

たことから、投与の影響による可能性は否定できないと考えられた。

本試験において、1,000 ppm 以上投与群の雌雄で変異肝細胞巢（好塩基性）等が認められたことから、無毒性量は雌雄で 125 ppm（雄：5.9 mg/kg 体重/日、雌：7.8 mg/kg 体重/日）であると考えられた。（参照 2）

表 12 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験(ラット)で認められた毒性所見(非腫瘍性病変)

投与群	雄	雌
8,000(雄)/4,000(雌) ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制及び摂餌量減少 ・GGT 増加 ・肝細胞肥大 ・腎尿細管色素沈着* 	<ul style="list-style-type: none"> ・全身蒼白 ・体重増加抑制 ・肝絶対及び比重量増加 ・肝細胞肥大
1,000 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・軟便 ・肝絶対及び比重量増加、肝脳比重量増加 ・肝腫瘍 ・変異肝細胞巢(好塩基性)、変異肝細胞巢(好酸性/明細胞性) 	<ul style="list-style-type: none"> ・摂餌量減少 ・変異肝細胞巢(好塩基性)**
125 ppm	毒性所見なし	毒性所見なし

*：色素はリポフスチンと考えられる。

**：1,000 ppm 投与群で有意差が認められたのは投与 53 週時剖検時のみ。

表 13 雄ラットで発生増加した腫瘍性・前腫瘍性病変の発生頻度

投与群		0 ppm	125 ppm	1,000 ppm	8,000 ppm
検査動物数		50	50	50	50
肝臓	変異肝細胞巢(好塩基性)	20	24	44↑	38↑
	変異肝細胞巢(好酸性/明細胞性)	23	32	41↑	35↑
	肝細胞腺腫	0	0	1	6↑
	肝細胞癌	1	0	5	7↑
血液	組織球肉腫	0	1	1	5↑

Fisher の直接確率法 ↑：p<0.05 ↑↑：p<0.01

(3) 80 週間発がん性試験 (マウス)

ICR マウス (一群雌雄各 50 匹) を用いた混餌 (原体：0、150、1,000 及び 7,000 ppm) 投与による 80 週間発がん性試験が実施された。

各投与群に認められた毒性所見は表 14、十二指腸/空腸及び肝臓に認められた過形成及び腫瘍性病変の発生頻度は表 15 に示されている。

剖検所見で認められた盲腸粘膜における暗領域は、病理組織学的検査では盲腸粘膜の褐色色素沈着と同一のものと判断された。この褐色色素について、特殊染色を実施した結果、リポフスチンである可能性が高いと判断された。

表 15 の腫瘍が増加した結果、腫瘍総数が 7,000 ppm 投与群の雌雄で有意に増加し、雌においては、良性腫瘍数、良性腫瘍の担腫瘍動物数及び担腫瘍動物数が有意に増加した。

本試験において、1,000 ppm 以上投与群の雌雄で盲腸の色素沈着、十二指腸/空腸粘膜の過形成及び異形成等が認められたことから、無毒性量は雌雄とも 150 ppm (雄: 20 mg/kg 体重/日、雌: 30 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 2)

表 14 80 週間発がん性試験(マウス)で認められた毒性所見(非腫瘍性病変)

投与群	雄	雌
7,000 ppm	・ 体重増加抑制 ・ 十二指腸肥厚、肝退色領域、肝腫瘍	・ 肝絶対及び比重量増加 ・ 十二指腸肥厚、肝隆起領域
1,000 ppm 以上	・ 肝絶対及び比重量増加 ・ 盲腸暗領域 ・ 盲腸色素沈着 ・ 十二指腸/空腸粘膜過形成/異形成	・ 盲腸暗領域 ・ 盲腸色素沈着、十二指腸/空腸粘膜過形成/異形成
150 ppm	毒性所見なし	毒性所見なし

表 15 十二指腸/空腸及び肝臓に認められた過形成及び腫瘍性病変の発生頻度

性別	雄				雌			
	0	150	1,000	7,000	0	150	1,000	7,000
投与群 (ppm)	0	150	1,000	7,000	0	150	1,000	7,000
検査動物数	50	50	49	49	50	50	50	50
十二指腸/空腸								
粘膜過形成/異形成	4	2	9	13↑	2	7	9↑	16↑
腺腫	0	0	0	3	0	0	0	0
腺癌	0	0	0	5↑	0	0	0	0
肝臓								
肝細胞腺腫	4	9	10	15↑	0	1	1	5↑
肝細胞癌	1	4	3	5	0	0	0	2

Fisher の直接確率法 ↑ : p<0.05 ↑↑ : p<0.01

1.2. 生殖発生毒性試験

(1) 2 世代繁殖試験 (ラット)

SD ラット (一群雌雄各 26 匹) を用いた混餌 (原体: 0、125、1,000 及び 8,000 (雄) /4,000 (雌) ppm) 投与による 2 世代繁殖試験が実施された。

親動物及び児動物における各投与群で認められた毒性所見はそれぞれ表 16 に示されている。

児動物において、1,000 ppm 以上の投与群で発育遅延 (膈開口の遅延等) が認められ、親動物への影響による新生児の体重増加抑制に伴う二次的変化であると考えられた。

本試験において、親動物では 1,000 ppm 以上投与群の雌雄で体重増加抑制、摂餌量減少、肝絶対及び比重量増加等、児動物では 1,000 ppm 以上投与群の雌雄で体重増加抑制等が認められたことから、無毒性量は、親動物及び児動物の雌雄で 125 ppm (P 雄: 8.1 mg/kg 体重/日、P 雌: 9.9 mg/kg 体重/日、F₁ 雄: 9.9 mg/kg

体重/日、F₁雌：11.1 mg/kg 体重/日) であると考えられた。繁殖能に対する影響は認められなかった。(参照 2)

表 16 2 世代繁殖試験(ラット)で認められた毒性所見

	投与群	親：P、児：F ₁		親：F ₁ 、児：F ₂	
		雄	雌	雄	雌
親への影響	4,000/8,000 ppm	・体重増加抑制	・体重増加抑制 ・摂餌量減少 ・肝絶対及び比重量増加		
	1,000 ppm 以上	・摂餌量減少 ・肝絶対及び比重量増加	1,000 ppm 以下毒性所見なし	・体重増加抑制 ・摂餌量減少 ・肝絶対及び比重量増加	・体重増加抑制 ・摂餌量減少 ・肝比重量増加
	125 ppm	毒性所見なし		毒性所見なし	
児への影響	4,000/8,000 ppm	・脳絶対重量減少	・眼瞼開裂遅延 ・脳絶対重量減少	・体重増加抑制(育成期間) ・脾及び胸腺絶対重量減少	・体重増加抑制(育成期間) ・膈開口遅延 ・脾及び胸腺絶対重量減少
	1,000 ppm 以上	・体重増加抑制 ・包皮分離遅延 ・脾及び胸腺絶対重量減少	・体重増加抑制 ・膈開口遅延 ・脾及び胸腺絶対重量減少	1,000 ppm 以下毒性所見なし	
	125 ppm	毒性所見なし			

(2) 発生毒性試験 (ラット)

SD ラット (一群雌 25 匹) の妊娠 6~19 日に強制経口 (原体：0、100、300 及び 1,000 mg/kg 体重/日、溶媒：1.0%MC 水溶液) 投与する発生毒性試験が実施された。

母動物では 1,000 mg/kg 体重投与群で肝絶対及び比重量増加、肝臓の小葉周辺性肝細胞肥大が認められた。

胎児では胎児体重、生存率、性別及び外形、内臓及び骨格異常に検体投与の影響は認められなかった。

本試験の無毒性量は、母動物で 300 mg/kg 体重、胎児で 1,000 mg/kg 体重/日と考えられた。催奇形性は認められなかった。(参照 2)

(3) 発生毒性試験 (ウサギ)

NZW ウサギ (一群雌 25 匹) の妊娠 6~28 日に強制経口 (原体：0、30、100 及び 250 mg/kg 体重/日、溶媒：1.0%MC 水溶液) 投与する発生毒性試験が実施された。

母動物では、250 mg/kg 体重/日投与群で体重増加量及び摂餌量が対照群に比べ有意に減少した。同群においては胎児吸収の増加を反映して、妊娠子宮重量が有意に減少した。また、胎児致死率の増加がみられ、その結果として、胚吸収を

1例でも有する母動物数、1腹あたりの平均吸収数、一腹あたりの胎児の死亡または吸収胎の割合が有意に増加した。100 mg/kg 体重/日投与群においても、摂餌量が有意に減少した。

胎児では 250 mg/kg 体重/日投与群で平均生存胎児数が減少した。

本試験の無毒性量は、母動物で 30 mg/kg 体重/日、胎児で 100 mg/kg 体重/日であると考えられた。催奇形性は認められなかった。(参照 2)

1.3. 遺伝毒性試験

フルアクリピリム (原体) の細菌を用いた DNA 修復試験及び復帰突然変異試験、チャイニーズハムスター肺線維芽細胞を用いた染色体異常試験、マウスを用いた小核試験及びコメットアッセイが実施された。試験結果は表 17 に示すとおり、全て陰性であった。(参照 2)

表 17 遺伝毒性試験概要(原体)

試験		対象	処理濃度・投与量	結果
in vitro	DNA 修復試験	<i>Bacillus subtilis</i> (H17, M45 株)	141~4,500 µg/disk (-S9) 70.3~2,250 µg/disk (+S9)	陰性
	復帰突然変異試験	<i>Salmonella typhimurium</i> (TA98, TA100, TA1535, TA1537 株) <i>Escherichia coli</i> (WP2uvrA 株)	200~5,000 µg/plate (+/-S9)	陰性
	染色体異常試験	チャイニーズハムスター肺線維芽細胞 (CHL)	1~160 µg/mL(-S9) 40~160 µg/mL(+S9)	陰性
in vivo	小核試験	ICR マウス (骨髓細胞)	1,250、2,500、5,000 mg/kg 体重 (単回強制経口投与)	陰性
	コメットアッセイ	ICR マウス (小腸 [十二指腸及び空腸]、粘膜上皮細胞)	2,000 mg/kg 体重 (単回強制経口投与)	陰性
	コメットアッセイ	ICR マウス (肺、肝、盲腸)	2,000 mg/kg 体重 (単回強制経口投与)	陰性

注) +/-S9 : 代謝活性化系存在下及び非存在下

代謝物及び原体混在物の、細菌を用いた復帰突然変異試験、チャイニーズハムスター肺線維芽細胞を用いたコメットアッセイ及びげっ歯類を用いた小核試験が実施された。試験結果は表 18 に示すとおり、一部の原体混在物 (①及び⑤) では、一部の菌株において復帰突然変異が陽性を示したが、限界用量まで試験されたほ乳類の培養細胞を用いたコメットアッセイ及びげっ歯類を用いた小核試験では陰性であったことから、生体において問題となる遺伝毒性はないものと考えられた。その他の代謝物及び原体混在物における試験結果は全て陰性であった。(参照 2)

表 18 遺伝毒性試験概要(代謝物及び原体混在物)

検体	試験		対象	処理濃度・投与量	結果
代謝物 B	<i>in vitro</i>	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100, TA1535, TA1537 株) <i>E. coli</i> (WP2uvrA 株)	20~1,250 µg/plate (-S9) 10~5,000 µg/plate (+S9)	陰性
代謝物 D	<i>in vitro</i>	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100, TA1535, TA1537 株) <i>E. coli</i> (WP2uvrA 株)	156~5,000 µg/plate (+/-S9)	陰性
代謝物 E	<i>in vitro</i>	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100, TA1535, TA1537 株) <i>E. coli</i> (WP2uvrA 株)	39.1~1,250 µg/plate (+/-S9)	陰性
代謝物 F	<i>in vitro</i>	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100, TA1535, TA1537 株) <i>E. coli</i> (WP2uvrA 株)	156~5,000 µg/plate (+/-S9)	陰性
原体混在物 ①	<i>in vitro</i>	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100, TA1535, TA1537 株) <i>E. coli</i> (WP2uvrA 株)	78.1~5,000 µg/plate (-S9) 39.1~5,000 µg/plate (+S9)	陽性 ¹⁾
		コメットアッセイ	チャイニーズハムスター肺線維芽細胞 (CHL/IU)	15~300 µg/mL (-S9) 25~100 µg/mL (+S9)	陰性
	<i>in vivo</i>	小核試験	ICR マウス骨髄細胞	150、300、600、1,200 mg/kg 体重 (24 時間間隔で 2 回強制経口投与)	陰性
原体混在物 ②	<i>in vitro</i>	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100, TA1535, TA1537 株) <i>E. coli</i> (WP2uvrA 株)	313~5,000 µg/plate (-S9) 39.1~1,250 µg/plate (+S9)	陰性
原体混在物 ③	<i>in vitro</i>	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100, TA1535, TA1537 株) <i>E. coli</i> (WP2uvrA 株)	313~5,000 µg/plate (-S9) 39.1~5,000 µg/plate (+S9)	陰性
原体混在物 ④	<i>in vitro</i>	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100, TA1535, TA1537 株) <i>E. coli</i> (WP2uvrA 株)	39.1~1,250 µg/plate (+/-S9)	陰性
原体混在物 ⑤	<i>in vitro</i>	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100, TA1535, TA1537 株) <i>E. coli</i> (WP2uvrA 株)	39.1~5,000 µg/plate (+/-S9)	陽性 ²⁾
		コメットアッセイ	チャイニーズハムスター肺線維芽細胞 (CHL/IU)	10~120 µg/mL (-S9) 30~120 µg/mL (+S9)	陰性
	<i>in vivo</i>	小核試験	ICR マウス骨髄細胞	100、200、400 mg/kg 体重 (単回強制経口投与)	陰性

原体混在物 ⑥	<i>in vitro</i>	復帰突然変異 試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100、 TA1535、TA1537 株) <i>E. coli</i> (WP2uvrA 株)	313~5,000 µg/plate (-S9) 39.1~1,250 µg/plate (+S9)	陰性
原体混在物 ⑦	<i>in vitro</i>	復帰突然変異 試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100、 TA1535、TA1537 株) <i>E. coli</i> (WP2uvrA 株)	39.1~1,250 µg/plate (+/-S9)	陰性
原体混在物 ⑧	<i>in vitro</i>	復帰突然変異 試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100、 TA1535、TA1537 株) <i>E. coli</i> (WP2uvrA 株)	39.1~1,250 µg/plate (+/-S9)	陰性
原体混在物 ⑨	<i>in vitro</i>	復帰突然変異 試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100、 TA1535、TA1537 株) <i>E. coli</i> (WP2uvrA 株)	39.1~1,250 µg/plate (+/-S9)	陰性

注) +/-S9: 代謝活性化系存在下及び非存在下

1): TA1537 株でのみ陽性 (代謝活性化系存在下及び非存在下)

2): TA98 株の代謝活性化系非存在下及び TA1537 株の代謝活性化系存在下で陽性

14. その他の試験

(1) マウスを用いた発がん性試験の盲腸リポフスチン沈着とアポトーシスの関連についての検討

フルアクリピリムのマウスを用いた 80 週間発がん性試験[11. (3)]で見られた盲腸における色素沈着の機序を検討した。

同試験の投与 80 週時に計画と殺した動物のうち、各群 10 匹 (1,000 ppm 群は 9 匹) を選び、これらの動物の盲腸の ABC 法による免疫染色標本にて抗一本鎖 DNA (ssDNA) 抗体陽性細胞を、また、HE 染色標本を用いて分裂細胞核数を計数した。

その結果、いずれの投与群においても、抗 ssDNA 抗体陽性細胞及び細胞分裂指数に有意な差は認められなかった。したがって、盲腸粘膜上皮にアポトーシスの増加は認められず、同試験で観察された盲腸のリポフスチン沈着は本剤のアポトーシス促進を介した変化ではないと考えられた。(参照 2)

(2) ラットを用いた中期肝発がん性試験及び肝細胞増殖活性の検討

Fischer ラット (一群雄 10~15 匹) に DEN (200 mg/kg 体重) の腹腔内投与後、2 週間の回復期間後からフルアクリピリム (0, 125, 8,000 ppm) または PB (500 ppm) を 6 週間混餌投与、その間 DEN 投与 3 週後に肝部分切除を実施し、中期肝発がん性試験を実施した。陰性対照群として、DEN の投与をせずに、フルアクリピリムを 8,000 ppm で投与する群を設けた。

DEN 処置及び DEN 無処置後 8,000 ppm 投与群において、体重増加抑制が認められた。DEN 処置後フルアクリピリム投与群 (0, 125, 8,000 ppm) 及び PB 投与群において、肝臓の白色点が各群それぞれ 2~4 匹に認められた。DEN 処置後 8,000 ppm 投与群及び PB 投与群及び DEN 無処置後 8,000 ppm 投与群において、肝絶対及び比重量が増加した。DEN 処置後 8,000 ppm 投与群及び PB 投

与群において、GST-P 陽性細胞巢の単位面積当たりの数及び面積とも有意に増加した。DEN 無処置群では GST-P 陽性細胞巢は認められなかった。また、DEN 処置後 8,000 ppm 投与群において、有意差はないものの BrdU 標識率の増加傾向が認められた。

以上より、フルアクリピリム混餌投与による中期肝発がん試験において、本剤が 8,000 ppm (648 mg/kg 体重/日) でラットの肝臓に対して発がんプロモーション作用を有することが判明した。また、無作用量は 125 ppm (8.58 mg/kg 体重/日) であった。(参照 2)

(3) ラットを用いた肝薬物代謝酵素誘導試験

SD ラット (一群雄 7 匹) に 2 週間混餌 (0、125、1,000、8,000 ppm) 投与し、各種の肝薬物代謝酵素を測定した。同時に甲状腺ホルモン (T_3 及び T_4) 及び TSH も測定した。陽性対照群として PB (500 ppm) を同様に混餌投与する群を設けた。

8,000 ppm 投与群において、肝比重量が増加したが、甲状腺重量に影響は認められなかった、PB 投与群において、肝及び甲状腺の絶対及び比重量が増加した。

8,000 ppm 投与群において、P-450、APND 及び UDP-GT (基質: *p*-ニトロフェノール) 活性の有意な増加が認められ、EROD 及び STase 活性に変化は認められなかった。PB 投与群では P-450、APND 及び UDP-GT 活性が有意に増加した。

8,000 ppm 投与群において、有意でないものの T_4 の減少傾向が認められた。PB 投与群では TSH の有意な増加が認められた。

甲状腺の病理組織学的検査において、PB 投与群でのみ、甲状腺ろ胞上皮細胞の肥大が 6 匹に認められた。

以上の結果から、本剤を 2 週間混餌投与した時、8,000 ppm で肝薬物代謝酵素を誘導した。したがって、無作用量は 1,000 ppm (61.2 mg/kg 体重/日) であると考えられた。また、フルアクリピリム 8,000 ppm 2 週間投与では、甲状腺に対し明らかな影響は認められなかった。(参照 2)

(4) マウスを用いた肝薬物代謝酵素誘導試験

ICR マウス (一群雄 5 匹) に 2 週間混餌 (0、150、1,000、7,000 ppm) 投与し、各種の肝薬物代謝酵素を測定した。陽性対照群として PB (500 ppm) を同様に混餌投与する群を設けた。

7,000 ppm 投与群及び PB 投与群において、肝絶対及び比重量が有意に増加した。

7,000 ppm 投与群において、UDP-GT (基質: *p*-ニトロフェノール) 及び APND が有意に増加した。また、P-450 が有意差はないものの増加傾向を示した。PB 投与群では P-450、UDP-GT、APND 及び EROD が有意に増加した。

以上より、フルアクリピリムを 2 週間雄マウスに投与した時、7,000 ppm 以上で肝薬物代謝酵素を誘導し、その時の無作用量は 1,000 ppm (124 mg/kg 体重/

日)と考えられた。(参照 2)

(5) マウスを用いた胃酸分泌試験

ICR マウス (一群雄 5 匹) に、被験物質をイオン交換水で懸濁し、20 mg/kg 体重 (pH 5.46) 及び 1,000 mg/kg 体重 (pH 3.30) の投与量で単回強制経口投与し、胃内 pH 及び胃内容物を測定した。なお、1,000 mg/kg 体重投与群については pH 調整を行なった群 (pH 6.25) も設けた。対照群 (pH 6.22) にはイオン交換水を同様に投与した。

pH 調製後の 1,000 mg/kg 体重投与群において、胃内 pH の若干の低下と胃内容物の増加傾向が認められたが、いずれも有意差はなかった。

以上より、フルアクリピリムを雄マウスに単回強制経口投与した時、有意ではないが、若干の胃酸分泌亢進傾向が認められた。(参照 2)

(6) マウスの小腸及び肝臓に対する細胞増殖活性及びアポトーシスへの影響

ICR マウス (一群雄 30 匹) に、被験物質を 12 週間混餌 (0、150、1,000、7,000 ppm) 投与し、投与 2、4 及び 12 週後に小腸 (十二指腸) 及び肝臓における細胞増殖活性 (BrdU 陽性細胞数及び細胞分裂指数) 及びアポトーシス (抗 ssDNA 陽性細胞数) に対する影響を検討した。

7,000 ppm 投与群では、全ての検査時期で小腸及び肝臓における BrdU 陽性細胞が有意に増加した。また、7,000 及び 1,000 ppm 投与群において分裂細胞核数が有意に増加した。

また、アポトーシスに関しては、7,000 ppm 投与群で小腸の抗 ssDNA 陽性細胞数の減少傾向 (有意差なし) が認められた。

したがって、フルアクリピリムは、マウスの小腸粘膜上皮細胞並びに肝細胞に対し、高用量投与 (7,000 ppm 混餌投与) により細胞増殖活性を示すものと考えられた。また、無作用量は 1,000 ppm (139 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 2)

(7) [pyr-¹⁴C]フルアクリピリムのラット及びマウスにおける消化管内代謝物の比較

SD ラット (一群雄 3 匹) 及び ICR マウス (一群雄 4 匹) に、[pyr-¹⁴C]フルアクリピリムを単回強制経口投与し、投与 24 時間後にと殺し、胃、小腸及び大腸内の代謝物を分析し、比較検討した。

マウス、ラット共に各消化管中の代謝物は、親化合物のフルアクリピリムのみが検出された。以上のことから、ラット、マウスの消化管中の代謝物に大きな差はないと考えられた。(参照 2)

(8) CHL 細胞を用いた細胞毒性試験

フルアクリピリム処理により CHL 細胞に生じた細胞毒性が、本剤由来の活性酸素による影響か否かの検討のため、哺乳類培養細胞を用いて細胞毒性試験を行った。

常法により細胞を用意し、処理前に培地交換を行った。フルアクリピリム添加 (3 µg/mL) 群と活性酸素除去剤存在下におけるフルアクリピリム添加群との比較を行った。活性酸素除去剤として SOD (最終濃度 3,000 U/mL) を、H₂O₂ 除去剤としてカタラーゼ (最終濃度 6,650 U/mL) を処理した群を各 6 例用意した。この他に、フルアクリピリムの溶媒である DMSO のみを添加した群、スカベンジャー (SOD 及びカタラーゼ) のみを添加した群を設けた。

溶媒対照群である DMSO 添加群で 100% の細胞増殖率が得られたのに対し、フルアクリピリム処理群では平均して 40% の細胞増殖率まで抑制された。フルアクリピリムとスカベンジャーとして SOD とカタラーゼを処理した場合には、44.5% まで抑制された。SOD とカタラーゼのみを処理した場合には 115% の細胞増殖率が得られた。

フルアクリピリム処理時にスカベンジャーを添加した条件では無添加と比べ、有意に細胞増殖率が増加した。しかし、対照として設けたスカベンジャーのみを添加した群においても無添加群と比較して有意に細胞増殖率が増加した。これらの条件で認められた細胞増殖は、スカベンジャーによって細胞由来の活性酸素が除去されたことにより、細胞に対するダメージが減ったために増殖率が増したものと考えられた。フルアクリピリム非存在下においても増殖率が上がったことから、これらの増殖はフルアクリピリム由来の活性酸素を除去したために生じたのではないと考えられた。

これらの結果より、本条件下においてフルアクリピリム処理時に見られた細胞毒性は、フルアクリピリム由来の活性酸素に起因するものではないと結論された。(参照 2)

(9) 肝ミクロゾームを用いたスーパーオキシドの発生について

部分的にスクシニル化した、チロクローム C と、肝ミクロゾーム (0.4 mg 蛋白/mL、無処置の ICR 雄マウス (8 週齢) から調製)、フルアクリピリム (最終濃度 1 mM) またはパラコート (0.002~1 mM) を反応させて、スーパーオキシドの生成を測定した。その後 SOD (300 ユニット/mL) を加えスーパーオキシドの生成が止まることを確認した。

その結果、フルアクリピリムによるスーパーオキシドの生成は認められなかった。パラコートは 0.02 mM 以上でスーパーオキシドの生成を亢進し、その生成は SOD で抑制された。(参照 2)

(10) 脂質過酸化に及ぼすフルアクリピリムの影響

ICR マウス (一群各雄 6 匹) にフルアクリピリムを 7 日間強制経口投与 (実験 A : 0、1,000 mg/kg 体重/日、実験 B : 0、30、1,000 mg/kg 体重/日) し、投与 8 日後に臓器を採取 (実験 A : 肺、肝、十二指腸、盲腸、実験 B : 盲腸) し、その臓器のホモジネート中の MDA を測定した。また、Cytochrome C 還元法でフルアクリピリムのスーパーオキシド産生能を *in vitro* で検討した。

その結果、1,000 mg/kg 体重/日の投与量で 7 日間強制経口投与しても、マウス

の肺、肝臓、十二指腸および盲腸に MDA の増加は認められなかった。また、*in vitro* でもスーパーオキシド産生能はみられなかった。したがって、フルアクリピリムには脂質を過酸化する能力はないか、または極めて乏しいと考えられた。(参照 2)

(11) マウスの盲腸粘膜上皮細胞の増殖及びアポトーシスに及ぼす影響

ICR マウス (一群雄 20 匹) に、被験物質を 4 週間混餌 (0、7,000 ppm) 投与し、投与 2 及び 4 週後に盲腸における細胞増殖活性 (BrdU 陽性細胞数及び細胞分裂指数) 及びアポトーシス (抗 ssDNA 陽性細胞数) に対する影響を検討した。

その結果、いずれの検査時期においても、投与群において抗 ssDNA 陽性細胞数、分裂細胞核数及び細胞分裂指数に変化は認められなかった。したがって、マウス発がん性試験でみられた盲腸のリポフスチン沈着はアポトーシスの亢進によるものとは異なる機序で形成されたことを示すものであった。また、本剤は盲腸粘膜上皮細胞の細胞増殖にも影響しないと考えられた。(参照 2)

(12) まとめ

① ラット及びマウスにおける肝発がん機序

肝臓における催腫瘍性の機序を解明するために、上記に示したとおり種々の試験が実施された。フルアクリピリム投与による発がん性は、遺伝毒性試験の結果が陰性であったことから、イニシエーション作用によるものではなく、プロモーション作用によるものと判断された。プロモーション作用を確認するため、肝中期発がん試験、肝薬物代謝酵素誘導試験、活性酸素による脂質過酸化増加の検討等の試験を実施した。その結果、高用量投与により肝臓の酵素誘導及び肝細胞の増殖活性が認められた。過酸化脂質およびアポトーシス誘導については投与による変化はなかったので、本剤による肝腫瘍発生の機序にこれらの関与は少ないものと判断された。したがって、フルアクリピリムの持続的な大量投与により、肝臓において薬物代謝酵素の誘導及び弱いながらも肝細胞の障害による細胞増殖をもたらし、その結果肝細胞腺腫・癌が発生したと考えられた。

② マウスにおける小腸発がん機序

小腸における催腫瘍性の機序を解明するために、上記に示したとおり種々の試験が実施された。フルアクリピリム投与による発がんは、遺伝毒性試験の結果が陰性であったことから、イニシエーション作用によるものではないと判断された。プロモーション作用を検討するため、アポトーシス・細胞増殖活性検討試験等が実施された。その結果、高用量投与においてアポトーシス抑制傾向及び小腸粘膜上皮細胞の増殖亢進が認められ、その結果腺腫・腺癌が発生したと考えられた。

Ⅲ. 食品健康影響評価

参照に挙げた資料を用いて、農薬「フルアクリピリム」の食品健康影響評価を実施した。

動物体内運命試験の結果、経口投与されたフルアクリピリムは速やかに吸収、排泄された。主要排泄経路は糞中であつた。主要代謝物は糞中では親化合物、K、L、H、G、尿中ではD及びOであつた。主要代謝経路として、フェニル環の水酸化(G)、メトキシアクリラートの2重結合の還元と水酸化(H、L)、メチルエステルの加水分解(E)、アクリラート基の2重結合の酸化的開裂(J、D)、メトキシアクリラート基の脱メチル(K)、ピリミジン環のイソプロポキシ基の酸化(I)、エーテル結合の開裂(F)及びO-グルクロン酸抱合化(M、N、O、P、Q、R)であつた。

みかん及びりんごにおける植物体内運命試験の結果、散布したフルアクリピリムの大部分は表面に留まり、果実及び葉内部への移行は少なかった。主要成分は親化合物であつた。

フルアクリピリム及び代謝物Bを分析対象化合物とした作物残留試験の結果、フルアクリピリムの最高値は散布7日後の温州みかん(果皮)における3.00 mg/kg、代謝物Bの最高値は散布42日後の温州みかん(果皮)における0.06 mg/kgであつた。

各種毒性試験結果から、フルアクリピリム投与による影響は、主に肝臓に認められ、マウスのみ小腸及び盲腸に認められた。繁殖能に対する影響、催奇形性及び生体において問題となる遺伝毒性は認められなかった。

発がん性試験において、雄ラット及び雌雄マウスに肝細胞腺腫及び肝細胞癌、雄ラットに皮膚組織球肉腫、雄マウスに十二指腸腺腫及び腺癌の増加が認められたが、フルアクリピリムに遺伝毒性は認められないことから発生機序は遺伝毒性メカニズムとは考えがたく、評価にあたり閾値を設定することは可能であると考えられた。

各種試験結果から、農産物中の暴露評価対象物質をフルアクリピリム(親化合物のみ)と設定した。

各試験における無毒性量等は表19に示されている。

食品安全委員会は、各試験の無毒性量の最小値がラットを用いた2年間慢性毒性/発がん性併合試験の5.9 mg/kg 体重/日であつたことから、これを根拠として、安全係数100で除した0.059 mg/kg 体重/日を一日摂取許容量(ADI)と設定した。

ADI	0.059 mg/kg 体重/日
(ADI 設定根拠資料)	慢性毒性/発がん性併合試験
(動物種)	ラット
(期間)	2年間
(投与方法)	混餌
(無毒性量)	5.9 mg/kg 体重/日
(安全係数)	100

暴露量については、当評価結果を踏まえて暫定基準値の見直しを行う際に確認することとする。

表 19 各試験における無毒性量等

動物種	試験	投与量 (mg/kg 体重/日)	無毒性量 (mg/kg 体重/日) ¹⁾
			農薬抄録
ラット	90日間 亜急性 毒性試験	0、80、400、2,000、10,000 ppm 雄：0、5.2、26.6、129、675 雌：0、6.2、30.2、152、740	雄：129 雌：30.2 雌雄：体重増加抑制等
	2年間 慢性毒性 /発がん性 併合試験	0、125、1,000、 8,000(雄)/4,000(雌) ppm 雄：0、5.9、48.8、401 雌：0、7.8、61.7、249	雄：5.9 雌：7.8 雌雄：変異肝細胞巢(好塩基性)等 (雄：肝細胞腺腫・癌、皮膚組織球肉腫 増加)
	2世代 繁殖試験	0、125、1,000、 8,000(雄)/4,000(雌) ppm P雄：0、8.1、65.4、516 P雌：0、9.9、78.4、298 F ₁ 雄：0、9.9、78.9、666 F ₁ 雌：0、11.1、89.2、362	親動物及び児動物 P雄：8.1 F ₁ 雄：9.9 P雌：9.9 F ₁ 雌：11.1 親動物：体重増加抑制、摂餌量減少、肝 絶対及び比重量増加等 児動物：体重増加抑制等 (繁殖能に対する影響は認められない)
	発生毒性 試験	0、100、300、1,000	母動物：300 胎児：1,000 母動物：肝絶対及び比重量増加、肝小葉 周辺性肝細胞肥大 胎児：毒性所見なし (催奇形性は認められない)
マウス	90日間 亜急性 毒性試験	0、300、1,000、3,000、7,000 ppm 雄：0、50、170、500、1,140 雌：0、70、210、640、1,430	雄：500 雌：640 雌雄：肝絶対及び比重量増加
	80週間 発がん性 試験	0、150、1,000、7,000 ppm 雄：0、20、150、1,060 雌：0、30、190、1,320	雄：20 雌：30 雌雄：盲腸色素沈着、十二指腸/空腸粘 膜の過形成及び異形成等 (雌雄：肝細胞腺腫、雄：十二指腸/空腸 腺癌増加)
ウサギ	発生毒性 試験	0、30、100、250	母動物：30 胎児：100 母動物：摂餌量減少 胎児：平均生存胎児数減少 (催奇形性は認められない)
イヌ	90日間 亜急性 毒性試験	0、20、150、1,000	雄：20 雌：20 雌雄：軟便、下痢、嘔吐
	1年間 慢性毒性 試験	0、10、100、1,000	雄：10 雌：10 雌雄：軟便、下痢、嘔吐等
ADI			NOAEL：5.9 ADI：0.059 SF：100
ADI 設定根拠資料			ラット2年間慢性毒性/発がん性併合試験

NOAEL：無毒性量 SF：安全係数 ADI：一日摂取許容量

1)：無毒性量欄には、最小毒性量で認められた主な毒性所見等を記した。

<別紙1：代謝物/分解物等略称>

・代謝物/分解物

略称	化学名
B (302-(Z)-PS)	(Z)-2-{ α -[2-イソプロポキシ-6-(トリフルオロメチル)ピリミジン-4-イルオキシ]- <i>o</i> -トリル}-3-メトキシアクリル酸メチル
C (302-PH)	2-{ α -[2-イソプロポキシ-6-(トリフルオロメチル)ピリミジン-4-イルオキシ]- <i>o</i> -トリル}-2-ヒドロキシ酢酸メチル
D (302-PB)	α -[2-イソプロポキシ-6-(トリフルオロメチル)ピリミジン-4-イルオキシ]- <i>o</i> -トリル酸
E (302-PS1)	(E)-2-{ α -[2-イソプロポキシ-6-(トリフルオロメチル)ピリミジン-4-イルオキシ]- <i>o</i> -トリル}-3-メトキシアクリル酸
F (302-P1)	2-イソプロポキシ-6-トリフルオロメチル-4-ヒドロキシピリミジン
G (302-PS7)	(E)-2-{2-[2-イソプロポキシ-6-(トリフルオロメチル)ピリミジン-4-イルオキシメチル]-4-ヒドロキシフェニル}-3-メトキシアクリル酸メチル
H (302-PS12)	2-{ α -[2-イソプロポキシ-6-(トリフルオロメチル)ピリミジン-4-イルオキシ]- <i>o</i> -トリル}-3-ヒドロキシプロピオン酸メチル
I (302-P4S16)	2-{ α -[2-(2-ヒドロキシ-1-メチルエトキシ)-6-(トリフルオロメチル)ピリミジン-4-イルオキシ]- <i>o</i> -トリル}-2,3-ジヒドロキシプロピオン酸メチル
J (302-PS21)	2-{ α -[2-イソプロポキシ-6-(トリフルオロメチル)ピリミジン-4-イルオキシ]- <i>o</i> -トリル}-2-ヒドロキシ酢酸
K (302-P5S16)	2-{ α -[2-(1-カルボキシエトキシ)-6-(トリフルオロメチル)ピリミジン-4-イルオキシ]- <i>o</i> -トリル}-2,3-ジヒドロキシプロピオン酸メチル
L (302-PS14)	2-{2-[2-イソプロポキシ-6-(トリフルオロメチル)ピリミジン-4-イルオキシメチル]-4-ヒドロキシフェニル}-3-ヒドロキシプロピオン酸メチル
M (302-P1-GlcUA)	2-イソプロポキシ-6-トリフルオロメチルピリミジン-4-イル- β -D-グルクロン酸
N (302-PS1A-GlcUA)	(E)-[(Z)-2-{ α -[2-イソプロポキシ-6-(トリフルオロメチル)ピリミジン-4-イルオキシ]- <i>o</i> -トリル}]-2-メトキシカルボニルビニル- β -D-グルクロン酸
O (302-PS1-GlcUA)	(E)-2-{ α -[2-イソプロポキシ-6-(トリフルオロメチル)ピリミジン-4-イルオキシ]- <i>o</i> -トリル}-3-メトキシアクリロイル- β -D-グルクロン酸
P (302-P4S14-GlcUA)	2-{2-[2-(2-ヒドロキシ-1-メチルエトキシ)-6-(トリフルオロメチル)ピリミジン-4-イルオキシメチル]-4-ヒドロキシフェニル}-3-ヒドロキシプロピオン酸メチルのグルクロン酸抱合体 ※グルクロン酸抱合位置未決定のため命名不可
Q (302-PS10-GlcUA)	(E)-2-{2-[2-イソプロポキシ-6-(トリフルオロメチル)ピリミジン-4-イルオキシメチル]-4-ヒドロキシフェニル}-3-ヒドロキシアクリル酸メチルのグルクロン酸抱合体 ※グルクロン酸抱合位置未決定のため命名不可
R (302-P-4-OH-S-GlcUA)	α -[2-イソプロポキシ-6-(トリフルオロメチル)ピリミジン-4-イルオキシ]-4-[(Z)-1-メトキシカルボニル-2-メトキシビニル]- <i>m</i> -トリル- β -D-グルクロン酸

· 原体混在物

略称	化学名
①	(原体混在物)
②	(原体混在物)
③	(原体混在物)
④	(原体混在物)
⑤	(原体混在物)
⑥	(原体混在物)
⑦	(原体混在物)
⑧	(原体混在物)
⑨	(原体混在物)

<別紙 2 : 検査値等略称>

略称	名称
ai	有効成分量
Alb	アルブミン
ALP	アルカリホスファターゼ
APND	アミノピリン-N脱メチル酵素
BrdU	5-ブロモ-2'-デオキシウリジン
C _{max}	最高濃度
DEN	ジエチルニトロソアミン
DMH	1,2-ジメチルヒドラジン
DMSO	ジメチルスルホキシド
EROD	7-エトキシレゾルフィン-O脱エチル酵素
GGT	γ-グルタミルトランスぺプチダーゼ
GST-P	胎盤型グルタチオンS-トランスフェラーゼ
Glob	グロブリン
LC ₅₀	半数致死濃度
LD ₅₀	半数致死量
MC	メチルセルロース
MCV	平均赤血球容積
MDA	マロンジアルデヒド
MMS	メチルメタンスルホネート
OCT	オルニチン・カルバミル・トランスフェラーゼ
P-450	チトクローム P-450
PB	フェノバルビタール
PHI	最終使用から収穫までの日数
PL	リン脂質
PLT	血小板数
SOD	スーパーオキシドジスムターゼ
STase	スルホトランスフェラーゼ
T _{1/2}	消失半減期
T ₃	トリヨードチロシン
T ₄	チロキシン
TAR	総投与 (処理) 放射能
T.Chol	総コレステロール
T _{max}	最高濃度到達時間
TRR	総残留放射能
TSH	甲状腺刺激ホルモン
UDP-GT	UDP-グルクロン酸転移酵素

<別紙3：作物残留試験成績>

作物名 実施年	試験 圃場数	使用量 (g ai/ha)	回数 (回)	PHI (日)	残留値(mg/kg)				
					フルアクリピリム		代謝物 B		合計
					最高値	平均値	最高値	平均値	平均値
りんご (果実) 1998年度	2	750	1	6-7	0.578	0.460	0.017	0.012	0.472
				13-14	0.372	0.246	0.029	0.014	0.260
				21	0.471	0.268	0.019	0.014	0.282
なし (果実) 1998年度	2	600	1	3	0.231	0.125	0.008	0.006*	0.131
				7	0.289	0.144	0.012	0.007*	0.151
				14	0.128	0.068	0.008	0.006*	0.074
なし (果実) 2002年度	1	600	1	1	0.26	0.25	<0.01	<0.01	0.26*
				7	0.22	0.18	<0.01	<0.01	0.19*
				14	0.25	0.17	0.01	0.01*	0.18*
なし (果実) 2001年度	1	600	1	1	0.68	0.52	<0.01	<0.01	0.53*
				7	0.40	0.32	0.01	0.01	0.33
				14	0.27	0.22	0.01	0.01	0.23
温州みかん (果肉) 1998年度	2	500	1	7	0.014	0.011	<0.005	<0.005	0.016*
				14	0.016	0.010	<0.005	<0.005	0.015*
				21	0.017	0.011	<0.005	<0.005	0.016*
温州みかん (果皮) 1998年度	2	500	1	7	3.00	1.78	0.02	0.01	1.79
				14	2.16	1.27	0.02	0.02	1.29
				21	2.23	1.65	0.02	0.01	1.66
温州みかん (果肉) 1999年度	2	500-1,250	1	21	0.008	0.006*	<0.005	<0.005	0.011*
				28	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.010
				42	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.010
温州みかん (果皮) 1999年度	2	500-1,250	1	21	1.57	0.81	0.02	0.02	0.83
				28	0.87	0.64	0.02	0.02	0.66
				42	1.49	0.88	0.06	0.04	0.92
夏みかん (全果実) 1998年度	2	500	1	7	/	0.12	<0.01	<0.01	0.13*
				14		0.15	<0.01	0.01*	0.16*
				21		0.12	<0.01	0.01*	0.13*
夏みかん (果肉) 1998年度	2	500	1	7	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.010
				14	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.010
				21	0.007	0.006*	<0.005	<0.005	0.011*
夏みかん (果皮) 1998年度	2	500	1	7	0.70	0.43	<0.01	<0.01	0.44*
				14	0.71	0.55	0.01	0.01*	0.56*
				21	0.52	0.43	0.01	0.01*	0.44*
すだち (果実) 1998年度	1	500	1	7	0.160	0.159	0.006	0.006	0.165
				14	0.147	0.146	0.006	0.006	0.152
				21	0.059	0.059	<0.005	<0.005	0.064*
かぼす (果実) 1998年度	1	400	1	7	0.017	0.017	<0.005	<0.005	0.022*
				14	0.016	0.016	<0.005	<0.005	0.021*
				21	0.009	0.009	<0.005	<0.005	0.014*

- ・処理方法は散布処理とし、30%水和剤（フロアブル）を用いた。栽培形態は露地栽培とした。
- ・複数の試験機関で定量限界が異なる場合の最高値は、大きい値を示した（例えば A 機関で 0.006 検出され、B 機関で<0.008 の場合、<0.008 とした）。
- ・全てのデータが定量限界未満の場合の平均値は、定量限界値の平均に<を付して記載した。
- ・一部に定量限界未満を含むデータの平均を計算する場合は定量限界値を検出したものとして計算し、*を付した。

<参照>

1. 食品、添加物等の規格基準（昭和 34 年厚生省告示第 370 号）の一部を改正する件（平成 17 年 11 月 29 日付、平成 17 年厚生労働省告示第 499 号）
2. 農薬抄録フルアクリピリム、平成 19 年 3 月 6 日改訂：日本曹達株式会社
3. 食品健康影響評価について
(URL ; <http://www.fsc.go.jp/hyouka/hy/hy-uke-fluacrypyrim-190306.pdf>)
4. 第 181 回食品安全委員会
(URL ; <http://www.fsc.go.jp/iinkai/i-dai181/index.html>)
5. 第 6 回食品安全委員会農薬専門調査会確認評価第二部会
(URL; http://www.fsc.go.jp/senmon/nouyaku/kakunin2_dai6/index.html)
6. 第 42 回食品安全委員会幹事会
(URL; http://www.fsc.go.jp/senmon/nouyaku/kanjikai_dai42/index.html)

