

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。このような状態は腔スミア像では持続発情、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/腺上皮や腔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-hydroxyestradiol 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 DNA adduct 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-hydroxyestradiol 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、メタゾスル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か予測した結果を表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。一方メタゾスル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. 健康危険情報**

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

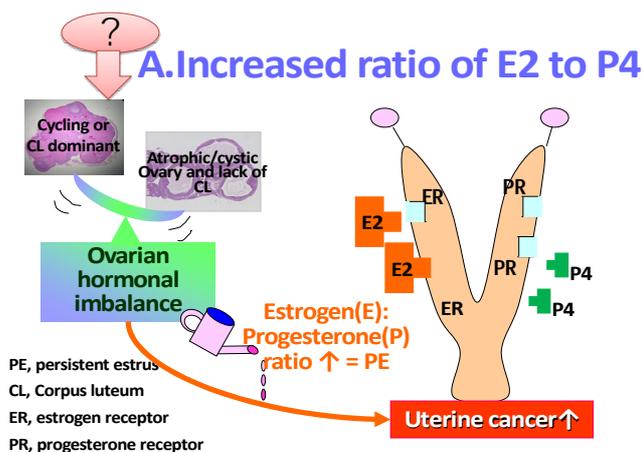


図 2 既知の子宮癌の発がん機序タイプ B エストロゲン作用がある化合物

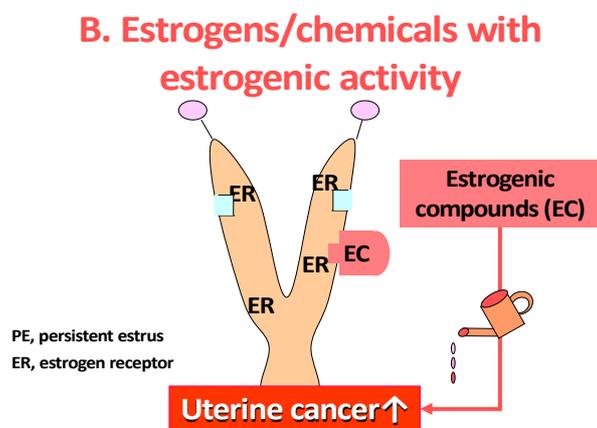


図 3 既知の子宮癌の発がん機序タイプ C 薬物代謝酵素によるエストロゲン代謝変調を起しカテコールエストロゲン産生を促進する化合物

**C. Modulation of estrogen metabolism via CYP induction**

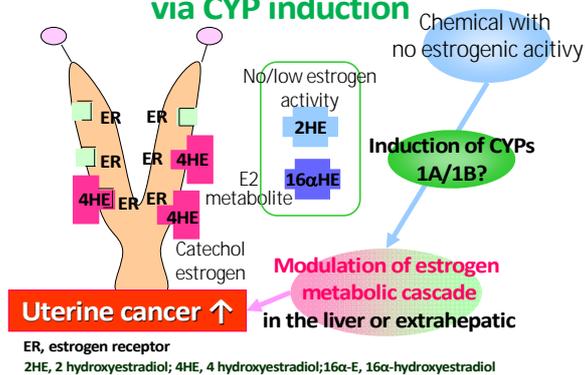


図 4 その他の子宮がん機序として考えられているもの

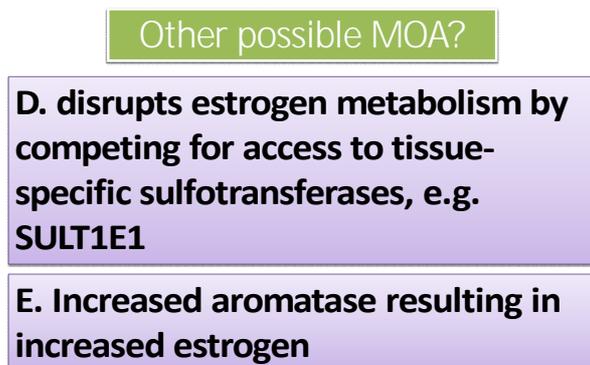


図 5 子宮がん機序予測フローチャート

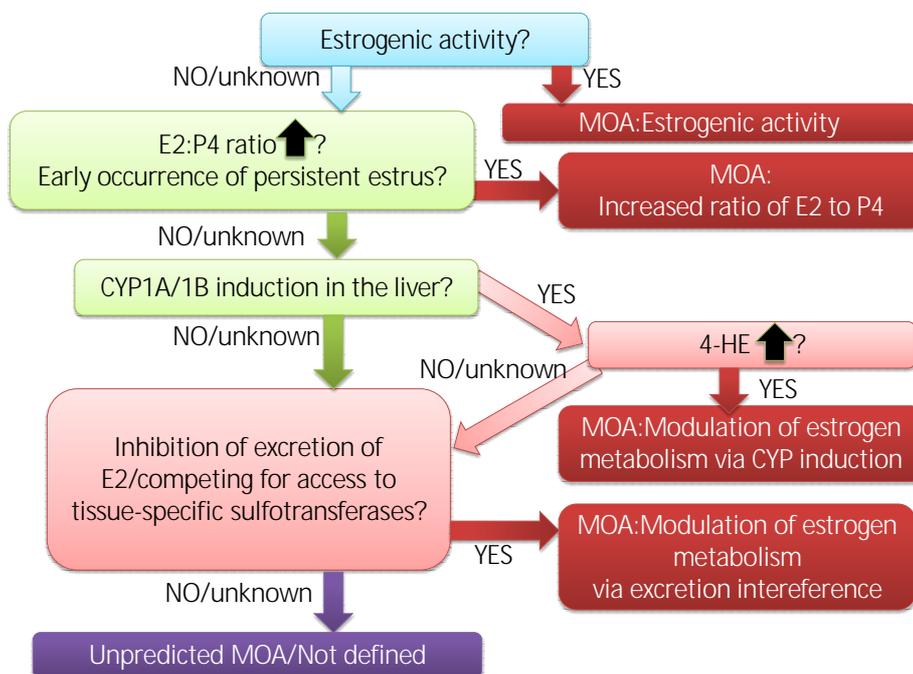


表1 子宮癌の増加が認められた7剤の化学構造、作用機序および毒性プロファイル

農薬名(和名)	農薬名(英名)	CAS	分類(殺虫剤、殺菌剤、除草剤、草植物成長調整剤、殺鼠剤)	剤の特徴	植物・昆虫・細菌への作用機序	たい		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				動物種(ラット、R.マウス、M.イヌ、D.ウサギ、Rb)	ADI設定根拠の値が他の試験よりも高い	子宮癌		
						標的臓器・組織	毒性の特徴		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	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系)(安息香酸系)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、雄ラットで肝細胞癌、雌ラットで子宮腺癌、雌マウスで肝細胞癌	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
シエンピラフェン	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の阻害。既存の殺ダニ剤と違い、体内の代謝により生成するシエンピラフェンの加水分解物が電子伝達複合体に作用し、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	5.15	10450	雄: 腎及び肝比重量増加等 雌: 甲状腺の上皮細胞過形成等、子宮内膜癌 母動物: 体重増加抑制 胎児: 毒性所見なし	慢性毒性/発がん性併合: 2年間 発生毒性: 23日	R Rb		1.2	124
ベンチアバリカルブイソプロピル	英名: benthiavali carb-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(る)上皮細胞過形成)、貧血、ラット雄で肝細胞癌、雌で子宮腺癌が、マウス雄で肝細胞癌、雄で甲状腺の細胞癌、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)、ライディック細胞肥大、ラット雄でライディック細胞腫、雌で子宮腺癌、マウス雄で肝細胞癌腫瘍、ラットF1世代の雄に生殖器官の萎縮及び精子数減少	>2500	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の阻害、すなわちコハク酸脱水素酵素を阻害することに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、ラット肝細胞癌腫、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
セダキサキ	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	
Cyenyprafen	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	
Benthiavalcaryl-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 )