
	-	648.5 ± 57.6	1245.0 ± 101.9	2031.5 ± 160.1	3029.0 ± 149.6	
F ₁ generation						
preconception						
male	-	10	10	10	10	
	-	172.3 ± 9.4	345.3 ± 23.2	671.7 ± 26.9	1433.8 ± 117.6	
female	-	10	10	10	10	
	-	211.5 ± 40.8	396.9 ± 41.0	731.3 ± 54.2	1445.0 ± 98.4	
mating	-	10	10	10	10	
	-	171.4 ± 33.2	317.6 ± 40.4	662.6 ± 65.6	1382.3 ± 217.3	
gestation	-	10	9	9	8	
	-	173.4 ± 21.6	332.7 ± 46.5	650.9 ± 65.3	1264.8 ± 161.7	
lactation	-	10	9	9	7	
	-	637.4 ± 49.5	1169.2 ± 152.9	2133.2 ± 287.8	2715.5 ± 293.7	

Each value represents number of mice and daily intake during each period (mean ± SD). Significantly different from controls: *P<0.05, **P<0.001.

Table 2-2. Summary of data of litters at birth of F₁ generation in a three-generation toxicity study of piperonyl butoxide administered to mice.

	Dose Levels (%)				
	0	0.1	0.2	0.4	0.8
No. of females examined	10	10	10	10	10
No. of pregnant females	10	10	10	9	8
No. of litters	10	10	9	9	6
No. of offspring	106	116	106	81	46
Average litter size	10.6 ± 1.7	11.6 ± 1.8	11.8 ± 1.6	9.0 ± 2.4	7.7 ± 2.3
Average litter weight (g)	17.06 ± 2.30	17.44 ± 2.14	18.33 ± 1.80	13.95 ± 3.00	10.54 ± 3.19**
Sex ratio (male/female)	1.00 (53/53)	0.78 (51/65)	0.93 (51/55)	0.80 (36/45)	1.42 (27/19)

Each value represents the mean ± SD. Significantly different from controls: **P<0.01.

Table 2-3. Summary of average body weight of offspring during the lactation period of F₁ generation in a three-generation toxicity study of piperonyl butoxide administered to mice.

	Dose Levels (%)				
	0	0.1	0.2	0.4	0.8
Male Offspring					
PND 0	53	51	51	36	27
	1.64 ± 0.15	1.50 ± 0.16**	1.60 ± 0.14	1.57 ± 0.14	1.42 ± 0.13**
PND 4	53	51	51	35	17
	3.09 ± 0.50	2.62 ± 0.44**	2.91 ± 0.36	2.70 ± 0.68	2.40 ± 0.36**
PND 7	52	49	49	34	17
	4.59 ± 0.84	3.93 ± 0.41**	4.23 ± 0.50	3.74 ± 0.96**	3.17 ± 0.56**
PND 14	48	49	49	34	17
	7.30 ± 1.09	6.16 ± 0.67**	6.49 ± 0.80	5.51 ± 1.24**	4.64 ± 0.83**
PND 21	48	49	49	34	17
	12.21 ± 2.18	9.68 ± 1.39**	10.80 ± 2.21	9.10 ± 2.76**	5.85 ± 1.75**
Female Offspring					
PND 0	53	65	55	45	19
	1.58 ± 0.12	1.51 ± 0.12	1.52 ± 0.16	1.53 ± 0.16	1.33 ± 0.10**
PND 4	53	62	55	42	15
	2.93 ± 0.52	2.60 ± 0.28**	2.78 ± 0.38	2.65 ± 0.80	2.35 ± 0.39**
PND 7	53	57	55	42	15
	4.39 ± 0.97	3.87 ± 0.32**	4.01 ± 0.50	3.66 ± 1.23**	3.20 ± 0.58**
PND 14	48	57	55	42	15
	7.18 ± 1.09	6.04 ± 0.65**	6.11 ± 0.92**	5.55 ± 1.80**	4.83 ± 0.76**
PND 21	47	57	55	42	15
	11.91 ± 2.17	9.41 ± 1.36**	10.06 ± 2.40**	8.82 ± 3.09**	6.60 ± 1.50**

Each value represents mean ± SD. Significantly different from controls: **P<0.01.
PND = postnatal day

Table 2-4. Summary of number of offspring and survival index (%) during the lactation period of F₁ generation in a three-generation toxicity study of piperonyl butoxide administered to mice.

	Dose Levels (%)				
	0	0.1	0.2	0.4	0.8
Male Offspring					
PND 0	53 (100.0)	51 (100.0)	51 (100.0)	36 (100.0)	27 (100.0)
PND 4	53 (100.0)	51 (100.0)	51 (100.0)	35 (97.2)	17 (70.8)**
PND 7	52 (98.1)	49 (100.0)	49 (96.1)	34 (94.4)	17 (70.8)
PND 14	48 (90.6)	49 (100.0)	49 (96.1)	34 (94.4)	17 (70.8)
PND 21	48 (90.6)	49 (100.0)	49 (96.1)	34 (94.4)	17 (70.8)
Female Offspring					
PND 0	53 (100.0)	65 (100.0)	55 (100.0)	45 (100.0)	19 (100.0)
PND 4	53 (100.0)	62 (95.4)	55 (100.0)	42 (93.3)	15 (83.3)*
PND 7	53 (100.0)	57 (98.3)	55 (100.0)	42 (93.3)	15 (83.3)*
PND 14	48 (90.6)	57 (98.3)	55 (100.0)	42 (93.3)	15 (83.3)
PND 21	47 (88.7)	57 (98.3)	55 (100.0)	42 (93.3)	15 (83.3)

Each value represents number of offspring: survival index (%) in parentheses. Survival indices are calculated except for the dead litters. Significantly different from controls: *P<0.05, **P<0.001.
PND = postnatal day

Table 2-5. Summary of data of litters at birth of F₂ generation in a three-generation toxicity study of piperonyl butoxide administered to mice.

	Dose Levels (%)				
	0	0.1	0.2	0.4	0.8
No. of females examined	10	10	10	10	10
No. of pregnant females	9	10	9	9	9
No. of litters	9	10	9	9	8
No. of offspring	118	118	106	93	56
Average litter size	13.1 ± 1.5	11.8 ± 1.8	11.8 ± 1.2	10.3 ± 1.2*	7.0 ± 1.3**
Average litter weight (g)	20.59 ± 1.23	17.46 ± 2.52*	17.76 ± 1.85	15.53 ± 1.73**	8.84 ± 1.71**
Sex ratio (male/female)	1.07 (61/57)	1.11 (62/56)	0.86 (49/57)	1.16 (50/43)	1.33 (32/24)

Each value represents the mean ± SD. Significantly different from controls: *P<0.05, **P<0.01.

Table 2-6. Summary of average body weight of offspring during the lactation period of F₂ generation in a three-generation toxicity study of piperonyl butoxide administered to mice.

	Dose Levels (%)				
	0	0.1	0.2	0.4	0.8
Male Offspring					
	61	62	49	50	32
PND 0	1.60 ± 0.14	1.52 ± 0.14	1.52 ± 0.16	1.52 ± 0.10	1.28 ± 0.12**
	61	62	47	50	20
PND 4	3.00 ± 0.35	2.79 ± 0.34*	2.72 ± 0.30**	2.70 ± 0.28**	2.27 ± 0.27**
	61	62	47	50	19
PND 7	4.44 ± 0.51	4.08 ±	3.86 ± 0.50**	3.86 ± 0.46**	3.22 ± 0.42**
	61	62	47	49	19
PND 14	6.59 ± 0.81	6.29 ± 0.84	5.78 ± 0.75**	5.85 ± 0.56**	4.78 ± 0.58**
	61	62	47	49	19
PND 21	10.64 ± 1.77	10.26 ± 1.80	8.91 ± 1.95**	8.65 ± 1.67**	6.31 ± 1.38**
Female Offspring					
	57	56	57	43	24
PND 0	1.54 ± 0.16	1.44 ± 0.16	1.50 ± 0.12	1.48 ± 0.09	1.23 ± 0.11**
	57	55	57	43	19
PND 4	2.90 ± 0.39	2.67 ± 0.40	2.62 ± 0.34*	2.63 ± 0.26*	2.24 ± 0.25**
	57	55	57	42	19
PND 7	4.30 ± 0.52	3.96 ± 0.52*	3.68 ± 0.52**	3.80 ± 0.43**	3.24 ± 0.48**
	57	55	57	42	19
PND 14	6.30 ± 0.78	6.22 ± 0.78	5.58 ± 0.77**	5.74 ± 0.72*	4.85 ± 0.75**
	57	55	57	42	19
PND 21	9.83 ± 1.73	9.89 ± 1.82	8.68 ± 1.88*	8.40 ± 1.55**	6.73 ± 1.57**

Each value represents number of offspring and mean ± SD. Significantly different from controls:
 *P<0.05, **P<0.01.
 PND = postnatal day

Table 2-7. Summary of number of offspring and survival index (%) during the lactation period of F₂ generation in a three-generation toxicity study of piperonyl butoxide administered to mice.

	Dose Levels (%)				
	0	0.1	0.2	0.4	0.8
Male Offspring					
PND 0	61 (100.0)	62 (100.0)	49 (100.0)	50 (100.0)	32 (100.0)
PND 4	61 (100.0)	62 (100.0)	47 (95.9)	50 (100.0)	20 (76.9)**
PND 7	61 (100.0)	62 (100.0)	47 (95.9)	50 (100.0)	19 (73.1)**
PND 14	61 (100.0)	62 (100.0)	47 (95.9)	49 (98.0)	19 (73.1)**
PND 21	61 (100.0)	62 (100.0)	47 (95.9)	49 (98.0)	19 (73.1)**
Female Offspring					
PND 0	57 (100.0)	56 (100.0)	57 (100.0)	43 (100.0)	24 (100.0)
PND 4	57 (100.0)	55 (98.2)	57 (100.0)	43 (100.0)	19 (82.6)*
PND 7	57 (100.0)	55 (98.2)	57 (100.0)	42 (97.7)	19 (82.6)*
PND 14	57 (100.0)	55 (98.2)	57 (100.0)	42 (97.7)	19 (82.6)*
PND 21	57 (100.0)	55 (98.2)	57 (100.0)	42 (97.7)	19 (82.6)*

Each value represents number of offspring: survival index (%) in parentheses. Survival indices are calculated except for the dead litters. Significantly different from controls: *P<0.01, **P<0.001. PND = postnatal day.

第3章 マウスにおけるピペロニルブトキシドの発生毒性評価

1. 序文

ピペロニルブトキシドが後世代に及ぼす影響については、これまでに Kennedy らがピペロニルブトキシドはラットに対して催奇形性を示さないと報告し⁴⁾、Khera らも同様にラットに対して催奇形性及び母体毒性を示さないと報告している¹⁶⁾が、第2章のマウスを用いた3世代の行動発達毒性研究において、著者らはピペロニルブトキシド 0.4%投与群で四肢の奇形を有する雌子マウスを確認し、東京都立衛生研究所（当時）の先行調査においてもマウスに対する前肢の奇形の可能性が示唆されていた。

そこで、第3章ではピペロニルブトキシドのマウスの発生に対する影響について、特に四肢の奇形に重点を置いて検討した³⁶⁾。投与濃度については先行調査において前肢の奇形の可能性が示唆された 1800 mg/kg を最高濃度に3段階の濃度を設定した。また、投与時期はマウスの前肢芽が形成される妊娠9日目に設定した。

2. 材料と方法

2-1. 試料

ピペロニルブトキシドは第 1 章と同様のものを用いた。

2-2. 動物と飼育条件

マウス及びその飼育条件は第 1 章と同様のものを用いた。

2-3. 実験計画

マウスは 8 週齢に雌 2 匹と雄 1 匹を 16:30 から 1 晩同居交配させ、翌朝雌雄を分離した。交尾の判定は膣栓の確認によって行ない、この日を妊娠 0 日とした。膣栓の確認できた雌マウスをランダムに 4 つのグループに分けて、プラスチックケージで 1 匹ずつ飼育した。マウスの前肢芽が形成される妊娠 9 日目³⁷⁾にオリーブオイルに溶かしたピペロニルブトキシドを強制経口投与により、体重 1 kg 当たり 0 (対照群)、1065、1385、1800 mg/kg の濃度で投与した。

2-4. 解剖と観察

妊娠 18 日目に妊娠マウスの体重を計測し、一般状態を確認後、頸椎脱臼により安楽死させ、解剖して胎子の状態を観察した。子宮内の吸収子の数と位置を確認し、生存及び死亡胎子と着床痕数を測定した。生存胎子は体重を測定し、性別と外表奇形や変異の有無について観察した。胎子は 70%エタノールで 1 日以上固定した後に剥皮し、95%エタノールで 4 日以上固定した後に、アリザリンレッド S とアルシアンブルー 8GS による骨・軟骨の 2 重骨格染色を行なった³⁸⁾。染色液の構成は以下の通り：フィルターを通して 0.3%に調製したアルシアンブルー 8GS の 70%エタノール溶液 1 容量；フィルターを通して 0.1%に調製したアリザリンレッド S の 95%エタノール溶液 1 容量；酢酸 1 容量；70%エタノール 17 容量³⁹⁾。

2-5. 統計解析

母体重、着床痕数、産子数及び胎子重量は Bartlett の等分散検定の後、有意でなければ一元配置分散分析を行なった後に、Bonferroni の多重比較検定のパラメトリック版、有意ならば Kruskal-Wallis の順位の分散分析を行なった後に、Bonferroni の多重比較検定のノンパラメトリック版により解析した。早期及び後期死胚数、総吸収胚率、性比及び外表奇形の出現率については χ^2 検定または Fisher の正確確率検定により解析した。また、用量反応性の解析は累積 χ^2 検定または Jonckheere の傾向検定により解析した。各検定の有意水準は 0.05 以下とした。

3. 結果

3-1. 母体に対する影響

実験期間中に、妊娠マウスにピペロニルブトキシドの投与による行動の異常や死亡は観察されなかった。対照群、1385 及び 1800 mg/kg 投与群の雌マウス各 1 匹の計 3 匹は妊娠には至らなかった (Table 3-1)。1385 mg/kg 投与群 1 匹と 1800 mg/kg 投与群 2 匹の計 3 匹の妊娠マウスは妊娠期間中に流産した。1385 mg/kg 投与群 1 母体と 1800 mg/kg 投与群 3 母体の計 4 母体は全てが吸収胚で、生存胎子はなかった。妊娠 9-18 日の母体重の増加量はすべての群で同様であった。

3-2. 胎子に関連する影響

3-2-1. 胎子に対する影響

母親マウス当たりの平均着床痕数にはピペロニルブトキシドの投与による統計学的な差は見られなかった (Table 3-1)。早期及び後期死胚数は 1800 mg/kg 投与群で有意に増加し、その影響は用量依存的であった。総吸収胚率も 1385 及び 1800 mg/kg 投与群で有意に増加した。生存胎子を伴った母親マウス数は 1385 及び 1800 mg/kg 投与群で減少しているものの、母親マウス当たりの生存胎子数にはピペロニルブトキシドの投与による統計学的な差は見られなかった。母親マウス当たりの雌雄の生存胎子数には各群ともに差が認められず、性比への影響は観察されなかった。雄胎子の体重は 1385 及び 1800 mg/kg 投与群で有意に抑制され、雌胎子の体重は全投与群で有意に抑制された。

3-2-2. 外表奇形

外表奇形は対照群を含むすべての群で観察された。対照群では外脳及び頭蓋破裂の胎子が各 1 匹観察された (Table 3-2)。1385 及び 1800 mg/kg 投与群の各 1 匹に眼瞼開裂が認められた。1385 mg/kg 投与群で臍帯ヘルニアと曲尾が各 1 匹観察された。内反足はすべての群で観察された。前肢の欠指症は全投与群で観

察され、そのすべてが第5指の欠損であった (Fig. 3-1)。前肢の欠指症の発現は1385 及び 1800 mg/kg 投与群で有意に増加し、その影響は用量依存的であった。特に、1800 mg/kg 投与群では母体当たりの欠指症になった胎子の割合が上昇している。

4. 考察

本研究における濃度のピペロニルブトキシドはマウスの発生に対していくつかの抑制的な作用を示した。1385 及び 1800 mg/kg 投与群では流産または全てが吸収胚の母体が認められたが、実験期間中に死亡した母親マウスはいなかった。雌雄の胎子の平均体重が投与群において有意に減少したことから、母体のピペロニルブトキシドの摂取はマウス胎子の雌雄の発達に抑制的な影響を及ぼすことが示唆された。

外表奇形に関して、投与群において前肢の欠指症の出現が有意に増加した。マウスにおける欠指症の自然発生率は 0–0.08% と非常に少なく^{40–44)}、本実験の対照群でも発生していないことから、これらの影響はピペロニルブトキシドの投与によると思われる。Kotch らは妊娠 9 日齢のマウスへのエタノールの急性投与で、25%の胎子に前肢の無指症や合指症などの指の数が減少する外表奇形が見られたと報告している⁴⁵⁾。Collins らは 3 種の抗痙攣物質のマウスへの妊娠 9 日目の投与が、それぞれ高い出現率で前肢の無指症を引き起こしたと報告している⁴⁶⁾。したがって、ピペロニルブトキシドによって引き起こされる前肢の欠指症は、妊娠 9 日目の投与の結果として表れたものと思われ、ピペロニルブトキシドによる催奇形作用には発生段階特異性があると考えられる。さらに、前肢第 5 指の欠指以外の奇形がほとんど観察されないことから、ピペロニルブトキシドによる催奇形作用には作因特異性があると考えられる。

以上の結果から、本研究で用いられた高い用量のピペロニルブトキシドは、マウスに対し胎子の成長を抑制し、催奇形性を有することが確認された。しかしながら、特に影響の大きかった前肢の欠指症を有意に誘発したピペロニルブトキシドの摂取量は、1385 mg/kg 以上と非常に高い濃度であり、ピペロニルブトキシドの日本における推定摂取量は、大人 1 人当たり 1.77 µg (体重 1kg 当た

り 0.0354 μg) と報告されており³³⁾、この値は人間の ADI である 0.20 mg に較べるとはるかに低い値であることから、ピペロニルブトキシドは日常生活での食品からの摂取量ではほとんど人体に影響を及ぼさないと思われる。しかし、穀類への最大許容使用量から日本で推定されるピペロニルブトキシドの最大摂取量は、体重 1 kg 当たり 0.108 mg/kg となる。また、ピペロニルブトキシドの残留基準は日本では設定されていないことから、日本において白米に対してピペロニルブトキシドを最大許容使用量使用した場合、ADI 値に近い量を摂取する可能性も考えられる。したがって、ピペロニルブトキシドは発ガン性¹³⁻¹⁵⁾ 及び本研究で明らかにした催奇形性を示すことから、ピペロニルブトキシドの使用基準について考慮する必要があると思われる。

5. 小括

第3章では、第2章のマウスを用いた3世代の行動発達毒性研究において、ピペロニルブトキシド 0.4%投与群で四肢の奇形を有する雌子マウスが確認されたことから、マウスの発生に対する影響について特に四肢の奇形に重点を置いて検討した。

ピペロニルブトキシドを、0 (対照群)、1065、1385、1800 mg/kg bw の濃度で、マウスに妊娠9日目に単回投与し、胎子の発生に及ぼす影響について検討した。その結果、早期及び後期死胚数が用量依存的に増加し、胎子体重は雌雄ともに用量依存的に抑制された。また、外表奇形では前肢の欠指症が投与群で用量依存的に増加した。

以上の結果から、本研究で用いられた高い用量のピペロニルブトキシドは、マウスに対し胎子の成長を抑制し、四肢に対する催奇形性を有することが確認された。

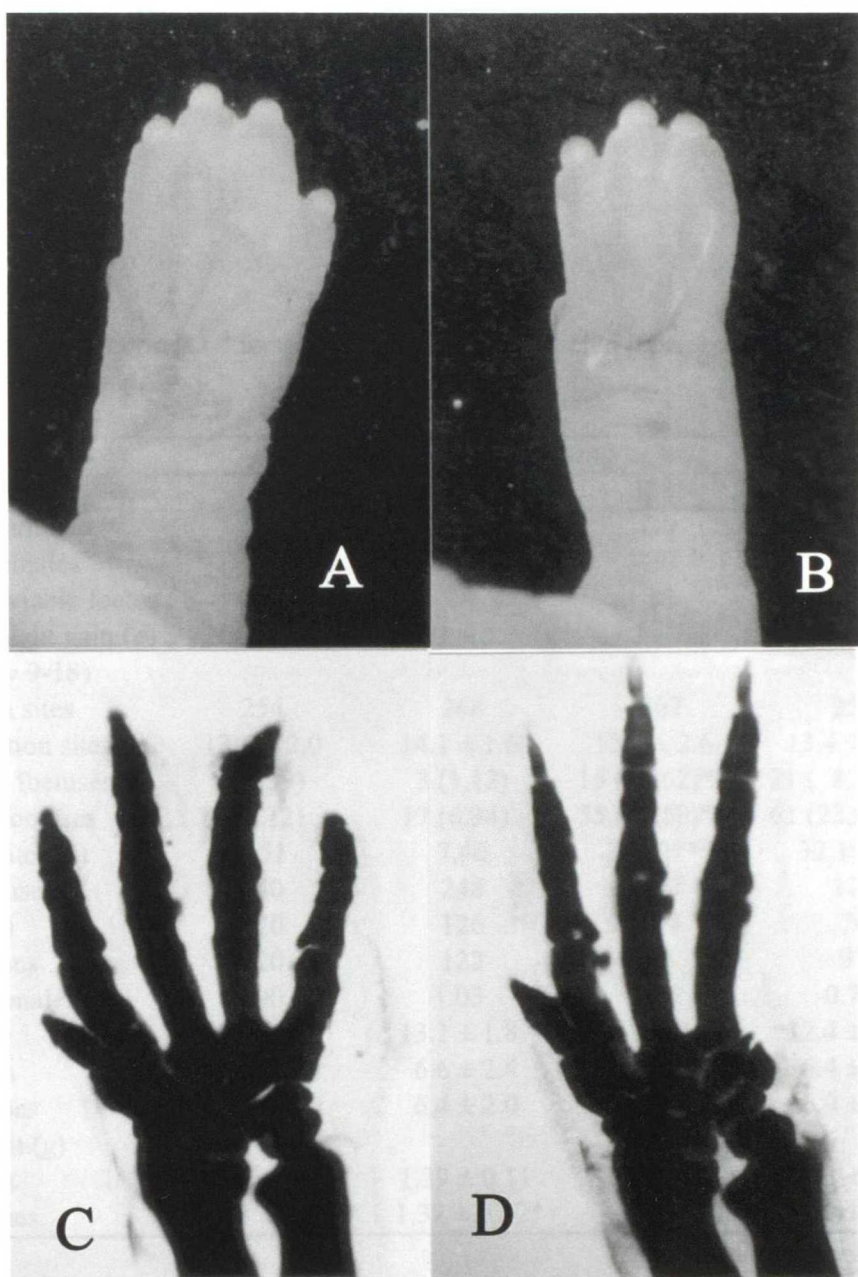


Fig. 3-1. Comparison between normal and anomalous right forelimbs of fetuses. (A) controls; (B) forelimb with oligodactyly (defects of 5th digit); (C) double-stained skeleton of controls; (D) double-stained skeleton of forelimb with oligodactyly (defects of 5th digit).

注) 本図の写真は Toxicology Letter, 71, 123-129 (1994) より転載した

Table 3-1. Summary of maternal and foetal data of mice administered piperonyl butoxide in developmental toxicity study.

	Dose Levels (mg/kg bw)			
	0	1065	1385	1800
No. of females examined	20	20	20	20
No. of pregnant females	19	19	20	19
No. of dams with viable foetus	19	19	18	14
Maternal body weight gain (g) (gestation day 9-18)	26.3 ± 3.7	25.1 ± 3.3	22.2 ± 6.2	24.0 ± 4.4
Total implantation sites	254	268	267	255
Average implantation sites	13.4 ± 2.0	14.1 ± 1.6	13.4 ± 2.6	13.4 ± 2.3
No. of early death foetuses	1 (0.39)	3 (1.12)	15 (5.62)***	21 (8.24)***
No. of late death foetuses	13 (5.12)	17 (6.34)	55 (20.60)***	61 (23.92)***
Total resorption rate (%)	5.51	7.46	26.22***	32.16***
No. of viable foetuses	240	248	197	173
male foetuses	120	126	104	76
female foetuses	120	122	93	97
Sex ratio (male/female)	1.00	1.03	1.12	0.78
Average litter size	12.6 ± 1.7	13.1 ± 1.8	10.9 ± 3.9	12.4 ± 2.6
male foetuses	6.3 ± 2.2	6.6 ± 2.4	5.8 ± 2.8	5.4 ± 2.1
female foetuses	6.3 ± 2.0	6.4 ± 2.0	5.2 ± 2.0	6.9 ± 2.0
Foetal body weight (g)				
male foetuses	1.43 ± 0.14	1.39 ± 0.11	1.38 ± 0.10*	1.33 ± 0.12**
female foetuses	1.38 ± 0.13	1.32 ± 0.12*	1.31 ± 0.11**	1.30 ± 0.09**

Each value represents the mean ± SD; rate of occurrence (%) in parentheses. Significantly different from controls: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Table 3-2. Summary of the incidence of external malformations of mice administered piperonyl butoxide in developmental toxicity study.

	Dose Levels (mg/kg bw)			
	0	1065	1385	1800
No. of dams with viable fetus	19	19	18	14
No. of viable fetuses	240	248	197	173
No. of dams with anomalies	4	2	10	5
Extrenal malformations				
Exencephaly	1 (0.42)	0	0	0
Cranioschisis	1 (0.42)	0	0	0
Open eyelids	0	0	1 (0.51)	1 (0.58)
Omphalocele	0	0	1 (0.51)	0
kinky tail	0	0	2 (1.02)	0
Talipes varus	2 (0.84)	1 (0.40)	3 (1.52)	4 (2.31)
Oligodactyly of forelimbs	0	1 (0.40)	4 (2.03)*	27 (15.61)**

Each value represents number of fetuses; rate of occurrence (%) in parentheses. Significantly different from controls: *P<0.05, **P<0.001.

第 4 章 混餌法によるピペロニルブトキシドのマウスの生殖及び行動発達に及ぼす影響

1. 序文

近年、内分泌攪乱物質（いわゆる環境ホルモン）に見られるように、化学物質の低濃度での生体の生殖機能に対する影響に注目が集まり、比較的高い濃度で行なわれてきた従来の毒性試験とは異なるアプローチによる毒性評価を行なう必要性が高まっている。

第 1 章のマウスを用いた 2 世代の行動発達毒性研究で用いられた用量（0.15–0.6%）のピペロニルブトキシドは、親動物の一般状態にはあまり影響を及ぼさないが、生殖と行動発達に対しては抑制的に影響することが確認された。また、第 2 章で行なったマウスを用いた 3 世代行動発達毒性研究で用いられた用量（0.1–0.8%）のピペロニルブトキシドは、生殖と行動発達に対しては抑制的に影響することと、その影響の再現性が確認された。

そこで、これらの結果を受けて、より低濃度のピペロニルブトキシドによる行動発達毒性研究を行ない、ピペロニルブトキシドの生殖と行動発達に及ぼす影響のより低濃度における再現性について検討した⁴⁷⁾。投与濃度は第 2 章の 3 世代行動発達毒性研究で影響の見られた 0.1%より低い濃度である 0.09%を最高濃度に 3 段階の濃度を設定した。また、第 2 章以降に導入した小動物運動解析装置 AT-420 を用い、新奇環境に対する探査行動に及ぼす影響について検討した。

2. 材料と方法

2-1. 試料

ピペロニルブトキシドは（ロット番号 GC01）は東京化成工業株式会社より購入し、その純度は 95%以上であった。

2-2. 動物と飼育条件

マウス及びその飼育条件は第 1 章と同様のものを用いた。飼育施設の改修により温度 $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ・相対湿度 $50 \pm 5\%$ に調節された飼育室において飼育した。

2-3. 実験計画

ピペロニルブトキシドを混餌法により、1 群雌雄各 10 匹ずつ 0.01、0.03、0.09% の濃度で、5 週齢より投与した。対照群として雌雄各 10 匹ずつ実験期間中に標準試料（日本クレア（株）CE-2）を投与した。各マウスの摂餌量を、第 1 章と同様に測定した。

2-4. 生殖試験

F_0 世代の実験開始から F_1 世代の離乳までは第 1 章と同様に行なった。 F_1 世代の離乳後は 4-9 週齢に週に一回体重を測定した。

2-5. 行動発達試験

授乳期間中に行なった子マウスの機能と行動発達に関するテストの測定項目は第 1 章と同様のものについて行なった。

2-6. 多様式 T 型水迷路試験

行動試験のプロトコールの見直しにより、 F_1 マウスの 7 週齢に多様式 T 型水迷路試験を 1 日 1 回 3 日間連続で行なった。装置及び測定条件は第 1 章と同様のものを用いた。

2-7. 探査行動の測定

F₀ マウスの 8 週齢と F₁ マウスの 3 週齢及び 9 週齢に、小動物運動解析装置 AT-420 (東洋産業株式会社製) により新奇環境に対する探査行動を測定した⁴⁸⁻⁴⁹⁾。測定装置はドーナツ型の透明なアクリル樹脂ケージを用い、36 組の近赤外線フォトセンサーにより 3 次元的に位置情報を記録し、自発行動などを測定するものである。測定は F₀ マウスの 8 週齢と F₁ マウスの 9 週齢は全個体、F₁ マウスの 3 週齢は各腹子から雌雄各 1 匹ずつをランダムに選定し、各個体 10 分間探査行動を測定した。測定項目は動作回数、移動時間 (秒)、水平移動回数、総移動距離 (cm)、平均移動距離(cm/回)、平均移動速度(cm/秒)、立ち上がり回数、総立ち上がり時間 (秒)、方向回転数、脱糞数であった。

2-8. 統計解析

出生時の性比・授乳期間中の生存率及び行動発達のデータは χ^2 検定または Fisher の正確確率検定により解析し、探査行動のデータは Shirley-Williams の多重比較検定により解析した³⁰⁾。多様式 T 型水迷路試験のデータは試行間の比較は Sign-Wilcoxon 検定を、群間の比較は Shirley-Williams の多重比較検定により解析した。その他のデータは Bartlett の等分散の検定の後、有意でなければ一元配置分散分析を行なった後に、Bonferroni の多重比較検定のパラメトリック版、有意ならば Kruskal-Wallis の順位の分散分析を行なった後に、Bonferroni の多重比較検定のノンパラメトリック版により解析した。また、用量反応性の解析は累積 χ^2 検定または Jonckheere の傾向検定により解析した。各検定の有意水準は 0.05 以下とした。

3. 結果

3-1. 飼料及び薬物摂取量

実験期間中の飼料の摂取量は、F₁ 世代を除いてピペロニルブトキシドの投与による変化は見られなかった (Table 4-1)。F₁ 世代において、0.03%投与群の雌マウスの摂餌量は有意に抑制されが、薬物摂取量は全期間を通じて用量依存的に増加した。

3-2. F₀ マウスに対する影響

3-2-1. 交配前

親動物の平均体重の推移には、ピペロニルブトキシドの投与による変化は見られなかった。また、親動物の一般状態にピペロニルブトキシドの投与による影響は見られなかった。

3-2-2. 探査行動に及ぼす影響

8 週齢の探査行動の測定では、雌雄ともにピペロニルブトキシドの投与による変化は見られなかった。

3-2-3. 妊娠期

対照群及び 0.09%投与群の雌各 1 匹の計 2 匹は妊娠に至らず、対照群で 1 匹流産が観察された (Table 4-2)。妊娠マウスの平均体重の推移には、ピペロニルブトキシドの投与による変化は見られなかった。期間中、妊娠マウスの一般状態にピペロニルブトキシドの投与による影響は見られなかった。

3-2-4. 授乳期

授乳期の第 1 週に対照群の母親マウス 1 匹が、乳腺の発達不良を示し、授乳期の第 2 週及び第 3 週に 0.03%投与群の母親マウス 1 匹が、乳腺の発達不良を示した。また、対照群及び 0.03%投与群の母親マウス各 1 匹の計 2 匹が、授乳期の第 2 週に死亡した。死亡例を解剖した結果、明らかな病変は見られなかった。

母親マウスの平均体重の推移には、ピペロニルブトキシドの投与による変化は見られなかった。期間中、生存している母親マウスの一般状態にピペロニルブトキシドの投与による影響は見られなかった。

3-3. F₁ マウスに対する影響

3-3-1. 生殖に及ぼす影響

出生時の産子数・1腹子の重さ及び性比には、ピペロニルブトキシドの投与による変化は見られなかった (Table 4-2)。授乳期間中の平均子体重の推移は、雄子マウスの 0.03%投与群の 4 日齢及び 7 日齢で有意に増加し、雌子マウスでは 0.03%投与群の 7 日齢及び 14 日齢で有意に増加した (Table 4-3)。対照群の 1 腹子は、母親マウスの死亡が授乳期の第 2 週に確認された後に、餓死を避けるために安楽死させた。0.03%投与群各群の 1 腹子が、授乳期の第 3 週に母親マウスにより全て食殺された。全個体が死亡した腹子を除いて計算した生存率には、ピペロニルブトキシドの投与による変化は見られなかった (Table 4-4)。0.03%投与の 1 腹子が、母親マウスの乳腺の発達不良が原因で離乳前に全て死亡した。

3-3-2. 行動発達に及ぼす影響

授乳期における子マウスの行動発達のテストでは、7 日齢の正向反射が雄の 0.03%及び 0.09%投与群で有意に抑制され、その影響は用量依存的であった (Fig. 4-1)。4 日齢の背地走性も 0.09%投与群で有意に抑制され、その影響は用量依存的であった。14 日齢の嗅覚性指向反応は、雄の 0.03%及び 0.09%投与群で有意に抑制され、その影響は用量依存的であった。雌の 14 日齢の嗅覚性指向反応は、0.01%投与群で有意に促進された。その他の測定項目には、ピペロニルブトキシドの投与による変化は見られなかった。

3-3-3. 離乳後

F₁ マウスの平均体重の推移には、ピペロニルブトキシドの投与による変化は見られなかった。

3-3-4. 多様式 T 型水迷路試験

7 週齢の多様式 T 型水迷路試験において雌雄ともにピペロニルブトキシドの投与による変化は見られなかった。

3-3-5. 探査行動に及ぼす影響

3 週齢の探査行動において、雌雄ともにピペロニルブトキシドの投与による変化は見られなかった。9 週齢において、雄の総移動距離は 0.03% 及び 0.09% 投与群で有意に抑制され、その影響は用量依存的であった (Fig. 4-2)。また、雄の平均移動距離と平均速度も 0.09% 投与群で有意に抑制され、その影響は用量依存的であった。その他の測定項目には、ピペロニルブトキシドの投与による変化は見られなかった。

4. 考察

本研究において、0.03%投与群で雄の4日齢及び7日齢と雌の7日齢及び14日齢で平均子体重が増加している。授乳期間中の生存率は、0.03%投与群と対照群の間で差はなく、各群の平均1腹子数も授乳期間中に差が見られなかった。したがって、各群の子マウスは授乳期間中の栄養状態は同程度であったと考えられる。しかしながら、出生時の子体重が0.03%投与群でやや大きいこと、用量反応性が見られないことから、これらの変化はピペロニルブトキシドの投与によるものではないと思われる。

授乳期間中の行動発達においては、7日齢の雄子マウスの正向反射が投与群で用量依存的に抑制されていることから、ピペロニルブトキシドは雄子マウスに対して、授乳期間の初期に、神経筋協調運動の指標である正向反射に抑制的な影響を及ぼすものと思われる。14日齢の雄の嗅覚性指向反応は、投与群で用量依存的に抑制され、雌では0.01%投与群で有意に促進された。著者は2世代毒性研究において、より高い濃度(0.15–0.6%)でピペロニルブトキシドが嗅覚性指向反応を抑制することを報告している¹⁹⁾。また、著者らは3世代試験(0.1–0.8%)のF₁世代で、ピペロニルブトキシドが嗅覚性指向反応を抑制し、F₂世代ではより多くの行動発達指標が抑制されたと報告している³⁴⁾。したがって、ピペロニルブトキシドはマウスに対して、以前の研究よりも低い濃度で行動発達に抑制的な影響を及ぼすものと考えられる。

F₁世代の9週齢の探査行動では、雄マウスの総移動距離と平均移動距離及び平均速度が用量依存的に促進されたことから、ピペロニルブトキシドはF₁世代の成体雄マウスに対して活動性を高める影響を及ぼすものと思われる。木村らはピペロニルブトキシドの経口及び静脈内投与で、ラットの脳への分布が認められたことを報告していることから⁹⁾、これらの探査行動の変化はピペロニルブ

トキシドの中樞神経系への影響によるものと思われる。著者は行動毒性研究において、ピペロニルブトキシド (0.15–0.6%) が F₀ 世代の雄マウスの探査行動を促進したと報告している⁵⁰⁾。今回の研究では、以前の研究よりも低い濃度で探査行動に促進的な影響を示すことから、ピペロニルブトキシドの探査行動に対する影響は世代を経るとより強く表れることが示唆される。

以上の結果から、本研究で用いられた用量のピペロニルブトキシドは、雄子マウスの正向反射と嗅覚性指向反応を用量依存的に抑制し、その影響のより低い濃度での再現性が確認された。また、探査行動では F₁ 世代の成体雄マウスに対して活動性を高める影響を示した。これらの影響は F₁ 世代の雄マウスにしか見られなかったので、ピペロニルブトキシドに対する感受性は雌雄で異なるものと考えられる。本研究におけるピペロニルブトキシドの中濃度投与群 (体重 1 kg 当たりおよそ 40–160 mg) は ADI 値 (0–0.20 mg) の 200 倍以上であった。ピペロニルブトキシドの食品中の残留量は、アメリカとオーストラリアにおける調査で、小麦と大麦から検出され 0.2 から 1.4ppm であった⁵¹⁾。しかしながら、ピペロニルブトキシドの日本における推定摂取量は、大人 1 人当たり 1.77μg (体重 1kg 当たり 0.0354μg) と報告されており³³⁾、この値は人間の ADI の 0.20 mg に較べるとはるかに少ないので、ピペロニルブトキシドは日常生活での食品からの摂取量ではほとんど人体に影響を及ぼさないであろう。しかし、ピペロニルブトキシドは以前の研究よりも低い濃度で探査行動に促進的な影響を示したことから、その影響の再現性と次世代の自発行動に及ぼす影響について検討する必要がある。

5. 小括

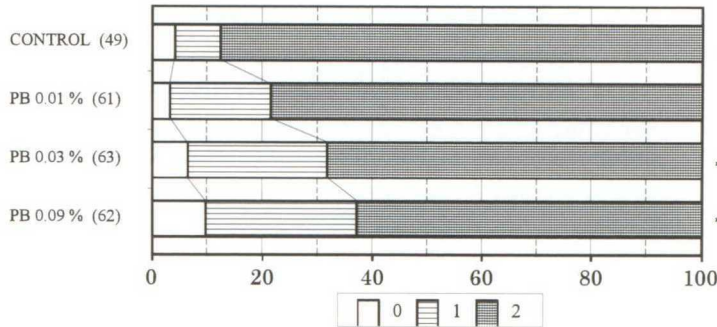
第4章では、第1章及び第2章のマウスを用いた2世代及び3世代毒性研究の結果を受けて、より低濃度のピペロニルブトキシドによる行動発達毒性研究を行ない、ピペロニルブトキシドの生殖と行動発達に及ぼす影響のより低濃度における再現性について検討した。

ピペロニルブトキシドを、0（対照群）、0.01、0.03、0.09%の濃度で、マウスにF₀世代の5週齢からF₁世代の9週齢まで2世代にわたって投与した。その結果、ピペロニルブトキシドは出生時における産子数・一腹子の重さ・性比に影響を及ぼさず、行動発達では雄子マウスの7日齢の正向反射と14日齢の嗅覚性指向反応が投与群で用量依存的に抑制された。また、小動物運動解析装置ANIMATE AT-420による探索行動の測定では次世代の雄成体マウスで総移動距離・平均移動距離及び平均移動速度が用量依存的に増加した。

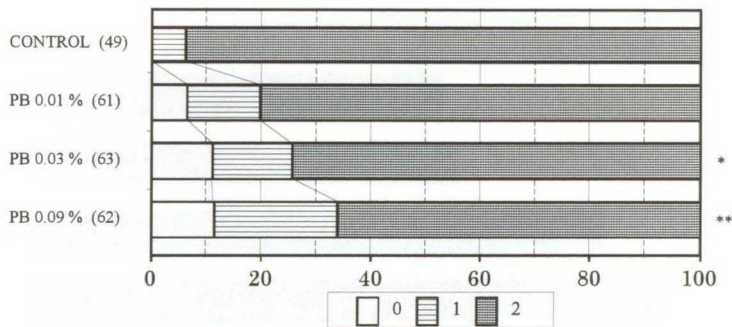
以上の結果から、本研究で用いられた用量のピペロニルブトキシドは、雄子マウスの正向反射と嗅覚性指向反応を用量依存的に抑制し、その影響のより低い濃度での再現性が確認された。また、探索行動ではF₁世代の成体雄マウスに対して活動性を高める影響を示した。

MALE OFFSPRING

SURFACE RIGHTING AT PND 7



OLFACTORY ORIENTATION AT PND 14



FEMALE OFFSPRING

OLFACTORY ORIENTATION AT PND 14

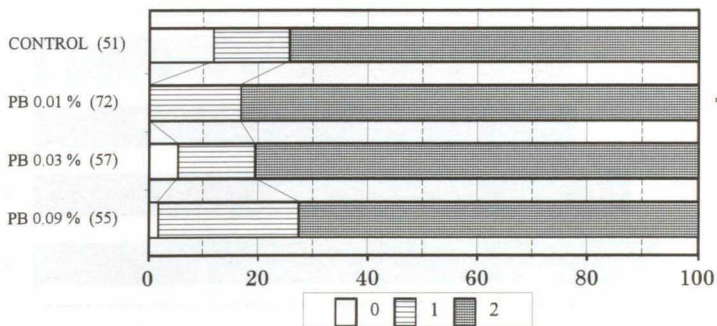


Fig. 4-1. Score frequencies of behavioural development during the lactation period in a two-generation toxicity study of piperonyl butoxide (PB) administered to mice. Each value represents rate of each score: number of mice in parentheses after group name. Significant different from controls: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

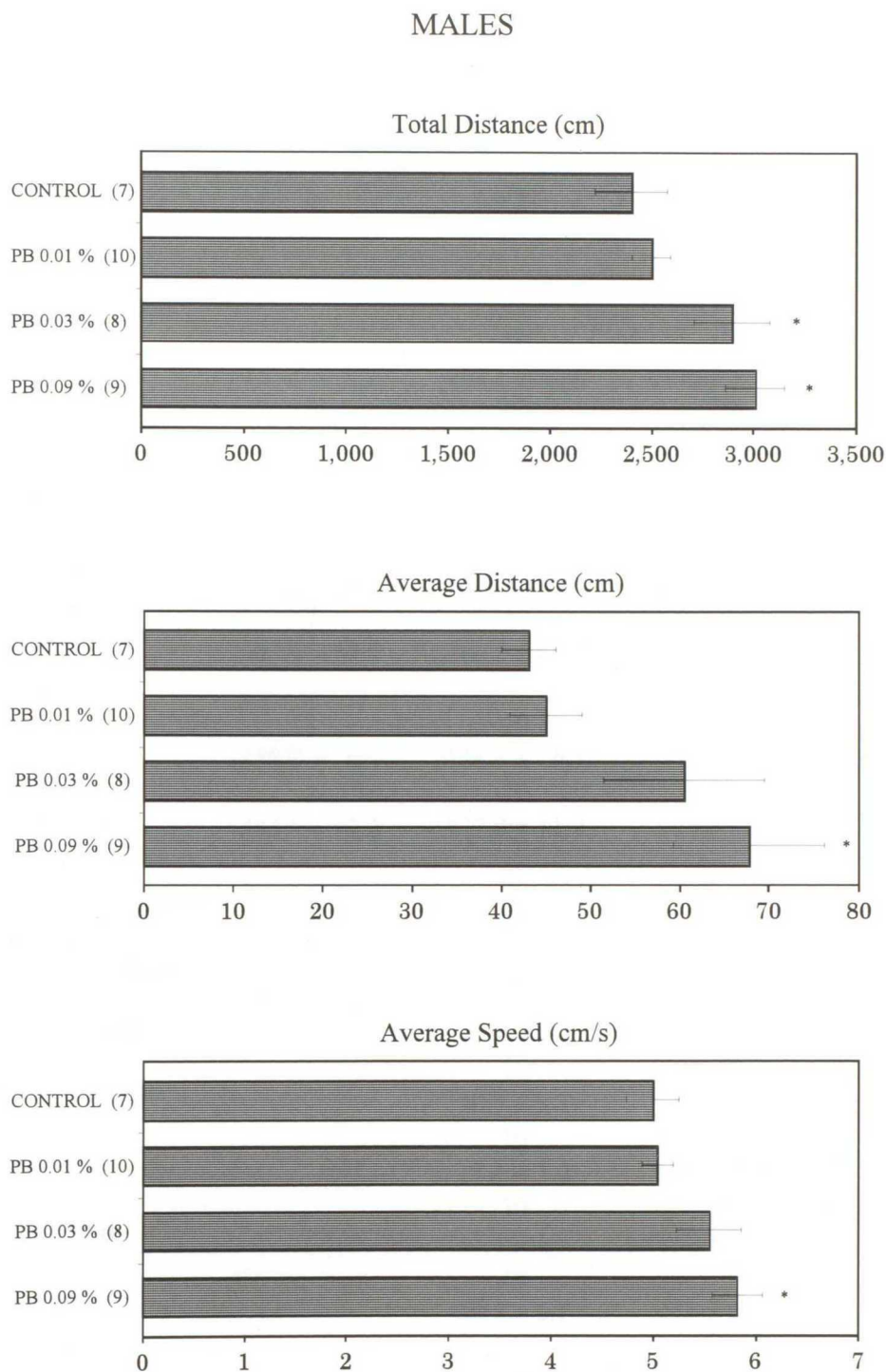


Fig. 4-2. Movement activity of exploratory behaviour at 9 weeks of age for the F₁ generation male mice administered piperonyl butoxide (PB) in the diets. Each value represents the mean \pm SE: number of mice in parentheses after group name. Significant different from controls: *P<0.05

Table 4-1. Average daily food and chemical intake of mice administered piperonyl butoxide in a two-generation toxicity study.

		Dose Levels (%)			
		0	0.01	0.03	0.09
Food intake (g/kg/day)					
F ₀ generation					
preconception					
male		10	10	10	10
		163.0 ± 8.7	164.1 ± 10.9	169.3 ± 9.4	172.9 ± 16.6
female		10	10	10	10
		191.8 ± 17.9	206.9 ± 20.6	193.4 ± 22.5	195.0 ± 17.2
mating		10	10	10	10
		151.0 ± 20.1	143.9 ± 11.7	138.0 ± 18.4	144.8 ± 15.8
gestation		8	10	10	9
		173.2 ± 28.7	173.6 ± 15.0	166.9 ± 19.7	161.0 ± 21.5
lactation		7	10	7	9
		607.8 ± 69.9	588.5 ± 66.8	544.3 ± 60.1	582.5 ± 79.6
F ₁ generation					
male		7	10	8	9
		158.7 ± 6.4	156.1 ± 6.1	152.3 ± 4.7	163.0 ± 5.2
female		7	10	8	9
		203.1 ± 32.2	177.9 ± 11.9	167.4 ± 10.7*	184.2 ± 20.9
Chemical intake (mg/kg/day)					
F ₀ generation					
preconception					
male		-	10	10	10
		-	16.4 ± 1.1	50.8 ± 2.8	155.6 ± 15.0
female		-	10	10	10
		-	20.7 ± 2.1	58.0 ± 6.8	175.5 ± 15.5
mating		-	10	10	10
		-	14.4 ± 1.2	41.4 ± 5.5	130.3 ± 14.2
gestation		-	10	10	9
		-	17.4 ± 1.5	50.1 ± 5.9	144.9 ± 19.4
lactation		-	10	7	9
		-	58.9 ± 6.7	163.3 ± 18.0	524.3 ± 71.6
F ₁ generation					
male		-	10	8	9
		-	15.6 ± 0.6	45.7 ± 1.4	146.7 ± 4.7
female		-	10	8	9
		-	17.8 ± 1.2	50.2 ± 3.2	165.8 ± 18.8

Each value represents number of mice and daily intake during each period (mean ± SD).
Significantly different from controls: *P<0.05.

Table 4-2. Summary of data of litters at birth in a two-generation toxicity study of piperonyl butoxide administered to mice.

	Dose Levels (%)			
	0	0.01	0.03	0.09
No. of females examined	10	10	10	10
No. of pregnant females	9	10	10	9
No. of litters	8	10	10	9
No. of offspring	100	133	120	118
Average litter size	12.5 ± 1.2	13.3 ± 1.7	12.0 ± 1.3	13.1 ± 1.8
Average litter weight (g)	19.03 ± 2.19	20.38 ± 2.15	18.73 ± 1.77	19.56 ± 1.90
Sex ratio (male/female)	0.96 (49/51)	0.85 (61/72)	1.11 (63/57)	1.15 (63/55)

Each value represents the mean ± SD.

Table 4-3. Summary of average body weight of offspring during the lactation period.in a two-generation toxicity study of piperonyl butoxide administered to mice.

	Dose Levels (%)			
	0	0.01	0.03	0.09
Male Offspring				
	49	61	63	63
PND 0	1.55 ± 0.14	1.57 ± 0.15	1.61 ± 0.14	1.53 ± 0.14
	49	61	63	62
PND 4	2.97 ± 0.33	2.98 ± 0.43	3.21 ± 0.35*	2.99 ± 0.41
	49	61	63	62
PND 7	4.39 ± 0.59	4.48 ± 0.74	4.72 ± 0.58*	4.42 ± 0.57
	49	61	63	62
PND 14	6.02 ± 0.91	6.38 ± 1.01	6.43 ± 1.36	6.44 ± 0.71
	43	61	55	62
PND 21	10.63 ± 2.52	11.31 ± 2.32	11.41 ± 3.60	11.30 ± 2.05
Female Offspring				
	51	72	57	55
PND 0	1.49 ± 0.15	1.50 ± 0.13	1.51 ± 0.13	1.45 ± 0.13
	51	72	57	55
PND 4	2.86 ± 0.34	2.88 ± 0.43	3.05 ± 0.36	2.78 ± 0.41
	51	72	57	55
PND 7	4.22 ± 0.60	4.37 ± 0.71	4.60 ± 0.52**	4.14 ± 0.58
	51	72	57	55
PND 14	5.93 ± 0.90	6.32 ± 0.91	6.57 ± 0.98**	6.02 ± 0.81
	43	72	51	55
PND 21	10.32 ± 2.21	10.95 ± 2.08	11.42 ± 2.35	10.29 ± 2.03

Each value represents number of offspring and mean ± SD. Significantly different from controls: *P<0.05, **P<0.01.

PND = postnatal day

Table 4-4. Summary of number of offspring and survival index (%) during the lactation period.in a two-generation toxicity study of piperonyl butoxide administered to mice.

	Dose Levels (%)			
	0	0.01	0.03	0.09
Male Offspring				
PND 0	49 (100.0)	61 (100.0)	63 (100.0)	63 (100.0)
PND 4	49 (100.0)	61 (100.0)	63 (100.0)	62 (98.4)
PND 7	49 (100.0)	61 (100.0)	63 (100.0)	62 (98.4)
PND 14	49 (100.0)	61 (100.0)	63 (100.0)	62 (98.4)
PND 21	43 (100.0)	61 (100.0)	55 (100.0)	62 (98.4)
Female Offspring				
PND 0	51 (100.0)	72 (97.3)	57 (98.3)	55 (100.0)
PND 4	51 (100.0)	72 (97.3)	57 (98.3)	55 (100.0)
PND 7	51 (100.0)	72 (97.3)	57 (98.3)	55 (100.0)
PND 14	51 (100.0)	72 (97.3)	57 (98.3)	55 (100.0)
PND 21	43 (100.0)	72 (97.3)	51 (98.1)	55 (100.0)

Each value represents number of offspring: survival index (%) in parentheses. Survival indices are calculated except for the dead litters.

PND = postnatal day.

第5章 ピペロニルブトキシドの次世代マウスの自発行動に及ぼす影響

1. 序文

第1章及び第2章で比較的高濃度（0.1–0.8%）のピペロニルブトキシドは、親動物の一般状態にはあまり影響を及ぼさないが、生殖と行動発達に対しては抑制的に影響することが確認され、その影響の再現性が確認された。また、第4章ではより低濃度（0.01–0.09%）のピペロニルブトキシドによる行動発達毒性研究を行ない、これまでよりも低い濃度で行動発達に抑制的な影響を及ぼし、探索行動に対しては促進的な影響を及ぼすことが確認された。

そこで、これらの結果を受けて、自発行動の測定を含む行動発達毒性研究を行ない、ピペロニルブトキシドの行動発達と探索行動に及ぼす影響の再現性と自発行動に及ぼす影響について検討した⁵²⁾。投与濃度は第4章で成体マウスの探索行動に促進的な影響の見られた0.09%より高い濃度である0.18%を最高濃度に3段階の濃度を設定した。また、小動物運動解析装置を用い、新奇環境に対する探索行動に引き続き現れる自発行動に及ぼす影響についても検討した。2000年代中盤より動物実験及び発達神経毒性試験のガイドラインが整備されたため、本研究は各ガイドラインに準拠するよう実験手法に改良を加えた。

2. 材料と方法

2-1. 試料

ピペロニルブトキシドは第4章と同様のものを用いた。

2-2. 動物と飼育条件

マウスは4週齢の Crlj:CD1 (ICR) の雌雄を日本チャールス・リバー (株) から購入し、そのうち一般状態の良好なマウスを実験に供した。飼育条件は第4章と同様のものを用いた。

2-3. 実験計画

ピペロニルブトキシドを混餌法により、1群雌雄各10匹ずつ0.02、0.06、0.18%の濃度で、5週齢より投与した。対照群として雌雄各10匹ずつ実験期間中に標準試料 (日本クレア (株) CE-2) を投与した。各マウスの摂餌量を第1章と同様に測定し、離乳後については12週齢まで測定した。

2-4. 生殖試験

F₀世代の実験開始から F₁世代の離乳までは第1章と同様に行なった。F₁世代の離乳後は4-12週齢に週に一回体重を測定した。

2-5. 行動発達試験

授乳期間中に行なった子マウスの機能と行動発達に関するテストの測定項目は以下の変更点を除いて第1章と同様のものについて行なった。

- 1) 遊泳試験の測定を7、14日齢に行なった。
- 2) 嗅覚性指向反応を所要時間と移動経路に分けて測定した。所要時間：30秒未満 (3)、30秒以上60秒未満 (2)、60秒以上90秒未満 (1)、90秒以上 (0)。移動経路：新しい床敷の部屋経由 (1)、元の床敷の部屋へ直行 (2)。

2-6. 多様式 T 型水迷路試験

多様式 T 型水迷路試験の装置及び測定条件は第4章と同様のものを用いた。

2-7. 探査行動の測定

F₀ マウスの 8 週齢と F₁ マウスの 3 週齢に、小動物運動解析装置 AT-420（東洋産業株式会社製）により新奇環境に対する探査行動を測定した⁴⁸⁻⁴⁹⁾。装置及び測定条件は第 4 章と同様のものを用いた。

2-8. 自発行動の測定

F₁ マウスの 8 週齢から 11 週齢に、小動物運動解析装置 AT-420（東洋産業株式会社製）により自発行動を測定した。測定対象は全個体で、各個体 10 分の潜時の後に 10 分間隔で 120 分間自発行動を測定した。測定項目は動作回数、移動時間 (秒)、水平移動回数、総移動距離 (cm)、平均移動距離(cm/回)、平均移動速度 (cm/秒)、立ち上がり回数、総立ち上がり時間 (秒)、方向回転数であった。

2-9. 統計解析

取得したデータの解析は以下の変更・追加点を除いて第 4 章と同様に行なった。

- 1) 探査行動のデータは Steel-Dwass の多重比較検定（有意水準 0.05 以下）により解析した。
- 2) 自発行動のデータは経時データ解析のプロファイル分析を行ない、平行性仮説が有意に棄却（有意水準 0.05 以下）された項目を時点毎に Steel-Dwass の多重比較検定（有意水準 0.05 以下）により解析した。

2-10. ガイドライン

本研究のデザインは ICH⁵³⁾ と OECD⁵⁴⁾ のガイドラインをマウス用に改変したものに基いている。当研究センターでは、資源の低減のためと、マウスの行動発達に対する影響を評価する背景データが蓄積しているため⁵⁵⁾、マウスを生殖及び行動発達毒性研究に使用している。動物実験全般に関しては日本学術会議が制定した動物実験に関するガイドライン⁵⁶⁾に準拠している。

3. 結果

3-1. 飼料及び薬物摂取量

実験期間中の飼料の摂取量は、F₁ 世代を除いてピペロニルブトキシドの投与による変化は見られなかった (Table 5-1)。F₁ 世代において、雌マウスの摂餌量は0.02%投与群で有意に増加した。しかし、薬物摂取量は全期間を通じ用量依存的に増加し、摂取量の逆転は見られなかった。

3-2. F₀ マウスに対する影響

3-2-1. 交配前

親動物の平均体重の推移には、ピペロニルブトキシドの投与による変化は見られなかった。また、親動物の一般状態にピペロニルブトキシドの投与による影響は見られなかった。

3-2-2. 探査行動に及ぼす影響

8 週齢の探査行動の測定では、雌マウスの立ち上がり時間が用量依存的に促進される傾向が見られた (Fig. 5-1)。その他の測定項目にピペロニルブトキシドの投与による変化は見られなかった。

3-2-3. 妊娠期

0.02%投与群の雌 1 匹は妊娠に至らず、対照群の母親マウス 1 匹は出産直後に出生子をすべて食殺した (Table 5-2)。妊娠マウスの平均体重の推移には、ピペロニルブトキシドの投与による変化は見られなかった。期間中、妊娠マウスの一般状態にピペロニルブトキシドの投与による影響は見られなかった。

3-2-4. 授乳期

授乳期の第 2 週に、0.02%投与群の母親マウス 3 匹が死亡し、授乳期の第 3 週に、対照群の母親マウス 1 匹と 0.06%投与群の母親マウス 2 匹の計 3 匹が死亡した。死亡例を解剖した結果、明らかな病変は見られなかった。母親マウスの平

均体重の推移には、ピペロニルブトキシドの投与による変化は見られなかった。期間中、生存している母親マウスの一般状態にピペロニルブトキシドの投与による影響は見られなかった。

3-3. F₁ マウスに対する影響

3-3-1. 生殖に及ぼす影響

出生時の産子数・1 腹子の重さ及び性比には、ピペロニルブトキシドの投与による変化は見られなかった (Table 5-2)。出生時の平均子体重は、0.06%投与群で雌雄ともに有意に抑制され、雌子マウスでは 0.18%投与群でも有意に抑制された (Fig. 5-2)。授乳期間中の平均子体重の推移は、雌子マウスの 0.18%投与群の 4 日齢と 14 日齢で有意に抑制され、授乳期間中における雌子マウスの体重の推移は用量依存的に抑制された (Table 5-3)。0.02%投与群の 3 腹子は、母親マウスの死亡が授乳期の第 2 週に確認された後に、餓死を避けるために安楽死させた。全個体が死亡した腹子を除いて計算した生存率には、ピペロニルブトキシドの投与による変化は見られなかった (Table 5-4)。

3-3-2. 行動発達に及ぼす影響

授乳期における子マウスの行動発達のテストでは、7 日齢の断崖回避が雄の 0.18%投与群で有意に抑制され、その影響は用量依存的であった (Fig. 5-2)。雄子マウスの 7 日齢における遊泳試験の方向は 0.18%投与群で有意に促進された (Fig. 5-2)。雌の 7 日齢における正向反射は 0.18%投与群で有意に抑制され、その影響は用量依存的であった (Fig. 5-3)。14 日齢の嗅覚性指向反応は、雌の 0.06%及び 0.18%投与群で所要時間が有意に抑制され、その影響は用量依存的であった (Fig. 5-3)。その他の測定項目には、ピペロニルブトキシドの投与による変化は見られなかった。

3-3-3. 探査行動に及ぼす影響

3 週齢の探査行動においては雌雄ともにピペロニルブトキシドの投与による

変化は見られなかった。

3-3-4. 離乳後

F₁ マウスの平均体重の推移には、ピペロニルブトキシドの投与によると変化は見られなかった。

3-3-5. 多様式 T 型水迷路試験

7 週齢の多様式 T 型水迷路試験において雌雄ともにピペロニルブトキシドの投与による変化は見られなかった。

3-3-6. 自発行動に及ぼす影響

8 週齢から 11 週齢の自発行動において、雄ではピペロニルブトキシドの投与による変化は見られなかった。雌では動作回数、移動時間、総移動距離及び方向回転数が 0.18%投与群において異なる経時パターンを示し、これらの項目は 0.18%投与群で測定開始 40 分以降に有意に促進された (Fig. 5-4, 5-5)。その他の測定項目には、ピペロニルブトキシドの投与による変化は見られなかった。

4. 考察

本研究において、授乳期間中の行動発達については、7日齢の雄子マウスの断崖回避が投与群で用量依存的に抑制されていることから、ピペロニルブトキシドは雄子マウスに対して、授乳期間の初期に、意識状態の発達の指標である断崖回避に抑制的な影響を及ぼすものと思われる。雌子マウスでは、7日齢の正向反射が投与群で用量依存的に抑制されているが、雌子マウスの授乳期間中における体重の推移が用量依存的に抑制されていることから、これらの影響は授乳期間中の低体重によるものかも知れない。しかしながら、著者は授乳期間中の行動発達は、自然状態では子体重の影響を受けないことを報告している⁵⁵⁾。したがって、ピペロニルブトキシドは雌子マウスに対して、授乳期間の初期に、神経筋協調運動の指標である正向反射に抑制的な影響を及ぼすものと思われる。14日齢の嗅覚性指向反応の所要時間が雌子マウスで用量依存的に抑制されたことから、ピペロニルブトキシドは雌子マウスに対して、嗅覚の発達の指標である嗅覚性指向反応に抑制的な影響を及ぼすものと思われる。

F₀世代の8週齢の探査行動では、雌マウスの立ち上がり時間が用量依存的に促進された。著者は行動毒性研究において、ピペロニルブトキシド (0.15–0.6%) がF₀世代の雄マウスの探査行動を促進したと報告している⁵⁰⁾。また、著者はピペロニルブトキシドがF₁世代の成体マウスの探査行動に対して、雄マウスの総移動距離と平均移動距離及び平均速度を用量依存的に促進させることを報告している⁴⁷⁾。したがって、ピペロニルブトキシドは雄マウスに対してだけでなく、雌マウスの探査行動に対しても影響を及ぼすものと思われる。F₁世代の自発行動では、雄にはピペロニルブトキシドの投与による変化は見られなかったが、雌の動作回数、移動時間、総移動距離及び方向回転数が0.18%投与群において、測定開始40分以降に有意に促進された。木村らはピペロニルブトキシドの経口

及び静脈内投与で、ラットの脳への分布が認められたことを報告している⁹⁾ことから、これらの行動の変化はピペロニルブトキシドの中樞神経系への影響によるものと思われる。

以上の結果から、ピペロニルブトキシドの投与により、断崖回避能力が雄子マウスで用量依存的に抑制され、正向反射が雌子マウスで用量依存的に抑制されることが確認された。また、F₀世代の新奇環境に対する探査行動は、雌成体マウスの投与群で用量依存的に促進される傾向が見られた。F₁世代の自発行動については、雌成体マウスの0.18%投与群で促進された。したがって、ピペロニルブトキシドに対する感受性は雌雄で異なっているものと考えられる。

本研究におけるピペロニルブトキシドの0.18%投与群（体重1 kg当たりおよそ250–900 mg）はADI値（0–0.20 mg）に較べると非常に大きい。ピペロニルブトキシドの食品中の残留量は、アメリカとオーストラリアにおける調査で、小麦と大麦から検出され0.2–1.4 ppmであった⁵¹⁾。しかしながら、ピペロニルブトキシドの日本における推定摂取量は、大人1人当たり1.77 µg（体重1 kg当たり0.0354 µg）と報告されており³³⁾、この値は人間のADIの0.20 mgに較べるとはるかに少ないので、ピペロニルブトキシドは日常生活での食品からの摂取量ではほとんど人体に影響を及ぼさないであろう。

5. 小括

第 5 章では、第 4 章のマウスを用いた低濃度による行動発達毒性研究において、行動発達と探査行動に対してピペロニルブトキシドの投与による変化が見られたため、自発行動の測定を含む行動発達毒性研究を行ない、ピペロニルブトキシドの行動発達と探査行動に及ぼす影響の再現性と自発行動に及ぼす影響について検討した。

ピペロニルブトキシドを、0（対照群）、0.02、0.06、0.18%の濃度で、マウスに F_0 世代の 5 週齢から F_1 世代の 12 週齢まで 2 世代にわたって投与した。その結果、小動物運動解析装置 ANIMATE AT-420 による探査行動では F_0 世代の雌成体マウスの立ち上がり時間が用量依存的に増加した。また、子マウスの行動発達では雄子マウスの断崖回避と雌子マウスの正向反射が投与群で用量依存的に抑制された。また、ANIMATE AT-420 による自発行動の測定では F_1 世代の雌成体マウスの 0.18%投与群で動作回数・移動時間・総移動距離及び方向転回回数が増加した。

以上の結果から、本研究で用いられた用量のピペロニルブトキシドは、雄子マウスの断崖回避と雌子マウスの正向反射を用量依存的に抑制することが確認された。また、新奇環境に対する探査行動では、 F_0 世代の雌成体マウスの活動性を高める影響を示した。 F_1 世代の自発行動については、雌成体マウスの 0.18%投与群で活動性が促進された。

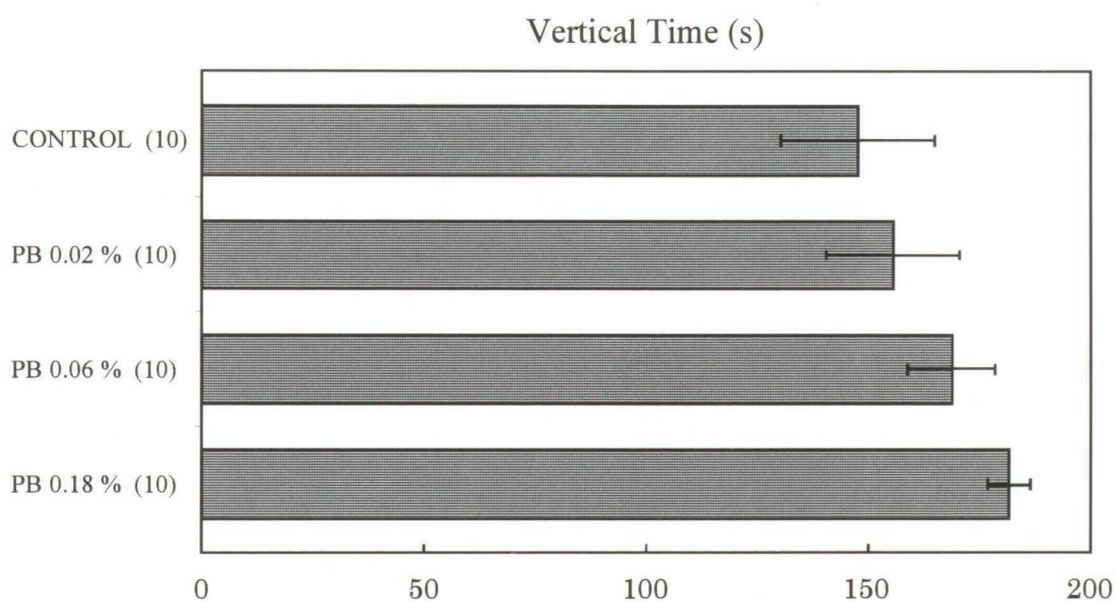


Fig. 5-1. Movement activity of exploratory behaviour at 8 weeks of age for the F_0 generation female mice administered piperonyl butoxide (PB) in the diets. Each value represents the mean \pm SE: number of mice in parentheses after group name.

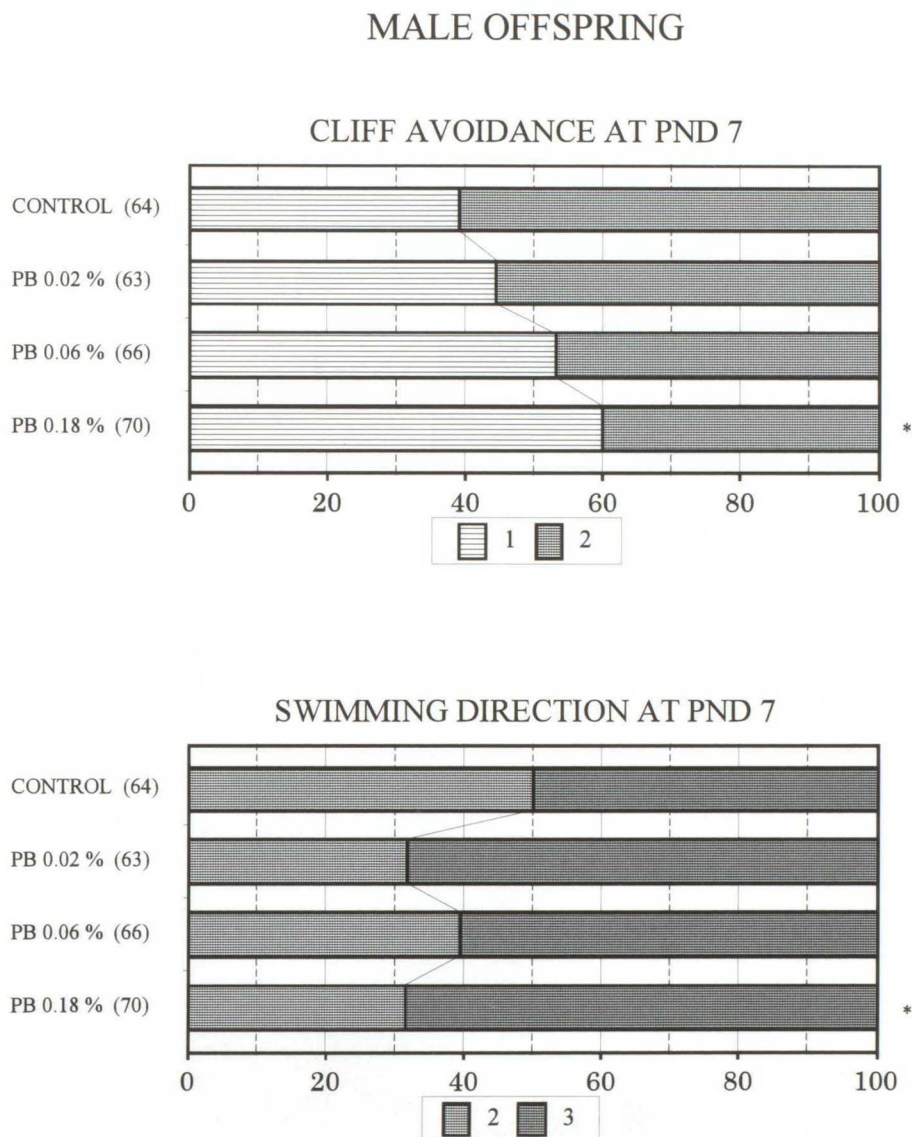


Fig. 5-2. Score frequencies of behavioural development during the lactation period in a two-generation toxicity study of piperonyl butoxide (PB) administered to mice (1). Each value represents rate of each score: number of mice in parentheses after group name. Significant different from controls: * $P < 0.05$.

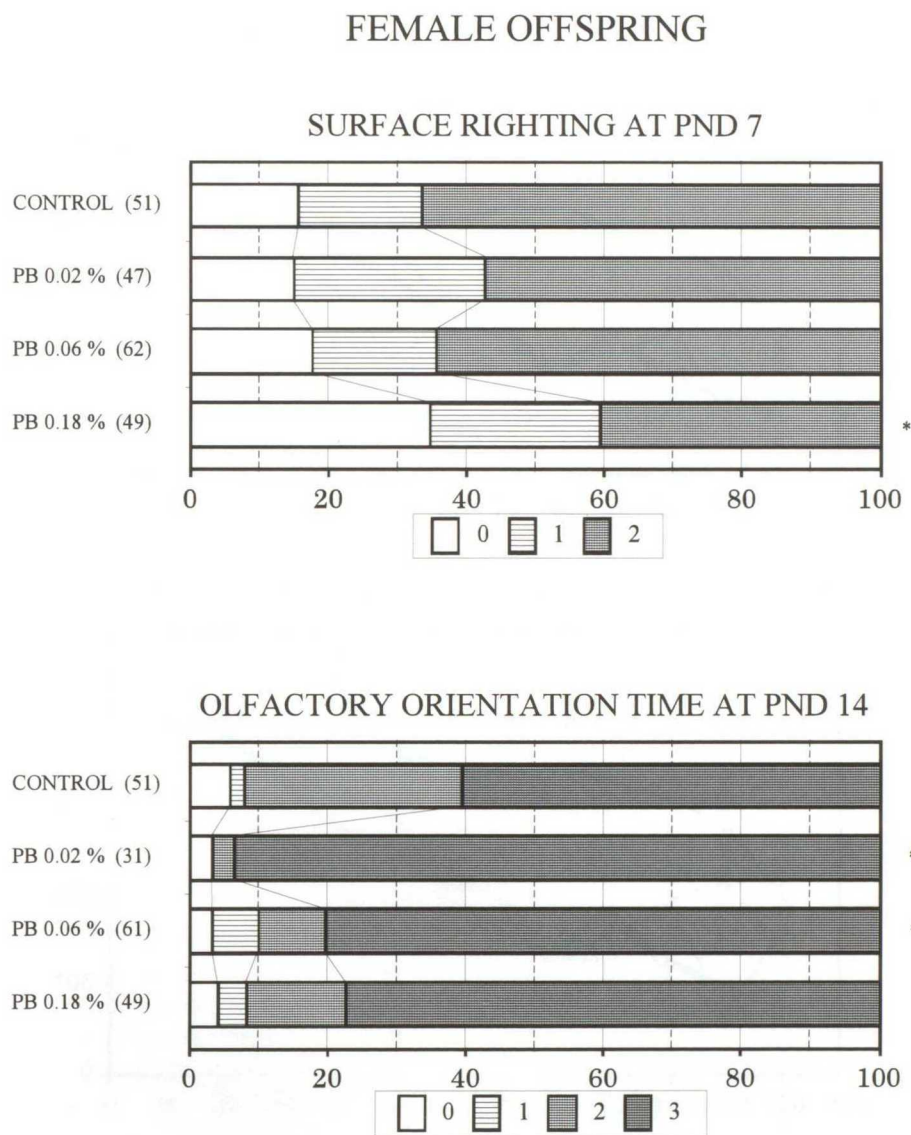


Fig. 5-3. Score frequencies of behavioural development during the lactation period in a two-generation toxicity study of piperonyl butoxide (PB) administered to mice (2). Each value represents rate of each score: number of mice in parentheses after group name. Significant different from controls: * $P < 0.05$.

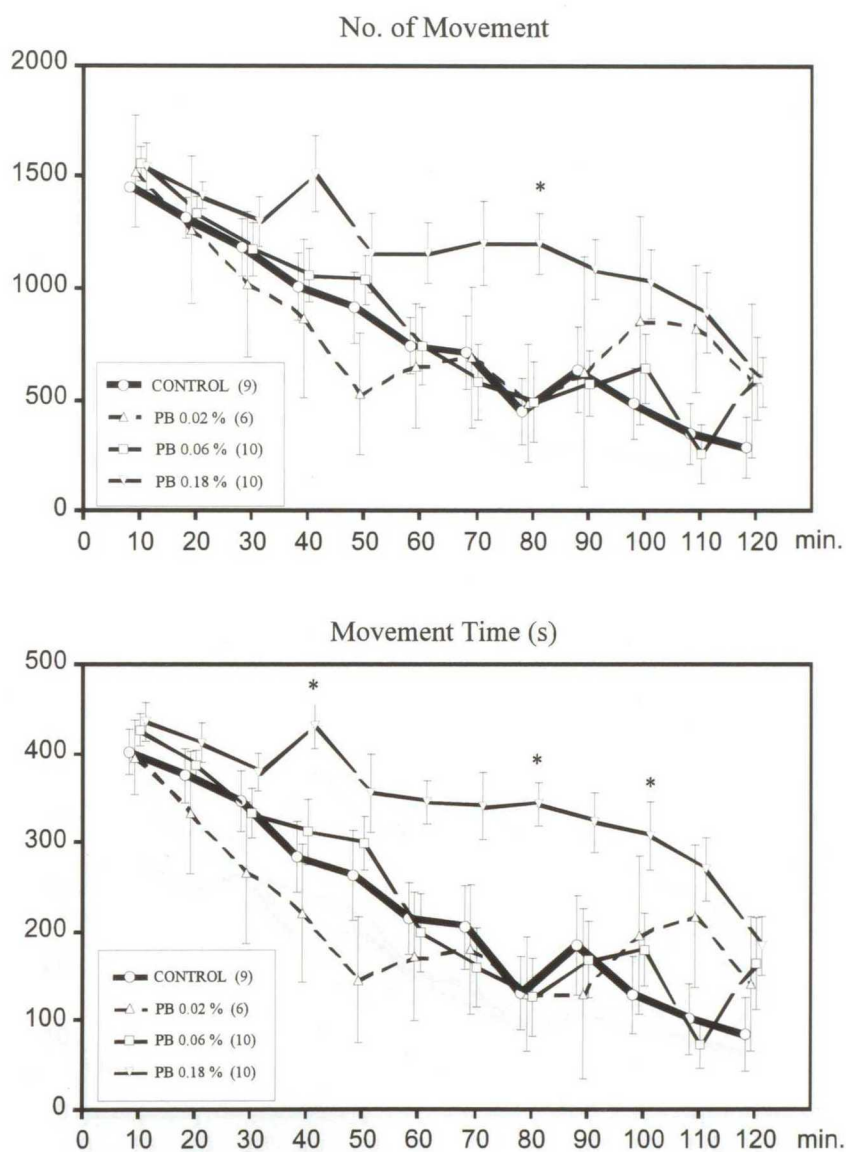


Fig. 5-4. Movement activity of spontaneous behaviour from 8 to 11 weeks of age of F₁ generation female mice administered piperonyl butoxide (PB) in the diet (1). Each value represents the mean \pm SE: number of mice in parentheses after group name. Significant different from controls: *P<0.05.

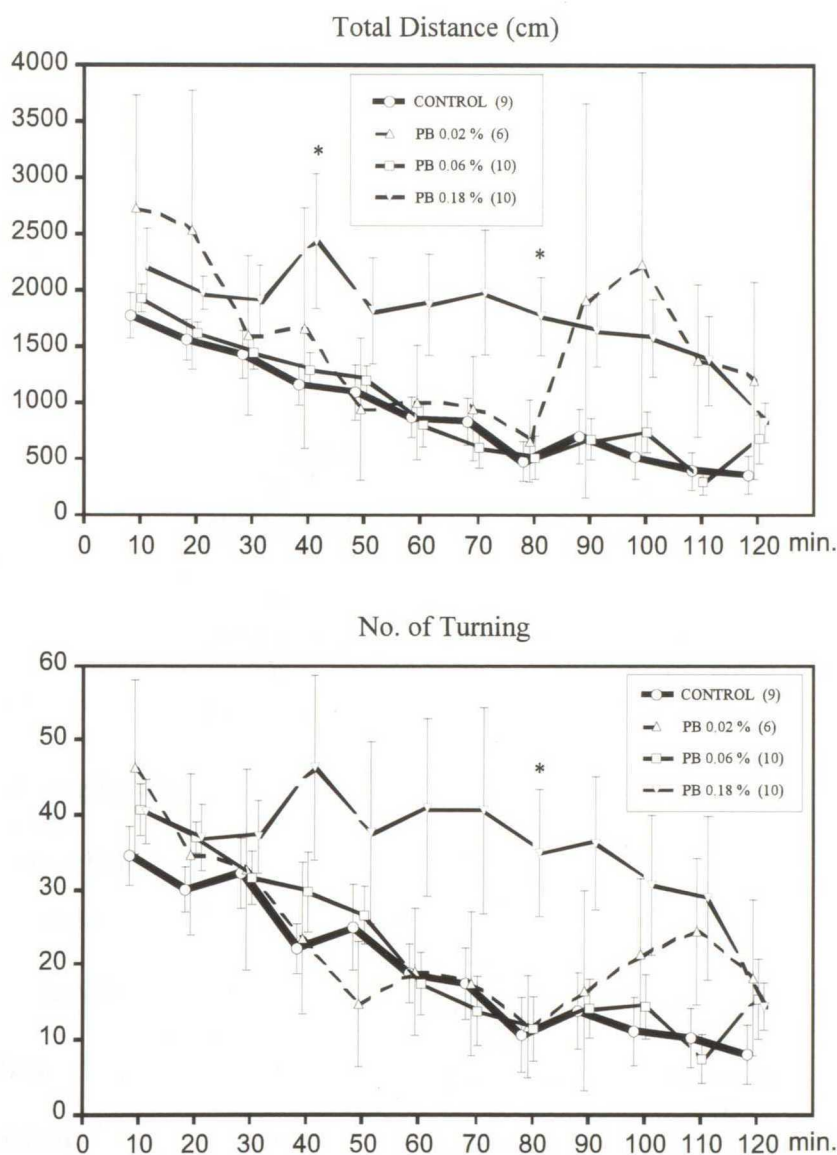


Fig. 5-5. Movement activity of spontaneous behaviour from 8 to 11 weeks of age of F₁ generation female mice administered piperonyl butoxide (PB) in the diet (2). Each value represents the mean \pm SE: number of mice in parentheses after group name. Significant different from controls: *P<0.05.

Table 5-1. Average daily food and chemical intake of mice administered piperonyl butoxide in a two-generation toxicity study.

		Dose Levels (%)			
		0	0.02	0.06	0.18
Food intake (g/kg/day)					
F ₀ generation					
preconception					
male		10	10	10	10
		153.6 ± 8.6	154.4 ± 9.8	148.8 ± 8.7	152.3 ± 13.2
female		10	10	10	10
		180.7 ± 18.3	171.4 ± 17.0	178.0 ± 24.1	174.0 ± 11.7
mating		10	10	10	10
		134.3 ± 19.6	128.9 ± 27.0	136.4 ± 17.2	138.7 ± 11.8
gestation		10	9	10	10
		153.3 ± 26.9	151.9 ± 21.9	155.3 ± 20.6	152.5 ± 11.9
lactation		8	6	8	10
		537.0 ± 88.4	484.3 ± 52.5	531.1 ± 84.1	506.3 ± 44.0
F ₁ generation					
male		9	6	9	10
		157.3 ± 5.2	153.4 ± 5.9	158.4 ± 10.7	152.1 ± 7.2
female		9	6	10	10
		176.5 ± 11.7	209.2 ± 34.3*	180.2 ± 16.1	177.1 ± 14.2
Chemical intake (mg/kg/day)					
F ₀ generation					
preconception					
male		-	10	10	10
		-	30.9 ± 2.0	89.3 ± 5.2	274.2 ± 23.7
female		-	10	10	10
		-	34.3 ± 3.4	106.8 ± 14.5	313.2 ± 21.1
mating		-	10	10	10
		-	25.8 ± 5.4	81.8 ± 10.3	249.7 ± 21.2
gestation		-	9	10	10
		-	30.4 ± 4.4	93.2 ± 12.4	274.5 ± 21.4
lactation		-	6	8	10
		-	96.9 ± 10.5	318.6 ± 50.4	911.3 ± 79.1
F ₁ generation					
male		-	6	9	10
		-	30.7 ± 1.2	95.0 ± 6.4	273.7 ± 12.9
female		-	6	10	10
		-	41.8 ± 6.8	108.1 ± 9.7	318.7 ± 25.5

Each value represents number of mice and daily intake during each period (mean ± SD).
Significantly different from controls: *P<0.05.

Table 5-2. Summary of data of litters at birth in a two-generation toxicity study of piperonyl butoxide administered to mice.

	Dose Levels (%)			
	0	0.02	0.06	0.18
No. of females examined	10	10	10	10
No. of pregnant females	10	9	10	10
No. of litters	9	9	10	10
No. of offspring	116	112	129	120
Average litter size	12.9 ± 2.9	12.4 ± 2.4	12.9 ± 2.3	12.0 ± 2.2
Average litter weight (g)	20.98 ± 4.45	19.91 ± 2.99	19.53 ± 2.92	18.95 ± 3.00
Sex ratio (male/female)	1.27 (65/51)	1.33 (64/48)	1.05 (66/63)	1.40 (70/50)

Each value represents the mean ± SD.

Table 5-3. Summary of average body weight of offspring during the lactation period.in a two-generation toxicity study of piperonyl butoxide administered to mice.

	Dose Levels (%)			
	0	0.02	0.06	0.18
Male Offspring				
	65	64	66	70
PND 0	1.65 ± 0.14	1.61 ± 0.13	1.56 ± 0.16**	1.63 ± 0.17
	65	63	66	70
PND 4	2.98 ± 0.39	2.94 ± 0.40	2.85 ± 0.41	3.00 ± 0.47
	64	63	66	70
PND 7	4.33 ± 0.67	4.41 ± 0.71	4.17 ± 0.59	4.36 ± 0.65
	64	39	66	70
PND 14	6.28 ± 0.98	6.59 ± 1.02	5.90 ± 0.89	6.27 ± 0.92
	61	38	57	70
PND 21	9.51 ± 3.18	10.54 ± 3.22	9.16 ± 2.26	10.45 ± 2.65
Female Offspring				
	51	48	63	50
PND 0	1.60 ± 0.11	1.58 ± 0.11	1.47 ± 0.14***	1.51 ± 0.17**
	51	47	62	49
PND 4	2.94 ± 0.38	2.96 ± 0.48	2.67 ± 0.42**	2.70 ± 0.50*
	51	47	62	49
PND 7	4.30 ± 0.69	4.49 ± 0.81	4.00 ± 0.63	3.95 ± 0.78
	51	31	61	49
PND 14	6.31 ± 0.98	6.41 ± 1.25	5.89 ± 0.98	5.61 ± 1.01*
	47	31	55	48
PND 21	9.98 ± 3.12	10.95 ± 3.19	9.33 ± 2.22	8.80 ± 2.91

Each value represents number of offspring and mean ± SD. Significantly different from controls: *P<0.05, **P<0.01.

PND = postnatal day

Table 5-4. Summary of number of offspring and survival index (%) during the lactation period in a two-generation toxicity study of piperonyl butoxide administered to mice.

	Dose Levels (%)			
	0	0.02	0.06	0.18
Male Offspring				
PND 0	65 (100.0)	64 (100.0)	66 (100.0)	70 (100.0)
PND 4	65 (100.0)	63 (98.4)	66 (100.0)	70 (100.0)
PND 7	64 (98.5)	63 (98.4)	66 (100.0)	70 (100.0)
PND 14	64 (98.5)	39 (95.1)	66 (100.0)	70 (100.0)
PND 21	61 (93.8)	38 (92.7)	57 (86.4)	70 (100.0)
Female Offspring				
PND 0	51 (100.0)	48 (96.0)	63 (98.4)	50 (96.2)
PND 4	51 (100.0)	47 (94.0)	62 (96.9)	49 (94.2)
PND 7	51 (100.0)	47 (94.0)	62 (96.9)	49 (94.2)
PND 14	51 (100.0)	31 (93.9)	61 (95.3)	49 (94.2)
PND 21	47 (92.2)	31 (93.9)	55 (85.9)	48 (92.3)

Each value represents number of offspring: survival index (%) in parentheses. Survival indices are calculated except for the dead litters.
PND = postnatal day.

総括

今回の一連の研究により、これまで明らかになっていなかったピペロニルブトキシドの後世代に対する毒性について新たな知見を得ることができた。まず、2世代毒性研究により、ピペロニルブトキシドは0.15–0.6%という高濃度においてマウスの生殖指標や行動発達に抑制的な影響を及ぼすことが示され、3世代毒性研究によってその影響に再現性のあることも明らかになった。

また、発生毒性研究において、マウスに対して四肢に対する催奇形性を持つことが示され、ピペロニルブトキシドが胎盤を通過して母体から胎子に移行する可能性が示唆された。その後、著者らの行なったラットを用いた発生毒性研究において、ピペロニルブトキシドは四肢に対する催奇形性を持つことが明らかになっている⁵⁷⁾ので、発ガン性同様、催奇形性に関しても齧歯類において種差が見られないことが示された。マウス及びラットの発生毒性研究において、前肢芽形成期を中心に投与したことから、四肢に対する催奇形性が明らかになったが、同じ時期に感受性のあるその他の器官に対する催奇形性は見られなかったことから、四肢に対する催奇形性を示した1385–1800 mg/kgのピペロニルブトキシドは前肢芽の形成に対して強い影響を及ぼすものの、その他の器官に対する影響はそれほど強くないものと思われる。

さらに、ピペロニルブトキシドが母体に毒性を示さない0.1%以下の低濃度投与によってもマウスの行動発達が用量依存的に抑制されたことにより、乳汁を介してピペロニルブトキシドまたはその代謝物が子マウスに影響を及ぼす可能性も示唆された。さらに、次世代の探査行動及び自発行動に促進的な影響を及ぼすことが示されたことにより、木村らがラットの脳への分布が認められたことを報告している⁹⁾ことから、ピペロニルブトキシドは中枢神経系へ影響を及ぼし、行動の変化を引き起こしたものと思われる。

また、今回の行動発達毒性研究を通して、授乳期間中に親動物の死亡が数例あったが、必ずしも高濃度投与群の個体が死亡する訳ではないことと、対照群でも親動物の死亡が起こることから、ピペロニルブトキシドの投与による影響ではないと思われる。死亡動物の死因は解剖の結果、明らかな病変がないことからはっきりとしないが、授乳期には母体に高い負荷がかかることから、飲水などに問題があったことが推測される。

本研究における最小毒性量 (LOAEL) は、行動発達と探査行動に対して 0.03% (約 50~55 mg/kg 相当) で、1 日許容摂取量 (ADI) を基にした無毒性量 (NOAEL) である 20 mg/kg の 2 倍強と非常に近い値になっている。しかし、日常生活での人の推定摂取量(体重 1kg 当たり 0.0354 μ g)は ADI 値 (0.20 mg/kg) に較べると非常に低い量であることから、現実的なピペロニルブトキシドの食品からの摂取量では人に対して影響を及ぼさないものと思われる。しかしながら、東京都の輸入食品の残留農薬調査でベビーフードから 0.33 ppm と少量ながらピペロニルブトキシドが検出されたこともあり⁵⁸⁾、東京都の輸入農産物の残留農薬調査で、麦芽や熱帯産果実などから微量ながらピペロニルブトキシドが検出されている⁵⁹⁻⁶¹⁾。これらの内、2006 年に施行されたポジティブリスト制度で設けられたピペロニルブトキシドの基準値と較べると、一番濃度の高いフランス産レンズ豆 (0.06 ppm) でも基準値の 1/3 以下であり、その他の農産物では基準値の 1/100-1/800 以下と非常に微量の検出となっている。しかし、ポジティブリスト制度で設けられたピペロニルブトキシドの基準値と平成 19 年度の国民栄養調査報告の結果を基に算出した最大推定摂取量は、国民平均で約 0.27 mg/kg と ADI 値 (0.20 mg/kg) を超えてしまう可能性が示唆される。さらに、市販のピレスロイド系防虫シートに共力剤としてピペロニルブトキシドが添加されている製品も見つかっている⁶²⁾ ほか、家庭用の不快昆虫の殺虫剤からも検出されている⁶³⁾ ことから、今後とも監視体制を強化する必要があると思われる。

さらに、ピペロニルブトキシドは四肢に対する催奇形性を持つことから、母体が摂取したピペロニルブトキシドは、そのままの形あるいはその代謝物として胎盤を通過して胎子に移行する可能性が示唆された。ポジティブリスト制度で設けられたピペロニルブトキシドの基準値と平成19年度の国民栄養調査報告の結果を基に算出した女性の最大推定摂取量は、約 0.23 mg/kg と ADI 値 (0-0.20 mg/kg) を超えてしまう可能性が示唆されるが、催奇形性を示した 1385-1800 mg/kg (ヒトに外挿すると約 14-18 mg/kg) に較べると非常に低い値なので、食品からの摂取量ではピペロニルブトキシドは妊婦に対して影響を及ぼさないものと思われる。しかしながら、本研究における催奇形性に関する最小毒性量 (LOAEL) は 1385 mg/kg で、ヒトへの外挿に用いられる安全係数をかけると約 14 mg/kg となり、日本人一人当たり約 730 mg に相当し、職業曝露においては十分考えられる用量と思われる。また、母体に毒性を示さない 0.1%以下の濃度を母体が摂取すると、授乳期間中の子マウスの行動発達が抑制されることから、乳汁を介してピペロニルブトキシドまたはその代謝物が子マウスに影響を及ぼす可能性も示唆された。また、ピペロニルブトキシドは皮膚から吸収されて体内に分布することが報告されている⁶⁴⁾。したがって、本研究の結果は、ピペロニルブトキシドを食品添加物として処理する作業、農薬として散布するなどの作業に従事するほか、製造工程での事故で大量にピペロニルブトキシドに曝露するなどの場合に次世代への危険性を示唆するものであり、これまでほとんど顧みられなかったピペロニルブトキシドの取扱に警鐘を鳴らすものである。

謝辞

本稿を終えるにあたり、懇切なる御指導と御校閲を賜りました麻布大学獣医学部教授 山本雅子博士に甚大なる謝意を表します。また、有益な御助言と御指導をいただいた麻布大学獣医学部教授 有嶋和義博士、麻布大学獣医学部准教授 代田真理子博士及び麻布大学生物科学総合研究所所長 代田欣二博士に感謝の意を表します。

本研究は東京都健康安全研究センターにて遂行されたものであり、入所以来終始暖かい御指導と御鞭撻をいただきました東京都健康安全研究センター環境保健部生体影響研究科主任研究員 大石眞之博士及び高橋省博士に感謝の意を表します。

また、本稿作成の機会を与えてくださった東京都健康安全研究センター環境保健部生体影響研究科前科長 大橋則雄博士に深く感謝いたします。最後に本研究に多大の御助力を賜りました東京都健康安全研究センターの皆様には感謝いたします。

引用文献

- 1) 鈴木郁生、野島庄七、谷村顕雄 (1999) 第7版 食品添加物公定書解説書. 東京：廣川書店.
- 2) Friedman, M.A., Epstein, S.S. (1970) Stability of piperonyl butoxide. *Toxicology and Applied Pharmacology* 17, 810–812.
- 3) Cardy, R.H., Renne, R.A., Warner, J.W., Cypher, R.L. (1979) Carcinogenesis bioassay of technical-grade piperonyl butoxide in F344 rats. *Journal of the National Cancer Institute* 62, 569–578.
- 4) Kennedy, Jr. G.L., Smith, S.H., Kinoshita, F.K., Carandra, J.C. (1977) Teratogenic evaluation of piperonyl butoxide in the rat. *Food and Cosmetics Toxicology* 15, 337–339.
- 5) FAO/WHO Food Standards. (2008) *Pesticide residues in food - Maximum residue limits*. Codex Alimentarius. Available at (http://www.codexalimentarius.net/mrls/pestdes/jsp/pest_q-e.jsp)
- 6) Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR). (1996) *Pesticide residues in food - 1995. Evaluations 1995 Part II - Toxicological and environmental*. Geneva: World Health Organization, pp. 277–306.
- 7) Kamienski, F.X., Casida, J.E. (1970) Importance of demethylenation in the metabolism in vivo and in vitro of methylenedioxyphenyl synergists and related compounds in mammals. *Biochemical Pharmacology* 19, 91–112.
- 8) Fishbein, L., Falk, H.L., Fawkes, J., Jordan, S. Corbett, B. (1969) The metabolism of piperonyl butoxide in the rat with ^{14}C in the methylenedioxy or α -methylene group. *Journal of Chromatography* 41, 61–79.
- 9) 木村良平, 出口一美, 村田敏郎 (1983) ピペロニルブトキシサイドのラットに

- おける吸収、分布、排泄. *食品衛生学雑誌* 24, 319–323.
- 10) Byard, J., Needham, D. (2006) Metabolism and excretion of piperonyl butoxide in the rat. *Xenobiotica* 36, 1259–1272.
- 11) Sarles, M.P., Vandegrift, W.B. (1952) Chronic oral toxicity and related studies on animals with the insecticide and pyrethrum synergist, piperonyl butoxide. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1, 862–883.
- 12) Maekawa, A., Onodera, H., Furuta, K., Tanigawa, H., Ogiu, T., Hayashi, Y. (1985) Lack of evidence of carcinogenicity of technical-grade piperonyl butoxide in F344 rats: Selective induction of ileocaecal ulcers. *Food and Chemical Toxicology* 23, 675–682.
- 13) Takahashi, O., Oishi, S., Fujitani, T., Tanaka, T., Yoneyama, M. (1994) Chronic toxicity studies of piperonyl butoxide in F344 rats: Induction of hepatocellular carcinoma. *Fundamental and Applied Toxicology* 22, 293–303.
- 14) Takahashi, O., Oishi, S., Fujitani, T., Tanaka, T., Yoneyama, M. (1994) Piperonyl butoxide induces hepatocellular carcinoma in male CD-1 mice. *Archives of Toxicology* 68, 467–469.
- 15) Takahashi, O., Oishi, S., Fujitani, T., Tanaka, T., Yoneyama, M. (1997) Chronic toxicity studies of piperonyl butoxide in CD-1 mice: Induction of hepatocellular carcinoma. *Toxicology* 124, 95–103.
- 16) Khera, K.S., Whalen, C., Angers, G., Trivet, G. (1979) Assessment of the teratogenic potential of piperonyl butoxide, biphenyl, and phosalone in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* 14, 353–358.
- 17) Ater, S.B., Swinyard, E.A., Tolman, K.G., Franklin, M.R. (1984) Anticonvulsant activity and neurotoxicity of piperonyl butoxide in mice. *Epilepsia* 25, 551–555.
- 18) 植村振作、河村宏、辻万千子 (2006) *農薬毒性の事典 第3版*. 東京：三省堂

pp. 363–364.

- 19) Tanaka, T. (1992) Effects of piperonyl butoxide on F₁ generation mice. *Toxicology Letters* 60, 83–90.
- 20) Fujitani, T., Ando, H., Fujitani, K., Ikeda, T., Kojima, A., Kubo, Y., Ogata, A., Oishi, S., Takahashi, H., Takahashi, O., Yoneyama, M. (1992) Sub-acute toxicity of piperonyl butoxide in F344 rats. *Toxicology* 72, 291–298.
- 21) Paget, G. E., Thomson, R. eds. (1979) *Standard Operating Procedures in Pathology*. Lancaster: MTP Press. pp. 334–340.
- 22) Tanaka, T. (1995) Reproductive and neurobehavioral effects of imazalil administered to mice. *Reproductive Toxicology* 9, 281–288.
- 23) Fox, W.M. (1965) Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. *Animal Behaviour* 13, 234–241.
- 24) Pantaleoni, G., Fanini, D., Sponta, A.M., Palumbo, G., Giorgi, R., Adams, P.M. (1988) Effects of maternal exposure to polychlorobiphenyls (PCBs) on F₁ generation behavior in the rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 11, 440–449.
- 25) Altman, J., Sudarshan, K. (1975) Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Animal Behaviour* 23, 896–920.
- 26) Barlow, S.M., Knight, A.F., Sullivan, F.M. (1978) Delay in postnatal growth and development of offspring produced by maternal restraint stress during pregnancy in the rat. *Teratology* 18, 211–218.
- 27) Meyer, O., Hansen, E. (1980) Behavioural and developmental effects of butylated hydroxytoluene dosed rats in utero and in lactation period. *Toxicology* 16, 247–258.
- 28) Biel, W.C. (1940) Early age differences in maze performance in the albino rat. *The Journal of Genetic Psychology* 56, 439–453.
- 29) 北谷照雄、赤池雅司、高山和男、小林孝好 (1988) Cefodizime sodium の生

- 殖試験—マウスにおける器官形成期静脈内投与試験—. *The Journal of Toxicological Sciences* 13 Suppl. I, 191–214.
- 30) Martin, P., Bateson, P. (1990) *Measuring behaviour: an introductory guide*. Tokyo: Tokai University Press. pp. 102–122.
- 31) Smart, J.L., Dobbing, J. (1971) Vulnerability of developing brain. II. Effects of early nutritioal deprivation on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. *Brain Research* 28, 85–95
- 32) Ottinger, D.R., Tanabe, G. (1968) Maternal food restriction: Effects on offspring behavior and development. *Developmental Psychobiology* 2, 7–9.
- 33) 一色賢司、津村周作、渡辺忠雄 (1983) 防カビ剤及び防虫剤の摂取量. *食品衛生学雑誌* 24, 344–349.
- 34) Tanaka, T, Takahashi O, Oishi S. (1992) Reproductive and neurobehavioural effects in three-generation toxicity study of piperonyl butoxide administered to mice. *Food and Chemical Toxicology* 30, 1015–1019.
- 35) Tanaka, T. (1992) Effects of amaranth on F₁ generation mice. *Toxicology Letters* 60, 315–324.
- 36) Tanaka, T., Fujitani, T., Takahashi, O., Oishi, S. (1994) Developmental toxicity evaluation of piperonyl butoxide in CD-1 mice. *Toxicology Letters* 71, 123–129.
- 37) Theiler, K. (1989) *The house mouse: Atlas of embryonic development*. New York: Springer-Verlag.
- 38) 石橋正彦、高橋寿太郎、菅原七郎、安田泰久 (1984) *実験動物学ラット*. 東京：講談社サイエンティフィック.
- 39) Inouye, M. (1976) Differential staining of cartilage and bone in fetal mouse skeleton by Alcian blue and Alizarin red S. *Congenital Anomalies* 16, 171–173.
- 40) Palmer, A.K. (1972) Sporadic malformations in laboratory animals and their

- influence on drug testing. *Advance of Experimental Biology and Medicine* 27, 45–60.
- 41) Perraud, J. (1976) Levels of spontaneous malformations in the CD rat and the CD-1 mouse. *Laboratory Animal Science* 26, 293–300.
- 42) Fritz, H., Grauwiler, J., Hummler, H., Lindt, S., Schon, H. (1978) Collection of control data from teratological experiments on mice, rats, and rabbits. *Arzneimittel-Forschung / Drug Research* 28, 1410–1413.
- 43) 亀山義郎、谷村孝、安田峯生 (1980) 実験動物における自然発生奇形—写真図譜および参考資料—。 *先天異常* 20, 25–106.
- 44) Morita, H., Ariyuki, F., Inomata, N., Nishimura, K., Hasegawa, Y., Miyamoto, M., Watanabe, T. (1987) Spontaneous malformations in Laboratory animals: Frequency of external, internal and skeletal malformations in rats, rabbits and mice. *Congenital Anomalies* 27, 147–206.
- 45) Kotch, L.E., Dehart, D.B., Alles, A.J., Chernoff, N., Sulik, K.K. (1992) Pathogenesis of ethanol-induced limb reduction defects in mice. *Teratology* 46, 323–332.
- 46) Collins, M.D., Walling, K.M., Resnick, E., Scott, Jr. W.J. (1991) The effect of administration time on malformations induced by three anticonvulsant agents in C57BL/6J mice with emphasis on forelimb ectrodactyly. *Teratology* 44, 617–627.
- 47) Tanaka, T. (2003) Reproductive and neurobehavioural effects of piperonyl butoxide administered to mice in the diet. *Food Additives and Contaminants* 20, 207–214.
- 48) 松本欣三、蔡兵、中村晋也、渡辺裕司 (1990) マウス運動量の測定及び解析のための新しいシステム。 *日本薬理学会誌* 96, 31–39.
- 49) Matsumoto, K., Cai, B., Sasaki, K., Watanabe, H. (1990) Methamphetamine- and apomorphine-induced change in spontaneous motor activity using a new system to

- detect and analyze motor activity in mice. *Journal of Pharmacological Methods* 24, 111–119.
- 50) Tanaka, T. (1993) Behavioural effects of piperonyl butoxide in male mice. *Toxicology Letters* 69, 155–161.
- 51) Isshiki, K., Tsumura, S., Watanabe, T. (1978) Residual piperonyl butoxide in agricultural products. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 19, 518–523.
- 52) Tanaka, T., Takahashi, O., Oishi, S., Ogata, A. (2009) Effects of piperonyl butoxide on spontaneous behavior in F1-generation mice. *Toxicology and Industrial Health* 25, 489–497.
- 53) International Conference on Harmonization of Technical Requirement for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). (2005) *Detection for Toxicity on Reproduction for Medicinal Products and Toxicity for Male Fertility*. ICH Tripartite Guideline S5.
- 54) Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). (2007) *Developmental neurotoxicity study*. OECD Guideline for Testing Chemicals 426.
- 55) Tanaka, T. (2004) The relationships between litter size, offspring weight, and behavioral development in laboratory mice *Mus musculus*. *Mammal Study* 29, 147–153.
- 56) 日本学術会議 (2006) 動物実験の適正な実施に向けたガイドライン. 日本学術会議
- 57) Tanaka, T., Fujitani, T., Takahashi, O., Oishi, S., Yoneyama, M. (1995) Developmental toxicity study of piperonyl butoxide in CD rats. *Toxicology and Industrial Health* 11, 175–184.
- 58) 東京都食品環境指導センター (1999) 平成10年度ベビーフード残留農薬検

査結果. *くらしの衛生* 35, 11.

- 59) 富澤早苗、高野伊知郎、小林麻紀、田村康宏、立石恭也、酒井奈穂子、上条恭子、井部明広 (2005) 輸入農産物中の残留農薬実態調査 (有機塩素系農薬, N-メチルカルバメート系農薬及びその他) —平成16年度—. *東京都健康安全研究センター年報* 56, 199–204.
- 60) 酒井奈穂子、高野伊知郎、小林麻紀、田村康宏、富澤早苗、立石恭也、上条恭子、井部明広 (2006) 輸入農産物中の残留農薬実態調査 (有機塩素系農薬, N-メチルカルバメート系農薬及びその他) —平成17年度—. *東京都健康安全研究センター年報* 57, 255–260.
- 61) 上条恭子、小林麻紀、大塚健治、田村康宏、富澤早苗、岩越景子、影山百合子、高野伊知郎、永山敏廣 (2009) 輸入農産物中の残留農薬実態調査 (有機塩素系農薬, N-メチルカルバメート系農薬及びその他) —平成20年度—. *東京都健康安全研究センター年報* 60, 179–185.
- 62) 宇都宮暁子、長谷川一夫、森康明 (1997) 防虫・防ダニ家庭用品中のピレスロイド系農薬, 共力剤及び忌避剤の分析と変異原性. *衛生化学* 43, 366–375.
- 63) 長谷川一夫、辻清美、石坂富美、伏脇裕一 (2004) 不快害虫用殺虫剤に含まれる農薬及び有害物質の分析. *神奈川県衛生研究所研究報告* 34, 24–28.
- 64) Wester, R.C., Bucks, D.A.W. and Maibach, H.I. (1994) Human *in vivo* percutaneous absorption of pyrethrin and piperonyl butoxide. *Food and Chemical Toxicology* 32, 51–53.

主論文及び参考論文リスト

主論文 []内は引用文献番号

- Tanaka, T. (1992) Effects of piperonyl butoxide on F₁ generation mice. *Toxicology Letters* 60, 83–90. [19]
- Tanaka, T., Takahashi, O., Oishi, S. (1992) Reproductive and neurobehavioural effects in three-generation toxicity study of piperonyl butoxide administered to mice. *Food and Chemical Toxicology*, 30, 1015–1019. [34]
- Tanaka, T., Fujitani, T., Takahashi, O. Oishi, S. (1994) Developmental toxicity evaluation of piperonyl butoxide in CD-1 mice. *Toxicology Letters* 71, 123–129. [36]
- Tanaka, T. (2003) Reproductive and neurobehavioural effects of piperonyl butoxide administered to mice in the diet. *Food Additives and Contaminants* 20, 207–214. [47]
- Tanaka, T., Takahashi, O., Oishi, S., Ogata, A. (2009) Effects of piperonyl butoxide on spontaneous behavior in F₁ generation mice. *Toxicology and Industrial Health* 25, 489–497. [52]

参考論文 []内は引用文献番号

- Tanaka, T., Takahashi, O., Oishi, S. and Ogata, A. (2008) Effects of tartrazine on exploratory behavior in a three-generation toxicity study in mice. *Reproductive Toxicology* 26, 156–163.
- Tanaka, T. (2006) Reproductive and neurobehavioural toxicity study of Ponceau 4R administered to mice in the diet. *Food and Chemical Toxicology* 44, 1651–1658.
- Tanaka, T. (2006) Reproductive and neurobehavioural toxicity study of tartrazine administered to mice in the diet. *Food and Chemical Toxicology* 44, 179–187.
- Tanaka T. (2005) Reproductive and neurobehavioural effects of bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in a cross-mating toxicity study of mice. *Food and Chemical*

Toxicology 43, 581–589.

- Tanaka, T. (2004) The relationships between litter size, offspring weight, and behavioral development in laboratory mice *Mus musculus*. *Mammal Study* 29, 147–153. [55]
- Tanaka, T. (2003) Effects of bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on secondary sex ratio of mice in a cross-mating study. *Food and Chemical Toxicology* 41, 1429–1432.
- Tanaka, T. (2002) Reproductive and neurobehavioural toxicity study of bis (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) administered to mice in the diet. *Food and Chemical Toxicology* 40, 1499–1506.
- Tanaka, T. (2001) Reproductive and neurobehavioural effects of thiabendazole administered to mice in the diet. *Food Additives and Contaminants* 18, 375–383.
- Tanaka, T. (2001) Reproductive and neurobehavioural toxicity study of erythrosine administered to mice in the diet. *Food and Chemical Toxicology* 39, 447–454.
- Tanaka, T. (1999) Reproductive and neurobehavioural toxicity study of chlorpropham in mice. *Food Additives and Contaminants* 16, 173–180.
- Tanaka, T., Fujitani, T., Takahashi, O., Oishi, S., Yoneyama, M. (1995) Developmental toxicity study of piperonyl butoxide in CD rats. *Toxicology and Industrial Health* 11, 175–184. [57]

和文要旨

ピペロニルブトキシドはピレスリンなどの殺虫剤の効果を高めるために用いられる農薬の共力剤であり、日本では食品添加物の防虫剤として登録され、諸外国では、果実・野菜・穀類などの貯蔵や保存のためにポストハーベスト農薬として用いられている。日本ではピペロニルブトキシドは、食品添加物として穀類 1 kg に対して0.024 g (24 ppm) 以下で使用が認められている。また、WHOが定める1日あたりの許容摂取量 (ADI) は、体重 1 kg当たり 0.20 mg となっている。

ピペロニルブトキシドの毒性については SarlesとVandegrift (1952) がラットを用いて第2世代及び第3世代に対して特に影響がなく、肝臓に対する発ガン性も認められないと報告している。生殖発生毒性については Kennedyら (1977) がピペロニルブトキシドはラットに対して催奇形性を示さないと報告し、Kheraら (1979) も同様にラットに対して催奇形性及び母体毒性を示さないと報告している。

一方、ピペロニルブトキシドの神経行動毒性に関してAterら (1984) が雄マウスにおいて神経毒性と抗痙攣活性を示すことを見いだしている。ピペロニルブトキシドは主食である穀類を保存の目的で混入することが認められており、非意図的に食品から摂取される可能性が高いことから、潜在的な健康被害のリスクが高い化学物質と考えられる。また、東京都の輸入食品の残留農薬調査でベビーフードから少量ながらピペロニルブトキシドが検出されたこともあり、市販のピレスロイド系防虫シートに共力剤としてピペロニルブトキシドが添加されている製品も見つかっている。そこで、本研究ではマウスを用いて、ピペロニルブトキシドの潜在的なリスクがより大きいと考えられる母体内及び授乳期曝露による後世代に及ぼす影響を検討するため、以下に掲げる5つの実験研究を

行ない、ピペロニルブトキシドがマウスの後世代に及ぼす影響について考察した。

第 1 章では、ピペロニルブトキシドが後世代に及ぼす影響について、まず 2 世代の行動発達毒性研究を行ない、生殖と行動発達に及ぼす影響について検討した。ピペロニルブトキシドを、0 (対照群)、0.15、0.30、0.60%の濃度で、マウス F₀ 世代の 5 週齢から F₁ 世代の 9 週齢まで 2 世代にわたって投与した。その結果、オープンフィールド試験において親マウスの 8 週齢の移動量と立ち上がり回数、子マウスの 3 週齢の移動量が雄の投与群で用量依存的に抑制された。また、授乳期間中の子マウスの体重は投与群で有意に抑制された。子マウスの行動発達では 7 日齢の正向反射と 4 日齢の背地走性、及び 14 日齢の嗅覚性指向反応が投与群で用量依存的に抑制された。4 日齢の遊泳試験では方向、頭角度、四肢の動きが投与群で用量依存的に抑制された。以上の結果から、本研究で用いられた用量のピペロニルブトキシドは、親動物の一般状態にはあまり影響を及ぼさないが、生殖と行動発達に対しては抑制的に影響することが確認された。

第 2 章では、第 1 章で実施した 2 世代の行動発達毒性研究の結果を受けて、より低濃度のピペロニルブトキシドを含む投与量による 3 世代毒性研究を行ない、生殖と行動発達に及ぼす影響の再現性と複数世代を経た影響について検討した。ピペロニルブトキシドを、0 (対照群)、0.1、0.2、0.4、0.8%の濃度で、マウス F₀ 世代の 5 週齢から F₂ 世代の離乳時まで 3 世代にわたって投与した。その結果、産子数と一腹子の重さが各世代とも 0.8%投与群で減少した。授乳期間中の子マウスの体重は各世代とも投与群で有意に抑制され、3 週齢の生存率は 0.8%投与群で減少した。0.4%投与群の 93 匹の子マウスの中で、四肢全ての第 5 指が欠損している雌子マウスが 1 匹確認された。子マウスの行動発達では F₁ 世代の 7 日齢の正向反射及び背地走性、14 日齢の嗅覚性指向反応が投与群で用量

依存的に抑制され、遊泳試験での 14 日齢の頭角度及び四肢の動きが 0.8%投与群で抑制された。F₂ 世代では 4 日齢及び 7 日齢の正向反射、4 日齢の背地走性、7 日齢の断崖回避及び 14 日齢の嗅覚性指向反応が投与群で用量依存的に抑制された。以上の結果から、本研究で用いられた用量のピペロニルブトキシドは、生殖と行動発達に対しては複数世代にわたって抑制的に影響することと、その影響の再現性が確認された。

第 3 章では、第 2 章で実施した 3 世代の行動発達毒性研究において、ピペロニルブトキシド 0.4%投与群において四肢の奇形を有する雌子マウスが確認されたことから、マウスの発生に対する影響について、特に四肢の奇形に重点を置いて検討した。ピペロニルブトキシドを、0 (対照群)、1065、1385、1800 mg/kg bw の濃度で、マウスに妊娠 9 日目に単回投与し、胎子の発生に及ぼす影響について観察した。その結果、早期死胚数及び後期死胚数が用量依存的に増加し、胎子体重増加は雌雄ともに用量依存的に抑制された。また、外表奇形では前肢の欠指症が投与群で用量依存的に増加した。以上の結果から、本研究で用いた高い用量のピペロニルブトキシドは、マウス胎子の成長を抑制し、四肢に対する催奇形性を有することが確認された。

第 4 章では、第 1 章及び第 2 章で実施した 2 世代及び 3 世代毒性研究の結果を受けて、これまで用いた投与量より低濃度のピペロニルブトキシドによる行動発達毒性研究を行ない、ピペロニルブトキシドの生殖と行動発達に及ぼす影響が、より低濃度においても再現されるかについて検討した。ピペロニルブトキシドを、0 (対照群)、0.01、0.03、0.09%の濃度で、マウス F₀ 世代の 5 週齢から F₁ 世代の 9 週齢まで 2 世代にわたって投与した。その結果、ピペロニルブトキシドは出生時における産子数、一腹子の重さ及び性比に影響を及ぼさず、行動発達では雄子マウスの 7 日齢の正向反射と 14 日齢の嗅覚性指向反応が投与

群で用量依存的に抑制された。また、小動物運動解析装置 ANIMATE AT-420 による探査行動の測定では、F₁ 世代の雄成体マウスで総移動距離・平均移動距離及び平均移動速度が用量依存的に増加した。以上の結果から、本章で用いられた用量のピペロニルブトキシドは、雄子マウスの正向反射と嗅覚性指向反応を用量依存的に抑制し、さらに 0.03% という低い濃度のピペロニルブトキシドは行動発達に影響することが確認された。また、ピペロニルブトキシドは F₁ 世代の成体雄マウスの探査行動の活動性を高める作用を示した。

第 5 章では、第 4 章において行動発達毒性研究を実施し、低濃度のピペロニルブトキシドの投与が行動発達と探査行動に対して影響を及ぼしたことから、自発行動の測定を含む行動発達毒性研究を行ない、ピペロニルブトキシドの行動発達と探査行動に及ぼす影響の再現性と自発行動に及ぼす影響について検討した。ピペロニルブトキシドを、0 (対照群)、0.02、0.06、0.18% の濃度で、マウスに F₀ 世代の 5 週齢から F₁ 世代の 12 週齢まで 2 世代にわたって投与した。その結果、小動物運動解析装置による探査行動では F₀ 世代の雌成体マウスの立ち上がり時間が用量依存的に増加した。また、子マウスの行動発達では雄子マウスの断崖回避と雌子マウスの正向反射が投与群で用量依存的に抑制された。また、ANIMATE AT-420 による自発行動の測定では F₁ 世代の雌成体マウスの 0.18% 投与群で動作回数・移動時間・総移動距離及び方向回転数が増加した。以上の結果から、本研究で用いられた用量のピペロニルブトキシドは、雄子マウスの断崖回避と雌子マウスの正向反射を用量依存的に抑制することが確認された。また、新奇環境に対する探査行動では、F₀ 世代の雌成体マウスの活動性を高める作用を示した。F₁ 世代の自発行動については、雌成体マウスの 0.18% 投与群で活動性が促進された。

本研究において、高濃度のピペロニルブトキシドはマウスの生殖指標や行動

発達に抑制的な影響を及ぼし、その影響は再現性のあることが明らかになるとともに、低濃度投与は行動発達を用量依存的に抑制し、次世代の探索行動及び自発行動に促進的な影響を及ぼすことが明らかになった。本研究における最小毒性量 (LOAEL) は、行動発達と探索行動に対して 0.03% (約 50–55 mg/kg 相当) で、1 日許容摂取量 (ADI) を基にした無毒性量 (NOAEL) である 20 mg/kg の 2 倍強と非常に近い値になっている。しかし、実際に人が摂取すると推定される量 (体重 1kg 当たり 0.0354 μ g) は、ADI 値 (0–0.20 mg/kg) に較べると非常に低い量であることから、ピペロニルブトキシドを食品としての摂取した場合、人に対してほとんど影響を及ぼさないことが明らかとなった。しかしながら、ピペロニルブトキシドは四肢に対する催奇形性を持つこと、母体に毒性を示さない 0.1%以下の濃度を母体が摂取すると、授乳期間中の子マウスの行動発達が抑制されることから、母体が摂取したピペロニルブトキシドは、そのままの構造あるいはその代謝物として胎盤を通過して胎子に移行する可能性があり、乳汁を介してピペロニルブトキシドまたはその代謝物が子マウスに影響を及ぼす可能性も示唆された。従って、本研究の結果は、ピペロニルブトキシドを食品添加物として処理する作業、農薬として散布するなどの作業に従事する場合の次世代への危険性を示唆するものであり、これまでほとんど顧みられなかったピペロニルブトキシドの取扱に警鐘を鳴らすものである。

英文要旨

Study of influences of piperonyl butoxide on the next generations in mice.

Piperonyl butoxide is a pesticide synergist used to enhance the effect of pyrethrins and other insecticides. It is registered for use on various fruits, vegetables, forage, and grain crops, as well as on livestock and other agricultural premises. The maximum allowable use level on raw cereals is 0.024 g/kg (24 ppm) in Japan, while the acceptable daily intake (ADI) for humans has been set at 0–0.2 mg/kg of body weight by Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR).

In toxicological studies of piperonyl butoxide, Sarles and Vandegrift (1952) reported that cumulative toxic effects in the second and third generation of rats was absent. Furthermore, they found that it did not exhibit hepatocarcinogenic effects in rats. With regards to reproductive and developmental toxicity studies, Kennedy *et al.* (1977) found that this compound showed no teratogenicity in rats. Furthermore, Khera *et al.* (1979) reported that it did not elicit any teratogenic nor any adverse maternal effects. With regard to neurobehavioural toxicity Ater *et al.* (1984) reported that piperonyl butoxide showed neurotoxicity and anticonvulsant activity in male mice.

Piperonyl butoxide is commonly mixed with grain, staple food for many people, for preservation purposes. Therefore, its unintentional ingestion by the public through their food supply, may pose a potential health hazard. Recently, small quantities of piperonyl butoxide have been detected in baby food when the Tokyo Metropolitan investigated the pesticide residue in imported food. Also, the pyrethrins seed products added piperonyl butoxide as a pesticide synergist are found in the market. The present study was designed to evaluate the reproductive and neurobehavioural effects of

piperonyl butoxide exposure during the gestation and lactation in mice.

In Chapter 1, piperonyl butoxide was included in the diet at a concentration of 0% (control), 0.15%, 0.3% and 0.6% from 5 weeks of age of the F₀ generation to 9 weeks of age of the F₁ generation in mice. Next, selected reproductive and neurobehavioural parameters were measured. In an open-field test of the F₀ generation, ambulation and rearing of adult males were significantly decreased in a dose-dependant manner. During the lactation period, the average body weight of the F₁ offspring decreased significantly in the presence of piperonyl butoxide in a dose-dependant manner. Among the behavioural parameters, surface righting at postnatal day (PND) 7, negative geotaxis at PND 4 and olfactory orientation at PND 14 were significantly delayed in a dose-dependant manner. Furthermore, similar results were observed in swimming behaviour at PND 4 in which the swimming direction, head angle and limb movement were significantly delayed. In an open-field test of the F₁ generation, ambulation of male offspring was significantly decreased in a dose-dependant manner. Based on these results, we can conclude that dose-dependant piperonyl butoxide exposure produced few effects on the general conditions in parental mice, but produced several adverse effects on the reproductive and neurobehavioural parameters of F₁ generation mice.

In Chapter 2, piperonyl butoxide included in the diet at a concentration of 0% (control), 0.1%, 0.2%, 0.4% and 0.8% from 5 weeks of age of the F₀ generation to weaning of the F₂ generation in mice. Next, the selected reproductive and neurobehavioural parameters were measured. In each generation, litter size and litter weight were decreased in the 0.4% and/or 0.8% groups, and the average body weight of offspring during the lactation period was significantly decreased. The survival index

at PND 21 was decreased in the 0.8% group for each generation. One female offspring in the 0.4% group showed incomplete development of the fifth digit on all four limbs. Among the behavioural developmental parameters of the F₁ generation, surface righting and negative geotaxis at PND 7 and olfactory orientation at PND 14 were significantly delayed. Furthermore, in the swimming behaviour at PND 14, the head angle and limb movement were significantly delayed in the 0.8% group. In the F₂ generation, surface righting at PNDs 4 and 7, negative geotaxis and cliff avoidance at PND 7 and olfactory orientation at PND 14 were significantly delayed. All the observations were dose-dependant. Based on these results, it was observed that the dose of piperonyl butoxide produced several adverse effects on both reproductive and neurobehavioural parameters in mice, and these effects are reproducible compared to those of a previous study.

In Chapter 3, piperonyl butoxide was administered to pregnant mice by gavage at a dose of 0 (control), 1065, 1385, 1800 mg/kg of body weight on day 9 of gestation. The animals were euthanized on day 18 of gestation. Early and late foetal deaths were increased significantly in groups receiving higher doses of piperonyl butoxide. The average body weight of male and female foetuses was significantly decreased and the external malformation of oligodactyly in the forelimbs was significantly increased in the higher-dose groups in a dose-related manner. All the observations were dose-dependant. Based on these results, it was concluded that piperonyl butoxide exposure produced adverse effects on foetal growth and induced teratogenic effects on limbs in mice.

In Chapter 4, piperonyl butoxide was included in the diet at concentrations of 0% (control), 0.01%, 0.03%, and 0.09% from 5 weeks of age of the F₀ generation to 9

weeks of age of the F₁ generation in mice. Next, the selected reproductive and neurobehavioural parameters were measured. Piperonyl butoxide had no adverse effects on the litter size, weight or sex ratio at birth. Among the behavioural developmental parameters, surface righting at PND 7 was significantly delayed in male offspring of 0.03% and 0.09% groups, and the olfactory orientation at PND 14 was significantly delayed in the male offspring of 0.03% and 0.09% groups. Examination of exploratory behaviour at 9 weeks of age of the F₁ generation revealed that the total distance travelled by males significantly increased in the 0.03% and 0.09% groups. Furthermore, the average distance and speed were significantly increased in the 0.09% group. All the observations were dose-dependent. Based on the results, the experimental piperonyl butoxide doses used produced some adverse effects on reproductive and neurobehavioural parameters in mice.

In Chapter 5, piperonyl butoxide was included in the diet at concentrations of 0% (control), 0.02%, 0.06%, and 0.18 % from 5 weeks of age of the F₀ generation to 12 weeks of age of the F₁ generation in mice. Next, the selected reproductive and neurobehavioural parameters were measured. Among the exploratory behavioural parameters in the F₀ generation, vertical time of adult females was significantly increased whereas in among those in the F₁ generation, cliff avoidance of male offspring at PND 7 was significantly delayed in the 0.18% group. In female offspring, surface righting at PND 7 was significantly delayed in the 0.18% group. For spontaneous behaviour in the F₁ generation, females in the 0.18% group showed increased activity in movement, movement time, total distance and number of turns. According to these results, the experimental dose of piperonyl butoxide used in the present study produced adverse effects on cliff avoidance in male offspring and on surface righting in female offspring. For exploratory behavioural parameters in a novel environment, piperonyl

butoxide exposure accelerated the activity of adult female mice of the F₀ generation. Similarly, for spontaneous behaviour, it accelerated the activity of adult female mice of the F₁ generation in the 0.18% group.

In Conclusion, piperonyl butoxide caused reproducible adverse effects on the reproductive and behavioural development in mice offspring. These adverse behavioural effects were dose-dependant, causing accelerated exploratory and spontaneous behaviour in F₁ generation mice. The lowest observed adverse effect level (LOAEL) of the present study is 0.03% (approximately 50–55 mg/kg/day) for behavioural development and exploratory behaviour, and it is two times or more the no observed adverse effect level (NOAEL) of piperonyl butoxide (20 mg/kg/day) calculated from ADI (0–0.20 mg/kg/bw). However, the estimated daily intake of this compound is presumed to be substantially lower or approximately 0.0354 µg/kg/day in Japan. Therefore the levels of actual dietary intake of piperonyl butoxide are quiet unlikely to produce any significant degree of adverse toxic effects in humans.

However, piperonyl butoxide did exhibit teratogenic effects of limb development in mice and it also affected the behavioural development of offspring during the lactation period when the dam ingested 0.1% level or less as the dose lower than necessary, toxicity was not exhibited in the dams. It was therefore suggested that piperonyl butoxide or its metabolites were most likely transferred to the foetuses through the placenta and also through milk from lactating dams. Therefore, the results of this study indicate that piperonyl butoxide could be considered a health hazard when used as a food additive or as an agricultural pesticide, due to its teratogenic and adverse effects thus appropriate instructions for handling the compound should be provided.