

表 1 毒性関連部分構造を用いた無毒性量判別決定木によるトレーニングセット及び外部検証セットの判別結果

トレーニングセットの判別成績					外部検証セットの判別成績				
<b>閾値0.8モデル</b>					<b>閾値0.8モデル</b>				
	判別結果 (無毒性量)					判別結果 (無毒性量)			
実測値	Low	High	Sensitivity	96.72	実測値	Low	High	Sensitivity	90.91
<0.8	118	4	Specifity	73.53	<0.8	260	26	Specifity	24.07
>0.8	9	25	Accuracy	91.67	>0.8	82	26	Accuracy	72.59
<b>閾値0.4モデル</b>					<b>閾値0.4モデル</b>				
	判別結果					判別結果			
実測値	Low	High	Sensitivity	95.37	実測値	Low	High	Sensitivity	75.10
<0.4	103	5	Specifity	87.50	<0.4	187	62	Specifity	24.83
>0.4	6	42	Accuracy	92.95	>0.4	109	36	Accuracy	56.60
<b>閾値0.2モデル</b>					<b>閾値0.2モデル</b>				
	判別結果					判別結果			
実測値	Low	High	Sensitivity	89.16	実測値	Low	High	Sensitivity	45.91
<0.2	74	9	Specifity	91.78	<0.2	101	119	Specifity	51.15
>0.2	6	67	Accuracy	90.38	>0.2	85	89	Accuracy	48.22

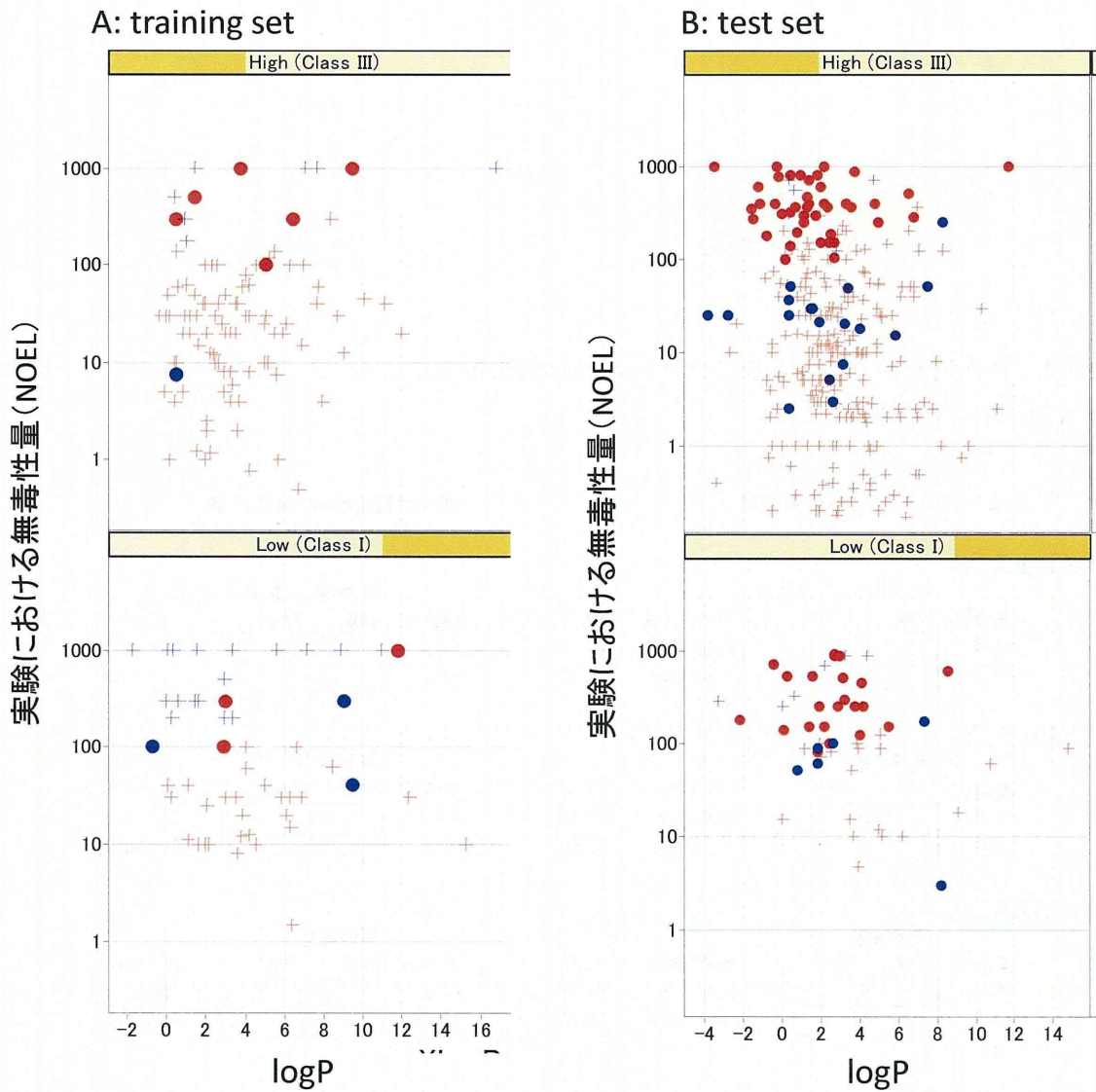


図3 無毒性量判別決定木による判別結果と Cramer rule による毒性分類の比較

※Cramer rule クラス1 (低毒性、下段パネル)、クラス3 (強毒性、上段パネル)のみ示す (縦軸は無毒性量、横軸は LogP)

赤：判別分析で無毒性量が低いクラス (強毒性) に判定された物質、青：判別分析で無毒性量が高いクラス (強毒性) に判定された物質

＋：判別分析で正しくクラス分けされた物質、○：判別分析で正しくクラス分けされなかった物質



表 2 脾臓毒性をターゲットとした判別分析モデル構築に用いた学習母集団

「脾臓毒性」の 病理グループ	病理変化・臓器 重量	血液検査 (Hct, Hgb, Ht)	化合物件数	学習母集団 M1	学習母集団 M2
G1	いずれか増加	いずれも変化なし	13	-	陽性(13)
G2	いずれか増加	いずれかで低下	47	陽性(47)	陽性(47)
G3	いずれも変化なし	いずれかで低下	23	-	陽性(23)
G4	いずれも変化なし	いずれも変化なし	163	陰性(163)	陰性(163)
G5	低下	-	8	-	-
合計			254	210	246

表 3 脾臓毒性モデル構築のために発生させたパラメータの概要と数

パラメータ種類	件数
トポロジカル、電子的、物理化学	555
部分構造パラメータ	138
分子軌道法パラメータ：MOG (MBオプション)	29
合計	722

表 4 パラメータの絞り込み手順

順番	手法	絞り込み指標
1	欠損値 (MV)	1 つでも欠損値のあるパラメータを除外した
2	ゼロ値 (ZT)	90%以上の値がゼロになっているパラメータを除外した
3	単相関 (CM)	90%以上の相関がある 2 つのパラメータ、その 1 つを除外した
4	多重相関 (AC)	95%以上の多重相関のパラメータを除外した
5	対話型MLR (iMLR)	pvalue>0.05 以上のパラメータを除外した

表 5 分類率が一番高かった脾臓毒性モデルの学習母集団サンプル数及びパラメータ数

モデル名	学習手法	学習母集団	サンプル数	パラメータ
①spleen-M1_CL_ADA_203	AdaBoost	M1	21	2
②spleen-M1_CL_NN_330	Perceptron	M1	21	2
③spleen-M1_CL_SVM_194	SV	M1	21	2
④spleen-M2_CL_ADA_1101	AdaBoost	M2	24	2
⑤spleen-M2_CL_NN_1120	Perceptron	M2	24	2
⑥spleen-M2_CL_SVM_656	SV	M2	24	2

表 6 脾臓毒性モデルの内部検証結果

A: M1 学習モデルの内部検証結果

M1モデル群	実測値 (脾臓毒性)	①spleen- M1_CL_ADA_203	②spleen- M1_CL_NN_330	③spleen- M1_CL_SVM_194
TN (true negative)	163	163	158	163
FP (false positive)	0	0	5	0
TP (true positive)	47	47	38	47
FN (false negative)	0	0	9	0
ALL	210	210	210	210
COVERAGE (適用率)	1.00	1.00	1.00	1.00
CONCORDANCE (精度)	1.00	1.00	0.93	1.00
SPECIFICITY (特異度)	1.00	1.00	0.97	1.00
SENSITIVITY (感度)	1.00	1.00	0.81	1.00

B: M1 学習モデルの内部検証結果

M2モデル群	実測値 (脾臓毒性)	④spleen- M2_CL_ADA_1101	⑤spleen- M2_CL_NN_1120	⑥spleen- M2_CL_SVM_656
TN (true negative)	163	163	154	163
FP (false positive)	0	0	9	0
TP (true positive)	83	83	60	83
FN (false negative)	0	0	23	0
ALL	246	246	246	246
COVERAGE (適用率)	1.00	1.00	1.00	1.00
CONCORDANCE (精度)	1.00	1.00	0.87	1.00
SPECIFICITY (特異度)	1.00	1.00	0.94	1.00
SENSITIVITY (感度)	1.00	1.00	0.72	1.00

表 7 新規 982 物質を用いた外部検証の結果

A: M1 学習モデルの外部検証結果

M1モデル群	実測値 (脾臓毒性)	①spleen- M1_CL_ADA_203	②spleen- M1_CL_NN_330	③spleen- M1_CL_SVM_194
TN (true negative)	602	535	537	527
FP (false positive)	0	67	65	75
TP (true positive)	380	70	57	71
FN (false negative)	0	310	323	309
ALL	982	982	982	982
COVERAGE (適用率)	1.00	1.00	1.00	1.00
CONCORDANCE (精度)	1.00	0.62	0.60	0.61
SPECIFICITY (特異度)	1.00	0.89	0.89	0.88
SENSITIVITY (感度)	1.00	0.18	0.15	0.19

B: M1 学習モデルの内部検証結果

M2モデル群	実測値 (脾臓毒性)	④spleen- M2_CL_ADA_1101	⑤spleen- M2_CL_NN_1120	⑥spleen- M2_CL_SVM_656
TN (true negative)	602	521	484	438
FP (false positive)	0	81	118	164
TP (true positive)	380	85	98	126
FN (false negative)	0	295	282	254
ALL	982	982	982	982
COVERAGE (適用率)	1.00	1.00	1.00	1.00
CONCORDANCE (精度)	1.00	0.62	0.59	0.57
SPECIFICITY (特異度)	1.00	0.87	0.80	0.73
SENSITIVITY (感度)	1.00	0.22	0.26	0.33

平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

化学物質のヒト健康リスク評価における(定量的)構造活性相関および  
カテゴリーアプローチの実用化に関する研究（H24-化学-指定-010）

類似化合物のカテゴリー化による毒性評価に関する研究

研究分担者 吉田 緑 国立医薬品食品衛生研究所 病理部第二室 室長

研究要旨

平成 24 年度の本研究において日本で評価された農薬の毒性について公表データを基に構造別に分類し、201 農薬のうち 145 農薬を構造別に 26 の系に分類した。本年度はその結果を応用し、化学構造から神経毒性が懸念されるカーバメイト系、有機リン系、16 員環マクロライド系、ピレスロイド系、ネオニコチノイド系の 5 系統について、各系で共通する毒性プロファイル、想定される mode of action、種差、神経毒性発現用量と許容 1 日摂取量(ADI)設定根拠無毒性量等、多角的な比較を行った。また上記の分類以外に神経毒性が検出された 11 農薬についても同様の解析を実施した。その結果、構造により神経毒性は有機リン系・カーバメイト系では全ての剤でコリンエステラーゼ(ChE)阻害作用が認められ、種差もなく且つ ChE 阻害作用に基づいて ADI が設定されている等、構造による神経毒性に多くの共通項目が認められた。また GABA アゴニスト作用のある 16 員環マクロライド系の剤にも種差のない共通な神経毒性が認められたものの ADI の設定根拠としてはばらつきが認められた。したがって、有機リン系・カーバメイト系、16 員環マクロライド系については構造による神経毒性が予測できる可能性が考えられた。一方、それ以外の系および単発的に神経毒性が認められた剤については種差が大きく、構造による神経毒性に関する共通項目は見出すことは困難であった。同様の解析を次年度も継続する予定である。

序論

反復投与毒性を指標にした構造活性相関モデルに関する研究および反復投与毒性予測モデル構築のための毒性情報の評価と数値化に関する研究の一環として、既存及び

新規化学物質の短期毒性試験から得られた病理学的所見の分類およびシソーラスの構築を行ってきた。

本年度は、平成 24 年度に 201 農薬を、公表毒性試験データを基に構造別に 26 系

に分類した結果を応用し、神経毒性に焦点を当てて、構造と毒性について解析を行った。神経毒性は、ヒトへの外挿上重要な毒性所見であるだけでなく、農薬において神経毒性が良く知られている有機リン系、カーバメイト系殺虫剤が使用されており毒性試験データが得られやすいことから選択した。また個別農薬についても神経毒性の有無を検索し、構造的な分類結果と比較した。

## 方法

2003年から2011年まで食品安全委員会が評価され評価書として公表された201農薬の毒性データを用いた。同一の農薬で複数の評価書がある場合は最新版から評価した。以下の手順で神経毒性物質を選択した。

1. 化学構造による分類方法は、食品安全委員会より公表された評価書に記載されている構造別の分類を基に分類したところ、145の農薬が26の系の構造に分類された。さらに、神経毒性が報告されている以下の構造をもつ系を選択した。

- ・有機リン系
- ・カーバメイト系
- ・ピレスロイド系
- ・ネコニコチノイド系
- ・16員環マクロライド系

2. 次にこれらの系に分類された個々の剤について、神経毒性に関連する変化(コリンエステラーゼ(ChE)活性阻害等)を検索し、それらの変化が認められた試験、動物種、その試験における神経毒性の無毒性量(NOAEL)を抽出した。複数の変化が認められる剤については、より感受性の高い試験を選択するために低いNOAELの試験を記載した。さらに機序が評価書に記載されて

剤については、mode of action (MOA)を抜粋し、参考として許容1日摂取量(ADI)等についても参考のために抽出した。

3. さらに201全ての剤について、神経毒性に関連する毒性所見の有無をチェックした。毒性所見としては、痙攣等の臨床症状、髄鞘の空胞等も病理組織学的所見、哺育脳能の低下等の行動所見についても抽出した。致死量における臨床状況については明らかに神経毒性と判断できるもののみ抽出した。

4. 前出の2および3で選択された神経毒性の剤について、以下の解析を行った。

- ・特徴的な神経毒性
- ・種差の有無(げっ歯類についてはマウス・ラットをまとめ、げっ歯類、イヌ、ヒトなど複数の種に認められた場合に種差「なし」、1種のみ場合は「あり」とした)。
- ・各動物種において神経毒性が認められないNOAEL
- ・ADIとの比較

5. ADIとの神経毒性のNOAELの比較の意義: 安全係数で神経毒性NOAELを除した場合、その値がADIと同じであれば、神経毒性をエンドポイントとしてADIを設定していることになる。値がADIより大きければADIはより感受性の高い異なるエンドポイントで設定されたことになる。したがって、この比較を行う事により、神経毒性が最も感受性高いエンドポイントであるかを理解することができる。

## 結果

表1に構造から神経毒性が疑われる5系について、検索した剤数を、表2に表1以外で神経毒性を示した剤の名称と神経毒性の特徴を列記した(表1、2)。有機リン系が

最も多く、16 剤、続いてカーバメイト系 6 剤、ネオニコチノイド系 5 剤であり、ピレスロイド系および 16 員環マクロライド系は各 3 剤について解析を行った。単独で神経毒性に関連した所見が認められた剤は、グルホシネート、グルホシネート P、メタアルデヒド、メタフルミゾン、アミトラズ、ピリミスルファン、クロルフェナピル、フェントラザミド、オキシロニック酸、ピリフタミド、ルフェヌロンの 11 剤であったが、神経毒性としての特徴は剤によって異なっており、臨床症状に関連するものが 7 剤、酵素阻害に関連するもの 2 剤、病理組織学的所見によるものが 2 剤であった。

上記の 5 分類および単独に神経毒性を示す 11 剤の詳細については付表 1 に示した。

次に、構造から神経毒性が予想された 5 分類について毒性の特徴や種差、ADI との比較を行い、そのまとめを表 3 に示した。

まず有機リン系およびカーバメイト系の剤については、いずれも ChE 活性阻害を神経毒性の特徴としてきた。またこれらの 2 系では有機リン系のクロルフトキシホス 1 剤を除き種差は認められなかった。種差なしとしたいずれの剤の種差についてはヒトデータを含め、神経毒性の NOAEL の差は近似の剤が多いことも特徴であった。また ADI との比較についても、全ての有機リン系およびカーバメイト系の剤は神経毒性をエンドポイントとして ADI が設定されていることも特徴であった。

ネオニコチノイド系については、イミダクプリドおよびジノテフランについては神経毒性に関連する臨床症状が認められたが、その他の剤の臨床症状は明白なものではなく、系による特徴的な毒性は認められな

った。また種差については全て 1 種のみ動物での発現であった。これらの神経毒性、あるいは臨床症状の発現は、ADI のエンドポイントより高い量で発現していた。

ピレスロイド系ではピフェントリンのみ神経毒性に関連する臨床症状がラットおよびイヌに認められ、イヌでより強く発現したが、ADI 設定の根拠となるエンドポイントより高い量であった。

16 員環マクロライド系殺虫剤では、よろめき歩行など共通な神経毒性が認められた。それらの変化はげっ歯類およびイヌと種にまたがって発現したが、イヌでより感受性が高かった。ミルベメクチンでのみ、これらの神経毒性が ADI 設定の根拠となるエンドポイントであった。

個別に神経毒性が発現した剤のまとめを表 4 に記載した。

これらに共通の神経毒性は認められなかった。しかし、複数の種にまたがって神経毒性を示す剤の多くは臨床症状として神経毒性が認められるものが多かった。神経毒性の NOAEL の種差についてはアミトラズのように近似値のものからかなり差があるものまで種々であった。一種あるいはげっ歯類のみ変化が認められたのは、グルホシネート、クロルフェナピル、フェントラザミドおよびピリフタミドであった。これらの神経への影響の特徴は、主にクロルフェナピルとピリフタミドは形態学的所見から、グルホシネートとフェントラザミドは酵素活性阻害作用としての神経毒性作用を示すものであった。ADI との比較では 11 剤のうち、4 剤のみ神経毒性を含むエンドポイントにより ADI が設定されていたが、残る 7 剤の神経毒性は ADI 設定根拠試験より高い量で



発現していた。

## 考察

平成 24 年度の本研究で構造別に 26 の系に分類した公表された農薬データを基に、今年度は神経毒性が懸念されるカーバメイト系、有機リン系、16 員環マクロライド系、ピレスロイド系、ネオニコチノイド系の 5 系統および個別に神経毒性を示した 11 剤について、毒性の特徴、種差、ADI との比較など解析を行った。

その結果、有機リン系・カーバメイト系では全ての剤でコリンエステラーゼ(ChE)阻害作用を示し、その作用は多種に跨っており、ChE 活性阻害に対する NOAEL も近似するものが多く、ADI も ChE 阻害作用に基づいて設定されていたこと。この結果は、これらの構造を有する剤については、構造的にヒトを含む多くの種で ChE 活性阻害作用という神経毒性を予測することが可能であると考えられる。

また 16 員環マクロライド系殺虫剤も共通の中枢神経抑制性の臨床症状が認められ、これらは同系の GABA アゴニスト作用が MOA として有力であると考えられた。また、これらの神経毒性に種差のなかったことから、16 員環マクロライド系の剤についても構造的に GABA 様神経毒性の予測が可能であると考えられた。しかし、ADI の設定根拠としてはばらつきが認められたことから、これらの神経毒性はその他の毒性作用と同用量で発現するものと考えられた。

ネオニコチノイド系については、単独の種で発現する神経毒性が 2 剤のみでその他には明白な神経毒性は観察されなかった。また神経毒性発現に対する NOAEL が ADI

設定根拠試験となる毒性より弱く、高い値で発現していた。この結果は今回解析した 5 剤については、その他の毒性作用のほうに神経毒性より感受性が高いことを示すものと考えられた。

ピレスロイド系については神経毒性が報告されているものの、申請に使用される毒性試験に使用する用量ではジフェントリンを除き、そのほかの毒性がより低い量で発現することが明らかとなった。

したがってネオニコチノイド系およびピレスロイド系については構造から神経毒性を予測することは難しいと考えられた。

単発的に神経毒性が認められた剤については種差が大きく、構造による神経毒性に関する共通項目は見出すことは困難であった。しかし、新生毒性を示す臨床症状が主に跨って発現する剤が多かったことから、これらの作用機序は種差なく発現する可能性を示唆する結果と考えられた。形態学的変化より神経毒性を示した 2 剤については、臨床症状を伴わないことから、作用機序を含むヒトへの外挿性検討が必要であると考えられた。

グルホシネートについては、グルタミン酸合成阻害作用が神経毒性機序として報告されているが、エンドポイントとしてその活性阻害は測定していない試験が多かった。今後同剤の神経毒性を精査するためには ChE 活性阻害作用と同様、明確なエンドポイントが必要であると考えられた。

## 結論

平成 24 年度の本研究で構造別に 26 の系に分類した公表された農薬データを基に、今年度は神経毒性が懸念されるカーバメイト

ト系、有機リン系、16員環マクロライド系、ピレスロイド系、ネオニコチノイド系の5系統および個別に神経毒性を示した11剤について、毒性の特徴、種差、ADIとの比較など解析を行った。

結論として、有機リン系およびカーバメイト系の構造を有する剤についてはChE活性阻害作用をエンドポイントとする神経毒性を予測することが可能であると考えられ、ChE活性阻害のNOAELはADIを予測可能と考えられた。16員環マクロライド系の剤についても構造的にGABA様神経毒性の予測が可能であると考えられたが、ADIの予測は難しいと考えられた。ネオニコチノイド系およびピレスロイド系については構造から神経毒性を予測することは難しいと考えられた。それ以外の系および単発的に神経毒性が認められた剤については

種差が大きく、構造による神経毒性に関する共通項目は見出すことは困難であった。

同様の解析を次年度も継続する予定である。

#### 健康危惧情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### 知的財産所有権の出願・登録状況

特許取得・ 実用新案登録   なし

表 1 化学構造により神経毒性が報告されている農薬の分類 (145 農薬)

化学構造別分類	品目数	影響1	影響2	影響3	註
有機リン系	16	ChE活性阻害			16剤全てでChE阻害作用
カーバメイト系	6	ChE 活性阻害			5剤でChE阻害作用
ネオニコチノイド系	5	体重増加抑制			ジノテフランはウサギに神経毒性あり
ピレスロイド系	3	とくに共通はなし			ピフェントリンで神経毒性あり
16 員環マクロライド骨格	3	神経症状	切歯(げっ歯類)	発生毒性	神経毒性はアバメクテンが強い

表 2 毒性プロファイルから神経毒性が検出された 9 農薬

品名	検出された主な神経毒性
グルホシネート	グルタミン酸合成酵素阻害
グルホシネートP	縮腫、前肢握力低下
メタアルデヒド	自発運動増加、驚愕反応増加
メタフルミゾン	嘔吐、運動失調、流涎、腹位
アミトラズ	中枢神経系抑制、運動失調、回帰性の体温低下、心拍数低下の臨床症状等
ピリミスルファン	流涎・復位、振顫、間代性痙攣
クロルフェナピル	髄鞘空胞化 脳白質空胞化
フェントラザミド	赤血球ChE活性阻害
オキシリニック酸	自発運動量の増加
ピリフタミド	脱髄
ルフェヌロン	強直性・間代性痙攣

表3 神経毒性が予想された5分類における毒性特徴、種差、ADIとの比較に関する要約

化学構造別分類	農薬名	特徴的な神経毒性	特徴的な神経毒性に対する種差	ラット	マウス	イヌ	ヒト	その他	最も感受性が高い神経毒性に対するNOAEL(mg/kg bw)	ADI設定時の安全係数	ADI比	ADI(mg/kg)	
化学構造上神経毒性が共通と考えられる剤													
有機リン系	ジクロトホス	ChE 活性阻害	なし	0.02>			0.04		0.02>	300	303	0.000066	
	クロルピリホス	ChE 活性阻害	あり	0.1					0.1	100	100	0.001	
	イプロベンホス	ChE 活性阻害	なし	3.5				0.3	3.5	100	100	0.035	
	イミシアホス	ChE 活性阻害	なし	0.15			1		0.15	100	300	0.0005	
	アジンホスメチル	ChE 活性阻害	なし				0.149	0.25	0.149	100	106	0.0014	
	アセフェート	ChE 活性阻害	なし	0.24			0.27	0.25	0.24	100	100	0.0024	
	エトプロホス	ChE活性阻害	なし	0.04	0.25	0.025			0.025	100	100	0.00025	
	カズサホス	ChE活性阻害	なし	0.025			0.01		0.025	100	100	0.00025	
	クロルエトキシホス	ChE活性阻害	あり				0.063		0.063	100	100	0.00063	
	トリアソホス	ChE活性阻害	なし	0.15			0.012	0.125>	0.125>	300	300	0.00041	
	フェンチオン	ChE活性阻害	なし				0.07	0.07	サル0.09	0.07	30	30	0.0023
	メタミドホス	ChE活性阻害	なし	0.067			0.06		0.06	100	100	0.0006	
	EPN	ChE活性阻害	なし	0.14	0.38	0.1			0.14	100	100	0.0014	
フェントエート(PAP)	ChE活性阻害	なし	0.66	4.16	0.29	0.66		0.29	100	100	0.0029		
ブタミホス	ChE活性阻害	なし	0.8/0.6	3.53	2.5			0.8	100	100	0.008		
トリプロホス	ChE活性阻害	なし	0.3	1.5	0.4			0.3	100	150	0.002		
カーバメイト系	塩酸ホルメタネート	ChE 活性阻害	なし	0.1			0.37		0.1	100	100	0.001	
	ベンダイオカルブ	ChE 活性阻害	なし	0.35			0.5		0.35	100	100	0.0035	
	メチオカルブ	後肢麻痺、振戦、注意力低下及び嘔吐	なし	3			2.4	3	2.4	100	100	0.024	
	アルジカルブ	ChE 活性阻害	なし	0.47			0.131	0.025	0.025	100	100	0.00025	
	アルドキシカルブ	ChE 活性阻害	なし	1.8			0.11		0.11	100	300	0.00036	
プロファム											設定できず		
ネオニコチノイド系	イミダクロプリド	警戒性・運動性の低下、運動失調、散瞳傾向(薬理試験)	あり	10					10	100	175	0.057	
	ジノテフラン	臨床症状(自発運動低下、腹臥、浅呼吸、振顫等)	あり					ウサギ125	125	100	568	0.22	
	アセタミプリド	臨床症状が神経毒性かどうかは明確でない	あり	10					10	100	141	0.071	
	クロチアニジン	臨床症状が神経毒性かどうかは明確でない	あり			25			25	100	258	0.097	
	チアメトキサム	臨床症状が神経毒性かどうかは明確でない	あり	100					100	100	5556	0.018	
ピレスロイド系	エトフェンブロックス	神経毒性なし								100		0.031	
	ピフェントリン	振顫	なし	10			2.5		2.5	100	250	0.01	
	シラフルオフェン	神経毒性なし								100		0.11	
16員環マクロライド骨格	ミルベメクテン	嘔吐(よるめき歩行等)	なし	10			3	20>	3	100	100	0.03	
	レピメクテン(LA3とLA4の混合物)	よるめき歩行、後肢引きずり歩行、自発運動低下	なし			13.9	2.51		2.51	100	126	0.02	
	アバメクテン	瞳孔対光反射消失、減弱化	なし	0.75			0.25		0.25	100	417	0.0006	

a)種差については、げっ歯類、イヌ、ヒトのいずれか2種で認められた時は「なし」、げっ歯類間のみ場合は「あり」とした。

表 4

化学構造別分類	農薬名	特徴的な神経毒性	特徴的な神経毒性に対する種差 <sup>5)</sup>	ラット	マウス	イヌ	ヒト	その他	最も感受性に高い神経毒性に対するNOAEL(mg/kg bw)	ADI設定時の安全係数	ADI比	ADI(mg/kg)
毒性プロファイルから神経毒性が検出された剤												
有機リン系(アミノ酸系)	グルホシネート	咬傷・運動亢進・嗜眠・失調性歩行等の臨床症状、心筋壊死、死亡	あり				5		5	100	238.0952381	0.021
	グルホシネートP	縮瞳、前肢握力低下	なし	1.74		50	3		1.74	100	191.2087912	0.0091
アミノ系除草剤	メタアルデヒド	自発運動増加、驚愕反応増加	なし	7			30		7	100	769	0.0091
フェニル系	メタフルミゾン	嘔吐、運動失調、流涎、腹位	なし	12			20	20	12	100	100	0.12
エタナル重合体	アミトラズ	中枢神経系抑制、運動失調、回帰性の体温低下、心拍数低下の臨床症状軽度の中枢神経抑制、体温低下	なし	0.97		17	0.25	0.125	0.25	100	100	0.0025
トリフルオロメルトキシフェニル環	ピリミスルフファン	流涎・復位、振顫、間代性痙攣	あり				50		50	100	143	0.35
ヘテロ系。ピロール環を有する	クロルフェナビル	髄鞘空胞化、脳白質空胞化、発達神経毒性における海馬長さ減少	あり	2.6		2.8			2.6	100	100	0.026
クロロアセトアミド系、オキサセトアミド系及びカルバモイルスルホニルアゾール系	フェントラザミド	赤血球ChE活性阻害坐骨神経髄鞘変性	あり	3.6		10.3			3.6	100	692	0.0052
キノリン系	オキシリニク酸	自発運動量の増加感覚過敏	なし	3.24			40		3.24	100	154	0.021
イソベンゾフラン環	ピリフタミド	脱髄	あり	0.56					0.56	100	100	0.0056
ベンゾイルフェニルウレア系	ルフェスロン	強直性・間代性痙攣	無し	1.92		2.12	7.02		1.92	100	137	0.014

<sup>a)</sup>種差については、げっ歯類、イヌ、ヒトのいずれか2種で認められた時は「なし」、げっ歯類間のみ場合は「あり」とした。

付表1 5分類および単独に神経毒性を示す11剤の詳細

化学構造別分類	農薬名	神経毒性 1	試験の種類・種	1のNOAEL(mg/kg bw/day)	神経毒性 2	試験の種類・種	2のNOAEL	神経毒性 3	試験の種類・種	3のNOAEL	予想される神経毒性のMOA、註	ADI(mg/kg)	ADI設定根拠	ADI設定根拠試験	動物種	Os No.	適用
化学構造上神経毒性が共通と考えられる剤																	
有機リン系	ジクロロホス	血液中ChE、赤血球中及び中AChE 活性抑制	慢性毒性/発がん性試験・ラット	0.02>	ChE 活性阻害	1年間・イス	0.04				ChE活性阻害	0.000066	血液中ChE、赤血球中及び中AChE 活性抑制	慢性毒性/発がん性2年間	R	141-66-2	虫
	クロルピリホス	赤血球中ChE 活性阻害(20%以上)、脳ChE活性阻害(20%以上)等	①慢性毒性/発がん性試験・2年間 ②発生毒性試験・妊娠6~15日 ③慢性毒性試験・1及び2年間	0.1							ChE活性阻害	0.001	①雄:赤血球中ChE活性阻害(20%以上)等 雌:脳ChE活性阻害(20%以上)等 ②母動物:赤血球ChE活性阻害(20%以上)等 胎児:体重減少等 ③赤血球ChE活性阻害(20%以上)	①R ②M ③D	2921-88-2	虫	
	イプロベンホス	雌雄:赤血球及び脳ChE 活性阻害(20%以上)等	慢性毒性/発がん性併合・ラット	3.5	ChE 活性阻害	単回・ヒト	0.3				ChE活性阻害 イスでは阻害は明らかでない	0.035	雌雄:赤血球及び脳ChE 活性阻害(20%以上)等	慢性毒性/発がん性併合2年間	R	26087-47-8	畜
	イミシアホス	雌雄:赤血球ChE 活性阻害(20%以上)等	慢性毒性/発がん性併合・ラット	0.15	ChE 活性阻害	1年慢性・イス	1				ChE活性阻害	0.0005	雌雄:骨髄造血亢進等	慢性毒性1年間	D	140163-89-9	雑虫
	アジシホスメテル	赤血球ChE 活性阻害(20%以上)等	1年慢性・イス	0.149	ChE 活性阻害	28日間・ヒト	0.25				ChE活性阻害	0.0014	赤血球ChE 活性阻害(20%以上)等	慢性毒性1年間	D	86-50-0	虫
	アセフェート	雌雄:赤血球及び脳ChE 活性阻害(20%以上)	慢性毒性/発がん性併合・ラット	0.24	雌雄:赤血球及び脳ChE 活性阻害(20%以上)	28日間・ヒト 21日間・ヒト	0.25(28日間) 0.25(21日間)	雌雄:赤血球及び脳ChE 活性阻害(20%以上)	1年間・イス	0.27	ChE活性阻害	0.0024	雌雄:赤血球及び脳ChE 活性阻害(20%以上)	慢性毒性/発がん性併合2年間	R	30560-19-1	虫
	エトプロホス	ChE活性阻害	5ヶ月亜急性・イス	0.025	ChE 活性阻害	慢性毒性/発がん性併合・ラット	0.04	ChE 活性阻害	発がん性・マウス	0.25	ChE活性阻害	0.00025	肝細胞空胞化等	慢性毒性1年間	D	13194-48-4	虫
	カズサホス	赤血球ChE 活性低下(約20%)等	繁殖2世代	0.025	ChE 活性阻害	慢性毒性/発がん性併合・ラット	0.045	ChE 活性阻害	90日間・イス	0.01	ChE活性阻害	0.00025	育成期中に体重増加抑制及び赤血球ChE 活性低下(約20%)等 母動物:毒性所見なし	繁殖2世代	R	95465-99-9	虫
	クロルエトキシホス	赤血球ChE 活性阻害(20%以上)等	慢性毒性・イス	0.063	ChE 活性阻害	90日間・イス	0.01	ChE 活性阻害	1年間・イス	0.02	ChE活性阻害	0.00063	赤血球ChE 活性阻害(20%以上)等	慢性毒性1年間	D	54593-83-8	虫
	トリアゾホス	血漿ChE 活性阻害	3週間・ヒト	0.125>	ChE 活性阻害	慢性毒性/発がん性併合・ラット	0.15	ChE 活性阻害	1年間・イス	0.012	ChE活性阻害 ヒトのNOAELから追加係数3	0.00041	下痢、嘔吐、胃腸障害等	反復投与3週間	ヒト	24017-47-8	虫
	フェンチオン	②赤血球ChE 活性阻害(20%以上)	反復投与・4週間・ヒト	0.07	ChE 活性阻害	慢性毒性・2年間・サル 慢性毒性・2年間・イス	0.07(サル) 0.06(イス)	ChE 活性阻害	慢性毒性/発がん性併合・ラット	0.14	ChE活性阻害	0.0023	②赤血球ChE 活性阻害(20%以上)	①反復投与・4週間 ②慢性毒性・2年間(参考)	①ヒト ②サル(参考)	55-38-9	虫
	メタドホス	脳及び赤血球ChE 活性抑制(20%以上)	慢性毒性1年間・イス	0.06	ChE 活性阻害	亜急性神経・ラット	0.067				ChE活性阻害	0.0006	脳及び赤血球ChE 活性抑制(20%以上)	慢性毒性1年間	D	10265-92-6	虫
	EPN	赤血球ChE 活性阻害(20%以上)	慢性毒性/発がん性併合・ラット	0.14	ChE 活性阻害	発がん性・マウス	0.38	ChE 活性阻害	1年間・イス	0.1	ChE活性阻害	0.0014	赤血球ChE 活性阻害(20%以上)	慢性毒性/発がん性併合2年間	R	2104-64-5	虫
フェントエート(PAP)	赤血球ChE 活性阻害(20%以上)	慢性毒性試験2年間・イス	0.29	ChE 活性阻害	亜急性・ラット	0.66	ChE 活性阻害	発がん性・マウス	4.16	ChE活性阻害	0.0029	赤血球ChE 活性阻害(20%以上)	慢性毒性試験2年間	D	2597-03-7	虫	
ブタミホス	赤血球ChE 活性阻害(20%以上)	慢性毒性/発がん性併合・ラット	0.8	ChE 活性阻害	亜急性神経毒性・ラット	0.6	ChE 活性阻害	亜急性・マウス 2年間慢性・イス	3.53(マウス) 2.5(イス)	ChE活性阻害	0.008	赤血球ChE 活性阻害(20%以上)	慢性毒性/発がん性併合2年間	R	36335-67-8	畜	
トリプロホス	赤血球ChE 活性	繁殖毒性・ラット	0.3	ChE 活性阻害	発がん性・マウス	1.5	ChE 活性阻害	1年間慢性毒性・イス	0.4	ChE活性阻害	0.002	小腸粘膜過形成等	慢性毒性/発がん性併合2年間	R	78-48-8	調	

付表 1 5 分類および単剤と神経毒性を示す 11 剤の詳細(続き)

化学構造別分類	農薬名	神経毒性 1	試験の種類・種	1のNOAEL(mg/kg bw/day)	神経毒性 2	試験の種類・種	2のNOAEL	神経毒性 3	試験の種類・種	3のNOAEL	予想される神経毒性のMOA、註	ADI(mg/kg)	ADI設定根拠	ADI設定根拠試験	動物種	Cas No.	適用	
化学構造上神経毒性が共通と考えられる剤																		
カーバメイト系	塩酸ホルメタネート	ChE 活性阻害	急性神経毒性試験・ラット	0.1	ChE 活性阻害	1年慢毒・イヌ	0.37	ChE 活性阻害	2年慢毒性発がん・ラット	0.45	ChE 活性阻害	0.001	脳及び全血ChE 活性阻害(20%以上)	急性神経毒性	R	23422-53-9	虫	
	ペンダイオカルブ	ChE 活性阻害	慢性毒性・発がん性・ラット	0.35	ChE 活性阻害	16週間・イヌ	0.5				ChE 活性阻害	0.0035	雄・水晶体混濁の増加 雌・全血ChE 活性阻害(20%以上)	慢性毒性/発がん性併合 2年	R	22781-23-3	虫	
	メチオカルブ	後肢麻痺、振戦、注意力低下及び嘔吐	2年慢毒・イヌ	2.4	ChE 活性阻害	4週間・経口・ラット		3				ChE活性阻害	0.024	後肢麻痺、振戦、注意力低下及び嘔吐	慢性毒性 2年間	D	2032-65-7	虫
	アルジカルブ	赤血球ChE 活性阻害(20%以上)	急性毒性試験(二重盲検試験)・単回・ヒト	0.025	ChE 活性阻害	慢毒・発がん性・ラット	0.47	ChE 活性阻害	1年イヌ	0.131	ChE 活性阻害ぬ10ヒトのデータの不十分さから追加	0.00025	赤血球ChE 活性阻害(20%以上)	急性毒性試験(二重盲検試験)・単回	Hト	116-06-3	虫	
	アルドキシカルブ	赤血球ChE 活性阻害(20%以上)等	1年イヌ	0.11	ChE 活性阻害	90日・経口・ラット	1.8				ChE 活性阻害 in vivo遺伝毒性がないことから追加3	0.00036	赤血球ChE 活性阻害(20%以上)等	慢性毒性 1年間	D	1646-88-4	虫	
	プロファミ										神経毒性の所見なし ChE測定の記事なし		設定できず			122-42-9	草・調	
ネオニコチノイド系	イミダクロプリド	警戒性・運動性の低下、運動失調、散瞳傾向(薬理試験)	薬理試験・Irwin法・マウス	10	運動能の低下(高用量で反応性の増加、歩行失調等)(ラット急性神経毒性)	急性神経毒性・ラット	20				不明 反復投与でラット・マウス・イヌともに神経毒性観察されず	0.057	甲状腺コロイド内鉍質沈着の増加等	慢性毒性/発がん性併合 2年間	R	138261-41-3	虫	
	ジノテフラン	臨床症状(自発運動低下、腹臥、浅呼吸、振顫等)	発生毒性・ウサギ	125						不明 ウサギが神経毒性かどうかは判断困難、ウサギ以外に神経毒性関連変化なし	0.22	雌で体重増加抑制、卵巣及び子宮比重量増加	慢性毒性 52週間	D	165252-70-0	虫		
	アセタミプリド	致死量で振顫・自発運動低下等の臨床症状	急性神経毒性試験・ラット	10						不明 神経毒性かどうか判断難しい	0.071	雄・7.1 雌・8.8 雄・肝細胞肥大 雌・体重増加抑制及び摂餌量減少	慢性毒性/発がん性併合 2年間	R	135410-20-7	虫		
	クロチアニジン	自発運動低下、振顫等の臨床症状(薬理試験)	薬理試験Irwin法・マウス	25						不明 マウス薬理試験以外に神経毒性観察されず	0.097	雄・体重増加抑制等 雌・卵巣間質腺過形成	慢性毒性/発がん性併合 2年間	R	210880-92-5	虫		
	チアメトキサム	歩行異常、直腸温低下等	急性神経毒性試験・ラット	100						不明 神経毒性かどうか判断難しい	0.018	親動物：尿細管硝子滴沈着増加 児動物：体重増加抑制	繁殖 2世代	R	153719-23-4	虫		

付表 1 5分類および単剤ご神経毒性を示す II 剤の詳細(続き)

化学構造別分類	農薬名	神経毒性 1	試験の種類・種	1のNOAEL(mg/kg bw/day)	神経毒性 2	試験の種類・種	2のNOAEL	神経毒性 3	試験の種類・種	3のNOAEL	予想される神経毒性のMOA、柱	ADI(mg/kg)	ADI設定根拠	ADI設定根拠試験	動物種	Cas No.	適用	
化学構造上神経毒性が共通と考えられる剤																		
ピレスロイド系	エトフェプロックス										神経毒性なし	0.03	雌雄:腎尿管好塩基性変化	発がん性2年間	M	80844-07-1	虫	
	ピフェントリン	振盪	発生毒性・母ラット	1.0(発生毒性)	振盪・筋攣縮(亜急性神経毒性)	亜急性神経毒性・ラット90日間・イヌ	2.9(亜急性神経毒性) 2.5(亜急性イヌ)	不活発、自発運動低下等	薬理試験・Irwin法・マウス	3.13>	合成ピレスロイド剤特有の神経系Naチャンネルへの影響発達神経毒性のNOAELは3.0mg/kg	0.01	母動物:振盪 胎児:毒性所見なし	発生毒性試験① 妊娠6~15日	R	82657-04-3	虫	
	シラフルオフェン										神経毒性なし	0.11	PLT増加及びALP増加等	慢性毒性試験② 1年間	D	105024-66-6	虫	
16員環マクロライド骨格	ミルベメクテン	嘔吐(よるめき歩行等のNOAELは10)	90日間経口・イヌ		3	自発運動低下	急性神経毒性・ラット	20>			不明 慢毒イヌではよるめき歩行等のNOAELは10	0.03	雄:よるめき歩行等 雌:体重増加抑制	慢性毒性1年間	D	M.A3(51596-10-2)、 M.A4(51596-11-3)	虫	
	レピメクテン(LA3とLA4の混合物)	よるめき歩行、後肢引きずり歩行、自発運動低下	1年・経口・イヌ		2.51	歩様異常、振盪、筋緊張低下等	90日・経口・イヌ	5.52	自発運動低下、呼吸緩徐	発がん性・マウス	13.9	不明 ラット90日で、空中立ち直り反射の低下(その他の試験で認められないため、神経毒性を反映していか不明)	0.02	Eos減少等	発がん性2年間	R	LA3:171249-10-8 LA4:171249-05-1	虫
	アバメクテン	・瞳孔対光反射消失、減弱	1年イヌ		0.25	振盪	慢性毒性・発がん性・ラット	0.75	・開脚反射の低下・脊椎の上方彎曲(薬理試験) ・開脚歩行及び爪歩行	薬理試験・Irwin法・ラット 急性神経毒性	1.5(薬理試験) 0.5(急性神経毒性)	0.0006	GABA アゴニストとして作用	母動物:同腹児重量減少 児動物:低体重等(発達神経毒性は認められない)	慢性神経毒性試験	R	71751-41-2	虫



平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

化学物質のヒト健康リスク評価における（定量的）構造活性相関および  
カテゴリーアプローチの実用化に関する研究(H24-化学-指定-010)

カテゴリー化による神経系毒性評価に関する研究

研究分担者 西村 哲治 帝京平成大学 薬学部 教授

研究要旨

限られた既知の結果を有効に利用し、試験を実施せずに、環境中運命や毒性を予測できる方法を確立するため、神経系に対する毒性について、カテゴリーアプローチを検討することとした。

有機リン系殺虫剤を対象物質群として、アセチルコリンエステラーゼ（AChE）活性阻害を指標とした神経系への毒性に関して、作用と構造の関係を検討した。ホスフェート型の 6 種では、対象農薬数が少ないこともあり、ADI 値と *In vitro* 試験法から得られた IC<sub>20</sub> 値の間には相関性は認められなかったが、 $-(\text{CH}_3\text{O})_2$  と  $\text{-C}_2\text{H}_5\text{O}$  の側鎖の相違については差がみられず、ADI 値と IC<sub>20</sub> 値の両方が低い傾向が認められた。一方、 $-\text{[(CH}_3)_2\text{CHO]}_2$  と側鎖が長くかつ立体構造が大きくなると、毒性が低くなる傾向がみられた。別の側鎖については、構造と阻害活性の間に関連を見出すには至らなかったが、側鎖の構造の長さや立体構造の大きさと毒性発現との関連が示唆され、AChE の結合部位に結合する能力として側鎖の構造が寄与していると考えられた。チオノ型やジチオ型 17 種の中で、フェントロチオンとフェンチオンでは、側鎖の立体的大きさや電子吸引性に基づく相違が阻害作用に影響していると推測された。ピリミホスメチルとダイアジノン、クロルピリホスメチルとクロルピリホスの比較では、 $\text{-C}_2\text{H}_5\text{O}$  の側鎖の方が  $-(\text{CH}_3\text{O})_2$  の方に比べ毒性に及ぼす作用が強く出る可能性が推測された。別の側鎖が、毒性発現にさらに影響を及ぼしている可能性が示唆された。これらの結果から、構造の類似に基づくカテゴリー化による化学物質の類別化が毒性の発現予測に有効であり、作用の強弱の推測が可能であることを示唆する例を提示することができた。今後、カテゴリー化をするために多種多様な化学物質の中から抽出する方法の確立と、カテゴリー化の対象とする毒性の選択、毒性作用の発現に寄与する構造と毒性の寄与に対する数値化の手法の確立等の課題の重要性と必要性が抽出できた。

*In vitro* 試験系迅速試験により得られた IC<sub>20</sub> 値と ADI 値の関係に必ずしも高い相関関係は見られなかった。しかし、特異的に高い IC<sub>20</sub> 値と ADI 値を除くと、相関が認められ、カテゴリー化による毒性評価の結果を補填することや、毒性の強弱などの予測を検証評価することに有効な手段であることが示唆され、*In vitro* 試験法の確立が必要であることも明らかとなった。

それらの観点から、ラットの副腎髄質由来の褐色細胞腫 PC12 細胞に神経増殖因子を暴露して神経系細胞に分化する系を用いた、細胞毒性を評価できる *in vitro* 試験系を確立した。対象とする化学物質の細胞毒性の試験結果を、カテゴリー化による毒性予測手法の精緻化のために情報として供する。

## A. 研究目的

化学物質の物理化学的性状など、化学物質を開発合成、分離後に比較的得やすい性状を用いて、毒性に関する試験を実施することなく毒性作用を予測する方法として、定量的構造活性相関(QSAR)による方法と、カテゴリー化による方法とがある。これらの方法を適用することで、実際の試験を実施せずに、環境中運命、生態影響、人の健康に及ぼす影響に関する情報を得ることが可能となる。カテゴリー化による方法は、構造的な類似性に基づき、類似した環境中運命や毒性を示すと予測される化学物質をグループ化した後、同一グループ内の化学物質についてすでに得られている試験結果から、他の化学物質の未知の試験結果を予測する方法である。この方法は、QSARが適用できないエンドポイントや物質群の予測に有効な方法である。本研究では、限られた既報の結果を有効に利用して毒性を予測できる方法を確立することを目的として、カテゴリー化による手法(カテゴリーアプローチ)を検討する。

神経細胞は一般的に再生不能で、致死的な障害を受けると、神経系全体の機能不全に影響が及ぶ恐れがある。末梢神経系の機能再生能が残されているが、中枢神経系はほとんど再生能力がなく、障害が重篤な影響を及ぼす恐れが高く、神経系は生体の維持と機能発現に重要なシステムの一つである。新しい化学物質を開発する過程で、また、すでに使用されている化学物質について、毒性に関する試験を実施することなく生物に及ぼす影響を予測することは、生態系に対するリスクを削減するためには重要なことであり、リスクのある化学物質が混在する状況における複合有害影響の評価を考えることは、管理の上から重要な課題であると考えられる。したがって、神経系に及ぼす毒性を対象として検討する。

本年度は、有機リン系殺虫剤を対象物質として、アセチルコリンエステラーゼ活性阻害を指標とした神経系への毒性に関して、作用と構造の関係を検討した。

## B. 研究方法

### 1. カテゴリー化

アセチルコリンエステラーゼ阻害活性を示す化学物質として、有機リン系農薬に関する既報の結果を収集し、カテゴリー化による手法(カテゴリーアプローチ)を検討した。

有機リン系農薬として、ホスフェート型6種と、チオノ型やジチオ型17種(図1)、チオノ型やジチオ型17種については代謝活性体と考えられるオキソン体についても、*In vitro*試験系として確立した、環境中存在状態での測定が可能な迅速試験法を用いて、アセチルコリンエステラーゼ阻害活性を測定した結果を用いて比較検討した<sup>2-4)</sup>。ADI(一日摂取許容量)については、国立医薬品食品衛生研究所 農薬等ADI関連情報データベース<sup>5)</sup>を参考にした。

### 2. 細胞培養

PC12細胞は、RPMI1640(シグマアルドリッチ社)に、10%ウマ血清(ライフテックテクノロジー社)、5%FBS(Fetal Bovine Serum:ウシ胎児血清;Specialty Media社, EmbryoMax<sup>®</sup>)、1/100容量のペニシリン・ストレプトマイシン溶液(ライフテックテクノロジー社)をそれぞれ添加した培地を培養液として用いた。直径100mm培養皿に培養液10mLを加え、約80%の細胞密度に達する毎に1/4分割して、継代培養し、実験に用いた。

## C. 結果および考察

### 1. カテゴリーアプローチによる毒性評価

化学物質の物理化学的性状など、化学物質を開発合成、分離後に比較的得やすい性状を用いて、毒性に関する試験を実施することなく毒性作用を予測する方法として、定量的構造活性相関(QSAR)による方法と、カテゴリー化による方法とがある。これらの方法を適用することで、実際の試験を実施せずに、環境中運命、生態影響、人の健康に及ぼす影響に関する情報を得ることが可能となる。

QSARでは、物性などの要素を用いて、統計学的手法によりモデル式を構築して予測する方法や、

専門家による判断に基づいて毒性の発現に寄与する構造の一部や官能基（アラート構造）を用いて予測する方法がある。どちらの方法も、モデルの構築やアラートと構造の抽出に予測結果が依存するとともに、その予測精度の確認には多くの試験結果が必要となる。精度の高い方法が確立した後は、非常に有効な方法を提示することができるが、そこに至るまでには時間、労力、経費がかかると考えられる。

カテゴリー化による方法は、構造的な類似性に基づき、類似した環境中運命や毒性を示すと予測される化学物質をグループ化した後、同一グループ内の化学物質についてすでに得られている試験結果から、他の化学物質の未知の試験結果を予測する方法である。この方法は、QSARが適用できないエンドポイントや物質群の予測に有効な方法とされている。

化学物質が生物と相互作用をするためには、吸収され、体内に分布し、体内の器官・組織成分等と相互作用をし、代謝、排泄の過程を経ることが重要な要素として関与する。

外界から生物体内に入ることが第一段階である。吸収においては、経口、経皮、経気道の経路によらず、細胞膜の主要構成成分である脂質との相互作用を示す脂質分配性（脂質親和性）もしくはその性質と相関関係が高いオクタノール/水分配係数（Log Pow）が考慮すべき重要な要素となる。現在、細胞膜に存在する受容体等の膜たんぱく質との相互作用も考慮しなくてはならない。

体内分布においては、暴露部位にとどまるか、吸収部位から主として血液に移行して、血液成分とともに全身に循環して臓器に移行する。血液中から組織に移行する速度や効率が、血液成分に対する影響を含め、各組織に対する影響を考慮する要素となる。また、リンパ細胞に貪食され、体内に取り込まれて体内循環を通して特異的な組織に負荷を及ぼす可能性も考慮しなくてはならない。

標的臓器に輸送後は、組織細胞への取り込み、細胞内標的小器官やタンパク質への移行に考慮しなくてはならない要素がある。化学物質が酵素や

受容体などの標的タンパク質と作用する際には、水素結合、疎水性相互作用等の分子間の相互作用を介して結合するが、基本構造や官能基の立体構造の形状と大きさが影響する。タンパク質の結合部位と化学物質の基本骨格における立体構造に依存する相補性の強弱、置換基の電子効果などが、考慮すべき要素である。

また、細胞内で様々な代謝酵素の働きで代謝された結果、影響が減弱される場合もあるし、逆に増強される場合もある。様々な代謝経路を経て、排泄される。体内分布した臓器に比べ、排泄のために集中する腎臓に対する負荷がかかり影響が及ぶ恐れもある。

毒性は、これらの複数の複雑な総合作用の結果として、影響が現れることとなる。本研究では、限られた既報の結果を有効に利用して毒性を予測できる方法を確立することを目的として、カテゴリー化による手法（カテゴリーアプローチ）を取り、検討を進めることとした。

## 2. 神経系に及ぼす影響評価

神経細胞は、神経突起などの一部に傷害を受けると、傷害を受けた部位よりも細胞体の遠い部位が変性して機能しなくなる変性が生じることがある。また、細胞体のある側にも変性が起こることもあり、神経細胞機能に影響を生じる変性を起こす恐れがある。シナプスで接続している神経細胞間では神経栄養因子などの機能を維持するための因子を相互利用しており、一部の神経細胞に障害が生じると、一連の神経細胞に影響を受けて障害が生じることが知られている。一般的に、神経細胞は再生不能で、致死的な障害を受けると、神経系全体の機能不全に影響が及ぶ恐れがある。末梢神経系の機能再生能が残されているが、中枢神経系はほとんど再生能力がなく、障害が重篤な影響を及ぼす恐れが高い。

農薬等では、脳神経系の機能、形態、発達への影響を体系的に評価する、一般毒性試験を一時スクリーニング試験とし、成獣期および発達期の試験を実施し、段階的に評価するガイドラインが整備されている。このガイドラインは、ラットを想

定した哺乳動物を試験対象としている。評価対象項目として、個体の状態観察、機能検査、神経病理検査が対象となっていることもあり、実験動物を使用しない代替試験法による評価が難しいと考えられる。さらに、発達神経毒性として、行動に影響を及ぼす影響、学習記憶能力、遅発性障害などの検査も求められている。

今後上市される化学物質については、前述したガイドラインに準拠することにより神経系に対する毒性を評価することができるが、新しい化学物質を開発する過程で、毒性に関する試験を実施することなく神経系に及ぼす影響を予測する方法は有用な手段となる。さらに、既に使用されて環境中に存在する化学物質や、リスクのある化学物質が混在する状況における複合有害影響の評価を考えることは、生態系に対するリスクを削減するために、神経系に及ぼす影響を予測することは、管理の上から重要な課題であると考えられる。

### 3. アセチルコリンエステラーゼ活性阻害を指標とした検討

有機リン系殺虫剤は、活性体として、中枢神経系のコリン作動性シナプス末端に存在するアセチルコリンエステラーゼに不可逆的に結合し、アセチルコリンの分解を阻害することにより、神経伝達の正常な働きを阻害する。殺虫剤として開発されたが、ヒトにも同様の機構で作用することが知られ、中毒の起因为物質としても上位の順位にあげられている。日本では、毒性の強い種類から、ヒトに対して低毒性型の有機リン系殺虫剤が開発されて多用されてきているが、登録農薬の殺虫剤の中でも種類、量とも多い物質群となっている。また、諸外国での使用量も多く、様々な形で残留する農薬として入ってくる可能性もある。

基本骨格として、リン酸エステル結合をもち、*O,O*-ジメチル、*O,O*-ジエチル基をもつ対称型リン酸エステルと、置換脂肪族、ベンゼン環とエステル結合をもつものに大別できる。チオノ型やジチオ型は、体内で代謝されて、ホスフェート型もしくはチオール型の活性型に変換されて作用を示すとともに、毒性も発現すると考えられている<sup>1)</sup>。

基本骨格が同じ化合物群では類似の作用を示すことが予想される一例として、殺虫剤に殺菌剤も加えた有機リン系農薬を対象に検討を進めた。

*In vitro* 試験系迅速試験法について概略する。活性型アセチルコリンエステラーゼが基質となる 5-methyl-2-thienoyl-iodide を切断して生成するチオコリンと、5,5'-dithiobisnitrobenzoic acid が反応して生じる生成物の呈色を 405nm の紫外部吸収を測定して、活性を算出する方法である。37°Cの保温後、7分間で測定ができる方法である<sup>2)</sup>。

ホスフェート型の6種では、トリクロロホン(殺虫剤)のADI値が0.002mg/kg体重/日に対してIC<sub>20</sub>値は0.49mg/L、ジクロロボス(殺虫剤)のADI値が0.004mg/kg体重/日に対してIC<sub>20</sub>値は0.048mg/L、エディフェンホス(殺菌剤)のADI値が0.0025mg/kg体重/日に対してIC<sub>20</sub>値は0.08mg/L、イプロベンホス(殺菌剤)のADI値が0.035mg/kg体重/日に対してIC<sub>20</sub>値は2.81mg/L、ホセチル(殺菌剤)のADI値が0.88mg/kg体重/日に対してIC<sub>20</sub>値は0.3mg/L、アセフェート(殺虫剤)のADI値が0.0024mg/kg体重/日に対してIC<sub>20</sub>値は求められない結果であった。対象農薬数が少ないこともあり、ADI値と*In vitro*試験法から得られたIC<sub>20</sub>値の間には相関性は認められなかったが、-(CH<sub>3</sub>O)<sub>2</sub>やC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>Oの側鎖がエステル結合している農薬のどちらもADI値とIC<sub>20</sub>値の両方が低い傾向が認められた。一方、-[(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHO]<sub>2</sub>と側鎖が長く、かつ立体構造が大きくなるとADI値とIC<sub>20</sub>値の両方が高くなる(毒性が低くなる)結果であった。他方の側鎖は、-CH(OH)-C-Cl<sub>3</sub>と-O-CH=CH<sub>2</sub>、-(S-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>の3種があり、構造と阻害活性の間に関連を見出すには至らなかった。側鎖の構造の長さや立体構造の大きさが作用と関連していることが示唆され、アセチルコリンエステラーゼの結合部位に結合する能力として側鎖の構造が寄与していると考えられる。

チオノ型やジチオ型17種では、適用した*In vitro*試験系迅速試験法において、ほとんどの農薬