有機リン殺虫剤 Cyanofenphos の反復前投与法による遅発性神経毒性の増強作用

Intensifying Effect of Repeated Pretreatment for Delayed Neurotoxicity from Organophosphorus Insecticide Cyanofenphos in Hens

福島県立医科大学公衆衛生学教室

山内 徹・紺野 信弘

山口 靖明・福島 匡昭

Toru Yamauchi, Nobuhiro Konno, Yasuaki Yamaguchi
and Masaaki Fukushima

Department of Public Health, Fukushima Medical College, Fukushima

Cyanofenphos, O-ethyl O-4 cyanophenyl phenylphosphonothioate (CYP), is one of the delayed neurotoxic organophosphorus insecticides. The effect of repeated pretreatment by small dosages of CYP on delayed neurotoxicity (DNT) from subsequent large doses (100 mg/kg-1600 mg/kg) of CYP itself as a challenge dose was investigated in hens. Most of the hens given preliminarily 10 mg/kg/day of CYP (1.9% LD 50) for 8 days survived the acute toxicity of a subsequent challenge dose of CYP, while many hens given only the challenge dose died of acute intoxication. The hens pretreated for 8 days showed significantly intensified DNT, compared with the other 2 groups of hens, the non-pretreated group and the atropinized group, after each challenge dose unless the amounts of CYP-challenge doses were more than 800 mg/kg. The pretreatment by small doses of CYP intensified the DNT from subsequent challenge doses of CYP more effectively in the case where small doses of CYP were pretreated repeatedly for several days than in the case where the same amount of the pretreatment in total was given at once. The intensifying effect of DNT could not be observed clearly by repeated pretreatment of leptophos.

These results suggest that repeated pretreatment by small amounts of delayed neurotoxic organophosphorus insecticides make it possible to subsequently administer a large amount of the same insecticide to hens as a challenge dose without atropinization, and also make it easy to observe DNT of organophosphorus insecticides which show relatively strong inhibition of ChE activity. The results also give warning that persons who are exposed repeatedly to low levels of CYP may be affected by more severe neuropathy than usual if they accidentally receive a high level of CYP exposure.

Key words: Delayed neurotoxicity, Organophosphate, Cyanofenphos, Pretreatment method, Intensifying effect

遅発性神経毒性, 有機リン殺虫剤, Cyanofenphos, 前投与法, 毒性増強効果

緒 言

いくつかの有機リン殺虫剤は、暴露8～14日後から発症する遅発性神経毒性を示す^{1,2)}。それは、下肢の運動失調からはじまり、次第に上半身へ及ぶとともに症状も重篤な麻痺にいたり、重症例では呼吸困難で死亡するもの

である。昭和52年にわが国での農業登録が失効した leptophos (商品名: Phosvel[®]) もその一例である³⁾。さらに、現在も国内で販売され広く使用されている cyanofenphos (同, Surecide[®]) にも、遅発性神経毒性が近年証明された⁴⁻⁶⁾。このほか、trichlorphos (Diptel[®]) によるヒトの遅発性神経毒性による障害例

が報告されたが^{9,10)}, この殺虫剤については動物実験による証明が困難であった¹¹⁾。このような事実は、有機リン殺虫剤の安全性評価に際しては、急性毒性の評価だけでは不十分であることを示唆しているが、わが国ではこのことに関する十分な検討がなされていない。

有機リン殺虫剤のひとつ cyanofenphos (以下、CYP と略称) については、これまで経口投与 (1 回投与^{5,6)}, 少量連続⁹⁾ または間欠投与⁷⁾ あるいは経皮投与⁸⁾ により、ニワトリとヒツジ⁴⁾ に対する遅発性神経毒性が報告されている。ところで、CYP はコリンエステラーゼ (ChE) の活性阻害による急性毒性が比較的強く、ニワトリに対する経口投与による LD₅₀ が leptophos の 4700 mg/kg に対し²⁾, CYP は 540 mg/kg である⁵⁾。このため、遅発性神経毒性の発症に有効な量の CYP を 1 回に経口投与することが困難であり、しばしば硫酸アトロピンによる救命を必要とする⁵⁾。

近年、著者らは、CYP の遅発性神経毒性に関する一連の実験を進めている過程で、少量の CYP を反復投与すると、ニワトリの急性毒性症状が徐々に緩和され、かつ多くのニワトリがひきつづく相当大量の CYP 投与にも耐えて急性中毒期を生き延びる現象を認めた¹²⁾。

今回の報告は、このような「急性毒性に対する反復前投与による保護効果」ともいえるべき現象を利用し、硫酸アトロピンによる救命に依らずに CYP を大量投与し、その遅発性神経毒性に関して得られた興味ある知見について述べるものである。

実験材料と実験方法

1. 試薬

cyanofenphos, (O-ethyl O-4 cyanophenyl phenylphosphonothioate) は、三共 CYP 25% 乳剤を必要な濃度にサラダ油で希釈したものを用いた。

leptophos, O-(4-bromo-2, 5-dichlorophenyl) O-methyl phenylphosphonothioate は、市販の乳剤から既報³⁾の方法で leptophos 粗結晶 (純度 96% 以上であることを gas chromatography で確認) を析出させ、これをサラダ油に溶解して用いた。

それぞれの有機リン殺虫剤の投与は、注射筒の先にカテーテルチューブを接続し、これを実験動物の食道に挿入して強制的に投与する方法で行った。

2. 投与方法

実験動物には 23 月齢の採卵用雌成鶏 (*Gallus gallus domestics* 系雑種, 平均体重 1.59 kg, 1.30 kg~2.00 kg) を用いた。有機リン殺虫剤の投与に先立って、ニワトリ

を搬入後 1 週間飼育観察し、動きや歩行に異常のないことを確認して実験に供した。有機リン殺虫剤の投与期間中はニワトリを同じ容積の個別ケージで飼育し、攻撃投与後の急性中毒から回復した後に、平場の屋内運動場に移し、その動きや歩行を毎日観察した。また、実験期間中、市販の配合飼料と水道水を自由に摂取させた。また、週に 2 度定期的に体重を測定した。

有機リン殺虫剤の投与内容は次のとおりである (Table 1)。

(1) CYP 少量連続投与後の攻撃投与実験

120羽のニワトリを 1 群 30羽の 4 群に分け、それぞれ 100, 200, 400 および 800 mg/kg CYP の攻撃投与群とした。以下、少量の前処理的投与を前投与、その後の大量投与を攻撃投与という。各攻撃投与群の 30羽のニワトリをさらに 10羽 3 群に分け、それぞれ、CYP 前投与を 1 日につき 10 mg/kg 経口的に連続 8 日間行い、その 24 時間後に CYP の各攻撃投与を行う群、CYP を前投与せずに CYP の各攻撃投与を行う群、および CYP 前投与せず CYP の各攻撃投与の前後に救命に必要な量の硫酸アトロピンの経口投与を行う群とした (Table 1-a)。

また、20羽のニワトリを、10羽 1 群と 5羽 2 群の計 3 群に分け、それぞれ CYP 1200, 1400 および 1600 mg/kg 攻撃投与群とした。1200 mg/kg 攻撃投与群 10羽のうち、5羽には 10 mg/kg/day の CYP を 8 日間前投与した後に、残りの 5羽には前投与なしにそれぞれ攻撃投与を行った。1400 と 1600 mg/kg 攻撃投与群の各 5羽には 8 日間の前投与後各攻撃投与を行った (Table 1-b)。

(2) CYP 少量 1 回前投与後の攻撃投与実験

40羽のニワトリを 20羽 2 群に分け、それぞれ 100 および 200 mg/kg CYP 攻撃投与群とした。各群とも前投与を CYP 80 mg/kg の 1 回投与とし、各群 20羽中 10羽にはその 24 時間後に、残りにはその 8 日後に CYP の各攻撃投与を行った (Table 1-c)。

(3) leptophos 少量反復投与後の leptophos 攻撃投与実験

30羽のニワトリを 10羽 3 群に分け、はじめの 10羽には leptophos 3 mg/kg/day を、次の 10羽には leptophos 5 mg/kg/day をそれぞれ 10日間前投与し、最終前投与 24 時間後に leptophos 150 mg/kg を攻撃投与した。残りの 10羽には前投与しないで、leptophos 150 mg/kg を攻撃投与した (Table 1-d)。

3. 神経毒性の評価と統計検定の方法

有機リン殺虫剤による遅発性神経毒性の評価は、前報¹³⁾の判定基準に従って神経障害の程度を判定し、評価

Table 1 Profiles of the experiment.

a. Experiment of challenge doses after 8 days-pretreatment of cyanofenphos (CYP).

CYP challenge dose (mg/kg)	Pretreatment			Total number of hens
	CYP 10 mg/kg/day for 8 days	Non-pretreatment	Treated by atropine sulfate	
100	10 hens	10 hens	10 hens	30 hens
200	10	10	10	30
400	10	10	10	30
800	10	10	10	30
Total				120

b. Experiment of high concentrated CYP-challenge doses after 8 days-pretreatment of CYP.

CYP challenge dose (mg/kg)	Pretreatment		Total number of hens
	CYP 10 mg/kg/day for 8 days	Non-pretreatment	
1200	5 hens	5 hens	10 hens
1400	5	—	5
1600	5	—	5
Total			20

c. Experiment of challenge doses after a single pretreatment of 80 mg/kg CYP at various time intervals.

CYP challenge dose (mg/kg)	Time intervals between a single dosing of 80 mg/kg CYP and a challenge dosing		Total number of hens
	24 hr	8 days	
100	10 hens	10 hens	20 hens
200	10	10	20
Total			40

d. Experiment of challenge doses of leptophos after 10 days-pretreatment of leptophos.

Leptophos challenge dose (mg/kg)	Pretreatment of leptophos			Total number of hens
	3 mg/kg/day for 10 days	5 mg/kg/day for 10 days	Non-pretreatment	
150	10 hens	10 hens	10 hens	30 hens

した (Table 3 脚注参照)。発生率の比較は χ^2 -test で、体重変化は Student's *t*-test により、有意差検定を行った。

実験結果

1. CYP 前投与期間中の急性毒性

8日間の CYP 10 mg/kg/day の前投与期間中、ニワトリははじめの3～4日間は食欲と体重が徐々に減少し、

動きも少し不活発になったが、その後は食欲も回復し、動きも活発になった。しかし、体重は前投与を受けた55羽中33羽 (60%) が攻撃投与の時までに、前投与開始時の体重に回復しなかった。また、1600 mg/kg 攻撃投与群の1羽が、攻撃投与前に急死した。

2. CYP 攻撃投与後の急性毒性

CYP 前投与群と CYP 前投与を行わずに攻撃投与した群 (以下、無処理群という) の CYP 攻撃投与後7日以

Table 2 Acute toxicity from various challenge doses of cyanofenphos in pretreated group and in non-pretreated group.

CYP challenge dose (mg/kg)	Number of acute deaths within 7 days after each challenge dosing;		P
	Pretreated gr. ^{a)}	Non-pretreated gr. ^{b)}	
100	0 / 10 ^{c)}	0 / 10 ^{c)}	N. S. ^{d)}
200	0 / 10	0 / 10	N. S.
400	0 / 10	3 / 10 (2.5-6hr) ^{e)}	<0.05
800	0 / 10	5 / 10 (6hr-5days)	<0.01
1200	3 / 5 (9-48hr)	5 / 5 (6hr-3days)	N. S.
1400	4 / 5 (9hr-4days)	—	—
1600	5 ^{f)} / 5 (9-48hr)	—	—

a) : These groups were pretreated by 10 mg/kg/day of CYP for 8 days before each challenge dosing. b) : These groups were not given any pretreatment. c) : Number of dead hens / number of tested hens. d) : The incidence rates were evaluated by χ^2 -test. N. S. means not significant. e) : Time intervals from challenge treatment to death.

f) : One of them died without receiving a challenge dose.

内の急性毒性による死亡の状況を Table 2 に示した。

CYP 前投与群では、100 mg/kg から 800 mg/kg までの攻撃投与では急性中毒死はなかったが、高濃度の CYP 攻撃投与では、1200 mg/kg 投与で 5 羽中 3 羽、1400 mg/kg で 5 羽中 4 羽、さらに 1600 mg/kg では 4 羽すべてが、それぞれ急性中毒により死亡した。これに対して、無処理群では 400 mg/kg 以上の攻撃投与で急性中毒死亡が認められた。すなわち、CYP 400 mg/kg 投与で 10 羽中 3 羽、800 mg/kg で 10 羽中 5 羽、さらに 1200 mg/kg で 5 羽すべてが、それぞれ急性中毒により死亡した。このため無処理群の 1400 あるいは 1600 mg/kg の攻撃投与実験は行わなかった。

攻撃投与から最初の死亡が出るまでの時間は、無処理群では 2.5 hr (400 mg/kg 攻撃投与) ~ 6 hr (800, 1200 mg/kg 同) だったのに対し、前投与群は、投与量が多いにもかかわらずいずれの攻撃投与でも 9 hr と長い傾向を示したが、有意の差は認められなかった (Table 2)。

3. CYP 攻撃投与後の遅発性神経毒性

100 mg/kg から 800 mg/kg の CYP 各攻撃投与後の遅発性神経毒性の出現状況を (Table 3) に示した。今回の実験では、遅発性神経毒性による神経症状が不可逆的に進行し、症状が固定してある段階以上に進行しない例はみられたが、軽症へ回復した例はなかったため、麻痺死例を除いては、各攻撃投与後 21 日間の観察期間の最終日における神経障害の程度により遅発性神経毒性効果を判定した。

100 mg/kg CYP 攻撃投与の場合、無処理群と、攻撃投与の前後に救命のため硫酸アトロピンを投与した群

(以下、アトロピン投与群という)が、それぞれ 10 羽中 1 羽に軽度運動失調が認められただけであるのに対し、CYP 前投与群では 10 羽中 7 羽が発症し、このうち 3 羽は麻痺により死亡した。

200 mg/kg CYP 攻撃投与の場合は、無処理群が 10 羽中 2 羽に、アトロピン投与群では 10 羽中 6 羽にそれぞれ軽度運動失調がみられた。一方、CYP 前投与群は 10 羽すべてが発症し、このうち 3 羽は麻痺死し、5 羽は重症麻痺に進行した。400 mg/kg CYP 攻撃投与の場合、無処理群では、急性中毒を生き残った 7 羽のうち 3 羽が、アトロピン投与群の 10 羽中 6 羽が、それぞれ軽度運動失調を示した。これに対して CYP 前投与群では 10 羽すべてが発症し、このうち 2 羽が死亡、5 羽は重症麻痺に進行した。800 mg/kg CYP 攻撃投与を行った場合は、各群ともすべてのニワトリが発症した。すなわち、無処理群では急性中毒を生き残った 5 羽すべてが発症し、そのうち 1 羽は麻痺死した。アトロピン投与群と CYP 前投与群もすべてが発症し、それぞれ 4 羽が麻痺死した。しかし、21 日間生存したニワトリの神経症状は、全般に CYP 前投与群の方がアトロピン投与群より重篤な傾向を示した。

一方、1200 mg/kg 以上の高濃度 CYP 攻撃投与を行った場合、CYP 前投与群に 1200 mg/kg CYP を攻撃投与した 5 羽中 2 羽と 1400 mg/kg CYP を攻撃投与した 5 羽中 1 羽が急性中毒を生き残ったが、この 3 羽はすべて遅発性神経障害を発症し、そのうち 1 羽は麻痺死した (Table 4)。

4. CYP 1 回投与後の攻撃投与による遅発性神経毒性
CYP 10 mg/kg/day を 8 日間連続前投与を行った場

Table 3 Comparison of delayed neurotoxicity after various challenge doses by cyanofenphos (CYP) in three groups of hens, pretreated by CYP, non-pretreated group and atropinized group.

Challenge dose of CYP (mg/kg)	Group	No. of tested hens	No. surviving acute death	No. of hens affected by neuropathy as below; ^{f)}				Death	Total no. of affected hens	p ^{e)}
				Ataxia (+)	Ataxia (++)	Paralysis (+++)	Paralysis (++++)			
100	Pretreat. ^{b)}	10	10	1	1	2	0	3	7	—
	Non-pre. ^{c)}	10	10	1	0	0	0	0	1	0.01
	Atropin. ^{d)}	10	10	1	0	0	0	0	1	0.01
200	Pretreat.	10	10	1	1	0	5	3	10	—
	Non-pre.	10	10	2	0	0	0	0	2	0.01
	Atropin.	10	10	4	1	1	0	0	6	0.05
400	Pretreat.	10	10	1	1	1	5	2	10	—
	Non-pre.	10	7	3	0	0	0	0	3	0.01
	Atropin.	10	10	5	0	1	0	0	6	0.05
800	Pretreat.	10	10	0	2	1	3	4	10	—
	Non-pre.	10	5	1	2	1	0	1	5	N. S.
	Atropin.	10	10	1	4	0	1	4	10	N. S.

a) : In the pretreated groups, each challenge dose of CYP was given 24 hrs after the last pretreatment. b) : Hens were pretreated by 10 mg/kg/day of CYP for 8 days in this group. c) : Hens were not given any pretreatment prior to their challenge doses in this group. d) : Hens were given the necessary amount of atropine sulfate in this group before/ after their challenge doses. e) : Comparisons were made between the pretreated group and the non-pretreated group, the pretreated group and the atropinized group and evaluated by χ^2 -test. f) : Neurotoxic signs: (+) Slight ataxia—subjects stagger often and tire easily. (++) Severe ataxia—gait is always abnormal i. e. waddling. (+++) Slight paralysis—wing flapping is required for movement. (++++ Severe paralysis—subjects are unable to maintain their posture, to stand or to move at all.

合の遅発性神経毒性に対する影響を検討するために、総前投与量 80 mg/kg の CYP を 1 度に前投与し、その 24 時間後および 8 日後に CYP 100 mg/kg あるいは 200 mg/kg を攻撃投与した (Table 5)。CYP 80 mg/kg 1 回前投与し、24 時間後に CYP 100 mg/kg 攻撃投与したニワトリでは 10 羽中 2 羽に軽度運動失調がみられ、前投与後 8 日目に 100 mg/kg CYP 攻撃投与したニワトリ 10 羽中 1 羽に軽度運動失調が認められたに過ぎなかった。一方、CYP 80 mg/kg 前投与し、24 時間後に CYP 200 mg/kg を攻撃投与した 10 羽中 8 羽が軽度ないしは重症の運

動失調を示し、また、前投与後 8 日目に CYP 200 mg/kg 攻撃投与したニワトリでは、攻撃投与直後事故死した 1 羽を除く 9 羽のうち、8 羽に遅発性神経障害が発症し、このうち 2 羽は麻痺死した。

5. CYP 攻撃投与後のニワトリ体重の変化

各 CYP 攻撃投与後の各群の体重変化を Fig.1 (a~d) に示した。

CYP 100 mg/kg 攻撃投与では、CYP 前投与群が前投与期間に減少したままの低い水準で経過したが、実験最終日の体重は攻撃投与時より有意に減少した ($p <$

Table 4 Development of delayed neurotoxicity in surviving hens after high concentrated CYP challenge dosing.

CYP challenge dose (mg/kg)	No. of tested hens	No. surviving acute toxicity	Hen no.	Number of days until various stages of delayed neuropathy;				Death
				Ataxia (+)	Ataxia (++)	Paralysis (+++)	Paralysis (++++)	
1200	5	2	903	9	13	16	19	—
			904	—	11	15	—	17
1400	5	1	996	14	19	22	—	—

Table 5 Delayed neurotoxicity from a challenge dose of cyanofenphos (CYP) in hens after a single pretreatment of CYP 80 mg/kg at various time intervals.

CYP challenge dose (mg/kg)	Time interval ^{a)}	No. of tested hens	No. of acute deaths	No. of hens affected by neuropathy as follows;					Total no. of affected hens
				Ataxia		Paralysis		Death	
				(+)	(++)	(+++)	(++++)		
100	24 hr	10	0	2	0	0	0	0	2
100	8 days	10	0	1	0	0	0	0	1
200	24 hr	10	0	6	2	0	0	0	8
200	8 days	10	1 ^{b)}	2	0	2	2	2	8

a) : Time intervals from a single pretreatment to a challenge dosing of CYP. b) : This hen died due to accident on the day following its challenge dosing.

0.01)。無処理群とアトロピン投与群は有意の体重減少は示さなかった (Fig.1-a)。CYP 200 mg/kg および 400 mg/kg 攻撃投与では、無処理群はいずれの場合も有意の体重減少はみられなかったが、CYP 前投与群とアトロピン投与群は、いずれの攻撃投与でも実験最終日の体重は

攻撃投与時より有意の減少を示し ($p < 0.001$)、特に CYP 前投与群は著しい減少を示した (Fig.1-b,c)。一方、CYP 800 mg/kg 攻撃投与では、CYP 前投与群、無処理群およびアトロピン投与群のいずれも、神経症状の進行とともに体重が減少し、最終日の体重は攻撃投与時より有意の

Fig. 1 Changes in body weight of hens. The subjects are given a challenge dose of CYP 100 mg/kg(a), 200 mg/kg(b), 400 mg/kg(c) and 800 mg/kg(d). ▲—▲ Pretreated group: the birds are pretreated by CYP 10 mg/kg/day for 8 days prior to each challenge dose. ●—● Non-pretreated group: the birds are not given any pretreatment. ■—■ Atropinized group: the birds are given enough atropine sulfate to rescue before/after each challenge dose. †: Fatalities due to delayed neurotoxicity. C. D.: Administration of challenge dose. P. P.: Pretreatment period.

Fig. 2 Changes in body weight of hens. The birds are given a challenge dose of CYP 1200 mg/kg (Δ — Δ ; $n=5$) or 1400 mg/kg ($\bullet$ — $\bullet$; $n=5$), after being pretreated by CYP 10 mg/kg/day for 8 days. †: Fatalities. C.D.: Administration of challenge dose. P. P.: Pretreatment period.

低値を示した (CYP 前投与群とアトロピン投与群 $p < 0.001$, 無処理群 $p < 0.01$)。

また, 800 mg/kg 以下の CYP を攻撃投与した120羽について, 最終日の神経症状の各重症度区分別に, 攻撃投与時と最終日 (麻痺死例は死亡時) の平均体重を比較した。最終日の平均体重は, 軽度運動失調例 (+, $n=20$) では攻撃投与時の 83%, 重症運動失調例 (++, $n=13$) で 73%, 軽度麻痺例 (+++, $n=7$) で 69%, 重症麻痺例 (++++, $n=14$) で 66%, さらに麻痺死例 ($n=17$) では 61% にそれぞれ減少しており, いずれの重症度区分でも有意の減少であった ($p < 0.001$)。

一方, CYP 前投与後に高濃度の CYP (1200 mg/kg, 1400 mg/kg) 攻撃投与を行ったニワトリの体重変化を Fig. 2 に示した。攻撃投与後の急性中毒死亡を免れた 3 羽 (1200 mg/kg の 2 羽と 1400 mg/kg の 1 羽) は, 重篤な神経症状を呈し, 体重も著しく減少した。

6. leptophos の少量連続投与後の leptophos 攻撃投与による遅発性神経毒性

CYP 少量連続投与の, CYP 攻撃投与による遅発性神

経毒性に及ぼす影響と比較するために, もう 1 つの遅発性神経毒性有機リン殺虫剤 leptophos について同様の実験を行い, その結果を Table 6 に示した。leptophos 3 mg/kg/day を 10 日間前投与した群は, 前投与しなかった群と同じく 10 羽中 1 羽が軽度運動失調を示しただけであったが, 5 mg/kg/day 10 日間前投与した群では, 10 羽中 1 羽が軽度運動失調を示し, 2 羽が重症麻痺まで進行した。神経障害の発症率に有意の差はなかった。

考 察

有機リン殺虫剤 cyanofenphos (CYP) のニワトリへの経口投与による遅発性神経毒性と投与量について, Abou-Donia ら⁵⁾ は, 10 または 50 mg/kg という少量の CYP 原体の経口 1 回投与で, また El-Sebae ら⁶⁾ も 8 ~ 40 mg/kg CYP 経口 1 回投与で運動失調を認めたという。しかし, 著者らが CYP 原体を用いた実験では, 10, 50 あるいは 100 mg/kg 経口 1 回投与では神経障害の発生は認められなかった⁷⁾。この差異の理由は明らかでないが, El-Sebae ら⁶⁾ は, ニワトリがはばたくときふらつくような微妙な動作を運動失調と判定しているが, 著者らが有機リン殺虫剤の遅発性神経毒性に関する一連の研究で一貫して用いている判定方法とはかなり異なっており, これがこのような差を生じる要因の 1 つかもしれない。著者らの判定基準 (Table 3) で明らかに運動失調と判定できるニワトリが出現するのは, 経口 1 回投与では少なくとも 100 mg/kg 以上と考えられ, 今回の実験でも無処理群に 100 または 200 mg/kg 攻撃投与した場合, それぞれ 10 羽中 1 ないし 2 羽に軽度運動失調を認めたただけであった。また, Abou-Donia ら⁵⁾ は, 100 mg/kg 以上の CYP 投与に際し急性中毒死を防ぐため硫酸アトロピンの投与が必要であると述べているが, 今回の実験で急性中毒死は, 無処理群に 400 mg/kg 以上攻撃投与した場合に発生した。いずれにしても, アトロピンなしで急性中毒死を免れ得る投与量 (400 mg/kg 未満) の CYP によって発現する遅発性神経毒性は, 発生率も低

Table 6 Comparison of delayed neurotoxicity after a challenge dose by leptophos in three groups of hens; pretreated by leptophos 3 and 5 mg/kg/day for 10 days and non-pretreated group.

Pretreatment by leptophos (mg/kg/day ×days)	Challenge dose of leptophos (mg/kg)	No. of tested hens	No. of hens affected by neuropathy as follows;					Total no. of affected hens
			Ataxia		Paralysis		Death	
			(+)	(++)	(+++)	(++++)		
3 ×10 days	150	10 hens	1	0	0	0	0	1
5 ×10	150	10	1	0	0	2	0	3
Non-pretreated	150	10	1	0	0	0	0	1

く、神経障害も一般に軽症であるといえる。

CYP の反復投与による遅発性神経毒性について、El-Sebae ら⁶⁾は 1.5 または 3.0 mg/hen/day を連日経口投与したニワトリに 16 日目から運動失調を認め、投与を継続すると、それらの一部は麻痺に進行したと報告しているが、この総投与量と等量を 1 度に投与した場合との比較はしていない。著者らは、leptophos について観察した^{3,14)}と同様に、CYP についても 1 日おき 4 回投与法で総量 200 mg/kg を分割投与すると等量を 1 度に投与した場合より神経毒性が増強されることを認めている⁷⁾。

一方、著者らは、少量の CYP を反復投与していると、投与直後のニワトリの急性中毒症状が徐々に軽減され、また、このような少量反復投与を行うことによりその直後に行う大量の CYP 攻撃投与による重篤な急性中毒が著しく減弱することを報告したが¹²⁾、この現象は今回の実験でも再現された (Table 2)。

今回の一連の実験は、CYP の少量反復投与による 2 つの効果、すなわち、急性毒性減弱効果と遅発性神経毒性増強効果を組み合わせることにより、CYP のように急性毒性の強い有機リン殺虫剤の遅発性神経毒性実験が、アトロピンによる救命操作なしで容易に行えるのではないかと考えて行ったものである。Table 3 に示したように、CYP 10 mg/kg/day を 8 日間投与した前投与群では、400 mg/kg 以下の CYP 攻撃投与による遅発性神経障害の発生率が有意に高くなっており、かつ、神経症状もより重症化していた。ところで、CYP 前投与群では、無処理群やアトロピン投与群より、いずれの攻撃投与実験でも CYP 総投与量が 80 mg/kg だけ多いことになる。この過剰分を考慮してたとえば、CYP 前投与群に 100 mg/kg を攻撃投与した場合 (総投与量 180 mg/kg) と、無処理群やアトロピン投与群に 200 または 400 mg/kg の CYP を攻撃投与した場合の遅発性神経毒性の発生率を比較すると、アトロピン投与群の発生率との間には有意差がなかったが、無処理群の 200, 400 mg/kg 攻撃投与による発生率よりは有意に高率であった ($p < 0.05$ および < 0.01)。CYP 前投与群の 200 mg/kg 攻撃投与による発生率も、無処理群とアトロピン投与群の 400 mg/kg 攻撃投与による発生率より有意に高かった (それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.05$)。すなわち、比較した両群間に観察された遅発性神経毒性の差は、両群に投与した CYP 総投与量の差より大きいものであった。しかし、攻撃投与量が 800 mg/kg 以上になると、無処理群の急性中毒死が多くなり、遅発性神経障害の比較が困難になる。そこで、アトロピン投与によりニワトリを急性中毒死から救命した場

合の神経毒性を観察するために、各攻撃投与量についてアトロピン投与群を設定した。その結果、アトロピン投与群に 800 mg/kg の攻撃投与をした場合 10 羽すべてが発症した。すなわち、800 mg/kg 以上の高濃度投与では、CYP 前投与群、無処理群およびアトロピン投与群のいずれも、急性中毒を生き残ったすべてのニワトリが遅発性神経障害を発症した。この結果から、1200 mg/kg 以上の攻撃投与に対して、硫酸アトロピンにより救命したニワトリはすべて神経障害を発症することが推測されたので、アトロピン投与群に対する 1200, 1400 および 1600 mg/kg 攻撃投与実験は行わなかった。

ところで、CYP 前投与総量 (80 mg/kg) を少量に分割投与した場合と 1 回に投与した場合のひきつづく攻撃投与による遅発性神経障害の発生率を比較検討したところ (Table 5)、CYP 80 mg/kg 1 回前投与後に 100 mg/kg を攻撃投与すると、前投与と攻撃投与の時間的間隔が 24 時間の場合と 8 日間の場合で、遅発性神経毒性の発現に有意差なく、その発生率は 200 mg/kg 攻撃投与した無処理群の発生率 (Table 3) に近かった。また、80 mg/kg 1 回前投与後 200 mg/kg 攻撃投与の場合、24 時間後と 8 日後の場合とで発生率は同じであったが、後者がより重症化した。これを 10 mg/kg/day 8 日間前投与後 200 mg/kg 攻撃投与した場合 (Table 3) と比較すると、80 mg/kg 1 回前投与 8 日後 200 mg/kg 攻撃投与した場合と神経障害の発生状況が同じであったが、8 日間反復前投与後の攻撃投与の場合、80 mg/kg 1 回前投与 24 時間後攻撃投与の場合より重症が多かった ($p < 0.01$)。以上の結果は、前投与による神経毒性増強効果は一定量以上の CYP が攻撃投与の一定期間前から生体に取り込まれ、標的臓器に作用した場合に発現することを示唆している。

CYP 以外の有機リン殺虫剤の例として同様の実験を leptophos について行った結果を Table 6 に示した。leptophos 3 mg/kg/day を 10 日間前投与した群と前投与しなかった群で、leptophos 150 mg/kg 攻撃投与後の遅発性神経毒性の発生率に差はなかった。前投与量を 5 mg/kg/day として 10 日間投与後 leptophos 150 mg/kg 攻撃投与した場合は、10 羽中 3 羽が発症し、このうち 2 羽は重症麻痺に進行した。これら 3 群間の発生率に有意の差はなかった。この実験で leptophos の少量反復前投与による遅発性神経毒性の増強効果は明らかにされなかったが、これは、leptophos 前投与量が少なすぎたか前投与期間が不十分だったためかもしれない。因みに、CYP の 1 回前投与量 10 mg/kg はその経口 LD 50 の約 1.9% であったのに対し、leptophos の場合 3.5 mg/kg は

LD 50 の約 0.1% であり、この点についてさらに検討する必要がある。また、EPN など他の遅発性神経毒性有機リン殺虫剤についても反復前投与による毒性増強効果を検討する必要がある。

これまで、有機リン殺虫剤を長期間少量連続投与することにより、その蓄積作用により遅発性神経毒性を認めた報告は多いが、同種の殺虫剤を短期間前処理的に少量反復投与することにより、その殺虫剤の攻撃投与後の遅発性神経毒性が著しく増強されたという報告は見られない。今回の実験成績は、以下の 2 つの重要な示唆を与えている。その 1 はコリンエステラーゼ活性阻害による急性毒性が比較的強い有機リン殺虫剤では経口 1 回投与による遅発性神経毒性試験は一般に困難であり、そのような場合に反復前投与法は有効な手段となり得ること、その 2 は、急性中毒症状が自覚されない程度の少量の有機リン殺虫剤に反復暴露されている者が、事後的に 1 度に多量の暴露を受けた場合に遅発性神経障害が重症化する危険性があること、である。

結 論

コリンエステラーゼ活性阻害による急性毒性が比較的強い有機リン殺虫剤 cyanofenphos (CYP) について、救命のための硫酸アトロピン投与の遅発性神経毒性に対する影響を除くため、ニワトリに CYP を少量反復前投与した後に相当高濃度の同じ CYP を攻撃投与する実験を行い、次の結論を得た。

1. 大量の CYP 攻撃投与後の急性中毒に対する CYP 少量反復前投与による著明な保護効果が再確認された。

2. CYP 10 mg/kg/day を 8 日間前投与したニワトリに、無処理のニワトリやアトロピンを投与したニワトリに比較して、各種濃度の CYP 攻撃投与後の遅発性神経毒性が有意に高率に認められた。

3. CYP 攻撃投与量が 800 mg/kg 以上の高濃度になると、CYP 前投与による神経毒性増強効果は認められなくなった。

4. 前投与総量と等量の CYP を攻撃投与の 8 日前に 1 回前投与した場合も、攻撃投与後の神経毒性の増強がみられたが、その増強効果は少量反復投与した場合より弱いものであった。

5. 遅発性神経毒性有機リン殺虫剤 leptophos については、少量反復投与により、攻撃投与の後の遅発性神経障害が重症化する傾向がみられたが、神経障害の発生率に前投与をしない群と有意の差はなかった。

6. 同一の有機リン殺虫剤の少量反復前投与により、

アトロピンの救命効果によらずに大量攻撃投与が可能となり、この方法は、有機リン殺虫剤の遅発性神経毒性試験に有効であることが示唆された。

稿を終るに臨み、御協力いただいた福島県立医科大学公衆衛生学教室の金田光男氏、佐々木一男氏に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨は、第 53 回日本衛生学会総会（昭和 58 年 4 月、大阪府）および III-International Congress on Toxicology (Aug.-Sept., 1983, San Diego, U. S. A.) において発表した。

文 献

- 1) Abou-Donia, M. B., Othman, M. A., Tantawy, G., Zaki Khalil, A. and Shawer, M. F.: Neurotoxic effect of leptophos, *Experientia*, **30**, 63-64 (1974).
- 2) 木根渕英雄, 紺野信弘, 山内 徹: 有機燐農薬「ホスベル」の遅発性神経毒性 (予報), *日本公衛誌*, **23**, 509-514 (1976).
- 3) 木根渕英雄, 紺野信弘: 限界量分割投与によるホスベルの神経毒性の増強と減弱, *日本公衛誌*, **25**, 393-397 (1978).
- 4) El-Sebae, A. H., Soliman, S. A. and Ahmed, N. S.: Delayed Neuropathy in sheep by the phosphonothioate insecticide cyanofenphos, *J. Environ. Sci. Health*, **B 14**, 247-263 (1979).
- 5) Abou-Donia, M. B. and Graham, D. G.: Delayed neurotoxicity of a single oral dose of O-ethyl-O-4-cyanophenyl phenylphosphonothioate in the hen, *Neurotoxicology*, **1**, 449-466 (1979).
- 6) El-Sebae, A. H., Othman, M. A. S., Soheir M. Hamman, Tantawy, G. and Soliman, S. A.: Delayed neurotoxicity of cyanofenphos in chickens, *J. Environ. Sci. Health*, **B 15**, 267-285 (1980).
- 7) 木根渕英雄, 紺野信弘, 山内 徹: 有機リン殺虫剤 cyanofenphos の遅発性神経毒性, *日本公衛誌*, **28**, 33-37 (1981).
- 8) 紺野信弘, 山内 徹, 木根渕英雄: 有機リン殺虫剤 cyanofenphos のニワトリ肉冠塗布による遅発性神経毒性, *日本公衛誌*, **29**, 97-103 (1982).
- 9) 白石 悟, 後藤幾生, 山下順章, 大西晃生, 長尾英彦: Diptelex 中毒による polyneuropathy, 神経内

- 科, 6, 34-38 (1977).
- 10) Shiraishi, S., Inoue, N., Murai, Y., Onishi, A. and Noda, S.: Diptalex (Trichlorfon) poisoning-clinical and pathological studies in human and Monkeys, J. UOEH, 5(Suppl.), 125-132 (1983).
- 11) 木根渕英雄, 紺野信弘, 山内 徹: 有機リン殺虫剤 cyanofenphos の遅発性神経毒性, 日農医誌, 29, 570-571 (1980).
- 12) Konno, N., Yamauchi, T., Yamaguchi, Y. and Fukushima, M.: Protective effect of pretreatment against the acute toxicity of formulated cyanofenphos in hens, Tohoku J. exp. Med., 142, 155-163 (1984).
- 13) 山内 徹: 有機リン殺虫剤 Phosvel の遅発性神経毒性に対する実験的肥瘦の影響, 日衛誌, 35, 782-793 (1980).
- 14) 紺野信弘, 木根渕英雄, 山内 徹: 有機リン農薬「ホスベル」の鶏脂肪組織中残留, 日本公衛誌, 24, 507-512 (1977).
- 15) Yamauchi, T., Konno, N. and Kinebuchi, H.: Neurotoxicity by the dividing administration of critical dose of phosvel, Experientia, 36, 104-105 (1980).

(受付 1984年1月13日)