

薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会
農薬・動物用医薬品部会
議事次第

日時：平成21年8月21日（金）

14:00～17:00

場所：厚生労働省 共用第7会議室

1. 開会

2. 議題

(1) 食品中の残留農薬等に係る残留基準設定について

- ・ フェントラザミド（農薬）
- ・ イソチアニル（農薬）
- ・ ボスカリド（農薬）
- ・ 豚サーコウイルス（2型）感染症（1型-2型キメラ）（デキストリン誘導体アジュバント加）不活化ワクチン（動物用医薬品）
- ・ ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎混合生ワクチン（動物用医薬品）

(2) 報告事項

食品に残留する農薬等の成分である物質の試験法における「同等以上の性能を有する試験法」の取扱いについて

(3) その他

3. 閉会

(配付資料)

【フェントラザミド (農薬)】

資料1-1 食品安全委員会における食品健康影響評価結果

資料1-2 農薬・動物用医薬品部会報告 (案)

【イソチアニル (農薬)】

資料2-1 食品安全委員会における食品健康影響評価結果

資料2-2 農薬・動物用医薬品部会報告 (案)

【ボスカリド (農薬)】

資料3-1 食品安全委員会における食品健康影響評価結果

資料3-2 農薬・動物用医薬品部会報告 (案)

【豚サーコウイルス (2型) 感染症 (1型-2型キメラ) (デキストリン誘導体アジュバント加) 不活化ワクチン (動物用医薬品)】

資料4-1 食品安全委員会における食品健康影響評価結果

資料4-2 農薬・動物用医薬品部会報告 (案)

【ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎混合生ワクチン (動物用医薬品)】

資料5-1 食品安全委員会における食品健康影響評価結果

資料5-2 農薬・動物用医薬品部会報告 (案)

資料6 食品に残留する農薬等の成分である物質の試験法における「同等以上の性能を有する試験法」の取扱いについて

【参考資料】

参考資料1 国民平均、幼小児、妊婦、高齢者別の農産物・畜産物摂取量

参考資料2 食品安全委員会への意見聴取及び食品健康影響評価結果について

農薬評価書

フェントラザミド

2008年12月

食品安全委員会

目次

	頁
○審議の経緯	4
○食品安全委員会委員名簿	4
○食品安全委員会農薬専門調査会専門委員名簿	4
○要約	6
I. 評価対象農薬の概要	7
1. 用途	7
2. 有効成分の一般名	7
3. 化学名	7
4. 分子式	7
5. 分子量	7
6. 構造式	7
7. 開発の経緯	7
II. 安全性に係る試験の概要	8
1. 動物体内運命試験	8
(1) ラット① ([phe- ¹⁴ C]フェントラザミド)	8
① 血中濃度推移	8
② 排泄	8
③ 胆汁中排泄	9
④ 体内分布	9
⑤ 代謝物同定・定量	10
(2) ラット② ([cyc- ¹⁴ C]フェントラザミド)	11
① 血中濃度推移	11
② 排泄	12
③ 体内分布	12
④ 代謝物同定・定量	12
(3) 経口投与後の動物体内における消長及び動態	13
2. 植物体内運命試験	15
(1) 水稻① ([phe- ¹⁴ C]フェントラザミド)	15
(2) 水稻② ([cyc- ¹⁴ C]フェントラザミド)	16
3. 土壌中運命試験	17
(1) 好氣的湛水土壌中運命試験	17
(2) 土壌吸着試験	18
4. 水中運命試験	18
(1) 加水分解試験	18

(2) 水中光分解試験 (精製水)	19
(3) 水中光分解試験 (自然水)	19
5. 土壌残留試験	20
6. 作物等残留試験	20
(1) 作物残留試験	20
(2) 魚介類における最大推定残留値	20
7. 一般薬理試験	21
8. 急性毒性試験	22
(1) 急性毒性試験	22
(2) 急性神経毒性試験 (ラット)	23
(3) 急性遅発性神経毒性試験 (ニワトリ)	23
9. 眼・皮膚に対する刺激性及び皮膚感作性試験	24
10. 亜急性毒性試験	24
(1) 90日間亜急性毒性試験 (ラット)	24
(2) 90日間亜急性毒性試験 (マウス)	25
(3) 90日間亜急性毒性試験 (イヌ)	26
(4) 90日間亜急性神経毒性試験 (ラット)	27
(5) 28日間亜急性遅発性神経毒性試験 (ニワトリ)	27
(6) 代謝物IIの28日間亜急性毒性試験 (ラット)	28
(7) 代謝物VIの28日間亜急性毒性試験 (ラット)	29
11. 慢性毒性試験及び発がん性試験	29
(1) 1年間慢性毒性試験 (イヌ)	29
(2) 2年間慢性毒性/発がん性併合試験 (ラット)	30
(3) 2年間発がん性試験 (マウス)	31
12. 生殖発生毒性試験	33
(1) 2世代繁殖試験 (ラット)	33
(2) 発生毒性試験 (ラット)	34
(3) 発生毒性試験 (ウサギ)	34
(4) 代謝物VIの発生毒性試験 (ラット)	35
13. 遺伝毒性試験	36
14. その他の試験	37
(1) 赤血球におけるフェントラザミド及び代謝物の分析 (ラット)	37
(2) 代謝物VIの血漿中動態及び排泄試験 (ラット)	38
(3) 神経病変についての解明試験 (ラット)	38
① NTE 活性阻害能力及びその機序 (<i>in vitro</i>)	38
② 2週間混餌投与による発生機序解明試験	40
③ 神経細胞に対する影響 (<i>in vitro</i>)	41
(4) ChE 活性に及ぼす影響 (ラット)	45

① 単回経口投与による ChE 活性への影響 (<i>in vivo</i>)	45
② フェントラザミド存在下の血球及び脳 ChE 活性 (<i>in vitro</i>)	46
③ 代謝物存在下の血清及び脳 ChE 活性 (<i>in vitro</i>)	46
④ 代謝物存在下の赤血球 ChE 活性 (<i>in vitro</i>)	46
⑤ まとめ	47
(5) 甲状腺に及ぼす影響 (<i>in vitro</i>)	47
① グアヤコール酸化の測定	47
② ヨウ素生成の測定	48
③ まとめ	48
(6) 膀胱上皮過形成及び腫瘍についての解明試験 (ラット)	48
① 中期発がん性試験	48
② 初期膀胱病変及び膀胱上皮細胞増殖活性の検索試験	49
③ 亜急性毒性試験における代謝	50
④ まとめ	51
(7) ラットの肝臓、胆汁及び ChE 活性への影響	51
(8) マウスの肝臓、胆汁及び胆嚢内容物への影響	52
(9) フェントラザミド混餌投与後のマウス胆汁を用いた復帰突然変異試験	53
(10) マウス胆嚢の PCNA 免疫染色追加試験	53
(11) 肝薬物代謝酵素及び胆嚢への影響についての解明試験 (イヌ)	54
① 肝臓酵素及び胆嚢のトキシコダイナミックスの解明試験	54
② 胆汁流量、胆汁組成及び肝機能パラメータへの影響	55
③ まとめ	56
(12) ラットの胆汁流量、胆汁組成及び肝機能パラメータへの影響	56
(13) フェントラザミド及び代謝物の溶血性試験 (<i>in vitro</i>)	57
(14) フェントラザミド及び代謝物Ⅱの赤血球に対する影響 (<i>in vitro</i>)	57
(15) ラットのフェントラザミドの高用量連続投与による血液への影響	58
Ⅲ. 食品健康影響評価	60
・別紙 1: 代謝物/分解物略称	64
・別紙 2: 検査値等略称	65
・別紙 3: 作物残留試験成績	67
・参照	68

<審議の経緯>

- 2003年 7月 1日 厚生労働大臣より残留基準設定に係る食品健康影響評価について要請（厚生労働省発食安第0701012号）（参照1）
- 2003年 7月 3日 関係書類接受
- 2003年 7月 18日 第3回食品安全委員会（要請事項説明）（参照2）
- 2003年 9月 18日 第11回食品安全委員会
（同日付け厚生労働大臣へ通知）（経過措置）（参照3）
- 2008年 1月 17日 農林水産省より厚生労働省へ基準設定依頼（魚介類）
- 2008年 2月 5日 厚生労働大臣より残留基準設定に係る食品健康影響評価について要請（厚生労働省発食安第0205004号）、関係書類の接受（参照4～83、86）
- 2008年 2月 7日 第225回食品安全委員会（要請事項説明）（参照87）
- 2008年 6月 18日 第22回農薬専門調査会総合評価第一部会（参照88）
- 2008年 9月 30日 第43回農薬専門調査会幹事会（参照89）
- 2008年 10月 30日 第260回食品安全委員会（報告）
- 2008年 10月 30日より11月28日 国民からの御意見・情報の募集
- 2008年 12月 3日 農薬専門調査会座長より食品安全委員会委員長へ報告
- 2008年 12月 4日 第265回食品安全委員会（報告）
（同日付け厚生労働大臣へ通知）

<食品安全委員会委員名簿>

(2006年6月30日まで)	(2006年12月20日まで)	(2006年12月21日から)
寺田雅昭（委員長）	寺田雅昭（委員長）	見上 彪（委員長）
寺尾允男（委員長代理）	見上 彪（委員長代理）	小泉直子（委員長代理*）
小泉直子	小泉直子	長尾 拓
坂本元子	長尾 拓	野村一正
中村靖彦	野村一正	畑江敬子
本間清一	畑江敬子	廣瀬雅雄**
見上 彪	本間清一	本間清一

*：2007年2月1日から

**：2007年4月1日から

<食品安全委員会農薬専門調査会専門委員名簿>

(2008年3月31日まで)

鈴木勝士（座長）	三枝順三	布柴達男
林 真（座長代理）	佐々木有	根岸友恵
赤池昭紀	代田真理子	平塚 明
石井康雄	高木篤也	藤本成明

泉 啓介
上路雅子
臼井健二
江馬 眞
大澤貫寿
太田敏博
大谷 浩
小澤正吾
小林裕子

玉井郁巳
田村廣人
津田修治
津田洋幸
出川雅邦
長尾哲二
中澤憲一
納屋聖人
西川秋佳

細川正清
松本清司
柳井徳磨
山崎浩史
山手丈至
與語靖洋
吉田 緑
若栗 忍

(2008年4月1日から)

鈴木勝士 (座長)
林 眞 (座長代理)
相磯成敏
赤池昭紀
石井康雄
泉 啓介
今井田克己
上路雅子
臼井健二
太田敏博
大谷 浩
小澤正吾
川合是彰
小林裕子

佐々木有
代田眞理子
高木篤也
玉井郁巳
田村廣人
津田修治
津田洋幸
長尾哲二
中澤憲一
永田 清
納屋聖人
西川秋佳
布柴達男
根岸友恵

根本信雄
平塚 明
藤本成明
細川正清
堀本政夫
松本清司
本間正充
柳井徳磨
山崎浩史
山手丈至
與語靖洋
吉田 緑
若栗 忍

要 約

除草剤であるフェントラザミド (CAS No. 158237-07-1) について、各種試験成績等を用いて食品健康影響評価を実施した。

評価に供した試験成績は、動物体内運命 (ラット)、植物体内運命 (水稻)、土壌中運命、水中運命、土壌残留、作物等残留、急性毒性 (ラット、マウス及びニワトリ)、亜急性毒性 (ラット、マウス、イヌ及びニワトリ)、慢性毒性 (イヌ)、慢性毒性/発がん性併合 (ラット)、発がん性 (マウス)、2 世代繁殖 (ラット)、発生毒性 (ラット及びウサギ)、遺伝毒性試験等である。

試験結果から、フェントラザミド投与による影響は主に赤血球及び脳 ChE 活性阻害、NTE 活性阻害、肝臓及び膀胱に認められた。繁殖能に対する影響、催奇形性及び遺伝毒性は認められなかった。

本剤投与により ChE 及び NTE 活性阻害が認められたが、症状観察において神経症状はみられず、遅発性神経毒性を示唆する所見も認められなかった。ラットで尿路上皮腫瘍及び甲状腺ろ胞上皮腫瘍が低頻度発生したが、各種メカニズム試験の結果に加え、本剤に遺伝毒性が認められないことを考慮すると、発生機序はいずれも遺伝毒性メカニズムとは考え難く、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。

各試験で得られた無毒性量の最小値は、イヌを用いた 1 年間慢性毒性試験の 0.52 mg/kg 体重/日であったので、これを根拠として、安全係数 100 で除した 0.0052 mg/kg 体重/日を一日摂取許容量 (ADI) と設定した。

I. 評価対象農薬の概要

1. 用途

除草剤

2. 有効成分の一般名

和名：フェントラザミド

英名：fentrazamide (ISO 名)

3. 化学名

IUPAC

和名：4-(2-クロロフェニル)-*N*-シクロヘキシル-*N*-エチル-4,5-ジヒドロ
-5-オキソ-1*H*-テトラゾール-1-カルボキサミド

英名：4-(2-chlorophenyl)-*N*-cyclohexyl-*N*-ethyl-4,5-dihydro
-5-oxo-1*H*-tetrazole-1-carboxamide

CAS (No. 158237-07-1)

和名：4-(2-クロロフェニル)-*N*-シクロヘキシル-*N*-エチル-4,5-ジヒドロ
-5-オキソ-1*H*-テトラゾール-1-カルボキサミド

英名：4-(2-chlorophenyl)-*N*-cyclohexyl-*N*-ethyl-4,5-dihydro
-5-oxo-1*H*-tetrazole-1-carboxamide

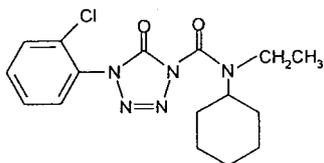
4. 分子式

$C_{16}H_{20}ClN_5O_2$

5. 分子量

349.8

6. 構造式



7. 開発の経緯

フェントラザミドは、バイエルクロップサイエンス株式会社によって開発された除草剤である。作用機構は明らかでないが、クロロアセトアミド系、オキシアセトアミド系及びカルバモイルスルホニルtriaゾール系除草剤の作用と同様、植物の細胞分裂組織に作用し、細胞分裂及び伸長を阻害して雑草の生育を停止させ、枯死させると考えられている。

海外では、タイをはじめとする東南アジアの数カ国で登録されている。日本では、2000年に水稻を対象として農薬登録されており、今回、魚介類への残留基準値の設定が申請されている。

II. 安全性に係る試験の概要

各種運命試験（II. 1~4）は、フェントラザミドのフェニル基の炭素を均一に ^{14}C で標識したもの（[phe- ^{14}C]フェントラザミド）及びシクロヘキシル環の1位炭素を ^{14}C で標識したもの（[cyc- ^{14}C]フェントラザミド）を用いて実施された。放射能濃度及び代謝物濃度は特に断りがない場合はフェントラザミドに換算した。代謝物/分解物略称及び検査値等略称は別紙1及び2に示されている。

1. 動物体内運命試験

(1) ラット①（[phe- ^{14}C]フェントラザミド）

① 血中濃度推移

Wistar ラット（一群雌雄各5匹）に[phe- ^{14}C]フェントラザミドを低用量（1.5 mg/kg 体重）または高用量（75 mg/kg 体重）で単回経口投与、または低用量で反復経口投与¹し、血中濃度推移について検討された。

血漿中放射能濃度推移は表1に示されている。

血漿中放射能の最高濃度到達時間（ T_{\max} ）は29.5~72.0分、消失半減期（ $T_{1/2}$ ）は9.67~40.6時間であったことから、経口投与された[phe- ^{14}C]フェントラザミドは速やかに吸収、排泄されることが示唆された。（参照5）

表1 血漿中放射能濃度推移

投与量	単回投与				反復投与	
	低用量		高用量		低用量	
性別	雄	雌	雄	雌	雄	雌
T_{\max} (分)	40.7	29.5	63.6	72.0	34.1	30.2
C_{\max} ($\mu\text{g/g}$)	0.856	0.661	8.16	8.94	1.07	1.04
$T_{1/2}$ (時間)	35.3	40.6	14.8	9.67	37	10

② 排泄

Wistar ラット（一群雌雄各5匹）に[phe- ^{14}C]フェントラザミドを低用量または高用量で単回経口投与、または低用量で反復経口投与し、排泄試験が実施された。

投与後24及び48時間の糞及び尿中排泄率は表2に示されている。

いずれの投与群も、投与後48時間の糞尿中に総投与放射能（TAR）の94.4~106%が排泄された。主要排泄経路は尿中であり、投与後48時間の尿中に低用量群では78.6~93.8%TAR、高用量群では40.9~49.4%TARが排泄された。性差は大きくなかったが、投与量による差が認められ、高用量群では糞への排泄率が高かった。また、呼気への排泄は極微量であり、 CO_2 やその他の揮発性物質には

¹ 非標識体を14日間連続投与後、[phe- ^{14}C]フェントラザミドを単回経口投与。②排泄、④体内分布も同じ。

代謝されないと考えられた。反復投与による影響は認められなかった。(参照 5)

表 2 投与後 24 及び 48 時間の尿及び糞中排泄率 (%TAR)

投与量	単回投与								反復投与			
	低用量				高用量				低用量			
	雄		雌		雄		雌		雄		雌	
性別	糞		尿		糞		尿		糞		尿	
試料	糞	尿	糞	尿	糞	尿	糞	尿	糞	尿	糞	尿
24 時間	11.2	83.3	11.0	93.0	54.5	40.5	42.8	46.6	15.3	83.3	13.1	77.0
48 時間	11.3	84.1	11.9	93.8	55.4	40.9	48.8	49.4	15.6	83.6	15.8	78.6

③ 胆汁中排泄

胆管カニューレを施した Wistar ラット (雄 6 匹) に、[phe-¹⁴C]フェントラザミドを低用量で十二指腸内投与し、胆汁中排泄試験が実施された。

投与後 48 時間の胆汁中に 41.3%TAR、糞中に 2.2%TAR、尿中に 62.1%TAR が排泄され、そのほとんど (98~100%) が投与後 24 時間以内に排泄された。

経口投与群 [1. (1)②] と比較して尿中排泄率が低いことから、経口投与群では腸肝循環により尿中排泄が上昇しているものと考えられ、投与された [phe-¹⁴C]フェントラザミドは、胆汁とともに十二指腸に分泌された後、腸肝循環、代謝を受け、最終的に大部分が尿中から体外に排泄されると考えられた。(参照 5)

④ 体内分布

Wistar ラット (一群雌雄各 5 匹) に [phe-¹⁴C]フェントラザミドを低用量または高用量で単回経口投与、または低用量で反復経口投与し、体内分布試験が実施された。

投与 48 時間後の主要組織における残留放射能濃度は表 3 に示されている。

投与 48 時間後のラット体内における放射能残留量は、胃腸管を除く動物体合計で 0.06~0.18%TAR とわずかであった。最も高い放射能濃度を示したのは肝臓であり、低用量群で 0.0061~0.0127 µg/g、高用量群で 0.985~1.10 µg/g であった。体内分布においても、反復投与の影響は認められなかった。

表 3 投与 48 時間後の主要組織における残留放射能濃度 (µg/g)

投与量		雄	雌
単回投与	低用量	肝臓(0.0069)、胃腸管(0.0033)、腎臓(0.0027)、赤血球(0.0011)、皮膚(0.0008)、骨(0.0007)、脾臓(0.0006)、心臓、肺及びカーカス(いずれも 0.0004)、筋肉(0.0003)、精巣、脳及び血漿(いずれも 0.0002)	肝臓(0.0061)、胃腸管(0.0028)、腎臓(0.0025)、赤血球(0.0018)、カーカス(0.0008)、骨及び肺(いずれも 0.0007)、脾臓及び皮膚(いずれも 0.0006)、心臓(0.0005)、筋肉及び血漿(いずれも 0.0003)
	高用量	肝臓(0.985)、腎臓(0.183)、赤血球(0.158)、胃腸管(0.0969)、心臓(0.0701)、骨(0.0638)、肺(0.0563)、血漿(0.0447)	肝臓(1.10)、胃腸管(0.778)、赤血球(0.651)、腎臓(0.315)、脾臓(0.189)、肺(0.182)、心臓(0.126)、骨(0.0706)、カーカス(0.0570)、皮

			膚(0.0555)、血漿(0.0527)
反復投与	低用量	肝臓(0.0122)、腎臓(0.0035)、胃腸管(0.0018)、赤血球(0.0013)、脾臓及び骨(いずれも 0.0006)、肺(0.0005)、心臓(0.0004)、筋肉、脳及び血漿(いずれも 0.0003)	肝臓(0.0127)、胃腸管(0.0120)、腎臓(0.0053)、赤血球(0.0048)、皮膚(0.0016)、肺(0.0014)、脾臓(0.0013)、骨(0.0010)、心臓(0.0010)、カーカス(0.0008)、血漿(0.0007)

また、Wistar ラット (雄 6 匹) に、[phe-¹⁴C]フェントラザミドを低用量で単回経口投与し、全身オートラジオグラフィによる経時的な体内分布解析が実施された。

投与 1 時間後には、最高濃度の放射能が胃や小腸に認められた。血液含量が多い肺、心臓 (心房内)、腎臓及び肝臓には全身よりも高い濃度が観察され、速やかな吸収と投与直後からの腎排泄が示唆された。脂肪、精巣及び筋肉では低く、中枢神経系、眼球及び大腸下部では非常に低い濃度であったことから、[phe-¹⁴C]フェントラザミドは初回通過効果により極性化合物に代謝され、血液脳関門を通過しないと考えられた。

投与 4 時間後には、肝臓及び腎臓で高い濃度を示し、腸肝循環が示唆された。心臓や肺などの血液含量の多い組織では体内濃度と比較して高く、脊髄、脳及び大腸下部では低かった。

投与 8 時間後には、胃や腸を除くと、肝臓、腎臓、血液及び肺を含め非常に低い濃度であったことから、[phe-¹⁴C]フェントラザミドの大部分が大腸へ排泄される過程であることが示唆された。

投与 24 時間後には、腸、肝臓及び腎臓を除き、体内には放射能の残留は認められなかった。投与 48 時間後でも 24 時間後と同じオートラジオグラムが得られ、速やかな体内消失が示された。(参照 5)

⑤ 代謝物同定・定量

排泄試験 [1. (1)②] で得られた投与後 48 時間の尿及び投与後 24 時間の糞、胆汁中排泄試験 [1. (1)③] で得られた投与後 1 時間の胆汁を試料として、代謝物同定・定量試験が実施された。

尿、糞及び胆汁における代謝物は表 4 に示されている。

尿中に親化合物は検出されなかった。主要代謝物はⅡ及びⅩであった。Ⅱ及びⅩの合計で尿中排泄率の 91%以上 (低用量群)、74%以上 (高用量群)、82%以上 (反復投与群) を占めた。尿中代謝物の種類及び生成割合に反復投与の影響は認められなかった。

糞中では親化合物が主要成分であった。代謝物は、尿と同様にⅡ及びⅩが各 0.1~2.9% TAR 検出された他、Ⅲ及びⅨが少量検出された。反復投与量群の糞は分析されなかった。

胆汁中に親化合物は検出されなかった。主要代謝物は尿中と同様にⅡ及びⅩであ

り、その他にⅧが検出された。また、いずれの試料においても、未同定代謝物で単一の成分として4%TARを超えるものは認められなかった。

ラットに[phe-¹⁴C]フェントラザミドを投与した場合の主要代謝経路は、テトラゾリノン環窒素とカルボニルの C-N 結合の開裂によるⅡの生成であった。Ⅱはグルクロン酸抱合を受けてXとなり、両者とも主として尿中に排泄された。(参照5)

表4. 尿、糞及び胆汁における代謝物 (%TAR)

投与量	性別	試料	フェントラザミド	代謝物	
単回 経口投与	低用量	雄	尿	n.d.	X(63.5)、Ⅱ(13.1)
			糞	1.6	Ⅱ(0.4)、Ⅲ(0.2)、Ⅸ(0.2)、X(0.2)
		雌	尿	n.d.	Ⅱ(45.4)、X(39.4)
			糞	0.6	Ⅱ(0.6)、Ⅲ(0.2)、Ⅸ(0.2)、X(0.1)
	高用量	雄	尿	n.d.	X(25.7)、Ⅱ(6.2)
			糞	28.5	Ⅱ(2.9)、Ⅸ(0.8)、X(0.6)
		雌	尿	n.d.	X(23.3)、Ⅱ(13.4)
			糞	8.9	Ⅱ(2.6)、Ⅲ(1.3)、Ⅸ(0.8)、X(1.1)
反復 経口投与	低用量	雄	尿	n.d.	X(56.0)、Ⅱ(12.6)
		雌	尿	n.d.	X(39.2)、Ⅱ(25.6)
単回 十二指腸投与	低用量	雄	胆汁	n.d.	Ⅱ(4.3)、Ⅷ(3.7)、X(1.5)

n.d.: 検出されず

(2) ラット② ([cyc-¹⁴C]フェントラザミド)

① 血中濃度推移

Wistar ラットに[cyc-¹⁴C]フェントラザミドを低用量 (1.5 mg/kg 体重、一群雌雄各5匹) または高用量 (75 mg/kg 体重、一群雄5匹) で単回経口投与し、血中濃度推移について検討された。

血漿中放射能濃度推移は表5に示されている。

血漿中放射能の T_{1/2} は 16.1~37.0 時間であり、経口投与された[cyc-¹⁴C]フェントラザミドの排泄は速やかであると考えられた。(参照6)

表5 血漿中放射能濃度推移

投与量	低用量		高用量
	雄	雌	雄
T _{max} (分)	66.0	100	137
C _{max} (µg/g)	1.01	1.71	6.38
T _{1/2} (時間)	16.1	37.0	16.4

② 排泄

Wistar ラットに[cyc-¹⁴C]フェントラザミドを低用量または高用量で単回経口投与し、排泄試験が実施された。

投与後 24 及び 48 時間の糞及び尿中排泄率は表 6 に示されている。

いずれの投与群も、投与後 48 時間の糞尿中に 85.7～95.7%TAR が排泄された。主要排泄経路は尿中であり、投与後 48 時間の尿中に低用量群（雌雄）では 68.2～76.2%TAR、高用量群（雄）では 40.6%TAR が排泄された。高用量群では糞への排泄が高く、投与された[cyc-¹⁴C]フェントラザミドの多くが吸収されずに排泄されたと考えられた。また、呼気への排泄は極微量であり、CO₂やその他の揮発性物質には代謝されないと考えられた。（参照 6）

表 6 投与後 24 及び 48 時間の尿及び糞中排泄率 (%TAR)

投与量	低用量				高用量	
	雄		雌		雄	
性別	尿	糞	尿	糞	尿	糞
24 時間	63.0	16.7	70.5	12.5	38.5	53.8
48 時間	68.2	17.5	76.2	13.8	40.6	55.1

③ 体内分布

Wistar ラットに[cyc-¹⁴C]フェントラザミドを低用量または高用量で単回経口投与し、体内分布試験が実施された。

投与 48 時間後の主要組織における残留放射能濃度は表 7 に示されている。

投与 48 時間後のラット体内における放射能残留量は、胃腸管（及び放射能の汚染の恐れのある皮膚）を除く動物体合計で 2.3～5.4%TAR であったが、雌の方が約 2 倍高かった。最も高い放射能濃度を示したのは肝臓であり、低用量群で 0.690～1.16 µg/g、高用量群で 7.20 µg/g であった。次いで腎臓の放射能濃度が高く、主要排泄経路が尿中であることに起因すると考えられた。（参照 6）

表 7 投与 48 時間後の主要組織における残留放射能濃度 (µg/g)

投与量	雄	雌
低用量	肝臓(0.690)、腎臓(0.147)、肺(0.119)、血漿(0.0867)	肝臓(1.16)、腎臓(0.332)、肺(0.289)、甲状腺(0.151)、血漿(0.137)
高用量	肝臓(7.20)、甲状腺(4.29)、腎臓(2.32)、赤血球(1.62)、肺(1.29)、血漿(1.20)	

④ 代謝物同定・定量

排泄試験[1. (2)②]で得られた投与後 48 時間の尿及び投与後 24 時間の糞を試料として、代謝物同定・定量試験が実施された。

尿、糞及び胆汁における代謝物は表 8 に示されている。

尿中に親化合物は検出されず、主要代謝物はX IIであった。次いで多く認められた代謝物はX I及びXIVであった。その他、6種類の微量代謝物が尿中からのみ検出され、その量は雌雄、投与量による差はなく0.2~2.9%TARであった。

糞中では、親化合物が低用量群で0.4~0.6%TAR、高用量群では未吸収と考えられる分を含めて18.8%TARが検出された。主要代謝物は、低用量群ではX II、高用量群ではX Iであり、他に少量のXIVが検出された。

ラットに経口投与された[cyc-¹⁴C]フェントラザミドは、テトラゾリノン環側鎖のカルボニル基が水酸基により求核攻撃を受け、テトラゾリノン環の窒素とカルボニルのC-N結合が開裂した後、脱炭酸を受けてX IやX IIが生成する一方、カルボニルが生体内有機酸によって求核攻撃を受けて抱合体が生成するものと考えられた。(参照6)

表8 尿及び糞における代謝物 (%TAR)

投与量	性別	試料	フェントラザミド	代謝物	
単回 経口投与	低用量	雄	尿	n.d.	X II(36.5)、XIV(11.4)、X I(8.1)、XIX(1.4)、XX I(1.4)、XVIII(1.3)、X V(1.2)、XX II(1.0)
			糞	0.6	X II(7.5)、X I(1.6)、XIV(1.0)
	雌	尿	n.d.	X II(25.2)、X I(16.9)、XIV(12.9)、XIX(2.9)、XX I(2.9)、XVIII(2.6)、XX II(1.9)、XVI(1.2)、X V(1.1)	
		糞	0.4	X II(5.1)、X I(1.4)、XIV(0.5)	
	高用量	雄	尿	n.d.	X II(25.1)、XIV(4.2)、XVIII(2.2)、X I(1.5)、XX II(0.9)、XX I(0.8)、XIX(0.2)
			糞	18.8	X I(6.0)、X II(4.6)、XIV(0.1)

n.d.: 検出されず

(3) 経口投与後の動物体内における消長及び動態

Wistar ラット (一群雄 5 匹) に[phe-¹⁴C]フェントラザミドまたは[cyc-¹⁴C]フェントラザミドを低用量 (1.5 mg/kg 体重) で単回経口投与し、ラット体内における消長及び動態について検討された。

と殺時における放射能の分布は表9に、尿、血漿、肝臓及び腎臓における代謝物は表10に示されている。

血漿では、[phe-¹⁴C]フェントラザミド投与群で投与60分後、[cyc-¹⁴C]フェントラザミド投与群で投与120分後に最大濃度となり、その後いずれも減少したが、[phe-¹⁴C]フェントラザミドに比べて[cyc-¹⁴C]フェントラザミドの血漿クリアランスは小さいことが示唆された。検出、同定された代謝物は、[phe-¹⁴C]フェントラザミドではII及びX、[cyc-¹⁴C]フェントラザミドではX I、X II、XIV及びX X IIであった。

肝臓では、血漿と同様、[phe-¹⁴C]フェントラザミド投与群で投与 60 分後、[cyc-¹⁴C]フェントラザミド投与群で投与 120 分後に最大濃度となった後に減少した。検出、同定された代謝物は、[phe-¹⁴C]フェントラザミドではⅡ、Ⅷ及びⅩであり、Ⅹが優先的に検出され、経時的な消長は認められなかった。[cyc-¹⁴C]フェントラザミドでは、血漿中で検出されたⅩⅠ、ⅩⅡ、ⅩⅣ及びⅩⅩⅡの他に、ⅩⅩⅠ及びⅩⅨが認められた。最も多く検出された代謝物はⅩⅡであり、次いで量的に多い代謝物はⅩⅣ及びⅩⅠであった。

腎臓では、[phe-¹⁴C]フェントラザミド及び[cyc-¹⁴C]フェントラザミドともに、投与 60 分後に最大濃度となった後に減少した。検出、同定された代謝物は血漿と同じであったが、[phe-¹⁴C]フェントラザミドの代謝物Ⅹと、[cyc-¹⁴C]フェントラザミドの代謝物ⅩⅠは増加傾向が認められた。

尿中で検出、同定された代謝物は、血漿及び腎臓で検出された種類と同様であり、回収量に対して高い割合で検出された。(参照 7)

表 9 経口投与後のと殺時における放射能の分布 (%TAR) *

標識体		[phe- ¹⁴ C]フェントラザミド			[cyc- ¹⁴ C]フェントラザミド		
投与後経過時間 (分)		30	60	180	60	120	360
尿		3.8	32.8	49.7	4.9	14.6	21.5
糞		0	0	0	0	0	0.2
血漿	(%TAR)	1.4	0.7	0.2	0.9	0.9	0.6
	(µg/g)	0.64	0.99	0.17	0.65	0.80	0.44
肝臓	(%TAR)	0.9	2.5	0.6	4.4	8.8	6.5
	(µg/g)	0.35	0.96	0.18	1.64	3.43	2.59
腎臓	(%TAR)	1.5	2.2	0.5	1.4	1.1	0.7
	(µg/g)	2.75	4.30	0.96	2.43	2.00	1.23
皮膚		8.1	5.1	1.3	2.9	3.4	2.5
胃腸管		51.1	30.7	27.3	59.7	63.5	34.6
カーカス		13.6	9.1	2.6	10.4	11.6	9.9
合計		80.4	83.1	82.2	84.4	103.9	76.5

* : 血漿、肝臓及び腎臓については、下段に放射能濃度 (µg/g) を示した。

表 10 尿、血漿、肝臓及び腎臓における代謝物（回収放射能に対する割合、%）

標識体	[phe- ¹⁴ C]フェントラザミド			[cyc- ¹⁴ C]フェントラザミド		
	30分	60分	180分	60分	120分	360分
尿	X(56.6) II(39.0)	X(75.9) II(19.6)	X(76.7) II(20.2)	X II(23.9)、XIV(18.4)、 X X II(3.03)、X I(2.9)	X II(26.6)、XIV(22.9)、 X X II(15.7)、X I(5.0)	X II(31.5)、XIV(23.9)、 X X II(14.4)、X I(6.4)
血漿	II(47.3) X(46.9)	X(54.0) II(29.8)	X(51.5) II(27.6)	XIV(21.1)、X II(4.0)、 X I(1.1)、X X II(1.1)	XIV(10.2)、X II(4.5)、 X I(1.3)、X X II(0.8)	X II(3.9)、X I(3.3)、 XIV(2.6)、X X II(0.3)
肝臓	X(71.8) II(5.1) VII(3.7)	X(63.4) II(5.3) VIII(4.6)	X(66.8) II(4.3) VIII(4.1)	X II(17.8)、XIV(6.0)、 X I(3.7)、X X I(1.9)、 X X II(1.7)、X IX(0.8)	X II(11.4)、XIV(4.8)、 X I(3.4)、X X I(1.0)、 X IX(0.5)、X X II(0.4)	X II(5.4)、X I(5.1)、 XIV(1.5)、X IX(0.4)、 X X I(0.2)、X X II(0.2)
腎臓	II(54.0) X(42.5)	X(57.3) II(36.3)	X(55.8) II(36.3)	X II(22.5)、X I(15.4)、 XIV(14.4)、X X II(5.9)	X II(16.8)、X I(14.1)、 XIV(13.0)、X X II(1.4)	X I(28.4)、X II(9.3) XIV(3.8)、X X II(0.5)

2. 植物体内運命試験

(1) 水稻①（[phe-¹⁴C]フェントラザミド）

[phe-¹⁴C]フェントラザミドを、移植 10 日後の水稻（品種：日本晴）に 266 g ai/ha の処理量で湛水表面に均一に処理し、処理 59 日後（青刈り）及び 132 日後（収穫期）の試料を用いた植物体内運命試験が実施された。

各試料における総残留放射能濃度及び代謝物は表 11 に示されている。

処理 59 日後の青刈り試料には、総処理放射能（TAR）の 17.3% が移行していた。その後、収穫期には吸収移行量が増大したが、稲わらで 21.7% TAR（2.38 mg/kg）、玄米で 0.03% TAR（0.048 mg/kg）、もみ殻で 0.02% TAR（0.156 mg/kg）、枝梗で 0.6% TAR（0.500 mg/kg）であり、ほとんどが稲わら中に存在した。

青刈り、稲わら及び玄米のすべての試料において親化合物は検出されなかった。主要代謝物は VI であり、各試料中の総残留放射能（TRR）の 43.0～50.3% を占めた。その他に、青刈りでは II、V 及び VII、稲わらでは VII、玄米では II 及び IV が認められた。

湛水表面処理された [phe-¹⁴C]フェントラザミドは、稲体内で II となり、メチル化体の IV や、抱合化を受けて V 及び VI へ代謝されると考えられた。（参照 8）

表 11 各試料における総残留放射能濃度及び代謝物（[phe-¹⁴C]フェントラザミド）

採取 時期	試料	吸収量 (%TAR)	総残留放射能 濃度 (mg/kg)	代謝物（上段：%TRR、下段：mg/kg）					
				II	IV	V	VI	VII	未同定
処理 59 日後	青刈り	17.3	0.937	3.2	n.d.	6.2	50.3	14.1	1.3
				0.030	—	0.058	0.471	0.132	0.012
処理 132 日後	稲わら	21.7	2.38	n.d.	n.d.	n.d.	43.0	14.9	18.3
				—	—	—	1.02	0.354	0.436
	玄米	0.03	0.048	3.6		n.d.	48.4	n.d.	4.8
				0.001		—	0.024	—	0.002
	もみ殻	0.02	0.156						
	枝梗	0.6	0.500						
稲全体	22.3	—							

／：分析せず n.d.：検出されず —：該当せず

(2) 水稻②（[cyc-¹⁴C]フェントラザミド）

[cyc-¹⁴C]フェントラザミドを、移植 10 日後の水稻（品種：日本晴）に 266 g ai/ha の処理量で湛水表面に均一に処理し、処理 59 日後（青刈り）及び 131 日後（収穫期）の試料を用いた植物体内運命試験が実施された。

各試料における総残留放射能濃度及び代謝物は表 12 に示されている。

処理 59 日後の青刈り試料には 4.5%TAR が移行していた。その後、吸収移行量はほとんど変わらず、収穫期では稲わらで 4.7%TAR (0.624 mg/kg)、玄米では 0.06%TAR (0.040 mg/kg)、もみ殻で 0.03%TAR (0.081 mg/kg)、枝梗で 0.2%TAR (0.123 mg/kg) であり、ほとんどが稲わら中に存在していた。

青刈り、稲わら及び玄米のすべての試料において親化合物は検出されなかった。代謝物として X I、X II、X IV 及び X XIV が認められた。X II の生成量が最も多く、青刈り及び稲わら中では 25.6~26.5%TRR を占めた。玄米中では、いずれの代謝物も 0.5~2.4%TRR と少量であり、42.8%TRR が天然成分のでんぷんに取り込まれていた。

湛水表面処理された [cyc-¹⁴C]フェントラザミドは、主に加水分解及び土壌分解を受けて X I になると考えられた。さらに、稲体内には親化合物及び X I が吸収され、X I はシクロヘキサン環が水酸化されて主要代謝物の X II、あるいはエチル基が脱離して X IV になり、また、吸収された親化合物は X I あるいは推定代謝物のウレア-X I を経由して X XIV になると推定された。（参照 9）

表 12 各試料における総残留放射能濃度及び代謝物 ([cyc-¹⁴C]フェントラザミド)

採取時期	試料	吸収量 (%TAR)	総残留放射能濃度 (mg/kg)	代謝物 (上段: %TRR、下段: mg/kg)				
				XI	XII	XIV	XXIV	未同定
処理 59 日後	青刈り	4.5	0.164	10.4	25.6*	3.0	10.1	23.5
				0.017	0.042	0.005	0.017	0.038
処理 132 日後	稲わら	4.7	0.624	17.0	26.5*	3.6	7.5	24.2
				0.107	0.164	0.022	0.047	0.151
	玄米	0.06	0.040	1.7	2.4**	0.5	1.4	9.5
				0.001	0.001	<0.001	0.001	0.004
	もみ殻	0.03	0.081					
枝梗	0.2	0.123						
稲全体	5.0	—						

/: 分析せず n.d.: 検出されず —: 該当せず *: 異性体 3 種 **: 異性体 2 種

3. 土壌中運命試験

(1) 好氣的湛水土壌中運命試験

[phe-¹⁴C]フェントラザミドまたは[cyc-¹⁴C]フェントラザミドを、水深 1.5 cm の湛水状態にした 2 種類の土壌 (火山灰・埴土及び沖積・埴壤土: 茨城) の水層に乾土あたり 300 g ai/ha (標準施用量) になるように添加し、28.1±1°C の暗条件下で 105 日間インキュベートする好氣的湛水土壌中運命試験が実施された。なお、分解物同定・定量用として、標準施用量の 10 倍である 3,000 g ai/ha 処理区についても実施された。

放射能分布の経時的变化は表 13 に示されている。

処理直後では、水層に 3.3~4.1%TAR、土壌に 93.7~95.7%TAR が分布していた。CO₂ の生成量は経時的に増加した。水層における消長は、標識体間で大きく異なっており、また、いずれの土壌においても、抽出放射能量は[phe-¹⁴C]フェントラザミド処理区でより高く、逆に発生した CO₂ 量と土壌結合性残留物の量は相対的に少なかった。

試験系全体において、親化合物は経時的に減少し、処理直後~3 日後に最大 78.9~87.4%TAR となり、試験終了時には 10.7~19.3%TAR となった。標識体及び土壌による大きな差はなかった。主要分解物は、[phe-¹⁴C]フェントラザミドでは II 及び IV、[cyc-¹⁴C]フェントラザミドでは X I であった。最大で、II は 32.0~39.1%TAR (処理 35~70 日後)、IV は 10.6~13.1%TAR (試験終了時)、X I は 7.0~9.5%TAR (処理 16~35 日後) を占めた。これらの他に 5%TAR を超える分解物は認められなかった。

消失半減期は、沖積土壌で 10.0~10.7 日、火山灰土壌で 16.8~18.7 日であった。フェントラザミドは湛水土壌において、急速に水層から土壌へ移行し、II 及び IV、あるいは X I を経て、CO₂ まで分解されると考えられた。(参照 10)

表 13 放射能分布の経時的変化 (%TAR)

経過 日数	[phe- ¹⁴ C]フェントラザミド								[cyc- ¹⁴ C]フェントラザミド							
	火山灰・埴土				沖積・埴壤土				火山灰・埴土				沖積・埴壤土			
	CO ₂	水層	土壌		CO ₂	水層	土壌		CO ₂	水層	土壌		CO ₂	水層	土壌	
			抽出物	残渣			抽出物	残渣			抽出物	残渣			抽出物	残渣
0	-	3.3	84.3	10.8	-	4.1	85.2	9.0	-	3.4	83.2	12.5	-	3.4	86.9	6.8
3	<0.1	3.5	87.4	8.1	<0.1	6.6	84.4	6.2	0.1	1.3	87.5	10.2	<0.1	2.0	84.5	10.9
7	0.1	5.6	83.8	11.0	0.1	12.7	77.4	8.3	0.4	1.2	82.0	14.8	0.5	3.3	76.4	16.9
16	1.2	12.3	71.4	12.7	1.9	24.0	60.5	10.2	4.6	1.7	68.3	21.2	4.0	4.8	56.8	28.8
35	4.5	14.9	61.4	15.4	5.9	28.2	47.3	11.9	14.0	1.2	50.4	25.7	11.1	3.6	42.5	34.0
70	6.5	12.2	61.0	18.2	10.7	30.0	40.6	5.8	21.9	1.0	39.5	29.9	32.8	1.3	25.3	35.1
105	11.8	12.3	52.7	20.7	16.0	26.8	35.5	18.4	33.3	0.6	29.8	29.3	43.2	0.8	18.4	34.7

(2) 土壌吸着試験

[phe-¹⁴C]フェントラザミドを用い、4種類の水田土壌（軽埴土：宮城、石川及び茨城、砂埴土：宮崎）における土壌吸着試験が実施された。

Freundlich の吸着係数 K_{ads} は 12.2~40.8、有機炭素含有率により補正した吸着係数 K_{oc} は 500~3,340 であった。（参照 11）

4. 水中運命試験

(1) 加水分解試験

pH 4（クエン酸緩衝液）、pH 7（トリス酸緩衝液）及び pH 9（ホウ酸緩衝液）の各滅菌緩衝液に、[phe-¹⁴C]フェントラザミドまたは[cyc-¹⁴C]フェントラザミドを 0.6 mg/L になるように添加した後、25 及び 40℃の暗所下で最長 35 日間インキュベートする加水分解試験が実施された。

25℃では、両標識体ともに pH 4 及び 7 において安定であり、試験終了時（処理 35 日後）に親化合物が 90.5~95.1%TAR を占めた。pH 9 では両標識体ともに分解し、試験終了時の親化合物は 62.6~72.0%TAR であった。一方、40℃では、pH 4 及び 7 においても分解が認められ、試験終了時の親化合物は、pH 4 及び 7 で 46.0~54.3%TAR、pH 9 で 5.9~8.2%TAR であった。

両標識体でそれぞれ 1 種類の加水分解物が同定された。[phe-¹⁴C]フェントラザミドでは II、[cyc-¹⁴C]フェントラザミドでは X I であり、いずれも処理 28~35 日後に最大となった。最大値は、II 及び X I ともに 25℃で 5.5~8.2%TAR (pH 4 及び 7) または 23.5~29.9%TAR (pH 9)、40℃で 43.2~58.7%TAR (pH 4 及び 7) または 71.5~89.9%TAR (pH 9) であった。

試験期間中の放射能の総回収率は、概ね 92~107%TAR であったが、40℃では、pH 9 における[cyc-¹⁴C]フェントラザミド処理溶液のみ 81~99%TAR とやや低く、インキュベーション期間が長くなるにつれて減少する傾向にあった。これは、生成した X I の一部が試験溶液から揮発することによると考えられた。

フェントラザミドの pH 4、7 及び 9 における推定半減期は、25℃ではそれぞれ 319、501 及び 69 日、40℃ではそれぞれ 35、36 及び 9 日であった。（参照 12）

(2) 水中光分解試験 (精製水)

滅菌精製水に[phe-¹⁴C]フェントラザミドまたは[cyc-¹⁴C]フェントラザミドを 0.6 mg/L となるように添加し、25±1°Cで最長 22 日間、キセノン光 (光強度: 1,020 W/m²、波長: 300~400 nm) を照射する水中光分解試験が実施された。

試験期間中の放射能の総回収率は、光照射区で 84.8~97.4% TAR、暗所対照区で 96.3~104% TAR であった。

加水分解試験 [4. (1)] でも明らかのように、フェントラザミドは加水分解されるが、光照射によって分解速度が速くなり、試験終了時 (処理 22 日後) の親化合物は、光照射区で 37.4~42.0% TAR であった。なお、暗所対照区では 69.4~72.4% TAR であった。

[phe-¹⁴C]フェントラザミドでは、分解物として II のみが同定され、光照射区では、処理 11 日後に最大 (21.7% TAR) となった。CO₂ の生成は処理 22 日後に最大 (13.4% TAR) であった。

[cyc-¹⁴C]フェントラザミドでは、X I、XXIII、XXV 及び XXVI が認められた。主要分解物は X I であり、光照射区で処理 7 日後に最大 (14.5% TAR) となった。XXIII 及び XXV はいずれも処理 22 日後に最大 (それぞれ 7.5 及び 5.0% TAR) となり、XXVI は処理 16 日後に最大 (4.5% TAR) となった。また、CO₂ の生成は、処理 22 日後に最大 (1.8% TAR) であった。

推定半減期は 14~17 日 (北緯 40 度、真夏正午の半減期換算では 62~75 日) であった。(参照 13)

(3) 水中光分解試験 (自然水)

自然水 (ドイツ、河川水、pH 7.9) に[phe-¹⁴C]フェントラザミドまたは[cyc-¹⁴C]フェントラザミドを 0.6 mg/L となるように添加し、25±1°Cで最長 22 日間、キセノン光 (光強度: 1,020 W/m²、波長: 300~400 nm) を照射する水中光分解試験が実施された。

試験期間中の放射能の総回収率は、光照射区で 83.8~99.0% TAR、暗所対照区で 95.5~101% TAR であった。試験終了時の親化合物は、光照射区で 25.9~28.2% TAR、暗所対照区では 69.0~76.0% TAR であった。

分解物は、精製水における試験 [4. (2)] と同じであった。[phe-¹⁴C]フェントラザミドでは、II が光照射区で処理 11 及び 22 日後に最大 (18.0% TAR) となった。CO₂ は、処理 16 日後に最大 (9.7% TAR) であった。

[cyc-¹⁴C]フェントラザミドでは、X I、XXIII 及び XXV がいずれも処理 22 日後に最大 (それぞれ 12.4、9.7 及び 5.8% TAR)、XXVI 及び CO₂ は処理 16 日後に最大 (それぞれ 6.0 及び 2.5% TAR) となった。

推定半減期は 11~13 日 (北緯 40 度、真夏正午の半減期換算では 46~55 日) であった。

[4. (2) 及び (3)] より、フェントラザミドの水中における光分解経路は、テトラ

ゾリノン環窒素とカルボニル基の C-N 結合の開裂による II の生成、または X I のカルバモイル体（中間体）の生成とその脱炭酸による X I の生成、さらにアンモニアや尿素の反応による X X III、X X V、X X VI の生成であると考えられた。生成した分解物はさらに分解し、CO₂ への無機化が進むと考えられた。（参照 13）

5. 土壌残留試験

火山灰・軽埴土（茨城）及び沖積・埴壤土（茨城）を用いて、フェントラザミドを分析対象化合物とした土壌残留試験（容器内及び圃場、湛水状態）が実施された。結果は表 14 に示されている。推定半減期は 0.5～28 日であった。（参照 14）

表 14 土壌残留試験成績（推定半減期）

試験	濃度*	土壌	フェントラザミド
容器内試験	0.3 mg/kg	火山灰・軽埴土	28 日
		沖積・埴壤土	28 日
圃場試験	10 kg ai/ha	火山灰・軽埴土	0.5 日
		沖積・埴壤土	3.5 日

※：容器内試験で原体、圃場試験でフェントラザミド 3%、イマゾスルフロン 0.9%、ダイムロン 10%含有粒剤を使用

6. 作物等残留試験

（1）作物残留試験

水稻を用い、フェントラザミド及び代謝物 II を分析対象化合物とした作物残留試験が実施された。

結果は別紙 3 に示されているとおり、すべて定量限界未満であった。（参照 15）

（2）魚介類における最大推定残留値

フェントラザミドの公共用水域における予測濃度である水産動植物被害予測濃度（水産 PEC）及び生物濃縮係数（BCF）を基に、魚介類の最大推定残留値が算出された。

フェントラザミドの水産 PEC は 0.075 µg/L、BCF は 71（試験魚種：ブルーギル）、魚介類における最大推定残留値は 0.027 mg/kg であった。（参照 82）

上記の作物残留試験の分析値及び魚介類における最大推定残留値を用いて、フェントラザミド（親化合物のみ）を暴露評価対象化合物とした際に食品中から摂取される推定摂取量が表 15 に示されている。なお、本推定摂取量の算定は、登録に基づく使用方法から、フェントラザミドが最大の残留を示す使用条件で水稻に使用され、かつ、魚介類への残留が上記の最大推定残留値を示し、加工・調理による残留農薬の増減が全くないとの仮定の下に行った。

表 15 食品中から摂取されるフェントラザミドの推定摂取量

食品名	残留値 (mg/kg)	国民平均 (体重：53.3 kg)		小児（1～6歳） (体重：15.8 kg)		妊婦 (体重：55.6 kg)		高齢者（65歳以上） (体重：54.2 kg)	
		ff	摂取量	ff	摂取量	ff	摂取量	ff	摂取量
魚介類	0.027	94.1	2.5	42.8	1.2	94.1	2.5	94.1	2.5
合計			2.5		1.2		2.5		2.5

注)・残留値は最大推定残留値を用いた。

- ・玄米のデータはすべて定量限界未満であったため、摂取量の計算に含めていない。
- ・「ff」：平成10年～12年の国民栄養調査（参照83～85）の結果に基づく摂取量（g/人/日）
- ・妊婦及び高齢者の魚介類のffは国民平均のffを用いた。
- ・「摂取量」：残留値から求めたフェントラザミドの推定摂取量（μg/人/日）

7. 一般薬理試験

マウス、ウサギ及びラットを用いた一般薬理試験が実施された。結果は表16に示されている。（参照16）

表 16 一般薬理試験概要

試験の種類	動物種	動物数 匹/群	投与量* (mg/kg 体重)	最大無作用量 (mg/kg 体重)	最小作用量 (mg/kg 体重)	結果の概要	
中枢神経系	一般症状 (Irwin 法)	ICR マウス	雄 5	0、1,000、 5,000	5,000	—	影響なし
	一般症状 (Irwin 法)	日本在来種 ウサギ	雄 5	0、500、 2,500	2,500	—	影響なし
	自発 運動量	ICR マウス	雄 5	0、1,000、 5,000	5,000	—	影響なし
	体温	日本白色種 ウサギ	雄 3	0、500、 2,500	2,500	—	影響なし
自律神経系	瞳孔径	日本在来種 ウサギ	雄 3	0、500、 2,500	2,500	—	影響なし
呼吸・循環器系	呼吸数 血圧 心拍数 心電図	日本在来種 ウサギ	雄 3	0、500、 2,500	2,500	—	影響なし
運動機能	回転棒法 懸垂法	ICR マウス	雄 5	0、1,000、 5,000	5,000	—	影響なし

消化器系	炭末輸送能	ICR マウス	雄 5	0、1,000、 5,000	5,000	—	影響なし
腎機能	尿排泄	SD ラット	雄 5	0、1,000、 5,000	5,000	—	影響なし
血液	血液凝固	SD ラット	雄 5	0、1,000、 5,000	5,000	—	影響なし
	溶血	SD ラット	雄 5	0、1,000、 5,000	5,000	—	影響なし
	血漿中 ChE 活性	ウサギ	雄 3	0、500、 1,000、2,500、 5,000	—	500	すべての用量で有意 に阻害 5,000 mg/kg 体重の 2 匹が投与翌日に死亡

*：検体はすべてクレモホア EL を加えて摩砕後、経口投与とした。

—：最小作用量または最大無作用量が設定できない。

8. 急性毒性試験

(1) 急性毒性試験

フェントラザミド（原体）を用いた急性経口、急性毒性試験が実施された。結果は表 17 に示されている。（参照 17～20）

表 17 急性毒性試験概要（原体）

投与経路	動物種	LD ₅₀ (mg/kg 体重)		観察された症状
		雄	雌	
経口	Wistar ラット 雌雄各 5 匹	>5,000	>5,000	症状及び死亡例なし
経口	ICR マウス 雌雄各 5 匹	>5,000	>5,000	症状及び死亡例なし
経皮	Wistar ラット 雌雄各 5 匹	>5,000	>5,000	症状及び死亡例なし
吸入	Wistar ラット 雌雄各 5 匹	LC ₅₀ (mg/L)		症状及び死亡例なし
		>5.09	>5.09	

フェントラザミドの代謝物 II、IV、VI、VII 及び分解物 XXIII を用いた急性毒性試験が実施された。結果は表 18 に示されている。（参照 21～25）

表 18 急性毒性試験結果概要 (代謝物及び分解物)

被験物質	投与経路	動物種	LD ₅₀ (mg/kg 体重)		観察された症状
			雄	雌	
II	経口	Wistar ラット 雌雄各 3 匹	>2,500	>2,500	症状及び死亡例なし
IV	経口	ICR マウス 雌雄各 5 匹	1,570	1,460	雌雄で鎮静、麻酔様症状、呼吸異常及びよろめき歩行 雌雄とも 1,400 mg/kg 体重以上で死亡
VI	経口	ICR マウス 雌雄各 5 匹	5,000	5,000	雌雄で鎮静及び背弯姿勢、雌でよろめき歩行及び後肢麻痺様状態 雌雄とも 5,000 mg/kg 体重で各 2 例死亡
VII	経口	ICR マウス 雌雄各 5 匹	>5,000	5,000	雌雄で鎮静及び呼吸異常、雌で閉眼及びチアノーゼ 雌雄とも 5,000 mg/kg 体重で死亡
XXIII	経口	ICR マウス 雌雄各 5 匹	220	220	雌雄で四肢の緊張、痙攣様苦悶及び呼吸異常 雌雄とも 140 mg/kg 体重以上で死亡

(2) 急性神経毒性試験 (ラット)

Wistar ラット (一群雌雄各 12 匹) を用いた強制経口 (原体 : 0、20、500 及び 2,000 mg/kg 体重、溶媒 : 0.5% MC/0.4% Tween20) 投与による急性神経毒性試験が実施された。

臨床症状、体重変化、機能観察総合検査 (FOB)、自発運動量、剖検、脳重量及び病理組織学的検査のいずれにおいても、検体投与の影響は認められなかった。

本試験で毒性所見は認められなかったことから、無毒性量は雌雄とも 2,000 mg/kg 体重であると考えられた。神経毒性は認められなかった。(参照 26)

(3) 急性遅発性神経毒性試験 (ニワトリ)

LSL 系ニワトリ (一群雌 20 羽、対照群及び陽性対照群は各 15 羽) を用いた強制経口 (原体 : 0 及び 5,000 mg/kg 体重、溶媒 : 2% クレモホア EL) 投与による急性遅発性神経毒性試験が実施された。なお、3 週間観察後の生存動物には再度 5,000 mg/kg 体重を強制経口投与し、さらに 3 週間観察後、神経病理組織学的検査が実施された。

初回投与の 6 日後までと、2 回目投与の 8 日後までは急性中毒症状 (緑色下痢便、反応性の低下、運動性低下及び一過性の不整歩行) が認められた。死亡は、初回投与 6 日後及び 2 回目投与 13 日後にそれぞれ 1 羽でみられた。

神経障害標的エステラーゼ (NTE) 活性阻害は初回投与 2 日後が最も強かったが、7 日後にはほとんど回復した。

脳 ChE 活性阻害は認められず、遅発性神経毒性症状を示唆する歩行異常及び

神経病理組織学的所見は認められなかった。(参照 27)

9. 眼・皮膚に対する刺激性及び皮膚感作性試験

NZW ウサギを用いた眼刺激性試験及び皮膚刺激性試験が実施された。眼及び皮膚に対する刺激性は認められなかった。(参照 28)

Hsd/Win:DH モルモットを用いた皮膚感作性試験 (Maximization 法) が実施された。皮膚感作性は陰性であった。(参照 29)

10. 亜急性毒性試験

(1) 90 日間亜急性毒性試験 (ラット)

Wistar ラット (一群雌雄各 10 匹) を用いた混餌 (原体 : 0、20、100、400、1,600 及び 6,400 ppm : 平均検体摂取量は表 19 参照) 投与による 90 日間亜急性毒性試験が実施された。なお、対照群及び 6,400 ppm 投与群には 4 週間の回復期間が設けられた。

表 19 90 日間亜急性毒性試験 (ラット) の平均検体摂取量

投与群 (ppm)		20	100	400	1,600	6,400
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	1.5	7.2	29.8	137	661
	雌	1.9	8.8	35.5	174	701

各投与群で認められた毒性所見は表 20 に示されている。

全投与群の雄で RBC の有意な減少が認められた。この変化は用量相関性がなく、背景データの範囲内であったが、Hb 及び Ht の減少との関連から、1,600 ppm 以上投与群については検体投与の影響も否定できなかった。

1,600 ppm 以上投与群の雌雄では、赤血球 ChE 活性阻害 (43~85%の阻害) が認められた。回復期間終了時には回復傾向を示したものの、6,400 ppm 投与群の雌雄では、赤血球 ChE 活性阻害 (28~32%) が認められた。

6,400 ppm 投与群の雌雄で O-デメチラーゼ活性が増加し、肝酵素誘導が示唆されたが、回復期間終了時には回復し、可逆性の変化であると考えられた。また、全投与群の雌で T₃ が増加し、用量相関性はなかったが、肝酵素誘導が認められていることから、6,400 ppm 投与群については検体投与の二次的影響も示唆された。

病理組織学的検査において、肝細胞肥大、副腎束状帯細胞空胞化、膀胱の円形細胞浸潤を伴う単純過形成及び甲状腺ろ胞のコロイド凝縮が認められたが、甲状腺ろ胞のコロイド凝縮以外は回復がみられた。また、雄の対照群及び 6,400 ppm 投与群の全例の膀胱について、走査電子顕微鏡を用いて追加的に膀胱上皮の損傷を検索した結果、6,400 ppm 投与群の膀胱上皮の表層部に壊死及び再生性過形成が認められた。対照群では全例が正常であった。

本試験において、1,600 ppm 以上投与群の雌雄で赤血球 ChE 活性阻害 (20% 以上) 等が認められたことから、無毒性量は雌雄とも 400 ppm (雄: 29.8 mg/kg 体重/日、雌: 35.5 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 30)

表 20 90 日間亜急性毒性試験 (ラット) で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
6,400 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・網状赤血球数増加 ・Alb 減少、T.Chol 及び Ure 増加 ・肝比重量²増加 ・甲状腺ろ胞のコロイド凝縮 ・膀胱の円形細胞浸潤を伴う単純過形成 	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 ・Hb 減少、網状赤血球数増加 ・Alb 減少 ・肝絶対重量増加 ・副腎束状帯空胞化
1,600 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 ・RBC、Hb 及び Ht 減少、MetHb 増加 ・TG 減少 ・赤血球 ChE 活性阻害 (20%以上) ・肝細胞肥大 	<ul style="list-style-type: none"> ・T.Chol 増加 ・赤血球 ChE 活性阻害 (20%以上) ・肝比重量増加 ・肝細胞肥大
400 ppm 以下	毒性所見なし	毒性所見なし

(2) 90 日間亜急性毒性試験 (マウス)

B6C3F₁ マウス (一群雌雄各 10 匹) を用いた混餌 (原体: 0、20、100、600、3,600 及び 7,200 ppm: 平均検体摂取量は表 21 参照) 投与による 90 日間亜急性毒性試験が実施された。

表 21 90 日間亜急性毒性試験 (マウス) の平均検体摂取量

投与群 (ppm)		20	100	600	3,600	7,200
平均検体摂取量 (mg/kg・体重/日)	雄	8.1	42.4	266	1,590	3,390
	雌	10.6	55.2	332	1,880	3,940

各投与群で認められた毒性所見は表 22 に示されている。

3,600 ppm 以上投与群の雌で TG 減少が認められたが、7,200 ppm 投与群では有意差がなく、用量相関性はなかった。

600 ppm 以上投与群の雌雄において、胆嚢の粘液分泌過多及び好酸性不定形物質に関連した胆嚢上皮過形成が認められた。これらの所見は、600 ppm 投与群では有意差はなかったが、いずれも検体投与の影響と考えられた。さらに、同群の雄では、腎尿細管上皮細胞の空胞が減少したが、この空胞は一般に雄マウスのみで観察されることから、腎臓に対する直接的な有害作用とは考えられなかった。

本試験において、600 ppm 以上投与群の雌雄で胆嚢上皮過形成等が認められたことから、無毒性量は雌雄とも 100 ppm (雄: 42.4 mg/kg 体重/日、雌: 55.2 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 31)

² 体重比重量を比重量という (以下同じ)。

表 22 90 日間亜急性毒性試験（マウス）で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
7,200 ppm	・ T.Chol 増加 ・ 肝細胞肥大	・ 肝単細胞壊死 ・ 胆嚢の限局性炎症細胞浸潤 ・ 副腎 X 帯の空胞減少
3,600 ppm 以上	・ 肝比重量増加	・ T.Chol 増加 ・ 肝絶対及び比重量増加 ・ 肝細胞肥大
600 ppm 以上	・ 体重増加抑制 ・ 胆嚢上皮過形成、粘液分泌過多、 好酸性不定形物質	・ 胆嚢上皮過形成、粘液分泌過多、 好酸性不定形物質
100 ppm 以下	毒性所見なし	毒性所見なし

(3) 90 日間亜急性毒性試験（イヌ）

ビーグル犬（一群雌雄各 4 匹）を用いた混餌（原体：0、75、300 及び 1,200 ppm：平均検体摂取量は表 23 参照）投与による 90 日間亜急性毒性試験が実施された。

表 23 90 日間亜急性毒性試験（イヌ）の平均検体摂取量

投与群 (ppm)		75	300	1,200
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	2.98	12.3	45.5
	雌	2.95	12.4	43.2

各投与群で認められた毒性所見は表 24 に示されている。

1,200 ppm 投与群の雄において、心電図の P 波高と P 波時間の低下がみられたが、心臓に病理組織学的な変化はみられず、摂餌量低下及び体重増加抑制が著明であったことから、低栄養状態に起因した変化であり、検体投与の直接的な心筋障害によるものでないと考えられた。

全投与群の雌雄で *N*-デメチラーゼ及び *O*-デメチラーゼが顕著に増加し、チトクローム P450 が有意な増加または有意ではないが対照群よりも高値を示した。これらの所見から、検体による肝薬物代謝酵素誘導が考えられたが、75 ppm 投与群では関連した形態学的変化がみられていないことから、75 ppm 投与群における酵素誘導は外来性異物に対する生体反応であり、毒性学的変化を反映したものではないと考えられた。

臨床神経学的検査において検体投与に起因する所見はみられず、赤血球及び脳 ChE 活性の有意な阻害も認められなかった。

本試験において、300 ppm 以上投与群の雌雄で肝細胞肥大等が認められたことから、無毒性量は雌雄とも 75 ppm（雄：2.98 mg/kg 体重/日、雌：2.95 mg/kg 体重/日）であると考えられた。（参照 32）

表 24 90 日間亜急性毒性試験（イヌ）で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
1,200 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制、摂餌量低下 ・TG、T.Chol、TP、カルシウム、T₃及びT₄減少 ・AST、ALT、GGT 及び胆汁酸増加 ・Lym 増加 ・胆嚢壁肥厚、胆嚢上皮過形成 ・肝絶対重量増加 	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制、摂餌量低下 ・TG、T.Chol、T₃及びT₄減少 ・GGT 増加 ・Lym 増加 ・胆嚢壁肥厚、胆嚢上皮過形成
300 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・ALP 増加 ・Alb 減少 ・肝細胞肥大 	<ul style="list-style-type: none"> ・ALP 及び胆汁酸増加 ・TP、Alb 及びカルシウム減少 ・肝絶対重量増加 ・肝細胞肥大
75 ppm	毒性所見なし	毒性所見なし

(4) 90 日間亜急性神経毒性試験（ラット）

Wistar ラット（一群雌雄各 12 匹）を用いた混餌（原体：0、400、1,200 及び 3,600 ppm：平均検体摂取量は表 25 参照）投与による 90 日間亜急性神経毒性試験が実施された。

表 25 90 日間亜急性神経毒性試験（ラット）の平均検体摂取量

投与群 (ppm)		400	1,200	3,600
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	24.3	77.0	229
	雌	31.1	92.9	274

3,600 ppm 投与群の雄で体重低下、雌で摂餌量低下及び有意差のない体重低下が認められた。雌では肝絶対及び比重量増加も認められた。

自発運動量及び移動運動量について、20%以上の変動が時折認められたが、統計学的有意差及び用量相関性が認められないこと、及び投与前の変動範囲と比べて大きく外れていないことから、投与の影響とは考えられなかった。症状観察、FOB 及び病理組織学的検査において、検体投与の影響は認められなかった。

本試験において、3,600 ppm 投与群の雌雄で体重低下等が認められたことから、無毒性量は雌雄とも 1,200 ppm（雄：77.0 mg/kg 体重/日、雌：92.9 mg/kg 体重/日）であると考えられた。神経毒性は認められなかった。（参照 33）

(5) 28 日間亜急性遅発性神経毒性試験（ニワトリ）

LSL 系ニワトリ（一群雌 17～24 羽）を用いた強制経口（原体：0、50、200 及び 750/500 mg/kg 体重/日³、溶媒：2%クレモホア EL 含有脱塩水）投与による 28 日間亜急性遅発性神経毒性試験が実施された。なお、検体投与終了後、2 週間

³ 投与期間当初は 750 mg/kg 体重/日であったが、死亡例が多く認められたため、投与 2 週間後から 500 mg/kg 体重/日に変更された。

の回復期間が設けられた。

最高用量群では、750 mg/kg 体重/日投与時には 24 例中 9 例 (37.5%) が最初の 2 週間に死亡し、別の 4 例 (16.7%) が 500 mg/kg 体重/日に減じた後の 20～24 日に死亡したため、この群では 50%以上の動物が死亡した。200 mg/kg 体重/日投与群では 18 例中 2 例 (11%) が試験 3 及び 16 日にそれぞれ死亡したが、この 2 例は中毒症状がなく突然死亡したことから、検体による死亡とはみなされなかった。

750/500 mg/kg 体重/日投与群では、運動性及び反応性の低下、痙攣、暗緑色の糞、とさかの退色が認められた。これらの症状は試験 2 日目からみられたが、試験 29 日にはすべての臨床症状は認められなかった。これは、投与量を減じた結果、症状が改善されたものと考えられた。同群では、体重が投与開始初週に約 20%まで低下し、約 1 kg まで減少した動物は死亡した。生存例でも体重減少が認められた。

検体投与群では、遅発性神経毒性症状を示唆する歩行異常は認められなかった。750/500 mg/kg 体重/日投与群の生存例では脳 AChE 活性阻害 (20%以上) が認められた。また、同群では、脳、脊髄及び坐骨神経の NTE 活性が 30～45%阻害されたが、50 及び 200 mg/kg 体重/日投与群ではほとんど阻害されず、阻害の程度は、最終投与 48 時間後では最終投与 24 時間後より低かった。

神経病理組織学的検査では、一側性のわずかな円形細胞浸潤 (主に脳及び坐骨神経) 及びわずかな神経線維の変性 (坐骨神経) で認められたが、対照群にも均一に認められたことから検体投与の影響ではないと考えられた。有機リン化合物により誘発される遅発性神経障害を示唆するような病理組織学的所見は認められなかった。

本試験における無毒性量は 200 mg/kg 体重/日であると考えられた。遅発性神経毒性は認められなかった。(参照 34)

(6) 代謝物Ⅱの 28 日間亜急性毒性試験 (ラット)

Wistar ラット (一群雌雄各 5 匹) を用いた代謝物Ⅱの強制経口 (代謝物Ⅱ: 0、100、300 及び 1,000 mg/kg 体重/日、溶媒: 不明) 投与による 28 日間亜急性毒性試験が実施された。

1,000 mg/kg 体重/日投与群の雌雄で ALT 及び肝比重量増加、雌で肝絶対重量増加が認められた。雌の ALT 増加は統計学的に有意でなかったが、肝絶対及び比重量が増加していることから、検体投与の影響と考えられた。

本試験において、1,000 mg/kg 体重/日投与群の雌雄で ALT 増加等が認められたことから、無毒性量は雌雄とも 300 mg/kg 体重/日であると考えられた。(参照 35)

(7) 代謝物VIの28日間亜急性毒性試験(ラット)

Wistar ラット(一群雌雄各10匹)を用いた代謝物VIの混餌(原体:0、1,000、3,000及び10,000 ppm:平均検体摂取量は表26参照)投与による28日間亜急性毒性試験が実施された。

表26 28日間亜急性毒性試験(ラット)の平均検体摂取量

投与群(ppm)		1,000	3,000	10,000
平均検体摂取量 (mg/kg体重/日)	雄	90.6	267	932
	雌	108	304	1,000

本試験において、雄ではいずれの投与群でも検体投与の影響は認められず、10,000 ppm投与群の雌で肝細胞の脂肪化が小葉周辺性に認められたことから、無毒性量は雄で10,000 ppm(932 mg/kg体重/日)、雌で3,000 ppm(304 mg/kg体重/日)であると考えられた。(参照36)

1.1. 慢性毒性試験及び発がん性試験

(1) 1年間慢性毒性試験(イヌ)

ビーグル犬(一群雌雄各4匹)を用いた混餌(原体:0、20、40、200及び750 ppm:平均検体摂取量は表27参照)投与による1年間慢性毒性試験が実施された。

表27 1年間慢性毒性試験(イヌ)の平均検体摂取量

投与群(ppm)		20	40	200	750
平均検体摂取量 (mg/kg体重/日)	雄	0.55	1.12	5.35	24.3
	雌	0.52	1.14	5.50	24.7

各投与群で認められた毒性所見は表28に示されている。

200 ppm投与群の雄1例が、進行性消瘦と全身状態悪化のために投与開始後146日に切迫と殺された。剖検では幽門狭窄と脳室の拡張がみられ、先天性の異常と考えられた。

全投与群の雌雄で*N*-デメチラーゼ及び*O*-デメチラーゼの有意な増加、200 ppm以上投与群の雄及び40 ppm以上投与群の雌でチトクロームP450の有意な増加が認められ、検体投与による肝臓の薬物代謝酵素誘導が考えられた。しかし、20 ppm投与群の雌雄及び40 ppm投与群の雄については、肝障害逸脱酵素、肝重量の変化及び病理組織学的所見を伴わなかった。

本試験において、200 ppm以上投与群の雄及び40 ppm以上投与群の雌でALP増加等が認められたことから、無毒性量は雄で40 ppm(1.12 mg/kg体重/日)、雌で20 ppm(0.52 mg/kg体重/日)であると考えられた。(参照37)

表 28 1年間慢性毒性試験（イヌ）で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
750 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制、摂餌量低下 ・PLT 増加 ・ALT 及び GGT 増加 ・TP 及び Alb 低下 ・T₃、T₄ 及び TSH 増加 ・肝腫大、胆嚢壁肥厚 ・肝比重量増加 	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制、摂餌量低下 ・PLT 増加 ・TP 低下 ・肝腫大 ・肝比重量増加 ・胆嚢上皮過形成
200 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・ALP 増加 ・肝絶対重量増加 ・胆嚢上皮過形成 ・肝細胞肥大 	<ul style="list-style-type: none"> ・ALT 及び GGT 増加 ・Alb 及びカルシウム低下 ・甲状腺絶対及び比重量増加 ・肝細胞肥大
40 ppm 以上	40 ppm 以下毒性所見なし	・ALP 増加
20 ppm		毒性所見なし

(2) 2年間慢性毒性/発がん性併合試験（ラット）

Wistar ラット（一群雌雄各 60 匹）を用いた混餌（原体：0、50、200、1,000 及び 3,000（雄のみ）または 4,000（雌のみ）ppm：平均検体摂取量は表 29 参照）投与による 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験が実施された。

表 29 2年間慢性毒性/発がん性併合試験（ラット）の平均検体摂取量

投与群 (ppm)		50	200	1,000	3,000	4,000
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	雄	2.5	10.3	52.7	170	
	雌	3.6	14.6	75.4		327

各投与群で認められた毒性所見は表 30 に示されている。

1,000 ppm 以上投与群の雄及び 200 ppm 以上投与群の雌で赤血球 ChE 活性阻害（20%以上）が認められた。さらに雌では、4,000 ppm 投与群で脳 ChE 活性阻害（20%以上）も認められた。

検体投与との関連が考えられる腫瘍性病変のうち、雌の尿路（膀胱及び尿道）移行上皮乳頭腫及び癌、雄の甲状腺ろ胞細胞腺腫及び癌の発生は、傾向検定で有意であった。また、雌の膀胱における免疫組織化学的検査の結果、4,000 ppm 投与群において、膀胱移行上皮の過形成を呈した部分にのみ PCNA の有意な増加がみられた。

本試験において、1,000 ppm 以上投与群の雄及び 200 ppm 以上投与群の雌で赤血球 ChE 活性阻害（20%以上）等が認められたことから、無毒性量は雄で 200 ppm（10.3 mg/kg 体重/日）、雌で 50 ppm（3.6 mg/kg 体重/日）であると考えられた。（参照 38）

表 30 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

投与群	雄	雌
4,000 ppm		<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 ・脳 ChE 活性阻害 (20%以上) ・消瘦 (5例、剖検時) ・肝絶対及び比重量増加 ・小葉中心性肝細胞肥大 ・肝紫斑病変巣、単細胞壊死 ・膀胱移行上皮過形成 (び慢性) ・骨格筋萎縮 ・筋線維変性 (大腿筋) ・坐骨神経髄鞘変性 ・甲状腺ろ胞コロイド内鉍質沈着 ・膀胱移行上皮癌 (1例) 及び乳頭腫 (2例)
3,000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加抑制 ・消瘦 (6例、剖検時) ・肝絶対及び比重量増加 ・肝変異細胞巣 (好酸性) ・限局性肝細胞変性 (門脈周辺性) ・肝細胞質変化 (小葉中心性～門脈周辺性) ・膀胱移行上皮過形成 (限局性及びび慢性) ・甲状腺ろ胞細胞過形成、ろ胞コロイド内鉍質沈着 ・副腎束状帯の空胞化 ・尿道移行上皮癌 (1例) ・甲状腺ろ胞細胞癌 (1例) 	
1,000 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・赤血球 ChE 活性阻害 (20%以上) ・坐骨神経髄鞘変性 ・甲状腺ろ胞細胞腺腫 (1,000 ppm : 1例、3,000 ppm : 2例) 	<ul style="list-style-type: none"> ・肝細胞質変化 (小葉中心性)
200 ppm 以上	200 ppm 以下毒性所見なし	<ul style="list-style-type: none"> ・赤血球 ChE 活性阻害 (20%以上)
50 ppm		毒性所見なし

(3) 2年間発がん性試験 (マウス)

B6C3F₁ マウス (一群雌雄各 50~70 匹) を用いた混餌 (原体 : 0、20、100、500 及び 2,000 ppm : 平均検体摂取量は表 31 参照) 投与による 2年間発がん性試験が実施された。

表 31 2年間発がん性試験 (マウス) の平均検体摂取量

投与群 (ppm)		20	100	500	2,000
平均検体摂取量 (mg/kg体重/日)	雄	5.4	28.0	131	575
	雌	7.7	41.9	201	831

各投与群で認められた毒性所見は表 32、発生頻度が増加した腫瘍性病変は表 33 に示されている。

全投与群の雄及び 500 ppm 以上投与群の雌で T.Chol の増加が認められた。この変化は、用量相関性及び期間の一貫性を欠いたが、病理組織学的検査において、500 ppm 以上投与群の雌雄で胆嚢の好酸性不定形物質や上皮過形成が見られており、胆汁酸組成の変化が考えられたことから、雌雄とも、500 ppm 以上投与群で認められた T.Chol 増加は検体投与の影響であると考えられた。

2,000 ppm 投与群の雄で、腎近位尿細管上皮細胞空胞の発生頻度及び程度が有意に減少したが、この空胞は一般的に雄マウスにみられるとされており、空胞減少はしばしば体重低下に伴ってみられることから、腎臓への直接的な毒性作用とは考えられなかった。

100 ppm 以上投与群の雄において、肝細胞腺腫が傾向検定で有意な増加を示した。しかし、これらの発生数は背景データ (0~22%) の範囲内であり、さらに、肝細胞腺腫と癌を合計した場合には有意差は認められなかったことから、肝腫瘍に対する投与の影響は考えられなかった。

2,000 ppm 投与群の雌では、子宮内膜間質肉腫及び乳腺腺癌が傾向検定で有意な増加を示したが、いずれもほぼ背景データ (子宮内膜間質肉腫: 0~6%、乳腺腺癌: 0~10%) の範囲内であったことから偶発性のものと考えられた。

本試験において、500 ppm 以上投与群の雌雄で胆嚢の好酸性不定形物質等が認められたことから、無毒性量は 100 ppm (雄: 28.0 mg/kg 体重/日、雌: 41.9 mg/kg 体重/日) であると考えられた。発がん性は認められなかった。(参照 39)

表 32 2年間発がん性試験 (マウス) で認められた毒性所見 (非腫瘍性病変)

投与群	雄	雌
2,000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> ・ 体重低下 ・ 肝比重量増加 ・ 肝細胞肥大及び細胞質好酸性化 (計画と殺動物のみ) ・ 胆嚢粘液分泌過多 (計画と殺動物のみ) ・ 胆嚢上皮過形成 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 赤血球 ChE 活性阻害 (20%以上) ・ 肝絶対重量増加 ・ 胆嚢の好酸性不定形物質 ・ 肝細胞肥大及び細胞質好酸性化 (計画と殺動物のみ) ・ 胆嚢粘液分泌過多 (計画と殺動物のみ)
500 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・ T.Chol 増加、TG 低下 ・ 胆嚢の胆汁黒色化、好酸性不定形物質 	<ul style="list-style-type: none"> ・ T.Chol 増加 ・ 胆嚢の胆汁黒色化、好酸性不定形物質 ・ 肝比重量増加 ・ 胆嚢上皮過形成
100 ppm 以下	毒性所見なし	毒性所見なし

表 33 発生頻度が増加した腫瘍性病変

投与量 (ppm)		0	20	100	500	2,000
雄	肝細胞腺腫	#3/50	3/50	5/50	7/50	8/50
	肝細胞癌	3/50	2/50	9/50	7/50	2/50
	腺腫+癌	6/50	5/50	14/50	14/50	10/50
雌	子宮内膜間質肉腫	#1/50	1/47	0/49	0/50	3/49
	乳腺腺癌	§0/49	0/49	0/49	1/50	3/49

: p<0.05、§ : p<0.01 (Peto の傾向検定)

1 2. 生殖発生毒性試験

(1) 2 世代繁殖試験 (ラット)

Wistar ラット (一群雌雄各 30 匹) を用いた混餌 (原体 : 0、20、300 及び 1,800 ppm : 平均検体摂取量は表 34 参照) 投与による 2 世代繁殖試験が実施された。

表 34 2 世代繁殖試験 (ラット) の平均検体摂取量

投与群 (ppm)			20	300	1,800
平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)	P 世代	雄	1.4	21.4	139
		雌	1.8	28.1	204
	F ₁ 世代	雄	1.6	25.0	202
		雌	2.2	32.1	259

各投与群で認められた毒性所見は表 35 に示されている。

親動物において、P 世代雌の対照群、20 ppm 投与群及び 300 ppm 投与群で各 1 例が妊娠 11~28 日に死亡し、さらに F₁ 世代雌の 20 ppm 投与群及び 1,800 ppm 投与群の各 1 例が切迫と殺されたが、いずれも検体投与に起因するものではなかった。1,800 ppm 投与群の F₁ 世代において、膀胱上皮過形成が雄で 3 例、雌で 1 例認められた。例数は少なかったが、この病変はラットを用いた 90 日間亜急性毒性試験 [10. (1)] 及び 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験 [11. (2)] でみられたものと同様、膀胱上皮における細胞毒性とその再生に起因したものと推察され、検体投与の影響であると考えられた。

児動物の F₂ 世代で哺育率低下が認められ、300 ppm 投与群でも統計学的に有意であったが、この群については背景データの範囲内であったことから、検体投与による作用とは考えられなかった。また、1,800 ppm 投与群児動物の F₂ 世代で出生時同腹児数低下が認められたが、これは繁殖能に対する影響というより親動物の毒性による影響であると考えられた。

本試験において、親動物では 300 ppm 以上投与群の雌雄で肝細胞質変化等、児動物では 1,800 ppm 投与群で体重増加抑制等が認められたことから、無毒性量は親動物で 20 ppm (P 雄 : 1.4 mg/kg 体重/日、P 雌 : 1.8 mg/kg 体重/日、F₁ 雄 : 1.6 mg/kg 体重/日、F₁ 雌 : 2.2 mg/kg 体重/日)、児動物で 300 ppm (P 雄 : 21.4 mg/kg 体重/日、P 雌 : 28.1 mg/kg 体重/日、F₁ 雄 : 25.0 mg/kg 体重/日、F₁

雌：32.1 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 40）

表 35 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
親動物	1,800 ppm	<ul style="list-style-type: none"> 赤血球 ChE 活性阻害（20%以上） 肝比重量増加 肝細胞質変化 	<ul style="list-style-type: none"> 摂餌量増加 赤血球 ChE 活性阻害（20%以上） 脳 ChE 活性阻害（20%以上） 肝絶対及び比重量増加 肝細胞質変化及び肝細胞肥大 	<ul style="list-style-type: none"> 体重増加抑制 摂餌量増加 赤血球 ChE 活性阻害（20%以上） 肝比重量増加 膀胱上皮過形成 	<ul style="list-style-type: none"> 体重増加抑制 摂餌量増加 赤血球 ChE 活性阻害（20%以上） 脳 ChE 活性阻害（20%以上） 肝絶対及び比重量増加 膀胱上皮過形成
	300 ppm 以上	300 ppm 以下 毒性所見なし	300 ppm 以下 毒性所見なし	肝細胞質変化	肝細胞質変化及び肝細胞肥大 副腎皮質空胞化
	20 ppm			毒性所見なし	毒性所見なし
児動物	1,800 ppm	<ul style="list-style-type: none"> 4 日生存率低下 体重増加抑制（哺育期） 		<ul style="list-style-type: none"> 出生時同腹児数低下 哺育率低下 体重増加抑制（哺育期） 	
	300 ppm 以下	毒性所見なし		毒性所見なし	

（2）発生毒性試験（ラット）

Wistar ラット（一群雌 28 匹）の妊娠 6～15 日に強制経口（原体：0、100、300 及び 1,000 mg/kg 体重/日、0.5% Tylose 水溶液に懸濁）投与する発生毒性試験が実施された。

母動物に検体投与に関連した所見は認められなかった。胎児では、1,000 mg/kg 投与群でダンベル型の第 12 胸椎弓、第 4 仙椎体と第 2 尾椎弓ならびに第 6 尾椎体の骨化促進、舌骨体の未骨化、泉門の拡張が胎児単位で有意に増加した。第 4 仙椎体の骨化促進のみは母動物単位でも有意な増加であった。しかし、これらのすべての所見は本系統のラットでの他試験と同様な頻度であるか、または用量相関性が明らかでないことから、投与に関連した所見とは考えられなかった。

本試験において、いずれの投与群の母動物及び胎児にも毒性所見は認められなかったことから、無毒性量は母動物及び胎児とも 1,000 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 41）

（3）発生毒性試験（ウサギ）

ヒマラヤウサギ（一群雌 16 匹）の妊娠 6～19 日に強制経口（原体：0、2.5、10、40、160 及び 640 mg/kg 体重/日、0.5% Tylose 水溶液に懸濁）投与する発生毒性試験が実施された。なお、試験開始時は 40 mg/kg 体重/日を最低用量として実施されたが、母動物への毒性をより明確にするため、2.5 及び 10 mg/kg 体

重/日投与群が追加された。

各投与群で認められた毒性所見は表 36 に示されている。

母動物では、流産が 40、160 及び 640 mg/kg 体重/日投与群でそれぞれ 1、2 及び 3 例にみられた。流産及び切迫と殺動物では、摂餌量の顕著な減少、糞量減少、糞の退色等がみられ、検体が母動物に強い毒性を示したことが推測された。追加された 10 mg/kg 体重/日投与群では、流産は観察されなかったが、赤血球 ChE 活性阻害が用量相関性に認められた (10、40、160 及び 640 mg/kg 体重/日投与群の妊娠 13~20 日でそれぞれ 33~59%、58~80%、92~97% 及び 98~100% の阻害)。さらに 2.5 mg/kg 体重/日投与群が追加された結果、この阻害は認められなかった。また、脳 ChE 活性阻害はいずれの投与群においても認められなかった。

胎児では、検体投与に関連した所見は認められなかった。

本試験において、母動物では 10 mg/kg 体重/日以上投与群で赤血球 ChE 活性阻害 (20%以上) が認められ、胎児では毒性所見が認められなかったことから、無毒性量は母動物で 2.5 mg/kg 体重/日、胎児で 640 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 42)

表 36 発生毒性試験 (ウサギ) で認められた毒性所見

投与群	母動物	胎児
640 mg/kg 体重/日	<ul style="list-style-type: none"> ・切迫と殺 (2 例) ・体重低下及び体重増加抑制 ・摂餌量低下 ・糞量低下、糞の退色 	毒性所見なし
160 mg/kg 体重/日以上	<ul style="list-style-type: none"> ・軟便 ・GGT、ALT 及び TG 増加 ・肝臓中 TG 増加 	
40 mg/kg 体重/日以上	<ul style="list-style-type: none"> ・流産 ・小葉中心性~中間帯肝細胞肥大 ・肝細胞質変化 (すりガラス様) 	
10 mg/kg 体重/日以上	<ul style="list-style-type: none"> ・赤血球 ChE 活性阻害 (20%以上) 	
2.5 mg/kg 体重/日	毒性所見なし	

(4) 代謝物VIの発生毒性試験 (ラット)

Wistar ラット (一群雌 30 匹) の妊娠 6~15 日に代謝物VIを強制経口 (代謝物 IV : 0 及び 1,000 mg/kg 体重/日、0.5% Tylose 水溶液に懸濁) 投与する発生毒性試験が実施された。

本試験において、母動物及び胎児に検体投与の影響は認められなかったことから、無毒性量は母動物及び胎児とも 1,000 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 43)

13. 遺伝毒性試験

フェントラザミドの細菌を用いた 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由来 V79 培養細胞を用いた染色体異常試験及び前進突然変異試験、ラット肝細胞を用いた不定期 DNA 合成 (UDS) 試験、マウスを用いた小核試験、ラットを用いた ³²P-ポストラベリングアッセイ (DNA アダクトの検出) が実施された。

試験結果は表 37 に示されており、すべて陰性であったことから、フェントラザミドに遺伝毒性はないと考えられた。(参照 44~50)

表 37 遺伝毒性試験概要 (原体)

	試験	対象	処理濃度・投与量	結果
<i>in vitro</i>	DNA 修復試験	<i>Bacillus subtilis</i> (H17、M45 株)	① 0.75~12 µg/7 ⁺ 1株 (+/-S9) ② 3~48 µg/7 ⁺ 1株 (+S9)	陰性
	復帰突然変異試験	<i>Salmonella typhimurium</i> (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) <i>Escherichia coli</i> (WP2 <i>uvrA</i> 株)	313~5,000 µg/7 ⁺ 1レト (+/-S9)	陰性
	染色体異常試験	チャイニーズハムスター由来 V79 培養細胞	5~50 µg/mL (-S9) 10~100 µg/mL (+S9)	陰性
	前進突然変異試験	チャイニーズハムスター由来 V79 培養細胞	5~60 µg/mL (-S9) 1.88~60 µg/mL (+S9)	陰性
	UDS 試験	SD ラット肝細胞	1.0~50 µg/mL	陰性
<i>in vivo</i>	小核試験	NMRI マウス (骨髄細胞) (一群雌雄 5 匹)	1,500 mg/kg 体重 (1 回腹腔内投与)	陰性
	³² P-ポストラベリングアッセイ	Wistar ラット (膀胱上皮) (一群雌 6 匹)	2,500、5,000 mg/kg 体重 (1 回経口投与)	陰性

フェントラザミドの代謝物 VI 及び X II の細菌を用いた DNA 修復試験、II、IV、VI、VII、X I、X II 及び分解物 X X III の細菌を用いた復帰突然変異試験、VI を用いた染色体異常試験及び前進突然変異試験が実施された。

試験結果は表 38 に示されているとおり、すべて陰性であった。(参照 51~61)

表 38 遺伝毒性試験概要 (代謝物)

被験物質	試験	対象	処理濃度・投与量	結果
代謝物 II	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98、TA100、TA102、TA1535、TA1537 株)	75~4,800 µg/7 ⁺ 1レト (+/-S9)	陰性
代謝物 IV	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) <i>E. coli</i> (WP2 <i>uvrA</i> 株)	156~5,000 µg/7 ⁺ 1レト (+/-S9)	陰性
代謝物	DNA 修復試験	<i>B. subtilis</i> (H17、M45 株)	63~2,000 µg/7 ⁺ 1株 (+/-S9)	陰性

VI	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100, TA1535, TA1537 株) <i>E. coli</i> (WP2 <i>uvrA</i> 株)	313~5,000 $\mu\text{g}/\text{l}^{\circ}$ レト (+/-S9)	陰性
	染色体異常試験	チャイニーズハムスター由来 V79 培養細胞	2,040~4,590 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (+/-S9)	陰性
	前進突然変異試験	チャイニーズハムスター由来 V79 培養細胞	125~4,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (+/-S9)	陰性
代謝物 VII	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100, TA1535, TA1537 株) <i>E. coli</i> (WP2 <i>uvrA</i> 株)	313~5,000 $\mu\text{g}/\text{l}^{\circ}$ レト (+/-S9)	陰性
代謝物 XI	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100, TA1535, TA1537 株) <i>E. coli</i> (WP2 <i>uvrA</i> 株)	156~5,000 $\mu\text{g}/\text{l}^{\circ}$ レト (-S9) 78~2,500 $\mu\text{g}/\text{l}^{\circ}$ レト (+S9)	陰性
代謝物 XII	DNA 修復試験	<i>B. subtilis</i> (H17, M45 株)	63~1,000 $\mu\text{g}/\text{l}^{\circ}$ イソ (+/-S9)	陰性
	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100, TA1535, TA1537 株) <i>E. coli</i> (WP2 <i>uvrA</i> 株)	313~5,000 $\mu\text{g}/\text{l}^{\circ}$ レト (+/-S9)	陰性
分解物 XXIII	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100, TA1535, TA1537 株) <i>E. coli</i> (WP2 <i>uvrA</i> 株)	156~5,000 $\mu\text{g}/\text{l}^{\circ}$ レト (+/-S9)	陰性

1.4. その他の試験

(1) 赤血球におけるフェントラザミド及び代謝物の分析 (ラット)

[phe-¹⁴C]フェントラザミドを用いた体内分布試験[1. (1)④]において、血漿中に比べて赤血球中で高い放射能分布が認められており、ラットの垂急性[10. (1)]及び慢性毒性/発がん性併合試験[11. (2)]でみられた赤血球関連項目の変動への関与が疑われた。赤血球中の放射能残留性と、血液に対する影響との関連について考察する目的で、Wistar ラット (一群雄 4 匹) に[phe-¹⁴C]フェントラザミドを 75 mg/kg 体重で単回経口投与し、1 時間後の赤血球におけるフェントラザミド、II、XI、XIV 及び XII の残留濃度について検討された。

投与 1 時間後の赤血球からフェントラザミドが 0.026 $\mu\text{g}/\text{g}$ 検出された。これはいずれの代謝物よりも低濃度であった。

代謝物 II は 3.37 $\mu\text{g}/\text{g}$ 検出され、分析した化合物の中で最も高い濃度を示した。ラット体内における消長及び動態試験[1. (3)]において、II は X とともに血漿中の主要代謝物であることが認められているが、赤血球においても同様の分布を示したものと推察された。したがって、動物体内運命試験でみられた血球中での高い放射能分布は、主に II 及び X (II のグルクロン酸抱合体) が関与していたものと考えられた。

一方、シクロヘキシル環を有する代謝物については、XIV が最も高く、0.83 $\mu\text{g}/\text{g}$

を示した。次いでXIIが0.14 µg/g、XIが0.032 µg/g 検出された。この分布パターンは、ラット体内における消長及び動態試験[1. (3)]における血漿中の代謝物分布と同様であった。またIIより低レベルでの分布であった。

以上のように、フェントラザミドを経口投与後のラット赤血球からは、血漿と同様に、主な代謝物としてII、このほか量的には少ないがXIV、XII及びXIが検出された。(参照 62)

(2) 代謝物VIの血漿中動態及び排泄試験 (ラット)

Wistar ラット (一群雌雄各 1~3 匹) に、代謝物VIを 0 及び 2,000 mg/kg 体重で単回強制経口投与し、血漿中動態、尿及び糞への排泄試験が実施された。

経口投与後の吸収は速やかであり、血漿中濃度は投与 30 分後に最高 (雄: 230 µg/mL、雌: 197 µg/mL) となり、その後減少した。

主要排泄経路は尿中であり、投与後 72 時間の尿中に、雄で 41.6% TAR、雌で 38.3% TAR が排泄された。IVは未変化のまま、速やかに排泄され、尿中排泄の約 80%が投与後 24 時間に排泄された。糞の分析は、技術的な問題により雄 1 例のみで実施されたが、糞中排泄量は 4.5% TAR と少なかった。(参照 63)

(3) 神経病変についての解明試験 (ラット)

フェントラザミドの亜急性及び慢性毒性試験[10. 及び 11.]において、本剤は ChE 活性阻害作用を持つことが示されており、また、ラットを用いた 2 年間慢性毒性/発がん性試験[11. (2)]の最高用量群 (雄: 3,000 ppm、雌: 4,000 ppm) において、最終と殺動物で坐骨神経に変性髄鞘病変の増加が観察された。しかし、神経病変がみられた動物の臨床観察では、行動等に異常は認められなかった。

この所見及び本剤の ChE 活性阻害作用を考慮して、NTE 活性阻害性ととともに、ラットでの神経病変とある種の有機リン剤誘発遅発性神経障害 (OPIDN) との類似性について検証する目的で、以下の①~③の試験が実施された。

① NTE 活性阻害能力及びその機序 (*in vitro*)

ChE 活性阻害作用を持つ有機リン剤のうち、ある種のものは、急性中毒後に生存した場合 OPIDN を誘発することがあり、有機リン剤による OPIDN 誘発性は神経組織の NTE 活性の強い阻害 (>70~80%) に相関している。

したがって、フェントラザミドが NTE 活性も同様に阻害するかどうか、また本剤のラットへの慢性投与による髄鞘の変性が OPIDN に類似した変化であるかどうかを検査するため、ニワトリ及びラットの脳 10% ホモジネート液 (脳 1 g / 9 mL 50 mM tris、0.2 mM EDTA、pH 8.0) の 50 倍 (脳 4.0 mg/mL) または 25 倍 (脳 2.0 mg/mL) 希釈液を用いて、以下の試験が実施された。

a) NTE 活性の測定

フェントラザミド及び陽性対照物質（ジクロロボス及びラセミ体のメタミドホス）を処理して、ニワトリ及びラットの脳 NTE 活性を測定し、その阻害程度について検討された。

フェントラザミドで濃度依存的な NTE 活性阻害が認められた。阻害の程度は、ジクロロボスより軽度であったが、メタミドホスより強かった。また、ジクロロボスとメタミドホスはラット及びニワトリの脳 NTE 活性を同等に阻害したが、フェントラザミドはニワトリの脳 NTE 活性よりもラットの脳 NTE 活性を強く阻害した。

また、プレインキュベーション時間を通常の 20 分から 2 時間 20 分に延長して同様に実施された結果、ニワトリ及びラットの脳 NTE 活性阻害の程度は、フェントラザミド及びメタミドホスで増加し、ともに NTE 活性の進行的な阻害が示唆された。

b) 反応基質の濃度による影響

基質の吉草酸フェニルの濃度のみを変え（0.27、0.55 及び 1.37 mM）、通常条件下で試験を実施し、基質濃度とフェントラザミドによるラットの脳 NTE 活性阻害との関係について検討された。

フェントラザミドによるラットの脳 NTE 活性阻害の程度は基質濃度に反比例したが、メタミドホスによる阻害は基質濃度に影響されなかった。さらに、Lineweaver-Burk 法による解析では、フェントラザミドによる NTE 活性の競合的な阻害が強く示唆された。一方、メタミドホスでは非競合的な阻害が示され、触媒中心部の速やかなリン酸化が示唆された。

インキュベーション時間が 2 時間 20 分に延長された場合には、フェントラザミドにおいても基質濃度に関係なく同程度にラットの脳 NTE 活性を阻害し、競合的な阻害が非競合的な阻害へ変化したことが示唆された。これにより、フェントラザミドが NTE を共有結合的に修飾して、持続的に酵素を阻害していることが考えられた。

c) 阻害されたラット脳 NTE 活性の賦活化

フェントラザミド及びメタミドホスにより阻害されたラットの脳 NTE 活性の賦活化について検討された。

ラット脳ホモジネート液にフェントラザミドまたはメタミドホスを加え、37°C で 30 分間インキュベーションして NTE 活性を阻害した後、フッ化カリウムを加えて同条件でインキュベーションし、賦活化処理された。

フェントラザミドによる NTE 活性阻害は、フッ化カリウム処理によって全く賦活化されなかった。一方、メタミドホスによって阻害された NTE 活性は、フッ化カリウム処理によってほぼ完全に賦活化された。したがって、フェントラザ

ミドが NTE と共有的に結合しているものと推察された。

また、ラット脳ホモジネート液に、メタミドホスを加えて 37°C で 30 分間インキュベートして NTE 活性を阻害後、さらにフェントラザミドを加えて同条件でインキュベートした試料についても、フッ化カリウムを加えて同様に賦活化処理された。

メタミドホスの単独処理によって、NTE 活性の十分な阻害が認められた。メタミドホス処理後にフェントラザミド処理した結果、さらに NTE 活性阻害のわずかな増加が認められた。また、フェントラザミドの単独処理では、メタミドホスとフェントラザミドの併用処理により得られたものと同程度で NTE 活性を阻害した。

賦活化処理については、メタミドホスとフェントラザミドの併合処理により NTE 活性を阻害した場合、メタミドホスの単独処理と同様に十分に賦活できたが、その一部は非賦活的であった。加えて、フェントラザミド単独処理による NTE 活性阻害は全く賦活化されなかったことから、フェントラザミドはメタミドホスと同じく NTE の触媒中心部と結合すると考えられた。

d) まとめ

フェントラザミドは、初めから賦活できないような形で NTE 活性を阻害することが示唆され、既知の NTE 阻害剤（特に有機リン剤）と構造的に異なっていることから、遅発性神経障害誘発性の結論は *in vitro* の本試験のデータのみでは得られなかった。フェントラザミドによる *in vitro* の NTE 活性阻害が遅発性神経障害の誘発性を示唆しているかどうかを判断するためには、*in vivo* でのさらなる検証が必要と考えられた。（参照 64）

② 2 週間混餌投与による発生機序解明試験

本試験は、フェントラザミド及び主要代謝物である II の血漿中濃度を評価することに加えて、脳、脊髄及び坐骨神経 NTE 活性と脳 AChE 活性を測定し、ラットでみられた髄鞘変性の病態を明らかにする目的で実施された。また、尿検査を実施し、同じく慢性毒性試験でみられた膀胱病変の発生機序の解明についても検討された。

Wistar ラット（一群雌雄各 5 匹）にフェントラザミドを 2 週間混餌投与（原体：0、50、200、1,000 及び 4,000 ppm：平均検体摂取量は表 39 参照）し、試験終了時における血漿中のフェントラザミド及び II の濃度、脳、脊髄及び坐骨神経 NTE 活性及び脳 AChE 活性の測定、投与 1 週間後における尿の Na⁺、pH 及び尿量が測定された。なお、陽性対照群にはリン酸トリ- σ クレジル (TOCP) を 500 mg/kg 体重で 1 回強制経口投与し、NTE 活性の測定のみ実施された。

表 39 2 週間混餌投与による発生機序解明特殊試験（ラット）の平均検体摂取量

投与群 (ppm)		50	200	1,000	4,000
平均検体摂取量 (mg/kg体重/日)	雄	3.5	14.4	74.0	366
	雌	4.1	15.5	88.5	405

すべての群において、死亡、検体投与に起因する行動、外観及び体重の変化は観察されなかった。4,000 ppm 投与群では摂餌量が増加した（雄で 28%、雌で 24%）。

フェントラザミドの血漿中濃度は、4,000 ppm 投与群では極めて低く、雄で 0.52 μM 、雌で 1.10 μM と定量限界（1 μM ）付近であり、その他の群では検出限界（0.5 μM ）未満であった。II の濃度は、200 ppm 以上投与群で用量相関的に増加し、4,000 ppm 投与群の雄では 9.8 μM 、雌では 13.9 μM であった。したがって、フェントラザミドは初回通過効果により代謝されることが示唆された。

NTE 活性について、陽性対照群では、投与 1 日後には試験した神経組織のすべてで強い NTE 活性阻害（脳及び脊髄：約 90%、坐骨神経：77%阻害）がみられた。一方、検体投与群では、4,000 ppm 投与群の雄では脳のみ、雌ではすべての神経組織で統計的に有意な阻害（13~29%阻害）が認められたが、有機リン酸エステルでみられるような、神経毒性に関連する程度ではなく、生物学的に有意な阻害ではなかった。他の群の NTE 活性阻害もわずかであり、用量相関性もなく、雌雄いずれかのみの変化であったことから、検体によるものとは考えられなかった。

脳 AChE は、4,000 ppm 投与群の雌でのみ有意な阻害（47%阻害）が認められ、本試験においても、脳は慢性毒性試験と同等な影響を受けたものと考えられた。

なお、投与開始 1 週間後の尿（16 時間採取）を用いた尿検査では、全投与群で Na^+ 、pH 及び尿量のいずれも統計的に有意な変化は認められず、これらと慢性毒性試験でみられた膀胱病変との関連は否定できると判断された。

in vivo の本試験では、①の *in vitro* の試験で認められたような強い NTE 活性阻害は認められなかった。さらに、ニワトリを用いた急性及び 28 日間亜急性遅発性神経毒性試験 [8. (4) 及び 10. (5)] においても、遅発性神経毒性を示唆する所見は認められていないことから、ラットでみられた髄鞘変性の増加は、有機リン酸エステルに起因する神経病変とは異なる作用機序によるものと推察された。
(参照 65)

③ 神経細胞に対する影響 (*in vitro*)

ラットで認められた神経障害について、分子レベルでの研究を参考にし、神経細胞内のエネルギー代謝、神経細胞骨格（神経フィラメント）への影響について検討するため *in vitro* での試験が実施された。さらに、非神経細胞や既知の神経毒性物質も併用し、神経系への影響の機序について検討された。

a) 初代培養神経細胞への影響

神経細胞への影響の指標として、細胞毒性（細胞への Calcein 色素の取込みに伴う蛍光の測定による細胞生存率で判定）、エネルギー代謝（細胞内でのグルコース消費と細胞内 ATP の測定、ローダミン 123 色素の取込みに伴う蛍光の測定によるミトコンドリア内膜電位の測定）及び神経フィラメント（マウス抗体及び抗マウス抗体で処理後に細胞フィラメントに付着した抗体を測定）について検討された。

ラット胎児由来の神経初代培養細胞に、フェントラザミドを 0.1、1、5、10 及び 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ （調製可能最大濃度）の処理濃度で添加し、14 日間（うち 7 日間は回復期間）インキュベートされた。各測定は、処理 3 または 7 日後及び試験終了時に実施された。

フェントラザミドは、細胞エネルギーの項目であるグルコース消費、ATP 量及びミトコンドリア活性を著しく減少させた。細胞骨格（神経フィラメント）には、遅延的に試験終了時にわずかに影響がみられた。ATP は最も感受性の高いパラメータであり、50%阻害濃度（ IC_{50} ）は 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。細胞毒性にはあまり強い作用はみられなかった。

これらの結果から、フェントラザミドの作用による ATP 量減少による遅延的な神経フィラメントへの影響が考えられたため、培養液にピルビン酸を添加し、前述と同じ試験系で試験が実施された。その結果、いずれの測定項目にも著明な作用はみられなかったことから、フェントラザミドによるエネルギー項目への影響は、解糖系の代謝物（ピルビン酸）により改善されたものと考えられた。

b) 6 種の継代培養細胞株への影響

a) と同様の試験系において、初代培養細胞の代わりにマウスの N-18 細胞（神経芽細胞腫）株、ラット腎臓 NRK52e 細胞株、ラット骨格筋 L6 細胞株、ラット心筋 H9C2 細胞株、マウス肝臓 Hepa 1-6 細胞株及びマウス線維芽細胞 3T3 細胞株を用いた試験が実施された。

フェントラザミドは、神経芽細胞腫由来の N-18 株のみに初代継代培養神経細胞と同様な作用を示したが、その程度は弱いものであった。その他の非神経系細胞株には、検体の作用は認められなかった。

a) 及び b) の結果から、フェントラザミドの細胞エネルギー系への作用は神経細胞に限定されるものと考えられた。

c) 各種神経毒性物質の初代培養神経細胞への影響

末梢神経障害を誘発することが知られている 7 種の化合物（名称、標的部位及び症状は表 40 参照、処理濃度：0.1、1、5、10 及び 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を用いて、a) 及び b) と同様の条件下で初代培養神経細胞への影響を調べ、フェントラザミドでの結果と比較し、作用機序について検討された。

表 40 試験に用いた末梢神経障害誘発性化合物

化合物	標的部位	症状
2,5-ヘキサンジオン	細胞骨格、解糖系	遠位軸索障害
アクリルアミド	細胞骨格、解糖系、ATP枯渇	遠位軸索障害
パラコート	レドックス循環	振戦麻痺、神経節変性
青酸カリウム	チトクローム C 酸化酵素	遅発性振戦麻痺
ミパホックス	細胞骨格、NTE、AChE	遅発神経毒性
TOCP	細胞骨格、NTE、AChE	遅発神経毒性
パラオキシソン	AChE	コリン作動性症状

2,5-ヘキサンジオン及びアクリルアミドは、細胞骨格に直接作用することが特徴であるが、同時に細胞エネルギー供給に対する作用も示した。パラコート及び青酸カリウムは、ミトコンドリアや細胞エネルギー供給に対する強い作用を示したが、ピルビン酸添加条件では明らかな改善はみられなかった。遅発性神経毒性有機リン酸エステルであるミパホックス及び TOCP は、細胞骨格に直接及び選択的な作用を示した。これとは対照的に、パラオキシソンではいずれの項目にも影響を及ぼさなかった。

したがって、フェントラザミドのラット神経細胞に対する作用は、細胞エネルギー供給に関わっているという点ではパラコートや青酸カリウムと概ね同じであったが、ピルビン酸添加により改善される点、ならびに作用発現が青酸カリウムに比べ比較的遅発性である点から、作用機序はこれらの物質とは異なったものであることが推察された。

d) 呼吸鎖及びミトコンドリアの機能に対する作用

a) の試験結果から、フェントラザミドはまず神経細胞でのグルコース利用を阻害することが示された。神経細胞内の ATP のエネルギー源はグルコースのみであり、グルコースの利用段階としては、神経細胞内へのグルコースの取込み、解糖系、クエン酸サイクル及び呼吸鎖が考えられる。これらのどの段階での作用が重要であるかを検討するため、ラット肝臓のミトコンドリアを用い、フェントラザミド、2,5-ヘキサンジオン、アクリルアミド、パラコート及び青酸カリウムがグルタミン酸/リンゴ酸誘起呼吸及びコハク酸誘起呼吸時に、ミトコンドリア呼吸とそれに続く ATP 産生を直接阻害するかどうかを検討した。

脱共役活性はいずれの化合物においても認められなかった。

青酸カリウムは、グルタミン酸/リンゴ酸誘起呼吸及びコハク酸誘起呼吸を用量相関的に阻害した。青酸カリウムはチトクローム C オキシダーゼ阻害剤であることから、これは予想される反応であった。フェントラザミドでは、グルタミン/リンゴ酸誘起呼吸をわずかに阻害した。このときの 50%効果濃度 (EC₅₀) は 100 µg/mL 超であり、ミトコンドリア膜活性 (ローダミン) への影響の濃度 (EC₅₀ 値 : 9 µg/mL) と比較すると高値であった。したがって、フェントラザミドのミ

トコンドリアに対する作用は、神経細胞へのエネルギー供給不全が主な理由ではないことが示唆された。

e) グルコース利用の中間代謝物への作用

d)に関連して、グルコースの取込みや利用への影響を検討するため、継代神経芽細胞株(神経芽細胞腫株)にフェントラザミドを処理し、処理3及び7日後のグルコースの取込量、細胞内グルコース、ピルビン酸及び乳酸濃度が測定された。

グルコース消費(細胞外グルコース量)は、処理7日後に用量相関的に顕著に減少したが、細胞内のグルコース濃度は逆に増加しており、フェントラザミドが細胞内へのグルコースの取込みに関与していないこと、またグルコースの利用が減少したことが示唆された。

ピルビン酸(解糖系の代謝物)及び乳酸(嫌気的条件下でピルビン酸から生成)の細胞内における測定では、いずれも用量相関的な減少が認められた。フェントラザミドは極めて低濃度で作用し、ATP濃度の抑制を示す濃度よりも明らかに低い濃度で作用した。

これらの結果により、フェントラザミドはピルビン酸と乳酸を同時に減少させるが、これは乳酸濃度を増加させるべき嫌气的解糖系への移行というよりは、むしろ好气的解糖系におけるピルビン酸産生を抑制することが示唆された。また、ピルビン酸のクエン酸回路及び呼吸鎖を経由しての代謝は影響されず、ピルビン酸が徐々に欠乏していくことにより、呼吸鎖に対する基質の供給も減少し、ミトコンドリア膜の機能とATP産生能が低下すると考えられた。

f) 神経細胞への作用の濃度

a)の結果から、初代培養神経細胞でフェントラザミドに対して最も感受性の高い項目はATPの減少であり、0.1 µg/mLという低濃度で影響を受けた。しかし、細胞培養液中の培地成分に検体が結合することが懸念されたことから、培養液中の蛋白と検体の結合を明らかにするため、培養液中の遊離(非結合)検体濃度を限外濾過法により測定された。

フェントラザミドは、細胞培養に使用した培養液成分に約50%結合していた。したがって、*in vitro*における遊離の検体濃度は、最も感受性のATPに対しては、約0.05 µg/mLであったと推定された。

g) まとめ

a)~f)の結果から、*in vivo*における神経細胞のエネルギー需給状態に対するフェントラザミドの作用は、*in vivo*で細胞に到達した量が非常に少ないことを考慮すれば、非常に弱くかつ選択的なものであったことが予測された。ラットの慢性毒性/発がん性併合試験において、髄鞘変性は対照群での老齢のラットにも観察されたが、エイジングによるミトコンドリア機能の低下と、それによっておこ

るエネルギー供給の減少ならびに酸化的ストレスの増加等が、加齢ラットでの髄鞘変性に関与するという報告がある。また、高用量群で観察された髄鞘変性と老齢ラットで観察された自然発生的な病変との間には、病理組織学的差異は認められなかった。したがって、投与群における髄鞘変性の発生頻度及び程度の増加は、加齢の因子に加えて、検体の神経細胞に対する細胞エネルギー供給の減少により、運動神経細胞の老化が促進されたものと考えられた。

ラットを用いた作用機序解明試験[14. (3)]で示されたように、フェントラザミド 4,000 ppm 投与群雌の血漿中濃度は、最高でも 1 nM と考えられ、これは約 0.4 µg/mL と推定される。さらに、蛋白非結合の遊離検体のみが血液脳関門を通過して神経細胞に作用するものと仮定した場合、血中濃度の約 22% が有効濃度と考えられ、この量は、雌ラットの場合 0.09 µg/mL と考えられる。同様に、雄ラット (慢性毒性/発がん性併合試験) の 3,000 ppm 投与群は 0.03 µg/mL と推定される。これらの量は、本試験の *in vitro* 条件における ATP に作用する最低濃度 0.05 µg/mL と極めて類似し、慢性毒性/発がん性併合試験でみられた髄鞘病変が検体の ATP に対する作用に相関していることが推察された。

ラットにおける本検体の神経に対する作用について、高用量の慢性投与及び老化を考慮すると、作物残留による微量な暴露が想定されるヒトではその危険性が大きくないものと考えられた。(参照 66)

(4) ChE 活性に及ぼす影響 (ラット)

フェントラザミドの ChE 活性に及ぼす影響を調べるとともに、代謝物に ChE 活性阻害作用があるかどうかを調べるため、以下の①～④の試験が実施された。

① 単回経口投与による ChE 活性への影響 (*in vivo*)

SD ラット (一群雄各 4 匹) にフェントラザミドを単回強制経口投与 (0, 1,000 及び 5,000 mg/kg 体重、2% クレモホア EL 含有蒸留水に懸濁) し、*in vivo* における血漿、赤血球及び脳 ChE 活性への影響について検討された。

5,000 mg/kg 体重投与群において、血漿 ChE 活性は投与 2 日後に対照群と比べて 50% の阻害を示したが、投与 3 日後には回復傾向を示し、投与 7 日後には回復した。赤血球 ChE 活性は投与 1 日後に 31% の阻害、投与 2 日後に最大の 43% 阻害がみられた。投与 7 日後にはやや回復を示したが、27% の阻害を示した。脳 ChE 活性は、投与 3 日後に最大の 37% 阻害がみられた。回復は遅く、投与 7 日後で 31%、投与 14 日後にようやく 15% 阻害にまで戻っていた。なお、投与後 14 日間の観察中、ラットに外観の変化及び中毒症状は全く認められなかった。

1,000 mg/kg 体重投与群では、血漿 ChE 活性は投与 1 日後に 22%、血球 ChE 活性は投与 3 日後に 33%、脳 ChE で投与 2 日後に 21% の阻害を示し、最大の活性低下がみられた。いずれも、投与 7 日後にはほぼ回復した。

② フェントラザミド存在下の血球及び脳 ChE 活性 (*in vitro*)

SD ラット (雄 3 匹) の血漿、赤血球及び脳の 5% ホモジネート液に、DMSO に溶解したフェントラザミドを含むリン酸緩衝液 (最終濃度 10^{-6} ~ 10^{-3} M) を加え、一定時間経過後 (暴露 5 分、30 分、1 時間及び 3 時間) の ChE 活性を測定し、*in vitro* における ChE 活性への影響について検討された。なお、陽性対照化合物として、パラオキソン (有機リン化合物) 及びプロポキスル (カーバメイト化合物) が用いられた。

血漿、赤血球及び脳のいずれも、フェントラザミドの暴露時間が長くなるにつれて阻害の程度が高くなるだけでなく、低濃度でも ChE 活性阻害が生じる傾向がみられた。

血漿では、 10^{-4} 及び 10^{-3} M では暴露 5 分、 10^{-5} M では暴露 3 時間で 20% 以上の活性阻害がみられた。赤血球では、 10^{-4} M では暴露 5 分、 10^{-3} M では暴露 30 分、 10^{-5} M では暴露 1 時間で 20% 以上の活性阻害がみられた。脳においても、 10^{-3} M では暴露 5 分、 10^{-4} M では暴露 30 分、 10^{-5} M では暴露 1 時間で 20% 以上の活性阻害がみられた。 10^{-3} M では、いずれの測定時においても 20% 以上の活性阻害はみられなかった。一方、陽性対照のパラオキソン (10^{-7} M) 及びプロポキスル (10^{-5} M) では、血漿、血球及び脳 ChE 活性の明らかな阻害が認められ、その発現もフェントラザミドに比べはるかに早かった。

③ 代謝物存在下の血清及び脳 ChE 活性 (*in vitro*)

SD ラット (雄 1 匹) の血清及び脳 5% ホモジネート液に、フェントラザミド、代謝物 II、X I、X II 及び X IV (いずれも最終濃度 10^{-6} ~ 10^{-3} M) を加え、血清及び脳 ChE 活性を②と同様の手順で測定し、*in vitro* における ChE 活性への影響について検討された。

フェントラザミドでは、血清及び脳 ChE とともに、 10^{-5} M まで 20% 以上の活性阻害がみられたが、II、X II 及び X IV では 10^{-3} M でも阻害作用はみられなかった。X I では、 10^{-3} M でのみ 20~40% の ChE 活性阻害が血清及び脳にみられたが、 10^{-4} M 以下の濃度ではほとんど影響はみられなかった。

④ 代謝物存在下の赤血球 ChE 活性 (*in vitro*)

③の試験では、赤血球 ChE 活性に対する影響を調べられていないことから、本試験は、*in vitro* 条件下における代謝物の赤血球 ChE 活性に対する影響を調べるとともに、フェントラザミドによる作用も再度確認する目的で実施された。

SD ラット (雄 2 匹) から採取した赤血球を、DMSO に溶解したフェントラザミド及び代謝物 II、X I、X II 及び X IV を含むリン酸緩衝液 (いずれも最終濃度 10^{-6} ~ 10^{-3} M) に加え、②及び③と同様の手順で測定し、*in vitro* における赤血球 ChE 活性への影響について検討された。

フェントラザミドでは、 10^{-5} M まで 20% 以上の活性阻害がみられ、阻害の時

間的傾向及び程度は、②の結果とほぼ同じであった。

代謝物 II、X II 及び X IV では、阻害作用はみられなかった。X I では、 10^{-3} M で極めて弱い ChE 活性阻害が暴露 3 時間後にみられたが、 10^{-4} M ではほとんど影響がみられなかった。

⑤ まとめ

in vivo の試験結果から、フェントラザミドは ChE 活性を緩やかに阻害し、かつその回復が遅いことが示唆された。しかし、明らかな ChE 活性阻害がみられた用量においても、外観の変化及び中毒症状は全く認められず、これはウサギを用いた一般薬理試験でも同様であった。さらに、ウサギの発生毒性試験 [12. (3)] 及びラットの慢性毒性/発がん性併合試験 [11. (2)] においても血漿及び赤血球 ChE 活性阻害が認められているが、これらや本試験を含む大多数の試験においても脳 ChE の残存活性が 50% 以上保たれていることから、結果として中毒症状があらわれなかったものと考えられた。

また、代謝物 X I でも ChE 活性阻害作用がみられたが、用量的に見て、その作用はフェントラザミドより弱いものであった。したがって、*in vivo* の試験でみられた ChE 活性の低下は、フェントラザミドそのものによるものと示唆され、フェントラザミドの動物代謝物は親化合物よりも強い ChE 活性阻害作用を示さないと考えられた。(参照 67)

(5) 甲状腺に及ぼす影響 (*in vitro*)

ラットを用いた 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験 [11. (2)] の最高用量群において、甲状腺ろ胞のコロイド内鉍質沈着 (雌雄)、過形成及び腺腫 (雄) の増加が認められた。この機構は、先の試験 [14. (3)] でみられたウリジンニリン酸グルクロニルトランスフェラーゼ (UDPGT) の明らかな誘導から、甲状腺ホルモンの代謝的な分解の増加による二次的作用であると推察されたが、甲状腺ペルオキシダーゼ (TPO) への直接的阻害作用の可能性についても検討する目的で、ブタ甲状腺の可溶化したマイクロゾームを用い、TPO に触媒されるグアヤコール酸化及びヨウ素生成が測定された。

① グアヤコール酸化の測定

グアヤコール (5 mM)、TPO (No. 109、0.1 グアヤコール単位) 及びフェントラザミド (DMSO に溶解) を 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (総容量; 1 mL, pH 7.4) に加え、1 分間室温でプレインキュベーションの後、過酸化水素 (200 μ M) を添加して反応を開始した。なお、陽性対照にはアミトロールが用いられた。

陽性対照では、アミトロールにより、TPO 触媒のモデル物質であるグアヤコールの酸化が強く、かつ濃度に関連して阻害された。フェントラザミドの調製可能最高濃度である 100 μ M では、阻害は認められず、また 30 及び 100 μ M では

グアヤコール酸化が促進された。

② ヨウ素生成の測定

インキュベーションは①と同様とし、グアヤコールをヨウ化カリウム(10 mM)に置き換え、過酸化水素の濃度を 150 μ M として実施された。

陽性対照のアミトロールは、ヨウ化物から TPO によって触媒されるヨウ素生成の初期速度を効率的に、かつ濃度依存性に阻害した。一方、フェントラザミドの 25 μ M では影響なく、検体に沈殿が認められた 50 及び 100 μ M でもヨウ素生成に影響を及ぼさなかった。

したがって、フェントラザミドが酵素そのものを阻害することもなく、また TPO により生成したヨウ素化物質をトラップしないことが示唆された。

③ まとめ

フェントラザミドによる TPO の直接的阻害作用は認められなかったことから、ラットで認められた甲状腺の前腫瘍性変化及び腫瘍性変化は、肝臓における酵素誘導及び抱合化の増加に伴う甲状腺ホルモンの代謝的分解の増加により、二次的に生じた甲状腺への持続的な刺激によるものと考えられた。(参照 68)

(6) 膀胱上皮過形成及び腫瘍についての解明試験(ラット)

ラットを用いた 90 日間亜急性毒性試験[10. (1)]の高用量群(雄雌:6,400 ppm)において膀胱上皮の過形成が認められ、さらに 2 年間慢性毒性/発がん性併合試験[11. (2)]の高用量群(雄:3,000 ppm、雌:4,000 ppm)及び中用量群(雄:1,000 ppm)では、膀胱上皮過形成の増加とともに 4,000 ppm 群の雌で低頻度ではあるが膀胱腫瘍が観察された。これらの発生機序を解明するため、以下の①~③の試験が実施された。

① 中期発がん性試験

フェントラザミドの膀胱に対する発がんプロモーション作用の有無を調べる目的で、Fischer ラット(一群雄 10~20 匹)を用いた中期発がん性試験(試験期間:イニシエーション 4 週間、プロモーション 32 週間の合計 36 週間)が実施された。

なお、イニシエーション処置には、*N*-ブチル-*N*-(4-ヒドロキシブチル)ニトロソアミン(BBN)を 0.05%の濃度で飲料水により投与(BBN 摂取量は 52.7~55.0 mg/kg 体重/日)、陽性対照群には L-アスコルビン酸ナトリウムを 50,000 ppm の濃度で混餌投与された。試験群構成は表 41 に示されている。

表 41 中期発がん性試験（ラット）の試験群構成

BBN	動物数	32 週間投与化合物	上段：投与量 (ppm)
			下段：平均検体摂取量 (mg/kg 体重/日)
処置	各 20	フェントラザミド	0 (対照群)、20、50、200、3,000 0、0.93、2.28、9.21、174
	20	L-アスコルビン酸 ナトリウム	50,000 2,450
無処置	各 10	フェントラザミド	0 (対照群)、3,000 0、162

投与 134 日に BBN 処置対照群の 1 例が死亡した。剖検所見から、F344 ラットに自然発生する LGL 白血病と考えられたが、本腫瘍発生は BBN イニシエーション処置とは関係しないと考えられた。

BBN 処置の有無を問わず、フェントラザミド 3,000 ppm 投与群において給餌器からの餌の掻き出し及び体重増加抑制が認められた。体重増加抑制は陽性対照群でも認められた。餌の掻き出しは検体に対するラットの忌避が原因と考えられたが、投与開始 23 週以後は全く観察されなかった。

BBN 処置群では、3,000 ppm 投与群及び陽性対照群において、肉眼的な膀胱の単発性ないし多発性の隆起及び結節性病変の発生頻度が統計学的に有意に増加し、膀胱絶対・比重量増加も認められた。さらに、病理組織学的検査では、膀胱上皮の乳頭状ないし結節状過形成、乳頭腫及び移行上皮癌の発生頻度、基底膜 10 cm あたりの膀胱病変の個数についても統計学的有意な増加を示した。

一方、BBN 無処置群では、膀胱の肉眼的病変及び膀胱重量への影響は認められなかったが、3,000 ppm 投与群の全例に単純性過形成が認められ、BBN 無処置対照群と比較して明らかに発生頻度が増加した。

本試験において、フェントラザミドの 3,000 ppm 投与群で膀胱発がんプロモーション作用が確認された。したがって、プロモーション作用に対する無毒性量は 200 ppm (9.21 mg/kg 体重/日) であると考えられた。(参照 69)

② 初期膀胱病変及び膀胱上皮細胞増殖活性の検索試験

①の中期発がん性試験では、3,000 ppm 投与群で膀胱発がんプロモーション作用が認められた。したがって、検体投与の初期段階における膀胱の病理組織学的変化、ならびにプロモーション作用と関連性が深いとされる細胞増殖活性を、5-ブromo-2'-デオキシウリジン (BrdU) の細胞核内への取り込みにより検討するため、Fischer ラット (一群雄 12 匹) にフェントラザミドを 0、50 及び 3,000 ppm で 3 または 7 日間混餌投与する試験が実施された。

3,000 ppm 投与群では、3 日間投与により軽度の体重増加抑制 (有意差なし) 及び BrdU 標識率の増加傾向 (対照群の 4.4 倍、有意差なし) が認められた。7 日間投与では、統計学的に有意な体重増加抑制、膀胱絶対及び比重量低下ならび

に BrdU 標識率の増加 (対照群の 5.7 倍) が認められた。膀胱の肉眼所見及び病理組織学的所見はいずれの投与期間でも認められなかった。

一方、プロモーション作用が認められなかった 50 ppm 投与群では、これらの作用は全く観察されなかった。このことから、プロモーション作用の発現と細胞増殖活性の亢進とは密接に関連すると考えられた。(参照 70)

③ 亜急性毒性試験における代謝

膀胱毒性の発現機序と、長期間の高用量の投与により特異的な代謝物が生成したこととの関連を検証する目的で、亜急性毒性試験のラット (一群雌 3 匹) のうち、50 及び 6,400 ppm 投与群の 90 日間投与終了後に、[phe-¹⁴C]フェントラザミドまたは[cyc-¹⁴C]フェントラザミドを 1.5 mg/kg 体重で単回経口投与し、低用量投与による短期代謝試験との相異点について検討された。また、長期間投与の比較対照群として、50 及び 6,400 ppm の 3 日間投与群を設定した。

a) 血中濃度推移

[phe-¹⁴C]フェントラザミド投与群の T_{max} は 20~60 分、 C_{max} は 0.288~1.01 $\mu\text{g/g}$ であり、動物体内運命試験[1. (1)]の低用量群の結果と顕著な差はなかった。一方、[cyc-¹⁴C]フェントラザミド投与群の T_{max} は 40~90 分、 C_{max} は 0.221~0.498 $\mu\text{g/g}$ であり、 C_{max} はやや低い値を示したものの、同じく動物体内運命試験[1. (2)]の低用量群の結果と顕著な差はなかった。

前処理投与の投与量と投与期間の関係を比較すると、50 ppm の 3 日間投与群の血漿中濃度は、90 日間投与群と比較し試験期間を通じて概ね低い値であった。一方、6,400 ppm の比較では逆の現象が認められ、3 日間投与群の血漿中濃度は 90 日間投与群より高かった。

b) 排泄

主要排泄経路は尿中であり、動物体内運命試験[1. (1)及び(2)]と同様の傾向であった。50 ppm 投与群では、投与後 72 時間の尿中に 69.3~86.3% TAR、糞中に 12.3~21.5% TAR、6,400 ppm 投与群では尿中に 57.5~71.9% TAR、糞中に 24.1~38.4% TAR が排泄された。尿中排泄率を投与期間で比較すると、50 ppm では 90 日間投与群の方がやや低く、逆に 6,400 ppm では 90 日間投与群の方がやや高かった。また、[cyc-¹⁴C]フェントラザミド投与群は [phe-¹⁴C]フェントラザミド投与群よりも低い尿中排泄率であった。

体内への残留放射エネルギーは、[phe-¹⁴C]フェントラザミド投与群では 0.1~0.3% TAR と低かったが、[cyc-¹⁴C]フェントラザミド投与群では約 10 倍高かった。

c) 代謝物同定・定量

糞尿中の代謝物について分析された結果、[phe-¹⁴C]フェントラザミド投与群で

は、II及びXがそれぞれ回収放射能の17.9~39.4%及び31.5~51.0%認められた。Xの生成量は、3日間投与群よりも90日間投与群で多かった。6,400 ppmの3日間投与群では、II及びXはそれぞれ20.2及び31.5%と低く、未同定代謝物が38.3%と他の試験群より高かった。

[cyc-¹⁴C]フェントラザミド投与群における主要代謝物はX IIであり、回収放射能の27.5~37.0%を占めた。他に、XIV (9.5~14.1%)、X I (5.8~14.4%)、X X II (4.5~8.2%) 及びXIX (1.4~1.9%) が認められた。主要代謝物であるX IIは、6,400 ppm 投与群よりも50 ppm 投与群で多く認められ、一方、X X IIは6,400 ppm 投与群で多かった。この差は主に糞中で認められた。未同定代謝物は、50 ppm 投与群 (17.1~23.2%) より6,400 ppm 投与群 (30.8~32.4%) で多かった。

以上のように、両標識体とも、フェントラザミドの長期間高用量投与により特異的な代謝物が生成していることはなく、投与量に相関した代謝物それぞれの量的な変化のみが認められた。

これらの実験結果からでは、4,000 ppm 以上投与群で膀胱病変が発現し、50 ppm のような低濃度では膀胱病変が認められなかったことへの説明にはならないため、さらに、[cyc-¹⁴C]フェントラザミド投与群の尿中代謝物について検討された。

仮に、標識化合物の挙動が動物に混餌投与された検体の挙動に一致しているとの前提で、1日あたりの尿中代謝物の生成量 (mg/動物/日) を、投与放射能に対する尿中放射能排泄率、尿中代謝物の生成割合、1日の摂餌量 (20 g/動物/日)、飼料中の検体濃度から算出すると、50 及び6,400 ppm の90日間投与後での尿中代謝物の生成量の比較では、X IIで約95倍、X Iで約50倍、XIVで約65倍であった。これらの生成量の差が、高用量投与での膀胱病変の差になったのではないかと推測された。なお、X II、X I及びXIVはいずれもシクロヘキシルアミン類であり、このうち、X I及びXIVには、強い刺激性が報告されている。(参照71)

④ まとめ

①~③の結果に加え、遺伝毒性試験[13.]にあるように、本剤及び代謝物に遺伝毒性は認められなかったことから、膀胱腫瘍の発生機序は、X II、X I、XIV等のシクロヘキシルアミン類の膀胱上皮への持続的な刺激あるいは細胞毒性による壊死及び再生、さらに、細胞増殖活性の亢進を伴ったプロモーション作用が関連した結果生じるものと推察された。

(7) ラットの肝臓、胆汁及びChE活性への影響

Wistar ラット (一群雌雄各5匹) にフェントラザミドを0及び10,000 ppm で28日間混餌投与 (原体、検体摂取量は雄:0及び904 mg/kg 体重/日、雌:0

及び 1,360 mg/kg 体重/日) する試験が実施された。

本試験は、ラットを用いた 90 日間亜急性毒性試験[10. (1)]で肝機能に変化が認められ、さらに、同試験では脳 ChE 活性への影響が検索されていなかったことから、肝薬物代謝酵素活性のパターン、血漿、血球及び脳 ChE 活性について検査する目的で実施された。また、マウスを用いた 90 日間亜急性毒性試験[10. (2)]及び 2 年間発がん性試験[11. (3)]で胆汁黒色化及び胆嚢上皮過形成が認められたことから、胆汁中の有色素性内容物に重要な関わりを有する、肝及び胆汁中のプロトポルフィリンIXの予備的な検査も実施された。

検体投与群では、雌雄ともに体重増加抑制が認められたが、臨床症状は認められなかった。脳及び赤血球 ChE 活性阻害が認められ、阻害の程度は、脳では雄で 70%、雌で 20%、赤血球では雄で 82%、雌で 94%であった。さらに雌では、血漿 ChE 活性阻害も認められた (63%阻害)。

検体投与群では、肝薬物代謝酵素活性への影響が認められた。雄では、エトキシマリン *O*-デエチラーゼ (ECOD) は対照群に比べて 1.5 倍増加し、エトキシレゾルフィン *O*-デエチラーゼ (EROD) 及びアルドリンエポキシダーゼ (ALD) は最大 50%低下した (いずれも有意差なし)。一方、エポキシドヒドロラーゼ (EH) は 4 倍、グルタチオン-*S*-トランスフェラーゼ (GST) は 4 倍、UDPGT は 2.5 倍、統計学的に有意に増加した。

雌でも雄とほぼ同等の誘導パターンであった。EROD 及び ALD はわずかに統計学的に有意な減少が認められ、ECOD 減少には有意差は認められなかった。一方、EH は 3.7 倍、GST は 2.6 倍、UDPGT は 1.9 倍増加した (UDPGT には有意差なし)。このように、本試験における薬物代謝酵素誘導のパターンは、チトクローム P450 アイソザイム (CYP) 依存性モノオキシゲナーゼ (ECOD、EROD 及び ALD) の変動は比較的わずかであり、一方、第 II 相型酵素 (EH、GST 及び UDPGT) では著明な誘導が認められた。

プロトポルフィリンIX量には、検体投与の影響は認められなかった。(参照 72)

(8) マウスの肝臓、胆汁及び胆嚢内容物への影響

マウスを用いた 2 年間発がん性試験[11. (3)]で肝機能の変化、胆汁の黒色化及び胆嚢上皮過形成が認められたことから、検体投与後の肝薬物代謝酵素活性のパターン、胆汁黒色化に関連すると考えられる肝及び胆汁中のプロトポルフィリンIXの予備的な検査を実施するため、B6C3F₁ マウス (一群雌 80 匹) にフェントラザミドを 0 及び 10,000 ppm の濃度で 8 週間混餌投与する試験が実施された。

死亡例及び臨床症状は認められなかった。

肝薬物代謝酵素について、10,000 ppm 投与群ではモノオキシゲナーゼの著しい誘導がみられ、ECOD は 8 倍、EROD は 7 倍、ALD は 3.5 倍にまで増加した。したがって、多くの CYP サブタイプ (1A1、2B、3A 他) の誘導が推測された。

一方、EH、GST及びUDPGTの誘導はわずかで、対照群に比べて2倍程度の増加であった。このように、雌マウスの10,000 ppm投与群でみられた薬物代謝酵素誘導のパターンは、第Ⅱ相酵素のみが誘導されたラット[14. (3)]とは異なり、CYP依存性酵素の誘導が顕著であった。

肝臓及び胆汁中からプロトポルフィリンIX及びその他のポルフィリンは検出されず、ポルフィリン生合成に投与による影響はみられなかった。

胆嚢内でみられた固形物（病理組織学的には好酸性不定形物質）の分析では、高用量であるにもかかわらず、フェントラザミドや代謝物Ⅱは認められず、マウスにおいてはこれらの物質の著明な胆汁排泄はないものと考えられた。また、対照群と比較して、コレステロール濃度の増加はなかったが、タウロコール酸の著明な増加が認められ、胆嚢内固形物の40%に達した。この所見から、胆汁酸組成に変化があったことが示唆された。

以上より、マウスの混餌投与試験でみられた胆嚢の形態学的変化は、まず検体投与によって胆汁組成が変化し、粘膜を刺激することで粘液分泌亢進を伴う上皮過形成が発現し、時に好酸性の不定形物質が形成されるものと考えられた。（参照 73）

(9) フェントラザミド混餌投与後のマウス胆汁を用いた復帰突然変異試験

マウスを用いた90日間亜急性毒性試験[10. (2)]及び2年間発がん性試験[11. (3)]で胆嚢上皮の過形成が認められ、胆汁中の胆汁組成の変化によるものと考えられた。さらに、胆汁中成分の変異原性について確認する目的で、フェントラザミドを0及び7,200 ppmの濃度で7日間混餌投与したICRマウス（一群雄70匹）の胆汁を用いた、細菌（*S.typhimurium* : TA98及びTA100株）における復帰突然変異試験が実施された。

検体投与群のマウスでは、肝絶対及び比重量の統計学的な有意な増加が認められ、酵素誘導によるものであると考えられた。したがって、今回の試験で供されたマウス胆汁中には、酵素誘導を受けた後に排泄される胆汁中の成分も既に含まれていることが推察された。

採取された胆汁（原液または5倍希釈液）を用いたAmes試験は、胆汁中で化合物が代謝を受ける可能性がないことから、代謝活性化系（S9mix添加条件下）では実施されなかったが、代謝物が抱合体で存在することも考えられることから、β-グルクロニダーゼを添加した系についても実施された。試験結果は陰性であった。

以上の結果から、フェントラザミドを投与されたマウスの胆汁は、細菌に対する復帰突然変異誘発性を持たないと判断された。（参照 74）

(10) 胆嚢のPCNA免疫染色追加試験

マウスを用いた90日間亜急性毒性試験[10. (2)]及び2年間発がん性試験

[11. (3)]、ならびにイヌを用いた 90 日間亜急性毒性試験[10. (3)]及び 1 年間慢性毒性試験[11. (1)]の雌雄で胆嚢上皮過形成が認められた。この変化における細胞増殖の関与を検討するため、亜急性試験で用いたマウス(投与量:0、20、100、600、3,600 及び 7,200 ppm)の雌各 10 匹及びイヌ(投与量:0、75、300 及び 1,200 ppm)の雌各 4 匹の胆嚢及び肝臓(陽性対照)を用いた PCNA 免疫染色試験が実施された。

マウスの 7,200 ppm 投与群で PCNA 標識率が有意に増加し、3,600 ppm 投与群では増加傾向がみられた。これらは検体投与の影響と考えられ、胆嚢上皮の過形成に関連するものと判断された。なお、胆嚢上皮過形成はマウスの 600 ppm 投与群、イヌの 300 及び 1,200 ppm 投与群においても観察されたが、これらの用量では明らかな細胞増殖亢進は認められなかった。(参照 75)

(11) 肝薬物代謝酵素及び胆嚢への影響についての解明試験(イヌ)

イヌを用いた 90 日間亜急性毒性試験[10. (3)]及び 1 年間慢性毒性試験[11. (1)]の全投与群で認められた肝薬物代謝酵素誘導の回復性、高用量群(亜急性:1,200 ppm、慢性:750 ppm)で認められた胆嚢上皮病変の機序を解明する目的で、以下の①~②の試験が実施された。

① 肝臓酵素及び胆嚢のトキシコダイナミックスの解明試験

ビーグル犬(一群雌 4 匹)にフェントラザミドを 0 及び 750 ppm の濃度で 6 週間混餌投与(投与群)して試験が実施された。なお、回復性を観察するため、6 週間の回復期間を設けた回復群についても検討された。投与期間中の平均検体摂取量は、投与群で 30.6 mg/kg 体重/日、回復群で 31.9 mg/kg 体重/日であった。

死亡及び臨床症状は認められなかった。750 ppm 投与群で体重増加抑制傾向が認められたが、回復群では回復傾向を示した。

肝薬物代謝酵素誘導について、750 ppm 投与群で *N*-デメチラーゼ、*O*-デメチラーゼ、チトクローム P450、UDPGT、CYP7A 及び CYP 依存性のモノオキシゲナーゼ(ECOD、ALD)が統計学的有意に増加し、EROD は有意に減少した。このように、フェントラザミド投与による肝薬物代謝酵素誘導が確認されたが、回復群では、これらの項目は対照群のレベルまで回復した。

胆汁酸濃度は、投与群の 750 ppm 投与群(95 M)で対照群(120 M)よりもわずかに減少し、回復群の 750 ppm 投与群(146 M)で対照群(107 M)よりもわずかに増加した。これらの変化は統計的に有意でなく、胆汁酸産生に関与する CYP7A(コレステロールから胆汁酸への変換の第 1 段階であり、律速段階の酵素)の誘導と胆汁酸濃度の変化には一定の傾向がみられなかった。

病理組織学的検査において、肝臓では投与群の 750 ppm 投与群ですりガラス様肝細胞質を示す肝細胞肥大が全例に認められたが、回復群の 750 ppm 投与群ではほぼ完全に回復した。肝重量の変化は、投与群及び回復群ともに比重量の増

加のみであった。胆嚢では、投与群の 750 ppm 投与群で粘膜下の浮腫が 4 例中 3 例にみられた。回復群の 750 ppm 投与群ではこの変化は認められなかったが、4 例中 2 例に過形成がみられ、慢性毒性試験でみられたものと同じであった。

以上の結果から、イヌの亜急性及び慢性毒性試験でみられた肝薬物代謝酵素誘導は回復性であることが確認され、それぞれの試験の低用量群でみられた肝薬物代謝酵素の誘導は、肝重量増加及び形態学的変化を伴わなかったため、有害作用ではないと推察された。なお、本試験の 750 ppm は、肝薬物代謝酵素の誘導に加え、胆嚢病変を発現できるほどの高用量であったため、肝薬物代謝酵素活性は回復性を示すものの、肝重量及び形態学的変化は完全には回復しなかった。また、胆嚢上皮過形成については、本試験で CYP7A の誘導が確認され、胆嚢上皮過形成が再現されたことから、CYP7A 酵素の誘導による胆汁酸の変化によって影響されたものと推察されたが、胆汁酸産生量増加の確認ができなかったため、この関係は明らかにならなかった。(参照 76)

② 胆汁流量、胆汁組成及び肝機能パラメータへの影響

胆嚢上皮過形成の病態発生をさらに明らかにするため、胆管カニューレーションを施したビーグル犬（一群雌 4 匹）にフェントラザミドを 750 ppm の濃度（平均検体摂取量：18.7 mg/kg 体重/日）で 6 週間混餌投与し、投与期間中の胆汁流量及び胆汁成分への影響について検討した。なお、胆汁生成に必要な胆汁成分（特に胆汁酸）の枯渇を防ぐために、動物には分泌された胆汁の一部を毎日再補給された。また、投与前に測定された胆汁流量及び胆汁組成を各動物の対照とした。

投与 12 日（術後の感染症）及び投与 35 日（カテーテルの脱離）に各 1 例が切迫と殺された。手術に起因した感染症などを除いて、毒性学的に検体投与に関連性のある臨床所見は認められなかった。また、生存した 1 例では、手術の合併症により摂餌量及び体重低下が認められた。

投与開始 1 週間前から週 1 回実施された血液学的検査においても、検体投与に関連性のある所見は認められず、胆管カテーテル挿管手術時の出血及び細菌感染、カテーテル脱離後の腹腔炎に関連すると考えられる RBC、Hb 及び Ht の低下、MCV 増加、赤血球沈降速度の顕著な増加に伴う WBC 増加等が認められた。一方、血液生化学的検査では ALT、ALP 及び LDH 増加が認められ、長期間の胆管カニューレーションによる臓器へのストレスとともに、検体投与との関連も示唆された。

4 例すべてにおいて、摂餌量と胆汁産生に強い関連性が認められた。3 例では、投与開始 2～4 週目に胆汁の色調が暗緑色から茶褐色へ変化し、その後、投与前に比べ 13～63% の流量増加が認められた。残りの 1 例については、投与 12 日にと殺されたため、胆汁の色や流量への影響の詳細は確認できなかった。

胆汁中のフェントラザミド及び代謝物 II は、いずれもごく低濃度（最高濃度はそれぞれ 0.20 及び 0.84 mM）であり、コレステロール濃度は投与期間中減少し

ていた。

最終投与後の胆汁酸では、タウリンで抱合されたタウロコール酸やタウロデオキシコール酸の濃度が減少し、コール酸やデオキシコール酸のような非抱合胆汁酸が有意に増加した。

剖検の結果、検体投与に関連した肉眼的所見は認められなかった。胆嚢の変化（のり状、ゼラチン状、黒色あるいは有形の内容物：病理組織学的には血液及び胆汁の残渣として同定）及び胆嚢萎縮が認められたが、これらは手術処置及び胆嚢管結紮に関連した所見であると考えられた。

病理組織学的検査において、肝細胞質の変化（すりガラス様変化及び細胞質の好酸性封入体）が認められ、検体投与によるものと考えられた。これらの影響は、組織学的にはミクロゾーム酵素の誘導と関連しており、①で確認された CYP7A の誘導とも関連していると考えられた。胆嚢上皮過形成は、胆嚢を胆汁の流れから外科的に隔離させた本試験では認められなかった。（参照 77）

③ まとめ

イヌで認められた胆嚢上皮過形成の病態発現機序として、フェントラザミド、代謝物Ⅱ及びコレステロールが影響している可能性は考えにくく、CYP7A 活性の増加が引き金となったと考えられる胆汁酸組成の変化が最も関与したと考えられた。すなわち、抱合胆汁酸が減少し、非抱合胆汁酸が増加したことにより、より刺激性が高いとされている非抱合胆汁酸により胆嚢上皮が刺激された結果、粘液分泌亢進を伴った上皮過形成が発現したものと推察された。また、結紮した胆嚢には過形成がみられないことから、この病変は局所的であり、かつ、マウスを用いた発がん性試験 [11. (3)] では胆嚢上皮に腫瘍が認められていないことから、フェントラザミド投与により認められた胆嚢上皮の過形成が腫瘍発現につながることはないものと推察された。

(12) ラットの胆汁流量、胆汁組成及び肝機能パラメータへの影響

イヌで認められた胆嚢上皮への影響は、[14. (10)] の結果から、CYP7A の誘導に関連する胆汁酸組成の変化の関与が考えられた。一方、ラットを用いた試験では、胆道系の生理学的機能に疑わしい影響は認められなかった。したがって、胆嚢上皮への影響の作用機序をさらに精査し、種差を明らかにする目的で、Wistar ラット（一群雄各 15 匹）にフェントラザミドを 0 及び 6,400 ppm（平均検体摂取量：0 及び 581 mg/kg 体重/日）の濃度で 7 週間混餌投与し、胆汁流量、胆汁組成及び肝 CYP7A 活性について解析された。

死亡例及び臨床症状は認められなかった。6,400 ppm 投与群では、体重増加抑制、肝絶対重量増加及び総胆汁量増加が認められた。

肝臓中の CYP7A 活性は、検体投与群では対照群に比べわずかに低かった（対照群の 78%）が、統計学的に有意ではなかった。

抱合体開裂処理された胆汁中にフェントラザミドは認められず、IIが低濃度で認められたのみであった。抱合体開裂処理をしていない胆汁の胆汁酸分析では、6,400 ppm 投与群においてグリコ-デヒドロコール酸がわずかに増えたが、胆汁酸組成は対照群のものとはほぼ変わりなく、主たる胆汁酸はタウロデヒドロコール酸であった。また、6,400 ppm 投与群では、ラットの胆汁中主要代謝物であるVIIIが認められた。

剖検所見は認められなかった。病理組織学的検査では、6,400 ppm 投与群の9例中5例で小葉中心性に細胞質の変化が認められ、肝細胞質には微細な顆粒がより均一に分布していた。また、数例では門脈周囲の肝細胞にわずかな脂肪の蓄積がみられた。

本試験において、肝絶対重量増加、胆汁量増加及び肝細胞質の変化が認められた。しかし、胆汁量を肝絶対重量 (g) あたりで比較すると、対照群に比べほとんど差はなく、統計学的に有意ではなかった。ラットでは、胆汁流量が肝絶対重量に相関することが報告されており、本試験でみられた胆汁量増加は、検体による肝ミクロゾーム薬物代謝酵素誘導の結果、肝絶対重量が増加したことによるものと考えられ、胆汁量に対するフェントラザミドの直接的な影響はなかったと考えられた。また、肝細胞質の変化については、形態学的には外来物質に対する肝臓の代謝活性化 (薬物代謝酵素誘導) によって観察されるものであった。胆汁酸組成に関連するとされる CYP7A の誘導はみられなかった。(参照 78)

(13) フェントラザミド及び代謝物の溶血性試験 (*in vitro*)

一般薬理試験[7.]のラットを用いた溶血試験では、*in vivo*での溶血作用は認められなかったが、*in vitro*条件下で赤血球に直接的に暴露した際の影響について確認する目的で、SD ラット (雄4匹) の血液を、DMSO に溶解したフェントラザミド、代謝物II、XI、XII及びXIVを含むリン酸緩衝液食塩水系列 (いずれも最終濃度 10^{-7} ~ 10^{-4} M) に加え、低張溶血性試験が実施された。

フェントラザミド、代謝物II、XI、XII及びXIVは、*in vitro*条件下で溶血作用を示さなかった。(参照 79)

(14) フェントラザミド及び代謝物IIの赤血球に対する影響 (*in vitro*)

ラットの亜急性毒性試験[10. (1)]及び慢性毒性/発がん性試験[11. (2)]の高用量群では、軽度な赤血球に対する影響が一時的に認められた。赤血球と神経細胞 (特に長い軸索を有する神経細胞) は生化学的に共通する性質を有することが知られており、両細胞ともに代謝エネルギーの供給をグルコースに依存している。そこで、[14. (3)③]の試験の神経細胞で解糖系を介したグルコースの利用に影響がみられたように、赤血球においても、同様なメカニズムでその完全な形状を保つ能力 (integrity) が妨害される可能性が推察されることから、赤血球に対するフェントラザミド投与の影響を検討するために、エネルギー供給系への効果に着

眼した試験が実施された。

Wistar ラット (雄) から採取された赤血球をグルコース (4.5 g/L) を高濃度に含有した培地で培養し、フェントラザミド及び代謝物Ⅱを 0、0.1、1、5、10 及び 50 µg/mL の濃度で処理し、培養赤血球を用いた生化学的解析が実施された。

フェントラザミド処理により、溶血性、ATP 量、グルコース消費量及び還元型 GSH 量に影響が認められた。

処理開始 1 日後にグルコース消費量及び還元型 GSH 量が顕著に減少し、ATP 量も軽度ではあるが濃度依存的に減少した。溶血性は、最高濃度でわずかに認められる程度であった。処理開始 3 日後から、ATP 量が最低濃度を除くすべての濃度で統計学的に有意に減少し、一番感受性の高いパラメータであった。グルコース消費量は、低濃度 (0.1 及び 1 µg/mL) で一時的に増加した以外は用量相関的に低下した。処理開始 7 日後ではすべての濃度で ATP 量が低下し、グルコース消費量も強く抑制され、溶血性への影響も中間濃度処理群まで認められた。これらの影響は、濃度依存性や時間経過の点で、神経細胞で観察されたものと極めて類似していた。メトヘモグロビン形成には、フェントラザミドの影響はみられなかった。

代謝物Ⅱ処理による影響は、いずれの項目にもみられなかった。

以上の結果から、ラットの亜急性毒性試験及び慢性毒性/発がん性併合試験の高用量群で認められた、網状赤血球の増加を伴う貧血傾向は、フェントラザミド投与により、赤血球の解糖系を介したグルコースの利用が低下した結果生じたものと考えられた。ただし、フェントラザミドのバイオアベイラビリティが低いいため、*in vivo* で観察された影響は極めて弱く、高用量群でしか生じなかったものと考えられた。また、代謝物Ⅱは、フェントラザミドでみられた赤血球に対する影響に関与していないことが示唆され、Ⅱのみならず、XI、XIV 及び XII のような他の主要代謝物は、反応性のあるテトラゾリノンカルボニル構造を欠いていることから、おそらく赤血球の代謝に関し特異的な影響を及ぼさないと考えられた。(参照 80)

(15) ラットのフェントラザミドの高用量連続投与による血液への影響

ラットで認められた赤血球系への影響をさらに検討する目的で、SD ラット (一群雄 5 匹) にフェントラザミドを 14 日間連続強制経口投与 (原体 : 0、2,500 及び 5,000 mg/kg 体重/日、2%クレモホア EL 水溶液に懸濁) する試験が実施された。

検体投与群では、体重増加抑制、肝絶対及び比重量増加、肝腫大及び肝細胞肥大が認められた。Ht の統計学的に有意な低下、RBC 及び Hb の減少傾向、網状赤血球数の増加傾向が認められたが、いずれも用量相関性がみられなかった。メトヘモグロビンの増加及びハイツ小体の出現はみられなかった。赤血球膜の脆弱性を指標とした溶血性試験及び血清鉄測定において、明らかな所見は認められ

なかった。病理組織学的検査で脾臓のヘモジデリン沈着の増加傾向が認められたが、骨髄では異常所見はみられず、造血機能への影響は認められなかった。

以上のように、フェントラザミドを高用量で連続経口投与した本試験において、軽度の溶血性貧血傾向が認められた。(参照 81)

Ⅲ. 食品健康影響評価

参照に挙げた資料を用いて農薬「フェントラザミド」の食品健康影響評価を実施した。

ラットを用いた動物体内運命試験において、経口投与されたフェントラザミドは速やかに吸収、排泄された。T_{1/2}は9.67～40.6時間であった。主要排泄経路は尿中であったが、高用量群では糞への排泄が高くなった。投与1時間後には、血液含量が多い臓器には全身よりも高い濃度が観察されたが、中枢神経系では非常に低い濃度であった。投与48時間後の体内残存はわずかであった。尿中に親化合物は検出されず、主要代謝物はⅡ、X、XⅠ、XⅡ及びXⅣであった。糞中では親化合物が主成分であり、主要代謝物はⅡ、X、XⅠ及びXⅡであった。主要代謝経路は、テトラゾリノン環側鎖のカルボニル基が水酸化物イオンにより求核攻撃を受け、テトラゾリノン環の窒素とカルボニルのC-N結合が開裂した後、Ⅱ及びXⅠが生成し、さらに代謝、抱合等を受けると考えられた。

水稻を用いた植物体内運命試験の結果、青刈り、稲わら及び玄米のすべての試料において親化合物は検出されず、主要代謝物はⅥ及びXⅡであった。また、植物固有の代謝物は、Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ、Ⅶ及びXⅣであった。主要代謝経路は、加水分解によるⅡ及びXⅠの生成、Ⅱの抱合化、XⅠのシクロヘキサン環の水酸化によるXⅡの生成であると考えられた。

水稻を用いて、フェントラザミド及び代謝物Ⅱを分析対象化合物とした作物残留試験が実施された。いずれの化合物も定量限界未満であった。また、魚介類におけるフェントラザミドの最大推定残留値は、0.027 mg/kgであった。

各種毒性試験結果から、フェントラザミド投与による影響は主に赤血球及び脳ChE活性阻害、NTE活性阻害、肝臓及び膀胱に認められた。繁殖能に対する影響、催奇形性及び遺伝毒性は認められなかった。

本剤投与によりChE及びNTE活性阻害が認められたが、症状観察において神経症状はみられず、遅発性神経毒性を示唆する所見も認められなかった。これは、明らかなChE活性阻害がみられた用量においても、脳ChEの残存活性が50%以上保たれていたことから、結果として中毒症状があらわれなかったものと考えられた。さらに、ラットでは、高用量の長期間投与により髄鞘変性の発生頻度及び程度の増加がみられたが、この発生機序は、加齢の因子に加えて、検体の神経細胞に対する細胞エネルギー供給の減少により、運動神経細胞の老化が促進されたものと考えられた。また、本剤は既知のNTE活性阻害剤（特に有機リン剤）と構造的に異なっており、本剤によるNTE活性阻害は、フッ化カリウム処理によって全く賦活化されなかった。

ラットで尿路（膀胱及び尿道）上皮腫瘍及び甲状腺ろ胞細胞腫瘍が低頻度ながら発生した。甲状腺については、肝臓における酵素誘導及び抱合化の増加に伴い、甲状腺ホルモンの代謝的分解が増加したことによる二次的作用によるものと考えられた。尿路については、代謝物の一部（シクロヘキシルアミン類）の膀胱上皮への

持続的な刺激あるいは細胞毒性による壊死及び再生に加え、細胞増殖活性の亢進を伴う本剤のプロモーション作用が関与したものと推察された。したがって、本剤に遺伝毒性は認められないことも考慮し、本剤の評価にあたり閾値を設定することは可能であると判断された。

また、マウス及びイヌで胆嚢上皮の過形成が認められた。発生機序は、肝臓における CYP7A の誘導により胆汁中の非抱合胆汁酸が増加し、胆嚢上皮が刺激されたことによるものと推察され、かつ、マウスを用いた発がん性試験で胆嚢上皮に腫瘍が認められていないことから、この過形成が腫瘍発現につながることはないものと推察された。

各種試験結果から、食品中の暴露評価対象物質をフェントラザミド（親化合物のみ）と設定した。

各試験における無毒性量及び最小毒性量は表 42 に示されている。

表 42 各試験における無毒性量及び最小毒性量

動物種	試験	無毒性量 (mg/kg 体重/日)	最小毒性量 (mg/kg 体重/日)	備考
ラット	90 日間亜急性 毒性試験	雄：29.8 雌：35.5	雄：137 雌：174	雌雄：赤血球 ChE 活性阻害等
	90 日間亜急性 神経毒性試験	雄：77.0 雌：92.9	雄：229 雌：274	雌雄：体重低下等 (神経毒性は認められない)
	2 年間慢性毒性/ 発がん性 併合試験	雄：10.3 雌：14.6	雄：52.7 雌：75.4	雌雄：赤血球 ChE 活性阻害等 (雄で甲状腺ろ胞細胞腺腫及び癌、雌で 膀胱移行上皮乳頭腫及び癌が増加)
	2 世代 繁殖試験	親動物 P 雄：1.4 P 雌：1.8 F ₁ 雄：1.6 F ₁ 雌：2.2 児動物 P 雄：21.4 P 雌：28.1 F ₁ 雄：25.0 F ₁ 雌：32.1	親動物 P 雄：21.4 P 雌：28.1 F ₁ 雄：25.0 F ₁ 雌：32.1 児動物 P 雄：139 P 雌：204 F ₁ 雄：202 F ₁ 雌：259	親動物 雌雄：肝細胞質変化等 児動物 雌雄：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	母動物及び胎児： 1,000	母動物及び胎児： —	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	雄：42.4 雌：55.2	雄：266 雌：332	雌雄：胆嚢上皮過形成等
	2 年間 発がん性試験	雄：28.0 雌：41.9	雄：131 雌：201	雌雄：胆嚢の好酸性不定形物質等 (発がん性は認められない)
ウサギ	発生毒性 試験	母動物：2.5 胎 児：640	母動物：10 胎 児：—	母動物：赤血球 ChE 活性阻害 胎 児：毒性所見なし (催奇形性は認められない)
イヌ	90 日間亜急性 毒性試験	雄：2.98 雌：2.95	雄：12.3 雌：12.4	雌雄：肝細胞肥大等
	1 年間慢性 毒性試験	雄：1.12 雌：0.52	雄：5.35 雌：1.14	雌雄：ALP 増加等
ニワトリ	28 日間 亜急性遅発性 神経毒性試験	200	750/500	体重減少等 (遅発性神経毒性は認められない)

—：最小毒性量は設定できなかった。

備考には最小毒性量で認められた所見の概要を示した。

食品安全委員会は、各試験で得られた無毒性量の最小値がイヌを用いた1年間慢性毒性試験の0.52 mg/kg 体重/日であったので、これを根拠として、安全係数100で除した0.0052 mg/kg 体重/日を一日摂取許容量（ADI）と設定した。

ADI	0.0052 mg/kg 体重/日
(ADI 設定根拠資料)	慢性毒性試験
(動物種)	イヌ
(期間)	1年間
(投与方法)	混餌
(無毒性量)	0.52 mg/kg 体重/日
(安全係数)	100

<別紙 1 : 代謝物/分解物略称>

記号	略称	化学名
II	CPT	1-(2-クロロフェニル)-4,5-ジヒドロ-1 <i>H</i> -テトラゾール-5-オン
III	YRC4694	<i>N</i> -エチル- <i>N</i> -(4-ヒドロキシシクロヘキシル)-4-(2-クロロフェニル-4,5-ジヒドロ-5-オキソ-1 <i>H</i> -テトラゾール-1-イル)カルボキサミド
IV	CPT-Me	1-(2-クロロフェニル)-4-メチル-4,5-ジヒドロ-1 <i>H</i> -テトラゾール-5-オン
V	CPT-ALA	2-アミノ-3-[4-(2-クロロフェニル)-4,5-ジヒドロ-5-オキソ-1 <i>H</i> -テトラゾール-1-イル]プロピオン酸
VI	CPT-AA	[4-(2-クロロフェニル)-4,5-ジヒドロ-5-オキソ-1 <i>H</i> -テトラゾール-1-イル]酢酸
VII	CPT-LA	3-[4-(2-クロロフェニル)-4,5-ジヒドロ-5-オキソ-1 <i>H</i> -テトラゾール-1-イル]-2-ヒドロキシプロピオン酸
VIII	ECW10212	<i>N</i> -[4-(2-クロロフェニル)-4,5-ジヒドロ-5-オキソ-1 <i>H</i> -テトラゾール-1-イル]カルボニル- <i>N</i> -エチルアミノシクロヘキシルグルクロニド
IX	OH-CPT	3-クロロ-4-(4,5-ジヒドロ-5-オキソ-1 <i>H</i> -テトラゾール-1-イル)フェノール
X	CPT-グルクロニド	4-(2-クロロフェニル)-4,5-ジヒドロ-5-オキソ-1 <i>H</i> -テトラゾール-1-イルグルクロニド
X I	CEA	<i>N</i> -エチルシクロヘキシルアミン
X II	OH-CEA	エチルアミノシクロヘキサノール
X III	ECW10439A	<i>N</i> -シクロヘキシルグリシン
X IV	CA	シクロヘキシルアミン
X V	OH-CEA-CO-グルタミン酸	<i>N</i> -[<i>N</i> -エチル- <i>N</i> -(ヒドロキシシクロヘキシル)カルバモイル]グルタミン酸
X VI	CEA-CO-OH-グルタミン酸	3-(<i>N</i> -シクロヘキシル- <i>N</i> -エチルカルバモイルオキシ)グルタミン酸
X VII		<i>N</i> -(<i>N</i> -シクロヘキシル- <i>N</i> -エチルカルバモイル)-3-ヒドロキシグルタミン酸
X VIII	CEA-CO-タウリン酸	<i>N</i> -(<i>N</i> -シクロヘキシル- <i>N</i> -エチルカルバモイル)タウリン酸
X IX	CEA-CO-グルタミン酸	<i>N</i> -(<i>N</i> -シクロヘキシル- <i>N</i> -エチルカルバモイル)グルタミン酸
X X	ECW10438	シクロヘキシルウレア
X X I	ECW10435	1-シクロヘキシルビウレット
X X II	CA-CO-S-cys- <i>N</i> -ac	<i>N</i> -アセチル- <i>S</i> -シクロヘキシルカルバモイルシステイン
X X III		1-シクロヘキシル-1-エチルウレア
X X IV	ウレア-ジヒドロキシ-CEA	1-エチル-1-(ジヒドロキシシクロヘキシル)ウレア
X X V		1-シクロヘキシル-1-エチルビウレット
X X VI		<i>N</i> -(<i>N</i> -シクロヘキシル- <i>N</i> -エチルカルバモイル)シアナミド

<別紙2：検査値等略称>

略称	名称
AChE	アセチルコリンエステラーゼ
ai	有効成分量
Alb	アルブミン
ALD	アルドリンエポキシダーゼ
ALP	アルカリホスファターゼ
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ (=グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT))
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (=グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT))
ATP	アデノシン三リン酸
BBN	<i>N</i> -ブチル- <i>N</i> -(4-ヒドロキシブチル) ニトロソアミン
BCF	生物濃縮係数
BrdU	5-ブromo-2'-デオキシウリジン
ChE	コリンエステラーゼ
C _{max}	最高濃度
CYP	チトクローム P450 アイソザイム
DMSO	ジメチルスルホキシド
ECOD	エトキシクマリン <i>O</i> -デエチラーゼ
EC ₅₀	50%効果濃度
EDTA	エチレンジアミン四酢酸
EH	エポキシドヒドロラーゼ
FOB	機能観察総合検査
EROD	エトキシレゾルフィン <i>O</i> -デエチラーゼ
GGT	γ-グルタミルトランスフェラーゼ (= γ-グルタミルトランスぺプチターゼ (γ-GTP))
GSH	グルタチオン
GST	グルタチオン-S-トランスフェラーゼ
Hb	ヘモグロビン (血色素量)
Ht	ヘマトクリット値
IC ₅₀	50%阻害濃度
LC ₅₀	半数致死濃度
LDH	乳酸脱水素酵素
LD ₅₀	半数致死量
LGL	ラージ・グラニューラー・リンフォサイティック (大顆粒リンパ球)
Lym	リンパ球数

MC	メチルセルロース
MCV	平均赤血球容積
MetHb	メトヘモグロビン量
NTE	神経障害標的エステラーゼ
OPIDN	有機リン剤誘発遅発性神経障害
PCNA	増殖性細胞核抗原
PEC	動植物被害予測濃度
PHI	最終使用から収穫までの日数
PLT	血小板数
RBC	赤血球数
TAR	総投与（処理）放射能
T.Chol	総コレステロール
TG	トリグリセリド
T _{max}	最高濃度到達時間
TOCP	リン酸トリ- <i>o</i> -クレジル
TP	総蛋白質
TPO	甲状腺ペルオキシダーゼ
TRR	総残留放射能
TSH	甲状腺刺激ホルモン
T _{1/2}	消失半減期
T ₃	トリヨードサイロニン
T ₄	サイロキシン
UDPGT	ウリジンニリン酸グルクロニルトランスフェラーゼ
Ure	尿素
WBC	白血球数

<別紙3：作物残留試験成績>

作物名 (分析部位) 実施年度	使用量 (kg ai/ha)	試験 圃場 数	回 数 (回)	PHI (日)	残留値 (mg/kg)									
					公的分析機関					社内分析機関				
					フェントラザミド		II		合計	フェントラザミド		II		合計
					最高値	平均値	最高値	平均値		最高値	平均値	最高値	平均値	
水稲(玄米) 1996年度	10 ^A	1	1	108	<0.005	<0.005	<0.01	<0.01	<0.015	<0.005	<0.005	<0.01	<0.01	<0.015
			1	100	<0.005	<0.005	<0.01	<0.01	<0.015	<0.005	<0.005	<0.01	<0.01	<0.015
水稲(稲わら) 1996年度		1	108	<0.02	<0.02	<0.04	<0.04	<0.06	<0.02	<0.02	<0.04	<0.04	<0.06	
		1	100	<0.02	<0.02	<0.04	<0.04	<0.06	<0.02	<0.02	<0.04	<0.04	<0.06	
水稲(玄米) 1998年度	10 ^A	1	1	92	<0.005	<0.005	<0.01	<0.01	<0.015	<0.005	<0.005	<0.01	<0.01	<0.015
			1	97	<0.005	<0.005	<0.01	<0.01	<0.015	<0.005	<0.005	<0.01	<0.01	<0.015
		1	1	94	<0.005	<0.005	<0.01	<0.01	<0.015	<0.005	<0.005	<0.01	<0.01	<0.015
			1	99	<0.005	<0.005	<0.01	<0.01	<0.015	<0.005	<0.005	<0.01	<0.01	<0.015
水稲(稲わら) 1998年度		1	1	92	<0.02	<0.02	<0.04	<0.04	<0.06	<0.02	<0.02	<0.04	<0.04	<0.06
			1	97	<0.02	<0.02	<0.04	<0.04	<0.06	<0.02	<0.02	<0.04	<0.04	<0.06
		1	1	94	<0.02	<0.02	<0.04	<0.04	<0.06	<0.02	<0.02	<0.04	<0.04	<0.06
			1	99	<0.02	<0.02	<0.04	<0.04	<0.06	<0.02	<0.02	<0.04	<0.04	<0.06
水稲(玄米) 1998年度	4 ^B	1	1	97	<0.005	<0.005	<0.01	<0.01	<0.015	<0.005	<0.005	<0.01	<0.01	<0.015
		1	1	99	<0.005	<0.005	<0.01	<0.01	<0.015	<0.005	<0.005	<0.01	<0.01	<0.015

A：フェントラザミド3%、イマゾスルフロン0.9%、ダイムロン10%含有粒剤

B：フェントラザミド7.5%、イマゾスルフロン3.0%含有ジャンボ剤

・処理方法は、いずれも水面散布とした。

(参考) その他の代謝物の分析結果

作物名 (分析部位) 実施年度	使用量 (kg ai/ha)	試験 圃場 数	回 数 (回)	PHI (日)	残留値 (mg/kg)							
					VI		IV		VII		XI	
					最高値	平均値	最高値	平均値	最高値	平均値	最高値	平均値
水稲(玄米) 1996年度	10 ^A	1	1	108	<0.01	<0.01						
			1	100	0.02	0.02						
水稲(玄米) 1996年度	10 ^A	1	1	108	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
			1	100	0.02	0.02	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
水稲(玄米) 1998年度	10 ^A	1	1	92	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
			1	97	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
水稲(玄米) 1998年度	4 ^B	1	1	97	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
			1	99	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
水稲(稲わら) 1996年度	10 ^A	1	1	108	0.10	0.10						
			1	100	0.31	0.30						
水稲(稲わら) 1996年度	10 ^A	1	1	97	0.06	0.05	<0.04	<0.04	0.05	0.05	<0.04	<0.04
			1	99	0.29	0.28	<0.04	<0.04	0.14	0.14	<0.04	<0.04
水稲(稲わら) 1998年度	10 ^A	1	1	92	0.09	0.08	<0.04	<0.04	0.13	0.13	<0.04	<0.04
			1	97	0.08	0.08	<0.04	<0.04	0.09	0.09	<0.04	<0.04
水稲(稲わら) 1998年度	10 ^A	1	1	94	0.13	0.13	<0.04	<0.04	0.06	0.06	<0.04	<0.04
			1	99	0.11	0.10	<0.04	<0.04	0.07	0.06	<0.04	<0.04

A：フェントラザミド3%、イマゾスルフロン0.9%、ダイムロン10%含有粒剤

B：フェントラザミド7.5%、イマゾスルフロン3.0%含有ジャンボ剤

・処理方法は、いずれも水面散布とした。

<参照>

- 1 諮問書（食品健康影響評価について）
（URL：<http://www.fsc.go.jp/hyouka/hy/hy-uke-bunshyo-08.pdf>）
- 2 7月1日付けで厚生労働大臣から食品安全委員会委員長へ食品健康影響評価を依頼した事項：第3回食品安全委員会会合資料
（URL：<http://www.fsc.go.jp/iinkai/i-dai3/dai3kai-kouseisyousiryoku.pdf>）
- 3 委員会の意見の聴取要請に関する案件（農薬の食品中の残留基準を設定又は改正することに関する案件）
（URL：<http://www.fsc.go.jp/hyouka/hy/hy-tuuchi-bunshyo-12.pdf>）
- 4 農薬抄録フェントラザミド（除草剤）：バイエルクロップサイエンス株式会社、2007年、未公表
- 5 フェニル-UL-¹⁴C フェントラザミドを用いたラット体内における代謝試験（GLP 対応）：バイエル社 代謝・残留研究所（ドイツ）、1997年、未公表
- 6 シクロヘキシル-1-¹⁴C フェントラザミドを用いたラット体内における代謝試験（GLP 対応）：バイエル社 代謝・残留研究所（ドイツ）、1997年、未公表
- 7 フェニル-UL-¹⁴C フェントラザミド及びシクロヘキシル-1-¹⁴C フェントラザミドを経口投与した後の動物体内における消長、動態（GLP 対応）：バイエル社 代謝・残留研究所（ドイツ）、1997年、未公表
- 8 フェニル-UL-¹⁴C フェントラザミドの稲における代謝（GLP 対応）：バイエル社 代謝・残留研究所（ドイツ）、1997年、未公表
- 9 シクロヘキシル-1-¹⁴C フェントラザミドの稲における代謝（GLP 対応）：バイエル社 代謝・残留研究所（ドイツ）、1997年、未公表
- 10 フェントラザミドの水田土壌中の分解・代謝（GLP 対応）：バイエル社 代謝・残留研究所（ドイツ）、1997年、未公表
- 11 フェントラザミドの土壌吸着試験：日本バイエルアグロケム株式会社、1997年、未公表
- 12 フェントラザミドの緩衝液中における加水分解（GLP 対応）：バイエル社 代謝・残留研究所（ドイツ）、1997年、未公表
- 13 フェントラザミドの水中光分解（純水及び光分解）（GLP 対応）：バイエル社 代謝・残留研究所（ドイツ）、1997年、未公表
- 14 フェントラザミドの土壌残留試験：日本バイエルアグロケム（株）結城中央研究所、未公表
- 15 フェントラザミドの作物残留試験：日本バイエルアグロケム（株）、未公表
- 16 生体機能に及ぼす影響に関する試験：（財）食品薬品安全センター秦野研究所、1997年、未公表
- 17 ラットにおける急性経口毒性試験（GLP 対応）：バイエル社 毒性研究所（ドイツ）、1995年、未公表
- 18 マウスにおける急性経口毒性試験（GLP 対応）：日本バイエルアグロケム株式会社 環境安全研究部、1997年、未公表

- 19 ラットにおける急性経皮毒性試験 (GLP 対応) : バイエル社 毒性研究所 (ドイツ)、1995年、未公表
- 20 ラットにおける急性吸入毒性試験 (GLP 対応) : バイエル社 毒性研究所 (ドイツ)、1996年、未公表
- 21 動物、植物、土壌代謝物 : CPT [II] のラットにおける急性経口毒性試験 (GLP 対応) : バイエル社 毒性研究所 (ドイツ)、1996年、未公表
- 22 植物、土壌代謝物 : CPT-Me [IV] のマウスにおける急性経口毒性試験 (GLP 対応) : 日本バイエルアグロケム株式会社 環境安全研究部、1997年、未公表
- 23 植物代謝物 : CPT-酢酸 (CPT-AA) [VI] のマウスにおける急性経口毒性試験 (GLP 対応) : 日本バイエルアグロケム株式会社 環境安全研究部、1997年、未公表
- 24 植物代謝物 : CPT-LA [VII] のマウスにおける急性経口毒性試験 (GLP 対応) : 日本バイエルアグロケム株式会社 環境安全研究部、1997年、未公表
- 25 推定植物代謝物 : CEA-Urea [X X III] のマウスにおける急性経口毒性試験 (GLP 対応) : 日本バイエルアグロケム株式会社 環境安全研究部、1998年、未公表
- 26 ラットを用いた急性神経毒性試験 (GLP 対応) : バイエルコーポレーション (アメリカ)、2002年、未公表
- 27 雌鶏を用いた経口投与による急性遅発性神経毒性試験 (GLP 対応) : バイエル社 毒性研究所 (ドイツ)、1998年、未公表
- 28 ウサギの眼及び皮膚に対する一次刺激性及び腐食性試験 (GLP 対応) : バイエル社 毒性研究所 (ドイツ)、1995年、未公表
- 29 モルモットを用いた皮膚感作性試験 (Maximization 法) (GLP 対応) : バイエル社 毒性研究所 (ドイツ)、1995年、未公表
- 30 ラットを用いた亜急性経口毒性試験 (13 週間混餌投与及び 4 週間回復試験) (GLP 対応) : バイエル社 毒性研究所 (ドイツ)、1996年、未公表
- 31 マウスを用いた飼料混入投与による亜急性経口毒性試験 (GLP 対応) : バイエル社 毒性研究所 (ドイツ)、1996年、未公表
- 32 イヌにおける亜急性経口毒性試験 (GLP 対応) : バイエルコープ 毒性研究所 (アメリカ)、1996年、未公表
- 33 ラットを用いた反復経口投与神経毒性試験 (GLP 対応) : バイエルクロップサイエンス LP (アメリカ)、2004年、未公表
- 34 雌鶏を用いた経口投与による亜急性遅発性神経毒性試験 (GLP 対応) : バイエル社 毒性研究所 (ドイツ)、1999年、未公表
- 35 動物、植物、土壌代謝物 : CPT [II] のラットを用いた亜急性経口毒性試験 (4 週強制経口投与試験) (GLP 対応) : バイエル社 毒性研究所 (ドイツ)、1997年、未公表
- 36 植物代謝物 : CPT-酢酸 (CPT-AA) [VI] のラットを用いた亜急性経口毒性試験 (4 週混餌投与試験) (GLP 対応) : バイエル社 毒性研究所 (ドイツ)、1997年、未公表
- 37 イヌにおける慢性経口毒性試験 (GLP 対応) : バイエルコープ 毒性研究所 (アメリカ)、1997年、未公表

- 38 ラットを用いた飼料混入投与による慢性毒性/発がん性併合試験 (GLP 対応) : バイエル社 毒性研究所 (ドイツ)、1997 年、未公表
- 39 マウスを用いた発がん性試験 (GLP 対応) : バイエル社 毒性研究所 (ドイツ)、1997 年、未公表
- 40 ラットの繁殖性に及ぼす影響 (GLP 対応) : バイエル社 毒性研究所 (ドイツ)、1997 年、未公表
- 41 ラットを用いた催奇形性試験 (GLP 対応) : バイエル社 毒性研究所 (ドイツ)、1996 年、未公表
- 42 ウサギを用いた催奇形性試験 (GLP 対応) : バイエル社 毒性研究所 (ドイツ)、1997 年、未公表
- 43 植物代謝物 : CPT-酢酸 (CPT-AA) [VI] のウィスター系ラットを用いた催奇形性試験 (GLP 対応) : バイエル社 毒性研究所 (ドイツ)、1997 年、未公表
- 44 細菌を用いた DNA 修復試験 (GLP 対応) : 日本バイエルアグロケム株式会社 環境安全研究部、1997 年、未公表
- 45 細菌を用いた復帰突然変異性試験 (GLP 対応) : 日本バイエルアグロケム株式会社 安全性評価研究部、1995 年、未公表
- 46 チャイニーズハムスター由来 V79 細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験 (GLP 対応) : バイエル社 毒性研究所 (ドイツ)、1996 年、未公表
- 47 チャイニーズハムスター由来 V79 培養細胞を用いた HPRT を指標にした前進突然変異性試験 (GLP 対応) : バイエル社 毒性研究所 (ドイツ)、1996 年、未公表
- 48 ラット初代肝臓培養細胞を用いた *in vitro* 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験 (GLP 対応) : バイエル社 毒性研究所 (ドイツ)、1996 年、未公表
- 49 マウスにおける小核試験 (GLP 対応) : バイエル社 毒性研究所 (ドイツ)、1995 年、未公表
- 50 ラット雌の膀胱上皮での *in vivo* ³²P-ポストラベリングアッセイ (GLP 対応) : バイエル社 毒性研究所 (ドイツ)、1997 年、未公表
- 51 動物、植物、土壌代謝物 : CPT [II] の細菌を用いた復帰突然変異性試験 (GLP 対応) : バイエル社 毒性研究所 (ドイツ)、1997 年、未公表
- 52 植物、土壌代謝物 : CPT-Me [IV] の細菌を用いた復帰突然変異性試験 (GLP 対応) : 日本バイエルアグロケム株式会社 環境安全研究部、1997 年、未公表
- 53 植物代謝物 : CPT-酢酸 (CPT-AA) [VI] の細菌を用いた DNA 修復試験 (GLP 対応) : 日本バイエルアグロケム株式会社 環境安全研究部、1997 年、未公表
- 54 植物代謝物 : CPT-酢酸 (CPT-AA) [VI] の細菌を用いた復帰突然変異性試験 (GLP 対応) : 日本バイエルアグロケム株式会社 環境安全研究部、1997 年、未公表
- 55 植物代謝物 : CPT-酢酸 (CPT-AA) [VI] のチャイニーズハムスター由来 V79 細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験 (GLP 対応) : バイエル社 毒性研究所 (ドイツ)、1997 年、未公表
- 56 植物代謝物 : CPT-酢酸 (CPT-AA) [VI] のチャイニーズハムスター由来 V79 培養細胞

- を用いた HPRT を指標にした前進突然変異性試験 (GLP 対応) : 日本バイエルグロケム株式会社 環境安全研究部、1997 年、未公表
- 57 植物代謝物 : CPT-LA [VII] の細菌を用いた復帰突然変異性試験 (GLP 対応) : 日本バイエルグロケム株式会社 環境安全研究部、1997 年、未公表
- 58 動物、植物、土壌代謝物 : CEA [X I] の細菌を用いた復帰突然変異性試験 (GLP 対応) : 日本バイエルグロケム株式会社 環境安全研究部、1997 年、未公表
- 59 動物、植物代謝物 : 4-OH CEA [X II] の細菌を用いた DNA 修復試験 (GLP 対応) : 日本バイエルグロケム株式会社 環境安全研究部、1997 年、未公表
- 60 動物、植物代謝物 : 4-OH CEA [X II] の細菌を用いた復帰突然変異性試験 (GLP 対応) : 日本バイエルグロケム株式会社 環境安全研究部、1997 年、未公表
- 61 推定植物代謝物 : CEA-Urea [X X III] の細菌を用いた復帰突然変異性試験 (GLP 対応) : 日本バイエルグロケム株式会社 環境安全研究部、1998 年、未公表
- 62 フェントラザミドを経口投与したラットの赤血球におけるフェントラザミド及び代謝物の分析 (GLP 対応) : 日本バイエルグロケム株式会社 環境安全研究部、2000 年、未公表
- 63 植物代謝物 : CPT-酢酸 (CPT-AA) [VI] のラットへの単回経口投与後の血漿中の動態及び排泄 : バイエル社 毒性研究所 (ドイツ)、1997 年、未公表
- 64 フェントラザミドの神経毒性エステラーゼ (NTE) 阻害能力とその機作 : バイエル社 毒性研究所 (ドイツ)、1997 年、未公表
- 65 ラットを用いた作用機作解明特殊試験 (2 週間混餌投与試験) (GLP 対応) : バイエル社 毒性研究所 (ドイツ)、1998 年、未公表
- 66 *in vitro* における神経細胞に対する影響 : バイエル社 毒性研究所 (ドイツ)、1998 年、未公表
- 67 ラットのコリンエステラーゼ (ChE) 活性に及ぼす影響 : 日本バイエルグロケム株式会社 環境安全研究部、1997 年、未公表
- 68 フェントラザミドと甲状腺ペルオキシダーゼに触媒された反応の *in vitro* における相互作用 : バイエル社 毒性研究所 (ドイツ)、1997 年、未公表
- 69 ラット膀胱における中期発がん性試験 : 大雄会医科学研究所、2000 年
- 70 初期膀胱病変および膀胱上皮細胞増殖活性の検索試験 : 大雄会医科学研究所、2000 年
- 71 シクロヘキシル-1-¹⁴C フェントラザミド及びフェニル-UL-¹⁴C フェントラザミドを用いた亜急性毒性試験のラット体内における代謝 (GLP 対応) : バイエル社 代謝・残留研究所 (ドイツ)、1998 年、未公表
- 72 ラットの肝薬物代謝酵素活性、肝プロトポルフィリン IX 量の測定、コリンエステラーゼ活性の測定 : バイエル社 毒性研究所 (ドイツ)、1997 年、未公表
- 73 マウスを用いた肝薬物代謝酵素活性及び肝プロトポルフィリン IX 量の測定、胆のう内容物の化学分析 : バイエル社 毒性研究所 (ドイツ)、1997 年、未公表
- 74 フェントラザミド混餌投与後のマウス胆汁に対する細菌を用いた復帰変異試験 : 日本バイエルグロケム株式会社 安全性評価研究部、2000 年、未公表

- 75 胆のう増殖細胞核抗原 (PCNA) 免疫染色追加試験 : (財) 残留農薬研究所、2000 年、未公表
- 76 イヌにおける肝臓酵素及び胆のうのトキシコダイナミックスの解明試験 (GLP 対応) : バイエルコープ毒性研究所 (アメリカ)、1997 年、未公表
- 77 フェントラザミドの胆管にカニューレションした雌イヌにおける胆汁流量、胆汁組成及び肝機能パラメータへの影響 (6 週間混餌投与) : バイエル社 (ドイツ) 前臨床薬物動態研究所、毒性研究所、2000 年、未公表
- 78 フェントラザミドの胆管にカニューレションした雄ラットにおける胆汁流量、胆汁組成及び肝機能パラメータへの影響 (7 週間混餌投与) : バイエル社 (ドイツ) 毒性研究所、代謝及び残留分析研究所、2000 年、未公表
- 79 フェントラザミド及びその代謝物の溶血性試験 (*in vitro*) : 日本バイエルアグロケム株式会社 環境安全研究部、1999 及び 2000 年、未公表
- 80 フェントラザミド及びその代謝物 CPT [II] の *in vitro* 系におけるラット赤血球に対する影響 : バイエル社 毒性研究所 (ドイツ)、2000 年、未公表
- 81 フェントラザミドの高用量連続投与によるラット血液への影響 : 日本バイエルアグロケム株式会社 環境安全研究部、2000 年、未公表
- 82 フェントラザミドの魚介類における最大推定残留値に係る資料
- 83 国民栄養の現状—平成 10 年国民栄養調査結果— : 健康・栄養情報研究会編、2000 年
- 84 国民栄養の現状—平成 11 年国民栄養調査結果— : 健康・栄養情報研究会編、2001 年
- 85 国民栄養の現状—平成 12 年国民栄養調査結果— : 健康・栄養情報研究会編、2002 年
- 86 食品健康影響評価について
(URL : <http://www.fsc.go.jp/hyouka/hy/hy-uke-fentrazamide-200205.pdf>)
- 87 第 225 回食品安全委員会
(URL : <http://www.fsc.go.jp/iinkai/i-dai225/index.html>)
- 88 第 22 回農薬専門調査会総合評価第一部会
(URL : http://www.fsc.go.jp/senmon/nouyaku/sougou1_dai22/index.html)
- 89 第 43 回農薬専門調査会幹事会
(URL : http://www.fsc.go.jp/senmon/nouyaku/kanjikai_dai43/index.html)

フェントラザミド (案)

1. 品目名：フェントラザミド (Fentrazamide)

2. 用途：除草剤

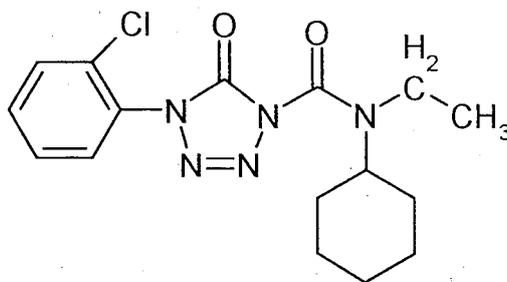
作用機構は明らかでないが、植物の細胞分裂組織に作用し、細胞分裂及び伸長を阻害して雑草の生育を停止させると考えられている。

3. 化学名：

4-(2-chlorophenyl)-*N*-cyclohexyl-*N*-ethyl-4,5-dihydro-5-oxo-1*H*-tetrazole-1-carboxamide (IUPAC)

4-(2-chlorophenyl)-*N*-cyclohexyl-*N*-ethyl-4,5-dihydro-5-oxo-1*H*-tetrazole-1-carboxamide (CAS)

4. 構造式及び物性



分子式	$C_{16}H_{20}ClN_5O_2$
分子量	349.8
水溶解度	0.0025 g/L (20°C)
分配係数	$\log_{10}Pow = 3.60$ (20°C)

(メーカー提供資料より)

5. 適用雑草の範囲及び使用方法

本薬の適用雑草の範囲及び使用方は以下のとおり。

(1) 3.0%フェントラザミド・0.30%ピラゾスルフロンエチル粒剤

作物名	適用雑草名	使用時期	適用土壌	使用量	本剤の使用回数	使用方法
移植 水 稲	水田一年生雑草 及び マツハイ ホタルイ ウリカ ミスガヤツリ (北海道を除く) ヘラオモガカ (北海道、東北) エゾノヤサカグサ(北海道) ヒルムシロ セリ クログライ (近畿・中国・四国) アオミドロ・藻類 による表層はく離	移植後5日～ ルビエ2.5葉期 ただし、 移植後30日まで	砂壤土～埴土	1kg/10a	1回	湛水散布
		移植直後～ ルビエ2.5葉期 (砂壤土は 移植後5日～ ルビエ2.5葉期) ただし、 移植後30日まで				
直 播 水 稲	水田一年生雑草 及び マツハイ ホタルイ ウリカ ミスガヤツリ ヒルムシロ セリ アオミドロ・藻類 による表層はく離	稲1葉期 ～ルビエ 2.5葉期 ただし、収穫 90日前まで	埴土～埴土			

ピラゾスルフロンエチルを含む農薬の総使用回数：1回

フェントラザミドを含む農薬の総使用回数：1回

(2) 7.5%フェントラザミド・0.52%ピラゾスルフロンエチル粒剤

作物名	適用雑草名	使用時期	適用土壌	使用量	本剤の使用回数	使用方法
移植水稲	水田一年生雑草及び マツバイ ホタルイ ウリカワ	移植後5日～ ルビエ2葉期 ただし、移植後30日 まで	砂壤土～ 埴土	小包装 (パック) 10個 400g/10a	1回	水田に 小包装 (パック) のまま 投げ入 れる
	ミズガヤツリ (北海道を除く) ヒルムシロ (北陸を除く) ヘラオモダカ (北海道、東北) セリ アオミドロ・藻類 による表層はく離	移植後5日～ ルビエ2.5葉期 ただし、移植後30日 まで				

ピラゾスルフロンエチルを含む農薬の総使用回数：1回
フェントラザミドを含む農薬の総使用回数：1回

(3) 50.0%フェントラザミド・3.5%ピラゾスルフロンエチル水和剤

作物名	適用雑草名	使用時期	適用土壌	使用量		本剤の使用回数	使用方法
				薬量	希釈水量		
移植水稲	水田一年生雑草 及び マツバイ ホタルイ ウリカワ	移植後5日～ ルビエ2.5葉期 ただし、移植後 30日まで	砂壤土～ 埴土	60g/10a	250～ 500ml /10a	1回	湛水 散布又は無人ヘリ コプターによる滴下
			砂壤土				
	埴土～埴土						
	砂壤土						
アオミドロ・藻類 による表層はく離 (北陸を除く)	移植後5日～ ルビエ2.5葉期 ただし、移植後 30日まで	砂壤土～ 埴土	—	—	—	顆粒水口施用	
		砂壤土					
	移植直後～ ルビエ2.5葉期 ただし、移植後 30日まで	埴土～埴土					

ピラゾスルフロンエチルを含む農薬の総使用回数：1回
フェントラザミドを含む農薬の総使用回数：1回

(4) 25.0%フェントラザミド・25.0%ベンゾビシクロン・2.6%ピラゾスルフロンエチル顆粒水和剤

作物名	適用雑草名	使用時期	適用土壌	使用量		本剤の使用回数	使用方法
				薬量	希釈水量		
移植水稲	水田一年生雑草及び マツバイ ホタルイ ウリカワ ミズガヤツリ (北海道を除く) ヘラオモダカ (北海道、東北) ヒルムシロ セリ オモダカ (北海道) アオミドロ・藻類 による表層はく離 (北陸を除く)	移植直後～ ノビエ2.5葉期 ただし、 移植後30日 まで	砂壤土 ～埴土	80g/10a	500ml /10a	1回	湛水散布 又は無人 ヘリコプ ターによ る滴下
					-		顆粒水口 施用
直播水稲	水田一年生雑草 及び マツバイ ホタルイ ウリカワ ミズガヤツリ	ノビエ1葉期～ ノビエ2.5葉期 まで ただし、収穫 90日前まで	壤土～埴土		500ml /10a		湛水散布

ピラゾスルフロンエチルを含む農薬の総使用回数：1回
 フェントラザミドを含む農薬の総使用回数：1回
 ベンゾビシクロンを含む農薬の総使用回数：2回以内

(5) 6.0%フェントラザミド・18.0%プロモブチド・1.4%ベンスルフロンメチルフロアブル

作物名	適用雑草名	使用時期	適用土壌	使用量	本剤の使用回数	使用方法
移植水稲	水田一年生雑草 及び マツバイ ホタルイ ヘラオモダカ ミズガヤツリ (東北) ウリカワ ヒルムシロ セリ アオミドロ・藻類に よる表層はく離	移植直後 ～ノビエ2.5葉 期 ただし、 移植後30日まで	砂壤土～ 埴土	500mL /10a	1回	原液 湛水 散布

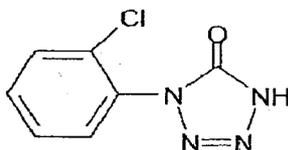
フェントラザミドを含む農薬の総使用回数：1回
 プロモブチドを含む農薬の総使用回数：2回以内
 ベンスルフロンメチルを含む農薬の総使用回数：2回以内

6. 作物残留試験

(1) 分析の概要

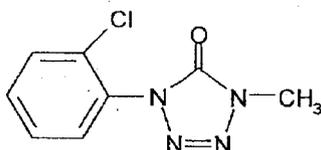
① 分析対象の化合物

- ・ フェントラザミド
- ・ 1-(2-クロロフェニル)-4,5-ジヒドロ-1*H*-テトラゾール-5-オン (以下、代謝物CPTという。)



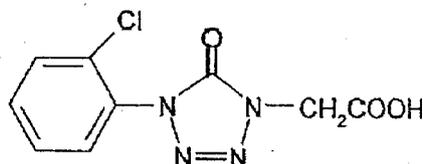
代謝物CPT

- ・ 1-(2-クロロフェニル)-4-メチル-4,5-ジヒドロ-1*H*-テトラゾール-5-オン (以下、代謝物CPT-Meという。)



代謝物CPT-Me

- ・ [4-(2-クロロフェニル)-4,5-ジヒドロ-5-オキソ-1*H*-テトラゾール-1-イル] 酢酸 (以下、代謝物CPT-AAという。)



代謝物CPT-AA

② 分析法の概要

- 1) 試料をアセトニトリルを用いて抽出・ろ過する。ろ液から溶媒を留去した水層に塩酸及び酢酸エチルを添加し、水層と酢酸エチル層とに分配する。酢酸エチル層にリン酸水素2ナトリウムを添加して再分配し、酢酸エチル層にフェントラザミド及びCPT-Me、水層にCPT及びCPT-AAを分配する。
- 2) 1)の酢酸エチル層(フェントラザミド、CPT-Me)は留去した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いてフェントラザミドとCPT-Meを分画する。分画したフェントラザミドは加水分解してCPTとし、更にヨウ化メチルでメチル化後、CPT-MeとしてGC(NPD)で定量する。分画してあったCPT-MeもGC(NPD)で定量する。
- 3) 1)の水層(CPT、CPT-AA)は塩酸を滴下して酸性とした後、CPT

及びCPT-AAを酢酸エチルへ分配する。アミノプロピルカラムを用いてCPTとCPT-AAを分画する。CPTはメチル化及び精製後、CPT-MeとしてGC (NPD) で定量する。CPT-AAもメチル化及び精製後、CPT-AA-MeとしてGC (NPD) で定量する。

フェントラザミド (親化合物) 定量限界 : 0.005 ppm

(参考)

代謝物CPT 定量限界 : 0.01 ppm

代謝物CPT-Me 定量限界 : 0.01 ppm

代謝物CPT-AA 定量限界 : 0.01 ppm

(2) 作物残留試験結果

単位面積当たりの有効成分投下量が最大となり、残留値が高くなると考えられる剤型を用いて作物残留試験が実施されている。

水稻(玄米)を用いた作物残留試験(2例)において、3%粒剤を1回湛水散布(1kg/10a)したところ、散布後100、108日の最大残留量^{注1)}は以下のとおりであった。

フェントラザミド (親化合物) の残留量 : <0.005 ppm、<0.005 ppm

(参考)

代謝物CPT : <0.01、<0.01 ppm

代謝物CPT-Me : <0.01、<0.01 ppm

代謝物CPT-AA : <0.01、0.02 ppm

水稻(玄米)を用いた作物残留試験(2例)において、3%粒剤を1回湛水散布(1kg/10a)したところ、散布後92~99日の最大残留量^{注1)}は以下のとおりであった。

フェントラザミド (親化合物) の残留量 : <0.005、<0.005 ppm

(参考)

代謝物CPT : <0.01、<0.01 ppm

代謝物CPT-Me : <0.01、<0.01 ppm

代謝物CPT-AA : <0.01、<0.01 ppm

水稻(玄米)を用いた作物残留試験(2例)において、7.5%粒剤を1回湛水散布(0.4kg/10a)したところ、散布後97、99日の最大残留量^{注1)}は以下のとおりであった。

フェントラザミド (親化合物) の残留量 : <0.005、<0.005 ppm

(参考)

代謝物CPT : <0.01、<0.01 ppm

代謝物CPT-Me : <0.01、<0.01 ppm

代謝物CPT-AA : <0.01、<0.01 ppm

なお、これらの試験結果の概要については、別紙1を参照。

注1) 最大残留量：当該農薬の申請の範囲内で最も多量に用い、かつ最終使用から収穫までの期間を最短とした場合の作物残留試験（いわゆる最大使用条件下の作物残留試験）を実施し、それぞれの試験から得られた残留量。

(参考：平成10年8月7日付「残留農薬基準設定における暴露評価の精密化に関する意見具申」)

7. 魚介類への推定残留量

本農薬については水系を通じた魚介類への残留が想定されることから、農林水産省から魚介類に関する個別の残留基準の設定について要請されている。このため、本農薬の水産動植物被害予測濃度^{注1)}及び生物濃縮係数（BCF：Bioconcentration Factor）から、以下の通り魚介類中の推定残留量を算出した。

(1) 水産動植物被害予測濃度

本農薬が水田においてのみ使用されることから、フェントラザミド（親化合物）の水田PECtier2^{注2)}を算出したところ、0.075 ppb となった。

(2) 生物濃縮係数

フェントラザミド（0.05mg/L）を用いた28日間の取込期間及び14日間の排泄期間を設定したブルーギルの魚類濃縮性試験が実施された。¹⁴C-放射能濃度及びプロファイルの確認を実施した結果、魚体中の総放射能濃度は、暴露7日以降、定常状態に達すると判断された。魚体及び試験水中のフェントラザミド（親化合物）の濃度分析の結果から、BCF_{ss}^{注3)}=71と算出された。

(3) 推定残留量

(1) 及び (2) の結果から、水産動植物被害予測濃度：0.075ppb、BCF：71とし、下記のとおり推定残留量が算出された。

$$\text{推定残留量} = 0.075\text{ppb} \times (71 \times 5) = 26.625\text{ppb} = 0.02625\text{ppm} \doteq 0.03\text{ppm}$$

注1) 農薬取締法第3条第1項第6号に基づく水産動植物の被害防止に係る農薬の登録保留基準設定における規定に準拠

注2) 水田中や河川中での農薬の分解や土壌・底質への吸着、止水期間等を考慮して算出したもの。

注3) BCF_{ss}: 定常状態における被験物質の魚体中濃度と水中濃度の比で求められたBCF。
(参考:平成19年度厚生労働科学研究費補助金食品の安心・安全確保推進研究事業「食品中に残留する農薬等におけるリスク管理手法の精密化に関する研究」分担研究「魚介類への残留基準設定法」報告書)

8. ADIの評価

食品安全基本法(平成15年法律第48号)第24条第1項第1号の規定に基づき、平成20年2月5日付け厚生労働省発食安第0205004号により食品安全委員会あて意見を求めたフェントラザミドに係る食品健康影響評価について、以下のとおり評価されている

無毒性量: 0.52 mg/kg 体重/day

(動物種)	イヌ
(投与方法)	混餌
(試験の種類)	慢性毒性試験
(期間)	1年間

安全係数: 100

ADI: 0.0052 mg/kg 体重/day

9. 諸外国における状況

JMPRにおける毒性評価はなされておらず、国際基準も設定されていない。

米国、カナダ、欧州連合(EU)、オーストラリア及びニュージーランドについて調査した結果、いずれの国及び地域においても基準値が設定されていない。

10. 基準値案

(1) 残留の規制対象

・フェントラザミド本体

植物体内運命試験では、主残留物としてCPT-AAがTRRの約50%(0.024ppm)、CPT及び/又はCPT-Meが<5%(<0.01ppm)検出されているが、CPT-AAはフェントラザミドに比べて毒性が低いと評価されていること及び作物残留試験における玄米中の残留量が微量又は不検出であることから、農産物中の規制対象はフェントラザミド本体とした。

魚介類中では、フェントラザミドと代謝物CPTが主な残留物であるが、CPTはフェントラザミドに比べて毒性が低いと報告されていることから、規制対象をフェントラザミド本体のみとした。

なお、食品安全委員会によって作成された食品健康影響評価においては、食品中の暴露評価対象物質としてフェントラザミド（親化合物のみ）と設定されている。

(2) 基準値案

別紙2 のとおりである。

(3) 暴露評価

各食品について基準値案の上限まで又は作物残留試験成績等のデータから推定される量のフェントラザミドが残留していると仮定した場合、国民栄養調査結果に基づき試算される、1日当たり摂取する農薬の量（理論最大1日摂取量(TMDI)）のADIに対する比は、以下のとおりである。詳細な暴露評価は別紙3参照。

なお、本暴露評価は、各食品分類において、加工・調理による残留農薬の増減が全くないとの仮定の下におこなった。

	TMDI / ADI (%) ^{注)}
国民平均	2.4
幼小児 (1~6 歳)	3.9
妊婦	1.9
高齢者 (65 歳以上)	2.3

注) TMDI 試算は、基準値案×摂取量の総和として計算している。なお、高齢者及び妊婦については水産物の摂取量データがないため、国民平均の摂取量を参考とした。

フェントラザミド作物残留試験一覧表

農作物	試験圃場数	農作物				最大残留量 (ppm) 【フェントラザミド/CPT/CPT-AA/CPT-Me】
		剤型	使用量・使用方法	回数	経過日数	
水稲 (玄米)	2	3%粒剤	1kg/10a, 湛水散布	1回	108日	圃場A:<u>0.005</u>/ <0.01/ <0.01/ <0.01
					100日	圃場B:<u>0.005</u>/ <0.01/ 0.02/ <0.01
水稲 (玄米)	2	3%粒剤	1kg/10a, 湛水散布	1回	92, 97日	圃場A:<u>0.005</u>/ <0.01/ <0.01/ <0.01
					94, 99日	圃場B:<u>0.005</u>/ <0.01/ <0.01/ <0.01
水稲 (玄米)	2	7.5%粒剤	0.4kg/10a, 湛水散布	1回	97日	圃場A:<u>0.005</u>/ <0.01/ <0.01/ <0.01
					99日	圃場B:<u>0.005</u>/ <0.01/ <0.01/ <0.01

食品名	基準値 案 ppm	基準値 現行 ppm	登録 有無	参考基準値		残留試験成績 ppm
				国際 基準 ppm	外国 基準値 ppm	
米	0.02	0.1 ^(注)	○			<0.005, <0.005
魚介類	0.03					推:0.0266

注) 基準値現行における米のフェントラザミドの分析対象化合物は、「フェントラザミド及びCPTが含まれる」とされるもの。

(別紙3)

フェントラザミド推定摂取量 (単位: $\mu\text{g}/\text{人}/\text{day}$)

食品群	基準値案 (ppm)	国民平均 TMDI	幼小児 (1~6歳) TMDI	妊婦 TMDI	高齢者 (65歳以上) TMDI
米	0.02	3.7	2.0	2.8	3.8
魚介類	0.03	2.8	1.3	2.8	2.8
計		6.5	3.2	5.6	6.6
ADI比 (%)		2.4	3.9	1.9	2.3

高齢者及び妊婦については水産物の摂取量データがないため、国民平均の摂取量を参考とした。
TMDI: 理論最大1日摂取量 (Theoretical Maximum Daily Intake)

(参考)

これまでの経緯

平成12年12月21日	初回農薬登録
平成20年1月17日	農林水産省より厚生労働省へ魚介類に係る基準設定依頼
平成20年2月5日	厚生労働大臣より食品安全委員会委員長あてに残留基準設定に係る食品健康影響評価について要請
平成20年2月7日	食品安全委員会(要請事項説明)
平成20年6月18日	第22回農薬専門調査会総合評価第一部会
平成20年9月30日	第43回農薬専門調査会幹事会
平成20年10月30日	食品安全委員会における食品健康影響評価(案)の公表
平成20年12月4日	食品安全委員会(報告)
平成20年12月4日	食品安全委員会委員長から厚生労働大臣あてに食品健康影響評価について通知
平成21年6月15日	薬事・食品衛生審議会へ諮問
平成21年6月19日	薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会
平成21年8月21日	薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会

●薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会

[委員]

青木 宙	東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科教授
生方 公子	北里大学北里生命科学研究科病原微生物分子疫学研究室教授
○大野 泰雄	国立医薬品食品衛生研究所副所長
尾崎 博	東京大学大学院農学生命科学研究科教授
加藤 保博	財団法人残留農薬研究所理事
斉藤 貢一	星薬科大学薬品分析化学教室准教授
佐々木 久美子	元国立医薬品食品衛生研究所食品部第一室長
志賀 正和	元農業技術研究機構中央農業総合研究センター虫害防除部長
豊田 正武	実践女子大学生生活科学部食生活科学科教授
松田 りえ子	国立医薬品食品衛生研究所食品部長
山内 明子	日本生活協同組合連合会組織推進本部本部長
山添 康	東北大学大学院薬学研究科医療薬学講座薬物動態学分野教授
吉池 信男	青森県立保健大学健康科学部栄養学科教授
由田 克士	国立健康・栄養研究所栄養疫学プログラム国民健康・栄養調査プロジェクトリーダー
鰐淵 英機	大阪市立大学大学院医学研究科都市環境病理学教授

(○: 部会長)

答申(案)

フェントラザミド

食品名	残留基準値 ^{注)}
米	DDM 0.02
魚介類	0.03

注)今回基準を設定するフェントラザミドは、フェントラザミドのみをいうこと。