

氏名(本籍)	田中豊人(東京都)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	乙第425号
学位授与年月日	平成23年2月28日
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	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
論文審査委員	(主査) 山本雅子 (副査) 有嶋和義 代 田真理子

論文内容の要旨

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1kgに対して0.024g(24ppm)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1kg当たり0.20mg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、本章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、本章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、本章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、次世代の探査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、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。

論文審査の結果の要旨

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1kgに対して0.024g (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1kg当たり0.20mg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。またFAO/WHOにおける毒性評価も1972年以降行われていないことから、本研究は慢性毒性を含む毒性プロファイルを作成する目的で計画されている。そのため、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ている。

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、本章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を確認している。

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、本章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、その影響の再現性を確認している。

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、本章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を確認している。

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している。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すことも明らかにしている。

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している。また、ピペロニルブトキシドは、F₀世代の雌成体マウスの新奇環境に対する探査行動の活動性を高める作用を示し、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ることを明らかにしている。

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、次世代の探査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（LOEL）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、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。

本研究の結果は、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にするとともに、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る。本研究で得られた知見は、獣医学上意義ある業績として評価できることから、博士（獣医学）の学位を授与するに相応しい研究と判定した。