

- 5) A. Hirose, S. Fujii, T. Suzuki, H. Kato, T. Kawamura, M. Takahashi, M. Matsumoto, M. koizumi null, A. Ono, T. Nishimaki-Mogami, T. Nishimura and M. Ema :Combined repeated dose toxicity studies with the reproduction/developmental toxicity screening tests for long-chain perfluoroalkyl carboxylic acids in rats. The 50th EUROTOX2014 (2014.9, 英国,エジンバラ)
- 6) T. Yamada, Y. Tanaka, R. Hasegawa, Y. Sakuratani, Y. Yamazoe, A. Ono, A. Hirose and M. Hayashi :Hazard evaluation support system (Hess): Category approach to screen chemicals which are metabolized to methoxy-or ethoxyacetic acid responsible for testicular toxicity. The 50th EUROTOX2014 (2014.9, 英国,エジンバラ)
- 7) A. Hirose, Y. Kosugi, T. Suzuki, S. Fujii, H. Kato, M. Takahashi, T. Kawamura, M. Matsumoto, A. Ono and M. Hirata-Koizumi :Chain length-dependent difference in the toxic potency of long-chain perfluoroalkyl carboxylic acids (PFCA) in rats: Determination of the serum pfca concentrations. DIOXIN2014 (2014.8, スペイン,マドリッド)
- 8) A. Ono, M. Takeyoshi, Y. Maeda, N. Suzuki, H. Kojima, S. Takeuchi, J. Hong, H. Lee, A. Vinggaard, J. Odum, S. Laws and H. Kojima : Inter-laboratory validation study of Androgen receptor stably transfected transcriptional activation (STTA) assay for new OECD test guideline. The 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (2014.8, プラハ、チェコ)
- 9) 広瀬 明彦, 藤井 咲子, 鈴木 俊也, 加藤 日奈, 川村 智子, 松本 真理子, 高橋 美加, 平田 睦子, 西村 哲治, 江馬 眞, 小野 敦 :パーフルオロアルキル (C14, C16) カルボン酸の反復投与および生殖・発生毒性. 第41回日本毒性学会学術年会 (2014.7, 神戸)
- 10) 山田 隆志, 長谷川 隆一, 三浦 稔, 櫻谷 祐企, 山添 康, 小野 敦, 広瀬 明彦, 林 真 :有害性評価支援システム統合プラットフォーム (HESS) -精巣毒性に係わるアルコキシ酢酸を生成する化学物質のスクリーニング-. 第41回日本毒性学会学術年会 (2014.7, 神戸)
- 11) 小野 敦 :トキシコゲノミクスによる肝毒性バイオマーカー. 第41回日本毒性学会学術年会 (2014.7, 神戸)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得: 該当なし
 2. 実用新案登録: 該当なし
 3. その他: 該当なし

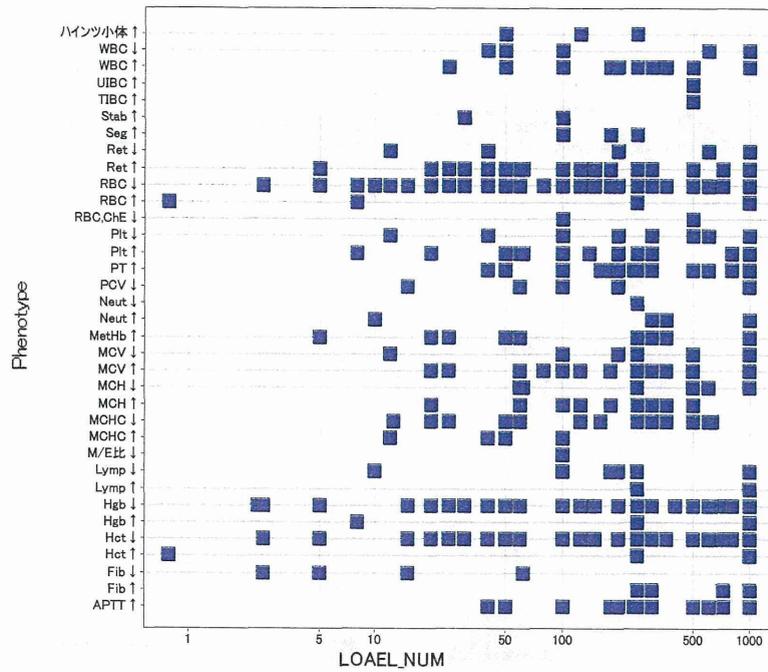


図 1 血液学的検査のパラメータに変化が認められた被験物質投与量

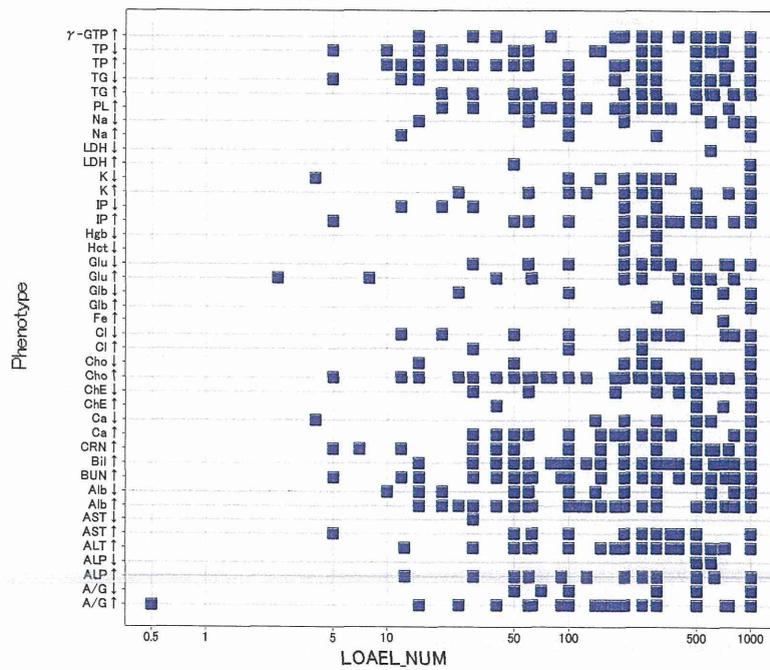


図 2 血液生化学的検査のパラメータに変化が認められた被験物質投与量

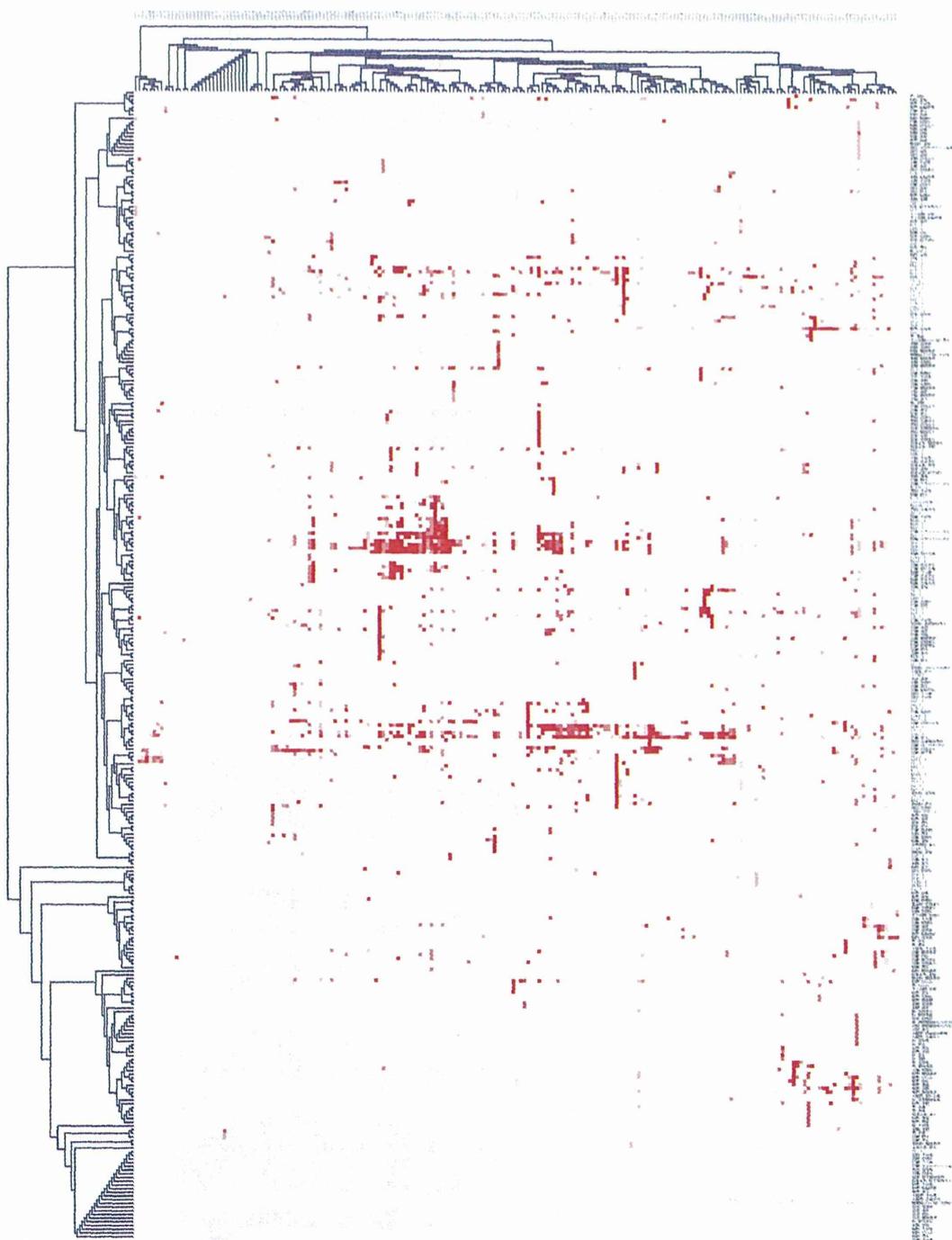


図3 病理変化、血液化学及び血液生化学的変化の階層クラスタリング解析結果

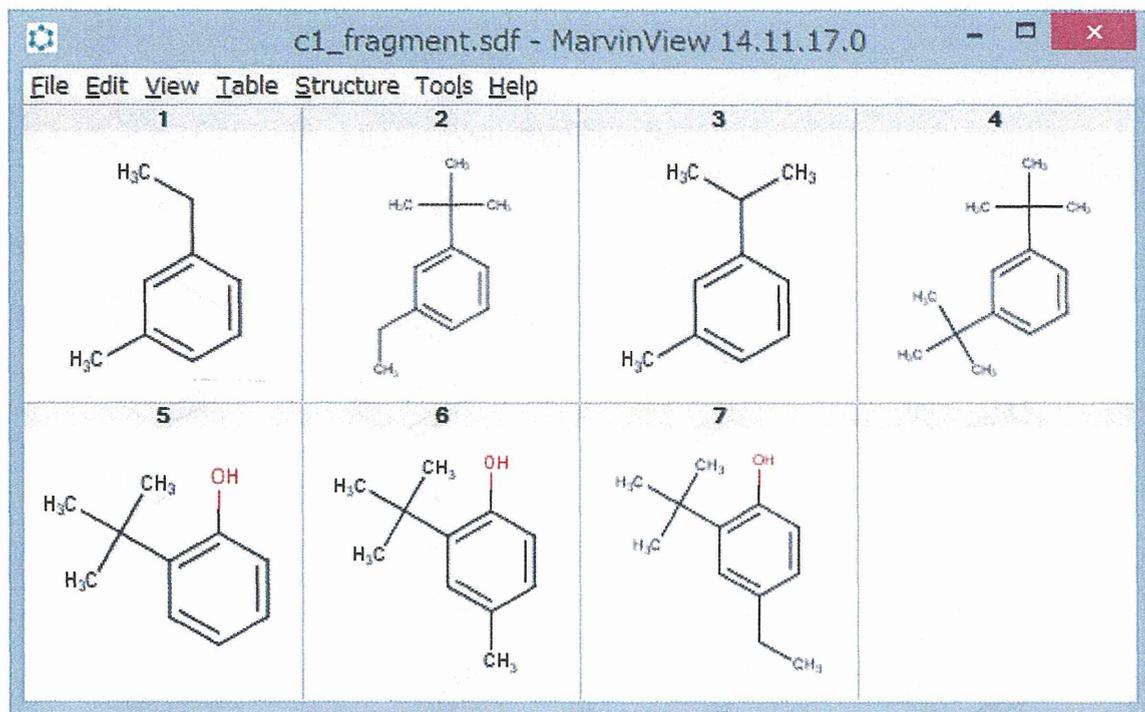
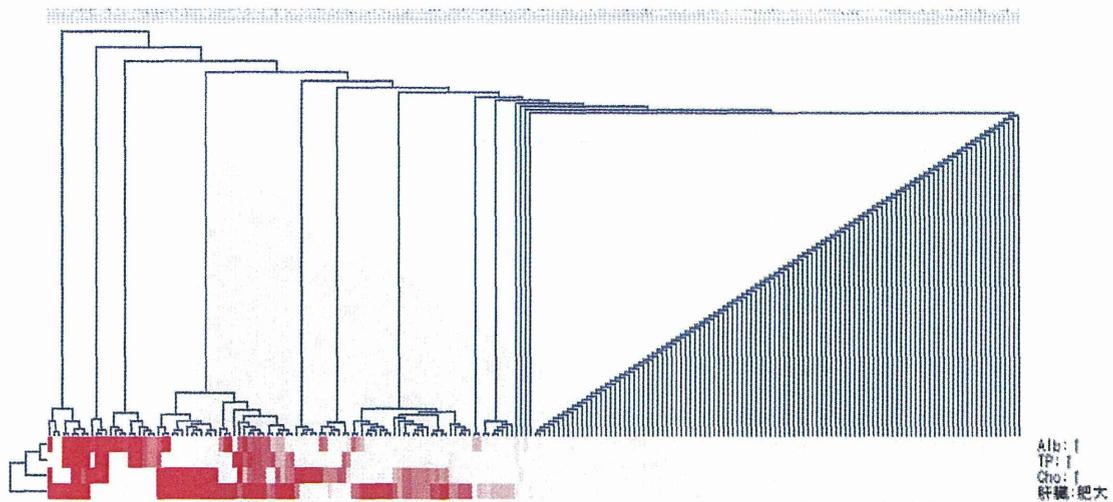


図 4 脂質代謝異常を主徴とするフェノタイプクラスター（上図）と共通部分構造（下図）

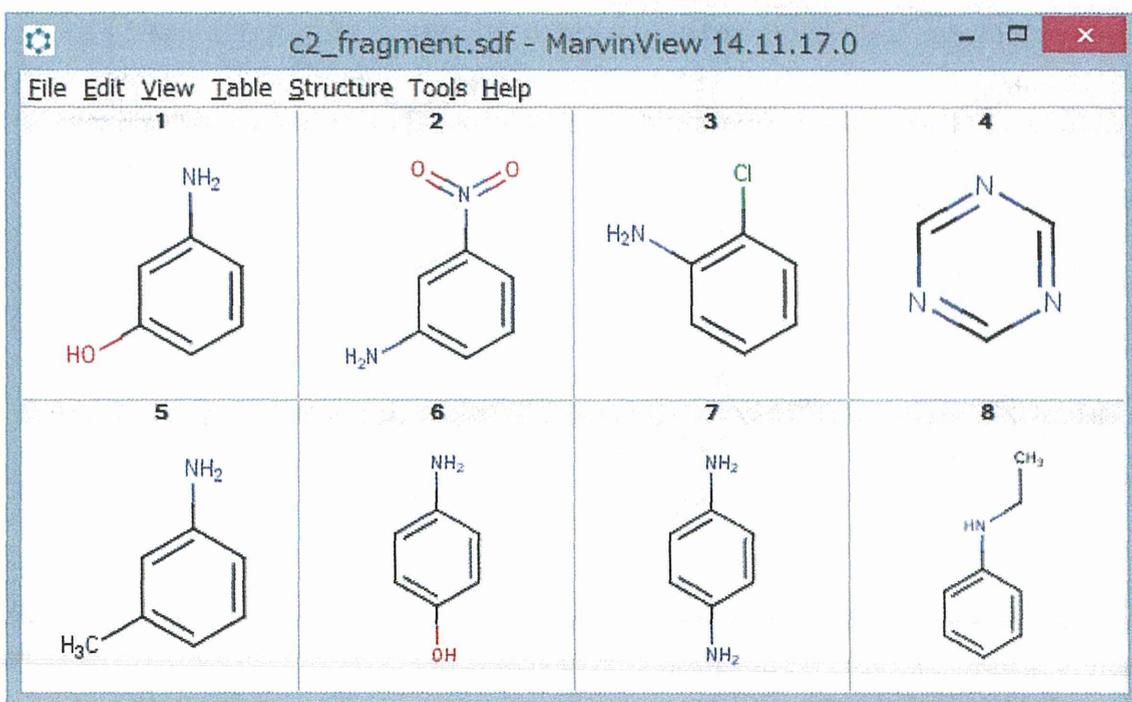
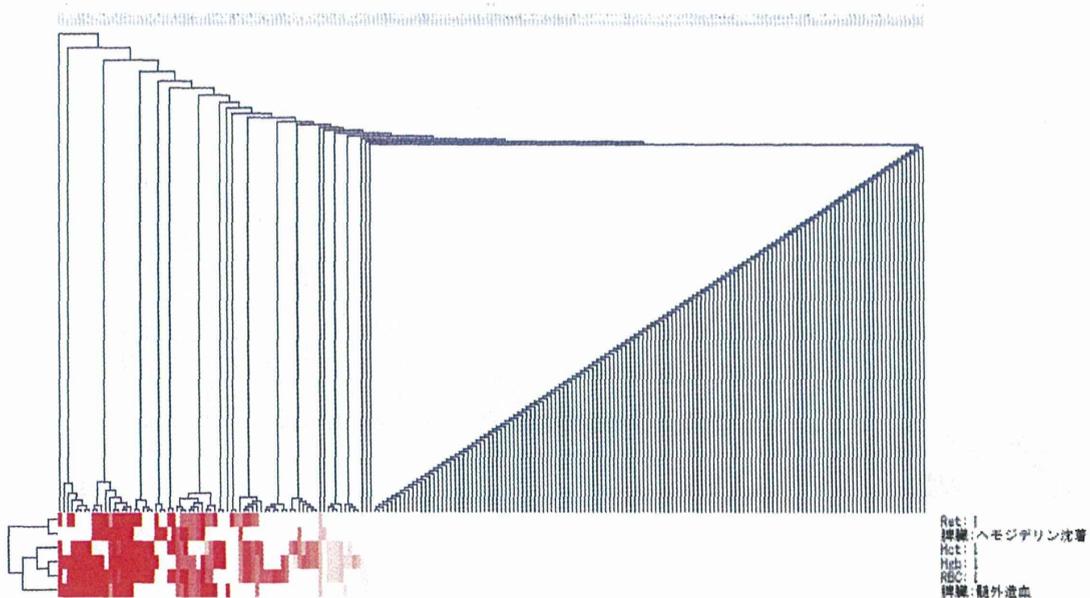


図5 貧血を主徴とするフェノタイプクラスター（上図）と共通部分構造（下図）

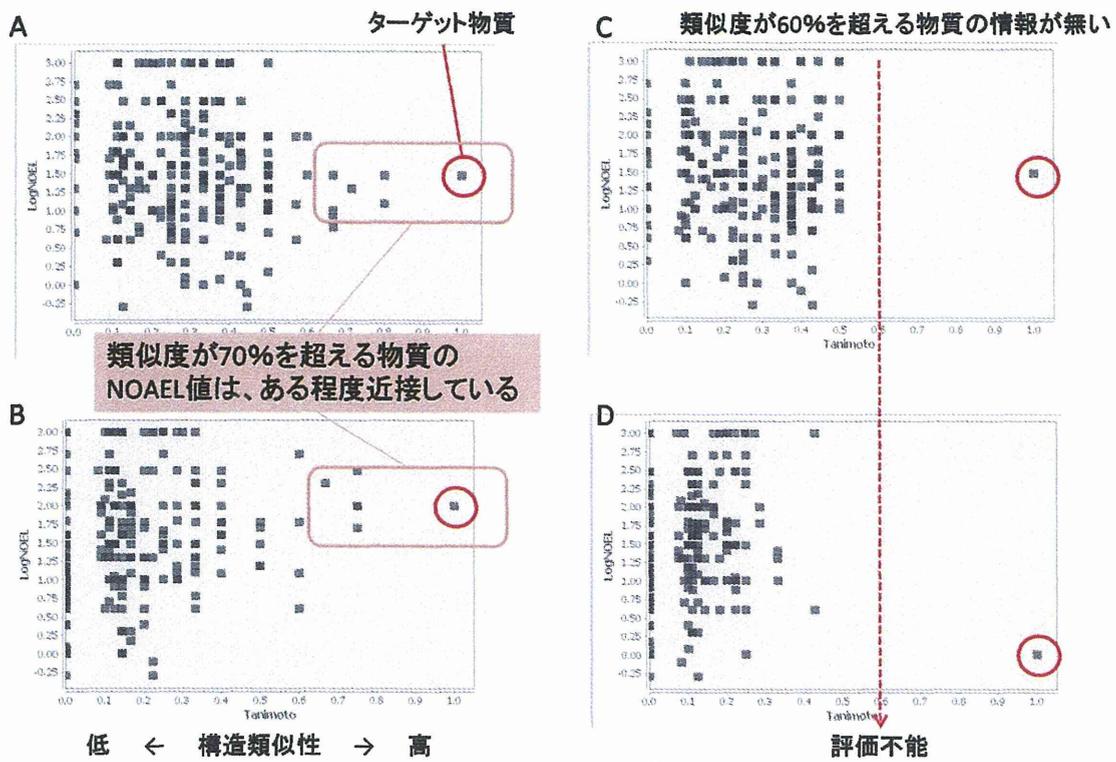


図6 化学構造類似度と *in vivo* 反復毒性試験における無毒性量の近似度の関係

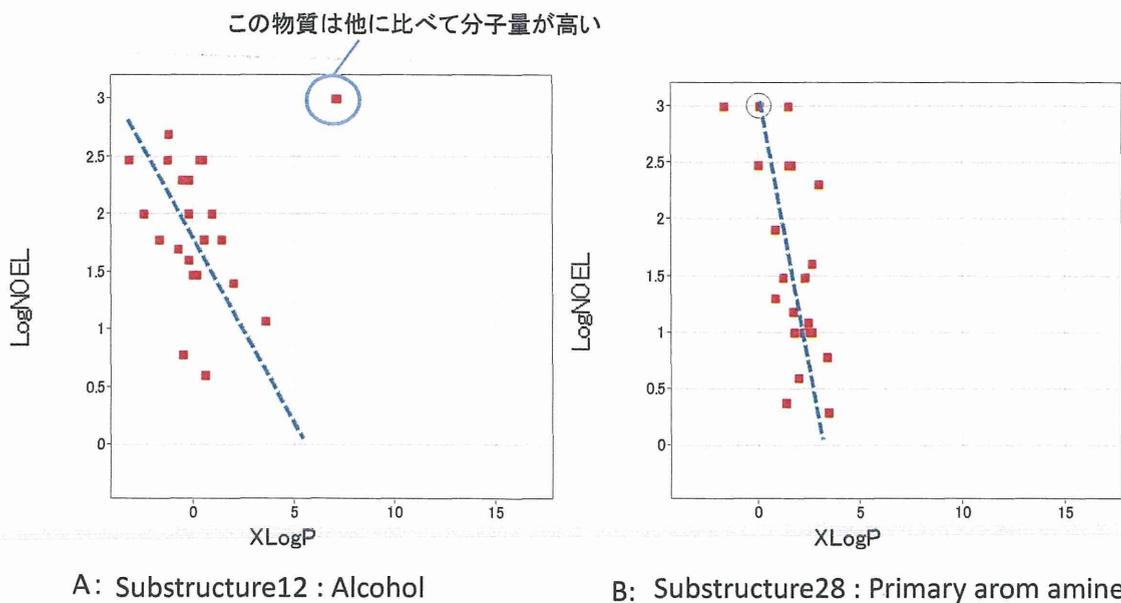


図7 毒性に関連する共通部分構造を有する化学物質群におけるLogPと無毒性量の相関性

平成 26 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)

分担研究課題：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、平成 25 年度はその結果を応用して化学構造から懸念される神経毒性について解析した。平成 26 年度も平成 24 年度の解析結果を応用し、生殖器毒性・発がん性の予測に取り組んだ。特にヒトへの外挿性が高いと考えられる子宮癌について、子宮内膜腺癌が増加した農薬を抽出し、各剤の既知情報から考えられる発がん機序予測の可否と化学構造および作用機序を解析した。子宮癌はラットの慢性毒性発がん性併合試験のみ計 7 剤で投与により発生頻度が増加した。7 剤のうち 5 剤では機序試験が実施されており、このうち化学構造の異なる 4 剤では機序試験から発がん機序が予測できた。機序試験が実施されていない 2 剤は構造、作用機序および毒性プロファイルが類似していたが、発がん機序は予測できなかった。これらの結果から、子宮発がん性機序予測には機序試験が重要であることが確認された。今回の結果と既知情報を基に子宮発がん機序予測のためのフローチャートを作成した。しかし今回の検索結果から化学構造の類似性により子宮発がん機序を予測することはできなかった。

A. 研究目的

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。

本研究では、初年度である平成 24 年度に

201 農薬について、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。

次年度の 25 年度は前年度の解析結果を応用して神経毒性と化学構造および作用機序について解析した。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。

最終年度である平成 26 年度は、エストロゲン類を始めとする化学物質で誘発されることが既知の子宮癌を取り上げた。子宮体部癌(子宮内膜腺癌)はヒトにおいても閉経期の女性の悪性腫瘍であり、その主因として閉経期の卵巣ホルモンアンバランスによるエストロゲンが挙げられている[1]。げっ歯類においても同様にエストロゲン類の長期投与や持続発情の連続として示される相対的高エストロゲン状態の持続が子宮癌の重要な因子であることが既知であることから、ラットでの子宮癌誘発は、ヒトへ外挿性のある可能性が高いと考えられている[2]。上記以外の子宮発がん機序として、肝臓などのエストロゲン代謝において DNAadduct 形成に関わる 4-hydroxyestradiol (4HE) を増加させる変調が生じた場合、エストロゲン依存性臓器の腫瘍化を促進する可能性がヒト[3]およびラットで報告されている[4,5]。またヒトでの報告はないものの近年、化学物質投与によるエストロゲンの排泄抑制により血中エストロゲン高値でラットで子宮癌を増加させる可能性が報告された[6]。このように子宮癌は、その機序がヒトと同様の場合が多く、ヒトへの外挿性が高い腫瘍であること、ヒトにおいても重要な腫瘍であると考えられることから、今回同腫瘍を選択した。

B. 研究方法

公表されている約 200 の農薬の報告書を基に、ラットおよびマウスの長期毒性試験(慢性毒性発がん性併合試験/発がん性試験)で

投与により子宮内膜腺癌が増加した農薬を検索した。子宮腫瘍が増加した各剤について、農薬名(common name)、農薬の分類、化学構造の特徴、農薬としての作用機序、毒性プロファイル(急性毒性、毒性の特徴、1 日許容摂取量(ADI)とその設定根拠試験における最小毒性量(LOAEL)と無毒性量(NOAEL)、子宮癌の NOAEL と LOAEL)と評価年を記載した。

また公表データより機序試験の有無についても検索した。まず既知の子宮がん発生機序をタイプ A から E の 5 つに分けた:

タイプ A(図 1)

エストロゲン(E2)/プロゲステロン(P4)比の増加(Increased ratio of E2 to P4)

同義語:相対的高エストロゲン状態の持続。加齢あるいは化学物質投与等の原因により、卵巣からのステロイドホルモンのアンバランスが生じ、P4 産生が E2 に比較して低値である場合、相対的な高エストロゲン状態となる。このような状態は膣スメア像では持続発情、形態学的に卵巣ののう胞状の閉鎖卵胞と黄体が欠如/少数を伴う萎縮、子宮被覆/腺上皮や膣粘膜の扁平上皮化としてとらえられる。

タイプ B(図 2)

エストロゲン作用物質(Estrogens/chemicals with estrogenic activity)

エストロゲン作用物質の持続投与は子宮癌を増加させる。子宮肥大試験等で子宮肥大が認められればその物質は in vivo エストロゲン作用を示すことが明らかとなる。短期投与の場合、卵巣が存在した状況では高用量投与でないと性周期の異常など明らか

高用量投与でないとき性周期の異常など明らかな影響は出にくい。しかし比較的低用量のエストロゲン作用物質の長期投与による組織像は、タイプ A に類似する。

タイプ C (図 3)

P450 薬物代謝酵素誘導によるエストロゲン代謝変調 (Modulation of estrogen metabolism via CYP induction)

血中エストロゲンは肝臓等の代謝器官において、水酸化を受けて代謝される。通常は 2-水酸化酵素によりエストロゲン作用の少ない 2-hydroxyestroradiol となるが、CYP1B 等の薬物代謝酵素が誘導された場合は、子宮等に DNAadduct を形成すると報告されている catechol estrogen である 4-hydroxyestradiol へと代謝する 4 水酸化酵素誘導が促進し、その結果子宮癌が増加すると考えられている。このような場合は、肝肥大が認められるが、薬物代謝酵素誘導による肝肥大は、CYP2B 等によっても誘導される最も一般的な指標であるため、エストロゲン代謝が変調していることを直接確認するためには、エストロゲン代謝変調に関わる CYP1B 等の薬物代謝酵素誘導の確認、肝臓中の 2 あるいは 4 水酸化酵素の測定あるいは血中や組織中の 2-あるいは 4-hydroxyestraiol を測定することが最も有効と考えられる。組織学的には雌性生殖器に特に異常は認められない。

タイプ D (図 4)

エストロゲン排泄阻害による血中エストロゲン高値持続

この機序による子宮癌増加の報告は比較的新しい。性周期回帰中であれば baseline

時（発情休止から発情前期以外）の血中ホルモン測定（性周期停止後であれば考慮せず）における E2 の増加が直接的な根拠となりうると考えられる。第 2 相酵素の測定も支持データとなるがこれらの誘導は化学物質全般で一般的に認められるため、E2 増加の直接的根拠とはなりにくいとする。このタイプで相対的高エストロゲン状態であれば、タイプ A と同様の形態学的特徴を示す可能性が推測されるが報告はない。

タイプ E (図 4)

局所におけるアロマターゼ増加

ヒト子宮内膜腺癌内でのアロマターゼ遺伝子増加が報告されていることから、局所におけるアロマターゼ増加が子宮癌を増悪化させる可能性が示唆される。げっ歯類での報告はない。

次にこれらのタイプ分類において重要と考えられる以下の項目について、公表されている機序試験の実施の有無と各項目の検査結果を記載し、どの発がん機序タイプに予測されるかを示した。

1. 肝肥大の有無と肥大のタイプ
2. 肝薬物代謝酵素誘導と誘導される酵素のタイプ
3. エストロゲン代謝酵素測定
4. エストロゲン作用（子宮肥大試験）
5. アロマターゼ測定
6. ホルモン測定および E2/P4 比
7. その他関連項目

これらの結果を総合的に考察し、最終的にげっ歯類子宮がんの機序を評価するためのフローチャートを提案した。

C. 研究結果

検索した農薬において、投与によって子宮内膜腺癌の頻度が 7 化合物において増加し、これらは全てラット慢性毒性発がん性試験併合試験で認められた。農薬名 (common name)、農薬の分類、化学構造の特徴、農薬としての作用機序、毒性プロファイル (急性毒性、毒性の特徴、1 日許容摂取量 (ADI) とその設定根拠試験における最小毒性量 (LOAEL) と無毒性量 (NOAEL)、子宮癌の NOAEL と LOAEL) と評価年を記載した (表 1)。農薬の分類では、殺虫剤が 2 剤、殺菌剤が 3 剤、除草剤が 2 剤であった。農薬としての作用機序の点からは、除草剤のピリミノバックメチル、メタゾスフロンはアセト乳酸合成酵素 (ALS) 阻害作用、殺菌剤であるイソピラザム、セダキサソおよび殺虫剤シエノピラフェンはミトコンドリアのコハク酸脱水素酵素阻害剤、殺菌剤のベンチアバリカルブイソプロピルと殺虫剤のスピロジクロフェンは脂質系生合成阻害を有する化合物であった。7 剤の化学構造は、5 剤は異なっていた。2 剤 (イソピラザム、セダキサソ) のみピラゾールカルボキサミド系と類似した化学構造を有していた。

発がん用量の比較において、子宮内膜腺癌の増加は 6 剤で高用量のみに認められた。ADI の設定根拠試験との比較では、差が最も小さい剤がベンチアバリカルブイソプロピルであったが子宮癌が増加した投与量は 318mg/kg 体重以上と大量投与条件下であった。ピリミノバックメチルでは ADI 設定根拠試験との差が 200 倍近かった。

公表された機序試験から得られたデータ

を基に子宮発がん機序がタイプ A から E のいずれに分類可能が予測した結果を表 2 に示す。その結果、多くのメカニズム試験が公表されているピリミノバックメチルとスピロジクロフェンがタイプ A の相対的高エストロゲン状態の持続、シエノピラフェンとベンチアバリカルブイソプロピルがタイプ C の肝臓エストロゲン代謝変調を介したカテコールエストロゲン産生が子宮内膜腺癌増加に関連していると予想された。一方メタゾスフロンは繁殖毒性試験で通常観察されない膈開口早期化が認められたことから何等かのホルモン様作用を有することが示唆されたが、機序試験でエストロゲン活性やエストロゲン受容体結合能を有しないことから、いずれのタイプの機序も予想することはできなかった。イソピラザムについては機序試験結果よりエストロゲン活性やエストロゲン受容体結合能はないと考えられ、類似構造を有するセダキサソでは子宮発がん機序試験が実施されていないことから、両剤についても発がん機序予測することはできなかった。しかし両剤の毒性プロファイルは肝肥大や甲状腺への影響等多くの類似点が認められた。

既知のげっ歯類子宮発がん機序に有用と考えられる薬物代謝酵素、エストロゲン代謝、エストロゲン活性、アロマターゼ測定、E2 や P4 測定、毒性試験からの情報等と今回予測を行った 7 剤を基に、げっ歯類子宮がんの機序を評価するためのフローチャートを作成した (図 5)。

D. 考察

ラットの子宮発がん作用機序として、エストロゲン作用、持続的な相対的高エ

ストロゲン状態の持続、あるいは肝臓におけるエストロゲン代謝変調によるカテコールエストロゲンの産生の3つの経路が知られている。今回検索した7剤中5剤については機序試験が実施され、そのうち各2剤が相対的高エストロゲン状態の持続およびエストロゲン代謝変調によるカテコールエストロゲンの産生であったことから、これら4剤の試験では適切な機序試験が実施されていると判断され、長期毒性試験で発がん性が認められた場合の適切な機序試験の実施が発がん機序予測さらにはヒトへの外挿性予測のためには重要であると結論した。

一方、今回の検索結果より化学構造から子宮発がん機序を予測することはできなかった。しかし興味ある点として、化学構造が類似していた2剤では適切な機序試験が実施されていないために発がん機序を予測することはできなかったが、毒性のプロファイルも類似していることから同様の機序により子宮内膜腺癌が増加した可能性が示唆された。

げっ歯類子宮がんの機序を評価するためのフローチャートについては、さらに多くの剤の機序試験を用いて検証するだけでなく、毒性学的な知見を加えることにより、予測性の高いものになると考えられる。

E. 結 論

子宮内膜腺癌が誘発された剤は7剤であった。発がん機序試験が提出された5剤中4剤で既知の発がん機序の予測が可能であり、適切な機序試験の重要性が確認された。化学構造の類似性による子宮発がん機序予測はできなかった。子宮発がん機序を予測

するフローチャートを作成することができた。

参考文献

1. Sherman NE. Theories of endometrial carcinogenesis: a multidisciplinary approach. *Modern Pathol.* 13: 295-308. 2000.
2. Maekawa A, Takahashi M, Ando J, Yoshida M. Uterine carcinogenesis by chemicals/hormones in rodents. *J Toxicol Pathol.* 12: 1-11. 1999
3. Liehr JG, Ricci MJ, Jefcoate CR, Hannigan EV, Hoakanson JA, Zhu BT. 4-Hydroxylation of estradiol by human uterine myometrium and myoma microsomes: implications for the mechanism of uterine carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92: 9220-9224. 1995.
4. Badawi AF, Cavalieri EL, Rogan EG. Effect of chlorinated hydrocarbons on expression of cytochrome P450 1A1, 1A2 and 1B1 and 2- and 4-hydroxylation of 17 beta-estradiol in female Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis.* 21: 1593-1599. 2000.
5. Yoshida M, Katashima S, Ando J, Tanaka T, Uematsu F, Nakae D, Maekawa A. Dietary indole 3-carbinol promotes endometrial adenocarcinoma development in rats initiated with N-ethyl-N'-nitrosoguanidine, with induction of cytochrome P450s in the liver and consequent modulation of

- estrogen metabolism. Carcinogenesis. 11: 2257-2264. 2004.
6. Knunsen GA, Sanders JM, Sadik AM, Birnbaum LS. Disposition and kinetics of tetrabromobisphenol A in female Wistar Han rats. Toxicol Rep. 1:214-223. 2014.

F. 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

Midori Yoshida, Kaoru Inoue, Miwa Takahashi. Predictive MOAs of uterine adenocarcinoma development induced by pesticides. SOT2015 (San Diego, March 2015)

H. 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

図 1 既知の子宮癌の発がん機序タイプ A 相対的エストロゲン高値の持続を起こす化合物

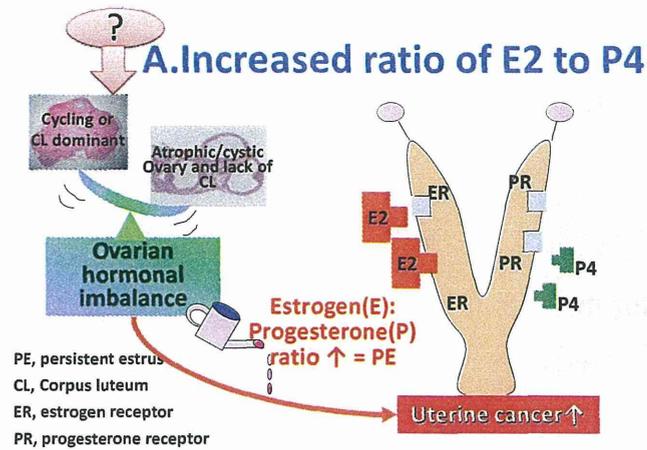


図 2 既知の子宮癌の発がん機序タイプ B エストロゲン作用がある化合物

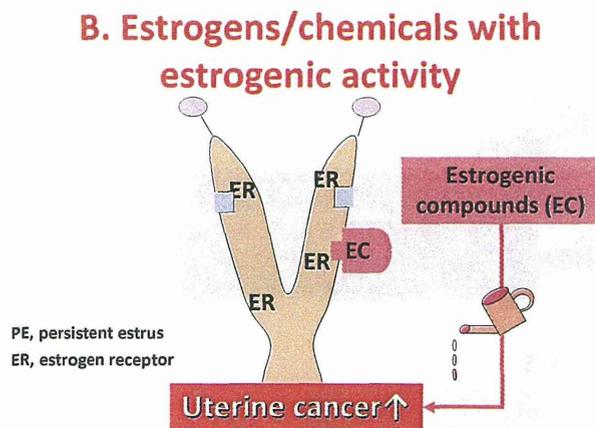


図 3 既知の子宮癌の発がん機序タイプ C 薬物代謝酵素によるエストロゲン代謝変調を起こしカテコールエストロゲン産生を促進する化合物

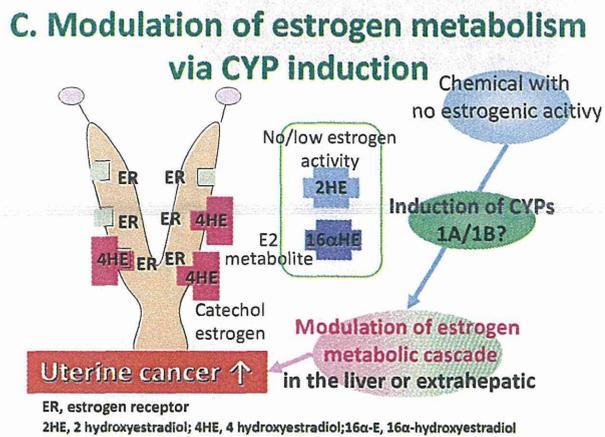


図4 その他の子宮発がん機序として考えられているもの

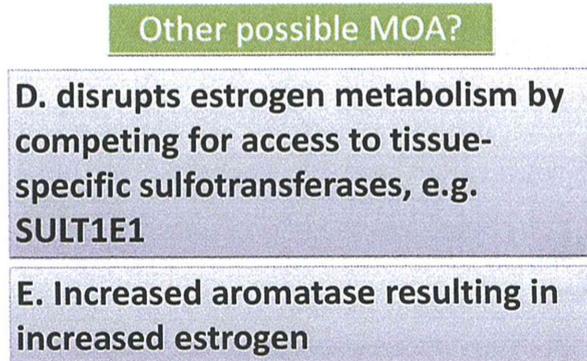


図5 子宮発がん機序予測フローチャート

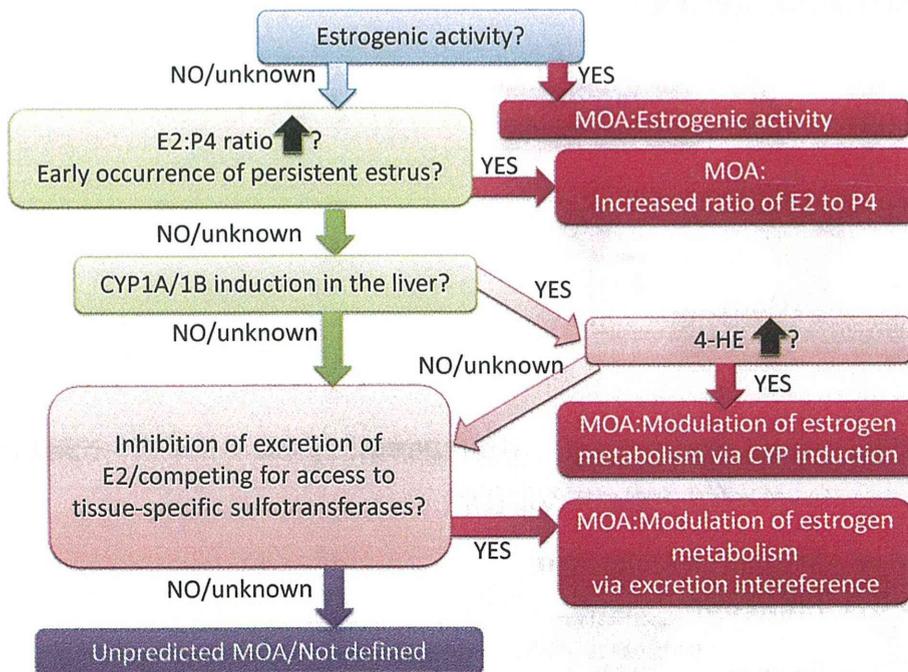


表 1 子宮癌の増加が認められた 7 剤の化学構造、作用機序および毒性プロファイル

農薬名(和名)	農薬名(英名)	CAS	分類(殺虫剤、虫殺菌剤、菌除剤、殺菌剤、除草剤、植物成長調整剤、調製剤、調製剤)	剤の特徴	植物・昆虫・細菌への作用機序	標的臓器・組織	毒性の特徴	LD50 ラット経口投与、複数ある時は一番低いもの mg/kg bw	Setting ADI				子宮癌				
									ADI (mg/kg bw)	Lowest NOAEL (mg/kg bw per day)	Lowest LOAEL (mg/kg bw per day)	設定根拠となる毒性所見	試験名	動物種ラットRマウスM及びDウサギRb	ADI設定根拠の値が他の試験よりも高い	NOAEL	LOAEL
ピリミノバクメチル	英名: pyriminobac-methyl	136191-64-5	草	ヘテロ系。(ピリミジンカルボキシル系)除草剤	ALS阻害。アセト乳酸合成酵素(ALS)の阻害	肝臓、腎臓、血液(ラット)、発がん性	貧血(ラット)、ラットでLGL白血病、雄ラットで肝細胞腫、雌ラットで子宮腺癌、雌マウスで肝細胞腫	1,850	0.02	2	36	親動物: 体重増加抑制等 児動物: 低体重	繁殖2世代	R		372	777
シエノピラフェン	英名: cyenopyrafen	560121-52-0	虫	ピラゾール系殺虫剤	ミトコンドリアの電子伝達複合体IIの阻害。既存の殺ダニ剤と違い、生体内の代謝により生成するシエノピラフェンの加水分解物が電子伝達複合体IIに作用し、コハク酸からコエンザイムQへの電子の流れを非拮抗的に阻害することで、ハダニ類の細胞内呼吸を強く攪乱すると考えられている。	肝臓、腎臓、子宮、網膜、発がん性	小葉中心性肝細胞肥大等、腎皮質尿細管褐色色素沈着等、子宮内膜過形成等、眼球網膜萎縮、ラットで子宮腺癌	>5,000	0.05	①5.1 ②5	①104 ②50	①雄: 腎及び肝比重量増加等 雌: 甲状腺の胞上皮細胞過形成等、子宮内膜腺癌 ②母動物: 体重増加抑制 胎児: 毒性所見なし	①慢性毒性/発がん性併合・2年間 ②発生毒性・23日	①R ②Rb		1.2	124
ベンチアバリカルブイソプロピル	英名: bentiavalicarb-isopropyl	177406-68-7	菌	カーバメイト系(アミノ酸アミドカーバメイト系)殺菌剤	リン脂質の生合成系阻害	肝臓、甲状腺、血液、発がん性	肝細胞肥大等、甲状腺(ろ胞上皮細胞過形成)、貧血、ラット雄で肝細胞腫、雌で子宮腺癌が、マウス雌雄で肝細胞腫、雄で甲状腺肉腫、肝芽細胞腫及び肝細胞癌	>2,000	0.069	6.9	68.5	親動物: 肝細胞肥大等 児動物: 肝絶対重量増加	繁殖2世代	R			
メタゾスルフロン	英名: metazosulfuron	868680-84-6	草	スルホニルウレア系の水稲用除草剤	ALS阻害。分枝アミノ酸合成の鍵酵素であるアセト乳酸合成酵素(ALS)阻害により雑草を枯死させると考えられている	体重、肝臓、血液	体重増加抑制、肝細胞肥大、貧血	>2,000	0.12	12	30	雄: MCHC 減少、低色素性赤血球増加、T.Bil 増加等 雌: 嘔吐、運動失調、体重増加抑制、体重及び摂餌量減少等	慢性毒性1年間	D		564	1170
スピロジクロフェン	英名: spirodiclofen	148477-71-8	虫	環状ケトエノール系。テトロン酸誘導体でハダニに広範囲な活性を有する新規構造を有する	脂質生合成を阻害することが明らかにされているが、詳細な作用機構は不明	副腎、生殖器、発がん性	副腎(皮質空胞化)、ライディヒ細胞肥大、ラット雄でライディヒ細胞腫・雌で子宮腺癌、マウス雄で肝細胞腫、ラットF1世代の雄に生殖器の萎縮及び精子数減少	>2,500	0.013	雄: 1.38 雌: 1.52	雄: 4.33 雌: 4.74	副腎皮質束状帯空胞化	1年間慢性毒性	D		19.9	153
イソピラザム	英名: isopyrazam	881685-58-1	菌	ピラゾールカルボキサミド系殺菌剤	ミトコンドリアの電子伝達複合体IIの阻害。すなわちコハク酸脱水素酵素を阻害することより呼吸機能に影響を及ぼし殺菌効果を表す。	体重増加抑制、肝臓、発がん性	体重増加抑制、肝細胞肥大、肝重量増加、好酸性変異肝細胞腫、ラット肝細胞腫、ラット子宮癌、ラット繁殖着床数低下、ラット発生毒性骨化遅延に基づく骨格変異、ウサギ発生毒性小眼症	2000	0.055	雄: 5.5	雄: 27.6	好酸性変異肝細胞腫、小葉中心性肝細胞肥大(雌雄)、GGT、肝細胞空胞化(雄)、TG低下、肝細胞褐色色素沈着(雌)	慢性毒性/発がん性併合・2年間	R		34.6	233
セダキサ	英名: sedaxane	87497-67-6	菌	ピラゾールカルボキサミド系殺菌剤	コハク酸脱水素酵素阻害剤であり、TCAサイクルを阻害して殺菌効果をしめす	体重増加抑制、肝臓、甲状腺、発がん性	体重増加抑制、肝細胞肥大、肝重量増加、ラット子宮癌、ラット甲状腺肥大	>5000	0.11	11	67	肝重量増加、小葉中心性肝細胞肥大、甲状腺の胞上皮細胞肥大	慢性毒性/発がん性併合・2年間	R		86	261

表 2 子宮癌が増加した 7 剤の子宮発がん機序に関連する検査項目の結果と結果から予測される子宮癌の発現機序

Common name	Predictable? What MOR is appropriate?	Liver hypertrophy	Parameters in mechanism studies					
			Drug metabolism enzymes in the liver	Estrogen metabolism	Estrogenic activity	Aromatase	Hormonal assay	Others
Pyriminobac-methyl	Predictable, A	Centrilobular hypertrophy	Increases in N-DEM activity, CYP3A2 by IHC	NE	NE	NE	E2 No change; P4 decrease; E/P increase	
Cyenypropafen	Predictable, C	Centrilobular hypertrophy	Increased EROD, PROD, MROD, mRNA(CYP3A, CYP1A1, CYP1B1)	No change of 2-, 4-OH Estradiol, CYP1B1 mRNA No change in the liver and uterus	No	NE	No change	
Benthiavalicarb-isopropyl	Predictable, C	Centrilobular hypertrophy	Increased EROD, PROD, MROD, mRNA of CYP3A, CYP1A1, CYP1B1	Increased 2-, 4-OH Estradiol, CYP1B1 mRNA in the LIVER, but not in the uterus	No Uterotrophic assay, Eralpha binding assay	Increase in the liver but not in the uterus	No change	
Metazosulfuron	Not defined	Centrilobular hypertrophy	NE	NE	ER binding assay, Uterotrophic assay; negative; Anti-androgen activity, negative		No change	Early vaginal opening in rat reproductive study
Spirodiclofen	Predictable, A	None	NE	NE	NE	NE	E2,P4, decrease; E/P increase	
Isopyrazam	Not defined	Centrilobular hypertrophy	Increased EROD, PROD (Rat), BrdU increase (rat), BROD(human liver in vitro). No cell proliferation in human hepatocyte in vitro	NE	No Uterotrophic assay, Eralpha binding assay	NE	NE	
Sedaxane	Not defined	Centrilobular hypertrophy	EROD, PROD (Rat)	NE	NE	NE	NE	

NE, Not examined; EROD, 7-ethoxyresorufin, O-deethylation; PROD, pentoxyresorufin-O-dealkylase; BROD, benzyloxyresorufin-O-dealkylase; MROD, 7-methoxyresorufin O-demethylation

水色のカラム 発がん機序が予測できた剤と、予測に有用であった指標

緑色のカラム 予測できなかった指標

A, 相対的高エストロゲン状態の持続による子宮癌の増加 (前述 Fig.1 参照); C, エストロゲン代謝変調による子宮癌の増加 (前述 Fig.3 参照)

平成 26 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）

分担研究課題：カテゴリー化による神経系毒性評価に関する研究
—ネオニコチノイド系殺虫剤のアセチルコリンエステラーゼ活性阻害作用と構造—

研究分担者	帝京平成大学	薬学部	西村 哲治
研究協力者	帝京平成大学	薬学部	深山 俊
研究協力者	帝京平成大学	薬学部	山下 亜紀子

研究要旨

アセチルコリンによる神経伝達機構に影響を及ぼす化学物質に関する検討の一環として、昆虫に対して選択性の高いネオニコチノイド系殺虫剤の神経毒性に関する検討を実施した。

アセタミプリドとイミダクリプリド及びニテンピラムが類似の骨格構造を有し、チアクロプリド、チアメトキサム及びクロチアニジンが類似の骨格構造を有し、ジノテフランが他の2群と異なった構造をもつ。ヒトアセチルコリンエステラーゼ活性に対するネオニコチノイド系殺虫剤7物質の作用を検討した結果、アセタミプリドが、AChE に対して最も作用が強く、ダイアジノンオキソンと比較して、相対濃度として約 1,150 倍に相当する濃度（1,150 分の1の作用）で AChE の阻害を示した。アセタミプリド（1）に対して、ジノテフランが相対濃度として 0.08 であった他は、0.1~0.3 に相当し、毒性が低いこともあり、構造と明確な定量関係を明らかにすることができなかつたが、 $-C-N-C-N-$ の構造を共通骨格構造として、側鎖として結合している構造が作用に関与していることが推測された。

当該物質は AChE の酵素に作用して、アセチルコリンの分解を抑制する作用も最大で 1/1,000~1/10,000 程度ではあるが、0.1~0.3 $\mu\text{g/mL}$ の濃度から示した。個々の物質の評価では、問題とする作用濃度ではないが、類似の基本骨格をもち、側鎖の構造は変化に富み多岐にわたることから、それらの環境に共存する状況における複合暴露については注意を払う必要がある。今後、さらにカテゴリー化を進め、詳細な検討を行うことが重要な課題である。

A. 研究目的

末梢神経系と中枢神経系に大別される神経系は、部位によって特異的で複雑な機能を発現して生体の生理機能を維持しているが、細胞としては主としてニューロンとグリア細胞によって機能を分担しているといえる。ニューロンは、①情報を集める、②情報を処理する、③処理された情報を他の細胞や部位に伝達する、④対象とする細胞・組織

等の部位に情報を伝える（作用発現）などの働きを担っている。あるニューロンから素早く他の部位に情報を伝達するために電気的信号伝達機構と、ニューロン間の情報伝達のために化学的信号伝達機構により機能を発揮している。

化学的信号伝達機構は、多種多様な神経伝達物質を用いて情報の伝達を行っている。そのため、多様な情報信号の伝達処理が可能となり、機能の

多様化にも現れている。典型的な化学シナプスは、シナプス前部とシナプス後部との狭いシナプス間隙と呼ばれる領域から成る構造をしており、シナプス前部が情報を得て脱分極すると、シナプス小胞に蓄えられた神経伝達物質の遊離が促される。シナプス間隙に放出された神経伝達物質はシナプス後部に存在する神経伝達物質受容体に結合し、シナプス後部の膜のイオン透過性を変化させることにより、情報の伝達が達成される。これらの過程において、神経伝達物質の合成と蓄積、神経伝達物質の遊離の促進と阻害、神経伝達物質受容体との結合能に対するアンタゴニスト活性とアゴニスト活性、そして神経伝達物質の分解や再吸収などの段階に化学物質が作用することにより、情報伝達機能に影響が及ぶことが考えられる。

ボツリヌス毒素は、運動ニューロンの前終末に取り込まれることにより、アセチルコリンを蓄積している小胞がシナプス前膜との融合に必須なタンパク質を切断する。そのために、シナプス間隙へのアセチルコリンの遊離が阻害されて、神経筋接合部の伝達機能が阻害される。

イオンチャネル型アセチルコリン受容体（ニコチン受容体）は、自律神経節細胞と骨格筋で構成されているサブユニットがそれぞれ異なり、ヘキサメトニウムは自律神経節細胞のニコチン受容体に、 α -ツボクラリン（クラーレ）は神経筋接合部ニコチン受容体にそれぞれ作用することにより、伝達機能を阻害する。

神経伝達物質の再取り込みを阻害することにより、伝達物質がシナプス間隙にとどまる時間を延ばして効果を増強する物質がある。フルオキシセチンはセレトニンの、コカインはドパミン等の再吸収を阻害する。

有機リン酸化合物は、アセチルコリンエステラーゼに結合し、シナプス間隙に放出されたアセチルコリンの分解を阻害することにより、骨格筋のシナプス後部の膜にアセチルコリンが長時間留まり、骨格筋は脱分極した状態が継続することになる。その結果、筋繊維は非興奮性の収縮ができなくなることで有害作用を発現する。アセチルコリンは、

ニコチン受容体に作用する、末梢神経系で速い興奮性伝達を担う伝達物質である。ニコチン受容体は、神経筋伝達がおきている骨格筋繊維に多く見られ、自立神経筋細胞にも存在している。

以上のように、化学物質が神経系における情報伝達的作用を及ぼす例が知られている。

本研究では、アセチルコリンによる神経伝達機構に影響を及ぼす化学物質に関する検討の一環として、昆虫に対して選択性の高いネオニコチノイド系殺虫剤の神経毒性に関する検討を実施した。

B. 研究方法

1. ネオニコチノイド系殺虫剤

ネオニコチノイド系殺虫剤であるアセタミプリド（純度98.0%）、イミダクロプリド（純度98.0%）、チアクロプリド（純度98.4%）、ニテンピラム（純度99.0%）、チアメトキサム（純度99.9%）、ジノテフラン（純度99.0%）は和光純薬工業株式会社、クロチアニジン（純度99.5%）はDr. Ehrenstorfer GmbH社から購入した。フィプロニル（純度97.0%）は関東化学（株）、フロニカミド（純度98.0%）は和光純薬工業（株）から購入した。

2. ヒトアセチルコリンエステラーゼ活性阻害を指標とした評価

アッセイ緩衝液（100 mmol/Lリン酸溶液（pH7.4）50 μ Lを96穴ウエルプレートに加え、ヒトアセチルコリンエステラーゼ（AChE）を含むアッセイ緩衝液溶液 50 μ L、アッセイ緩衝液に溶解した2 mmol/L 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNBと省略) 溶液 50 μ Lと2 mmol/L 1,1-Dimethyl-4-acetylthiomethylpiperidinium iodide (MATP⁺と省略) 溶液を順次加え均一にした。その混合溶液に、アッセイ緩衝液により公比2で希釈した被験物質溶液を50 μ L加え、37°Cで、60分間保温した。反応後、マイクロプレートリーダ（コロナ電気株式会社製、型式：MTP-810Lab/880Lab）を用いて、450 nmの吸光度を測定した。

C. 結果および考察

1. ヒトアセチルコリンエステラーゼに対する活性阻害を指標とした評価

ヒトアセチルコリンエステラーゼ活性に対するネオニコチノイド系殺虫剤7物質の作用を検討した(図2)。

アセタミプリドは、60分間の反応後において1 mg/mL(最終作用濃度;以下同様)で93.8%、0.5 mg/mLで84.2%、0.25 mg/mLで71.6%、0.125 mg/mLで50.5%、0.0625 mg/mLで32.0%、0.03125 mg/mLで19.5%の割合で、AChEの活性を阻害した。一方、有機リン系殺虫剤の一つであるダイアジノンの活性体であるダイアジノンオキシソンの場合には、0.0007 mg/mLの濃度で90%以上の阻害が認められた。アセタミプリドの設定濃度である0.125 mg/mLの作用で示した阻害の割合(約50%)は、ダイアジノンオキシソンが示す阻害の作用濃度では約0.11 µg/mLに相当した。

イミダクロプリドは、60分間の反応後において1 mg/mLで45.7%、0.5 mg/mLで56.0%、0.25 mg/mLで30.1%、0.125 mg/mLで17.6%の割合で、AChEの活性を阻害した。設定濃度である0.5 mg/mLの作用で示した阻害の割合(約56%)は、ダイアジノンオキシソンが示す阻害の作用濃度では約0.13 µg/mLに相当した。

ニテンピラムは、60分間の反応後において1 mg/mLで37.1%、0.5 mg/mLで35.2%、0.25 mg/mLで31.2%、0.125 mg/mLで17.8%の割合で、AChEの活性を阻害した。設定濃度である0.25 mg/mLの作用で示した阻害の割合(約30%)は、ダイアジノンオキシソンが示す阻害の作用濃度では0.049 µg/mL/mLに相当した。

チアクロプリドは、60分間の反応後において1 mg/mLで67.4%、0.5 mg/mLで55.2%、0.25 mg/mLで22.6%、0.125 mg/mLで13.2%の割合で、AChEの活性を阻害した。設定濃度である0.5 mg/mLの作用で示した阻害の割合(約55%)は、ダイアジノンオキシソンが示す阻害の作用濃度では0.13 µg/mLに相当した。

チアメトキサムは、60分間の反応後において1 mg/mLで43.7%、0.5 mg/mLで36.3%、0.25

mg/mLで29.1%、0.125 mg/mLで21.1%、0.0625 mg/mLで21.8%、0.03125 mg/mLで15.4%の割合で、AChEの活性を阻害した。設定最高濃度である1 mg/mLの作用で示した阻害の割合(約44%)は、ダイアジノンオキシソンが示す阻害の作用濃度では0.088 µg/mLに相当した。

クロチアニジンは、60分間の反応後において1 mg/mLで37.1%、0.5 mg/mLで35.2%、0.25 mg/mLで30.2%、0.125 mg/mLで17.8%の割合で、AChEの活性を阻害した。設定濃度である0.25 mg/mLの作用で示した阻害の割合(約30%)は、ダイアジノンオキシソンが示す阻害の作用濃度では0.057 µg/mLに相当した。

ジノテフランは、60分間の反応後において1 mg/mLで39.5%、0.5 mg/mLで26.3%、0.25 mg/mLで20.7%、0.125 mg/mLで17.6%の割合で、AChEの活性を阻害した。設定濃度である0.25 mg/mLの作用で示した阻害の割合(約40%)は、ダイアジノンオキシソンが示す阻害の作用濃度では0.073 µg/mLに相当した。

ネオニコチノイド系殺虫剤は、イミダクリプリドが開発されて、-C-N-C-N-の構造を共通に有する類似の作用性を持つ殺虫剤として、開発されて登録されている(図1)。アセタミプリドとイミダクリプリド及びニテンピラムが類似の骨格構造を有し、チアクロプリド、チアメトキサム及びクロチアニジンは類似の骨格構造を有し、ジノテフランが他の2群と異なった構造をもつ。アセタミプリドが最も作用が強く、ダイアジノンオキシソンに比較して、相対濃度として約1,150倍に相当する濃度(1,150分の1の作用)でAChEの阻害を示した。アセタミプリド(1)に対して、ジノテフランが相対濃度として0.08であった他は0.1~0.3に相当し、毒性が低いこともあり、構造と明確な定量関係を明らかにすることができなかったが、-C-N-C-N-の構造を共通骨格構造として(図3)、側鎖として結合している構造が作用に関与していることが推測された。

D. 結論

ネオニコチノイド系殺虫剤は、天然物であるニ

コチンと同様、神経のシナプス後膜に局在するアセチルコリン受容体に結合し、神経興奮を遮断することにより毒性作用を発現されるとされている。

ネオニコチノイド系殺虫剤7物質の間で、アセタミプリドが、AChE に対して最も作用が強く、ダイアジノンオキソンに比較して、相対濃度として約 1,150 倍に相当する濃度 (1,150 分の一の作用) で AChE の阻害を示した。アセタミプリド (1) に対して、ジノテフランが相対濃度として 0.08 であった他は、0.1~0.3 に相当し、毒性が低いこともあり、構造と明確な定量関係を明らかにすることができなかったが、-C-N-C-N-の構造を共通骨格構造として、側鎖として結合している構造が作用に関与していることが推測された。

一方、本研究で明らかとなったように、当該物質は AChE の酵素に作用して、アセチルコリンの分解を抑制する作用も最大で 1/1,000~1/10,000 程度ではあるが、0.1~0.3 µg/mL の濃度から示した。個々の物質の評価では、問題とする作用濃度ではないが、類似の基本骨格をもち、側鎖の構造は変化に富み多岐にわたることから、それらの環境に共存する状況における複合暴露については注意を払う必要がある。今後、さらにカテゴリー化を進め、詳細な検討を行うことが重要な課題であ

る。

E. 参考文献

- 1) 神経科学, Nolet, J (白尾智明監訳) 東京化学同人 (2011).

F. 健康危機情報

なし。

G. 成果発表

1. 論文発表
なし。
2. 学会発表
なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

1. 特許取得
該当なし。
2. 実用新案登録
該当なし。
3. その他
該当なし。